

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 377**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2008 E 08722057 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2119776**

54 Título: **Gen de la flavonoide 3', 5' hidroxilasa de la Flor de Santa Lucía**

30 Prioridad:

15.03.2007 JP 2007066539

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

07.04.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**YUKI, SHUNJI;
ARAKI, SATOSHI y
SUZUKI, TAKANORI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 453 377 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

Gen de la flavonoide 3', 5' hidroxilasa de la Flor de Santa Lucía

5 Campo de la Técnica

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una planta de la familia de las Orquídeas que tiene un color de flor azul empleando una tecnología de recombinación genética. Particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir Orquídeas que tienen color de flor azul utilizando un gen que
10 codifica una flavonoide 3',5' hidroxilasa (F3'5'H) que es una de las enzimas de *Commelina communis* para la síntesis de pigmentos.

Técnica Precedente

15 El color de la flor es una característica particularmente importante en las plantas ornamentales, y hasta ahora se producían flores de varios colores por cruzamiento. Sin embargo, en el caso del cruzamiento, las fuentes de genes se limitan a las especies que son capaces de cruzarse, y los colores que se pueden cambiar están limitados. Además, en un caso en el que se introduce solo una característica específica tal como el color de las flores en una variedad específica, es necesario hacer repetidos retrocruzamientos a lo largo de generaciones, y se necesita
20 emplear gran cantidad de esfuerzo y tiempo. Además, el periodo de cruzamiento varía dependiendo de las especies vegetales, y algunas plantas tardan desde unos cuantos años a unas cuantas décadas en florecer. Particularmente, las Orquídeas tales como la Orquídea mariposa y *Cymbidium* necesitan un periodo de tiempo largo para florecer, y se tarda mucho tiempo en desarrollar tales plantas. Por lo tanto, aunque existe una demanda en los mercados, no se ha producido una nueva variedad superior de Orquídea mariposa o *Cymbidium* que tenga un nuevo color de flor,
25 particularmente una flor azul.

En los últimos años, es posible llevar a cabo cruzamientos entre especies y géneros por tecnologías de recombinación de ADN, y se espera producir una nueva variedad que tenga un color que no se pueda obtener por cruzamientos convencionales.

30 El color de las flores deriva principalmente de tres tipos de pigmentos: antocianina, carotenoides y betalaína. Entre ellos, la antocianina (del color naranja al azul) que tiene la absorción máxima del espectro de longitudes de onda tiene la función del control del color azul. La antocianina es uno de los flavonoides y se sintetiza biológicamente por medio de una ruta metabólica que se muestra en la Fig. 1. El color de la antocianina depende sustancialmente de su estructura química, y cuanto mayor es el número de grupos hidroxilo en un anillo bencénico, más azul es el color. La hidroxilación del anillo bencénico se cataliza por una flavonoide 3'- hidroxilasa (F3'H) y una flavonoide 3',5'
35 hidroxilasa (F3'5'H). En el caso en que no haya actividad de la F3'H ni de la F3'5'H en las células de los pétalos, se sintetiza pelargonidina (del color naranja al color rojo), y en el caso en el que haya actividad F3'H, se sintetiza cianidina (del color rojo al carmesí). Y, en el caso en el que haya actividad F3'5'H, se sintetiza delfinidina (color azul).
40 Por lo tanto, con el fin de producir el color azul de las flores, el papel de la F3'5'H se considera importante.

Desde tal punto de vista, se ha desarrollado un estudio para producir una planta que tenga flores azules por recombinación genética, utilizando la F3'5'H.

45 Entre los genes conocidos convencionalmente que codifican la F3'5'H, se conocen los genes derivados de plantas tales como *Campanula medium*, *Catharanthus roseus*, *Petunia*, *Eustoma grandiflorum*, *Nierembergia spp.*, *Verbena*, *Gossypium hirsutum*, *Lycianthes rantonnei*, *Solanum tuberosum* y *Torenia*, pero no se ha informado de que se haya aislado un gen que codifique la F3'5'H a partir de *Commelina communis*.

50 Como ejemplos en los que el color de la flor se ha cambiado utilizando un gen conocido convencionalmente, se han descrito, un procedimiento para producir un clavel azul transflectando una variedad de clavel deficiente en DFR (dihidroflavonoide 4 reductasa) con un gen F3'5'H y un gen DFR que derivaba de *Petunia* (Documento Patente 1) y un procedimiento para producir una rosa azul transflectando una rosa en la que se había eliminado la ruta metabólica interna, con un gen F3'5'H derivado de *Viola x Wittrockiana* (Documento Patente 2).
55

Por otra parte, se ha descrito el cambio del color de la flor de la orquídea mariposa sobre-expresando un gen endógeno, sin embargo, no se ha producido una orquídea mariposa azul (Documento no Patente 1). Además, no se ha informado de la producción de una variedad de *cymbidium* azul.

60 Documento Patente 1: WO1996/036716
Documento Patente 2: WO2005/017147
Documento no Patente 1: Su y Hsu, *Biotechnology Letters* (2003) 25: 1933-1939.

Divulgación de la Invención

Objetivo a conseguir por la Invención

- 5 Con el fin de producir una flor azul, se sabe que la F3'5'H tiene un papel importante, y se desea un gen F3'5'H que se pueda expresar con más fuerza.

Es un objetivo de la presente invención encontrar un tipo de gen F3'5'H que tenga una expresión alta, de forma que se pueda producir una orquídea mariposa azul, y producir Orquídeas que tengan flores azules utilizando tal tipo de gen F3'5'H de expresión alta.

Medios para conseguir el objetivo

15 Los presentes inventores han llevado a cabo un extenso estudio con el fin de conseguir el objetivo anterior, y como resultado han encontrado que un gen F3'5'H que se deriva de *Commelina communis* tiene un mayor efecto que el de los genes convencionales, y que transfectando orquídeas mariposa con el gen anterior, el color de sus flores pueda cambiarse en azul. Así, se ha conseguido la presente invención.

20 Es decir, la presente invención se refiere a un gen que codifica una flavonoide 3',5' hidroxilasa de *Commelina communis*, que comprende una secuencia aminoacídica representada por la SEC ID N° 2 o una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 90% de homología con la secuencia aminoacídica representada por la SEC ID N° 2.

25 Además, la presente invención se refiere a un vector, que contiene el gen anterior.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir una planta en la que se ha cambiado el color de las flores, que comprende la transfección de una orquídea mariposa roja con el gen anterior y la expresión del gen.

30 Además, se describe un procedimiento para producir una planta en la que se ha cambiado el color de las flores, que comprende la transfección de una Orquídea con el gen anterior y un gen que codifica una dihidroflavonol 4 reductasa de *Torenia* o *Gerbera* y la expresión de los genes.

35 Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir una Orquídea que tenga flores azules, que comprende la transfección de una Orquídea que tiene flores blancas con el gen anterior; un gen que codifica una dihidroflavonol 4 reductasa de *Torenia* o *Gerbera*; un gen que codifica una flavanona 3 hidroxilasa; y un gen que codifica una antocianidín sintasa y la expresión de los genes.

40 Además, la presente invención se refiere a una planta en la que se ha cambiado el color de las flores, como se define en las reivindicaciones 6 a 9.

45 Además, en la presente invención, "flavonoide 3',5' hidroxilasa" (F3'5'H) es una enzima que cataliza una reacción para producir dihidromiricetina a partir de dihidrokaempferol. Además, "flavanona 3 hidroxilasa" (F3H) es una enzima que cataliza una reacción para producir dihidrokaempferol a partir de naringenina. "Antocianidín Sintasa" (ANS) es una enzima que cataliza una reacción para producir delfinidina a partir de leucodelfinidina.

Efecto de la presente Invención

50 Utilizando el gen F3'5'H derivado de *Commelina communis*, se pueden producir plantas que tienen flores de varios tonos de color azul. Particularmente, por medio de la presente invención, es posible producir

Orquídeas que tienen flores de tonos de color azul que no se pueden conseguir por los procedimientos de cruzamiento convencionales.

Breve descripción de los Dibujos

La Fig. 1 es una ruta sintética de antocianina.

La Fig. 2 es un vector plásmido utilizado para transfectar un pétalo con un gen. El P-CaMV35S es un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Ω es una secuencia omega del virus del mosaico del tabaco. T es una secuencia de terminación de la transcripción que se deriva de un virus del mosaico de la coliflor.

La Fig. 3 es la transfección de un pétalo de *Phal. amabilis* con un gen ANS diferente derivado de una planta.

La Fig. 4 es la transfección de un pétalo de *Phal. amabilis* con un gen DFR diferente derivado de una planta.

La Fig. 5 es la transfección de un pétalo de *Phal. amabilis* con un gen F3'5'H diferente derivado de una planta.

La Fig. 6 es la identificación de un gen necesario para el cambio de color de las flores de una orquídea mariposa blanca.

La Fig. 7 es una vista esquemática (1) que muestra un procedimiento para la construcción de ADN por

transformación de la orquídea mariposa.

La Fig. 8 es una vista esquemática (2) de un procedimiento para la construcción de ADN para la transformación de la orquídea mariposa.

La Fig. 9 es la transfección de un pétalo de un cymbidium blanco con los genes.

5

Mejores modos para llevar a cabo la Invención

A partir de aquí, la presente invención se describirá en detalle, y por medio de estas descripciones, serán aparentes para los expertos en la técnica, otros objetivos, características y superioridades de la presente invención. Además, las descripciones de la presente especificación incluyendo las siguientes explicaciones, ejemplos específicos, etc. muestran realizaciones preferidas, y los expertos en la técnica pueden hacer cambios y modificaciones (o alteraciones) de la invención dentro del concepto y el ámbito de la presente invención desvelada en la presente especificación. Además todos los Documentos Patentes y referencias citadas en la presente especificación se citan con fines de explicación.

15

Poniendo atención al gen F3'5'H que se relaciona con un pigmento azul (delfinidina), los presentes inventores han transfectado orquídeas mariposa con un gen F3'5'H conocido que se deriva de petunia y que muestra resultados prácticos en el clavel, con el fin de producir orquídeas azules. Sin embargo, no se ha podido obtener el resultado deseado. Por tanto, los presentes inventores han llevado a cabo la clonación de genes F3'5'H de varias plantas con el fin de encontrar un gen superior. Como resultado, han descubierto que un gen (secuencia número 1) derivado de *Commelina communis* tenía un rendimiento de producción de pigmento marcadamente alto. En un caso en el que se transfecta una célula del pétalo de la orquídea mariposa con el gen anterior, se producía cinco veces más de delfinidina, cuando se comparaba con el gen derivado de petunia que era la técnica anterior. Además, en un caso en el que la célula del pétalo de una orquídea mariposa blanca se transfecta con el gen de la presente invención, se cambia el color de las flores a un azul con tonalidad púrpura.

20

25

Además, se ha descubierto que el color de la flor cambia de blanco a azul transfectando una célula del pétalo de una orquídea mariposa blanca con el gen F3H que cataliza una reacción corriente arriba del F3'5'H y con un gen DFR y un gen ANS que catalizan una reacción corriente abajo del F3'5'H en la ruta de síntesis de la antocianina, además del gen F3'5'H anterior. Particularmente, en el caso en el que se utiliza el gen DFR derivado de *Gerbera* o *Torenia*, la flor tiene un color azul más profundo.

30

El gen derivado de *Commelina communis* que se encuentra en la presente invención es superior a los genes convencionales, y empleando el gen de la presente invención, es posible producir un tipo de orquídea mariposa azul. Además, la superioridad del gen de la presente invención se ha probado en cymbidium así como en orquídea mariposa, y se ha descubierto que el gen de la presente invención se puede aplicar para cambiar los colores de las flores de varias plantas con flores.

35

El gen F3'5'H se aísla del ADN genómico de la flor de Santa Lucía Asiática (nomenclatura: *Commelina communis*) o del ADN transcrito inversamente a partir de un ARNm transcrito del ADN genómico anterior. El gen F3'5'H de la presente invención es el gen representado en la SEC ID N° 1 que codifica una proteína representada en la SEC ID N° 2. El gen de la presente invención incluye genes que tienen una alta homología con el gen anterior, en tanto que tales genes tengan actividad de la enzima F3'5'H. La homología alta es al menos de un 90% de homología con la secuencia aminoácídica representada en la SEC ID N° 2, preferentemente al menos de un 95%, y más preferentemente al menos del 98%.

40

45

Se pueden utilizar genes nuevos o convencionales, como el gen flavanona 3 hidroxilasa (F3H), el gen dihidroflavonol 4 reductasa (DFR) y el gen de la enzima que sintetiza la antocianidina (ANS). Específicamente, el gen F3H puede ser, por ejemplo, un gen registrado en GenBank (número de registro: DQ394303, AY221246, AJ493133, AY641730, AF184270, AB078956, AB201760, AY669324, AF036093, AB211958, AB187027 o AB234905). El gen DFR puede ser, por ejemplo, un gen registrado en GenBank (número de registro: AAB62873, AAC17843, AAD49343, AAQ83576, AAU93766, AAY32600, AAY32601, AAY32602, BAB40789 o BAE79202). El gen ANS puede ser, por ejemplo, un gen registrado en GenBank (número de registro: AY585677, AY228485, AF015885, AY581048, U82432, AY695817, AB208689, AY997840, AY382828, AY256380, AF026058, Y07955, AF384050, AB097216, AB087206, AB198869, AB044091, AY123768 o AB234906). Particularmente, el gen DFR es preferentemente el gen derivado de *Gerbera* mostrado por el número de registro: Z17221 o el gen derivado de *Torenia* que se muestra por el número de registro: AB012924. Además, se puede utilizar un gen tal como el gen F3H (SEC ID N° 50) que se deriva de la orquídea mariposa, el gen DFR (SEC ID N° 64) o el gen ANS (SEC ID N° 74).

50

55

Además, se describe un vector recombinante que contiene tal gen, particularmente un vector de expresión.

60

Dependiendo de las especies huésped en las que se introduce el gen, el vector de expresión tiene una región reguladora de la expresión tal como una promotora, una de terminación, un origen de replicación de ADN, etc. El promotor puede ser, por ejemplo, uno que induzca una expresión del gen en células del pétalo, y un promotor derivado de un gen CHS (chalcona sintasa) de la orquídea mariposa o se puede mencionar un promotor derivado del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S. Además, la secuencia de terminación puede ser, por ejemplo, un

65

terminador derivado de un gen CHS de la orquídea mariposa o un terminador derivado del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) 35S.

Específicamente, se prefiere que el gen F3'5'H de *Commelina communis* se conecte al 3' corriente abajo de una secuencia promotora, y se añade una secuencia de terminación de la transcripción al 3' corriente abajo del gen F3'5'H.

El gen F3H, el gen DFR y/o el gen ANS pueden conectarse también al 3' corriente abajo de una secuencia promotora e introducirse en las plantas, de forma similar que el gen F3'5'H.

El vector de expresión se puede producir de acuerdo con un procedimiento convencional utilizando una endonucleasa de restricción, una ligasa, etc. Además, la transformación de huéspedes con el vector de expresión se puede llevar a cabo también con un procedimiento convencional.

El procedimiento para expresar un gen en las células del pétalo pueden ser por ejemplo, un procedimiento de bombardeo con microproyectiles, un procedimiento de transformación mediado por *Agrobacterium*, un procedimiento de electroporación, un procedimiento PEG o un procedimiento de transformación mediado por virus.

En la Fig. 7, (pBIH-35S-CcF3'5'H) muestra un ejemplo de un vector para llevar a cabo la transformación con el gen F3'5'H por un procedimiento de transformación mediado por *Agrobacterium*. Además, los genes F3H, DFR y ANS también se pueden construir en el mismo vector como el que contiene el gen F3'5'H de *Commelina communis* independientemente o juntos (Figs. 7 y 8).

En la presente invención, las plantas que se transforman son Orquídeas. Las Orquídeas pueden ser, por ejemplo, orquídeas mariposa, cymbidium, dendrobium, oncidium, odontoglossum, mitonia o cattleya. Entre ellas, se prefieren las orquídeas mariposa y cymbidium. El cymbidium es una planta que pertenece al género *Cymbidium*, y la orquídea mariposa se incluye en el género *Phalaenopsis* y el género *Doritaenopsis*.

Ejemplos

A partir de ahora, la presente invención se describirá con más detalle en referencia a los Ejemplos. Sin embargo estos Ejemplos se dan simplemente para describir la presente invención y como referencia de las realizaciones. Estos ejemplos describen realizaciones específicas de la presente invención.

Además, los procedimientos generales que se necesitan para la recombinación genética, tales como de corte y empalme de ADN, transformación de *E. coli*, determinación de la secuencia de bases de un gen y PCR se llevaron a cabo según los manuales de los reactivos disponibles comercialmente o los aparatos utilizados para cada operación o según manuales experimentales (tales como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Tercera Edición, Sambrook y Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press"). Para la PCR se utilizó un sistema PCR GeneAmp 9700 (PE Applied Biosystems). A menos de que se especifique otra cosa, un aparato se manejó de acuerdo con el procedimiento de manipulación de referencia que se describe en el manual adjunto al aparato. A menos de que se especifique otra cosa, todos los ejemplos se llevaron a cabo o pueden llevarse a cabo utilizando técnicas de referencia, y tales técnicas se conocen bien y son comunes para los expertos en la técnica.

Como programa de búsqueda de homologías para examinar una secuencia aminoacídica codificada por el nuevo gen de la presente invención y secuencias aminoacídicas conocidas se utilizó BLASTP 2.2.15 (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>, Documento: Altschul y col., Nucleic Acids Res. (1997) 25: 3389-3402). Aquí, la homología es el grado de similitud de aminoácidos a lo largo de la secuencia entera, y su valor se obtiene alineando una secuencia aminoacídica codificada por el gen nuevo con secuencias aminoacídicas conocidas en el orden de alta similitud, y dividiendo el número de aminoácidos homólogos entre ellas por el número de aminoácidos de la región comparada. En el presente documento alta similitud es el resultado de un alineamiento que se produce bajo un estado (con hueco, valor 10 esperado, con filtro) que es un parámetro que el programa BLASTP mencionado anteriormente tiene por defecto. La homología descrita en los presentes Ejemplos es la que se describe con respecto a una secuencia aminoacídica conocida que mostró la alta homología en el análisis de homología anterior.

EJEMPLO 1: Transfección de un pétalo de orquídea mariposa con un gen

A menos de que se especifique otra cosa en los Ejemplos de la presente especificación, un pétalo de orquídea mariposa se transfectó con cada gen por el siguiente procedimiento de transfección, y se evaluó su propiedad. Todos los genes tenían una estructura ADN que tenía un promotor en el lado 5' y un terminador en el lado 3' y se introdujeron en una célula del pétalo de tal forma que fuera expresado en la célula.

Se esterilizó un capullo de orquídea mariposa con una solución acuosa de hipoclorito sódico al 1% pp durante cinco minutos y se lavó con agua esterilizada 3 veces. Luego, el capullo se separó en sépalo lateral, sépalo dorsal y pétalos, y el sépalo lateral, sépalo dorsal y pétalo se dejaron en un medio agar que contenía sal de Nuevo Medio Dogashima (Tokuhara y Mii, Plant Cell Reports (1993) 13: 7-11, de aquí en adelante designada como sal NDM) y un

0,6% pp de agarosa. Aquí, en el caso de *Phal. amabilis*, se utilizó un capullo que tenía una longitud de aproximadamente 15 mm, y en el caso de *Dtps. Queen Beer 'Mantenkou'*, se utilizó un capullo que tenía una longitud de aproximadamente 8 mm.

- 5 El ADN que se iba a introducir se purificó utilizando el Kit Hi Speed Plasmid Midi (QUIAGEN), y el gen se introdujo por el procedimiento de bombardeo de microproyectiles. Además, en el caso en el que una pluralidad de genes se introdujo simultáneamente, estas soluciones de ADN se mezclaron equitativamente entre ellas, y tal mezcla se utilizó como una solución de ADN para la transfección.
- 10 En ese momento, se llevó a cabo la adsorción de ADN en partículas de oro con la relación siguiente. El ADN disuelto en 20 µl de tampón Tris/EDTA (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) (Cada 2 pg de ADN del plásmido que contenía un gen se mezcló y disolvió en el tampón Tris/EDTA) se mezcló con 50 µl de una suspensión de partículas de oro (el tamaño de las partículas era: 1,0 µm, en glicerol al 50% con una concentración de 60 mg/ml), y se añadieron 50 µl de cloruro cálcico 2,5 M y 10 µl de espermidina 0,2 M a 70 µl de la mezcla y se suspendió, de forma
- 15 que el ADN se adsorbió a las partículas de oro. Luego, se eliminó el sobrenadante por separación en centrifuga, y las partículas se lavaron con etanol al 70% y 100% respectivamente. Luego, se añadieron 60 µl de etanol al 100% al precipitado obtenido para preparar una suspensión. La suspensión se utilizó como una solución muestra, y se utilizaron 10 µl de la solución muestra para la transfección genética en una vez. Como pistola génica, se utilizó IDERA GIE-III (TANAKA Co., Ltd.). La transfección genética se llevó a cabo bajo unas condiciones de distancia de la boquilla a la muestra de 12 cm, bajo presión reducida de -80 kPa, una presión de gas helio de 0,3 MPa y un tiempo de rociado de 0,025 segundos.
- 20

Se dejó el pétalo después de la transfección génica en un medio agar sal NDM y se cultivó bajo un ciclo de luz-oscuridad (intensidad de luz: 23 µmol/m²/s, periodo de luz: 16 horas, periodo de oscuridad: 8 horas) a 25 °C.

25 EJEMPLO 2: Búsqueda y clonación del gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H)

A partir de un pétalo de un capullo de flor de Santa Lucía de color azul (*Commelina communis*), se extrajo todo el ARN utilizando el Mini Kit RNeasy Plant (QIAGEN), y utilizando el ARN como matriz, se preparó un ADNc utilizando el kit GeneRacer (Invitrogen).

Luego, se llevó a cabo una RT-PCR utilizando este ADNc como matriz. Los cebadores que se utilizaron para la reacción PCR fueron 35FH-1 (5'-ATGGTIGTIGARYTIATGAC-3'; SEC ID N° 3) y 35FH-4 (5'-CCRAAIGGIA TIARYTCRAA-3'; SEC ID N° 4) que se diseñaron a partir de una secuencia de un gen F3'5'H conocido

- 35 convencionalmente (N°s de registro GenBank: D14590, AJ011862, AB262585, D14589, AB078514, AY566988, D85184, AY275430, AF313490, AY675558, AB012925). En la reacción, se repitió una etapa de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 56 °C y 1 minuto a 72 °C 40 ciclos. Además se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción y un cebador 35FH-2 (5'-TGGATGGAYYTICARGGIAT-3'; SEC ID N° 5) y un cebador 35FH-3(5'-CCDATIGCCCADATRTTIAC-3'; SEC ID N° 6). En la reacción, se repitió una etapa de 10
- 40 segundos a 98 °C, 30 segundos a 56 °C y 1 minuto a 72 °C 40 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a un tratamiento de formación de extremos romos y luego se clonó en el sitio HincII del pUC18 (Takara Bio Inc.) para obtener el p35FH23, y se determinó una secuencia parcial de ADN en el p35FH23 (secuencia parcial de CcF3'5'H).

45 A partir de la secuencia parcial de CcF3'5'H, se analizaron las secuencias del lado 3' corriente abajo y el lado 5' corriente arriba por el procedimiento RACE.

El procedimiento RACE 3' se llevó a cabo utilizando un cebador que se puede diseñar a partir de la secuencia parcial de CcF3'5'H, el ARN de *Commelina communis* anterior y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores que se utilizaron en la reacción PCR fueron C35FH-3 (5'-ATCTCCCTCGTATCGCAACC-3'; SEC ID N° 7) y el cebador GeneRacer 3'. En la reacción, se repitió una etapa de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 58 °C y un minuto a 72 °C 40 ciclos. Se llevó a cabo la PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador C35FH-4 (5'-GAAGCTTGTGAAGCCAATGG-3'; SEC ID N° 8) y un cebador anidado GeneRacer 3'. En la reacción se repitió una etapa de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 58 °C y 1 minuto a 72 °C 40 ciclos. El producto que se

- 55 obtuvo en la reacción se sometió a un tratamiento de formación de extremos romos y luego se clonó en el sitio HincII del pUC18 (Takara Bio, Inc.) para obtener el p35FHC43', y se determinó una secuencia de ADN del lado 3' corriente abajo contenida en p35FHC43' (secuencia CcF3'5'H 3'RACE).

Se llevó a cabo el procedimiento RACE 5' utilizando un cebador que se puede diseñar a partir de la secuencia parcial de CcF3'5'H, el ARN de *Commelina communis* anterior y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la reacción PCR fueron el C35FH-6 (5'-CGTCGCCTCGTGCTCTCGAGTATC-3'; SEC ID N° 9) y el cebador GeneRacer 5'. En la reacción, se repitió una etapa de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 68 °C y 1 minuto a 72 °C 30 ciclos. Se llevó a cabo una PCR anidada utilizando la solución obtenida en la reacción como matriz, un cebador C35FH-5 (5'-TCTTCGAGAGCACCTTATCGAACCTC-3'; SEC ID N° 10) y un cebador anidado

- 60 GeneRacer 5'. En la reacción, se repitió una etapa de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 68 °C y 1 minuto a 72 °C
- 65

30 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el pCR4/TOP010 (Invitrogen) para obtener el p35FH5'5, y se determinó una secuencia de del lado 5' corriente arriba contenida en p35FH5'5 (secuencia CcF3'5'H 5'RACE).

- 5 El gen F3'5'H de *Commelina communis* completo (CcF3'5'H) se sometió a clonación basándose en la secuencia CcF3'5'H 3'RACE y la secuencia CCF3'5'H 5'RACE. Se llevó a cabo la RT-PCR utilizando el ARN de *Commelina communis* anterior como matriz, un cebador C35FH-7 (5'-GAAAACCAATACAAAAACATACC-3'; SEC ID N° 11), un cebador C35FH-10 (5'-ATTGCTTCAAGTTCCCTAGC-3'; SEC ID N° 12) y Perlas Ready-To-Go RT-PCR (Amersham Biosciences). En la reacción se repitió una etapa de 30 segundos a 98 °C, 30 segundos a 54 °C y 2 minutos a 72 °C
- 10 30 ciclos. Además se llevó a cabo una PCR semi anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador C35FH-7 (SEC ID N° 11) y C35FH-9 (5'-GTTCCCTAGCCCCGTACCAC-3'; SEC ID N° 13). En la reacción se repitió una etapa de 10 segundos a 98 °C, 30 segundos a 54 °C y 1 minuto a 72 °C 30 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el pCR4/TOPO10 (Invitrogen) para obtener el p35FH79. Luego, se determinó una secuencia de ADN del gen F3'5'H completo de la flor de Santa Lucía Asiática contenida en
- 15 p35FH79 (CcF3'5'H; SEC ID N° 1). Además, la secuencia del gen de la presente invención encontrado en *Commelina communis* es un gen nuevo. La secuencia aminoacídica codificada por la secuencia de base tiene una homología del 61% con la secuencia aminoacídica (N° de registro GenBank: AY856345) codificada por el gen F3'5'H de delphinium según el análisis de homología.

20 EJEMPLO 3: Preparación de un vector de expresión (pBS-P35T35) para la transfección genética

El pBS-P35T35 es un plásmido que tiene un promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Hohn y col., Current Topics in Microbiology and Immunology (1982) 96: 194-236), una secuencia omega del virus del mosaico del tabaco (Gallie y col., Nucleic Acids Research (1987) 15: 3257-3273), un sitio Swal para una endonucleasa de restricción y

25 un terminador 35S del virus del mosaico del tabaco en este orden en el pBluescriptIIISK (Stratagene) (Fig. 2). Un plásmido que tiene sustancialmente la misma función que este pBS-P35T35 se puede construir de la siguiente manera.

Se desnaturalizaron un oligonucleótido SAS-S (5'-CTAGCTAGCGGCGCGCCTGCAGGATATCATTTAAATCC CGGG-3'; SEC ID N° 14) y un oligonucleótido SAS-AS (5'-CCCGGGATTTAAATGATATCCTGCAGGCGCGCCGCTA GCTA G-3'; SEC ID N° 15) y luego se enfriaron gradualmente hasta temperatura ambiente. El producto que se obtuvo se sometió a tratamiento con NheI y se conectó al sitio XbaI-EcoRV del pBluescriptIIISK (Stratagene) para preparar el pBS-SAS que es un plásmido ADN al que se le ha modificado un sitio de restricción enzimática. Se trató con las endonucleasas de restricción Sse8387I y Ascl una región amplificada por PCR utilizando como matriz un

30 ADN del genoma del virus del mosaico de la coliflor (registro GenBank V00140), un cebador T-CaMV35S-SseI-F (5'-AACCTGCAGGAAATCACCAGTCTCTCTCTA-3'; SEC ID N° 16) y un cebador T-CaMV35S-Ascl-R (5'-GGCGCGC CATCGATAAGGGGTTATTAG-3'; SEC ID N° 17). Este fragmento se conectó al sitio Sse8387I – Ascl del pBS-SAS para preparar el pBS-T35S. Basándose en el pJD301 (Leon y col., Plant Physiology (1991) 95: 968-972), se conectaron una secuencia promotora del virus 35S del mosaico de la coliflor que se cortó con HindIII e HincII y una

35 secuencia omega del virus del mosaico del tabaco al sitio HidnIII-SmaI del pBS-T35S para preparar un vector de expresión (pBS-P35T35).

40

EJEMPLO 4: Subclonación del gen F3'5'H de *Commelina communis* en un vector de expresión

45 Una parte de la fase de lectura abierta del gen F3'5'H de *Commelina communis* se amplificó por PCR utilizando como matriz un plásmido ADN (p35FH79) que contenía la anterior secuencia CcF3'5'H completa y se sometió a subclonación en un vector de expresión pBS-P35T35. La PCR se llevó a cabo utilizando un cebador CcF35H-F (5'-ATGGTACCCCTTACGTACCTT-3'; SEC ID N° 18), un cebador CcF35H-R (5'-TTATGTTGTTTTATATTCTTATAA ACG-3'; SEC ID N° 19) y el p35FH79 como matriz. En la reacción se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 52 °C y 1 minuto y 20 segundos a 72 °C 25 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el sitio Swal del pBS-P35T35 para obtener el p35CcF3'5'H. El p35CcF3'5'H es un ADN que expresa el gen F3'5'H de *Commelina communis* en células vegetales.

EJEMPLO 5: Confirmación de la expresión del gen F3'5'H de *Commelina communis*

55 Un pétalo de una orquídea mariposa roja (*Dtps. Queen Beer 'Mantenkou'*) se transfectó con 1,2 pg del p35CcF3'5'H por el procedimiento del Ejemplo 1 y se cultivó durante 5 días, por el que muchas células púrpura oscuro emergieron en el pétalo. Por otra parte, en el caso en el que las células se transfectaron con partículas de oro que no contenían tal gen, el fenómeno anterior no se observó.

60 Por lo tanto, se considera que el gen F3'5'H de *Commelina communis* aislado tiene una actividad flavonoide 3', 5' hidroxilasa en la célula del pétalo de la orquídea mariposa, y como resultado, produce delphinidina que es un pigmento azul.

EJEMPLO 6: Evaluación de la actividad enzimática del gen F3'5'H de *Commelina communis*

La actividad enzimática del gen F3'5'H de *Commelina communis* se evaluó por la cantidad de delfinidina que es un pigmento azul y comparándola con la de un gen que ya se conocía (gen de Petunia) que se consideraba útil para producir el clavel azul.

(1) Aislamiento del gen F3'5'H de Petunia (PetF3'5'H)

Se aisló todo el ARN de un pétalo de un capullo de Petunia disponible comercialmente (híbrida) antes de la floración utilizando el Mini Kit RNeasy Plant (QIAGEN). Se preparó el ADNc utilizando este ARN como matriz y el Sistema de Síntesis SuperscriptII First-Strand (Invitrogen). Luego se llevó a cabo una RT-PCR utilizando este ADNc como matriz. Se utilizaron como cebadores para la reacción PCR, el PetF3'5'H1-F (5'-ATGATGCTACTTACTGAGCT TGGTG-3'; SEC ID N° 20) y el PetF3'5'H1-R (5'-CAACATGCGCAATTATAGCA-3'; SEC ID N° 22) que se habían diseñado a partir de dos secuencias (N°s de registro GenBank: A29011, A29013) de un gen F3'5'H de petunia conocido, o con PetF3'5'H2-F (5'-ATGGTGCTACTTAGTGAGCTTGC-3'; SEC ID N° 22) y PetF3'5'H2-R (5'-AACC AACGTAAGG CATGTT-3'; SEC ID N° 23). En ambos casos, la reacción se llevó a cabo repitiendo una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 2,5 minutos a 72 °C 45 ciclos. El producto obtenido en cada reacción se sometió a clonación en el sitio Swal del pBS-P35T35 para obtener el p35PetF3'5'H1 y el p35PetF3'5'H2.

(2) Transfección con el gen F3'5'H de *Commelina communis* y el gen F3'5'H de Petunia

Un pétalo de una orquídea mariposa roja (*Dtps. Queen Beer 'Mantenkou'*) se transfectó con 1,3 µg de o bien el gen p35CcF3'5'H derivado de *Commelina communis* o bien un gen (p35 PetF3'5'H1 o p35 PetF3'5'H2) derivado de Petunia por el procedimiento del Ejemplo 1. Además, en el momento de la transfección genética, con el fin de medir la eficacia de la transfección genética, el pétalo se cotransfectó con 0,17 pg de p35luc (gen de la luciferasa de luciérnaga) como referencia interna. Este p35luc se preparó subclonando el fragmento del extremo truncado del gen de la luciferasa, que se obtuvo cortando el pSP-luc⁺ (Promega) con BglII-XbaI, en el extremo truncado de pBI221 (CLONTECH) que se corta con BamHI y SacI.

El pétalo transfectado genéticamente se cultivó estático durante 5 días, y a continuación se molió en nitrógeno líquido y se suspendió en 200 µl de Tampón de Lisis Pasivo 0,1 x (Dual-Luciferasa Reporter Assay System, Promega) para preparar una muestra. Se midió la actividad de luciferasa de la muestra, y se llevó a cabo el análisis cuantitativo de antocianidina.

MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LUCIFERASA

Se añadieron 5 µl de Tampón de Lisis Pasivo 5x (Promega) y 100 µl de Sustrato de Ensayo de Luciferasa (Promega) a 20 µl de la muestra anterior, y luego se midió la actividad de Luciferasa utilizando un luminómetro Flash'n glow LB955 (BERTHOLD TECHNOLOGIES) bajo una condición de tiempo de medición de 10 segundos.

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE DELFINIDINA

Se añadieron 400 µl de ácido clorhídrico a 150 µl de la muestra anterior, y se llevó a cabo entonces el tratamiento de hidrólisis a 98 °C durante 2 horas, y la extracción con 200 µl de isoamilalcohol. La cantidad de delfinidina en la capa orgánica se midió por un procedimiento de cromatografía líquida bajo las siguientes condiciones.

Aparato: Waters2690 (Waters),
Columna: Nucleosil 100-5C18 4,6x250 mm (GL. Sciences),
Temperatura de la columna: 40 °C,

Condiciones de elución: Se aplicó un gradiente (líquido B al 20% → 85% durante 40 minutos, Líquido B al 85% durante 5 minutos) utilizando una solución de ácido fosfórico al 1,5% (líquido A) y una solución acuosa de ácido fosfórico al 1,5%-ácido acético al 20%-acetonitrilo al 25% (líquido B), y se llevó a cabo la elución a una tasa de flujo de 1 ml/minuto.

Longitud de onda de detección: 531 nm.

La cantidad de delfinidina se midió por un procedimiento analítico de curva absoluta utilizando la referencia (hidrocloruro de delfinidina). Además, la cantidad que se obtuvo de delfinidina se corrigió utilizando la actividad Luciferasa. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se evidencia en la Tabla 1 que la cantidad acumulada de delfinidina por el gen F3'5'H de *Commelina communis* era aproximadamente cinco veces mayor que la del gen F3'5'H2 de Petunia. Además, la delfinidina no se detectó a partir de la muestra utilizando el gen F3'5'H1 de Petunia.

TABLA 1

	CcF3'5'H			Pet F3'5'H2		
	Cantidad de delfinidina (pg/muestra)	Ensayo Luc (RLU/muestra)	pg/RLU	Cantidad de delfinidina (pg/muestra)	Ensayo Luc (RLU/muestra)	pg/RLU
1	12400	265681	0,0467	4400	491562	0,0090
2	26200	743973	0,0352	13000	1063867	0,0122
3	50600	880990	0,0574	7400	757137	0,0098
4	37000	741444	0,0499	3200	530822	0,0060
Media			0,0473			0,0092
DS			0,0092			0,0026

EJEMPLO 7: Transfección de un pétalo de la orquídea mariposa blanca con un gen F3'5'H

- 5 Con el fin de producir una orquídea mariposa azul, se transfectó un pétalo de orquídea mariposa blanca (*Phal. amabilis*) con 1,6 µg de o bien un gen (p35CcF3'5'H) derivado de *Commelina communis* o un gen (p35Pet F3'5'H1, p35Pet F3'5'H2) derivado de Petunia como en el Ejemplo 6 (2), según el procedimiento del Ejemplo 1. Sin embargo, no se observó un cambio de color claro en el pétalo transfectado con tales genes.
- 10 Por lo tanto, se aisló para la transfección un gen que codifica el grupo de enzimas corriente arriba de la F3'5'H en la ruta sintética de la antocianidina (Fig.1) ((1) Chalcona sintasa: CHS, (2) chalcona Isomerasa: CHI y (3) flavanona 3 hidroxilasa: F3H).

EJEMPLO 8: Aislamiento del gen CHS de la orquídea mariposa (PhCHS3)

- 15 Se aisló todo el ARN de un pétalo de una orquídea mariposa (*Dpts. Sogo Vivien x Dpts. Sogo Yenlin*) justo antes de la floración utilizando el Mini Kit RNeasy Plant (QIAGEN). Se preparó el ADNc utilizando este ARN como matriz y el Sistema de Síntesis SuperscriptII First-Strand (Invitrogen). Luego se llevó a cabo la RT-PCR utilizando este ADNc como matriz. Se utilizaron como cebadores de la reacción PCR PhCHS3 F1 (5'-AAGCTTGTGAG AGACGACG GA-3'; SEC ID N° 24) y PhCHS3 R1 (5'-TGGCCCTAATCCTTCAAATT-3'; SEC ID N° 25) que se diseñaron a partir de la secuencia conocida del gen CHS de la orquídea mariposa (PhCHS3) (N° de registro GenBank: DQ089652). La reacción se llevó a cabo repitiendo una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. El producto de la reacción se amplificó utilizando como matriz esta solución de la reacción de nuevo bajo las mismas condiciones. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el sitio Swal de pBS-P35T35 para obtener el p35PhCHS3. Luego se determinó una secuencia completa del gen CHS de la orquídea mariposa contenido en p35PhCHS3 (PhCHS3; SEC ID N° 26). El p35PhCHS3 es un ADN que expresa el gen CHS de orquídea mariposa en las células vegetales.

EJEMPLO 9: Aislamiento del gen CHI de la orquídea mariposa (PhCHI1)

- 30 Se aisló todo el ARN de un pétalo de una orquídea mariposa (*Dpts. Sogo Vivien x Dpts. Sogo Yenlin*) justo antes de la floración utilizando el Mini Kit RNeasy Plant (QIAGEN). Se preparó el ADNc utilizando este ARN como matriz y el Sistema de Síntesis SuperscriptII First-Strand (Invitrogen).
- 35 Luego, se llevó a cabo la RT-PCR utilizando este ADNc como matriz. Se ha informado de varios genes CHI vegetales (N°s de registro GenBank: AY700850, AY086088, DQ160231, AJ004902, AF474923, XM_470129, 03433, AB187026). Se utilizaron como cebadores para la reacción PCR CHI-dgF1 (5'-TTYCTCGSYGGBGCMGGYGVWVG VGG-3'; SEC ID N° 28) y CHI-dgR1 (5'-CMGGIGAIACVSCRTKYTYICCRATVAT-3'; SEC ID N° 29) que se diseñaron a partir de genes CHI conocidos convencionalmente. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 72 °C 5 ciclos, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 70 °C 5 ciclos, y luego se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 68 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos.

- Además, se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador CHI-dgF3 (5'-TMIKYWCMGGISMITTYGARAARYT-3'; SEC ID N° 30) y un cebador CHI-dgR3 (5'-TYICCRA TVATIGWHTCCARIAYBGC-3'; SEC ID N° 31). En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener el PhCHIfrag 16, y se determinó una secuencia parcial de ADN contenida en PhCHIfrag 16 (secuencia parcial PhCHI).

A partir de la secuencia parcial PhCHI, se analizaron las secuencias del lado 3' corriente abajo y del lado 5' corriente arriba por el procedimiento RACE.

El procedimiento RACE 3' se llevó a cabo utilizando un cebador que se puede diseñar a partir de la secuencia parcial PhCHI, el ARN anterior y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la reacción PCR fueron PhCHI-GSP F1 (5'-ATGCTGCTGCCATTAACGGGTCA-3'; SEC ID N° 32) y el cebador GeneRacer 3'. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 72 °C 5 ciclos, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 70 °C 5 ciclos, y luego se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. Además, se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador PhCHI-GSP F2 (5'-TCCGAGAAGGTCTCCGGGA-3'; SEC ID N° 33) y un cebador GeneRacer 3' anidado. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener el PhCHI3'RACE23. Se determinó una secuencia de ADN en el lado 3' corriente abajo contenida en PhCHI3'RACE23 (secuencia PhCHI 3'RACE).

El procedimiento RACE 5' se llevó a cabo utilizando un cebador que se puede diseñar a partir de la secuencia parcial PhCHI, el ARN anterior y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la reacción PCR fueron PHCHI-GSP R1 (5'-GCATTCGTCAGCTTCTGCTCTCT-3'; SEC ID N° 34) y el cebador GeneRacer 5'. En la reacción se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 72 °C 5 ciclos, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 70 °C 5 ciclos, y luego se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. Además se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador PhCHI-GSP R2 (5'-ATCACATCAGTCTCAGCCACA-3'; SEC ID N° 35) y un cebador GeneRacer 5' anidado. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener el PhCHI5'RACE54. Se determinó la secuencia de ADN del lado 5' corriente arriba contenida en PhCHI5'RACE54 (secuencia PhCHI 5'RACE).

El gen CHI completo de la orquídea mariposa (PhCHI) se sometió a clonación basándose en la secuencia PhCHI3'RACE y la secuencia PhCHI5'RACE. Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADNc anterior, un cebador PhCHI init (5'-ATGGCAGAAACAGTGGCGACGCCCA-3'; SEC ID N° 36) y un cebador PhCHI term (5'-TCAAACGAC TCCATCTTGCTC-3'; SEC ID N° 37). En la reacción se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C y 1,5 minutos a 72 °C 45 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el sitio Swal del pBS-P35T35 para obtener el p35PhCHI1. Luego se determinó una secuencia básica del gen CHI completo de la orquídea mariposa contenido en el p35PhCHI1 (PhCHI1, SEC ID N° 38). Además, la presente secuencia del gen descubierto en la orquídea mariposa es un gen nuevo. La secuencia aminoacídica codificada por la secuencia de tiene un 54% de homología con la secuencia aminoacídica (N° de registro GenBank: DQ120521) codificada por el gen CHI de la planta del té por el análisis de homología. El p35PhCHI1 es un ADN que expresa el gen CHI de orquídea mariposa en células vegetales.

EJEMPLO 10: Aislamiento del gen F3H de orquídea mariposa (PhF3H1)

Se aisló todo el ARN de un pétalo de orquídea mariposa (*Dpts. Sogo Vivien x Dtps. Sogo Yenlin*) justo antes de la floración utilizando el Mini Kit RNeasy Plant (QIAGEN). Se preparó el ADNc utilizando este ARN como matriz y el Sistema de Síntesis SuperscriptII First-Strand (Invitrogen).

Luego se llevó a cabo la RT-PCR utilizando el ADNc como matriz. Se ha informado de varios genes F3H vegetales (N°s de registro GenBank: DQ394303, AY221246, AJ493133, AY641730, AF184270, AB078956, AB078956, AB201760, AY669324, AF036093, AB211958, AB187027, AB234905). Se utilizaron como cebadores para la reacción PCR, un cebador P3H-dgF1 (5'-TIVGIGAYGARGABGARMGBCCIAA-3'; SEC ID N° 40) y un cebador F3H-dgR1 (5'-ACBGCCYYGRTGRTCHGCRITCTTAA-3'; SEC ID N° 41) que se habían diseñado a partir del gen F3H conocido convencionalmente. En la reacción se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 72 °C 5 ciclos, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 70 °C 5 ciclos, y luego se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 68 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. Además se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador F3H-dgF3 (5'-AARYTBRGKTTYGAY ATGWCHGGIG-3'; SEC ID N° 42) y un cebador F3H-dgR3 (5'-GGHWSRACVGTATCCAIGWBTT-3'; SEC ID N° 43). En la reacción se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener el PhF3Hfrag26, y se determinó una secuencia parcial de ADN contenida en PhF3Hfrag26 (secuencia parcial PhF3H).

Se analizaron las secuencias del lado 3' corriente abajo y del lado 5' corriente arriba de la secuencia parcial PhF3H por el procedimiento RACE.

El procedimiento RACE 3' se llevó a cabo utilizando un cebador que se puede diseñar a partir de la secuencia parcial PhF3H, el ARN anterior y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la reacción PCR fueron PhF3H-GSP F1 (5'-TTCTCATACCAATCGGGAG-3'; SEC ID N° 44) y el cebador GeneRacer 3'. En la reacción se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 72 °C 5 ciclos, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y

1 minuto a 70 °C 5 ciclos, y luego se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. Además, se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador PhF3H-GSP F2 (5'-AATCGGGAGCCGCGATTACT-3'; SEC ID N° 45) y un cebador GeneRacer 3' anidado. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. El producto que se obtuvo de la reacción se sometió a clonación en el pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener el PhF3H3'RACE33. Se determinó una secuencia de ADN en el lado 3' corriente abajo contenida en PhF3H 3'RACE33 (secuencia PhF3H 3'RACE)

El procedimiento RACE 5' se llevó a cabo utilizando un oligonucleótido que se puede diseñar a partir de la secuencia parcial PhF3H, el ARN anterior y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados en la reacción PCR fueron PhF3H-GSPR1 (5'-TCTGTGTGGCGCTTCAGGCC-3'; SEC ID N° 46) y el cebador GeneRacer 5'. En la reacción se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 72 °C 5 ciclos, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 70 °C 5 ciclos, y luego se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. Además se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador PhF3H-GSP R2 (5'-TGAGGTCCGGTTGCGGGCATT-3'; SEC ID N° 47) y un cebador GeneRacer 5' anidado. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en pCR4-TOPO (Invitrogen) para obtener el PhF3H5'RACE86. Se determinó la secuencia de ADN en el lado 5' corriente arriba contenido en el PhF3H 5'RACE86 (secuencia PhF3H 5'RACE).

El gen F3H completo de la orquídea mariposa (PhF3H) se sometió a clonación basándose en la secuencia PhF3H 3'RACE y la secuencia PhF3H 5'RACE. Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADNc anterior, un cebador PhF3H init. (5'-ATGGCCCCAATACCATTCCTACCGA-3'; SEC ID N° 48) y un cebador PhF3H term. (5'-CCTTAAGCTAAAATCT CATTAAATGCCTTTGCTCC-3'; SEC ID N° 49).

En la reacción se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C y 1,5 minutos a 72 °C 40 ciclos. El producto que se obtuvo de la reacción se sometió a clonación en el sitio Swal del pBS-P35T35 para obtener el p35PhF3H1. Luego se determinó una secuencia básica del gen F3H completo de la orquídea mariposa contenido en el p35PhF3H1 (PhF3H1, SEC ID N° 50). Además, la secuencia del gen descubierto en la orquídea mariposa es un gen nuevo. La secuencia aminoacídica codificada por la secuencia de ADN tiene un 86% de homología con la secuencia aminoacídica (N° de registro GenBank: X89199) codificada por el gen F3H de *Bromheadia finlaysoniana*. El p35PhF3H1 es un ADN que expresa el gen F3H de orquídea mariposa en células vegetales.

EJEMPLO 11: Transfección de un pétalo de orquídea mariposa blanca con el gen F3'5'H y genes relacionados con la antocianina

Un pétalo de una orquídea mariposa blanca (*Phal. amabilis*) se cotransfectó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1 con el gen CHS (p35PhCHS3: Ejemplo 8), el gen CHI (p35PhCHI1: Ejemplo 9) y el gen F3H (p35PhF3H1: Ejemplo 10) que se derivaban de la orquídea mariposa y el gen F3'5'H (p35CcF3'5'H: Ejemplo 2) que se derivaba de *Commelina communis*. Sin embargo, no se observó el cambio de color en el pétalo.

Por tanto, se aislaron los genes que codifican las enzimas ((1) dihidroflavonol 4 – reductasa: DFR y (2) antocianidina sintasa: ANS) corriente abajo del gen F3'5'H en la ruta de síntesis de antocianina para su transfección.

EJEMPLO 12: Aislamiento del gen DFR de orquídea mariposa (PhDFR)

Se aisló todo el ARN de un pétalo del capullo de una orquídea mariposa (*Dtps. Queen Beer 'Mantenkou'*) utilizando el Mini Kit RNeasy Plant (QIAGEN), y se preparó el ADNc utilizando este ARN como matriz y el kit GeneRacer (Invitrogen).

A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR utilizando este ADNc como matriz. Se ha informado de varios genes DFR vegetales (N° de registro GenBank: AAB62873, AAC17843, AAD49343, AAQ83576, AAU93766, AAY32600, AAY32601, AAY32602, BAB40789, BAE79202). Los cebadores utilizados para la reacción PCR fueron DFRD-F1 (5'-TTYCAYGTIGCIACNCCNATG-3'; SEC ID N° 52) y DFRD-R1 (5'-DATNGCRTCRTCRAACATYTC-3'; SEC ID N° 53) que se habían diseñado a partir de la secuencia del gen DFR anterior. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 48 °C y 1 minuto a 72 °C 40 ciclos. Se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador DFRD-F2 (5'-ATGAAYTTYCARWSIRARGAYCC-3'; SEC ID N° 54) y un cebador DFRD-R2 (5'-RCAIATRTAICKNCIRTNGC-3'; SEC ID N° 55). En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 48 °C y 1 minuto a 72 °C 40 ciclos. Además se llevó a cabo de nuevo una PCR anidada utilizando la solución obtenida de la reacción, un cebador DFRD-F3 (5'-GARAAY GARGTNATHAA RCC-3'; SEC ID N° 56) y un cebador DFRD-R3 (5'-RTCRTCIAARRTGNACRAAYTG-3'; SEC ID N° 57). En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 48 °C y 30 segundos a 72 °C 40 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en pCR4/TOPO (Invitrogen) para obtener el PhDFR-D/pCR4, y se determinó una secuencia parcial de ADN contenida en PhDFR-D/pCR4 (secuencia parcial PhDFR).

A partir de la secuencia parcial PhDFR se analizaron las secuencias del lado 3' corriente abajo y del lado 5' corriente arriba por el procedimiento RACE.

El procedimiento RACE 3' se llevó a cabo utilizando un cebador que se puede diseñar a partir de la secuencia parcial PhDFR, el ARN anterior y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados para la reacción PCR fueron PhDFR-F1 (5'-GGTCATGCAAAAAGGTCGGGCAGCGTAA-3'; SEC ID N° 58) y el cebador GeneRacer 3'. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 72 °C 5 ciclos, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 70 °C 5 ciclos, y luego se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 68 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. Además se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador PhDFR-F2 (5'-GTGATCTTCACATCTTCCGAGGAACAGT-3'; SEC ID N° 59) y un cebador GeneRacer 3' anidado. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el pCR4/TOPO10 (Invitrogen) para obtener el PhDFR3'RACE/pCR4, y se determinó una secuencia de ADN del lado 3' corriente abajo contenida en PhDFR3'RACE/pCR4 (secuencia PhDFR3'RACE).

El procedimiento RACE 5' se llevó a cabo utilizando un cebador que se puede diseñar a partir de la secuencia parcial PhDFR, el ARN anterior y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados para la reacción PCR fueron PhDFR-R4 (5'-ATGATTCATTAATAAATCCGAAAAAAGACCACTACAA-3'; SEC ID N° 60) y el cebador GeneRacer 5'. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 72 °C 5 ciclos, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1 minuto a 70 °C 5 ciclos, y luego se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 68 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. Además se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador PhDFR-R3 (5'-AACCATGCATAATAAAGCAGATGTGTAAAT-3'; SEC ID N° 61) y un cebador GeneRacer 5' anidado. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 65 °C y 1 minuto a 72 °C 25 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el pCR4/TOPO10 (Invitrogen) para obtener el PhDFR 5'RACE/pCR4, y se determinó una secuencia de ADN del lado corriente arriba contenida en PhDFR 5'RACE/pCR4 (secuencia PhDFR 5'RACE).

El gen DFR completo de la orquídea mariposa se sometió a clonación basándose en la secuencia PhDFR3'RACE y la secuencia PhDFR5'RACE. Se llevó a cabo la RT-PCR utilizando el ARN anterior, un cebador PhDFR-F8A5 (5'-AAAAATGGAGGATGTGAGGAAGGGTCCTGTT-3'; SEC ID N° 62), un cebador PhDFR-R5 (5'-ACATGATTCATTAATAAATCCGAAAAAAGACCA-3'; SEC ID N° 63) y las perlas Ready-To-Go You Prime First Strand (Amersham Biosciences). En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 98 °C, 30 segundos a 68 °C y 1,5 minutos a 72 °C 35 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el pBS-P35T35 para obtener el p35PhDFR. A continuación se determinó la secuencia de completa del gen DFR contenida en p35PhDFR (PhDFR; SEC ID N° 64). Además, la secuencia del gen descubierto en la orquídea mariposa es un gen nuevo. La secuencia aminoácida codificada por la secuencia de ADN tiene un 86% de homología con la secuencia aminoácida (N° de registro GenBank: AF007096) codificada por el gen DFR de *Bromheadia finlaysoniana* por el análisis de homología. El p35PhDFR es un ADN para la expresión del gen DFR de orquídea mariposa en células vegetales.

EJEMPLO 13: Aislamiento del gen ANS de orquídea mariposa (PhANS1)

Se aisló todo el ARN de un pétalo del capullo de una orquídea mariposa (*Dtps. Queen Beer 'Mantenkou'*) justo antes de la floración utilizando el Mini Kit RNeasy Plant (QIAGEN), y se preparó el ADNc utilizando este ARN como matriz y el Sistema de Síntesis SuperscriptII First-Strand (Invitrogen).

A continuación, se llevó a cabo la RT-PCR utilizando este ADNc como matriz. Los cebadores utilizados para la reacción PCR fueron ANS-dgF2 (5'-TICARGGBTAYGGIAGYARRYTIGCIRMYA-3'; SEC ID N° 66) and ANS-dgR2 (5'-GGYTCCRCARAAIAYIRCCCAIGADA-3'; SEC ID N° 67) que se habían diseñado a partir de la secuencia de un gen ANS conocido. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 1,5 minutos a 72 °C 40 ciclos. Utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción y los mismos cebadores de nuevo, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 1 minuto a 72 °C 30 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en pCR4/TOPO10 (Invitrogen) para obtener el PhANSfrag10, y se determinó una secuencia parcial de ADN contenida en PhANSfrag10 (secuencia parcial PhANS). A partir de la secuencia parcial PhANS se analizaron las secuencias del lado 3' corriente abajo y del lado 5' corriente arriba por el procedimiento RACE.

El procedimiento RACE 3' se llevó a cabo utilizando un cebador que se puede diseñar a partir de la secuencia parcial PhANS, el ARN anterior y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados para la reacción PCR fueron PhANS3RACEGSP1 (5'-GCCCACACCGACGTCAGCTCCCTCTCCT-3'; SEC ID N° 68) y el cebador GeneRacer 3'. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1,5 minutos a 72 °C 5 ciclos, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1,5 minutos a 70 °C 5 ciclos, y luego se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 70 °C y 1,5 minutos a 72 °C 25 ciclos. Además se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador PhANS3RACEGSP2 (5'-CGTCGGGGATGCGCTCGAGATCCTCAGC-3'; SEC ID N° 69) y un cebador GeneRacer 3' anidado. En la reacción, se repitió una etapa de 10 segundos a 94 °C, 10 segundos a 58 °C y 1 minuto a 72 °C 35 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se

sometió a clonación en el pCR4/TOPO (Invitrogen) para obtener el PhANS3'RACE37, y se determinó una secuencia de ADN del lado 3' corriente abajo contenida en PhANS3'RACE37 (secuencia PhANS3'RACE).

El procedimiento RACE 5' se llevó a cabo utilizando un cebador que se puede diseñar a partir de la secuencia parcial PhANS, el ARN anterior y el kit GeneRacer (Invitrogen). Los cebadores utilizados para la reacción PCR fueron PhANS5RACEGSP1 (5'-AGTCCGCGGGTTCAGTCGCCAGATGGT-3'; SEC ID N° 70) y el cebador Gene Racer 5'. En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1,5 minutos a 72 °C 5 ciclos, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C y 1,5 minutos a 70 °C 5 ciclos, y luego se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 70 °C y 1,5 minutos a 72 °C 25 ciclos. Se llevó a cabo una PCR anidada utilizando como matriz la solución obtenida en la reacción, un cebador PhANS5RACEGSP2 (5'-CCGTCTTCTC CGGCGGGTAGACGAGGTG-3'; SEC ID N° 71) y un cebador GeneRacer 5' anidado. En la reacción, se repitió una etapa de 10 segundos a 94 °C, 10 segundos a 58 °C y 1 minuto a 72 °C 35 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el pCR4/TOPO (Invitrogen) para obtener el PhANS5'RACE15, y se determinó una secuencia de ADN del lado corriente arriba contenida en PhANS5'RACE15 (secuencia PhANS 5'RACE).

El gen ANS completo de la orquídea mariposa se sometió a clonación basándose en la secuencia PhANS 3'RACE y la secuencia PhANS 5'RACE. Se llevó a cabo la PCR utilizando el ADNc anterior, un cebador PhANS init (5'-ATGGCCACCAAAGCAATCCACC-3'; SEC ID N° 72), un cebador PhANS term (5'-TCAATCCAC AGGCGCCTT CT-3'; SEC ID N° 73). En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 69 °C y 1,5 minutos a 72 °C 35 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el sitio Swal de pBS-P35T35 para obtener el p35PhANS1. A continuación se determinó la secuencia de bases completa del gen ANS (PhANS1) contenida en el p35PhANS1 (PhANS1; SEC ID N° 74).

Además, la secuencia del presente gen descubierto en la orquídea mariposa es un gen nuevo. La secuencia aminoacídica codificada por la secuencia de ADN tiene un 58% de homología con la secuencia aminoacídica (N° de registro GenBank: EF079869) codificada por el gen ANS de Anthurium por el análisis de homología. El p35PhANS1 es un ADN que expresa el gen ANS de orquídea mariposa en células vegetales.

EJEMPLO 14: Transfección de un pétalo de orquídea mariposa blanca con el gen F3'5'H y un gen relacionado con antocianidina

0093 Un pétalo de orquídea mariposa blanca (*Phal. amabilis*) se contranfectó con el gen F3'5'H que se derivaba de *Commelina communis* y los genes CHS (p35PhCHS3), CHI (35PhCHI), F3H (p35PhF3H1), DFR (PhDFR) y ANS (PhANS1) que se habían derivado de orquídea mariposa según el procedimiento del Ejemplo 1. Como resultado, se observaron células azul pálido en el pétalo.

Por lo tanto, es evidente que con el fin de cambiar el color de las flores de la orquídea mariposa blanca a azules, el gen DFR y el gen ANS eran importantes. Por tanto, con el fin de cambiar el color de las flores en azul más oscuro, se estudiaron los genes DFR y ANS de otras plantas.

EJEMPLO 15: Aislamiento del gen DFR y el gen ANS de Gerbera y cotransfección con los mismos

(1) Aislamiento del gen DFR de Gerbera (GerDFR)

Se aisló todo el ARN de un pétalo de un capullo de Gerbera disponible comercialmente (híbrido) utilizando el Mini Kit RNeasy Plant (QIAGEN), y se preparó el ADNc utilizando este ARN como matriz y Sistema de Síntesis SuperscriptII First-Strand (Invitrogen). A continuación se llevó a cabo una RT-PCR utilizando este ADNc como matriz. Se utilizaron como cebadores para la reacción PCR el GerDFR-F (5'-ATGGAAGAGGATTCTCCGGC-3'; SEC ID N° 76) y GerDFR-R (5'-CTATTGGCCTTCTTTGAACAACAAA-3'; SEC ID N° 77) que se habían diseñado a partir de una secuencia (N° de registro GenBank: Z17221) de un gen DFR de Gerbera conocido (GerDFR). La reacción se llevó a cabo repitiendo una etapa de 10 segundos a 98 °C, 10 segundos a 55 °C y 1 minuto y 30 segundos a 72 °C 45 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el sitio Swal del pBS-P35T35 para obtener un gen DFR de Gerbera (p35GerDFR). El p35GerDFR es un ADN que expresa el gen DFR de Gerbera en células vegetales.

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

Se llevó a cabo una RT-PCR utilizando el ADNc anterior como matriz. Los cebadores utilizados en la reacción PCR fueron GerANS-F (5'-ATGGTGATTCAAGCAACCACA-3'; SEC ID N° 78) y GerANS-R (5'-CTAGTTTTCATCA CTTCGTCTTTAT-3'; SEC ID N° 79) que se habían diseñado a partir de una secuencia (N° de registro GenBank: AY997842) de un gen ANS de Gerbera conocido (GerANS).

En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 1 minuto y 10 segundos a 72 °C 45 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el sitio Swal del pBS-P35T35 para obtener el gen ANS de Gerbera (p35 GerANS). El p35 GerANS es un ADN que expresa el gen ANS de Gerbera en células vegetales.

(3) Cotransfección con el gen DFR de Gerbera y el gen GerANS

Un pétalo de orquídea mariposa (*Phal. amabilis*) se cotransfectó con los respectivos genes CHS (PhCHS33), CHI (PhCHI1) y F3H (PhF3H1) que se habían derivado a partir de la orquídea mariposa, el gen F3'5'H (CcF3'5'H) que se derivaba de *Commelina communis* y el gen DFR (GerDFR) y gen ANS (GerANS) que se derivaban de Gerbera. Como resultado, emergía nuevamente un azul más oscuro en el pétalo, al compararlo con el del Ejemplo 14.

EJEMPLO 16: Aislamiento del gen DFR y el gen ANS de Torenia y cotransfección con los mismos

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

Se aisló todo el ARN de un pétalo de un capullo de Torenia disponible comercialmente (Torenia founmieri) utilizando el Mini Kit RNeasy Plant (QIAGEN), y se preparó el ADNc utilizando el Sistema de Síntesis SuperscriptII First-Strand (Invitrogen). Se llevó a cabo la RT-PCR utilizando este ADNc como matriz. Los cebadores utilizados para la reacción PCR fueron un oligonucleótido TorDFR-F (5'-ATGAGCATGGAAGTAGTAGTACCA-3'; SEC ID N° 80) y TorDFR-R (5'-CTATTCTATCTTATGTTCTCCATGG-3'; SEC ID N° 81) que se habían diseñado a partir de la secuencia (N° de registro GenBank: AB012924) de un gen DFR de Torenia que ya se conocía (TorDFR). En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 1 minuto y 10 segundos a 72 °C 45 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el sitio Swal del pBS-P35T35 para obtener un gen DFR de Torenia (p35TorDFR). El p35TorDFR es un ADN que expresa el gen DFR de Torenia en células vegetales.

(2) Aislamiento del gen ANS de Torenia (TorANS)

Se llevó a cabo una RT-PCR utilizando el ADNc anterior como matriz. Los cebadores utilizados para la reacción PCR fueron TorANS-F (5'-ATGGTTTCTCCAGCATCTCCGA-3'; SEC ID N° 82) y TorANS-R (5'-TCACTCAA CACTCTTATCATCATGCTC-3'; SEC ID N° 83) que se habían diseñado a partir de una secuencia (N° de registro GenBank: AB044091) de un gen ANS de Torenia conocido (TorANS). En la reacción, se repitió una etapa de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 1 minuto y 10 segundos a 72 °C 45 ciclos. El producto que se obtuvo en la reacción se sometió a clonación en el sitio Swal de pBS-P35T35 para obtener el gen ANS de Torenia (p35TorANS). El p35TorANS es un ADN que expresa el gen AND en células vegetales.

(3) Cotransfección del gen DFR de Torenia y el gen ANS de Torenia

Un pétalo de orquídea mariposa blanca (*Phal. amabilis*) se cotransfectó con los genes respectivos CHS (PhCHS33), CHI (PhCHI1) and F3H (PhF3H1) que se derivaban de orquídea mariposa, el gen F3'5'H (CcF3'5'H) que se derivaba de *Commelina communis* y el gen DFR (TorDFR) y gen ANS (TorANS) que se derivaban de Torenia según el procedimiento del Ejemplo 1, y como resultado, emergieron nuevamente células en el pétalo que tenían un color púrpura más profundo que las del Ejemplo 14.

EXAMEN DEL MEJOR GEN DFR Y GEN ANS

Con respecto al cambio de la orquídea mariposa blanca a color azul, se introdujeron los diferentes genes derivados de plantas con el fin de encontrar el mejor gen DFR y el mejor gen ANS, y tales genes se compararon y examinaron.

EJEMPLO 17: Observación de la coloración de las células del pétalo

La coloración de las células del pétalo se observaron con el estereomicroscopio SZX12 (OLYMPUS Corporation) y se observaron macroscópicamente. La referencia del grado de coloración del pétalo se estableció en que si se podía observar macroscópicamente se juzgó como "III", si se podía observar con un estereomicroscopio con una magnificación de al menos 32 veces se juzgó como "II", y si no podía observarse con un estereomicroscopio con una magnificación de al menos 32 veces se juzgó como "I", y cuando la coloración no se observaba se juzgó como "-".

EJEMPLO 18: Comparación de los genes ANS en el pétalo de la orquídea mariposa blanca

Un pétalo de orquídea mariposa blanca (*Phal. amabilis*) se transfectó con uno de los siguientes tres grupos de genes en los que solamente un gen ANS variaba, y se observó el grado de coloración.

(1) gen ANS de orquídea mariposa (PhANS)+ gen CHS de orquídea mariposa (PhCHS3) + gen CHI de orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de orquídea mariposa (PhF3H1) + gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H) + gen DFR de Gerbera (GerDFR)

(2) gen ANS de Gerbera (GerDFR) + gen CHS de orquídea mariposa (PhCHS3) + gen CHI de orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de orquídea mariposa (PhF3H1) + gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H) + gen DFR de Gerbera (GerDFR)

(3) gen ANS de Torenia (TorANS) + gen CHS de orquídea mariposa (PhCHS3) + gen CHI de orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de orquídea mariposa (PhF3H1) + gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H) + gen DFR de Gerbera (GerDFR)

Como resultado, emergieron células azul púrpura en las respectivas muestras. Se compararon los grados de coloración de células azul púrpura que emergieron en veintidós fragmentos de pétalo. Los resultados se muestran en la Fig. 3.

5 EJEMPLO 19: Comparación de los genes DFR en el pétalo de orquídea mariposa

Un pétalo de orquídea mariposa blanca (*Phal. amabilis*) se transfectó con uno de los siguientes tres grupos de genes en los que solamente variaba un gen DFR, y se observó el grado de coloración.

- 10 (1) gen DFR de orquídea mariposa (Ph DFR) + gen CHS de orquídea mariposa (PhCHS3) + gen CHI de orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de orquídea mariposa (PhF3H1) + gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H)+ gen ANS de Torenia (TorANS)
- (2) gen DFR de Gerbera (Ger DFR) + gen CHS de orquídea mariposa (PhCHS3)+gen CHI de orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de orquídea mariposa (PhF3H1) + gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H) + gen
- 15 ANS de Torenia (TorANS)
- (3) gen DFR de Torenia (TorDFR) + gen CHS de orquídea mariposa (PhCHS3) + gen CHI de orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de orquídea mariposa (PhF3H1) + gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H)+ gen ANS de Torenia (TorANS)
- 20 Como resultado, emergieron células azul púrpura en las respectivas muestras. Se comparó el grado de coloración azul púrpura de las células que emergieron en veintitrés fragmentos del pétalo. Los resultados se muestran en la Fig. 4. Cuando se utilizó el gen PhDFR, el grado de coloración azul-púrpura fue bajo al compararse con el caso en el que se utilizó el gen GerDFR o el TorDFR. Se consideró que con el fin de producir un color de flores azul púrpura oscuro, el gen Gerbera DFR (GerDFR) y el gen DFR de Torenia (TorDFR) eran superiores al gen DFR endógeno de la orquídea mariposa (PhDFR).
- 25

EJEMPLO 20: Rendimiento del gen F3'5'H de *Commelina communis*

- 30 Con el fin de medir el rendimiento del gen F3'5'H de *Commelina communis* en la orquídea mariposa blanca, se llevaron a cabo ensayos comparativos con el gen de petunia.

Un pétalo de orquídea mariposa blanca (*Phal. amabilis*) se cotransfectó con el gen F3'5'H de *Commelina communis* ((1) CcF3'5'H) o un gen F3'5'H de petunia ((2) PetF3'5'H1, o (3) PetF3'5'H2), junto con el gen CHS (PhCHS3), el gen CHI (PhCHI1) y el gen F3H (PhF3H1) que se derivaban de la orquídea mariposa y el gen DFR (GerDFR) y el gen ANS (GerANS) que se derivaban de Gerbera.

35

Como resultado, en el caso en que se utilizó el gen F3'5'H de petunia (PetF3'5'H1) o el gen de petunia F3'5'H2 (Pet F3'5'H2), la coloración azul era poca. Por otro lado, en el caso en el que se utilizó el gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H), se observó una coloración clara (Fig. 5).

40

EJEMPLO 21: Necesidad de transfección con los genes F3H, CHI, CHS

- Se examinó la necesidad de los genes respectivos en el cambio de coloración a azul de las orquídeas mariposa blancas. Un pétalo de una orquídea mariposa blanca (*Phal. amabilis*) como material se transfectó con los siguientes cuatro grupos de genes, y se observó el grado de coloración.
- 45

- (1) gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H) + gen DFR de Torenia (TorDFR) + gen ANS de Torenia (TorANS)
- (2) gen F3H de Orquídea mariposa (PhF3H1) + gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H) + gen DFR de
- 50 Torenia (TorDFR) + gen ANS de Torenia (TorANS)
- (3) gen CHI de Orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de Orquídea mariposa (PhF3H1) + gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H) + gen DFR de Torenia (TorDFR) + gen ANS de Torenia (TorANS)
- (4) gen CHS de Orquídea mariposa (PhCHS3) + gen CHI de Orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de Orquídea mariposa (PhF3H1) + gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H) + gen DFR de Torenia
- 55 (TorDFR) + gen ANS de Torenia (TorANS)

Un pétalo de *Phal. amabilis* se transfectó con estos genes, y se observó la coloración de las células. Como resultado, excepto en (1), emergieron células azul púrpura. Se compararon los grados de coloración de 18 fragmentos de las respectivas muestras, y los resultados se muestran en la Fig. 6. A partir de estos resultados, es evidente que el gen F3H (PhF3H1) es esencial para la coloración.

60

EJEMPLO 22: Análisis de los pigmentos emergentes por transfección de un pétalo de orquídeas mariposa blancas

- En el experimento anterior, se examinó si los pigmentos contenidos en las células azul púrpura que emergían en el pétalo de la orquídea mariposa blanca (*Phal. amabilis*) eran pigmentos relacionados con la delphinidina o no. Un pétalo de una orquídea mariposa blanca (*Phal. amabilis*) se cotransfectó con el gen CHI, el gen F3H y el gen ANS
- 65

que se derivaban de orquídea mariposa, el gen DFR que se derivaba de Gerbera y el gen F3'5'H que se derivaba de *Commelina communis*, el pétalo se cultivó durante 5 días, y se extrajo la antocianidina del pétalo de la misma manera que en el Ejemplo 6 y se analizó. Como resultado, se detectó delfinidina como el componente principal del pigmento. La cantidad de delfinidina detectada era de 16 ng por muestra (media de cinco muestras). Por otro lado, en el caso del grupo en el que el gen F3'5'H de *Commelina communis* se excluyó de los grupos de genes anteriores, no se detectó la delfinidina. A partir del resultado anterior, es evidente que las células azul púrpura observadas en la transfección genética de la orquídea mariposa blanca estaban coloreadas por un derivado de la delfinidina.

EJEMPLO 23: Aplicación a otras orquídeas mariposa blancas distintas de *Phal. amabilis*

Un pétalo de un capullo con una longitud de 1,7 cm de una gran orquídea mariposa blanca pura (*Phal. White Stat*) se contranfectó con el gen CHS, el gen CHI y el gen F3H que se derivaban de orquídea mariposa, el gen DFR y el gen ANS derivados de Gerbera y el gen F3'5'H derivado de *Commelina communis* según el procedimiento del Ejemplo 1, y emergieron nuevas células azul púrpura en el pétalo.

EJEMPLO 24: Preparación de ADN para la transformación de orquídeas mariposa por el procedimiento con *Agrobacterium*

La transformación de orquídeas mariposa se puede llevar a cabo por el procedimiento con *Agrobacterium*, así como por el procedimiento de bombardeo con microproyectiles (Belarmino y Mii, Plant Cell Reports (2000) 19:435-442., Mishiba y col., Plant Cell Reports (2005) 24: 297-303). Se construyó el ADN para la transformación para obtener plantas recombinadas genéticamente por estos procedimientos. Los mapas y los procedimientos de preparación de los plásmidos respectivos se muestran en las Fig. 7 y 8.

(1) Construcción del pBI-SAS1

Un fragmento corto obtenido cortando el pBI-SAS del Ejemplo 4 con NotI e HindIII se sometió a subclonación de una parte del pBI-RHL que se describe en el documento PCT/JP02/12268 que se cortó con NotI e HindIII para construir el pBI-SAS1. El pBI-SAS1 es un plásmido que confiere resistencia a la higromicina a las plantas transformadas con *Agrobacterium*.

(2) Construcción del pBS-35S-FT

Como se necesita al menos un periodo de un año para la floración de las orquídeas mariposa, se construyó un ADN para expresar el gen de floración FT (Kobayashi y col., Science (1999) 286: 1960-1962).

El ADNc FT se preparó amplificando todo el ARN preparado a partir de la planta completa de *Arabidopsis* por RT-PCR. Para la PCR, se utilizaron como cebadores el AtFT 2nd-F (5'-GAAACACCTGTTTGTTCAGA-3'; SEC ID N° 84) y AtFT 2nd-R (5'-TCAATTGGTTATAAAGGAAGAAGC-3'; SEC ID N° 85), se insertó el ADNc FT purificado en una parte formada por el corte con SmaI del pBS-P35T35, el clon en el que se insertó el ADNc en la dirección sentido se seleccionó para construir el pBS-35S-FT. El pBS-35S-FT es un plásmido cuya transcripción está controlada por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S.

(3) Construcción del pBIH-35S-CcF3'5'H

Se cortó el p35CcF3'5'H con BamHI, y un extremo cohesivo se truncó con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con AscI para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte de pBI-SAS1 con AscI y SmaI para construir el pBIH-35S-CcF3'5'H. El pBIH-35S-CcF3'5'H es un vector binario que tiene una región ADN-T en la que están conectados en este orden el HPT que es un marcador de selección y el CcF3'5'H, cuya transcripción está controlada por el promotor CaMV 35S y el terminador Ca MV 35S.

(4) Construcción del pBS-35S-mPhCHS3

Se introdujo una sustitución de nucleótidos sin sustitución de aminoácidos en una parte cortada con SphI en el ADNc PhCHS3 para preparar un ADNc que no se pudiera cortar con SphI. Se utilizaron como cebadores para la sustitución de nucleótidos el PhCHS3-1038F (5'-GTAACATGTCGAGCGCTTGC GTTCTTTTCATACTCG-3'; SEC ID N° 86) y PhCHS3-1073R (5'-CGAGTATGAAAAGAACGCAAGCGCTCGACATGTTAC-3'; SEC ID N° 87), y se sintetizó un ADNc utilizando el pBS-35S-PhCHS3 como matriz y Pyrobest (Takara Bio Inc.). A continuación el plásmido matriz se digirió por tratamiento con DpnI para construir el pBS-35S-mPhCHS3.

(5) Construcción del pBS-35S-UP1

Después de cortar el p35PhCHI1 con AscI, y de que se truncara un extremo cohesivo con el fragmento Klenow, se continuó cortando con SphI para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte de p35PhF3H1 con XbaI, se truncó un extremo cohesivo, y a continuación se cortó

con SphI para construir el BS-35S-UP1. El pBS-35S-UP1 es un plásmido en el que en los ADNc respectivos cuya transcripción está controlada por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S están conectados en el orden de PhCHI1 y PhF3H1.

5 (6) Construcción del pBS-35S-Del1

Se cortó el p35TorANS con Ascl, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con KpnI para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte de p35TorDFR con XbaI, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con KpnI para construir el pBS-35S-Del1. El pBS-35S-Del1 es un plásmido en el que los ADNc respectivos cuya transcripción está controlada por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S están conectados en el orden de TorANS y TorDFR.

15 (7) Construcción de pBS-35S-Del2

Se cortó el p35CcF3'5'H con Ascl, se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y se recortó un fragmento de ADN cortando el plásmido con SphI. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte de pBS-35S-Del1 con XbaI, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con SphI para construir el pBS-35S-Del2. El pBS-35S-Del2 es un plásmido en el que los ADNc respectivos cuya transcripción está controlada por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S están en orden de CcF3'5'H, TorANS y TorDFR.

20 (8) Construcción del pBS-35S-Del8

Se cortó el pBS-35S-UP1 con Ascl, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación, cortando con SphI se recortó un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte del pBS-35S-Del2 con XbaI, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con SphI para construir el pBS-35S-Del8. El pBS-35S-Del8 es un plásmido en el que los ADNc respectivos cuya transcripción está controlada por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S están conectados en el orden PhCHI1, PhF3H1, CcF3'5'H, TorANS y TorDFR.

30 (9) Construcción del pBS-35S-Del9

Se cortó el pBS-35S-mPhCHS3 con Ascl, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación cortando con SphI se recortó un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte de pBS-35S-Del8 con XbaI, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con SphI para construir el pBS-35S-Del9. El pBS-35S-Del9 es un plásmido en el que los respectivos ADNc cuya transcripción está controlada por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S están conectados en el orden mPhCHS3, PhCHI1, PhF3H1, CcF3'5'H, TorANS y TorDFR,

40 (10) Construcción de pBS-35S-Del15

Se cortó el p35 CcF3'5'H con Ascl, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con SphI para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte del pBS-35S-FT con XbaI, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con SphI para construir el pBS-35S-Del15. El pBS-35S-Del15 es un plásmido en el que los respectivos ADNc cuya transcripción se controla por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S se conectan en el orden de CcF3'5'H y FT.

50 (11) Construcción del pBS-35S-Del16

El p35 TorDFR se cortó con Ascl, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con SphI para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte del p35-PhANS1 con XbaI, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con SphI para construir el pBS-35S-Del16. El pBS-35S-Del16 es un plásmido en el que los respectivos ADNc cuya transcripción se controla por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S se conectan en el orden de TorDFR y PhANS1.

60 (12) Construcción de pBS-35S-UP4

El pBS-35S-Del16 se cortó con Ascl, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con SphI para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte del pBS-35S-UP1 con XbaI, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con SphI para construir el pBS-35S-UP4. El pBS-35S-UP4 es un plásmido en el que los respectivos ADNc cuya transcripción se controla por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S se conectan en el orden de TorDFR, PhANS1, PhCHI1 y PhF3H1.

(13) Construcción del pBS-355-Del17

El pBS-35S-CcF3'5'H se cortó con *Ascl*, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con *SphI* para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte del pBS-35S-UP4 con *XbaI*, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con *SphI* para construir el pBS-355-Del17. El pBS-355-Del17 es un plásmido en el que los respectivos ADNc cuya transcripción se controla por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S se conectan en el orden de CcF3'5'H, TorDFR, PhANS1, PhCHI1 y PhF3H1.

(14) Construcción del pBS-35S-Del18

El pBS-35S-Del15 se cortó con *Ascl*, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con *SphI* para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte del pBS-35S-UP4 con *XbaI*, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con *SphI* para construir el pBS-35S-Del18. El pBS-35S-Del18 es un plásmido en el que los respectivos ADNc cuya transcripción se controla por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S se conectan en el orden de CcF3'5'H, FT, TorDFR, PhANS1, PhCHI1 y PhF3H1.

(15) Construcción del pBIH-35S-Del8

El pBS-35S-Del8 se cortó con *SphI*, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con *Ascl* para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte del pBI-SAS1 con *Ascl* y *SwaI*, para construir el BIH-35S-Del8. El pBIH-35S-Del8 es un vector binario que tiene una región ADN-T en la que HPT es un marcador de selección y en el que los respectivos ADNc cuya transcripción se controla por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S se conectan en el orden de PhCHI1, PhF3H1, CcF3'5'H, TorANS y TorDFR.

(16) Construcción del pBIH-35S-Del9

El pBS-35S-Del9 se cortó con *SphI*, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con *Ascl* para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte del pBI-SAS1 con *Ascl* y *SwaI*, para construir el pBIH-35S-Del9. El pBIH-35S-Del9 es un vector binario que tiene una región ADN-T en la que HPT es un marcador de selección y en el que los respectivos ADNc cuya transcripción se controla por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S se conectan en el orden de mPhCHS3, PhCHI1, PhF3H1, CcF3'5'H, TorANS y TorDFR.

(17) Construcción del pBIH-35S-Del17

El pBS-35S-Del17 se cortó con *SphI*, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con *Ascl* para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte del pBI-SAS1 con *Ascl* y *SwaI*, para construir el BIH-35S-Del17. El pBIH-35S-Del17 es un vector binario que tiene una región ADN-T en la que HPT es un marcador de selección y en el que los respectivos ADNc cuya transcripción se controla por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S se conectan en el orden de CcF3'5'H, TorDFR, PhANS1, PhCHI1 y PhF3H1.

(18) Construcción del pBIH-35S-Del18

El pBS-35S-Del18 se cortó con *SphI*, y se truncó un extremo cohesivo con un fragmento Klenow, y a continuación se cortó con *Ascl* para recortar un fragmento de ADN del plásmido. Este fragmento de ADN se insertó en una parte formada por el corte del pBI-SAS1 con *Ascl* y *SwaI*, para construir el BIH-35S-Del18. El pBIH-35S-Del18 es un vector binario que tiene una región ADN-T en la que HPT es un marcador de selección y en el que los respectivos ADNc cuya transcripción se controla por el promotor CaMV 35S y el terminador CaMV 35S se conectan en el orden de CcF3'5'H, FT, TorDFR, PhANS1, PhCHI1 y PhF3H1.

EJEMPLO 25: Producción de orquídeas mariposa transformadas

Se seleccionó con 50 mg/ml de higromicina una orquídea mariposa producida utilizando el ADN (pBIH-35S-CcF3'5'H, pBIH-35S-De18, pBIH-35S-Del9, pBIH-355-Del17 y pBIH-355-Del18) que se había construido con el vector binario del Ejemplo 24 y la cepa *Agrobacterium* EHA101. Como resultado, se pudo obtener una orquídea mariposa en la que estaban integrados en el cromosoma los genes mostrados en el Ejemplo 24.

Se puede inducir PLB de la orquídea mariposa transformada que se ha obtenido, utilizando una parte de la planta tal como el tallo floral o una yema axilar, y se puede llevar a cabo la reproducción del clon. Llevando a cabo el cruzamiento utilizando la orquídea mariposa transformada que se obtiene, como parental del cruzamiento, es posible obtener una descendencia con los genes integrados.

Por tanto, utilizando el gen F3'5'H de *Commelina communis*, se puede producir una variedad de tonos azules a partir de una orquídea mariposa con su color original, y se puede producir nuevamente una variedad azul a partir de una orquídea mariposa blanca.

5 EJEMPLO 26: Evaluación de la actuación del gen F3'5'H de *Commelina communis* en un pétalo de *Cymbidium*

Diez fragmentos de un pétalo obtenido de un capullo que tenía una longitud de 30 mm de un *Cymbidium* blanco (*Cym. Lovely angel 'The Two Virgins'*) se cotransfectaron según el procedimiento del Ejemplo 1 con uno de los siguientes tres grupos de genes.

- 10 (1) gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H) + gen CHS de Orquídea mariposa (PhCHS3) + gen CHI de orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de Orquídea mariposa (PhF3H1) + gen DFR de Gerbera (GerDFR) + gen ANS de Gerbera (GerANS)
- 15 (2) gen F3'5'H2 de Petunia (PetF3'5'H2) + gen CHS de orquídea mariposa (PhCHS3) + gen CHI de orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de orquídea mariposa (PhF3H1) + gen DFR de Gerbera (GerDFR) + gen ANS de Gerbera (GerANS)
- (3) gen CHS de orquídea mariposa (PhCHS3) + gen CHI de orquídea mariposa (PhCHI1) + gen F3H de orquídea mariposa (PhF3H1) + gen DFR de Gerbera (GerDFR) + gen ANS de Gerbera (GerANS)

- 20 Un pétalo transfectado se cultivó estáticamente durante 5 días, y luego se observó con un estereomicroscopio. Emergieron células nuevas de un azul púrpura profundo en los pétalos que se habían transfectado con el grupo de genes (1) que incluían el gen F3'5'H de *Commelina communis* (CcF3'5'H). Por otro lado, en los pétalos que se habían transfectado con el grupo de genes (2) que incluía el gen F3'5'H2 de Petunia (PetF3'5'H2), se observaron células púrpura claro en solo una parte de los pétalos, y en los pétalos que se transfectaron con el grupo de genes
- 25 (3) que no contenía el gen F3'5'H, no se observó ningún cambio de color. Los resultados de la evaluación del grado de coloración de las células que emergieron en cada pétalo por el procedimiento descrito en el Ejemplo 17 se muestran en la Fig. 9.

30 Aplicabilidad Industrial

Utilizando el gen F3'5'H de *Commelina communis*, además de orquídeas que tienen flores azules que no se pueden conseguir por los procedimientos de cruzamiento convencionales, se pueden producir plantas que tengan varios tonos azules de la flor, y su aplicabilidad es extremadamente amplia.

- 35 Se hace referencia a la divulgación completa de la Solicitud de Patente Japonesa N° 2007-066539 presentada el 15 de marzo de 2007 que incluye la especificación, reivindicaciones, dibujos y resumen.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 SEC ID N°: 1, secuencia de nucleótidos que codifica flavonoide 3',5'-hidroxilasa de *Commelina communis*
SEC ID N°: 2, secuencia de aminoácidos de flavonoide 3',5'-hidroxilasa de *Commelina communis*
SEC ID N°: 3, Cebador 35FH-1
SEC ID N° 4, Cebador 35FH-4
SEC ID N°: 5, Cebador 35FH-2
- 45 SEC ID N°: 6, Cebador 35FH-3
SEC ID N°: 7, Cebador C35FH-3
SEC ID N°: 8, Cebador C35FH-4
SEC ID N°: 9, Cebador C35FH-6
SEC ID N°: 10, Cebador C35FH-5
- 50 SEC ID N°: 11, Cebador C35FH-7
SEC ID N° 12, Cebador C35FH-10
SEC ID N° 13, Cebador C35FH-9
SEC ID N°: 14, Oligonucleótido SAS-S
SEC ID N°: 15, Oligonucleótido SAS-AS
- 55 SEC ID N°: 16, Cebador T-CaMV35S-SseI-F
SEC ID N°: 17, Cebador T-CaMV35S-Ascl-R
SEC ID N°: 18, Cebador CcF35H-F
SEC ID N°: 19, Cebador CcF35H-R
SEC ID N°: 20, Cebador PetF3'5'H1-F
- 60 SEC ID N°: 21, Cebador PetF3'5'H1-R
SEC ID N°: 22, Cebador PetF3'5'H2-F
SEC ID N°: 23, Cebador PetF3'5'H2-R
SEC ID N°: 24, Cebador PhCHS3 F1
SEC ID N° 25, Cebador PhCHS3 R1
- 65 SEC ID N°: 26, secuencia de nucleótidos que codifica la chalcona sintasa variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis*

	SEC ID N°: 27, secuencia de aminoácidos de la chalcona sintasa variedad de cultivo híbrida de <i>Doritaenopsis</i>
	SEC ID N°: 28, Cebador CHI-dgF1
	SEC ID N°: 29, Cebador CHI-dgR1
	SEC ID N° 30, Cebador CHI-dgF3
5	SEC ID N°: 31, Cebador CHI-dgR3
	SEC ID N°: 32, Cebador PhCHI-GSP F1
	SEC ID N°: 33, Cebador PhCHI-GSP F2
	SEC ID N°: 34, Cebador PhCHI-GSP R1
	SEC ID N° 35, Cebador PhCHI-GSP R2
10	SEC ID N°: 36, Cebador PhCHI ini.
	SEC ID N° 37, Cebador PhCHI term.
	SEC ID N°: 38, secuencia de nucleótidos que codifica la chalcona isomerasa variedad de cultivo híbrida de <i>Doritaenopsis</i>
15	SEC ID N°: 39, secuencia de aminoácidos de la chalcona isomerasa variedad de cultivo híbrida de <i>Doritaenopsis</i>
	SEC ID N°: 40, Cebador F3H-dgF1
	SEC ID N°: 41, Cebador F3H-dgR1
	SEC ID N°: 42, Cebador F3H-dgF3
	SEC ID N°: 43, Cebador F3H-dgR3
20	SEC ID N°: 44, Cebador PhF3H-GSPF1
	SEC ID N°: 45, Cebador PhF3H-GSPF2
	SEC ID N°: 46, Cebador PhF3H-GSPR1
	SEC ID N°: 47, Cebador PhF3H-GSPR2
	SEC ID N°: 48, Cebador PhF3H ini.
25	SEC ID N°: 49, Cebador PhF3H term.
	SEC ID N°: 50, secuencia de nucleótidos que codifica la flavanona 3-hidroxilasa variedad de cultivo híbrida de <i>Doritaenopsis</i>
	SEC ID N°: 51, secuencia de aminoácidos de la flavanona 3-hidroxilasa variedad de cultivo híbrida de <i>Doritaenopsis</i>
30	SEC ID N°: 52, Cebador DFRD-F1
	SEC ID N°: 53, Cebador DFRD-R1
	SEC ID N°: 54, Cebador DFRD-F2
	SEC ID N°: 55, Cebador DFRD-R2
	SEC ID N°: 56, Cebador DFRD-F3
35	SEC ID N°: 57, Cebador DFRD-R3
	SEC ID N°: 58, Cebador PhDFR-F1
	SEC ID N°: 59, Cebador PhDFR-F2
	SEC ID N°: 60, Cebador PhDFR-R4
	SEC ID N°: 61, Cebador PhDFR-R3
40	SEC ID N°: 62, Cebador PhDFR-F8A5
	SEC ID N°: 63, Cebador PhDFR-R5
	SEC ID N°: 64, secuencia de nucleótidos que codifica la dihidroflavonol-4-reductasa variedad de cultivo híbrida de <i>Doritaenopsis</i>
45	SEC ID N°: 65, secuencia de aminoácidos de la dihidroflavonol-4-reductasa variedad de cultivo híbrida de <i>Doritaenopsis</i>
	SEC ID N°: 66, Cebador ANS-dgF2
	SEC ID N°: 67, Cebador ANS-dgR2
	SEC ID N°: 68, Cebador PhANS3RACEGSP1
	SEC ID N°: 69, Cebador PhANS3RACEGSP2
50	SEC ID N°: 70, Cebador PhANS5RACEGSP1
	SEC ID N°: 71, Cebador PhANS5RACEGSP2
	SEC ID N°: 72, Cebador PhANS ini.
	SEC ID N°: 73, Cebador PhANS term.
55	SEC ID N°: 74, secuencia de nucleótidos que codifica la antocianidina sintasa variedad de cultivo híbrida de <i>Doritaenopsis</i>
	SEC ID N°: 75, secuencia de aminoácidos de la antocianidina sintasa variedad de cultivo híbrida de <i>Doritaenopsis</i>
	SEC ID N°: 76, Cebador GerDFR-F
60	SEC ID N°: 77, Cebador GerDFR-R
	SEC ID N°: 78, Cebador GerANS-F
	SEC ID N°: 79, Cebador GerANS-R
	SEC ID N°: 80, Cebador TorDFR-F
	SEC ID N°: 81, Cebador TorDFR-R
	SEC ID N°: 82, Cebador TorANS-F
65	SEC ID N°: 83, Cebador TorANS-R
	SEC ID N°: 84, Cebador AtFT 2nd-F

SEC ID N°: 85, Cebador AtFT 2nd-R
SEC ID N°: 86, Cebador PhCHS3-1038F
SEC ID N°: 87, Cebador PhCHS3-1073R

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ishihara Sangyo Kaisha LTD

<120> Gen de la flavonoide 3', 5' hidroxilasa de *Commelina communis*

<130> P2008003

<160> 87

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1524

<212> ADN

<213> *Commelina communis*

$\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (1)..(1524)

<223> flavonoide 3',5'- hidroxilasa de *Commelina communis*, (Cc F3'5'H)

<400> 1

atg gta ccc ctt acg tac ctt gca tgt ctc ctc ctc ccc ttc ctc ctc 48
Met Val Pro Leu Thr Tyr Leu Ala Cys Leu Leu Leu Pro Phe Leu Leu
1 5 10 15

cac cac ctc ctc ctc ctc cat cgc cga cgt cga ctc ccc ccc ggt ccc 96
 His His Leu Leu Leu Leu His Arg Arg Arg Arg Leu Pro Pro Gly Pro
 20 25 30

ctc ggc ttc ccc atc cta ggc tcc ctc ccc tct ttg ggc acc acc cct 144
Leu Gly Phe Pro Ile Leu Gly Ser Leu Pro Ser Leu Gly Thr Thr Pro
35 40 45

cac atc tct cta gct cat ctc tcc acc ctc tat ggc ccc att atg cac 192
 His Ile Ser Leu Ala His Leu Ser Thr Leu Tyr Gly Pro Ile Met His
 50 55 60

ctt cga cta ggc caa gcc gat gtc gtc gtc gcc tcc acc ccc tcg gcc 240
Leu Arg Leu Gly Gln Ala Asp Val Val Val Ala Ser Thr Pro Ser Ala
65 70 75 80

gcc cgt ctc ttc ctc aaa gac ctc gaa aac ttc ttt cgg gac cgt ccc 288
Ala Arg Leu Phe Leu Lys Asp Leu Glu Asn Phe Phe Arg Asp Arg Pro
85 90 95

acc gat gct gca cca att cga tta gcc tat gaa gcc caa gac atg gtg Thr Asp Ala Ala Pro Ile Arg Leu Ala Tyr Glu Ala Gln Asp Met Val 100 105 110	336
ttt gca ccc tat gcc ccc aag tgg aag ctt ttg agg cgc cta gct cac Phe Ala Pro Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Leu Arg Arg Leu Ala His 115 120 125	384
caa gag atg cta ggg ccc aaa gca ctt gat aaa tgg agc tct ata aga Gln Glu Met Leu Gly Pro Lys Ala Leu Asp Lys Trp Ser Ser Ile Arg 130 135 140	432
tgt cgc gag gct gaa cgg atg gtc cgc tcg atg cgt agc tcg tcg gag Cys Arg Glu Ala Glu Arg Met Val Arg Ser Met Arg Ser Ser Ser Glu 145 150 155 160	480
tct ggg gag ctc gta aag gtg gca gag atg atg gtg ttt act att gct Ser Gly Glu Leu Val Lys Val Ala Glu Met Met Val Phe Thr Ile Ala 165 170 175	528
aac atg ata ggg agg gtt ata ctt agt agg aga gtg ttt gag gtg aag Asn Met Ile Gly Arg Val Ile Leu Ser Arg Arg Val Phe Glu Val Lys 180 185 190	576
gat ggg gag gct aat gag ttc aag gag atg gtg gtg gag ctg atg act Asp Gly Glu Ala Asn Glu Phe Lys Glu Met Val Val Glu Leu Met Thr 195 200 205	624
ttg gct ggg ctc ttt aac att ggg gac ttt gtt ccg gct gtg gcg tgg Leu Ala Gly Leu Phe Asn Ile Gly Asp Phe Val Pro Ala Val Ala Trp 210 215 220	672
atg gac ttg cag ggg ttg gag ggg aag atg aag aag ctg cat gtg agg Met Asp Leu Gln Gly Leu Glu Gly Lys Met Lys Lys Leu His Val Arg 225 230 235 240	720
ttc gat aag gtg ctc tcg aag ata ctg cga gag cac gag gcg acg aag Phe Asp Lys Val Leu Ser Lys Ile Leu Arg Glu His Glu Ala Thr Lys 245 250 255	768
ggg gag agg aag ggg agg gag gat tta ctt gat ctt ctg att gga tgc Gly Glu Arg Lys Gly Arg Glu Asp Leu Leu Asp Leu Leu Ile Gly Cys 260 265 270	816
aga gat gga cag gga ggg gag gag ggg gtg gag gtc act gat gat aat Arg Asp Gly Gln Gly Gly Glu Glu Gly Val Glu Val Thr Asp Asp Asn 275 280 285	864

atc aag gct gtc cta ttg aac tta ttc acg gcc ggt tct gac act tca Ile Lys Ala Val Leu Leu Asn Leu Phe Thr Ala Gly Ser Asp Thr Ser 290 295 300	912
act ggt gct ttg gag tgg gca ata acc gaa ctg ata gtg aac cca aca Thr Gly Ala Leu Glu Trp Ala Ile Thr Glu Leu Ile Val Asn Pro Thr 305 310 315 320	960
ata ctt cac aag gca caa gct gaa atg gac caa gtt atc gga cga aat Ile Leu His Lys Ala Gln Ala Glu Met Asp Gln Val Ile Gly Arg Asn 325 330 335	1008
cgc ctg ctc gaa gaa tgg gac ata ccg aag ttg cca tac cta aga gcc Arg Leu Leu Glu Glu Ser Asp Ile Pro Lys Leu Pro Tyr Leu Arg Ala 340 345 350	1056
ata gtg aag gaa aca ttc cga aaa cat cct tca aca cct tta aat ctc Ile Val Lys Glu Thr Phe Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu Asn Leu 355 360 365	1104
cct cgt atc gca acc gaa gct tgt gaa gcc aat ggt tat tac att cca Pro Arg Ile Ala Thr Glu Ala Cys Glu Ala Asn Gly Tyr Tyr Ile Pro 370 375 380	1152
aag aac act aag ctc ttg gtc aac att tgg gca ata ggg cgt gac cca Lys Asn Thr Lys Leu Leu Val Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro 385 390 395 400	1200
aat gtt tgg cct aac cca ctc aaa ttt gac cca gaa cga ttt atg acc Asn Val Trp Pro Asn Pro Leu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Phe Met Thr 405 410 415	1248
ttg aag ggc tct aaa att gac cca caa ggt aat gac ttt gag ctc ata Leu Lys Gly Ser Lys Ile Asp Pro Gln Gly Asn Asp Phe Glu Leu Ile 420 425 430	1296
cca ttc ggg tct gga cgc aga atc tgc gcc ggt gcc cgt atg ggt gtt Pro Phe Gly Ser Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Ala Arg Met Gly Val 435 440 445	1344
gtg gtt gtg gag tac ctc ttg ggc ttg atg att cac gca ttt gac tgg Val Val Val Glu Tyr Leu Leu Gly Leu Met Ile His Ala Phe Asp Trp 450 455 460	1392
aaa ttg cct ctg ggt gaa acc atg gac atg ggc gag aca ttt gga atc Lys Leu Pro Leu Gly Glu Thr Met Asp Met Gly Glu Thr Phe Gly Ile 465 470 475 480	1440
gca ctt caa aag act gtg ccg gta gcg gca att gtg agc cct cgc cta Ala Leu Gln Lys Thr Val Pro Val Ala Ala Ile Val Ser Pro Arg Leu 485 490 495	1488
gag cca aac gtt tat aag aat ata aaa aca aca taa Glu Pro Asn Val Tyr Lys Asn Ile Lys Thr Thr 500 505	1524

<211> 507
 <212> PRT
 <213> *Commelina communis*

5 <400> 2

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

Gln Glu Met Leu Gly Pro Lys Ala Leu Asp Lys Trp Ser Ser Ile Arg
130 135 140

Cys Arg Glu Ala Glu Arg Met Val Arg Ser Met Arg Ser Ser Ser Glu
145 150 155 160

Ser Gly Glu Leu Val Lys Val Ala Glu Met Met Val Phe Thr Ile Ala
165 170 175

Asn Met Ile Gly Arg Val Ile Leu Ser Arg Arg Val Phe Glu Val Lys
180 185 190

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

Leu Ala Gly Leu Phe Asn Ile Gly Asp Phe Val Pro Ala Val Ala Trp
210 215 220

Met Asp Leu Gln Gly Leu Glu Gly Lys Met Lys Lys Leu His Val Arg
225 230 235 240

Phe Asp Lys Val Leu Ser Lys Ile Leu Arg Glu His Glu Ala Thr Lys
245 250 255

Gly Glu Arg Lys Gly Arg Glu Asp Leu Leu Asp Leu Leu Ile Gly Cys
260 265 270

Arg Asp Gly Gln Gly Gly Glu Glu Gly Val Glu Val Thr Asp Asp Asn
275 280 285

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

Thr Gly Ala Leu Glu Trp Ala Ile Thr Glu Leu Ile Val Asn Pro Thr
305 310 315 320

ES 2 453 377 T3

Ile Leu His Lys Ala Gln Ala Glu Met Asp Gln Val Ile Gly Arg Asn
325 330 335

Arg Leu Leu Glu Glu Ser Asp Ile Pro Lys Leu Pro Tyr Leu Arg Ala
340 345 350

Ile Val Lys Glu Thr Phe Arg Lys His Pro Ser Thr Pro Leu Asn Leu
355 360 365

Pro Arg Ile Ala Thr Glu Ala Cys Glu Ala Asn Gly Tyr Tyr Ile Pro
370 375 380

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

Asn Val Trp Pro Asn Pro Leu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Phe Met Thr
405 410 415

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

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

Val Val Val Glu Tyr Leu Leu Gly Leu Met Ile His Ala Phe Asp Trp
450 455 460

Lys Leu Pro Leu Gly Glu Thr Met Asp Met Gly Glu Thr Phe Gly Ile
465 470 475 480

Ala Leu Gln Lys Thr Val Pro Val Ala Ala Ile Val Ser Pro Arg Leu
485 490 495

Glu Pro Asn Val Tyr Lys Asn Ile Lys Thr Thr
500 505

<210> 3
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador 35FH-1

<220>
<221> base modificada
<222> (6) .. (15)

	<223> n (6, 9, 15) = i	
5	<400> 3 atggtngtng arytnatgac	20
10	<210> 4 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador 35FH-4	
20	<220> <221> base modificada <222> (6)..(12) <223> n (6, 9, 12) = i	
25	<400> 4 ccraanggna tnarytcraa	20
30	<210> 5 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador 35FH-2	
40	<220> <221> base modificada <222> (12) .. (18) <223> n (12, 18) i	
45	<400> 5 tggatggayy tncarggnat	20
50	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador 35FH-3	
60	<220> <221> base modificada <222> (3) .. (12) <223> n (3, 12) = d	
65	<220> <221> base modificada <222> (6) .. (18) <223> n (6, 18) = i	
	<400> 6 ccnatngccc anatrtnac	20
	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador C35FH-3	

	<400> 7 atctccctcg tatcgcaacc	20
5	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador C35FH-4	
	<400> 8 gaagcttgtag aagccaatgg	20
15	<210> 9 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador C35FH-6	
25	<400> 9 cgctgcctcg tgctctcgca gtatc	25
30	<210> 10 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador C35FH-5	
35	<400> 10 tcttcgagag caccttatcg aacctc	26
40	<210> 11 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador C35FH-7	
45	<400> 11 gaaaaccaat acaaaaacat acc	23
50	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador C35FH-10	
55	<400> 12 attgcttcaa gttccctagc	20
60	<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Cebador C35FH-9	

<400> 13
 gttccctagc cccgtaccac 20

 5 <210> 14
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido SAS-S

 <400> 14
 ctagctagcg ggcgcctgc aggatatcat ttaatcccg gg 42

 15 <210> 15
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido SAS-AS

 <400> 15
 cccgggattt aatgatatc ctgcaggcgc gccgctagct ag 42
 25
 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador T-CaMV35S-Ssel-F

 <400> 16
 aacctgcagg aatcaccag tctctctcta 30
 35
 <210> 17
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador T-CaMV35S-Ascl-R

 45 <400> 17
 ggcgcgcat cgataagggg ttattag 27

 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador CcF35H-F

 55 <400> 18
 atggtacccc ttacgtacct t 21

 <210> 19
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Cebador CcF35H-R
 65

	<400> 19 ttatgttgtt ttatattct tataaacg	28
5	<210> 20 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador PetF3'5'H1-F	
	<400> 20 atgatgctac ttactgagct tgggtg	25
15	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador PetF3'5'H1-R	
25	<400> 21 caacatgcgc aattatagca	20
30	<210> 22 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador PetF3'5'H2-F	
35	<400> 22 atggtgctac ttagtgagct tgc	23
40	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador PetF3' 5' H2-R	
45	<400> 23 aaccaacgta aaggcatgtt	20
50	<210> 24 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador PhCHS3 F1	
	<400> 24 aagcttgtga gagacgacgg a	21
60	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Cebador PhCHS3 R1	

ES 2 453 377 T3

<400> 25
 tggccctaatt ccttcaaatt 20

5 <210> 26
 <211> 1185
 <212> ADN
 <213> Variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis* Sogo Vivien x *Doritae nopsis* Sogo Yenlin)

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1185)
 <223> Chalcona sintasa variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (PhCHS 3)

15 <400> 26

atg gcg ccg gcg atg gag gag atc agg cga act cag aga gct gag ggc	48
Met Ala Pro Ala Met Glu Glu Ile Arg Arg Thr Gln Arg Ala Glu Gly	
1 5 10 15	
ccc gcg gcg gtc ctc gca atc ggc acc tcc acg ccg ccg aac gct ctg	96
Pro Ala Ala Val Leu Ala Ile Gly Thr Ser Thr Pro Pro Asn Ala Leu	
20 25 30	
tat cag gcc gat tat ccc gat tat tac ttc aga atc acc aac tgc gag	144
Tyr Gln Ala Asp Tyr Pro Asp Tyr Tyr Phe Arg Ile Thr Asn Cys Glu	
35 40 45	
cat ctc act gac ctc aag gag aag ttc aag cga atg tgc gag aaa tcc	192
His Leu Thr Asp Leu Lys Glu Lys Phe Lys Arg Met Cys Glu Lys Ser	
50 55 60	
atg ata aaa aaa cgg tac atg tat cta aca gaa gaa ttc ctg aaa gaa	240
Met Ile Lys Lys Arg Tyr Met Tyr Leu Thr Glu Glu Phe Leu Lys Glu	
65 70 75 80	
aat ccc aat atc tgc gca ttc atg gct cct tca ctc gac gcc cgg caa	288
Asn Pro Asn Ile Cys Ala Phe Met Ala Pro Ser Leu Asp Ala Arg Gln	
85 90 95	

gac ata gtt gtc gcc gag gtc ccg aag ctc gcc aaa gag gcc gcc gcc Asp Ile Val Val Ala Glu Val Pro Lys Leu Ala Lys Glu Ala Ala Ala 100 105 110	336
cgc gcc atc aag gaa tgg gga cac ccc aaa tca cgc ata act cat ctc Arg Ala Ile Lys Glu Trp Gly His Pro Lys Ser Arg Ile Thr His Leu 115 120 125	384
atc ttc tgc acc acc agc gcc gtc gac atg ccc gcc gcc gac tac caa Ile Phe Cys Thr Thr Ser Gly Val Asp Met Pro Gly Ala Asp Tyr Gln 130 135 140	432
ctc acc cgc ctc ctc ggt ctc cgc ccc tcc gtc aac aga ttc atg ctc Leu Thr Arg Leu Leu Gly Leu Arg Pro Ser Val Asn Arg Phe Met Leu 145 150 155 160	480
tac cag cag gcc tgc ttc gcc gcc gcc acc gtc ctc cgc ctc gcc aag Tyr Gln Gln Gly Cys Phe Ala Gly Gly Thr Val Leu Arg Leu Ala Lys 165 170 175	528
gat ctc gcc gag aac aac gcc gcc gcc cgc gtg ctc gtc gtt tgc tcc Asp Leu Ala Glu Asn Asn Ala Gly Ala Arg Val Leu Val Val Cys Ser 180 185 190	576
gaa atc acc gcc gtc act ttc cgc gcc ccg tgg gaa tcc cat ctc gat Glu Ile Thr Ala Val Thr Phe Arg Gly Pro Ser Glu Ser His Leu Asp 195 200 205	624
tcc ctc gtc gga cag gcc ctc ttc gcc gac gcc gcc gcc gct atc att Ser Leu Val Gly Gln Ala Leu Phe Gly Asp Gly Ala Ala Ala Ile Ile 210 215 220	672
gtc gga tcc gac cct gat tta gcc acc gag cgc cct ctg ttt caa cta Val Gly Ser Asp Pro Asp Leu Ala Thr Glu Arg Pro Leu Phe Gln Leu 225 230 235 240	720
gtc tct gct tcc caa acc atc ctt ccc gaa tca gag gcc gcc att gat Val Ser Ala Ser Gln Thr Ile Leu Pro Glu Ser Glu Gly Ala Ile Asp 245 250 255	768
ggc cac ctt cgt gaa atc ggg ctc acc ttc cac cta ctc aaa gac gtc Gly His Leu Arg Glu Ile Gly Leu Thr Phe His Leu Leu Lys Asp Val 260 265 270	816
ccc gcc ctc att tct aaa aac att caa aaa tgt ctc ctt gag gcc ttc Pro Gly Leu Ile Ser Lys Asn Ile Gln Lys Cys Leu Leu Glu Ala Phe 275 280 285	864

aag cca ctt ggt gtc ctt gat tgg aac tct att ttt tgg atc gct cac	912
Lys Pro Leu Gly Val Leu Asp Trp Asn Ser Ile Phe Trp Ile Ala His	
290 295 300	
ccg ggc ggc ccg gct ata ctc gat caa gtt gag acc aag ctc ggt cta	960
Pro Gly Gly Pro Ala Ile Leu Asp Gln Val Glu Thr Lys Leu Gly Leu	
305 310 315 320	
aag tcc gag aag ctc gcc gcg agt aga aat gtg ctc gct gac tac ggt	1008
Lys Ser Glu Lys Leu Ala Ala Ser Arg Asn Val Leu Ala Asp Tyr Gly	
325 330 335	
aac atg tgc agc gca tgc gtt ctt ttc ata ctc gat gag atg cga agg	1056
Asn Met Ser Ser Ala Cys Val Leu Phe Ile Leu Asp Glu Met Arg Arg	
340 345 350	
cga tgc gca gag gct ggc cag tgc acc act ggc gag ggt ttg gag tgg	1104
Arg Ser Ala Glu Ala Gly Gln Ser Thr Thr Gly Glu Gly Leu Glu Trp	
355 360 365	
gga gtt cta ttc ggc ttc ggt ccg gga ctt acg gtc gag act gtt gta	1152
Gly Val Leu Phe Gly Phe Gly Pro Gly Leu Thr Val Glu Thr Val Val	
370 375 380	
tta cgc agc gtt ccg att ggt ggc acc gag taa	1185
Leu Arg Ser Val Pro Ile Gly Gly Thr Glu	
385 390	

<210> 27

<211> 394

<212> PRT

<213> Variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis* Sogo Vivien x *Doritae nopsis* Sogo Yenlin)

<400> 27

Met	Ala	Pro	Ala	Met	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Thr	Gln	Arg	Ala	Glu	Gly
1				5				10					15		

Pro	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Ile	Gly	Thr	Ser	Thr	Pro	Pro	Asn	Ala	Leu
			20					25					30		

Tyr	Gln	Ala	Asp	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Arg	Ile	Thr	Asn	Cys	Glu
			35				40					45			

5

10

His Leu Thr Asp Leu Lys Glu Lys Phe Lys Arg Met Cys Glu Lys Ser
50 55 60

Met Ile Lys Lys Arg Tyr Met Tyr Leu Thr Glu Glu Phe Leu Lys Glu
65 70 75 80

Asn Pro Asn Ile Cys Ala Phe Met Ala Pro Ser Leu Asp Ala Arg Gln
85 90 95

Asp Ile Val Val Ala Glu Val Pro Lys Leu Ala Lys Glu Ala Ala Ala
100 105 110

Arg Ala Ile Lys Glu Trp Gly His Pro Lys Ser Arg Ile Thr His Leu
115 120 125

Ile Phe Cys Thr Thr Ser Gly Val Asp Met Pro Gly Ala Asp Tyr Gln
130 135 140

Leu Thr Arg Leu Leu Gly Leu Arg Pro Ser Val Asn Arg Phe Met Leu
145 150 155 160

Tyr Gln Gln Gly Cys Phe Ala Gly Gly Thr Val Leu Arg Leu Ala Lys
165 170 175

Asp Leu Ala Glu Asn Asn Ala Gly Ala Arg Val Leu Val Val Cys Ser
180 185 190

Glu Ile Thr Ala Val Thr Phe Arg Gly Pro Ser Glu Ser His Leu Asp
195 200 205

Ser Leu Val Gly Gln Ala Leu Phe Gly Asp Gly Ala Ala Ala Ile Ile
210 215 220

Val Gly Ser Asp Pro Asp Leu Ala Thr Glu Arg Pro Leu Phe Gln Leu
225 230 235 240

ES 2 453 377 T3

Val Ser Ala Ser Gln Thr Ile Leu Pro Glu Ser Glu Gly Ala Ile Asp
245 250 255

Gly His Leu Arg Glu Ile Gly Leu Thr Phe His Leu Leu Lys Asp Val
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador CHI-dgF1

<400> 28
ttyctcgsyg gbgcmggygw vmgvvgg 26

<210> 29
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador CHI-dgR1

<220>
<221> base modificada

	<222> (5) .. (20) <223> n (5, 8, 20) = i	
5	<400> 29 cmggnganac vsrctkytyn ccratvat	28
10	<210> 30 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> Cebador CHI-dgF3	
20	<220> <221> base modificada <222> (3) .. (14) <223> n (3, 11, 14) = i	
25	<400> 30 tmnkywcmgg nsmnttygar aaryt	25
30	<210> 31 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador CHI-dgR3	
40	<220> <221> base modificada <222> (3).. (21) <223> n (3, 12, 21)=i	
45	<400> 31 tynccratva tngwhtccar naybgc	26
50	<210> 32 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Cebador PhCHI-GSP F1	
60	<400> 32 atgctgctgc cattaacggg tca	23
65	<210> 33 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador PhCHI-GSP F2	
	<400> 33 tccgagaagg tctccgggaa ct	22
	<210> 34 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	

<223> Cebador PhCHI-GSP R1
 <400> 34
 gcattcgta gcttcttgct ctct 24
 5
 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Cebador PhCHI-GSP R2
 <400> 35
 atcacatcag tctcagccac a 21
 15
 <210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador PhCHI ini.
 25
 <400> 36
 atggcagaaa cagtggcgac gccca 25
 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador PhCHI term.
 35
 <400> 37
 tcaaacgact ccatcttgct c 21
 <210> 38
 <211> 723
 <212> ADN
 <213> Variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis* Sogo Vivien x *Doritae nopsis* Sogo Yenlin)
 40
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(723)
 <223> Chalcona isomerasa variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (PhCHI 3)
 45
 <400> 38

atg gca gaa aca gtc gcg acg ccc atc gag gtg gag gga gtg aag ttt	48
Met Ala Glu Thr Val Ala Thr Pro Ile Glu Val Glu Gly Val Lys Phe	
1 5 10 15	
ccg gcc gag atc tcg tcg ccg gcg acc tcg aaa cct cta ttt ctc ggt	96
Pro Ala Glu Ile Ser Ser Pro Ala Thr Ser Lys Pro Leu Phe Leu Gly	
20 25 30	
ggc gca ggg gcg agg ggt ata gaa gtt gga gga aag ttt tta gcc gta	144
Gly Ala Gly Ala Arg Gly Ile Glu Val Gly Gly Lys Phe Leu Ala Val	
35 40 45	
acc gcg atc gga gtg tac ttg gaa gcg gcg gtg att ccg gcg atc gcc	192
Thr Ala Ile Gly Val Tyr Leu Glu Ala Ala Val Ile Pro Ala Ile Ala	
50 55 60	
gga aaa tgg acg ggg aag aag gcg gag aag ctc act gat tcg gtt gac	240
Gly Lys Trp Thr Gly Lys Lys Ala Glu Lys Leu Thr Asp Ser Val Asp	
65 70 75 80	
ttt tac cga gac att att aca ggt tcc ttt gag aag ctg acg aga gtg	288
Phe Tyr Arg Asp Ile Ile Thr Gly Ser Phe Glu Lys Leu Thr Arg Val	
85 90 95	
acg atg ctg ctg cca tta acg ggt caa cag tac tcc gag aag gtc tcc	336
Thr Met Leu Leu Pro Leu Thr Gly Gln Gln Tyr Ser Glu Lys Val Ser	
100 105 110	
ggg aac tgc gtc gcc gca tgg aaa gcc gcc gga gaa tac aca gag gaa	384
Gly Asn Cys Val Ala Ala Trp Lys Ala Ala Gly Glu Tyr Thr Glu Glu	
115 120 125	
gaa gca acg gcc att aat aag ttt ctg gaa atc ttc aag cct aag aac	432
Glu Ala Thr Ala Ile Asn Lys Phe Leu Glu Ile Phe Lys Pro Lys Asn	
130 135 140	
ttt ctt cca ggc acc tcc atc atc ttc act cat tcc cct cat ggc tct	480
Phe Leu Pro Gly Thr Ser Ile Ile Phe Thr His Ser Pro His Gly Ser	
145 150 155 160	
ctc act att gga ttt ttg gag ggg gat ggc gtt cct gtg gct gag act	528
Leu Thr Ile Gly Phe Leu Glu Gly Asp Gly Val Pro Val Ala Glu Thr	
165 170 175	
gat gtg ata gag agc aag aag ctg acg aat gcg gtg ttg gaa tcc att	576
Asp Val Ile Glu Ser Lys Lys Leu Thr Asn Ala Val Leu Glu Ser Ile	
180 185 190	
ata ggg gag aat gga gtt tct ccc gct gcg aaa cag agc ctg gct cgg	624
Ile Gly Glu Asn Gly Val Ser Pro Ala Ala Lys Gln Ser Leu Ala Arg	
195 200 205	

```

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

ggg att ttg gat gtg gag aaa gcc aaa tta gag caa gat gga gtc gtt      720
Gly ile Leu Asp Val Glu Lys Ala Lys Leu Glu Gln Asp Gly Val Val
  225               230               235               240

tga                                                                    723

```

5 <210> 39
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> Variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis* Sogo Vivien x *Doritae nopsi* Sogo Yenlin)
 <400> 39

```

Met Ala Glu Thr Val Ala Thr Pro Ile Glu Val Glu Gly Val Lys Phe
  1               5               10               15

Pro Ala Glu Ile Ser Ser Pro Ala Thr Ser Lys Pro Leu Phe Leu Gly
              20               25               30

Gly Ala Gly Ala Arg Gly Ile Glu Val Gly Gly Lys Phe Leu Ala Val
   35               40               45

Thr Ala Ile Gly Val Tyr Leu Glu Ala Ala Val Ile Pro Ala Ile Ala
   50               55               60

Gly Lys Trp Thr Gly Lys Lys Ala Glu Lys Leu Thr Asp Ser Val Asp
  65               70               75               80

Phe Tyr Arg Asp Ile Ile Thr Gly Ser Phe Glu Lys Leu Thr Arg Val
              85               90               95

Thr Met Leu Leu Pro Leu Thr Gly Gln Gln Tyr Ser Glu Lys Val Ser
      100               105               110

```

10

ES 2 453 377 T3

Gly Asn Cys Val Ala Ala Trp Lys Ala Ala Gly Glu Tyr Thr Glu Glu
 115 120 125
 Glu Ala Thr Ala Ile Asn Lys Phe Leu Glu Ile Phe Lys Pro Lys Asn
 130 135 140
 Phe Leu Pro Gly Thr Ser Ile Ile Phe Thr His Ser Pro His Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Thr Ile Gly Phe Leu Glu Gly Asp Gly Val Pro Val Ala Glu Thr
 165 170 175
 Asp Val Ile Glu Ser Lys Lys Leu Thr Asn Ala Val Leu Glu Ser Ile
 180 185 190
 Ile Gly Glu Asn Gly Val Ser Pro Ala Ala Lys Gln Ser Leu Ala Arg
 195 200 205
 Arg Phe Ser Glu Leu Leu Asn Lys Lys Glu Asp Gln Glu Glu Asp
 210 215 220
 Gly Ile Leu Asp Val Glu Lys Ala Lys Leu Glu Gln Asp Gly Val Val
 225 230 235 240

5 <210> 40
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Cebador F3H-dgF1
 15 <220>
 <221> base modificada
 <222> (2).. (23)
 <223> n (2, 5, 23) = i
 <400> 40
 tnvngayga rgabgarmgb ccnaa 25
 20 <210> 41
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Cebador F3H-dgR1
 <400> 41
 acbgcyggrt grtchgrtt cttraa 26
 30 <210> 42
 <211> 25
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador F3H-dgF3
 5
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (24) .. (24)
 <223> n (24) = i
 10
 <400> 42
 aarytbrgkt tygayatgwc hggng 25
 <210> 43
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Cebador F3H-dgR3
 20
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12) .. (12)
 <223> n(12) = d
 25
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (18) .. (18)
 <223> n(18) = i
 30
 <400> 43
 gghwsracvg tnatccangw btt 23
 35
 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador PhF3H-GSPF1
 <400> 44
 ttctcatacc caatcgggag 20
 45
 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador PhF3H-GSPF2
 <400> 45
 aatcgggagc cgcgattact 20
 55
 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Cebador PhF3H-GSPR1
 65
 <400> 46
 tctgtgtggc gcttcaggcc 20

5
 <210> 47
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

10
 <220>
 <223> Cebador PhF3H-GSPR2

15
 <400> 47
 tgaggtccgg ttgcgggcat ttt 23

20
 <210> 48
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

25
 <220>
 <223> Cebador PhF3H ini.

30
 <400> 48
 atggcccaa taccattcct accga 25

35
 <210> 49
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

40
 <220>
 <223> Cebador PhF3H term.

45
 <400> 49
 ccttaagcta aaatctcatt taatgccttt gctcc 35

50
 <210> 50
 <211> 1113
 <212> ADN
 <213> Variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis* Sogo Vivien x *Doritae nopsis* Sogo Yenlin)

55
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1113)
 <223> Flavanona 3-hidroxilasa variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (PhF3H 1)

60
 <400> 50

atg gcc cca ata cca ttc cta ccg act gcg gtt aca gag aag aca ctg Met Ala Pro Ile Pro Phe Leu Pro Thr Ala Val Thr Glu Lys Thr Leu 1 5 10 15	48
aga gca agc ttt gta cgg gat gag gac gag agg cca aag gta gcc tac Arg Ala Ser Phe Val Arg Asp Glu Asp Glu Arg Pro Lys Val Ala Tyr 20 25 30	96
aac gaa ttc agt aac cag att ccg gtg atc tca ctt cag ggg atc gaa Asn Glu Phe Ser Asn Gln Ile Pro Val Ile Ser Leu Gln Gly Ile Glu 35 40 45	144
gag aat gga gac gga ggt cga agg tcg gag att tgc cgg agt atc gtg Glu Asn Gly Asp Gly Gly Arg Arg Ser Glu Ile Cys Arg Ser Ile Val 50 55 60	192
gca cgc tgc gag gac tgg gga atc ttt cag gcc gtc gac cat ggt gtc Ala Ala Cys Glu Asp Trp Gly Ile Phe Gln Ala Val Asp His Gly Val 65 70 75 80	240
gat gca ggg ctc atc gca gac atg aac cgc ctt gct cga gag ttc ttc Asp Ala Gly Leu Ile Ala Asp Met Asn Arg Leu Ala Arg Glu Phe Phe 85 90 95	288
gat ctg ctg cca gag gag aag ctt cgt ttt gac atg tcc ggc ggg aag Asp Leu Leu Pro Glu Glu Lys Leu Arg Phe Asp Met Ser Gly Gly Lys 100 105 110	336
aaa ggc ggc ttc atc gtt tcc agc cat ctt cag ggt gaa gta gtt caa Lys Gly Gly Phe Ile Val Ser Ser His Leu Gln Gly Glu Val Val Gln 115 120 125	384
gat tgg agg gag atc gtt acc tat ttc tca tac cca atc ggg agc cgc Asp Trp Arg Glu Ile Val Thr Tyr Phe Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Arg 130 135 140	432
gat tac tgc cgg tgg ccg gac aag ccg gag ggg tgg cgc gct gtt gtg Asp Tyr Ser Arg Trp Pro Asp Lys Pro Glu Gly Trp Arg Ala Val Val 145 150 155 160	480
gag gag tac agc gcc aag ctg atg gag ctg gcc tgc aat ctc ctc ggc Glu Glu Tyr Ser Ala Lys Leu Met Glu Leu Ala Cys Asn Leu Leu Gly 165 170 175	528
gtg cta tgc gaa gcc atg gga cta gat cgt gaa gcc cta gcc gga gcc Val Leu Ser Glu Ala Met Gly Leu Asp Arg Glu Ala Leu Ala Gly Ala 180 185 190	576
tgt atc gat atg gac cag aaa ttg gtg gtc aat ttc tac cca aaa tgc Cys Ile Asp Met Asp Gln Lys Leu Val Val Asn Phe Tyr Pro Lys Cys 195 200 205	624
ccg caa ccg gac ctc acc ctg ggc ctg aag cgc cac aca gac ccc ggc Pro Gln Pro Asp Leu Thr Leu Gly Leu Lys Arg His Thr Asp Pro Gly 210 215 220	672

acc att acc ctg ttg ctt caa gat caa gtc ggc ggt ctc caa gcc acc	720
Thr Ile Thr Leu Leu Leu Gln Asp Gln Val Gly Gly Leu Gln Ala Thr	
225 230 235 240	
aag gac gac ggt aaa acc tgg atc acc gtt cag cct gtc cag aat gct	768
Lys Asp Asp Gly Lys Thr Trp Ile Thr Val Gln Pro Val Gln Asn Ala	
245 250 255	
ttc gtc gtt aac ctc ggc gac cac ggt cat tac ctg agc aac ggt cgg	816
Phe Val Val Asn Leu Gly Asp His Gly His Tyr Leu Ser Asn Gly Arg	
260 265 270	
ttt aag aac gcg gac cat cag gcc gtc gtg aac tcg aat tac agc cgg	864
Phe Lys Asn Ala Asp His Gln Ala Val Val Asn Ser Asn Tyr Ser Arg	
275 280 285	
ctt tcg atc gcg gcg ttc cag aac cct gct ccg gaa gcg gtt gtt tac	912
Leu Ser Ile Ala Ala Phe Gln Asn Pro Ala Pro Glu Ala Val Val Tyr	
290 295 300	
ccg cta gcg stg agg gaa gga gag agg ccg gtg atg gag gag gcc atc	960
Pro Leu Ala Val Arg Glu Gly Glu Arg Pro Val Met Glu Glu Gly Ile	
305 310 315 320	
aca ttt gcg gag atg tat agg agg aag atg agc agg gat ctg gag ctg	1008
Thr Phe Ala Glu Met Tyr Arg Arg Lys Met Ser Arg Asp Leu Glu Leu	
325 330 335	
gcc agg tlg aag aag atg gcg aag atg gag agt ggg gag gaa ggg gcc	1056
Ala Arg Leu Lys Lys Met Ala Lys Met Glu Ser Gly Glu Glu Gly Ala	
340 345 350	
gca gga aag act gct gag gtt act gga gca aag gca tta aat gag att	1104
Ala Gly Lys Thr Ala Glu Val Thr Gly Ala Lys Ala Leu Asn Glu Ile	
355 360 365	
tta gct taa	1113
Leu Ala	
370	

<210> 51

<211> 370

<212> PRT

<213> Variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis* Sogo Vivien x *Doritae napsis* Sogo Yenlin)

<400> 51

ES 2 453 377 T3

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

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

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

Glu Asn Gly Asp Gly Gly Arg Arg Ser Glu Ile Cys Arg Ser Ile Val
50 55 60

Ala Ala Cys Glu Asp Trp Gly Ile Phe Gln Ala Val Asp His Gly Val
65 70 75 80

Asp Ala Gly Leu Ile Ala Asp Met Asn Arg Leu Ala Arg Glu Phe Phe
85 90 95

Asp Leu Leu Pro Glu Glu Lys Leu Arg Phe Asp Met Ser Gly Gly Lys
100 105 110

Lys Gly Gly Phe Ile Val Ser Ser His Leu Gln Gly Glu Val Val Gln
115 120 125

Asp Trp Arg Glu Ile Val Thr Tyr Phe Ser Tyr Pro Ile Gly Ser Arg
130 135 140

Asp Tyr Ser Arg Trp Pro Asp Lys Pro Glu Gly Trp Arg Ala Val Val
145 150 155 160

Glu Glu Tyr Ser Ala Lys Leu Met Glu Leu Ala Cys Asn Leu Leu Gly
165 170 175

Val Leu Ser Glu Ala Met Gly Leu Asp Arg Glu Ala Leu Ala Gly Ala
180 185 190

Cys Ile Asp Met Asp Gln Lys Leu Val Val Asn Phe Tyr Pro Lys Cys
195 200 205

Pro Gln Pro Asp Leu Thr Leu Gly Leu Lys Arg His Thr Asp Pro Gly
210 215 220

Thr Ile Thr Leu Leu Leu Gln Asp Gln Val Gly Gly Leu Gln Ala Thr
225 230 235 240

Lys Asp Asp Gly Lys Thr Trp Ile Thr Val Gln Pro Val Gln Asn Ala
245 250 255

Phe Val Val Asn Leu Gly Asp His Gly His Tyr Leu Ser Asn Gly Arg
260 265 270

Phe Lys Asn Ala Asp His Gln Ala Val Val Asn Ser Asn Tyr Ser Arg
275 280 285

Leu Ser Ile Ala Ala Phe Gln Asn Pro Ala Pro Glu Ala Val Val Tyr
290 295 300

Pro Leu Ala Val Arg Glu Gly Glu Arg Pro Val Met Glu Glu Gly Ile
305 310 315 320

Thr Phe Ala Glu Met Tyr Arg Arg Lys Met Ser Arg Asp Leu Glu Leu
325 330 335

Ala Arg Leu Lys Lys Met Ala Lys Met Glu Ser Gly Glu Glu Gly Ala
340 345 350

Ala Gly Lys Thr Ala Glu Val Thr Gly Ala Lys Ala Leu Asn Glu Ile
355 360 365

Leu Ala
370

<210> 52
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador DFRD-F1

<220>
<221> base modificada
<222> (9) .. (12)
<223> n (9, 12) =i

	<400> 52 ttypcaygtng cnacnccnat g	21
5	<210> 53 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador DFRD-R1	
15	<220> <221> base modificada <222> (1) .. (1) <223> n(1) = d	
20	<400> 53 natngcrtcr tcraacatyt c	21
25	<210> 54 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador DFRD-F2	
35	<220> <221> base modificada <222> (15) .. (15) <223> n(15) = i	
40	<400> 54 atgaayttyc arwsnrarga ycc	23
45	<210> 55 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Cebador DFRD-R2	
55	<220> <221> base modificada <222> (4) .. (15) <223> n (4, 10, 15) = i	
60	<400> 55 rcanatrtan ckncnrttng c	21
65	<210> 56 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador DFRD-F3	
	<400> 56 garaaygarg tnatharcc	20
	<210> 57 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	

<220>
 <223> Cebador DFRD-R3

 5 <220>
 <221> base modificada
 <222> (7).. (7)
 <223> n(7) = i

 10 <400> 57
 rtctcnarr tgnacraayt g 21

 <210> 58
 <211> 27
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador PhDFR-F1
 20 <400> 58
 ggtcatgcaa aaggtcgggc agcgtaa 27

 <210> 59
 <211> 29
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador PhDFR-F2
 30 <400> 59
 gtgatcttca catctccgc aggaacagt 29

 <210> 60
 <211> 37
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> Cebador PhDFR-R4

 <400> 60
 atgattcatt aaaaatccga aaaaaagacc actacaa 37
 45 <210> 61
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> Cebador PhDFR-R3

 <400> 61
 aaccatgcat aataaagcag atgtgtaa 30
 55 <210> 62
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Cebador PhDFR-F8A5

 <400> 62
 65 aaaaaatgga ggatgtgagg aagggtcctg tt 32

ES 2 453 377 T3

<210> 63
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Cebador PhDFR-R5

10

<400> 63
 acatgattca ttaaaaatcc gaaaaaaga cca 33

<210> 64
 <211> 1140
 <212> ADN
 <213> Variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis Queen Beer*)

15

<220>
 <221> CDS

20

<222> (1)..(1140)
 <223> Dihidroflavonol-4-reductasa variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (PhDFR)

<400> 64

atg gag gat gtg agg aag ggt cct gtt gtg gtg acg gga gcc agc ggg	48
Met Glu Asp Val Arg Lys Gly Pro Val Val Val Thr Gly Ala Ser Gly	
1 5 10 15	
tac gtg ggt tca tgg ctg gtt atg aag ctt ctt cga aag ggt tat gag	96
Tyr Val Gly Ser Trp Leu Val Met Lys Leu Leu Arg Lys Gly Tyr Glu	
20 25 30	
gtc agg gct aca gtc aga gat cca aca aat tct aaa aaa gtc aag ccg	144
Val Arg Ala Thr Val Arg Asp Pro Thr Asn Ser Lys Lys Val Lys Pro	

25

35	40	45	
ttg ttg gat ctt ccg ggc tgc aat gaa ctg ctc agc ata tgg aaa gca			192
Leu Leu Asp Leu Pro Gly Ser Asn Glu Leu Leu Ser Ile Trp Lys Ala			
50	55	60	
gat cta aat gac att gaa ggg agc ttc gat gag gtg ata cgt ggt tct			240
Asp Leu Asn Asp Ile Glu Gly Ser Phe Asp Glu Val Ile Arg Gly Cys			
65	70	75	80
gtt ggg gtg ttc cat gtc gct act ccc atg aat ttt caa tcc aaa gac			288
Val Gly Val Phe His Val Ala Thr Pro Met Asn Phe Gln Ser Lys Asp			
85	90	95	
cct gag aac gaa gtg ata caa ccg gca atc aac ggt ttg ctg agc atc			336
Pro Glu Asn Glu Val Ile Gln Pro Ala Ile Asn Gly Leu Leu Ser Ile			
100	105	110	
ctg agg tca tgc aaa agg tgc ggc agc gta agg cgc gtg atc ttc aca			384
Leu Arg Ser Cys Lys Arg Ser Gly Ser Val Arg Arg Val Ile Phe Thr			
115	120	125	
tct tcc gca gga aca gtc aac gtg gag gaa cgc cga gca ccg gtg tac			432
Ser Ser Ala Gly Thr Val Asn Val Glu Glu Arg Arg Ala Pro Val Tyr			
130	135	140	
gac gag agc tcc tgg agc gac ctc gat ttc atc acc cgt gtc aaa atg			480
Asp Glu Ser Ser Trp Ser Asp Leu Asp Phe Ile Thr Arg Val Lys Met			
145	150	155	160
acc ggt tgg atg tac ttc gta tca aaa aca ctt gcg gag aag gct gct			528
Thr Gly Trp Met Tyr Phe Val Ser Lys Thr Leu Ala Glu Lys Ala Ala			
165	170	175	
tgg gag ttt gtg aaa gaa aat gac gtt gat ttt ata gcc ata att ccc			576
Trp Glu Phe Val Lys Glu Asn Asp Val Asp Phe Ile Ala Ile Ile Pro			
180	185	190	
act ttg gtg gtg ggt tcc ttc ata aca gat gag atg ccg cca agt ttg			624
Thr Leu Val Val Gly Ser Phe Ile Thr Asp Glu Met Pro Pro Ser Leu			
195	200	205	
acc act gca ttt tca tta att aca gga aat gaa gct cat tac tgc ata			672
Thr Thr Ala Phe Ser Leu Ile Thr Gly Asn Glu Ala His Tyr Ser Ile			
210	215	220	
ata aag caa gct caa ttt gtt cat ttg gat gac tta tgt gat gct cat			720
Ile Lys Gln Ala Gln Phe Val His Leu Asp Asp Leu Cys Asp Ala His			

225	230	235	240	
att ttc ctt ttc gaa cat ccc gaa gca aat ggt agg tac att tgt tct				768
Ile Phe Leu Phe Glu His Pro Glu Ala Asn Gly Arg Tyr Ile Cys Ser				
	245	250	255	
tca cat gat tgg aca att tat gac ttg gca aaa atg ctg aag aag aga				816
Ser His Asp Ser Thr Ile Tyr Asp Leu Ala Lys Met Leu Lys Lys Arg				
	260	265	270	
tat gcc aca tat gcc ata cct caa gag ttt aaa gat att gat cca aat				864
Tyr Ala Thr Tyr Ala Ile Pro Gln Glu Phe Lys Asp Ile Asp Pro Asn				
	275	280	285	
att aag aga gtg agt ttc tct tct aag aag ttc atg gac ttg ggg ttc				912
Ile Lys Arg Val Ser Phe Ser Ser Lys Lys Phe Met Asp Leu Gly Phe				
	290	295	300	
aag tac aag tac act att gag gag atg ttt gat gat gct att aag acc				960
Lys Tyr Lys Tyr Thr Ile Glu Glu Met Phe Asp Asp Ala Ile Lys Thr				
	305	310	315	320
tgc agg gaa aag aat ctc tta ccg ccc aac act gag gaa cca gcc tta				1008
Cys Arg Glu Lys Asn Leu Leu Pro Pro Asn Thr Glu Glu Pro Ala Leu				
	325	330	335	
ctt gcc gaa aag tac gaa gaa atg aaa gaa caa ttg cag tta agt gaa				1056
Leu Ala Glu Lys Tyr Glu Glu Met Lys Glu Gln Leu Gln Leu Ser Glu				
	340	345	350	
aga aga atg aga agt ttg aaa att ctt tat gtt atc ctt tta ttt aca				1104
Arg Arg Met Arg Ser Leu Lys Ile Leu Tyr Val Ile Leu Leu Phe Thr				
	355	360	365	
cat ctg ctt tat tat gca tgg tta tat ctt gac tga				1140
His Leu Leu Tyr Tyr Ala Trp Leu Tyr Leu Asp				
	370	375		

<210> 65

<211> 379

5 <212> PRT

<213> Variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis* Queen Beer)

<400> 65

10

Met	Glu	Asp	Val	Arg	Lys	Gly	Pro	Val	Val	Val	Thr	Gly	Ala	Ser	Gly
1				5					10					15	

Tyr Val Gly Ser Trp Leu Val Met Lys Leu Leu Arg Lys Gly Tyr Glu
20 25 30

Val Arg Ala Thr Val Arg Asp Pro Thr Asn Ser Lys Lys Val Lys Pro
35 40 45

Leu Leu Asp Leu Pro Gly Ser Asn Glu Leu Leu Ser Ile Trp Lys Ala
50 55 60

Asp Leu Asn Asp Ile Glu Gly Ser Phe Asp Glu Val Ile Arg Gly Cys
65 70 75 80

Val Gly Val Phe His Val Ala Thr Pro Met Asn Phe Gln Ser Lys Asp
85 90 95

Pro Glu Asn Glu Val Ile Gln Pro Ala Ile Asn Gly Leu Leu Ser Ile
100 105 110

Leu Arg Ser Cys Lys Arg Ser Gly Ser Val Arg Arg Val Ile Phe Thr
115 120 125

Ser Ser Ala Gly Thr Val Asn Val Glu Glu Arg Arg Ala Pro Val Tyr
130 135 140

Asp Glu Ser Ser Trp Ser Asp Leu Asp Phe Ile Thr Arg Val Lys Met
145 150 155 160

Thr Gly Trp Met Tyr Phe Val Ser Lys Thr Leu Ala Glu Lys Ala Ala
165 170 175

Trp Glu Phe Val Lys Glu Asn Asp Val Asp Phe Ile Ala Ile Ile Pro
180 185 190

Thr Leu Val Val Gly Ser Phe Ile Thr Asp Glu Met Pro Pro Ser Leu
195 200 205

Thr Thr Ala Phe Ser Leu Ile Thr Gly Asn Glu Ala His Tyr Ser Ile
 210 215 220
 Ile Lys Gln Ala Gln Phe Val His Leu Asp Asp Leu Cys Asp Ala His
 225 230 235 240
 Ile Phe Leu Phe Glu His Pro Glu Ala Asn Gly Arg Tyr Ile Cys Ser
 245 250 255
 Ser His Asp Ser Thr Ile Tyr Asp Leu Ala Lys Met Leu Lys Lys Arg
 260 265 270
 Tyr Ala Thr Tyr Ala Ile Pro Gln Glu Phe Lys Asp Ile Asp Pro Asn
 275 280 285
 Ile Lys Arg Val Ser Phe Ser Ser Lys Lys Phe Met Asp Leu Gly Phe
 290 295 300
 Lys Tyr Lys Tyr Thr Ile Glu Glu Met Phe Asp Asp Ala Ile Lys Thr
 305 310 315 320
 Cys Arg Glu Lys Asn Leu Leu Pro Pro Asn Thr Glu Glu Pro Ala Leu
 325 330 335
 Leu Ala Glu Lys Tyr Glu Glu Met Lys Glu Gln Leu Gln Leu Ser Glu
 340 345 350
 Arg Arg Met Arg Ser Leu Lys Ile Leu Tyr Val Ile Leu Leu Phe Thr
 355 360 365
 His Leu Leu Tyr Tyr Ala Trp Leu Tyr Leu Asp
 370 375

<210> 66
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador ANS-dgF2

<220>
 <221> base modificada
 <222> (2) .. (26)
 <223> n (2, 14, 23, 26) = i

<400> 66
 tncarggbta yggnagyarr ytnqcnrmya 30

<210> 67

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Cebador ANS-dgR2

10 <220>
 <221> base modificada
 <222> (12) .. (21)
 <223> n (12, 15, 21) = i

15 <400> 67
 ggytcrara anaynrccca ngada 25

20 <210> 68
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Cebador PhANS3RACEGSP1

25 <400> 68
 gccacaccg acgtcagctc cctctcct 28

30 <210> 69
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Cebador PhANS3RACEGSP2

35 <400> 69
 cgtcggggat gcgctcgaga tcctcagc 28

40 <210> 70
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador PhANS5RACEGSP1

45 <400> 70
 agtccgcggg ttcagtcggc cagatggt 28

50 <210> 71
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Cebador PhANS5RACEGSP2

55 <400> 71
 ccgtcttctc cggcgggtag acgagggtg 28

60 <210> 72
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> Cebador PhANS ini.

<400> 72
 atggccacca aagcaatccc acc 23

 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador PHANS term.

 <400> 73
 tcaatccaca ggcgccttct 20

 <210> 74
 <211> 1083
 <212> ADN
 <213> Variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis* Sogo Vivien x *Doritae nopsis* Sogo Yenlin)

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1083)
 <223> Antocianidina sintasa variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (PHANS 1)

 <400> 74

atg gcc acc aaa gca atc cca cct act cca aga gtg gag atc ctc gca	48
Met Ala Thr Lys Ala Ile Pro Pro Thr Pro Arg Val Glu Ile Leu Ala	
1 5 10 15	
aac agc ggc ctc agc ttc atc ccc gcc gag ttc gtc cgc cca caa tct	96
Asn Ser Gly Leu Ser Phe Ile Pro Ala Glu Phe Val Arg Pro Gln Ser	
20 25 30	
gaa cgc caa cac ctc caa gac tcc ctc aac aag aac ccc tgc ggt gtt	144
Glu Arg Gln His Leu Gln Asp Ser Leu Asn Lys Asn Pro Cys Gly Val	
35 40 45	
gag atc cca atc gtg gat ctc ggg ggg ttc tca tca gag gaa ggg cgg	192
Glu Ile Pro Ile Val Asp Leu Gly Gly Phe Ser Ser Glu Glu Gly Arg	
50 55 60	
cgg cgg cgg tgc gtg gag gag gtg atg gca gct gca gag gag tgg ggg	240
Arg Arg Arg Cys Val Glu Glu Val Met Ala Ala Ala Glu Glu Trp Gly	
65 70 75 80	
gtg atg ttc ctc gtg aac cac ggt gtg ccg gag gag ctc att gag cgg	288
Val Met Phe Leu Val Asn His Gly Val Pro Glu Glu Leu Ile Glu Arg	
85 90 95	
ctg cag gcg acg ggg aag ggg ttc ttc gaa ttg ccg gtg gac gag aag	336
Leu Gln Ala Thr Gly Lys Gly Phe Phe Glu Leu Pro Val Asp Glu Lys	
100 105 110	

gag aag tat gct aat gat cag tca agg gga cag ata cag ggc tat ggg Glu Lys Tyr Ala Asn Asp Gln Ser Arg Gly Gln Ile Gln Gly Tyr Gly 115 120 125	384
agc aag cta gca aat aat gaa aac ggt ata ctt gag tgg cag gat tac Ser Lys Leu Ala Asn Asn Glu Asn Gly Ile Leu Glu Trp Gln Asp Tyr 130 135 140	432
ttt ttt cac ctc gtc tac ccg ccg gag aag acg gac ctc acc atc tgg Phe Phe His Leu Val Tyr Pro Pro Glu Lys Thr Asp Leu Thr Ile Trp 145 150 155 160	480
ccg act gaa ccc gcg gac tac att gcg acc aca acc tcg ttc gcc aag Pro Thr Glu Pro Ala Asp Tyr Ile Ala Thr Thr Thr Ser Phe Ala Lys 165 170 175	528
gag ctc cga acc cta gcc tca aaa atg ttc tcc ata ctc tcc ctc ggt Glu Leu Arg Thr Leu Ala Ser Lys Met Phe Ser Ile Leu Ser Leu Gly 180 185 190	576
ctc ggc ctc gac caa aac aag ctc gaa gct gag ctc ggc ggc caa gac Leu Gly Leu Asp Gln Asn Lys Leu Glu Ala Glu Leu Gly Gly Gln Asp 195 200 205	624
gac ctc ctc ctc cag ctt aag atc aat tac tac ccg ccc tgc ccg cag Asp Leu Leu Leu Gln Leu Lys Ile Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Gln 210 215 220	672
ccg gag ctg gcc ctc ggc gtc gag gcc cac acc gac gtc agc tcc ctc Pro Glu Leu Ala Leu Gly Val Glu Ala His Thr Asp Val Ser Ser Leu 225 230 235 240	720
tcc ttc atc ctt cac aac ggg atc ccc ggc ctc cag gtc ttc aag aac Ser Phe Ile Leu His Asn Gly Ile Pro Gly Leu Gln Val Phe Lys Asn 245 250 255	768
ggc gcc ggc tgg atc acc gct ccc ctc gtc cca aac tcg atc atc gtt Gly Ala Gly Trp Ile Thr Ala Pro Leu Val Pro Asn Ser Ile Ile Val 260 265 270	816
cac gtc ggg gat gcg ctc gag atc ctc agc aat ggg agg tgc cac agc His Val Gly Asp Ala Leu Glu Ile Leu Ser Asn Gly Arg Cys His Ser 275 280 285	864
gtt ctt cac cga gga ctt gtt act aag gaa aat gtt cgg atc tcg tgg Val Leu His Arg Gly Leu Val Thr Lys Glu Asn Val Arg Ile Ser Trp 290 295 300	912

```

gcg gtt ttc tgc gag ccg ccg agg gag aag gtc gtc ctt ccg ccg ctg      960
Ala Val Phe Cys Glu Pro Pro Arg Glu Lys Val Val Leu Arg Pro Leu
305                      310                      315                      320

ctg gag ttg att ggg aag ggg gag gtc gcg agg ttt gag ccg ccg act      1008
Leu Glu Leu Ile Gly Lys Gly Glu Val Ala Arg Phe Glu Pro Arg Thr
                      325                      330                      335

ttt gcg gag cat ttg gag agg aag ctg ttc aag ccg agg gtc gag ggt      1056
Phe Ala Glu His Leu Glu Arg Lys Leu Phe Lys Pro Arg Val Glu Gly
                      340                      345                      350

tgc ggg gag aag gcg cct gtc gat tga                                  1083
Cys Gly Glu Lys Ala Pro Val Asp
                      355                      360

```

<210> 75

<211> 360

<212> PRT

<213> Variedad de cultivo híbrida de *Doritaenopsis* (*Doritaenopsis Sogo Vivien x Doritae nopsis Sogo Yenlin*)

<400> 75

```

Met Ala Thr Lys Ala Ile Pro Pro Thr Pro Arg Val Glu Ile Leu Ala
1                      5                      10                      15

Asn Ser Gly Leu Ser Phe Ile Pro Ala Glu Phe Val Arg Pro Gln Ser
                      20                      25                      30

Glu Arg Gln His Leu Gln Asp Ser Leu Asn Lys Asn Pro Cys Gly Val
                      35                      40                      45

Glu Ile Pro Ile Val Asp Leu Gly Gly Phe Ser Ser Glu Glu Gly Arg
50                      55                      60

Arg Arg Arg Cys Val Glu Glu Val Met Ala Ala Ala Glu Glu Trp Gly
65                      70                      75                      80

Val Met Phe Leu Val Asn His Gly Val Pro Glu Glu Leu Ile Glu Arg
                      85                      90                      95

```

Leu Gln Ala Thr Gly Lys Gly Phe Phe Glu Leu Pro Val Asp Glu Lys
100 105 110

Glu Lys Tyr Ala Asn Asp Gln Ser Arg Gly Gln Ile Gln Gly Tyr Gly
115 120 125

Ser Lys Leu Ala Asn Asn Glu Asn Gly Ile Leu Glu Trp Gln Asp Tyr
130 135 140

Phe Phe His Leu Val Tyr Pro Pro Glu Lys Thr Asp Leu Thr Ile Trp
145 150 155 160

Pro Thr Glu Pro Ala Asp Tyr Ile Ala Thr Thr Thr Ser Phe Ala Lys
165 170 175

Glu Leu Arg Thr Leu Ala Ser Lys Met Phe Ser Ile Leu Ser Leu Gly
180 185 190

Leu Gly Leu Asp Gln Asn Lys Leu Glu Ala Glu Leu Gly Gly Gln Asp
195 200 205

Asp Leu Leu Leu Gln Leu Lys Ile Asn Tyr Tyr Pro Pro Cys Pro Gln
210 215 220

Pro Glu Leu Ala Leu Gly Val Glu Ala His Thr Asp Val Ser Ser Leu
225 230 235 240

Ser Phe Ile Leu His Asn Gly Ile Pro Gly Leu Gln Val Phe Lys Asn
245 250 255

Gly Ala Gly Trp Ile Thr Ala Pro Leu Val Pro Asn Ser Ile Ile Val
260 265 270

His Val Gly Asp Ala Leu Glu Ile Leu Ser Asn Gly Arg Cys His Ser
275 280 285

ES 2 453 377 T3

Val Leu His Arg Gly Leu Val Thr Lys Glu Asn Val Arg Ile Ser Trp
290 295 300

Ala Val Phe Cys Glu Pro Pro Arg Glu Lys Val Val Leu Arg Pro Leu
305 310 315 320

Leu Glu Leu Ile Gly Lys Gly Glu Val Ala Arg Phe Glu Pro Arg Thr
325 330 335

Phe Ala Glu His Leu Glu Arg Lys Leu Phe Lys Pro Arg Val Glu Gly
340 345 350

Cys Gly Glu Lys Ala Pro Val Asp
355 360

5 <210> 76
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador GerDFR-F

<400> 76
atggaagagg attctcggc 20

15 <210> 77
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador GerDFR-R

<400> 77
ctattggcct tctttgaac aacaaa 26

25 <210> 78
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cebador GerANS-F

<400> 78
atggtgattc aagcaaccac a 21

35 <210> 79
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador GerANS-R

<400> 79
ctagttttgc atcacttcgt ctttat 26

45

5 <210> 80
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador TorDFR-F
 10 <400> 80
 atgagcatgg aagtagtagt acca 24
 <210> 81
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador TorDFR-R
 20 <400> 81
 ctattctatc ttatgttctc catgg 25
 <210> 82
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador TorANS-F
 30 <400> 82
 atggtttctc cagcatctcc ga 22
 <210> 83
 <211> 27
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Cebador TorANS-R
 <400> 83
 tcactcaaca ctctatcat catgctc 27
 45 <210> 84
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador AtFT 2nd-F
 <400> 84
 55 gaaaccacct gttgttcaa ga 22
 <210> 85
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador AtFT 2nd-R
 65 <400> 85
 tcaattggtt ataaaggaag aagc 24

ES 2 453 377 T3

5 <210> 86
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador PhCHS3-1038F

10 <400> 86
 gtaacatgtc gagcgcttgc gttctttca tactcg 36

 <210> 87
 <211> 36
15 <212> ADN
 <213> Artificial

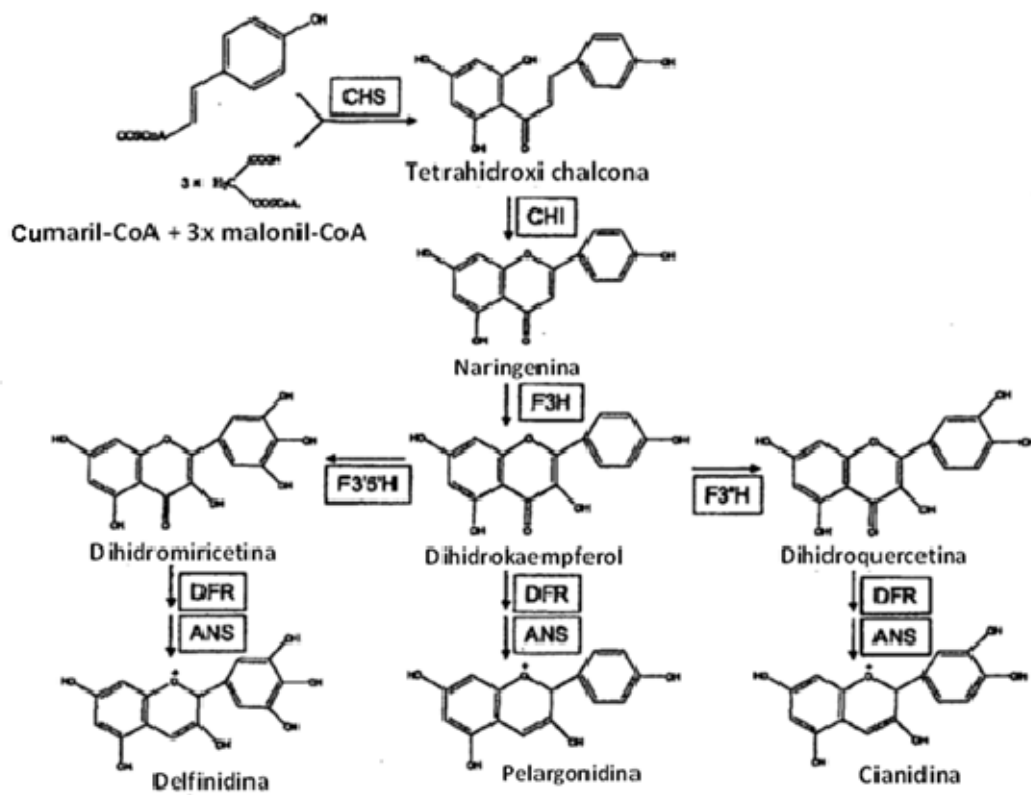
 <220>
 <223> Cebador PhCHS3-1073R

20 <400> 87
 cgagtatgaa aagaacgcaa gcgctcgaca tgttac 36

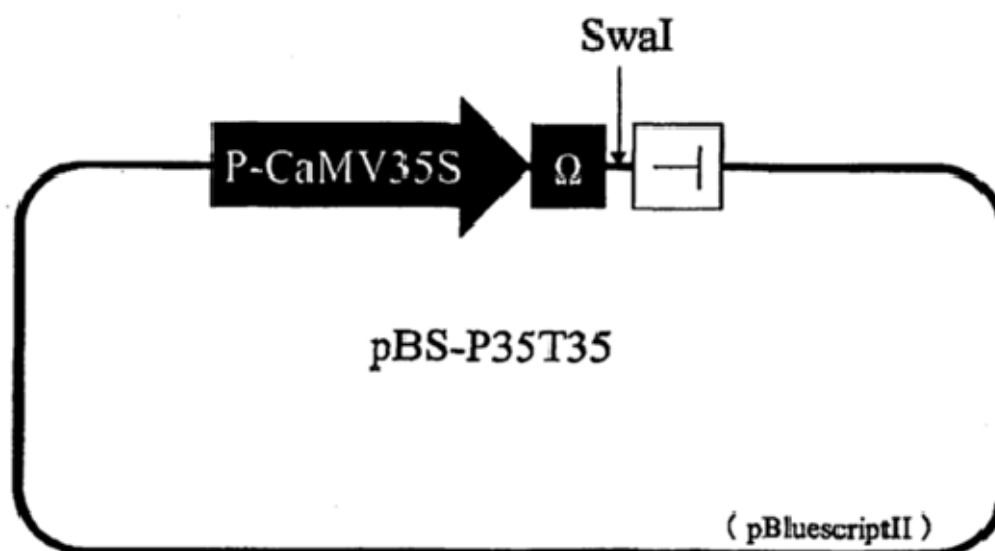
REIVINDICACIONES

1. Un gen que codifica una flavonoide 3',5'- hidroxilasa de *Commelina communis*, que comprende una secuencia aminoacídica representada en la SEC ID N° 2 o una secuencia aminoacídica que tenga al menos un 90% de homología con la secuencia aminoacídica representada en la SEC ID N° 2.
5
2. Un vector que contiene el gen que se define en la Reivindicación 1.
3. Un procedimiento para producir una planta con el color de las flores cambiado, que comprende transfectar una orquídea mariposa roja con el gen que se define en la Reivindicación 1 y la expresión del gen.
10
4. Un procedimiento para producir una planta de la familia de las *Orquídeas* que tiene una flor azul, que comprende transfectar una planta de la familia de las *Orquídeas* que tiene una flor blanca con el gen que se define en la Reivindicación 1; un gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa de *Torenia* o *Gerbera*; un gen que codifica una flavanona 3-hidroxilasa; y un gen que codifica una antocianidin sintasa y la expresión de los genes.
15
5. El procedimiento para producir una planta de la familia de las *Orquídeas* que tiene una flor azul de acuerdo con la Reivindicación 4, en la que la planta de la familia de las *Orquídeas* es una orquídea mariposa o un cymbidium.
- 20 6. Una planta de la familia de las *Orquídeas* con el color de las flores cambiado que tiene el gen que se define en la Reivindicación 1.
7. La planta de la familia de las *Orquídeas* de acuerdo con la Reivindicación 6, que es una orquídea mariposa o un cymbidium.
25
8. La planta de la familia de las *Orquídeas* con el color de las flores cambiado de acuerdo con la Reivindicación 7, que se ha transfectado con un gen que codifica una dihidroflavonol 4-reductasa de *Torenia* o *Gerbera*.
- 30 9. La planta de la familia de las *Orquídeas* de acuerdo con la Reivindicación 8, teniendo dicha planta una flor azul y que además se ha transfectado con un gen que codifica una flavanona 3-hidroxilasa derivado de una orquídea mariposa y un gen que codifica una antocianidin sintasa derivada de una orquídea mariposa, *Torenia* o *Gerbera*.

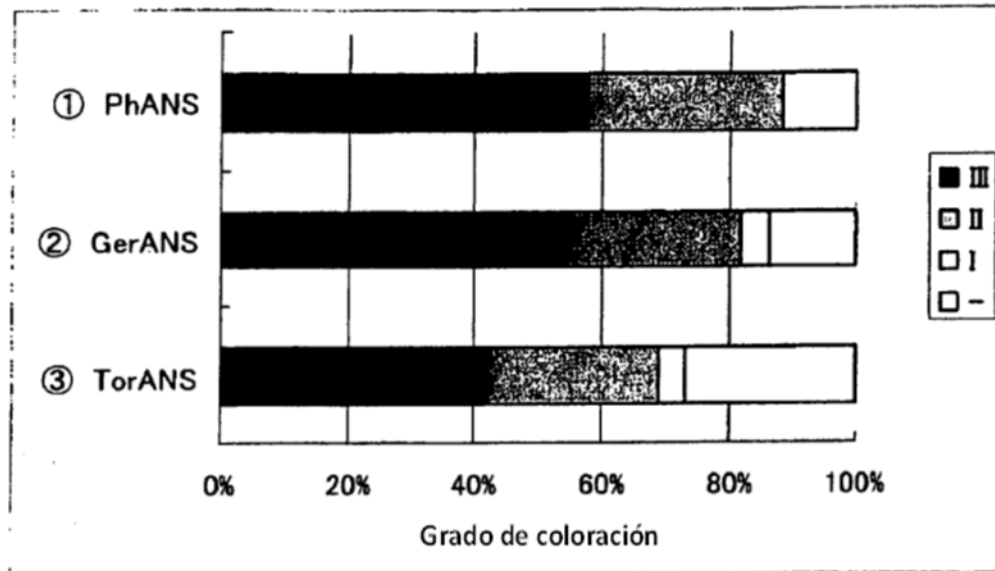
F i g.1



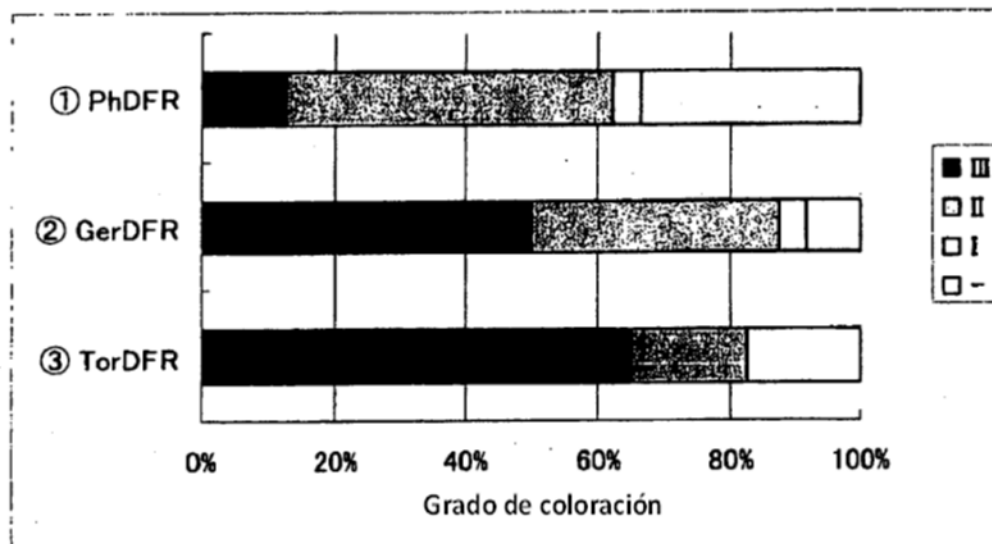
F i g.2



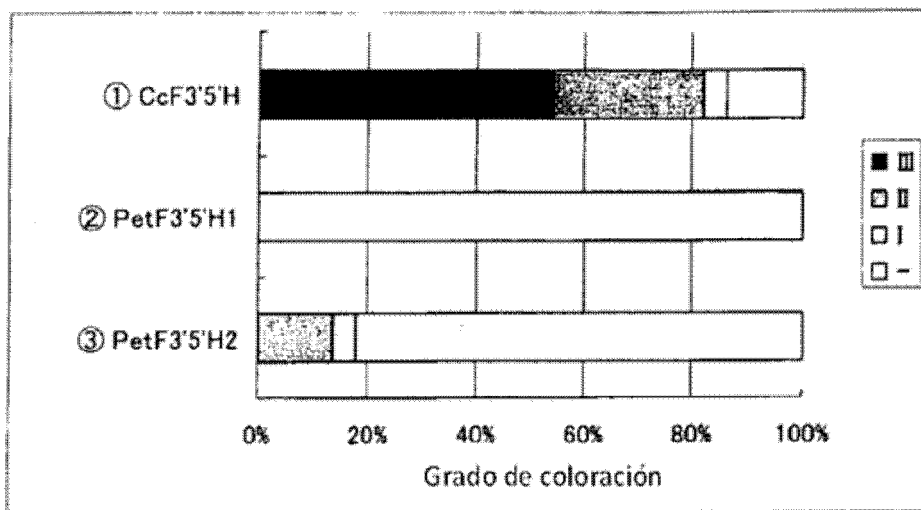
F i g.3



F i g.4



F i g.5



F i g.6

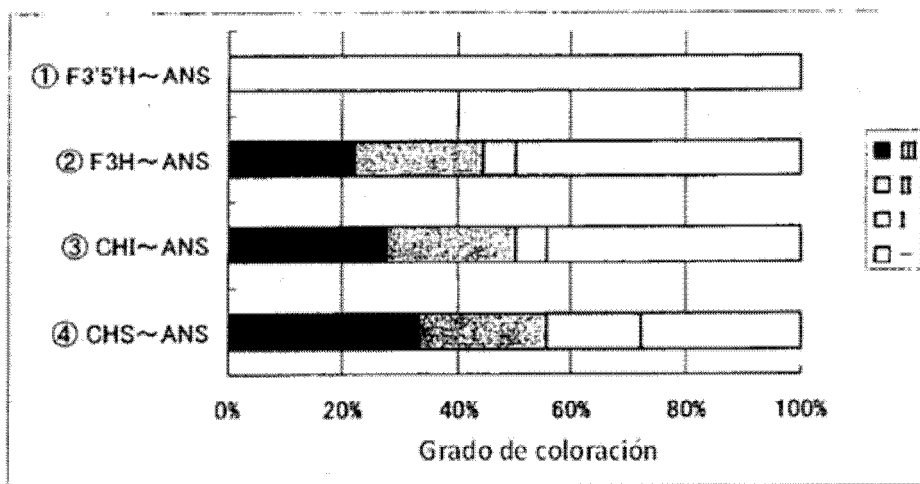
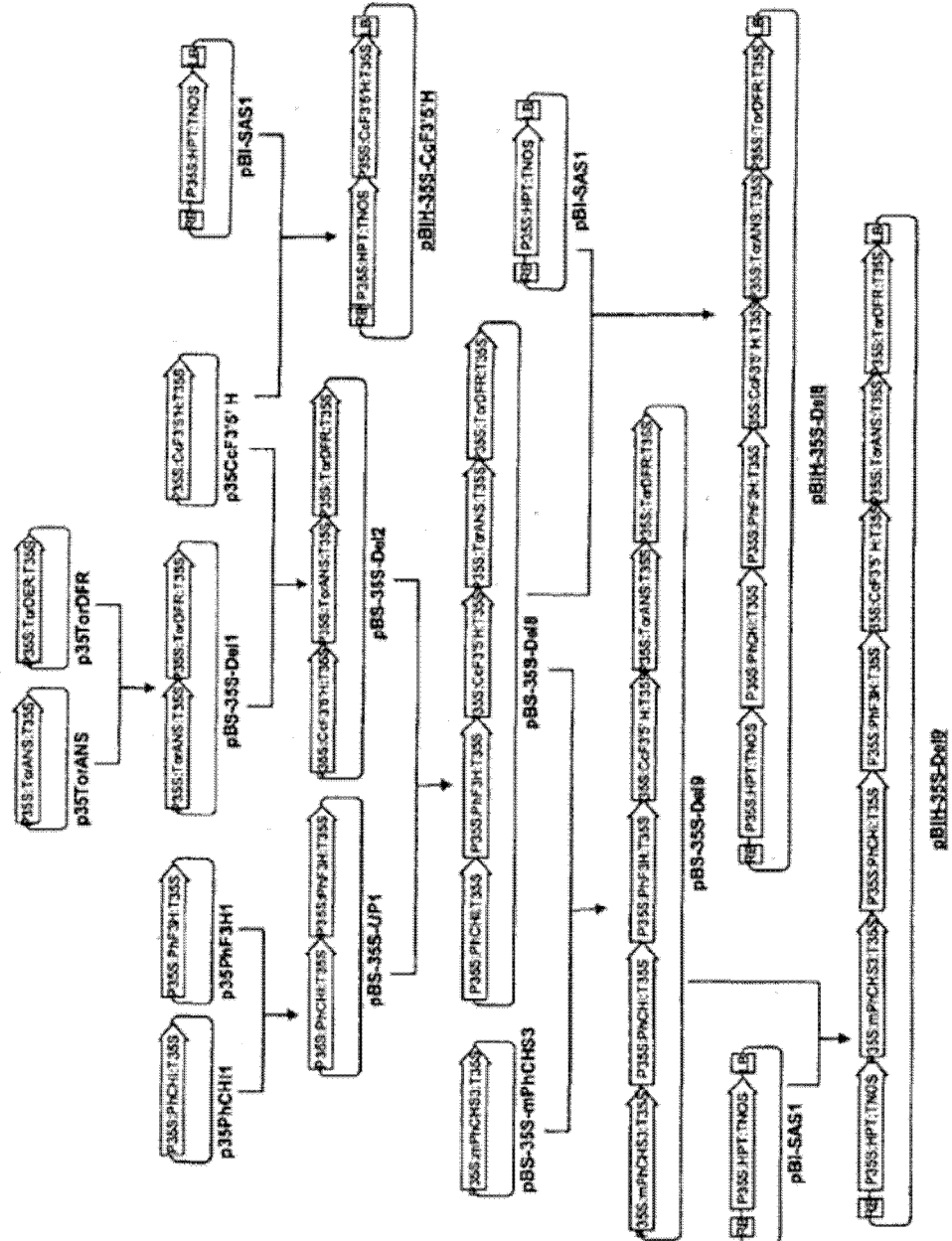
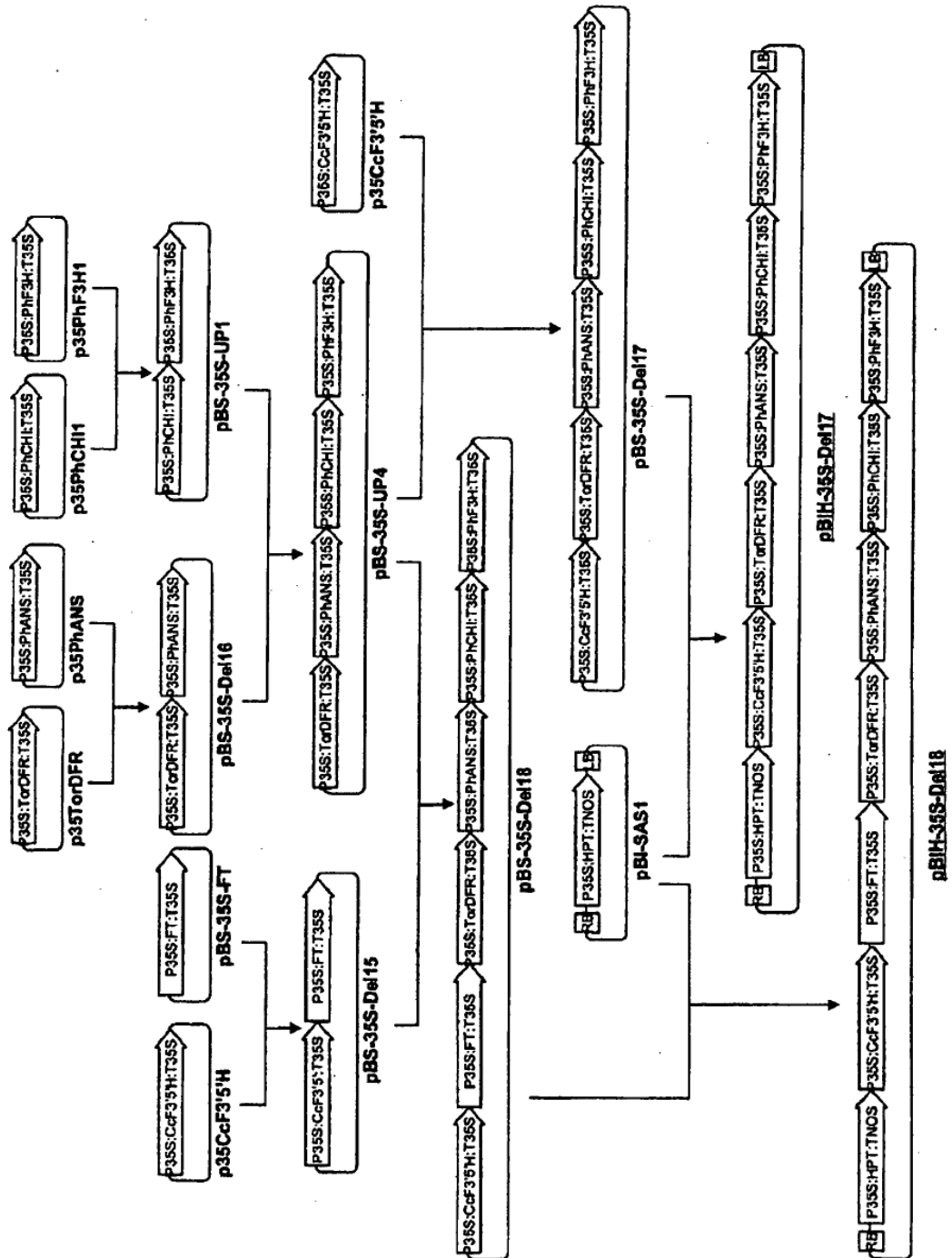


Fig.7



Figs 8



F i g.9

