



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 770**

51 Int. Cl.:
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06015652 .8**
96 Fecha de presentación : **28.01.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1726653**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.11.2006**

54 Título: **Genes que codifican sintasas de flavonas.**

30 Prioridad: **29.01.1999 JP 11-22427**
19.07.1999 JP 11-205229

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.06.2009

73 Titular/es: **International Flower Developments
Proprietary Limited**
1 Park Drive
Bundoora, Victoria 3083, AU

72 Inventor/es: **Mizutani, Masako;**
Tanaka, Yoshikazu;
Kusumi, Takaaki;
Ayabe, Shin-ichi y
Akashi, Tomoyoshi

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Genes que codifican sintasas de flavonas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al control y a la utilización de la biosíntesis de flavonas, que tienen efectos sobre el color de las flores, la protección de los rayos ultravioletas, la simbiosis con microorganismos, etc. en plantas, mediante una técnica de ingeniería genética. Más específicamente, se refiere a genes que codifican proteínas con actividad para sintetizar flavonas a partir de flavanonas, y a su utilización.

Antecedentes de la técnica

La abundancia de los diferentes colores en las flores es uno de los aspectos agradables de la vida que enriquece las mentes y los corazones humanos. Se espera que aumente la producción de alimentos para satisfacer el futuro aumento demográfico por medio de la aceleración del crecimiento de plantas por la simbiosis con microorganismos, o aumentando el número de bacterias de leguminosas que fijan nitrógeno, mejorándose así la productividad de las plantas como consecuencia del aumento del contenido de nitrógeno en el suelo. La eliminación o la reducción del uso de sustancias químicas agrícolas es también deseable para lograr una agricultura más ecológica, y esto requiere la mejora del suelo por los medios biológicos anteriormente mencionados, así como una resistencia más alta de las plantas contra la infección microbiana. Otro objetivo deseado es obtener plantas con altas funciones protectoras contra los rayos ultravioletas como medio para proteger las plantas de la destrucción de la capa de ozono.

“Flavonoide” es un término general para un grupo de compuestos con la estructura carbonada C6-C3-C6, y que están extensamente distribuidos en todas las partes de las células de las plantas. Se sabe que los flavonoides tienen funciones tales como la atracción de insectos y otros polinizadores, la protección de la planta de los rayos ultravioletas, y la participación en la interacción con los microorganismos del suelo (*BioEssays*, 16 (1994), Koes *et al.*, pág. 123; *Trends in Plant Science*, 1 (1997), Shirley, B.W., pág. 377).

De los flavonoides, las flavonas juegan un papel importante en la interacción de las plantas con los microorganismos, especialmente en las legumbres, en las que participan en las etapas iniciales de la simbiosis con las bacterias de las leguminosas (*Plant Cell*, 7 (1995), Dixon y Paiva, pág. 1085; *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33 (1995), Spaink, pág. 345). Las flavonas en los pétalos desempeñan un papel en el reconocimiento por los insectos y actúan como copigmentos que forman complejos con las antocianinas. (Gendai Kagaku, (mayo de 1998), Honda y Saito, pág. 25; *Prog. Chem. Org. Natl. Prod.*, 52 (1987), Goto, T., pág. 114). Se sabe que cuando la flavona forma un complejo con la antocianina, el máximo de la absorción de la antocianina se desplaza hacia longitudes de onda más altas, es decir, hacia el azul.

Las rutas de la biosíntesis para los flavonoides han sido ampliamente estudiadas (*Plant Cell*, 7 (1995), Holton y Cornish, pág. 1071), y los genes para todas las enzimas implicadas en la biosíntesis de antocianidina 3-glucósido y flavonol, por ejemplo, han sido aislados. Sin embargo, los genes implicados en la biosíntesis de las flavonas aún no han sido aislados. Las enzimas que sintetizan flavonas incluyen las que pertenecen a la familia de la dioxigenasa que depende del ácido 2-oxoglutarico (flavona sintasa I) y las enzimas monoxigenasas que pertenecen a la familia del citocromo P450 (flavona sintasa II). Estos grupos de enzimas son enzimas completamente diferentes sin ninguna homología estructural.

Se ha informado que en el perejil, la dioxigenasa dependiente del ácido 2-oxoglutarico cataliza una reacción que produce apigenina, una flavona, a partir de la naringenina, una flavanona (*Z. Naturforsch.*, 36c (1981), Britsch *et al.*, pág. 742; *Arch. Biochem. Biophys.*, 282 (1990), Britsch, pág. 152). Se conocen otros tipos, la flavona sintasa II, que existen en el dragón (*Z. Naturforsch.*, 36c (1981), Stotz y Forkmann, pág. 737) y la soja (*Z. Naturforsch.*, 42c (1987), Koch y Grisebach, pág. 343; *Planta*, 171 (1987), Koch *et al.*, pág. 519). Se ha publicado recientemente una correlación entre un locus génico y la actividad de la flavona sintasa II en los pétalos de la gerbera (*Phytochemistry*, 49 (1998), Martens y Forkmann, pág. 1953). Sin embargo, no hay ninguna publicación en la que los genes para estas flavona sintasa I y II fueran aislados o en la que la flavona sintasa II fuera altamente purificada.

Fueron investigadas las propiedades de una proteína citocromo P450, que tenía actividad de síntesis de licodiona que fue inducida cuando células cultivadas de regaliz (*Glycyrrhiza echinata*) fueron tratadas con un elicitor. La proteína, según se piensa, cataliza la hidroxilación de la posición 2 de liquiritigenina que es una 5-desoxiflavanona, seguido de la apertura del anillo hemiacetal no enzimático para producir licodiona (*Plant Physiol.*, 105 (1994), Otani *et al.*, pág. 1427). Para la clonación de licodiona sintasa, fue preparada una genoteca de cADN a partir de células cultivadas de *Glycyrrhiza* tratadas con elicitor, y fueron clonados 8 fragmentos génicos que codificaban la citocromo P450 (*Plant Science*, 126 (1997), Akashi *et al.*, pág. 39).

A partir de estos fragmentos fueron obtenidas dos secuencias de cADN diferentes de cadena entera, cada una codificando una citocromo P450, que habían sido desconocidas hasta aquel tiempo. Específicamente, eran CYPGe-3 (la citocromo P450 N° CYP81E1) y CYPGE-5 (la citocromo P450 N° CYP93B1, en lo sucesivo en este documento indicada como la CYP93B1) (*Plant Physiol.*, 115 (1997), Akashi *et al.*, pág. 1288). Mediante la expresión posterior del cADN de CYP93B1 en un sistema que usaba células de insecto cultivadas, se mostró que la proteína derivada del

gen catalizaba la reacción que sintetizaba la licodiona a partir de liquiritigenina, una flavanona, y 2-hidroxinaringenina a partir de naringenina, también una flavanona.

La 2-hidroxinaringenina fue convertida a apigenina, una flavona, por tratamiento ácido con ácido clorhídrico del 10% (temperatura ambiente, 2 horas). También, el eriodictiol fue convertida a luteolina, una flavona, por la reacción de eriodictiol con microsomas de levadura que expresaba CYP93B1 seguido de tratamiento ácido. Por lo tanto, fue demostrado que el gen de citocromo P450 codifica la función de la actividad de la flavanona 2-hidroxilasa (*FEBS Lett.*, 431 (1998), Akashi *et al.*, pág. 287). En esta invención, la producción de apigenina a partir de la naringenina requirió CYP93B1 así como otra enzima desconocida, de modo que fue concluido que un total de dos enzimas eran necesarias.

Sin embargo, ningún gen ha sido identificado aún para enzimas con actividad de síntesis de flavonas (tal como la apigenina) directamente a partir de flavanonas (tal como la naringenina) sin tratamiento ácido. Así, a pesar del hecho de que las flavonas tienen numerosas funciones en plantas, ninguna técnica ha sido publicada aún que controle su biosíntesis en plantas, y que mejore las biofunciones en las que las flavonas están implicadas, tal como el color de la flor. El descubrimiento de una enzima que por sí misma pueda lograr la síntesis de flavonas a partir de flavanonas y la adquisición de su gen, y la introducción de tal gen en plantas, sería más práctico e industrialmente aplicable que la introducción en una planta de genes para dos enzimas implicadas en la síntesis de flavonas a partir de flavanonas.

Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar genes para flavona sintasas, preferiblemente genes para flavona sintasa II, y más preferiblemente genes para flavona sintasas con actividad de síntesis de flavonas directamente a partir de flavanonas. Los genes de flavona sintasa obtenidos pueden ser introducidos en plantas y ser sobreexpresados para cambiar los colores de la flor.

Además, en los pétalos de las flores que contienen de forma natural grandes cantidades de flavonas, se espera que el control de la expresión de los genes de la flavona sintasa por un método antisentido o un método de cosupresión también pueda cambiar los colores de la flor. También, la expresión de los genes de flavona sintasa en los órganos apropiados, a la luz de la actividad antibacteriana de las flavonas y su interacción con los microorganismos del suelo, causará un aumento de las propiedades antibacterianas de las plantas y mejorará la capacidad de fijar nitrógeno de las legumbres debido a la simbiosis promovida con los microorganismos de la rizosfera, así como un efecto protector contra los rayos ultravioletas y la luz.

La presente invención, por lo tanto, proporciona un gen tal como se describe en las reivindicaciones que codifica una proteína que puedan sintetizar flavonas directamente a partir de flavanonas. El gen es, específicamente, un gen que codifican la flavona sintasa II que pueden sintetizar flavonas a partir de flavanonas por una reacción mono-enzimática (denominada en este documento en adelante "flavona sintasa II").

Más específicamente, la presente invención proporciona un gen que codifica la proteína P450 que tiene la secuencia de aminoácidos enumerada como SEQ. ID. No. 4 del Listado de Secuencias y que posee actividad para sintetizar flavonas a partir de flavanonas.

La invención además proporciona un gen tal como se define en las reivindicaciones que codifica proteínas que tienen secuencias de aminoácidos con una identidad de al menos el 55% respecto a la secuencia de aminoácidos enumerada como SEQ. ID. No. 4 del Listado de Secuencias y que posee actividad para sintetizar flavonas a partir de flavanonas.

La invención proporciona incluso además un vector tal como se describe en las reivindicaciones, particularmente un vector de expresión, que contiene cualquiera de los genes anteriormente mencionados.

La invención proporciona incluso además un huésped tal como se describe en las reivindicaciones transformado con el vector anteriormente mencionado.

La invención proporciona incluso además una proteína tal como se describe en las reivindicaciones codificada por cualquiera de los genes anteriormente mencionados.

La invención proporciona incluso además un procedimiento tal como se describe en las reivindicaciones para producir la proteína anteriormente mencionada que se caracteriza por cultivar o hacer crecer el huésped anteriormente mencionado y recuperar la proteína con actividad para sintetizar la flavona a partir del huésped.

La invención proporciona incluso además una planta tal como se describe en las reivindicaciones en la que han sido introducidos cualquiera de los genes anteriormente mencionados, o progenies de la planta o su tejido, tales como flores cortadas, que exhiben las mismas propiedades.

La invención proporciona incluso además un método tal como se describe en las reivindicaciones para cambiar las cantidades y las composiciones del flavonoide usando los genes anteriormente mencionados; un método tal como se describe en las reivindicaciones para cambiar las cantidades de flavonas usando los genes anteriormente mencionados; un método tal como se describe en las reivindicaciones para cambiar los colores de las flores usando los genes

anteriormente mencionados; un método tal como se describe en las reivindicaciones para volver más azul el color de las flores usando los genes anteriormente mencionados; un método para volver más rojo el color de las flores usando los genes anteriormente mencionados; un método tal como se describe en las reivindicaciones para modificar la fotosensibilidad de las plantas usando los genes anteriormente mencionados; y un método tal como se describe en las reivindicaciones para controlar la interacción entre las plantas y los microbios usando los genes anteriormente mencionados.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un cromatograma que muestra los resultados del análisis HPLC de los productos obtenidos a partir de un sustrato, la naringenina, usando las proteínas codificadas por CYP93B1 y TFNS5.

A y B: Obtenido añadiendo una fracción de enzimas a granel de levadura que expresa CYP93B1.

C y D: Obtenido añadiendo una fracción de enzimas a granel de levadura que expresa TFNS5.

A y C: Productos directos obtenidos por la adición de la fracción de enzimas.

B: Productos obtenidos por tratamiento ácido después de reacción de A.

D: Productos obtenidos por tratamiento ácido después de reacción de C.

Realizaciones para llevar a cabo la invención

La flavanona 2-hidroxilasa codificada por el gen de CYP93B1 de *Glycyrrhiza* produce 2-hidroxiflavanonas a partir de flavanonas como los sustratos, y los productos se convierten en flavonas por tratamiento ácido. Los presentes inventores vieron que sería posible obtener un gen que codificara una flavona sintasa II, que era un objeto de la invención, usando el cADN derivado de *Glycyrrhiza*, CYP93B1 para seleccionar de una genoteca de cADN de, por ejemplo, una flor que contiene una gran cantidad de flavonas, para así obtener el cADN que codificara proteínas con actividad de síntesis de flavonas directamente a partir de flavanonas como sustratos.

De acuerdo con la invención, una genoteca de cADN de dragón que contiene una gran cantidad de flavonas se rastrea usando el cADN derivado de *Glycyrrhiza*, CYP93B1 como una sonda, para obtener el cADN que codifica una nueva citocromo P450 (véase el Ejemplo 1). El cADN de dragón, ANFNS2, obtenido de esta manera y el cADN de CYP93B1 de *Glycyrrhiza* entonces fue usado como una sonda mezclada para obtener TFNS5, un cADN que codifica una nueva citocromo P450, a partir de una genoteca cADN de pétalos de flor de torenia (véase el Ejemplo 2).

El cADN derivado de torenia fue expresado en levadura y se hizo reaccionar con naringenina, una flavanona, como un sustrato que no causó la producción de 2-hidroxinaringenina, sino más bien de la flavona apigenina, sin tratamiento ácido (véase el Ejemplo 3). En otras palabras, esta enzima produjo directamente flavonas a partir de flavanonas sin tratamiento ácido, y se confirmó que su gen era una flavona sintasa II que nunca había sido clonada. La secuencia de aminoácidos codificada por el ANFNS2 derivado de dragón del Ejemplo 1 exhibió una alta identidad del 77% con la flavona sintasa II codificada por TFNS5, y exhibió actividad enzimática de flavona sintasa II (Ejemplo 4). Además, como una secuencia de aminoácidos codificada por cADN derivado de perilla también exhibió una alta identidad del 76% y 75% con TFNS5 y ANFNS2, respectivamente (Ejemplo 8), se especula que la proteína codificada por este cADN también posee la misma actividad enzimática que las flavona sintasas codificadas por TFNS5 y ANFNS2.

El gen de la presente invención pueden ser, por ejemplo, uno que codifica la secuencia de aminoácidos incluida en SEQ. ID. No. 4 del Listado de Secuencias. Sin embargo, se sabe que las proteínas cuyas secuencias de aminoácidos son modificadas por adiciones o deleciones de múltiples aminoácidos y/o sustituciones con aminoácidos diferentes pueden mantener la misma actividad enzimática que la proteína original.

La invención también se refiere a genes que codifican proteínas que tienen secuencias de aminoácido con una identidad de al menos el 55%, preferiblemente al menos el 70%, tal como el 80% o mayor y hasta el 90% o mayor, con la secuencia de aminoácidos incluida en SEQ. ID. No. 4 del Listado de Secuencias, y que posee una actividad de síntesis de flavonas a partir de flavanonas.

Un gen con la secuencia de nucleótidos natural puede ser obtenido rastreando una genoteca de cADN, por ejemplo, como se demuestra detalladamente en los ejemplos. El ADN que codifica las enzimas con secuencias de aminoácidos modificadas puede ser sintetizado usando mutagénesis dirigida común o un método PCR, usando el ADN con una secuencia de nucleótidos natural como material de partida. Por ejemplo, un fragmento de ADN en el que una modificación deba ser introducida puede ser obtenido por tratamientos con enzimas de restricción del cADN natural o del ADN genómico y luego puede usarse como plantilla para la mutagénesis dirigida o la PCR utilizando un cebador que tenga la mutación deseada introducida en el mismo, para obtener un fragmento de ADN que tenga la modificación deseada introducida en el mismo. Los fragmentos de ADN introducidos por mutación entonces pueden ser unidos a un fragmento de ADN que codifica otra parte de una enzima objetivo.

De forma alternativa, para obtener el ADN que codifica una enzima que consiste en una secuencia de aminoácidos acortada, por ejemplo, el ADN que codifica una secuencia de aminoácidos que es más larga que la secuencia de aminoácidos objetivo, tal como la secuencia de aminoácidos de longitud completa, puede ser cortado con las endonucleasas de restricción deseadas, y si el fragmento de ADN obtenido así no codifica la secuencia de aminoácidos objetivo entera, puede ser unido con el ADN sintetizado que comprende el resto de la secuencia.

Los genes así obtenidos pueden ser expresados en un sistema de expresión usando *E. coli* o una levadura y su actividad enzimática puede ser medida para confirmar que el gen obtenido codifica a la flavona sintasa. Expresando el gen, es también posible obtener la proteína flavona sintasa como producto génico. De forma alternativa, es también posible obtener una proteína flavona sintasa incluso usando anticuerpos para una secuencia de aminoácidos parcial o completa incluida en SEQ. ID. No. 4, y tales anticuerpos pueden ser usados para la clonación de un gen de flavona sintasa en otro organismo.

Por consiguiente, la invención también se refiere a vectores recombinantes, y especialmente a vectores de expresión, que contienen el gen anteriormente mencionados, y a huéspedes transformados por estos vectores. Los huéspedes usados pueden ser organismos procariotas o eucariotas. Los ejemplos de organismos procariotas que pueden ser usados comúnmente como huéspedes incluyen a las bacterias que pertenece al género *Escherichia*, tales como *Escherichia coli*, y los microorganismos que pertenecen al género *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis*.

Los ejemplos de huéspedes eucariotas que pueden ser usados incluyen organismos eucariotas inferiores, por ejemplo, microorganismos eucariotas, por ejemplo, *Eumycota* tales como levadura y hongos filamentosos. Como levaduras pueden mencionarse los microorganismos que pertenecen al género *Saccharomyces*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, y como hongos filamentosos pueden mencionarse microorganismos que pertenecen al género *Aspergillus*, tales como *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* y microorganismos que pertenecen al género *Penicillium*. También pueden ser usadas células de animal y células de planta, siendo las células de animal líneas celulares de ratones, hámsteres, monos o seres humanos. Las células de insecto, tales como células de gusano de seda, o los propios gusanos de seda adultos, también pueden ser usados.

Los vectores de expresión de la invención incluirán regiones reguladoras de la expresión tales como un promotor y un terminador, un origen de replicación, etc., dependiendo del tipo de huéspedes en los que deban ser introducidos. Los ejemplos de promotores para los vectores de expresión bacterianos que pueden ser usados incluyen a promotores convencionales tales como el promotor trc, el promotor tac, el promotor lac, etc., los ejemplos de los promotores de levadura que pueden ser usados incluyen al promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, el promotor PH05, etc., y los ejemplos de los promotores de hongos filamentosos que pueden ser usados incluyen al promotor de amilasa, trpC, etc. Los ejemplos de promotores huésped de células de animal que pueden ser usados incluyen a promotores virales tales como el promotor temprano SV40, tardío SV40, etc.

El vector de expresión puede prepararse de acuerdo con un método convencional usando endonucleasas de restricción, ligasas y otras similares. La transformación de un huésped con un vector de expresión también puede ser llevada a cabo de acuerdo con métodos convencionales.

Los huéspedes transformados por el vector de expresión pueden ser cultivados pueden hacerse crecer y la proteína objetivo puede ser recuperada y purificada a partir del producto cultivado, etc., de acuerdo con métodos convencionales tales como filtración, separación centrífuga, trituración de células, cromatografía de filtración de gel, cromatografía de intercambio iónico y otros similares.

La presente memoria descriptiva en todas partes habla de flavona sintasas II derivadas de dragón, torenia y perilla que son capaces de sintetizar flavonas directamente a partir de flavanonas, y también se sabe que los genes de citocromo P450 constituyen una superfamilia (*DNA and Cell Biology*, 12 (1993), Nelson *et al.*, pág. 1) y que las proteínas de citocromo P450 dentro de la misma familia tienen un 40% o mayor identidad en sus secuencias de aminoácidos mientras que las proteínas citocromo P450 dentro de una subfamilia tiene 55% o una mayor identidad en sus secuencias de aminoácidos, y que sus genes se hibridan entre sí (*Pharmacogenetics*, 6 (1996), Nelson *et al.*, pág. 1).

Por ejemplo, un gen para la flavonoide 3',5'-hidroxilasa, que era un tipo de citocromo P450 y que participaba en la ruta de síntesis de los flavonoides, fue aislado primero a partir de petunias (*Nature*, 366 (1993), Holton *et al.*, pág. 276), y el gen de flavonoide 3',5'-hidroxilasa de petunia fue usado como una sonda para aislar fácilmente un gen de flavonoide 3',5'-hidroxilasa de genciana (*Plant Cell Physiol.*, 37 (1996), Tanaka *et al.*, pág. 711), genciana de pradera, campanilla (documento WO93/18155 (1993), Kikuchi *et al.*), lavanda, torenia y verbena (*Shokubutsu no Kagaku Chosetsu*, 33 (1998), Tanaka *et al.*, pág. 55).

Así, una parte o todo de cualquiera de los genes de flavona sintasa II de la invención derivada de torenia, que son capaces de sintetizar flavonas directamente a partir de flavanonas, pueden ser usados como sonda, para obtener los genes de la flavona sintasa II capaces de sintetizar flavonas directamente a partir de flavanonas, a partir de diferentes especies de plantas. Además, purificando las enzimas de la flavona sintasa II derivadas de dragón, torenia o perilla descritas en esta memoria descriptiva que pueden sintetizar flavonas directamente a partir de flavanonas, y obteniendo los anticuerpos contra las enzimas por métodos convencionales, es posible obtener diferentes proteínas flavona sintasa II que reaccionen con los anticuerpos y obtener los genes que codifican para aquellas proteínas.

Las fuentes para genes de flavona sintasa II pueden ser, además de dragón, torenia y perilla descritas en este documento, también genciana, verbena, crisantemo, lirio, commelina, centaurea, salvia, nemófila y similares.

La invención se refiere incluso además a plantas cuyos colores sean modificados introduciendo un gen o genes para flavona sintasas II que pueda o puedan sintetizar flavonas directamente a partir de flavanonas, y a las progenies de las plantas o sus tejidos, que también puedan estar en forma de flores cortadas. Usando las flavona sintasas II o sus genes que han sido clonados de acuerdo con la invención, es posible producir flavonas en especies de plantas o variedades que de otra manera producirían pocas o absolutamente ninguna flavona. Expresando el gen o los genes de la flavona sintasa II en pétalos de flor, es posible aumentar la cantidad de flavonas en los pétalos de flor, permitiendo así que los colores de las flores sean modificados hacia el azul, por ejemplo.

A la inversa, reprimiendo la síntesis de flavonas en los pétalos de flor, es posible modificar los colores de las flores hacia el rojo, por ejemplo. Sin embargo, las flavonas tienen una miríada de efectos sobre los colores de las flores, y los cambios de colores de las flores por lo tanto no están limitados con los mencionados en este documento. Con el nivel actual de tecnología, es posible introducir un gen en una planta y expresar el gen en una manera constitutiva o específica de tejido, mientras que es también posible reprimir la expresión del gen objetivo por un método antisentido o un método de cosupresión.

Como ejemplos de plantas transformables pueden ser mencionados rosa, crisantemo, clavel, dragón, ciclamen, orquídea, violeta de pradera, freesia, gerbera, gladiolo, paniculata, kalanchoe, lirio, pelargonium, geranio, petunia, torenia, tulipán, arroz, cebada, trigo, semilla de colza, patata, tomate, álamo, plátano, eucalipto, batata, soja, alfalfa, lupino, grano, etc., pero no hay ninguna limitación a estos.

Como las flavonas tienen varias actividades fisiológicas como se explica anteriormente, pueden impartir una nueva actividad fisiológica o valor económico a las plantas. Por ejemplo, expresando el gen para producir flavonas en las raíces, es posible promover el crecimiento de microorganismos que son beneficiosos para las plantas, y así promover el crecimiento de las plantas. Es también posible sintetizar flavonas que exhiben actividad fisiológica en seres humanos, animales o insectos.

Ejemplos

La invención ahora será explicada con más detalle mediante los Ejemplos siguientes. A no ser que sea especificado de otra manera, los métodos biológicos moleculares fueron llevados a cabo de acuerdo con "Molecular Cloning" (de Sambrook *et al.*, 1989).

Ejemplo 1

Clonación del gen de flavona sintasa II de dragón

Fue extraído ARN de aproximadamente 5 g de brotes jóvenes de un dragón "Yellow Butterfly" (nombre comercial de Sakatano-Tane, KK.), y fue obtenido el ARN de polyA+ por un Oligotex. Este ARN de polyA+ fue usado como una plantilla para preparar una genoteca de cADN usando un Kit de Síntesis de Genoteca de cADN Lambda ZAPII (Stratagene) por el método recomendado por Stratagene (Manual de instrucciones de Stratagene, Revisión N° 065001). La genoteca de cADN fue rastreada usando el cADN de CYP93B1 de longitud completa como sonda. El rastreo y la detección de clones positivos fueron llevados a cabo usando un kit de marcación DIG-ADN y detección (Boehringer) basado en el método recomendado por la misma empresa, en condiciones pocas rigurosas.

Específicamente, un tampón de hibridación (5 x SSC, 30% de formamida, tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0), 1% de SDS, 2% de reactivo bloqueante (Boehringer), 0,1% de lauroilsarcosina, 80 µg/ml de ADN de esperma de salmón) fue usado para la prehibridación a 42°C durante 2 horas, después de lo cual la sonda DIG-marcada fue añadida y la mezcla fue guardada por la noche. La membrana fue aclarada en una solución de aclarado 5 x SSC que contenía 1% de SDS a 65°C durante 1,5 horas. Un clon positivo fue obtenido, y fue denominado ANFNS1. En la determinación de la secuencia de nucleótidos en el extremo 5' de ANFNS1 se esperaba que ANFNS1 codificara una secuencia con una alta identidad con la flavanona 2-hidroxilasa codificada por el CYP93B1 de regaliz, y fue asumido que codificaba una P450 con una función similar a la de la flavanona 2-hidroxilasa.

Sin embargo, una comparación con la secuencia de aminoácidos de flavanona 2-hidroxilasa codificada por CYP93B1 sugirió que el cADN de ANFNS1 no era un cADN de cadena entera, careciendo de la parte correspondiente a aproximadamente 65 restos de aminoácidos de la metionina de iniciación. El cADN de ANFNS1 por lo tanto fue usado como una sonda para rastrear de nuevo la genoteca del cADN de dragón, para obtener el cADN (ANFNS2) que, según se creía, incluía la secuencia de aminoácidos de cadena entera. La proteína codificada por ANFNS2 obtenida en este documento exhibió una identidad del 53% respecto al nivel de aminoácidos con la flavanona 2-hidroxilasa codificada por CYP93B1 de regaliz. La secuencia de nucleótidos de ANFNS2 es la SEQ. ID. No. 1, y la secuencia de aminoácidos deducida a partir de ahí es la SEQ. ID. No. 2.

Ejemplo 2

Clonación del gen de flavona sintasa II de torenia

5 Fue extraído ARN a partir de aproximadamente 2 g de brotes de una variedad de torenia (nombre de la variedad Sunrenive, N° de Solicitud del Registro de Variedades: 7433 de acuerdo con el Derecho de Semillas y Plantones, de Suntory Ltd.) y fue obtenido el ARN de polyA+ con un Oligotex. El ARN de polyA+ fue usado como plantilla para preparar una genoteca de cADN usando un Kit de Síntesis de Genoteca de cADN Lambda ZAPII (Stratagene) por el método recomendado por Stratagene como se menciona en el Ejemplo 1. La genoteca de cADN fue rastreada
 10 usando una mezcla del cADN de CYP93B1 anteriormente mencionado y el cADN de ANFNS1 como sondas. El rastreo y la detección de clones positivos fueron llevados a cabo en condiciones poco rigurosas como se describe en el Ejemplo 1.

Un clon positivo fue obtenido, y fue denominado TFNS5. Para determinar la secuencia de nucleótidos completa
 15 del cADN de TFNS5, fue encontrado que la proteína codificada por el cADN de TFNS5 exhibía una identidad del 52% respecto al nivel de aminoácidos con la flavanona-2-hidroxilasa codificada por CYP93B1 de regaliz. Este cADN de TFNS5 también tenía una alta identidad del 77% con la proteína codificada por ANFNS2, el cADN derivado de dragón obtenido en el Ejemplo 1. La secuencia de nucleótidos determinada es la SEQ. ID. No. 3, y la secuencia de aminoácidos deducida a partir de ahí es la SEQ. ID. No. 4.

Ejemplo 3

Expresión del gen de flavona sintasa II de torenia en levadura

25 El siguiente experimento fue llevado a cabo para detectar la actividad enzimática de la proteína codificada por TFNS5, el cADN de torenia obtenido en el Ejemplo 2. Las partes del exterior de la región traducida del gen fueron modificadas para introducir los sitios de la enzima de restricción para preparar un cebador sentido (5'-AAATAGGATCCA AGCatgGACACAGTCTTAA-3'; subrayado = el sitio BamHI; letras minúsculas: codon de iniciación) (SEQ. ID. No.
 30 5) y un cebador antisentido (5'-CCCTTCTAGAtcaAGCACCCGATATTGTGGCCGGG-3'; subrayado = el sitio XbaI; letras minúsculas: codon de terminación) (SEQ. ID. No. 6) fueron usados con la polimerasa KOD (Toyobo) para la reacción PCR. Las condiciones de la PCR fueron 98°C durante un minuto, 20 ciclos (de 98°C durante 15 segundos, 55°C durante 10 segundos, 74°C durante 30 segundos), seguido de 74°C durante 10 minutos.

35 Después de la introducción del resultado del producto de la PCR en el sitio EcoRV de pBluescriptII SK(-) (Stratagene), fue digerido con las enzimas de restricción BamHI y XbaI e introducido en los sitios de BamHI-XbaI del vector de expresión de levadura pYES2 (Invitrogen). El plásmido resultante entonces fue introducido en la levadura BJ2168 (Nihon Gene). La actividad enzimática fue medida por el método descrito por Akashi *et al.* (FEBS Lett., 431 (1998), Akashi *et al.*, pág. 287). Las células de levadura transformadas fueron cultivadas en 20 ml de medio selectivo
 40 (6,7 mg/ml de base de nitrógeno de levadura sin amino-ácido (Difco), 20 mg/ml de glucosa, 30 µg/ml de leucina, 20 µg/ml de triptófano y 5 mg/ml de ácido casamino), a 30°C durante 24 horas.

Después de la recolección de las células de levadura con centrifugación, las células de levadura cosechadas fueron cultivadas a 30°C durante 48 horas en un medio de expresión (10 mg/ml de extracto de levadura, 10 mg/ml de peptona,
 45 2 µg/ml de hemina, 20 mg/ml de galactosa). Después de la recuperación de las células de levadura, fueron lavadas suspendiéndolas en agua y recogiendo las. Fueron usadas perlas de vidrio durante 10 minutos de interrupción, después de lo cual las células fueron centrifugadas a 8000 g x durante 10 minutos. El sobrenadante además fue centrifugado a 15.000 x g durante 10 minutos para obtener una fracción de enzimas a granel.

50 Una mezcla de 15 µg de (R,S)-naringenina (disuelta en 30 µl de 2-metoxietanol), 1 ml de solución de enzima a granel y NADPH 1 mM (volumen de mezcla de reacción total: 1,05 ml) se hizo reaccionar a 30°C durante 2 horas. Después de la finalización de la reacción por la adición de 30 µl de ácido acético, fue añadido 1 ml de acetato de etilo y fue mezclado con esto. Después de la centrifugación, la capa de acetato de etilo fue secada con un evaporador. El residuo fue disuelto en 100 µl de metanol y fue analizado por HPLC. El análisis fue llevado a cabo de acuerdo con el
 55 método descrito por Akashi *et al.* El tratamiento ácido implicó la disolución de la muestra secada por el evaporador en 150 µl de etanol que contenía 10% de ácido clorhídrico, y fue agitado durante 30 minutos. Esto fue diluido con 1,3 ml de agua, fueron añadidos después 800 µl de acetato de etilo y fue mezclado con esto, y después de la centrifugación, la capa de acetato de etilo fue recuperada. Esto entonces fue secado, fue disuelto en 200 µl de metanol y fue analizado por HPLC.

60 La levadura que expresa CYP93B1 de regaliz produjo 2-hidroxinaringenina a partir de naringenina, pero no proporcionó ninguna apigenina (Figura 1, A). Sólo bajo el tratamiento ácido de la mezcla de reacción, la apigenina fue proporcionada a partir de 2-hidroxinaringenina (Figura 1, B). Por el contrario, la levadura que expresa TFNS5 de torenia proporcionó apigenina a partir de naringenina sin tratamiento ácido de la mezcla de reacción (Figura 1, C). Esto
 65 demostró que TFNS5 codifica una flavona sintasa II.

ES 2 322 770 T3

Ejemplo 4

Expresión del gen de flavona sintasa II de dragón en levadura

5 Un fragmento de ADN de aproximadamente 1400 bp obtenido digiriendo cADN de ANFNS2 con BamHI y SphI, un fragmento de ADN de aproximadamente 350 bp obtenido digiriendo el mismo con SphI y BamHI, y pYES2 digerido con BamHI y XhoI fue ligado para obtener un plásmido, que entonces fue introducido en la levadura por el mismo método que el descrito en el Ejemplo 3. Las células de levadura recombinantes resultantes fueron usadas para medir la actividad de síntesis de flavona por el mismo método que en el Ejemplo 3. La levadura que expresa el
10 ANFNS2 derivado de dragón produjo la apigenina sin tratamiento ácido, demostrando así que ANFNS2 codifica una flavona sintasa II.

Ejemplo 5

15 *Construcción del vector de expresión en plantas*

Un vector de expresión de planta fue construido para introducir TFNS5, el cADN de torenia obtenido en el Ejemplo 2, en plantas. Después de la digestión de pBE2113-Gus (*Plant Cell Physiol.*, 37 (1996), Mitsuhara *et al.*, pág. 49) con SacI, un kit de redondeo (Takara) fue usado para redondear los extremos, después de lo cual fue insertado un
20 enlazador XhoI (Toyobo). El plásmido resultante entonces fue digerido con HindIII y EcoRI, y fue recuperado un fragmento de ADN de aproximadamente 3 kilobytes. El fragmento de ADN fue unido al sitio de HindIII/EcoRI del vector binario pBINPLUS para preparar pBE2113'. El vector pBINPLUS usado en este documento fue obtenido modificando el vector binario Bin19 (*Nucl. Acids Res.*, 12 (1984), Bevan, pág. 8711), que se usa extensamente para
25 la introducción génica en plantas usando células de *Agrobacterium*, de la manera publicada por van Engelen *et al.* (*Transgenic Research*, 4 (1995), van Engelen *et al.*, pág. 288).

El cADN de TFNS5 fue cortado del vector SK(-) por la división con BamHI/XhoI, y un fragmento de aproximadamente 1,7 kilobytes así obtenido fue ligado a los sitios de BamHI/XhoI del vector binario anteriormente mencionado
30 pBE2113'. La construcción así obtenida, pSPB441, expresa el cADN de TFNS5 en la dirección sentido en el control del promotor de virus del mosaico de la coliflor de 35S que tiene una doble repetición de la secuencia del potenciador (*Plant cell Physiol.*, 37 (1996), Mitsuhara *et al.*, pág. 49).

Ejemplo 6

Alteración del color de la flor de torenia

Una variedad de torenia (nombre de la variedad Sunrenive, N° de Solicitud de Registro de Variedades: 7433 de acuerdo con el Derecho de Semillas y Plantones, de Suntory Ltd.) fue transformada con el pSPB441 construido en el Ejemplo 5 anterior, de acuerdo con el método de Aida *et al.* (*Breeding Science*, 45 (1995), Aida *et al.*, pág. 71). Más del 95% de los transformantes obtenidos mostraron la alteración del color de flor del púrpura oscuro de la cepa parenteral a un púrpura claro. Los colores de los pétalos de la flor izquierdo y derecho de cuatro pétalos de la flor fueron medidos. Aunque el color de los pétalos de la flor de la cepa parenteral era el Número 89A de acuerdo con
45 la Carta de Colores de la Real Sociedad Hortícola, los colores de los pétalos de la flor típicos de los transformantes fueron 82C, 87, 87C, 88, 91A, etc. Estos resultados indicaron que la introducción de TFNS5 en las plantas puede cambiar los colores de la flor.

En los individuos transformados, la cantidad de flavonas estaba en los rangos de 1/5 a 1/10 respecto al del huésped, mientras que se redujo la cantidad de antocianinas a aproximadamente 1/3 respecto a la del huésped. También se detectaron las flavanonas (naringenina, eriodictiol y pentahidroxiflavanona) que son las precursoras de la biosíntesis de flavona que no fueron detectados en el huésped.

Ejemplo 7

Expresión de flavona sintasa en petunias

El plásmido pSPB441 fue introducido en una variedad de petunia (nombre de la variedad: Revolution Violet Mini, N° de Solicitud de Registro de Variedades: 9217, de acuerdo con el Derecho de Semillas y Plantones, de Suntory Ltd.) de acuerdo con el método de Napoli *et al.* (*Plant Cell*, 2, (1990), Napoli *et al.*, pág. 279). Los cambios de colores de la flor ocurrieron en dos de los transformantes resultantes, en los que los colores de la flor eran más claros que los de la cepa parenteral. El color de la flor de la cepa parenteral era del Número 88A de acuerdo con la Carta de Colores de la Real Sociedad Hortícola, mientras que era el 87A en los transformantes. También,
65 aunque ninguna flavona fue detectada en la cepa parenteral, una flavona, la luteolina, fue detectada en las cepas transformadas.

Ejemplo 8

Clonación del gen de flavona sintasa II de perilla

El método descrito en el Ejemplo 1 fue usado para rastrear una genoteca de cADN preparada a partir de hojas de perilla roja (*Perilla frutescens*) de acuerdo con el método de Gong *et al.* (*Plant Mol. Biol.*, 35, (1997), Gong *et al.*, pág. 915) utilizando λ gt10 (Stratagene) como vector. El cultivo, la preparación de ADN y la subclonación de los clones del bacteriófago resultante N°. 3 fueron llevados a cabo de acuerdo con el método de Gong *et al.* (*Plant Mol. Biol.*, 35, (1997), Gong *et al.*, pág. 915), y la secuencia de nucleótidos fue determinada y catalogada como SEQ. ID. No. 7. La secuencia de aminoácidos deducida codificada por esta secuencia de nucleótidos fue SEQ.ID. No 8. Esta secuencia de aminoácidos mostró una identidad del 76% y 75% con TFNS5 y ANFNS2, respectivamente. Ésta también mostró una identidad del 52% con CYP93B1.

Ejemplo 9

Expresión del gen de flavona sintasa II de perilla en levadura

El clon del bacteriófago N° 3 obtenido en el Ejemplo 8 fue usado como una plantilla para PCR por el método descrito en el Ejemplo 3, usando el cebador Lambda Arm (Stratagene). El fragmento de ADN amplificado fue subclonado en el sitio de EcoRV de pBluescript KS(-). Un clon con el codon de iniciación del cADN de flavona sintasa II de perilla en el lado del sitio de SalI de pBluescript KS(-) fue seleccionado, y fue denominado pFS3. La secuencia de nucleótidos del inserto de cADN de pFS3 fue determinada, y fue llevada a cabo la PCR para confirmar la ausencia de errores.

Un fragmento de ADN de aproximadamente 1,8 kilobytes obtenido digiriendo pFS3 con SalI y XbaI fue ligado con pYES2 digerido con XhoI y XbaI (Ejemplo 3) para obtener un plásmido que fue denominado pYFS3, y esto fue introducido en BJ2168 de levadura por el método descrito en el Ejemplo 3. Cuando la actividad de flavona sintasa de esta levadura recombinante fue medida por el método descrito en el Ejemplo 3, se confirmó la producción de apigenina a partir de naringenina, indicando que el cADN del clon del bacteriófago de perilla N° 3 codificaba una proteína con actividad de flavona sintasa II.

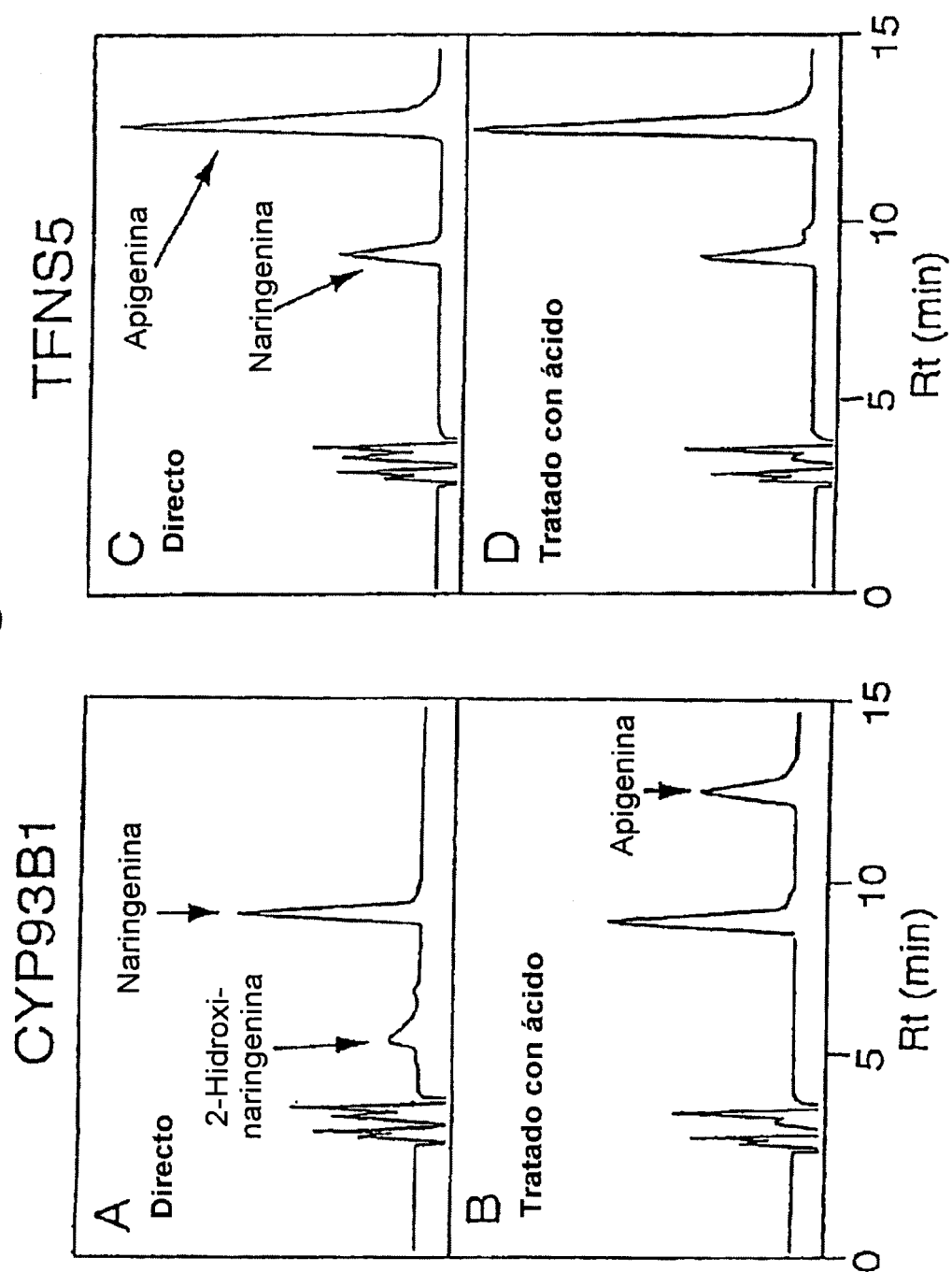
Aplicabilidad industrial

Es posible cambiar los colores de las flores uniendo el cADN de la invención a un vector de expresión de planta apropiado e introduciéndolo en plantas que expresan o inhiben la expresión de flavona sintasas. Además, expresando los genes de flavona sintasa no sólo en pétalos sino también en plantas enteras o en sus órganos apropiados, es posible aumentar la resistencia frente a microorganismos de plantas o mejorar la capacidad fijadora del nitrógeno de legumbres promoviendo la asociación con los microorganismos de la rizosfera, así como mejorar los efectos protectores de las plantas contra los rayos ultravioletas y la luz.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un gen que codifica una proteína con actividad de síntesis de flavonas directamente a partir de flavanonas, donde la proteína:
- (1) tiene la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ. ID. No. 4;
- (2) tiene una identidad de al menos el 55% con la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ. ID. No. 4.
- 10 2. Un gen según la reivindicación 1, donde el nivel de identidad es de al menos el 70%.
3. Un gen según la reivindicación 1, donde el nivel de identidad es de al menos el 80%.
- 15 4. Un gen según la reivindicación 1, donde el nivel de identidad es de al menos el 90%.
5. Un gen según la reivindicación 1, que tiene la secuencia de nucleótidos indicada en SEQ ID NO: 3.
6. Un vector que comprende un gen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 7. Un huésped transformado que comprende un vector según la reivindicación 6.
8. Una proteína codificada por un gen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 25 9. Un método para producir una proteína con actividad de síntesis de flavona, que se **caracteriza** por cultivar o hacer crecer un huésped según la reivindicación 7 y recuperar dicha proteína de dicho huésped.
10. Una planta transgénica o célula de planta que comprende un gen artificialmente introducido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la progenie de dicha planta o su tejido, cuya progenie comprende el gen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 11. Una flor cortada de la planta transgénica o su progenie según la reivindicación 10, que comprende el gen de la célula de planta según la reivindicación 10.
- 35 12. Un método para cambiar una composición de flavonoides y/o sus cantidades usando un gen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
13. Un método para cambiar la cantidad de una flavona usando un gen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 40 14. Un método para cambiar el color de una flor usando un gen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
15. Un método para volver más azul el color de una flor usando un gen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 45 16. Un método para volver más rojo el color de una flor usando un gen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
17. Un método para cambiar la fotosensibilidad de una planta usando un gen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 50 18. Un método para controlar la interacción entre una planta y microorganismos usando un gen según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

Fig.1



ES 2 322 770 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> SUNTORY LIMITED
- 5 <120> Gen que codifica para enzimas sintetizadoras de flavonas
- <130> 993009
- <160> 8
- <210> 1
- 10 <211> 1724
- <212> ADN
- <213> *Antirrhinum majus*
- 15 <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad para convertir directamente flavanona en flavona
- <400> 1
- 20

25	gctttacaca cacacacaca cacacacaca caaacaaaa atg tct aca ctt gtc	54
	Met Ser Thr Leu Val	
	1 5	
30	tac agc aca ctc ttc atc ctc tca acc ctc ctc ctc acc ctc cta acc	102
	Tyr Ser Thr Leu Phe Ile Leu Ser Thr Leu Leu Leu Thr Leu Leu Thr	
	10 15 20	
35	cgc acc cgc cgc aag acc cgc ccg ccc ggc cca tta gcc ctc ccc tta	150
	Arg Thr Arg Arg Lys Thr Arg Pro Pro Gly Pro Leu Ala Leu Pro Leu	
	25 30 35	
40	ata ggc cac tta cac ctc ctc ggc cca aag ctc cac cac acc ttc cac	198
	Ile Gly His Leu His Leu Leu Gly Pro Lys Leu His His Thr Phe His	
	40 45 50	
45	caa ttc tcc caa cgc tac ggc ccg ctc atc cag ctc tac ctc ggc tcc	246
	Gln Phe Ser Gln Arg Tyr Gly Pro Leu Ile Gln Leu Tyr Leu Gly Ser	
	55 60 65	

50

55

60

65

ES 2 322 770 T3

	gtc cca tgc gtc gtc gct tcc acg ccc gaa etc gcc cgc gaa ttc etc	294
	Val Pro Cys Val Val Ala Ser Thr Pro Glu Leu Ala Arg Glu Phe Leu	
5	70 75 80 85	
	aag acg cac gaa etc gac ttc tcg tcc cgc aag cac tcc acc gcc atc	342
	Lys Thr His Glu Leu Asp Phe Ser Ser Arg Lys His Ser Thr Ala Ile	
10	90 95 100	
	gac atc gtc acg tac gac tcc tcg ttc gcc ttc gcg ccg tac ggg ccg	390
	Asp Ile Val Thr Tyr Asp Ser Ser Phe Ala Phe Ala Pro Tyr Gly Pro	
15	105 110 115	
	tac tgg aaa ttc atc aag aaa tta tgt act tac gag cta ctg ggt gcc	438
	Tyr Trp Lys Phe Ile Lys Lys Leu Cys Thr Tyr Glu Leu Leu Gly Ala	
20	120 125 130	
	cgg aac ttg agc cat ttc cag ccc att aga gct ttg gag gtc aac agt	486
	Arg Asn Leu Ser His Phe Gln Pro Ile Arg Ala Leu Glu Val Asn Ser	
25	135 140 145	
	ttc ttg aga att ttg tac gag aaa aca gag cag aaa cag agt gtt aat	534
	Phe Leu Arg Ile Leu Tyr Glu Lys Thr Glu Gln Lys Gln Ser Val Asn	
30	150 155 160 165	
	gtg act gag gag ctt gtg aag ctg acg agt aat gtg atc agt aac atg	582
	Val Thr Glu Glu Leu Val Lys Leu Thr Ser Asn Val Ile Ser Asn Met	
35	170 175 180	
	atg ttg ggg atc agg tgt tcg ggg acg gaa ggg gag gcg gag gtg gcg	630
	Met Leu Gly Ile Arg Cys Ser Gly Thr Glu Gly Glu Ala Glu Val Ala	
40	185 190 195	
	agg acg gtg ata agg gag gtg acg cag ata ttt ggg gag ttt gat gtg	678
	Arg Thr Val Ile Arg Glu Val Thr Gln Ile Phe Gly Glu Phe Asp Val	
45	200 205 210	
	tcg gag att gtt tgg ttt tgt aag aat ttg gat ctg cag ggg att agg	726
	Ser Glu Ile Val Trp Phe Cys Lys Asn Leu Asp Leu Gln Gly Ile Arg	
50	215 220 225	
	aag agg tcg gag gat att agg agg agg tat gat gct ttg ttg gag aag	774
	Lys Arg Ser Glu Asp Ile Arg Arg Arg Tyr Asp Ala Leu Leu Glu Lys	
55	230 235 240 245	
	att att agt gat agg gag agg ttg agg ttg agg ggg ggt ggt ggt gga	822
	Ile Ile Ser Asp Arg Glu Arg Leu Arg Leu Arg Gly Gly Gly Gly Gly	
60	250 255 260	
65		

ES 2 322 770 T3

	ggg ggt gga gag gtg aag gat ttt ttg gat atg ttg ttg gat gtg atg	870
	Gly Gly Gly Glu Val Lys Asp Phe Leu Asp Met Leu Leu Asp Val Met	
5	265 270 275	
	gag agt gag aaa tcg gag gtg gag ttt acg agg gag cat ctc aaa gct	918
	Glu Ser Glu Lys Ser Glu Val Glu Phe Thr Arg Glu His Leu Lys Ala	
10	280 285 290	
	ttg att ctg gat ttc ttc act gcc ggt aca gac aca aca gca atc aca	966
	Leu Ile Leu Asp Phe Phe Thr Ala Gly Thr Asp Thr Thr Ala Ile Thr	
15	295 300 305	
	aca gaa tgg gca ata gca gaa ctc att agc aat cca aat gta ctc aaa	1014
	Thr Glu Trp Ala Ile Ala Glu Leu Ile Ser Asn Pro Asn Val Leu Lys	
20	310 315 320 325	
	aaa gct caa gaa gag atg gac aaa gtc ata gga tca caa agg ttg ttg	1062
	Lys Ala Gln Glu Glu Met Asp Lys Val Ile Gly Ser Gln Arg Leu Leu	
25	330 335 340	
	caa gaa tcc gac gcc cct aac ttg cct tac ctc aac gog atc ata aaa	1110
	Gln Glu Ser Asp Ala Pro Asn Leu Pro Tyr Leu Asn Ala Ile Ile Lys	
30	345 350 355	
	gaa acg ttc ogt ctc cac cct cca atc occ atg ctc act aga aaa tca	1158
	Glu Thr Phe Arg Leu His Pro Pro Ile Pro Met Leu Thr Arg Lys Ser	
35	360 365 370	
	att tct gac gtt gtg gtc aac ggg tac acg atc cct gcc aaa acg cta	1206
	Ile Ser Asp Val Val Val Asn Gly Tyr Thr Ile Pro Ala Lys Thr Leu	
40	375 380 385	
	ttg ttt gtc aac ctt tgg tcc atg gga agg aat cct aac tac tgg gaa	1254
	Leu Phe Val Asn Leu Trp Ser Met Gly Arg Asn Pro Asn Tyr Trp Glu	
45	390 395 400 405	
	aat cog atg gag ttc cga ccc gag agg ttt ctc gag aaa ggg acc ggg	1302
	Asn Pro Met Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Lys Gly Thr Gly	
50	410 415 420	
	tcg ata gac gtt aaa ggg cag cat ttc gag ttg ctg cog ttt ggc acg	1350
	Ser Ile Asp Val Lys Gly Gln His Phe Glu Leu Leu Pro Phe Gly Thr	
55	425 430 435	
	ggc agg cgg ggc tgc cgg ggg atg ttg tta ggc atg cag gag ttg ttt	1398
	Gly Arg Arg Gly Cys Pro Gly Met Leu Leu Gly Met Gln Glu Leu Phe	
60	440 445 450	
65		

ES 2 322 770 T3

agt att atc ggg gct atg gtg cag tgc ttc gat tgg aaa ctg ccc gat 1446
 Ser Ile Ile Gly Ala Met Val Gln Cys Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asp
 5 455 460 465
 ggt gtg aag tcg gtc gac atg acc gag cgg ccc ggg ttg acg gct cca 1494
 Gly Val Lys Ser Val Asp Met Thr Glu Arg Pro Gly Leu Thr Ala Pro
 10 470 475 480 485
 cgt gcc aat gat ttg gtg tgc caa ttg gtg cca cgg att gac ccg gtc 1542
 Arg Ala Asn Asp Leu Val Cys Gln Leu Val Pro Arg Ile Asp Pro Val
 15 490 495 500
 gtt gtc tcc gga ccg tgaaccttaa ggtagtatcg ataattctgtt taatt 1592
 Val Val Ser Gly Pro
 20 505
 aaattgttat ttgttgtagag gatttgattt ttgttatgta tgattatgag tggattaaga 1652
 taagcctgca aggacaaatt ccccttcttt gattgatgtc aatgagtttg tgtcaaaaaa 1712
 aaaaaaaaaa aa 1724
 25

<210> 2

30 <211> 506

<212> PRT

<213> *Antirrhinum majus*

35 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene actividad para convertir directamente flavanona en flavona

<400> 2

40

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

65

ES 2 322 770 T3

His Ser Thr Ala Ile Asp Ile Val Thr Tyr Asp Ser Ser Phe Ala Phe
 100 105 110
 5 Ala Pro Tyr Gly Pro Tyr Trp Lys Phe Ile Lys Lys Leu Cys Thr Tyr
 115 120 125
 10 Glu Leu Leu Gly Ala Arg Asn Leu Ser His Phe Gln Pro Ile Arg Ala
 130 135 140
 Leu Glu Val Asn Ser Phe Leu Arg Ile Leu Tyr Glu Lys Thr Glu Gln
 145 150 155 160
 15 Lys Gln Ser Val Asn Val Thr Glu Glu Leu Val Lys Leu Thr Ser Asn
 165 170 175
 20 Val Ile Ser Asn Met Met Leu Gly Ile Arg Cys Ser Gly Thr Glu Gly
 180 185 190
 Glu Ala Glu Val Ala Arg Thr Val Ile Arg Glu Val Thr Gln Ile Phe
 195 200 205
 25 Gly Glu Phe Asp Val Ser Glu Ile Val Trp Phe Cys Lys Asn Leu Asp
 210 215 220
 Leu Gln Gly Ile Arg Lys Arg Ser Glu Asp Ile Arg Arg Arg Tyr Asp
 30 225 230 235 240
 Ala Leu Leu Glu Lys Ile Ile Ser Asp Arg Glu Arg Leu Arg Leu Arg
 245 250 255
 35 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Asp Phe Leu Asp Met
 260 265 270
 Leu Leu Asp Val Met Glu Ser Glu Lys Ser Glu Val Glu Phe Thr Arg
 40 275 280 285
 Glu His Leu Lys Ala Leu Ile Leu Asp Phe Phe Thr Ala Gly Thr Asp
 290 295 300
 45 Thr Thr Ala Ile Thr Thr Glu Trp Ala Ile Ala Glu Leu Ile Ser Asn
 305 310 315 320
 Pro Asn Val Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Met Asp Lys Val Ile Gly
 50 325 330 335
 Ser Gln Arg Leu Leu Gln Glu Ser Asp Ala Pro Asn Leu Pro Tyr Leu
 340 345 350
 55 Asn Ala Ile Ile Lys Glu Thr Phe Arg Leu His Pro Pro Ile Pro Met
 355 360 365
 Leu Thr Arg Lys Ser Ile Ser Asp Val Val Val Asn Gly Tyr Thr Ile
 60 370 375 380
 Pro Ala Lys Thr Leu Leu Phe Val Asn Leu Trp Ser Met Gly Arg Asn
 385 390 395 400
 65

ES 2 322 770 T3

Pro Asn Tyr Trp Glu Asn Pro Met Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu
405 410 415
5 Glu Lys Gly Thr Gly Ser Ile Asp Val Lys Gly Gln His Phe Glu Leu
420 425 430
Leu Pro Phe Gly Thr Gly Arg Arg Gly Cys Pro Gly Met Leu Leu Gly
10 435 440 445
Met Gln Glu Leu Phe Ser Ile Ile Gly Ala Met Val Gln Cys Phe Asp
450 455 460
15 Trp Lys Leu Pro Asp Gly Val Lys Ser Val Asp Met Thr Glu Arg Pro
465 470 475 480
Gly Leu Thr Ala Pro Arg Ala Asn Asp Leu Val Cys Gln Leu Val Pro
20 485 490 495
Arg Ile Asp Pro Val Val Val Ser Gly Pro
500 505
25

<210> 3

30 <211> 1730

<212> ADN

<213> *Torenia hybrida*

<220>

35 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad para convertir directamente flavanona en flavona

<400> 3

40

atcgaaaccg ctatatcatt acatttacaa cagcgctaaa aaaatatata taaagc 56
45 atg gac aca gtc tta atc aca ctc tac acc gcc ctg ttc gtc atc acc 104
Met Asp Thr Val Leu Ile Thr Leu Tyr Thr Ala Leu Phe Val Ile Thr
1 5 10 15
50 acc acc ttc ctc ctc ctc ctc cgc cga agg gga cca ccg tct ccg ccc 152
Thr Thr Phe Leu Leu Leu Leu Arg Arg Arg Gly Pro Pro Ser Pro Pro
20 25 30
55 ggt oct ctc tcc cta ccc ata att ggc cac ctc cac ctc ctc ggc cca 200
Gly Pro Leu Ser Leu Pro Ile Ile Gly His Leu His Leu Leu Gly Pro
35 40 45
60 aga ctc cac cac aag ttc cat gaa ttc tca ctc aaa tac ggc cca ttg 248
Arg Leu His His Thr Phe His Glu Phe Ser Leu Lys Tyr Gly Pro Leu
50 55 60
65

ES 2 322 770 T3

	atc cag ctc aag ctc ggc tgc atc ccg tgc gtc gtg gcc tgc acg ccc	296
	Ile Gln Leu Lys Leu Gly Ser Ile Pro Cys Val Val Ala Ser Thr Pro	
5	65 70 75 80	
	gag ctc gcg aga gag ttt ctt aag acg aac gag ctc gcg ttc tcc tct	344
	Glu Leu Ala Arg Glu Phe Leu Lys Thr Asn Glu Leu Ala Phe Ser Ser	
10	85 90 95	
	cgc aag cac tct acg gcc ata gac atc gtc acc tac gac tgc tcc ttt	392
	Arg Lys His Ser Thr Ala Ile Asp Ile Val Thr Tyr Asp Ser Ser Phe	
	100 105 110	
15	gct ttc tct ccg tac gga ccc tac tgg aag tac atc aag aaa ctg tgt	440
	Ala Phe Ser Pro Tyr Gly Pro Tyr Trp Lys Tyr Ile Lys Lys Leu Cys	
	115 120 125	
20	acc tac gag ctg ctc gga gcg agg aac ctc gga cac ttt cag ccc att	488
	Thr Tyr Glu Leu Leu Gly Ala Arg Asn Leu Gly His Phe Gln Pro Ile	
	130 135 140	
25	agg aat ctc gag gtc agg tcc ttt ctg cag ctt ctg atg cac aag agc	536
	Arg Asn Leu Glu Val Arg Ser Phe Leu Gln Leu Leu Met His Lys Ser	
	145 150 155 160	
30	ttt aag ggc gag agt gtg aat gtg aca gac gag ctg gtg agg ctg acg	584
	Phe Lys Gly Glu Ser Val Asn Val Thr Asp Glu Leu Val Arg Leu Thr	
	165 170 175	
35	agc aat gtg ata tcc cac atg atg ctg agc ata agg tgc tgc gaa gat	632
	Ser Asn Val Ile Ser His Met Met Leu Ser Ile Arg Cys Ser Glu Asp	
	180 185 190	
40	gaa ggc gat gct gag gcg gcg aga aca gtg ata cgc gag gtg acg cag	680
	Glu Gly Asp Ala Glu Ala Ala Arg Thr Val Ile Arg Glu Val Thr Gln	
	195 200 205	
45	ata ttt ggg gaa ttc gat gtt acg gac ata ata tgg ttt tgc aag aaa	728
	Ile Phe Gly Glu Phe Asp Val Thr Asp Ile Ile Trp Phe Cys Lys Lys	
	210 215 220	
50	ttc gat ctg cag ggg ata aag aag agg tca gag gat att cag agg agg	776
	Phe Asp Leu Gln Gly Ile Lys Lys Arg Ser Glu Asp Ile Gln Arg Arg	
	225 230 235 240	
55	tat gat gct ttg ctc gag aag att att agt gat aga gag aga tgc agg	824
	Tyr Asp Ala Leu Leu Glu Lys Ile Ile Ser Asp Arg Glu Arg Ser Arg	
	245 250 255	

ES 2 322 770 T3

	agg caa aat cgt gat aag cat ggt ggc ggt aac aat gag gag gcc aag	872
	Arg Gln Asn Arg Asp Lys His Gly Gly Gly Asn Asn Glu Glu Ala Lys	
5	260 265 270	
	gat ttt ctt gat atg ttg ctt gat gtg atg gag agt ggg gac acg gag	920
	Asp Phe Leu Asp Met Leu Leu Asp Val Met Glu Ser Gly Asp Thr Glu	
10	275 280 285	
	gtc aaa ttc act aga gag cat ctc aag gct ttg att ctg gat ttc ttc	968
	Val Lys Phe Thr Arg Glu His Leu Lys Ala Leu Ile Leu Asp Phe Phe	
15	290 295 300	
	acg gcc ggt acg gac aca aca gcc ata gcc acc gag tgg gcc atc gcc	1016
	Thr Ala Gly Thr Asp Thr Thr Ala Ile Ala Thr Glu Trp Ala Ile Ala	
20	305 310 315 320	
	gag ctc atc aac aac ccg aac gtc ttg aag aag gcc caa gaa gaa ata	1064
	Glu Leu Ile Asn Asn Pro Asn Val Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile	
25	325 330 335	
	tcc cgg atc atc gga acc aag cgg atc gta caa gaa tcc gac gcc cca	1112
	Ser Arg Ile Ile Gly Thr Lys Arg Ile Val Gln Glu Ser Asp Ala Pro	
30	340 345 350	
	gac cta ccc tac ctc cag gcc atc atc aag gag acg ttc cgg ctc cac	1160
	Asp Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Ile Ile Lys Glu Thr Phe Arg Leu His	
35	355 360 365	
	cca ccg atc ccg atg ctc tgg cgt aag tcc acc tcc gat tgc acg gtc	1208
	Pro Pro Ile Pro Met Leu Ser Arg Lys Ser Thr Ser Asp Cys Thr Val	
40	370 375 380	
	aac ggc tac aaa atc caa gcc aag agc ctc ttg ttc gtg aac ata tgg	1256
	Asn Gly Tyr Lys Ile Gln Ala Lys Ser Leu Leu Phe Val Asn Ile Trp	
45	385 390 395 400	
	tcc atc ggt cga aac cct aat tac tgg gaa agc cct atg gag ttc agg	1304
	Ser Ile Gly Arg Asn Pro Asn Tyr Trp Glu Ser Pro Met Glu Phe Arg	
50	405 410 415	
	ccc gag cgg ttc ttg gag aag gga cgc gag tcc atc gac gtc aag ggc	1352
	Pro Glu Arg Phe Leu Glu Lys Gly Arg Glu Ser Ile Asp Val Lys Gly	
55	420 425 430	
	cag cac ttt gag ctc ttg cct ttt ggg acg ggc cgc agg ggc tgt ccc	1400
	Gln His Phe Glu Leu Leu Pro Phe Gly Thr Gly Arg Arg Gly Cys Pro	
60	435 440 445	
65		

ES 2 322 770 T3

5 ggt atg ttg ctg gct ata caa gag gtg gtc agc atc att ggg acc atg 1448
 Gly Met Leu Leu Ala Ile Gln Glu Val Val Ser Ile Ile Gly Thr Met
 450 455 460
 gtt cag tgc ttc gac tgg aaa ttg gca gat ggt tcg ggc aat aat gtg 1496
 Val Gln Cys Phe Asp Trp Lys Leu Ala Asp Gly Ser Gly Asn Asn Val
 10 465 470 475 480
 gac atg acc gaa cgg tct gga ttg acc gct ccg aga gcg ttc gat ctg 1544
 Asp Met Thr Glu Arg Ser Gly Leu Thr Ala Pro Arg Ala Phe Asp Leu
 485 490 495
 15 gtt tgc cgg ttg tat cca cgg gtt gac ccg gcc aca ata tcg ggt gct 1592
 Val Cys Arg Leu Tyr Pro Arg Val Asp Pro Ala Thr Ile Ser Gly Ala
 500 505 510 512
 20 tgatgtagta ggggtgaggcg cgtgttggtg ttttatcttt cgggttttggt ctgttagtat 1652
 tattatgggc tgtgttgaag cctcaaggat tttaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1712
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1730
 25

<210> 4
 30 <211> 512
 <212> PRT
 <213> *Torenia hybrida*
 35 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene actividad para convertir directamente flavanona en flavona
 <400> 4

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

65

ES 2 322 770 T3

	Arg Lys His Ser Thr Ala Ile Asp Ile Val Thr Tyr Asp Ser Ser Phe		
	100	105	110
5	Ala Phe Ser Pro Tyr Gly Pro Tyr Trp Lys Tyr Ile Lys Lys Leu Cys		
	115	120	125
	Thr Tyr Glu Leu Leu Gly Ala Arg Asn Leu Gly His Phe Gln Pro Ile		
10	130	135	140
	Arg Asn Leu Glu Val Arg Ser Phe Leu Gln Leu Leu Met His Lys Ser		
	145	150	155
15	Phe Lys Gly Glu Ser Val Asn Val Thr Asp Glu Leu Val Arg Leu Thr		
	165	170	175
	Ser Asn Val Ile Ser His Met Met Leu Ser Ile Arg Cys Ser Glu Asp		
20	180	185	190
	Glu Gly Asp Ala Glu Ala Ala Arg Thr Val Ile Arg Glu Val Thr Gln		
	195	200	205
25	Ile Phe Gly Glu Phe Asp Val Thr Asp Ile Ile Trp Phe Cys Lys Lys		
	210	215	220
	Phe Asp Leu Gln Gly Ile Lys Lys Arg Ser Glu Asp Ile Gln Arg Arg		
30	225	230	235
	Tyr Asp Ala Leu Leu Glu Lys Ile Ile Ser Asp Arg Glu Arg Ser Arg		
	245	250	255
35	Arg Gln Asn Arg Asp Lys His Gly Gly Gly Asn Asn Glu Glu Ala Lys		
	260	265	270
	Asp Phe Leu Asp Met Leu Leu Asp Val Met Glu Ser Gly Asp Thr Glu		
40	275	280	285
	Val Lys Phe Thr Arg Glu His Leu Lys Ala Leu Ile Leu Asp Phe Phe		
	290	295	300
45	Thr Ala Gly Thr Asp Thr Thr Ala Ile Ala Thr Glu Trp Ala Ile Ala		
	305	310	315
	Glu Leu Ile Asn Asn Pro Asn Val Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile		
50	325	330	335
	Ser Arg Ile Ile Gly Thr Lys Arg Ile Val Gln Glu Ser Asp Ala Pro		
	340	345	350
55	Asp Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Ile Ile Lys Glu Thr Phe Arg Leu His		
	355	360	365
	Pro Pro Ile Pro Met Leu Ser Arg Lys Ser Thr Ser Asp Cys Thr Val		
60	370	375	380
	Asn Gly Tyr Lys Ile Gln Ala Lys Ser Leu Leu Phe Val Asn Ile Trp		
65	385	390	395
			400

ES 2 322 770 T3

Ser Ile Gly Arg Asn Pro Asn Tyr Trp Glu Ser Pro Met Glu Phe Arg
 405 410 415
 5 Pro Glu Arg Phe Leu Glu Lys Gly Arg Glu Ser Ile Asp Val Lys Gly
 420 425 430
 Gln His Phe Glu Leu Leu Pro Phe Gly Thr Gly Arg Arg Gly Cys Pro
 10 435 440 445
 Gly Met Leu Leu Ala Ile Gln Glu Val Val Ser Ile Ile Gly Thr Met
 450 455 460
 15 Val Gln Cys Phe Asp Trp Lys Leu Ala Asp Gly Ser Gly Asn Asn Val
 465 470 475 480
 Asp Met Thr Glu Arg Ser Gly Leu Thr Ala Pro Arg Ala Phe Asp Leu
 20 485 490 495
 Val Cys Arg Leu Tyr Pro Arg Val Asp Pro Ala Thr Ile Ser Gly Ala
 500 505 510

25

<210> 5

30 <211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador

<400> 5

40 aaataggatc caagcatgga cacagtctta a

31

<210> 6

45 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cebador

<400> 6

55 cccttctaga tcaagcaccc gatattgtgg ccggg

35

<210> 7

<211> 1770

60 <212> ADN

<213> *Perilla frutescens*

<220>

65 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene actividad para convertir directamente flavanona en flavona

ES 2 322 770 T3

<400> 7

5	tgtcgaacgga gcaagtggaa atg gca ctg tac gcc gcc ctc ttc ctc ctg tcc	53
	Met Ala Leu Tyr Ala Ala Leu Phe Leu Leu Ser	
	1 5 10	
10	gcc gcc gtg gtc cgc tcc gtt ctg gat cga aaa cgc ggg cgg ccg ccc	101
	Ala Ala Val Val Arg Ser Val Leu Asp Arg Lys Arg Gly Arg Pro Pro	
	15 20 25	
15	tac cct ccc ggg ccg ttc cct ctt ccc atc atc ggc cac tta cac ctc	149
	Tyr Pro Pro Gly Pro Phe Pro Leu Pro Ile Ile Gly His Leu His Leu	
	30 35 40	
20	ctc ggg ccg aga ctc cac caa acc ttc cac gat ctg tcc caa cgg tac	197
	Leu Gly Pro Arg Leu His Gln Thr Phe His Asp Leu Ser Gln Arg Tyr	
	45 50 55	
25	ggg ccc tta atg cag ctc cgc ctc ggg tcc atc cgc tgc gtc att gct	245
	Gly Pro Leu Met Gln Leu Arg Leu Gly Ser Ile Arg Cys Val Ile Ala	
	60 65 70 75	
30	gcc tgg ccg gag ctc gcc aag gaa tgc ctc aag aca cac gag ctc gtc	293
	Ala Ser Pro Glu Leu Ala Lys Glu Cys Leu Lys Thr His Glu Leu Val	
	80 85 90	
35	ttc tcc tcc cgc aaa cac tcc acc gcc att gat atc gtc acc tac gat	341
	Phe Ser Ser Arg Lys His Ser Thr Ala Ile Asp Ile Val Thr Tyr Asp	
	95 100 105	
40	tca tcc ttc gct ttc tct ccc tac ggg cct tac tgg aaa ttc atc aag	389
	Ser Ser Phe Ala Phe Ser Pro Tyr Gly Pro Tyr Trp Lys Phe Ile Lys	
	110 115 120	
45	aaa tta tgc acc tac gag ctg ctc ggg gcc cga aat ctc gcc cac ttt	437
	Lys Leu Cys Thr Tyr Glu Leu Leu Gly Ala Arg Asn Leu Ala His Phe	
	125 130 135	

ES 2 322 770 T3

	cag ccc atc agg act ctc gaa gtc aag tct ttc ctc caa att ctt atg	485
	Gln Pro Ile Arg Thr Leu Glu Val Lys Ser Phe Leu Gln Ile Leu Met	
5	140 145 150 155	
	cgc aag ggt gaa tcg ggg gag agc ttc aac gtg act gag gag ctc gtg	533
	Arg Lys Gly Glu Ser Gly Glu Ser Phe Asn Val Thr Glu Glu Leu Val	
10	160 165 170	
	aag ctg acg agc aac gtc ata tcg cat atg atg ctg agc ata cgg tgt	581
	Lys Leu Thr Ser Asn Val Ile Ser His Met Met Leu Ser Ile Arg Cys	
	175 180 185	
15	tca gag acg gag tcg gag gcg gag gcg gog agg acg gtg att cgg gag	629
	Ser Glu Thr Glu Ser Glu Ala Glu Ala Ala Arg Thr Val Ile Arg Glu	
	190 195 200	
20	gtc acg cag ata ttt ggg gag ttc gac gtc tcc gac atc ata tgg ctt	677
	Val Thr Gln Ile Phe Gly Glu Phe Asp Val Ser Asp Ile Ile Trp Leu	
	205 210 215	
25	tgt aag aac ttc gat ttc caa ggt ata agg aag cgg tcc gag gat atc	725
	Cys Lys Asn Phe Asp Phe Gln Gly Ile Arg Lys Arg Ser Glu Asp Ile	
	220 225 230 235	
30	cag Asp Leu Gln Gly Ile Lys Lys Arg Ser Glu Asp Ile Gln Arg Arg	
	225 230 235 240	
	Tyr Asp Ala Leu Leu Glu Lys Ile Ile Ser Asp Arg Glu Arg Ser Arg	
	245 250 255	
35	Arg Gln Asn Arg Asp Lys His Gly Gly Gly Asn Asn Glu Glu Ala Lys	
	260 265 270	
	Asp Phe Leu Asp Met Leu Leu Asp Val Met Glu Ser Gly Asp Thr Glu	
40	275 280 285	
	Val Lys Phe Thr Arg Glu His Leu Lys Ala Leu Ile Leu Asp Phe Phe	
	290 295 300	
45	Thr Ala Gly Thr Asp Thr Thr Ala Ile Ala Thr Glu Trp Ala Ile Ala	
	305 310 315 320	
	acc gcc gcc acc gac acg acg gcg atc gtg tgt gaa tgg gcg ata gca	965
	Thr Ala Gly Thr Asp Thr Thr Ala Ile Val Cys Glu Trp Ala Ile Ala	
50	300 305 310 315	
	gaa gtg atc aac aat cca aat gtg ttg aag aaa gct caa gaa gag att	1013
	Glu Val Ile Asn Asn Pro Asn Val Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile	
55	320 325 330	
60		
65		

ES 2 322 770 T3

```

gcc aac atc gtc gga ttc gac aga att ctg caa gaa tcc gac gcc cca      1061
Ala Asn Ile Val Gly Phe Asp Arg Ile Leu Gln Glu Ser Asp Ala Pro
5          335          340          345
aat ctg ccc tac ctt caa gcc ctc atc aaa gaa aca ttc cgg ctc cac      1109
Asn Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Leu Ile Lys Glu Thr Phe Arg Leu His
10          350          355          360
cct cca atc cca atg ctg gcg agg aaa tcg atc tcc gac tgc gtc atc      1157
Pro Pro Ile Pro Met Leu Ala Arg Lys Ser Ile Ser Asp Cys Val Ile
15          365          370          375
gac ggc tac atg att ccg gcc aac acg ctg ctc ttc gtc aac ctc tgg      1205
Asp Gly Tyr Met Ile Pro Ala Asn Thr Leu Leu Phe Val Asn Leu Trp
20          380          385          390          395
tcc atg ggg cgg aac cct aaa atc tgg gac tac ccg acg gcg ttc cag      1253
Ser Met Gly Arg Asn Pro Lys Ile Trp Asp Tyr Pro Thr Ala Phe Gln
25          400          405          410
cog gag agg ttt ctg gag aag gaa aag gcc gcc atc gat gtt aaa ggg      1301
Pro Glu Arg Phe Leu Glu Lys Glu Lys Ala Ala Ile Asp Val Lys Gly
30          415          420          425
cag cat ttt gag ctg cta ccg ttc gga acg ggc agg aga ggc tgc cca      1349
Gln His Phe Glu Leu Leu Pro Phe Gly Thr Gly Arg Arg Gly Cys Pro
35          430          435          440
ggg atg ctt tta gcc att cag gag gtg gtc atc ata att ggg acg atg      1397
Gly Met Leu Leu Ala Ile Gln Glu Val Val Ile Ile Ile Gly Thr Met
40          445          450          455
att caa tgc ttc gat tgg aag ctg ccc gac ggc tcc ggc cat gtt gat      1445
Ile Gln Cys Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asp Gly Ser Gly His Val Asp
45          460          465          470          475
atg gca gaa cgg cca ggg ctc acg gca ccg cga gag acc gat ttg ttt      1493
Met Ala Glu Arg Pro Gly Leu Thr Ala Pro Arg Glu Thr Asp Leu Phe
50          480          485          490
tgc cgt gtg gtg ccg cga gtt gat ccg ttg gtt gtt tcc acc cag      1538
Cys Arg Val Val Pro Arg Val Asp Pro Leu Val Val Ser Thr Gln
55          495          500          505
tgatcacccc ctttaaattt attaatgata tatttttatt ttgagaaaaa ataaaaatgc      1598
taattgtttt gtttcatgat gtaattgtta attagtctct attgtgcgct gtcgcgtgtc      1658
gogtggttta agataagatt gtatcattgg tacctaggat gtattttcat tttcaataaa      1718
ttattttgtg ctgtgtatat taaaaaaaaa aaagaaaaaa aaaaaaaaaa aa      1770

```

<210> 8

<211>

<212> PRT

ES 2 322 770 T3

<213> *Perilla frutescens*

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de una proteína que tiene actividad para convertir directamente flavanona en flavona

<400> 8

```

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

```

ES 2 322 770 T3

Phe Gln Gly Ile Arg Lys Arg Ser Glu Asp Ile Gln Arg Arg Tyr Asp
 225 230 235 240
 5 Ala Leu Leu Glu Lys Ile Ile Thr Asp Arg Glu Lys Gln Arg Arg Thr
 245 250 255
 His Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Lys Asp Phe Leu Asp Met
 10 260 265 270
 Phe Leu Asp Ile Met Glu Ser Gly Lys Ala Glu Val Lys Phe Thr Arg
 275 280 285
 15 Glu His Leu Lys Ala Leu Ile Leu Asp Phe Phe Thr Ala Gly Thr Asp
 290 295 300
 Thr Thr Ala Ile Val Cys Glu Trp Ala Ile Ala Glu Val Ile Asn Asn
 20 305 310 315 320
 Pro Asn Val Leu Lys Lys Ala Gln Glu Glu Ile Ala Asn Ile Val Gly
 325 330 335
 25 Phe Asp Arg Ile Leu Gln Glu Ser Asp Ala Pro Asn Leu Pro Tyr Leu
 340 345 350
 Gln Ala Leu Ile Lys Glu Thr Phe Arg Leu His Pro Pro Ile Pro Met
 30 355 360 365
 Leu Ala Arg Lys Ser Ile Ser Asp Cys Val Ile Asp Gly Tyr Met Ile
 370 375 380
 35 Pro Ala Asn Thr Leu Leu Phe Val Asn Leu Trp Ser Met Gly Arg Asn
 385 390 395 400
 Pro Lys Ile Trp Asp Tyr Pro Thr Ala Phe Gln Pro Glu Arg Phe Leu
 40 405 410 415
 Glu Lys Glu Lys Ala Ala Ile Asp Val Lys Gly Gln His Phe Glu Leu
 420 425 430
 45 Leu Pro Phe Gly Thr Gly Arg Arg Gly Cys Pro Gly Met Leu Leu Ala
 435 440 445
 Ile Gln Glu Val Val Ile Ile Ile Gly Thr Met Ile Gln Cys Phe Asp
 50 450 455 460
 Trp Lys Leu Pro Asp Gly Ser Gly His Val Asp Met Ala Glu Arg Pro
 465 470 475 480
 55 Gly Leu Thr Ala Pro Arg Glu Thr Asp Leu Phe Cys Arg Val Val Pro
 485 490 495
 Arg Val Asp Pro Leu Val Val Ser Thr Gln
 60 500 505
 65