



# Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

## SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-143300-00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:20:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

21. EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

54. TÍTULO METODO PARA PRODUCCION DE UNA PLANTA DE CRISANTEMO QUE TIENE  
PETALOS QUE CONTIENEN DELFINIDINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL \_\_\_\_\_

71. SOLICITANTE INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY NATIONAL AGRICULTURE  
AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION y SUNTORY HOLDINGS LIMITED

DOMICILIO IBARAKI, JAPON, y OSAKA, JAPON, Respectivamente

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ  
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C., \_\_\_\_\_



Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-143300- -00000-0000

Fecha: 2011-10-24 17:20:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE  
PCT  
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE  
(71)

Nombre: INCORPORATED  
ADMINISTRATIVE AGENCY NATIONAL  
AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH  
ORGANIZATION y SUNTORY HOLDINGS  
LIMITED

Sociedades constituidas existentes bajo las  
leyes de Japón, respectivamente.

Dirección: 3-1-1 Kannondai,  
Tsukuba-shi,  
Ibaraki 3058517,  
Japón

y

1-40, Dojimahama 2-chome,  
Kita-ku, Osaka-shi,  
Osaka 530-8203,  
Japón

Respectivamente

Domicilio: Ibaraki,  
Japón

y

Osaka,  
Japón

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

\_\_\_\_\_

3

REPRESENTANTE  
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ  
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35  
Teléfono: 347 36 11  
Fax: 211 86 50  
E-mail: [clientes@cavelier.com](mailto:clientes@cavelier.com)  
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344

T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)  
(72)

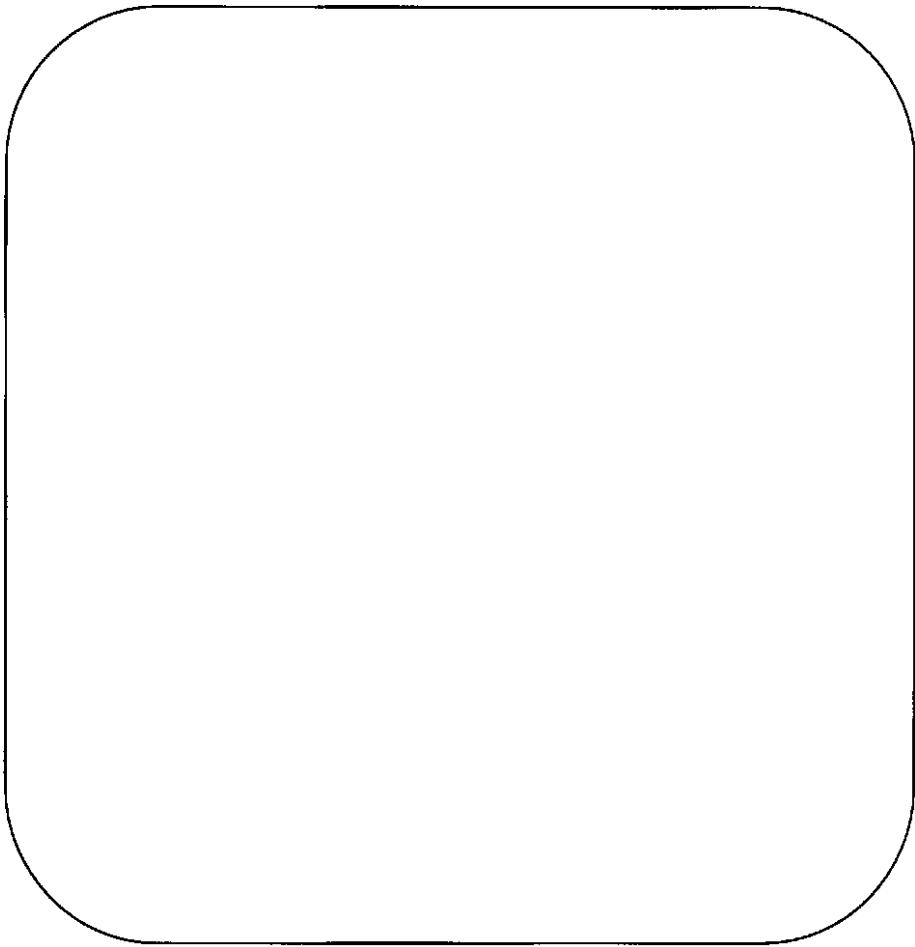
1. Naonobu NODA  
c/o National Institute of Floricultural  
Science,  
Incorporated Administrative Agency  
National Agriculture and Food Research  
Organization,  
2-1, Fujimoto,  
Tsukuba-shi,  
Ibariki 3058519,  
Japón

2. Ryutaro AIDA  
c/o National Institute of Floricultural  
Science,  
Incorporated Administrative Agency  
National Agriculture and Food Research  
Organization,  
2-1, Fujimoto,  
Tsukuba-shi,  
Ibariki 3058519,  
Japón

|                     | <b>3. Sanae SATO</b><br>c/o National Institute of Floricultural Science,<br>Incorporated Administrative Agency<br>National Agriculture and Food Research Organization,<br>2-1, Fujimoto,<br>Tsukuba-shi,<br>Ibaraki 3058519,<br>Japón                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>4. Akemi OHMIYA</b><br>c/o National Institute of Floricultural Science,<br>Incorporated Administrative Agency<br>National Agriculture and Food Research Organization,<br>2-1, Fujimoto,<br>Tsukuba-shi,<br>Ibariki 3058519,<br>Japón    |                     |            |                          |           |                            |                    |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------|--------------------------|-----------|----------------------------|--------------------|
| <b>5</b>            | <b>PCT (86)</b><br>Solicitud Internacional No. <u>PCT/JP2010/053904</u> Fecha: <u>09 de marzo de 2010</u><br>Publicación Internacional No. <u>WO 2010/122849 A1</u> Fecha: <u>28 de octubre de 2010</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                            |                     |            |                          |           |                            |                    |
| <b>6</b>            | <b>Título (54)</b><br><b><u>MÉTODO PARA PRODUCCIÓN DE UNA PLANTA DE CRISANTEMO QUE TIENE PÉTALOS QUE CONTIENEN DELFINIDINA</u></b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                            |                     |            |                          |           |                            |                    |
| <b>7</b>            | <b>Clasificación Internacional (51)</b> <u>C12N 015/029</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                            |                     |            |                          |           |                            |                    |
| <b>8</b>            | <b>Prioridad</b><br>SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <table border="1"><thead><tr><th>(33) País de Origen</th><th>(32) Fecha</th><th>(31) Número de Solicitud</th></tr></thead><tbody><tr><td><u>JP</u></td><td><u>24 de abril de 2009</u></td><td><u>2009-107054</u></td></tr></tbody></table> | (33) País de Origen | (32) Fecha | (31) Número de Solicitud | <u>JP</u> | <u>24 de abril de 2009</u> | <u>2009-107054</u> |
| (33) País de Origen | (32) Fecha                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | (31) Número de Solicitud                                                                                                                                                                                                                   |                     |            |                          |           |                            |                    |
| <u>JP</u>           | <u>24 de abril de 2009</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <u>2009-107054</u>                                                                                                                                                                                                                         |                     |            |                          |           |                            |                    |
| <b>9</b>            | <b>Comprobante de pago No.:</b> <u>11-101381</u> <b>Fecha:</b> <u>14 de octubre de 2010</u>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                            |                     |            |                          |           |                            |                    |
| <b>10</b>           | <b>Anexos:</b><br><input checked="" type="checkbox"/> Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.00.<br><input type="checkbox"/> Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por.<br><input checked="" type="checkbox"/> Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.<br><input checked="" type="checkbox"/> Poder, si fuere el caso de <b>SUNTORY HOLDINGS LIMITED</b> .<br><input type="checkbox"/> Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.<br><input type="checkbox"/> Declaraciones.<br><input type="checkbox"/> Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)<br><input checked="" type="checkbox"/> Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2010/122849 A1.<br><input checked="" type="checkbox"/> Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)<br><input type="checkbox"/> Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.<br><input type="checkbox"/> Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, copia del contrato de acceso.<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.<br><input type="checkbox"/> Arte final 12x12<br><input type="checkbox"/> De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.<br><input checked="" type="checkbox"/> Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS |                                                                                                                                                                                                                                            |                     |            |                          |           |                            |                    |

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia De Paez  
C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCT

**DOCUMENTOS ANEXOS**

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/122849 A1

Descripción:

Páginas 41 en español

Reivindicaciones: Número (s) 8

Figuras: Número (s) 4

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio de nombre de uno de los solicitantes **NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION** por **INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION**

5. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio de nombre del inventor **Sanae KISHIMOTO** por **Sanae SATO**.

6. ☒ **Forma PCT/IB/306.** Notificación de la inscripción del cambio de dirección de los inventores **Naonobu NODA, Ryutaro AIDA y Akemi OHMIYA**.

7. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE  
INTERNACIONAL**

**Notaría  
Sexta**

**6**

**DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.**

COPIA NUMERO 12

DE LA ESCRITURA NUMERO:  
FECHA: 09/Agosto/2011

**4017**

ACTO O CONTRATO:  
PODER ESPECIAL  
OTORGANTES:  
CAVELIER ABOGADOS



CERTIFICADO SC 3980-1  
PRESTACION DEL  
SERVICIO PUBLICO  
NOTARIAL  
ISO 9001:2000  
NTC-ISO 9001:2000



**AMPARO QUINTERO ARTURO**

**NOTARIA SEXTA**

**CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41**  
**Correo Electrónico: [notariasexta@etb.net.co](mailto:notariasexta@etb.net.co)**



ESCRITURA PUBLICA NUMERO - - - - 4017 - - - -  
No. CUATRO MIL DIECISIETE - - - - -  
DE FECHA: NUEVE (9) DE AGOSTO DEL AÑO DOS MIL ONCE  
(2011) - - - - -  
OTORGADA EN LA NOTARIA SEXTA (6ª.) DEL  
CÍRCULO NOTARIAL DE BOGOTÁ, D.C. - - - - -

ACTO: PODER - - - - -

PODERDANTE: CAVELIER ABOGADOS Nit. 860.041.367-3

APODERADOS: - - - - -

|                               |                 |
|-------------------------------|-----------------|
| LUZ CLEMENCIA DE PAEZ         | C.C. 35.456.344 |
| NIDIA OSORIO LOPEZ            | C.C. 39.787.682 |
| OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA | C.C. 79.524.634 |
| EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY | C.C. 52.006.265 |
| JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL    | C.C. 16.209.380 |

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, República de Colombia, ante mí - MABEL ANDREA RODRIGUEZ DIAZ - Notaria(o) Sexta(o) (6) - Encargada - de este Circulo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: - - - - -

Compareció: con minuta escrita la señora ADRIANA ZAPATA GIRALDO, mayor de edad, vecina de esta ciudad, casada, identificada con la cédula de ciudadanía No. 51.680.061 de Bogotá, y dijo: - - - - -

----- ESTIPULACIONES -----

PRIMERA: Que obra en su calidad de Representante Legal de la sociedad denominada CAVELIER ABOGADOS domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. - - - - -

SEGUNDA: Que SUNTORY HOLDINGS LIMITED, sociedad constituida y existente bajo las leyes de Japón, domiciliada en 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japón, designó a CAVELIER ABOGADOS como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. - - - - -

TERCERA: Que en su carácter de representante legal de CAVELIER ABOGADOS, y en desarrollo de la facultad otorgada por SUNTORY HOLDINGS LIMITED, confiere poder a los abogados LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, T.P.A. No.



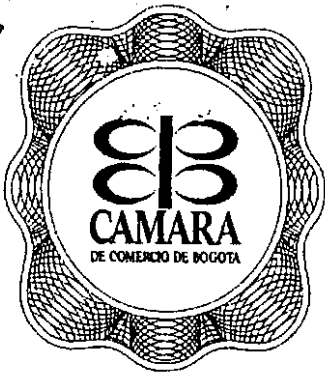
23.555, identificada con cédula de ciudadanía número **35.456.344** de Usaquén, **NIDIA OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No.73.366, identificada con cédula de ciudadanía número **39.787.682** de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número **79.524.634** de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número **52.006.265** de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARISTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número **16.209.380** de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: -----

a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos -----

b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. -----

**CUARTO:** Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. -----

**QUINTO:** Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del



\*01\*



\* 1 0 7 0 0 6 3 9 2 \*

7

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

15 DE JULIO DE 2011 HORA 09:02:14

R032051265

PAGINA: 1 de 3

\*\*\*\*\*

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS

N.I.T. : 860041367-3

DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO ( CUNDINAMARCA )

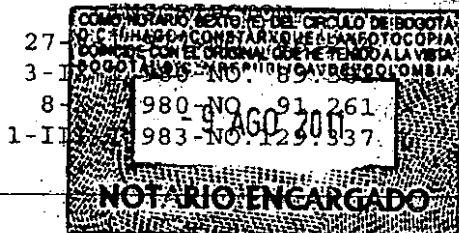
CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

| ESCRITURAS NO. | FECHA       | NOTARIA  |
|----------------|-------------|----------|
| 842            | 10-V-1.977  | 18. BTA. |
| 3.430          | 1-VII-1.980 | 6A. BTA. |
| 4.844          | 10-IX-1.980 | 6A. BTA. |
| 432            | 10-II-1.983 | 6A. BTA. |



|             |               |                 |                   |         |
|-------------|---------------|-----------------|-------------------|---------|
| 7.710       | 10-X-1.984    | 6A. BTA.        | 15-XI-1.984-NO.   | 1.559   |
| 7.305       | 21-X-1.985    | 6A. BTA.        | 18-XI-1.985-NO.   | 1.906   |
| 2.567       | 29-IV-1.987   | 6A. BTA.        | 7-V- 1.987-NO.    | 2.386   |
| 4.278       | 3-VII-1.987   | 6A. BTA.        | 23-VII-1987 NO.   | 215.652 |
| 2.657       | 25- IV-1.988  | 6A. BTA.        | 19- V -1988-NO.   | 2,740   |
| 9.033       | 21-XII-1.990  | 6A. BTA.        | 10- I - 1991-NO.  | 3.786   |
| 25          | 3- I -1.991   | 6A. BTA.        | 10- I - 1991-NO.  | 3.787   |
| 1.608       | 8-III-1.991   | 6A. BTA.        | 14-III- 1991-NO.  | 3.841   |
| 2.155       | 2-IV- 1.991   | 6A. BTA.        | 8-IV - 1991-NO.   | 3.862   |
| 797         | 7-II -1.991   | 6A. BTA.        | 7- V -1991-NO.    | 3.882   |
| 1.739       | 14-III-1.991  | 6A. BTA.        | 7- V -1991-NO.    | 3.881   |
| 5.886       | 21-VIII-1.991 | 6A. BTA.        | 27-VIII-1991 NO.  | 4.019   |
| 8.596       | 4-XII -1.991  | 6A. BTA.        | 16-III -1992 NO.  | 4.430   |
| 1.494       | 10-III -1.992 | 6A. BTA.        | 19-III -1992 NO.  | 4.436   |
| 4.205       | 8 -VII -1.992 | 6A. BTA.        | 15-VII -1992 NO.  | 4.554   |
| 8.829       | 16-XII -1.992 | 6A. BTA.        | 24-XII -1992 NO.  | 4.819   |
| 12          | 5-I -1.993    | 6 STAFE BTA     | 13-I -1993 NO.    | 4.850   |
| 4.877       | 29-VI -1.993  | 6 STAFE BTA     | 7-VII -1993 NO.   | 5.065   |
| 5.216       | 12-VII -1.993 | 6 STAFE BTA     | 16-VII -1993 NO.  | 5.077   |
| ACTA NO. 71 | 2-IX- 1.993   | JUNTA DE SOCIOS | 29-IX- 1993 NO.   | 5.174   |
| 2.034       | 18-IV- 1.995  | 6 STAFE BTA     | 27- IV -1995 NO.  | 5.937   |
| 2.227       | 25-IV-1.995   | 6 STAFE BTA     | 18-VIII-1.995 NO. | 6.092   |
| 7.594       | 12-XII-1.995  | 6 STAFE BTA     | 19- XII-1.995 NO. | 6.294   |
| 676         | 11- II-1.997  | 6 STAFE BTA     | 14- II -1.997 NO. | 6.873   |

CERTIFICA:

REFORMAS:

| E.P. NO. | FECHA      | NOTARIA | CIUDAD      | FECHA      | NO. INSC. |
|----------|------------|---------|-------------|------------|-----------|
| 0004506  | 1997/07/28 | 0006    | BOGOTA D.C. | 1997/09/02 | 00007115  |
| 0002103  | 1998/04/08 | 0006    | BOGOTA D.C. | 1998/04/21 | 00007426  |
| 0005326  | 1998/08/06 | 0006    | BOGOTA D.C. | 1998/08/13 | 00007544  |
| 0005538  | 1998/08/14 | 0006    | BOGOTA D.C. | 1998/08/27 | 00007564  |
| 0007760  | 1998/11/10 | 0006    | BOGOTA D.C. | 1998/11/12 | 00007644  |
| 0006709  | 1997/11/04 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2000/12/04 | 00008481  |
| 0003034  | 2003/05/30 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2003/06/04 | 00882729  |
| 0003786  | 2004/07/16 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2004/07/28 | 00009703  |
| 0001432  | 2005/03/18 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2005/04/07 | 00009917  |
| 0004818  | 2005/08/22 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2005/08/26 | 00010008  |
| 0005506  | 2007/07/17 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2007/07/24 | 00010841  |
| 5453     | 2009/10/19 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2009/10/21 | 00012243  |
| 1336     | 2010/03/16 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2010/03/24 | 00012506  |
| 915      | 2011/02/28 | 0006    | BOGOTA D.C. | 2011/03/03 | 00013022  |

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

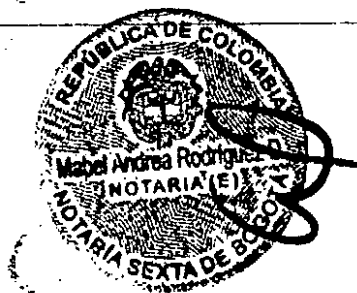
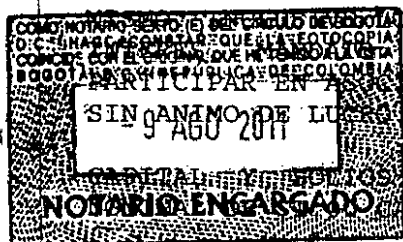
CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL EJERCICIO DE LAS ACTIVIDADES DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN INTERES, DE ALQUILER, DE ARRENDAMIENTO DE COSAS, DE ALQUILER DE COSAS CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES

SIN ANIMO DE LUCHAR

CERTIFICA:

CAPITAL: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR DE UNA, DISTRIBUIDO ASI :





\*01\*



\* 1 0 7 0 0 6 3 9 3 \*

8

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

15 DE JULIO DE 2011 HORA 09:02:14

R032051265

PAGINA: 2 de 3

\*\*\*\*\*

- SOCIO CAPITALISTA (S)

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE C.E. 000000000131100  
NO. CUOTAS: 1,200.00 VALOR: \$1,200.00  
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO N.I.T. 000008001722568  
NO. CUOTAS: 8,800.00 VALOR: \$8,800.00

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

ZAPATA GIRALDO ADRIANA C.C. 000000051680061  
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: \$0.00  
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA C.C. 000000035456344  
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: \$0.00  
SARMIENTO CHARRY EDNA DARMELY C.C. 000000052006265  
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: \$0.00  
TOBON FRANCO NATALIA C.C. 000000051725514  
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: \$0.00  
OSORIO LOPEZ NIDIA C.C. 000000039787682  
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: \$0.00  
CHAVARRO JORGE C.C. 000000016209380  
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: \$0.00  
CORREA BARBOSA OSCAR FERNANDO C.C. 000000079524634  
NO. CUOTAS: 0.00 VALOR: \$0.00  
TOTALES  
NO. CUOTAS: 10,000.00 VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS ( 1200 ) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALLECIMIENTO DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTAN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACION DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES

NOTARIO ENCARGADO

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.



CERTIFICA:  
 \*\* NOMBRAMIENTOS \*\*  
 QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL  
 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO  
 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

| NOMBRE                                                                                                                                                               | IDENTIFICACION       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO<br>CAVELIER GAVIRIA GERMAN                                                                                                             | C.C. 000000002877924 |
| QUE POR ACTA NO. 26 DE ASAMBLEA GENERAL DEL 13 DE MAYO DE 2010,<br>INSCRITA EL 24 DE MAYO DE 2010 BAJO EL NUMERO 00012618 DEL LIBRO XIII,<br>FUE (RON) NOMBRADO (S): |                      |

| NOMBRE                             | IDENTIFICACION         |
|------------------------------------|------------------------|
| DIRECTORA                          |                        |
| ZAPATA GIRALDO ADRIANA             | C.C. 0000000051680061  |
| REPRESENTANTE LEGAL                |                        |
| ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO    | N.I.T. 000008001722568 |
| REPRESENTANTE LEGAL                |                        |
| GALLON GIRALDO CARLOS              | C.C. 0000000019066425  |
| REPRESENTANTE LEGAL                |                        |
| GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE | C.E. 0000000000131100  |
| SOCIO COLECTIVO                    |                        |
| GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE | C.E. 0000000000131100  |
| SOCIO COLECTIVO                    |                        |
| ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO    | N.I.T. 000008001722568 |

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

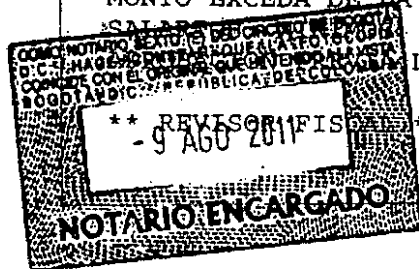
| NOMBRE                                                                        | IDENTIFICACION        |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE | C.E. 0000000000131100 |

CERTIFICA:  
QUE EL NOMBRAMIENTO DE GALLÓN GIRALDO CARLOS INSCRITO BAJO EL REGISTRO  
00012618 DEL LIBRO XIII, SE DA EN SU CONDICIÓN DE REPRESENTANTE LEGAL  
DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO.

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C ) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA ( 180 ) SALARIOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:





**\*01\***

\* 1 0 7 0 0 6 3 9 4 \*

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

15 DE JULIO DE 2011

HORA 09:02:14

R032051265

PAGINA: 3 de 3

\* \* \* \* \*

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

REVISOR FISCAL

IDENTIFICACION

RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO

C.C. 000000002877024

QUE POR ACTA NO. 33 DE CONCEJO DEL 25 DE MARZO DE 2011, INSCRITA EL 10 DE MAYO DE 2011 BAJO EL NUMERO 00013098 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

REVISOR FISCAL SUPLENTE

IDENTIFICACION

PAEZ SANABRIA ALVARO

C.C. 000000019323543

CERTIFICA:

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

\* \* \* EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE  
\* \* \* FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO \*

SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE 75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

RECUERDE INGRESAR A [www.supersociedades.gov.co](http://www.supersociedades.gov.co) PARA VERIFICAR SI SU EMPRESA ESTA OBLIGADA A REMITIR ESTADOS FINANCIEROS. EVITE SANCIONES.

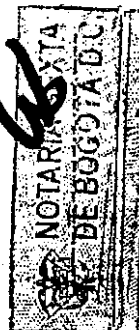
EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,

[illegible]

COMO NOTARIO CERTO EN EL CIRCULO DE BOGOTA  
D.C. HAGU CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA  
CORRIGE CON ELEGANCIA Y ENTENDIENDO A LA VISTA  
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

9\* A60\* 201\*

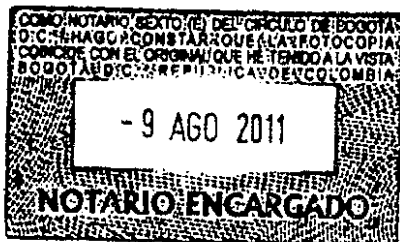
**NOTARIO ENCARGADO**



VALOR : \$ 3,700

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA  
POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO  
DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A  
CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Jaime Esteban R



# CAVELIER

## ABOGADOS

EDIFICIO SISKI  
CARRERA 4a N° 72-35  
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

### REPRESENTACION

### REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

#### SUNTORY HOLDINGS LIMITED

domiciliado (s) 1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku,  
en/of Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japan

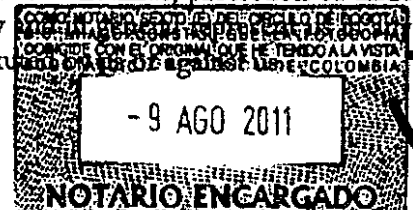
Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Circuito de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law actions and suits instituted against us in Colombia.



The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power, representative of a third party, when summoned to appear, or as intervenor ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the

mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 3rd day of June, 2011

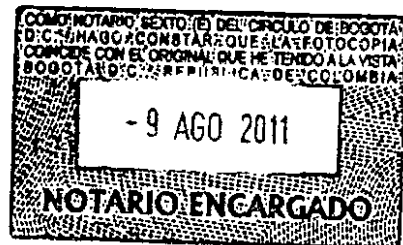
En/in Osaka, Japan.

Por/by Kazushi Takemoto, Executive General Manager

Firma/Signature

K. Takemoto

Kazushi Takemoto, Executive General Manager



Nota:

#### PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada\*.

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada\* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

\*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

#### PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante. El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

#### FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/she purports to be. The Notary's signature should then be legalized\*.

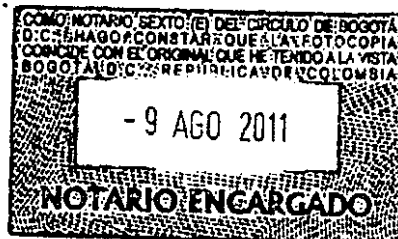
In addition a legalized copy\* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

\*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.

#### FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.

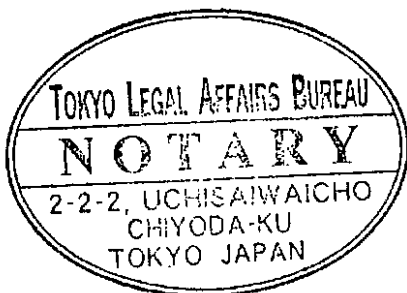


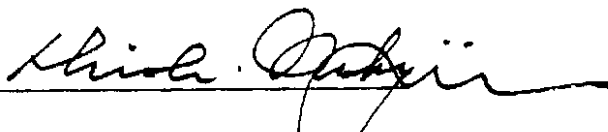
Registration NO. 1294 , 2011.

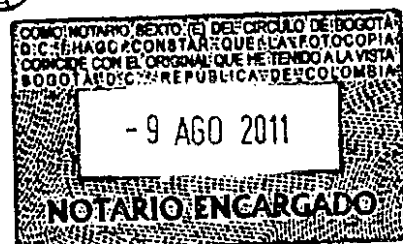
## NOTARIAL CERTIFICATE

This is to certify that the signature at the foot of foregoing document is genuine and authentic signature of Mr. Kazushi TAKEMOTO, Executive General Manager of SUNTORY HOLDINGS LIMITED, a corporation existing and organized under the laws of Japan, who has produced sufficient proof of his power to execute the said instrument on behalf of the above-mentioned corporation.

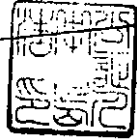
Dated this 6th day of July, 2011,



  
HIROSHI NAKAJIMA  
NOTARY



嘱託人サントリーホールディングス株式会社知的財産部長竹本一志の代理人  
城野喬は、本公証人に対し、嘱託人が別添文書に署名したことを自認している旨陳述  
した。



よって、これを認証する。  
平成23年 7 月 6 日、本公証人役場において  
東京都千代田区内幸町2丁目2番2号  
東京法務局所属  
公証人  
Notary

中島浩

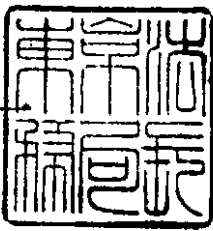


HIROSHI NAKAJIMA  
証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、  
真実のものであることを証明する。  
平成23年7 月 6 日

東京法務局長

相澤恵



APOSTILLE  
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN  
This public document  
2. has been signed by HIROSHI NAKAJIMA  
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau  
4. bears the seal/stamp of HIROSHI NAKAJIMA, NOTARY  
Certified  
5. at Tokyo  
6. JUL - 6 2011  
7. by the Ministry of Foreign Affairs  
8. 11-Nº 002587  
9. Seal/stamp:  
10. Signature  
Kazutoyo OYABE  
For the Minister for Foreign Affairs

COMO NOTARIO SECTORIAL DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ  
D.C. SE HA GOZADO CONSTANTE QUE LA FOTOCOPIA  
CONCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME TENGO A LA VISTA  
BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA

- 9 AGO 2011  
NOTARIO ENCARGADO

REPUBLICA DE COLOMBIA  
Mabel Andrea Rodríguez D.  
NOTARIA (E)  
SECTORIAL SECTORA DE BOGOTÁ

NOTARIA  
DE BOGOTÁ D.C.

MINISTRY OF FOREIGN AFFAIRS  
JAPAN

Aparece Documento de Representación de SUNTORY HOLDINGS LIMITED, con domicilio en 1-4, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japón; dado y firmado el día 3 de junio, 2011 en Osaka Japón, por Kazushi Takemoto, Gerente General (aparece firma).  
Aparece documento de nota para Sociedades

Registro No. 1294, 2011.

### CERTIFICADO NOTARIAL

La presente es para certificar que la firma al pie en el anterior documento es la firma genuina y autentica del Sr. Kazushi TAKEMOTO, Gerente General de SUNTORY HOLDINGS LIMITED, una sociedad vigente y organizada de conformidad con las leyes de Japón, quien ha producido suficiente prueba de su facultad para legalizar el dicho instrumento en nombre de la sociedad anteriormente mencionada.

Fecha el día 6 de Julio 2011

(Aparece sello:

OFICINA DE ASUNTOS LEGALES DE TOKIO,  
NOTARIO  
2-2-2, UCHISAIWAICHO  
CHIYODA-KU,  
TOKIO, JAPÓN)

(Aparece firma)

HIROSHI NAKAJIMA  
NOTARIO

### APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5 de 1961)

1. País: JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por HIROSHI NAKAJIMA

3. actuando en calidad de Notario de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio

4. Lleva el sello/timbre de HIROSHI NAKAJIMA, NOTARIO  
Certifica

5. en Tokio

6. Julio 6, 2011

7. por el Ministro de Relaciones Exteriores

8. 11- No. 002587

9. Sello/timbre:

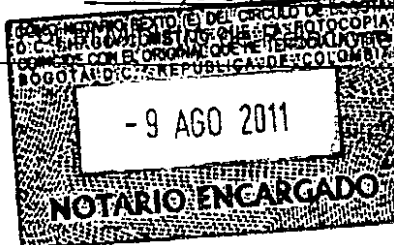
10. Firma

(Aparece sello:

MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES,  
JAPÓN)

(Aparece firma)

Kazutoyo OYABE



MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES  
JAPÓN  
2011-06-05  
JEFE DE LEGACIONES  
BOGOTÁ

MINISTERIO DE  
RELACIONES EXTERIORES  
JAPÓN  
2011-06-06  
JEFE DE LEGACIONES  
BOGOTÁ

Traductor e Interpreté Oficial  
Resol. No. 2839 Minjusticia 1991





documento de representación otorgado el día **03 de Junio de 2011** por **SUNTORY HOLDINGS LIMITED**, documento que está debidamente legalizado por Apostilla -----  
Presente la señora **ADRIANA ZAPATA GIRALDO** domiciliada en Bogotá, identificada como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública. -----

----- **HASTA AQUI LAS DECLARACIONES DEL INTERESADO** -----

**OTORGAMIENTO Y AUTORIZACIÓN.** Leído, el presente instrumento público por el otorgante, dio su asentimiento y en prueba de ello lo firma junto con la suscrita Notaria quien en esta forma lo autoriza. -----

**DERECHOS NOTARIALES:** \$ 44,000 - - - - -

**IVA:** \$ 34,688 - - - - -

**RECAUDO SUPERINTENDENCIA:** \$3.700.00 -----

**RECAUDO FONDO NACIONAL DE NOTARIADO:** \$3.700.00 -----

**RESOLUCIÓN 11621 DE DICIEMBRE 22 DE 2010 MODIFICADA MEDIANTE**

**RESOLUCIÓN 11903 DE DICIEMBRE 30 DE 2010** -----

**PAPEL NOTARIAL:** El presente instrumento público se extendió y firmó en las hojas de papel notarial números: 7-700135-632963, 7-700135-632970- - - - -

**EN BLANCO... EN BLANCO**

  
**ADRIANA ZAPATA GIRALDO**

**C.C. 51645001**

**TEL. 3473611**

**Representante Legal de CAVELIER ABOGADOS**





MABEL ANDREA RODRIGUEZ DIAZ  
NOTARIA(O) SEXTA(O) (6) (E) DE BOGOTÁ, D.C.

|             |                      |
|-------------|----------------------|
| Elaboró:    | Angelica.PE.Cavelier |
| Identificó: |                      |
| Revisó:     | JE                   |
| Cerró:      | HE                   |

14

ES FIEL Y DECIMA SEGUNDA COPIA ( FOTOCOPIA ) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO 4017 DE FECHA AGOSTO 09 DE 2011.



COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO EN 09 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA, MODIFICACION, O SUSTITUCIÓN, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTÀ, D.C. OCTUBRE 06 DE 2011

RESOLUCION 01 DE 2008

LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTÀ



AMPARO QUINTERO ARTURO  
NOTARIA SEXTA.

## (12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2010年10月28日(28.10.2010)(10) 国際公開番号  
WO 2010/122849 A1

PCT

- (51) 国際特許分類:  
C12N 15/29 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)  
A01H 1/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/053904
- (22) 国際出願日: 2010年3月9日(09.03.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2009-107054 2009年4月24日(24.04.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構(National Agriculture and Food Research Organization) [JP/JP]; 〒3058517 茨城県つくば市観音台3-1-1 Ibaraki (JP). サントリーホールディングス株式会社(Suntory Holdings Limited) [JP/JP]; 〒5308203 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目1番40号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 野田 尚信(NODA, Naonobu) [JP/JP]; 〒3058519 茨城県つくば市藤本2-1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所内 Ibaraki (JP). 間竜太郎(AIDA, Ryutaro) [JP/JP]; 〒3058519 茨城県つくば市藤本2-1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所内 Ibaraki (JP). 岸本 早苗(KISHIMOTO, Sanae) [JP/JP]; 〒3058519 茨城県つくば市藤本2-1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所内 Ibaraki (JP). 大宮 あけみ(OHMIYA, Ake-mi) [JP/JP]; 〒3058519 茨城県つくば市藤本2-1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 花き研究所内 Ibaraki (JP). 田中 良和(TANAKA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒6188503 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1 サントリー研究センター内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告(条約第21条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF CHRYSANTHEMUM PLANT HAVING DELPHINIDIN-CONTAINING PETALS

(54) 発明の名称: デルフィニジンを含むキク植物を生産する方法

(57) Abstract: Disclosed are: a method for producing a chrysanthemum plant having delphinidin-containing petals using a transcription regulation region for a chrysanthemum-derived flavanone 3-hydroxylase (F3H) gene; and a chrysanthemum plant, a progeny or a vegetative proliferation product of the plant, or a part or a tissue of the plant, the progeny or the vegetable proliferation product, particularly a petal or a cut flower of the plant. In the method for producing a chrysanthemum plant having delphinidin-containing petals, a flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3'5'H) is caused to be expressed in a chrysanthemum plant using a transcription regulation region for a chrysanthemum-derived flavanone 3-hydroxylase (F3H) gene.

(57) 要約: 本発明により、キク由来フラバノン3-水酸化酵素(F3H)遺伝子の転写調節領域を用いてデルフィニジンを含むキク植物を生産する方法、及び該調節領域が導入された、キク植物若しくはその子孫若しくはその栄養増殖体又はその部分若しくは組織、特に花弁、切り花が提供される。本発明は、キク由来フラバノン3-水酸化酵素(F3H)遺伝子の転写調節領域を転写調節領域として用いて、フラボノイド3',5'-水酸化酵素(F3'5'H)をキク植物において発現させて、その花弁にデルフィニジンを含むキク植物を生産する方法に関する。

## DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA PRODUCCIÓN DE UNA PLANTA DE CRISANTEMO QUE  
TIENE PÉTALOS QUE CONTIENEN DELFINIDINACAMPO TÉCNICO

[0001]

La presente invención se refiere a un método para producir una planta de crisantemo que contiene delphinidina en sus pétalos, utilizando la región reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo, un ácido nucleico de esa región reguladora, un vector de expresión o casete de expresión que contiene ese ácido nucleico, y una planta de crisantemo, su progenie o producto de proliferación vegetativa, o una parte o tejido de la misma y, particularmente, un pétalo o flor cortada de la misma, en la cual se ha introducido esa región reguladora.

ARTE PREVIO

[0002]

El uso de la tecnología de transformación genética hace posible impartir nuevos rasgos a las plantas expresando un gen útil en una planta diana. Una amplia gama de plantas genéticamente modificadas producidas de esta manera ya han sido cultivadas. Puesto que la regulación de la expresión de genes está principalmente controlada en el nivel de transcripción, la regulación de la transcripción es la más importante en términos de regular la expresión de genes. En otras palabras, expresar un gen en un momento apropiado, en un tejido adecuado y con una potencia correspondiente es importante para producir una planta genéticamente modificada, industrialmente útil. En muchos casos, la transcripción se controla por una secuencia de ADN en la región no traducida 5' de un marco de lectura abierto. Una región de ADN, que determina el sitio inicial de transcripción del gen y regula directamente su frecuencia, se denomina un promotor. Un promotor se encuentra localizado en un codón de iniciación conformado por varias decenas de pares de bases (bp) en la región no traducida 5' y, frecuentemente, contiene una caja TATA, y similares. Un elemento *cis* que une varios factores reguladores de transcripción se encuentra igualmente presente en la región no traducida 5', y su presencia sirve para controlar el momento

oportuno de transcripción, el tejido en el cual tiene lugar la transcripción y la potencia de la transcripción. Los factores reguladores de transcripción se clasifican en muchas familias de acuerdo con su secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, ejemplos de familias bien conocidas de factores reguladores de transcripción incluyen el factor regulador de transcripción Myb y el factor regulador bHLH (básico hélice-bucle-hélice). En la actualidad, los términos factor regulador de transcripción y promotor se usan frecuentemente con el mismo significado.

[0003]

Las antocianinas, que constituyen los principales componentes del color de una flor, son un miembro de metabolitos secundarios, denominados genéricamente flavonoides. El color de las antocianinas depende de su estructura. En otras palabras, el color se vuelve azul a medida que aumenta el número de grupos hidroxilo del anillo B de las antocianidinas, que es el cromóforo de las antocianinas. Además, a medida que aumenta el número de grupos acilo aromáticos (tales como los grupos cumaroilo o los grupos cafeolilo), que modifican la antocianina (es decir, la longitud de onda de absorberencia máxima cambia a una longitud de onda más larga), el color de la antocianina se vuelve azul, y se sabe que aumenta la estabilidad de la antocianina (véase Documento 1 Distinto de Patente).

Considerable investigación se ha conducido acerca de estas enzimas y los genes que codifican estas enzimas involucradas en la biosíntesis de antocianinas (véase Documento 1 Distinto de Patente). Por ejemplo, un gen de una enzima que cataliza una reacción, mediante la cual un grupo acilo aromático se transfiere a antocianina, se obtiene de la genciana japonesa, lavanda y petunias (véase Documento de Patente 1 y Documento de Patente 2). Un gen de una enzima involucrada en la síntesis de antocianina que se acumula en las hojas de la perilla roja (malonilshisonina, 3-O-(6-O-(E)-p-cumaroil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-5-O-(6-O-malonil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-cianidina) (véase Documento 2 Distinto de Patente) se ha divulgado previamente en hidroxycinnamoil CoA: gen de la antocianina-3-glucósido-grupo acilo aromático transferasa (3AT) (o, designado más simplemente como "el gen de la antocianina-3-aciltransferasa (3AT) de shiso (perilla)") (véase Documento de Patente 1). Más aún, se han conseguido igualmente descubrimientos con respecto a la regulación de transcripción (control) de genes biosintasa de antocianinas. Secuencias de elementos *cis* unidos por el factor regulador de transcripción Myb y el factor regulador de transcripción bHLH están presentes en la región reguladora de transcripción localizada en la región 5' de los

codones de iniciación de estos genes. El factor regulador de transcripción Myb y el factor regulador de transcripción bHLH son conocidos por controlar la síntesis de antocianinas en petunias, maíz y perilla (véase Documento 1 Distinto de Patente).

[0004]

Los promotores (también designados como regiones reguladoras de transcripción) responsables de la transcripción de genes en plantas están conformados por los denominados promotores constitutivos, los cuales funcionan en cualquier tejido y en cualquier momento, tal como en la etapa evolutiva, promotores específicos de órganos/tejidos, los cuales funcionan únicamente en órganos y tejidos específicos, y promotores específicos del momento, los cuales únicamente se expresan en un momento específico de la etapa evolutiva. Los promotores constitutivos se utilizan frecuentemente como promotores para expresar genes útiles en plantas genéticamente modificadas. Ejemplos típicos de promotores constitutivos incluyen el promotor del virus mosaico del coliflor 35S (abreviado también como promotor CaMV35S) y construcción de promotores sobre la base de los mismos (véase Documento 3 Distinto de Patente), y promotor Mac1 (véase Documento 4 Distinto de Patente). En plantas, sin embargo, muchos genes se expresan únicamente en tejidos u órganos específicos o se expresan específicamente con respecto al momento. Esto sugiere que la expresión de genes, específica de tejidos/órganos o específica del momento, es necesaria para las plantas. Existen ejemplos de recombinación genética de plantas, que utilizan tales regiones reguladoras de transcripción, específicas de tejidos/órganos o específicas del momento. Por ejemplo, existen ejemplos de proteína que se acumula en semillas utilizando una región reguladora de transcripción específica de la semilla.

[0005]

No obstante, aunque las plantas producen flores de varios colores, existen pocas especies capaces de producir flores de todos los colores debido a restricciones genéticas sobre esa especie. Por ejemplo, no existen variedades de rosa o clavel en la naturaleza que sean capaces de producir flores azules o púrpuras. Esto se debe a que las rosas y los claveles carecen del gen de la flavonoide 3',5'-hidroxilasa, requerido para sintetizar la antocianidina, delfinidina, la cual se sintetiza por muchas especies que producen flores azules y púrpuras. Mediante transformación con el gen de la flavonoide 3',5'-hidroxilasa de petunia o

pensamiento, por ejemplo, que son especies capaces de producir flores azules y púrpuras, en estas especies, puede hacerse que estas especies produzcan flores azules. En el caso de claveles, la región reguladora de transcripción del gen de la chalcona sintasa, derivado de la cabeza de dragón común o petunia, se utiliza para transcribir el gen de la flavonoide 3',5'-hidroxilasa, derivado de la cabeza de dragón común o petunia. Ejemplos de plásmidos que contienen la región reguladora de transcripción del gen de la chalcona sintasa, derivado de la cabeza de dragón común o petunia, incluyen los plásmidos pCGP485 y pCGP653 descritos en el Documento de Patente 3, y ejemplos de plásmidos, que contienen una región reguladora de transcripción constitutiva, incluyen el plásmido PCGP628 (que contiene un promotor Mac1) y el plásmido pSPB130 (que contiene un promotor CaMV35S al cual se añade el potenciador E12) descrito en el Documento de Patente 4.

[0006]

Sin embargo, es difícil predecir con qué potencia funcionan tales promotores en plantas recombinantes para ser capaces de producir un fenotipo diana. Además, puesto que usar repetidamente el mismo promotor para expresar una pluralidad de genes extraños puede causar silenciamiento de genes, se cree que esto debe evitarse (véase Documento 5 Distinto de Patente).

Por consiguiente, aunque se han utilizado varios promotores para cambiar el color de la flor, se necesita un promotor útil correspondiente a la planta hospedera y al objetivo, con el fin de cambiar posteriormente a un color de flor diferente.

[0007]

En particular, plantas de crisantemo (también designadas simplemente como crisantemos) representan alrededor del 30% de todas las ventas mayoristas de flores en todo el Japón (Resumen de Resultados de la Investigación del Mercado Mayorista de Plantas de Floración 2007, Ministerio de Agricultura, Silvicultura e Industrias Pesqueras), haciendo de estas plantas un producto importante, cuando se comparan con rosas las cuales representan aproximadamente 9% y los claveles que representan aproximadamente 7%. Aunque los crisantemos vienen en colores de flores incluyendo blanco, amarillo, anaranjado, rojo, rosado y rojo púrpura, no existen variedades o variedades silvestres estrechamente relacionadas, que produzcan colores azulados tales como las que tienen un color azul o púrpura.

Por consiguiente, un objetivo de la propagación selectiva de flores azuladas es estimular una nueva demanda. El color de la flor de crisantemo se expresa debido a una combinación de antocianinas y carotenoides. Las antocianinas son capaces de expresar varios colores debido a diferencias en la estructura de la antocianidina que sirve como la cadena principal básica, y diferencias en la modificación por azúcares y ácidos orgánicos. No obstante, se sabe que existen dos tipos de antocianinas que regulan el color de la flor de crisantemo en el cual la cianidina en la posición 3 se modifica por glucosa y ácido malónico (cianidina 3-O-(6"-O-monomalonil- $\beta$ -glucopiranosido y 3-O-(3",6"-O-dimalonil- $\beta$ -glucopiranosido) (véase Documento 6 Distinto de Patente). Adicionalmente, estas estructuras son comparativamente simples (véase FIG. 1). Esto hace que la gama de colores de flor atribuibles a las antocianinas en crisantemos sea extremadamente estrecha. No obstante, aunque la expresión del color azulado es principalmente el resultado de antocianinas, puesto que no existe gen que codifique la enzima clave de la flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) en crisantemos, la antocianina a base de delfinidina, que produce el color azul, no se biosintetiza en crisantemos (véase FIG. 1). Por consiguiente, se ha buscado el desarrollo de una tecnología para controlar la expresión de antocianinas de crisantemo empleando técnicas de ingeniería genética, con el fin de poder obtener un crisantemo que produzca flores azuladas modificando el pigmento a base de antocianina, que se acumula en los pétalos del crisantemo.

[0008]

Como se describió previamente, aunque los crisantemos son la planta de floración más importante en el Japón, puesto que son hexaploides, lo cual resulta en una ploidía elevada, y tienen un tamaño de genoma grande, además de tener una baja eficiencia de transformación, puesto que pueden causar asimismo silenciamiento (desactivación) de transgenes, no es fácil obtener crisantemos genéticamente modificados, capaces de expresión de transgenes estables. En crisantemos transformados con el gen de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) acoplado al promotor CaMV35S, la actividad del gen GUS es aproximadamente un décimo el del tabaco transformado con el mismo gen, y se ha informado que esa actividad disminuye en casi todos los individuos después de pasados 12 meses luego de la transformación (véase Documento 7 Distinto de Patente). Aunque se ha divulgado que se ha obtenido un promotor de una proteína ligada a clorofila a/b, que funciona favorablemente en crisantemos, con el fin de expresar establemente un gen exógeno en crisantemos, este promotor no es apropiado para expresar genes

en pétalos de flor, en los cuales hay presente poca clorofila (véase Documento 8 Distinto de Patente). Adicionalmente, cuando el gen GUS acoplado al promotor del factor 1 de alargamiento del tabaco ( $EF1\alpha$ ) se transforma en crisantemos, se ha informado que el gen GUS se expresa en hojas y pétalos incluso después de transcurridos 20 meses o más (véase Documento 9 Distinto de Patente). Más aún, existen también ejemplos de una vida de flor prolongada expresando un gen de receptor de etileno mutante en crisantemos (véase Documento 10 Distinto de Patente), del cambio de la forma de una flor suprimiendo la expresión del gen AGAMOUS del crisantemo (véase Documento 11 Distinto de Patente), y del aumento de la expresión de genes exógenos en crisantemos (véase Documento 12 Distinto de Patente) utilizando un potenciador de traducción de la alcohol deshidrogenasa del tabaco (véase Documento de Patente 7).

[0009]

Por otro lado, aunque ha habido ejemplos de alteración exitosa del color de la flor del crisantemo por recombinación genética, incluyendo un informe de haber cambiado flores rosadas en flores blancas suprimiendo el gen de la chalcona sintasa (CHS) mediante co-supresión (véase Documento 13 Distinto de Patente), y un informe de haber cambiado flores blancas en flores amarillas suprimiendo la dioxigenasa de escisión de carotenoide (CCD4a) por ARNi (véase Documento 14 Distinto de Patente), todos estos métodos involucran la alteración del color de la flor suprimiendo la expresión de genes endógenos, y no ha habido ejemplos exitosos de alterar el color de la flor mediante sobre-expresión de genes exógenos, así como tampoco ejemplos de haber realizado un cambio en la estructura de la antocianina o un cambio concomitante en el color de la flor.

[0010]

Aunque se han referido intentos de alterar el color de la flor mediante sobre-expresión de un gen exógeno, que involucran la transformación con un gen que codifica F3'5'H, la cual es una enzima requerida para la síntesis de delfinidina (véase Documento de Patente 5 y Documento 15 Distinto de Patente 15), la delfinidina producida debido a la acción del gen F3'5'H transfectado se acumula en los pétalos en rayos, y no hay informes de la producción de crisantemos azulados. En crisantemos, incluso si F3'5'H se expresa con el promotor CaMV35S, no se observa la producción de delfinidina (véase Documento 15 Distinto de Patente). Adicionalmente, la expresión de un gen expresado con el promotor CaMV35S es inapropiado para expresión estable y, por ejemplo, termina disipando el crecimiento concomitante del transformante de crisantemo (véase Documento 7

Distinto de Patente). El promotor Lhca3.St.1 de papa (véase Documento 16 Distinto de Patente), el promotor UEP1 de crisantemo (véase Documento 17 Distinto de Patente) y el promotor EF1 $\alpha$  del tabaco (véase Documento de Patente 6 y Documento 9 Distinto de Patente), por ejemplo, han sido desarrollados para uso como promotores que permiten la expresión eficiente y estable de genes exógenos en los pétalos en rayos de los crisantemos. Sin embargo, no ha habido informes describiendo la alteración del color de la flor de crisantemo mediante sobre-expresión de un gen exógeno utilizando estos promotores. Sobre la base de lo anterior, con el fin de producir crisantemos en los cuales se ha alterado el color de la flor por recombinación genética, es necesario establecer una tecnología para controlar la expresión de genes de biosíntesis de flavonoides, incluyendo el desarrollo de un promotor apropiado para crisantemos.

[0011]

Aunque la expresión de genes se controla principalmente por regiones reguladoras de transcripción, se conocen también secuencias que mejoran la traducción de ARNm. Por ejemplo, se sabe que la secuencia omega derivada del virus mosaico del tabaco aumenta la eficiencia de traducción de genes heterólogos acoplados a la secuencia omega tanto *in vitro* como *in vivo* (véase Documento 18 Distinto de Patente). Además, se sabe que una secuencia (ADH200) presente en la región no traducida 5' de la alcohol deshidrogenasa del tabaco (NtADH5'UTR) contribuye a una estabilidad mejorada de la expresión de genes heterólogos (véase Documento 7 de Patente). Asimismo, en el caso de acoplar un potenciador de traducción de 94 bp (ADHNF, véase Documento 8 de Patente) presente corriente abajo de esta secuencia al extremo 3' del promotor CaMV35S y posterior transformación con un casete de expresión acoplado con el gene GUS, se ha informado que esta secuencia contribuye a una eficiencia de traducción cada vez mayor en crisantemos (véase Documento 12 Distinto de Patente). No obstante, no existen ejemplos de que esta secuencia se haya usado para cambiar el color de la flor alterando la estructura y la composición de flavonoides. Puesto que es necesario expresar un gen heterólogo en células epidérmicas, en las cuales se acumulan principalmente flavonoides y antocianinas, con el fin de alterar el color de la flor, es difícil inferir de resultados convencionales si NtADH5'UTR (ADH200 o el potenciador de traducción ADHNF) es efectivo o no para alterar el color de la flor.

Documentos del Arte Previo

## Documentos de Patente

[0012]

Documento de Patente 1: WO 96/25500

Documento de Patente 2: WO 01/72984

Documento de Patente 3: WO 94/28140

Documento de Patente 4: WO 05/17147

Documento de Patente 5: Patente de los Estados Unidos No. 5948955

Documento de Patente 6: Publicación de Patente Japonesa Sin Examinar  
No. 2004-65096

Documento de Patente 7: Patente de los Estados Unidos No. 6573429

Documento de Patente 8: Publicación de Patente Japonesa Sin Examinar  
No. 2003-79372

## Documentos Distintos de Patente

[0013]

Documento 1 Distinto de Patente: Plant J., 54, 737-749, 2008

Documento 2 Distinto de Patente: Agricultural and Biological Chemistry, 53,  
797-800, 1989

Documento 3 Distinto de Patente: Plant Cell Physiology, 37, 49-59, 1996

Documento 4 Distinto de Patente: Plant Molecular Biology, 15, 373-381,  
1990

Documento 5 Distinto de Patente: Annals of Botany, 79, 3-12, 1997

Documento 6 Distinto de Patente: Journal of Horticultural Science &  
Biotechnology, 81, 728-734, 2006

Documento 7 Distinto de Patente: Plant Biotechnology, 17, 241-245, 2000

Documento 8 Distinto de Patente: Breeding Science, 54, 51-58, 2004

Documento 9 Distinto de Patente: Japan Agricultural Research Quarterly,  
39, 269-274, 2005

Documento 10 Distinto de Patente: Postharvest Biology and Technology,  
37, 101-110, 2005

Documento 11 Distinto de Patente: Plant Biotechnology, 25, 55-59, 2008

Documento 12 Distinto de Patente: Plant Biotechnology, 25, 69-75, 2008

Documento 13 Distinto de Patente: Bio/Technology, 12, 268, 1994

Documento 14 Distinto de Patente: Plant Physiology, 142, 1193, 2006

Documento 15 Distinto de Patente: J. Plant Biol., 50, 626, 2007

Documento 16 Distinto de Patente: Mol. Breed., 8, 335, 2001

Documento 17 Distinto de Patente: Transgenic Res., 11, 437, 2002

Documento 18 Distinto de Patente: Nucleic Acids Research, 15, 3257-3273, 1987

### SUMARIO DE LA INVENCION

#### Problemas a Solucionarse por la Invención

[0014]

Un objeto a solucionar por la presente invención es proveer un método para producir una planta de crisantemo, que contiene delfinidina en sus pétalos, utilizando la región reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo, y una planta de crisantemo, su progenie o producto de proliferación vegetativa, o una parte o tejido de la misma y, particularmente, un pétalo o flor cortada de la misma, transformada con esa región reguladora.

#### Medios de Solucionar los Problemas

[0015]

Como resultado de conducir estudios extensivos para solucionar los problemas ya mencionados, los inventores de la presente invención descubrieron que cuando el gen de la flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) se expresa en crisantemo utilizando una región reguladora de transcripción de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivada de crisantemo, se acumula una gran cantidad de delfinidina en sus pétalos, cambia el color de la flor, y el color de la flor cambia debido a una acumulación aún mayor de delfinidina como resultado de agregar un potenciador translacional derivado del gen de la alcohol deshidrogenasa del tabaco, y confirmó su utilidad mediante experimentación, llevando así al perfeccionamiento de la presente invención.

En otras palabras, la presente invención es como se describe a continuación.

[0016]

[1] Un método para producir una planta de crisantemo que contiene delfinidina en sus pétalos, método que incluye el paso de expresar la flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) en una planta de crisantemo, utilizando como una región reguladora de transcripción un ácido nucleico seleccionado del grupo conformado por:

(1) un ácido nucleico que contiene la secuencia nucleotídica indicada en

SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87;

(2) un ácido nucleico capaz de funcionar como una región reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H), derivado de crisantemo, y que contiene una secuencia nucleotídica en el cual la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87 se ha modificado por la adición, deleción y/o sustitución de uno o varios nucleótidos;

(3) un ácido nucleico capaz de funcionar como una región reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H), derivado de crisantemo, y capaz de hibridarse bajo condiciones de alta restricción con un ácido nucleico compuesto por una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87; y,

(4) un ácido nucleico capaz de funcionar como una región reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H), derivado de crisantemo, y que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% con la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87.

[0017]

[2] El método descrito en el anterior numeral [1], en donde la flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) se deriva de la campanilla (campánula), cineraria, verbena y pensamiento #40.

[0018]

[3] El método descrito en los anteriores numerales [1] o [2], en donde un potenciador translacional derivado del gen de la alcohol deshidrogenasa del tabaco se usa también adicionalmente a la región reguladora de transcripción.

[0019]

[4] El método descrito en cualquiera de los anteriores numerales [1] a [3], en donde se utiliza un vector de expresión o casete de expresión, en el cual el potenciador translacional se acopla directamente a un codón de iniciación del gen F3'5'H.

[0020]

[5] El método descrito en cualquiera de los anteriores numerales [1] a [4], en donde el contenido de delfinidina en los pétalos es 25% en peso o más del peso total de las antocianidinas.

[0021]

[6] Una planta de crisantemo, su progenie, o producto de proliferación vegetativa, parte o tejido de la misma, que contiene el ácido nucleico descrito en el anterior numeral [1] o producido de acuerdo con el método descrito en cualquiera de los anteriores numerales [1] a [5].

[0022]

[7] La planta de crisantemo, su progenie, o producto de proliferación vegetativa, parte o tejido de la misma, descritos en el anterior numeral [6], la cual es una flor cortada.

[8] Un producto procesado de una flor cortada utilizando la flor cortada descrita en el anterior numeral [7].

#### Efectos de la Invención

[0023]

De acuerdo con la presente invención, se determinó que cuando el gen de la flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) se expresa en crisantemo utilizando la región reguladora de transcripción de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivada de crisantemo, se acumula más delphinidina en los pétalos de la flor que en el caso de usar otro promotor, y cuando el color de la flor se vuelve más azul, se acumula una cantidad aún mayor de delphinidina, como resultado de agregar un potenciador de transcripción, derivado del gen de la alcohol deshidrogenasa del tabaco, haciendo en esa forma que el color de la flor se vuelva aún más azul.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0024]

FIG. 1 es un diagrama esquemático de la ruta de biosíntesis de flavonoide en crisantemo transformado con el gen F3'5'H.

FIG. 2 es un diagrama esquemático de un vector binario para introducir el gen F3'5'H.

FIG. 3 indica el color de la flor y la relación del contenido de delphinidina en individuos transformados con *chrysanthemum* F3Hpro::ADHNF-F3'5'H-bellflower::NOSter.

FIG. 4 indica el proceso de construcción de pBI121 *chrysanthemum*

F3Hpro1k::ADHNF- F3'5'H-bellflower::NOSter.

### INCORPORACIONES DE LA INVENCION

[0025]

La presente invención se refiere a un método para producir una planta de crisantemo que contiene delfinidina en sus pétalos, método que incluye transformar crisantemo con un vector que contiene un casete génico que ocasiona la expresión de la flavonoide 3',5'-dehidroxilasa (F3'5'H) por la región 5' de un gen que codifica la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) de crisantemo (también designado como "CmF3Hpro" o "chrysF3H5"). El casete génico contiene preferiblemente un potenciador translacional derivado del gen de la alcohol deshidrogenasa del tabaco (véase la parte inferior de FIG. 2). El contenido de delfinidina en los pétalos de la flor es preferiblemente 25% en peso o más del peso total de las antocianidinas, y el color de los pétalos de la flor se altera hacia el azul. La presente invención se refiere igualmente a una planta de crisantemo, su progenie, o producto de proliferación vegetativa, parte o tejido de la misma, producida de acuerdo con ese método o que contiene CmF3Hpro. La parte o tejido es preferiblemente un pétalo de la flor o una flor cortada.

En la presente descripción, un "casete de expresión" se refiere a un fragmento de ADN en el cual un promotor y un terminador se acoplan a ácidos nucleicos arbitrarios.

[0026]

De acuerdo con la presente invención, puesto que el gen F3'5'H se expresa en pétalos en rayos de crisantemo, y que la proteína de la enzima se sintetiza y funciona, puede producirse un crisantemo que tiene un color de flor azulado, permitiendo que se sintetice y acumule una antocianina a base de delfinidina. Aunque se confirmó la acumulación de delfinidina (máx. 5.4%) en el caso de utilizar RoseCHSpro (promotor del gen de la chalcona sintasa (CHS) de rosa), *R. rugosa* DFRpro (promotor del gen de la dihidroflavonol-4-reductasa (DFR) de rosa *Rugosa*), *R. rugosa* F3Hpro (flavanona 3-hidroxilasa (F3H) de *R. rugosa*) o *Viola* F3'5'H#40pro (promotor del gen F3'5'H del pensamiento) para el promotor contenido en el casete génico utilizado para expresar F3'5'H (véase Tabla 1), esto no llevó a que el color de la flor se volviera azulado. En consecuencia, como resultado de conducir repetidamente experimentos de expresión en F3'5'H utilizando varios tipos de promotores, con el fin de descubrir un promotor efectivo

para potenciar la acumulación de delfinidina en pétalos de la flor de crisantemo y hacer azulado el color de la flor, se determinó que CmF3Hpro era un promotor efectivo. El uso de CmF3Hpro hizo posible mejorar la acumulación de delfinidina, en comparación con el caso de usar otros promotores (véase Tabla 1, media: 31.4%, máx.: 80.5%), y llevó a la obtención de un color de flor azulado (véase FIG. 3, carta de colores RHS 79A, 77A, 72A y 72B). Además, dentro del gen F3'5'H expresado por CmF3Hpro, se descubrió que F3'5'H derivada de campanilla (índice de acumulación de delfinidina: máx. 81%), cineraria (índice de acumulación de delfinidina: máx. 36%), verbena y pensamiento (índice de acumulación de delfinidina: máx. 27% a 28%) tenía la capacidad de cambiar el color de la flor de crisantemo a púrpura. Más aún, la transformación con un casete génico directamente acoplado con el potenciador translacional ADH de tabaco (véase Documento de Patente 8) fue exitosa en alterar el color de la flor permitiendo que antocianina, que tiene delfinidina para su cadena principal básica, se acumulara eficientemente en pétalos en rayos de crisantemo (véase Tabla 1, FIG. 3). Además, acoplamiento directo se refiere a acoplamiento sin contener una secuencia de ácido nucleico adicional entre un polinucleótido y otro polinucleótido.

[0027]

Un ejemplo de una región reguladora de transcripción de acuerdo con la presente invención es un ácido nucleico compuesto por una secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87. Sin embargo, se cree asimismo que un promotor compuesto de una secuencia base, en la cual varios nucleótidos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) se han agregado, eliminado y/o sustituido en un ácido nucleico compuesto por una secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87, mantiene una actividad similar a la del promotor original. En consecuencia, la región reguladora de transcripción de acuerdo con la presente invención puede ser también un ácido nucleico compuesto por una secuencia nucleotídica, en la cual varios nucleótidos se han agregado, eliminado y/o sustituidos en la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87 siempre y cuando el ácido nucleico sea capaz de funcionar como una región reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo.

[0028]

La región reguladora de transcripción de acuerdo con la presente invención puede ser también un ácido nucleico capaz de funcionar como una región

reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo y capaz de hibridarse bajo condiciones de alta restricción con la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87, o un ácido nucleico capaz de funcionar como una región reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo y tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% con la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87.

[0029]

Ejemplos de estos ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos compuestos por secuencias nucleotídicas que tienen una identidad de secuencia con la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 de preferiblemente alrededor de 70% o más, más preferiblemente alrededor de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% o 98% y, muy preferiblemente, alrededor de 99%.

[0030]

En esta especificación, condiciones de restricción se refieren a condiciones de hibridación fácilmente determinadas empíricamente por una persona de habilidad ordinaria en el arte, dependientes por lo general de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración salina. En general, la temperatura para una hibridación apropiada se hace más alta en la medida en que la sonda sea más larga, y la temperatura se hace más baja entre más corta sea la sonda. Por lo general la hibridación depende de la capacidad del ADN desnaturalizado de hibridar en el caso de que esté presente una hebra complementaria en un ambiente a una temperatura cerca de su temperatura de fusión, o por debajo de ella. Más específicamente, un ejemplo de condiciones de baja restricción consiste de un lavado, etc., en solución 0.1% SDS a  $5 \times$  SSC bajo condiciones de temperatura de 37°C a 42°C en la fase de lavado del filtro, luego de la hibridación. Adicionalmente, un ejemplo de condiciones de alta restricción consta de lavado, etc., en 0.1% SDS a  $0.1 \times$  SSC y 65°C en la fase de lavado. El uso de condiciones de restricción más alta hace posible obtener polinucleótidos que tienen una mayor homología o identidad.

[0031]

En la presente invención, el gen de la flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) se deriva preferiblemente de campanilla (campánula), cineraria, verbena o

pensamiento #40. En la presente invención, un potenciador de traducción derivado de la alcohol deshidrogenasa del tabaco se utiliza preferiblemente además en adición a la región reguladora de transcripción. Por lo demás, preferiblemente el potenciador de traducción se acopla directamente a un codón de iniciación del gen F3'5'H en un casete génico de un vector de expresión.

[0032]

En el método of la presente invención, el contenido de delfinidina en los pétalos de la flor es preferiblemente 25% en peso, o más, del peso total de las antocianidinas.

[0033]

La presente invención es una planta de crisantemo, su progenie, o producto de proliferación vegetativa, parte o tejido de la misma, producida de acuerdo con el método de la presente invención, o transformada con el ácido nucleico anteriormente mencionado, y es preferiblemente un pétalo de una flor o flor cortada.

La presente invención se refiere asimismo a un producto procesado, que utiliza la flor cortada ya mencionada (producto procesado de flor cortada). En esta especificación, un producto procesado de flor cortada incluye, pero no se limita a, una flor prensada, una flor preservada, una flor seca o un producto sellado con resina, obtenido de la flor cortada.

## Ejemplos

[0034]

La siguiente sección proporciona una explicación detallada de la presente invención mediante ejemplos de la misma.

Se llevaron a cabo técnicas biológicas moleculares de acuerdo con Molecular Cloning (Sambrook and Russell, 2001), a menos que se indique específicamente lo contrario.

[0035]

Los siguientes Ejemplos de Referencia 1 a 9 son ejemplos de utilizar un promotor distinto de la región 5' de un gen que codifica la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) de crisantemo (CmF3Hpro), mientras que, por otro lado, los Ejemplos 1 a 10 son ejemplos relativos a la región 5' de un gen que codifica la flavanona 3-

hidroxilasa (F3H) de crisantemo (CmF3Hpro).

[0036]

Ejemplo de Referencia 1: Expresión del Gen F3'5'H por el Promotor EF1 $\alpha$  del Tabaco

pBIEF1 $\alpha$  descrito en el Documento de Patente 6 se digirió con las restrictasas HindIII y BamHI para obtener un fragmento de ADN de aproximadamente 1.2 kb, que contenía una secuencia promotora del EF1 $\alpha$  de tabaco. Este fragmento de ADN se insertó en el extremo 5' del ADNc DFR de lirio del pSPB909 descrito en el Documento de Patente 4 para obtener un plásmido pSLF339. En forma similar, se construyó un plásmido pSLF340 en el cual ADNc DFR de petunia (descrito en la Publicación Internacional WO 96/36716) se insertó en lugar de ADNc DFR de lirio.

[0037]

Un plásmido obtenido insertando un fragmento BP40 del gen F3'5'H de pensamiento, seccionado por digestión parcial con BamHI y XhoI de pCGP1961 descrito en el Documento de Patente 4, en los sitios BamHI y Sall de pSPB176 (descrito en Plant Science, 163, 253-263, 2002) se designó pSPB575. La porción del promotor de este plásmido se reemplazó con el promotor del EF1 $\alpha$  del tabaco, ya mencionado, utilizando HindIII y BamHI para obtener pSLF338. Un fragmento que contenía ADNc DFR de lirio se insertó en pSLF339 digerido con AscI en este sitio AscI. El plásmido resultante se designó pSLF346. Este plásmido pSLF346 se diseñó para expresar los genes F3'5'H de pensamiento y DFR de lirio en plantas bajo el control del promotor de EF1 $\alpha$  de tabaco.

[0038]

El plásmido pLHF8 que contiene ADNc F3'5'H de lavanda se describe en La publicación Internacional WO 04/20637. El plásmido pSPB2772 se obtuvo acoplando este plásmido al fragmento de ADN, que tiene el peso molecular más alto entre un fragmento de ADN obtenido digiriendo este plásmido con BamHI y XhoI y un fragmento de ADN de pSPB176 obtenido digiriendo con BamHI y Sall. En este plásmido, ADNc F3'5'H derivado de lavanda se acopla al promotor CaMV35S, al cual se ha agregado el potenciador EI2. Esta porción del promotor se reemplazó con el promotor ya mencionado de EF1 $\alpha$  de tabaco, utilizando HindIII y BamHI para obtener el plásmido pSPB2778. Un fragmento, que contenía

ADNc DFR de petunia en pSFL340, digerido con *Ascl*, se insertó en este sitio *Ascl*. El plásmido resultante se designó pSPB2780. Este plásmido pSPB2780 se diseñó con el fin de expresar los genes F3'5'H de lavanda y DFR de petunia en plantas bajo el control del promotor EF1 $\alpha$  del tabaco.

[0039]

El plásmido pSPB2777 se obtuvo reemplazando la porción del promotor del plásmido pSPB748 descrito en *Plant Biotechnol.*, 23, 5-11 (2006) (en el que ADNc F3'5'H, derivado de *clitoria ternatea* (*butterfly pea*), se acopla al promotor CaMV35S, al cual se ha agregado el potenciador E12) con el promotor ya mencionado de EF1 $\alpha$  del tabaco utilizando *HindIII* y *BamHI*. Un fragmento de pSFL340 digerido con *Ascl*, que contenía ADNc DFR de petunia, se insertó en este sitio *Ascl*. El plásmido resultante se designó pSPB2779. Este plásmido pSPB2779 se diseñó para expresar los genes F3'5'H de *clitoria ternatea* y DFR de petunia en plantas bajo el control del promotor EF1 $\alpha$  del tabaco.

[0040]

Cada uno de los plásmidos ya mencionados pSFL346, pSPB2780 y pSPB2779 se transformaron en *Agrobacterium* y luego se transfectaron en la variedad de crisantemo 94-765, utilizando el *Agrobacterium* transformado. Aunque se analizaron las antocianidinas en pétalos de la flor del crisantemo transformado, no se detectó delfinidina.

[0041]

#### Ejemplo de Referencia 2: Crisantemo Transfectado con el Promotor del Gen F3'5'H de Cineraria

Basándose en un método establecido, se extrajo ARN de los pétalos de un capullo de *Cineraria* Senetti azul (Suntory Flowers Ltd.). Se produjo una biblioteca de ADNc utilizando el ZAP-cDNA® Library Construction Kit (Stratagene Corp., Catálogo No. 200450) de acuerdo con el método recomendado por el fabricante utilizando poli-A+ARN preparado de este ARN. Esta biblioteca de ADNc se cribó entonces utilizando ADNc F3'5'H de *clitoria ternatea* (*Clitoria ternatea*, véase *Plant Biotechnology*, 23, 5-11 (2006)) etiquetado con el Sistema DIG (Roche Applied Science), de acuerdo con el método recomendado por el fabricante. Se aislaron cuarenta y ocho bacteriófagos indicadores de señal. Se obtuvieron plásmidos de estos bacteriófagos mediante escisión *in vivo*, de acuerdo con el método recomendado por el fabricante (Stratagene).

[0042]

Se determinaron las secuencias nucleotídicas de las porciones de ADNc contenidas en estos plásmidos, se realizó una búsqueda Blast de bases de datos de ADN, se obtuvieron numerosos genes que mostraron homología con el citocromo P450, y estos genes pudieron clasificarse en 8 tipos. Entre éstos, se determinó la secuencia nucleotídica completa de Ci5a18 (SEQ ID NO. 77), que se supuso estaba clasificada como CYP75B. Un plásmido pBluescript SKII, que contenía esta secuencia, se designó pSPB2774.

[0043]

Se extrajo ADN cromosómico de una hoja de la misma Cineraria, y se produjo una biblioteca cromosómica utilizando el  $\lambda$ BlueSTAR™ Xho I Half-Site Arms Kit (Novagen, <http://www.merckbiosciences.com/product/69242>). Las 200.000 placas resultantes se cribaron empleando un fragmento de ADNc Ci5a18 etiquetado con DIG. Este fragmento ADNc se amplificó usando Ci5a18 como molde y empleando cebadores Ci5a18F1 (SEQ ID NO. 81: 5'-CATCTGTTTTCTGCCAAAGC-3') y Ci5a18R1 (SEQ ID NO. 82: 5'-GGATTAGGAAACGACCAGG-3'). Finalmente se obtuvieron cuatro placas de las 17 placas resultantes, y éstas se convirtieron en plásmidos mediante escisión *in vivo*. Cuando se determinaron sus secuencias nucleotídicas de ADN, se descubrió que contenían las mismas secuencias. Entre éstas, un clon designado gCi01-pBluestar se utilizó en experimentos subsiguientes. La secuencia nucleotídica clonada de gCi01-pBluestar se muestra en SEQ ID NO. 79. Se esperaba que esta secuencia contuviera una secuencia no traducida 5' con actividad promotora de F3'5'H de cineraria, una región traducida, y una región no traducida 3'.

[0044]

Un fragmento de ADN de aproximadamente 5.7 kb, seccionado de gCi01-pBluestar con PvuI y EcoRV (SEQ ID NO. 80), se cortó dejando extremos romos usando un kit de despuntado de ADN (Takara). Este fragmento de ADN se clonó entonces en el sitio SmaI de pBinPLUS y se designó pSPB3130. Este vector binario tenía un gen nptII capaz de utilizarse para cribar la región T-ADN con kanamicina.

[0045]

pSPB3130 se transformó en la variedad de crisantemo 94-765, utilizando un método *Agrobacterium*. Aunque se analizaron las antocianidinas en los pétalos del crisantemo transformado, no se detectó delfinidina y el color de la flor no cambió.

[0046]

Ejemplo de Referencia 3: Producción de Delfinidina Utilizando el Promotor del Gen de la Chalcona Sintasa de Rosa

Se construyó un vector binario en el cual se acopló el gen BP#18 F3'5'H, derivado de pensamiento, a un promotor de chalcona sintasa, derivado de rosa, descrito en la Publicación Internacional de Patente PCT No. PCT/AU03/01111, y este vector binario se designó pBRBP18. El gen contenido en este vector binario se transformó en la variedad de crisantemo 94-765, como se describe en los Ejemplos de Referencia 1 y 2. Cuando se analizaron las antocianidinas en los pétalos de la flor del crisantemo transformado, no se observó un cambio en el color de la flor, si bien se detectó un máximo de 5.4% de delfinidina con respecto a todas las antocianidinas.

Adicionalmente, pSPB3325 (rose CHSpro::pansy #18+ rose CHSp::chrysanthemum F3'H IR), descrito en la novena fila desde la parte superior en Tabla 1, es un ejemplo de la producción de delfinidina usando el promotor del gen de la chalcona sintasa de rosa, y la producción de delfinidina en este ejemplo alcanzó un máximo de 3.6%.

[0047]

Ejemplo de Referencia 4: Producción de Delfinidina Utilizando el Promotor del Gen F3'5'H de Pensamiento

(1) Clonación del Gen Cromosómico de la Antocianina 3-Acil Transferasa de Perilla

Se sabe que existen variedades rojas de perilla, en las cuales las antocianinas se acumulan en las hojas, y variedades verdes en las cuales no lo hacen. Se preparó ADN cromosómico de las hojas de las primeras empleando un método referido (Plant Mol. Biol., December 1997, 35(6), 915-927). Este ADN cromosómico se descompuso parcialmente con *Sau3AI* (Toyobo), y se recuperó una fracción, que contenía un fragmento de ADN de 10 kb a 15 kb, utilizando un método de gradiente de densidad de sacarosa. Este fragmento se insertó entonces en el sitio *BamHI* de EMBL3 (Promega), un tipo de vector de bacteriófago lambda, usando un método conocido para preparar un biblioteca de

ADN genómico. La biblioteca resultante se cribó utilizando pSAT208 (véase Plant Cell Physiol., April 2000, 41(4), 495-502), que es ADNc de la antocianina 3-acil transferasa derivada de perilla, como sonda. El cribado de la biblioteca se hizo de acuerdo con un método referido previamente (Plant Cell Physiol., July 1996, 37(5), 711-716). Las placas que hibridaron con la sonda se cortaron, y se preparó ADN del bacteriófago resultante.

[0048]

(2) Determinación de la Secuencia Nucleotídica del Gen Cromosómico de la Antocianina 3-Acil Transferasa de Perilla

10 µg del ADN obtenido anteriormente se digirieron con XbaI y se aislaron con 0.7% de gel de agarosa, seguido por transferencia a Hybond-N (Amersham). Cuando esta película se hibridó en la misma manera como se describió previamente, se encontró que un fragmento de ADN de aproximadamente 6.8 kb se hibridó con la sonda. Luego de digerir 20 µg del mismo ADN con XbaI y aislar con 0.7% de gel de agarosa, se purificó un fragmento de ADN de aproximadamente 6.8 kb usando un GeneClean Kit y se acopló con pBluescript SKII- digerido con XbaI. El plásmido resultante se designó pSPB513. La secuencia de ADN derivado de perilla contenida en este plásmido se determinó por desplazamiento con cebadores (*primer walking*). Su secuencia nucleotídica se muestra en SEQ ID NO. 4. Esta secuencia contiene una región que muestra una alta homología con el ADNc de la antocianina 3-aciltransferasa en la forma de pSAT208, se observó que la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 6) de la proteína codificada por esta región muestra la sustitución de 19 residuos de aminoácido y la delección de 2 residuos de aminoácido, en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada por pSAT208, y no se observaron intrones. Adicionalmente, la secuencia de la región, que muestra alta homología con pSAT208, contenía una secuencia de 3438 bp corriente arriba de ATG, que se pensó era el codón de iniciación, y una secuencia de 2052 bp corriente abajo de TAA, que se pensó era su codón de terminación. Un marco de lectura abierto diferente (ORF, SEQ ID NO. 5), que no era antocianina 3-aciltransferasa, estaba presente en la secuencia 3438 bp ya mencionada. El siguiente experimento se condujo para amplificar la región reguladora de transcripción del gen de la antocianina 3-acil transferasa de shiso (perilla), excluyendo esta porción.

[0049]

(3) Amplificación de la Región Reguladora de Transcripción del Gen de la

### Antocianina 3-Aciltransferasa de Shiso

PCR (25 ciclos de una reacción conformada por mantener durante 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 52°C, 2 minutos a 72°C y 1 minuto a 95°C) se llevó a cabo utilizando 1 ng de pSPB513 como molde y dos tipos de cebadores (5'-AAGCTTAACTATTATGATCCACAGAG-3' (SEQ ID NO. 7, la subraya indica la secuencia de reconocimiento HindIII) y 5'-GGATCCGGCGGTGTTGAACGTAGC-3' (SEQ ID NO. 8, la subraya indica la secuencia de reconocimiento BamHI)). El fragmento de ADN de aproximadamente 1.1 kb, amplificado, se digirió con HindIII y BamHI.

[0050]

El plásmido pSPB567 descrito en el Documento de Patente 4 (en el cual el gen de la flavonoide 3',5'-hidroxilasa, derivado de pensamiento, se acopla al extremo 3' del promotor del mosaico del coliflor, al que se ha agregado el potenciador EI2, y en el cual un terminador nopalina sintasa se acopla además a su extremo 3') se digirió con PaeI, y un fragmento de ADN que contenía el gen de la flavonoide 3',5'-hidroxilasa, derivado de pensamiento, se clonó en el sitio PaeI de pBin+. Un plásmido, en el cual el promotor del mosaico del coliflor 35S, al que se agregó el potenciador EI2, está presente cerca del sitio Ascl de pBin+ en el plásmido resultante, se designó pSPB575. Este plásmido se digirió entonces con HindIII y BamHI, y un fragmento de ADN, obtenido digiriendo un fragmento de ADN de aproximadamente 1.1 kb, que contenía la región reguladora de transcripción de antocianina 3-aciltransferasa de perilla, con HindIII y BamHI se insertó en él. El plásmido resultante se designó pSFL205.

[0051]

El plásmido pSFL205 se digirió con HindIII y SacI, y se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 100 bp. Este fragmento de ADN, un fragmento de ADN de aproximadamente 4 kb, obtenido digiriendo pSPB513 con SacI y XbaI, y un plásmido pBin+ (véase Transgenic Research, 4, 288-290, 1995), digerido con HindIII y XbaI, se acoplaron para obtener el plásmido pSPB3311. Este plásmido pSPB3311 es un vector binario que contiene la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 2, y contiene la región reguladora de transcripción del gen de la antocianina 3-aciltransferasa de perilla y una región no traducida de su extremo 3'.

[0052]

#### (4) Construcción de pSPB3323

La región reguladora de transcripción del gen BP#40 de la flavonoide 3',5'-hidroxilasa (véase WO 04/020637) se amplificó como se describe más adelante utilizando el Takara LA PCR™ In Vitro Cloning Kit.

Se preparó ADN cromosómico de una hoja de pensamiento empleando el DNA Easy Plant Kit (Qiagen). 3 µg del ADN cromosómico se digirieron con la enzima de restricción HindIII. El ADN digerido se acopló con el ADN terminal HindIII (incluido en Takara LA PCR™ In Vitro Cloning Kit) haciendo reaccionar durante 40 minutos a 16°C empleando Ligation High (Takara). Luego de diluir 4 µl de la mezcla de reacción con 10 µl de agua y desnaturalizar el ADN acoplado tratando durante 10 minutos a 94°C, la mezcla de reacción se enfrió en hielo. Se agregaron entonces 5 pmol del cebador C1 (5'-GTACATATTGTCGTTAGAACGCGTAATACGACTCA-3', SEQ ID NO. 9, incluido en el kit como una secuencia parcial de la secuencia casete HindIII) y 5 pmol del cebador BP40-i5 (5'-AGGTGCATGATCGGACCATACTTC-3', SEQ ID NO. 10, equivalente a la hebra complementaria de la región traducida de BP#40), seguidos por la repetición de 30 ciclos de una reacción en 25 µl de la mezcla de reacción conformados por 20 segundos a 98°C y 15 minutos a 68°C, de acuerdo con el protocolo del kit. La mezcla de reacción se diluyó entonces con un factor de dilución de 10 veces con agua. Luego de hacer reaccionar durante 5 minutos a 98°C en 25 µl de una mezcla de reacción que contenía 5 pmol del cebador C2 (5'-CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3', SEQ ID NO. 11, incluido en el kit como secuencia parcial de la secuencia casete HindIII) y 5 pmol del cebador BP40-i7 (5'-GACCATACTTCTTAGCGAGTTTGGC-3', SEQ ID NO. 12) usando 0.5 µl de esta dilución como molde, se repitieron 30 ciclos de una reacción conformados por hacer reaccionar durante 20 segundos a 98°C y 15 minutos a 68°C.

[0053]

El fragmento de ADN resultante se ligó en el plásmido pCR2.1 (Invitrogen). Cuando se determinó la secuencia nucleotídica del ADN resultante, se observó que la secuencia tenía sitios que no coincidían con la secuencia nucleotídica ADNc de BP#40. Se cree que esto se debió a la ocurrencia de un error durante la PCR. Se llevó a cabo el siguiente procedimiento con el propósito de amplificar una secuencia libre de error.

Con el fin de amplificar una región 5' no traducida de aproximadamente 2 kb

y una región traducida de 200 bp de BP#40, se llevó a cabo PCR en 25 µl de una mezcla de reacción usando 200 ng de ADN genómico de pensamiento como molde y empleando 50 pmol del cebador BP40-i7 (SEQ ID NO. 12) y 50 pmol del cebador BP40 pro-F (5'-ACTCAAACAAGCATCTCGCCATAGG-3', SEQ ID NO. 3, secuencia en la región no traducida 5' del gen BP#40). Luego de tratar durante 5 minutos a 98°C, se repitió durante 30 ciclos una reacción conformada por 20 segundos a 98°C y 15 minutos a 68°C. El fragmento de ADN amplificado se insertó en pCR2.1. Este fragmento de ADN contenía una región 5' no traducida de aproximadamente 2.1 kbp y una región traducida de 200 bp. Este plásmido se designó pSFL614. La secuencia nucleotídica del plásmido pSFL614 se muestra en SEQ ID NO. 14.

[0054]

La región no traducida 5' de aproximadamente 2.1 bp (BP40pro, SEQ ID NO. 15) contenida en pSFL614 se utilizó para transcribir el gen BP#40. En este momento, el sitio BamHI se cambió a NheI. Luego de usar 1 ng de pSFL614 como molde, agregar 50 pmol del cebador BP40pro-HindIII-F (5'-AAG CTT GTG ATC GAC ATC TCT CTC C-3', SEQ ID NO. 16), 50 pmol del cebador BP40pro-NheI-R (5'-CGA GGC TAG CTA AAC ACT TAT-3', SEQ ID NO. 17), y mantener durante 5 minutos a 98°C en 25 µl de la mezcla de reacción, se repitió durante 25 ciclos una reacción conformada por 20 segundos a 98°C y 15 minutos a 68°C. El fragmento de ADN amplificado se clonó en pCR2.1. Se determinó que esta secuencia estaba libre de errores atribuibles a PCR, confirmando su secuencia nucleotídica. Este plásmido se digirió entonces con HindIII y NheI para obtener un fragmento de ADN de 470 bp. Este fragmento de ADN se designó fragmento A.

[0055]

Luego de usar 1 ng de pSLF614 como molde, agregando 50 pmol del cebador BP40pro-NheI-F (5'-TTT AGC TAG CCT CGA AGT TG-3', SEQ ID NO. 18) y 50 pmol del cebador BP40pro-BamHI-R (5'-GGA TCC CTA TGT TGA GAA AAA GGG ACT-3', SEQ ID NO. 19) y ADN polimerasa Ex-Taq, y manteniendo durante 5 minutos a 98°C en 25 µl de la mezcla de reacción, se repitió durante 25 ciclos una reacción que constaba de 20 segundos a 98°C y 15 minutos a 68°C. El fragmento amplificado de ADN se clonó en pCR2.1. Se determinó que esta secuencia estaba libre de errores atribuibles a PCR, confirmando su secuencia nucleotídica. Este plásmido se digirió entonces con HindIII y NheI para obtener un

fragmento de ADN de 630 bp. Este fragmento de ADN se designó fragmento B.

[0056]

Se recuperó el fragmento más largo de los fragmentos de ADN formados digiriendo el plásmido pSPB567 descrito en el Documento de Patente 4 con HindIII y NheI, y se acopló con el fragmento A y el fragmento B ya mencionados para obtener pSFL620.

Después de digerir pSFL620 con PaeI, se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 3.2 kb. Este fragmento de ADN se insertó en el sitio PaeI de pBin+. El plásmido resultante se designó pSBP3317. Un fragmento obtenido digiriendo el pSPB3311 ya mencionado con AscI y XbaI se clonó en los sitios AscI y XbaI de pSBP3317, y el plásmido resultante se designó pSPB3323.

[0057]

(5) Expresión del Gen Genómico de la Antocianina 3-Acil Transferasa de Perilla y el Gen F3'5'H de Pensamiento en Crisantemo

El pSPB3323 preparado en el numeral anterior (4) se introdujo en *Agrobacterium*, y la variedad crisantemo 94-765 (Seiko-en, no comercializada) se transformó de acuerdo con un método conocido, utilizando este *Agrobacterium*. Se adquirieron seis cepas transformadas.

[0058]

Se analizaron antocianidinas extraídas de acuerdo con el método descrito a continuación. Se congelaron pétalos en rayos y luego se trituraron, seguidos por extracción de 50 mg a 100 mg del pétalo triturado con 500 µL de 1% de cloruro de hidrógeno-metanol, agregando 500 µL de 4 N de ácido clorhídrico (HCl) a este extracto y mezclando, e hidrolizando durante 1 hora a 100°C. Después de enfriar la solución luego de la hidrólisis, se agregó un 1 ml de 0.05 M de ácido trifluoroacético (TFA) y se mezcló en ella. Seguidamente, esta solución se agregó a una Sep-Pak C18 (Millipore) para adsorber el producto de hidrólisis. La Sep-Pak C18 se lavó preliminarmente con 80% acetonitrilo (MeCN) y se equilibró con 0.05 M TFA. Luego de lavar el producto de hidrólisis absorbido en la Sep-Pak C18 con 0.05 M TFA, el producto de hidrólisis se lavó posteriormente con 20% MeCN y 0.05 M TFA, seguido por elución del producto de hidrólisis con 80% MeCN y 0.05 M TFA para obtener una muestra de análisis.

La muestra de análisis se analizó bajo las siguientes condiciones utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento. Se empleó una columna Inertsil ODS-2

(diámetro de partícula: 5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm, GL Sciences) para la columna, el caudal fue de 0.8 ml/min, la fase móvil contenía 1.5% ácido fosfórico, y se llevó a cabo una elución isocrática durante 20 minutos, empleando una gradiente de concentración lineal de 5% ácido acético y 6.25% acetonitrilo a 20% ácido acético y 25% acetonitrilo, seguido por elución durante 5 minutos con 25% acetonitrilo que contenía 1.5% ácido fosfórico y 20% ácido acético. La detección se llevó a cabo utilizando un Detector de Arreglo de Diodos Agilent Serie 1100 (GL Sciences) sobre una región de longitud de onda de 250 nm a 600 nm, y las relaciones de absorbencia de cada una de las antocianidinas se determinó de acuerdo con el área de absorbencia óptica a 530 nm.

Como resultado del análisis, se detectó delfinidina en relaciones de 0.9%, 0.8%, 1.4% y 0.6% de la cantidad total de antocianidinas en transformantes que constaban de las cepas analizadas 1300-3, 1300-4, 1300-5 y 1300-6, respectivamente. Aunque esto sugiere que la región reguladora de transcripción BP#40 de pensamiento gobierna la transcripción de BP#40, esto no condujo a un cambio en el color de la flor.

[0059]

#### Ejemplo de Referencia 5: Producción de Delfinidina en Crisantemo Utilizando el Promotor DFR de Rosa Rugosa

Se preparó una biblioteca de ADN de rosa rugosa en la manera descrita a continuación empleando el Kit  $\lambda$ BlueSTAR™ Xho I Half-Site Arms (Novagen, <http://www.merckbiosciences.com/product/69242>). Se preparó ADN cromosómico de una hoja joven de rosa rugosa utilizando Nucleon Phytopure™ (Tepnel Life Sciences). Aproximadamente 100  $\mu$ g de ADN cromosómico se digirieron con la enzima de restricción Sau3AI.

Este fragmento de ADN se llenó luego parcialmente con un fragmento de ADN polimerasa I Klenow (Toyobo) en la presencia de dGTP y dATP, y se fraccionó mediante centrifugación de gradiente de densidad de sacarosa. Se recuperó ADN de alrededor de 13 kb y se concentró mediante precipitación en etanol. Aproximadamente 180 ng de ADN se ligaron durante 15 horas a 4°C con 1  $\mu$ L del Kit  $\lambda$ BlueSTAR™ Xho I Half-Site Arms, seguidos por la realización de empaquetado *in vitro* para obtener una biblioteca genómica.

[0060]

Esta biblioteca se cribó utilizando ADNc DFR de rosa cultivada (Plant and

Cell Physiology, 36, 1023-1031, 1995) para obtener una placa que indicara una señal. Se obtuvo el plásmido pSFK710 por excisión *in vivo* de esta placa utilizando el método recomendado por el fabricante (Novagen). Este plásmido contenía una secuencia de ADN, que coincidió muy de cerca con el ADNc DFR de rosa cultivada, ya mencionado.

[0061]

Realizando PCR con el fin de obtener una región 5' no traducida de una secuencia traducida DFR de este plásmido y facilitar el acoplamiento con genes heterólogos, una de las secuencias de reconocimiento EcoRI se mutó a una secuencia de reconocimiento NheI, seguida por la adición de las secuencias de reconocimiento HindIII y BamHI. En primer lugar, se llevó a cabo PCR en 50 µL de la mezcla de reacción usando pSLF710 como molde, empleando 25 pmol de cada uno de los cebadores DFRproHindIIIF (5'-TAATAAGCTTACAGTGTAATTATC-3', SEQ ID NO. 20) y DFRproNheIR (5'-TTATGCTAGCGTGTCAAGACCAC-3', SEQ ID NO. 21), y utilizando la enzima ExTaq ADN Polimerasa (Toyobo). Las condiciones de reacción PCR consistieron en hacer reaccionar durante 5 minutos a 94°C, seguidas por repetir 30 ciclos de una reacción de los cuales un ciclo consiste en hacer reaccionar durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C y, finalmente, mantener durante 7 minutos a 72°C. Como resultado, se obtuvo un fragmento de ADN de aproximadamente 350 bp. De modo semejante, se llevó a cabo una reacción PCR en 50 µL de la mezcla de reacción usando pSFL710 como molde, utilizando 25 pmol de cada uno de los cebadores DFRproNheIF (5'-ACACGCTAGCATAAGTCTGTTG-3', SEQ ID NO. 22) y DFRproBamHI-R (5'-GCTTGGGGATCCATCTTAGG-3', SEQ ID NO. 23), y empleando la enzima ExTaq ADN Polimerasa (Toyobo). Las condiciones de la reacción PCR consistieron en hacer reaccionar durante 5 minutos a 94°C, seguidas por repetir 30 ciclos de una reacción de los cuales un ciclo consiste en hacer reaccionar durante 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C y, finalmente, mantener durante 7 minutos a 72°C. Como resultado, se obtiene un fragmento B de ADN de 600 bp.

[0062]

El pSPB567 descrito en el Documento de Patente 4 (plásmido pUC que contiene el promotor CaMV35S, al cual se han agregado el potenciador Ei2, el

F3'5'HBP#40 de pensamiento y el terminador de nopalina sintasa) se digirió con BamHI y luego se digirió parcialmente con HindIII para acoplar el fragmento A con un fragmento digerido con HindIII y NheI y acoplar el fragmento B con un fragmento digerido con NheI y BamHI y obtener el plásmido pSLF721 (que contiene un casete de expresión de *R. rugosa* DFR 5':BPF3'5'H#40:nos3'. Un casete de expresión obtenido digiriendo este plásmido con PacI se introdujo en el sitio PacI de pBinPLUS para obtener pSLF724. Este plásmido se transfectó entonces en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Se obtuvo un crisantemo recombinante de la variedad 94-765, utilizando este *Agrobacterium* transformado. La cepa resultante produjo delfinidina en los pétalos de su flor en alrededor del 0.6% de la cantidad total de antocianidinas.

Adicionalmente, otros ejemplos de referencia usando el promotor DFR de rosa rugosa se muestran en la segunda fila desde la parte superior (pSPB3316 (*R. rugosa* DFRpro:pansy#40 + rose rANSpro:torenia5GT, cepa no productora de delfinidina) y en la quinta fila desde la parte superior (Rugosa rose DFRpro:pansy#40 + Japanese gentian 3'GTpro::torenia MT, nivel máximo de producción de delfinidina: 0.9%) de Tabla 1. Ninguno de los dos de estos ejemplos de referencia resultó en un cambio de color de la flor.

[0063]

Ejemplo de Referencia 6: Producción de Delfinidina en Crisantemo Utilizando el Promotor F3H de Rosa Rugosa

La biblioteca de ADN genómico de rosa rugosa, producida en Ejemplo de Referencia 5, se cribó con ADNc de flavanona 3-hidroxilasa (F3H) de torenia (NCBI No. AB211958) para obtener placas que indicaran señales. Una de estas placas se convirtió en un plásmido en la misma manera de Ejemplo de Referencia 5. Éste se digirió entonces con la enzima de restricción SpeI para recuperar un fragmento de ADN de 2.6 kb, y se obtuvo el plásmido pSPB804 sub-clonando este fragmento de ADN en el sitio SpeI de pBluescript SKII- (Stratagene). Este plásmido tenía una secuencia nucleotídica que mostró homología con F3H.

[0064]

Con el fin de amplificar la región 5' no traducida de F3H, se llevó a cabo PCR en 50 µl de una mezcla de reacción utilizando 1 ng de pSPB804 como molde, usando el cebador RrF3H-F (5'-AAGCTTCTAGTTAGACAAAAAGCTA-3', SEQ ID NO. 24) y el cebador RrF3H (5'-GGATCCTCTCTTGATATTTCCGTTC-3', SEQ ID NO. 25), y empleando Ex-Taq ADN Polimerasa (Toyobo). Las condiciones de

reacción de PCR consistieron en hacer reaccionar durante 5 minutos a 94°C, repitiendo 30 ciclos de reacción, uno de los cuales constó de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C y, finalmente, manteniendo durante 7 minutos a 72°C. El fragmento de ADN resultante se insertó en pCR-TOPO (Invitrogen) para obtener el plásmido pSPB811. Se pudo recuperar una región 5' no traducida F3H de aproximadamente 2.1 kb de este plásmido utilizando HindIII y BamHI. Se obtuvo el plásmido pSFL814 (que contenía R. rugosa F3H 5':BFP3'5'#40:nos 3') sustituyendo la porción promotora de pSPB567 con la región 5' no traducida de aproximadamente 1.2 kb de F3H, utilizando HindIII y BamHI como se describe en Ejemplo de Referencia 5. Este plásmido se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Aunque se obtuvieron tres cepas de crisantemos recombinantes de la variedad 94-765 usando este *Agrobacterium* transformado, no hubo cepas en las cuales se observara la producción de delphinidina en los pétalos de la flor (véase Tabla 1).

[0065]

Ejemplo de Referencia 7: Producción de pBINPLUS Rogosa Rose F3Hpro:ADHNF-pansy-F3'5'H#40::NOSter

Se mezclaron un fragmento de ADN amplificado por PCR utilizando pSLF814 (Ejemplo de Referencia 6) como molde y usando ADH-BP40-Fd (5'-CAAGAAAAATAAATGGCAATTCTAGTCACCGAC-3', SEQ ID NO. 26) y NcoI-BP40-Rv (5'-CTCGAGCGTACGTGAGCATC-3', SEQ ID NO. 27) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado por PCR utilizando pB1221 ADH-221 como molde y usando BamHI-ADH-Fd (5'-CGCGGATCCGTCTATTTAACTCAGTATTC-3', SEQ ID NO. 28) y BP40-ADH-Rv (5'-TAGAATTGCCATTTATTTTCTTGATTTCCTTCAC-3', SEQ ID NO. 29) como cebadores, y se obtuvo un fragmento de ADN, en el cual ADH-5'UTR 94 bp de tabaco se acopló directamente al codón de iniciación de F3'5'H#40 de pensamiento, por PCR usando esta mezcla de fragmentos de ADN como molde y usando BamHI-ADH-Fd (5'-CGCGGATCCGTCTATTTAACTCAGTATTC-3', SEQ ID NO. 30) y NcoI-BP40-Rv (5'-CTCGAGCGTACGTGAGCATC-3', SEQ ID NO. 31) como cebadores.

[0066]

Luego de subclonar, mediante la técnica *TA-cloning*, este fragmento de ADN en pCR2.1, un fragmento de ADN de aproximadamente 600 bp, obtenido

digiriendo con BamHI y NcoI, y un fragmento de vector binario, obtenido digiriendo pSFL814 con BamHI y NcoI, se ligaron para obtener pBinPLUS Rugosa rose F3Hpro:ADHNF-pansy-F3'5'H#40::Noster. Este plásmido se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

No hubo individuos en los cuales se detectara delfinidina entre cuatro cepas de transformantes derivados de la variedad de crisantemo 94-765, obtenida usando este *Agrobacterium* transformado (véase Tabla 1).

[0067]

Ejemplo de Referencia 8: Producción de pBIN19 Rose CHSpro:ADH-pansy-F3'5'H#18::NOSTer

Un fragmento de ADN amplificado por PCR, utilizando pB1221 ADH221 como molde y usando ADH KpnI Forward (5'-CGGTACCGTCTATTAACTCAGTATTC-3', SEQ ID NO. 32) y GUS19R (5'-TTTCTACAGGACGTAACATAAGGGA-3', SEQ ID NO. 33) como cebadores, se digirió con KpnI y SmaI para obtener un fragmento de ADN ADH-5'UTR de tabaco de aproximadamente 110 bp. Este fragmento de ADN se ligó con un fragmento de ADN de vector binario, obtenido digiriendo pBRBP18 (que tenía un casete de expresión de rose CHSpro::pansy- F3'5'H#18::NOSTer insertado en pBIN19) con KpnI y SmaI para obtener pBIN19 rose CHSpro::ADH-pansy-F3'5'H#18:NOSTer. En este plásmido, se halla presente un espaciador de 38 bp entre ADH-5'UTR de tabaco y F3'5'H#18 de pensamiento. Este plásmido se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

30 cepas de crisantemos recombinantes derivadas de la variedad de crisantemo 94-765 se obtuvieron utilizando este *Agrobacterium* transformado. Se detectó delfinidina en los pétalos de cinco de estas cepas y el contenido de delfinidina alcanzó 1.9%. No obstante, no se observaron cambios en color de la flor.

[0068]

Ejemplo de Referencia 9: Producción de pBI121-rose CHSpro::ADHNF-pansy-F3'5'H#40::NOSTer

Se ligaron un fragmento de ADN obtenido por PCR utilizando pBRBP18 (Ejemplo de Referencia 3) como molde, usando HAPS-RhCHSpro3k-Fd (5'-CCAAGCTTGGCGCGCCTTAATTAAATTTAAATCAGCAAGAGTTGAAGAAATAG-3', SEQ ID NO. 85) y NS-RhCHSpro3k-Rv (5'-AAAGCTAGCACTAGTCATCTCGGAGAAGGGTCG-3', SEQ ID NO. 86) como

cebadores, y empleando Pyrobest Polymerase (Takara), y un fragmento de un vector binario obtenido digiriendo con HindIII y NheI y digiriendo pBI121 ADHNF con HindIII y XbaI, y el vector binario resultante se designó pBI121-RhCHSp-GUS-NOST.

Un fragmento de ADN ADHNF-pansy-F3'5'H#40, obtenido digiriendo el pCR-ADHBP40-SpeSac obtenido en Ejemplo 10 con SpeI y EcoRI, se ligó a un fragmento de un vector binario obtenido digiriendo pBI121-RhCHSp-GUS-NOST con SpeI y EcoRI para obtener pBI121-rose CHSpro::ADHNF-pansy-F3'5'H#40::NOSTer, el cual se usó para transformar la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Aunque 19 cepas de crisantemos recombinantes derivadas de la variedad de crisantemo 94-765 se obtuvieron usando este *Agrobacterium* transformado, no hubo individuos en los cuales se detectara delfinidina.

[0069]

#### Ejemplo 1: Clonación de la Región Promotora del Gen de la Flavanona 3-Hidroxilasa de Crisantemo

Un fragmento de ADN amplificado por PCR usando como molde pBluescript SK-gF3H9 (Kanno, et al. (2001), Journal of the Japanese Society for Horticultural Science (Supplement 2), 193, SEQ ID NO. 35), obtenido sub-clonando un fragmento de ADN que contenía la región promotora F3H obtenida cribando una biblioteca genómica usando un fragmento de ADNc del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) de crisantemo, y utilizando como cebadores HANS-F3Hpro1k-Fd (5'-

CCAAGCTTGGCGCGCCGCGGCCGCATTAAATTTACAAAACCATGTGCAAGA  
ATG-3', SEQ ID NO. 36, la subraya indica una secuencia que se hibrida con ADN que contiene la región promotora F3H) y SNM-F3Hpro-Rv (5'-ACTAGTGCTAGCA  
CGCGTTTTTTATTTTTCTTCACACACTTG-3', SEQ ID NO. 37, la subraya indica la secuencia que se hibrida con ADN que contiene la región promotora F3H), se clonó en pCR2.1 (Invitrogen) para obtener pCR HANS-CmF3Hp1k-NS. Adicionalmente, un fragmento de ADN amplificado por PCR utilizando HANS-F3Hpro1k-Fd y NSM-F3Hpro-Rv (5'-  
GCTAGCACTAGTACGCGTTTTTTATTTTTCTTCACACACTTG-3', SEQ ID NO. 38, la subraya indica una secuencia que se hibrida con ADN que contiene la región promotora F3H) como cebadores se clonó en pCR2.1 para obtener pCR HANS-CmF3Hp1k-SN. Un fragmento de ADN amplificado por PCR utilizando HANS-F3Hpro1k-Fd y BclI-CmF3Hp-Rv (5'-

TTTTGATCATTTTTTATTTTTTCTTCACACAGTG-3', SEQ ID NO. 39, la subraya indica la secuencia que se hibrida con ADN que contiene la región promotora de F3H) como cebadores se clonó en pCR2.1 para obtener pCR HANS-CmF3Hp1k-BclI. Por otra parte, se ligaron un fragmento de un vector binario obtenido digiriendo pBI121 ADHNF (Sato, J. et al. (2004), J. Biosci. Bioengineer.) con HindIII y XbaI y un fragmento de ADN del promotor F3H de crisantemo de aproximadamente 1.1 kb obtenido digiriendo pCR HANS-CmF3Hp1k-SN con HindIII y NheI, para obtener pBI121 HANS-CmF3Hp1k-S.

[0070]

Una región promotora, que tiene una longitud diferente, se amplificó en la manera descrita a continuación.

Un fragmento de ADN amplificado PCR utilizando pBluescript SK-gF3H9 como molde y usando HANS-F3Hpro-500Fd (5'-CCAAGCTTGGCGCGCCGCGGCCGCATTAAATTACTGTTTGAACCTACAAAGG-3', SEQ ID NO. 83, la subraya indica una secuencia que se hibrida con ADN que contiene la región promotora F3H) y MX-F3Hpro-Rv (5'-TTTCTAGAACGCGTTTTTATTTTTTCTTCACACACTTG-3', SEQ ID NO. 84, la subraya indica una secuencia que se hibrida con ADN que contiene la región promotora F3H) como cebadores se clonó en pCR2.1 para obtener pCR HANS-CmF3Hpro500-X. Adicionalmente, se ligaron un fragmento de un vector binario obtenido digiriendo pBI121 ADHNF con HindIII y XbaI y un fragmento de ADN del promotor F3H de crisantemo de aproximadamente 500 bp obtenido digiriendo pCR HANS-CmF3Hpro500-X con HindIII y XbaI para obtener pBI121 HANS-CmF3Hp500-X.

[0071]

Ejemplo 2: Producción de pBI121 Chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-Bellflower F3'5'H::NOSter

Dos tipos de cebadores conformados por CamF1 (5'-GTGAAGCCACCATGTCTATAG-3', SEQ ID NO. 49) y CamR1 (5'-GCATTTGCCTAGACAGTGTAAG-3', SEQ ID NO. 50) se sintetizaron basándose en la secuencia traducida de ADNc de F3'5'H (No. de Acceso D14590) de campanilla (Campanula medium) registrada en la base de datos GenBank DNA. Se extrajo ARN de los pétalos de la flor de los capullos de la campanilla usando el RNeasy Mini Plant Kit (Qiagen), y se sintetizó ADN de primera cadena utilizando un RT-PCR kit. Se llevó a cabo PCR usando cebadores que empleaban este DNA

de primera cadena como molde. El fragmento de ADN resultante se clonó en pCR-TOPO II. Se determinó que la secuencia nucleotídica del clon #4 resultante (designado como pSPB2561) era SEQ ID NO. 51.

[0072]

Se construyó un vector obtenido acoplando ADH-5'UTR del tabaco de 94 bp y el gen F3'5'H, en la manera descrita a continuación (FIG. 4). Por otra parte, se llevó a cabo también el mismo procedimiento en los ejemplos descritos más adelante.

Se sintetizaron dos tipos de fragmentos de ADN conformados por un fragmento de ADN amplificado por PCR utilizando pSPB2561 como modelo y usando ADH-Campa-Fd (5'-CAAGAAAAATAAATGTCTATAGACATAACCATTC-3', SEQ ID NO. 53) y HpaI-Campa-Rv (5'-GTTAACATCTCTGGCACCACC-3', SEQ ID NO. 54) como cebadores y un fragmento de ADN amplificando por PCR usando pBI1121 ADH-221 como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y Campa-ADH-Rv (5'-GTCTATAGACATTTATTTTCTTGATTTCTTCAC-3', SEQ ID NO. 55) como cebadores, y se obtuvo un fragmento de ADN, en el cual ADH-5'UTR de tabaco de 94 bp se acopla directamente al codón de iniciación de F3'5'H de campanilla, por PCR usando los dos tipos de fragmentos de ADN como moldes y utilizando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y HpaI-Campa-Rv (5'-GTTAACATCTCTGGCACCACC-3', SEQ ID NO. 56) como cebadores. Este fragmento de ADN se subclonó entonces, mediante la técnica *TA-cloning*, en pCR2.1, seguido por digestión con XbaI y HpaI, y el fragmento resultante de aproximadamente 650 bp se ligó con un fragmento del vector obtenido digiriendo pSPB2561 con XbaI y HpaI para obtener pCR ADHNF-Campanula F3'5'H.

[0073]

A continuación, pCR ADHNF-Campanula F3'5'H se digirió con KpnI, seguido por corte dejando extremos romos (*by blunting*) con Blunting High (Toyobo) y digestión con XbaI, y el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 1.7 kb se ligó con un fragmento de un vector binario obtenido digiriendo pBI121 HANS-CmF3Hp1k-S con SpeI y EcoRI para obtener pBI121 chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-bellflower F3'5'H::NOSter. Este plásmido se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

48 cepas de crisantemo recombinantes de la variedad de crisantemo 94-765 se obtuvieron usando este *Agrobacterium* transformado. Se detectó delfinidina en los pétalos de la flor de 30 de estas cepas, y el contenido de

delfinidina alcanzó 80.5%.

Se construyó pSPB3738 a partir de pBI121 chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-bellflower F3'5'H::NOSter. Este plásmido se transfeció en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, y ésta se usó entonces para transformar la variedad de crisantemo Sei Taitan (Seikoen). Entre las 26 cepas resultantes de crisantemos recombinantes, se observó un cambio en el color de la flor en 6 cepas, y pudo detectarse delfinidina mediante cromatografía de capa fina.

[0074]

Ejemplo 3: Producción de pIG121-Hm-chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-lisianthus F3'5'H::NOSter

El gen F3'5'H de *Eustoma* (EgF3'5'H, GenBank AB078957) clonado en pBluescript SK- se digirió con XhoI, seguido por corte dejando extremos romos con Blunting High (Toyobo), y el fragmento de ADN de EgF3'5'H de aproximadamente 1.9 kb, obtenido por digestión posterior con XbaI, se ligó a un vector primario pIG121-Hm, obtenido digiriendo con XbaI y EcoICRI, para obtener pIG121-Hm 35S::EgF3'5'H.

A continuación, se mezclaron dos tipos de fragmentos de ADN conformados por un fragmento de ADN amplificado por PCR usando pBluescript SK- EgF3'5'H como molde y usando ADH-EgF3'5'H-Fd (5'-CAAGAAAAATAAATGGCTGTTGGAAATGGCGTT-3', SEQ ID NO. 40) y HpaI-EgF3'5'H-Rv (5'-GTTAACGCTGAGCCTAGTGCC-3', SEQ ID NO. 41) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado por PCR utilizando pBI221 ADH-221 (Satoh, J. et al. (2004), J. Biosci. Bioengineer) como molde y usando XbaI-ADH-Fd (5'-ACGCGTTCTAGAGTCTATTTAACTCAGTATTC-3', SEQ ID NO. 42) y EgF3'5'H-ADH-Rv (5'-TCCAACAGCCATTTATTTTTCTTGATTTCCTTCAC-3', SEQ ID NO. 43) como cebadores, y un fragmento de ADN, en el cual ADH-5'UTR de tabaco de 94 bp (Satoh, J. et al. (2004), J. Biosci. Bioengineer) se acopló directamente al codón de iniciación de EgF3'5'H, se obtuvo mediante PCR usando la mezcla de los fragmentos de ADN como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y HpaI-EgF3'5'H-Rv (5'-GTTAACGCTGAGCCTAGTGCC-3', SEQ ID NO. 44) como cebadores. Luego de clonar este fragmento de ADN en pCR2.1, un fragmento de ADN de aproximadamente 1.3 kb, obtenido digiriendo con XbaI y HpaI, y un fragmento de un vector binario, obtenido digiriendo pIG121-Hm 35S::EgF3'5'H con XbaI y HpaI, se ligaron para obtener pIG121-Hm 35S::ADHNF-EgF3'5'H. Un fragmento de ADN de EgF3'5'H de aproximadamente 1.2 kb, obtenido digiriendo este pIG121-Hm 35S::EgF3'5'H con HindIII y XbaI, un fragmento de ADN de vector

binario de aproximadamente 15 kb, y un fragmento de ADN, obtenido digiriendo posteriormente pCR HANS-CmF3Hp1k-MNS con HindIII y SpeI, se ligaron para obtener pIG121-Hm chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-lisianthus F3'5'H::NOSter. Este plásmido se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Se obtuvieron cinco cepas de crisantemos recombinantes, derivados de la variedad de crisantemo 94-765, utilizando este *Agrobacterium* transformado. Se detectó delphinidina en los pétalos de la flor de una de estas cepas, y el contenido de delphinidina fue de 4.4%.

[0075]

Ejemplo 4: Producción de pBI121 Chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-Lobelia F3'5'H::NOSter

El gen F3'5'H derivado de los pétalos de la flor de lobelia clonado en pBluescript SK- (LeF3'5'H1, GenBank ABS221077 y LeF3'5'H4, GenBank AB221078) se digirió con KpnI, seguido por corte dejando extremos romos con Blunting High (Toyobo), y un fragmento de ADN de EgF3'5'H de aproximadamente 1.9 kb, obtenido por digestión posterior con XbaI, se ligó a un fragmento de un vector binario pIG121-Hm, obtenido digiriendo XbaI y EcoICRI, para obtener pIG121-Hm 35S::LeF3'5'H1 and pIG121-Hm 35S::LeF3'5'H4.

[0076]

A continuación, se mezclaron dos tipos de fragmentos de ADN conformados por un fragmento de ADN amplificado por PCR usando pBluescript SK- LeF3'5'H1 o pBluescript SK- LeF3'5'H4 como molde y usando ADH-LeF3'5'H-Fd (5'-CAAGAAAATAAATGGACGCGACAWACATTGC-3', SEQ ID NO. 45) y HpaI-LeF3'5'H-Rv (5'-GTTAACATCTCGGGCAGCACC-3', SEQ ID NO. 46) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado por PCR usando pBI121 ADH-221 como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y LeF3'5'H-ADH-Rv (5'-TGTCGCGTCCATTTATTTTCTTGATTTCCTTCAC-3', SEQ ID NO. 47) como cebadores, y se obtuvieron fragmentos de ADN, en los cuales ADH-5'UTR de tabaco de 94 bp se acopló directamente al codón de iniciación de LeF3'5'H1 o LeF3'5'H4, respectivamente usando esta mezcla de fragmentos de ADN como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y HpaI-LeF3'5'H-Rv (5'-GTTAACATCTCGGGCAGCACC-3', SEQ ID NO. 48) como cebadores.

[0077]

Luego de subclonar en cada caso mediante la técnica *TA-cloning* estos

fragmentos de ADN en pCR2.1, se ligaron respectivamente un fragmento de ADN, obtenido digiriendo con XbaI y HpaI, y un fragmento de un vector binario, obtenido digiriendo pIG121-Hm 35S::LeF3'5'H1 o pIG121-Hm 35S::LeF3'5'H4 con XbaI y HpaI, para obtener pIG121-Hm 35S::ADHNF-LeF3'5'H1 y pIG121-Hm 35S::ADHNF-LeF3'5'H4. Un fragmento de ADN de ADHNF-LeF3'5'H1::NOSter de aproximadamente 2.6 kb, obtenido digiriendo estos vectores binarios con XbaI y EcoRV, se ligó con un fragmento de un vector binario, obtenido digiriendo pBI121 HANS-CmF3Hp1k-S con SpeI y EcoRI, para obtener pBI121 chrysanthemum F3Hpro1kpro::ADHNF-loberia F3'5'H1::NOSter y pBI121 chrysanthemum F3Hpro1kpro::ADHNF-eustoma F3'5'H4::NOSter.

Aunque se obtuvieron 12 cepas de crisantemos recombinantes derivados de la variedad de crisantemo 94-765 utilizando *Agrobacterium* transformado con pBI121 chrysanthemum F3Hpro1kpro::ADHNF-loberia F3'5'H1::NOSter, no se obtuvieron individuos que contuvieran delfinidina. Adicionalmente, aunque se obtuvieron 34 cepas de crisantemos recombinantes derivados de la variedad de crisantemo 94-765 usando *Agrobacterium* transformado con pBI121 chrysanthemum F3Hpro1kpro::ADHNF-loberia F3'5'H4::NOSter, no se obtuvieron individuos que contuvieran delfinidina.

[0078]

Ejemplo 5: Producción de pBINPLUS Chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-pansy-F3'5'H#40::NOSter

Se obtuvo pBinPLUS chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-pansy F3'5'H#40::NOSter ligando un fragmento de ADN del promotor F3H de aproximadamente 1.1 kb, obtenido digiriendo pCR HANS-CmF3Hp1k-BclI con AscI y BclI, y un fragmento de un vector binario, obtenido digiriendo pBinPLUS Rugosa rose F3Hpro::ADHNF-pansy F3'5'H#40::NOSter con AscI y BamHI. Este plásmido se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Se obtuvieron 6 cepas de crisantemos recombinantes derivados de la variedad de crisantemo 94-675, utilizando este *Agrobacterium* transformado. Se detectó delfinidina en los pétalos de la flor de 4 de estas cepas, y el contenido de delfinidina alcanzó 26.8%.

[0079]

Ejemplo 6: Producción de pBI121 Chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-cineraria F3'5'H::NOSter y Transformación en Crisantemo

Se mezclaron dos tipos de fragmentos de ADN conformados por un

fragmento de ADN amplificado por PCR usando el F3'5'H (pSPB2774) de cineraria, obtenido en Ejemplo de Referencia 2, como molde y usando ADH-ScF3'5'H-Fd (5'-CAAGAAAAATAAATGAGCATTCTAACCCTAATC-3', SEQ ID NO. 57) y NdeI-ScF3'5'H-Rv (5'-CATATGTTTAGCTCCAGAATTTGG-3', SEQ ID NO. 58) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado por PCR usando pBI121 ADH-221 como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y ScF3'5'H-ADH-Rv (5'-TAGAATGCTCATTTATTTTCTTGATTCCTTCAC-3', SEQ ID NO. 59) como cebadores, y se obtuvo un fragmento de ADN, en el cual ADH-5'UTR de tabaco de 94 bp se acopló directamente al codón de iniciación de F3'5'H de cineraria, mediante PCR usando esta mezcla de fragmentos de ADN como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y NdeI-ScF3'5'H-Rv (5'-CATATGTTTAGCTCCAGAATTTGG-3', SEQ ID NO. 60) como cebadores. Luego de subclonar, por la técnica *TA-cloning*, este fragmento de ADN en pCR2.1, se ligaron un fragmento de ADN, obtenido digiriendo con XbaI y NdeI, y un fragmento del vector, obtenido digiriendo pSPB2774 con XbaI y NdeI, para obtener pBluescript Sk<sup>-</sup> ADHNF-cineraria F3'5'H.

[0080]

A continuación, se ligaron un fragmento de ADN de aproximadamente 1.7 kb, obtenido digiriendo pBluescript Sk<sup>-</sup> ADHNF-cineraria F3'5'H con XbaI y XhoI, y un fragmento de un vector obtenido digiriendo pCR2.1 con XbaI y XhoI para obtener pCR2.1 ADHNF-cineraria F3'5'H. Se obtuvo entonces pBI121 *chrysanthemum* F3Hpro1k::ADHNF-cineraria F3'5'H::NOSTer ligando un fragmento de ADN obtenido digiriendo este pCR2.1 ADHNF-cineraria F3'5'H con XbaI y EcoRV con un fragmento de un vector binario, obtenido digiriendo pBI121 HANS-CmF3Hp1k-S con SpeI y EcoCRI. Este plásmido se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Se obtuvieron 50 cepas de crisantemos recombinantes de la variedad de crisantemo 94-765, utilizando este *Agrobacterium* transformado. Se detectó delfinidina en los pétalos de la flor de 37 de estas cepas, y el contenido de delfinidina alcanzó 36.2%.

[0081]

#### Ejemplo 7: Producción de pBI121 *Chrysanthemum*F3Hpro1k::ADHNF-Japanese gentian F3'5'H::NOSTer

Se mezclaron dos tipos de fragmentos de ADN conformados por un fragmento de ADN amplificado por PCR usando F3'5'H de genciana japonesa

clonado en pBluescript SK- (plásmido pG48 descrito en WO 2004/020637) como molde y usando ADH-Gentian-Fd (5'-CAAGAAAAATAAATGTCACCCATTTACACCACCC-3', SEQ ID NO. 61) y Sall-Gentian F3'5'H-Rv (5'-GTCGACGCTATTGCTAAGCC-3', SEQ ID NO. 62) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado por PCR usando pBI121 ADH-221 como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y Gentian-ADH-Rv (5'-AATGGGTGACATTTATTTTCTTGATTTCCTTCAC-3', SEQ ID NO. 63) como cebadores, y se obtuvo un fragmento de ADN, en el cual ADH-5'UTR de tabaco de 94 bp se acopló directamente al codón de iniciación de F3'5'H de genciana japonesa, utilizando esta mezcla de fragmentos de ADN como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y Sall-Gentian F3'5'H-Rv (5'-GTCGACGCTATTGCTAAGCC-3', SEQ ID NO. 64) como cebadores. Luego de subclonar, por la técnica *TA-cloning*, este fragmento de ADN en pCR2.1, se ligaron un fragmento de ADN de aproximadamente 400 bp, obtenido digiriendo con XbaI y Sall, y un fragmento de un vector, obtenido digiriendo pG48 con XbaI y Sall, para obtener pBluescript SK- ADHNF-Japanese gentian F3'5'H.

[0082]

A continuación, se ligaron un fragmento de ADN de aproximadamente 1.8 kb, obtenido digiriendo pBluescript SK- ADHNF-Japanese gentian F3'5'H con XbaI y XhoI, y un fragmento de un vector, obtenido digiriendo pCR2.1 con XbaI y XhoI, para obtener pCR2.1 ADHNF-Japanese gentian F3'5'H. Se obtuvo pBI112 chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF Japanese gentian F3'5'H::NOSter ligando un fragmento de ADN, obtenido digiriendo este pCR2.1 ADHNF-Japanese gentian F3'5'H con XbaI y EcoRV, y un fragmento de un vector binario obtenido digiriendo pBI121 HANS-CmF3Hp1k-S con SpeI y EcoRI. Este plásmido se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Aunque se obtuvieron 21 cepas de crisantemos recombinantes derivados de la variedad de crisantemo 94-765, utilizando este *Agrobacterium* transformado, no se obtuvieron individuos que contuvieran delfinidina.

[0083]

#### Ejemplo 8: Producción de pBI121 Chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-Verbena F3'5'H::NOSter

Se mezclaron dos tipos de fragmentos de ADN conformados por un fragmento de ADN amplificado por PCR usando F3'5'H de verbena clonado en pBluescript SK- (pHV7, Plant Biotechnology, 23, 5-11, 2006, base de datos de

ADN No. de Accesoión ABA234898) como molde y usando ADH-Verbena-Fd (5'-CAAGAAAAATAAATGACGTTTTTCAGAGCTTATAAAC-3', SEQ ID NO.65) y NcoI-Verbena F3'5'H-Rv (5'-CCATGGAGTAAATCAGCATCTC-3', SEQ ID NO. 66) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado por PCR usando pBI121 ADH-221 como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y Verbena ADH-Rv (5'-TGAAAACGTCATTTATTTTCTTGATTTCCTTCAC-3', SEQ ID NO. 67) como cebadores, y se obtuvo un fragmento de ADN, en el cual ADH-5'UTR de tabaco de 94 bp se acopló directamente al codón de iniciación de F3'5'H de verbena, obtenido por PCR utilizando la mezcla de los fragmentos de ADN como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y NcoI-Verbena F3'5'H-Rv (5'-CCATGGAGTAAATCAGCATCTC-3', SEQ ID NO. 68) como cebadores. Luego de subclonar, por la técnica de *TA-cloning*, este fragmento de ADN en pCR2.1, se obtuvo pBluescript SK- ADHNF-verbena F3'5'H ligando un fragmento de ADN de aproximadamente 700 b, obtenido digiriendo con XbaI y NcoI, y un fragmento de un vector, obtenido digiriendo pHVF7 con XbaI y NcoI.

[0084]

A continuación, se ligaron un fragmento de ADN de 1.8 kb, obtenido digiriendo pBluescript SK- ADHNF-verbena F3'5'H con XbaI y XhoI, y un fragmento de un vector, obtenido digiriendo pCR2.1 con XbaI y XhoI, para obtener pCR2.1 ADHNF-verbena F3'5'H. Se obtuvo entonces pBI121 *chrysanthemum*F3Hpro1k::ADHNF-verbena F3'5'H::NOSter ligando un fragmento de ADN, obtenido digiriendo este pCR2.1 ADHNF-verbena F3'5'H con XbaI y EcoRV, y un fragmento de un vector binario, obtenido digiriendo pBI121 HANS-CmF3Hk1k-S con SpeI y EcoCRI. Este plásmido se introdujo en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Se obtuvieron 17 cepas de crisantemos recombinantes derivados de la variedad de crisantemo 94-765, utilizando este *Agrobacterium* transformado. Se detectó delfinidina en los pétalos de las flores de 11 de estas cepas, y el contenido máximo de delfinidina fue 28.4%.

[0085]

#### Ejemplo 9: Producción de pBI121 *Chrysanthemum* F3Hpro1k::ADHNF-Blue Snapdragon F3'5'H::NOSter

Se produjo una biblioteca de ADNc utilizando ARNm obtenido del capullo de un tipo de cabeza de dragón (*Antirrhinum kelloggii*, cabeza de dragón azul) empleando el Uni-ZAP XR Vector Kit (Stratagene), de acuerdo con el método

recomendado por el fabricante. Esta biblioteca se cribó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo de Referencia 2 para obtener dos tipos de plásmidos pSPB3145 y pSPB3146 que contenían respectivamente ADNc #1 de F3'5'H (SEQ ID NO. 69) y ADNc #12 de F3'5'H (SEQ ID NO. 71).

[0086]

Se mezclaron dos tipos de fragmentos de ADN conformados por un fragmento de ADN amplificado por PCR utilizando pSPB3145 o pSPB3146 como molde y usando ADH-AkF3'5'H-Fd (5'-CAAGAAAAATAAATGCAGATAATAATTCCGGTCC-3', SEQ ID NO. 73) y Nsil-AkF3'5'H-Rv (5'-ATGCATGTCCTCTAACATGTATC-3', SEQ ID NO. 74) como cebadores, y un fragmento de ADN amplificado por PCR utilizando pBI121 ADH-221 como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y AkF3'5'H-ADH-Rv (5'-TATTATCTGCATTTATTTTCTTGATTTCCTTCAC-3', SEQ ID NO. 75) como cebadores, y se obtuvo respectivamente un fragmento de ADN, en el cual ADH-5'UTR de tabaco de 94 bp se acopló directamente al codón de iniciación (Ak)F3'5'H #1 o #12 de cabeza de dragón azul, por PCR utilizando la mezcla de fragmentos de ADN como molde y usando XbaI-ADH-Fd (SEQ ID NO. 42) y Nsil-AkF3'5'H-Rv (5'-ATGCATGTCCTCTAACATGTATC-3', SEQ ID NO. 76) como cebadores. Luego de subclonar, por la técnica *TA-cloning*, este fragmento de ADN a pCR2.1, se obtuvieron pBluescript SK- ADHNF-AkF3'5'H #1 y #12 ligando respectivamente un fragmento de ADN de aproximadamente 700 b, obtenido digiriendo con XbaI y Nsil, y un fragmento de un vector, obtenido digiriendo pSPB3145 (pBluescript SK- AkF3'5'H #1) y pSPB3146 (pBluescript SK- AkF3'5'H #12) con XbaI y Nsil.

[0087]

A continuación, se ligaron fragmentos de ADN de aproximadamente 700 b, obtenidos digiriendo pBluescript SK- ADHNF-AkF3'5'H #1 y #12 con XbaI y XhoI con un fragmento de un vector, obtenido digiriendo pCR2.1 con XbaI y XhoI, para obtener pCR2.1 ADHNF-AkF3'5'H #1 y #12. Se obtuvieron pBI121 chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-AkF3'5'H#1::NOSter y pBI121 chrysanthemum F3Hpro1k::ADHNF-AkF3'5'H#12::NOSter, ligando respectivamente fragmentos de ADN, obtenidos digiriendo estos pCR2.1 ADHNF-AkF3'5'H #1 y #12 con XbaI y EcoRV, con un fragmento de un vector binario, obtenido digiriendo pBI121 HANS-CmF3Hp1k-S con SpeI y EcoCRI. Estos plásmidos se transfectaron en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Se obtuvo 1 cepa de crisantemos recombinantes derivados de la variedad de crisantemo 94-765, utilizando este *Agrobacterium* transformado. Se detectó delfinidina en los pétalos de las flores de esta cepa, y el contenido de delfinidina alcanzó 2.9%.

[0088]

Ejemplo 10: Producción de pBI121 *Chrysanthemum* F3Hpro500::ADHNF-cineraria F3'5'H::NOSTer

Se ligaron un fragmento de ADN de un vector binario, obtenido digiriendo el pBI121 HANS-CmF3Hp500-X obtenido en Ejemplo 1 con XbaI y EcoICRI, y un fragmento de ADN de ADHNF-cineraria F3'5'H, obtenido digiriendo el pCR2.1 ADHNF-cineraria F3'5'H obtenido en Ejemplo 6, para obtener pBI121-*chrysanthemum* F3Hpro500::ADHNF-cineraria F3'5'H::NOSTer, el cual se introdujo luego en la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Se obtuvieron 7 cepas de crisantemos recombinantes derivados de la variedad de crisantemo Taihei, utilizando este *Agrobacterium* transformado. Se detectó delfinidina en 5 de esas cepas, y el contenido de delfinidina alcanzó 25.5%.

POSIBILIDAD DE APLICACIÓN INDUSTRIAL

[0089]

De acuerdo con la presente invención, el color de las flores de crisantemo puede cambiarse a azul utilizando la región reguladora de transcripción de flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivada de crisantemo, expresando la flavonoide 3'5'-hidroxilasa (F3'5'H) en crisantemo, y permitiendo que una gran cantidad de delfinidina se acumule en los pétalos de las flores. Aunque los crisantemos vienen en colores de flores incluyendo blanco, amarillo, anaranjado, rojo, rosado y rojo púrpura, puesto que no hay variedades existentes o variedades silvestres estrechamente relacionadas que produzcan flores azuladas, tales como las que tienen un color púrpura o azul, los crisantemos azules producidos de acuerdo con el método de la presente invención llevarán a estimular una nueva demanda.

[0090]

[Tabla 1]

Tabla 1 Acumulación de Delfinidina en Transformantes de Crisantemo Introducidos con Varios Genes F3'5'H

| Casete de Genes 1 F3'5'H |                         |                          |            | Casete de Genes 2 |                         |             | No. de trans-<br>formantes | No. de individuos<br>analizados para<br>detectar la presencia<br>de agliconas | No. de individuos que<br>contienen delfinidina | Contenido de Delfinidina** |            | Ejemplo No. |
|--------------------------|-------------------------|--------------------------|------------|-------------------|-------------------------|-------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------|------------|-------------|
| Promotor                 | Potenciador ADH*        | Origen del Gen<br>F3'5'H | Terminador | Promotor          | Genes                   | Terminador  |                            |                                                                               |                                                | Medio<br>(%)               | Máximo (%) |             |
| Rugosa rose DFR          | Ninguno                 | Pansy #40                | NOS        |                   |                         |             | 4                          | 2                                                                             | 1                                              | 0.3                        | 0.6        | Ref. Ej. 5  |
| Rugosa rose DFR          | Ninguno                 | Pansy #40                | NOS        | Rose ANS          | Torenia 5GT             | MAS         | 2                          | 1                                                                             | 0                                              | 0.0                        | 0.0        | Ref. Ej. 5  |
| Rugosa rose F3H          | Ninguno                 | Pansy #40                | NOS        |                   |                         |             | 3                          | 3                                                                             | 0                                              | 0.0                        | 0.0        | Ref. Ej. 8  |
| Rugosa rose F3H          | 94 bp, acoplado directo | Pansy #40                | NOS        |                   |                         |             | 4                          | 2                                                                             | 0                                              | 0.0                        | 0.0        | Ref. Ej. 7  |
| Rugosa rose DFR          | Ninguno                 | Pansy #40                | NOS        | Gentian 3GT       | Torenia MT              | MOS         | 5                          | 4                                                                             | 4                                              | 0.7                        | 0.9        | Ref. Ej. 5  |
| Gerbers CHS              |                         | Pansy #18                | NOS        |                   |                         |             | 2                          | 1                                                                             | 0                                              | 0.0                        | 0.0        |             |
| Pansy #40                | Ninguno                 | Pansy #40                | NOS        | Perilla 3AT       | Perilla 3AT             | Perilla 3AT | 6                          | 6                                                                             | 4                                              | 0.6                        | 1.4        | Ref. Ej. 4  |
| Rose CHS                 | Ninguno                 | Pansy #18                | NOS        |                   |                         |             | 11                         | 10                                                                            | 5                                              | 1.3                        | 5.4        | Ref. Ej. 3  |
| Rose CHS                 | Ninguno                 | Pansy #18                | NOS        | Rose CHS          | Chrysanthemum<br>F3H IR | NOS         | 11                         | 11                                                                            | 2                                              | 0.4                        | 3.6        | Ref. Ej. 3  |
| Rose CHS                 | 94 bp, con espaciador   | Pansy #18                | NOS        |                   |                         |             | 30                         | 29                                                                            | 5                                              | 0.2                        | 1.9        | Ref. Ej. 8  |
| Rose CHS                 | 94 bp, acoplado directo | Pansy #40                | NOS        |                   |                         |             | 19                         | 19                                                                            | 0                                              | 0.0                        | 0.0        | Ref. Ej. 9  |
| CaMV35S                  | 74 bp, con espaciador   | Pansy #40                | NOS        |                   |                         |             | 8                          | 5                                                                             | 2                                              | 0.2                        | 0.7        |             |
| CaMV35S                  | 74 bp, con espaciador   | Bellflower               | NOS        |                   |                         |             | 11                         | 9                                                                             | 9                                              | 1.5                        | 6.9        |             |
| Chrysanthemum F3H1K      | 94 bp, acoplado directo | Gentian                  | NOS        |                   |                         |             | 21                         | 19                                                                            | 0                                              | 0.0                        | 0.0        | Ex.7        |
| Chrysanthemum F3H1K      | 94 bp, acoplado directo | Lobelia #1               | NOS        |                   |                         |             | 12                         | 11                                                                            | 0                                              | 0.0                        | 0.0        | Ex.4        |
| Chrysanthemum F3H1K      | 94 bp, acoplado directo | Lobelia #4               | NOS        |                   |                         |             | 34                         | 20                                                                            | 0                                              | 0.0                        | 0.0        | Ex.4        |
| Chrysanthemum F3H1K      | 94 bp, acoplado directo | Blue snap- dragon        | NOS        |                   |                         |             | 1                          | 1                                                                             | 1                                              | 2.9                        | 2.9        | Ex.9        |
| Chrysanthemum F3H1K      | 94 bp, acoplado directo | Eustoma                  | NOS        |                   |                         |             | 5                          | 5                                                                             | 1                                              | 0.9                        | 4.4        | Ex.3        |
| Chrysanthemum F3H500     | 94 bp, acoplado directo | Cineraria                | NOS        |                   |                         |             | 7                          | 7                                                                             | 5                                              | 11.9                       | 25.5       | Ex.10       |
| Chrysanthemum F3H1K      | 94 bp, acoplado directo | Pansy #40                | NOS        |                   |                         |             | 8                          | 5                                                                             | 4                                              | 14.8                       | 28.8       | Ex.5        |
| Chrysanthemum F3H1K      | 94 bp, acoplado directo | Verbena                  | NOS        |                   |                         |             | 17                         | 12                                                                            | 11                                             | 8.9                        | 28.4       | Ex.8        |
| Chrysanthemum F3H1K      | 94 bp, acoplado directo | Cineraria                | NOS        |                   |                         |             | 50                         | 47                                                                            | 37                                             | 7.5                        | 38.2       | Ex.6        |
| Chrysanthemum F3H1K      | 94 bp, acoplado directo | Bellflower               | NOS        |                   |                         |             | 48                         | 38                                                                            | 30                                             | 31.4                       | 60.5       | Ex.2        |

\* Longitud de 5'UTR del gen ADH de tabaco y manera de acoplarlo al codón de iniciación del gen F3'5'H

\*\* Relación de delfinidina a antocianidinas totales durante la hidrólisis de antocianina acumulada en pétalos en rayos (% en peso)

El número de transformantes para los cuales el contenido de delfinidina fue 0 se incluyó al determinar los valores de la media.

U1

57

### REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una planta de crisantemo que contiene delfinidina en sus pétalos, método que incluye el paso de expresar la flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) en una planta de crisantemo usando como una región reguladora de transcripción un ácido nucleico seleccionado del grupo conformado por:

(1) un ácido nucleico que contiene la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87;

(2) un ácido nucleico capaz de funcionar como una región reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo, y que contiene una secuencia nucleotídica en la cual la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87 se ha modificado por la adición, deleción y/o sustitución de uno o varios nucleótidos;

(3) un ácido nucleico capaz de funcionar como una región reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo, y capaz de hibridarse bajo condiciones de alta restricción con un ácido nucleico compuesto por una secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87; y,

(4) un ácido nucleico capaz de funcionar como una región reguladora de transcripción del gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo, y que tiene una identidad de secuencia de por lo menos 90% con la secuencia nucleotídica indicada en SEQ ID NO. 34 o SEQ ID NO. 87.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) se deriva de la campanilla o campánula, cineraria, verbena y pensamiento #40.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde un potenciador de traducción derivado de la alcohol deshidrogenasa del tabaco se

utiliza además en adición a la región reguladora de transcripción.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde se utiliza un vector de expresión o casete de expresión, en el cual el potenciador de traducción se acopla directamente a un codón de iniciación del gen F3'5'H.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el contenido de delfinidina en los pétalos es 25% en peso, o más, del peso total de las antocianidinas.

6. Una planta de crisantemo, su progenie, o producto de proliferación vegetativa, parte o tejido de la misma, que contiene el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, o producida según el método de acuerdo con la reivindicación 1.

7. La planta de crisantemo, su progenie, o producto de proliferación vegetativa, parte o tejido de la misma de acuerdo con reivindicación 6, la cual es una flor cortada.

8. Un producto procesado de una flor cortada utilizando la flor cortada de acuerdo con reivindicación 7.

EXTRACTO

Se divulgan: un método para producir una planta de crisantemo, que tiene pétalos que contienen delphinidina, utilizando una región reguladora de transcripción para un gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo; y una planta de crisantemo, una progenie o un producto de proliferación vegetativa de la planta, o una parte o un tejido de la planta, la progenie o el producto de proliferación vegetativa, y particularmente un pétalo o una flor cortada de la planta. En el método para producir una planta de crisantemo, que tiene pétalos que contienen delphinidina, se hace que una flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) se exprese en una planta de crisantemo, utilizando una región reguladora de transcripción para un gen de flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo.

Fig.1

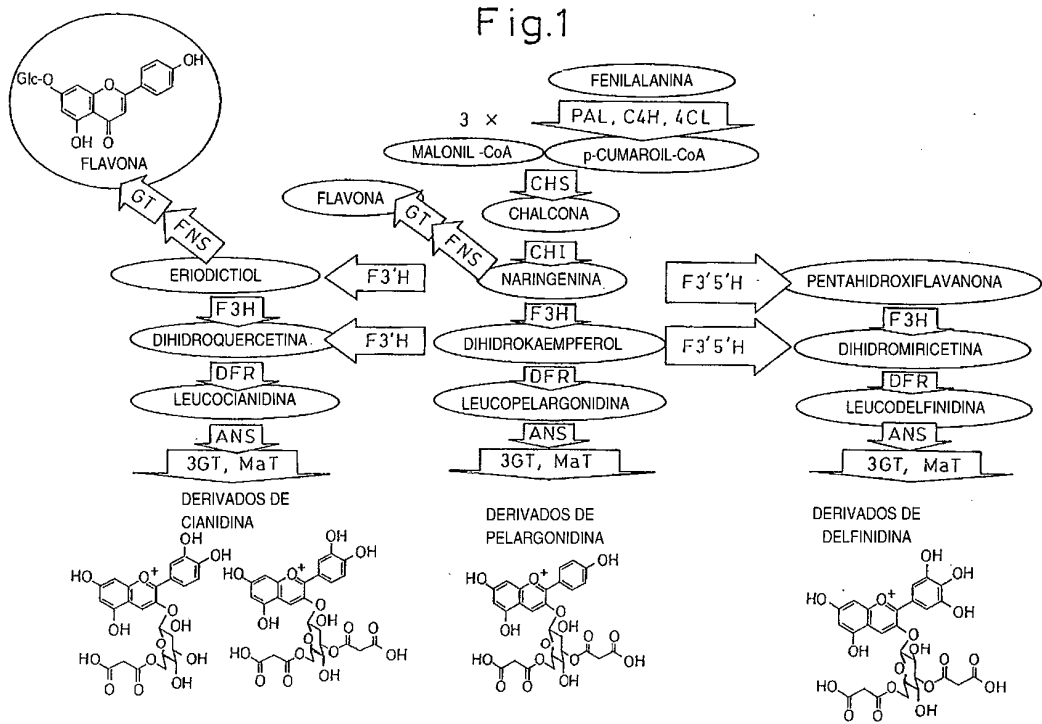


Fig.2

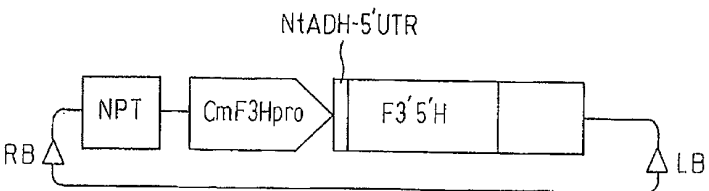
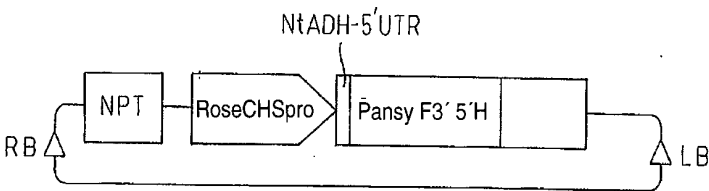
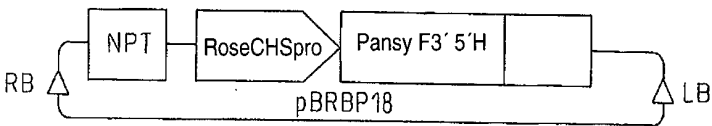
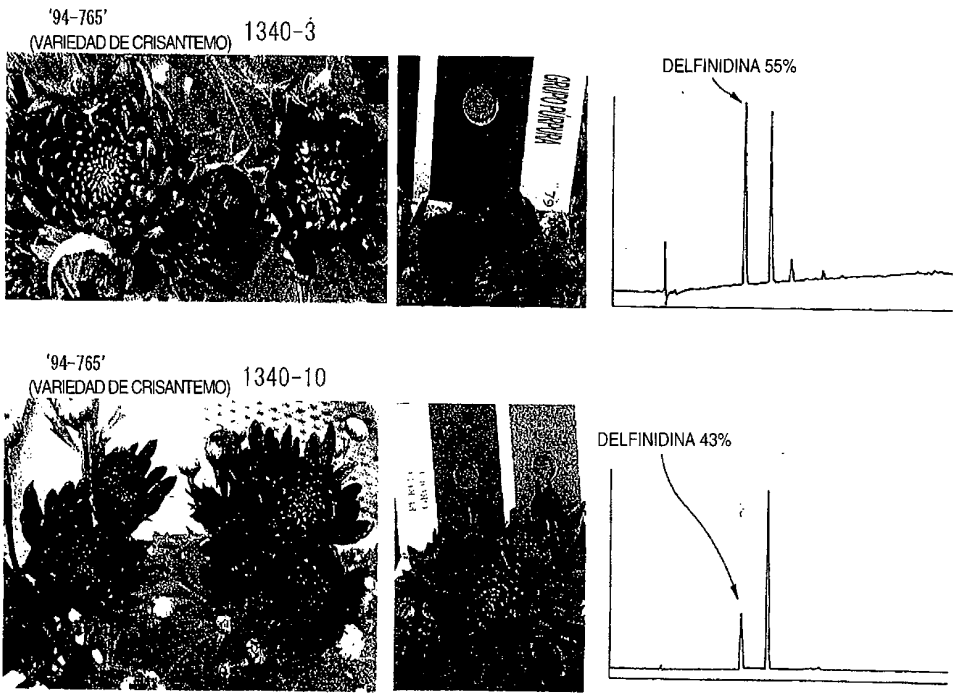


Fig.3



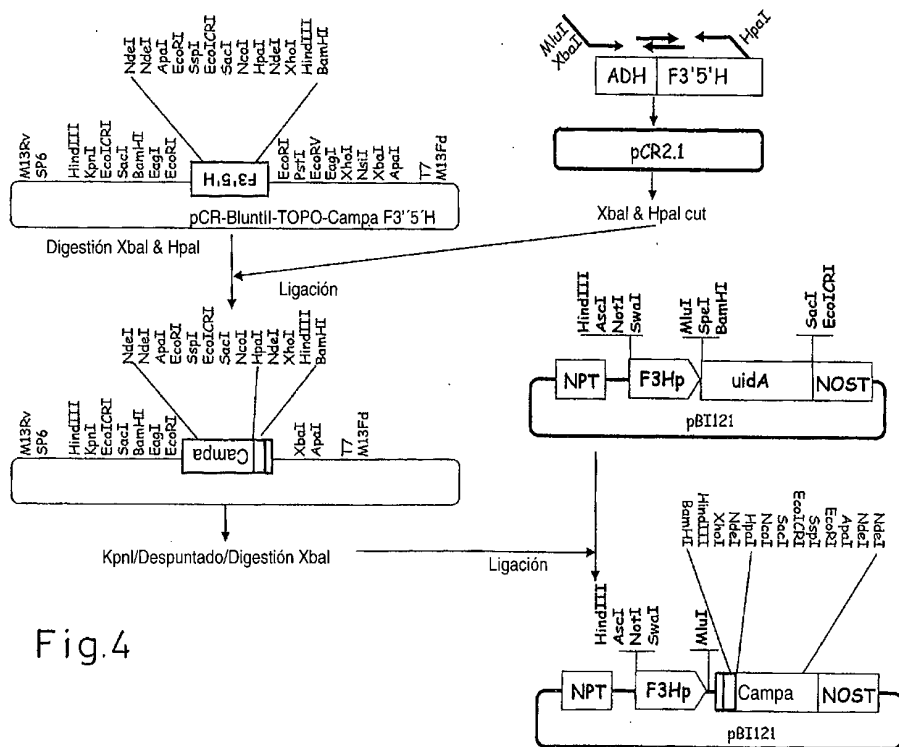


Fig.4

65

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> National Agriculture and Food Research Organization, and  
Suntory Holdings Limited

<120> Un Método para Producir Crisantemo cuyos Pétalos Contienen  
Delfinidina Utilizando el Promotor F3H de Crisantemo

<130> Y540-PCT

<150> JP2009-107054  
<151> 2009-04-24

<160> 87

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
<211> 1096  
<212> DNA  
<213> Perilla frutescens

<220>  
<221> promotor  
<222> (1)..(1096)  
<223> promotor de la antocianina 3-acil transferasa

<400> 1  
aactattatg atcccacaga gtttttgaca gatgagtctt caggaggaga tgctgaacct 60  
tttcactact ctactgaacg catcacaagt ttatcggtctt atatgactaa tagggatcaa 120  
cttcacaaca gagaggctca tagagctctt aaagaggatt tgatcgagca catatggaaa 180  
aaattcggca ctaactaaat atataattta cgttttatgc actcgtaatt taaaatttca 240  
tgtgtctcat tgtagtttat ttaattatgt ttctactctt gtaattttta ttttgttgtg 300  
aagtaaatta tgaatttata attatatggg taattttttg ataattatgc aattaataat 360  
aattaatatt ttttaaagtc aagagaaaaa tgttatttta ataacatgtt cttattaataa 420  
aataaaatga taaatatatt atgtaggttg ggagaaaatg aaaaaataat attttatttg 480  
aaggttgggt tggatgaggt cactgatggg agtataaata atactccctc cgtcccataa 540  
ttattgtcca ttattccttt ttgggatgtc ccaaatttat agtcctattc taaattggga 600  
ttgtatttaa atattccttt acaaatataa ccctatttga tatagtatga atgcaattaa 660  
tatagtaaaa aaataagggc aatataggat aattattgta aattgtatat ttccaataca 720  
tattaaatgt gatttcttaa tctgtgtgaa aataggaagt ggactataat tatgggacgg 780  
agggagtata aagttggagg ttgtggatgt ggaggagaaa gaaattaata ttttatttaa 840  
agattggatt aaaggaggtc actgatgtgg gtagtcttag aggaaatgta gtcttagagg 900  
aatctgccc agcaaaataa aataataagt aaataaataa actaaatatg tattgaatgc 960  
gacatctagc aatatagcca catatatagt gcagtagcac gcagcgctcg ttactcgtca 1020  
gtcgtcaaag aatggtaagt atagaaaagc atctttaaat aacacaccaa aaaccacagc 1080  
tacgttcaac accgcc 1096

<210> 2  
 <211> 4087  
 <212> DNA  
 <213> *Perilla frutescens*

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1097)..(2443)  
 <223> pSPB3311, promotor de la antocianina 3-acil transferasa + CDS +  
 terminador

<400> 2  
 aactattatg atccacaga gtttttgaca gatgagtctt caggaggaga tgctgaacct 60  
 tttcactact ctactgaacg catcacaagt ttatcggctt atatgactaa tagggatcaa 120  
 cttcacaaca gagaggctca tagagctctt aaagaggatt tgatcgagca catatggaaa 180  
 aaattcggca ctaactaat atataattta cgttttatgc actcgtaatt taaaatttca 240  
 tgtgtctcat tgtagtttat ttaattatgt tttcactctt gtaattttta ttttgttgtg 300  
 aagtaaatta tgaatttata attatatggg taattttttg ataattatgc aattaaaat 360  
 aattaatatt ttttaaagtc aagagaaaaa tgttatttta ataacatggt cttattaaaa 420  
 aataaaatga taaatatttt atgtaggttg ggagaaaatg aaaaaataat attttatttg 480  
 aagggtgggt tggatgaggt cactgatggg agtataaata atactccctc cgtcccataa 540  
 ttattgtcca ttattccttt ttgggatgtc ccaaattat agtcctattc taaattggga 600  
 ttgtatttaa atattccttt acaaatataa ccctatttga tatagtatga atgcaattaa 660  
 tatagtaaaa aaataagggc aatataggat aattattgta aattgtatat ttccaataca 720  
 tattaaatgt gatttcttaa tctgtgtgaa aataggaagt ggactataat tatgggacgg 780  
 agggagtata aagttggagg ttgtggatgt ggaggagaaa gaaattaata ttttatttaa 840  
 agattggatt aaaggaggtc actgatgtgg gtagtcttag aggaaatgta gtcttagagg 900  
 aaatctgccc agcaaaataa aataataagt aaataaataa actaaatatg tattgaatgc 960  
 gacatctagc aatatagcca catatatagt gcagtagcac gcagcgctcg ttactcgtea 1020  
 gtcgtcaaag aatggtaagt atagaaaagc atctttaaat aacacaccaa aaaccacagc 1080  
 tacgttcaac accgcc atg acc acc acc gtg atc gaa acg tgt aga gtt ggg 1132  
 Met Thr Thr Thr Val Ile Glu Thr Cys Arg Val Gly  
 1 5 10  
 cca ccg ccg gac tcg gtg gcg gag caa tcg ttg ccg ctc aca ttc ttc 1180  
 Pro Pro Pro Asp Ser Val Ala Glu Gln Ser Leu Pro Leu Thr Phe Phe  
 15 20 25  
 gac atg acg tgg ctg cat ttt cat ccc atg ctt cag ctc ctc ttc tac 1228  
 Asp Met Thr Trp Leu His Phe His Pro Met Leu Gln Leu Leu Phe Tyr  
 30 35 40  
 gaa ttc cct tgt tcc aag caa cat ttc tca gaa tcc atc att cca aaa 1276  
 Glu Phe Pro Cys Ser Lys Gln His Phe Ser Glu Ser Ile Ile Pro Lys  
 45 50 55 60

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| ctc aaa caa tct ctc tct aaa act ctc ata cac ttc ttc cct ctc tca | 1324 |
| Leu Lys Gln Ser Leu Ser Lys Thr Leu Ile His Phe Phe Pro Leu Ser |      |
| 65 70 75                                                        |      |
| tgc aat tta atc tac cct tca tct ccg gag aaa atg ccc gag ttt cgg | 1372 |
| Cys Asn Leu Ile Tyr Pro Ser Ser Pro Glu Lys Met Pro Glu Phe Arg |      |
| 80 85 90                                                        |      |
| tat cta tcg ggg gac tcg gtt tct ttc act atc gca gaa tct agc gac | 1420 |
| Tyr Leu Ser Gly Asp Ser Val Ser Phe Thr Ile Ala Glu Ser Ser Asp |      |
| 95 100 105                                                      |      |
| gac ttc gat gat ctc gtc gga aat cgc gca gaa tct ccc gtt agg ctc | 1468 |
| Asp Phe Asp Asp Leu Val Gly Asn Arg Ala Glu Ser Pro Val Arg Leu |      |
| 110 115 120                                                     |      |
| tac aac ttc gtc cct aaa ttg ccg cag att gtc gaa gaa tct gat aga | 1516 |
| Tyr Asn Phe Val Pro Lys Leu Pro Gln Ile Val Glu Glu Ser Asp Arg |      |
| 125 130 135 140                                                 |      |
| aaa ctc ttc caa gtt ttc gcc gtg cag gtg act ctt ttc cca ggt cga | 1564 |
| Lys Leu Phe Gln Val Phe Ala Val Gln Val Thr Leu Phe Pro Gly Arg |      |
| 145 150 155                                                     |      |
| ggc gtc ggt att gga ata gca acg cat cac acc gtt agc gat gcc ccg | 1612 |
| Gly Val Gly Ile Gly Ile Ala Thr His His Thr Val Ser Asp Ala Pro |      |
| 160 165 170                                                     |      |
| tcg ttt ctc gcc ttt ata acg gct tgg gct tgg atg agc aaa cac att | 1660 |
| Ser Phe Leu Ala Phe Ile Thr Ala Trp Ala Trp Met Ser Lys His Ile |      |
| 175 180 185                                                     |      |
| gaa gat gaa gat gaa gag ttt aaa tct ttg cca gtt ttc gat aga tcc | 1708 |
| Glu Asp Glu Asp Glu Glu Phe Lys Ser Leu Pro Val Phe Asp Arg Ser |      |
| 190 195 200                                                     |      |
| gtc ata aaa tat ccg acg aaa ttt gac tcg att tat tgg aaa aag gcg | 1756 |
| Val Ile Lys Tyr Pro Thr Lys Phe Asp Ser Ile Tyr Trp Lys Lys Ala |      |
| 205 210 215 220                                                 |      |
| cta aaa ttt cct ttg caa tct cgt cat ccc tca tta ccg acg gac cgc | 1804 |
| Leu Lys Phe Pro Leu Gln Ser Arg His Pro Ser Leu Pro Thr Asp Arg |      |
| 225 230 235                                                     |      |
| att cga acc acg ttc gtt ttc acc caa tcc gaa att aag aaa ttg aag | 1852 |
| Ile Arg Thr Thr Phe Val Phe Thr Gln Ser Glu Ile Lys Lys Leu Lys |      |
| 240 245 250                                                     |      |
| ggt tcg att cag tcc aga gtt cca agt tta gtc cat ctc tca tct ttt | 1900 |
| Gly Ser Ile Gln Ser Arg Val Pro Ser Leu Val His Leu Ser Ser Phe |      |
| 255 260 265                                                     |      |
| gta gcg att gca gct tat atg tgg gct ggc gta acg aaa tca ctc aca | 1948 |
| Val Ala Ile Ala Ala Tyr Met Trp Ala Gly Val Thr Lys Ser Leu Thr |      |
| 270 275 280                                                     |      |
| gca gat gaa gac cac gac gac ggg gat gca ttt ttc ttg att ccg gtc | 1996 |
| Ala Asp Glu Asp His Asp Asp Gly Asp Ala Phe Phe Leu Ile Pro Val |      |
| 285 290 295 300                                                 |      |
| gat cta agg cca cga tta gat ccg cca gtt ccc gaa aat tac ttc ggg | 2044 |
| Asp Leu Arg Pro Arg Leu Asp Pro Pro Val Pro Glu Asn Tyr Phe Gly |      |
| 305 310 315                                                     |      |
| aac tgc tta tcg tac gcg ctg ccg aga atg cgg cgg cga gag ctg gtg | 2092 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| Asn Cys Leu Ser Tyr Ala Leu Pro Arg Met Arg Arg Arg Glu Leu Val    |      |
| 320 325 330                                                        |      |
| gga gag aaa ggg gtg ttt ctg gcg gct gag gca atc gcg gcg gag atc    | 2140 |
| Gly Glu Lys Gly Val Phe Leu Ala Ala Glu Ala Ile Ala Ala Glu Ile    |      |
| 335 340 345                                                        |      |
| aaa aaa agg atc aac gac aag aga ata tta gaa acg gtg gag aaa tgg    | 2188 |
| Lys Lys Arg Ile Asn Asp Lys Arg Ile Leu Glu Thr Val Glu Lys Trp    |      |
| 350 355 360                                                        |      |
| tcg ctg gag att cgt gaa gcg ttg cag aaa tca tat ttt tcg gtg gca    | 2236 |
| Ser Leu Glu Ile Arg Glu Ala Leu Gln Lys Ser Tyr Phe Ser Val Ala    |      |
| 365 370 375 380                                                    |      |
| gga tcg agc aag cta gat ctt tac ggt gca gat ttt gga tgg ggg aag    | 2284 |
| Gly Ser Ser Lys Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Asp Phe Gly Trp Gly Lys    |      |
| 385 390 395                                                        |      |
| gcg aga aag caa gaa ata ttg tcg att gat ggg gag aaa tat gca atg    | 2332 |
| Ala Arg Lys Gln Glu Ile Leu Ser Ile Asp Gly Glu Lys Tyr Ala Met    |      |
| 400 405 410                                                        |      |
| acg ctt tgt aaa gcc agg gat ttc gaa gga gga ttg gag gtt tgc ttg    | 2380 |
| Thr Leu Cys Lys Ala Arg Asp Phe Glu Gly Gly Leu Glu Val Cys Leu    |      |
| 415 420 425                                                        |      |
| tct ttg cct aag gac aaa atg gat gct ttt gct gct tat ttt tca gcg    | 2428 |
| Ser Leu Pro Lys Asp Lys Met Asp Ala Phe Ala Ala Tyr Phe Ser Ala    |      |
| 430 435 440                                                        |      |
| gga att aat ggt taa taaatgtatg taattaaact aatattatta tgtaacaatt    | 2483 |
| Gly Ile Asn Gly                                                    |      |
| 445                                                                |      |
| aattaagtgt tgagtaacgt gaagaataat atcttttacc tattatatat ttatgagttg  | 2543 |
| gttcaaataa aatcacttca tttattgtat taaccgttta gtgttcttct caccatattt  | 2603 |
| tggtgctatt ttttaaaaaa tgtttttttt attgtatttt agtattaatt gttttaccac  | 2663 |
| taaaattaca gtaaaatgca agatagttta atttttacat ttacatatga aacacattct  | 2723 |
| ctttataacc aacctctcta tatatataat atgtgtgtat gtatgtatac acatgtatga  | 2783 |
| atactagaaa tatatcttaa accatccatc cttcaaaaat ttccggggcca tattgcatgg | 2843 |
| tgacattata atatttgata atttcttoga acacgttatt aattcaattt aataattcta  | 2903 |
| ataaaaagac gctcagacaa tatatgtaga taggatcggc ccaaaggggt gtctgggtgg  | 2963 |
| gctgtcgccc atgggccccg aaatcttagg ggcaaaaaaa aaaaaattca ttatacctag  | 3023 |
| ggcaaaaaaa ttaccgctct tcaattctct gcctctctcc ctcacccctc gttcctctc   | 3083 |
| tctcttccct atgtacgct ctttcaactcc ctccccctct ctcagttctc tatcacttgt  | 3143 |
| attttgtatt gaaaacttgt tgaaaactaa accaaaaata gaaaaaggta tagaaaattt  | 3203 |
| gaaaacaaag gttgtttttt tgtgttgctg cagttcccaa acttgccgag ttgccgactt  | 3263 |
| gccgtgttga attgttatat atgttaaaag cctaaaatat atcctttcag aattgagatg  | 3323 |
| gattgttgta actatcagg tttttttatt gagaatttta gatcaattag ttatcttgta   | 3383 |
| attttttatt ctttttaata caatactccc tccatcccaa tagcaaggtc cccttgctat  | 3443 |

tgggcacggg tattaaggag gaggattatt ataatgaaaa ttaatataaa gtaagtggat 3503  
 tccactttat taaggaatat tataatcaaa agtaatataa agtaagtgga ttccacttta 3563  
 attaggacac taattatfff cttttttggg atgagacttt gctattggga catcccaaaa 3623  
 aggcaaaaga gaccttgcta ttaggacggg ggacgtgctg ccgaggcacg caaattaatt 3683  
 tacctttcct cttctatact aactcgtagt agcggcgagt aaaggtcgaa ccctcaagga 3743  
 gcaattgaac tagatgtgct attagaaata aaataaacac aagtgagagg ggagtttttg 3803  
 gtttcaatff aactaaaact aattatgaaa atgaaaaaac aaatataaaa cataaacagg 3863  
 tagacgaaat atgataaaga tagaattcta gttctcggtt cagttatcac ctttctccaa 3923  
 gtatttcatg aataatgcaa cgcctctfff catacaactt agaatcgatg tccaaagggt 3983  
 aatatcaagc tttatttacc taattgtctc gtacgattag ttaactaaaa caagctctff 4043  
 aattaactct actcaattag ataacctaga ataagctctc taga 4087

<210> 3  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> *Perilla frutescens*

<400> 3

Met Thr Thr Thr Val Ile Glu Thr Cys Arg Val Gly Pro Pro Pro Asp  
1 5 10 15

Ser Val Ala Glu Gln Ser Leu Pro Leu Thr Phe Phe Asp Met Thr Trp  
20 25 30

Leu His Phe His Pro Met Leu Gln Leu Leu Phe Tyr Glu Phe Pro Cys  
35 40 45

Ser Lys Gln His Phe Ser Glu Ser Ile Ile Pro Lys Leu Lys Gln Ser  
50 55 60

Leu Ser Lys Thr Leu Ile His Phe Phe Pro Leu Ser Cys Asn Leu Ile  
65 70 75 80

Tyr Pro Ser Ser Pro Glu Lys Met Pro Glu Phe Arg Tyr Leu Ser Gly  
85 90 95

Asp Ser Val Ser Phe Thr Ile Ala Glu Ser Ser Asp Asp Phe Asp Asp  
100 105 110

Leu Val Gly Asn Arg Ala Glu Ser Pro Val Arg Leu Tyr Asn Phe Val  
115 120 125

Pro Lys Leu Pro Gln Ile Val Glu Glu Ser Asp Arg Lys Leu Phe Gln  
130 135 140

Val Phe Ala Val Gln Val Thr Leu Phe Pro Gly Arg Gly Val Gly Ile  
145 150 155 160

Gly Ile Ala Thr His His Thr Val Ser Asp Ala Pro Ser Phe Leu Ala  
165 170 175

Phe Ile Thr Ala Trp Ala Trp Met Ser Lys His Ile Glu Asp Glu Asp  
180 185 190

Glu Glu Phe Lys Ser Leu Pro Val Phe Asp Arg Ser Val Ile Lys Tyr  
195 200 205

Pro Thr Lys Phe Asp Ser Ile Tyr Trp Lys Lys Ala Leu Lys Phe Pro  
210 215 220

Leu Gln Ser Arg His Pro Ser Leu Pro Thr Asp Arg Ile Arg Thr Thr  
225 230 235 240

Phe Val Phe Thr Gln Ser Glu Ile Lys Lys Leu Lys Gly Ser Ile Gln  
245 250 255

Ser Arg Val Pro Ser Leu Val His Leu Ser Ser Phe Val Ala Ile Ala  
260 265 270

Ala Tyr Met Trp Ala Gly Val Thr Lys Ser Leu Thr Ala Asp Glu Asp  
275 280 285

His Asp Asp Gly Asp Ala Phe Phe Leu Ile Pro Val Asp Leu Arg Pro  
290 295 300

Arg Leu Asp Pro Pro Val Pro Glu Asn Tyr Phe Gly Asn Cys Leu Ser  
305 310 315 320

Tyr Ala Leu Pro Arg Met Arg Arg Arg Glu Leu Val Gly Glu Lys Gly  
325 330 335

Val Phe Leu Ala Ala Glu Ala Ile Ala Ala Glu Ile Lys Lys Arg Ile  
340 345 350

Asn Asp Lys Arg Ile Leu Glu Thr Val Glu Lys Trp Ser Leu Glu Ile  
355 360 365

Arg Glu Ala Leu Gln Lys Ser Tyr Phe Ser Val Ala Gly Ser Ser Lys  
370 375 380

Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Asp Phe Gly Trp Gly Lys Ala Arg Lys Gln  
385 390 395 400

Glu Ile Leu Ser Ile Asp Gly Glu Lys Tyr Ala Met Thr Leu Cys Lys

405

410

415

Ala Arg Asp Phe Glu Gly Gly Leu Glu Val Cys Leu Ser Leu Pro Lys  
420 425 430

Asp Lys Met Asp Ala Phe Ala Ala Tyr Phe Ser Ala Gly Ile Asn Gly  
435 440 445

<210> 4  
<211> 6835  
<212> DNA  
<213> Perilla frutescens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1608)..(2330)  
<223> Otro ORF

<220>  
<221> CDS  
<222> (3439)..(4785)  
<223> SAT208 ORF

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (6815)..(6815)  
<223> n is a, c, g, or t

<400> 4  
ccccaaaaac cttgattagg gtgatgggtc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt 60  
ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg 120  
aacaacactc aaccctatct cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc 180  
ggcctattgg ttaaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttaacaaaa 240  
tattaacgct tacaatttcc attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc 300  
gggtgcgggcc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt 360  
aagttgggta acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgcgag 420  
cgcgtaatac gactcactat agggcggaatt gggtaccggg cccccctcg aggtcgacgg 480  
tatcgataag cttgatatcg aattcctgca gcccggggga tccactagtt ctagaagatg 540  
aagagacaaa acatcgacta cttgcccttg tgtttgggca aaattaaatt aatgtaattg 600  
taattgtgag atgtgtgtta gtaattatgc tatgtgtgtg ttagtaatta tgagatgtgt 660  
gtgtttgtaa ttttgagatg tcttttcctc actttataaa taattaatgt attttatgca 720  
tatctatttc tcttattctt ttcatacaaa cctgcatgca taagtctcaa tcatgcattg 780  
gattctttat gccttgctca tttctttttg tacaaacctc atgcatctca atcatgcatt 840  
ggattcttat actctcattt caatttatat gcaagagtaa agctaagtat atcacatgca 900  
ttggattcca ctttatatca aattgatttc ttgataaatc acatgctttt gtcagccatc 960  
acatgcattg gattccactt tatatcaaat taatttcttg ataaatcaca tacttttgtc 1020



cga aag tat aag ttg ttt gtt caa cac caa gaa gct gct aga aaa gat 2192  
 Arg Lys Tyr Lys Leu Phe Val Gln His Gln Glu Ala Ala Arg Lys Asp  
 180 185 190 195

gta gaa cgg gcc ttt gga gtt cta caa gct cgt ttt gca ttt att cga 2240  
 Val Glu Arg Ala Phe Gly Val Leu Gln Ala Arg Phe Ala Phe Ile Arg  
 200 205 210

cgt cca tgt ctt gtt tgg gac aag gtt ttg atg gga aaa att atg atg 2288  
 Arg Pro Cys Leu Val Trp Asp Lys Val Leu Met Gly Lys Ile Met Met  
 215 220 225

gct tgt atc atc ata cac aat atg att gtg gag gat gaa tga 2330  
 Ala Cys Ile Ile Ile His Asn Met Ile Val Glu Asp Glu  
 230 235 240

gacacatacc taaactatta tgatcccaca gagtttttga cagatgagtc ttcaggagga 2390  
 gatgctgaac cttttcacta ctctactgaa cgcatacacia gtttatcggc ttatatgact 2450  
 aatagggatc aacttcacaa cagagaggct catagagctc ttaaagagga tttgatcgag 2510  
 cacatatgga aaaaattcgg cactaactaa atatataatt tacgttttat gcactcgtaa 2570  
 tttaaaattt catgtgtctc attgtagttt atttaattat gttttcactc ttgtaatttt 2630  
 tattttgttg tgaagtaa atgaattta taattatatg ggtaattttt tgataattat 2690  
 gcaattaaaa ataattaata ttttttaaat gcaagagaaa aatgttat ttaataacatg 2750  
 ttcttattaa aaaataaaat gataaatatt ttatgtaggt tgggagaaaa tgaaaaaata 2810  
 atattttatt tgaagggttg gttggatgag gtcactgatg ggagtataaa taatactccc 2870  
 tccgtcccat aattattgtc cattattcct ttttgggatg tcccaaaatt atagtcctat 2930  
 tctaaattgg gattgtattt aaatattcct ttacaaatat aaccctat t gatatagtat 2990  
 gaatgcaatt aatatagtaa aaaaataagg gcaatatagg ataattattg taaattgtat 3050  
 atttccaata catattaaat gtgatttctt aatctgtgtg aaaataggaa gtggactata 3110  
 attatgggac ggagggagta taaagttgga ggttgtggat gtggaggaga aagaaattaa 3170  
 tattttattt aaagattgga ttaaaggagg tcaactgatg gggtagtctt agaggaaatg 3230  
 tagtcttaga ggaaatctgc ccagcaaaat aaaataataa gtaaataaat aaactaaata 3290  
 tgtattgaat gcgacatcta gcaatatagc cacatatata gtgcagtagc acgcagcgct 3350  
 cgttactcgt cagtcgtcaa agaatggtaa gtatagaaaa gcatctttaa ataacacacc 3410  
 aaaaaccaca gctacgttca acaccgcc atg acc acc acc gtg atc gaa acg 3462  
 Met Thr Thr Thr Val Ile Glu Thr  
 245

tgt aga gtt ggg cca ccg ccg gac tcg gtg gcg gag caa tcg ttg ccg 3510  
 Cys Arg Val Gly Pro Pro Pro Asp Ser Val Ala Glu Gln Ser Leu Pro  
 250 255 260

ctc aca ttc ttc gac atg acg tgg ctg cat ttt cat ccc atg ctt cag 3558  
 Leu Thr Phe Phe Asp Met Thr Trp Leu His Phe His Pro Met Leu Gln  
 265 270 275 280

ctc ctc ttc tac gaa ttc cct tgt tcc aag caa cat ttc tca gaa tcc 3606

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Leu | Leu | Phe | Tyr | Glu | Phe | Pro | Cys | Ser | Lys | Gln | His | Phe | Ser | Glu | Ser |  |      |
|     |     |     |     | 285 |     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |  |      |
| atc | att | cca | aaa | ctc | aaa | caa | tct | ctc | tct | aaa | act | ctc | ata | cac | ttc |  | 3654 |
| Ile | Ile | Pro | Lys | Leu | Lys | Gln | Ser | Leu | Ser | Lys | Thr | Leu | Ile | His | Phe |  |      |
|     |     |     | 300 |     |     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |  |      |
| ttc | cct | ctc | tca | tgc | aat | tta | atc | tac | cct | tca | tct | ccg | gag | aaa | atg |  | 3702 |
| Phe | Pro | Leu | Ser | Cys | Asn | Leu | Ile | Tyr | Pro | Ser | Ser | Pro | Glu | Lys | Met |  |      |
|     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |     |     |     | 325 |     |     |     |  |      |
| ccc | gag | ttt | cgg | tat | cta | tcg | ggg | gac | tcg | ggt | tct | ttc | act | atc | gca |  | 3750 |
| Pro | Glu | Phe | Arg | Tyr | Leu | Ser | Gly | Asp | Ser | Val | Ser | Phe | Thr | Ile | Ala |  |      |
|     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |     |     | 340 |     |     |     |     |  |      |
| gaa | tct | agc | gac | gac | ttc | gat | gat | ctc | gtc | gga | aat | cgc | gca | gaa | tct |  | 3798 |
| Glu | Ser | Ser | Asp | Asp | Phe | Asp | Asp | Leu | Val | Gly | Asn | Arg | Ala | Glu | Ser |  |      |
| 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |  |      |
| ccc | gtt | agg | ctc | tac | aac | ttc | gtc | cct | aaa | ttg | ccg | cag | att | gtc | gaa |  | 3846 |
| Pro | Val | Arg | Leu | Tyr | Asn | Phe | Val | Pro | Lys | Leu | Pro | Gln | Ile | Val | Glu |  |      |
|     |     |     | 365 |     |     |     |     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |  |      |
| gaa | tct | gat | aga | aaa | ctc | ttc | caa | gtt | ttc | gcc | gtg | cag | gtg | act | ctt |  | 3894 |
| Glu | Ser | Asp | Arg | Lys | Leu | Phe | Gln | Val | Phe | Ala | Val | Gln | Val | Thr | Leu |  |      |
|     |     |     | 380 |     |     |     |     | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |  |      |
| ttc | cca | ggg | cga | ggc | gtc | ggg | att | gga | ata | gca | acg | cat | cac | acc | gtt |  | 3942 |
| Phe | Pro | Gly | Arg | Gly | Val | Gly | Ile | Gly | Ile | Ala | Thr | His | His | Thr | Val |  |      |
|     |     | 395 |     |     |     | 400 |     |     |     |     |     | 405 |     |     |     |  |      |
| agc | gat | gcc | ccg | tcg | ttt | ctc | gcc | ttt | ata | acg | gct | tgg | gct | tgg | atg |  | 3990 |
| Ser | Asp | Ala | Pro | Ser | Phe | Leu | Ala | Phe | Ile | Thr | Ala | Trp | Ala | Trp | Met |  |      |
|     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |     |     |     | 420 |     |     |     |     |  |      |
| agc | aaa | cac | att | gaa | gat | gaa | gat | gaa | gag | ttt | aaa | tct | ttg | cca | gtt |  | 4038 |
| Ser | Lys | His | Ile | Glu | Asp | Glu | Asp | Glu | Glu | Phe | Lys | Ser | Leu | Pro | Val |  |      |
| 425 |     |     |     | 430 |     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |  |      |
| ttc | gat | aga | tcc | gtc | ata | aaa | tat | ccg | acg | aaa | ttt | gac | tcg | att | tat |  | 4086 |
| Phe | Asp | Arg | Ser | Val | Ile | Lys | Tyr | Pro | Thr | Lys | Phe | Asp | Ser | Ile | Tyr |  |      |
|     |     |     | 445 |     |     |     |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |  |      |
| tgg | aaa | aag | gcg | cta | aaa | ttt | cct | ttg | caa | tct | cgt | cat | ccc | tca | tta |  | 4134 |
| Trp | Lys | Lys | Ala | Leu | Lys | Phe | Pro | Leu | Gln | Ser | Arg | His | Pro | Ser | Leu |  |      |
|     |     |     | 460 |     |     |     | 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |  |      |
| ccg | acg | gac | cgc | att | cga | acc | acg | ttc | gtt | ttc | acc | caa | tcc | gaa | att |  | 4182 |
| Pro | Thr | Asp | Arg | Ile | Arg | Thr | Thr | Phe | Val | Phe | Thr | Gln | Ser | Glu | Ile |  |      |
|     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |     |     |     |     | 485 |     |     |     |  |      |
| aag | aaa | ttg | aag | ggg | tcg | att | cag | tcc | aga | gtt | cca | agt | tta | gtc | cat |  | 4230 |
| Lys | Lys | Leu | Lys | Gly | Ser | Ile | Gln | Ser | Arg | Val | Pro | Ser | Leu | Val | His |  |      |
|     | 490 |     |     |     | 495 |     |     |     |     |     | 500 |     |     |     |     |  |      |
| ctc | tca | tct | ttt | gta | gcg | att | gca | gct | tat | atg | tgg | gct | ggc | gta | acg |  | 4278 |
| Leu | Ser | Ser | Phe | Val | Ala | Ile | Ala | Ala | Tyr | Met | Trp | Ala | Gly | Val | Thr |  |      |
| 505 |     |     |     | 510 |     |     |     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |  |      |
| aaa | tca | ctc | aca | gca | gat | gaa | gac | cac | gac | gac | ggg | gat | gca | ttt | ttc |  | 4326 |
| Lys | Ser | Leu | Thr | Ala | Asp | Glu | Asp | His | Asp | Asp | Gly | Asp | Ala | Phe | Phe |  |      |
|     |     |     | 525 |     |     |     |     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |  |      |
| ttg | att | ccg | gtc | gat | cta | agg | cca | cga | tta | gat | ccg | cca | gtt | ccc | gaa |  | 4374 |
| Leu | Ile | Pro | Val | Asp | Leu | Arg | Pro | Arg | Leu | Asp | Pro | Pro | Val | Pro | Glu |  |      |
|     |     |     | 540 |     |     |     |     | 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |  |      |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| aat tac ttc ggg aac tgc tta tcg tac gcg ctg ccg aga atg cgg cgg    | 4422 |
| Asn Tyr Phe Gly Asn Cys Leu Ser Tyr Ala Leu Pro Arg Met Arg Arg    |      |
| 555 560 565                                                        |      |
| cga gag ctg gtg gga gag aaa ggg gtg ttt ctg gcg gct gag gca atc    | 4470 |
| Arg Glu Leu Val Gly Glu Lys Gly Val Phe Leu Ala Ala Glu Ala Ile    |      |
| 570 575 580                                                        |      |
| gcg gcg gag atc aaa aaa agg atc aac gac aag aga ata tta gaa acg    | 4518 |
| Ala Ala Glu Ile Lys Lys Arg Ile Asn Asp Lys Arg Ile Leu Glu Thr    |      |
| 585 590 595 600                                                    |      |
| gtg gag aaa tgg tcg ctg gag att cgt gaa gcg ttg cag aaa tca tat    | 4566 |
| Val Glu Lys Trp Ser Leu Glu Ile Arg Glu Ala Leu Gln Lys Ser Tyr    |      |
| 605 610 615                                                        |      |
| ttt tcg gtg gca gga tcg agc aag cta gat ctt tac ggt gca gat ttt    | 4614 |
| Phe Ser Val Ala Gly Ser Ser Lys Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Asp Phe    |      |
| 620 625 630                                                        |      |
| gga tgg ggg aag gcg aga aag caa gaa ata ttg tcg att gat ggg gag    | 4662 |
| Gly Trp Gly Lys Ala Arg Lys Gln Glu Ile Leu Ser Ile Asp Gly Glu    |      |
| 635 640 645                                                        |      |
| aaa tat gca atg acg ctt tgt aaa gcc agg gat ttc gaa gga gga ttg    | 4710 |
| Lys Tyr Ala Met Thr Leu Cys Lys Ala Arg Asp Phe Glu Gly Gly Leu    |      |
| 650 655 660                                                        |      |
| gag gtt tgc ttg tct ttg cct aag gac aaa atg gat gct ttt gct gct    | 4758 |
| Glu Val Cys Leu Ser Leu Pro Lys Asp Lys Met Asp Ala Phe Ala Ala    |      |
| 665 670 675 680                                                    |      |
| tat ttt tca gcg gga att aat ggt taa taaatgtatg taattaaact          | 4805 |
| Tyr Phe Ser Ala Gly Ile Asn Gly                                    |      |
| 685                                                                |      |
| aatattatta tgtaacaatt aattaagtgt tgagtaacgt gaagaataat atcttttacc  | 4865 |
| tattatatat ttatgagttg gttcaaataa aatcacttca tttattgtat taaccgttta  | 4925 |
| gtgttcttct caccatattt tgggtgctatt ttttaaaaaa tgtttttttt attgtatttt | 4985 |
| agtattaatt gttttaccac taaaattaca gtaaaatgca agatagttta atttttacat  | 5045 |
| ttacatatga aacacattct ctttataacc aacctctcta tatatataat atgtgtgtat  | 5105 |
| gtatgtatac acatgtatga atactagaaa tatatcttaa accatccatc cttcaaaaat  | 5165 |
| ttcgggggcca tattgcatgg tgacattata atatttgata atttcttcga acacgttatt | 5225 |
| aattcaattt aataattcta ataaaaagac gctcagacaa tatatgtaga taggatcggc  | 5285 |
| ccaaaggggt gtctgggtgg gctgtcgccc atgggccccg aaatcttagg ggcaaaaaaa  | 5345 |
| aaaaaattca ttatacctag ggcaaaaaaa ttaccgctct tcaacttctct gcctctctcc | 5405 |
| ctcatccctc gttctctctc tctcttccct atgtacgctt ctttcaactcc ctccccctct | 5465 |
| ctcagttctc tatcacttgt attttgtatt gaaaacttgt tgaaaactaa accaaaaata  | 5525 |
| gaaaaaggta tagaaaattt gaaaacaaag gttgtttttt tgtgttgctg cagttcccaa  | 5585 |
| acttgccgag ttgccgactt gccgtgttga attgttatat atgttaaaag cctaaaatat  | 5645 |
| atcctttcag aattgagatg gattgttgta actatcaggt tttttttatt gagaatttta  | 5705 |

gatcaattag ttatcttgta attttttatt ctttttaata caatactccc tccatcccaa 5765  
 tagcaaggtc cccttgctat tgggcacggg tattaaggag gaggattatt ataatgaaaa 5825  
 ttaatataaa gtaagtggat tccactttat taaggaatat tataatcaaa agtaatataa 5885  
 agtaagtgga ttccacttta attaggacac taattatttt cttttttggt atgagacttt 5945  
 gctattggga catccccaaa aggcaaaaga gaccttgcta ttaggacggg ggacgtgctg 6005  
 ccgaggcacg caaattaatt tacctttcct cttctatact aactcgtagt agcggcgagt 6065  
 aaaggctgaa ccctcaagga gcaattgaac tagatgtgct attagaaata aaataaacac 6125  
 aagtgagagg ggagtttttg gtttcaattt aactaaaact aattatgaaa atgaaaaaac 6185  
 aaatataaaa cataaacagg tagacgaaat atgataaaga tagaattcta gttctcggtt 6245  
 cagttatcac ctttctccaa gtatttcacg aataatgcaa cgctctttt catacaactt 6305  
 agaatcgatg tccaaagggt aatatcaagc tttatttacc taattgtctc gtacgattag 6365  
 ttaactaaaa caagctcttt aattaactct actcaattag ataacctaga ataagctctc 6425  
 tagagcgggc gccaccggg tggagctcca gcttttgctt ccttttagtga gggttaattg 6485  
 cgcgcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat ccgctcacia 6545  
 ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctgggggtgcc taatgagtga 6605  
 gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga aacctgtcgt 6665  
 gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cgggttgctg attgggccgc 6725  
 tcttccgctt ccttggttac ttgactcgtt gcgctcgcc gtcggctgcg gcgagcggtg 6785  
 tcaagctcac tcaaaggcgg taataccggn tatccacaga atcaggggat 6835

<210> 5  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> *Perilla frutescens*

<400> 5

Met Arg Val Leu Ala Tyr Gly Ala Ser Ala Asp Val Val Asp Glu Tyr  
1 5 10 15

Leu Arg Met Ser Ala Thr Val Thr Arg Asp Ala Val Ile His Phe Val  
20 25 30

Glu Gly Val Ile Ser Cys Phe Ser Asp Thr Tyr Leu Arg Lys Pro Asn  
35 40 45

Gln Gln Asp Leu Ala Arg Leu Leu Tyr Val Gly Glu Gln Arg Gly Phe  
50 55 60

Pro Gly Met Ile Gly Ser Ile Asp Cys Met His Trp Glu Trp Thr Asn  
65 70 75 80

Cys Pro Asn Ala Trp Ala Gly Gln Phe Thr Gly Arg Ser Gly Lys Ser  
85 90 95

Thr Ile Ile Leu Glu Ala Val Ala Ser Tyr Asp Leu Trp Ile Trp His  
100 105 110

Ala Phe Phe Gly Thr Ser Gly Ala Cys Asn Asp Ile Asn Val Leu His  
115 120 125

Gly Ser Pro Ile Phe Ser Asp Val Leu Glu Gly Arg Ala Pro His Val  
130 135 140

Ser Tyr Ile Val Asn Gly Arg Gln Asn Asp Arg Ala Tyr Tyr Leu Thr  
145 150 155 160

Asp Gly Ile Tyr Pro Ser Trp Ala Ala Phe Val Lys Ser Ile Thr Ser  
165 170 175

Pro Met Thr Arg Lys Tyr Lys Leu Phe Val Gln His Gln Glu Ala Ala  
180 185 190

Arg Lys Asp Val Glu Arg Ala Phe Gly Val Leu Gln Ala Arg Phe Ala  
195 200 205

Phe Ile Arg Arg Pro Cys Leu Val Trp Asp Lys Val Leu Met Gly Lys  
210 215 220

Ile Met Met Ala Cys Ile Ile Ile His Asn Met Ile Val Glu Asp Glu  
225 230 235 240

<210> 6  
<211> 448  
<212> PRT  
<213> *Perilla frutescens*

<400> 6

Met Thr Thr Thr Val Ile Glu Thr Cys Arg Val Gly Pro Pro Pro Asp  
1 5 10 15

Ser Val Ala Glu Gln Ser Leu Pro Leu Thr Phe Phe Asp Met Thr Trp  
20 25 30

Leu His Phe His Pro Met Leu Gln Leu Leu Phe Tyr Glu Phe Pro Cys  
35 40 45

Ser Lys Gln His Phe Ser Glu Ser Ile Ile Pro Lys Leu Lys Gln Ser  
50 55 60

Leu Ser Lys Thr Leu Ile His Phe Phe Pro Leu Ser Cys Asn Leu Ile  
65 70 75 80

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

Val Phe Leu Ala Ala Glu Ala Ile Ala Ala Glu Ile Lys Lys Arg Ile  
340 345 350

Asn Asp Lys Arg Ile Leu Glu Thr Val Glu Lys Trp Ser Leu Glu Ile  
355 360 365

Arg Glu Ala Leu Gln Lys Ser Tyr Phe Ser Val Ala Gly Ser Ser Lys  
370 375 380

Leu Asp Leu Tyr Gly Ala Asp Phe Gly Trp Gly Lys Ala Arg Lys Gln  
385 390 395 400

Glu Ile Leu Ser Ile Asp Gly Glu Lys Tyr Ala Met Thr Leu Cys Lys  
405 410 415

Ala Arg Asp Phe Glu Gly Gly Leu Glu Val Cys Leu Ser Leu Pro Lys  
420 425 430

Asp Lys Met Asp Ala Phe Ala Ala Tyr Phe Ser Ala Gly Ile Asn Gly  
435 440 445

<210> 7  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador que contiene HindIII

<400> 7  
aagcttaact attatgatcc cacagag 27

<210> 8  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador que contiene BamHI

<400> 8  
ggatccggcg gtgttgaacg tagc 24

<210> 9  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador C1

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Cebador C1

<400> 9

gtacatatattg tcgttagaac gcgtaatacg actca

35

<210> 10  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador BP40-i5

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Cebador BP40-i5

<400> 10  
aggtgcatga tcggaccata cttc

24

<210> 11  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador C2

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Cebador C2

<400> 11  
cgttagaacg cgtaatacga ctcactatag ggaga

35

<210> 12  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador BP40-i7

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Cebador BP40-i7

<400> 12  
gaccataactt cttagcgagt ttggc

25

<210> 13  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador BP40pro-F

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Cebador BP40pro-F

<400> 13

actcaaacaa gcatctcgcc atagg

25

<210> 14

<211> 2369

<212> DNA

<213> Viola x wittrockiana

<220>

<221> misc\_feature

<223> Plásmido pSFL614

<400> 14

actcaaacaa gcatctcgcc aatggttctc taaattttct tctactctca tctcacgtgg

60

tttccgccaa tctgtctctg attacagcct ttccacatat gtcaaagggt cagttagtgt

120

ttttgtcctt gtttatgtcg acgatataat cgttactggc aacaatctag atgccatttc

180

tgagactaaa caattcctcg caaattcatt ctctattaaa gatctcggca ctcttcgata

240

ttttcttgga atcgaagtat ctcgttctac gaaagggtatt ttcttatgtc aacgaaaata

300

cactctcgat attctctcag attctgggtca ccttggtatgt cgaccttctc catttcccat

360

ggagcaacat cttcatctac ttctgatga tggtagacca ctaccgacc catccattta

420

tcgacgtctg gttggtcgac tactttactt gactgtcact cgctctgata ttcaatatgc

480

agtgaatact cttagtcaat tcatgcaact tctcgttcg acccatctcg atgcggcaaa

540

tcgagttctc cgatatctca aaggatcagt tggtaaagga atcctccttt cggccactag

600

tctcttttca cttgttggtt ttgctgattc tgactgggct ggttgtccaa ctactcgtcg

660

ttcaactact ggctacatta ccatgcttgg ttcaagtcct atctcttgga aaactaaaaa

720

gcaaccact gtctctcgat cttctgcga agccgaatat cgatcactcg ctgctctcac

780

ttcagagata cagtggcttc attatctact ctggatctc ggttttcccc ctcaacaacc

840

gattaccgtt cattgtgaca accaagctgc tatacacatc gctaataatc cggttttcca

900

tgaacgaaca aagcacattg agctcgattg tcactttggt cgtgaaaaaa ttatttctgg

960

tctcgtctcc accagttatt tgcgttcctc agatcaactt gctgatattt tcacaaaacc

1020

acttggtgca gatgcattta atcaccttat ttccaagttg ggcgatcg acatctctct

1080

cccggctcca acttgacggg ggggtgttaa cgtatacaag attttcta atctgtatatt

1140

tgattttcta atatcttgta tatttgattt tctattatct tgtatttgaa cttttgtatt

1200

tccttagtat caggaaagtt agttgtagat attattttat atttcaaatc tgtatcta

1260

acttgcctat ataaaggcca actaatcaat gaaatgaaca catcaatttt ctcaatttct

1320

cattctctgt ttccatatct attctctatt ttcacatttt ctgaaaagaa agatgcttga

1380

catgatcaga gacagttctt tcttcttcat actttcgtac taaacttctc ctggtcgcga

1440

actaatcttc catcattttc ttgtgatctt cacttgagga tagtctctag aaaacggcac

1500

```

ggtcacgctg gataagtgtt taggatccct cgaagttgag ttgcatgaat tttgcgggta 1560
cgcaagtgac ttgactctta tcttggacgt cttatatgct cgaccaaagt ttggccaagt 1620
cgggatgctc gggttaagcc tctcttaggt caagtttatg agcgaacccc tttctttgag 1680
ggctctttat ttgccaactc gtctgccatt aaagttctat tagagctcta atgctgtgta 1740
tgtggctacc gatcaccttc attctcagag gaatcctctt ttcgaatttc tgggtactttg 1800
aaactagctg cttcaatttc agccactcga attaaacact aaaacagAAC attgagagga 1860
acgggcccctc ttccaaatat agaaagAAC agataatgtc aaaagacaca tcaactaggt 1920
cgagatacct gctcacatgc atcacatcta accaactcga gtcggacgag aaatgagttc 1980
gtaactcgat gataataagg caaaggctcta aaaccacatt cggttggtgg ttgtgttcat 2040
ggaccgatca cgtgccctaa cctaaccccc gcatccatcc accaacagct agtcctcgcc 2100
gagtccecca aagttcctat ttatatcact aaagtccttt tttctcaaca tagacatgca 2160
aacacgagac aacatggcaa ttctagtcac cgacttcggt gtcgeggcta taattttctt 2220
gatcactcgg ttcttagttc gttctctttt caagaaacca acccgaccgc tcccccgagg 2280
tctctcgggt tggcccttgg tgggcccctt cctctccta ggcgccatgc ctcacgtcgc 2340
actagccaaa ctcgctaaga agtatggtc 2369

```

```

<210> 15
<211> 1102
<212> DNA
<213> Viola x wittrockiana

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> BP40pro

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> HindIII

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1097)..(1102)
<223> BamHI

```

```

<400> 15
aagcttgtga tcgacatctc tctcccggct ccaacttgac ggggggtggt aaacgtatac 60
aagatcttct aatcttgtat atttgatttt ctaatatctt gtatatattga ttttctatta 120
tcttgtatct gaacttttgt atttccttag tatcaggaaa gttagttgta gatattatct 180
tatatttcaa atctgtatct aatacttgcc tatataaagg ccaactaatc aatgaaatga 240
acacatcaat tttctcaatt tctcattctc tgttttcata tctattctct attttcacat 300
tttctgaaaa gaaagatgct tgacatgac agagacaggt ctttcttctt catactttcg 360
tactaaactt ctctgggtcc gcaactaatc ttccatcatt ttcttgtgat cttcacttga 420

```

```

ggatagtctc tagaaaacgg cacggtcacg ctggataagt gtttagctag cctcgaagtt 480
gagttgcatg aattttgctg gtacgcaagt gacttgactc ttatcttgga cgtcttatat 540
gctcgaccaa atgttggcca agtcgggatg ctcggtttaa gcctctctta ggtcaagttt 600
atgagcgaac ccctttcttt gagggctctt tatttgcaa ctcgtctgcc attaaagttc 660
tattagagct ctaatgctgt gtatgtggct accgatcacc ttcattctca gaggaatcct 720
cttttcgaat ttctggtact ttgaaactag ctgcttcaat ttcagccact cgaattaaac 780
actaaaacag aacattgaga ggaacgggcc ctcttccaaa tatagaaaga aacagataat 840
gtcaaaagac acatcaacta ggtcgagata cctgctcaca tgcatcacat ctaaccaact 900
cgagtcggac gagaaatgag ttcgtaactc gatgataata aggcaaaggt ctaaaaccac 960
attcggttgg tggttgtgtt catggaccga tcacgtgccc taacctaacc cccgcatcca 1020
tccaccaaca gctagtcttc gccgagtccc ccaaagttcc tatttatatc actaaagtcc 1080
ctttttctca acatagggat cc 1102

```

```

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador BP40pro-HindIII-F

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador BP40pro-HindIII-F

```

```

<400> 16
aagcttgtga tcgacatctc tctcc 25

```

```

<210> 17
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador BP40pro-NheI-R

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador BP40pro-NheI-R

```

```

<400> 17
cgaggctagc taaacactta t 21

```

```

<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

```

```

<220>
<223> Cebador BP40pro-NheI-F

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> BPpro-NheI-F

<400> 18
tttagctagc ctcgaagttg                                     20

<210> 19
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador BP40pro-BamHI-R

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador BP40pro-BamHI-R

<400> 19
ggatccctat gttgagaaaa agggact                             27

<210> 20
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DFRproHindIIIF

<400> 20
taataagctt acagtgtaat tatc                                24

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DFRproNheIR

<400> 21
ttatgctagc gtgtcaagac cac                                  23

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> DFRproNheIF

<400> 22
acacgctagc ataagtctgt tg                                   22

<210> 23
<211> 20
<212> DNA

```

85

<213> Artificial

<220>  
<223> DFRproBamHI-R

<400> 23  
gcttggggat ccatcttagg 20

<210> 24  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador RrF3H-F

<400> 24  
aagcttctag ttagacaaaa agcta 25

<210> 25  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador RrF3H-R

<400> 25  
ggatcctctc ttgatatttc cgttc 25

<210> 26  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADH-BP40Fd

<400> 26  
caagaaaaat aaatggcaat tctagtcacc gac 33

<210> 27  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> NcoI-BP40-Rv

<400> 27  
ctcgagcgta cgtgagcatc 20

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

<220>  
<223> BamHI-ADH-Fd

<400> 28

cgcggatccg tctatttaac tcagtattc

29

<210> 29  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> BP40-ADH-Rv

<400> 29  
 tagaattgcc atttattttt cttgatttcc ttcac

35

<210> 30  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> BamHI-ADH-Fd

<400> 30  
 cgcggatccg tctatttaac tcagtattc

29

<210> 31  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> NcoI-BP40Rv

<400> 31  
 ctcgagcgta cgtgagcatc

20

<210> 32  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADH KpnI Forward

<400> 32  
 cggtaccgtc tattttaactc agtattc

27

<210> 33  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> GUS19R

<400> 33  
 tttctacagg acgtaacata agggga

25

<210> 34  
 <211> 1047  
 <212> DNA

<213> Chrysanthemum

<220>

<221> misc\_feature

<223> Promotor de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H)

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1)..(23)

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1023)..(1047)

<400> 34

```

ttacaaaacc atgtgcaaga atgaagaaag aagaaacaat gaggggtctaa tatgtaatag      60
ttagcttagc ttttctagta agctaaattt aggggttttta tgtaacctcc ctctcttata      120
taaagagggt aggcgtctag gggttcggta ttcctttcca ttatcctttt cattcatcct      180
ttcatttcat agtattcatc tctaattgaga gtctagacac acgatcatag cgtgtgtata      240
atagttgtag tagttttttt gttttaatta ataaagaaaa cttattatt agtgatgttg      300
attgtgtttt taatcattcc gctgttttca atcaattgat atcaactcata ccctagttga      360
gtcccgatct tgttttcaac aattggtttc agagcctcgt ggotctcgat ctagggttta      420
taagattttc atgtaattag gggtttatact ctaattcatc tattgcagca gatttgaaaa      480
gaaaagagggc agcagatggg gaattgatca catggctact gttcgaacct acaaaggaat      540
atcaatacga gggctcaatt attgtctcgg attcaatgaa ttcacaaggt aaataaacgc      600
ggctactctt tcattgggtcc ttcgttttat ttgtttgaca attaattggg atggctggcg      660
tgtataattc tcaatacatg tctgatttaa tatgtgattg gttgacattc atgtgaaatt      720
aatatactca ttttatgatt acaaagaccc acgatgtata attaattcca atcttgtgga      780
atgggatcca ttgtgaaccg gtgcatgatt gttacggtgg ggattacttt tgattgggtc      840
agcattatca tataaccccc gttcaacgga tgcattgtac attggtacgt atacatatac      900
gattcacgtg tggtagttga taactagcgc gatacgcccc cccccatat ttcttcaatt      960
ttctctacaa atacccatgc caaccttacg aaacactcat tcccctctac tcatagacgc     1020
accaagtgtg tgaagaaaaa ataaaaa                                     1047

```

<210> 35

<211> 2346

<212> DNA

<213> Chrysanthemum

<220>

<221> misc\_feature

<223> pBluescript SK-F3H9 que contiene el promotor de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H)

<220>

<221> primer\_bind

<222> (1092)..(1114)

<220>

<221> primer\_bind

<222> (2114)..(2138)

<400> 35

```

aagcttttcgg gggatgaatt cttecgctacc acgtaattcc ccatggcttt gagtctaact      60
taaagactcg gtaataaaga aaagtgcctt ttcgggagac aaccogaatt atccttttta      120
tttcttttat ttcacttttt gtttggtttt gtgtttttaa cattttgcag gaattggaga      180
agaattcaca agtgactaaa acggggacct gttctgtcca acagttacgg cgtaactcat      240
cctcatgggt acgccgtaac atatcctcag tagcgattct ctccaatata taaaccatta      300
cggcgtaatc ccattctatg gttacgccgt agctattctc cagtagcaaa ttgccagttt      360
ttaccacaat tacagcttaa ctctcttttc gggttacgtc gtaactatcc tacaattcta      420
atcttttcta tattaacaca ataaccttgt attagttttt aaatgaactt tgcgggtatg      480
ttccatgtaa gccctcatga gactacactc gtccacttgg gacaccaagt ggtttaaaat      540
gcttggttga tatgctaaat gcaaccgtga ttctacgaa agtgagttag atttcttttt      600
gtttttgttt ttatttttct ttttagaatt atgcttggtg gttagtgtga tatcagggaa      660
tgaagtttgc tcgtggatgc ttaagcaaag gcacgattct cttegtaggc cttctttctt      720
tttaagagca aatttcaggg aagttctcgc tctaattcta ctttctcttc acctttattt      780
aacgtttagt acaaaagggg ctttgtacat cttaagtggg ggggacggga gtagaattat      840
tacttgaact taattgccct cgtttttcta gtttattttg aaaaattatg ccatttttaa      900
aattttggca tgtttttctt aagctaacta gattagacct tagccgagca ctttataacc      960
cttgatattt tatggtgaga ttagctttat ccgtttctaa ttatttacct aaatccacta     1020
aattattaga gtgtcggtag cttgtaaaact ttagaacttg gtctttgtgt tgggaattgt     1080
cgagttgaag attacaaaac catgtgcaag aatgaagaaa gaagaaacaa tgagggtcta     1140
atatgtaata gttagcttag cttttctagt aagctaaatt tagggttttt atgtaacctc     1200
cctctcttat ataaagaggg taggogtcta gggtttcggt attcctttcc attatccttt     1260
tcattcatcc tttcatttca tagtattcat ctctaagag agtctagaca cacgatcata     1320
gcgtgtgtat aatagttgta gtagtttttt tgttttaatt aataaagaaa accttattat     1380
tagtgatggt gattgtgttt ttaatcattc cgctgttttc aatcaattga tatcactcat     1440
accctagttg agtcccgatc ttgttttcaa caattggttt cagagcctcg tggtctctga     1500
tctagggttt ataagatttt catgtaatta gggtttatac tctaattcat ctattgcagc     1560
agatttgaaa agaaaagagg cagcagatgg ggaattgatc acatggctac tgttcgaacc     1620
taciaaggaa tatcaatagc agggctcaat tattgtctcg gattcaatga attcacaagg     1680
taaataaacg cggtagctct ttcattggtc cttegtttta tttgtttgac aattaattgg     1740
gatggctggc gtgtataatt ctcaatacat gtctgattta atatgtgatt ggttgacatt     1800

```

catgtgaaat taatatactc attttatgat tacaagacc cacgatgtat aattaattcc 1860  
aatcttgtgg aatgggatcc attgtgaacc ggtgcatgat tgttacgggtg gggattactt 1920  
ttgattgggtt cagcattatc atataacccc cgttcaacgg atgcatgcta cattgggtacg 1980  
tatacatata cgattcacgt gtggtagttg ataactagcg cgatacgccc ccaccccata 2040  
tttcttcaat tttctctaca aatacccatg ccaaccttac gaaacactca ttccctctta 2100  
ctcatagacg caccaagtgt gtgaagaaaa aataaaaaat ggcacctata tccttgaaat 2160  
gggacgataa ttogctgcat gaaaaccggg tcgtccgtga tgaggacgag cggcctaagg 2220  
tgccatacaa caagtttacc aacgagattc ccgttatctc acttaagggg attgacgatg 2280  
tggaagagag tagcgggtgg atcaaatac gtagggccga gatttgtgag aagataataa 2340  
aagctt 2346

<210> 36  
<211> 55  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> HANS-F3Hpro1k-Fd

<400> 36  
ccaagcttgg cgcgccggg ccgcatttaa atttacaaaa ccatgtgcaa gaatg 55

<210> 37  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> SNM-F3Hpro-Rv

<400> 37  
actagtgcta gcacgcgttt tttatTTTTT cttcacacac ttg 43

<210> 38  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> NSM-F3Hpro-Rv

<400> 38  
gctagcacta gtacgcgttt tttatTTTTT cttcacacac ttg 43

<210> 39  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> BclI-CmF3Hp-Rv

<400> 39  
ttttgatcat tttttatttt ttcttcacac agtg 34

<210> 40  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADH-EgF3'5'H-Fd

<400> 40  
caagaaaaat aaatggctgt tggaaatggc gtt 33

<210> 41  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> HpaI-EgF3'5'H-Rv

<400> 41  
gttaacgctg agcctagtgc c 21

<210> 42  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> XbaI-ADH-Fd

<400> 42  
acgcgttcta gagtctattt aactcagtat tc 32

<210> 43  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> EgF3'5'H-ADH-Rv

<400> 43  
tccaacagcc atttattttt cttgatttcc ttcac 35

<210> 44  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> HpaI-EgF3'5'H-Rv

<400> 44  
gttaacgctg agcctagtgc c 21

<210> 45  
<211> 32

```

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> ADH-LeF3'5'H-Fd

<400> 45
caagaaaaat aaatggacgc gacawacatt gc 32

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> HpaI-LeF3'5'H-Rv

<400> 46
gttaacatct cgggcagcac c 21

<210> 47
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> LeF3'5'H-ADH-Rv

<400> 47
tgtcgcgtcc atttattttt cttgatttcc ttcac 35

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> HpaI-LeF3'5'H-Rv

<400> 48
gttaacatct cgggcagcac c 21

<210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> CamF1

<400> 49
gtgaagccac catgtctata g 21

<210> 50
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> CamR1

```

```

<400> 50
gcatttgccct agacagtgtgta ag 22

<210> 51
<211> 1585
<212> DNA
<213> Campanula medium

<220>
<221> misc_feature
<223> Cline #4 pSPB2561

<220>
<221> CDS
<222> (12)..(1577)

<400> 51
gtgaagccac c atg tct ata gac ata acc att ctc tta tgt gaa ctt gtt 50
      Met Ser Ile Asp Ile Thr Ile Leu Leu Cys Glu Leu Val
      1             5             10

gct gca att tca ctc tac tta tta acc tac tat ttc att tgt ttc ctc 98
Ala Ala Ile Ser Leu Tyr Leu Leu Thr Tyr Tyr Phe Ile Cys Phe Leu
      15             20             25

ttc aaa ccc tct cat cat cac cac cac ctc cct ccc ggc cca acc gga 146
Phe Lys Pro Ser His His His His His Leu Pro Pro Gly Pro Thr Gly
      30             35             40             45

tgg ccg atc att gga tcc ctt cct ctc tta ggc act atg cca cat gtt 194
Trp Pro Ile Ile Gly Ser Leu Pro Leu Leu Gly Thr Met Pro His Val
      50             55             60

tcc tta gcc gac atg gcc gta aaa tac ggg cct ata atg tac cta aaa 242
Ser Leu Ala Asp Met Ala Val Lys Tyr Gly Pro Ile Met Tyr Leu Lys
      65             70             75

ctt ggt tca aag ggc acc gtc gtg gcc tca aat cca aaa gcc gcc cga 290
Leu Gly Ser Lys Gly Thr Val Val Ala Ser Asn Pro Lys Ala Ala Arg
      80             85             90

gca ttc ttg aaa tcc cat gat gcc aat ttt tct aac cgt ccg att gat 338
Ala Phe Leu Lys Ser His Asp Ala Asn Phe Ser Asn Arg Pro Ile Asp
      95             100             105

ggg ggg ccc acc tac ctc gcg tat aat gca caa gac atg gtt ttt gca 386
Gly Gly Pro Thr Tyr Leu Ala Tyr Asn Ala Gln Asp Met Val Phe Ala
      110             115             120             125

gaa tat ggc cca aaa tgg aag ctt ttg cga aag cta tgt agc ttg cac 434
Glu Tyr Gly Pro Lys Trp Lys Leu Leu Arg Lys Leu Cys Ser Leu His
      130             135             140

atg tta ggc ccg aag gca ctc gag gat tgg gct cat gtc aga gtt tca 482
Met Leu Gly Pro Lys Ala Leu Glu Asp Trp Ala His Val Arg Val Ser
      145             150             155

gag gtc ggt cat atg ctc aaa gaa atg tac gag caa tcg agt aag tcc 530
Glu Val Gly His Met Leu Lys Glu Met Tyr Glu Gln Ser Ser Lys Ser
      160             165             170

gtg cca gtg gtg gtg cca gag atg tta act tat gcc atg gct aat atg 578
Val Pro Val Val Val Pro Glu Met Leu Thr Tyr Ala Met Ala Asn Met
      175             180             185

```

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| att gga cga atc ata ctc agt cga cgc cct ttt gtt atc acg agc aaa<br>Ile Gly Arg Ile Ile Leu Ser Arg Arg Pro Phe Val Ile Thr Ser Lys<br>190 195 200 205 | 626  |
| tta gac tcg tct gct tct gct gct tct gtt agt gaa ttc caa tat atg<br>Leu Asp Ser Ser Ala Ser Ala Ala Ser Val Ser Glu Phe Gln Tyr Met<br>210 215 220     | 674  |
| gtt atg gag ctc atg agg atg gca ggg ttg ttc aat att ggt gat ttc<br>Val Met Glu Leu Met Arg Met Ala Gly Leu Phe Asn Ile Gly Asp Phe<br>225 230 235     | 722  |
| ata cca tat att gcg tgg atg gat ttg caa ggc att caa cgc gat atg<br>Ile Pro Tyr Ile Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly Ile Gln Arg Asp Met<br>240 245 250     | 770  |
| aag gtt ata cag caa aag ttt gat gtc ttg ttg aac aaa atg atc aag<br>Lys Val Ile Gln Gln Lys Phe Asp Val Leu Leu Asn Lys Met Ile Lys<br>255 260 265     | 818  |
| gaa cat aca gaa tcc gct cat gat cgt aaa gat aat cct gat ttt ctt<br>Glu His Thr Glu Ser Ala His Asp Arg Lys Asp Asn Pro Asp Phe Leu<br>270 275 280 285 | 866  |
| gat att ctt atg gcg gct acc caa gaa aac acg gag gga att cag ctt<br>Asp Ile Leu Met Ala Ala Thr Gln Glu Asn Thr Glu Gly Ile Gln Leu<br>290 295 300     | 914  |
| aat ctc gta aat gtt aag gcg ctt ctt ttg gat tta ttc acg gcg ggc<br>Asn Leu Val Asn Val Lys Ala Leu Leu Leu Asp Leu Phe Thr Ala Gly<br>305 310 315     | 962  |
| acg gat aca tcg tcg agt gtg atc gaa tgg gca cta gcc gaa atg ttg<br>Thr Asp Thr Ser Ser Ser Val Ile Glu Trp Ala Leu Ala Glu Met Leu<br>320 325 330     | 1010 |
| aac aat cga cag atc cta aac cgg gcc cac gaa gaa atg gac caa gtc<br>Asn Asn Arg Gln Ile Leu Asn Arg Ala His Glu Glu Met Asp Gln Val<br>335 340 345     | 1058 |
| att ggc aga aac aga aga cta gaa caa tct gac ata cca aac ttg cca<br>Ile Gly Arg Asn Arg Arg Leu Glu Gln Ser Asp Ile Pro Asn Leu Pro<br>350 355 360 365 | 1106 |
| tat ttc caa gcc ata tgc aaa gaa aca ttc cga aaa cac cct tcc acg<br>Tyr Phe Gln Ala Ile Cys Lys Glu Thr Phe Arg Lys His Pro Ser Thr<br>370 375 380     | 1154 |
| ccc tta aac ctc cca aga atc tca aca gaa gaa tgt gaa gtc gaa gga<br>Pro Leu Asn Leu Pro Arg Ile Ser Thr Glu Glu Cys Glu Val Glu Gly<br>385 390 395     | 1202 |
| ttt cgc ata ccc aaa aac act aga cta ata gtg aac ata tgg gca ata<br>Phe Arg Ile Pro Lys Asn Thr Arg Leu Ile Val Asn Ile Trp Ala Ile<br>400 405 410     | 1250 |
| ggg aga gac cct aaa gtg tgg gaa aat cca ttg gat ttt acc ccg gaa<br>Gly Arg Asp Pro Lys Val Trp Glu Asn Pro Leu Asp Phe Thr Pro Glu<br>415 420 425     | 1298 |
| cga ttc ttg agt gaa aaa cac gcg aaa att gat ccg cga ggt aat cat<br>Arg Phe Leu Ser Glu Lys His Ala Lys Ile Asp Pro Arg Gly Asn His<br>430 435 440 445 | 1346 |
| ttt gag tta atc cca ttt ggg gcg gga cgg agg ata tgt gca ggg gct                                                                                       | 1394 |

Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Ala  
 450 455 460  
 aga atg gga gcg gcc tcg gtc gag tac att tta ggt aca ttg gtg cac 1442  
 Arg Met Gly Ala Ala Ser Val Glu Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His  
 465 470 475  
 tca ttt gat tgg aaa ttg cct gat gga gtt gtg gaa gtt aat atg gaa 1490  
 Ser Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asp Gly Val Val Glu Val Asn Met Glu  
 480 485 490  
 gag agc ttt ggg ata gca ttg cag aaa aag atg cct ctt tct gct att 1538  
 Glu Ser Phe Gly Ile Ala Leu Gln Lys Lys Met Pro Leu Ser Ala Ile  
 495 500 505  
 gtt act cca aga ttg cct cca agt gct tac act gtc tag gcaaattgc 1585  
 Val Thr Pro Arg Leu Pro Pro Ser Ala Tyr Thr Val  
 510 515 520  
  
 <210> 52  
 <211> 521  
 <212> PRT  
 <213> Campanula medium  
  
 <400> 52  
  
 Met Ser Ile Asp Ile Thr Ile Leu Leu Cys Glu Leu Val Ala Ala Ile  
 1 5 10 15  
  
 Ser Leu Tyr Leu Leu Thr Tyr Tyr Phe Ile Cys Phe Leu Phe Lys Pro  
 20 25 30  
  
 Ser His His His His His Leu Pro Pro Gly Pro Thr Gly Trp Pro Ile  
 35 40 45  
  
 Ile Gly Ser Leu Pro Leu Leu Gly Thr Met Pro His Val Ser Leu Ala  
 50 55 60  
  
 Asp Met Ala Val Lys Tyr Gly Pro Ile Met Tyr Leu Lys Leu Gly Ser  
 65 70 75 80  
  
 Lys Gly Thr Val Val Ala Ser Asn Pro Lys Ala Ala Arg Ala Phe Leu  
 85 90 95  
  
 Lys Ser His Asp Ala Asn Phe Ser Asn Arg Pro Ile Asp Gly Gly Pro  
 100 105 110  
  
 Thr Tyr Leu Ala Tyr Asn Ala Gln Asp Met Val Phe Ala Glu Tyr Gly  
 115 120 125  
  
 Pro Lys Trp Lys Leu Leu Arg Lys Leu Cys Ser Leu His Met Leu Gly  
 130 135 140  
  
 Pro Lys Ala Leu Glu Asp Trp Ala His Val Arg Val Ser Glu Val Gly  
 145 150 155 160

His Met Leu Lys Glu Met Tyr Glu Gln Ser Ser Lys Ser Val Pro Val  
165 170 175

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

Ile Ile Leu Ser Arg Arg Pro Phe Val Ile Thr Ser Lys Leu Asp Ser  
195 200 205

Ser Ala Ser Ala Ala Ser Val Ser Glu Phe Gln Tyr Met Val Met Glu  
210 215 220

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

Ile Ala Trp Met Asp Leu Gln Gly Ile Gln Arg Asp Met Lys Val Ile  
245 250 255

Gln Gln Lys Phe Asp Val Leu Leu Asn Lys Met Ile Lys Glu His Thr  
260 265 270

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

Met Ala Ala Thr Gln Glu Asn Thr Glu Gly Ile Gln Leu Asn Leu Val  
290 295 300

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

Ser Ser Ser Val Ile Glu Trp Ala Leu Ala Glu Met Leu Asn Asn Arg  
325 330 335

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

Asn Arg Arg Leu Glu Gln Ser Asp Ile Pro Asn Leu Pro Tyr Phe Gln  
355 360 365

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

Leu Pro Arg Ile Ser Thr Glu Glu Cys Glu Val Glu Gly Phe Arg Ile  
385 390 395 400

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

Pro Lys Val Trp Glu Asn Pro Leu Asp Phe Thr Pro Glu Arg Phe Leu

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Ser Glu Lys His Ala Lys Ile Asp Pro Arg Gly Asn His Phe Glu Leu |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
|                                                                 |     |     |
| Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Ala Arg Met Gly |     |     |
| 450                                                             | 455 | 460 |
|                                                                 |     |     |
| Ala Ala Ser Val Glu Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His Ser Phe Asp |     |     |
| 465                                                             | 470 | 475 |
|                                                                 |     |     |
| Trp Lys Leu Pro Asp Gly Val Val Glu Val Asn Met Glu Glu Ser Phe |     |     |
| 485                                                             | 490 | 495 |
|                                                                 |     |     |
| Gly Ile Ala Leu Gln Lys Lys Met Pro Leu Ser Ala Ile Val Thr Pro |     |     |
| 500                                                             | 505 | 510 |
|                                                                 |     |     |
| Arg Leu Pro Pro Ser Ala Tyr Thr Val                             |     |     |
| 515                                                             | 520 |     |

<210> 53  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> ADH-Campa-Fd

<400> 53  
 caagaaaaat aaatgtctat agacataacc attc 34

<210> 54  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> HpaI-Campa-Rv

<400> 54  
 gttaacatct ctggcaccac c 21

<210> 55  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Campa-ADH-Rv

<400> 55  
 gtctatagac atttattttt cttgatttcc ttcac 35

<210> 56  
 <211> 21  
 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> HpaI-Campa-Rv

<400> 56

gttaacatct ctggcaccac c

21

<210> 57

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> ADH-ScF3'5'H-Fd

<400> 57

caagaaaaat aaatgagcat tctaacccta atc

33

<210> 58

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> NdeI-ScF3'5'H-Rv

<400> 58

catatgttta gctccagaat ttgg

24

<210> 59

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> ScF3'5'H-ADH-Rv

<400> 59

tagaatgctc atttatTTTT cttgatttcc ttcac

35

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> NdeI-ScF3'5'H-Rv

<400> 60

catatgttta gctccagaat ttgg

24

<210> 61

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> ADH-Gentian-Fd

<400> 61

caagaaaaat aaatgtcacc catttacacc accc 34

<210> 62  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> SalI-GentianF3'5'H-Rv

<400> 62  
gtcgacgcta ttgctaagcc 20

<210> 63  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Gentian-ADH-Rv

<400> 63  
aatgggtgac atttattttt cttgatttcc ttcac 35

<210> 64  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> SalI-GentianF3'5'H-Rv

<400> 64  
gtcgacgcta ttgctaagcc 20

<210> 65  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADH-Verbena-Fd

<400> 65  
caagaaaaat aaatgacggtt ttcagagctt ataaac 36

<210> 66  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> NcoI-Verbena-F3'5'H-Rv

<400> 66  
ccatggagta aatcagcatc tc 22

<210> 67  
<211> 35  
<212> DNA

```

<213> Artificial

<220>
<223> Verbena-ADH-Rv

<400> 67
tgaaaacgtc atttattttt cttgatttcc ttcac 35

<210> 68
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> NcoI-VerbenaF3'5'H-Rv

<400> 68
ccatggagta aatcagcatc tc 22

<210> 69
<211> 1755
<212> DNA
<213> Antirrhinum kellogii

<220>
<221> misc_feature
<223> F3'5'HcDNA#1 pSPB3145

<220>
<221> CDS
<222> (73)..(1602)

<400> 69
ttcggcacga ggggtacctt agtatgttca atctctagtt ttttattaat cacaactcaa 60

tagataatcg tc atg cag ata ata att ccg gtc ctc ctg aag gag ctc acc 111
Met Gln Ile Ile Ile Pro Val Leu Leu Lys Glu Leu Thr
1 5 10

gta gca gca tta ctc tat gtt ttc act aac att ctc atc cgc tca ctt 159
Val Ala Ala Leu Leu Tyr Val Phe Thr Asn Ile Leu Ile Arg Ser Leu
15 20 25

ctc aca aga ccc tgt cac cgt ctc ccg cca ggg cca aga ggc ttt cca 207
Leu Thr Arg Pro Cys His Arg Leu Pro Pro Gly Pro Arg Gly Phe Pro
30 35 40 45

gta gtc ggc gct ctt cca ctc cta ggc agc atg cca cac gtg gcg ctc 255
Val Val Gly Ala Leu Pro Leu Leu Gly Ser Met Pro His Val Ala Leu
50 55 60

gcc aaa atg tcc aaa act tat ggt ccc gtc ata tac cta aaa gta ggc 303
Ala Lys Met Ser Lys Thr Tyr Gly Pro Val Ile Tyr Leu Lys Val Gly
65 70 75

gca cac ggc atg gca gtg gcc tca act cct gaa tcc gcc aaa gcg ttc 351
Ala His Gly Met Ala Val Ala Ser Thr Pro Glu Ser Ala Lys Ala Phe
80 85 90

ctc aaa acc cta gac acc aac ttc tcc aac cgc ccg cca aat gcc ggt 399
Leu Lys Thr Leu Asp Thr Asn Phe Ser Asn Arg Pro Pro Asn Ala Gly
95 100 105

```

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| gcc act cac ctg gct tat aac tca caa gac atg gtg ttt gcc gcc tac | 447  |
| Ala Thr His Leu Ala Tyr Asn Ser Gln Asp Met Val Phe Ala Ala Tyr |      |
| 110 115 120 125                                                 |      |
| ggc ccg agg tgg aga ttg ctt aga aag ttg agc aat ctc cac atg ttg | 495  |
| Gly Pro Arg Trp Arg Leu Leu Arg Lys Leu Ser Asn Leu His Met Leu |      |
| 130 135 140                                                     |      |
| ggg act aag gct tta gac gat tgg gca aat gtt agg gtt tcg gag gtt | 543  |
| Gly Thr Lys Ala Leu Asp Asp Trp Ala Asn Val Arg Val Ser Glu Val |      |
| 145 150 155                                                     |      |
| gga tac atg tta gag gac atg cat ggg gca agt ggc cgc gga gag gcg | 591  |
| Gly Tyr Met Leu Glu Asp Met His Gly Ala Ser Gly Arg Gly Glu Ala |      |
| 160 165 170                                                     |      |
| gtg ggt gtg ccg ggg atg ttg gtg tac gca atg gct aat atg ata gga | 639  |
| Val Gly Val Pro Gly Met Leu Val Tyr Ala Met Ala Asn Met Ile Gly |      |
| 175 180 185                                                     |      |
| cag gtg ata ctt agt cgg cgt gtt ttc gtg acg aga gga gaa gaa ttg | 687  |
| Gln Val Ile Leu Ser Arg Arg Val Phe Val Thr Arg Gly Glu Glu Leu |      |
| 190 195 200 205                                                 |      |
| aac gag ttt aag gat atg gtg gtg gag ctc atg act tcg gct gga tat | 735  |
| Asn Glu Phe Lys Asp Met Val Val Glu Leu Met Thr Ser Ala Gly Tyr |      |
| 210 215 220                                                     |      |
| ttc aat att ggt gat ttt att ccg tct ttt gct tgg atg gat ttg caa | 783  |
| Phe Asn Ile Gly Asp Phe Ile Pro Ser Phe Ala Trp Met Asp Leu Gln |      |
| 225 230 235                                                     |      |
| gga ata gag aag gga atg aag ggc ttg cac aaa aag ttt gat gat ttg | 831  |
| Gly Ile Glu Lys Gly Met Lys Gly Leu His Lys Lys Phe Asp Asp Leu |      |
| 240 245 250                                                     |      |
| atc agt aga atg ttg gag gaa cac ctg gcg tca gct cat atc cga aag | 879  |
| Ile Ser Arg Met Leu Glu Glu His Leu Ala Ser Ala His Ile Arg Lys |      |
| 255 260 265                                                     |      |
| gag aaa cct gat ttt ctt gat gtc att ttg gct aat cgt gat act ttg | 927  |
| Glu Lys Pro Asp Phe Leu Asp Val Ile Leu Ala Asn Arg Asp Thr Leu |      |
| 270 275 280 285                                                 |      |
| gag gga gag agg ctt acc act tct aac atc aag gct ctt tta ctg aac | 975  |
| Glu Gly Glu Arg Leu Thr Thr Ser Asn Ile Lys Ala Leu Leu Leu Asn |      |
| 290 295 300                                                     |      |
| ttg ttc acc gcc ggt acg gat aca tct tcg agc aca ata gag tgg gcg | 1023 |
| Leu Phe Thr Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Trp Ala |      |
| 305 310 315                                                     |      |
| ctg gcg gag atg ata aaa aac ccg gcg atc ctc aag aaa gca cac gat | 1071 |
| Leu Ala Glu Met Ile Lys Asn Pro Ala Ile Leu Lys Lys Ala His Asp |      |
| 320 325 330                                                     |      |
| gaa atg gat caa gtc gta ggc ccg aat cga cgt tta atg gag tcg gac | 1119 |
| Glu Met Asp Gln Val Val Gly Arg Asn Arg Arg Leu Met Glu Ser Asp |      |
| 335 340 345                                                     |      |
| ata ccc aaa ctt cca tac cta caa gcg ata tgc aag gaa tca ttt cgt | 1167 |
| Ile Pro Lys Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Ile Cys Lys Glu Ser Phe Arg |      |
| 350 355 360 365                                                 |      |
| aag cac cct tcc act cct tta aat ctg ccc cga atc tct tca caa gca | 1215 |
| Lys His Pro Ser Thr Pro Leu Asn Leu Pro Arg Ile Ser Ser Gln Ala |      |

| 370                                                               | 375 | 380     |      |
|-------------------------------------------------------------------|-----|---------|------|
| tgc acg gtg aac ggt tac tac ata ccg aag aac acg agg ctc aac gtc   |     |         | 1263 |
| Cys Thr Val Asn Gly Tyr Tyr Ile Pro Lys Asn Thr Arg Leu Asn Val   |     |         |      |
| 385                                                               | 390 | 395     |      |
| aac ata tgg gcg atc gga agg gat ccc aac gtg tgg gag aat ccc ctg   |     |         | 1311 |
| Asn Ile Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asn Val Trp Glu Asn Pro Leu   |     |         |      |
| 400                                                               | 405 | 410     |      |
| gaa ttc aac ccc gac agg ttc atg tcc ggt aag aat gca aag ctc gat   |     |         | 1359 |
| Glu Phe Asn Pro Asp Arg Phe Met Ser Gly Lys Asn Ala Lys Leu Asp   |     |         |      |
| 415                                                               | 420 | 425     |      |
| ccg aga gga aat gat ttt gaa ctc att ccg ttc ggg gct ggt cga agg   |     |         | 1407 |
| Pro Arg Gly Asn Asp Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg   |     |         |      |
| 430                                                               | 435 | 440 445 |      |
| att tgt gcg gga gcg agg atg ggg ata gtt ctt gtg gaa tat ata ttg   |     |         | 1455 |
| Ile Cys Ala Gly Ala Arg Met Gly Ile Val Leu Val Glu Tyr Ile Leu   |     |         |      |
| 450                                                               | 455 | 460     |      |
| gga agt ttg gtg cat tct ttt gat tgg aaa ttg ccc gaa gga gtg aag   |     |         | 1503 |
| Gly Ser Leu Val His Ser Phe Asp Trp Lys Leu Pro Glu Gly Val Lys   |     |         |      |
| 465                                                               | 470 | 475     |      |
| gag atg aat ttg gat gag gct ttt ggg ctt gct ttg caa aaa gct gtt   |     |         | 1551 |
| Glu Met Asn Leu Asp Glu Ala Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val   |     |         |      |
| 480                                                               | 485 | 490     |      |
| cct ctt gca gca atg gtt act ccg agg ttg cct tca aat tgt tat gct   |     |         | 1599 |
| Pro Leu Ala Ala Met Val Thr Pro Arg Leu Pro Ser Asn Cys Tyr Ala   |     |         |      |
| 495                                                               | 500 | 505     |      |
| cct taagtaatag tatttaagtg cgtcggaata tcgaagtcta tatgattttc        |     |         | 1652 |
| Pro                                                               |     |         |      |
| 510                                                               |     |         |      |
| ttgtgcttgt ttctatccac tatgttgtaa gaattcatct ccgatcctct ggtgggcatg |     |         | 1712 |
| gctatatatc gtaattcttt ttcgaaaaaa aaaaaaaaaa aaa                   |     |         | 1755 |

<210> 70  
 <211> 510  
 <212> PRT  
 <213> Antirrhinum kellogii

<400> 70

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Met Gln Ile Ile Ile Pro Val Leu Leu Lys Glu Leu Thr Val Ala Ala |
| 1 5 10 15                                                       |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Leu Leu Tyr Val Phe Thr Asn Ile Leu Ile Arg Ser Leu Leu Thr Arg |
| 20 25 30                                                        |

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| Pro Cys His Arg Leu Pro Pro Gly Pro Arg Gly Phe Pro Val Val Gly |
| 35 40 45                                                        |

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

Ser Lys Thr Tyr Gly Pro Val Ile Tyr Leu Lys Val Gly Ala His Gly  
65 70 75 80

Met Ala Val Ala Ser Thr Pro Glu Ser Ala Lys Ala Phe Leu Lys Thr  
85 90 95

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

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

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

Ala Leu Asp Asp Trp Ala Asn Val Arg Val Ser Glu Val Gly Tyr Met  
145 150 155 160

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

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

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

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

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

Lys Gly Met Lys Gly Leu His Lys Lys Phe Asp Asp Leu Ile Ser Arg  
245 250 255

Met Leu Glu Glu His Leu Ala Ser Ala His Ile Arg Lys Glu Lys Pro  
260 265 270

Asp Phe Leu Asp Val Ile Leu Ala Asn Arg Asp Thr Leu Glu Gly Glu  
275 280 285

Arg Leu Thr Thr Ser Asn Ile Lys Ala Leu Leu Leu Asn Leu Phe Thr  
290 295 300

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

Met Ile Lys Asn Pro Ala Ile Leu Lys Lys Ala His Asp Glu Met Asp  
325 330 335

Gln Val Val Gly Arg Asn Arg Arg Leu Met Glu Ser Asp Ile Pro Lys  
340 345 350

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

Ser Thr Pro Leu Asn Leu Pro Arg Ile Ser Ser Gln Ala Cys Thr Val  
370 375 380

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

Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asn Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Asn  
405 410 415

Pro Asp Arg Phe Met Ser Gly Lys Asn Ala Lys Leu Asp Pro Arg Gly  
420 425 430

Asn Asp Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala  
435 440 445

Gly Ala Arg Met Gly Ile Val Leu Val Glu Tyr Ile Leu Gly Ser Leu  
450 455 460

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

Leu Asp Glu Ala Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Ala  
485 490 495

Ala Met Val Thr Pro Arg Leu Pro Ser Asn Cys Tyr Ala Pro  
500 505 510

<210> 71  
<211> 1811  
<212> DNA  
<213> Antirrhinum kellogii

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> F3'5'cDNA#12 pSPB3146

<220>  
<221> CDS  
<222> (86)..(1615)

<400> 71  
gatactaaaa accatccaaa ttaagtacct ttagtatggt caatctctag tttttttatt 60  
  
aatcacaact caatagataa tcgtc atg cag ata ata att ccg gtc ctc ctg 112  
Met Gln Ile Ile Ile Pro Val Leu Leu  
1 5

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| aag gag ctc acc gta gca gca tta ctc tat gtt ttc act aac att ctc | 160 |
| Lys Glu Leu Thr Val Ala Ala Leu Leu Tyr Val Phe Thr Asn Ile Leu |     |
| 10 15 20 25                                                     |     |
| atc cgc tca ctt ctc aca aga ccc cgt cac cgt ctc ccg cca ggg cca | 208 |
| Ile Arg Ser Leu Leu Thr Arg Pro Arg His Arg Leu Pro Pro Gly Pro |     |
| 30 35 40                                                        |     |
| aga ggc ttt cca gta gtc ggc gct ctt cca ctc cta ggc agc atg cca | 256 |
| Arg Gly Phe Pro Val Val Gly Ala Leu Pro Leu Leu Gly Ser Met Pro |     |
| 45 50 55                                                        |     |
| cac gtg gcg ctc gcc aaa atg tcc aaa act tat ggt ccc gtc ata tac | 304 |
| His Val Ala Leu Ala Lys Met Ser Lys Thr Tyr Gly Pro Val Ile Tyr |     |
| 60 65 70                                                        |     |
| cta aaa gta ggc gca cac ggc atg gca gtg gcc tca act cct gaa tcc | 352 |
| Leu Lys Val Gly Ala His Gly Met Ala Val Ala Ser Thr Pro Glu Ser |     |
| 75 80 85                                                        |     |
| gcc aaa gcg ttc ctc aaa acc cta gac acc aac ttc tcc aac cgc ccg | 400 |
| Ala Lys Ala Phe Leu Lys Thr Leu Asp Thr Asn Phe Ser Asn Arg Pro |     |
| 90 95 100 105                                                   |     |
| cca aat gcc ggt gcc act cac ctg gct tat aac tca caa gac atg gtg | 448 |
| Pro Asn Ala Gly Ala Thr His Leu Ala Tyr Asn Ser Gln Asp Met Val |     |
| 110 115 120                                                     |     |
| ttt gcc gcc tac ggc ccg agg tgg aga ttg ctt aga aag ttg agc aat | 496 |
| Phe Ala Ala Tyr Gly Pro Arg Trp Arg Leu Leu Arg Lys Leu Ser Asn |     |
| 125 130 135                                                     |     |
| ctc cac atg ttg ggg act aag gct tta gac gat tgg gca aat gtt agg | 544 |
| Leu His Met Leu Gly Thr Lys Ala Leu Asp Asp Trp Ala Asn Val Arg |     |
| 140 145 150                                                     |     |
| gtt tcg gag gtt gga tac atg tta gag gac atg cat ggg gca agt ggc | 592 |
| Val Ser Glu Val Gly Tyr Met Leu Glu Asp Met His Gly Ala Ser Gly |     |
| 155 160 165                                                     |     |
| cgc gga aag gtg gtg ggt gtg ccg ggg atg ttg gtg tac gca atg gct | 640 |
| Arg Gly Lys Val Val Gly Val Pro Gly Met Leu Val Tyr Ala Met Ala |     |
| 170 175 180 185                                                 |     |
| aat atg ata gga cag gtg ata ctt agt cgg cgt gtt ttc gtg acg aga | 688 |
| Asn Met Ile Gly Gln Val Ile Leu Ser Arg Arg Val Phe Val Thr Arg |     |
| 190 195 200                                                     |     |
| gaa gaa gaa ttg aac gag ttt aag gat atg gtg gtg gag ctc atg act | 736 |
| Glu Glu Glu Leu Asn Glu Phe Lys Asp Met Val Val Glu Leu Met Thr |     |
| 205 210 215                                                     |     |
| tcg gct gga tat ttc aat att ggt gat ttt att ccg tct ttt gca tgg | 784 |
| Ser Ala Gly Tyr Phe Asn Ile Gly Asp Phe Ile Pro Ser Phe Ala Trp |     |
| 220 225 230                                                     |     |
| atg gat ttg caa gga ata gag aag gga atg aag ggt ttg cac aaa aag | 832 |
| Met Asp Leu Gln Gly Ile Glu Lys Gly Met Lys Gly Leu His Lys Lys |     |
| 235 240 245                                                     |     |
| ttt gat gat ttg atc agt aga atg ttg aag gaa cac ctg gcg tca gct | 880 |
| Phe Asp Asp Leu Ile Ser Arg Met Leu Lys Glu His Leu Ala Ser Ala |     |
| 250 255 260 265                                                 |     |
| cat atc cga aag gag aaa cct gat ttt ctt gat gtc att ttg gct aat | 928 |

|            |          |     |            |         |      |            |     |         |      |         |     |       |     |     |       |       |      |
|------------|----------|-----|------------|---------|------|------------|-----|---------|------|---------|-----|-------|-----|-----|-------|-------|------|
| His        | Ile      | Arg | Lys        | Glu     | Lys  | Pro        | Asp | Phe     | Leu  | Asp     | Val | Ile   | Leu | Ala | Asn   |       |      |
|            |          |     |            | 270     |      |            |     |         | 275  |         |     |       |     | 280 |       |       |      |
| cgt        | gat      | act | ttg        | gag     | gga  | gag        | agg | ctt     | acc  | act     | tct | aac   | atc | aag | gct   | 976   |      |
| Arg        | Asp      | Thr | Leu        | Glu     | Gly  | Glu        | Arg | Leu     | Thr  | Thr     | Ser | Asn   | Ile | Lys | Ala   |       |      |
|            |          |     | 285        |         |      |            |     | 290     |      |         |     |       | 295 |     |       |       |      |
| ctt        | tta      | ctg | aac        | ttg     | ttc  | acc        | gcc | ggg     | acg  | gat     | aca | tct   | tcg | agc | aca   | 1024  |      |
| Leu        | Leu      | Leu | Asn        | Leu     | Phe  | Thr        | Ala | Gly     | Thr  | Asp     | Thr | Ser   | Ser | Ser | Thr   |       |      |
|            |          | 300 |            |         |      |            | 305 |         |      |         |     | 310   |     |     |       |       |      |
| ata        | gag      | tgg | gcg        | ctg     | gcg  | gag        | atg | ata     | aaa  | aac     | ccg | gcg   | atc | ctc | aag   | 1072  |      |
| Ile        | Glu      | Trp | Ala        | Leu     | Ala  | Glu        | Met | Ile     | Lys  | Asn     | Pro | Ala   | Ile | Leu | Lys   |       |      |
|            | 315      |     |            |         |      | 320        |     |         |      | 325     |     |       |     |     |       |       |      |
| aaa        | gca      | cat | gat        | gaa     | atg  | gat        | caa | gtc     | gta  | ggc     | tgg | aat   | cga | cgt | tta   | 1120  |      |
| Lys        | Ala      | His | Asp        | Glu     | Met  | Asp        | Gln | Val     | Val  | Gly     | Trp | Asn   | Arg | Arg | Leu   |       |      |
| 330        |          |     |            |         | 335  |            |     |         |      | 340     |     |       |     |     | 345   |       |      |
| atg        | gag      | tcg | gac        | ata     | ccc  | aaa        | ctt | cca     | tac  | cta     | caa | gcg   | ata | tgc | aag   | 1168  |      |
| Met        | Glu      | Ser | Asp        | Ile     | Pro  | Lys        | Leu | Pro     | Tyr  | Leu     | Gln | Ala   | Ile | Cys | Lys   |       |      |
|            |          |     |            | 350     |      |            |     |         | 355  |         |     |       |     | 360 |       |       |      |
| gaa        | tca      | ttt | cgt        | aag     | cac  | cct        | tcc | act     | cct  | tta     | aat | ctg   | ccc | cga | atc   | 1216  |      |
| Glu        | Ser      | Phe | Arg        | Lys     | His  | Pro        | Ser | Thr     | Pro  | Leu     | Asn | Leu   | Pro | Arg | Ile   |       |      |
|            |          |     | 365        |         |      |            |     | 370     |      |         |     |       | 375 |     |       |       |      |
| tct        | tca      | caa | gca        | tgc     | acg  | gtg        | aac | ggg     | tac  | tac     | ata | ccg   | aag | aac | acg   | 1264  |      |
| Ser        | Ser      | Gln | Ala        | Cys     | Thr  | Val        | Asn | Gly     | Tyr  | Tyr     | Ile | Pro   | Lys | Asn | Thr   |       |      |
|            |          | 380 |            |         |      |            | 385 |         |      |         |     | 390   |     |     |       |       |      |
| agg        | ctc      | aac | gtc        | aac     | ata  | tgg        | gcg | atc     | gga  | agg     | gat | ccc   | aat | gtg | tgg   | 1312  |      |
| Arg        | Leu      | Asn | Val        | Asn     | Ile  | Trp        | Ala | Ile     | Gly  | Arg     | Asp | Pro   | Asn | Val | Trp   |       |      |
|            | 395      |     |            |         |      | 400        |     |         |      | 405     |     |       |     |     |       |       |      |
| gag        | aat      | ccc | ctg        | gaa     | ttc  | aac        | ccc | gac     | agg  | ttc     | atg | tcc   | ggg | aag | aac   | 1360  |      |
| Glu        | Asn      | Pro | Leu        | Glu     | Phe  | Asn        | Pro | Asp     | Arg  | Phe     | Met | Ser   | Gly | Lys | Asn   |       |      |
| 410        |          |     |            |         | 415  |            |     |         | 420  |         |     |       |     | 425 |       |       |      |
| gca        | aag      | ctc | gat        | ccg     | aga  | gga        | aat | gat     | ttt  | gaa     | ctc | att   | ccg | ttc | ggg   | 1408  |      |
| Ala        | Lys      | Leu | Asp        | Pro     | Arg  | Gly        | Asn | Asp     | Phe  | Glu     | Leu | Ile   | Pro | Phe | Gly   |       |      |
|            |          |     |            | 430     |      |            |     | 435     |      |         |     |       |     | 440 |       |       |      |
| gct        | ggg      | cga | agg        | att     | tgt  | gcg        | gga | gcg     | agg  | atg     | ggg | ata   | gtt | ctt | gtg   | 1456  |      |
| Ala        | Gly      | Arg | Arg        | Ile     | Cys  | Ala        | Gly | Ala     | Arg  | Met     | Gly | Ile   | Val | Leu | Val   |       |      |
|            |          |     | 445        |         |      |            |     | 450     |      |         |     |       | 455 |     |       |       |      |
| gaa        | tat      | ata | ttg        | gga     | agt  | ttg        | gtg | cat     | tct  | ttt     | gat | tgg   | aaa | ttg | ccc   | 1504  |      |
| Glu        | Tyr      | Ile | Leu        | Gly     | Ser  | Leu        | Val | His     | Ser  | Phe     | Asp | Trp   | Lys | Leu | Pro   |       |      |
|            |          | 460 |            |         |      |            | 465 |         |      |         |     | 470   |     |     |       |       |      |
| gaa        | gga      | gtg | aag        | gag     | atg  | aat        | ttg | gat     | gag  | gct     | ttt | ggg   | ctt | gct | ttg   | 1552  |      |
| Glu        | Gly      | Val | Lys        | Glu     | Met  | Asn        | Leu | Asp     | Glu  | Ala     | Phe | Gly   | Leu | Ala | Leu   |       |      |
|            | 475      |     |            |         |      | 480        |     |         |      | 485     |     |       |     |     |       |       |      |
| caa        | aaa      | gct | gtt        | cct     | ctt  | gca        | gca | atg     | gtt  | act     | ccg | agg   | ttg | cct | tca   | 1600  |      |
| Gln        | Lys      | Ala | Val        | Pro     | Leu  | Ala        | Ala | Met     | Val  | Thr     | Pro | Arg   | Leu | Pro | Ser   |       |      |
| 490        |          |     |            |         | 495  |            |     |         |      | 500     |     |       |     |     | 505   |       |      |
| aat        | tgt      | tat | gct        | cct     | taag | taat       | ag  | tatt    | taag | tg      | cg  | tc    | cg  | aa  | ta    | 1655  |      |
| Asn        | Cys      | Tyr | Ala        | Pro     |      |            |     |         |      |         |     |       |     |     |       |       |      |
|            |          |     |            | 510     |      |            |     |         |      |         |     |       |     |     |       |       |      |
| tatgattttc | ttgtgctt | gtt | ttctatccac | tatggtt | gtaa | gaattcatct | ccg | atcctct |      |         |     |       |     |     |       | 1715  |      |
| gg         | tg       | gc  | atg        | gct     | atat | atc        | g   | taattc  | ttt  | ttctatg | tcg | tacta | at  | atc | aatca | attat | 1775 |

attttcaaac ttttttctaa aaaaaaaaaa aaaaaa

1811

<210> 72  
 <211> 510  
 <212> PRT  
 <213> Antirrhinum kellogii

<400> 72

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

Leu Leu Tyr Val Phe Thr Asn Ile Leu Ile Arg Ser Leu Leu Thr Arg  
 20 25 30

Pro Arg His Arg Leu Pro Pro Gly Pro Arg Gly Phe Pro Val Val Gly  
 35 40 45

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

Ser Lys Thr Tyr Gly Pro Val Ile Tyr Leu Lys Val Gly Ala His Gly  
 65 70 75 80

Met Ala Val Ala Ser Thr Pro Glu Ser Ala Lys Ala Phe Leu Lys Thr  
 85 90 95

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

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

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

Ala Leu Asp Asp Trp Ala Asn Val Arg Val Ser Glu Val Gly Tyr Met  
 145 150 155 160

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

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

Leu Ser Arg Arg Val Phe Val Thr Arg Glu Glu Glu Leu Asn Glu Phe  
 195 200 205

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

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

Lys Gly Met Lys Gly Leu His Lys Lys Phe Asp Asp Leu Ile Ser Arg  
245 250 255

Met Leu Lys Glu His Leu Ala Ser Ala His Ile Arg Lys Glu Lys Pro  
260 265 270

Asp Phe Leu Asp Val Ile Leu Ala Asn Arg Asp Thr Leu Glu Gly Glu  
275 280 285

Arg Leu Thr Thr Ser Asn Ile Lys Ala Leu Leu Leu Asn Leu Phe Thr  
290 295 300

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

Met Ile Lys Asn Pro Ala Ile Leu Lys Lys Ala His Asp Glu Met Asp  
325 330 335

Gln Val Val Gly Trp Asn Arg Arg Leu Met Glu Ser Asp Ile Pro Lys  
340 345 350

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

Ser Thr Pro Leu Asn Leu Pro Arg Ile Ser Ser Gln Ala Cys Thr Val  
370 375 380

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

Ala Ile Gly Arg Asp Pro Asn Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Asn  
405 410 415

Pro Asp Arg Phe Met Ser Gly Lys Asn Ala Lys Leu Asp Pro Arg Gly  
420 425 430

Asn Asp Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala  
435 440 445

Gly Ala Arg Met Gly Ile Val Leu Val Glu Tyr Ile Leu Gly Ser Leu  
450 455 460

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

Leu Asp Glu Ala Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Ala

485

490

495

Ala Met Val Thr Pro Arg Leu Pro Ser Asn Cys Tyr Ala Pro  
500 505 510

<210> 73  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> ADH-AkF3'5'H-Fd

<400> 73  
caagaaaaat aaatgcagat aataattccg gtcc 34

<210> 74  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> NsiI-AkF3'5'H-Rv

<400> 74  
atgcatgtcc tctaacatgt atc 23

<210> 75  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> AkF3'5'H-ADH-Rv

<400> 75  
tattatctgc atttattttt cttgatttcc ttcac 35

<210> 76  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> NsiI-AkF3'5'H-Rv

<400> 76  
atgcatgtcc tctaacatgt atc 23

<210> 77  
<211> 1667  
<212> DNA  
<213> Cineraria

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> Ci5a18

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (39)..(1550)

&lt;400&gt; 77

```

gaattactaa ccaattctta cgttgtcaag taaataaa atg agc att cta acc cta      56
                                   Met Ser Ile Leu Thr Leu
                                   1               5

atc tgc acc ttc atc act ggt ttg atg ttc tat ggg ttg gtt aat ttg      104
Ile Cys Thr Phe Ile Thr Gly Leu Met Phe Tyr Gly Leu Val Asn Leu
              10               15               20

ctt agc cgt cgc gct agc cgt ctt cct cca ggt cca acc cca tgg cca      152
Leu Ser Arg Arg Ala Ser Arg Leu Pro Pro Gly Pro Thr Pro Trp Pro
              25               30               35

atc atc ggc aac cta atg cac ctt ggt aaa ctt cca cat cac tcg ctg      200
Ile Ile Gly Asn Leu Met His Leu Gly Lys Leu Pro His His Ser Leu
              40               45               50

gcg gac ttg gcg aaa aag tat ggt ccg ttg ata cat gtc cga cta ggg      248
Ala Asp Leu Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Leu Ile His Val Arg Leu Gly
              55               60               65               70

tcc gtt gat gtt gtg gtg gcc tcg tct gcg tcc gtt gct ggg cag ttt      296
Ser Val Asp Val Val Val Ala Ser Ser Ala Ser Val Ala Gly Gln Phe
              75               80               85

tta aag gtg cac gat gcg aat ttt gcc aac agg cca cca aat tct gga      344
Leu Lys Val His Asp Ala Asn Phe Ala Asn Arg Pro Pro Asn Ser Gly
              90               95               100

gct aaa cat atg gcg tat aat tat cat gat atg gtg ttt gcg ccg tat      392
Ala Lys His Met Ala Tyr Asn Tyr His Asp Met Val Phe Ala Pro Tyr
              105               110               115

ggg cca agg tgg cga atg ctt cga aag atg tgc tcc atg cat ctg ttt      440
Gly Pro Arg Trp Arg Met Leu Arg Lys Met Cys Ser Met His Leu Phe
              120               125               130

tct gcc aaa gca ctc act gat ttt cgt caa gtt cga cag gag gag gta      488
Ser Ala Lys Ala Leu Thr Asp Phe Arg Gln Val Arg Gln Glu Glu Val
              135               140               145               150

atg ata ctc acg cgc gtt ttg gcc ggg act gaa caa tcg gca gtg aaa      536
Met Ile Leu Thr Arg Val Leu Ala Gly Thr Glu Gln Ser Ala Val Lys
              155               160               165

cta gat caa caa ctt aac gtg tgc ttc gca aac aca tta tcc cga atg      584
Leu Asp Gln Gln Leu Asn Val Cys Phe Ala Asn Thr Leu Ser Arg Met
              170               175               180

atg tta gac agg aga gta ttt gga gac ggt gat cca aag gcg gac gac      632
Met Leu Asp Arg Arg Val Phe Gly Asp Gly Asp Pro Lys Ala Asp Asp
              185               190               195

tac aag gat atg gtg gtt gag ttg atg act ttg gcc gga caa ttc aac      680
Tyr Lys Asp Met Val Val Glu Leu Met Thr Leu Ala Gly Gln Phe Asn
              200               205               210

atc ggt gac tac att cct tgg ctt gac ttg ctt gac cta caa ggc att      728
Ile Gly Asp Tyr Ile Pro Trp Leu Asp Leu Leu Asp Leu Gln Gly Ile
              215               220               225               230

gtc aaa agg atg aag aaa gtt cat tct caa ttc gat tcg ttc ctt gac      776
Val Lys Arg Met Lys Lys Val His Ser Gln Phe Asp Ser Phe Leu Asp

```

| 235                                                                                                                                                   | 240 | 245 |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| acc atc att gat gaa cat act att ggc acg ggc cgt cat gtt gac atg<br>Thr Ile Ile Asp Glu His Thr Ile Gly Thr Gly Arg His Val Asp Met<br>250 255 260     |     |     | 824  |
| tta agc aca atg att tca ctc aaa gat aat gcc gat gga gag gga ggg<br>Leu Ser Thr Met Ile Ser Leu Lys Asp Asn Ala Asp Gly Glu Gly Gly<br>265 270 275     |     |     | 872  |
| aag ctt tgc ttc atc gag atc aaa gct ctt cta ctg aac tta ttc tca<br>Lys Leu Ser Phe Ile Glu Ile Lys Ala Leu Leu Leu Asn Leu Phe Ser<br>280 285 290     |     |     | 920  |
| gcg gga acg gac acg tca tct agt acc gtg gaa tgg gga ata gcg gaa<br>Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Thr Val Glu Trp Gly Ile Ala Glu<br>295 300 305 310     |     |     | 968  |
| ctc att cgc cac cca cag cta atg aaa caa gcg caa gaa gaa atg gac<br>Leu Ile Arg His Pro Gln Leu Met Lys Gln Ala Gln Glu Glu Met Asp<br>315 320 325     |     |     | 1016 |
| att gta att gga aaa aac cgg ctt gta aca gaa atg gac ata agc caa<br>Ile Val Ile Gly Lys Asn Arg Leu Val Thr Glu Met Asp Ile Ser Gln<br>330 335 340     |     |     | 1064 |
| cta aca ttc ctc caa gcc att gtg aaa gaa acg ttt aga ctc cac ccc<br>Leu Thr Phe Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Thr Phe Arg Leu His Pro<br>345 350 355     |     |     | 1112 |
| gcg acg cca ctt tcc ctg cca agg att gca tgc gaa agc tgt gag gtc<br>Ala Thr Pro Leu Ser Leu Pro Arg Ile Ala Ser Glu Ser Cys Glu Val<br>360 365 370     |     |     | 1160 |
| aag ggg tat cat gtt cct aag gga tcc ata ctc ttt gtt aac gtg tgg<br>Lys Gly Tyr His Val Pro Lys Gly Ser Ile Leu Phe Val Asn Val Trp<br>375 380 385 390 |     |     | 1208 |
| gcc att gct cga caa tca gaa ttg tgg acc gac cca ctt gaa ttt cgg<br>Ala Ile Ala Arg Gln Ser Glu Leu Trp Thr Asp Pro Leu Glu Phe Arg<br>395 400 405     |     |     | 1256 |
| cct ggt cgt ttc cta atc cca gga gaa aaa cct aat gtt gaa gtg aag<br>Pro Gly Arg Phe Leu Ile Pro Gly Glu Lys Pro Asn Val Glu Val Lys<br>410 415 420     |     |     | 1304 |
| cca aat gat ttc gaa att gta cca ttc ggg gga gga cga agg att tgt<br>Pro Asn Asp Phe Glu Ile Val Pro Phe Gly Gly Gly Arg Arg Ile Cys<br>425 430 435     |     |     | 1352 |
| gca ggt atg agc ctc gga ttg aga atg gtc aat ttg ctt att gca aca<br>Ala Gly Met Ser Leu Gly Leu Arg Met Val Asn Leu Leu Ile Ala Thr<br>440 445 450     |     |     | 1400 |
| ttg gtt caa gcc ttt gat tgg gaa ttg gct aat ggg tta gag cca gaa<br>Leu Val Gln Ala Phe Asp Trp Glu Leu Ala Asn Gly Leu Glu Pro Glu<br>455 460 465 470 |     |     | 1448 |
| aag ctt aac atg gaa gaa gtg ttt ggg att agc ctt caa agg gtt caa<br>Lys Leu Asn Met Glu Glu Val Phe Gly Ile Ser Leu Gln Arg Val Gln<br>475 480 485     |     |     | 1496 |
| ccc ttg ttg gtg cac ccg agg cca agg tta gcc cgt cac gta tac gga<br>Pro Leu Leu Val His Pro Arg Pro Arg Leu Ala Arg His Val Tyr Gly<br>490 495 500     |     |     | 1544 |

111

acg ggt taaggaaata aactgcoctgt ttgtaagata aatctgtttg aatttatgta 1600  
Thr Gly

ttaaataggtt atgctaagaa ctatTTTTtac aaataaaaagt atattgggttt gaaaaaaaaa 1660

aaaaaaaa 1667

<210> 78  
<211> 504  
<212> PRT  
<213> Cineraria

<400> 78

Met Ser Ile Leu Thr Leu Ile Cys Thr Phe Ile Thr Gly Leu Met Phe  
1 5 10 15

Tyr Gly Leu Val Asn Leu Leu Ser Arg Arg Ala Ser Arg Leu Pro Pro  
20 25 30

Gly Pro Thr Pro Trp Pro Ile Ile Gly Asn Leu Met His Leu Gly Lys  
35 40 45

Leu Pro His His Ser Leu Ala Asp Leu Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Leu  
50 55 60

Ile His Val Arg Leu Gly Ser Val Asp Val Val Val Ala Ser Ser Ala  
65 70 75 80

Ser Val Ala Gly Gln Phe Leu Lys Val His Asp Ala Asn Phe Ala Asn  
85 90 95

Arg Pro Pro Asn Ser Gly Ala Lys His Met Ala Tyr Asn Tyr His Asp  
100 105 110

Met Val Phe Ala Pro Tyr Gly Pro Arg Trp Arg Met Leu Arg Lys Met  
115 120 125

Cys Ser Met His Leu Phe Ser Ala Lys Ala Leu Thr Asp Phe Arg Gln  
130 135 140

Val Arg Gln Glu Glu Val Met Ile Leu Thr Arg Val Leu Ala Gly Thr  
145 150 155 160

Glu Gln Ser Ala Val Lys Leu Asp Gln Gln Leu Asn Val Cys Phe Ala  
165 170 175

Asn Thr Leu Ser Arg Met Met Leu Asp Arg Arg Val Phe Gly Asp Gly  
180 185 190

Asp Pro Lys Ala Asp Asp Tyr Lys Asp Met Val Val Glu Leu Met Thr  
195 200 205

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

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

Phe Asp Ser Phe Leu Asp Thr Ile Ile Asp Glu His Thr Ile Gly Thr  
245 250 255

Gly Arg His Val Asp Met Leu Ser Thr Met Ile Ser Leu Lys Asp Asn  
260 265 270

Ala Asp Gly Glu Gly Gly Lys Leu Ser Phe Ile Glu Ile Lys Ala Leu  
275 280 285

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

Glu Trp Gly Ile Ala Glu Leu Ile Arg His Pro Gln Leu Met Lys Gln  
305 310 315 320

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

Glu Met Asp Ile Ser Gln Leu Thr Phe Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu  
340 345 350

Thr Phe Arg Leu His Pro Ala Thr Pro Leu Ser Leu Pro Arg Ile Ala  
355 360 365

Ser Glu Ser Cys Glu Val Lys Gly Tyr His Val Pro Lys Gly Ser Ile  
370 375 380

Leu Phe Val Asn Val Trp Ala Ile Ala Arg Gln Ser Glu Leu Trp Thr  
385 390 395 400

Asp Pro Leu Glu Phe Arg Pro Gly Arg Phe Leu Ile Pro Gly Glu Lys  
405 410 415

Pro Asn Val Glu Val Lys Pro Asn Asp Phe Glu Ile Val Pro Phe Gly  
420 425 430

Gly Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Met Ser Leu Gly Leu Arg Met Val  
435 440 445

Asn Leu Leu Ile Ala Thr Leu Val Gln Ala Phe Asp Trp Glu Leu Ala  
450 455 460

Asn Gly Leu Glu Pro Glu Lys Leu Asn Met Glu Glu Val Phe Gly Ile  
465 470 475 480

Ser Leu Gln Arg Val Gln Pro Leu Leu Val His Pro Arg Pro Arg Leu  
485 490 495

Ala Arg His Val Tyr Gly Thr Gly  
500

<210> 79  
<211> 8552  
<212> DNA  
<213> Cineraria

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> gCi01-pBluestar

<400> 79  
gcgggcgcgg atccccgggaa ttctcgatcc agccatgtgt ctagtacaac catacagacg 60  
attaaaaaaaa aaactttaaa ccacaaaacg ggttttgcaa acgaagaaat tgcctcaaaa 120  
catttccata tggagtttag ggacagagtg cgtttgctac attaaacaac tcttttataa 180  
aaaaacatag cggtagcaga atgacccact aaccgttcat gtccattggc aaaagttact 240  
attgtgagtc ttgtatatac atttaaaaaa aaagaatata tcagttccat aaagggcctg 300  
aaacataagt aagaatatat caatgacgtt cggttcgggt tttggtttat ataaagagaa 360  
cttgatttga aaaattacga gaataacaaa tatttggggg gtcattttat aaaatatcaa 420  
aattttaaaa ctattttaca aaatgttaac aagtaagttg tttttttttt ttttttcaca 480  
agcagttgaa acagtttttg ttgaacgtga agttatagct ttacttgaag tttgatattt 540  
tggcattctg acactacatg tctttctagt gtgaccctta tcttacaact atcacatgtc 600  
aacggttttg tctgtccttt ggatagtata cggctcttctg tttaggacgt ctcgcattgtg 660  
tcctctctat ggtgggtggg tgatcgtatg aatccttagg atcgtagcca tttagaagga 720  
tttccgacat ggaatatcaa tcatgtatat gtacgtttat aattctcggc gttgaaccaa 780  
tgttgtgtcg aactcccgac atcgttcatt tccaaatgtg ttaaaactgt tgtaaggtgt 840  
gaacaaggta taccatattt ttgccaaact tgacaactgc atttttttta tcatgttgtc 900  
acacacctca tacatttate attaaactgg atgactttcc atccaaactt gacaagctct 960  
taaccatttg gcgacatcta aactattcga tagtgactta attcgttaagt taatgcacaa 1020  
atgtcgacaa catattccgc gagtcgcac tggtatggaa cacaaatgga tcaagagggc 1080  
taaaacccat gaggttagaa aattttactt ccaagttcaa gttcatttga tacaagcact 1140  
gcaaaatcat tctgcagact aatctaaatc ttattcttcc agagatgata agttagtttg 1200  
cagctcgggt tttatgtttt cttgatacgt ttatctgtag atgtgatcga aatgatagta 1260  
cacgcgctta tttttttagt tcgtatcgca tatgttagtt aaaaagtctg aaactaactt 1320

|             |             |             |            |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|------|
| aaaaagtttg  | tcattttgaa  | taggtggtag  | ttgaaaatta | ggagtataag | tttacaaggg  | 1380 |
| ttggtgttac  | ttaacaatct  | cctaatacttt | aagtcattct | tttgattttt | cggcataaat  | 1440 |
| atatcgatga  | caatctccct  | acataaacgc  | gattttgggt | aataacctga | ggtagaaata  | 1500 |
| tggetggggg  | tggagaactt  | agtactatca  | caacaaaaac | aggcgaacat | gtggtttagga | 1560 |
| ggccacgggg  | caggccagct  | gggtcaaaaa  | acaggccgaa | accacccatt | atcattaccc  | 1620 |
| gagacagtgc  | caatacgttg  | cgggctcatg  | ccatggaggt | tagcccaggg | tgtgacattg  | 1680 |
| ttgagagctt  | agccactttt  | gctaggagga  | aacaacaagg | gatttgggtg | ctaagtgccg  | 1740 |
| ctggatttgt  | gagcaatgtt  | atgttgcgtc  | aacctggccc | atcacaggct | ggtacggggt  | 1800 |
| cggggcctat  | tgtcacactt  | catggccggt  | ttgagatttt | atctttgggt | ggttctgtat  | 1860 |
| tgccacatcc  | ggctccgcca  | ggtgtcactg  | ggtagccat  | atatttagtt | ggcccgcagg  | 1920 |
| gccaagtcgt  | gggtgggtgcc | attgctggcc  | cactcatgac | atcgggacct | gtggtgctca  | 1980 |
| tggcagccac  | tttcatgaat  | gccactttcg  | ataggttgcc | tatcgaaaaa | gatgaaatgg  | 2040 |
| ttgcagccac  | tactacacac  | gatcgacatc  | accattgtgt | caatgggtgt | tccgatattt  | 2100 |
| atgggacgac  | ccaacaaaac  | atgcttttcta | acacaacctt | ccctcatccc | gagattttata | 2160 |
| cctgggtcaac | ggctcgacca  | ttgtccaagg  | cataagttat | ggaaaagaaa | aaataaaaaa  | 2220 |
| catatagaaa  | gtaaactttt  | aaaacttgtg  | taagcccaaa | ttgtattact | caagatcggc  | 2280 |
| aggcgattta  | cgacctcagt  | tacgtgttta  | agcgtttgat | atgtaaactt | ttacgagcga  | 2340 |
| aaaatgatca  | agaaaattta  | gtcatatgaa  | gttagaagtc | attagattct | gtaatgtaat  | 2400 |
| gtatgtttct  | ggtatcaaaa  | gttattatca  | gtttgtgttt | ctaaatcctt | aacagaatca  | 2460 |
| atatgcattc  | gacttacagt  | gattaagacg  | atcatagaag | ggattatcgt | cacaaaattt  | 2520 |
| agtcagatac  | ttatgaactg  | acaaaatcct  | ttacagaatc | aatatgcatt | agacttacag  | 2580 |
| tgcaaacata  | tacgccgaga  | gctaaaagcg  | acggtgataa | gagtagaatc | gtaatttcac  | 2640 |
| agaatcagca  | gacttcttat  | aaagaaaaca  | caactagaaa | tcaagttcac | aaactacttc  | 2700 |
| atttactaat  | ctttgatgtt  | caacaagtcg  | ttggcgaggg | catgggtact | tccgtaattt  | 2760 |
| cacacaactc  | atgaatgttt  | ttatgaagaa  | aacacttcca | agtataaacc | aagttctcaa  | 2820 |
| actaatatgt  | tcactaatca  | atgacgttcg  | agtaaatac  | acctgaatac | aatgagccta  | 2880 |
| gattttacct  | ggcaattcga  | attttcaaac  | cattgaacta | atcttttgca | ataattctct  | 2940 |
| tgcaccaaga  | tcategggtg  | aacgagaggt  | ccactcctgg | taatggcgaa | gactaccagt  | 3000 |
| gaaatctgta  | aaaagcccgt  | caaggcgtca  | actcccattg | tgtctatcca | gtaattgtat  | 3060 |
| tccatatatg  | ggccttcaca  | gaatttgaaa  | tgcaagaact | ggttttcatt | gcgaaatgtg  | 3120 |
| taaggggtgca | gctgcaagta  | ttagtaaaag  | acgttcgggt | tgacttttga | ggccaacaca  | 3180 |
| tagaaaaatt  | ctactccaat  | tttactcgaa  | gtaatgtgat | tttcaggaaa | gattacaaag  | 3240 |
| aaactcgtaa  | catattaaat  | atgggacaat  | attagtatta | agaacttacc | cagattcaaa  | 3300 |

|                                                                      |      |
|----------------------------------------------------------------------|------|
| tcagtttgaa aatttgaaag ttatatataa agataaaatt tgacctctca aggtcaaaca    | 3360 |
| gagaaatcca actccgttta tacacaacct taacgaaatt ttaagaaaat atcaacgatt    | 3420 |
| accaaaacag ttctaacatg ttaacacgtg gaaacgattc gtctcttgag actaagtaaa    | 3480 |
| ttatatattac attaatgtgt gattctgaaa aaaggctcgtc aaaatatcta ttaaattctaa | 3540 |
| tgtacctgta gattatgggc gtgagctcgg gttttgagat tgggaggcgt ttgaatgtag    | 3600 |
| ttatctttca caggaacaac agtgtctttc catggaccaaa taccgacaac atattctttg   | 3660 |
| atataatttga agtaacgata tgaagtgtt tctgcatacg tctgcaaagt aaaaagaaat    | 3720 |
| cagattataa acatccattg caaactatcc ttgcatcgtg tttggatgtt cgttttaagc    | 3780 |
| gagtatttta tggaataggg agaatacagac aattagttgt aataaaacat gatctttaat   | 3840 |
| tgtgctacta gtttaagtta taatgataat agaaaacatt tagtcttcgg aaaattatat    | 3900 |
| aaattaccaa aatggggtt aactgtttca aaccaaagt ggcaagatgt caggtcggat      | 3960 |
| ggattgggta acgggtcaaa atgggttga ctgaaacatg ttcaaacata gcgcgtaggc     | 4020 |
| cgtagagatt acaaaaattc tccgttccaa ataaggttaa cagatatgac tatgctgact    | 4080 |
| ttttaagtgt caaatgcgat tctcttttcc ggtatgcata aaaaactgac gacggacatt    | 4140 |
| acactatata aaaatttaga aggttataat aaaccaagaa aatataattg tattaaattg    | 4200 |
| tgtgagttat atgaattaca tagaaccttt tatatatggg tgaattacct tgctgaacaa    | 4260 |
| gaaacctaaa cctattagaa atgtctcaaa aatcctaagc ttcaggaata ccttcccggc    | 4320 |
| cttagcgacg aggaagatat gctagagtgt atgtgtgact cgttaaaatc atgaactaga    | 4380 |
| acaaagggaa aggaacaatg ttacaatctc aatgattaga taggatataa ctcgataaca    | 4440 |
| aacctaacca gcagagttag atcaagtggg aagtctttgc ctttgaagac ataggctcgag   | 4500 |
| ggttcgatcc tcactccatg tggctcggagg tttattgggtg aatgcatgct tagctaccgt  | 4560 |
| tcaaagtaac tttattgggtg aatgcatgct tagctaccgt tcaaaatctt caaaaagggg   | 4620 |
| aattatgtct aatatgccat ctaagttcta accaaccctt caaatgttca ttctataat     | 4680 |
| tactaaccaa ttcttacgtt gtcaagtaaa taaaatgagc attctaacc taatctgcac     | 4740 |
| cttcatcact ggtttgatgt tctatgggtt ggtaatttg cttagccgtc gcgctagccg     | 4800 |
| tcttctcca ggtccaacc catggccaat catcggcaac ctaatgcacc ttggtaaact      | 4860 |
| tccacatcac tcgctggcgg acttggcgaa aaagtatggg ccgttgatac atgtccgact    | 4920 |
| agggtcggt gatgttggtg tggcctcgtc tgcgtccgtt gctgggcagt ttttaaagg      | 4980 |
| gcatgatgcg aattttgcc acaggccacc aaattctgga gctaaacata tggcgtataa     | 5040 |
| ttatcatgat atgggtgttg cgccgtatgg tccaagggtg cgaatgcttc gaaagatgtg    | 5100 |
| ctccatgcat ctgttttctg ccaaagcact cactgatttt cgtcaagttc gacaggtttt    | 5160 |
| gtactttcac tttcgtcata tatataggga gattagtacg agaacgaaca cttttaaaat    | 5220 |
| cactttttaa taatcaaaat atcttttttt ttttaacaa aatcatggaa tcttattcaa     | 5280 |

|            |            |            |             |             |             |      |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ataacttttc | taaccttcta | aatttttttt | aattttttta  | tttttttttt  | acttacagtg  | 5340 |
| attaagataa | tcacataaaa | tatatagata | atcacatgaa  | atttttttgtg | attattttagt | 5400 |
| tcaaatacat | tattatcgat | atattttttt | tgattatctt  | aaccaccgta  | aaaaaaattc  | 5460 |
| aaaaataaaa | taaaatctga | gaagggttaa | aaagttatat  | aaataagatt  | ttccgatttt  | 5520 |
| gttttcaaca | ataaaataaa | atttcagaac | gtaataaaaa  | ttgatttttt  | gttaacgaga  | 5580 |
| gtttgtaaca | atagacggtc | aacggaaaaa | gtgtattatc  | tggtgggtatc | accatcggat  | 5640 |
| tatgccaagc | atgcataaaa | aaacaaaatc | gtaactacag  | gaggaggtaa  | cgatactcac  | 5700 |
| gcgcgttttg | gccaggactg | gacaatcggc | agtgaacta   | gatcaacaac  | ttaacgtgtg  | 5760 |
| cttcgcaaac | acattatccc | gaatgatgtt | agacaggaga  | gtatttggag  | acggtgatcc  | 5820 |
| aaaggcggac | gactacaagg | atatggtggt | tgagttgatg  | actttggccg  | gacaattcaa  | 5880 |
| catcggtgac | tacattcctt | ggcttgactt | gcttgacctt  | caaggcattg  | tcaaaaggat  | 5940 |
| gaagaaagtt | cattctcaat | tcgattcgtt | ccttgacacc  | atcattgatg  | aacatactat  | 6000 |
| tggcacgggc | cgtcatgttg | acatgttaag | cacaatgatt  | tcactcaaag  | ataatgccga  | 6060 |
| tggagagggg | gggaagcttt | cgttcatcga | gatcaaagct  | cttctactgg  | tgcgcgtaat  | 6120 |
| acatagtagt | caactttttt | ttttttctgg | taatgactct  | ttgagcaggt  | aaaatgtccc  | 6180 |
| caacaggaat | caaacttggt | acctatcatt | tttgggaaaa  | attttaaaag  | tactagcttt  | 6240 |
| ttcaaaaaga | ttatgaaaag | tatctgtttt | tctggacgat  | tgttaaactt  | accccaaacg  | 6300 |
| catgtcttat | atgcgttccc | ttaatcaaac | gttgaggggtg | cgcatatggt  | acatgcatac  | 6360 |
| cctccaaagg | agttcccatg | cacgttgagg | gtgcacatat  | acacatgcgc  | accctcttcg  | 6420 |
| tggtttgcca | ccaaggcaaa | tcctggagga | cagtcaacct  | ttttgatata  | agttcagatc  | 6480 |
| taactctagg | ctaatactgt | tgatgtttca | gaacttgttc  | tcagcgggaa  | cggacacgtc  | 6540 |
| atctagtacc | gtggaatggg | gaatagcgga | actcatcgc   | caccacagc   | taatgaaaca  | 6600 |
| agcgcaagaa | gaaatggaca | ttgtagttgg | aaaaaacccg  | cttgtaacag  | aaatggacat  | 6660 |
| aagccaacta | acattccttc | aagccattgt | gaaagaaacg  | tttaggctac  | accccgcgac  | 6720 |
| gccactttcc | ctgccaagga | ttgcatcaga | aagctgtgag  | gtcaaggggt  | atcatgttcc  | 6780 |
| taagggatcg | atactctttg | ttaacgtgtg | ggccattgct  | cgacaatcag  | aattgtggac  | 6840 |
| cgacccactt | gaatttcggc | ctggtcgttt | cctaatacca  | ggagaaaaac  | ctaattgttg  | 6900 |
| agtgaagcca | aatgatttcg | aaattgtacc | attcggggga  | ggacgaagga  | tttgtgcagg  | 6960 |
| tatgagcctc | ggattgagaa | tggtcaattt | gcttattgca  | acattgggtc  | aagcctttga  | 7020 |
| ttgggaattg | gctaattggg | tagagccaga | aaagcttaac  | atggaagaag  | tgtttgggat  | 7080 |
| tagccttcaa | agggttcaac | ccttgttggt | gcacccgagg  | ccaaggttag  | cccgtcacgt  | 7140 |
| atacggaacg | ggttaaggaa | ataaactgtc | tgtttgtaag  | atgaatctgt  | ttgaatttat  | 7200 |
| gtattaaata | gttatgctaa | gaactatttt | tacaaataaa  | agtatattgg  | tttgattggt  | 7260 |

```

ctcgcttagc ctttgctaaa tcttagatag atgagttgta taacacatca tcattaactc 7320
acatcacgtg gtaacgattt gtttttgagt taaaattttt aaagaaagga aagaaagaga 7380
aagtaaatat aaaaaaattt gtgttcccga gaagtttttt acgaaggaag aggggagaaa 7440
gagagagaat tttagagaaa ttttgagtat ttacaacaa aaatcatcct ctcatttttg 7500
ggatgatttg gaggatcttt tttctttctt ttcttcgctc cacttcacct ccctttcttt 7560
ccaaaaaat ctcggaaaca tagcgtaatg ataaacaaaa accaataaaa atgagcagga 7620
gcaaacccta gaaggacgaa atcttgaaaa ttattcttaa gattttttaa aaaaacttgg 7680
cagttggaaa gggcggcgga tatcagtagg tagttgtgtc acaacgacca gggcgggtgtg 7740
tcaagaaacc ttgttttgag ttgtgtctat atttaaggct ccaaaatctc cctcgacttc 7800
aaagtgtaca tagaactgcg ttcaaagtga ccgtaggact gcttgtgagt aggagataac 7860
tacaaaatta aacttagtta ggaattagta tgtccgacca aaagattgtg atggttttaga 7920
attaagagac aattacatat attttcaatt aaaactctat aataaaatat ttttcaatca 7980
aattttaaaa taatatatat atatttattt taaaagtata taataatata tttatccaat 8040
caaattttta aataacatat atatatatat tttaaaattt taaattatat atttatccat 8100
ttctatcaat tataataaaa aaataactat tatacctttt ttgataaaac aaaataaaca 8160
tatttaacaa attttattat ataaacttca ataaaatata aaatatatga aataaacaga 8220
aatcgtgtta tcgcttactt gaatcaaata ataagttgca gaagataaaa aaaaaattag 8280
actttgaaaa ataaaataaa aaataatata tggttataaa tactataatt tatcaaaaat 8340
actatatttt atcaaaatcc aaaacaaata gtttttttgt tatgaaaaaa aaaatctcta 8400
cacaaacaca ttaaaatttt ataatttaat ttcaaacttc aattaattat ttgagaagat 8460
tcgttcaata tatttgttaa taaagtggac aataagaatt tatttgcttc aaataaacga 8520
caacatgatt tttgttaatt tcatatatat tg 8552

```

```

<210> 80
<211> 5638
<212> DNA
<213> Cineraria

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Fragmento PvuI-EcoRV de gCi01-pBluestar

```

```

<220>
<221> exón
<222> (2652)..(3092)

```

```

<220>
<221> exón
<222> (3618)..(4046)

```

```

<220>
<221> exón

```

&lt;222&gt; (4449) .. (5090)

&lt;400&gt; 80

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| cgacatcacc attgtgtcaa tgggtgtttcg gatattttatg ggacgaccca acaaaacatg | 60   |
| cttttctaaca caaccctccc tcatcccgag atttatacct ggtcaacggc tgcaccattg  | 120  |
| tccaaggcat aagttatgga aaagaaaaaa taaaaaacat atagaaagta aactttttaa   | 180  |
| acttgtgtaa gcccaaattg tattactcaa gatcggcagg cgattttacga cctcagttac  | 240  |
| gtgttttaagc gtttgatatg taaactttta cgagcgaaaa atgatcaaga aaatttagtc  | 300  |
| atatgaagtt agaagtcatt agattctgta atgtaatgta tgtttctggt atcaaaagtt   | 360  |
| attatcagtt tgtgtttcta aatccttaac agaatcaata tgcattcgac ttacagtgat   | 420  |
| taagacgatc atagaaggga ttatcgtcac aaaatttagt cagatactta tgaactgaca   | 480  |
| aaatccttta cagaatcaat atgcattaga cttacagtgc aaacatatac gccgagagct   | 540  |
| aaaagcgacg gtgataagag tagaatcgta atttcacaga atcagcagac ttctttataaa  | 600  |
| gaaaacacaa ctagaaatca agttcacaaa ctacttcatt tactaatctt tgatgttcaa   | 660  |
| caagtcgttg gcgagggcat ggggtacttcg gtaatttcac acaactcatg aatgttttta  | 720  |
| tgaagaaaac acttccaagt ataaaccaag ttctcaaact aatatgttca ctaatcaatg   | 780  |
| acgttcgagt aaatcacacc tgaatacaat gagcctagat ttacactggc aattcgaatt   | 840  |
| ttcaaaccat tgaactaatc ttttgcaata attctcttgc accaagatca tcgggtgaac   | 900  |
| gagaggtcca ctctggtaa tggcgaagac taccagtga atctgtaaaa agcccgtaa      | 960  |
| ggcgtcaact ccattgtgt ctatccagta attgtattcc atatatgggc cttcacagaa    | 1020 |
| tttgaaatgc aagaactggg ttccattgag aaatgtgtaa ggggtgcagct gcaagtatta  | 1080 |
| gtaaaagacg ttcggtttga cttttgaggt caacacatag aaaaattcta ctccaatttt   | 1140 |
| actcgaagta atgtgatttt caggaaagat taaaagaaa ctcgtaacat attaaatatg    | 1200 |
| ggacaatatt agtattaaga acttaccag attcaaatca gtttgaaaat ttgaaagtta    | 1260 |
| tatataaaga taaaatttga cctctcaagg tcaaacagag aaatccaact ccgtttatac   | 1320 |
| acaaccttaa cgaaatttta agaaaatata aacgattacc aaaacagttc taacatgtta   | 1380 |
| acacgtggaa acgattcgtc tcttgagact aagtaaatta tatttacatt aatgtgtgat   | 1440 |
| tctgaaaaaa ggtcgtcaaa atatctatta aatctaattgt acctgtagat tatgggcgtg  | 1500 |
| agctcgggtt ttgagattgg gaggcgtttg aatgtagtta tctttcacag gaacaacagt   | 1560 |
| gtctttccat ggaccaatac cgacaacata ttctttgata tatttgaagt aacgatctga   | 1620 |
| agtgatttct gcatacgtct gcaaatgaaa aagaaatcag attataaaca tccattgcaa   | 1680 |
| actatccttg catcgtgttt ggatgttcgt ttttagcgag tatttttatgg aatagggaga  | 1740 |
| atcagacaat tagttgtaat aaaacatgat ctttaattgt gctactagtt taagttataa   | 1800 |
| tgataataga aaacatttag tcttcggaaa attatataaa ttaccaaaaa tgggtttaac   | 1860 |
| tgtttcaaac caaaagtggc aagatgtcag gtcggatgga ttgggtaacg ggtcaaaatg   | 1920 |

```

ggttggactg aaacatgttc aaacatagcg cgtaggccgt agagattaca aaaattctcc 1980
gttccaaata aggttaacag atatgactat gctgactttt taagtgtcaa atgcgattct 2040
cttttccggt atgcataaaa aactgacgac ggacattaca ctatataaaa atttagaagg 2100
ttataataaa ccaagaaaat ataattgtat taaattgtgt gagttatatg aattacatag 2160
aaccttttat atatggttga attaccttgc tgaacaagaa acctaaacct attagaaatg 2220
tctcaaaaat cctaagcttc aggaatacct tcccggcctt agcgacgagg aagatatgct 2280
agagtgtatg tgtgactcgt taaaatcatg aactagaaca aagggaagg aacaatgtta 2340
caatctcaat gattagatag gatataactc gataacaaac ctaaccagca gagttagatc 2400
aagtggtaag tctttgcctt tgaagacata ggtcgagggt tcgatcctca ctccatgtgg 2460
tcggagggtt attggtgaat gcatgcttag ctaccgttca aagtaacttt attggtgaat 2520
gcatgcttag ctaccgttca aaatcttcaa aaagggtaat tatgtcta atgccatcta 2580
agttctaacc aacccttcaa atgttcattc ctataattac taaccaattc ttacgttgtc 2640
aagtaaataa a atg agc att cta acc cta atc tgc acc ttc atc act ggt 2690
          Met Ser Ile Leu Thr Leu Ile Cys Thr Phe Ile Thr Gly
              1             5             10

ttg atg ttc tat ggg ttg gtt aat ttg ctt agc cgt cgc gct agc cgt 2738
Leu Met Phe Tyr Gly Leu Val Asn Leu Leu Ser Arg Arg Ala Ser Arg
      15             20             25

ctt cct cca ggt cca acc cca tgg cca atc atc ggc aac cta atg cac 2786
Leu Pro Pro Gly Pro Thr Pro Trp Pro Ile Ile Gly Asn Leu Met His
      30             35             40             45

ctt ggt aaa ctt cca cat cac tcg ctg gcg gac ttg gcg aaa aag tat 2834
Leu Gly Lys Leu Pro His His Ser Leu Ala Asp Leu Ala Lys Lys Tyr
              50             55             60

ggg cgg ttg ata cat gtc cga cta ggg tcc gtt gat gtt gtg gtg gcc 2882
Gly Pro Leu Ile His Val Arg Leu Gly Ser Val Asp Val Val Val Ala
              65             70             75

tcg tct gcg tcc gtt gct ggg cag ttt tta aag gtg cat gat gcg aat 2930
Ser Ser Ala Ser Val Ala Gly Gln Phe Leu Lys Val His Asp Ala Asn
              80             85             90

ttt gcc aac agg cca cca aat tct gga gct aaa cat atg gcg tat aat 2978
Phe Ala Asn Arg Pro Pro Asn Ser Gly Ala Lys His Met Ala Tyr Asn
              95             100             105

tat cat gat atg gtg ttt gcg ccg tat ggt cca agg tgg cga atg ctt 3026
Tyr His Asp Met Val Phe Ala Pro Tyr Gly Pro Arg Trp Arg Met Leu
      110             115             120             125

cga aag atg tgc tcc atg cat ctg ttt tct gcc aaa gca ctc act gat 3074
Arg Lys Met Cys Ser Met His Leu Phe Ser Ala Lys Ala Leu Thr Asp
              130             135             140

ttt cgt caa gtt cga cag gttttgtact ttcactttcg tcatatatat 3122
Phe Arg Gln Val Arg Gln
              145

agggagatta gtacgagaac gaacactttt aaaatcactt ttttaataatc aaaatatctt 3182

```

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ttttttttta aacaaaatca tggaatctta ttcaaataac ttttctaacc ttctaaattt  | 3242 |
| tttttaattt ttttaatttt tttttactta cagtgattaa gataatcaca taaaatatat  | 3302 |
| agataatcac atgaaatttt ttgtgattat ttagttcaaa tacattatta tcgatatatt  | 3362 |
| ttttgtgatt atcttaacca ccgtaaaaaa aattcaaaaa taaaataaaa tctgagaagg  | 3422 |
| ttaaaaaagt tatataaata agattttccg attttgtttt caacaataaa ataaaatttc  | 3482 |
| agaacgtaat aaaaattgat tttttgttaa cgagagtttg taacaataga cggccaacgg  | 3542 |
| aaaatgtgta ttatctggtg gtatcaccat cggattatgc caagcatgca taaaaaaca   | 3602 |
| aaatcgtaac tacag gag gag gta acg ata ctc acg cgc gtt ttg gcc agg   | 3653 |
| Glu Glu Val Thr Ile Leu Thr Arg Val Leu Ala Arg                    |      |
| 150 155                                                            |      |
| act gga caa tcg gca gtg aaa cta gat caa caa ctt aac gtg tgc ttc    | 3701 |
| Thr Gly Gln Ser Ala Val Lys Leu Asp Gln Gln Leu Asn Val Cys Phe    |      |
| 160 165 170 175                                                    |      |
| gca aac aca tta tcc cga atg atg tta gac agg aga gta ttt gga gac    | 3749 |
| Ala Asn Thr Leu Ser Arg Met Met Leu Asp Arg Arg Val Phe Gly Asp    |      |
| 180 185 190                                                        |      |
| ggg gat cca aag gcg gac gac tac aag gat atg gtg gtt gag ttg atg    | 3797 |
| Gly Asp Pro Lys Ala Asp Asp Tyr Lys Asp Met Val Val Glu Leu Met    |      |
| 195 200 205                                                        |      |
| act ttg gcc gga caa ttc aac atc ggt gac tac att cct tgg ctt gac    | 3845 |
| Thr Leu Ala Gly Gln Phe Asn Ile Gly Asp Tyr Ile Pro Trp Leu Asp    |      |
| 210 215 220                                                        |      |
| ttg ctt gac cta caa ggc att gtc aaa agg atg aag aaa gtt cat tct    | 3893 |
| Leu Leu Asp Leu Gln Gly Ile Val Lys Arg Met Lys Lys Val His Ser    |      |
| 225 230 235                                                        |      |
| caa ttc gat tcg ttc ctt gac acc atc att gat gaa cat act att ggc    | 3941 |
| Gln Phe Asp Ser Phe Leu Asp Thr Ile Ile Asp Glu His Thr Ile Gly    |      |
| 240 245 250 255                                                    |      |
| acg ggc cgt cat gtt gac atg tta agc aca atg att tca ctc aaa gat    | 3989 |
| Thr Gly Arg His Val Asp Met Leu Ser Thr Met Ile Ser Leu Lys Asp    |      |
| 260 265 270                                                        |      |
| aat gcc gat gga gag gga ggg aag ctt tcg ttc atc gag atc aaa gct    | 4037 |
| Asn Ala Asp Gly Glu Gly Gly Lys Leu Ser Phe Ile Glu Ile Lys Ala    |      |
| 275 280 285                                                        |      |
| ctt cta ctg gtgcgcgtaa tacatagtag tcaacttttt ttttttctg             | 4086 |
| Leu Leu Leu                                                        |      |
| 290                                                                |      |
| gtaatgactc tttgagcagg taaaatgtcc ccaacaggaa tcaaacttgg tacctatcat  | 4146 |
| ttttgggaaa aattttaaaa gtactagctt tttcaaaaag attatgaaaa gtatctgttt  | 4206 |
| ttctggacga ttgttaaate taccctaaac gcatgtotta tatgcgttcc cttaatcaaa  | 4266 |
| cgttgagggt gcgcatatgg tacatgcata ccctccaaag gagttcccat gcaogttgag  | 4326 |
| gggtgcacata tacacatgcg caccctcttc gtggtttgcc accaaggcaa atcctggagg | 4386 |
| acagtcaacc tttttgatat aagttcagat ctaactctag gctaatactg ttgatgtttc  | 4446 |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| ag aac ttg ttc tca gcg gga acg gac acg tca tct agt acc gtg gaa      | 4493 |
| Asn Leu Phe Ser Ala Gly Thr Asp Thr Ser Ser Ser Thr Val Glu         |      |
| 295 300 305                                                         |      |
| tg gga ata gcg gaa ctc att cgc cac cca cag cta atg aaa caa gcg      | 4541 |
| Trp Gly Ile Ala Glu Leu Ile Arg His Pro Gln Leu Met Lys Gln Ala     |      |
| 310 315 320                                                         |      |
| caa gaa gaa atg gac att gta gtt gga aaa aac cgg ctt gta aca gaa     | 4589 |
| Gln Glu Glu Met Asp Ile Val Val Gly Lys Asn Arg Leu Val Thr Glu     |      |
| 325 330 335                                                         |      |
| atg gac ata agc caa cta aca ttc ctt caa gcc att gtg aaa gaa acg     | 4637 |
| Met Asp Ile Ser Gln Leu Thr Phe Leu Gln Ala Ile Val Lys Glu Thr     |      |
| 340 345 350                                                         |      |
| ttt agg cta cac ccc gcg acg cca ctt tcc ctg cca agg att gca tca     | 4685 |
| Phe Arg Leu His Pro Ala Thr Pro Leu Ser Leu Pro Arg Ile Ala Ser     |      |
| 355 360 365                                                         |      |
| gaa agc tgt gag gtc aag ggg tat cat gtt cct aag gga tcg ata ctc     | 4733 |
| Glu Ser Cys Glu Val Lys Gly Tyr His Val Pro Lys Gly Ser Ile Leu     |      |
| 370 375 380 385                                                     |      |
| ttt gtt aac gtg tgg gcc att gct cga caa tca gaa ttg tgg acc gac     | 4781 |
| Phe Val Asn Val Trp Ala Ile Ala Arg Gln Ser Glu Leu Trp Thr Asp     |      |
| 390 395 400                                                         |      |
| cca ctt gaa ttt cgg cct ggt cgt ttc cta atc cca gga gaa aaa cct     | 4829 |
| Pro Leu Glu Phe Arg Pro Gly Arg Phe Leu Ile Pro Gly Glu Lys Pro     |      |
| 405 410 415                                                         |      |
| aat gtt gaa gtg aag cca aat gat ttc gaa att gta cca ttc ggg gga     | 4877 |
| Asn Val Glu Val Lys Pro Asn Asp Phe Glu Ile Val Pro Phe Gly Gly     |      |
| 420 425 430                                                         |      |
| gga cga agg att tgt gca ggt atg agc ctc gga ttg aga atg gtc aat     | 4925 |
| Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Met Ser Leu Gly Leu Arg Met Val Asn     |      |
| 435 440 445                                                         |      |
| ttg ctt att gca aca ttg gtt caa gcc ttt gat tgg gaa ttg gct aat     | 4973 |
| Leu Leu Ile Ala Thr Leu Val Gln Ala Phe Asp Trp Glu Leu Ala Asn     |      |
| 450 455 460 465                                                     |      |
| ggg tta gag cca gaa aag ctt aac atg gaa gaa gtg ttt ggg att agc     | 5021 |
| Gly Leu Glu Pro Glu Lys Leu Asn Met Glu Glu Val Phe Gly Ile Ser     |      |
| 470 475 480                                                         |      |
| ctt caa agg gtt caa ccc ttg ttg gtg cac cgg agg cca agg tta gcc     | 5069 |
| Leu Gln Arg Val Gln Pro Leu Leu Val His Pro Arg Pro Arg Leu Ala     |      |
| 485 490 495                                                         |      |
| cgt cac gta tac gga acg ggt taaggaaata aactgtctgt ttgtaagatg        | 5120 |
| Arg His Val Tyr Gly Thr Gly                                         |      |
| 500                                                                 |      |
| aatctgtttg aatttatgta ttaaatagtt atgctaagaa ctatttttac aaataaaagt   | 5180 |
| atattgggttt gattgtttctc gcttagcctt tgctaaatct tagatagatg agttgtataa | 5240 |
| cacatcatca ttaactcaca tcacgtggta acgatttggt tttgagttaa aattttttaa   | 5300 |
| gaaaggaaag aaagagaaag taaatataaa aaaatttggtg ttcccagaa gtttttttacg  | 5360 |
| aaggaagagg ggagaaagag agagaatttt agagaaattt tgagtatttt acaacaaaaa   | 5420 |

tcacccctctc atttttggga tgatttggag gatctttttt ctttcttttc cttcgtccac 5480  
ttcacctccc tttctttcca aaaaaatctc ggaaacatag cgtaatgata aacaaaaacc 5540  
aataaaaaatg agcaggagca aaccctagaa ggacgaaatc ttgaaaattt attctaagat 5600  
ttttaaaaaa aacttggcag ttggaaaagg cggcggat 5638

<210> 81  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador primario Ci5a18F1

<400> 81  
catctgtttt ctgccaaagc 20

<210> 82  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> cebador inverso Ci5a18R1

<400> 82  
ggattaggaa acgaccagg 19

<210> 83  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador HANS-F3Hpro500-Fd

<400> 83  
ccaagcttgg cgcgccgcgg ccgcatttaa attactgttc gaacctacaa agg 53

<210> 84  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador MX-F3Hpro-Rv

<400> 84  
tttctagaac gcgtttttta ttttttcttc acacacttg 39

<210> 85  
<211> 53  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador HAPS-RhCHSpro3k-Fd

<400> 85  
ccaagcttgg cgcgcttaa tttaaatttaa atcagcaaga gttgaagaaa tag 53

<210> 86  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador NS-RhCHSpro3k-Rv

<400> 86  
aaagctagca ctagtcatct cggagaaggg tcg 33

<210> 87  
<211> 531  
<212> DNA  
<213> Chrysanthemum

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> CmF3Hpro500

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (1)..(21)

<220>  
<221> primer\_bind  
<222> (507)..(531)

<400> 87  
tactgttcga acctacaaag gaatatcaat acgagggctc aattattgtc tcggattcaa 60  
tgaattcaca aggtaaataa acgcgggtact cttttcattg gtccttcggt ttatttgttt 120  
gacaattaat tgggatggct ggcgtgtata attctcaata catgtctgat ttaatatgtg 180  
attggttgac attcatgtga aattaatata ctcatTTTTat gattacaaag acccacgatg 240  
tataattaat tccaatcttg tggaatggga tccattgtga accggtgcat gattggttacg 300  
gtggggatta cttttgattg gttcagcatt atcatataac ccccggtcaa cggatgcatg 360  
ctacattgggt acgtatacat atacgattca cgtgtggttag ttgataacta gcgcgatacg 420  
ccccacccc atatttcttc aattttctct acaaataccc atgccaacct tacgaaacac 480  
tcattccccct ctactcatag acgcaccaag tgtgtgaaga aaaaataaaa a 531

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/053904

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/29(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12N15/00-15/90, A01H1/00, A01H5/00, C12N5/00-5/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/SCISEARCH/AGRICOLA/CABA/CONFSCI/WPIDS (STN),  
JSTPlus (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y/A       | TANAKA Y, Flower colour and cytochromes P450., Phytochem. Rev., 2006, vol. 5, p. 283-291                                                                                                                                                                                       | 1, 3, 4, 6-8/2, 5     |
| Y/A       | KANNO Y et al., Histochemical analysis of gene expression directed by the promoter of a flavanone 3-hydroxylase gene from Dendranthema x grandiflorum in Petunia hybrida., Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2001, vol. 70, separate volume 2, p. 193 | 1, 3, 4, 6-8/2, 5     |
| Y/A       | Yoshiaki KAN'NO, Naoko KATO, "Kaben de Tokuiteki ni Hatsugen suru Kiku F3H Promoter", National Agricultural Research Center for Tohoku Region Kenkyu Seika Joho, 2002, no. 16, pages 281 to 282                                                                                | 1, 3, 4, 6-8/2, 5     |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 April, 2010 (23.04.10)Date of mailing of the international search report  
11 May, 2010 (11.05.10)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/053904

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                  | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y/A       | KIM Y and PARK S, Identification and characterization of flavanone 3-hydroxylase (F3H) gene from <i>Dendranthema grandiflora</i> ., J. Kor. Soc. Hort. Sci., 2002, vol. 43, p. 666-670                                                                                              | 1, 3, 4, 6-8/2, 5     |
| Y/A       | AIDA R et al., Improved translation efficiency in chrysanthemum and torenia with a translational enhancer derived from the tobacco alcohol dehydrogenase gene., Plant Biotechnol., 2008, vol. 25, p. 69-75                                                                          | 3, 4/5                |
| A         | SEO J et al., Co-expression of flavonoid 3',5'-hydroxylase and flavonoid 3'-hydroxylase accelerates decolorization in transgenic chrysanthemum petals., J. Plant Biol., 2007, vol. 50, p. 626-631                                                                                   | 1-8                   |
| A         | KR 10-0726874 B1 (KOREA RES. INST. BIOSCI. BIOTECHNOL.),<br>14 June 2007 (14.06.2007),<br>& KR 10-2006-0080067                                                                                                                                                                      | 1-8                   |
| A         | AKIM Y, Identification and characterization of flavonoid 3',5'-hydroxylase gene in transgenic <i>Chrysanthemum jawadskii</i> ., Plant Physiol., 1997, vol. 114, no. 3(suppl.), p. 299 (Abstract No. 1563)                                                                           | 1-8                   |
| A         | WO 1994/028140 A1 (INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PTY. LTD.),<br>08 December 1994 (08.12.1994),<br>examples 12, 13, 23<br>& US 5948955 A & EP 703982 A1<br>& JP 8-511683 A                                                                                                       | 1-8                   |
| A         | KANNO Y et al., Expression of anthocyanin biosynthetic genes in 3 cultivars of chrysanthemum., Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2000, vol. 69, separate volume 1, p. 355                                                                                  | 1-8                   |
| A         | PARK S Y and KIM Y H, GenBank Accession: U86837 [online], 1999.03.08 updated, [retrieved from the Internet (2010.04.19)], ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?2801406:NCBI:994364">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?2801406:NCBI:994364</a> ) | 1-8                   |
| P, Y/P, A | WO 2009/062253 A1 (INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PTY. LTD.),<br>22 May 2009 (22.05.2009),<br>(Family: none)                                                                                                                                                                     | 1, 3, 4, 6-8/2, 5     |

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP2010/053904

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

AOKI, Atsushi  
SEIWA PATENT & LAW, Toranomom 37 Mori Bldg.,  
5-1, Toranomom 3-chome, Minato-ku, Tokyo  
1058423  
JAPON

|                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>29 September 2011 (29.09.2011) |
| Applicant's or agent's file reference<br>Y540-PCT                  |
| International application No.<br>PCT/JP2010/053904                 |

|                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------|
| IMPORTANT NOTIFICATION                                                   |
| International filing date (day/month/year)<br>09 March 2010 (09.03.2010) |

|                                                                                                                                                                            |                                                                               |                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| 1. The following indications appeared on record concerning:                                                                                                                |                                                                               |                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> the applicant                                                                                                                          | <input type="checkbox"/> the inventor                                         | <input type="checkbox"/> the agent |
| <input type="checkbox"/> the common representative                                                                                                                         |                                                                               |                                    |
| Name and Address<br>National Agriculture and Food Research Organization<br>3-1-1, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki<br>3058517<br>Japan                                      | State of Nationality<br>JP                                                    | State of Residence<br>JP           |
|                                                                                                                                                                            | Telephone No.                                                                 |                                    |
|                                                                                                                                                                            | Facsimile No.                                                                 |                                    |
|                                                                                                                                                                            | E-mail address                                                                |                                    |
| 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:                                                          |                                                                               |                                    |
| <input type="checkbox"/> the person                                                                                                                                        |                                                                               |                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> the name                                                                                                                               |                                                                               |                                    |
| <input type="checkbox"/> the address                                                                                                                                       |                                                                               |                                    |
| <input type="checkbox"/> the nationality                                                                                                                                   |                                                                               |                                    |
| <input type="checkbox"/> the residence                                                                                                                                     |                                                                               |                                    |
| Name and Address<br>Incorporated Administrative Agency National Agriculture and Food Research<br>Organization<br>3-1-1 Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki<br>3058517<br>Japan | State of Nationality<br>JP                                                    | State of Residence<br>JP           |
|                                                                                                                                                                            | Telephone No.                                                                 |                                    |
|                                                                                                                                                                            | Facsimile No.                                                                 |                                    |
|                                                                                                                                                                            | E-mail address<br><input type="checkbox"/> Notifications by e-mail authorized |                                    |
| 3. Further observations, if necessary:                                                                                                                                     |                                                                               |                                    |
| 4. A copy of this notification has been sent to:                                                                                                                           |                                                                               |                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority    |                                    |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority                                                                                                             | <input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned          |                                    |
| <input type="checkbox"/> the Authority(ies) specified for supplementary search                                                                                             | <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned                        |                                    |
| <input type="checkbox"/> other:                                                                                                                                            |                                                                               |                                    |

|                                                                                               |                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>Iwamoto Mitsuyo<br>e-mail pt07.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 07 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

AOKI, Atsushi  
SEIWA PATENT & LAW, Toranomom 37 Mori Bldg.,  
5-1, Toranomom 3-chome, Minato-ku, Tokyo  
1058423  
JAPON

|                                                                    |
|--------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>29 September 2011 (29.09.2011) |
| Applicant's or agent's file reference<br>Y540-PCT                  |
| International application No.<br>PCT/JP2010/053904                 |

|                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------|
| IMPORTANT NOTIFICATION                                                   |
| International filing date (day/month/year)<br>09 March 2010 (09.03.2010) |

|                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                            |                                                                               |                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 1. The following indications appeared on record concerning:                                                                                                                                                                                 |                                                                            |                                                                               |                                                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> the applicant                                                                                                                                                                                           | <input checked="" type="checkbox"/> the inventor                           | <input type="checkbox"/> the agent                                            | <input type="checkbox"/> the common representative                              |
| Name and Address<br>KISHIMOTO, Sanae<br>c/o National Institute of Floricultural Science, National Agriculture and Food<br>Research Organization, 2-1, Fujimoto,Tsukuba-shi, Ibaraki<br>3058519<br>Japan                                     |                                                                            | State of Nationality<br>JP                                                    | State of Residence<br>JP                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                            | Telephone No.                                                                 |                                                                                 |
|                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                            | Facsimile No.                                                                 |                                                                                 |
|                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                            | E-mail address                                                                |                                                                                 |
| 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:                                                                                                                           |                                                                            |                                                                               |                                                                                 |
| <input type="checkbox"/> the person                                                                                                                                                                                                         | <input checked="" type="checkbox"/> the name                               | <input checked="" type="checkbox"/> the address                               | <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence |
| Name and Address<br>SATO, Sanae<br>c/o National Institute of Floricultural Science,<br>Incorporated Administrative Agency National Agriculture<br>and Food Research Organization,<br>2-1, Fujimoto,Tsukuba-shi, Ibaraki<br>3058519<br>Japan |                                                                            | State of Nationality<br>JP                                                    | State of Residence<br>JP                                                        |
|                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                            | Telephone No.                                                                 |                                                                                 |
|                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                            | Facsimile No.                                                                 |                                                                                 |
|                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                            | E-mail address<br><input type="checkbox"/> Notifications by e-mail authorized |                                                                                 |
| 3. Further observations, if necessary:                                                                                                                                                                                                      |                                                                            |                                                                               |                                                                                 |
| 4. A copy of this notification has been sent to:                                                                                                                                                                                            |                                                                            |                                                                               |                                                                                 |
| <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office                                                                                                                                                                                    | <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority |                                                                               |                                                                                 |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority                                                                                                                                                                              | <input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned       |                                                                               |                                                                                 |
| <input type="checkbox"/> the Authority(ies) specified for supplementary search                                                                                                                                                              | <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned                     |                                                                               |                                                                                 |
|                                                                                                                                                                                                                                             | <input type="checkbox"/> other:                                            |                                                                               |                                                                                 |

|                                                                                               |                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>Iwamoto Mitsuyo<br>e-mail pt07.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 07 |
| Facsimile No. +41 22 338 90 90                                                                |                                                                                                         |

128

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP2010/053904

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

To:

AOKI, Atsushi  
SEIWA PATENT & LAW, Toranomom 37 Mori Bldg.,  
5-1, Toranomom 3-chome, Minato-ku, Tokyo  
1058423  
JAPON

|                                                                    |                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Date of mailing (day/month/year)<br>29 September 2011 (29.09.2011) |                                                                          |
| Applicant's or agent's file reference<br>Y540-PCT                  | IMPORTANT NOTIFICATION                                                   |
| International application No.<br>PCT/JP2010/053904                 | International filing date (day/month/year)<br>09 March 2010 (09.03.2010) |

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant      ☒ the inventor      ☐ the agent      ☐ the common representative

|                                                                                                                                                                                                                                            |                            |                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Name and Address<br>1) NODA, Naonobu 2) AIDA, Ryutaro 3) OHMIYA, Akemi<br>c/o National Institute of Floricultural Science, National Agriculture and Food<br>Research Organization, 2-1, Fujimoto, Tsukuba-shi, Ibaraki<br>3058519<br>Japan | State of Nationality<br>JP | State of Residence<br>JP |
|                                                                                                                                                                                                                                            | Telephone No.              |                          |
|                                                                                                                                                                                                                                            | Facsimile No.              |                          |
|                                                                                                                                                                                                                                            | E-mail address             |                          |

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person      ☐ the name      ☒ the address      ☐ the nationality      ☐ the residence

|                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                               |                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Name and Address<br>1) NODA, Naonobu 2) AIDA, Ryutaro 3) OHMIYA, Akemi<br>c/o National Institute of Floricultural Science,<br>Incorporated Administrative Agency National Agriculture<br>and Food Research Organization,<br>2-1, Fujimoto, Tsukuba-shi, Ibaraki<br>3058519<br>Japan | State of Nationality<br>JP                                                    | State of Residence<br>JP |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Telephone No.                                                                 |                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Facsimile No.                                                                 |                          |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                     | E-mail address<br><input type="checkbox"/> Notifications by e-mail authorized |                          |

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

|                                                                                |                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office                       | <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority |
| <input type="checkbox"/> the International Searching Authority                 | <input checked="" type="checkbox"/> the designated Offices concerned       |
| <input type="checkbox"/> the Authority(ies) specified for supplementary search | <input type="checkbox"/> the elected Offices concerned                     |
|                                                                                | <input type="checkbox"/> other:                                            |

|                                                                                               |                                                                                                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO<br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer<br><br>Iwamoto Mitsuyo<br>e-mail pt07.pct@wipo.int<br>Telephone No. +41 22 338 74 07 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Facsimile No. +41 22 338 90 90



**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**  
**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**  
**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN**  
**SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT**

|                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(21) N° de solicitud:</p> <p>(22) Fecha de solicitud:</p> <p>(30) Prioridad    (31) <b>Prioridad</b>    (32) <b>Fecha</b>    (33) <b>País</b><br/> <b>2009-107054</b>                      <b>24/04/2009</b>                      <b>JP</b></p> | <p>(51) Int Cl:                      <b>C12N 015/029</b></p> <p>(71) Solicitante(s)            <b>INCORPORATED ADMINISTRATIVE AGENCY NATIONAL AGRICULTURE AND FOOD RESEARCH ORGANIZATION y SUNTORY HOLDINGS LIMITED</b></p> <p>(72) Inventor(es)              <b>NAONOBU NODA Y OTROS</b></p> <p>(74) Apoderado:                <b>LUZ CLEMENCIA DE PAEZ</b></p> |
| <p>(85) Fecha limite inicio fase nacional:    <b>24/11/2011</b></p> <p>(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT</p> <p>Fecha de presentación de la solicitud:    <b>09/03/2010</b></p> <p>No. de solicitud PCT/JP2010/053904</p> | <p>(87) Publicación internacional</p> <p>Fecha:                                <b>28/10/2010</b></p> <p>N° publicación:                   <b>WO 2010/122849</b></p>                                                                                                                                                                                              |
| <p>(54) Título:    <b>MÉTODO PARA PRODUCCIÓN DE UNA PLANTA DE CRISANTEMO QUE TIENE PÉTALOS QUE CONTIENEN DELFINIDINA</b></p>                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

### Resumen:

Se divulgan: un método para producir una planta de crisantemo, que tiene pétalos que contienen delfinidina, utilizando una región reguladora de transcripción para un gen de la flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo; y una planta de crisantemo, una progenie o un producto de proliferación vegetativa de la planta, o una parte o un tejido de la planta, la progenie o el producto de proliferación vegetativa, y particularmente un pétalo o una flor cortada de la planta. En el método para producir una planta de crisantemo, que tiene pétalos que contienen delfinidina, se hace que una flavonoides 3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) se exprese en una planta de crisantemo, utilizando una región reguladora de transcripción para un gen de flavanona 3-hidroxilasa (F3H) derivado de crisantemo.

130

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
NIT : 800.176.089-2  
-/-



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 101381

Bogotá D.C., Octubre 14 de 2011 - 17:10:34

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

\*\*\* Soporte del Pago \*\*\*

| TIPO PAGO    | BANCO           | CUENTA    | No. PAGO  | FECHA PAGO | VR PAGO       |
|--------------|-----------------|-----------|-----------|------------|---------------|
| CONSIGNACION | BANCO DE BOGOTA | 062754387 | 431629995 | 14/10/2011 | 41.725.000.00 |

\*\*\* Conceptos Pagados \*\*\*

| CANT. | RENTISTICO              | CONCEPTO                                   | Vr.UNDITARIO | Vr. CONCEPTO |
|-------|-------------------------|--------------------------------------------|--------------|--------------|
| 1     | 50005-01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN | 571.000.00   | 571.000.00   |
|       |                         |                                            |              | \$571.000.00 |

SON: \*\*QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE\*\*

Responsable: \_\_\_\_\_  
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
  
No. 11-143300- -00000-0000  
Fecha: 2011-10-24 17:20:57 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR  
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI  
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

COLO: 18835-841-001-0

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE I

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
  - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
  - ☐ Descripción de la invención
  - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
  - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
  - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
  - ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
  - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
  - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
  - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
  - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
  - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
  - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
  - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐