

46

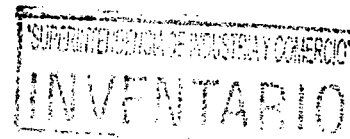
Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

B1
Organización y
Digitalización CSA Ltda
OK/ST
PCT



SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

09-106063

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

METODO PARA PRODUCIR UNA PLANTA QUIMERICA CON UNA CAPA
SUPERFICIAL TRANSGENICA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PROPRIETARY LIMITED

DOMICILIO

BUNDOORA, VICTORIA, AUSTRALIA

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. 09-106063- -00000-0000

Fecha: 2009-09-28 17:31:28 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
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: **INTERNATIONAL FLOWER
DEVELOPMENTS PROPRIETARY
LIMITED**Sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Australia.Dirección: 1 Park Drive,
Bundoora,
Victoria-3083,
AustraliaDomicilio: Bundoora,
Victoria,
Australia**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

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓNC.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 35.456.344T.P 23.555**4****INVENTOR (ES)
(72)****1. Junichi TOGAMI**
c/o Suntory Limited,
Research Center,
1-1-1, Wakayamadai,
Shimamoto-cho,
Mishima-gun,
Osaka 6188503,
Japón**2. Ekaterina MOURADOVA**
8 Francis Walton Road,
Mill Park,
Victoria 3082,
Australia**5****PCT (86)**Solicitud Internacional No. PCT/JP2008/056746Fecha: 28 de marzo de 2008Publicación Internacional No. WO 2008/120820 A1Fecha: 9 de octubre de 2008**6****Título (54)****MÉTODO PARA PRODUCIR UNA PLANTA QUIMÉRICA CON UNA CAPA
SUPERFICIAL TRANSGÉNICA****7****Clasificación Internacional (51) C12N 015/009****8****Prioridad**SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

JPJP

(32) Fecha

29 de marzo de 20072 de agosto de 2007

(31) Número de Solicitud

2007-0892592007-202291**9**Comprobante de pago No.: 09 – 70,565Fecha: 21 de septiembre de 2009Comprobante de pago No.: 09 – 66,575Fecha: 7 de septiembre de 2009Comprobante de pago No.: 09 – 68,588Fecha: 14 de septiembre de 2009

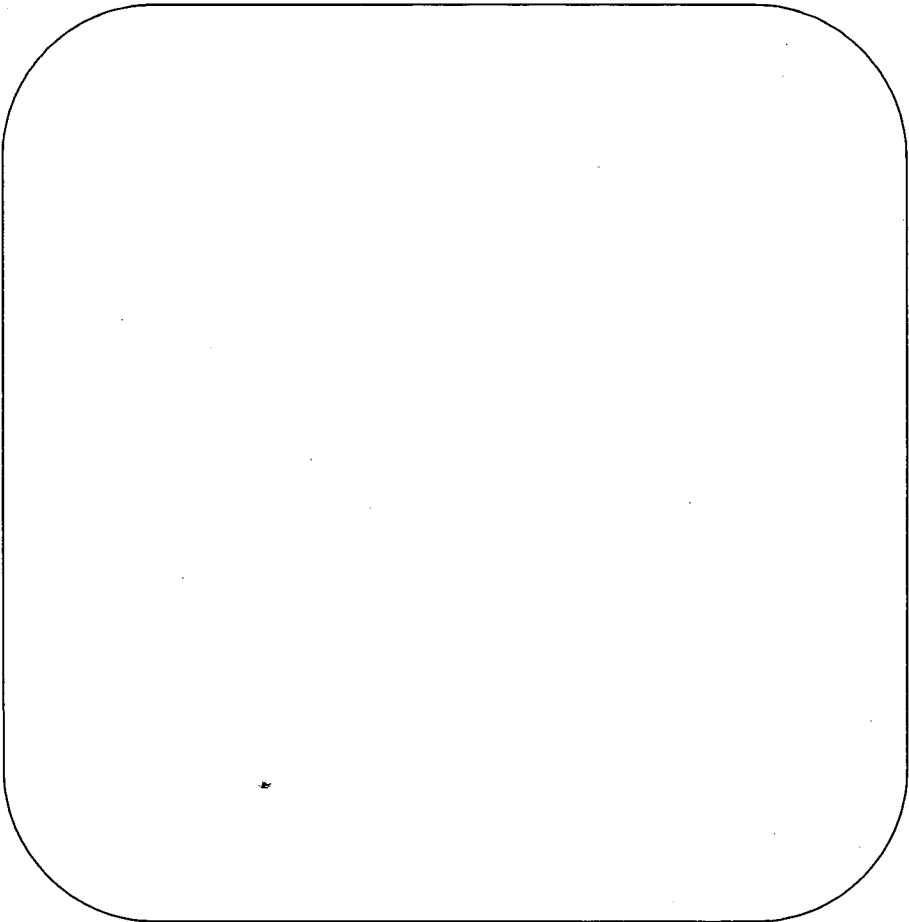
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.
- ☒ Comprobante de pago por 15 reivindicaciones adicionales después de la decimoquinta reivindicación por 375.000.oo.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ 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.
- ☒ 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

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/120820 A1

Descripción:

Páginas 34 en el idioma original

Páginas 45 en español

Reivindicaciones: Número (s) 30

Figuras: Número (s) 3

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

3. ☒ Listado de Secuencias.

4. ☒ Extracto de publicación.

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

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned
INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PROPIETARY LIMITED

domiciliado (s) en/of _____

1 Park Drive, Bundoora, Victoria -3083, Australia

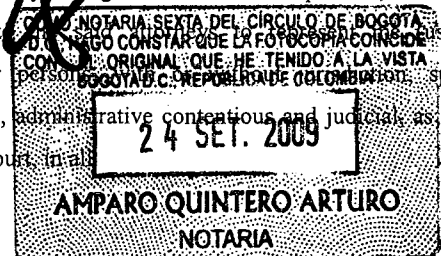
Hereby ratify the patent application No. 06. 024. 513 filed by Emilio FERRERO before the Colombian Patent Office on March 10, 2006.

Por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize them to act before any authorities or persons, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all



6

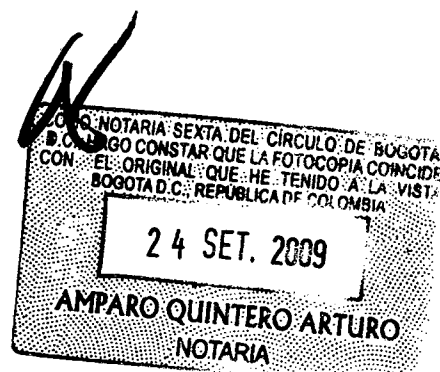
arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; 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 u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes o funcionarios.

matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 31st August 2006
en/in Melbourne, Australia
por: TOSHIHIKO ASHIKARI, Director

INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PROPRIETARY LIMITED

Toshi Ashikari



[Handwritten signature]

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de

de la compañía

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de

que la dirección de dicha compañía es

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en

El

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of

TOSHIHIKO ASHIKARI
is authentic, that the signatory currently acts in the position of Director

of the company INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PROPRIETARY LIMITED

a company currently existing and organized under the laws of Australia

that the address is 1 Park Drive, Bundoora, Victoria 3083, Australia

and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

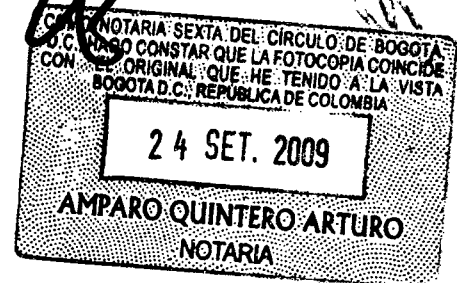
Given and signed in Melbourne Australia

On 31st August 2006

El Notario Público - The Notary Public
(Firma-sello) (Signature-seal)

PETER ZOUPA
Notary Public
Melbourne Victoria
Australia

My Commission is not
limited by time



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: Australia

This public document

2. has been signed by P. ZOUPA

3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

4. bears the seal/stamp of PETER ZOUPA

NOTARY PUBLIC

Certified

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. DEBO CONSTAR QUE LA FOTOCopia COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

24 SET. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

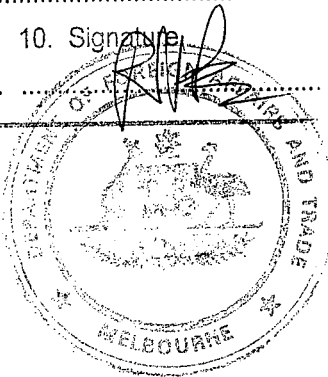
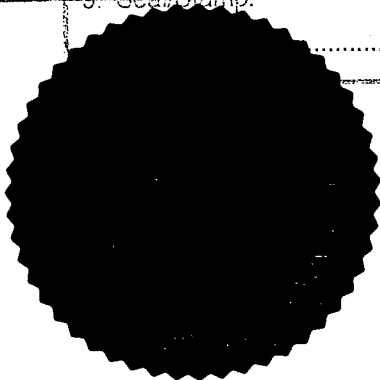
5. at: MELBOURNE 6. 21-09-2009

7. by: RANU YATANA

8. M 47520

9. Seal/Stamp:

10. Signature



8

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 13/10.06 preparada por María Elvira Martelo, Traductora Oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante Resolución No. 2879 de 1995 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un Documento de Representación y Poder escrito en inglés y español, mediante el cual **INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PROPRIETARY LIMITED**, sociedad domiciliada en 1 Park Drive, Bundoora, Victoria 3083, Australia, otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ y GERMAN CAVELIER**.

Dado y firmado el 31 de agosto de 2006

En Melbourne, Australia

Por Toshihiko Ashikari, Director

INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PROPRIETARY LIMITED

[Firma ilegible]

CERTIFICACIÓN NOTARIAL en inglés y español referente a la capacidad legal de Toshihiko Ashikari para otorgar poder y a la existencia legal de **INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PROPRIETARY LIMITED**.

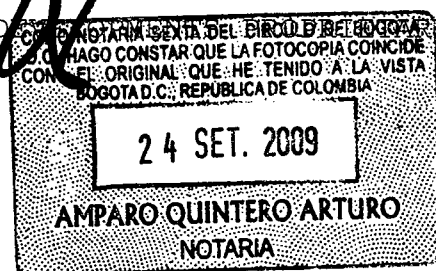
Dado y firmado en Melbourne, Australia

el 31 de agosto de 2006

[Firma ilegible], Notario Público.

Sello: **PETER ZOUPA**, Notario Público, Melbourne, Australia. Mi comisión no tiene límite en el tiempo.

(Sello de oblea de **PETER ZOUPA**, Notario Público)



9

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Australia

Este documento público

2. Ha sido firmado por P. ZOUPA

3. Actuando en su capacidad de Notario Público

4. Lleva el sello/timbre de Peter Zoupa

CERTIFICADO

5. En Melbourne

6. el 21 de septiembre de 2006

7. Por Ranu Vayana

8. No. M 47520

9. Sello: DEPARTAMENTO DE RELACIONES Y COMERCIO EXTERIOR,
MELBOURNE

10. Firma: (Firma ilegible)

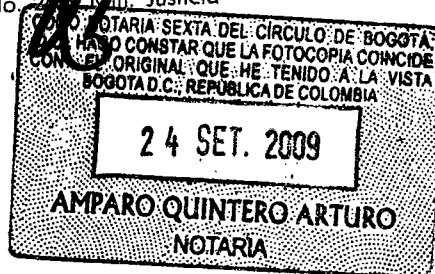
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta
oficina para su confrontación.

COLO 15218-841-001-2

WPC 15218- ID 10

OCT 19/06

Maria Elvira Martelo
TRADUCCION No: 13/10.06
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2981 Min. Justicia



COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA(S) Milagros Pluma
del or febo
 COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
 EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
 SANTAFÉ DE BOGOTÁ, **19 OCT 2006**

NOTARIA SEXTA
 FABIAN RIVERA
 BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA

NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ
 HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
 EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
 BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
24 SET. 2009
AMPARO QUINTERO ARTURO
 NOTARIA

NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
 NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
19 OCT 2006
Pluma
 LEGALIZACIONES
 BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
 MINISTERIO DE EXTERIORES
Pluma 4 pardo
 CUYA FIRMA APARECE EN EL
 CUYA FIRMA APARECE EN EL
 DOCUMENTO QUE HE TENIDO A LA VISTA
 LAS FUNCIONES INDICADAS

(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
2008 年 10 月 9 日 (09.10.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/120820 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

(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 3 7 森ビ
ル青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2008/056746

(22) 国際出願日: 2008 年 3 月 28 日 (28.03.2008)

(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2007-089259 2007 年 3 月 29 日 (29.03.2007) JP
特願2007-202291 2007 年 8 月 2 日 (02.08.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): イン
ターナショナル フラワー ディベロプメンツ プ
ロプライアタリー リミティド (INTERNATIONAL
FLOWER DEVELOPMENTS PROPRIETARY LIM-
ITED) [AU/AU]; 3083 ヴィクトリア州 バンドーラ,
パークドライブ 1 Victoria (AU).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 戸上 純一
(TOGAMI, Junichi) [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). ムラドバエカテリナ (MOURADOVA,
Ekaterina) [AU/AU]; 3082 ヴィクトリア州 ミルパー
ク フランシスワルトンロード 8 Victoria (AU).

(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, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING TRANSGENIC SURFACE CHIMERIC PLANT

(54) 発明の名称: 表層キメラ形質転換植物の作出方法

(57) Abstract: It is intended to produce a rose in which an introduced gene is present in part of cells, for example, cells in L1 layer of petals or the like, and is not present in other cells, for example, germ cells such as pollen cells and ovule cells. Even when this rose is crossed with other roses, the introduced gene is not spread to the other roses, therefore, the possibility of spread of introduced gene can be completely denied.

(57) 要約: 導入遺伝子が一部の細胞、例えば花弁のL1層の細胞等に存在し、他の細胞、例えば花粉細胞や胚珠細胞などの生殖細胞には存在しないバラを作出する。このバラは他のバラと交雑しても導入遺伝子が他のバラに伝播しないので、導入遺伝子拡散の可能性を完全に否定することができる。

WO 2008/120820 A1

明 細 書

表層キメラ形質転換植物の作出方法

技術分野

本発明は一部の細胞にのみ導入遺伝子を有するキメラの遺伝子組換え植物を作出する方法を提供するものである。

背景技術

複数の遺伝的に異なる細胞群よりなる個体はキメラと呼ばれる。植物のキメラはその構造から周縁キメラ、部分キメラ及び区分キメラに分けられ、たとえば接木のほかに偶発的あるいは放射線照射による体細胞変異や薬剤処理による染色体倍加によって作製されうる。

区分キメラ (sectorial chimera) は植物の積み重ね構造に起因する非構造的キメラで、成長点に非構造的に混在する変異細胞の増殖により生じる。すなわち、ひとつの組織層自体がキメラであるものを指し、花・葉・茎などの器官に異色の縞として現れることが多い。区分キメラは通常不安定で消失することが多いが、稀に周縁キメラに発展することもある。

周縁キメラ (periclinal chimera) は、植物の組織層構造に起因する構造的キメラで区分キメラが発展し、ひとつの細胞層が変異細胞で完全に置換された状態のものを言う。周縁キメラの場合、ひとつの組織層自体は均一であり、キメラではない。周縁キメラは安定しており、消失する頻度は小さいと言われている。植物の細胞組織は基本的に3つの細胞層より構成されており、外側から第1層 (L1)、第2層 (L2)、第3層 (L3) という組織層構造を持っている。

12

成長点の2層の外皮 (tunica) から生じるのがL1とL2であり、内体 (corpus) から生じるのがL3である。ほとんどの植物種において、表皮は全てL1層から生成し、L2層は生殖細胞系に関係する。これらの細胞層ごとに異なる性質をもつ周縁キメラは園芸的に重要なものが多く産業的価値は高いが、偶発的に、あるいは放射線照射や薬剤処理のような人為的に変異を誘発する手段によっても周縁キメラが得られる確率は極めて低い。

外来遺伝子を植物体へ導入する際に人為的に一部の細胞のみ導入遺伝子を有するキメラ植物を作出するのは容易ではない。これまでは、パーティクルガンを用いた方法によりトウモロコシの未成熟胚に遺伝子を導入し、生殖細胞またはL2細胞層にのみ導入遺伝子を有するキメラ植物を作出した例がある (特表平10-503374号公報)。しかし、アグロバクテリウムを介して遺伝子を導入する場合には、キメラ植物を作出するのは一層難しい。アグロバクテリウムを介して遺伝子を導入する方法においては、マーカー遺伝子の発現による薬剤耐性などの形質を指標として、遺伝子が導入された単一の細胞を選別し、当該単一の遺伝子導入細胞から一個体の形質転換体植物を得る。

よって、通常得られる遺伝子組換え植物は遺伝的に単一の細胞からなり、すべての細胞において導入遺伝子を有するものである。仮に一部の細胞にしか外来遺伝子を有しない植物 (キメラ植物) が得られたとしても、それは偶然の結果であり、現在の技術を以って植物体の特定の部分の細胞にのみ遺伝子が導入されるように制御することは非常に困難である。また偶然得られたとしても、前述のように、一部の細胞層にのみ遺伝子を有する周縁キメラとなる確率は極めて低いと考えられる。

遺伝子導入細胞を選抜する過程において、その一部にのみ外来遺

伝子導入されたキメラ細胞塊あるいはキメラ植物体が出現すること
はあるが、この場合、全細胞層を通してキメラ、もしくはひとつの
組織層自体がキメラとなっており、完全な周縁キメラ（特定の細胞
層にのみ外来遺伝子が導入され、その細胞層自体は均一なもの）で
はない。これまでに完全な周縁キメラ形質転換植物を作出し、それ
を分子生物学的手法で証明した例は極めて少ない。これまでにはro
l遺伝子と脱離因子を含むベクターを用いることにより、周縁キメ
ラ体 that 作出できることを見出した例が報告されている（特開2002-3
15460号）が、この場合はL3層の周縁キメラである。

遺伝子組換え植物においては、染色体に取り込まれた導入遺伝子
はメンデルの法則に従いその子孫にまで安定して伝達される。これ
らの遺伝子組換え植物を交配親として用いることにより、導入遺伝
子に由来する形質を利用してさらに新たな品種が作り出せる。

また、遺伝子組換え植物に関しては、生態系（環境）への影響（
自然界への導入遺伝子の拡散等）が懸念されている。遺伝子組換え
植物から非形質転換体や野生植物への遺伝子拡散を防ぐ技術として
は、（1）母性遺伝の利用、（2）雄性不稔の利用、（3）不稔種
子の利用などが知られている。母性遺伝の利用とは、花粉細胞には
伝わらない葉緑体のゲノムに外来遺伝子を導入することで、花粉に
よる遺伝子拡散を防ぐ方法である。

雄性不稔の利用とは、花粉形成を阻害したり、花粉に生殖能を持
たせない方法をいい、これにより遺伝的隔離を行うことができる。
例えば雄性生殖器官特異的に発現するプロモーターを使って有害な
遺伝子産物を組織特異的に作らせて、花粉形成を阻害する方法など
がある。不稔種子の利用とは遺伝子組換え植物の種子形成を直接阻
害することにより、交雑あるいは種子の拡散の両方を防ぐ方法であ
り、自家採種を不可能にする「ターミネーターテクノロジー」等は

これに該当する。

仮に生殖細胞には導入遺伝子を持たない遺伝子組換え植物を作出することができれば、その組換え植物を花粉親とした場合あるいは種子親とした場合いずれにおいても、交雑による導入遺伝子拡散の可能性を完全に排除できることになる。このことは、遺伝子組換え植物を野外で栽培したり、産業利用したりする者にとっては、遺伝子組換え植物の栽培のための手続きに係る負担を軽減することにもなる。このような手続は、日本国内においては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」に基づく生物多様性影響評価などであり、他の国においては同様の法律に基づく評価がある。

特許文献 1 特表平10-503374号公報

特許文献 2 特開2002-315460号

特許文献 3 USP 5480789

特許文献 4 WO 2005/017147

特許文献 5 PCT/JP96/00348

非特許文献 1 Firoozabady et al. Bio/Technology 12:883-888 1994

非特許文献 2 Lazo et al. Bio/Technology 9: 963-967, 1991

非特許文献 3 Fujiwara et al. Plant J. 16 421-431, 1998

非特許文献 4 Mitsuhara et al. Plant Cell Physiol. 37, 45-59 1996

発明の開示

従って、本発明は、導入遺伝子が植物体の一部分の細胞にのみ存在し、例えば生殖細胞には存在しない遺伝子導入のバラ等の花卉植

物を提供するものである。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、外来遺伝子をアグロバクテリウム・ツメファシエンスを介して花卉植物に導入し、再生した花卉植物がキメラ植物となる場合があることを見出した。さらに、その中から周縁キメラの植物を選択することにより、目的とする遺伝子組換え花卉植物が得られることを見出し、本発明を完成した。従って本発明は、外来遺伝子が一部の細胞に存在し、他の細胞には存在しないバラ等の花卉植物を提供する。

好ましくは、前記一部の細胞は一部の細胞層を構成している。例えば、上記他の細胞は、例えば花粉又は胚珠である。より具体的な例として、前記一部の細胞層が、L1層であるか、またはL1層とL3層とである。外来遺伝子としては、フラボノイドの合成に係る遺伝子、中でもアントシアニンの合成に係る遺伝子等の花色に関する遺伝子が挙げられる。

花卉植物がバラの場合においては、外来遺伝子は、例えばスミレ科植物由来のフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子、ゴマノハグサ科植物由来の芳香族アシル基転移酵素遺伝子が重要である。前記スミレ科植物は例えばスミレ科パンジーであり、前記ゴマノハグサ科植物は例えばゴマノハグサ科トレニアである。前記バラは、例えばバラ品種WKS82などのハイブリッドティー、フロリバンダ、ミニバラである。本発明のバラは導入遺伝子の効果によって、たとえば遺伝子導入前のバラと比べて花色が青色方向に変化している。

花卉植物がカーネーションの場合においては、外来遺伝子は、例えば前記外来遺伝子が、キンギョソウ由来のカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター制御下にあるサルビア由来のフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子 cDNA、ペチュニアのジヒドロフラボノール4-還元酵素の染色遺伝子、カーネーション由来のアントシアニン合

成酵素遺伝子のうちの一ないし複数の遺伝子である。前記カーネーションは、スタンダードタイプまたはスプレータイプのものである。本発明のカーネーションは導入遺伝子の効果によって、たとえば遺伝子導入前のカーネーションと比べて花色が青色方向に変化している。

しかし、外来遺伝子は上記のような遺伝子に限定されるものではなく、広く色素合成系で機能する遺伝子、例えばフラボノイド合成系で機能する遺伝子であってもよい。また外来遺伝子はGFP遺伝子やNPTII遺伝子、GUS遺伝子、SURB遺伝子のような選択マーカーの遺伝子であってもよい。*さらに外来遺伝子は転写因子をコードする遺伝子でもよく、例えばmyb様転写因子をコードする遺伝子、具体的にはPHR1遺伝子やPsr1遺伝子であってもよい。

本発明はまた、上記のバラ等の花卉植物と同じ性質を有するそれらの組織、及びこれらの栄養増殖体を提供する。

本発明は更に、前記のバラ等の花卉植物の製造方法において、外来遺伝子をアグロバクテリウムを介してバラに導入し、そして当該外来遺伝子が一部の細胞にのみ存在するバラを選択する工程を含む方法を提供する。本発明はさらに、請求項3～27のいずれかに1項に記載の、生殖細胞に外来遺伝子をもたない花卉植物を作出することにより自然界への導入遺伝子の拡散を防止する方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、導入された遺伝子の、バラの各器官における存在の有無を示す図である。

図2は、導入された外来遺伝子がL1層の細胞においてのみ発現しており、L2層及びL3層には発現していないことを示す。

図3は、実施例2において使用するバイナリーベクターpSPB130

の構造を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明で用いられる花卉植物は、アグロバクテリウムを介して外来遺伝子を導入可能な花卉植物であれば特に限定されない。例えば、バラ、カーネーション、ペチュニア、トレニア、タバコ、バーベナ、ニーレンベルギア、キク、ユリ、アサガオ、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カランコエ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、チューリップ、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、タイズ、アルファルファ、ルーピン、カリフラワーなどが挙げられる。なかでも、バラ、カーネーション、ペチュニア、トレニア、タバコ、バーベナ、ニーレンベルギアが好ましい。中でも、バラとカーネーションは特に好適に用いることができる。

本発明で用いる外来遺伝子としては、導入後にL1層の細胞で機能する酵素の遺伝子であることが望ましい。例えば花色に関する遺伝子や選択マーカーの遺伝子、あるいは転写因子をコードする遺伝子が好ましい。花色に関する遺伝子としては、フラボノイドの合成に係る酵素の遺伝子、たとえばアントシアニン合成に関わる遺伝子やオーロン合成に関する蛋白質をコードする遺伝子、液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子、脂肪族アシル基転移酵素をコードする遺伝子、フラボン合成酵素をコードする遺伝子などが挙げられる。選択マーカー遺伝子としてはGFP遺伝子やNPTII遺伝子、GUS遺伝子、SURB遺伝子などが挙げられる。転写因子をコードする遺伝子としては、例えばMYB様の転写因子をコードする遺伝子、具体的にはPHR1遺伝子やPsr1遺伝子が挙げられる。しかし、これら具体的に挙げた遺伝子に限定されるものではない。

本発明で用いるバラは、園芸種または野性種のいずれでもよい。なかでも、商業的に有用なハイブリッドティー、フロリバンダ、グランディ・フローラまたはミニバラ等の園芸種 (*Rosa hybrida*) が望ましい。これらの品種は特に限定されない。

バラのカルスに一定の条件下で、アグロバクテリウムを介して、パンジー由来のフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子の発現カセットならびにトレニア由来の芳香族アシル基転移酵素遺伝子NPTII遺伝子の発現カセットからなるT-DNAを導入した。得られた形質転換は導入遺伝子の作用により花色が変化したことから、導入遺伝子が花卉の細胞、とくに色素合成を行っている花卉のL1層の細胞には存在することが示唆された。バラの各々の器官にわけて抽出したゲノムDNAを鋳型とするPCRにより、花粉細胞には導入遺伝子が存在しないことが示唆された。

また、当該組換え植物から得られた花粉を用いて他の園芸種ならびに野生種のバラと交雑試験を行った場合において、得られた種子には導入遺伝子が全く検出されなかった。このことから、導入遺伝子が花粉細胞には含まれていないことが示唆された。更に *in situ* ハイブリダイゼーションによって、導入遺伝子がL1細胞層にのみ存在することが明かとなった。このことは、L2細胞層を起源として形成される花粉などの生殖細胞には導入遺伝子が存在しないことを裏付けるものである。よって、上記のようにしてバラカルスに外来遺伝子を導入することにより、一部の細胞にのみ導入遺伝子を有するキメラ植物を作出することができる。

このうち、フラボノイド類の合成に係る酵素の遺伝子としては、フラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子や芳香族アシル基転移酵素遺伝子が挙げられる。これらの由来は特に限定されないが、バラで機能することが確認されている、パンジーなどスミレ科植物由来のフ

ラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子、あるいは、トレニアなどゴマノハグサ科植物由来の芳香族アシル基転移酵素遺伝子が好ましい。

本発明で用いるカーネーションは、商業的に有用なスタンダードタイプまたはスプレータイプが望ましい。これらの品種は特に限定されない。フィーリングホワイト、ブлекロスドゥジィ、スターザール、コルティナシャネルなどいずれの品種でもよい。

カーネーションについて、一定の条件下で、アグロバクテリウムを介して、キンギョソウ由来のカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター制御下にあるサルビア由来のフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子cDNA、ペチュニアのジヒドロフラボノール4-還元酵素の染色遺伝子、カーネーション由来のアントシアニン合成酵素遺伝子SURB遺伝子を導入した。得られた形質転換は導入遺伝子の作用により花色が変化したことから、導入遺伝子が花卉の細胞、とくに色素合成を行っている花卉のL1層の細胞には存在することが示唆された。カーネーションの各々の器官にわけて抽出したゲノムDNAを鋳型とするPCRにより、導入遺伝子がL1層にのみ存在するキメラ植物であることが判断された。

実施例

次に、本発明を実施例により、更の具体的に説明する。

実施例 1. バラへの遺伝子導入方法

バラの形質転換に関してはすでに多くの方法が報告されており（たとえばFiroozabady et al. Bio/Technology 12:883-888 1994, U S 5480789, WO 2005/017147）、これらの方法に従ってバラへ外来遺伝子を導入することができる。

具体的にはアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) Agl0株 (Lazo et al. Bio/Technology 9: 963-

967, 1991) の菌液中に、無菌苗の葉から誘導したバラのカルスを5分間浸し、滅菌濾紙で余分な菌液を拭き取った後、継代用培地に移植し、2日間暗所で共存培養した。

その後、カルベニシリンを400mg/l 加えたMS液体培地で洗浄し、継代用培地にカナマイシン50mg/l とカルベニシリン200mg/lを加えた選抜・除菌用培地へ移植した。選抜培地上で生育阻害を受けず、正常に増殖する部分の移植と培養を繰り返し、カナマイシン耐性カルスを選抜した。

カナマイシン耐性を示した形質転換カルスを、カナマイシン50mg/l、カルベニシリン200mg/lを添加した再分化用の培地で培養し、カナマイシン耐性シュートを得た。得られたシュートは1/2MS培地（カナマイシンを添加していない）で発根させた後、馴化を行った。馴化個体は鉢上げ後、閉鎖系温室で栽培して開花させた。その後、通常の栄養増殖（挿し木）にて維持・増殖を行った。

実施例 2. バイナリーバクターpSPB130の構築

アントシアニンを芳香族アシル基により修飾することによりアントシアニンを安定化させ、かつその色を青くすることができる（たとえば、PCT/JP96/00348）。アシル化したデルフィニジン型アントシアニンの生産を目指して以下の実験を行った。

トレニア（商品名：サマーウェーブ（商標））の花弁からtotal RNAを得、さらにこれからpolyA+RNAを調製した。このpolyA+RNAからλZAPII（Stratagene社）をベクターとするcDNAライブラリーをdirectional cDNAライブラリー作製キット（Stratagene社）を用いて製造者が推奨する方法で作製した。

トレニアの主要アントシアニンはその5位のグルコースが芳香族アシル基により修飾されている（Suzuki et al. Molecular Breeding 6, 239-246, 2000）ので、トレニア花弁においてはアントシア

21

ニンアシル基転移酵素が発現している。アントシアニンアシル基転移酵素はAsp-Phe-Gly-Trp-Gly-Lys. というアミノ酸配列が保存されており、これに対応する合成DNAをプライマーとして用いることによりアントシアニンアシル基転移酵素遺伝子を取得することができる (PCT/JP96/00348)。

具体的には、トレニアcDNAライブラリー作製の際に合成した1本鎖cDNA10ngを鋳型とし、100ngのATCプライマー (5'-GA(TC)TT(TC)GGITGGGGIAA-3', Iはイノシン、(TC)はいずれか一方を意味する) (配列番号: 1)、100ngのオリゴdTプライマー (5'-TTTTTTTTTTTTTTT TTTCTCGAG-3') (配列番号: 2) をプライマーとし、Taqポリメラーゼ (タカラ、日本) を用いて製造者の推奨する条件でPCRを行った。PCRは、95度1分、55度1分、72度1分を1サイクルとする反応を25サイクル行った。得られた約400 bpのDNA断片をGene Clean II (BI O, 101. Inc.) により製造者の推奨する方法で回収し、pCR-TOPOにサブクローニングした。

その塩基配列を決定したところリンドウのアシル基転移酵素遺伝子 (Fujiwara et al. Plant J. 16 421-431, 1998) に相同な配列が見られた。なお塩基配列はダイプライマー法 (アプライドバイオシステムズ社) を用い、シークエンサー310あるいは377 (いずれもアプライドバイオシステムズ社) を用いて決定した。

このDNA断片をDIG標識検出キット (日本ロシュ) を用いてDIGにより標識し、製造者が推奨する方法でトレニアのcDNAライブラリーをブランクハイブリダイゼーション法によりスクリーニングした。得られたポジティブシグナルをもたらしたクローンを無作為に12個選択し、そこからプラスミドを回収し、塩基配列を決定した。これらはアントシアニンアシル基転移酵素により相同性を示した。これらのクローンのうちpTAT7としたクローンに含まれるcDNAの全塩

基配列を決定した（配列番号：3）。

pBE2113-GUS (Mitsuhara et al. Plant Vell Physiol. 37, 45-59 1996) を SacI で消化した後、平滑末端化し、8bp の XhoI リンカー (TaKaRa) を挿入した。このプラスミドの BamHI と XhoI 部位に pTAT7 を BamHI と XhoI で消化して得られる約 1.7kb の DNA を挿入し、pSPB120 を得た。pSPB120 を SnaBI と BamHI で消化した後平滑末端化しライゲーションすることにより pSPB120' を得た。一方、パンジー由来の F3', 5' H#40 cDNA を含むプラスミド pCGP1961 を BamHI で完全消化し、さらに XhoI で部分消化し得られる約 1.8kb の DNA 断片を回収し、これと BamHI と XhoI で消化した pUE5H とライゲーションし得られたプラスミドを pUEBP40 とした。

pUEBP40 を SnaBI と BamHI で消化した後平滑末端化しライゲーションすることにより pUEBP40' を得た。pUEBP40 を HindIII で部分消化し得られる約 2.7kb の DNA 断片を回収し、HindIII で部分消化した DNA 断片と連結した。得られたプラスミドのうち、バイナリ-ベクター上でライトボーダー側から、ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子、パンジー F3' 5' H#40、トレニア 5 AT 遺伝子の順にそれぞれが同方向に連結されたバイナリ-ベクターを pSPB130 とした（図 3）。本プラスミドは植物においてはパンジー F3' 5' H#40 遺伝子と 5AT 遺伝子構成的に発現し、遺伝子を花卉特異的に転写するように工夫されている。このプラスミドを *Agrobacterium tumefaciens* Ag10 株に導入した。

実施例 3. WKS82 へのパンジー F3', 5' H#40 遺伝子とトレニアアントシアニン 5-アシル基転移酵素遺伝子の導入

藤色系バラ「WKS82」へ pSPB130 を導入し、89 個体の形質転換体を得た。色素分析を行った 44 個体全てでデルフィニジンの蓄積を確認した。デルフィニジン含有率は最高 91%（平均 49%）であった。花

色はRHSカラーチャート186d (GREYED-PURPLE GROUP) から80c (PURPLE-VIOLET GROUP) へ変化した。代表的な形質転換体の分析値を下表に示す。

表 1

Plant No.	acyl (%)	Del (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
WKS82 control	0.0	0.0%	0.000	0.074	0.000	0.000	2.400	0.196
1	10.5	52.3%	0.055	0.050	0.000	0.430	0.883	0.083
2	15.9	62.5%	0.091	0.054	0.000	0.570	0.549	0.030
3	15.9	36.6%	0.044	0.076	0.000	0.622	2.221	0.102
4	6.8	40.0%	0.023	0.034	0.000	0.247	0.986	0.172
5	15.0	82.9%	0.087	0.018	0.000	5.451	0.403	0.042
6		89.7%	0.072	0.008	0.000	0.853	0.163	0.062
7	9.5	89.5%	0.101	0.012	0.000	0.719	0.144	0.019
8	14.7	11.4%	0.012	0.090	0.000	na	na	na
9	11.6	29.3%	0.024	0.059	0.000	na	na	na
10	8.7	15.2%	0.010	0.053	0.000	na	na	na
11	7.9	59.0%	0.046	0.032	0.000	0.580	0.619	0.022
12	8.5	55.6%	0.060	0.048	0.000	1.318	1.615	0.165
13	13.9	42.3%	0.026	0.035	0.000	0.603	1.094	0.052
14	10.1	10.3%	0.008	0.073	0.000	na	na	na
15	10.6	18.8%	0.018	0.079	0.000	na	na	na
16	9.3	11.7%	0.009	0.066	0.000	na	na	na
17	14.3	76.2%	0.112	0.035	0.000	3.741	1.587	0.377
18	12.7	76.7%	0.101	0.031	0.000	1.608	0.656	0.075
19	9.8	71.7%	0.057	0.022	0.000	1.403	0.455	0.041
20	5.3	14.1%	0.011	0.068	0.000	0.132	2.999	0.720
21	3.5	18.5%	0.008	0.035	0.000	na	na	na
21	7.7	23.1%	0.017	0.055	0.000	0.141	0.929	0.034
22	5.4	19.0%	0.015	0.065	0.000	0.297	4.128	1.350

Del : デルフィジニン、Cya : シアニジン、Pel : ペラルゴニン、M : ミリセチン、Q : ケルセチン、K : ケンフェロール、Del (%) : 総アントシアニン中のデルフィニジンの割合、Acyl (%) : 総アントシアニン中のアシル化された色素の割合、na : 分析未実施

表 2

Plant No.	acyl (%)	Del (%)	Del (mg/g)	Cya (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
23	1.1	42.1%	0.036	0.050	0.000	0.609	2.929	0.679
24	22.7	91.0%	0.079	0.008	0.000	0.964	0.218	0.018
25	6.1	61.3%	0.048	0.030	0.000	0.490	0.468	0.029
26	8.7	91.3%	0.097	0.009	0.000	2.053	0.339	0.123
27	9.4	59.9%	0.060	0.040	0.000	1.537	1.631	0.422
28	5.5	51.2%	0.040	0.038	0.000	0.688	0.723	0.038
29	5.1	61.4%	0.056	0.032	0.003	0.637	0.537	0.087
30	7.0	53.3%	0.037	0.032	0.000	0.706	1.032	0.051
31	5.7	58.1%	0.071	0.051	0.000	1.592	1.478	0.220
32	4.3	64.6%	0.092	0.050	0.000	0.849	0.753	0.035
33	6.4	61.7%	0.042	0.026	0.000	0.477	0.468	0.023
34	8.9	58.8%	0.048	0.034	0.000	0.646	0.928	0.063
35	6.2	11.6%	0.007	0.057	0.000	0.094	1.132	0.066
36	7.1	51.2%	0.038	0.036	0.000	0.911	1.135	0.079
37	5.8	50.8%	0.029	0.028	0.000	0.868	1.105	0.096
38	5.5	47.0%	0.027	0.023	0.007	1.366	1.632	0.105
39	4.9	67.0%	0.044	0.022	0.000	0.795	0.586	0.051
40	0.0	61.1%	0.053	0.033	0.000	1.310	1.466	0.259
41	9.6	71.0%	0.074	0.030	0.000	0.460	0.337	0.023
42	1.2	27.6%	0.009	0.024	0.000	na	na	na
43	5.2	13.8%	0.013	0.078	0.000	na	na	na

Del : デルフィジニン、Cya : シアニジン、Pel : ペラルゴニン、M : ミリセチン、Q : ケルセチン、K : ケンフェロール、Del (%) : 総アントシアニジン中のデルフィニジンの割合、Acyl (%) : 総アントシアニン中のアシル化された色素の割合、na : 分析未実施

実施例 4. 各器官における導入遺伝子の存在の有無確認

「WKS82」(以下、宿主という)及び実施例 3 で作出した組換え体 No. 5 及び No. 24 (WKS82/130-4-1 及び WKS82/130-9-1 ; 以下、組換え体という)の花弁、葉、茎、根及び花粉より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて製造業者推奨の方法に従ってゲノム DNA を抽出した。抽出したゲノム DNA を鋳型として TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) に

よりPCR 法にて導入遺伝子（パンジーF3' 5' H 遺伝子（配列番号 4）、トレニア5AT 遺伝子（配列番号 3）、大腸菌NPTII遺伝子）の増幅を行った。

さらに、内在性コントロールとしてバラのアントシアニン合成酵素 (ANS) 遺伝子の増幅を行った。PCR の反応条件は、熱変性が94℃で5 分間、続いて94℃で30 秒、55℃で30 秒、72℃で1 分のサイクルを25 回繰り返し、その後、伸長反応が72℃で7 分である。得られた増幅産物をアガロースゲルにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によって増幅断片の検出を行った。

なお、パンジーF3' 5' H 遺伝子の増幅にはBP40-F2 とBP40-R3 を、トレニア5AT 遺伝子の増幅にはTAT7-50F とTAT7-R1 を、NPTII遺伝子の増幅にはNPTII-F とNPTII-R を、ANS遺伝子の増幅にはRhANS 69-r1 とRhANS69-m1 をプライマーとして用いた。

パンジーF3' 5' H 特異的プライマー

BP40-F2 : 5'-GAG CTA GGC CAC ATG CTT A-3' (配列番号 : 5)

BP40-R3 : 5' -CTT TGC GCT CAT GAC TCG T-3' (配列番号 : 6

)

トレニア5AT 遺伝子特異的プライマー

TAT7-50F : 5'-AAC AAT ATG TGC AGT CCT CGA A-3' (配列番号 : 7)

TAT7-R1 : 5'-AAC TCG CAT CGC CAA CTA C-3' (配列番号 : 8

)

NPTII遺伝子特異的プライマー

NPTII-F : 5'-GAT TGA ACA AGA TGG ATT GCA CGC-3' (配列番号 : 9)

NPTII-R : 5'-CGA AGA ACT CCA GCA TGA GAT CCC-3' (配列番号 : 10)

ANS 特異的プライマー

Rh ANS 69-r1 : 5'-TTT GAT CTT CCC ATT GAG C-3' (配列番号 : 11)

Rh ANS 69-m1 : 5'-TCC GCG GTG GGA AGA TCC CC-3' (配列番号 : 12)

PCR による解析の結果、本組換え体の花弁、葉、茎のゲノム中には導入遺伝子が検出されたが、根、花粉のゲノムにおいてはこれら導入遺伝子は検出されなかった。表 3 及び図 1 に結果を示した。

また、花弁、葉や茎の表皮系、がく片、雄ずい、雌ずいはL1 層及びL2 層、花粉と卵細胞はL2 層、葉や茎の内部組織、根はL3 層に由来することが知られている。根及び花粉のゲノムにおいて導入遺伝子が検出されなかったことより、本組換え体は導入遺伝子がL1 層にのみ存在するキメラ植物であることが示唆された。

表 3 : 組換え体の各器官における導入遺伝子の存在の有無

検出遺伝子	導入遺伝子存在の有無				
	花弁	葉	茎	根	花粉
パンジーF3' 5' H	+	+	+	-	-
トレニア5AT	+	+	+	-	-
NPT II	+	+	+	-	-

実施例 5. 園芸種との人工交配 (温室内)

常法に従い、園芸種の開花直前に除雄、袋かけをした後、雌しべが十分に成熟した時点で晴天日の午前中に温室内で栽培した宿主あるいは実施例3で作出した組換え体No. 24 (WKS82/130-9-1 ; 以下、組換え体という) の花粉を付着させた。その後、他の花粉が付着しないように再度袋かけを行い、種子形成の有無を調査した。なお、花粉は開裂前の葯を回収後、シリカゲルを入れたデシケータ内で1 日間室温放置し、翌日開裂した葯から回収した新鮮な花粉を用いた。交雑母本として、グランディ・フローラ系四季咲きバラ品種「ク

クイーンエリザベス」、フロリバンダ系四季咲きバラ品種「ゴールドバニー」を用いた。

交配後1ヶ月以上経過した時点で、生理落果せず、結実が認められた果実について種子形成の有無を確認した。さらに組換え体との交配により得られた種子については、後代における導入遺伝子の伝達性を確認するため、得られた種子よりNucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences)を用いてゲノムDNAを抽出し、さらにREPLI-g Kit (QIAGEN)にてこれを増幅後、PCR法にて導入遺伝子（パンジーF3'5' H 遺伝子）を検出した。

結果を表4に示した。結実率は、宿主及び組換え体間でほとんど差異は認められなかった。さらに組換え体との交配により得られた種子を解析した結果、これらの種子からは導入遺伝子は全く検出されなかった。このことから、花粉の受精能力については宿主と組換え体間で差異はないものの、組換え体の花粉細胞中には導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子は後代に伝達されないことが示唆された。

表4：園芸種との人工交配

	宿主 (WKS82)		組換え体No. 24 (WKS82/130-9-1)			
	結実数 /交配花数	結実率 (%)	結実数 /交配花数	結実率 (%)	導入遺伝子 検出種子数 /解析種子数	導入遺伝子の 検出率 (%)
クイーン エリザベス	19/20	95	20/20	100	0/94	0
ゴールドバニー	16/20	80	14/20	70	0/94	0

実施例6. 園芸種との人工交配（野外）

常法に従い、園芸種の開花直前に除雄、袋かけをした後、雌しべが十分に成熟した時点で晴天日の午前中に野外で栽培した宿主あるいは実施例3で作出した組換え体No. 24（WKS82/130-9-1；以下、組換え体という）の花粉を付着させた。その後、他の花粉が付着しな

いように再度袋かけを行い、種子形成の有無を調査した。なお、花粉は開裂前の葯を回収後、シリカゲルを入れたデシケータ内で1日間室温放置し、翌日開裂した葯から回収した新鮮な花粉を用いた。

交雑母本として、グランディ・フローラ系四季咲きバラ品種「クイーンエリザベス」、フロリバンダ系四季咲きバラ品種「ゴールドバニー」を用いた。

交配後3ヶ月以上経過した時点で、生理落果せず、結実が認められた果実について種子形成の有無を確認した。さらに組換え体との交配により得られた種子を回収し、4℃で3ヶ月間低温処理した後、播種した。これらにおける導入遺伝子の伝達の有無を確認するため、得られた実生の葉よりDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出し、PCR法にて導入遺伝子（パンジーF3' 5' H遺伝子）の検出を行った。なお、内在性コントロール遺伝子としてバラのグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子の検出を行った。

また、種子を低温処理した場合、通常は1ヶ月程度で発芽が認められるが、3ヶ月経過してもその一部しか発芽が認められなかった。そこで、発芽しなかった播種種子の一部を再回収し、種子を用いて同様の解析を行った。再回収した種子より、Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences)を用いてゲノムDNAを抽出し、さらにREPLI-g Kit (QIAGEN)にてこれを増幅後、PCR法にて導入遺伝子（パンジーF3' 5' H遺伝子）の検出を行った。

結果を表5及び表6に示す。結実率は、宿主及び組換え体間ではほとんど差異は認められなかった。さらに、組換え体との交配により得られた実生をPCR法にて解析したが、これらの実生からは組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。さらに、いずれの種子に

29

においても組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。このことから、花粉の受精能力については宿主と組換え体間で差異はないものの、組換え体の花粉細胞中には導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子は後代に伝達されないことが示唆された。

30

表 5. 人工交配による園芸種との結実率及び発芽個体における導入遺伝子の検出率

	宿主 (WKS82)			組換え体 No. 24 (WKS82/130-9-1)				
	結実数 /交配花数	結実率 (%)	総種子数	結実数 /交配花数	結実率 (%)	総種子数	導入遺伝子 検出個体数 /発芽数	導入遺伝子 の検出率 (%)
クイーンエリザベス	27/41	65.8	262	19/42	45.2	192	0/4	0.0
ゴールドバニー	14/64	21.8	174	15/60	25.0	150	0/9	0.0

表 6. 園芸種との人工交配により得られた種子における導入遺伝子の検出率

	組換え体 No. 24 (WKS82/130-9-1)		
	¹⁾ 回収種子数	導入遺伝子検出種子数 / ²⁾ 解析種子数	導入遺伝子の検出率 (%)
クイーンエリザベス	155	0/33	0.0
ゴールドバニー	122	0/37	0.0

* 1), 2) : 回収種子数と解析種子数の相違は、^{しいな}秕（種子の中身がないもの）、DNA抽出が不可能であったもの、PCR解析でコントロール遺伝子の増幅が認められなかったものは本解析の対象から除外したため生じた。

実施例 7. 野生種との人工交配（野外）

常法に従い、園芸種の開花直前に除雄、袋かけをした後、雌しべが十分に成熟した時点で晴天日の午前中に野外で栽培した宿主あるいは実施例3で作出した組換え体No. 24 (WKS82/130-9-1 ; 以下、組換え体という) の花粉を付着させた。

その後、他の花粉が付着しないように再度袋かけを行い、種子形成の有無を調査した。なお、花粉は開裂前の葯を回収後、シリカゲルを入れたデシケーター内で1日間室温放置し、翌日開裂した葯から回収した新鮮な花粉を用いた。

交雑母本として、野生種はノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray)、テリハノイバラ (*R. wichuraiana* Crep.)、ハマナス (*R. rugosa* Thunb. ex Murray) を用いた。

交配後2ヶ月以上経過した時点で、生理落果せず、結実が認められた果実について種子形成の有無を確認した。さらに得られた種子を回収し、4℃で3ヶ月間低温処理した後、播種した。これらにおける宿主あるいは組換え体との交雑の有無、導入遺伝子の伝達の有無を確認するため、得られた実生の葉よりDNeasy Plant Mini Kit (Q

32

QIAGEN) を用いてゲノムDNAを抽出し、PCR法にて解析を行った。宿主あるいは組換え体との交雑の有無については四季咲き性に関与する遺伝子 (KSN遺伝子) を指標とし、導入遺伝子の伝達の有無については組換え体由来の導入遺伝子であるパンジーF3' 5' H遺伝子を指標とした。なお、内在性コントロール遺伝子としてバラのGAPDH遺伝子を用いた。

KSN遺伝子は一季咲きのバラのksn遺伝子 (茎頂を維持する働きをもつ) に約9kbのトランスポゾンが挿入されて生じたもので、これにより当該遺伝子の発現が抑制され、茎頂における花芽の形成抑制が解除されるため、花芽形成が促進され、四季咲き性となることが報告されている¹⁾。園芸種はKSN遺伝子をホモで有する。一方、一季咲きの野生種はksn遺伝子をホモで有する。従って、野生種 (一季咲き) においては、KSN遺伝子は園芸種と交雑した場合にのみ検出されると考えられる。

また、種子を低温処理した場合、通常は1ヶ月程度で発芽が認められるが、3ヶ月経過してもその一部しか発芽が認められなかった。そこで、発芽しなかった播種種子の一部を再回収し、種子を用いて同様の解析を行った。再回収した種子より、Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences) を用いてゲノムDNAを抽出し、さらにREPLI-g Kit (QIAGEN) にてこれを増幅後、PCR法にて宿主あるいは組換え体との交雑の有無、導入遺伝子の伝達の有無について解析を行った。

結果を表7及び表8に示す。結実率は宿主、組換え体いずれを花粉親とした場合でも極めて低かった。得られた実生をPCR法にて解析したが、宿主あるいは組換え体と野生種との交雑は認められたものの、組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。さらに、発芽しなかった播種種子を再回収し、種子の充実について観察を行っ

たところ、そのほとんどが「しいな（種子の中身がないもの）」であり、正常な胚が確認できた個体はごくわずかであった。これらについても同様にPCR法にて解析を行ったが、宿主あるいは組換え体と野生種との交雑は認められたものの、組換え体由来の導入遺伝子は検出されなかった。このことから、組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由により、導入遺伝子が後代に伝達されなかったものであると考えられた。

よって、本組換え体と野生種（ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス）が交雑したとしても、組換え体の花粉細胞中に導入遺伝子が含まれていない等の理由から、導入遺伝子が後代に伝達される可能性はないことが示唆された。

なおテリハノイバラについては、いずれの種子も正常な胚を確認できなかった。

表7. 人工交配による野生種（ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス）との結実率及び発芽個体における導入遺伝子の検出率

	宿主 (WKS82)				組換え体 No. 24 (WKS82/130-9-1)							
	結実数 /交配 花数	結実率 (%)	総種 子数	交雑 個体数 /発芽数	交雑率 (%)	結実数 /交配花数	結実率 (%)	総種 子数	交雑 個体数 /発芽数	交雑率 (%)	導入遺 伝子検 出個体数 /発芽数	導入遺 伝子の 検出率 (%)
ノイバラ	18/251	7.1	27	1/2	50.0	34/255	13.3	59	1/4	25.0	0/4	0.0
テリハノイバラ	23/260	8.8	44	1/1	100.0	14/261	5.4	44	0/0	—	0/0	—
ハマナス	2/74	2.7	263	0/0	—	4/71	5.6	283	0/0	—	0/0	—

35

表 8. 野生種（ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス）との人工交配により得られた種子における
導入遺伝子の検出率

	宿主 (WKS82)			組換え体 No. 24 (WKS82/130-9-1)				
	¹⁾ 回収 種子数	交雑種子数 / ²⁾ 解析種子数	交雑率 (%)	¹⁾ 回収 種子数	交雑種子数 / ²⁾ 解析種子数	交雑率 (%)	導入遺伝子 検出種子数 /解析種子数	導入遺伝子 の検出率 (%)
ノイバラ	23	11/12	91.7	44	8/8	100.0	0/8	0.0
テリハノイバラ	43	0/0	—	44	0/0	—	0/0	—
ハマナス	257	30/33	90.9	281	24/26	92.3	0/26	0.0

* 1), 2): 回収種子数と解析種子数の相違は、^{しいな} 批（種子の中身がないもの）、DNA 抽出が不可
能であったもの、PCR 解析でコントロール遺伝子の増幅が認められなかったものは本解析の対
象から除外したため生じた。

3b

実施例 8. in situハイブリダイゼーション

導入遺伝子の局在性をさらに詳しく調べるために、in situハイブリダイゼーションを行った。5mm程度の大きさの蕾を垂直方向に半分に切断後、ホルムアルデヒド固定液に浸して固定した。次に脱水を行うため、固定液を50%エタノールから100%エタノールに順に置換し、さらに25%レモゾールに置換(透徹)した。その後パラフィン徐徐に浸潤させ、包埋した。包埋サンプルをマイクロトームで薄切し、スライドグラスに接着させた。スライドグラスを水和し、プロテネースK処理、アセチル化などの前処理を行った後、脱水、乾燥させた。DIGラベルしたプローブ(BP40、TAT、NPTII、各遺伝子のアンチセンス及びセンスプローブ)をハイブリダイゼーション溶液に溶解し、乾燥させたスライドグラスにのせ反応させた。ハイブリダイゼーション後、スライドグラスを洗浄し、DIGを検出した。

図2の写真に示されるように、導入遺伝子はL1層の細胞でのみ発現しており、L2層、L3層の細胞では発現が見られない。このことから、導入遺伝子はL1層にのみ存在しL2層、L3層には存在しないこと、ゆえにL2層から生じる生殖細胞(花粉細胞や胚珠の細胞)には導入遺伝子が存在しないことが証明された。

実施例9: 組換えカーネーションの作製と解析

導入遺伝子がL1層にのみ存在するカーネーションを作成した。

組換えカーネーションは、アグロバクテリウムを用いる遺伝子導入により、以下のように作製した。プラスミド pCGP2442 (Application No. US60/988,293 出願日2007年11月15日に記載) はそのT-DNA領域に、キンギョソウ由来のカルコン合成酵素遺伝子のプロモーター制御下にあるサルビア由来のフラボノイド3'、5'-水酸化酵素遺伝子 cDNA、ペチュニアのジヒドロフラボノール4-還元酵素の染色遺伝子、カーネーション由来のアントシアニン合成酵素遺伝

子、さらに形質転換の選抜マーカーとしてカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター制御下にあるタバコのアセトラクテート合成遺伝子SURB c DNAが含まれている。これを特許出願特表平11-505116に記載されている方法でアグロバクテリウムに導入し、さらにカーネーション品種コルティナシャネルに導入した。得られた組換えカーネーションの花弁には、天然のカーネーションには含まれないデルフィニジンが検出された。これは導入遺伝子が少なくとも花弁の上皮細胞で機能していることを示している。このうち1系統（系統19907）について詳細に解析した。また、系統19907から染色体DNAを抽出し、上述のpCGP2442のT-DNA上の遺伝子をプローブとして用いてサザンハイブリダイゼーション法により解析したところ、導入遺伝子が染色体に挿入されていることが確認された。

5 μ g/L Gleanを含むホルモンフリーMS固形培地に系統19907と系統26898のシュートを植えることにより組織培養物を作製した。4-5週間に発根の有無を観察したところ、系統26898は発根していたが、系統19907は発根していなかった。

次に系統19907と系統26898および品種コルティナシャネルから得た葉の切片を5 μ g/L Gleanを含むhalf-strength MS 固形medium with 0.5 mg/L IAAとGleanを含まないhalf-strength MS 固形medium with 0.5 mg/L IAA上において5週間培養した。5 μ g/L Gleanを含む培地で培養した系統19907と品種コルティナシャネルの葉片はいずれも褐変した。系統26898の得られた葉片は緑色で発根が見られた。

系統19907の葉と根からDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN社) を用いて染色体DNAを抽出した。このDNA100 ngを鋳型にし、SuRB遺伝子を増幅するための合成プライマー（# 960 5' -ATT TCC GCC TCA TTA GAA GG-3' , # 1468 5' -GCC TCA TGT TTC CAT TTG TGC-3'）

）を用いてPCRを行った。反応はHot Star Taqを用い、25 μ lの反応体積で、95度の反応を15分行った後、96度の反応を1分、52度の反応30秒、72度の反応を2分からなる1サイクルを35サイクル行い、さらに72度の反応を7分おこなった。この反応物をアガロースゲル電気泳動で解析したところ、葉由来のDNAを鋳型とした場合には、SURBのバンドが観察されたが、根由来のDNAを鋳型とした場合には、SURBのバンドが観察されなかった。

葉はL1、L2、L3細胞からなり、根はL2、L3細胞からなることが知られている。以上の結果から、系統19907はL1細胞には導入遺伝子が入っているがL2、L3細胞には導入遺伝子が入っていないこと、すなわち、系統19907は導入遺伝子がL1層にのみ存在するキメラ植物であることが判断された。

実施例10

各種植物について、本発明の技術の応用の可能性を検討した。

(1) ペチュニアへの感染例

花卉植物としてペチュニアを用いて、外来遺伝子としてフラボノイドの合成に係る遺伝子を導入した。

カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーター上流にエンハンサー配列を2回繰り返し持つE1₂35Sプロモーター配列 (PlantCell Physiol. 37, 49-59 (1996)) と、チョウマメのF3' 5' H cDNA配列 (特許出願番号WO 2004/020637に記載)、ノバリン合成酵素 (nos) のターミネーター配列をバイナリーベクターpBinPlus (Trangen Research, 4, 288-290 (1995)) に導入してあるpSPB748 (PlantCell Physiol. 43, s227 (2002)) より、チョウマメF3' 5' H cDNAとnosターミネーターの連結したDNA断片 (約2.0kb) をBamHI消化とEcoRIの部分消化によって回収し、pBluescriptII (sk-) (Stratagene社) のBamHI/EcoRIサイトに導入することにより、プラ

スミドpB-Bnとした。マウスの異物応答配列 (XRE) を6回繰り返し持つ6xXREプロモーター配列と、GUS遺伝子、nosターミネーターをpBluescriptII (ks+) (Stratagene) に導入してあるpBlueSXXREGUS (Kodama (2003) Molecular mechanisms of chemical-inducible gene expression in higher plants for monitoring and remediation of environmental contaminants, Diss.) よりGUS遺伝子とnosターミネーターの遺伝子カセットをXbaIとKpnIで抜き出し、同サイトにpB-BnからXbaIとKpnI消化で切り出したチョウマメF3' 5' Hとnosターミネーターの連結したDNA断片 (約2.0kb) を挿入し、pB-X6Bnを得た。バイナリーベクターpBin19上に、CaMV35Sプロモーターとnosターミネーターからなる発現ユニット2組にアルファルファモザイクウイルスの5' 非翻訳 (UTR) 配列をそれぞれ付加させたAhRV及びArntを順方向に挿入したベクターpSKAVAt (Kodama (2003)) のSalIサイトに、pB-X6BnをXhoI消化して切り出した6xXREプロモーター配列とチョウマメF3' 5' H cDNA、nosターミネーター配列の遺伝子カセット (2.2kb) を導入することにより、pSPB1459を構築した。

pSPB1459をアグロバクテリウムツメファシエンスAgl10株 (BioTechnology 9, 963-967 (1991)) に導入し、ペチュニア (品種PL, Skr 4 xSw63 (Nature, 366, 276-279 と同じ)) をリーフディスクを用いるアグロバクテリウム法で形質転換した。アグロバクテリウムへのプラスミドの導入、形質転換の方法は公知の方法 (Plant J. 5, p81-92 (1994)) によった。品種PLはフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子、フラボノイド3'-水酸化酵素遺伝子を欠損しているため花色は白ないし薄いピンクであるが、本実験の目的には使用するペチュニア品種はPLに限定されるものではない。独立した形質転換ペチュニアPABを38系統取得した。

(2) : トレニアへの感染例 その1

花卉植物としてトレニアを用いて、外来遺伝子として選択マーカーの遺伝子であるGFP遺伝子を導入した。

CaMV35S-sGFP(S65T)-NOS3' (Curr. Biol. 6, 325-330 (1996)) をBamHIとEcoRIで消化し、sGFP遺伝子とnosターミネーター遺伝子の連結DNA(1.0kb)をpBluescriptII (sk-)のBamHI/EcoRIサイトに導入することにより、プラスミドpB-Gnを構築した。pBlueSXXREGUS-lastよりGUS遺伝子とnosターミネーターの遺伝子カセットをXbaIとKpnIで抜き出し、同サイトにpB-GnからXbaIとKpnI消化で切り出したsGFPとnosターミネーターの遺伝子カセット(1.0kb)を挿入、pB-X6Gnを構築。pSKAVAtのSalIサイトに、pB-X6GnをXhoI消化して切り出した6xXREプロモーターとsGFP、nosターミネーターの遺伝子カセット(1.2kb)を導入、pSPB1458を構築した。

pSPB1458をアグロバクテリウムツメファシエンスAgl0株に導入し、リーフディスクを用いるアグロバクテリウム法でトレニア(品種サマーウェーブブルー:SWB(サントリーフラワーズ株式会社))リーフディスクに形質転換を行った。トレニアの形質転換は公知の方法(Mol. Breeding 6, 239-246 (2000))によった。SWBの花色は青であるが、本実験の目的には使用するトレニア品種はSWBに限定されるものではない。独立した形質転換トレニア系統TAGを40系統取得した。

(3) トレニアへの感染例 その2

花卉植物としてトレニアを用いて、外来遺伝子としてフラボノイドの合成に係る遺伝子を導入した。

W02005-059141に開示されている方法に準じ、トレニア品種サマーウェーブブルーを宿主植物として、上記同様のアグロバクテリウムを用いる方法により、オーロン合成に関わる遺伝子の発現カセットと、アントシアニン合成系遺伝子の発現をRNAiにより抑制するた

めのカセットを有するコンストラクト (pSFL307またはpSFL308) を導入した。得られたトレニアでは、花色が青から黄色に変化した。

(4) タバコ、バーベナ、ニーレンベルギアへの感染例

花卉植物としてタバコ、バーベナまたはニーレンベルギアを用いて、外来遺伝子として転写因子遺伝子を導入した。

リン酸飢餓条件下で発現するシロイヌナズナのPHR1遺伝子 (Gene s & Development 15:2122-2133 (2001)) をTOPO-TACloningKit (インビトロジェン株式会社) を用い、解説書に従いpCR2.1ベクターにサブクローニングした。プライマーPHRf (5' -ATGGAGGCTCGTCCAGTTCAT-3') とPHRr (5' -TCAATTATCGATTTTGGGACGC-3') を用いたPCR反応で増幅した産物をサブクローニングし、pSPB1892とした。35Sプロモーターのエンハンサー配列とマノピンシンターゼプロモーターを連結した (Mac) プロモーターとマノピンシンターゼ (mas) ターミネーターを有するバイナリーベクターpSPB2311をSmaIで切断し、pSPB2311Aを得た。pSPB1892をEcoRIで切断し平滑化した断片をpSPB2311Aに挿入しpSPB2314を得た。

引き続いて、公知の方法 (Plant J. 5, 81, 1994) に基づいてpSPB1898を用いてアグロバクテリウム (菌株: Ag10) を形質転換し、このpSPB1898を有する形質転換体アグロバクテリウムを用いて、タバコ、バーベナ、ニーレンベルギアの形質転換を実施した。タバコ、バーベナ、ニーレンベルギアの形質転換はそれぞれ公知の方法 (Science 227, 1229, 1985; Plant Cell Rep. 21, 459, 2003; Plant Biotech. 23, 19, 2006) に基づき行った。得られた植物体の遺伝子導入については、各植物体の葉よりDNAを抽出し、PHR1遺伝子をテンプレートとしたPCRにより確認した。タバコで11個体、バーベナで16個体、ニーレンベルギアで1個体のPHR1形質転換植物を取得した。

(5) インパチェンス、ベゴニアへの感染例

花卉植物としてインパチェンスまたはベゴニアを用いて、外来遺伝子として転写因子遺伝子を導入した。

インパチェンス (*Impatiens walleriana*) の形質転換は基本的に US Patent 6,121,511 に従い、品種グリッターレッド (サカタのタネ) とテンポピンク (タキイ種苗) を用いておこなった。ビトロ苗から切り出した茎頂、節、葉柄、葉片を前培養液体培地 (1mg/L TDZ 添加MS培地) で5日間前培養後、前培養固形培地 (0.05mg/L NAA, 6mg/L Zeatin, 0.3% ゲランガム 添加MS培地) に48時間静置した。その後、pSPB2314を導入したアグロバクテリウム (菌株Ag10) を感染させ、選択培地上 (0.05mg/L NAA, 6mg/L Zeatin, 100mg/L Kanamycin, 500mg/L Carbenicillin, 100mg/L Cefotaxime, 0.3% ゲランガム 添加MS培地) で4-8週間培養しシュートを得た (表9)。葉片は容易に褐変してしまいシュートは得られなかった。茎頂および節では1つの外植片より多くのシュートが得られたが、偽陽性も多数含まれると考えられた。葉柄からのシュートは出現に時間がかかり、数も少ないが、最も確からしい。

ベゴニア (*Begonia Semperflorens*) の形質転換は品種アンバサダーホワイトとアンバサダースカーレット (サカタのタネ) を用いておこなった。ビトロ苗から葉片と葉柄を切り出し、pSPB2314を導入したアグロバクテリウム (菌株Ag10) を感染させ、共存培養培地 (0.5mg/L IAA, 0.1mg/L TDZ, 0.5% PVP, 2mg/L AgNO₃, 200 μ M Acetosyringone, 0.3% ゲランガム 添加MS培地) 上で暗黒下3日間培養した。その後、前選択培地 (1mg/L BAP, 1mg/L Zeatin, 0.1mg/L IAA, 500mg/L Timentin, 50 μ M Acetosyringone, 0.25% ゲランガム 添加MS培地) で3-5日間、選択培地1 (2mg/L TDZ, 0.1mg/L NAA, 100mg/L Kanamycin, 500mg/L Timentin, 0.4% 寒天 添加MS培地

）で2週間、選択培地2（0.2mg/L BAP, 0.1mg/L NAA, 100mg/L Kanamycin, 500mg/L Timentin, 0.4%寒天添加MS培地）で2週間、選択培地3（100mg/L Kanamycin, 500mg/L Timentin, 0.4%寒天添加MS培地）で3週間連続して培養した。その間に形成されたシュートは直径5mm以上に成長したところで、周りの組織を削り取り、選択培地4（150mg/L Kanamycin, 500mg/L Timentin, 0.4%寒天添加MS培地）に移し、さらに2－3週間培養後、発根培地（100mg/L Kanamycin, 500mg/L Timentin, 0.4%寒天添加MS培地）に移し発根シュートを得た（表10）。

表9．インパチエンスのシュート数

品種	外植片由来	感染外植片数	得られたシュート数
グリッターレッド	葉	30	0
	茎頂	82	187
	節	145	89
	葉柄	90	0
テンポピンク	葉	35	0
	茎頂	196	333
	節	418	184
	葉柄	259	5

表10．ベゴニアのシュート数

品種	感染外植片数	得られたシュート数
アンバサダーホワイト	940	13
アンバサダースカーレット	805	2

以上のように、バラやカーネーション以外の花卉植物、例えばペチュニア、トレニア、タバコ、バーベナ、ニーレン、インパチエンス、ベゴニアなどにもアグロバクテリウムを用いて外来遺伝子を導入することが出来ることがわかった。導入する外来遺伝子としては、ここで挙げている具体的な遺伝子に限らず、導入後にL1細胞で機能する遺伝子であれば、いずれの遺伝子であっても同様の方法にてこれら花卉植物に導入することができると考えられる。本発明の技術はアグロバクテリウムを用いて外来遺伝子を導入することがで

きる花卉植物に適応可能であることから、これらの植物についても、本発明の花卉植物、すなわち、導入遺伝子が形質転換体植物の一部の細胞にのみ存在し、他の細胞には存在しない花卉植物を作出することが可能である。

産業上の利用可能性

本発明によって開示された方法によって作出される形質転換体植物は生殖細胞等を含むL2細胞層には導入遺伝子を有さず、L1層の細胞にのみ導入遺伝子を有するキメラ植物である。このような形質転換体は生殖細胞に導入遺伝子を有さないため、権限なき第三者により、当該遺伝子組換え植物が自由に交配親として利用される可能性を阻止することができる。

また、遺伝子組換え植物に関しては、自然界への導入遺伝子の拡散が懸念されるところ、このような生殖細胞に導入遺伝子を持たない遺伝子組換え植物を作出することで、導入遺伝子拡散の可能性が完全に否定されることとなる。よって、遺伝子組換え植物を産業上利用しようとする者にとっては遺伝子組換え植物の商業利用のための承認申請（日本国内においては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）」に基づく生物多様性影響評価など）に係る負担を軽減することとなる。

45

請求の範囲

1. 外来遺伝子を一部の細胞に含み、他の細胞には含まない花卉植物。
2. 前記一部の細胞が一部の細胞層を構成している、請求項1に記載の花卉植物。
3. 前記他の細胞が、花粉の細胞又は胚珠の細胞である、請求項1又は2に記載の花卉植物。
4. 前記他の細胞が、L2層を構成する細胞である、請求項1又は2に記載の花卉植物。
5. 前記一部の細胞層が、L1層であるか、またはL1層とL3層である、請求項2又は3に記載の花卉植物。
6. 花卉植物が、アグロバクテリウムを介して外来遺伝子を導入可能な花卉植物である請求項1ないし5記載の花卉植物。
7. 花卉植物が、バラ、カーネーション、ペチュニア、トレニア、タバコ、バーベナ、ニールンベルギア、キク、ユリ、アサガオ、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カランコエ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、チューリップ、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、タイズ、アルファルファ、ルーピン、カリフラワーのいずれかである請求項6記載の花卉植物。
8. 前記外来遺伝子が、導入後にL1層の細胞で機能する遺伝子である請求項1ないし7いずれか1項に記載の花卉植物。
9. 前記外来遺伝子が花色に関する遺伝子である、請求項8に記載の花卉植物。
10. 前記外来遺伝子が、フラボノイドの合成に係る遺伝子である請求項9に記載の花卉植物。

46

11. 前記外来遺伝子が、スミレ科植物由来のフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ゴマノハグサ科植物由来の芳香族アシル基転移酵素遺伝子、サルビア由来のフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子 cDNA、ペチュニアのジヒドロフラボノール4-還元酵素の染色遺伝子、カーネーション由来のアントシアニン合成酵素遺伝子の一ないし複数の遺伝子である請求項10に花卉植物。

12. 前記外来遺伝子が選択マーカーの遺伝子、または転写因子をコードする遺伝子である請求項8に記載の花卉植物。

13. 花卉植物がバラである請求項7記載の花卉植物。

14. 前記バラが、*Rosa hybrida*である、請求項13に記載の花卉植物。

15. 前記バラが、ハイブリッドティー、フロリバンダ又はミニバラである14に記載の花卉植物。

16. 前記外来遺伝子が花色に関する遺伝子である、請求項13ないし15のいずれか1項に記載の花卉植物。

17. 前記外来遺伝子が、フラボノイドの合成に係る遺伝子である請求項16のいずれか1項に記載の花卉植物。

18. 前記外来遺伝子が、スミレ科植物由来のフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子、ゴマノハグサ科植物由来の芳香族アシル基転移酵素遺伝子のいずれか一方、またはその両方である、請求項17記載の花卉植物。

19. 前記スミレ科植物がスミレ科パンジーである、請求項18に記載の花卉植物。

20. 前記ゴマノハグサ科植物がゴマノハグサ科トレニアである、請求項18記載の花卉植物。

21. 遺伝子導入前のバラと比べて花色が青色方向に変化している、請求項13ないし20のいずれか1項に記載の花卉植物。

- 47
22. 花卉植物がカーネーションである請求項7記載の花弁植物。
 23. 前記カーネーションが、スプレータイプまたはスタンダードタイプである請求項22に記載の花弁植物。
 24. 前記外来遺伝子が花色に関する遺伝子である、請求項22または23に記載の花弁植物。
 25. 前記外来遺伝子が、フラボノイドの合成に係る酵素の遺伝子である請求項24に記載の花弁植物。
 26. 前記外来遺伝子が、サルビア由来のフラボノイド3'、5'-水酸化酵素遺伝子 c DNA、ペチュニアのジヒドロフラボノール4-還元酵素の染色遺伝子、カーネーション由来のアントシアニン合成酵素遺伝子の一ないし複数の遺伝子である、請求項25に記載の花弁植物。
 27. 遺伝子導入前のカーネーションと比べて花色が青色方向に変化している、請求項22ないし26のいずれか1項に記載の花弁植物。
 28. 請求項1～27のいずれか1項に記載の花弁植物と同じ性質を有するそれらの組織、及びこれらの栄養増殖体。
 29. 請求項1～27のいずれか1項に記載の花弁植物の製造方法において、外来遺伝子をアグロバクテリウムを介して植物に導入し、そして当該外来遺伝子が一部の細胞にのみ存在する植物を選択する工程を含む方法。
 30. 請求項3～27のいずれかに1項に記載の、生殖細胞に外来遺伝子をもたない花弁植物を作出することにより自然界への導入遺伝子の拡散を防止する方法。

48

Fig.1

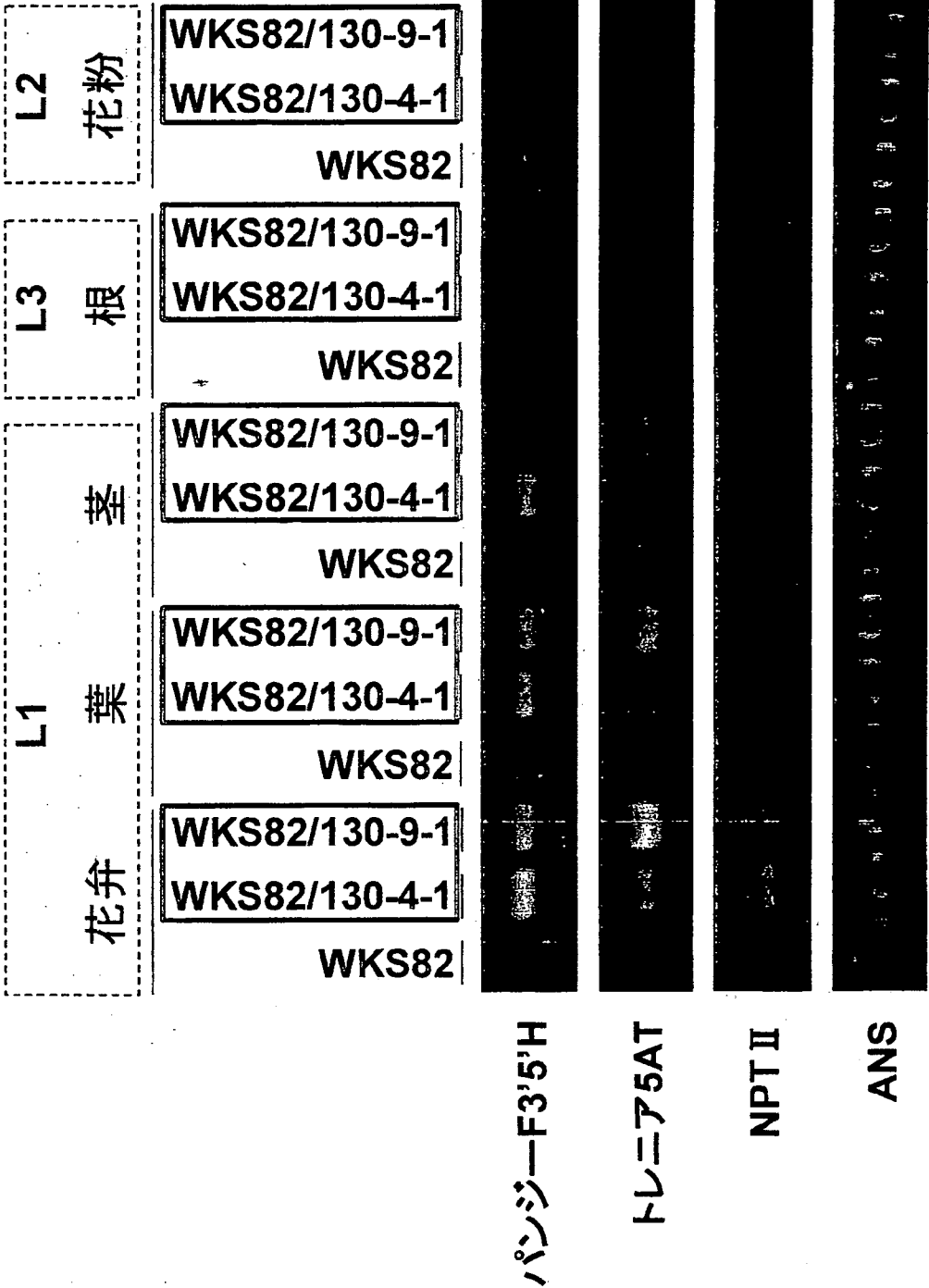
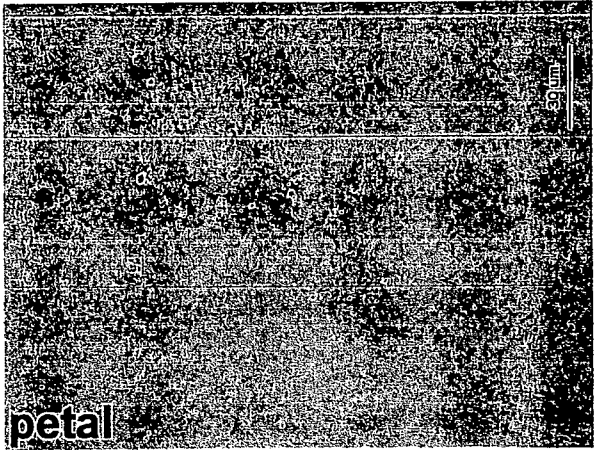
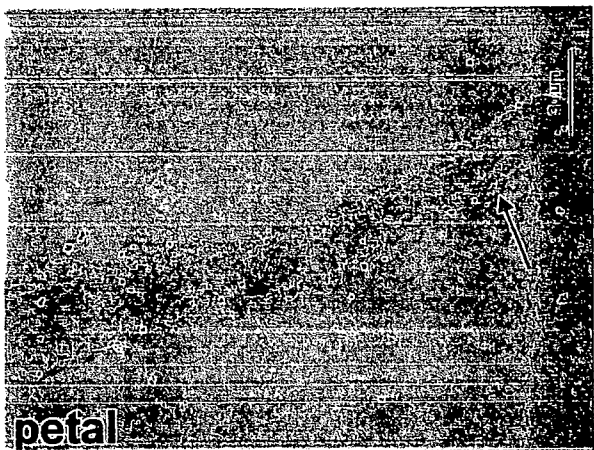


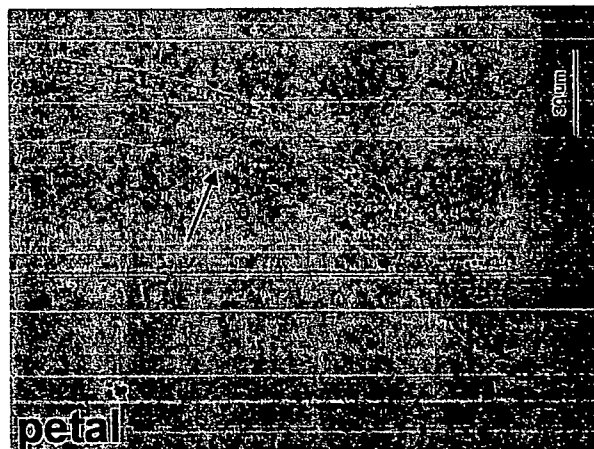
Fig.2 WKS82



WKS82/130-4-1

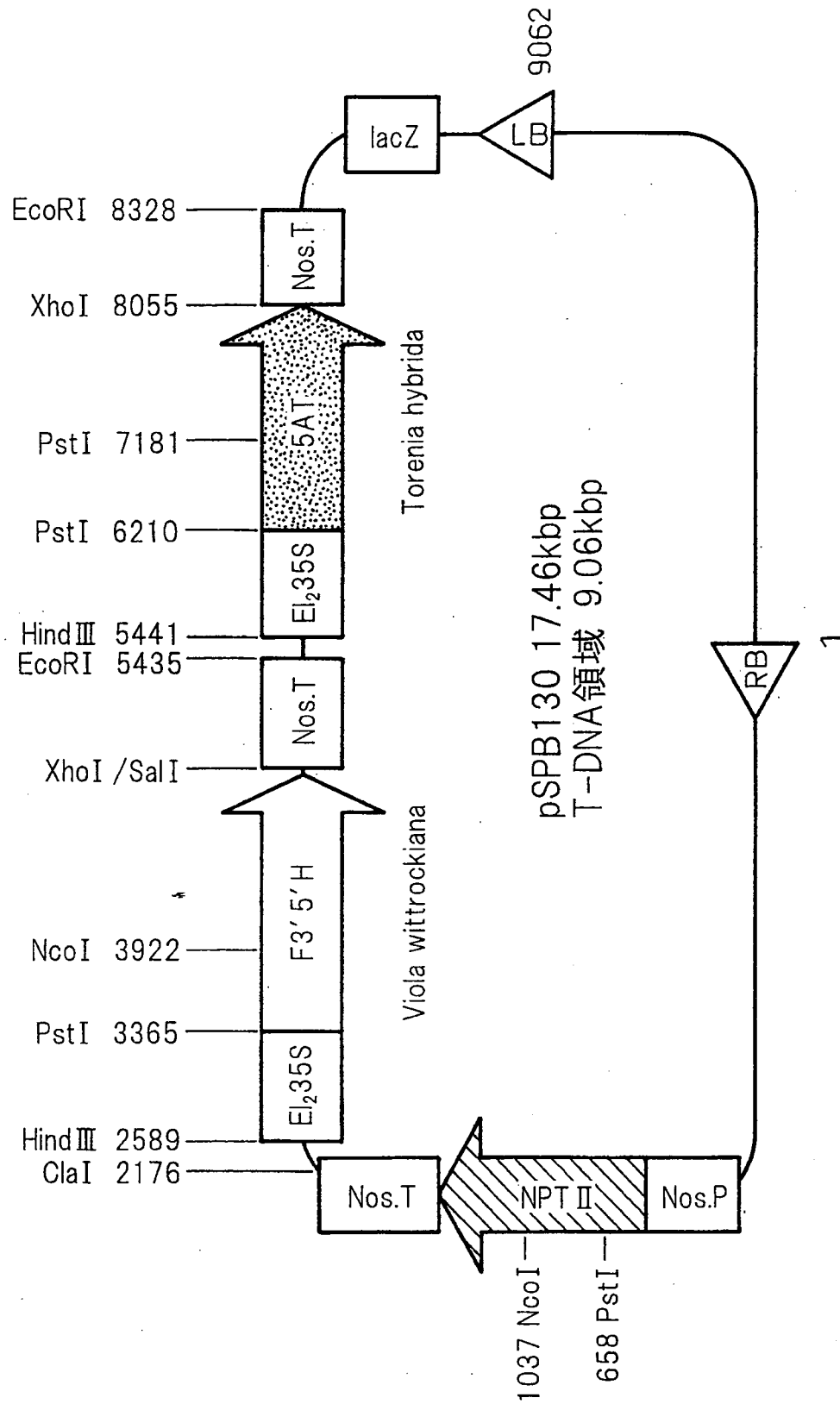


WKS82/130-9-1



(probe ; pansy F3'5'H)

Fig. 3



51

PCT/JP2008/056746

SEQUENCE LISTING

<110>International Flower Developments Proprietary Limited

<120>Method for producing periclinal chimera transgenic rose

<130>V568-PCT

<160>12

<210>1

<211>17

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>ATC primer

<400>1

gayttyggit ggggiaa

17

<210>2

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Oligo dT primer

<400>2

tttttttttt tttttttctc gag

23

<210>3

<211>1808

<212>DNA

<213>Torenia

<220>

<221>

<222>

<223>

<400>3

cttcaaagcc aaaaagaaac aattaatca atg gct gtt gaa gcc ccc aaa aca
Met Ala Val Glu Ala Pro Lys Thr

53

2/9

53

POT/JP2008/056746

185	190	195	200	
atc aaa gct tgg agt	aaa gtt gca atg tat	gaa gac gat gaa gag att		677
Ile Lys Ala Trp Ser Lys Val Ala Met Tyr Glu Asp Asp Glu Glu Ile				
	205	210	215	
cta gct aac aac aat ttg att cca tct tat gac aga tca gtc gtg aaa				725
Leu Ala Asn Asn Asn Leu Ile Pro Ser Tyr Asp Arg Ser Val Val Lys				
	220	225	230	
gat cca aaa ggg atc aaa tct ttg ctc tgg aac aag atg aag aac gtg				773
Asp Pro Lys Gly Ile Lys Ser Leu Leu Trp Asn Lys Met Lys Asn Val				
	235	240	245	
aaa tat caa ccc caa ccc gca aaa cat ctc cca aca aac aag gtc cga				821
Lys Tyr Gln Pro Gln Pro Ala Lys His Leu Pro Thr Asn Lys Val Arg				
	250	255	260	
gcc aca tac acc ttg aga aag aac gat atc gag agg ctg aaa acc cga				869
Ala Thr Tyr Thr Leu Arg Lys Asn Asp Ile Glu Arg Leu Lys Thr Arg				
265	270	275	280	
atc cga tcc aag aaa cca ggc aca acc tgc tta tca tct ttc aca atc				917
Ile Arg Ser Lys Lys Pro Gly Thr Thr Cys Leu Ser Ser Phe Thr Ile				
	285	290	295	
gca aca gcc tat gct tgg aca tgc ctt gca aaa tct gca gca gaa gct				965
Ala Thr Ala Tyr Ala Trp Thr Cys Leu Ala Lys Ser Ala Ala Glu Ala				
	300	305	310	
gaa gaa caa gta gtc caa gac agt gac gac gag cac ttg ctc atg ccc				1013
Glu Glu Gln Val Val Gln Asp Ser Asp Asp Glu His Leu Leu Met Pro				
	315	320	325	
gtt gat ttg aga cca aga ata gat cct cca tta cca cct tct tac ttt				1061
Val Asp Leu Arg Pro Arg Ile Asp Pro Pro Leu Pro Pro Ser Tyr Phe				
	330	335	340	
gga aac tgc gtt ctt cca tct ttt gcg aaa acg acg cat ggg ctt ttg				1109
Gly Asn Cys Val Leu Pro Ser Phe Ala Lys Thr Thr His Gly Leu Leu				
345	350	355	360	
aaa gga gag tta ggg ctt ttt aat gca gtg gaa gtg att agt gat gtc				1157
Lys Gly Glu Leu Gly Leu Phe Asn Ala Val Glu Val Ile Ser Asp Val				
	365	370	375	
att acc ggt atc gtt agc aag aaa tat gac ttg ttc aaa gac tta gac				1205
Ile Thr Gly Ile Val Ser Lys Lys Tyr Asp Leu Phe Lys Asp Leu Asp				

54

380	385	390	
aga caa ggt gag att ttt cgt gcc ttg ttc gga aaa cga gtg ttg gcg			1253
Arg Gln Gly Glu Ile Phe Arg Ala Leu Phe Gly Lys Arg Val Leu Ala			
395	400	405	
atc atg ggt tcg cct aag ttc gat ctc tac gaa gtt gat ttc ggg tgg			1301
Ile Met Gly Ser Pro Lys Phe Asp Leu Tyr Glu Val Asp Phe Gly Trp			
410	415	420	
ggt aag ccg aag aag att gaa cct gtg tcc att gat aga gag agg acg			1349
Gly Lys Pro Lys Lys Ile Glu Pro Val Ser Ile Asp Arg Glu Arg Thr			
425	430	435	440
act atg tgg att agc aag tct ggc gag ttt gag ggt gga ttg gag att			1397
Thr Met Trp Ile Ser Lys Ser Gly Glu Phe Glu Gly Gly Leu Glu Ile			
445	450	455	
ggt ttt tct ttc aat aag aag aaa atg gat gct ttt ggc gag tgt ttt			1445
Gly Phe Ser Phe Asn Lys Lys Lys Met Asp Ala Phe Gly Glu Cys Phe			
460	465	470	
aac agc ggt ttg aag gat att taatttaaaa aattgttttag ctttgatgca			1496
Asn Ser Gly Leu Lys Asp Ile			
475			
tcggttttat atatgttgtg aaataatgtg gtgtgcaata actagagtaa ctttaggtta			1556
ataaattcgg tttttctggt aaatctggat gattcgtgca agcaaactgt cgatgcgttg			1616
gatggatgic gggtaggtgtg gagattgttg aagaaggaaa tggatgcttt ttttatggtg			1676
gtttgaagga ttigaatgtg tagattattg gtttattgag gttgtttata tttgtgtatg			1736
ttgtttatgc atgaaaaata ttttagatccc aacattttat gtatgacgtg gtttaatat			1796
tcgatttcga tc			1808
<210>4			
<211>1781			
<212>DNA			
<213>Pangy			
<220>			
<221>			
<222>			
<223>			
<400>4			
gacaac atg gca att cta gtc acc gac ttc gtt gtc gcg gct ata att			48
Met Ala Ile Leu Val Thr Asp Phe Val Val Ala Ala Ile Ile			

55

PCT/JP2008/056746

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

56

PCT/JP2008/056746

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

5

PCT/JP2008/056746

385	390	395	
ggt cgg gac ccg aat gtt tgg gag aat ccg ttg gag ttc ttg ccg gaa			1248
Gly Arg Asp Pro Asn Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Leu Pro Glu			
400	405	410	
aga ttc ttg tct gaa gag aat ggg aag atc aat ccc ggt ggg aat gat			1296
Arg Phe Leu Ser Glu Glu Asn Gly Lys Ile Asn Pro Gly Gly Asn Asp			
415	420	425	430
ttt gag ctg att ccg ttt gga gcc ggg agg aga att tgt gcg ggg aca			1344
Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Thr			
435	440	445	
agg atg gga atg gtc ctt gta agt tat att ttg ggc act ttg gtc cat			1392
Arg Met Gly Met Val Leu Val Ser Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His			
450	455	460	
tct ttt gat tgg aaa tta cca aat ggt gtc gct gag ctt aat atg gat			1440
Ser Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asn Gly Val Ala Glu Leu Asn Met Asp			
465	470	475	
gaa agt ttt ggg ctt gca ttg caa aag gcc gtg ccg ctc tcg gcc ttg			1488
Glu Ser Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Ser Ala Leu			
480	485	490	
gtc agc cca cgg ttg gcc tca aac gcg tac gca acc tgagctaattg			1534
Val Ser Pro Arg Leu Ala Ser Asn Ala Tyr Ala Thr			
495	500	505	
ggctgggcct agttttgtgg gccttaattt agagactttt gtgttttaag gtgtgtactt			1594
tattaattgg gtgcttaaat gtgtgtttta atttgtattt atggttaatt atgactttat			1654
tgtataatta tttatttttc ccttctgggt attttatcca tttaattttt cttcagaatt			1714
atgatcatag ttatcagaat aaaattgaaa ataatgaatc ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa			1774
aaaaaaaa			1781
<210>5			
<211>19			
<212>DNA			
<213>Artificial Sequence			
<220>			
<221>			
<222>			
<223>BP40-F2 primer			
<400>5			

gagctaggcc acatgctta

19

<210>6

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>BP40-R3 primer

<400>6

ctttgcgctc atgactcgt

19

<210>7

<211>22

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>TAT7-50F primer

<400>7

aacaatatgt gcagtcctcg aa

22

<210>8

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>ATC primer

<400>8

aactcgcatc gccaaactac

19

<210>9

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

59

PCT/JP2008/056746

<221>
<222>
<223>ATC primer
<400>9
gattgaacaa gatggattgc acgc 24
<210>10
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>ATC primer
<400>10
cgaagaactc cagcatgaga tccc 24
<210>11
<211>19
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Rh ANS 69-r1 primer
<400>11
tttgatcttc ccattgagc 19
<210>12
<211>20
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>ATC primer
<400>12
tccgcggtgg gaagatcccc 20

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA PRODUCIR UNA PLANTA QUIMÉRICA CON UNA CAPA
SUPERFICIAL TRANSGÉNICA

5

CAMPO TÉCNICO

La presente invención proporciona un método para producir una planta transgénica quimérica la cual tiene un gen
10 introducido en una parte de sus células.

ANTERIORIDADES

Los individuos compuestos de una pluralidad de grupos de
15 células genéticamente diferentes se denominan quimeras. Las quimeras vegetales se clasifican en quimeras periclinales, quimeras parciales y quimeras sectoriales de acuerdo con su estructura y se pueden obtener, por ejemplo, por medio de injertos así como por mutaciones somáticas accidentales o
20 inducidas por radiación o por duplicación cromosómica inducida por tratamiento químico.

Las quimeras sectoriales son quimeras no estructurales derivadas de la estructura de capas de las plantas y se
25 producen debido a la proliferación de células mutantes presentes de manera no estructural en los puntos de crecimiento. Principalmente, las quimeras sectoriales se refieren a quimeras en las cuales una sola capa de tejido es propiamente quimérica y frecuentemente aparece en forma de
30 líneas o franjas de diferentes colores en flores, hojas, tallos y otros órganos. Aunque las quimeras sectoriales usualmente desaparecen debido a su inestabilidad, ocasionalmente las quimeras periclinales continúan desarrollándose.

Las quimeras periclinales se refieren a quimeras estructurales derivadas del de la estructura de capas de tejido de las plantas en las cuales se desarrollan quimeras sectoriales y una sola capa celular es reemplazada completamente con células mutantes. En el caso de quimeras periclinales, una sola capa de tejido es propiamente homogénea y no quimérica. Las quimeras periclinales son estables y la frecuencia con la que desaparecen se dice que es baja. El tejido celular vegetal está compuesto básicamente por tres capas celulares que tienen una estructura de capa de tejido compuesta por una primera capa (L1), una segunda capa (L2) y una tercera capa (L3) las cuales van hacia adentro desde el exterior.

Las capas L1 y L2 surgen de las dos capas de túnica de los puntos de crecimiento, mientras de la capa L3 surge del cuerpo. En casi todas las especies de plantas, la epidermis se forma enteramente a partir de la capa L1, mientras que la capa L2 está relacionada con el sistema de células germinales. Aunque hay numerosas quimeras periclinales con distintas propiedades para cada una de estas capas celulares, las cuales tienen importancia en la horticultura y un gran valor industrial, es muy baja la probabilidad de obtener una quimera periclinal ya sea de forma accidental o por un medio en el cual las mutaciones son inducidas artificialmente en forma de exposición a la radiación o tratamiento químico.

Cuando se introduce un gen extraño en un cuerpo de planta no es fácil producir de manera artificial una planta quimérica que tenga un gen introducido únicamente en una parte de las

células. Anteriormente, ya existía un ejemplo de la producción de una planta quimérica que tiene un gen introducido únicamente en una parte de las células germinales o de la capa celular L2 por medio de la introducción de un gen en un embrión inmaduro de maíz por un método que usa una pistola de partículas (Publicación Internacional Japonesa no Examinada No. H10-503374). Sin embargo, si se introduce un gen mediado por la *Agrobacterium*, es aún más difícil producir una planta quimérica. En los métodos de introducción de gen mediada por *Agrobacterium*, células únicas en las cuales el gen ha sido introducido son seleccionadas usando como indicador un rasgo tal como resistencia a medicamentos según se determina a través de la expresión de un gen marcador y se obtiene una sola planta transgénica a partir de la célula única en la cual se introdujo el gen.

Por consiguiente, las plantas transgénicas que se obtienen de manera normal están compuestas por una sola clase de célula, genéticamente y todas las células tienen el gen introducido. Aún si se obtuviera una planta que tuviera únicamente un gen extraño en una parte de las células (planta quimérica), esta constituiría simplemente un resultado accidental y es extremadamente difícil controlar la introducción de genes de forma tal que el gen sea introducido únicamente en las células de una porción específica de una planta con el nivel tecnológico actual. Además, aún si se llegara a obtener dicha planta accidentalmente, la probabilidad de que la planta sea una quimera periclinal que tenga el gen únicamente en una parte

de las capas celulares se considera que es extremadamente bajo tal como se ha mencionado anteriormente.

Durante el curso de selección de células que tienen un gen
5 introducido, aunque pueden aparecer cúmulos de células
quiméricas o cuerpos de plantas quiméricas en los cuales se ha
introducido un gen extraño únicamente dentro de una de sus
partes, en este caso, el cúmulo de células quiméricas o el
cuerpo de planta o es completamente quimérico en todas las
10 capas celulares o únicamente una sola capa de tejido es
propiamente quimérica y no es una verdadera quimera periclinal
(aquella en la cual un gen extraño ha sido introducido
únicamente en una capa celular específica al tiempo que la capa
celular es en si homogénea). Ha habido muy pocos ejemplos
15 anteriores de la producción de una verdadera planta transgénica
quimérica periclinal que hayan sido verificados por técnicas
biológicas moleculares. Aunque se ha reportado un ejemplo
previo en el que se encontró que un cuerpo quimérico periclinal
se podía producir usando un vector que contiene un gen rol y un
20 factor de salida (Publicación de Patente Japonesa no Examinada
No. 2002-315460), este caso es de una quimera periclinal de la
capa L3.

En las plantas transgénicas, un gen introducido que está
25 incorporado en un cromosoma se transfiere de manera estable a
su progenie de conformidad con las leyes de Mendel. Por medio
del uso posterior de estas plantas transgénicas como
progenitores para cruzamiento, es posible obtener nuevas
variedades de plantas utilizando rasgos derivados del gen
30 introducido.

Adicionalmente, existen preocupaciones acerca de las plantas transgénicas con relación a los efectos en el ecosistema (medio ambiente) (tales como la dispersión de un gen introducido en el mundo natural). Los ejemplos conocidos de tecnologías para evitar la dispersión de genes de plantas transgénicas a plantas silvestres y no transformantes incluyen (1) uso de herencia maternal, (2) uso de esterilidad masculina y (3) uso de semillas estériles. El uso de la herencia maternal se refiere a un método para prevenir la dispersión de genes por polen por medio de la introducción de un gen extraño en un genoma de cloroplasto que no es pasado a las células del polen.

El uso de la esterilidad masculina se refiere a un método para inhibir la formación de polen y no permitir que el polen tenga capacidad de reproducción y posibilitar así el aislamiento genético. Por ejemplo, este método consiste en la fabricación de un producto dañino para genes específico para un tejido empleando un promotor específicamente expresado en los órganos reproductivos masculinos para la inhibir la formación de polen. El uso de semillas estériles hace referencia a un método para prevenir tanto el cruzamiento como la dispersión de semillas al inhibir directamente la formación de semillas de una planta transgénica y es equivalente a la "tecnología terminadora" y similares que evitan el almacenamiento de semillas.

Si fuera posible producir una planta transgénica que no tuviera un gen introducido en sus células germinales, aún en caso de usar dicha planta transgénica como un progenitor de polen o como un progenitor de semilla, la posibilidad de

65

dispersión del gen introducido por cruzamiento se eliminaría completamente. Esto significa que para una persona dedicada al cultivo de la planta transgénica de manera silvestre o utilización de la planta transgénica de manera industrial, se le reducirá la carga de procedimientos regulativos para el cultivo de plantas transgénicas. En Japón, dichos procedimientos incluyen una evaluación de los efectos en la biodiversidad con base en la "Ley Relativa a la Conservación y Uso Sostenible de la Diversidad Biológica a través de Regulaciones sobre el Uso de Organismos Vivos Modificados" (Protocolo de Cartagena) e incluye evaluaciones basadas en leyes similares en otros países.

Documento de Patente 1: Publicación Internacional Japonesa No Examinada No. H10-503374

Documento de Patente 2: Publicación Internacional Japonesa No Examinada No. 2002-503374

Documento de Patente 3: US' 5480789

Documento de Patente 4: WO 2005/017147

Documento de Patente 5: PCT/JP96/00348

Documento no patentario 1: Firoozababy y otros, Bio/Technology, 12: 883-888, 1994

Documento no patentario 2: Lazo y otros, Bio/Technology, 9: 963-967, 1991

Documento no patentario 3: Fujiwara y otros, Plant J., 16, 421-431, 1998

Documento no patentario 4: Mitsuhara y otros, Plant Vell. Physiol., 37, 45-59, 1996

66

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Por consiguiente, la presente invención proporciona una planta floricultural, tal como una rosa, en la cual un gen introducido únicamente está presente en una parte de las células del cuerpo de la planta, por ejemplo, está ausente en las células germinales.

Como resultado de la realización de distintos estudios para superar los problemas mencionados anteriormente, los inventores de la presente invención han encontrado que la introducción de un gen extraño en una planta floricultural mediada por *Agrobacterium tumefaciens* puede producir una planta floricultural regenerada que es una planta quimérica.

Adicionalmente, también se ha encontrado que se puede obtener una planta floricultural transgénica objetivo seleccionando una planta quimérica periclinal de estas, consiguiendo de esta manera la conclusión de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención proporciona una planta floricultural tal como una rosa en el cual un gen introducido está presente únicamente en una parte de las células y no está presente en las otras células.

La mencionada parte de las células preferiblemente compone una parte de las capas celulares. Por ejemplo, las otras células anteriormente mencionadas son polen o células ovulares. Más específicamente, la porción de las capas celulares o es la capa L1 o es la capa L1 o la capa L3. Los ejemplos de un gen introducido incluyen genes involucrados en la síntesis de los flavonoides y particularmente genes relativos al color de las

flores como genes involucrados en la síntesis de la antocianina.

En caso que la planta floricultural sea una rosa, es importante que el gen introducido sea, por ejemplo, un gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivado de una planta que pertenezca a la familia de las violetas o un gen transferasa de grupo acilo aromático derivado de una planta que pertenece a la familia de la boca de dragón. Un ejemplo de una planta que pertenece a la familia de las violetas es un pensamiento, mientras que un ejemplo de una planta que pertenece a la familia de la boca de dragón es una torenia. Los ejemplos de rosas incluyen rosa híbrida de té tal como la variedad de rosa WKS82, la rosa floribunda y la miniatura. Debido al efecto del gen introducido, la rosa de la presente invención, por ejemplo, cambia su color de flor a un color azulado en comparación con el de antes de la introducción del gen.

En caso que la planta floricultural sea un clavel, el gen introducido es uno o una pluralidad de genes tales como ADNc de gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivado de la salvia bajo el control de un promotor de un gen chalcon sintasa derivado de la boca de dragón común, un gen genómico dihidroflavonol 4-reductasa de petunia, o un gen antocianina sintasa derivado del clavel. El clavel puede ser del tipo común o del tipo "spray". Debido al efecto del gen introducido, el clavel de la presente invención, por ejemplo, cambia su color de flor a un color azulado en comparación con el de antes de la introducción del gen.

Sin embargo, el gen extraño no está limitado a los genes descritos anteriormente sino que puede ser un gen que funcione en una amplia gama de sistemas de síntesis de pigmentos y, por ejemplo, puede ser un gen que funciona en el sistema de síntesis de flavonoides. Asimismo, el gen extraño puede ser un gen marcador seleccionable en forma de un gen GFP, un gen NPTII, un gen GUS o un gen SURB. De igual forma, el gen extraño puede ser un gen que codifica un factor de transcripción, tal como un gen que codifica un factor de transcripción similar a myb y más específicamente un gen PHR1 o un gen Psr1.

Adicionalmente, la presente invención también proporciona un tejido de la rosa o de otra planta floricultural, tal como se describe anteriormente, que tiene las mismas propiedades de esta, o un producto de crecimiento nutritivo de esta.

Asimismo, la presente invención proporciona además el método para producir una planta floricultural, tal como una rosa, que comprende una etapa para introducir un gen extraño dentro de la rosa mediado por *Agrobacterium* y seleccionar una rosa en la cual el gen extraño únicamente está presente en una parte de las células de ésta. La presente invención proporciona también un método para evitar la dispersión de un gen introducido al mundo natural por medio de la producción de una planta floricultural que no tiene un gen extraño en sus células germinales tal como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 27.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un dibujo que indica la presencia o ausencia de un gen introducido en distintos órganos de la rosa.

5

La figura 2 muestra que un gen introducido está expresado únicamente en las células de la capa L1 y no está expresado en la capa L2 o la capa L3.

10

La figura 3 ilustra la estructura de un vector binario pSPB130 usado en el ejemplo 2.

MEJOR FORMA DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

15

No existen limitaciones específicas respecto a la planta floricultural usada en la presente invención siempre y cuando esta sea una planta floricultural en la cual se pueda introducir un gen extraño mediado por *Agrobacterium*. Los ejemplos de plantas floriculturales incluyen la rosa, clavel, petunia, torenia, tabaco, verbena, Nierembergia, crisantemo, lila, suspiro, boca de dragón común, ciclamen, orquídea, lisiantus, fresia, gerbera, gladiola, gipsofilia, calanchoe, pelargonium, geranio, tulipán, colza, batata, tomate, álamo, banano, eucalipto, batata dulce, soya, alfalfa, lupina y coliflor. En particular rosa, clavel, petunia, torenia, tabaco, verbena y Nierembergia son preferibles, en donde la rosa y el clavel pueden ser usados de manera particularmente preferible.

20

25

30

El gen extraño usado en la presente invención es preferiblemente un gen de una enzima que funciona en las células de la capa L1 después de ser introducido. Por ejemplo, se prefieren genes relacionados con el color de flor, genes marcadores seleccionables y genes que codifican factores de

transcripción. Los ejemplos de genes relaciones con el color de flor incluyen genes de enzimas involucradas en la síntesis de flavonoides, tales como genes relacionados con la síntesis de la antocianina, genes que codifican proteínas relativas a la síntesis de auronas, genes que codifican transferasas del grupo acil alifático y genes que codifican flavona sintasas. Los ejemplos de genes marcadores seleccionables incluyen gen GFP y gen NPTII, gen GUS y gen SURB. Los ejemplos de genes que codifican factores de transcripción incluyen genes que codifican factores de transcripción similar al MYB y más específicamente el gen PHR1 y el gen Psr1. Sin embargo esta invención no se encuentra limitada a los genes específicamente relacionados en la presente.

La rosa usada en la presente invención puede ser una variedad horticultural o una variedad silvestre. En particular, se prefieren las variedades horticulturales comercialmente útiles (Rosa híbrida) tales como rosa híbrida de té, rosa floribunda y miniatura. No existen limitaciones particulares respecto a estas variedades.

El ADN-T compuesto de un casete de expresión del gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivado del pensamiento y un casete de expresión del gen NPTII grupo acilo aromático transferasa derivado de la torenia fue insertado dentro un callo de rosa mediado por *Agrobacterium*. Dado que el transformante resultante experimentó un cambio de color debido a la acción de los genes introducidos, esto sugería la presencia de los genes introducidos en las células de los pétalos y particularmente en las células de la capa L1 de

71

dichos pétalos involucradas en la síntesis de pigmentos. Los genes introducidos no tenían indicio de estar presentes en las células de polen con base en una reacción PCR usando como molde ADN genómico extraído de diferentes órganos de la rosa.

5

Adicionalmente, en el caso de haber efectuado una prueba de cruzamiento con otras variedades hortícolas y silvestres de rosa usando polen obtenido de plantas transgénicas, no se hubiera detectado la existencia de ningún gen introducido en las semillas resultantes. Con fundamento en lo anterior, se sugería adicionalmente que los genes introducidos no estaban contenidos en las células de polen. Asimismo, se determinó claramente que los genes introducidos estaban presentes en la capa celular L1 únicamente con base en la hibridación *in situ*. Este hallazgo comprueba que los genes introducidos no están presentes en las células germinales tales como el polen que se produce por formación en la capa celular L2. Por consiguiente, una planta quimérica que tiene un gen introducido únicamente en una parte de sus células puede ser producida por medio de la introducción de un gen extraño en un callo de rosa en la manera descrita anteriormente.

10

15

20

25

30

Los ejemplos de genes de enzimas involucradas en la síntesis de flavonoides incluyen el gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa y el gen transferasa de grupo acilo aromático. Aunque no existen limitaciones particulares respecto a sus fuentes, se prefieren el gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivado de un pensamiento o de otra planta de la familia de las violetas, o un gen transferasa del grupo acilo aromático derivado de la torenia o de otras plantas pertenecientes a la

familia de la boca de dragón, las cuales se ha confirmado que funcionan en rosas.

El clavel usado en la presente invención es preferiblemente uno de tipo común o de tipo "spray" comercialmente útil. No existen limitaciones particulares respecto a sus variedades. Cualquiera de las variedades tales como Feeling White, Precross Doozy, Starzarl o Kortina Chanel pueden ser empleadas.

Con respecto al clavel, el ADNc del gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivado de la salvia bajo el control de un gen chalcon sintasa derivado de la boca de dragón común, el gen genómico dihidroflavonol 4-reductasa de la petunia y la antocianina sintasa derivada del clavel, el gen SURB fueron introducidos según las condiciones prescritas mediados por *Agrobacterium*. Dado que el transformante resultante experimentó cambio de color debido a la acción de los genes introducidos, esto sugiere la presencia de los genes introducidos en las células de los pétalos y particularmente en las células de la capa L1 de los pétalos involucradas en la síntesis de pigmentos. Se determinó que el transformado resultante era una planta quimérica en la cual los genes introducidos estaban presentes únicamente en la capa L1 con base en una reacción PCR usando como molde ADN genómico extraído de varios órganos del clavel.

Ejemplos

A continuación se proporciona una explicación más detallada de la presente invención por medios de sus ejemplos.

73

Ejemplo 1 - Método para Introducir Genes en la Rosa

Actualmente se han reportado numerosos métodos relativos a la transformación de rosas (tales como Firoozababy y otros, Bio/Technology, 12: 883-888, 1994, patentes US 5480789 y WO 2005/017147) y es posible introducir un gen extraño en una rosa de conformidad con estos métodos.

Más específicamente, un callo de rosa derivado de la hoja de una plántula estéril fue sumergido por 5 minutos en un caldo que contenía una cepa Ag 10 de *Agrobacterium tumefaciens* (Lazo y otros, Bio/Technology, 9: 963-967, 1991) seguido por la eliminación del exceso de caldo con un papel de filtro estéril, transplantándola a un medio de subcultivo y co-cultivándola en un lugar oscuro por 2 días.

Posteriormente después de lavarlo con un medio líquido MS con contenía 400 mg/l de carbenicilina, el callo de la rosa fue transplantado a un medio de selección/desinfección en el cual se adicionaron 50 mg/l de canamicina y 200 mg/l de carbenicilina al medio de subcultivo. Se repitió el transplante y cultivo en la porción que creció normalmente sin ser inhibida en el medio de selección para seleccionar un callo resistente a la canamicina.

El callo transformado que exhibía resistencia a la canamicina fue cultivado en un medio de rediferenciación que contenía 50 mg/l de canamicina y 200 mg/l de carbencilina para obtener retoños resistentes a la canamicina. Los retoños resultantes fueron aclimatados después de hacerles formar raíces en un medio 1/2 MS (que no contenía canamicina). Después

74

de sembrar en macetas a los individuos aclimatados, se cultivaron los individuos aclimatados en un sistema invernadero cerrado y se les dejó florecer. Posteriormente, se mantuvo a los individuos y se les permitió crecer por medio de propagación vegetativa (injerto).

Ejemplo 2 - Construcción del Vector Binario psPB130

Es posible estabilizar la antocianina y hacer que su color azul sea más intenso modificando la antocianina con un grupo acilo aromático (ver por ejemplo, la patente PCT/JP96/00348). Se realizó el siguiente experimento con el fin de producir una antocianina de tipo delfinidina acilada.

El ARN total fue obtenido de los pétalos de la torenia (nombre comercial: Summer Wave [marca]) después de lo cual se preparó poliA + ARN a partir de este. Se preparó una biblioteca de ADNc usando λZAPII (Stratagene) como vector a partir de esta poliA + ARN usando un kit de producción de biblioteca de ADNc direccional (Stratagene) de acuerdo al método recomendado por el fabricante.

Dado que la mayoría de antocianina de la torenia tiene la glucosa en la posición 5 modificada por un grupo acilo aromático (Suzuki y otros, Molecular Breeding, 6, 239-246, 2000), la transferasa del grupo antocianina acilo se expresa en los pétalos de la torenia. La transferasa del grupo antocianina acilo retiene la secuencia aminoácida de Asp-Phe-Gly-Trp-Gly-Lys y el gen transferasa del grupo antocianina acilo puede ser adquirido usando un ADN sintético correspondiente al mismo como cebador (patente PCT/JP96/00348).

Más específicamente, se efectuó una reacción PCR usando polimerasa Taq (Takara Japón) de acuerdo con la condiciones recomendadas por el fabricante usando 10 ng de ADN de cadena de sencilla sintetizado durante la producción de la biblioteca del ADNc de la torenia como molde y usando 100 ng de cebador ATC (5'-GA(TC)TT(TC)GGITGGGGIAA-3' en donde I representa inosina y (TC) representa T o C) (SEQ ID NO. 1) y 100 NG de cebador oligo dT (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTCTCGAG-3') (SEQ ID NO. 2) como cebadores. Se realizó una reacción PCR por 25 ciclos de reacciones consistentes en 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C. El fragmento de ADN resultante de aproximadamente 400 bp fue recuperado por medio de Gene Clean II (BIO 101 Inc.) de acuerdo al método recomendado por el fabricante y subclonado a pCR-TOPO.

Cuando su secuencia base fue determinada, se observó una secuencia que era homóloga al gen transferasa del grupo acilogeniano (Fujiwara y otros, Plant J., 16, 421-431, 1998). Adicionalmente, la secuencia base fue determinada usando el secuenciador 310 o 377 (Applied Biosystems) de acuerdo al Método Diprimer (Applied Biosystems).

Este fragmento de ADN fue posteriormente etiquetado con DIG usando un kit de detección y etiquetado DIG (Nippon Roche) y se tamizó la biblioteca de ADNc de la torenia por medio de hibridación de placa de acuerdo con el método recomendado por el fabricante. Se escogieron doce clones de manera aleatoria entre aquellos resultantes que presentaban una señal positiva y se recuperaron plásmidos de estos seguido por la determinación de las secuencias base. Estas secuencias demostraron una buena

76

homología con la transferasa del grupo antocianina acilo. La secuencia completa de base se determinó para el ADNc contenido en el clon denominado pTAT7 (SEQ ID NO. 3).

5 Después de digerir el pBE2113-GUS (Mitsuhara y otros, Plant Cell. Physiol., 37, 45-59, 1996) con SacI, se suavizaron los extremos, lo cual fue seguido de la inserción de un ligador 8 bp XhoI (Takara). Un fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb obtenido de la digestión del pTAT7 con BamHI y XhoI fue
10 insertado dentro de los sitios BamHI y XhoI de este plásmido para obtener pSBB120. Después de digerir pSPB120 con SnaBI y BamHI se suavizaron los extremos, lo cual fue seguido por ligación para obtener pSPB120'. De otro lado, un plásmido pCGP1961, que contenía ADNc del F3',5' H#40 derivado del
15 pensamiento, fue completamente digerido con BamHI seguido por la digestión parcial con XhoI y recuperación del fragmento de ADN resultante de aproximadamente 1,8 kb el cual fue posteriormente ligado con PUE5H digerido con BamHI y XhoI. El plásmido resultante fue designado pUEB40.

20 Después de digerir pUEB40 con SnaBI y BamHI, se suavizaron los extremos, lo cual fue seguido por ligación para obtener pUEBP40'. Se recuperó un fragmento de ADN de aproximadamente 2,7 kb obtenido digiriendo parcialmente pUEB40 con HindII y
25 ligado con una fragmento de ADN parcialmente digerido con HindII. Entre los plásmidos resultantes, se designó al vector binario en el cual el gen neomicin fosfotransferasa, el gen F3'5'H #40 del pensamiento y el gen 5AT de la torenia estaban respectivamente ligados en la misma dirección en un orden de
30 inicio desde el extremo derecho como pSPB130 (FIG. 3). Este

77

plásmido expresa de manera constitutiva el gen F3'5'H #40 del pensamiento y el gen 5AT de la torenia en las plantas y está diseñado para transcribir los genes de manera específica a los pétalos. Este plásmido fue introducido en la cepa Ag10 del *Agrobacterium tumefaciens*.

Ejemplo 3 - Introducción de un gen F3'5'H #40 de pensamiento y de un gen transferasa del grupo antocianino 5-acilo de torenia dentro de la WKS82

Se introdujo el plásmido pSPB130 dentro de una rosa de color violeta claro "WKS82" y se obtuvieron 89 transformantes. Se confirmó la acumulación de delphinidina en todos los 44 transformados que fueron sometidos a análisis de pigmento. El contenido de delphinidina tuvo un máximo de 91% (media:49%). El color de la flor cambió de 186d de la tabla de colores RHS (grupo púrpura agrisado) al 80c (grupo violeta púrpura). Los valores de análisis de los transformantes representativos se ilustran en las siguiente tablas.

Tabla 1

Planta No.	Acilo (%)	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
WKS82 control	0.0	0.0%	0.000	0.074	0.000	0.000	2.400	0.196
1	10.5	52.3%	0.055	0.050	0.000	0.430	0.883	0.083
2	15.9	62.5%	0.091	0.054	0.000	0.570	0.549	0.030
3	15.9	36.6%	0.044	0.076	0.000	0.622	2.221	0.102
4	6.8	40.0%	0.023	0.034	0.000	0.247	0.986	0.172
5	15.0	82.9%	0.087	0.018	0.000	5.451	0.403	0.042
6		89.7%	0.072	0.008	0.000	0.853	0.163	0.062
7	9.5	89.5%	0.101	0.012	0.000	0.719	0.144	0.019
8	14.7	11.4%	0.012	0.090	0.000	na	na	na
9	11.6	29.3%	0.024	0.059	0.000	na	na	na
10	8.7	15.2%	0.010	0.053	0.000	na	na	na
11	7.9	59.0%	0.046	0.032	0.000	0.580	0.619	0.022
12	8.5	55.6%	0.060	0.048	0.000	1.318	1.615	0.165
13	13.9	42.3%	0.026	0.035	0.000	0.603	1.094	0.052
14	10.1	10.3%	0.008	0.073	0.000	na	na	na

15	10.6	18.8%	0.018	0.079	0.000	na	na	na
16	9.3	11.7%	0.009	0.066	0.000	na	na	na
17	14.3	76.2%	0.112	0.035	0.000	3.741	1.587	0.377
18	12.7	76.7%	0.101	0.031	0.000	1.608	0.656	0.075
19	9.8	71.7%	0.057	0.022	0.000	1.403	0.455	0.041
20	5.3	14.1%	0.011	0.068	0.000	0.132	2.999	0.720
21	3.5	18.5%	0.008	0.035	0.000	na	na	na
21	7.7	23.1%	0.017	0.055	0.000	0.141	0.929	0.034
22	5.4	19.0%	0.015	0.065	0.000	0.297	4.128	1.350

Del: delfinidina, Cia: cianidina, Pel: pelargonidina, M: miricetina, Q: quercetina, K: kaempferol, Del(%): porcentaje de delfinidina en la antocianina total, Acilo(%): porcentaje de pigmento acilado en la antocianina total, na: no analizado.

Tabla 2

Planta No.	Acilo (%)	Del (%)	Del (mg/g)	Cia (mg/g)	Pel (mg/g)	M (mg/g)	Q (mg/g)	K (mg/g)
23	1.1	42.1%	0.036	0.050	0.000	0.609	2.929	0.679
24	22.7	91.0%	0.079	0.008	0.000	0.964	0.218	0.018
25	6.1	61.3%	0.048	0.030	0.000	0.490	0.468	0.029
26	8.7	91.3%	0.097	0.009	0.000	2.053	0.339	0.123
27	9.4	59.9%	0.060	0.040	0.000	1.537	1.631	0.422
28	5.5	51.2%	0.040	0.038	0.000	0.688	0.723	0.038
29	5.1	61.4%	0.056	0.032	0.003	0.637	0.537	0.087
30	7.0	53.3%	0.037	0.032	0.000	0.706	1.032	0.051
31	5.7	58.1%	0.071	0.051	0.000	1.592	1.478	0.220
32	4.3	64.6%	0.092	0.050	0.000	0.849	0.753	0.035
33	6.4	61.7%	0.042	0.026	0.000	0.477	0.468	0.023
34	8.9	58.8%	0.048	0.034	0.000	0.646	0.928	0.063
35	6.2	11.6%	0.007	0.057	0.000	0.094	1.132	0.066
36	7.1	51.2%	0.038	0.036	0.000	0.911	1.135	0.079
37	5.8	50.8%	0.029	0.028	0.000	0.868	1.105	0.096
38	5.5	47.0%	0.027	0.023	0.007	1.366	1.632	0.105
39	4.9	67.0%	0.044	0.022	0.000	0.795	0.586	0.051
40	0.0	61.1%	0.053	0.033	0.000	1.310	1.466	0.259
41	9.6	71.0%	0.074	0.030	0.000	0.460	0.337	0.023
42	1.2	27.6%	0.009	0.024	0.000	na	na	na
43	5.2	13.8%	0.013	0.078	0.000	na	na	na

Del: delfinidina, Cia: cianidina, Pel: pelargonidina, M: miricetina, Q: quercetina, K: kaempferol, Del(%): porcentaje de delfinidina en la antocianina total, Acilo(%): porcentaje de pigmento acilado en la antocianina total, na: no analizado.

Ejemplo 4: Confirmación de la Presencia del Gen Introducido en Cada Órgano

Se extrajo ADN genómico de los pétalos, hojas, tallos, raíces y polen de la rosa "WKS82" (a la que se hará referencia como "hospedador") y los recombinantes nos. 5 y 24 producidos en el ejemplo 3 (WKS82/130-4-1 y WKS82/130-9-1, a los que se hará referencia como "recombinantes") usando el kit DNeasy

79

Plant Mini Kit (Qiagen) de conformidad con el método recomendado por el fabricante. Los genes introducidos (gen F3'5'H del pensamiento (SEQ ID NO. 4), el gen 5AT de la torenia (SEQ ID NO. 3) y el gen NPTII del E. coli) fueron amplificados por medio de una reacción PCR con Takara Ex Taq (Takara) usando el ADN extraído como molde.

Adicionalmente, el gen antocianina sintasa (ANS) de la rosa fue amplificado como un control endógeno. La condiciones de la reacción PCR consistían en la repetición de 25 ciclos consistentes en la desnaturalización térmica por 5 minutos a 94°C, por 30 segundos a 94°C, por 30 segundos a 55°C y por 1 minuto a 72°C, seguido por una reacción de elongación por 7 minutos a 72°C. Los productos resultantes de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel agarosa y los fragmentos amplificados se detectaron por tinción de bromuro de etidio.

Adicionalmente se emplearon BP40-F2 y BP40-R3 como cebadores para la amplificación del gen F3'5'H del pensamiento, se empleó TAT7-50F y TAT7-R1 para la amplificación del 5AT de la torenia, se empleó NPTII-F y NPTII-R para la amplificación del gen NPTII y se empleó RhANS69-r1 y RhANS69-m1 para la amplificación del gen ANS.

Cebadores específicos para el gen F3'5'H del pensamiento:

BP40-F2: 5'-GAG CTA GGC CAC ATG CTT A-3' (SEQ ID NO. 5)

BP40-R3: 5'-CTT TGC GCT CAT GAC TCG T-3' (SEQ ID NO. 6)

Cebadores específicos para el gen 5AT de la torenia:

TAT7-50F: 5'-AAC AAT ATG TGC AGT CCT CGA A-3' (SEQ ID NO. 7)

TAT7-R1: 5'-AAC TCG CAT GCG CAA CTA C-3' (SEQ ID NO. 8)

Cebadores específicos para el gen NPTII:

NPTII-F: 5'-GAT TGA ACA AGA TGG ATT GCA CGC-3' (SEQ ID NO. 9)

NPTII-R: 5'-CGA AGA ACT CCA GCA TGA GAT CCC-3' (SEQ ID NO. 10)

Cebadores específicos para el gen ANS:

RhANS69-r1: 5'-TTT GAT CTT CCC ATT GAG C-3' (SEQ ID NO. 11)

RhANS69-m1: 5'-TCC GCG GTG GGA AGA TCC CC-3' (SEQ ID NO. 12)

Según el resultado del análisis de la PCR, aunque los genes introducidos fueron detectados en los pétalos, hojas y tallos de los recombinantes, estos genes introducidos no fueron detectados en los genomas de las raíces o el polen. Estos resultados se presentan en la Tabla 3 y en la Figura 1.

Adicionalmente, se sabe que los pétalos, los sistemas epidérmicos de las hojas y tallos, el sépalo, estambre y el pistilo son derivados de la capa L1 y de la capa L2, el polen y los oocitos de la capa L2 y el tejido interno de las hojas y tallos junto con el de las raíces de la capa L3. Dado que los genes introducidos no fueron detectados en los genomas de las raíces y el polen, esto sugiere que estos recombinantes son plantas quiméricas en las cuales los genes introducidos sólo están presentes en la capa L1.

Tabla 3: Presencia de Genes introducidos en Distintos Órganos de Recombinantes

Gen Detectado	Presencia del Gen Introducido				
	Pétalo	Hoja	Tallo	Raíz	Polen
F3'5'H del Pensamiento	+	+	+	-	-
5AT de la Torenia	+	+	+	-	-
NPTII	+	+	+	-	-

Ejemplo 5 - Cruzamiento Artificial con Variedades Hortícolas (en un Invernadero)

81

Después de removerle a las variedades hortícolas el embolsado y la antera inmediatamente antes del florecimiento de conformidad con los métodos ordinarios, se adhirió el polen del hospedador o del recombinante no. 24 producido en el Ejemplo 3 (WKS82/130-9-1, al que se hará referencia como el recombinante) cultivados en un invernadero en la mañana de un día soleado en un momento en que el estambre había madurado adecuadamente. Posteriormente, las plantas fueron nuevamente embolsadas para prevenir la adhesión de polen diferente y posteriormente se investigó la presencia de formación de semillas. Además, el polen era polen fresco obtenido por recuperación de la antera con anterioridad a la deshidratación y posteriormente se le dejó permanecer a temperatura ambiente por 1 día en un desecador que contenía gel de sílice seguido por la recuperación de la antera que experimentó deshidratación al día siguiente. Los progenitores femeninos consistían en una variedad de rosa perpetua Grandiflora conocida como "Queen Elizabeth" (Reina Elizabeth) y una variedad de rosa Floribunda perpetua conocida como "Gold Bunny" (Conejillo Dorado).

La presencia de formación de semillas fue confirmada un mes o más después del cruzamiento por frutos que no se habían caído fisiológicamente y en las cuales se observó endurecimiento de semillas. Adicionalmente con el fin de confirmar el paso de genes introducidos a la siguiente generación por parte de semillas obtenidas por medio de cruzamiento con el recombinante, se extrajo ADN recombinante de las semillas resultantes usando Nucleon Phytopure para el Kit de Extracción de ADN Vegetal (Amersham Biosciences) y después

de amplificación adicional con el Kit REPLI-g (Qiagen) se detectó el gen introducido (F3'5'H del pensamiento) por medio de la Reacción de PCR.

5 En la Tabla 4 se presentan los resultados. No hubo casi ninguna diferencia observada en las tasas de cuajado de semillas entre el hospedador y el recombinante. Adicionalmente, a partir del análisis de las semillas obtenidas por cruzamiento con el recombinante, no se detectó la existencia de genes
10 introducidos en la semilla. Con base en estos hallazgos, aunque no hubo diferencias en la habilidad de fertilización del polen entre el hospedador y el recombinante, por motivos tales como que el gen introducido no estuviera contenido en las células de polen del recombinante, se sugería que el gen introducido no
15 había sido pasado a la siguiente generación.

Tabla 4: Polinización Artificial con Variedades Hortícolas
Pollination with Horticultural Varieties

	Hospedador (WKS82)		Recombinante No. 24 (WKS82/130-9-1)			
	No. de semillas cuajadas/no. de flores cruzadas	Tasa de Cuajado de Semillas (%)	No. de semillas cuajadas /no. de flores cruzadas	Tasa de Cuajado de Semillas (%)	No. de semillas en la cuales en gen introducido fue detectado/no. de semillas analizadas	Tasa de detección de gen introducido (%)
Queen Elizabeth	19/20	95	20/20	100	0/94	0
Cold Bunny	16/20	80	14/20	70	0/94	0

20 Ejemplo 6 - Cruzamiento Artificial con Variedades Hortícolas (Exteriores)

Después de removerle a las variedades hortícolas el embolsado y la antera inmediatamente antes del florecimiento de
25 conformidad con los métodos ordinarios, se adhirió el polen del hospedador o del recombinante no. 24 producido en el Ejemplo 3 (WKS82/130-9-1, al que se hará referencia como el recombinante)

cultivado en exteriores en la mañana de un día soleado en el momento en que el estambre había madurado adecuadamente. Posteriormente, las plantas fueron nuevamente embolsadas para prevenir la adhesión de polen diferente y posteriormente se
5 investigó la presencia de formación de semillas. Además, el polen era polen fresco obtenido por recuperación de la antera con anterioridad a la deshicencia y posteriormente se le dejó permanecer a temperatura ambiente por 1 día en un desecador que contenía gel de sílice seguido por la recuperación de la antera
10 que experimentó deshicencia al día siguiente.

Los progenitores femeninos consistían en una variedad de rosa perpetua Grandiflora conocida como "Queen Elizabeth" (Reina Elizabeth) y una variedad de rosa Floribunda perpetua
15 conocida como "Gold Bunny" (Conejillo Dorado).

La presencia de formación de semillas fue confirmada tres o más meses después del cruzamiento por frutos que no se habían caído fisiológicamente y en las cuales se observó cuajado de
20 semillas. Adicionalmente las semillas recuperadas del cruzamiento fueron recuperadas y tratadas a una temperatura baja de 4°C por 3 meses y posteriormente fueron sembradas. Con el fin de confirmar el paso de genes introducidos a la siguiente generación por parte de estas semillas, se extrajo
25 ADN genómico de las hojas de las plántulas resultantes usando el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) seguido por detección del gene introducido (gen F3'5'H del pensamiento) por medio de la Reacción PCR. Adicionalmente el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de la rosa se detectó como el gen de
30 control intrínseco.

84

Además, aunque normalmente se observa germinación después de cerca de un mes, cuando se tratan las semillas a bajas temperaturas, sólo se observó germinación en una porción de las
5 semillas incluso después de tres meses. Por consiguiente, una porción de las semillas sembradas que no germinaron fueron re-recuperadas y se realizó un análisis similar empleando dichas semillas. Se extrajo ADN genómico de las semillas re-recuperadas usando Nucleon Phytopure para el Kit de Extracción
10 de ADN Vegetal (Amersham Biosciences) y después de amplificar el ADN genómico con el Kit REPLI-g (Qiagen) se detectó el gen introducido (F3'5'H del pensamiento) por medio de la Reacción PCR.

En las Tablas 5 y 6 se presentan los resultados. No hubo
15 casi ninguna diferencia observada en las tasas de cuajado de entre el hospedador y el recombinante. Adicionalmente, aunque se analizaron las plántulas obtenidas por cruzamiento con el recombinante por medio de la Reacción PCR, los genes introducidos derivados del recombinante no fueron detectados en
20 las plántulas. Con base en estos hallazgos, aunque no hubo diferencias en la habilidad de fertilización del polen entre el huésped y el recombinante, por motivos tales como que el gen introducido no estuviera contenido en las células de polen del recombinante, se sugiere que el gen introducido no había sido
25 pasado a la siguiente generación.

Tabla 5: Tasas Semillas-plántulas con Variedades Artificiales por Polinización Artificiales y Tasas de Detección del Gen Introducido en los Individuos de Germinación

	Hospedador (WKS82)			Recombinante No. 24 (WKS82/130-9-1)				
	No. de semillas cuajadas /no de flores cruzadas	Tasa de cuajad o de semill as (%)	No. Total de semill as	No. de semillas cuajadas /no. de flores cruzadas	Tasa De cuajad o de semill as (%)	No. Total de semill as	No. de individuos en los cuales se detectó el gen/no. de individuos germinados	Tasa de Detección del gen introducido (%)
Queen Elizabeth	27/41	65.8	262	19/42	45.2	192	0/4	0.0
Gold Bunny	14/64	21.8	174	15/60	25.0	150	0/9	0.0

5

Tabla 6: Tasas de Detección del Gen Introducido en Semillas Obtenidas por medio de Polinización Artificial con Variedades Hortícolas

	Recombinante No. 24 (WKS82/130-9-1)		
	No. de semillas recuperadas ¹⁾	No. de semillas en las cuales se detecto el gen introducido/no. de semillas analizadas ²⁾	Tasa de detección de gen introducido (%)
Queen Elizabeth	155	0/33	0.0
Gold Bunny	122	0/37	0.0

10

*1)2): Las diferencias en los números de semillas recuperadas y los números de semillas analizadas se originaron debido a que las semillas que eran huecas imposibilitaron la extracción de ADN o para las cuales la amplificación del gen de control no fue observado en el análisis de Reacción de PCR, las cuales fueron excluidas de los análisis.

15

Ejemplo 7 - Cruzamiento Artificial con Variedades Silvestres (Exteriores)

20

Después de removerle a las variedades hortícolas el embolsado y la antera inmediatamente antes del florecimiento de conformidad con los métodos ordinarios, se adhirió el polen del hospedador o del recombinante no. 24 producido en el Ejemplo 3 (WKS82/130-9-1, al que se hará referencia como el recombinante) cultivado en exteriores en la mañana de un día soleado en el momento en que el estambre había madurado adecuadamente.

25

86

Posteriormente, las plantas fueron nuevamente embolsadas para prevenir la adhesión de polen diferente y posteriormente se investigó la presencia de formación de semillas. Además, el polen era polen fresco obtenido por recuperación de la antera con anterioridad a la deshicencia y posteriormente se le dejó permanecer a temperatura ambiente por 1 día en un desecador que contenía gel de sílice seguido por la recuperación de la antera que experimentó deshicencia al día siguiente.

Los progenitores femeninos consistían en variedades silvestres conocidas como *R. multiflora* Thunb. ex Murray, *R. wichuraiana* Crep. y *R. rugosa* Thunb. ex Murray).

La presencia de formación de semillas fue confirmada dos o más meses después del cruzamiento por frutos que no se habían caído fisiológicamente y en las cuales se observó endurecimiento de semillas. Adicionalmente las semillas resultantes fueron recuperadas y sometidas a un tratamiento a baja temperatura de 4°C por 3 meses y posteriormente fueron sembradas. Con el fin de confirmar el cruzamiento con el hospedador o con el recombinante y el paso de genes introducidos a la siguiente generación, se extrajo ADN genómico de las hojas de las plántulas resultantes usando el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) seguido y analizado por medio la Reacción PCR. Un gen relacionado con la perpetuidad (gen KSN) se usó como indicador de la presencia de cruzamiento con el hospedador o el recombinante, al tiempo que se usó un gen introducido derivado del recombinante en forma del gen F3'5'H del pensamiento como indicador del paso del gen introducido.

87

Asimismo el gen GAPDH de la rosa fue usado como un gen de control intrínseco.

El gen KSN se forma como resultado de la inserción de un transposón de aproximadamente 9 kb en el gen ksn (el cual tiene una función que mantiene el meristema del retoño) de las rosas estacionales, y dado que la expresión de este gen está inhibida, como resultado ocasiona que la inhibición de la formación de los capullos en el meristema del retoño se cancele, promoviendo la formación de capullos, lo cual se reporta ocasiona que la flor se vuelva perenne¹⁾. Las variedades hortícolas son homocigóticas para el gen KSN. De otro lado, las variedades silvestres estacionales son homocigóticas para el gen ksn. Por consiguiente, en las variedades silvestres (variedades estacionales), se considera que el gen KSN únicamente es detectado en caso que se haya cruzado con una variedad horticultural.

Además, aunque normalmente se observa germinación después de cerca de un mes, cuando se tratan las semillas a bajas temperaturas, sólo se observó germinación en una porción de las semillas incluso después de tres meses. Por consiguiente, una porción de las semillas sembradas que no germinaron fueron re-recuperadas y se realizó un análisis similar empleando dichas semillas. Se extrajo ADN genómico de las semillas re-recuperadas usando Nucleon Phytopure para el Kit de Extracción de ADN Vegetal (Amersham Biosciences) y después de amplificar el ADN genómico con el Kit REPLI-g (Qiagen) se detectó la presencia de cruzamiento con el

hospedador o recombinante y la presencia del paso del gen introducido por medio de la Reacción PCR.

En las Tablas 7 y 8 se presentan los resultados. Las tasas de semilla-endurecimiento son extremadamente bajas en caso de usar el recombinante para cada uno de los progenitores del polen. Aunque las plántulas resultantes fueron analizadas por medio de la Reacción PCR, se observó polinización entre el hospedador o recombinante y las variedades silvestres, pero no se detectó el gen introducido derivado del recombinante. Adicionalmente, las semillas sembradas que no germinaron fueron re-recuperadas y cuando se observó el desarrollo de las semillas, casi todas las semillas estaban vacías y solo se pudo confirmar la presencia de embriones normales en un número muy reducido de semillas. Aunque estas también fueron analizadas por medio de la Reacción PCR, se confirmó la polinización entre el hospedador o recombinante y las variedades silvestres, aunque no se detectó un gen introducido derivado del recombinante. Con base en estos hallazgos, por motivos tales como que el gen introducido no estuviera contenido en las células de polen del recombinante, se consideró que el gen introducido no había sido pasado a la siguiente generación.

Por consiguiente, dado que las células de polen del recombinante no contienen un gen introducido en caso de polinización entre el recombinante y las variedades silvestres (*R. multiflora* Thunb. ex Murray, *R. wichuraiana* Crep. y *R. rugosa* Thunb. ex Murray), esto sugiere que el gen introducido no ha tenido la posibilidad de ser pasado a la siguiente generación.

Adicionalmente, no fue posible confirmar la existencia de embriones normales para ninguna de las semillas de *R. wichuraiana* Crep.

Tabla 7: Tasas de cuajado de semillas de Variedades Silvestres (*R. multiflora* Thunb. ex Murray, *R. wichuraiana* Crep. y *R. rugosa* Thunb. ex Murray) obtenidas por Polinización Artificial y Tasas de Detección del Gen Introducido en Individuos Germinados

	Hospedador (WSK82)						Recombinante No. 24 (WKS82/130-9-1)					Tasa de detección del gen introducido (%)
	No. de semillas cuajadas /no. de flores cruzadas	Tasa de Cuajado de Semilla s (%)	No. Total de semilla s	No. de individuos polinizados/ no de germinacione s	Tasa de Polinización	No. de semillas cuajadas /no. de flores cruzadas	Tasa de Cuajado de Semilla s (%)	No. Total de semilla s	No. de individuos polinizados/n o de germinaciones	Tasa de Polinización	No. de individuos en los cuales se detectó el gen introducido/ No. de germinacione s	
R. multiflora Thunb. ex Murray	18/251	7.1	27	1/2	50.0	34/255	13.3	59	1/4	25.0	0/4	0.0
R. wichuraiana Crep.	23/260	8.8	44	1/1	100.0	14/261	5.4	44	0/0	--	0/0	--
R. rugosa Thunb. ex Murray	2/74	2.7	263	0/0	--	4/71	5.6	283	0/0	--	0/0	--

Tabla 8: Tasas de Detección del Gen Introducido en Semillas Obtenidas por Polinización Artificial de Variedades Silvestres (R. multiflora Thunb. ex Murray, R. wichuraiana Crep. y R. rugosa Thunb. ex Murray)

	Hospedador (WKS82)				Recombinante No. 24 (WKS82/130-9-1)			
	No. de semillas recuperadas ¹⁾	No. de semillas polinizadas /No. de semillas analizadas ²⁾	Tasa de Polinización (%)	No. de semillas recuperadas ¹⁾	No. de semillas polinizadas /No. de semillas analizadas ²⁾	Tasa de Polinización (%)	No. de semillas en las cuales se detectó el gen introducido /No. de semillas analizadas	Tasa de Detección del Gen Introducido (%)
R. multiflora Thunb. ex Murray	23	11/12	91.7	44	8/8	100.0	0/8	0.0
R. wichuraiana Crep.	43	0/0	--	44	0/0	--	0/0	--
R. rugosa Thunb. ex Murray	257	30/33	90.9	281	24/26	92.3	0/26	0.0

*1)2): Las diferencias en los números de semillas recuperadas y los números de semillas analizadas se originaron debido a que las semillas que eran huecas imposibilitaron la extracción de ADN o para las cuales la amplificación del gen de control no fue observado en el análisis de Reacción de PCR, las cuales fueron excluidas de los análisis.

Ejemplo 8 - Hibridación in situ

Se realizó hibridación *in situ* con el fin de investigar la localización de un gen introducido más detalladamente.

5 Después de cortar una yema que media 5 mm en la dirección vertical, las porciones cortadas fueron fijadas sumergiéndolas en una solución de fijado de formaldehído. A continuación, la solución de fijado se reemplazó de forma secuencial con soluciones de etanol que variaban del 50% al
10 100% para deshidratar las porciones cortadas seguido por reemplazo (clarificación) con lemozol al 25%. Las secciones fueron posteriormente sumergidas de forma gradual en parafina y embebidas en ésta. Las muestras embebidas fueron rebanadas con un micrótopo y adheridas a portaobjetos de vidrio.
15 Después de hidratar los portaobjetos de vidrio, de tratarlos con Proteínasa K y efectuar un pre-tratamiento en forma de acetilación y similares, las muestras fueron deshidratadas y secadas. Sondas con etiquetas DIG (sondas de sentido y antisentido de los genes BP40, TAT, NPTII, y de cada gen)
20 fueron disueltas en una solución de hibridación, colocadas en los portaobjetos secados y se les dejó reaccionar. Después de la hibridación, los portaobjetos de vidrio fueron lavados seguidos por la detección del DIG.

25 Como se muestra en las fotografías de la figura 2, los genes introducidos únicamente se expresaron en células de la capa L1, al tiempo que no se observó expresión en las células de las capas L2 o L3. Con base en lo anterior, dado que los genes introducidos sólo estaban presentes en la capa L1 pero
30 no en la capa L2 ni en la capa L3, se verificó que los genes

93

introducidos no estaban presentes en las células germinales (células de polen y células ovulares) que se desarrollan a partir de la capa L2.

5 Ejemplo 9 - Producción y Análisis de Clavel Transgénico

Se produjo un clavel en el cual un gen introducido estaba presente únicamente en la capa L1.

10 El clavel transgénico fue producido de la manera descrita a continuación por medio de la introducción de un gen mediado por *Agrobacterium*. Un plásmido pCGP2442 (descrito en la solicitud de patente US/988,293 presentada el 15 de noviembre de 2007) que contiene en la región ADN-T del mismo el ADNc del gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa bajo el control de un promotor de un gen chalcon sintasa derivado de la boca de dragón común, un gen genómico dihidroflavonol 4-reductasa de petunia, un gen antocianina sintasa derivado del clavel, y un marcador seleccionable de transformación en forma del ADNc del SURB gen acetolactato sintasa del tabaco bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Este plásmido fue introducido en la *Agrobacterium* usando el método descrito en la Publicación de la Solicitud Internacional de Patente Japonesa no Examinada No. H11-505116 seguido por la introducción posterior en la variedad de clavel Kortina Chanel. Se detectó delfinidina en los pétalos del clavel transgénico resultante, la cual no está contenida en los claveles naturales. Esto indica que el gen introducido funciona al menos en las células epidérmicas de los pétalos. Se realizó un análisis detallado en una de sus cepas (cepa 25 19907). Adicionalmente, como resultado de la extracción de 30

94

ADN cromosómico de esta cepa 19907 y del análisis por medio de hibridación Southern usando un gen del mencionado ADN-T del pCGP2442 como sonda, se confirmó que el gen introducido había sido insertado en un cromosoma.

5

Se obtuvo un cultivo de tejido plantando los retoños de la cepa 19907 y de la cepa 26898 en un medio sólido MS libre de hormonas que contenía 5 de $\mu\text{g/L}$ de Glean. Al estudiarse en los retoños la presencia de formación de raíces durante 4 a 5 semanas, se notó que aunque la cepa 26898 formó raíces, la cepa 19907 no lo hizo.

10

A continuación, secciones de las hojas de la cepa 19907, de la cepa 26898 y de la variedad Kortina Chanel fueron cultivadas por 5 semanas en un medio sólido MS de resistencia media con 0,5 mg/L de IAA con un contenido de 5 $\mu\text{g/L}$ de Glean y en un medio sólido MS de resistencia media con 0,5 mg/L de IAA sin ningún contenido de Glean. Las secciones de hojas de la cepa 19907 y de la variedad Kortina Chanel que fueron cultivadas en un medio que contenía 5 $\mu\text{g/L}$ de Glean se tornaron cafés. La sección de hoja obtenida de la cepa 26898 estaba verde y se observó que había formado raíces.

20

Se extrajo ADN cromosómico de las hojas y raíces de la cepa 19907 usando el kit DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Se realizó posteriormente un Reacción PCR usando 100 ng de este ADN como molde y usando cebadores sintéticos para amplificar el gen SuRB (#960: 5'-ATT TCC GCC TCA TTA GAA GG-3', #1468: 5'-GCC TCA TGT TTC CAT TTG TCG-3'). Después de efectuar la

30

95

reacción por 15 minutos a 95°C a un volumen de reacción de 25 µl, usando el producto Hot Star Taq, la reacción se realizó adicionalmente por 35 ciclos donde un ciclo consistía en 1 minuto a 96°C, 30 segundos a 52°C y 2 minutos a 72°C, seguidos por la realización finalmente de la reacción por 7 minutos a 72°C. Cuando el producto de la reacción fue finalmente analizado por medio de electroforesis de gel de agarosa, aunque se observó la banda para el SURB cuando se usaba el ADN de la hoja como molde, la banda para el SURB no se observaba cuando se usaba el ADN de raíz.

Se sabe que las hojas están compuestas por células L1, L2 Y L3, y asimismo se conoce que las raíces están compuestas por células L2 y L3. Con base en los resultados anteriores, en el caso de la cepa 19907, el gen introducido estaba presente en las células L1, pero no estaba presente ni en las células L2 ni en las L3, o en otras palabras, se determinó que la cepa 19907 era una planta quimérica en la cual el gen introducido está presente sólo en la capa L1.

Ejemplo 10 - Estudio del Potencial de Aplicación de la Tecnología de la Presente Invención a Distintas Plantas

(1) Ejemplo de Infección en una Petunia

Usando una petunia como planta floricultural, se introdujo un gen involucrado en la síntesis de flavonoides como un gen extraño.

Se recuperó un fragmento de ADN (de aproximadamente 2,0 kb), que ligaba el ADNc del F3'5'H de la Clítora Mariana y un terminador nos, de una secuencia promotora El₂35S, la cual

46

tenía dos secuencias potenciadoras repetitivas secuencia
arriba de un promotor 35S del virus del mosaico de la
coliflor (Plant Cell Physiol., 37, 49-59 (1996)), y el
pSPB748 (Plant Cell Physiol., 43, s277 (2002)) obtenido
5 introduciendo una secuencia de ADNc F3'5'H de la Clítora
Mariana (descrita en la solicitud de patente No. WO
2004/020637) y una secuencia de terminación de nopalina
sintasa (nos) dentro de una vector binario pBinPlus
(Transgenic Research, 4, 288-290 (1995)), por medio de la
10 digestión con BamHI y digiriéndola parcialmente con EcoRI,
seguido por la introducción en un sitio BamHI/EcoRI de
pBluescriptII (sk-) (Stratagene) para obtener un plásmido pB-
Bn. Un casete génico consistente en un gen GUS y un
terminador nos fue extraído con XbaI y KpnI de una secuencia
15 promotora 6xXRE que tenía seis repeticiones del elemento
responsivo xenobiótico (XRE) del ratón y pBlueSXXREGUS
(Kodama (2003), Molecular mechanisms of chemical-inducible
gene expression in higher plants for monitoring and
remediation of environmental contaminants, Diss.), obtenido
20 por medio de la introducción de un gen GUS y un terminador
nos en un pBluescriptII (ks+) (Stratagene), seguido por la
introducción en el mismo sitio de un fragmento de ADN
(aproximadamente 2.0 kb) ligando F3'5'H de la Clítora Mariana
y el terminador nos extraído del pB-Bn por medio de la
25 digestión con XbaI y KpnI para obtener pB-X6Bn. Un casete
génico (2,2 kb) consistente en la secuencia promotora 6xXRE,
el ADNc del F3',5'H de la Clítora Mariana y una secuencia de
terminación nos, extraída por medio de la digestión de pB-
X6Bn con XhoI, fue posteriormente introducido en el sitio

47

SalI de un vector pSKAVAt (Kodama (2003)), en el cual un AhRV y un Arnt, al cual una secuencia no traducida (UTR) 5' del virus del mosaico de la alfalfa le fue respectivamente agregada, fueron insertados en la dirección delantera en dos conjuntos de unidades de expresión consistentes en un promotor CamV35S y un terminador nos en un vector binario pBin19, para construcción del pSBP1459.

El pSBP1459 fue posteriormente introducido a la cepa Ag10 de la *Agrobacterium tumefaciens* (BioTechnology, 9, 963-967 (1991)) para transformar la petunia (variedad PL, Skr4 xSw63 (igual que en Nature, 366, 276-279) de acuerdo con el método de *Agrobacterium* usando un disco foliar. La introducción del plásmido dentro de la *Agrobacterium* y la transformación fueron realizadas de conformidad con un método conocido (Plant J., 5, p. 81-82 (1994)). Aunque el color de flor de la variedad PL va de blanco a rosado claro, dado que carece del gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa y del gen flavonoide 3'-hidroxilasa, la variedad de petunia usada para fines de éste experimento no está limitado a la PL. Se adquirieron 38 cepas independientes de petunia PAB transformada.

(2) Ejemplo de Infección a Torenia - Parte 1

Usando torenia como la planta floricultural, se introdujo un gen marcador seleccionable en forma del gen GFP como gen extraño.

El CaMV35S-sGFP(S65T)-NOS3' (Curr. Biol., 6, 325-330 (1996)) fue digerido con BamHI y EcoRI, y se introdujo ADN

98

(1,0 kb) ligando el gen sGFP gene con el gen terminador nos dentro del sitio BamHI/EcoRI del pBluescriptII (sk-) para la construcción de un pB-Gn plásmido. Un casete génico consistente en un gen GUS y un terminador nos fue extraído del último pBlueSXXREGUS con XbaI y KpnI, y se introdujo un casete génico (1,0 kb) consistente en sGFP y terminador nos extraído del pB-Gn con XbaI y KpnI en el mismo sitio para la construcción del pB-X6Gn. Un casete génico (1,2 kb) consistente en promotor 6xXRE, sGFP y terminador nos extraído del pB-X6Gn por digestión con XhoI fue posteriormente introducido en el sitio SalI del pSKAVAt para la construcción del pSPB1458.

El pSPB1458 fue posteriormente introducido en una cepa Ag10 de la *Agrobacterium tumefaciens* seguido por la transformación de la torenia (variedad Summer Wave Blue: SWB (Suntory Flowers) a un disco foliar de acuerdo con un método de *Agrobacterium* usando un disco foliar. La transformación de la torenia fue efectuada de conformidad con un método conocido (Mol. Breeding, 6, 239-246 (2000)). Aunque el color de flor de la variedad SWB es azul, la variedad de torenia usada para fines de este experimento no está limitada a la SWB. Se adquirieron 40 cepas independientes de torenia TAG transformada.

25

(3) Ejemplo de Infección en Torenia - Parte 2

Usando torenia como planta horticultural, un gen involucrado en la síntesis de flavonoides fue introducido como gen extraño.

30

Una construcción (pSFL307 ó pSFL308) que tiene un casete de expresión de un gen involucrado en la síntesis de la aurona y una casete para inhibir la expresión de los genes relacionados con la síntesis de antocianina por medio del iARN fue introducido usando la variedad de torenia Summer Wave Blue [Onda Estival Azul] como la planta hospedadora de acuerdo con un método usando *Agrobacterium* de la misma manera descrita anteriormente. El color de flor de la torenia resultante cambió de azul a amarillo.

(4) Ejemplo de Infección en Tabaco, Verbena o Nierembergia.

Usando tabaco, verbena o nierembergia como planta floricultural, se introdujo un factor de transcripción como gen extraño.

El gen PHRI *Arabidopsis thaliana* (Genes & Development, 15: 2122-2133 (2001)), el cual se expresa bajo condición de privación de fosfato, fue subclonado en un vector pCR2.1 usando un Kit de Clonación TOPO-TA (Invitrogen) de conformidad con el manual. Un producto amplificado por una reacción PCR usando los cebadores PHRf (5'-ATGGAGGCTCGTCCAGTTCAT-3') y PHRr (5'-TCAATTATCGATTTTGGGACGC-3') fue subclonado y denominado como pSPB1892. Un vector binario pSPB2311 que tenía un promotor (Mac) ligando una secuencia potenciadora de un promotor de 35S con un promotor de manopina sintasa y un terminador de manopina sintasa (mas) fue extraído con SmaI para obtener pSPB2311A. Un fragmento suavizado por medio de la extracción de pSBP1892 con EcoRI

100

fue posteriormente insertado dentro del pSBP2311A para obtener pSBP2314.

Posteriormente, la *Agrobacterium* (cepa Ag10) fue entonces transformada usando pSBP1898 con base en un método conocido (Plant J., 5, 81, 1994) y el tabaco, la verbena y la nierembergia fueron transformadas usando la *Agrobacterium* transformada que tenía pSPB1898. La transformación del tabaco, la verbena y la nierembergia fue realizada respectivamente con base en métodos conocidos (Science, 227, 1229, 1985; Plant Cell Rep., 21, 459, 2003; y, Plant Biotech., 23, 19, 2006). La introducción de genes en los cuerpos de las plantas resultantes fue confirmada por medio de la extracción de ADN de una hoja de cada uno de los cuerpos de las plantas seguidos por reacciones PCR empleando el gen PHR1 como molde. Se adquirieron 11 plantas transgénicas PHR1 del tabaco, 16 de la verbena y 1 de la Nierembergia.

(5) Ejemplo de infección en Impatiens y Begonia

Usando Impatiens o Begonia como planta floricultural, se introdujo un gen de factor de transcripción como gen extraño.

La transformación de impatiens (*Impatiens Walleriana*) se efectuó básicamente usando las variedades Glitter Red [Rojo Resplandeciente] (Sakata Seed) y Tempo Pink [Rosado Compás] (Takii & Co.) de conformidad con la patente de los Estados Unidos 6,121,511. Después de pre-cultivar ápices de yemas, nudos, pecíolos y secciones de hoja cortados de plántulas in vitro por 5 días en un medio líquido de pre-

(01

cultivo (medio MS con contenido de 1 mg/L de TDZ), se dejó a las muestras sin perturbarlas por 48 horas en un medio sólido de precultivo (medio MS con contenido de 0,05 mg/L de NA, 6 mg/L de Zeatina y 0,3% de goma gellan).

5

Posteriormente, las muestras fueron infectadas con *Agrobacterium* (cepa Ag10) que contenía pSPB2314 seguido por cultivo durante 4 a 8 semanas en un medio selectivo (medio MS que contenía 0,05 mg/L of NAA, 6 mg/L de zeatina, 100 mg/L de canamicina, 500 mg/L de carbenicilina, 100 mg/L de cefotaxima y 3% goma gellan) para obtener retoños (Tabla 9). No fue posible obtener retoños de las secciones de hojas dado que estas se tornaban café fácilmente. Aunque se obtuvieron numerosos retoños de una sola explantar en el caso de nudos y

10

15

ápices de retoños, se consideró que estas contenían un gran número de falsos positivos. La expresión tomó una considerable cantidad de tiempo en los retoños obtenidos de los pecíolos y aunque hubo unos pocos, estos parecían ser los más confiables.

20

La transformación de la begonia (*Begonia semperflorens*) se efectuó usando las variedades Ambassador White (Blanco Embajador) y Ambassador Scarlet (Escarlata Embajador) (Sakata Seed). Se cortaron secciones de hoja y pecíolos de plántulas

25

in vitro y se infectaron con *Agrobacterium* (cepa Ag10) que contenía pSPB2314, seguido por cultivo por 3 días a oscuras en un medio de co-cultivo (medio MS que contenía de 0,5 mg/L de IAA, 0,1 mg/L de TDZ, 0,5% de PVP, 2 mg/L de AgNO₃, 200 µM de acetosiringona y 0,3% goma gellan). Posteriormente las

30

muestras fueron cultivadas de 3 a 5 días en un medio pre-

(52)

selectivo (medio MS que contenía contenido de 1 mg/L de BAP, 1 mg/L de zeatina, 0,1 mg/L de IAA, 500 mg/L de timentina, 50 µM de acetosiringona y 0,25% de goma gellan), seguido por cultivo consecutivo por 2 semanas en el medio selectivo 1 (medio MS que contenía 2 mg/L de TDZ, 0,1 mg/L de NAA, 100 mg/L de canamicina, 500 mg/L de timentina y 0.4% de agar), cultivo por 2 semanas en el medio selectivo 2 (medio MS con contenido de 0,2 mg/L de BAP, 0,1 mg/L de NAA, 100 mg/L de canamicina, 500 mg/L de timentina y 0.4% de agar) y 3 semanas en el medio selectivo 3 (medio MS con contenido de 100 mg/L de canamicina, 500 mg/L de timentina y 0.4% de agar).

El tejido circundante fue cortado de los retoños que se formaron durante dicho periodo cuando crecieron hasta un diámetro de 5 mm o mayor, los retoños se transfirieron al medio selectivo 4 (medio MS que contenía 150 mg/L de canamicina, 500 mg/L de timentina y 0.4% de agar) y después de cultivar por otras 2 a 3 semanas, los retoños fueron transferidos a un medio de iniciación de raíces (medio MS con contenido de 100 mg/L de canamicina, 500 mg/L de timentina y 0.4% de agar) para obtener retoños que formaban raíces (Tabla 10).

Tabla 9: Número de Retoños de Impatiens

Variedad	Fuente Explantar	No. de Explantares Infectadas	No. de Retoños Resultantes
Glitter Red	Hoja	30	0
	Ápice del Retoño	82	187
	Nudo	145	89
	Pecíolo	90	0
Tempo Pink	Hoja	35	0
	Ápice del Retoño	196	333
	Nudo	418	184
	Pecíolo	259	5

Tabla 10: Número de Retoños de Begonia

Variedad	No. de Explantares Infectados	No. de Retoños Resultantes
Ambassador White	940	13
Ambassador Scarlet	805	2

5 Como se indica anteriormente, se determinó que era
posible introducir un gen extraño usando *Agrobacterium* en
plantas hortícolas diferentes a las rosas y los claveles
tales como las petunias, la torenia, el tabaco, la verbena,
la nierenbergia, las impatiens o begonias. El gen extraño
10 introducido no está limitado a los genes específicos
ejemplificados en la presente sino que se considera que es
posible incluir cualquier gen en estas plantas
florícolas usando métodos similares siempre y cuando
éste sea un gen que funcione en la células L1 después de su
15 introducción. Dado que la tecnología de la presente invención
puede ser aplicada a las plantas florícolas a las cuales
es posible introducirles un gen extraño usando la
Agrobacterium, con respecto a estas plantas, es posible
producir una planta florícola de la presente invención, a
saber una planta florícola en la cual un gen extraño está
20 únicamente presente en una parte de las células de la planta
transgénica pero no está presente en otras células.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

25 Una planta transgénica producida de acuerdo con el método
divulgado por la presente invención es una planta quimérica
que no tiene un gen introducido en la capa celular L2, la
cual que incluye células germinales y similares, sino que
únicamente tiene el gen introducido en las células de la capa
30 L1. Dado que éste tipo de transformada no tiene un gen

introducido en las células germinales, se puede prevenir la posibilidad de que la planta transgénica sea libremente usada como un progenitor de cruzamiento por un tercero no autorizado.

5

Adicionalmente, dado que existe una preocupación relativa a las plantas transgénicas con respecto a la dispersión al mundo natural de un gen introducido, la posibilidad de dispersión de un gen introducido puede ser completamente evitado por medio de la producción de una planta transgénica que no tenga un gen introducido en sus células germinales. Por consiguiente es posible reducir la carga colocada en las personas que intentan usar una planta transgénica de manera industrial con respecto a la solicitud de aprobación para el uso industrial de una planta transgénica (en Japón, la "Ley Relativa a Conservación y Uso Sostenible de la Diversidad Biológica a través de Regulaciones concernientes al Uso de Organismos Vivos Modificados" (Protocolo de Cartagena)).

15

20

105

REIVINDICACIONES

1. Una planta floricultural que contiene un gen
5 extraño únicamente en una parte de sus células, pero no en
otras células.

2. La planta floricultural de acuerdo con la
reivindicación 1, en donde la parte de las células comprende
10 una parte de una capa celular.

3. La planta floricultural de acuerdo con la
reivindicación 1 o 2, en donde las otras células son células
de polen o células ovulares.

15 4. La planta floricultural de acuerdo con la
reivindicación 1 o 2, en donde las otras células son células
comprendidas en la capa L2.

20 5. La planta floricultural de acuerdo con la
reivindicación 2 o 3, en donde la parte de la capa celular o
es la capa L1 o es la capa L1 y la capa L3.

25 6. La planta floricultural de acuerdo con la
reivindicación 2 o 3, en donde la planta floricultural es una
planta floricultural en de la cual es posible introducir un
gen extraño mediado por la *Agrobacterium*.

30 7. La planta floricultural de acuerdo con la
reivindicación 6, en donde la planta floricultural es
cualquiera entre rosa, clavel, petunia, torenia, tabaco,
verbena, nierembergia, crisantemo, lila, suspiro, boca de
dragón común, ciclamen, orquídea, lisiantus, fresia, gerbera,

106

gladiola, gipsofilia, calanchoe, pelargonium, geranio, tulipán, colza, batata, tomate, álamo, banano, eucalipto, batata dulce, soya, alfalfa, lupina y coliflor.

5 8. La planta floricultural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el gen extraño es un gen que funciona en las células de la capa L1 después de su introducción.

10 9. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el gen extraño es un gen relacionado con el color de flor.

15 10. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el gen extraño es un gen involucrado en la síntesis de flavonoides.

20 11. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el gen extraño es un, o una pluralidad de, gen flavonoide 3',5'- hidroxilasa derivado de una planta que pertenece a la familia de las violetas, gen transferasa del grupo acilo aromático derivado de una planta perteneciente a la familia de la boca de dragón, ADNc del gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivado de la salvia, gen
25 genómico de dihidroflavonol 4-reductasa de la petunia y un gen antocianina sintasa derivado del clavel.

30 12. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el gen extraño es un gen marcador seleccionable o un gen que codifica un factor de transcripción.

157

13. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la planta floricultural es una rosa.

5

14. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la rosa es Rosa híbrida.

10

15. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la rosa es rosa híbrida de té, rosa floribunda o miniatura.

15

16. La planta floricultural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde el gen extraño es un gen relacionado con el color de flor.

20

17. La planta floricultural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde el gen extraño es un gen involucrado en la síntesis de flavonoides.

25

18. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el gen extraño es el gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivado de una planta que pertenece a la familia de las violetas y/o un gen transferasa del grupo acilo aromático derivado de una planta que pertenece a la familia de la boca de dragón.

30

19. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la planta que pertenece a la familia de las violetas es un pensamiento.

20. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 18, en donde la planta que pertenece a la familia de la boca de dragón es una torenia.

5 21. La planta floricultural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, en donde el color de flor cambia a una rosa de color azulado en comparación con el de antes de la introducción del gen.

10 22. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la planta floricultural es el clavel.

15 23. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el clavel es de tipo "spray" o de tipo común.

20 24. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el gen extraño es un gen relacionado con el color de flor.

25 25. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el gen extraño es un gen de una enzima involucrada en la síntesis de flavonoides.

30 26. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el gen extraño es un, o una pluralidad de, ADNc del gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivado de la salvia, gen genómico de dihidroflavonol 4-reductasa de la petunia y gen antocianina sintasa derivado del clavel.

109

27. La planta floricultural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en donde el color de flor cambia a un clavel de color azulado en comparación con el de antes de la introducción del gen.

5

28. Un tejido que tiene las mismas propiedades que la planta floricultural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, o un producto de propagación vegetativa de este.

10

29. Un método para producir la planta floricultural de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, que comprende una etapa de introducción de un gen extraño dentro de una planta mediado por *Agrobacterium* y la selección de una planta en la cual el gen extraño únicamente está presente en una parte de sus células.

15

30. Un método para prevenir la dispersión al mundo natural de un gen introducido mediante la producción de una planta floricultural que no tiene un gen extraño en sus células germinales de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 27.

20

25

30

110

RESUMEN

5 Se produce una rosa en la cual un gen introducido está
presente únicamente en una parte de sus células, tales como
las células la capa L1 de los pétalos de la flor, pero no
está presente en células germinales ni en células ovulares.
Dado que el gen introducido no se propaga a otras rosas, aún
cuando esta rosa sea cruzada con otras rosas, es posible
10 evitar completamente la posibilidad de dispersión del gen
introducido.

(11)

Fig.1

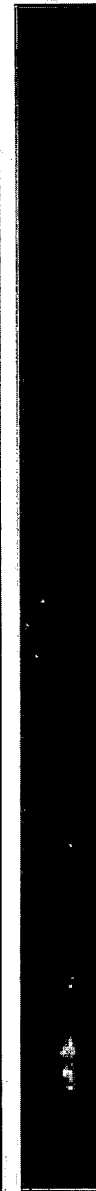
L1		L2		L3	
PÉTALO	HOJA	TALLO	RAÍZ	POLEN	
WKS82/130-9-1	WKS82/130-4-1	WKS82/130-9-1	WKS82/130-4-1	WKS82/130-9-1	WKS82/130-4-1
WKS82	WKS82	WKS82	WKS82	WKS82	WKS82



F3/5'H PENSAMIENTO



5AT TORENIA



NIPT II

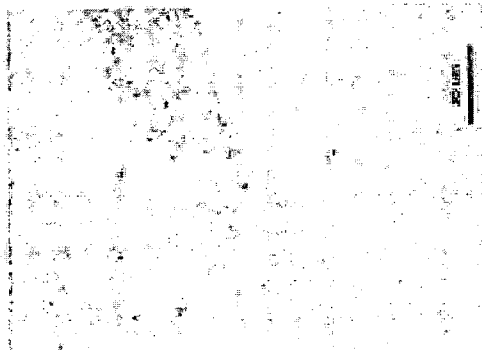


ANS

112

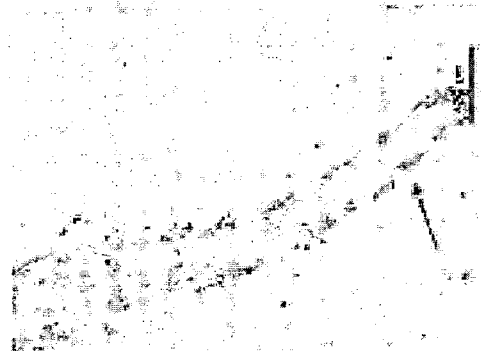
Fig.2

WKS82



Pétalo

WKS82/130-4-1



Pétalo

WKS82/130-9-1

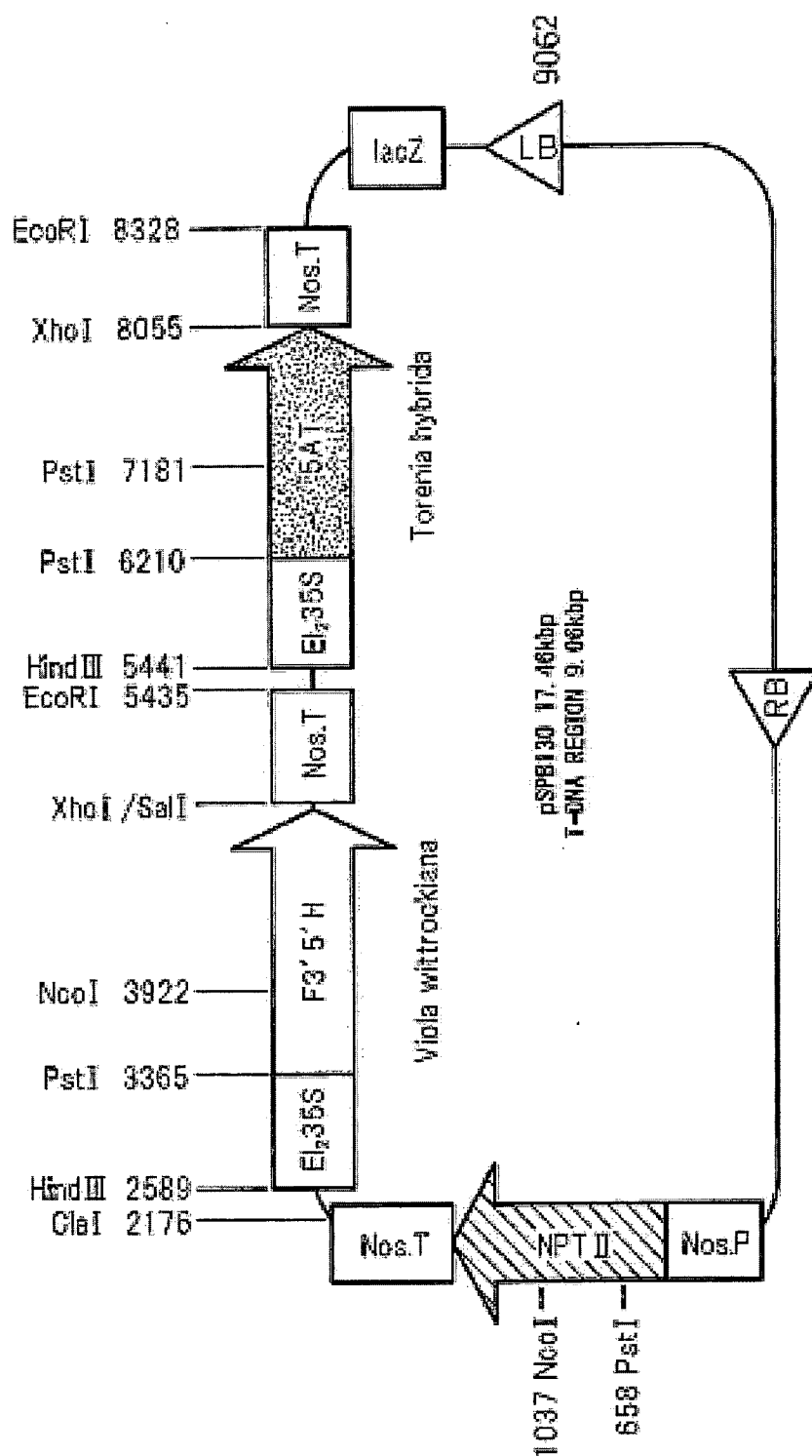


Pétalo

(sonda; F3 5'H del pensamiento)

113

Fig. 3



3/3

SEQUENCE LISTING

<110>International Flower Developments Proprietary Limited

<120>Method for producing periclinal chimera transgenic rose

<130>V568-PCT

<160>12

<210>1

<211>17

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>ATC primer

<400>1

gayttyggit ggggiaa

17

<210>2

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Oligo dT primer

<400>2

tttttttttt tttttttctc gag

23

<210>3

<211>1808

<212>DNA

<213>Torenia

<220>

<221>

<222>

<223>

<400>3

cttcaaagcc aaaaagaaac aattaatca atg gct gtt gaa gcc ccc aaa aca

53

Met Ala Val Glu Ala Pro Lys Thr

185

	1	5	
ata tgt gca gtc ctc gaa aac tct ctt att aca cca caa agt acc gat			101
Ile Cys Ala Val Leu Glu Asn Ser Leu Ile Thr Pro Gln Ser Thr Asp			
10 15 20			
aca gaa caa act ctt tca ctc aca ttc ttt gac atc aaa tgg gtt cat			149
Thr Glu Gln Thr Leu Ser Leu Thr Phe Phe Asp Ile Lys Trp Val His			
25 30 35 40			
ttt cat cca atg caa tgc ctt gtg ttg tac aac ttc cca tgt tct aag			197
Phe His Pro Met Gln Cys Leu Val Leu Tyr Asn Phe Pro Cys Ser Lys			
45 50 55			
tca cat ttt ctc gaa gcc aca gtt ccg agc ttc aaa tca tca ctc tcc			245
Ser His Phe Leu Glu Ala Thr Val Pro Ser Phe Lys Ser Ser Leu Ser			
60 65 70			
aaa act ctc aga cac tat ctt cca tta tca gga aac tta tac tat cca			293
Lys Thr Leu Arg His Tyr Leu Pro Leu Ser Gly Asn Leu Tyr Tyr Pro			
75 80 85			
aac ccg acc cat gac atg gat gat gat gaa tgc aac atg ccc gag atc			341
Asn Pro Thr His Asp Met Asp Asp Asp Glu Ser Asn Met Pro Glu Ile			
90 95 100			
cgt tat aaa cct ggc gac tgc gtt tct cta acc gtt gca gag tac ttc			389
Arg Tyr Lys Pro Gly Asp Ser Val Ser Leu Thr Val Ala Glu Tyr Phe			
105 110 115 120			
tcc ggt cat gaa gac aat acg act act gaa gaa tac ttc aat tac ctc			437
Ser Gly His Glu Asp Asn Thr Thr Thr Glu Glu Tyr Phe Asn Tyr Leu			
125 130 135			
act gga aat ttc cag aga gat tgc gat caa ttc tat gat ctc tta ccc			485
Thr Gly Asn Phe Gln Arg Asp Cys Asp Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Pro			
140 145 150			
gat ttt cga gac ccg gaa acc gaa tcc aat tgc aca gta atc cca ctt			533
Asp Phe Arg Asp Pro Glu Thr Glu Ser Asn Cys Thr Val Ile Pro Leu			
155 160 165			
ata gca gtt caa atc aca ctc ttt cca ggt gct ggg ata tgt ctg ggg			581
Ile Ala Val Gln Ile Thr Leu Phe Pro Gly Ala Gly Ile Cys Leu Gly			
170 175 180			
gtc atc aac agt cac gta gtt ggc gat gcg agt tcc ata gtg gga ttc			629
Val Ile Asn Ser His Val Val Gly Asp Ala Ser Ser Ile Val Gly Phe			

116

PCT/JP2008/056746

185	190	195	200	
atc aaa gct tgg agt aaa gtt gca atg tat gaa gac gat gaa gag att				677
Ile Lys Ala Trp Ser Lys Val Ala Met Tyr Glu Asp Asp Glu Glu Ile				
205	210	215		
cta gct aac aac aat ttg att cca tct tat gac aga tca gtc gtg aaa				725
Leu Ala Asn Asn Asn Leu Ile Pro Ser Tyr Asp Arg Ser Val Val Lys				
220	225	230		
gat cca aaa ggg atc aaa tct ttg ctc tgg aac aag atg aag aac gtg				773
Asp Pro Lys Gly Ile Lys Ser Leu Leu Trp Asn Lys Met Lys Asn Val				
235	240	245		
aaa tat caa ccc caa ccc gca aaa cat ctc cca aca aac aag gtc cga				821
Lys Tyr Gln Pro Gln Pro Ala Lys His Leu Pro Thr Asn Lys Val Arg				
250	255	260		
gcc aca tac acc ttg aga aag aac gat atc gag agg ctg aaa acc cga				869
Ala Thr Tyr Thr Leu Arg Lys Asn Asp Ile Glu Arg Leu Lys Thr Arg				
265	270	275	280	
atc cga tcc aag aaa cca ggc aca acc tgc tta tca tct ttc aca atc				917
Ile Arg Ser Lys Lys Pro Gly Thr Thr Cys Leu Ser Ser Phe Thr Ile				
285	290	295		
gca aca gcc tat gct tgg aca tgc ctt gca aaa tct gca gca gaa gct				965
Ala Thr Ala Tyr Ala Trp Thr Cys Leu Ala Lys Ser Ala Ala Glu Ala				
300	305	310		
gaa gaa caa gta gtc caa gac agt gac gac gag cac ttg ctc atg ccc				1013
Glu Glu Gln Val Val Gln Asp Ser Asp Asp Glu His Leu Leu Met Pro				
315	320	325		
gtt gat ttg aga cca aga ata gat cct cca tta cca cct tct tac ttt				1061
Val Asp Leu Arg Pro Arg Ile Asp Pro Pro Leu Pro Pro Ser Tyr Phe				
330	335	340		
gga aac tgc gtt ctt cca tct ttt gcg aaa acg acg cat ggg ctt ttg				1109
Gly Asn Cys Val Leu Pro Ser Phe Ala Lys Thr Thr His Gly Leu Leu				
345	350	355	360	
aaa gga gag tta ggg ctt ttt aat gca gtg gaa gtg att agt gat gtc				1157
Lys Gly Glu Leu Gly Leu Phe Asn Ala Val Glu Val Ile Ser Asp Val				
365	370	375		
att acc ggt atc gtt agc aag aaa tat gac ttg ttc aaa gac tta gac				1205
Ile Thr Gly Ile Val Ser Lys Lys Tyr Asp Leu Phe Lys Asp Leu Asp				

117

PCT/JP2008/056746

380	385	390	
aga caa ggt gag att ttt cgt gcc ttg ttc gga aaa cga gtg ttg gcg			1253
Arg Gln Gly Glu Ile Phe Arg Ala Leu Phe Gly Lys Arg Val Leu Ala			
395	400	405	
atc atg ggt tgc cct aag ttc gat ctc tac gaa gtt gat ttc ggg tgg			1301
Ile Met Gly Ser Pro Lys Phe Asp Leu Tyr Glu Val Asp Phe Gly Trp			
410	415	420	
ggt aag ccg aag aag att gaa cct gtg tcc att gat aga gag agg acg			1349
Gly Lys Pro Lys Lys Ile Glu Pro Val Ser Ile Asp Arg Glu Arg Thr			
425	430	435	440
act atg tgg att agc aag tct ggc gag ttt gag ggt gga ttg gag att			1397
Thr Met Trp Ile Ser Lys Ser Gly Glu Phe Glu Gly Gly Leu Glu Ile			
445	450	455	
ggt ttt tct ttc aat aag aag aaa atg gat gct ttt ggc gag tgt ttt			1445
Gly Phe Ser Phe Asn Lys Lys Lys Met Asp Ala Phe Gly Glu Cys Phe			
460	465	470	
aac agc ggt ttg aag gat att taatttaaaa aattgttttag ctttgatgca			1496
Asn Ser Gly Leu Lys Asp Ile			
475			
tgcgttttat atatgtttgtg aaataatgtg gtgtgcaata actagagtaa ctttaggtta			1556
ataaattcgg tttttctgtt aaatctggat gattcgtgca agcaaactgt cgatgcgttg			1616
gatggatgtc ggggtgtgtg gagattgttg aagaaggaaa tggatgcitt ttttatggtg			1676
gtttgaagga ttgaaatgtg tagattattg gtttattgag gtgtttata tttgtgtatg			1736
ttgtttatgc atgaaaaata tttagatccc aacattttat gtatgacgtg gtttaatt			1796
tcgatttcga tc			1808
<210>4			
<211>1781			
<212>DNA			
<213>Pangy			
<220>			
<221>			
<222>			
<223>			
<400>4			
gacaac atg gca att cta gtc acc gac ttc gtt gtc gcg gct ata att			48
Met Ala Ile Leu Val Thr Asp Phe Val Val Ala Ala Ile Ile			

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

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

120

POT/JP2008/056746

385	390	395	
ggt cgg gac ccg aat gtt tgg gag aat ccg ttg gag ttc ttg ccg gaa			1248
Gly Arg Asp Pro Asn Val Trp Glu Asn Pro Leu Glu Phe Leu Pro Glu			
400	405	410	
aga ttc ttg tct gaa gag aat ggg aag atc aat ccc ggt ggg aat gat			1296
Arg Phe Leu Ser Glu Glu Asn Gly Lys Ile Asn Pro Gly Gly Asn Asp			
415	420	425	430
ttt gag ctg att ccg ttt gga gcc ggg agg aga att tgt gcg ggg aca			1344
Phe Glu Leu Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile Cys Ala Gly Thr			
435	440	445	
agg atg gga atg gtc ctt gta agt tat att ttg ggc act ttg gtc cat			1392
Arg Met Gly Met Val Leu Val Ser Tyr Ile Leu Gly Thr Leu Val His			
450	455	460	
tct ttt gat tgg aaa tta cca aat ggt gtc gct gag ctt aat atg gat			1440
Ser Phe Asp Trp Lys Leu Pro Asn Gly Val Ala Glu Leu Asn Met Asp			
465	470	475	
gaa agt ttt ggg ctt gca ttg caa aag gcc gtg ccg ctc tcg gcc ttg			1488
Glu Ser Phe Gly Leu Ala Leu Gln Lys Ala Val Pro Leu Ser Ala Leu			
480	485	490	
gtc agc cca cgg ttg gcc tca aac gcg tac gca acc tgagctaag			1534
Val Ser Pro Arg Leu Ala Ser Asn Ala Tyr Ala Thr			
495	500	505	
ggctgggcct agttttgtgg gccttaattt agagactttt gtgttttaag gtgtgtactt			1594
tattaattgg gtgcttaaatt gtgtgtttta atttgtattt atggttaatt atgactttat			1654
tgtataatta tttatttttc ccttctgggt attttatcca ttttaatttt cttcagaatt			1714
atgatcatag ttatcagaat aaaattgaaa ataatgaatc ggaaaaaaaa aaaaaaaaaa			1774
aaaaaaa			1781
<210>5			
<211>19			
<212>DNA			
<213>Artificial Sequence			
<220>			
<221>			
<222>			
<223>BP40-F2 primer			
<400>5			

121

PCT/JP2008/056746

gagctaggcc acatgctta	19
<210>6	
<211>19	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>BP40-R3 primer	
<400>6	
ctttgcgctc atgactcgt	19
<210>7	
<211>22	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>TAT7-50F primer	
<400>7	
aacaatatgt gcagtcctcg aa	22
<210>8	
<211>19	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>ATC primer	
<400>8	
aactcgcatc gccaaactac	19
<210>9	
<211>24	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	

<221>	
<222>	
<223>ATC primer	
<400>9	
gattgaacaa gatggattgc acgc	24
<210>10	
<211>24	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>ATC primer	
<400>10	
cgaagaactc cagcatgaga tccc	24
<210>11	
<211>19	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>Rh ANS 69-rl primer	
<400>11	
tttgatcttc ccattgagc	19
<210>12	
<211>20	
<212>DNA	
<213>Artificial Sequence	
<220>	
<221>	
<222>	
<223>ATC primer	
<400>12	
tccgcggtgg gaagatcccc	20

(23)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/056746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01H1/00(2006.01)i, A01H5/00(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)

C12N15/09, A01H1/00, A01H5/00

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)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq, Science Direct, JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	Sanae KISHIMOTO et al., "Random Primer o Riyo shita Kiku no Edakawari no Shuen Chimera Kozo no Kaiseki", Heisei 9 Nendo Yasai Sagyo Kenkyu Seika Joho (1998), pages 49 to 50	1-7/8-30
X/A	Sanae KISHIMOTO, "Kiku no Edakawari no Shuen Chimera Kozo no RAPD Bunseki", Norinsuisansho Yasai Sagyo Shikenjo News (1997), Vol.49, page 4	1-7/8-30
Y	WO 2005/017147 A1 (International Flower Developments PTY. Ltd.), 24 February, 2005 (24.02.05), Full text & EP 1652916 A1 & AU 2004264488 A1 & JP 2005-513219 A & KR 2006081400 A & CN 1836039 A & MX 2006001621 A1	1-30

☒ 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 April, 2008 (22.04.08)

Date of mailing of the international search report

13 May, 2008 (13.05.08)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

(24)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/056746

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-512057 A (International Flower Developments PTY. Ltd.), 13 April, 2006 (13.04.06), Full text & WO 2004/020637 A1 & AU 2003254410 A1 & EP 1546340 A1 & CN 1678746 A & US 2007/033674 A1	1-30
Y	JP 11-505116 A (International Flower Developments PTY. Ltd.), 18 May, 1999 (18.05.99), Full text & WO 96/36716 A1 & AU 9656396 A & EP 873410 A1 & AU 699874 B & HU 9802555 A2 & NZ 307119 A & US 6080920 A & JP 3585932 B2 & EP 873410 B1 & DE 69636328 E & ES 2265644 T3 & DE 69636328 T2	1-30
Y	Yoshikazu TANAKA et al., "Hana no Iro no Taisha Kogaku -Aoi Bara to Kankyo Mondai eno Torikumi-", Bio Industry (2005), Vol.22, No.8, pages 33 to 38	1-30
Y	JP 2006-280282 A (Nippon Paper Industries Co., Ltd.), 19 October, 2006 (19.10.06), Full text (Family: none)	1-30
Y	Oono, Y. et al., Effects of the Over-Expression of the rolC Gene on Leaf Development in Transgenic Periclinal Chimeric Plants Plant Cell Physiol. (1993) Vol.34, No.5, p.745-752	1-30
Y/A	JP 2001-190169 A (Florigene Europe B.V.), 17 July, 2001 (17.07.01), Full text & WO 92/00371 A & EP 536327 A1 & JP 05-507415 A & EP 536327 A4 & US 5480789 A & US 5530182 A & US 5792927 A & US 2001/007157 A1	14-15/1-13, 16-30
A	Lembert, C. et al., Use of Agrobacterium Rhizogenes to Create Chimeric Apple Trees Through Genetic Grafting BIO/TECHNOLOGY (1991) Vol.9, p.80-83 *	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/056746

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

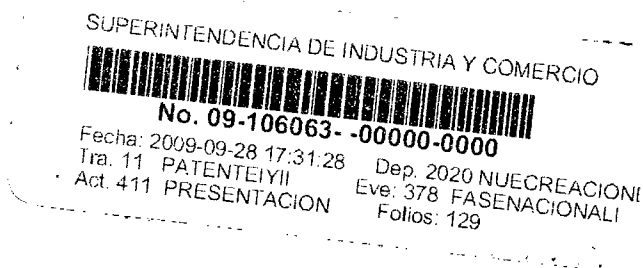
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 93/18155 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 16 September, 1993 (16.09.93), Full text & AU 9229560 A & JP 05-515520 A & EP 632128 A1 & EP 632128 A4 & AU 680401 B & US 6114601 A & KR 245488 B1 & US 6232109 B1 & CA 2365599 A1* & CA 2130800 C & US 2002/100072 A1 & JP 3403196 B2	1-30
A	JP 2003-523724 A (Exelixis Plant Sciences, Inc.), 12 August, 2003 (12.08.03), Full text & WO 2000/53794 A2 & AU 200037369 A & EP 1161526 A2 & US 2002/157130 A1 & NZ 514459 A	1-30
A	JP 10-501139 A (Danisco A/S), 03 February, 1998 (03.02.98), Full text & WO 95/34667 A2 & AU 9526694 A & WO 95/34667 A3 & EP 766743 A1 & BR 9507970 A & AU 690999 B & NZ 287848 A & KR 97704045 A & MX 9606226 A1 & US 6307127 B1 & RU 2173345 C2 & US 2001/034887 A1 & CN 1155907 A	1-30
A	WO 2001/92536 A1 (International Flower Developments PTY. Ltd.), 06 December, 2001 (06.12.01), Full text & AU 200160700 A & EP 1291426 A1 & JP 2002-500728 A & US 2004/132016 A1 & EP 1291426 B1 & DE 60123787 E & US 7186886 B2 & ES 2274888 T3 & DE 60123787 T2	1-30
A	Li, MY. et al., Observation of High-frequency Occurrence of Chimera Adventitious Shoots in Tissue Culture from the Chimera Tissues of Pelargonium zonale HortScience (2005) Vol.40, No.5, p.1461-1463	1-30

18. La planta floricultural de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el gen extraño es el gen flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivado de una planta que pertenece a la familia de las violetas y/o un gen transferasa del grupo acilo aromático derivado de una planta que pertenece a la familia de la boca de dragón.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 70,565
FECHA : SEPTIEMBRE 21 DE 2009



***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	17854550	21/09/2009	45,108,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

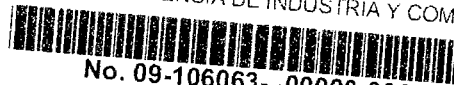
RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010:15218-841-004-6.

128

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-106063- -00000-0000

Fecha: 2009-09-28 17:31:28 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800178089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 66,575
FECHA : SEPTIEMBRE 7 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

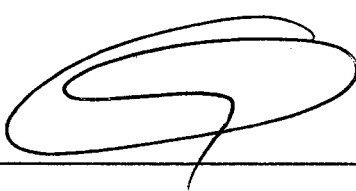
DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	17854583	07/09/2009	52,455,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I *** TASA ANUAL C.RECARGO AÑOS 4 a 8 P	350,000.00

TOTAL : \$ 350,000.00

SON: TRESCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO 15218-841-004 6.

129

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 68,588
FECHA : SEPTIEMBRE 14 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-106063- -00000-0000

Fecha: 2009-09-28 17:31:28 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411-PRESENTACION Folios: 129

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	17854546	14/09/2009	33,365,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI
			TOTAL : \$ 25,000.00

SON: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

0010.152.8 - 841-004-6.





Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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 []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

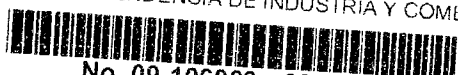
COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-106063- -00000-0000

Fecha: 2009-09-28 17:31:28 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYI Eve. 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 129

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Conmutador: 3 82 08 40

Fax: 350 52 20

E-mail: info@sic.gov.co

www.sic.gov.co

Bogotá, D.C., Colombia



Bogotá,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PROPRIETARY LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	9 106063
	Solicitud internacional	PCT/JP2008/056746
	Fecha inicio fase nacional	29/10/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	237

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


JESÚS FERNEL GARCÍA GARCÍA
Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 ENE. 2010
adpall

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el rótulo