

25



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Organización y
Digitalización CSA Ltd.

BT

PCT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-103864

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

METODO PARA LA DETERMINACION DE PRESENCIA DE CRUCES

CON ROSA CULTIVADA EN ROSA SILVESTRE

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

INTERNATIONAL FLOW DEVELOPMENTS PROPRIETARY LIMITED

DOMICILIO

VICTORIA, AUSTRALIA

74. APODERADO

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D.C.,

(FORMA P-10)

PA

23-10-2004



PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y.COMERCIO



No. 09-103864- -00000-0000

Fecha: 2009-09-23 16:57:17 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 99

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ 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,
Australia

Domicilio: Victoria,
Australia

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3
REPRESENTANTE
O APODERADO

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

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T. P. 23.555

4
INVENTOR (ES)
(72)

1. Noriko NAKAMURA
c/o Suntory Limited,
Research Center,
1-1-1 Wakayamadai,
Shimamoto-cho,
Mishima-gun,
Osaka 6188503,
Japón

3. Yoshikazu TANAKA
c/o Suntory Limited,
Research Center,
1-1-1 Wakayamadai,
Shimamoto-cho,
Mishima-gun,
Osaka 6188503,
Japón

2. Masako MIZUTANI
c/o Suntory Limited,
Research Center,
1-1-1 Wakayamadai,
Shimamoto-cho,
Mishima-gun,
Osaka 6188503,
Japón

5
PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/JP2008/056000 Fecha: 21 de marzo de 2008
Publicación Internacional No. WO 2008/117860 A1 Fecha: 2 de octubre de 2008

6
Título (54)
METODO PARA LA DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE CRUCES CON ROSA CULTIVADA EN ROSA SILVESTRE

7
Clasificación Internacional (51) C12Q 001/068

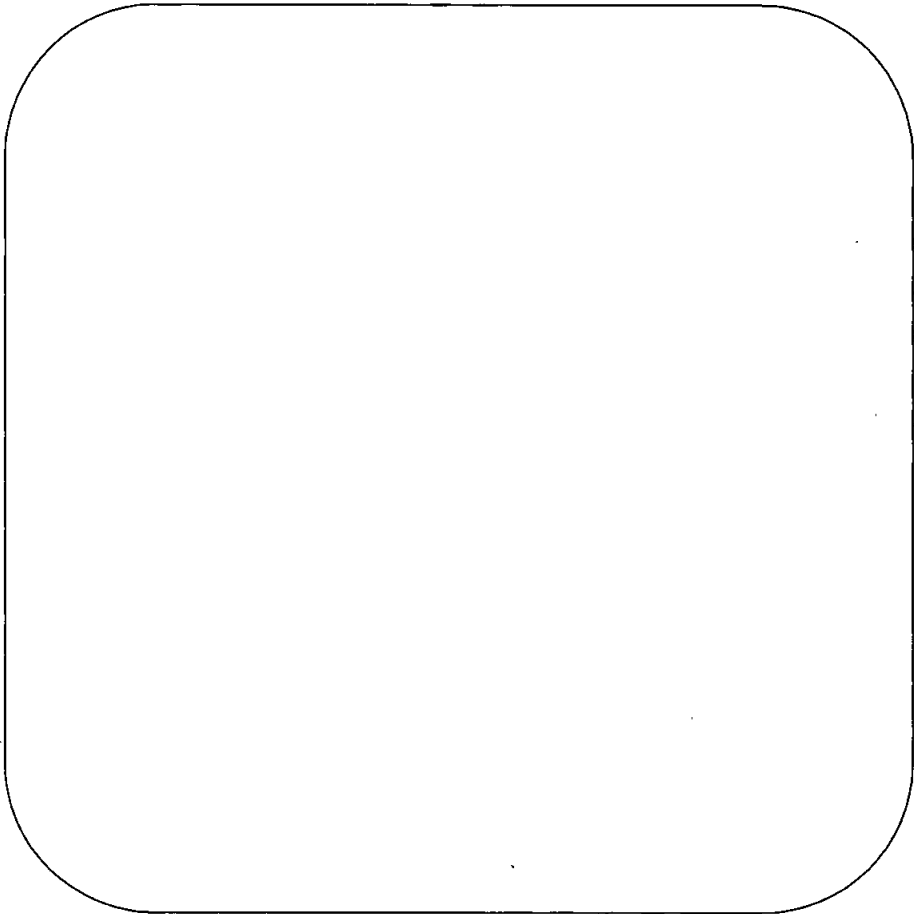
8	Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	SI ☒ NO ☐	<u>JP</u>	<u>23 de marzo de 2007</u>	<u>2007-077882</u>

9	Comprobante de pago No.: <u>09-68,551</u>	Fecha: <u>14 de septiembre de 2009</u>
	<u>09-68,586</u>	<u>14 de septiembre de 2009</u>

10	Anexos:
☒	Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 540.000.oo.
☒	Comprobante de pago por 1 reivindicación adicional después de la decimoquinta reivindicación por \$25.000.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 PÁEZ

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

JGG

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2008/117860 A1

Descripción:

Páginas 20 en el idioma original

Páginas 31 en español

Reivindicaciones: Número (s) 16

Figuras: Número (s) 1

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**

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

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

domiciliado (s) en/of _____

1 Park Drive, Bundoora, Victoria -3083, Australia

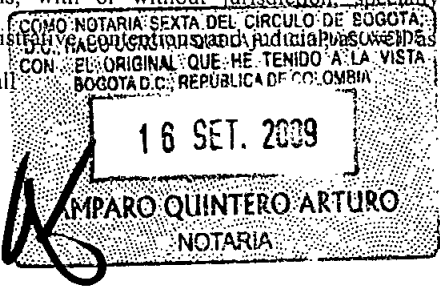
75218
6002

ratify the patent application No. 06. 024. 513 filed by Emilio FERRERO before the Colombian Patent Office on March 10, 2006.
presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and DANIEL PEÑA, tpa. 65620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35 Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el 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 ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La presente se aplicará cuando el segundo representante suplente haya reemplazado al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario Consular en el extranjero; y si en caso de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los representantes faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando en ausencia o impedimento del representante principal, o de su primer o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Yo, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para tener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos abogados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden judicial, contencioso-administrativo y judicial, así como los casos 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 of 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 the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative-judicial and judicial, before the Arbitration Court, in all



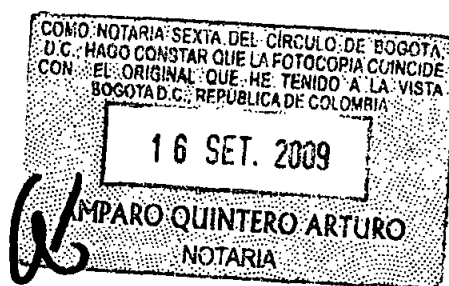
arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos. a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñanzas, nombres de dominio, variedades 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 oficiales.

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: TOSHIIKO ASHIKARI, Director

INTERNATIONAL FLOWER DEVELOPMENTS PROPRIETARY LIMITED

Toshi Ashikari



[Signature]

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de

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

TOSHITAKO ASHICARI

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

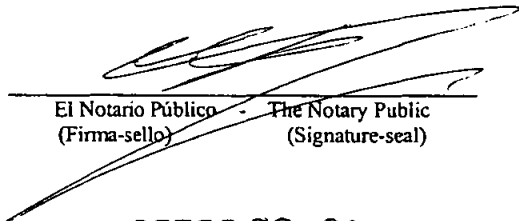
Australia

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

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

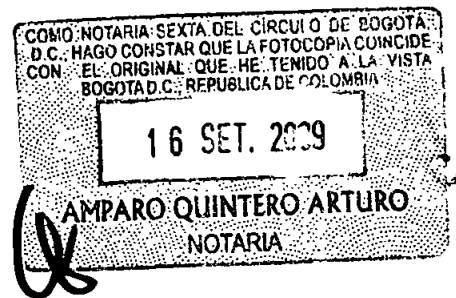
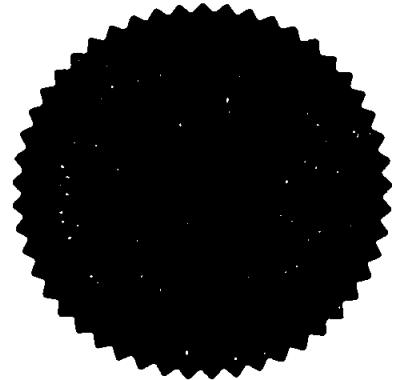
Given and signed in Melbourne Australia

On 31st August 2006


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

acting in the capacity of NOTARY PUBLIC

4. bears the seal/stamp of PETER ZOUPA

NOTARY PUBLIC

Certified

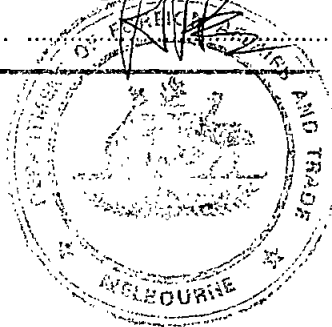
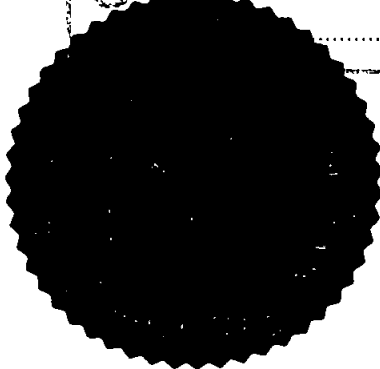
at MELBOURNE 6. 21-09-2006

by DANU VATAWA

3. No 111 47520

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA QUE PRESENTO
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

16 SET. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

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

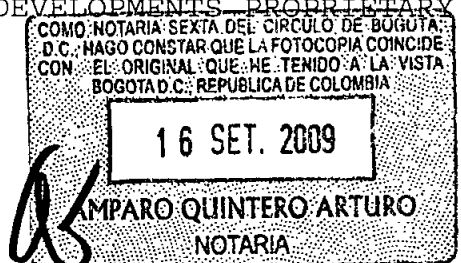
[Firma ilegible]

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)

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



USE ASUME TEXT

MINISTERIO DE RELACIONES
MINISTERIO DE NEGOCIOS
EXTERNO

María Utrando

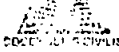
WILLIAM L. BATES

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

Alvaro Plena

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFÉ DE BOGOTÁ. 19 OCT 2006

 OFICINA DEL NOTARIO

14-00000

COMO NOTARIA: SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA,
D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

16 SET. 2009

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

od.

VELIER

BOGADOS

OFICIO SISKI
CALLE 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

374

TU 10

CESION

otros) abajo firmado (s)

ado(s) en

amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es)
ención:

amos) así mismo que cedo(emos) y transfiero(erimos), sin
n, a favor de la sociedad

da y existente de conformidad con las leyes de

iada en

s derechos inherentes a dicha invención y que la citada
ia queda facultada para solicitar en su nombre la patente de
n correspondiente en la República de Colombia.

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

1) Noriko Nakamura 2) Masako Mizutani

3) Yoshikazu Tanaka

of c/o SUNTORY Limited, Research Center, 1-1-1,
Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka
618-8503, Japan

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

METHOD FOR DETERMINATION OF PRESENCE
OF CROSSING WITH CULTIVATED ROSE IN
WILD ROSE

(International Application No. PCT/JP2008/056000)

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour
of International Flower Developments Proprietary Limited

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of
Australia

domiciled in 1 Park Drive, Bundoora, Victoria 3083,
Australia

all rights inherent to said invention and that the above mentioned
company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding
patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this 28th day of August, 2009

en/in Osaka, Japan

por/by Noriko Nakamura, Masako Mizutani, and
Yoshikazu Tanaka

Firma/Signature

Noriko Nakamura
1) Noriko Nakamura

Masako Mizutani
2) Masako Mizutani

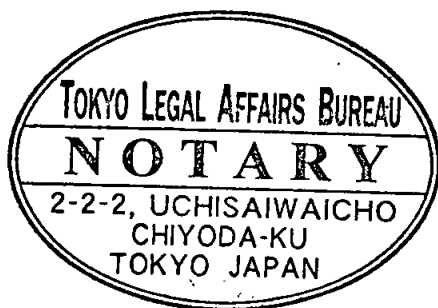
11

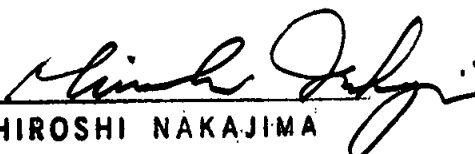
Registration No. 1597 , 2009

NOTARIAL CERTIFICATE

I, the undersigned Notary, do hereby certify that Tatsushi WATANABE, an agent of Noriko NAKAMURA, Masako MIZUTANI and Yoshikazu TANAKA who have been authorized to sign the attached document has stated in my presence that Noriko NAKAMURA, Masako MIZUTANI and Yoshikazu TANAKA acknowledged themselves to have signed the attached document, and that their signatures are true and genuine.

Dated: on this 3rd day of September, 2009.




HIROSHI NAKAJIMA
NOTARY

属託人中川典子、水谷正子及び田中良和の代理人渡邊達史は、本公証人に対し、各嘱
毛人が別添文書に署名したことを自認している旨陳述した。



って、これを認証する。

平成 21 年 9 月 3 日、本公証人役場において
東京都千代田区内幸町 2 丁目 2 番 2 号
東京法務局所属

公 証 人
Notary

中 島 浩



HIROSHI NAKAJIMA

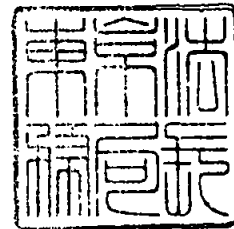
証 明

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

平成 21 年 9 月 3 日

東京法務局長

山 舗 弥 一 郎



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN
This public document
2. has been signed by HIROSHI NAKAJIMA
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of HIROSHI NAKAJIMA, NOTARY
Certified
5. at Tokyo
6. SEP - 3 2009
7. by the Ministry of Foreign Affairs
8. 09- NO 002713
9. Seal/stamp:
10. Signature



K. Oyabe

Kazutoyo OYABE

For the Minister for Foreign Affairs

13

TRADUCCION OFICIAL NO. 780/2009-.

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES, Y LLEVA EL SELLO Y LA FIRMA DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGÚN RESOLUCIÓN No. 3618 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA EL 6 DE SEPT. DE 1972.

CESIÓN

Nosotros abajo firmantes:

- 1) NORIKO NAKAMURA
- 2) MASAOKO MIZUTANI
- 3) YOSHIKAZU TANAKA

De:

c/o Suntory Limited, Research Center, 1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho,
Mishima-gun, Osaka 618-8503, Japón

Declaramos bajo juramento ser únicos y verdaderos inventores de la invención

**METODO PARA LA DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL CRUCE
ENTRE ROSAS CULTIVADAS EN ROSAS SILVESTRES**

(Solicitud Internacional No.PCT/JP2008/056000)

Declaramos así mismo que cedemos y transferimos sin limitación a favor de la sociedad **International Flower Developments Proprietary Limited**, constituida y existente de conformidad con las Leyes de Australia, domiciliada 1 Park Drive, Bundoora, Victoria 3083, Australia, todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

Dado y firmado el 28 de Agosto de 2009 en Osaka, Japón.

FIRMADO: (1) NORIKO NAKAMURA

FIRMADO: (2) MASAOKO MIZUTANI

FIRMADO: (3) YOSHIKAZU TANAKA



14

TRADUCCION OFICIAL NO. 780/2009-.

REGISTRO NO. 1597, 2009
CERTIFICACIÓN NOTARIAL

EL suscrito Notario por medio del presente certifica que TATSUSHI WATANABE, un agente de NORIKO NAKAMURA, MASAKO MIZUTANI Y YOSHIKAZU TANAKA, está autorizado para firmar el documento adjunto y ha declarado en mi presencia que NORIKO NAKAMURA, MASAKO MIZUTANI Y YOSHIKAZU TANAKA, reconocieron que ellos mismos firmaron el documento y que sus firmas son verdaderas y genuinas.

Fechado el 3 de Septiembre de 2009

FIRMADO: HIROSHI NAKAJIMA, NOTARIO ADSCRITO ANTE LA OFICINA DE
ASUNTOS LEGALES DE TOKIO
2-2-2 UCHISAIWAICHO, CHIYODA-KU, TOKIO, JAPON.
HAY SELLO DEL NOTARIO.



15

TRADUCCION OFICIAL NO. 780/2009-.

APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAÍS: JAPON

EL PRESENTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: **HIROSHI NAKAJIMA**

3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO DE LA OFICINA DE ASUNTOS LEGALES DE TOKIO

4. LLEVA EL SELLO DE: **HIROSHI NAKAJIMA, NOTARIO**

CERTIFICADO

5. EN: TOKIO

6. EL: 3 DE SEPTIEMBRE DE 2009

7. POR: EL MINISTRO DE RELACIONES EXTERIORES

8. BAJO EL NO.: **002713**

9. SELLO: MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE JAPON

10. FIRMADO: KAZUTOYO OYABE, POR EL MINISTRO DE RELACIONES EXTERIORES.

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

2009 SET 22 A 8:13

956567

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

(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 2 日 (02.10.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/117860 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01) 山台 1-1-1 サントリー研究センター内 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/056000 (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).
- (22) 国際出願日: 2008 年 3 月 21 日 (21.03.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (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.
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (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).
- (30) 優先権データ:
特願2007-077882 2007 年 3 月 23 日 (23.03.2007) 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 LIMITED) [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): 中村典子 (NAKA-MURA, Noriko) [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). 水谷正子 (MIZUTANI, Masako) [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). 田中良和 (TANAKA, Yoshikazu) [JP/JP]; 〒6188503 大阪府三島郡島本町若
- 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 DETERMINATION OF PRESENCE OF CROSSING WITH GARDEN-SPECIES ROSE PLANT IN WILD-SPECIES ROSE PLANT

(54) 発明の名称: 野生種のバラにおける園芸種のバラとの交雑の有無を検定する方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for determining whether or not a wild-species rose plant of interest is crossed with a garden-species rose plant. The method comprises the steps of: examining whether or not a KSN gene containing a transposon (an indicator) is contained in an individual of the rose plant of interest; and determining as that the rose plant of interest is crossed with a garden-species rose when the individual has the transposon-containing KSN gene.

(57) 要約: 被験対象である野生種のバラが園芸種のバラと交雑しているか否かを検定する方法において、当該被験対象バラから得られた個体に指標となるトランスポゾンを含むKSN遺伝子が存在するか否かを調べ、当該トランスポゾンを含むKSN遺伝子が存在すれば、当該被験対象バラは園芸種のバラと交雑していると判定することを特徴とする方法。

WO 2008/117860 A1

明 細 書

野生種のバラにおける園芸種のバラとの交雑の有無を検定する方法

技術分野

本発明は野生種のバラにおける園芸種のバラとの交雑の有無を検定する手法に関するものである。

背景技術

花卉産業においては新しい形質を持った花は常に珍重されるため、このような花き植物の開発は産業上重要である。主に交配を用いた品種改良により、さまざまな形質を有する品種が育種されてきた。しかしながら、交配による品種改良は、利用できる遺伝子資源が交配可能な近縁の植物に限定されているため、導入できる色や形質は限定される場合が多く、単一の植物種が多種多様な色や形質を有することはまれである。色で例えれば、青いバラ、カーネーション、黄色のアサガオ、ゼラニウムなどは交配による品種改良では開発することができなかった。

しかしながら、遺伝子組換えを用いればさまざまな遺伝子を種の壁を超えて任意の植物に導入し、植物の代謝等を人為的に改変することでより多彩な形質を実現することができる。例えば、デルフィニジンを花卉で生産できないバラやカーネーションにおいて、デルフィニジンを合成するために必要なフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を発現させることにより、デルフィニジンを生産させ、自然にはない青い花を作製した例がある (Tanaka 2006)。

しかしながら、このように人為的に作出された遺伝子組換え植物の研究開発、栽培、流通などは日本では「遺伝子組換え生物等の使

12

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）を遵守して行うことが求められている。他の国でも同様の法律に基づき、遺伝子組換え植物の野外での栽培などは規制されている。特に、花粉に稔性を有し、かつ交雑可能な近縁野生種が日本国内に多数存在する植物においては、交雑性、つまり、組換え植物から近縁野生種への遺伝子拡散の可能性について評価を行うことが義務付けられる。

バラのように我が国に近縁野生種が多数自生し、さらにそれらが多花で結実性に富む場合、園芸種と近縁野生種との交雑の有無については、解析量が膨大となるため、簡便で正確な解析技術の確立が求められる。これまでの報告では、マイクロサテライトを分子マーカーとして利用したもの（Debener 2003, 2006）が報告されている。その他、フローサイトメトリーを利用した倍数性の決定による同定法によっても解析できうる。しかしながら、いずれの方法も正確性や汎用性、簡便さにかけるという問題があった。また、現在のバラの園芸種は8種類程度の野生種を人為的に交雑することにより作られたものであるため園芸種と野生種とを区別するDNAマーカーを得るのは容易でなかった。

本発明において指標遺伝子となるKSN遺伝子は、ロサ・キネンシス・スポンタネア（*Rosa chinensis spontanea*）から取得されたバラの四季咲き性に関与する遺伝子であり、この遺伝子は一季咲きのバラのKSN遺伝子に約9 kbのトランスポゾンが挿入されて生じたものである。トランスポゾンの挿入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（岩田ら、公開番号2006-149202）。

園芸種のバラはトランスポゾンの挿入された当該遺伝子をホモで

有することがすでに調べられている。一方野生種のバラは原則としてトランスポゾンを含まないKSN遺伝子をホモで有している。

なお、ロサ・キネンシス (*Rosa chinensis*) はバラの園芸種の祖先となった野生種の1つで一季咲きであり、ロサ・キネンシス・スポンタネア (*Rosa chinensis spontanea*) はこれの突然変異系統で四季咲きである。

特許文献1 特開2006-149202号公報

発明の開示

バラの野生種におけるバラの園芸種との交雑の有無を検定する方法はこれまでも報告はあるが、汎用性に欠けていた。その他にも考え得る方法はあるものの、簡便性や正確性に欠けていた。これらの欠点を解決でき、バラのように結実性があり、近縁野生種が多数存在する植物について、野生種が園芸種と交雑しているか否かを検定する方法が求められている。

遺伝子組換え植物の遺伝子拡散の可能性を調べるために、膨大な個体数について交雑の有無を検定するような場合には、野生種のバラが、遺伝子導入された園芸種のバラを花粉親として交雑しているか否かを簡便に検定できる方法が特に必要である。従って、本発明は、被験体である野生種のバラが、遺伝子導入された園芸種のバラの花粉と交雑しているか否かを簡便に検定できる方法を提供使用とするものである。

本発明者らは、上記の課題を達成すべく種々検討した結果、野生種のバラにおいては、トランスポゾンを含むKSN遺伝子は園芸種のバラと交雑した場合にのみ検出されると着想し、トランスポゾンを含むKSN遺伝子を指標とすることにより、上記の課題が達成されることを見出し本発明を完成した。

44
20

従って、本発明は、被験対象である野生種のバラが園芸種のバラと交雑しているか否かを検定する方法において、当該被験対象バラにトランスポゾンを含むKSN遺伝子が存在するか否かを調べ、当該KSN遺伝子が存在すれば、当該被験対象バラは園芸種のバラと交雑していると判定することを特徴とする方法を提供する。

通常、組換え植物の生物多様性影響評価試験におけるバラの園芸種と野生種の交雑においては、園芸種の花粉が飛散して周辺野生種と交雑することが問題である。従って、本発明の方法においては、典型的には、母方が野生種のバラであり、父方が園芸種のバラである。また、典型的には、前記園芸種のバラは、遺伝子を導入した遺伝子組換えバラであり、この場合の遺伝子としては、例えば、色に関連する遺伝子、例えばスミレ科パンジー由来のフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子である。

図面の簡単な説明

図1は、PCR法によるKSN遺伝子の検出の結果を示す。PCRにて検出された、イントロンを含むKSN遺伝子及びGAPDH遺伝子（内在性コントロール）の特異的増幅産物の位置を矢印で示した。

発明を実施するための最良の形態

園芸種と野生種

通常、園芸種のバラは4倍体（4x）であり、四季咲きである。これに対して、野生種のバラは、通常2倍体（2x）であり、一季咲きである。

園芸種のバラは、ハイブリッドティー、フロリバンダ、ミニバラのように分類されるが、いずれも通常、トランスポゾンが挿入されたKSN遺伝子をホモに有する。即ち、本発明でいう園芸種のバラは

、トランスポゾンが挿入されたKSN遺伝子をホモに有するバラを意味する。

一方、野生種のバラとして日本に自生するものには、ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス、オオタカネバラ、カラフトイバラ、オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラ、ヤマイバラ、カカヤンバラ、ヤエヤマノイバラ、ナニワイバラ、サンショウバラ、タカネバラ、ツクシイバラ、モリイバラ、フジイバラ、ヤブイバラ、ニオイイバラ、又はミヤコイバラなどがあり、通常、トランスポゾンが挿入されていないKSN遺伝子をホモに有する。即ち、本発明でいう野生種のバラは、トランスポゾンが挿入されていないKSN遺伝子をホモに有するバラを意味する。

指標遺伝子

本発明の方法において、指標遺伝子としては、

(1) 指標遺伝子は園芸種のバラには必ず存在し、生来の野生種のバラには存在しない。

(2) 園芸種のバラは4倍体(4x)であり、交雑の指標となる遺伝子は、4本の相同染色体の内、少なくとも3個に存在する必要がある、4本の相同染色体全てに存在することが好ましい。園芸種のバラは4倍体(4x)であり、一方、生来の野生種のバラは2倍体(2x)である。よって、園芸種のバラから生じる配偶子は通常2x、野生種のバラの場合はxであり、これらが交雑した結果生ずる雑種は3倍体(3x)となる。このことから、交雑の指標遺伝子は、園芸種のバラの相同遺伝子の内、少なくとも3本に存在している必要があるが、園芸種のバラから不均一な減数分裂によって1倍体(x)の配偶子が生ずる可能性も否定できないことを考えると、確実な検定のためには、4本全ての相同染色体に指標遺伝子が存在するのが好ましい。

16
22

(3) 指標遺伝子の塩基配列の部分配列と同じ配列が、染色体の他の部分に存在しない。

被験植物に指標遺伝子が存在するか否かを検定するためには、通常、当該遺伝子を増幅する必要がある、このためには、標的遺伝子の部分に相補的な1対のプライマーを用いるPCR法が便利である。この場合に、当該プライマーとハイブリダイズする配列が、標的遺伝子以外に存在すれば、本来の標的遺伝子が存在しない場合であっても、その遺伝子が存在すると判断できる結果が得られる。従って、この要件は、プライマーの設計との関連において重要である。

具体的な指標遺伝子

上記の要件を満たす遺伝子としてトランスポゾンが挿入されたKSN遺伝子が上げられる。バラの四季咲きに関する遺伝子として報告されるKSN遺伝子（公開公報2006-149202）は、野生種において519アミノ酸をコードする完全な遺伝子として存在するが、園芸種においてはイントロン部分に約9 kbのトランスポゾンが挿入されていることが明らかとなっている。即ち、このトランスポゾンは野生種には存在せず、園芸種には必ず存在するから、このトランスポゾンを含むKSN遺伝子は、前記（1）の要件を満たす。

また、このトランスポゾンを含むKSN遺伝子は、園芸種のバラの4つの遺伝子の全てに存在する、従って、この遺伝子は前記の要件（2）を満たす。

このトランスポゾンを含むKSN遺伝子は又、プライマーの選択により前記要件（3）を満たす。

プライマー及びプローブ

KSN遺伝子（配列番号：1）、及びその中に挿入されているトランスポゾンの塩基配列（配列番号：2）は既に知られている。このトランスポゾンが挿入されたKSN遺伝子は、園芸種のバラにのみ特

23

異的に存在する。このトランスポゾンが挿入されたKSN遺伝子をPCRによって検出するためには、配列番号：1に示す配列と同一又は実質的に相補的な配列を有する1つのプライマーと、他方、配列番号：2に示す配列と同一又は実質的に相補的な配列を有する1つのプライマーとを対にして用いる必要がある。更に、プライマーとしての一般的な条件を満たす必要があり、いずれのプライマーも、サイズが10塩基以上、好ましくは15塩基以上であり、且つ50塩基以下、好ましくは30塩基以下のオリゴヌクレオチドである。

本発明の目的からして、トランスポゾン中の増幅すべき領域は特に限定されないが、プライマー対の両者が当該トランスポゾン以外の部分とハイブリダイズすることは好ましくない。このような要件を満たすプライマー対の一例として、フォワードプライマー：CATA TTATGGCATAGGGTGTGGC（配列番号：3）及びリバースプライマー：T GTAATCTGTAGGAGATCCCATGC（配列番号：4）が挙げられる。

指標遺伝子の検出

バラからのDNAの抽出、PCRなどによる増幅、及び増幅産物の検出は、常法に従って行なうことができる。

実施例

以下、実施例に従って発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)、Plant Physiol. (2003) 132, 1652-1663に依った。

参考例1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 解析によるバラの園芸種特異的遺伝子の取得

野生種のバラにおける園芸種のバラとの交雑の有無を判定するため、RAPD解析による遺伝子多型の検出を利用し、園芸種のバラ

28
24

にのみ特異的に存在する遺伝子の取得を試みた。野生種（ミヤコイバラ）及び園芸種（ラバンデ及びWKS82）のそれぞれの葉よりDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)にて、製造者が推奨する方法に従いゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNA 10ng、任意のプライマー（ベックス社製コモンプライマーセット（CMN-A00））2 μ M、dNTP混合物 0.4mM、1 $\times$ Ex Taq Buffer、Takara Ex Taq 0.05UからなるPCR反応液を調整した。

反応は、94℃で5分間反応させた後、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分の反応を25サイクル行い、最後に72℃で7分間反応させた。得られたPCR産物を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、野生種と園芸種間での泳動パターンを比較した。園芸種でのみ特異的に検出されたバンドをアガロースゲルより切り出し、GENECLEAN Turbo Kit（フナコシ株式会社）にて製造者が推奨する方法に従い精製を行った。最後にこれらをpCR2.1 TOPO vector (INVITROGEN)に製造者が推奨する方法でサブクローニングし、シーケンス解析により配列の決定を行った。

各増幅フラグメントの配列を解析した。各フラグメントの両端にあるコモンプライマー配列を含む20 mer前後のオリゴプライマーを作成し、園芸種（ラバンデ、WKS82）でのみ特異的に増幅産物が検出されるオリゴプライマーの組み合わせを検討した。ミヤコイバラ、ラバンデ、WKS82の各ゲノムDNA 10ngを鋳型として、各オリゴプライマー2 μ M、1 $\times$ dNTP 混合物、Ex Taq Buffer 0.05 μ M、からなるPCR反応液を調整した。反応は、94℃で5分間反応させた後、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分の反応を25サイクル行い、最後に72℃で7分間反応させた。得られたPCR産物を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、園芸種でのみ特異的に増幅産物が検出されるオリゴプライマーの組み合わせを検討した。その結果、園芸種での

みバンドを与えると考えられるオリゴプライマーの組合せを選び、以下、参考例 2 で示す実験を行った。

参考例 2. 特異的遺伝子の検出を指標とした後代における交雑有無の判定

野生種のバラに園芸種のバラの花粉を人為的に受粉させ得られた個体について、参考例 1 にて取得した園芸種特異的と考えられるオリゴプライマーの組合せに特異的な遺伝子の検出を指標として交雑の有無について検定した。取得した各後代の葉より DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) にて製造業者が推奨する方法に従いゲノム DNA を抽出した。

次にこれを鋳型とし、プライマー 2 μ M、dNTP 混合物 0.4mM、1 $\times$ Ex Taq Buffer、Ex Taq 0.05U を反応に供した。反応は、94℃で 5 分反応させた後、94℃、1 分、55℃、1 分、72℃、2 分の反応を 25 サイクル行い、最後に 72℃で 7 分間反応させた。得られた PCR 産物を 0.8% アガロースゲル電気泳動に供し、特異的バンドの検出の有無を確認した。しかしながら、個体の形態は明らかに中間的形質を示したにも関わらず、特異的バンドの検出の有無との相関性は得られなかった。このことから、今回得た RAPD マーカーは 4 本の相同染色体全てに含まれるものではなく、園芸種の 4 本の相同染色体の内、一部の染色体上にのみ存在する遺伝子配列に由来するものであることが推察された。即ち、交雑の有無の指標として不適當であると判断した。

実施例 1. KSN 遺伝子の検出を指標とした後代における交雑有無の判定

野生種のバラに園芸種のバラの花粉を受粉させ、得られた個体について、四季咲き性を有するバラで特異的に検出されることが知られているトランスポゾンを含む KSN 遺伝子 (W02004/070036) の検出

20
26

を指標として交雑の有無について検定した。本遺伝子上に正鎖のプライマーを、挿入されているトランスポゾン上に逆鎖のプライマーを設計し、トランスポゾンの挿入の有無による判定ができるように作製した。

人工交配により得られた各後代の葉よりDNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) にて製造業者が推奨する方法に従いゲノムDNAを抽出した。次にこれを鋳型とし、フォワードプライマーKSN1F3: 5'-CAT AT T ATG GCA TAG GGT GTG GC-3' (配列番号: 3) 及びリバースプライマーKSN1nsR3: 5'-TGT AAT CTG TAG GAG ATC CCA TGC-5' (配列番号: 4) 各0.2 μ M、dNTP 混合物0.2 mM、1 $\times$ Ex Taq Buffer、Ex Taq 0.625Uの合計2.5mlからなる反応を作製し、反応に供した。反応は、94 $^{\circ}$ Cで5分反応させた後、94 $^{\circ}$ C、1分、55 $^{\circ}$ C、1分、72 $^{\circ}$ C、2分の反応を25サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cで7分間反応させた。得られたPCR産物を0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、約1.2kbの特異的バンド検出の有無を確認した。また、バンドが検出された個体の形態が、園芸種と野生種の中間的形質を示すことを確認した。

このように、形態から園芸種のバラと野生種のバラとの交雑種であると判断できる個体について、トランスポゾンを含むKSN遺伝子が存在することが確認できた。このことから、トランスポゾンを含むKSN遺伝子を持たない個体は、園芸種のバラと野生種のバラとの交雑種ではないと判断できることが判明した。この特徴を鑑みれば、母系としてトランスポゾンを含むKSN遺伝子を持たない種を用いた場合、後代の個体におけるトランスポゾンを含むKSN遺伝子の有無を確認すれば、交雑個体であるかを判定でき得ることが示された。

実施例 2. 野生種のバラにおけるKSN遺伝子の存在の有無の判定

2A
2A

野性種のバラが本発明の検定方法の被験対象となり得るかを判断することを目的として、各野性種のバラにおけるトランスポゾンを含むKSN遺伝子の存在の有無を評価した。野性種のバラとして、ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス、オオタカネバラ、カラフトイバラ、ヤマイバラ、ヤエヤマノイバラ、ナニワイバラ、サンショウバラ、ツクシイバラ、モリイバラ、フジイバラ、ヤブイバラ、ミヤコイバラを用い、実施例1に記載の方法に従いトランスポゾンを含むKSN遺伝子（W02004/070036）の存在の有無を検定した。

その結果、いずれの野生種のバラからもトランスポゾンを含むKSN遺伝子の特異的増幅産物（増幅予想サイズ；約1.2kb）は検出されなかった。一方、内在性コントロールとしたGAPDH遺伝子は全野生種で増幅産物が検出された。よって、これら野生種のバラにおいてトランスポゾンを含むKSN遺伝子の存在は認められなかった。

以上より、トランスポゾンを含むKSN遺伝子を指標とする本発明の方法は、野性種のバラを被験対象として好適に用いることができると判断された。

実施例3. 人工交配により得られた後代における園芸種のバラとの交雑有無の検証

母系が野生種のバラであり、父系が園芸種のバラである後代個体について、本発明の検定方法を用いて交雑の有無を評価した。

常法に従い、野生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宿主（WKS82）あるいは組換え体（WKS82/130-4-1及びWKS82/130-9-1）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、野生種はノイバラ (*R. multiflora* Thunb. ex Murray)、テリハノイバラ (*R. wichuraiana* Crép.)、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、実施例1の方法に従いPCR法にて解析を行った。

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、製造業者推奨の方法に従ってゲノムDNAを抽出した。さらにREPLI-g Midi Kit (QIAGEN) にてこれを増幅後、トランスポゾンの挿入されたKSN遺伝子の有無を指標としたPCR解析により、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。また、内在性コントロールとして グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子を用いた。

GAPDH遺伝子特異的プライマー

Rh GAPDH-237F: 5' - TGT CAT CTC TGC CCC AAG TAA GG - 3' (配列番号 : 5)

Rh GAPDH-724R: 5' - CAA CAT CCT CAT CGG TGT AAC CC - 3' (配列番号 : 6)

結果を表1および表2に示した。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、トランスポゾンを含むKSN遺伝子は検出され、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、トランスポゾンを含むKSN遺伝子は検出され、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と考えられた。

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。

このように、本発明の検定方法を用いることにより、野生種のバラと園芸種のバラとの交雑の有無を極めて簡便に評価することができた。また、一般に、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い場合には、交雑の解析に困難を伴うことが多い。しかしながら、本発明の検定方法を用いれば、交雑の有無を簡便に判断できる。よって、本発明の検定方法により、まず交雑の有無を判断し、交雑していると判断される場合には、さらに導入遺伝子の伝達の有無を調べることで、導入遺伝子が、交雑親の生殖細胞に存在しているか否かの推測が可能である。

24
30

表1. 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 (WKS82/130-4-1)				
	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 (%)
ノイバラ	18/251	7.1	27	1/2	50.0	45/256	17.6	65	3/3	100.0
テリハノイバラ	23/260	8.8	44	1/1	100.0	11/260	4.2	24	0/0	—
ハマナス	2/74	2.7	263	0/0	—	5/79	6.3	427	3/3	100.0
									0/3	0.0

	宿主 (WKS82)					組換え体 (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 (%)
ノイバラ	18/251	7.1	27	1/2	50.0	34/255	13.3	59	1/4	25.0
テリハノイバラ	23/260	8.8	44	1/1	100.0	14/261	5.4	44	0/0	—
ハマナス	2/74	2.7	263	0/0	—	4/71	5.6	283	0/0	—
									0/0	0.0

28
31

表2. 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 (WKS82/130-4-1)			
	回収種子数	交雑種子数 / 解析種子数	交雑率 (%)	回収種子数	交雑種子数 / 解析種子数	交雑率 (%)	導入遺伝子 検出種子数 / 解析種子数
ノイバラ	23	11/12	91.7	58	10/10	100.0	0/10
テリハノイバラ	43	0/0	-	24	0/0	-	-
ハマナス	257	30/33	90.9	271	28/30	93.3	0/30

	宿主 (WKS82)				組換え体 (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
ノイバラ	18/251	7.1	27	1/2	50.0	34/255	13.3	59	1/4
テリハノイバラ	23/260	8.8	44	1/1	100.0	14/261	5.4	44	0/0
ハマナス	2/74	2.7	263	0/0	-	4/71	5.6	283	0/0

* 1), 2): 回収種子数と解析種子数の相違は、秕(しいな) (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。

24
32

実施例 4. 自然条件下における野生種のバラと園芸種のバラとの交雑の有無の検証

本発明の検定方法を用いて、自然条件下における野生種のバラと園芸種のバラとの交雑の有無を評価した。

屋外において、宿主あるいは組換え体から1m、5mの距離に野生種（ノイバラ）を配置し、自然条件下での野生種との交雑性について調査した。本試験は宿主及び組換え体とノイバラが同時期に開花している条件下で実施した。なお、本試験開始以前に開花したノイバラの花については試験開始時に全て取り除いた後、所定の位置に配置した。

試験終了後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、実施例1の方法に従い、PCR法にて解析を行った。

結果を表3に示した。いずれの地点から採集した種子より得られた実生においてもトランスポゾンを含むKSN遺伝子は検出されず、宿主あるいは組換え体とノイバラとの交雑は認められなかった。

よって、自然条件下で本組換え体と野生種（ノイバラ）が交雑する可能性はないか、あっても極めて低いことが示唆された。

このように、本発明の検定方法を用いることにより、野生種のバラと園芸種のバラとの交雑の有無を極めて簡便に評価することができた。また、一般に、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い場合には、交雑の解析に困難を伴うことが多い。しかしながら、本発明の検定方法で交雑の有無を簡便に判断できることから、交雑による導入

28
34

表3. 自然条件下における野生種（ノイバラ）との交雑率及び導入遺伝子の検出率

距離	宿主 (WKS82)										組換え体 (WKS82/130-4-1)							
	総開 花数	総結 実数	総種 子数	解析 個体数	交雑の有無		交雑率 (%)	総開 花数	総結 実数	総種 子数	解析 個体数	交雑の有無		交雑率 (%)	導入遺伝子の有無			
					交雑 個体数	非交雑 個体数						交雑 個体数	非交雑 個体数		検出 個体数	検出率 (%)		
1m	466	206	1011	300	0	300	0.0	485	117	648	129	0	129	0.0	0	0.0		
5m	484	145	751	148	0	148	0.0	484	40	199	28	0	28	0.0	0	0.0		

距離	宿主 (WKS82)					組換え体 (WKS82/130-9-1)										
	総開 花数	総結 実数	総種 子数	解析 個体数	交雑の有無		交雑率 (%)	総開 花数	総結 実数	総種 子数	解析 個体数	交雑の有無		交雑率 (%)	導入遺伝子の有無	
					交雑 個体数	非交雑 個体数						交雑 個体数	非交雑 個体数		検出 個体数	検出率 (%)
1m	466	206	1011	300	0	300	0.0	484	205	1067	192	0	192	0.0	0	0.0
5m	484	145	751	148	0	148	0.0	485	120	592	158	0	158	0.0	0	0.0

29
35

実施例 5. 自生する野生種のバラから採取した種子における園芸種のバラとの交雑の有無の検証

本発明の検定方法を用いて、自然条件下における自生する野生種のバラと園芸種のバラとの交雑の有無を評価した。

自生する野生種のバラから、採取した種子より実施例3の方法に従い、トランスポゾンの挿入されたKSN遺伝子の有無を指標としたPCR解析により、園芸種のバラとの交雑の有無を検証した。また、内在性コントロールとして グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) 遺伝子を用いた。

結果及び考察

結果を図 1 及び表4に示した。

計17ヵ所から採集した約1800種子について解析を行ったが、いずれの種子からもトランスポゾンを含むKSN遺伝子の特異的増幅産物（増幅予想サイズ；約1.2kb）は検出されなかった。一方、内在性コントロールとしたGAPDH遺伝子は全個体で増幅産物が検出された。

以上より、自生する野生種のバラから採集した全ての種子について、園芸種との交雑は無いと判断された。

このように、本発明の検定方法を用いることにより、野生種のバラと園芸種のバラとの交雑の有無を極めて簡便に評価することができた。

30
36

表 4. 自生する野生種のバラから採集した種子の解析結果

試料番号	種名	開花数	果実数		*1) 種子 総数	*2) 解析 種子数	園芸種との交雑の有無		園芸種との 交雑率 (%)
			結実数	解析数			交雑個体数	非交雑個体数	
1	ミヤコイバラ	30	5	5	23	13	0	13	0.0
2	ミヤコイバラ	50	37	37	227	79	0	79	0.0
3	ミヤコイバラ	10	3	3	15	12	0	12	0.0
4	ミヤコイバラ	5	2	2	20	16	0	16	0.0
5	ミヤコイバラ	100	46	46	270	233	0	233	0.0
6	ミヤコイバラ	10	2	2	3	1	0	1	0.0
7	ミヤコイバラ	20	4	4	27	5	0	5	0.0
8	ミヤコイバラ	300	176	176	695	380	0	380	0.0
9	ミヤコイバラ	100	102	102	428	75	0	75	0.0
10	ミヤコイバラ	10	7	7	40	22	0	22	0.0
11	ミヤコイバラ	300	200	20	169	109	0	109	0.0
12	ミヤコイバラ	50	34	10	100	88	0	88	0.0
13	ミヤコイバラ	50	18	10	67	42	0	42	0.0
14	ミヤコイバラ	40	18	10	80	27	0	27	0.0
15	ミヤコイバラ	100	15	10	86	65	0	65	0.0
16	ミヤコイバラ	5000	1000	100	792	600	0	600	0.0
17	ヤブイバラ	500	29	29	129	52	0	52	0.0
—	—	6675	1698	573	3171	1819	0	1819	—

* 1), 2) ; 種子総数と解析種子数の相違は、^{いい}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。

31
31

請 求 の 範 囲

1. 被験対象である野生種のバラが園芸種のバラと交雑しているか否かを検定する方法において、当該被験対象である野生種のバラに、指標となるトランスポゾンを含むKSN遺伝子が存在するかを調べることを特徴とする方法。

2. 被験対象である野生種のバラに指標となるトランスポゾンを含むKSN遺伝子が存在しなければ被験対象である野生種のバラは園芸種のバラと交雑していないと判断する、請求項1記載の方法。

3. 被験対象である野生種のバラに指標となるトランスポゾンを含むKSN遺伝子が存在すれば、被験対象である野生種のバラは園芸種のバラと交雑していると判断する、請求項1記載の方法。

4. 母系が野生種のバラであり、父系が園芸種のバラである、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

5. 前記園芸種のバラが、遺伝子を導入したバラである、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

6. 前記遺伝子が、花色に関連する遺伝子である請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

7. 前記花色に関連する遺伝子が、スミレ科パンジー由来のフラボノイド3',5'-水酸化酵素遺伝子である、請求項6に記載の方法。

8. 前記指標遺伝子の検出を、当該遺伝子の核酸のハイブリダイゼーションを介して行なう、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

9. 前記検出をPCRによる特異的増幅により行なう、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

10. 前記PCRを、フォワードプライマー：CATATTATGGCATAGGGTG

TGGC（配列番号：3）及びリバースプライマー：TGTAATCTGTAGGAGATCCCATGC（配列番号：4）により行なう、請求項9に記載の方法。

1 1. 前記野生種のバラが、トランスポゾンを持たないKSN遺伝子をホモに有するバラである、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

1 2. 前記野生種のバラが、ノイバラ、テリハノイバラ、ハマナス、オオタカネバラ、カラフトイバラ、オオフジイバラ、アズマイバラ、ヤマテリハノイバラ、ヤマイバラ、カカヤンバラ、ヤエヤマノイバラ、ナニワイバラ、サンショウバラ、タカネバラ、ツクシイバラ、モリイバラ、フジイバラ、ヤブイバラ、ニオイイバラ、又はミヤコイバラである、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

1 3. 前記園芸種のバラが、トランスポゾンが挿入されたKSN遺伝子をホモに有するバラである、請求項1～12のいずれか1項に記載の方法。

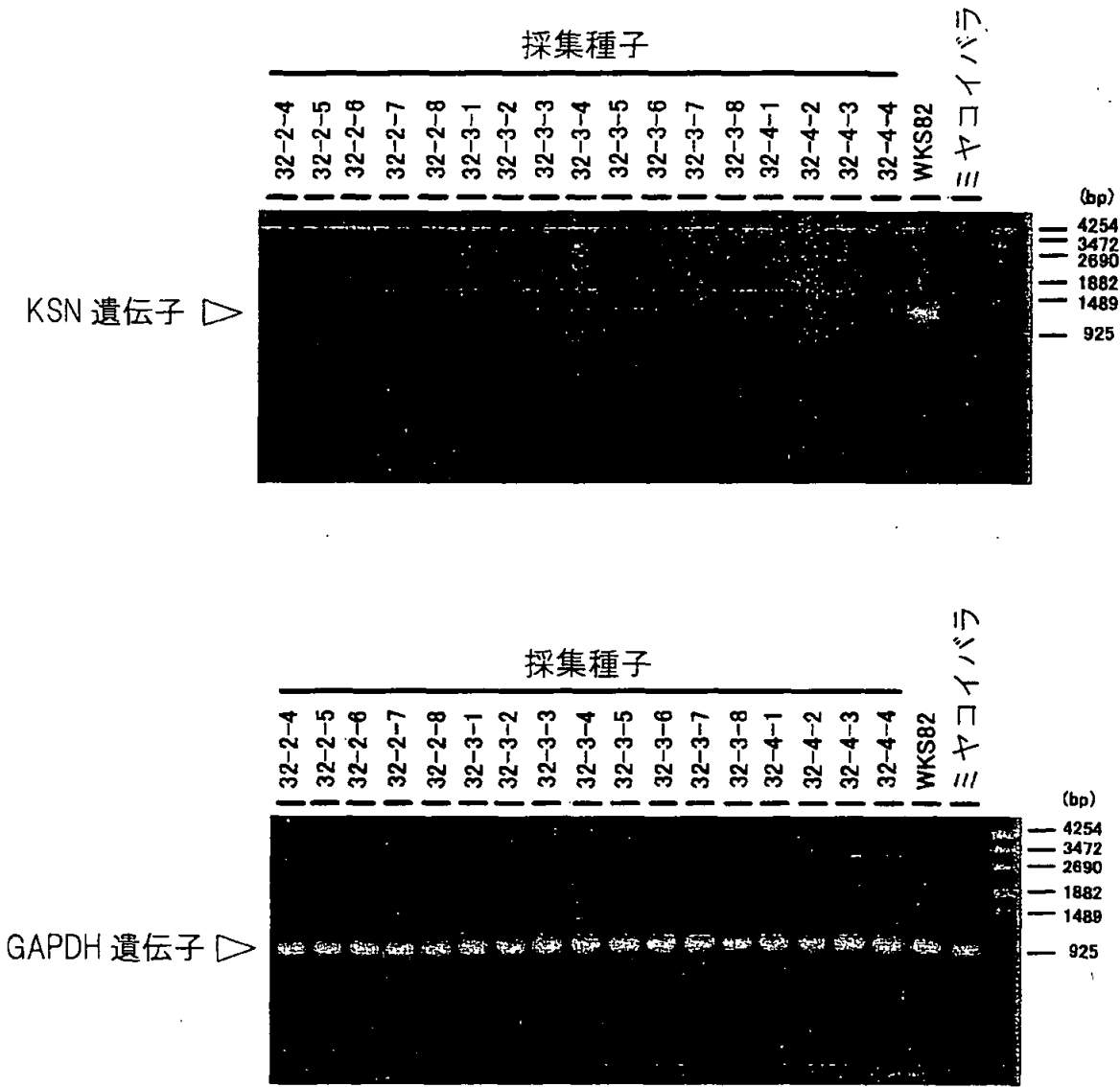
1 4. 前記園芸種のバラが、ハイブリッドティー、フロリバンダ、又はミニバラである、請求項1～13のいずれか1項に記載の方法。

1 5. 被験対象である野生種のバラが園芸種のバラと交雑しているか否かを検定する方法において、指標となるトランスポゾンを含むKSN遺伝子を増幅するためのプライマー対であって、配列番号1：に示す塩基配列の部分と同一又は実質的に相補的な塩基配列を有するプライマーと、配列番号：2に示す塩基配列の部分と同一又は実質的に相補的な塩基配列を有するプライマーとからなるプライマー対。

1 6. フォワードプライマー：CATATTATGGCATAGGGTGTGGC（配列番号：3）及びリバースプライマー：TGTAATCTGTAGGAGATCCCATGC（配列番号：4）からなる、請求項15に記載のプライマー対。

33
39

Fig. 1



PCR 法による KSN 遺伝子の検出

34
40

PCT/JP 2008/056000

SEQUENCE LISTING

<110>Method for determining whether or to wild roses have crossed with cultivated roses

<120>

<130>1073356

<160>6

<210>1

<211>519

<212>DNA

<213>Rosa sp.

<220>

<221>CDS

<222>(1).. (516)

<223>Nucleotide sequence of rose KSN gene

<400>1

atg gca aga atg tcg gaa cct tta gtt gtt gga aga gtc ata gga gat	48
Met Ala Arg Met Ser Glu Pro Leu Val Val Gly Arg Val Ile Gly Asp	
1 5 10 15	

gtt ctt gat tac ttt acc cca act act aaa atg att gtc act tac agc	96
Val Leu Asp Tyr Phe Thr Pro Thr Thr Lys Met Ile Val Thr Tyr Ser	
20 25 30	

acc aaa ctc gtc ttc aat gga cat gag ctc ttc cca tct gca gtc acc	144
Thr Lys Leu Val Phe Asn Gly His Glu Leu Phe Pro Ser Ala Val Thr	
35 40 45	

gcc aaa cct aga gtt gag att caa gga ggc gac atg aga tca ttc ttc	192
Ala Lys Pro Arg Val Glu Ile Gln Gly Gly Asp Met Arg Ser Phe Phe	
50 55 60	

act ctg gtg atg aca gac cca gat gtt cct ggc cct agt gat cct tat	240
Thr Leu Val Met Thr Asp Pro Asp Val Pro Gly Pro Ser Asp Pro Tyr	
65 70 75 80	

ttg aag gag cac ctg cac tgg att gtg aca gac att cca ggc acc aca	288
---	-----

35
41

PCT/JP 2008/058000

Leu Lys Glu His Leu His Trp Ile Val Thr Asp Ile Pro Gly Thr Thr
85 90 95

gat gtt aca ttt gga aga gag atg gtg agc tac gag atg cca agg cca 336
Asp Val Thr Phe Gly Arg Glu Met Val Ser Tyr Glu Met Pro Arg Pro
100 105 110

aac ata gga atc cac agg ttt gtg ttt gtt ctt ttc aag cag aaa cga 384
Asn Ile Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Lys Gln Lys Arg
115 120 125

agg cag tcg gtg aac cca cct tct tca agg gat cac ttc aac acc cga 432
Arg Gln Ser Val Asn Pro Pro Ser Ser Arg Asp His Phe Asn Thr Arg
130 135 140

agc ttc gca gcc gaa aac gac ctc ggt ctt cct gtt gct gcc gtt tac 480
Ser Phe Ala Ala Glu Asn Asp Leu Gly Leu Pro Val Ala Ala Val Tyr
145 150 155 160

ttc aat gcg cag aga gaa acg gca gca aga aga cgc tag 519
Phe Asn Ala Gln Arg Glu Thr Ala Ala Arg Arg Arg
165 170

<210>2
<211>8925
<212>DNA
<213>Rosa sp.
<220>
<221>
<222>
<223>Nucleotide sequence of transposon in rose KSN gene
<400>2

tgtaagtaca ttggcctatt accattcaac atatgatitc ccaactacgac gaggaaacg 60
gagcttcaag gaagcaaaga gaaagatcac aagatcggtt citgaagaca agatcaagtc 120
aaatcgagtc actgatcttg agtttaatgt gtattcattc catattgggtt ggtataaatc 180
taaattgata tgcatatcgg ttgtattaag tcaataatcc cttatgcatt aaaatggttt 240

36
42

PCT/JP 2008/053000

ttaacatgca tatcaatttg agaccttggt aggaaagtat cgattgcaca ttcaaaaact	300
gttttaaatc tttctatatt tatcttaatc aattatcaag aaaagatttg attgaggggg	360
agtttttctc ccttataaaa aggtttcaaa actaaagttt tgtgtagggt ttttgacggc	420
tgaaactggg tttctcttga acttcttggt ttgttcaaat cgttttcgaa aaacctctt	480
taattgtttc atgtattact ttgcataatc ttttacctc actctcaaga tcagtgttc	540
aattgagtga aaggaaggct gaagattgat tgcctggaat gttgaatcta gagttagaat	600
ggttgtaaaa caagttagca ttgttgcta agaaaagggt ttgtttgtga acaacactac	660
ttgtattctg taaactctag tgtttaatat tggattgatt tttcgtgttg gctacgttaa	720
aagccacgca gtgaagtctc ctacgtggag aggtttacac tgcgttagca aatcttcgtg	780
tcatgtatca tactttcttt gattaaactc ttgagaaaaa gtattttatc aacactgggt	840
ccatctagta ttttcaattg gcatcagagc gggttctaga accttctaga gatcccagga	900
aagatggaac attcacgtga tagggctact gggggatcta taaatagtcc tccctgggtc	960
gaaggtggat gtgaaaaata cactcaatgg aagatttaca tgaaatcata cctctatgct	1020
caagatgaac acgtgtggaa catcgtagaa aatggctgga gtgtacctat gacaaaagca	1080
aaagaagaag gcgcttccac taccactccc aaaccaagga aggactggac tgaggaagaa	1140
gttcgttaact tgcaagcaga tticaaagcg aagaacagca tcttcacagc cctatcggag	1200
cgggaaaaac tgaggataag tcatgttgag actgccaaagc aggcattgga tctcctacag	1260
attacatacg aaggaaataa aaaggtagct gcacagaaac tgcaagcact gatttttgaa	1320
ttcgaaacca tgactatggc agatgatgga accgtggatg acttccatgg tagaattctt	1380
aaaatctccg gtcagtgtcg cagtctagga gcacctttg atgaagataa aatagtcaaa	1440
aagatactca gggctctgcc ggaaaaattt cactcaaagg ttacgagcat agaggactct	1500
tttgatatag atgattatcc acttgatgag ctcatcgga aattgaaaac ctatgagatg	1560
atgttaaaac ctgagaagaa aaacaagggc gtagccttca aagcagtga agaaattgaa	1620
gaggaagaag gatactatga tcttgctcta ctgacgaagg aattcaaaaa atttctcaaa	1680
agcaagaact cctctaaaaa caggaatgct ccagaagga ataaccatat tggcagtgggt	1740
aacaacagtg actacaatag taagaatgga agaggaaact tcaaaggaaa tcaactcaagg	1800
aaaccaaaat gctatgaatg tggtaggttc ggtcacattt ctactgactg tggaaatagg	1860
aagcttggaa acagcaacaa caagtcactc ctttcaactt ggagtgtga tgaatctcaa	1920
gaaattgaaa atgtggctct tgtctcatca ttgttgccctg attctgaaag tgatgagtat	1980
ttctctgatg atgatgaaac aaatgttcgc tgcaaacac tctacaaagc ttcaaaggcc	2040
actctgatta gaaacttgag cttagaaaaa gaagtagatt tcctgaggac tgaaaaagaa	2100
aaggtagaga aactattcga atcttcacaa tctgcatgga aactggagaa aagcaaactc	2160
gtgagtgaat cggcagatct acaaggtagc caaaagatac tgacgtggaa gactgaaaag	2220
aatgagtatc tcaacaagat caaacttcta gaactggatg ttaaaggaca aagagccctg	2280
aacttggaa tgtagcgaa aaatgagtct ctacaacatg agttaaaatt aactcaagaa	2340
agattcatga agtttgatat cagctccact tccatgtcca agttacttgg atcaggaaaa	2400

57
43

PCT/JP 2008/056000

gctcctcatg atacatgtgg gctaggatac actggagaag attccaaaag caccaaattc	2460
gtacgtgcct caaaaccatc thtagagcag atagatgtct cccttgatga tcatgtcaaa	2520
agtgttaaggg aaggtaattc aaaccaacat catcaggtaa aacttgacca agaatcccc	2580
actggtaaac acaggtacgc aaaccctaga acccttggtc ctacttgta tcaactgtgt	2640
aagattggcc atatcagacc tagatgtaat gaacggtttt taaacttaca attttctcaa	2700
gaaaaatgta ctgtcgaaac cttacaggtt gagcttaaag aacaaaagga actcattaac	2760
aaatttaactg aaattgtttc tcaaaagaat cctcaaactg aaagaagaaa agatgtctgg	2820
accagaaaaa ttaaaagcaa aaatcattgg tccccgttg gtgaaactga tgatacatgt	2880
ctttttgttt gtgctagcaa aattcatcaa cgctctcaca ttgaggcaac ttgttttgta	2940
gctttaactg catttgctga caaacgacga gatttttggt atgttgacag tggttgttct	3000
agacacatga ctggagacaa aacctgggtt acttcatttg aggatgaaaa tacctctgga	3060
tcagtcacgt ttggagatgg gaggaagct aacattctag ctcgaggta agtaaacact	3120
ccaggtatag ctaaccttaa aaatgtgtta ttgtttgaag gattaactgc aaatctgatt	3180
agcgtcagcc atttggctga tgactatgaa gatgtgtggt ttaacaaaca gagatgtttg	3240
gtcctaaatc agaaagggtg aggtatcatg ggaggtatga gatctgttga taactgttat	3300
catattcaag caaatgaatc ttctagtgtt cagctctgtt tgtctgttaa atccacagag	3360
gaaacctttg aactttggca cagaaagatg ggacatatca actatcagga ctgtctgaaa	3420
ttatcttcca aacaatgtgt cagaggcttg ccaaatttaa aaggtaaaac tgacaagatg	3480
tgtggagact gcaaggttgg aaagcaaact aaggcacctc acagaatggt aaattctgcg	3540
acaacctcac aagtattgga actattacac atggatctca tgggaccagc tcaatctgaa	3600
agtcttggag gtaagagcta catactagta gtgttagatg atttctcaag atacacctgg	3660
gtaaacttct tgaagacaa aactgaaacg tttgagtcct ttaagaactt gagtcaaaaa	3720
ttaatcattg agaaacaatc atctaataac tgtttagtga gaataagatc agataatgga	3780
actgagttta aaaatgcctc tttttctaac tactgtcatg agcttgggtg gtcacatgag	3840
ttctcagctc caataacccc tcaacaaaat gggatagtgg aaaggaaaaa tagggactg	3900
ctagacatgg ctcgagtatt actacacgct gcagggttaa gcaaaaactt ttgggctgan	3960
gcgatcagca ctgcttgcta cacaataaat agagtattcc ttanaccang aaatgatcaa	4020
actgcctacg agctgtggaa aggtanaaag ccaaagtta aacactttca tgttntnggc	4080
agtccttggt acattctacg agatagagaa caccttggtg agtttgatgc tagaactgat	4140
gatngtgtgt tcttggggta ttctctgaac agcagagcat atagggttta caataaaaga	4200
actcgtgttg ttatggaatc cattaatgtt tctattgatg atcaatgtgt gaaacaggaa	4260
gtaacatttg cagatacttc acccttctcg gtcacacctt cacagaatac tgaaacatca	4320
tntgaggaag aggaagagga aatccatgac aacatttttg aaccagctnc cacccaaagn	4380
agagggttca agcaagttca aaaagatcac tccactcaag atatcatcgg caatctaaca	4440
gatggtccga tgacaaggag aaaggctgca gttcaggtaa gtccctntga ggtaagtga	4500
ggaaatgtat tactgtgttt cattaccgaa aatttggtaa gcatgaacat tatatctcat	4560

38
44

PCT/JP2008/056000

tttggttttg tgtccattat tgaaccnaaa aatattaagg cagccttggt ggatgataac 4620
tggattagcg ccatgcaaga tgaactgaat cagtttacta ggaatgatgt atggtactta 4680
gtaccaaggc ctagtaagtg caatgttata ggaactaagt ggattttcag naatnaaagc 4740
gatgntaaag gnaacgtgat taggaataaa gccagactag ttgctcaggg atattcacag 4800
gtcgaaggac ttgactttga cgagactttt gctcctgtag ctaggttggg atctgttaga 4860
ttacttctat ccattgcttg tcatctccgg ttcaaattgt ttcaaattga tgtcaaaact 4920
gcctttctga atggatttct tcaggaggaa gtttatgtag agcagcctcc aggtttccaa 4980
gatccacaca acctagatca tgtctaccgg ctcaagaaag cctgttatgg gctaaagcag 5040
gctcctcgag cctggatga gagactatcc actcatcttg tgggaaaagg gtatgctaga 5100
ggatccatag ataaaacatt gtttgtgaaa cgaacaaaa atgacattgt cattgcccac 5160
gtgtatgttg atgatattgt atttgggtcc acttctaaat acctgttcaa agaatttcaa 5220
tctgtcatgg aaagtgaatt tgaaatgagc atgtgtggtg aactaacgta ttttcttggg 5280
ctgcaagtaa agcagataga cacaggtttg ttctctctc aatcaaaata cgctgagaac 5340
ctgatcaaga aattcgggtct tgcctccaag aagacagtga ccaatcccat gagtacaact 5400
actaagttaa gcgaagatca tgaaggaaaa tcagttgatc cgactctcta tcgaagtatg 5460
atcgggagtt tgcctctatct cactgccagc agacctgaca tctcttacag tgtgggtgtg 5520
tgtgtcgtat ttcaagcaaa ccccaaagaa tctcacctgg acgtgtcaa aagaataatc 5580
cgctatgttg caggtaacgt taattgtggc cttttctata ccttcgacac taatgtagaa 5640
attgcaggat actctgatgc tgaactggga ggaaatttaa aggatcgga aagcacttca 5700
gggggatgtt ttttcatitg caacaatctg gttgcctggc atagtaagaa aaaaaactgc 5760
atatccttgt ctactgcaga agctgaalat gttgccgctg gaagtgtctg cacacaaata 5820
ctttggatga agcaaatgct tcatgattat ggcatatctc aaggtaagtt gtctatitct 5880
tgtgacaaca ctagtgctat taacatcact aagaatcctg ttcaacactc tcgaacaaag 5940
cacatigatc tccgatatca ctttatitagg gatttgggtg aacaaaacat acttgagtta 6000
agcttltgtc ccactgaaaa tcaacttgc t gatctgttca ctaagcctct tgacactgct 6060
aggtttgaaa tgttgaggaa tgccttaggg atatgttcta agcattaagg caaaatgatg 6120
actgtccact attgattgag aaaattgtga tccatagtatc ccttgatcac agtcactagt 6180
gaaatgtaca tattttcagt catgtatctt aatgttatca tgccttattc tggacaaatg 6240
aaattgtgta ctcatgttta gtcactgaat caagtaacct tactatgcat cttcacctat 6300
agcctatgtg gtggcatgtt tccittttgt ttctgtcaaa tgagattcag tgaagtagac 6360
gaactgcttc ttttgcctac ataactaatt cctcttctc aaagtaatca ggtcctagtt 6420
gtggatgaact ttctaggatt tgtaanaaac ganaacggaa aattgtatcc catctctcaa 6480
agtaatcagg ccttagtctg ggtgaacttt ctaangtttg caagaaacga gctgggtgagt 6540
ggtctttgca cataacataa aatcatgcag acaactactc gagactctct ccatgganac 6600
tccttggtat gcttagtacc ctaagaacat ctgttctggg ggttgctgag aagagtcttg 6660
ttacatgagt aatatttgtc actaaatnaa ggagatcttt gactccanta nacatgtgct 6720

37
45

PCT/JP2008/056000

tgggaccatg attccctgctc cttnntlagga gatttcatga gctttacttt agttctctta	6780
cttcaactect tnntatgac actaaaaatct ttcttaagcc ccacatcatg gttatattca	6840
cttctatcac aagtttactc cttaaggctc aactatgagt accaattctt attgttgaga	6900
gaatacatca tgccttcgtac tctgaactat gtgccttcca ctaagtgatc tgtgctctct	6960
gtgattaaac ttgcctatct tttctctcct cgataagacc tatgcattca ttgccttgat	7020
acttgcaaag gaaacgatcc tctgatatac ttgcagattc tctgaatata ttttggctct	7080
tgttttccct ccttgatggt aatctgccta caattaattt ccataatgac tatgcctaag	7140
ttgaggggga gaagttatct gcatgcatac acctaggga aataaatigt cataacttct	7200
ctccccatt gagccgttct cccaateggt gigtctcttg gtcttctnaa aacctaacgt	7260
ttcaactacat atagctctctc ttgtctccct cggattttac tcttggttgt ctcgtgtgc	7320
aggttctttc acccaactgt cctctaccaa ggctcgtcca cagcaaaca ctcgccttgg	7380
aggacatcgc cgcctgcctc ctcagaaga aggtcgtcag gcagctgcca gagccgggat	7440
tnccatccc ggcatgcac glacacgcag tcggagtcct cctcctctg tctctctgga	7500
aagtctcgt gatcagattc tagtggctga ctggcgaatt gcttgcctca cgacggacat	7560
ggacgacatg cattctcttc tggttcgaac tcgtcatgcc ctgaccactc tcacacagga	7620
gatccggaac atgcagcgcc accctccggg gtttgacgt cccggctcat ccatgccat	7680
gcaggagcct gtgcaccag aggaaagctc ggattccatg gatgaagagg aatttctgga	7740
caccgtcacc aagctttgtg aggaatttga cgtgcctcc cattcaaagg gggagaagta	7800
acttgatttt tcttacttta ttctgtttc tgcattttta atttttttg gtgtgtaagt	7860
gcataagcac agatactctt aggatgcttg ctattattat tcttaagtaa tcgtattttg	7920
gctacttgga tccggaaaag gatggaaact gattccttac tccaagtagc accctttgtt	7980
tagtgattag tgtttatctg tgaaacctaa ctgacaggac aaaagatgaa aaatcatgcg	8040
ttgaatggga atgccc aaag ggggagattg taagtacatt ggctattac cattcaacat	8100
atgatttccc actacgacga ggaaaccgga gcttcaagga agcaaagaga aagatcacia	8160
gatcggttct tgaagacaag atcaagtcaa atcgagtcac tgatcttgag tttaatgtgt	8220
attcattcca tattggttgg tataaatcta aattgatacg catatcggtt gtattaaagtc	8280
aataatccct tatgcattaa aatggttttt aacatgcata tcaattigag acctgtttag	8340
gaaagtatcg attgcacatt caaaaactgt tttaaactct tctatattta tcttaatcaa	8400
ttatcaagaa aagatttgat tgagggggag tttttctccc ttataaaaag gtttcaaaac	8460
taaagttttg tgtagggttt ttgacggctg aaactggttt ctttttgaac ttcttgtttt	8520
gttcaaatcg ttttcgaaaa accctcttta attgtttcat gtattacttt gcataatctt	8580
ttacattcac ttcaagatc agtgattcaa ttgagtgaag ggaaggctga agattgattg	8640
cttggaatgt tgaatctaga gttagaatgg ttgtaaaacc aagttagcat ttgttgctaa	8700
gaaaagggtgt ttgttgtgaa caacactact tgtattctgt aaactctagt gtttaatat	8760
ggattgattt ttctgtttgg ctacgtttaa agccacgcag tgaggtttcc tcagtggaga	8820
ggtttacact gcgttagcaa atcttctgt catgtatcat actttctttg attaaactct	8880

tgagaaaaag tattttatca acaciggttc catctagtat ttcca 8925

<210>3
<211>23
<212>DNA
<213>Artificial sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Forward primer

<400>3
catattatgg catagggigt ggc 23

<210>4
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Reward primer

<400>4
tgtaatctgt aggagatccc atgc 24

<210>5
<211>23
<212>DNA
<213>Artificial sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer

<400>5
tgtcatctct gccccaagta agg 23

<210>6
<211>23
<212>DNA
<213>Artificial sequence

47

PCT/JP 2008/056000

<220>

<221>

<222>

<223>Primer

<400>6

caacatcctc atcggtgtaa ccc

23

MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE PRESENCIA DE CRUCES CON
ROSA CULTIVADA EN ROSA SILVESTRE

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se relaciona con un método para determinar la presencia de cruce con una rosa cultivada en una rosa silvestre.

TÉCNICA ANTERIOR

10

En razón a que las flores que tienen nuevos rasgos se favorecen siempre en la industria floricultora, el desarrollo de tales plantas de flores es industrialmente importante. La mejora en el desarrollo se basa principalmente en el cruce que ha producido especies con una variedad de rasgos. Sin embargo, en las mejoras de desarrollo basadas en cruce, los recursos genéticos disponibles están restringidos a las plantas cruzables cercanamente relacionadas, y así los colores y rasgos que se pueden introducir están limitados en la mayoría de los casos y además es raro que especies de plantas únicas tengan varios colores y rasgos. En términos de color, por ejemplo, es imposible producir rosas y claveles azules, glorias de la mañana o geranios amarillos mediante mejoras en el desarrollo a base de cruce.

15

20

25

Sin embargo, el uso de la tecnología de gen recombinante puede efectuar el desarrollo de una variedad de rasgos al introducir varios genes en cualquiera de las plantas que trascienden la barrera de las especies y al alterar artificialmente el metabolismo de las plantas etc. Por ejemplo, existe un ejemplo en donde las rosas y claveles que no pueden producir delfinidina en el pétalo de la flor, el gen de la

enzima 3', 5'-hidroxilasa que se requiere para sintetizar la delphinidina se expresó para producir delphinidina, que posibilita la creación de flores azules que no están presentes en la naturaleza (Tanaka 2006).

5 Sin embargo, en Japón, la investigación y desarrollo, cultivo, distribución etc. de tales plantas creadas con gen recombinante se requiere para ajustarse a las regulaciones establecidas en la "Ley Relacionada con la Conservación y el Uso Sostenible de la Diversidad Biológica a Través de las Regulaciones Sobre el Uso de Organismos Vivos Modificados" (Protocolo de Cartagena). En otros países
0 también, el cultivo en campo etc. de plantas con gen recombinante se han regulado con base en leyes similares. Específicamente, para plantas cuyos pólenes son fértiles y para los cuales una horda de plantas cruzables cercanamente relacionadas ocurre en Japón, la evaluación sobre la cruzabilidad, o sobre la posibilidad de la proliferación de gen de una planta recombinante a
5 especies silvestres cercanamente relacionada es obligatoria.

En el caso de rosas para las cuales una horda de especies cercanamente relacionadas ocurre en Japón y las cuales son cantidades multiflores y fructíferas a ser analizadas en la presencia de cruce entre especies cultivadas y silvestres se
0 vuelve enorme y así el establecimiento de tecnologías analíticas simples y precisas está siendo después buscado. Hasta ahora, aquel que utiliza microsatélites como de marcador molecular ha sido reportado (Debener 2003, 2006). Además, el análisis también se puede llevar a cabo con el método de identificación a base de la determinación ploidia utilizando citometría de flujo. Sin
5 embargo, cualquiera de los métodos anteriores tuvo problemas porque a ellos les faltaba precisión, versatilidad, y/o simplicidad. Además, en razón a que las rosas cultivadas hoy fueron creadas mediante cruces artificiales de aproximadamente 8

especies silvestres, no era fácil obtener marcadores de ADN que pudieran distinguir especies cultivadas de especies silvestres.

De acuerdo con la presente invención, el gen KSN, un gen blanco, es un
5 gen involucrado en el florecimiento perpetuo de rosas obtenidas de rosas
chinensis spontanea y el gen se creó al insertar un transposón de
aproximadamente 9 kb en el gen KSN de una rosa con florecimiento estacional.
Se reportó que la inserción de un transposón sirve para inhibir la expresión de
dicho gen, que conduce a la desregulación del control de la antogenia en el ápice
10 del vástago que promueve la antogenia, lo cual dio como resultado la naturaleza
del florecimiento perpetuo (Iwata et al., Solicitud de Patente Japonesa no
Examinada (Kokai) No. 2006-149202).

Ya se ha elucidado que las rosas de especies cultivadas contienen, en la
15 configuración homóloga, dicho gen que tiene un transposón insertado allí. De otra
parte, las rosas de las especies silvestres tienen, en la configuración homóloga, un
gen KSN el cual, en principio, no contiene un transposón. Como se utiliza aquí, la
rosa chinensis es una de las especies silvestres que se convirtió en ancestro de
las rosas cultivadas y una rosa de florecimiento estacional. La R. chinensis
20 spontanea es un linaje mutante de ella y una rosa con florecimiento perpetuo.

El documento de Patente 1: Publicación de Patente Japonesa no
Examinada (Kokai) No. 2006-149202.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los métodos para determinar la presencia de cruces con rosas cultivadas en rosas silvestres se han reportado, pero a ellos les falta versatilidad. Pueden ser concebibles otros métodos, pero a ellos les falta simplicidad y precisión. Así, subsiste la necesidad de un método que pueda resolver estos problemas y pueda determinar si las rosas silvestres se cruzaron con rosas cultivadas para plantas que son fructíferas y para las cuales se presenta una horda de especies silvestres cercanamente relacionadas.

10

En los casos en los cuales donde se debe determinar un número enorme de plantas individuales para la presencia de cruces con el fin de examinar la posibilidad de la proliferación genética de plantas recombinantes, un método que permite una determinación fácil de si una rosa silvestre está cruzada con una rosa transformante como un padre de polen se requiere de manera específica. Así, la presente invención tiene por objeto suministrar un método que permita una fácil determinación de si una rosa silvestre de interés está cruzada con el polen de una rosa transformante.

Después de investigación intensiva y extensiva con el fin de lograr los anteriores objetivos, los presentes inventores han concebido la idea de que en una rosa silvestre, el gen KSN que contiene un transposón solo se puede detectar cuando la rosa silvestre cruzada con una rosa cultivada y ha encontrado que utilizar el gen KSN que contiene un transposón como el indicador, se puede obtener el objetivo anterior y de esta manera se ha completado la presente invención.

25

Así, la presente invención suministra un método para determinar si o no una rosa silvestre de interés está cruzada con rosas cultivadas, dicho método comprende las etapas de: examinar si o no un gen KSN que contiene un transposón (como indicador) está contenido en la rosa de interés; y determinar
5 que la rosa de interés esté cruzada con una rosa cultivada cuando el individuo tiene el gen KSN que contiene el transposón.

Normalmente, en el cruce de una rosa cultivada con especies silvestres en un estudio para evaluar el efecto de las plantas transgénicas sobre la diversidad
0 biológica, el esparcimiento de polen de especies cultivadas que resultan del cruce con especies silvestres en el vecindario posee problemas. Así, en el método de la presente invención, típicamente la semilla padre es una rosa silvestre y el polen padre es una rosa cultivada. También, típicamente la rosa cultivada anterior es una rosa transformante que tiene un gen introducido en ésta, en el cual el gen
5 puede ser un gen relacionado con el color tal como el gen de la enzima flavonoide 3', 5' – hidroxilasa derivado de pensamiento de la familia violácea.

BREVE EXPLICACIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La Figura 1 muestra el resultado de la detección del gen KSN mediante un método PCR. La posición de los productos amplificados específicos del gen KSN que contiene intrones y el gen GAPDH (control interno) se muestra mediante las flechas.

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

Especies cultivadas y especies silvestres

5 En general, las rosas cultivadas son tetraploides (4x) y el florecimiento perpetuo. En contraste, las rosas silvestres son generalmente diploides (2x) y florecen en una estación.

Las rosas cultivadas se pueden clasificar en té híbrido, floribunda y
0 miniatura, y todas contienen, en la configuración homóloga un gen KSN que tiene un transposón insertado en ésta.

Así, las rosas cultivadas como se utilizan aquí denotan rosas que contienen,
en la configuración homóloga, un gen KSN que tiene un transposón insertado en
5 ésta.

De otra parte, la rosas silvestres nativas del Japón incluyen NOIBARA (*R. multiflora* Thunb. ex Murray), TERIHANOIBARA (*R. wichuraiana* Crep.), HAMANASU (*R. rugosa* Thunb. ex Murray), OOTAKANEBARA (*R. acicularis* Lindl.); KARAFUTOIBARA (*R. marretii* Lev.), OOFUJIBARA, AZUMAIBARA, YAMATERIHANOIBARA (*R. luciae* Franch. et Rochebr.), YAMAIBARA (*R. sambucina* Koidz.), KAKAYANBARA, YAEYAMANOIBARA (*R. bracteata* Wendl.), NANIWAIBARA (*R. laevigata* Michx.), SANSHOUBARA (*R. roxburghii* Tratt. var. *hirtula* (Regel) Rehd. et Wils.), TAKANEBARA (*R. acicularis* var. *nipponensis* (Crép.) Koehne.), TSUKUSHIIBARA (*R. multiflora* var. *adenochaeta* (Koidz.) Makino), MORIIBARA (*R. luciae* var. *hakonensis* Franch. et Sav.), FUJIBARA (*R. luciae* var. *fujisanensis* Makino), YABUIBARA, NIOIIBARA (*R. luciae* var. *onoei*

(Makino) Momiyama), MIYAKOIBARA (*R. luciae* var. *paniculgera* (Makino) Momiyama) y usualmente tienen, en la configuración homóloga, un gen KSN que no tiene transposón insertado en ésta. Así, las rosas silvestres como se utilizan aquí denotan plantas de rosa que tienen, en la configuración homóloga, un gen

5 KSN que no tiene transposón insertado en ésta.

Gen indicador

De acuerdo con el método de la presente invención, preferiblemente el gen

10 indicador es tal que:

- (1) el gen indicador está siempre presente en las rosas cultivadas y no en rosas silvestres nativas.
- 15 (2) Las rosas cultivadas son tetraploides (4x), y debe estar presente un gen indicador para cruzar en por lo menos tres de los cuatro cromosomas homólogos y pueden preferiblemente estar presentes en todos los cuatro cromosomas homólogos. Las rosas cultivadas son tetraploides (4x), mientras que las rosas silvestres nativas son diploides (2x). Así, los
- 20 gametos producidos de rosas cultivadas pueden ser usualmente 2x, las rosas silvestres pueden ser x, y los híbridos producidos de los cruces de ellas se convierten en triploides (3x), con base en esto, es imperativo que el gen indicador para el cruce esté presente en por lo menos tres de los genes homólogos de las rosas cultivadas. Considerando la posibilidad de que un
- 25 gameto haploide (x) se pueda producir mediante meiosis heterogénea de rosas cultivadas, sin embargo, se prefiere, para determinación precisa, que el gen indicador esté presente en todos los cuatro cromosomas homólogos.

(3) La misma secuencia que la secuencia parcial de la secuencia avance del gen indicador no está presente en las otras regiones del cromosoma.

5 Con el fin de determinar la presencia del un gen indicador en la planta de interés, dicho gen se debe usualmente amplificar. Con este propósito, es conveniente utilizar un método PCR que utilice un par de iniciadores que sean homólogos a la región del gen blanco. En este caso, cuando una secuencia que hibrida con dicho iniciador está presente en otro diferente del gen blanco, se
10 obtiene un resultado que indica la presencia del gen, aun si el gen blanco nativo está ausente. Así, este requisito es importante en relación con el diseño del iniciador.

Gen indicador específico

15

Como un gen que satisface el requisito anterior, se puede mencionar un gen KSN que tenga un transposón insertado en éste. El gen KSN que se reportó como un gen relacionado con la propiedad del florecimiento perpetuo de las rosas (Solicitud de Patente Japonesa no Examinada (Kokai) No. 2006-149202) ha
20 demostrado que existe como un gen completo que codifica los aminoácidos 519 en las especies silvestres mientras que en las especies cultivadas se ha insertado un transposón de aproximadamente 9 kb en el segmento del intrón. Así, en razón a que este transposón no está presente en las especies silvestres sino está presente en las especies cultivadas, un gen KSN que contiene este transposón
25 satisface el requisito establecido en lo anterior (1).

También, el gen KSN que contiene este transposón está presente en todos los cuatro genes de las rosas cultivadas. Así, este gen satisface el requisito establecido en lo anterior (2).

- 5 El gen KSN que contiene este transposón también satisface el requisito establecido en lo anterior (3) mediante la selección del iniciador.

Iniciadores y sondas

- 10 La secuencia base del gen KSN (SEQ ID NO: 1) y aquella del transposón (SEQ ID NO: 2) insertada en éste ya son conocidos. El gen KSN que tiene este transposón insertado en él está específicamente presente solamente en las rosas cultivadas. Con el fin de detectar el gen KSN que tiene este transposón insertado en él mediante PCR, es necesario utilizar, como un par, un iniciador que tenga una
- 15 secuencia idéntica o sustancialmente homóloga con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 1 y un iniciador que tenga una secuencia idéntica o sustancialmente homóloga con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, las condiciones generales del iniciador se deben cumplir y cualquiera de los iniciadores son un oligonucleótido con el tamaño de 10 bases o más,
- 20 preferiblemente 15 bases o más y 50 bases o menos, preferiblemente 30 bases o menos.

- Para el propósito de la presente invención, no se prefiere que tanto el par iniciador hibride con una región diferente a dicho transposón, aunque la región a
- 25 ser amplificada en el transposón no se limita específicamente. Como un ejemplo del par iniciador que satisfaga tal requisito, se puede mencionar un iniciador

57

delantero: CATATTATGGCATAGGGTGTGGC (SEQ ID NO: 3) y un iniciador
inverso: TGTAATCTGTAGGAGATCCCATGC (SEQ ID NO: 4).

Detección del gen indicador

5

La extracción del ADN de las rosas, la amplificación mediante PCR etc., y la
detección de productos amplificados se puede llevar a cabo de acuerdo con
métodos estándar.

10 Ejemplos

A continuación, serán explicados detalles de la presente invención con
referencia a ejemplos, a menos que se especifique otra cosa, los métodos de
biología molecular utilizados están basados en Clonación Molecular (Cold Spring
15 Harbor Laboratory Press, 2001), Plant Physiol. (2003) 132, 1652-1663.

Ejemplo de Referencia 1

Adquisición de un gen específico a una rosa cultivada mediante análisis de ADN

20 Polimórfico Amplificado Aleatorio (RAPD)

Con el fin de determinar la presencia de cruce con una rosa cultivada en
una rosa silvestre, la detección del polimorfismo genético mediante análisis RAPD
se utilizó en un intento para obtener un gen que esté específicamente presente
25 solamente en la rosa cultivada. De cada hoja de las especies silvestre (R.
paniculigera) y de especies cultivadas (lavanda y WKS82), el ADN genómico se
extrajo utilizando un Mini Kit DNeasy Plant (QIAGEN) de acuerdo con un método

recomendado por el fabricante. Una porción PCR que comprende 10 ng del ADN genómico extraído, 2 μ M de cualquier cebador (BEX's Common's primer set, CMN-A00), 0.4 mM de la mezcla de un dNTP, un amortiguador 1x Ex Taq y 0.05 U de Takara Ex Taq se prepararon.

5

La reacción comprendió, después de reacción a 94°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 12°C durante 2 minutos y finalmente reaccionó a 72°C durante 7 minutos. El producto PCR obtenido se sometió a una electroforesis de gel de agarosa 0.8% para comparar el patrón electroforético entre las especies silvestres y las especies cultivadas. Las bandas que fueron detectadas específicamente en las especies cultivadas se extirparon del gel de agarosa y se purificaron mediante el Turbo Kit GENECLAN (Funakoshi K.K) de acuerdo con un método recomendado por el fabricante. Finalmente, ellas se subclonaron mediante el vector pCR2.1 TOPO (INVITROGEN) de acuerdo con un método recomendado por el fabricante y se sometieron a análisis de secuencia para determinar la secuencia.

La secuencia de cada fragmento amplificado se analizó. Los oligoiniciadores de aproximadamente 20 meros que contienen una secuencia iniciadora común presentes en ambos extremos de cada fragmento fueron creados y la combinación de los oligoiniciadores para los cuales los productos amplificados se detectaron específicamente solo en las especies cultivadas (lavanda WKS82) se examinó. Con 10 ng de cada ADN genómico de R. paniculigera, lavanda y WKS82 como la plantilla, la reacción PCR que comprende 2 μ M de cada oligoiniciador, una mezcla de 1x dNTP y 0.05 μ M de un amortiguador Ex Taq se preparó. La reacción comprendió, después de hacer reaccionar a 94°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55°C

durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y finalmente reaccionó a 72°C durante 7 minutos. Los productos PCR obtenidos se sometieron a electroforesis con gel de agarosa a 0.8% para comparar las combinaciones de oligoiniciadores para los cuales los productos amplificados fueron detectados de manera específica solamente fueron examinados en las especies cultivadas. Como resultado, las combinaciones de los oligoiniciadores que se creen suministran bandas solamente en las especies cultivadas fueron seleccionados y sometidos a un experimento mostrado en el siguiente Ejemplo de Referencia 2.

0 Ejemplo de Referencia 2

Determinación de la presencia de cruce en la progenie con la detección de un gen específico como un indicador

5 Para plantas obtenidas al polinizar artificialmente el polen de una rosa cultivada a una rosa silvestre, la presencia del cruce se determinó utilizando como un indicador la detección de un gen específico a la combinación de los oligoiniciadores aunque para ser especies cultivadas específicas obtenidas en el Ejemplo de Referencia 1. De la hoja de cada progenie obtenida, se extrajo ADN
20 genómico utilizando el Mini Kit DNeasy Plant (QIAGEN) de acuerdo a un método recomendado por el fabricante.

Luego utilizando éste como una plantilla, 2 µM del iniciador, 0.4 mM de una mezcla dNTP, un amortiguador 1x Ex Taq y 0.05U del Ex Taq se sometieron a la
25 reacción. La reacción comprendió, después de reaccionar a 94°C, durante 5 minutos, 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos y finalmente reaccionó a 72°C durante 7 minutos. El producto

34
60

PCR obtenido se sometió a electroforesis con un gel de agarosa 0.8% para confirmar la detección de las bandas específicas. Sin embargo, aunque la morfología de la planta individual aparentemente exhibió un rasgo intermedio, ninguna correlación con la presencia de las bandas específicas se obtuvo. Esto sugirió que el marcador RAPD obtenido aquí puede no ser el obtenido en todos los cuatro cromosomas homólogos, sino se puede derivar de una secuencia de gen presente solamente en algunos de los cuatro cromosomas homólogos de las especies cultivadas. Así, se determinó que es inapropiado como indicador para la presencia de cruce.

Ejemplo de Trabajo 1

Determinación de la presencia de cruce en la progenie con la detección del gen KSN como un indicador

El polen de una rosa cultivada se polinizó a una rosa silvestre y para la planta obtenida, se determinó la presencia de cruce utilizando como un indicador la detección del gen KSN (WO2004/070036) que contiene un transposón que es conocido por ser específicamente detectado en las rosas de florecimiento perpetuo. Un iniciador de cadena más en este gen y un iniciador de cadena inversa en el transposón insertado se designaron y prepararon con el fin de posibilitar la determinación de la presencia de inserción de un transposón.

De la hoja de cada progenie obtenida mediante cruce artificial, el ADN genómico se extrajo utilizando el Mini Kit DNeasy Plant (QIAGEN) de acuerdo con un método recomendado por el fabricante. Utilizando éste como una plantilla, un total de 2.5 ml de solución de reacción que comprende 0.2 μ M de cada uno de los

iniciadores delanteros KSN1F3: 5' –CAT ATT ATG GCA TAG GGT GTG GC-3' (SEQ ID NO: 3) y un iniciador inverso KSN1nsR3: 5' –TGT AAT CTG TAG GAG ATC CCA TGC-5' (SEQ ID NO: 4), 0.2 mM de una mezcla de dNTP, un amortiguador 1x Ex Taq y 0.625 U del Ex Taq se prepararon y se sometieron a
 5 reacción. La reacción comprendió, después de hacer reaccionar a 94°C durante 5 minutos, 25 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, y finalmente reaccionó a 72°C durante 7 minutos. El producto PCR obtenido se sometió a una electroforesis con gel de agarosa a 0.8% para confirmar la detección de una banda específica de aproximadamente 1.2 kb.
 0 También, se confirmó que la morfología de la planta individual obtenida exhibió un rasgo intermedio a aquellas de las especies cultivadas y de las especies silvestres.

Así, para las plantas involucradas que se podrían determinar de la
 5 morfología por ser un cruce de las especies cultivadas y las especies silvestres, la presencia del transposón que contiene el gen KSN se confirmó. Con base en esto, se determinó que las plantas individuales que no tienen un gen KSN que contenga transposón no son un cruce de las especies cultivadas y de las especies silvestres. Considerando esta característica, se indicó que cuando las especies no
 10 tienen un gen KSN que contiene transposón se utilizaron como el lado femenino, la identidad del cruce se puede determinar al confirmar la presencia de un gen KSN que contiene transposón en la planta individual de la progenie.

Ejemplo de Trabajo 2.

25

Determinación de la presencia del gen KSN en las rosas silvestres

Con el propósito de determinar si una rosa silvestre se podría someter a un método de determinación de la presente invención, la presencia de un gen KSN que contiene transposón en cada rosa silvestre se evaluó. Como las rosas silvestres, NOIBARA (*R. multiflora* Thunb. ex Murray), TERIHANOIBARA (*R. wichuraiana* Crep.), HAMANASU (*R. rugosa* Thunb. ex Murray), OOTAKANEBARA (*R. acicularis* Lindl.), KARAFUTOIBARA (*R. marretii* Lev.), OOFUJIIBARA, AZUMAIBARA, YAMATERIHANOIBARA (*R. luciae* Franch. et Rochebr.), YAMAIBARA (*R. sambucina* Koidz.), YAEYAMANOIBARA (*R. bracteata* Wendl.), NANIWAIBARA (*R. laevigata* Michx.), SANSHOUBARA (*R. roxburghii* Tratt. var. *hirtula* (Regel) Rehd. et Wils.), TSUKUSHIIBARA (*R. multiflora* var. *adenochaeta* (Koidz.) Makino), MORIIBARA (*R. luciae* var. *hakonensis* Franch. et Sav.), FUJIIBARA (*R. luciae* var. *fujisanensis* Makino), YABUIBARA (*R. luciae* var. *onoei* (Makino) Momiyama), MIYAKOIBARA (*R. luciae* var. *paniculgera* (Makino) Momiyama) se utilizaron para determinar la presencia del gen KSN que contiene transposón (WO2004/070036) de acuerdo a un método descrito en el Ejemplo de Trabajo 1.

Como resultado, ningún producto amplificado específico (tamaño amplificado predicho: aproximadamente 1.2 kb) del gen KSN que contiene transposón se detectó de ninguna de las rosas silvestres. Por otro lado, el producto amplificado del gen GAPDH que sirvió como el control interno se detectó en todas las especies silvestres. Así, en estas rosas silvestres, la presencia de un KSN que contiene transposón no se reconoció.

De lo anterior, se determinó que el método de la presente invención que utiliza un gen KSN que contiene transposón como indicador puede utilizar favorablemente una rosa silvestre como el sujeto de prueba.

Ejemplo de Trabajo 3

Validación de la presencia de cruce con una rosa cultivada en la progenie obtenida 5 mediante cruce artificial.

Para una progenie individual para la cual la semilla padre es una rosa silvestre y el polen padre es una rosa cultivada, la presencia del cruce se evaluó utilizando el método de determinación d la présente invención.

10

De acuerdo con un método estándar, inmediatamente antes del florecimiento de las especies silvestres, se llevan a cabo el ensacado y la emasculación cuando el estambre alcanza la madurez completa, los pólenes del huésped (WKS82) y un transformante (WKS82/130-4-1 y WKS82/130-9-1) fueron
15 unidos en la mañana del día adecuado. Entonces, el ensacado se llevó a cabo de nuevo para evitar la unión de otros pólenes y la presencia de la formación de semillas se examinó. El polen utilizado se obtuvo al recubrir la antera antes del clivaje, a la cual se le permitió permanecer en un desecador que tiene gel de sílice y luego obtener el polen fresco de la antera que clivó el siguiente día.

20

Como la planta madre para el cruce, las especies silvestres utilizadas fueron *R. multiflora* Thunb. ex Murray, *R. wichuraiana* Crép., y *R. rugosa* Thunb. ex Murray.

25

La presencia de formación de semilla se confirmó para la fruta para lo cual ninguna caída de fruta fisiológica se notó sino que el establecimiento de la fruta se notó en el punto de tiempo de más de 2 meses después del cruce.

Adicionalmente, las semillas obtenidas se recuperaron y después de un tratamiento de enfriamiento a 4°C durante 3 meses, ellas se cosecharon. Con el fin de confirmar la presencia de cruce con el huésped o el transformante y la presencia de la transmisión del transgen en ellas, se efectuó un método PCR de acuerdo a un método descrito en el Ejemplo de Trabajo 1 para análisis.

Cuando las semillas fueron sometidas a un tratamiento de enfriamiento, gemación, que es usualmente observada en aproximadamente 1 mes, no se observó aun después del paso de 3 meses. Así, una porción de las semillas cosechadas que no germinaron se recuperaron de nuevo y fueron cosechadas para un análisis similar. De las semillas recuperadas de nuevo, se extrajo el ADN genómico utilizando un Nucleón PHYTOPURE para un KIT DE EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTA (Amersham Biosciences) de acuerdo a un método recomendado por el fabricante. Además, después de amplificar éste mediante un equipo Midi REPLI-g (QIAGEN), la presencia del cruce con el huésped o el transformante y la presencia de transmisión del gen introducido en ella se analizó mediante un método PCR utilizando como el indicador la presencia de un gen KSN que tiene un transposón insertado en éste. Como el control interno, el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó.

Iniciador específico del gen GAPDH

Rh GAPDH-237F: 5'-TGT CAT CTC TGC CCC AAG TAA GG-3' (SEQ ID NO: 5)

Rh GAPDH-724R: 5'-CAA CAT CCT CAT CGG TGT AAC CC-3' (SEQ ID NO: 6)

Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Tabla 2. La tasa de fruta ajustada fue muy baja aun cuando cualquiera de los huéspedes y el recombinante se utilizaran en el polen padre. La plántula obtenida se analizó mediante un método PCR, en el cual el gen KSN que contiene el transposón se detectó y el cruce de las especies silvestres con el huésped o el transformante se reconoció, pero el transgen derivado del transformante no se detectó. Adicionalmente, cuando las semillas cosechadas que no germinaron se recuperaron de nuevo y se observó si ellas sonaban o no, la mayoría de ellas estaban “vacías (sin contenido de semillas)” y los embriones normales se confirmaron solamente para una fracción de las plantas. Para estas, se efectuó un análisis similar mediante el método PCR, en el cual un gen KSN que contiene transposón se detectó y el cruce de las especies silvestres con el huésped o el transformante se reconoció, pero el transgen derivado del transformante no se detectó. Se creyó de esto que el transgen no se transmitió a la progenie, porque por ejemplo, el transgen no estaba contenido en la célula de polen del transformante.

Así, se creyó que aun si el transformante no se cruzó con las especies silvestres (*R. multiflora*, *R. wichuraiana*, y *R. rugosa*), no hay posibilidad de que el transgen se transmita a la progenie, porque, por ejemplo, el transgen no estaba contenido en la célula de polen del transformante.

Para *R. wichuraiana*, no fueron confirmados embriones normales en ninguna semilla.

25

Así, al utilizar el método de determinación de la presente invención, la presencia de cruce entre una rosa silvestre y una rosa cultivada se puede evaluar

muy fácilmente. También cuando el transgen no se puede transmitir a la progenie, porque, por ejemplo, el transgen no está contenido en la célula de polen del transformante, generalmente el análisis de cruce es a menudo difícil. Sin embargo, al utilizar el método de determinación de la presente invención, la presencia de cruce se puede determinar fácilmente. Así, primero la presencia de cruce se determina utilizando el método de determinación de la presente invención y cuando esta se determina porque se ha cruzado, es posible estimar si el transgen está presente en la célula de germen del padre del cruce al investigar la presencia de transmisión del transgen.

Tabla 1. La tasa de frutos logrados con las especies silvestres (R. multiflora, R. wichuraiana, R. rugosa) mediante cruce artificial y tasa de detección del transgen en el individuo con gemación.

	Huésped (WKS82)					Transformante (WKS82/130-4-1)						
	No. de frutos logrados/ No. de flores cruzadas	Tasa de frutos logrados (%)	No. de semillas totales	No. de individuos cruzados/ No. de gemación	Tasa de cruce (%)	No. de frutos logrados/ No. de flores cruzadas	Tasa de frutos logrados (%)	No. total de semillas	No. de individuos cruzados/ No. de gemación	Tasa de cruce (%)	No. de individuos para los cuales el transgen se detectó/ No. De gemación	Detección de la tasa de transgen (%)
R. multiflora	18/251	7.1	27	1/2	50.0	45/256	17.6	65	3/3	100.0	0/3	0.0
R. wichuraiana	23/260	8.8	44	1/1	100.0	11/260	4.2	24	0/0	-	-	-
R. rugosa	2/74	2.7	263	0/0	-	5/79	6.3	427	3/3	100.0	0/3	0.0

	Huésped (WKS82)					Transformante (WKS82/130-9-1)						
	No. de frutos logrados /No. de flores cruzadas	Tasa de frutos logrados (%)	No. de semillas totales	No. de individuos cruzados/ No. de gemación	Tasa de cruce (%)	No. de frutos logrados/No. de flores cruzadas	Tasa de frutos logrados (%)	No. total de semillas	No. de individuos cruzados/No. de gemación	Tasa de cruce (%)	No. de individuos para los cuales el transgen se detectó/No. De gemación	Detección de la tasa de transgen (%)
R. multiflora	18/251	7.1	27	1/2	50.0	34/255	13.3	59	1/4	25.0	0/4	0.0
R. wichuraiana	23/260	8.8	44	1/1	100.0	14/261	5.4	44	0/0	-	0/0	-
R. rugosa	2/74	2.7	263	0/0	-	4/71	5.6	283	0/0	-	0/0	-

Tabla 2. La tasa de determinación del transgen en las semillas obtenidas mediante cruce artificial con las especies silvestres (R. multiflora, R. wichuraiana, R. rugosa)

	Huésped (WKS82)			Transformante (WKS82/130-4-1)				
	¹⁾ No. semillas recuperadas	No. de semillas cruzadas/ ²⁾ No. de semillas analizadas	Tasa de cruce (%)	¹⁾ No. de semillas recuperadas	No. de semillas cruzadas/ ²⁾ No. de semillas analizadas	Tasa de cruce (%)	No. de semillas en las cuales el transgen se detectó/No. de semillas analizadas	Detección de la tasa de transgen (%)
R. multiflora	23	11/12	91.7	58	10/10	100.0	0/10	0.0
R. wichuraiana	43	0/0	-	24	0/0	-	0/0	-
R. rugosa	257	30/33	90.9	271	28/30	93.3	0/30	0.0

	Huésped (WKS82)					Transformante (WKS82/130-9-1)						
	No. de frutos logrados/ No. de flores cruzadas	Tasa de frutos logrados (%)	No. de semillas totales	No. de individuos cruzados/ No. de gemación	Tasa de cruce (%)	No. de frutos logrados/ No. de flores cruzadas	Tasa de frutos logrados (%)	No. total de semillas	No. de individuos cruzados/ No. de gemación	Tasa de cruce (%)	No. de individuos para los cuales el transgen se detectó/ No. de gemación	Detección de la tasa de transgen (%)
R. multiflora	18/251	7.1	27	1/2	50.0	34/255	13.3	59	1/4	25.0	0/4	0.0
R. wichuraiana	23/260	8.8	44	1/1	100.0	14/261	5.4	44	0/0	-	0/0	-
R. rugosa	2/74	2.7	263	0/0	-	4/71	5.6	283	0/0	-	0/0	-

*1), 2): Diferencia del No. de semillas recuperadas y el No. de semillas analizadas resultó porque semillas vacías (sin contenido de semillas), semillas para las cuales la extracción de ADN era imposible, y semillas para las cuales ninguna amplificación del gen de control mediante PCR se notó estaban excluidas del objeto del presente análisis.

Ejemplo de Trabajo 4.

Validación de la presencia de cruce entre una rosa silvestre y una rosa cultivada bajo condiciones naturales

Utilizando el método de determinación de la presente invención, se evaluó la presencia de cruce entre una rosa silvestre y una rosa cultivada bajo condiciones naturales.

A aire abierto, la especie silvestre (*R. multiflora*) se colocó a una distancia de 1m y 5m desde el huésped o el transformante para investigar el cruce con la especie silvestre bajo condiciones naturales. Este estudio se llevó a cabo bajo una condición en la cual el huésped y el transformante y *R. multiflora* florecieron simultáneamente. Las flores de *R. multiflora* que florecieron antes del inicio de este estudio se removieron todas al inicio de este estudio y fueron colocadas en una posición predeterminada.

La presencia de la formación de semilla se confirmó para el fruto para el cual ninguna caída fisiológica de frutos se notó pero que los frutos logrados se notaron en el punto de tiempo de más de 3 meses después de completar el estudio. Adicionalmente, las semillas obtenidas se recuperaron y después de tratamiento con enfriamiento a 4°C durante 3 meses, ellos fueron cosechados. Con el fin de confirmar la presencia de cruce con el huésped o el transformante y la presencia de transmisión del transgen en ellas, se llevó a cabo un método PCR de acuerdo con un método descrito en el Ejemplo de Trabajo 1 para análisis.

El resultado se muestra en la Tabla 3. Para la plántula obtenida de las semillas cosechadas en cualquier posición, ningún gen KSN que contiene transposón se detectó o ningún cruce del huésped y el transformante con *R. multiflora* se notó.

Esto sugirió ninguna o muy poca posibilidad de cruce del transformante presente con las especies silvestres (*R. multiflora*) bajo condiciones naturales.

Así, al utilizar el método de determinación de la presente invención, la presencia de cruce entre una rosa silvestre y una rosa cultivada podría ser muy fácilmente evaluada. También cuando el transgen no se puede transmitir a la progenie, porque, por ejemplo, el transgen no se obtiene de la célula de polen del transformante, generalmente el análisis del cruce es a menudo difícil. Sin embargo, al utilizar el método de determinación de la presente invención, la presencia de cruce se puede determinar fácilmente y así, la presencia de transmisión del transgen de cruce también se podría analizar fácilmente.

Tabla 3. La tasa de cruce con una especie silvestre (*R. multiflora*) bajo condiciones naturales y la detección de la tasa del transgen

Distancia	Huésped (WKS82)							Transformante (WKS82/130-4-1)								
	No. total de flores florecidas	No. total de frutos logrados	No. total de semillas	No. de individuos analizados	Presencia de cruce		Tasa de cruce (%)	No. total de flores florecidas	No. total de frutos logrados	No. total de semillas	No. de individuos analizados	Presencia de cruce		Tasa de cruce (%)	Presencia de transgen	
					No. de individuos cruzados	No. de individuos no cruzados						No. de individuos cruzados	No. de individuos no cruzados		No. de individuos detectados	Tasa de detección (%)
1 m	466	206	1011	300	0	300	0.0	485	117	648	129	0	129	0.0	0	0.0
5 m	484	145	751	148	0	148	0.0	484	40	199	28	0	28	0.0	0	0.0

Distancia	Huésped (WKS82)							Transformante (WKS82/130-9-1)								
	No. total de flores florecidas	No. total de frutos logrados	No. total de semillas	No. de individuos analizados	Presencia de cruce		Tasa de cruce (%)	No. total de flores florecidas	No. total de frutos logrados	No. total de semillas	No. de individuos analizados	Presencia de cruce		Tasa de cruce (%)	Presencia de transgen	
					No. de individuos cruzados	No. de individuos no cruzados						No. de individuos cruzados	No. de individuos no cruzados		No. de individuos detectados	Tasa de detección (%)
1 m	466	206	1011	300	0	300	0.0	484	205	1067	192	0	192	0.0	0	0.0
5 m	484	145	751	148	0	148	0.0	485	120	592	158	0	158	0.0	0	0.0

69
75

Ejemplo de Trabajo 5.

Validación de la presencia de cruce con rosa cultivada en las semillas cosechadas de rosa silvestre nativa

Utilizando el método de determinación de la presente invención, se evaluó la presencia de cruce entre una rosa silvestre nativa con una rosa cultivada bajo condiciones normales.

De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo de Trabajo 3, de la semilla cosechada de la rosa silvestre nativa, se condujo un análisis PCR utilizando la presencia de un gen KSN que tiene transposones insertados en estos como el indicador para validar la presencia de cruce con una rosa cultivada. Como control interno, se utilizó un gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Resultados y discusión

Los resultados se muestran en la Figura 1 y en la Tabla 4.

En el análisis de aproximadamente 1800 semillas cosechadas de un total de 17 sitios, ninguno de los productos amplificados (tamaño amplificado predicho: aproximadamente 1.2 kb) de un gen KSN que contiene transposón se detectó de ninguna de las semillas. De otra parte, el gen GAPDH que sirvió como control interno se detectó en todos los individuos.

De lo anterior, se determinó que no había cruce con las especies cultivadas en todas las semillas cosechadas de las rosas silvestres nativas.

Así, al utilizar el método de determinación de la presente invención, la presencia de cruce entre una rosa silvestre y una rosa cultivada se podría evaluar muy fácilmente.

Tabla 4. Resultado del análisis de las semillas cosechadas de rosas silvestres nativas

Muestra No.	Nombre de la especie	No. de plantas florecidas	No. de frutos		*1) No. total de semillas	*2) No. total de semillas analizadas	Presencia de cruce con una rosa cultivada		Tasa de cruce con especies cultivadas (%)
			No. de frutos logrados	No. de análisis			No. de individuos cruzados	No. de individuos no cruzados	
1	R. paniculigera	30	5	5	23	13	0	13	0.0
2	R. paniculigera	50	37	37	227	79	0	79	0.0
3	R. paniculigera	10	3	3	15	12	0	12	0.0
4	R. paniculigera	5	2	2	20	16	0	16	0.0
5	R. paniculigera	100	46	46	270	233	0	233	0.0
6	R. paniculigera	10	2	2	3	1	0	1	0.0
7	R. paniculigera	20	4	4	27	5	0	5	0.0
8	R. paniculigera	300	176	176	695	380	0	380	0.0
9	R. paniculigera	100	102	102	428	75	0	75	0.0
10	R. paniculigera	10	7	7	40	22	0	22	0.0
11	R. paniculigera	300	200	20	169	109	0	109	0.0
12	R. paniculigera	50	34	10	100	88	0	88	0.0
13	R. paniculigera	50	18	10	67	42	0	42	0.0

Muestra No.	Nombre de la especie	No. de plantas florecidas	No. de frutos		*1) No. total de semillas	*2) No. total de semillas analizadas	Presencia de cruce con una rosa cultivada		Tasa de cruce con especies cultivadas (%)
			No. de frutos logrados	No. de análisis			No. de individuos cruzados	No. de individuos no cruzados	
14	R. paniculigera	40	18	10	80	27	0	27	0.0
15	R. paniculigera	100	15	10	86	65	0	65	0.0
16	R. paniculigera	5000	1000	100	792	600	0	600	0.0
17	R. onoei	500	29	29	129	52	0	52	0.0
-	-	6675	1698	573	3171	1819	0	1819	-

*1), 2): Diferencia en el No. total de semillas recuperadas y el No. total de semillas analizadas resultó porque las semillas vacías (sin contenido de semilla), semillas para las cuales la extracción de ADN era imposible y las semillas para las cuales ninguna amplificación del gen de control mediante PCR se notó se excluyeron del objeto del presente análisis.

28

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si o no una rosa silvestre de interés está cruzada con una rosa cultivada, que comprende investigar la presencia de un gen KSN que contiene un transposón indicador.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la rosa silvestre de interés se determinó no por ser cruzada con una rosa cultivada cuando un gen KSN que contiene un transposón indicador no está presente en dicha rosa silvestre de interés.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la rosa silvestre de interés se determinó por estar cruzada con una rosa cultivada cuando el gen KSN que contiene un transposón indicador está presente en dicha rosa silvestre de interés.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la semilla padre es una rosa silvestre y el polen padre es una rosa cultivada.
5. El método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde dicha rosa cultivada es una rosa que tiene un gen insertado en éste.
6. El método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde dicho gen es un gen relacionado con el color de la flor.

7. El método de acuerdo a la reivindicación 6 en donde el gen relacionado con el color de la flor es el gen de la enzima flavonoide 3', 5'-hidroxilasa derivado de pensamiento de la familia violácea.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde la detección de dicho gen indicador se lleva a cabo por vía de hibridación de los ácidos nucleicos de dicho gen.
9. El método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde dicha detección se lleva a cabo por vía de amplificación específica mediante PCR.
10. El método de acuerdo a la reivindicación 9 en donde dicho PCR se lleva a cabo por vía de un iniciador delantero:

CATATTATGGCATAGGGTGTGGC (SEQ ID NO: 3) y un iniciador inverso: TGTAATCTGTAGGAGATCCCATGC (SEQ ID NO: 4).

11. El método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde dicha rosa silvestre es una planta de rosa que tiene, en la configuración homóloga, un gen KSN que no contiene un transposón.
12. El método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en donde dicha rosa silvestre es NOIBARA (*R. multiflora* Thunb. ex Murray), TERIHANOIBARA (*R. wichuraiana* Crep.), HAMANASU (*R. rugosa* Thunb. ex Murray), OOTAKANEBARA (*R. acicularis* Lindl.), KARAFUTOIBARA (*R. marretii* Lev.), OOFUJIIBARA, AZUMAIBARA,

35
81

YAMATERIHANOIBARA (*R. luciae* Franch. et Rochebr.), YAMAIBARA (*R. sambucina* Koidz.), KAKAYANBARA, YAEYAMANOIBARA (*R. bracteata* Wendl.), NANIWAIBARA (*R. laevigata* Michx.), SANSHOUBARA (*R. roxburghii* Tratt. var. *hirtula* (Regel) Rehd. et Wils.), TAKANEBARA (*R. acicularis* var. *nipponensis* (Crép.) Koehne.), TSUKUSHIIBARA (*R. multiflora* var. *adenochaeta* (Koidz.) Makino), MORIIBARA (*R. luciae* var. *hakonensis* Franch. et Sav.), FUJIIBARA (*R. luciae* var. *fujisanensis* Makino), YABUIBARA, NIOIIBARA (*R. luciae* var. *onoei* (Makino) Momiyama), MIYAKOIBARA (*R. luciae* var. *paniculgera* (Makino) Momiyama).

13. El método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en donde dicha rosa cultivada es una planta de rosa que tiene, en la configuración homóloga, un gen KSN que tiene un transposón insertado en ésta.
14. El método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en donde dicha rosa cultivada es té híbrido, floribunda o miniatura.
15. Un par iniciador para amplificar un gen KSN que contiene un transposón indicador en un método para determinar si o no una rosa silvestre de interés está cruzada con una rosa cultivada, dicho par comprende un iniciador que tiene una secuencia base idéntica o sustancialmente homóloga a la región de la secuencia base establecida en la SEQ ID NO: 1 y un iniciador que tiene una secuencia base idéntica sustancialmente homóloga con la región de la secuencia base establecida en la SEQ ID NO: 2.

16
82

16. Un par iniciador de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende un iniciador delantero: CATATTATGGCATAGGGTGTGGC (SEQ ID NO: 3) y un iniciador inverso TGTAATCTGTAGGAGATCCCATGC (SEQ ID NO: 4).

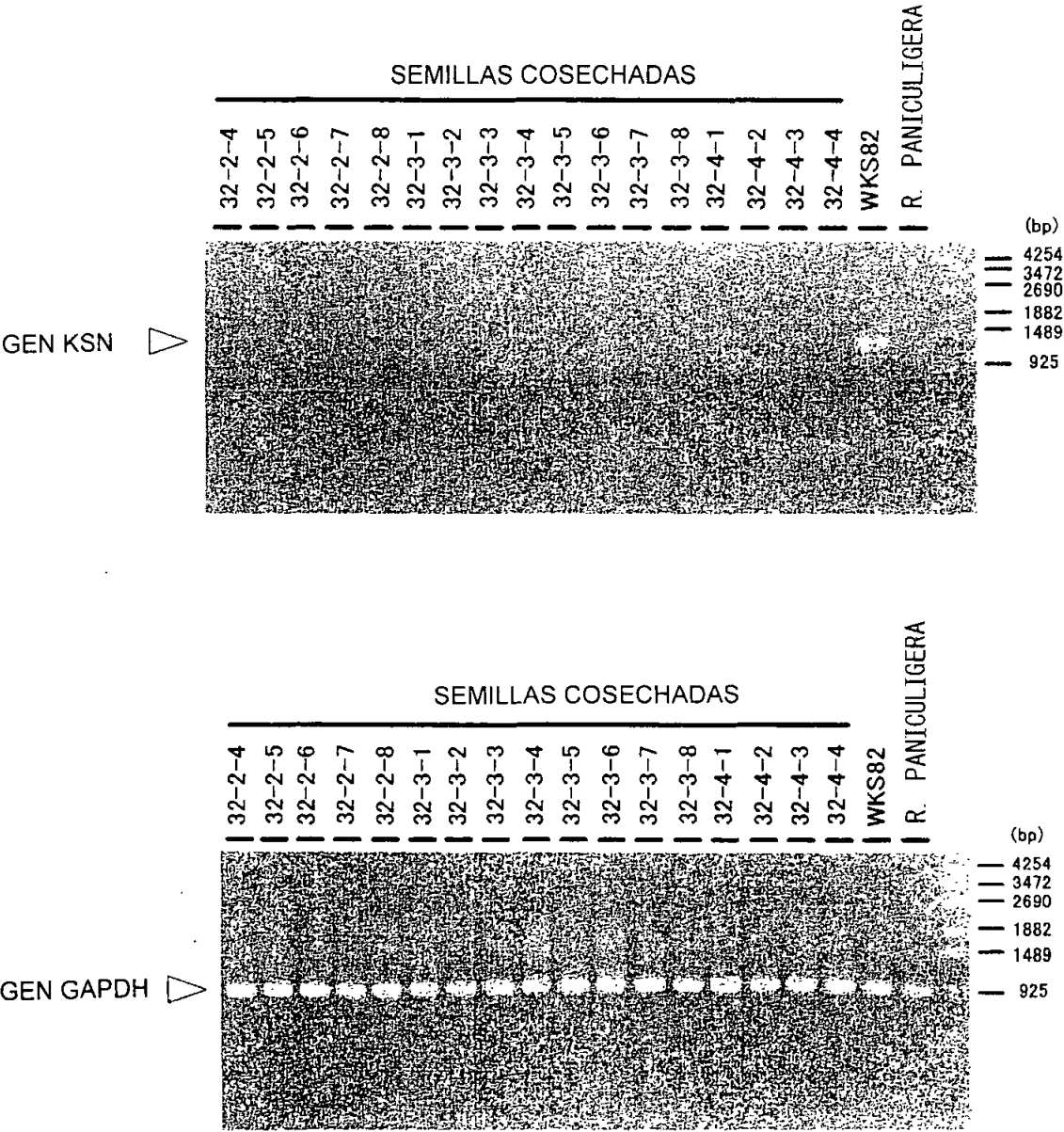
7/83

RESUMEN

Se describe un método para determinar si o no una rosa silvestre de interés está cruzada con una rosa cultivada. El método comprende las etapas de: examinar si o no el gen KSN que contiene un transposón (un indicador) está contenido en la rosa de interés; y determinar que la rosa de interés esté cruzada con una rosa cultivada cuando el individuo tiene un transposón que contiene un gen KSN.

78
84

Fig.1



DETECCIÓN DEL GEN KSN POR UN MÉTODO PCR

79
85

SEQUENCE LISTING

<110>Method for determining whether or to wild roses have crossed with cultivated roses

<120>

<130>1073356

<160>6

<210>1

<211>519

<212>DNA

<213>Rosa sp.

<220>

<221>CDS

<222>(1).. (516)

<223>Nucleotide sequence of rose KSN gene

<400>1

atg gca aga atg tcg gaa cct tta gtt gtt gga aga gtc ata gga gat	48
Met Ala Arg Met Ser Glu Pro Leu Val Val Gly Arg Val Ile Gly Asp	
1 5 10 15	
gtt ctt gat tac ttt acc cca act act aaa atg att gtc act tac agc	96
Val Leu Asp Tyr Phe Thr Pro Thr Thr Lys Met Ile Val Thr Tyr Ser	
20 25 30	
acc aaa ctc gtc ttc aat gga cat gag ctc ttc cca tct gca gtc acc	144
Thr Lys Leu Val Phe Asn Gly His Glu Leu Phe Pro Ser Ala Val Thr	
35 40 45	
gcc aaa cct aga gtt gag att caa gga ggc gac atg aga tca ttc ttc	192
Ala Lys Pro Arg Val Glu Ile Gln Gly Gly Asp Met Arg Ser Phe Phe	
50 55 60	
act ctg gtg atg aca gac cca gat gtt cct ggc cct agt gat cct tat	240
Thr Leu Val Met Thr Asp Pro Asp Val Pro Gly Pro Ser Asp Pro Tyr	
65 70 75 80	
ttg aag gag cac ctg cac tgg att gtg aca gac att cca ggc acc aca	288

86

PCT/JP 2008/056000

Leu Lys Glu His Leu His Trp Ile Val Thr Asp Ile Pro Gly Thr Thr
85 90 95

gat gtt aca ttt gga aga gag atg gtg agc tac gag atg cca agg cca 336
Asp Val Thr Phe Gly Arg Glu Met Val Ser Tyr Glu Met Pro Arg Pro
100 105 110

aac ata gga atc cac agg ttt gtg ttt gtt ctt ttc aag cag aaa cga 384
Asn Ile Gly Ile His Arg Phe Val Phe Val Leu Phe Lys Gln Lys Arg
115 120 125

agg cag tcg gtg aac cca cct tct tca agg gat cac ttc aac acc cga 432
Arg Gln Ser Val Asn Pro Pro Ser Ser Arg Asp His Phe Asn Thr Arg
130 135 140

agc ttc gca gcc gaa aac gac ctc ggt ctt cct gtt gct gcc gtt tac 480
Ser Phe Ala Ala Glu Asn Asp Leu Gly Leu Pro Val Ala Ala Val Tyr
145 150 155 160

ttc aat gcg cag aga gaa acg gca gca aga aga cgc tag 519
Phe Asn Ala Gln Arg Glu Thr Ala Ala Arg Arg Arg
165 170

<210>2

<211>8925

<212>DNA

<213>Rosa sp.

<220>

<221>

<222>

<223>Nucleotide sequence of transposon in rose KSN gene.

<400>2

tgtaagtaca ttggcctatt accattcaac atatgatttc ccactacgac gaggaaccg 60
gagcttcaag gaagcaaaga gaaagatcac aagatcggtt cttgaagaca agatcaagtc 120
aaatcgagtc actgatcttg agtttaatgt gtattcattc catattgggtt ggtataaatc 180
taaattgata tgcataatcg ttgtattaag tcaataatcc cttatgcatt aaaatgggtt 240

49

PCT/JP2008/053000

ttaacatgca tatcaatttg agaccttggt aggaaagtat cgattgcaca ttcaaaaact	300
gttttaaatc tttctatatt tatcttaac aattatcaag aaaagatttg attgaggggg	360
agtttttctc ccttataaaa aggtttcaaa actaaagttt tgtgtagggt ttttgacggc	420
tgaaactggg ttctctttga acttcttggt ttgttcaaat cgttttcgaa aaacctcttt	480
taattgtttc atgtattact ttgcataatc ttttacctcc actctcaaga tcagtgttc	540
aattgagtga aaggaaggct gaagattgat tgcctggaat gttgaatcta gagttagaat	600
ggttgtaaaa caagttagca ttgtttgcta agaaaagggt tttgttgtga acaacactac	660
ttgtattctg taaactctag tgtttaatat tggattgatt tttcgtgttg gctacgttaa	720
aagccacgca gtgaagtffc ctcagtggag aggtttacac tgcgttagca aatcttcgtg	780
tcatgtatca tactttcttt gattaaactc ttgagaaaaa gtattttatc aacactgggt	840
ccatctagta ttttcaattg gcatcagagc gggttctaga accttctaga gatcccagga	900
aagatggaac attcacgtga tagggctact gggggatcta taaatagtc tccctggttc	960
gaaggtggat gtgaaaaata cactcaatgg aagatttaca tgaaatcata cctctatgct	1020
caagatgaac acgtgtggaa catcgtagaa aatggctgga gtgtacctat gacaaaagca	1080
aaagaagaag gcgcttccac taccactccc aaaccaagga aggactggac tgaggaagaa	1140
gttcgtaact tgcaagcaga ttcaaagcg aagaacagca tcttcacagc cctatcggag	1200
cgggaaaaac tgaggataag tcattgtgag actgccaagc aggcatggga tctcctacag	1260
attacatacg aaggaaataa aaaggtagct gcacagaaac tgcaagcact gatttttgaa	1320
ttcgaacca tgactatggc agatgatgga accgtggatg acttccatgg tagaattctt	1380
aaaatctccg gtcagtgtcg cagtctagga gcaccttttg atgaagataa aatagtcaaa	1440
aagatactca gggctctgcc ggaaaaattt cactcaaagg ttacgagcat agaggactct	1500
tttgatatag atgattatcc acttgatgag ctcacggaa atttgaaaac ctatgagatg	1560
atgttaaaac ctgagaagaa aaacaagggc gtagccttca aagcagtga agaaattgaa	1620
gaggaagaag gatactaga tcttgctcta ctgacgaagg aattcaaaaa atttctcaaa	1680
agcaagaact cctctaaaaa cacgaatgct ccagaagga ataaccatat tggcagtggg	1740
aacaacagtg actacaatag taagaatgga agaggaaact tcaaaggaaa tcactcaagg	1800
aaacaaaaat gctatgaatg tggfgttttc ggtcacattt ctactgactg tggaaatagg	1860
aagcttggaa acagcaacaa caagtcactc ctttcaactt ggagtgatga tgaatctcaa	1920
gaaattgaaa atgtggctct tgtctcatca ttgttgccctg attctgaaag tgatgagtat	1980
ttctctgatg atgatgaaac aaatgttcgc tgcaaacac tctacaaagc ttcaaaggcc	2040
actctgatta gaaacttgag cttggaaaaa gaagtagatt tcttgaggac tgaaaaagaa	2100
aaggtggaga aactattcga atcctcacia tctgcatgga aactggagaa aagcaaactc	2160
gtgagtgaat cggcagatct acaagggtgac caaaagatag tgacgtggaa gactgaaaag	2220
aatgagtatc tcaacaagat caaacttcta gaactggatg ttaaaggaca aagagccctg	2280
aacttggaac tgttagcgaa aaatgagtct ctacaacatg agttaaaatt aactcaagaa	2340
agattcatga agtttgatat cagctccact tccatgtcca agttacttgg atcaggaaaa	2400

gctcctcatg atacatgtgg gctaggatac actggagaag attccaaaag caccaaattc	2460
gtacgtgcct caaaaccatc tgtagagcag atagatgtct cccttgatga tcatgtcaaa	2520
agtgtaaagg aaggtaattc aaaccaacat catcaggtaa aacttgacca agaatcccc	2580
actggtaaac acaggtaacg aaaccctaga acccttgctc ctacttgta tcactgtgtt	2640
aagattggcc atatcagacc tagatgtaat gaacggtttt taaacttaca attttctcaa	2700
gaaaaatgta ctgtcgaaac cttacagggt gagcttaaag aacaaaagga actcattaac	2760
aaattaactg aaattgtttc tcaaaagaat cctcaaactg aaagaagaaa agatgtctgg	2820
accagaaaaa ttaaaagcaa aaatcattgg tccccgttg gtgaaactga tgatacatgt	2880
ctttttgttt gtgctagcaa aattcatcaa cgctctcaca ttgaggcaac ttgtttggta	2940
gctttaactg catttgctga caaacgacga gatttttgg atgttgacag tggttgttct	3000
agacacatga ctggagacaa aacctgggtt acttcatttg aggatgaaaa tacctctgga	3060
tcagtcacgt ttggagatgg gaggaagct aacattctag ctgaggtac agtaaacact	3120
ccaggtatac ctaaccttaa aaatgigtta ttgttgaag gaitaactgc aaatctgatt	3180
agcgtcagcc atttggctga tgaatgtaa gatgtgtgtt ttaacaaaca gagatgtttg	3240
gtcctaaatc agaaaggta aggtatcatg ggaggtatga gatctgttga taactgttat	3300
catattcaag caaatgaatc ttctagtgtt cagtcctgtt tgtctgttaa atccacagag	3360
gaaacctttg aactttggca cagaaagatg ggacataatc actatcagga cttgctgaaa	3420
ttatcttcca aacaatgtgt cggaggcttg ccaaatttaa aaggtaaaac tgacaagatg	3480
tgtggagact gcaaggttgg aaagcaaact aaggcacctc acagaatggt aaattctgcg	3540
acaacctcac aagtattgga actattacac atggatctca tgggaccagc tcaatctgaa	3600
agtccttgag gtaagagcta catactagta gttgtagatg atttctcaag atacacctgg	3660
gtaaacttct tgaaagacaa aactgaaacg tttagtcct ttaagaactt gactcaaaaa	3720
ttaatcattg agaaacaatc atctaataac tgtttagtga gaataagatc agataatgga	3780
actgagttta aaaatgcctc tttttctaac tactgtcatg agcttgggtg gtcacatgag	3840
ttctcagctc caataacccc tcaacaaaat gggatagtgg aaaggaaaaa tagggtagtg	3900
ctagacatgg ctgagtatt actacacgt gcaggtttta gcaaaaactt ttgggctgan	3960
gcgatcagca ctgcttgcta cacaataaat agagtattcc ttanaccang aaatgatcaa	4020
actgcttacg agctgtgga aggtanaag ccaaagtta aacactttca tgttntnggc	4080
agtccttgtt acattctacg agatagagaa caccttggtg agtttgatgc tagaactgat	4140
gatngtgtgt tcttggggtg ttctctgaac agcagagcat atagggttta caataaaaga	4200
actcgtgttg ttatggaatc cattaatgtt tctattgatg atcaatgtgt gaaacaggaa	4260
gtaacatttg cagatactc acccttctcg gtcacacctt cacagaatac tgaaacatca	4320
tntgaggaag aggaagagga aatccatgac aacatttttg aaccagctnc cacccaaagn	4380
agagggttca agcaagtcca aaaagatcac tccactcaag atatcatcgg caatctaaca	4440
gatggctcca tgacaaggag aaaggctgca gttcaggtaa gtccctntga ggtaagtga	4500
ggaaatgtat tactgtgttt cattaccgaa aatttggtaa gcatgaacat tataatctat	4560

tttggttttg tgtccattat tgaaccnaaa aatattaagg cagccttgtt ggatgataac	4620
tggattagcg ccatgcaaga tgaactgaat cagtttacta ggaatgatgt atgggtactta	4680
gtaccaaggc ctagtaagtg caatgttata ggaactaagt ggattttcag naatnaaagc	4740
gatgntaaag gnaacgtgat taggaataaa gccagactag ttgctcaggg atattcacag	4800
gtcgaaggac ttgactttga cgagactttt gctcctgtag ctaggttgga atctgttaga	4860
ttactttctat ccattgcttg tcatctccgg ttcaaatgtt ttcaaatgga tgtcaaaact	4920
gcctttctga atggatttct tcaggaggaa gtttatgtag agcagcctcc aggtttccaa	4980
gateccacaca acctagatca tgtctaccgg ctcaagaaag ccttgtatgg gctaaagcag	5040
gctcctcgag cctgggatga gagactatcc actcatcttg tgggaaaagg gtatgctaga	5100
ggatccatag ataaaacatt gtttgtgaaa cgaaccaaaa atgacattgt cattgcccaa	5160
gigtatgttg atgatattgt atttggttcc acttctaaat accttgtcaa agaatttcaa	5220
tctgtcatgg aaagtgaatt tgaatgagc atgtgtgggtg aactaacgta ttttcttgga	5280
ctgcaagtaa agcagataga cacaggtttg ttctctctc aatcaaaaata cgctgagaac	5340
ctgatcaaga aattcggctt tgcctccaag aagacagtga ccaatcccat gagtacaact	5400
actaagttaa gcgaagatca tgaaggaaaa tcagttgatc cgactctcta tcgaagtatg	5460
atcgggagtt tgcctctatc cactgccagc agacctgaca tctcttacag tgtgggtgtg	5520
tgtgctcgat ttcaagcaaa ccccaaagaa tctcacctgg acgctgtcaa aagaataatc	5580
cgctatgttg caggtacagt taattgtggc cttttctata ccttcgacac taatgtagaa	5640
attgcaggat actctgatgc tgactgggga ggaaatttaa aggatcgga aagcacttca	5700
gggggatgtt ttttcattgg caacaatctg gttgcctggc atagtaagaa acaaaactgc	5760
atatacttgt ctactgcaga agctgaatat gttgccgctg gaagtgtctg cacacaaata	5820
ctttggatga agcaaatgct tcatgattat ggcatatctc aaggtaagtt gtctattttc	5880
tgtgacaaca ctagtgtat taacatcact aagaatcctg ttcaacactc tcgaacaaag	5940
cacattgatc tccgatatca ctttattagg gatttggttg aacaaaacat acttgagtt	6000
agctttgtgc ccaactgaaa tcaacttgc tgcctgttca ctaagcctct tgacactgct	6060
aggtttgaaa tgttgaggaa tgccctaggg atatgttcta agcattaagg caaaatgatg	6120
actgtccact attgattgag aaaatttga tcctagtatc ccttgatcac agtcactagt	6180
gaaatgtaca tattttcagt catgtatctt aatgttatca tgccttattc tggacaaatg	6240
aaattgtgta ctcatgttta gtcactgaat caagtaacct tactatgcat cttcacctat	6300
agcctatgtg gtggcatgtt tccttttgtt ttctgtcaaa tgagattcag tgaagtagac	6360
gaactgcttc ttttgctcac ataactaatt cctctttctc aaagtaatca ggtcctagtt	6420
gtggatgaact ttctaggatt tgtaanaaac ganaacggaa aattgtatcc catctctcaa	6480
agtaatcagg ccttagtcgt ggtgaacttt ctaangtttg caagaaacga gctggtgagt	6540
ggtcttttga cataacataa aatcatgcag acaactactc gagactctct ccatgganca	6600
tccttgttat gcttagtacc ctaagaacat ctgttctggg ggttgctgag aagagtcttg	6660
ttacatgagt aatatttgtc actaaatnaa ggagatcttt gactccanta nacatgtgct	6720

84
90

PCT/JP 2008/056000

tgggaccatg attcctgctc ctntttagga gatttcatga gctttacttt agttctctta	6780
cttcaactcct tnntatgac actaaaatct tttctaagcc ccacatcatg gttatattca	6840
cttctatcac aagtttactc ctttaaggct aactatgagt accaattctt attggtgaga	6900
gaatacatca tgccttctac tctgaactat gtagcttcca ctaagtgatc tgtgctctct	6960
gtgattaaac ttctgtatat tttctctcct cgatagacc tatgcattca ttgccttgat	7020
acttgcaaag gaaacgatcc tctgatatac ttgcagattc tctgaatata ttttggctct	7080
tcgtttcctt ccttgatggt aatctgccta caattaattt ccataatgac tatgcctaag	7140
ttgaggggga gaagttatct gcatgcatac acctagggaa aataaatgt cataactct	7200
ctccccattt gagecgttct cccaatcggt gtagtccctg gcttctntaa aacctactg	7260
ttcaactacat atagctctct ttgtctccct cggattttac tcttgggtgt cttgtgtgc	7320
aggttctttc acccactgct ctctcaccat ggttcgctca cagcaaaca ctcgccttgg	7380
aggacatcgc cgcctgcctc ctccagaaga aggtcgtcag gcagctgcca gagccgggat	7440
ntccatccc ggcatgcac glacacgcag tcggagtcct cctcctcctg tctctctgga	7500
aagctctcgt gatcagattc tagtggctga ctggcgaatt gcttgcctca cgacggacat	7560
ggacgacatg cattctcttc tggttcgaac tcgtcatgcc ctgaccactc tcacacagga	7620
gatecggaa atgcagcgcc acctctccgg gtttgacgct cccggtccat cccatgccat	7680
gcaggagcct gtcgcaccag aggaaagctc ggattccatg gatgaagagg aatttctgga	7740
caccgtcacc aagctttgtg aggaatttga cgtgccctcc cattcaaagg gggagaagta	7800
acttgatttt tcttacttta ttctgttttc tgcattttta attttttttg gtgtgtaagt	7860
gcataagcac agatactctt aggatgcttg ctattattat tcttaagtaa tegtattttg	7920
gctacttgga tccggaaaag gatggaaact gattccttac tccaagtagc accttttgtt	7980
tagtgattag tgtttatctg tgaacctaa ctgcaggac aaaagatgaa aaatcatgcg	8040
ttgaatggga atgcccagg ggggagattg taagtacatt ggctattac cattcaacat	8100
atgatttccc actacgacga ggaaaccgga gcttcaagga agcaaagaga aagatcacia	8160
gatcggttct tgaagacaag atcaagtcaa atcgagtcac tgatcttgag tttaatgtgt	8220
attcattcca tatgtgttg tataaatcta aattgatatg catatcggtt gtattaagtc	8280
aataatccct tatgcattaa aatggttttt aacatgcata tcaatttgag accttgtag	8340
gaaagtatcg attgcacatt caaaaactgt tttaaactct tctatattta tcttaatcaa	8400
ttatcaagaa aagatttgat tgagggggag ttttctctcc ttataaaaag gtttcaaac	8460
taaagttttg ttaggggttt ttgacggctg aaactggttt ctctttgaac ttcttgtttt	8520
gttcaaatcg ttttcgaaaa acctcttta attgtttcat gtattacttt gcataatctt	8580
ttacattcac ttcaagatc agtgattcaa ttgagtgaag ggaaggctga agattgattg	8640
cctggaatgt tgaatctaga gttagaatgg ttgtaaaacc aagttagcat ttgttgctaa	8700
gaaaagggtgt ttgttgtgaa caacactact tgtattctgt aaactctagt gtttaatat	8760
ggattgattt ttctgttggt ctacgttaaa agccacgcag tgaggtttcc tcagtggaga	8820
ggtttacact gcgttagcaa atcttcgtgt catgtatcat actttctttg attaaactct	8880

85
91

PCT/JP 2008/053000

tgagaaaaag tattttatca acactgggtc catctagtat ttcca 8925

<210>3
<211>23
<212>DNA
<213>Artificial sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Forward primer
<400>3

catattatgg cataggggtg ggc 23

<210>4
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Reward primer
<400>4

tgtaatctgt aggagatccc atgc 24

<210>5
<211>23
<212>DNA
<213>Artificial sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer
<400>5

tgtcatctct gcccgaagta agg 23

<210>6
<211>23
<212>DNA
<213>Artificial sequence

87
93

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2008/056000
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(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) C12Q1/68, C12N15/09
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2008 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2008 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2008
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), CAPLUS (STN), 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	WO 2004/070036 A1 (Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.), 19 August, 2004 (19.08.04), Full text & JP 2006-149202 A	1-16
A	Pallett D. et al., Within-population variation in hybridization and transgene transfer between wild Brassica rapa and Brassica napus in the UK., Annals of Applied Biology, 2006, 148(2), p.147-155	1-16
A	Song Z. et al., Gene flow from cultivated rice to the wild species Oryza rufipogon under experimental field conditions., New Phytologist, 2003, 157(3), p.657-665	1-16

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 29 May, 2008 (29.05.08)	Date of mailing of the international search report 10 June, 2008 (10.06.08)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

8894

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/056000

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Desplanque B. et al., Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of Beta vulgaris L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers., Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98(8), p.1194-1201	1-16
A	Luby J. and McNicol R., Gene flow from cultivated to wild raspberries in Scotland: developing a basis for risk assessment for testing and deployment of transgenic cultivars., Theoretical and Applied Genetics, 1995, 90(7/8), p.1133-1137	1-16
A	WO 2003/097869 A2 (CON/CIPPIO GMBH), 27 November, 2003 (27.11.03), Full text & DE 10222632 A	1-16
P,X	Noriko NAKAMURA et al., "Shizen Kankyoka ni Okeru Saibai Bara to Yasei Bara tono Kozatsusei", Horticultural Research (Japan), 24 March, 2007 (24.03.07), Vol.6, separate Vol.1, page 506, P211	1-16

89
95

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 5 6 0 0 0

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2008年 日本国実用新案登録公報 1996-2008年 日本国登録実用新案公報 1994-2008年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), Cplus(STN), JSTplus(JDreamII), JMEDplus(JDreamII), JST7580(JDreamII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2004/070036 A1 (湧永製薬株式会社) 2004.08.19, 全文 & JP 2006-149202 A	1-16
A	Pallett D. et al., Within-population variation in hybridisation and transgene transfer between wild Brassica rapa and Brassica napus in the UK., Annals of Applied Biology, 2006, 148(2), p.147-155	1-16
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 29.05.2008	国際調査報告の発送日 10.06.2008	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 三原 健治 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 3846

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Song Z. et al., Gene flow from cultivated rice to the wild species Oryza rufipogon under experimental field conditions., New Phytologist, 2003, 157(3), p.657-665	1-16
A	Desplanque B. et al., Genetic diversity and gene flow between wild, cultivated and weedy forms of Beta vulgaris L. (Chenopodiaceae), assessed by RFLP and microsatellite markers., Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98(8), p.1194-1201	1-16
A	Luby J. and McNicol R., Gene flow from cultivated to wild raspberries in Scotland: developing a basis for risk assessment for testing and deployment of transgenic cultivars., Theoretical and Applied Genetics, 1995, 90(7/8), p.1133-1137	1-16
A	WO 2003/097869 A2 (CON/CIPTO GMBH) 2003.11.27, 全文 & DE 10222632 A	1-16
P, X	中村典子他, 自然環境下における栽培バラと野生バラとの交雑性, 園芸学研究, 2007.03.24, 第6巻別冊1, p. 506 P 2 1 1	1-16

98

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NII : 800176089-2



RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 68,551
FECHA : -SEPTIEMBRE 14 DE 2009

***** 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	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

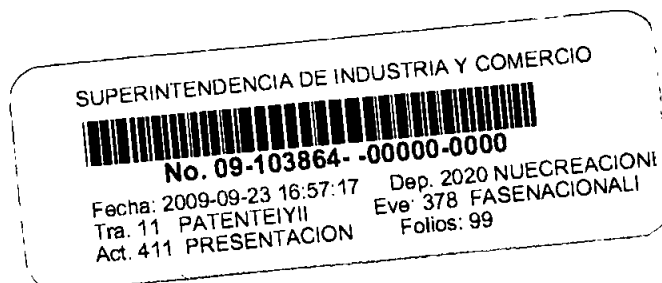
RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

010: 15218-841-003-8

939

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 68,586

FECHA : SEPTIEMBRE 14 DE 2009

***** 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 TRAM
			TOTAL : \$ 25,000.00

SDN: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

COLO: 15218-841-003-8

COLO: 15896-841-001-5

**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 []

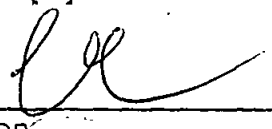
INCOMPLETA []

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 []

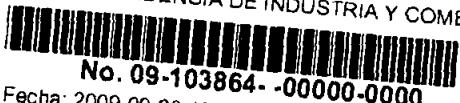
COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Respon 

Fecha _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-103864-00000-0000

Fecha: 2009-09-23 16:57:17 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 99

ra 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



2020

Bogotá D.C.,

Folio 100

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

REFERENCIA	Radicación No.	9 103864
	Solicitud internacional	PCT/JP2008/056000
	Fecha inicio fase nacional	23/10/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	9643
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

15 DIC. 2009

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

adpall