

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 944**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2008 E 08722920 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2128274**

54 Título: **Método para determinar en un rosal silvestre la presencia de cruzamiento con un rosal cultivado**

30 Prioridad:

**23.03.2007 JP 2007077882**

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

**26.05.2014**

73 Titular/es:

**SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)  
1-40, Dojimahama 2-chome Kita-ku  
Osaka-shi Osaka 530-8203, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAMURA, NORIKO;  
MIZUTANI, MASAOKO y  
TANAKA, YOSHIKAZU**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 462 944 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para determinar en un rosal silvestre la presencia de cruzamiento con un rosal cultivado

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un método para determinar la presencia de cruzamiento con una rosa cultivada en una rosa silvestre.

**Técnica anterior**

10 Puesto que siempre se favorecen las flores que tienen nuevos rasgos de la industria de las flores, el desarrollo de tal tipo de plantas con flores es industrialmente importante. La mejora de la raza basada principalmente en cruzamiento ha producido especies con una variedad de rasgos. Sin embargo, en la mejora de la raza basada en el cruzamiento, los recursos genéticos disponibles se limitan a plantas susceptibles de cruzamiento estrechamente relacionadas, y de este modo los colores y los rasgos que se pueden introducir son limitados en la mayoría de los casos, y además es raro que las especies de plantas individuales tengan diversos colores y rasgos. En términos de color, por ejemplo, era imposible producir rosas y claveles de color azul, campanillas o geranios de color amarillo mediante mejora de la raza basada en el cruzamiento.

15 Sin embargo, el uso de la tecnología recombinante de genes puede conseguir el desarrollo de una variedad de rasgos mediante la introducción de varios genes en las plantas que superen la barrera de la especie y mediante la alteración artificial de los metabolismos de plantas, etc. Por ejemplo, hay un ejemplo en el que en las rosas y los claveles que no pueden producir delfinidina en el pétalo de la flor, se expresó el gen de la enzima flavonoide 3',5'-hidroxilasa que es requerido para sintetizar delfinidina para producir delfinidina, permitió la creación de flores de color azul que no están presentes en la naturaleza (Tanaka 2006).

20 Sin embargo, en Japón, la investigación y el desarrollo, el cultivo, la distribución, etc. de tales plantas recombinantes de genes creados artificialmente son necesarios para cumplir con las regulaciones establecidas en la "Ley sobre la Conservación y Uso Sostenible de la Diversidad Biológica a través de las Regulaciones sobre el Uso de Organismos Vivos Modificados" (Protocolo de Cartagena). En otros países también, el cultivo en campos, etc. de las plantas recombinantes de genes ha sido regulado basándose en leyes similares. En concreto, para las plantas cuyos pólenes son fértiles y para las que existen una multitud de plantas susceptibles de cruzamiento estrechamente relacionadas que existen en Japón, es obligatoria la evaluación de la capacidad de cruzamiento, o de la posibilidad de proliferación de genes de una planta recombinante con respecto a una especie silvestre estrechamente relacionada.

30 En el caso de las rosas para las que se producen a una multitud de especies estrechamente relacionadas en Japón y que son de varias flores y fructíferas, las cantidades que se deben analizar para determinar la presencia de cruzamiento entre especies cultivadas y silvestres se convierten en enormes, y de este modo se está buscando el establecimiento de tecnologías analíticas simples y precisas. Hasta ahora, se ha informado sobre la que utiliza microsatélites como marcador molecular (Debener 2003, 2006). Además, el análisis también se puede llevar a cabo con un método de identificación basado en la determinación de la ploidía por medio de citometría de flujo. Sin embargo, cualquiera de los métodos anteriores tenía el problema de que carecían de precisión, versatilidad y/o simplicidad. Además, dado que las rosas cultivadas hoy en día fueron creadas mediante cruzamiento artificial de aproximadamente 8 especies silvestres, no fue fácil obtener marcadores de ADN que pudieran distinguir las especies cultivadas de las especies silvestres.

40 De acuerdo con la presente invención, el gen KSN, un gen diana, es un gen implicado en la floración perpetua de las rosas obtenidas a partir de Rosa chinensis spontanea, y el gen se creó insertando un transposón aproximadamente 9 kb en el gen KSN de una rosa de floración estacional. Se ha informado de que la inserción de un transposón sirve para inhibir la expresión de dicho gen, lo que condujo a la desregulación del control de la antogénesis en el ápice del brote, lo que dio como resultado la naturaleza de floración perpetua (Iwata et al., Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) Núm. 2006-149202).

Ya se ha dilucidado que las rosas de las especies cultivadas contienen, en la configuración homóloga, dicho gen que tiene un transposón insertado en el mismo. Por otro lado, las rosas de la especie silvestre tienen, en la configuración homóloga, un gen KSN que, en principio, no contiene un transposón.

50 Según se utiliza en la presente memoria, la Rosa chinensis es una de las especies silvestres que se convirtieron en un antepasado de las rosas cultivadas y una rosa de floración estacional R. chinensis spontanea es un linaje mutante de la misma y una rosa de floración perpetua.

Documento de Patente 1: Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) Núm. 2006-149202.

### Descripción de la invención

Se ha informado sobre métodos para determinar la presencia de cruzamiento con rosas cultivadas en rosas silvestres, pero carecen de la versatilidad. Otros métodos pueden ser concebibles, pero carecen de simplicidad y precisión. Por lo tanto, existe la necesidad de un método que pueda resolver estos problemas y pueda determinar si las rosas silvestres se cruzan con las rosas cultivadas para que las plantas sean fructíferas y para las cuales se produce una multitud de especies silvestres estrechamente relacionadas.

En los casos en que se va a determinar un número enorme de plantas individuales para determinar la presencia de cruzamiento con el fin de examinar la posibilidad de proliferación de genes de plantas recombinantes, se requiere específicamente un método que permita una fácil determinación de si una rosa silvestre se cruza con una rosa transformante como planta parental polinífera. Por lo tanto, la presente invención tiene como objetivo proporcionar un método que permita determinar fácilmente si una rosa silvestre de interés se cruza con el polen de una rosa transformante.

Después de una investigación intensiva y exhaustiva con el fin de alcanzar el objetivo anterior, los autores de la presente invención han concebido la idea de que en una rosa silvestre, solo se puede detectar un gen KSN que contiene un transposón cuando la rosa silvestre se cruza con una rosa cultivada, y han descubierto que utilizando un gen KSN que contiene un transposón como indicador, se puede lograr el objetivo anterior, y de ese modo han completado la presente invención.

De este modo, la presente invención proporciona un método para determinar si una rosa silvestre de interés se cruza o no con una rosa cultivada, comprendiendo dicho método las etapas de: examinar si un gen KSN que contiene un transposón (indicador) está contenido o no en la rosa de interés; y determinar que la rosa de interés está cruzada con una rosa cultivada cuando el individuo tiene el gen KSN que contiene el transposón.

Normalmente, en el cruzamiento de una rosa cultivada con una especie silvestre en un estudio para evaluar el efecto de las plantas transgénicas en la diversidad biológica, la dispersión de pólenes de especies cultivadas que da como resultado el cruzamiento con especies silvestres en las proximidades presenta problemas. Así, en el método de la presente invención, típicamente la planta parental semillera es una rosa silvestre y la planta parental polinífera es una rosa cultivada. Asimismo, típicamente la rosa cultivada anterior es una rosa transformante que tiene un gen introducido en la misma, en la que el gen puede ser un gen relacionado con el color tal como el gen de la enzima flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivada del pensamiento de la familia *Violaceae*.

### Breve explicación de los dibujos

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

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

Especies cultivadas y especies silvestres

En general, las rosas cultivadas son tetraploides (4x) y de floración perpetua. En contraste, rosas silvestres son generalmente diploides (2x) y de floración estacional.

Las rosas cultivadas se pueden clasificar en híbrido de té, floribunda y miniatura, y todas contienen, en la configuración homóloga, un gen KSN que tiene un transposón insertado en el mismo. Por lo tanto, rosas cultivadas, según se utiliza en la presente memoria indica rosas que contienen, en la configuración homóloga, un gen KSN que tiene un transposón insertado en el mismo.

Por otro lado, las rosas silvestres nativas de 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 normalmente tienen, en la configuración homóloga, un gen KSN que no tiene ningún transposón insertado en el mismo. De este modo, rosas silvestres utilizadas en la presente memoria indican plantas de rosa que tienen, en la configuración homóloga, un gen KSN que no tiene un transposón insertado en el mismo.

Gen indicador

De acuerdo con el método de la presente invención, preferiblemente el gen indicador es tal que:

(1) el gen indicador está siempre presente en rosas cultivadas y no en rosas silvestres nativas.

5 (2) Las rosas cultivadas son tetraploides (4x), y debe estar presente un gen indicador para el cruzamiento en al menos tres de los cuatro cromosomas homólogos, y puede estar presente preferiblemente en los cuatro cromosomas homólogos. Las rosas cultivadas son tetraploide (4x), mientras que las rosas silvestres nativas son diploides (2x). Por lo tanto, los gametos producidos a partir de rosas cultivadas pueden ser generalmente 2x, las rosas silvestres pueden ser x, y los híbridos producidos a partir del cruzamiento de las mismas pueden llegar a ser triploides (3x). Basándose en esto, es imperativo que el gen indicador del cruzamiento esté presente en al menos tres de los genes homólogos de las rosas cultivadas. Teniendo en cuenta la posibilidad de que se pueda producir un gameto haploide (x) por medio de meiosis heterogénea a partir de rosas cultivadas, sin embargo, se prefiere, para una determinación exacta, que el gen indicador está presente en los cuatro cromosomas homólogos.

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

15 Con el fin de determinar la presencia de un gen indicador en la planta de interés, dicho gen debe ser amplificada normalmente. Para este fin, resulta conveniente utilizar un método de PCR utilizando un par de cebadores que sean homólogos para la región del gen diana. En este caso, cuando está presente una secuencia que se hibrida con dicho cebador en otro gen distinto del gen diana, se puede obtener un resultado que indique la presencia del gen, incluso si el gen diana nativo está ausente. De este modo, este requisito es importante con respecto al diseño del cebador.

20 Gen indicador específico

En cuanto al gen que satisface el requisito anterior, se puede mencionar un gen KSN que tiene un transposón insertado en el mismo. Se ha demostrado que el gen KSN referido como gen relacionado con la propiedad de floración perpetua de las rosas (Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) Núm. 2006-149202) existe como un gen completo que codifica 519 aminoácidos en las especies silvestres mientras que en las especies cultivadas se ha insertado un transposón de aproximadamente 9 kb en el segmento del intrón. Por lo tanto, puesto que este transposón no está presente en las especies silvestres, pero presente en las especies cultivadas, el gen KSN que contiene este transposón satisface el requisito expuesto en el apartado (1) anterior.

Asimismo, el gen KSN que contiene este transposón está presente en los cuatro genes de las rosas cultivadas. De este modo, este gen satisface el requisito establecido en el apartado (2) anterior.

30 El gen KSN que contiene este transposón también satisface el requisito expuesto en el apartado (3) anterior de selección de cebadores.

Cebadores y sondas

La secuencia de bases del gen KSN (SEQ ID NO: 1) y la de un transposón (SEC ID NO: 2) insertado en el mismo son ya conocidos. El gen KSN que tiene este transposón insertado en el mismo está específicamente presentes solo en las rosas cultivadas. Con el fin de detectar el gen KSN que tiene este transposón insertado en el mismo mediante PCR, es necesario utilizar, como par, un cebador que tiene una secuencia idéntica o sustancialmente homóloga a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 y un cebador que tiene una secuencia idéntica o sustancialmente homóloga a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2. Además, las condiciones generales que deben cumplir el cebador, y cualquiera de los cebadores son un oligonucleótido con un tamaño de 10 bases o más, preferiblemente 15 bases o más, y 50 bases o menos, preferiblemente 30 bases o menos.

45 Teniendo en cuenta el propósito de la presente invención, se prefiere que ninguno del par de cebadores hibride con una región distinta de dicho transposón, aunque la región que se va amplificar en el transposón no está limitada específicamente. Como ejemplo de un par de cebadores que satisface tales requisitos, se pueden mencionar un cebador directo: CATATTATGGCATAGGGTGTGGC (SEC ID NO: 3) y un cebador inverso: TGTAATCTGTAGGAGATCCCATGC (SEQ ID NO: 4).

Detección del gen indicador

La extracción de ADN de las rosas, la amplificación por PCR, etc., y la detección de los productos amplificados se pueden llevar a cabo de acuerdo con los métodos convencionales.

Ejemplos

De aquí en adelante, se explicarán los detalles de la presente invención con referencia a los ejemplos. A menos que se especifique lo contrario, los métodos de biología molecular utilizados están basados en Molecular Cloning (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001), Plant Physiol. (2003) 132, 1652-1663.

5 Ejemplo de Referencia 1.

Adquisición de un gen específico para una rosa cultivada mediante el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

10 Con el fin de determinar la presencia de cruzamiento de una rosa cultivada con una rosa silvestre, se utilizó la detección de polimorfismo de genes mediante el análisis RAPD en un intento de obtener un gen que esté específicamente presente solo en la cultivada rosa. De cada hoja de una especie silvestre (*R. paniculigera*) y una especie cultivada (lavande y WKS82), se extrajo ADN genómico usando DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) de acuerdo con un método recomendado por el fabricante. Se preparó una reacción de PCR que comprendía 10 ng del ADN genómico extraído, 2  $\mu$ M de cualquier cebador (grupo de cebadores de Common de BEX, CMN-A00), 0,4 mM de una mezcla de dNTP, 1 x tampón Ex Taq, y 0,05 U de Takara Ex Taq.

15 La reacción comprendía, 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 se hizo reaccionar a 72°C durante 7 minutos. El producto de PCR obtenido se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 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 escindieron del gel de agarosa, y se purificaron mediante el GENECLAN Turbo Kit (Funakoshi KK) de acuerdo con un método recomendado por el fabricante. Finalmente, se subclonaron por medio del 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.

25 Se analizó la secuencia de cada fragmento amplificado. Se crearon los cebadores Oligo de aproximadamente 20 unidades que contenían una secuencia de cebador común presente en ambos extremos de cada fragmento, y se examinaron las combinaciones de cebadores oligo para los cuales se detectaron específicamente los productos amplificados solo en las especies cultivadas (lavande, WKS82). Con 10 ng de cada ADN genómico de *R. paniculigera*, lavande y WKS82 como la molde, se preparó una reacción de PCR que comprendía 2  $\mu$ M de cada cebador oligo, 1 x mezcla dNTP, y 0,05  $\mu$ M de tampón Ex Taq. La reacción comprendía, 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 se hizo reaccionar a 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR obtenidos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para comparar las combinaciones de cebadores oligo para las cuales se examinaron los productos amplificados detectados específicamente solo en las especies cultivadas. Como resultado, se seleccionaron las combinaciones de cebadores oligo que se cree que proporcionan bandas solo en las especies cultivadas, y se sometieron a un experimento que se muestra en el Ejemplo de Referencia 2 siguiente.

35 Ejemplo de Referencia 2.

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

40 Para las plantas obtenidas polinizando artificialmente con polen de una rosa cultivada una rosa silvestre, se determinó la presencia de cruzamiento utilizando como indicador la detección de un gen específico para la combinación de cebadores oligo que se pensaba que eran especies cultivadas específicas obtenidas en el Ejemplo de Referencia 1. De la hoja de cada progenie obtenida, se extrajo ADN genómico usando el DNeasy Plan Mini Kit (Qiagen) de acuerdo a un método recomendado por el fabricante.

45 A continuación, utilizando esto como molde, se sometieron a la reacción 2  $\mu$ M del cebador, 0,4 mM de una mezcla de dNTP, 1 x tampón Ex Taq y 0,05 U de Ex Taq. La reacción comprendía, 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 se hizo reaccionar a 72°C durante 7 minutos. El producto de PCR obtenido se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para confirmar la detección de bandas específicas. Sin embargo, aunque la morfología de la planta individual aparentemente mostraba un rasgo intermedio, no se obtuvo ninguna correlación con la presencia de bandas específicas. Esto sugirió que el marcador RAPD obtenido aquí puede no ser el contenido los cuatro cromosomas homólogos, pero puede derivar de una secuencia génica presente solamente en algunos de los cuatro cromosomas homólogos de las especies cultivadas. De este modo, se determinó que era apropiado como indicador para la presencia de cruzamiento.

Ejemplo de trabajo 1.

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

5 Se polinizó una rosa silvestre con polen de una rosa cultivada, y para la planta obtenida, se determinó la presencia de cruzamiento utilizando como indicador la detección del gen KSN (documento WO2004/070036) que contenía un transposón que se sabe que se detectada específicamente en rosas de floración perpetua. Se diseñaron un cebador de hebra + de este gen y un cebador de cadena inversa en el transposón insertado y prepararon con el fin de permitir la determinación de la presencia de la inserción de un transposón.

10 De la hoja de cada progenie obtenida por medio de cruzamiento artificial, se extrajo ADN genómico utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acuerdo a un método recomendado por el fabricante. Utilizando éste como molde, se prepararon un total de 2,5 ml de una disolución de reacción que comprendía 0,2 µM de cada uno de un cebador directo KSN1F3: 5'-CAT ATT GCA TAG GGT GTG GC-3' (SEC ID NO: 3) y un cebador inverso KSN1nsR3: 5'-TGT AAT CTG TAG GAG ATC CCA TGC-5' (SEQ ID NO: 4), 0,2 µM de una mezcla de dNTP, 1 x tampón Ex Taq, y 0,625 U de Ex Taq y se sometieron a reacción. La reacción comprendía, 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 se hicieron reaccionar a 72°C durante 7 minutos. El producto de PCR obtenido se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% para confirmar la detección de una banda específica de aproximadamente 1,2 kb. Asimismo, se confirmó que la morfología de la planta individual obtenida mostraba un rasgo intermedio entre los de las especies cultivadas y las especies silvestres.

20 De este modo, para las plantas implicadas a partir de cuya morfología se puede determinar que son un cruce de la especie cultivada y la especie silvestre, se confirmó la presencia del gen KSN que contenía el transposón. Basándose en esto, se determinó que las plantas individuales que tienen un gen KSN que no contiene el transposón no son un cruce de la especie cultivada y la especie silvestre. Teniendo en cuenta esta característica, se indicó que, cuando se utilizó una especie que tenía un gen KSN que no contenía un transposón por línea materna, se puede determinar la identidad del cruzamiento confirmando la presencia de un gen KSN que contiene un transposón en la planta individual progenie.

Ejemplo de Trabajo 2.

Determinación de la presencia de un gen KSN en rosas silvestres

30 Con el fin de determinar si una rosa silvestre podría ser un sujeto para el método de determinación de la presente invención, se evaluó la presencia de un gen KSN que contiene un transposón en cada rosa silvestre. Como rosas silvestres, se utilizaron 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.), 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.), FUJIBARA (*R. luciae* var. *fujisanensis* Makino), YABUIBARA (*R. luciae* var. *onoei* (Makino) Momiyama), MIYAKOIBARA (*R. luciae* var. *paniculgera* (Makino) Momiyama) para determinar la presencia de un gen KSN que contiene un transposón (documento WO2004/070036) de acuerdo con un método descrito en el Ejemplo de Trabajo 1.

40 Como resultado, no se detectó ningún producto específico amplificado (tamaño amplificado pronosticado: aproximadamente 1,2 kb) del gen KSN que contiene un transposón en ninguna de las rosas silvestres. Por otro lado, el producto amplificado del gen GAPDH que servía como control interno se detectó en todas las especies silvestres. Por lo tanto, en estas rosas silvestres, no se reconoció la presencia de un gen KSN que contiene un transposón.

A partir 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 sujeto de ensayo.

45 Ejemplo de Trabajo 3.

Validación de la presencia de cruzamiento con una rosa cultivada en la progenie obtenida por cruzamiento artificial

Para un individuo progenie para el cual la planta parental semillera es una rosa silvestre y la planta parental polinífera es una rosa cultivada, la presencia de cruzamiento se evaluó utilizando el método de determinación de la presente invención.

50 De acuerdo con un método convencional, inmediatamente antes de la floración de las especies silvestres, se llevaron a cabo la emasculación y el embolsado, y cuando el estambre alcanzó la plena madurez, los pólenes del anfitrión (WKS82) y un transformante (WKS82/130-4-1 y WKS82/130-9-1) se acoplaron la mañana de un día agradable. A continuación, se llevó a cabo de nuevo el embolsado para evitar el acoplamiento de otros pólenes, y se

examinó la presencia de la formación de semillas. El polen utilizado se obtuvo mediante la recuperación de la antera antes de la escisión, que se dejó que reposara en un desecador que tenía gel de sílice, y a continuación se obtuvo el polen fresco de la antera que escindió el día siguiente.

5 Como planta madre para el cruzamiento, las especies silvestres utilizadas fueron *R. multiflora* Thunb. ex Murray, *R. wichuraiana* Crep., y *R. rugosa* Thunb. ex Murray.

10 La presencia de la formación de semillas fue confirmada para el fruto para el que no se observó una caída de frutos fisiológica, sino que se observó el cuajado del fruto en el punto temporal de más de 2 meses después del cruzamiento. Además, se recuperaron las semillas obtenidas, y después de un tratamiento de enfriamiento a 4°C durante 3 meses, se sembraron. Con el fin de confirmar la presencia de cruzamiento con el anfitrión o el transformante y la presencia de la transmisión del transgén en los mismos, se realizó un método de PCR de acuerdo con un método descrito en el Ejemplo de Trabajo 1 para el análisis.

15 Cuando las semillas se sometieron a un tratamiento de enfriamiento, la brotación, que se observa por lo general en aproximadamente un mes, no se observó ni siquiera después del paso de 3 meses. Por lo tanto, se recuperó de nuevo una parte de las semillas sembradas que no brotaban, y se sembraron para un análisis similar. De las semillas recuperadas de nuevo, se extrajo ADN genómico usando Nucleon PHYTOPURE for PLANT DNA EXTRACTION KIT (Amersham Biosciences) de acuerdo con un método recomendado por el fabricante. Además, después de su amplificación mediante REPLI-g Midi Kit (QIAGEN), se analizó la presencia de cruzamiento con el anfitrión o el transformante y la presencia de la transmisión del gen introducido en los mismos mediante un método de PCR utilizando como indicador la presencia de un gen KSN que tiene un transposón insertado en el mismo.

20 Como control interno, se utilizó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Cebador 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' (SEC ID NO: 6)

25 Los resultados se muestran en la Tabla 1 y la Tabla 2. La tasa de cuajado de fruto fue muy baja incluso cuando se utilizaron cualquiera del anfitrión y el recombinante como el plantas parentales poliníferas. La plántula obtenida se analizó por medio de un método de PCR, en el que se detectó un gen KSN que contenía un transposón y se reconoció el cruzamiento de las especies silvestres con el anfitrión o el transformante, pero no se detectó el transgén derivado del transformante. Además, cuando se recuperaron de nuevo las semillas sembradas que no brotaban y se observó si eran válidas o no, la mayoría de ellas estaban "vacías (sin contenido de semilla)" y solo se confirmaron

30 embriones normales para una fracción de las plantas. Para éstas, se llevó a cabo un análisis similar mediante el método de PCR, en el que se detectó un gen KSN que contenía un transposón y se reconoció el cruzamiento de las especies silvestres con el anfitrión o el transformante, pero no se detectó el transgén derivado del transformante. Se pensaba a partir de esto que el transgén no se transmitía a la progenie, debido a que, por ejemplo, el transgén no estaba contenido en la célula de polen del transformante.

35 Por lo tanto, se pensó que incluso si el transformante se cruzaba con las especies silvestres (*R. multiflora*, *R. wichuraiana*, y *R. rugosa*), no hay posibilidad de que el transgén sea transmitido a la progenie, debido a que, por ejemplo, el transgén no estaba contenido en la célula de polen del transformante.

Para *R. wichuraiana*, no se confirmaron embriones normales en ninguna semilla.

40 Por lo tanto, utilizando el método de determinación de la presente invención, se puede evaluar muy fácilmente la presencia de cruzamiento entre una rosa silvestre y una rosa cultivada. Asimismo cuando el transgén no puede ser transmitido a la progenie, debido a que, por ejemplo, el transgén no está contenido en la célula de polen del transformante, generalmente es a menudo difícil el análisis de cruzamiento. Sin embargo, utilizando el método de determinación de la presente invención, se puede determinar fácilmente la presencia de cruzamiento. Por lo tanto, la presencia de cruzamiento se determina primero utilizando el método de determinación de la presente invención y

45 cuando se determina que ha habido cruzamiento, es posible estimar si el transgén está presente en la célula germinal del parental de cruzamiento mediante la investigación de la presencia de la transmisión del transgén.

**Tabla 1. Tasa de cuajado de frutos con la especie silvestre (*R. multiflora*, *R. wichuraiana*, *R. rugosa*) mediante cruzamiento artificial y tasa de detección del transgén en individuos en brotación**

	Anfitrión (WKS82)						Transformante (WKS82/130-4-1)					
	Núm. de frutos cuajados/ Núm. de flores cruzadas	Tasa de cuajado de frutos (%)	Núm. total de semillas	Núm. de individuos cruzados/ Núm. de brotes	Tasa de cruzamiento (%)	Núm. de frutos cuajados/ Núm. de flores cruzadas	Tasa de cuajado de frutos (%)	Núm. de semillas totales	Núm. de individuos cruzados/ Núm. de brotes	Tasa de cruzamiento (%)	Núm. de individuos para los cuales se detectó el transgén/ Núm. de brotes	Tasa de detección del transgén (%)
<i>R. multiflora</i>	18/251	7,1	27	1/2	50,0	45/256	17,6	65	3/3	100,0	0/3	0,0
<i>R. wichuraiana</i>	23/260	8,8	44	1/1	100,0	11/260	4,2	24	0/0	-	-	-
<i>R. rugosa</i>	2/74	2,7	263	0/0	-	5/79	6,3	427	3/3	100,0	0/3	0,0

	Anfitrión (WKS82)						Transformante (WKS82/130-9-1)					
	Núm. de frutos cuajados/ Núm. de flores cruzadas	Tasa de cuajado de frutos (%)	Núm. total de semillas	Núm. de individuos cruzados/ Núm. de brotes	Tasa de cruzamiento (%)	Núm. de frutos cuajados/ Núm. de flores cruzadas	Tasa de cuajado de frutos (%)	Núm. de semillas totales	Núm. de individuos cruzados/ Núm. de brotes	Tasa de cruzamiento (%)	Núm. de individuos para los cuales se detectó el transgén/ Núm. de brotes	Tasa de detección del transgén (%)
<i>R. multiflora</i>	18/251	7,1	27	1/2	50,0	34/255	13,3	59	1/4	25,0	0/4	0,0
<i>R. wichuraiana</i>	23/260	8,8	44	1/1	100,0	14/261	5,4	44	0/0	-	0/0	-
<i>R. rugosa</i>	2/74	2,7	263	0/0	-	4/71	5,6	283	0/0	-	0/0	-

Tabla 2. Tasa de detección del transgén en semillas obtenidas mediante cruzamiento artificial con especies silvestres (R. multiflora, R. wichuraiana, R. rugosa)

	Anfitrión (WKS82)				Transformante (WKS82/130-4-1)			
	Núm. de semillas recuperadas	Núm. de semillas cruzadas/ 2) Núm. de semillas analizadas	Tasa de cruzamiento (%)	1) Núm. de semillas recuperadas	Núm. de semillas cruzadas/ 2) Núm. de semillas analizadas	Tasa de cruzamiento (%)	Núm. de semillas en las que fue detectado el transgén/ Núm. de semillas analizadas	Tasa de detección del transgén (%)
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

	Anfitrión (WKS82)				Transformante (WKS82/130-9-1)							
	Núm. de frutos cuajados/ Núm. de flores cruzadas	Tasa de cuajado de frutos (%)	Núm. total de semillas	Núm. de individuos cruzados/ Núm. de brotes	Tasa de cruzamiento (%)	Núm. de frutos cuajados/ Núm. de flores cruzadas	Tasa de cuajado de frutos (%)	Núm. de semillas totales	Núm. de individuos cruzados/ Núm. de brotes	Tasa de cruzamiento (%)	Núm. de individuos para los cuales se detectó el transgén/ Núm. de brotes	Tasa de detección del transgén (%)
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): Se produjo una diferencia en el Núm. de semillas recuperadas y el Núm. de semillas analizadas debido a que las semillas vacías (sin contenido en la semilla), las semillas para las cuales fue imposible la extracción del ADN, y las semillas para las cuales no se observó amplificación del gen de control mediante PCR, se excluyeron del sujeto del presente análisis.

Ejemplo de trabajo 4.

Validación de la presencia de cruzamiento entre una rosa silvestre y una rosa cultivada en condiciones naturales

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

- 5 Al aire libre, la especie silvestre (*R. multiflora*) se colocó a una distancia de 1m y 5m del anfitrión o el transformante para investigar el cruzamiento con la especie silvestre en condiciones naturales. Este estudio se llevó a cabo en condiciones en las que el anfitrión y el transformante y *R. multiflora* florecían simultáneamente. Las flores de *R. multiflora* que florecieron antes del inicio de este estudio se retiraron todas antes del inicio de este estudio, y a continuación se colocaron en una posición predeterminada.
- 10 La presencia de la formación de semillas se confirmó para el fruto para el cual no se había observado una caída de frutos fisiológica, pero se había observado cuajado de fruto el punto temporal de más de 3 meses después de la finalización del estudio. Además, las semillas obtenidas se recuperaron, y después de un tratamiento de enfriamiento a 4°C durante 3 meses, se sembraron. Con el fin de confirmar la presencia de cruzamiento con el anfitrión o el transformante y la presencia de la transmisión del transgén en los mismos, se llevó a cabo de acuerdo
- 15 un método de PCR de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo de Trabajo 1 para el análisis.

El resultado se muestra en la Tabla 3. Para las plántulas obtenidas a partir de las semillas cosechadas a partir de cualquier posición, no se detectó ningún gen KSN que contuviera el transposón o no se observó cruzamiento del anfitrión o el transformante con *R. multiflora*.

- 20 Esto sugirió una posibilidad nula o muy baja de cruzamiento del presente transformante con la especie silvestre (*R. multiflora*) en condiciones naturales.

- Por lo tanto, mediante el uso del método de determinación de la presente invención, se pudo evaluar muy fácilmente la presencia de cruzamiento entre una rosa silvestre y una rosa cultivada. Asimismo cuando el transgén no puede ser transmitido a la progenie, debido a que, por ejemplo, el transgén no está contenido en la célula de polen del transformante, en general, el análisis de cruzamiento es a menudo difícil. Sin embargo, mediante el uso del método
- 25 de determinación de la presente invención, se puede determinar fácilmente la presencia de cruzamiento, y de este modo, también se podría analizar fácilmente la presencia de la transmisión del transgén en el cruzamiento.

Tabla 3. Tasa de cruzamiento con una especie silvestre (*R. multiflora*) en condiciones naturales y tasa de detección del transgén

Distancia	Anfitrión (WKS82)										Transformante (WKS82/130-4-1)					
	Núm. total de flores florecidas	Núm. total de frutos cuajados	Núm. total de semillas	Núm. de individuos analizados	Presencia de cruzamiento		Tasa de cruzamiento (%)	Núm. total de flores florecidas	Núm. total de frutos cuajados	Núm. total de semillas	Núm. de individuos analizados	Presencia de cruzamiento		Tasa de cruzamiento (%)	Presencia de transgén	
					Núm. individuos cruzados	Núm. individuos no cruzados						Núm. individuos cruzados	Núm. individuos no cruzados		Núm. 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	Anfitrión (WKS82)										Transformante (WKS82/130-9-1)					
	Núm. total de flores florecidas	Núm. total de frutos cuajados	Núm. total de semillas	Núm. de individuos analizados	Presencia de cruzamiento		Tasa de cruzamiento (%)	Núm. total de flores florecidas	Núm. total de frutos cuajados	Núm. total de semillas	Núm. de individuos analizados	Presencia de cruzamiento		Tasa de cruzamiento (%)	Presencia de transgén	
					Núm. individuos cruzados	Núm. individuos no cruzados						Núm. individuos cruzados	Núm. individuos no cruzados		Núm. 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

Ejemplo de Trabajo 5.

Validación de la presencia de cruzamiento con una rosa cultivada en semillas cosechadas de una rosa silvestre nativa

5 Utilizando el método de determinación de la presente invención, se evaluó la presencia de cruzamiento entre un silvestre nativa con un cultivada rosa en condiciones normales.

De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo de Trabajo 3, a partir de la semilla cosechada de un rosa silvestre nativa, se llevó a cabo un análisis de PCR utilizando la presencia de un gen KSN que tiene un transposón insertado en el mismo como indicador para validar la presencia de cruzamiento con un rosa cultivada. Como control interno, se utilizó el gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

10 Resultados y Discusión

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

15 En el análisis de aproximadamente 1.800 semillas cosechadas de un total de 17 sitios, no se detectaron productos amplificados específicos (tamaño amplificado pronosticado: aproximadamente 1,2 kb) de un gen KSN que contenía un transposón a partir de cualquiera de las semillas. Por otro lado, el gen GAPDH que servía como control interno se detectó en todos los individuos.

A partir de lo anterior, se determinó que no existe cruzamiento con una especie cultivada en todas las semillas cosechadas de las rosas silvestres nativas.

Por lo tanto, mediante el uso del método de determinación de la presente invención, se pudo evaluar muy fácilmente la presencia de cruzamiento entre una rosa silvestre y una rosa cultivada.

20

ES 2 462 944 T3

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

Núm. de Muestra	Nombre de la especie	Número de plantas florecidas	Núm. de frutos		*1)Núm. total de semillas	*2)Núm de semillas analizadas	Presencia de cruzamiento con una rosa cultivada		Tasa de cruzamiento con una especie cultivada (%)
			Núm. de frutos cuajados	Núm. de análisis			Número de individuos cruzados	Número 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
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): Se produjo una diferencia en el núm. total de semillas recuperadas y el núm. de semillas analizadas debido a que las semillas vacías (sin contenido de semillas), las semillas para las cuales fue imposible la extracción de ADN, y las semillas para las cuales no se observó una amplificación del gen de control mediante PCR se excluyeron del sujeto del presente análisis.

# ES 2 462 944 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Método para determinar si rosas silvestres se han cruzado o no con rosas cultivadas	
	<120>	
	<130> R2369 EP S3	
	<140> EP 08 72 2920.9	
10	<141> 2008-03-21	
	<160> 6	
	<210> 1	
15	<211> 519	
	<212> ADN	
	<213> Rosa sp.	
20	<221> CDS	
	<222> (1)...(516)	
	<223> Secuencia de nucleótidos del gen KSN de rosa	
25	<400> 1	
	atg gca aga atg tog 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	
	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	

ES 2 462 944 T3

```

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

5

<212> ADN

<213> Rosa sp.

10

<221> CDS

<222> (1)...(516)

<223> Secuencia de nucleótidos del transposón en gen KSN de rosa

<400> 2

```

tgtaagtaca ttggcctatt accattcaac atatgatttc ccactacgac gaggaaccg      60
gagcttcaag gaagcaaaga gaaagatcac aagatcgggt cttgaagaca agatcaagtc      120
aaatcgagtc actgatcttg agtttaatgt gtattcattc catattgggt ggtataaatc      180
taaattgata tgcataatcg ttgtattaag tcaataatcc cttatgcatt aaaatggttt      240
tcaacatgca tatcaatttg agacottggt aggaaagtat cgattgcaca ttcaaaaact      300
gttttaaatc tttctatatt tatcttaatc aattatcaag aaaagatttg attgaggggg      360
agttttcttc ccttataaaa aggtttcaaa actaaagttt tgtgtagggt ttttgacggc      420
tgaaactggg ttctctttga actctctggt ttgttcaaat cgttttcgaa aaacctcttt      480
taattgtttc atgtattact ttgcataatc ttttacatcc actctcaaga tcagtgattc      540
aattgagtga aaggaaggct gaagattgat tgccctggaat gttgaatcga gagttagaat      600
ggttgtaaaa caagttagca ttgtttgcta agaaaagggt ttgtttgga acaecactac      660
ttgtattctg taaactctag tgtttaatat tggattgatt tttcgtgttg gctacgttaa      720
aagccacgca gtgaagtttc ctcaagtggg aggtttacac tgcgtagca aatctctgtg      780
tcatgtatca tactttcttt gattaaactc ttgagaaaaa gtattttatc aacactgggt      840
ccatctagta ttttcaattg gcatcagagc gggttctaga acctctaga gatcccagga      900
aagatggaac attcacgtga tagggctact gggggatcga taaatagtc cccctggttc      960
gaaggtggat gtgaaaaata cactcaatgg aagatttaca tgaaatcata cctctatget      1020
caagatgaac acgtgtggaa catcgtagaa aatggctgga gtgtacctat gacaaaagca      1080
aaagaagaag gcgcttccac taccactccc aaaccaagga aggactggac tgaggaagaa      1140
gttcgtaact tgcgaagcaga tttcaaagcg aagaacagca tcttcacagc cctatcggag      1200
cgggaaaaac tgaggataag tcattgtgag actgccaaagc aggcattgga tctcctacag      1260
attacatacg aaggaaataa aaaggtacgt gcacagaaac tgcaagcact gatttttgaa      1320
ttcgaaacca tgactatggc agatgatgga accgtggatg acttccatgg tagaattctt      1380
aaaatctccg gtcagtgtcg cagtctagga gcaccttttg atgaagataa aatagtcaaa      1440
aagatactca gggctctgcc ggaaaaattt cactcaaggg ttacgagcat agaggactct      1500
tttgatatag atgattatcc acttgatgag ctcatcggaa atttgaaaaa ctatgagatg      1560
atgttaaaac ctgagaagaa aaacaagggc gtagccttca aagcagtgaa agaaattgaa      1620
gaggaagaag gatcactaga tcttgcctca ctgacgaagg aattcaaaaa atttctcaaa      1680
agcaagaact cctctaaaaa caagaatgct cccagaagga ataaccatct tggcagtggg      1740
aacaacagtg actacaatag taagaatgga agaggaaact tcaaaggaaa tcaactcaagg      1800
aaacccaaat gctatgaatg ttgttggttc ggtcacattt ctactgactg tggaaatagg      1860
aagcttgaaa acagcaacaa caagtcactc ctttcaactt ggagtgatga tgaatctcaa      1920
gaaattgaaa atgtggctct tgtctcatca ttgttgcctg attctgaaag tgatgagtat      1980
ttctctgatg atgatgaaac aaatgttctg tgcaaaccaac tctacaaagc ttcaaaaggcc      2040

```

15

actctgatta	gaaacttgag	cttggaaaaa	gaagtagatt	tectgaggac	tgaaaaagaa	2100
aagggtggaga	aactatttcca	atcctcacia	tctgcatgga	aactggagaa	aagcaaaactc	2160
gtgagtgaat	cggcagatct	acaaggtgac	caaaagatac	tgacgtggaa	gactgaaaag	2220
aatgagtatc	tcaacaagat	caaacttcta	gaactggatg	ttaaaggaca	aagagccctg	2280
aaacttggaa	tgttagcgaa	aaatgagtct	ctacaacatg	agttaaaatt	aactcaagaa	2340
agattcatga	agtttgabat	cagctccact	tccatgtcca	agttacttgg	atcaggaaaa	2400
gctcctcatg	atacatgtgg	gctaggatac	actggagaag	attocaaaag	caccaaattc	2460
gtacgtgect	caaaaccatc	tgtagagcag	atagatgtct	cccttgatga	tcatgtcaaa	2520
agtgtaaagg	aaggtaattc	aaaccaacat	catcaggtaa	aacttgacca	agaatcccc	2580
actggtcaac	acaggtacgc	aaacctaga	acctttgttc	ctacttgtca	tcactgtggt	2640
aagattggcc	atatcagacc	tagatgtaat	gaacggtttt	taaacttaca	atcttctcaa	2700
gaaaaatgta	ctgtcgaaac	cttacagggt	gagcttaaag	aacaaaagga	actcattaac	2760
aaattaactg	aaattgtttc	tcaaaagaat	ctcctaaactg	aaagaagaaa	agatgtcttg	2820
accgaaaaaa	ttaaaagcaa	aaatcattgg	tccctgtttg	gtgaaactga	tgatacatgt	2880
ctttttgttt	gtgctagcaa	aaatcactca	cgctctcaca	ttgaggcaac	ttgtttggta	2940
gctttaactg	catttgetga	caaacgacga	gatttttggg	atgttgacag	tggtttgtct	3000
agacacatga	ctggagacaa	aacctggttt	acttcatttg	aggatgaaaa	tacctctgga	3060
tcagtcacgt	ttggagatgg	gaggaaaact	aacattctag	ctcgaggtag	agtaaacact	3120
ccaggatatac	ctaaccctaa	aaatgtgtta	ttgtttgaag	gattaactgc	aaatctgatt	3180
agcgtcagcc	atgttgetga	tgactatgaa	gatgtgtggt	ttaacaaaca	gagatgtttg	3240
gtcctaatac	agaaaggtga	aggtatcatg	ggaggtatga	gatctgttga	taactgttat	3300
cataattcaag	caaatgaatc	ttctagtttg	cagtcctgtt	tgtctgttaa	atccacagag	3360
gaaacctttg	aactttggca	cagaaagatg	ggacatatca	actatcagga	cttgtctgaaa	3420
ttatcttcca	aaaatgtgtt	ccgaggcttg	ccaaatttaa	aaggtaaaac	tgacaagatg	3480
tgtggagact	gcaaggttgg	aaagcaactc	aaggcactc	acagaatggt	aaattctgcg	3540
acaacctcac	aagtattgga	actattacac	atggatctca	tgggaccagc	tcaatctgaa	3600
agtcttggag	gtaagagcta	catactagta	gtttagatg	atctctcaag	atacacttgg	3660
gtaaacctct	tgaaagacaa	aactgaaacg	tttagtctct	ttaagaactt	gagtcaaaaa	3720
ttaatcattg	agaacaatc	atctaataac	tgtttagtga	gaataagatc	agataatgga	3780
actgagttta	aaaatgcttc	ttttctaac	tactgtcatg	agcttgggtg	gtcacatgag	3840
ttctcagctc	caataacccc	tcaacaaaat	gggatagtgg	aaaggaaaaa	tagggtagctg	3900
ctagacatgg	ctcgagtatt	actacacgct	gcaggtttaa	gcaaaaactt	ttgggctgan	3960
ggatcagca	ctgcttgcct	cacaataaat	agagtattcc	ttanaccang	aaatgatcaa	4020
actgctttacg	agctgtggaa	aggtanaaag	ccaaatgta	aacactttca	tgctntnggc	4080
agtccttgtt	acattctacg	agatagagaa	ccctctggta	agtttgatgc	tagaactgat	4140
gatngtgtgt	ctttgggta	ttctctgaac	agcagagcat	atagggttta	caataaaaag	4200
actcgtgttg	ttatggaaac	cattaatggt	ctctattgatg	atcaatgtgt	gaaacaggaa	4260
gtaacatttg	cagatacctc	accttctctg	gtcacacctt	cacagaatac	tgaaacatca	4320
tntgaggaag	aggaagagga	aatccatgac	aacatttttg	aaccagctnc	cacccaaagn	4380
agagggttca	agcaagttca	aaaagatcac	tcactcaag	atatactegg	caatctaac	4440
gatggtccga	tgacaaggag	aaaggctgca	gttcaggtaa	gtccctntga	ggtaagtga	4500
ggaaatgtat	tactgtgtct	cattaccgaa	aatttggtaa	gcataaacat	tatatctcat	4560
tttggttttg	tgtccattat	tgaaccnaaa	aatattaagg	cagccttgtt	ggatgataac	4620
tggattagcg	ccatgcaaga	tgaactgaat	cagtttacta	ggaatgatgt	atggtagtta	4680
gtaccaaggc	ctagtaagtg	caatgttata	ggaactlaag	ggattttcag	naatnaaagc	4740
gatntaaag	gnaacgtgat	taggaataaa	gccagactag	ttgctcaggg	atattcagag	4800
gtogaaggac	ttgactttga	cgagactttt	gctcctgtag	ctaggttgg	atctgttaga	4860
ttactctcat	ccattgcttg	tcctctccgg	ttcaaatgtt	ttcaaatgga	tgtcaaaact	4920
gcctttctga	atggatttct	tcaggaggaa	gtttatgtag	agcagctctc	aggtttccaa	4980
gatccacaca	acctagatca	tgtctaccgg	ctcaagaaag	ccctgtatgg	gctaaagcag	5040
gctcctcgag	cctggtatga	gagactatcc	actcatcttg	tgggaaaagg	gtatgctaga	5100
ggatccatag	ataaaacatt	gtttgtgaaa	cgaacaaaaa	atgacattgt	cattgcccac	5160
gtgtatgttg	atgatattgt	acttggttcc	acttctaaat	accttgtcaa	agaatttcaa	5220
tctgtcatgg	aaagtgaatt	tgaatgagc	atgtgtggtg	aactaacgta	ttttcttgg	5280
ctgcaagtaa	agcagataga	cacaggtttg	ttctctctc	aatcaaaata	cgctgagaac	5340
ctgatcaaga	aattcggctc	tgcttccaag	aaagacagtga	ccaatcccat	gagtaaacat	5400
actaagttaa	gcgaagatca	tgaaggaaaa	tcagttgatc	cgactctcta	togaagtatg	5460
atcggggggt	tgctctatct	cactgccagc	agaactgaca	tctcttacag	tgtgggtgtg	5520
tgtgctcgat	ttcaagcaaa	ccccaaagaa	tctcacctgg	acgctgtcaa	aagaataatc	5580
cgctatgtgg	caggtacagt	taattgtggc	cttttctata	ccttccgacac	taatgtagaa	5640

ES 2 462 944 T3

attgcaggat	actctgatgc	tgactgggga	ggaatbttaa	aggatcggaa	aagcaactca	5700
gggggatggt	ttttcattgg	caacaatctg	gttgcctggc	atagtaagaa	aceaaaactgc	5760
atatecctgt	ctactgcaga	agctgaatat	gttgcocctg	gaagtgtctg	cacacaaaata	5820
ctttggatga	agcaaatgct	tcattgattat	ggcatalctc	aaggtaagtt	gtctatcttc	5880
tgtgacaaca	ctagtgcctat	taacatcact	aagaatcctg	ttcaaacctc	tcgaacaaag	5940
caacttgatc	tcogatatca	ctttattagg	gatttggctg	aacaaaaacat	acttgagtta	6000
agctttgtgc	ccactgaaaa	tcaacttgcct	gabctgttca	ctaagcctct	tgacactgct	6060
aggtttgaaa	tgttgaggaa	tgccctaggg	atatgttcta	agcattaagg	caaaatgatg	6120
actgtocact	attgattgag	aaaattgtga	tcctagtatc	ccttgatcac	agtoactagt	6180
gaaatgtaca	tattttcagc	catgtatctt	aatgttatca	tgccctatc	tggaacaaatg	6240
aaattgtgta	ctcatgttta	gtcactgaat	caagtaaccc	tactatgcat	cttcaacctat	6300
agcctatgtg	gtggcatgct	tccttttggc	ttctgtcaaa	tgagattcag	tgaaagttagc	6360
gaactgcttc	ttttgctcac	ataactaatt	ccctctctct	aaagtaatca	ggctcctagtt	6420
gtggtgaact	ttctaggatt	tgtaansaac	ganaacggaa	aattgtatcc	catctctcaa	6480
agtaatcagg	ccttagtgcct	ggtgaacttt	ctaangtttg	caagaaaacga	gctgggtgagt	6540
ggtctttgca	cataacataa	aatcatgcag	acaactactc	gagactctct	ccatggancca	6600
tccttggttat	gcttagtacc	ctaagaacat	ctgttctggg	ggttgcctgag	aagagctcttg	6660
ttcatagagt	aatatttgc	actaaatnaa	ggagatcttt	gactccanta	nacatgtgct	6720
tggaaccatg	attcctgctc	cttnttagga	gatttcatga	gctttacttt	agttctctta	6780
cttcaactct	tntnatgac	actaaaatct	tttctaagcc	ccacatcatg	gttatattca	6840
cttctatcac	aagtttactc	cttaaggctc	aactatgagt	accaattctt	attgttgaga	6900
gaatacatca	tgcttcgtac	cttgaactat	gtgcttcca	ctaagtgatc	tggtctctct	6960
gtgattaaac	ttcgtatata	ttctctctct	cgatatgacc	tatgcattca	ttgcttggat	7020
acttgcaaaag	gaaacgatcc	cttgcataac	ttgcagattc	cttgaatata	ttttggctct	7080
tcgtttcctt	ccttgatggt	aatctgccta	caattaatct	ccataatgac	tatgcctaag	7140
ttgaggggga	gaagttatct	gcattgcata	acctagggaa	aataaattgt	cataacttct	7200
ctccccatct	gagccgttct	cccaatcggc	gtgttctctg	gtcttentaa	aacctaactg	7260
ttcaactacat	atagctctct	ttgtctctct	cggattttac	ctttggttgt	ctctgtgtgc	7320
aggttctctc	accctactgt	ctctcaccat	ggttcctcca	cagcaaaaca	ctcgccttgg	7380
aggacatcgc	cgcttgcctc	ctccagaaga	aggtcctcag	gcagctgcca	gagccgggat	7440
ntccatccc	ggcatgcate	gtacacgcag	tcggagctct	ctctctctct	ctctctctct	7500
aagtctcctg	gatcagatcc	tagtggctga	ctggcgaatt	gcttgcctca	cgacggacat	7560
ggacgacatg	cattctcttc	tggttcgaac	tcgtcatgcc	ctgaccactc	tcacacagga	7620
gatccggaac	atgcagcgc	accctcccg	gtttgacgct	cccggctcc	cccattgccat	7680
gcaggagcct	gtgcaccag	aggaaagctc	ggattccatg	gatgaagagg	aatttctgga	7740
caccgtcacc	aagctttgtg	aggaatttga	cgtgcctctc	cattcaaagg	gggagaagta	7800
acttgatttt	tcttacttta	ttctgtttc	tgcattttta	atcttttttg	gtgtgtaagt	7860
gcataagcac	agatactctt	aggatgcttg	ctattattat	tcttaagtaa	tcgtatcttg	7920
gctacttggg	tcgggaaaag	gatggaaaact	gattccttac	tccaagttagc	accctttggt	7980
tagtgattag	tgtttatctg	tgaaacctaa	cttgcaggac	aaaagatgaa	aatcatgcg	8040
ttgaatggga	atgcccaag	ggggagattg	taagtacatt	ggcctattcc	cattcaacat	8100
atgatttccc	actacgacga	ggaaaccgga	gcttcaagga	agcaaaagaga	aagatcacia	8160
gatcggttct	tgaagacaag	atcaagtcaa	atcagatcac	tgatcttgag	cttaagtgtg	8220
attcattcca	tattggttgg	tataaatcta	aattgatatg	catatcggtt	gtattaagtc	8280
aataatccct	tatgcattaa	aatggttttt	aacatgcata	tcaatttgag	accttgttag	8340
gaaagtatcg	attgcacatt	caaaaactgt	tttaaatctt	tctatattta	tcttaatcaa	8400
ttatcaagaa	aagatttgat	tgagggggag	ttttctctcc	ttataaaaag	gtttcaaac	8460
taaagttttg	tgtagggttt	ttgacggctg	aaactggttt	ctctttgaa	ttcttgtttt	8520
gttcaaatcg	ttttcgaaaa	acctctctta	attgttctct	gtattacttt	gcataatctt	8580
ttacattcac	tttcaagatc	agtgatccaa	ttgagtgaaa	ggaaggctga	agattgattg	8640
cctggaatgt	tgaatctaga	gttagaatgg	ttgtaaaaac	aagtttagcat	ttgttgctaa	8700
gaaaagggtg	ttgttctgaa	caacactact	tgtattctgt	aaactctagt	gttcaatatt	8760
ggattgattt	ttcgtgttgg	ctacgttaaa	agccacgcag	tgaggtttcc	tcagtggaga	8820
ggtttacact	gcgttagcaa	atcttctgtg	catgtatcat	actttctctg	atcaaacctct	8880
tgagaaaaag	tattttatca	acactggctc	catctagtat	tttca		8925

<210> 3

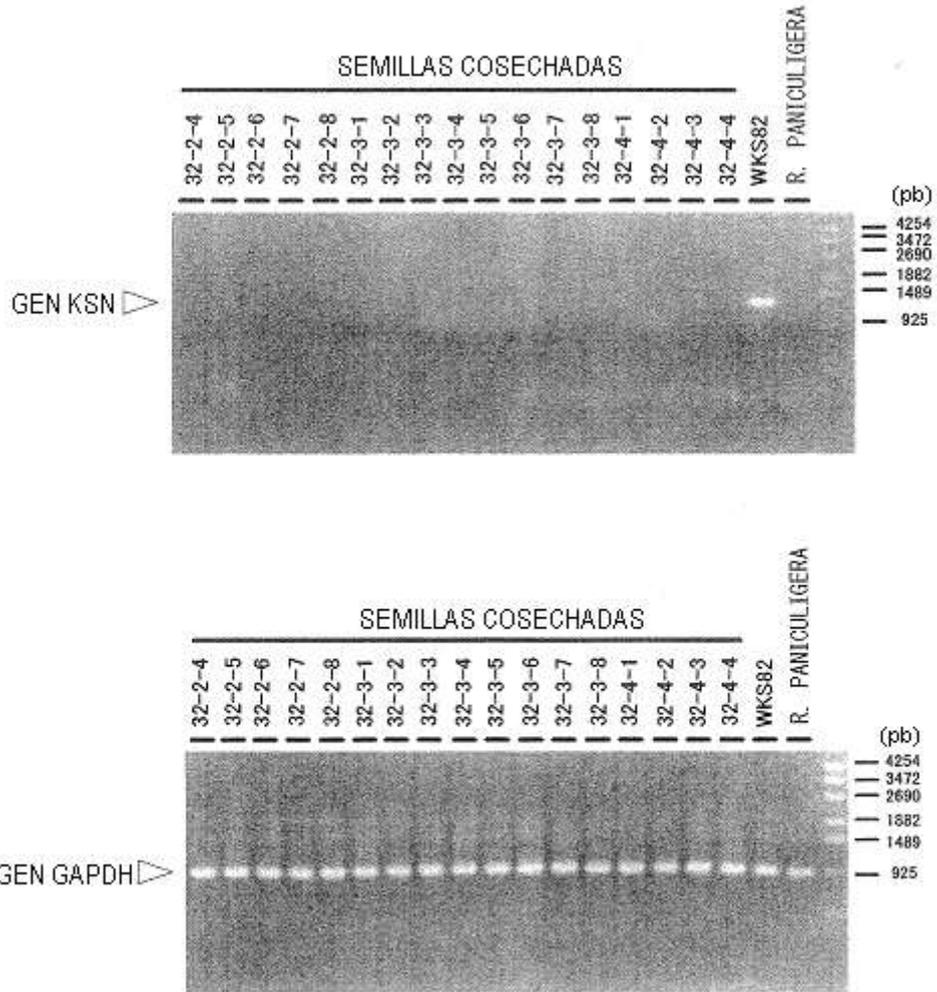
<211> 23

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <221> fuente  
 5 <222>  
 <223> / nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador directo"  
  
 <400> 3  
 10 catattatgg cataggggtgt ggc 23  
  
 <210> 4  
 <211> 24  
  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <221> fuente  
 20 <222>  
 <223> / nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador inverso"  
  
 <400> 4  
 25 tgtaatctgt aggagatccc atgc 24  
  
 <210> 5  
 <211> 23  
  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <221> fuente  
 35 <222>  
 <223> / nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador  
  
 <400> 5  
 40 tgcatctct gcccgaagta agg 23  
  
 <210> 6  
 <211> 23  
  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <221> fuente  
 50 <222>  
 <223> / nota = "Descripción de secuencia artificial: Cebador  
  
 <400> 6  
 55 caacatcctc atcgggtgtaa ccc 23

## REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si una rosa silvestre de interés está cruzada o no con una rosa cultivada, comprendiendo dicho método la investigación de la presencia de un gen KSN que contiene un transposón indicador, en donde se determina que la rosa silvestre de interés no está cruzada con una rosa cultivada cuando no está presente un gen KSN que contiene un transposón indicador en dicha rosa silvestre de interés; o
- 5 en donde se determina que la rosa silvestre de interés está cruzada con una rosa cultivada cuando está presente un gen KSN que contiene un transposón indicador en dicha rosa silvestre de interés.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la planta parental semillera es una rosa silvestre y la planta parental polinífera es una rosa cultivada.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha rosa cultivada es una rosa que tiene un gen insertado en la misma.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho gen es un gen relacionado con el color de la flor.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el gen relacionado con el color de la flor es el gen de la enzima flavonoide 3',5'-hidroxilasa derivada del pensamiento de la familia Violaceae.
- 15 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la detección de dicho gen indicador se lleva a cabo a través de hibridación de ácidos nucleicos de dicho gen.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha detección se lleva a cabo a través de la amplificación específica mediante PCR.
- 20 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicha PCR se lleva a cabo a través de un cebador directo: CATATTATGGCATAGGGTGTGGC (SEC ID NO: 3) y un cebador inverso: TGTAATCTGTAGGAGATCCCATGC (SEQ ID NO: 4).
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha rosa silvestre es una planta de rosa que tiene, en la configuración homóloga, un gen KSN que no contiene un transposón.
- 25 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, 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, 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.), TAKANEIBARA (*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).
- 30 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, 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 el mismo.
- 35 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha rosa cultivada es híbrido de té, floribunda o miniatura.
13. El uso de un par de cebadores para amplificar un gen KSN que contiene un transposón indicador en un método para determinar si una rosa silvestre de interés se cruzó o no con una rosa cultivada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo dicho par un cebador que tiene una secuencia de bases idéntica o sustancialmente homóloga a la región de la secuencia de bases mostrada en el SEC ID NO: 1 y un cebador que tiene una secuencia de bases idéntica o sustancialmente homóloga a la región de la secuencia de bases mostrada en el SEQ ID NO: 2.
- 40 14. El uso del par de cebadores de acuerdo con la reivindicación 13 que comprende un cebador directo: CATATTATGGCATAGGGTGTGGC (SEC ID NO: 3) y un cebador inverso: TGTAATCTGTAGGAGATCCCATGC (SEQ ID NO: 4).
- 45

Fig.1



DETECCIÓN DEL GEN KSN MEDIANTE UN MÉTODO DE PCR