

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-521492

(P2020-521492A)

(43) 公表日 令和2年7月27日 (2020.7.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>AO1H 6/82 (2018.01)</b>	AO1H 6/82	2B030
<b>AO1H 5/08 (2018.01)</b>	AO1H 5/08 ZNA	4B063
<b>AO1H 1/00 (2006.01)</b>	AO1H 1/00 A	4B065
<b>AO1H 5/02 (2018.01)</b>	AO1H 5/02	
<b>AO1H 5/04 (2018.01)</b>	AO1H 5/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2019-566238 (P2019-566238)	(71) 出願人	518049164
(86) (22) 出願日	平成30年5月29日 (2018.5.29)		ビルモラン エ コンパニー
(85) 翻訳文提出日	令和1年11月29日 (2019.11.29)		フランス国, 75001 パリ, ケ ドゥ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2018/064055		ラ メギスリー, 4
(87) 国際公開番号	W02018/219941	(74) 代理人	100099759
(87) 国際公開日	平成30年12月6日 (2018.12.6)		弁理士 青木 篤
(31) 優先権主張番号	17305644.1	(74) 代理人	100123582
(32) 優先日	平成29年6月1日 (2017.6.1)		弁理士 三橋 真二
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100141977
			弁理士 中島 勝
		(74) 代理人	100150810
			弁理士 武居 良太郎
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 トバモウイルスであるトマト褐色縮葉フルーツウイルス (TBRFV) に対するソヌラム・リコペルシカム植物における耐性

#### (57) 【要約】

本発明は、QTL を欠く対応する植物に対して、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉および / または果実の耐性および / または抵抗性に対応する改善された表現型を植物に付与する QTL をゲノム中に含む、ソヌラム・リコペルシカム植物に関し、上記 QTL は、種子 HAZTBRFVRES1 NCIMB 受託番号 42758 の植物のゲノム中に存在する QTL から選択される。QTL は、好ましくは、染色体 6、9、および 11 上の異なる SNP の定義された対立遺伝子によって特徴付けられる。本発明は、表現型が改善されたこれらの植物の一部および子孫、別の遺伝的バックグラウンドにおいて改善された表現型を移入するためのこれらの植物の使用、ならびにトマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉および / または果実の耐性または抵抗性が増加したトマト植物または種子を取得するための異なる方法にも関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の耐性に対応する改善された表現型を植物に付与する染色体 11 の量的形質遺伝子座 Q T L 3 をホモ接合でゲノム中に含む、ソヌラム・リコベルシカム植物であって、前記 Q T L 3 が、種子 H A Z T B R F V R E S 1 N C I M B 受託番号 4 2 7 5 8 の植物のゲノム中に存在する、ソヌラム・リコベルシカム植物。

## 【請求項 2】

トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実の耐性に対応する改善された表現型を植物に独立して付与する染色体 6 上の第 1 の量的形質遺伝子座 ( Q T L ) である Q T L 1 または染色体 9 上の第 2 の Q T L である Q T L 2 をゲノムにホモ接合でゲノム中に含む、ソヌラム・リコベルシカム植物であって、前記 Q T L 1 および Q T L 2 が、種子 H A Z T B R F V R E S 1 N C I M B 受託番号 4 2 7 5 8 の植物のゲノム中に存在する、ソヌラム・リコベルシカム植物。

10

## 【請求項 3】

前記 Q T L が、Q T L 1 について、T O - 0 0 0 5 1 9 7 ( 配列番号 1 ) および T O - 0 1 5 5 8 1 ( 配列番号 2 ) により区切られた染色体領域内の染色体 6 上に見出され、Q T L 2 について、T O - 0 1 8 0 9 5 5 ( 配列番号 3 ) および T O - 0 1 9 6 1 0 9 ( 配列番号 6 ) で区切られた染色体領域内の染色体 9 上に見出され、Q T L 3 について、T O - 0 1 2 2 2 5 2 ( 配列番号 7 ) および T O - 0 1 6 2 4 2 7 ( 配列番号 1 8 ) により区切られた染色体領域内の染色体 11 上に見出される、請求項 1 または 2 に記載のソヌラム・リコベルシカム植物。

20

## 【請求項 4】

前記 Q T L が、以下の遺伝子座：

- ・染色体 6 上の T O - 0 0 0 5 1 9 7 ( 配列番号 1 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 6 上の T O - 0 1 4 5 5 8 1 ( 配列番号 2 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 9 上の T O - 0 1 8 0 9 5 5 ( 配列番号 3 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 9 上の T O - 0 1 9 6 7 2 4 ( 配列番号 4 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 9 上の T O - 0 1 4 5 1 2 5 ( 配列番号 5 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 9 上の T O - 0 1 9 6 1 0 9 ( 配列番号 6 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 8 2 2 7 6 ( 配列番号 7 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 2 2 2 5 2 ( 配列番号 8 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 4 4 3 1 7 ( 配列番号 9 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 4 2 2 9 4 ( 配列番号 1 0 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 4 2 3 0 3 ( 配列番号 1 1 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 4 2 3 0 6 ( 配列番号 1 2 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 8 2 2 7 6 ( 配列番号 1 3 ) を含む遺伝子座
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 8 1 0 4 0 ( 配列番号 1 4 ) を含む遺伝子座
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 2 3 0 5 7 ( 配列番号 1 5 ) を含む遺伝子座、
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 2 5 5 2 8 ( 配列番号 1 6 ) を含む遺伝子座
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 6 2 4 3 2 ( 配列番号 1 7 ) を含む遺伝子座、および
- ・染色体 11 上の T O - 0 1 6 2 4 2 7 ( 配列番号 1 8 ) を含む遺伝子座

のうちの 1 つ以上で見出され、前記 Q T L が、種子 H A Z T B R F V R E S 1 N C I M B 受託番号 4 2 7 5 8 の植物のゲノム中に存在する、請求項 1 または 2 に記載の S . リコベルシカム植物。

30

40

## 【請求項 5】

以下の対立遺伝子：

- ・Q T L 1 の存在についての、T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T および / または
- ・T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子、
- ・Q T L 2 の存在についての、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G および / または

50

- ・ T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C および / または
- ・ T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G および / または
- ・ T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、
- ・ Q T L 3 の存在についての、 T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T および / または
- ・ T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C および / または
- ・ T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T および / または
- ・ T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G および / または
- ・ T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A および / または
- ・ T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A および / または
- ・ T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G および / または
- ・ T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G および / または
- ・ T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G および / または
- ・ T O - 0 1 2 5 5 2 8 および / または
- ・ T O - 0 1 6 2 4 3 2 および / または
- ・ T O - 0 1 6 2 4 2 7

10

のうちの少なくとも 1 つが前記 S . リコペルシカム植物のゲノム中に存在することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の植物。

#### 【請求項 6】

前記植物が、種子 H A Z T B R F V R E S 1 ( N C I M B 受託番号 4 2 7 5 8 ) の子孫である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の植物。

20

#### 【請求項 7】

T B R F ウイルスに対する果実または葉の耐性に対応する改善された表現型を付与する、前記染色体 6 上の Q T L 1、前記染色体 9 上の Q T L 2、および / または前記染色体 1 1 上の Q T L 3 をゲノム中に含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の S . リコペルシカム植物の細胞。

#### 【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の S . リコペルシカム植物の植物部分、特に、種子、外植片、生殖材料、接ぎ穂、挿し木、種子、果実、根、台木、花粉、胚珠、胚、プロトプラスト、葉、葯、茎、葉柄、または花であって、前記植物部分が請求項 9 に記載の細胞を含む、S . リコペルシカム植物の植物部分。

30

#### 【請求項 9】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の植物に成長する、S . リコペルシカム植物の種子。

#### 【請求項 10】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の植物の再生可能細胞の組織培養物であって、前記再生可能細胞は、胚、プロトプラスト、分裂組織細胞、カルス、花粉、葉、葯、茎、葉柄、根、根先、種子、花、子葉、および / または胚軸に由来し、T B R F ウイルスに対する果実または葉の耐性に対応する改善された表現型を付与する、前記染色体 6 上の Q T L 1、前記染色体 9 上の Q T L 2、および / または前記染色体 1 1 上の Q T L 3 をゲノム中に含む、植物の再生可能細胞の組織培養物。

40

#### 【請求項 11】

種子 H A Z T B R F V R E S 1 ( N C I M B 受託番号 4 2 7 5 8 ) のゲノム中に見出される染色体 1 1 上の 1 つの Q T L を有する S . リコペルシカム植物を検出および / または選択する方法であって、前記 Q T L は、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の耐性に対応する改善された表現型を付与し、前記方法は、選択される前記植物の遺伝物質試料中に、以下のマーカー、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4

50

32の対立遺伝子C、およびTO-0162427の対立遺伝子Tのうちの少なくとも1つを検出することを含む、方法。

【請求項12】

トマトゲノム中のQTLを同定するためのマーカーの使用であって、前記QTLは、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実の耐性を付与し、前記マーカーは、

TO-0005197およびTO-015581により染色体6上で区切られた染色体領域内に位置するか、もしくは

TO-0180955およびTO-0196109により染色体9上で区切られた染色体領域内に位置するか、または

TO-0005197、TO-015581、TO-0180955、TO-0196724、TO-0145125、もしくはTO-0196109の遺伝子座から2メガベース単位未満に位置し

10

前記マーカーは、0.05以下のp値で、以下のSNP対立遺伝子：TO-0005197の対立遺伝子T、TO-0145581の対立遺伝子C、TO-0180955の対立遺伝子G、TO-0196724の対立遺伝子C、TO-0145125の対立遺伝子G、およびTO-0196109の対立遺伝子Gのうちの少なくとも1つと関連する、使用。

【請求項13】

トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の耐性を付与するトマトゲノム中のQTLを同定するためのマーカーの使用であって、前記マーカーは、

20

TO-0122252およびTO-0162427により、もしくはTO-0142270およびTO-0125528により染色体11上で区切られた染色体領域に位置するか、または

TO-0122252、TO-0144317、TO-0142270、TO-0142294、TO-0142303、TO-0142306、TO-0182276、TO-0181040、TO-0123057、TO-0125528、TO-0162432およびTO-0162427の遺伝子座から2メガベース単位未満に位置し、

前記マーカーは、0.05以下のp値で、以下のSNP対立遺伝子：TO-0122252の対立遺伝子T、TO-0144317の対立遺伝子C、TO-0142270の対立遺伝子T、TO-0142294の対立遺伝子G、TO-0142303の対立遺伝子A、TO-0142306の対立遺伝子A、TO-0182276の対立遺伝子G、TO-0181040の対立遺伝子G、TO-0123057の対立遺伝子G、TO-0125528の対立遺伝子A、TO-0162432の対立遺伝子C、および/またはTO-0162427の対立遺伝子Tのうちの少なくとも1つに関連と関連する、使用。

30

【請求項14】

TBRFウイルスに対する果実の耐性を付与するQTLに関連する分子マーカーを同定する方法であって、

TO-0005197（配列番号1）およびTO-015581（配列番号2）により染色体6上で区切られた染色体領域にあるか、もしくはTO-0180955（配列番号3）およびTO-0196109（配列番号6）により染色体9上で区切られた染色体領域にあるか、またはTO-0005197、TO-015581、TO-0180955、TO-0196724、TO-0145125、またはTO-0196109の遺伝子座から2メガベース単位未満にある、分子マーカーを同定することと、

40

前記分子マーカーの対立遺伝子または状態が、TBRFウイルスに対する果実耐性を示す植物から生じた分離集団におけるTBRFウイルスに対する果実耐性の表現型に関連するかどうかを決定することと、を含む、方法。

【請求項15】

TBRFウイルスに対する葉の耐性を付与するQTLに関連する分子マーカーを同定する方法であって、

TO-0122252およびTO-0162427によりもしくはTO-014227

50

0 および T O - 0 1 2 5 5 2 8 により染色体 6 上で区切られた染色体領域にあるか、または T O - 0 1 8 0 9 5 5 ( 配列番号 3 ) および T O - 0 1 9 6 1 0 9 ( 配列番号 6 ) により染色体 1 1 上で区切られた染色体領域、または T O - 0 1 2 2 2 5 2、T O - 0 1 4 4 3 1 7、T O - 0 1 4 2 2 7 0、T O - 0 1 4 2 2 9 4、T O - 0 1 4 2 3 0 3、T O - 0 1 4 2 3 0 6、T O - 0 1 8 2 2 7 6、T O - 0 1 8 1 0 4 0、T O - 0 1 2 3 0 5 7、T O - 0 1 2 5 5 2 8、T O - 0 1 6 2 4 3 2、もしくは T O - 0 1 6 2 4 2 7 の遺伝子座からの 2 メガベース単位未満にある、分子マーカーを同定することと、

前記分子マーカーの対立遺伝子または状態が、T B R F ウイルスに対する葉耐性を示す植物から生じた分離集団における T B R F ウイルスに対する葉耐性の表現型に関連するかどうかを決定することと、を含む、方法。

10

【請求項 1 6】

前記分離集団が、T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C および T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つを含む T B R F ウイルスに対して耐性である植物から生じる、請求項 1 4 または 1 5 に記載の方法。

20

【請求項 1 7】

S . リコペルシカム植物、好ましくは T B R F V に易感染性の S . リコペルシカム植物に対する耐性および / または抵抗性を付与するための育種プログラムにおける育種パートナーとしての、T B R F V 感染に対する耐性または抵抗性を付与する Q T L をホモ接合で有する、受託番号 N C I M B 4 2 7 5 8 で N C I M B に寄託された S . リコペルシカムの植物もしくは種子またはそれらの子孫の使用。

【請求項 1 8】

T B R F V に対する耐性を S . リコペルシカム植物に付与する方法であって、

a ) T B R F V 耐性を付与する Q T L 1、Q T L 2、および / または Q T L 3 を有する寄託された種子 N C I M B 4 2 7 5 8 またはその子孫から成長させた植物と、好ましくは前記 Q T L を欠いた最初の S . リコペルシカム植物とを交配するステップと、

30

b ) このようにして得られた子孫において、Q T L 1、Q T L 2、および / または Q T L 3 のうちの 1 つ、2 つ、または 3 つを有する植物を選択するステップと、

c ) 任意選択により、ステップ b ) で得られた前記植物を 1 回以上自家受粉し、このようにして得られた前記子孫において、T B R F V に対する耐性を有する植物を選択するステップと、を含む、方法。

【請求項 1 9】

T B R F V に対する耐性を S . リコペルシカム植物に付与する方法であって、

a ) T B R F V 耐性を付与する Q T L 1、Q T L 2、および / または Q T L 3 を有する寄託された種子 N C I M B 4 2 7 5 8 またはその子孫から成長させた植物と、好ましくは前記 Q T L を欠いた最初の S . リコペルシカム植物とを交配し、それにより F 1 集団を生成するステップと、

40

a 2 ) F 1 交雑種を自殖して、F 2 集団を生成するステップと、

b ) このようにして得られた子孫において、T B R F V に対する耐性を有する個体を選択するステップと、を含む、方法。

【請求項 2 0】

S N P マーカーが、T B R F V 耐性を付与する Q T L 1、Q T L 2、および / または Q T L 3 を有する植物を選択するためにステップ b ) および / または c ) で使用される、請求項 1 8 または 1 9 に記載の方法。

50

## 【請求項 21】

前記選択が、以下の対立遺伝子：T O - 0 0 0 5 1 9 7の対立遺伝子T、T O - 0 1 4 5 5 8 1の対立遺伝子C、T O - 0 1 8 0 9 5 5の対立遺伝子G、T O - 0 1 9 6 7 2 4の対立遺伝子C、T O - 0 1 4 5 1 2 5の対立遺伝子G、T O - 0 1 9 6 1 0 9の対立遺伝子G、T O - 0 1 2 2 2 5 2の対立遺伝子T、T O - 0 1 4 4 3 1 7の対立遺伝子C、T O - 0 1 4 2 2 7 0の対立遺伝子T、T O - 0 1 4 2 2 9 4の対立遺伝子G、T O - 0 1 4 2 3 0 3の対立遺伝子A、T O - 0 1 4 2 3 0 6の対立遺伝子A、T O - 0 1 8 2 2 7 6の対立遺伝子G、T O - 0 1 8 1 0 4 0の対立遺伝子G、T O - 0 1 2 3 0 5 7の対立遺伝子G、T O - 0 1 2 5 5 2 8の対立遺伝子A、T O - 0 1 6 2 4 3 2の対立遺伝子C、およびT O - 0 1 6 2 4 2 7の対立遺伝子Tのうちの少なくとも1つの検出により行われる、請求項18～20のいずれか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 22】

T B R F Vに対する耐性を有するS・リコペルシカム植物を育種する方法であって、T B R F V耐性を付与するQ T L 1、Q T L 2、および/またはQ T L 3を有する寄託された種子N C I M B 4 2 7 5 8またはその子孫から成長した植物を、前記Q T Lを欠失した最初のS・リコペルシカム植物と交配するステップを含む、方法。

## 【請求項 23】

請求項18～22のいずれか一項に記載の方法により得られるS・リコペルシカム植物。

## 【請求項 24】

T B R F Vに対する葉の抵抗性をS・リコペルシカム植物に付与する染色体11上のQ T Lと関連するS N PマーカーT O - 0 1 2 2 2 5 2、T O - 0 1 4 4 3 1 7、T O - 0 1 4 2 2 7 0、T O - 0 1 4 2 2 9 4、T O - 0 1 4 2 3 0 3、T O - 0 1 4 2 3 0 6、T O - 0 1 8 2 2 7 6、T O - 0 1 8 1 0 4 0、T O - 0 1 2 3 0 5 7、T O - 0 1 2 5 5 2 8、T O - 0 1 6 2 4 3 2、およびT O - 0 1 6 2 4 2 7のうちの少なくとも1つの、前記Q T Lと関連する代替分子マーカーを同定するための使用であって、前記代替分子マーカーが、T O - 0 1 2 2 2 5 2およびT O - 0 1 6 2 4 2 7もしくはT O - 0 1 4 2 2 7 0およびT O - 0 1 2 5 5 2 8により染色体11上で区切られた染色体領域にあるか、またはT O - 0 1 2 2 2 5 2、T O - 0 1 4 4 3 1 7、T O - 0 1 4 2 2 7 0、T O - 0 1 4 2 2 9 4、T O - 0 1 4 2 3 0 3、T O - 0 1 4 2 3 0 6、T O - 0 1 8 2 2 7 6、T O - 0 1 8 1 0 4 0、T O - 0 1 2 3 0 5 7、T O - 0 1 2 5 5 2 8、T O - 0 1 6 2 4 3 2、もしくはT O - 0 1 6 2 4 2 7の遺伝子座から2メガベース単位未満にある、使用。

20

30

## 【請求項 25】

T B R F Vに外寄生された環境でのトマト植物の収量を改善する方法であって、前記植物にT B R F Vに対する抵抗性または耐性を付与する染色体6のQ T L 1、染色体9のQ T L 2、および/または染色体11のQ T L 3をホモ接合でゲノム中に含むトマト植物を成長させることを含み、前記Q T Lが、種子H A Z T B R F V R E S 1 N C I M B 受託番号4 2 7 5 8の植物のゲノム中に存在する、方法。

## 【請求項 26】

T B R F Vに外寄生された環境でのトマト植物の収量を改善する方法であって、前記植物にT B R F Vに対する抵抗性または耐性を付与する染色体11のQ T Lをホモ接合でゲノム中に含むトマト植物を成長させることを含み、前記Q T Lが、種子H A Z T B R F V R E S 1 N C I M B 受託番号4 2 7 5 8の植物のゲノム中に存在する、方法。

40

## 【請求項 27】

T B R F V外寄生の状態におけるトマト生産の損失を低減する方法であって、前記植物にT B R F Vに対する抵抗性または耐性を付与する染色体6のQ T L 1、染色体9のQ T L 2、および/または染色体11のQ T L 3をホモ接合でゲノム中に含むトマト植物を成長させることを含み、前記Q T Lが、種子H A Z T B R F V R E S 1 N C I M B 受託番号4 2 7 5 8の植物のゲノム中に存在する、方法。

50

## 【請求項 28】

前記植物に T B R F V に対する葉の耐性を付与する染色体 11 の Q T L 3 をそのゲノム中に含む T B R F V に耐性であるトマト植物を同定することであって、前記 Q T L が、種子 H A Z T B R F V R E S 1 N C I M B 受託番号 4 2 7 5 8 の植物のゲノム中に存在する、同定することと、

T B R F V に外寄生された環境または T B R F V 外寄生の状態の前記植物を成長させることと、を含む、請求項 25 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 29】

トマト植物の畑、通路、または温室を T B R F V 外寄生から保護する方法であって、前記植物に T B R F V に対する抵抗性または耐性を付与する染色体 6 の Q T L 1、染色体 9 の Q T L 2、および / または染色体 11 の Q T L 3 をホモ接合でゲノム中に含む抵抗性または耐性トマト植物を成長させることを含み、前記 Q T L が、種子 H A Z T B R F V R E S 1 N C I M B 受託番号 4 2 7 5 8 の植物のゲノム中に存在する、方法。

## 【請求項 30】

畑、通路、または温室の T B R F V 外寄生を制御するための T B R F V に耐性であるトマト植物の使用であって、前記トマト植物は、前記植物に T B R F V に対する耐性を付与する染色体 6 の Q T L 1、染色体 9 の Q T L 2、および / または染色体 11 の Q T L 3 をホモ接合でゲノム中に含み、前記 Q T L が、種子 H A Z T B R F V R E S 1 N C I M B 受託番号 4 2 7 5 8 の植物のゲノム中に存在する、方法。

## 【請求項 31】

T B R F V 感染に対する耐性に関連する少なくとも 1 つの遺伝子マーカーの存在について S . リコペルシカム植物またはトマト生殖質の遺伝子型解析する方法であって、検査される前記植物または生殖質のゲノム中において、T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および / または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つを含む核酸を決定または検出するステップを含む、方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、リコペルシカム・エスクレンタム (*Lycopersicon esculentum*) としても知られるソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物における、トバモウイルスであるトマト褐色縮葉フルーツウイルス (Tomato Brown Rugose Fruit virus) (T B R F V) に対する耐性または抵抗性に関する。より具体的には、本発明は、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する耐性または抵抗性をもたらす 1 つ以上の遺伝的決定因子を含むトマト植物および果実に関する。本発明はさらに、1 つ以上の遺伝的決定因子と関連するマーカー、および遺伝的決定因子を同定または選択し、そのような耐性または抵抗性を有する植物を同定または選択するためのそのようなマーカーの使用に関する。本発明はまた、そのような植物の種子および子孫、ならびにそのような植物を取得するための繁殖性 (propagation) 材料、およびこれらの植物の異なる使用にも関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

トマトのすべての栽培および商業形態は、リコペルシコン・エスクレンタム・ミラー (*Lycopersicon esculentum* Miller) と呼ばれることが非常に多い種に属する。リコペルシコンは、トウガラシ、タバコ、およびナスを含む、約 90 の属からなると考えられている

10

20

30

40

50

非常に大きくかつ多様なナス科内の比較的小さな属である。リコペルシコン属は、商業用のトマトと容易に交配することができる種を含むエスクレンタム (*esculentum*) 複合体と、交配させることがかなり難しい種を含むペルビアナム (*peruvianum*) 複合体と、の2つの下位属に分けられている (Stevens, M., and Rick, C. M. 1986)。L. エスクレンタム・ミラーは、作物としての価値があるため、世界中で広く普及している。栽培トマトの正確な起源が未だに幾分不明であるとしても、それはエクアドル、ペルー、およびガラパゴス島原産のアメリカ大陸から来ているようであり、紀元700年にはアステカおよびインカによって最初に栽培されていた。メキシコは栽培化の場所であり、最も最初の導入の起源であったようである。チェリートマト、L. エスクレンタム・パール・セラシフォルメ (*L. esculentum* var. *cerasiforme*) は、現代の栽培形態の直接の祖先である。

10

#### 【0003】

トマトはその果実のために栽培され、生食用製品または加工製品として広く使用されている。作物として、トマトは環境条件が経済的に採算の合う収量の生産を可能にするところならどこでも商業的に栽培される。新鮮な市場のトマトの大部分は、完熟および緑熟 (*mature green*) の成熟段階で手によって収穫される。新鮮な市場トマトは一年中入手できる。加工トマトは、ほとんどが機械的に収穫され、缶詰のトマト、トマトジュース、トマトソース、ピューレ、ペースト、またはケチャップなどの多くの形態で使用される。

#### 【0004】

トマトは、通常、12対の分化した染色体を有する単純な二倍体種である。しかしながら、倍数性トマトも本発明の一部である。栽培されたトマトは自家受粉性であり、ほぼ専ら自家受粉する。トマトの花は雌雄同体である。商業用の栽培品種は、最初は放任受粉されていた。雑種強勢 (*hybrid vigor*) がトマトで同定されたため、交雑種は、より良い収量および植物特性の均一性を有して農家の間でますます人気を獲得することにより、放任受粉品種に置き換わっている。広く普及し、価値が高いため、トマトは、集約的に育種されている。これは、そのように多彩なトマトが現在入手できるのかを説明している。形状は小さいものから大きいものまであり得、チェリー状、プラム状、ナシ状、塊状、円形、およびビーフステーキのタイプがある。トマトは、植物が収穫用の果実を成熟させるのにかかる時間量によってグループ化することができ、一般に、栽培品種は早熟、中熟、または晩熟とみなされる。トマトは、植物の成長習性：確定 (*determinate*)、半確定 (*semi-determinate*)、または不確定 (*indeterminate*) によってグループ化することもできる。確定植物は、最初に葉を成長させ、次いで花をつけ、受粉が成功するとこれが果実に成熟する傾向がある。すべての果物は、ほぼ同時に植物上で熟す傾向がある。不確定トマトは、一部の葉の成長によって始まり、次いで成長期を通して葉および花の生産を続ける。これらの植物は、いつでも、異なる成熟段階のトマト果実を有する傾向がある。半確定トマトは確定と不確定との間の表現型を有し、確定品種よりも大きくなることを除いて、典型的な確定タイプである。より最近のトマト育種での開発により、多彩な果物の色がもたらされている。標準的な赤い熟した色に加えて、トマトは、乳白色、ライムグリーン、ピンク、黄色、金色、オレンジ、または紫色であり得る。

20

30

#### 【0005】

商業用の交雑種トマトの種子は、手による授粉によって生産することができる。雄の親の花粉を収穫し、雌の同系交配の柱頭表面に手で適用する。手による授粉の前後に、昆虫が外来の花粉を持ち込んで混合物または不純物を作らないように花を覆う。花は、種子が収穫される受粉された果物を識別するために標識付けされる。

40

#### 【0006】

ウイルス、真菌、細菌、線虫、および昆虫を含む様々な病原体がトマト植物の生産性に影響を与える。トマトは特に多くのウイルスに対して易感染性 (*susceptible*) であるため、ウイルス抵抗性は農業にとって非常に重要である。

#### 【0007】

トバモウイルスは、農業、特に世界中の野菜および観賞用作物に深刻な被害をもたらす最も重要な植物ウイルスの1つである。トバモウイルスは、機械的手段および種子伝染に

50



よって簡単に伝染する。トバモウイルスは一般に、4本のタンパク質をコードする一本鎖の陽性RNAゲノムを包む約300nmの桿状粒子によって特徴付けられる。トマトでは、タバコモザイクウイルス(TMV)、トマトモザイクウイルス(ToMV)は、例えば不規則な熟成(表面上の黄色がかった斑点および表面下の茶色がかった斑点がある果物)によって、作物生産に深刻な損傷を与える可能性があるため、世界中の栽培者に恐れられている。しかし、長年にわたっていくつかの遺伝子が植物育種家によって同定されており、現在ではTMVおよび/またはToMV抵抗性トマト品種が利用可能である。

#### 【0008】

近年、ウイルスの深刻な発生が、ヨルダンやイスラエルなどの中東のトマト生産地域に影響を及ぼした。影響を受けたトマト品種のほとんどは、TMVおよび/またはToMV抵抗性と考えられていたが、依然として深刻な影響を受け、典型的なTMV/ToMV様の症状を示した。葉の症状は、TMV/ToMVの症状に非常に似ていたのに対し、果物の症状は、果物の病変および変形を伴うこのようなウイルス由来の通常症状よりも非常に頻繁で深刻であった。果物の品質は非常に悪く、むしろ市場性がなかった。Saleemら(Arch.Virol. 161(2) 503-506, 2015)は、症候のある植物の果実および葉からRNAを抽出し、様々な検査を行い、これにより新しいトバモウイルス種が同定され、これをトマト褐色縮葉フルーツウイルス(TBRFV)と命名することを提案した。TMVおよび/またはToMVに対する抵抗性は、この新しいウイルスTBRFVに対する抵抗性を付与しない。

10

#### 【発明の概要】

20

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

トバモウイルスは容易に制御されないが、抵抗性遺伝子の同定による遺伝的改善および抵抗性遺伝子の育種での使用により、およびTMVおよび/またはToMVを制御するために現在利用可能な抵抗性遺伝子は新しいトマト褐色縮葉フルーツウイルスによる損傷に対して無益であるので、この新しいトバモウイルスに対する抵抗性および/または耐性を同定する緊急の必要性があり、それがうまくいかないと、地域全体においてトマト作物を生産できなくなり得る。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

30

本発明者らは、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する耐性または抵抗性を示すトマト植物を同定し、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する耐性または抵抗性をもたらすQTL(定量的形質遺伝子座)とも以下で称する遺伝的決定因子を位置特定および同定することができた。

#### 【0011】

本発明による耐性または抵抗性は、ウイルスに感染したトマト植物の葉のレベルで、ウイルスに感染したトマト植物の果物のレベルで、または葉および果実の両方のレベルで、トマト褐色縮葉フルーツウイルス(TBRFV)に対する耐性または抵抗性を付与することができる新たに発見された遺伝的決定因子によって付与される。新たに発見された遺伝的決定因子は劣性(recessive nature)である。果実の耐性および/または抵抗性は2つのQTLによって独立して付与され、葉の抵抗性は1つのQTLによって付与されるため、特に、本発明者によって提供されるQTLに関連する好適なマーカーに関する情報が与えられれば、異なる遺伝的バックグラウンド(genetic background)、すなわち様々なトマトへのそれらの移入は植物育種の当業者によって容易に実施され得る。

40

#### 【0012】

したがって、本発明は、ホモ接合状態で存在する場合に、TBRFVに感染したトマト植物のトマトの葉および/または果実のレベルでTBRFV耐性または抵抗性の表現型を付与する、ここではQTLとも呼ばれるこれらの遺伝的決定因子を提供する。

#### 【0013】

本発明は、TBRFVに対する耐性または抵抗性を示す商業用のS・リコペルシカム植

50

物、および T B R F V に対する抵抗性を示す S . リコペルシカム植物または集団（生殖質）を産生または同定する方法を提供する。本発明はまた、葉および / または果実耐性または抵抗性であり得、劣性である、T B R F V に対する耐性または抵抗性をもたらす Q T L に関連する分子遺伝マーカー、特に S N P も開示する。そのような分子マーカーの方法および使用により得られた植物も提供される。

#### 【 0 0 1 4 】

本発明はまた、T B R F V 耐性を付与する Q T L に関連するこれらの S N P に関連する情報のいくつかの方法および使用、特に、T B R F V 耐性植物を同定する方法およびこの耐性に関連するさらなる分子マーカーを同定する方法、および T B R F V に外寄生された（infested）環境でのトマト生産収量を改善する方法、ならびに T B R F V 外寄生からト

10

#### 【 0 0 1 5 】

##### 定義

「抵抗性」という用語は、害虫または病原体に対する植物の反応、および野菜種子産業の非生物学的ストレスを記述するための I S F（国際種子連盟）野菜および観賞作物セクションによって定義されている。具体的には、抵抗性とは、特定された害虫または病原体の成長および発達を制限する植物品種の能力、および / または同様の環境条件および害虫または病原体の圧力下での易感染性の植物品種と比較した場合にそれらが引き起こす損傷を意味する。抵抗性品種は、重い害虫または病原体の圧力下で、いくつかの病気の症状または損傷を示し得る。

20

#### 【 0 0 1 6 】

「耐性」という用語は、本明細書において、植物の表現型を示すために使用され、病気の症状のうちの少なくともいくつかは、感染用量のウイルスに上記植物を曝露した際に不存在のままであり、それにより、全身または局所感染の存在、ウイルス増殖、少なくとも上記植物の細胞中のウイルスゲノム配列の存在、および / またはそのゲノムの組み込みを、少なくともいくつかの培養条件下で確立することができる。したがって、耐性植物は、症状の発現には抵抗性であるが、無症状のウイルスキャリアである。ウイルス配列は、病気の症状を引き起こすことなく、植物中に存在するか、または増殖することさえする場合もある。耐性植物は、ウイルスに感染しているが、一般に、ウイルスの増殖および発達を少なくとも穏やかに制限できることを理解されたい。さらに、いくつかの植物は、いくつかの培養条件下で耐性であり、異なる条件下で抵抗性であり得る。したがって、耐性および抵抗性は相互に排他的ではない。

30

#### 【 0 0 1 7 】

T B R F V の場合、葉（leave）の耐性または葉（foliar）の耐性とは、感染用量の T B R F V に上記植物を曝露したときに葉における病気の症状が存在のままである植物の表現型を意味する。しかしながら、果実における病気の症状は、感染植物に存在し得る。

#### 【 0 0 1 8 】

果実耐性とは、T B R F V の場合、感染用量の T B R F V に上記植物を曝露したときに果物における病気の症状が存在のままである植物の表現型を意味する。しかしながら、葉における病気の症状は、感染植物に存在し得る。

40

#### 【 0 0 1 9 】

T B R F V 感染の葉の症状には、一般に、モザイク、小葉（leaflet）の擦れ、多くの場合には靴紐様の症状が含まれる。T B R F V 感染の果実の症状には、一般に、典型的な黄色の病変および果実の変形が含まれる。多くの場合、果物には「チョコレート状斑点（chocolate spots）」もある。

#### 【 0 0 2 0 】

易感染性：植物品種が特定の害虫または病原体の成長および発達を制限できないこと；易感染性植物は、ウイルス感染に関連する有害な症状、すなわち、T B R F V 外感染の場合には葉の損傷および果実の損傷を示す。

#### 【 0 0 2 1 】

50

トマト褐色縮葉フルーツウイルスに易感染性のS・リコペルシカム植物は、例えば、2015 Salemらの刊行物で言及されている商業用の品種カンデラ(candela)である。それはまた、本出願の実施例の部分で言及されているHazer a第2号およびHazer a第4号でもあり得る。TB RF V感染地域で成長した商業用のトマト品種はすべて、現在まで、すなわち本発明の前は、TB RF Vに易感染性である。

【0022】

したがって、本発明による植物は、トマト褐色縮葉フルーツウイルスの感染地域で成長した品種カンデラ、より一般的には任意の商業用のトマト品種に関して、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する少なくとも改善された抵抗性または耐性、より具体的にはTB RF Vに対する少なくとも改善された葉の耐性または果実の耐性を有する。

10

【0023】

本明細書で使用する場合、「子孫」または「子孫」という用語は、1つ以上の親植物またはその子孫からの無性生殖または有性生殖から子孫として生じる任意の植物を指す。例えば、子孫植物は、親植物のクローニングまたは自殖(selfing)によって得られ、または2つの親植物を交配することによって得られ、自殖ならびにF1若しくはF2またはさらなる世代を含み得る。F1は、少なくともその1つが形質のドナーとして初めて使用される親から生産される第1世代の子孫であり、第2世代(F2)の子孫または後続の世代(F3、F4など)の子孫は、F1、F2などの自殖から生産される標本である。したがって、F1は、2つの真の育種親の間の交配から生ずる交雑種であり得(通常はそうである)(真の育種は形質に対してホモ接合である)、F2は、上記F1交雑種の自家受粉から生じる子孫であり得る(通常はそうである)。

20

【0024】

本明細書で使用する場合、「交配(cross)」、「交配(crossing)」、「交配受粉(cross pollination)」、または「交配育種(cross-breeding)」という用語は、1つの植物上の1つの花の花粉が別の植物の花の胚珠(柱頭)に(人工的または自然に)適用されるプロセスを指す。

【0025】

本明細書で使用する場合、「遺伝的決定因子」および/または「QTL」という用語は、生物学的機能に関連するDNAの任意のセグメントを指す。したがって、QTLおよび/または遺伝的決定因子には、遺伝子、コード配列、および/またはそれらの発現に必要な調節配列が含まれるが、これらに限定されない。QTLおよび/または遺伝的決定因子は、例えば他のタンパク質の認識配列を形成する非発現DNAセグメントも含み得る。

30

【0026】

本明細書で使用する場合、「遺伝子型」という用語は、個々の細胞、細胞培養物、組織、生物(例えば、植物)、または生物群の遺伝子構造を指す。

【0027】

本明細書で使用する場合、「接ぎ木」という用語は、台木に接ぎ穂を接ぎ木する操作である。接ぎ木の主な動機は、病気管理のための遺伝的または化学的アプローチが利用できない場合に、土壌で生育する害虫および病原体による損傷を避けることである。抵抗性の台木に易感染性の接ぎ穂を接ぎ木することにより、抵抗性を品種に引き起こす必要なく、抵抗性の品種を提供することができる。さらに、接ぎ木は、非生物学的ストレスに対する耐性を高め、収量を増やし、より効率的な水および栄養の使用をもたらす。

40

【0028】

本明細書で使用する場合、「ヘテロ接合体」という用語は、少なくとも1つの遺伝子座に存在する異なる対立遺伝子(所定の遺伝子の形態、遺伝的決定因子、または配列)を有する二倍体または倍数体の個々の細胞または植物を指す。

【0029】

本明細書で使用する場合、「ヘテロ接合」という用語は、特定の遺伝子座における異なる対立遺伝子(所定の遺伝子の形態、遺伝的決定因子、または配列)の存在を指す。

【0030】

50

本明細書で使用する場合、「相同染色体」または「相同体(homolog)」(または相同体(homologue))は、減数分裂中に互いに対になる1つの母系染色体および1つの父系染色体のセットを指す。これらのコピーは、同じ遺伝子座および同じセントロメア位置において同じ遺伝子を有する。

【0031】

本明細書で使用する場合、「ホモ接合体」という用語は、すべての相同染色体上の1つ以上の遺伝子座において同じ対立遺伝子を有する個々の細胞または植物を指す。

【0032】

本明細書で使用する場合、「ホモ接合」という用語は、相同染色体セグメント中の1つ以上の遺伝子座において同一の対立遺伝子が存在することを指す。

10

【0033】

本明細書で使用する場合、「交雑種」という用語は、1つ以上の遺伝子が異なる親間の交配から生じる個々の細胞、組織または植物を指す。

【0034】

本明細書で使用する場合、「遺伝子座(locus)」(複数:「遺伝子座(loci)」)という用語は、遺伝的に定義された任意の部位を指し、これは単一の位置(ヌクレオチド)または染色体領域であり得る。遺伝子座は、遺伝子、遺伝的決定因子、もしくは遺伝子の一部、またはDNA配列であり得、異なる配列によって占有され得る。遺伝子座はまた、SNP(一塩基多型)、複数のSNP、または2つの隣接するSNPによって定義されてもよい。

20

【0035】

本明細書で使用する場合、「台木」という用語は、接ぎ木プロセスにおいて接ぎ穂を受け取ることができる植物の下部である。

【0036】

本明細書で使用する場合、「接ぎ穂」という用語は、接ぎ木プロセスにおいて台木に接ぎ木することができる植物の上部である。

【発明を実施するための形態】

【0037】

本発明者らは、S・リコペルシカム植物中にホモ接合で存在する場合に、単独でまたは本出願の他の箇所に記載されている組み合わせなどの組み合わせで、トマト褐色縮葉ウイルス(TBRFV)に感染しているかまたは感染する可能性があるトマト植物の果物および/または葉において改善された耐性および/または抵抗性を提供する、3つのQTLを同定した。

30

【0038】

本発明者らは、特に染色体6および9上でS・リコペルシカムバックグラウンド中にホモ接合で存在する場合に、TBRFVに感染しているかまたは感染する可能性があるトマト植物の果実において改善された耐性を独立してまたは組み合わせで付与する、2つのQTL、すなわちQTL1およびQTL2を同定した。さらに、本発明者らは、特に染色体11上でS・リコペルシカムバックグラウンド中にホモ接合で存在する場合に、TBRFVに感染しているかまたは感染する可能性があるトマト植物の葉において改善された耐性を付与する、1つのQTLを同定した。染色体6、9、および11上にホモ接合で存在する場合に、3つのQTLは、TBRFVに感染しているかまたは感染する可能性があるトマト植物の葉および果実の両方で改善された耐性および/または抵抗性を付与する。

40

【0039】

実施例で実証されるように、本発明による植物の表現型は、ほとんどの状況において、TBRFVに対する、抵抗性ではなく、耐性、すなわち葉耐性、果実耐性、または両方の形態の耐性として最もよく特徴付けられる。しかしながら、特定の状況下では、本発明の植物はTBRFVに対する抵抗性を示す。以下では、TBRFVに対する耐性について言及する。しかしながら、この表現型は、特定の状況下で、抵抗性表現型を包含する。

【0040】

50

したがって、第1の態様によれば、本発明は、S．リコペルシカムバックグラウンド中にホモ接合で存在する場合に、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに感染したトマト植物の果実において改善された耐性を付与する、特にそれぞれ染色体6および/または9上の1つまたは2つのQTL、すなわちQTL1および/またはQTL2をゲノム中に含むS．リコペルシカム植物に関する。QTL1は染色体6に位置し、QTL2は染色体9に位置する。したがって、本発明は、S．リコペルシカムバックグラウンド中にホモ接合で存在する場合に、TBRFVに対するトマト植物において改善された果実の耐性を付与する、特に染色体6上のQTL、すなわちQTL1をゲノム中に含むS．リコペルシカム植物に関する。本発明はまた、S．リコペルシカムバックグラウンド中にホモ接合で存在する場合に、TBRFVに対するトマト植物において改善された果実の耐性を付与する、特に染色体9上のQTL、すなわちQTL2をゲノム中に含むS．リコペルシカム植物にも関する。

10

#### 【0041】

一実施形態によれば、本発明はさらに、本発明は、S．リコペルシカムバックグラウンド中にホモ接合で存在する場合に、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに感染したトマト植物において改善された葉の耐性を付与する、特に染色体11上の1つのQTL、すなわちQTL3をゲノム中に含むS．リコペルシカム植物に関する。

#### 【0042】

本発明は、より具体的には、TBRFVに対する果実の耐性を独立して付与する、染色体6上のQTL1、若しくは染色体9上のQTL2、または両方のQTLをゲノム中にホモ接合で含む植物を対象とする。本発明はまた、TBRFVに対する葉の耐性を付与する、染色体11上のQTL3をゲノム中にホモ接合で含む植物にも関する。

20

#### 【0043】

一実施形態によれば、本発明は、S．リコペルシカムバックグラウンド中にホモ接合で存在する場合に、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに感染したトマト植物の果実および葉において改善された耐性および/または抵抗性を付与するQTL1、QTL2、およびQTL3の様々な組み合わせをゲノム中に含むS．リコペルシカム植物に関する。このような組み合わせは、QTL1およびQTL3、QTL2およびQTL3、QTL1、QTL2、およびQTL3である。より好ましくは、そのような組み合わせは、QTL1、QTL2、およびQTL3である。すべてのQTLは、ホモ接合で存在することが好ましい。

30

#### 【0044】

本発明は、前述の態様のそのような植物の細胞および上記QTLを含む種子にも関する。

#### 【0045】

本発明によるTBRFVに対する改善された耐性を付与するQTLは、HAZTBRFVRES1の種子のゲノム中に存在するQTLから選択される。このS．リコペルシカムの種子の試料は、Hazer Seeds Ltd, Berurim, M.P. Shimim79837 (イスラエル)により、特許手続上の微生物の寄託の国際承認に関するブダペスト条約(「ブダペスト条約」、産業、食品、および海洋細菌の国立コレクション(National collection of Industrial, Food and Marine bacteria)(NCIMB)(NCIMB, Ltd, ファーガソンビル, クレイブストーンエステート, バックスバーン, アパディーンAB21 9YA (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA), 英国)の要件に準拠しかつそれを満たして、2017年5月16日に受託番号42758で寄託されている。このトマト種子の寄託物は、Hazer Seeds Ltd, Berurim, M.P. Shimim79837 (イスラエル)によって維持されている。

40

#### 【0046】

TBRFVに対する改善された耐性を付与するQTLは、好ましくは、QTL1については染色体6上に、QTL2については染色体9上に、QTL3については染色体11上に位置する。それらは、より好ましくは、QTL1については、SNPTO-00051

50

97 (配列番号1) およびSNPTO-0145581 (配列番号2) を含む染色体6の染色体間隔内に位置し、QTL2については、SNPTO-0180955 (配列番号3) およびSNPTO-0196109 (配列番号6) を含む染色体9の染色体間隔内に位置し、QTL3については、SNPTO-0122252 (配列番号7) およびSNPTO-0162427 (配列番号18) を含む染色体11の染色体間隔内に位置する。

【0047】

本明細書で言及されるSNP (一塩基多型) に対応する特定の多型、およびS.リコペルシカムゲノム中のこれらのSNPの隣接配列は、実験セクション (特に、表4、5、6、7、9、および10を参照のこと) および付随する配列表で示されている。染色体6、9、および11上のトマトゲノムのバージョン2.40に対するそれらの位置は、表4、6、および9に示され、それらの隣接配列は、表5、7、および10並びに配列表にも示されている。

10

【0048】

この点に関して、定義により、SNPはゲノム中の単一のヌクレオチドを指し、これは、存在する対立遺伝子に応じて可変であるが、隣接ヌクレオチドは同一であることに留意されたい。異なるSNPの位置の明確な識別を容易にするために、バージョン2.40のトマトゲノム配列を参照し、配列番号で識別される隣接配列を参照して、それらの位置を表4、6、9に示す。本出願における特定のSNPに関連する配列、例えばSNPTO-0005197についての配列番号1では、配列内の1つのヌクレオチドのみが実際に多型に対応し、すなわち、配列番号1の61番目のヌクレオチドがSNPTO-0005197の多型位置に対応し、表4、5、および6に示されるようにTまたはCであり得る。隣接配列は、SNPをゲノム中で位置づけるために示されるが、そのような多型の一部ではない。

20

【0049】

本発明者らは、目的の表現型に關与するQTL、すなわちTBRFVに感染した場合における葉および/または果実の耐性の改善が、上記領域に沿った異なる遺伝子座、すなわち18個の以下のSNP: 染色体6上のQTL1について、TO-0005197 (配列番号1) およびTO-0145581 (配列番号2)、染色体9上のQTL2について、TO-0180955 (配列番号3)、TO-0196724 (配列番号4)、TO-0145125 (配列番号5)、およびTO-0196109 (配列番号6)、染色体11上のQTL3について、TO-0122252 (配列番号7)、TO-0144317 (配列番号8)、TO-0142270 (配列番号9)、TO-0142294 (配列番号10)、TO-0142303 (配列番号11)、TO-0142306 (配列番号12)、TO-0182276 (配列番号13)、TO-0181040 (配列番号14)、TO-0123057 (配列番号15)、TO-0125528 (配列番号16)、TO-0162432 (配列番号17)、およびTO-0162427 (配列番号18) により定義される18個の異なる遺伝子座における配列の存在を同定することにより、上記で言及した染色体領域中に見出されることを同定した。

30

【0050】

TBRFVに感染したときに果実の改善された耐性を有する本発明によるトマト植物は、染色体6および/または染色体9上の遺伝子座の少なくとも1つにおいて上記表現型を付与するQTLを有する。好ましくは、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに感染したときに改善された果実の耐性を有する本発明によるトマト植物は、染色体6上の少なくとも1つの遺伝子座および染色体9上の少なくとも1つの遺伝子座においてQTLを有する。あるいは、本発明のトマト植物は、上記で詳述した染色体6上の2つの遺伝子座のうちの少なくとも1つにおいてTBRFVに対する果実の耐性を付与するQTLを有するか、または上記で詳述した染色体9上の4つの遺伝子座のうちの少なくとも1つにおいてTBRFVに対する果実の耐性を付与するQTLを有する。

40

【0051】

TBRFVに感染した場合に葉の改善された耐性を有する本発明によるトマト植物は、

50

染色体 11 上の遺伝子座の少なくとも 1 つにおいて Q T L を有する。

【0052】

トマト褐色縮葉フルーツウイルスに感染したときに葉および果実の両方のレベルで改善された耐性を有する本発明によるトマト植物は、染色体 6 および / または染色体 9 上の遺伝子座の少なくとも 1 つ、好ましくは、染色体 6 および染色体 9 の両方上の少なくとも 1 つにおいて、および 11 番染色体上の遺伝子座の少なくとも 1 つにおいて表現型を付与する配列を有する。

【0053】

したがって、本発明の別の実施形態によれば、本発明の植物、種子、または細胞のゲノム中に存在する Q T L は、好ましくは、上記で言及した上記 18 個の S N P を含む 18 個の遺伝子座、すなわち染色体 6 上の Q T L 1 について、T O - 0 0 0 5 1 9 7 ( 配列番号 1 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 5 5 8 1 ( 配列番号 2 ) を含む遺伝子座、染色体 9 上の Q T L 2 について、T O - 0 1 8 0 9 5 5 ( 配列番号 3 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 9 6 7 2 4 ( 配列番号 4 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 5 1 2 5 ( 配列番号 5 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 9 6 1 0 9 ( 配列番号 6 ) を含む遺伝子座、染色体 11 上の Q T L 3 について、T O - 0 1 2 2 2 5 2 ( 配列番号 7 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 4 3 1 7 ( 配列番号 8 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 2 2 7 0 ( 配列番号 9 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 2 2 9 4 ( 配列番号 10 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 2 3 0 3 ( 配列番号 11 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 2 3 0 6 ( 配列番号 12 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 8 2 2 7 6 ( 配列番号 13 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 8 1 0 4 0 ( 配列番号 14 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 2 3 0 5 7 ( 配列番号 15 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 2 5 5 2 8 ( 配列番号 16 ) を含む遺伝子座、T O - 0 1 6 2 4 3 2 ( 配列番号 17 ) を含む遺伝子座、および T O - 0 1 6 2 4 2 7 ( 配列番号 18 ) を含む遺伝子座のうちの少なくとも 1 つ以上において見出される。

10

20

【0054】

本発明によるトマト植物では、その果実は T B R F V に感染した場合に改善された耐性を有し、そのようなトマト植物の植物、種子、または細胞のゲノム中に存在する Q T L は、好ましくは、以下の遺伝子座：染色体 6 上の Q T L 1 について、T O - 0 0 0 5 1 9 7 を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 5 5 8 1 を含む遺伝子座、および / または染色体 9 上の Q T L 2 について、T O - 0 1 8 0 9 5 5 を含む遺伝子座、T O - 0 1 9 6 7 2 4 を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 5 1 2 5 を含む遺伝子座、および T O - 0 1 9 6 1 0 9 を含む遺伝子座のうちの少なくとも 1 つ以上において見出される。

30

【0055】

本発明によるトマト植物では、その葉は T B R F V に感染したときに改善された耐性を有し、そのようなトマト植物の植物、種子、または細胞のゲノム中に存在する Q T L は、好ましくは、以下の遺伝子座：染色体 11 上の Q T L 3 について、T O - 0 1 2 2 2 5 2 を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 4 3 1 7 を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 2 2 7 0 を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 2 2 9 4 を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 2 3 0 3 を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 2 3 0 6 を含む遺伝子座、T O - 0 1 8 2 2 7 6 を含む遺伝子座、T O - 0 1 8 1 0 4 0 を含む遺伝子座、T O - 0 1 2 3 0 5 7 を含む遺伝子座、T O - 0 1 2 5 5 2 8 を含む遺伝子座、T O - 0 1 6 2 4 3 2 を含む遺伝子座、および T O - 0 1 6 2 4 2 7 を含む遺伝子座 のうちの少なくとも 1 つ以上において見出される。

40

【0056】

T B R F V に感染した場合に葉および果実の両方の改善された耐性を有する本発明によるトマト植物について、本発明の植物、種子、または細胞のゲノム中に存在する Q T L は、好ましくは、染色体 6 上の S N P を含む 2 つの遺伝子座、すなわち T O - 0 0 0 5 1 9 7 を含む遺伝子座および T O - 0 1 4 5 5 8 1 を含む遺伝子座のうちの少なくとも 1 つ以上、および / または染色体 9 上の S N P を含む 4 つの遺伝子座、すなわち T O - 0 1 8 0 9 5 5 を含む遺伝子座、T O - 0 1 9 6 7 2 4 を含む遺伝子座、T O - 0 1 4 5 1 2 5 を含む遺伝子座、T O - 0 1 9 6 1 0 9 を含む遺伝子座のうちの少なくとも 1 つ以上、なら

50

びに染色体 11 上の SNP を含む 12 個の遺伝子座、すなわち TO - 0122252 を含む遺伝子座、TO - 0144317 を含む遺伝子座、TO - 0142270 を含む遺伝子座、TO - 0142294 を含む遺伝子座、TO - 0142303 を含む遺伝子座、TO - 0142306 を含む遺伝子座、TO - 0182276、TO - 0181040 を含む遺伝子座、TO - 0123057 を含む遺伝子座、TO - 0125528 を含む遺伝子座、TO - 0162432 を含む遺伝子座、および TO - 0162427 を含む遺伝子座のうちの少なくとも 1 つ以上において見出される。

【0057】

TBRFV 耐性を付与する QTL に対応する本発明の 18 個の SNP の対立遺伝子は、TO - 0005197 の対立遺伝子 T、TO - 0145581 の対立遺伝子 C、TO - 0180955 の対立遺伝子 G、TO - 0196724 の対立遺伝子 C、TO - 0145125 の対立遺伝子 G、TO - 0196109 の対立遺伝子 G、TO - 0122252 の対立遺伝子 T、TO - 0144317 の対立遺伝子 C、TO - 0142270 の対立遺伝子 T、TO - 0142294 の対立遺伝子 G、TO - 0142303 の対立遺伝子 A、TO - 0142306 の対立遺伝子 A、TO - 0182276 の対立遺伝子 G、TO - 0181040 の対立遺伝子 G、TO - 0123057 の対立遺伝子 G、TO - 0125528 の対立遺伝子 A、TO - 0162432 の対立遺伝子 C、および TO - 0162427 の対立遺伝子 T である。TBRFV に対する耐性を付与する QTL の存在は、上記の特定の対立遺伝子の存在によって明らかにすることができる。したがって、これらの SNP の対立遺伝子は、本発明の QTL の存在を反映することができる。

10

20

【0058】

本発明の好ましい実施形態によれば、TBRFV に対する耐性を付与する QTL は、本発明の SNP により区切られた 1 つ以上の染色体間隔上にある。この実施形態によれば、QTL 1 は、一方の側が SNPTO - 0005197 により区切られ、他方の側が SNPTO - 0145581 により区切られた染色体 6 の染色体間隔上にある。

【0059】

別の実施形態によれば、QTL 2 は、一方の側が SNPTO - 0180955 により区切られ、他方の側が SNPTO - 0196109 により区切られた染色体 9 の染色体間隔上にある。

30

【0060】

別の実施形態によれば、QTL 3 は、一方の側が SNPTO - 0122252 により区切られ、他方の側が TO - 0162427 により区切られた染色体 11 の染色体間隔上にある。QTL 3 が見出される染色体 11 のより好ましい染色体間隔は、TO - 0144317 と TO - 0125528 とにより区切られた間隔、TO - 0142270 と TO - 0162432 とにより区切られた間隔、TO - 0144317 と TO - 0162432 とにより区切られた間隔、および TO - 0142270 と TO - 0125528 とにより区切られた間隔である。さらに好ましい間隔は、TO - 0142270 と TO - 0125528 とにより区切られた間隔である。別の好ましい間隔は、TO - 0142294 と TO - 0125528 とにより区切られ、かつそれらを含む間隔である。

40

【0061】

この点において、染色体における特定の位置は、ゲノム上でそれらを明確に位置付けるために上記 SNP の隣接配列が定義される限り、実際に一塩基多型に関して定義することができることに留意されたい。本発明者らは、異なる対立遺伝子を有する、それらの隣接配列によって同定された SNP を使用して、本発明の QTL を同定および追跡した。

【0062】

2 つの SNP X および Y で区切られた染色体領域は、これら 2 つの SNP の位置の間にあり、かつ上記 SNP を含む染色体の区画を指し、したがって、この染色体領域のヌクレオチド配列は、SNP X に対応するヌクレオチドで始まり、SNP Y に対応するヌクレオチドで終わり、すなわち、本発明の意味において、SNP は、それらが区切る領域内に含まれる。

50



## 【0063】

本発明の植物、種子、または細胞において、目的の表現型を付与するQTLの存在は、TBRFVに対する耐性が果実の耐性である場合、好ましくは、染色体6上のQTL1について、TO-0005197および/またはTO-0145581により特徴付けられ、ならびに/あるいは染色体9上のQTL2について、TO-0180955、TO-0196724、TO-0145125、および/またはTO-0196109により特徴付けられ、TBRFVに対する耐性が葉の耐性である場合、好ましくは、染色体11上のQTL3について、TO-0122252、TO-0144317、TO-0142270、TO-0142294、TO-0142303、TO-0142306、TO-0182276、TO-0181040、TO-0123057、TO-0125528、TO-0162432、およびTO-0162427により特徴付けられ、最も好ましくは、TO-0142294、TO-0142303、TO-0142306、TO-0182276、TO-0181040、TO-0123057、TO-0125528により、さらにより好ましくはTO-0182276により特徴付けられる。

10

## 【0064】

本発明によるトマト植物のゲノム中にホモ接合で存在する場合、QTL1および/またはQTL2は、TBRFVに対する果実の抵抗性/耐性を独立しておよび集合的に付与し、QTL3はTBRFVに対する葉の抵抗性/耐性を付与する。3つのQTLが本発明によるトマト植物のゲノム中にホモ接合で存在する場合、あるいはQTL1およびQTL3またはQTL2およびQTL3がホモ接合で存在する場合、そのような植物はTBRFVに対する改善された果実および葉の耐性を有する。

20

## 【0065】

本発明はまた、改善された表現型を有し、本発明のQTLの1つ以上をホモ接合で有する植物を別のS.リコペルシカムと交配することにより得ることができるS.リコペルシカムの交雑種植物に関する。改善された表現型を有し、本発明のQTLの1つ以上をホモ接合で有する植物は、TBRFVに対する果実の耐性を有するトマト植物であり得、そのような場合、QTL1および/またはQTL2をホモ接合で有し、TBRFVに対する葉の耐性を有するトマト植物であり得、そのような場合、QTL3をホモ接合で有し、またはTBRFVに対する果実および葉の両方の耐性を有する植物であり得る。後者の場合、トマト植物は、QTL1およびQTL3、QTL2およびQTL3、またはQTL1、QTL2、およびQTL3、好ましくはQTL1、QTL2、およびQTL3をホモ接合で有する。本発明のQTLは劣性様式で作用するので、上記の交配により生産されたS.リコペルシカムの交雑種植物は、他のS.リコペルシカム交配パートナーが本発明のQTLを有する場合にのみ、TBRFVに対する葉および/または果実耐性を有する。他のS.リコペルシカムの交配パートナーが本発明のQTLを欠く場合、交配から生じる交雑種は本発明のQTLをヘテロ接合様式で有し、トマト植物は葉および/または果実耐性を有しない。しかしながら、それらの抵抗性/耐性の子孫は、育種の当業者に利用可能である。

30

## 【0066】

好ましくは、本発明によるS.リコペルシカム植物は、商業用の植物または系統である。そのような商業用の植物または系統は、好ましくは、例えば、TomV(トマトモザイクウイルス)に対する抵抗性も付与する、Tm-2(対立遺伝子Tm-2もしくはTm-22(Tm-2aとしても知られている)またはTm-1抵抗性遺伝子の存在により、TMV(タバコモザイクウイルス)に対する抵抗性も示す。本発明のこの態様による植物は、好ましくは、以下の追加の特徴：線虫抵抗性形質(Mi-1またはMi-j)、ならびにフザリウムおよびパーティシリウム抵抗性も有する。

40

## 【0067】

本発明によれば、他の抵抗性または耐性も企図される。

## 【0068】

好ましい実施形態によれば、本発明の植物は、ペピーノモザイクウイルス(PePMV)に対して抵抗性ではない。別の実施形態によれば、本発明のトマト植物は、PePMV

50

にも抵抗性である。

【0069】

さらに別の実施形態によれば、本発明の植物は、確定、不確定、または半不確定（すなわち確定、不確定、または半不確定の成長習性に対応する）植物またはその種子もしくは細胞である。

【0070】

確定とは、最初に葉を成長させ、次いで花をつけ、受粉が成功した場合にこれが成熟して果実となる傾向があるトマト植物を意味する。すべての果物は、ほぼ同時に植物上で熟す傾向がある。不確定トマトは、一部の葉の成長によって始まり、成長期を通して葉および花の生産を続ける。これらの植物は、いつでも、異なる成熟段階のトマト果実を有する傾向がある。半確定トマトは、確定と不確定との間の表現型を有し、確定品種よりも大きくなることを除いて、典型的な確定タイプである。

【0071】

さらに別の実施形態によれば、本発明の植物は、接ぎ木プロセスにおける接ぎ穂または台木として使用される。接ぎ木は、ウリ科などの作物で長年使用されてきたプロセスであるが、最近ではトマトでのみ使用されている。接ぎ木は、疫病菌などの地中の病原体（*terrestrial pathogen*）またはある特定の線虫に対する特定のレベルの耐性を提供するために使用され得る。したがって、接ぎ木は、栽培される植物または品種と外寄生した土壌との間の接触を防ぐことを意図している。接ぎ木または接ぎ穂として使用される目的の品種、任意選択により、F1交雑種は、台木として使用される抵抗性植物へと接ぎ木される。抵抗性台木は健常なままであり、病気から隔離する接ぎ木に土壌から通常の供給を提供する。

【0072】

さらに、本発明の商業用の植物は、好適な条件で果実を生じ、この果実は、完全な成熟で少なくとも25g、好ましくは完全な成熟で少なくとも100g、さらにより好ましくは完全な成熟で少なくとも200gである。

【0073】

上記のように、本発明は、改善された表現型を示すS・リコペルシカム植物およびその植物を生じさせる種子に関する。

【0074】

本発明による植物または種子は、受託番号NCIMB42758でNCIMBに寄託された寄託種子HAZTB RFVRES1から成長した植物の子孫（progeny）または子孫（offspring）であり得る。寄託された種子から成長した植物は、実際に、改善された表現型を付与する本発明のQTLについてホモ接合であり、したがって、それらは、染色体6、9、および11の各相同体上の目的のQTLをゲノム中に有する。それらは、交配、自殖、および/または戻し交配によって、これらの配列を別のバックグラウンドに移すために使用される。

【0075】

本発明はまた、HAZTB RFVRES1（NCIMB42758）の寄託された種子、およびこれらの種子のうちの1つから成長した植物に関する。これらの種子は、目的の表現型を付与するQTLをホモ接合で含む。これらの種子は植物品種に対応せず、本発明のQTLを除くほとんどの遺伝子についてホモ接合ではないことに留意されたい。したがって、それらの表現型は、本発明の葉および果実の抵抗性/耐性を除いて、繁殖の際に固定されない。それらの表現型特性のほとんどは、本発明のTB RFV葉および果実の抵抗性/耐性を除いて、繁殖中に分離する（segregate）。

【0076】

本発明はまた、上記で定義される植物または種子、すなわち、ホモ接合またはヘテロ接合状態の目的の1つ、2つ、または3つのQTLを含み、上記配列がホモ接合で存在する場合に改善された表現型を付与する植物または種子に関し、この植物または種子は、QTLをS・リコペルシカム植物（その代表的な種子はNCIMB受託NCIMB-4275

10

20

30

40

50

8で寄託されている)から別のS・リコペルシカム遺伝的バックグラウンドに移すことにより、例えば、上記植物を第2のトマト植物親と交配し、目的の表現型の原因となるQTLを有する植物を選択することにより得ることができる。このような交配では、QTL1、QTL2、および/もしくはQTL3、またはそれらの任意の組み合わせを移し得る。好ましくは、果実耐性を有する植物を取得するためには、QTL1のみ、もしくはQTL2のみ、またはQTL1およびQTL2の両方が寄託された種子HAZTB RFVRES1(NCIMB42758)から移され、葉の耐性を有する植物を取得するためには、QTL3が寄託された種子HAZTB RFVRES1(NCIMB42758)から移され、果実および葉の両方の耐性を有する植物を取得するためには、QTL1およびQTL3、QTL2およびQTL3、またはQTL1、QTL2、およびQTL3、好ましくはQTL1、QTL2、およびQTL3が、寄託された種子HAZTB RFVRES1(NCIMB42758)から移される。

10

20

30

40

50

#### 【0077】

本発明の種子または植物は、異なるプロセスによって得ることができ、本質的に生物学的なプロセスによって専ら得られるわけではないことに留意されたい。

#### 【0078】

このような態様によれば、本発明は、トマト植物または種子、好ましくは、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実および/または葉の耐性を提供する1つ以上の変異をゲノム中に含み得る、天然に存在しないトマト植物または種子に関し、この変異は、例えば、代表的な試料が寄託番号NCIMB42758でNCIMBに寄託されている植物のゲノム中に存在する。

#### 【0079】

別の実施形態では、本発明は、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実および/または葉の耐性を植物に提供する1つ以上の変異をゲノム中に有するトマト植物または種子を取得する方法に関する。このような方法は実施例7に示されており、以下：

- a) 改変されるトマト植物のM0種子を変異誘発剤で処理してM1種子を得ることと、
- b) このようにして得られたM1種子から植物を成長させてM1植物を取得することと、
- c) M1植物の自家受精によるM2種子の生産することと、
- d) 任意選択により、ステップb)およびc)をn回繰り返して、M1+n種子を取得すること、を含み得る。

#### 【0080】

M1+n種子を成長させて植物にし、トマト褐色縮葉フルーツウイルス感染を享受させる。生存している植物またはより軽いTB RFV感染症状を有する植物は、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実および/または葉の耐性についての選択を続けながら、さらに1世代以上増殖される。

#### 【0081】

この方法では、ステップa)のM1種子は、EMS変異誘発などの化学変異誘発によって取得することができる。他の化学変異誘発剤には、硫酸ジエチル(des)、エチレンイミン(ei)、プロパンスルトン、N-メチル-N-ニトロソウレタン(mnu)、N-ニトロソ-N-メチル尿素(NMU)、N-エチル-N-ニトロソウレア(enu)、およびアジ化ナトリウムが含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0082】

あるいは、変異は、例えばX線、高速中性子、UV放射から選択される、照射により誘発される。

#### 【0083】

本発明の別の実施形態では、変異は遺伝子工学によって誘発される。そのような変異には、果実および/または葉のTB RFV抵抗性を付与する配列の挿入、ならびに果実および/または葉のTB RFV抵抗性または耐性を付与する代替配列による在中の配列(residing sequences)の置換も含まれる。好ましくは、変異は、S・リコペルシカム植物の相同配列の代わりの、上記のQTL1、QTL2、およびQTL3のうちの1つ以上の挿入

である。さらにより好ましくは、変異は、代表的な試料が寄託番号NCIMB42758でNCIMBに寄託された植物のゲノム中に存在する染色体11上の相同配列による、S・リコペルシカムゲノムの染色体11上のSNPTO-0122252(配列番号7)およびSNPTO-0162427(配列番号18)内に含まれる配列またはその断片の置換であり、該配列またはその断片はTBRFVに対する葉の抵抗性を付与する。

#### 【0084】

使用することができる遺伝子工学的手段には、遺伝的変異により植物に新しい特性を作り出すために開発および/または使用される様々な新しい技術である新しい育種技術(New Breeding Techniques)と呼ばれるすべての技術の使用が含まれ、その目的は、標的化変異誘発、すなわち新しい遺伝子または遺伝子サイレンシング(RdDM)の標的化導入である。そのような新しい育種技術の例は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)技術(ZFN-1、ZFN-2、およびZFN-3、米国特許第9,145,565号を参照のこと)、オリゴヌクレオチド誘発突然変異導入(ODM)、シスジェネシスおよびイントラジェネシス、接ぎ木(GM台木上)、逆育種、アグロインフィルトレーション(Agro-infiltration)(agro-infiltration「sensu stricto」, agro-inoculation, floral dip)、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ(TALEN、米国特許第8,586,363号および同9,181,535号を参照のこと)、CRISPR/Casシステム(米国特許第8,697,359号、同8,771,945号、同8,795,965号、同8,865,406号、同8,871,445号、同8,889,356号、同8,895,308号、同8,906,616号、同8,932,814号、同8,945,839号、同8,993,233号、および同8,999,641号を参照のこと)、工学操作(engineered)メガヌクレアーゼ 再工学操作ホーミングエンドヌクレアーゼ、DNAガイド(DNA guided)ゲノム編集(Gao et al., Nature Biotechnology (2016))、および合成ゲノミクスの使用により促進される標的化配列の変更である。新しい育種技術の別の名称である標的化ゲノム編集の主要な部分は、改変が意図されるゲノム中の選択された場所でのDNA二本鎖切断(DSB)の誘発の適用である。DSBの指向性(directed)修復により、標的化ゲノム編集が可能となる。そのような適用を利用して、変異(例えば、標的化変異または正確なネイティブ遺伝子編集)および遺伝子(シス遺伝子(cisgene)、イントラ遺伝子(intragenic)、またはトランス遺伝子(transgene))の正確な挿入を生成することができる。変異を引きこす適用はしばしば、SDN1、SDN2、SDN3などの部位特異的ヌクレアーゼ(SDN)テクノロジーとして同定される。SDN1の場合、成果は、標的化された非特異的遺伝子欠失変異である：DNA DSBの位置は正確に選択されるが、宿主細胞によるDNA修復はランダムであり、小さなヌクレオチドの欠失、付加、または置換が生じる。SDN2の場合、SDNは、標的化DSBを生成するために使用され、DNA修復鋳型(1つまたはいくつかのヌクレオチドの変更を除いて、標的化DSB DNA配列と同一の短いDNA配列)は、DSBを修復するために使用される：成果は、目的の所望の遺伝子における標的化された所定の点変異である。SDN3に関しては、SDNは、新しいDNA配列(遺伝子など)を含むDNA修復鋳型とともに使用される。この技術の成果は、そのDNA配列の植物ゲノムへの挿入である。SDN3の使用を示す最も可能性の高い適用は、選択されたゲノム位置でのシスジェニック、イントラジェニック(intragenic)、またはトランスジェニック発現カセットの挿入であろう。これらの各手法の完全な説明は、2011年に欧州委員会共同研究センター(JRC)未来技術研究所によって作成された「新しい植物育種技術-商業開発のための最新技術と展望」という表題のレポートに記載されている。

#### 【0085】

本発明はまた、別の態様において、上記の本発明の種子または植物から得られる可能性のある任意の植物、およびそのような植物の植物部分、最も好ましくは、外植片、接ぎ穂、挿し木、種子、果実、根、台木、花粉、胚珠、胚、プロトプラスト、葉、葯、茎、葉柄、および任意の他の植物部分にも関し、上記の植物、外植片、接ぎ穂、挿し木、種子、果

10

20

30

40

50

実、根、台木、花粉、胚珠、胚、プロトプラスト、葉、葯、茎、葉柄、および／または植物の部分は、本発明の第１の態様による種子または植物、すなわち、いずれの組み合わせでもよい１つ、２つ、または３つのＱＴＬをゲノム中にホモ接合またはヘテロ接合で有する種子または植物から得ることができる。これらの植物部分、特に、外植片、接ぎ穂、挿し木、種子、果実、根、台木、花粉、胚珠、胚、プロトプラスト、葉、葯、茎または葉柄は、ホモ接合で存在する場合に目的の表現型、すなわちＴＢＲＦＶに対する果実および／または葉の耐性を付与するＱＴＬをゲノム中に含む。

【００８６】

本発明のこの態様で言及されるＱＴＬは、本発明の植物の関連において上記で定義されたＱＴＬである。本発明の第１の態様に関して定義されたＱＴＬの異なる特徴は、本発明のこの態様に準用する。したがって、ＱＴＬは、好ましくは、寄託された材料ＨＡＺＴＢＲＦＶＲＥＳ１（ＮＣＩＭＢ受託番号４２７５８）に対応する植物のゲノム中に存在するＱＴＬから選択される。それらは、目的のＱＴＬに応じて、ＴＯ－０００５１９７の対立遺伝子Ｔ、ＴＯ－０１４５５８１の対立遺伝子Ｃ、ＴＯ－０１８０９５５の対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１９６７２４の対立遺伝子Ｃ、ＴＯ－０１４５１２５の対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１９６１０９の対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１２２２５２の対立遺伝子Ｔ、ＴＯ－０１４４３１７の対立遺伝子Ｃ、ＴＯ－０１４２２７０の対立遺伝子Ｔ、ＴＯ－０１４２２９４の対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１４２３０３の対立遺伝子Ａ、ＴＯ－０１４２３０６の対立遺伝子Ａ、ＴＯ－０１８２２７６の対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１８１０４０の対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１２３０５７の対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１２５５２８の対立遺伝子Ａ、ＴＯ－０１  
6２４３２の対立遺伝子Ｃ、および／またはＴＯ－０１６２４２７の対立遺伝子Ｔの存在、好ましくは、ホモ接合でのこの対立遺伝子またはこれらの対立遺伝子の存在、すなわち  
ＴＯ－０００５１９７の２つの対立遺伝子Ｔ、ＴＯ－０１４５５８１の２つの対立遺伝子  
Ｃ、ＴＯ－０１８０９５５の２つの対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１９６７２４の２つの対立遺  
伝子Ｃ、ＴＯ－０１４５１２５の２つの対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１９６１０９の２つの対  
立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１２２２５２の２つの対立遺伝子Ｔ、ＴＯ－０１４４３１７の２つ  
の対立遺伝子Ｃ、ＴＯ－０１４２２７０の２つの対立遺伝子Ｔ、ＴＯ－０１４２２９４の  
２つの対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１４２３０３の２つの対立遺伝子Ａ、ＴＯ－０１４２３０  
６の２つの対立遺伝子Ａ、ＴＯ－０１８２２７６の２つの対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１８１  
０４０の２つの対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１２３０５７の２つの対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０１  
25528の2つの対立遺伝子A、TO-0162432の2つの対立遺伝子C、および  
／またはＴＯ－０１６２４２７の２つの対立遺伝子Ｔの存在によって有利に特徴付けられ  
る。

【００８７】

本発明はまた、Ｓ．リコベルシカム植物の細胞にも関し、これらの細胞は、ゲノム中に  
Ｓ．リコベルシカム植物に目的の表現型を付与する本発明のＱＴＬを含み、好ましくは、  
これらのＱＴＬはホモ接合で存在する。ＱＴＬは、本発明の枠内で既に定義されたもので  
あり、本発明の前述の態様による植物および種子に関して既に開示された同じ特徴および  
好ましい実施形態によって特徴付けられる。これらのＱＴＬの存在は、上記で開示され、  
熟練した読み手に周知である技術によって明らかにすることができる。特に、ＱＴＬが本  
発明のそのような細胞のゲノム中にホモ接合またはヘテロ接合のどちらで存在するかを決  
定することができる。それらは、目的のＱＴＬに応じて、ＴＯ－０００５１９７の対立遺  
伝子Ｔ、ＴＯ－０１４５５８１の対立遺伝子Ｃ、ＴＯ－０１８０９５５の対立遺伝子Ｇ、  
ＴＯ－０１９６７２４の対立遺伝子Ｃ、ＴＯ－０１４５１２５の対立遺伝子Ｇ、ＴＯ－０  
196109の対立遺伝子G、TO-0122252の対立遺伝子T、TO-01443  
17の対立遺伝子C、TO-0142270の対立遺伝子T、TO-0142294の対  
立遺伝子G、TO-0142303の対立遺伝子A、TO-0142306の対立遺伝子  
A、TO-0182276の対立遺伝子G、TO-0181040の対立遺伝子G、TO  
-0123057の対立遺伝子G、TO-0125528の対立遺伝子A、TO-016  
2432の対立遺伝子C、および／またはＴＯ－０１６２４２７の対立遺伝子Ｔの存在、

好ましくは、各染色体上で同時に、すなわちホモ接合でのこの対立遺伝子またはこれらの対立遺伝子の存在によって有利に特徴付けられる。

【0088】

本発明による細胞は、S・リコペルシカム細胞の任意の種類、特に単離された細胞および/または目的のQTLを有するS・リコペルシカム植物全体を再生することができる細胞であり得る。

【0089】

本発明はまた、本発明による上記で定義された植物の非再生可能または再生可能細胞の組織培養物にも関する。好ましくは、再生可能な細胞は、本発明の胚、プロトプラスト、分裂組織細胞、カルス、花粉、葉、葯、茎、葉柄、根、根端、果実、種子、花、子葉、および/または胚軸に由来し、この細胞は、ホモ接合で存在する場合に改善された表現型を付与する、すなわち、QTL1および/またはQTL2についてはTBRFVに対する果実耐性、QTL3についてはTBRFVに対する葉耐性を付与する、いずれの組み合わせでもよい1つ、2つ、または3つの目的のQTLをゲノム中にホモ接合またはヘテロ接合で含む。

10

【0090】

組織培養物は、好ましくは、前述のトマト植物の生理学的および形態学的特徴を有する植物を再生することができ、前述のトマト植物と実質的に同じ遺伝子型を有する植物を再生することができる。本発明はまた、本発明の組織培養物から再生されたトマト植物も提供する。

20

【0091】

本発明はまた、上記で定義された植物のプロトプラスト、または上記で定義された組織培養物由来のプロトプラストも提供し、このプロトプラストは、本発明の改善された表現型を付与するQTLを含む。

【0092】

別の態様によれば、本発明は、本発明の改善された表現型を有するS・リコペルシカム植物を取得するための育種プログラムにおける育種パートナーとしての、好ましくは本発明のQTLをホモ接合で含む本発明のトマト植物の使用にも関する。実際に、そのような育種パートナーは、目的の表現型を付与するQTLをゲノム中にホモ接合で保有する。したがって、この植物をトマト植物、特に系統と交配することにより、所望の表現型を付与する本発明の1つ、2つ、または3つのQTLを子孫に移すことが可能である。したがって、本発明による植物は、所望の表現型をS・リコペルシカム植物または生殖質に付与するQTLを移入するための育種パートナーとして、好ましくは葉の抵抗性の原因となるQTLを移すために使用することができる。目的のQTLをヘテロ接合で有する植物または種子は、上記で詳述したように育種パートナーとしても使用することができるが、表現型の分離により、育種プログラムがより複雑になる可能性がある。

30

【0093】

本発明の改善された表現型は、TBRFVに対する耐性、特に葉の耐性または果実の耐性、または果実および葉の耐性の組み合わせである。

【0094】

移入されたQTLは、病気に対する抵抗性、果実の早熟、干ばつ耐性、果実形状などの他の所望の遺伝的形質を含む品種に有利に導入されるであろう。

40

【0095】

本発明はまた、受託番号NCIMB42758でNCIMBに寄託されたHAZTBRFVRES1の植物または種子との同じ使用にも関する。この植物は、S・リコペルシカム植物または生殖質に所望の表現型を付与することを目的とする育種プログラムにおける移入パートナーとしても好適である。

【0096】

このような育種プログラムにおいて、所望の表現型を示す子孫または所望の表現型に関連するQTLを有する子孫の選択は、SNPマーカの対立遺伝子、特に本発明のSNP

50

マーカーに基づいて有利に行うことができる。

【0097】

植物の子孫は、好ましくは、染色体6上のQTL1の存在についてのTO-0005197の対立遺伝子Tおよび/またはTO-0145581の対立遺伝子C、染色体9上のQTL2の存在についてのTO-0180955の対立遺伝子G、TO-0196724の対立遺伝子C、TO-0145125の対立遺伝子Gおよび/またはTO-0196109の対立遺伝子G、染色体11上のQTL3の存在についてのTO-0122252の対立遺伝子T、TO-0144317の対立遺伝子C、TO-0142270の対立遺伝子T、TO-0142294の対立遺伝子G、TO-0142303の対立遺伝子A、TO-0142306の対立遺伝子A、TO-0182276の対立遺伝子G、TO-0181040の対立遺伝子G、TO-0123057の対立遺伝子G、TO-0125528の対立遺伝子A、TO-0162432の対立遺伝子C、および/またはTO-0162427の対立遺伝子Tの存在について選択される。QTLの劣性により、植物の子孫は、各染色体の両方のホモログ上の同じ対立遺伝子の存在について選択されることが好ましい。

10

【0098】

あるいは、改善された表現型に関連する本発明の18個のSNPの対立遺伝子のうちのいずれか1つまたはこれらの対立遺伝子の組み合わせの存在に基づいて、選択を行うことができる。そのような実施形態によれば、選択は、達成されるQTLの組み合わせ(QTL1およびQTL2、QTL1およびQTL3、QTL2およびQTL3、QTL1、QTL2、およびQTL3、好ましくはできればQTL1、QTL2、およびQTL3)に応じて、QTL1についての少なくとも1つのSNP対立遺伝子の存在、もしくはQTL2についての少なくとも1つのSNP対立遺伝子、もしくはQTL3についての少なくとも1つのSNP対立遺伝子の存在、またはQTL1についての少なくとも1つのSNP対立遺伝子の存在、もしくはQTL2についての少なくとも1つのSNP対立遺伝子、および/もしくはQTL3についての少なくとも1つのSNP対立遺伝子の同時存在について、選択を行うことができる。そのような選択は、選択される植物の遺伝物質試料中の目的の対立遺伝子の存在について行われる。これらの対立遺伝子の存在により、上記SNPによって定義される遺伝子座における本発明のQTLの存在が実際に確認される。さらに、点変異または組換え事象に加えて、これらの対立遺伝子のうちの少なくとも1つまたは2つが失われ、目的のQTLを有する残りの染色体断片が依然として目的の表現型を付与することが考えられる。

20

30

【0099】

したがって、本発明による植物または受託番号NCIMB42758で寄託された種子から成長した植物は、本発明の改善された表現型を有する商業用のトマト系統および品種を取得するためのマーカー利用選択において特に価値がある。

【0100】

本発明はまた、所望の表現型を付与する遺伝子配列の同定、配列決定、および/またはクローニングを目的とするプログラムにおける上記植物の使用にも関する。

【0101】

本発明の前述の態様について記載された任意の特定の実施形態は、特に目的の表現型を付与するQTLの特徴に関して、本発明のこの態様にも適用可能である。

40

【0102】

本発明はまた、HAZTBRFVRES1(NCIMB受託番号42758)の種子のゲノム中に見出される本発明のQTLを有するS.リコベルシカム植物を同定、検出、および/または選択する方法にも関し、上記QTLは、上記配列を欠く対応する植物に対して、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する耐性および/または抵抗性の改善された表現型を付与し、該方法は、同定および/または選択される植物の遺伝物質試料中において、以下のマーカー：TO-0005197の対立遺伝子T、TO-0145581の対立遺伝子C、TO-0180955の対立遺伝子G、TO-0196724の対立遺伝子C

50

、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つを検出することを含む。

【0103】

本発明はまた、ホモ接合で存在する場合にのみ T B R F V に対する抵抗性を付与する Q T L を有し、以下の対立遺伝子：T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つを有する S . リコペルシカム植物を検出または選択するための方法にも関し、検出または選択は、検査される植物への T B R F V の接種を含む T B R F V 感染の条件で行われる。好ましい実施形態によれば、本方法は、ホモ接合性で存在する場合にのみ T B R F V に対する葉の抵抗性または耐性を付与する Q T L を有し、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G を有する S . リコペルシカム植物を検出または選択するためであり、検出または選択は、検査される植物の葉への T B R F V の接種を含む T B R F V 感染の条件で行われる。

【0104】

本方法は、抵抗性を付与する本発明の Q T L を含む、最初の親またはその子孫としての H A Z T B R F V R E S 1 ( N C I M B 受託番号 4 2 7 5 8 ) を用いた育種プログラムに特に適合され、検出および / または選択は、T B R F V による外寄生を含む条件で行われ、上記移入された配列は、T B R F V に対する耐性または抵抗性を付与し、以下のマーカー：T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つ、より好ましくは染色体 1 1 の対立遺伝子、さらにより好ましくは T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G を有する。

【0105】

さらに、本発明は、18 個の S N P から選択された少なくとも 1 つ S N P の対立遺伝子の検出に基づいて、改善された表現型を付与する本発明の Q T L のうちの少なくとも 1 つを有する S . リコペルシカム植物を検出および / または選択する方法に関する。

【0106】

好ましくは、本発明の Q T L を有する植物は、以下のマーカー：T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対



立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および / または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T の少なくとも 1 つ、好ましくは少なくとも 2 つ、3 つ、4 つ、5 つ以上、またはすべてが、選択される植物の遺伝物質試料中に検出される場合に、選択される。植物は、以下の対立遺伝子：T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C の少なくとも一方または両方が検出された場合に、Q T L 1 の存在について選択される。植物は、以下の対立遺伝子：T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G のうちの少なくとも 1 つ、2 つ、もしくは 3 つ、または 4 つが検出された場合、Q T L 2 の存在について選択される。植物は、以下の対立遺伝子：T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C および T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つ、もしくは 2 つ、もしくは 3 つ、もしくは 4 つ、または 5 つ以上が検出された場合、Q T L 3 の存在について選択される。

10

【0107】

植物は、本発明の対立遺伝子の組み合わせを有する場合にも検出される。植物は、以下の対立遺伝子：T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C の少なくとも一方または両方が検出された場合、および以下の対立遺伝子：T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G のうちの少なくとも 1 つ、もしくは 2 つ、もしくは 3 つ、または 4 つが検出された場合に、Q T L 1 および Q T L 2 の存在について選択される。植物は、以下の対立遺伝子：T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C の少なくとも一方または両方が検出された場合、および以下の対立遺伝子：T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つ、もしくは 2 つ、もしくは 3 つ、もしくは 4 つ、または 5 つ以上が検出された場合、Q T L 1 および Q T L 3 の存在について選択される。植物は、以下の対立遺伝子：T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G のうちの少なくとも 1 つ、もしくは 2 つ、もしくは 3 つ、または 4 つが検出された場合、および以下の対立遺伝子：T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C および T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つ、もしくは 2 つ、もしくは 3 つ、もしくは 4 つ、または 5 つ以上が検出された場合、Q T L 2 および Q T L 3 の存在について選択される。植物は、以下の対立遺伝子：T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C のうちの少なくとも一方または両方が検出された場合、および以下の対立遺伝子：T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G のうちの少なくとも 1 つ、もしくは 2 つ、もしくは 3 つ、もしくは 4 つ、

20

30

40

50

ならびに T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つ、もしくは 2 つ、もしくは 3 つ、もしくは 4 つ、または 5 つ以上が検出された場合、Q T L 1、Q T L 2、および Q T L 3 の存在について選択される。

【 0 1 0 8 】

本発明の前述のすべての態様において、T B R F V に対する好ましい耐性は、葉の耐性である。好ましい S N P は、本発明のすべての態様に関して、T O - 0 1 4 2 2 9 4、T O - 0 1 4 2 3 0 3、T O - 0 1 4 2 3 0 6、T O - 0 1 8 2 2 7 6、T O - 0 1 8 1 0 4 0、T O - 0 1 2 3 0 5 7、および T O - 0 1 2 5 5 2 8 であり、さらにより好ましくは T O - 0 1 8 2 2 7 6 である。

【 0 1 0 9 】

本発明はさらに、上記の Q T L の存在を明らかにする任意の分子マーカーの検出に基づいて、改善された表現型を付与する本発明の Q T L の少なくとも 1 つを有する S . リコペルシカム植物を検出および / または選択するための方法に関する。実際に、本発明の Q T L が本発明者らによって同定され、本発明の 1 8 個の S N P に加えて、分子マーカーの同定および使用は、当業者によって行われ得る。Q T L 自体は、本発明の 1 8 個の S N P のうちの少なくとも 1 つの存在によって継続して特徴付けられるが、それらはまた、異なる代替マーカーの使用により同定されるであろう。トマトゲノム中の本発明の Q T L を同定するための任意のそのような分子マーカーの方法および使用であって、該 Q T L は、該 Q T L を欠く対応する植物に関して、T B R F V に対する葉および / または果実の耐性を付与し、上記 Q T L は、以下の S N P : T O - 0 0 0 5 1 9 7、T O - 0 1 4 5 5 8 1、T O - 0 1 8 0 9 5 5、T O - 0 1 9 6 7 2 4、T O - 0 1 4 5 1 2 5、T O - 0 1 9 6 1 0 9、T O - 0 1 2 2 2 5 2、T O - 0 1 4 4 3 1 7、T O - 0 1 4 2 2 7 0、T O - 0 1 4 2 2 9 4、T O - 0 1 4 2 3 0 3、T O - 0 1 4 2 3 0 6、T O - 0 1 8 2 2 7 6、T O - 0 1 8 1 0 4 0、T O - 0 1 2 3 0 5 7、T O - 0 1 2 5 5 2 8、T O - 0 1 6 2 4 3 2、および T O - 0 1 6 2 4 2 7 のうちの少なくとも 1 つの存在により特徴付けられる、方法および使用が本発明に含まれる。

【 0 1 1 0 】

トマトゲノム中の本発明の Q T L を同定するための任意のそのような分子マーカーの方法および使用であって、Q T L は、該 Q T L を欠く対応する植物に対して、T B R F V に対する葉および / または果実の耐性を付与し、該 Q T L は、以下の S N P 対立遺伝子 : T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T の少なくとも 1 つの存在によって特徴付けられる、方法および使用も含まれる。

【 0 1 1 1 】

さらに別の態様によれば、本発明は、所望の表現型を有する S . リコペルシカム植物、特に商業用の植物および近交系の親系統の生産のための方法またはプロセスにも関する。本発明は、実際に、定義された改善された表現型を付与する本発明の 1 つ、2 つ、または 3 つの Q T L を他のトマト品種または他の種もしくは近交系の親系統に移すことも目的と

10

20

30

40

50

し、新しいタイプおよび品種のトマトを生産するのに有用である。

【0112】

これらの特徴を有する植物の生産のための方法またはプロセスは、以下のステップを含み得る：

a) T B R F V 耐性を付与する Q T L 1、Q T L 2、および / または Q T L 3 を有する寄託された種子 N C I M B 4 2 7 5 8 またはその子孫から成長した植物と、好ましくは上記 Q T L を欠く、最初の S . リコベルシカム植物とを交配するステップ、

b) このようにして得られた子孫において、本発明の Q T L 1、Q T L 2、および / または Q T L 3 のうちの 1 つ、2 つ、または 3 つを有する 1 つの植物を選択するステップ、

c) 任意選択により、ステップ b) で得られた植物を 1 回または数回自家受粉し、このようにして得られた子孫において、子孫の植物に存在する Q T L に応じて、果実の耐性、葉の耐性、またはその両方でもよい T B R F V に対する耐性を有する植物を選択するステップ。

10

【0113】

あるいは、本方法またはプロセスは、ステップ a) の代わりに以下のステップを含み得る：

a 1) T B R F V 耐性を付与する Q T L 1、Q T L 2、および / または Q T L 3 を有する寄託された種子 ( N C I M B 4 2 7 5 8 ) またはその子孫に対応する植物と、好ましくは上記 Q T L を欠く、最初の S . リコベルシカム植物とを交配するステップ、

a 2) 自殖によって F 1 交雑種を増殖し、F 2 集団を生成するステップ。

20

【0114】

上記の方法またはプロセスにおいて、S N P マーカーは、好ましくは、目的の耐性および / または抵抗性の表現型を付与する配列を有する植物を選択するためにステップ b) および / または c) で使用される。

【0115】

S N P マーカーは、好ましくは、本発明の 18 個の S N P マーカーのうちの 1 つ以上 ( 本出願の他の箇所で言及されるそれらのすべての組み合わせを含む ) である。

【0116】

好ましい実施形態によれば、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉耐性を有する植物の選択は、T O - 0 1 8 2 2 7 6 に基づいて、または T O - 0 1 4 2 2 9 4、T O - 0 1 4 2 3 0 3、T O - 0 1 4 2 3 0 6、T O - 0 1 8 2 2 7 6、T O - 0 1 8 1 0 4 0、T O - 0 1 2 3 0 5 7、T O - 0 1 2 5 5 2 8 のうちの少なくとも 1 つに基づいて行われる。

30

【0117】

S N P の対立遺伝子が、この S N P についての H A Z T B R F V R E S 1 親の対立遺伝子に対応する対立遺伝子であり、最初の S . リコベルシカム植物の対立遺伝子ではない場合に、1 つ以上の S N P の対立遺伝子に基づいて植物を選択することにより、最初の植物に関して、果実の耐性 / 抵抗性、葉の耐性 / 抵抗性、またはその両方でよい T B R F V に対する耐性を有するものとして植物が選択されることを理解されたい。例えば、T O - 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および / または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T が検出された場合に、本発明の改善された表現型を有するものとして、植物が選択され得る。

40

【0118】

50

好ましくは、ステップ a ) の S . リコペルシカム植物は、商業的に望ましい形質または望ましい植物栽培形質を有する植物を取得するために使用される優秀な系統である。

【 0 1 1 9 】

上記で定義された方法またはプロセスは、S . リコペルシカム植物のすべての特徴的な特徴を有する植物を取得するために、好ましくはステップ c ) の後に、戻し交配ステップを有利に含み得る。その結果、これらの特徴を有する植物の生産のための方法またはプロセスは、以下の追加のステップも含み得る：

d ) ステップ b ) または c ) で選択した抵抗性植物を S . リコペルシカム植物と戻し交配するステップ、

e ) 最初の植物に関して、本発明の Q T L 1、Q T L 2、および / または Q T L 3 のうちの 1 つ、2 つ、または 3 つを有する植物を選択するステップ。

10

【 0 1 2 0 】

ステップ a ) で使用される植物、すなわち、寄託された種子に対応する植物は、寄託された種子から成長した植物であり得る。あるいは、それは、表現型を付与する Q T L を有する、好ましくはこれらの配列をホモ接合で有する、本発明の第 1 の態様による任意の植物であり得る。

【 0 1 2 1 】

ステップ e ) において、S N P マーカーは、最初の植物に関して、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の耐性および / または抵抗性を有する植物を選択するために使用することができる。前の項目で説明したように、S N P マーカーは、本発明の S N P マーカーである。

20

【 0 1 2 2 】

好ましい実施形態によれば、本発明の方法またはプロセスは、選択ステップ、すなわち b )、c )、および / または e ) の少なくとも 1 つについては、選択が、以下の対立遺伝子：T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および / または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つの検出に基づくようにして行われる。

30

【 0 1 2 3 】

改善された表現型を有し、この表現型を付与する Q T L の 1 つ以上をホモ接合で有する植物を選択する場合、選択は、Q T L を代表する対立遺伝子、すなわち対立遺伝子 H A Z T B R F V R E S 1 親の存在について、再発 S . リコペルシカム親を代表する対立遺伝子の不存在と組み合わせて、本発明の 1 つ以上の S N P に基づいて行われることに留意されたい。

【 0 1 2 4 】

ステップ e ) で選択される植物は、好ましくは商業用の植物、特に、通常の培養条件での完熟状態で少なくとも 2 5 g、少なくとも 1 0 0 g、または少なくとも 2 0 0 g の重量を有する果実を有する植物である。

40

【 0 1 2 5 】

好ましくは、ステップ d ) および e ) は、少なくとも 2 回、好ましくは 3 回繰り返され、必ずしも同じ S . リコペルシカム植物でなくてもよい。上記 S . リコペルシカム植物は、好ましくは育種系統である。

【 0 1 2 6 】

上記で開示されたプロセスの各選択ステップにおいて、線虫の形質に対する抵抗性または T o M V に対する抵抗性をさらに選択することができる。

50

## 【0127】

自己受粉および戻し交配ステップは、任意の順序で実施することができ、間に挿入することができ、例えば、1回または数回の自家受粉の前後に戻し交配を実施することができ、1回または数回の戻し交配の前後の自家受粉を企図することができる。

## 【0128】

所望の改善された表現型を有する子孫の選択は、特に実施例に開示されているプロトコルにより、S・リコペルシカム親に由来するトマト褐色縮葉フルーツウイルス抵抗性の比較に基づいて行うこともでき、検査される抵抗性/耐性は、果実の抵抗性/耐性、もしくは葉の抵抗性/耐性、またはその両方のいずれかであり得る。

## 【0129】

対立遺伝子の検出に使用される方法は、特定の染色体上のSNPの2つの異なる対立遺伝子間の区別を可能にする任意の技術に基づくことができる。

## 【0130】

本発明はまた、そのような方法により取得されたまたは取得することができる植物にも関する。そのような植物は、実際に、本発明の第1の態様による改善された表現型を有するS・リコペルシカム植物である。

## 【0131】

本発明はまた、最初のS・リコペルシカム植物に対して、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実および/または葉の耐性および/または抵抗性に対応する所望の改善された表現型を有する商業用のトマト植物またはその近交系の親系統を取得する方法であって、以下のステップを含む方法にも関する：

a) TBRFV耐性を付与するQTL1、QTL2、および/またはQTL3を有する寄託された種子HAZTBRFVRES1 NCIMB受託番号42758またはその子孫を発芽させることにより得られた植物を商業用のS・リコペルシカム植物と戻し交配するステップ、

b) 本発明のQTL1、QTL2、および/またはQTL3のうちの1つ、2つ、または3つを有する植物を選択するステップ。

## 【0132】

好ましくは、本発明の他の方法について詳述したように、本発明の18個のSNPのうちの1つ以上に基づいて選択が行われる。

## 【0133】

本発明による本発明のすべての方法およびプロセスにおいて、最初のS・リコペルシカム植物は、確定、不確定、または半確定である。

## 【0134】

既の開示したように、本発明によるトマト植物は、好ましくは、トマトモザイクウイルス、線虫、ならびにフザリウムおよびパーティシリウムにも抵抗性である。本発明のプロセスおよび方法においてそのような植物を取得するために、育種スキームにおいて使用されるS・リコペルシカム親は、好ましくは、トマトモザイクウイルス、線虫、ならびにフザリウムおよびパーティシリウムに対する抵抗性を付与する配列を有し、選択ステップは、本発明の改善された表現型を付与するQTLに加えて、これらの抵抗性配列を有する植物を選択するように行われる。

## 【0135】

本発明はまた、上記で開示された方法およびプロセスのいずれかにより取得することができるS・リコペルシカム植物および種子に関する。そのようなS・リコペルシカムの種子は、好ましくは、植物栄養素、強化微生物(enhancing microorganism)、または種子および植物の環境を消毒するための製品などの、個々のまたは組み合わせた活性種でコーティングまたはペレット化される。そのような種および化学物質は、植物の成長を促進する製品、例えばホルモン、もしくは環境ストレスに対する抵抗性を高める製品、例えば保護刺激剤(defense stimulator)、もしくは基質およびそのすぐ周辺のpHを安定化する製品、または栄養素であってもよい。

10

20

30

40

50

## 【0136】

それらはまた、本明細書においてウイルスおよび病原性微生物を含む、若い植物の成長に好ましくない作用因子から保護するための製品、例えば、殺真菌剤 (fungicidal)、殺菌剤、殺線虫剤 (nematicidal)、殺虫剤、または除草剤であってもよく、これらは接触、摂取、またはガス拡散によって作用する。それらは、例えば任意の好適なエッセンシャルオイル、例えばタイムの抽出物である。これらの製品はすべて、植物の抵抗性反応を増強し、および/または上記植物の環境を消毒または調節する。それらは、必要であればその生存能力を確保する培地とともに、生きている生物学的材料、例えば、非病原性微生物、例えば少なくとも1つの真菌、もしくは細菌、またはウイルスであってもよく、例えばシュドモナス、パチルス、トリコデルマ、クロノスタキ、フザリウム、リゾクトニアなどの種のこの微生物は、植物の成長を刺激するか、または病原体から保護する。

10

## 【0137】

前述のすべての方法およびプロセスにおいて、TBRFVに対する果実および/または葉の耐性の原因となるQTLをホモ接合で有する植物の同定は、各QTLに関連する対立遺伝子のうちの少なくとも1つの検出だけでなく、本発明のSNPの他の対立遺伝子形態の不存在との組み合わせによっても行われ得る。したがって、本発明のQTL1をホモ接合性に有する植物の同定は、TO-0005197の対立遺伝子Tおよび/またはTO-0145581の対立遺伝子Cの同定、ならびにTO-0005197の対立遺伝子CおよびTO-0145581の対立遺伝子Tの不存在に基づく。同様に、本発明のQTL2をホモ接合で有する植物の同定は、TO-0180955の対立遺伝子Gおよび/またはTO-0196724の対立遺伝子Cおよび/またはTO-0145125の対立遺伝子Gおよび/またはTO-0196109の対立遺伝子Gの同定、ならびにTO-0180955の対立遺伝子A、TO-0196724の対立遺伝子T、TO-0145125の対立遺伝子A、およびTO-0196109の対立遺伝子Tの不存在に基づく。同様に、本発明のQTL3をホモ接合で有する植物の同定は、TO-0122252の対立遺伝子T、および/またはTO-0144317の対立遺伝子C、および/またはTO-0142270の対立遺伝子T、および/またはTO-0142294の対立遺伝子G、および/またはTO-0142303の対立遺伝子A、および/またはTO-0142306の対立遺伝子A、および/またはTO-0182276の対立遺伝子G、および/またはTO-0181040の対立遺伝子G、および/またはTO-0123057の対立遺伝子G、および/またはTO-0125528の対立遺伝子A、および/またはTO-0162432の対立遺伝子C、および/またはTO-0162427の対立遺伝子Tの同定、ならびにTO-0122252の対立遺伝子A、TO-0144317の対立遺伝子T、TO-0142270の対立遺伝子C、TO-0142294の対立遺伝子A、TO-0142303の対立遺伝子C、TO-0142306の対立遺伝子G、TO-0182276の対立遺伝子A、TO-0181040の対立遺伝子A、TO-0123057の対立遺伝子T、TO-0125528の対立遺伝子G、TO-0162432の対立遺伝子T、およびTO-0162427の対立遺伝子Cの不存在に基づく。

20

30

## 【0138】

本発明はまた、本発明者らによって本明細書に提供される情報の使用、すなわちHAZTBRFVRES1の寄託された種子に存在し、改善された表現型をS.リコペルシカム植物に付与する、3つのQTLの存在、およびこれらのQTLに関連する分子マーカーの開示にも関する。この知識は、特に、QTLの正確なマッピング、それらの配列の定義付け、改善された表現型を付与するQTLを含むトマト植物の同定、およびこれらのQTLに関連するさらなるマーカーまたは代替マーカーの同定に使用することができる。そのようなさらなるマーカーは、それらの位置、すなわち本発明で開示されている18個のマーカーに近い位置、好ましくは染色体11上の12個のSNPに由来する位置により、および本発明によって明らかにされた目的の表現型、すなわち、TBRFVに対する葉の耐性、もしくは果実の耐性、またはその両方のいずれかの耐性との関連により特徴付けられる。

40

50

## 【0139】

関連、または遺伝的関連、およびより具体的には遺伝的連鎖 (genetic linkage) により、マーカーの遺伝子多型 (すなわち SNP マーカーの特定の対立遺伝子) および目的の表現型が同時に生じること、すなわち偶然の発生によって予想されるよりも頻繁に一緒に遺伝すること、すなわち同じ染色体上での近接の結果として、対立遺伝子および表現型の原因となる遺伝子配列の非ランダムな関連があることを理解されたい。

## 【0140】

本発明の分子マーカー、上記で開示された 18 個のマーカーまたは代替マーカーのいずれか 1 つは、好ましくは減数分裂の 90 % 超、好ましくは減数分裂の 95 %、96 %、98 %、または 99 % 超において目的の表現型を伴って遺伝する。

10

## 【0141】

したがって、本発明は、トマトゲノム中の QTL を細かくマッピングまたは同定するための 1 つ以上の分子マーカーの使用に関し、上記 QTL は、ホモ接合で存在する場合に本発明の改善された表現型を S . リコペルシカム植物に付与し、上記 1 つ以上のマーカーは、以下の染色体領域：TO - 0005197 および TO - 015581 により染色体 6 上で区切られた染色体領域、TO - 0180955 および TO - 0196109 により染色体 9 上で区切られた染色体領域、TO - 0122252 および TO - 0162427 または TO - 0142270 および TO - 0125528 により染色体 11 上で区切られた染色体領域のうちの 1 つに位置するか、あるいは本発明の 18 個の SNP マーカー、すなわち、TO - 0005197、TO - 015581、TO - 0180955、TO - 0196724、TO - 0145125、TO - 0196109、TO - 0122252、TO - 0144317、TO - 0142270、TO - 0142294、TO - 0142303、TO - 0142306、TO - 0182276、TO - 0181040、TO - 0123057、TO - 0125528、TO - 0162432、および TO - 0162427 のうちの 1 つの遺伝子座から 2 メガベース単位未満に位置する。

20

## 【0142】

改善された表現型は、果実または葉の耐性のいずれかの TBRFV に対する耐性である。

## 【0143】

より具体的には果実の耐性を付与する QTL の細かいマッピングまたは同定のために、上記の 1 つ以上のマーカーは、上記で定義された染色体 6 および 9 の染色体領域に位置するか、または TO - 0005197、TO - 015581、TO - 0180955、TO - 0196724、TO - 0145125、または TO - 0196109 の遺伝子座から 2 メガベース未満に位置する。より具体的には葉の耐性を付与する QTL の細かいマッピングまたは同定のために、上記の 1 つ以上のマーカーは、上記で定義された染色体 11 の染色体領域に位置するか、または TO - 0122252、TO - 0144317、TO - 0142270、TO - 0142294、TO - 0142303、TO - 0142306、TO - 0182276、TO - 0181040、TO - 0123057、TO - 0125528、TO - 0162432、および TO - 0162427 の遺伝子座から 2 メガベース未満に位置する。

30

40

## 【0144】

好ましい実施形態によれば、上記の 1 つ以上のマーカーは、TO - 0122252 および TO - 0162427、もしくは TO - 0144317 および TO - 0125528、もしくは TO - 0142270 および TO - 0162432、もしくは TO - 0144317 および TO - 0162432、または TO - 0142270 および TO - 0125528 により区切られた染色体領域にある。

## 【0145】

上記の 1 つ以上の分子マーカーは、さらに好ましくは、0.05 以下の p 値で、以下の SNP 対立遺伝子：TO - 0005197 の対立遺伝子 T、TO - 0145581 の対立遺伝子 C、TO - 0180955 の対立遺伝子 G、TO - 0196724 の対立遺伝子 C

50

、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および / または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つと関連する。

【 0 1 4 6 】

分子マーカーは、好ましくは S N P マーカーである。それは、より好ましくは、本発明の 1 8 個の S N P のうちの少なくとも 1 つの遺伝子座から 1 メガベース未満にある。

10

【 0 1 4 7 】

Q T L は、寄託された種子 N C I M B 4 2 7 5 8 中に見出される。

【 0 1 4 8 】

p 値は、好ましくは 0 . 0 1 未満である。

【 0 1 4 9 】

本発明はまた、本発明による改善された表現型を付与する、6 番染色体上の Q T L ( リストの最初の 2 つの S N P )、染色体 9 上の Q T L ( リストの 3 番目から 6 番目の S N P )、および染色体 1 1 上の Q T L ( リストの 7 番目から最後の S N P ) に関連する、T O - 0 0 0 5 1 9 7、T O - 0 1 5 5 8 1、T O - 0 1 8 0 9 5 5、T O - 0 1 9 6 7 2 4、T O - 0 1 4 5 1 2 5、T O - 0 1 9 6 1 0 9、T O - 0 1 2 2 2 5 2、T O - 0 1 4 4 3 1 7、T O - 0 1 4 2 2 7 0、T O - 0 1 4 2 2 9 4、T O - 0 1 4 2 3 0 3、T O - 0 1 4 2 3 0 6、T O - 0 1 8 2 2 7 6、T O - 0 1 8 1 0 4 0、T O - 0 1 2 3 0 5 7、T O - 0 1 2 5 5 2 8、T O - 0 1 6 2 4 3 2、および T O - 0 1 6 2 4 2 7 の S N P マーカーのリストのうちの少なくとも 1 つの、上記 Q T L に関連する代替分子マーカーを同定するための使用にも関し、上記代替分子マーカーは、T O - 0 0 0 5 1 9 7 および T O - 0 1 5 5 8 1 により染色体 6 上で区切られた染色体領域、T O - 0 1 8 0 9 5 5 および T O - 0 1 9 6 1 0 9 により染色体 9 上で区切られた染色体領域、T O - 0 1 2 2 2 5 2 および T O - 0 1 6 2 4 2 7 によりもしくは T O - 0 1 4 2 2 7 0 および T O - 0 1 2 5 5 2 8 により染色体 1 1 上で区切られた染色体領域にあるか、または本発明の 1 8 個の S N P マーカー、すなわち T O - 0 0 0 5 1 9 7、T O - 0 1 5 5 8 1、T O - 0 1 8 0 9 5 5、T O - 0 1 9 6 7 2 4、T O - 0 1 4 5 1 2 5、T O - 0 1 9 6 1 0 9、T O - 0 1 2 2 2 5 2、T O - 0 1 4 4 3 1 7、T O - 0 1 4 2 2 7 0、T O - 0 1 4 2 2 9 4、T O - 0 1 4 2 3 0 3、T O - 0 1 4 2 3 0 6、T O - 0 1 8 2 2 7 6、T O - 0 1 8 1 0 4 0、T O - 0 1 2 3 0 5 7、T O - 0 1 2 5 5 2 8、T O - 0 1 6 2 4 3 2、および T O - 0 1 6 2 4 2 7 の遺伝子座から 2 メガベース単位未満にある。

20

30

【 0 1 5 0 】

好適な実施形態によれば、上記代替マーカーは、T O - 0 1 2 2 2 5 2 および T O - 0 1 6 2 4 2 7、もしくは T O - 0 1 4 4 3 1 7 および T O - 0 1 2 5 5 2 8、もしくは T O - 0 1 4 2 2 7 0 および T O - 0 1 6 2 4 3 2、もしくは T O - 0 1 4 4 3 1 7 および T O - 0 1 6 2 4 3 2、または T O - 0 1 4 2 2 7 0 および T O - 0 1 2 5 5 2 8 により区切られた染色体領域にある。

40

【 0 1 5 1 】

代替分子マーカーは、0 . 0 5 以下、好ましくは 0 . 0 1 未満の p 値を有する上記 Q T L と関連することが好ましい。Q T L は、寄託された種子 N C I M B 4 2 7 5 8 に見出される。

【 0 1 5 2 】

本発明は、ホモ接合で存在する場合に T B R F V に果実の耐性を付与する Q T L に関連する分子マーカーを同定するための方法であって、S N P マーカー T O - 0 0 0 5 1 9 7 および T O - 0 1 5 5 8 1 により染色体 6 上で区切られた染色体領域にあるか、もしくは S N P マーカー T O - 0 1 8 0 9 5 5 および T O - 0 1 9 6 1 0 9 により染色体 9 上で区

50



切られた染色体領域中にあるか、またはSNPマーカーTO-0005197、TO-015581、TO-0180955、TO-0196724、TO-0145125、およびTO-0196109のうちの少なくとも1つの遺伝子座から2メガベース単位未満にある、分子マーカーを同定することと、上記分子マーカーが、上記改善された表現型を示す植物から生じた分離集団においてTBRFVに対する果実の耐性に関連または連鎖するかどうかを決定することと、を含む方法にも関する。集団は、好ましくは、本発明の果実耐性を示す寄託された種子NCIMB42758またはその子孫から成長した植物から生じる。

【0153】

本発明による果実の耐性を付与する上記で言及した染色体6および9上のQTLは、HAZTBRFVRES1(NCIMB42758)に存在するQTLである。

10

【0154】

遺伝的関連または遺伝的連鎖は上記で定義したとおりである。好ましくは、関連または連鎖は、好ましくは0.05未満のp値、最も好ましくは0.01未満またはさらに少ないp値を有する。

【0155】

分子マーカーおよび抵抗性表現型は、好ましくは減数分裂の90%超、好ましくは95%超で一緒に遺伝する。

【0156】

本発明はまた、ホモ接合で存在する場合にTBRFVに対する葉の耐性を付与するQTLに関連する分子マーカーを同定するための方法であって、SNPマーカーTO-0122252およびTO-0162427によりもしくはTO-0142270およびTO-0125528により染色体11上で区切られた染色体領域中にあるか、またはSNPマーカーTO-0122252、TO-0144317、TO-0142270、TO-0142294、TO-0142303、TO-0142306、TO-0182276、TO-0181040、TO-0123057、TO-0125528、TO-0162432、およびTO-0162427のうちの少なくとも1つの遺伝子座から2メガベース単位未満にある、分子マーカーを同定することと、上記分子マーカーが、上記改善された表現型を示す植物から生じた分離集団においてTBRFVに対する葉の耐性に関連または連鎖するかどうかを決定することを含む方法にも関する。集団は、好ましくは、本発明の葉の耐性を示す寄託された種子NCIMB42758またはその子孫から成長した植物から生じる。

20

30

【0157】

本発明による葉の耐性を付与する上記で言及した染色体11上のQTLは、HAZTBRFVRES1(NCIMB42758)に存在するQTLである。

【0158】

本発明のこの態様による分子マーカーは、最も好ましくはSNPマーカーである。それらは、より好ましくは、本発明の18個のSNPのうちの少なくとも1つの遺伝子座から1メガベース未満である。

【0159】

本発明はまた、ホモ接合で存在する場合にS.リコペルシカム植物にTBRFVに対する果実の耐性を付与するQTLをゲノム中に含むトマト植物を同定または選択するための分子マーカーの使用に関し、マーカーは、SNPマーカーTO-0005197およびTO-015581により染色体6上で区切られた染色体領域に位置するか、もしくはSNPマーカーTO-0180955およびTO-0196109により染色体9上で区切られた染色体領域に位置するか、またはSNPマーカーTO-0005197、TO-015581、TO-0180955、TO-0196724、TO-0145125、およびTO-0196109のうちの少なくとも1つの遺伝子座から2メガベース単位未満に位置し、上記分子マーカーは、0.05以下、好ましくは0.01以下のp値で、以下のSNP対立遺伝子：TO-0005197の対立遺伝子T、TO-0145581の対立遺伝子

40

50

C、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、および T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G のうちの少なくとも 1 つと関連する。Q T L がホモ接合で存在する場合に T B R F V 表現型に対する果実の耐性が付与される。

【 0 1 6 0 】

本発明はまた、ホモ接合で存在する場合に S . リコペルシカム植物に対する T B R F V に対する葉の耐性を付与する Q T L をゲノム中に含むトマト植物を同定または選択するための分子マーカーの使用にも関し、マーカーは、S N P マーカー T O - 0 1 2 2 2 5 2 および T O - 0 1 6 2 4 2 7 により染色体 1 1 上で区切られた染色体領域に位置するか、または S N P マーカー T O - 0 1 2 2 2 5 2、T O - 0 1 4 4 3 1 7、T O - 0 1 4 2 2 7 0、T O - 0 1 4 2 2 9 4、T O - 0 1 4 2 3 0 3、T O - 0 1 4 2 3 0 6、T O - 0 1 8 2 2 7 6、T O - 0 1 8 1 0 4 0、T O - 0 1 2 3 0 5 7、T O - 0 1 2 5 5 2 8、T O - 0 1 6 2 4 3 2、および T O - 0 1 6 2 4 2 7 のうちの少なくとも 1 つの遺伝子座から 2 メガベース単位未満に位置し、上記分子マーカーは、0 . 0 5 以下、好ましくは 0 . 0 1 以下の p 値で、以下の S N P 対立遺伝子：T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および / または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つと関連する。Q T L がホモ接合で存在する場合に T B R F V 表現型に対する葉の耐性が付与される。

【 0 1 6 1 】

この実施形態に従って使用される分子マーカーは、特に、上記で開示されている、さらなるまたは代替の分子マーカーを同定するための方法によって得ることができる。分子マーカーは、好ましくは、S N P マーカーである。それらは、より好ましくは、本発明の 1 8 個の S N P のうちの少なくとも 1 つの遺伝子座から 1 メガベース未満にある。

【 0 1 6 2 】

さらに別の態様によれば、本発明はまた、T B R F V 感染に対する抵抗性または耐性に関連する少なくとも 1 つの遺伝子マーカーの存在について、植物、好ましくは S . リコペルシカム植物またはトマト生殖質の遺伝子型を解析する方法にも関し、該方法は、検査される植物のゲノム中において、本発明のマーカーの少なくとも 1 つを含むまたは上記で開示された代替分子マーカーの少なくとも 1 つを含む核酸の決定または検出することを含む。好ましくは、該方法は、検査される目的の植物の試料において、T O - 0 0 0 5 1 9 7 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 5 5 8 1 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 8 0 9 5 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 7 2 4 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 5 1 2 5 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 9 6 1 0 9 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および / または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T のうちの少なくとも 1 つを含む核酸中の T B R F V に対する抵抗性 / 耐性に関連する特定の配列を同定するステップを含む。より好ましくは、該方法は、検査される植物の試料において、T O - 0 1 2 2 2 5 2 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 4 3 1 7 の対立遺伝子 C、T O - 0 1 4 2 2 7 0 の対立遺伝子 T、T O - 0 1 4 2 2 9 4 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 4 2 3 0 3 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 4 2 3 0 6 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 8 1 0 4 0 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 3 0 5 7 の対立遺伝子 G、T O - 0 1 2 5 5 2 8 の対立遺伝子 A、T O - 0 1 6 2 4 3 2 の対立遺伝子 C、および / または T O - 0 1 6 2 4 2 7 の対立遺伝子 T を含む核酸中の T B R F V に対

する抵抗性に関連する特定の配列を検出することを含む。

【0163】

この方法の最も好ましい実施形態によれば、該方法は、検査植物において、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G を含む核酸の存在を検出することを含む。

【0164】

S N P の特定の対立遺伝子の検出は、当業者である読み手に周知である任意の方法によって行うことができる。

【0165】

本発明の抵抗性植物が T B R F V 感染によって引き起こされる損傷を制限する能力を考慮すると、該植物は、T B R F V に外寄生された環境または T B R F V に外寄生されたもしくは感染している可能性のある環境で有利に成長する。これらの条件では、本発明の抵抗性または耐性植物は、易感染性の植物よりも市場性の高いトマトを生産する。したがって、本発明は、本発明の前述の態様により定義され、上記植物に T B R F V に対する抵抗性または耐性を付与する、染色体 6、染色体 9、および / または染色体 1 1 上の Q T L をゲノム中にホモ接合で含むトマト植物を成長させることを含む、T B R F V に感染した環境におけるトマト植物の収量を改善するための方法にも関する。好ましくは、該方法は、目的の Q T L の 1 つ以上をホモ接合で有するトマト植物を選別または選択する第 1 のステップを含む。該方法は、トマト畑、通路、または温室の生産性を向上させる方法として定義することもできる。

10

【0166】

一実施形態によれば、該方法は、T B R F V に対する葉の抵抗性を付与する上記で定義された染色体 1 1 上の Q T L 3 を含むトマト植物を成長させることを含む。

20

【0167】

本発明はまた、上記で定義されたトマト植物を成長させることを含む、T B R F V 外寄生または感染の状態におけるトマト生産の損失を低減するための方法にも関する。

【0168】

これらの方法は、畑、通路、または温室におけるトマト植物の集団に特に価値がある。

【0169】

あるいは、トマト生産の収量を改善するまたは損失を低減する上記方法は、T B R F V に抵抗性 / 耐性であり、植物に T B R F V に対する抵抗性または耐性を付与する染色体 6、9、および / または 1 1 上の Q T L をゲノム中に含むトマト植物を同定し、次いで、ウイルスに外寄生されたまたは外寄生される可能性のある環境で上記耐性または抵抗性植物を成長させる、第 1 のステップを含み得る。好ましくは、植物は、本発明により定義され、ホモ接合で存在する場合に T B R F V に対する葉の耐性を付与する染色体 1 1 上の Q T L を含む。好ましい実施形態によれば、第 1 のステップで同定される植物は、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G を含む。

30

【0170】

本発明の抵抗性植物はまた、T B R F V の増殖を制限することもでき、したがって、さらなる植物の感染およびウイルスの増殖を制限する。したがって、本発明はまた、畑、通路、もしくは温室、または他の任意の種類の栽培地を T B R F V 外寄生から保護する方法、あるいは上記畑、通路、または温室の T B R F V による外寄生レベルを少なくとも制限する方法、あるいは畑、通路、温室、特にトマト畑での T B R F V の拡散を制限する方法にも関する。そのような方法は、好ましくは、本発明の抵抗性または耐性植物、すなわち、T B R F V に対する抵抗性または耐性を植物に付与する染色体 6、9、および / または 1 1 上の Q T L をホモ接合でゲノム中に含む植物を成長させるステップを含む。使用される本発明の植物は、好ましくは染色体 1 1 上の Q T L 3 を含み、より好ましくは、植物は、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G を示す。

40

【0171】

好ましくは、該方法は、目的の Q T L、特に染色体 1 1 上の Q T L 3 をホモ接合で有するトマト植物を選別または選択する第 1 のステップを含む。

50

## 【 0 1 7 2 】

本発明はまた、畑、通路、もしくは温室、または他の栽培地における T B R F V の外寄生または感染を制御するための T B R F V に抵抗性または耐性の植物の使用にも関する。そのような植物は、それぞれ、上記で定義された染色体 6、9、および 11 上の Q T L 1、Q T L 2、および / または Q T L 3 のうちの少なくとも 1 つをゲノム中にホモ接合で含む本発明の植物である。したがって、この使用によれば、本発明の植物は、畑、通路、または温室を T B R F V の外寄生から保護するために使用される。使用される本発明の植物は、好ましくは染色体 11 上の Q T L 3 を含み、より好ましくは、それらは、T O - 0 1 8 2 2 7 6 の対立遺伝子 G を示す。

## 【図面の簡単な説明】

10

## 【 0 1 7 3 】

【図 1】図 1 は、H A Z 1 x H A Z 2 の F 2 集団に基づく果実の T B R F V 抵抗性に関連する Q T L の p 値プロットを示す。この図は、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実の耐性および / または抵抗性に関する二親性マッピング集団 (H A Z 1 x H A Z 2、実施例 4 を参照のこと) のマッピング結果を示すマンハッタンプロットである。縦軸 (y 軸) は、 $-\log_{10}(p \text{ 値})$  を示し、横軸 (x 軸) は、物理マップに沿った染色体ごとの位置 (物理的距離 b p) によってすべての S N P を表す。

【図 2】図 2 は、H A Z 1 x H A Z 2 の F 2 集団に基づく葉の T B R F V 抵抗性に関連する Q T L の p 値プロットを示す。この図は、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の耐性および / または抵抗性に関する二親性マッピング集団 (H A Z 1 x H A Z 2、実施例 4 を参照のこと) のマッピング結果を示すマンハッタンプロットである。縦軸 (y 軸) は、 $-\log_{10}(p \text{ 値})$  を示し、横軸 (x 軸) は、物理マップに沿った染色体ごとの位置 (物理的距離 b p) によってすべての S N P を表す。

20

【図 3】図 3 は、H A Z 3 x H A Z 4 の F 2 集団に基づく葉の T B R F V 抵抗性に関連する Q T L の p 値プロットを示す。この図は、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の耐性および / または抵抗性に関する二親性マッピング集団 (H A Z 3 x H A Z 4、実施例 6 を参照のこと) のマッピング結果を示すマンハッタンプロットである。縦軸 (y 軸) は、 $-\log_{10}(p \text{ 値})$  を示し、横軸 (x 軸) は、物理マップに沿った染色体ごとの位置 (物理的距離 b p) によってすべての S N P を表す。

## 【実施例】

30

## 【 0 1 7 4 】

実施例 1 : トマト褐色縮葉フルーツウイルスの収集および同定 :

本発明者らは、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに感染した、イスラエルの異なる生産地域 (北、中央、および南イスラエル) 由来の異なる分離株の収集物を作成した : 7 つの異なる分離株を収集し、S a l e m らによって記載されたプロトコルに従って分析した。ヨルダンのトマト褐色縮葉フルーツウイルスとの配列比較により、イスラエルの分離株がすべて、ヨルダンの分離株と同一であることが示され、同じウイルスが両国に存在することを確認した。

## 【 0 1 7 5 】

実施例 2 : 抵抗性の同定

40

本発明者らは、イスラエルの主要なトマト作物生産地域であるイスラエル南部の B s o r 地域にある自然感染した温室中でトマト育種遺伝物質をスクリーニングした。約 4 4 3 の異なるトマトをスクリーニングした。各トマトを温室中の異なる場所に、1 反復あたり 10 の植物で、2 反復で植え付けた。

## 【 0 1 7 6 】

温室中の各列は 120 の植物を含んだ。各列に、易感染性の系統対照として 10 の植物を植え付けた。対照を温室中の異なる場所に広げるために、温室中の異なる列に沿って斜めに対照を配置した。

## 【 0 1 7 7 】

このスクリーニングでは、少数のトマトが、葉の T B R F V 症状を示さず、果実の T B

50

R F V 症状をほとんど示さなかった。これらのうち、2つの症状のないトマトおよび2つの易感染性のトマトを次の段階のために選択した。

【0178】

これらの実験の結果を表1に示す。選択された2つの易感染性のトマトは、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに易感染性であるとみなされる意味で、441の易感染性のトマトを代表している。

【0179】

H a z e r a 第1号(またはH A Z 1)は、約170grの規則的で丸くて暗赤色の果実を有する、ルーズ(loose)タイプの不確定トマトである。植物は、暗緑色の葉を有し、パーティシリウム・ダーリエ(*Verticillium dahlia*)、サツマイモ・ネコブセンチュウ(*Meloidogyne incognita*)、トマト黄化葉巻ウイルス(*Tomato yellow leaf curl virus*)、およびステムフィリウム・ソラニ(*Stemphylium solani*)に対して抵抗性である。

【0180】

H a z e r a 第2号(またはH A Z 2)は、約280grの規則的かつ中程度で扁平性の濃い暗赤色の果実を有する、ビーフ(beef)タイプの不確定トマトである。この植物は、パーティシリウム・ダーリエ、フザリウム・オキシスポラム・f・エスピー・リコペルシシ1,2(*Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* 1,2)、トマトモザイクウイルス、フルビア・フルバ(*Fulvia fulva*)、サツマイモ・ネコブセンチュウ、トマト黄化壊疽ウイルス(*Tomato spotted wilt virus*)に対して抵抗性である。

【0181】

H a z e r a 第3号(またはH A Z 3)は、約270grの中程度で扁平性の赤い果実を有する、ビーフタイプの不確定トマトである。この植物は、トマト黄化壊疽ウイルス、パーティシリウム・ダーリエ、フザリウム・オキシスポラム・f・エスピー・リコペルシシ1,2、およびステムフィリウム・ソラニに対して抵抗性である。

【0182】

H a z e r a 第4号(またはH A Z 4)は、約180grの丸くて赤い果実を有する、ミニビーフ(minibeef)タイプの不確定トマトである。この植物は、トマトモザイクウイルス、トマト黄化葉巻ウイルス、クラドスポリウム・フルヴム(*Cladosporium fulvum*) (CF9)、パーティシリウム・ダーリエ、およびフザリウム・オキシスポラム・f・エスピー・リコペルシシ1,2に対して抵抗性である。

【0183】

【表1】

表1：TBRFVに対する抵抗性について検査した植物：

トマト	植物の総数	TBRFV葉および果実症状のない植物の数	有意なTBRFV葉および果実症状を有する植物の数	結果
Hazera第1号	20	20	0	耐性/抵抗性
Hazera第2号	20	0	20	易感染性
Hazera第3号	20	20	0	耐性/抵抗性
Hazera第4号	20	0	20	易感染性

【0184】

実施例3：抵抗性の確認

耐性/抵抗性表現型の基礎をなす遺伝学をよりよく理解し、1回目のスクリーニングで同定されたリードを検証するために、本発明者らは、1回目のスクリーニングの条件と同様の条件下で2回目のスクリーニングを行った：自然感染下の温室中の各列は120の植物を含み、各列において、易感染性の対照(10の植物)を植え付けた。対照を温室中の異なる場所に広げるために、対照を温室中の異なる列に沿って斜めに配置した。

【0185】

1 回目のスクリーニングで同定された抵抗性トマトに加えて、抵抗性植物と易感染性系統との交配から得られた F 1 および F 2 が検査に含まれた。

【 0 1 8 6 】

表 2 は、葉の評価に関する 2 回目のスクリーニングの結果を示す。芽の頂点にいくらかのモザイクおよび擦れがあり次第、植物を易感染性とみなした。耐性 / 抵抗性植物は、芽の頂点に症状がない。

【 0 1 8 7 】

【 表 2 】

表 2 : 2 回目のスクリーニングの葉の評価

トマト	植物の総数	T B R F V 葉症状のない植物の数	有意な T B R F V 葉症状を有する植物の数	結果
Hazera 第 1 号	20	20	0	耐性 / 抵抗性
Hazera 第 2 号	20	0	20	易感染性
F1 Hazera 第 1 号 x Hazera 第 2 号	20	0	20	易感染性
F2 Hazera 第 1 号 x Hazera 第 2 号	247	60	187	分離
Hazera 第 3 号	20	20	0	耐性 / 抵抗性
Hazera 第 4 号	20	0	20	易感染性
F1 Hazera 第 3 号 x Hazera 第 4 号	20	0	20	易感染性
F2 Hazera 第 3 号 x Hazera 第 4 号	248	63	185	分離

10

20

30

40

50

【 0 1 8 8 】

F 1 および F 2 植物の表現型解析データは、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の耐性および / または抵抗性が単一の遺伝子または Q T L によって劣性様式で制御されることを示す傾向がある。

【 0 1 8 9 】

表 3 は、果実の評価に関する 2 回目のスクリーニングの結果を示す。植物は 1 ~ 4 の尺度で評点付けされ、それにより、1 ~ 3 の評点を有する植物は易感染性とみなされ、等級 1 の植物については、典型的な果実病変の重篤な症状およびいくつかの果実の変形を有し、等級 2 の植物については、いくつかの果実のみでの中程度の病変を有し、3 は軽い症状を有する。3 . 5 および 4 の植物、すなわち果実に症状がない植物のみを抵抗性とみなす。

【 0 1 9 0 】

【 表 3 】

表 3 : 2 回目のスクリーニングの果物の評価

系統	植物の総数	果実の症状の評点付けした植物の数						結果
		1	1.5	2	2.5	3	3.5	
Hazera 第 1 号	20	0	0	0	0	0	20	耐性
Hazera 第 2 号	20	20	0	0	0	0	0	易感染性
F2 Haz1 x Haz2	238	101	28	21	12	21	55	分離

## 【0191】

F2植物の表現型解析データは、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実の耐性および/または抵抗性が、少数の、1つまたは2つのQTLにより劣性様式で制御されることを示す傾向がある。

## 【0192】

実施例4：遺伝子マッピングの関連付け分析

トマト植物Hazer a第1号およびHazer a第2号を使用して、F2二親性マッピング集団を構築した。トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する抵抗性表現型（果実および葉）を示すトマト植物Hazer a第1号を、易感染性植物と交配してF1を作成し、その後、これを使用してF2分離集団を生成した。Hazer a第3号およびHaze 10  
r a第4号に基づく検証（葉のQTL）に使用される追加の二親性集団を同じ方法で作成した（実施例6を参照のこと）。

## 【0193】

DNA抽出：製造業者の手順に従って、NucleoMag（登録商標）植物キット（Macherey-Nagel）を使用して、擦りつぶした葉からDNAを抽出した。DNA精製は、植物組織からゲノムDNAを単離するための磁気ビーズ技術に基づいた。NanoDrop分光光度計を用いて、DNA濃度を定量化した。

## 【0194】

F2集団（Hazer a第1号およびHazer a第2号に基づく）の遺伝子型解析は、トマトについての約9500個のSNPを含む特注のAffymetrix Axi 20  
omチップアレイ（多重遺伝子型解析技術）を使用して行った。

## 【0195】

トマトSNPマーカーは、パブリックドメイン、LVSプロジェクト、およびコラボレーションを含む異なる情報源から選択および発見された。すべてのSNPを事前スクリーニング（他の技術での従前の経験）で検証し、以下に従って選択した：

- ・多型/対立遺伝子頻度
- ・表現ワールドワイドバリエーション（Representing world wide variation）
- ・SNPクラスターの除去
- ・物理的マップ距離に従って均等に配置されたSNP
- ・ヘテロクロマチン（動原体周辺（pericentromeric））領域での低い表現 - 高LD。

Affymetrix Axiomチップアレイでの遺伝子型解析を、製造業者が推奨する標準プロトコルを使用して行った。手順には、以下のステップ：DNA増幅、断片化、沈殿、再懸濁およびハイブリダイゼーション調製、チップへのハイブリダイゼーション、洗浄、ライゲーション、染色、ならびに走査が含まれる。最後の2つのステップは、AffymetrixのGeneTitan機器によって行われる。分析は、Affymetrixが開発したクラスタリングの自動アルゴリズムによって行われる。

## 【0196】

混合線形モデルの関連付け（mixed linear model association）を、果実および葉の症状の両方に対して独立して使用した。

## 【0197】

マッピングの結果により、染色体11上に位置する、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の耐性および/または抵抗性に関連する1つの候補QTL、およびトマト染色体6および染色体9に位置する、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実の耐性および/または抵抗性に関連する2つの候補QTLが明らかとなった。

## 【0198】

トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉および/または果実の耐性および/または抵抗性のための様々なQTLと有意に関連するマーカーおよびトマトゲノム上のそれらの位置を表4に纏めている。表5および本出願の添付の配列表部分において、隣接配列を含むSNPの配列を報告する。

## 【0199】

10

20

30

40

50

結果により、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実の耐性および／または抵抗性の原因となる１つのＱＴＬ（本発明のＱＴＬ１）が、染色体６上において位置３３９３２４３８と位置３３９３３９０５との間に位置し、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実の耐性および／または抵抗性の原因となる第２のＱＴＬ（本発明のＱＴＬ２）が、染色体９上において位置４８００６８０と位置５９０１４５４０との間に位置することが示され、ゲノム上のそのような物理的位置はトマトゲノムのバージョン２．４０に基づいている（Bombarely 2011）。染色体９の領域は、組換え率の低い領域である。

#### 【０２００】

染色体６の領域は移入が起こりやすい領域であり、いくつかの目的の遺伝子はこの領域に既にマッピングされており、特に、*S. リコペルシコイデス* (*S. lycopersicoides*)、*S. ペネリー* (*S. pennellii*) および *S. ピンピネリホリウム* (*S. pimpinellifolium*) 由来の塩耐性に関する遺伝子の移入 (Li et al, *Euphytica* (2011) 178: 403)、*S. ハプロカイトス* (*S. habrochaites*) および *S. ネオリキー* (*S. neorickii*) 由来のうどんこ病の抵抗性に関する遺伝子の移入 (Seifi et al, *Eur J Plant Pathol* (2014) 138: 641)、およびペピーノモザイクウイルスに関する遺伝子の移入 (WO 2013 / 064641) がある。

10

#### 【０２０１】

結果により、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の耐性および／または抵抗性の原因となるＱＴＬが、染色体１１上において位置９５４８０２９と位置１００１５４７８との間に位置することが示され、ゲノム上のそのような物理的位置はトマトゲノムのバージョン２．４０に基づいている（Bombarely 2011）。

20

#### 【０２０２】

葉の抵抗性の原因となる染色体１１上のＱＴＬをより良好に特徴付けるために、追加のマーカーを用いてさらなる分析を行った。結果を表６に示し、SNPの配列を表５および７に報告する。

#### 【０２０３】

これらの追加の結果により、染色体１１についての $p$ 値および $R^2$ 値に基づいてならびにこれらの値の変動に基づいて、トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の耐性の原因となるＱＴＬが、染色体１１上においてSNPTO - 0122252とTO - 0162427との間、すなわち位置8090264と位置10018811との間に広く位置していたと定義することができ、ゲノム上のそのような物理的位置はトマトゲノムのバージョン２．４０に基づいている。より広い定義のＱＴＬ遺伝子座に隣接するSNPTO - 0122252およびTO - 0162427は、表６においてアスタリスク（\*）によって示されている。染色体１１上のより狭い定義のＱＴＬの位置は、SNPTO - 0142270およびTO - 0162432によって定義される領域である。より狭い定義の遺伝子座のこれらの隣接マーカーは、表６の(\*\*)によって示されている。葉の抵抗性／耐性を付与するＱＴＬとより有意な関連を有するSNPは、表６の(+)によって示され、すなわちTO - 0181040、TO - 0123057、およびTO60125528である。

30

#### 【０２０４】



【表 4】

表 4：易感染性植物に見出された SNP、その位置、および対立遺伝子（示されている 1 番目のヌクレオチド：S 対立遺伝子）対耐性／抵抗性に関連するマーカーの対立遺伝子（示されている 2 番目のヌクレオチド：T 対立遺伝子）のリスト

SNP	R <sup>2</sup>	P値	染色体	位置 SL2.40	S/T 対立遺伝子
T0-0005197	0,33402601	5,61E-08	6	33932438	C/T
T0-0145581	0,33402601	5,61E-08	6	33933905	T/C
T0-0180955	0,33863743	1,68E-11	9	4800680	A/G
T0-0196724	0,351965936	4,96E-12	9	5203457	T/C
T0-0145125	0,347544015	6,03E-12	9	40025769	A/G
T0-0196109	0,33402601	2,09E-11	9	59014540	T/G
T0-0182276			11	9548029	A/G
T0-0181040	0,848753	2,35E-50	11	9797143	A/G
T0-0123057	0,8477487	5,33945E-51	11	9825111	T/G
T0-0125528	0,8477487	5,33945E-51	11	9837711	G/A
T0-0162432	0,7216998	8,88E-34	11	10015478	T/C

10

20

【 0 2 0 5 】

【表 5】

表5 SNPの配列

	配列 番号	SNPの配列：トマト褐色縮葉フルーツウイルス耐性または抵抗性に関連する対立遺伝子は、括弧中の2番目に示されている
TO-0005197	1	GTGGGACCAAGAAACCATATTTGGTAACGGGTTGAGTTGCTGCCTGAAC CTTTAGCCC [C/T]TTGCAATATTTGTGAAGTGATATTCCTTTGTGTTATTAA TAATTTTCGTTTTGAGTTTT
TO-0145581	2	TTCAGAGAGCAACACTCCTGCAAGACCAACTCGGAGTAATTCAGTAACT CGACCTTCAT [T/C]TCTAGCTCTCAGTATAGTACTTACTCAAATAAATCA GGCTCTATTCTAAACACAAGCTCT
TO-0180955	3	TTCCGAAATGAGGACGATCCATCAGCTTCTTCAGCTGAGAGCCCCTGG TC[A/G]ACATACCAGAATTCTGTTTTCTAAACTGTCCAAAATCTCCTGT AAAGA
TO-0196724	4	GATTTGAATGCCTTGCCACAGCCAGAGGATGACGA [T/C]GAGATTTTT GGACAACAATTAGAAGATGAACCACA
TO-0145125	5	AGAGAATGATCACTGCCTTAGTTTCTCAATTAAGTTGTGCAAAA ACAAAACACACA [A/G]CTAGATGAAGAAAACAGAGCATTGCGCTCAA AGCTTCAGACAAAAGAAGTTGAGAACAAC
TO-0196109	6	TACAATACCTTCTGGCATCCCTTTCGCAAAACGA [T/G]AGATCTTTAG TATCAAACCGAGAGCACTGTCACC
TO-0182276	13	CTCCTATTGAACATCCTGAAAACCTTGTGTCTACATCATGAGAAGATGCA GGCCAATTC [A/G]CTCAGTACATGGAATGCACGAGCATGTTAGGGGA ATTCTAACGCAAAGCATAAGCTTGATACTTGAATAAAGATGAAACAT ACTTACTTCTTCTCAAACT
TO-0181040	14	CTCTTGGTGACAAACCACTGGCTCAATTTCTTCGCGAAGCTAAAG CTATC [A/G]CTGATGAGCTTGTACGGCAGGCACACGTGTCTCCTGATG AATTCAATGC
TO-0123057	15	CATTACTGTTGAGATATCTCATCGGCAACCCCTGGAGCTTGCCAC CCGC [T/G]TGTCTCCAGGATCTGATTTCAGAAAGGATGAATAGTAACTGT GTTTCAG
TO-0125528	16	CAAGAACCCAAACGACTTCTTCTTCTTTGCTTATTGAAAACTTGGT TTTGAAATGAAAGG [G/A]ATCGAGAAATTGGATACTCAGTGGTTCTCTAC TACTAAACCTTCTCCTGATTTTAAGAAA
TO-0162432	17	TGATCGACAATTCTTGTGTTGTTGAAACTCTGCAAGTGAGAGAGGGATG [T/C]ATATAG AGAAAGGATATTGGTAAAGGACAATTCTAGAAGGGTCTA GGGAA

【表 6】

表 6：追加の隣接マーカー H A Z 1 の F 2 集団に基づく葉の抵抗性をマッピングする関連付け分析。易感染性植物に見出される対立遺伝子（S 対立遺伝子）および耐性／抵抗性に関連するマーカーの対立遺伝子（示されている 2 番目のヌクレオチド：T 対立遺伝子）を報告する。

SNP	R <sup>2</sup>	P 値	染色体 11 上の位置 SL2.40	隣接マーカー	S/T 対立遺伝子
T0-0122252	0.7758002	1.16E-40	8090264	*	A/T
T0-0144325	0.8101493	9.62E-45	8140310		
T0-0144322	0.8001583	1.10E-42	8163278		
T0-0144317	0.8051598	2.07E-44	8334467		
T0-0101684	0.8051598	2.07E-44	8345699		
T0-0197358	0.8051598	2.07E-44	8357644		
T0-0144313	0.8051598	2.07E-44	8410749		
T0-0144309	0.8249175	1.65E-46	8412924		
T0-0144308	0.8051598	2.07E-44	8414574		
T0-0144303	0.8051598	2.07E-44	8419932		
T0-0121816	0.797688	2.30E-42	8626324		
T0-0142268	0.7613548	5.39E-39	8631287		
T0-0142270	0.8064465	1.37E-44	8633469	**	C/T
T0-0142294	0.8474345	6.06E-51	8764030		
T0-0142299	0.8474345	6.06E-51	8891489		
T0-0142301	0.8474345	6.06E-51	8900707		
T0-0142302	0.8474345	6.06E-51	8902922		
T0-0142303	0.8474345	6.06E-51	8903092		
T0-0142305	0.8474345	6.06E-51	8963512		
T0-0142306	0.8474345	6.06E-51	9318832		
T0-0142307	0.8474345	6.06E-51	9318930		
T0-0162436	0.7855676	7.54E-41	9789608		
T0-0181040	0.848753	2.35E-50	9797143	+	A/G
T0-0123057	0.8477487	5.34E-51	9825111	+	T/G
T0-0125528	0.8477487	5.34E-51	9837711	+	G/A
T0-0162432	0.7216998	8.88E-34	10015478	**	T/C
T0-0162427	0.7459438	2.53E-37	10018811	*	C/T

【 0 2 0 7 】

【表 7】

表 7：追加の S N P の配列

	配列 番号	S N P の配列：T B R F V 耐性または抵抗性に関連する対立遺伝子 は、括弧中の 2 番目に示されている
T0-0122252	7	ATGGCAATAGTGAAGTGCAGATACAACTGAAATTGCAGAACACCCTTAA[A/T]ATAGAATC AATAGAAAGTTGCAACAATATTTGAATGATGAAGCAACAAAG
T0-0142270	9	AACACCAGGTAGAGAGCACAGCGAAACAATGGCCTCAGGAAGATCTACTT[C/T]GCGAAGTG CAGCAAGCCACTCCATACCTCCACCAGGCTTTGATTTCAGTG
T0-0162427	18	GCACCAGTTATAGTAATGTCTGCTTCTTTCTGTACCCTTATCAGTAGC[C/T]GTGACAGA AAGAATACCGTTGGTGTCAATGTGGAAGTTCACCTCAATCTG

10

## 【0208】

実施例 5：マーカーのさらなる検証

T B R F ウイルスに対する葉の耐性と最も関連する 1 つマーカーが、抵抗性遺伝子に近い候補マーカーである Q T L 3 領域の端において定義された。この S N P は、S N P m o n o p l e x K A S P a r 技術向けに設計された：検証に使用される K A S P a r アッセイを、K B i o s c i e n c e ( L G C G r o u p 、テディントン、ミドルセックス、英国)の K A S P 法に基づいて行った。

20

## 【0209】

L G C のプライマーピッカー (primer picker) ソフトウェアを使用して、K A S P S N P アッセイ用のプライマーを設計した。S N P により、S N P アッセイごとに、2 つの対立遺伝子特異的フォワードプライマーおよび 1 つの一般的なリバースプライマーを設計した。K A S P 遺伝子型解析アッセイは、競合的対立遺伝子特異的 P C R に基づいており、特定の遺伝子座における S N P の二重対立遺伝子 (bi-allelic) 評価付けを可能にする。要約すると、S N P 特異的 K A S P アッセイミックス (KASP assay mix) およびユニバーサル K A S P マスターミックス (KASP Master mix) を D N A 試料に添加し、次いで熱サイクリング反応を行い、続いてエンドポイント蛍光読み取りを行った。二重対立遺伝子の識別は、2 つの対立遺伝子特異的フォワードプライマーの競合的結合によって達成され、それぞれ、2 つのユニバーサル F R E T (蛍光共鳴エネルギー移動) カセットに対応する特有のテール (tail) 配列を有し、そのうちの 1 つが F A M (商標) 色素で標識され、他方が V I C (商標) 色素で標識されている (L G C、www.lgcgroup.com)。

30

## 【0210】

3 μ l の体積の D N A を黒色の 384 ウェル h a r d s h e l l P C R プレートにピペットで入れ、室温で乾燥させた。遺伝子型解析を行った際、製造元のプロトコル (K B i o s c i e n c e) に従って、3 μ l の P C R ミックスを添加することにより D N A を懸濁した。遺伝子型解析 P C R の結果をソフトウェア K l u s t e r C a l l e r (K B i o s c i e n c e) を使用して分析した。本研究で使用されたマーカーは、T O - 0182276 (配列番号 13) である。

40

## 【0211】

H A Z 3 × H A Z 4 F 2 集団 (表 2) をこのマーカー検証に使用した。F 2 植物の遺伝子型解析をこのマーカーを使用して行い、実施例 3 に記載した葉の症状について表現型解析も行った。関連性は、251 の植物のデータに基づき、100% であった。

## 【0212】

葉の症状の表現型解析および候補マーカーの遺伝子型解析の要約データを表 8 に示す。R マーカーは、抵抗性 / 耐性対立遺伝子に対してホモ接合であることを意味し、S マーカーは、易感染性対立遺伝子に対してホモ接合であることを意味し、H マーカーは、2 つの対立遺伝子からなるヘテロ接合を意味する。

50

【 0 2 1 3 】

【 表 8 】

表 8 :

	植物の数	葉の T B R F V 耐性又は 抵抗性症状を有する植物の数	葉の T B R F V 易感染性症状を 有する植物の数
R マーカー	67	67	0
S マーカー	62	0	62
H マーカー	122	0	122

10

【 0 2 1 4 】

実施例 6 : 遺伝子マッピングのための関連付け分析

トマト植物 H a z e r a 第 3 号および H a z e r a 第 4 号を使用して、F 2 二親性マッピング集団を構築した。トマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する葉の抵抗性表現型を示すトマト植物 H a z e r a 第 3 号を易感染性の植物 H a z e r a 第 4 号と交配して F 1 を作成し、その後、これを使用して F 2 分離集団を生成した。

【 0 2 1 5 】

H A Z 1 および H A Z 2 を使用して、交配、表現型解析、および関連付けを実施例 4 に記載されるように行った。

20

【 0 2 1 6 】

表 9 に詳細に示され、図 3 に示されるように、葉の抵抗性のための Q T L および最も重要な関連を有するマーカーを染色体 1 1 上において同定した。

【 0 2 1 7 】

実施例 4 のように、Q T L を含むより広い定義の遺伝子座は、表 9 中のアスタリスクの付いている隣接マーカー、すなわち S N P T O - 0 1 2 2 5 2 および T O 0 1 6 2 4 2 7 によって定義される。これらの S N P は、他の耐性の供給源、すなわち H A Z 1 で得られた結果から推定される、より広い定義の Q T L 位置に隣接するものと同じである。この点は、葉の耐性のための Q T L が H A Z 1 および H A Z 3 では同じであるという結論を強く裏付けている。

30

【 0 2 1 8 】

H A Z 1 は、受託番号 4 2 7 5 8 で N I C M B に寄託された種子 H A Z T B R F V R E S 1 に対応する。

【 0 2 1 9 】

H A Z 3 集団についての結果から推定される、より狭い定義の Q T L の遺伝子座は、染色体 1 1 上の隣接マーカーである T O - 0 1 4 4 3 1 7 および T O - 0 1 2 5 5 2 8 ( 表 9 中のマーカー \* \* ) によって定義される。T B R F V 葉耐性 / 抵抗性と最も有意な関連を有するマーカーは、( + ) で示されたマーカー、すなわち T O - 0 1 4 2 3 0 3 、 T O - 0 1 4 2 3 0 6 、および T O 6 0 1 4 2 2 9 4 である。

【 0 2 2 0 】

40

【表 9】

表 9：易感染性の植物に見出される追加の SNP、その位置、および対立遺伝子（示されている 1 番目のヌクレオチド：S 対立遺伝子）対耐性／抵抗性に関連するマーカーの対立遺伝子（示されている 2 番目のヌクレオチド：T 対立遺伝子）のリスト

SNP	R <sup>2</sup>	P値	染色体11上の位置 SL2.40	隣接マーカー	S/T対立遺伝子
TO-0122252	0.81927235	1.55E-60	8090264	*	A/T
TO-0144317	0.854230073	6.90E-69	8334467	**	T/C
TO-0142303	0.884698061	3.46E-77	8903092	+	C/A
TO-0142305	0.884698061	3.46E-77	8963512		
TO-0142306	0.884698061	3.46E-77	9318832	+	G/A
TO-0142307	0.884698061	3.46E-77	9318930		
TO-0142294	0.884698061	3.46E-77	8764030	+	A/G
TO-0142299	0.884698061	3.46E-77	8891489		
TO-0142301	0.884698061	3.46E-77	8900707		
TO-0142302	0.884698061	3.46E-77	8902922		
TO-0144308	0.854199247	7.02E-69	8414574		
TO-0144303	0.854199247	7.02E-69	8419932		
TO-0142268	0.854144413	7.24E-69	8631287		
TO-0142270	0.854144413	7.24E-69	8633469		
TO-0121816	0.854144413	7.24E-69	8626324		
TO-0144313	0.853890923	2.18E-68	8410749		
TO-0181040	0.851931696	2.47E-68	9797143		
TO-0123057	0.851931696	2.47E-68	9825111		
TO-0125528	0.851931696	2.47E-68	9837711	**	G/A
TO-0144309	0.853578274	6.78E-68	8412924		
TO-0162436	0.851618235	7.62E-68	9789608		
TO-0197358	0.848638959	9.80E-67	8357644		
TO-0101684	0.831991299	7.32E-64	8345699		
TO-0144325	0.821665121	9.46E-62	8140310		
TO-0144322	0.822371998	1.62E-61	8163278		
TO-0162427	0.789778057	6.28E-56	10018811	*	C/T

【 0 2 2 1 】

【表 10】

表 10：追加の SNP の配列

SNP	配列 番号	SNP の配列：T B R F V 耐性または抵抗性に関連する対立遺伝子は、括弧中の 2 番目に示されている
TO-0144317	8	AGCCATTGTGATTGTGTCTGTTGTACATTACCAAATTCTCTAGAGAAAG[T/C]GATACAC ATGCCAGCCCTATCGATATAAAGCAACGCAAGGTGGATTCTGC
TO-0142303	11	GAGGAGCTATCAACTTCATAGTCAGATTCAGAAAATGATTGAGATGAGGA[C/A]GTGGCTG ATTCTTCTTGTCTTTCTTTCTTCTCTGCTCGAACTCTCTCC
TO-0142306	12	CAGAAATAATAGAAAATCAGAAAGAAAAATCAGCTTTCTAAATGGAAAAG[G/A]CGATGGC ACTATGTTTGAAGTTTAAAGCAACTTTTCTGAAGTCCCAAAG
TO-0142294	10	TCAACTGCAACTTTAACAGCTGATTCAACTTCTTCTTTTGGAAACATC[A/G]CATTGAA TGTAACGACCTCCAATAGATTGAGCTAACTTGTACCTACTTC

10

## 【0222】

纏めると、これらの結果により、TO-012252 および TO-0162427、より正確には、TO-0144317 および TO-0125528 により区切られた染色体領域内に広く位置する葉の耐性を付与する QTL の存在が確認される。

## 【0223】

したがって、実施例 4 の結果を考慮すると、これらの結果は、この QTL の位置が TO-0142270 と TO-0125528 との間として有利に定義できることを示している。

20

## 【0224】

実施例 7：メタンスルホン酸エチル (EMS) によるトマト種子の遺伝子組み換え

品種ごとに約 2000 個の種子を 0.5% (w/v) EMS または 0.7% EMS のいずれかの通気溶液に室温で 24 時間浸漬することにより、トマト品種の種子を EMS で処理する。

## 【0225】

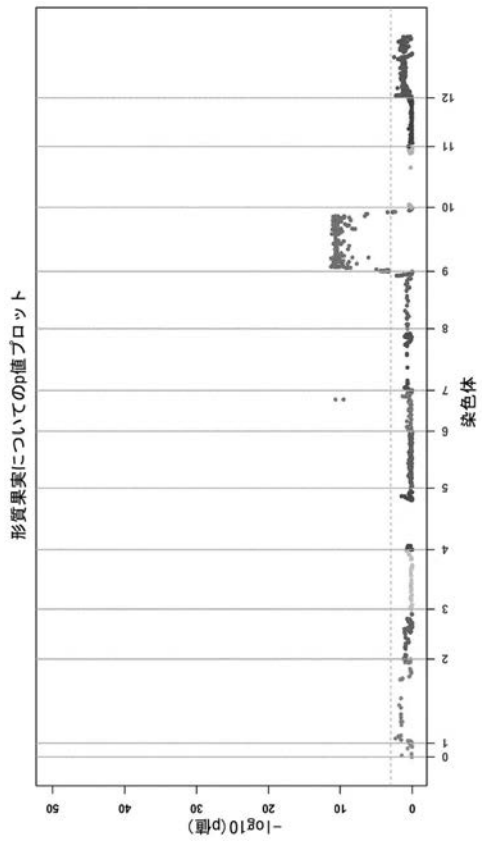
品種ごと、EMS 用量ごとに約 1500 個の処理した種子を発芽させ、得られた植物を、好ましくは温室中で、例えば 5 月から 9 月まで成長させて、種子を生産する。

30

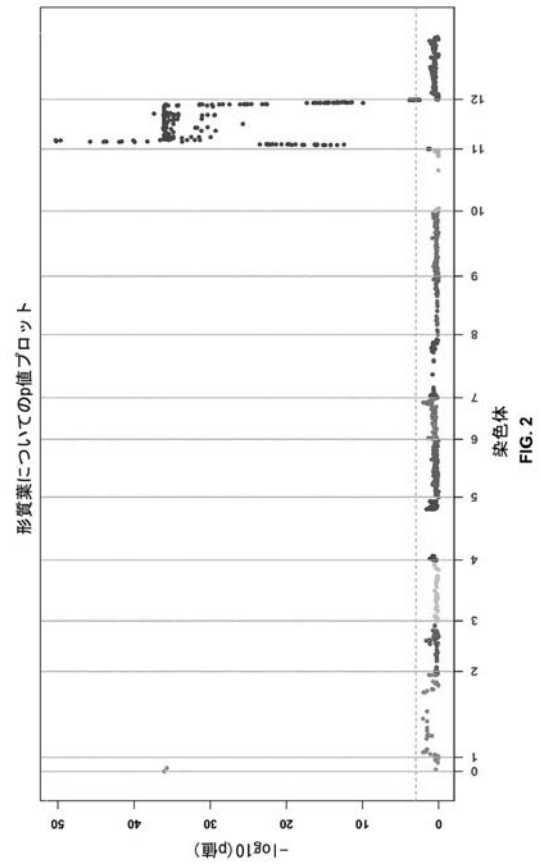
## 【0226】

成熟後、M2 種子を収穫し、処理ごと、品種ごとに 1 つのプールに纏める。得られた M2 種子のプールを出発材料として使用して、個々の M2 種子、およびトマト褐色縮葉フルーツウイルスに対する果実および / または葉の耐性を有する植物を同定する。

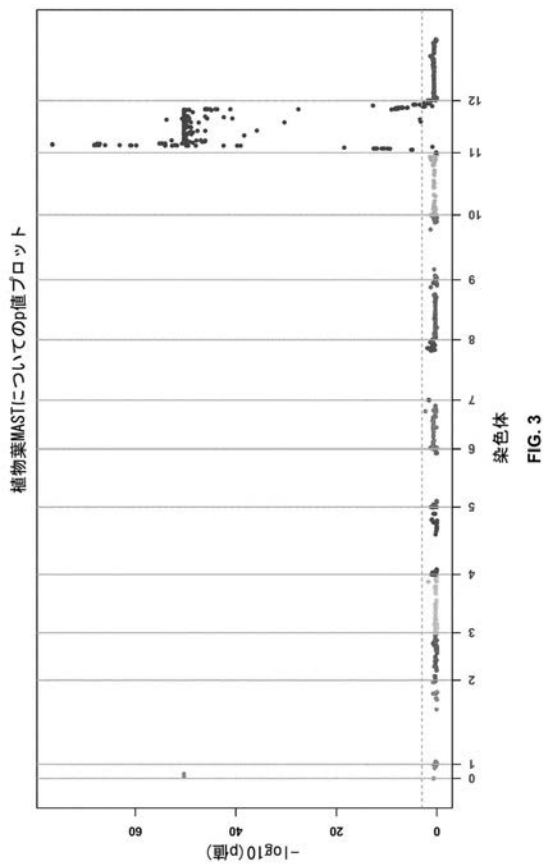
【図 1】



【図 2】



【図 3】





【配列表】

2020521492000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/064055

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A01H5/08 A01H6/82  
ADD.

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)

A01H C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBL, FSTA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/064641 A1 (RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL BV [NL]) 10 May 2013 (2013-05-10) example 4	1-10,23
Y	----- US 2016/242376 A1 (JIANG CHUNXIAO [US]) 25 August 2016 (2016-08-25) paragraph [0114] ----- -/--	11-22, 24-31

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

## \* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Date of the actual completion of the international search

27 June 2018

Date of mailing of the international search report

27/07/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Obel, Nicolai

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2018/064055

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SALEM N ET AL: "A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan", ARCHIVES OF VIROLOGY, SPRINGER WIEN, AT, vol. 161, no. 2, 19 November 2015 (2015-11-19), pages 503-506, XP035888535, ISSN: 0304-8608, DOI: 10.1007/S00705-015-2677-7 [retrieved on 2015-11-19] cited in the application abstract -----	11-22, 24-31
Y	AINONG SHI ET AL: "Molecular Markers for Tm-2 Alleles of Tomato Mosaic Virus Resistance in Tomato", AMERICAN JOURNAL OF PLANT SCIENCES, vol. 02, no. 02, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 180-189, XP055392176, US ISSN: 2158-2742, DOI: 10.4236/ajps.2011.22020 abstract -----	11-22, 24-31
Y	P. KADIRVEL ET AL: "Mapping of QTLs in tomato line FLA456 associated with resistance to a virus causing tomato yellow leaf curl disease", EUPHYTICA, vol. 190, no. 2, 5 December 2012 (2012-12-05), pages 297-308, XP055392076, NL ISSN: 0014-2336, DOI: 10.1007/s10681-012-0848-0 abstract -----	11-22, 24-31
A	WOJCIECH SZCZECURA ET AL: "Tomato Molecular Markers", VEGETABLE CROPS RESEARCH BULLETIN, vol. 74, 13 June 2011 (2011-06-13), pages 5-23, XP055392178, PL ISSN: 1506-9427, DOI: 10.2478/v10032-011-0001-y table 1 -----	1-31

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/064055

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013064641	A1	10-05-2013	
		AU 2012331109 A1	15-05-2014
		CA 2853194 A1	10-05-2013
		CN 104093303 A	08-10-2014
		EP 2773184 A1	10-09-2014
		JP 2014532420 A	08-12-2014
		KR 20140087031 A	08-07-2014
		US 2013254928 A1	26-09-2013
		US 2017142923 A1	25-05-2017
		WO 2013064641 A1	10-05-2013
-----			
US 2016242376	A1	25-08-2016	
		US 2016242376 A1	25-08-2016
		US 2016242377 A1	25-08-2016
-----			

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
<b>A 0 1 H</b>	<b>5/06</b>	<b>(2018.01)</b>	<b>A 0 1 H</b> 5/06
<b>A 0 1 H</b>	<b>5/10</b>	<b>(2018.01)</b>	<b>A 0 1 H</b> 5/10
<b>A 0 1 H</b>	<b>5/12</b>	<b>(2018.01)</b>	<b>A 0 1 H</b> 5/12
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/04</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b> 5/04
<b>C 1 2 Q</b>	<b>1/68</b>	<b>(2018.01)</b>	<b>C 1 2 Q</b> 1/68
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/29</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 1 2 N</b> 15/29

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 バルダ アシュケナジ

イスラエル国, 7 9 8 3 7 ベルリム, エム・ピー・シクミム, シーノオー ハゼラ シーズ リミティド

(72)発明者 ヤニブ ロテム

イスラエル国, 7 9 8 3 7 ベルリム, エム・ピー・シクミム, シーノオー ハゼラ シーズ リミティド

(72)発明者 ロン エッカー

イスラエル国, 7 9 8 3 7 ベルリム, エム・ピー・シクミム, シーノオー ハゼラ シーズ リミティド

(72)発明者 シャイ ナシレピッツ

イスラエル国, 7 9 8 3 7 ベルリム, エム・ピー・シクミム, シーノオー ハゼラ シーズ リミティド

(72)発明者 ナアマ バロム

イスラエル国, 7 9 8 3 7 ベルリム, エム・ピー・シクミム, シーノオー ハゼラ シーズ リミティド

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD04 AD07 CA05 CA10

4B063 QA07 QQ04 QQ42 QR40 QR73

4B065 AA89X BA22 CA41