

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015年3月12日(12.03.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/034040 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/073460
- (22) 国際出願日: 2014年9月5日(05.09.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-186688 2013年9月9日(09.09.2013) JP
特願 2014-165405 2014年8月15日(15.08.2014) JP
- (71) 出願人: トヨタ自動車株式会社 (TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町1番地 Aichi (JP).
- (72) 発明者: 榎 宏征(ENOKI Hiroyuki); 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 西村 哲(NISHIMURA Satoru); 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 水藤 百江(SUITO Momoe); 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町1番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 布

目 司(NUNOME Tsukasa); 〒5142392 三重県津市安濃町草生360 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所内 Mie (JP). 野口 裕司(NOGUCHI Yuji); 〒5142392 三重県津市安濃町草生360 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 野菜茶業研究所内 Mie (JP).

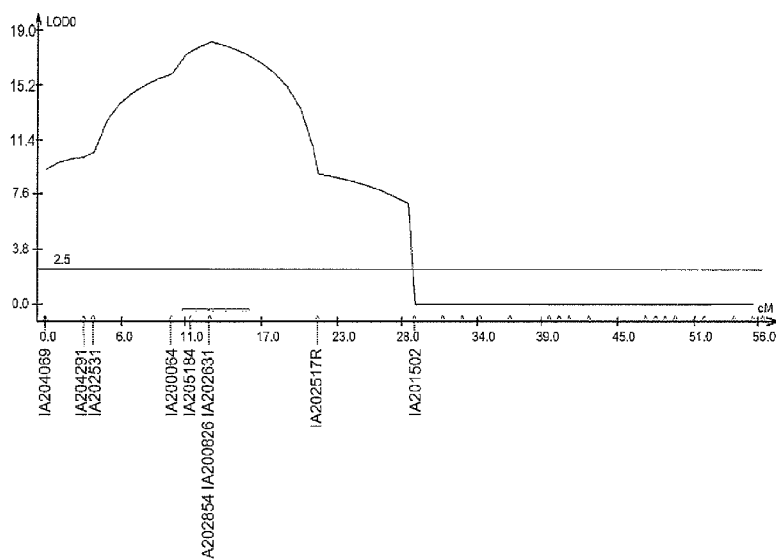
(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: ANTHRACNOSE RESISTANCE-ASSOCIATED MARKER FOR PLANT OF GENUS FRAGARIA, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: イチゴ属植物の炭疽病抵抗性関連マーカーとその利用



(57) Abstract: Multiple DNA markers for a plant of the genus fragaria were developed, and by using these multiple DNA markers, anthracnose resistance can be determined with high precision. This anthracnose resistance-associated marker for a plant of the genus fragaria comprises a contiguous nucleic acid region sandwiched between the base sequence indicated in sequence 1 and the base sequence indicated in sequence 10 in the chromosome of the plant of the genus fragaria.

(57) 要約: イチゴ属植物について多数の DNA マーカーを開発し、これら多数の DNA マーカーを用いることで炭疽病抵抗性を高精度に判定する。 イチゴ属植物の染色体における配列番号 1 に示す塩基配列及び配列番号 10 に示す塩基配列により挟まれる連続する核酸領域からなる、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカー。



WO 2015/034040 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：

イチゴ属植物の炭疽病抵抗性関連マーカーとその利用

技術分野

[0001] 本発明は、イチゴ炭疽病に対する抵抗性を示すイチゴ属植物系統を選抜することができる炭疽病抵抗性関連マーカー及びその利用方法に関する。

背景技術

[0002] DNAマーカー（遺伝マーカーや遺伝子マーカーとも称される）の開発により、植物の品種改良において、有用形質や不良形質の有無を迅速に且つ効率的に判別することが可能となっている。DNAマーカーの開発は、シロイヌナズナやイネといったモデル植物のみならず、様々な実用植物においても進捗しており、品種改良において大いに役立っている。

[0003] 非特許文献1には、栽培イチゴにおいて統合型高密度連鎖地図を開発したとの報告がある。非特許文献1によれば、以前より約300個のamplified fragment length polymorphism (AFLP)マーカーからなる連鎖地図の報告があるものの、8倍体と複雑なゲノムを有するため、栽培イチゴについてはより高密度な連鎖地図の開発が望まれているとある。また、非特許文献1では、F. vesca及びF. ×ananassaについて単純反復配列（simple sequence repeat）マーカーを開発し、統合型高密度連鎖地図を構築している。具体的には、02-19、Sachinoka、Kaorino、Akihime及び0212921の5品種・系統を用いて連鎖地図を作製し、これを統合して1つの統合型高密度連鎖地図を作成している。非特許文献1では、02-19については575個のマーカー、Sachinokaについては556個のマーカー、Kaorinoについては294個のマーカー、Akihimeについては318個のマーカー及び0212921については822個のマーカーを開発している。しかし、非特許文献1に開示された統合型高密度連鎖地図では、座上するマーカー数が無い連鎖群が存在しており、特にマーカー数が少ないKaorinoやAkihimeではその傾向は顕著である。さらに、非特許文献1に開示された統合型高密

度連鎖地図は、すべての連鎖地図がカバーされていないと考察している。

[0004] また、非特許文献2には、イチゴ炭疽病抵抗性品種の開発を効率的に進めるため、イチゴ炭疽耐病性と連鎖するDNAマーカーを開発したと記載されている。非特許文献2には、Random Amplified Polymorphic DNA法 (RAPD法)、 AFLP法及びSSR法によりマーカーを用いて連鎖地図を作製し、耐病性連鎖マーカーを解析したとある。その結果、非特許文献2によれば、いちご中間母本農2号を交配した集団に利用することで、育種集団を1/8に減らすことができ、約70%の確率で耐病性系統を判別できるマーカーを開発できたとある。

[0005] なお、イチゴ炭疽病については、非特許文献3に記載されるように、*Glomerella cingulate*及び*Colletotrichum acutatum*がその原因菌として知られている。

[0006] 一方、例えば、特許文献1にはテンサイ黒根病抵抗性品種選抜マーカーを開発したことが開示され、特許文献2にはトウモロコシについて目的の形質に連鎖したマーカーを利用する選抜技術が開示されている。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: DNA Research 20, 79-92, (2013)

非特許文献2: 栃木県農業試験場 研究成果集第29号、第51~52頁

非特許文献3: Microbiol. Cult. Coll., 25(1): 27-32, 2009

特許文献

[0008] 特許文献1: W02007/125958

特許文献2: 特開2010-516236号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] ところが、上述したテンサイやトウモロコシで開発されてきたDNAマーカー技術は、イチゴ属植物において殆ど進んでいないのが現状であった。非特許

文献1にはSSRマーカーを開発し、統合型高密度連鎖地図を構築したことが記載されるものの、多倍数性で複雑なゲノム構造のイチゴ属植物において目的とする形質に連鎖するDNAマーカーを選抜するには十分とは言えなかった。また、非特許文献2には、イチゴ炭疽病耐病性と連鎖するDNAマーカーを開発したと記載されるものの、QTL解析の結果としてはLOD (logarithm of odds) 値や寄与率が高いとは言えず、優れたマーカーとは評価できなかった。

[0010] そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、多倍数性で複雑なゲノム構造のイチゴ属植物について多数のDNAマーカーを開発し、これら多数のDNAマーカーを用いることで炭疽病抵抗性を高精度に判定することができる炭疽病抵抗性関連マーカー及びその利用方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、イチゴ属植物における多数のマーカーを準備し、交雑後代系統における量的形質とマーカーとの連鎖解析によって、炭疽病抵抗性といった量的形質に連鎖するマーカーを見だし、本発明を完成するに至った。

[0012] 本発明は以下を包含する。

[0013] (1) イチゴ属植物の染色体における配列番号1に示す塩基配列及び配列番号10に示す塩基配列により挟まれる連続する核酸領域からなる、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカー。

[0014] (2) 上記核酸領域は、配列番号1～10からなる群から選ばれるいずれか1の塩基配列又は当該塩基配列の一部を含むことを特徴とする(1)記載のイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカー。

[0015] (3) 上記核酸領域は、イチゴ属植物の染色体における配列番号4に示す塩基配列と配列番号8に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域に位置することを特徴とする(1)記載のイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカー。

[0016] (4) 少なくとも一方の親がイチゴ属植物である後代植物の染色体及び/又は当該親のイチゴ属植物の染色体を抽出する工程と、

上記で得られた染色体における上記(1)乃至(3)いずれか1に記載の

イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカの存在・非存在を測定する工程とを含む、炭疽病抵抗性が向上したイチゴ属植物系統の製造方法。

[0017] (5) 上記測定する工程では、上記イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカを特異的に増幅するプライマーを用いた核酸増幅反応により当該イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカの存在・非存在を測定することを特徴とする(4)記載のイチゴ属植物系統の製造方法。

[0018] (6) 上記測定する工程では、上記イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカに対応するプローブを備えるDNAチップを使用することを特徴とする(4)記載のイチゴ属植物系統の製造方法。

[0019] (7) 上記後代植物は種子又は幼苗であり、当該種子又は幼苗から染色体を抽出することを特徴とする(4)記載のイチゴ属植物系統の製造方法。

[0020] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2013-186688号、2014-165405号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0021] 本発明によれば、イチゴ属植物における量的形質の中でも炭疽病抵抗性に連鎖する新規なイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカを提供することができる。本発明に係るイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカを利用することによって、イチゴ属植物の交配系統における炭疽病抵抗性を検定することができる。これにより、炭疽病抵抗性が向上した特性を有するイチゴ属植物系統を非常に低コストに識別することができる。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]イチゴ属植物染色体のマーカを得る際に使用したDNAマイクロアレイの製造フローを示す模式図である。

[図2]DNAマイクロアレイを使用したシグナル検出の工程を示す模式図である。

[図3]実施例で使用したイチゴ属植物品種・系統群について2012年10月19日に調査した炭疽病抵抗性データを示す特性図である。

[図4]炭疽病抵抗性に関するQTL解析の結果(いちご中間母本農2号における

第23連鎖群)を示す特性図である。

[図5]各系統におけるIA204069のシグナル値を示す特性図である。

[図6]各系統におけるIA204291のシグナル値を示す特性図である。

[図7]各系統におけるIA202531のシグナル値を示す特性図である。

[図8]各系統におけるIA200064のシグナル値を示す特性図である。

[図9]各系統におけるIA205184のシグナル値を示す特性図である。

[図10]各系統におけるIA202854のシグナル値を示す特性図である。

[図11]各系統におけるIA200826のシグナル値を示す特性図である。

[図12]各系統におけるIA202631のシグナル値を示す特性図である。

[図13]各系統におけるIA202517Rのシグナル値を示す特性図である。

[図14]各系統におけるIA201502のシグナル値を示す特性図である。

[図15]マーカーIA200826をPCR増幅した結果を示す電気泳動写真である。

[図16]マーカーIA202631をPCR増幅した結果を示す電気泳動写真である。

[図17]図3に示した炭疽病抵抗性データとマーカーIA200826の遺伝子型データとを比較して示す特性図である。

[図18]イチゴ品種さちのか、いちご中間母本農2号および交雑後代2系統(A及びB)において、マーカーIA202631及びマーカーIA200826をPCR増幅した結果を示す電気泳動写真である。

[図19]イチゴ品種さちのか、いちご中間母本農2号および交雑後代2系統(A及びB)において、マーカーIA202631及びマーカーIA200826を含む領域をPCR増幅した結果を示す電気泳動写真である。

[図20]マーカーIA202531をPCR増幅した結果を示す電気泳動写真である。

[図21]マーカーIA200064をPCR増幅し、制限酵素処理した結果を示す電気泳動写真である。

発明を実施するための形態

[0023] 以下、本発明に係るイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカー及びその利用方法、特にイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーを用いたイチゴ属植物系統の製造方法について説明する。

[0024] <イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカー>

本発明に係るイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとは、イチゴ属植物の染色体上に存在する特定の領域であり、イチゴ属植物炭疽病抵抗性という形質を判別できる機能を有する。すなわち、既知のイチゴ属植物を用いて得られた後代系統において、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの存在・非存在を確認することで炭疽病抵抗性の向上という形質を有する系統であると判断することができる。なお、本発明において、イチゴ炭疽病とは、Microbiol. Cult. Coll., 25(1): 27-32, 2009に記載されるように、*Glomerella cingulate*及び/又は*Colletotrichum acutatum*が感染することに起因して病斑が形成される病気を意味している。特に、本発明において、イチゴ炭疽病とは、*Glomerella cingulata*の感染を原因とする病気としても良い。

[0025] また、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとは、炭疽病抵抗性が向上する形質に連鎖するマーカーと、炭疽病抵抗性が低下する形質に連鎖するマーカーの両者を含む意味である。例えば、特定のイチゴ属植物において、前者のマーカーが存在していれば炭疽病抵抗性が向上した品種と判断できる。さらに、特定のイチゴ属植物において、前者のマーカーが存在し、且つ、後者のマーカーが非存在である場合には炭疽病抵抗性が向上した品種であることより高精度に判断できる。なお、特定のイチゴ属植物において、後者のマーカーが非存在であることのみをもって、炭疽病抵抗性が向上した品種であると判断しても良い。

[0026] 特に、前者のイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーは、イチゴ属植物の炭疽病抵抗性といった形質の原因遺伝子（群）に連鎖した領域と考えられる。

[0027] ここで、イチゴ属植物とは、バラ科イチゴ属(*Fragaria* L.)に属する植物の全てを含む意味である。すなわち、イチゴ属植物としては、一般的な栽培イチゴであるオランダイチゴ(*Fragaria* × *ananassa*)等の交雑種を挙げることができる。また、イチゴ属植物としては、栽培イチゴの祖先種となる*F. virginiana*並びに*F. chiloensis*、シロバナノヘビイチゴ (*F. vesca*)、ノウゴウ

イチゴ (*F. iinumae*)、モリイチゴ (*F. nipponica*)、*F. nubicola*、*F. bucharica*、*F. daltoniana*、*F. orientalis*、*F. corimbosa*、*F. moschata*及び*F. iturupensis*等の野生種を挙げることができる。さらに、イチゴ属植物としては、栽培イチゴ (*F. × ananassa*) における既知の品種・系統も含む意味である。栽培イチゴにおける既知の品種・系統としては、特に限定されず、日本国内にて使用可能なあらゆる品種・系統、日本国外において使用されている品種・系統等を含む意味である。例えば、栽培イチゴの日本国内育成品種としては、特に限定されないが、とよのか、サンチーゴ、純ベリー、女峰、ピーストロ、リングモール、とちおとめ、アイストロ、栃の峰、章姫、紅ほっぺ、とちひめ、さちのか、けいきわせ、さがほのか、アイベリー、カレンベリー、レッドパール、さつまおとめ、福岡S6 (あまおう)、濃姫、ひのみね及び宝交早生等を挙げることができる。また、栽培イチゴの品種としては、所定の特性の獲得を目的とした品種改良に利用する育種素材である中間母本である、いちご中間母本農1号及びいちご中間母本農2号を挙げることができる。いちご中間母本農2号は炭疽病抵抗性の育成系統である83118-41と抵抗性品種Doverの交配から育成された育種素材である。なお、いちご中間母本農2号の炭疽病抵抗性は、抵抗性品種宝交早生やDoverと同程度以上であり、また罹病性品種との交配実生集団において高度抵抗性個体の出現率が高く、イチゴ炭疽病抵抗性を有する新品種育成へ利用されている。

[0028] イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの存在・非存在を確認する対象の植物としては、上述したイチゴ属植物、上述したイチゴ属植物を利用した後代系統とすることができる。後代系統は、母本及び父本のいずれか一方が上述したイチゴ属植物であればよく、いわゆる同種交配による系統であっても良いし、交雑系統であっても良い。また、後代系統は、いわゆる戻し交配によって得られたものでも良い。

[0029] 特に、栽培イチゴ (*F. × ananassa*) を対象として、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの存在・非存在を確認することが好ましい。さらに、栽培イチゴの中でも上述した各種の品種・系統を用いた品種改良において、イ

イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの存在・非存在を確認することが好ましい。すなわち、この場合、作出した新品種についてイチゴ炭疽病抵抗性を判別することができる。よって、新品種としては、イチゴ炭疽病抵抗性を有する品種を少なくとも一方の親として得た品種であることが好ましい。より詳細には、例えば、いちご中間母本農2号を一方の親として作出した新品種について、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの存在・非存在を確認し、イチゴ炭疽病抵抗性を評価することができる。

[0030] 本発明に係るイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーは、栽培いちご：さちのかから取得した1,502個のマーカー及びいちご中間母本農2号から取得した2,162個のマーカーを含む遺伝子連鎖地図と、イチゴ炭疽病抵抗性データとを用いたQTL (Quantitative Trait Loci) 解析によって新たに同定されたものである。なお、イチゴ炭疽病抵抗性は、多数の遺伝子が関与していると考えられ、連続分布をとる量的形質である。すなわち、イチゴ炭疽病抵抗性は、連続分布をとるイチゴ炭疽病への罹患率に基づいて評価される。QTL解析には、遺伝解析ソフトQTL Cartographer (Wang S., C. J. Basten, and Z.-B. Zeng (2010). Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC) を使用し、Composite interval mapping (CIM) 法を適用している。

[0031] 具体的に、上述したQTL解析により、ロッドスコア (LOD score) が所定の閾値 (例えば2.5) 以上となる領域を上記遺伝子連鎖地図に見いだした。この領域は約29.0cM (センチモルガン) であり、いちご中間母本農2号の第23連鎖群に含まれる領域であった。ここで、「モルガン (M)」は、染色体上の遺伝子間の距離を相対的に示した単位であり、交叉価をパーセントにした値である。イチゴ属植物の染色体において、1cMは、約400kbに相当する。なお、この領域には、ロッドスコアが約18.3のピークが存在しており、当該ピーク位置又はその近傍にイチゴ属植物炭疽病抵抗性を向上させる形質の原因遺伝子 (群) が存在することが示唆される。

[0032] この29.0cMの領域には、表1に示す10種類のマーカーがこの順で含まれ

ている。なお、表1において、マーカー名とは、本発明で独自に取得したマーカーに付された名称である。

[表1]

配列番号	マーカー名	塩基配列情報
1	IA204069	GC GTTACTAATTGATATTGGTTTACAATAAGTATCAATTTGCTAAAGCTAGCTACAACAGCACT ACAGCAGTTGTAGTATTAGTTGTTACATGATTCGTCGGACTTTGTGACTCTGTTTTCTTTGCTG TTTCTTGCTTTGTGCTTGTATTACAAGGGTTATCTTGTGCAATTAGAGTTTTGGGGATTGGATC GGATGATTATCGGATTCAACTGCAG
2	IA204291	GCTTTTTTAGCTTTTGGTATCAGAACAATAGTTCAGGCATGTCAACAGGAAAAATGAAGTAAACCA ATGGAAAAGGGCAGAAGAAATGAGACTAGAAGAGGCCAAAAGTAGCCGAAGAAGTTGCAATGGAAG CTGCAG
3	IA202531	AACAAATATAGTGAATTAAGCTACTCATAGTAGGTCGATTGGAAGAGGTGATCCAGAGTTCTAA ACTATATAGCATCACTGTTCAATTTAAATCGTCACGCAGCGCACAGTAGGCTTCATTGTGTGAGCC AAATTGAGAGTGGTTGGTTTTGCCAATGTTTTGAGCACGTCTGCTGCATGTAAACTGCAG
4	IA200064	CTGCAGAATAAGTTCAACATTATCAAGGAAAAATGAAGCAATTTATCTCTGCAAGGTTTTAGAGGT AACAAATTTGTAGAGATCTGTGGAGCATGAAGAAGTTCTTAAAGTTGCAAGTGAATGAAGTGGTG CAAAGGATGTATAGCGCTATCAACCATTGCTGAATGTAATCTTCTCCTCGAGTTCAAAGGAATA GCAAGTGGCAAATTAATAATTTGGCCATATGGTCTGTAAACCCAAACATCTTCATCAGAAATTGC ATGATGAGAGGAACGCCTCTTGAGTACTTTCTGAAGTTTGTAGTACTTGCAGTAAGGGGCACAT TTACTAACTTGGAAATGAAAAATATCATGAATCGGTATCAACAAGAATTGGTATGAGAATTTTCA TTCCATTCTACCAATTTTTATCCAACACAAGAGTTTCCGTCATAGTGAACCAGCAGAGGTGTT GTTGGGTCTCCTGAGTCTGACTGCTGTTAATAGTTATCAATTTATCATAAT
5	IA205184	GACGGTATTCTAATCTATAATTAAGAGCTCAGTGATTTTCATTGTTGTCTAAATAGCTGAATGAG TAATTGAGGCTATGGCCAATGAGCCAGCAATTTGCAGTACTTGCTGCAG
6	IA202854	TCTAACATGACAAGCTATCTTTCATTTTAAACAGAAGTTTTTCATTTTTCTTTATACGCCTAAGC TAAAACTTTTATAATCTCATCACTAACTACTAGCTACTACTACTGCAG
7	IA200826	CTGCAGAAAAGGGAGAAGAAGTTCTTGGAAAAGTTTTGTGATCAAATATCAAGAGCAAGTACCGAA TTATTGAGCATATTTAAAGGTAAAACGGGCTGGCGGAAGTGGGCTTAGGATTTGTGAAAAGATA TGAAGTGAAACAACAGTGTGATGATTAGAAGGTCGTAGAACCATTTCATGTTTTTGTGAGTCTGT TGTCAGTCTCATTAATACAAGTGTATATAGTGTACTGGTGTAACTCTTCTATTTTCATCTGGCA TTACAATCTTCTATTATGAGT
8	IA202631	ACGGTTAACCCCTCCTAGAAAATCCATATCAATTTATATATGTATGTATCTGTATCTGTATCTAT CTCTCATATCTCTATGTAACATATAAAGACAACCTCACAGCTGCAG
9	IA202517R	ATCTTCAATAGCCGACCAGTCGCTATGTTTTTATTTTGTCAAATTGTACGTGTGTGCTCCTCAAT AGTTTCTTTTCAAATATGAAGGATGGTGGCGCTGTAGCTGGTCTTGCTATTGCTGCAG
10	IA201502	CTGCAGCGGAGGGCGCTGCCGACTCCAACCTGATGTTGAGATTGATAAAAATATGGGAATAAT ATGGTCATAGTTGGACACTGACCGAGCCAGCCATGGGCTAGTGTAGCTGATGCTTTTTATATAG GGAAAATTGTCCAACAGTGTCTCACCTTTTGA AAAAATAACTTTTGGTATCTCAACTTTTAAA AACTTCAAACGGTATCTCACGTTTCTACTTCAACCGAAATATGGTACCTGCAACTGTTAATTTT GTTAAAACAACACTGACAGATTAAGGGTATTTTCGTCCTTCA

[0033] すなわち、本発明に係るイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーは、イチゴ属植物の染色体における配列番号1に示す塩基配列及び配列番号10に示

す塩基配列により挟まれる連続する核酸領域である。ここで、上記29.0cMの領域に含まれるピークは、配列番号4に示す塩基配列からなるマーカー（IA200064）及び配列番号8に示す塩基配列からなるマーカー（IA202631）により挟み込まれる領域に存在している。

[0034] また、この29.0cMの領域には、炭疽病抵抗性が向上する形質に連鎖するマーカーと、炭疽病抵抗性が低下する形質に連鎖するマーカーの両者を含んでいる。表1に示す10種類のマーカーのうち、配列番号9に示す塩基配列からなるマーカー（IA202517R）は、炭疽病抵抗性が低下する形質に連鎖するマーカー（相反マーカー）であり、その他は全て炭疽病抵抗性が向上する形質に連鎖するマーカーである。

[0035] 表1に示した29.0cMの領域に含まれる連続した核酸領域を、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとして使用することができる。ここで、核酸領域とは、イチゴ属植物の染色体に存在する他の領域との同一性が95%以下、好ましくは90%以下、より好ましくは80%以下、最も好ましくは70%以下となるような塩基配列からなる領域を意味する。イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとなる核酸領域と他の領域との同一性が上記範囲であれば、定法に従って、当該核酸領域を特異的に検出することができる。ここで、同一性の値は、例えばBLASTを用いてデフォルトパラメータを用いて算出することができる。

[0036] また、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとなる核酸領域の塩基長は、少なくとも8塩基長以上、好ましくは15塩基長以上、より好ましくは20塩基長以上、最も好ましくは30塩基長とすることができる。イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとなる核酸領域の塩基長が上記範囲であれば、定法に従って、当該核酸領域を特異的に検出することができる。

[0037] 特に、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとしては、上記29.0cMの領域に含まれる10種類のマーカーのうち、配列番号4に示す塩基配列と配列番号8に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域から選ばれることが好ましい。上記ピークが配列番号4に示す塩基配列と配列番号8に示す塩基配列と

により挟み込まれる領域に存在するためである。

[0038] また、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとしては、上記表 1 に示した 10 種類のマーカーから選ばれる 1 種類のマーカーを含む核酸領域とすることもできる。例えば、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとしては、ピークの位置に最も近い配列番号 8 に示す塩基配列からなるマーカー (IA202631) を含む核酸領域を使用することが好ましい。このとき、マーカーを含む核酸領域の塩基配列は、当該マーカーの塩基配列に基づいて設計したプライマーを用いたインバースPCR等の隣接配列取得法によって特定することができる。

[0039] さらに、イチゴ属植物の染色体における配列番号 1 に示す塩基配列及び配列番号 10 に示す塩基配列により挟まれる核酸領域から、複数の領域をイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとすることもできる。

[0040] さらにまた、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとしては、上記 10 種類のマーカーそのものを使用することができる。すなわち、配列番号 1 ~ 10 の塩基配列からなる 10 個の領域から選ばれる 1 又は複数の領域をイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとすることができる。例えば、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとしては、ピークの位置に最も近い配列番号 8 に示す塩基配列からなるマーカー (IA202631) を使用することが好ましい。或いは、例えば、配列番号 7 の塩基配列からなるマーカー (IA200826) と配列番号 8 の塩基配列からなるマーカー (IA202631) とで挟み込まれる領域をイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとすることもできる。

[0041] <イチゴ属植物におけるマーカーの同定>

本発明では、上述したように、さちのかから取得した 1,502 個のマーカー及びいちご中間母本農 2 号から取得した 2,162 個のマーカーからイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーを特定した。ここでは、これら 1,502 個と 2,162 個のマーカーについて説明する。このマーカーを同定する際には、特開 2011-120558 号公報や国際公開公報 2011/074510 に開示された方法を適用した DNA マイクロアレイを使用することができる。

[0042] 具体的に、当該DNAマイクロアレイに使用するプローブの設計方法は、図1に示すように、先ず、さちのか或いはいちご中間母本農2号からゲノムDNAを抽出する（工程1a）。次に、抽出したゲノムDNAを1又は複数の制限酵素により消化する（工程1b）。なお、図1に示した例では、制限酵素A及び制限酵素Bの2種類の制限酵素をこの順で用いてゲノムDNAを消化している。ここで、制限酵素としては、特に限定されないが、例えば、PstI、EcoRI、HindIII、BstNI、HpaII、HaeIII等を使用することができる。特に制限酵素としては、ゲノムDNAを完全に消化した際に20~10000塩基長のゲノムDNA断片となるよう、認識配列の出現頻度等を考慮して適宜選択することができる。また、複数の制限酵素を使用する場合、全ての制限酵素を使用した後のゲノムDNA断片が200~6000塩基長となっていることが好ましい。さらに、複数の制限酵素を使用する場合、処理に供する制限酵素の順序は特に限定されず、また、処理条件（溶液組成や温度等）が共通する場合には複数の制限酵素を同一の反応系で使用しても良い。すなわち、図1に示した例においては、制限酵素A及び制限酵素Bをこの順で使用してゲノムDNAを消化しているが、制限酵素A及び制限酵素Bを同じ反応系で同時に使用してゲノムDNAを消化しても良いし、制限酵素B及び制限酵素Aをこの順で使用してゲノムDNAを消化してもよい。さらに、使用する制限酵素の数は3以上であってもよい。

[0043] 次に、制限酵素処理後のゲノムDNA断片に対してアダプターを結合する（工程1c）。ここで、アダプターとは、上述した制限酵素処理によって得られたゲノムDNA断片の両端に結合できるものであれば特に限定されない。アダプターとしては、例えば、制限酵素処理によってゲノムDNAの両末端に形成される突出末端（粘着末端）に対して相補的な一本鎖を有し、詳細を後述する増幅処理の際に使用するプライマーがハイブリダイズしうるプライマー結合配列を有するものを使用することができる。また、アダプターとしては、上記突出末端（粘着末端）に対して相補的な一本鎖を有し、クローニングする際のベクターに組み入れるための制限酵素認識部位を有するものを使用することもできる。

- [0044] また、複数の制限酵素を使用してゲノムDNAを消化した場合には、各制限酵素に対応する複数のアダプターを準備して使用することができる。すなわち、複数の制限酵素でゲノムDNAを消化した場合に生ずる複数種類の突出末端のそれぞれに対して、相補的な一本鎖を有する複数のアダプターを使用することができる。このとき、複数の制限酵素に対応する複数のアダプターは、共通するプライマーがハイブリダイズできるように共通するプライマー結合配列を有しているものであっても良いし、それぞれ異なるプライマーがハイブリダイズできるように異なるプライマー結合配列を有するものであっても良い。
- [0045] さらに、複数の制限酵素を使用してゲノムDNAを消化した場合、アダプターとしては、使用した複数の制限酵素のなかから選ばれる1つの制限酵素若しくは、使用した制限酵素のうち一部の制限酵素に対応するアダプターを準備して使用することもできる。
- [0046] 次に、両末端にアダプターが付加されたゲノムDNA断片を増幅する（工程1d）。プライマー結合配列を有するアダプターを使用した場合には、当該プライマー結合配列にハイブリダイズできるプライマーを使用することで上記ゲノムDNA断片を増幅することができる。或いは、アダプターを付加したゲノムDNA断片を、アダプター配列を利用してベクターにクローニングし、当該ベクターにおける所定の領域にハイブリダイズできるプライマーを用いてゲノムDNA断片を増幅することができる。なお、プライマーを用いたゲノムDNA断片の増幅反応としては、一例としてPCRを使用することができる。
- [0047] また、複数の制限酵素を使用してゲノムDNAを消化するとともに、各制限酵素に対応する複数のアダプターをゲノムDNA断片に連結した場合、複数の制限酵素を用いた処理によって得られたゲノムDNA断片の全てにアダプターが連結されることとなる。この場合、アダプターに含まれるプライマー結合配列を用いて核酸増幅反応を行うことで、得られた全てのゲノムDNA断片を増幅することができる。
- [0048] 或いは、複数の制限酵素を使用してゲノムDNAを消化するとともに、使用し

た複数の制限酵素のなかから選ばれる1つの制限酵素若しくは、使用した制限酵素のうち一部の制限酵素に対応するアダプターをゲノムDNA断片に連結した場合、得られたゲノムDNA断片のうち、選ばれた制限酵素の認識配列を両末端に有するゲノムDNA断片のみを増幅することができる。

[0049] 次に、増幅されたゲノムDNA断片の塩基配列を決定し（工程1e）、当該ゲノムDNA断片より短い塩基長を有し、ゲノムDNA断片内の少なくとも一部をカバーする1又は複数の領域を特定し、特定した1又は複数の領域を、栽培いちごにおけるプローブとして設計する（工程1f）。ゲノムDNA断片の塩基配列を決定する方法は、特に限定されず、サンガー法等を適用したDNAシーケンサーを利用した従来公知の方法を使用することができる。ここで、設計する領域としては、上述したように、例えば20～100塩基長、好ましくは30～90塩基長、より好ましくは50～75塩基長とする。

[0050] 以上のように、栽培いちごから抽出したゲノムDNAを使用して多数のプローブを設計し、設計したプローブの塩基配列に基づいて、担体上にて目的の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成することでDNAマイクロアレイを作製することができる。このように作製したDNAマイクロアレイを使用することで、上述した配列番号1～10に示した10種類のイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーを含む1,502個と2,162個のマーカーを同定することができる。

[0051] より具体的に、本発明者らは、既知の栽培いちご品種さちのか、いちご中間母本農2号及びこれらの交配後代系統（133系統）について、上述したDNAマイクロアレイを用いてシグナルデータを取得した。そして、得られたシグナルデータから遺伝子型データを取得し、この遺伝子型データを元にして、遺伝地図作成ソフトウェアAntMap (Iwata H, Ninomiya S (2006) AntMap: constructing genetic linkage maps using an ant colony optimization algorithm. Breed Sci 56: 371-378) を使用し、遺伝距離計算式Kosambiにより染色体におけるマーカーの位置情報を算出した。さらに、取得したマーカーの位置情報をもとに、Mapmaker/EXP ver.3.0 (A Whitehead Institute for Bio

medical Research Technical Report, Third Edition, January, 1993) により遺伝地図データシートを作成した。その結果、上述した配列番号 1～10 に示した 10 種類のイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーを含む 1,502 個と 2,162 個のマーカーを同定している。

[0052] <イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの利用>

イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーを利用することで、炭疽病抵抗性が未知であるイチゴ属植物（例えば、後代系統）について炭疽病抵抗性を示す系統であるか判断することができる。ここで、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーを利用するとは、当該マーカーを含む核酸断片を特異的に増幅する方法を利用する形態、当該マーカーに対応するプローブを有する DNA マイクロアレイを利用する形態を含む意味である。

[0053] イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーを含む核酸断片を特異的に増幅する方法とは、いわゆる核酸増幅法を利用することを意味する。核酸増幅法としては、目的とする核酸断片を特異的に増幅するように設計したプライマーを使用する方法、プライマーを使用することなく目的とする核酸断片を特異的に増幅する方法が挙げられる。

[0054] 目的とする核酸断片を特異的に増幅するプライマーとは、核酸増幅法によって、上述のように定義されたイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーを含む核酸断片を増幅できるオリゴヌクレオチドを意味する。プライマーを使用する核酸増幅法としては、特に限定されず、PCR(Polymerase Chain Reaction)法に代表される核酸断片を増幅させるものであればどのようなものでもかまわない。例えば、PCR法以外に、RCA(Rolling Circle Amplification)法、CPT(Cycling Probe Technology)法、ICAN(Isothermal and Chimeric primer-initiated Amplification of Nucleic Acids)法、LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA)法、SDA(Strand Displacement Amplification)法、NASBA(Nucleic acid Sequence-based Amplification method)法、及びTMA(Transcription mediated amplification method)法等の公知の方法が例示できるが、これらに限定されるものではない。

- [0055] これら核酸増幅反応のうち例えばPCR法を利用する場合、イチゴ属植物の染色体におけるイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカークを挟み込むように一対のプライマーを設計する。また、LAMP法を利用する場合、イチゴ属植物の染色体におけるイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカークを挟み込むように4種類のプライマーを設計する。
- [0056] プライマーを使用しない核酸増幅法としては、特に限定されないが、LCR(Ligase Chain Reaction)法を挙げることができる。ただし、LCR法においても、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカークを含む核酸断片にハイブリダイズする複数のオリゴヌクレオチドを設計する。
- [0057] 以上のように、核酸増幅法によれば、検査対象のイチゴ属植物に上記イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカークが存在している場合、当該マーカークを含む核酸断片を増幅産物として得ることができる。言い換えると、検査対象のイチゴ属植物から抽出した染色体を鋳型とした核酸増幅法によって所期の核酸断片を増幅した場合には、当該検査対象のイチゴ属植物が炭疽病抵抗性を有すると判断することができる。
- [0058] 増幅した核酸断片を検出するには、特に限定されないが、増幅反応後の溶液をアガロース電気泳動にかけ、Ethidium BromideやSYBR Greenなどの蛍光性インターカレーターを結合させ特異的な蛍光を観察する方法、核酸増幅反応の溶液に蛍光性インターカレーターを添加し、増幅反応後の蛍光検出を行う方法、蛍光標識されたプライマーを用いて核酸増幅反応を行い、増幅反応後の蛍光検出を行う方法等を挙げることができる。
- [0059] なお、核酸増幅法を利用してイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカークを検出する場合、当該マーカークを含む増幅断片の塩基長は、核酸増幅方法の原理等によっても異なるが、例えば30~10000塩基長とすることができ、50~5000塩基長とすることが好ましく、70~2000塩基長とすることがより好ましい。
- [0060] また、イチゴ属植物における炭疽病抵抗性を判定する際、複数のイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカークを検出しても良い。すなわち、イチゴ属植物の染色体における配列番号1に示す塩基配列及び配列番号10に示す塩基配

列により挟まれる核酸領域から選ばれる複数の領域をイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとし、これら複数のイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーを検出しても良い。例えば、配列番号1～10の塩基配列からなる10個の領域から選ばれる複数の領域をイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとし、これら複数の領域を検出しても良い。

[0061] 一例としては、配列番号7の塩基配列からなる領域（IA200826）と配列番号8の塩基配列からなる領域（IA202631）とをそれぞれイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとし、これら各領域を核酸増幅法により増幅してイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの存否を確認することができる。或いは、一例として、配列番号7の塩基配列からなる領域（IA200826）と配列番号8の塩基配列からなる領域（IA202631）とで挟み込まれる領域をイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとし、この領域を核酸増幅法により増幅してイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの存否を確認することができる。

[0062] 一方、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーに対応するプローブを有するDNAマイクロアレイを利用する形態において、当該プローブとは、上述のように定義されたイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーに対して、ストリンジントな条件下で特異的にハイブリダイズできるオリゴヌクレオチドを意味する。このようなオリゴヌクレオチドは、例えば、上述のように定義されたイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの塩基配列又はその相補鎖の少なくとも連続する10塩基、15塩基、20塩基、25塩基、30塩基、35塩基、40塩基、45塩基、50塩基又はそれ以上の塩基長の部分領域若しくは全領域として設計することができる。なお、このプローブを有するDNAマイクロアレイとしては、ガラスやシリコン等の平面基板を担体とするマイクロアレイや、マイクロビーズを担体とするビーズアレイ、或いは中空繊維の内壁にプローブを固定する3次元マイクロアレイ等の如何なるタイプのマイクロアレイであってもよい。

[0063] 以上のように作製されたDNAマイクロアレイを使用することで、後代系統等に代表される炭疽病抵抗性の表現型が未知のイチゴ属植物について、炭疽病

抵抗性に優れるという表現型を示す系統であるか判断することができる。なお、上述したDNAマイクロアレイを使用する方法以外であっても、従来公知の手法を用いて上述したイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカ进行检测して、供試イチゴ属植物について炭疽病抵抗性に優れるという形質を有する系統であるか判断してもよい。DNAマイクロアレイを使用する方法以外の方法としては、例えば、上述したプローブを用いた、いわゆるFISH (fluorescence in situ hybridization) 法を適用することができる。

[0064] DNAマイクロアレイを使用する方法をより詳細に説明する。図2に示すように、先ず供試イチゴ属植物からゲノムDNAを抽出する。この供試イチゴ属植物とは、後代系統等の炭疽病抵抗性の表現型が未知のイチゴ属植物及び/又は後代系統を作製する際に使用した親のイチゴ属植物のことであり、炭疽病抵抗性に優れるといった形質を有するか判定する対象となるイチゴ属植物である。

[0065] 次に、抽出したゲノムDNAを、上記<イチゴ属植物におけるマーカ-の同定>の欄で説明したDNAマイクロアレイを作製する際に使用した制限酵素で消化して複数のゲノムDNA断片を調整する。次に、得られたゲノムDNA断片と、DNAマイクロアレイを作製する際に使用したアダプターとを連結する。次に、両末端にアダプターが付加されたゲノムDNA断片を、DNAマイクロアレイを作製する際に使用したプライマーを用いて増幅する。これにより、DNAマイクロアレイを作製する際の工程1dで増幅したゲノムDNA断片に対応する、供試イチゴ属植物由来のゲノムDNA断片を増幅することができる。

[0066] この工程においては、アダプターが付加されたゲノムDNA断片のうち、所定のゲノムDNA断片を選択的に増幅してもよい。例えば、複数の制限酵素に対応する複数のアダプターを使用した場合には、特定のアダプターが付加されたゲノムDNA断片を選択的に増幅することができる。また、複数の制限酵素でゲノムDNAを消化した場合、得られたゲノムDNA断片のうち、所定の制限酵素に対応する突出末端を有するゲノムDNA断片のみにアダプターを付加することで、アダプターが付加されたゲノムDNA断片を選択的に増幅することができる。

このように、所定のゲノムDNA断片を選択的に増幅することで濃縮することができる。

[0067] 次に、増幅したゲノムDNA断片に標識を付加する。標識としては、従来公知の如何なる物質を使用しても良い。標識としては、例えば蛍光分子、色素分子、放射性分子等を使用することができる。なお、本工程は、ゲノムDNA断片を増幅する工程において標識を有するヌクレオチドを用いることで省略することができる。上記工程において標識を有するヌクレオチドを用いてゲノムDNA断片を増幅することで、増幅されたDNA断片が標識化されるためである。

[0068] 次に、標識を有するゲノムDNA断片を所定の条件下でDNAマイクロアレイに接触させ、DNAマイクロアレイに固定されたプローブと標識を有するゲノムDNA断片とをハイブリダイズさせる。このとき、ハイブリダイズさせる際には高いストリンジエンシー条件とすることが好ましい。このような高いストリンジエンシー条件とすることによって、供試イチゴ属植物にイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーが存在しているか否かを、より高精度に判定することができる。なお、ストリンジエンシー条件は、反応温度及び塩濃度で調節することができる。すなわち、より高温とすることでより高いストリンジエンシー条件となり、またより低い塩濃度でより高いストリンジエンシー条件となる。例えば、50～75塩基長のプローブを使用する場合、ハイブリダイゼーション条件としては、40～44℃、0.2%SDS、6×SSCの条件とすることでより高いストリンジエンシー条件とすることができる。

[0069] また、プローブと標識を有するゲノムDNA断片とのハイブリダイズは、標識に基づいて検出することができる。すなわち、上述した標識を有するゲノムDNA断片とプローブのハイブリダイズ反応の後、未反応のゲノムDNA断片等を洗浄し、その後、プローブに対して特異的にハイブリダイズしたゲノムDNA断片の標識を観察する。例えば、標識が蛍光物質である場合にはその蛍光波長を検出し、標識が色素分子であればその色素波長を検出する。より具体的には、通常のDNAマイクロアレイ解析に使用している、蛍光検出装置やイメージアナライザー等の装置を使用することができる。

[0070] 以上のように、核酸増幅法を利用する方法或いはDNAマイクロアレイを使用する方法により、供試イチゴ属植物が上述したイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカを有するか否か判断することができる。ここで、上述したように、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカのうち、炭疽病抵抗性に優れるという形質に連鎖するイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカが存在していれば、炭疽病抵抗性に優れる系統・品種と判断できる。また、上述したように、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカのうち、炭疽病抵抗性が低下する形質に連鎖するイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカが非存在であれば、炭疽病抵抗性に優れる系統・品種と判断できる。

[0071] 特に、上述した方法では、供試イチゴ属植物を実際の炭疽病抵抗性試験を実施可能な程度まで成長させる必要はなく、例えば後代系統の種子や当該種子を発芽させた幼苗を使用することができる。したがって、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカを利用することによって、供試イチゴ属植物を生育させるための圃場やその他、生育のためのコストを大幅に削減することができる。また、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカを利用することによって、実際に炭疽菌の原因微生物 (*Glomerella cingulate*及び/又は*Colletotrichum acutatum*) を感染させる必要がなく、大規模専用温室や専用圃場、外部との隔離施設など設備等にかかるコストを削減できる。

[0072] 特に、イチゴ属植物の新品種作出に際して、先ず、交配により数万種類の交配種を作製した後、実生選抜に先立って若しくは実生選抜に代えて、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカを利用した判断を行うことが好ましい。これにより、実際の圃場において、優良な系統を栽培する数を大幅に削減することができ、イチゴ属植物の新品種作出に係る手間やコストを大幅に抑制することができる。

[0073] 或いは、イチゴ属植物の新品種作出に際して、先ず、交配に使用する親品種におけるイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカの存在の有無を判定し、炭疽病抵抗性に優れた親品種を選抜することもできる。炭疽病抵抗性に優れた親品種を優先的に使用して後代系統を作出することで、炭疽病抵抗性に優

れた後代系統が高頻度に出現すると期待できる。これにより、優良な系統を栽培する数を大幅に削減することができ、イチゴ属植物の新品種作出に係る手間やコストを大幅に抑制することができる。

実施例

[0074] 以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

[0075] 1. DNAマイクロアレイ用プローブの作成

(1)材料

栽培いちご品種：さちのか及びいちご中間母本農2号を用いた。

[0076] (2)制限酵素処理

これら栽培いちご品種からそれぞれゲノムDNAをCTAB法 (Cetyl trimethyl ammonium bromide法) により抽出した。抽出したゲノムDNA(180ng)を制限酵素PstI(NEB社、6unit)で37℃、1時間処理した。その後、PstI処理後のゲノムDNA(150ng)を制限酵素BstNI(NEB社、5unit)を添加、60℃で1時間処理した。

[0077] (3)アダプターライゲーション

(2)で処理したゲノムDNA断片(120ng)にPstI配列アダプター(5' -CACGATGGATCCAGTGCA-3' (配列番号11)、5' -CTGGATCCATCGTGCA-3' (配列番号12))とT4 DNA Ligase(NEB社、800 unit)を加え、16℃で4時間以上の条件でライゲーション反応を行った。これにより、(2)で処理したゲノムDNA断片のうち、両末端にPstI認識配列を有するゲノムDNA断片に対して選択的にアダプターを付加した。

[0078] (4)PCR増幅

(3)で得られたアダプターを有するゲノムDNA断片(15ng)にPstI配列アダプター認識プライマー(5' -GATGGATCCAGTGCA-3' (配列番号13))とTaq polymerase(タカラバイオ社PrimeSTAR、1.25unit)を加え、PCR(98℃を10秒間、55℃を15秒間、72℃を1分間を1サイクルとして30サイクル実施後、72℃で3分間処理後、4℃で保存)でゲノムDNA断片を増幅した。

[0079] (5)ゲノムシーケンス取得

(4)においてPCR増幅したゲノムDNA断片についてGAII(Illumina社)を用いて塩基配列を決定した。

[0080] (6)プローブ設計及びDNAマイクロアレイの作成

(5)のゲノムシーケンス情報をもとに50~75bpのプローブを設計した。設計したプローブの塩基配列情報をもとに、これらプローブを有するDNAマイクロアレイを作製した。

[0081] 2. DNAマイクロアレイを用いたシグナルデータの取得

(1)材料

栽培いちご品種：さちのか、いちご中間母本農2号及びこれらの交雑後代133系統を用いた。

[0082] (2)制限酵素処理

これら栽培いちご品種及び交雑後代からそれぞれゲノムDNAをCTAB法により抽出した。抽出したゲノムDNA(180ng)を制限酵素PstI(NEB社、6unit)で37℃、1時間処理した。その後、PstI処理後のゲノムDNA(150ng)を制限酵素BstNI(NEB社、5unit)を添加、60℃で1時間処理した。

[0083] (3)アダプターライゲーション

(2)で処理したゲノムDNA断片(120ng)にPstI配列アダプター(5' -CACGATGGATCCAGTGCA-3' (配列番号11)、5' -CTGGATCCATCGTGCA-3' (配列番号12))とT4 DNA Ligase(NEB社、800 unit)を加え、16℃で4時間以上の条件でライゲーション反応を行った。これにより、(2)で処理したゲノムDNA断片のうち、両末端にPstI認識配列を有するゲノムDNA断片に対して選択的にアダプターを付加した。

[0084] (4)PCR増幅

(3)で得られたアダプターを有するゲノムDNA断片(15ng)にPstI配列アダプター認識プライマー(5' -GATGGATCCAGTGCA-3' (配列番号13))とTaq polymerase(タカラバイオ社PrimeSTAR、1.25unit)を加え、PCR(98℃を10秒間、55℃を15秒間、72℃を1分間を1サイクルとして30サイクル実施後、72℃で3分間処理後、4℃で保存)でゲノムDNA断片を増幅した。

[0085] (5)ラベル化

上述した(4)で得られたPCR増幅断片をカラム(Qiagen社)で精製後、NimbleGen Arrays User's Guideに従ってNimbleGen One-Color DNA Labelingを用いてラベル化サンプルを調整した。

[0086] (6)ハイブリ・シグナル検出

(5)のラベル化サンプルを用い、NimbleGen Array User's Guideに従い、上記1. で作製したDNAマイクロアレイを用いてハイブリダイズを行い、ラベルに基づくシグナルを検出した。

[0087] 3. イチゴ属植物炭疽病抵抗性のQTLの同定及びマーカーの開発

(1)遺伝地図データ作成

さちのか、いちご中間母本農2号、交雑後代133系統のシグナルデータから、さちのか型の1,502個のマーカー及びいちご中間母本農2号型の2,162個のマーカーとなりうる遺伝子型データを取得した。遺伝子型データをもとに、遺伝地図作成ソフトウェアAntMap (Iwata H, Ninomiya S (2006) AntMap: constructing genetic linkage maps using an ant colony optimization algorithm. Breed Sci 56: 371-378) を使用し、遺伝距離計算式Kosambiにより染色体におけるマーカーの位置情報を算出してマーカーの遺伝地図データを取得した。

[0088] (2)イチゴ炭疽病検定試験データの取得

さちのか、いちご中間母本農2号、交雑後代103系統のランナー増殖したクローン株を検定株とした。各検定株について1区5株×3反復で栽培した。接種2日前までに展開葉が3~4枚になるように下葉を除去して葉数をそろえた。

[0089] そして、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構の野菜茶業研究所が保有しているイチゴ炭疽病菌株 (*Glomerella cingulate*) をPS液体培地(1000mlに対しマッシュポテト20g、しょ糖2%)中にて5日間振盪培養(120rpm)した。培養液をガーゼで濾過した後、分生胞子を 10^5 個/mlの濃度に調整したものを接種源(分生胞子懸濁液)とした。2012年9月19日、気温が低下し始める午後

3時より、調整した接種源(分生孢子懸濁液)を電池式肩掛け動力噴霧器にて、展着剤などは添加せずに、植物体が全体的に濡れる程度まで噴霧した。

[0090] その後、寒冷紗で内張遮光をしたガラス室内で発病させた。接種当日から翌日の昼までガラス室を閉めきり、多湿に保った。その後、天窓・側窓を自動開閉(25℃)として、温度は成り行きで管理した。イチゴ炭疽病罹病株の調査は、10月19日に各品種・系統について萎凋もしくは枯死した株の割合として調査した。調査結果を図3に示した。

[0091] (3)量的形質 (Quantitative trait loci: QTL) の解析

上記(1)で得られた遺伝地図データ及び上記(2)で得られたイチゴ炭疽病検定試験データ(萎凋・枯死株率)をもとに、遺伝解析ソフトQTL Cartographer (Wang S., C. J. Basten, and Z.-B. Zeng (2010). Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC) を使用し、Composite interval mapping (CIM) 法によりQTL解析を行った。LODの閾値は2.5を用いた。その結果、図4に示すように、いちご中間母本農2号の第23連鎖群のマーカーIA204069からIA201502の区間内にLOD値18.3のイチゴの炭疽病抵抗性に関する遺伝子の存在を示唆するピークを確認することができた。得られたピークは表2に示すように特定することができ、当該ピークの位置に炭疽病抵抗性を向上させる機能を有する原因遺伝子(群)が存在することが示唆された。

[表2]

品種	連鎖群	位置 (cM)	範囲 (cM)	近接マーカー	LOD値	効果* (%)	寄与率 (%)
中間母本農2号	23	12.9	29.0	IA204069 - IA201502	18.3	-38.4	45.0

*:炭疽病萎凋・枯死株率(%)

[0092] なお、表2において効果(%)の欄は、炭疽病萎凋・枯死株率を示している。よって、効果(%)の数値が負である場合、当該QTLは炭疽病抵抗性が向上する形質に連鎖することを意味している。

[0093] そして、図4に示すように、当該ピークの近傍に位置するマーカーは、炭疽病抵抗性を向上させる機能を有する原因遺伝子(群)と連鎖して遺伝する

ため、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとして使用できることが示された。すなわち、図4に示した10種類のマーカーは、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーとして使用できることが明らかとなった。

[0094] また、本実施例で作成したプローブの塩基配列及びシグナル値の閾値を表3に示した。

[表3]

配列番号	マーカー名	プローブ配列	シグナル閾値
11	IA204069	GCGTTACTAATTGATATTGGGTTTACAATAAGTATCAATTTGCTA AAGCTAGCTACAACAGCACTACAGCA	1,000
12	IA204291	TGAAGTAAACCAATGGAAAAGGGCAGAAGAAATGAGACTAGAAGA GGCAAAAGTAGC	1,400
13	IA202531	TGGAAGAGGTGATCCAGAGTTCTAACTATATAGCATCACTGTTT ATTAAATCGTCACG	1,300
14	IA200064	GAATAAGTTCAACATTATCAAGGAAAATGAAGCAATTTATCTCTG CAAGGTTTTAGAGGTAACAAAT	1,900
15	IA205184	ATTGTTGTCTAAATAGCTGAATGAGTAATTGAGGCTATGGGCCAA TGAGCCCA	1,300
16	IA202854	TTTCATTTTAAACAGAAGTTTTTCATTTTCTTTATACGCCTAAGC TAAAACTTTTATAATC	1,300
17	IA200826	GTGCTGTTGTGCTCAGTCTCATTAAATACAACGTATATAGTGATGACT GGTGCTAATCTTCTATTTTCATCTG	2,800
18	IA202631	TGTATGTATCTGTATCTGTATCTATCTCATATCTCTATGTAAC TATATAAGACAACCTCACAGCTGCACT	1,900
19	IA202517R	GCCGACCAGTCGCTATGTTTTTATTTTGTCAAATGTACGTGTG TGTCTCAATAGTTTCTTTTCAA	1,300
20	IA201502	CGTTTCTACTTCAACCGAAATATGGTACCTGCAACTGTTAATTT GTAAAACAACCTGACAGATTA	2,500

[0095] 表3に示したプローブを利用して、さちのか及びいちご中間母本農2号、並びに後代系統について、マーカーIA204069からIA201502のシグナルを検出した結果をそれぞれ図5乃至14に示した（なお、図5乃至14において中母2号*はいちご中間母本農2号を意味している）。また、検出結果を表4に纏めて示した。

[表4]

連鎖群	マーカー名	さちのか	中間 母本 農2号	F1							
				1	2	3	4	5	6	7	8
	IA204069	529	1,216	1,352	417	1,370	2,141	570	1,770	532	621
	IA204291	737	2,484	2,545	607	2,803	2,788	627	2,672	635	597
	IA202531	593	2,695	2,997	402	3,008	4,755	511	4,864	492	448
	IA200064	816	5,128	5,829	875	6,168	5,584	671	5,311	618	653
中間母本 農2号	IA205184	515	3,408	3,727	422	3,553	3,069	460	2,565	490	451
23連鎖群	IA202854	1,052	2,222	2,540	489	2,454	2,562	1,053	2,415	787	907
	IA200826	457	13,950	15,663	386	17,189	21,362	412	20,572	417	407
	IA202631	407	9,148	9,729	394	10,790	12,522	394	10,238	404	373
	IA202517R*	646	2,655	879	1,615	816	542	2,169	770	2,251	2,879
	IA201502	417	13,076	13,283	463	13,848	17,816	427	15,042	412	401
炭疽病萎凋・枯死株率(%)		60.0	20.0	20.0	85.0	13.3	8.3	73.3	0.0	73.3	73.3

[0096] 表4及び図5～14に示すように、いちご中間母本農2号の第23連鎖群のマーカーIA204069からIA201502の領域は、イチゴ属植における炭疽病萎凋・枯死株率(%)と高い関連性を示すことが明らかとなった。

[0097] 4. PCRベースマーカーの開発

また、本実施例では、いちご中間母本農2号の第23連鎖群のマーカーIA204069からIA201502の領域のなかからマーカーIA202631及びIA200826をPCRによって増幅するプライマーを設計した。

[0098] (1)プライマー作製

シーケンスアセンブリソフトウェアATGC ver.6を使い、マーカーIA202631及びIA200826の配列情報から、それぞれの配列を識別するプライマーを作製した。すなわち、IA202631についてはCGGTAAACCCCTCCTAGAAAATC (IA202631F_2A : 配列番号24)とTGCAGCTGTGAGGTTGTCTTTAT (IA202631R_111A : 配列番号25)を設計し、IA200826についてはCTGCAGAAAAGGAGAAGAAGTTC (IA200826F_1A : 配列番号26)とGCCAGATGAAATAGAAGATTAGCACC (IA200826R_259A : 配列番号27)を設計した。

また、同様に、シーケンスアセンブリソフトウェアATGC ver.6を使い、マ

ーカマーIA202531及びIA200064の配列情報から、それぞれの配列を識別するプライマーを作製した。すなわち、IA202531についてはGCTACTCATAGTAGGTCGATTGGAAG：配列番号28とCTGCAGTTTACATGCAGCAGA：配列番号29を設計し、IA200064についてはAAGTTCAACATTATCAAGGAAAATGAA：配列番号30とAATTGATAACTATTAACAGCAGTCAGG：配列番号31を設計した。

[0099] (2)PCR増幅

イチゴ品種さちのか、いちご中間母本農2号および交雑後代12系統のゲノムDNA (15ng) に、上記プライマーペアとTaq polymerase (タカラバイオ社、PrimeSTAR、0.5 unit) を加え、PCR (98°Cを10秒間、55°Cを5秒間、72°Cを1分間、30サイクル後、72°Cで3分間処理後、4°Cで保存) で増幅した。PCR増幅したDNA断片は、電気泳動 (2.0 %アガロースゲル、TAE、100 v 30分) により確認した。マーカーIA200826をPCR増幅した結果を図15に示し、マーカーIA202631をPCR増幅した結果を図16に示した。図15及び図16に示すように、表4に示したシグナルデータと一致して、いずれのプライマーペアも目的のバンドパターンを増幅できることが示された。

[0100] また、マーカーIA202531をPCR増幅した結果を図20に示した。図20に示すように、マーカーIA202531についても、表4に示したシグナルデータと一致して、上述のように設計したプライマーペアにより目的のバンドパターンを増幅できることが示された。

[0101] ところで、マーカーIA200064については、イチゴ品種さちのか、いちご中間母本農2号のゲノムDNAを鋳型としたPCRの後、PCR増幅したDNA断片をサンガー法でシーケンスした。その結果、さちのかゲノムからは配列番号32に示す配列情報が得られ、中間母本農2号ゲノムからは配列番号32に示す配列情報と配列番号4に示す配列情報が得られた。配列番号32と配列番号4とにおける257番目は、SNP (配列番号32ではA、配列番号4ではT) であることが判明した。配列番号32において、257番目のAから6塩基 (ATGCAT) は、制限酵素Nsi Iの認識配列 (ATGCAT) と一致していた。

[0102] そして、マーカーIA200064を上記他のマーカーと同様にPCR増幅し、PCR増

幅したDNA断片にNsi I (NEB社、2 unit) を加え、37°Cで1時間処理した。制限酵素処理したDNA断片は、電気泳動 (2.0 %アガロースゲル、TAE、100 v 30分) により確認した。マーカーIA200064をPCR増幅し、制限酵素処理した結果を図21に示した。制限酵素認識部位を有するさちのかでは247塩基と261塩基近傍にバンドが現れたが、一方、中間母本農2号では、247塩基と261塩基近傍のバンドに加え500塩基近傍にバンドが現れた。図21に示すように、500塩基近傍のバンドは、表4に示したシグナルデータと一致して、上述のように設計したプライマーペアにより目的のバンドパターンを増幅できることが示された。

[0103] 5. 炭疽病抵抗性系統の選抜

(1) 遺伝子型データと炭疽病萎凋・枯死株率

イチゴ品種さちのか、いちご中間母本農2号および交雑後代133系統の選抜マーカーIA200826の遺伝子型データと炭疽病萎凋・枯死株率を比較した (図17)。イチゴ炭疽病への抵抗性に優れる系統の多くは、選抜マーカーIA200826を持っていた (平均10.6%)。一方、イチゴ炭疽病への罹病性を示す系統の多くは、選抜マーカーIA200826を持っていなかった (平均49.8%)。T検定の結果、有意水準1%で両平均値に有意な差が認められた。

[0104] (2) 未知系統の選抜

I. ゲノムDNAの抽出

新たに、イチゴ品種さちのか、いちご中間母本農2号の交雑後代2系統(A及びB)について、CTAB法によりゲノムDNAを抽出した。

II. 選抜マーカーによる検定

イチゴ品種さちのか、いちご中間母本農2号および交雑後代2系統(A及びB)のゲノムDNA (15ng) に、上記4. で設計したIA202631プライマーペア (IA202631F_2A及びIA202631R_111A) 或いはIA200826プライマーペア (IA200826F_1A及びIA200826R_259A) とTaq polymerase (タカラバイオ社、PrimeSTAR、0.5 unit) を加え、PCR (98°Cを10秒間、55°Cを5秒間、72°Cを1分間、30サイクル後、72°Cで3分間処理後、4°Cで保存) で増幅した。PCR増幅したDNA断片は

、電気泳動（2.0 %アガロースゲル、TAE、100 v 30分）により確認した。その結果を図18に示した。図18に示すように、交雑後代A系統は、IA202631及びIA200826のいずれのマーカースも保有していなかった。一方、交雑後代B系統は、IA202631及びIA200826の両方のマーカースを保有していた。

III. 炭疽病検定試験データとの比較

炭疽病検定試験の結果、交雑後代A系統及び交雑後代B系統の炭疽病萎凋・枯死株率は、それぞれ80.0%と13.3%であった。T検定の結果、有意水準1%で系統Aおよび系統Bの炭疽病萎凋・枯死株率に有意な差が認められた。IA202631及びIA200826マーカースを保有していた交雑後代B系統は、炭疽病萎凋・枯死株率が低く、イチゴ炭疽病の抵抗性に優れていた。一方、IA202631及びIA200826のマーカースをいずれも保有していなかった交雑後代A系統は、炭疽病萎凋・枯死株率が高く、イチゴ炭疽病の抵抗性が劣っていた。以上の結果から、これらのマーカースを利用することで、炭疽病抵抗性に優れる系統、炭疽病抵抗性に劣る系統を判別できることが明らかとなった。

[0105] IV. マーカー間領域でのPCR増幅

イチゴ品種さちのか、いちご中間母本農2号のゲノムDNA（15ng）に、プライマーペア（IA200826F_1AおよびIA202631R_111A）とTaq polymerase（タカラバイオ社、PrimeSTAR、0.5 unit）を加え、PCR（98℃を10秒間、55℃を5秒間、72℃を2分間、25サイクル後、72℃で3分間処理後、4℃で保存）で増幅した。PCR増幅したDNA断片は、電気泳動（2.0 %アガロースゲル、TAE、100 v 30分）により確認した。その結果を図19に示した。図19に示すように、いちご中間母本農2号では、1.4kbpのPCR増幅したDNA断片が確認された。すなわち、いちご中間母本農2号の第23連鎖群のマーカースIA204069からIA201502の領域のなかからマーカースIA202631及びIA200826を含む領域をPCRによって増幅することができた。

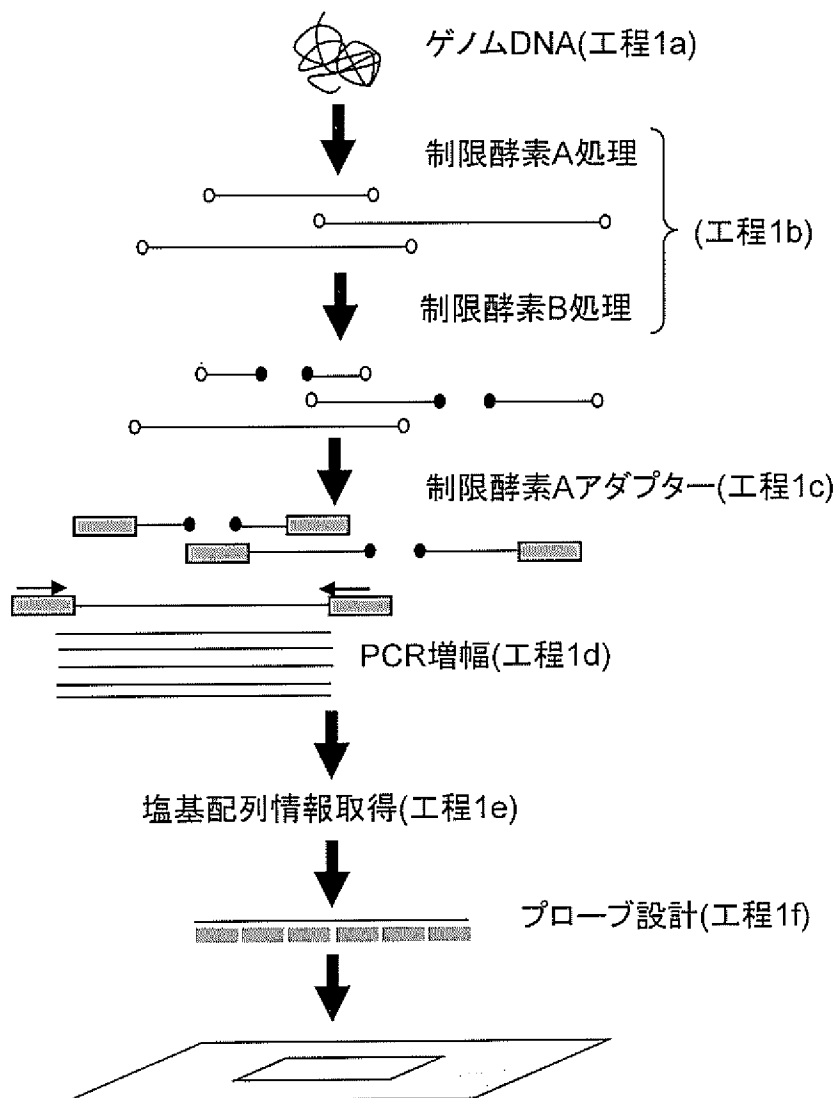
[0106] この結果から、いちご中間母本農2号の第23連鎖群のマーカースIA204069からIA201502の領域のなかから複数のマーカースを一对のプライマーペアで増幅して、イチゴ属植物炭疽病を判別できることが明らかとなった。

[0107] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

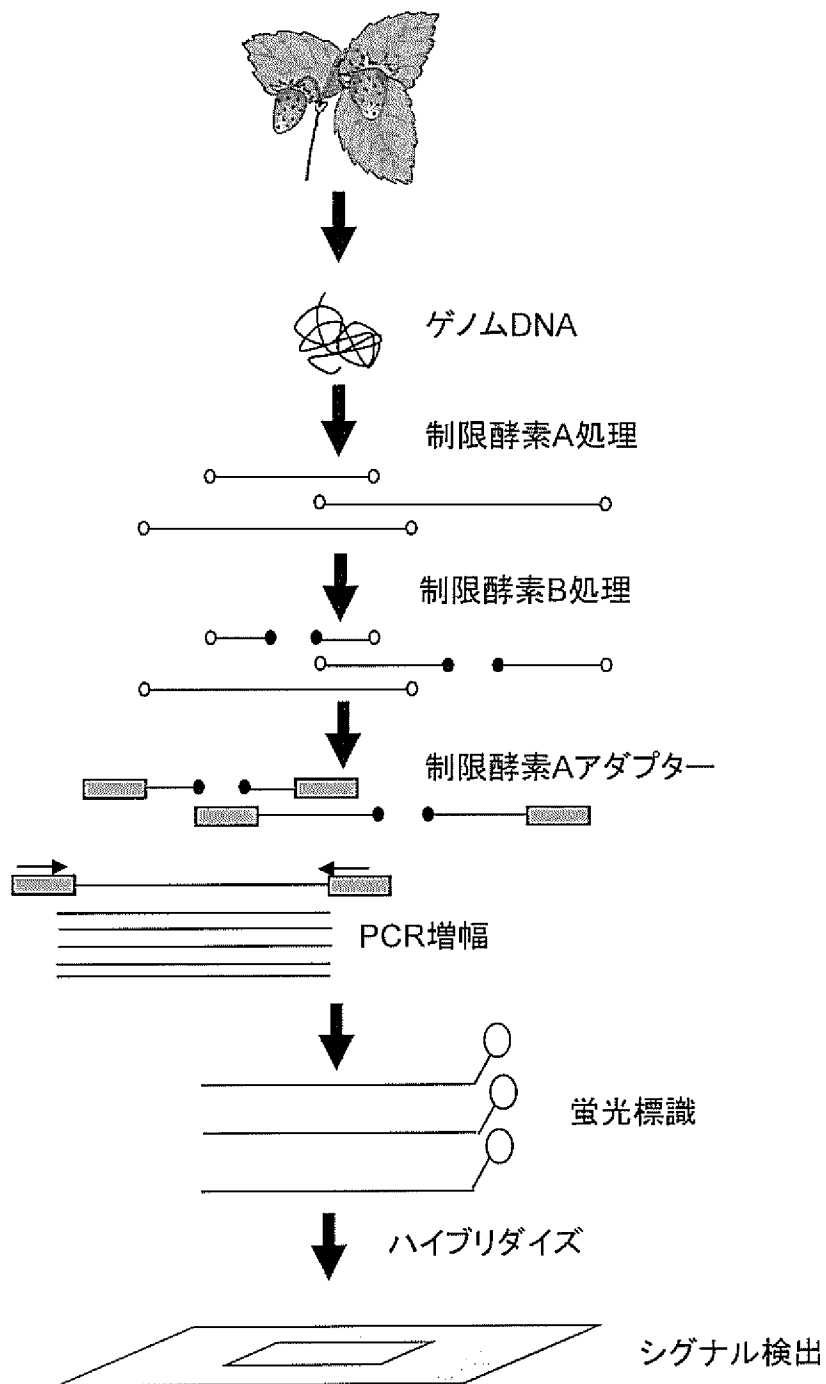
請求の範囲

- [請求項1] イチゴ属植物の染色体における配列番号1に示す塩基配列及び配列番号10に示す塩基配列により挟まれる連続する核酸領域からなる、イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカー。
- [請求項2] 上記核酸領域は、配列番号1～10からなる群から選ばれるいずれか1の塩基配列又は当該塩基配列の一部を含むことを特徴とする請求項1記載のイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカー。
- [請求項3] 上記核酸領域は、イチゴ属植物の染色体における配列番号4に示す塩基配列と配列番号8に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域に位置することを特徴とする請求項1記載のイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカー。
- [請求項4] 少なくとも一方の親がイチゴ属植物である後代植物の染色体及び/又は当該親のイチゴ属植物の染色体を抽出する工程と、
上記で得られた染色体における上記請求項1乃至3いずれか1に記載のイチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの存在・非存在を測定する工程とを含む、炭疽病抵抗性が向上したイチゴ属植物系統の製造方法。
- [請求項5] 上記測定する工程では、上記イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーを特異的に増幅するプライマーを用いた核酸増幅反応により当該イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーの存在・非存在を測定することを特徴とする請求項4記載のイチゴ属植物系統の製造方法。
- [請求項6] 上記測定する工程では、上記イチゴ属植物炭疽病抵抗性関連マーカーに対応するプローブを備えるDNAチップを使用することを特徴とする請求項4記載のイチゴ属植物系統の製造方法。
- [請求項7] 上記後代植物は種子又は幼苗であり、当該種子又は幼苗から染色体を抽出することを特徴とする請求項4記載のイチゴ属植物系統の製造方法。

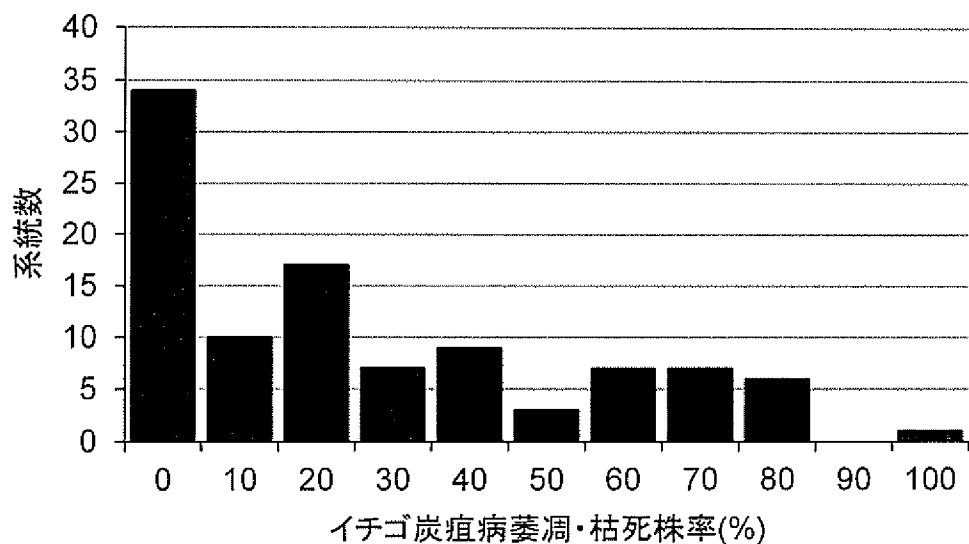
[図1]



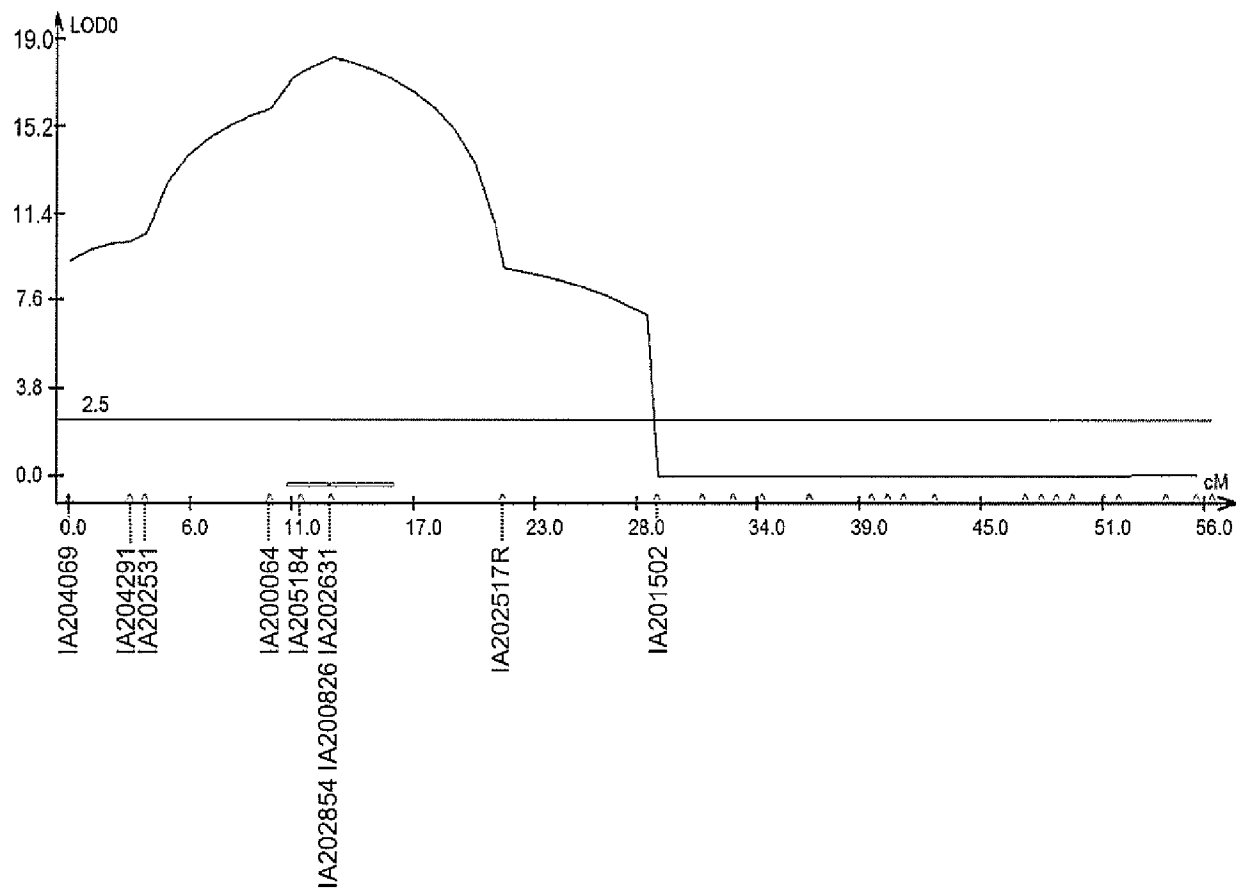
[図2]



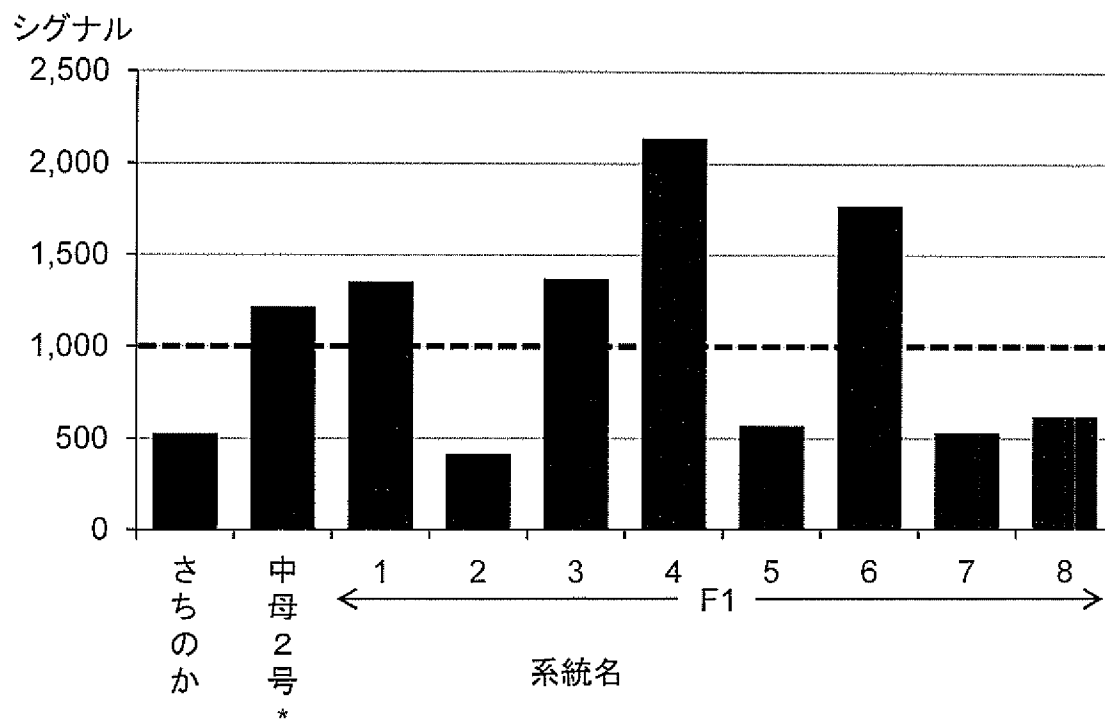
[図3]



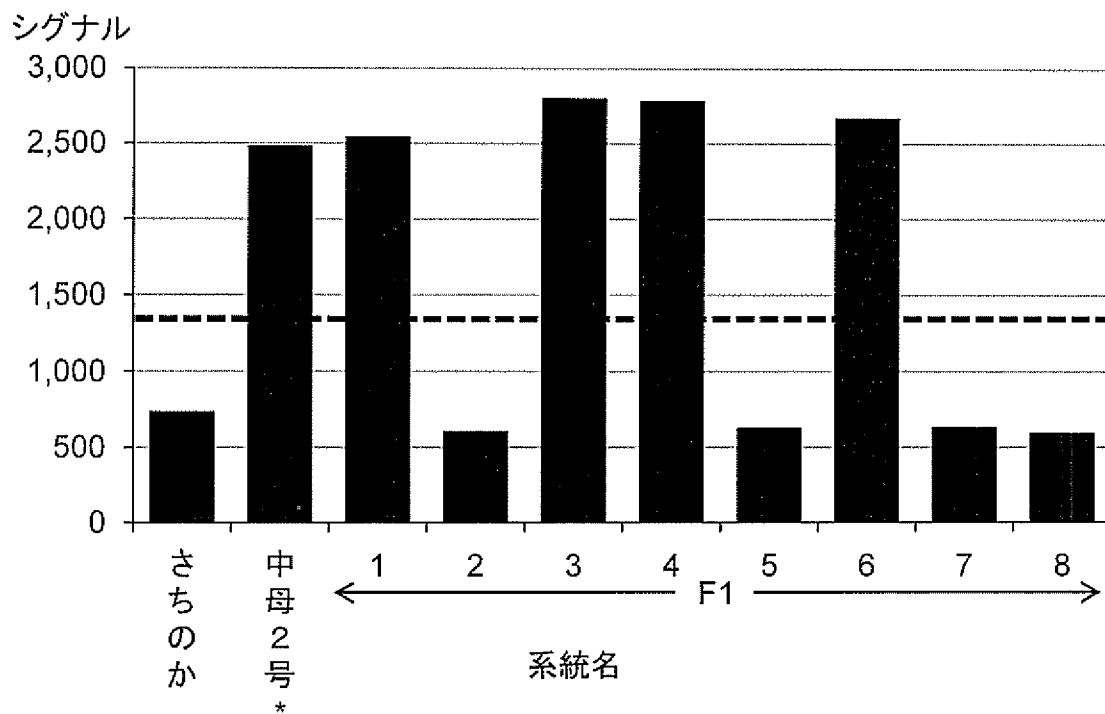
[図4]



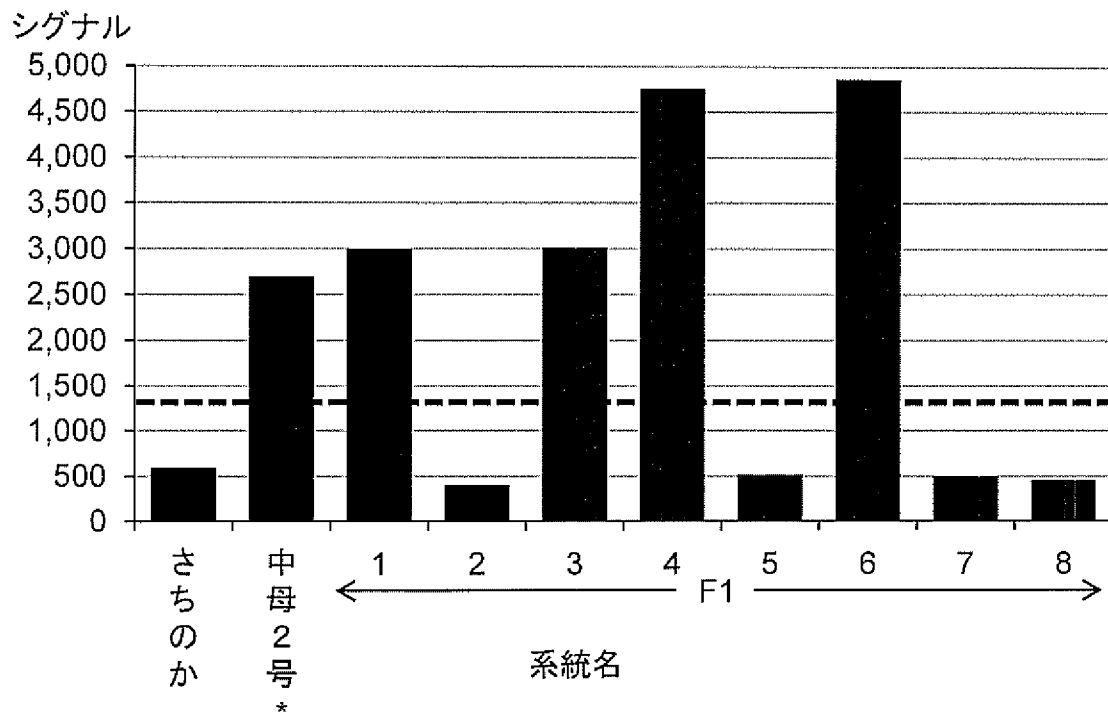
[図5]



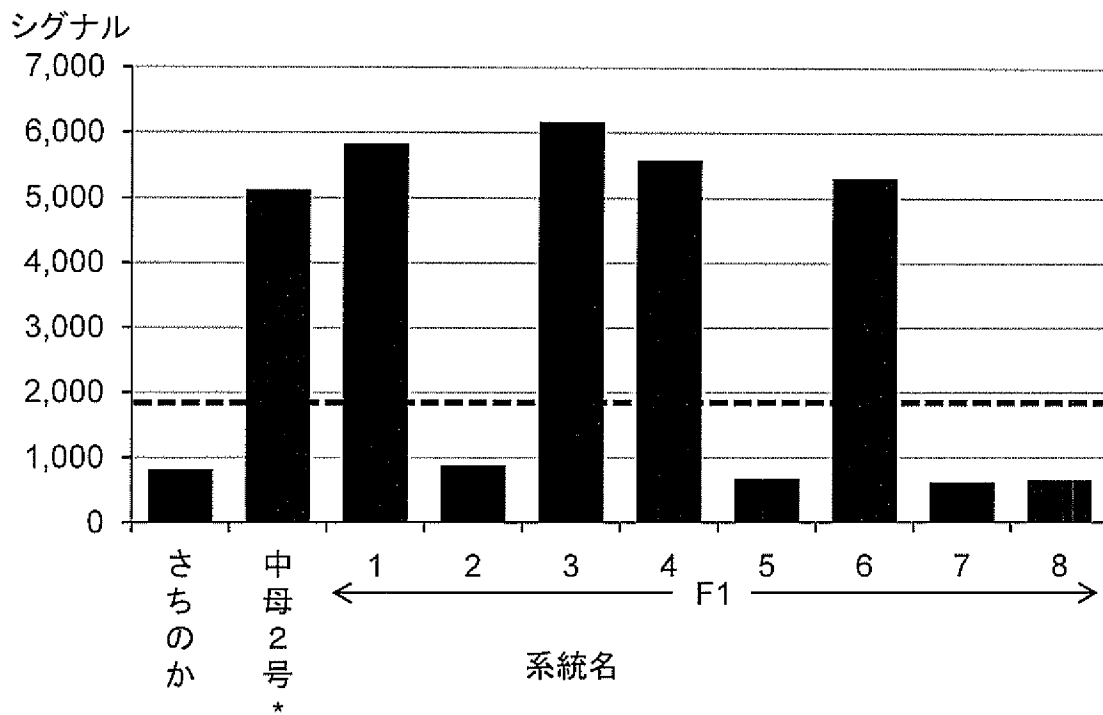
[図6]



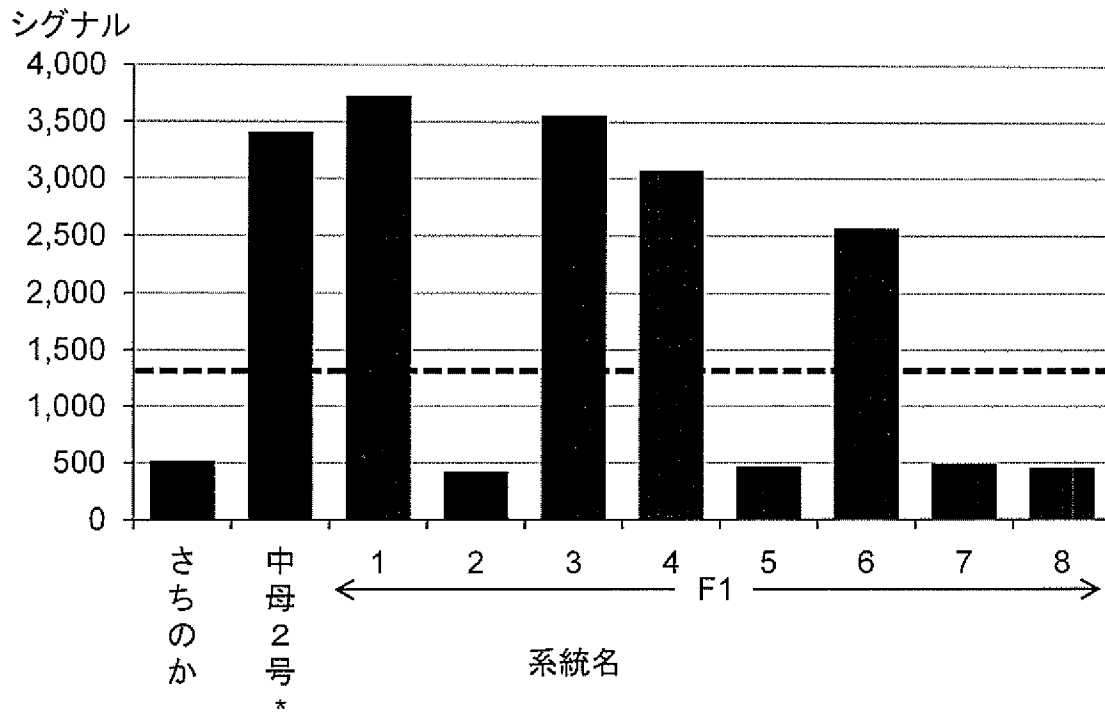
[図7]



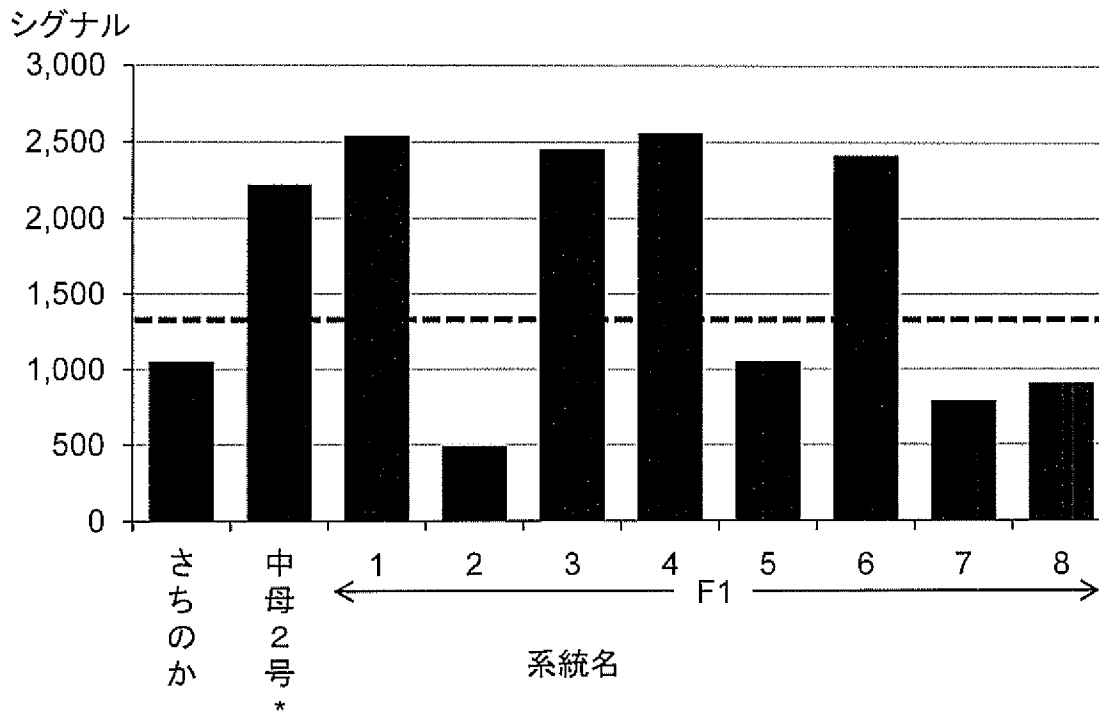
[図8]



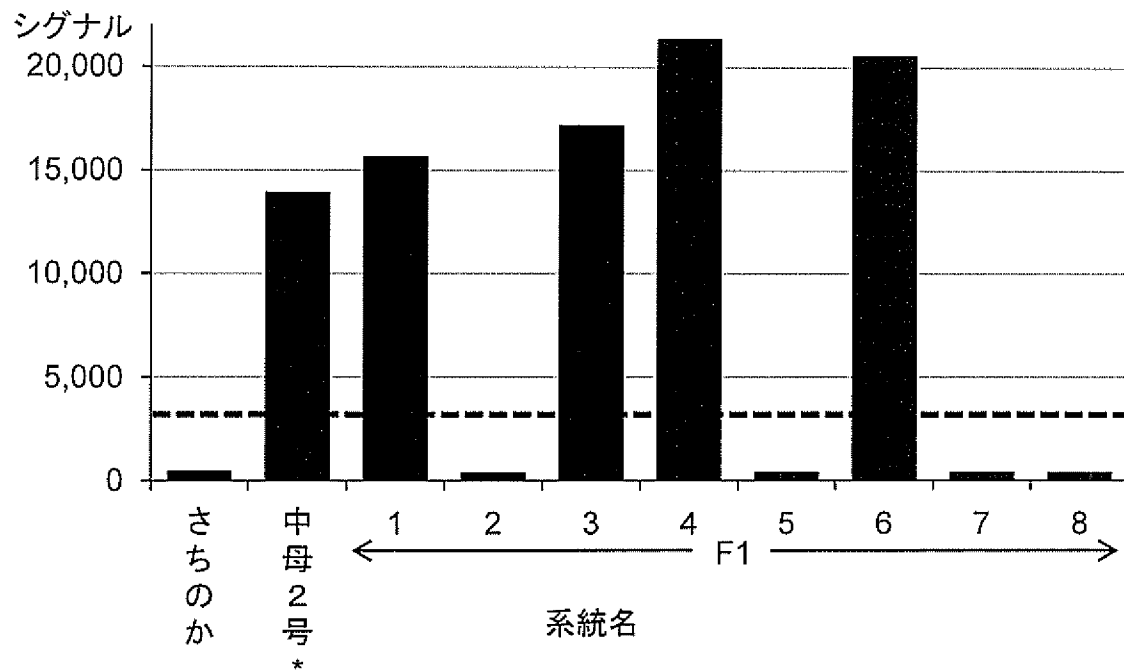
[図9]



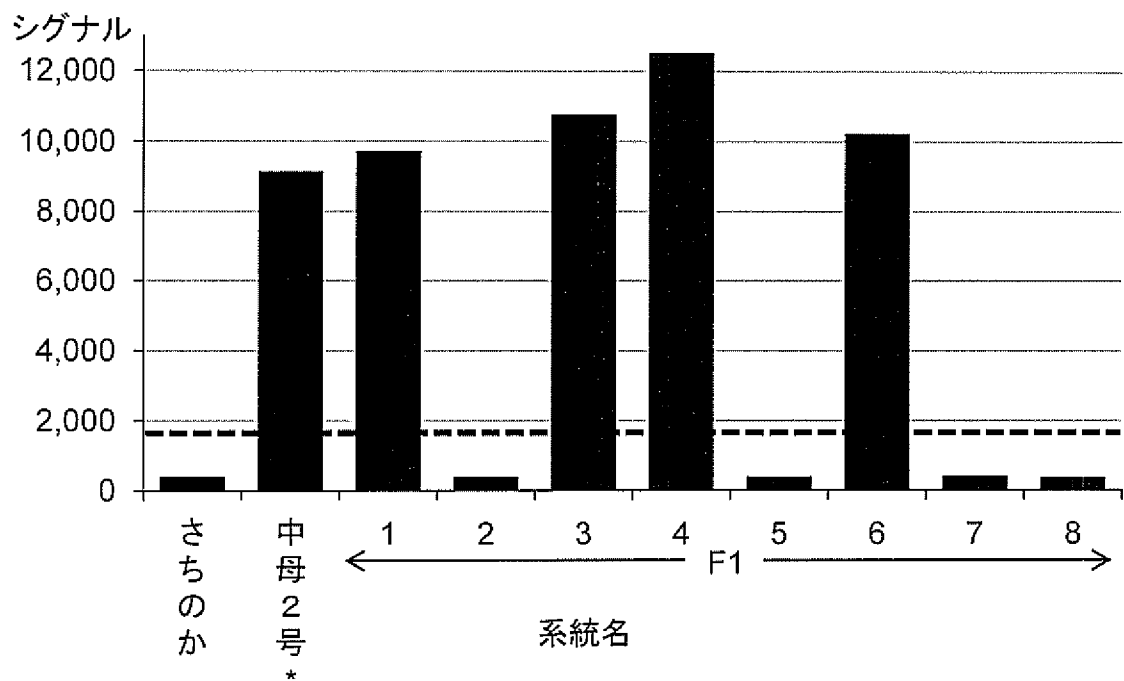
[図10]



[図11]

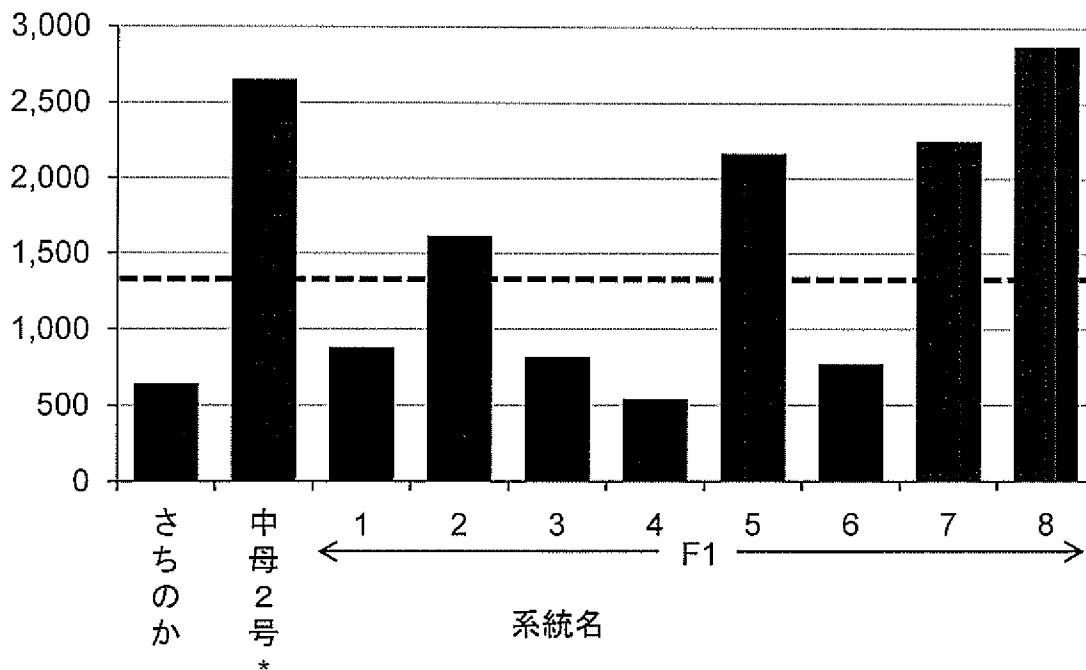


[図12]



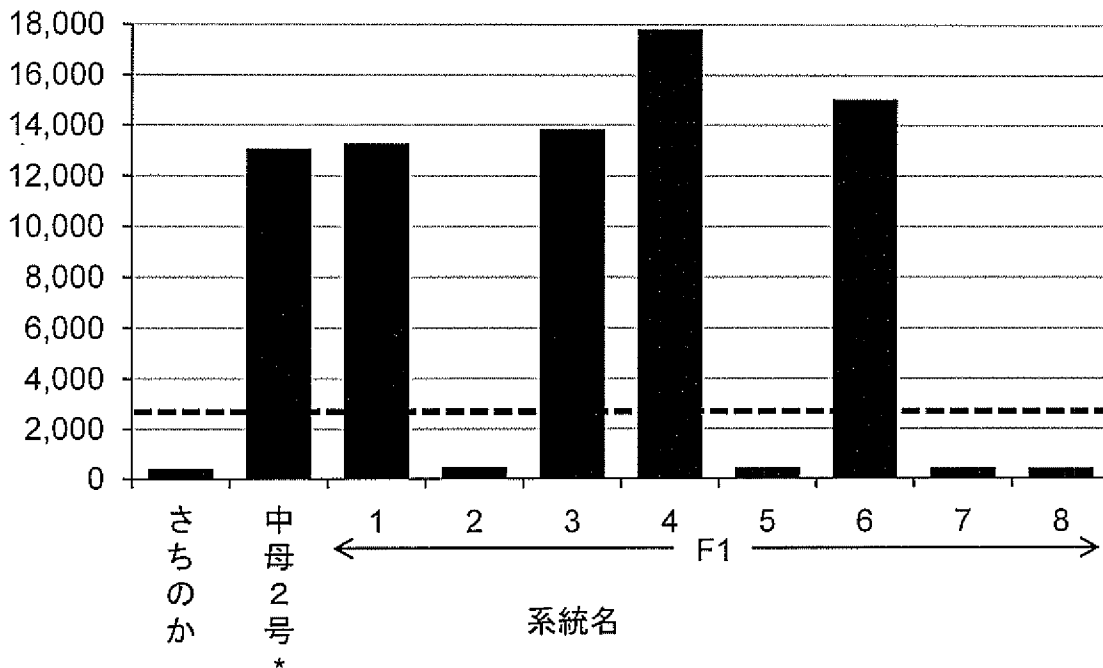
[図13]

シグナル

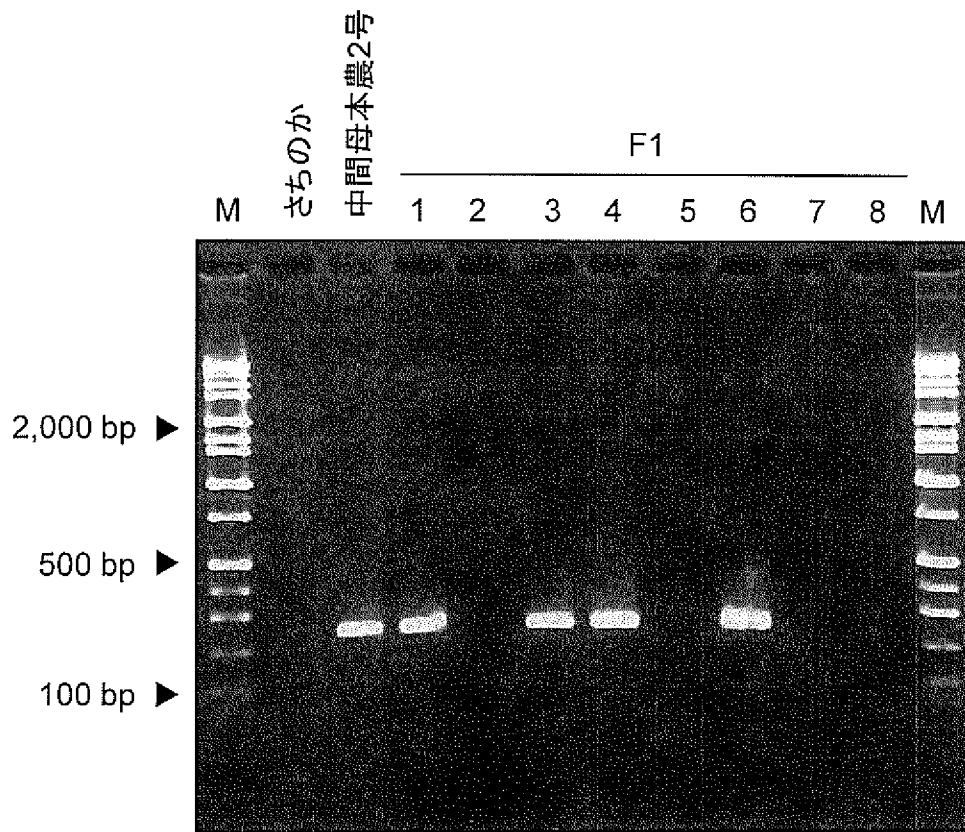


[図14]

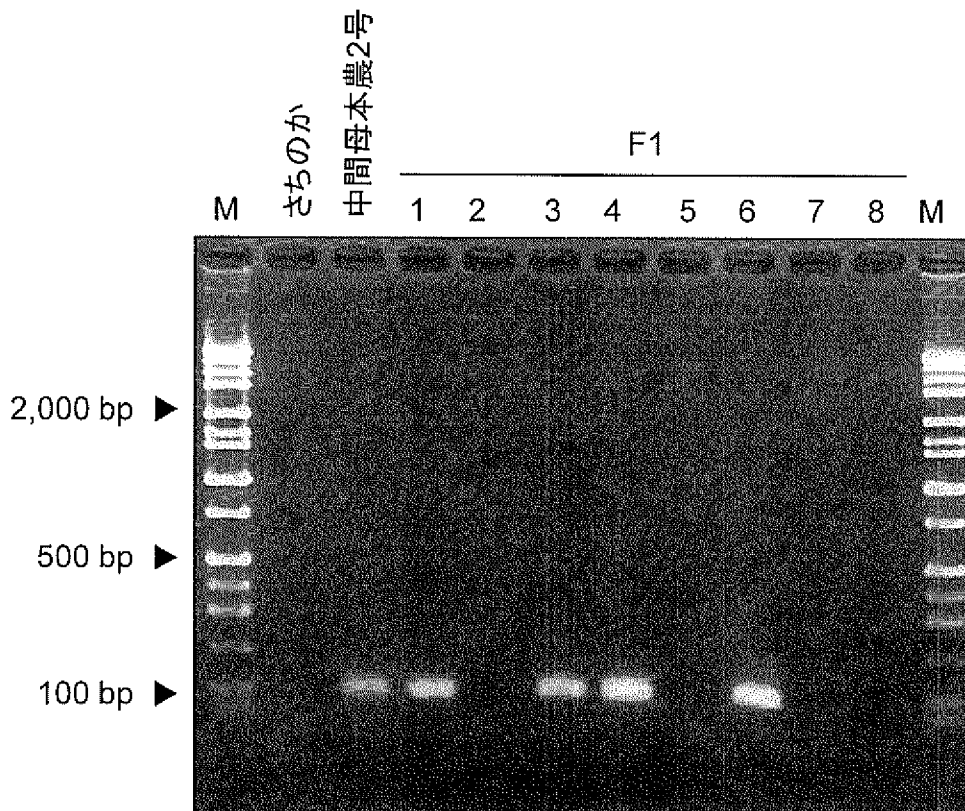
シグナル



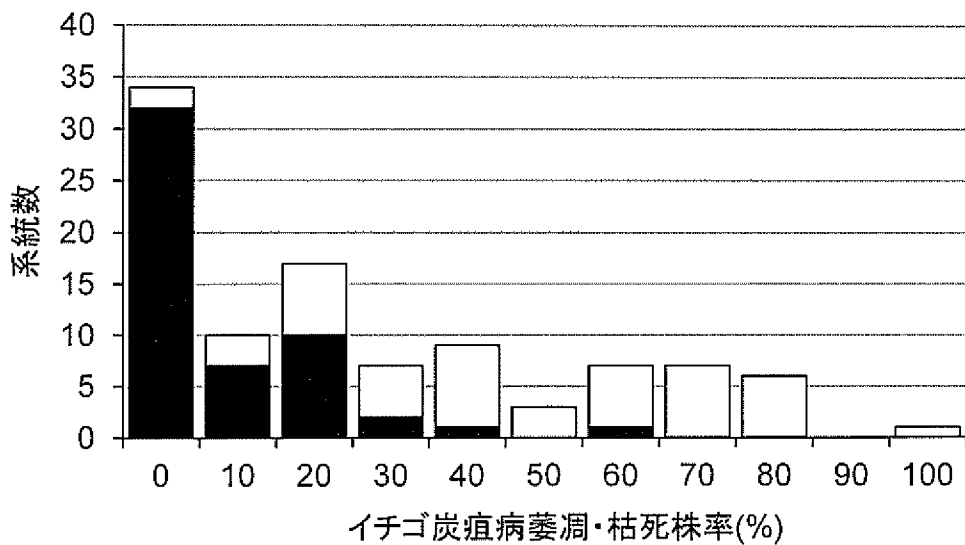
[図15]



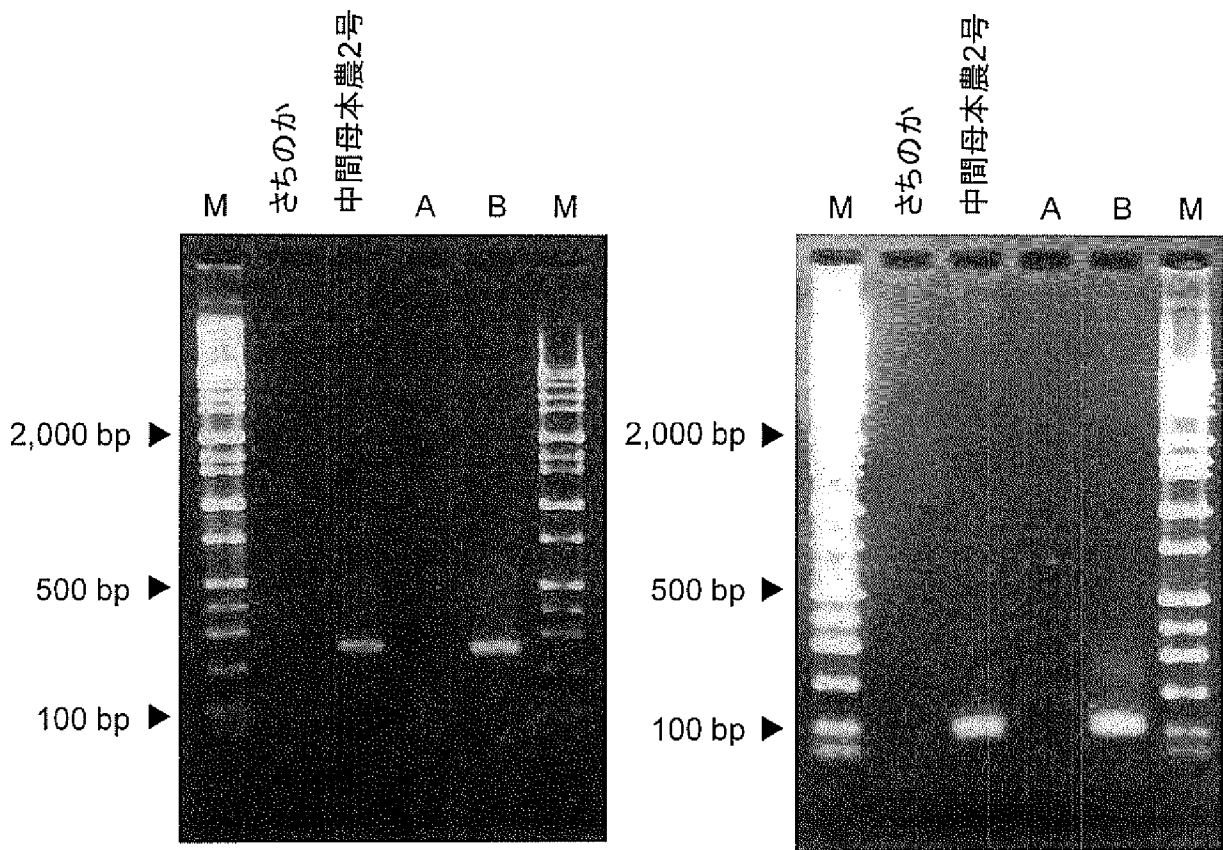
[図16]



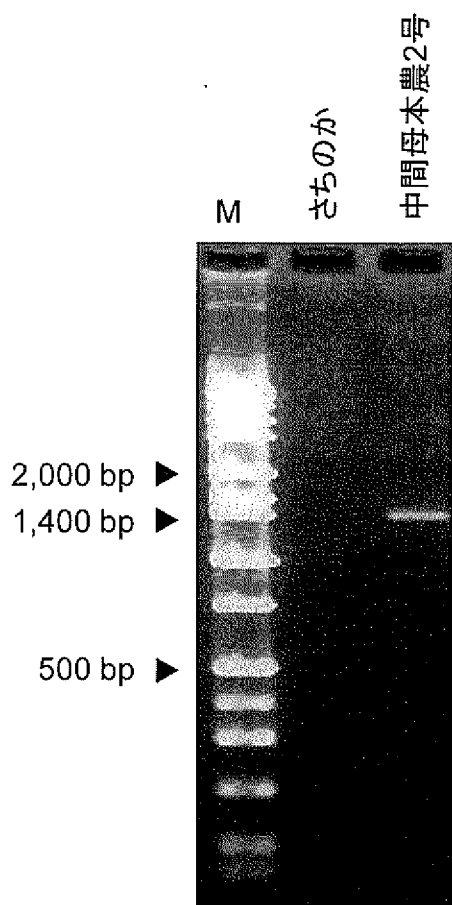
[図17]



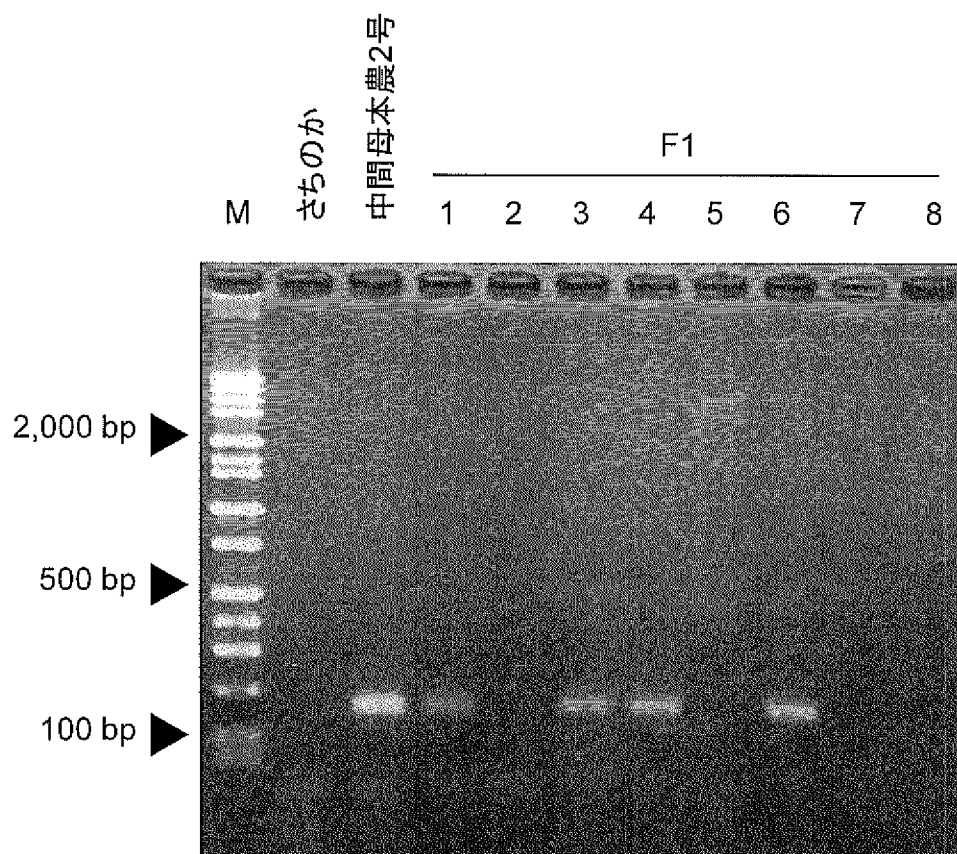
[図18]



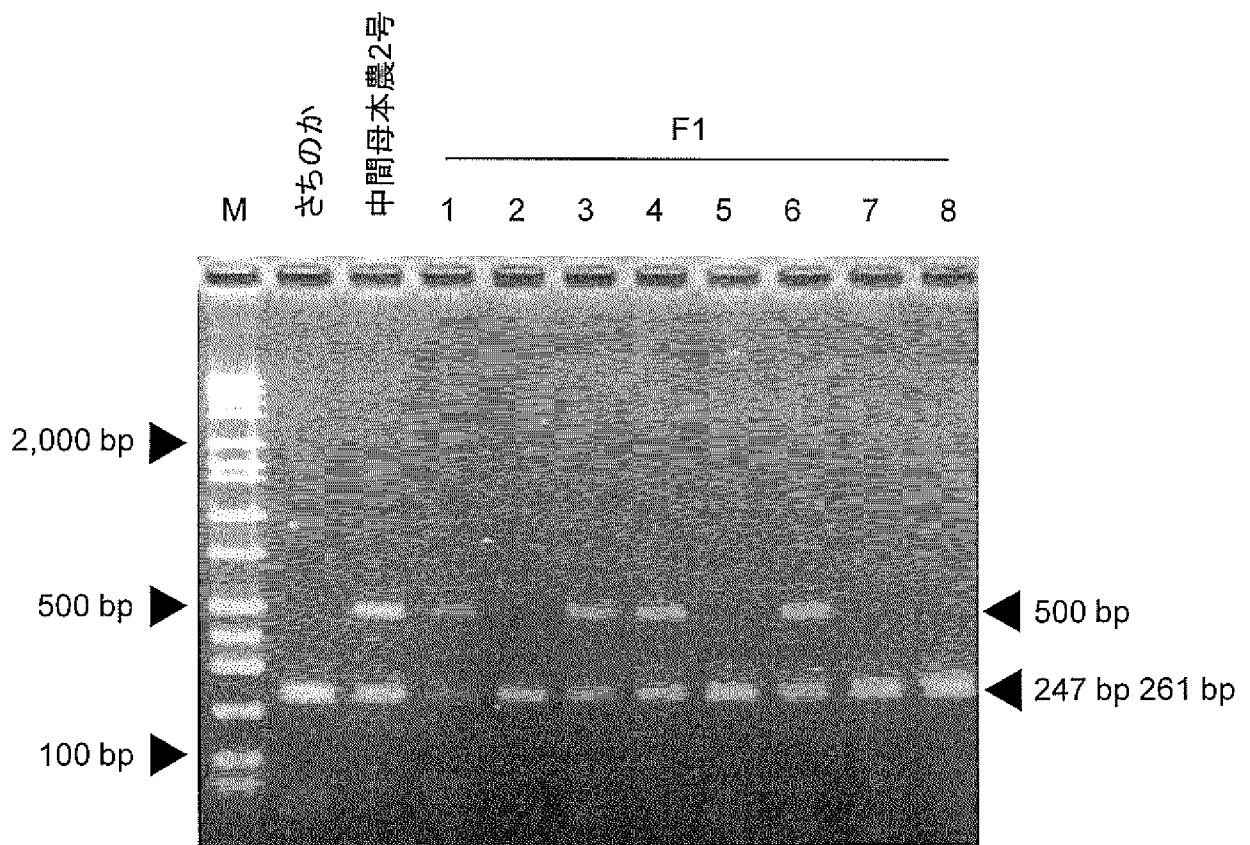
[図19]



[図20]



[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/073460

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A01H5/00, C12Q1/68

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yudai MATSUSHIMA et al., "Micro Array-ho o Mochiita Ichigo Tansobyō Otosei Idenshi no Kensaku", Tochigi-Ken Nogyo Shikenjo Kenkyu Seikashu, 2010, no.29, pages 49, 50	1-7
A	Tomohiro YAMADA et al., "Ichigo Junkan Senbatsu Shudan ni Okeru Tansobyō Teikosei Idenshi no Sonzai ni Tsuite", Horticultural Research (Japan), 20 March 2011 (20.03.2011), vol.10, separate volume 1, page 126	1-7
A	MOUHU, K., et al., Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant, BMC Plant Biology [online], 2009.09.28, 9:122, Internet http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2229-9-122.pdf , [retrieval date 2014.11.05]	1-7

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 November, 2014 (05.11.14)Date of mailing of the international search report
25 November, 2014 (25.11.14)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/073460

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LERCETEAU-KOHLER, E., et al., Identification of SCAR markers linked to Rca2 anthracnose resistance gene and their assessment in strawberry germplasm, Theoretical and Applied Genetics, 2005.07.08, Vol. 111, p. 862-870	1-7
P,A	CN 103667427 A (SHANGHAI ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES), 26 March 2014 (26.03.2014), (Family: none)	1-7
P,X	Hiromasa ENOKI et al., "Array Marker Gijutsu ni yoru Saibai Ichigo Rensa Chizu Kaihatsu Oyobi Tansobyō Teikosei Idenshi Rensa Marker no Kaihatsu", Breeding research, 12 October 2013 (12.10.2013), vol.15, separate volume no.2, page 27	1-7

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01H5/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N15/09, A01H5/00, C12Q1/68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX(STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	松島雄大, 他, マイクロアレイ法を用いたイチゴ炭疽病応答性遺伝子の検索, 栃木県農業試験場 研究成果集, 2010, 第29号, p. 49, 50	1-7
A	山田朋宏, 他, イチゴ循環選抜集団における炭疽病抵抗性遺伝子の存在について, 園芸学研究, 2011.03.20, 第10巻 別冊1, p. 126	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 05.11.2014	国際調査報告の発送日 25.11.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 太田 雄三 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 3 9 5 9

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MOUHU, K., et al., Identification of flowering genes in strawberry, a perennial SD plant, BMC Plant Biology [online], 2009.09.28, 9:122, インターネット http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2229-9-122.pdf , [検索日 2014.11.05]	1-7
A	LERCETEAU-KOHLER, E., et al., Identification of SCAR markers linked to Rca2 anthracnose resistance gene and their assessment in strawberry germplasm, Theoretical and Applied Genetics, 2005.07.08, Vol. 111, p. 862-870	1-7
P, A	CN 103667427 A (SHANGHAI ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES) 2014.03.26, (ファミリーなし)	1-7
P, X	榎宏征, 他, アレイマーカー技術による栽培イチゴ連鎖地図開発および炭疽病抵抗性遺伝子連鎖マーカーの開発, 育種学研究, 2013.10.12, 第15巻 別冊2号, p. 27	1-7