

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5466504号
(P5466504)

(45) 発行日 平成26年4月9日 (2014.4.9)

(24) 登録日 平成26年1月31日 (2014.1.31)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/00 (2006.01)
A O 1 H 5/00 (2006.01)C 1 2 N 15/00 Z N A A
A O 1 H 5/00 A

請求項の数 5 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2009-517286 (P2009-517286)	(73) 特許権者	508088753
(86) (22) 出願日	平成19年7月6日 (2007.7.6)		エンザ・ガーデン・ベヘル・ベスローテ
(65) 公表番号	特表2009-542198 (P2009-542198A)		ン・フェンノートシャップ
(43) 公表日	平成21年12月3日 (2009.12.3)		オランダ国, エヌエルー 1 6 0 2 デーベ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/056911		ー・エンクハイゼン, ヘイリング 1 E
(87) 国際公開番号	W02008/003783	(74) 代理人	100099623
(87) 国際公開日	平成20年1月10日 (2008.1.10)		弁理士 奥山 尚一
審査請求日	平成22年7月1日 (2010.7.1)	(74) 代理人	100096769
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2006/064033		弁理士 有原 幸一
(32) 優先日	平成18年7月7日 (2006.7.7)	(74) 代理人	100107319
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 松島 鉄男
微生物の受託番号	ATCC PTA-7394	(74) 代理人	100114591
			弁理士 河村 英文
		(74) 代理人	100118407
			弁理士 吉田 尚美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ククミス・サティブス (*Cucumis sativus*) におけるうどんこ病耐性および壊死欠如

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ククミス・サティブス植物由来の壊死抑制遺伝因子をそのゲノム内に含むうどんこ病耐性ククミス・サティブス (*Cucumis sativus* (キュウリ)) 植物であって、前記植物の露光量が $2,000 \text{ J/cm}^2$ 未満である条件下で、うどんこ病に耐性であり、壊死の生じない植物であって、前記壊死抑制遺伝因子の存在が、配列番号 1 (G A C T G C G T A C C A A T T C A A) および配列番号 2 (G A T G A G T C C T G A G T A A C C C) によって同定される 65 bp の第 1 の DNA マーカーの不在、ならびに配列番号 3 (G A C T G C G T A C C A A T T C A C) および配列番号 4 (G A T G A G T C C T G A G T A A T C G) によって同定される 123 bp の第 2 の DNA マーカーの不在によって決定される植物であって、

種子がアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) に受託番号 PTA-7394 を付して 2006 年 2 月 14 日に受託されている植物。

【請求項 2】

胚軸耐性遺伝子 (s) および葉耐性遺伝子 (R) を含む、請求項 1 に記載の植物。

【請求項 3】

前記耐性遺伝子の存在は、表 3 における配列番号 5~8 によって同定されるヌクレオチド配列を含むマーカー、ならびに AFLP マーカーである E16/M50-F-194、E11/M48-F-251、E23/M38-M001、E23/M40-M003、E24/M46-M002、E24/M46-M003、E12/M48-M003、E

26/M43-M003、E14/M59-F-134およびE14/M59-F-200からなる群から選択される1つまたは複数の特異的マーカーによって決定できる、請求項1または2に記載の植物。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項に記載の植物の種子および／またはその他の植物部分。

【請求項5】

請求項1～3のいずれか一項に記載の植物に由来するキュウリ果実。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、壊死の生じないうどんこ病耐性ククミス・サティブス (*Cucumis sativus*) 植物に関する。さらに、本発明は、壊死の生じないうどんこ病耐性キュウリ植物を入手するための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

キュウリ植物（即ち、植物種ククミス・サティブスの植物）は、メロンやカボチャと同様に、*Cucurbitaceae*のウリ科に属する。キュウリは、約96%が水分からなる、円筒形で表皮が緑色の果実である、植物の食用果実である。長年にわたり栽培されてきたキュウリ植物は、世界中で重要な園芸作物である。キュウリは、一般には未熟期に収穫され、酢漬け産業もしくは生鮮市場のために使用できる。

20

【0003】

うどんこ病は、田畑および温室のどちらにおいても、キュウリ植物に知られている主要な真菌病の1つである。うどんこ病は、スフェロテカ・フリギネア (*Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.)) (近年、ポドスフェラ・キサンチイ (*Podosphaera xanthii*) と改名された) および／またはエリシフェ・シコラセアラム (*Erysiphe cichoracearum* DC) (ex *Merat emend. Salm*) (近年、ゴロビノマイセス・シコアセアラム (*Golovinomyces cichoracearum*) と改名された) によって引き起こされ得る。温室栽培では、うどんこ病は、主として最初の種によって引き起こされる。これらの真菌は主として、開いてから2～3週間後に最も感受性である葉において発生する。しかし重度の病害に冒された植物においては、これらの真菌は、茎や果実上でさえ発生する可能性がある。重度の病害に冒された葉は、乾燥して脆弱になることがある、またはしおれて枯死することがある。感染のために、果実はサイズが小さくなる、数が少なくなる、良好に保存することができなくなる、葉焼けする、成熟が不完全になる、そしていやな匂いを有する可能性がある。感染はさらに、植物が他の病原体に対してより脆弱になる素因を与えることもある。最終的には、その植物は枯死する場合がある。

30

【0004】

現在まで、殺真菌剤の適用および真菌への耐性を備える品種の使用が主要な病害対策法であった。そこで、様々な商業的栽培品種において、両方の真菌に対する耐性が証明されてきた。胚軸耐性は劣性遺伝子 (*s*) に基づくが、葉耐性は優性葉遺伝子 (*R*) によって制御されることが証明されている。全植物レベルでの高レベルの耐性のためには両方の遺伝子が必要である (*Shanmugasundaram et al.*, *Phytopathology* 61:1218-1221, 1971)。

40

【0005】

しかしうどんこ病 (PM) 耐性栽培品種は、一般に弱光条件（即ち、植物の露光量が、植物によって2,000 J/cm²未満のエネルギーが摂取される=286 J/cm²/日未満である条件）下では、特に、高い着果負荷 (*fruit load*)、即ち収穫期において1節当たり少なくとも1つの十分に成熟した果実が得られることと組み合わせると、壊死に苦しめられる。そのような条件は、特別には北欧諸国およびカナダにおける生

50

産領域において、秋、冬および早春に発生することが多い。うどんこ病に対する耐性が植物の壊死に結び付いているという事実は、これらのうどんこ病耐性植物の実際的使用を制限する。

【0006】

キュウリにおけるうどんこ病耐性に関連する壊死の症状は、葉の主葉脈間の黄変（退緑）から始まり、最終的には壊死（即ち、葉の枯死）を生じさせる。うどんこ病耐性と壊死感受性との間では正の相関が証明され、このことから両方の形質が遺伝的に密接に関連している、または壊死が1つまたは複数の耐性遺伝子の多発現効果であるという提案が導かれた。

【0007】

欧州特許第1433378号明細書では、1つのククミス・サティブス系統（DC-1）におけるうどんこ病耐性と葉の壊死との間の遺伝的連鎖の切り離しについて記載されている。しかし、うどんこ病耐性関連性壊死現象の遺伝子制御についてはまだ解明されておらず、多数のキュウリ生産者は、うどんこ病耐性キュウリ栽培品種における壊死の発生に苦しめられている。その結果として、キュウリ生産は依然としてうどんこ病への感染を制御するために作物保護用の殺真菌剤の使用を含み、これは関係経費を増加させるだけではなく、健全な環境という観点においても望ましくない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

そこで殺真菌剤の使用を減少させるためには、うどんこ病に対して耐性であり、壊死の生じない植物を提供すること、またはそのような植物を提供するための新規な方法を見出すことが不可欠である。

【0009】

本発明の目的は、うどんこ病感染に対して耐性であり、壊死の生じないククミス・サティブス植物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

これは、本発明によって、そのゲノム内に壊死抑制遺伝因子を含む、うどんこ病に対して耐性であり、壊死が生じないうどんこ病耐性ククミス・サティブス植物を提供することによって達成される。本発明の植物は、弱光条件（即ち、植物の露光量が、植物によって $2,000\text{ J/cm}^2$ 未満のエネルギーが摂取される $= 286\text{ J/cm}^2$ /日未満である条件）下で、特に、高い着果負荷と組み合わせても、うどんこ病に対して耐性であり、葉の壊死の症状を全く示さない。

【0011】

本発明によると、新規な壊死抑制遺伝因子が同定されている。さらに、うどんこ病に対して耐性であり、壊死の生じないククミス・サティブス植物を同定および提供するために使用できる適切な分子マーカーが開発されている。この新規な遺伝因子は、うどんこ病関連性壊死を抑制することが見い出されている。この壊死抑制遺伝因子は、不完全優性遺伝因子である。つまり、ヘテロ接合性形およびホモ接合性形で存在するどちらの場合でも、その表現型は「壊死が生じない」になる。

【0012】

本発明によって証明されるように（以下に示す）、欧州特許第1433378号明細書に記載されているキュウリ植物は、壊死抑制遺伝因子を含んでいない。

【0013】

本発明の好ましい実施形態では、本植物は、うどんこ病病原体に対する高レベルの耐性を付与する公知の胚軸耐性遺伝子（s）および葉耐性遺伝子（R）を含む。

【0014】

うどんこ病耐性遺伝子の存在は、これらの耐性遺伝子に特異的に連結している特異的分子マーカーを用いて決定することができる。適切なマーカーは当分野において公知であり

10

20

30

40

50

、例えば国際公開第2007/053015号パンフレットに記載されている。そこで国際公開第2007/053015号パンフレットに開示されているように、胚軸耐性遺伝子（即ち、国際公開第2007/053015号パンフレットにおいてp m-hと呼ばれているうどんこ病耐性の原因となるゲノム領域）の存在は、前記植物における前記うどんこ病耐性遺伝子と結び付いている特異的単一ヌクレオチド多型（SNP）マーカーの存在によって示される。葉耐性遺伝子（即ち、国際公開第2007/053015号パンフレットにおいてp m-1と呼ばれるうどんこ病耐性の原因となるゲノム領域）は、特異的単一ヌクレオチド多型（SNP）マーカー、または5bpインサートである5-AATTT-3' 'と表示される特異的挿入変異マーカーの存在によって示される。うどんこ病耐性遺伝子の存在を検出するために使用できるまた別のマーカーは、この状況において明示的に参照する国際公開第2007/053015号パンフレットによって詳細に記載されているように、AFLPマーカーであるE16/M50-F-194、E11/M48-F-251、E23/M38-M001、E23/M40-M003、E24/M46-M002、E24/M46-M003、E12/M48-M003、E26/M43-M003、E14/M59-F-134およびE14/M59-F-200である。

【0015】

本発明によると、壊死抑制遺伝因子は、うどんこ病耐性遺伝子：sおよびRと比較して別の染色体上に位置することが証明されている。これは、キュウリ染色体マップで、うどんこ病耐性遺伝子および壊死抑制遺伝因子各々について特異的マーカーをマッピングすることによって遂行された。

【0016】

本発明の好ましい実施形態では、前記植物のゲノム内での壊死抑制遺伝因子はさらに1つまたは複数のDNAマーカーにも連結し、前記DNAマーカーの1つまたは複数を用いて前記植物のゲノム内での壊死抑制遺伝因子を決定することができる。DNAマーカーを使用することによって、うどんこ病耐性および壊死抑制遺伝因子の所望の組み合わせを備える植物を、スペースおよび時間を消費する壊死試験を実施する必要を伴わずに、容易に同定できる。DNAマーカーにより、当業者には周知であるゲル電気泳動法および化学薬品（例えば、臭化エチジウム）を用いた染色もしくは放射性プローブを用いた検出によって可視化できる遺伝子の差異が解明される。

【0017】

本発明の好ましい実施形態によると、壊死抑制遺伝因子は、配列番号1（GACTGCGTACCAATTCAA）および配列番号2（GATGAGTCCGTAGTAACC）によって同定される約65bpの第1のDNAマーカー、ならびに配列番号3（GACTGCGTACCAATTCAAC）および配列番号4（GATGAGTCCGTAGTAATCG）によって同定される約123bpの第2のDNAマーカーからなる群から選択される1つまたは複数のDNAマーカーに連結していて、それらによって同定することができる。

【0018】

本発明の好ましい実施形態によると、前記植物のゲノム内の壊死抑制遺伝因子のホモ接合性の存在は、少なくとも1つの前記DNAマーカーの不在によって同定される。好ましくは、前記植物のゲノム内の前記壊死抑制遺伝因子のホモ接合性の存在は、第1のDNAマーカーおよび第2のDNAマーカー両方の不在によって同定される。

【0019】

本発明を導いた研究では、耐性植物中での本発明の一または複数の前記特異的遺伝子マーカーの不在は、壊死の生じない表現形（phenotype）についての指標であることが証明されている。本発明の分子マーカーは、いわゆる「トランス」マーカーである。DNAフラグメント（対立遺伝子）のホモ接合性の存在は、壊死抑制遺伝因子の不在と相関し、このため望ましくない壊死性表現型の指標である。DNAマーカーの不在は、それゆえ壊死抑制遺伝因子のホモ接合性の存在の指標である。つまり、一または複数のDNAマーカーが不在である場合は、これは壊死抑制遺伝因子が植物のゲノム内においてホモ接合

性で存在することを意味している。

【0020】

本発明のまた別の好ましい実施形態によると、壊死抑制遺伝因子のヘテロ接合性の存在は、一または複数のDNAマーカーのヘテロ接合性の存在によって同定される。壊死抑制遺伝因子は、不完全優性遺伝因子であることが見い出されている。つまり、ホモ接合性形およびヘテロ接合性形のどちらで存在する場合でも、表現型は「壊死が生じない」。したがって、本発明による一または複数のDNAマーカーのヘテロ接合性の存在は、植物中における壊死抑制遺伝因子のヘテロ接合性の存在についての指標である。一または複数のDNAマーカーのヘテロ接合性の存在は、例えば、Keygene社（オランダ国ヴァーゲニンゲン）によって開発されたAFLP-Quantar（登録商標）Proなどの適切なソフトウェアを用いて決定することができる。

10

【0021】

特に好ましい実施形態では、この植物は、2006年2月14日にアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）（米合衆国バージニア州 20110-2209、10801 University Boulevard、マナッサス）に受託番号PTA-7394を付して受託されている種子であるククミス・サティブス植物に由来する壊死抑制遺伝因子を含む。

【0022】

本発明は、上述した植物の種子および／またはその他の植物部分にさらに関する。本発明による植物部分は、植物に由来する、例えば植物細胞、花粉、胚珠、葉、胚、根、根端、葯、花、茎、種子、プロトプラストおよびカルスである。

20

【0023】

好ましい実施形態では、本発明は、上述したような植物に由来するキュウリ果実に関する。

【0024】

本発明は、壊死の生じない、うどんこ病耐性ククミス・サティブス植物を入手するための方法であって、壊死抑制遺伝因子をうどんこ病耐性植物のゲノム内に導入するステップを含む方法にさらに関する。

【0025】

本発明によると、うどんこ病耐性遺伝子および壊死抑制遺伝因子は、伝統的な繁殖技術および／または分子生物学的技術のような周知の技術を用いて植物のゲノム内に導入することができる。

30

【0026】

前記方法の好ましい実施形態によると、うどんこ病耐性遺伝子は、公知の胚軸耐性遺伝子（s）および葉耐性遺伝子（R）を含む。上記に示したように、うどんこ病耐性遺伝子の存在は、これらの耐性遺伝子に特異的に連結している特異的マーカーを用いて決定することができる。適切なマーカーは当分野において公知であり、例えば上述されている。好ましい実施形態では、壊死抑制遺伝因子の存在は、1つまたは複数の特異的DNAマーカーを用いて決定される。そこで本発明は、任意の疾患耐性および／または壊死試験を実施する必要を伴わずに対象の植物を同定できることを保証する、単純かつ信頼性の高い方法を提供する。

40

【0027】

好ましくは、壊死抑制遺伝因子を同定するためのDNAマーカーは、配列番号1（GAC T G C G T A C C A A T T C A A）および配列番号2（G A T G A G T C C T G A G T A A C C C）によって同定される約65bpの第1のDNAマーカー、ならびに配列番号3（G A C T G C G T A C C A A T T C A C）および配列番号4（G A T G A G T C C T G A G T A A T C G）によって同定される約123bpの第2のDNAマーカーからなる群から選択される。

【0028】

好ましい実施形態では、壊死抑制遺伝因子のホモ接合性の存在は、少なくとも1つの前

50

記DNAマーカーの不在によって同定される。好ましくは、壊死抑制遺伝因子のホモ接合性の存在は、第1のDNAマーカーおよび第2のDNAマーカー両方の不在によって同定される。

【0029】

本発明のまた別の好ましい実施形態によると、壊死抑制遺伝因子のヘテロ接合性の存在は、一または複数のDNAマーカーのヘテロ接合性の存在によって同定される。

【0030】

特定の好ましい実施形態では、壊死抑制遺伝因子は、それらの種子がPTA-7394の番号を付してATCCに受託されているククミス・サティブス植物に由来する。

【0031】

本発明は、その植物が壊死の生じない、上述した方法によって入手可能なうどんこ病耐性ククミス・サティブス植物、および／または前記植物の他の植物部分および果実にさらに関する。

【0032】

さらに、本発明は、ククミス・サティブス植物において壊死耐性を同定するための方法であって、前記植物のゲノム内で1つまたは複数のDNAマーカーを使用して壊死抑制遺伝因子の存在を検出するステップを含み、このときDNAマーカーは、配列番号1 (GAC TGC GTACCAATTC AA) および配列番号2 (GATGAGTCC TGA GTAA C C C) によって同定される約65bpの第1のDNAマーカー、ならびに配列番号3 (GAC TGC GTACCAATTC AC) および配列番号4 (GATGAGTCC TGA GTAA TCG) によって同定される約123bpの第2のDNAマーカーからなる群から選択される方法に関する。本発明の方法を用いると、壊死耐性を、ククミス・サティブス植物において、既に実生および／または若い植物において容易に検出できる。

【0033】

好ましい実施形態では、壊死抑制遺伝因子のホモ接合性の存在は、少なくとも1つの前記DNAマーカーの不在によって同定される。好ましくは、壊死抑制遺伝因子のホモ接合性の存在は、第1のDNAマーカーおよび第2のDNAマーカー両方の不在によって同定される。

【0034】

本発明のまた別の好ましい実施形態によると、壊死抑制遺伝因子のヘテロ接合性の存在は、一または複数のDNAマーカーのヘテロ接合性の存在によって同定される。

【0035】

<用語の定義の説明>

うどんこ病耐性の症状は、以下の通りに分類できる。

【0036】

本発明によると、うどんこ病 (PM) 耐性のレベルは、以下の通りに分類できる。

レベル1 = 人工接種後に第1本葉の表面積の10%未満がPMに冒されている、孢子形成なし、分類：R / 耐性；

レベル2 = 人工接種後に第1本葉の表面積の10～50%未満がPMに冒されている、一部の孢子形成あり、分類：IR / 中間耐性；

レベル3 = 人工接種後に第1本葉の表面積の50%超がPMに冒されている、孢子形成あり、分類：S / 感受性。

【0037】

本発明によると、壊死は、以下の通りに分類できる。

レベル1：葉は緑色であり、植物は良好に機能かつ発達している（分類：壊死が生じていない）；

レベル2：葉の上に黄斑が現れ、葉のある程度の成長減退が見られる（分類：中間レベルの壊死が生じている）；

レベル3：多数の黄斑を伴う黄緑の葉、極めて重篤な成長問題があり、最終的には葉が部分的もしくは完全に枯れる（壊死）および時には植物の枯死さえ生じる（分類：壊死）

。

【0038】

「弱光条件」という表現は、即ち植物の露光量が、植物によって $2,000 \text{ J/cm}^2$ 未満のエネルギーが摂取される $= 286 \text{ J/cm}^2$ / 日未満である条件を意味する。これらの条件下では、壊死の症状は、本発明の壊死抑制遺伝因子を含んでいない植物において発生する。

【0039】

本発明による高い着果負荷は、1節当たり少なくとも1つの十分に成熟した（即ち収穫可能期にある）果実の着果負荷に関する。

【0040】

10

本発明によって使用される用語「壊死抑制遺伝因子」は、壊死抑制特性を決定して、壊死抑制特性を親から子孫へ伝達するDNAフラグメントに関する。本発明によって、壊死の生じない遺伝因子は不完全優性である、即ちホモ接合性およびヘテロ接合性のどちらで存在する場合においても、壊死の生じない表現型が観察されることが見い出されている。

【0041】

本発明によるDNAマーカーは、ゲノムの推測される隣接伸長鎖の存在もしくは不在を許容する単純なアッセイによって、例えばPCRの後に電気泳動を行うことによって同定できるDNA配列を指す。マーカーは、例えば、AFLPマーカーであってよい。

【0042】

以下に、本発明を実施例によって詳細に例示する。

20

【実施例】

【0043】

本発明を導いた研究においては、ククミス・サティブス植物において新規な壊死減少因子が同定されている。

【0044】

うどんこ病胚軸および葉耐性、壊死性ククミス・サティブス（コードB、表1を参照）×うどんこ病胚軸および葉耐性、壊死の生じないククミス・サティブス（コードA、PTA-7394の番号を付してATCCに2006年2月14日に受託された）の分離集団を生成した。壊死抑制遺伝因子に連結しているAFLPマーカーは、バルクセグレガント法（Bulked Segregant Analysis: BSA）アプローチ（Michelmore et al., PNAS 88:9828-9832, 1991）を用いて同定された。壊死抑制因子に結合したマーカーを、うどんこ病耐性遺伝子を含む連鎖群とは別個の連鎖群上でマッピングすることができた。

30

【0045】

壊死抑制遺伝因子に結合したマーカーのバリデーションは、周知の分子生物学的方法によって、分離集団の植物上のこれらのマーカーおよび特定パネルの育種系統をスクリーニングするステップによって実施された。

【0046】

国際公開第2007/053015号パンフレットに記載され、表3に同定された分子マーカーを使用して、うどんこ病耐性遺伝子の存在／不在を決定した。

40

【0047】

【表 1】

壊死抑制遺伝因子、様々な遺伝子型を用いたマーカーの試験結果

遺伝子型	PM耐性レベル	壊死レベル	65bp のマーカー	123bp のマーカー
コード A	1	1	-	-
コード B	1	3	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性
cv Flamingo F1*	2	2	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性

+=マーカーが存在する

-=マーカーが存在しない

*=欧州特許第 1 4 3 3 3 7 8 号明細書による植物
スコア 1～3 は、上記で説明されている。

【0048】

そこで、本発明による植物（コード A）においては、本発明の新規な壊死抑制遺伝因子に結合していると同定されている両方の DNA マーカーが存在しないことが明白になり、これは壊死抑制遺伝因子、従って壊死の生じない表現形（*phenotype*）の存在を示している。これとは対照的に、コード B（耐性、壊死性）によって示される植物および上記に述べた欧州特許第 1 4 3 3 3 7 8 号明細書に記載された植物では、これらの DNA マーカーの両方が存在し、これらの植物が本発明の壊死抑制遺伝因子を含んでいないことを示している。

【0049】

これらの植物のうどんこ病耐性遺伝子の存在は、さらに分子マーカー（表 3 に列挙した）を用いて試験されている。両方のマーカーの分析結果を表 2 に要約した。

【0050】

これらの結果によって、コード A およびコード B（遺伝子型 A および B）によって同定された植物が、全うどんこ病マーカーに対してホモ接合性であると判定され、最高レベルのうどんこ病耐性を示すが、他方、園芸品種名（*cv.*）Flamingo（即ち、欧州特許第 1 4 3 3 3 7 8 号明細書に記載の植物）は、配列番号 7 および 8 によって同定される PM マーカーに対してヘテロ接合性であると判定され、低レベルのうどんこ病耐性を示すことが、明らかに示されている。

【0051】

そこでこれらのマーカーについてのデータは、壊死マーカーと比較したうどんこ病耐性マーカーの独立した分離挙動を示している。これは、うどんこ病耐性および壊死抑制遺伝因子が結合していないことを明白に証明している。

【0052】

<結合 PM/壊死実生試験のプロトコール:>

<植物材料>

オランダ国において実験を実施するための期間は、11月1日～2月1日である（弱光条件、1週当たり 2, 000 J/cm² = 286 J/cm²/日未満のエネルギー）。実生（試験植物および対照）を、砂で被覆した 24℃ のバーミキュライト中で成長させる。

（ちょうど子葉が広がる）4～5日後に、実生をグラウンドテーブル（*ground table*）内に移植する。対照は、壊死感受性、PM耐性植物である。

【0053】

<病原体>

市販で入手できる F 1 雑種である K a m a r o n 上で増殖させたスフェロテカ・フリギネア（ポドスフェラ・キサランチイ）品種 2。

【 0 0 5 4 】

【表 2】

うどんこ病耐性マーカーの試験結果

遺伝子型	PM 耐性 レベル	壊死レベル	配列番号 5 の マーカー	配列番号 6 の マーカー	配列番号 7 の マーカー	配列番号 8 の マーカー	65bp のマーカー	123bp のマーカー
コード A	1	1	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性	-	-
コード B	1	3	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性
cv. Flamingo	2	2	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性	+ ヘテロ接合	+ ヘテロ接合	+ ホモ接合性	+ ホモ接合性

<接種菌の調製>

明確に孢子形成している葉を採取し、孢子を水中へ擦り取った。完全に湿潤させたチーズクロスで被覆した漏斗を通して接種材料を注入することによって、接種材料をふるい分けする。

【0056】

FDA（フルオレセイン二酢酸）を用いて染色した後にUV顕微鏡を用いて、孢子の生育性をチェックし、さらに計数した後に、生存孢子の濃度を、胚軸上への初回接種のためには約 1×10^5 生存孢子数/mL に、および第1本葉上の第2回接種のためには約 5×10^4 生存孢子数/mL に調整する。

【0057】

10

<接種>

実生には、移植の1～2日後に（噴霧器を用いて）接種する。第2感染は、第1本葉がちょうど広がった時点（移植4～6日後）に行う。

【0058】

接種直後に土壌を湿らせることによって湿度を増加させると、感染を促進することができる。夜間温度：18～20℃、日中温度：22～25℃。

【0059】

<増殖の測定>

（感染）5日後に低湿度であれば、土壌を毎日1回もしくは2回湿らせることによって、孢子形成を促進することができる。

20

【0060】

<症状の発生>

若い植物における壊死を、最終接種の約14日後に判定する。壊死のスコアは、上記に規定したように決定される。胚軸上および葉上のうどんこ病感染も、また、最終接種の約14日後に判定される。うどんこ病感染のスコアは、上記に規定したように決定される。

【0061】

【表3】

うどんこ病のマーカー配列

>PMHypocotyl1- 配列番号 5

30

TCATAATGACACGTAATGATTGTCAGAGR~~AAA~~TTTATAGAAACCTTTTGTTCAACTATCCA
ACAAATTACAATCAAGGCACTTCTGGAATGAGATAGTCA

>PMHypocotyl2- 配列番号 6

GTCGTCTTCGCCTATGCaAGACAAAATAAATGCTTGTTTK~~K~~AGTCTAGCCAAAAATGGTGT
AGAACAGTTGATCACAGTTCCTACGGACTA

>PM-Leaf1- 配列番号 7

40

TGGATAAGAGAGGTYCTTGTA~~AAA~~TRTTATTTTTCATTTAGACCTTGATtttaaTTTGGACTA
TGAATCATATTTGACAATTGTAGGATCAAACCGAAGGTGCA

>PM-Leaf 2- 配列番号 8

GAGAGGATTCATRTTCATCTTCTCCCAGGTGCTACAATCGAAAGAATTYATCTTCATCTT
CTCTTAGGTGCCACAATCGAGAGGGTTTATCTTCATCTTTC

フロントページの続き

(74)代理人 100125380

弁理士 中村 綾子

(74)代理人 100130960

弁理士 岡本 正之

(74)代理人 100125036

弁理士 深川 英里

(74)代理人 100142996

弁理士 森本 聡二

(72)発明者 マゼレーウ, ヤコブ・ピーテル

オランダ国, エヌエルー 1 6 0 2 デーバー・エンクハイゼン, ヘイリング 1 E 気付

(72)発明者 シューンマーケルス, マリヌス・コルネリウス・マリーア

オランダ国, エヌエルー 1 6 0 2 デーバー・エンクハイゼン, ヘイリング 1 E 気付

(72)発明者 ファン・カンペン, ブリヒッタ・フェロニカ

オランダ国, エヌエルー 1 6 0 2 デーバー・エンクハイゼン, ヘイリング 1 E 気付

(72)発明者 ランバルク, ヨハネス・ヤボクス・マリーア

オランダ国, エヌエルー 1 6 0 2 デーバー・エンクハイゼン, ヘイリング 1 E 気付

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 欧州特許出願公開第 0 1 4 3 3 3 7 8 (E P, A 1)

国際公開第 2 0 0 7 / 0 5 3 0 1 5 (W O, A 1)

Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1991,88(21),p.9828-32

Phytopathology,1971,61(10),p.1218-21

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

P u b M e d

W P I