

(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
2012 年 11 月 1 日(01.11.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/147635 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/JP2012/060671
- (22) 国際出願日: 2012 年 4 月 20 日(20.04.2012)
- (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 2011-101050 2011 年 4 月 28 日(28.04.2011) JP
特願 2012-094995 2012 年 4 月 18 日(18.04.2012) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 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; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 榎 宏征 (ENOKI Hiroyuki) [JP/JP]; 〒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 Ai-

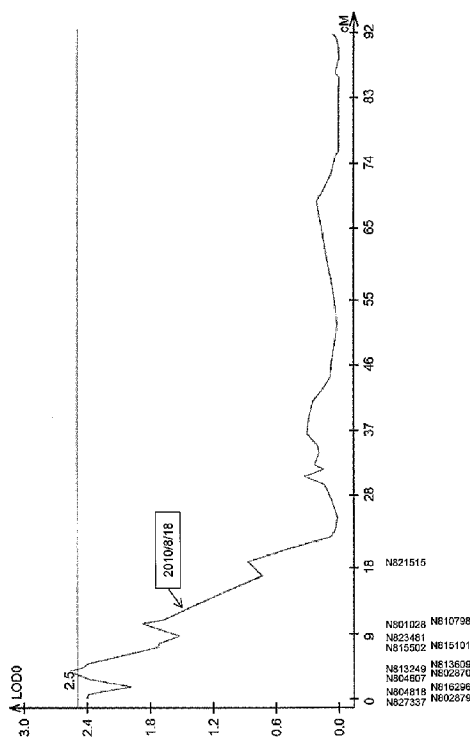
chi (JP). 木村 達郎 (KIMURA Tatsuro) [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町 1 番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 西村 哲 (NISHIMURA Satoru) [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町 1 番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 村上 亜矢 (MURAKAMI Aya) [JP/JP]; 〒4718571 愛知県豊田市トヨタ町 1 番地 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 寺内 方克 (TERAUCHI Takayoshi) [JP/JP]; 〒8913102 鹿児島県西之表市安納 1 7 4 2-1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター内 Kagoshima (JP). 境垣内 岳雄 (SAKAIGAI-CHI Takeo) [JP/JP]; 〒8913102 鹿児島県西之表市安納 1 7 4 2-1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター内 Kagoshima (JP). 服部 太一朗 (HATTORI Taiichiro) [JP/JP]; 〒8913102 鹿児島県西之表市安納 1 7 4 2-1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター内 Kagoshima (JP). 石川 葉子 (ISHIKAWA Syoko) [JP/JP]; 〒8611192 熊本県合志市須屋 2 4 2 1 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

[続葉有]

(54) Title: MARKER ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO SMUT IN PLANT BELONGING TO GENUS SACCHARUM, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: サトウキビ属植物の黒穂病抵抗性関連マーカーとその利用

[図7]



(57) Abstract: Provided is a marker associated with smut resistance among quantitative traits of a sugarcane plant (i.e., a plant belonging to the genus *Saccharum*). A marker associated with sugarcane smut resistance, comprising a contiguous nucleic acid region selected from a region intercalated between the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:1 and the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:14 in the chromosome of sugarcane and a region other than the above-mentioned region.

(57) 要約: サトウキビ植物の量的形質の中でも黒穂病抵抗性に関連するマーカーを提供する。サトウキビ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 14 に示す塩基配列により挟まれる領域及びその他領域から選ばれる連続する核酸領域からなる、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカー。

WO 2012/147635 A1



九州沖縄農業研究センター内 Kumamoto (JP). 寺
島 義文 (TERAJIMA Yoshifumi) [JP/JP]; 〒
9070002 沖縄県石垣市字真栄里川良原 1 0 9 1
- 1 Okinawa (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 M O R I タワー 3 2 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, 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, IS,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

(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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラ
シア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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：

サトウキビ属植物の黒穂病抵抗性関連マーカーとその利用

技術分野

[0001] 本発明は、黒穂病に対する抵抗性を示すサトウキビ属植物系統を選抜することができる黒穂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] サトウキビは、砂糖の原料、酒類原料など、食用に栽培されている他、バイオ燃料原料としての利用を含む様々な産業分野で利用されている。このような状況下、所望の特性(例えば、糖含有量、生長力の増強、新芽形成能、耐病性及び虫害抵抗性、耐寒性、葉長の増大、葉面積の増大、茎長の増大など)を有するサトウキビ植物の新品種を開発するニーズがある。

[0003] 一般に、植物品種・系統の識別として、特性データを比較する「特性比較」、同一条件で栽培し比較する「比較栽培」、DNAを解析する「DNA分析」の3つの方法がある。特性比較および比較栽培による系統識別は、栽培条件の違いによる精度低下や多大な工数が必要とされる長期間の圃場調査など多くの問題を抱える。特に、サトウキビは、イネやトウモロコシなど、他のイネ科作物と比べ植物体が極めて大きく、圃場調査による系統識別の実施が困難である。

[0004] また、特定の病害に対する抵抗性品種を識別するには、サトウキビを長期間栽培した後、病害原因微生物を接種する試験を行い、その後、病班等を観察することで抵抗性データを収集する。しかし、当該試験を行うには、外部環境に対する病害原因微生物の伝搬を確実に防止しなければならず、大規模専用温室や専用圃場、外部との隔離施設など設備が必要となる。さらに、サトウキビの新品種作出には、先ず、交配により数万種類の交配種を作製し、そこから実生選抜、さらに優良な系統を段階的に選抜し、最終的に所望な特性を有する2～3種の新品種を得ることができる。このように、サトウキビ

の新品種作出には、非常に多くの系統を栽培・評価する必要がある、上述したような温室や圃場を準備して多大な手間をかける必要がある。

[0005] したがって、病害抵抗性を示すサトウキビ系統を、ゲノムに存在するマーカーを用いて識別する方法の開発が求められている。特に、サトウキビにおける新品種作出に際して、種々の特性について優れたマーカーが使用できれば、上述したようなサトウキビに特有の諸問題を回避でき、非常に有効なツールとなりうる。しかしながら、サトウキビ植物は、高次倍数性で染色体数が多いため（約100～130）、マーカー技術開発が遅れている。サトウキビでは、USDAにおいてSSRマーカーを用いた遺伝子型決定に関する報告があるものの（非特許文献1）、マーカー数及び各マーカーからの多型数が少ないことに起因して精度が低く、適用範囲がアメリカ・オーストラリア品種に限られるため、日本国内および台湾・インドなどの主要品種および有用な遺伝資源の系統識別に利用できない。

[0006] また、非特許文献2は、マーカー数を増やし、各々のマーカーの特性関係を比較し、検証することでサトウキビにおける遺伝子地図を作製する可能性を示唆している。しかしながら、非特許文献2には、十分な数のマーカーが開示されておらず、目的とする特性に連鎖したマーカーも見つかっていない。

[0007] 一方、病害抵抗性に関連するマーカーとしては、特許文献1に示すように、テンサイにおける黒根病抵抗性関連マーカーが知られている。また、特許文献2に示すように、トウモロコシにおいて、目的とする形質に連鎖したマーカーを利用して品種を選抜する技術が開示されている。

[0008] 一方、サトウキビの黒穂病は、原因微生物の感染力が強く、一旦発病すると圃場全体に感染が拡大する。黒穂病に罹病したサトウキビは、製糖用原料として利用できないだけでなく枯死する。このため、黒穂病の発生は、次年度以降における大幅な減収を引き起こす。黒穂病の被害は、ブラジル、アメリカ、オーストラリア、中国、インドネシアなど28ヶ国以上で報告がある。黒穂病の防除方法には、植付時の殺菌処理があるが、初期生育時に効果が

限定される。したがって、黒穂病の抵抗性を付与したサトウキビ品種の育成が求められている。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1 : Maydica 48(2003)319-329 “Molecular genotyping of sugarcane clones with microsatellite DNA markers”

非特許文献2 : Nathalie Piperidis et al., Molecular Breeding, 2008, Vol 21, 233-247

特許文献

[0010] 特許文献1 : WO 2007/125958

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

[0011] そこで、本発明は、サトウキビの量的形質の中でも黒穂病抵抗性に関連するマーカー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

[0012] 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、サトウキビ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、黒穂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。

[0013] 本発明は以下を包含する。

[0014] (1) サトウキビ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14に示す塩基配列により挟まれる領域、配列番号15に示す塩基配列及び配列番号22に示す塩基配列により挟まれる領域、配列番号23に示す塩基配列及び配列番号32に示す塩基配列により挟まれる領域、配列番号33に示す塩基配列及び配列番号51に示す塩基配列により挟まれる領域、配列番号52に示す塩基配列及び配列番号62に示す塩基配列により挟まれる領域

、配列番号 63 に示す塩基配列及び配列番号 72 に示す塩基配列により挟まれる領域、又は配列番号 73 に示す塩基配列及び配列番号 85 に示す塩基配列により挟まれる領域から選ばれる連続する核酸領域からなる、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカー。

[0015] (2) 上記核酸領域は、配列番号 1～85 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) 記載のサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカー。

[0016] (3) 上記核酸領域は、サトウキビの染色体における配列番号 5 に示す塩基配列と配列番号 9 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、配列番号 18 に示す塩基配列と配列番号 22 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、配列番号 25 に示す塩基配列と配列番号 32 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、配列番号 33 に示す塩基配列と配列番号 42 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、配列番号 57 に示す塩基配列と配列番号 59 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、配列番号 64 に示す塩基配列と配列番号 66 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、又は配列番号 72 に示す塩基配列と配列番号 80 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) 記載のサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカー。

[0017] (4) 少なくとも一方の親がサトウキビ植物である後代植物の染色体及び/又は当該親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 に記載のサトウキビ黒穂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、黒穂病抵抗性が向上したサトウキビ系統の製造方法。

[0018] (5) 上記測定する工程では、上記サトウキビ黒穂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 (4) 記載のサトウキビ系統の製造方法。

[0019] (6) 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) 記載のサトウキビ系統の製造方法。

[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 2011-101050 号及び日

本国特許出願2012-94995号の明細書及び/又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、サトウキビにおける量的形質の中でも黒穂病抵抗性に連鎖する新規なサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを提供することができる。本発明に係るサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを利用することによって、サトウキビの交配系統における黒穂病抵抗性を検定することができる。これにより、黒穂病抵抗性が向上した特性を有するサトウキビ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]サトウキビ染色体のマーカー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]実施例で使用したサトウキビ品種・系統群について2010年6月23日に調査した黒穂病抵抗性データを示す特性図である。

[図4]実施例で使用したサトウキビ品種・系統群について2010年7月21日に調査した黒穂病抵抗性データを示す特性図である。

[図5]実施例で使用したサトウキビ品種・系統群について2010年8月18日に調査した黒穂病抵抗性データを示す特性図である。

[図6]実施例で使用したサトウキビ品種・系統群について2010年9月2日に調査した黒穂病抵抗性データを示す特性図である。

[図7]黒穂病抵抗性に関するQTL解析の結果（NiF8における第5連鎖群）を示す特性図である。

[図8]黒穂病抵抗性に関するQTL解析の結果（NiF8における第17連鎖群）を示す特性図である。

[図9]黒穂病抵抗性に関するQTL解析の結果（NiF8における第40連鎖群）を示す特性図である。

[図10]黒穂病抵抗性に関するQTL解析の結果（Ni9における第1連鎖群）を示す特性図である。

[図11]黒穂病抵抗性に関するQTL解析の結果（Ni9における第13連鎖群）を示す特性図である。

[図12]黒穂病抵抗性に関するQTL解析の結果（Ni9における第14連鎖群）を示す特性図である。

[図13]各系統におけるN802870のシグナル値を示す特性図である。

[図14]各系統におけるN827136のシグナル値を示す特性図である。

[図15]各系統におけるN812680のシグナル値を示す特性図である。

[図16]各系統におけるN916081のシグナル値を示す特性図である。

[図17]各系統におけるN919839のシグナル値を示す特性図である。

[図18]各系統におけるN918761のシグナル値を示す特性図である。

[図19]各系統におけるN901160のシグナル値を示す特性図である。

発明を実施するための形態

[0023] 以下、本発明に係るサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカー及びその利用方法、特にサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを用いたサトウキビ系統の製造方法について説明する。

[0024] <サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカー>

本発明に係るサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとは、サトウキビの染色体上に存在する特定の領域であり、サトウキビの黒穂病抵抗性といった形質の原因遺伝子（群）に連鎖して、サトウキビ黒穂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、既知のサトウキビ系統を用いて得られた後代系統において、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーの存在・非存在を確認することで黒穂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、黒穂病とは、*Ustilago*属の微生物が感染することに起因して病班が形成される病気を意味している。*Ustilago*属の微生物としては、一例として*Ustilago scitaminea*を挙げることができる。

[0025] また、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとは、黒穂病抵抗性が向上する形質に連鎖するマーカーと、黒穂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、特定のサトウキビ品種において、前者のマーカーが存在していれば黒穂病抵抗性が向上した品種と判断できる。さらに、特定のサトウキビ品種において、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黒穂病抵抗性が向上した品種であるとより高精度に判断できる。なお、特定のサトウキビ品種において、後者のマーカーが非存在であることのみをもって、黒穂病抵抗性が向上した品種であると判断しても良い。

[0026] ここで、サトウキビとは、イネ科サトウキビ属に属する植物を意味する。また、サトウキビとは、所謂、高貴種（学名：Saccharum officinarum）と野生種（学名：Saccharum spontaneum）、バルベリ種（Saccharum barberi）、シネンセ種（Saccharum sinense）、オフィシナルム種の祖先種であるロバスタム種（Saccharum robustum）のいずれも含むことを意味する。既知のサトウキビ品種・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、サトウキビ日本国内育成品種としては、特に限定されないが、Ni1、Ni2、NiF3、NiF4、NiF5、Ni6、NiN7、NiF8、Ni9、NiTn10、Ni11、Ni12、Ni14、Ni15、Ni16、Ni17、NiTn19、NiTn20、Ni22及びNi23等を挙げることができる。また、サトウキビ日本国内主要品種としては、特に限定されないが、NiF8、Ni9、NiTn10及びNi15等を挙げることができる。さらに、サトウキビ日本国内導入主要品種としては、特に限定されないが、F177、Nco310及びF172等を挙げることができる。

[0027] また、後代系統は、母本及び父本の両方がサトウキビ品種・系統である同種交配による系統であっても良いし、いずれか一方がサトウキビ品種・系統であり他方が近縁のErianthus arundinaceusであるような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。

- [0028] サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーは、サトウキビの染色体から独自に取得した3004個と4569個のマーカーを含む遺伝子連鎖地図とサトウキビ黒穂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、サトウキビ黒穂病抵抗性は、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、サトウキビ黒穂病抵抗性は、連続分布をとる黒穂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。
- [0029] 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) 以上となる上記遺伝子連鎖地図に含まれる領域を7つ見いだした。すなわち、当該領域を含む約18.7cM (センチモルガン) 領域、当該領域を含む約39.2cM領域、当該領域を含む約19.2cM領域、当該領域を含む約32.0cM領域、当該領域を含む約39.5cM領域、当該領域を含む約53.4cM領域、及び当該領域を含む約38.0cM領域の7領域を特定した。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。サトウキビの染色体において、1cMは、約2000 kbに相当する。なお、このピーク位置又はその近傍には、黒穂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。
- [0030] 上記18.7cMの領域は、上記マーカーのうち表1に示す14種類のマーカーがこの順に含まれる領域であり、黒穂病抵抗性が低下する形質に連鎖する領域である。

[表1]

連鎖群	マーカー名	塩基配列情報	シグナル 閾値	配列番号
NIF8_5	N827337	CCTCGTCATGCACCCGTGCCTCTTCTCCTCTTGCTGTT GCTCCTCCTCC	1,000	配列番号1
	N802879	GGAATTGTTGTAGATTGTTTTGTGATGGAAAGATCATAC CTCAGCTACAAGAAGTAAATATCCTTTTCCA	1,000	配列番号2
	N804818	GGCATTAGAAGAAAGGTGGAAGAATAAGGTTTGAGCCC TTATTTATTTGCTTTGGTGATGGAT	1,000	配列番号3
	N816296	CCATTCTACTTCTACCAACCATAAACAGGAGGAGCATG CATGCACATGC	1,000	配列番号4
	N804607	ATTGCTTGCTCGCTGCAACTTGGGCCATGTTTAGTTCCT CGAATTTGAGT	1,000	配列番号5
	N802870	AGTGAAGAGATTGGATTCTAGGGTTACTTTATAAAGTGT CAACACCTTAGATCTGTTTTTAGT	1,500	配列番号6
	N813249	GGCCGGCAGCAGCATCAGGGTCAAGACTCAAGAGCTC AAGTGCTTGCTTT	1,500	配列番号7
	N813609	TACTTTGTCTCGTTCCAGTAGTCCATCAAGCAAGCCTCG TACACAAGTCC	1,000	配列番号8
	N815502	TGCACTGGGGATACCAGTTGAGTTGATTGCACAACCTG CGCTACACCATG	1,000	配列番号9
	N815101	GCCGCCTGATGGAACGGTCGTCGCATCCAAAGACGC ACATGGTTTAGCA	1,000	配列番号10
	N823481	AGTACCTGTTCTGCTGCACTACATAACAGTACTTTTCAG TGAACGAACAGTGTTC	1,000	配列番号11
	N801028	AGCGGATAGCGCTAGCATGTCATTCTCTCCCTCGCTA GCACGTTATTCC	1,500	配列番号12
	N810798	GTTGCGGCGTGTGTTGATGATGTAAAGAATACTCGTCC GTGAGAAATTATCA	1,500	配列番号13
	N821515	ACGTGACGACGACGACGATGCAGCTGGGGCTTGGCGT GGAATGGTTGTCG	1,000	配列番号14

[0031] 上記39.2cMの領域は、上記マーカーのうち表2に示す8種類のマーカーがこの順で含まれる領域であり、黒穂病抵抗性が向上する形質に連鎖する領域である。

[表2]

連鎖群	マーカー名	塩基配列情報	シグナル 閾値	配列番号
NIF8_17	N826561	GGCCTTGTTTAAATGTCACCTAAATTCTAAATTTTACACT CTTTTCATAACATCGAATCTTAAAA	1,000	配列番号15
	N827136	AAACTGAGGGATTACTTTCCAATTGAAATGTCATCCACC ACAAACACAAAAGGCATACTCA	1,500	配列番号16
	N826325	ACACTACACTGTGTAGGCAATGAGCAGCTCTGTTGCAC AGCAAAGCCAAA	1,000	配列番号17
	N803928	GGATGTGAAGTATGTATGTGTTTTAGATGGACCAAGG AAGCTGCATGGG	1,000	配列番号18
	N822568	TACGGTGGTACAAAGCTTAGATCAATGATCAAGCTACAA AACACACAAAGATAGTCAGTAGAAAAAGT	1,000	配列番号19
	N829026	GACGACGAGGTGGGCAGCGCCAGTGCGCTACTACCTT CTTTCTTGCAACT	1,000	配列番号20
	N815300	GTATGGTTATGTTGGTACTAAAGGTTTCTGACTATTGTAT TGTATTGTTGTGTTATAATGGGTTCAATG	1,000	配列番号21
	N826906	GGCTGCAATACCTGTTCTCATCTCATCTATTCTGTGCAA AGTTGCTGGTC	1,000	配列番号22

[0032] 上記19.2cMの領域は、上記マーカーのうち表3に示す10種類のマーカーがこの順で含まれる領域であり、黒穂病抵抗性が低下する形質に連鎖する領域である。

[表3]

連鎖群	マーカー名	塩基配列情報	シグナル 閾値	配列番号
Nif8_40	N816552	TCGGGTTGGAGGCAAGGAAGAAAGGAGCTAGATTGCT CGGCTGCTGGTGC	1,500	配列番号23
	N827448	ACAGTAGTGCAACTGCGACGACGATGTGTGGGTATATG TTCCATAGCTTG	1,000	配列番号24
	N829378	TTTTGATTGGCCTTGCAGATGTTGCAGCGATGGCACTC GTGGCAAACAGA	900	配列番号25
	N829404	AACCATGCTGAAAACGTCTTCCGTTTACAGTTTATGGTA TATCCGCTTAAAACTAACTCGATC	1,000	配列番号26
	N828725	AATCTAAATGACTAATGAGACCGTGAGAGCTGCTTAGC TTAATGGTGCATCCCTTTTAAACT	1,000	配列番号27
	N812680	AAGAACACTGCTAAGGATGGTCACAATTTGGAACTGA AGTTTTATCTCTGTTCCGT	1,500	配列番号28
	N811688	AAGCTGCATCTGATTCTCATCCAAACCTGCTCTGCTCA TTATCATTACTTCGT	1,000	配列番号29
	N819703	CCAACCAACAGCAAGAACACCAAGACGCACATAATGA GGCCCATGAAGTA	1,500	配列番号30
	N815648	TTTACACCACTGAACTGACAAAAATCGAAGTGGTGCG GTACATAAGAACATTTACATCCAAC	1,000	配列番号31
	N821999	GACCAATCTAGGAAAAACAATTGCACAAATGACTACATT TATTATGGCAAATCAATTTCTTCAGTCATTGTA	1,000	配列番号32

[0033] 上記32.0cMの領域は、上記マーカーのうち表4に示す19種類のマーカーがこの順で含まれる領域であり、黒穂病抵抗性が向上する形質に連鎖する領域である。

[表4]

連鎖群	マーカー名	塩基配列情報	シグナル 閾値	配列番号
Ni9_1	N915070	ATAGTCTACCTATACTGGTGCCACAAGTCAACAAGTGAT GGCAATACCCATTCAAATT	1,000	配列番号33
	N915209	TGGCAATACCCATTCAAATTGCGTCAAATGTGAATAAAT GGAGGTAGATGACTAACACCTTTGTTTCAAAA	1,000	配列番号34
	N916186	CTGCAATACAATGCGGTGGAAGCGGATTGGTGGAAGG CATGCATGCATCA	1,000	配列番号35
	N902342	CCAAATACCTAAGTGCACCTTTTTCTGAGGCCAAATACC TAGGTTGAAAGATTTCGT	900	配列番号36
	N919949	CCGCCTCAAAAGGAAGTAACACAGGAACATGATCATAAC GGAGTAGTACTAT	1,000	配列番号37
	N920597	CTTGCCGGCCGGGACCCTGCTGGCAGCATCAAGCGA CTACAGTACAATGC	1,500	配列番号38
	N916081	CAAAGAAAGCACATTACCGGTATGTTACCAACTTCCTA TGTTGACTATCCAAATACTG	4,000	配列番号39
	N902047	GGATTGGTCTAGTACAATCTTTATTGAAGACGAAAGATT TATGCATGGTGATTAGTTGAGCCTGT	1,500	配列番号40
	N916874	CAAATATGACGATGGAAATATAGTACTATTAATAAGAC ATAACTTGCAGCATATATTAATTCATAGGATAAG	1,000	配列番号41
	N918161	CTAGTTAGAGCATCTCCAAGCGTACTCAGAAGAGTCGC CCAATCTAGCAA	1,000	配列番号42
	N918536	CAGAGAACTGGGAACGAAACAGGACAATACATCTGTA CGTTTGGCTTGT	900	配列番号43
	N901676	TCCCTGTACTGTATGGTCGCCACAAATGCATATTGATAG ACATGTTTATGATGTAGAATTTGATGTTTACA	1,000	配列番号44
	N919743	AAATCAATAAAGAAAGGCACGCTGAAAATAAGATGGTC TGATCGAGCTCCTGTGTTTAGTACAA	1,000	配列番号45
	N901176	ATTCCAATGAACTAAGGGTAAGTAGAGATTATTATATATA AATCAATGATACACAACTGATCAATCAACTAA	1,500	配列番号46
	N916035	GCCTTCTTGATCTCTCAGACTAAGAACATAGGCCCAGA GTGAGGGGAAAC	1,500	配列番号47
	N921010	CGTTCGCTTGAGCTTATTAGATAAAATCAATCAGCAATA AAATAATATTTTCTAATAAAAATCAGCA	1,500	配列番号48
	N915635	TTTATCAGCTTCGGAAATCAGCTTGAGCTGACGAAGAC ATCAATCTTCTACATCAGAT	4,000	配列番号49
	N901348	ACATGTATGTGCAAAATATCTTGAGACCCTCTGCTTTAA CATGCATGTCCTTCACATGT	1,500	配列番号50
	N920207	CAGCTCTGTCATTGCCGCCAAACACATATGCGCCTTCA TGCCCTTCTCCC	1,500	配列番号51

[0034] 上記39.5cMの領域は、上記マーカーのうち表5に示す11種類のマーカーがこの順で含まれる領域であり、黒穂病抵抗性が低下する形質に連鎖する領域

域である。

[表5]

連鎖群	マーカー名	塩基配列情報	シグナル 閾値	配列番号
Ni9_13	N914284	AGCCATCCCGCAGAGGCTCTTGATGTCCTTTGAGCTG TCCTAAAACCACT	1,000	配列番号52
	N901453	CTATGTGTTGGGCTTATATGTGATGCATCTTCCTTTTG AATTCAGGGTAGTGCTGATA	1,000	配列番号53
	N900044	GTGCTGATACGCCACCAGCCGAAACAAATGGTGATAG CTCTAGCGCACAG	1,000	配列番号54
	N919839	AAATCCTGAAGGCCGAAGCCCGTAGACATGTTCAACCT AGCAAACAAAGG	1,500	配列番号55
	N901567	GCATCGGCTGGTGCTGGTAGGATAAACCTCTGCTCC GCTTGATATTTTT	1,500	配列番号56
	N911103	TTCGCTTGAGTTTTATCAGCAGAATTAACAGTTATATAGC GGTGTTTTTCTCTCACACTAAATCAGTAAA	800	配列番号57
	N918508	CTTGCCCTACTTCTTGATAGATGCTTAGTTTACATTTTAC CTGAAATTTATTAATATCGATCACTACAAAT	1,500	配列番号58
	N918344	GAACAAGGAGCATCCATATATGTATGGCACTTTGACATT GTTGGCTATGTCTAGCTT	1,000	配列番号59
	N919696	GGAAAAGCAAGCAGCTCGTGTAGCAATAGTTGGCATTG GCAACAGACGCC	1,000	配列番号60
	N916172	GGTAAAATTATGCAAGTTCCACGAAATTTGGCATATGA AAGTGCCCTTAAAAATTAAGGTTT	1,500	配列番号61
	N916129	GAGCTTTTATTTATGCTAACCTGTAACAATAAATTGTCTT TGAGCATGGTTGTTTGATGATCTCAATGACCG	1,500	配列番号62

[0035] 上記53.4cMの領域は、上記マーカーのうち表6に示す10種類のマーカーがこの順で含まれる領域であり、黒穂病抵抗性が低下する形質に連鎖する領域である。

[表6]

連鎖群	マーカー名	塩基配列情報	シグナル 閾値	配列番号
Ni9_14_1	N901178	ATCTACACAACAAATCCACTGTATTAGACGATTGTTATC AAATGATCTTCCAGCAAATTGACATAATATGACATT	1,000	配列番号63
	N918761	AGAACAGGGCCATCGTTGTTAGCGTGCGTGCTGTAA GTTTGATTTAATTTAAAAAAATACGTATA	1,500	配列番号64
	N913735	ACGTACAAATGTTTGGGATGGCAGAGGACATGTAGTA CAGGGTTGATTCTTTCAATA	1,000	配列番号65
	N900663	GCACCTCGCTCCTCCTTATCAAGTTTCGATTCTGGAT TTGCTGCTCTTG	1,000	配列番号66
	N918363	AAGGCGAACAATGATTCCCCTCAGTGACCTGAACGT AATAGTAAATGATACACACT	1,000	配列番号67
	N918213	TCGCATGTCAGGGCTGACAAATGGCTAAAACCAGAC GGAAGATAGACGGA	1,500	配列番号68
	N900568	AACATCAGCTTAGTCTTTAGAGGTTATACCTGCTGTGC TATTTTTTTTACTTAGTGACACCATTCTGA	1,000	配列番号69
	N912523	CCTTAATCACGCTTGTGAAATATCACTCAAACCAACAA TATCAATACCACCATTATTATGCTTGTGAAATATGC	1,500	配列番号70
	N900344	TTAAAGACTGAAAGAAACAATTATTGAATTAAAGAACA ACTAGATAGAGAGCACTGGACTGAATGGTTGCAGA	1,500	配列番号71
	N900802	ATCCCATCACAAAGGAAAGAATTGCACAAACAATGAC GTGGTACCTTTAAAGATAGAGAATGGAATAGA	1,500	配列番号72

[0036] 上記38.0cMの領域は、上記マーカーのうち表7に示す13種類のマーカーがこの順で含まれる領域であり、黒穂病抵抗性が向上する形質に連鎖する領域である。

[表7]

連鎖群	マーカー名	塩基配列情報	シグナル 閾値	配列番号
Ni9_14_2	N901524	AAGCAACAGATGACTAGAAGTACAGTGCAGGAGACT CCAACACTTTACTATATTAGTAGAAGA	1,000	配列番号73
	N901163	TCTTCAGTTCATATCTATCATCTATCCGTCGCTCGTTTC ATGAGACAGATCAAATAAGCAGAT	1,000	配列番号74
	N911063	TTCGAGAATGAGCGCATTAGCACAAGGTTTAATTCAT TAATCACTTTAGGTATCTAGTTAGGTGTGTGT	1,000	配列番号75
	N914692	CGCCACCAATGCATTACCCAATGGGGTACCCGATGC CGCCCATTCGCA	1,500	配列番号76
	N911405	GTGCAGGGTACCCGTCATGGGCTACGGCTATGGCC GCCACCAATGCAT	1,000	配列番号77
	N913383	AAGATAAATTACAAGCAAAATTAGAATGTCAAATACCA CAAATATTGAGAGCTGTGCCTGACAATTGAGGAGA	1,000	配列番号78
	N914112	AGCTGTGCCTGACAATTGAGAGTGAACAGAGTACATT TCATACTGCCAG	1,000	配列番号79
	N915180	TCCGGAGATTACAACGTCTTCAGTGACGAGAACCCG AACAGCTGCTCGGT	1,000	配列番号80
	N901160	CCCCTGACACGATAATTTATTTGCCAGAATTTATGAATTA CAGCCGCATTTCTGTGTGT	1,500	配列番号81
	N916293	TTGGCAATCATCGACTAATTAGGTGTAAGAGATTGCTC TTGTTATTTTCTACCAAATTATGAAATTTA	1,000	配列番号82
	N916263	TATAGGGCCAGATAAACCATGATAATCATAGGATATTTG CAGAAATCTTAAATTTCTGAGATTGCCAACAGAAGA	1,000	配列番号83
	N917579	TATGGATCTTCCAGTTGATTACTGTTCTTTCGCTCCGC TTTTTGCTTTTTTACTCGTGA	1,000	配列番号84
	N918080	TACTCGTGAGGGTCCATCTATGACCTATCCTGTGTTCT TTACTAGCGAAA	1,000	配列番号85

[0037] なお、表1～7において、連鎖群とは、QTL解析において特定された複数の連鎖群についてそれぞれ付された番号である。表1～7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1～7においてシグナル閾値とは、マーカーの有無を判定するための閾値である。

[0038] また、18.7cMの領域に含まれるピークは、配列番号5に示す塩基配列からなるマーカー（N804607）及び配列番号9に示す塩基配列からなるマーカー（N815502）により挟み込まれる領域に存在している。39.2cMの領域に含まれるピークは、配列番号18に示す塩基配列からなるマーカー（N803928）及び配列番号22に示す塩基配列からなるマーカー（N826906）により挟み込まれる

領域に存在している。19.2cMの領域に含まれるピークは、配列番号25に示す塩基配列からなるマーカー（N829378）及び配列番号32に示す塩基配列からなるマーカー（N821999）により挟み込まれる領域に存在している。32.0cMの領域に含まれるピークは、配列番号33に示す塩基配列からなるマーカー（N915070）及び配列番号42に示す塩基配列からなるマーカー（N918161）により挟み込まれる領域に存在している。39.5cMの領域に含まれるピークは、配列番号57に示す塩基配列からなるマーカー（N911103）及び配列番号59に示す塩基配列からなるマーカー（N918344）により挟み込まれる領域に存在している。53.4cMの領域に含まれるピークは、配列番号64に示す塩基配列からなるマーカー（N918761）及び配列番号66に示す塩基配列からなるマーカー（N900663）により挟み込まれる領域に存在している。38.0cMの領域に含まれるピークは、配列番号73に示す塩基配列からなるマーカー（N901524）及び配列番号80に示す塩基配列からなるマーカー（N915180）により挟み込まれる領域に存在している。

[0039] 表1～7に示したマーカーが含まれる7つの領域から選ばれる連続した核酸領域を、サトウキビ黒穂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、サトウキビ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。サトウキビ黒穂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。

[0040] また、サトウキビ黒穂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以上、最も好ましくは30塩基長とすることができる。サトウキビ黒穂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。

[0041] 特に、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、18.7cMの領域に含まれる14種類のマーカーのうち、配列番号5に示す塩基配列と配列番号9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5に示す塩基配列と配列番号9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。また、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、39.2cMの領域に含まれる8種類のマーカーのうち、配列番号18に示す塩基配列と配列番号22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18に示す塩基配列と配列番号22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。さらに、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、19.2cMの領域に含まれる10種類のマーカーのうち、配列番号25に示す塩基配列と配列番号32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25に示す塩基配列と配列番号30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。さらにまた、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、32.0cMの領域に含まれる19種類のマーカーのうち、配列番号33に示す塩基配列と配列番号42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33に示す塩基配列と配列番号42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。さらにまた、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、39.5cMの領域に含まれる11種類のマーカーのうち、配列番号57に示す塩基配列と配列番号59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57に示す塩基配列と配列番号59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。さらにまた、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、53.4cMの領域に含まれる10種類のマーカーのうち、配列番号64に示す塩基配列と配列番号66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64に示す塩基配列と配列番号66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。

。さらにまた、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、38.0cMの領域に含まれる13種類のマーカーのうち、配列番号73に示す塩基配列と配列番号80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73に示す塩基配列と配列番号80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。

[0042] また、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、上記表1～7に示した85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、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、18.7cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号6に示す塩基配列からなるマーカー（N802870）を含む核酸領域、39.2cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号22に示す塩基配列からなるマーカー（N826906）を含む核酸領域、19.2cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号32に示す塩基配列からなるマーカー（N821999）を含む核酸領域、32.0cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号35に示す塩基配列からなるマーカー（N916186）を含む核酸領域、39.5cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号58に示す塩基配列からなるマーカー（N918508）を含む核酸領域、53.4cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号65に示す塩基配列からなるマーカー（N913735）を含む核酸領域、38.0cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号74に示す塩基配列からなるマーカー（N901163）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。

[0043] さらに、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、上記85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、これら85種類のマーカーのうち1種類以上のマーカーをサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとして使用することができる。例えば、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーとしては、18.7cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号6に

示す塩基配列からなるマーカー（N802870）、39.2cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号22に示す塩基配列からなるマーカー（N826906）、19.2cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号32に示す塩基配列からなるマーカー（N821999）、32.0cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号35に示す塩基配列からなるマーカー（N916186）、39.5cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号58に示す塩基配列からなるマーカー（N918508）、53.4cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号65に示す塩基配列からなるマーカー（N913735）、38.0cMの領域に含まれるピークの位置に最も近い配列番号74に示す塩基配列からなるマーカー（N901163）を使用することが好ましい。

[0044] <サトウキビにおけるマーカーの同定>

本発明では、上述したように、サトウキビの染色体から独自に取得した3004個と4569個のマーカーからサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを特定した。ここでは、これら3004個と4569個のマーカーについて説明する。これマーカーを同定する際には、特願2009-283430号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。

[0045] 具体的に、サトウキビの染色体から独自に取得した3004個と4569個のマーカーは、特願2009-283430号に開示された方法により設計されたプローブを有するDNAマイクロアレイを使用する。プローブの設計方法は、図1に示すように、まず、サトウキビからゲノム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。

[0046] 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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 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、サトウキビ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。

[0053] 以上のように、サトウキビ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1～85に示した85種類のサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを含む3004個と4569個のマーカーを同定することができる。

[0054] より具体的に、本発明者らは、既知のサトウキビ品種NiF8、Ni9及びこれらの交配後代系統（191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 Biomedical 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1～85に示した85種類のサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを含む3004個と4569個のマーカーを同定している。

[0055] <サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーの利用>

サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを利用することで、後代系統等に黒穂病抵抗性の表現型が未知のサトウキビ系統について黒穂病抵抗性の向上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。ここで、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを利用するとは、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。サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーに対応するプローブとは、上述のように定義され

たサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーに対して、ストリンジェ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サトウキビ黒穂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。

[0056] 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黒穂病抵抗性の表現型が未知のサトウキビ系統について、黒穂病抵抗性の向上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サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを検出して、黒穂病抵抗性の表現型が未知のサトウキビ系統について黒穂病抵抗性の向上という形質を有する系統であるか判断してもよい。

[0057] 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、先ず供試サトウキビからゲノム DNA を抽出する。この供試サトウキビとは、後代系統等の黒穂病抵抗性の表現型が未知のサトウキビ系統及び/又は後代系統を作製する際に使用した親のサトウキビ系統のことであり、黒穂病抵抗性が向上する形質を有するか判定する対象となるサトウキビ系統である。なお、サトウキビ以外の植物、例えば、ソルガムやエリアンサスといったイネ科植物を供試植物とし、これら供試植物における黒穂病抵抗性を評価しても良い。

[0058] 次に、抽出したゲノム DNA を、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、供試サトウキビ由来のゲノムDNA断片を増幅することができる。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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ェ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ェンシー条件とすることによって、供試サトウキビにサトウキビ黒穂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、ストリンジェンシー条件は、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ェンシー

条件となり、またより低い塩濃度でより高いストリンジェンシー条件となる。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℃、0.21SDS、6×SSCの条件とすることでより高いストリンジェンシー条件とすることができる。

[0062] 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。

[0063] 以上のように、上述したDNAマイクロアレイを使用することにより、供試サトウキビが上述したサトウキビ黒穂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、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカには、黒穂病抵抗性が向上する形質に連鎖するマーカと、黒穂病抵抗性が低下する形質に連鎖するマーカとがある。上述した表2、表4、及び表7に示した3つの領域から設計したサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカは、黒穂病抵抗性が向上する形質に連鎖する。一方、上述した表1、表3、表5及び表6に示した4つの領域から設計したサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカは、黒穂病抵抗性が低下する形質に連鎖する。

[0064] したがって、供試サトウキビにおいて、上述した表2、表4、及び表7に示した3つの領域から設計したサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカのうちのいずれかが存在していれば、黒穂病抵抗性が向上した品種と判断できる。さらに、供試サトウキビにおいて、上述した表1、表3、表5及び表6に示した4つの領域から設計したサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカのいずれかが非存在であれば、黒穂病抵抗性が向上した品種と判断できる。更に好ましくは、供試サトウキビにおいて、上述した表2、表4、及び表7に示した3

つの領域から設計したサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーのうちいずれかが存在し、且つ、上述した表1、表3、表5及び表6に示した4つの領域から設計したサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーのいずれかが非存在であれば、黒穂病抵抗性が向上した品種と高精度に判断できる。

[0065] 特に、上述した方法では、供試サトウキビを実際の黒穂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、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを利用することによって、供試サトウキビ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、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーを利用することによって、実際に黒穂病の原因微生物 (*Ustilago scitaminea*) 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。

[0066] 特に、サトウキビ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、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカー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、サトウキビ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。

[0067] 或いは、サトウキビ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サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーの存在の有無を判定し、黒穂病抵抗性に優れた親品種を選抜することもできる。黒穂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、黒穂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、サトウキビ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

[0068] 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。

[0069] 1. DNAマイクロアレイ用プローブの作成

(1)材料

サトウキビ品種 : NiF8、Ni9、US56-15-8、POJ2878、Q165、R570、Co290及びB3439、サトウキビ近縁野生種 : Glagah Kloet、Chunee、Natal Uba及びRobustum9、並びにエリアンサス : IJ76-349及びJW630を用いた。

[0070] (2)制限酵素処理

これらサトウキビ品種、サトウキビ近縁野生種及びエリアンサスからそれぞれゲノムDNAを、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen社製) を用いて抽出した。ゲノムDNA(750ng)を制限酵素PstI(NEB社、25unit)で37℃、2時間処理後、制限酵素BstNI(NEB社、25unit)を添加、60℃、2時間処理した。

[0071] (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' -CACGATGGA TCCAGTGCA-3' (配列番号86)、5' -CTGGATCCATCGTGCA-3' (配列番号87))とT4 DNA Ligase(NEB社、800 unit)を加え、16℃、一昼夜処理した。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。

[0072] (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' -GATGGATCCAGTGCAG-3' (配列番号88))とTaq polymerase(TAKARA社PrimeSTAR、1.25unit)を加え、PCR(98℃を10秒間、55℃を15秒間、72℃を1分間、30サイクル後、72℃で3分間処理後、4℃で保存)でゲノムDNA断片を増幅した。

[0073] (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断片についてサンガー法により塩基配列を決定した。また、ゲノムデータベース (Gramene : <http://www.gramene.org/>) に格納されたソルガム全ゲノム配列情報から、PstI認識配列により挟み込まれる塩基配列情報を取得した。

[0074] (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。

[0075] 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

サトウキビ品種・系統：NiF8及びNi9、並びに、交配後代191系統を用いた。

[0076] (2)制限酵素処理

これらNiF8及びNi9、並びに191系統の後代系統からそれぞれゲノムDNAを、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen社製)を用いて抽出した。ゲノムDNA(750ng)を制限酵素PstI(NEB社、25unit)で37℃、2時間処理後、制限酵素BstNI(NEB社、25unit)を添加、60℃、2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86)、5' -CTGGATCCATCGTGCA-3' (配列番号87))とT4 DNA Ligase(NEB社、800 unit)を加え、16℃、一昼夜処理した。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' -GATGGATCCAGTGCAG-3' (配列番号88))とTaq polymerase(TAKARA社PrimeSTAR、1.25unit)を加え、PCR(98℃を10秒間、55℃を15秒間、72℃を1分間、30サイクル後、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)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、Cy3-labeled 9mers(TriLink社、10.D.)を加え、98℃、10分間処理後、氷上で10分間

静置した。その後、Klenow(NEB社、100unit)を加え37℃、2時間処理した。そして、エタノール沈殿によりラベル化サンプルを調整した。

[0080] (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。

[0081] 3. サトウキビ黒穂病抵抗性のQTLの同定及びマーカーの開発

(1)遺伝地図データシート作成

上記2. にて検出したサトウキビ品種NiF8、Ni9及びこれらの交配後代系統(191系統)のシグナルデータから、3004個と4569個のマーカーとなりうる遺伝子型データを取得した。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 Biomedical 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。

[0082] (2) 黒穂病抵抗性データの取得

2009年10月26～28日、NiF8及びNi9、交雑後代191系統の茎を収穫し、2～3日間、室温・高湿度条件下で催芽処理した後、黒穂病胞子の有傷接種に供した。有傷接種は、苗芽子両側に傷を付け(計6か所、深さ約4.0mm)、毛筆により胞子浮遊液($10^7 \sim 10^8$ 個・胞子/ml)を塗布した。胞子浮遊液の黒穂病胞子は、2009年に沖縄県内で栽培したNi9の黒穂病自然発病株の鞭状物より採取した。有傷接種した苗は、2～3日間、室温・高湿度条件下で栽培し、2009年10月30日～11月1日に育苗箱へ植付けた(40芽/箱、2箱/系統)。苗の植付け後、2010年9月2日まで、高湿度条件下、温室で栽培した。黒穂病罹病程度の調査は、罹病の兆候である鞭状物が頂部より露出した株数を計測し罹病株数と

した。罹病株数の調査後、罹病株の植物体は、地際部より刈取り除去した。黒穂病罹病株数の調査は2010年6月23日、7月21日、8月18日及び9月2日の計4回実施した。黒穂病の罹病率は、発芽株数（黒穂病以外の枯死株を除く）に対する罹病株数の割合として算出した。2010年6月23日に調査した結果を図3に示し、7月21日に調査した結果を図4に示し、8月18日に調査した結果を図5に示し、9月2日に調査した結果を図6に示す。

[0083] (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シート及び上記(2)で得られた黒穂病抵抗性データを元にして、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。このときLODの閾値を2.5とした。その結果、図7～12に示すように、サトウキビ品種NiF8の第5連鎖群のマーカーN827337からN821515(8月18日)、第17連鎖群のマーカーN826561からN826906(6月23日、7月21日、8月18日)、第40連鎖群のマーカーN816552からN821999(7月21日、8月18日、9月2日)、サトウキビ品種Ni9の第1連鎖群のマーカーN915070からN920207(7月21日、8月18日、9月2日)、第13連鎖群のマーカーN914284からN916129(7月21日、8月18日、9月2日)、第14連鎖群のマーカーN901177からN900802(6月23日)、マーカーN901524からN918080(6月23日、7月21日)の7つ区間内にサトウキビの黒穂病抵抗性に関するQTLの存在を確認した。すなわち、これら7つ区間内にLODの閾値を超えるピークが得られた。得られたピークは表8に示すように特定することができ、当該ピークの位置に黒穂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。なお、表8において効果(%)の欄は、黒穂病の罹患率の増減を示している。よって、効果(%)の数値が負である場合、当該QTLは黒穂病抵抗性が向上する形質に連鎖することを意味し、効果(%)の数値が正である場合、当該QTLは黒穂病抵抗性が低下する形質に連鎖することを意味する。

[表8]

品種	連鎖群	調査日	位置 (cM)	範囲 (cM)	近接マーカ-	LOD値	効果 (%)
NiF8	5	8/18	3.8	18.7	N827337 - N821515	2.6	8.2
NiF8	17	6/23	94.3	39.2	N826561 - N826906	6.5	-16.5
NiF8	17	7/21	94.3	39.2	N826561 - N826906	3.6	-10.1
NiF8	17	8/18	94.3	39.2	N826561 - N826906	3.5	-9.7
NiF8	40	7/21	34.1	19.2	N816552 - N821999	3.3	9.6
NiF8	40	8/18	34.1	19.2	N816552 - N821999	3.0	8.9
NiF8	40	9/2	34.1	19.2	N816552 - N821999	3.4	8.4
Ni9	1	7/21	5.5	32.0	N915070 - N920207	2.8	-8.7
Ni9	1	8/18	5.5	32.0	N915070 - N920207	2.6	-8.3
Ni9	1	9/2	5.5	32.0	N915070 - N920207	3.3	-8.5
Ni9	13	7/21	12.9	39.5	N914284 - N916129	2.6	8.3
Ni9	13	8/18	12.9	39.5	N914284 - N916129	2.6	8.3
Ni9	13	9/2	12.9	39.5	N914284 - N916129	2.6	7.4
Ni9	14.1	6/23	97.3	53.4	N901178 - N900802	2.6	15.2
Ni9	14.2	6/23	137.7	38.0	N901524 - N918080	5.2	-21.3
Ni9	14.2	7/21	137.7	38.0	N901524 - N918080	4.7	-16.2

[0084] そして、図7～12に示すように、当該ピークの近傍に位置するマーカ-は、黒穂病抵抗性を向上又は低下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サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカ-として使用できることが示された。すなわち、図7～12に示した85種類のマーカ-は、サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカ-として使用できることが明らかとなった。

[0085] なお、上記2.における(6)シグナル検出の一例として、NiF8及びNi9、並

びに後代系統における、NiF8に存在する第5連鎖群に存在するマーカーN82733
7からN821515に含まれる14種類のマーカーのシグナル値を表9に示し、な
かでもN802870については当該シグナル値を図13に示した。

[表9]

連鎖群	マーカー名	F1														
		NIF8	NIF9													
	N827337	1,629	529	1,354	344	439	403	1,330	1,593	1,823	1,495	1,717	512	495	739	
	N802879	4,193	393	2,706	370	347	372	1,484	2,319	1,707	1,897	1,803	365	518	389	
	N804818	3,093	591	2,173	531	494	408	2,480	3,233	3,589	4,092	4,075	533	635	613	
	N816296	1,489	379	1,440	510	358	342	1,445	1,822	1,671	1,664	1,691	355	398	336	
	N804607	2,125	375	1,454	393	361	394	1,258	1,266	1,422	1,416	1,311	660	382	495	
	N802870	5,498	828	4,275	377	412	444	5,198	4,496	4,195	4,631	4,207	446	655	361	
	N813249	6,034	778	4,329	553	498	764	4,208	3,754	3,864	3,749	3,330	627	711	414	
NIF8_5	N813609	2,821	701	2,178	750	901	869	2,820	3,222	3,729	2,888	3,552	566	945	840	
	N815502	2,044	481	2,452	806	493	436	2,390	2,587	2,088	2,211	2,088	493	640	425	
	N815101	2,055	446	2,660	549	419	344	3,184	2,673	3,153	3,105	3,116	504	347	346	
	N823481	2,096	509	1,200	457	487	393	1,629	1,460	1,870	1,925	1,920	528	585	402	
	N801028	6,877	907	5,694	886	799	651	5,083	3,359	3,578	4,019	4,197	792	377	930	
	N810798	5,506	633	5,171	823	608	513	5,720	4,545	5,463	6,279	5,907	561	847	775	
	N821515	3,768	819	3,190	790	489	418	4,899	3,485	3,282	3,331	3,603	553	921	515	

[0086] NiF8に存在する連鎖群のなかで、黒穂病抵抗性が低下した後代系統ではこれら14種類のマーカーのシグナル値が非常に高いことが示された。これらの結果からも、第5連鎖群に存在するマーカーN827337からN821515に含まれる14種類のマーカーは、サトウキビ黒穂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。

[0087] 同様に、NiF8及びNi9、並びに後代系統における、NiF8に存在する第17連鎖群に存在するマーカーN826561からN826906に含まれる8種類のマーカーのシグナル値を表10に示し、なかでもN827136については当該シグナル値を図14に示した。

[表10]

連鎖群	マカ一名	NIF8	Ni9	F1											
NIF8_17	N826561	1,977	525	462	1,514	574	1,629	744	864	1,136	1,415	528	1,752	453	1,350
	N827136	5,717	514	390	3,279	405	2,898	423	433	4,050	3,633	445	3,857	547	3,723
	N826325	1,620	404	421	1,103	358	1,102	381	408	1,081	1,409	408	1,458	381	1,317
	N803928	2,082	403	390	1,517	427	1,875	412	426	1,696	1,520	393	1,743	322	1,620
	N822568	3,592	501	753	2,556	466	2,502	360	506	2,159	2,941	425	2,733	571	2,580
	N829026	1,766	540	432	1,656	452	1,759	396	656	2,159	2,325	456	1,906	558	2,041
	N815300	3,128	669	708	1,951	974	2,189	460	439	2,271	1,981	687	2,039	372	2,028
	N826906	2,339	447	407	1,704	754	2,139	679	485	2,122	2,554	361	1,915	480	2,281

[0088] NiF8に存在する連鎖群のなかで、黒穂病抵抗性に優れる後代系統ではこれら8種類のマーカーのシグナル値が非常に高いことが示された。これらの結果からも、第17連鎖群に存在するN826561からN826906に含まれる8種類のマーカーは、サトウキビ黒穂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。

[0089] 同様に、NiF8及びNi9、並びに後代系統における、NiF8に存在する第40連鎖群に存在するマーカーN816552からN821999に含まれる10種類のマーカーのシグナル値を表11に示し、なかでもN812680については当該シグナル値を図15に示した。

[表11]

連鎖群	7-カ-名	NiF8	Ni9	F1															
	N816552	2,731	770	630	622	845	3,929	4,570	4,215	3,666	4,651	4,394	900	719	747				
	N827448	2,470	450	357	391	340	2,664	3,031	2,325	2,650	2,035	2,473	376	564	467				
	N829378	3,344	609	443	505	453	1,508	2,045	2,319	1,428	1,093	1,506	752	603	497				
	N829404	2,700	752	723	758	771	2,641	2,295	2,645	2,128	2,792	3,259	523	748	794				
NIF8_40	N828725	2,053	461	548	542	433	1,860	2,282	2,130	1,645	2,066	1,435	496	368	453				
	N812680	7,958	377	309	322	343	6,921	7,267	5,468	5,905	9,015	8,278	317	378	490				
	N811688	4,885	410	680	954	496	3,324	4,237	3,073	2,636	2,919	3,384	520	471	649				
	N819703	4,612	736	617	820	633	4,054	5,138	3,636	5,267	5,107	3,622	761	648	907				
	N815648	3,391	471	472	550	363	2,902	3,116	2,694	2,747	3,836	3,554	393	680	483				
	N821999	3,255	678	427	422	427	2,959	2,237	3,538	2,036	2,680	3,002	904	413	401				

[0090] NiF8に存在する連鎖群のなかで、黒穂病抵抗性が低下した後代系統ではこれら10種類のマーカーのシグナル値が非常に高いことが示された。これらの結果からも、第40連鎖群に存在するN816552からN821999に含まれる10種類のマーカーは、サトウキビ黒穂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。

[0091] 同様に、NiF8及びNi9、並びに後代系統における、Ni9に存在する第1連鎖群に存在するマーカーN915070からN920207に含まれる19種類のマーカーのシグナル値を表12に示し、なかでもN916081については当該シグナル値を図16に示した。

[表12]

連鎖群	マカ一名	NIF8	NIF9	F1															
	N915070	424	1,195	418	1,393	1,122	1,717	480	1,356	1,359	1,707	370	424	424	403				
	N915209	560	1,796	435	2,840	1,776	3,016	601	2,378	2,361	3,451	446	541	462	484				
	N916186	496	2,002	403	2,447	1,808	1,571	415	2,608	1,723	2,687	406	671	466	432				
	N902342	372	1,245	349	1,049	1,003	1,045	420	1,062	1,346	2,206	333	352	401	398				
	N919949	625	1,459	406	2,169	1,942	2,723	738	1,679	2,360	3,490	650	680	444	572				
	N920597	450	4,702	399	5,028	3,819	5,583	348	6,733	4,669	7,196	436	431	393	537				
	N916081	516	13,678	954	16,011	14,893	10,082	634	10,528	10,441	11,232	504	785	435	604				
	N902047	955	5,233	658	4,400	3,853	4,711	825	3,378	5,336	6,194	581	992	555	854				
	N916874	491	3,320	486	2,511	2,869	3,276	708	2,304	3,046	4,073	416	791	409	430				
N19_1	N918161	438	2,109	411	1,989	1,892	2,109	397	1,690	2,193	2,643	406	610	398	335				
	N918536	372	1,059	508	1,229	1,293	1,368	487	1,253	1,704	1,967	511	423	395	381				
	N901676	648	1,534	702	2,407	1,395	1,389	705	1,590	1,820	1,918	521	577	483	582				
	N919743	635	2,361	437	1,703	1,731	1,990	471	2,385	2,076	3,665	568	417	399	398				
	N901176	697	5,017	408	3,009	5,027	5,059	820	5,316	3,362	3,347	764	454	715	420				
	N916035	757	4,444	684	3,088	3,803	3,576	580	4,310	4,270	4,272	448	585	485	581				
	N921010	521	5,630	448	6,214	5,012	7,792	909	5,074	4,902	5,904	557	658	559	611				
	N915635	424	7,875	538	12,542	10,900	15,388	568	9,698	10,501	14,732	391	505	400	469				
	N901348	493	3,188	558	6,692	7,451	6,466	605	3,553	7,406	2,655	659	584	638	438				
	N920207	421	5,291	349	4,550	4,857	6,695	385	1,962	3,567	11,697	449	478	416	450				

[0092] Ni9に存在する連鎖群のなかで、黒穂病抵抗性に優れる後代系統ではこれら19種類のマーカーのシグナル値が非常に高いことが示された。これらの結果からも、第1連鎖群に存在するN915070からN920207に含まれる19種類のマーカーは、サトウキビ黒穂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。

[0093] 同様に、NiF8及びNi9、並びに後代系統における、Ni9に存在する第13連鎖群に存在するマーカーN914284からN916129に含まれる11種類のマーカーのシグナル値を表13に示し、なかでもN919839については当該シグナル値を図17に示した。

[表13]

連鎖群	マーカー名	F1															
		NIF8	Ni9														
Ni9_13	N914284	439	1,102	380	551	1,358	562	1,234	1,463	1,247	877	1,235	492	467	1,342		
	N901453	788	1,511	661	638	1,120	580	1,380	2,056	2,671	807	1,415	512	533	1,821		
	N900044	688	1,693	646	652	1,600	554	1,632	2,841	2,410	618	1,619	603	577	1,639		
	N919839	389	4,719	364	329	4,261	332	4,331	6,387	5,540	360	4,307	352	334	7,400		
	N901567	426	2,890	374	399	3,213	526	3,981	5,253	5,212	434	3,364	449	383	4,346		
	N911103	500	902	388	424	1,069	414	1,246	2,352	1,465	408	1,036	417	630	1,500		
	N918508	686	5,836	513	667	4,963	778	4,317	7,106	5,911	599	4,037	587	547	7,786		
	N918344	385	1,970	352	578	1,765	470	2,000	3,298	2,428	409	2,079	426	483	2,488		
	N919696	497	2,686	496	427	2,327	685	1,928	2,433	2,370	414	2,043	680	657	2,763		
	N916172	471	1,980	448	378	3,025	445	2,990	4,282	3,314	433	2,866	403	445	3,518		
Ni9_13	N916129	526	5,026	641	506	3,393	858	3,465	5,094	5,261	478	4,030	383	558	6,621		

[0094] Ni9に存在する連鎖群のなかで、黒穂病抵抗性が低下した後代系統ではこれら 11 種類のマーカーのシグナル値が非常に高いことが示された。これらの結果からも、第13連鎖群に存在するN914284からN916129に含まれる 11 種類のマーカーは、サトウキビ黒穂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。

[0095] 同様に、NiF8及びNi9、並びに後代系統における、Ni9に存在する第14連鎖群に存在するマーカーN901178からN900802に含まれる 10 種類のマーカーのシグナル値を表 14 に示し、なかでもN918761については当該シグナル値を図 18 に示した。

[表14]

連鎖群	マーカー名	NiF8	Ni9	F1											
	N901178	617	1,779	1,250	508	414	1,929	1,698	1,986	470	584	1,104	498	1,454	539
	N918761	607	5,766	6,048	453	631	5,410	4,505	6,440	519	484	2,747	453	4,233	473
	N913735	850	2,996	2,251	557	519	2,576	2,759	3,188	496	555	1,903	461	2,490	651
	N900663	686	3,173	2,014	412	466	2,351	3,156	4,168	475	423	1,810	559	2,534	662
	N918363	477	1,964	1,961	573	481	1,895	2,092	2,809	516	486	2,012	496	2,223	583
Ni9 14_1	N918213	760	2,319	3,224	882	798	3,485	3,433	4,402	579	507	3,767	678	2,874	509
	N900568	1,040	3,437	3,017	581	368	2,479	3,246	3,387	571	476	2,098	525	1,821	833
	N912523	626	6,398	6,371	476	565	4,799	5,756	7,064	526	813	4,739	424	4,431	541
	N900344	692	5,788	6,366	838	759	3,590	5,674	6,474	588	729	6,622	640	5,622	542
	N900802	717	6,090	6,668	453	537	4,639	6,414	8,043	618	905	5,322	430	6,032	619

[0096] Ni9に存在する連鎖群のなかで、黒穂病抵抗性が低下した後代系統ではこれ

ら 10 種類のマーカーのシグナル値が非常に高いことが示された。これらの結果からも、第14連鎖群に存在するN901178からN900802に含まれる 10 種類のマーカーは、サトウキビ黒穂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。

[0097] 同様に、NiF8及びNi9、並びに後代系統における、Ni9に存在する第14連鎖群に存在するマーカーN901524からN918080に含まれる 13 種類のマーカーのシグナル値を表 15 に示し、なかでもN901160については当該シグナル値を図 19 に示した。

[表15]

連鎖群	マ-カ-名	NIF8	Ni9	F1											
	N901524	428	2,677	2,763	425	457	343	2,534	1,954	617	445	3,083	1,291	2,532	674
	N901163	379	3,462	2,099	909	861	632	3,268	3,426	600	380	3,196	3,202	3,260	392
	N911063	575	4,326	5,570	385	466	384	2,738	7,453	398	409	7,625	8,794	2,220	381
	N914692	625	3,592	4,016	811	577	419	3,574	3,955	742	959	3,573	4,756	4,094	714
	N911405	386	1,893	1,692	470	404	411	1,715	2,402	411	437	1,762	2,052	1,660	396
	N913383	580	2,923	2,202	710	421	596	2,256	2,986	821	798	2,768	3,336	2,062	708
N19_14.2	N914112	564	3,387	3,390	825	417	730	1,913	3,528	1,000	987	2,934	3,753	2,600	966
	N915180	537	2,482	2,950	566	485	396	2,590	2,968	438	497	2,242	3,021	3,110	729
	N901160	452	4,333	6,165	375	394	333	4,340	6,432	424	417	7,227	8,545	4,069	359
	N916293	560	2,069	1,908	725	868	520	1,420	3,179	463	517	1,720	2,129	1,681	464
	N916263	414	2,358	1,775	379	348	359	2,136	2,174	522	404	2,041	1,850	2,502	491
	N917579	485	2,335	1,873	501	459	395	2,209	3,210	440	390	2,959	1,816	3,724	378
	N918080	469	1,238	1,171	432	532	361	1,621	1,567	380	402	1,269	1,015	1,940	442

- [0098] Ni9に存在する連鎖群のなかで、黒穂病抵抗性に優れる後代系統ではこれら 13種類のマーカーのシグナル値が非常に高いことが示された。これらの結果からも、第14連鎖群に存在するN901524からN918080に含まれる 13種類のマーカーは、サトウキビ黒穂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。
- [0099] 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

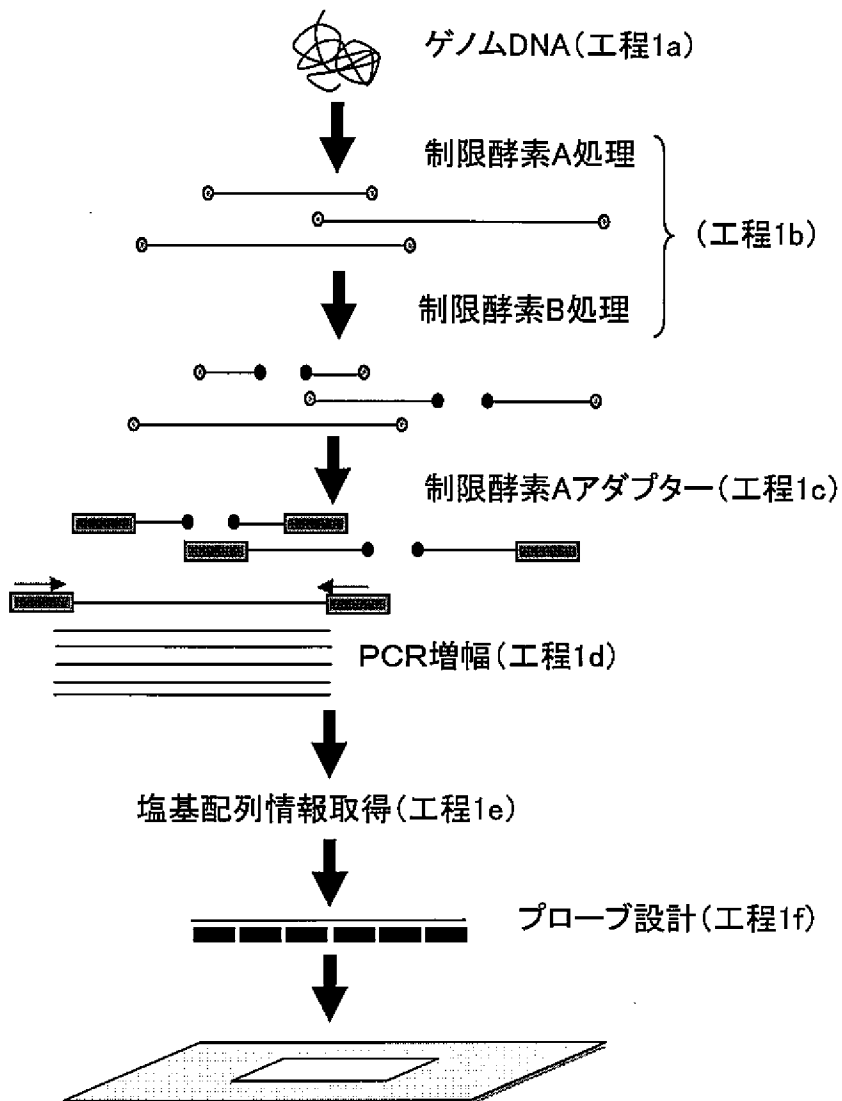
- [請求項1] サトウキビの染色体における配列番号 1 に示す塩基配列及び配列番号 1 4 に示す塩基配列により挟まれる領域、配列番号 1 5 に示す塩基配列及び配列番号 2 2 に示す塩基配列により挟まれる領域、配列番号 2 3 に示す塩基配列及び配列番号 3 2 に示す塩基配列により挟まれる領域、配列番号 3 3 に示す塩基配列及び配列番号 5 1 に示す塩基配列により挟まれる領域、配列番号 5 2 に示す塩基配列及び配列番号 6 2 に示す塩基配列により挟まれる領域、配列番号 6 3 に示す塩基配列及び配列番号 7 2 に示す塩基配列により挟まれる領域、又は配列番号 7 3 に示す塩基配列及び配列番号 8 5 に示す塩基配列により挟まれる領域から選ばれる連続する核酸領域からなる、サトウキビ黒穂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 ～ 8 5 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 記載のサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカー。
- [請求項3] 上記核酸領域は、サトウキビの染色体における配列番号 5 に示す塩基配列と配列番号 9 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、配列番号 1 8 に示す塩基配列と配列番号 2 2 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、配列番号 2 5 に示す塩基配列と配列番号 3 2 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、配列番号 3 3 に示す塩基配列と配列番号 4 2 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、配列番号 5 7 に示す塩基配列と配列番号 5 9 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、配列番号 6 4 に示す塩基配列と配列番号 6 6 に示す塩基配列とにより挟み込まれる領域、又は配列番号 7 2 に示す塩基配列と配列番号 8 0 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 記載のサトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカー。
- [請求項4] 少なくとも一方の親がサトウキビ植物である後代植物の染色体及び/又は当該親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請求項 1 乃至 3 いずれか一項に記載のサトウキビ黒穂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、黒穂病抵抗性が向上したサトウキビ系統の製造方法。

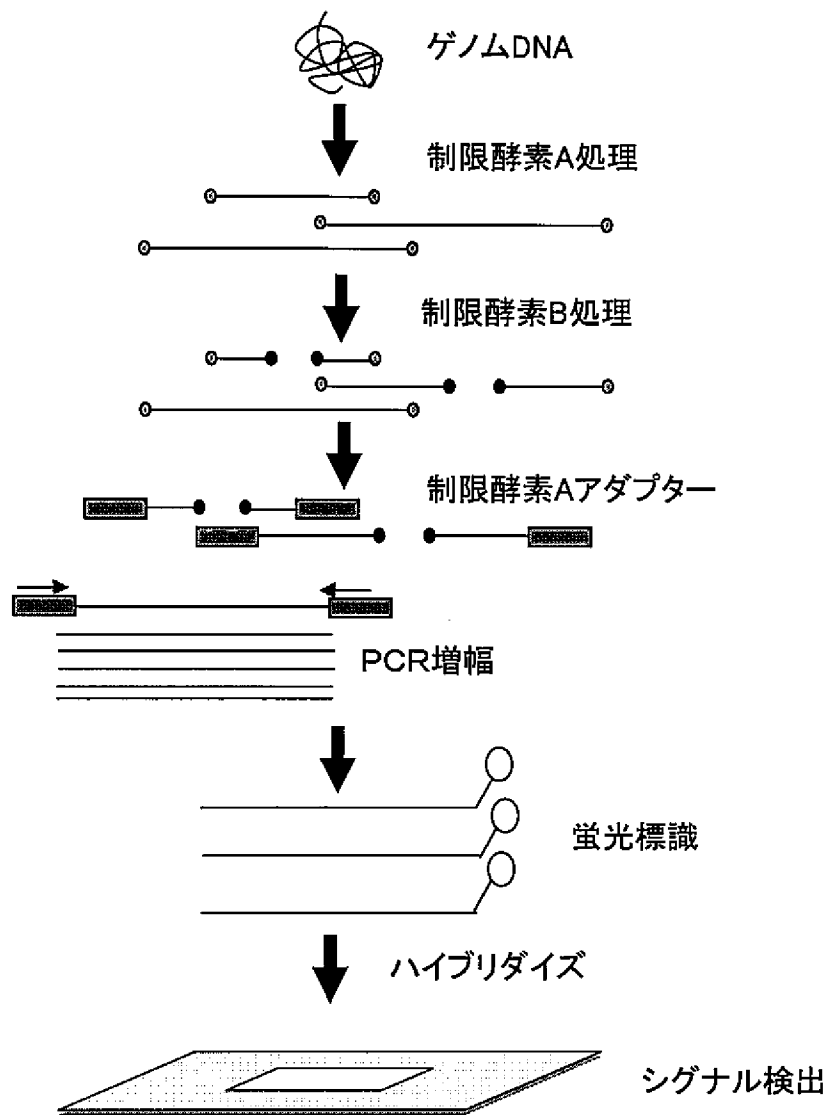
[請求項5] 上記測定する工程では、上記サトウキビ黒穂病抵抗性関連マーカーに対応するプローブを備えるDNAチップを使用することを特徴とする請求項 4 記載のサトウキビ系統の製造方法。

[請求項6] 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 記載のサトウキビ系統の製造方法。

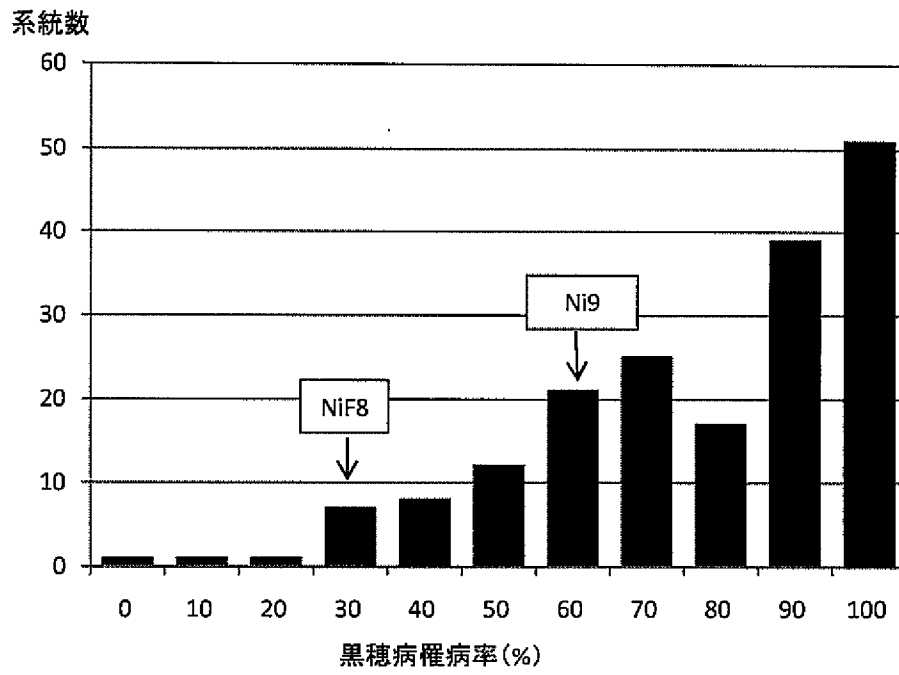
[図1]



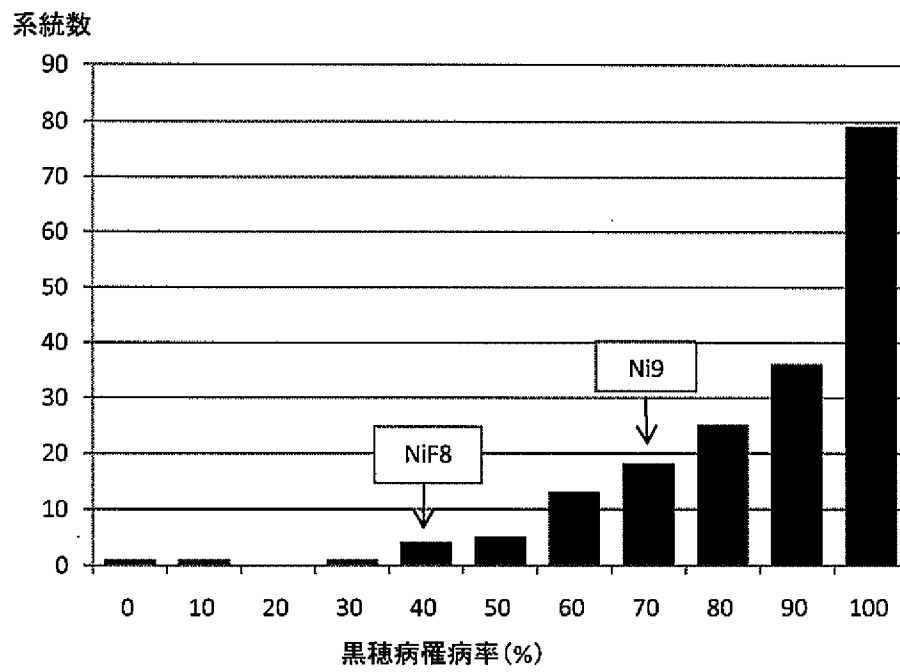
[図2]



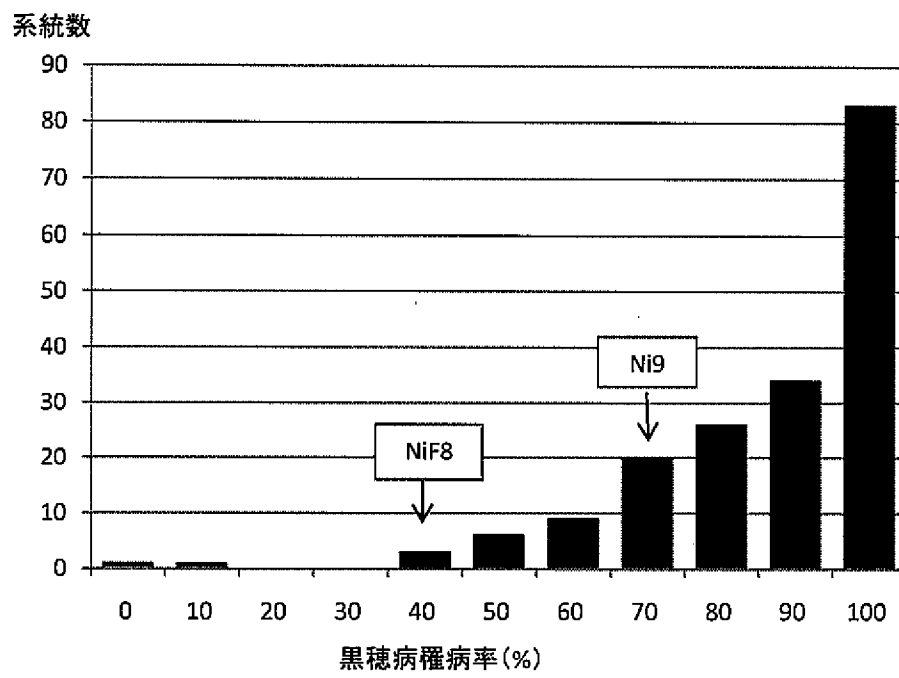
[図3]



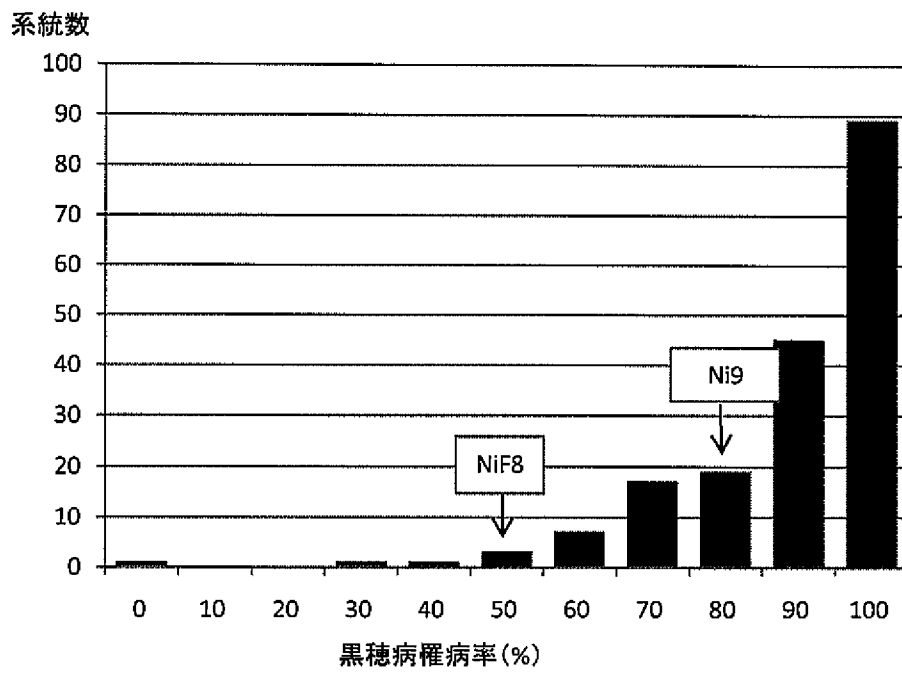
[図4]



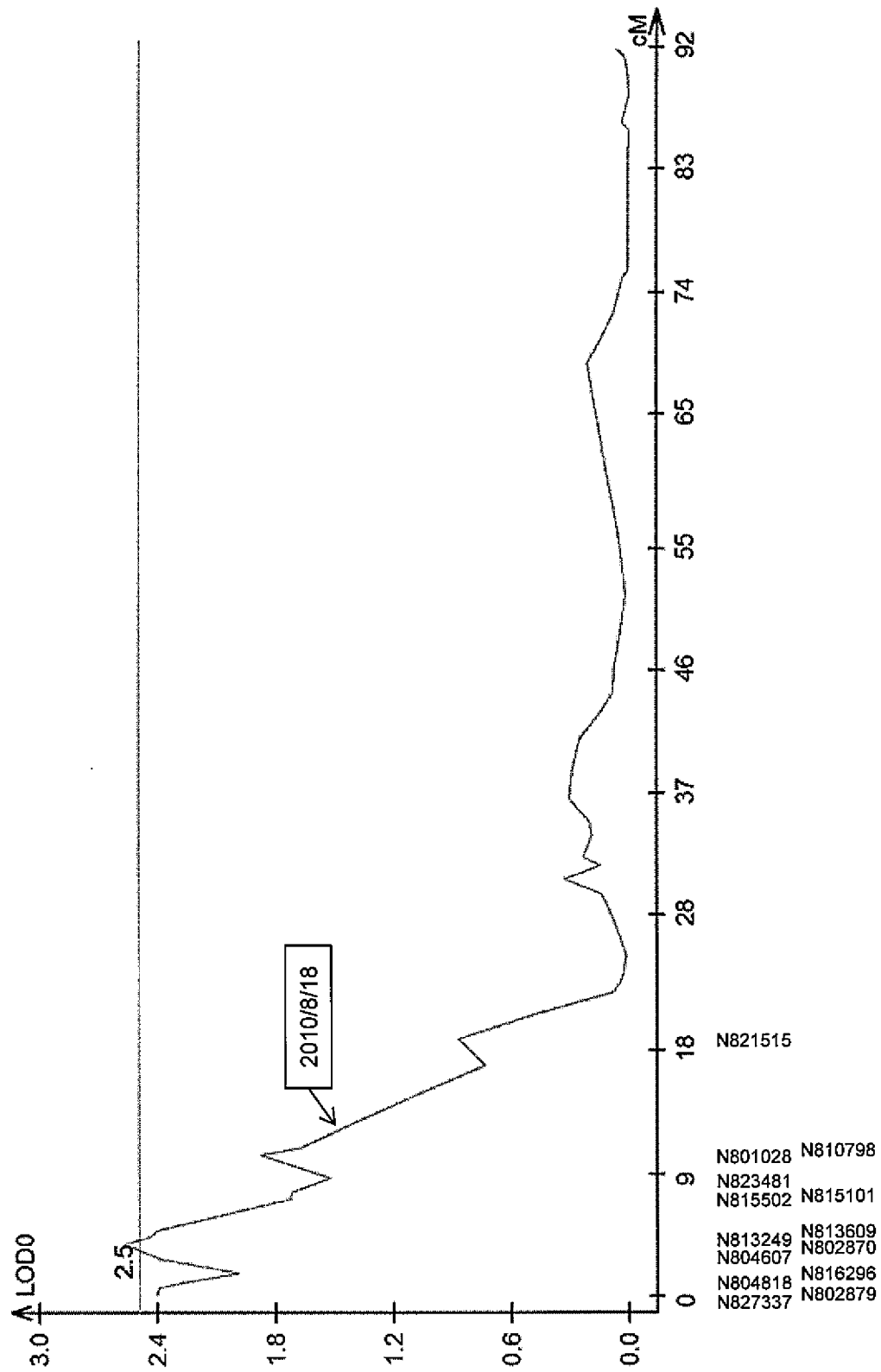
[図5]



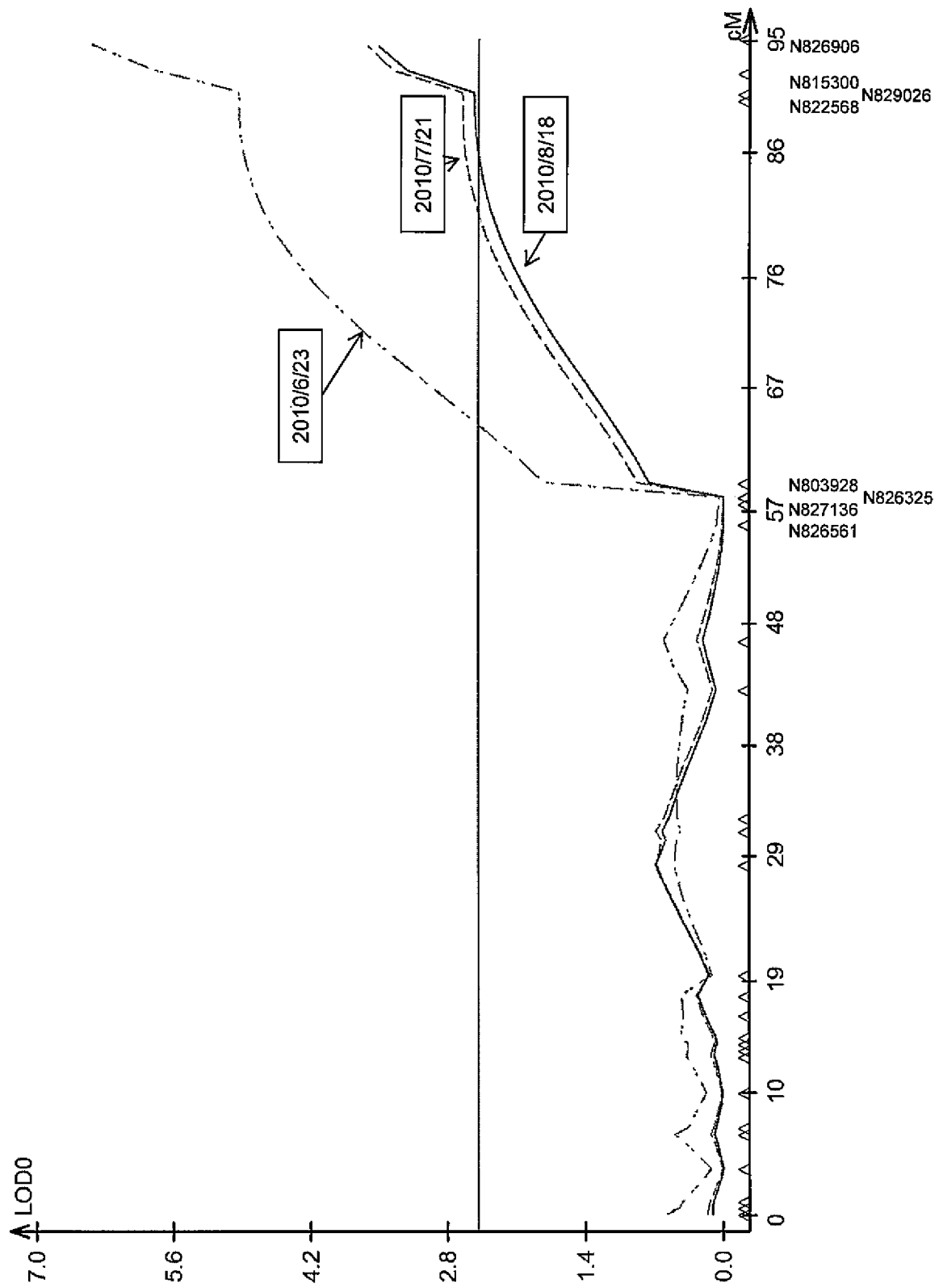
[図6]



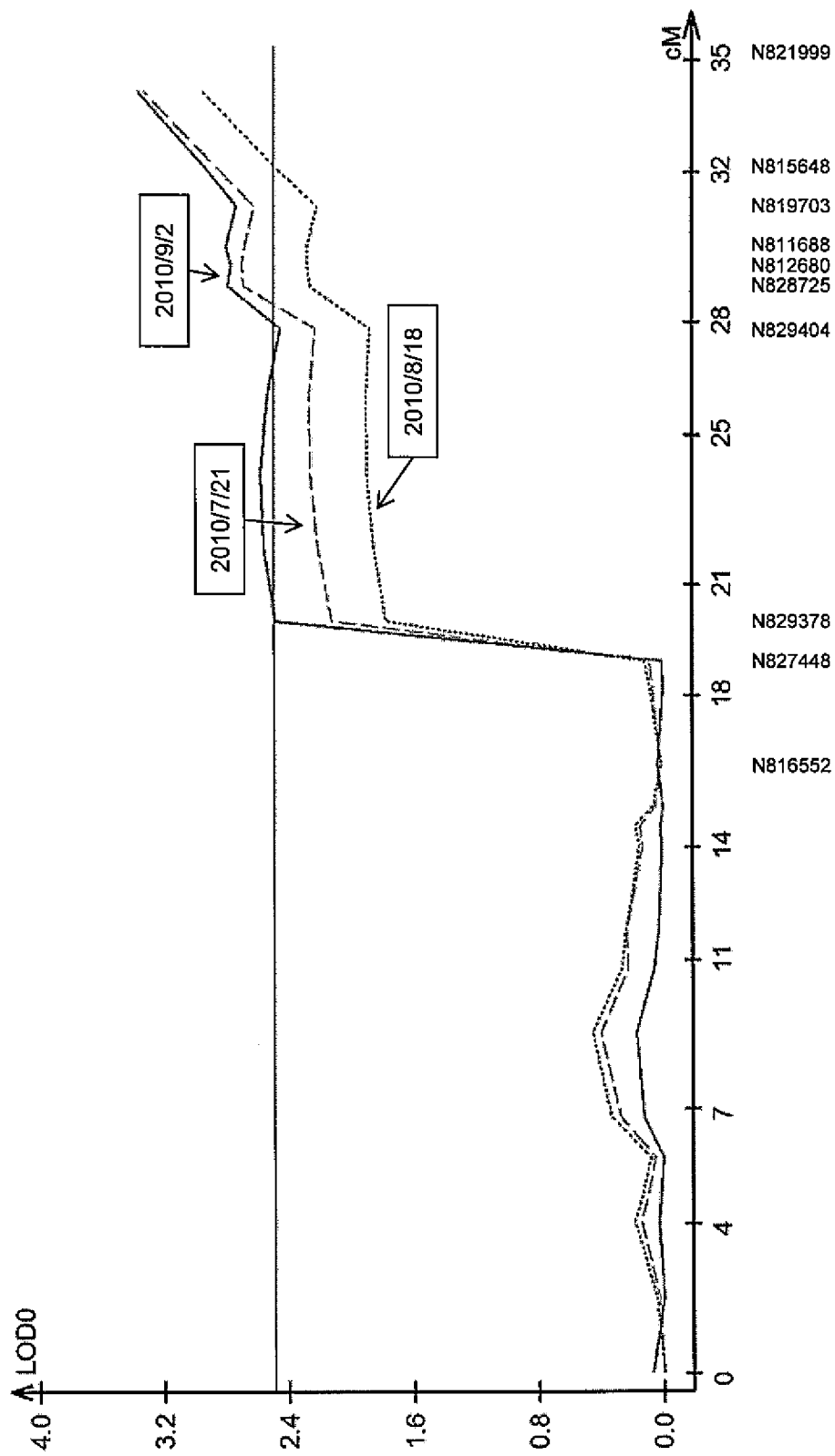
[図7]



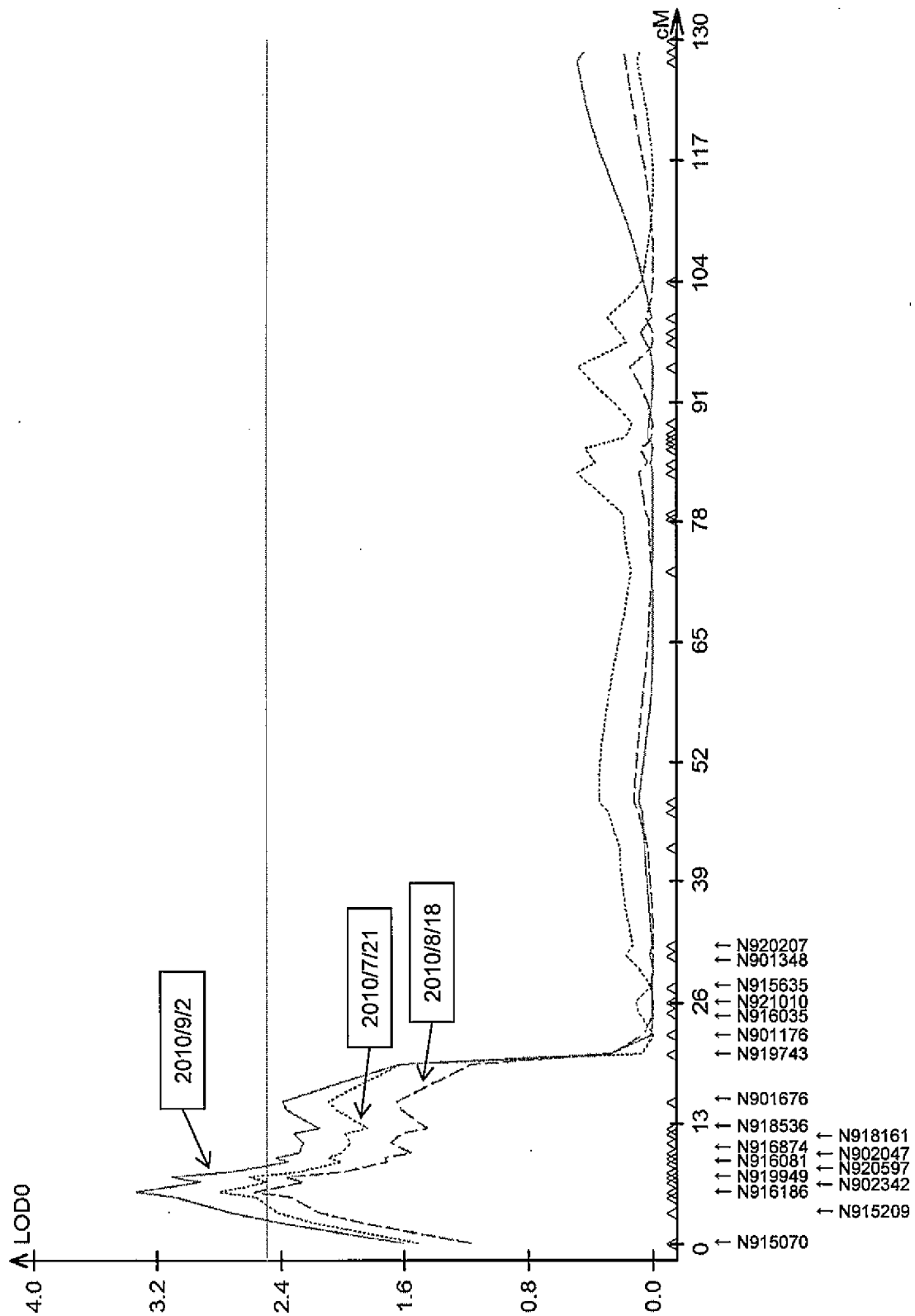
[図8]



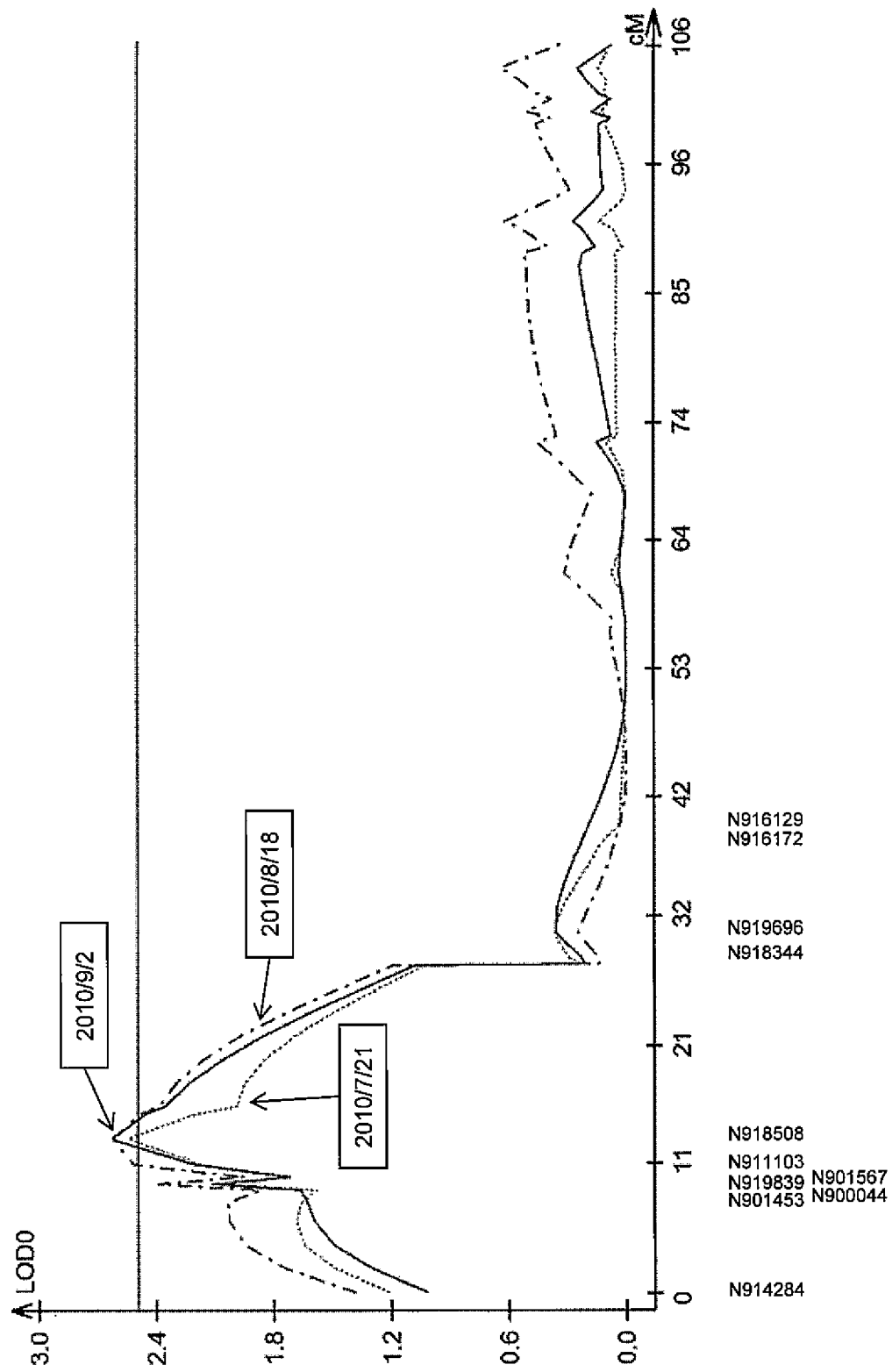
[図9]



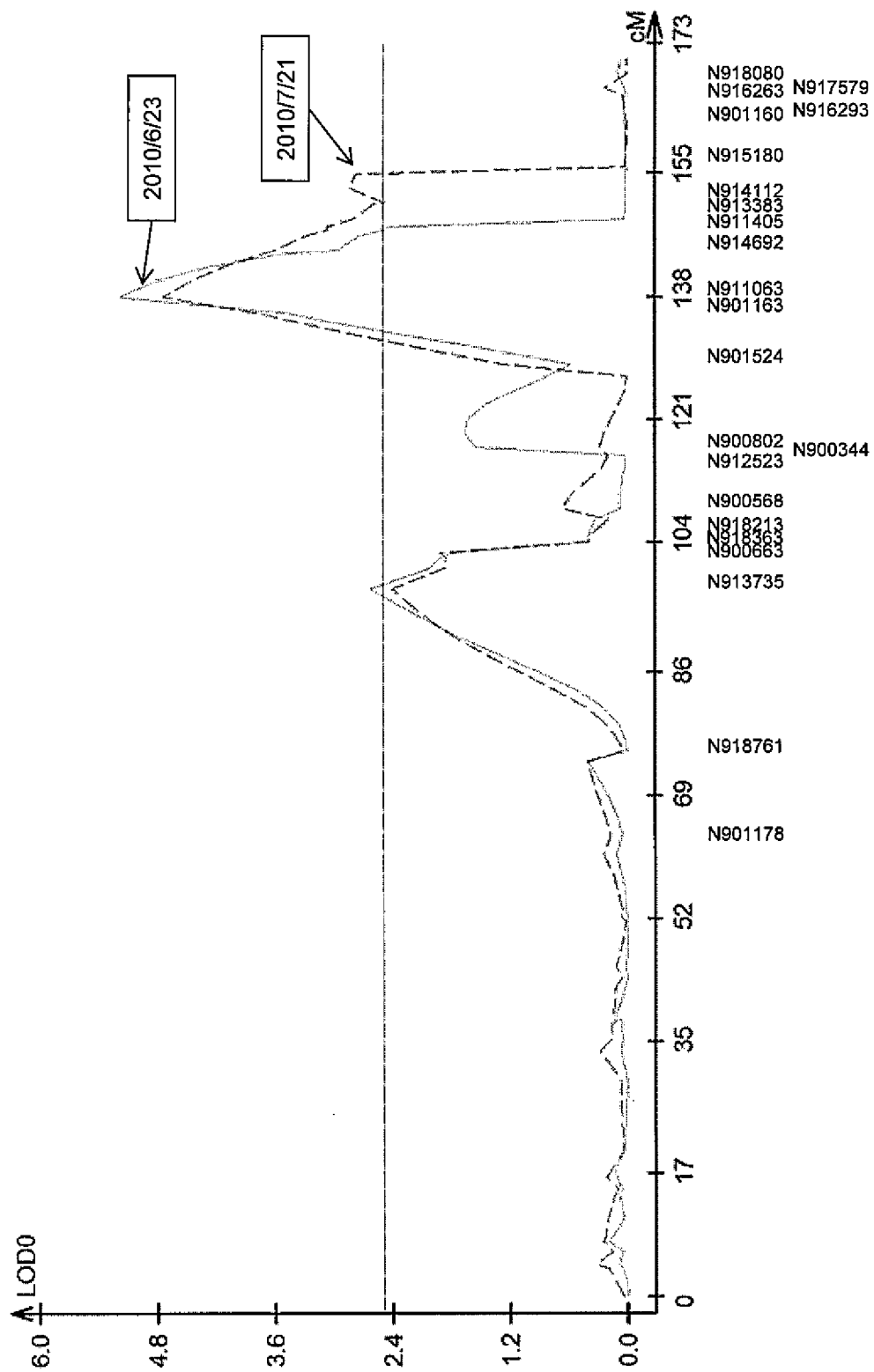
[図10]



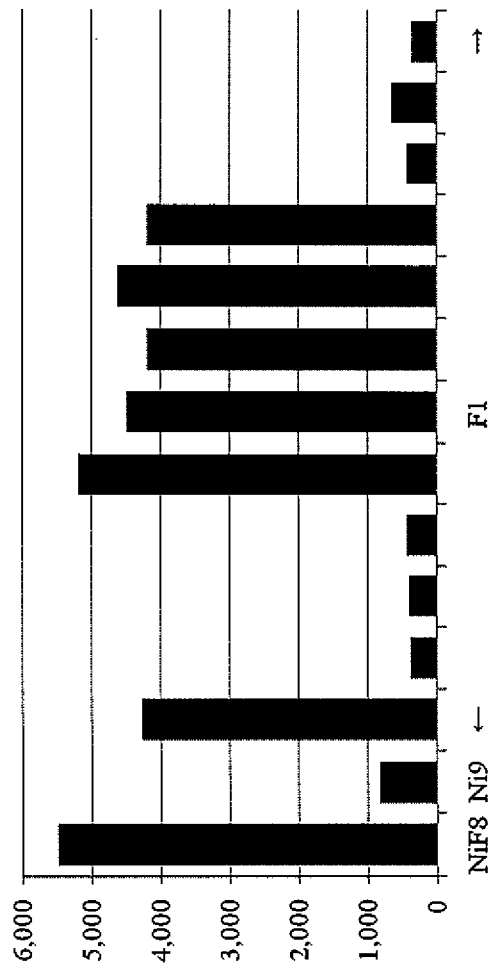
[図11]



[図12]



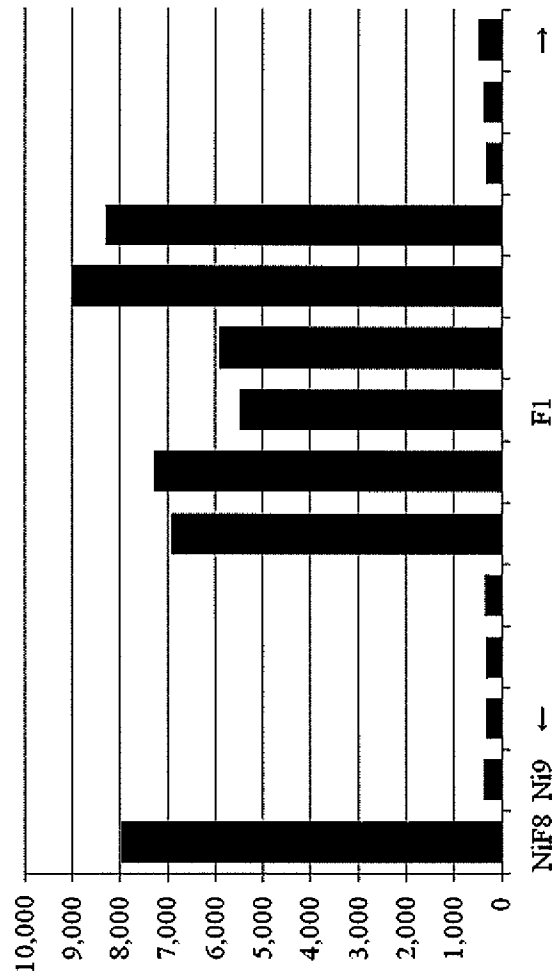
[図13]



[図14]



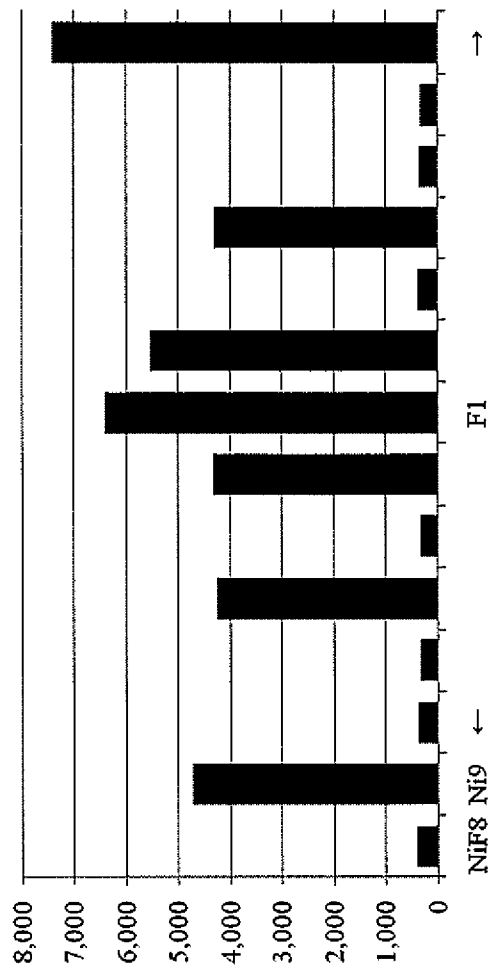
[図15]



[図16]



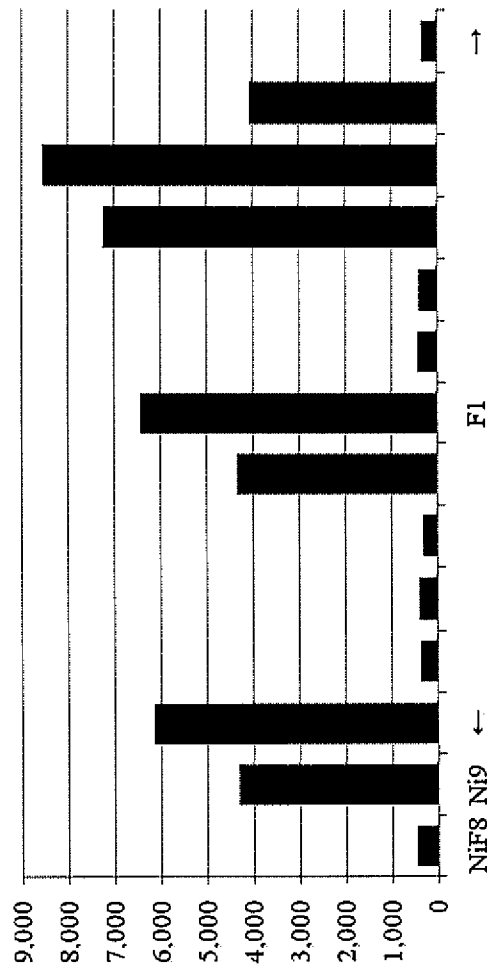
[図17]



[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060671

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 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Hiromasa ENOKI et al., "Micro Array Gijutsu o Mochiita Satokibito Seisansei Kanren Keishitsu no QTL Kaiseki", Breeding research, 29 March 2011 (29.03.2011), vol.13, separate volume no.1, page 54	1-6
A	L. N. Thokoane and R. S. Rutherford, cDNA-AFLP differential display of sugarcane (Saccharum spp, hybrids) genes induced by challenge with the fungal pathogen Ustilago scitaminea (sugarcane smut), Proceedings of the South African Sugar Technologists Association, 2001, 75th, p. 104-107	1-6



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

17 July, 2012 (17.07.12)

Date of mailing of the international search report

24 July, 2012 (24.07.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060671

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	M. K. Butterfield, et al., Application of gene discovery to varietal improvement in sugarcane, South African Journal of Botany, 2004, Vol. 70, No. 1, p. 167-172	1-6
A	Xianming Wei, et al., Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure, Thoretical and Applied Genetics, 2006, Vol. 114, p. 155-164	1-6
A	Meredith D. McNeil, et al, Conversion of AFLP markers to high-throughput markers in a complex polyploid, sugarcane, Molecular Breeding, 2011. 03, Vol. 27, p. 395-407	1-6
A	XU Liping and Chen Rukai, Identification of RAPD marker linked to smut resistance gene in sugarcane, Chin. J. Appl. Environ. Biol., 2004, Vol. 10, No. 3, p. 263-267	1-6
A	N. Singh, et al., Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars, Plant Science, 2004, Vol. 167, No. 5, p. 987-994	1-6
A	WO 2007/125958 A1 (National Agriculture and Food Research Organization), 08 November 2007 (08.11.2007), & US 2009/0222941 A1 & EP 2017336 A1	1-6
A	JP 2010-516236 A (Syngenta Participations AG.), 20 May 2010 (20.05.2010), & JP 2011-509663 A & US 2010/0138950 A1 & US 2011/0154528 A1 & EP 1947198 A1 & EP 2121982 A & EP 2242850 A & WO 2008/087208 A2 & WO 2009/089928 A1	1-6
P.A	JP 2011-120558 A (Toyota Motor Corp.), 23 June 2011 (23.06.2011), & WO 2011/074510 A	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

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 (I P C))

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	榎宏征 他, マイクロアレイ技術を用いたサトウキビ糖生産性関連形質のQTL解析, 育種学研究, 2011.03.29, 第13巻 別冊1号, p. 54	1-6
A	L. N. Thokoane and R. S. Rutherford, cDNA-AFLP differential display of sugarcane (Saccharum spp, hybrids) genes induced by challenge with the fungal pathogen Ustilago scitaminea (sugarcane smut), Proceedings of the South African Sugar Technologists Association, 2001, 75th, p. 104-107	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の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

1 7 . 0 7 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 4 . 0 7 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

濱田 光浩

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

3 7 6 3

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	M. K. Butterfield, et al., Application of gene discovery to varietal improvement in sugarcane, South African Journal of Botany, 2004, Vol. 70, No. 1, p. 167-172	1-6
A	Xianming Wei, et al., Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure, Theoretical and Applied Genetics, 2006, Vol. 114, p. 155-164	1-6
A	Meredith D. McNeil, et al, Conversion of AFLP markers to high-throughput markers in a complex polyploid, sugarcane, Molecular Breeding, 2011.03, Vol. 27, p. 395-407	1-6
A	XU Liping and Chen Rukai, Identification of RAPD marker linked to smut resistance gene in sugarcane, Chin. J. Appl. Environ. Biol., 2004, Vol. 10, No. 3, p. 263-267	1-6
A	N. Singh, et al., Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars, Plant Science, 2004, Vol. 167, No. 5, p. 987-994	1-6
A	WO 2007/125958 A1 (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構) 2007.11.08, & US 2009/0222941 A1 & EP 2017336 A1	1-6
A	JP 2010-516236 A (Syngenta Participations AG) 2010.05.20, & JP 2011-509663 A & US 2010/0138950 A1 & US 2011/0154528 A1 & EP 1947198 A1 & EP 2121982 A & EP 2242850 A & WO 2008/087208 A2 & WO 2009/089928 A1	1-6
P. A	JP 2011-120558 A (トヨタ自動車株式会社) 2011.06.23, & WO 2011/074510 A	1-6