

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6168993号
(P6168993)

(45) 発行日 平成29年7月26日(2017.7.26)

(24) 登録日 平成29年7月7日(2017.7.7)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 Z N A A

A O 1 H 1/00 (2006.01)

A O 1 H 1/00 Z

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 18 (全 35 頁)

(21) 出願番号	特願2013-537791 (P2013-537791)	(73) 特許権者	597089200
(86) (22) 出願日	平成23年11月2日(2011.11.2)		アグリジェネティクス、インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2014-500010 (P2014-500010A)		アメリカ合衆国 インディアナ、インディアナポリス、ザイオンズビル ロード 9330
(43) 公表日	平成26年1月9日(2014.1.9)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/058986	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開番号	W02012/061513		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開日	平成24年5月10日(2012.5.10)	(74) 代理人	100120134
審査請求日	平成26年10月28日(2014.10.28)		弁理士 大森 規雄
(31) 優先権主張番号	61/410,783	(74) 代理人	100126354
(32) 優先日	平成22年11月5日(2010.11.5)		弁理士 藤田 尚
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100104282
前置審査			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 SCN耐性に連鎖したダイズマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ダイズ品種におけるSCN耐性の少なくとも1つの決定因子を含む植物を同定するための方法であって、

植物から核酸分子を単離するステップと、

ダイズ品種におけるSCN耐性表現型と連鎖したマーカーに関して単離核酸分子をスクリーニングするステップとを含み、マーカーが配列番号10のマーカーと遺伝的に連鎖しており、前記マーカーの61位のアデニンヌクレオチドで定義される一塩基多型(SNP)の存在がダイズ品種におけるSCN耐性の少なくとも1つの決定因子を示す方法。

【請求項2】

単離核酸分子がゲノムDNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

SCN耐性表現型がSCNレース3に対するSCN耐性である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

ダイズ品種がダイズ品種98860-71である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

ダイズ品種におけるSCN耐性表現型と連鎖したマーカーに関して単離核酸分子をスクリーニングするステップを、競合的対立遺伝子特異的ポリメラーゼ連鎖反応を使用して実施する、請求項1に記載の方法。

10

20

【請求項 6】

S C N 耐性ダイズ植物を生産するための方法であって、

S C N 耐性の形質を有するダイズ植物を対象のダイズ品種由来のダイズ植物と交配させるステップと、

マーカー支援型選択を使用して、S C N 耐性の形質を有するダイズ植物における S C N 耐性表現型と連鎖したマーカーを含む F₁ ダイズ植物を同定するステップであって、マーカーが配列番号 10 のマーカーと遺伝的に連鎖しており、F₁ ダイズ植物が対象のダイズ品種の任意の望ましい形質を有するステップと、

同定した F₁ ダイズ植物を繁殖させ、それによって S C N 耐性ダイズ植物を生産するステップとを含む方法。

10

【請求項 7】

対象のダイズ品種が S C N 感受性ダイズ品種である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

S C N 耐性が S C N レース 3 に対する耐性である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

S C N 耐性の形質を有するダイズ植物が品種 9 8 8 6 0 - 7 1 のダイズ植物である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

S C N 耐性の形質を有するダイズ植物における S C N 耐性表現型と連鎖したマーカーが配列番号 10 である、請求項 9 に記載の方法。

20

【請求項 11】

マーカー支援型選択を、競合的対立遺伝子特異的ポリメラーゼ連鎖反応を使用して実施する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

ダイズ品種における S C N 耐性の少なくとも 1 つの決定因子を移動させるための方法であって、

(a) ダイズ品種における配列番号 10 のマーカーと連鎖した少なくとも 1 つのマーカーと特異的にハイブリダイズ可能であるプローブで、第 1 の植物のゲノム D N A をドナーの遺伝子型により分析し、そして、第 2 の植物の D N A をレシピエントの遺伝子型により分析するステップと、

30

(b) 2 つの親植物遺伝子型を有性交配して子孫集団を得るステップと、

(c) 少なくとも 1 つのマーカーの存在に関して子孫集団を分析するステップと、

(d) 少なくとも 1 つのマーカーを含む子孫集団由来の個体をレシピエントの遺伝子型と戻し交配させて、次世代集団を生成するステップと、

(e) 次世代集団のメンバーが、レシピエントの遺伝子型由来の望ましい形質および少なくとも 1 つのマーカーを含むかどうか決定するステップと、

(f) 次世代集団のメンバーが、レシピエントの遺伝子型由来の望ましい形質および少なくとも 1 つのマーカーを含まない場合、レシピエントの遺伝子型由来の望ましい形質および少なくとも 1 つのマーカーを含む個体が同定されるまでステップ (d) および (e) を繰り返すステップとを含む方法。

40

【請求項 13】

各交配および戻し交配ステップにおいて得られる個々の子孫を各世代での S C N マーカー分析によって選択する、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

ダイズ品種がダイズ品種 9 8 8 6 0 - 7 1 である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 15】

遺伝子形質転換により宿主生物中にダイズ品種における S C N 耐性の少なくとも 1 つの決定因子を導入するための方法であって、

ダイズ品種における配列番号 10 のマーカーと連鎖したマーカーと特異的にハイブリダイズ可能であるプローブで植物のゲノム D N A を分析して、植物中のダイズ品種における

50

S C N 耐性の少なくとも 1 つの決定因子を同定するステップと、

前記マーカーと特異的にハイブリダイズ可能であるプローブと特異的にハイブリダイズする植物のゲノム DNA のセグメントを単離するステップと、

宿主生物中にゲノム DNA の単離セグメントを導入するステップと、

前記マーカーと特異的にハイブリダイズ可能であるプローブで宿主生物の DNA を分析して、宿主生物中のダイズ品種における S C N 耐性の少なくとも 1 つの決定因子を同定するステップとを含む方法。

【請求項 16】

DNA の単離セグメントを宿主生物のゲノムに安定的に組み込む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

宿主生物がマメ科植物である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

宿主生物がダイズ、緑英インゲン、サヤインゲン、ドライビーンズ、赤インゲン豆、ライマメ、リョクトウ、ツルナシインゲンマメ、アズキマメ、サヤエンドウ、およびササゲからなる群から選択される、請求項 17 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

本出願は、2010 年 11 月 5 日に提出された米国仮特許出願第 61/410,783 号の利益を主張するものである。

【0002】

本開示は、植物の疾患耐性に関する。いくつかの実施形態では、本開示は、ダイズにおけるダイズシストセンチュウ (S C N) 耐性に関する。特定の実施形態では、本開示は、生物における S C N 耐性形質を同定するための組成物および方法、例えば S C N 耐性と密接に連鎖した分子マーカーに関する。さらなる実施形態は、例えば、S C N 耐性と密接に連鎖した分子マーカーを使用することによって、S C N 耐性形質を宿主生物に導入するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

ダイズ、グリシンマックス (Glycine max) は、植物油およびタンパク質の主な供給源として、世界中で栽培される主な実用作物の 1 つである。低コレステロールおよび高繊維食に関する需要の増大により、食品としてのダイズの重要性が増している。10,000 を超えるダイズ品種が現在米国に導入されており、その中で限られた数のダイズ品種が、ハイブリダイゼーションおよび選択プログラムから開発される栽培種の遺伝的基盤となる。Johnson and Bernard, The Soybean, Norman Ed., Academic Press, N.Y., pp.1-73, 1963。

【0004】

ダイズシストセンチュウ、(S C N、ヘテロデラグリシネス (Heterodera glycines) (HG) イチノヘ (Ichinohe)) は、米國中、および世界の大部分の他のダイズ生産上位國中で、ダイズに影響を及ぼす 1 つの最も有害な害虫である。2003 年と 2004 年の米国内の推定収穫高減は約 290 万トン ~ 340 万トンであり、これは約 15 億ドルの推定年間損失をもたらした。Wrather et al. (2001); Wrather and Koenning (2006)。S C N 表現型は、劣性と優勢の両方で多数の遺伝子によって制御される、非常に複雑な形質である。Concibido et al. (2004)。S C N 表現型決定は時間がかかり、コストおよび労働集約的である。

【0005】

S C N 感染は様々な症状を引き起こし、それらは葉および茎のクロロシス、根の壊死、種子収率の低下、ならびに根および苗条生長の抑制を含み得る。S C N 感染の地上の症状

10

20

30

40

50

はSCN感染に特有なわけではなく、栄養素欠乏、特に鉄欠乏、干ばつが原因のストレス、除草剤による障害または別の疾患と混同する可能性がある。感染の最初の兆候は、発育を阻害された黄色い葉を有する植物群である。さらに根における病原体を検出するのは困難である可能性がある。発育を阻害された根も、ストレスまたは植物疾患の一般的な症状であるからである。SCN of 成体メスおよび嚢子は約1/32インチ長であり、したがって拡大せずに目で見ることができる。根におけるSCN of 成体メスおよび嚢子の観察は、野外でSCN感染を検出し診断するための唯一の正確な方法である。

【0006】

SCN of 存在は、最初の土壌侵入時に通常明らかではない。SCN of 集団の密度は、それが植物の地上症状または収率の低下を引き起こすのに十分となるまで、土壌中で増大するはずである。集団の密度は、有意な数値に達するまで数年を要する可能性がある。したがって、現在のSCNによる損傷は、数年間で増大している侵入の結果である。ダイズはSCN of 主な宿主であるが、他のマメ科植物、例えば、緑英インゲン、サヤインゲン、ドライピーズ、赤インゲン豆、ライマメ、リョクトウ、ツルナシインゲンマメ、アズキマメ、サヤエンドウ、およびササゲは宿主として働くことができる。SCN of ライフサイクルは30日である。したがって、1つの増殖期は多世代の寄生虫を包含する。さらにSCN of 卵は、孵化前の数年間、土壌中で完全な状態であり得る。

【0007】

過去において、一組の4つのダイズ生殖質系統におけるその繁殖と標準SCN of 感受性ダイズ栽培種におけるその繁殖を比較することにより、SCN of 集団に「レース」の名称が与えられた。最も一般的に使用されるレーススキームはSCN of の16のレースを同定した。レースの名称は、線虫学者とダイズ生産者が特定SCN of 集団の能力に関する情報を共有して、SCN of に対する耐性用の特定遺伝子を含むダイズ品種を繁殖させるのを可能にした。

【0008】

2003年、HG型試験が開発されてこのレース試験を代用した。この新たな試験は7個の耐性源(生殖質系統)を含み、7つの系統各々において土壌サンプルから線虫集団がどのくらいの数が増大したかを示す割合として、それらの結果は示される。この試験は、どの耐性源が試験する個々の領域に適しているか、およびどれが望ましくないかを示す。遺伝的耐性源は市販のダイズ品種において現在限られているので、これらの「耐性源」を循環させて毒性SCN of 集団の構築を遅らせることが重要である。

【0009】

米国内でのSCN of の発見直後、SCN of 耐性源が同定された。Ross and Brim (1957) Plant Dis.Rep.41: 923-4. PekingおよびPI88788などのいくつかの系統が、品種改良プログラムにすぐに組み込まれた。その農業経済学的に望ましくない形質がないため、Pekingは耐性源として広く使用されるようになり、Pickettは最初のSCN of 耐性栽培種として発表された。特定SCN of 耐性集団は耐性栽培種に優り得るという認識が、追加のSCN of 耐性源に関する広範囲のスクリーニングに至った。それはレース4より10%を超える(ただし20%未満の)嚢子の指数を有していたが、PI88788はレース3および4耐性の一般的な供給源として現れ、Pekingおよびその誘導体はレース1および3の一般的な供給源として現れた。PI437654は知られている全レースに対する耐性を有するとして後に同定され、そのSCN of 耐性はForrestに戻し交配された。現在、SCN of 耐性を有することが知られている、130を超えるPIが存在する。PI209332およびPI90763は、他の例示的なSCN of 耐性ダイズ品種改良株である。同じ耐性源を有する全ての品種が比較可能な収率を有するわけではなく、それらはSCN of に対して同様に応答するわけでもない。

【0010】

耐性ダイズ品種は、SCN of の管理に利用可能な最有効ツールである。SCN of 密度は耐性ダイズが成長すると通常低下する。大部分のSCN of 幼若虫は、耐性品種の根では栄養を得て発生することができないからである。しかしながら、任意の自然に侵入可能な領域では

10

20

30

40

50

、いくつかのSCN幼若虫(<1%)は現在入手可能な耐性品種において繁殖することができる。耐性ダイズ品種において繁殖することができるSCN幼若虫の数は、耐性品種が反復的に成長するとき増大する可能性がある。最終的に、SCN耐性ダイズが毎回成長し侵入領域でダイズが生成する場合、SCN集団は感受性品種としての耐性品種においても繁殖することができ得る。幸い、耐性品種において繁殖することができるSCN幼若虫の数は、感受性ダイズ品種が成長すると減少する。これらの線虫は、耐性品種において栄養を得ることができない土壌中の他のSCN幼若虫と食物に関してうまく競合しないからである。

【0011】

SCNレース3は、中西部のダイズ生産州において最も顕著なレースであると考えられる。レース3耐性に関する遺伝学および品種改良に対して相当な努力がなされている。PeekingとPI88788の両方がSCNレース3に対して耐性がある一方で、従来の遺伝学的試験は、それらはレース3耐性に関して異なる遺伝子を有することを示唆する。Rao-Arelli and Anand (1988) Crop Sci.28: 650-2。レース3耐性は、おそらく3個または4個の異なる遺伝子の制御下にある。同上; Mansur et al. (1993) Crop Sci.33: 1249-53も同様に参照。連鎖群Gにマッピングする1つの主なSCN耐性QTLはrhg1である。Concibido et al. (1996) Theor. Appl. Genet.93: 234-41。他のSCN耐性QTLは連鎖群A2、C1、M、D、J、L25、L26、およびKにマッピングされる。同上; 米国特許第5,491,081号を参照。SCN耐性QTLは、少なくとも異なるSCNレースに関する全体表現型変異の異なる割合を占めることにより、レース特異的に挙動する。Concibido et al. (1997) Crop Sci.37: 258-64。しかしながら、連鎖群Gにおけるrhg1遺伝子座は、任意の同定したSCNレースの耐性の発生に必要である可能性がある。ただし、Qui et al. (1999) Theor. Appl. Genet.98: 356-64を参照。

【0012】

SCN形質と連鎖したマーカーにはRFLP、SSRおよびSNPがある。本開示中で同定したSNPマーカーを使用して、品種改良プログラムをサポートするためにSCN遺伝子型を決定することができる。品種改良プログラムをサポートするためのSCN遺伝子型決定を実施するための、本開示中のSNPマーカーの使用は、コストおよび時間を節約する、早期の望ましい子孫の選択、ならびにSCN耐性ダイズ品種のより正確で迅速な商品化をもたらす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

SCN表現型と連鎖した分子マーカーを使用して、ダイズにおけるSCN耐性形質に関するマーカー支援型選択を容易にすることができる。マーカー支援型選択は、SCN表現型決定と比較して、時間、コスト、および労力に関して重大な利点をもたらす。驚くことに、親遺伝子型において多形であったダイズゲノム中のSCN疾患耐性QTL領域内または近辺で同定した15個のSNPマーカーの中で、わずか3個がSCN耐性形質と連鎖したことが本明細書において開示される。したがって、これら3個のSNPマーカーは、SCN耐性ダイズ品種のマーカー支援型選択において優れた有用性をもたらす。

【課題を解決するための手段】

【0014】

SCN耐性表現型と連鎖した(例えば連鎖した、密接に連鎖した、または非常に密接に連鎖した)核酸分子マーカーを本明細書中に記載する。特定の例において、分子マーカーはSNPマーカーであってよい。例えば非制限的に、SCN耐性表現型を有する植物を同定するため、(例えば、マーカー支援型品種改良または遺伝子形質転換によって)新たな植物遺伝子型にSCN耐性表現型を導入するため、およびSCN耐性表現型を有し得る植物を栽培するための、SCN耐性表現型と連鎖した核酸分子マーカーの使用法も、本明細書中に記載する。

【0015】

ダイズにSCN表現型を導入するための手段、およびSCN表現型を有する植物を同定するための手段をさらに記載する。いくつかの例では、ダイズにSCN表現型を導入するための手段は、SCN表現型と連鎖した（例えば連鎖した、密接に連鎖した、または非常に密接に連鎖した）マーカーであってよい。いくつかの例では、SCN表現型を有する植物を同定するための手段は、SCN表現型と連鎖した（例えば連鎖した、密接に連鎖した、または非常に密接に連鎖した）マーカーと特異的にハイブリダイズするプローブであってよい。

【0016】

本明細書中に記載する分子マーカーを使用して同定した、SCN表現型を有する植物およびその植物に由来する植物材料も、本明細書中に記載する。したがって、SCN耐性表現型と連鎖した1つまたは複数の分子マーカー（複数可）を使用するマーカー支援型選択によって生成するダイズ植物を記載する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1a】、

【図1a-1】、

【図1b】及び

【図1b-1】（図1a-1は図1aの続き、図1b-1は図1bの続き）SCNに関する文献中で報告されたSCN耐性と関係があるQTLの一覧を含む図である。

【図2】染色体および連鎖群（LG）を含むダイズゲノムの表記を含む図である。

【図3】ダイズ第18染色体（連鎖群G）、ならびにSCN耐性と関係があるQTLおよびQTL間隔、ならびにその中に位置するSNPの表記を含む図である。

【図4】ダイズ第8染色体（連鎖群A₂）、ならびにSCN耐性と関係があるQTLおよびQTL間隔、ならびにその中に位置するSNPの表記を含む図である。

【図5】ダイズ第11染色体（連鎖群B₁）、ならびにSCN耐性と関係があるQTLおよびQTL間隔、ならびにその中に位置するSNPの表記を含む図である。

【図6】ダイズ第20染色体（連鎖群I）、ならびにSCN耐性と関係があるQTLおよびQTL間隔、ならびにその中に位置するSNPの表記を含む図である。

【図7】4個のSNP遺伝子座における24個のダイズSCN関連栽培種または親株のクラスターを含む図である。使用した24個のダイズ栽培種およびSCNマッピング親株を示す表も含まれる。表中、第1行のサンプルおよび第2行中の最後の2個のサンプルはSCN感受性であり（緑色）、第2行中の最初の10個のサンプルはSCN耐性であった（黄色）。第2行中の最後の3個のサンプルは2個のSCNマッピング集団の親株であった。

【図8】SCN耐性形質との同時分離を示した3個のSNP遺伝子座における96株のクラスターを含む図である。

【図9】マッピング集団に割り当てたSCN指数の分布を含む図である。ヒストグラムは0.01～3.8の範囲、および0.63の平均、および0.465のメディアンを示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

配列表

添付の配列表中に列挙する核酸配列は、37C.F.R. § 1.822において定義されるのと同様に、ヌクレオチド塩基に関する標準的な文字略語を使用して示す。各核酸配列の一方の鎖のみを示すが、相補鎖は示した鎖に対する任意の参照によって含まれると理解される。添付の配列表中：

【0019】

配列番号1は、r h g 1 - 3995対立遺伝子に特異的なK B i o s c i e n c e s 競合的対立遺伝子特異的PCR SNP遺伝子型決定システム（K A S P a r（商標））アッセイ中で使用したプライマー配列を示す。G A A G G T G A C C A A G T T C A T G C

10

20

30

40

50

T G G A A T T A T G T T G G G T T T T T T T T C T T T C T G T
 【 0 0 2 0 】

配列番号2は、r h g 1 - 3 9 9 5 対立遺伝子に特異的なK A S P a r (商 標) アッセイ中で使用した第2のプライマー配列を示す。G A A G G T C G G A G T C A A C G G A T T G A A T T A T G T T G G G T T T T T T T T C T T T C T G G

【 0 0 2 1 】

配列番号3は、r h g 1 - 3 9 9 5 に関するK A S P a r (商 標) アッセイ中で使用した共通リバースプライマー配列を示す。G C C C A G A A A A A A G G G A T A A A T A A C G G A T A

【 0 0 2 2 】

配列番号4は、N C S B _ 0 0 4 0 7 4 対立遺伝子に特異的なK A S P a r (商 標) アッセイ中で使用したプライマー配列を示す。G A A G G T G A C C A A G T T C A T G C T A T T A T G T T G T A A C A C A A A T T T G C A C C T C A T

【 0 0 2 3 】

配列番号5は、N C S B _ 0 0 4 0 7 4 対立遺伝子に特異的なK A S P a r (商 標) アッセイ中で使用した第2のプライマー配列を示す。G A A G G T C G G A G T C A A C G G A T T A T G T T G T A A C A C A A A T T T G C A C C T C A G

【 0 0 2 4 】

配列番号6は、N C S B _ 0 0 4 0 7 4 に関するK A S P a r (商 標) アッセイ中で使用した共通リバースプライマー配列を示す。C T A T A C A A C T A A A T C G T A A T T C C A T T G T A T

【 0 0 2 5 】

配列番号7は、B A R C _ 0 1 0 8 8 9 - 0 1 6 9 1 対立遺伝子に特異的なK A S P a r (商 標) アッセイ中で使用したプライマー配列を示す。G A A G G T G A C C A A G T T C A T G C T G A A A A A T A A A A T T G A T C A T C A C A T A T G G T T A G

【 0 0 2 6 】

配列番号8は、B A R C _ 0 1 0 8 8 9 - 0 1 6 9 1 対立遺伝子に特異的なK A S P a r (商 標) アッセイ中で使用した第2のプライマー配列を示す。G A A G G T C G G A G T C A A C G G A T T G A A A A A T A A A A T T G A T C A T C A C A T A T G G T T A A

【 0 0 2 7 】

配列番号9は、B A R C _ 0 1 0 8 8 9 - 0 1 6 9 1 に関するK A S P a r (商 標) アッセイ中で使用した共通リバースプライマー配列を示す。T A A G T G A G G G C A A T G T A T T A G T A T Y A A G T A

【 0 0 2 8 】

配列番号10は、マーカーN C S B _ 0 0 4 0 7 4 配列を示す。C A C G A T T T T G T T G T G T T A C A T A A A T T A C T A T A C A A C T A A A T C G T A A T T C C A T T G T A T T A C [A / C] T G A G G T G C A A A T T T G T G T T A C A A C A T A A T T G T A A T T T T A T T G T A C G A T A A A A A C T A T A A C

【 0 0 2 9 】

配列番号11は、マーカーB A R C _ 0 1 0 8 8 9 - 0 1 6 9 1 配列を示す。C T C T T C A C A C C T T T A A G G A A G T T A G T A C C A T T C C A C T A T T C A A G T A T T T T T T T T A A T T C A A A A T T A T T A A G T G A G G G C A A T G T A T T A G T A T N A A G T A [C / T] T A A C C A T A T G T G A T G A T C A A T T T T A T T T T T T C A T G G C T T T G T C G A A A G T A A C A T T A T A T T G T G G T T T T A A A T G A A A A T C T G T G A T T T G C A T

【 0 0 3 0 】

配列番号12は、マーカーr h g 1 - 3 9 9 5 配列を示す。T C T G A T A A C T A T G A C A G C A T C T T C C A A G A T A A T G A C T T C C A A G T T C C A A C A C T G G C T C T G T A C A T T T G A A C T A A T T T T A T A T C A T T T A T C T A

10

20

30

40

50

T T G T G A T T G A A A T A T A A A A T T G A A G T G A T G T G A A C A A T A C
 A A A T C A C A T C T T G A A T T A A A A T A T C T A A C A A C T G G A A C A A
 A T A A G A G G C C C A G A A A A A A G G G A T A A A T A A C G G A T A A C A A
 G [A / C] C A G A A A G A A A A A A A C C C A A C A T A A T T C C A A C T T
 C A A A A T T C A C T C A A T A A A A A G T T T A A C A T G T A A A T T T A C T
 T G G A A A C A A A A C T C A T A A C C A A T A A T A A T A A T A A A A G
 A A A T C A G T T T T A T A G C A T T A A T T T G G G A T G C T C T G C T T G T
 A T G C A A A T G G C A C A A C C T T A C C C T C A A G A T T G C A A A A C A C
 A G A T G A G T A A C A G A T G C A A T G T G A A T C A A T A A A A A G T A T T
 G T T G C G T T G T T G A T G A C A C A A C C T T A C T C A T A A A A A A T G C
 A T

10

【 0 0 3 1 】

I . いくつかの実施形態の概要

特定の実施形態は、96の試験ダイズ株においてダイズシストセンチュウ（SCN）耐性形質との同時分離を示す、3個の例示的なSNPマーカー（rhg1-3995、BARC_010889_01691、およびNCsB_004074）を含む。SCN耐性と同時分離するマーカーはこの形質と連鎖しており、したがってマーカー支援型選択および品種改良において有用であり得る。SCN耐性と連鎖したこれら3個の例示的なSNPマーカーを同定するために使用する戦略も、本明細書中に開示する。グリシンマックス（Glycine max）ゲノム中の、これら3個の例示的なSNPマーカーの物理的マップ位置を

20

【 0 0 3 2 】

ダイズシストセンチュウ（SCN）耐性は非常に複雑な形質である。SCNの侵入は1つまたは複数の異なるヘテロデラグリシネス（Heterodera glycines）レースによって引き起こされる可能性があり、その各々の耐性は異なる連鎖群に位置する異なる耐性遺伝子を必要とし得る。表1参照。表1中に開示する3個のマーカーはいずれも連鎖群G中に位置する。連鎖群G中のSCN耐性遺伝子（複数可）は、レース3および14に対する耐性を担うと考えられる。

30

【 0 0 3 3 】

本明細書中に記載する戦略を使用して、SCN耐性と連鎖した他の連鎖群（例えば、A₂、B₁、およびI）中のマーカーを同定する。したがって、このようなマーカーを同定するための方法も提供する。一般的な戦略を使用して、他の対象の形質をマッピングすることもできる。この戦略は従来のマッピング戦略より有効であり、分子的品種改良プログラムにおいて特に有用であり得る。

40

【 0 0 3 4 】

【表 1】

表1:SCN耐性源

耐性生殖質	ヘテロデラグリシネス (<i>Heterodera glycines</i>)の レース	連鎖群(LG)
PI 88788	3、14	G
Peking	1、3、および5	G、A2、およびB
PI 437654	全て	G (Rhgl)、A2 (Rhg4)、B、C1、L 25、L26、M、およびD1a
PI 90763	3	
PI 438489B	1、2、3、5、および14	G、E、A1、B1、およびC1
PI 89772	1、2、3、および5	G、E、A1、C1、C2、およびD1a
PI209332	全て	G (Rhgl)、およびA2 (Rhg4)
PUSCN14	3	A、G、B、I、およびF
Hartwig	3	
Forrest	3	GおよびA2
Pyramid	3、14 (PI 88788由来)	A2、D、およびG

10

20

【 0 0 3 5 】

I I . 用語

マッピング集団：本明細書中で使用する用語「マッピング集団」は、ゲノムマッピングに使用する植物集団を指すことができる。マッピング集団は、典型的には、制御された親遺伝子型の交配から得られる。マッピング集団の開発用の親および交配設計の選択、および使用するマーカーの型に関する決定は、マッピングする遺伝子、マーカーの有用性、および分子マップに依存する。マッピング集団内の植物の親は、核酸配列レベルと表現型レベルの両方で、対象の形質（複数可）に関して十分な変異がなければならない。親の核酸配列の変異を使用して、マッピング集団の植物における組換え事象を追跡する。情報を与える多型マーカーの有用性は、核酸配列変異の量に依存する。

30

【 0 0 3 6 】

戻し交配：戻し交配法を使用して、植物中に核酸配列を導入することができる。植物中に新たな形質を導入するため、戻し交配技法は数十年間広く使用されている。N. Jensen, Ed., Plant Breeding Methodology, John Wiley & Sons, Inc., 1988。典型的な戻し交配プロトコルでは、対象の原型品種（再現親株）を、移動させる対象の遺伝子を有する第2の品種（非再現親株）と交配させる。この交配から生じた子孫は、次いで再現親株と再度交配させ、非再現親株由来の移動遺伝子以外に、再現植物のほぼ全ての望ましい形態学および生理学的特徴が変換型植物において取り戻された植物を得るまで、そのプロセスを繰り返す。

40

【 0 0 3 7 】

K B i o s c i e n c e s 競合的対立遺伝子特異的 P C R S N P 遺伝子型決定システム (K A S P a r (商標)) : K A S P a r (商標) は、S N P 遺伝子型を決定するための市販の均一蛍光システムである (K B i o s c i e n c e s L t d . , H o d d e s d o n , U K) 。 K A S P a r (商標) アッセイは、3 個の非標識プライマーを含有する S N P 特異的「アッセイ混合物」、および他の必要とされる全構成要素、例えば、共通蛍光レポートシステムを含有する「反応混合物」を含む。これらの混合物以外に、ユーザーは、特に F R E T 可能プレートリーダー、マイクロタイタープレート（複数可）、および約 5 n g / L の D N A を含有する D N A サンプルを提供する。

50

【0038】

典型的なKASPar（商標）アッセイは、（例えば、KBiosciencesのウェブサイトに於いてインターネット経由で無料で利用可能な、PrimerPicker（商標）を使用した）対立遺伝子特異的プライマー設計、対立遺伝子特異的プライマーを含む反応混合物の調製、マイクロタイタープレートにおけるDNAサンプルと反応混合物の混合、熱循環、蛍光プレートリーダーにおけるプレートの読み取り、ならびに蛍光データのプロットおよびスコア化のステップを含む。それぞれのサンプルからのデータは、x軸とy軸がFAMおよびVIC蛍光値に相当する二次元グラフ上に、一緒にプロットする。同じSNP遺伝子型を有するサンプルをプロット上に1つに集める（すなわち、A/A、A/a、およびa/a）。一般的な問題に対する解決策の指針を含めた、KASPar システムに関する一層の技術情報は、KBiosciences Ltd.（例えば、the KASPar SNP Genotyping System Reagent Manual）から入手可能である。

10

【0039】

連鎖した、密接に連鎖した、および非常に密接に連鎖した：本明細書中で使用する遺伝子またはマーカー間の連鎖は、染色体上の遺伝子またはマーカーが次世代中の個体に一緒に継代される測定可能な確率を示す現象を指すことができる。2つの遺伝子またはマーカーが互いに接近するほど、この確率は接近した状態になる（1）。したがって、用語「連鎖」は、（マーカー/遺伝子が異なる染色体上に位置する独立した一団から予想される）0.5を超える確率で、1つの遺伝子と一緒に継代される1つまたは複数の遺伝子またはマーカーを指すことができる。遺伝子の存在が個体における表現型に貢献するとき、遺伝子と連鎖したマーカーは表現型と連鎖していると言うことができる。したがって、用語「連鎖」は、マーカーと遺伝子の間の関係、またはマーカーと表現型の間の関係を指すことができる。

20

【0040】

染色体上の2つの遺伝子またはマーカーの近接性は、遺伝子またはマーカーが次世代中の個体に一緒に継代される確率と直接関連するので、用語「連鎖」は、本明細書中では、同じ染色体上で互いに約2.0 Mb以内に位置する1つまたは複数の遺伝子またはマーカーを指すこともできる。したがって、2つの「連鎖」遺伝子またはマーカーは、約2.1 Mb、2.0 Mb、約1.95 Mb、約1.90 Mb、約1.85 Mb、約1.80 Mb、約1.75 Mb、約1.70 Mb、約1.65 Mb、約1.60 Mb、約1.55 Mb、約1.50 Mb、約1.45 Mb、約1.40 Mb、約1.35 Mb、約1.30 Mb、約1.25 Mb、約1.20 Mb、約1.15 Mb、約1.10 Mb、約1.05 Mb、約1.00 Mb、約0.95 Mb、約0.90 Mb、約0.85 Mb、約0.80 Mb、約0.75 Mb、約0.70 Mb、約0.65 Mb、約0.60 Mb、約0.55 Mb、約0.50 Mb、約0.45 Mb、約0.40 Mb、約0.35 Mb、約0.30 Mb、約0.25 Mb、約0.20 Mb、約0.15 Mb、約0.10 Mb、約0.05 Mb、約0.025 Mb、および約0.01 Mb離れている可能性がある。ダイズにおけるSCN表現型と「連鎖」したマーカーの特定の例には、ダイズゲノムの第18染色体上のヌクレオチド配列がある。

30

【0041】

本明細書中で使用する用語「密接に連鎖した」は、同じ染色体上で互いに約0.5 Mb以内に位置する1つまたは複数の遺伝子またはマーカーを指すことができる。したがって、2つの「密接に連鎖した」遺伝子またはマーカーは、約0.6 Mb、約0.55 Mb、0.5 Mb、約0.45 Mb、約0.4 Mb、約0.35 Mb、約0.3 Mb、約0.25 Mb、約0.2 Mb、約0.15 Mb、約0.1 Mb、および約0.05 Mb離れている可能性がある。

40

【0042】

本明細書中で使用する用語「非常に密接に連鎖した」は、同じ染色体上で互いに約100 kb以内に位置する1つまたは複数の遺伝子またはマーカーを指すことができる。したがって、2つの「非常に密接に連鎖した」遺伝子またはマーカーは、約125 kb、約1

50

20 kb、約115 kb、約110 kb、約105 kb、100 kb、約95 kb、約90 kb、約85 kb、約80 kb、約75 kb、約70 kb、約65 kb、約60 kb、約55 kb、約50 kb、約45 kb、約40 kb、約35 kb、約30 kb、約25 kb、約20 kb、約15 kb、約10 kb、約5 kb、および約1 kb離れている可能性がある。ダイズにおけるSCN表現型と「非常に密接に連鎖した」マーカーの特定の例には、rhg1-3995、BARC__010889__01691、およびNC SB__004074がある。

【0043】

前述の事項を鑑みて、特定遺伝子または表現型と連鎖したマーカーには、その遺伝子または表現型と密接に連鎖したマーカー、およびその遺伝子または表現型と非常に密接に連鎖したマーカーがあることは理解される。SCN表現型の連鎖した、密接に連鎖した、および非常に密接に連鎖した遺伝マーカーは、SCN耐性ダイズ品種の同定、およびこの形質を他のダイズ品種に品種改良してSCN耐性を与えるための、マーカー支援型品種改良プログラムにおいて有用であり得る。

【0044】

遺伝子座：本明細書中で使用する用語「遺伝子座」は、測定可能な特徴（例えば、形質）に対応するゲノム上の位置を指す。SNP遺伝子座は、遺伝子座内に含有されるDNAとハイブリダイズするプローブによって定義される。

【0045】

マーカー：本明細書中で使用するマーカーは、特定の対立遺伝子を有する植物を同定するために使用することができる、遺伝子またはヌクレオチド配列を指す。マーカーは、所与のゲノム遺伝子座における変異として記載することができる。遺伝マーカーは、一塩基対の変化（一塩基多型、または「SNP」）が周囲にある配列などの短いDNA配列、または長いDNA配列、例えば、マイクロサテライト/単純反復配列（「SSR」）であってよい。「マーカー対立遺伝子」は、個々の個体中に存在するマーカーの型を指す。

【0046】

本明細書中で使用する、用語マーカーは、ダイズ染色体DNAのクローンセグメント（例えば、rhg1-3995、BARC__010889__01691、またはNC SB__004074を含むセグメント）を指すことができ、ダイズ染色体DNAのクローンセグメントと相補的なDNA分子（例えば、rhg1-3995、BARC__010889__01691、またはNC SB__004074を含むセグメントと相補的なDNA）をさらに、または代替的に指すことができる。

【0047】

いくつかの実施形態では、植物中のマーカーの存在を、核酸プローブの使用によって検出することができる。プローブはDNA分子またはRNA分子であってよい。RNAプローブは、当技術分野で知られている手段、例えばDNA分子鋳型の使用によって合成することができる。プローブは、マーカーのヌクレオチド配列、および植物ゲノム由来の追加の連続ヌクレオチド配列の全部または一部を含有し得る。これを本明細書中では「連続プローブ」と呼ぶ。追加の連続ヌクレオチド配列は、従来理解されているように、植物染色体由来の連続ヌクレオチド配列が原型マーカーの5'または3'側に存在するかどうかに応じて、原型マーカーの「上流」または「下流」と呼ばれる。当業者によって理解されるように、マーカー中に含めるための追加の連続ヌクレオチド配列を得る方法は、ほぼ無限に繰り返すことができ（染色体の長さによってのみ制限される）、それによって染色体に沿った追加のマーカーを同定することができる。本発明のいくつかの実施形態において、全ての前に記載したマーカーを使用することができる。

【0048】

オリゴヌクレオチドプローブ配列は合成によって、またはクローニングによって調製することができる。適切なクローニングベクターは当業者によく知られている。オリゴヌクレオチドプローブは標識または非標識状態であってよい。例えば、利用するヌクレオチドを例えば放射性³²Pで標識する、ニックトランスレーション、ランダムプライミング、

10

20

30

40

50

ターミナルデオキシトランスフェラーゼによるテーリングなどによる放射能標識を非制限的に含む、核酸分子を標識するための広く様々な技法が存在する。使用することができる他の標識には、例えば非制限的に、フルオロフォア（例えば、FAMおよびVIC）、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤などがある。あるいは、単独で、または他の反応物質と共に検出可能なシグナルをもたらす標識の使用を、（例えば、前に示した標識により）標識される受容体と結合するリガンドに置き換えて、単独で、または他の試薬と共に検出可能なシグナルをもたらすことができる。例えば、Leary et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4045-9を参照。

【0049】

プローブは、原型マーカーのヌクレオチド配列と不連続なヌクレオチド配列を含有することができ、このプローブは本明細書中では「不連続プローブ」と呼ぶ。不連続プローブの配列は、ゲノム上の原型マーカーの配列と十分密接して位置し、したがって不連続プローブは同じ遺伝子または形質（例えば、SCN耐性）と遺伝的に連鎖している。例えば、いくつかの実施形態では、不連続プローブは、ダイズゲノム上の原型マーカーの500 kb、450 kb、400 kb、350 kb、300 kb、250 kb、200 kb、150 kb、125 kb、100 kb、0.9 kb、0.8 kb、0.7 kb、0.6 kb、0.5 kb、0.4 kb、0.3 kb、0.2 kb、または0.1 kb以内に位置する。

【0050】

プローブは、検出するマーカーの正確なコピーであってよい。プローブは、対象生物（例えばダイズ）の染色体DNAのクローンセグメントと実質的に同一であるヌクレオチド配列を含む、またはそれからなる核酸分子であってもよい。本明細書中で使用する用語「実質的に同一である」は、85%を超えて同一であるヌクレオチド配列を指すことができる。例えば、実質的に同一であるヌクレオチド配列は、参照配列と85.5%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または99.5%同一であってよい。

【0051】

プローブは、検出するマーカーの正確なコピー（「DNA標的」）と「特異的にハイブリダイズ可能である」または「特異的に相補的である」核酸分子であってもよい。「特異的にハイブリダイズ可能である」と「特異的に相補的である」は、核酸分子とDNA標的の間で安定的かつ特異的な結合が生じるような、十分な程度の相補性を示す用語である。核酸分子は、特異的にハイブリダイズ可能であるその標的配列と100%相補的である必要はない。特異的な結合が望ましい条件下、例えばストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、核酸と非標的配列の非特異的な結合を回避するのに十分な程度の相補性があるとき、核酸分子は特異的にハイブリダイズ可能である。

【0052】

個々の程度のストリンジエンシーをもたらすハイブリダイゼーション条件は、選択するハイブリダイゼーション法の性質、ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成および長さに応じて変化する。一般に、ハイブリダイゼーションの温度、およびハイブリダイゼーションバッファのイオン強度（特にNa⁺および/またはMg⁺⁺濃度）がハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定するが、洗浄時間もストリンジエンシーに影響を与える。個々の程度のストリンジエンシーを得るのに必要なハイブリダイゼーション条件に関する計算は当業者に知られており、例えば、Sambrook et al. (ed.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, chapters 9 and 11; および Hames and Higgins (eds.) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985において論じられる。核酸のハイブリダイゼーションに関するさらなる詳細な説明および指針は、例えば、Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Part I, Chapter 2, Elsevier, NY, 1993; および Ausubel et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 2, Greene Publishing

10

20

30

40

50

and Wiley-Interscience, NY, 1995において見ることができる。

【0053】

本明細書中で使用する「ストリンジェントな条件」は、ハイブリダイゼーション分子とDNA標的の間に50%未満のミスマッチがある場合のみ、その下でハイブリダイゼーションを行う条件を包含する。「ストリンジェントな条件」は、特定レベルのストリンジェンシーをさらに含む。したがって、本明細書中で使用する「適度なストリンジェンシー」条件は、その下で50%を超える配列ミスマッチがある分子がハイブリダイズしない条件であり、「高いストリンジェンシー」の条件は、その下で20%を超えるミスマッチがある配列がハイブリダイズしない条件であり、「非常に高いストリンジェンシー」の条件は、その下で10%を超えるミスマッチがある配列がハイブリダイズしない条件である。

10

【0054】

以下は代表的な、非制限的なハイブリダイゼーション条件である。

【0055】

(少なくとも90%の配列同一性を共有する配列を検出する)非常に高いストリンジェンシー。16時間65 において5×SSCバッファー中でのハイブリダイゼーション、それぞれ15分間室温において2×SSCバッファー中での二回の洗浄、およびそれぞれ20分間65 において0.5×SSCバッファー中での二回の洗浄。

【0056】

(少なくとも80%の配列同一性を共有する配列を検出する)高いストリンジェンシー。16~20時間65~70 において5×~6×SSCバッファー中でのハイブリダイゼーション、それぞれ5~20分間室温において2×SSCバッファー中での二回の洗浄、およびそれぞれ30分間55~70 において1×SSCバッファー中での二回の洗浄。

20

【0057】

(少なくとも50%の配列同一性を共有する配列を検出する)適度なストリンジェンシー。16~20時間室温~55 において6×SSCバッファー中でのハイブリダイゼーション、それぞれ20~30分間室温~55 において2×~3×SSCバッファー中での少なくとも二回の洗浄。

【0058】

前に論じた全てのプローブに関して、プローブは、追加の核酸配列、例えばプロモーター、転写シグナル、および/またはベクター配列を含むことができる。前に論じた任意のプローブを使用して、SCN耐性と関連がある遺伝子と密接に連鎖した追加のマーカーを定義することができ、このように同定したマーカーは、本開示中で命名した例示的なマーカーと同等である可能性があり、したがって本発明の範囲内にある。

30

【0059】

マーカー支援型品種改良：本明細書中で使用する用語「マーカー支援型品種改良」は、1つまたは複数の複雑な形質(例えば、SCN耐性)に関して直接品種改良するための手法を指すことができる。現行では、植物生産者は、農業経済学的に望ましい形質と連鎖した、花の色、種皮の外見、またはアイソザイム変異などの、容易に検出可能な形質を確認しようと試みる。したがって植物生産者は、容易に検出可能な形質の分離を追求することにより分離、品種改良集団において農業経済学的に望ましい形質を追求する。しかしながら、植物の品種改良に使用することができるこのような連鎖関係は非常に少ない。

40

【0060】

マーカー支援型品種改良は、植物品種を改良するための、時間およびコスト効率の良い方法をもたらす。マーカー支援型品種改良の適用のいくつかの例は、アイソザイムマーカーの使用に関する。例えば、Tanksley and Orton, eds.(1983) Isozymes in Plant Breeding and Genetics, Amsterdam: Elsevierを参照。一例は、トマトにおける線虫疫病に耐性がある遺伝子と関係があるアイソザイムマーカーである。Miという名称の遺伝子によって制御される耐性はトマトの第6染色体上に位置し、Aps1、酸性ホスファターゼアイソザイムと非常に密接に連鎖している。Mi遺伝子を間接的に選択するためのAps1

50

アイソザイムマーカ-の使用は、標準的な電気泳動技法により集団の分離を明確に決定することができ、アイソザイムマーカ-を実生組織においてスコア化し、植物を成熟状態に維持する必要をなくすことができ、アイソザイムマーカ-対立遺伝子の共同優占はホモ接合体とヘテロ接合体の区別を可能にするという利点を与えた。Rick (1983) in Tanksley and Orton上記を参照。

【 0 0 6 1 】

量的形質遺伝子座：本明細書中で使用する用語「量的形質遺伝子座」(QTL)は、様々な程度で量的形質、もしくは表現型の根底をなし、2つ以上のDNA配列(例えば遺伝子、非コード配列、および/または遺伝子間配列)の間の相互作用の原因となり得る、考えられるDNA配列(例えば遺伝子、非コード配列、および/または遺伝子間配列)として同定されているDNAのストレッチ、またはDNAの発現産物およびそれらの環境を指すことができる。量的形質遺伝子座(QTL)を分子的に同定して、量的形質の指定に関与する配列を含有するゲノム領域のマッピングを手助けすることができる。

10

【 0 0 6 2 】

本明細書中で使用する用語「QTL間隔」は、QTL形質の根底をなす遺伝子と連鎖したDNAのストレッチを指すことができる。QTL間隔は、典型的には、ただし必ずではないが、QTL自体より大きい。QTL間隔は、QTLに関して5'および/または3'であるDNAのストレッチを含有することができる。

【 0 0 6 3 】

配列同一性：2つの核酸またはポリペプチド配列の文脈で、本明細書中で使用する用語「配列同一性」または「同一性」は、指定比較ウインドウにわたり最大対応性でアラインメントをとるとき同一である、2つの配列中の残基を指すことができる。

20

【 0 0 6 4 】

本明細書中で使用する用語「配列同一性の割合」は、比較ウインドウにわたる2つの最適アラインメント配列(例えば、核酸配列)の比較によって決定される値を指すことができ、比較ウインドウ中の配列の一部分は、2配列の最適アラインメントに関して(付加または欠失を含まない)参照配列と比較して付加または欠失(即ちギャップ)を含む可能性がある。その割合は、同一ヌクレオチドまたはアミノ酸残基が両配列中に存在する位置の数を決定して一致位置の数を得ること、比較ウインドウ中の位置の総数で一致位置の数を割ること、およびその結果に100を掛けて配列同一性の割合を得ることによって計算される。

30

【 0 0 6 5 】

比較用配列のアラインメントをとるための方法は当技術分野でよく知られている。様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムは、例えば、Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73: 237-44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-3; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16: 10881-90; Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8: 155-65; Pearson et al. (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-31; Tatiana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174: 247-50中に記載される。配列アラインメント法および相同性の計算の詳細な考察は、例えば、Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10において見ることができる。

40

【 0 0 6 6 】

国立生物工学情報センター(The National Center for Biotechnology Information)(NCBI)のBasic Local Alignment Search Tool(BLAST(商標); Altschul et al. (1990))を、いくつかの配列分析プログラムと共に使用するため、国立生物工学情報センター(Bethesda, MD)を含めたいくつかの供給源から、およびインターネットで利用可能である。このプログラムを使用した配列同一性の決定の仕方に関する記載は、BLAST(商標)の「ヘルプ」セクションの下においてインターネットで利用可

50

能である。核酸配列の比較のため、デフォルトパラメーターに設定したデフォルト B L O S U M 6 2 マトリックスを使用して、B L A S T (商標) (B l a s t n) プログラムの「B l a s t 2 s e q u e n c e s」機能を利用することができる。参照配列とさらに高い類似性を有する核酸配列は、この方法によって評価すると高い割合の同一性を示す。

【 0 0 6 7 】

一塩基多型：本明細書中で使用する用語「一塩基多型」(S N P)は、個体におけるゲノム(または他の共有配列)中のヌクレオチドが種または対の染色体のメンバー間で異なるときに存在する、D N A 配列変異を指すことができる。集団内で、特定集団において観察される遺伝子座での最小対立遺伝子頻度であるわずかな対立遺伝子頻度を、S N P に割り当てることができる。これは単に、一塩基多型に関する2つの対立遺伝子頻度の低い方である。異なる集団は、少なくとも若干異なる対立遺伝子頻度を示すと予想される。特定集団は、有意に異なる対立遺伝子頻度を示し得る。いくつかの例では、S C N 耐性と連鎖したマーカーはS N P マーカーである。

【 0 0 6 8 】

S N P は遺伝子のコード配列内、遺伝子の非コード領域内、または遺伝子間の遺伝子内領域内に入り得る。コード配列内のS N P は、遺伝コードの縮重のため、生成されるタンパク質のアミノ酸配列を必ずしも変えるわけではない。両型が同じポリペプチド配列をもたらすS N P は「同義的」と呼ばれる(時折サイレント突然変異と呼ばれる)。異なるポリペプチド配列が生成する場合、それらは「非同義的」と呼ばれる。非同義的变化はミスセンスまたはナンセンスのいずれかであってよく、ミスセンス変化は異なるアミノ酸をもたらし、ナンセンス変化は早期の停止コドンをもたらす。タンパク質コード領域に存在しないS N P は、遺伝子スプライシング、転写因子結合の産物、または非コードR N A の配列を依然有し得る。S N P は通常2対立遺伝子であり、したがって植物および動物において容易にアッセイされる。Sachidanandam (2001) Nature 409: 928-33。

【 0 0 6 9 】

形質または表現型：用語「形質」と「表現型」は、本明細書中では交互に使用する。本開示の目的では、特定対象の形質はS C N 耐性である。

【 0 0 7 0 】

I I I . 対象の形質と連鎖したマーカーのQ T L ベースの同定

A . 概要

いくつかの実施形態では、従来のマッピング手法と異なる戦略を使用して、形質(例えば、S C N 耐性)をマッピングする。例えば、便宜上、4ステップを含むものとして記載することができる戦略に従い、形質をマッピングすることができる。第1のステップでは、マッピングする形質に相当するQ T L 間隔の標的領域を決定することができる。第2のステップでは、標的ゲノム(例えば、ダイズゲノム)の決定したQ T L 間隔内または近辺に位置するマーカー(例えば、S N P マーカー)を選択することができる。第3のステップでは、選択したマーカーに関する個々の対象の遺伝子型決定を容易にする、特異的プライマーを設計することができる。特定の例では、K A S P a r (商標) 遺伝子型決定アッセイ中で使用するための特異的プライマーを設計する。第4のステップでは、形質の分離を示す集団を特異的プライマーを使用してスクリーニングし、形質と連鎖したマーカーを同定することができる。

【 0 0 7 1 】

B . 対象の形質と連鎖したマーカーおよびそれらの同定

Q T L 間隔の標的領域の決定およびマーカーの同定。

当業者に利用可能な任意の技法により、Q T L を決定することができる。例えば、特定形質に貢献することが知られている遺伝子の位置を参照することによって、対象の特定形質に対応するQ T L の物理的位置を最初に決定することができる。いくつかの実施形態では、それぞれ第8、11、18、および20染色体上の少なくとも4領域においてS C N 耐性遺伝子を同定することができる。例えば、Concibido et al.(1996) Theor.Appl.Gene

10

20

30

40

50

t.93: 234-41, Concibido et al.(1997) Crop Sci.37: 258-64, Meksem et al.(1999) Theor.Appl. Genet.99: 1131-42, Qui et al.(1999) Theor.Appl.Genet.98: 356-64, Meksem et al.(2001) Mol.Breeding 7: 63-71, Li et al.(2009) Mol. Breeding 24: 63-76, Wu et al.(2009) Theor.Appl.Genet. 118: 1093-105、米国特許第5,491,081号、同第6,096,944号、同第6,162,967号、同第6,271,437号、同第6,284,948号、同第6,300,541号、同第6,538,175号、同第7,154,021号、同第7,485,770号、U.S.S.N.20020129402、20020144310、20030005491、20030135881、20060225150、20060253919、20080072352、および20090100537、ならびに国際PCT公開WO1995020669A2、WO20001051627A2、およびWO2008153804A2を参照。いくつかの実施形態では、最初に同定したQTLを、最初に同定したQTLの境界と同じまたは異なる境界をゲノム内に有し得るQTLの、低複雑性または広範囲の一覧にグループ分けまたは分類する。

【0072】

いくつかの実施形態では、QTL形質と連鎖するマーカーを含有する可能性がある、DNAの領域を選択することができる。この領域はQTL間隔と呼ぶことができる。例えば、QTL間隔は、5'方向と3'方向の一方または両方に、QTLおよびQTL付近に存在する追加のゲノムDNAを含むDNAの領域であってよい。いくつかの実施形態では、QTL間隔は、約4Mb、約3.5Mb、約3Mb、約2.5Mb、約2Mb、約1.5Mb、または約1Mbであってよい。

【0073】

特定の実施形態では、標的ゲノムを検索して、QTL、およびQTL間隔内部、その近辺、またはその間に物理的に位置するマーカーを同定することができる。知られているマーカーの位置を含有する参照マップが標的ゲノムに利用可能である場合、その参照マップを使用してマーカーを同定することができる。標的ゲノムの核酸配列は、例えばBLAST(商標)などのソフトウェアによって検索することもできる。いくつかの実施形態では、SNPマーカーを同定することができる。いくつかの実施形態では、SCN耐性形質に対応するダイズゲノムのQTL、およびQTL間隔内部、その近辺、またはその間に物理的に位置する、マーカーを同定することができる。特定の例では、SCN耐性形質に対応するダイズゲノムのQTL、およびQTL間隔内部、その近辺、またはその間に物理的に位置する、同定するSNPマーカーは、表2中に列挙するマーカーからなる群から選択することができる。

【0074】

他の実施形態では、対象の形質に対応するQTL、およびQTL間隔内部、その近辺、またはその間に物理的に位置する、同定したマーカーから、特定マーカーを選択することができ、そこからマッピング集団を作製する親株の間で、それらのマーカーは多型である。親株間の所与のマーカーの多型は、親株から生じるマッピング集団中の組換え事象を追跡する能力と直接関係がある。

【0075】

特定の例では、親ダイズ株間の多型マーカーを選択しSCN耐性マッピング集団をスクリーニングして、存在する場合、どの多型マーカーがSCN耐性形質と連鎖しているか決定する。このようなマーカーは、SNPマーカーの1つの対立遺伝子がSCN耐性個体中にのみ出現し、かつSNPマーカーの他の対立遺伝子がSCN感受性個体中にのみ出現するように分離し得る。マッピング集団は、SCN耐性である一品種をSCN感受性である別の品種と交配させることによって作製することができる。いくつかの実施形態では、マッピング集団は、約10、約20、約30、約40、約50、約60、約70、約80、約90、約95、約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、約500、またはそれより多くの個体を含むことができる。いくつかの実施形態では、SCN耐性ダイズ生殖質98860-71を1つまたは複数のSCN感受

性生殖質（複数可）（例えば、75213および6CH026-035）と交配して、マッピング集団を作製することができる。

【0076】

いくつかの実施形態では、多型マーカーは、対象のSCN耐性形質に対応する遺伝子またはQTLと連鎖しているかまたは内部に存在する一塩基多型（SNP）であってよい。これらのSNPマーカーは、それだけには限られないが、対象領域全体の短いもしくは長い配列の読み取りを可能にするサンガーの配列決定法またはハイスループット配列決定（「次世代」）方法を含めた、当技術分野で知られている任意のDNA配列決定法を使用して、遺伝子またはQTLを含有する領域全体の配列決定により検出することができる。配列決定による遺伝子型決定をSNPマーカーの検出に使用する、このような実施形態では、対象の遺伝子またはQTLにおけるSNPを含有する領域の隣接配列に対応するプライマーを配列決定性に利用して、対象領域全体を配列決定することができる。このような実施形態では、本明細書中に例示するSNPの検出のため対象領域全体の配列決定に異なる遺伝子型を使用するとき、本明細書中に例示するSNP以外の他のSNPを同定することができる。このような実施形態では、本明細書中に例示するSNP自体（個々のSNP）または例示した配列と連鎖した他のSNPとの組合せ（ハプロタイプ）を、対象のSCN耐性形質に関する植物のマーカー支援型選択のため、遺伝子型を区別するのに利用することができる。

10

【0077】

プライマー設計および連鎖のスクリーニング。

20

オリゴヌクレオチドプローブ（例えばプライマー）を設計して、対象の形質に対応するQTL、およびQTL間隔内部、その近辺、またはその間に物理的に位置するマーカーを特異的に検出することができる。一般に、マーカーの1対立遺伝子のみと特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを設計することができる。いくつかの実施形態では、各々が他のプローブが特異的にハイブリダイズしないSNP対立遺伝子と特異的にハイブリダイズするように、2つのオリゴヌクレオチドプローブを設計してSNPマーカーを検出する。当業者によって理解されるように、個々のマーカーに関するオリゴヌクレオチドプローブの長さまたは組成は、プローブをマーカーの1対立遺伝子に非特異的にせず、確立した原理に従い変えることができる。

【0078】

30

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドプローブはプライマーであってよい。具体的な実施形態では、KASPar（商標）遺伝子型決定アッセイにおいてマーカーを検出するための、プライマーを設計することができる。特定の実施形態では、KASPar（商標）遺伝子型決定アッセイを使用してダイズにおけるSCN耐性表現型と連鎖したマーカーを検出するための、プライマーを設計することができる。これらおよびさらなる実施形態では、検出システムはマッピング集団における個体の遺伝子型を決定するためのハイスループットで好都合な形式をもたらすことができ、それによって特定遺伝子または形質を有する個体の同定を非常に容易にすることができ、マーカー支援型選択プログラムの実施または実行を非常に容易にすることもできる。

【0079】

40

具体的な実施形態では、オリゴヌクレオチドプローブは、TAQMAN（登録商標）遺伝子型決定アッセイにおいてマーカーを検出するように設計されたプライマーであってよい。この方法は、SCN耐性遺伝子と密接に連鎖したマーカーに特異的なプライマー、および一塩基多型（SNP）を含有する蛍光標識プローブを利用する。耐性と関係があるSNPプローブはFAMなどの蛍光色素で標識し、一方感受性と関係があるプローブはVICなどの異なる蛍光色素で標識する。データは蛍光色素シグナルの有無として分析する。検出システムはマッピング集団における個体遺伝子型決定の多重化などの、ハイスループットで好都合な形式をもたらすことができ、それによって特定遺伝子または形質を有する個体の同定を非常に容易にすることができ、マーカー支援型選択プログラムの実施または実行を非常に容易にすることもできる。

50

【0080】

例えば例示的マーカーと追加のマーカーの間の組換え頻度を決定することによって、本明細書中で命名する任意の例示的マーカー（例えば、表3中に列挙するマーカー、例えば r h g 1 - 3 9 9 5、B A R C _ 0 1 0 8 8 9 _ 0 1 6 9 1、および N C S B _ 0 0 4 0 7 4 など）の同等物として、追加のマーカーを同定することができる。このような決定は、Mather (1931), The Measurement of Linkage in Heredity, Methuen & Co., Londonの方法に基づく正射影法、次に組換え頻度を決定するための最大尤度試験を利用することができる。Allard (1956) Hilgardia 24: 235-78。組換え頻度の値が0.10（すなわち10%）以下である場合、追加のマーカーは、本開示の方法中で使用する目的の特定の例示的マーカーと、同等であると考えられる。

10

【0081】

本発明のいくつかの実施形態では、任意および全てのS C N耐性遺伝子と連鎖したマーカーを同定することができる。さらに、本発明のいくつかの実施形態では、全てのS C N H G種に関する任意および全ての耐性に貢献する遺伝子座を制御するマーカーを同定することができる。

【0082】

ダイズにおけるS C N耐性をもたらすための手段はS N Pマーカー対立遺伝子であってよく、生殖質98860-71に属するかまたは由来するダイズ植物における、そのS N Pマーカー対立遺伝子の検出は、その核酸配列を含む植物がS C N耐性表現型を有する、強力な指標を少なくとももたらす。いくつかの例では、ダイズにおけるS C N耐性をもたらすための手段は、表3中に列挙するマーカーからなる群から選択されるマーカーである。特定の例では、ダイズにおけるS C N耐性をもたらすための手段は、r h g 1 - 3 9 9 5、B A R C _ 0 1 0 8 8 9 _ 0 1 6 9 1、およびN C S B _ 0 0 4 0 7 4 からなる群から選択されるマーカーである。

20

【0083】

S C N耐性表現型を有するダイズ植物を同定するための手段は、S C N耐性遺伝子型を有する生殖質98860-71に属するかまたは由来するダイズ植物から得たサンプルに加えると検出可能なシグナルを示す分子であってよいが、S C N耐性表現型を有さない生殖質98860-71に属するかまたは由来するダイズ植物から得たサンプルに加えると、その手段は検出可能なシグナルを示さない。核酸の特異的ハイブリダイゼーションは検出可能なシグナルであり、S C N耐性表現型と連鎖したS N Pマーカー対立遺伝子と特異的にハイブリダイズする核酸プローブは、したがってS C N耐性表現型を有するダイズ植物を同定するための手段であり得る。いくつかの例では、S C N耐性表現型を有するダイズ植物を同定するための手段は、S C N耐性表現型と連鎖したマーカーと特異的にハイブリダイズするプローブである。

30

【0084】

C. 対象の形質と連鎖したマーカーを使用する方法

対象の形質（例えば、ダイズにおけるS C N耐性）と連鎖した核酸分子マーカーを使用して対象の形質を有する植物を同定する方法は、植物生産者にコスト節約をもたらすことができる。このような方法は、（例えば、S C N耐性を有するダイズ植物品種を脆弱性植物品種と交配させることによって）開発中に生じる個々の植物を、表現型決定する必要性を除去することができるからである。

40

【0085】

特定の実施形態では、ダイズにおけるS C N耐性と連鎖したマーカーを使用して、S C N耐性の1つまたは複数の決定因子を含有するDNAのセグメント（複数可）を移動させることが可能である。特定の実施形態では、表3中に列挙するマーカーおよびそれらの同等物であるマーカーを含むマーカーの群から、マーカーを選択することができる。いくつかの実施形態では、r h g 1 - 3 9 9 5、B A R C _ 0 1 0 8 8 9 _ 0 1 6 9 1、およびN C S B _ 0 0 4 0 7 4 からなる群からマーカーを選択することができる。いくつかの実施形態では、ダイズにおけるS C N耐性と連鎖したマーカーを使用してS C N耐性の1つ

50

または複数の決定因子を含有するDNAのセグメント（複数可）を移動させる方法は、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーと特異的にハイブリダイズ可能であるプローブで、2つの親植物のゲノムDNAを分析するステップと、2つの親植物遺伝子型を有性交配して子孫集団を得るステップと、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーの存在に関してこれらの子孫を分析するステップと、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーを含有する子孫をレシピエントの遺伝子型と戻し交配させて第1の戻し交配集団を生成するステップと、次いで、親の遺伝子型およびSCN耐性表現型によって示される任意の望ましい形質（複数可）を含む最終子孫を得られるまで、戻し交配プログラムを続けるステップとを含むことができる。特定の実施形態では、各交配および戻し交配ステップにおいて得られる個々の子孫は、各世代でのSCNマーカー分析によって選択する。いくつかの実施形態では、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーと特異的にハイブリダイズ可能であるプローブを用いた2つの親植物のゲノムDNAの分析によって、一方の親植物が、プローブが特異的にハイブリダイズする少数の連鎖マーカーを含むこと、またはプローブが特異的にハイブリダイズする連鎖マーカーを含まないことが明らかになる。いくつかの実施形態では、各交配および/または戻し交配において得られる個々の子孫は個々の植物の配列変異によって選択する。

10

【0086】

いくつかの実施形態では、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーを使用して、遺伝子形質転換により植物（例えばダイズ）中にSCN耐性の1つまたは複数の決定因子を導入することができる。特定の実施形態では、表3中に列挙するマーカーおよびそれらの同等物であるマーカーを含むマーカーの群から、マーカーを選択することができる。いくつかの実施形態では、遺伝子組換えにより植物中にSCN耐性の1つまたは複数の決定因子を導入するための方法は、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーと特異的にハイブリダイズ可能であるプローブで植物（例えばダイズ）のゲノムDNAを分析して、植物中のSCN耐性の1つまたは複数の決定因子を同定するステップと、例えばゲノムDNAを抽出し1つまたは複数の制限エンドヌクレアーゼ酵素でそのゲノムDNAを消化することによって、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーを含む植物のゲノムDNAのセグメントを単離するステップと、DNAの単離セグメントを場合によっては増幅するステップと、宿主植物の細胞または組織中にDNAの単離セグメントを導入するステップと、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーと特異的にハイブリダイズ可能であるプローブで宿主植物のDNAを分析して、宿主植物中のSCN耐性の1つまたは複数の決定因子を同定するステップとを含むことができる。特定の実施形態では、DNAの単離セグメントを、それが宿主植物のゲノムに安定的に組み込まれるように宿主植物中に導入することができる。

20

30

【0087】

いくつかの実施形態では、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーを使用して、他の生物、例えば植物中にSCN耐性の1つまたは複数の決定因子を導入することができる。特定の実施形態では、表3中に列挙するマーカーおよびそれらの同等物であるマーカーを含むマーカーの群から、マーカーを選択することができる。いくつかの実施形態では、ダイズ以外の生物中にSCN耐性の1つまたは複数の決定因子を導入するための方法は、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーと特異的にハイブリダイズ可能であるプローブで植物（例えばダイズ植物）のゲノムDNAを分析して、植物中のSCN耐性の1つまたは複数の決定因子を同定するステップと、例えばゲノムDNAを抽出し1つまたは複数の制限エンドヌクレアーゼ酵素でそのゲノムDNAを消化することによって、SCN耐性の1つまたは複数の決定因子を含む植物のゲノムDNAのセグメントを単離するステップと、DNAの単離セグメントを場合によっては増幅するステップと、ダイズ以外の生物中にDNAの単離セグメントを導入するステップと、SCN耐性表現型と連鎖したマーカーと特異的にハイブリダイズ可能であるプローブでダイズ以外の生物のDNAを分析して、生物中のSCN耐性の1つまたは複数の決定因子を同定するステップとを含むことができる。他の実施形態では、DNAの単離セグメントを、それが生物のゲノムに安定的に組み込まれるように生物中に導入することができる。

40

50

【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態では、S C N耐性表現型と連鎖したマーカーを使用して、S C N耐性の1つまたは複数の決定因子を有する植物を同定することができる。いくつかの実施形態では、植物はダイズ植物であってよい。例えば、植物は生殖質98860-71のダイズ植物であってよい。特定の実施形態では、核酸分子（例えば、ゲノムDNAまたはmRNA）を植物から抽出することができる。抽出した核酸分子は、S C N耐性表現型と連鎖したマーカーと特異的にハイブリダイズ可能である1つまたは複数のプローブと、次いで接触させることが可能である。抽出した核酸分子と1つまたは複数のプローブの特異的ハイブリダイゼーションは、植物におけるS C N耐性の1つまたは複数の決定因子の存在を示す。

10

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態では、S C N耐性の多数の決定因子と連鎖したマーカーを同時に使用することができる。他の実施形態では、1つのS C N耐性の決定因子のみと連鎖したマーカーを使用することができる。具体的な例では、1つまたは複数の特定S C N H Gレース（例えば、レース1、レース2、レース3、レース5、およびレース14）に関してS C N耐性と連鎖したマーカーを同時に使用することができる。例えば、異なるS C N H Gレースに関してS C N耐性と連鎖した複数のマーカーを同時に使用することができる。

（実施例）

【 0 0 9 0 】

20

以下の実施例は、特定の個々の特徴および/または実施形態を例示するために示される。これらの実施例は、記載する個々の特徴または実施形態に対する開示を制限するものと解釈すべきではない。

【実施例1】

【 0 0 9 1 】

材料および方法

24個のダイズ栽培種およびS C Nマッピング親を使用して、S C N耐性表現型と連鎖したマーカーを同定した。14の栽培種、75110、75155、75163、99630、99726、95895-755PRU、99345-31、75192、75209、75159、Essex、Williams82、75213、および6CH026-035がS C N感受性であった。10の栽培種、Maverick、Peking、PI209332、PI437654、99811、99294、Forrest、PI88788、PI437654、および98860-71がS C N耐性であった。

30

【 0 0 9 2 】

S C Nバイオアッセイ：S C Nバイオアッセイを実施して、S C N耐性ダイズ品種98860-71とS C N感受性ダイズ品種75213および6CH026-035の交配によって生じたマッピング集団の表現型の情報を得た。使用したマッピング集団の表現型の情報は表3中に列挙する。当技術分野は、ダイズ品種における耐性レベルを分類するための均一な手法を有していない。したがって、耐性レベルは「S C Nスコア」の点で分類した。S C Nスコア0~10=R（耐性）、S C Nスコア10.1~29.9=MR（中程度の耐性）、S C Nスコア30.0~59.9=MS（中程度の感受性）、および60+=S（感受性）。周知の感受性および耐性株と試験株を比較することによって、S C N指数値を測定した。指数スコアは、サンプルに関して観察したS C N感受性の割合に直接基づいた。例えば、試験株が9植物の各々において10の嚢子を有し、Williams（感受性）が9植物の各々において100の嚢子を有した場合、試験株は10%の指数で分類した。最終指数は9植物のスコアの平均であった。

40

【 0 0 9 3 】

KASPar（商標）反応：SNPを有するDNA配列を提供することにより、KLIMS（商標）（KBioscience Laboratory Management System）においてPrimerPicker（商標）ツールを使用してKASPar

50

ar (商標) プライマーを設計した。3つのプライマー、A1 (対立遺伝子特異的プライマー1)、A2 (対立遺伝子特異的プライマー2)、およびC (一般的なりバースプライマー)を、KASPar (商標)の化学的性質に基づき各々のSNP配列用に設計した。各KASPar (商標)反応のアッセイ混合物は、KASPar (商標)SNP遺伝子型決定システムv2.0中と同様に調製した。最終反応体積は反応当たり5 μ Lであり、1 μ LのDNA鋳型(5ng/ μ L)、2.5 μ Lの2x反応混合物、0.06875 μ Lのアッセイ混合物、0.04 μ Lの50mM MgCl₂、および1.39125 μ LのddH₂Oを含んでいた。アッセイは384ウエル形式で実施した。アッセイ中に使用した熱循環条件は製造者の説明書に従った。94 で15分間、20サイクルの94 で10秒間、57 で5秒間、および72 で10秒間、ならびに22サイクルの94 で10秒間、57 で20秒間、および72 で40秒間。PCR用プレートを遠心分離し、対立遺伝子特異的FAMとVICの強度を室温において分光蛍光計(Tecan GENios (商標)、Mannedorf、スイス)で読み取った。データは直接ロードし、Kluster Caller (商標)を使用してKLIMS (商標)で分析した。

【実施例2】

【0094】

SCN耐性遺伝子と連鎖したQTLおよびQTL間隔の物理的位置の同定

SCN耐性に関与するQTLを、SCNに関する文献を研究することにより初期に同定した。SCNに関する文献中に見られる初期に同定したSCN関連QTLは、図1a、図1a-1、図1b及び図1b-1(図1a-1は図1aの続き、図1b-1は図1bの続き)中に列挙する。

【0095】

SCNに関する文献中で初期に同定されたQTLの一覧から、異なるSCNレースに対する耐性に関与するいくつかの異なるQTL間隔を、ダイズゲノムマップとの参照によって決定した。例えば図2を参照。例えば、図3中に示すように連鎖群(LG)GにおけるQTL間隔を決定し、図4中に示すようにLG A₂におけるQTL間隔を決定し、図5中に示すようにLG B₁におけるQTL間隔を決定し、図6中に示すようにLG IにおけるQTL間隔を決定した。表2は、異なるSCNレースに対する耐性に関与する、例示的QTLおよびそれらの対応する決定したQTL間隔を列挙する。

【実施例3】

【0096】

SCN耐性遺伝子と連鎖したQTLおよびQTL間隔の内部/近辺/間に物理的に位置するSNPマーカーの同定

決定したQTL間隔の内部、その近辺、またはその間に物理的に位置するSNPマーカーに関して、BLAST (商標)を使用してダイズゲノムを検索した。これらのSNPマーカーのいくつかは、SCN耐性表現型と連鎖している可能性があるかと仮定した。合計79個のSNPマーカーを、24個のダイズ株(14のSCN感受性と10のSCN耐性)を使用する初期スクリーニング用に選択して、存在する場合、これらのSNPマーカーのどれがSCN耐性表現型と連鎖しているかを決定した。79個のマーカーの25個がLG Gに位置し、マーカーの12個がLG A₂に位置し、マーカーの22個がLG B₁に位置し、マーカーの20個がLG Iに位置した。79個の選択したマーカーの全てを表2中に列挙する。

【0097】

【表 2 - 1】

表2:24個のダイズ株を用いたスクリーニング用の79個のSNPの一覧

マーカー	SNP対立遺伝子	連鎖群	染色体
BARC_018419_02911	[C/T]	A2	8
BARC_025811_05088	[C/T]	A2	8
BARC_040339_07714	[A/G]	A2	8
NCSB_001710	[A/T]	A2	8
NCSB_001716	[T/C]	A2	8
NCSB_001717	[A/C]	A2	8
NCSB_001718	[A/G]	A2	8
NCSB_001719	[A/C]	A2	8
BARC_007704_00081	[T/A]	B1	11
BARC_010169_00537	[C/T]	B1	11
BARC_013547_01157	[A/T]	B1	11
BARC_018557_03202	[A/G]	B1	11
BARC_018649_03221	[C/T]	B1	11
BARC_025703_04999	[C/G]	B1	11
BARC_035379_07178	[G/T]	B1	11
BARC_904050_01007	[A/T]	B1	11
NCSB_002644	[A/G]	B1	11
NCSB_002645	[A/G]	B1	11
NCSB_002646	[A/G]	B1	11
NCSB_002647	[A/T]	B1	11

10

20

【表 2 - 2】

マーカー	SNP対立遺伝子	連鎖群	染色体
NCSB_002648	[T/G]	B1	11
NCSB_002649	[T/C]	B1	11
NCSB_002650	[C/G]	B1	11
NCSB_002651	[T/C]	B1	11
NCSB_002652	[T/C]	B1	11
NCSB_002653	[A/C]	B1	11
NCSB_002654	[A/C]	B1	11
NCSB_002655	[A/C]	B1	11
NCSB_002656	[A/G]	B1	11
NCSB_002657	[A/C]	B1	11
BARC_003180_00257	[C/T]	G	18
BARC_010889_01691	[C/T]	G	18
BARC_012237_01755	[A/C]	G	18
BARC_015377_01829	[A/C]	G	18
BARC_027452_06569	[A/T]	G	18
BARC_028299_05817	[C/G]	G	18
BARC_035305_07162	[A/T]	G	18
BARC_G01475_00237	[A/C]	G	18
NCSB_004072	[A/G]	G	18
NCSB_004073	[A/G]	G	18
NCSB_004074	[A/C]	G	18
NCSB_004078	[A/G]	G	18
NCSB_004079	[C/G]	G	18
NCSB_004080	[C/G]	G	18
NCSB_004081	[A/G]	G	18
NCSB_004082	[T/C]	G	18
NCSB_004083	[A/G]	G	18
NCSB_004084	[A/T]	G	18
NCSB_004085	[A/T]	G	18
NCSB_004086	[A/T]	G	18
NCSB_004097	[T/C]	G	18
NCSB_004098	[T/C]	G	18
NCSB_004107	[T/G]	G	18
NCSB_004108	[A/C]	G	18
NCSB_004109	[C/G]	G	18
rhgl_2564	[G/-]	G	18
rhgl_3995	[A/C]	G	18
rhgl_689	[A/C]	G	18
rhgl_757	[T/C]	G	18
NCSB_004874	[A/G]	I	20
NCSB_004875	[T/G]	I	20
NCSB_004877	[A/T]	I	20
NCSB_004879	[A/G]	I	20

10

20

30

【表 2 - 3】

マーカー	SNP対立遺伝子	連鎖群	染色体
NCSB_004882	[A/T]	I	20
NCSB_004883	[A/G]	I	20
NCSB_004884	[T/G]	I	20
NCSB_004886	[T/C]	I	20
NCSB_004887	[T/G]	I	20
NCSB_004889	[A/G]	I	20
NCSB_004890	[T/C]	I	20
NCSB_004891	[T/C]	I	20
NCSB_004893	[T/C]	I	20
NCSB_004894	[T/C]	I	20
NCSB_004895	[A/G]	I	20
NCSB_004897	[T/C]	I	20
NCSB_004898	[A/T]	I	20
NCSB_004899	[A/C]	I	20
NCSB_004900	[A/T]	I	20
NCSB_004903	[T/G]	I	20

10

20

【実施例 4】

【0098】

KASPar (商標) アッセイの開発

24個の親株における79個のSNPマーカーの初期スクリーニングを、KASPar (商標) 遺伝子型決定アッセイを使用して実施した。75個のSNPマーカーを確認した。

【0099】

LG G (Gm18) において21個のSNPマーカーを確認した。NCSB__004072、BARC__015277__01929、NCSB__004073、NCSB__004074、NCSB__004075、NCSB__004076、NCSB__004077、NCSB__004078、NCSB__004079、NCSB__004080、NCSB__004081、NCSB__004082、NCSB__004083、NCSB__004084、NCSB__004085、NCSB__004086、NCSB__004097、NCSB__004098、NCSB__004107、NCSB__004108、およびNCSB__004109。

30

【0100】

LG A2 (Gm08) において12個のSNPマーカーを確認した。BARC__025911__05089、BARC__019419__02921、NCSB__001710、NCSB__001711、NCSB__001712、NCSB__001713、NCSB__001714、NCSB__001715、NCSB__001716、NCSB__001717、NCSB__001718、およびNCSB__001719。

40

【0101】

LG B1 (Gm11) において22個のSNPマーカーを確認した。NCSB__002644、NCSB__002645、NCSB__002646、NCSB__002647、NCSB__002648、NCSB__002649、NCSB__002650、NCSB__002651、NCSB__002652、NCSB__002653、NCSB__002654、NCSB__002655、NCSB__002656、NCSB__002657、BARC__007704__00091、BARC__010269__00537、BAR

50

C__904050__01007、BARC__019557__03202、BARC__018649__03221、BARC__025703__04999、BARC__013547__01157、およびBARC__035379__07178。

【0102】

LG I (Gm20)において20個のSNPマーカを確認した。NC SB__004974、NC SB__004975、NC SB__004977、NC SB__004979、NC SB__004882、NC SB__004883、NC SB__004884、NC SB__004886、NC SB__004887、NC SB__004889、NC SB__004880、NC SB__004882、NC SB__004883、NC SB__004884、NC SB__004885、NC SB__004887、NC SB__004888、NC SB__004899、NC SB__004900、およびNC SB__004903。

10

【0103】

初期スクリーニングは、24個の親株間で44個のSNPマーカを多型として同定した。SCN耐性ダイズ品種98860-71とSCN感受性ダイズ品種75213および6CH026-035の交配によって生じたマッピング集団に関するさらなる連鎖試験用に、24個の多型マーカ(NC SB__001716 (LG A₂)、NC SB__002645 (B₁)、NC SB__002646 (B₁)、NC SB__002648 (B₁)、NC SB__002651 (B₁)、NC SB__002652 (B₁)、NC SB__002654 (B₁)、NC SB__002656 (B₁)、BARC__013547__01157 (B₁)、NC SB__004073 (G)、NC SB__004074 (G)、NC SB__004078 (G)、NC SB__004080 (G)、NC SB__004084 (G)、NC SB__004085 (G)、NC SB__004097 (G)、NC SB__004109 (G)、BARC__012237__01755 (G)、rgh1-689 (G)、rgh1-757 (G)、rgh1-2564 (G)、rgh1-3995 (G)、およびNC SB__004900 (I))を選択した。図7は、4個の多型マーカに関するKASPar (商標) アッセイからの、代表的な遺伝子型決定データを示す。

20

【0104】

SCN耐性親と感受性親の間で15個のSNPマーカが多型であった。これらの15個の多型SNPマーカは、マッピング集団中の93の個体に対して後にスクリーニングした。

30

【0105】

マッピング集団の個体に対して試験した親株間で、多型であった15個のSNPマーカの中で、3個のSNP、NC SB__004074、BARC__010889__01691、およびrgh1-3995のみがSCN耐性形質との同時分離を示した。図8。これら3個のマーカに関して個体の遺伝子型を決定するのに使用したKASPar (商標) プライマー配列は、表3中に列挙する。

【0106】

【表 3】

表3:SNPマーカーのKASPar(商標)プライマー配列

rhg1-3995A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGAATTATGTTGGGTTTTT TTTCTTTCTGT (配列番号1)
rhg1-3995A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAATTATGTTGGGTTTTT TTTCTTTCTGG (配列番号2)
rhg1-3995C1	GCCCAGAAAAAAGGGATAAATAACGGATA (配列番号3)
NCSB_004074A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATTATGTTGTAACACAAA TTTGACCTCAT (配列番号4)
NCSB_004074A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGTTGTAACACAAATT GCACCTCAG (配列番号5)
NCSB_004074C1	CTATACTAAATCGTAATTCATTGTAT (配列番号6)
BARC_010889-01 691A1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAAAAAATAAAATTGATC ATCACATATGGTTAG (配列番号7)
BARC_010889-01 691A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAAAAAATAAAATTGATC ATCACATATGGTTAA (配列番号8)
BARC_010889-01 691C1	TAAGTGAGGGCAATGTATTAGTATYAAGTA (配列番号9)

10

20

【0107】

参照としてダイズ栽培種Williams 82のゲノム核酸配列を使用すると、BARC_010889_01691は1,674,511塩基対で第18染色体上に位置し、NCSB_004074は1,663,671塩基対で第18染色体上に位置し、rhg1-3995は1,714,741塩基対で第18染色体上に位置する。3個の連鎖マーカー(NCSB_004074、BARC_010889_01691、およびrhg1-3995)は全て、rhg1遺伝子座内(rhg1-3995)、または連鎖群Gにおいてその近辺(BARC_010889_01691およびNCSB_004074)のいずれかに位置する。

30

【0108】

耐性および中程度の耐性の表現型に関して、3個の連鎖マーカー全ての遺伝子型が表現型と一致した。感受性株に関しては、BARC_010889_01691は表現型と5つのミスマッチがあり、NCSB_004074は9つのミスマッチがあり、rhg1-3995は6つのミスマッチがあった。表4参照。

【0109】

【表 4 - 1】

表4:2つのマッピング集団および3つの親由来の93株の表現型スコアと遺伝子型スコアの比較。R=耐性;MR=中程度の耐性;S=感受性;MS=中程度の感受性;およびX=不一致。

サンプル	SCN耐性	SCNスコア	rhg1_3995	NCSB_004074	BARC_010889_01691
40779	R	1.00	C:C	A:A	T:T
40785	R	1.60	C:C	A:A	T:T
29110	R	2.30	C:C	A:A	T:T
40780	R	2.30	C:C	A:A	T:T
29148	R	2.50	C:C	A:A	T:T
40781	R	2.50	C:C	A:A	T:T
40799	R	2.50	C:C	A:A	T:T
29226	R	3.10	C:C	A:A	T:T
40910	R	4.00	C:C	A:A	T:T
29040	R	4.10	C:A	A:A	T:T
40908	R	4.50	C:C	A:A	T:T
19152	R	4.70	C:C	A:A	T:T
29149	R	4.80	C:C	A:A	T:T
29023	R	5.60	C:C	A:A	T:T
40907	R	5.80	C:C	A:A	T:T
40959	R	6.10	C:C	A:A	T:T
29181	R	6.50	C:C	A:A	T:T
29151	R	6.60	C:C	A:A	T:T
19209	R	6.90	C:C	A:A	T:T
40989	R	7.10	C:C	A:A	T:T
29189	R	7.60	C:C	A:A	T:T
21692	R	8.30	C:C	A:A	T:T
29089	R	8.80	C:C	A:A	T:T
21553	R	9.00	C:C	A:A	T:T
40833	R	9.20	C:C	A:A	T:T
21642	R	9.60	C:C	A:A	T:T
29228	R	9.70	C:C	A:A	T:T
40957	R	9.80	C:C	A:A	T:T
29191	MR	10.2	C:C	A:A	T:T
40935	MR	10.7	C:C	A:A	T:T
98860-71(P1-R)	R/MR	11.3	C:C	A:A	T:T
21648	R/MR	11.8	C:C	A:A	T:T
19155	MR	12.4	C:C	A:A	T:T
40808	MR	12.6	C:C	A:A	T:T
40940	MR	13.0	C:C	A:A	T:T
40831	MR	13.7	C:C	A:A	T:T
40932	MR	14.5	C:C	A:A	T:T
29180	MR	16.9	C:C	A:A	T:T

10

20

30

【表 4 - 2】

サンプル	SCN耐性	SCNスコア	rhg1_3995	NCSB_004074	BARC_010889_01691
40937	MR	17.9	C:C	A:A	T:T
40958	MR	19.6	C:C	A:A	T:T
40936	MR	21.5	C:C	A:A	T:T
41022	X	22.7	C:C	A:A	T:T
19182	MR	23.3	C:C	A:A	T:T
40810	X	27.5	C:C	A:A	T:T
41015	X	27.6	C:C	A:A	T:T
29039	MS	31.70	A:A	C:C	C:C
29212	MS	37.50	C:C	A:A	T:T
40905	X	39.70	A:A	A:A	C:C
40834	X	46.50	A:A	C:C	C:C
40906	MS	46.60	A:A	A:A	C:C
41016	MS	46.80	A:A	C:C	C:C
29179	MS	48.10	A:A	C:C	C:C
29119	MS	59.50	A:A	C:C	C:C
29021	MS	59.80	A:A	C:C	C:C
29142	S	61.90	A:A	C:C	C:C
40939	S	66.40	A:A	C:C	C:C
41026	S	67.90	C:C	C:C	C:C
40909	S	68.90	A:A	C:C	C:C
29150	S	70.60	A:A	C:C	C:C
40942	S	71.20	A:A	A:A	C:C
40711	S	71.50	C:C	A:A	T:T
40931	S	73.80	A:A	C:C	C:C
21633	S	75.00	C:C	A:A	T:T
29190	S	79.70	A:A	C:C	C:C
29229	S	79.90	A:A	C:C	C:C
40938	S	80.10	A:A	C:C	C:C
40873	X	81.50	C:C	A:A	T:T
29222	S	81.90	A:A	C:C	C:C
40941	S	84.00	A:A	C:C	C:C
40934	S	85.70	A:A	C:C	C:C
29376	S	88.90	A:A	C:C	C:C
75213(P2-S)	S	88.90	A:A	C:C	C:C
40990	S	90.10	A:A	C:C	C:C
29224	S	90.60	A:A	C:C	C:C
29399	S	93.50	A:A	C:C	C:C
40798	X	96.40	A:A	A:A	C:C
21693	X	98.00	A:A	C:C	C:C
21684	X	98.10	A:A	C:C	C:C
6CH026-035(P3-S)	S	101.20	A:A	C:C	C:C

10

20

30

【表 4 - 3】

サンプル	SCN耐性	SCNスコア	rhg1_3995	NCSB_004074	BARC_010889_01691
41014	S	109.40	A:A	C:C	C:C
41027	S	125.60	A:A	C:C	C:C
29514	S	130.00	A:A	C:C	C:C
21688	S	133.90	A:A	C:C	C:C
40992	S	134.40	A:A	C:C	C:C
21700	S	134.60	A:A	C:C	C:C
40991	S	138.80	A:A	C:C	C:C
40782	S	147.00	A:A	C:C	C:C
29639	S	163.20	A:A	C:C	C:C
40783	S	178.20	C:C	A:A	T:T
40778	S	187.40	A:A	C:C	C:C
21683	S	204.40	A:A	C:C	C:C
40809	S	207.70	A:A	C:C	C:C
40835	S	212.90	A:A	C:C	C:C
40832	S	215.20	A:A	C:C	C:C
21694	S	254.90	A:A	C:C	C:C
21698	S	380.00	A:A	C:C	C:C

10

20

【 0 1 1 0 】

本発明者らが、これら 3 個の S N P マーカーを用いて任意の感受性遺伝子型を同定した後、偽陰性率は 0 % である。言い換えると、本発明者らは、3 個のマーカーを使用して、S C N 感受性表現型を完璧な精度で同定することができる。本発明者らは、約 1 0 ~ 1 8 % の「偽陽性」率で S C N 耐性遺伝子型を予測することもできる (5 1、感受性サンプルの合計数割る 5 または 9)。したがって、同定された S C N 耐性遺伝子型の中で、それらの 5 ~ 9 % のみが S C N 感受性表現型を示すと予想される。

30

【実施例 5】

【 0 1 1 1 】

S C N 耐性表現型と連鎖した L G A₂、L G B₁、および L G I における S N P マーカー

連鎖群 A₂、B₁、および I における S C N 耐性と関連がある Q T L 間隔の内部、その近辺、またはその間に物理的に位置する S N P マーカーに関して、B L A S T (商標) を使用してダイズゲノムを検索する。S N P マーカーの一覧は B L A S T (商標) 検索によって作製する。複数の S N P マーカーを、S C N 感受性および S C N 耐性ダイズ株を使用する初期スクリーニング用に選択して、存在する場合、連鎖群 A₂、B₁、および I におけるこれらの S N P マーカーのどれが S C N 耐性表現型と連鎖しているかを決定する。

40

【 0 1 1 2 】

親株において選択した S N P マーカーの初期スクリーニングを、K A S P a r (商標) 遺伝子型決定アッセイを使用して実施する。一組の選択した S N P マーカーを確認し、その部分集合は親株間の多型として同定する。多型 S N P マーカーの少なくとも 1 つを、S C N 耐性ダイズ品種と 1 つまたは複数の S C N 感受性ダイズ品種の交配によって生じたマッピング集団に関する連鎖試験用に使用する。1 つまたは複数のこれらの多型 S N P マーカーは、マッピング集団中の個体に対してスクリーニングする。

【 0 1 1 3 】

50

マッピング集団の個体においてSCN耐性形質と同時分離するSNPは、SCN耐性親品種においてSCN耐性と連鎖する連鎖群A₂、B₁、およびIにおけるマーカーとして同定する。連鎖マーカーの遺伝子型は、マッピング集団の個体において観察される表現型と一致する。

【実施例6】

【0114】

生殖質JTN-5109におけるSCN耐性表現型と連鎖したSNPマーカー

SCN耐性と関連があるQTL間隔の内部、その近辺、またはその間に物理的に位置する複数のSNPマーカー（例えば、表3中に列挙するマーカーの群から選択されるSNPマーカー）を、SCN耐性ダイズ品種JTN-5109とSCN感受性ダイズ株を使用する初期スクリーニング用に選択して、存在する場合、これらのSNPマーカーのどれがダイズ品種JTN-5109においてSCN耐性表現型と連鎖しているかを決定する。

10

【0115】

親株において選択したSNPマーカーの初期スクリーニングを、KASPar（商標）遺伝子型決定アッセイを使用して実施する。一組の選択したSNPマーカーを確認し、その部分集合はダイズ品種JTN-5109およびSCN感受性親株間の多型として同定する。多型SNPマーカーの少なくとも1つを、ダイズ品種JTN-5109と1つまたは複数のSCN感受性ダイズ品種の交配によって生じたマッピング集団に関する連鎖試験用に使用する。これらの1つまたは複数の多型SNPマーカーは、マッピング集団中の個体に対してスクリーニングする。

20

【0116】

マッピング集団の個体においてSCN耐性形質と同時分離するSNPは、ダイズ品種JTN-5109においてSCN耐性と連鎖するマーカーとして同定する。連鎖マーカーの遺伝子型は、マッピング集団の個体において観察される表現型と一致する。

【実施例7】

【0117】

レース3以外のHGレースにおけるSCN耐性表現型と連鎖したSNPマーカー

PI88788、Peking、PI437654、PI90763、PI438489B、PI89772、PI209332、PUSCN14、Hartwig、Forrest、およびPyramidからなる群から選択されるSCN耐性ダイズ品種を1つまたは複数のSCN感受性ダイズ品種と交配させることによって、マッピング集団をレース3以外のHGレースに特異的に開発する。

30

【0118】

特異的HGレースに関してSCN耐性と関連があるQTL間隔の内部、その近辺、またはその間に物理的に位置するSNPマーカーに関して、BLAST（商標）を使用してダイズゲノムを検索する。SNPマーカーの一覧はBLAST（商標）検索によって作製する。複数のSNPマーカーを、選択SCN耐性ダイズ品種とSCN感受性品種を使用する初期スクリーニング用に選択して、存在する場合、特異的HGレースに関して、これらのSNPマーカーのどれがSCN耐性表現型と連鎖しているかを決定する。

【0119】

40

親株において選択したSNPマーカーの初期スクリーニングを、KASPar（商標）遺伝子型決定アッセイを使用して実施する。一組の選択したSNPマーカーを確認し、その部分集合は親株間の多型として同定する。多型SNPマーカーの少なくとも1つを、選択したSCN耐性ダイズ品種と1つまたは複数のSCN感受性ダイズ品種の交配によって生じたマッピング集団に関する連鎖試験用に使用する。これらの1つまたは複数の多型SNPマーカーは、マッピング集団中の個体に対してスクリーニングする。

【0120】

マッピング集団の個体においてSCN耐性形質と同時分離するSNPは、特異的HGレースに関してSCN耐性親品種において、SCN耐性と連鎖するマーカーとして同定する。連鎖マーカーの遺伝子型は、マッピング集団の個体において観察される表現型と一致す

50

【図 1 b】

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

【 図 4 】

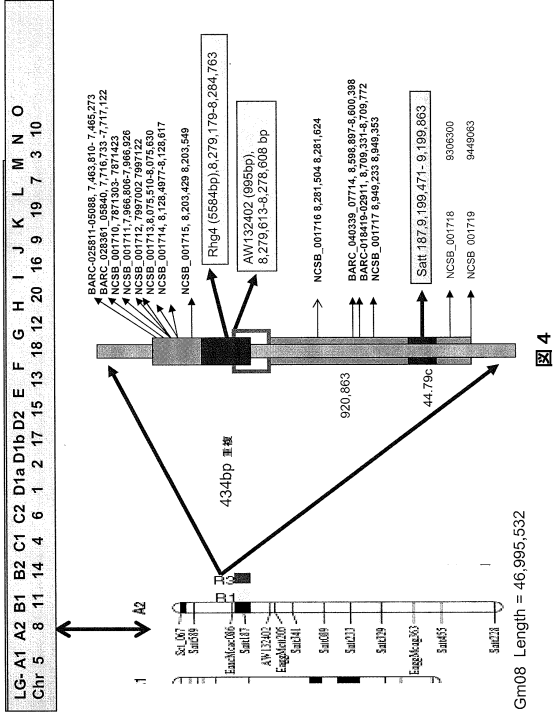


図 4

【 図 5 】

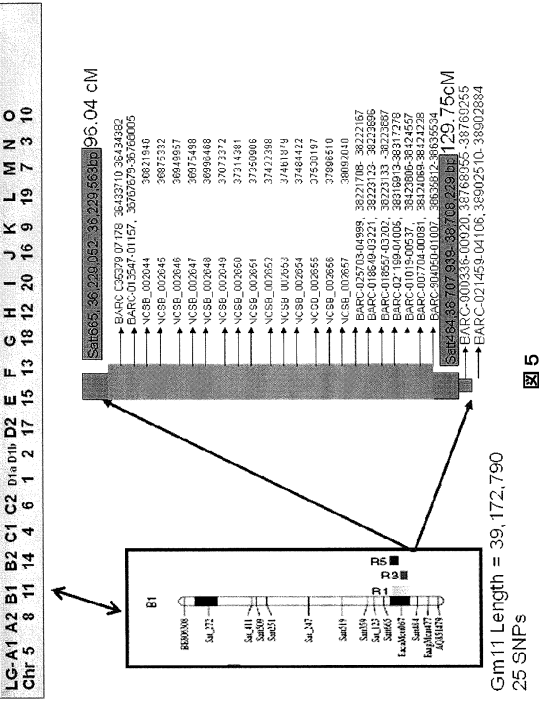
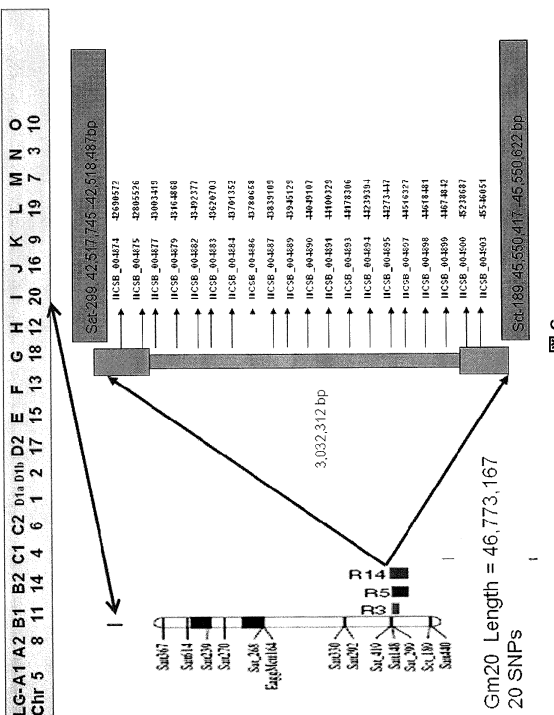


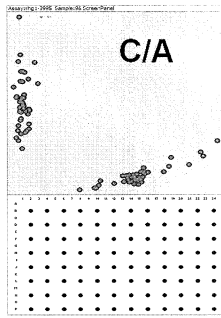
図 5

【 図 6 】

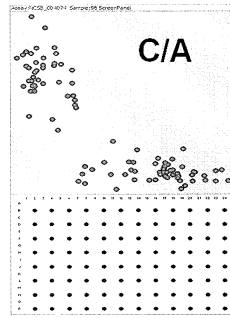


【図 8】

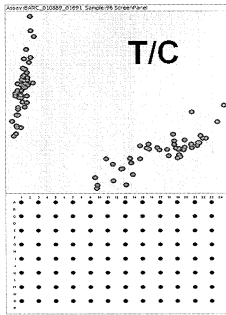
図 8 rhg1_3995



NCSB_004074



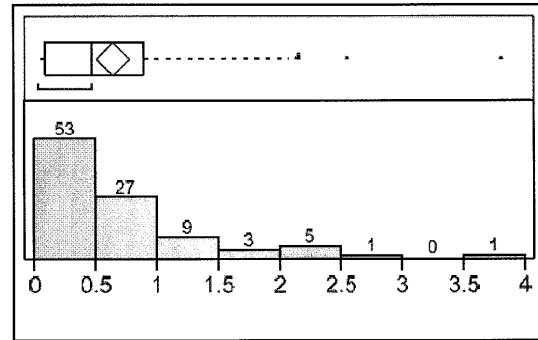
BARC_010889_01691



LG G (Gm 18)

【図 9】

図 9



【配列表】

0006168993000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 バイ, ヨンエ
アメリカ合衆国 インディアナ州 46074, ウェストフィールド, ファーレル ドライブ 3
222
- (72)発明者 ル, ファンゲ
アメリカ合衆国 インディアナ州 46074, ウェストフィールド, バーリングラム ブルーバー
ド 3442
- (72)発明者 グリーン, トーマス, ダブリュー.
アメリカ合衆国 アイオワ州 50266, ウェスト デモイン, グレン オークス ポアント
5535
- (72)発明者 ムーア, ロバート イー., ジュニア
アメリカ合衆国 イリノイ州 60936, ギブソン シティ, グレイ ドライブ 510
- (72)発明者 ヘッジズ, ブラッドリー
カナダ国, オンタリオ州 エヌ9ワイ 1シー4, キングスヴィレ, オーガスティン ドライブ
93
- (72)発明者 カンパトラ, スィバ ビー.
アメリカ合衆国 インディアナ州 46032, カーマル, ボールドウィン ルン 14524
- (72)発明者 ラム, ラーガブ
アメリカ合衆国 インディアナ州 46032, カーマル, シェイズ コート 390

審査官 伊達 利奈

- (56)参考文献 国際公開第2009/048847(WO, A1)
米国特許第07485770(US, B1)
Ying-Hui Li, et al, Mol Breeding, 2009年, Vol.24, p.63-76

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/00
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
PubMed