

(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 1

C 12 Q 1/68 (2006.01)
A 01 H 1/00 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)

C 12 Q 1/68 Z N A A
A 01 H 1/00 Z
C 12 N 15/09 A

請求項の数 18 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2013-537791 (P2013-537791)
(86) (22) 出願日 平成23年11月2日 (2011.11.2)
(65) 公表番号 特表2014-500010 (P2014-500010A)
(43) 公表日 平成26年1月9日 (2014.1.9)
(86) 國際出願番号 PCT/US2011/058986
(87) 國際公開番号 WO2012/061513
(87) 國際公開日 平成24年5月10日 (2012.5.10)
審査請求日 平成26年10月28日 (2014.10.28)
(31) 優先権主張番号 61/410,783
(32) 優先日 平成22年11月5日 (2010.11.5)
(33) 優先権主張国 米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 597089200
アグリジェネティクス、インコーポレイテッド
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 9
330
(74) 代理人 100092783
弁理士 小林 浩
(74) 代理人 100120134
弁理士 大森 規雄
(74) 代理人 100126354
弁理士 藤田 尚
(74) 代理人 100104282
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 6 1 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。

【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98860-71のダイズ植物である、請求項6に記載の方法。 20

【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。 30

【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DNAをドナーの遺伝子型により分析し、そして、第2の植物のDNA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98860-71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DNA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 D N A 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 D N A 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 D N A 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 1 6】

D N A 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 1 5 に記載の方法。

10

【請求項 1 7】

宿主生物がマメ科植物である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

宿主生物がダイズ、緑莢インゲン、サヤインゲン、ドライビーンズ、赤インゲン豆、ライマメ、リヨクトウ、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 1 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

優先権主張

20

本出願は、2010年11月5日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 4 1 0 , 7 8 3 号の利益を主張するものである。

【0 0 0 2】

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】

30

【0 0 0 3】

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纖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。1 0 , 0 0 0 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。

【0 0 0 4】

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) (H G) イチノヘ (Ichinohe)) は、米国中、および世界の大部分の他のダイズ生産上位国中で、ダイズに影響を及ぼす 1 つの最も有害な害虫である。2 0 0 3 年と 2 0 0 4 年の米国内の推定収穫高減は約 2 9 0 万トン～ 3 4 0 万トンであり、これは約 1 5 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。

【0 0 0 5】

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

50

は S C N 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。S C N の成体メスおよび囊子は約 1 / 3 2 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 S C N の成体メスおよび囊子の観察は、野外で S C N 感染を検出し診断するための唯一の正確な方法である。

【 0 0 0 6 】

S C N の存在は、最初の土壤侵入時に通常明らかではない。S C N 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、土壤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 S C N 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 S C N の主な宿主であるが、他のマメ科植物、例えば、緑莢インゲン、サヤインゲン、ドライビーンズ、赤インゲン豆、ライマメ、リヨクトウ、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。S C N のライフサイクルは 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 S C N の卵は、孵化前の数年間、土壤中で完全な状態であり得る。

10

【 0 0 0 7 】

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 S C N 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、S C N 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 S C N 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 S C N 集団の能力に関する情報を共有して、S C N に対する耐性用の特定遺伝子を含有するダイズ品種を繁殖させるのを可能にした。

20

【 0 0 0 8 】

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壤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 S C N 集団の構築を遅らせることが重要である。

30

【 0 0 0 9 】

米国内での S C N の発見直後、S C N 耐性源が同定された。Ross and Brim (1957) Plant Dis. Rep. 41: 923-4。Peiking および PI 88788 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、Peiking は耐性源として広く使用されるようになり、Pickett は最初の S C N 耐性栽培種として発表された。特定 S C N 耐性集団は耐性栽培種に優り得るという認識が、追加の S C N 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）囊子の指数を有していたが、PI 88788 はレース 3 および 4 耐性の一般的な供給源として現れ、Peiking 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。PI 437654 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 S C N 耐性は Forrest に戻し交配された。現在、S C N 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。PI 209332 および PI 90763 は、他の例示的な S C N 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 S C N に対して同様に応答するわけでもない。

40

【 0 0 1 0 】

耐性ダイズ品種は、S C N の管理に利用可能な最有効ツールである。S C N 密度は耐性ダイズが成長すると通常低下する。大部分の S C N 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

50

、いくらかの S C N 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 S C N 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、S C N 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、S C N 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 S C N 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壤中の他の S C N 幼若虫と食物に関してうまく競合しないからである。

【0011】

S C N 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。Pecking と P I 8 8 7 8 8 の両方が S C N 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 S C N 耐性 Q T L は r h g 1 である。Concibido et al. (1996) Theor. Appl. Genet. 93: 234-41。他の S C N 耐性 Q T L は連鎖群 A 2、C 1、M、D、J、L 2 5、L 2 6、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。S C N 耐性 Q T L は、少なくとも異なる S C N 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 r h g 1 遺伝子座は、任意の同定した S C N 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】

S C N 形質と連鎖したマーカーには R F L P、S S R および S N P がある。本開示中で同定した S N P 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 S C N 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 S C N 遺伝子型決定を実施するための、本開示中の S N P 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 S C N 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】

S C N 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 S C N 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ます。マーカー支援型選択は、S C N 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 S C N 疾患耐性 Q T L 領域内または近辺で同定した 15 個の S N P マーカーの中で、わずか 3 個が S C N 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 S N P マーカーは、S C N 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】

S C N 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 S N P マーカーであってよい。例えば非制限的に、S C N 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 S C N 耐性表現型を導入するため、および S C N 耐性表現型を有し得る植物を栽培するための、S C N 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】

10

20

30

40

50

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。

10

【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。

20

【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。

30

【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】

40

【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 - 3 9 9 5 対立遺伝子に特異的なK Bi 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

50

T G G A A T T A T G T T G G G T T T T T T C T T T C T G T

【0020】

配列番号2は、r h g 1 - 3 9 9 5 対立遺伝子に特異的なKASPar（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 C T T T C T G G

【0021】

配列番号3は、r h g 1 - 3 9 9 5 に関するKASPar（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 G G G A T A A A T A C G G A T A

【0022】

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KASPar（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

【0023】

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KASPar（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

【0024】

配列番号6は、N C S B _ 0 0 4 0 7 4 に関するKASPar（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

【0025】

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KASPar（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

【0026】

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KASPar（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

【0027】

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KASPar（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

【0028】

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 A T T G T A C G A T A A A A A C T A T A A C

【0029】

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 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 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 C A T G G C 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 A A A T G A A A A T C T G T G A T T T G C A T

【0030】

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 G A A C T A A T T T A T A T C A T T T A T C T A

10

20

30

40

50

TTGTGATTGAAATATAAAATTGAAGTGATGTAACAAATAC
 AAATCACATCTTGAATTAAAAATATCTAACAACTGGAACAA
 ATAAGAGGCCAGAAAAAGGGATAAATAACGGATAACAA
 G [A / C] CAGAAAGAAAAACCCAAACATAATTCCAACCTT
 CAAAATTCACTCAATAAAAAGTTAACATGTAAATTACT
 TGGAAACAAACTCATAACCAATAATAATAATAAAAG
 AAATCAGTTTATAGCATTAAATTGGGATGCTCTGCTTGT
 ATGCAAATGGCACACCTTACCCCTCAAGATTGCAAAACAC
 AGATGAGTAACAGATGCAATGTGAATCAATAAAAGTATT
 GTTGC GTT GTT GATGACACACCTTACTCATAAAAATGC 10
 AT

【0031】

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提供する。本明細書中に記載する3個の例示的なSNPマーカーを使用し、K Biосciences競合的対立遺伝子特異的PCR-SNP遺伝子型決定システム (KASP ar (商標)) を使用する特異的アッセイを開発して、SCN耐性形質を有する植物を迅速かつ正確に同定した。SCN耐性と連鎖した3個の例示的なSNPマーカーに関して本発明の実施形態を記載するが、当業者は、本明細書中に記載する技法を使用して、追加の同等なマーカーを同定することができることを理解するであろう。SCN耐性と連鎖したSNPマーカーを、例えばSCN遺伝子型決定において使用して、ダイズ品種改良集団からSCN耐性個体を選択することができる。

【0032】

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。

【0033】

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。

【0034】

【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 (Rhgl)、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 (Rhgl)
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

30

40

【0035】

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。

【0036】

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ールでは、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的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。

【0037】

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 K A S P a r (商標) アッセイは、(例えば、K B i o s c i e n c e s のウェブサイトにおいてインターネット経由で無料で利用可能な、P r i m e r P i c k e r (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、マイクロタイプレートにおけるD N A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 F A M および V I C 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 S N P 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、K A S P a r システムに関する一層の技術情報は、K B i o s c i e n c e s L t d . (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と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と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 M b 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 M b、2.00 M b、約 1.95 M b、約 1.90 M b、約 1.85 M b、約 1.80 M b、約 1.75 M b、約 1.70 M b、約 1.65 M b、約 1.60 M b、約 1.55 M b、約 1.50 M b、約 1.45 M b、約 1.40 M b、約 1.35 M b、約 1.30 M b、約 1.25 M b、約 1.20 M b、約 1.15 M b、約 1.10 M b、約 1.05 M b、約 1.00 M b、約 0.95 M b、約 0.90 M b、約 0.85 M b、約 0.80 M b、約 0.75 M b、約 0.70 M b、約 0.65 M b、約 0.60 M b、約 0.55 M b、約 0.50 M b、約 0.45 M b、約 0.40 M b、約 0.35 M b、約 0.30 M b、約 0.25 M b、約 0.20 M b、約 0.15 M b、約 0.10 M b、約 0.05 M b、約 0.025 M b、および約 0.01 M b 離れている可能性がある。ダイズにおける S C N 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 染色体上のス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 M b 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 M b、約 0.55 M b、0.5 M b、約 0.45 M b、約 0.4 M b、約 0.35 M b、約 0.3 M b、約 0.25 M b、約 0.2 M b、約 0.15 M b、約 0.1 M b、および約 0.05 M b 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 1.0 M b 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 1.25 M b、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、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 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。

10

【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は、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」）であつてよい。「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。

20

【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、r h g 1 - 3 9 9 5、B A R C _ 0 1 0 8 8 9 _ 0 1 6 9 1、またはN C S B _ 0 0 4 0 7 4 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、r h g 1 - 3 9 9 5、B A R C _ 0 1 0 8 8 9 _ 0 1 6 9 1、またはN C S B _ 0 0 4 0 7 4 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。

30

【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分子であつてよい。RNAプローブは、当技術分野で知られている手段、例えばDNA分子錆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。

40

【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つてよい。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、

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、F A M およびV I C ）、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.USA80: 4045-9を参照。

【 0 0 4 9 】

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、S C N 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5 0 0 k b、4 5 0 k b、4 0 0 k b、3 5 0 k b、3 0 0 k b、2 5 0 k b、2 0 0 k b、1 5 0 k b、1 2 5 k b、1 0 0 k b、0 . 9 k b、0 . 8 k b、0 . 7 k b、0 . 6 k b、0 . 5 k b、0 . 4 k b、0 . 3 k b、0 . 2 k b、または0 . 1 k b 以内に位置する。

10

【 0 0 5 0 】

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D N A 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、8 5 %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8 5 . 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %または9 9 . 5 %同一であってよい。

20

【 0 0 5 1 】

プローブは、検出するマーカーの正確なコピー（「D N A 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D N A 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1 0 0 %相補的である必要はない。特異的結合が望ましい条件下、例えばストリンジェント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。

30

【 0 0 5 2 】

個々の程度のストリンジェ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ーのイオン強度（特にN a + および / またはM g + + 濃度）がハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定するが、洗浄時間もストリンジェンシーに影響を与える。個々の程度のストリンジェンシーを得るため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, 2nded., 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, Chapter2, Elsevier, NY, 1993; およびAusubel et al., Eds., Current Protocols in Molecular Biology, Chapter2, Greene Publishing

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「ストリンジエントな条件」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。「ストリンジエントな条件」は、特定レベルのストリンジエンシーをさらに含む。したがって、本明細書中で使用する「適度なストリンジエンシー」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、「高いストリンジエンシー」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エンシー」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エンシー。16時間65において5×SSCバッファー中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)高いストリンジエンシー。16~20時間65~70において5×~6×SSCバッファー中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)適度なストリンジエンシー。16~20時間室温~55において6×SSCバッファー中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ーの使用は、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ー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ー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。

【0061】

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

【0062】

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。

【0063】

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

【0064】

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

【0065】

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

【0066】

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。

【0067】

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)中の一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。

【0068】

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。

【0069】

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。

【0070】

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。

【0071】

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、WO2001051627A2、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。 10

【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。 20

【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。 30

【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。 40

【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 50

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、多型マークは、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マークは、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マークの検出に使用する、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を利用して、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ク支援型選択のため、遺伝子型を区別するのに利用することができる。

【0077】

プライマー設計および連鎖のスクリーニング。

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クを特異的に検出することができる。一般に、マークの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マークを検出する。当業者によって理解されるように、個々のマーク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、プローブをマークの1対立遺伝子に非特異的にせずに、確立した原理に従い変えることができる。

【0078】

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クを検出するための、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クを検出するための、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ことができ、マーク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】

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ク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ク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ことができ、マーク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。

10

20

30

40

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 9 8 8 6 0 - 7 1 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 9 8 8 6 0 - 7 1 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 9 8 8 6 0 - 7 1 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 D N A のセグメント（複数可）を移動させることができる。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、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。

【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。

【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。

10

20

30

40

50

【0088】

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、SCN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、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1つまたは複数のプローブと、次いで接触させることができる。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SCN耐性の1つまたは複数の決定因子の存在を示す。

10

【0089】

いくつかの実施形態では、SCN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SCN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SCN HG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SCN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SCN HGレースに関してSCN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）

【0090】

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】

【0091】

材料および方法

24個のダイズ栽培種およびSCNマッピング親を使用して、SCN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、Williams 82、75213、および6CH026-035がSCN感受性であった。10の栽培種、Maverick、Peking、PI 209332、PI 437654、99811、99294、Forrest、PI 88788、PI 437654、および98860-71がSCN耐性であった。

30

【0092】

SCNバイオアッセイ：SCNバイオアッセイを実施して、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「SCNスコア」の点で分類した。SCNスコア0~10=R（耐性）、SCNスコア10.1~29.9=MR（中程度の耐性）、SCN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、SCN指數値を測定した。指數スコアは、サンプルに関して観察したSCN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の囊子を有し、Williams（感受性）が9植物の各々において100の囊子を有した場合、試験株は10%の指數で分類した。最終指數は9植物のスコアの平均であった。

40

【0093】

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Primer Picker（商標）ツールを使用してKASPar

50

a r (商標) プライマーを設計した。3つのプライマー、A 1 (対立遺伝子特異的プライマー-1)、A 2 (対立遺伝子特異的プライマー-2)、およびC (一般的なリバースプライマー)を、K A S P a r (商標) の化学的性質に基づき各々のS N P配列用に設計した。各K A S P a r (商標) 反応のアッセイ混合物は、K A S P a r (商標) S N P遺伝子型決定システムv 2 . 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D N A鑄型 (5 ng / μ L)、2 . 5 μ Lの2 \times 反応混合物、0 . 0 6 8 7 5 μ Lのアッセイ混合物、0 . 0 4 μ Lの5 0 mM Mg C l₂、および1 . 3 9 1 2 5 μ Lのd d H₂Oを含んでいた。アッセイは3 8 4 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。9 4 で1 5 分間、2 0 サイクルの9 4 で1 0 秒間、5 7 で5 秒間、および7 2 で1 0 秒間、ならびに2 2 サイクルの9 4 で1 0 秒間、5 7 で2 0 秒間、および7 2 で4 0 秒間。P C R用プレートを遠心分離し、対立遺伝子特異的F A MとV I Cの強度を室温において分光蛍光計 (T e c a n G E N i o s (商標)、M a n n e d o r f、スイス)で読み取った。データは直接ロードし、K l u s t e r C a l l e r (商標)を使用してK L I M S (商標)で分析した。 10

【実施例2】

【0 0 9 4】

S C N耐性遺伝子と連鎖したQ T LおよびQ T L間隔の物理的位置の同定

S C N耐性に関するQ T Lを、S C Nに関する文献を研究することにより初期に同定した。S C Nに関する文献中に見られる初期に同定したS C N関連Q T Lは、図1 a、図1 a - 1、図1 b及び図1 b - 1 (図1 a - 1は図1 aの続き、図1 b - 1は図1 bの続き)中に列挙する。 20

【0 0 9 5】

S C Nに関する文献中で初期に同定されたQ T Lの一覧から、異なるS C Nレースに対する耐性に関するいくつかの異なるQ T L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 (L G) GにおけるQ T L間隔を決定し、図4中に示すようにL G A₂におけるQ T L間隔を決定し、図5中に示すようにL G B₁におけるQ T L間隔を決定し、図6中に示すようにL G IにおけるQ T L間隔を決定した。表2は、異なるS C Nレースに対する耐性に関する、例示的Q T Lおよびそれらの対応する決定したQ T L間隔を列挙する。 30

【実施例3】

【0 0 9 6】

S C N耐性遺伝子と連鎖したQ T LおよびQ T L間隔の内部/近辺/間に物理的に位置するS N Pマーカーの同定

決定した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した。これらのS N Pマーカーのいくつかは、S C N耐性表現型と連鎖している可能性があると仮定した。合計7 9個のS N Pマーカーを、2 4個のダイズ株 (1 4のS C N感受性と1 0のS C N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した。7 9個のマーカーの2 5個がL G Gに位置し、マーカーの1 2個がL G A₂に位置し、マーカーの2 2個がL G B₁に位置し、マーカーの2 0個がL G Iに位置した。7 9個の選択したマーカーの全てを表2中に列挙する。 40

【0 0 9 7】

【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】

～～～～	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
rhg1_2564	[G/-]	G	18
rhg1_3995	[A/C]	G	18
rhg1_689	[A/C]	G	18
rhg1_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】

マークー	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】

K A S P a r (商標) アッセイの開発

24個の親株における79個のSNPマーク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した。75個のSNPマークーを確認した。

【0099】

L G G (Gm18)において21個のSNPマークーを確認した。NCSB_004072、B A R C_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】

L G A 2 (Gm08)において12個のSNPマークーを確認した。B A R C_025911_05089、B A R C_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】

L G B 1 (Gm11)において22個のSNPマークーを確認した。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、B A R C_007704_00091、B A R C_010269_00537、B A R

50

C_904050_01007、B A R C_019557_03202、B A R C_018649_03221、B A R C_025703_04999、B A R C_013547_01157、およびB A R C_035379_07178。

【0102】

L G_I (Gm 20)において20個のS N Pマークーを確認した。N C S B_004974、N C S B_004975、N C S B_004977、N C S B_004979、N C S B_004882、N C S B_004883、N C S B_004884、N C S B_004886、N C S B_004887、N C S B_004889、N C S B_004880、N C S B_004882、N C S B_004883、N C S B_004884、N C S B_004885、N C S B_004887、N C S B_004888、N C S B_004899、N C S B_004900、およびN C S B_004903。 10

【0103】

初期スクリーニングは、24個の親株間で44個のS N Pマークーを多型として同定した。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6 C H 0 2 6 - 0 3 5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個の多型マークー (N C S B_001716 (L G A₂))、N C S B_002645 (B₁)、N C S B_002646 (B₁)、N C S B_002648 (B₁)、N C S B_002651 (B₁)、N C S B_002652 (B₁)、N C S B_002654 (B₁)、N C S B_002656 (B₁)、B A R C_013547_01157 (B₁)、N C S B_004073 (G)、N C S B_004074 (G)、N C S B_004078 (G)、N C S B_004080 (G)、N C S B_004084 (G)、N C S B_004085 (G)、N C S B_004097 (G)、N C S B_004109 (G)、B A R C_012237_01755 (G)、r g h 1 - 6 8 9 (G)、r g h 1 - 7 5 7 (G)、r g h 1 - 2 5 6 4 (G)、r g h 1 - 3 9 9 5 (G)、およびN C S B_004900 (I))を選択した。図7は、4個の多型マークーに関するK A S P a r (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】

S C N耐性親と感受性親の間で15個のS N Pマークーが多型であった。これらの15個の多型S N Pマークーは、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S N Pマークーの中で、3個のS N P、N C S B_004074、B A R C_010889_01691、およびr h g 1 - 3 9 9 5のみがS C N耐性形質との同時分離を示した。図8。これら3個のマークーに関して個体の遺伝子型を決定するのに使用したK A S P a r (商標) プライマー配列は、表3中に列挙する。

【0106】

【表3】

表3:SNPマークーのKASPar(商標)プライマー配列

rhg1-3995A1	GAAGGTGACCAAGTCATGCTGGAATTATGTTGGGTTTT TTTCTTCTGT (配列番号1)	
rhg1-3995A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAATTATGTTGGGTTTT TTTCTTCTGG (配列番号2)	
rhg1-3995C1	GCCCAGAAAAAAGGGATAAATAACGGATA (配列番号3)	
NCSB_004074A1	GAAGGTGACCAAGTCATGCTATTATGTTGTAACACAAA TTTGCACCTCAT (配列番号4)	10
NCSB_004074A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGTTGTAACACAAATT GCACCTCAG (配列番号5)	
NCSB_004074C1	CTATACAACTAAATCGAATTCCATTGTAT (配列番号6)	
BARC_010889-01 691A1	GAAGGTGACCAAGTCATGCTAAAAAATAAAATTGATC ATCACATATGGTTAG (配列番号7)	
BARC_010889-01 691A2	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAAAAAATAAAATTGATC ATCACATATGGTTAA (配列番号8)	
BARC_010889-01 691C1	TAAGTGAGGGCAATGTATTAGTATYAAAGTA (配列番号9)	20

【0107】

参照としてダイズ栽培種W illiams 82のゲノム核酸配列を使用すると、B A R C_010889_01691は1,674,511塩基対で第18染色体上に位置し、N C S B_004074は1,663,671塩基対で第18染色体上に位置し、r g h 1 - 3 9 9 5は1,714,741塩基対で第18染色体上に位置する。3個の連鎖マークー(N S C B_004074、B A R C_010889_01691、およびr h g 1 - 3 9 9 5)は全て、r h g 1遺伝子座内(r h g 1 - 3 9 9 5)、または連鎖群Gにおいてその近辺(B A R C_010889_01691およびN C S B_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個の連鎖マーク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、B A R C_010889_01691は表現型と5つのミスマッチがあり、N S C B_004074は9つのミスマッチがあり、r h g 1 - 3 9 9 5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_010 889_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_010 889_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_010 889_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

【0110】

本発明者らが、これら3個のSNP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、SCN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10~18%の「偽陽性」率でSCN耐性遺伝子型を予測することもできる(51、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SCN耐性遺伝子型の中で、それらの5~9%のみがSCN感受性表現型を示すと予想される。

【実施例5】

【0111】

SCN耐性表現型と連鎖したLG A₂、LG B₁、およびLG IにおけるSNPマーカー

連鎖群A₂、B₁、およびIにおける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、SCN感受性およびSCN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。

【0112】

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、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。1つまたは複数のこれらの多型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。

【0113】

マッピング集団の個体において S C N 耐性形質と同時分離する S N P は、 S C N 耐性親品種において S C N 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 J T N - 5109 における S C N 耐性表現型と連鎖した S N P マーカー

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複数の S N P 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 S N P マーカー）を、 S C N 耐性ダイズ品種 J T N - 5109 と S C N 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 S N P マーカーのどれがダイズ品種 J T N - 5109 において S C N 耐性表現型と連鎖しているかを決定する。

【0115】

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、その部分集合はダイズ品種 J T N - 5109 および S C N 感受性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、ダイズ品種 J T N - 5109 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。これらの 1 つまたは複数の多型 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。

【0116】

マッピング集団の個体において S C N 耐性形質と同時分離する S N P は、ダイズ品種 J T N - 5109 において S C N 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 H G レースにおける S C N 耐性表現型と連鎖した S N P マーカー

P I 8 8 7 8 8、 P e k i n g、 P I 4 3 7 6 5 4、 P I 9 0 7 6 3、 P I 4 3 8 4 8 9 B、 P I 8 9 7 7 2、 P I 2 0 9 3 3 2、 P U S C N 1 4、 H a r t w i g、 F o r r e s t、 および P y r a m i d からなる群から選択される S C N 耐性ダイズ品種を 1 つまたは複数の S C N 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 H G レースに特異的に開発する。

【0118】

特異的 H G レースに関して 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、選択 S C N 耐性ダイズ品種と S C N 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 H G レースに関して、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。

【0119】

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、選択した 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。これらの 1 つまたは複数の多型 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。

【0120】

マッピング集団の個体において S C N 耐性形質と同時分離する S N P は、特異的 H G レースに関して S C N 耐性親品種において、 S C N 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

10

20

30

40

50

る。

【図 1 a】

1 a

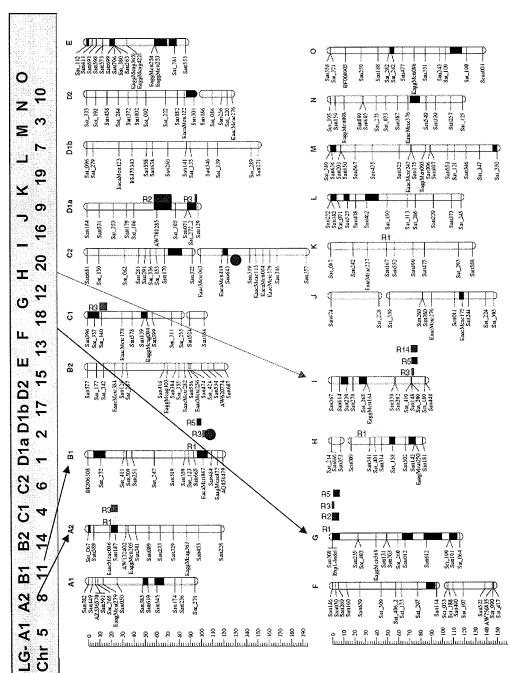
【図1a-1】

図1a-1(図1aの続き)

【図 1 b】

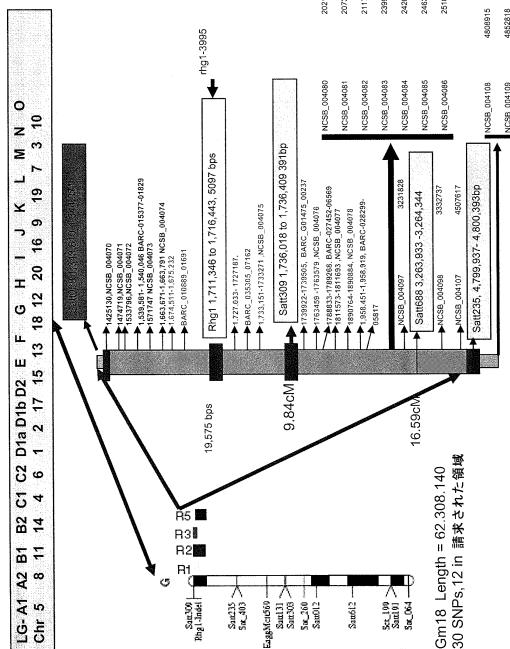
【図1b-1】

【 図 3 】



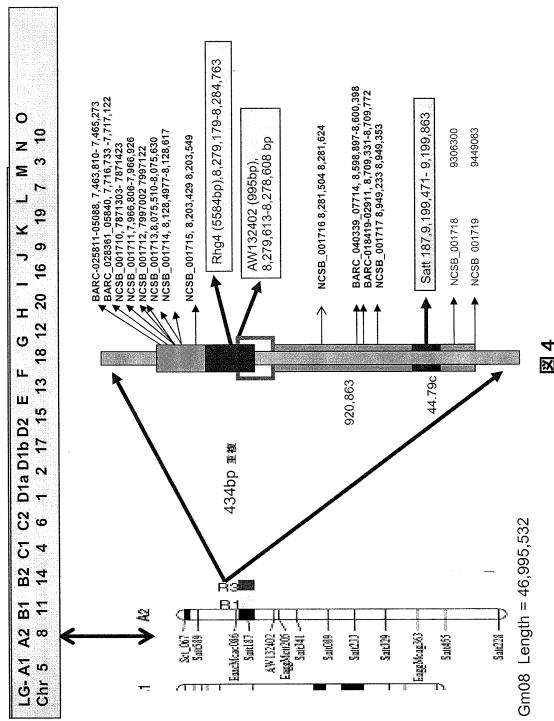
2

1

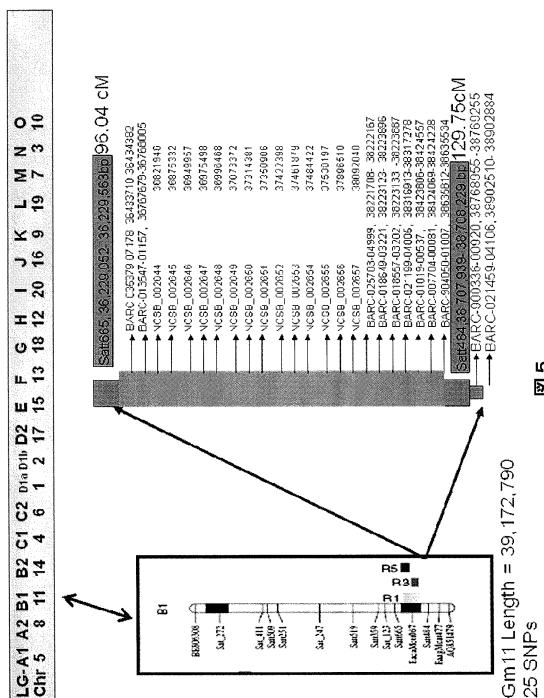


6

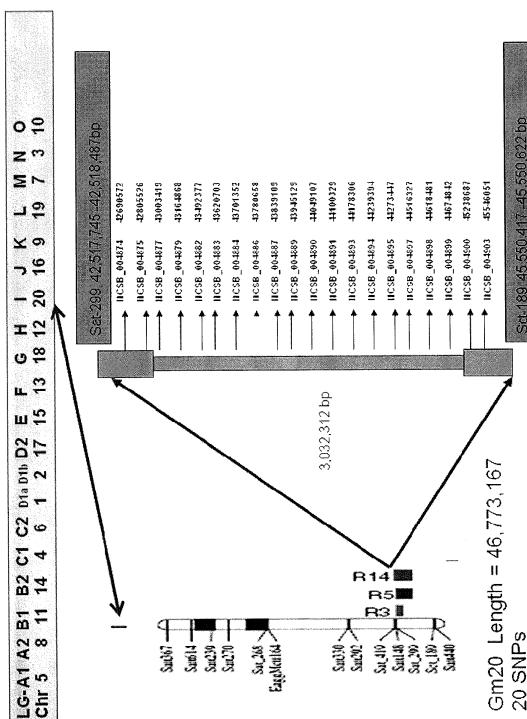
【 図 4 】



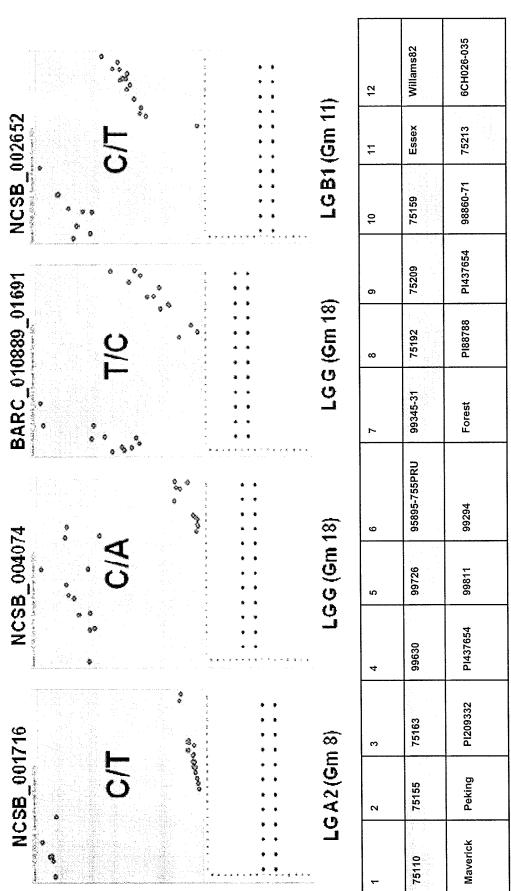
〔 四 5 〕



【 四 6 】

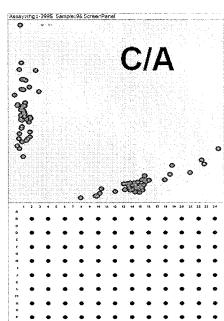


【 四 7 】

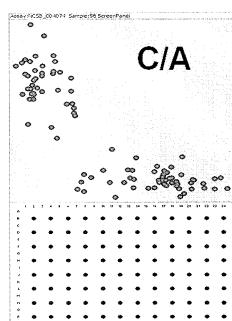


【図8】

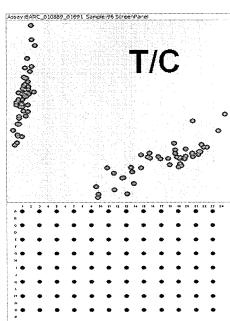
図8 rhg1_3995



NCSB_004074



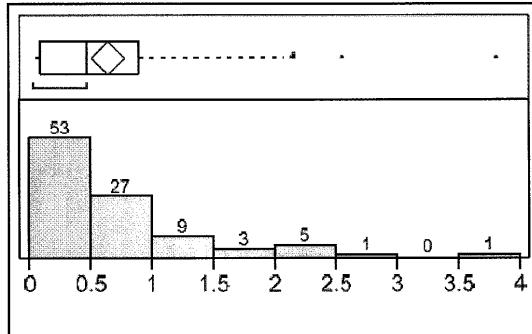
BARC_010889_01691



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, ウエストフィールド, ファーレル ドライブ 3
222
- (72)発明者 ル, ファング
アメリカ合衆国 インディアナ州 46074, ウエストフィールド, バーリンガム 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, ウエスト 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-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 ピー.
アメリカ合衆国 インディアナ州 46032, カーメル、ポールドワイン 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, カーメル, シェイズ コート 390

審査官 伊達 利奈

- (56)参考文献 國際公開第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/GenSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq
PubMed