

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6872307号
(P6872307)

(45) 発行日 令和3年5月19日 (2021.5.19)

(24) 登録日 令和3年4月21日 (2021.4.21)

(51) Int. Cl.	F I
AO 1 H 5/00 (2018.01)	AO 1 H 5/00 Z N A Z
AO 1 H 5/10 (2018.01)	AO 1 H 5/10
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68
AO 1 H 1/00 (2006.01)	AO 1 H 1/00 Z

請求項の数 24 外国語出願 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-36977 (P2015-36977)	(73) 特許権者	500195035
(22) 出願日	平成27年2月26日 (2015.2.26)		セミニス・ベジタブル・シーズ・インコーポレイテッド
(65) 公開番号	特開2015-231359 (P2015-231359A)		Seminis Vegetable Seeds, Inc.
(43) 公開日	平成27年12月24日 (2015.12.24)		アメリカ合衆国63167ミズーリ州セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブルーバード800番
審査請求日	平成30年2月21日 (2018.2.21)	(74) 代理人	100145403
(31) 優先権主張番号	61/945,675		弁理士 山尾 憲人
(32) 優先日	平成26年2月27日 (2014.2.27)	(74) 代理人	100132263
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 江間 晴彦
微生物の受託番号	ATCC PTA-120472		
微生物の受託番号	ATCC PTA-120473		
微生物の受託番号	ATCC PTA-120474		
微生物の受託番号	ATCC PTA-12486		
微生物の受託番号	ATCC PTA-12041		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホウレンソウにおけるペロノスポラ耐性のための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

Peronospora farinosa f. sp. *Spinaciae* に対する広範な耐性を与えるアレルのヘテロ接合性の組み合わせをゲノム内に含む *Spinacia oleracea* ホウレンソウ植物であって、前記植物はアレル A を含み、前記アレル A が前記植物のゲノムに配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19 または配列番号：22 の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、かつ、前記植物はアレル V t またはアレル C を含み、前記アレル V t が前記植物のゲノムに配列番号：3、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：14、配列番号：17、配列番号：20 または配列番号：23 の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、および前記アレル C が前記植物のゲノムに配列番号：12、配列番号：15、配列番号：18 または配列番号：21 の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、前記アレル A、アレル C、又はアレル V t は、それぞれ ATCC 受託番号 PTA-120472、ATCC 受託番号 PTA-12486、又は ATCC 受託番号 PTA-12041 として寄託された種子と遺伝源を共有している、ホウレンソウ植物。

【請求項2】

前記広範な耐性は、*Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* (Pfs) の少なくとも10レースに対する耐性を含み、請求項1記載のホウレンソウ植物。

【請求項 3】

アレルの前記組み合わせは、アレル A 及び C を含み、前記アレル A が前記植物のゲノムに配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19 または配列番号：22 の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、および前記アレル C が前記植物のゲノムに配列番号：12、配列番号：15、配列番号：18 または配列番号：21 の1つ以上が存在することによって特徴付けられる、請求項 2 記載のハウレンソウ植物。

【請求項 4】

アレルの前記組み合わせは、アレル A 及び V t を含み、前記アレル A が前記植物のゲノムに配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19 または配列番号：22 の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、前記アレル V t が前記植物のゲノムに配列番号：3、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：14、配列番号：17、配列番号：20 または配列番号：23 の1つ以上が存在することによって特徴付けられる、請求項 2 記載のハウレンソウ植物。

10

【請求項 5】

前記植物は、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* レース 7、8、10、11、12、14、及び分離菌 U A 4 7 1 2 に対する耐性を有する、請求項 2 記載のハウレンソウ植物。

【請求項 6】

前記植物は、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* レース 7、8、10、11、12、13、及び 14 に対する耐性を有する、請求項 2 記載のハウレンソウ植物。

20

【請求項 7】

耐性は、配列番号：3、5～8 および 10～25 から成る群から選択された少なくとも 1 つの配列と遺伝的に連鎖する、請求項 2 記載のハウレンソウ植物。

【請求項 8】

Peronospora farinosa f. sp. *Spinaciae* レース 7 及び 13 に対する劣性耐性を含み、請求項 1 記載のハウレンソウ植物。

【請求項 9】

請求項 1 記載の植物を産出する種子。

30

【請求項 10】

前記植物は、葉、茎、根、花、又は細胞である、請求項 1 記載の植物の植物部位。

【請求項 11】

Peronospora farinosa f. sp. *Spinaciae* に対する広範な耐性を備えたハウレンソウ植物の種子を生産する方法であって、

(a) アレル A を含む第 1 のハウレンソウ植物と、第 2 のハウレンソウ植物とを交配させることと、前記アレル A が前記植物のゲノムに配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19 または配列番号：22 の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、前記第 2 のハウレンソウ植物はアレル V t 及びアレル C を含み、前記アレル V t が前記植物のゲノムに配列番号：3、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：14、配列番号：17、配列番号：20 または配列番号：23 の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、および前記アレル C が前記植物のゲノムに配列番号：12、配列番号：15、配列番号：18 または配列番号：21 の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、前記アレル A、アレル C、又はアレル V t は、それぞれ A T C C 受託番号 P T A－1 2 0 4 7 2、A T C C 受託番号 P T A－1 2 4 8 6、又は A T C C 受託番号 P T A－1 2 0 4 1 として寄託された種子と遺伝源を共有しており、

40

(b) *Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* に対する広範な耐性を与える前記アレルのヘテロ接合性の組み合わせを含む、前記交配により生じた少なくとも第 1 の種子を取得することと、を含む方法。

50

【請求項 1 2】

更に、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* に対する広範な耐性を与える前記アレルのヘテロ接合性の組み合わせを含む、前記交配により生じた種子の個体群を取得することを含む、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

前記第 1 のハウレンソウ植物は、アレル A を含み、前記第 2 のハウレンソウ植物は、アレル C を含み、前記アレル A が前記植物のゲノムに配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19 または配列番号：22 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられ、および前記アレル C が前記植物のゲノムに配列番号：12、配列番号：15、配列番号：18 または配列番号：21 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられる、請求項 1 1 記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記第 1 のハウレンソウ植物は、アレル A を含み、前記第 2 のハウレンソウ植物は、アレル V t を含み、前記アレル A が前記植物のゲノムに配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19 または配列番号：22 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられ、前記アレル V t が前記植物のゲノムに配列番号：3、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：14、配列番号：17、配列番号：20 または配列番号：23 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられる、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 5】

20

前記第 1 のハウレンソウ植物又は前記第 2 のハウレンソウ植物は、前記アレル A、アレル V t、又はアレル C についてホモ接合性であり、前記アレル A が前記植物のゲノムに配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19 または配列番号：22 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられ、前記アレル V t が前記植物のゲノムに配列番号：3、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：14、配列番号：17、配列番号：20 または配列番号：23 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられ、および前記アレル C が前記植物のゲノムに配列番号：12、配列番号：15、配列番号：18 または配列番号：21 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられる、請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 6】

30

請求項 1 1 記載の方法により生産された種子。

【請求項 1 7】

第 1 のアレルは、アレル A であり、第 2 のアレルは、アレル C であり、前記アレル A が前記植物のゲノムに配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19 または配列番号：22 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられ、および前記アレル C が前記植物のゲノムに配列番号：12、配列番号：15、配列番号：18 または配列番号：21 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられ、前記アレル A、アレル C、又はアレル V t は、それぞれ A T C C 受託番号 P T A - 1 2 0 4 7 2、A T C C 受託番号 P T A - 1 2 4 8 6、又は A T C C 受託番号 P T A - 1 2 0 4 1 として寄託された種子と遺伝源を共有している、前記請求項 1 6 記載の種子。

40

【請求項 1 8】

第 1 のアレルは、アレル A であり、第 2 のアレルは、アレル V t であり、前記アレル A が前記植物のゲノムに配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19 または配列番号：22 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられ、および前記アレル V t が前記植物のゲノムに配列番号：3、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：14、配列番号：17、配列番号：20 または配列番号：23 の 1 つ以上が存在することによって特徴付けられる、前記請求項 1 6 記載の種子。

【請求項 1 9】

Peronospora farinosa f. sp. *Spinaciae* に対する耐

50

性をハウレンソウ植物に導入する方法であって、

(a) アレルAをゲノム内に含む第1のハウレンソウ植物を、A、V t及びCから成る群から選択されるアレルをゲノム内に含む第2のハウレンソウ植物と交配させることと、前記アレルAが前記植物のゲノムに配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19または配列番号：22の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、前記アレルV tが前記植物のゲノムに配列番号：3、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：14、配列番号：17、配列番号：20または配列番号：23の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、および前記アレルCが前記植物のゲノムに配列番号：12、配列番号：15、配列番号：18または配列番号：21の1つ以上が存在することによって特徴付けられ、前記アレルA、アレルC、又はアレルV tは、それぞれATCC受託番号PTA-120472、ATCC受託番号PTA-12486、又はATCC受託番号PTA-12041として寄託された種子と遺伝源を共有しており、；

10

(b) *Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae*に対する耐性について、前記第1のアレルを含む少なくとも1つの後代植物を、前記後代植物のゲノム内において配列番号：3、5～8および10～25から成る群から選択された核酸配列の存在を検出することにより選択することと、を含む方法。

【請求項20】

前記交配は、後代植物の個体群を生産することを含む、請求項19記載の方法。

【請求項21】

配列番号：3、5～8および10～25から成る群から選択された少なくとも2つの核酸配列の存在について、前記後代植物を選別することを含む、請求項20記載の方法。

20

【請求項22】

請求項19記載の方法により生産された植物。

【請求項23】

配列番号：3、5～8および10～25から成る群から選択された少なくとも2つの多型核酸配列を、前記植物のゲノム内において検出することを含むとして更に定義され、前記多型核酸配列の存在は、アレルAと、アレルV tまたはアレルCの、前記植物における存在を示し、前記アレルA、アレルC、又はアレルV tは、それぞれATCC受託番号PTA-120472、ATCC受託番号PTA-12486、又はATCC受託番号PTA-12041として寄託された種子と遺伝源を共有している、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae*に対する耐性を与える所望のアレルを含む植物を同定する方法であって、配列番号：3、5～8および10～25から成る群から選択された少なくとも第1の多型核酸配列を、前記植物のゲノム内において検出することを含む方法。

30

【請求項24】

配列番号：3、5～8および10～25から成る群から選択された少なくとも2つの多型核酸配列を、前記植物のゲノム内において検出することを含むとして更に定義され、前記多型核酸配列の存在は、アレルAと、アレルV tまたはアレルCの、前記植物における存在を示し、前記アレルA、アレルC、又はアレルV tは、それぞれATCC受託番号PTA-120472、ATCC受託番号PTA-12486、又はATCC受託番号PTA-12041として寄託された種子と遺伝源を共有している、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae*に対する耐性を与える所望のアレルを含む植物を同定する方法であって、配列番号：3、5～8および10～25から成る群から選択された少なくとも第1の多型核酸配列を、前記植物のゲノム内において検出することを含む方法により得られた植物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物育種分野に関し、詳しくは、べと病に対する耐性を備えたハウレンソウ

50

植物を生産するための方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

べと病は、植物病原菌 *Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* (Pfs) が引き起こすものであり、ハウレンソウ、特に最も一般的な栽培ハウレンソウ種である *Spinacia oleracea* にとって、世界全体で経済的に重要な病気となっている。現在、べと病 (DM) の原因となる病原体は、14 レースが公的に認められているが、新たな分離菌が今でも毎年発見及び命名されている。これまで、ハウレンソウにおける DM に対する耐性は、不完全且つレース特異的であると考えられてきた。したがって、病原体の新たな株がハウレンソウ植物の耐性を克服する能力のため、*Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* に対する有効なレベルの耐性を備えたハウレンソウ変種の開発は困難になると共に、その重要性が更に高まりつつある。

10

【発明の概要】

【0003】

一態様において、本発明は、本明細書に記載のアレル A をゲノム内に含む *Spinacia oleracea* ハウレンソウ植物を提供する。他の態様において、本発明は、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* に対する広範な耐性を与えるアレルのヘテロ接合性の組み合わせをゲノム内に含む *Spinacia oleracea* ハウレンソウ植物を提供する。一実施形態において、広範な耐性は、*Peronospora farinosa* f. sp. *spinaciae* (Pfs) の少なくとも 10 レースに対する耐性を含む。他の実施形態において、広範な耐性を与えるアレルの組み合わせは、アレル A、アレル Vt、及びアレル C から成る群から選択されたアレルの組み合わせである。他の実施形態において、アレルの組み合わせは、アレル A 及び C を含み、植物は、少なくとも *Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* レース 7、8、10、11、12、14、及び分離菌 UA4712 に対する耐性を有し、アレルの組み合わせは、アレル A 及び Vt を含み、植物は、少なくとも *Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* レース 7、8、10、11、12、13、及び 14 に対する耐性を有し、或いは、アレルの組み合わせは、アレル C 及び Vt を含み、植物は、少なくとも *Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* レース 7、8、10、11、12、13、及び分離菌 UA4712 に対する耐性を有する。他の実施形態において、アレル A、アレル C、及びアレル Vt を含む種子の代表試料は、それぞれ ATCC 受託番号 PTA-120472、ATCC 受託番号 PTA-12486、及び ATCC 受託番号 PTA-12041 として寄託されている。他の実施形態において、アレル A、アレル C、及び／又はアレル Vt は、配列番号：1 乃至 25 の群から選択された少なくとも 1 つの配列と遺伝的に連鎖する。

20

30

【0004】

他の実施形態において、本発明の植物は、ATCC 受託番号 PTA-120472、ATCC 受託番号 PTA-12486、又は ATCC 受託番号 PTA-12041 として寄託された種子と遺伝源を共有するアレル A、アレル C、及び／又はアレル Vt を含む。他の実施形態において、本発明の植物は、インブリード又はハイブリッドにし得る。更に他の実施形態において、本発明は、このような植物、又はこのような植物の植物部位を生産する種子を提供する。他の実施形態において、植物部位は、胚、分裂組織、子葉、花粉、葉、葯、根、雌蕊、花、細胞、及び茎から成る群から選択される。更に他の実施形態において、本発明は、こうしたハウレンソウ植物の収穫された葉を含む食品を提供する。

40

【0005】

他の態様において、本発明は、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* に対する広範な耐性を与えるアレルのヘテロ接合性の組み合わせをゲノム内に含む *Spinacia oleracea* ハウレンソウ植物を提供し、一方の

50

アレルは、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* レース7及び13に対する劣性耐性を与える。一実施形態において、広範な耐性は、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* (Pfs) の少なくとも10レースに対する耐性を含む。他の実施形態において、一方のアレルはアレルVt、他方のアレルはアレルCであり、又は一方のアレルはアレルA、他方はアレルVtであり、又は一方のアレルはアレルA、他方はアレルCである。

【0006】

他の態様において、本発明は、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* に対する広範な耐性を備えたハウレンソウ植物を生産する方法であって、(a) A、Vt、及びCから成る群から選択された第1のアレルをゲノム内に含む第1のハウレンソウ植物を、A、Vt、及びCから成る群から選択された第2のアレルをゲノム内に含む第2のハウレンソウ植物と交配させ、ハイブリッド後代植物の個体群を生産することと、(b) *Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* に対する広範な耐性を与える前記第1のアレルと前記第2のアレルとの組み合わせを含む前記個体群から、少なくとも1つのハイブリッド後代植物を選択することと、を含む方法を提供する。一実施形態において、方法は、更に、ハイブリッド植物の個体群の生産を含む。他の実施形態において、第1のハウレンソウ植物はアレルA、第2のハウレンソウ植物はアレルCを含み、又は第1のハウレンソウ植物はアレルA、第2のハウレンソウ植物はアレルVtを含み、又は第1のハウレンソウ植物はアレルC、第2のハウレンソウ植物はアレルVtを含む。他の実施形態において、本発明は、こうした方法により生産されたハイブリッド後代植物を提供する。更に他の実施形態において、植物の第1のアレルはアレルA、第2のアレルはアレルCであり、又は第1のアレルはアレルA、第2のアレルはアレルVtであり、又は第1のアレルはアレルC、第2のアレルはアレルVtである。

【0007】

他の態様において、本発明は、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* に対する耐性をハウレンソウ植物に導入する方法であって、(a) A、Vt、及びCから成る群から選択された第1のアレルをゲノム内に含む第1のハウレンソウ植物を、第2の別個のアレルをゲノム内に含む第2のハウレンソウ植物と交配させることと、(b) *Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* に対する耐性について、前記第1のアレルを含む少なくとも1つの後代植物を、配列番号：1乃至25から選択された配列の、植物ゲノム内における存在に基づいて選択することと、を含む方法を提供する。他の実施形態において、方法は、前記植物のゲノムにおいて、配列番号：1乃至25から成る群から選択された少なくとも2つの多型核酸配列を検出することを含む、多型核酸配列の存在は、アレルA、Vt、及びCから選択された*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* に対する耐性を与える少なくとも2つのアレルが植物に存在することを示す。

【0008】

更に他の態様において、本発明は、アレルA、Vt、及びCのうちの異なるアレルに関連する少なくとも2つの多型DNA配列を含むハウレンソウ植物、細胞、又は細胞含有植物部位を提供する。一実施形態において、提供されるハウレンソウ植物、細胞、又は細胞含有植物部位は、(a)、(b)、及び(c)として指定されたもののうち異なる群において表される少なくとも2つのDNA配列を含み、前記群は、次のように構成される：(a) 配列番号：2、配列番号：5、配列番号：7、配列番号：10、配列番号：13、配列番号：16、配列番号：19、又は配列番号：22を含むDNA配列、(b) 配列番号：1、配列番号：4、配列番号：9、配列番号：12、配列番号：15、配列番号：18、配列番号：21、又は配列番号：22を含むDNA配列、及び(c) 配列番号：3、配列番号：6、配列番号：8、配列番号：11、配列番号：14、配列番号：17、配列番号：20、又は配列番号：23を含むDNA配列。本発明は、更に、配列番号：1乃至25から成る群から選択されたDNA配列を提供する。

【0009】

配列表の簡単な説明

配列番号：1 — スキャフォールド S F 6 3 8 1 5 に対応し、アレル C を判定する D N A 配列。

配列番号：2 — スキャフォールド S F 6 3 8 1 5 に対応し、アレル A を判定する D N A 配列。

配列番号：3 — スキャフォールド S F 6 3 8 1 5 に対応し、アレル V t を判定する D N A 配列。

配列番号：4 — スキャフォールド S F 5 9 0 0 2 に対応し、アレル C を判定する D N A 配列。

配列番号：5 — スキャフォールド S F 5 9 0 0 2 に対応し、アレル A を判定する D N A 配列。

配列番号：6 — スキャフォールド S F 5 9 0 0 2 に対応し、アレル V t を判定する D N A 配列。

配列番号：7 — スキャフォールド S F 5 9 0 0 2 に対応し、アレル A を判定する D N A 配列。

配列番号：8 — スキャフォールド S F 5 9 0 0 2 に対応し、アレル V t を判定する D N A 配列。

配列番号：9 — スキャフォールド S F 9 5 4 8 7 に対応し、アレル C を判定する D N A 配列。

配列番号：10 — スキャフォールド S F 9 5 4 8 7 に対応し、アレル A を判定する D N A 配列。

配列番号：11 — スキャフォールド S F 9 5 4 8 7 に対応し、アレル V t を判定する D N A 配列。

配列番号：12 — スキャフォールド S F 9 0 9 0 6 に対応し、アレル C を判定する D N A 配列。

配列番号：13 — スキャフォールド S F 9 0 9 0 6 に対応し、アレル A を判定する D N A 配列。

配列番号：14 — スキャフォールド S F 9 0 9 0 6 に対応し、アレル V t を判定する D N A 配列。

配列番号：15 — スキャフォールド S F 9 0 9 0 6 に対応し、アレル C を判定する D N A 配列。

配列番号：16 — スキャフォールド S F 9 0 9 0 6 に対応し、アレル A を判定する D N A 配列。

配列番号：17 — スキャフォールド S F 9 0 9 0 6 に対応し、アレル V t を判定する D N A 配列。

配列番号：18 — スキャフォールド S F 3 4 7 3 2 に対応し、アレル C を判定する D N A 配列。

配列番号：19 — スキャフォールド S F 3 4 7 3 2 に対応し、アレル A を判定する D N A 配列。

配列番号：20 — スキャフォールド S F 3 4 7 3 2 に対応し、アレル V t を判定する D N A 配列。

配列番号：21 — スキャフォールド S F 3 4 7 3 2 に対応し、アレル C を判定する D N A 配列。

配列番号：22 — スキャフォールド S F 3 4 7 3 2 に対応し、アレル A を判定する D N A 配列。

配列番号：23 — スキャフォールド S F 3 4 7 3 2 に対応し、アレル V t を判定する D N A 配列。

配列番号：24 — スキャフォールド S F 6 2 7 4 9 のアレル A、C、及び V t に対応する D N A 配列。

10

20

30

40

50

配列番号：25 — スキャフォールド S F 1 7 8 6 3 7 のアレル A、C、及び V t に対応する DNA 配列。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、実施例3に記載の3つのマッピング個体群から収集された遺伝子型及び表現型から組み立てた3つの連鎖群を表すアレル A、V t、及び C を示す図である。

【図2A】図2Aは、ハイブリッド及び3元ハイブリッドを開発するための可能な育種方法を示す図である。

【図2B】図2Bは、ハイブリッド及び3元ハイブリッドを開発するための可能な育種方法を示す図である。

【図3】図3は、アレル C、A、及び V t に対応する多型を含むスキャフォールドの配列アライメントを示す図であって、アレル間の多型が網掛けにより表され、ハウレンソウにおけるべと病耐性アレル C、A、及び／又は V t の存在を同定及び／又は判定するために使用可能となる図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、べと病 (DM) に対する耐性を備えたハウレンソウ変種の開発のための方法及び組成物を提供する。本発明は、A、V t、及び C と命名された、*Spinacia oleracea* の3つの別個のアレルの同定を提供する。これらのアレルは、DM に対する独自の広範な耐性を備えたハウレンソウ植物を得るために、様々な組み合わせで用い

【0012】

3つのアレルは、ハウレンソウ系統 S M B S 0 1 1 - 1 1 6 2 M から A、S M B - 6 6 - 1 1 4 3 M から C、及び S S B - 6 6 - 1 1 3 1 M から V t として定めたものであり、*Spinacia oleracea* において同定され、既存及び新たな DM 株に対する耐性をもたらすことが発見された。各アレルは、特定の1組のレース及び／又は分離菌に対する耐性を有することが発見された。アレルは、様々な組み合わせで、所望の DM 耐性を備えたハイブリッドを作成するために用いることができる。

【0013】

本明細書で更に詳細に示すように、アレル C は、レース 1、2、3、4、5、6、7、8、10 と、新たに発見された、レース 15 の候補株である P f s 分離菌 U A 4 7 1 2 に対する耐性を与えることが分かった。アレル A は、*Peronospora farinosa* (P f s) レース 1、3、5、7、8、11、12、13、及び 14 に対する耐性を与えることが分かった。レース 7 及び 13 に対する耐性は、殆どの DM レースとは異なり、劣性遺伝する。アレル V t は、レース 1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、及び 13 に対する耐性を与えることが分かった。これらの新たに特徴付けされたアレルは、新規のヘテロ接合性の組み合わせで用いて、幅広い DM 耐性を備えたハウレンソウ植物を得ることができる。ハウレンソウ植物は、インブレッド植物及び／又はハイブリッド植物にしてよく、本明細書に記載のアレルの様々な組み合わせを含むことができる。

【0014】

例えば、本発明の一実施形態によれば、アレル C 及び V t は、ハウレンソウ植物 (即ち、ヘテロ接合型ハウレンソウ植物) に存在し、P f s レース 1 乃至 8、10 乃至 13、及び新たに発見された P f s 分離菌 U A 4 7 1 2 に対する耐性をもたらすことができる。他の実施形態において、アレル A 及び V t は、ハウレンソウ植物に存在し、P f s レース 1 乃至 8 及び 10 乃至 14 に対する耐性をもたらすことができる。アレル V t は、アレル A による劣性耐性を補完する。同様に、アレル A 及び C が共にハウレンソウ植物に存在する場合、植物は、P f s レース 1 乃至 8、10 乃至 12、14、及び U A 4 7 1 2 に対して耐性となる。アレルは、任意の組み合わせで利用して、特定の市場又は領域に対して所望の耐性を提供することができる。例えば、アレル C 及び V t を有するハイブリッドは、P

f s 1 4を除く全てのP f sレースに対する耐性を示す。P f sレース1 4は、欧州では発生しないため、このハイブリッドは、その地勢において完全な耐性を有することになる。他の例として、アレルA及びV tを有するハイブリッドは、分離菌U A 4 7 1 2を除く全てのP f sレースに対する耐性を示す。新たな分離菌U A 4 7 1 2が見つかったいる場所は限られているため、このハイブリッドは、多くの地域で完全な耐性を有する。

【0015】

更に他の実施形態において、記載した全てのDMレース及び分離菌U A 4 7 1 2に対する耐性を有する3元ハイブリッドが考えられる。本発明によれば、限定ではないが、A、C、及びV tを含む本明細書に記載の1つ又は2つのアレルを含むハウレンソウ植物は、限定ではないが、A、C、及びV tを含む第2又は第3のアレルを含む第2の別個のハウレンソウ植物と交配させ、有益な1組の本明細書に記載のアレルを含むハイブリッドハウレンソウ植物を生産することができる。

10

【0016】

本明細書において更に説明するように、アレルは、DMに対する所望の耐性をもたらす任意の組み合わせで、選択されたハウレンソウ変種に移入することができる。本発明によれば、こうしたDMに対する耐性を与えるアレルは、特定のハウレンソウ変種又は栽培品種における任意の所望のゲノムの背景に移入し得る。例えば、本発明による所定のDM耐性アレルを含む開始ハウレンソウ植物を、十分な世代数に亘り自花受精させ、DMに対する耐性を与えるアレルについてホモ接合型であるインブレットハウレンソウ変種を生産することができる。こうしたインブレット植物は、その後、別個のDM耐性アレルを含む他のハウレンソウ植物と交配させ、本明細書に記載した、DMに対する望ましい耐性を与えるアレルの組み合わせを含むハウレンソウインブレット又はハイブリッドを安定的に生産し得る。本発明によるDMに対する耐性を示すハウレンソウ植物は、更に、他のハウレンソウ植物と交配させ、本発明による選択を行うことにより、本明細書に記載のアレルの任意の所望の組み合わせを備えた新しいDM耐性ハウレンソウインブレット又はハイブリッドを取得し得る。

20

【0017】

DMの特定のレースに対する耐性を与える他のアレルは、ハウレンソウにおいて以前から同定されているが、こうしたアレルは、ハイブリッドの組み合わせであっても、*Peronospora farinose* (P f s)の一部のレースに対する耐性しか付与していない。DMに対する非宿主耐性も、*Spinacia turkestanica*及び*Spinacia tetrandra*等のハウレンソウの近縁野生種において発見される場合がある。しかしながら、近縁野生種由来の遺伝子は、収量及び品質を含む商業的特性にとって負のドラッグをもたらす場合が多い。近縁野生種に見られる好ましくないアレルは、DM耐性アレルと共にエリート生殖質に導入される場合が多い。本発明は、レース特異的且つ広範なDM耐性を提供する、新規の*S. oleracea*耐性源、アレル、及びマーカを記載する。

30

【0018】

本発明の一実施形態において、DMに対する耐性を与えるアレルA、C、及びV tは、遠位位置において配列スキュフォールドS F 3 4 7 3 2及びS F 6 3 8 1 5、近位位置においてS F S F 5 9 0 0 2、S F 9 5 4 8 7、及びS F 9 0 9 0 6内の共通のマーカにより、ハウレンソウ第6連鎖群に存在するものとして定義し得る。耐性アレルに関連する判定用のヌクレオチド配列は、配列番号：1乃至25に記載している。アレルA、C、及びV t間の多型は、図3に示している。他の実施形態において、DMに対する広範な耐性を提供するアレルは、種子の代表寄託物がATCCにより受託番号PTA-120472、PTA-12486、及びPTA-12041の下でそれぞれ作成された系統種SMB S 011-1162M、SMB-66-1143M、及びSSB-66-1131Mから選択された遺伝源に由来するか、又はこれを共有するものとして定義し得る。

40

【0019】

本発明は、更に、DMに対する広範な耐性を備えたハウレンソウ植物を生産する方法と

50

、こうした方法により作成されたハウレンソウ植物及びその部位とを提供する。一実施形態において、核酸配列又はゲノムマーカーを用いて、本発明によるアレルを同定し得る。これらの核酸配列は、本発明によるDM耐性付与アレルと、ハウレンソウゲノムにおいて遺伝的に連鎖する多型又はマーカーの同定において使用し得る。本発明は、更に、こうした植物と、その生産方法とに由来する食品を提供する。

【0020】

本発明のDM耐性アレルと連鎖不平衡となる遺伝子マーカーにより、基本的には任意のハウレンソウゲノムにDM耐性を効率的に導入することが可能となり得る。また、これにより、コストが高く、時間集約的で、信頼性が低くなる恐れのある表現型アッセイの代用が可能となることで、大幅な経済化がもたらされる。更に、特定の遺伝子型を標的とすることにより、特定の良好な表現型の頻度を明示的に操作するように育種プログラムを設計することができる。こうした関連性の忠実度を継続的に監視することにより、予測能力が維持された状態が確保され、したがって、情報に基づく育種決定を保証し得る。

10

【0021】

本発明によれば、当業者は、本明細書に記載の系統種等から、望ましいDM耐性表現型を有する候補生殖質源を同定し得る。本発明の一実施形態は、任意の付加的なハウレンソウ系統種から、DMに対する広範な耐性を与えるアレルを取得するために、本発明の材料及び方法を用いることを含む。限定ではないが、ハウレンソウ第6染色体由来の配列スキュフォールドを含め、本明細書に記載の情報をを用いることで、DM耐性を、他の任意のハウレンソウ変種に移入することができる。

20

【0022】

ハウレンソウ育種プログラムにおけるハウレンソウ変種の開発では、一般に、ホモ接合型インブレット系統の開発と、これらの系統の交配と、結果的に生じたハイブリッド植物の評価とが必要となる。ハウレンソウ育種プログラムでは、2つ以上のインブレット系統又は他の様々な生殖質源由来の遺伝的背景を組み合わせて、育種個体群としたものから、自家受粉と所望の表現型の選択とにより、新たなインブレット系統を開発する。ハイブリッドも、植物育種材料のソースとして、或いは新たなハウレンソウ系統を開発又は導出するソース個体群として用いることができる。当該技術分野において公知であり、ハウレンソウ育種プログラムにおいて用いられる植物育種手法には、限定ではないが、循環選択、戻し交配、倍加半数体、家系育種、遺伝子マーカー強化選択、及び形質転換が含まれる。多くの場合、こうした手法の組み合わせが用いられる。したがって、ハイブリッド由来のインブレット系統は、上述した植物育種手法を用いて開発することができる。新たなインブレット系統は、他のインブレット系統と交配させることが可能であり、こうした交配によるハイブリッドを評価して、そのうちどれが商業的可能性を有するかを判定する。

30

【0023】

本発明の手法は、望ましい耐病性表現型を、こうした表現型を与えるアレル又は座位に遺伝的に連鎖する遺伝子マーカーを同定することにより同定するために使用し得る。本発明によれば、当業者は、例えば、ハウレンソウゲノムにおけるSNP及び／又はインデルに基づいた分子マーカーアッセイを開発し得る。一実施形態において、本発明によるDM耐性ハウレンソウ植物の同定に有用な分子マーカーアッセイは、ハウレンソウ第6染色体由来の配列スキュフォールドに基づいて設計し得る。こうした手法には、所望の植物を同定する表現型アッセイを単体で、或いは遺伝的アッセイと組み合わせて含めることにより、本明細書に記載の方法による新たな変種の生産に使用し得る形質に関連するマーカー遺伝子型を更に同定し得る。

40

【0024】

本発明は、DMに対する耐性を与えるアレルの組み合わせを含む栽培ハウレンソウ植物の生産を提供する。ハウレンソウ生産の成功は、様々な園芸活動に対する配慮に左右される。これらには、適切な施肥に特に配慮した土壌管理、適切な間隔での作物の定着、雑草防除、及びミツバチ等の授粉用昆虫の導入、灌漑、及び有害生物管理が含まれる。

ハウレンソウ作物は、種子から、或いは移植により、定着させることができる。移植す

50

ることで、直播きにより生産される作物に比べ、早期に作物が生じる。移植は、特に3倍体種子のように種子のコストが高く直播きにリスクが伴う場合、完全に生育した植物を素早く達成するのに役立つ。

【0025】

べと病に対する耐性を備えたハウレンソウ植物の開発

本開示では、DMに対する広範な耐性を与える栽培ハウレンソウ由来のアレル及びその組み合わせと、マーカ支援選択及び／又はマーカ支援戻し交配等により、座位の追跡及び所望の生殖質への移入に使用可能なハウレンソウ第6染色体由来の配列スキュフォールドとを特定する。

【0026】

本発明は、こうした任意のアレル及び／又はこうしたアレル他の耐性座位との任意の組み合わせを追跡し、所定の遺伝的背景に導入することを提供する。本明細書記載のアレルにより付与されたDMに対する耐性を、ある遺伝子型から他の遺伝子型へマーカ支援選択により移入し得ることは、当業者に理解されよう。その結果、DMに対する耐性を有する生殖質源を選択することができる。こうしたアレルを用いて、育種者は、DMに対する耐性を備えたハウレンソウ植物を選択し、本明細書記載の領域に対するマーカ支援選択を用いた育種中に、こうした表現型を追跡し得る。本発明によれば、隣接マーカによる選別は、単一の耐性アレルについて分離した家系において所望のDM耐性を保有する後代を選択する上で十分となり得る。更に、例えば、あるアレルとは適合性相互作用を示し、他のアレルとは不適合性相互作用を示す様々なレースによる表現型の選別により、マーカを補完し、2つ以上のハプロタイプについて分離した個体群において所望の耐性を備えた個体を選択可能であることは、当業者に理解されよう。

【0027】

べと病に対する耐性を有するハウレンソウハイブリッドの開発

本明細書に記載したように、本発明によるハウレンソウ植物は、アレルC、アレルA、及びアレルVtの任意のヘテロ接合性の組み合わせを含み、幅広いDM耐性を付与し得る。例えば、一実施形態において、アレルC及びVtは、ヘテロ接合型ハウレンソウ植物に存在してPfsレース1乃至8、10乃至13、及び新たに発見されたPfs分離菌UA4712に対する耐性を付与することができる。他の実施形態において、アレルA及びVtは、ハウレンソウ植物に存在してPfsレース1乃至8及び10乃至14に対する耐性を付与することが可能であり、又はアレルA及びCは、ハウレンソウ植物に存在してPfsレース1乃至8、10乃至12、14、及びUA4712に対する耐性を付与することができる。更に、本発明によれば、記載した全てのDMレース及び分離菌UA4712に対する耐性を有する3元ハイブリッドがある。こうした本明細書に記載の1つ又は2つのアレルを含むハウレンソウ植物は、本明細書に記載の第2又は第3のアレルを含む第2の別個のハウレンソウ植物と交配させ、有益な一組の本明細書に記載のアレルを含むハイブリッドハウレンソウ植物を生産し得る。

【0028】

新規の耐性遺伝子を、受け入れ可能な市販型に移入するプロセスは、困難なプロセスとなる場合があり、リンケージドラッグ、エピスタシス、及び低い遺伝率等の要因により複雑化する恐れがある。形質の遺伝率は、遺伝的分散に起因する表現型変異の割合であり、0乃至1.0で変化する。したがって、1.0に近い遺伝率を有する形質は、環境により大きく影響されない。当業者は、高い遺伝率を有する園芸的形質を備えた商業用系統を形成することの重要性を認識しており、これは、こうした栽培品種により、栽培者が均一な市場規格の作物を生産することが可能となるためである。

【0029】

本明細書に記載の耐性アレルを組み合わせ、特に、DMレースの混合群が発生し得る土地において耐性を改良可能であることは、当業者に理解されよう。本発明によれば、本明細書記載のアレルは、マーカ支援及び／又は表現型選択により、ハイブリッドの親に移入し得る。育種者は、レース特異性を相互に補完し、DMに対する幅広い耐性を達成する

アレルを選択し得る。記載した耐性ドナーは、結合能力が実証されたインブレッドと交配させる。各初期交配から生じたF1は、その後、レシピエント遺伝子型、即ち、反復親と戻し交配させる。本発明によれば、ヘテロ接合相で耐性を保有する個体は、マーカ支援及び／又は表現型選択を用いて選択される。この戻し交配及び選択ステップは、例えば、3回繰り返す。所望の耐性アレルを保有する個体は、その後、自家受粉を、例えば、単粒系統法により2世代に亘り行う。育種者は、各家系の後代から所望の耐性アレルを保有するインブレッドハウレンソウ植物を回収し、それぞれの反復親と同じ、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する遺伝的背景に導入する。商業用の耐性栽培品種は、相補的な耐性アレルをそれぞれ備えた親系統の交配により生成され、これにより、優れた耐性を有するハイブリッドが作出される。

10

【0030】

本発明によれば、複数の耐性ドナーを、個別に同じレシピエント遺伝子型と交配し得る。上述した戻し交配及び選択ステップに続いて、反復親と同じ、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する遺伝的背景に導入された、別個の耐性アレルを保有するインブレッドハウレンソウ植物を取得し得る。異なる耐性アレルを、同一の固定された遺伝的背景、即ち、準同質遺伝子系統において維持し得ることは、当業者に理解されよう。耐性アレルについて準同質遺伝子型のインブレッドを作出するステップは、任意のハイブリッドの両方のインブレッド親に適用することができる。本発明によれば、育種者は、1つの親系統に由来する2つの準同質遺伝子系統を交配してF1種子親を生成することにより3元ハイブリッドを作出し得る。F1種子親は、相補的な耐性アレルを保有する第3の親と交配させる。結果的に生じた3元ハイブリッドは、DM耐性アレルの相補的組み合わせを除き、均一となる。ハイブリッド植物は、反復親と同じ、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する遺伝的背景を常に共有し、耐性アレルの様々な組み合わせを保有する。本明細書記載のアレルにより、幅広いDM耐性を備えた商業用変種の安定生産が可能となる。更に、本発明は、個別のDM集団を有する各地域及び／又は領域用のハウレンソウ植物を提供するために異なる組み合わせで使用可能なアレルを提供する。加えて、耐性克服レース又は新生分離菌が存在する時に、病原体の圧力を低減する耐性アレルの混合を備えた単一変種を得ることができる。

20

【0031】

DM耐性に関連するゲノム領域、多型核酸、及びアレル

30

出願者は、ハイブリッド（ヘテロ接合型）ハウレンソウ植物において特定の組み合わせで共に存在する場合に、DMに対する広範な耐性を与える、栽培ハウレンソウ *S. oleracea* 由来の3つのアレルを発見した。本明細書において概要を述べた方法を用いて、これらのアレルは、ハウレンソウ第6染色体上で、遠位位置において配列スキャフォールドSF34732及びSF63815、近位位置においてSF59002、SF95487、及びSF90906、或いは、それに対して少なくとも95%の同一性を有する配列であって、少なくとも96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を有するものを含む配列により定義し得る座位に位置することが発見され、こうした領域において、異なる個体群で多型が存在し得ることは当業者に理解されよう。耐性アレルC、A、及び／又はVtの存在を同定又は判定するために使用し得る多型を図3に示す。こうしたヌクレオチド配列の例は、配列番号：1乃至25に記載している。こうした配列は、本発明により、植物内の特定のアレルの存在又は同一性を同定又は判定するために使用し得るものであり、したがってDMに対する耐性を保有する植物を同定するために使用し得る。当業者には、更に、*S. oleracea* ゲノム全体で多くの遺伝子マーカを見つけることが可能であり、マーカは、本明細書記載の配列の隣接配列及び*S. oleracea* ゲノム全体に位置する他の断片におけるSNP及び／又はインデルから開発し得ることは理解されよう。こうしたマーカは、本発明による耐性アレルの有無を特定する上で有用となる。ハウレンソウゲノムにおけるマーカの例は、例えば、Khattak et al. (Euphytica 148:311-318, 2006)に記載されている。本明細書に記載のアレル及びDM耐性付与アレルの

40

50

同定では、同じ領域にあり、それらに遺伝的に連鎖する（連鎖不平衡にある）他の任意のこうしたマーカの使用が可能となる。

【0032】

本明細書において特定したゲノム領域、アレル、及び多型マーカは、公開されている物理又は遺伝地図に対してマッピングし、こうした地図に本明細書記載の領域を配置することができる。当業者には、更に、ハウレンソウにおけるDMに対する耐性に関連するアレルと遺伝的に連鎖する本明細書記載の付加的な多型核酸と、DMに対する抵抗性に関連するアレル又はマーカの約40 cM、20 cM、10 cM、5 cM、又は1 cM内の地図も利用し得ることは理解されよう。

【0033】

したがって、上述したマーカ及びアレルの状態は、例示的なものである。本開示と一致するハウレンソウにおけるDMに対する耐性に関連した他の多型核酸マーカ及びそのアレル状態により、ハウレンソウ植物を同定する方法は、当業者に認識されよう。更に、ゲノム領域（群）に位置する、或いは本明細書において特定したアレル又は他のマーカに連鎖する他の多型核酸マーカのアレル状態を同定して、ハウレンソウにおけるDMに対する耐性との関連性を判定する方法は、当業者に公知であろう。

【0034】

レシピエントペアレントに関連するゲノム領域、多型核酸、及び遺伝的背景

ここでは耐性アレルの有無の特定に用いるマーカについて説明する。本発明によれば、耐性座位に関連しない、或いは耐性座位との有意な遺伝連鎖を欠いているハウレンソウゲノム内のマーカにより、遺伝的背景の選択が可能となる。背景の選択の一例は、循環戻し交配スキームにおけるレシピエントペアレントのゲノムの回収であり、その例は本明細書に記載している。循環選択では、良好な特性を保有する同胞間の交配を複数回実施し、後代を選択することにより、1つ以上のエリートペアレントの良好な特質を維持しつつ、DM耐性付与アレルを遺伝的多様性と共に家系に導入させる。ゲノム全体に分布し、本発明の方法による植物の生産に使用し得るハウレンソウ用のマーカの例は、例えば、Khattak et al. (Euphytica 148:311-318, 2006)に記載されている。背景の選択と並行した本明細書に記載のDM耐性付与アレルの同定では、ゲノム断片の同じ遺伝子間隔にある任意のマーカと、他の遺伝子間隔にある任意のマーカとの使用が可能となる。

【0035】

ハウレンソウにおけるDMに対する耐性に関連するゲノム遺伝子座の移入

ここではDMに対する広範な耐性を与えるアレルの組み合わせを含むハウレンソウ植物（*S. oleracea*）と、その取得方法とを記載する。本発明によれば、マーカ支援遺伝子移入には、1つ以上のマーカにより定められた染色体領域の、ある生殖質から第2の生殖質への移動が含まれる。移入されたゲノム領域を含む交配の子孫は、第1の生殖質（即ち、DMに対する耐性を備えた生殖質）由来の所望の移入ゲノム領域の特徴を示すマーカと、第2の生殖質の所望の遺伝的背景の特徴を示す連鎖及び非連鎖マーカの両方との組み合わせにより同定することができる。

【0036】

同定されたDM耐性アレルを含む座位、或いはアレル又は座位の移入を、そのアレル又は座位を含むソース生殖質に由来する外来性連鎖DNAが存在しない状態で可能にする本明細書に記載の座位に連鎖及び／又は直に隣接するマーカは、本明細書により提供される。本明細書に記載のDMに対する耐性に関連するアレル又は座位を含む小さなゲノム領域を移入する場合には、そのアレル又は座位を含む、より大きなゲノム領域に直に隣接するテロメア近位又はセントロメア近位マーカの何れかを用いて、その小さなゲノム領域を移入可能であることは、当業者に理解されよう。

【0037】

したがって、DMに対する耐性に関連する、こうした移入領域を含むハウレンソウ植物又は生殖質であって、残りのゲノム配列の少なくとも10%、25%、50%、75%、90%、又は99%が、他の場合又は通常の場合、他の表現型に関連するゲノム領域を含

10

20

30

40

50

む植物又は生殖質の特徴を示すマーカを保有するものが、特定の実施形態において提供される。更に、本明細書により提供されるゲノム領域、アレル又は座位、及び／又はマーカに隣接及び／又は直に隣接する密接に連鎖した領域が、他の場合又は通常の場合には表現型に関連するゲノム領域を含むハウレンソウ植物又は生殖質の特徴を示すマーカを保有するゲノム配列を含む遺伝子移入領域を含んだハウレンソウ植物が、更に提供される。

【0038】

分子支援育種手法

本発明の実施において使用可能な遺伝子マーカには、限定ではないが、制限断片長多型 (RFLP)、増幅断片長多型 (AFLP)、単純反復配列 (SSR)、単純配列長多型 (SSLP)、一塩基多型 (SNP)、挿入欠失多型 (インデル)、縦列反復配列多型 (VNTR)、無作為増幅多型DNA (RAPD)、アイソザイム、及び他の当業者に公知のものが含まれる。作物におけるマーカの発見及び開発は、マーカ支援育種活動へ応用するための初期の枠組みを提供する (米国特許公開番号第2005/0204780号、第2005/0216545号、第2005/0218305号、及び第2006/00504538号)。結果的にもたらされる「遺伝子地図」は、特徴付けされた座位 (多型核酸マーカ又はアレルを同定可能な他の任意の座位) の互いに対する相対位置を表すものとなる。

【0039】

単一の核酸の変化のような僅かな変化を含む多型を、多数の方法で分析することができる。例えば、一本鎖高次構造多型分析 (Orita et al. Genomics, 8(2):271-278, 1989)、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Myers EP0 0273085, 1985)、又は切断断片長多型分析 (Life Technologies, Inc., メリーランド州ゲイザースバーグ、20877) を含む電気泳動手法による検出が可能であるが、DNAシーケンシングマシンが広く利用可能であることから、増幅産物の配列決定のみを直接的に行うことが容易となる場合が多い。多型配列の差が判明すれば、後代検定のための迅速なアッセイを設計することが可能となり、一般的には、特異的アレルのPCR増幅 (PASA, Sommer et al., Biotechniques 12(1):82-87, 1992)、又は複数の特異的アレルのPCR増幅 (PAMSA, Dutton et al., Biotechniques 11(6):700-702, 1991) の何らかのバージョンが含まれる。

【0040】

多型マーカは、組にすることで、植物のフィンガープリントを取得して系統又は変種の同一性の度合いを示すための有用なツールとして機能する (米国特許第6, 207, 367号)。こうしたマーカは、表現型との関連性を判定するための基礎となるものであり、遺伝獲得量を操作するために用いることができる。本発明の方法の特定の実施形態では、多型核酸を用いて、DMに対する耐性に関連する遺伝子型をハウレンソウ植物において検出すること、DMに対する耐性に関連する遺伝子型を有するハウレンソウ植物を同定すること、及びDMに対する耐性に関連する遺伝子型を有するハウレンソウ植物を選択することが可能となる。本発明の方法の特定の実施形態では、多型核酸を用いて、DMに対する耐性に関連するアレルの組み合わせをゲノム内に含むハウレンソウ植物を生産することが可能となる。本発明の特定の実施形態では、多型核酸を用いて、DMに対する耐性に関連するアレルの組み合わせを含む後代ハウレンソウ植物を育種することが可能となる。

【0041】

特定の遺伝子マーカは、「優性」又は「共優性」マーカを含み得る。「共優性」マーカは、2つ以上のアレル (2倍体個体当たり2個) の存在を明らかにする。「優性」マーカは、単一のアレルのみの存在を明らかにする。マーカは、2倍体遺伝子座における両方のアレル、又は3倍体又は4倍体遺伝子座における複数のアレルが容易に検出可能となり、環境変異が存在しない、即ち、その遺伝率が1となるような共優性の形で遺伝することが好ましい。マーカの遺伝子型は、一般に、2倍体生物の各座位に2つのマーカアレルを含む。各座位のマーカアレル組成は、ホモ接合性とヘテロ接合性との何れかにすることができる。ホモ接合性は、座位の両方のアレルが同一の核酸配列により特徴付けられる状態で

10

20

30

40

50

ある。ヘテロ接合性は、座位におけるアレルの異なる状態を示す。

【0042】

遺伝子多型の有無を判定するための（即ち、遺伝子型判定のための）核酸に基づく分析は、同定、選択、遺伝子移入等の育種プログラムにおいて用いることができる。遺伝子多型分析用の様々な遺伝子マーカーが利用可能であり、当業者に公知である。分析は、DM耐性表現型に関係又は関連する遺伝子マーカーを含む、或いはこれと連鎖する遺伝子、遺伝子の一部、QTL、アレル、又はゲノム領域を選択するために使用し得る。

【0043】

本明細書での使用において、核酸分析法には、限定ではないが、PCRに基づく検出方法（例えば、TaqManアッセイ）、マイクロアレイ法、質量分析に基づく方法及び／又は全ゲノム配列決定を含む核酸配列決定法が含まれる。特定の実施形態において、DNA、RNA、又はcDNAの試料における多型部位の検出は、核酸増幅法の使用により容易となり得る。こうした方法は、多型部位に渡る、或いは、その部位と、その部位に対して遠位又は近位に位置する配列とを含むポリヌクレオチドの濃度を特異的に増加させる。こうした増幅分子は、ゲル電気泳動法、蛍光検出法、又は他の手段により容易に検出することができる。

【0044】

こうした増幅を達成する一方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（Mullis et al. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273, 1986、欧州特許第50,424号、欧州特許第84,796号、欧州特許第258,017号、欧州特許第237,362号、欧州特許第201,184号、米国特許第4,683,202号、米国特許第4,582,788号、及び米国特許第4,683,194号）を利用し、2本鎖形態において多型を定義する近位配列に対してハイブリダイズ可能なプライマ対を用いる。質量分析に基づくDNAタイピング方法を用いることもできる。こうした方法は、米国特許第6,613,509号及び第6,503,710号、及びそれらに記載の参考文献において開示されている。

【0045】

DNA配列内の多型は、限定ではないが、出典を明記することによりその開示内容全体を本願明細書の一部とした米国特許第5,468,613号、第5,217,863号、第5,210,015号、第5,876,930号、第6,030,787号、第6,004,744号、第6,013,431号、第5,595,890号、第5,762,876号、第5,945,283号、第5,468,613号、第6,090,558号、第5,800,944号、第5,616,464号、第7,312,039号、第7,238,476号、第7,297,485号、第7,282,355号、第7,270,981号、及び第7,250,252号に開示されたものを含む、当該技術分野において周知の様々な効果的方法により検出又はタイピング可能である。しかしながら、本発明の組成物及び方法は、多型タイピング方法と併せて、ゲノムDNA試料における多型をタイピングするために用いることができる。こうした使用されるゲノムDNA試料には、限定ではないが、植物から直接単離したゲノムDNA、クローン化ゲノムDNA、又は増幅ゲノムDNAが含まれる。

【0046】

例えば、DNA配列内の多型は、米国特許第5,468,613号及び第5,217,863号に開示されたアレル特異的オリゴヌクレオチド（ASO）プローブに対するハイブリダイゼーションにより検出することができる。米国特許第5,468,613号には、核酸配列における単一又は複数のヌクレオチド変異を、ヌクレオチド変異を含む配列を増幅し、膜上に点として付け、標識した配列特異的オリゴヌクレオチドプローブにより処理するプロセスにより、核酸において検出可能な、アレル特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションが開示されている。

【0047】

標的核酸配列は、対象の配列を増幅してプローブとハイブリダイズした後、ライゲーション

10

20

30

40

50

ョンによりプローブの標識部分を検出する、米国特許第5, 800, 944号に記載のプローブライゲーション法により検出することもできる。

【0048】

マイクロアレイを、多型の検出に用いることも可能であり、この場合、オリゴヌクレオチドプローブセットを重ね合わせて組み立て、単一の配列を表現し、標的配列の1点における差異が部分的なプローブのハイブリダイゼーションを生じるようにする (Borevitz et al., Genome Res. 13:513-523, 2003, Cui et al., Bioinformatics 21:3852-3858, 2005)。何れか1つのマイクロアレイ上では、遺伝子及び／又は非コード領域を表現し得る複数の標的配列が存在することが見込まれ、各標的配列は、単一のプローブではなく、一連の重なり合ったオリゴヌクレオチドにより表現される。このプラットフォームは、複数の多型の高スループットスクリーニングを提供する。マイクロアレイに基づく方法による標的配列のタイピングは、米国特許第6, 799, 122号、第6, 913, 879号、及び第6, 996, 476号に開示されている。

【0049】

標的核酸配列は、標的核酸配列の隣接部分と相同な配列を有し且つ非共有結合的に結合して標的核酸配列に対するプローブの塩基対上にステムを形成する側鎖を有する少なくとも一対のプローブを利用する、米国特許第5, 616, 464号に開示されたプローブ連鎖方法により検出することもできる。側鎖の少なくとも一方は、ステムの他方の側鎖要素と共有結合架橋を形成可能な光活性化基を有する。

【0050】

SNP及びインデルを検出するための他の方法には、一塩基伸長 (SBE) 法が含まれる。SBE法の例には、限定ではないが、米国特許第6, 004, 744号、第6, 013, 431号、第5, 595, 890号、第5, 762, 876号、及び第5, 945, 283号に開示されたものが含まれる。SBE法は、多型に隣接するヌクレオチドプライマを伸長し、プライマの伸長時に、検出可能なヌクレオチド残基を組み入れることに基づく。特定の実施形態において、SBE法は、3つの合成オリゴヌクレオチドを用いる。オリゴヌクレオチドのうち2つは、PCRプライマの役割を果たし、アッセイの対象となる多型を含む領域に隣接するゲノムDNAの座位の配列に対して相補的となる。多型を含むゲノムの領域の増幅に続いて、DNAポリメラーゼ及び2種類の標識を施したジデオキシヌクレオシド三リン酸の存在下で多型に隣接する増幅DNAとハイブリダイズするように設計された第3のオリゴヌクレオチド (伸長プライマと呼ばれる) と、PCR産物を混合する。鋳型に多型が存在する場合、標識ジデオキシヌクレオシド三リン酸の一方は、一塩基鎖伸長においてプライマに追加することができる。存在するアレルは、その後、2種類の標識のうち、どちらが伸長プライマに追加されたかを判定することにより推測される。ホモ接合性の試料では、2つの標識塩基のうち一方のみが組み込まれ、2つの標識のうち一方のみが検出される。ヘテロ接合性の試料では、両方のアレルが存在し、両方の標識が直接 (伸長プライマの異なる分子に) 組み込まれるため、両方の標識が検出される。

【0051】

多型を検出する他の方法において、SNP及びインデルは、5' 蛍光レポーター色素及び3' クエンチャ色素を有するオリゴヌクレオチドがプローブの5' 及び3' 末端に共有結合する、米国特許第5, 210, 015号、第5, 876, 930号、及び第6, 030, 787号に開示された方法により検出することができる。プローブが完全である場合、レポーター色素がクエンチャ色素に近接すると、例えば、フェルスタ型のエネルギー移動により、レポーター色素の蛍光が抑制される。PCR中、順方向及び逆方向プライマは、多型に隣接する標的DNAの特異的配列とハイブリダイズする一方、ハイブリダイゼーションプローブは、増幅PCR産物内の多型含有配列とハイブリダイズする。後続のPCRサイクルでは、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を備えたDNAポリメラーゼによりプローブが切断され、レポーター色素がクエンチャ色素から分離されて、レポーターの蛍光が増加する。

【0052】

他の実施形態において、対象のアレル又は座位は、核酸配列決定手法を用いて直接的に配列決定することができる。核酸配列決定方法は、当該技術分野において公知であり、454 Life Sciences（コネチカット州ブランフォード）、Agencourt Bioscience（マサチューセッツ州ビバリー）、Applied Biosystems（カリフォルニア州フォスターシティ）、LI-COR Biosciences（ネブラスカ州リンカーン）、NimbleGen Systems（ウィスコンシン州マディソン）、Illumina（カリフォルニア州サンディエゴ）、及びVisiGen Biotechnologies（テキサス州ヒューストン）が提供する手法が含まれる。こうした核酸配列決定手法には、R.F. Service Science 311:1544-1546、2006にて検討されているように、パラレルビーズアレイ、ライゲーションによる配列決定、キャピラリー電気泳動、電子マイクロチップ、「バイオチップ」、マイクロアレイ、パラレルマイクロチップ、及び一分子アレイ等のプラットフォームが含まれる。

10

【0053】

本発明により使用されるマーカは、好ましくは、後続の個体群について推測を行うために、起源の特徴を示すべきである。これまでの経験から、SNPマーカは、特定のSNPアレルが特定の種の現存個体群内の独立した起源に由来する可能性が非常に低いため、マッピングに理想的となり得ることが示唆される。そのため、SNPマーカは、アレル又は座位の移入の追跡及び支援に有用であると思われる。

【0054】

定義

20

以下の定義は、本発明をより優れた形で定義し、本発明の実施において当業者を導くために提供される。特に記載しない限り、用語は、当業者による従来の用法に応じて理解されるべきである。

【0055】

本明細書での使用において、「植物」という用語は、植物細胞、植物プロトプラスト、ハウレンソウ植物を再生可能な組織培養の植物細胞、植物カルス、植物群、及び植物において又は花粉、花、種子、葉、茎等の植物の部分において、完全な状態である植物細胞を含む。

【0056】

本明細書での使用において、「DM」又は「べと病」という用語は、ペロノスポラ属由来の病原菌、特に *Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* (Pfs) が引き起こす、ハウレンソウ等の植物の病気を示す。

30

【0057】

本明細書での使用において、「レース」は、DMを引き起こすことが可能な、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* (Pfs) の公的に指定された株を示す。本明細書での使用において、「分離菌」は、DMを引き起こすことが可能であり、未だ公的に命名されていない、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* (Pfs) の新たに発見された株を示す。本発明によるDMに対する耐性を備えたハウレンソウ植物は、A、C、及びVtから選択されたアレルの組み合わせを保有する。DM耐性は、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* の1つ以上の公知のレースに対するもの、或いは、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* の1つ以上の分離菌に対するものとなり得る。他の実施形態において、本発明の植物は、少なくとも *Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* Pfs 7、8、10、11、12、13、及び／又は14に対する耐性を有するものとして定義される場合がある。

40

【0058】

本明細書での使用において、「家系」、「個体群」、及び「後代」という用語は、共通の親からの派生物を共有する植物の集合を意味する。

【0059】

50

本明細書での使用において、「変種」及び「栽培品種」という用語は、遺伝的家系及び能力により、同じ種内の他の変種から識別可能な類似する植物の群を意味する。

【0060】

本明細書での使用において、「アレル」は、染色体上の所定の座位におけるゲノム配列の2つ以上の代替形態の1つを示す。

【0061】

「量的形質座位 (QTL)」は、表現型の表現度に影響する少なくとも第1のアレルをコードする染色体位置である。

【0062】

本明細書での使用において、「マーカ」は、生物を区別するために使用できる検出可能な特徴を意味する。こうした特徴の例には、限定ではないが、遺伝子マーカ、生化学マーカ、代謝産物、形態学的特徴、及び農学的特徴が含まれる。

【0063】

本明細書での使用において、「表現型」という用語は、遺伝子発現により影響を受け得る細胞又は生物の検出可能な特徴を意味する。

【0064】

本明細書での使用において、「耐性」という用語は、感受性植物と比較した際の病徴の不在及び／又は減少により示すことが可能な、植物の自然免疫による病原体感染の回避及び／又は低減を意味する。

【0065】

本明細書での使用において、「感受性」という用語は、病態をもたらす、病原体による植物の感染を意味する。

【0066】

本明細書での使用において、「適合性相互作用」という用語は、病態をもたらす、病原体による感受性植物の感染を意味する

【0067】

本明細書での使用において、「不適合性相互作用」という用語は、病態の不在及び／又は減少により示すことが可能な、病原体による耐性植物の感染の回避及び／又は低減を意味する。

【0068】

本明細書での使用において、「遺伝子型」という用語は、植物の特異的なアレル構造を意味する。

【0069】

本明細書での使用において、「ヘテロ接合相」という用語は、アレルの2つの別個のコピーを保有する、ハウレンソウ等の2倍体植物を意味する。

【0070】

本明細書での使用において、「ホモ接合相」という用語は、アレルの2つの同一のコピーを保有する、ハウレンソウ等の2倍体植物を意味する。

【0071】

本明細書での使用において、「移入」という用語は、遺伝子座に関連して用いられる場合、戻し交配等により、新たな遺伝的背景に導入された遺伝子座を示す。したがって、遺伝子座の移入は、植物育種方法を介して、及び／又は分子遺伝学的方法により、達成することができる。こうした分子遺伝学的方法には、限定ではないが、様々な植物形質転換手法、及び／又は、相同組換え、非相同組換え、部位特異的組換え、及び／又は座位の置換若しくは座位の転換をもたらすゲノム修飾を提供する方法が含まれる。

【0072】

本明細書での使用において、「連鎖」という用語は、核酸マーカ及び／又はゲノム領域に関連して使用される場合、マーカ及び／又はゲノム領域が同じ連鎖群又は染色体上に位置し、減数分裂において共に分離する傾向を有するようになることを意味する。

【0073】

10

20

30

40

50

本明細書での使用において、「表示する (denoting)」という用語は、植物の遺伝子型に関連して使用される場合、植物が特定の遺伝子型を有することを示す任意の方法を示す。これには、特定の遺伝子型を有する植物を同定する任意の手段が含まれる。特定の遺伝子型の表示は、限定ではないが、植物の遺伝子型を示す任意の種類の書面又は電子媒体又はデータベースへの任意の入力を含み得る。特定の遺伝子型の表示は、更に、限定ではないが、植物を物理的にマーク又はタグ付けする任意の方法が含まれる。本発明において有用な物理的マーキング又はタグを例示するものには、限定ではないが、バーコード、無線IDタグ (RFID)、標識等が含まれる。

【0074】

寄託情報

SMBS011-1162M、SMB-66-1143M、及びSSB-66-1131Mとして指定された *Spinacia oleracea* 系統種の少なくとも2500個の種子を寄託した。寄託は、American Type Culture Collection (ATCC)、10801 University Boulevard、Manassas、Va. 20110-2209 USA に対して行われた。寄託物には、ATCC受託番号PTA-120472、PTA-12486、及びPTA-12041がそれぞれ割り当てられた。これらの系統種の寄託日は、それぞれ2013年7月17日、2012年2月2日、及び2011年8月19日である。寄託物へのアクセスは、本願係属中、資格を有する人物の要求に応じて可能となる。寄託物は、公共の保管場所であるATCC Depositoryにおいて、30年間、又は直近の要求後5年間、又は特許の有効期間のうち、より長い期間に亘って維持され、その期間中に生育不能となった場合に交換される。出願者は、この特許又は植物変種保護法 (7 U. S. C. 2321 以下参照) を含む何らかの形式の品種保護の下で付与された権利の侵害を放棄しない。

【実施例】

【0075】

実施例

以下に開示した実施形態は、様々な形態で実施し得る本発明の例示に過ぎない。したがって、以下の実施例に開示した具体的な構造、機能、及び手順の詳細は、限定と解釈されるべきではない。

【0076】

実施例1

Spinacia oleracea におけるDMレースに対する新規の耐性の同定

実施例5に記載の疾患アッセイを用いて、*S. oleracea* 生殖質において選別を行った。内部の遺伝子バンク内の *S. oleracea* 系統種を選別した。加えて、十分な感受性を有するか、或いは耐性特異性の組み合わせを有する公的に入手可能なハウレンソウハイブリッドを、感受性及び耐性の基準として試験に含めた。感染は、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae* (Pfs) レース7、8、及び10乃至14により、レース1乃至6に関する過去のデータを補完するように行った。レース9は、もはや栽培地には存在していない。レースを指定された株に加えて、2013年の春にカリフォルニア (米国) にて採取された耐性克服分離菌を含めた。この分離菌は、現在、International Working Group on *Peronospora* によりUA4712と呼ばれており、レースPfs15の可能性が高い候補とされている。

【0077】

感染に対する対照エントリの応答は、表1に示しており、他の公開データと一致する (Correll et al., Eur J Plant Pathol 129:193-205, 2011)。両親が耐性特異性に寄与するにもかかわらず、試験に含めた全ての商業用ハイブリッド基準は、全ての分離菌に対する耐性を示すことができなかった。例えば、変種Lionは、レース10に対する感受性を有し、Lazioはレース11乃至14に対する感受性を有し、Pigeonは、レー

ス14に対する感受性を有する。レース10及び14の両方に対する耐性は、単一のハイブリッドでは観察されておらず、レース13及び14に対する耐性の組み合わせは、ハイブリッドLionのみで観察された。

【0078】

内部遺伝子バンクのS. oleracea系統種のうち、3系統は、耐性の相補的な組み合わせを有することが分かった。インブレッド系統SMBS011-1162Mは、アレルAとして同定されたアレルを保有し、レース13及び14を含む複数のレースに対する耐性を有した。第2のインブレッド系統SSB-66-1131Mは、Vtに指定されたアレルを含み、レース1乃至13に対する耐性を有することが分かった。最後のインブレッド系統SMB-66-1143Mは、アレルCとして同定されたアレルを含み、レース1乃至10に加え、新たな分離菌UA4712に対する耐性を有することが分かった。同定されたアレルのそれぞれは、異なるレースの組み合わせに対するDM耐性を与えることが分かった。

【0079】

【表1】

表1. Pfs レース1-14及び分離菌UA4712による感染に対する対照及び実験エントリの表現型応答

受け入れ レース	商業的ハイブリッド										系統		
	Viroflay	Resistoflay	Clermont	Campania	Boeing	Califlay	Whale	Lion	Lazio	Pigeon	A (SMBS011-1162M)	Vt (SSB-66-1131M)	C (SMB-66-1143M)
Pfs 1	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Pfs 2	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R
Pfs 3	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Pfs 4	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R
Pfs 5	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Pfs 6	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R
Pfs 7	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
Pfs 8	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R
Pfs 10	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R
Pfs 11	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
Pfs 12	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S
Pfs 13	S	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R	R	S
Pfs 14	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S
UA4712											S	S	R

Sは、感受性応答であり、胞子形成する葉表面の平均パーセンテージが85%を上回ると推定されるもの。Rは、耐性であり、胞子形成が全く無いこと又は殆ど無いこと（3%未満）により示される。

【0080】

実施例2

DMに対する耐性のマッピング

Irish et al. (2008)は、S. oleracea由来の耐性座位RPF1と密接に連鎖する、Dm-1に指定された共優性マーカを同定した。Dm-1とRPF1との遺伝距離は、1.7cMと推定された。RPF1座位に対するDm-1マーカの微細マッピングを更に行い、Dm-1マーカの近傍にある配列リソースを生成したが、RPF1のクローニングは発生させていない (Yang et al., Initial fine-mapping of the spinach downy mildew resistance locus RPF1, University of Arkansas, 2013, 102 pages; 1536814)。原因となる多型の欠如と、Dm-1及びRPF1間の距離とを考えると、関連性は、戻し交配又は循環選択中に失われる可能性がある。そのため、耐性アレルの追跡及び更なる微細マッピングには、耐性の両側に隣接するマーカが必要となった。

【0081】

3つの耐性アレルA、Vt、又はCの1つを保有するハウレンソウ系統を、レースPfs 1乃至4に対する耐性を排他的に有する系統と個別に交配させた。殆どのレースに対する耐性は、両親に由来する耐性を区別するレースによりF1個体を感染させた際の症状の欠如に基づいて、優性遺伝する。対照的に、アレルA由来のレース7及び13に対する耐性は、劣性であると思われる。F3ファミリーを、別個の2親性F1交配からの単粒系統法により取得し、表現型により選別した。疾患アッセイには、Pfsレース8に感染させた、アレルAについて分離した74のF3ファミリーと、レース7、10、及び12によるチャレンジを行った、アレルVtについて分離した107のF3ファミリーと、レース10を接種した、アレルCについて分離した40のF3ファミリーを含めた。興味深いことに、Vt由来ファミリーが1つのレースに対する抵抗を示す場合には、他の2レースに対する免疫も観察された。

10

【0082】

公開情報に基づいて、配列スキャフォールドの可能性のある位置を、DM耐性と同じ位置でSF34732、SF59002、SF62749、SF63815、SF90906、SF95487、及びSF178637に指定した。DMに対する耐性を与えるアレルアレルC、A、及びVtに対応するヌクレオチド配列の例を、配列番号：1乃至25として記載する。更に、スキャフォールドの個別のアレル間の多型を図3に示す。これらのスキャフォールドに由来する一塩基多型（SNP）を、1つ以上のマッピング個体群において多型であることに基づいて選択した。SNPは、TaqMan（TM）アッセイに変換し、各個体群のそれぞれのF3ファミリーのF2個体の遺伝子型判定に用いた。連鎖不平衡を試験し、SNP及び表現型間の遺伝距離を、JoinMapを用いて推定した（Stam, Plant J 3:739-744, 1993）。関連解析により、配列スキャフォールドと耐性との連鎖を、単一の集合を組み立てることで確認した。この結果は、マッピングに使用したソース又はレースと無関係であることが分かった（図1）。観察された組換え頻度及び導出された遺伝距離は、各個体群の個別の試料サイズにより変化した。スキャフォールドSF59002及びSF95487は、全ての個体群で同時分離すると思われた。スキャフォールド及び遺伝子マーカの順序は、アレルVt又はアレルCについて分離した個体群において一定となった。しかしながら、例えば、スキャフォールドSF59002及びSF90906に対するSF62749の正確な位置は、不明確なままである。最後に、Khattak et al. (Euphytica 148:311-318, 2006)により公開された、変換及びマッピング済みのSSRマーカーにより、連鎖群を公開されているLG6として同定した。

20

30

【0083】

実施例3

DM耐性アレルの定量効果

実施例2において収集した遺伝子型及び表現型は、標準インターバルマッピング設定を利用して、mapQTLによる定量解析に使用した（Van Ooijen, 1996）。Peronospora farinosa f. sp. Spinaciaeレース8に対する耐性のための主要な座位は、アレルAについて分離したマッピング個体群において検出された。LODピーク値57.51により証明されるように、形質は、スキャフォールドSF59002、SF95487、及びSF63815由来のマーカーとの関連性が高かった（表2）。座位は、大きな影響を有していると思われ、観察された97.2%の分散を説明するものとなった。

40

【0084】

【表 2】

表 2. P f s レース 8 に対する耐性アレル A の定量分析

map	lod	iter	mu_A	mu_H	mu_B	var	%expl	add	dom	locus
-----	-----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
0	40.53	4	94.4444	50	2.63158	92.0657	92	45.9064	1.46199	SF90906a
0.7	46.42	4	97.0588	50	2.63158	63.8022	94.4	47.2136	0.154799	SF90906b
1.4	57.51	4	100	50	2.63158	32.0057	97.2	48.6842	-1.31579	SF59002
1.4	57.51	4	100	50	2.63158	32.0057	97.2	48.6842	-1.31579	SF95487
1.4	57.51	4	100	50	2.63158	32.0057	97.2	48.6842	-1.31579	SF63815
5.7	31.74	4	94.1176	50	2.77778	159.093	86.1	45.6699	1.55229	SF62749

10

P f s レース 7、10、及び 12 に対する耐性についてのソース V t (S S B-66-1131M) による第 2 の分析でも、耐性座位が同定された (表 3、4、及び 5)。使用した分離菌に関係無く、座位は、L O D ピーク値 91.81 により証明されるように、スキヤフォールド S F 95487 及び S F 59002 と強く連鎖すると思われた。この座位は、大きな影響を有し、ほぼ全ての表現型分散を説明するものとなった。特に、耐性ソース A (S M B S 011-1162M) 及び V t (S S B-66-1131M) において同定された座位は、共線状である。

【0085】

【表 3】

表 3: P f s レース 7 に対する耐性アレル V t の定量分析

map	lod	iter	mu_A	mu_H	mu_B	var	%expl	add	dom	locus
-----	-----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
0	24.43	4	88	52.7273	9.25926	408.188	65.1	39.3704	4.09764	SF34732a
0.6	25.6	4	88.4615	51.8519	9.25926	388.21	66.8	39.6011	2.99145	SF34732b
11.7	91.81	4	98.0769	50	0	22.4659	98.1	49.0385	0.961538	SF95487
11.7	91.81	4	98.0769	50	0	22.4659	98.1	49.0385	0.961538	SF59002
13.8	55.39	4	94.4444	50.9259	1.92308	107.703	90.8	46.2607	2.74217	SF90906
19.8	31.02	4	89.6552	51.0638	11.2903	307.4	73.7	39.1824	0.591082	SF62749

20

【0086】

【表 4】

表 4: P f s レース 10 に対する耐性アレル V t の定量分析

map	lod	iter	mu_A	mu_H	mu_B	var	%expl	add	dom	locus
-----	-----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
0	24.43	4	88	52.7273	9.25926	408.188	65.1	39.3704	4.09764	SF34732a
0.6	25.6	4	88.4615	51.8519	9.25926	388.21	66.8	39.6011	2.99145	SF34732b
11.7	91.81	4	98.0769	50	0	22.4659	98.1	49.0385	0.961538	SF95487
11.7	91.81	4	98.0769	50	0	22.4659	98.1	49.0385	0.961538	SF59002
13.8	55.39	4	94.4444	50.9259	1.92308	107.703	90.8	46.2607	2.74217	SF90906
19.8	31.02	4	89.6552	51.0638	11.2903	307.4	73.7	39.1824	0.591082	SF62749

30

【0087】

【表 5】

表 5: P f s レース 12 に対する耐性アレル V t の定量分析

map	lod	iter	mu_A	mu_H	mu_B	var	%expl	add	dom	locus
-----	-----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
0	24.43	4	88	52.7273	9.25926	408.188	65.1	39.3704	4.09764	SF34732a
0.6	25.6	4	88.4615	51.8519	9.25926	388.21	66.8	39.6011	2.99145	SF34732b
11.7	91.81	4	98.0769	50	0	22.4659	98.1	49.0385	0.961538	SF95487
11.7	91.81	4	98.0769	50	0	22.4659	98.1	49.0385	0.961538	SF59002
13.8	55.39	4	94.4444	50.9259	1.92308	107.703	90.8	46.2607	2.74217	SF90906
19.8	31.02	4	89.6552	51.0638	11.2903	307.4	73.7	39.1824	0.591082	SF62749

40

アレル C 由来の耐性に関する研究は、P f s レース 10 により行った。以前の結果と同様に、耐性についての主要な座位は、スキヤフォールド S F 34732 及び S F 6381

50

と強く関連すると思われた（表6）。

【0088】

【表6】

表6：P f s レース10に対する耐性アレルCの定量分析

map	lod	iter	mu_A	mu_H	mu_B	var	%expl	add	dom	locus
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
0	perfect fit	3	100	50	0	0	100	50	0	SF34732
0	perfect fit	3	100	50	0	0	100	50	0	SF63815
1.3	28.02	4	100	46.6667	0	58.3333	96	50	-3.33333	SF95487
1.3	28.02	4	100	46.6667	0	58.3333	96	50	-3.33333	SF59002
2.6	22.3	4	100	46.4286	6.25	112.723	92.3	46.875	-6.69643	SF90906
8.4	12.19	4	100	47.2222	8.33333	361.111	75.4	45.8333	-6.94444	SF62749
22.1	6.14	4	96.6667	47.2222	28.5714	724.504	50.7	34.0476	-15.3968	SF178637

DM耐性は、使用したソース又は分離菌とは無関係の第6染色体に位置した。耐性座位は、遠位位置では一般に配列スキャフォールドSF34732及びSF63815、近位位置では一般に配列スキャフォールドSF59002、SF95487及びSF90906である共通のマーカにより描写された。

【0089】

実施例4

ハイブリッドにおける耐性アレルA、Vt、及びCの配置

耐性アレルA、C及びVtを感受性ハイブリッドに導入した。インブレッッドSMB S 0 1 1-1 1 6 2 MをアレルAのドナーとして用い、系統S S B-6 6-1 1 3 1 MをVtに対して用い、アレルCには、SMB-6 6-1 1 4 3 Mをソースとして用いた。それぞれのアレルは、当該技術分野において公知の育種方法に続いて、感受性ハイブリッドのインブレッッド親の両方に別々に移入した。次に、アレルAについてホモ接合性（A/A）である第1のハウレンソウ植物を、第2のハウレンソウ植物（C/C）と交配させ、アレルA及びCについてヘテロ接合性のハイブリッドF1を生成した（図2A）。このハイブリッドをシングルハイブリッドA又はF1（A/C）と称した。F1（A/C）は、実施例5に記載したように、*Peronospora farinosa* f. sp. *Spinaciae*の公知のレース及び分離菌UA4712により選別した。このハイブリッドは、レース13を除く全てのP f s レースに対する耐性を有することが分かった（表7）。ハイブリッドAは、新生分離菌UA4712に対する耐性も有する。

【0090】

アレルC及びVtを保有するハイブリッドB（図2B）は、記載のように選別し、P f s 14を除く全てのP f s レースに対する耐性を有することが分かった（表7）。P f s レース14は欧州において発生しないため、これは重要である。ハウレンソウ植物におけるアレルC及びVtの組み合わせは、欧州市場に対する完全な耐性品種をもたらす。

【0091】

アレルA及びVtを備えたハイブリッドCは、分離菌UA4712を除く全てのP f s レースに対する耐性を有した（表7）。新たな分離菌の分布は、当初は幾つかの場所に限定されているため、これも重要である。F1（A/Vt）は、現在命名されている全てのP f s レースに対する耐性を有する。

【0092】

2親性ハイブリッドに加え、3元ハイブリッドを生成した。3元ハイブリッドは、F1種子親をインブレッッド親P2に交配させることで作出した。F1種子親は、P1の2つの準同質遺伝子系統間での交配により生じたものであり、それぞれ別個の耐性アレルを保有する。インブレッッド親P2は、第3の相補的なアレルを保有する。3元ハイブリッドにより、同定された3つ全てのアレルを、2倍体ハイブリッド植物の混合個体群に配置することが可能となる。3種類の3元ハイブリッドが可能となる（図2B）。各交配により、公知の全P f s レース及び分離菌UA4712に対する耐性を備えたハイブリッド植物の個

体群が生じる。しかしながら、各アレルの頻度は、どのように3元交雑が構築されたかに依存する。

【0093】

栽培ホウレンソウ *Spinacia oleracea* に含まれる遺伝的変化を起源とする新規の耐性が同定された。この耐性は、栽培作物における遺伝的多様性が一般に狭小であるため、驚くべきことである (Fernie et al., Curr. Opin. Pl. Biol. 9:196-202, 2006)。3つのホウレンソウ系統における3つの独自の耐性アレル A、Vt、及び／又は C の同定により、種内の *S. oleracea* 交配のみによるレース特異的 DM 耐性育種が提供される。加えて、これらのアレルは、新規の属性を組み合わせることにおいて最も優れたものとなるシングルハイブリッドの組み合わせにおいて、耐性の積み重ねを可能とし、公知の全 Pfs レース、新たな分離菌 UA 4712 に対する耐性、又は記述されている全ての欧州 DM 集団に対する耐性を含む。3つの耐性アレルに関連するマーカーにより、任意の栽培ホウレンソウハイブリッドにおいて、記述されている DM 耐性アレル等の導入が可能となる。最後に、3元ハイブリッド法の開示により、更なる DM 耐性変種の開発が可能となる。

【0094】

【表7】

表7. Pfs レース1乃至8、10乃至14、及び分離菌 UA 4712 によるリーフディスキの感染に対する検定交雑の表現型応答

検定交雑	Pfs 1	Pfs 2	Pfs 3	Pfs 4	Pfs 5	Pfs 6	Pfs 7	Pfs 8	Pfs 10	Pfs 11	Pfs 12	Pfs 13	Pfs 14	UA4 712
F1 (A/C)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
F1 (C/Vt)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
F1(Ax Vt)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S

「S」は、感受性応答を示す。「R」は、耐性を示す。

【0095】

実施例5

DM に対する耐性についてホウレンソウ系統種を選別するためのアッセイ

べと病 (DM) に対する耐性についてホウレンソウ系統種を選別するために、植物新品種保護国際同盟 (UPOV) が策定した検定を利用した。"Protocol for Tests on Distinctness, Uniformity, and Stability of *Spinacia oleracea* L. Spinach," UPOV Code: SPINA_OLE, CPVO-TP/055/5 は、2013年2月27日に採択及び施行された。プロトコルは次の通りである。

【0096】

Peronospora farinosa f. sp. *Spinaciae* のレースは、Naktuinbouw (P. O. Box 40, NL-2370 AA, Roelofarendsveen, Netherlands, naktuinbouw.com) から入手可能な生きた宿主植物において維持するか、或いは、-20℃で最長1年間に亘り保管される胞子を有する植物材料において維持する。

【0097】

検定の実施：個体の成長段階：第1の子葉／葉、11日齢個体、温度：日中15℃／夜間12℃、光：発芽後1日15時間、生育方法：温室又は生育室内のポット又はトレイ内の土壌。

【0098】

接種方法：胞子形成している葉を、7日前に感染させた宿主個体から採取し、滅菌水道

水により完全に洗い落とす（224個体につき最大150mlの水）。孢子懸濁液をチーズクロスにより濾過し、検定個体に噴霧し、接種材料が葉を覆うが、流れ落ちない状態とする。150mlの懸濁液は、3×224までの個体に対して十分となる。孢子密度は、20,000乃至100,000分生子/ml水とするべきである。孢子懸濁液は、新鮮なものを用いるべきである。ハウレンソウと病は風媒性であるため、孢子形成植物は、閉じた容器又は隔離室に入れ、相互汚染を防止するべきである。

【0099】

各増殖及び各検定では、レースの同一性を確保するために耐性の制御が必要となる。苗の発育及び培養中の光及び湿度条件が重要となる。最適な略89乃至90%RHの湿度により、植物の成長及び菌類の成長が可能となり、強い光により、孢子的発芽及び感染が阻害される。検定は、冬季に直射日光を防いで実施するべきである。接種後、植物は、3日間に亘りプラスチックを被せた状態とするべきである。この期間の後、日中は、プラスチックを僅かに持ち上げるべきである。

10

【0100】

検定期間：増殖産物は、接種後7日で孢子を形成する。播種から接種まで：11日、接種から測定まで：10日、検定個体数：56個体、感染の評価：耐性は通常完全となり、感染の結果として壊死点が見える場合もある。感受性植物は、様々な度合いの孢子形成を示す。孢子形成は、葉を覆う灰色の部分として見え、水分の多い背軸側で始まる。

【0101】

レースを同定する判別品種：Peronospora farinosa f. sp. SpinaciaeのレースPfs：1乃至8及び10乃至13は、表8による「判別品種」の標準セットにより定義される。

20

【0102】

【表8】

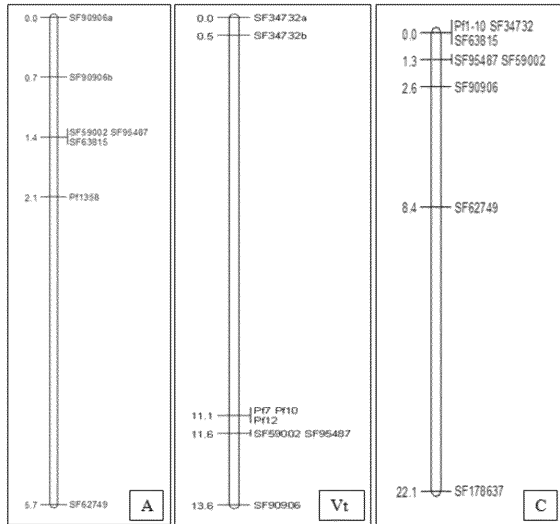
表8. レースを同定する判別品種：Peronospora farinosa f. sp. SpinaciaeのレースPfs：1乃至8及び10乃至13

判別品種	Pfs:1	Pfs:2	Pfs:3	Pfs:4	Pfs:5	Pfs:6	Pfs:7	Pfs:8	Pfs:10	Pfs:11	Pfs:12	Pfs:13
Viroflay	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Resistoflay	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Califlay	R	S	R	S	R	S	S	R	S	R	R	S
Clermont	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Campania	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S
Boeing	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R
Lion	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
Lazio	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S

30

Rは耐性の存在、Sは耐性の欠如（感受性）

【図 1】



【図 2 A】

シングル ハイブリッド A: P1(A/A) x P2(C/C)

F1(A/C)

シングル ハイブリッド B: P1(Vt/Vt) x P2(C/C)

F1(Vt/C)

シングル ハイブリッド C: P1(A/A) x P2(Vt/Vt)

F1(A/Vt)

【図 2 B】

三元 ハイブリッド 1: P1(A/A) x P1(Vt/Vt) P2(C/C)

P1(A/Vt) x P2(C/C)

F1(A/C) and F1(Vt/C)

三元 ハイブリッド 2: P1(A/A) x P1(C/C) P2(Vt/Vt)

P1(A/C) x P2(Vt/Vt)

F1(A/Vt) and F1(C/Vt)

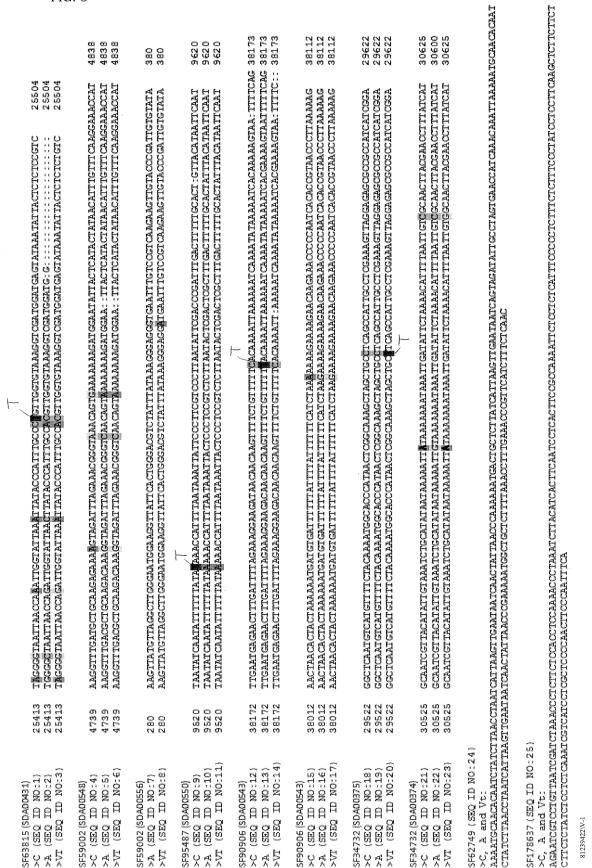
三元 ハイブリッド 3: P1(C/C) x P1(Vt/Vt) P2(A/A)

P1(C/Vt) x P2(A/A)

F1(C/A) and F1(Vt/A)

【図 3】

FIG. 3



【配列表】

0006872307000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 0 1 H 6/02 (2018.01) A 0 1 H 6/02

前置審査

- (72)発明者 バルト・ウィレム・ブルフマンス
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブールバード 8 0
0 番
- (72)発明者 ジョン・メーウセン
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブールバード 8 0
0 番
- (72)発明者 クラウディア・ノーイエン
アメリカ合衆国 6 3 1 6 7 ミズーリ州セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブールバード 8 0
0 番

審査官 飯室 里美

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 0 5 5 4 2 2 (US, A1)
米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 9 8 8 8 2 (US, A1)
Plant Disease, January 2014, Vol.98, p.145-152

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 0 1 H 5 / 0 0
A 0 1 H 1 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q