

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-506655
(P2025-506655A)

(43)公表日 令和7年3月13日(2025.3.13)

(51)国際特許分類		F I		
A O 1 H	6/82 (2018.01)	A O 1 H	6/82	Z N A
A O 1 H	5/10 (2018.01)	A O 1 H	5/10	
C 1 2 N	15/29 (2006.01)	C 1 2 N	15/29	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全34頁)				
(21)出願番号	特願2024-547663(P2024-547663)	(71)出願人	520222106	
(86)(22)出願日	令和5年2月16日(2023.2.16)		シンジェンタ クロップ プロテクション	
(85)翻訳文提出日	令和6年8月13日(2024.8.13)		アクチェンゲゼルシャフト	
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/053979		スイス 4 0 5 8 バーゼル ローゼンタ	
(87)国際公開番号	WO2023/156569		ールシュトラーセ 6 7	
(87)国際公開日	令和5年8月24日(2023.8.24)	(74)代理人	100103610	
(31)優先権主張番号	22157283.7		弁理士 ▲吉▼田 和彦	
(32)優先日	令和4年2月17日(2022.2.17)	(74)代理人	100109070	
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 須田 洋之	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100119013	
	最終頁に続く		弁理士 山崎 一夫	
		(74)代理人	100111796	
			弁理士 服部 博信	
		(74)代理人	100123766	
			弁理士 松田 七重	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 T o B R F V耐性を有する新規トマト植物

(57)【要約】

本発明は、T o B R F V感染に対して高い耐性を示す新規トマト植物に関する。本発明はまた、種子及び前記植物の部分、例えば果実に関する。本発明はさらに、このような種子及び植物を形成及び使用方法に関する。本発明はまた、前記高い耐性に関連する新規遺伝子配列及び前記新規遺伝子配列に関連する分子マーカに関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T o B R F V に対する耐性を付与するソラナム・ガラパゲンセ (*S o l a n u m g a l a p a g e n s e*) 由来の遺伝子移入配列をそのゲノム中に含み、前記遺伝子移入配列が第 1 染色体上に位置し、以下の SNP マーカの少なくとも 1 つを含む、T o B R F V 感染に耐性である栽培種トマト植物、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム (*S o l a n u m l y c o p e r s i c u m*) 植物：

a) 配列番号 6 中の位置 7 9 に対応する位置における SNP マーカ 2 に対してホモ接合状態である A 遺伝子型；

b) 配列番号 1 1 中の位置 5 1 に対応する位置における SNP マーカ 3 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型；及び／又は

c) 配列番号 1 6 中の位置 1 4 7 に対応する位置における SNP マーカ 4 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型。

【請求項 2】

a) SNP マーカ 2 に対する前記 A 遺伝子型は、一対のオリゴヌクレオチドプライマ：配列番号 7 の順方向プライマ及び配列番号 1 0 の逆方向プライマ、並びに、配列番号 8 のプローブを伴う核酸フラグメントの増幅による PCR において同定可能であり；

b) SNP マーカ 3 に対する前記 G 遺伝子型は、一対のオリゴヌクレオチドプライマ：配列番号 1 2 の順方向プライマ及び配列番号 1 5 の逆方向プライマ、並びに、配列番号 1 3 のプローブを伴う核酸フラグメントの増幅による PCR において同定可能であり；並びに／又は

c) SNP マーカ 4 に対する前記 G 遺伝子型は、一対のオリゴヌクレオチドプライマ：配列番号 1 7 の順方向プライマ及び配列番号 2 0 の逆方向プライマ、並びに、配列番号 1 8 のプローブを伴う核酸フラグメントの増幅による PCR において同定可能である、請求項 1 に記載の植物。

【請求項 3】

前記遺伝子移入配列が、配列番号 6、配列番号 1 1、及び／若しくは配列番号 1 6 のうちの少なくとも 1 つ、又は前記配列のうちの 1 つ以上と少なくとも 8 0 % 同一である配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の植物。

【請求項 4】

前記遺伝子移入配列が、トマト植物 1 9 T E P 0 8 0 6 7 0 (その代表種子は N C I M B 受入番号 4 3 9 3 8 で寄託されている)、又はその子孫若しくは祖先に含まれる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の植物。

【請求項 5】

前記植物が、トマト植物 1 9 T E P 0 8 0 6 7 0 (その代表種子は N C I M B 受入番号 4 3 9 3 8 で寄託されている)、又はその子孫若しくは祖先、又はソラナム・ガラパゲンセ (*S o l a n u m g a l a p a g e n s e*) 系統種 L A 0 4 8 3 を、前記 T o B R F V 耐性付与遺伝子移入配列を含まないトマト植物と交配することによって得られる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の植物。

【請求項 6】

前記植物は、近郊系、二ゲノム性半数体、二倍体、又はハイブリッド植物である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の植物。

【請求項 7】

その代表種子は N C I M B 受入番号 4 3 9 3 8 で寄託されている、トマト植物 1 9 T E P 0 8 0 6 7 0 の植物。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の植物の植物部位。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の植物又は植物部位をもたらす種子。

【請求項 1 0】

T o B R F V 感染に耐性である栽培種トマト植物、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム (S o l a n u m l y c o p e r s i c u m) 植物の生産方法であって、

a) 請求項 1～7 のいずれか一項に記載の植物を、前記 T o B R F V 耐性付与遺伝子移入配列を欠く栽培種トマト植物と交配するステップ；

b) T o B R F V に対する耐性を付与する、第 1 染色体上に位置する前記遺伝子移入配列を含む子孫植物を選択するステップであって、以下の S N P マーカのうちの少なくとも 1 つを検出することを含む、ステップ；

i) 配列番号 6 中の位置 7 9 に対応する位置における S N P マーカ 2 に対してホモ接合状態である A 遺伝子型；

i i) 配列番号 1 1 中の位置 5 1 に対応する位置における S N P マーカ 3 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型；及び／又は

i i i) 配列番号 1 6 中の位置 1 4 7 に対応する位置における S N P マーカ 4 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型；

を含み、

それにより、T o B R F V に対して増強された耐性を有する植物を生産する、方法。

【請求項 1 1】

c) 前記選択された子孫を自配させるステップ、又は、前記選択された子孫と他のトマト植物とを交配してさらなる子孫を生産するステップ

をさらに含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

さらなる子孫は、選択され、2～1 0 世代自配／交配される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

ステップ a) の前記植物が、トマト植物 1 9 T E P 0 8 0 6 7 0 (その代表種子は N C I M B 受入番号 4 3 9 3 8 で寄託されている)、又はその子孫若しくは祖先、又はソラナム・ガラパゲンセ (S o l a n u m g a l a p a g e n s e) 系統種 L A 0 4 8 3 である、請求項 1 0～1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

T o B R F V に対する耐性を示す F 1 トマト植物を生産する方法であって、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の植物である近郊系トマト植物と、異なる近郊系トマト植物とを交配して、F 1 ハイブリッド子孫を生産するステップを含む、方法。

【請求項 1 5】

T o B R F V 感染に耐性であり、T o B R F V 耐性付与遺伝子移入配列の少なくとも 1 つのコピーを有する、栽培種トマト植物、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム (S o l a n u m l y c o p e r s i c u m) 植物を同定するための方法であって、以下の S N P マーカの少なくとも 1 つを検出するステップを含み；

a) 配列番号 6 中の位置 7 9 に対応する位置における S N P マーカ 2 に対してホモ接合状態である A 遺伝子型；

b) 配列番号 1 1 中の位置 5 1 に対応する位置における S N P マーカ 3 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型；及び／又は

c) 配列番号 1 6 中の位置 1 4 7 に対応する位置における S N P マーカ 4 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型；

それにより、T o B R F V に対する耐性を示すトマト植物を同定する、方法。

【請求項 1 6】

前記 1 つ以上の S N P マーカを含むトマト植物を選択するステップ、及び、前記選択されたトマト植物と第 2 のトマト植物とを交配して、前記 S N P マーカの少なくとも 1 つを含むと共に T o B R F V に対する耐性を示す子孫トマト植物を生産するステップをさらに含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

請求項 9 に記載の種子からトマト植物を成長させるステップ、及び、前記植物にさらな

10

20

30

40

50

るトマト種子を生産させるステップを含む、トマト種子を生産する方法。

【請求項 18】

T o B R F V に対する耐性を示す栽培種トマト植物、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム (S o l a n u m l y c o p e r s i c u m) 植物の遺伝子型を評価する方法であって、以下のステップを含む、方法：

a) 前記植物からのサンプルを提供するステップ、及び

b) 前記サンプルにおいて、第 1 染色体上に位置し、且つ前記 T o B R F V 耐性に関連する Q T L 遺伝子座を検出するステップであって、前記 Q T L 遺伝子座が、S N P マーカ 1 及び 5、並びに以下の S N P マーカのうちの少なくとも 1 つに隣接している、ステップ：

i) 配列番号 6 中の位置 7 9 に対応する位置における S N P マーカ 2 に対してホモ接合状態である A 遺伝子型；

i i) 配列番号 1 1 中の位置 5 1 に対応する位置における S N P マーカ 3 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型；

i i i) 配列番号 1 6 中の位置 1 4 7 に対応する位置における S N P マーカ 4 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型；及び／又は

i v) S N P マーカ 1 及び 5 に隣接する前記 Q T L 遺伝子座に関連する任意の他の D N A マーカ。

【請求項 19】

栽培種トマト植物、好ましくは、栽培種ソラナム・リコペルシカム (S o l a n u m l y c o p e r s i c u m) 植物において、T o B R F V に対する高い耐性に関連する遺伝子移入配列を同定する方法であって、前記植物において、前記 T o B R F V に対する高い耐性に関連する Q T L 遺伝子座に遺伝的に関連付けられている少なくとも 1 つの D N A マーカの対立遺伝子を検出するステップを含み、前記対立遺伝子は、S N P マーカ 1 及び 5 に隣接するゲノム領域における第 1 染色体上に位置されている前記 Q T L 遺伝子座の 1 0 c M 以内、好ましくは 5 c M 以内に位置される、方法。

【請求項 20】

前記 Q T L 遺伝子座が、以下の S N P マーカのうちの少なくとも 1 つによって同定され得る、請求項 19 に記載の方法

a) 配列番号 6 中の位置 7 9 に対応する位置における S N P マーカ 2 に対してホモ接合状態である A 遺伝子型；

b) 配列番号 1 1 中の位置 5 1 に対応する位置における S N P マーカ 3 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型；及び／又は

c) 配列番号 1 6 中の位置 1 4 7 に対応する位置における S N P マーカ 4 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型。

【請求項 21】

前記遺伝子移入配列を含む栽培種トマト植物、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム (S o l a n u m l y c o p e r s i c u m) 植物を選択するステップをさらに含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

T o B R F V に対する高い耐性に関連する Q T L を同定することにより、前記 T o B R F V に対する高い耐性を示す栽培種トマト植物、好ましくは、栽培種ソラナム・リコペルシカム (S o l a n u m l y c o p e r s i c u m) 植物を同定する方法であって：

a) トマト植物由来の少なくとも 1 つの D N A マーカであって、T o B R F V に対する高い耐性に関連する染色体区間に連結している D N A マーカを検出するステップであって、前記染色体区間は、配列番号 1 及び 2 1 に少なくとも 8 0 % 配列同一性を有する S N P マーカに両側で隣接しているステップ；並びに

b) 前記少なくとも 1 つの D N A マーカを含む前記トマト植物を同定するステップを含む、方法。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

第 1 染色体における T o B R F V 耐性形質の野生トマトソースを同定する方法であって：

- a) 野生トマト系統種又は複数の野生トマト系統種を提供するステップ、
 - b) 表 4 に列挙されている S N P マーカの少なくとも 1 つを検出するキットを用いて前記野生トマト系統種又は複数の野生トマト系統種をスクリーニングするステップ、及び
 - c) 前記表 4 の列挙において選択された前記少なくとも 1 つの S N P マーカを含む野生トマト系統種を同定するステップ
- を含む方法。

【請求項 2 4】

第 1 染色体上に位置すると共に高い T o B R F V 耐性に関連する Q T L 遺伝子座の存在についてトマト植物の集団をスクリーニングするための、配列番号 6、11、又は 16 のいずれかの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、T o B R F V 感染に対して高い耐性を示す新規トマト植物に関する。本発明はまた、種子及び前記植物の部分、例えば果実に関する。本発明はさらに、このような種子及び植物の形成方法及び使用方法に関する。本発明はまた、前記高い耐性に関連する新規遺伝子配列、及び、前記新規遺伝子配列に関連する分子マーカに関する。

【背景技術】

【0002】

トバモウイルス属に属するものなどのウイルスは、トマトの種類や栽培方法にかかわらず、トマト生産者に著しい被害を与える。トバモウイルスによる感染（例えば、タバコモザイクウイルス（T M V）、トマトモザイクウイルス（T o M V）又はトマトマイルドモットルウイルス（T o M M V）による感染）は、典型的には、植物及び果実の野外労働者、道具及び手動操作による機械的伝播を介して、又は同様に制御が困難である昆虫などの天然ベクターを介して、野外に急速に広がる。

【0003】

2014 年及び 2015 年に、新規トバモウイルスが、それぞれイスラエル及びヨルダンのトマトについて最初に報告された（L u r i a e t a l . , 2017, S a l e m e t a l . , 2016）。これは、作物に引き起こされた主な症状の 1 つ、すなわち黄色及び／又は茶色領域を有する果実の変形の後に、トマトブラウンゴースフルーツウイルス（T o B R F V）と命名された。このウイルスはトバモウイルス耐性遺伝子 T m - 2²を克服できることが示されたため、この T o B R F V の流行は、トマト産業にとって特に関心事である。したがって、T o B R F V 耐性トマト作物を栽培することができる生産者及び種子産業のための解決策が必要とされている。

【0004】

T o B R F V 耐性の可能な源は、特許及び非特許文献に記載されている。

【0005】

例えば、国際公開第 2018 / 219941 号は、第 6、第 9 及び第 11 染色体上に位置する Q T L を報告しており、国際公開第 2019 / 110821 号、国際公開第 2020 / 018783 号、国際公開第 2021 / 110855 号及び国際公開第 2021 / 170868 号も、第 11 染色体上に位置する Q T L 又は遺伝子を開示している。

【0006】

国際公開第 2020 / 148021 号及び国際公開第 2022 / 013452 号は、第 8 染色体上に位置する Q T L 又は遺伝子を報告している。

【0007】

最後に、国際公開第 2021 / 213892 号は、第 2 染色体上に位置する既知の耐性遺伝子 t m - 1 の代替対立遺伝子を開示している。

【0008】

10

20

30

40

50

記載された遺伝子座の数にもかかわらず、T o B R F V 感染の根底にあるメカニズムはまだ決定されていないので、どの Q T L 又は遺伝子（の組み合わせ）が、野外において T o B R F V に対する耐性を効果的に提供するかはまだ不明である。例えば、Z i n g e r らは、第 2 染色体上に位置する遺伝子座が第 1 1 染色体上に位置する遺伝子座と相互作用して T o B R F V 耐性を制御することを示唆している（Z i n g e r e t a l . , 2 0 2 1）。

【0009】

したがって、植物、特にトマト植物における T o B R F V 制御をさらに改善するための代替的な解決策が必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、増加した T o B R F V 耐性形質を含む新規トマト植物を提供することによって、T o B R F V に対する改善された耐性の必要性に対処する。育種集団における増加した T o B R F V 耐性に関連する 1 つの新規 Q T L を同定し、その対応する配列をエリートトマト植物に遺伝子移入することによって、トマト植物の T o B R F V 耐性能力が増加し、これは全体的な植物性能にプラスの影響を有する。第 1 染色体（Q T L 1）上に位置する T o B R F V 耐性 Q T L 及びその対応する遺伝子移入配列は、劣性の性質であり、したがって、改善された T o B R F V 耐性表現型を提供するためには、配列の 2 つのコピーが必要である。

【0011】

まとめると、本発明内で開示される改良された T o B R F V 耐性トマト植物の特徴は、T o B R F V の影響下にある圃場にトマト品種を展開する際の経済的及び商業的効率を向上させるための新規な解決策を、トマト生産者に提供する。

【0012】

第 1 の実施形態では、本発明は、T o B R F V に対する耐性を付与するソラナム・ガラパゲンセ（*S o l a n u m g a l a p a g e n s e*）植物由来の遺伝子移入配列をそのゲノム中に含み、前記遺伝子移入配列が第 1 染色体上に位置し、以下の S N P マーカの少なくとも 1 つを含む、T o B R F V 感染に耐性である培養トマト植物、好ましくは培養ソラナム・リコペルシカム（*S o l a n u m l y c o p e r s i c u m*）植物を提供する：

- a) 配列番号 6 中の位置 7 9 に対応する位置における S N P マーカ 2 に対してホモ接合状態である A 遺伝子型；
- b) 配列番号 1 1 中の位置 5 1 に対応する位置における S N P マーカ 3 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型；及び／又は
- c) 配列番号 1 6 中の位置 1 4 7 に対応する位置における S N P マーカ 4 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型。

【0013】

さらに、前述の実施形態の植物であって：

- a) S N P マーカ 2 の A 遺伝子型は、一対のオリゴヌクレオチドプライマ：配列番号 7 の順方向プライマ及び配列番号 1 0 の逆方向プライマ、並びに配列番号 8 のプローブを用いた核酸断片の増幅によって P C R において同定することができ；
- b) S N P マーカ 3 の G 遺伝子型は、一対のオリゴヌクレオチドプライマ：配列番号 1 2 の順方向プライマ及び配列番号 1 5 の逆方向プライマ、並びに配列番号 1 3 のプローブを用いた核酸断片の増幅によって P C R において同定することができ；並びに／又は
- c) S N P マーカ 4 の G 遺伝子型は、一対のオリゴヌクレオチドプライマ：配列番号 1 7 の順方向プライマ及び配列番号 2 0 の逆方向プライマ、並びに配列番号 1 8 のプローブを用いた核酸断片の増幅によって P C R において同定することができる。

【0014】

本発明のさらなる実施形態では、前記 T o B R F V 耐性付与遺伝子移入配列は、配列番号 6、配列番号 1 1、及び／若しくは配列番号 1 6 のうちの少なくとも 1 つ、又は前記配

10

20

30

40

50

列のうちの1つ以上と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%同一である配列を含む。

【0015】

本発明のさらなる実施形態において、前記遺伝子移入配列は、トマト植物19TEP080670（その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている）、又は、その子孫若しくは祖先に含まれている。

【0016】

さらなる実施形態において、本発明は、前述の実施形態のいずれかに記載の植物を提供するものであり、ここで、前記植物は、トマト植物19TEP080670（その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている）、又は、その子孫若しくは祖先と、前記TOBRFV耐性付与性遺伝子移入配列を含有しないトマト植物とを交配することにより得られる。

10

【0017】

さらなる実施形態において、本発明は前述の実施形態のいずれかに記載の植物を提供するものであり、ここで、前記植物は、近郊系、ニゲノム性半数体、二倍体、又はハイブリッド植物である。

【0018】

特に限定されないが、葉、莖、根、花又は花部、果実、苗条、配偶体、孢子対、花粉、葯、小孢子、卵細胞、接合体、胚、分裂組織部位、カルス組織、種子、挿木、細胞若しくは組織培養物、又は、特に果実を産する植物に成長した際においても本発明に係るTOBRFV耐性形質をなお示す、植物のいずれかの他の部分若しくは産物を含む前述の実施形態のいずれかに記載のトマト植物から得られる植物部位、器官又は組織の提供がさらなる実施形態である。

20

【0019】

さらなる実施形態において、本発明は、前述の実施形態のいずれかに記載の植物を産する種子を提供する。

【0020】

さらなる実施形態では、本発明は、TOBRFV感染に耐性である培養トマト植物、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム（*Solanum lycopersicum*）植物を生産するための方法を提供し、この方法は

30

a) 前述の実施形態のいずれか1つによる植物を、前記TOBRFV耐性付与遺伝子移入配列を欠く栽培種トマト植物と交配するステップ；

b) TOBRFVに対する耐性を付与する、第1染色体上に位置する前記遺伝子移入配列を含む子孫植物を選択するステップであって、以下のSNPマーカのうちの少なくとも1つを検出することを含む、ステップ；

i) 配列番号6中の位置79に対応する位置におけるSNPマーカ2に対してホモ接合状態であるA遺伝子型；

ii) 配列番号11中の位置51に対応する位置におけるSNPマーカ3に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；及び／又は

iii) 配列番号16中の位置147に対応する位置におけるSNPマーカ4に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；

40

を含み、それによりTOBRFVに対して増強された耐性を有する植物を生産する。

【0021】

さらなる実施形態において、本発明は前述の実施形態のいずれかの方法に関し、ここで、この方法は：

c) 選択された子孫を自配させるステップ、又は、選択された子孫と他のトマト植物とを交配してさらなる子孫を生産するステップをさらに含む。

【0022】

さらなる実施形態において、本発明は前述の実施形態に記載の方法に関し、ここで、さ

50

らなる子孫は、選択され、及び、さらに2～10世代自配／交配される。

【0023】

さらなる実施形態において、本発明は前述の実施形態のいずれかに記載の方法に関し、ここで、ステップa)の植物は、トマト植物19TEP080670(その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている)、又は、その子孫若しくは祖先である。

【0024】

さらなる実施形態において、本発明はTOBRFVに対する耐性を示すF1トマト植物を生産する方法に関し、この方法は、前述の実施形態のいずれか一つに記載の植物である近郊系トマト植物と、異なる近郊系トマト植物とを交配させて、F1ハイブリッド子孫を生産するステップを含む。

10

【0025】

さらなる実施形態では、本発明は、TOBRFVに対する耐性を示し、前記TOBRFV耐性付与遺伝子移入配列の少なくとも1つのコピーを有する、栽培種トマト植物、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム(*Solanum lycopersicum*)植物を同定するための方法を提供し、前記方法は、以下のSNPマーカの少なくとも1つを検出するステップを含み：

a) 配列番号6中の位置79に対応する位置におけるSNPマーカ2に対してホモ接合状態であるA遺伝子型；

b) 配列番号11中の位置51に対応する位置におけるSNPマーカ3に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；及び／又は

c) 配列番号16中の位置147に対応する位置におけるSNPマーカ4に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；

それにより、TOBRFVに対する耐性を示すトマト植物を同定する。

20

【0026】

さらなる実施形態において、本発明は前述の実施形態に係る方法に関し、ここで、前記方法は、前記少なくとも1つ以上のSNPマーカを含むトマト植物を選択するステップ、及び、選択されたトマト植物と第2のトマト植物とを交配して、少なくとも1つの前記SNPマーカを含むと共に、TOBRFVに対する高い耐性を示す子孫トマト植物を生産するステップをさらに含む。

【図面の簡単な説明】

30

【0027】

【図1】実施例2Cで使用及び記載される疾患スケールを表すTOBRFV病理学アッセイ写真を示す。(a)感受性の評価(S又は1)；(b)中間耐性の評価(IR又は5)；(c)高耐性の評価(HR又は9)。

【図2】感受性チェック(a)及びドナーLA0483植物(b)を用いて実施されたTOBRFV病理学アッセイの結果を示す。

【図3】TOMV病原型0(a)、TOMV病原型2(b)及びウイルスなし(模擬試験)(c)を接種したドナーLA0483植物を用いて実施されたトバモウイルス病理学アッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

40

【0028】

定義

本出願の範囲内で使用される技術用語及び表現は、一般に、本明細書において以下に特に示されない場合、植物の育種及び栽培の関連技術においてそれらに一般的に適用される意味を与えられるべきである。

【0029】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される際、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、文脈上特に明記されない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「植物」への言及は、1つ又は複数の植物を含み、「細胞」への言及は、細胞、組織などの混合物を含む。

50

【0030】

「栽培種トマト」又は「エリートトマト」植物は、本発明の範囲内で、もはや自然状態ではないが、ヒトのケアによって、また農業用途及び／又はヒト消費のために開発及び栽培植物化された植物を指すと理解され、ソラナム・ガラパゲンセ（*Solanum galapagense*）系統種などの野生トマト系統種を除外する。例として、実施形態では、本発明による栽培種トマト又はエリートトマト植物は、食用果実を成長させることができる。或いは、又はさらに、栽培種トマト植物は、ハイブリッド植物である。或いは、又はさらに、栽培種トマト植物は、栽培されたソラナム・リコペルシカム（*Solanum lycopersicum*）植物である。

【0031】

「対立遺伝子」は、本発明の範囲内において、遺伝子又はQTLなどのいずれかの種類の同定可能な遺伝的決定因子の異なる形態と同一であるか、又は、これらに関連する種々の遺伝的単位の代替又は変異形態を指すと理解され、これらは、これらは相同染色体における同一の遺伝子座に位置しているために遺伝において代替的であるとされている。このような代替型又は異型は、一塩基多型、挿入、反転、転座若しくは欠失の結果であり得、又は例えば化学的若しくは構造的修飾、転写調節若しくは翻訳後修飾／調節によって引き起こされる遺伝子調節の結果であり得る。二倍体細胞又は生物において、所与の遺伝子又は遺伝要素の2つの対立遺伝子は、典型的に、相同染色体の対上の対応する遺伝子座を占有する。

【0032】

相対的に言えば、「改善されたTOBRFV耐性」又は「増加したTOBRFV耐性」という用語は、本明細書において、例えば、TOBRFVに対する耐性を付与する、ソラナム・ガラパゲンセ（*Solanum galapagense*）植物由来の遺伝子移入配列を含む本発明による植物を意味すると理解され、ここで前記遺伝子移入配列は第1染色体上に位置し、SNPマーカ2～4の少なくとも1つを含み、前記遺伝子移入配列を欠く植物と比較してTOBRFVに対してより耐性である。

【0033】

「改善されたTOBRFV耐性」は、本発明の範囲内で、標準誤差を使用して、及び／又はスチューデント検定を使用して $P < 0.05$ 若しくは $P < 0.01$ で、及び／又はLodスコア > 3 で、本発明の遺伝子移入配列を欠く対照トマト植物と比較して（例えば、実施例部分に記載されるように）、TOBRFVに対する統計的に有意な改善された耐性を有するトマト植物を意味すると理解される。

【0034】

「表現型」は、本発明の範囲内において、遺伝的に制御された形質の識別可能な特徴を指すと理解される。

【0035】

「対照トマト植物」は、本発明の範囲内において、本発明の栽培種トマト植物と同一の遺伝的背景を実質的に有するトマト植物を意味することが理解され、ここで、対照植物は、向上したTOBRFV耐性に関連する本発明の遺伝子移入配列を有していない。対照トマト植物は、同一の植物品種に属すると共に、本発明に係る遺伝子移入配列を含まないトマト植物であり得る。対照トマト植物は、本発明に係る栽培種のトマト植物と同一の期間、及び、同一の条件下栽培される。本明細書において、植物品種は、UPOVの定義に準拠して理解される。それ故、所望の対照トマト植物は、近同質遺伝子系統、近交系又はハイブリッドであり得、ただし、これらは、本発明に係るトマト植物と同一の遺伝的背景を有するが、対照植物は、向上したTOBRFV耐性に関連する本発明に係る遺伝子移入配列を有していない。

【0036】

「形質」という用語は、特徴又は表現型を指す。本発明の文脈において、TOBRFV耐性形質は、向上したTOBRFV耐性形質である。形質は、優性的若しくは劣性的に、又は、部分優性、半優性若しくは不完全優性的に継承され得る。本発明の文脈において、

第1染色体上に位置されているT o B R F V耐性付与性遺伝子移入配列は劣性である。本発明のトマト植物はしたがって、形質についてホモ接合である。さらに、形質は一遺伝子的若しくは多遺伝子的であり得、又は、環境で1つ以上の遺伝子の相互作用に由来し得る。本発明の文脈において、第1染色体上に位置するT o B R F V耐性付与遺伝子移入配列は、単独で、改善されたT o B R F V耐性形質を付与するのに十分であり、それ故、一遺伝子的である。

【0037】

「雑種」、「雑種植物」及び「雑種子孫」という用語は、遺伝的に異なる親から生成された個体（例えば、遺伝的にヘテロ接合性又はほぼヘテロ接合性の個体）を指す。

【0038】

「近交系」という用語は、遺伝的にホモ接合性又はほぼホモ接合性の集団を指す。近交系は、例えば、兄弟／姉妹育種若しくは自殖のいくつかの周期を通して又は二ゲノム性半数体生成において得られる。

【0039】

「二ゲノム性半数体系統」という用語は、別の培養物に由来する安定した近交系を指す。特定の培地及び条件で栽培されたいくつかの花粉粒（半数体）は、 n 個の染色体を含有する胚を発達させ得る。次に、これらの胚は、「倍化」され、 $2n$ 個の染色体を含有する。これらの胚の子孫は、「二ゲノム性半数体」と呼ばれ、本質的にもはや分離しない（安定している）。

【0040】

「遺伝的に固定された」という用語は、通常は前記遺伝子配列を含有しない植物のゲノムに安定的に組み込まれた遺伝子配列を指す。遺伝的に固定されている場合、遺伝子配列は、有性交配によって他の植物に容易で予測可能に継承可能である。

【0041】

「台木」という用語は、挿木に対する受け部として用いられる植物を指す。典型的には、台木植物及び挿木は遺伝子型が異なるものである。実施形態において、本発明に係る植物は台木植物として用いられる。

【0042】

「植物」又は「植物部分」という用語は、以後、本発明に係るトマト植物から得ることができる植物部分、器官又は組織であって、葉、莖、根、花若しくは花部、果実、シュート、配偶体、孢子体、花粉、葯、小孢子、卵細胞、接合子、胚、分裂組織部位、カルス組織、種子、挿木、細胞若しくは組織培養物、又は特に果実を産生する植物へと成長した場合、本発明に係る向上したT o B R F V耐性形質を依然として示す植物の任意の他の部分若しくは産物を含むが、これらに限定されない、植物部分、器官又は組織を指す。

【0043】

「植物」は、任意の発達段階における任意の植物である。

【0044】

「トマト植物種子」は、実施形態にいずれかに記載のトマト植物へと成長する種子である。

【0045】

「植物細胞」は、プロトプラスト及び細胞壁を含む植物の構造的及び生理的単位である。植物細胞は、単離された単一の細胞若しくは培養された細胞の形態であり得、又は例えば植物組織、植物器官若しくは植物全体などの高度に組織化された単位の一部としてのものであり得る。

【0046】

「植物細胞培養物」は、例えば、プロトプラスト、細胞培養細胞、植物組織中の細胞、花粉、花粉管、胚株、胚嚢、接合子及び様々な発達段階における胚などの植物単位の培養物を意味する。

【0047】

「植物器官」は、根、莖、葉、花芽又は胚など、明確で視覚的に構造化された植物の分

10

20

30

40

50

化した部分である。

【0048】

本明細書において使用される際、「植物組織」は、構造的及び機能的単位へと組織化された植物細胞の群を意味する。植物中又は培養物中の任意の植物組織が含まれる。この用語は、限定はされないが、植物全体、植物器官、植物種子、組織培養物並びに構造的及び／又は機能的単位へと組織化された植物細胞の任意の群を含む。

【0049】

本明細書において使用される際、「育種」という用語及びその文法的変化形は、子孫の個体を生成する任意のプロセスを指す。育種は、有性若しくは無性又はそれらの任意の組合せであり得る。例示的な非限定的な育種のタイプは、交配、自殖、倍加半数体の派生的生成及びそれらの組合せを含む。

10

【0050】

本明細書において使用される際、「確立された育種集団」という語句は、育種計画、例えば商業的育種計画において親によって生成され、及び／又は親として使用される潜在的育種パートナーの集合を指す。確立された育種集団のメンバーは、典型的に、遺伝子的に及び／又は表現型的に十分に特性決定されている。例えば、対象とするいくつかの表現型形質は、例えば、異なる環境条件下、複数の場所及び／又は異なる時間で評価され得る。代わりに又は加えて、表現型形質の発現に関連する1つ又は複数の遺伝子座が同定され得、育種集団のメンバーの1つ又は複数の1つ又は複数の遺伝子座に関して、及び1つ又は複数の遺伝子座に関連する1つ又は複数の遺伝子マーカに関して遺伝子型を決定され得る。

20

【0051】

本明細書において使用される際、「二倍体個体」という語句は、2組の染色体を有する個体を指し、典型的に、1つは、その2つの親のそれぞれからのものである。しかしながら、ある実施形態において、二倍体個体は、例えば、植物が自殖して植物の次の世代を生成する場合、同じ単一の生物からその「母親」及び「父親」の染色体の組を受け継ぎ得ることが理解される。

【0052】

「ホモ接合」とは、本発明の範囲内において、相同染色体における1つ以上の対応する遺伝子座における同様の対立遺伝子を指すと理解される。本発明の文脈において、例えば第1染色体上に位置されている遺伝子移入配列といった、特定の遺伝子座における特定の遺伝子移入配列の2つの同一コピーを含むトマト植物は、対応する遺伝子座においてホモ接合である。

30

【0053】

「ヘテロ接合」は、本発明の範囲内において、相同染色体の1つ以上の対応する遺伝子座における対立遺伝子が異なっていることを指すと理解される。

【0054】

「優性」対立遺伝子は、本発明の範囲内において、ヘテロ接合若しくはホモ接合状態で存在する場合に表現型を決定する対立遺伝子を指すと理解される。

【0055】

「半優性」対立遺伝子は、本発明の範囲内において、ヘテロ接合若しくはホモ接合状態で存在する場合に表現型を決定する対立遺伝子を指すと理解される。しかしながら、表現型の強さは一般に、対立遺伝子がホモ接合状態で存在する場合により高い。

40

【0056】

「劣性」対立遺伝子は、ホモ接合状態でのみ存在する場合に表現型を決定する対立遺伝子を指す。

【0057】

「戻し交配」は、本発明の範囲内において、雑種の子孫が元の親の一方と繰り返し交配されるプロセスを指すものと理解される。異なる反復親が後の戻し交配において使用され得る。

50

【0058】

「遺伝子座」は、本発明の範囲内において、遺伝子、QTL又は形質に寄与するその対応する遺伝子配列を含む染色体上の領域を指すものと理解される。

【0059】

「遺伝連鎖」は、本発明の範囲内において、同一の染色体において近接する遺伝子の位置による遺伝における特徴の関連性を指すと理解され、遺伝子座間の組み換え率によって計測される（センチモルガン、cM）。

【0060】

本明細書において使用される際、本開示の主題に関連する「有性交配」及び「有性生殖」という語句は、配偶子の融合により（例えば、植物において受粉により種子を生成するなどの受精によって）子孫を生成することを指す。「有性交配」又は「他家受精」は、ある実施形態において、一個体の、別の個体による受精（例えば、植物における他花受粉）を指す。「自殖」という用語は、ある実施形態において、自家受精又は自家受粉による種子の生成、すなわち花粉及び胚珠が同じ植物からのものであることを指す。

10

【0061】

本明細書において使用される際、「遺伝子マーカ」又は「DNAマーカ」という語句は、対象とする1つ又は複数の遺伝子座に関連する個体のゲノムの特徴（例えば、個体のゲノムに存在するヌクレオチド又はポリヌクレオチド配列）を指す。ある実施形態において、遺伝子マーカは、文脈に応じて、対象とする集団において多型であるか、又は多型によって占有される遺伝子座である。遺伝子マーカとしては、多くの他の例の中でも、例えば一塩基多型（SNP）、インデル（すなわち挿入／欠失）、単純反復配列（SSR）、制限酵素断片長多型（RFLP）、ランダム増幅多型DNA（RAPD）、切断増幅多型配列（CAPS）マーカ、多様性アレイ技術（DArT）マーカ及び増幅断片長多型（AFLP）が挙げられる。遺伝子マーカは、例えば、表現型形質の変動性に寄与する染色体上の対立遺伝子を含む遺伝子座の位置を特定するのに使用され得る。「遺伝子マーカ」という語句は、プローブとして使用される核酸の配列などのゲノム配列と相補的なポリヌクレオチド配列も指し得る。

20

【0062】

本明細書において使用される際、「遺伝子型」という用語は、細胞又は生物の遺伝子構成を指す。個体の「一連の遺伝子マーカに対する遺伝子型」は、個体のハプロタイプに存在する1つ又は複数の遺伝子マーカ遺伝子座に対する特定の対立遺伝子を含む。

30

【0063】

本明細書において使用される際、「子孫」という用語は、特定の交配の子孫を指す。典型的に、子孫は、2つの個体の育種から生じるが、いくつかの種（特にいくつかの植物及び雌雄同体の動物）は、自殖し得る（すなわち同じ植物が雄性及び雌性配偶子の両方のドナーとしての役割を果たす）。子孫は、例えば、F₁、F₂又は任意の次世代のものであり得る。

【0064】

本明細書において用いられるところ、「量的形質遺伝子座」（QTL）という用語は、遺伝子マーカと、目的の形質の表現型に影響を与える染色体領域及び／又は遺伝子及び／又は遺伝子移入配列との間における関連性を指す。典型的には、これは、統計的に；例えば、文献において公開された1つ以上方法に基づいて決定される。QTLは、表現型形質に異なる影響を与える少なくとも2つの対立遺伝子を伴う、染色体領域、及び／又は、遺伝子座であることが可能である。

40

【0065】

「レシピエントトマト植物」という用語は、本明細書では、改善されたTOBRFV耐性形質を含むドナートマト植物から得られたDNAを受容するトマト植物を示すために使用される。

【0066】

「天然の遺伝的背景」という用語は、本明細書では、遺伝子配列の元の遺伝的背景を示

50

すために使用される。例えば、本発明の遺伝子配列は、ソラナム・ガラパゲンセ (*Solanum galapagense*) 植物の第1染色体上の特定の位置に見出された。逆に、ソラナム・ガラパゲンセ (*Solanum galapagense*) 植物の第1染色体から別のトマト種、好ましくは栽培種トマト植物、さらにより好ましくはソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物の第1染色体上の同じ位置へのこの遺伝子配列を含むDNAの移入、例えば育種を介したDNAの移入を含む方法は、この遺伝子配列がその自然の遺伝的背景にないことをもたらすであろう。本発明の遺伝子配列がソラナム・ガラパゲンセ (*Solanum galapagense*) 背景から別のトマト種、好ましくは栽培種トマト植物、さらにより好ましくはソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物に移入される場合、それらは「遺伝子移入配列」又は「遺伝子移入遺伝子配列」と称される。

10

【0067】

「ドナートマト植物」は、本発明の範囲内で、改善されたTOBRFV耐性形質を提供するトマト植物を意味すると理解される。

【0068】

「マーカによる選択」は、本発明の範囲内において、例えば植物由来の1つ又は複数の核酸を検出する遺伝子マーカの使用を指すものと理解され、選択的育種計画においてそれらの植物が使用（又は回避）され得るように、核酸は、望ましい（又は望ましくない）形質に関する対立遺伝子を有する植物を同定するように所望の形質に関連している。

【0069】

DNA中の単一部位における変異である一塩基多型 (SNP) は、ゲノムの変異の最もよく見られるタイプである。一塩基多型 (SNP) は、ゲノム（又は他の共有配列）中の一塩基 (A、T、C又はG) が生物学的種のメンバー間又は個体の対合染色体間で異なるときに起こるDNA配列の変異である。例えば、異なる個体由来の2つの配列決定されたDNA断片、AAGCCTAと、AAGCTTAとは、一塩基の相違を含む。この場合、2つの対立遺伝子：C及びTがある。SNPアレイの基本原理は、DNAマイクロアレイと同じである。これらは、DNAハイブリダイゼーション、蛍光顕微鏡法及びDNA捕捉の集合である。SNPアレイの3つの構成要素は、核酸配列（すなわち増幅配列又は標的）を含むアレイ、1つ又は複数の標識された対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプローブ及びハイブリダイゼーションシグナルを記録し、それを解釈する検出システムである。所望のSNPマーカ対立遺伝子の有無は、二本鎖DNA色素又は蛍光レポータープローブ法を用いたリアルタイムPCRによって決定され得る。

20

30

【0070】

「PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）」は、本発明の範囲内において、ゲノムのDNAの特定の領域又はサブセットを比較的大量に生成し、それにより、それらの領域に基づく様々な分析を可能にする方法を指すものと理解される。「PCRプライマ」は、本発明の範囲内において、DNAの特定領域のPCR増幅において使用される一本鎖DNAの比較的短い断片を指すものと理解される。

【0071】

本明細書において使用される際、「プローブ」は、特定の標的分子又は細胞構造を認識しそれに結合することができ、したがって標的分子又は構造の検出を可能にする原子又は分子の群を指す。特に、「プローブ」は、分子ハイブリダイゼーションによって相補的な配列の存在を検出し、それを定量化するのに使用され得る標識されたDNA又はRNA配列を指す。

40

【0072】

「配列同一性」。2つ以上の核酸又はタンパク質配列に関する「同一の」又は「同一性」という用語は、同じであるか、又は以下の配列比較アルゴリズムの1つを使用して若しくは目視検査によって測定される際、最大の一致について比較及び整列したとき、同じアミノ酸残基若しくはヌクレオチドの特定のパーセンテージを有する2つ以上の配列又は部分配列を指す。互いに比較される2つの配列の長さが異なる場合、配列同一性は、好まし

50

くは、より長い配列のヌクレオチド残基と同一であるより短い配列のヌクレオチド残基のパーセンテージに関連する。本明細書において使用される際、2つの配列間のパーセント同一性／相同性は、2つの配列の最適アライメントのために導入される必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮に入れて、配列に共有される同一位置の数の関数である（すなわち%同一性＝同一位置の数／位置の総数×100）。配列の比較及び2つの配列間のパーセント同一性の決定は、本明細書において後述されるように数学アルゴリズムを用いて行われ得る。例えば、配列同一性は、従来のように、Bestfitプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711）などのコンピュータプログラムを用いて決定され得る。Bestfitは、2つの配列間の最も高い配列同一性を有するセグメントを発見するために、Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2 (1981), 482-489の遺伝子座相同性アルゴリズムを利用する。特定の配列が例えば本発明の参照配列と95%の同一性を有するかどうかを決定するためにBestfit又は別の配列アライメントプログラムを使用する場合、パラメータは、好ましくは、同一性のパーセンテージが参照配列の全長にわたって計算されるように、及び参照配列におけるヌクレオチドの総数の5%までの相同性ギャップが許容されるように調整される。Bestfitを使用する場合、いわゆる任意選択的パラメータは、好ましくは、それらの予め設定された（「初期」）値のままである。所与の配列と、本発明の上記の配列との間の比較において見られる逸脱は、例えば、付加、欠失、置換、挿入又は組み換えによって引き起こされ得る。このような配列比較は、好ましくは、プログラム「fasta20u66」（William R. Pearson及びthe University of Virginiaによるバージョン2.0u66、1998年9月；W. R. Pearson (1990), Methods in Enzymology 183, 63-98、添付の例及びhttp://workbench.sdsc.edu/も参照されたい）を用いても行われ得る。この目的のために、「初期」パラメータ設定が使用され得る。

10

20

30

40

50

【0073】

実施形態

植物、種子、果実。

第1の実施形態では、本発明は、ToBRFVに対する耐性を付与するソラナム・ガラパゲンセ（*Solanum galapagense*）由来の遺伝子移入配列をそのゲノム中に含み、前記遺伝子移入配列が第1染色体上に位置し、以下のSNPマーカのうちの少なくとも1つを含む、ToBRFV感染に対して耐性である培養トマト植物、好ましくは培養ソラナム・リコペルシカム（*Solanum lycopersicum*）植物を提供する：

a) 配列番号6中の位置79に対応する位置におけるSNPマーカ2に対してホモ接合状態であるA遺伝子型；

b) 配列番号11中の位置51に対応する位置におけるSNPマーカ3に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；及び／又は

c) 配列番号16中の位置147に対応する位置におけるSNPマーカ4に対してホモ接合状態であるG遺伝子型。

【0074】

さらに、前述の実施形態の植物であって：

a) SNPマーカ2の遺伝子型は、一対のオリゴヌクレオチドプライマ：配列番号7の順方向プライマ及び配列番号10の逆方向プライマ、並びに配列番号8のプロープを用いた核酸断片の増幅によってPCRにおいて同定することができ；

b) SNPマーカ3のG遺伝子型は、一対のオリゴヌクレオチドプライマ：配列番号12の順方向プライマ及び配列番号15の逆方向プライマ、並びに配列番号13のプロープ

を用いた核酸断片の増幅によってPCRにおいて同定することができ；並びに／又は

c) SNPマーカ4のG遺伝子型は、一対のオリゴヌクレオチドプライマ：配列番号17の順方向プライマ及び配列番号20の逆方向プライマ、並びに配列番号18のプロープを用いた核酸断片の増幅によってPCRにおいて同定することができる。

【0075】

本発明のさらなる実施形態では、前記TOBRFV耐性付与遺伝子移入配列は、配列番号6、配列番号11、及び／若しくは配列番号16のうちの少なくとも1つ、又は前記配列のうちの1つ以上と少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%同一である配列を含む。

【0076】

本発明のさらなる実施形態では、前記植物は、配列番号11を含む。

【0077】

本発明のさらなる実施形態では、前記遺伝子移入配列は、トマト植物19TEP080670（その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている）、又はその子孫若しくは祖先に含まれる。

【0078】

さらなる実施形態では、本発明は、前記植物が、トマト植物19TEP080670（その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている）、又はその子孫若しくは祖先と、前記TOBRFV耐性付与遺伝子移入配列を含まないトマト植物とを交配することによって得られる、前述の実施形態のいずれかによる植物を提供する。

【0079】

さらなる実施形態では、本発明は、前記植物が近交系、半数体、二倍体、又はハイブリッド植物である、前述の実施形態のいずれかによる植物を提供する。

【0080】

別の実施形態では、本発明による植物は、雄性不稔である。別の実施形態では、本発明による植物は、細胞質雄性不稔である。

【0081】

さらなる実施形態では、本発明のトマト植物は、第1染色体上に位置する前記TOBRFV耐性付与遺伝子移入配列が、以下の表4に開示されるSNPマーカ2～4のいずれかを使用して同定することができる、前述の実施形態のいずれかによるトマト植物である。

【0082】

さらなる実施形態では、本発明は、第1染色体上に位置するTOBRFVに対する耐性を付与するソラナム・ガラパゲンセ (*Solanum galapagense*) 由来の遺伝子移入配列をそのゲノム中に含む、TOBRFV感染に耐性である栽培種トマト植物、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物を提供し、前記植物ゲノムは：

a) 配列番号1中の位置47に対応する位置におけるSNPマーカ1のホモ接合状態のA遺伝子型、及び

b) 配列番号21中の位置94に対応する位置におけるSNPマーカ5のヘテロ接合状態又はホモ接合状態のC遺伝子型、及び

c) 表4に開示されるSNPマーカ2～4のいずれか1つにおける耐性遺伝子型のうちの少なくとも1つを含む。

【0083】

さらなる実施形態では、先の実施形態の栽培種トマト植物は、表4に開示されるSNPマーカ2～4のいずれかにおいて少なくとも1つの第2の耐性遺伝子型をさらに含む。

【0084】

さらなる実施形態では、本発明は、第1染色体上に位置するTOBRFVに対する耐性を付与するソラナム・ガラパゲンセ (*Solanum galapagense*) 由来の遺伝子移入配列をそのゲノム中に含む、TOBRFV感染に耐性である栽培種トマト植物

10

20

30

40

50

、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム (Solanum lycopersicum) 植物を提供し、前記植物ゲノムは：

a) 配列番号 11 中の位置 51 に対応する位置における SNP マーカー 3 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型を含む。

【0085】

さらなる実施形態では、本発明のトマト植物は、トマト植物 19TEP080670 (その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている)、又はその子孫若しくは祖先、又はソラナム・ガラパゲンセ (Solanum galapagense) 系統種 LA0483 が、前記 T o B R F V 耐性付与遺伝子移入配列の供給源である、前述の実施形態のいずれかによるトマト植物である。

10

【0086】

特に限定されないが、葉、莖、根、花又は花部、果実、苗条、配偶体、孢子対、花粉、葯、小孢子、卵細胞、接合体、胚、分裂組織部位、カルス組織、種子、挿木、細胞若しくは組織培養物、又は、特に果実を産する植物に成長した際においても本発明に係る T o B R F V 耐性形質をなお示す、植物のいずれかの他の部分若しくは産物を含む前述の実施形態のいずれかに記載のトマト植物から得られる植物部位、器官又は組織の提供がさらなる実施形態である。

【0087】

さらなる実施形態において、本発明は、前述の実施形態のいずれかに記載の植物を産する種子を提供するものである。

20

【0088】

さらなる実施形態では、本発明は、台木、好ましくはトマト台木としての、前述の実施形態のいずれかによるトマト植物の使用に関する。さらなる実施形態では、本発明は、トマト植物 19TEP080670 (その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている)、又はその子孫若しくは祖先のトマト台木としての使用に関する。

【0089】

他の実施形態においては、トマト果実を生産し、収穫するための、前述の実施形態のいずれかに記載のトマト植物、植物部位又は種子の使用が考えられている。

【0090】

30

他の実施形態において、本発明は、いずれかの実施形態に記載のトマト植物、植物部位又は種子の使用に関し、ここで、トマト植物、植物部位又は種子は、トマト植物 19TEP080670 (その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている)、又は、その子孫若しくは祖先である。

【0091】

さらなる実施形態において、本発明は、圃場、温室又はビニールハウスに播種するための、前述の実施形態のいずれかに記載のトマト植物、植物部位又は種子の使用に関する。

【0092】

一実施形態においては、本発明は、前述の実施形態のいずれかに記載のトマト植物により生産されたトマト果実を提供する。

40

【0093】

本発明はさらに、T o B R F V 耐性形質を前記 T o B R F V 耐性形質を含まないトマト植物に遺伝子移入するための、前述の実施形態のいずれかに記載のトマト植物の使用に関する。

【0094】

さらなる実施形態では、前述の実施形態のいずれかのトマト植物は、トバモウイルスに耐性である。さらなる実施形態では、前記トマト植物はまた、TMV及びT o M V ウイルスに耐性である。さらなる実施形態では、前記トマト植物はまた、T o M V 病原型 0 及び 2 に耐性である。

【0095】

50

遺伝子配列、マーカ。

本発明はさらに、トマト植物におけるT o B R F V耐性形質に連結された遺伝子移入遺伝子配列に関する。さらなる実施形態では、本発明の遺伝子配列は、第1染色体上に位置する。本発明のさらなる実施形態では、遺伝子配列は、トマト植物19TEP080670（その代表種はNCIMB受入番号43938で寄託されている）、又はその子孫若しくは祖先であり、且つ前記遺伝子配列を含むドナー植物、又はソラナム・ガラパゲンセ（*Solanum galapagense*）系統種LA0483に含まれ、又はそれから得られ、又はそれから得ることができる。

【0096】

別の実施形態では、本発明の遺伝子移入遺伝子配列は、第1染色体上に位置し、以下を含むリスト中で選択される、SNPマーカのうちの1つにおける以下の耐性遺伝子型のうちの少なくとも1つを特徴とする：

a) 配列番号6中の位置79に対応する位置におけるSNPマーカ2に対してホモ接合状態であるA遺伝子型；

b) 配列番号11中の位置51に対応する位置におけるSNPマーカ3に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；及び／又は

c) 配列番号16中の位置147に対応する位置におけるSNPマーカ4に対してホモ接合状態であるG遺伝子型。

【0097】

本発明はまた、トマト植物、特に栽培種トマト植物におけるT o B R F V耐性形質遺伝子座の診断的選択及び／又は遺伝子型同定のための、本発明のSNPマーカの少なくとも1つ、少なくとも2つ又は少なくとも3つの使用を開示する。

【0098】

本発明はさらに、トマト植物、特に栽培種トマト植物、より特定の係るトマト植物において、T o B R F V耐性形質の存在を同定するため、及び／又は、トマト植物、特に栽培種トマト植物、特に本発明に係る本明細書に記載のトマト植物におけるT o B R F V耐性形質の遺伝子移入を監視するための、本発明に係るSNPマーカの少なくとも1つ、少なくとも2つ又は少なくとも3つの使用を開示する。

【0099】

本発明の遺伝子移入配列は、トバモウイルス、好ましくはTMV及びT o M Vウイルス、より好ましくはT o M V病原型0及び2に対する広範な耐性を提供することがさらに開示される。

【0100】

本発明はしたがって、一実施形態において、本発明に係るものであって、上記において本明細書に記載の増幅産物から技術分野において公知である方法によって開発された派生マーカ、特に派生プライマ又はプローブにさらに関し、この派生マーカは、T o B R F V耐性形質遺伝子座に遺伝的に関連付けられている。

【0101】

育種方法。

さらなる実施形態では、本発明は、T o B R F V感染に耐性である培養トマト植物、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム（*Solanum lycopersicum*）植物を生産するための方法を提供し、この方法は、

a) 前述の実施形態のいずれか1つによる植物を、前記T o B R F V耐性付与遺伝子移入配列を欠く栽培種トマト植物と交配するステップ；

b) T o B R F Vに対する耐性を付与する、第1染色体上に位置する前記遺伝子移入配列を含む子孫植物を選択するステップであって、以下のSNPマーカのうちの少なくとも1つに関する耐性遺伝子型を検出することを含む、ステップ：

i) 配列番号6中の位置79に対応する位置におけるSNPマーカ2に対してホモ接合状態であるA遺伝子型；

i i) 配列番号11中の位置51に対応する位置におけるSNPマーカ3に対してホ

10

20

30

40

50

モ接合状態である G 遺伝子型；及び／又は

i i i) 配列番号 16 中の位置 147 に対応する位置における SNP マーカ 4 に対してホモ接合状態である G 遺伝子型；

を含み、それにより、T o B R F V に対して増強された耐性を有する植物を生産する。

【0102】

さらなる実施形態において、本発明は前述の実施形態のいずれかの方法に関し、ここで、この方法は：

c) 選択された子孫を自配させるステップ、又は、選択された子孫と他のトマト植物とを交配してさらなる子孫を生産するステップをさらに含む。

【0103】

さらなる実施形態において、本発明は、さらなる子孫が選択され、さらに 2 ～ 10 世代自配／交配される前述の実施形態に係る方法に関する。

【0104】

さらなる実施形態では、本発明は、ステップ a) の植物が、トマト植物 19 T E P 0 8 0 6 7 0 (その代表種子は N C I M B 受入番号 4 3 9 3 8 で寄託されている)、又はその子孫若しくは祖先、又はソラナム・ガラパゲンセ (S o l a n u m g a l a p a g e n s e) 系統種 L A 0 4 8 3 である、前述の実施形態のいずれかの方法に関する。

【0105】

別の実施形態では、本発明は、T o B R F V 耐性トマト植物、植物部分又は種子を提供する方法であって、以下のステップを含む方法に関する：

a) T o B R F V 耐性付与遺伝子移入配列を欠く第 1 の植物を、任意の実施形態による第 2 のトマト植物と交配するステップ、

b) 子孫トマト植物を得るステップ、及び

c) 任意に、T o B R F V に対する耐性を示すことを特徴とする前記子孫の植物を選択するステップ。

【0106】

さらなる実施形態では、第 2 のトマト植物が、トマト植物 19 T E P 0 8 0 6 7 0 (その代表種子は N C I M B 受入番号 4 3 9 3 8 で寄託されている)、又はその子孫若しくは祖先、又はソラナム・ガラパゲンセ (S o l a n u m g a l a p a g e n s e) 系統種 L A 0 4 8 3 である、前述の実施形態の方法に関する。

【0107】

他の実施形態において、本発明は、以下のステップを含む、T o B R F V 耐性トマト植物を生産する方法に関する。

a) 前述の実施形態のいずれかに記載のトマト植物の種子を提供するステップ

b) 前記種子を発芽させ、これから成熟した稔性植物を育てるステップ、

c) a) の前記植物に自家受粉を誘発させ、果実を育て、及び、これから稔性種子を収穫するステップ、並びに

d) c) で収穫した種子から植物を育て、及び、T o B R F V 耐性トマト植物を選択するステップ。

【0108】

他の実施形態において、本発明は、トマト植物の T o B R F V に対する耐性を高める方法に関し、この方法は、以下のステップを含む。

a) 第 1 染色体上に位置されている 1 つの遺伝子移入配列に関連する T o B R F V 耐性形質を含むトマトを選択するステップであって、前記形質を、表 4 に列挙されている SNP マーカの少なくとも 1 つにおける耐性遺伝子型の存在により同定が可能であるもの；

b) T o B R F V 耐性形質を含むステップ a) の前記植物と、T o B R F V 耐性形質を含まず、且つ、ステップ a) の植物と比して T o B R F V に対する感受性を示すトマト植物、特に栽培種トマト植物とを交配するステップ、及び

c) 前記交配に由来する、ステップ b) の植物と比して高い T o B R F V 耐性を示す子

10

20

30

40

50

孫を選択するステップ。

【0109】

さらなる実施形態において、本発明はT o B R F Vに対する耐性を示すF 1トマト植物を生産する方法に関し、この方法は、前述の実施形態のいずれか一つに記載の植物である近郊系トマト植物と、異なる近郊系トマト植物とを交配させて、F 1ハイブリッド子孫を生産するステップを含む。

【0110】

選択方法。

さらなる実施形態では、本発明は、T o B R F Vに対する耐性を示し、前記T o B R F V耐性付与遺伝子移入配列の少なくとも1つのコピーを有する、栽培種トマト植物、好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物を同定するための方法を提供し、前記方法は、以下のSNPマーカの少なくとも1つに関する少なくとも1つの耐性遺伝子型を検出するステップを含み：

a) 配列番号6中の位置79に対応する位置におけるSNPマーカ2に対してホモ接合状態であるA遺伝子型；

b) 配列番号11中の位置51に対応する位置におけるSNPマーカ3に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；及び／又は

c) 配列番号16中の位置147に対応する位置におけるSNPマーカ4に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；

それにより、T o B R F Vに対する耐性を示すトマト植物を同定する。

【0111】

さらなる実施形態では、本発明は、前述の実施形態の方法に関し、前記方法は、対応するSNPマーカにおいて前記1つ以上の耐性遺伝子型を含むトマト植物を選択することと、選択されたトマト植物を第2のトマト植物と交配して、前記SNPマーカのうちの少なくとも1つについて少なくとも1つの耐性遺伝子型を含み、T o B R F Vに対する耐性を示す子孫トマト植物を生産することとをさらに含む。

【0112】

他の実施形態において、本発明は、本発明のT o B R F V耐性付与性遺伝子移入配列を含むトマト植物を同定する方法に関し、ここで、前記方法は、以下のステップを含む。

a) T o B R F V耐性形質について分離する集団を提供するステップ、

b) T o B R F Vに対する耐性を示す要素に対する分離集団をスクリーニングするステップであって、前記形質は、本発明のT o B R F V耐性付与性遺伝子移入配列の存在によって同定可能であるもの、

c) 分離集団の1つの要素を選択するステップであって、前記要素はT o B R F V耐性形質を含むもの。

【0113】

さらなる実施形態では、本発明は、T o B R F Vに対する耐性を付与する遺伝子移入配列を第1染色体上に含む培養トマト植物を同定するための方法を提供し、この方法は：

a) T o B R F V耐性に関して分離する集団を提供すること、

b) 表4に列挙されるSNPマーカの少なくとも1つについて少なくとも1つの耐性遺伝子型を検出するキットを用いて前記集団をスクリーニングすること、及び

c) 表4のリストにおいて選択される少なくとも1つのSNPマーカについて少なくとも1つの耐性遺伝子型を含む植物を同定することを含む。

【0114】

さらなる実施形態では、本発明は、第1染色体上のT o B R F V耐性形質のトマト源を同定するための方法を提供し、この方法は：

a) トマト系統種又は複数のトマト系統種を提供すること、

b) 表4に列挙されるSNPマーカの少なくとも1つについて少なくとも1つの耐性遺伝子型を検出するキットを用いて前記トマト系統種又は複数のトマト系統種をスクリーニ

ングすること、及び

c) 表4のリストにおいて選択される少なくとも1つのSNPマーカについて前記1つの耐性遺伝子型を含む野生トマト系統種を同定することを含む。

【0115】

さらに別の実施形態では、本発明は、TOBRFV耐性形質を含み、且つそれを示すトマト植物を同定するための、前述の実施形態のいずれかによるトマト植物のゲノム、好ましくはトマト植物19TEP080670（その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている）、又はその子孫若しくは祖先、又はソラナム・ガラパゲンセ（*Solanum galapagense*）系統種LA0483のゲノムから増幅された少なくとも1つのSNPマーカの使用に関し、前記SNPマーカは、表4に列挙されているSNPマーカの1つを使用して同定され、前記SNPマーカは、トマト植物におけるTOBRFV耐性形質の存在を示す。

【0116】

さらなる実施形態では、本発明は、TOBRFVに対する耐性を示す、栽培種トマト植物、好ましくはソラナム・リコペルシカム（*Solanum lycopersicum*）植物の遺伝子型を評価する方法に関し、この方法は：

a) 前記植物からのサンプルを提供するステップ、並びに

b) 前記サンプルにおいて、第1染色体上に位置し、前記TOBRFV耐性に関連するQTL遺伝子座を検出するステップであって、前記QTL遺伝子座は、SNPマーカ1及び5、並びに以下のSNPマーカのうちの少なくとも1つに隣接している、ステップ：

i) 配列番号6中の位置79に対応する位置におけるSNPマーカ2に対してホモ接合状態であるA遺伝子型；

ii) 配列番号11中の位置51に対応する位置におけるSNPマーカ3に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；

iii) 配列番号16中の位置147に対応する位置におけるSNPマーカ4に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；及び／又は

iv) SNPマーカ1及び5に隣接する前記QTL遺伝子座に関連する任意の他のDNAマーカを含む。

【0117】

さらなる実施形態において、本発明は、栽培種トマト植物、好ましくは、栽培種ソラナム・リコペルシカム（*Solanum lycopersicum*）植物において、TOBRFVに対する高い耐性に関連する遺伝子移入配列を同定する方法に関し、前記方法は、前記植物において、前記TOBRFVに対する高い耐性に関連するQTL遺伝子座に遺伝的に関連付けられている少なくとも1つのDNAマーカの対立遺伝子を検出するステップを含み、ここで、前記対立遺伝子は、SNPマーカ1及び5に隣接するゲノム領域における第1染色体上に位置されている前記QTL遺伝子座の10cM以内、好ましくは5cM以内に位置される。

【0118】

さらなる実施形態では、本発明は、前記QTL遺伝子座が以下のSNPマーカのうちの少なくとも1つによって同定され得る、前述の実施形態の方法に関する

a) 配列番号6中の位置79に対応する位置におけるSNPマーカ2に対してホモ接合状態であるA遺伝子型；

b) 配列番号11中の位置51に対応する位置におけるSNPマーカ3に対してホモ接合状態であるG遺伝子型；及び／又は

c) 配列番号16中の位置147に対応する位置におけるSNPマーカ4に対してホモ接合状態であるG遺伝子型。

【0119】

さらなる実施形態において、本発明は前述の実施形態に係る方法に関し、ここで、前記

10

20

30

40

50

方法は、前記遺伝子移入配列を含む栽培種トマト植物、好ましくは、栽培種ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物を選択するステップをさらに含む。

【0120】

さらなる実施形態において、本発明は、前記 T o B R F V に対する高い耐性に関連する Q T L を同定することにより、T o B R F V に対する高い耐性を示す栽培種トマト植物、好ましくは、栽培種ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物を同定する方法に関連し、この方法は：

a) トマト植物由来の少なくとも1つのDNAマーカであって、T o B R F V に対する高い耐性に関連する染色体区間に連結しているDNAマーカを検出するステップであって、前記染色体区間は、配列番号：1及び21に少なくとも80%配列同一性を有するSNPマーカに両側で隣接しているステップ；並びに

b) 前記少なくとも1つのDNAマーカを含む前記トマト植物を同定するステップを含む。

【0121】

使用。

本発明はまた、T o B R F V 耐性トマト植物を生産するためにトマト植物を育てるための前述の実施形態のいずれかに記載のトマト植物から得られるT o B R F V 耐性繁殖材料の使用に関し、ここで、前記T o B R F V 耐性は、標準的なアッセイ、特に以下の実施例2に記載のアッセイにおいて査定され得る。

【0122】

本発明はまた、トマト果実を生産するための前述の実施形態のいずれかに記載のトマト植物から得られるT o B R F V 耐性繁殖材料の使用に関する。

【0123】

他の実施形態において、本発明は、植物を育てるため、並びに、作物及び／又は果実を生産及び収穫するための、栽培種トマト植物、植物部位又は種子、より好ましくは、前述の実施形態のいずれかに記載の栽培種ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物、植物部位又は種子の使用に関する。

【0124】

他の実施形態において、本発明は、生鮮市場用又は食品加工用の果実を生産するための、栽培種トマト植物、より好ましくは、前述の実施形態のいずれかに記載の栽培種ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物の使用に関する。

【0125】

他の実施形態において、本発明は、栽培種トマト植物、植物部位又は種子、好ましくは、前述の実施形態のいずれかに記載の栽培種ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物、植物部位又は種子の使用に関し、ここで、前記栽培種トマト植物、植物部位又は種子、好ましくは、栽培種ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物、植物部位又は種子は、トマト植物19TEP080670（その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている）、又は、その子孫若しくは祖先のものである。

【0126】

さらなる実施形態において、本発明は、圃場、温室又はビニールハウスに播種するための、前述の実施形態のいずれかに記載の栽培種トマト植物、植物部位又は種子、より好ましくは栽培種ソラナム・リコペルシカム (*Solanum lycopersicum*) 植物、植物部位又は種子の使用に関する。

【0127】

さらなる実施形態では、本発明は、T o B R F V 耐性形質を欠くトマト植物に増加した前記形質を付与するための、前述の実施形態のいずれかによるトマト植物の使用に関する。本発明はさらに、増加したT o B R F V 耐性形質を、前記形質を欠くトマト植物に遺伝子移入するための、前述の実施形態のいずれかによるトマト植物の使用に関する。本発明

はさらに、増加したトバモウイルス耐性形質を、前記形質を欠くトマト植物に遺伝子移入するための、前述の実施形態のいずれかによるトマト植物の使用に関する。本発明はさらに、増加したT o M V病原型0及び2耐性形質を、前記形質を欠くトマト植物に遺伝子移入するための、前述の実施形態のいずれかによるトマト植物の使用に関する。

【0128】

さらなる実施形態では、本発明は、第1染色体上に位置し、増加したT o B R F V耐性に関連するQ T L遺伝子座の存在についてトマト植物の集団をスクリーニングするための配列番号1～25のいずれかの使用に関する。

【0129】

さらなる実施形態では、本発明は、第1染色体上に位置し、増加したT o B R F V耐性に関連するQ T L遺伝子座の存在についてトマト植物の集団をスクリーニングするための配列番号6、11及び／又は16の使用に関する。

【0130】

本発明の記載に基づいて、本明細書に記載の前記遺伝子移入遺伝子配列を含むトマト植物19TEP080670（その代表種子はNCIMB受入番号43938で寄託されている）、又は、その子孫を保有する当業者は、本明細書に開示されているSNPマーカによる補助を伴って、技術分野において周知である育種技術を用いることにより、種々のタイプの他のトマト植物に対する本発明の前記遺伝子移入遺伝子配列の導入に困難を伴うことはない。

【0131】

種子寄託の詳細

本出願人は、2022年2月11日に、NCIMB受入番号43938の下で、トマト植物19TEP080670の625粒の種子の寄託をNCIMB（National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria, NCIMB Limited, Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB21 9YA, Scotland）に行っている。

【0132】

本出願人は、専門家による解を選定すると共に、本特許の付与の告示が公告されるまで、又は、本出願が、拒絶され、取り下げられ、若しくは、みなし取り下げとされた場合には出願日から20年間は、EPC規則32（1）若しくは対応する他の国々の法規若しくは条約（専門家証人条項）に従って、寄託した材料は専門家のみに公開されることを要求する。

【0133】

トマトハイブリッド植物19TEP080670は、第1染色体上のT o B R F V耐性Q T Lについてヘテロ接合性であり、すなわち、トマト植物19TEP080670は、増加したT o B R F V耐性に関連する第1染色体上の遺伝子移入配列の1コピーを含む。

【実施例】

【0134】

実施例1：生殖質及び個体群の発生

ソラナム・ガラパゲンセ（*Solanum galapagense*）系統種LA0483は、増加したT o B R F V耐性を示すとしてT o B R F Vスクリーニングにおいて同定され、したがって、発見集団の作製のための供給源として使用された。

【0135】

LA0483と感受性エリート系統16TEP070330との交配から生じるF1集団を自家受粉させて、20のF2系統を得た。

【0136】

これらのF2系統の1つである20TEP070778を用いて、個々のF2植物の遺伝子型同定及び表現型決定データに基づくQ T Lマッピングを行った。合計443個のF2植物をサンプリングし、遺伝子型を同定して集団の遺伝子地図を確立した。並行して、

10

20

30

40

50

349個の植物のサブセットに、実生上でT o B R F V株を機械的に接種し、以下の実施例2A～Cに記載の定性的表現型スコアに従って評価した。第1染色体上に位置する増加したT o B R F V耐性に関連するQ T Lが、このF2集団において同定された（実施例3～5を参照されたい）。

【0137】

最初のトマト交配の1つの子孫、19TEP080670を保持し、2022年2月11日にNCIMB受入番号43938の下でNCIMBに寄託した。トマト植物19TEP080670は、T o B R F V耐性形質についてヘテロ接合性であり、すなわち、それは、LA0483由来のT o B R F V耐性付与遺伝子移入配列の1コピーを含む。

【0138】

実施例2：プロトコル。

実施例2A．T o B R F V分離株。

T o B R F V株を2015年にイスラエルで採集し、その後乾燥トマト葉上で保存した。これらのトマト葉1gから、葉を破碎し、5mlの緩衝液、0.1gの木炭、及び0.1grのカーボランダム（研磨粉）を添加することにより、接種材料の製造を行った。得られた溶液を用いて、感受性材料の子葉に機械的に接種した。実生を入れたトレイを、10～14日間、夜間18℃／日中24℃の成長チャンバー内に維持して、接種量を増加させた。1日の長さは、完全光（約10000ルクス）下で15時間で固定した。その後、症候性の葉を実生から回収し、-80℃の冷凍庫に貯蔵した。この貯蔵は、接種材料の供給源と考えられる。この製造に続いて、較正の第1のステップを実施して、接種材料のより低い濃度を確立し、100%の感受性対照を逃れることなく感染させた。この要件に適合する最良の希釈は、1／2（10ml緩衝液中の1gのウイルス葉）に固定され、表現型決定実験に使用された。

【0139】

実施例2B．植物の調製及び接種。

人工的な方法を用いて、植物にT o B R F V株を接種した。F2系統の種子を特定のトレイに播種し、フランスのサリアンズにある成長室に置いた。さらに、親系統16TEP070330及びLA0483の24個の種子、得られたF1植物19TEP080670及び感受性対照16TEP071665を、チェックとして使用するために播種した。接種の4日前に、発芽率に応じて、F2の349植物及びチェックの16植物を接種のために選択した。試験した各材料について、1つの植物を別の支持体に移植した。上記のように調製したT o B R F V接種材料を使用して、播種の14日後（2つの本葉）に、トレイ中の植物を接種した。接種は、葉を穏やかに2回擦ることによって行った。接種効果を評価するために、移植植物をウイルスなしで接種した（偽）。

【0140】

実施例2C．T o B R F V耐性のスコアリング。

葉の歪み及びモザイクなどの最初の症状は、接種後16～19日目（dpi）に現れた。感受性チェックが完全に症候性である場合、この場合、20及び27dpiで、植物をモニターし、症状を評価した。以下に記載され、図1に例示されるように、植物を定性的スケールでスコア化した。

評価 症状

HR（9）症状のない健康な植物。

IR（5）感受性と比較して低い症状発現

S（1）葉のゆがみが強い感受性植物。

【0141】

実施例2D．T o B R F Vの根底にあるQ T L及び対応する遺伝子移入配列を同定する方法は、耐性形質を増加させた。

【0142】

Q T L発見のために、「LA0483 x 16TEP070330」集団の349個の植物を、ゲノムにわたる191個の遺伝子マーカを用いて遺伝子型同定した。これらの植物

10

20

30

40

50

を成長させ、上記の実施例 2 A～C に記載のように T o B R F V について評価した。

【0143】

Q T L の検出を、R 統計フレームワークにおける R / q t l パッケージを用いて行った。まず、関数「c a l c . g e n o p r o b」を用いて、遺伝子型確率を算出した（ステップ 1 c M）。H a l e y - K n o t t 回帰法を行って、標準区間マッピングの結果の近似値を得た。次いで、完全自動化モデル選択フォワード／バックワードアルゴリズムをもたらず関数「s t e p w i s e q t l」を呼び出した。主な効果に対する L O D 閾値を 1 0 , 0 0 0 の順列により決定した。関数「f i t q t l」を用いて最終的な Q T L モデルと関数「q t l S t a t s」をフィッティングして、Q T L 効果の推定値を得た。

【0144】

実施例 3：増加した T o B R F V 耐性に関連する 1 つの Q T L の同定

1 つの Q T L は、F 2 集団からの T o B R F V 耐性表現型に基づいて同定された。表 1 は、染色体位置、L O D スコアとして測定された Q T L の効果、及び T o B R F V 耐性について第 1 染色体上の Q T L によって説明される変動のパーセンテージを示す。Q T L は、F 2 集団において劣性効果を示した。

【0145】

【表 1】

表 1: T o B R F V 耐性に関連する有意な QTL。

染色体	LOD	%var	P 値(F)
1	9.98	9.64%	4.24E-08 ***

“LOD”=対数尤度スコア、“%var”=QTL によって説明されるパーセント表現型変異、“P 値(F)”=F 検定によるランダムな偶然により検出される QTL の確率。

【0146】

実施例 4：トマト植物のパネルにおける T o B R F V 耐性の評価

ソラナム・ガラパゲンセ（*S o l a n u m g a l a p a g e n s e*）系統種 L A 0 4 8 3 は、臭いのある葉、繁殖する習慣、及び小さなオレンジ色の有毛果実を有する野生トマト植物である。感受性材料 1 6 T E P 0 7 0 3 3 0 は、受動的温室栽培のための不確定クラスタートマト型からのエリート系統である。

【0147】

L A 0 4 8 3 源は T o B R F V に対して強い耐性を示したが、1 6 T E P 0 7 0 3 3 0 感受性親及び「L A 0 4 8 3 x 1 6 T E P 0 7 0 3 3 0」交配から生じた F 1 は、重度の感受性の表現型を示す。ホモ接合状態にあるソラナム・ガラパゲンセ（*S o l a n u m g a l a p a g e n s e*）系統種 L A 0 4 8 3 の第 1 染色体上に存在する T o B R F V に対する耐性の増加に関連する遺伝子配列を有する F 2 植物は、強い耐性表現型を示した。一方、この同じゲノム領域においてヘテロ接合性であるか、又は感受性 1 6 T E P 0 7 0 3 3 0 対立遺伝子の 2 つのコピーを有する F 2 植物は、感受性表現型を示す。

【0148】

表現型決定の結果を、Q T L 1 における代表マーカの有無についての試験の結果と共に、以下の表 2 に要約する。

【0149】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2: QLT1 についての隣接及び特徴付け SNP マーカの有無、並びに対応する ToBRFV 表現型。

材料番号、ID 及び型	ToBRFV スコア	QLT1 領域				
		ST2752	ST4450	ST1840	ST4079	ST0435A
1. LA0483: 元のドナー	HR	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A
2. 16TEP070330: 感受性親	S	A/A	G/G	A/A	A/A	C/C
3. F1, 'LA0483 x 16TEP070330', 19TEP080670, 種子受託(deposit_)	S	G/A	A/G	G/A	G/A	A/C
4. F2 系統, DR225602385	S	A/A	G/G	A/A	A/A	C/C
5. F2 系統, DR225602252	S	A/A	G/G	A/A	A/A	C/C
6. F2 系統, DR225602575	S	G/A	A/G	G/A	G/A	A/C
7. F2 系統, DR225602168	S	G/A	A/G	G/A	G/A	A/C
8. F2 系統, DR225602183	HR	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A
9. F2 系統, DR225602191	HR	G/G	A/A	G/G	G/G	A/A

10

20

【0150】

既存の感受性チェック植物（2番）並びにF1植物（3番）及び0（4及び5番）又は1コピー（6及び7番）のQLT1における遺伝子移入配列を含むF2系統は、感受性表現型を示した。他方では、元のドナー植物（1番）と、前記遺伝子移入配列にまたがるSNPマーカにおける耐性遺伝子型を有する、2コピーのQLT1における遺伝子移入配列を含むF2系統（8及び9番）は、増加したToBRFV耐性を示し、高い耐性スコアを達成した。

【0151】

QLT1領域内で、QLT1区間内の3つのSNPマーカ、ST4450、ST1840及びST4079（それぞれSNPマーカ2、3及び4）は、耐性ドナーからのドナー耐性対立遺伝子の選択に対する特異性を示し、それらから、SNPマーカST1840（SNPマーカ3）は、耐性に最も密接に関連している。

30

【0152】

表3は、第1染色体上のQLTの遺伝的及び物理的位置の両方、並びにQLTと密接に関連する3つのSNPマーカの位置を示す。物理的位置は、Heinz 1706 SL 4.0（2019年9月リリース、<https://solgenomics.net/>）の公開ゲノムアセンブリに関連して提供される。

【0153】

40

50

【表 3】

表 3. 第 1 染色体上の QTL の遺伝的地図

SNP ID	SNP 遺伝子座	位置 (cM)	物理的位置 (bp; Heinz 1706 SL4.0)	観察
1	ST2752	86.18	82,311,506	左隣接マーカ
2	ST4450	93.4	84,759,575	R 対立遺伝子に特異的な SNP
3	ST1840	97.17	86,137,823	R 対立遺伝子に特異的な SNP
4	ST4079	103.74	87,456,377	R 対立遺伝子に特異的な SNP
5	ST0435A	110.57	88,906,129	右隣接マーカ

10

【 0 1 5 4 】

実施例 5：Q L T 1 の配列及び S N P マーカ情報

S N P マーカ 1 ～ 5 （ S T 2 7 5 2 、 S T 4 4 5 0 、 S T 1 8 4 0 、 S T 4 0 7 9 及び S T 0 4 3 5 A ） の配列情報を、以下の表 4 に要約する。

20

【 0 1 5 5 】

30

40

50

【表 4】

表 4.

マーカ	1/ ST2752	2/ ST4450	3/ ST1840	4/ ST4079
耐性対立遺伝子(S. ガラパゲンセ (<i>S. galapagense</i>))	G	A	G	G
感受性対立遺伝子(S. リコペルシカ ム(<i>S. lycopersicum</i>))	A	G	A	A
標的配列: 配列番号	1	6	11	16
標的配列における SNP 位置: nt	47	79	51	147
順方向プライマ: 配列番号	2	7	12	17
逆方向プライマ: 配列番号	5	10	15	20
プローブ(耐性): 配列番号	3	8	13	18
プローブ(感受性): 配列番号	4	9	14	19
マーカ	5 / ST0435A			
耐性対立遺伝子(S. ガラパゲンセ (<i>S. galapagense</i>))	A			
感受性対立遺伝子(S. リコペルシカ ム(<i>S. lycopersicum</i>))	C			
標的配列: 配列番号	21			
標的配列における SNP 位置: nt	94			
順方向プライマ: 配列番号	22			
逆方向プライマ: 配列番号	25			
プローブ(耐性): 配列番号	23			
プローブ(感受性): 配列番号	24			

10

20

30

【0156】

例として、第1染色体上の位置82,311,506bpにおけるSNPマーカ1(ST2752)(Heinz 1706 SL4.0アセンブリに基づく)は、配列番号1の標的配列の位置47における特定の配列多型(耐性ドナー対立遺伝子対感受性対立遺伝子)によって特徴付けられる。

【0157】

実施例6：他のトバモウイルスに対する耐性の評価

ToBRFV耐性についてスクリーニングされることに加えて、ソラナム・ガラパゲンセ(*Solanum galapagense*)系統種LA0483はまた、TMV及びToMV病原型0及び2などの他のトバモウイルスに対してチャレンジされた。この系統種は、例えば、ToMV病原型0(アウキュバ(*aucuba*))及び2に対して強い耐性を提供することが見出された。本発明のQTL1は、ToBRFV耐性に関与するだけでなく、トバモウイルスに対する広範な耐性にも関与すると仮定される。表現型決定の結果を以下の表5及び図3に要約する。

40

【0158】

50

【表 5】

表 5: 元のドナー及び感受性チェックの ToBRFV 及び ToMV 表現型。

材料番号、ID 及び型		ToBRFV スコア	ToMV 病原型 0 (アウキュバ(au cuba)) スコア	ToMV 病原型 2 スコア
1.	LA0483: 元のドナー	HR	HR	HR
2.	16TEP070330: 感受性親	S	S	S

10

【0159】

参考文献

・Luria et al., 2017, A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes, PLoS ONE 12 (1) : e0170429. doi:10.1371/journal.pone.0170429

・Salem et al., 2016, A new tobamovirus infecting tomato crops in Jordan, Arch. Virol. 161: 503-506.

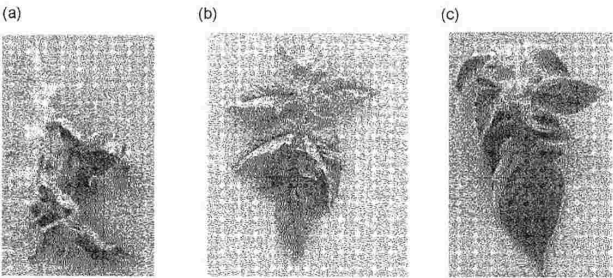
・Zinger et al., 2021, Identification and mapping of tomato genome loci controlling tolerance and resistance to Tomato Brown Rugose Fruit Virus, Plants 10 (1) : 179. doi: 10.3390/plants10010179.

20

【図面】

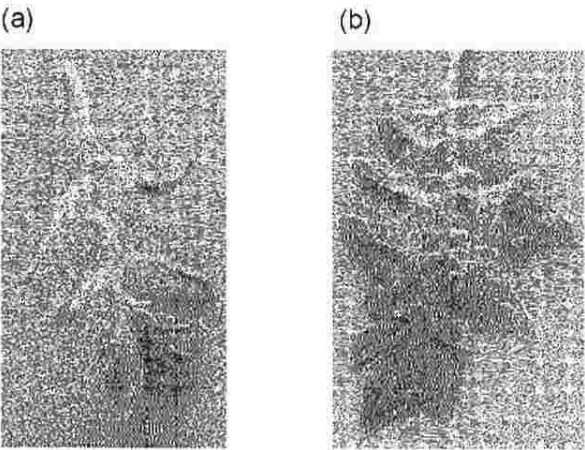
【図 1】

図1. 代表的なToBRFV症状



【図 2】

図2.ToBRFV表現型

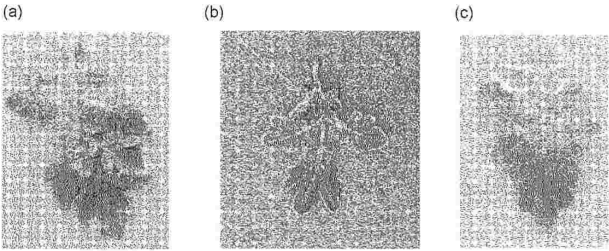


30

40

【図 3】

図3.ToMV表現型



【配列表】

202550665500001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
	International application No. PCT/EP2023/053979
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)). ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed. 2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing. 3. Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/053979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A01H1/00 A01H5/08 A01H6/82 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01H		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022/018734 A1 (PHILOSEED LTD [IL]) 27 January 2022 (2022-01-27) -----	1-24
A	WO 2022/013452 A1 (RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL BV [NL]) 20 January 2022 (2022-01-20) -----	1-24
A	WO 2021/245282 A1 (VILMORIN & CIE [FR]) 9 December 2021 (2021-12-09) -----	1-24
A	WO 2019/110130 A1 (RIJK ZWAAN ZAADTEELT EN ZAADHANDEL BV [NL]) 13 June 2019 (2019-06-13) ----- -/-	1-24
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 April 2023		Date of mailing of the international search report 11/05/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kania, Thomas

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/053979

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZINGER AVNER ET AL: "Identification and Mapping of Tomato Genome Loci Controlling Tolerance and Resistance to Tomato Brown Rugose Fruit Virus", PLANTS, vol. 10, no. 1, 19 January 2021 (2021-01-19), page 179, XP055816212, ISSN: 2223-7747, DOI: 10.3390/plants10010179 -----	1-24
A	US 2017/240910 A1 (SNOEREN TJEERD ADRIANUS LAMBERTUS [NL] ET AL) 24 August 2017 (2017-08-24) -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/053979

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2022018734 A1	27-01-2022	NONE	
WO 2022013452 A1	20-01-2022	AU 2021309723 A1	09-02-2023
		CA 3183549 A1	20-01-2022
		EP 4181663 A1	24-05-2023
		WO 2022013452 A1	20-01-2022
WO 2021245282 A1	09-12-2021	AU 2021285274 A1	02-02-2023
		BR 112022024738 A2	07-03-2023
		CA 3186284 A1	09-12-2021
		CN 115867129 A	28-03-2023
		EP 4161252 A1	12-04-2023
		IL 298618 A	01-01-2023
		WO 2021245282 A1	09-12-2021
WO 2019110130 A1	13-06-2019	CA 3078275 A1	13-06-2019
		CA 3092499 A1	13-06-2019
		CN 111432630 A	17-07-2020
		EP 3720272 A1	14-10-2020
		EP 3735125 A1	11-11-2020
		IL 274869 A	30-07-2020
		IL 276954 A	30-11-2020
		JP 7220217 B2	09-02-2023
		JP 2021505165 A	18-02-2021
		JP 2021516548 A	08-07-2021
		JP 2022116022 A	09-08-2022
		US 2020399652 A1	24-12-2020
		US 2022389442 A1	08-12-2022
		WO 2019110130 A1	13-06-2019
		WO 2019110821 A1	13-06-2019
US 2017240910 A1	24-08-2017	US 2017240910 A1	24-08-2017
		US 2020087739 A1	19-03-2020

フロントページの続き

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX
,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,
SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ラブーリー セリーヌ

フランス 8 4 2 6 0 サリアン ルート デ パスキエ 3 4 6 ドメーヌ デュ ムーラン

(72)発明者 アルベール エリーズ

フランス 3 1 7 9 0 サンーソヴァール シュマン ド ロビ 1 2 2 8

(72)発明者 シャセーニュ アルノー

フランス 3 1 7 9 0 サンーソヴァール シュマン ド ロビ 1 2 2 8