

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7198549号
(P7198549)

(45)発行日 令和5年1月4日(2023.1.4)

(24)登録日 令和4年12月21日(2022.12.21)

(51)国際特許分類		F I	
A 0 1 H	5/00 (2018.01)	A 0 1 H	5/00
A 0 1 H	1/02 (2006.01)	A 0 1 H	1/02
A 0 1 H	5/12 (2018.01)	A 0 1 H	5/12
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68

請求項の数 18 外国語出願 (全52頁)

(21)出願番号	特願2014-239084(P2014-239084)	(73)特許権者	500195035
(22)出願日	平成26年11月26日(2014.11.26)		セミス・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2015-142556(P2015-142556 A)		Seminis Vegetable Seeds, Inc.
(43)公開日	平成27年8月6日(2015.8.6)		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・ブルバード800番
審査請求日	平成29年10月18日(2017.10.18)	(74)代理人	100114188
審査番号	不服2019-14664(P2019-14664/J1)		弁理士 小野 誠
審判請求日	令和1年11月1日(2019.11.1)	(74)代理人	100119253
(31)優先権主張番号	61/909,883		弁理士 金山 賢教
(32)優先日	平成25年11月27日(2013.11.27)	(74)代理人	100124855
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 坪倉 道明
		(74)代理人	100129713

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タマネギにおける疾病抵抗性遺伝子座

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ゲノム内に少なくとも1個の遺伝子移入された対立遺伝子座を含む、農学的にエリート系統のタマネギ植物であって、ここで前記植物は、

連鎖群2(LG2)上のNQ0345038(配列番号3)およびNQ0257326(配列番号23)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域に含まれる乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する対立遺伝子、ならびに、連鎖群2(LG2)上のNQ0257277(配列番号22)およびNQ0258453(配列番号27)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域に含まれる紅色根腐病に対する抵抗性を付与する対立遺伝子、を含むcis結合した連鎖を含み、

ここで該植物が、連鎖群2(LG2)上のNQ0257220(配列番号26)およびNQ0257692(配列番号29)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域に含まれるピンク補色球根色を付与する対立遺伝子を欠失している、タマネギ植物。

【請求項2】

該cis結合した連鎖を北米黄タマネギおよび汎用黄タマネギから成る群から選択されるタマネギ品種に遺伝子移入する、請求項1に記載のタマネギ植物。

【請求項3】

少なくとも1個のタマネギ植物において疾病抵抗性または球根色と関連する遺伝子型を検出する方法であって、該方法は、

(i) 少なくとも1個のタマネギ植物において疾病抵抗性または球根色と関連する少なく

とも1個の多型核酸の対立遺伝子を検出する工程を含み、ここで、該多型核酸が、以下の領域内にあるか又は遺伝的に連鎖している、方法：

連鎖群2 (LG2) 上の、NQ0345038 (配列番号3) およびNQ0257326 (配列番号23) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (FBR) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群2 (LG2) 上の、NQ0257277 (配列番号22) およびNQ0258453 (配列番号27) の遺伝子座により定義され、紅色根腐病 (PR) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群2 (LG2) 上の、NQ0257220 (配列番号26) およびNQ0257692 (配列番号29) の遺伝子座により定義され、ピンク補色球根色の欠失を付与するタマネギゲノム領域；

10

連鎖群3 (LG3) 上の、NQ0258523 (配列番号30) およびNQ0345206 (配列番号36) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (FBR) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群4 (LG4) 上の、NQ0345564 (配列番号38) およびNQ0257917 (配列番号63) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (FBR) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群4 (LG4) 上の、NQ0344978 (配列番号49) およびNQ0344766 (配列番号55) の遺伝子座により定義され、紅色根腐病 (PR) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

20

連鎖群4 (LG4) 上の、NQ0258361 (配列番号37) およびNQ0344778 (配列番号61) の遺伝子座により定義され、球根色の発色または阻止を付与するタマネギゲノム領域；または

連鎖群6 (LG6) 上の、NQ0257378 (配列番号64) およびNQ0345734 (配列番号74) の遺伝子座により定義され、赤色色素球根色を付与するタマネギゲノム領域。

【請求項4】

さらに、(ii) 疾病抵抗性または球根色と関連する遺伝子型が検出されている少なくとも1個のタマネギ植物を選択する工程を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

タマネギ植物が農業生産的にエリート系統である、請求項3に記載の方法。

30

【請求項6】

タマネギ植物がハイブリッドまたは自殖である、請求項3に記載の方法。

【請求項7】

タマネギ植物が疾病抵抗性を含む少なくとも1個の親植物の交配から得られた子孫植物である、請求項3に記載の方法。

【請求項8】

ゲノム内に疾病抵抗性または球根色と関連する少なくとも1個の遺伝子座を含むタマネギ植物の生産方法であって、以下を含む方法：

(i) 疾病抵抗性または球根色と関連する遺伝子座を欠く第一タマネギ植物と、疾病抵抗性または球根色と関連する遺伝子座を含む第二タマネギ植物とを交配させ、ここで、遺伝子座は、以下に含まれ；

40

連鎖群2 (LG2) 上の、NQ0345038 (配列番号3) およびNQ0257326 (配列番号23) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (FBR) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群2 (LG2) 上の、NQ0257277 (配列番号22) およびNQ0258453 (配列番号27) の遺伝子座により定義され、紅色根腐病 (PR) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群2 (LG2) 上の、NQ0257220 (配列番号26) およびNQ0257692 (配列番号29) の遺伝子座により定義され、ピンク補色球根色の欠失を付与するタ

50

マネギゲノム領域；

連鎖群 3 (L G 3) 上の、 N Q 0 2 5 8 5 2 3 (配列番号 3 0) および N Q 0 3 4 5 2 0 6 (配列番号 3 6) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (F B R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 4 (L G 4) 上の、 N Q 0 3 4 5 5 6 4 (配列番号 3 8) および N Q 0 2 5 7 9 1 7 (配列番号 6 3) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (F B R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 4 (L G 4) 上の、 N Q 0 3 4 4 9 7 8 (配列番号 4 9) および N Q 0 3 4 4 7 6 6 (配列番号 5 5) の遺伝子座により定義され、紅色根腐病 (P R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 4 (L G 4) 上の、 N Q 0 2 5 8 3 6 1 (配列番号 3 7) および N Q 0 3 4 4 7 7 8 (配列番号 6 1) の遺伝子座により定義され、球根色の発色または阻止を付与するタマネギゲノム領域；または

連鎖群 6 (L G 6) 上の、 N Q 0 2 5 7 3 7 8 (配列番号 6 4) および N Q 0 3 4 5 7 3 4 (配列番号 7 4) の遺伝子座により定義され、赤色色素球根色を付与するタマネギゲノム領域；

(i i) 前記交配から得られた子孫において、疾病抵抗性または球根色と関連する遺伝子座にあるまたは遺伝的に連鎖している少なくとも 1 個の多型座を検出し；そして

(i i i) 疾病抵抗性または球根色と関連する前記多型および前記遺伝子座を含むタマネギ植物を選択する。

【請求項 9】

さらに、(i v) 工程 (i i i) のタマネギ植物とそれ自体または他のタマネギ植物を交配させて、さらなる世代を生産する工程を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

工程 (i i i) および (i v) を約 3 回 ~ 約 1 0 回繰り返す、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 8 に記載の方法であって、前記タマネギ植物が連鎖群 2 (L G 2) 上の N Q 0 3 4 5 0 3 8 (配列番号 3) および N Q 0 2 5 7 3 2 6 (配列番号 2 3) の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域に含まれる遺伝子座により付与される乾腐病 (F B R) に対する抵抗性、ならびに、連鎖群 2 (L G 2) 上の N Q 0 2 5 7 2 7 7 (配列番号 2 2) および N Q 0 2 5 8 4 5 3 (配列番号 2 7) の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域に含まれる遺伝子座により付与される紅色根腐病に対する抵抗性を含み、ここで該植物が、連鎖群 2 (L G 2) 上の N Q 0 2 5 7 2 2 0 (配列番号 2 6) および N Q 0 2 5 7 6 9 2 (配列番号 2 9) の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域に含まれる遺伝子座により付与されるピンク補色球根色を欠失している、方法。

【請求項 12】

選択されたタマネギ植物が農業生産的にエリート系統である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

選択されたタマネギ植物がハイブリッドまたは自殖である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 14】

タマネギ植物育種方法であって、

(i) 疾病抵抗性または球根色と関連する Q T L 内にあるか、遺伝的に連鎖している多型核酸の少なくとも 1 個の対立遺伝子を含む第一タマネギ植物を選択し、ここで、該 Q T L が、

連鎖群 2 (L G 2) 上の、 N Q 0 3 4 5 0 3 8 (配列番号 3) および N Q 0 2 5 7 3 2 6 (配列番号 2 3) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (F B R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 2 (L G 2) 上の、 N Q 0 2 5 7 2 7 7 (配列番号 2 2) および N Q 0 2 5 8 4 5 3 (配列番号 2 7) の遺伝子座により定義され、紅色根腐病 (P R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

10

20

30

40

50

連鎖群 2 (L G 2) 上の、 N Q 0 2 5 7 2 2 0 (配列番号 2 6) および N Q 0 2 5 7 6 9 2 (配列番号 2 9) の遺伝子座により定義され、ピンク補色球根色の欠失を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 3 (L G 3) 上の、 N Q 0 2 5 8 5 2 3 (配列番号 3 0) および N Q 0 3 4 5 2 0 6 (配列番号 3 6) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (F B R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 4 (L G 4) 上の、 N Q 0 3 4 5 5 6 4 (配列番号 3 8) および N Q 0 2 5 7 9 1 7 (配列番号 6 3) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (F B R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 4 (L G 4) 上の、 N Q 0 3 4 4 9 7 8 (配列番号 4 9) および N Q 0 3 4 4 7 6 6 (配列番号 5 5) の遺伝子座により定義され、紅色根腐病 (P R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 4 (L G 4) 上の、 N Q 0 2 5 8 3 6 1 (配列番号 3 7) および N Q 0 3 4 4 7 7 8 (配列番号 6 1) の遺伝子座により定義され、球根色の発色または阻止を付与するタマネギゲノム領域；または

連鎖群 6 (L G 6) 上の、 N Q 0 2 5 7 3 7 8 (配列番号 6 4) および N Q 0 3 4 5 7 3 4 (配列番号 7 4) の遺伝子座により定義され、赤色素球根色を付与するタマネギゲノム領域、
にマッピングされ；

(i i) 前記第一タマネギ植物を、それ自体または第二タマネギ植物と交配させて、疾病抵抗性または球根色に関連する Q T L を含む子孫タマネギ植物を生産することを含む、方法。

【請求項 1 5】

疾病抵抗性または球根色と関連する該 Q T L と遺伝的に連鎖している少なくとも 1 個の多型核酸が、疾病抵抗性または球根色と関連する該 Q T L の 4 0 c M、 2 0 c M、 1 5 c M、 1 0 c M、 5 c M または 1 c M 内にマッピングされる、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

タマネギ植物に対立遺伝子を遺伝子移入する方法であって、該方法は、
(i) 以下の領域に位置するかまたは遺伝的に連鎖している少なくとも 1 個の多型核酸に関して、集団内の少なくとも 1 個のタマネギ植物を遺伝子型判定し；

連鎖群 2 (L G 2) 上の、 N Q 0 3 4 5 0 3 8 (配列番号 3) および N Q 0 2 5 7 3 2 6 (配列番号 2 3) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (F B R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 2 (L G 2) 上の、 N Q 0 2 5 7 2 7 7 (配列番号 2 2) および N Q 0 2 5 8 4 5 3 (配列番号 2 7) の遺伝子座により定義され、紅色根腐病 (P R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 2 (L G 2) 上の、 N Q 0 2 5 7 2 2 0 (配列番号 2 6) および N Q 0 2 5 7 6 9 2 (配列番号 2 9) の遺伝子座により定義され、ピンク補色球根色の欠失を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 3 (L G 3) 上の、 N Q 0 2 5 8 5 2 3 (配列番号 3 0) および N Q 0 3 4 5 2 0 6 (配列番号 3 6) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (F B R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 4 (L G 4) 上の、 N Q 0 3 4 5 5 6 4 (配列番号 3 8) および N Q 0 2 5 7 9 1 7 (配列番号 6 3) の遺伝子座により定義され、乾腐病 (F B R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 4 (L G 4) 上の、 N Q 0 3 4 4 9 7 8 (配列番号 4 9) および N Q 0 3 4 4 7 6 6 (配列番号 5 5) の遺伝子座により定義され、紅色根腐病 (P R) に対する抵抗性を付与するタマネギゲノム領域；

連鎖群 4 (L G 4) 上の、 N Q 0 2 5 8 3 6 1 (配列番号 3 7) および N Q 0 3 4 4 7 7 8 (配列番号 6 1) の遺伝子座により定義され、球根色の発色または阻止を付与するタ

10

20

30

40

50

マネギゲノム領域；

または

連鎖群 6 (LG6) 上の、NQ0257378 (配列番号 64) および NQ0345734 (配列番号 74) の遺伝子座により定義され、赤色素球根色を付与するタマネギゲノム領域；

(ii) 疾病抵抗性または球根色と関連する少なくとも 1 個の対立遺伝子を含む少なくとも 1 個のタマネギ植物を集団から選択し、そして、

(iii) 前記少なくとも 1 個の対立遺伝子を含む前記タマネギ植物を第 2 のタマネギ植物と交配して、前記対立遺伝子を含む子孫タマネギ植物を生産する、ことを含む、方法。

【請求項 17】

タマネギ植物が農業生産的にエリート系統である、請求項 1.6 に記載の方法。

【請求項 18】

タマネギ植物がハイブリッドまたは自殖である、請求項 1.6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年11月27日出願の米国仮出願番号 61/909,883 の利益を主張し、引用によりその全体を本明細書に包含させる。

【0002】

発明の分野

本発明は農業の分野、より具体的には、疾病への抵抗性を好ましい球根色と組み合わせる有するタマネギ植物を生産するための方法および組成物に関する。

【0003】

配列表の取り込み

“SEMB012US_ST25.txt” なるファイル名に含まれ、Microsoft Windows オペレーティング・システムで測定して 61.3 キロバイトであり、2014年11月20日に作成した配列表を本願と共に電子的に提出し、引用により本明細書に包含させる。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

植物の疾病抵抗性は、特に食用作物の生産のための、植物育種において重要な形質である。タマネギ植物に影響する経済的に重要な疾病は、とりわけ乾腐病(フザリウム・オキシスポラム・フォルマ・スペシャリス・セペ(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*))および紅色根腐病(ホーマ・テレストリス(*Phoma terrestris*))を含む。これらの疾病は、商業用タマネギ作物に影響を与える植物自体の喪失をもたらし得る。植物の育種における努力が、疾病に抵抗性である多くのタマネギ品種をもたらしているが、このような努力は、多くの場合、遺伝連鎖、不適切な表現型アッセイおよび形質の複雑なまたはほとんど理解されていない問題、例えば遺伝により複雑化している。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】米国特許公報第 2005/0204780 号明細書

米国特許公報第 2005/0216545 号明細書

米国特許公報第 2005/0218305 号明細書

米国特許公報第 2006/0050453 号明細書

米国特許 6,207,367 号明細書

欧州特許第 50,424 号明細書

欧州特許第 84,796 号明細書

欧州特許第 258,017 号明細書

10

20

30

40

50

欧州特許第 2 3 7, 3 6 2 号明細書	
欧州特許第 2 0 1, 1 8 4 号明細書	
米国特許第 4, 6 8 3, 2 0 2 号明細書	
米国特許第 4, 5 8 2, 7 8 8 号明細書	
米国特許第 4, 6 8 3, 1 9 4 号明細書	
米国特許第 6, 6 1 3, 5 0 9 号明細書	
米国特許第 6, 5 0 3, 7 1 0 号明細書	
米国特許第 5, 4 6 8, 6 1 3 号明細書	
米国特許第 5, 2 1 7, 8 6 3 号明細書	
米国特許第 5, 2 1 0, 0 1 5 号明細書	10
米国特許第 5, 8 7 6, 9 3 0 号明細書	
米国特許第 6, 0 3 0, 7 8 7 号明細書	
米国特許第 6, 0 0 4, 7 4 4 号明細書	
米国特許第 6, 0 1 3, 4 3 1 号明細書	
米国特許第 5, 5 9 5, 8 9 0 号明細書	
米国特許第 5, 7 6 2, 8 7 6 号明細書	
米国特許第 5, 9 4 5, 2 8 3 号明細書	
米国特許第 5, 4 6 8, 6 1 3 号明細書	
米国特許第 6, 0 9 0, 5 5 8 号明細書	
米国特許第 5, 8 0 0, 9 4 4 号明細書	20
米国特許第 5, 6 1 6, 4 6 4 号明細書	
米国特許第 7, 3 1 2, 0 3 9 号明細書	
米国特許第 7, 2 3 8, 4 7 6 号明細書	
米国特許第 7, 2 9 7, 4 8 5 号明細書	
米国特許第 7, 2 8 2, 3 5 5 号明細書	
米国特許第 7, 2 7 0, 9 8 1 号明細書	
米国特許第 7, 2 5 0, 2 5 2 号明細書	
米国特許第 5, 4 6 8, 6 1 3 号明細書	
米国特許第 5, 2 1 7, 8 6 3 号明細書	
米国特許第 6, 7 9 9, 1 2 2 号明細書	30
米国特許第 6, 9 1 3, 8 7 9 号明細書	
米国特許第 6, 9 9 6, 4 7 6 号明細書	
【非特許文献】	
【 0 0 0 6 】	
【文献】 Smith, Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 44:413-16	
Duangjit et al., Theor Appl Genet 126(8):2093-2101, 2013	
Orita et al., Genomics 8(2):271-278, 1989	
Myers, EPO 0273085, 1985	
Life Technologies, Inc., Gathersberg, MD 20877	
PASA, Sommer, et al., Biotechniques 12(1):82-87, 1992	40
PAMSA, Dutton and Sommer, Biotechniques, 11(6):700-7002, 1991	
Holland et al., PNAS 88:7276-7280, 1991	
Mullis et al. 1986 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273	
Borevitz et al., Genome Res. 13:513-523, 2003; Cui et al., Bioinformatics 21:3852-3858, 2005	
R. F. Service Science 2006 311:1544-1546	
【発明の概要】	
【 0 0 0 7 】	
発明の要約	
一つの面において、本発明は、乾腐病および紅色根腐病に対する抵抗性を含むタマネギ	50

植物を提供し、ここで、該植物はさらにピンク補色形質を欠失する(lacks of the complementary pinks trait)。一つの態様において、タマネギ植物は、連鎖群 2 (L G 2)上の N Q 0 3 4 5 0 3 8 (配列番号 3)および N Q 0 2 5 7 3 2 6 (配列番号 2 3)の遺伝子座により定義される該タマネギゲノム領域により付与される乾腐病に対する抵抗性、連鎖群 2 (L G 2)上の N Q 0 2 5 7 2 7 7 (配列番号 2 2)および N Q 0 2 5 8 4 5 3 (配列番号 2 7)の遺伝子座により定義される該タマネギゲノム領域により付与される紅色根腐病に対する抵抗性および連鎖群 2 (L G 2)上の N Q 0 2 5 7 2 2 0 (配列番号 2 6)および N Q 0 2 5 7 6 9 2 (配列番号 2 9)の遺伝子座により定義される該タマネギゲノム領域により付与されるピンク補色球根色を欠失する、cis 結合した連鎖を含む。他の態様において、cis 結合した連鎖を、北米黄タマネギ(North American Yellow)および汎用黄タマネギ(Universal Yellow)から成る群から選択されるタマネギ品種に遺伝子移入する。他の態様において、本発明は、乾腐病および紅色根腐病に対する抵抗性を含むタマネギ植物の部分を提供し、ここで、該植物はさらにピンク補色形質を欠失し、ここで、該植物の部分は、さらに花粉、胚珠、葉、胚、根、根端、葯、花、球根、幹、芽、種、プロトプラスト、細胞およびカルスとして定義される。さらに他の態様において、タマネギ植物は農学的にエリート系統またはハイブリッドまたは自殖である。

【 0 0 0 8 】

一つの面において、本発明は、ゲノム内に少なくとも 1 個の遺伝子移入された対立遺伝子座を含むタマネギ植物またはそこからの子孫植物を提供し、ここで、該遺伝子移入された対立遺伝子座は、乾腐病(F B R)に対する抵抗性を付与する連鎖群 2 (L G 2)上の N Q 0 3 4 5 0 3 8 (配列番号 3)および N Q 0 2 5 7 3 2 6 (配列番号 2 3)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；紅色根腐病(P R)に対する抵抗性を付与する連鎖群 2 (L G 2)上の N Q 0 2 5 7 2 7 7 (配列番号 2 2)および N Q 0 2 5 8 4 5 3 (配列番号 2 7)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；ピンク補色球根色を欠失させる連鎖群 2 (L G 2)上の N Q 0 2 5 7 2 2 0 (配列番号 2 6)および N Q 0 2 5 7 6 9 2 (配列番号 2 9)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；乾腐病(F B R)に対する抵抗性を付与する連鎖群 3 (L G 3)上の N Q 0 2 5 8 5 2 3 (配列番号 3 0)および N Q 0 3 4 5 2 0 6 (配列番号 3 6)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；乾腐病(F B R)に対する抵抗性を付与する連鎖群 4 (L G 4)上の N Q 0 3 4 5 5 6 4 (配列番号 3 8)および N Q 0 2 5 7 9 1 7 (配列番号 6 3)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；紅色根腐病(P R)に対する抵抗性を付与する連鎖群 4 (L G 4)上の N Q 0 3 4 4 9 7 8 (配列番号 4 9)および N Q 0 3 4 4 7 6 6 (配列番号 5 5)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；球根色の発色または阻止を付与する連鎖群 4 (L G 4)上の N Q 0 2 5 8 3 6 1 (配列番号 3 7)および N Q 0 3 4 4 7 7 8 (配列番号 6 1)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；または赤色素球根色を付与する連鎖群 6 (L G 6)上の N Q 0 2 5 7 3 7 8 (配列番号 6 4)および N Q 0 3 4 5 7 3 4 (配列番号 7 4)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域を含む。一つの態様において、連鎖群 2 (L G 2)上の N Q 0 3 4 5 0 3 8 (配列番号 3)および N Q 0 2 5 7 3 2 6 (配列番号 2 3)の遺伝子座により定義される該タマネギゲノム領域により付与される乾腐病(F B R)に対する抵抗性、連鎖群 2 (L G 2)上の N Q 0 2 5 7 2 7 7 (配列番号 2 2)および N Q 0 2 5 8 4 5 3 (配列番号 2 7)の遺伝子座により定義される該タマネギゲノム領域により付与される紅色根腐病に対する抵抗性および連鎖群 2 (L G 2)上の N Q 0 2 5 7 2 2 0 (配列番号 2 6)および N Q 0 2 5 7 6 9 2 (配列番号 2 9)の遺伝子座により定義される該タマネギゲノム領域によりピンク補色球根色を欠失する cis 結合した連鎖を含むタマネギ植物を提供する。他の態様において、cis 結合した連鎖を、北米黄タマネギおよび汎用黄タマネギから成る群から選択されるタマネギ品種に遺伝子移入する。他の態様において、タマネギ植物の部分は花粉、胚珠、葉、胚、根、根端、葯、花、球根、幹、芽、種、プロトプラスト、細胞およびカルスとして定義される。他の態様において、タマネギ植物は農学的にエリート系統またはハイブリッドまたは自殖である。

【 0 0 0 9 】

10

20

30

40

50

他の面において、本発明は、少なくとも1個のタマネギ植物において疾病抵抗性または球根色と関連する遺伝子型を検出する方法を提供し、該方法は、(i)少なくとも1個のタマネギ植物において疾病抵抗性または球根色と関連する少なくとも1個の多型核酸の対立遺伝子を検出する工程を含み、ここで、該多型核酸は、乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群2(LG2)上のNQ0345038(配列番号3)およびNQ0257326(配列番号23)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；紅色根腐病(PR)に対する抵抗性を付与する連鎖群2(LG2)上のNQ0257277(配列番号22)およびNQ0258453(配列番号27)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；ピンク補色球根色を欠失させる連鎖群2(LG2)上のNQ0257220(配列番号26)およびNQ0257692(配列番号29)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群3(LG3)上のNQ0258523(配列番号30)およびNQ0345206(配列番号36)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0345564(配列番号38)およびNQ0257917(配列番号63)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；紅色根腐病(PR)に対する抵抗性を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0344978(配列番号49)およびNQ0344766(配列番号55)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；球根色の発色または阻止を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0258361(配列番号37)およびNQ0344778(配列番号61)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；または赤色素球根色を付与する連鎖群6(LG6)上のNQ0257378(配列番号64)およびNQ0345734(配列番号74)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域内にあるか、遺伝的に連鎖している。一つの態様において、本方法は、さらに(ii)疾病抵抗性または球根色と関連する遺伝子型が検出されている少なくとも1個のタマネギ植物の選択の工程を含む。他の態様において、タマネギ植物は農学的にエリート系統またはハイブリッドまたは自殖または疾病抵抗性を含む少なくとも1個の親植物の交配から得られた子孫植物である。

【0010】

他の面において、本発明は、ゲノム内に疾病抵抗性または球根色と関連する少なくとも1個の遺伝子座を含むタマネギ植物の生産方法を提供し、該方法は(i)疾病抵抗性または球根色と関連する遺伝子座を欠く第一タマネギ植物と、乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群2(LG2)上のNQ0345038(配列番号3)およびNQ0257326(配列番号23)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；紅色根腐病(PR)に対する抵抗性を付与する連鎖群2(LG2)上のNQ0257277(配列番号22)およびNQ0258453(配列番号27)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；ピンク補色球根色を欠失させる連鎖群2(LG2)上のNQ0257220(配列番号26)およびNQ0257692(配列番号29)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群3(LG3)上のNQ0258523(配列番号30)およびNQ0345206(配列番号36)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0345564(配列番号38)およびNQ0257917(配列番号63)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；紅色根腐病(PR)に対する抵抗性を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0344978(配列番号49)およびNQ0344766(配列番号55)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；球根色の発色または阻止を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0258361(配列番号37)およびNQ0344778(配列番号61)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；または赤色素球根色を付与する連鎖群6(LG6)上のNQ0257378(配列番号64)およびNQ0345734(配列番号74)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域により定義される疾病抵抗性または球根色と関連する遺伝子座を含む第二タマネギ植物を交配し；(ii)該交配から得られた子孫において疾病抵抗性または球根色と関連する遺伝子座にあるまたは遺伝的に連結した少なくとも1個の多型座を検出し；そして(iii)疾病抵抗性または球根色と関連する該多型および該座を含むタマネギ植物を選択する工程を含む。一つの態様において、本方法は、さ

10

20

30

40

50

らに(iv)工程(iii)のタマネギ植物とそれ自体または他のタマネギ植物を交配させて、さらなる世代を生産する工程を含む。他の態様において、工程(iii)および(iv)を約3回～約10回繰り返す。他の態様において、タマネギ植物は、連鎖群2(LG2)上のNQ0345038(配列番号3)およびNQ0257326(配列番号23)の遺伝子座により定義される該タマネギゲノム領域により付与される乾腐病(FBR)に対する抵抗性、連鎖群2(LG2)上のNQ0257277(配列番号22)およびNQ0258453(配列番号27)の遺伝子座により定義される該タマネギゲノム領域により付与される紅色根腐病に対する抵抗性および連鎖群2(LG2)上のNQ0257220(配列番号26)およびNQ0257692(配列番号29)の遺伝子座により定義される該タマネギゲノム領域によりピンク補色球根色を欠失する。他の態様において、タマネギ植物は農学的にエリート系統またはハイブリッドまたは自殖である。

10

【0011】

本発明の他の面は、タマネギ植物育種方法を提供し、該方法は、(i)疾病抵抗性または球根色と関連するQTL内にあるか、遺伝的に連鎖している多型核酸の少なくとも1個の対立遺伝子を含む少なくとも第一タマネギ植物を選択し、ここで、該QTLは、乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群2(LG2)上のNQ0345038(配列番号3)およびNQ0257326(配列番号23)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；紅色根腐病(PR)に対する抵抗性を付与する連鎖群2(LG2)上のNQ0257277(配列番号22)およびNQ0258453(配列番号27)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；ピンク補色球根色を欠失させる連鎖群2(LG2)上のNQ0257220(配列番号26)およびNQ0257692(配列番号29)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群3(LG3)上のNQ0258523(配列番号30)およびNQ0345206(配列番号36)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0345564(配列番号38)およびNQ0257917(配列番号63)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；紅色根腐病(PR)に対する抵抗性を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0344978(配列番号49)およびNQ0344766(配列番号55)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；球根色の発色または阻止を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0258361(配列番号37)およびNQ0344778(配列番号61)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；または赤色素球根色を付与する連鎖群6(LG6)上のNQ0257378(配列番号64)およびNQ0345734(配列番号74)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域にマッピングされており；(ii)第一タマネギ植物をそれ自体または第二タマネギ植物と交配させ、疾病抵抗性または球根色と関連するQTLを含む子孫タマネギ植物を生産する工程を含む。一つの態様において、疾病抵抗性または球根色と関連する該QTLと遺伝的に連鎖している少なくとも1個の多型核酸は、疾病抵抗性または球根色と関連する該QTLの40cM、20cM、15cM、10cM、5cMまたは1cM内にマッピングされる。

20

30

【0012】

他の面において、本発明は、タマネギ植物に対立遺伝子を遺伝子移入する方法を提供し、該方法は、(i)乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群2(LG2)上のNQ0345038(配列番号3)およびNQ0257326(配列番号23)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；紅色根腐病(PR)に対する抵抗性を付与する連鎖群2(LG2)上のNQ0257277(配列番号22)およびNQ0258453(配列番号27)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；ピンク補色球根色を欠失させる連鎖群2(LG2)上のNQ0257220(配列番号26)およびNQ0257692(配列番号29)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群3(LG3)上のNQ0258523(配列番号30)およびNQ0345206(配列番号36)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；乾腐病(FBR)に対する抵抗性を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0345564(配列番号38)およびNQ0257917(配列番号63)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；紅色根腐病(P

40

50

R)に対する抵抗性を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0344978(配列番号49)およびNQ0344766(配列番号55)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；球根色の発色または阻止を付与する連鎖群4(LG4)上のNQ0258361(配列番号37)およびNQ0344778(配列番号61)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域；または赤色色素球根色を付与する連鎖群6(LG6)上のNQ0257378(配列番号64)およびNQ0345734(配列番号74)の遺伝子座により定義されるタマネギゲノム領域に位置するまたは遺伝的に連鎖している少なくとも1個の多型核酸に関して、集団内の少なくとも1個のタマネギ植物を遺伝子型判定し；(ii)疾病抵抗性または球根色と関連する少なくとも1個の対立遺伝子を含む少なくとも1個のタマネギ植物を集団から選択する工程を含む。ある態様において、タマネギ植物は農学的にエリート系統またはハイブリッドまたは自殖である。他の態様において、本発明は、このような方法により得られるタマネギ植物を提供する。

10

【0013】

他の面において、本発明は、乾腐病および紅色根腐病に対する抵抗性を含むタマネギ植物を提供し、ここで、該植物はさらにピンク補色形質を欠失する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】乾腐病(FBR)および紅色根腐病(PR)のいずれにも耐性である汎用黄タマネギドナー生殖質に関する望ましいハプロタイプ構成を示す。染色体2(62~63位)上の1706親対立遺伝子が、乾腐病(FBR)および紅色根腐病(PR)の両者に耐性である北米黄タマネギ生殖質をもたらす。

20

【発明を実施するための形態】

【0015】

配列表の簡単な説明

配列番号1~74 - タマネギにおける疾病抵抗性および球根色表現型のマーカー利用選抜(MAS)に使用したマーカー配列。

配列番号75~115 - TaqMan(登録商標)アッセイで使用したVIC標識プローブの配列。

配列番号116~156 - TaqMan(登録商標)アッセイで使用したFAM標識プローブの配列。

30

配列番号157~197および239~240 - TaqMan(登録商標)アッセイで使用した順方向プライマーの配列。

配列番号198~238 - TaqMan(登録商標)アッセイで使用した逆方向プライマーの配列。

【0016】

発明の詳細な記載

本発明は、真菌病原体フザリウム・オキシスポラム・フォルマ・スペシャリス・セペが原因の乾腐病(FBR)および/または真菌病原体ホーマ・テレストリスが原因の紅色根腐病(PR)に対する抵抗性を示し、同時にまたピンク補色(CP)と呼ばれる形質および/またはここで定義する球根色遺伝子座の欠失による農産物として望ましい球根色(例えば黄色)も示す、疾病抵抗性タマネギ植物を生産するための方法および組成物を提供する。疾病抵抗性タマネギ系統を育種および選択する方法ならびにこのような疾病抵抗性タマネギの植物および植物部分をさらに提供する。またここに開示されるのは、このような植物疾病抵抗性を付与する定量的形質遺伝子座("QTL")と連鎖している分子マーカーである。これらのマーカーは、これらの遺伝子座の単独でのまたは任意の望む遺伝子座組み合わせでの使用を促進する。

40

【0017】

驚くべきことに、本発明者らは、特定の疾病抵抗性を有し、同時に、このような疾病抵抗性遺伝子座と以前関連付けられていた望ましくないCP球根色形質を回避または最小化した、タマネギ植物の効率的生産を可能にする方法および組成物の開発を、初めて可能と

50

した。このような形質は、以前は疾病抵抗性遺伝子座と望ましくないC P形質の有害な連鎖無しには、単一タマネギ植物に組み合わせのために利用不可能であった。本発明は、C P形質を生じる遺伝的に連鎖した対立遺伝子無しに、ここに記載するとおり望ましい疾病抵抗性形質を有するタマネギ植物の生産を可能にする。これらの形質を単一タマネギ植物で組み合わせる能力は、疾病抵抗性形質とC Pの間の連鎖の破壊の結果である。本発明の一態様において、2形質間の連鎖の破壊は、望む形質両者を有する植物を産生するための反復減数分裂イベント(すなわち、組み換え)により達成し得る。それゆえに、本発明の一態様は、疾病抵抗性および望む球根色を含むタマネギ植物を提供し、ここで、該望む球根色は、C Pを付与する対立遺伝子が存在しない結果である。

【0018】

本発明は、ある態様において、商業的に望まれる遺伝的背景としての疾病または疾病の組み合わせの選択に対する抵抗または遺伝子移入を可能にする方法および組成物を提供する点で、当分野に顕著な進歩をもたらす。本発明の特定の態様において、F B RおよびP Rを含むが、これらに限定されない少なくとも1種の疾病に対する抵抗性を付与し、C Pの欠失および/または望ましい球根色を提供するQ T Lを同定し、連鎖群2(L G 2)上のN Q 0 3 4 5 0 3 8(配列番号3)およびN Q 0 2 5 7 3 2 6(配列番号23);連鎖群2(L G 2)上のN Q 0 2 5 7 2 7 7(配列番号22)およびN Q 0 2 5 8 4 5 3(配列番号27);連鎖群2(L G 2)上のN Q 0 2 5 7 2 2 0(配列番号26)およびN Q 0 2 5 7 6 9 2(配列番号29);連鎖群3(L G 3)上のN Q 0 2 5 8 5 2 3(配列番号30)およびN Q 0 3 4 5 2 0 6(配列番号36);連鎖群4(L G 4)上のN Q 0 3 4 5 5 6 4(配列番号38)およびN Q 0 2 5 7 9 1 7(配列番号63);連鎖群4(L G 4)上のN Q 0 3 4 4 9 7 8(配列番号49)およびN Q 0 3 4 4 7 6 6(配列番号55);連鎖群4(L G 4)上のN Q 0 2 5 8 3 6 1(配列番号37)およびN Q 0 3 4 4 7 7 8(配列番号61);または連鎖群6(L G 6)上のN Q 0 2 5 7 3 7 8(配列番号64)およびN Q 0 3 4 5 7 3 4(配列番号74)に対応するタマネギゲノムにおける位置により境界される地図区間により定義する。本発明は、さらに、望ましい球根色と共に、疾病抵抗性を付与する1個以上のQ T Lを含むタマネギ植物を提供し、ここで、該望ましい球根色は、ここに記載するとおりC Pの欠失または他の球根色遺伝子座により付与され得る。一つの態様において、本発明に従う望ましい球根色は、C P遺伝子座の欠失、アントシアニン生合成経路中の遺伝子、ジヒドロフラバノール4-レダクターゼ(D F R)遺伝子または望ましい球根色を付与する当分野で知られる他の遺伝子または遺伝子座により付与され得る。本発明によって、ここに定義するQ T L区間内のマーカーを、疾病抵抗性植物の同定に使用し得る。特定の態様において、ここに記載する新規c i s結合イベントを、さらに望む形質と共に疾病抵抗性を有する植物を生産するために、連鎖群の単一ハプロタイプ、例えばL G 2上に組み合わせ得る。

【0019】

ここに提供する対応するマーカーおよび/またはそれと連鎖し得る他のマーカーの使用により、当業者は、商業的に関連するタマネギ系統に疾病抵抗性形質または他の望ましい形質を遺伝子移入および組み合わせ("スタック")するために遺伝子マーカーを使用し得る。特定の態様において、本発明のタマネギ植物を、望む形質を含むハイブリッドタマネギ植物または変種を生産するために交配させ得る。

【0020】

本発明によって、同定された疾病抵抗性Q T Lを任意のタマネギ遺伝的背景に遺伝子移入し得る。一つの態様において、例えば北米黄タマネギまたは汎用黄タマネギを含む、黄色球根のような商業的に好ましい球根色を含むタマネギ系統を、球根色および/またはC Pの欠失のような任意の付加的な望ましい形質と組み合わせで疾病抵抗性を付与するQ T Lの遺伝子移入に使用し得る。それゆえに、本発明の方法を使用し、ここに同定されたまたは当分野で利用可能ないずれかの遺伝子源から出発して、任意の付加的形質と組み合わせたF B RおよびP Rを含む望む疾病抵抗性をさらに含む、任意の遺伝子型のタマネギ植物を生産し得る。さらに、このような植物は、他の望む形質、例えば農学的エリート形質を含むように製造し得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 1 】

ある態様は、さらに、タマネギ植物において、望ましい球根色と結合し得る、疾病抵抗性と関連する遺伝子型を検出する方法を提供する。ある態様はまた、望ましい球根色と結合した疾病抵抗性と関連する遺伝子型をゲノムに含むタマネギ植物の同定および選択方法を提供する。さらなる態様は、望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性と関連する少なくとも1個の遺伝子移入された遺伝子座をそのゲノムに含むタマネギ植物の生産方法およびあるタマネギ品種へのこのような対立遺伝子の遺伝子移入方法を提供する。上記方法のいずれかにより製造したタマネギ植物およびその一部、ならびにこのような植物の生産および同定に使用し得る多型核酸配列も提供される。一つの態様において、本発明は、このようなタマネギ植物または球根またはこのような植物の他の植物部分を含む食品を提供する。

10

【 0 0 2 2 】

疾病抵抗性または望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性のような目的の表現型を得るためのマーカーの提供により、本発明は、高価で、時間集約的でおそらく信頼できない表現型アッセイに取って代わることが可能となり、顕著な経済化をもたらす。さらに、特定の遺伝子型を標的とすることにより、特定の好ましい表現型の頻度を明確に駆動するように、育種プログラムを設計できる。これらの結合のフィデリティを、維持された予測能力および情報に基づく育種決定を確実にするために連続的にモニターし得る。

【 0 0 2 3 】

本発明によって、当業者は、ここに記載した望ましい球根色表現型と一体となった望ましい疾病抵抗性表現型を有する候補生殖質源を同定できる。本発明の技術を使用して、望ましい球根色と一体となった望ましい疾病抵抗性表現型を、このような1個または複数個の表現型と関連する遺伝子マーカーを同定でき、またはこのような技術を単独でまたは遺伝子アッセイと組み合わせる望む植物を同定するための表現型アッセイに用い、それによりまたここに記載する方法で新規品種の生産に使用し得る形質と関連するマーカー遺伝子型も同定し得る。

20

【 0 0 2 4 】

本発明は、ある遺伝的背景への望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性を付与する少なくとも第一遺伝子座の遺伝子移入を提供する。タマネギ生産の成功は、種々の園芸実務に対する注意に依存する。これらは、適切な施肥、適当な隙間を空けた作物定着、雑草防除および受粉用の蜂または他の昆虫の導入、注水および害虫管理への特定の注意を伴う土壌管理を含む。タマネギ作物は、当分野で知られる方法で、とりわけ、種または始動球根から定着させ得る。始動球根は、直接播種から生産した作物と比較して、収穫が早くなり得る。

30

【 0 0 2 5 】

望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性を有するタマネギ植物の開発

本開示は、タマネギ植物の疾病抵抗性に大きな影響を与える定量的形質遺伝子座(QTL)および球根色に大きな影響を与えるQTL、ならびにマーカー利用選抜(MAS)および/またはマーカー利用戻し交配によるような、望ましい生殖質へのQTLの追跡および遺伝子移入に使用できる、このような遺伝子座に遺伝的に連鎖したかつ予測であるマーカーを同定する。本発明はまた、望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性を付与する単一遺伝子座の遺伝子移入も提供する。このような望ましい球根色は、ここに記載するまたは当分野で知られる球根色遺伝子座またはCPの遺伝子座の欠失により付与され得る。本発明のタマネギ植物はまた、疾病抵抗性および望む球根色の両者を有するタマネギ植物を生産するために、望ましい球根色を含むタマネギ植物への疾病抵抗性を付与する1個以上のQTLの遺伝子移入によっても製造できる。

40

【 0 0 2 6 】

実施例に記載するとおり、FBRおよびPRに対する疾病抵抗性に対する5個のQTLが、球根色および/またはCPを制御する3個の遺伝子座と共に同定された。これらの色遺伝子座の一つは、アントシアニン生合成経路からの候補遺伝子においてマーカーと共存

50

することが判明した。F B RおよびP R両者の主作用Q T Lは、L G 2上の類似領域に局在し、そこには、ピンク補色の遺伝子座の1個も局在した。これらのマッピング結果は、F B R、P RおよびC P形質の連鎖、そしてなぜタマネギ育種の間、C P無しでこれらの疾病に対する抵抗性を組み合わせることが困難であったかを確認した。これらの疾病形質のQ T L区間およびマーカーを、本発明で使用して、新タマネギ系統および変種を開発し得る。一つの態様において、例えばここに記載するとおりL G 2上の新規c i s結合連鎖は、とりわけ、北米黄タマネギおよび汎用黄タマネギのようなドナータマネギ系統における疾病抵抗性の組み合わせを可能にする。

【0027】

本発明は、このようなQ T Lおよびそのあらゆる組み合わせの、ある遺伝的背景への追跡および導入を意図する。当業者は、このQ T Lにより付与される1種以上の疾病に対する抵抗性を、M A Sを介して、ここに記載する遺伝子座を使用して、一つの遺伝子型から他へ遺伝子移入し得ることを理解する。したがって、1種以上の疾病に対する抵抗性を有するタマネギ生殖質源を選択できる。このQ T Lを使用して、育種家は、ここに記載する領域に対してM A Sを使用して、疾病に対する抵抗性または望ましい球根色と一体となった疾病に対する抵抗性を有するタマネギ植物を選択でき、または育種中に表現型を追跡できる。本開示の提供により、当業者は、任意の遺伝的背景に、望む球根色と一体となった1種以上の疾病に対する抵抗性を導入できる。

10

【0028】

ここで同定したQ T Lを、タマネギにおいて、望ましい球根色と一体となった1種以上の疾病に対する抵抗性に対するM A Sに使用し得る。望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性と関連するQ T Lのこの発見は、複数疾病に抵抗性を有する、商業的に価値あるタマネギ植物またはその変種の開発を促進し得る。

20

【0029】

ほとんどの育種目標のために、商業用育種家は、“栽培種”または“エリート”としばしば呼ばれる生殖質の範囲内で作業し得る。この生殖質は、園芸性能を評価するとき一般的に良い成績であるために、植物育種で使用が容易である。栽培種がもたらす性能利益は、対立遺伝子多様性の欠如により相殺されることがある。これは、栽培生殖質で作業するとき、育種家が受け入れる代償である - 対立遺伝子多様性欠如を代償に良好な全体的性能を達成。遺伝的に多様な源で育種したときよりも栽培された材料で作業するときの方が進歩が早いために、育種家は、一般的にこの代償を受け入れる。

30

【0030】

対照的に、育種家が種内交配または種間交配を行うとき、逆の代償が起こる。これらの例において、育種家は、典型的に栽培生殖質と非栽培種を交配する。このような交配において、育種家は、非栽培種からの新規対立遺伝子の利用を増やし得るが、ドナー親と関連する遺伝子の引きずり(genetic drag)に打ち勝たなければならないかもしれない。この育種戦略の困難さから、このアプローチは、繁殖性および繁殖力問題のためにしばしば失敗する。この育種アプローチの困難さは多くの作物に広がり、1944年に最初にトマトで記載された重要な疾病抵抗性表現型が例である(非特許文献1)。この交配において、線虫疾病抵抗性は、リコペルシコン・ペルヴィアヌム(*L. peruvianum*)(PI128657)から栽培トマトに伝達された。集中的育種にも係わらず、1970年代半ばまで、育種家は遺伝子の引きずりに打ち勝つことができず、この形質を持つ系統の発表に成功しなかった。実際、今日でさえ、トマト育種家は、この疾病抵抗性遺伝子を、ただ1種の親のみからハイブリッド品種に伝達している。

40

【0031】

今まで、許容される商業用種への新規抵抗性遺伝子の遺伝子移入方法は、長く、しばしば達成が困難な方法であり、形質が多遺伝子性であり得るか、または低遺伝率を有し得るか、連鎖引きずり(linkage drag)またはこれらのいくつかの組み合わせを有し得るため、困難であり得る。いくつかの表現型が、遺伝子型により一遺伝子座で決定されているが、自然に見られるほとんどの多様性は連続的である。単純に遺伝性の形質と異なり、連続的

50

多様性はおそらく多遺伝子性遺伝の結果であり、追跡が困難である。連続的多様性に影響する遺伝子座をQTLと呼ぶ。定量的形質の表現型における多様性は、QTLの対立遺伝子組成および環境影響の結果である。形質の遺伝率は、0～1.0で変動する遺伝分散の結果である表現型多様性の比である。それゆえに、約1.0の遺伝率の形質は、環境により大きな影響は受けない。当業者は、高遺伝率園芸形質を有する商業用システムを作る重要性を、これらの栽培品種が、栽培者が均質市場仕様の作物を生産することを可能にするため、認識している。

【0032】

タマネギにおける疾病抵抗性および好ましい球根色と関連するゲノム領域、QTL、多型核酸および対立遺伝子

本発明で有用なマーカーをタマネギゲノムから設計できる。Duangjitらは、タマネギゲノムの最新の公的に入手可能な遺伝子地図を公開した(非特許文献2)。出願人らは、ある対立形質で存在するとき、タマネギにおける疾病抵抗性および好ましい球根色と関連するゲノム領域、QTL、対立遺伝子、多型核酸、連鎖マーカーなどを発見した。ここに略記した方法を使用して、タマネギにおいて乾腐病(FBR)および紅色根腐病(PR)に対する抵抗性と同時に好ましい球根色も示すQTLが同定された。このような形質と関連するゲノム領域は、遺伝子座NQ0345038(配列番号3)およびNQ0257326(配列番号23)により規定されるタマネギ連鎖群2(LG2); 遺伝子座NQ0257277(配列番号22)およびNQ0258453(配列番号27)により規定されるLG2; 遺伝子座NQ0257220(配列番号26)およびNQ0257692(配列番号29)により規定されるLG2; 遺伝子座NQ0258523(配列番号30)およびNQ0345206(配列番号36)により規定されるLG3; 遺伝子座NQ0345564(配列番号38)およびNQ0257917(配列番号63)により規定されるLG4; 遺伝子座NQ0344978(配列番号49)およびNQ0344766(配列番号55)により規定されるLG4; 遺伝子座NQ0258361(配列番号37)およびNQ0344778(配列番号61)により規定されるLG4; または遺伝子座NQ0257378(配列番号64)およびNQ0345734(配列番号74)により規定されるLG6に位置した。

【0033】

本開示の種々の態様のいくつかは、このようなゲノム領域にまたは領域内に位置するQTLまたは多型核酸マーカーまたは対立遺伝子を使用する。複数疾病に対する抵抗性または好ましい球根色と関連するゲノム領域を同定したLG2上のランキングマーカーは、NQ0345038(配列番号3)およびNQ0257692(配列番号29)を含む。複数疾病に対する抵抗性または好ましい球根色と関連するゲノム領域を同定したLG2上の介在マーカーは、少なくとも配列番号4～28のいずれかを含み得る。疾病に対する抵抗性または好ましい球根色と関連するゲノム領域を同定したLG3上のランキングマーカーは、NQ0258523(配列番号30)およびNQ0345206(配列番号36)を含む。疾病に対する抵抗性または好ましい球根色と関連するゲノム領域を同定したLG3上の介在マーカーは、少なくとも配列番号31～35のいずれかを含み得る。複数疾病に対する抵抗性または好ましい球根色と関連するゲノム領域を同定したLG4上のランキングマーカーは、NQ0258361(配列番号37)およびNQ0257917(配列番号63)を含む。複数疾病に対する抵抗性または好ましい球根色と関連するゲノム領域を同定したLG4上の介在マーカーは、少なくとも配列番号38～62のいずれかを含み得る。疾病に対する抵抗性または好ましい球根色と関連するゲノム領域を同定したLG6上のランキングマーカーは、NQ0257378(配列番号64)およびNQ0345734(配列番号74)を含む。疾病に対する抵抗性または好ましい球根色と関連するゲノム領域を同定したLG6上の介在マーカーは、少なくとも配列番号65～73のいずれかを含み得る。疾病抵抗性および/または好ましい球根色と関連するこれらのゲノム領域またはその小領域は、ここに記載するマーカーのいずれかが隣接するまたはこれにより規定されると言うことができるが、当業者は、さらなるマーカーも同様に使用できることを認識する。

【0034】

10

20

30

40

50

上記マーカーおよび対立遺伝子状態の例である。当業者は、本開示に一致して、タマネギにおける疾病抵抗性または望ましい球根色と関連する他の多型核酸マーカーおよびその対立遺伝子状態を有するタマネギ植物をどのように同定するか認識する。当業者はまた、タマネギにおける疾病抵抗性または望ましい球根色との関連を決定するために、ここで同定されたゲノム領域に位置するまたはQ T Lまたは他のマーカーと連鎖している他の多型核酸マーカーの対立遺伝子状態をどのように同定するかも知っている。

【0035】

当業者は、同定されたゲノム領域に位置する多型核酸を、本発明の方法のある態様において使用できることを理解する。ここで同定されたゲノム領域、Q T Lおよび多型性マーカーのここでの条件を考慮して、本表現型と関連する、ここに記載したゲノム領域内またはゲノム領域付近に位置するさらなるマーカーを、種々の生殖質における新規マーカーのタイピングにより得ることができるかもしれない。ここで同定されたゲノム領域、Q T Lおよび多型性マーカーはまた、公的に入手可能な物理または遺伝子地図のいずれかに対してマッピングして、このような地図上にここに記載した領域を配置することもできる。当業者はまた、タマネギにおける疾病抵抗性または望ましい球根色と関連するQ T Lと遺伝的に連鎖し、タマネギにおける疾病抵抗性または望ましい球根色と関連するQ T Lまたはマーカーの約40cM、20cM、10cM、5cMまたは1cM内に位置するさらなる多型核酸も使用してよいことも理解する。

10

【0036】

タマネギにおける疾病抵抗性および/または望ましい球根色と関連するゲノム遺伝子座の遺伝子移入

20

ここに提供されるのは、疾病抵抗性および/または望ましい球根色と関連する1個以上の遺伝子移入されたゲノム領域を含むタマネギ植物およびそれを得る方法である。マーカー利用遺伝子移入は、1個以上のマーカーにより規定される染色体領域の、ある生殖質から第二の生殖質への伝達を含む。遺伝子移入されたゲノム領域を含む、交配の子孫を、第一生殖質(例えば、タマネギにおける疾病抵抗性または望ましい球根色を有する生殖質)からの望む遺伝子移入されたゲノム領域のマーカー特性および第二の生殖質の望む遺伝的背景の連鎖および非連鎖マーカー特性の両者の組み合わせにより同定できる。

【0037】

これらのゲノム区間のいずれかのテロメア近位末端およびセントロメア近位末端に位置するフランキングマーカーは、タマネギにおける望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性と関連するゲノム領域の、他の表現型と関連する遺伝子型を通常含む生殖質と関連するマーカーを含む遺伝的背景に遺伝子移入することを含むが、これに限定されない、多様な育種アプローチに有用であり得る。

30

【0038】

同定された疾病抵抗性および/または望ましい球根色Q T Lと連鎖し、それと直接隣接しているかまたは隣接しており、該Q T Lを含む源生殖質からの外来性の連鎖DNAの非存在下でのQ T Lの遺伝子移入を可能にするマーカーを、ここに提供する。当業者は、ここに記載するタマネギにおける疾病抵抗性および/または望ましい球根色と関連するQ T Lを含む小ゲノム領域の遺伝子移入を探求するとき、該Q T Lを含む大ゲノム領域に直接隣接したテロメア近位またはセントロメア近位マーカーのいずれかを、小ゲノム領域の遺伝子移入に使用できることを認識する。

40

【0039】

ここに記載する疾病抵抗性Q T Lまたは望ましい球根色Q T Lのマーカーから約40cM以内のマーカーは、例えば、タマネギにおける望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性と関連するゲノム領域の、他の表現型と関連する遺伝子型を通常含む生殖質と関連するマーカーを含む遺伝的背景に遺伝子移入することを含むが、これに限定されない種々の育種アプローチに有用であり得る。例えば、ここに記載する疾病抵抗性Q T Lまたは望ましい球根色Q T Lまたはマーカーと40cM、20cM、15cM、10cM、5cM、2cMまたは1cM以内またはそれ未満であるマーカーを、タマネギにおける望ましい球根色と一体と

50

なった疾病抵抗性のマーカー利用遺伝子移入に使用できる。

【0040】

ここに記載するLG2、LG3、LG4および/またはLG6上の疾病抵抗性または望ましい球根色表現型QTLマーカーと連鎖不平衡のマーカーを、したがって、タマネギにおける疾病抵抗性または望ましい球根色のマーカー利用遺伝子移入のために使用できる。例えば、ここに記載するLG2、LG3、LG4および/またはLG6上の疾病抵抗性または望ましい球根色QTLマーカーの40cM、20cM、15cM、10cM、5cM、2cMまたは1cM以内のを、疾病抵抗性または望ましい球根色のマーカー利用遺伝子移入に使用できる。上記のとおり、LG2、LG3、LG4および/またはLG6上の疾病抵抗性または望ましい球根色QTLマーカーは、配列番号1~74のいずれかまたはここに記載するいずれかの遺伝子座または小領域、ならびにこれらの同一領域にあり、遺伝的に連鎖する他の既知マーカーを含み得る。

10

【0041】

分子利用育種技法

本発明の実施に際して使用できる遺伝子マーカーは、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(SLPS)、一ヌクレオチド多型(SNP)、挿入/欠失多型(Indels)、タンDEM反復数(VNTR)および無作為増幅多型DNA(RAPD)、アイソザイムおよび当業者に知られるその他を含むが、これらに限定されない。作物におけるマーカー発見および開発は、マーカー利用育種活動への応用のための初期構想を提供する(特許文献1~4)。得られた“遺伝子地図”は、特徴付けられた遺伝子座(多型核酸マーカーまたは対立遺伝子が同定され得る任意の他の遺伝子座)の互いの相対位置を表す。

20

【0042】

できるだけ少ない単一ヌクレオチド変化を含む多型を、幾つかの方法でアッセイできる。例えば、一本鎖高次構造多型分析(非特許文献3)、変性勾配ゲル電気泳動(非特許文献4)または切断断片長多型(非特許文献5)を含む電気泳動技法により検出できるが、DNA配列解読装置の普及により、しばしば直接増副産物を配列決定することが容易となる。多型性配列差異が判明したら、典型的に特定の対立遺伝子のPCR増幅のあるバージョン(非特許文献6)または複数特定対立遺伝子のPCR増幅(非特許文献7)を含む、迅速なアッセイを子孫試験のために設計できる。

30

【0043】

一組のものとして、多型性マーカーは、系統または品種の同一性の情報のために植物をフィンガープリンティングする有益なツールとして働く(特許文献5)。これらのマーカーは、表現型との関連を決定する基礎を構成し、遺伝獲得を駆動し得る。本発明の方法のある態様において、多型核酸を使用して、タマネギ植物において、望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性と関連する遺伝子型を検出し、望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性と関連する遺伝子型を有するタマネギ植物を同定し、望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性と関連する遺伝子型を有するタマネギ植物を選択できる。本発明の方法のある態様において、多型核酸を使用して、ゲノムに望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性と関連する遺伝子移入された遺伝子座を含むタマネギ植物の生産に使用できる。本発明のある態様において、多型核酸を使用して、望ましい球根色と一体となった疾病抵抗性と関連する遺伝子座を含む子孫タマネギ植物を育種できる。

40

【0044】

ある遺伝子マーカーは、“優性”または“共優性”マーカーを含み得る。“共優性”マーカーは、2個以上の対立遺伝子(二倍体個体あたり2個)の存在を明らかにする。“優性”マーカーは単一对立遺伝子のみの存在を明らかにする。マーカーは、好ましくは共優性形態で遺伝性であり、それにより二倍体遺伝子座における両対立遺伝子または三倍体または四倍体遺伝子座における複数対立遺伝子の存在が容易に検出可能であり、環境性多様性がなく、すなわち、その遺伝率は1である。マーカー遺伝子型は、典型的に二倍体生物における各遺伝子座に2個のマーカー対立遺伝子を含む。各遺伝子座のマーカー対立遺伝子組成はホ

50

ホモ接合またはヘテロ接合であり得る。ホモ接合性は、遺伝子座における両対立遺伝子が同じヌクレオチド配列により特徴付けられる状態である。ヘテロ接合性は、遺伝子座の対立遺伝子の異なる状態をいう。

【 0 0 4 5 】

遺伝子多型の存在または不在を決定するための核酸ベース分析(すなわち遺伝子型判定のため)を、同定、選択、遺伝子移入などのために育種プログラムに使用できる。遺伝子多型を分析するための広範な遺伝子マーカーが利用可能であり、当業者に知られる。本分析を使用して、疾病抵抗性または望ましい球根色表現型と連鎖しているまたは関連する遺伝子マーカーを含むまたは連鎖している遺伝子、遺伝子の部分、QTL、対立遺伝子またはゲノム領域を選択し得る。

10

【 0 0 4 6 】

ここで使用する、核酸分析方法は、PCRベースの検出方法(例えば、TaqManアッセイ)、マイクロアレイ方法、マスペクトロメトリーベースの方法および/または全ゲノム配列決定を含む核酸配列決定方法を含む。ある態様において、DNA、RNAまたはcDNAサンプル中の多型部位検出は、核酸増幅方法の使用を介して促進され得る。このような方法は、特に多型部位に及ぶポリヌクレオチド濃度を上げるまたはそれに遠位または近位に位置する部位および配列を含む。このような増幅分子を、ゲル電気泳動、蛍光検出方法または他の手段により容易に検出できる。

【 0 0 4 7 】

PCRにおけるTaqMan(登録商標)プローブの使用は当分野で知られ(例えば、非特許文献8参照)、フルオロフォアベースの検出によるPCRアッセイの特異性増加を可能にする。本発明の一態様において、表3に示すもののようなTaqMan(登録商標)プローブを使用して、疾病抵抗性を付与するSNPを検出できる。TaqMan(登録商標)アッセイは、SNP部位に隣接する領域を標的とする2個の特定のプライマーおよびプローブの5'末端に共有結合した各々異なるフルオロフォア(VICまたは6-FAM)で標識された2個の蛍光プローブを含む。3'末端近位の非蛍光クエンチャーは、プローブが分解されないならば、蛍光遊離を妨げる。PCR中、DNAフラグメントと特異的にハイブリダイズするプローブが破壊され、対応するフルオロフォアの蛍光が遊離される。

20

【 0 0 4 8 】

このような増幅を達成する一つの方法は、多型を規定する近位配列に、その二本鎖形態でハイブリダイズできるプライマー対を使用する、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用する(非特許文献9;および特許文献6~13)。マスペクトロメトリーに基づきDNAをタイピングする方法も使用できる。このような方法は、特許文献14および15ならびにその中に記載された引用文献に開示される。

30

【 0 0 4 9 】

DNA配列の多型は、全て引用によりその全体を本明細書に包含させる特許文献15~25に開示されているものを含むが、これらに限定されない種々の有効な周知の方法により検出または分類できる。しかしながら、本発明の組成物および方法は、ゲノムDNAサンプルにおける多型を分類するための何れかの多型タイピング方法と組み合わせて使用できる。使用したこれらのゲノムDNAサンプルは、植物から直接単離したゲノムDNA、クローン化ゲノムDNAまたは増幅ゲノムDNAを含むが、これらに限定されない。

40

【 0 0 5 0 】

例えば、DNA配列における多型は、特許文献36および37に開示されたとおり、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)プローブとのハイブリダイゼーションにより検出できる。特許文献36は、ヌクレオチド多様性を含む配列を増幅し、膜上にスポットし、そして標識配列特異的オリゴヌクレオチドプローブで処理する工程により、核酸において、核酸配列中の単一または複数ヌクレオチド多様性が検出できる、対立遺伝子特定のオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを開示する。

【 0 0 5 1 】

標的核酸配列もまた、目的の配列を増幅し、プローブとハイブリダイズし、続いてプロ

50

ープの標識部分をライゲーションする、特許文献 28 に開示するプローブライゲーション方法により検出できる。

【0052】

マイクロアレイも多型検出に使用でき、ここで、オリゴヌクレオチドプローブセットを、標的配列における一点の差が部分的プローブハイブリダイゼーションをもたらすように、単一配列を表すように重複形態で集合させる(非特許文献 10)。任意の 1 個のマイクロアレイ上で、複数の標的配列が存在することが予測され、これは、遺伝子および/または非コード領域を表し、ここで、各標的配列は単一プローブよりも一連の重複オリゴヌクレオチドにより表される。このプラットフォームは、複数の多型のハイスループットスクリーニングを提供する。マイクロアレイベースの方法による標的配列のタイピングは、特許文献 38 ~ 40 に開示されている。

10

【0053】

標的核酸配列を、標的核酸配列の隣接部分に相同な配列を有し、プローブと標的核酸配列の塩基対形成により幹を形成するように非共有結合的に結合する側鎖を有する、少なくとも 1 対のプローブを用いる、特許文献 29 に開示されたとおりのプローブ連結方法によっても検出できる。側鎖の少なくとも 1 個は光活性化可能基を有し、これは幹の他の側鎖メンバーと共有結合架橋を形成できる。

【0054】

SNP および Indels を検出する他の方法は、一塩基伸長(SBE)方法を含む。SBE 方法の例は、特許文献 21 ~ 特許文献 25 に開示のものを含むが、これらに限定されない。SBE 方法は、ヌクレオチドプライマーの伸長に基づき、これは、該プライマーの伸長により多型に隣接する検出可能なヌクレオチド残基を取り込むことができる。ある態様において、SBE 方法は、3 個の合成オリゴヌクレオチドを使用する。オリゴヌクレオチドの 2 個は PCR プライマーとして働き、アッセイすべき多型を含む領域に隣接するゲノム DNA の遺伝子座の配列に相補的である。多型を含むゲノム領域の増幅後、PCR 産物を、DNA ポリメラーゼおよび 2 種の異なって標識されたジデオキシヌクレオシド三リン酸の存在下に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三のオリゴヌクレオチド(伸長プライマーと呼ばれる)と混合する。多型が鑄型に存在するならば、標識ジデオキシヌクレオシド三リン酸の 1 個を、一塩基鎖伸長でプライマーに付加できる。存在する対立遺伝子を、その後、2 個の異なった標識のいずれが伸長プライマーに付加したかの決定により推測する。ホモ接合サンプルでは、2 個の標識塩基の 1 個しか取り込まれず、ゆえに、2 個の標識中 1 個しか検出されない。ヘテロ接合サンプルは、存在する両対立遺伝子を有し、ゆえに、両標識の直接取り込み(伸長プライマーの異なる分子に)、したがって両標識が検出される。

20

30

【0055】

多型を検出する他の方法において、SNP および Indels は、5' 蛍光レポーター色素および 3' クエンチャー色素を有するオリゴヌクレオチドプローブが、プローブの 5' および 3' 末端に共有結合する、特許文献 18 ; 特許文献 19 ; および特許文献 20 に開示された方法で検出できる。プローブが無傷であるとき、レポーター色素のクエンチャー色素への近接が、例えばフェルスター型エネルギー移動により、レポーター色素蛍光を抑制する。PCR 中、順方向および逆方向プライマーは、多型に隣接した標的 DNA の特定の配列とハイブリダイズし、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。その後の PCR サイクルにおいて、5' 3' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼはプローブを開裂し、レポーター色素をクエンチャー色素から離し、レポーターの蛍光を増大させる。

40

【0056】

他の態様において、目的の 1 個または複数個の遺伝子座を、核酸配列決定テクノロジーを使用して直接配列決定できる。核酸配列決定の方法は当分野で知られ、454 Life Sciences(Branford, CT)、Agencourt Bioscience(Beverly, MA)、Applied Biosystems(Foster City, CA)、LI-COR Biosciences(Lincoln, NE)、NimbleGen Systems(Madi

50

son、WI)、Illumina(San Diego、CA)およびVisiGen Biotechnologies(Houston、TX)により提供されるテクノロジーを含む。このような核酸配列決定テクノロジーは、非特許文献11に概説されるとおり、平行ビーズアレイ、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、平行マイクロチップおよび単一分子アレイのような形態を含む。

【0057】

本発明の方法で使用するマーカーは、その後の集団に関して推測するために好ましくは起源を示すものでなければならない。今までの経験により、SNPマーカーは、特定のSNP対立遺伝子が特定の種の現存集団の独立した起源に由来する可能性が極めて低いため、マッピングに理想的であろうことが示唆される。そのようなものとして、SNPマーカーは、QTLの遺伝子移入の追跡および補助に有用であると考えられる。

10

【0058】

定義

次の定義を、本発明をよりよく特定し、本発明の実施に際し当業者の指針となるように提供する。特に断らない限り、用語は、関連分野の当業者の一般的使用と一致すると理解されるべきである。

【0059】

ここで使用する、“望む球根色”または“望ましい球根色”または“好ましい球根色”は、黄色のような商業的に許容される色を示し、ピンク補色(CP)により付与されるような有害なまたは望ましくない着色を欠くタマネギ球根をいう。

20

【0060】

ここで使用する、用語“植物”は、植物細胞、植物プロトプラスト、タマネギ植物を再生できる組織培養の植物細胞、植物カルス、植物凝集塊および植物で無傷の植物細胞または花粉、花、種、葉、幹などのような植物の一部を含む。

【0061】

ここで使用する、用語“集団”は、共通親起源を共有する植物の遺伝的に異種性のコレクションを意味する。

【0062】

ここで使用する、用語“品種”および“栽培品種”は、遺伝子系統および性能により、同一種内の他品種から同定できる類似植物群を意味する。

30

【0063】

ここで使用する、“対立遺伝子”は、染色体上のある遺伝子座のゲノム配列の2個以上の代替形態の一つをいう。

【0064】

“定量的形質遺伝子座(QTL)”は、表現型の発現度に影響する少なくとも第一対立遺伝子をコードする染色体位置である。

【0065】

ここで使用する、“反発”または“反発相”は、2個の遺伝子からの対立遺伝子の遺伝であって、2個の遺伝子座の各々での望む対立遺伝子が異なる相同染色体に見られる場合をいう。これは対立遺伝子の“trans”配置ともいう。

40

【0066】

ここで使用する、“マーカー”は、生物間を区別するために使用できる検出可能特性をいう。このような特性の例は、遺伝子マーカー、生化学的マーカー、代謝物、形態学的特性および農学的特性を含むが、これらに限定されない。

【0067】

ここで使用する、用語“表現型”は、遺伝子発現により影響を受け得る細胞または生物の検出可能特性を意味する。

【0068】

ここで使用する、用語“遺伝子型”は、植物の特定の対立遺伝子構造をいう。

【0069】

50

ここで使用する、用語“遺伝子移入された”は、遺伝子座と関連して使用するとき、戻し交配を介するような、新規遺伝的背景に導入されている遺伝子座をいう。遺伝子座の遺伝子移入は、ゆえに、植物育種方法および/または分子遺伝学的方法により達成できる。このような分子遺伝学的方法は、種々の植物形質転換技法および/または相同組み換え、非同相相同組み換え、部位特異的組み換えを提供する方法および/または遺伝子座置換または遺伝子座変換を提供するゲノム修飾を含むが、これらに限定されない。

【0070】

ここで使用する、用語“連鎖した”は、核酸マーカーおよび/またはゲノム領域の文脈で使用するとき、マーカーおよび/またはゲノム領域が、減数分裂と一緒に分離する傾向となるように、同一連鎖群または染色体に位置することを意味する。

10

【0071】

ここで使用する、用語“表す”は、植物遺伝子型と関連して使用したとき、植物がある遺伝子型を有することを示す、何らかの方法をいう。これは、ある遺伝子型を有する植物を同定するあらゆる手段を含む。ある遺伝子型の指標は、植物の遺伝子型が提供される、書面または電子媒体またはデータベースのいずれかのタイプへの任意のエントリーを含み得るが、これらに限定されない。ある遺伝子型の指標はまた、植物が物理的に印を付されるまたは標識される何らかの方法も含み得るが、これらに限定されない。本発明で有用な物理的マーキングまたは標識は、バーコード、無線周波数認識装置(RFID)、ラベルなどを含むが、これらに限定されない。

【実施例】

20

【0072】

次に開示する態様は、本発明の単なる代表例であり、これは種々の形態に具現化し得る。それゆえに、下の実施例に開示する特定の構造的、機能的および方法的詳細は、限定的と見なしてはならない。

【0073】

実施例 1

タマネギにおける疾病マッピング

起始タマネギ系統SYG-75-1706/Serranaからの大F2:3マッピング集団(約620系統群、複数疾病にわたり選択的に表現型分類した)を作製し、種々の形質について表現型分類した。これにより、タマネギにおける乾腐病(FBR)および紅色根腐病(PR)の2種の重要な疾病のQTLが同定された。デフォレスト(ウイスコンシン州)(FBRおよびPRについての播種実生栽培箱試験)およびドンナ(テキサス州)(PRについての成熟植物/球根実地評価)で行った表現型に基づき、これらの形質についての数個の主要なQTLが同定された(表1)。最も顕著なことは、FBRおよびPR抵抗性が、連鎖群2(LG2)上の類似領域に対する反発相に、ピンク補色(LG2上の62.5にマッピング)の第三の有害形質もこの集団に位置づけられている場所である遺伝子位置で、マッピングされた。ピンク補色とのこの反発連鎖は、在来種ドナーSerranaからのFBR抵抗性がエリートタマネギ生殖質に育種することが極めて困難であった理由と見なされた。従って、FBR抵抗性、PR抵抗性および球根色遺伝子座を、育種プログラムへの同時遺伝子移入のために正しい相で連鎖させる努力をした。この試みにより同定されたQTLを下の表1に示す。

30

40

【0074】

【 表 1 】

表 1. タマネギ疾患および色形質について検出した重要な QTL の要約

形質	抵抗性ドナー親対立遺伝子	QTL 連鎖群(LG) 部位および位置	LOD	1-LOD 間隔(cM)	2-LOD 間隔(cM)	最も重要なマーカー	相加効果 (%)
FBR	Serrana	LG 2 : 46.9 cM	14.7	41.9 – 54.9	40.9 – 61.9	NQ0258383	6.8
FBR	Serrana	LG 3 : 52.1cM	4.6	38.1 – 60.9	34.1 – 86.1	NQ0257455	2.3
FBR	Serrana	LG 4 : 44.8 cM	2.8	22.7 – 92.7	21.7 – 101.7	NQ0257799	3.3
PR	SYG-75-1706	LG 2 : 57.9 cM	17.7	53.9 – 60.9	53.5 – 61.9	NQ0257570	32.4
PR	Serrana	LG 4 : 51.7 cM	5.8	46.7 – 56.3	38.7 – 60.7	NQ0345680	10.8
球根色 LG6		LG 6 : 22 cM		4.6 – 33.6*		NACEP009089369*, NQ0258009*, NQ0344415*, NACEP009090969*	
球根色 LG4		LG 4 : 52.0-53.6 cM		17.0 – 82.8*		NQ0344496*, NQ0345333*	
球根色 LG2		LG 2 : 62.5-63.1 cM				NQ0258453*, NACEP009407370/NQ0257461*	

** p 値<0.05 での有意差を意味する

【 0 0 7 5 】

上記 QTL 研究に加えて、PR 抵抗性も、不完全優性制御下の単一遺伝子として予測される行動のために、同じ集団(SYG-75-1706/Serrana)におけるバイナリー形質としてマッピングした。バイナリーマッピングは、PR 抵抗性を、LG 2 上の 56.3 cM に確認した。

【 0 0 7 6 】

実施例 2

タマネギにおける球根色マッピング

タマネギの色を制御する 3 遺伝子座を、LG 2、LG 4 および LG 6 にマッピングした

10

20

30

40

50

。2個の上位遺伝子座により制御されることが報告されているピンク補色(CP)を、実施例1に記載のとおり、同じSYG-75-1706/Serrana集団でLG6およびLG2にマッピングした。ピンク補色は、エリートタマネギ系統と、ある種より外来性の生殖質を含む広い交配種にそれ自体顕在化する球根色現象である。これは伝統的に、Serranaのようなブラジル産タマネギ在来種に存在する、FBRのようなある疾病抵抗性に近づくバリアを作っていた。CP遺伝子座は、バイナリー形質(黄色対薄紅色球根表現型)としてLG6:~22.4cMおよびLG2:~62.5cMの位置にマッピングされた。ジヒドロフラボノール4-レダクターゼ(DFR)遺伝子に基づく候補遺伝子マーカーを開発し、LG6上の同じ領域にマッピングし、球根色を制御するR遺伝子座であることが疑われる。

【0077】

球根色について分離した(黄色、白色、赤色、ピンク色球根について分離)第二の、エリート×エリートF2マッピング集団(SWL-74-14197-DH/HRL-77-5225B)において、2個のQTLが球根色について同定された。親SWL-74-14197は白色球根であり、HRL-77-5225Bは赤色球根である。LG4上の~53cMのQTLが、色素の生産/阻害を制御しているように見え、一方LG6上の~22.4cM遺伝子のQTLが赤色色素生産を制御しているように見える。

【0078】

色についてのまたはCPと球根色の両者についてのLG6遺伝子座が両集団/形質で同じように見え、おそらくR遺伝子座またはDFR遺伝子であり、それに対して、アントシアニン生合成経路に対するこの候補遺伝子からのマーカーをマッピングする(NACEP009089369およびNACEP009090969、それぞれLG6:22.3cMおよび22.6cMにマッピング)。

【0079】

実施例3

FBR、PRおよび色のCis結合連鎖

SYG-75-1706/Serrana F2:3集団内で、北米黄タマネギおよび汎用黄タマネギタマネギ系統の両者において、FBR抵抗性とPR抵抗性を合わせる機会がある。色および疾病抵抗性の根底を成す主QTL/遺伝子の同定と共に、表現型および遺伝子型情報を使用して、形質の組み合わせに使用できる組み換え系統群を同定できる。連鎖群2の連続的ハプロタイプストレッチと一緒に組み合わさった複数疾病抵抗性を有する、新規cis結合イベントが同定された。QTL情報に基づき、次のハプロタイプが、汎用黄タマネギ球根において高レベルのFBRおよびPR抵抗性を有するための(すなわちFBR、PRに対する抵抗性を有し、CPを欠く単一タマネギ系統)最も望ましい配置であると見なされる。汎用黄タマネギ球根は、北米および南米生殖質の両方と交配でき、(補色)薄紅色球根を製造しないため、有利である。LG2での二重組み換えイベントがこの表現型を得るために必要である(図1)。北米黄タマネギドナーも、この生殖質を北米生殖質と交配したとき、CPを生じないために、また望ましい。北米黄タマネギは、LG2上の1706対立遺伝子(62~63位)により定義され、連鎖群2上の一組み換えしか必要としない。

【0080】

それゆえに、FBRおよびPRに対する疾病抵抗性の5個のQTLが、球根色および/またはCPを制御する3個の遺伝子座と共に同定された。これらの色遺伝子座の一つは、アントシアニン生合成経路からの候補遺伝子におけるマーカーと共存することが判明した。FBRおよびPR両者の主作用QTLは、LG2上の同一領域に局在し、そこには、ピンク補色の遺伝子座の1個も局在した。これらのマッピング結果は、FBR、PRおよびピンク補色の疑われた連鎖および育種で全形質を組み合わせることの困難な理由を証明した。全体として、この情報は、これらの重要なタマネギ形質の遺伝子制御の見通しをもたらし、その結果エリートタマネギ系統に全形質を組み合わせるためのより制御されたアプローチを可能にする。これらの疾病形質についてのQTL区間およびマーカーが、新規開発的交配し、HAPQTL MASアプローチにおいて生じる分離集団における使用を可能にする。さらに、イベント生成(event creation)が、北米黄タマネギおよび汎用黄タマ

10

20

30

40

50

ネギ球根ドナーの両者における F B R および P R 抵抗性を組み合わせるための、L G 2 上の新規 c i s 結合連鎖の生成を可能にし得る。北米黄タマネギに F B R および P R を合わせる組み換え事象も達成している。

【 0 0 8 1 】

実施例 4

マーカーを利用する選択のためのマーカー

Q T L 結果および区間に基づき、新開発交配における H A P Q T L アプローチのための重要な疾病抵抗性遺伝子座のためのマーカーをここで提供する。タマネギ育種は H A P Q T L アプローチしやすい。開発交配種ケージは、一植物 × 一植物交配パターンから成るため、各開発交配種に行く各植物の親マーカー遺伝子型を得ることができる。親遺伝子型を、マーカー利用選抜 (M A S) のための標的である可能性があると思なされる形質領域にあるコアセットのマーカーを使用して得ることができる (“ マスター遺伝子座 ” として同定)。それゆえに、ケージあたり、選択した数の同じ多型性マーカー (二親性に基づき同定) を、繁殖 × 繁殖 (F × F) 交配における真性 F 1 同定、ならびに目的の形質について分離される分離集団におけるその後の形質 M A S に使用できる。これは、主流育種ワークフローを可能にする。表 2 は、M A S および F × F ワークフローで使用できるマーカーの例の一覧である。これらのマーカー配列を、ハイスループット実験室設定で使用するための TaqMa n (登録商標) アッセイ開発に使用した (表 3)。これらのマーカーは、新規開発的交配における親遺伝子型判定のために使用できる “ マスター遺伝子座 ” におけるマーカー、ならびに F × F スクリーニングにおける各 F 1 の同定およびまた得られた分離世代 (典型的に F 1 M 1) における M A S 選択に使用できることが同定されている続く多型性マーカーとして働くことが意図される。

【 0 0 8 2 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. MAS および F × F ワークフローのためのマーカーの一覧

配列番号	マーカー	LG	位置	SYG-75-1706 の対立遺伝子	SERRANA の対立遺伝子	DNA 配列
1	NQ0257512	2	40.84	C	G	AAGGTTTGTAAACCAAACTCTGACCTTAGATGTTATGATTGTGTCACAAAGCTCTACTCTTC[C/G]CAGCAAAAnGATAGCAATTTGGATCTCCAACChTCCAACCTCTCTCTAAATATA TAThAA
2	NQ0345493	2	41.00	C	T	GCCTTCTCTCGAATTTTCAATTGACGAAAGGTGATGATGCTTTTGCCGAAATGATCCAAIGCTTC[C/T]TCCATACTAAAAAGAACCTACCAGCCTAGCACTATCAAAACGCAAGAGGACTCATGGTTAT
3	NQ0345038	2	41.33	G	A	GGGAAAGTCGGGATCCCTCGGGGCGCTGGGGGnATTGGCAGCCTTTGTCACCTCTGAT[A/G]AAGCTTAAATCCTCTTGTTACCAAGCTAGCTCTTTATGATATTGCTGGTACTCCTGGCGTG
4	NQ0345495	2	42.36	--	--	TTTCTTGACATTGGACGATGCGATCAAGACTACAAAATAGGAGGTTAAATGCCCTTGGAGAGTC[C/G]TTGTCAAAACCAAGGTTGGAGAAATACCATTACCTATATCAAGGGAGAGCTGGATGAGTTG
5	NQ0345022	2	42.53	C	T	CTCAAAACCACCACCGGTGCA TTAAGCAATGCTAGAGAAAAGTATTCTGTTAGGTGCAA Ttc[GCTGCCAACTTGCAAGCAATCAATTGCTCCCATGGAGTGACCAAAAAnCATGAGCTTTAGTC

10

20

30

40

50

【表 3】

6	NQ0257948	2	45.63	T	C	TTCCAAAGAGATTATGTACCGTGGTCTCTAGCTCTTTTC GGTGTAGGGCTTGATGATTA[T/C]TCCCAATGATTAATA TATATTAATAATTAACCTCAGACTTTGACTGCACATAGT GTCAC
7	NQ0258383	2	47.42	C	A	ATCAAAATAACTTGATGGTTTCTGAGGAATCCCATGATGT CAAAATCCGTTTTATTAGCTAA[A/C]GCAAAATGACCAGTG CAATTTAGCCA[Tn]TCAAAAATGTTGCTGTCCAAAGTGCAAG TAACCCCT
8	NQ0257610	2	47.47	T	A	TGAATCAGAAAGGTTCTTTTGTGCAATTTGTATCCCTGG CATACTATAATATACGAAATG[A/T]AATCACTCTTTATAA CCTGGTAGACATAGGTAGAAAACTAACTGGATGATTT AGCCAAAT
9	NQ0258102	2	48.51	--	--	GCTTGAAAAACATAAGTTAAGCAACTTTTTCCTCAAGCTGG TTGTCAATCTTTGGTCACCTAG[A/G]ATGGTACAGCCGATT TGGAAAAACAnTATGGGAAACTAAAAAnTGCACAAATTGAG AGAAGGT
10	NQ0257924	2	48.51	C	C	TTCCATTGCTTCTTGCCTTTTGATCTCCTTCCAATTTCTTCA GCCCTACTTTGTACGATT[C/G]TCAAAAGCTAGGGTTAGT TTTACTTTTGAATTCGATTTTGAATTTCTTAATTTCTTATGA TTT
11	NQ0257757	2	49.32	T	C	TCTGGATTGAAAAnTTAATGGCAGCAAGTTGAGAAAAGCT GAAAGAGAAAGGTGGAAAAAGATG[e]CTGCTTTGACCGTG AAACCAGAGAAAGGTAAAGATGCATCGAAGGCTGAGGC TGTTGTCA

10

20

30

40

【 0 0 8 3 】

50

【表 4】

12	NQ0258031	2	49.79	T	C	AATGACAGTAAAAATGGAAAAATTGTTCAAGGTTTGAGCCT GCGGCATCATGCCCTCCAAATA[T/C]GGAGTCCATTTTA ACAAATCCTTATTAGAAATTACTTTGGTAAAmAAGCAGA GAGATTA
13	NQ0257938	2	50.08	C	T	TTTGGAAATTAATAAGGTAGTAAAAAAGAAATGCTGA ATTCAGAGCTCTGGCATGCATG[T/C]GCTGGACCTCTTGT ATGTTGCCAACAAATCGGACTCGAGTAGTTTACTTCCC TCAAGGC
14	NQ0258282	2	50.08	C	T	TTCATGCAnGCATAnATTGATGTATGTTGTATGTAACA ATAACAGTAAGTTTTGTGTTG[T/C]TATTGTAGGTGGAGG GAGAAATGCGAAAAAGAAAGCnGTTGAAAGAACTGGGAGTTGC TTTGAAA
15	NQ0258343	2	50.53	C	T	CAATCCCACCTACACACACATTTCCACACGTTGCATTTT GTGAGTTATATACCTTTCTGT[T/C]GTTATCTTCATAGTC AACCTTGCTTATTThAACAAATAATAAAAAAGTCTTTTG GTAAAA
16	NQ0258609	2	51.49	--	--	TCTTTCGAAATGTATTTCTGAAAGTGAACACAGATGGGATGA TGCAGAGACGACGAGGATTAG[T/C]ATGAAGAATTTCTAA TGTAGATAAAATGCCCTGGATGGAGTTGTATAGAGGTTAA TGGAAAG
17	NQ0257954	2	51.64	A	G	CAAAAnCATAGCCAACTCTGCCAGTAAAGTTCAACTACCC TCCAAAGCACACCTTTACCTT[ag]CACTACAGCTACTTC ACCTTCTTACCTTCTGCCCGCAAAThCCATCACATAChC CAACC

10

20

30

40

50

【表 5】

18	NQ0257684	2	52.02	C	G	GGCTTATGACCAGGCAGCTTTTGCCATGAGGGGGTTCGCT GGCAATTTTGAACCTTCACAGT[C/G]GAAACACAGTTGTTGA ATCTTTGAGAGAAGTCAAGTGCCTAAAAGCTGGAGGAG AGTCCCT
19	NQ0258062	2	52.07	G	C	GCTTCAGAAAnCCTTAAAGTTTATTTCTTCTGCATCATCA CCCCCTTCCCTATAAGTTC[C/G]GATTACTATAATTCCTCG CCGTACAAATTTCCGAAAnCACCTCCAAAATCTTACCCTTT CTCAA
20	NQ0258384	2	52.07	C	G	GGCTTATGACCAGGCAGCTTTTGCCATGAGGGGnTCGCT GGCAATTTTGAACCTTCACAGT[C/G]GAAACACAGTTGTTGA ATCTTTGAGAGAAGTCAAGTGCCTAAAAGCTGGAGGAG AGTCCCT
21	NQ0257410	2	53.32	G	C	AGAAAnGAAAGAAAGAAAAACAATCGAAATCCCCTACCTCT TATCAGAAACATCGACCCGAAACC[C/G]CACAAAACCCACCCA ATATTCATTTGCCATCAAAAAAATTCCTCGCCGCTTC ACCCAGAA
22	NQ0257277	2	53.48	T	C	AATTAAnTAAATGGATCACAGACATTAGTATGAAAG CAAGCAATATAAATTAGAAAT[C]JAGGGCTGTTTGTCT AGAAATTTGAGTTTTGCATCTTGCATTTTCAATATGCAT GTTAAAA
23	NQ0257326	2	55.14	C	T	CCTAACCATGGnATTTGTCCAGCTAAAGATCCCCTTCAAG AGCAAGATTCCTCAATAATTTAGT[C]JATTAGCGGTTTCCCA AACTACACTCAAGATCAGGGCAGGCCCTGTATACTGGG TTGCTCT

10

20

30

40

【 0 0 8 4 】

50

【表 6】

24	NQ0257570	2	55.59	C	T	TTAATAAACTGAAAAAGGAGGATTCATTCATTCATGTTAA AGTGCATAAAATAATAGATGA[P/C]GATGACGATGATGA TTTGGTTTTTCGATTTTCTTACCCTTGCAAAAAGCTCGAGA AGCTGTG
25	NQ0257962	2	57.17	C	T	AAAnGAGAAAGAGAAAAAnCAITGCCCTTATCTTGTCTAT TTATCTCAATTAATCTCTTAA[P/C]TACTGCATCCGCATCT GATGCAGAGGAATCCCCTTCTTAACTGGAGATCGTCTCTT ATAAA
26	NQ0257220	2	58.38	C	C	ATTTCGTTCTAAGGATGGGAGTGGCACTGTTATGTGGA TAATGCTGTCTGGTACTATGC[P/G]ATGTATTAGTTGGTG ACAGTTATATTATCATACACTACAAAAATTCATGGGTT AATTG
27	NQ0258453	2	62.51	G	A	AAATCCTCGGAGATGGATATCTTCTCTGTAAAATAGCCT CGAGATTAATGGCCTAAATC[A/G]AAAACCCATTAACAT ATGATATCCAAACAAAAGTAGGACCCACAGATGGAA TTCCTTCA
28	NQ0257461=NACEP0094 07370	2	63.08	G	A	GTATTCAAAGTTGGCCACGTTTCCCTCAACTTTATATTTGAT GGGAGTTTTATGGAGGGTGTGATATTACTGTTGAAGCA TACCAGATGGGAACTGCAGGAAAGCAATAGAAAAAG CAAATGTGTTCTTAAATAATGTCTCAGTTATA[A/G]CCTCT ATGCTCCATTCAATGCAAAAGTTACACTTATTTAATAATTAT GTTATTATATAATATATATCTGCAATTTTCATATTTTCAGA TCTGTGGATGACACATTACCAATTTAGTTGCTTCTGGTGTTT ATATTTATCTACAAAAGACCAATTTACTGAGTTTTCAAAAT GCT

10

20

30

40

50

【表 7】

29	NQ0257692	2	69.89	G	A	CACTTTAAAGTAATAACTTTAAACCTTTAAAGGATCTTC AAATATCTCTTATAAAATTA[ar][g]AGGCCCCCAAGATTAAT CCAAACTGAATTCATAAAACAAnTAAAnTATCTATTThAGT TTCT
30	NQ0258523	3	37.78	T	C	AAGCTGTGATTTGGCACACTGGGTGCAGGGTGCACCTGT GGATAGTAGCAGTTGTTThA[le][e]GGGTGATGGCTAGTTT GGACTGTGGTCATTAATGTTTAGAGGCTAAAGCAGCTG GTTGAA
31	NQ0258354	3	43.03	G	A	AAATThTTACTGTAAATTCATCAAAACCTTAAnTCAAATC ATGCAAGTGTGCAATTACACC[A/G]CTCAAAGTCCCACCA TCATACAACTACTTATCGATTThGATGACTTTCAAAAGTTTA GTGCTA
32	NQ0257455	3	45.08	G	T	TTTGAAGCGGAAAAGATATGCTGTTGGTGTCAAATGCG CATAATAAAGAAAAGCATCAAA[le][g]GGTAAACTACTATT CAAAATTCATGTATTCAAATCATATTGTTTATGGGCTTTC GTCGTG
33	NQ0257354	3	50.20	A	A	TTACTATTAATAATCAATCCAThTAAACTGTTACGTCAATTC GAAATTTTCATCTCACTAAA[ar][e]GGTGCAAAATTGATA TG ATCCATCGAAAAATTTTATTTAAACCATChATTTCAAACG TAGTT
34	NQ0344514	3	58.45	--	--	TTGTCTAAACCCCTAnATCATATAGTATCTGTGTCTCCAAT GCCATATCTCGTGAATCAA[TC]JAGGTAACCCCAAAATC TTCGTTGGCTTCCACAGTGTACGGCCAGCATCTTTGCAG ATTATA

10

20

30

40

【 0 0 8 5 】

50

【表 8】

35	NQ0258512	3	60.87	--	--	CACTAAAGGATCTGAGCAAAAACAGCTGTAGAAAGTTAAATG ATAGTGAAGAAGTGATTTGAAACCG[ag]ACAAATTTTCATAAA CAATATTCATTTGATGCTGACAGTGAAGAGGTGAAAA AGAGATTC
36	NQ0345206	3	62.16	T	C	TGCAGATCCAAAGTAAhTATGGTATTTTTAAATTTGATAGC TATCGATTATTTTGGACCTTT[bc]CTCTTTTCTGCATTTGA TGATTCGAAAATGTGTTCTGATATATATATTTTTTTCATATTT TTA
37	NQ0258361	4	17.040 21	--	--	TTTGATGCGCCTAGGACCCCAACTTTAAAAGAAAAGCCACTT TGAACGTGAGAAATGATTCGTC[ag]TATAGTTCAATCAITTT AGCATCCCGhTTCACAAAATAATGCAAAACCTTCATTCCTCA GATTGC
38	NQ0345564	4	21.73	C	T	CGCTTGGCATCAGTACAGTAGTTGTAAAATCATGAACTTC CTCTGCACCCACCTCATTC[bc]TGTAACCTCACCGAATC CAACTCGTGGTTATACCAATCTGCTGGCGAAGCCCGTTGA CAACA
39	NQ0257741	4	25.93	A	G	AAhTTAAAGGGAGTTTGTGTAATAATCAAAAGGATAGGTA GTCCATCACACTACTGTTCATGgm[ag]GTTAGACGCTCCGGC TTTGGTCAGTGAAGTTACAGGTTGAATCATGGTAGTGTGTC ATTCAA
40	NQ0258022	4	30.38	A	A	ATAAATGGGATCAGCCAGAAAATGCTGAAAACACACACCT ATCAACAAATTTATACCAGAAATC[ag]CTATTTTACAGCCAA CATGCTAGAGGCACCTTCAATAAAAATGTTTAGACAGATC AGTCAITTT

10

20

30

40

50

【表 9】

41	NQ0257641	4	30.56	A	G	AAGAAATTCACCTTGTGATAGCTTCAATTCATTGCTTGGTGGTTT TCAACTAATCTCATAATTCATA[A/G]GTTGCCCTGAAAAATAA ATGTAATAATGGAAAAAATGTGAAAAAGGCAGGTAGAATC TTATAC
42	NQ0345175	4	32.83	A	G	CTCAATAGGCTTCTTGGTGAGGCAGAGTAATCGGCATG TCTTCTTGGTGAAGCAGAGT[A/G]TCAGTTTGCCTTCTT GGTGCAGGAGAGTACGACCTTGATGTATGGCGAGCTCT TGAAGAT
43	NQ0257421	4	35.05	A	C	TAGGTAANA _n TTAAAGAAAAAGCATCGTAAATAATA AGTCAAAAAAGCAGCAGGTGTGTT[ac]GAGTCTACACTAA ACCAATCCTTTAA _n GAAAGTGTACCACCTTATATACGATTAA ATGTATTA
44	NQ0257536	4	35.60	C	T	CCTAAATTTTCTCCTCAAATATCCCAATTTGTTTCTAECTA AATCTCAAAAGGAAAAAGCTTT[T/C]ATTTGCACGATAACGG TTAAATTAATCAATCTTCAAGCTACACAATCAGTCAATC AGTCGT
45	NQ0258247	4	37.98	G	A	AATTCGGGATGCATTTGAGATTGTTGGGAA _n TATGG TGGGTATGGTCAACCAATGAG[A/G]TATACACGATTCTT TTGTAACGATAAATGTTTGGATGACATTCAAATTTGTAGAA CCACTGA
46	NQ0257556	4	40.61	C	T	AATCTCCAAAATGGTCTAAGTTATACAACCTTAAAAGAGC AGCCATATGATTCATGTATA[T/c]GACTGAGATAAAAAATG GAAAGGTCAAGTGGTGGTGGAAAAATTAATAAACATTGCA ACChTCA

10

20

30

40

【 0 0 8 6 】

50

【表 10】

47	NQ0257799	4	44.79	C	T	TTCTATTATTAAATAAAGAAATACATAATTAATCCTTAAATC AACAAATCTTGGAAATCCTTTAGT[C]GAGGCAAAGTTACC GAGTTTCGTTTCTTGAACCTGTTACAATAAATACAAA ACCATAC
48	NQ0344630	4	45.78	C	T	CATTTTAAATATTGGTAATATGCAAAACATATTTTAAAGA AAATGCCAAAGTAGATGAGCCA[g]AGAAAGATACATTCA ATGTCCTCAAATGTAGATTTAATTAATTTTTTAAAAACAAG AGAATA
49	NQ0344978	4	46.32	--	--	ATGTGTTGTTAGATCTGCTTTCTAAATTCACAGGATCGAA AGTCCAAATTTCTTGGTACCTT[a t]TAAAAAGAGCTACCAAC GACAGCATTCAAAGCTGTTAAATGAAGAAGATGACACATC ACGTCC
50	NQ0345680	4	49.45	T	G	GTCTCTGTATAACCAAGCTGGTGGCGCTGGAGCTCCTGG TGGGGCTGACTCAGCTGGACC[T]G GTGCC TGGTTCGGGA ACCTTCTGGAACCTTCGGGTGGTAAAGGGGCTGAAGAATGG TGATGTTA
51	NQ0345468	4	50.90	--	--	AGGAGTTTTGGGGCAGGGAGTGAGATTGCCGTGAAGA AAGTACTGGAAATCAGATCTCCA[T]C GATGATGAATTC AGAAATGAGGTTGAGATAATCAGCAAGTTAAAGGCATAGA AATCTTGT
52	NQ0345333	4	52.02	A	T	AGCCACAACAATAGACCAAAAATGnATTTGCTTCTTTTGC ATGACAATAAAGATGATGC[A/T]T GCTTCTTCAACCA GGCAGCACAAAGGATGACCTGTTCCATCGAAAGTTATTTTT ACCACTT

10

20

30

40

50

【表 1 1】

53	NQ0344496	4	53.59	A	G	TTCAATTCAGGTAATTTATCACTCTCTGTGGAGTGTAGCGC ATGACCGATAAAAGTCAATGG[A/G]TTGTCAATCCAATCC ATATTTTGATATGAGCTCTTTAGTAGTACCCCTTGTAAAG GTCCAAAT
54	NQ0344746	4	54.31	C	T	CCTCTGAAAATTAAGATACTTTCTGGAGTAGAAACAAGTG AAGCTGCTACTGTTTCAAGTA[P/C]TGGCAGCGAATCTTTC TTCTGCAGAACTATTACCTTCGGATTCTTCTTCTATTGGG TTTTTC
55	NQ0344766	4	56.31	T	C	GAAAAAGACGACGAAATCTGCATTTTCGTCTCTGAAAAGTT AACGATCGCCACGCCGCTATCA[P/C]CCTCAGCTTCTTCG ACGTCGCCAAGGGAAAGGTGAAGAAATCGAAACTCGACGTC GGAGTCTG
56	NQ0258314	4	61.48	A	T	TATTGGTAAAAAnTAAAGTACAAAAATAAAGAAGATTAAAG TTTAATAATCCTGGTTCCTTTA[ar/t]JATTGTCCAGACTCTC CCAAGCAAAAAACAAAGTGAGAAAATTAGCATTTGGCTTCAAA GTTCAAA
57	NQ0257998	4	67.55	C	C	GATTAGATTTTCGAGAAATGGAGAAAAAnGGGAGTGTGGGA AGAAACAAGTAAAAAnGGAAATAAG[c]GTAGGTGACCGTTG GAGATTTThGTTTATAAAAAATGCTGATTTACGATTAAGCTT TAGCCA
58	NQ0257822	4	71.66	A	G	TGGTATACAAAATACAGCTCGATATTGGTTACTAATTGCT TGATAATTTGGTATGGTAATACC[ar/g]TAAATAGCCCTAACTA GCTCTAGGTCATAAAAAATTAATCTTTTCAATGGAAAAATGACA TAGTTT

10

20

30

40

【 0 0 8 7 】

50

【表 1 2】

59	NQ0345700	4	76.67	G	T	AGATTGTTGTTTCCCTAGGATTCCCTCAGTTAGCAGTTAT TGGTTTTTCGGGTAGTCTTGC[u/g]AAATCTTTACACGTTTG AGATAAGGTCAATGTGGTGGCTCAITTTTCTTGATGGAG GGTTT
60	NQ0258259	4	81.48	G	A	GCCCTGCTCCAGAGCTTAITTCACGACTGGACGGAGTGTG CCCTTTCGTGATCCAGGGGA[A/G]AACGGCGTTCGAAG AGACTTGAAAAAnGThCGTCTACAGCTGCGTTCCTCGTGTCC TGAGTTC
61	NQ0344778	4	83.34	G	A	TATTTAAAGTTThGTCAAAAAGAAAGGCGATAGTGGATCAA CTGAATATCCAAACAAGTCCAT[aa/g]GTTATTTGTTGTTATTA CGATAATTGGATGGAGAGCTTCCACCTGGACTGCCAATT AAAGA
62	NQ0344946	4	88.52	C	C	TGCCTTCCAGCATAAACACCCCTGCACAAAAATGCTACAT TTGTTAGGACGTGCTTGTCTA[u/e]JTAGCAAAAAATACCC AAATTGGTTGACTCAGTTGCCTCCAAATGATAATAATAA TAAAAAC
63	NQ0257917	4	92.84	C	T	AACTGTAGTACAGAAAAATAAACTAGTCTGAACCCCATGCTT CGCACATGGAAATCGCACAAACA[u/c]GATTAAATAAAAATTT GCATAGTACATTTTCAGGTTTGCAGATGTTTGACAAATACA TCAGAT
64	NQ0257378	6	4.61	G	A	CTATAGTGCAGAGCTTGAACCTTGAACCAAAGCAGTATC ATGTAATTGCATTTGAA[aa/g]hTCCAGCAGATTTCTAAAAhT TTCTGTTATATTGTGCAAGCACATATGGAGATGTTAGGA A

10

20

30

40

50

【表 1 3】

65	NQ0344375	6	8.04	T	C	TCAGGTTGAGCGGACCCGGAAAAGTGCAGCCGCTACA ATGGAGTTTGGTTAGGAAGTTT[e]jAATGGTGGAGGAGG GACGCCGTTGATGCCGAAGAGGAAAGTTTGAGACGTACA TTTTTGGC
66	NQ0344545	6	13.68	C	C	CAATGAGACATAGCCAAATTGGCAATTCGCAGCACTGAC CTAAAATGGATTTCATAATAACAAA[e]jCCCTTCAAAGGCAA ACCAATCAAACCTCTATTAGTAGTCTCTTTACGGCCCTCA CGTCGA
67	NQ0345400	6	17.69	C	T	ACAAATTGCTATCTTCGTTTTTACATnACCCTTTGGTGGTC GATAACATAGATGAATGAAA[e]jGAGGAGGATTTGATG AAGCAGCAGCAACACCTAAATATGAACCCATCTTCAAT TCCGTGC
68	NACEP009089369	6	22.28	--	--	TGTGGATTAGCTACTAAAAATTATACATGATTTCAAGGAA ATGAAGCACATTAATCAATCATAAAGCAAAGCTCAGCTG GTTCAACCTGGATTAGGCCCTGC AAAATTCATAAACCC AATTAACCTACCCCTTAACCTTAATTTTAGACAGGCCG GGCCTTCTCTGAAITCTTTCCTTCGCAACCCGTTTAAACCT CTTACTCTTCATACGACCCGTTAACGTTGTTC/GACTT GTGTGAAGCACACATTCGTGCTGAACCATCCATAAAGC GGAAAGGCCGATACATATGCTTTCTCATGACGTGACAAAT TTACGATATGGCTAAAATGATTAGGCAGAACTACCCCTCA ATATTACATTCCTCAAC]GACTC
69	NQ0258009	6	22.44	T	C	AGATAAACACTACTTTTGGATTATGGGCTTATGATGCTGC TTTTGGCTTAGCAAATGGCTAC[T/C]GAGTCAGCTCAGCCA GCTTATAACTATAGTAAATGAnGTTGCTAACGGTAAATTA ATGAAG

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

50

【表 1 4】

70	NQ0344415	6	22.44	C	T	AGAAATTACAGTTGATAAAGTAGCCGATGAAGGCAATC TTACACTAGCACAAAAGTTTATAGTTCGATAAACCCACAGTG ATAGGGATTCAAGAAAAnCACTGGCTCACTTAACAAATG AGCAAATCT
71	NACEP0090969	6	22.65	--	--	GCATTCATAAACCCACCAITCAACATGCACTCCACTGGCA TGCAATATGTTATTANATTTTATGATCAAGTC/TJACTTTC ATCAGCTGTACAAGTTGTGACTGTTCGGCTGCTAATAAC TTAATAATTCTGTCACTACAACAAAT
72	NQ0344386	6	26.52	--	--	TGGTGTCTTCTGGAGCTGAAAGCAITTTGGAGAAGTATTTCAC ATTGAAGGAAATAGGCATTTG[A/C]ACAGTGGCATAGCA ATTTGGCTCAGAACCCAGnCGCACAGATCAAAGGATTTCC TACAATG
73	NQ0345529	6	31.49	--	--	TGACTCTATACTAGATGATGAGTTCCTCTTCTCCAACCT CAACTTATCACATCTGCTATT[e]TGACTAACAITTCATTG CATCACTTCTGCTTCTTTTGAACTCTTTGTTGCAATCCAAC ATTC
74	NQ0345734	6	33.62	--	--	ATGGCTTGAAnGGTCGCTCATAnCCCCCAGGGTCCGA CCACTTATATCCAAATCTCCT[e]GGCTCGATTATCTTC TCCTCTTACTCTTCCCACCTCACTTTAAAACCTTCCCTCACGG ATCC

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

50

【表 15】

表 3. Taqman^(登録商標)アッセイのためのマーカー一覧

マーカー	LG	位置	形質	プロープ VIC 配列	プロープ FAM 配列	プライマー F 配列	プライマー R 配列
NQ0257512	2	40.8	FBR	AGCTCTACTCTTCCAG CAAAA (配列番号 75)	CTCTACTCTTGACGCAA A (配列番号 116)	TTTGTAAACCAACICT GACCTTAGATGTT (配 列番号 157)	GGTTGGAGATCCAA ATTGCTATC (配列番 号 198)
NQ0345493	2	41	FBR	ATGATCCAAATGCTTTT CCAT (配列番号 76)	TGATCCAAATGCTTCC AT (配列番号 117)	GACGAAGGTGATGAT GCTTTGC (配列番号 158)	GCTAGGCTGGTAGGT TCTTTTAGT (配列番 号 199)
NQ0345038	2	41.3	FBR	TCACTTCTGATAAAG CTT (配列番号 77)	ACTTCTGATGAAAGCTT (配列番号 118)	CGGAAGGTCGGATCC TC (配列番号 159)	GAGCTAGCTTGGTAA CAAGAGGATT (配列 番号 200)
NQ0345495	2	42.4	FBR	CCTTGGAGAGTGTIG TC (配列番号 78)	TTGGAGAGCGTTGTC (配 列番号 119)	GGACGATGGATCAA GACTACAAAAT (配列番 号 160)	GGTAA TGGTATTCTC CAACCTTGGT (配列番 号 201)
NQ0257948	2	45.6	FBR	ATCATTTGGAAAATAA TCAT (配列番号 79)	CATTGGAAAGTAATCAT (配列番号 120)	GTCTCTAGCTCTTTTC GGTGTAG (配列番号 161)	CACTATAGTGCAGTC AAAAGCTGAGT (配列 番号 202)
NQ0258383	2	47.4	FBR	CTGGTCATTTGCTTTA GCT (配列番号 80)	TGGTCATTTGCGTTAGCT (配列番号 121)	GAATCCCATGATGCA AATCCGTTT (配列番号 162)	GCAC TTGGACAGCA ACATTTTGA (配列番 号 203)
NQ0257610	2	47.5	FBR	ATACGAAAATGAAAATC ATC (配列番号 81)	ATACGAAAATGTAATCAT C (配列番号 122)	TGTGCAATTTGTATCC CTGGCATA (配列番号 163)	TTAGATTTTCTACCT ATGCTCTACCAGGTT (配列番号 204)

10

20

30

40

50

【表 16】

NQ0258102	2	48.5	FBR	TTGGTCACTAGAAT GGTA (配列番号 82)	TGGTACCTAGGATGGT A (配列番号 123)	CTTTTTCTCAAGCTG GTTGTCAAT (配列番号 164)	ACCTTCTCAATTG TGCA (配列番号 205)
NQ0257924	2	48.5	FBR	CTAGCTTTGAGAATC GT (配列番号 83)	CTAGCTTTGACAATCGT (配列番号 124)	TCCATTTCTCAGCCC TACTTTGTGTC (配列番号 165)	AAATCATAAAGAAATTA AGAAATTCAAAAATCG AATTCAAAAAG (配列 番号 206)
NQ0258031	2	49.8	FBR	ATGGACTCCATATTT G (配列番号 84)	ATGGACTCCGTATTTG (配列番号 125)	GAGCCTGCGGCAATCAT G (配列番号 166)	TTTACCAAAAGTAATTT CTAAATAAAGGATTTG T (配列番号 207)
NQ0257938	2	50.1	FBR	TCCAGCACATGCATG (配列番号 85)	CAGCGCATGCATG (配列 番号 126)	AGAAATGTCTGAATTC AGAGCTCTGG (配列番 号 167)	GAGTCCCGGATTTGTTG GCAAAAC (配列番号 208)
NQ0258282	2	50.1	FBR	CCACCTACAATAACA ACAC (配列番号 86)	CACCTACAATAGCAACA C (配列番号 127)	ATTGATGTATGTTGTA TGTAACAATAACAGT AAGT (配列番号 168)	CAAAAGCAACTCCCA GTTCTTCAAC (配列番 号 209)
NQ0258343	2	50.5	FBR	ACTTCTGTGTTATC TTC (配列番号 87)	TTCTGTCGTTATCTTC (配 列番号 128)	ACATTTCCACACGTTG CATTTGT (配列番号 169)	TTTTACCAAAAAAGCAC TTTTATATTATTGTT (配列番号 210)
NQ0258609	2	51.5	FBR	ACAATTTTCATACTA ATCC (配列番号 88)	AAATTTTCATGCTAATCC (配列番号 129)	GAACAGATGGGATGA TGCAGAGA (配列番号 170)	CTCTATACAACCTCCA TCCAGGCAAT (配列 番号 211)

10

20

30

40

【 0 0 9 0 】

50

【表 17】

NQ0257684	2	52	FBR	CTTCTCAGTCGAAAC AG (配列番号 89)	TTCTCAGTGGAAACAG (配列番号 130)	GGGTCGCTGGCAATTT TGAA (配列番号 171)	GCTTTTAGGCACTTG ACTTCTCTCA (配列番号 212)
NQ0258062	2	52.1	FBR	CCCTATAGTTCGGATT ACT (配列番号 90)	CCTATAGTTCGGATTAC T (配列番号 131)	CTGCATCATCACCCCC TCTT (配列番号 172)	CGGAAATTGTACGGC GGGAATAT (配列番号 213)
NQ0258384	2	52.1	FBR	CTTCTCAGTCGAAAC AG (配列番号 91)	TTCTCAGTGGAAACAG (配列番号 132)	CTTATGACCAGGCAGC TTTTGC (配列番号 173)	GCTTTTAGGCACTTG ACTTCTCTCA (配列番号 214)
NQ0257410	2	53.3	FBR	CCGAAACCCACAAAAC (配列番号 92)	CGAAACCCACAAAAC (配 列番号 133)	CCCCTACCTCTTATCA GAACATCGA (配列番号 174)	GGCAATTTTGTATGA GGCAATGGAA (配列 番号 215)
NQ0257277	2	53.5	FBR	ACAGCCCTAAATCT A (配列番号 93)	AGCCCTGAATTCTA (配 列番号 134)	TCACAGACATTAGTAT GAAAAGCAAGCA (配列 番号 175)	GCAAGATGCAAAAAC TCAAATTTCTAGCA (配列番号 216)
NQ0257326	2	55.1	PR	ACCGCTAAACTAAA TAT (配列番号 94)	CGCTAATGCTAAAATAT (配列番号 135)	CCCCTCAAGAGCAAG AATTCTCA (配列番号 176)	GCCCTGATCTTGAGT GTAGTTTGG (配列番号 217)
NQ0257570	2	55.6	PR	CATCGTCATCATCATC T (配列番号 95)	CATCGTCATCGTCATCT (配列番号 136)	GAGGATTCATTCATTC ATGTTAAAAGTGCAT (配 列番号 177)	GCAAGGTAAAGAAA ATCGAAAAACCA (配列 番号 218)

10

20

30

40

50

【表 18】

NQ0257962	2	57.2	PR	CGGATGCAGTAAATTA AGA (配列番号 96)	CGGATGCAGTAGTTAAG A (配列番号 137)	CATGCCCTTATCTTG CTATTATCTCA (配列 番号 178)	CAGTTAAGAAGGGA TTCCTCTGCAT (配列 番号 219)
NQ0258453	2	62.5	色	TGTTAATGGGTTTTGA TTTAG (配列番号 97)	AAATGGGTTTCGATTTAG (配列番号 138)	GATAITCTTCTCTGTA AATAGCCTCGAGATT (配列番号 179)	TGGGTCCTACTTTGT TTGTTGGAT (配列番 号 220)
NACEP009407370/ NQ0257461	2	63.1	色	AGCATAGAAAGGTTAT AACTG (配列番号 98)	CATAGAAAGGCTATAACT G (配列番号 139)	CTGAGGAAGCAATA GAAAAAGCAA (配列番 号 180)	AACATAAATTAATAAA TAAGTGTAACTTTGC ATGAA (配列番号 221)
NQ0257641	4	30.6	PNBR	ATTCAGGGCAACTT AGAAAT (配列番号 99)	TCAGGGCAACCTAGAAT (配列番号 140)	GCTTCAATTGCTTGCT GGTTTTCAA (配列番号 181)	CCTGCCTTTTTCACAT TTTTCCCATTT (配列番 号 222)
NQ0345175	4	32.8	PNBR	TGAAGCAGAGTGATC AGTT (配列番号 100)	AAGCAGAGTGGTCAGTT (配列番号 141)	GCAGAGTAAATCGGCAT GTCTTCTT (配列番号 182)	GTCGTACTIONCTGC ACCAA (配列番号 223)
NQ0257536	4	35.6	PNBR	TCGTGCAATAAAAAGC (配列番号 101)	TCGTGCAATGAAAAGC (配 列番号 142)	CCCATTTGTTTCTAAC TAAATCTCAAAAGGAA AA (配列番号 183)	TGATTGACTGATTGT GTAGCTTGAAGA (配 列番号 224)
NQ0258247	4	38	PNBR	CACCAAATGAGATAT ACAC (配列番号 102)	CACCAAATGAGGTATAC AC (配列番号 143)	CGATGCATTTGAGATT GTTTGGAA (配列番号 184)	GTCATCCAAAACATTT ATCGTTACAAAAGGA A (配列番号 225)

【 0 0 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 19】

NQ0257799	4	44.8	PNBR	CTTTGCCTCACTAAA GG (配列番号 103)	TTTGCCTCGCTAAAGG (配列番号 144)	TAAAAAGAATACTATT ATCCTTAAATCAACAA TCT (配列番号 185)	AGTTCAAGAGAAAAC GAAAACCGGTAA (配 列番号 226)
NQ0345680	4	49.4	色	CAGCACAGGTCAG (配列番号 104)	AGCACCGGTCCAG (配 列番号 145)	CGCTGGAGCTCTGGT G (配列番号 186)	CACCCGAAGTTCAG AAGGTT (配列番号 227)
NQ0345468	4	50.9	色	TCAGATCTCCATGAT GATG (配列番号 105)	AGATCTCCACGATGATG (配列番号 146)	ATTGCCGTGAAGAAA GTACTGGAA (配列番号 187)	GCCTTAACCTTGCTGA TTATCTCAACCT (配 列番号 228)
NQ0345333	4	52	色	AAGATGATGCAATGCT TC (配列番号 106)	AAAGATGATGCTTGCTT C (配列番号 147)	AGCCACAACAATAGA CCAAAATG (配列番号 188)	CCTTGCTGCTGCCTGG TTGA (配列番号 229)
NQ0344746	4	54.3	色	TCGCTGCCAATACCT GA (配列番号 107)	CGCTGCCAGTACCTGA (配列番号 148)	GGAGTAGAAAACAAGT GAAGCTGCTA (配列番 号 189)	TCCGAAGGTAATAGT TCTGACGAAGA (配列 番号 230)
NQ0345071	5	7.1	PNBR	CAAGAAAATGAGCAGT AATAT (配列番号 108)	AAGAAAATGAGCGGTAAT AT (配列番号 149)	AGGAAAGTTGAAAAGG CCATTAACGA (配列番 号 190)	CTTTTGGAAACCAITTT CTTTTCTCCTGTCT (配列番号 231)
NQ0345144	5	11	PNBR	CCGCCATAGCTCTAA (配列番号 109)	CGCCATGGCTCTAA (配 列番号 150)	CGAGTGCTCCCTCATG TATTTGG (配列番号 191)	CCTACCAAAAACGCCA AAGAAATTACA (配列 番号 232)

10

20

30

40

50

【表 2 0】

NQ0258331	5	19	PNBR	TGAAAAGTGTGCATC AATTA (配列番号 110)	AAAGTGTGTCGTCAAATT A (配列番号 151)	CCTTGAGTACCTAGGT GACTATCGT (配列番号 192)	TCTTGAATCTCTCTG TTAATAGTTCAAATC GTG (配列番号 233)
NACEP009089369	6	22.3	R 遺伝子座; 色	CCTGGATTAGGCCCTG (配列番号 111)	CCTGGATGACTTGTGT (配列番号 152)	AAGAGTAAAGAGGTTA AACGGGTTGC (配列番号 193), ATCATTTTTAGCCATAT CGTAAATGTCA (配列 番号 239US)	AATTATACATGATTT CAGGAAATGAAAGCA C (配列番号 234)
NQ0258009	6	22.4	R 遺伝子座	CAATGGCTACTGAGT CAG (配列番号 112)	AATGGCTACCGAGTCAG (配列番号 153)	GCATTATGATGCTGCTT TTGCCTTAG (配列番号 194)	TCATTACTATAGTTA TAAGCTGGCTGAG (配列番号 235)
NQ0344415	6	22.4	R 遺伝子座	ACTGTGGTTATCACT AAAA (配列番号 113)	CTGTGGTTATCGCTAAA A (配列番号 154)	CGATGAAAGGCAATCTT ACACTAGCA (配列番号 195)	GCTCATTGTTAAAGTG AGCCAGTG (配列番号 236)
NACEP009090969	6	22.6	R 遺伝子座; 色	CTGATGAAAAGTGCTT GATC (配列番号 114)	CTGATGAAAAGTACTTGA TC (配列番号 155)	ACTCCACTGGCATGCA ATATGTTAT (配列番号 196)	AGCGAACAGTCACA ACTTGTAAACA (配列 番号 237)
NACEP009112570	-	-	ANS 色	GAGTTACCTCTTAGCT (配列番号 115)	TTGGAGCATACCCTA (配 列番号 156)	AGTAGAAAATAAGTGA AGAATAATTGATGTG (配列番号 197), TACAATATGATACAGA AAATCAGAG (配列番号 240US)	TGGTTTGAGCTTGT GGTTTGGAG (配列番号 238)

10

20

30

40

【 0 0 9 2】

実施例 5

タマネギ乾腐病(FBR) LG2 QTL 精細マッピング

F3 球根を、実施例 1 に記載の起始 G-75-1706/Serrana-FBR マッピング集団から得た。分離 F2:3 系統群を、主作用 FBR QTL 領域を > 12 cm から 5 cm 未満に狭めるために、LG2 上の FBR の QTL 領域における望む遺伝子型データに基づき選択した。選択した F3 系統群の LG2 QTL 領域における F2 遺伝子型を表 4 に記載する。表 4 に見られるとおり、F2:3 segpop 系統群を、F2 世代における QTL 領域の“ 階段的 ”セクションのために FBR QTL LG2 領域において組み換えおよびヘテロ接合(網掛け)を

50

種の F 3 球根および F B R Q T L 領域全体にわたり SYG-75-1706 対立遺伝子交配種について固定ホモ接合である 10 種の F 3 球根を選択した(表 5 参照)。6 種の分離集団の各々について選択した球根(各対立遺伝子“群”について 1 個ずつの隔離ケージ)を、ウッドランド北部のケージ領域で 12 月に 16 個のヘッドケージに移植した。各“階段”での好ましいおよび好ましくない対立遺伝子の F 3 球根選択を別に集め、残りのゲノム異種性を維持しながら(近交弱勢および背景 Q T L 効果の機会を減少させ)、目的の組み換え Q T L 領域のみに固定した種を生産した。

【 0 0 9 5 】

集団採種の種を収穫し、F B R について試験した。6 系統群の各々について、その系統群の 2 個の集団採種した対立遺伝子“群”を表す 2 エントリー間の統計学的差異は、その F 3 系統群を分離した各遺伝子区間に F B R 抵抗性が位置するか否かの決定を可能とする。

【 0 0 9 6 】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 5. 集団採種のために選択した F 3 球根の例
(系統群 RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.)

		NC0346038	NC0257946	NC0258383	NC0258031	NC0258609	NC0257684	NC0258384	NC0257410	NC0257277	NC0257570	NACEP009407370
染色体		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
位置		41	46	47	50	51	52	52	53	53	56	63
形質 QTL		FBRR	FBRR	FBRR	FBRR	FBRR	FBRR	FBRR	FBRR	FBRR	PRR	color
SYG-75-1706 (HCH0351-S1)	F3植物番号	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	353	AA	CC	AA	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	356	AA	CC	AA	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	359	AA	CC	AA	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	375	AA	CC	AA	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	395	AA	CC	AA	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	397	AA	CC	AA	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	402	AA	CC	AA	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	408	AA	CC	AA	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	413	AA	CC	AA	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	415	AA	CC	AA	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	351	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	389	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	390	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	405	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	425	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	440	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	445	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	448	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	451	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG
RV_SYG-75-1706/SERRANA-FBR:01.0113.	496	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	GG

10

20

30

40

【 0 0 9 7 】

その後、29種のさらなる F 2 : 3 系統群を、LG 2 上の F B R Q T L のさらなる精細マッピング、ならびに LG 3 および LG 4 上の F B R の Q T L の検証のために選択した。

【 0 0 9 8 】

F B R Q T L 精細マッピングプロジェクトのための F 3 系統群は、LG 2 上の F B R Q T L 領域をさらに狭めることを可能とする個体を生産するために、LG 2 上の F B R Q T L 領域の多くの範囲を表す。

【 0 0 9 9 】

F B R Q T L 検証のための F 3 系統群は、LG 2 上の主 F B R Q T L 領域においては

50

Serrana好ましい対立遺伝子に固定されているが、L G 3およびL G 4上の副Q T L領域についてはヘテロ接合である系統群により表される。副Q T Lの両対立遺伝子の種々の組み合わせについてホモ接合である個体を同様に選択して(L G 2 Q T Lが固定されていると仮定して)、上記のとおり、副Q T LがF B Rに重要なさらなる抵抗性をもたらすか否かを決定するために試験できる集団採種した種のエントリーを生産する。

【0100】

実施例6

タマネギF B R - P R抵抗性形質結合プロジェクト

精細マッピングプロジェクトに準じて、F B RおよびP R抵抗性の結合を、利用可能なF 3球根を使用する2段階アプローチならびにSYG-75-1706/Serrana集団からの遺伝子原料のF 3種源の植え付けのを介して達成できた。球根を、L G 2上のSerranaからのF B R Q T Lについての好ましい対立遺伝子と北米黄タマネギ球根(または汎用黄タマネギ)におけるL G 2上のSYG-75-1706からのP Rについての好ましい対立遺伝子を組み合わせた個体を同定するためにサンプリングする。

【0101】

挿木(steckling)/種源アプローチのために、7種のF 3系統群を、L G 2形質領域およびL G 6色Q T L領域における対立遺伝子の好ましい組み合わせ、ならびに好ましい表現型疾病源を有するようにF 2植物マーカーデータに基づき選択した。F 3種を植え、得られたF 3植物を、L G 2上のF B Rの主Q T L、L G 3およびL G 4上のF B Rの副Q T L、L G 2上のP R Q T L領域と、L G 2およびL G 6上の色Q T L領域を包含する、TaqManマーカーで遺伝子型分類した。各F 3系統群からの組み換え個体は、固定されたまたはヘテロ接合状態のいずれかでできるだけ多くの形質の全装備を含むと同定され、“同類”個体をさらなる集団採種のためにヘッドケージに一緒に入れた。

【0102】

表6は、最初に追跡のために選択されたF 2系統群の代表的遺伝子型、および、形質の組み合わせのための望ましい組み換えを有するとして選択された得られたF 3植物の選択を示す。L G 2上のF B R抵抗性(F B R R)の好ましい対立遺伝子を示すマーカーを主基準として使用し、続いてL G 2上のP R抵抗性(P R R)の好ましい対立遺伝子、そして、最後に、L G 2上のSerrana色対立遺伝子およびL G 6上のSYG-75-1706色対立遺伝子を組み合わせる、理想的には汎用黄タマネギの好ましい色対立遺伝子であった。しかしながら、北米黄タマネギの獲得もまた目標であり、これは、L G 2およびL G 6色領域/Q T Lの両方でSYG-75-1706色対立遺伝子を必要とした。これらのケージからの集団採種した種を回収し、形質が組み合わさっていることを確認するために試験した。汎用黄タマネギF B R + P R組み合わせの場合、これはL G 2上に二重組み換えを含み、それゆえにこれらは、全形質を固定するためにさらに一世代のM A Sが必要であった。

【0103】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 6. その後の F 3 (およびそれ以降の) 世代において形質結合のために選択した F 2 系統群の大多数の遺伝子型および表現型情報

		NQ0345038	NQ0257948	NQ0258383	NQ0258031	NQ0258609	NQ0257684	NQ0258384	NQ0257410	NQ0257277	NQ0257326	NQ0257570	NQ0258453	NQ0258009	NQ0344415	PR スコア	FBR スコア
	LG	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	6	6	
	位置	41.3	45.6	47.4	49.8	51.5	52	52.1	53.3	53.5	55.1	55.6	62.5	22.4	22.4	Donna, TX	Deforest, WI % 致死率
	所望のハプロタイプ - 汎用:	FBR	FBR	FBR	FBR	FBR	FBR	FBR	FBR	FBR-PR	PRR	PRR	色	色	色		
	所望のハプロタイプ - NA 黄色:	FBR	FBR	FBR	FBR	FBR	FBR	FBR	FBR	FBR-PR	PRR	PRR	色	色	色		
	親: SYG-75-1706 (HCH0351-	GG	TT	CC	TT	CC	CC	CC	GG	TT	CC	CC	GG	TT	CC	PRR	94.8
ケージ	F2 先祖植物, HCS0103 黄色	AG	CT	AA	CC	TT	GG	GG	CC	CC	CT	CT	AG	TT	CC	seg	75.8
ケージ1:	F3 選択, FBR-PR- NA 黄タマネギ	AA	CC	AA	CC	TT	GG	GG	CC	CC	CC	CC	GG	TT	CC		
ケージ2:	F3 選択, FBR-PR- seg 汎用黄タマネギ	AA	CC	AA	CC	TT	GG	GG	CC	CC	CC	CC	AG	TT	CC		
	F2 先祖植物, HCS0149	AG	CT	AC	CT	CT	CG	CG	CG	CT	-	CT	AA	-	CC	seg	69.2
ケージ3:	F3 選択, FBR- seg PRR-汎用黄タマネギ	AA	CC	AA	CC	TT	GG	GG	CC	CC	CT	CT	AA	TT	CC		
ケージ4:	F3 選択, seg FBR- PRR-汎用黄タマネギ	AG	CT	AC	CT	CT	CG	CG	CG	CT	CC	CC	AA	TT	CC		
	F2 先祖植物, HCS0537	AA	CC	AA	CC	CT	CG	CG	GG	TT	CC	CC	GG	CT	CT	PRR	73.9
ケージ5:	F3 選択, FBR- PRR-NA 黄タマネギ	AA	CC	AA	CC	TT	GG	GG	GG	TT	CC	CC	GG	TT	CC		
	F2 先祖植物, HCS0189	AG	CT	AC	CT	CT	CG	CG	CG	CT	CT	CT	AA	CC	CT	seg	70.6
ケージ6:	F3 選択, seg FBR- PRR-seg 汎用黄タマネギ	AG	CT	AC	CT	CT	CG	CG	CG	CT	CC	CC	AA	CC	CT		
ケージ6:	F3 選択, FBR- seg PRR-汎用黄タマネギ	AA	CC	AA	CC	TT	GG	GG	CC	CC	**	CT	AA	CC	CC		
	F2 先祖植物, HCS0275	AG	CT	AC	CT	CT	CG	CG	CG	CT	CT	CT	AA	TT	CC	seg	87.4
ケージ7:	F3 選択, FBR- seg PRR-汎用黄タマネギ	AA	CC	AA	CC	TT	GG	GG	CC	CC	CT	CT	AA	TT	CC		
ケージ8:	F3 選択, seg FBR- PRR-汎用黄タマネギ	AG	CT	AC	CT	CT	CG	CG	CG	CT	CC	CC	AA	TT	CC		
	F2 先祖植物, HCS0723	AG	CT	AC	CC	TT	GG	GG	CC	CC	CT	CT	AG	CT	CT	seg	73.9
ケージ9:	F3 選択, FBR trunc- PRR-NA 黄タマネギ	GG	TT	CC	CC	TT	GG	GG	CC	CC	TT	CC	GG	TT	CC		
ケージ10:	F3 選択, FBR- seg PRR-seg 色	AA	CC	AA	CC	TT	GG	GG	CC	CC	TT	CT	AG	CT	**		
ケージ11:	F3 選択, FBR trunc-PRR-seg 色	GG	TT	CC	CC	TT	GG	GG	CC	CC	TT	CC	AG	**	CT		

10

20

30

40

【 0 1 0 4】

目的の Q T L 領域の F 2 遺伝子型を示しており、各 F 2 前駆細胞の下は、形質ドナーを
作製するためにケージ中での集団採種のために選択した(数) F 3 子孫の代表的遺伝子型で
ある。望むハプロタイプは、F B R + P R 抵抗性を有する北米または汎用黄タマネギであ
った。数ケージが北米黄タマネギ F B R + P R ドナーを提供し、数ケージが汎用黄タマネ
ギ F B R + P R ドナーを提供した(さらに 1 ラウンドの M A S を必要とした)。

【 0 1 0 5】

実施例 7

全て組み合わせさせた F B R および P R 抵抗性を有する、汎用黄タマネギおよび北米黄タ

50

マネギドナーを達成するための必要な遺伝子組み合わせを有するリーディング生殖質イベントドナーは、連鎖群 0 2 の標的領域における組み換えにより可能となった(表 7)。この表のイベントドナーは、先に記載した表 4 および表 6 に示す選択の小集団である。表 4 および 6 系統群の起源は、本表では前駆細胞源番号(接頭辞“ H C S ”)を介して同定できる。病理試験は、2 種の汎用ドナーおよび 3 種の北米黄タマネギドナーが、抵抗性親 Serrana と明らかに同等な高レベルの F B R 抵抗性を有することを示す。同様に、球根色および/または紅色根腐病抵抗性は、先の世代のデータから、各表カラムに“黄色”または“抵抗”により示されるとおり、これらのドナーの幾つかで好ましく固定されていることが表現型分類により確認された。全例で、望む組み換えイベント(北米または汎用黄タマネギドナーそれぞれで L G 0 2 領域において必要な一または二組み換えイベント)が産生され、F B R 抵抗性が固定され、表現型分類により確認された。北米黄タマネギドナーイベントの 2 種は望む L G 0 2 および L G 0 6 配置に固定された。本データセットで分離されている遺伝子型領域(表で“ S E G ”と示す)は、固定された色遺伝子座配置または P R 抵抗性を得るために、示す分子マーカーと共に、1 回を超える育種サイクルで固定される。

【 0 1 0 6 】

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 弁理士 重森 一輝
 (74)代理人 100137213
 弁理士 安藤 健司
 (74)代理人 100143823
 弁理士 市川 英彦
 (74)代理人 100183519
 弁理士 櫻田 芳恵
 (74)代理人 100196483
 弁理士 川崎 洋祐
 (74)代理人 100160749
 弁理士 飯野 陽一
 (74)代理人 100160255
 弁理士 市川 祐輔
 (74)代理人 100202267
 弁理士 森山 正浩
 (74)代理人 100182132
 弁理士 河野 隆
 (74)代理人 100146318
 弁理士 岩瀬 吉和
 (74)代理人 100127812
 弁理士 城山 康文
 (72)発明者 ロウエル・ブラック
 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・ブルバード 8 0
 0 番
 (72)発明者 エバ・キンファン・チャン
 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・ブルバード 8 0
 0 番
 (72)発明者 ジェニーライン・フェレラ・コルコル
 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・ブルバード 8 0
 0 番
 (72)発明者 リチャード・ジョーンズ
 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・ブルバード 8 0
 0 番
 (72)発明者 チャド・クレイマー
 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・ブルバード 8 0
 0 番
 (72)発明者 シャン・ウェンウェン
 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・ブルバード 8 0
 0 番
 合議体
 審判長 福井 悟
 審判官 森井 隆信
 審判官 川合 理恵
 (56)参考文献 特表 2 0 1 1 - 5 1 0 6 1 8 (J P , A)
 特表 2 0 0 9 - 5 3 9 4 1 4 (J P , A)
 韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 3 - 0 1 2 0 5 8 9 (K R , A)
 特表 2 0 0 9 - 5 0 1 5 2 8 (J P , A)
 J . Amer . Soc . Hort . Sci . , 2 0 0 2 , Vol . 1 2 7 , No . 5 , p

p . 8 4 8 - 8 5 4

Onion World , 2 0 0 8 , Vol . 2 4 , No . 8 , pp . 1 5 - 1 8

Plant disease , 1 9 8 2 , Vol . 6 6 , No . 1 1 , pp . 1 0 0 3 - 1 0 0 6

Plant disease , 1 9 9 6 , Vol . 8 0 , No . 6 , pp . 6 6 0 - 6 6 3

J . Amer . Soc . Hort . Sci . , 2 0 0 6 , Vol . 1 3 1 , No . 5 , p

p . 6 4 6 - 6 5 0

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

A 0 1 H

C 1 2 Q

MEDLINE / BIOSIS / WPIDS / CAPLUS (STN)

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

PubMed

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq