

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5709140号
(P5709140)

(45) 発行日 平成27年4月30日(2015.4.30)

(24) 登録日 平成27年3月13日(2015.3.13)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A A
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
A O 1 G	1/00	(2006.01)	A O 1 G	1/00	3 O 1 Z

請求項の数 5 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2011-518602 (P2011-518602)	(73) 特許権者	504258527 国立大学法人 鹿児島大学 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
(86) (22) 出願日	平成22年6月10日 (2010.6.10)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/060256	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(87) 国際公開番号	W02010/143749	(74) 代理人	100169579 弁理士 村林 望
(87) 国際公開日	平成22年12月16日 (2010.12.16)	(72) 発明者	坂田 祐介 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内
審査請求日	平成24年12月6日 (2012.12.6)	(72) 発明者	橋本 文雄 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内
(31) 優先権主張番号	特願2009-139477 (P2009-139477)		最終頁に続く
(32) 優先日	平成21年6月10日 (2009.6.10)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 白色花を生じるトルコギキョウ [Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.] を選別する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

トルコギキョウ[Eustoma grandiflorum (Raf.) Shinn.]のDNAサンプルから、アントシアニン合成酵素(ANS)遺伝子中の有色花関連マーカーを検出することを含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別する方法であって、前記有色花関連マーカーは、配列番号1のヌクレオチド2366~2459若しくは配列番号19のヌクレオチド2379~2472、又は配列番号1のヌクレオチド2366~2459若しくは配列番号19のヌクレオチド2379~2472において、1~数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドである、前記方法。

【請求項2】

配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472に隣接する5'側配列及び3'側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマー及び逆方向プライマーから成るプライマーセットによるDNAサンプルのPCR増幅と、その後の電気泳動によって、ANS遺伝子の遺伝子型の決定を行うことを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記プライマーセットは、配列番号3に示す正方向プライマー及び配列番号4に示す逆方向プライマーから成ることを特徴とする、請求項2記載の方法。

【請求項4】

配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472に隣

接する5'側配列と3'側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマー及び逆方向プライマーから成るプライマーセットを含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別するためのキット。

【請求項5】

前記プライマーセットは、配列番号3に示す正方向プライマー及び配列番号4に示す逆方向プライマーから成ることを特徴とする、請求項4記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、トルコギキョウ [*Eustoma grandiflorum* (Raf .) Shinn .] のアントシアニン合成酵素 (ANS) 遺伝子中の白色花関連マーカールを利用した、白色化を生じるトルコギキョウの選別方法、及び白色化を生じるトルコギキョウを選別するためのキットに関する。 10

【背景技術】

【0002】

トルコギキョウ [*Eustoma grandiflorum* (Raf .) Shinn .] は、リンドウ科に属し、アメリカ南西部を原産とする一年性の草本である。本種は、その大きな花と長い茎、そして花持ちのよさの点で、日本で最も人気の高い切花の一つとなっている。典型的なトルコギキョウの野生種の花色は紫色であり、その主要色素はデルフィニジン系のアントシアニンである。主に日本における商業育種によって、ピンク、白、クリーム色、藤色、赤などの多様な花色の系統が作出されているが、更なる花色の多彩化、効率的な花色育種法が望まれている。 20

例えば、花色の複対立遺伝子が提唱されているが、白色花の形成機構はまだDNAレベルでは詳しく証明されていない (特許文献 1) 。

一方、野田らは、トルコギキョウでアントシアニン合成に関わるフラボノール合成酵素 (FLS) 、ジヒドロフラボノール 4 還元酵素 (DFR) 、カルコン合成酵素 (CHS) 、アントシアニン合成酵素 (ANS) などの発現を詳しく解析しているが、これらの遺伝子と白色花との関係は不明である (非特許文献 1) 。

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0003】

【特許文献 1】国際公開 WO 2004 / 103065 号パンフレット

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】 N . Noda et al . , 「 Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) 」 *Physiologia Plantarum* 2004 年、第 122 巻、305 - 313 . 40

【発明の概要】

【0005】

上記のような状況下、現在までは、個々のトルコギキョウが白色花か否かは、生育の後期に花が形成されるまで栽培を行わないと判別することができなかった。また、有色花系統が白色花遺伝子をヘテロでもっている場合には、子孫を作って花が咲くまで調査を行わないと白色花を生じるか判別できないため、白色花を生じる可能性を試験当代で判定することはできなかった。

したがって、トルコギキョウの白色花発現に関係する特定の遺伝子マーカールを見出し、該遺伝子マーカールに基づいて、開花前に又は有色品種から、白色花を生じるトルコギキョウを選別することができれば、白色花を有するトルコギキョウを効率的に育種できると考 50

えられる。

そこで本発明は、トルコギキョウの白色花に関連する遺伝子マーカーの開発、及び当該マーカーを利用した、開花前に又は有色品種から、白色花を生じるトルコギキョウを選別する方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、白色花及び有色花のトルコギキョウにおいて、アントシアニン生合成に関与する遺伝子群を調査する過程で、各遺伝子の配列情報に基づいて設計したプライマーを用いてRT-PCR分析を行ったところ、白色花の系統ではアントシアニン合成酵素(ANS)の増幅が認められないことを確認した(図1)。

そこで白色花系統と有色花系統との間でANS遺伝子の塩基配列を調査し、両者を比較したところ、エクソンの配列は特定の連続した94ヌクレオチドの欠失を除いて約98%同一であり、イントロンの配列においては顕著な違いがあることを見出した(図2及び8)。

10

本発明は、上記塩基配列の差異に基づく白色花のトルコギキョウの選別方法であり、以下の特徴を包含する。

(1)トルコギキョウ[Eustoma grandiflorum(Raf.)Shinn.]のDNAサンプルから、アントシアニン合成酵素(ANS)遺伝子中の白色花関連マーカー又は有色花関連マーカーのいずれかを検出することを含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別する方法。

(2)白色花関連マーカーは、配列番号2若しくは20に示すポリヌクレオチド、又はそれらのポリヌクレオチドにおいて1~複数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドである、上記(1)記載の方法。

20

(3)有色花関連マーカーは、配列番号1若しくは19に示すポリヌクレオチド、又はそれらのポリヌクレオチドにおいて1~複数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドである、上記(1)記載の方法。

(4)有色花関連マーカーは、配列番号1のヌクレオチド2366~2459若しくは配列番号19のヌクレオチド2379~2472、又は配列番号1のヌクレオチド2366~2459若しくは配列番号19のヌクレオチド2379~2472において、1~数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドである、上記(1)記載の方法。

(5)白色花関連マーカー及び有色花関連マーカーの双方を検出することにより、ANS遺伝子の遺伝子型を決定することをさらに含む、上記(1)記載の方法。

30

(6)配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472に隣接する5'側配列及び3'側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマー及び逆方向プライマーからなるプライマーセットによるDNAサンプルのPCR増幅と、その後の電気泳動によって前記決定を行うことを特徴とする、上記(5)記載の方法。

(7)前記プライマーセットは、配列番号3に示す正方向プライマー及び配列番号4に示す逆方向プライマーからなることを特徴とする、上記(6)記載の方法。

(8)白色花関連マーカーがホモ型で存在する場合に、トルコギキョウの花色を白色と判定することをさらに含む、上記(5)記載の方法。

40

(9)白色花関連マーカーがヘテロ型で存在する場合に、試験当代は有色花であるが、自殖により白色花を生じるものであると判定することをさらに含む、上記(5)記載の方法。

(10)以下の(i)又は(ii)のいずれか1つ以上を含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別するためのキット。

(i)配列番号2若しくは20に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列を有する核酸プローブ;及びストリンジেন্টな条件下で配列番号2若しくは20に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列とハイブリダイズするが配列番号1及び19に示すヌクレオチド配列並びにその相補的配列とハイブリダイズしない、15塩基以上の長さを有する核酸プローブ、よりなる群から選択される少なくとも1つの白色花関連マーカーを検出するた

50

めの核酸プローブ

(i i) 配列番号 1 若しくは 1 9 に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列を有する核酸プローブ；ストリンジェントな条件下で配列番号 1 若しくは 1 9 に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列とハイブリダイズするが配列番号 2 及び 2 0 に示すヌクレオチド配列並びにその相補的配列とハイブリダイズしない、1 5 塩基以上の長さを有する核酸プローブ；及び配列番号 1 のヌクレオチド 2 3 6 6 ~ 2 4 5 9 又は配列番号 1 9 のヌクレオチド 2 3 7 9 ~ 2 4 7 2 の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズ可能であり、かつ 1 5 塩基以上の長さを有する核酸プローブ、よりなる群から選択される少なくとも 1 つの有色花関連マーカーを検出するための核酸プローブ

(1 1) 前記核酸プローブは標識化されている、上記 (1 0) 記載のキット。

10

(1 2) 前記 (i) 及び (i i) を含むことを特徴とする、上記 (1 0) 記載のキット

(1 3) 前記 (i) の核酸プローブと、前記 (i i) の核酸プローブとが異なる標識を有する、上記 (1 2) 記載のキット。

(1 4) 配列番号 1 のヌクレオチド 2 3 6 6 ~ 2 4 5 9 又は配列番号 1 9 のヌクレオチド 2 3 7 9 ~ 2 4 7 2 に隣接する 5 ' 側配列と 3 ' 側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマー及び逆方向プライマーからなるプライマーセットを含む、白色花を生じるトルコギキョウを選別するためのキット。

(1 5) 前記プライマーセットは、配列番号 3 に示す正方向プライマー及び配列番号 4 に示す逆方向プライマーからなることを特徴とする、上記 (1 4) 記載のキット。

20

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2 0 0 9 - 1 3 9 4 7 7 号の明細書及び / 又は図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 6 】

図 1 は、アントシアニン生合成に関与する様々な遺伝子の、有色花系統 A M 及び白色花系統 K S 間での発現差を示す電気泳動図を示す。なお図中の略記は次の通りである：C H S、カルコン合成酵素；C H I、カルコンイソメラーゼ；F 3 H、フラバノン 3 - 水酸化酵素；F L S、フラボノール合成酵素；D F R、ジヒドロフラボノール 4 - 還元酵素；A N S、アントシアニン合成酵素；7 G T、アントシアニン 7 - 糖転移酵素；M、DNA サイズマーカー。

30

図 2 は、有色花系統 A M (配列番号 1) 及び白色花系統 K S (配列番号 2) 間での A N S 遺伝子の配列比較を示す。下線部は、白色系花系統で特徴的な連続した 9 4 ヌクレオチドの欠失部位を示す。

図 3 は、トルコギキョウの有色花系統 A M の花を示す。

図 4 は、トルコギキョウの白色花系統 K S の花を示す。

図 5 は、トルコギキョウの有色花系統 A M とトルコギキョウの白色花系統 K S の交雑個体の花を示す。

図 6 は、トルコギキョウの有色花系統 A M とトルコギキョウの白色花系統 K S の交雑個体の自殖後代の分離した集団の A N S 遺伝子の P C R の結果を示す。

図 7 は、トルコギキョウの栽培品種の A N S 遺伝子の P C R の結果を示す。各レーンのサンプルは次の通りである：M、DNA サイズマーカー；1、A M (有色花) ；2、K S ；3、A W ；4、ロジーナグリーン；5、キュートグリーン；6、キングオブイエロー；7、あすかタイプホワイト；8、スピカホワイト；9、つくしの新雪 (以上白色花) 。

40

図 8 は、有色花系統 A M (配列番号 1 9) 及び白色花系統 K S (配列番号 2 0) 間での A N S 遺伝子の配列比較を示す。下線部は、白色系花系統で特徴的な連続した 9 4 ヌクレオチドの欠失部位を示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 7 】

本発明は、白色花を生じるトルコギキョウ [*Eustoma grandiflorum* (R a f .) S h i n n .] を選別する方法 (以下、本発明の方法という) に関する。

50

本発明でいう「白色花」とは、植物の花の主要色素の一つであるアントシアニンを全く生合成しないか、又はその生合成量が非常に少ないため、肉眼で色素の発現を識別できず白く見える花をいい、レモン色、黄色、緑色の花を含む。これに対して「有色花」とは、アントシアニンが肉眼で観察可能な程度に発現している、赤、青、紫、オレンジ、ピンク、黒色の花をいう。また本発明で使用する「白色花を生じる」とは、試験当代が白色花であること、及び試験当代は有色花であるが、自殖により潜在的に白色花を生じること、の両者を指す。

本発明の方法は、トルコギキョウのDNAサンプルから、アントシアニン合成酵素(A NS)遺伝子中の白色花関連マーカーを検出することを含んでいる。

本発明に使用されるトルコギキョウのDNAは、花形成前のトルコギキョウの組織、例えば種子、葉、根、茎から、又は、あらゆる時点での有色品種の組織(花を含む)から、抽出することにより取得することができる。DNAの抽出は、当業者に一般的な手法に従って行えばよい。すなわち、トルコギキョウの組織を微塵切りにし、これを適当なバッファ中でホモジナイズした後、フェノール抽出などの公知のDNA抽出法にて、全DNAを抽出する。またその際に使用するDNA抽出キットは市販のものであってよく、例えばPlant Genomics DNA Miniキット(バイオジーン社)などを使用することができる。

本発明でいう白色花関連マーカーとは、花組織で正常にA NSを発現するA NS遺伝子にはない、花組織で正常に発現されないA NS遺伝子に特徴的なヌクレオチド配列をいう。そのようなヌクレオチド配列として、配列番号2若しくは20に示す白色花品種のA NS遺伝子(以下、白色花遺伝子と称する)又はその変異体、あるいは配列番号2又は20に示す白色花遺伝子において、それぞれ配列番号1又は19に示す有色花品種のA NS遺伝子(以下、有色花遺伝子と称する)の対応領域と、塩基配列が顕著に異なる領域(以下、白色花領域と称する)を挙げることができる。

本発明でいう白色花遺伝子の変異体としては、配列番号2又は20に示すポリヌクレオチドにおいて1~複数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドが挙げられる。ここで「複数個」とは、100個以下、好ましくは50個以下、40個以下、30個以下、20個以下、そして最も好ましくは10個以下の整数をいう。

また、本発明でいう白色花遺伝子の変異体としては、配列番号2又は20に示すポリヌクレオチドに対して80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%、96%、97%、98%、99%以上のヌクレオチド同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

さらに、本発明でいう白色花遺伝子の変異体としては、配列番号2又は20に示すポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドから成るDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが挙げられる。ここで、「ストリンジェントな条件」は、当業者が適宜設定でき、例えば30~50 で、3~5 x SSC、0.1~1% SDS中で1~15時間のハイブリダイゼーション、その後の、例えば0.1~2 x SSC、0.1~1% SDS中、室温~70 での洗浄を含んでいる。ストリンジェント条件の例は、例えばSambrookら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989に開示されている。

上記白色花遺伝子の変異体には、配列番号2若しくは20に示す塩基配列又はその相補的配列の突然変異体、及び異なるトルコギキョウ白色花品種のホモログが含まれる。

白色花領域は、例えば本願明細書の図2及び8に示される有色花遺伝子と白色花遺伝子の配列アライメントから、両配列間で顕著に異なる配列領域を選択することによって特定することができる。

本発明の方法において、白色花関連マーカーの検出は、当業者に公知の任意の手法に従って行うことができる。そのような手法として、A NS遺伝子領域のPCR増幅と、その後の塩基配列決定による検出；白色花関連マーカーの少なくとも一部に特異的にハイブリダイズする標識化プローブを用いた検出(例えばサザンハイブリダイゼーション、マイク

10

20

30

40

50

ロアレイなどの手法による)などを挙げることができる。上記手法による白色花関連マーカーの検出に際し、当業者は適宜最適な条件を設定することができる。

具体的に、上記目的で使用されるPCRプライマーの長さは、15~50塩基、好ましくは17~25塩基の範囲で設定することができる。PCR条件は、目的のANS遺伝子領域が増幅可能な限り限定されないが、例えば94~95で10秒~1分の変性、50~65で10秒~1分間のアニーリング、72で30秒~10分の伸長反応を1サイクルとし、20~50サイクル反応を行うことを含む。

目的の白色花関連マーカーを該白色花関連マーカーの一部に特異的にハイブリダイズする標識化プローブを用いて検出する場合、使用されるプローブの長さは、15塩基以上、例えば20~200塩基、25~100塩基、25~50塩基であり、サンプルとプローブとの接触はストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下にて行うものとする。ここでストリンジェントな条件は、プローブの長さ、目的の白色花関連マーカーの塩基配列に基づいて当業者が適宜設定でき、例えば30~50で、3~5xSSC、0.1~1%SDS中で1~15時間のハイブリダイゼーション、その後の、例えば0.1~2xSSC、0.1~1%SDS中、室温~70での洗浄を含んでいる。ストリンジェント条件の例は、例えばSambrookら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989に開示されている。プローブの標識化は当業者に公知であり、例えば蛍光ラベル化剤、放射性同位元素を使用することによって行うことができる。

上記のようにしてトルコギキョウのDNAサンプルから目的とする白色花関連マーカーが検出された場合には、白色花を生じるトルコギキョウとして試験当代を選別することができる。

本発明の方法は、遺伝子マーカーを利用するため、花形成前を含むあらゆる時点で白色花を生じる系統の選別が可能であり、選別に要する時間を大幅に短縮することができる。また所望でない花色品種を育成する不都合を回避することができるため、育成に必要な畑面積はより少なく済み、農薬、肥料などの農業資材の節約にも資する。

一方、上記白色花関連マーカーの検出は、試験当代が白色花であることを保証するものではない。なぜなら、白色形質は劣性であるため、ANS遺伝子が有色花遺伝子と白色花遺伝子とをヘテロ型で有している場合には、上記白色花関連マーカーが検出できたとしても試験当代は有色花となるからである。

したがって本発明の方法は、上記白色花関連マーカーの検出に代えて又はこれに加えて、ANS遺伝子中の有色花関連マーカーを検出することを含むことができる。

本発明において、有色花関連マーカーとして、配列番号1若しくは19に示す有色花遺伝子又はその変異体、あるいは配列番号1又は19に示す有色花遺伝子において、それぞれ配列番号2又は20に示す白色花遺伝子の対応領域と、塩基配列が顕著に異なる領域(以下、有色花領域と称する)を挙げることができる。

本発明でいう有色花遺伝子の変異体としては、配列番号1又は19に示すポリヌクレオチドにおいて1~複数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドが挙げられる。ここで「複数個」とは、200個以下、好ましくは100個以下、より好ましくは50個以下、40個以下、30個以下、20個以下、そして最も好ましくは10個以下の整数をいう。

また、本発明でいう有色花遺伝子の変異体としては、配列番号1又は19に示すポリヌクレオチドに対して80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%、96%、97%、98%、99%以上のヌクレオチド同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

さらに、本発明でいう有色花遺伝子の変異体としては、配列番号1又は19に示すポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドから成るDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが挙げられる。ここで、「ストリンジェントな条件」は、当業者が適宜設定でき、例えば30~50で、3~5xSSC、0.1~1%SDS

10

20

30

40

50

DS中で1~15時間のハイブリダイゼーション、その後の、例えば0.1~2xSSC、0.1~1%SDS中、室温~70℃での洗浄を含んでいる。ストリンジェント条件の例は、例えばSambrookら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989に開示されている。

上記有色花遺伝子の変異体には、配列番号1若しくは19に示す塩基配列又はその相補的配列の突然変異体、及び異なるトルコギキョウ有色花品種のホモログが含まれる。

有色花領域は、例えば本願明細書の図2及び8に示される有色花遺伝子と白色花遺伝子の配列アライメントから、両配列間で顕著に異なる配列領域を選択することによって特定することができる。本発明において好ましい有色花領域として、有色花遺伝子(配列番号1)のヌクレオチド2366~2459若しくは有色花遺伝子(配列番号19)のヌクレオチド2379~2472又はその変異体を挙げることができる。

10

ここで「配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472の変異体」としては、配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472において、1~数個のヌクレオチドの置換、付加、欠失若しくは挿入を含むポリヌクレオチドが挙げられる。ここで「数個」とは、10以下の整数、好ましくは5以下の整数をいう。

また、「配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472の変異体」としては、配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472に対して80%以上、好ましくは90%以上、特に好ましくは95%、96%、97%、98%、99%以上のヌクレオチド同一性を有するポリヌクレオチドが挙げられる。

20

さらに、「配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472の変異体」としては、配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472と相補的なポリヌクレオチドから成るDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが挙げられる。ここで、「ストリンジェントな条件」は、当業者が適宜設定でき、例えば30~50℃で、3~5xSSC、0.1~1%SDS中で1~15時間のハイブリダイゼーション、その後の、例えば0.1~2xSSC、0.1~1%SDS中、室温~70℃での洗浄を含んでいる。ストリンジェント条件の例は、例えばSambrookら、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989に開示されている。

30

有色花関連マーカーの検出は、上記白色花関連マーカーの検出と同様にして行うことができるが、例えば有色花関連マーカーの少なくとも一部に特異的にハイブリダイズ可能なプローブは、有色花関連マーカーを検出することができるだけでなく、該プローブによる検出が認められない場合には、白色花関連マーカーの検出を行うことなく試験当時は白色花であると判定することができるため、好ましい。具体的に、トルコギキョウのDNAサンプルへの上記プローブの結合が検出されなかった場合には、白色遺伝子をホモ型で有しているため、試験当時は白色花であると判定することができる。

40

一方、トルコギキョウのDNAサンプルへの上記プローブの結合が検出された場合には、有色花遺伝子をホモ型又はヘテロ型で有しているため、試験当時は有色花であると判定することができる。なおこの場合には、上述した白色花関連マーカーの検出と組合せてANS遺伝子の遺伝子型を決定することにより、自殖により白色花を生じるトルコギキョウを選別することができる。

上記遺伝子型の決定は、上記の通り白色花関連マーカー及び有色花関連マーカーを個々に検出することによって行ってもよいが、配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472(94ヌクレオチド)を挟む領域を増幅することができるプライマーセットを用いたPCR増幅と、その後の電気泳動により、簡便に行うことができる。上記の通り、有色花遺伝子と白色花遺伝子のエクソン配列は

50

、前記94ヌクレオチドの有無を除いて約98%の配列同一性を有するため、配列番号1のヌクレオチド2366~2459に隣接する5'側配列と3'側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマーと逆方向プライマーの多くは、配列番号2のこれに相当する領域とも特異的にアニーリングすることができる。同様に、配列番号19のヌクレオチド2379~2472に隣接する5'側配列と3'側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマーと逆方向プライマーの多くは、配列番号20のこれに相当する領域とも特異的にアニーリングすることができる。したがって、上記正方向プライマーと逆方向プライマーからなるプライマーセットを用いたトルコギキョウのDNAサンプルのPCR増幅は、ANS遺伝子がヘテロ型である場合に、前記94ヌクレオチドだけ長さの異なる2種類の増幅産物を生じさせることができる。この2種類の増幅産物は、電気泳動(例えばアガロースゲル)によって視覚的に識別可能であるため、白色花関連マーカの検出と、それに基づく遺伝子型の決定とを同時に行うことができる。すなわち、上記電気泳動によって長さの異なる2本のバンドが検出された場合には、白色花関連マーカをヘテロで有しているため、試験当代は有色花であるが、自殖により白色花を生じるものであると判定することができる。一方、1本のバンドが検出された場合には、白色花関連マーカをホモ型で有するものであるか増幅産物の長さに基づいて判定し、試験当代が有色花であるか又は白色花であるかを判定することができる。

10

上記プライマーセットの例として、配列番号3に示す正方向プライマーと配列番号4に示す逆方向プライマーとからなるプライマーセットを挙げることができるが、これに限定されるものではなく、例えば本願明細書に添付の図2及び8の配列アライメントに基づいて、当業者は適宜適切なプライマーセットを構築することができる。

20

上記本発明の方法により、従来は試験当代で選別することができなかった、潜在的に白色花系統を生じる有色花系統の選別も、当代個体の花形成前に簡便に行うことができ、育種規模のコンパクト化のみならず育種年限の短縮も可能になる。

本発明はさらに、白色花を生じるトルコギキョウを選別するためのキットを包含する。本発明に係るキットは、少なくとも白色花関連マーカ又は有色花関連マーカのいずれかを特異的に検出するための構成を含んでいる。そのような構成の例として、これに限定されるものではないが、以下に示す核酸プローブを挙げることができる：

(i) 配列番号2若しくは20に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列を有する核酸プローブ；及びストリンジェントな条件下で配列番号2若しくは20に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列とハイブリダイズするが配列番号1及び19に示すヌクレオチド配列並びにその相補的配列とハイブリダイズしない、15塩基以上の長さを有する核酸プローブ、からなる群より選択される少なくとも1つの白色花関連マーカを検出するための核酸プローブ

30

(ii) 配列番号1若しくは19に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列を有する核酸プローブ；ストリンジェントな条件下で配列番号1若しくは19に示すヌクレオチド配列又はその相補的配列とハイブリダイズするが配列番号2及び20に示すヌクレオチド配列並びにその相補的配列とハイブリダイズしない、15塩基以上の長さを有する核酸プローブ；及び配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズ可能であり、かつ15塩基以上の長さを有する核酸プローブ、からなる群より選択される少なくとも1つの有色花関連マーカを検出するための核酸プローブ。

40

上記核酸プローブのサイズは、20~90塩基、好ましくは30~70塩基、例えば40~60塩基の長さである。また上記核酸プローブは、蛍光ラベル化剤、放射性同位元素などのラベル化剤によって標識されていることが好ましい。そのような蛍光ラベル化剤、放射性同位元素として、これに限定されるものではないが、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、及びそれらの誘導体、Cyダイ、³²P並びに³⁵Sなどが挙げられる。

本発明に係るキットは、好ましくは、白色花関連マーカ及び有色花関連マーカの双方を特異的に検出するための構成を含んでいる。この場合、有色花関連マーカの検出と白色花関連マーカの検出とを区別できるように、白色花関連マーカ用の核酸プローブ

50

の標識と有色花関連マーカー用の核酸プローブの標識とが異なることが好ましい。

本発明に係るキットは、最も好ましくは、トルコギキョウのANS遺伝子の遺伝子型を判定することができる構成を含むものであり、そのような構成の例として、これに限定されるものではないが、配列番号1のヌクレオチド2366~2459又は配列番号19のヌクレオチド2379~2472に隣接する5'側配列と3'側配列に特異的にアニーリングすることができる正方向プライマー及び逆方向プライマーからなるプライマーセットが挙げられる。

また上記プライマーセットの具体例として、配列番号3に示す正方向プライマーと配列番号4に示す逆方向プライマーとからなるプライマーセットを挙げることができる。

以下、本発明の一例を実施例として詳細に説明するが、本発明はこの実施例のみに限定されるものではない。

【実施例1】

【0008】

アントシアニン生合成に関与する遺伝子群の有色花品種及び白色花品種間での発現の比較

RNA抽出は、Plant Total RNA Extraction Miniprep System (VIOGENE)を使用し、100mgの花弁から行った。抽出後のDNA除去のために、deoxyribonuclease、amplification grade (Invitrogen)を使用した。cDNA合成にはSuperScript™ II First-Strand Synthesis System (Invitrogen)を使用した。いずれも製品に添付されたプロトコールに従って実験を行った。

RT-PCRのプライマーは非特許文献1に報告されている各遺伝子の配列を参考に設計した以下のようなものである：CHS用プライマー、5'-AGAGGTGAGGAAGGGCTCAAAG-3' (配列番号5)及び5'-CGAGACACTGTGTAGAACCACTG-3' (配列番号6)；CHI用プライマー、5'-TTCCTCCACTCCTTCCCTTT-3' (配列番号7)及び5'-ATTCGGGTGCCAAACTCTT-3' (配列番号8)；F3H用プライマー、5'-TGGCTCCATCTACACTAACAGC-3' (配列番号9)及び5'-GATCTCCTCAATAGGCTTGCTC-3' (配列番号10)；DFR用プライマー、5'-CCCTGAAAGCCTGTAAGAGC-3' (配列番号11)及び5'-TACGTGTCCTTGCCATGTTC-3' (配列番号12)；ANS用プライマー、5'-CCCCAGAGTAGAAAGCTTGG-3' (配列番号13)及び5'-TCCTGAAGAGCTTGTGCTTG-3' (配列番号14)；7GT用プライマー、5'-AACCTTGSTCCATGGGTCAA-3' (配列番号15)及び5'-TGCTCAGCAAACATAGGCCACGTC-3' (配列番号16)。

RT-PCR反応は以下の条件で行った。まず反応液は合計を20µl [1×Ex Taq Buffer、0.2mM dNTPs、0.5units TaKaRa Ex Taq™ HS、0.5µM forward、reverse各プライマー (各10µM)、約25ngの一本鎖cDNA]とし、94℃で1分間熱変性させた後、さらに熱変性後(94℃ 30秒)、アニーリング(60℃ 30秒)、伸長反応(72℃ 1.5分)を25サイクルおよび30サイクルで繰り返し行い、72℃で7分間反応させた後、最後に4℃まで冷却させた。PCR増幅産物は0.8%アガロースゲル(AMRESCO)で電気泳動(50V、1×TAE、60分)し、エチジウムブロマイド(EtBr)溶液(100倍EtBr 4µl、TAE Buffer 400ml)で30分間染色した後、ゲルをUV照射下で観察した。

図1から分かるとおり、白色花品種KSではアントシアニン合成酵素(ANS)遺伝子の増幅が認められないことが分かった。

【実施例2】

【0009】

アントシアニン合成酵素(ANS)遺伝子配列の有色花品種及び白色花品種間での比較

ゲノムDNA抽出は、Plant Genomic DNA Extraction Miniprep Systemに添付されているプロトコールに従って使用し、100 mgの若い葉から行った。抽出したゲノムDNAを対象に、ANS遺伝子の全長ORFを含むプライマー（5' - ATTCAGCAAAAGTAAAGATCAAAGCA - 3'（配列番号17）及び5' - CATGCATATTACATGGTTGAATCC - 3'（配列番号18））を用いてゲノミックPCRを行った。反応液の合計を50 µl [1 × Buffer for KOD-plus-ver.2、0.2 mM dNTPs、1.5 mM MgSO₄、1.0 units KOD-plus-、0.3 mM each forward、reverse各プライマー（各10 µM）、約25 ng 鋳型DNA]とし、94 で2分間熱変性させた後、さらに熱変性後（94 15秒）、アニーリング（63 30秒）、伸長反応（68 3分）を35サイクル繰り返し行い、68 で4分間反応させた後、最後に4 まで冷却させた。PCR増幅産物は1%アガロースゲルで電気泳動（50 V 1 × TAE、60分）し、エチジウムブロマイド（EtBr）溶液（100倍EtBr 4 µl、TAE Buffer 400 ml）で30分間染色した後、ゲルをUV照射下で観察し、目的の遺伝子が増えていることを確認した。

10

その後、泳動に使用しなかった残りのPCR増幅産物からDNAを精製した。精製はPCR-M Clean Up System（VIOGENE）を用い、添付されているプロトコールに従って行った。シーケンス解析は鹿児島大学学内共同研究施設である遺伝子実験施設のシーケンスサービスを利用し、施設の推奨する方法に従って行った。塩基配列およびアミノ酸配列のマルチプルアライメントにはGENETYX version 8 program（GENETYX Co.）を用いた。

20

【実施例3】

【0010】

白色花品種アントシアニン合成酵素（ANS）遺伝子中の94ヌクレオチドの欠失を利用した、白色花品種と有色花品種の識別

トルコギキョウの有色花系統AM（図3）と白色花系統KS（図4）を交配し、有色花の後代を得た（図5）。この後代を自殖させ種子を収穫し、その種子を播種して植物体になるまで育成したところ有色花23個体、白色花8個体が得られた。これは、メンデルの法則の3：1に分離比に適合している。

これらの後代のうち有色花10個体、白色花6個体からDNAを抽出した。DNA抽出は、バイオジーン社のプラントゲノムミニプレップシステムを用いてマニュアルに従って行った。

30

次に図2及び8に示すANS遺伝子の配列アライメントに基づいて、94塩基欠失部分を挟み込む形で増幅可能なプライマー（5' - TGGATCACAGCCAAATGTGT - 3'（配列番号3）及び5' - TGGTTGAATCCATGTCTTTTG - 3'（配列番号4）のDNA配列を有するオリゴヌクレオチド）を設計した。

PCR反応はGeneAmp9700システム（ABI社）を使用して行った。反応液20 µl中には10 ng DNA、0.5 units TAKARA EX Taq（タカラバイオ社）、0.2 mM dNTP、0.5 µM、2 µl 10 × EX Taqバッファが含まれる。PCR条件は、95 で10秒間のディネーター、62 で30秒間のアニール、72 で30秒間の伸長反応を1サイクルとし、30サイクル反応させた。

40

反応後、2%アガロースゲル（バイオジーン社）上の電気泳動によりバンドの確認を行った。

その結果を図6に示す。図6からわかるように、有色花のトルコギキョウでは、491 bpのバンドが必ずあり、白色花のトルコギキョウでは397 bpの短いバンドしか検出できない。

また、トルコギキョウの他の白色花品種6種（ロジーナグリーン、キュートグリーン、キングオブイエロー、あすかタイプホワイト、スピカホワイト、つくしの新雪）についても上記と同様の検出を行った（図7）。図7に示すように、他のトルコギキョウの白色花の品種でも397 bpの短いバンドしか検出できなかった。また、有色花の品種は必ず4

50

9 1 b p のバンドを有していた。

以上の結果、本発明では白色花遺伝子を持つトルコギキョウを完全に識別できる方法が確立された。

【産業上の利用可能性】

【0011】

本発明によれば、白色花のトルコギキョウに関連する新規な遺伝子マーカー、及び該マーカーを利用した白色花を生じるトルコギキョウの選別方法が提供される。遺伝子マーカーを利用することにより、開花前若しくは花形成前を含むあらゆる時点で白色花を生じる系統の選別が可能であるため、選別に要する時間を大幅に短縮することができる。また所望でない花色品種を育成する不都合を回避することができるため、育成に必要な畑面積はより少なく済み、農薬、肥料などの農業資材の節約にもなる。

10

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

[配列表]

SEQUENCE LISTING

<110> Kagoshima University
Japan Science and Technology Agency

<120> A method for selecting *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn having white flowers

<130> PH-4386-PCT 10

<150> JP 2009-139477
<151> 2009-06-10

<160> 20

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 2474 20
<212> DNA
<213> *Eustoma grandiflorum*

<400> 1
atgggaattc cggttgtccc cagagtagaa agcttggcca gaagcggcac ccaagaaatt 60
ccaaaagaat acgtgaggac taaagaagag ctaacaagca ttgcagatgt ttttgctgaa 120
gagaaaaacg acgagggggcc tcaagtacc c atgattgata taaaagacat cgagtcagaa 180 30
gacatcagtg ttagagaaag gtgtcgtgat gtattgaaca aagctgcaat ggagtgggga 240
gtgatgcacc ttgtcaatca tggatatca agtgatctga ttcgtcgcgt aaagtcgget 300
ggacaagcct tctttgatct tccagttgag gagaaagaaa agtatgcaa tgatcaggct 360
tcagggaatg tccaaggata tggaagcaaa cttgctaata atgcaagtgg gcagctggaa 420
tgggaggact attttttcca ctgcattttc cctgaagaga agcgtgacat gactatttgg 480 40
ccaaagactc cagaggatta catgtaagtc cattatatta gcaagtacca tgtataagtg 540
ttgtttttta tatactttat ctagtcgcac atttctgatg tctaatttgt attattgcgt 600
gtgttttcat gtcttctcta gaatatttca ttagagagag cgtgtttaac atgctcacac 660

cgcgactttt ctttaaactt cattcaaggg atttccaaa accttgctac taggatcatt	720	
tgtacagcat cacggagaca tagatagga tgtagtgac tgagttcaag taggctgggtg	780	
taggtggatg acggtctcag ggtgctgtgt gacaagaatt ttccaactaa attaaagaga	840	
aaatattata gaggggcagt gctgccgca atgttatatg agacggacta ctgagccata	900	
aagaggacat agtcgcagag atgaggatgc tgaggtgaat gtgtggataa tacaaggcta	960	10
gaccggatca gaaatgaggt atttcaggag gctaggggtg gttagtatag cggataagat	1020	
aaggaggagg agactgagat ggtttgggca tgtcaagcgg agacagataa cggcgtctgt	1080	
cagagcagtt gaaagcctct ttgtagaggg gaaaagaagt aaaggcagac ccgaactgac	1140	
ttggaggaa catattaaac atgacctact agatttgac ctgtgtgagg acatgggtcca	1200	
ggataggagc ttatagagac ggaggattaa tgtagcgag gtttaggcag gatatatggg	1260	20
cagcttagaa tatataaagg ggcgtagata ctgctcacc gttaggttga ctttgcaatt	1320	
ttttgtctt tgttttgcat tttttgtcgt gcattatgtg gttatgcagt tacatataga	1380	
gtcggggatc tcgctggaag caaactctct atcctttaag atggaggtat tgtttactg	1440	
cctctcacc ttccagacc aaacgatagc ttttactgtt gttgggatat actgagtatg	1500	
tgttgttgtt gtggctgctg ctacttgcta ctgttgatt taattttcaa ataaaagcca	1560	30
acggttgcaa ggtgcaagga tatccctaca aaggagatga gatcttctaa ccgcctcac	1620	
cttactcca ctgtccaccg ctgcacagt gacagcagag aggatggtga gactagatgt	1680	
gggtgaccct catctagcct caccaccct cctcctgctg ccacgtgtcc ggcggtaggc	1740	
agtagggtga aggtgagggc gatgagagga tcccgcccc cttgaaggta cttgagacaa	1800	
ttgtctcatc tatggattta tagagaaagt cccttatgtt agtcatttga ccagcggata	1860	40
aaagtcaaaa ttgttcgaat tattgcagac catcaacaaa tgagtatgca aagcaattga	1920	
gagcactggc tagcaagatt ctgctgtgt gtctctctgg cctaggatta gaaccaggca	1980	

ggctagaaaa agaagttggt ggcttgaag agctaattct acaaaaagaaa atcaattact 2040
 atccaagtg tccccaacca gaactggctc taggcgtgga ggcacacact gacattagcg 2100
 cgcttacttt catcctccac aatatggttc ctggcttgca attgttctat gaaggcaaat 2160
 ggatcacagc caaatgtgtc ccgaattoga ttatcatgca tntaggtgac accattgaga 2220
 ttetttagca tggcaagtac aaaagtatcc ttcatagagg acttgtgaac aaagagaaag 2280
 taaggatttc ttgggctggt ttctgtgagc caccaaagga gaagatcgtc ctcaagccac 2340
 tacctgagac tgtgtctgaa tccgagccgg ctcggttccc tctctgcacg tttgctgagc 2400
 atatcaagca caagctcttc aggaaaagtg aagaaactaa tgaagataac aattaccaa 2460
 agggtagttc ctag 2474

10

<210> 2
 <211> 2350
 <212> DNA
 <213> *Eustoma grandiflorum*

20

<400> 2
 atgggaattc oggttgtccc cagagtagaa agcttggcca gaagcggcac ccaagaaatt 60
 ccaaaagaat acgtgaggac taaagaagag ctaacaagca ttgcagatgt ttttctgaa 120
 gagaaaaacg acgaggggcc teaagtacc atgattgaca taaaagacat tgattcagaa 180
 gacatcagtg tgagacaaag gtgtcatgat gtattgaaca aagctgcaat ggagtgggga 240
 gtgatgcacc ttgtcaatca tggatatca agtgatctga ttctctcgtt aaagtcggct 300
 ggacaagcct tctttgatct tccagttgag gagaaagaaa agtatgcaa tgatcaggct 360
 tctgggaatg tccaaggata tgggagcaaa cttgctaata atgcaagtgg gcagctggag 420
 tgggaggact attttttoca ttgcatttcc cctgaagaga agcgtgacat gactatttgg 480
 ccaagactc cagaggatta catgtaagtc cattatatta gcaagtacca tgtataggtg 540

30

40

ttgtgttita tatactttat ctagtgcac atttctgatg tctaatttgt attattgcgt	600	
gtgattttca tgtcttctct agaatatttc attagagaga gcgtgtttaa catgctcaca	660	
ccgcgacttt tctttaaatc tcatccaagg gatttcccaa aatcttgctg ctgttggatt	720	
ttccaacagt acctaggatc atttgtacag cagaatgtgg acatagatag aaatgtagtg	780	
catcgagttc aaatatgctg gtgtagatgg agggcggcct cagggtactg tgtgacaata	840	10
atthtccaac taaattaana gaaaaattht atagggtagc agtgccggcc gcaacgttat	900	
atgggacaga ctgthgggcc atsaagagga cacagtgcga gaagatggaa gtggcagaga	960	
tgatgatgct gaggtagatg tgtggacata caaggctaga tccgatcaga aatgaggtat	1020	
ttcaaaagcc taggggggtht agtatagccg ataagataag ggaggggaga ctgagatggt	1080	
ttgggcatgt caagccgtga caaataaccg cgtctgtcag agcagttgaa agcctcttht	1140	20
tagagaggaa aagaagtaaa gthtgaccgc aactgacttg ggaggaacat attaaacatg	1200	
acctactaga thtgcacttg tgtgaggaca tggthtagga taggtactta tgaagaccga	1260	
ggattaaggt tagccaggtt taggcaggat ataggggcag cthtagaatat ataaaccggc	1320	
gtagatactc gctcactgtht agthtgactt tgtatththt tgtctthtgc thgcattatt	1380	
tgtcgtgcat tatgtggcta tgcaggtaaa tacagagtcg ggggtctcgc tggaaagaaa	1440	30
ctctctatcc thtgagatgg agthattgtht tgcctgtcta tcacactctc cagactctaa	1500	
cgatagcttht tgctgthgtht gtgatatact gggthattgt tgtthgthgat gctgthgatg	1560	
cttgcaactg thggatthta ththcaacta aaagccaacc gthgcaaggt gcaaggtctt	1620	
gggatatccc tagaatgcac thgagagaaa tgtctcatct atggacttht agagaaagtc	1680	
acttatacca gthcatttgac caaccgataa aagthcaaat tgtgtgaatt attgcagacc	1740	40
atcaacaaat gagthtgcaa agcaattgag agcctggct agcaagattht thgctgtgtht	1800	
gtctcttgcc ctaggattag aaccaggcag gctagaaaaa gaagthggtg gctggaaga	1860	

gctaattcta caaaagaaaa tcaattacta tcccaagtgt cccaaccag aactggctct	1920	
aggcgtggag gcacacactg acattagegc gcttactttc atcctccaca acatggttcc	1980	
tggcttgcaa ttgttctatg aaggcaaatg gatcacagcc aatgtgtcc cgaattcgat	2040	
tatcatgcat gtaggtgaca ccattgagat tcttagcaat ggcaagtaca aaagtatcct	2100	
tcatagagga ctigtgaaca aagagaaagt aaggatttct tgggctgttt tctgtgagcc	2160	10
accaaaggag aagatcgtcc tcaagccact acctgagact ctgtctgaat accaaagggt	2220	
agttcctaga tttgttggg tgtgtttgag tcaaaactct ctttatactt ggtccagaaa	2280	
cattgttget gatgtttttc gttttatfff atttaataata tataataact acattgtcaa	2340	
ttatctttaa	2350	
		20
<210> 3		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 3		
tggatcacag ccaaatgtgt	20	30
<210> 4		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial		
<220>		
<223> primer		
<400> 4		40
tggttgaatc catgtctttt g	21	
<210> 5		

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 5
 agaggtgaga agggctcaaa g . 21 10

<210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 6
 cgagacactg tgtagaacca ctg 23 20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 7
 ttctccact cttcccttt 20 30

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

40

<400> 8			
attcgggttg ccaaactctt		20	
<210> 9			
<211> 22			
<212> DNA			
<213> Artificial			10
<220>			
<223> primer			
<400> 9			
tggctccatc tacactaaca gc		22	
<210> 10			
<211> 22			
<212> DNA			20
<213> Artificial			
<220>			
<223> primer			
<400> 10			
gatctcctca ataggcttgc tc		22	
<210> 11			30
<211> 20			
<212> DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> primer			
<400> 11			
ccctgaaagc ctgtaagagc		20	40
<210> 12			

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 12
 tacgtgtcct tgccatgttc 20 10

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer 20

<400> 13
 ccccagagta gaaagcttgg 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer 30

<400> 14
 tcctgaagag cttgtgcttg 20

<210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer 40

<400> 15			
aaaccttgst ccatgggtca a		21	
<210> 16			
<211> 24			
<212> DNA			
<213> Artificial			10
<220>			
<223> primer			
<400> 16			
tgctcagcaa acataggcca cgtc		24	
<210> 17			
<211> 26			
<212> DNA			20
<213> Artificial			
<220>			
<223> primer			
<400> 17			
attcagcaaa agtaaagatc aaagca		26	
<210> 18			
<211> 24			
<212> DNA			
<213> Artificial			30
<220>			
<223> primer			
<400> 18			
catgcatatt acatggttga atcc		24	40
<210> 19			
<211> 2491			

<212> DNA

<213> *Eustoma grandiflorum*

<400> 19

atgggaattc cggttgtccc cagagtagaa agcttggcca gaagcggcac ccaagaaatt	60	
ccaaaagaat acgtgaggac taaagaagag ctaacaagca ttgcagatgt ttttctgaa	120	
gagaaaaacg acgaggggcc tcaagtacc atgattgata taaaagacat cgagtcagaa	180	10
gacatcagtg ttagagaaag gtgtcgtgat gtattgaaca aagctgcaat ggagtgggga	240	
gtgatgcacc ttgtcaatca tggatatca agtgatctga ttcgtcgcgt aaagtcggct	300	
ggacaagcct tctttgatct tccagttgag gagaaagaaa agtatgcaa tgatcagget	360	
tcagggaatg tccaaggata tggaagcaaa cttgctaata atgcaagtgg gcagctggaa	420	
tgggaggact attttttcca ctgcattttc cctgaagaga agcgtgacat gactatttgg	480	20
ccaaagactc cagaggatta catgtaagtc cattatatta gcaagtacca tgtataagtg	540	
ttgttttita tatactttat ctagtcgcac atttctgatg tctaatttgt attattgogt	600	
gtgttttcat gtcttcteta gaatatttca ttagagagag cgtgtttaac atgctcacac	660	
cgcgactttt ctttaaatct cattcaaggg atttcccaaa accttgctac taggatcatt	720	
tgtacagcat cacggagaca tagatagga tgtagtgcac tgagtcaag taggctggtg	780	30
taggtggatg acggtctcag ggtgctgtgt gacaagaatt ttccaactaa attaaagaga	840	
aaattttata gagtggcagt gctgccggca atgttatatg agacggacta ctgagccata	900	
aagaggacat agtcgcagag atgaggatgc gcagagatga ggatgctgag gtgaatgtgt	960	
ggataataca aggctagacc ggatcagaaa tgaggatatt caggaggcta ggggtgggta	1020	
gtatagcgga taagataagg gaggggagac tgagatggtt tgggcatgtc aagcggagac	1080	40
agataacggc gtctgtcaga gcagttgaaa gcctctttgt agaggggaaa agaagtaaag	1140	
gcagaccgga actgacttgg gaggaacata ttaaactga cctactagat ttgcacctgt	1200	

gtgaggacat ggtccaggat aggagcttat agagacggag gattaatgtt agcgaggttt	1260	
aggcaggata tatgggcagc ttagaatata taaagggcg tagatactcg ctcaccgtta	1320	
ggttgacttt gcaatTTTTT ttgtctttgt tttgcattat ttgtcgtgca ttatgtggtt	1380	
atgcagttac atatagagtc ggggatctcg ctggaagcaa actctctatc ctttaagatg	1440	
gaggtattgt ttcactgcct ctcacccttc ccagaccaa cgatagcttt tactgttggtt	1500	10
gggatatact gagtatgtgt tgttgttggt gctgctgcta cttgctactg ttggatttaa	1560	
TTTTCAAATA aaagccaacg gttcaaggt gcaaggatat ccctacaag gagatgagat	1620	
cttctaaccg ccctcacctt cactccactg tccaccgctc gacacgtgac agcagagagg	1680	
atggtgagac tagatgtggg tgacccteat ctagectcac caccctcct cctgctgcca	1740	
cgtgtccggc ggtaggcagt aggtgaagg tgaggcgat gagaggatcc cgteccccctt	1800	20
gaaggtactt gagacaattg tctcatctat ggatttatag agaaagtccc ttatgttagt	1860	
catttgacca gcgataaaa gtcaaaattg ttcgaattat tgcagacat caacaaatga	1920	
gatatcaaag caattgagag cactggctag caagattctt gctgtgttgt ctcttggcct	1980	
aggattagaa ccaggcaggc tagaaaaaga agttgggtgc ttggaagage taattctaca	2040	
aaagaaaatc aattactatc ccaagtgtcc ccaaccagaa ctggctctag gcgtggaggc	2100	30
acacactgac attagcgcgc ttactttcat cctccacaat atggttctg gcttgcaatt	2160	
gttctatgaa ggcaaatgga tcacagccaa atgtgtcccg aattcgatta teatgcatgt	2220	
aggtgacacc attgagattc ttagcaatgg caagtacaaa agtatcctc atagaggact	2280	
tgtgaacaaa gagaaagtaa ggatttcttg ggetgttttc tgtgagccac caaaggagaa	2340	
gatcgtctc aagccaactac ctgagaactg gtctgaatcc gagccggctc ggttccctcc	2400	40
tgcacgttt gctgagcata tcaagcacia gctcttcagg aaaagtgaag aaactaatga	2460	
agataacaat ttaccaaagg gtagttccta g	2491	

<210> 20
 <211> 2350
 <212> DNA
 <213> *Eustoma grandiflorum*

<400> 20
 atgggaatte cggttgtecc cagagtagaa agcttgcca gaagcggcac ccaagaaatt 60
 ccaaaagaat acgtgaggac taaagaagag ctaacaagca ttgcagatgt ttttgctgaa 120 10
 gagaaaaacg acgaggggcc tcaagtaccc atgattgaca taaaagacat tgattcagaa 180
 gacatcagtg tgagacaaag gtgtcatgat gtattgaaca aagctgcaat ggagtgggga 240
 gtgatgcacc ttgtcaatca tggatatca agtgatectga ttcgtcgcgt aaagtcggt 300
 ggacaagcct tctttgatct tccagttgag gaaaagaaa agtatgcaa tgatcaggt 360
 tctgggaatg tccaaggata tgggagcaaa cttgctaata atgcaagtgg gcagctggag 420 20
 tgggaggact atttttcca ttgcattttc cctgaagaga agcgtgacat gactatttgg 480
 ccaaagactc cagaggatta catgtaagtc cattatatta gcaagtacca tgtataggtg 540
 ttgtgtttta tatactttat ctagtcgcac atttetgatg tetaatttgt attattgcgt 600
 gtgattttca tgtcttctct agaatatttc attagagaga gcgtgtttaa catgctcaca 660
 cgcgaacttt tctttaaatc tcatccaagg gatttcccaa aatcttgcgt ctgttggatt 720 30
 ttccaacagt acctaggatc atttgtacag cagaatgtgg acatagatag aaatgtagtg 780
 catcgagttc aaatatgctg gtgtagatgg agggcggcct cagggtactg tgtgacaata 840
 attttccaac taaattaaaa gaaaaatfff atagggtagc agtgcggccg gcaacgttat 900
 atgggacaga ctgttgggcc atgaagagga cacagtcgca gaagatggaa gtggcagaga 960
 tgatgatgct gaggtagatg tgtggacata caaggctaga tcggatcaga aatgaggtat 1020 40
 ttcaaaagge taggggggtt agtatagcgg ataagataag ggaggggaga ctgagatggt 1080
 ttggcatgt caagcggatg caaataacgg cgtctgtcag agcagttgaa agcctctttg 1140

tagagaggaa aagaagtaaa ggttgaccog aactgacttg ggaggaacat attaaacatg	1200	
acctactaga tttgcacttg tgtgaggaca tggcttagga taggtactta tgaagacgga	1260	
ggattaaggt tagcgagggt taggcaggat ataggggcag cttagaatat ataaacgggc	1320	
gtagatactc gctcactggt aggttgactt tgtatTTTT tgtctttgtc ttgcattatt	1380	
tgtcgtgcat tatgtggcta tgcaggatac tacagagtgc ggggtctcgc tgaagaaaa	1440	10
ctctctatcc tttgagatgg aggtattggt tgccctgtcta tcacactctc cagactetaa	1500	
cgatagcttt tgctgttgtt gtgatatact gggatatgtt tgttgttgat gctgttgatg	1560	
cttgcaactg ttgatttaa ttttcaacta aaagccaacg gttgcaaggt gcaaggtctt	1620	
gggatatccc tagaatgcac ttgagagaaa tgtctcatct atggacttat agagaaagtc	1680	
acttatacca gtcatttgac caacggataa aagtcaaaat tgtgtgaatt attgcagacc	1740	20
atcaacaaat gagtatgcaa agcaattgag agccctggct agcaagatc ttgctgtggt	1800	
gtctcttggc ctaggattag aaccaggcag gctagaaaaa gaagttgggt gcctggaaga	1860	
gctaattcta caaaagaaaa tcaattaacta tccaagtgt cccaaccag aactggctct	1920	
aggcgtggag gcacacactg acattagcgc gcttacttcc atcctccaca acatggttcc	1980	
tgctttgcaa ttgtctatg aaggcaaatg gatcacagcc aaatgtgtcc cgaattcgat	2040	30
tatcatgcat gtaggtgaca ccattgagat tcttagcaat ggcaagtaca aaagtatcct	2100	
tcatagagga cttgtgaaca aagagaaagt aaggatttct tgggctgttt tctgtgagcc	2160	
accaaaggag aagatcgtcc tcaagccact acctgagact ctgtctgaat accaaagggt	2220	
agttcctaga tttgttgtt tgtgtttgag tcaaaactct ctttatactt ggtccagaaa	2280	
cattgttget gatgttttc gttttatttt atttaataata tataataact acattgtcaa	2340	40
ttatctttaa	2350	

【 2 】

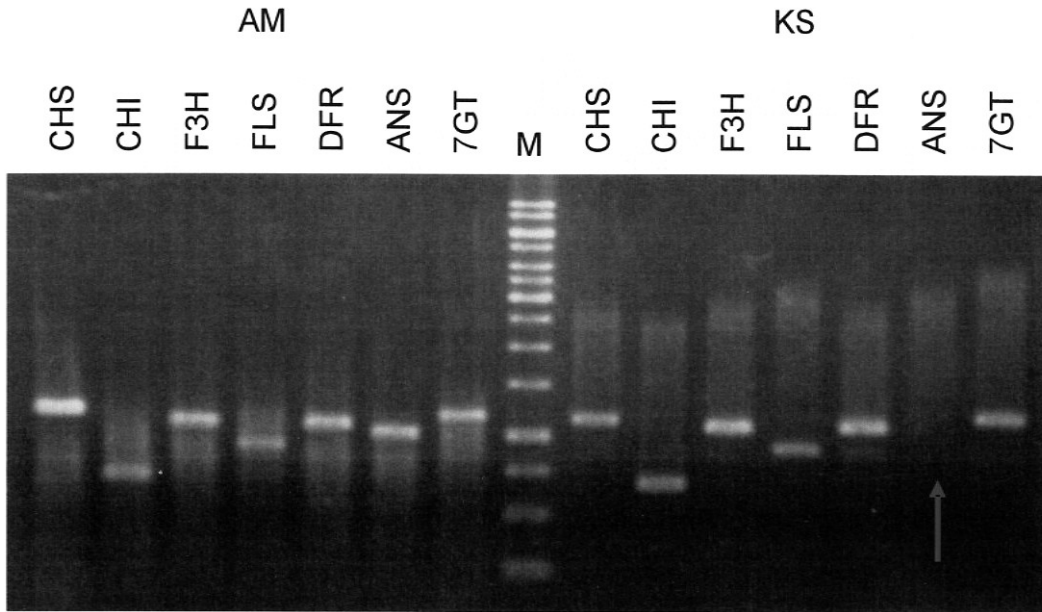
140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

【 8 】

1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000

【 図 1 】

図 1



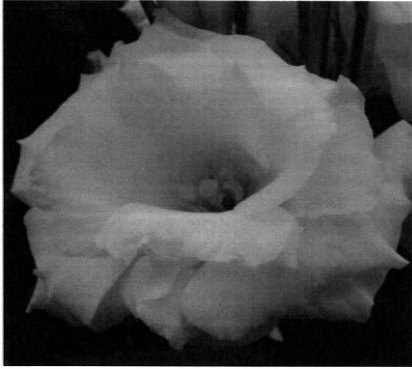
【図 3】

図 3



【 図 4 】

図 4



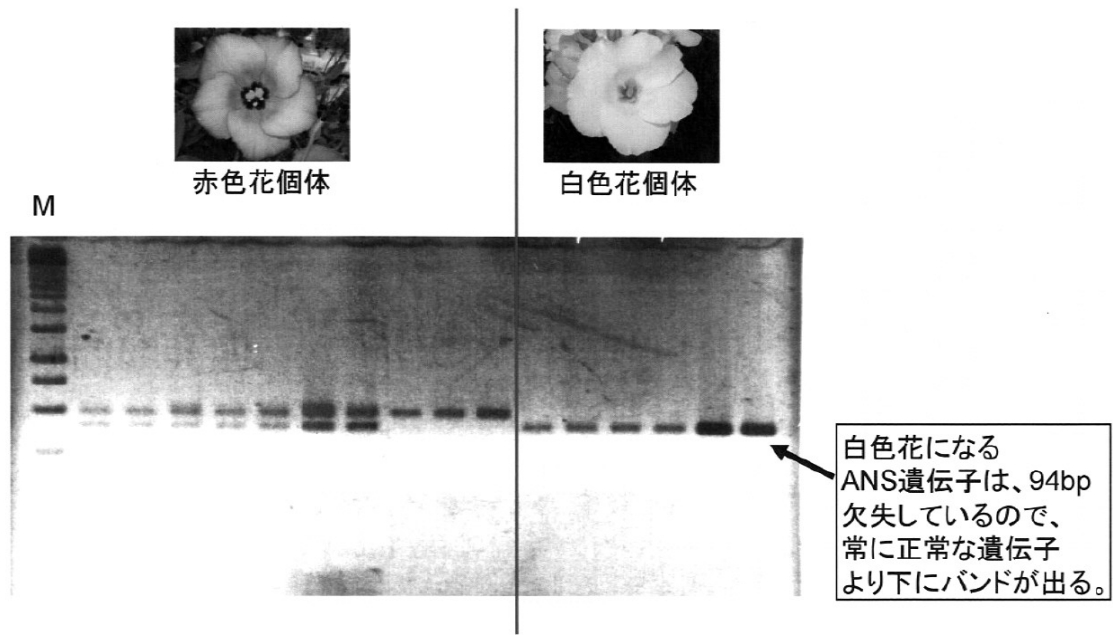
【図5】

図5



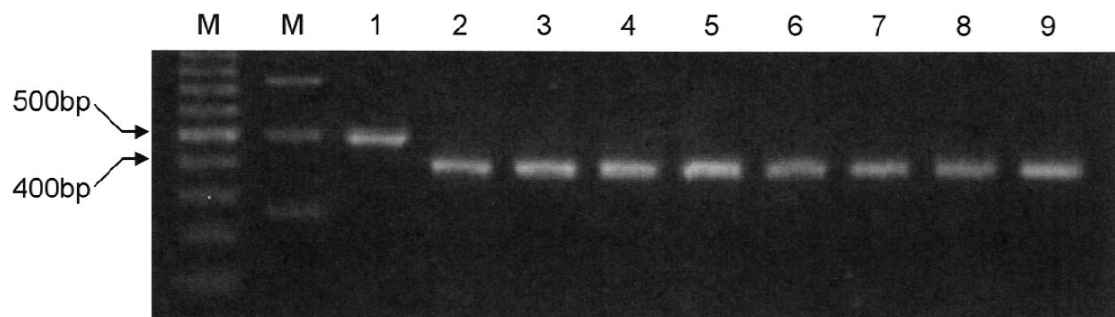
【図6】

図6



【図7】

図7



フロントページの続き

(72)発明者 清水 圭一

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内

(72)発明者 ウレド ラバ イセルモ

宮崎県宮崎市橘通東1丁目7番4号 独立行政法人科学技術振興機構 JSTイノベーションサテライト宮崎内

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献 特開2004-236516(JP,A)

国際公開第2004/103065(WO,A1)

特開2007-325533(JP,A)

NAKATSUKA, T., et al., , Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants. , Plant Science, 2005, Vol.169, pp.949-958

Breeding Science, 2006, Vol.56, pp.389-397

園芸学会雑誌, 2002, Vol.71, Suppl.2, p.407

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/68

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

PubMed