(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.			ＦＩ		
Ｃ１２Ｑ	*1/68*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/68	ＺＮＡＡ
Ｃ１２Ｎ	*15/09*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ
Ａ０１Ｇ	*1/00*	*(2006.01)*	Ａ０１Ｇ	1/00	３０１Ｚ

請求項の数 5　(全 31 頁)

(21)出願番号　特願2011-518602(P2011-518602)
(86)(22)出願日　平成22年6月10日(2010.6.10)
(86)国際出願番号　PCT/JP2010/060256
(87)国際公開番号　WO2010/143749
(87)国際公開日　平成22年12月16日(2010.12.16)
審査請求日　平成24年12月6日(2012.12.6)
(31)優先権主張番号　特願2009-139477(P2009-139477)
(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)

(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
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(74)代理人　100169579
弁理士　村林　望
(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
(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

最終頁に続く

(54)【発明の名称】白色花を生じるトルコギキョウ［Ｅｕｓｔｏｍａｇｒａｎｄｉｆｌｏｒｕｍ（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。

【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。

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】

【０００３】

【特許文献１】国際公開ＷＯ２００４／１０３０６５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.

【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を見出し、該遺伝子マーカーに基づいて、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

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）。

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。

（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。

（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。

（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、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

めの核酸プローブ

（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、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

（１１）前記核酸プローブは標識化されている、上記（１０）記載のキット。

（１２）前記（ｉ）及び（ｉｉ）を含むことを特徴とする、上記（１０）記載のキット。

（１３）前記（ｉ）の核酸プローブと、前記（ｉｉ）の核酸プローブとが異なる標識を有する、上記（１２）記載のキット。

（１４）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。

（１５）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（１４）記載のキット。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願２００９－１３９４７７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】

【０００６】

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ＡＭ及び白色花系統ＫＳ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：ＣＨＳ、カルコン合成酵素；ＣＨＩ、カルコンイソメラーゼ；Ｆ３Ｈ、フラバノン３－水酸化酵素；ＦＬＳ、フラボノール合成酵素；ＤＦＲ、ジヒドロフラボノール４－還元酵素；ＡＮＳ、アントシアニン合成酵素；７ＧＴ、アントシアニジン７－糖転移酵素；Ｍ、ＤＮＡサイズマーカー。

図２は、有色花系統ＡＭ（配列番号１）及び白色花系統ＫＳ（配列番号２）間でのＡＮＳ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９４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ＡＭの花を示す。

図４は、トルコギキョウの白色花系統ＫＳの花を示す。

図５は、トルコギキョウの有色花系統ＡＭとトルコギキョウの白色花系統ＫＳ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ＡＭとトルコギキョウの白色花系統ＫＳの交雑個体の自殖後代の分離した集団のＡＮＳ遺伝子のＰＣＲの結果を示す。

図７は、トルコギキョウの栽培品種のＡＮＳ遺伝子のＰＣＲ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、ＡＭ（有色花）；２、ＫＳ；３、ＡＷ；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）。

図８は、有色花系統ＡＭ（配列番号１９）及び白色花系統ＫＳ（配列番号２０）間でのＡＮＳ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９４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】

【０００７】

本発明は、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（以下、本発明の方法という）に関する。

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（ＡＮＳ）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ー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ＡＮＳを発現するＡＮＳ遺伝子にはない、花組織で正常に発現されないＡＮＳ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ＡＮＳ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ＡＮＳ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、３～５ｘＳＳＣ、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　Ｍａｎｎｕａｌ、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、ＡＮＳ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

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 Ｍａｎｎｕａｌ、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て済み、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％Ｓ

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 Ｍａｎｎｕａｌ、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。

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。

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 Ｍａｎｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、１９８９に開示されている。

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代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、試験当代は白色花であると判定することができる。

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、試験当代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

、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、白色花関連マーカーの検出と、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、白色花関連マーカー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、白色花関連マーカー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。

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。

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ー又は有色花関連マーカー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ーを検出するための核酸プローブ

（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ーを検出するための核酸プローブ。

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、^{32}Ｐ並びに^{35}Ｓなどが挙げられる。

本発明に係るキットは、好ましくは、白色花関連マーカー及び有色花関連マーカー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、有色花関連マーカーの検出と白色花関連マーカーの検出とを区別できるように、白色花関連マーカー用の核酸プローブ

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ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔＴＭ　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’－ＡＧＡＧＧＴＧＡＧＡＡＧＧＧＣＴＣＡＡＡＧ－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’－ＡＴＴＣＧＧＧＴＴＧＣＣＡＡＡＣＴＣＴＴ－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’－ＡＡＡＣＣＴＴＧＳＴＣＣＡＴＧＧＧＴＣＡＡ－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。先ず反応液は合計を２０μｌ［１×Ｅｘ　Ｔａｑ　Ｂｕｆｆｅｒ、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、０．５ｕｎｉｔｓ　ＴａＫａＲａ　Ｅｘ　ＴａｑＴＭ　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、１００ｍｇ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５０μｌ［１×Ｂｕｆｆｅｒ　ｆｏｒ　ＫＯＤ－ｐｌｕｓ－ｖｅｒ．２、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰｓ、１．５ｍＭ　ＭｇＳＯ$_4$、１．０ｕｎｉｔｓ　ＫＯＤ－ｐｌｕｓ－、０．３ｍＭ　ｅａｃｈ　ｆｏｒｗａｒｄ、ｒｅｖｅｒｓｅ各プライマー（各１０μＭ）、約２５ｎｇ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（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、目的の遺伝子が増えていることを確認した。

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。シークエ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クエ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。

【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。

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２０μｌ中には１０ｎｇ　ＤＮＡ、０．５ｕｎｉｔｓ　ＴＡＫＡＲＡ　ＥＸＴａｑ（タカラバイオ社）、０．２ｍＭ　ｄＮＴＰ、０．５μＭ、２μｌ　１０ｘＥＸＴａｑバッファーが含まれる。ＰＣＲ条件は、９５℃で１０秒間のディネーチャー、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。

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、４９１ｂｐのバンドが必ずあり、白色花のトルコギキョウでは３９７ｂｐ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３９７ｂｐ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

９１ｂｐ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て済み、農薬、肥料などの農業資材の節約にもなる。

　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

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

<160> 20

<170> PatentIn version 3.4

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

<400> 1
atgggaattc cggttgtccc cagagtagaa agcttggcca gaagcggcac ccaagaaatt 60

ccaaaagaat acgtgaggac taaagaagag ctaacaagca ttgcagatgt ttttgctgaa 120

gagaaaaacg acgaggggcc tcaagtaccc atgattgata taaaagacat cgagtcagaa 180

gacatcagtg ttagagaaag gtgtcgtgat gtattgaaca aagctgcaat ggagtgggga 240

gtgatgcacc ttgtcaatca tggtatatca agtgatctga ttcgtcgcgt aaagtcggct 300

ggacaagcct tctttgatct tccagttgag gagaaagaaa agtatgccaa tgatcaggct 360

tcagggaatg tccaaggata tggaagcaaa cttgctaata atgcaagtgg gcagctggaa 420

tgggaggact attttttcca ctgcattttc cctgaagaga agcgtgacat gactatttgg 480

ccaaagactc cagaggatta catgtaagtc cattatatta gcaagtacca tgtataagtg 540

ttgtttttta tatactttat ctagtcgcac atttctgatg tctaatttgt attattgcgt 600

gtgttttcat gtcttctcta gaatatttca ttagagagag cgtgtttaac atgctcacac 660 cgcgactttt ctttaaatct cattcaaggg atttcccaaa accttgctac taggatcatt 720

tgtacagcat cacggagaca tagataggga tgtagtgcac tgagttcaag taggctggtg 780

taggtggatg acggtctcag ggtgctgtgt gacaagaatt ttccaactaa attaaagaga 840

aaattttata gagtggcagt gctgccggca atgttatatg agacggacta ctgagccata 900

aagaggacat agtcgcagag atgaggatgc tgaggtgaat gtgtggataa tacaaggcta 960

gaccggatca gaaatgaggt atttcaggag gctaggggtg gttagtatag cggataagat 1020

aagggagggg agactgagat ggtttgggca tgtcaagcgg agacagataa cggcgtctgt 1080

cagagcagtt gaaagcctct ttgtagaggg gaaaagaagt aaaggcagac ccgaactgac 1140

ttgggaggaa catattaaac atgacctact agatttgcac ctgtgtgagg acatggtcca 1200

ggataggagc ttatagagac ggaggattaa tgttagcgag gtttaggcag gatatatggg 1260

cagcttagaa tatataaagg ggcgtagata ctcgctcacc gttaggttga ctttgcaatt 1320

tttttgtctt tgttttgcat tatttgtcgt gcattatgtg gttatgcagt tacatataga 1380

gtcggggatc tcgctggaag caaactctct atcctttaag atggaggtat tgtttcactg 1440

cctctcaccc ttcccagacc aaacgatagc ttttactgtt gttgggatat actgagtatg 1500

tgttgttgtt gtggctgctg ctacttgcta ctgttggatt taattttcaa ataaaagcca 1560

acggttgcaa ggtgcaagga tatccctaca aaggagatga gatcttctaa ccgcccctcac 1620

cttcactcca ctgtccaccg ctcgacacgt gacagcagag aggatggtga gactagatgt 1680

gggtgaccct catctagcct caccaccccct cctcctgctg ccacgtgtcc ggcggtaggc 1740

agtagggtga aggtgagggc gatgagagga tcccgtcccc cttgaaggta cttgagacaa 1800

ttgtctcatc tatggattta tagagaaagt cccttatgtt agtcatttga ccagcggata 1860

aaagtcaaaa ttgttcgaat tattgcagac catcaacaaa tgagtatgca aagcaattga 1920

gagcactggc tagcaagatt cttgctgtgt tgtctcttgg cctaggatta gaaccaggca 1980 ggctagaaaa agaagttggt ggcttggaag agctaattct acaaaagaaa atcaattact 2040

atcccaagtg tcccaacca gaactggctc taggcgtgga ggcacacact gacattagcg 2100

cgcttacttt catcctccac aatatggttc ctggcttgca attgttctat gaaggcaaat 2160

ggatcacagc caaatgtgtc ccgaattcga ttatcatgca tgtaggtgac accattgaga 2220

ttcttagcaa tggcaagtac aaaagtatcc ttcatagagg acttgtgaac aaagagaaag 2280

taaggatttc ttgggctgtt ttctgtgagc caccaaagga gaagatcgtc ctcaagccac 2340

tacctgagac tgtgtctgaa tccgagccgg ctcggttccc tcctcgcacg tttgctgagc 2400

atatcaagca caagctcttc aggaaaagtg aagaaactaa tgaagataac aatttaccaa 2460

agggtagttc ctag 2474

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

<400> 2
atgggaattc cggttgtccc cagagtagaa agcttggcca gaagcggcac ccaagaaatt 60

ccaaaagaat acgtgaggac taaagaagag ctaacaagca ttgcagatgt ttttgctgaa 120

gagaaaaacg acgaggggcc tcaagtaccc atgattgaca taaaagacat tgattcagaa 180

gacatcagtg tgagacaaag gtgtcatgat gtattgaaca aagctgcaat ggagtgggga 240

gtgatgcacc ttgtcaatca tggtatatca agtgatctga ttcgtcgcgt aaagtcggct 300

ggacaagcct tctttgatct tccagttgag gagaaagaaa agtatgccaa tgatcaggct 360

tctgggaatg tccaaggata tgggagcaaa cttgctaata atgcaagtgg gcagctggag 420

tgggaggact attttttcca ttgcattttc cctgaagaga agcgtgacat gactatttgg 480

ccaaagactc cagaggatta catgtaagtc cattatatta gcaagtacca tgtataggtg 540

```
ttgtgtttta tatactttat ctagtcgcac 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

attttccaac taaattaaaa gaaaaatttt atagggtagc agtgcggccg gcaacgttat     900

atgggacaga ctgttgggcc atsaagagga cacagtcgca gaagatggaa gtggcagaga     960

tgatgatgct gaggtagatg tgtggacata caaggctaga tcggatcaga aatgaggtat    1020

ttcaaaaggc tagggggggtt agtatagcgg ataagataag ggagggggaga ctgagatggt    1080

ttgggcatgt caagcggtga caaataacgg cgtctgtcag agcagttgaa agcctctttg    1140

tagagaggaa aagaagtaaa ggttgacccg aactgacttg ggaggaacat attaaacatg    1200

acctactaga tttgcacttg tgtgaggaca tggtctagga taggtactta tgaagacgga    1260

ggattaaggt tagcgaggtt taggcaggat ataggggcag cttagaatat ataaacgggc    1320

gtagatactc gctcactgtt aggttgactt tgtatttttt tgtctttgtc ttgcattatt    1380

tgtcgtgcat tatgtggcta tgcaggtaca tacagagtcg ggggtctcgc tggaagaaaa    1440

ctctctatcc tttgagatgg aggtattgtt tgcctgtcta tcacactctc cagactctaa    1500

cgatagcttt tgctgttgtt gtgatatact gggtatgtgt tgttgttgat gctgttgatg    1560

cttgcaactg ttggatttaa ttttcaacta aaagccaacg gttgcaaggt gcaaggtctt    1620

gggatatccc tagaatgcac ttgagagaaa tgtctcatct atggacttat agagaaagtc    1680

acttatacca gtcatttgac caacggataa aagtcaaaat tgtgtgaatt attgcagacc    1740

atcaacaaat gagtatgcaa agcaattgag agccctggct agcaagattc ttgctgtgtt    1800

gtctcttggc ctaggattag aaccaggcag gctagaaaaa gaagttggtg gcctggaaga    1860
```

gctaattcta caaaagaaaa tcaattacta tcccaagtgt ccccaaccag aactggctct 1920

aggcgtggag gcacacactg acattagcgc gcttactttc atcctccaca acatggttcc 1980

tggcttgcaa ttgttctatg aaggcaaatg gatcacagcc aaatgtgtcc cgaattcgat 2040

tatcatgcat gtaggtgaca ccattgagat tcttagcaat ggcaagtaca aaagtatcct 2100

tcatagagga cttgtgaaca aagagaaagt aaggatttct tgggctgttt tctgtgagcc 2160

accaaaggag aagatcgtcc tcaagccact acctgagact ctgtctgaat accaaagggt 2220

agttcctaga tttgttgttg tgtgtttgag tcaaaactct ctttatactt ggtccagaaa 2280

cattgttgct gatgtttttc gttttatttt atttaatata tataataact acattgtcaa 2340

ttatctttaa 2350

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 3
tggatcacag ccaaatgtgt 20

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 4
tggttgaatc catgtctttt g 21

<210> 5

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

<220>
<223> primer

<400> 5
agaggtgaga agggctcaaa g 21

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

<220>
<223> primer

<400> 6
cgagacactg tgtagaacca ctg 23

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

<220>
<223> primer

<400> 7
ttcctccact ccttcccttt 20

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

<220>
<223> primer

<400> 8
attcgggttg ccaaactctt 20

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 9
tggctccatc tacactaaca gc 22

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 10
gatctcctca ataggcttgc tc 22

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 11
ccctgaaagc ctgtaagagc 20

<210> 12

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

<220>
<223> primer

<400> 12
tacgtgtcct tgccatgttc 20

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

<220>
<223> primer

<400> 13
ccccagagta gaaagcttgg 20

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

<220>
<223> primer

<400> 14
tcctgaagag cttgtgcttg 20

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

<220>
<223> primer

<400> 15
aaaccttgst ccatgggtca a 21

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 16
tgctcagcaa acataggcca cgtc 24

<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 17
attcagcaaa agtaaagatc aaagca 26

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 18
catgcatatt acatggttga atcc 24

<210> 19
<211> 2491

<212> DNA
<213> Eustoma grandiflorum

<400> 19
atgggaattc cggttgtccc cagagtagaa agcttggcca gaagcggcac ccaagaaatt 60

ccaaaagaat acgtgaggac taaagaagag ctaacaagca ttgcagatgt ttttgctgaa 120

gagaaaaacg acgaggggcc tcaagtaccc atgattgata taaaagacat cgagtcagaa 180

gacatcagtg ttagagaaag gtgtcgtgat gtattgaaca aagctgcaat ggagtgggga 240

gtgatgcacc ttgtcaatca tggtatatca agtgatctga ttcgtcgcgt aaagtcggct 300

ggacaagcct tctttgatct tccagttgag gagaaagaaa agtatgccaa tgatcaggct 360

tcagggaatg tccaaggata tggaagcaaa cttgctaata atgcaagtgg gcagctggaa 420

tgggaggact atttttccca ctgcattttc cctgaagaga agcgtgacat gactatttgg 480

ccaaagactc cagaggatta catgtaagtc cattatatta gcaagtacca tgtataagtg 540

ttgtttttta tatactttat ctagtcgcac atttctgatg tctaatttgt attattgcgt 600

gtgttttcat gtcttctcta gaatatttca ttagagagag cgtgtttaac atgctcacac 660

cgcgactttt ctttaaatct cattcaaggg atttcccaaa accttgctac taggatcatt 720

tgtacagcat cacggagaca tagataggga tgtagtgcac tgagttcaag taggctggtg 780

taggtggatg acggtctcag ggtgctgtgt gacaagaatt ttccaactaa attaaagaga 840

aaattttata gagtggcagt gctgccggca atgttatatg agacggacta ctgagccata 900

aagaggacat agtcgcagag atgaggatgc gcagagatga ggatgctgag gtgaatgtgt 960

ggataataca aggctagacc ggatcagaaa tgaggtattt caggaggcta ggggtggtta 1020

gtatagcgga taagataagg gaggggagac tgagatggtt tgggcatgtc aagcggagac 1080

agataacggc gtctgtcaga gcagttgaaa gcctctttgt agaggggaaa agaagtaaag 1140

gcagacccga actgacttgg gaggaacata ttaaacatga cctactagat ttgcacctgt 1200 gtgaggacat ggtccaggat aggagcttat agagacggag gattaatgtt agcgaggttt 1260

aggcaggata tatgggcagc ttagaatata taaaggggcg tagatactcg ctcaccgtta 1320

ggttgacttt gcaatttttt ttgtctttgt tttgcattat ttgtcgtgca ttatgtggtt 1380

atgcagttac atatagagtc ggggatctcg ctggaagcaa actctctatc ctttaagatg 1440

gaggtattgt ttcactgcct ctcacccttc ccagaccaaa cgatagcttt tactgttgtt 1500

gggatatact gagtatgtgt tgttgttgtg gctgctgcta cttgctactg ttggatttaa 1560

ttttcaaata aaagccaacg gttgcaaggt gcaaggatat ccctacaaag gagatgagat 1620

cttctaaccg ccctcacctt cactccactg tccaccgctc gacacgtgac agcagagagg 1680

atggtgagac tagatgtggg tgaccctcat ctagcctcac cacccctcct cctgctgcca 1740

cgtgtccggc ggtaggcagt agggtgaagg tgagggcgat gagaggatcc cgtccccctt 1800

gaaggtactt gagacaattg tctcatctat ggatttatag agaaagtccc ttatgttagt 1860

catttgacca gcggataaaa gtcaaaattg ttcgaattat tgcagaccat caacaaatga 1920

gtatgcaaag caattgagag cactggctag caagattctt gctgtgttgt ctcttggcct 1980

aggattagaa ccaggcaggc tagaaaaaga agttggtggc ttggaagagc taattctaca 2040

aaagaaaatc aattactatc ccaagtgtcc ccaaccagaa ctggctctag gcgtggaggc 2100

acacactgac attagcgcgc ttactttcat cctccacaat atggttcctg gcttgcaatt 2160

gttctatgaa ggcaaatgga tcacagccaa atgtgtcccg aattcgatta tcatgcatgt 2220

aggtgacacc attgagattc ttagcaatgg caagtacaaa agtatccttc atagaggact 2280

tgtgaacaaa gagaaagtaa ggatttcttg ggctgttttc tgtgagccac caaaggagaa 2340

gatcgtcctc aagccactac ctgagactgt gtctgaatcc gagccggctc ggttccctcc 2400

tcgcacgttt gctgagcata tcaagcacaa gctcttcagg aaaagtgaag aaactaatga 2460

agataacaat ttaccaaagg gtagttccta g 2491

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

<400> 20
atgggaattc cggttgtccc cagagtagaa agcttggcca gaagcggcac ccaagaaatt 60

ccaaaagaat acgtgaggac taaagaagag ctaacaagca ttgcagatgt ttttgctgaa 120

gagaaaaacg acgaggggcc tcaagtaccc atgattgaca taaaagacat tgattcagaa 180

gacatcagtg tgagacaaag gtgtcatgat gtattgaaca aagctgcaat ggagtgggga 240

gtgatgcacc ttgtcaatca tggtatatca agtgatctga ttcgtcgcgt aaagtcggct 300

ggacaagcct tctttgatct tccagttgag gagaaagaaa agtatgccaa tgatcaggct 360

tctgggaatg tccaaggata tgggagcaaa cttgctaata atgcaagtgg gcagctggag 420

tgggaggact attttttcca ttgcattttc cctgaagaga agcgtgacat gactatttgg 480

ccaaagactc cagaggatta catgtaagtc cattatatta gcaagtacca tgtataggtg 540

ttgtgtttta tatactttat ctagtcgcac 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

attttccaac taaattaaaa gaaaaatttt atagggtagc agtgcggccg gcaacgttat 900

atgggacaga ctgttgggcc atgaagagga cacagtcgca gaagatggaa gtggcagaga 960

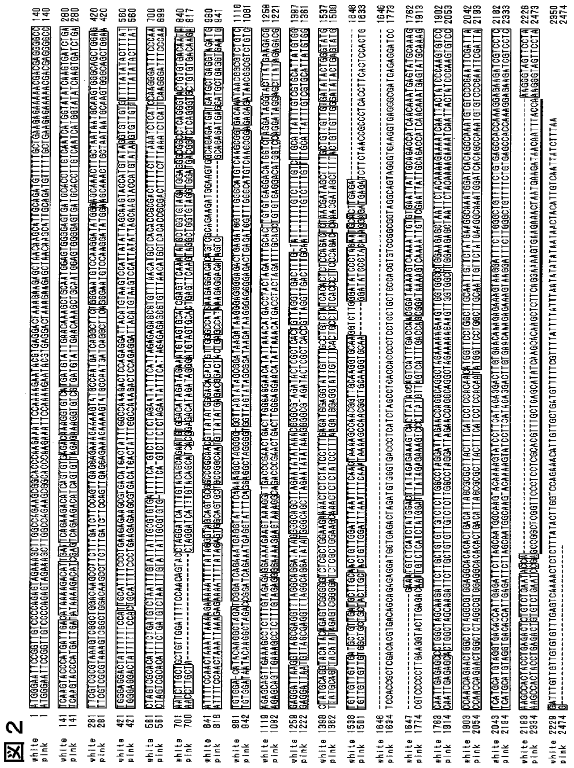
tgatgatgct gaggtagatg tgtggacata caaggctaga tcggatcaga aatgaggtat 1020

ttcaaaaggc tagggggtt agtatagcgg ataagataag ggaggggaga ctgagatggt 1080

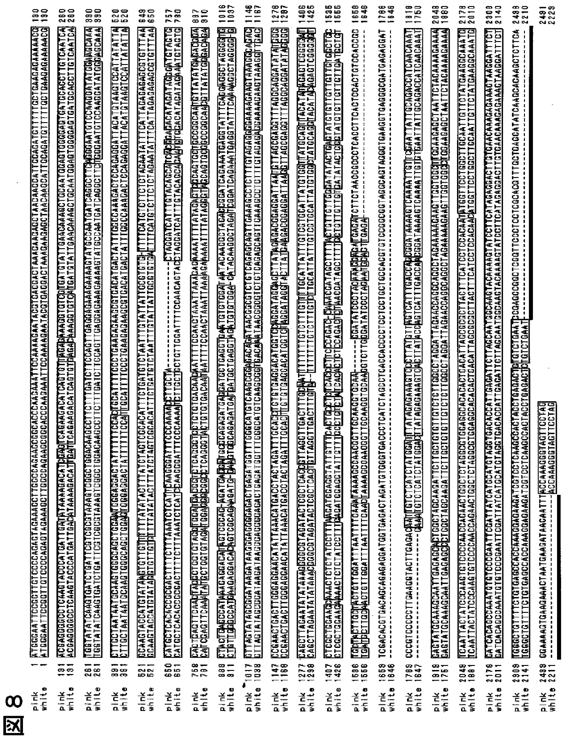
ttgggcatgt caagcggtga caaataacgg cgtctgtcag agcagttgaa agcctctttg 1140

```
tagagaggaa aagaagtaaa ggttgacccg aactgacttg ggaggaacat attaaacatg    1200

acctactaga tttgcacttg tgtgaggaca tggtctagga taggtactta tgaagacgga    1260

ggattaaggt tagcgaggtt taggcaggat ataggggcag cttagaatat ataaacgggc    1320

gtagatactc gctcactgtt aggttgactt tgtatttttt tgtctttgtc ttgcattatt    1380

tgtcgtgcat tatgtggcta tgcaggtaca tacagagtcg gggtctcgc tggaagaaaa    1440

ctctctatcc tttgagatgg aggtattgtt tgcctgtcta tcacactctc cagactctaa    1500

cgatagcttt tgctgttgtt gtgatatact gggtatgtgt tgttgttgat gctgttgatg    1560

cttgcaactg ttggatttaa ttttcaacta aaagccaacg gttgcaaggt gcaaggtctt    1620

gggatatccc tagaatgcac ttgagagaaa tgtctcatct atggacttat agagaaagtc    1680

acttatacca gtcatttgac caacggataa aagtcaaaat tgtgtgaatt attgcagacc    1740

atcaacaaat gagtatgcaa agcaattgag agccctggct agcaagattc ttgctgtgtt    1800

gtctcttggc ctaggattag aaccaggcag gctagaaaaa gaagttggtg gcctggaaga    1860

gctaattcta caaaagaaaa tcaattacta tcccaagtgt ccccaaccag aactggctct    1920

aggcgtggag gcacacactg acattagcgc gcttactttc atcctccaca acatggttcc    1980

tggcttgcaa ttgttctatg aaggcaaatg gatcacagcc aaatgtgtcc cgaattcgat    2040

tatcatgcat gtaggtgaca ccattgagat tcttagcaat ggcaagtaca aaagtatcct    2100

tcatagagga cttgtgaaca aagagaaagt aaggatttct tgggctgttt tctgtgagcc    2160

accaaaggag aagatcgtcc tcaagccact acctgagact ctgtctgaat accaaagggt    2220

agttcctaga tttgttgttg tgtgtttgag tcaaaactct ctttatactt ggtccagaaa    2280

cattgttgct gatgtttttc gttttatttt atttaatata tataataact acattgtcaa    2340

ttatctttaa                                                           2350
```

【図２】

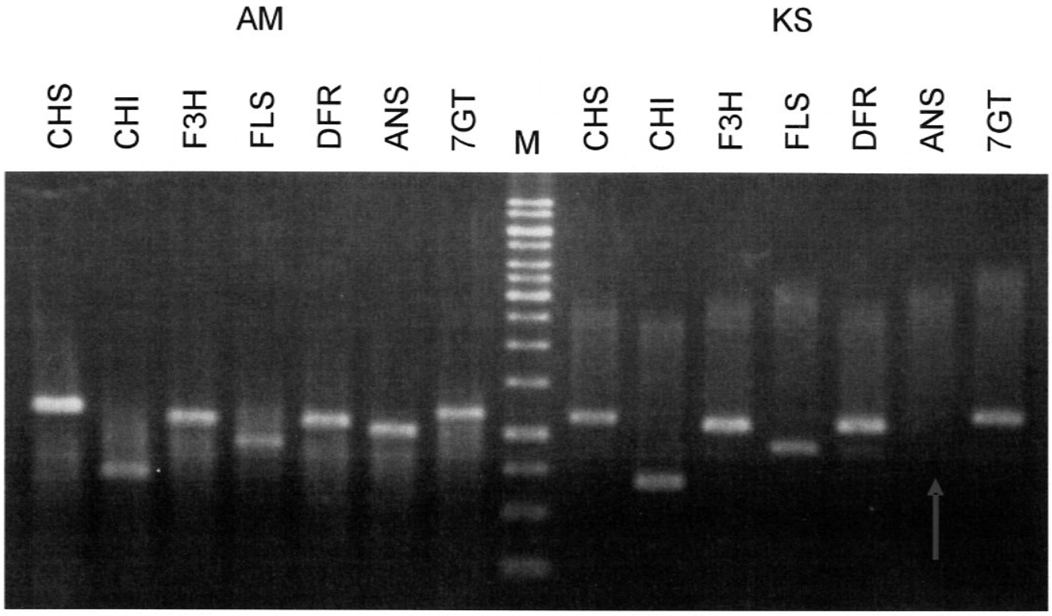


【図８】



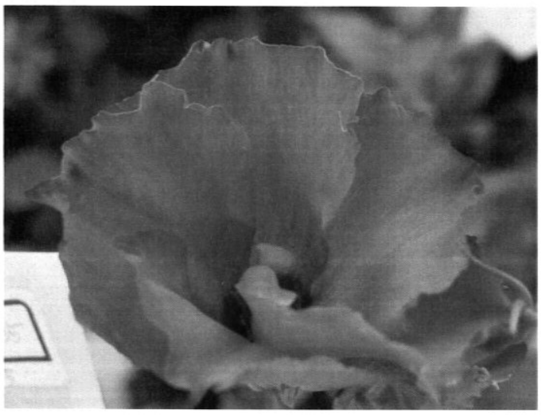
【図１】

図１


AM
KS
CHS
CHI
F3H
FLS
DFR
ANS
7GT
M
CHS
CHI
F3H
FLS
DFR
ANS
7GT

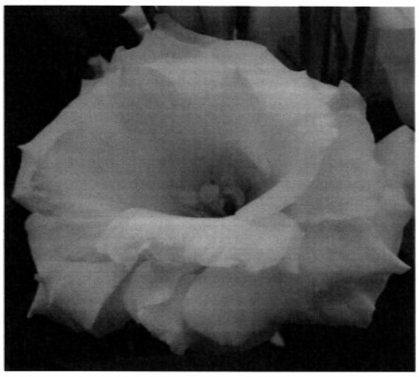
【図３】

図３



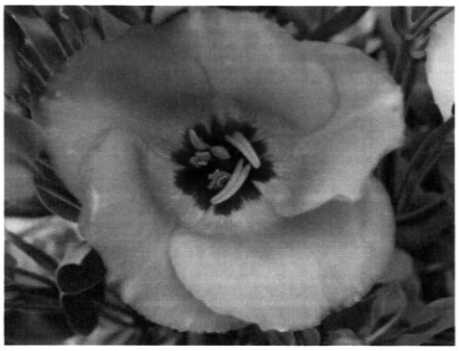
【図４】

図４



【図５】

図５



【図６】

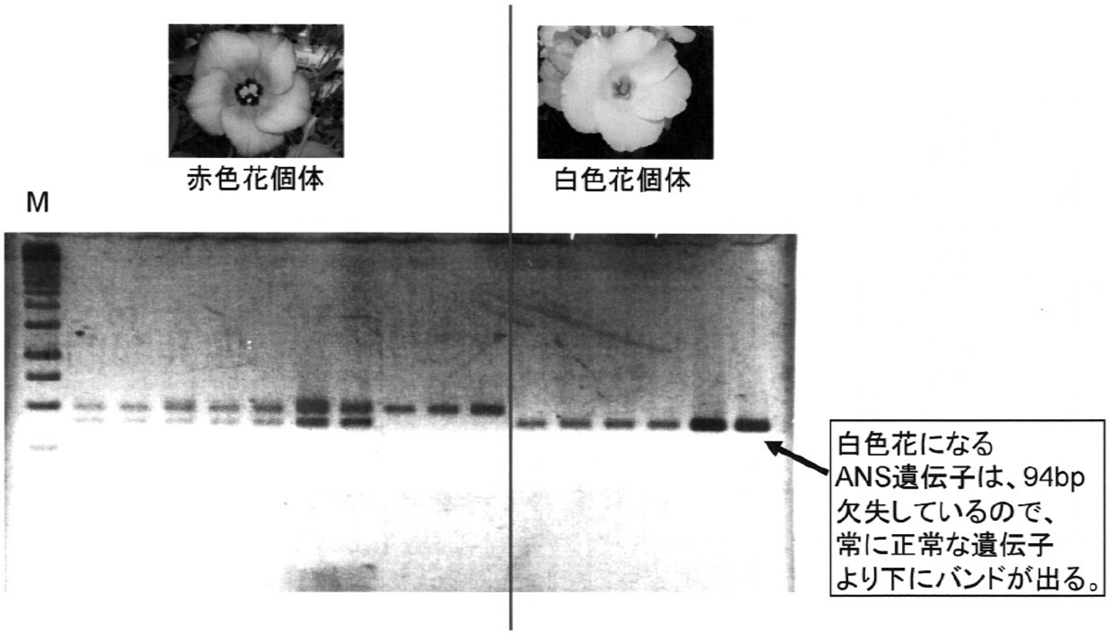


図6
赤色花個体
白色花個体
M
白色花になる
ANS遺伝子は、94bp
欠失しているので、
常に正常な遺伝子
より下にバンドが出る。

【図７】

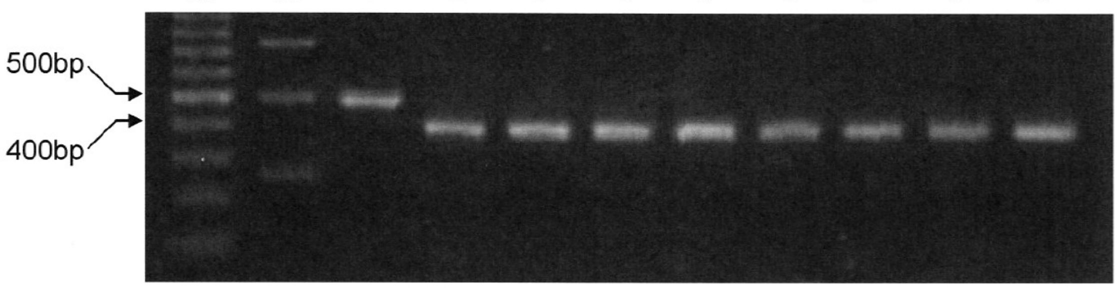


図7
M
M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
500bp
400bp

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２１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