



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101087884 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 14

(21) 申请号 200580044768. 8

代理人 林晓红

(22) 申请日 2005. 10. 24

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

04077931. 6 2004. 10. 25 EP

*C12N 15/82* (2006. 01)

*C12Q 1/68* (2006. 01)

*A01H 5/08* (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2007. 06. 25

审查员 孙彦珂

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/NL2005/000762 2005. 10. 24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02006/046861 EN 2006. 05. 04

(73) 专利权人 孟山都投资公众有限公司

地址 荷兰阿姆斯特尔芬

(72) 发明人 J·A·L·范坎 A·坦恩哈韦

W·H·林德豪特 H·J·芬克尔斯

R·范贝尔罗 A·W·范霍斯丹恩

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

权利要求书2页 说明书53页 附图5页

(54) 发明名称

具有更高水平的葡萄孢抗性的番茄植株

(57) 摘要

本发明涉及一种用于检测番茄中的与葡萄孢抗性相关的数量性状基因座 (QTL) 的方法, 包括步骤: 杂交抗葡萄孢的供体番茄植株和无抗性的或葡萄孢易感的受体番茄植株, 用感染量的葡萄孢接触一种或多种子代植株, 定量测定所述一种或多种子代植株中的发病率和 / 或病变生长速率, 建立联系在所述一种或多种子代植株中观察到的发病率和 / 或病变生长速率与存在所述供体番茄植株的染色体标记物的遗传连锁图, 并将所述图上的与降低发病率和 / 或降低病变生长速率相关的相邻标记物分配给 QTL。

1. 一种生产抗葡萄孢的番茄植株的方法,其中所述植株具有降低的发病率,所述方法包括将与番茄的葡萄孢抗性相关的至少一种 QTL 的核酸从抗葡萄孢的供体番茄植株转移到葡萄孢易感的受体番茄植株的步骤,其中所述 QTL 选自与葡萄孢抗性相关的多毛番茄 (*Lycopersicon hirsutum*)LYC4/78 的 2 和 4 号染色体上的 QTL 以及小花番茄 (*Lycopersicon parviflorum*)G1.1601 的 3 和 4 号染色体上的 QTL,其中所述 QTL 由与所述 QTL 连锁的 AFLP 标记物来指示,其中多毛番茄 LYC4/78 的 2 和 4 号染色体上的 QTL 由多毛番茄 LYC4/78 的 2 号染色体上的 AFLP 片段 P14M60-537h、P15M48-257e、P14M49-327h、P14M49-325h、P14M61-286e、P14M61-125h 和 P18M51-134h 以及多毛番茄 LYC4/78 的 4 号染色体上的 AFLP 片段 P18M51-169.5e、P18M51-305.4h、P14M60-262.9e、P14M61-292.7h、P14M48-345e、P14M48-177e 和 P18M50-147e 以及标记物 TG609 来指示,而其中小花番茄 G1.1601 的 3 和 4 号染色体上的 QTL 由与所述 QTL 连锁的小花番茄 G1.1601 的 3 号染色体上的 AFLP 片段 P15M48-234p、P18M51-486p 和 P14M60-65p 以及小花番茄 G1.1601 的 4 号染色体上的 AFLP 片段 E39M50-115p、P14M48-158p 和 P14M48-349p 来指示,其中通过转化、原生质体融合、双单倍体技术或通过胚拯救进行所述核酸的转移。

2. 一种生产抗葡萄孢的番茄植株的方法,其中所述植株具有降低的发病率,所述方法步骤包括:将包括与番茄的葡萄孢抗性相关的至少一种 QTL 的核酸从抗葡萄孢的供体番茄植株转移到葡萄孢易感的受体番茄植株,其中所述 QTL 选自与葡萄孢抗性相关的多毛番茄 LYC4/78 的 2 和 4 号染色体上的 QTL 以及小花番茄 G1.1601 的 3 和 4 号染色体上的 QTL,其中所述 QTL 由与所述 QTL 连锁的 AFLP 标记物来指示,其中多毛番茄 LYC4/78 的 2 和 4 号染色体上的 QTL 由多毛番茄 LYC4/78 的 2 号染色体上的 AFLP 片段 P14M60-537h、P15M48-257e、P14M49-327h、P14M49-325h、P14M61-286e、P14M61-125h 和 P18M51-134h 以及多毛番茄 LYC4/78 的 4 号染色体上的 AFLP 片段 P18M51-169.5e、P18M51-305.4h、P14M60-262.9e、P14M61-292.7h、P14M48-345e、P14M48-177e 和 P18M50-147e 以及标记物 TG609 来指示,而其中小花番茄 G1.1601 的 3 和 4 号染色体上的 QTL 由与所述 QTL 连锁的小花番茄 G1.1601 的 3 号染色体上的 AFLP 片段 P15M48-234p、P18M51-486p 和 P14M60-65p 以及小花番茄 G1.1601 的 4 号染色体上的 AFLP 片段 E39M50-115p、P14M48-158p 和 P14M48-349p 来指示。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述抗葡萄孢的供体番茄植株选自自由樱桃番茄 (*Lycopersicon cerasiforme*)、奇士曼尼番茄 (*Lycopersicon cheesmanii*)、智利番茄 (*Lycopersicon chilense*)、克梅留斯基番茄 (*Lycopersicon chmielewskii*)、普通番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、多毛番茄、小花番茄、潘那利番茄 (*Lycopersicon pennellii*)、秘鲁番茄 (*Lycopersicon peruvianum*)、醋栗番茄 (*Lycopersicon pimpinellifolium*) 和类番茄茄 (*Solanum lycopersicoides*) 组成的组。

4. 权利要求 1 到 3 中任一项的方法,其中所述抗葡萄孢的供体番茄植株是多毛番茄或小花番茄的野生株。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述抗葡萄孢的供体番茄植株是多毛番茄 LYC4/78 或小花番茄 G1.1601。

6. 权利要求 1 到 5 中任一项的方法,其中所述葡萄孢易感的受体番茄植株是普通番茄种的植株。

7. 权利要求 6 的方法,其中所述葡萄孢易感的受体番茄植株是具有商业所需特性的普

通番茄种的植株。

8. 权利要求 2 到 7 中任一项的方法,其中所述核酸的转移包括将所述抗葡萄孢的供体番茄植株与葡萄孢易感的受体番茄植株杂交以产生子代植株,并从子代植株中选出其基因组中包括所述至少一种 QTL 的植株。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述选择包括利用标记物的标记物辅助性选择,所述标记物选自自由与所述 QTL 连锁的标记物多毛番茄 LYC4/78 的 QTL-2h 的 P14M60-537h、P15M48-257e、P14M49-327h、P14M49-325h、P14M61-286e、P14M61-125h、P18M51-134h,多毛番茄 LYC4/78 的 QTL-4h 的 P18M51-169.5e、P18M51-305.4h、P14M60-262.9e、P14M61-292.7h、TG609、P14M48-345e、P14M48-177e 和 P18M50-147e,小花番茄 G1.1601 的 QTL-3p 的 P15M48-234p、P18M51-486p、P14M60-65p,小花番茄 G1.1601 的 QTL-4p 的 E39M50-115p、P14M48-158p、P14M48-349p 组成的组。

10. 权利要求 1 到 9 中任一项的方法,其中所述供体植株是多毛番茄 LYC4/78 和 / 或小花番茄 G1.1601,且其中从所述供体番茄植株转移到所述受体植株中的所述 DNA 包括至少一种与番茄的葡萄孢抗性相关的 QTL,所述 QTL 选自自由与葡萄孢抗性相关的多毛番茄 LYC4/78 的 2 和 4 号染色体上的 QTL 以及小花番茄 G1.1601 的 3 和 4 号染色体上的 QTL 组成的组。

11. 选自与葡萄孢抗性相关的所述 QTL 连锁的标记物多毛番茄 LYC4/78 的 QTL-2h 的 P14M60-537h、P15M48-257e、P14M49-327h、P14M49-325h、P14M61-286e、P14M61-125h、P18M51-134h,多毛番茄 LYC4/78 的 QTL-4h 的 P18M51-169.5e、P18M51-305.4h、P14M60-262.9e、P14M61-292.7h、TG609、P14M48-345e、P14M48-177e 和 P18M50-147e,小花番茄 G1.1601 的 QTL-3p 的 P15M48-234p、P18M51-486p、P14M60-65p,小花番茄 G1.1601 的 QTL-4p 的 E39M50-115p、P14M48-158p、P14M48-349p 组成的组中的标记物用于检测抗葡萄孢的番茄植株的用途,其中所述植株具有降低的发病率。

12. 选自自由与番茄的葡萄孢抗性相关的 QTL 连锁的标记物多毛番茄 LYC4/78 的 QTL-2h 的 P14M60-537h、P15M48-257e、P14M49-327h、P14M49-325h、P14M61-286e、P14M61-125h、P18M51-134h,多毛番茄 LYC4/78 的 QTL-4h 的 P18M51-169.5e、P18M51-305.4h、P14M60-262.9e、P14M61-292.7h、TG609、P14M48-345e、P14M48-177e 和 P18M50-147e,小花番茄 G1.1601 的 QTL-3p 的 P15M48-234p、P18M51-486p、P14M60-65p,小花番茄 G1.1601 的 QTL-4p 的 E39M50-115p、P14M48-158p、P14M48-349p 组成的组中的标记物用于生产抗葡萄孢的番茄植株的用途,其中所述 QTL 选自与葡萄孢抗性相关的多毛番茄 LYC4/78 的 2 和 4 号染色体上的 QTL 以及小花番茄 G1.1601 的 3 和 4 号染色体上的 QTL,其中所述植株具有降低的发病率。

## 具有更高水平的葡萄孢抗性的番茄植株

### 技术领域

[0001] 本发明涉及植物育种和分子生物学领域。更具体地,本发明涉及一种用于检测番茄中的与灰色葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 抗性相关的数量性状基因座 (QTL) 的方法,涉及一种生产抗葡萄孢 (*Botrytis*) 的番茄植株的方法以及涉及由此获得的抗葡萄孢的番茄植株及其部分。

### 背景技术

[0002] 灰色葡萄孢是一种具有极为广泛的宿主范围的坏死营养型的致病性真菌,其宿主范围至少包括 235 种可能宿主。因为其广泛的宿主范围以及因为其影响经济上重要的植物部分,灰色葡萄孢是多种商业种植农作物的主要问题。对于栽培者而言,真菌常常指的就是葡萄孢。种植的番茄(主要是番茄 (*Lycopersicon esculentum*)) 也易感于葡萄孢感染,并且真菌常常感染番茄植株的茎、叶和果实。在加温的温室中,葡萄孢对茎的感染发生是特别普遍的。

[0003] 葡萄孢积极地杀死受感染的细胞,造成软腐病、枯萎病、叶斑病、猝倒病和茎癌瘤。受感染的叶子被分生孢子柄和分生孢子所覆盖,随后出现萎陷和凋谢。真菌会从患病的叶子生长到茎,并形成长度为数毫米到数厘米的干燥的、浅褐色病变。也可以在茎上的修剪瘢痕处形成病变。茎病变也可以被灰霉覆盖。在一些情况中,感染灶环绕茎并杀死植物。番茄植株的更老的、衰老的组织通常比年幼的组织更易受到葡萄孢的攻击。

[0004] 为了预防温室生长的番茄发生葡萄孢,必须要严格地调节温度和相对湿度。给植物供水但不弄湿叶子也很重要。对于田地生长的植物而言,应当采用好的灌溉和除草。此外,必须保持高的植物养分水平。但是,这些预防措施并不能完全避免感染造成的相当大的产量下降的发生。

[0005] 已经有了用于控制温室和田地生长的番茄的葡萄孢的杀真菌剂。一些杀真菌剂的实例包括 Dovicide **A®**和百菌清 (chlorothalonil),它们也可以被施用于收获后的番茄果实。但是,已知葡萄孢已经发展出了对一些常用杀真菌剂的耐药性。另外,从经济和环境的角度出发,应用杀真菌剂都不是所希望的。现在,需要表现出抗葡萄孢的商品化番茄变种。

[0006] 在一些番茄属 (*Lycopersicon*) 的野生种中已经发现了对葡萄孢的部分抗性 (Egashira et al. 2000 ;Nicot et al. 2002 ;Urbasch1986)。但是,这些植物不能生成商品化的番茄农作物。

[0007] 从 W002/085105 中已知,多毛番茄 (*L. hirsutum*) 包括涉及对葡萄孢的部分抗性的基因组的 10 号染色体上的基因区。相信该遗传物质向所培育的番茄变种中的渐渗 (introgression) 能够为所培育的番茄植株提供对葡萄孢的部分抗性。

[0008] 但是,到目前为止,针对为番茄提供葡萄孢抗性的育种计划还只有很有限的成功。这些差的结果的原因目前还不清楚。一方面,这可能是关于葡萄孢抗性的遗传基础和遗传性方面的知识还很欠缺。另一方面,这可能是由于缺少合适的用于检测在育种计划中获得的番茄植株中的葡萄孢抗性水平的生物检测法。知识和方法的缺乏也使得在野生株和

后代植株中选择包括涉及葡萄孢抗性的基因的植株复杂化。

[0009] 本发明的目标是提高旨在提供抗葡萄孢的商品化番茄变种的育种计划的成功率。本发明的另一个目的是为商品化番茄变种提供附加的和 / 或改良的葡萄孢抗性。本发明的另一个目的是提供用于发现作为葡萄孢抗性来源的另外的野生型番茄株的方法以及用于发现这些植株的基因组中的涉及番茄中的葡萄孢抗性的另外的遗传物质的方法。这种另外的来源和另外的遗传物质可以用于拓宽用于生成所培育的番茄的抗葡萄孢的变种的基础。

## 发明内容

[0010] 本发明人现在已经发现,将包括测定番茄植株中最初的和 / 或进行性的葡萄孢感染参数的特殊的定量生物检测法与分子标记物检测技术相组合,提供了一种用于检测野生番茄株中的葡萄孢抗性的来源以及用于检测这些植株基因组中的涉及番茄的改良的葡萄孢抗性的遗传物质的非常有利的方法。

[0011] 通过使用这种技术的组合,本发明者已经成功地在两系番茄野生亲缘株(即多毛番茄 LYC4/78(*Lycopersicon hirsutum* LYC4/78)和小花番茄 G1.1601(*Lycopersicon parviflorum* G1.1601))中鉴定出了对葡萄孢的部分抗性。

[0012] 本发明人随后已经能够通过杂交这些抗葡萄孢的野生型(供体)番茄系和无抗性的受体番茄植株的植株而生成抗葡萄孢的番茄植株。这些植株比包括如 W002/085105 所述的多毛番茄的 10 号染色体上的与葡萄孢抗性相关的基因组区的植株表现出了更高水平的抗性。

[0013] 通过评价这些新生成杂种的分离群(F<sub>2</sub>群)中的对葡萄孢的抗性水平与存在供体植株的分子标记物的相关性,本发明人已经能够在抗性野生番茄系中鉴定出与葡萄孢抗性相关的多个数量性状基因座(QTL),并据此确定出多个赋予抗性的 DNA 序列在基因组中的位置。因此,本发明人现在已经发现番茄的葡萄孢抗性是多基因遗传的,其可能部分解释了差的育种结果。该发现现在被用于改良用于生产抗葡萄孢的番茄植株的方法。在下面的描述中,番茄中的与葡萄孢抗性相关的数量性状基因座(QTL)被简写为葡萄孢抗性的 QTL 或与葡萄孢抗性相关的 QTL。

[0014] 在两个野生番茄系中,总共发现了 6 个新的葡萄孢抗性的 QTL。这 6 个 QTL 中有 4 个与反映植物减少最初感染发生的能力的定量参数(此后称作发病率参数)相关。这 6 个 QTL 中有 2 个与反映植物减慢感染进程的能力的定量参数(此后称作病变生长速率参数)相关。

[0015] 通过生成遗传连锁图,发现多毛番茄 LYC4/78 的 1 号染色体具有与降低葡萄孢感染诱导的病变生长速率相关的 QTL,而相同植物株的 2 号和 4 号染色体都具有与降低发病率相关的 QTL。在小花番茄 G1.1601 中,发现降低病变生长速率的 QTL 位于 9 号染色体,而两个分开的降低发病率的 QTL 被发现位于 3 号和 4 号染色体。如先前所报道的那样,用这个方法不能检测到 10 号染色体上的 QTL。通过使用上面提及的定量生物检测法,至此通过评价在研究中具有分离的 QTL 的 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub>(自花传粉的回交 2 代)后代的抗病性可以验证所测试的多毛番茄 LYC4/78 中的所有 QTL。

[0016] 在第一个方面,本发明涉及抗葡萄孢的番茄植株,其中当用生物检测法测定时,所述植株具有比易感对照植株低至少 3 倍的对灰色葡萄孢的易感性,所述生物检测法是在标

准实践条件下,在 3 周时间内测定出成体植株中的灰色葡萄孢感染造成的茎病变的平均长度。用在此所述的标准实践条件确定出在此作为抗性水平的测定值的 3 周时间内的茎病变长度。在一个优选的实施方式中,所述抗葡萄孢的番茄植株的特征是所述植株的基因组包括至少一个 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分,所述 QTL 选自与葡萄孢抗性相关的多毛番茄 LYC4/78 的 1 号、2 号和 4 号染色体上的 QTL 以及小花番茄 G1. 1601 的 3 号、4 号和 9 号染色体上的 QTL 组成的组,其中所述 QTL 或所述的其赋予葡萄孢抗性的部分并非是在其天然遗传背景内。

[0017] 在另一个方面,本发明涉及用于检测与番茄中的葡萄孢抗性相关的数量性状基因座 (QTL) 的方法。方法包括步骤:杂交抗葡萄孢的供体番茄植株和无抗性的或部分抗性的(葡萄孢易感的)受体番茄植株;用感染量的葡萄孢接触一株或多株后代植株;定量地确定出所述一株或多株后代植株中的发病率和/或病变生长速率;建立联系在所述一株或多株后代植株中所观察到的发病率和/或病变生长速率与存在所述供体番茄植株的染色体标记物的遗传连锁图;把所述图上的与降低发病率和/或降低病变生长速率相关的相邻的标记物分配给数量性状基因座。

[0018] 在另一个方面,本发明涉及通过用于检测如上所列的本发明的葡萄孢抗性的 QTL 的方法获得的 QTL。这些 QTL 不同于现有技术的 QTL。其一是没有发现现有技术的 QTL。此外,本发明的 QTL 比现有技术的那些 QTL 有着更多的信息,因为它们指示了与植株对抗疾病发生的能力相关的表征,或者与植株减慢疾病进程的能力相关的表征。这些信息在育种计划中是非常有价值的,因此其组合可以适当地提高抗性,更好地控制抗性性状从一代向另一代正确的遗传 (proper inheritance)。

[0019] 本发明还涉及番茄中的葡萄孢抗性的 QTL,所述 QTL 选自与葡萄孢抗性相关的多毛番茄 LYC4/78 的 1 号、2 号和 4 号染色体上的 QTL 以及小花番茄 G1. 1601 的 3 号、4 号和 9 号染色体上的 QTL 组成的组。这些 QTL 位于先前与葡萄孢抗性无关的基因组的位点上。下面将更为详细地描述这些 QTL 的细节。

[0020] 这些 QTL 所示的基因组位置上的等位基因是本发明的一个方面。

[0021] 本发明的 QTL 可以是包括所述 QTL 或其赋予抗性部分的分离的、优选双链的核酸序列。例如可以从合适的供体植株的基因组中分离到的核酸序列的尺寸可以非常合适地是所述染色体上的 1-100cM,优选的是 10-50cM 遗传距离。所述核酸可以包括至少 50 个、更优选地至少 500 个、甚至更优选地至少 1000 个、仍更优选地至少 5000 个碱基对。核酸构建体可以反过来包括一种或多种包括本发明的 QTL 或其赋予抗性部分的核酸序列,所述构建体还可以包括位于所述一种或多种核酸序列侧部的区域,所述区域能够被整合到合适的载体内,用于将所述的一种或多种核酸序列转移到合适的葡萄孢易感的受体番茄植株内。载体还可以包括合适的启动子区或其他调节序列。QTL 也可以是存在于番茄植株基因组内的形式。本发明的 QTL 优选地包括至少一种标记物、优选地两种、更优选地 3 种、仍更优选地 4 种、仍更优选地 4 种以上与葡萄孢抗性相关的标记物,所述标记物选自表 1 和 2 的标记物以及图 1、5 和 6 所示的与所述 QTL 连锁的标记物组成的组。

[0022] 在另一个方面,本发明涉及一种用于检测葡萄孢抗性的 QTL 的方法,包括检测疑为抗葡萄孢的番茄植株中的至少一种标记物,所述标记物选自表 1 和 2 的标记物以及图 1、5 和 6 所示的与葡萄孢抗性相关的所述 QTL 连锁的标记物组成的组。

[0023] 本发明还涉及一种生产抗葡萄孢的番茄植株的方法。本方法包括步骤：通过实施用于检测本发明的葡萄孢抗性的数量性状基因座 (QTL) 的任一方法检测抗葡萄孢的供体番茄植株中的葡萄孢抗性的 QTL；以及将包括至少一种所检测到的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分的核酸从所述供体植株转移到葡萄孢易感的受体番茄植株。

[0024] 通过杂交所述抗葡萄孢的供体番茄植株和葡萄孢易感的受体番茄植株生成子代植株，以及从子代植株中选出其基因组中包括从所述供体番茄植株渐渗的核酸的植株，可以非常合适地进行包括至少一种 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分的核酸的转移，其中所述渐渗的核酸包括至少一种本发明的葡萄孢抗性的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分。用本发明的方法可以合适地检测出所述渐渗的核酸内存在至少一种本发明的葡萄孢抗性的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分，在所述方法中，检测至少一种选自由表 1 和 2 的标记物以及如图 1、5 和 6 所示的与葡萄孢抗性相关的所述 QTL 连锁的标记物组成的组中的标记物。

[0025] 优选的选择方法因此包括对所述渐渗的 DNA 的标记物辅助性选择 (MAS) (例如参见 Tanksley et al. 1998)，其中检测子代植株中的一种或多种与所述 QTL 相关的标记物。例如通过分离所述子代植株的遗传物质并用分子技术确定出其中一种或多种供体植株标记物的存在就可以进行 MAS。或者，在没有预先分离遗传物质时，就可以使用分子标记物检测方法。任选地，除了标记物检测外，还可以进行对葡萄孢抗性的表型测试，以便选择出合适的植株。非常合适的测试因此是在此所述的定量生物检测法，由此确定出参数例如发病率和 / 或病变生长速率。确定存在抗性表型以及证实存在至少一种葡萄孢抗性的 QTL 的组合为包括至少一种 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分的核酸从供体植株转移到受体植株的成功转移提供了证据。

[0026] 在生产抗葡萄孢的番茄植株的方法的其他实施方式中，通过转基因方法 (例如通过转化)、通过原生质体融合、通过双单倍体技术或通过胚拯救都可以非常适当地实现所示的核酸转移。

[0027] 在生产抗葡萄孢的番茄植株的方法的优选的实施方式中，供体植株是多毛番茄 LYC4/78 和 / 或小花番茄 G1. 1601 以及从这些供体植株转移到受体植株内的核酸优选地包括至少一种葡萄孢抗性的 QTL，所述 QTL 选自由与葡萄孢抗性相关的多毛番茄 LYC4/78 的 1 号、2 号和 4 号染色体上的 QTL 以及小花番茄 G1. 1601 的 3 号、4 号和 9 号染色体上的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性部分组成的组。

[0028] 在生产抗葡萄孢的番茄植株的方法的另一个优选实施方式中，方法包括杂交所述抗葡萄孢的供体番茄植株和葡萄孢易感的受体番茄植株生成第一代子代植株；从第一代子代植株中选择出其基因组中包括从所述供体番茄植株中渐渗的核酸的植株，其中所述渐渗的核酸包括至少一种 QTL，优选地 2 种，更优选地 2 种以上本发明的葡萄孢抗性的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分；杂交所述选出的子代植株与合适的商品化番茄系，生成第二代子代植株；从第二代子代植株物中选择出其基因组中包括从所述第一代子代番茄植株中渐渗的核酸的植株，其中所述渐渗的核酸包括至少一种 QTL，优选地 2 种，更优选地 2 种以上本发明的葡萄孢抗性的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分；以及任选地生成了更多代的子代植株。所提及的在子代植株中被渐渗的优选地 2 种、更优选地 2 种以上葡萄孢抗性的 QTL 可以是发病率的 QTL、病变生长速率的 QTL 或这些类型的组合。

[0029] 在另一个方面，本发明涉及用本发明的方法获得的抗葡萄孢的番茄植株或其部

分。

[0030] 仍在另一个方面,本发明涉及抗葡萄孢的番茄植株或其部分,在其基因组中包括至少一种 QTL 或其赋予葡萄孢抗性部分,其中所述 QTL 选自由与葡萄孢抗性相关的多毛番茄 LYC4/78 的 1 号、2 号和 4 号染色体上的 QTL 以及小花番茄 G1. 1601 的 3 号、4 号和 9 号染色体上的 QTL 组成的组,其中所述 QTL 或其所述赋予葡萄孢抗性的部分并不是处于其天然的遗传背景内。

[0031] 仍在另一个方面,本发明涉及生产抗葡萄孢的近交番茄植株的方法。方法包括步骤:根据本发明的方法生成抗葡萄孢的番茄植株,自交所述植株,从所述自交的植株中获得的种子生长成新的植株;从所述新植株中鉴定出表现出葡萄孢抗性以及具有商业所需特性的植株;以及重复自交和选择步骤,直到生成了表现出葡萄孢抗性以及具有商业所需特性的近交番茄植株。

[0032] 生产抗葡萄孢的近交番茄植株的方法还可以包括选择表现出葡萄孢抗性以及具有商业所需特性的纯合子的近交番茄植株的附加步骤。

[0033] 在另一个方面,本发明涉及本发明的方法所获得的抗葡萄孢的近交番茄植株或其部分。

[0034] 在另一个方面,本发明涉及表现出葡萄孢抗性的杂种番茄植株或其部分,其中所述杂种番茄植株是通过杂交本发明的方法所获得的抗葡萄孢的近交番茄植株和表现出商业所需特性的近交番茄植株获得的。

[0035] 本发明还涉及本发明的番茄植株的可再生细胞的组织培养物。在这种组织培养物的优选实施方式中,细胞或所述细胞的原生质体可以分离自选自由叶、花粉、胚、根、根尖、花药、花、果实以及茎和种子组成的组中的组织。

[0036] 本发明还涉及选自由表 1 和 2 的标记物和如图 1、5 和 6 所示的标记物组成的组中的标记物用于检测本发明的葡萄孢抗性的 QTL 和 / 或用于检测抗葡萄孢的番茄植株的用途。

[0037] 本发明的方法所用的抗葡萄孢的供体番茄植株优选地选自由樱桃番茄 (*Lycopersicon cerasiforme*)、奇士曼尼番茄 (*Lycopersicon cheesmanii*)、智利番茄 (*Lycopersicon chilense*)、克梅留斯基番茄 (*Lycopersicon chmielewskii*)、普通番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、多毛番茄、小花番茄、潘那利番茄 (*Lycopersicon pennellii*)、秘鲁番茄 (*Lycopersicon peruvianum*)、醋栗番茄 (*Lycopersicon pimpinellifolium*) 和类番茄茄 (*Solanum lycopersicoides*) 组成的组,更优选地,野生番茄株被用作供体植株。非常优选的供体植株是多毛番茄和小花番茄,特别是多毛番茄 LYC4/78 和小花番茄 G1. 1601。

[0038] 本发明的方法所用的葡萄孢易感的受体番茄植株优选地是普通番茄种的植株,更优选地是具有商业所需特性的普通番茄品种或另一种商品化的番茄系。

#### 附图说明

[0039] 图 1 显示了源自多毛番茄 LYC4/78 的抗灰色葡萄孢的数量性状基因座 (QTL) 的位置以及代表 1 号和 2 号染色体的连锁图。图上的位置是以 cM 为单位。1 号染色体上检测到的 QTL 是病变生长的 QTL, 2 号染色体上检测到的 QTL 是发病率的 QTL。栏表示 QTL 间距。

框显示了 LOD1 间距,线表示 LOD2 间距。表 1 更详细地描述了 AFLP 标记物的代码。所有所示的与 QTL 相关的标记物都可以用作为本发明的各个部分中的标记物。

[0040] 图 2 显示了开发普通番茄 x 多毛番茄 LYC4/78 群的示意图。BC<sub>4</sub> 系与普通番茄栽培种 MoneyMaker 回交,得到 BC<sub>5</sub> 系,有助于开发出表现出这两种主要效应的 QTL-NIL 系,在 F<sub>2</sub> 群中可以鉴定出这两种主要效应。BC<sub>3</sub> 和 BC<sub>4</sub> 系与普通番茄栽培种 MoneyMaker 回交,以获得回交近交系 (BIL) 群 (见实施例 3)。

[0041] 图 3 显示了两种出现病变生长 (图 3B 和 3D) 和发病率 (图 3A 和 3C) 分离的 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 群中的分离情况 (群大小分别为 60 和 47)。病变生长是在 x 轴上,单位为 mm (图 3B 和 3D),刻度为 0.5mm (2.75-3.25 ;3.25-3.75 等),发病率 (图 3A 和 3C) 的刻度为 5% (12.5-17.5%; 17.5-22.5% 等)。Y 轴上表示每种类型的植株数目。分别用箭头表示 MM 和 Lyc4/78 的平均亲代数值。

[0042] 图 4 显示了普通番茄栽培种 MoneyMaker 和小花番茄 G1.1601 杂交的结果。F<sub>2</sub> 群中的关于发病率 (图 4A) 和病变生长 (图 4B) 的分离情况 (基于 F<sub>3</sub> 系的平均值)。发病率是在 x 轴上,单位是百分比 (图 4A) 以及刻度是 5% (12.5-17.5%;17.5-22.5% 等)。病变生长是在 x 轴上,单位为 mm (图 4B) 和刻度为 0.5mm (2.75-3.25 ;3.25-3.75 等)。在 y 轴上,显示了每种类型的植株的数目。

[0043] 图 5 显示了如在此所述的小花番茄 QTL 的连锁图。QTL-3p 位于标记物 P15M48-234、P18M50-167、TG599、P18M51-486、P22M50-151 和 P14M60-65 所示的区域内。QTL-4p 位于标记物 P14M48-158 和 P14M48-34xCD (=表 2 中的 P14M48-349) 所示的区域内。QTL-9p 位于标记物 TG10、P22M50-56、P14M48-56、P14M50-82、P14M50-204、P15M48-138 (=表 2 中的 P15M48-137)、P14M50-174 (=表 2 中的 P14M50-176)、P22M51-201、P15M48-54、TM2a、P22M51-165、P14M48-120、TG551、P15M48-15xCD (=表 2 中的 P15M48-155) 所示的区域内。

[0044] 图 6 显示了如在此所述的多毛番茄 QTL 的连锁图和 QTL 图表。图谱是对图 1 的图谱的更新,更清楚地显示了基因组区。所示的与 QTL 相关的所有标记物 (那些从 TG301 到并包括 C1 上的 TG460 的标记物;那些从 TG145 到并包括 C2 上的 At5g64670 的标记物;以及那些从 TG339 到并包括 C4 上的 T1405 的标记物) 可以被用作本发明的各个部分中的标记物。这个更新的版本提供了本发明的各个部分中的优选实施方式的基础。

## 具体实施方式

### [0045] 定义

[0046] 在此提供的标题并不作为对整体引用本说明书所具有的本发明的各方面或实施方式的限制。因此,通过整体地引用本说明书能更充分地定义在下面所定义的术语。

[0047] 术语“葡萄孢”在此表示灰色葡萄孢,也称作灰霉或灰斑,这是一种常见于番茄的茎、叶和果实的疾病。一般认为植物致病性真菌核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 具有与灰色葡萄孢相似的感染机制 (Prins et al., 2000)。尽管番茄的核盘菌感染在经济上远没有灰色葡萄孢感染重要,但是两种真菌都分泌一大类蛋白酶、植物细胞壁降解酶、毒素以及草酸。已知这些因素中有一些因素在两种真菌的感染策略中都起到了作用。因此,相信赋予葡萄孢抗性的机制和基因能同样有效地提供抗核盘菌感染的抗性。因此,当在此引用

“葡萄孢抗性”时,这些抗性应当被理解为包括对核盘菌科 (Sclerotiniaceae) 的任何真菌的抗性,优选地是对核盘菌和灰色葡萄孢的抗性,更优选地是对灰色葡萄孢的抗性。

[0048] 术语“等位基因”在此表示任何一种或多种基因的可选择形式,所有的等位基因都涉及至少一种性状或特性。在二倍体细胞或生物体中,给定基因的两种等位基因都占据着一对同源染色体上的相应基因座。因为本发明涉及 QTL,即可包括一种或多种基因以及调节序列的基因组区,在某些情况中,用“单倍型”(即染色体片段的等位基因)代替“等位基因”是更为准确的,但是在这些情况中,术语“等位基因”应当被理解为包括术语“单倍型”。

[0049] “基因”在此被定义为由 DNA 序列组成的遗传单位,所述 DNA 序列占据着染色体上的特殊位置以及含有生物体中的特殊特征或性状的遗传构建体。

[0050] “基因座”在此被定义为给定基因所占据的给定物种的染色体上的位置。

[0051] 术语“杂合子的”在此表示当不同的等位基因位于同源染色体上的相应基因座时所存在的遗传状态。

[0052] 术语“纯合子的”在此表示当相同的等位基因位于同源染色体的相应基因座时的遗传状态。

[0053] 术语“杂种”在此表示两种遗传学上不同的个体之间的杂交的任何子代,包括但不限于两种近交系之间的杂交。

[0054] 术语“近交”在此表示基本上纯合子的个体或品系。

[0055] 在本申请中,“重组事件”被理解为表示有丝分裂交换。

[0056] 术语“渐渗”、“被渐渗的”和“渐渗的”表示天然的和人为的过程,其中通过杂交这些物种将一种物种、变种或栽培种的基因移动到了另一种物种、变种或栽培种的基因组内。任选地通过与轮回亲代的回交可以实现这些过程。

[0057] “遗传工程”、“转化”和“遗传修饰”在此都是表示分离的和克隆的基因向另一生物体的 DNA (通常是染色体 DNA 或基因组) 中的转移的同义词。

[0058] 术语“分子标记物”在此表示在方法中用于显示核酸序列的特征差异的指示物。这些指示物的实例是限制性片段长度多态性 (RFLP) 标记物、扩增片段长度多态性 (AFLP) 标记物、单核苷酸多态性 (SNPs)、微卫星标记物 (例如 SSRs)、序列特征性扩增区 (SCAR) 标记物、裂解性扩增多态性序列 (CAPS) 标记物或同工酶标记物或在此所述的定义出特异的遗传和染色体的位置的标记物的组合。

[0059] 术语“抗”和“抗性”包括对感染的部分和完全的抗性。葡萄孢易感的番茄植株可以是无抗性的或者具有低水平的葡萄孢抗性。

[0060] 术语“植物部分”在此表示番茄植株的部分,包括单个细胞和细胞组织例如植物中的完整的植物细胞、从中可以再生成番茄植株的细胞团和组织培养物。植株部分的实例包括,但不限于花粉、胚珠、叶、胚、根、根尖、花药、花、果实、茎、枝条、和种子的单个细胞和组织以及花粉、胚珠、叶、胚、根、根尖、花药、花、果实、茎、枝条、接穗、根茎、种子、原生质体、愈伤组织等。

[0061] 术语“群”在此表示共享有共同的遗传衍生性植株的遗传异源的植株库。

[0062] 术语“番茄”在此表示番茄属的任一植物、系或群,包括但不限于樱桃番茄、奇士曼尼番茄、智利番茄、克梅留斯基番茄、普通番茄 (或番茄 (或 *Solanum lycopersicum*))、多毛番茄、小花番茄、潘那利番茄、秘鲁番茄、醋栗番茄或类番茄茄。尽

管 Linnaeus 首先将现代番茄分类成了茄属,但是其科学名字多年来一直都是普通番茄 (*Lycopersicon esculentum*)。同样,现代番茄的野生亲株已经被分类到了番茄属内,例如潘那利番茄、多毛番茄、秘鲁番茄、智利番茄、小花番茄、克梅留斯基番茄、奇士曼尼番茄、樱桃番茄和醋栗番茄。在过去的数年里,番茄研究者和植株学家对是否重新分类这些物种的名字一直都有争议。新提出的现代番茄的科学名字是番茄 (*Solanum lycopersicum*)。同样,可以改变野生物种的名字。*L. pennellii* 可以变成 *Solanum pennellii*, *L. hirsutum* 可以变成 *S. habrochaites*, *L. peruvianum* 可以分为 *S. ' N peruvianum'* 和 *S. ' Callejon de Huayles '*, *S. peruvianum*、和 *S. corneliomuelleri*, *L. parviflorum* 可以变成 *S. neorickii*, *L. chmielewskii* 可以变成 *S. chmielewskii*, *L. chilense* 可以变成 *S. chilense*, *L. cheesmaniae* 可以变成 *S. cheesmaniae* 或 *S. galapagense*, 以及 *L. pimpinellifolium* 可以变成 *S. pimpinellifolium* (Solanacea Genome Network(2005) Spooner and Knapp ;

[0063] [http://www.sgn.cornell.edu/help/about/solanum\\_nomenclature.html](http://www.sgn.cornell.edu/help/about/solanum_nomenclature.html)。

[0064] 术语“变种”或“栽培种”在此表示一组相似的植株,它们的结构或遗传特点和 / 或性质与同一物种内的其他变种都可以区分。术语“QTL”在此表示本领域认可的含义。术语“与番茄的灰色葡萄孢抗性相关的 QTL”以及更短的术语“葡萄孢抗性的 QTL”都表示位于番茄的特殊染色体上的与至少一个编码葡萄孢抗性的基因或者至少一个调节区 (即控制一种或多种涉及葡萄孢抗性的染色体区域) 相关的区域。基因的表型表达例如可以被视为降低病变生长速率和 / 或降低发病率。QTL 例如可以包括一种或多种其产物能赋予遗传抗性的基因。或者, QTL 例如可以包括其产物影响植物基因组上的其他基因座上的基因的表达并据此赋予葡萄孢抗性的调节基因或序列。通过用一种或多种分子基因组标记物指示出其在相应的野生番茄株的基因组中的遗传位置可以确定出本发明的 QTL。一种或多种标记物反过来可以指示出特异的基因座。通常用相同染色体上的基因座之间的交换频率测定出基因座之间的距离。两个基因座离得越远,它们之间发生交换的可能性就更大。相反地,如果两个基因座非常接近,它们之间发生交换的可能性就越小。通常 1 厘摩 (cM) 等于基因座 (标记物) 之间的 1% 重组。当用多个标记物指示出 QTL 时,端点标记物之间的遗传距离是 QTL 尺寸的指示。

[0065] 术语“葡萄孢易感的受体番茄植株”在此表示接受从包括葡萄孢抗性的 QTL 的供体番茄植株中获得的 DNA 的番茄植株。所述“葡萄孢易感的受体番茄植株”可以已经包括或者没有包括一种或多种葡萄孢抗性的 QTL,在这种情况下该术语表示将要接受附加的 QTL 的植株。

[0066] 术语“天然的遗传背景”在此表示 QTL 的初始遗传背景。这种背景可以是例如抗葡萄孢的番茄野生株的基因组。例如,可以在多毛番茄 LYC4/78 的 1、2 和 4 号染色体以及小花番茄 G1. 1601 的 3、4 和 9 号染色体的特殊位置上发现本发明的 QTL。作为一个实例,多毛番茄 LYC4/78 代表多毛番茄 LYC4/78 的 1、2 和 4 号染色体上的 QTL 的天然遗传背景。多毛番茄 LYC4/78 也代表所述 QTL 的天然遗传背景。相反地,涉及将包括 QTL 和其赋予抗性部分的 DNA 从多毛番茄 LYC4/78 的 1 号染色体转移到另一种番茄物种的 1 号染色体的相同位置的方法将使得 QTL 或所述其赋予抗性部分不处于其天然的遗传背景内。

[0067] 术语“发病率”在此被定义为反映植物减少感染发生的能力的参数,例如通过确定

植株在与感染性病原体接触后发生感染的情况可以测定出这个参数。

[0068] 术语“病变生长的速率”和“病变生长速率”在此被定义为反映植株减缓或减少感染进程的能力的参数,例如通过确定出扩展性病变的生长速率可以测定出这个参数。

[0069] 术语“定量测定”在此被定义为测定或评价的方式,包括测量,特别是测量在数量和数目方面可被测定的部分。关于严重程度以及用更大、更多、更少、或相等或增加的或降低的幅度表示的测定都不在本术语“定量测定”的范围之内,所述术语最终表示存在用于测定绝对值的客观计数机制。因此“定量测定发病率和 / 或病变生长速率”优选地包括测定植株和感染病原体之间所有可能的造成可测量病变的感染性接触的百分比(评价发病率),和 / 或测定出所述一种和多种病变的直径、周长、面积或体积在合适真菌生长的条件下随着时间的增长(评价病变生长的速率)。

[0070] 术语“标准实践条件”、“标准温室条件”和“标准条件”都表示例如为了确定出疾病抗性的表型特征的目的,作为标准的植株生长或培育的光照、湿度、温度等条件。例如对于温室,这表示 16h 白昼、15-25℃。更一般性而言,该术语表示 8 到 24h 光照期(光合成光子通量(PPF)为 50 到 1000  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )的标准和参照的生长条件,更优选地是 16 小时光照和 8 小时黑暗的光照方案、气温约为白天 19℃和夜间 15℃、水蒸汽压缺乏约为 4.4g  $\text{m}^{-3}$ (对应于相对湿度(RH)约为 60-85%)、600-700ppm  $\text{CO}_2$  和大气  $\text{O}_2$  浓度以及大气压(一般为 1008hPa)。可以在近茎部逐滴地或者以喷雾或薄雾的形式施用水和养分。在下面的实施例中进一步说明了标准生物检测法的试验条件例如茎病变长度检测、发病率和病变生长速率测量。更详细地,如实施例 3.10 和 3.11 中所述的进行平均茎病变长度检测。

[0071] 番茄中的与葡萄孢抗性相关的 QTL 的鉴定

[0072] 已知野生番茄种提供了疾病和昆虫抗性性状的合适来源,已经证实野生番茄种的叶子中具有部分的灰色葡萄孢抗性(Urbasch, 1986)。过去有两种因素妨碍了灰色葡萄孢抗性的育种。首先,将部分抗性杂交到商品化育种系中只获得了有限的成功。其次,缺少可靠的和可重复的疾病检测法,所述方法使得能鉴定并定位出造成赋予抗性的遗传物质。

[0073] Urbasch(Urbasch, 1986) 例如利用琼脂栓用菌丝体感染叶子,其给真菌提供过量的养分,这强有力地实现了感染过程。其他研究者已经使用了主观的植株疾病指数,但这不适用于鉴定数量性状基因座(QTL)所需的定量分析。

[0074] 相对好地研究了在实验室条件下番茄中的灰色葡萄孢感染(例如 Benito et al., 1998)。对叶子的滴露接种以及随后在适合温度(15-20℃)下的孵育都造成了在接种部位上快速地(感染后 16-24h(hpi))出现了坏死斑。感染在近 48h 内都被暂时地限定于这个部位。从这个时间点开始,一定比例(通常是 5-10%)的病变开始扩展。这种向外生长被称作“扩展性病变”,其是通过真菌生物量的增长实现的,并在随后的 48h 内造成了对完整小叶的建群。

[0075] 本发明人发现当使用测量抗性的生物检测法时可以鉴定出番茄中与葡萄孢抗性相关的特异 QTL,所述生物检测法定量地测量出番茄植株部分上(优选地是分离的部分,更优选地是茎节段)的感染进程的速率和 / 或接触感染性病原体之后成功实现感染的情况。惊奇地发现,抗葡萄孢的番茄植株的基因组上存在着多个葡萄孢抗性的 QTL,而现有技术的方法只能进行对单个葡萄孢抗性的 QTL 的试验性鉴定。此外,用这些方法发现的 QTL 位于先前与番茄植株的葡萄孢抗性无关的染色体上,以及 QTL 与各种表型的抗性表现有关。因

此,本发明的方法提供了番茄中的葡萄孢抗性的遗传基础是多基因的新观点。

[0076] 例如,发现存在于多毛番茄 LYC4/78 的 2 和 4 号染色体上的基因区造成了发病率的下降,而存在于 1 号染色体上的基因区至少部分造成了病变生长速率的降低。发现与这些表型相关的相似的遗传区也存在于小花番茄 G1. 1601,尽管这些基因区不一定都位于相同的染色体上。

[0077] 此外,还发现新的 QTL 区与比现有技术中在 10 号染色体上发现的 QTL 更高水平的抗性相关。因此,本发明的方法能揭示出能赋予植株比先前所能获得的抗性水平更高的抗性水平的葡萄孢抗性的主要 QTL。因此,本发明的方法的一个优点是它能够发现与更高水平的葡萄孢抗性相关的 QTL。用任何可用的方法例如通过使用本发明的方法和通过使用现有技术的传统方法都可以确定出抗性水平。在下面的实施例中提供了对试验方案和条件的详细的描述。

[0078] 一种本发明的用于检测出与番茄的葡萄孢抗性相关的数量性状基因座 (QTL) 的方法或者称为用于鉴定或定位出数量性状基因座 (QTL) 的方法都需要得到 (部分) 抗葡萄孢的番茄植株。用本领域已知的任一方式以及通过利用任一用于确定出所述植株中存在所述 (部分) 抗性的方法都可以提供这种植株。提供 (部分) 抗葡萄孢的番茄植株 (其还可以作为本发明的方法中的供体植株) 使得能够建立或提供染色体标记物,优选地是 AFLP、CAPS 和 / 或 SCAR 标记物,最优选地是 CAPS 和 / 或 SCAR 标记物,至少是所述植株的一条染色体,但优选地是所述植株的所有染色体。通过建立全长所述染色体上的染色体标记物文库,可以有效地标记出所述染色体的各个位点。这些方法在本领域是公知的,下面将更详细地描述示例的方法。

[0079] 本发明的用于检测番茄中的与葡萄孢抗性相关的数量性状基因座 (QTL) 的方法包括:第一步是所述 (部分) 抗葡萄孢的供体番茄植株与无抗性的或葡萄孢易感的受体番茄植株杂交生成子代植株。随后用感染量的葡萄孢接触一种或多种子代植株。根据所测试的植株和真菌种的不同,所用的感染量可以有所不同。通常约 1 到 10 个所述真菌的分生孢子到 500 到 5000 个所述真菌的分生孢子是足够量的。

[0080] 随后的步骤包括定量测定出所述杂交生成的一种或多种子代植株中的发病率和 / 或病变生长速率。优选地在多个子代植株中进行所述的定量测定。子代植株优选地是源自抗葡萄孢的供体番茄植株和无抗性的或葡萄孢易感的受体番茄植株之间的杂交的  $F_2$  群的植株。优选地,作为子代,使用分离的  $F_2$  群,更优选地,使用源自普通番茄栽培种 Moneymaker 和多毛番茄 LYC4/78 之间杂交的  $F_2$  群。在实践中,源自所述杂交的  $F_1$  种子可以生长成  $F_1$  植株,在此之后单个  $F_1$  植株自交生成  $F_2$  种子,随后用本发明的方法测定所述种子生成的  $F_2$  植株的发病率和 / 或病变生长速率。同样,  $F_3$  系也可以用于抗性检测。

[0081] 作为抗性生物检测法的一部分,优选地在此所述的茎节段或叶子上进行一种或多种子代植株与感染量的葡萄孢接触以及定量测定所述一种或多种子代植株的发病率和 / 或病变生长速率的步骤,优选地在茎节段上进行抗性生物检测。本领域技术人员应理解如下面所述的检测的变异是可能的。

[0082] 基本上如下进行茎节段上的抗性生物检测:首先,播种子代植株的种子并生成合适的高度近似为 50cm 的苗 / 植株。去除植株的茎顶部的 5-10cm 以及底部的 5-10cm,剩下的 30cm 可以被切成 5-6cm 的相等节段。优选地将茎节段垂直地放置于格子内,茎底部放置

于湿滤纸上。在接种之前,给茎节段适当地喷雾水,以保证接种物在创伤表面的均匀播散。然后用灰色葡萄孢的分生孢子悬浮液接种每个茎节段。可以给每个茎节段的顶部施用合适量的接种物,例如 1 滴约  $5 \mu\text{l}$ 、包括近  $10^6$  分生孢子  $\text{ml}^{-1}$  的接种物。然后在合适温度约  $16^\circ\text{C}$ 、优选地在暗处以及优选地在高湿度(例如  $100\% \text{RH}$ )下孵育茎节段。通过在接种后的不同时间间隔内用游标卡尺测量腐烂症状的最大进程量可以定量地测定出感染进程。然后可以在多个合适的时间间隔例如感染后(hpi)96、120和144小时以定量的方式检查茎的病变形(发病率)和病变生长。非常合适的参数包括例如用测径器测量到的病变大小的测量值。为了校正季节或植物栽培所引起的变差,生物检测的定量测量值可以涉及与易感对照或参照系的比较测量值。通过用扩展性病变的总数除以接种物的总滴数可以合适地测定出发病率。然后用特殊基因型上的扩展性病变的比例除以在对照或参照基因型中观察到的扩展性病变的比例,并用百分比表示。可替代地或者附加地,通过计算出合适时间内(例如24h内)的病变大小的增加值(例如mm单位)可以测定出病变生长速率。可以从定量分析中删除非扩展性病变的数据。然后可以任选地用病变生长速率除以在对照或参照基因型中观察到的病变生长速率,并用百分比表示或者用绝对值表示(例如单位为毫米)。

[0083] 或者,通过利用如下的叶感染生物检测可以筛选植株:首先,播种番茄种子并生长成苗/植株。对于每个单个植株,可以从主茎切下一片或两片复叶,并将其转移到预先浸湿的花卉泡沫(florigist foam)内。然后将花卉泡沫放置于含有自来水的Petri皿内,随后将其放置于含有湿滤纸的经喷雾湿化的容器内。用本领域已知的方法例如如Benito等,1998年所述的方法可以制备出包括灰色葡萄孢的分生孢子的合适的接种物。然后,用灰色葡萄孢的分生孢子悬浮液通过向叶的上表面上滴上多滴例如6到10滴接种物(每滴 $2 \mu\text{l}$ )接种复叶。然后关闭容器,并在合适温度约 $15\text{--}20^\circ\text{C}$ 、优选地在暗处以及优选地在高湿度下孵育叶子。然后可以在多个合适的时间间隔例如感染后(hpi)96、120和144小时以如上述的用于茎生物检测的定量方式检查叶的发病率和病变生长。

[0084] 本发明的用于检测番茄中的与葡萄孢抗性相关的数量性状基因座(QTL)的方法还包括建立联系在所述一种或多种子代植株中所观察到的发病率和/或病变生长速率和存在染色体标记物的遗传连锁图,并将所述图上的与降低发病率和/或降低病变生长速率相关的相邻的标记物分配给数量性状基因座的步骤。

[0085] 用本领域已知的任何方法都可以建立出联系所述一种或多种子代植株中所观察到的发病率和/或病变生长速率和存在供体番茄植株的染色体标记物的遗传连锁图。本领域技术人员知道用于鉴定与抗性数量性状基因座(QTL)相关的分子标记物以及在遗传连锁图中基因定位(mapping)出这些标记物的方法(见例如Bai et al., 2003; Foolad et al., 2002; vanHeusden et al., 1999)。利用这些软件包例如JoinMap<sup>®</sup>和MapQTL<sup>®</sup>(见实施例)或者可以进行变异分析的任一标准统计包都可以合适地计算出葡萄孢抗性表型和标记物基因型之间的相关性。分子标记物可以被用于构建遗传连锁图并鉴定出葡萄孢抗性的数量性状基因座(QTL)。下面将更详细地描述合适类型的分子标记物以及获得这些标记物的方法。

[0086] 通过减少生物检测中的实验变差和/或通过构建完全回交近交群(BIL)还可以改进本发明的用于检测番茄中的与葡萄孢抗性相关的数量性状基因座(QTL)的方法。通过联合本发明的方法使用这种BIL系,甚至可以更精确地评价出定量的灰色葡萄孢抗性,以及

可以鉴定出附加的 QTL。

[0087] 分子标记物和 QTL

[0088] 用分子标记物显现出核酸序列之间的差异。这种显现作用可能取决于 DNA-DNA 杂交技术 (RFLP) 和 / 或是因为利用聚合酶链反应的技术 (例如 STS、微随体、AFLP)。在基于这些亲代基因型杂交的绘图群 (例如 BC<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>, 见图 2) 中, 两种亲代基因型之间的所有差异都是分离的。可以比较不同标记物的分离, 并计算出重组频率。不同染色体上的分子标记物的重组频率通常是 50%。在位于相同染色体上的分子标记物之间的重组频率取决于标记物之间的距离。低重组频率对应于染色体上的标记物之间的低距离。对所有重组频率的比较将形成分子标记物在染色体上的最合乎逻辑的次序。在连锁图中可以描绘出这个最合乎逻辑的次序 (Paterson, 1996)。连锁图上的一组与降低发病率和 / 或降低病变生长速率相关的邻接的或相邻的标记物可以精确地突出 QTL 的位置。

[0089] 在鉴定出 QTL 之后, 例如通过评价在研究中出现 QTL 分离的 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 后代中的葡萄孢抗性可以验证 QTL 效应 (抗性)。利用在此所述的茎或叶生物检测可以合适地进行葡萄孢抗性的评价。

[0090] 利用本发明的方法可获得的抗葡萄孢抗性的 QTL 是本发明的一个方面。这些 QTL 的特征是, 当它们存在于植株内时, 它们是在所述植株与感染量的葡萄孢物质接触之后出现发病率降低和 / 或病变生长速率降低的指示, 可以提供任何形式的所述葡萄孢物质, 例如分生孢子或菌丝体的形式。

[0091] 本发明也涉及番茄中的抗葡萄孢抗性的 QTL, 其中所述 QTL 选自由与葡萄孢抗性相关的多毛番茄 LYC4/78 的 1、2 和 4 号染色体上的 QTL 以及小花番茄 G1. 1601 的 3、4、和 9 号染色体上的 QTL 组成的组。用表 1 和 2 所列的标记物以及图 1、5 和 6 所示的标记物更为清楚地定义或指示出这些 QTL。表 1 和图 1 和 6 显示了在源自普通番茄栽培种 Moneymaker 和多毛番茄 LYC4/78 杂交的 F<sub>2</sub> 群中找到的 QTL。表 2 和图 5 显示了在源自普通番茄栽培种 Moneymaker 和小花番茄 G1. 1601 杂交的 F<sub>2</sub> 群中找到的 QTL。在两个表中, 用所列的 AFLP 标记物显示出了 QTL 所位于的基因组区。本发明的 QTL 包括 DNA 形式的能赋予番茄植株中的 (部分) 葡萄孢发病率或降低葡萄孢病变生长速率的遗传信息。本发明的遗传信息例如可以包括基因或调节元件。

[0092] 表 1: 在普通番茄栽培种 Moneymaker x 多毛番茄 LYC4/78 的杂交子代中找到的 QTL 以及相关的定量抗性信息。

[0093]

QTL	标记物 <sup>1*</sup>	代码 <sup>2</sup>	染色体	发病率 <sup>3,4</sup>	病变大小 <sup>3,4</sup>
QTL-1h 的病变生长	P-GT M-CAT-412h	P22M50-412h	1	aa50. 1	aa8. 8mm
	P-AT M-CAT-349h	P14M50-349h		ab50. 0	ab7. 8mm
	P-AT M-CTC-69h	P14M60-69h		bb42. 8	bb7. 1mm
	P-AT M-CAG-192h	P14M49-192h			
	P-AT M-CAG-232h	P14M49-232h			
	P-ATM-CAG-260e	P14M49-260e			
	P-AT M-CAT-503h	P14M50-503h			
	P-CT M-CAT-124h	P18M50-124h			
	P-AT M-CAG-114h	P14M49-114h			

QTL-2h 的发病率	P-AT M-CTC-537h P-CA M-CAC-257e P-AT M-CAG-327h P-AT M-CAG-325h P-AT M-CTG-286e P-AT M-CTG-125h P-CT M-CCA-134h CT128 <sup>5</sup>	P14M60-537h P15M48-257e P14M49-327h P14M49-325h P14M61-286e P14M61-125h P18M51-134h idem	2	aa63.4 ab47.1 bb43.5	aa7.6mm ab7.9mm bb7.8mm
QTL-4h 的发病率	P-CT M-CCA-170e P-CT M-CCA-305h P-AT M-CTC-263e P-AT M-CTG-293h	P18M51-169.5e P18M51-305.4h P14M60-262.9e P14M61-292.7h	4	aa51% ab53% bb42%	未测定
QTL-4h 的发病率 (依据其他标记物的测试)	TG609 <sup>6</sup>	idem P14M48-345e P14M48-177e P18M50-147e	4	aa66% ab69% bb46%	未测定

[0094] <sup>1</sup> 标记物命名:例如 P-GTM-CAT-412h, 其中 P 和 M 是常用的 PstI 和 MseI 引物序列或通用引物 (Vos et al., 1995; Bai et al. 2003), 加上如两个数字扩展码所示的 2 个或 3 个额外的选择碱基。412 是所形成的多态性片段的碱基对的近似大小 (给定大小  $\pm 2$  个碱基对)。大小通常地被四舍五入, 但是也可以给出有小数的大小。可以在普通番茄栽培种 MoneyMaker (e) 或多毛番茄 LYC4/78 (h) 中扩增该片段。Bai 等, 2003 详细地描述了引物和连接子序列。

[0095] <sup>2</sup> 常常用代码表示 AFLP 引物组合。对于 P、M 见标记物命名。两个数字扩展码如下: 14:AT、15:CA、18:CT、22:GT、48:CAC、49:CAG、50:CAT、51:CCA、60:CTC、61:CTG。

[0096] <sup>3</sup> aa: 标记物纯合子的普通番茄; ab: 标记物杂合子; bb: 标记物纯合子的野生亲属株多毛番茄 LYC4/78。

[0097] <sup>4</sup> 用在实施例详细描述的方法测定出发病率和病变生长。

[0098] <sup>5</sup> CT128 (见表 25) 是位于 2 号染色体上的 Tanksley 图 44cM 位置处的标记物 (Tanksley et al. 1992)。

[0099] <sup>6</sup> TG609 (见表 20) 是位于 4 号染色体上的基于番茄 (*S. lycopersicum* 栽培种 . VF36) x 潘那利番茄 LA716 的 F<sub>2</sub> 群的 Tomato-EXPEN1992 组合图 38cM 位置处的 RFLP 标记物 (Tanksley et al. 1992)。

[0100] 更为可靠地, QTL-1h 所位于的基因组区是处于如图 6 所示的标记物 TG301 (表 11) 和 TG460.61 (表 12) 之间。因此, 任一位于该区域内的标记物以及任一依据可公开获得的信息已知其位于该区域内的标记物都可以被用于评价植物的基因组内是否存在 QTL, 可公开获得的信息包括例如共有序列图 Tomato-EXPEN1992 (Tanksley et al., 1992)、Tomato-EXHIR1997 (Bernacchi and Tanksley, 1997)、Tomato-EXPEN2000 (Fulton et al., 2002) 或 Tomato-EXPIMP 2001 (Grandillo and Tanksley, 1996; Tanksley et al. 1996, Doganlar et al. 2002)。图 6 的栏显示了最优选的区域。

[0101] 最为可靠地, QTL-2h 所位于的基因组区是处于如图 6 所示的标记物 TG145 (表 15) 和 At5g64670 (表 19) 之间。因此, 任一位于该区域内的标记物以及任一依据可公开获得的信息已知其位于该区域内的标记物都可以被用于评价植物的基因组内是否存在 QTL。图 6

的栏显示了最优选的区域。

[0102] 最为可靠地, QTL-4h 所位于的基因组区是处于如图 6 所示的标记物 TG609 (表 20) 和 C2At1g74970 (表 24) 之间。因此, 任一位于该区域内的标记物以及任一依据可公开获得的信息已知其位于该区域内的标记物都可以被用于评价植物的基因组内是否存在 QTL。

[0103] 表 2: 在普通番茄栽培种 MoneyMaker x 小花番茄 G1. 1601 杂交的子代中发现的 QTL 以及相关的数量抗性信息。

[0104]

QTL	标记物 <sup>1</sup>	代码 <sup>2</sup>	染色体	发病率 <sup>3</sup> (个体数目)	病变大小
发病率的 QTL-3p	P-CA M-CAC-234p	P15M48-234p	3	aa70% (12)	aa5.7mm
	P-CT M-CCA-486p	P18M51-486p		b-49% (87)	b-5.1mm
	P-AT M-CTC-65p	P14M60-65p			
发病率的 QTL-4p	E-AGA M-CAT-115p	E39M50-115p	4	aa58% (17)	aa5.9mm
	P-AT M-CAC-158p	P14M48-158p		b-45% (76)	b-5.1mm
	P-AT M-CAC-349p	P14M48-349p			
病变生长的 QTL-9p	P-AT M-CAT-176p	P14M50-176p	9	aa49% (27)	aa5.8mm
	P-CA M-CAC-137p	P15M48-137p		b-51% (56)	b-4.9mm
	P-CA M-CAC-155p	P15M48-155p			

[0105] <sup>1</sup> 标记物命名: 例如 P-CAM-CAC-234p, 其中 P、M 和 E 是常用的 PstI、EcoRI 和 MseI 引物序列或通用引物 (Vos et al., 1995; Bai et al. 2003), 加上所示的 2 个或 3 个额外的选择碱基。234 是所形成的多态性片段的碱基对的近似大小 (给定大小  $\pm 2$  个碱基对)。在普通番茄栽培种 MoneyMaker (e) 或小花番茄 G1. 1601 (p) 内扩增该片段。Bai 等, 2003 详细地描述了引物和连接子序列。

[0106] <sup>2</sup> 常常用代码表示 AFLP 引物组合。对于 P、M 见标记物命名。

[0107] <sup>3</sup> aa: 标记物纯合子的普通番茄; b-: 一个等位基因是野生亲株 (此处是小花番茄), 另一个等位基因可以是普通番茄或野生亲株。

[0108] 最为可靠地, QTL-3p 所位于的基因组区是由标记物 P15M48-234、P18M50-167、TG599、P18M51-486、P22M50-151 和 P14M60-65 所示的区域。

[0109] 最为可靠地, QTL-4p 所位于的基因组区是由标记物 P14M48-158 和 P14M48-34xCD (= 表 2 中的 P14M48-349) 所示的区域。

[0110] 最为可靠地, QTL-9p 所位于的基因组区是由标记物 TG10、P22M50-56、P14M48-56、P14M50-82、P14M50-204、P15M48-138 (= 表 2 中的 P15M48-137)、P14M50-174 (= 表 2 中的 P14M50-176)、P22M51-201、P15M48-54、TM2a、P22M51-165、P14M48-120、TG551、P15M48-15xCD (= 表 2 中的 P15M48-155) 所示的区域。

[0111] 所有在普通番茄栽培种 MoneyMaker x 小花番茄 G1. 1601 杂交的子代中发现的 QTL 的标记物以及任一依据可公开获得的信息已知其位于该区域内的标记物都可以被用于本发明的各个部分。

[0112] 优选地, 本发明的 QTL 包括至少一种与所述 QTL 相连的表 1 或 2 的标记物或如图 1、5 或 6 所示的标记物。因为使得能赋予葡萄孢抗性的 QTL 的核酸序列可能仅仅是所鉴定到的整个 QTL 的一部分, 因此标记物只指示出了遗传区的连锁遗传性或者缺少这些遗传区内的所观察到的重组。因此, 要注意表 1 和 2 所列的标记物以及图 1、5 和 6 所示的标记物

都只指示出了特定番茄系的基因组中的本发明的 QTL 所处于的染色体区域,以及要注意这些标记物并非必定能确定出 QTL 的界限或结构。因此,包括基本的赋予抗性的核酸序列的 QTL 部分明显地要比所列的特定 QTL 的相邻标记物所示的部分更小。该部分在此被称作 QTL 的“赋予抗性的部分”。因此, QTL 的赋予抗性的部分不必一定要包括所有所述列举的标记物。其他的标记物也可以用于指示各种 QTL,只要这些标记物遗传上与 QTL 相连接,技术人员可以发现或使用与本发明的 QTL 类似的 QTL,但是其中不存在一种或多种与所述 QTL 相连的表 1 或 2 所示的标记物或图 1、5 或 6 所示的标记物。

[0113] 通过使用分子标记物技术,例如用一种或多种与所述 QTL 相连的表 1 或 2 所示的或图 1、5 或 6 所示的 QTL 的标记物,优选地联合抗性生物检测可以鉴定出番茄中的抗葡萄孢抗性的 QTL 的赋予葡萄孢抗性部分。不包括本发明的 QTL 的赋予葡萄孢抗性的部分的番茄植株相对地易感于葡萄孢感染。

[0114] 本发明所提供的标记物可以非常合适地应用于检测疑为抗葡萄孢的番茄植株中是否存在一种或多种本发明的 QTL,且因此可以被用于涉及标记物辅助性育种以及抗葡萄孢番茄植株的选择的方法。优选地,用至少一种与所述 QTL 相连的表 1 或 2 或图 1、5 或 6 所示的 QTL 的标记物进行是否存在本发明的 QTL 的检测。因此,在另一个方面,本发明涉及一种用于检测是否存在葡萄孢抗性的 QTL 的方法,包括检测在疑为抗葡萄孢的番茄植株中是否存在所述 QTL 的核酸序列,用所述标记物可以检测出其的存在。

[0115] 可以用本领域技术人员已知的方法确定出本发明的 QTL 的核酸序列。例如,通过对所述植株基因组的片段化以及选择出具有一种或多种作为所述 QTL 的指示的标记物的那些片段可以从抗葡萄孢的供体植株中分离出包括所述 QTL 或其赋予抗性部分的核酸序列。随后或可替代地,作为所述 QTL 的指示的标记物序列(或其部分)可以被用作 PCR 扩增引物,以便从所述植株中获得的基因组核酸样品或基因组片段中扩增出包括所述 QTL 的核酸序列。然后可以纯化出所扩增的片段,以便获得分离的 QTL。然好用标准的测序方法可以获得 QTL 的核苷酸序列和/或包含其中的任一附加的标记物。

[0116] 本发明的方法因此涉及包括本发明的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分的分离的核酸(优选地是 DNA)序列。因此,指示出各种在此所述的 QTL 的标记物可以被用于从番茄中鉴定、分离和纯化出编码葡萄孢抗性的一种或多种基因。

[0117] 通过确定与所述 QTL 相关的一种或多种标记物的核苷酸序列以及为所述标记物序列设计出内引物(所述引物可以用于进一步地确定出所述标记物序列外的 QTL 的序列)例如也可以分辨本发明的 QTL 的核苷酸序列。例如,通过在确定目标植物的基因组中是否存在所述标记物中所用的电泳凝胶中分离所述的标记物以及例如用本领域公知的双脱氧链终止法确定出所述标记物的核苷酸序列可以获得表 1 和表 2 的 AFLP 标记物的核苷酸序列。

[0118] 在这种用于检测疑为抗葡萄孢的番茄植株中是否存在 QTL 的方法的实施方式中,本发明也可以包括步骤:为与所述 QTL 相连的标记物的核酸序列提供在严格杂交条件下能够与之杂交的寡核苷酸或多核苷酸,所述标记物优选地选自与所述 QTL 相连的表 1 和 2 以及图 1、5 或 6 所示的标记物;将所述寡核苷酸或多核苷酸与疑为抗葡萄孢的番茄植株的基因组核酸接触,并确定出是否存在所述寡核苷酸或多核苷酸与所述基因组核酸的特异杂交。优选地,在从所述疑为抗葡萄孢的番茄植株中获得的核酸样品中进行所述的方法,尽管

也可以采用原位杂交方法。同样,在更为优选的实施方式中,一旦确定出 QTL 的核苷酸序列,本领域技术人员就可以设计出能够在严格杂交条件下与所述 QTL 的核酸序列杂交的特异杂交探针或寡核苷酸,并且可以在用于检测疑为抗葡萄孢的番茄植株中是否存在本发明的 QTL 的方法中使用这些杂交探针。

[0119] 短语“严格杂交条件”指的是探针或多核苷酸通常能与复杂的核酸混合物中的靶向子序列杂交但基本上不与其他序列杂交的条件。严格条件是序列依赖性的,在不同的情况下是有所不同的。更长的序列将在更高的温度下特异地杂交。在 Tijssen(Thijssen, 1993) 中可以找到关于核酸杂交的充分指南。一般而言,所选定的严格条件比特定序列在给定离子强度和 pH 下的热解链温度 ( $T_m$ ) 低约 5-10°C。 $T_m$  是(在给定的离子强度、pH 和核酸浓度)其中 50% 的与靶序列互补的探针与靶序列平衡杂交的温度(当存在过量的靶序列时,在  $T_m$  时,50% 的探针被平衡杂交)。严格条件将是其中盐浓度小于约 1.0M 钠离子(通常约 0.01 到 1.0M 钠离子浓度(或其他盐浓度))、pH7.0 到 8.3 以及短探针(例如 10 到 50 个核苷酸)的温度至少是约 30°C,长探针(例如大于 50 个核苷酸)的温度至少是约 60°C 的条件。通过加入去稳定剂例如甲酰胺也可以实现严格条件。对于选择性的或特异的杂交,阳性信号至少是背景信号的两倍,优选地是背景杂交信号的 10 倍。示例的严格杂交条件常常是:50% 甲酰胺、5xSSC、和 1% SDS,在 42°C 下孵育;或 5xSSC、1% SDS,在 65°C 下孵育;在 0.2xSSC 和 0.1SDS,65°C 下洗涤。对于 PCR 而言,约 36°C 的温度通常是低严格的扩增,尽管退火温度根据引物长度可以是在约 32°C 和 48°C 之间不等。在多种参考文献例如 Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel, et al. 1995 中都提供了用于确定杂交参数的附加指南。

[0120] 在此所用的“核酸”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”或所用的语法上的等同词在此都表示至少两个彼此共价连接在一起的核苷酸。寡核苷酸的长度通常是从约 7、8、9、10、12、15、18、20、25、30、40、50 或最多 100 个核苷酸。核酸和多核苷酸是任何长度的聚合物,包括更长的长度例如 200、300、500、1000、2000、3000、5000、7000 或 10000 个核苷酸等。本发明的核酸一般都含有磷酸二酯键,尽管在一些情况中,可以包括核酸类似物,其可以具有其他的骨架,包括例如氨基磷酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯或 O-甲基氨基磷酸酯键(见 Eckstein, 1991)、和肽核酸骨架及连键。可以使用天然存在的核酸和类似物的混合物。特别优选的寡核苷酸的类似物是肽核酸(PNA)。

#### [0121] 用转基因方法生成抗葡萄孢的番茄植株

[0122] 根据本发明的另一个方面,包括本发明的至少一种 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分的核酸(优选地是 DNA)序列可以用于生成抗葡萄孢的番茄植株。在这个方面,本发明提供了本发明的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分用于生产抗葡萄孢的番茄植株的用途,所述用途包含往葡萄孢易感的受体番茄植株中引入包括所述 QTL 的核酸序列。如所述的那样,所述核酸序列可以源自合适的抗葡萄孢的供体番茄植株。能够提供包括至少一种此前所述的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分的核酸序列的两种合适的抗葡萄孢的供体番茄植株是多毛番茄 LYC4/78 和小花番茄 G1. 1601。当本发明描述如何可以鉴定出这种物质时,其他表现出葡萄孢抗性以及包括一种或多种编码葡萄孢抗性的相关番茄植株也可以用作抗葡萄孢的供体植株。可以被用于检测葡萄孢抗性的其他番茄种株包括,但不限于樱桃番茄、奇士曼尼番茄、智利番茄、克梅留斯基番茄、普通番茄、多毛番茄、小花番茄、潘那利番茄、秘鲁

番茄、醋栗番茄和类番茄茄。

[0123] 一旦在合适的供体番茄植株中鉴定出所述核酸序列,用任何可用的方法都可以将包括本发明的葡萄孢抗性的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性部分的核酸序列转移到合适的受体植株内。例如,通过杂交抗葡萄孢的供体番茄植株和易感的受体番茄植株(例如通过渐渗)、通过转化、通过原生质体融合、通过双单倍体技术或者通过胚拯救或任何其他核酸转移系统可以转移所述核酸序列,任选地紧接着的是选择包括 QTL 并表现出葡萄孢抗性的子代植株。对于转基因的转移方法,用本领域已知的方法可以从所述供体植株中分离出包括本发明的葡萄孢抗性的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分的核酸序列,因此用转基因方法例如配子中的载体方式或者任何其他合适的转移元件例如经所述核酸序列涂敷的冲击颗粒的方式可以将分离的核酸序列转移到受体植株中。

[0124] 植物转化通常包含构建出在植物细胞中发挥作用的表达载体。在本发明中,这种载体包括本发明的葡萄孢抗性的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分的核酸序列,其中载体可以包括处于调节元件例如启动子的控制之下或者与之可操纵地连接的赋予葡萄孢抗性的基因。表达载体可以包含一种或多种这种可操纵地连接的基因/调节元件组合,只要组合中所含的至少一种基因编码葡萄孢抗性。载体可以是质粒形式,并且用本领域已知的转化方法例如土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 转化系统可以单独使用或者与其他质粒联合使用所述质粒,以便提供抗葡萄孢的转基因植物。

[0125] 表达载体可以包含至少一种与调节元件(例如启动子)可操纵地连接的标记物基因,其容许通过负选择(通过抑制不含选择性标记物基因的细胞的生长)或者通过正选择(通过筛选标记物基因编码的产物)回收含有标记物的转化细胞。用于植物转化的多种常用的选择性标记物基因在本领域是已知的,并包括例如编码代谢性地解毒作为抗生素或除草剂的选择性化学试剂的酶的基因,或者编码对抑制物不敏感的改变的靶点的基因。一些正选择方法在本领域是已知的,例如甘露糖选择。同样,可以用无标记物转化获得没有所提及的标记物基因的植物,这种技术在本领域是已知的。

[0126] 一种用于向植物内引入表达载体的方法是依据于土壤杆菌的天然转化系统(见例如 Horsch et al.,1985)。根癌土壤杆菌 (*A. Tumefaciens*) 和发根土壤杆菌 (*A. Rhizogenes*) 是遗传学转化植物细胞的植物致病性土壤细菌。根癌土壤杆菌和发根土壤杆菌的 Ti 和 Ri 质粒分别携带造成植物的遗传转化的基因(见例如 Kado,1991)。往植物组织中引入表达载体的方法包括用根癌土壤杆菌直接感染或共培养植物细胞(Horsch et al.,1985)。Gruber and Crosby,1993 和 Moloney et al.,1989 提供了用于土壤杆菌介导的基因转移的载体系统和方法,也见于美国专利 No. 5,591,616。在 Gruber and Crosby,1993 中可以找到对植物表达载体和报告子基因以及转化方案的综合描述以及对土壤杆菌载体系统及用于土壤杆菌介导的基因转移的方法的描述。例如 Miki et al.,1993 和 Phillips, et al.,1988 提供了培养植物组织的一般方法。分子克隆技术和合适表达载体的合适参考手册是 Sambrook and Russell(2001)。

[0127] 另一种用于向植物内引入表达载体的方法是依据于微粒介导的转化,其中微粒的表面携带有 DNA。用冲击装置将表达载体引入到植物组织内,所述冲击装置能将微粒加速到 300 到 600m/s 的速度,这足以穿透植物细胞壁和膜(见, Sanford et al.,1987,1993; Sanford,1988,1990; Kleinet al.,1988,1992)。另一种用于向植物内引入 DNA 的方法是通

对靶细胞的超声处理（见 Zhang et al., 1991）。或者，已经用脂质体或质体融合向植物内引入表达载体（见例如 Deshayes et al., 1985 和 Christou et al., 1987）。也已经报道了，用  $\text{CaCl}_2$  沉淀、聚乙烯醇或聚 L- 鸟氨酸使得 DNA 被直接摄入到原生质体内（见例如 Hain et al. 1985 和 Draper et al., 1982）。也已经描述了对原生质体和完整细胞及组织的电穿孔（D' Halluin et al., 1992 和 Laursen et al., 1994）。

[0128] 在转化番茄靶组织之后，利用本领域目前公知的再生和选择方法，上面所述的可选择标记物基因的表达容许优先选择转化细胞、组织和 / 或植物。表 1 或 2 的标记物也可以用于此目的。

#### [0129] 用非转基因方法生成抗葡萄孢的番茄植株

[0130] 在用于生成抗葡萄孢的番茄植株的另一个实施方式中，可以用原生质体融合将核酸从供体植株转移到受体植株内。原生质体融合是两个或多个原生质体（用酶处理去除了细胞壁的细胞）之间的一种可诱导的或自发的联合（union），以生成单个、两个或多个核的细胞。甚至用不能天然地品种间杂交的植物种类所获得的融合细胞可以被组织培养成为表现出所需的性状组合的杂种植物。更具体地，可以从表现出抗葡萄孢感染的番茄植株或其他株系中获得第一种原生质体。例如可以使用多毛番茄 LYC4/78 的原生质体。可以从第二种番茄或其他植物变种，优选地是包括商业所需特性例如但不仅限于疾病抗性、昆虫抗性、有价值的水果特性等的番茄系中获得第二种原生质体。然后用本领域已知的传统原生质体融合方法融合原生质体。

[0131] 或者，在将包括本发明的一种或多种 QTL 的核酸从供体植物转移到受体植物中可以采用胚拯救。胚拯救可以被用作从其中植物不能生成可育性种子的杂交中分离出胚的一种过程。在这个过程中，植物的受精卵或不成熟种子被组织培养生成新的植株（Pierik, 1999）。

[0132] 本发明也涉及一种生产抗葡萄孢的番茄植株的方法，包括步骤：实施用于检测如上所述的本发明的供体番茄植株中是否存在与灰色葡萄孢抗性相关的数量性状基因座（QTL）的方法，并将包括至少一种所检测到的 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分的核酸序列从所述供体植株转移到葡萄孢易感的受体番茄植株。用先前在此所述的任何一种方法可以实施所述核酸序列的转移。

[0133] 这种方法的优选的实施方式包括通过杂交所述植株经渐渗将所述核酸序列从抗葡萄孢的供体番茄植株转移到葡萄孢易感的受体番茄植株内。因此通过利用传统的育种技术可以适当地实现这种转移。利用标记物辅助性育种（MAS）将 QTL 优选地渐渗到商品化的番茄变种内。标记物辅助性育种或标记物辅助性选择都包含使用一种或多种分子标记物鉴定并选择出含有编码所需性状的一种或多种基因的子代植株。在本实例中，这种鉴定和选择是依据于对本发明的 QTL 的选择或标记物辅助性选择。MAS 也可以用于开发具有相关 QTL 的近同基因系（NIL），容许更为详细的研究每种 QTL 效应，它也是一种用于开发回交近交系（BIL）群的有效方法（见例如 Nesbitt et al., 2001; van Berloo et al., 2001）。根据本优选实施方式开发出的番茄植株可以有利地衍生出受体植株的大多数性状以及衍生出供体植株的葡萄孢抗性。

[0134] 因为现在发现灰色葡萄孢抗性是多基因遗传的，所以优选地用合适的转移方法向单个受体植株中插入至少 2 种、优选地 3 种 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分，即在受体植株

的基因组中堆积有多个 QTL。相信两种或多种本发明的 QTL 的堆积可以造成葡萄孢抗性的增加。本领域技术人员容易理解,用任一方法都可以实现堆积,例如通过用包括多个本发明的 QTL 的核酸构建体转化植株。同样,杂交的每种亲代植株中都可以存在至少一种 QTL,使得在所形成的杂种中含有至少两种 QTL。通过堆积这些抗性性状,可以获得高度抗性的植株。这些植株是本发明的高度优选的实施方式。

[0135] 如上面所简单讨论的那样,可以用传统育种技术将编码葡萄孢抗性的核酸序列渐渗到葡萄孢易感的受体番茄植株内。在一个方法中,其指的是谱系育种,表现出葡萄孢抗性并包括编码葡萄孢抗性的核酸序列的供体番茄植株与优选地表现出商业所需特性例如但不限于疾病抗性、昆虫抗性、有价值的水果特性等的葡萄孢易感的受体番茄植株杂交。然后所形成的植株群(表示 F<sub>1</sub> 杂种)自花授粉并收获种子(F<sub>2</sub> 种子)。筛选由 F<sub>2</sub> 种子所生长成的 F<sub>2</sub> 植株的葡萄孢抗性。可以用多种不同的方法筛选群。

[0136] 首先,可以用传统疾病筛选法筛选群。这些疾病筛选法在本领域是已知的。优选地,使用定量的茎或叶感染生物检测,优选地在如上面更详细描述的本发明的方法中都使用茎生物检测,应用实施例。其次,利用一种或多种此前所述的分子标记物可以实施标记物辅助性选择,以便鉴定出那些包括编码葡萄孢抗性的核酸序列的后代。也可以使用其他方法,即上面的用于检测是否存在 QTL 的方法。也可以用标记物辅助性选择验证从定量生物检测中得到的结果,因此可以联合应用一些方法。

[0137] 抗葡萄孢的番茄植株和种子

[0138] 本发明的抗葡萄孢的番茄植株的特征是具有高水平的抗性。这被定义为是比在易感对照植株中所观察到的抗性更高的抗性水平。事实上,本发明的植株具有比任一目前已知的商品化的番茄变种(即具有商业所需特性的变种)更高的抗性水平。当用生物检测法测量时,本发明的植株对灰色葡萄孢的易感性至少比易感对照植株低 3 倍,在生物检测中,如实施例 3.10 和 3.11 更详细描述的那样,在标准实践条件下,在 3 周时间内测量成体植株的灰色葡萄孢感染所造成的茎病变的平均长度。本发明的植株通常具有抗性水平,在设计为基于这些表征测定抗性的抗性生物检测中,所述抗性水平造成在利用标准实践条件下接种后 3 周的成体植株的灰色葡萄孢病变的平均茎病变长度小于 3.2cm。更常见地,本发明的植株显示出平均茎病变长度小于 2.9cm。本发明的一些植株甚至显示出平均茎病变长度为 2.0cm。考虑到所述数值表示包括 2cm 最初接种伤口的病变长度,因此推论在本发明的植株中观察到了高水平抗性,对于一些 QTL 而言,甚至观察到了完全抗性。与之相比,易感对照植株显示出在相同条件下的平均的平均茎病变长度是从约 3.6cm 到约 6.0cm,平均值为 4.85cm(见表 10)。同样作为对比,在相同条件下,多毛番茄 LA1777(含有 W002/085105 的葡萄孢部分抗性来源的 QTL-10)显示出平均茎病变长度约为 4.3cm。总而言之,在上面所示的抗性生物检测中,本发明的植株显示出其茎病变通常不到易感对照植株的净长度的约 30%( $0.9/2.85 \times 100\%$ ),通常小于部分抗性多毛番茄 LA1777 的净长度的约 40%( $0.9/2.3 \times 100\%$ )。

[0139] 因此,当用生物检测测量时,本发明的植株具有对灰色葡萄孢的易感性比易感对照植株低 3 倍,或者是小于易感对照植株的 1/3。反过来说,如在此所定义的以及如所述的生物检测所确定的那样,本发明的植株的抗性比易感对照植株高出 3 倍以上。对于一些 QTL 或者 QTL 的组合(例如 QTL-1h 和 QTL-3p+QTL-4p 或 QTL-9p+QTL-4p 的组合),观察到

了完全抗性（见表 10）。易感对照植株被定义为对灰色葡萄孢感染显示出正常易感性或无抗性的植株。易感对照植株的实例是杂种普通番茄栽培种“Tradiro”和普通番茄栽培种“Moneyberg”（De Ruiter Seeds CV, 博格圣利克, 荷兰）。

[0140] 通过本发明的方法所获得的抗葡萄孢的番茄植株或其部分也是本发明的一个方面。

[0141] 本发明的另一个方面涉及抗葡萄孢的番茄植株或其部分, 其基因组内包括至少一种 QTL 或其赋予葡萄孢抗性的部分, 所述 QTL 选自由与葡萄孢抗性相关的多毛番茄 LYC4/78 的 1、2 和 4 号染色体上的 QTL 和小花番茄 G1. 1601 的染色体 3、4 和 9 上的 QTL 组成的组, 其中所述 QTL 或其所述赋予葡萄孢抗性的部分并非处于其天然的遗传背景内。本发明的抗葡萄孢的植株可以是任一遗传类型, 例如近交、杂种、单倍体、二倍体、单性结实或转基因类型。此外, 本发明的植株可以是抗性性状的杂合子或纯合子, 优选地是纯合子。尽管本发明的 QTL 以及通过本发明的方法获得的这些 QTL 以及其赋予葡萄孢抗性的部分可以被转移到任何植株内, 以便提供抗葡萄孢的植株, 本发明的方法和植株优选地涉及茄科植物, 更优选地是番茄。

[0142] 利用轮回选择和回交、自交和 / 或二倍体或任何其他用于制备亲代系的技术可以开发出近交的抗葡萄孢的番茄株系。在选择和回交方法中, 通过轮回亲本和第一种供体植株（其不同于轮回亲本, 在此叫做“非轮回亲本”）杂交可以将葡萄孢抗性渐渗到靶向受体植株内（其叫做轮回亲本）。轮回亲本是无抗性的或具有低水平的葡萄孢抗性并且具有商业所需特性例如但不限于疾病抗性、昆虫抗性、有价值的水果特性等的植株。非轮回亲本表现出葡萄孢抗性, 并包括编码葡萄孢抗性的核酸序列。非轮回亲本可以是与轮回亲本杂交可育的任一植物变种或近交系。轮回亲本和非轮回亲本之间的杂交生成的后代可以与轮回亲本回交。然后筛选所形成的植物群。可以用多种不同的方式筛选群。例如, 可以用如先前所述的茎定量生物检测筛选群。然后选择出包括编码葡萄孢抗性所必需的核酸序列和具有商业所需特性的表现出葡萄孢抗表型的  $F_1$  杂种植株, 自交, 并选择数代, 以便容许番茄植株逐渐成为近交系。可以进行这个持续自交和选择的过程 2 到 5 代或更多代。这种育种和选择的结果是生成了具有遗传上同源的与葡萄孢抗性相关的基因以及其他与商业相关性状的基因的系。可以利用一种或多种在此前所述的分子标记物、杂交探针或多核苷酸而不是利用生物检测的表型病变筛选法来进行 MAS, 以便鉴定出那些包括编码葡萄孢抗性的核酸序列的后代。同样地, 可以用 MAS 验证从定量生物检测中获得的结果。一旦做出了合适的选择, 重复该过程。与轮回亲本回交以及选择葡萄孢抗性的过程被重复近 5 代或更多代。该过程所形成的后代是一种或多种编码葡萄孢抗性的基因的杂合子。然后最后回交代被自交, 以便提供葡萄孢抗性的纯合子的纯育种后代。

[0143] 在附加的杂交中, 可以使用在此所述的抗葡萄孢的近交番茄系, 以生成抗葡萄孢的杂种植株。例如, 本发明的第一种抗葡萄孢的近交番茄植株可以与第二种具有商业所需性状例如但不限于疾病抗性、昆虫抗性、有价值的水果特性等的近交番茄植株杂交。这第二种近交番茄系可以是或者可以不是抗葡萄孢的。

[0144] 本发明的另一个方面涉及一种生产种子的方法, 所述种子能生长成抗葡萄孢的番茄植株。在一个实施方式中, 本方法包括步骤: 提供本发明的抗葡萄孢的番茄植株, 所述抗葡萄孢的植株与普通番茄植株杂交, 并收集所述杂交生成的种子, 当播种所述种子时, 其能

生成抗葡萄孢的番茄植株。

[0145] 在另一个实施方式中,本方法包括步骤:提供本发明的抗葡萄孢的番茄植株,所述抗葡萄孢的植株与普通番茄植株杂交,收集所述杂交生成的种子,所述种子再生成植株,用在此所述的任一方法选择抗葡萄孢的植株,自交所选择的植株足够多的世代,以获得在植株中固定有赋予葡萄孢抗性的等位基因的植株,将所由此生成的植株与具有所需表型性状的普通番茄植株回交足够多的世代,以获得具有葡萄孢抗性和所需表型形状和普通番茄植株,以及收集末次回交形成的植株所生成的种子,当播种所述种子时,生长成抗葡萄孢的番茄植株。

[0146] 通过举例说明的方式,而不是限制的方式,现在给出了本发明的实施例。

[0147] 实施例

[0148] 实施例 1:鉴定抗灰色葡萄孢植株的方法

[0149] 1.1 引言

[0150] 本实施例描述了开发用于评价野生番茄基因型库的灰色葡萄孢抗性的定量生物检测法。

[0151] 在野生番茄种中,已经报道了抗灰色葡萄孢的部分抗性,但是这些报道多数都是描述性的和定性的。对部分抗性基因型的鉴定将提供向商品化的育种系中渐渗抗性以便获得具有可控制的抗性水平的株系的前景。可重复的、客观的和定量的检测的可得性以及对于具有遗传上确定的(部分的)灰霉抗性的基因型的鉴定打开了培育番茄变种的抗性育种的途径。

[0152] 本实施例描述了定量疾病检测。本检测被用于叶(叶接种检测)和茎节段(茎接种检测)。测定了疾病易感性的两个参数。第一个参数是发病率(DI),即造成扩展性病变的接种滴的比例。如果原发灰色葡萄孢病变在特定宿主基因型上扩展(部分)失败是植物的遗传性状,这种性状是重要的,因为它直接限制了农作物上的病灶数目。第二个测试参数是24h内的病变生长速率(病变生长, LG)。从原发接种点扩展出的病变显示出在一定时间内以均匀的速度(mm/天)传播,直到病变达到了叶的边缘或茎节段的底部末端。本检测使得能够定量出灰色葡萄孢感染的发生(发病率)和发展(病变生长),形成了两组数量性状数据。可以用该检测筛选番茄种库(此后也称作“株”)是否存在抗性。

[0153] 1.2 植物

[0154] 表3列出了所测试的植物基因型。

[0155] 表3:测试番茄属基因型的列表。

[0156]

代码	来源 <sup>(1)</sup>	种	说明 / 品种	叶 <sup>(2)</sup>	茎 <sup>(2)</sup>	参考文献 <sup>(3)</sup>
78/1604	DRS	<i>L. esculentum</i>	Kecksemeti Torpe	Y	Y	
82/2577	DRS	<i>L. esculentum</i>	Futura	Y	Y	
83/2896	DRS	<i>L. esculentum</i>	Biruinca	Y		
89/3695	DRS	<i>L. esculentum</i>	X 普通番茄 var. cerasiforme		Y	
89/3793	DRS	<i>L. pimpinellifolium</i>			Y	
89/3862	DRS	<i>L. esculentum</i>	Olomoucke	Y		
90/4063	DRS	<i>L. esculentum</i>	L4034	Y		
91/4311	DRS	<i>L. esculentum</i>	Seedathip2	Y	Y	
96/4326	DRS	<i>Solanum lycopersicoides</i>	Gbnr90124	Y	Y	
MM	WU PPW	<i>L. esculentum</i>	Money maker	S	S	
G11290	WU LoPB	<i>L. hirsutum</i>			Y	
G1. 1556	WU LoPB	<i>L. chilense</i>		Y	Y	
G1. 1558	WU LoPB	<i>L. chilense</i>		Y		
G1. 1560	WU LoPB	<i>L. hirsutum</i>		Y	Y	
G1. 1601	WU LoPB	<i>L. parviflorum</i>		Y	Y	
G1. 1615	WU LoPB	<i>L. cheesmanii</i>			Y	
IZ. 2 <sup>(3)</sup>	MPIZK	<i>L. pimpinellifolium</i>			Y	(Urbasch, 1986)
LA. 716	TGRC	<i>L. pennellii</i>		Y		
LA. 2157	TGRC	<i>L. peruvianum</i>			Y	
LA. 2172	TGRC	<i>L. peruvianum</i>			Y	
Lyc. 4/78 <sup>(3)</sup>	IPK	<i>L. hirsutum</i>		Y	Y	(Urbasch, 1986)
T160/79 <sup>(3)</sup>	IPK	<i>L. glandulosum</i>			Y	(Urbasch, 1986)
T566/81 <sup>(3)</sup>	IPK	<i>L. hirsutum</i>			Y	(Urbasch, 1986)

[0157] <sup>1</sup>DRS:De Ruiter 种子(博格圣利克,荷兰);WU PPW:Plantkundig Proefcentrum Wageningen(瓦格宁根大学,瓦格宁根,荷兰);LoPB:植株育种实验室(瓦格宁根大学,瓦格宁根,荷兰);MPIZK:Max Planck Institut für Züchtungsforschung an Kulturpflanze(科隆,德国);TGRC:加州大学戴维斯分校番茄遗传资源中心,加州戴维斯,USA);IPK:Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung(Gatersleben,德国)。

[0158] <sup>2</sup>Y表示在特定检测中测试的基因型;S表示作为易感参照对照的基因型。

[0159] <sup>3</sup>之前发表的抗灰色葡萄孢的抗性。

[0160] 植物生长在最低温度为15℃的温室的12cm盆的盆栽土壤内。从10月到3月给予人工的钠灯光(16h/天)。在发芽后5-7天时,加入10ml FeNaEDTA溶液(3.5g/l),之后在3天后加入10ml微量营养素溶液(0.286g/l H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,0.1558g/l MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O,0.008g/l CuO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O,0.022g/l ZnSO<sub>4</sub>·0.00196(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O)。从发芽开始后2周起,每周加入5ml Hoagland溶液(5mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,5mM KNO<sub>3</sub>,2mM MgSO<sub>4</sub>,1mMKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)。

[0161] 1.3叶检测

[0162] 根据Benito(1998)制备出灰色葡萄孢B05.10的接种物。对于每一单个的植株而言,用锋利的剃刀刀片从主茎中分割下1片或两片被完全拉伸的复叶,并将其转移到预先湿化的花卉泡沫内。花卉泡沫被放置于含有自来水的Petri皿内,随后放置于含有湿滤纸

的喷雾浸湿的容器内。然后通过仔细地向叶的上表面上滴上总共 6 到 10 滴接种物 ( $2 \mu\text{l}$ ) 用灰色葡萄孢的分生孢子悬浮液接种复叶。用喷雾浸湿的塞子密闭容器,并在  $15^{\circ}\text{C}$ 、暗处、 $100\% \text{RH}$  下孵育,基本上如 Benito 等,1998 描述的那样。表 4 的数据来自测试,其中复叶被分成四个小叶以及其中用 10 滴 (每滴  $2 \mu\text{l}$ , 含有 2000 个分生孢子) 接种物接种每个小叶。数天内监测进展性扩展性病变的比例 (发病率) 和病变生长速率。

[0163] 为了校正季节或植物培育所引起的变差,每个试验中的特定基因型的发病率都与在相同试验中测试的 Moneymaker 的发病率相比较。

[0164] 用测径器在感染后 96、120 和 144 小时测量病变大小。用扩展性病变的总数除以接种滴数的总数可以测定出发病率。通过计算出病变大小在 24h 内的增长 (单位为 mm) 可以测定出病变生长速率。从定量分析中删除非扩展性病变的数据。表 4 给出了叶检测的结果。

[0165] 表 4 :经灰色葡萄孢接种的番茄株的叶子的发病率 (DI, %) 和病变生长速率 (LG, mm/天  $\pm$  标准差)。在 1999 年和 2000 年的所示的不同周内进行试验。

[0166]

株	1999											2000	
	10	11	12	16	17	26	27	30	31	33	35	5	6
78/1604 DI				19%						14%			
LG				4.3±1.5						3.3±1.3			
82/2577 DI				26%								32%	
LG				3.1±2.0								6.0±2.0	
83/2896 DI				38%	23%	55%			29%				
LG				3.8±1.3	4.3±1.7	2.3±0.9			3.9±1.2				
89/3862 DI				61%	9%								
LG				4.0±1.0	3.1±1.8								
90/4063 DI										53%			
LG										3.8±1.0			
91/4311 DI						7%			4%			11%	
LG						1.8±0.7			2.0±0.7			3.3±1.3	
96/4326 DI			6%					2%		6%	11%		
LG			7.0±4.1					6.2±1.0		3.1±2.0	3.4±2.4		
T160/79 DI										4%			
LG										1.3±0.9			

[0167]

G1.1556 DI		0%						3%			5%		
LG								2.4±1.0			0.8±0.7		
G1.1558 DI													20%
LG													2.9±1.8
G1.1560 DI							4%				1%		18%
LG							2.8±1.3				3.3±0.5		3.8±2.0
G1.1601 DI			21%					1%			3%		
LG			5.2±1.7					3.1±0.9			1.5±1.3		
LA716 DI	23%	12%											
LG	7.4±1.7	4.6±1.7											
LYC 4/78 DI												3%	
LG												1.1±0.6	
MM DI	78%	24%	53%	73%	19%	57%	31%	25%	65%	15%	77%	26%	41%
LG	6.4±2.3	4.8±1.8	8.2±2.5	3.8±1.4	3.9±1.5	2.8±1.0	4.6±1.1	3.9±1.1	3.4±1.4	2.2±1.5	4.3±1.4	5.3±1.6	3.6±2.2

[0168] 1.4 茎检测 (标准化步骤)

[0169] 如下进行茎检测：去除近 50cm 高植株的茎的顶部 5 到 10cm 和底部 5 到 10cm，剩下的 30cm 被切成 5-6cm 的相等节段。每个茎节段都被垂直放置于格子内，茎基放置于湿滤纸上。在接种之前，用自来水喷雾茎节段，以便保证接种物在伤口表面上的均匀播散。如叶检测所述的那样制备出接种物。向每个茎节段的顶部上施用一滴含有近  $10^6$  分生孢子  $\cdot\text{ml}^{-1}$  的  $5\mu\text{l}$  接种物。在  $15\pm 2^\circ\text{C}$  下、暗处、100% 相对湿度进行接种。通过在接种后的不同时间间隔内用游标卡尺测量腐烂症状的最大进展可以测定出感染进程。

[0170] 对于每个基因型而言，计算出受感染的茎段的百分比。用具有扩展性病变的茎节段的总数除以被接种的节段总数测定出发病率。通过计算出病变大小在 24h 内的增长测定出病变生长速率，由此从分析中删除了非扩展性病变的数据。表 5 给出了茎检测的结果。

[0171] 表 5：经灰色葡萄孢接种的番茄株的茎节段的发病率 (DI, %) 和病变生长速率 (LG, mm/天  $\pm$  标准差)。在 1999 年和 2000 年的所示的不同周内进行试验。

[0172]

周 <sup>1</sup> 株	1999						2000			
	30	32	33	35	46	48	5	6	27	30
78/1604 DI									64%	87%
LG									7.8±1.7	5.6±1.2
82/2577 DI		81%					97%			
LG		7.1±2.4					5.8±2.1			
89/3695 DI		82%					70%			
LG		5.9±2.1					5.7±3.0			
89/3793 DI									57%	57%
LG									2.7±1.2	3.4±1.7
91/4311 DI							41%			
LG							5.5±3.4			
96/4326 DI			90%							
LG			7.8±2.5							
160/79 DI			67%							
LG			2.2±1.4							
G1.1290 DI					19%	72%				
LG					3.0±1.4	5.4±2.0				
G1.1556 DI					29%		41%			
LG					3.7±2.4		6.2±5.0			
G1.1560 DI			28%					7%		
LG			2.8±1.6					7.1±0.7		
G1.1601 DI	40%		92%							
LG	1.8±1.2		3.2±0.9							
G1.1615 DI					54%				89%	
LG					6.3±2.4				5.0±1.8	
I22 DI					77%					
LG					4.5±1.9					
LA2157 DI					16%				86%	
LG					8.3±4.3				10±5.3	
LA2172 DI					41%					
LG					6.6±2.4					
LYC 4/78 DI	29%		59%							
LG	4.5±2.9		1.4±1.1							
T566-81 DI				44%	35%					
LG				3.3±1.8	2.7±1.7					
MM DI		52%	95%	82%	89%	88%	68%	95%	84%	94%
LG		5.4±2.0	5.4±1.7	6.4±1.6	7.8±4.1	9.2±4.4	6.8±3.7	6.6±2.1	6.4±1.6	5.5±1.6

[0173] 1.5 结果

[0174] 测定出每种基因型在数天内的分离的茎感染试验中的发病率和病变生长,通常是从感染后 2 到 4 天开始。在这些试验中,作为参照的普通番茄栽培种(Moneymaker)的发病率在 15 到 78%之间波动。表 4 显示了 14 种基因型的结果,其中用每叶 40 个接种斑(每小叶 10 个)接种源自至少 5 种单个植株的分离的复叶。这 14 种基因型中的发病率应当与在相同试验/周中测定到的对照系普通番茄栽培种 Moneymaker 的发病率相比较。

[0175] 除了基因型 82/2577 和 83/2896(两种都是普通番茄种)外,测试基因型在所有

试验中都显示出了比 Moneymaker 更低的发病率。在三个独立试验中,基因型 G1. 1556、G1. 1560 和 G1. 1601 都显示出低发病率,范围是从 0 到 21%。统计学分析显示基因型 78/1604、91/4311、96/4326、G1. 1556、G1. 1558、G1. 1560、G1. 1601、LA716 和 LYC4/78 中的发病率都明显低于对照品系普通番茄栽培种 Moneymaker 中的发病率 ( $p < 0.05$ )。但是,因为发病率在试验 / 周之间的波动 (15-78%),周之间的较大变差以及在分离的叶检测中观察到的一些差异实际上可能不是非常强的。

[0176] 在这些抗性基因型中 (其发病率要明显低于 Moneymaker 参照),成功扩展的病变常常以与 Moneymaker 相似的速率扩展 (例如 96/4326、G1. 1560、LA716)。没有发现相反的情况,即没有一个基因型虽然表现出与 Moneymaker 相似的发病率,却表现出比 Moneymaker 更慢的病变生长速率。

[0177] 表 4 也给出了关于每种基因型的扩展性病变在 24 小时内 (在感染后 48 和 72 小时之间)的平均生长速率的数据。绝大多数基因型的病变生长速率处于与 Moneymaker 相同的范围内。5 种株 (91/4311、160/79、G1. 1556、G1. 1601 和 LYC4/78) 显示出了更慢的病变生长速率,其与普通番茄栽培种 Moneymaker 的病变生长速率有着显著的统计学差异。

[0178] 在不同季节进行的试验之间的可重复性方面,茎节段感染检测 (表 5) 显示出比叶检测更强。尽管茎节段 (每个植株 5-8 个节段) 的数据点数目远小于叶检测的数目 (每个复叶 40 个接种滴,每个植株测试 1 或 2 片叶子),但是茎节段检测的试验之间的变异性通常更低。茎检测中的对照基因型普通番茄栽培种 Moneymaker 的发病率范围是从 52% 到 95%。17 种基因型 (表 5) 的发病率应当与在相同试验 / 周中测定到的对照品系普通番茄栽培种 Moneymaker) 的发病率相比较。绝大多数基因型都显示出了与对照系 Moneymaker 相似范围内的发病率。基因型 G1. 1556 (29% 和 41%) 和 G1. 1560 (28% 和 7%) 都显示出了发病率的降低。仅仅 G1. 1560 与对照有着统计学显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

[0179] 茎检测中的对照基因型普通番茄栽培种 Moneymaker) 的病变生长速率 (表 5) 范围是从 5.4 到 9.2mm/天。很多基因型都显示出了与对照相似范围内的病变生长速率。但是,在 89/3793、G1. 1601、LYC4/78、T566-81 株中,病变生长速率与对照栽培种 Moneymaker 有着统计学显著性差异 ( $p < 0.01$ )。

[0180] 对于在茎节段检测中被标定 (rated) 为部分抗性的多种基因型而言,对在温室 Rockwool® 上生长的全部植株进行定量检测。目的是评价在实验室条件下的茎节段中表现出抗性的基因型是否真的在半商品化的耕作系统中具有比对照系更高的抗性。植株无序地生长于 Rockwool® 排内,用经孢子形成阶段的灰色葡萄孢严重感染的柑橘类果实填充温室的隔室。通过每天用自来水喷雾地板两次以及保持门窗关闭,保持温室隔室处于高湿度。以规律间隔,在所有植株上制造修剪伤口,并随着时间监测灰霉的发生情况。

[0181] 鉴定出多种表现出两种参数都出现重度降低的野生番茄株,因此提供了向普通番茄内渐渗两种机制上可能是独立的部分抗性的可能来源。

[0182] 实施例 2:对种间番茄杂交 (普通番茄栽培种 Moneymaker x 小花番茄 G1. 1601) 中的灰色葡萄孢抗性的 QTL 基因定位

[0183] 2.1 引言

[0184] 如实施例 1 所示的,筛选一组不同来源的番茄株对真菌病原体灰色葡萄孢的抗性。在茎检测中,小花番茄 G1. 1601 株显示出较低的发病率以及较慢的病变生长 (见上面

的表 4 和 5)。在茎检测中,评价由 130 个  $F_2$  衍生的  $F_3$  群组成的源自小花番茄 G. 1601 和普通番茄栽培种 MoneyMaker 之间杂交的分离群对灰色葡萄孢的抗性。

[0185] 用扩增片段长度多态性标记物构建出连锁图,并进行数量性状基因座分析。检测 QTL 的发病率和病变生长。

[0186] 2.2 植物材料在鉴定出抗性株小花番茄 G1. 1601 之后,用与该株作为基础亲本 (Huang, 2001) 的分离群进行进一步的分析。分离群是由 130 个  $F_2$  衍生的  $F_3$  群组成。

[0187] 2.3 疾病评价

[0188] 从 130 个  $F_3$  群的每个群中,栽培出 5 个苗,并进行如实施例 1 所述(见 1.4)的茎检测。因为现实的原因,完整的测量组被分成(随机地)了 13 个相等大小的部分。每周测量由 50 株植物组成的一个部分。用大组的易感 MoneyMaker 对照植株校正周之间的环境差异。因为现实的原因,本试验没有包含小花番茄 G1. 1601。如实施例 1 所示的进行测量。

[0189] 在接种后的两个时间点(感染后 96 和 120 小时)记录下感染的进程。以这种方式如实施例 1 所述的那样测定出发病率(定义为在最后一次观察时刻显示出疾病症状的被接种茎部分的百分比)和病变生长(定义为在 24 小时内病变发展横过番茄茎的平均速率)。

[0190] 图 4 显示了测量值的分布情况。分布表明正常的、数量性状特征,因此适用于 QTL 基因定位方法。

[0191] 2.4 分子标记物

[0192] 未得到  $F_2$  叶材料,因此收集 12 株源自 130 个  $F_2$  衍生群的每个群的  $F_3$  植株的叶子,并用于 DNA 分离。根据 Vos 等(1995)的方法,利用一组 10 个 Pst/Mse 引物组合进行 AFLP 测定。

[0193] 2.5 连锁分析和 QTL 基因定位

[0194] 因为 AFLP 标记物的显性性质,因此分别计算出父本(小花番茄)和母本(普通番茄)的连锁群。

[0195] 利用 JoinMap<sup>®</sup> 软件包(3.0 版, Plant Research International, 瓦格宁根, 荷兰)分析标记物数据并计算出遗传连锁图。按不同的对数可能性(LOD)阈值形成连锁群。用 Kosambi 函数(Kosambi, 1944)将重组率转化成图距。利用程序 MapChart(Plant Research International)将 JoinMap<sup>®</sup> 的输出值转化成连锁图以及 QTL 曲线的图解格式。利用 MapQTL<sup>®</sup>(4.0 版, Kyazma B. V., 瓦格宁根, 荷兰)通过间隔基因定位(IM)和多 QTL 基因定位(MQM)(Jansen, 1993, 1994)分析表型数据并计算出 QTL。所计算出的  $F_2$  群的表型数据来自  $F_3$  系内的所有植株的疾病检测的平均值。用反正弦转换将发病率数据标准化。用间隔基因定位算法计算出 QTL。

[0196] 对于 130 个  $F_3$  群中的每一个而言,利用 MapQTL<sup>®</sup> 对标记物和疾病数据的组合数据进行 QTL 分析。进行第一轮间隔基因定位,并鉴定出 LOD 谱中的峰值。直接用所有源自一种或其他亲本的标记物计算出独立的连锁图。总共有 192 个 AFLP 标记物被放置于父本和母本连锁图上。单独地用雄性和雌性连锁图进行 QTL 基因定位。确定出 3 种 QTL(见表 6)。

[0197] 表 6:基于非整合图的 QTL 基因定位结果的概述。

[0198]

小花番茄的 QTL	选择区域	最大 LOD	感染% (个体数目)		病变大小
发病率的 QTL (3 号染色体)	23cM	2.0	aa*	70% (12)	aa5.7mm
			b-	49% (87)	b-5.1mm
发病率的 QTL (4 号染色体)	28cM	2.8	aa	58% (17)	aa5.9mm
			b-	45% (76)	b-5.1mm
病变生长的 QTL (9 号染色体)	25cM	2.0	aa	49% (27)	aa5.8mm
			b-	51% (56)	b-4.9mm

[0199] aa 是完整染色体区域纯合的普通番茄。b- 是 QTL 区域杂合的或纯合的小花番茄。

[0200] 具有所有三个 QTL 区域杂合的或纯合的小花番茄 (b-) 的 11 个植株的平均葡萄孢抗性反映出 40% 的发病率以及每天 5.0mm 的病变生长。仅仅 1 个植株是所有三个 QTL 区域纯合的普通番茄,其发病率为 72%,病变生长为每天 7.2mm。5 个植株是 3 种 QTL 中的两种 QTL 纯合的普通番茄,其平均发病率为 67% 以及病变生长为每天 5.8mm (数据没有显示)。

[0201] 该实施例显示出遗传来源例如小花番茄 G1.1601 可以被用于增加番茄中的葡萄孢抗性。可以鉴定出一些发病率和病变生长的 QTL (表 6)。可以在更为先进的育种材料例如回交系中验证这些 QTL。

[0202] 表 7 显示了对普通番茄栽培种 Moneymaker 和小花番茄 G.1601 之间杂交所形成的各种 F<sub>3</sub> 系的疾病抗性试验的试验结果。清楚地显示出在这个试验中所用的 BChirs5 参照系表现出比所列的小花番茄 (L parv) 系更高的抗性水平。但是,也证实小花番茄 QTL 存在 QTL 效应。

[0203] 表 7: 在接种后 3 周的小花番茄 G.1601 株成体植株中的灰色葡萄孢病变的平均茎病变长度。

[0204]

背景*	平均茎病变长度(cm)	标准差	D.I. (%)	QTL-3p (发病率)	QTL-4p (发病率)	QTL-9p (病变生长速率)
Tradiro	6.9	3.6	86			
<b>Durinha</b>	8.1	1.1	100			
<b>Moneyberg</b>	8.1	2.1	100			
<b>GT</b>	8.2	2.0	100			
<b>BChirs5</b>	0.3	1.2	5			
小花番茄系 1						
PV960818	5.7	2.7	88	+	+	+
小花番茄系 2						
92686 (F1)	3.1	2.1	57	n.d.	n.d.	n.d.
小花番茄系 3						
	7.0	2.6	92	+	+	-

[0205]

PV960890						
小花番茄系 6						
PV960811	4.3	1.3	93	n.d.	+	+
小花番茄系 7						
PV960730	4.8	2.1	93	+	+	-
小花番茄系 5						
PV960860	5.9	2.2	100	-	-	-
小花番茄系 4						
PV960875	6.2	1.6	100	+	+	-

[0206] \*) 用黑体字表示参照系: Tradiro 是一种杂种, 依照栽培者的经验其易感于葡萄孢; 依照栽培者的经验, Durintha 是一种具有部分抗性的杂种。Moneyberg 和 Moneymaker 是相似类型的易感系; GT 是具有 TMV 抗性的 Moneyberg; BChris5 是多毛番茄 LYC4/78 渐渗形成的回交系, 包括病变生长的多毛番茄 QTL-1h。 (+): 杂合子或纯合子的存在; (-): 不存在; n. d.: 未测定。

[0207] 实施例 3: 对种间番茄群 (普通番茄栽培种 Moneymaker x 多毛番茄 LYC4/78 株) 中的对灰色葡萄孢的部分抗性的基因定位

[0208] 在这个实施例中, 给出了两个源自多毛番茄 LYC4/78 的赋予对灰色葡萄孢的部分抗性的 QTL 基因座。通过评价两种其中这两个 QTL 基因座之一分别为分离状态的 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 群中的对灰色葡萄孢的抗性水平对结果进行了验证。

[0209] 3.1 植物材料

[0210] 多毛番茄 LYC4/78 (此后称作 LYC4/78) 的种子来自位于德国 Gatersleben 的植物遗传学与农作物研究所内的基因库。

[0211] 普通番茄栽培种 Moneymaker (此后称作 Moneymaker) 的种子来自荷兰博格圣利克 De Ruiter Seeds 栽培种的种子库。

[0212] 进行 Moneymaker 和 LYC4/78 之间的种间杂交生成 F<sub>1</sub> 种子。F<sub>1</sub> 种子生长成为 F<sub>1</sub> 植株。播种源自一种 F<sub>1</sub> 植株的自交的 F<sub>2</sub> 种子, 获得 174 个个体的 F<sub>2</sub> 群。通过与作为轮回亲本和雌性亲本的 Moneymaker 回交两轮生成 59 个个体的 BC<sub>2</sub> (回交 2) 群。利用 MAS 选择出其中含有两种已鉴定出的 QTL 中的一种 QTL 的 BC<sub>2</sub>、BC<sub>3</sub>、和 BC<sub>4</sub> 基因型, 一些 BC<sub>2</sub> 自交生成 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 种子 (见图 2)。生成两个 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 群: 其中 60 个 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 个体的 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 群出现发病率的 QTL 的分离; 另一 47 个 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 个体的 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 群出现病变生长的 QTL 的分离。

[0213] 3.2 茎检测

[0214] 根据 Benito (1998) 制备出灰色葡萄孢 B05.10 的接种物。如实施例 1 所示的进行茎检测。

[0215] 3.3 DNA 分离和标记物分析

[0216] 根据 Steward 和 Via (1993) 的方案, 用溴化十六烷基三甲胺 (CTAB) 从两种幼叶

(roller up, 卷叶) 中分离出基因组 DNA, 其中用 1ml micronic 管 (Micronic BV, 莱利斯塔德, 荷兰) 调整后用于高通量 DNA 分离, 以及用 Retsch300mm 振荡器 (Retsch BV, Ochten, 荷兰) 最大速度地磨碎。对 F<sub>2</sub>、BC<sub>2</sub>、BC<sub>3</sub>、BC<sub>4</sub> 和 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 群进行 AFLP 分析 (Vos et al., 1995), 主要依照 Myburg 发表的方法 (Myburg et al. 2001) 在 LI-COR4200DNA 测序仪上进行 AFLP 片段的测序。用 IRD700 或 IRD800 荧光标记标记选择性 Pst 引物。用 AFLP-Quantar Pro 软件包 (Keygene BV, 瓦格宁根, 荷兰) 对 AFLP 凝胶图像进行评分 (Score)。用下面的 10 种引物组合和接头序列进行基因分型: P14M48、P14M49、P14M50、P14M60、P14M61、P15M48、P18M50、P18M51、P22M50 和 P22M51, 如 Bai 等 (2003) 所示。

### [0217] 3. 4F<sub>2</sub> 群的表型分析

[0218] 观察到了不同葡萄孢检测之间的发病率差异 (见实施例 1, 见上)。因此, 对源自 Moneymaker x LYC4/78 之间的杂交的 F<sub>2</sub> 群的 174 个个体中的 172 个个体进行 7 次独立的连续的茎疾病检测。这造成了对几乎每种 F<sub>2</sub> 基因型的疾病生物检测的至少 5 次独立评价。在每个单个的疾病生物检测中, 6 个茎节段用于病变生长的计算。F<sub>2</sub> 群的发病率和病变生长的平均值显示出了正常分布 (数据没有显示)。Moneymaker 的平均发病率是 59%, 病变生长是 9.2mm/天。F<sub>2</sub> 群中的平均发病率范围是在 10% 和 97% 之间, 群的平均发病率是 48%。病变生长范围是在 3.3mm/天和 11.5mm/天之间, 平均值是 7.8mm/天。

[0219] 每个单个试验的平均发病率范围是从 31% 到 73%, 而平均病变生长范围是从 6.2 到 7.9mm/天 (表 8)。只有在 6 个茎段中至少有一个出现感染时, 才能计算病变生长。因此, 更高的发病率才可以观察到能提供信息的病变生长的基因型数目的增加。例如, 在低的平均发病率 (31%) 时, 仅仅 52% 的基因型能为病变生长提供信息。

[0220] 表 8: 实施例 3.4 的 7 个试验的平均发病率和平均病变生长。根据发病率百分比排出了周的平均值。

### [0221]

Nr	平均发病率 (%)	n	平均病变生长速率 (mm/天)	n	能为病变生长提供信息的植株 %
1	40.6	172	6.4	116	67.4
2	43.3	155	7.9	117	75.5
3	30.9	109	6.3	57	52.3
4	54.2	51	7.2	43	84.3
5	55.4	139	7.5	111	79.9
6	73.9	153	7.9	144	94.1
7	37.5	140	6.6	86	61.4
平均	48.2	172	7.2	172	100.0

### [0222] 3.5 分子标记物和遗传连锁图

[0223] 计算出源自 Moneymakerx LYC4/78 杂交的 F<sub>2</sub> 群 (n = 174) 的遗传连锁图。用 10 种引物组合得到 F<sub>2</sub> 群中的 218 种扩增片段长度多态性 (AFLP) 标记物。总共有 69 种标记物 (31.7%) 可以被容易地评分为共显性的, 因此容许计算出整合的 F<sub>2</sub> 遗传连锁图。对 BC<sub>2</sub>、BC<sub>3</sub> 和 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 基因型进行的标记物分析容许添加附加的 145 个 AFLP 标记物。因为 F<sub>2</sub> 凝胶的复杂性, 这 145 个附加的 AFLP 标记物中总共有 102 种标记物先前没有被评分。总的遗传连锁图是由 14 个连锁群的 315 个 AFLP 标记物组成, 总长度为 958cM。因为种内的共迁移的

AFLP 标记物通常是等位基因特异的,与其他 AFLP 连锁图的共线性被用于将连锁群分配到染色体。一些 Moneymaker 特异性 AFLP 标记物与已发表的遗传连锁图是相同的 (Haanstra et al. 1999 ;Bai et al. 2003),因此一些连锁群可以被分配到染色体,包括具有已鉴定出的 QTL 的连锁群。为了改进 QTL 间隔内的连锁图,依据已发表的普通番茄 x 潘那利番茄图 (Tanksley et al. 1992 ;Haanstra et al. 1999) 将诊断性 CAPS 标记物加入到这些区域内。

#### [0224] 3.6 连锁分析和 QTL 基因定位

[0225] 如实施例 2 所示的分析标记物数据以及计算出遗传连锁图。

[0226]  $F_2$  连锁图的总长为 958cM,其比其他已发表的种间番茄图短,它们的遗传长度范围是从 1200 到 1400cM(Foolad et al. 2002 ;Haanstra et al. 1999 ;Tanksley et al. 1992)。用从回交和  $BC_2S_1$  群中获得的 AFLP 标记物数据评分出附加的 AFLP 标记物。尽管 46% 以上的标记物都被放置于连锁图上,但是遗传连锁图的长度没有增加。原因是因为所用的数据来自于一些小的亚家族,因此不能为计算遗传距离提供信息,但是通过观察图解的基因型 (Van Berloo, 1999) 有可能估计出位置。

#### [0227] 3.7 $F_2$ 群的 QTL 基因定位

[0228] 通过间隔基因定位 (IM, 见实施例 2) 的方法,用表型和标记物数据鉴定出 QTL。IM 被应用于从单个重复中获得的数据以及重复的平均值。

#### [0229] 发病率

[0230] 对那些平均发病率小于 50% 的单个疾病测试以及从所有疾病测试中获得的平均数据 (表 8) 进行  $F_2$  群的发病率的间隔基因定位。在间隔基因定位方法中,所有测试的平均数据给出了发病率的单个显著的 QTL (基因组宽可信度水平的似然比 (LOD) 分值必须高于 3.4,  $P < 0.05$ )。该 QTL 的 LOD 分值为 4.5,并解释了 13% 的总表型变异 (表 9)。造成抗性的等位基因源自抗性亲本 LYC4/78。在所有 4 种情况中,每个单个试验中的 QTL 基因定位给出了相同的 QTL 区。在每个独立的试验中,偶然观察到了其他的“次要 QTL”。

#### [0231] 病变生长

[0232] 在那些具有高发病率的疾病测试中,可以最好地测量病变生长。对于 QTL 基因定位而言,使用了所有 7 个疾病测试的平均值,并鉴定出了超过阈值 (基因组宽可信度水平的 LOD 为 3.4,  $P < 0.05$ ) 的一种灰色葡萄孢病变生长的 QTL。该 QTL 的 LOD 分值为 4.2,并解释了 12% 的总表型变异 (表 9)。阳性效应源自抗性亲本 LYC4/78。举例说明了进行多个疾病测试的必要性,因为在仅仅一次单次重复中发现了超过阈值的 LOD 值。

[0233] 表 9: 对所计算出的对植株 (纯合子 Moneymaker (A)、杂合子 (H) 或纯合子 LYC4/78 (B)) 的效应的估计。用间隔基因定位方法计算出  $F_2$  群的分值,同时用 Kruskal-Wallis 分析计算出  $BC_2S_1$  群的分值。

#### [0234]

染色体	Pop	LOD	A	H	B	% Expl
1 (病变生长)	$F_2$	4.2	8.8	7.8	7.1	11.9
	$BC_2S_1$		6.2	5.2	4.9	ND <sup>a</sup>
2 (发病率)	$F_2$	4.5	63.4	47.1	43.5	13.0
	$BC_2S_1$		77.0	72.3	59.9	ND

[0235] <sup>a</sup>ND = 未测定

#### [0236] 3.8 用生物检测验证 QTL

[0237] MoneyMaker x LYC4/78 杂交的  $F_1$  植株与 MoneyMaker 回交两次,用 AFLP 标记物筛选 59 株后代植株是否存在两种鉴定出的 QTL 区(一种是关于发病率以及另一种是关于病变生长)。筛选出具有两种鉴定出的 QTL 的其中一种 QTL 杂合子的植株,自交得到两个  $BC_2S_1$  群。对每个  $BC_2S_1$  基因型进行总共 4 个疾病生物检测。用 SPSS 分析两个  $BC_2S_1$  亚群的数据,显示出了病变生长是正态分布,但是由于观察到了一些亚型(subclass),因此发病率不是正态分布(图 2)。

[0238] 用如上面 3.3 部分中所述的用于  $F_2$  群的引物相同的 10 种引物组合对所有  $BC_2S_1$  植株进行 AFLP 基因分型。出现病变生长基因座分离的群中的平均病变生长是 5.3mm/天,而在其他群中观察到的平均病变生长是 6.3mm/天。没有单个植株具有与抗性亲代 LYC4/78 一样慢的病变生长。但是,对于发病率而言,观察到了具有比抗性亲代 LYC4/78 更低的发病率的植株。两个  $BC_2S_1$  群的平均发病率是相同的(57-59%)。

[0239] 在  $BC_2S_1$  群中验证了每种 QTL 的阳性效应。发病率的 QTL 降低了感染机会 17%(亲代变异的 46%),病变生长的 QTL 使得真菌生长减慢了 1.3mm/天(亲代变异的 33%)。

[0240] 表 8 给出了与从  $F_2$  群获得的数据的比较。用两种 QTL 的效应只能解释一部分变异。鉴定出了一些附加的(“次要的”)QTL 基因座。

[0241] 在分析从  $F_2$  和  $BC_2S_1$  基因型获得的疾病测试数据的过程中,鉴定出了一种主要的发病率的 QTL(QTL-2h)。除了该 QTL 外,鉴定出了发病率的其他的“推定的”QTL 基因座。利用这个信息,选出辅助因素对  $F_2$  数据组进行限制性“多 QTL 基因定位”(MQM)方法。在这个分析中,鉴定出一种附加的“次要的”发病率的 QTL 基因座(QTL-4h)。当其分值低于 LOD 的显著阈值 3.4 时,QTL 被称作“次要的”QTL。但是,相信其效应是真实的 QTL 效应。

[0242] QTL-4h 位于 4 号染色体上,其降低了发病率(见表 1)。QTL 的 LOD 积分为 2.9,其与下面的 AFLP 标记物匹配:P18M51-169.5e、P18M51-305.4h、P14M60-262.9e、和 P14M61-292.7h。该基因座的阳性效应源自抗性亲本多毛番茄。在  $F_2$  和  $BC_2S_1$  群中都鉴定了阳性效应。最初在缺少 QTL-2h 分离的  $BC_2S_1$  群中鉴定到该 QTL,其也与 AFLP 标记物 P14M48-345e、P14M48-177e、和 P18M50-147e 相匹配。对于位于 2 号染色体和 4 号染色体上的基因座,在  $BC_2S_1$  群和  $F_2$  群中都评价了与该区域共显性的 CAPS 标记物的分离情况。2 号染色体上的 CAPS 标记物 AT4G30930 与 2 号染色体上的 QTL 紧密相连,而对于 4 号染色体,分析了一组在该染色体上均匀分布的 10 个 CAPS 标记物的分离数据。对包括 CAPS 标记物 AT4G30930 和 4 号染色体上的 CAPS 标记物 TG609 的 ANOVA 分析显示出 CAPS 标记物 TG609 与性状发病率显著相关。

[0243] 为了验证每个“次要”QTL 的效应,可以开发含有 QTL 效应的区域的近同基因系(NIL)。与此平行地,可以开发出普通番茄栽培种 MoneyMaker 遗传背景中的多毛番茄 LYC4/78 的回交近交系(BIL)群。

[0244] 3.9 疾病检测和 QTL 基因定位的结论

[0245] 用于测量对灰色葡萄孢的抗性的生物检测已经被证实是一种有价值的工具。但是,仍然有大量的和未知的变异表现出能影响感染过程的发生。通过利用标准化方法和通过进行多个独立的复制可以将大的非遗传的变异最小化。通过引起茎的生理条件的不同的周与周之间的温室条件变化(白昼长度、日照时间和温度)可以引起变异。真菌接种物制备中的小变异也可以在感染过程的变异中发挥作用。另一个观察是通过茎段所放置的花盆

(tray) 内的微小气候也可以影响疾病的发生。10 个不同的试验花盆被用于 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 生物检测。用统计学分析补偿试验之间和试验内的变差。尽管具有更适中的疾病发病率的试验提供的信息更多,但具有最高平均发病率的试验为测量病变生长提供了最多的信息。发病率和病变生长是独立的性状,因为没有观察到两种性状之间的线性相关性。

[0246] 鉴定出 F<sub>2</sub> 中的番茄的抗灰色葡萄孢抗性的数量性状基因座。在 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 群中验证了这些鉴定出的 QTL,并分别解释了发病率和病变生长的 46%和 33%的亲代变异。这些结果说明在最初的 F<sub>2</sub> 基因定位群中没有检测到所有的赋予灰色葡萄孢抗性的 QTL。在两种 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 群中,发现了比抗性亲代 LYC4/78 更高抗性水平的植株。这表明在 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 群中存在着附加的分离的抗性基因座。抗性的附加分离是令人惊讶的,因为已经预测两种 BC<sub>2</sub>S<sub>1</sub> 群的大部分基因组都是纯合子的 Moneymaker。

[0247] 3.10 验证单个 QTL 在温室条件下的效应。

[0248] 用图 2 所示的方法将含有上面所述的两种 QTL 之一的植株放置于普通番茄背景内。将 BC<sub>2</sub>S<sub>2</sub> 系放置于温室的土壤内,在荷兰的标准实践条件下栽培。在 3 个月,通过将含有葡萄孢的琼脂盘放置于主茎的伤口上接种植株。随后用 Parafilm® 闭合伤口。在接种后 3 周,测量茎病变长度(单位为 cm)(细节见下)。结果列于表 10。含有病变生长的 QTL 的系清楚地表现出病变大小的极大缩小。

[0249] 表 10:在接种后 3 周时的多毛番茄 LYC4/78 和多毛番茄 LA1777 成体植株中的灰色葡萄孢病变的平均茎病变长度。

[0250]

系	重复	平均茎病变长度 (cm)	标准差	背景	注释 /QTL
21	a <sup>***</sup>	4, 2	1, 1	GT	易感对照
21	b	3, 6	0, 9	GT	易感对照
22	a	3, 0	0, 0	Durinta	部分抗性对照
22	b	5, 0	2, 9	Durinta	部分抗性对照
23	a	5, 6	3, 0	Tradiro	易感对照
23	b	6, 0	3, 3	Tradiro	易感对照
26	a	3, 2	0, 8	BChirs3	QTL-2h
26	b	2, 6	0, 9	BChirs3	QTL-2h
26	c	2, 6	1, 3	BChirs3	QTL-2h

[0251]

26	d	3, 2	2, 2	BChirs3	QTL-2h
28	a	2, 6	0, 5	BChirs5	QTL-1h
28	b	2, 0	0, 0	BChirs5	QTL-1h
28	c	2, 0	0, 0	BChirs5	QTL-1h
28	d	2, 0	0, 0	BChirs5	QTL-1h
373	e	4, 3	0, 6	LA1777	含 W002/085105 来源的 QTL-10
373	f	4, 3	0, 2	LA1777	含 W002/085105 来源的 QTL-10
374	e	4, 8	0, 6	BC chrs10	来自普通番茄 x LA1777 的 Introgr 系
374	f	4, 5	0, 0	BC chrs10	来自普通番茄 x LA1777 的 Introgr 系
375	e	4, 2	0, 3	BC chrs10	来自普通番茄 x LA1777 的 Introgr 系
375	f	4, 2	0, 2	BC chrs10	来自普通番茄 x LA1777 的 Introgr 系
376	e	4, 3	0, 3	BC chrs10	来自普通番茄 x LA1777 的 Introgr 系
376	f	5, 0	0, 7	BC chrs10	来自普通番茄 x LA1777 的 Introgr 系
377	e	4, 2	0, 3	BC chrs10	来自普通番茄 x LA1777 的 Introgr 系
377	f	4, 3	0, 2	BC chrs10	来自普通番茄 x LA1777 的 Introgr 系
378	e	4, 8	0, 2	BC chrs10	来自普通番茄 x LA1777 的 Introgr 系

378	f	4, 6	0, 4	BC chrs10	来自普通番茄 x LA1777 的 Introgr 系
68	e	2, 0	0, 0	parv1	QTL-3p+QTL-4p
68	f	2, 0	0, 0	parv1	QTL-3p+QTL-4p
78	e	2, 0	0, 0	parv2	QTL-9p+QTL-4p
78	f	2, 0	0, 0	parv2	QTL-9p+QTL-4p

[0252] (\*\*\*) a, b, c 和 d 是重复, 其中每个重复代表 5 个植株, e 和 f 是重复, 其中每个重复代表 3 个植株 ;GT 是抗 TMV 的 Moneyberg ;Durintha 是栽培者判断为具有部分抗性的杂种 ; Tradiro 是栽培者判断为易感于葡萄孢的杂种 ;BChirs 表示多毛番茄 LYC4/78 渐渗形成的回交系 ;LA1777 是野生种株多毛番茄 LA1777 ;BC chrs10 表示具有多毛番茄 LA1777 的 10 号染色体的渐渗的回交系 ;parv 表示小花番茄渐渗形成的系。

[0253] 3. 11 多毛番茄 LYC4/78QTL 赋予的葡萄孢抗性水平要高于 10 号染色体上的小花番茄 LA1777QTL 赋予的抗性水平。

[0254] 将含有在此所述的多毛番茄 LYC4/78QTL 的植株中的抗性水平与多毛番茄 LA1777、含有 10 号染色体上的部分葡萄孢抗性的 QTL 的 W002/085105 来源、以及源自 10 号染色体渐渗的渐渗系的抗性水平相比较。

[0255] 将各系放置于温室的土壤内, 在荷兰的标准实践条件下栽培。在 3 个月后, 通过将含有葡萄孢的 0. 5x0. 5cm 琼脂盘放置于主茎的 2cm 长的垂直茎伤口上接种植株。随后用 Parafilm® 闭合伤口。在接种后 3 周, 测量出从病变顶部到病变底部的茎病变长度 (有真菌生长斑点的变色组织的长度) (单位为 cm)。结果列于表 10。观察到含有多毛番茄 LYC4/78 的 QTL 的系显示出比 LA1777 来源和 IL 系更高水平的葡萄孢抗性。另外, 将含有 4 号染色体上的任一种发病率的 QTL 和 9 号染色体上的病变生长的 QTL 组合 (系 68) 或含有 3 号染色体和 4 号染色体上的发病率的 QTL 组合 (系 78) 的小花番茄系与 LA1777 来源和 IL 系进行比较。前系显示出更少的茎上的病变生长, 因此比源自 LA1777 的品系表现出更高水平的葡萄孢抗性 (见表 10)。当记录到 2. 0cm 的病变长度时, 只能测量到原始伤口, 并没有观察到真菌生长, 其表明了高水平的抗性。因此, 2cm 长的茎病变长度说明缺少净生长。

[0256] 在此所用的标记物

[0257] 下面的表格提供了关于在各种连锁图中所示的以及表示为与本发明的 QTL 的相关性的各种 RFLP 和 COS-II 标记物的详细信息。信息直接复制于康奈尔大学 2005 年 10 月 7 日版本的 SOL 基因组网络 (SGN) 数据库。

[0258] 表 11

[0259] TG301 RFLP 标记物

[0260] RFLP 信息

[0261] 名称 :TG301

[0262] 插入物大小 :750

[0263] 载体 :pGEM4Z

[0264] 切割位点 :PST1

[0265] 抗药性 :AMP

[0266] 正向序列 :

[0267] TTGTA ACTTACTAAATTAAGAGCTCAGGATGAACAGAACACGAATTATTAGTTCATATTTAA

[0268] GCAAGAACTTAAAAA ACTTCACCTTCTC

[0269] CAACATACTCTACAACAAACTCTTTTGTCTTGATATCTTCATCTGCCACAATCCCAGTGCC  
[0270] ACATTTCTCAGTCTGCACGTTATGAGTCA  
[0271] ACAAACTTTAGTTTTTTAGATGATTATTGCTTGGTTTTCAAAAAGAAACGAAAAAAGAAG  
[0272] AATACAAAATAACCAACATTTCTTTACTT  
[0273] CTTACCAGATACACAACCTGAATTAATGCAAAAAATAGATATGAAAAATGTTACCAGCCTG  
[0274] CACTTTTGATGCAGATTGTAAGTTGTTGCT  
[0275] AATTGAAAAGTGTGCAATGGTCATTTTTGGTAAAACTGATGAATGTGGTATTTTGAGAAA  
[0276] GGATTTATGACGGTCCTTTTGCTTAATTA  
[0277] TCCCTCTTATAAACGTTAGTAAAGGC  
[0278] 反向序列  
[0279] TATTCTGAATCTGGAAAATTGTTCTGCCAATTTCTTTGACCAACCAGACAATACCCTTTTA  
[0280] ATCTAAGACCCTAATTACAAGTTACTGA  
[0281] CAATCACTTTTGACACCAATGTCTTTGATAAAGCACTGTAAAAATTTTCAGATGTGCTTTA  
[0282] ATACTCTGCATCCTTTTTAGGAACTCTTT  
[0283] TGTCTACTTTCACTTTTTAAAAGAAAGAACTTAAGGAGAGGACATACTTATTATTTTTGCA  
[0284] TTTTCTATATCAAGTAAAGTGAGAAGACT  
[0285] TCCATTAATTTGCATCCAGCGGATGCTAATGGCTACAACATAGCTACTTTAAGCAAATAGG  
[0286] TGATTTGATCAAGATTCTTTACGTTTTCA  
[0287] AGATCACAGCAACAAAAAGGGTTCTTAAAAACCTAGCCTTTACTAACGTTTATAAGAGGG  
[0288] ATAATTAAGCAAAAAGGACCGTCATAAATC  
[0289] CTTTCTCAAAAATACCACATTCATCAGTTTTTACCA  
[0290] 表 12  
[0291] TG460 RFLP 标记物  
[0292] RFLP 信息  
[0293] 名称 :TG460  
[0294] 插入物大小 :2000  
[0295] 载体 :pGEM4Z  
[0296] 切割位点 :PST1  
[0297] 抗药性 :AMP  
[0298] 正向序列  
[0299] CCTTAGTTTTGAAATCTTTAAGTAGCAATTAGTAATCGGTAGCTCTCCAGTATGAAAAGTT  
[0300] CATAATCACTTGGTGGATCTCTTATTATT  
[0301] TGCATCATTTGTGTGCAATAGGCATAAGAGGTAGTCATTTCACAATGCCTCTGAAATGTGT  
[0302] GCATTGACATTTGAGAACAACCTTGAGGATG  
[0303] GGATACACTCTCTGTATCAGGAACCTTAGGTGACAAAATAGATGTGAAGATTCACGGCA  
[0304] TAGTGTCTTTTGATCCATATCATAACCAG  
[0305] AAAGTGAGTATCCCCATTTCTCACATTAGCTATATGAAGGAAGAAAGGGAAAAACAAAGGAA  
[0306] AGCGCTACCCTTATTCGTCGAAAGCTAGC  
[0307] CTTTCATGATAAACCAAAATGAAATTAGAAAAATTTAAGAACTTTGCTATAGCTTCAAAGAAA

- [0308] TCTTTTAGATTCTTGTTTACAAAGTTTTG  
[0309] CTGATCTTTCTTACAT  
[0310] 反向序列  
[0311] TTATGATGCTCAAAATTTCTTATTTTAGACAGACTCGAAATGTGACTATTCCAGAGAAAAA  
[0312] TAAACAAGATCCCTCGGGACACTGAACCT  
[0313] GAGAACAGGTTCAAATTCCTACTGTACCCCAACAGACAAAGGGAAGAGAGAGCTATCAGT  
[0314] TTCTCTTTGGTTTGAGAAAAAACATAATA  
[0315] GTATGGAGTGTACCAGATGCTTCAGGATTTTCAGACATGTTCTGACTTGTTACCTAATGTAT  
[0316] TTGATTTTCATAGTATAAATCTTAGGTGTT  
[0317] CTGCTTGACTAGAAGTATGGAAAGTCATTCTTGTGAGTAGTCAGTCTTGAGATATAAGATA  
[0318] TAATTTGATATACATCTAAATAGATCTTG  
[0319] GATTCATTAGATAAGTTCAACAAGCATGGGTCAATAAGCACATTGATCAATTACAGGATGT  
[0320] AGAATAACTTTGCTTATTGTGAAATCCCTC  
[0321] AAAAAATGAATGATGCAGGCAAGAAGTGCAAATTACC  
[0322] 表 13  
[0323] TG55 RFLP 标记物  
[0324] RFLP 信息  
[0325] 名称 :TG55  
[0326] 插入物大小 :1800  
[0327] 载体 :pUC  
[0328] 切割位点 :PST1  
[0329] 抗药性 :AMP  
[0330] 正向序列  
[0331] TGGATTCAAGTGTGAAGAAAGGGGACATGGTGAGTTACCTACCATATGCAATGGGAAGAATG  
[0332] AAATTTATATGGGGCGATGATGCAGAAGA  
[0333] ATATACACCGGAGAGATGGCTTGATGGGGACGGTTTCTTCAGGCAATACAATCCCTTCAAA  
[0334] TTTACAGCTTTCCAGGGTGTTTTGAAGCT  
[0335] CATCATAAGCTTTGATTATCATTTTGTAAAGCCTTGAACGCAAGTCTATACTTAACTTGC  
[0336] CTAGAGCTATGTACTGTCGACATATGATC  
[0337] AATTAATAAGCACATTCTTTTGTAAATAAAACAGGCAGGGCCAAGGATTTGCTTGGGAAA  
[0338] GGAGTTTGCTTATAGGCAAATGAAGATAT  
[0339] TCTCTGCTGTTTTATTACATCACTTCGTTTTCAAGCTGAGTGATGACAACAAGGCTACCAA  
[0340] CTACAGGACAATGATTACTCTTCACATTG  
[0341] ATGGGGGATT  
[0342] 反向序列  
[0343] GATCCAAAATATGCTTTTCTGATGACCCTTACCAGATGGATTCAGTGTGAAGAAAGGGGAC  
[0344] ATGGTGAGTTACCTACCATATGCAATGGG  
[0345] AAGAATGAAATTTATATGGGGTGATGATGCAGAAGAATATAAAACCGGAGAGATGGCTTGAT  
[0346] GGGGACGGTTTCTTCAGGCAAGAGAATCC

- [0347] CTTCAAATTTACAGCTTTCCAGGTTGTTTTAAAGCTCATCATAAGCTTTGATTATCATTTT  
[0348] GTTAAAGCCTTGAACGCGAGTCTATACTT  
[0349] AACTTGCCTAGTGCTATGTA CTGTCATATGATCAATTA ACTAAGCACATTCTTTTGTT  
[0350] AATAAAACAGGCAGGGCCAAGGATTTGCT  
[0351] TGGGAAAGGAGTTTGCTTATAGGCAAATGAAGATATTCTCTGCTGTTTTATTACATCACTT  
[0352] TGTTTTCAAGTTGAGTGATGACAACAAGG  
[0353] CTACCAACTACAGGACAATGATTACTCTTCACATTGATGGGGGATTGCATGTTTCGTGTCTT  
[0354] TAGTA  
[0355] 表 14  
[0356] TG59 RFLP 标记物  
[0357] RFLP 信息  
[0358] 名称 :TG59  
[0359] 插入物大小 :3500  
[0360] 载体 :pUC  
[0361] 切割位点 :PST1  
[0362] 抗药性 :AMP  
[0363] 正向序列  
[0364] TCGACCTGCAGATATTTTCATAAAAAGAATGCCCCCTGAAGCAGTTGATTTGGTGTGCGAGGCT  
[0365] TCTCCAATATTCTCCA ACTCTACGCTGCA  
[0366] CTGCTGTAAGTAAAAAGTTTTCTTCTCAATTATCAAGTATTTAGGATATTCTGGTAGTTTC  
[0367] CCATTTTACCCATCATTCAAACATGGTGT  
[0368] TCCATTTTTGTTATGTTTCAATATGCGAGTTCTCATTGATTGTCCTTTTAGCACTTCTGTT  
[0369] TTCCGGGGATATTGAGAACATTTTGTGTT  
[0370] TATTGACAGTTGGAAGCATGTGCACACCCTTTCTTTGATTCTTTAAGGGAACCAAATGCTT  
[0371] GCTTGCCAAATGGGCGACCTCTGCCTCCC  
[0372] CTATTCAACTTTTACCTCAAGGTGAGCTTCAGTCTAGCTTTCTCCTTTTATTTACATGA  
[0373] TTTGATACGTCAAT  
[0374] 反向序列  
[0375] AGTTGGGAATTATATCCTGTT CAGTAGACAAATTACCCAACCAGAATATACGTACCTGAAT  
[0376] GTTCATGTGATAGATAAGTCCATACTAGT  
[0377] ACTTCTGTCTTGTGAATATCTGTGTGTTGCC TTGTGAGTAAGGATATTCATTGCTCCAATG  
[0378] CAAAACCATTATGTCATTGTCTTAGGGAG  
[0379] CTTTCTGTTGTTTGTATGGCATGAAAAGTTAATCCTAAAAGAAAAGGTAAAGTAAAGGTGCA  
[0380] TCCTAGGTTAGTATAATGTTCTGAAGGCA  
[0381] AAGATGTTTTTCTTTTGATTTAAACTTATGTTTTTTTTCTTTGATTCCGTCTCCTTCCCT  
[0382] AATAGCAAAA ACTGGGAAGTTGAAACTAC  
[0383] GTTATAACTGGACAACCTCATAAATGAAAAAGATGGTAAATAATGCCATTTCTGGGGTGGG  
[0384] GTAATTTTCTTAGATGAGTGTGATACTG  
[0385] TTGTACCTGTTGCTTGA ACTCCTAAGTTTCTCATTCTTCTTTTGT TTTATGCTAAAT

- [0386] GCCGTGTGTACTGTG
- [0387] 表 15
- [0388] TG145 RFLP 标记物
- [0389] RFLP 信息
- [0390] 名称 :TG145
- [0391] 插入物大小 :2480
- [0392] 载体 :pGEM4Z
- [0393] 切割位点 :PST1
- [0394] 抗药性 :AMP
- [0395] 正向序列
- [0396] ATGGGCTATGCTTGGTGCTCTTGGATGTGTCTTCCCTGAGCTATTGGCCCGTAATGGTGTC
- [0397] AAGTTCGGTGAGGCTGTGTGGTTCAAGGC
- [0398] TGGATCCCAGATCTTCAGCGAGGGTGGACTTGATTACTTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCAT
- [0399] GCACAAAGCATCTTGGCCATCTGGGCTTG
- [0400] CCAAGTTGTGTTGATGGGAGCCGTTGAGGGATACCGCATTGCTGGTGGACCTCTTGGTGAG
- [0401] GTTGTGACCCACTCTACCCCGGTGGCAG
- [0402] CTTGACCCATTAGGCCTTGTGTAAGACCCGGAGGCATTTGCTGAGCTTAAGGTTAAGGAG
- [0403] ATCAAGAACGGCAGACTTGCTATGTTCTC
- [0404] TATGTTTGGGTTCTTTGTTCAAGCCATTGTTACCGGAAAGGGTCCATTGGAGAACCTCGCT
- [0405] GACCACCTT
- [0406] 反向序列
- [0407] GGAGACAACCTTGCATGCCAGCAGTGGATCACCTCGAGTCCACGGTTCTTGGCAAAGGTTT
- [0408] CTGGATCTGCTGAAAGTCCAGCGGTGTCC
- [0409] CACCCGTAGTCACCAGGGAATTCACCATTCAAGTAGCTAGGGGACTCACCAGAGAATGGAC
- [0410] CCAAGTACTTAACACGGTCAGGGCCATAC
- [0411] CATGGGCTGCTAGATGGGGCTGACTTTGCGACAGCCTTTCTCATAGTGATCCTTCCATTTT
- [0412] CTGTGATTTCTGAGGCAGATGGTAAGAGT
- [0413] TTCACTGCTTGTCCAGCAAAAAGAAGGGGAAGAAAGAGCCATTGTAGCAGCTGCCATGGTGT
- [0414] TTATATCAAGAGAAATGTAAGTGTTGAT
- [0415] GGTATGAGATATTGTTGAAGTTGGCTGTAATGAGATGAAGTTACAAGGAATTAATTCACCA
- [0416] TATATATAGGGAGTAATTAAGAGGGAAAG
- [0417] AGTCCAAATTATCTAATGATATCTATATCTA
- [0418] 表 16
- [0419] CT128 RFLP 标记物
- [0420] RFLP 信息
- [0421] 名称 :CT128
- [0422] 插入物大小 :700
- [0423] 载体 :pBLUESC
- [0424] 切割位点 :EcoR1

- [0425] 抗药性 :AMP
- [0426] 正向序列
- [0427] CTTTTTTTTTTTTTCAACACAAAACAAAATTTTCATTATATTGTCAGGTAGCACACTACATCT
- [0428] TTACACTGTCATCAAACGACCAGAGACTT
- [0429] GAGAACGTTTTAAGAGATTCATTTTCCGGGGACAAAGTTTGTGGCGAAAAGCCCAGGCATTG
- [0430] TTGTTTACGGGGTCTGCAAGGTGGTCAGC
- [0431] AAGGTTCTCCAATGGACCCTTTCCGGTGACAATAGCTTGAACAAAGAATCCAAACATAGAG
- [0432] AACATAGCAAGTCTACCGTTCTTGATCTC
- [0433] CTTTACCTTGAGCTCAGCAAATGCCTCTGGGTCTTCAGCAAGGCCTAATGGGTCTGAAGCTG
- [0434] CCACCAGGGTAGAGTGGGTCGACAACCTC
- [0435] ACCAAGAGGTCCACCAGCAATACGGTATCCCTCAACAGCTCCCATCAACACAACCTTGGCAA
- [0436] GCCCAGATGGCCAAGATGCTTTGTGCATG
- [0437] GACCAAGCTTGGGTTGCCAAGTAGTCAA
- [0438] 反向序列
- [0439] CTGGTGATTACGGGTGGGATACCGCTGGACTTTCAGCAGACCCTGAAACTTTTGCCAAGAA
- [0440] CCGTGAACCTTGAGGTGATCCACTGCAGAT
- [0441] GGGCTATGCTTGGTGCTCTTGATGTGTCTTCCCTGAGCTCTTGGCCCGTAATGGTGTCAA
- [0442] GTTCGGTGAGGCTGTGTGGTTCAAGGCCG
- [0443] GATCCCAGATCTTCAGTGAAGGTGGACTTGACTACTTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGC
- [0444] ACAAAGCATCTTGGCCATCTGGGCTTGCC
- [0445] AAGTTGTGTTGATGGGAGCTGTTGAGGGATACCGTATTGCTGGTGGGACCTCTTGGTGAGG
- [0446] TTGTCGACCCACTCTACCCTGGTGGCAGC
- [0447] TTCGACCCATTAGGCCTTGCTGAAGACCCAGAGGCATTTGCTGAGCTCAAGGTAAAGGAGA
- [0448] TCAAGAACGGTAGACTTGCTATGTTCTCT
- [0449] ATGTTTGGATTCTTTGTTCAAGCTATTGTCACCGGAAAGGGTCCA
- [0450] 表 17
- [0451] C2\_At4g30930 COS-II 标记物
- [0452] 基因定位试验
- [0453] 图 :Tomato-EXPEN2000
- [0454] 前向引物 (5' ; -3' ) :
- [0455] ATCATACCTTCTCTCCAAACCC
- [0456] 反向引物 (5' ; -3' ) :
- [0457] TCGCCATTGCTCACTTTAAACTG
- [0458] 温度 :55℃
- [0459] Mg<sup>2+</sup> 浓度 :1.5mM
- [0460] PCR 产物大小
- [0461] LA716 :700
- [0462] LA925 :700
- [0463] 消化条带大小 (用 DpnII)

- [0464] LA716 :380+220
- [0465] LA925 :340+220
- [0466] 基因定位
- | [0467] 图                | 染色体 | 偏移   | 置信度 |
|-------------------------|-----|------|-----|
| [0468] Tomato-EXPEN2000 | 2   | 63.5 | I   |
- [0469] 表 18
- [0470] C2\_At2g18030 COS-II 标记物
- [0471] 基因定位试验
- [0472] 图 :Tomato-EXPEN2000
- [0473] 前向引物 (5' ; -3' ) :
- [0474] TTGGGCGACCACGCTGAATC
- [0475] 反向引物 (5' ; -3' ) :
- [0476] TTACCCACATCAGGACCTTGCC
- [0477] 温度 :55℃
- [0478] Mg<sup>+2</sup> 浓度 :1.5mM
- [0479] PCR 产物大小
- [0480] LA716 :1300
- [0481] LA925 :1200
- [0482] 消化条带大小 (用扩增子差异)
- [0483] LA716 :1300
- [0484] LA925 :1200
- [0485] 基因定位
- | [0486] 图                | 染色体 | 偏移   | 置信度 |
|-------------------------|-----|------|-----|
| [0487] Tomato-EXPEN2000 | 2   | 83.1 | I   |
- [0488] 表 19
- [0489] C2\_At5g64670 COS-II 标记物
- [0490] 基因定位试验
- [0491] 图 :Tomato-EXPEN2000
- [0492] 前向引物 (5' ; -3' ) :
- [0493] TGATAAATGCTGGGAAGATTGACTC
- [0494] 反向引物 (5' ; -3' ) :
- [0495] ATCAACCTGGCTCCATCTTCTATTTG
- [0496] 温度 :55℃
- [0497] Mg<sup>+2</sup> 浓度 :1.5mM
- [0498] PCR 产物大小
- [0499] LA716 :200
- [0500] LA925 :220
- [0501] 消化条带大小 (用扩增子差异)
- [0502] LA716 :200

- [0503] LA925 :220
- [0504] 基因定位
- [0505] 图 染色体 偏移 置信度
- [0506] Tomato-EXPEN2000 2 76 CF (LOD3)
- [0507] 表 20
- [0508] TG609 RFLP 标记物
- [0509] RFLP 信息
- [0510] 名称 :TG609
- [0511] 插入物大小 :1900
- [0512] 载体 :pGEM4Z
- [0513] 切割位点 :PST1
- [0514] 抗药性 :AMP
- [0515] 正向序列
- [0516] GAGACAGCTTGCATGCCTGCAGAGGTGATAAAATTCACCAAGGTTTCATATTTAGGAAACAA
- [0517] GAAAATTTAAAAGATCATTAACACAGATGA
- [0518] AAGGATATGACTAGGAGGCAATGACTGATCTTTGACTATCAAATACTTCTCAGGGAAACAA
- [0519] TGTGAATGGGCTTTTACATGCAGAGATAT
- [0520] TGATTGTGATCATGTTGAAGAACTTAGGAAACATGAAATTAATGATCATTAACACTGATG
- [0521] CAAGGATATGCCAAGTAGGCAAGCAAAAT
- [0522] AAGGTTGAACATAAAATGTCTGTGATCTTTGACTATCAAATATCTTCTCAGAAAAAAAAATG
- [0523] TGAATGCTCATTACATGCAGAGATGGCT
- [0524] ATTGTGATCATGTGGCTCAGCCTTGAGTCTATATTGAGGTGCAGACAACATAGTCCCTAAC
- [0525] CACATGTGTGATCAAGCAACTTTTTTGGAT
- [0526] GTCCACAGGGTTATAAGTAGGCAACATTTAAGCAAGAAAAAACACAGGATCACTATTGAGT
- [0527] CAGCTGCTGTTGCCTGT
- [0528] 反向序列
- [0529] GGAGACAAGCTTGCATGCCTGCAGAGGTGATAAAATTCACCAAGGTTTCATATTTAGGAAAC
- [0530] AAGAAAATTTAAAAGATCATTAACACAGAT
- [0531] GAAAGGATATGACTAGTAGGCAATGACTGATCTTTGACTATCAAATACTTCTCAGGGAAAC
- [0532] AATGTGAATGGGCTTTTACATGCAGAGAT
- [0533] ATTGATTGTGATCATGTTGAAGAACTTAGGAAACATGAAATTAATGATCATTAACACTGA
- [0534] TGCAAGGATATGCCAAGTAGGCAAGCAAAA
- [0535] TTAAGGTTGAACATAAAATGTCTGTGATCTTTGACTATCAAATATCTTCTCAGAAAAAAAAAA
- [0536] TGTGAATGCTCATTACATGCAGAGATGG
- [0537] CTATTGTGATCATGTGGCTCAGCCTTGAGTCTATATTGAGGTGCAGACAACATAGTCCCTA
- [0538] ACCACATGTGTGATCAAGCAACTTTTTTGG
- [0539] ATGTCCACAGGTTTATAAGTAGGCAACATTTAAGCAAGAAAAAACACAGGATCACTATTGA
- [0540] GTCAGCTGCTGTTGCCTGTTACTGAG
- [0541] 表 21

- [0542] TG62 RFLP 标记物
- [0543] RFLP 信息
- [0544] 名称 :TG62
- [0545] 插入物大小 :1800
- [0546] 载体 :pUC
- [0547] 切割位点 :PST1
- [0548] 抗药性 :AMP
- [0549] 正向序列
- [0550] CAAAATGCTTCAGCTACTGGCTAAATGAAGTATGTTCTCAACATATTCACAAGCTTCTGTC
- [0551] TTCGAAGCTCAAGAAGTGTCGGTATTATC
- [0552] TGAATTAATAGTAAAGCAAAGAGATGGTTTTATGTTTCTTAAGCAGCATTTCTTAGCTTA
- [0553] ACGGCCCTCCAGATATATGGTGGACAAAA
- [0554] TAGAATCCATTAGATATAACAAATGGGATTAGTATAATGATCTTTTACTTTGTTAGATGAT
- [0555] CATACTAACAGATTGCAAGTTAATCATAT
- [0556] CCAACATATTCTGTAGATATTTTACATTGGCTAGCATGAGGAAAGGTCATGTAGGAAATTG
- [0557] AATAGAGTTCAATTTTGGGAAAAGTTGCA
- [0558] TTGAAGAAGGTAACCTTCAACAAACGTGTGAAAAAATCACATTTGAGTTGCCCGCTCACCAT
- [0559] CGTGATTCCAGTACGAACTACTCAAAAAAT
- [0560] TTTACTTTTGAGCCTTAAACATCATTTTAAAGCCTTGAAAAGCTGCTTTTGAAAAGATCTAAG
- [0561] CAAGAT
- [0562] 反向序列
- [0563] GGAGAATATTGTCACTCTATCAGATAGTTCAAAAATATCGGAGAATGAAATGGTCAATTCT
- [0564] TCTCACAAGATATTCATGCCTAGTTGCAG
- [0565] TGTCCGAATTAACATAACATGCTCAATTTTTCATATCTTGCAGCAAAAATTTATCATTGAAAC
- [0566] TCTCTGAGATGGAAACAGAGAACAAAGAC
- [0567] CATATTGGAAAGCTTCAATCAGACATGCAGAAAAAGGAAGATGAGATTCATGTTTTACGCA
- [0568] AGGAAATTGACAATTACACGGAAACAGTG
- [0569] GATTTACTGGAGAAGCATGTTACAGAGATTAACAATAAAATGGAGGAGAAAAGATCAGCTTG
- [0570] TTCAGGAACCTTCAGGACAAGGAGAAGCAG
- [0571] TTGGAAGCTGACAGAGAAAAGTTTTTACTACGGATACTTTTAGTTCTACAAAATCTATTA
- [0572] TAACCAATACAATGTGTTCAAGTACTAG
- [0573] TGTTTTGCACCTTGTGAGATTTCAGGCATCTTTGCTTGCTGCTGAAAAGCAAGCTCACAGA
- [0574] ATCCAAAAAGCAGTATGATCAGATGT
- [0575] 表 22
- [0576] TG555 RFLP 标记物
- [0577] RFLP 信息
- [0578] 名称 :TG555
- [0579] 插入物大小 :1600
- [0580] 载体 :pGEM4Z

- [0581] 切割位点 :PST1  
[0582] 抗药性 :AMP  
[0583] 正向序列  
[0584] AATTCGGAGCTCACTGCTTCTAATCCTCAGTGAGACTTATTTTCTACATATTAACAATAA  
[0585] GAAATTTACGAAGGAATATTATAGACTGA  
[0586] ATTCCTTGGTGACAAGTATCAAGACATCTTGACCAAGTTTAAAGTTTTGTAGTGGCAGTTC  
[0587] TTTTAAGCTTTACTTGTGTGAGGTAGACA  
[0588] TCAAGGAAGATAAGTAGCAGCTACTCTTCACGGAGCAGCCCATAGGACACTCAAATTCACT  
[0589] ATTGCGAGGGTCAATCTACCAATTTATGG  
[0590] AACGATACCAGTAAAGTCATTTTTATGTAAACATCAGACAGCTTTTGACTAAGCAGAGACA  
[0591] TGAATAAGTTCTATTTGTTAGAAGTCGAA  
[0592] GAGACAAATAAGTTAATTTACCTATGCTATAAAAAGAGGACTCTTATAGTTATAAATACAG  
[0593] TACATTTTATTAAGGGTTCTAATTGTTGA  
[0594] CTATGATAGCAAGCATGCCGTAATAATT  
[0595] 反向序列  
[0596] ACATTTTGAGGAAGACAGGAGTTATGTATCGCCATCTGGTGTGCTCCAAGAACATGACAGA  
[0597] TATAAAGACCCGCGGGTGCACCAGAGAA  
[0598] ATGTTGCATTGGAGCATATTGAACATCATAGGCTCAATGGAATTGTTTACTTTGCAGATGA  
[0599] TGATAATATCTACTCACTTGAGTTGTTTG  
[0600] AGAGCATTAGATCGATCAAGTAAGTTGAGATTCATCAGTCTTGTTTACATGACTTGTCTTT  
[0601] GTTTTGTCTGCTGTGAGCATGTTTCAGGA  
[0602] TGATGTTATGTGCTTTATGTAGATGTTCAAGTCGATAATAGTGAATAGTCTAGAGCTATTT  
[0603] CACATATATTACAACCTTCACTAACAATAATT  
[0604] CTTTTCTGGTGTCTCGGTTCACTCTTCATAGTTATAAGAATAACAGTTGTAGATTA  
[0605] GACCACTGGTCGTGTGATTTTTGGACTTA  
[0606] ATTATTATCTCAATTCTTCCTCAAAAATAGCAGTCCTTAGATTAGAAGCTGAGG  
[0607] 表 23  
[0608] CT50 RFLP 标记物  
[0609] RFLP 信息  
[0610] 名称 :CT50  
[0611] 插入物大小 :1600  
[0612] 载体 :pBLUESC  
[0613] 切割位点 :EcoR1  
[0614] 抗药性 :AMP  
[0615] 正向序列  
[0616] CTTTTTTTTTTTTTTATATATTGTGGTATAGATTATTATATAATAACAAGGTGAATTAAC  
[0617] ATGAGAAATGAATAATTGTCACATTCTTG  
[0618] TTCTGTCCATTTTCCAGTAGCGGCTAGTTGGAAAATTTGTTGTAACATGTAACACAGGCTG  
[0619] TCCACATTCTACTCCAGAGAGAAAAGTTGG



- [0659] CT128 RFLP 标记物
- [0660] RFLP 信息
- [0661] 名称 :CT128
- [0662] 插入物大小 :700
- [0663] 载体 :pBLUESC
- [0664] 切割位点 :EcoRI
- [0665] 抗药性 :AMP
- [0666] 正向序列
- [0667] CTTTTTTTTTTTTTCAACACAAAACAAAATTTTCATTATATTGTCAGGTAGCACACTACATCT
- [0668] TTACTGTGCATCAAACGACCAGAGACTT
- [0669] GAGAACGTTTTAAGAGATTCATTTTCCGGGACAAAAGTTTGTGGCGAAAAGCCCAGGCATTG
- [0670] TTGTTTACGGGGTCTGCAAGGTGGTCAGC
- [0671] AAGGTTCTCCAATGGACCCTTTCCGGTGACAATAGCTTGAACAAAAGAATCCAAACATAGAG
- [0672] AACATAGCAAGTCTACCGTTCTTGATCTC
- [0673] CTTTACCTTGAGCTCAGCAAATGCCTCTGGGTCTTCAGCAAGGCCTAATGGGTCTGAAGCTG
- [0674] CCACCAGGGTAGAGTGGGTCGACAACCTC
- [0675] ACCAAGAGGTCCACCAGCAATACGGTATCCCTCAACAGCTCCCATCAACACAACCTTGGCAA
- [0676] GCCCAGATGGCCAAGATGCTTTGTGCATG
- [0677] GACCAAGCTTGGGTTGCCCAAGTAGTCAA
- [0678] 反向序列
- [0679] CTGGTGATTACGGGTGGGATACCGCTGGACTTTCAGCAGACCCTGAAACTTTTGCCAAGAA
- [0680] CCGTGAACCTTGAGGTGATCCACTGCAGAT
- [0681] GGGCTATGCTTGGTGCTCTTGATGTGTCTTCCCTGAGCTCTTGGCCCGTAATGGTGTCAA
- [0682] GTTCGGTGAGGCTGTGTGGTTCAAGGCCG
- [0683] GATCCCAGATCTTCAGTGAAGGTGGACTTGACTACTTGGGCAACCCAAGCTTGGTCCATGC
- [0684] ACAAAGCATCTTGGCCATCTGGGCTTGCC
- [0685] AAGTTGTGTTGATGGGAGCTGTTGAGGGATACCGTATTGCTGGTGGGACCTCTTGGTGAGG
- [0686] TTGTCGACCCACTCTACCCTGGTGGCAGC
- [0687] TTCGACCCATTAGGCCTTGCTGAAGACCCAGAGGCATTTGCTGAGCTCAAGGTAAAGGAGA
- [0688] TCAAGAACGGTAGACTTGCTATGTTCTCT
- [0689] ATGTTTGGATTCTTTGTTCAAGCTATTGTCACCGGAAAAGGGTCCA
- [0690] 表 26
- [0691] TG599 RFLP 标记物
- [0692] RFLP 信息
- [0693] 名称 :TG599
- [0694] 插入物大小 :700
- [0695] 载体 :pGEM4Z
- [0696] 切割位点 :PST1
- [0697] 抗药性 :AMP

- [0698] 正向序列
- [0699] TGCTTTGAGACAGATGTCTCTCATTAAAGTGAAGCTTTCTTCTAGTTGGCTAGCATAT
- [0700] TCATTTTCAGCATATAATCTGTATCATGA
- [0701] AAAAAATTGCGACAGTATTGAATTTTTATTGTTGAATAGTCTTTTTATTATCCCCGAAGTT
- [0702] GAGGGTGGAACTTACATTTTCTGTTGATC
- [0703] CTTGCTTGCTGTTTTTGTAAACAAAAAAGCGTCACCCATTATTTTTCTTTTATTCTTTCTA
- [0704] GGTGGGACTAAGATTTTTTGAATGAGA
- [0705] AAGGTATTCGCTACCTTGAGGGCTGTGGTTGAAGTGATGGAGTATCTGAGCAAAGATGCAG
- [0706] CTCCTGATGGTGTGGGAAGGCTTATAAAG
- [0707] GAGGAGGGAGTATTTCCTTTCATTTCTTTGTATTTCCGTGTGTGTATAGTCCGGAAGTGGT
- [0708] TCCCTACTTATGAATTCATTTTCATGGTTTG
- [0709] GTCAATTGAGAAGGATCAAGAAATCTGATGCTACTTTATCATGGGAACTT
- [0710] 反向序列
- [0711] GCTTGCATGCCTGCAGAGTGGTCATACAATAAAAAGGTAAAAATCAACATTCTTACCTCTGG
- [0712] AAAGAAACCAATAGCATTGGTCAATGATG
- [0713] CTGCCTCTAGAGGAACAATATTGTATGGTGCAAGTTCCCCTGATAAAGTAGCATCAGATTT
- [0714] CTTGATCCTTCTCAACTGACCAAACCATG
- [0715] AAAGAATTCATAAGTAGGGAACCAGTCCGGACTATACACACACGGAAATACAAAAGAAATG
- [0716] AAAGGAAATACTACCTCCTCCTTTTATAAG
- [0717] CCTTCCCACACCATCAGGAGCTGCATCTTTGCTCAGATACTCCATCACTTCAACCACAGCC
- [0718] CTCAAGGTAGCGAATACCTTTCTCATTTC
- [0719] AAAAAATCTTAGTCCCAACCTAGAAAAGAATAAAAAGAAAAATAATGGGTGACGCTTTTTTGT
- [0720] TTACAAAAACAGCAAGCAAGGATCAACAG
- [0721] AAAATCTAAGTTCCACCCTCAACTTCGGGGATAATAAAAAGACTATTCAACAATAAAAAATT
- [0722] CAATACTGTCGCAA
- [0723] 表 27
- [0724] TG10 RFLP 标记物
- [0725] RFLP 信息
- [0726] 名称 :TG10
- [0727] 插入物大小 :900
- [0728] 载体 :pUC
- [0729] 切割位点 :EcoRI/HindIII
- [0730] 抗药性 :AMP
- [0731] 正向序列
- [0732] AACTCTGCTCTGCCAATAGTAGTCAGGCAGATCAAGATGCTCAAAAATTTTCTATTTGAATT
- [0733] GGAAGCATCAAGATGGTTCTTAGCATTTA
- [0734] TTTTAGAAAGACTAACCATATTATCAAATAACCAGACTGAGACGCACACAAAAGTTCCCT
- [0735] CTATTATTTTTATAATGATGTGAAGATGC
- [0736] TACATAATGAGTACACTTTGCCTTACTTTACTGCAGATGGACCTACCAGGCCCAAACGGAC

- [0737] ATGTAGCTATGACAGAAGAGCAACCGCTA
- [0738] TGAATGTCTCAAACCTGTTGGCCTAGGCGATCAGCACAGATGATGAATCTGGAAGTACATTC
- [0739] CAAGAAGGAAAAGCTGGAGCGTGGGAACTA
- [0740] ACCAGATGCAGGGGATGAATCCACACCTTTCAGTTGATCATCTGAAGGGAAAACTAAGAAT
- [0741] TTTTCATGAGAAAATGACTGGCTATTTTCA
- [0742] ACTTTG
- [0743] 反向序列
- [0744] TTCAATGCATTTAAGCTCAAAAAAACAAGCTGTAGGAAGGAGCATATTAGTAGCCTAACT
- [0745] CTGCTCTGCCAATAATAGTTAAGCAGATC
- [0746] AAGATGCTCAAAATTTTCTAATTGAATTGTTAGCATCAAGATGCTTCTTAGCATTATTTTT
- [0747] AGAAAGATTAACCATATTATCAAATAACC
- [0748] AGACAGAGACGCACACAAAAGTTTCAATCTATTATTTTTATAATGATGTGAAAAATGCTACA
- [0749] TAATGAGTACACTTTCCCTTACTTTACTG
- [0750] CAGATGGACCTACCAGGCCCAAACGGTCATGTAGTTATGACAGAAGAACAACAGTATGAAT
- [0751] TTCTCAAACCTGTTGGCCAAGGTGATCAGC
- [0752] AAAGATTATGAATTTGGAAGTACATTCCAAGAGGAAAAGCTGGAGCATCGTAACTAACCAGA
- [0753] TGCAGGGGATGAATCCACACCTTTCAGTT
- [0754] GATCATCTGAAGGCAAACTAAGAATTTTCATGAGAAAATACTGGTTATTTTCAACTTTGT
- [0755] TGGCCAGACGAGGAGTCCAATGGGATAGA
- [0756] AGGACTAACTCAATGACGTATG
- [0757] 表 28
- [0758] TM2a TM 标记物
- [0759] TM 信息
- [0760] 名称 :TM2A
- [0761] 老的 COS ID :T0899
- [0762] 序列
- [0763] CNAGCTCGANNACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGC
- [0764] GGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGCTCCTCC
- [0765] ATTGAAAAGGGAATCAAGTTTGCCAAAGAAAACAAAAAACAATAT
- [0766] GGTCTAGTTTTCTATAGTGACAGTTTTGGATCTTTTTGGGTCAATTGTTT
- [0767] TTGTATCCTTTGCAAGTTTCTTGCAGCCGGAGGCTTAGATTTAGCTCTTT
- [0768] TGATATTATACCCAACATTTCTACAAAATAATGTATGGCAAACCTGGGGGC
- [0769] CTATCCCATTTGCCTTAGTGTGGAGGTGTTATTCTCACATGAATCGTTTT
- [0770] CCAATTATGGTTAGTAGCAGACAATTGATGCAAAATGAAGAAATGTTTCAT
- [0771] GACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
- [0772] 基因定位
- | [0773] 图                       | 染色体 | 偏移   | 置信度 |
|--------------------------------|-----|------|-----|
| [0774] Tomato-EXPEN2000 (TM2A) | 9   | 50.5 | I   |
- [0775] 表 29

- [0776] TG551 RFLP 标记物
- [0777] RFLP 信息
- [0778] 名称 :TG551
- [0779] 插入物大小 :950
- [0780] 载体 :pGEM4Z
- [0781] 切割位点 :PST1
- [0782] 抗药性 :AMP
- [0783] 正向序列
- [0784] AATGAAGTTCAGTTGATAAGCTAAATGGTGGAAATACTAATTTTAATTGACAGTAACTTTGCATTT
- [0785] CAAGGTCCATACCAAAAACATTTGC
- [0786] TAACACCAGTTGCTTTGTCAACGAAAACCTTGGCACTCAAAAACCTACCAAAAAGGCTGAAATGCAT
- [0787] TTGCAAGCTCTTGATCACCAAATT
- [0788] CTTGAGGAATATGGTAAATAAATAGATTAGCACCAGGTGGACCTGTAAACAGCAAAAATCGTTTTTTG
- [0789] ATAAGTACAGGTTTATTTCTACAT
- [0790] GTTCAACTACCACTGCCAAGTACACTAGTTCAAGTGACATCTCCACCACTTAATTGCATAAAGCTT
- [0791] TACCAACGACAAAATATAACAAACT
- [0792] TGTGCAAGTAATTTGAGTTCCTGTCTATACAGTCCAGAATCTCCATATGCTGCTCATCTCACAATG
- [0793] TTGGTTAAGGAAATTTGTCAAGTA
- [0794] AAGTTCAA
- [0795] 反向序列
- [0796] CATCTTCAAGTGTCAGCTCAAGTACAGGGGGTCAGGTTGAAGGTTGTTGAACATTTATTTTGTGAC
- [0797] CTTTTTAGCTCTAGAATTTCTGTA
- [0798] GCTAATCAAGTACAGTCCCATAACCTAGGGGCTGTTAGGGTTTTCTGCTGAATGAGGCTGCTTGTC
- [0799] TTTATTTTGGTTAATTATTTTCTG
- [0800] GAAATTGTTCTCGTCATAGAGAATAGAAGTAGAAGAAGAAGATAGTATAATCTATTATATTT
- [0801] GTTTTTTACTTAATTTATAAAGAT
- [0802] TCCATAAATGCATGTGATCTTTGATCAATGATATCTTATACAAGTGATCACTAGAATCTATTATA
- [0803] TTTGGATTTACTTATTTTATATAG
- [0804] GATTTTCATAAACGCATGTGATC
- [0805] 参考文献
- [0806] Bai YL, Huang CC, van der Hulst R, Meijer Dekens F, Bonnema G, Lindhout P(2003) QTLs for tomato powdery mildew resistance (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon parviflorum* Gl.1601 co-localize with two qualitative powdery mildew resistance genes. *Mol. plant microbe interactions* 16:169-176.
- [0807] Benito EP, ten Have A, van't Klooster JW, van Kan JAL(1998) Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:207-220.
- [0808] Bernacchi D, Tanksley SD(1997) An interspecific backcross of *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum*: Linkage analysis and a QTL study of sexual

compatibility factors and floral traits. *Genetics* 147:861-877.

[0809] Ch riston P, Murphy JE, and Swain WF (1987) Stable transformation of soybean by electroporation and root formation from transformed callus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3962-3966.

[0810] Churchill GA, Doerge RW (1994) Empirical threshold values for Quantitative trait mapping. *Genetics* 138:963-971.

[0811] Deshayes A, Herrera-Estrella L, Caboche M (1985) Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid. *EMBO J.* 4:2731-2737.

[0812] D' Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J (1992) *Plant. Cell* 4:1495-1505.

[0813] Dik AJ, Koning G, Kohl J (1999) Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:115-122.

[0814] Doganlar S, Frary A, Ku HM and Tanksley SD (2002) Mapping Quantitative Trait Loci in Inbred Backcross Lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome* 45:1189-1202.

[0815] Draper J, Davey MR, Freeman JP, Cocking EC and Cox BJ (1982) Ti plasmid homologous sequences present in tissues from *Agrobacterium* plasmid-transformed *Petunia* protoplasts. *Plant and Cell Physiol.* 23:451-458.

[0816] Eckstein F (ed) (1991) *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach.* Oxford Univ. Press, NY 1991

[0817] Egashira H, Kuwashima A, Ishiguro H, Fukushima K, Kaya T, Imanishi S (2000) Screening of wild accessions resistant to gray mold (*Botrytis cinerea* Pers.) in *Lycopersicon*. *Acta physiologiae plantarum* 22:324-326.

[0818] Foolad MR, Zhang LP, Khan AA, Nino Liu D, Liln GY (2002) Identification of QTLs for early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using backcross populations of a *Lycopersicon esculentum* x *L. hirsutum* cross. *Theor. Appl. Genetics* 104:945-958.

[0819] Fulton T, van der Hoeven R, Eannetta N, Tanksley S (2002). Identification, Analysis and Utilization of a Conserved Ortholog Set (COS) markers for Comparative Genomics in Higher Plants. *The Plant Cell* 14(7):1457-1467.

[0820] Godoy G, Steadman JR, Dickman MB, Dam R (1990) Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological Molecular Plant Pathology* 37, 179-191.

[0821] Grandillo S, Tanksley SD (1996) QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* 92:935-951.

[0822] Gruber MY, Crosby WL (1993) vectors for Plant Transformation. In: Glick BR

andThompson JE(Eds.)Methods in Plant Molecular Biology & Biotechnology, CRC Press, pp. 89-119.

[0823] Haanstra JPW, Wye C, Verbakel H, Meijer Dekens F, van den Berg P, Odinet P, van Heusden AW, Tanksley S, Lindhout P, Peleman J(1999)An integrated highdensity RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii*F<sub>2</sub>populations. *Theor. Appl. Genetics*99:254-271.

[0824] Hain R, Stabel P, Czernilofsky AP, Steinbliss HH, Herrera-Estrella L, Schell J(1985)Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaericgene to plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 199:161-168.

[0825] Horsch RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholts D, Rogers SG, Fraley RT(1985) A simple method for transferring genes into plants. *Science*227:1229-1231.

[0826] Jansen RC(1993)Interval Mapping of Multiple Quantitative Trait Loci. *Genetics*135:205-211.

[0827] Jansen RC(1994)Controlling the Type I and Type II Errors in Mapping QuantitativeTrait Loci. *Genetics*138:871-881.

[0828] Kado CI(1991)Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Crit. Rev. PlantSci.* 10:1-32.

[0829] Klein TM, Gradziel T, Fromm ME, Sanford JC(1988).Factors influencing gene delivery into zea mays cells by high velocity microprojectiles. *Biotechnology*6:559-563.

[0830] Klein TM, Arentzen R, Lewis PA, and Fitzpatrick-McElligott S(1992) Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology*10:286-291.

[0831] Kosambi DD(1944)The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12:172-175.

[0832] Laursen CM, Krzyzek RA, Flick CE, Anderson PC, Spencer TM(1994)Production of fertile transgenic maize by electroporation of suspension culture cells. *PlantMol Biol.* 24(1):51-61.

[0833] Miki BL, Fobert PF, Charest PJ, Iyer VN(1993)Procedures for IntroducingForeign DNA into Plants. In:Glick BR and Thompson JE(Eds.)Methods in PlantMolecular Biology & Biotechnology, CRC Press, pp. 67-88.

[0834] Moloney MM, Walker JM, Sharma KK(1989)High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports*8:238-242.

[0835] Myburg AA, Remington DL, O' Malley DM, Sederoff RR, Whetten RW(2001) High-throughput AFLP analysis using infrared dye-labeled primers and an automatedDNA sequencer. *Biotechniques*30:348-357.

[0836] Nesbitt TC, Tanksley SD(2001)fw2.2directly affects the size ofdeveloping tomatofruit, with secondary effects on fruit number and photosynthate distribution. *Plant Physiol.* 127:575-583.

- [0837] Nicot PC, Moretti A, Romiti C, Bardin M, Caranta C, Ferrière H(2002) Differences in susceptibility of pruning wounds and leaves to infection by *Botrytis cinerea* among wild tomato accessions. *TGCReport*52:24-26.
- [0838] Paterson AH(ed.) (1996) *Genome Mapping in Plants*, Academic Press Inc San Diego, CA, USA.
- [0839] Phillips RL, Somers DA, Hibberd KA. 1988. Cell/tissue culture and in vitro manipulation. In: G. F. Sprague & J. W. Dudley, eds. *Corn and corn improvement*, 3rd ed., p. 345-387. Madison, WI, USA, American Society of Agronomy.
- [0840] Pierik RLM(1999) *In vitro Culture of Higher Plants*, 4th edition, 360 pages, ISBN:0-7923-5267-X.
- [0841] Prins TW, Tudzynski P, von Tiedemann A, Tudzynski B, ten Have A, Hansen ME, Tenberge K, van Kan JAL(2000) Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. In " *Fungal Pathology* " (J. Kronstad, editor). Kluwer Academic Publishers, pp. 33-64.
- [0842] Roupe van der Voort JNAM, van Zandvoort P, van Eck HJ, Folkertsma RT, Hutten RCB, Draaistra J, Gommers FJ, Jacobsen E, Helder J, Bakker J(1997) Use of allele specificity of comigrating AFLP markers to align genetic maps from different potato genotypes. *Mol. Gen. Genetics*255:438-447.
- [0843] Sambrook J, and Russell DW(2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY, USA., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [0844] Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N(1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *J. Particulate Sci. Technol.* 5:27-37.
- [0845] Sanford JC(1988) The biolistic process. *Trends in Biotechnology*6:299-302.
- [0846] Sanford JC(1990) Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*79:206-209.
- [0847] Sanford JC, Smith FD, and Russell JA(1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*217:483-509.
- [0848] Steward CN, Via LE(1993) A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Biotechniques*14:748-750.
- [0849] Tanksley SD, Ganai MW, Priney JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB(1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*132:1141-1160.
- [0850] Tanksley SD, Grandillo S, Fulton TM, Zamir D, Eshed Y, Petiard V, Lopez J and Beck-Bunn T(1996) Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet*92:213-224.
- [0851] Tanksley SD, Young ND, Paterson AH, Bonierbale MW(1998) RFLP mapping

inplant breeding:New tools for an old science.Bio/technology7:257-263.

[0852] Tijssen P(1993)Hybridization With Nucleic Acid Probes.Part I.Theory and NucleicAcid Preparation.In:Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology.Elsevier.

[0853] Urbasch I(1986)Resistenz verschiedener Kultur-und Wildtomatenpflanzen(Lycopersicon spp.)gegenüber Botrytis cinerea Pers.J Phytopathol116:344-351

[0854] Utkhede R, Bogdanoff C, McNevin J(2001)Effects of biological and chemicaltreatments on Botrytis stem canker and fruit yield of tomato under greenhouse conditions.Can. J. Plant Pathol23:253-259

[0855] Utkhede RS, Mathur S(2002)Biological control of stem canker of greenhousetomatoes caused by Botrytis cinerea.Can. J. Microbiol. 48:550-554

[0856] Van Berloo R(1999)GGT:Software for the display of graphical genotypes.J. Heredity90:328-329

[0857] Van Berloo R, Aalbers H, Werkman A, Niks RE(2001)Resistance QTL confirmedthrough development of QTL-NILs for barley leaf rust resistance.Mol. Breeding8:187-195

[0858] Van Heusden AW, Koornneef M, Voorrips RE, Bruggemann W, Pet G, Vrielingvan Ginkel R, Chen X, Lindhout P(1999)Three QTLs from Lycopersicon peruvianumconfer a high level of resistance to Clavibacter michiganensis ssp michiganensis.Theor. Appl. Genetics99:1068-1074

[0859] Voorrips RE(2002)MapChart:software for the graphical presentation of linkagemaps and QTLs.J. Heredity93:77-78.

[0860] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, PotJ, Peleman J, Kuiper M(1995)AFLP:a new technique for DNA fingerprinting.Nucl. Acids Res. 23:4407-4414.

[0861] Zhang L, Cheng L, Xu N, Zhao M, Li C, Yuan J, and Jia S(1991)Efficientttransformation of tobacco by ultrasonication.Biotechnology9:996-997.

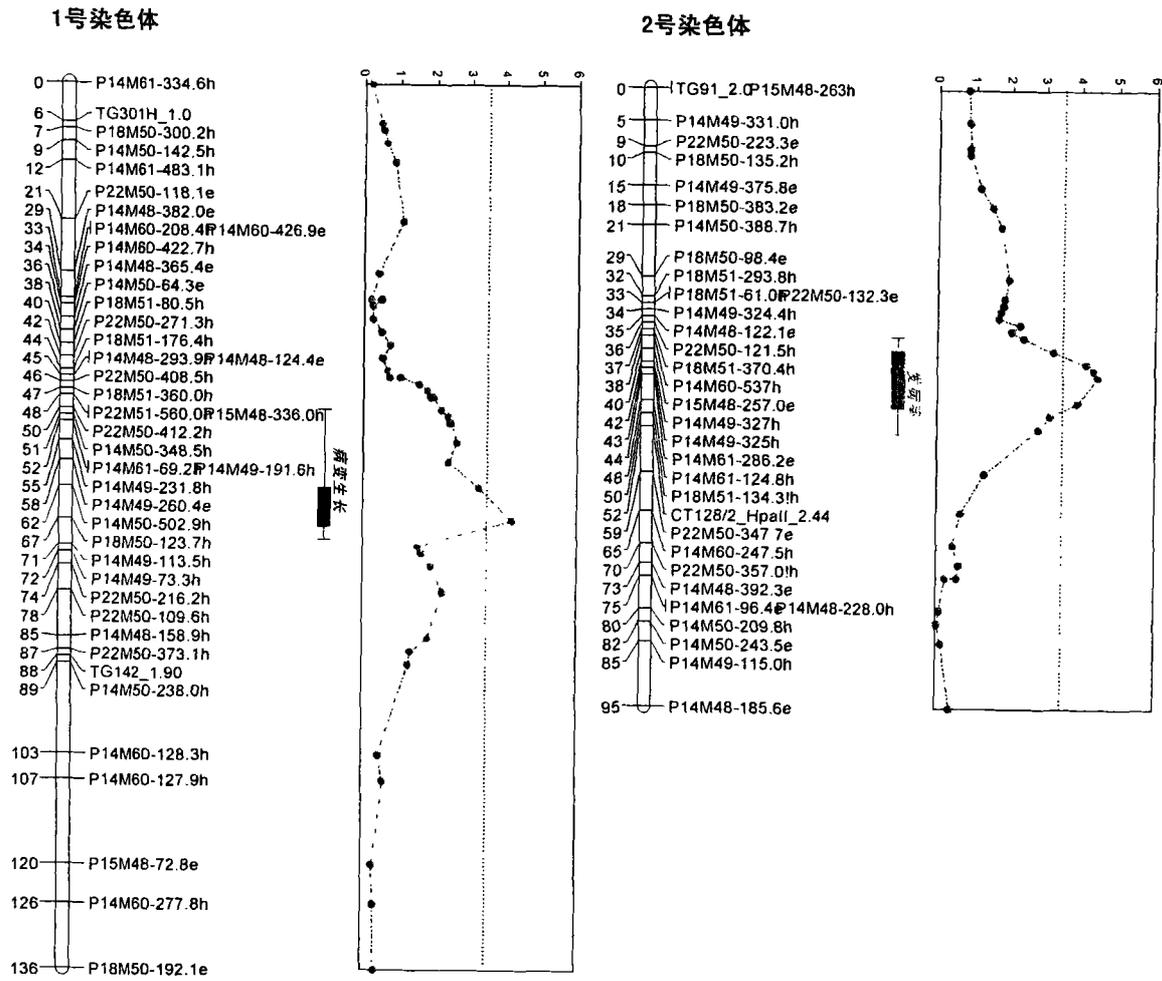


图 1

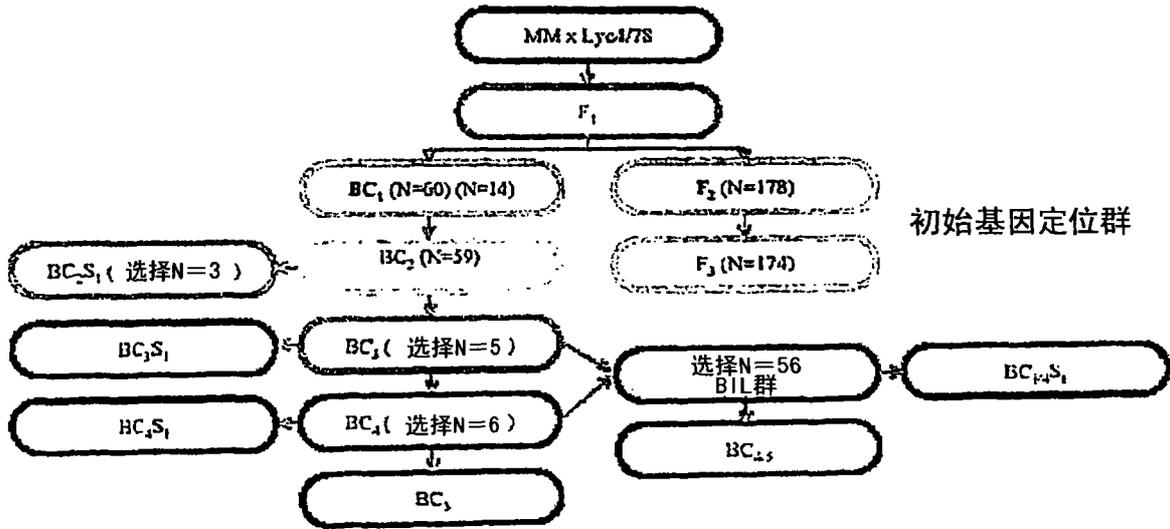


图 2

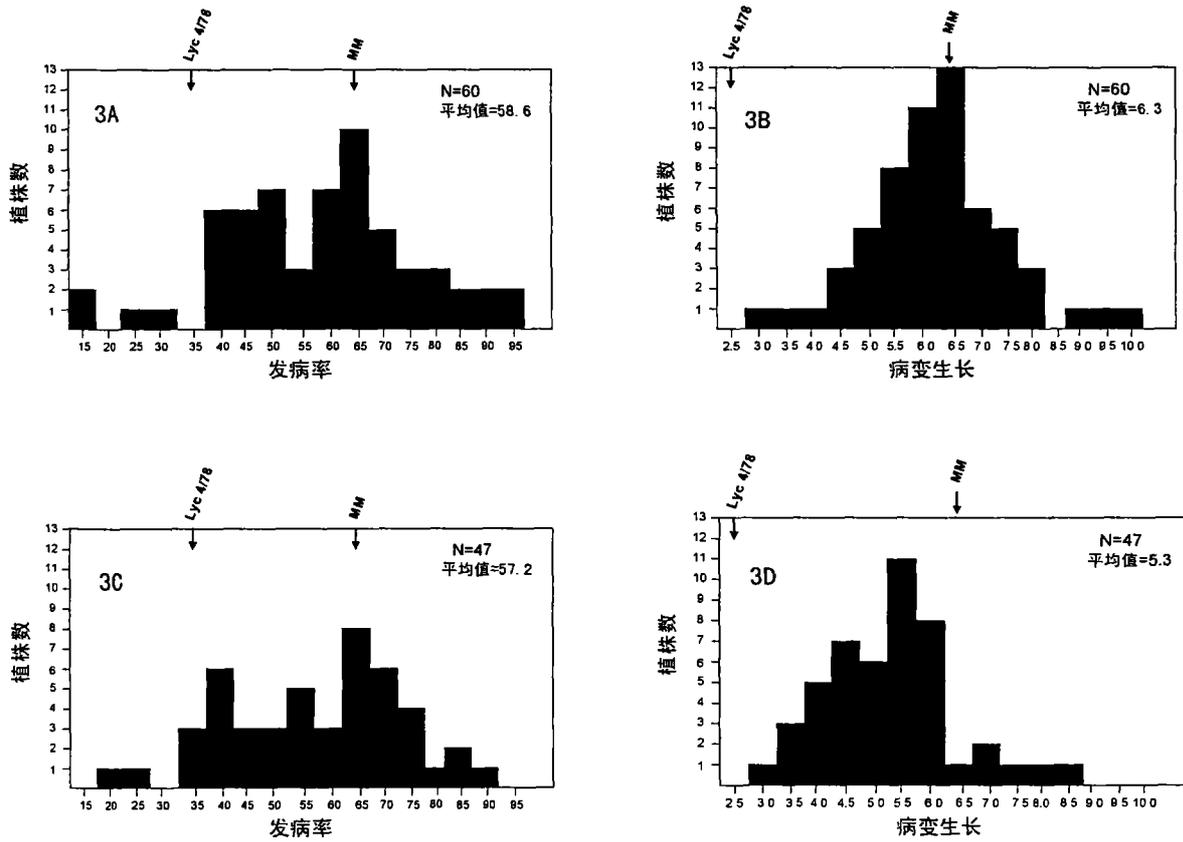


图 3

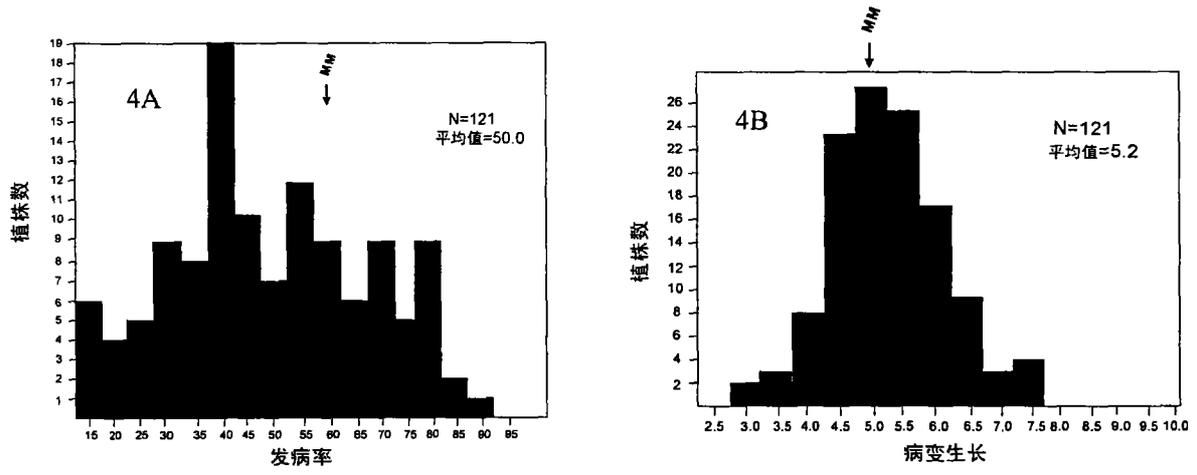


图 4

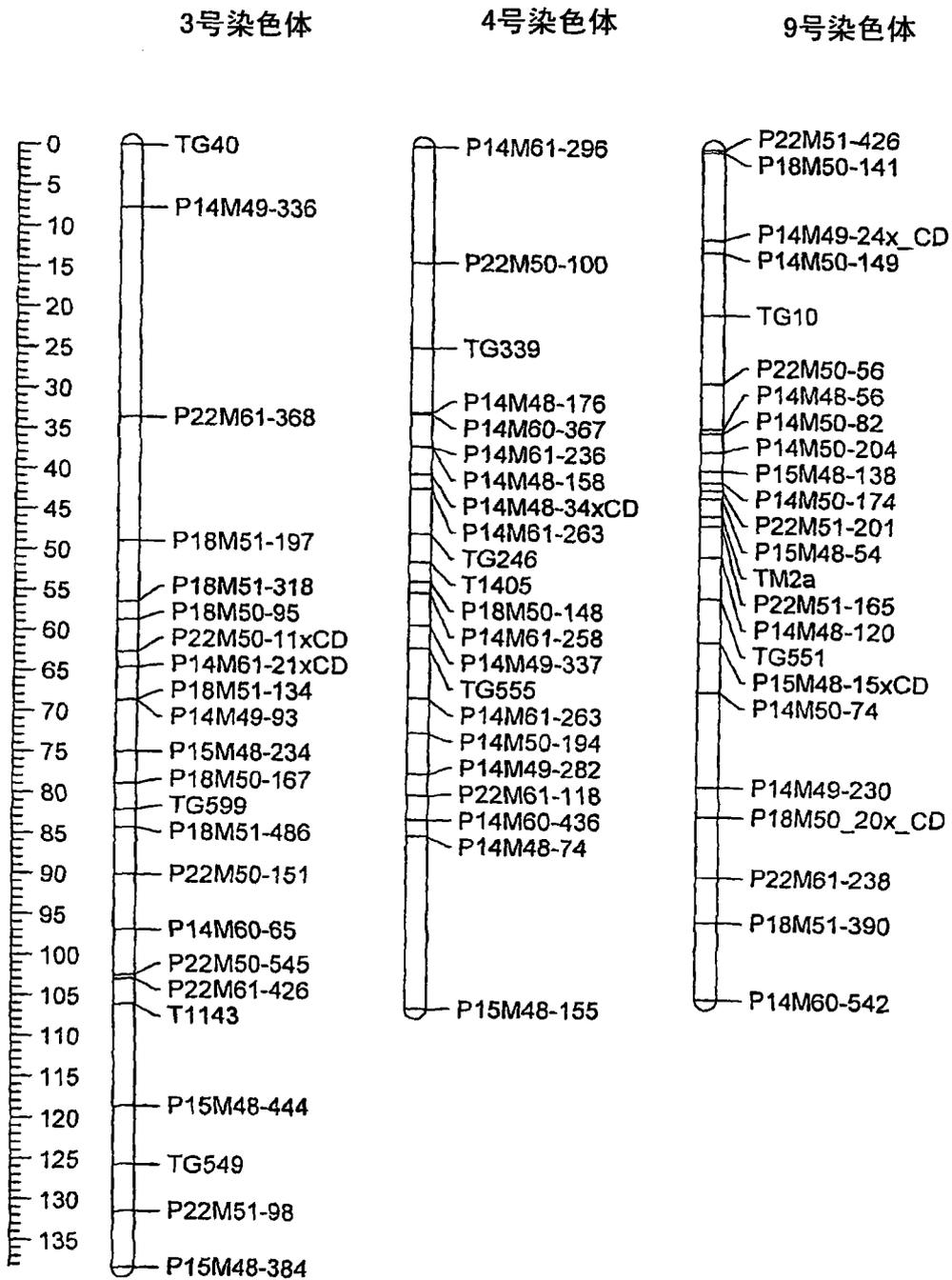


图 5

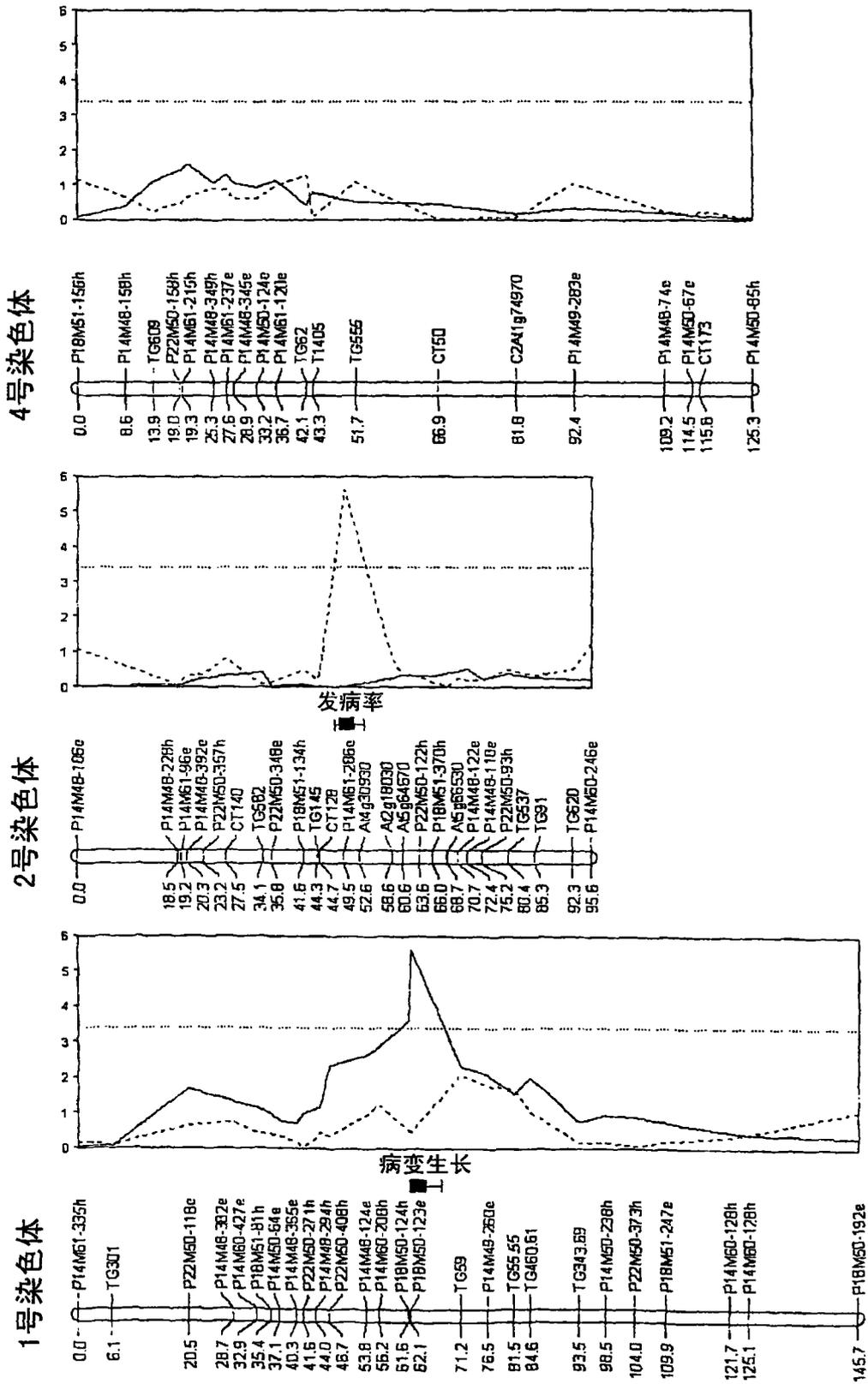


图 6