

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780027839.2

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年8月5日

[11] 公开号 CN 101501217A

[22] 申请日 2007.5.24

[21] 申请号 200780027839.2

[30] 优先权

[32] 2006.5.25 [33] US [31] 60/808,430

[86] 国际申请 PCT/US2007/012363 2007.5.24

[87] 国际公布 WO2008/054546 英 2008.5.8

[85] 进入国家阶段日期 2009.1.22

[71] 申请人 孟山都技术有限公司

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 G·J·贝利 D·V·布特勒伊勒
S·R·伊兴顿 M·D·哈弗丁克
W·M·克鲁格尔 J·R·勒多
V·C·康奇比多 J·纳维尔
J·W·皮特金 J·塔穆罗尼斯
谢重庆

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘冬 韦欣华

权利要求书 8 页 说明书 61 页 序列表 57 页

[54] 发明名称

大豆抗病性数量性状基因座及其组成的鉴定方法

[57] 摘要

本发明涉及植物育种和遗传学领域，具体地讲，本发明涉及大豆属。更具体地讲，本发明涉及含有一个或多个抗病性数量性状基因座的大豆植物的筛选方法、具有这种基因座的大豆品种以及具有这种基因座的大豆的育种和筛选方法。本发明还涉及外来种质在育种程序中的用途。

1. 一种用于测定大豆植物对病害的抗性、免疫性或易感性的方法，该方法包括以下步骤：

- a. 从所述大豆植物中剥离出植物组织；
- b. 将所述组织在培养基中进行培养；
- c. 将所述组织暴露在植物病原体中；和
- d. 对所述组织由该病原体所引起的病害的抗性、免疫性或易感性进行评价。

2. 权利要求1的方法，该方法还包括：

- a. 从所述植物中分离出核酸；
- b. 测定所述核酸存在的与所述抗性、免疫性或易感性相关的数量性状基因座的一个或多个标记分子；和
- c. 选出所述植物用于育种程序。

3. 权利要求1的方法，其中所述组织为叶、维管组织、花、豆荚、根、茎、种子或它们的组成部分。

4. 权利要求1的方法，其中所述将所述组织暴露在植物病原体中可通过选自以下的方法来完成：(a)将病原体直接用到组织中；(b)培养基中含有病原体；和(c)包含被病原体有效污染的物质并将其接种到组织中。

5. 权利要求1的方法，其中所述植物病原体暴露可以是病原体大分子、细胞、组织、整个生物或其组合的形式，其中所述病原体及其组成部分或是有生命的或是死的，只要该材料在宿主组织中介导免疫应答。

6. 权利要求1的方法，其中所述对病害的抗性、免疫性或易感性包括与选自以下病原体的反应：豆薯层锈菌(*Phakopsora pachyrhizi*)、山水蛭层锈菌(*Phakopsora meibomia*) (亚洲大豆锈病)、平头刺盘孢(*Colletotrichum truncatum*)、束状刺盘孢平头变种(*Colletotrichum*

dematium var. *truncatum*)、大豆小丛壳(*Glomerella glycines*) (大豆炭疽病)、大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*) (疫霉根茎腐病)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) (核盘菌茎腐病)、大豆腐皮镰孢(*Fusarium solani* f. sp. *glycines*) (猝死综合征)、镰孢(*Fusarium* spp.) (镰孢根腐病)、菜豆壳球孢(*Macrophomina phaseolina*) (炭腐病)、大豆壳针孢(*Septoria glycines*) (褐斑病)、瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)、德巴利腐霉(*Pythium debaryanum*)、畸雌腐霉(*Pythium irregulare*)、终极腐霉(*Pythium ultimum*)、群结腐霉(*Pythium myriotylum*)、簇囊腐霉(*Pythium torulosum*) (腐霉种子腐病)、菜豆间座壳大豆变种(*Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*) (豆荚枯病)、*Phomopsis longicola* (茎枯病)、拟茎点霉(*Phomopsis* spp.) (拟茎点霉种子腐病)、东北霜霉(*Peronospora manshurica*) (霜霉病)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) (丝核菌根茎腐病, 丝核菌地上部分枯萎病)、大豆茎褐腐病菌(*Phialophora gregata*) (茎褐腐病)、大豆北方茎溃疡病菌(*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*) (茎溃疡病)、菊池尾孢(*Cercospora kikuchii*) (种子紫斑病)、链格孢(*Alternaria* sp.) (黑斑病)、大豆尾孢(*Cercospora sojina*) (蛙眼病)、齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*) (白绢病)、*Arkoala nigra* (黑色叶斑病)、根串珠霉(*Thielaviopsis basicola*) (黑色根腐病)、漏斗笄霉(*Choanephora infundibulifera*)、三孢笄霉(*Choanephora trispora*) (笄霉叶枯病)、三叶草小光壳(*Leptosphaerulina trifolii*) (小光壳叶斑病)、*Mycoleptodiscus terrestris* (*Mycoleptodiscus* 根腐病)、侵管新赤壳(*Neocosmospora vasinfecta*) (新赤壳茎腐病)、大豆生叶点霉(*Phyllosticta sojicola*) (叶点霉叶斑病)、大豆棘壳孢(*Pyrenochaeta glycines*) (棘壳孢叶斑病)、*Cylindrocladium crotalariae* (红色颈腐病)、*Dactuliochaeta glycines* (红色叶斑枯病)、大豆痂圆孢(*Spaceloma glycines*) (疮痂病)、葡柄霉(*Stemphylium botryosum*) (葡柄霉叶枯病)、山扁豆生棒孢(*Corynespora cassiicola*) (黑斑病)、榛针孢酵母(*Nematospora coryli*) (酵母斑点病)、多主瘤梗孢(*Phymatotrichum omnivorum*) (棉根腐病)、苜蓿花叶病毒属

(*Alfamovirus*) (苜蓿花叶病毒, AMV)、豇豆花叶病毒属(*Comovirus*) (菜豆荚斑驳病毒, BPMV)、马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*) (菜豆黄色花叶病毒, BYMV)、雀麦花叶病毒属(*Bromovirus*) (豇豆褪绿斑驳病毒, CCMV)、菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*) (绿豆黄色花叶病毒, MYMV)、马铃薯 Y 病毒属(花生斑驳病毒, PeMoV)、马铃薯 Y 病毒属(花生条纹病毒, PStV)、黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*) (花生矮化病毒, PSV)、花椰菜花叶病毒属(*Caulimovirus*) (大豆褪绿斑驳病毒, SbCMV)、菜豆金色花叶病毒属(大豆皱叶病毒, SCLV)、黄矮病毒属(*Luteovirus*) (大豆矮缩病毒, SbdV)、马铃薯 Y 病毒属(大豆花叶病毒, SMV)、线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*) (大豆极度矮化病毒, SSSV)、线虫传多面体病毒属(烟草环斑病毒, TRSV)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) (芽孢杆菌种子腐病)、萨氏假单胞菌大豆致病变种(*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*) (细菌疫病)、丁香假单胞菌丁香亚种(*Pseudomonas syringae* subsp. *syringae*) (细菌皱叶病)、地毯草黄单胞菌大豆致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) (细菌斑疹病)、萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) (细菌褐斑病)、萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*)、茄科罗尔斯通氏菌(*Ralstonia solanacearum*) (桑青枯病)、丁香假单胞菌烟草致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) (野火病)、大豆蚜(*Aphis glycines*)、大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)、花生根结线虫(*Meloidogyne arenari*)、北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*)、南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、爪哇根结线虫(*Meloidogyne javanica*) (根结线虫)、哥伦比亚纽带线虫(*Hoplolaimus Columbus*)、帽状纽带线虫(*Hoplolaimus galeatus*)、大针纽带线虫(*Hoplolaimus magnistylus*) (纽带线虫)、短体线虫(*Pratylenchus* spp.) (根斑线虫)、突出针线虫(*Paratylenchus projectus*)、细尾针线虫(*Paratylenchus tenuicaudatus*) (针线虫)、肾形小盘线虫(*Rotylenchulus reniformis*) (肾形线虫)、装饰小

环线虫(*Criconemella ornata*) (环线虫)、鞘线虫(*Hemicycliophora* spp.)、螺旋线虫(*Helicotylenchus* spp.)、细小刺线虫(*Belonolainus gracilis*)、长尾刺线虫(*Belonolainus longicaudatus*) (刺线虫)、五沟线虫(*Quinisulcius acutus*)、矮化线虫(*Tylenchorhynchus* spp.)和短小拟毛刺线虫(*Paratrichodorus minor*) (毛刺线虫)。

7. 权利要求3的方法, 其中对所述组织对以下病原体的抗性、免疫性或易感性进行评价: 豆薯层锈菌、山水蛭层锈菌(亚洲大豆锈病)、平头刺盘孢、束状刺盘孢平头变种、大豆小丛壳(大豆炭疽病)、大豆疫霉菌(疫霉根茎腐病)、核盘菌(核盘菌茎腐病)、大豆腐皮镰孢(猝死综合征)、镰孢(镰孢根腐病)、菜豆壳球孢(炭腐病)、大豆壳针孢(褐斑病)、瓜果腐霉、德巴利腐霉、畸雌腐霉、终极腐霉、群结腐霉、簇囊腐霉(腐霉种子腐病)、菜豆间座壳大豆变种(豆荚枯病)、*Phomopsis longicola* (茎枯病)、拟茎点霉(拟茎点霉种子腐病)、东北霜霉(霜霉病)、立枯丝核菌(丝核菌根茎腐病, 丝核菌地上部分枯萎病)、大豆茎褐腐病菌(茎褐腐病)、大豆北方茎溃疡病菌(茎溃疡病)、菊池尾孢(种子紫斑病)、链格孢(黑斑病)、大豆尾孢(蛙眼病)、齐整小核菌(白绢病)、*Arkoala nigra* (黑色叶斑病)、根串珠霉(黑色根腐病)、漏斗笄霉、三孢笄霉(笄霉叶枯病)、三叶草小光壳(小光壳叶斑病)、*Mycocleptodiscus terrestris* (*Mycocleptodiscus* 根腐病)、侵管新赤壳(新赤壳茎腐病)、大豆生叶点霉(叶点霉叶斑病)、大豆棘壳孢(棘壳孢叶斑病)、*Cylindrocladium crotalariae* (红色颈腐病)、*Dactuliochaeta glycines* (红色叶斑枯病)、大豆痂圆孢(疮痂病)、匍柄霉(匍柄霉叶枯病)、山扁豆生棒孢(黑斑病)、榛针孢酵母(酵母斑点病)、多主瘤梗孢(棉根腐病)、苜蓿花叶病毒属(苜蓿花叶病毒, AMV)、豇豆花叶病毒属(菜豆荚斑驳病毒, BPMV)、马铃薯 Y 病毒属(菜豆黄色花叶病毒, BYMV)、雀麦花叶病毒属(豇豆褪绿斑驳病毒, CCMV)、菜豆金色花叶病毒属(绿豆黄色花叶病毒, MYMV)、马铃薯 Y 病毒属(花生斑驳病毒, PeMoV)、马铃薯 Y 病毒属(花生条纹病毒, PStV)、黄瓜花叶病毒属(花生矮化病

毒, PSV)、花椰菜花叶病毒属(大豆褪绿斑驳病毒, SbCMV)、菜豆金色花叶病毒属(大豆皱叶病毒, SCLV)、黄矮病毒属(大豆矮缩病毒, SbDV)、马铃薯 Y 病毒属(大豆花叶病毒, SMV)、线虫传多面体病毒属(大豆极度矮化病毒, SSSV)、线虫传多面体病毒属(烟草环斑病毒, TRSV)、枯草芽孢杆菌(芽孢杆菌种子腐病)、萨氏假单胞菌大豆致病变种(细菌疫病)、丁香假单胞菌丁香亚种(细菌皱叶病)、地毯草黄单胞菌大豆致病变种(细菌斑疹病)、萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种(细菌褐斑病)、萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种、茄科罗尔斯通氏菌(桑青枯病)、丁香假单胞菌烟草致病变种(野火病)、大豆蚜、大豆胞囊线虫、花生根结线虫、北方根结线虫、南方根结线虫、爪哇根结线虫(根结线虫)、哥伦比亚纽带线虫、帽状纽带线虫、大针纽带线虫(纽带线虫)、短体线虫(根斑线虫)、突出针线虫、细尾针线虫(针线虫)、肾形小盘线虫(肾形线虫)、装饰小环线虫(环线虫)、鞘线虫、螺旋线虫、细小刺线虫、长尾刺线虫(刺线虫)、五沟线虫、矮化线虫和短小拟毛刺线虫(毛刺线虫)。

8. 权利要求 1 的方法, 其中所述选出的大豆植物选自 *Glycine arenaria*、*Glycine argyrea*、*Glycine canescens*、澎湖大豆(*Glycine clandestine*)、*Glycine curvata*、*Glycine cyrtoloba*、*Glycine falcate*、*Glycine latifolia*、*Glycine latrobeana*、栽培大豆(*Glycine max*)、*Glycine microphylla*、*Glycine pescadrensis*、*Glycine pindanica*、*Glycine rubiginosa*、野生大豆(*Glycine soja*)、大豆(*Glycine sp.*)、*Glycine stenophita*、烟豆(*Glycine tabacina*)和短绒野大豆(*Glycine tomentella*)。

9. 权利要求 1 的方法, 其中所述培养基含有水和维持感染且同时又不干扰所述抗病性数量性状基因座作用的所必需的营养物。

10. 权利要求 1 的方法, 其中所述对病害的抗性、免疫性或易感性选自疫霉(根腐病)感染耐受性、大豆腐皮镰孢(猝死综合征)抗性、大豆尾孢(蛙眼病)抗性、大豆茎褐腐病菌(*Phialophora gregata*) (茎褐腐病)抗性、核盘菌(茎腐病)抗性和亚洲大豆锈病(ASR)抗性。

11. 权利要求 2 的方法, 其中所述数量性状基因座选自 ASR 抗性基因座 1-13。

12. 权利要求 1 的方法, 其中所述大豆植物是包含所需抗病性数量性状基因座的大豆植物和优良系大豆植物之间杂交的子代。

13. 一种大豆植物, 所述大豆植物用权利要求的方法 2 选出。

14. 一种分离或重组 DNA 分子, 所述 DNA 分子选自 SEQ ID NO:67-99。

15. 一种选择 ASR 抗性大豆植物的方法, 该方法包括以下步骤:

a) 从大量大豆植物中分离出核酸;

b) 检测所述分离的核酸中存在的与 ASR 抗性基因座 1 有关的一个或多个标记分子, 其中所述标记分子选自 NS0093250、NS0119710、NS0103004、NS0099454、NS0102630、NS0102915、NS0102913、NS0123728、NS0129943、NS0102168、NS0092723、NS0098177、NS0127343、NS0101121 和作图在距所述标记分子 10 厘摩以内的任何标记分子; 和

c) 选出包含所述一个或多个标记分子的大豆植物, 从而选出 ASR 抗性大豆植物。

16. 一种选择 ASR 抗性大豆植物的方法, 该方法包括以下步骤:

a) 从大量大豆植物中分离出核酸;

b) 检测所述分离的核酸中存在的与 ASR 抗性基因座 3 有关的一个或多个标记分子, 其中所述标记分子选自 NS0099746、NS0123747、NS0126598、NS0128378、NS0096829、NS0125408、NS0098902、NS0099529、NS0097798、NS0137477、NS0095322、NS0136101、NS0098982 和作图在距所述标记分子 10 厘摩以内的任何标记分子; 和

c) 选出包含所述一个或多个标记分子的大豆植物, 从而选出 ASR 抗性大豆植物。

17. 一种选择 ASR 抗性大豆植物的方法, 该方法包括以下步骤:

a) 从大量大豆植物中分离出核酸;

b) 检测所述分离的核酸中存在的与 ASR 抗性基因座 5-9 有关的一个或多个标记分子, 其中所述标记分子选自 NS0103033 和作图在距所述标记分子 10 厘摩以内的任一种标记分子; 和

c) 选出包含所述一个或多个标记分子的大豆植物, 从而选出 ASR 抗性大豆植物。

18. 一种选择 ASR 抗性大豆植物的方法, 该方法包括以下步骤:

a) 从大量大豆植物中分离出核酸;

b) 检测所述分离的核酸中存在的与 ASR 抗性基因座 10-13 有关的一个或多个标记分子, 其中所述标记分子选自 NS0124935 和作图在距所述标记分子 10 厘摩以内的任一种标记分子; 和

c) 选出包含所述一个或多个标记分子的大豆植物, 从而选出 ASR 抗性大豆植物。

19. 一种选择 ASR 抗性大豆植物的方法, 该方法包括以下步骤:

a) 从大量大豆植物中分离出核酸;

b) 检测所述分离的核酸中存在的与 ASR 抗性基因座 2 有关的一个或多个标记分子, 其中所述标记分子选自对应于 J 连锁群或 N 连锁群的区; 和

c) 选出包含所述一个或多个标记分子的大豆植物, 从而选出 ASR 抗性大豆植物。

20. 一种选择 ASR 抗性大豆植物的方法, 该方法包括以下步骤:

a) 从大量大豆植物中分离出核酸;

b) 检测所述分离的核酸中存在的与 ASR 抗性基因座 4 有关的一个或多个标记分子, 其中所述标记分子选自对应于 N 连锁群的区; 和

c) 选出包含所述一个或多个标记分子的大豆植物, 从而选出 ASR 抗性大豆植物。

21. 一种 ASR 抗性大豆植物, 所述 ASR 抗性大豆植物用权利要求 15-20 中任一项的方法选出。

22. 一种大豆植物,所述大豆植物包含选自 ASR 抗性基因座 5-13 的至少一个渐渗的 ASR 抗性基因座。

23. 权利要求 22 的大豆植物,其中所述渐渗的 ASR 抗性基因座源自表 6 中所列的大豆保藏品种。

24. 权利要求 22 的大豆植物,所述大豆植物还包含选自 ASR 抗性基因座 1-4 的一个或多个 ASR 抗性基因座。

25. 权利要求 24 的大豆植物,其中所述 ASR 抗性基因座 1-4 源自表 4 中所列的大豆保藏品种。

26. 一种大豆植物,所述大豆植物包含渐渗的数量性状基因座,其中所述基因座源自大豆保藏品种 PI 200487,其中所述基因座赋予迟发锈病表型。

大豆抗病性数量性状基因座及其组成的鉴定方法

相关申请的交叉引用

本申请要求 2006 年 5 月 25 日申请的美国临时申请顺序号 60/808,430 的优先权的权益。

序列表的引用

序列表存放在文件名为“pa_53517.txt”的文件中，该文件具有 65,000 字节(按 MS-Windows 统计)，创建于 2007 年 5 月 22 日，存放在与本文一起提交的计算机可读形式的磁盘中并通过引用结合到本文中。

发明领域

本发明涉及植物育种和抗病性领域。更具体地讲，本发明涉及含有与抗病性有关的数量性状基因座的大豆属(*Glycine*)植物的筛选方法和抗病大豆属植物的育种方法。植物病害可由真菌、病毒、细菌或无脊椎动物引起。本发明还涉及在真菌病原体豆薯层锈菌(*Phakopsora pachyrhizi*)抗性育种程序中将含有赋予抗病性的数量性状基因座(QTL)的保藏(accession)种质渐渗入优良种质中的用途。

发明背景

栽培大豆(*Glycine max* (L.) Merrill)，是一种全球种植的作为植物油和植物蛋白主要来源的重要经济作物(Sinclair 和 Backman, *Compendium of Soybean Diseases* (大豆病害概要)，第三版，APS Press, St. Paul, MN, 第 106 页，(1989))。对低胆固醇和高纤维饮食不断增长的需求也增加了大豆作为健康食品的重要性。

在美国, 每年由于病害使得大豆产量减少。提高每公顷的产量对于农民的利润率十分重要, 尤其在大豆价格低迷的时期。对于农村经济和城区关联产业经济, 大豆病害引起的财务损失都非常大。这些损失的影响最终都将在全球大豆市场上反映出来。在美国和加拿大安大略省, 估计由病害引起的损失每年都不相同, 并且因病害不同而不同。自 1999 年到 2002 年, 在美国估计大豆产量损失的范围在 800 万公吨至 1000 万公吨, 在安大略省为 90,000-166,000 公吨(Wrathner 等, 在线, *Plant Health Progress doi:10:1094/PHP-2003-0325-01-RV*)。

在东半球和西半球均有亚洲大豆锈病(Asian Soybean Rust, 本文称为 ASR)的报道。在东半球, 已经报道了 ASR 的有澳大利亚、中国、印度、日本、台湾地区和泰国。在西半球, 已经观察到 ASR 的有巴西、哥伦比亚、哥斯达黎加和波多黎各。ASR 可以是破坏性病害, 据台湾报道在某些田间引起的产量损失高达 70-80%。被严重感染的植物品质较差, 豆荚较少, 种子较小(Frederick 等, *Mycology* 92: 217-227 (2002))。1994 年首次在美国夏威夷发现 ASR。ASR 稍后在 2004 年夏季传到美国内陆, 据推测是热带风暴活动的结果。模型预测法表明, ASR 已广泛扩散到整个美国东南部, 田间和实验室随后的观察结果证实了这种分布状况。

两种真菌——豆薯层锈菌(*Phakopsora pachyrhizi* Sydow)和山水蛭层锈菌(*Phakopsora meibomia* (Arthur) Arthur)引起 ASR。与其它锈病不同, 豆薯层锈菌(*P. pachyrhizi*)和山水蛭层锈菌(*P. meibomia*)感染植物品种的范围极其广泛。已知豆薯层锈菌自然感染豆科植物 17 个属中的 31 个种, 在控制条件下感染其余 26 个属中的 60 个种。山水蛭层锈菌自然感染豆科植物 19 个属中的 42 个种, 并已人工感染了其余 12 个属中的额外 18 个种。19 个属中的 24 个植物品种是这两个菌种的宿主(Frederick 等, *Mycology* 92: 217-227 (2002))。

已经鉴定出大豆植物的 ASR 抗性。已分别在 PI 200492、PI 230970、PI 462312 (Ankur)和 PI 459025B 中鉴定出 4 个抗豆薯层锈菌

的独立遗传的显性小种专化 QTL, 本文称为 ASR 抗性基因座 1 (ASR resistance locus 1)、ASR 抗性基因座 2、ASR 抗性基因座 3 和 ASR 抗性基因座 4。这些品系以及其余 7 个品系疑似含有 ASR 抗性的 QTL。在台湾亚洲蔬菜研究开发中心 (Asian Vegetable Research and Development Center), PI 239871A 和 PI 239871B (野生大豆(*G. soja*)), PI 230971 和 PI 459024B 和栽培种 Taita Kaohsiung-5、Tainung-4 和 Wayne 已被用作区别种(differentials)鉴定出 9 个小种。最重要的小种与 3 个以上区别种相容, 这就表明一些小种已经对已知和疑似抗性基因具有多个毒力因子。澳大利亚野生大豆中也产生了抗性。还证实了减速抗性(Rate-reducing resistance)。然而, 难以对这一抗性类型进行评价, 因为锈病发展的速度依赖于大豆发育和成熟(Sinclair 等主编, Soybean rust workshop. College of Agricultural, Consumer, and Environmental Sciences. Natl. Soybean Res. Lab. Publ. 1 (1996))。

评价可能含有赋予 ASR 抗性的 QTL 的植物可能是耗时的, 并且需要大量具备生物防范作用的空间。培养豆薯层锈菌需要使用经批准的生物防范操作台(biological containment hood)。此外, 栽培用于 ASR 抗性试验的植物的温室和生长室必须按防止意外释放出生物的方式建造, 尤其是在尚未观察到所述生物的地区。不同的豆薯层锈菌培养物可具有不同的毒力因子。随着时间推移, 新的豆薯层锈菌菌株有可能传入美国。因此, 设计培育大豆抗 ASR 抗性的任何育种程序都必需能够快速应对豆薯层锈菌种群的变化。同样, 用在其它地理位置的大豆作物育种除提供该区域农民喜欢的农艺性状以外, 还需要选择影响该区域的特定菌株的抗性。因此, 非常需要用于筛选抗 ASR 种质的快速、省时和有成本效益的高通量方法。这种方法不仅必须提供速度和效率, 而且还必须能够用最少的空地量进行, 便于在同一时间筛选多个样品。

本发明提供用于包含抗病性 QTL 的大豆植物的筛选和选择方法。

发明概述

本发明提供一种用于测定大豆植物对病害的抗性、免疫性或易感性的方法，该方法包括：(a)由大豆植物中剥离出植物组织；(b)将所述组织在培养基中进行培养；(c)将所述组织暴露在植物病原体中；和(d)对所述组织由该病原体所引起的病害的抗性、免疫性或易感性进行评价。此外，可通过以下步骤评价植物对病原体的反应：(e)从所述植物中分离出核酸(DNA和/或RNA)；(f)测定所述核酸(DNA、RNA和/或cDNA)存在的与所述抗性、免疫性或易感性相关的数量性状基因座的一个或多个分子标记；和(g)选出所述植物用于育种程序。植物对特定病原体的抗性、免疫性或易感性的测定法对本领域任何技术人员而言是显而易见的。植物组织可以是叶、维管组织、花、豆荚、根、茎、种子或它们的组成部分，或者是由组织分离出来的细胞。将所述组织暴露在植物病原体中可通过选自以下的方法来完成：(a)将病原体直接用到组织中；(b)培养基中含有病原体；和(c)包含将被病原体有效污染的物质接种到组织中。植物病原体可以是真菌、病毒、细菌或无脊椎动物。植物病原体暴露可以病原体大分子、细胞、组织、整个生物或其组合的形式，其中病原体及其组成部分或是有生命的或是死的，只要该材料在宿主组织中介导免疫应答。本发明的相关病原体大分子包括但不限于毒素、细胞壁、细胞膜、抗原和多糖。

本发明还包括赋予针对真菌病原体的抗病性的QTL，所述真菌病原体选自豆薯层锈菌(*Phakopsora pachyrhizi*)、山水蛭层锈菌(*Phakopsora meibomia*) (亚洲大豆锈病)、平头刺盘孢(*Colletotrichum truncatum*)、束状刺盘孢平头变种(*Colletotrichum dematium* var. *truncatum*)、大豆小丛壳(*Glomerella glycines*) (大豆炭疽病)、大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*) (疫霉根茎腐病)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) (核盘菌茎腐病)、大豆腐皮镰孢(*Fusarium solani* f. sp. *glycines*) (猝死综合征)、镰孢(*Fusarium* spp.) (镰孢根腐病)、菜豆壳球孢(*Macrophomina phaseolina*) (炭腐病)、大豆壳针孢(*Septoria glycines*)

(褐斑病)、瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)、德巴利腐霉(*Pythium debaryanum*)、畸雌腐霉(*Pythium irregulare*)、终极腐霉(*Pythium ultimum*)、群结腐霉(*Pythium myriotylum*)、簇囊腐霉(*Pythium torulosum*) (腐霉种子腐病)、菜豆间座壳大豆变种(*Diaporthe phaseolorum* var. *sojae*) (豆荚枯病)、*Phomopsis longicola* (茎枯病)、拟茎点霉(*Phomopsis* spp.) (拟茎点霉种子腐病)、东北霜霉(*Peronospora manshurica*) (霜霉病)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) (丝核菌根茎腐病, 丝核菌地上部分枯萎病)、大豆茎褐腐病菌(*Phialophora gregata*) (茎褐腐病)、大豆北方茎溃疡病菌(*Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*) (茎溃疡病(Stem Canker))、菊池尾孢(*Cercospora kikuchii*) (种子紫斑病(Purple Seed Stain))、链格孢(*Alternaria* sp.) (黑斑病(Target Spot))、大豆尾孢(*Cercospora sojae*) (蛙眼病(Frogeye Leafspot))、齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*) (白绢病)、*Arkoala nigra* (黑色叶斑病)、根串珠霉(*Thielaviopsis basicola*) (黑色根腐病)、漏斗笄霉(*Choanephora infundibulifera*)、三孢笄霉(*Choanephora trispora*) (笄霉叶枯病)、三叶草小光壳(*Leptosphaerulina trifolii*) (小光壳叶斑病)、*Mycoleptodiscus terrestris* (*Mycoleptodiscus* 根腐病)、侵管新赤壳(*Neocosmospora vasinfecta*) (新赤壳茎腐病)、大豆生叶点霉(*Phyllosticta sojicola*) (叶点霉叶斑病)、大豆棘壳孢(*Pyrenochaeta glycines*) (棘壳孢叶斑病)、*Cylindrocladium crotalariae* (红色颈腐病(Red crown rot))、*Dactuliochaeta glycines* (红色叶斑枯病)、大豆痂圆孢(*Spaceloma glycines*) (疮痂病)、匍柄霉(*Stemphylium botryosum*) (匍柄霉叶枯病)、山扁豆生棒孢(*Corynespora cassicola*) (黑斑病)、榛针孢酵母(*Nematospora coryli*) (酵母斑点病(Yeast spot))和多主瘤梗孢(*Phymatotrichum omnivorum*) (棉根腐病)。

本发明还包括赋予针对病毒病原体的抗病性的 QTL, 所述病毒病原体选自苜蓿花叶病毒属(*Alfavirus*) (苜蓿花叶病毒(*Alfafa mosaic virus*, AMV))、豇豆花叶病毒属(*Comovirus*) (菜豆荚斑驳病毒(bean pod mottle virus, BPMV))、马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*) (菜豆黄色花叶病

毒(bean yellow mosaic virus, BYMV)、雀麦花叶病毒属(*Bromovirus*) (豇豆褪绿斑驳病毒(cowpea chlorotic mottle virus, CCMV)、菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*) (绿豆黄色花叶病毒(mung bean yellow mosaic virus, MYMV))、马铃薯 Y 病毒属(花生斑驳病毒(peanut mottle virus, PeMoV))、马铃薯 Y 病毒属(花生条纹病毒(peanut stripe virus, PStV))、黄瓜花叶病毒属(*Cucumovirus*) (花生矮化病毒((peanut stunt virus, PSV))、花椰菜花叶病毒属(*Caulimovirus*) (大豆褪绿斑驳病毒(soybean chlorotic mottle virus, SbCMV))、菜豆金色花叶病毒属(大豆皱叶病毒(soybean crinkle leaf virus, SCLV))、黄矮病毒属(*Luteovirus*) (大豆矮缩病毒(soybean dwarf virus, SbDV))、马铃薯 Y 病毒属(大豆花叶病毒(soybean mosaic virus, SMV))、线虫传多面体病毒属(*Nepovirus*) (大豆极度矮化病毒(soybean severe stunt virus, SSSV))和线虫传多面体病毒属(烟草环斑病毒(tobacco ringspot virus, TRSV))。

本发明还包括赋予针对细菌病原体的抗病性的 QTL, 所述细菌病原体选自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) (芽孢杆菌种子腐病)、萨氏假单胞菌大豆致病变种(*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*) (细菌疫病)、丁香假单胞菌丁香亚种(*Pseudomonas syringae* subsp. *syringae*) (细菌皱叶病)、地毯草黄单胞菌大豆致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*) (细菌斑疹病)、萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) (细菌褐斑病)、萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*)、茄科罗尔斯通氏菌(*Ralstonia solanacearum*) (桑青枯病)和丁香假单胞菌烟草致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) (野火病)。

本发明还包括赋予针对无脊椎动物病原体的抗病性的 QTL, 所述无脊椎动物病原体选自大豆蚜(*Aphis glycines*)、大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)、花生根结线虫(*Meloidogyne arenari*)、北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*)、南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、爪哇根结线虫(*Meloidogyne javanica*) (根结线虫)、哥伦比亚纽带线虫

(*Hoplolaimus Columbus*)、帽状纽带线虫(*Hoplolaimus galeatus*)、大针纽带线虫(*Hoplolaimus magnistylus*) (纽带线虫(Lance nematode))、短体线虫(*Pratylenchus* spp.) (根斑线虫(Lesion nematode))、突出针线虫(*Paratylenchus projectus*)、细尾针线虫(*Paratylenchus tenuicaudatus*) (针线虫)、肾形小盘旋线虫(*Rotylenchulus reniformis*) (肾形线虫(Reniform nematode))、装饰小环线虫(*Criconemella ornata*) (环线虫)、鞘线虫(*Hemicycliophora* spp.) (鞘线虫 (Sheath nematode))、螺旋线虫(*Heliocotylenchus* spp.) (螺旋线虫(Spiral nematode))、细小刺线虫(*Belonolaimus gracilis*)、长尾刺线虫(*Belonolaimus longicaudatus*) (刺线虫(Sting nematode))、五沟线虫(*Quinisulcius acutus*)、矮化线虫(*Tylenchorhynchus* spp.) (矮化线虫(Stunt nematode))和短小拟毛刺线虫(*Paratrichodorus minor*) (毛刺线虫(Stubby root nematode))。

本发明还提供筛选出来的对以下病原体有抗性的大豆组织和植物：豆薯层锈菌、山水蛭层锈菌(亚洲大豆锈病)、平头刺盘孢、束状刺盘孢平头变种、大豆小丛壳(大豆炭疽病)、大豆疫霉菌(疫霉根茎腐病)、核盘菌(核盘菌茎腐病)、大豆腐皮镰孢(猝死综合征)、镰孢(镰孢根腐病)、菜豆壳球孢(炭腐病)、大豆壳针孢、(褐斑病)、瓜果腐霉、德巴利腐霉、畸雌腐霉、终极腐霉、群结腐霉、簇囊腐霉(腐霉种子腐病)、菜豆间座壳大豆变种(豆荚枯病)、*Phomopsis longicola* (茎枯病)、拟茎点霉(拟茎点霉种子腐病)、东北霜霉(霜霉病)、立枯丝核菌(丝核菌根茎腐病, 丝核菌地上部分枯萎病)、大豆茎褐腐病菌(茎褐腐病)、大豆北方茎溃疡病菌(茎溃疡病)、菊池尾孢(种子紫斑病)、链格孢(黑斑病)、大豆尾孢(蛙眼病)、齐整小核菌(白绢病)、*Arkoala nigra* (黑色叶斑病)、根串珠霉、(黑色根腐病)、漏斗笄霉、三孢笄霉(笄霉叶枯病)、三叶草小光壳(小光壳叶斑病)、*Mycocleptodiscus terrestris* (Mycocleptodiscus 根腐病)、侵管新赤壳(新赤壳茎腐病)、大豆生叶点霉(叶点霉叶斑病)、大豆棘壳孢(棘壳孢叶斑病)、*Cylindrocladium crotalariae* (红色颈腐病)、*Dactuliochaeta glycines* (红色叶斑枯病)、大

豆痂圆孢(疮痂病)、匍柄霉(匍柄霉叶枯病)、山扁豆生棒孢(黑斑病)、榛针孢酵母(酵母斑点病)、多主瘤梗孢(棉根腐病)、苜蓿花叶病毒属(苜蓿花叶病毒, AMV)、豇豆花叶病毒属(菜豆荚斑驳病毒, BPMV)、马铃薯 Y 病毒属(菜豆黄色花叶病毒, BYMV)、雀麦花叶病毒属(豇豆褪绿斑驳病毒, CCMV)、菜豆金色花叶病毒属(绿豆黄色花叶病毒, MYMV)、马铃薯 Y 病毒属(花生斑驳病毒, PeMoV)、马铃薯 Y 病毒属(花生条纹病毒, PSTV)、黄瓜花叶病毒属(花生矮化病毒, PSV)、花椰菜花叶病毒属(大豆褪绿斑驳病毒, SbCMV)、菜豆金色花叶病毒属(大豆皱叶病毒, SCLV)、黄矮病毒属(大豆矮缩病毒, SbdV)、马铃薯 Y 病毒属(大豆花叶病毒, SMV)、线虫传多面体病毒属(大豆极度矮化病毒, SSSV)、线虫传多面体病毒属(烟草环斑病毒, TRSV)、枯草芽孢杆菌(芽孢杆菌种子腐病)、萨氏假单胞菌大豆致病变种(细菌疫病)、丁香假单胞菌丁香亚种(细菌皱叶病)、地毯草黄单胞菌大豆致病变种(细菌斑疹病)、萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种(细菌褐斑病)、萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种、茄科罗尔斯通氏菌(桑青枯病)、丁香假单胞菌烟草致病变种(野火病)、大豆蚜、大豆胞囊线虫、花生根结线虫、北方根结线虫、南方根结线虫、爪哇根结线虫(根结线虫)、哥伦比亚纽带线虫、帽状纽带线虫、大针纽带线虫(纽带线虫)、短体线虫(根斑线虫)、突出针线虫、细尾针线虫(针线虫)、肾形小盘旋线虫(肾形线虫)、装饰小环线虫(环线虫)、鞘线虫、螺旋线虫、细小刺线虫、长尾刺线虫(刺线虫)、五沟线虫、矮化线虫或短小拟毛刺线虫(毛刺线虫)。

本发明还提供选自大豆属成员的精选植物, 更尤其选自 *Glycine arenaria*、*Glycine argyrea*、*Glycine canescens*、澎湖大豆(*Glycine clandestine*)、*Glycine curvata*、*Glycine cyrtoloba*、*Glycine falcate*、*Glycine latifolia*、*Glycine latrobeana*、栽培大豆(*Glycine max*)、*Glycine microphylla*、*Glycine pescadrensis*、*Glycine pindanica*、*Glycine rubiginosa*、野生大豆(*Glycine soja*)、大豆(*Glycine sp.*)、*Glycine stenophita*、烟豆(*Glycine tabacina*)和短绒野大豆(*Glycine tomentella*)。

本发明还提供用于选择方法的培养基，该培养基中含有未处理水、蒸馏水或去离子水。培养基可含有维持病原体或植物组织的任何必需成分，只要该成分不干扰 QTL 所赋予的抗性的表达。

本发明还提供采用所述方法选出的大豆植物。

本发明还提供选自以下基因座的 QTL：疫霉(根腐病)感染耐受性基因座、大豆腐皮镰孢(猝死综合征)抗性基因座、大豆尾孢(蛙眼病)抗性基因座、大豆茎褐腐病菌(*Phialophora gregata*) (茎褐腐病)抗性基因座、核盘菌(茎腐病)抗性基因座、ASR 抗性基因座 1、ASR 抗性基因座 2、ASR 抗性基因座 3、ASR 抗性基因座 4、ASR 抗性基因座 5、ASR 抗性基因座 6、ASR 抗性基因座 7、ASR 抗性基因座 8、ASR 抗性基因座 9、ASR 抗性基因座 10、ASR 抗性基因座 11、ASR 抗性基因座 12 和 ASR 抗性基因座 13。

本发明还提供筛选出来的含有一个或多个真菌病抗性 QTL 的植物，其中包括 ASR 抗性基因座 1、ASR 抗性基因座 2、ASR 抗性基因座 3、ASR 抗性基因座 4、ASR 抗性基因座 5、ASR 抗性基因座 6、ASR 抗性基因座 7、ASR 抗性基因座 8、ASR 抗性基因座 9、ASR 抗性基因座 10、ASR 抗性基因座 11、ASR 抗性基因座 12 和 ASR 抗性基因座 13。

本发明还提供用于 ASR 抗性基因座 1 的一个或多个单核苷酸多态性(SNP)标记基因座，其中所述 SNP 标记选自 NS0093250、NS0119710、NS0103004、NS0099454、NS0102630、NS0102915、NS0102913、NS0123728、NS0129943、NS0102168、NS0092723、NS0098177、NS0127343 和 NS0101121。还提供了用于 ASR 抗性基因座 3 的一个或多个 SNP 标记基因座，其中所述 SNP 标记选自 NS0099746、NS0123747、NS0126598、NS0128378、NS0096829、NS0125408、NS0098902、NS0099529、NS0097798、NS0137477、NS0095322、NS0136101 和 NS0098982。本发明提供用于 ASR 抗性基因座 5、ASR 抗性基因座 6、ASR 抗性基因座 7、ASR 抗性基因座 8

和 ASR 抗性基因座 9 的示例性的 SNP 标记基因座 NS0103033。本发明提供用于 ASR 抗性基因座 10、ASR 抗性基因座 11、ASR 抗性基因座 12 和 ASR 抗性基因座 13 的另一个示例性 SNP 标记基因座 NS0124935。此外，作图在距所述标记分子 10 厘摩以内的一个或多个标记可用于 ASR 抗性基因座的选择和渐渗。

本发明还提供用于大豆 ASR 抗性选择和渐渗的方法，该方法包括：(a)从大量大豆植物中分离出核酸；(b)检测所述分离的核酸中存在的与 ASR 抗性基因座 1-13 有关的一个或多个标记分子(其中所述标记分子选自 SEQ ID NO:67-99)，以及作图在距所述标记分子 10 厘摩以内的任何一种标记分子；和(c)选出包含所述一个或多个标记分子的大豆植物，从而选出 ASR 抗性大豆植物。

本发明还提供采用所述方法筛选出来的大豆植物。

发明详述

本发明提供大豆植物对真菌病的抗性、免疫性或易感性的筛选方法。在一个优选的实施方案中，植物选自大豆属。野生多年生大豆属于大豆亚属(subgenus *Glycine*)，具有广泛的遗传多样性。栽培大豆(*Glycine max* (L.) Merr.)及其野生一年生祖先(野生大豆(*Glycine soja* (Sieb.和 Zucc.)))属于黄豆亚属(subgenus *Soja*)，含有 $2n = 40$ 条染色体，是杂交亲和的，通常生长成茁壮可育的 F1 杂种，携带相似的基因组。栽培大豆品种和野生多年生大豆品种之间可进行杂交，杂交是否成功在各保藏品种之间有所不同。研究表明，若干野生多年生大豆保藏品种具有褐斑病、大豆锈病、根腐病、黄色花叶病毒和白粉病抗性。在全球的保藏种质中，有 100,000 多个栽培大豆保藏品种，大概不到 10,000 个野生大豆保藏品种，大约 3500 个多年生大豆保藏品种。尚不知确切数目。主要的大豆保藏物保存在澳大利亚、巴西、中国、德国、印度、印尼、日本、俄罗斯、南韩和美国。许多其它较少但重要的保藏物遍及亚洲和欧洲。不知道在保藏物中有多少许多保藏品种是

重复的。美国农业部大豆种质保藏中心(USDA Soybean Germplasm Collection)是亚洲以外最大的保藏中心(Verma 等, 主编, Soybean: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology (1996))。目前保藏了 20,765 个品种, 由 19 个品种保藏物组成, 包括 18,680 个栽培大豆保藏品种和 1,166 个野生大豆及多年生大豆保藏品种。

在一个优选的实施方案中, 对大豆植物对病害的抗性、免疫性或易感性进行了测定, 包括: (a)由大豆植物分离出植物组织; (b)将所述组织在培养基中进行培养; (c)将所述组织暴露在植物病原体中; 和(d)评价所述组织对该病原体所引起的病害的抗性、免疫性或易感性。此外, 可通过以下步骤评价植物对病原体的反应: (e)从所述植物中分离出核酸; (f)测定所述核酸存在的与所述抗性、免疫性或易感性相关的数量性状基因座的一个或多个分子标记; 和(g)选出用于育种程序的所述植物。植物对特定病原体的抗性、免疫性或易感性的测定法对本领域任何技术人员而言是显而易见的。植物组织可以是叶、维管组织、花、豆荚、根、茎、种子或它们的组成部分, 或者是由组织分离出来的细胞。将所述组织暴露在植物病原体中可通过选自以下的方法来完成: (a)将病原体直接用到组织中; (b)培养基中含有病原体; 和(c)将包含被病原体有效污染的物质接种到组织中。植物病原体可以是真菌、病毒、细菌或无脊椎动物。植物病原体暴露可以是病原体大分子、细胞、组织、整个生物或其组合的形式, 其中病原体及其组成部分或是有生命的或是死的, 只要该材料在宿主组织中介导免疫应答。本发明的相关病原体大分子包括但不限于毒素、细胞壁、细胞膜、抗原和多糖。

在一个优选的实施方案中, 叶组织可包含子叶、具一小叶的叶片、具三叶的叶片和先出叶。大豆叶有四种类型: 1)第一对单片子叶(simple cotyledons 或 seed leaves), 2)第二对单片初生叶, 亦称具一小叶的叶片, 3)具三叶的营养叶, 和 4)先出叶, 这是类似叶的植物部分。具一小叶的叶片生长在子叶以上的第一节上。其它所有叶都是具三叶的叶

片，其中在具一小叶的叶片之后萌发的第一对便是第一具三叶的叶片，其后则萌发第二具三叶的叶片，然后是第三具三叶的叶片(H.R. Boerma 和 J.E. Specht (主编.) Soybean Monograph, 第三版, Am. Soc. Agron., Madison, WI (2004))。

在一个优选的实施方案中，本发明能够测定大豆植物对真菌病的抗性、免疫性或易感性。由真菌引起的大豆病害包括但不限于豆薯层锈菌、山水蛭层锈菌(亚洲大豆锈病)、平头刺盘孢、束状刺盘孢平头变种、大豆小丛壳(大豆炭疽病)、大豆疫霉菌(疫霉根茎腐病)、核盘菌(核盘菌茎腐病)、大豆腐皮镰孢(猝死综合征)、镰孢(镰孢根腐病)、菜豆壳球孢(炭腐病)、大豆壳针孢(褐斑病)、瓜果腐霉、德巴利腐霉、畸雌腐霉、终极腐霉、群结腐霉、簇囊腐霉(腐霉种子腐病)、菜豆间座壳大豆变种(豆荚枯病)、*Phomopsis longicola* (茎枯病)、拟茎点霉(拟茎点霉种子腐病)、东北霜霉(霜霉病)、立枯丝核菌(丝核菌根茎腐病，丝核菌地上部分枯萎病)、大豆茎褐腐病菌(茎褐腐病)、大豆北方茎溃疡病菌(茎溃疡病)、菊池尾孢(种子紫斑病)、链格孢(黑斑病)、大豆尾孢(蛙眼病)、齐整小核菌(白绢病)、*Arkoala nigra* (黑色叶斑病)、根串珠霉、(黑色根腐病)、漏斗笄霉、三孢笄霉(笄霉叶枯病)、三叶草小光壳(小光壳叶斑病)、*Mycoleptodiscus terrestris* (Mycoleptodiscus 根腐病)、侵管新赤壳(新赤壳茎腐病)、大豆生叶点霉(叶点霉叶斑病)、大豆棘壳孢(棘壳孢叶斑病)、*Cylindrocladium crotalariae* (红色颈腐病)、*Dactuliochaeta glycines* (红色叶斑枯病)、大豆痂圆孢(疮痂病)、匍柄霉(匍柄霉叶枯病)、山扁豆生棒孢(黑斑病)、榛针孢酵母(酵母斑点病)和多主瘤梗孢(棉根腐病)。

在一个优选的实施方案中，本发明能够测定大豆植物对病毒病的抗性、免疫性或易感性。病毒引起的大豆病害包括但不限于苜蓿花叶病毒属(苜蓿花叶病毒，AMV)、豇豆花叶病毒属(菜豆荚斑驳病毒，BPMV)、马铃薯Y病毒属(菜豆黄色花叶病毒，BYMV)、雀麦花叶病毒属(豇豆褪绿斑驳病毒，CCMV)、菜豆金色花叶病毒属(绿豆黄色花

叶病毒, MYMV)、马铃薯 Y 病毒属(花生斑驳病毒, PeMoV)、马铃薯 Y 病毒属(花生条纹病毒, PSTV)、黄瓜花叶病毒属(花生矮化病毒, PSV)、花椰菜花叶病毒属(大豆褪绿斑驳病毒, SbCMV)、菜豆金色花叶病毒属(大豆皱叶病毒, SCLV)、黄矮病毒属(大豆矮缩病毒, SbDV)、马铃薯 Y 病毒属(大豆花叶病毒, SMV)、线虫传多面体病毒属(大豆极度矮化病毒, SSSV)和线虫传多面体病毒属(烟草环斑病毒, TRSV)。

在一个优选的实施方案中, 本发明能够测定大豆植物对细菌病的抗性、免疫性或易感性。由细菌引起的大豆病害包括但不限于枯草芽孢杆菌(芽孢杆菌种子腐病)、萨氏假单胞菌大豆致病变种(细菌疫病)、丁香假单胞菌丁香亚种(细菌皱叶病)、地毯草黄单胞菌大豆致病变种(细菌斑疹病)、萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种(细菌褐斑病)、萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种、茄科罗尔斯通氏菌(桑青枯病)和丁香假单胞菌烟草致病变种(野火病)。

在一个优选的实施方案中, 本发明能够测定大豆植物对有害动物病害的抗性、免疫性或易感性。由有害动物引起的大豆病害包括但不限于大豆蚜、大豆胞囊线虫、花生根结线虫、北方根结线虫、南方根结线虫、爪哇根结线虫(根结线虫)、哥伦比亚纽带线虫、帽状纽带线虫、大针纽带线虫(纽带线虫)、短体线虫(根斑线虫)、突出针线虫、细尾针线虫(针线虫)、肾形小盘旋线虫(肾形线虫)、装饰小环线虫(环线虫)、鞘线虫、螺旋线虫、细小刺线虫、长尾刺线虫(刺线虫)、五沟线虫、矮化线虫和短小拟毛刺线虫(毛刺线虫)。

本发明还提供大豆抗病性的 QTL 的选择和渐渗的方法, 该方法包括: (a)从大量大豆植物中分离出核酸; (b)检测所述分离的核酸中存在的与抗病性 QTL 有关的一个或多个标记分子; 和(c)选出包含所述一个或多个标记分子的大豆植物, 从而选出抗病大豆植物。

可将本发明的抗病性 QTL 导入优良的大豆品系。“优良系”是由优良农艺性能育种和选择所产生的任何品系。优良系的实例是农民或大豆育种人员可从商业途径获得的品系, 例如 HARTZ™ 变种

H4994、HARTZ™变种 H5218、HARTZ™变种 H5350、HARTZ™变种 H5545、HARTZ™变种 H5050、HARTZ™变种 H5454、HARTZ™变种 H5233、HARTZ™变种 H5488、HARTZ™变种 HLA572、HARTZ™变种 H6200、HARTZ™变种 H6104、HARTZ™变种 H6255、HARTZ™变种 H6586、HARTZ™变种 H6191、HARTZ™变种 H7440、HARTZ™变种 H4452 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H4994 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H4988 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5000 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5147 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5247 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5350 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5545 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5855 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5088 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5164 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5361 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5566 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5181 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5889 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H5999 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H6013 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H6255 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H6454 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H6686 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H7152 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H7550 Roundup Ready™、HARTZ™变种 H8001 Roundup Ready™ (HARTZ SEED, Stuttgart, Arkansas, USA); A0868、AG0202、AG0401、AG0803、AG0901、A1553、A1900、AG1502、AG1702、AG1901、A1923、A2069、AG2101、AG2201、AG2205、A2247、AG2301、A2304、A2396、AG2401、AG2501、A2506、A2553、AG2701、AG2702、AG2703、A2704、A2833、A2869、AG2901、AG2902、AG2905、AG3001、AG3002、AG3101、A3204、A3237、A3244、AG3301、AG3302、AG3006、AG3203、A3404、A3469、AG3502、AG3503、AG3505、AG3305、AG3602、AG3802、AG3905、AG3906、AG4102、AG4201、AG4403、AG4502、AG4603、AG4801、AG4902、AG4903、

AG5301、AG5501、AG5605、AG5903、AG5905、A3559、AG3601、AG3701、AG3704、AG3750、A3834、AG3901、A3904、A4045 AG4301、A4341、AG4401、AG4404、AG4501、AG4503、AG4601、AG4602、A4604、AG4702、AG4703、AG4901、A4922、AG5401、A5547、AG5602、AG5702、A5704、AG5801、AG5901、A5944、A5959、AG6101、AJW2600C0R、FPG26932、QR4459 和 QP4544 (Asgrow Seeds, Des Moines, Iowa, USA); DKB26-52、DKB28-51、DKB32-52、DKB08-51、DKB09-53、DKB10-52、DKB18-51、DKB26-53、DKB29-51、DKB42-51、DKB35-51 DKB34-51、DKB36-52、DKB37-51、DKB38-52、DKB46-51、DKB54-52 和 DeKalb 变种 CX445 (DeKalb, Illinois, USA); 91B91、92B24、92B37、92B63、92B71、92B74、92B75、92B91、93B01、93B11、93B26、93B34、93B35、93B41、93B45、93B51、93B53、93B66、93B81、93B82、93B84、94B01、94B32、94B53、94M80 RR、94M50 RR、95B71、95B95、95M81 RR、95M50 RR、95M30 RR、9306、9294、93M50、93M93、94B73、94B74、94M41、94M70、94M90、95B32、95B42、95B43 和 9344 (Pioneer Hi-bred International, Johnston, Iowa, USA); SSC-251RR、SSC-273CNRR、AGRA 5429RR、SSC-314RR、SSC-315RR、SSC-311STS、SSC-320RR、AGRA5432RR、SSC-345RR、SSC-356RR、SSC-366、SSC-373RR 和 AGRA5537CNRR (Schlessman Seed Company, Milan, Ohio, USA); 39-E9、44-R4、44-R5、47-G7、49-P9、52-Q2、53-K3、56-J6、58-V8、ARX A48104、ARX B48104、ARX B55104 和 GP530 (Armor Beans, Fisher, Arkansas, USA); HT322STS、HT3596STS、L0332、L0717、L1309CN、L1817、L1913CN、L1984、L2303CN、L2495、L2509CN、L2719CN、L3997CN、L4317CN、RC1303、RC1620、RC1799、RC1802、RC1900、RC1919、RC2020、RC2300、RC2389、RC2424、RC2462、RC2500、RC2504、RC2525、RC2702、RC2964、RC3212、RC3335、RC3354、RC3422、RC3624、RC3636、RC3732、RC3838、RC3864、RC3939、RC3942、RC3964、RC4013、

RC4104、RC4233、RC4432、RC4444、RC4464、RC4842、RC4848、
RC4992、RC5003、RC5222、RC5332、RC5454、RC5555、RC5892、
RC5972、RC6767、RC7402、RT0032、RT0041、RT0065、RT0073、
RT0079、RT0255、RT0269、RT0273、RT0312、RT0374、RT0396、
RT0476、RT0574、RT0583、RT0662、RT0669、RT0676、RT0684、
RT0755、RT0874、RT0907、RT0929、RT0994、RT0995、RT1004、
RT1183、RT1199、RT1234、RT1399、RT1413、RT1535、RT1606、
RT1741、RT1789、RT1992、RT2000、RT2041、RT2089、RT2092、
RT2112、RT2127、RT2200、RT2292、RT2341、RT2430、RT2440、
RT2512、RT2544、RT2629、RT2678、RT2732、RT2800、RT2802、
RT2822、RT2898、RT2963、RT3176、RT3200、RT3253、RT3432、
RT3595、RT3836、RT4098、RX2540、RX2944、RX3444 和 TS466RR
(Croplan Genetics, Clinton, Kentucky, USA); 4340RR、4630RR、
4840RR、4860RR、4960RR、4970RR、5260RR、5460RR、5555RR、
5630RR 和 5702RR (Delta Grow, England, Arkansas, USA); DK3964RR、
DK3968RR、DK4461RR、DK4763RR、DK4868RR、DK4967RR、
DK5161RR、DK5366RR、DK5465RR、DK55T6、DK5668RR、
DK5767RR、DK5967RR、DKXTJ446、DKXTJ448、DKXTJ541、
DKXTJ542、DKXTJ543、DKXTJ546、DKXTJ548、DKXTJ549、
DKXTJ54J9、DKXTJ54X9、DKXTJ554、DKXTJ555、DKXTJ55J5 和
DKXTJ5K57 (Delta King Seed Company, McCrory, Arkansas, USA); DP
3861RR、DP 4331 RR、DP 4546RR、DP 4724 RR、DP 4933 RR、DP
5414RR、DP 5634 RR、DP 5915 RR、DPX 3950RR、DPX 4891RR、
DPX 5808RR (Delta & Pine Land Company, Lubbock, Texas, USA);
DG31T31、DG32C38、DG3362NRR、DG3390NRR、DG33A37、
DG33B52、DG3443NRR、DG3463NRR、DG3481NRR、DG3484NRR、
DG3535NRR、DG3562NRR、DG3583NRR、DG35B40、DG35D33、
DG36M49、DG37N43、DG38K57、DG38T47、SX04334、SX04453

(Dyna-gro 品系, UAP-MidSouth, Cordova, Tennessee, USA); 8374RR CYSTX、8390 NNRR、8416RR、8492NRR 和 8499NRR (Excel Brand, Camp Point, Illinois, USA); 4922RR、5033RR、5225RR 和 5663RR (FFR Seed, Southaven, Mississippi, USA); 3624RR/N、3824RR/N、4212RR/N、4612RR/N、5012RR/N、5212RR/N 和 5412RR/STS/N (Garst Seed Company, Slater, Iowa, USA); 471、4R451、4R485、4R495、4RS421 和 5R531 (Gateway Seed Company, Nashville, Illinois, USA); H-3606RR、H-3945RR、H-4368RR、H-4749RR、H-5053RR 和 H-5492RR (Golden Harvest Seeds, Inc., Pekin, Illinois, USA); HBK 5324、HBK 5524、HBK R4023、HBK R4623、HBK R4724、HBK R4820、HBK R4924、HBK R4945CX、HBK R5620 和 HBK R5624 (Hornbeck Seed Co. Inc., DeWitt, Arkansas, USA); 341 RR/SCN、343 RR/SCN、346 RR/SCN、349 RR、355 RR/SCN、363 RR/SCN、373 RR、375 RR、379 RR/SCN、379+ RR/SCN、380 RR/SCN、380+ RR/SCN、381 RR/SCN、389 RR/SCN、389+ RR/SCN、393 RR/SCN、393+ RR/SCN、398 RR、402 RR/SCN、404 RR、424 RR、434 RR/SCN 和 442 RR/SCN (Kruger Seed Company, Dike, Iowa, USA); 3566、3715、3875、3944、4010 和 4106 (Lewis Hybrids, Inc., Ursa, Illinois, USA); C3999NRR (LG Seeds, Elmwood, Illinois, USA); Atlanta 543、Austin RR、Cleveland VIIRR、Dallas RR、Denver RRSTS、Everest RR、Grant 3RR、Olympus RR、Phoenix IIIRR、Rocky RR、Rushmore 553RR 和 Washington IXRR (Merschman Seed Inc., West Point, Iowa, USA); RT 3304N、RT 3603N、RT 3644N、RT 3712N、RT 3804N、RT 3883N、RT 3991N、RT 4044N、RT 4114N、RT 4124N、RT 4201N、RT 4334N、RT 4402N、RT 4480N、RT 4503N、RT 4683N、RT 4993N、RT 5043N、RT 5204、RT 5553N、RT 5773、RT4731N 和 RTS 4824N (MFA Inc., Columbia, Missouri, USA); 9A373NRR、9A375XRR、9A385NRS、9A402NRR、9A455NRR、9A485XRR 和 9B445NRS (Midland Genetics Group L.L.C., Ottawa,

Kansas, USA); 3605nRR、3805nRR、3903nRR、3905nRR、4305nRR、4404nRR、4705nRR、4805nRR、4904nRR、4905nRR、5504nRR 和 5505nRR (Midwest Premium Genetics, Concordia, Missouri, USA); S37-N4、S39-K6、S40-R9、S42-P7、S43-B1、S49-Q9、S50-N3、S52-U3 和 S56-D7 (Syngenta Seeds, Henderson, Kentucky, USA); NT-3707 RR、NT-3737 RR/SCN、NT-3737+RR/SCN、NT-3737sc RR/SCN、NT-3777+RR、NT-3787 RR/SCN、NT-3828 RR、NT-3839 RR、NT-3909 RR/SCN/STS、NT-3909+ RR/SCN/ST、NT-3909sc RR/SCN/S、NT-3919 RR、NT-3922 RR/SCN、NT-3929 RR/SCN、NT-3999 RR/SCN、NT-3999+ RR/SCN、NT-3999sc RR/SCN、NT-4040 RR/SCN、NT-4040+RR/SCN、NT-4044 RR/SCN、NT-4122 RR/SCN、NT-4414 RR/SCN/STS、NT-4646 RR/SCN 和 NT-4747 RR/SCN (NuTech Seed Co., Ames, Iowa, USA); PB-3494NRR、PB-3732RR、PB-3894NRR、PB-3921NRR、PB-4023NRR、PB-4394NRR、PB-4483NRR 和 PB-5083NRR (Prairie Brand Seed Co., Story City, Iowa, USA); 3900RR、4401RR、4703RR、4860RR、4910、4949RR、5250RR、5404RR、5503RR、5660RR、5703RR、5770、5822RR、PGY 4304RR、PGY 4604RR、PGY 4804RR、PGY 5622RR 和 PGY 5714RR (Progeny Ag Products, Wynne, Arkansas, USA); R3595RCX、R3684Rcn、R3814RR、R4095Rcn、R4385Rcn 和 R4695Rcn (Renze Hybrids Inc., Carroll, Iowa, USA); S3532-4、S3600-4、S3832-4、S3932-4、S3942-4、S4102-4、S4542-4 和 S4842-4 (Stine Seed Co., Adel, Iowa, USA); 374RR、398RRS (Taylor Seed Farms Inc., White Cloud, Kansas, USA); USG 5002T、USG 510nRR、USG 5601T、USG 7440nRR、USG 7443nRR、USG 7473nRR、USG 7482nRR、USG 7484nRR、USG 7499nRR、USG 7504nRR、USG 7514nRR、USG 7523nRR、USG 7553nRS 和 USG 7563nRR (UniSouth Genetics Inc., Nashville, Tennessee, USA); V38N5RS、V39N4RR、V42N3RR、V48N5RR、V284RR、V28N5RR、V315RR、V35N4RR、

V36N5RR、V37N3RR、V40N3RR、V47N3RR 和 V562NRR (Royster-Clark Inc., Washington C.H., Ohio, USA); RR2383N、2525NA、RR2335N、RR2354N、RR2355N、RR2362、RR2385N、RR2392N、RR2392NA、RR2393N、RR2432N、RR2432NA、RR2445N、RR2474N、RR2484N、RR2495N 和 RR2525N (Willcross Seed, King City Seed, King City, Missouri, USA); 1493RR、1991NRR、2217RR、2301NRR、2319RR、2321NRR、2341NRR、2531NRR、2541NRR、2574RR、2659RR、2663RR、2665NRR、2671NRR、2678RR、2685RR、2765NRR、2782NRR、2788NRR、2791NRR、3410RR、3411NRR、3419NRR、3421NRR、3425NRR、3453NRR、3461NRR、3470CRR、3471NRR、3473NRR、3475RR、3479NRR、3491NRR、3499NRR、WX134、WX137、WX177 和 WX300 (Wilken Seeds, Pontiac, Illinois, USA)。优良植物是来自优良系的代表性植物。

本发明的抗病性 QTL 还可被导入含有以下一个或多个基因的优良大豆转基因植物中：除草剂耐受性、增产、昆虫防治、真菌病抗性、病毒抗性、线虫抗性、细菌病抗性、支原体病抗性、改进油产量、高产油、高产蛋白质、萌发和幼苗生长控制、增加动物和人类营养、低棉子糖、环境胁迫抗性、提高可消化性、工业用酶、药物蛋白、肽和小分子、改进加工性状、改善口味、固氮作用、杂种制种、降低变应原性、生物聚合物和生物燃料，等等。可通过植物生物工程学的方法作为大豆的转基因来提供这些农艺性状。

还要了解的是，本发明的大豆植物可具有任何成熟群体的特性。选定大豆植物的花粉可深低温冷藏，用于与其它成熟群体的优良系杂交以将抗真菌病基因座渐渗入天然杂交不可能正常获得的品系中。花粉深低温冷藏技术是本领域众所周知的(Tyagi 等, *Cryo Letters*, 24: 119-124 (2003), Liang 等, *Acta Botanica Sinica*, 35: 733-738 (1993) 和 Honda 等, *Euphytica* 126: 315-320 (2002))。

QTL 的抗病作用可根据亲本基因型和测定抗病作用的环境条件

而改变。这都在植物育种领域技术人员掌握之中，并且无需过多实验即可采用本文所述方法，从植物种群或者从亲本基因型保藏物中选出当含有病害基因座时能导致相对于亲本基因型抗病性提高的基因型的植物。本文中，植物病害可由真菌、病毒、细菌或无脊椎动物引起。

已经报道了大豆的多种分子遗传学图(Mansur 等, *Crop Sci.* 36: 1327-1336 (1996); Shoemaker 等, *Genetics* 144: 329-338 (1996); Shoemaker 等, *Crop Science* 32: 1091-1098 (1992); Shoemaker 等, *Crop Science* 35: 436-446 (1995); Tinley 等, *J. Cell Biochem.* 增刊 14E: 291 (1990); Cregan 等, *Crop Science* 39:1464-1490 (1999))。栽培大豆、野生大豆和栽培大豆 x 野生大豆共享连锁群(Shoemaker 等, *Genetics* 144: 329-338 (1996))。如本文所用，当提及栽培大豆的连锁群 G、C2、J 和 N 时是指对应于栽培大豆的遗传学图连锁群 G、C2、J 和 N 的连锁群(Mansur 等, *Crop Science*. 36: 1327-1336 (1996); Cregan 等, *Crop Science* 39:1464-1490 (1999) 和美国农业部农业研究服务机构 (Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture) 的大豆数据库)。

QTL 的等位基因当然可包含多基因或者甚至在邻接基因组区 (contiguous genomic region) 或连锁群内的其它遗传因子，例如单元型。因此，本文所使用的 QTL 的等位基因可包含不止一个基因或其它遗传因子，其中各个单独的基因或遗传成分能够显示出等位变异，且其中每个基因或遗传因子还能够引起所述数量性状的表型效应。在本发明的一个实施方案中，QTL 的等位基因包含也能够表现出等位变异的一个或多个基因或其它遗传因子。因此，所用术语“QTL 的等位基因”并不排除包含不止一个基因或其它遗传因子的 QTL。准确地讲，本发明的“QTL 的等位基因”可指其中表型可以是抗病性的单元型窗 (haplotype window) 的单元型。单元型窗是可界定范围并可被追踪到的邻接基因组区，具有一组一个或多个多态性标记，其中所述多态性通过世代表明特性。所述单元型窗内的单元型可通过每个标记等位基因

的独特指纹来限定。本文所使用的等位基因是占据染色体指定基因座的若干可选择形式的基因。如果在染色体指定基因座上存在的所有等位基因都相同，则植物在该基因座上是纯合的。如果在染色体指定基因座上存在的等位基因不相同，则该植物在该基因座上是杂合的。

本发明的植物可以是育种程序的一部分或由育种程序产生。育种方法的选择取决于植物繁殖的方式、待改进性状的遗传力和商用栽培种的类型(例如 F₁ 杂种栽培种、纯系栽培种等)。栽培种是有意产生或选出的并且通过栽培维持的植物的一个小种或变种。

用于本发明植物育种的精选的非限制性方法参见下文。可采用任何杂交子代的标记辅助选择(MAS)来改进育种程序。还要了解的是，任何商业化和非商业化栽培种都可用于育种程序。例如，苗势、营养生长势(vegetative vigor)、胁迫耐受性、抗病性、抽条、开花、结实、种子大小、种子容重、抗倒伏性(standability)和脱粒性等因素通常决定了选择。

对于高度可遗传性状，在单一地点评出的备选的优良个体植物可能是有效的，然而对于遗传力低的性状，应根据从有关植物家系重复评价所得到的平均值来进行选择。通行的选择方法常常包括系谱选择、改进的系谱选择、混合选择和轮回选择。在一个优选的实施方案中，采取回交或轮回育种程序。

遗传的复杂性影响育种方法的选择。回交育种可用于将一个或少数几个高度可遗传性状的有利基因转移到所需要的栽培种内。这一方法已被广泛用于培育抗病栽培种。各种轮回选择技术被用来改进由多个基因控制的数量遗传性状。自花传粉农作物中轮回选择的应用取决于是否易于传粉、每个传粉事件成功杂交的频率和每个成功杂交的杂种子代数。

可对育种系进行两代或更多代的检验，并在代表商业化目标区域的环境中与适当标准进行比较。最佳品系是用于新的商业化栽培种的候选品系；性状上仍有缺陷的品系则可用作亲本以产生用于进一步选

择的新种群。

鉴定优良植物的一种方法是观察该植物相对于其它实验植物和广泛栽培的标准栽培种的特性。如果单次观察没有结果，则重复观察可更好地估计其遗传价值。育种人员可以选择两个或多个亲本系并使之杂交，随后进行重复自交和选择，以产生多种新的遗传组合。

新的大豆栽培种的开发需要开发和选择大豆变种，使这些变种杂交并选出优良杂种进行杂交。通过所选出的雄性可育亲本之间的手工杂交或采用雄性不育系统来产生杂交种子。选出杂种的某些表明种子的确是杂种的单一基因性状，例如豆荚色、花色、种子产量、茸毛色或除草剂抗性。亲本系的其它数据以及杂种表型都影响育种人员决定是否继续特定的杂种杂交。

可以采用系谱育种和轮回选择育种方法来开发育种群体的栽培种。育种程序将得自两个或多个栽培种或者各种广泛来源的所需性状合并到育种库(breeding pool)，从中通过自交并选出所需表型从而开发出栽培种。可对新的栽培种进行评价以确定哪一个具有商业潜力。

通常采用系谱育种以改进自花传粉农作物。使具有有利互补性状的两个亲本杂交以产生 F_1 。 F_2 种群通过一个或数个 F_1 自交而产生。选出最佳家系中的最佳个体进行选择。可从 F_4 代开始对家系进行重复检验以改进具有低遗传力的性状的选择效率。在育种的深入阶段(即 F_6 和 F_7)，检验最佳品系或表型上相似的品系的混合品系作为新的栽培种子予以推广的可能性。

回交育种已被用来将简单遗传的高度可遗传性状的基因转移至所需要的纯合栽培种或是回交亲本的近交系。将待转移的性状来源称为供方亲本。预期所得植物具有回交亲本(例如栽培种)的特性，所需性状转移自供方亲本。在最初的杂交后，选出具有供方亲本表型的个体并与回交亲本重复杂交(回交)。预期所得亲本具有回交亲本(例如栽培种)的特性，所需性状转移自供方亲本。

单粒种子世代方法(single-seed descent procedure)从严格意义上来

说是指种植分离的种群，每株植物收获一粒种子样品，用一粒种子样品种植出下一代。当种群从 F_2 继续种植到所需的近交水平时，可以分别追踪植物(从中衍生出品系)到不同的 F_2 个体。由于一些种子不萌发或者一些植物无法产生至少一粒种子而使种群的植物数各代都减少。因此，当各代继续生长完成时，种群中不是所有最初采样的 F_2 植物都可用于子代表示。

多粒种子方法(multiple-seed procedure)中，大豆育种人员常常从种群中的每株植物收获一个或多个豆荚，使它们混在一起脱粒以形成批量。采用部分批量种植下一代，部分保存备用。该方法被称为改进的单粒种子世代技术或豆荚批量技术(pod-bulk technique)。

多粒种子方法已被用在收获时节省人力。用机器为豆荚脱粒比在单粒种子方法中用手从每一豆荚中取出一粒种子要快得多。多粒种子方法还使种植近交各代种群相同数目的种子成为可能。

常用于不同性状和农作物的其它育种方法的内容可参见几本参考书之一(例如 Fehr, *Principles of Cultivar Development* 第 1 卷, 第 2-3 页(1987))。

本发明还提供本发明的植物部分。植物部分包括但不限于种子、胚乳、胚珠和花粉。在本发明一个特别优选的实施方案中，植物部分是种子。

本发明的植物或其部分可以在培养物中培育并再生。从各种组织类型再生出大豆植物的方法和大豆的组织培养方法是本领域已知的(参见例如 Widholm 等, *In Vitro Selection and Culture-induced Variation in Soybean* (大豆的体外选择和培养诱导型变异), 载于 *Soybean: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology*, Verma 和 Shoemaker 主编, CAB International, Wallingford, Oxon, England (1996))。植物(例如大豆)的再生技术可使用各种组织或细胞类型作为起始材料。特别对于大豆，已经研发出始于某些分化组织类型的再生方法，例如分生组织(Cartha 等, *Can. J. Bot.* 59:1671-1679 (1981))、下胚轴切片(Cameya 等,

Plant Science Letters 21: 289-294 (1981))和茎节节段(Saka 等, *Plant Science Letters*, 19: 193-201 (1980); Cheng 等, *Plant Science Letters*, 19: 91-99 (1980))。据报道, 由未成熟大豆胚外植体产生的体细胞胚再生出完全性成熟的大豆植物(Ranch 等, *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 21: 653-658 (1985))。另据报道, 通过器官发生和胚胎发生从组织培养物中再生出成熟的大豆植物(Barwale 等, *Planta* 167: 473-481 (1986); Wright 等, *Plant Cell Reports* 5: 150-154 (1986))。

本发明还提供通过筛选大豆植物对病害的抗性、免疫性或易感性来选出抗病大豆植物, 所述选择包括测定大豆植物的基因组核酸中存在的在遗传上与抗病性相关 QTL 的等位基因连锁的标记分子, 其中 QTL 的等位基因也位于与抗病大豆有关的连锁群上。所述病害可由真菌、病毒、细菌或无脊椎动物引起。

本发明还提供赋予亚洲大豆锈病抗性的 QTL, 包括 ASR 抗性基因座 1、ASR 抗性基因座 2、ASR 抗性基因座 3、ASR 抗性基因座 4、ASR 抗性基因座 5、ASR 抗性基因座 6、ASR 抗性基因座 7、ASR 抗性基因座 8、ASR 抗性基因座 9、ASR 抗性基因座 10、ASR 抗性基因座 11、ASR 抗性基因座 12 和 ASR 抗性基因座 13。已经分别在 PI 200492、PI 230970、PI 462312 (Ankur)和 PI 459025B 中鉴定出 4 个显性和独立遗传的豆薯层锈菌抗性基因座(本文标注为 ASR 抗性基因座 1-4)。在本发明中, ASR 抗性基因座 1 位于大豆 G 连锁群上。监测 ASR 抗性基因座 1 渐渗所用的 SNP 标记选自 NS0093250、NS0119710、NS0103004、NS0099454、NS0102630、NS0102915、NS0102913、NS0123728、NS0129943、NS0102168、NS0092723、NS0098177、NS0127343 和 NS0101121。ASR 抗性基因座 1 SNP 标记 DNA 序列(表示为 SEQ ID NO:67-80)可用标注为 SEQ ID NO:1-28 的引物扩增, 并且用标注为 SEQ ID NO:100-127 的探针检测。在本发明中, ASR 抗性基因座 2 最有可能位于 J 连锁群上, 接近或在含有褐茎腐病(Brown Stem Rot)抗性、大豆胞囊线虫抗性和蛙眼病抗性的抗病基因簇内, 或

者位于 N 连锁群上。在本发明中, ASR 抗性基因座 3 位于 C2 连锁群上。监测 ASR 抗性基因座 3 渐渗所用的 SNP 标记选自 NS0099746、NS0123747、NS0126598、NS0128378、NS0096829、NS0125408、NS0098902、NS0099529、NS0097798、NS0137477、NS0095322、NS0136101、NS0098982、NS0103749、NS0118897、NS0119715 和 NS0130920。这些标记 DNA 序列(表示为 SEQ ID NO:81-97)可用标注为 SEQ ID NO:29-62 的引物扩增, 并且用标注为 SEQ ID NO:128-161 的探针检测。在本发明中, ASR 抗性基因座 4 很可能位于 N 连锁群上。

本发明还提供在相关研究中鉴定赋予 ASR 抗性的单元型。这些全基因组测量表明与 ASR 抗性相关的 2 个 SNP 标记位于 13 号染色体的 2 个不同的窗内。在第一单元型窗内, 监测 ASR 抗性基因座 5、ASR 抗性基因座 6、ASR 抗性基因座 7、ASR 抗性基因座 8 和 ASR 抗性基因座 9 渐渗所用的 SNP 标记是 NS0103033。这个 SNP 标记 DNA 序列(表示为 SEQ ID NO:98)可用标注为 SEQ ID NO:63-64 的引物扩增, 并且用标注为 SEQ ID NO:162-163 的探针检测。在第二单元型窗内, 监测抗性基因座 10、ASR 抗性基因座 11、ASR 抗性基因座 12 和 ASR 抗性基因座 13 渐渗所用的 SNP 标记是 NS0124935。这个 SNP 标记 DNA 序列(表示为 SEQ ID NO:99)可用标注为 SEQ ID NO:65-66 的引物扩增, 并且用标注为 SEQ ID NO:164-165 的探针检测。

还要了解的是, 作图在距所述标记分子 10 厘摩以内的一个或多个标记可用于 ASR 抗性基因座的选择和渐渗。

还要了解的是, 本发明提供包含本发明分子(agent)的细菌、病毒、微生物、昆虫、哺乳动物和植物细胞。

核酸分子或其片段在某些环境下能够与其它核酸分子特异性杂交。如本文所使用的一样, 如果两个核酸分子能够形成反向平行的双链核酸结构, 则这两个分子能够彼此特异性地杂交。一个核酸分子是另一个核酸分子的“互补分子”, 只要它们具有完全互补性。如本文所使用的一样, 当一个核酸分子的每个核苷酸与另一个核酸分子的核

昔酸都互补时，则分子间表现出“完全互补性”。如果两个分子可以彼此杂交，具有足够的稳定性使得其在至少常规“低严格性”条件下彼此保持退火，则这两个分子是“最低限度互补的”。同样地，如果分子可以彼此杂交，具有足够的稳定性使得其在常规“高严格性”条件下彼此保持退火，则它们是“互补的”。常规严格性条件可参见 Sambrook 等，载于 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (分子克隆实验室指南)，第二版，Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)和 Haymes 等，载于 *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach* (核酸杂交实用方法)，IRL Press, Washington, DC (1985)。因此，偏离完全互补性是允许的，只要这种偏离不会完全排除分子形成双链结构的能力。为了将核酸分子用作引物或探针，只需要在所采用的特定溶剂和盐浓度下，在序列上充分互补以便能够形成稳定的双链结构。

本文所使用的基本同源序列是与在高严格性条件下比较起来是与互补的核酸序列特异性杂交的核酸序列。本发明的核酸探针和引物可在严格性条件下与靶 DNA 序列杂交。术语“严格性杂交条件”的定义是探针或引物与靶序列特异性杂交而不与非靶序列杂交的条件，可凭经验确定。术语“严格性条件”通过具体杂交方法(Sambrook 等，1989，于 9.52-9.55)，在功能上限定了有关核酸探针与靶核酸(即特定的目标核酸序列)的杂交。还可参见 Sambrook 等(1989)于 9.47-9.52、9.56-9.58; Kanehisa *Nucl. Acids Res.* 12:203-213 (1984)和 Wetmur 等, *J. Mol. Biol.* 31:349-370 (1968)。促进 DNA 杂交合适的严格性条件为本领域技术人员所知，例如约 45°C 下 6.0 x 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)，随后 50°C 下 2.0 x SSC 洗涤，或者可参见 *Current Protocols in Molecular Biology* (最新分子生物学实验指南)，John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6。例如，洗涤步骤中的盐浓度可以从低严格性的 50°C 下大约 2.0 x SSC 至高严格性的 50°C 下大约 0.2 x SSC 中选择。此外，洗涤步骤中的温度可从室温约 22°C 的低严格性条件向约 65°C 的高严格性

条件升高。温度和盐两者均可改变，或者将温度或盐浓度之一保持恒定，而另一个则可以变化。

例如，使用 DNA 或 RNA 探针或引物的杂交可以如下进行：对于高严格性，65°C 下，6x SSC，0.5% SDS，5x Denhardt's，100 µg/mL 非特异性 DNA（例如经超声处理的鲑精 DNA），洗涤为 65°C 下 0.5x SSC，0.5% SDS。

预期如果探针或引物与靶序列结合的特异性受到保护，则较低严格性杂交条件（例如较低杂交和/或洗涤温度）可用来鉴定具有较低序列相似性程度的有关序列。因此，由于其与 DNA、RNA 或 cDNA 片段的互补序列选择性形成双链体分子的能力，所以可以使用本发明的核苷酸序列。通过杂交来检测 DNA 区段的方法为本领域技术人员所熟知，因此根据应用前景，我们可以展望采用不同的杂交条件以获得探针对靶序列的不同程度的选择性，并且方法的选择将取决于所需要的结果。

本文所使用的分子(agent)，是天然存在的分子，或者如有需要则可是“基本纯的”，它指的是基本上从与其天然状态正常缔合的所有其它分子中分离出来的分子。更优选基本纯的分子是制备物中存在的主要类型。基本纯的分子可以是除去天然混合物中存在的其它分子（溶剂除外）后大于 60%，优选大于 75%，更优选大于 90%，更优选大于 95%。术语“基本纯的”往往不包括其天然状态中存在的分子。

对于结构特征例如一核酸与另一核酸分子杂交的能力，或者对于蛋白质与抗体结合的能力（或者与其它分子竞争以结合），本发明的分子(agent)优选为“生物活性的”。或者，这类特征可以是催化性的，因此涉及分子(agent)介导化学反应的能力。

本发明的分子(agent)还可以是重组分子。本文所使用的术语重组分子是指任何分子(agent)（例如 DNA、肽等），也就是说人为操纵的核酸分子，或者不论是否是间接的，都由人为操纵的核酸分子产生。

本发明的分子(agent)可用以下成分标记：有助于检测分子(agent)

的试剂(例如荧光标记(Prober 等, *Science* 238:336-340 (1987); 欧洲专利 144914)、化学标记(美国专利 4,582,789、美国专利 4,563,417)、修饰碱基(欧洲专利 119448), 所有这些文献都通过引用全部结合到本文中)。

在一个优选的实施方案中, 本发明的核酸可在中等严格性条件下(例如大约 2.0 x SSC, 大约 65°C)与 SEQ ID NO:67 至 SEQ ID NO:99 中所列的一个或多个核酸分子或其互补序列或者两者之一的片段特异性杂交。在一个特别优选的实施方案中, 本发明的核酸可在高严格性条件下与 SEQ ID NO:67 至 SEQ ID NO:99 中所列的一个或多个核酸分子或其互补序列或者两者之一的片段特异性杂交。在本发明的一个方面, 本发明优选的标记核酸分子具有 SEQ ID NO:67 至 SEQ ID NO:99 中所列的核酸序列或其互补序列或者两者之一的片段。在本发明的另一方面, 本发明优选的标记核酸分子与 SEQ ID NO:67 至 SEQ ID NO:99 中所列的核酸序列或其互补序列或者两者之一的片段共享介于 80%和 100%之间或者介于 90%和 100%之间的序列同一性。在本发明又一个方面, 本发明优选的标记核酸分子与 SEQ ID NO:67 至 SEQ ID NO:99 中所列的序列或其互补序列或者两者之一的片段共享介于 95%和 100%之间的序列同一性。在本发明一个更优选的方面, 本发明优选的标记核酸分子与 SEQ ID NO:67 至 SEQ ID NO:99 中所列的核酸序列或其互补序列或者两者之一的片段共享介于 98%和 100%之间的序列同一性。

可以采用额外的遗传标记来选择具有本发明大豆真菌病抗性相关 QTL 的等位基因的植物。公共标记数据库的实例包括例如美国农业部农业研究服务机构的大豆数据库。

本发明的遗传标记包括“显性”或“共显性”标记。“共显性标记”表示存在两个或多个等位基因(每二倍体个体有两个)。“显性标记”表示只存在单个等位基因。存在显性标记表型(例如 DNA 条带)表示以纯合状态或杂合状态存在的一个等位基因。缺乏显性标记表型

(例如 DNA 条带不存在)仅仅只是“某些其它”未确定的等位基因存在的证据。在其中个体主要是纯合的且基因座主要是二态的种群的情况下,显性和共显性标记可能有相同价值。因为种群杂合性变得更高,并且等位基因变得更多,因此比起显性标记,共显性标记基因型的信息量常常更大。

可以采用与本发明 QTL 的等位基因在遗传上连锁或相关联的标记,例如简单序列重复标记(SSR)、AFLP 标记、RFLP 标记、RAPD 标记、表型标记、SNP、同工酶标记、微阵列转录谱(Walton, *Seed World* 22-29 (1993 年 7 月); Burow 等, *Molecular Dissection of Complex Traits* (复杂性状的分子剖析), 13-29, Paterson 主编, CRC Press, New York (1988)。这类标记的分离方法为本领域所知。例如,通过筛选基因组文库的微卫星重复序列(microsatellite repeat),对“阳性”克隆进行测序,设计出邻接重复序列的引物,并用这些引物使基因组 DNA 扩增,从而可获得基因座专一性 SSR 标记。所得到的扩增产物的大小可按基本重复单元的整数发生变化。为了检测多态性,PCR 产物可经放射性标记,用变性聚丙烯酰胺凝胶分离,并通过放射自显影检测。大小差异>4 bp 的片段还可用琼脂糖凝胶分离,从而避免了放射性。

通过使用核酸扩增方法,可有利于 DNA、RNA 或 cDNA 样品中多态性位点的检测。这类方法尤其增加跨多态性位点或包括该位点以及位于其远端或近端的序列的多核苷酸的浓度。这类扩增分子可容易地通过凝胶电泳或其它方法检测出来。

实现这种扩增最优选的方法采用使用引物对的聚合酶链式反应(PCR) (Mullis 等, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273 (1986)、欧洲专利申请 50,424、欧洲专利 84,796、欧洲专利 258,017、欧洲专利 237,362、欧洲专利 201,184、美国专利 4,683,202、美国专利 4,582,788、美国专利 4,683,194), 所述引物对能够与界定其双链形式的多态性的近端序列杂交。

除了 PCR 外,还可采用替代方法,例如“连接酶链式反应”(LCR)

(Barany, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:189-193 (1991), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中)。LCR 使用两对寡核苷酸探针按指数级来扩增特异性靶。选择每对寡核苷酸的序列, 以便该对序列与所述靶同一链的邻接序列杂交。这类杂交形成模板依赖性连接酶的底物。如同 PCR 一样, 所得产物进而用作随后循环的模板, 获得所需序列的指数扩增。

或者, 可以应用“寡核苷酸连接测定法”(OLA) (Landegren 等, *Science* 241:1077-1080 (1988), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中)。OLA 方案使用经设计能够与靶单链的邻接序列杂交的两个寡核苷酸。OLA 同 LCR 一样, 特别适于检测点突变。然而, 与 LCR 不同, OLA 引起靶序列“线性”扩增而不是指数扩增。

基于在具有所得到的“二寡核苷酸”序列的核酸存在下连接两个(或多个)寡核苷酸, 从而扩增该二寡核苷酸的方案也是已知的(Wu 等, *Genomics* 4:560-569 (1989), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中), 可容易地进行调整以适于本发明的目的。

还可采用其它已知的核酸扩增方法, 例如等位基因特异性寡聚体、分支 DAN 技术、基于转录的扩增系统或者等温扩增方法, 来进行扩增并分析这类多态性(美国专利 5,130,238, 欧洲专利 329,822, 美国专利 5,169,766, 欧洲专利 359,789, Kwoh 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86:1173-1177 (1989), 欧洲专利 368,906, Walker 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:392-396 (1992), 所有这些文献都通过引用全部结合到本文中)。

多态性还可通过单链构象多态性(SSCP)分析来鉴定。SSCP 是能够在通常长度介于 150 个和 250 个核苷酸之间的单链 DNA 中鉴定出最多序列变异的方法(Elles, *Methods in Molecular Medicine: Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (分子医学方法: 遗传疾病的分子诊断), Humana Press (1996); Orita 等, *Genomics* 5: 874-879 (1989))。在变性条件下, 单链 DNA 可呈独特的依赖于其序列构象的构象。这种构象通

常不同，即使仅单个碱基发生变化。据报道，大多数构象改变的物理构型或大小足以用电泳检测出。

SNP 的一个主要特征是多态性的位点在单个核苷酸上。SNP 比其它类别的多态性更稳定。其自发突变率大约为 10^{-9} (Kornberg, DNA Replication (DNA 复制), W. H. Freeman & Co., San Francisco (1980))。因为 SNP 由序列变异产生，所以新的多态性可通过对基因组或 cDNA 分子进行随机测序来鉴定。SNP 还可由缺失、点突变和插入产生。这就是说，SNP 作为标记也是有利的，因为由于它们几乎不会从独立起源产生，因此它们通常能诊断出“世代身份(identity by descent)”。无论什么起因，任何单个碱基改变都可以是 SNP。SNP 发生的频率比其它类别的多态性高，可更容易地鉴定出来。在本发明中，SNP 可代表单一插入/缺失事件，它可由一个或多个碱基对或单核苷酸多态性组成。

SNP 可用多种方法的任一种表征。这类方法包括对位点进行直接或间接测序、采用其中相应的等位基因位点产生或破坏限制位点的限制性内切酶、采用等位基因特异性杂交探针、采用对由多态性不同等位基因编码的蛋白质是特异性的抗体或者其它生化分析。SNP 可用链终止方法的变通法(Sanger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 74: 5463-5467 (1977))进行测序，其中放射性同位素的使用被荧光标记的二脱氧核苷酸替换，并进行毛细管型自动测序(美国专利 5,332,666，该专利的全部内容通过引用结合到本文中；美国专利 5,821,058，该专利的全部内容通过引用结合到本文中)。自动测序仪可获自例如 Applied Biosystems, Foster City, CA (3730xl DNA 分析仪)；Beckman Coulter, Fullerton, CA (CEQ™ 8000 遗传分析系统)和 LI-COR, Inc., Lincoln, NE (4300 DNA 分析系统)。

SNP 的分析方法可以分成两组。第一组基于引物延伸测定法，例如固相微测序 (solid-phase minisequencing) 或焦磷酸测序 (pyrosequencing)。固相微测序法中，DNA 聚合酶尤其用来延伸使紧接

变异核苷酸退火的引物。与变异位点上的核苷酸互补的单一标记的核苷三磷酸被用于延伸反应。仅在含有变异位点上的核苷酸的序列可通过聚合酶延伸。可将引物阵列固定在固相支持体上，其中各引物被装在4个小孔中，各孔分别用于DNA中存在的4种核苷三磷酸之一。将各试验生物的模板DNA或RNA加到各孔中，使之退火至引物。然后，用聚合酶和标记的二脱氧核苷酸三磷酸，使引物延伸一个核苷酸。反应完成时可用能够检测可能是放射性或荧光的标记的装置成像。采用这种方法，可观察和检测若干不同的SNP (Syvänen等, *Hum. Mutat.* 13: 1-10 (1999))。焦磷酸测序技术基于DNA链延长时从每个dNTP释放的焦磷酸(PPI)的间接生物发光测定法。在Klenow聚合酶介导的碱基掺入后，释放出PPI，并与腺苷5-酰硫酸(APS)一起用作导致ATP形成的ATP硫酸化酶的底物。随后，通过萤光素酶的作用，ATP完成了使萤光素转化成其氧化衍生物。随之产生的光输出量与所添加的碱基数(最多约4个碱基)成比例。为便于该方法的持续合成能力，dNTP过量通过腺苷三磷酸双磷酸酶降解，起始反应混合物中也存在该酶，以便在测序过程中仅dNTP被加到模板上(Alderborn等, *Genome Res.* 10: 1249-1258 (2000))。设计来检测和分析焦磷酸测序反应的仪器的一个实例可获自Biotage, Charlottesville, VA (PyroMark MD)。

基于引物延伸测定的最新SNP检测方法是GOOD测定法。GOOD测定法(Sauer等, *Nucleic Acids Res.* 28: e100 (2000))是利用MALDI-TOF (基质辅助激光解吸/电离飞行时间)质谱法的等位基因特异性引物延伸方案。含有SNP的DNA区先通过PCR扩增法进行扩增。残余dNTP用碱性磷酸酶破坏。在引物延伸反应中，再用特异性引物(一组预处理的 α -S-dNTP和 α -S-ddNTP)及新鲜DNA聚合酶产生等位基因特异性产物。通过5'-磷酸二酯酶消化脱去未修饰的DNA，修饰产物是甲基化的以提高质谱分析的检测灵敏度。所有步骤以最小实际样品体积在单个小瓶中进行，不需要纯化。延伸反应可产生正电荷或负电荷，用质谱法进行检测(Sauer等, *Nucleic Acids Res.* 28: e13

(2000))。其中进行 GOOD 测定法分析的仪器为例如得自 Bruker Daltonics (Billerica, MA)的 autoflex® MALDI-TOF 系统。

第二组基于异源双链体 DNA 分子的识别, 包括寡核苷酸杂交、Taq-Man 测定法、分子信标、电子斑点印迹测定法(electronic dot blot assay)和变性高效液相色谱法。寡核苷酸杂交可用微阵列整体进行(Southern, *Trends Genet.* 12: 110-115 (1996))。Taq-Man®测定法或实时 PCR 通过在扩增反应期间双标记的荧光探针的杂交和切割, 来检测特异性 PCR 产物的累积。Taq-Man 测定法包括 4 种寡核苷酸, 其中两种用作 PCR 引物并产生包括待检测多态性的 PCR 产物。其余两种是等位基因特异性的荧光共振能量转移(FRET)探针。FRET 探针掺入紧密相邻的荧光团和猝灭剂分子间, 以便使荧光团的荧光猝灭。FRET 探针的信号由 FRET 寡核苷酸降解产生, 使得荧光团在猝灭剂附近释放出来, 因此当适当波长激发时能够发光。在本测定中, 采用带有不同荧光报告染料两个 FRET 探针, 其中单一染料被掺到能够只与两个等位基因的一个高特异性退火的寡核苷酸中。可用的报告染料包括 6-羧基-4,7,2',7'-四氯荧光素(TET)、2'-氯-7'-苯基-1,4-二氯-6-羧基荧光素(VIC)和 6-羧基荧光素氨基磷酸(FAM)。一个可用的猝灭剂为 6-羧基-N,N,N',N'-四甲基罗丹明(TAMRA)。当 TAQ DNA 聚合酶遇到退火探针的 5'端时, 退火(但不是非退火) FRET 探针被该酶降解, 从而从其猝灭剂附近释放出荧光团。在 PCR 反应后, 两种荧光剂各自的荧光, 以及钝态参比(passive reference)的荧光用荧光测定法测定。两种染料各自的归一化荧光强度可与样品中最初存在的各等位基因的量成比例, 因此可推断出样品的基因型。Taq-Man®测定法或实时 PCR 中检测荧光信号所使用的仪器的实例为 7500 实时 PCR 系统(Applied Biosystems, Foster City, CA)。

分子信标是形成茎-环结构并具有内部猝灭的荧光团的寡核苷酸探针。当它们与互补靶结合时, 经历开启其荧光的构象转换。这些探针识别它们的靶, 比线性探针具有较高特异性, 并且可容易地区分

由单个核苷酸而彼此不同的靶。分子的环部分用作与靶核酸互补的探针序列。茎通过使探针序列任一侧的两条互补臂序列退火而形成。荧光部分附在一个臂的末端上，非荧光的猝灭部分附在另一臂的末端上。该茎杂交使得荧光团和猝灭剂彼此接近以致于不发出荧光。当分子信标遇到靶序列时，就形成了比茎杂交更强更稳定的探针-靶杂交体。探针经历促使臂序列分开的自发构象改组，将荧光团与猝灭剂分隔开，允许荧光团发出荧光(Bonnet 等, 1999)。分子信标的功率取决于仅与探针序列极佳互补的靶序列杂交的能力，因此允许检测单个碱基差异(Kota 等, *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 363-370 (1999))。可以在例如得自 Stratagene (La Jolla, CA)的 Mx4000® Multiplex Quantitative PCR 系统上进行分子信标检测。

电子斑点印迹测定法(electronic dot blot assay)采用半导体微芯片，该芯片由被含有链霉抗生物素的琼脂糖渗透层覆盖的微电极的阵列组成。将生物素化扩增子涂在芯片上，通过正偏压直流电电泳到所选择的垫片上，通过与渗透层中的链霉抗生物素的相互作用而被包埋在其中。然后，各垫片上的 DNA 与荧光标记的等位基因特异性寡核苷酸的混合物杂交。之后，可通过增加安培数使各个垫片上的电荷极性逆转，从而使单个碱基对错配的探针优先变性。随着安培数递增至完成，用数码照相机对阵列进行拍照，并使荧光量化。然后，通过对目标区域的像素统计值取平均来确定荧光强度(Gilles 等, *Nature Biotech.* 17: 365-370 (1999))。

基于识别异源双链 DNA 分子的最新应用是采用变性高效液相色谱法(DHPLC)。这一技术代表高灵敏全自动化测定法，它结合了用于高通量 SNP 分析的 Peltier 冷却的 96 孔自动进样器。这是基于离子对的反相高效液相色谱方法。该分析法的核心是聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物，它起着固定相的作用。流动相由离子配对剂三乙基乙酸铵(TEAA)缓冲液和有机试剂乙腈(ACN)组成，它介导 DNA 与固定相结合，以便实现 DNA 随后从柱上分离出来。CAN 的线性梯度便于根据

存在的异源双链体来进行片段分离。因此, DHPLC 识别引起双链 PCR 扩增 DNA 中错配核苷酸之间形成异源双链体的突变和多态性。在一个典型的测定法中, 在野生型和突变型 DNA 重退火期间, 序列变异产生异源双链和同源双链的混合群体。当该混合群体在部分变性温度下用 DHPLC 进行分析时, 异源双链分子由于其解链温度低而在同源双链分子之前从柱上洗脱出来(Kota 等, *Genome* 44: 523-528 (2001))。通过 DHPLC 分析 SNP 所使用的仪器的实例是得自 Transgenomic, Inc. (Omaha, NE)的 WAVE® HS 系统。

用于高通量监测植物基因表达的基于微阵列的方法可用作遗传标记系统。这一基于“芯片”的方法包括将核酸分子微阵列用作基因特异性杂交靶, 以定量或定性测定植物基因的表达(Schena 等, *Science* 270:467-470 (1995), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中; Shalon, 博士论文, Stanford University (1996), 该论文的全部内容通过引用结合到本文中)。可同时查找大段序列上的每个核苷酸。可利用杂交来有效地对核苷酸序列进行分析。这类微阵列可用核酸分子的任何组合进行探测。特别优选的用作探针的核酸分子组合包括得自已知组织类型或已知发育阶段或者遭受已知胁迫(环境或人造胁迫)或其任何组合的植物的 mRNA 分子群(例如从两叶期水分胁迫叶片中制备的 mRNA)。通过该方法产生的表达谱可以用作标记。

为了 QTL 作图, 所包括的标记必须可诊断出起源以便对随后的种群作出推测。SNP 标记对于作图是理想的, 因为在特定种尚存的种群中, 从独立起源得出特定 SNP 等位基因的可能性非常低。因此, SNP 标记可用于跟踪和辅助 QTL 的渐渗, 特别在单元型的情况下。

另外的标记分子的遗传连锁可通过基因作图模型和运行软件包 MAPMAKER/QTL (Lincoln 和 Lander, *Mapping Genes Controlling Quantitative Traits Using MAPMAKER/QTL* (运用 MAPMAKER/QTL 对控制数量性状的基因作图), Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts, (1990)来确立, 所述基因作图模型例如但不限于 Lander

和 Botstein 报道的侧翼标记模型(Lander 和 Botstein, *Genetics*, 121:185-199 (1989))以及 Lander 和 Botstein 描述的基于最大似然法的区间作图法(Lander 和 Botstein, *Genetics*, 121:185-199 (1989))。另外的软件包括 Qgene, 2.23 版(1996), 康乃尔大学植物育种和生物统计学系, 266 Emerson Hall, Cornell University, Ithaca, NY, 该软件的手册通过引用全部结合到本文中)。采用 Qgene 软件是特别优选的方法。

计算最大似然估计(MLE)看标记是否存在, 连同假定无 QTL 效应的 MLE 一起以避免假阳性。如下计算优势比的 \log_{10} (LOD): $\text{LOD} = \log_{10}(\text{存在 QTL/MLE 但假定无连锁 QTL 的 MLE})$ 。LOD 分值主要表明假定 QTL 存在相对于 QTL 不存时, 数据更可能增至多大。在给定置信度(例如 95%)时, 为避免假阳性的 LOD 阈值取决于标记的数目和基因组的长度。表明 LOD 阈值的图表可参见 Lander 和 Botstein, *Genetics*, 121:185-199 (1989), 另可参见 Arús 和 Moreno-González, *Plant Breeding*, Hayward, Bosemark, Romagosa (主编) Chapman & Hall, London, 第 314-331 页(1993)。

还可以使用另外的模型。已经报道了区间作图法的许多修改和替代方法, 包括非参数方法的使用(Kruglyak 和 Lander, *Genetics*, 139:1421-1428 (1995), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中)。也可采用多元回归方法或模型, 其中性状用多个标记进行回归分析(Jansen, *Biometrics in Plant Breed*, van Oijen, Jansen (主编), 第九届欧洲植物育种学会生物统计学分会植物育种大会会议录(Proceedings of the Ninth Meeting of the Eucarpia Section Biometrics in Plant Breeding), The Netherlands, 第 116-124 页(1994); Weber 和 Wricke, *Advances in Plant Breeding*, Blackwell, Berlin, 16 (1994)。有研究报道了区间作图法与回归分析结合的方法, 其中表型在假定标记间隔回归到单一推定 QTL, 并且同时回归到用作“余因子(cofactor)”的多个标记(Jansen 和 Stam, *Genetics*, 136:1447-1455 (1994)和 Zeng, *Genetics*, 136:1457-1468 (1994)。一般来讲, 使用余因子降低了 QTL 估计位置的偏倚和采样误

差(Utz 和 Melchinger, *Biometrics in Plant Breeding*, van Oijen, Jansen (主编) 第九届欧洲植物育种学会生物统计学分会植物育种大会会议录, The Netherlands, 第 195-204 页(1994), 从而改进 QTL 作图的精度和效率(Zeng, *Genetics*, 136:1457-1468 (1994)). 可将这些模型推广到多环境实验中以分析基因型 - 环境的相互作用(Jansen 等, *Theo. Appl. Genet.* 91:33-37 (1995)).

选择合适的作图种群对制图十分重要。合适的作图种群的选择取决于所采用的标记系统类型(Tanksley 等, *Molecular mapping of plant chromosomes. chromosome structure and function: Impact of new concepts* (植物染色体的分子作图、染色体结构和功能: 新构思的影响) J.P. Gustafson 和 R. Appels (主编), Plenum Press, New York, 第 157-173 页(1988), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中)。必须考虑用于作图种群的亲本来源(适应性亲本对外来亲本)。在远缘杂交(适应性亲本 x 外来亲本)中, 染色体配对率和重组率可能受到严重干扰(被抑制), 通常产生的连锁距离极大地被缩短。当与近缘杂交(适应性亲本 x 适应性亲本)的子代相比时, 远缘杂交通常可提供具有量相对大的多态性的分离种群。

F₂ 种群是杂交种子产生后自交的第一代。通常单一 F₁ 植物自交对于所有基因而言均以孟德尔(1:2:1)模式产生分离的种群。采用共显性标记系统, 从完全分类的 F₂ 种群(completely classified F₂ population)中获得最大遗传信息(Mather, *Measurement of Linkage in Heredity: Methuen and Co.*, (1938), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中)。在显性标记的情况下, 需要子代检验(例如 F₃、BCF₂)来鉴定杂合子, 因此使之等同于完全分类的 F₂ 种群。然而, 该方法由于涉及子代检验成本和时间而常常令人望而却步。F₂ 个体的子代检验常用于其中表型不是始终反映基因型(例如抗病性), 或者其中性状表达受 QTL 调控的制图。得自子代检验种群(例如 F₃ 或 BCF₂)的分离数据可用于制图。标记辅助选择因而可根据标记性状图联合分析应用于子代杂交(F₂、F₃),

其中连锁群未被重组事件完全分离(即最大不平衡)。

重组近交系(RIL) (遗传相关品系; 通常 $>F_5$, 由连续自交 F_2 系开发出来趋于纯合)可以用作作图种群。通过采用 RIL, 可使从显性标记获得的信息最大化, 因为所有基因座都是纯合的或几乎纯合。在紧密连锁(即重组约 $<10\%$)的条件下, 在 RIL 种群中经评价的显性和共显性标记提供的每个体的信息比回交种群的任一标记类型的信息都多(Reiter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:1477-1481 (1992))。然而, 由于标记之间的距离变得较大(即基因座变得更加独立), 因此当与共显性标记相比时, RIL 种群中的信息急剧减少。

回交种群(例如通过成功的变种(回交亲本)和携带前者不存在的性状的另一变种(供方亲本)之间杂交产生的种群)可用作作图种群。与回交亲本的一系列回交可恢复其大多数所需要的性状。因此, 产生出包括几乎与回交亲本相同但每个个体携带来自供方亲本的不同含量或不同嵌合的基因组区的个体的种群。如果回交亲本的所有基因座是纯合的且供方亲本和回交亲本具有明显差异的多态性标记等位基因, 则回交种群可用于显性标记作图(Reiter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:1477-1481 (1992))。采用共显性标记或显性标记, 从回交种群获得的信息少于从 F_2 种群获得的信息, 因为从每株植物采样的是一个而不是两个重组配子。然而, 回交种群当与 RIL 相比时信息量更大(在标记饱和度低时), 因为 RIL 种群中连锁基因座之间的距离增加(即重组约为 $.15\%$)。重组增加可有益于紧密连锁的清晰度, 但是可能在低标记饱和度制图时是不适合的。

由产生除所研究的性状或基因组区之外遗传组成几乎相同的一系列个体的多次回交所产生的近等基因系(NIL)可用作作图种群。在用 NIL 作图时, 预期仅部分多态基因座可作图至选定区域。

混合分离子分析法(Bulk segregant analysis, BSA)是开发用于快速鉴定标记和目标性状之间连锁的方法(Michelmore 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:9828-9832 (1991))。在 BSA 中, 从单次杂交所产

生的分离种群中提取两批 DNA 样品。这些批次含有特定性状(对特定病害的抗性或易感)或基因组区相同但任意在不连锁区(即杂合)的个体。在 BSA 中,与靶区不连锁的区在混合样品的多个个体之间没有不同。

传统 QTL 作图的一个替代方法包括对单元型与个体标记作图而达到更高清晰度(Fan 等 2006 Genetics)。这一方法跟踪称为单元型的 DNA 区组,如多态性标记所限定的一样,在作图种群中就世代来说,它被认为是相同的。这个假设导致较大的有效样品大小,提供了更高清晰度的 QTL。表型和基因型(在这种情况下为单元型)之间关联统计显著性的测定方法,可通过本领域已知任何统计检验和所需统计显著性的任何可接受的阈值来确定。具体方法的应用和显著性阈值都在本领域普通技术人员掌握之中。

本发明的 SNP 标记可用来分离或基本纯化同样位于与以下基因座相关的连锁群上的 QTL 的等位基因: ASR 抗性基因座 1、ASR 抗性基因座 2、ASR 抗性基因座 3、ASR 抗性基因座 4、ASR 抗性基因座 5、ASR 抗性基因座 6、ASR 抗性基因座 7、ASR 抗性基因座 8、ASR 抗性基因座 9、ASR 抗性基因座 10、ASR 抗性基因座 11、ASR 抗性基因座 12 和 ASR 抗性基因座 13。构建跨区的一系列重叠克隆(克隆重叠群)可为包括位于与以下基因座有关的连锁群上的真菌病抗性 QTL 的等位基因的物理图谱提供了基础: ASR 抗性基因座 1、ASR 抗性基因座 2、ASR 抗性基因座 3、ASR 抗性基因座 4、ASR 抗性基因座 5、ASR 抗性基因座 6、ASR 抗性基因座 7、ASR 抗性基因座 8、ASR 抗性基因座 9、ASR 抗性基因座 10、ASR 抗性基因座 11、ASR 抗性基因座 12 和 ASR 抗性基因座 13。酵母人工染色体(YAC)克隆系统促进了染色体步查和大型克隆策略。利用本发明标记的序列标签位点(sequence tag site, STS)含量方法可用于构建跨染色体区的 YAC 克隆。这类构建 YAC 图的 STS 含量方法可提供任何染色体区的详细有序的基于 STS 的图谱,包括包含同样位于与以下基因座有关的连锁群

上的 QTL 的等位基因的区域: ASR 抗性基因座 1、ASR 抗性基因座 2、ASR 抗性基因座 3、ASR 抗性基因座 4、ASR 抗性基因座 5、ASR 抗性基因座 6、ASR 抗性基因座 7、ASR 抗性基因座 8、ASR 抗性基因座 9、ASR 抗性基因座 10、ASR 抗性基因座 11、ASR 抗性基因座 12 和 ASR 抗性基因座 13。可用通过使用 BAC、PAC 或含有大小范围为 70 kb 至数百个千碱基的插入序列的噬菌体 P1 克隆来跨区绘制的详细的物理图谱补充 YAC 图(Cregan, *Theor. Appl. Gen.* 78:919-928 (1999); Sternberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:103-107 (1990); Sternberg, *Trends Genet.* 8:11-16 (1992); Sternberg 等, *New Biol.* 2:151-162 (1990); Ioannou 等, *Nat. Genet.* 6:84-89 (1994); Shizuya 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:8794-8797 (1992), 所有这些文献都通过引用全部结合到本文中)。

采用本发明的可用标记得到多套克隆重叠以筛选 BAC、PAC、噬菌体 P1 或黏粒文库。此外, 可应用杂交方法将 YAC 图转化成 BAC、PAC、噬菌体 P1 或黏粒重叠群图。完整的 YAC 和 inter-*Alu*-PCR 的产物以及合适 STS 的引物序列可用来筛选 BAC、PAC、噬菌体 P1 或黏粒文库。使用 STS 含量信息和指纹法, 可将分离用于任何区的克隆装配成重叠群(Sulston 等, *Comput. Appl. Biosci.* 4:125-132 (1988))。

允许不同核酸序列编码同一蛋白质或肽的遗传密码的简并性在文献中有记载。当核酸分子编码同一氨基酸序列但却包含不同核苷酸序列时, 则本文所使用的核酸分子是另一核酸分子的简并核酸分子。本发明的一个方面是, 本发明的核酸分子包括与编码数量性状等位基因蛋白质的核酸分子是简并的核酸分子。

本发明的另一方面是, 本发明的核酸分子包括与编码 QTL 相关的一个或多个蛋白质的核酸分子同源的核酸分子。

可使用设计用于转化目的的 DNA 植物转化载体或构建体, 将外源遗传物质转移到植物中。一个特别优选的细分的外源材料包含本发明的核酸分子。这类载体的设计一般为本领域技术人员所掌握(参见 *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual* (植物分子生物学实验室

指南), Clark 主编, Springer, New York (1997), 这类植物的实例包括但不限于苜蓿、拟南芥属(*Arabidopsis*)、大麦、芸苔属(*Brassica*)、青花椰菜、卷心菜、柑桔、棉花、大蒜、燕麦、油料种子油菜、洋葱、欧洲油菜、亚麻、玉米、观赏植物、豌豆、花生、胡椒、马铃薯、水稻、黑麦、高粱、大豆、草莓、甘蔗、甜菜、番茄、小麦、杨树、松树、冷杉、桉树、苹果、莴苣、兵豆、葡萄、香蕉、茶树、草坪草、向日葵、油椰、菜豆属(*Phaseolus*)等。

构建体或载体可包括本发明的真菌病抗性 QTL 的内源启动子。真菌病抗性的特征最好通过表达已鉴定出的具有内源启动子的 QTL 蛋白来实现。或者, 可以选择异源启动子来表达精选的蛋白质或蛋白质片段。这些启动子可与编码与真菌抗性 QTL 对应的蛋白质的多核苷酸序列有效连接。异源启动子可以是根据成熟期或开花期选出的异源启动子, 因为所需蛋白质表达的时间选择可能对影响真菌病抗性性状的参数十分关键。真菌病抗性 QTL 的有效表达可能还需要在特定组织类型中表达的启动子。

或者, 启动子可与其它核酸序列(例如编码转运肽、选择标记蛋白的核酸序列或反义序列)有效连接。可以在载体将插入的细胞类型的基础上或者在其调节特征的基础上, 对启动子进行选择。这种特征的实例包括转录活性的提高、可诱导性、组织特异性和发育阶段特异性。植物中, 已经披露了病毒或合成来源的诱导型启动子、组成型活性启动子、时序调节启动子和空间调节启动子(Poszkowski 等, *EMBO J.*, 3: 2719, 1989; Odell 等, *Nature*, 313:810, 1985; Chau 等, *Science*, 244:174-181. 1989)。常用的组成型启动子包括 CaMV 35S 启动子(Odell 等, *Nature*, 313: 810, 1985)、增强型 CaMV 35S 启动子、玄参花叶病毒(FMV)启动子(Richins 等, *Nucleic Acids Res.* 20: 8451, 1987)、胭脂碱合酶(nos)启动子(Shaw 等 *Nucleic Acids Res.* 12: 7831-7846 (1984))和章鱼碱合酶(ocs)启动子。

可用的诱导型启动子包括水杨酸或聚丙烯酸诱导的启动子

(PR-1; Williams 等, *Biotechnology* 10:540-543, 1992)、施用安全剂诱导的启动子(取代的苯磺酰胺除草剂; Hershey 和 Stoner, *Plant Mol. Biol.* 17: 679-690, 1991)、热激启动子(Ou-Lee 等, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 83: 6815, 1986; Ainley 等, *Plant Mol. Biol.* 14: 949, 1990)、从菠菜亚硝酸还原酶可转录多核苷酸序列得到的硝酸诱导型启动子(Back 等, *Plant Mol. Biol.* 17:9, 1991)、激素诱导型启动子(Yamaguchi-Shinozaki 等, *Plant Mol. Biol.* 15: 905, 1990)和与 RuBP 羧化酶小亚基和 LHCP 家族有关的光诱导型启动子(Kuhlemeier 等, *Plant Cell* 1: 471, 1989; Feinbaum 等, *Mol. Gen. Genet.* 226: 449-456, 1991; Weisshaar 等, *EMBO J.* 10: 1777-1786, 1991; Lam 和 Chua, *J. Biol. Chem.* 266: 17131-17135, 1990; Castresana 等, *EMBO J.* 7: 1929-1936, 1988; Schulze-Lefert 等, *EMBO J.* 8: 651, 1989)。

重组载体中特别优选的启动子包括胭脂碱合酶(NOS)启动子(Ebert 等, 1987)、章鱼碱合酶(OCS)启动子(它被携带在根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的根瘤诱导质粒上)、花椰菜花叶病毒启动子例如花椰菜花叶病毒(CaMV) 19S 启动子(Lawton 等, 1987)、CaMV 35S 启动子(Odell 等, 1985)、玄参花叶病毒 35S-启动子(Walker 等, 1987); 得自核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基(ssRUBISCO)的光诱导型启动子; 得自烟草的 EIF-4A 启动子(Mandel 等, *Plant Mol. Biol.* 29: 995-1004, 1995); 得自拟南芥的几丁质酶启动子(Samac 等, *Plant Cell*, 3:1063-1072, 1991); 得自青花椰菜的 LTP (脂质转运蛋白)启动子(Pyee 等, *Plant J.*, 7: 49-59, 1995); 矮牵牛查耳酮异构酶启动子(Van Tunen 等, *EMBO J.* 7: 1257, 1988); 菜豆富含甘氨酸蛋白 1 启动子(Keller 等, *EMBO L.*, 8: 1309-1314, 1989); 马铃薯 patatin 启动子(Wenzler 等, *Plant Mol. Biol.*, 12: 41-50, 1989); 拟南芥肌动蛋白 7 启动子(Genbank 检索号 U27811.1 GI:1002528、17-APR-1997 和 PCT 申请 WO0144457A2; 该文献的全部内容通过引用结合到本文中); 拟南芥肌动蛋白 8 启动子(An 等, *Plant J.* 10: 107-121 (1996)和 PCT 申请

WO0144457A2); 拟南芥核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶小亚基 4 启动子(Krebbers 等, *Plant Mol. Biol.* 11: 745-759 (1988)); 芸苔油菜籽蛋白基因启动子(美国专利 5,420,034, 该专利的全部内容通过引用结合到本文中); 拟南芥 Suc2 启动子(Truernit 等, *Planta* 196: 564-570 (1995)); 拟南芥延伸因子 EF-1 α 启动子(Axelos 等, *Mol. Gen. Genet.* 219: 106-112 (1989))和大豆 7 α β 伴大豆球蛋白(conglycin)启动子, 即 Sphas (Doyle 等, *J. Biol. Chem.* 261: 9228-9238 (1986))。

本发明的构建体还可包括另外的 mRNA 多核苷酸分子的 5'非翻译区(5'UTR)或前导区或者可能在翻译起始中起重要作用的基因。某些 5'UTR 可起翻译增强子的作用, 并且还可整合成为重组载体的组成部分。例如, 已经证实, 得自热激蛋白基因的非翻译 5'前导多核苷酸分子提高基因在植物中的表达(参见例如美国专利 5,659,122 (该专利的全部内容通过引用结合到本文中)以及美国专利 5,362,865 (该专利的全部内容通过引用结合到本文中))。因此, 重组载体可优选含有用来提高核酸序列表达的一个或多个 5'非翻译前导序列。这类增强子序列可能是提高或改变所得 mRNA 的翻译效率所需要的。优选的 5'核酸序列包括拟南芥肌动蛋白 7 前导序列(Genbank 检索号 U27811.1 GI:1002528、17-APR-1997 和 PCT 申请 WO0144457A2; 该申请的全部内容通过引用结合到本文中); 拟南芥肌动蛋白 8 前导序列(An 等, *Plant J.* 10: 107-121 (1996)和 PCT 申请 WO0144457A2); 拟南芥核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶小亚基 4 前导序列(Krebbers 等, *Plant Mol. Biol.* 11: 745-759 (1988)); 芸苔油菜籽蛋白基因前导序列(美国专利 5,420,034, 该专利的全部内容通过引用结合到本文中); 拟南芥 Suc2 前导序列(Truernit 等, *Planta* 196: 564-570 (1995)); 矮牵牛(*Petunia hybrida*) Hsp70 基因前导序列(Winter 等, *Mol. Gen. Genet.* 211: 315-319 (1988)); 拟南芥 EPSPS 基因前导序列(Klee 等, *Mol. Gen. Genet.* 210: 437-442 (1987)); 拟南芥延伸因子 EF-1 α 前导序列(Axelos 等, *Mol. Gen. Genet.* 219: 106-112 (1989))和大豆 7 α β 伴大豆球蛋白

前导序列(Doyle 等, *J. Biol. Chem.* 261: 9228-9238 (1986))。另外这些上游调节的多核苷酸分子可得自相对于构建体上存在的其它元件是天然或异源的来源。

此外, 构建体可包括得自植物基因 3'非翻译区(3'UTR)的另外的调节多核苷酸分子。3'UTR 或终止子通常提供转录终止信号和聚腺苷酸化信号, 聚腺苷酸化信号的作用是在植物中使腺苷酸核苷酸加到 mRNA 的 3'端。位于聚腺苷酸化位点下游几百个碱基对的核酸序列通常用来终止转录。此外, 某些 3'UTR 提供额外的性质, 例如提高 mRNA 的稳定性, 如马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因的 3'UTR (An 等, *The Plant Cell* 1: 115-122 (1989))。其它 3'UTR 可提供增强 mRNA 降解的序列, 例如在动物细胞中显示是引起 RNA 信息稳定性较低的 5'-UUAUUUAUU-3'基序(Zubiaga 等, *Mol. Cell Biol.* 15: 2219-2230 (1995))。这些额外的下游调节多核苷酸分子可得自相对于构建体上存在的其它元件是天然或异源的来源。

优选的 3'UTR 或终止子是马铃薯蛋白酶抑制剂 II 基因 3'UTR (An 等, *The Plant Cell* 1: 115-122 (1989)); 豌豆核酮糖二磷酸羧化酶-加氧酶小亚基 E9 终止子(Coruzzi 等, *EMBO J.* 3: 1671-1679 (1984)); 花椰菜花叶病毒 35S 终止子; 芸苔油菜籽蛋白基因终止子(美国专利 5,420,034); 大豆 7s α β 伴大豆球蛋白基因终止子(Doyle 等, *J. Biol. Chem.* 261: 9228-9238 (1986)); 菜豆(*Phaseolus vulgaris*) Arc5 终止子(Goossens 等, *Eur. J. Biochem.* 225: 787-795 (1994)); 根癌土壤杆菌胭脂碱合酶终止子(Rojiyaa 等, 1987, Genbank 检索号 E01312 和美国专利申请 US20020192813A1, 这些文献的全部内容通过引用结合到本文中)和大豆 ADR12 基因终止子(Datta 等, *Plant Mol. Biol.* 21: 859-869 (1993))。

载体或构建体还可包括得自某些基因的内含子的调节元件。其实例包括 Adh 内含子 1 (Callis 等, *Genes and Develop.* 1:1183-1200 (1987)); 蔗糖合酶内含子(Vasil 等, *Plant Physiol.* 91:1575-1579 (1989))

和 TMV Ω 元件(Gallie 等, *The Plant Cell* 1:301-311 (1989))。优选的内含子是拟南芥肌动蛋白 7 内含子(Genbank 检索号 U27811.1 GI:1002528、17-APR-1997 和 PCT 申请 WO200144457A2; 这些文献的全部内容通过引用结合到本文中); 拟南芥肌动蛋白 8 内含子(An 等, *Plant J.* 10: 107-121 (1996)和 PCT 申请 WO200144457A2)及拟南芥延伸因子 EF-1 α 内含子(Axelos 等, *Mol. Gen. Genet.* 219: 106-112 (1989))。适当时可包括这些元件和其它调节元件。

载体或构建体还可包括选择标记(selectable marker)。还可以采用选择标记来选择含有外源遗传物质的植物或植物细胞。这些选择标记的实例包括但不限于 neo 基因(Potrykus 等, *Mol. Gen. Genet.* 199:183-188 (1985)), 它编码卡那霉素抗性并可用卡那霉素、G418 等来选择; 编码双丙氨磷(bialaphos)抗性的 bar 基因; 突变型 EPSP 合酶基因(Hinchee 等, *Bio/Technology* 6:915-922 (1988)), 它编码草甘膦抗性; 赋予溴苯腈抗性的胍水解酶基因(Stalker 等, *J. Biol. Chem.* 263:6310-6314 (1988)); 赋予咪唑啉酮或磺酰脲抗性的突变型乙酰乳酸合酶基因(ALS) (例如美国专利 6,222,100, 该专利的全部内容通过引用结合到本文中); 甲氨蝶呤抗性 DHFR 基因(Thillet 等, *J. Biol. Chem.* 263:12500-12508 (1988)); 由例如嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*)的麦草畏单加氧酶(DMO)基因赋予的麦草畏耐受性(美国专利申请 20030135879, 该专利的全部内容通过引用结合到本文中)。

载体或构建体还可包括筛选标记(screenable marker)。筛选标记可用来监测表达。示例性的筛选标记包括 β -葡糖醛酸糖苷酶基因或编码已知的各种显色底物的酶的 uidA 基因(GUS) (Jefferson, *Plant Mol. Biol, Rep.* 5:387-405 (1987), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中; Jefferson 等, *EMBO J.* 6:3901-3907 (1987), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中); R-基因座基因, 它编码的产物调节植物组织中花色素苷色素(红色)的产生(Dellaporta 等, *Stadler Symposium* 11:263-282 (1988), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中); β -内

酰胺酶基因(Sutcliffe 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 75:3737-3741 (1978), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中), 编码各种显色底物是已知的酶的基因(例如 PADAC、显色头孢菌素); 萤光素酶基因(Ow 等, *Science* 234:856-859 (1986), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中); xylE 基因(Zukowsky 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 80:1101-1105 (1983), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中), 它编码可以转化显色儿茶酚的儿茶酚双加氧酶; α -淀粉酶基因(Ikatu 等, *Bio/Technol.* 8:241-242 (1990), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中); 酪氨酸酶基因(Katz 等, *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714 (1983), 该文献的全部内容通过引用结合到本文中), 它编码能够使酪氨酸氧化成 DOPA 且多巴醌进而缩合成黑色素的酶和 α -半乳糖苷酶。

可以采用本领域已知的将转基因导入植物中的任何技术来制备本发明的真菌病抗性植物。一般认为植物转化的合适方法实际上包括可将 DNA 导入细胞的任何方法, 例如通过电穿孔, 参见美国专利号 5,384,253; 微弹轰击, 参见美国专利号 5,015,580、5,550,318、5,538,880、6,160,208、6,399,861 和 6,403,865; 土壤杆菌介导的转化, 参见美国专利号 5,635,055、5,824,877、5,591,616、5,981,840 和 6,384,301 以及原生质体转化, 参见美国专利号 5,508,184。通过例如这些技术的应用, 实际上任何植物品种的细胞都可被稳定转化, 并且这些细胞可发育成转基因植物。用于棉花转化方面的技术参见美国专利号 5,846,797、5,159,135、5,004,863 和 6,624,344; 芸苔属植物的转化技术特别参见例如美国专利 5,750,871; 大豆转化技术参见例如 Zhang 等(*Plant Cell Tissue Organ Cult* 56:37-46 (1999)和美国专利 6,384,301)。

既然我们已对本发明进行了一般性描述, 通过参考下面以示例方式提供的实施例就能更容易地理解本发明, 实施例并不是对本发明的限制, 除非另有说明。

实施例

实施例 1: 含有 ASR 抗性基因座的近等基因系的育种

1400 个单核苷酸多态性(SNP)标记, 随机分布在大豆遗传连锁图的 20 个连锁群中, 被用来鉴定与 ASR 抗性基因座 1 基因座紧密连锁的 SNP 标记。从 Williams 82 与 ASR 抗性基因座 1 供体 PI 200492 杂交培育出由近等基因系(NIL)组成的一组大豆品系。采用了 PI 200492 的衍生系来鉴定在 Williams 82 和 PI 200492 之间为多态的 SNP 标记。然后使用这些多态性 SNP 标记, 利用分离的回交种群 L85-2378 来鉴定 ASR 抗性基因座 1 的图位。通过将 Williams 82 与 PI 200492 杂交培育出 L85-2378, 进行 5 轮回交循环或者基本上 6 轮 Williams 82 回交以恢复大多 Williams 82 的良性性状。因此, 产生了由几乎同回交亲本 Williams 82、但 NIL 的每个个体携带得自供方亲本 PI 200492 的不同数量或嵌合的基因组区的个体组成的 L85-2378。

用上述鉴定出的多态性 SNP 标记对整个种群进行了基因型分析, 随后采用温室实验法对大豆锈病抗性进行了评价。对 SNP 标记基因型与大豆锈病抗性表型间的关联性进行了评价。发现与 ASR 抗性基因座 1 病害表型反应高度连锁不平衡的 SNP 标记为 NS0093250、NS0119710、NS0103004、NS0099454、NS0102630、NS0102915、NS0102913、NS0123728、NS0129943、NS0102168、NS0092723、NS0098177、NS0127343 和 NS0101121, 参见表 1, 并被标注为 SEQ ID NO:67-80。所有这些 SNP 标记都作图在通用大豆遗传连锁图的 G 连锁群的区域上。表 1 列出了标注为 SEQ ID NO:1-28 的 PCR 扩增引物序列和对应于这些 SNP 标记的标注为 SEQ ID NO:100-127 的探针。鉴定出两个 SNP 标记用于监测 ASR 抗性基因座 1 的阳性渐渗, 并分别对应于 SNP 标记 NS0102913 和 NS0129943 以及对应于 SEQ ID NO:73 和 SEQ ID NO:75。

还在下列 F2:3 种群中, 对 ASR 抗性基因座 1 针对得自美国阿拉巴马州大豆锈病分离菌种的功效进行了评价: AG4403 x PI 200492、AG3302 x PI 200492、AG3201 x PI 200492、AG26932 x PI 200492、

AG2402 x PI 200492。在所述各种群中，观测到 3:1 分离比率，这表明了单显性基因遗传模式。

根据所述用于 ASR 抗性基因座 1 的方法，由 Williams 82 与供方亲本 PI 462312 杂交，接着进行 5 轮回交循环，或基本上 6 轮 Williams 82 回交以恢复大多 Williams 82 的良性性状，用由此产生的 NIL 对 ASR 抗性基因座 3 基因座作图。因此，产生了由几乎同回交亲本 Williams 82、但是近等基因系的每个个体携带了得自供方亲本 PI 200492 的不同数量或嵌合的基因组区的个体组成的 L85-2378。用上述鉴定出的一套多态性 SNP 标记，对整个种群进行了基因型分析，并且采用温室实验法，随后对大豆锈病抗性进行了评价。对 SNP 标记基因型与大豆锈病抗性表型之间的关联性进行了评价。发现与 ASR 抗性基因座 3 高度连锁不平衡的 SNP 标记为 NS0099746、NS0123747、NS0126598、NS0128378、NS0096829、NS0125408、NS0098902、NS0099529、NS0097798、NS0137477、NS0095322、NS0136101 和 NS0098992，参见表 1，并被标注为 SEQ ID NO:81-93。这些标记都作图在通用大豆遗传学图的 LG C2 连锁群上。表 1 列出了标注为 SEQ ID NO:29-54 的 PCR 扩增引物序列和对应于这些 SNP 标记的标注为 SEQ ID NO:128-153 的探针。监测 ASR 抗性基因座 3 渐渗所用的标记对应于 SNP 标记 NS0137477，被标为 SEQ ID NO:90。为了证实 ASR 抗性基因座 3 的推定位置，在 AVRDC-8 和 AG4403 之间培育出分离的 F3:4 种群。AVRDC-8 是由台湾亚洲蔬菜研究开发中心通过 Ankur (含有 ASR 抗性基因座 3 的品系)与 PI 230970 (ASR 抗性基因座 2 供体)杂交培育出的品系。目前正在对这个种群的 SNP 标记进行基因型分析，并对针对得自 Loxley, AL 的大豆锈病分离菌株的抗性反应进行评价，以证实 ASR 抗性基因座 3 的位置。

随后在基于一组 PI 系和文献已报道含有任一 QTL 的其它系之间多态性的研究中确定了 ASR 抗性基因座 2 和 ASR 抗性基因座 4 的大致位置，所述 PI 系是已知分别含有 ASR 抗性基因座 2 或 ASR 抗性基

因座 4，即是 ASR 抗性基因座 2 供体和 ASR 抗性基因座 4 供体的 PI 230970 和 PI 459025B。根据多态性研究，任何多态性 SNP 标记都是接近 ASR 抗性基因座的候选区。对于 ASR 抗性基因座 2，鉴定出两个候选区，该基因座很可能位于 J 连锁群，接近或在褐茎腐病、大豆胞囊线虫抗性和蛙眼病抗病性簇内，或者在 N 连锁群内。ASR 抗性基因座 4 很可能位于 N 连锁群内。

表 1. 用于 ASR 抗性基因座 1 和 ASR 抗性基因座 3 鉴定和选择的 SNP 标记

标记	SEQ ID	SEQ ID 正向引物	SEQ ID 反向引物	SEQ ID 探针 1	SEQ ID 探针 2
NS0093250	67	1	2	100	101
NS0119710	68	3	4	102	103
NS0103004	69	5	6	104	105
NS0099454	70	7	8	106	107
NS0102630	71	9	10	108	109
NS0102915	72	11	12	110	111
NS0102913	73	13	14	112	113
NS0123728	74	15	16	114	115
NS0129943	75	17	18	116	117
NS0102168	76	19	20	118	119
NS0092723	77	21	22	120	121
NS0098177	78	23	24	122	123
NS0127343	79	25	26	124	125
NS0101121	80	27	28	126	127
NS0099746	81	29	30	128	129
NS0123747	82	31	32	130	131
NS0126598	83	33	34	132	133
NS0128378	84	35	36	134	135
NS0096829	85	37	38	136	137
NS0125408	86	39	40	138	139
NS0098902	87	41	42	140	141
NS0099529	88	43	44	142	143
NS0097798	89	45	46	144	145
NS0137477	90	47	48	146	147
NS0095322	91	49	50	148	149
NS0136101	92	51	52	150	151
NS0098982	93	53	54	152	153

实施例 2: 孢子的收集和繁殖

从 Monsanto Loxley Agronomy station (Loxley, AL) 的受感染植物中收集豆薯层锈菌的亚洲大豆锈病夏孢子, 本文称为 Loxley 菌株。

将悬浮于含有 0.01% 吐温 20 (Tween-20) 的水中的孢子喷撒在叶背面而接种到大豆植物中。感染后 7-10 天左右无需放大便可目测到病斑发生, 感染后 12-14 天则形成孢子。收集受感染植物的孢子, 将其重悬浮于含有 0.01% 吐温 20 的无菌去离子水中。孢子浓度用血细胞计数器测定。

实施例 3: 亚洲大豆锈病抗性的离脱叶实验

对两种类型的叶组织进行了评价以进行 ASR 病害表型分析。对出苗后 7-10 天具一小叶的叶片或出苗后 21-28 天具三叶的叶片 V3 进行了评价。从土壤中出苗后 2 天左右, 大豆植物长出一对具一小叶的叶片, 5 天左右完全展开, 构成第一“真叶”。出苗后 7 天左右, 出现具三叶的叶片(在一个叶柄末端包含 3 片叶)。依次出现三组叶片, 第一具三叶的叶片被称为 V1 期, 在出苗后 10 天完全伸展。接下来的两个 V 期相隔一周发生。值得注意的是, 在叶片展开和硬化后, 即不是新叶和嫩叶, 才给叶片接种病害。具一小叶的叶片往往硬化得非常快, 在出苗后 8-10 天左右, 而 V2 和 V3 具三叶的叶片可能直到出苗后 24-28 天才完全展开。

将 3 张直径 3.2 cm 的 Watmann #1 滤纸各放入 6 孔组织培养板(孔容积为 15.5 毫升)的 6 孔各孔中。将叶片切成 3 厘米 X 3 厘米的小块, 将叶片背面(气孔面)向上放在 Watmann 滤纸上面。将大约 2.0 毫升无菌去离子水加到 6 孔组织培养板各孔中。将得自豆薯层锈菌的亚洲大豆锈病夏孢子悬浮于含有 0.01% 吐温 20 的无菌去离子水中, 浓度为 1×10^5 个夏孢子/毫升。用喷枪(Badger 155 Anthem 型, Badger Air-Brush Co., Franklin Park, IL)与设置为 1 千克/平方厘米的压缩机(TC-20 型, Airbrush Depot, San Diego, CA), 将约 50 微升孢子悬液喷洒到各叶片上至湿润。然后将 6 孔板用石蜡膜密封, 并放到设置为 22 摄氏度

的生长室内，光周期为 12 小时/昼长。每 2 天或每 3 天监测板中病害的进展，并确保各孔不变干。需要时加入去离子水补充至最初的孔容积，或者调整培育箱相对湿度至大约 80%。接种后 3-5 天左右，发生病斑的早期症状在解剖显微镜下应是明显的。接种后 9-14 天形成孢子的病斑应是明显的。由多次试验计算出平均大豆锈病严重程度分值。锈病严重程度分值使用 1-5 的评价等级；1 - 是免疫的，2 - 在 50% 以下的叶片区域显示红色/棕色病斑，3 - 在 50% 以上的叶片区域显示红色/棕色病斑，4 - 在 50% 以下的叶片区域显示黄褐色病斑和 5 - 在 50% 以上的叶片区域显示黄褐色病斑。本测定法的叶切片可保持存活长达 2 个月。

采用易感亚洲大豆锈病的大豆 Lee 74 的实验，对于每次进行的测定都始终显示感染程度高。评价推定的抗性种质的进一步实验能够区分表 2 中所示的易感保藏品种的耐受性。保藏品种 PI 200487 表现出迟发锈病(slow rust)抗性表型。我们正在尝试以期鉴定出可用于把在 PI 200487 中鉴定出的抗性基因座渐渗到优良种质中的标记。

此外，具一小叶的叶片组织与具三叶的叶片组织的 ASR 评价的比较显示，对于具三叶的叶片组织，由种子到数据点需要 45 天左右，对于具一小叶的叶片组织则 23 天左右。实验时间缩减了一半，这显然节省了确定抗病性评级所需要的离脱叶实验和时间。由于节省 3 周时间，植物可以更快的时标繁殖，易感植物可越早剔除，因此节省了田间和温室空间。

表 2. 用具一小叶的叶片组织和具三叶的叶片组织测定的抗性和易感保藏品种(accession)的平均锈病分值; “-” 表示未进行实验。

保藏品种(accession)	平均锈病严重程度分值 离脱的具一小叶的叶片	平均锈病严重程度分值 离脱叶
Lee 74	5.0	5
PI 200487	1.89	2.25
PI 200492 (ASR 抗性基因座 1)	1.00	2
PI 200499	-	5
PI 230970	2.5	3
PI 368038	-	3
PI 368039	-	2
PI 462312	-	2
PI 547875	-	2
PI 547878	-	4.25
PI 547879	-	5
Tiana	-	5
Williams	-	5
AVRDC-8	1.8	2.25
Dowling	-	5

实施例 4: 对于具有渐渗的 ASR 抗性基因座 1、ASR 抗性基因座 2 和 ASR 抗性基因座 3 的豆薯层锈菌抗性的优良杂交品种的试验

将含有 ASR 抗性基因座 1 的供方抗性亲本系 PI 200492 与不同大豆优良系进行杂交, 以监测 ASR 抗性基因座 1 的阳性渐渗。用从抗性亲本系保藏品种 PI 200492 (ASR 抗性基因座 1) 以及已知的抗性保藏品种 (PI 230970 (ASR 抗性基因座 2) 和 PI 462312 (ASR 抗性基因座 3)) 与易感优良系杂交得到的品系进行了 Loxley 菌株抗性的叶片实验。所有试验品系的抗性分值见表 3。平均锈病严重程度分值得自 4 株植物, 每株 4 次重复, 并在不同的 4 天中进行了评分 (10DAI、17DAI、24DAI、32DAI)。

表 3. ASR 回交事件和优良系的平均锈病严重程度分值

杂交	杂交子代	ASR 抗性基因座 各基因座	平均锈病 严重程度 分值
多次杂交以渐渗入 ASR 抗性基因座 2 和 ASR 抗性基因座 3	AVRDC- 8	ASR 抗性基因座 2/ASR 抗性基因座 3	1.7
已知易感系	Dowling	易感	5
GL_AG4801//L85-2378/L86-1752	JN1137.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1753	JN1137.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	5
GL_AG4801//L85-2378/L86-1754	JN1137.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1755	JN1137.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1752	JN1153.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1753	JN1153.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1754	JN1153.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1755	JN1153.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1752	JN1160.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	4.8
GL_AG4801//L85-2378/L86-1752	JN1160.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1752	JN1160.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1752	JN1160.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1752	JN1163.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1752	JN1163.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	4.8
GL_AG4801//L85-2378/L86-1752	JN1163.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4801//L85-2378/L86-1752	JN1163.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	5
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1691.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	4.5
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1691.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	4.6
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1691.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	4.6
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1691.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	3
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1692.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1.1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1692.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1692.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1692.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1742.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1742.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1742.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1742.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1765.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1.2
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1765.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1

GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1765.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1765.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1774.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1774.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1774.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG5501//L85-2378/L86-1752	JN1774.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL4504D0C//L85-2378/L86-1752	JN1866.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL4504D0C//L85-2378/L86-1752	JN1866.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL4504D0C//L85-2378/L86-1752	JN1866.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL4504D0C//L85-2378/L86-1752	JN1866.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2242.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2242.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2242.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2242.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2243.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2243.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	2.4
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2243.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2243.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1.3
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2250.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2250.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2250.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1.2
GL_CGL5400E1X//L85-2378/L86-1752	JN2250.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4403//L85-2378/L86-1752	JN774.1	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4403//L85-2378/L86-1752	JN774.2	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1.1
GL_AG4403//L85-2378/L86-1752	JN774.3	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1
GL_AG4403//L85-2378/L86-1752	JN774.4	ASR 抗性基因座 1 (MAS)	1

含有 ASR 抗性基因座 1 基因座的品系具有最大 Loxley 菌株抗性。通过 MAS 证实了 ASR 抗性基因座 1 的渐渗。

实施例 5: 采用离脱叶实验测定大豆保藏品种的 ASR 抗性

基于温室实验法, 采用外部起源的 ASR 分离菌种的混合种群, 鉴定出 700 个推定的 ASR 抗性保藏品种。按照实施例 3 所述方法, 用 700 个 USDA 推定的抗性保藏品种中的 250 个的一小组进行了 ASR 抗

性的叶片实验。选出得自 USDA 的一组补充的 250 个 ASR 易感保藏品种，用于在叶实验中根据使成熟和地理起源相对应而与 250 个抗性保藏品种进行比较。大多数抗性保藏品种(这些品种的平均锈病严重程度分值为 1-2)的平均锈病严重程度分值见下表 4。1400 个 SNP 标记，每隔 5 厘摩分布在大豆遗传连锁图 20 个连锁群中，可用来鉴定用于在下列抗性保藏品种所具有的 ASR 抗性基因座渐渗到优良种质的标记。

表 4. ASR 抗性保藏品种的平均锈病严重程度分值

保藏品种	平均锈病严重程度 分值
PI200488	1.0
PI200492	1.0
PI203398	1.0
PI307884B	1.0
PI416764	1.0
PI416826A	1.0
PI417117	1.0
PI417132	1.0
PI423967	1.0
PI506947	1.0
PI507009	1.0
PI507259	1.0
PI561305	1.0
PI567031B	1.0
PI567034	1.0
PI567056A	1.0
PI567058D	1.0
PI567190	1.0
PI605773	1.0
PI605829	1.0
PI605865B	1.0
PI379620	1.3
PI416873B	1.3
PI417128	1.3
PI417463	1.3
PI567123A	1.3
PI578457A	1.3
PI615437	1.3
PI379621	1.3

PI567102B	1.3
PI594172A	1.3
PI628932	1.3
PI079648	1.5
PI291309C	1.5
PI416886	1.5
PI417503	1.5
PI506491	1.5
PI506677	1.5
PI506695	1.5
PI507193	1.5
PI567046A	1.5
PI567053	1.5
PI567189A	1.5
PI605891B	1.5
PI200455	1.8
PI232989	1.8
PI594494A	1.8
PI597405D	1.8
PI069533	2.0
PI084674	2.0
PI230970	2.0
PI291278	2.0
PI341252	2.0
PI417126	2.0
PI417134	2.0
PI417208	2.0
PI423923	2.0
PI437609A	2.0
PI471900	2.0
PI497969	2.0
PI506628	2.0
PI547875	2.0
PI567024	2.0
PI567025A	2.0
PI578471A	2.0
PI594512C	2.0
PI594561	2.0
PI605781A	2.0
PI605838	2.0
PI606405	2.0
PI606440A	2.0
PI615445	2.0

此外,对于一组 89 个抗性保藏品种,对分布在 ASR 抗性基因座 3 近端和远端的 SNP 标记进行了基因型分析。发现 4 个额外的 SNP 标记(NS0103749、NS0118897、NS0119715 和 NS0130920)与 ASR 抗性基因座 3 有关并列于表中,标注为 SEQ ID NO:94-97。表 5 列出了标注为 SEQ ID NO:55-62 的 PCR 扩增引物序列和对应于这些 SNP 标记的标注为 SEQ ID NO:154-161 的探针。

该信息将用来鉴定使 ASR 和其它病原体抗性基因座渐渗以优先顺序排列的新的抗性来源。

表 5. 用于 ASR 抗性基因座 3 鉴定和选择的 SNP 标记

标记	SEQ ID	SEQ ID 正向引物	SEQ ID 反向引物	SEQ ID 探针 1	SEQ ID 探针 2
NS0103749	94	55	56	154	155
NS0118897	95	57	58	156	157
NS0119715	96	59	60	158	159
NS0130920	97	61	62	160	161

实施例 6. 应用相关研究来鉴定赋予真菌病抗性的 QTL

为了鉴定与病害有关的区或基因,第一步是培育抗性变种。之前已鉴定出 4 个锈病抗性的基因座(ASR 抗性基因座 1、ASR 抗性基因座 2、ASR 抗性基因座 3、ASR 抗性基因座 4)。在这个实施例中,连锁不平衡和单元型关联作图被应用于大豆种质的病例对照数据样品中。

用 797 个 SNP,对 492 个大豆品系(246 个抗性易感对)的锈病抗性进行评分并进行指纹分析。对豆薯层锈菌分离菌种混合物的抗病性按 1-5 分进行评分,小于 3 为抗性,大于 4 为易感。准确地讲,对 3、5 和 9 个连续 SNP 的窗大小进行了病例对照测定、费希尔精确检验(Fishers' exact test)、单标记 F 检验和单元型趋势回归研究。多项检验结果明显将 2 个单独的单元型窗的 2 个 SNP 标记与真菌病抗性联系在一起,所述单元型窗本文称为真菌病抗性单元型窗 1 和 2,位于具有

真菌病抗性的 13 号染色体 24-45 cM。SNP 标记 NS0103033 和 NS0124935 分别位于真菌病抗性单元型窗 1 和 2 上。NS0103033 (SEQ ID NO:98)的引物用 SEQ ID NO:63 和 64 标注,探针用 SEQ ID NO:162 和 163 标注。NS0124935 (SEQ ID NO:99)的引物用 SEQ ID NO:65 和 66 标注,探针用 SEQ ID NO:164 和 165 标注。每个单元型的抗性分值和每个单元型的标记等位基因见表 5。指定每个窗 5 个 SNP 标记,且每个的等位基因用单元型序列表示。单元型窗 1 中 NS0103033 的等位基因和单元型窗 2 中 NS0124935 的等位基因用黑体字表示。至于 NS0103033, SNP 实际为 9-bp 插入/缺失,其中“Z”表示缺失(*****),“W”表示插入(GAAGTGGAT)。

含有得自单元型窗 1 和/或单元型窗 2 的抗性单元型的变化见表 6。这个作图成就除了上述 ASR 抗性基因座以外,还鉴定出额外的 ASR 抗病性 QTL。

表 5. ASR 抗性单元型窗 1 和 2 中含有抗性单元型品系的评分一览表。抗性分值 0 表示有抗性的品系,分值 1 表示称为易感的品系。

ASR 抗性基因座	单元型窗 1	单元型序列	抗性分值	
			0	1
5	单元型 1	AAZA?	5	0
6	单元型 2	AGWGA	26	10
7	单元型 3	AGWGG	34	15
8	单元型 4	TAZAG	5	0
9	单元型 5	TAZGA	13	5
ASR 抗性基因座	单元型窗 1	单元型序列	抗性分值	
			0	1
10	单元型 6	CGTTG	8	1
11	单元型 7	GGTTC	26	11
12	单元型 8	GGCCC	12	6
13	单元型 9	GGT-C	4	0

表 6. 13 号染色体上 ASR 抗性窗 1 和/或 2 中含有单元型的抗性种质病害评级。

品系	评级	单元型窗 1 的 抗性单元型	单元型窗 2 的 抗性单元型
PI164885	2.5	X	X
PI165524	2	X	X
PI166028	2		X
PI189968	2	X	X
PI200446	2	X	
PI200488	2.5		X
PI205901B	2.5	X	
PI222549	2.5	X	
PI224270	2.5	X	
PI227331	2.5	X	X
PI229333	2.5		X
PI238109	2.3	X	
PI240667A	1	X	
PI258383	2	X	
PI291309C	2	X	
PI341252	2.5	X	X
PI374189	2.3	X	
PI398335	2	X	
PI399070	2.5	X	
PI407831	2.5	X	
PI407833C	2		X
PI407845A	2.5	X	
PI407858	2.3	X	X
PI407881	2.3	X	
PI408088	2.3	X	
PI408134B	2	X	
PI408272B	2	X	
PI417122	2.5	X	
PI417126	2.5	X	
PI417235	2	X	
PI417335	2.3	X	
PI423717	2	X	
PI423722	2.3	X	
PI423730B	2.3	X	
PI423852	2.3	X	X
PI424190	2.5	X	
PI434973A	2.5	X	
PI437110A	2.3	X	
PI437437A	1.5		X
PI437740B	2.3	X	X
PI437921	2	X	
PI437982	2.3	X	X
PI438073	2.3	X	

PI438371	2.5	X	
PI438480	2.5	X	
PI479735	2.3	X	
PI497965	2.5	X	
PI506737	2	X	
PI506863	2	X	
PI507142	2.5		X
PI508269	2	X	
PI548325	2	X	
PI561289	2	X	X
PI561329	2.5	X	
PI561330A	2		X
PI561337	2		X
PI561377	2.3		X
PI566978	2.5	X	
PI567010B	2.3	X	
PI567093B	2	X	X
PI567104B	2.5	X	X
PI567108B	2.5	X	X
PI567129	2.3	X	X
PI567140B	2.5	X	
PI567174C	2.3		X
PI567175C	2	X	X
PI567300A	2	X	
PI567409A	2.3	X	
PI567470	2	X	
PI567473C	2.5	X	
PI567474	2.3	X	
PI567489A	2	X	
PI567507B	2	X	
PI567554A	2	X	
PI567560	2.5	X	X
PI567561	2.5	X	
PI567675	2.3		X
PI567692	2	X	X
PI567718	2	X	X
PI567780A	2.3	X	
PI578305B	2.5	X	
PI587598A	2.5	X	
PI587914B	2		X
PI587922A	2		X
PI587935A	2.3		X
PI588000	2.5		X
PI588034	2.5		X
PI592962B	2.3	X	
PI594525	2.5	X	X
PI594538A	2	X	X
PI594767B	1	X	
PI597480A	2.3	X	
PI603293B	2.3	X	

PI603296	2.5		X
PI603429D	2.5	X	
PI603564A	2.3	X	
PI603612	2.3	X	X
PI603704A	2.5	X	X
PI605891B	2.5	X	
PI628870	1.5		X
PI628932	2.4	X	

虽然已经说明和描述了本发明的原理，但是对本领域技术人员显而易见的是，在不偏离本发明的原理的情况下，可在安排和细节方面对本发明作出修改。我们要求落入所附权利要求书精神和范围内的所有修改的权益。

本说明书所引用的所有出版物和专利文件都通过引用结合到本文中，如果各个出版物或专利申请具体和个别规定了通过引用结合的程度，则引用程度与之相同。

-
- <110> 孟山都技术有限公司(MONSANTO TECHNOLOGY LLC.)
 Baley, George James
 Butruille, David
 Concibido, Vergel C
 Eathington, Samuel R
 Haverdink, Michael D
 Kruger, Warren M
 LeDeaux, John R
 Narvel, James
 Pitkin, John W
 Tamulonis, John P
 Xie, Chongqing
- <120> 大豆抗病性数量性状基因座及其组成的鉴定方法
- <130> 38-21(53517)
- <140> 60/808430
 <141> 2006-05-25
- <160> 165
- <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工的
- <400> 1
- cacctggtgc ttctccacca t 21
- <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> 人工的
- <400> 2
- gggtggtgct cttggaggta 20

<210>	3	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	3	
taaagcaaaa ggacgttacg acaa		24
<210>	4	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	4	
gcattgattt gtccacgaag aac		23
<210>	5	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	5	
ttgcaatddd ttatatcttg atttcacat		29
<210>	6	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	6	
gcgaagaatc aaaactggtc aaa		23

<210>	7	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	7	
aagtgaggaga	ggaaatgatg	ga 22
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	8	
caagggccct	gattatgtga	a 21
<210>	9	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	9	
acaaggacaa	ggctatgaga	agtaaga 27
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	10	
ggccatgaat	caagccactt	20
<210>	11	

<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	11	
gagttagatt tatccggcaa cga		23
<210>	12	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	12	
cccgaagaga tgtcatgtta acaa		24
<210>	13	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	13	
gggttacctt catagctgct attttc		26
<210>	14	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	14	
gggcacaaca cctgaatgg		19
<210>	15	
<211>	29	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	15	
ccgcagtgaa tcaagtaatt agttaataa		29
<210>	16	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	16	
aaggtttagt tcgatcagtg attttga		27
<210>	17	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	17	
ggtttcagat attttgataa gctaattaga tg		32
<210>	18	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	18	
caagaactca cattcctcag atgaag		26
<210>	19	
<211>	24	
<212>	DNA	

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	19	
agggcctatt	gtgatgatta	agga
		24
<210>	20	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	20	
aaatctgaaa	aagcatccca	aaag
		24
<210>	21	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	21	
gtaataatcc	caaacatttt	tcttcga
		27
<210>	22	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	22	
gggatgagtt	gaattaattt	tcaaagta
		28
<210>	23	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	人工的	
<400>	23	
gcatgctgct tttactatg aaacat		26
<210>	24	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	24	
gttgatgaag tatacaattt catttgca		28
<210>	25	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	25	
aaaccaagtg aggagacatt aattca		26
<210>	26	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	26	
ggctgagttg ggttaatatc acatt		25
<210>	27	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	人工的	
<400>	27	
aaaaagttga atgatacct gcatt		25
<210>	28	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	28	
catttgctt ttgcaggcta atctaa		26
<210>	29	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	29	
atgggcaaca gttgtcatat gg		22
<210>	30	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	30	
tgatgatggc atggaattat tacc		24
<210>	31	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	人工的	
<400>	31	
atTTTTGGTA CCTCTCTTTC CTTCAA		26
<210>	32	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	32	
TTATTACCAA CATCCAAACA CACACA		26
<210>	33	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	33	
GTGGCAAGGA AATAATCAGT AGCTTT		26
<210>	34	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	34	
ATCCTTAACA TGATTTATGT TGTAAATTTGT G		31
<210>	35	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	

<400>	35	
ggaggaaggg tatgcaactt ttac		24
<210>	36	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	36	
catttettca acatccgaac caa		23
<210>	37	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	37	
cataagacgc gttaaactgc agtactt		27
<210>	38	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	38	
ccaacgatct tgctaattag cacata		26
<210>	39	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	

<400>	39	
	cgaggttggt agccgttgga	20
<210>	40	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	40	
	accaatcaac ctttctttat cgtttt	26
<210>	41	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	41	
	tgtggaatg cattttcttg gtctt	25
<210>	42	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	42	
	gaacaggttc caacactaat gtgagt	26
<210>	43	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	43	

tggaagcaat gtcaatcaat tca	23
<210>	44
<211>	22
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	人工的
<400>	44
tccatggcat cettaagggt aa	22
<210>	45
<211>	25
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	人工的
<400>	45
caattttatt ctggcacct tcatt	25
<210>	46
<211>	24
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	人工的
<400>	46
gtgaagtgta ttccagtgggt gtga	24
<210>	47
<211>	24
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	人工的
<400>	47

cgcatatcaa caggacagac aaaa	24
<210> 48	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工的	
<400> 48	
cgttgagagt actattaata gccctcaa	28
<210> 49	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工的	
<400> 49	
caggcgatcc ctaattataa ttatcc	26
<210> 50	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工的	
<400> 50	
cgcaggaggg acatggtaa	19
<210> 51	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工的	
<400> 51	
ggagacagtc atgacatgca tattg	25

<210>	52	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	52	
tcaactgcat tgttgcttta atttct		26
<210>	53	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	53	
accgtgcct taaagcttcc ca		22
<210>	54	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	54	
aaggttatat aaatcaaggg gaatgct		27
<210>	55	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	55	
cgcctgggag caacaagat		19

<210>	56	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	56	
ttcgaagaat gggagcagaa a		21
<210>	57	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	57	
tggagatcat ctataccgaa tggatt		26
<210>	58	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	58	
tgtcttgata attacacagc tctgatacaa		30
<210>	59	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	59	
gaaatgcggg catatatgca		20
<210>	60	

<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	60	
gcttctggtt ctagttctaa cttctacca		29
<210>	61	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	61	
gggtcgggtc gaaccaa		17
<210>	62	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	62	
cgaatattca gtgaaacggg ttaaa		25
<210>	63	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	63	
aggcggcttg aagaattga c		21
<210>	64	
<211>	23	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	64	
	ttagccaaaa tccatagcag gaa	23
<210>	65	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	65	
	aacatcaggg tcagcattcc at	22
<210>	66	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	66	
	cacaatatgg tcagacagct ttcc	24
<210>	67	
<211>	492	
<212>	DNA	
<213>	大豆(Glycine max)	
<400>	67	
	aacaaactcc aacaccccaa cgacgtcatt catggaagga cgctgggtcc catcctcatg	60
	caaacagctt agcgcacct cgccaaatct gttcaaacac tgagttgcta tctggccctt	120
	tagttttgca tccacaatgg caccagaga acccttctga tatagatgct tcgccaatc	180
	aaccagtgac acctgttgct tctccacat gcggagcaaa ggctgtctcc cagacaatac	240

ctccaagagc accaccccaa aggagtlacac gtcagacttc tcagtcaaac gctgtcgttt 300
gtaaactacc gggctctaat atccaacgct acctttcacc tgagtgtca catgggtcat 360
tgaagaacca atgggcecaa ttcgggataa cccgaagtct gaaaccttgg ccaccattt 420
ctcatccaat aagatgttgg tgctcttcac gtcacggiga atgatcatgt gcttcgcacc 480
cgtatgcaga ta 492

<210> 68
<211> 655
<212> DNA
<213> 大豆(Glycine max)

<400> 68
attgataata taaagcaaaa ggacgttacg acaaaaagct cgttcccat gaatagttct 60
tcgtggacia atcaatgctc tgtagtactg ttggcttaga ttaattttac tacggattta 120
cctacgggtca caaaattgac tgctgaaaat cttacagta ctcatcttt ttcatacatt 180
aaaaatttac tttatttctt atatatatat tattagtata atcaattatg catatatacc 240
aaccgatcga gcccttgctt catttccaaa caatatggca tacgaaaatc tatttattat 300
atagagatta aatgtgaaca cttcttagtt cttaacctgt gtggttgtat tattatgaaa 360
caccagctc ttcggctata ctcaattcta ttctattaag atcttggtta aagttttaca 420
ttcatcttta ttttaacagt atcctatata agaaaatagg caaaaagatg ccacagctgc 480
attaatttgc tagaaaaata taggtgacta gcctgtaaaa ttatgtcaat ctcttgctct 540
gctaccttat caagccgcac tgttgcaactg attgcatgta gaggcatcgc aacagcactt 600
aatttgcgag atactggtag tatatgattt taattggacc ccaacaagcc atttt 655

<210> 69
<211> 668
<212> DNA
<213> 大豆(Glycine max)

<400> 69
acttttgtac aagctcatca atgtatatca tagtttttga aatcggtaat gaaccaatgc 60
aaaaaatggt ttaaaccctg atttctttag gagatattag gtgaattgga tgattaagga 120

aaaatggaag gaaaaaatat cacaagtta attcctgcta ataaaattaa tattttaaca 180
 actaacattt gctcatataa aaaaccccaa tattttttaa aatttaactt aaagcatttt 240
 taagttaact aaaaacatat ttaataagaa ttaaaatagt tgtaaattat tttattaatt 300
 attattaatt actcttataa aacatataat ttaatcatta tatcaatttg caatttttta 360
 tatcttgatt tcacataatc ttatattaac ttcttgtttt cttttttatt ctagatgtaa 420
 acttgttatg aagtgatttt actgggtttt gaccagtttt gattcttcgc caattccttg 480
 aacgattttg tagttttattt atatcaaaca ctaaataaat tcatcagttt tctgggtcaa 540
 accaacaat ttgatctggc atcttataac acaattgttt atggaaaaca catctaattg 600
 gattaaaca ggacatcag caacttggca gttaccactt ctttgccttt gctccaatat 660
 ttttattt 668

 <210> 70
 <211> 612
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)

 <400> 70

 ctagtgggga caatattcct gaaaggggtg gcaacaatgg tgggaggctg ggtaatccag 60
 gaatgggagg aagaagacca ccaggtgttt ttggattttg aagtggagga ggaaatgatg 120
 gatctatttt tggaggaaat atgtgtttca cataatcagg gcccttgatg ttttgaatgc 180
 ttggtttttc gttgcaaaga actggctgtc taagaggctt gaatgagaaa aagccggctg 240
 agaatatgtg tagtccttcc ttcttgact tgaggcacag tgatgaagaa gttgctgctg 300
 aggcaacagc acaataaggc tcaactgctat ttattagttt cacagtgcac ctttttattc 360
 tttcacatg ttgctcact gagaaaggca actgcacctt gaactcccca tgctcatctg 420
 tcttcacttc tttcctaac ctggcctttg acctcccata cccatcttg cattctacag 480
 caactgatgc acctgccatc atgaatatag aaaaacataa gacaacatga cttcataatc 540
 aaaatttaga gcatgtgtgt aagagttaag agatatgaaa ctgaaccttt ttaagaaaaa 600
 taagtcaagc ag 612

<210> 71
 <211> 941
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

<400> 71

caagcttggt gcctgcagaa aaagcacatg ggatagttgt taatagtttt gaagagttgg 60
 aagcagaata tgttgaagag tgtcaaagat ttacggacca tagggtatgg tgtgttgggc 120
 ctgtgtcgct gtcaaataag gatgacaagg acaaggctat gagaagtaag agaaactcaa 180
 gtgatattga gagtgagtat gtgaagtggc ttgattcatg gcctccgagg tcagtgattt 240
 atgtttgcct tggtagccta aaccgtgcaa cgccagagca gttgatagag ctcggttagg 300
 gattggaagc gacaaaaagg ccattcattt ggggtccttag aggtgcatat ggaagagagg 360
 agatggagaa gtggctgttg gaagatgggt ttgaagagag ggtgaaaggg agagggcttt 420
 tgatcaaggg ttgggtgcca caagtgttga tcttatcaca tagagcaata ggagcgttca 480
 tgacacattg cggatggaat tccacactcg aagggatttg tgctggcgtg ccgttggtaa 540
 cttttcctct gtttctgag cagttcatca atgagaaact tgtacaagtg gtgaagattg 600
 gcgtgagtgt gggagctgaa tctgtttgct acttgggtga agaagataag tctcgggttc 660
 aggtgaccag agaaaatggt ctggattcta ttgaaaggta atgggagaat ggccaaaaaa 720
 aaaaaaata taggaaaggg ctttaaagta ttccgccatt ggcagggaaa gcaaaaaaaa 780
 aagtgggttt tttttctcac atggtcctac tcattgggcc atataccttt ggaggggttaa 840
 ccaagtttaa ccagggttct attttttggt ttcaacacca attgcttttc tcaagggtca 900
 accttaaacc caatttgtct tccgaaagaa ttttttttt a 941

<210> 72
 <211> 652
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

<400> 72

taattatatt atttgatttt ttttattcat gacatttatt ttatataatt ttttcttagt 60

ttggtcaaattt attatcatcc ttttcattat ctactaata aggtggattt tttttgtttg 120
 acaaaatttc tttttcaga ttggtcaaag ctaaagaaga tagaggagtt agatttatcc 180
 ggcaacgaat ttaagggacc acttccctcg tcttttgta acatgacatc tcttcgggag 240
 ttggaaattt ctcataatca cttcattgga aatttcgatt ctaacattgc aagccttaca 300
 tcacttgaat attttggtt tacagaaaac caatttgaag ttctgttctc tttctcaaca 360
 ttgccaatc attcaaagat caagttgatc gacggaggag gaaacagatt catattggac 420
 tcacaacata gtttaccac ttggattcca aaatttcagt tacaagagct tagtgtgtct 480
 tcaacaactg aaactaagtc tcttccactc cccaattttc ttctatacca aaacagttta 540
 atcagcctag acttcagtag ttggaagttg gaaggagact ttccttattg gttgttgtaa 600
 aacaacacaa aatgactga agctctgttt agaaattgct ctttactgg tg 652

<210> 73
 <211> 671
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

<400> 73
 aaggattgat gtataaaget attgctgttg ccaacaatgc tgctgagaat gacactgcaa 60
 agctcacata gaaaacatac atgtccacca aactaccatc gtctacatga gtgtgtgaat 120
 catttggtat aatactaggt ggaggattgc aacttttga cagtgagggt ccacaaagga 180
 aggggttacc ttcatactg ctattttcaa aggtcgagaa ttgtccttcc cattcaggtg 240
 ttgtgcccga taagttgttg tgtgccacac tgaatacttc aaggagggtt agcttactca 300
 gttgaggagg aatttgacca ctcaacttgt taaatgaaag gtctaaactc tctgtttgta 360
 ccaaattgga gaatgtagct ggaatttgc caatcaaac attatgagac aagttcaatg 420
 ctggaattct tgcaaaattt ccaagatcaa atgggatatt cccattcagt ttattgtggg 480
 acaagtcaat tccagacata taagcaagga tgctccttgt gtaagtgtcg gttctcttct 540
 ttgaagtga aattacttcc tcttccacat ttggtaattg tgatgggaaa attttatttt 600
 ggctgtaga accccaaccg gacaatctt ccaaaaaccg ttcaggatcc ttattctcaa 660

aagacatttt t	671
<210> 74	
<211> 619	
<212> DNA	
<213> 大豆 (Glycine max)	
<400> 74	
aaatctctca ggtcattgct aatctgctaa taattaatat ttacttatgt aataatttct	60
ctgactatat ttgtgttaac tttgcgtga aattcacat atgcaggaca cttcaactag	120
aatacataga tctctttctg atccactggc ccattgctac taagcctgga aaagttgtgt	180
acccattga agtatcagag atagtggaat ttgacatgaa ggggtgtgtg ggatccatgg	240
aggagtgcc gagacttggc ctcaccaaag ccattggagt cagcaacttc tccatcaaga	300
agcttgaaaa attgctctct tttgctacca tcctcccgc agtgaatcaa gtaattagtt	360
aataattaag ttgatcacac attagtttaa ttacctgact gatccactga tcaaaatcac	420
tgatgaact aaaccttaat caatccttaa caggtagaag ttaaccttgg gtggcaacaa	480
cagaagctta gagatttctg caaggaaaag ggtattactg taactgcctt ctcaccctg	540
aggaagggtg ctagtagggg tgctaatttt gtgctggaca atgatgtaat caaagaattg	600
gcagatgctc atggcaaga	619
<210> 75	
<211> 978	
<212> DNA	
<213> 大豆 (Glycine max)	
<400> 75	
ttgcatgctt ttagtagatg aattacacat aagtaaaaca agtaaaattt atacaagtga	60
ccaggataaa aatgatggcc acttgcaagt tagatatgca tatacataaa gtaaaagtaa	120
actgtttcca gtaaaaactt gtgctcaaaa gaaccaacag tggttcacta aaatcttatt	180
agtccagcat agggcataaa gatgtgtatt aaaccatcac aatatgcaca acattcgccg	240
agaggtttca gatattttga taagctaatt agatgataat aataataatc agatgacact	300
gctcttctgc aatgaaagac ttcattctgag gaatgtgagt tcttgatatt ttaaataata	360

ggagcatata ggatatagca taggcagaga cacgcaaacg gctacagttg ttgatcaatc 420
 agattactgg atgtggttct ttaccttcta tccccaggaa tgaatcatta tagccttatt 480
 ataggtatct ctcccaatct gacatatatc tcctttccta gggatataaa cagcaaatca 540
 aaacctttaa caaaaggaaa gtattcactt acaatgatag caccaacagg gtccatccaa 600
 tcatcaacat aatttgccaa aagtgcagca ataaggccaa tgatattagt gatcacatca 660
 aaaaagtgat cctgggcata ggctttaatt atctcattgg taaaagaacg acagtaaate 720
 atcagcagga atttcaccaa agtcactgaa agcataatgc ccacaacca gcgctcttgt 780
 tccttggcca agttgaatgc attttcttgg aatgtcatt acgagacaca ttagaaatac 840
 ctagaaaaaa aagagatcct aatgcaact aatgaaaat ttaatgtttt agcagtttgg 900
 gtgtcagatt tgcctaaaaa aatagagcaa gaatcaactt acagaagata ttaatgtgca 960
 ggtagactcc aagattat 978

<210> 76
 <211> 845
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

<400> 76
 ttgcctgcag gcatagtcca tctgaggata ttactagtat tttgatgat gtgtttgact 60
 attttgagga tgtcagggag caaggtggga ggggttttgt gcactgttgt caaggggtgt 120
 ctaggtctac ctcttggtc attgcttacc ttatgtggag ggaagggcag agttttgatg 180
 atgcttttca gtttgtgaag gcggcgagag ggattgctga tccaaatatg gggtttgctt 240
 gccagctgtt gcagtgccag aagagggttc atgctgtccc tcttagccct agctctttgc 300
 tgaggatgta tagaattgct cccattcgc cgtatgatcc tttgatcctt gtccaaaaa 360
 tgttgggtga tccttcatta gctgcattgg actccagagg tgcgtttatc gtgcacattc 420
 cttcagcaat atatgtttgg gtgggtaaga actgtgaggc caccatggag agggacgcca 480
 gaggggctgt tggccagatt gtccggtatg agaaggtaca agggcctatt gtgatgatta 540
 aggaaggtga ggagcctgtt tacttttggg atgctttttc agattttctg cccttaatgg 600

acaaatctgg caaatctggc agtaggatag aagatggaaa actatttgtt ttgcctggta 660
 agaggagagt agatgcatac aatgttgatt acgaagtttt cacaaaagca atcacgggag 720
 ggcttcgtgc cttcttttgg ttcattctgg tgaacatgaa acccatttgc ctgcaaggga 780
 aaatatttgg agtgtaaggc gtaaagtffc ccattggtac atggaaagag ttgttacggt 840
 ccctc 845

<210> 77
 <211> 533
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

<400> 77

tcaaaccatg ttaaactgtc tatttttctt ctcctctgt tcgcacagct tctaagcatg 60
 gcattcctca aattgggtgc aaattgcaag aatttctggc tgatttttgg aatataattt 120
 tacttcggaa gagggaggag caacttcaat aaaaaatact ttctaatttg aaattttaac 180
 tccactattt tataagtaat aateccaaac atttttcttc gatttttcaa tagcaatccc 240
 tcctctttcc tctactttga aaattaatc aactcatccc agtttagaat ttgtgattta 300
 aaattttgat catagaaatt aggaatatac agtaaaactt tatttggggc taagaaaatg 360
 ataaccagaa aaggaataaa acataaaaga caacaattaa ttgaaacata catgtcaata 420
 attagtttaa taaggacgct cacagccaca tccgttgatg gttttccact gttattactt 480
 agtctagttg atgctgtagt agcattggta ttcggggaat aagcctctga gca 533

<210> 78
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

<400> 78

aggtaatcct aatgcatgct gcttttaact atgaaacatt aaattcctat aagttatag 60
 cattgcgaag agttctgtgc aaatatgcaa atgaaattgt atacttcac aacaagtata 120
 cagaatacta cacttgaaga ttgtataagt cttagcctat ggtgttttat tttgtgtcat 180

caaatactat accaaattgg atcacattat cagcagaaaa tcataatata taagtttaa 240
 tccccaaaat gcaaggtttc aaagaatgac tgaacaaaat caatgagaaa caacactcca 300
 gcacaatttg tagacagttg agcataaact aataaaaata tatttcaatt agtaaagaag 360
 ttgtcaaac ctaacctttt gcttgatcca gctatgctgt ttgccactgc gaggacaaaag 420
 aagcacttgc actgaagagt gcttaaaaaa tctacgagtc tcctcatcat gagttgcat 480
 gacaccatcc tgaacgtaaa gtccaagagt atctcaaac taaagctaaa agggaaaatc 540
 ataaatatta tatttggatt aatgaaaaaa aataacttaa taatctaagt ctttctttaa 600
 ataaagtaaa aatcagtagt catacatgag aaagtgttaa tgaag 645

 <210> 79
 <211> 1178
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

 <400> 79

 tctcgggtag ttgagtctta gtgagttagt taatgacaac taattacagc tgtcatagct 60
 aacagctttg tctatataaa cagatctgta ctctggagtt agttgggtta atgaaactaa 120
 agtttttttc ctccttcatt ttctgttatt aaaaatcttc tctcaagatt ctattaacgg 180
 acatacaagc actcgttaata ataaactaag gaataaatatg gtagaatact tacatgtaaa 240
 gattaatatg ttctagcata tttatttctt atgacatggc aatgcctctc attatttgc 300
 aaatttgtgc ttctgggttt tgattatfff aactcaact agcttttcag tcagtttctt 360
 tcttgaacaa ttigattata agcttttgc atactcatga aagaaaaata agctaatcca 420
 aagatgtact aatgtgtaac atgatttctt tatttgcctt ctactacag atacaacca 480
 agtgaggaga cattaattca gatagatctc ttttgcctca ccatgattgc tgaatgtgat 540
 attaaccxaa ctcagccgtg gtcactagct ttgaatcgac aatctggtgc atcaaatata 600
 tctcctttac ctgtatctac ctttgcctct gagtcccttg taaagtcatt aagttatgtg 660
 cgttccctag ttgctcaaca ctttctaaa cggttttttc aaccagcttc atttgctgga 720
 ccaccttcat cgggacagtc actaccgaca ttgtcatctt tgctgagtaa atccttcaat 780

tccaactaa ctctgcaag tattccagaa acaccaagtt ctgcaagtgt tccaaaaaca 840
 ctagagaagg attcaagtgc tctatctggt tcaaggttat caaaaatcga aaaagctaata 900
 gaaacagatg aactaggggt cattgctcat gatgttctaa aatggcgctg gcttgaggaa 960
 ccacagtcat catctatagg gactgaaaag taataatcta tgtttcatgt tggtttaggt 1020
 gtcttggtag tggccactgt agtttatatc tctactttac ctgttagttt tttcccactg 1080
 tagtttcaga aattgacttt gttatttaac atttttaatg cagtgatcga gctgtgaatt 1140
 ctcaagacat gacagcacat agtttcttag aataggt 1178

 <210> 80
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

 <400> 80

 tctacttgta ggagatatag aatctaagat gaaggggcaa ccatggaaat tttttggaac 60
 cgatgatatg ccttacctgg atcagctatt gcagcttctt cctgtaacac caataactaa 120
 ttctgactct gctcgcccc atctgagagc aataacagca tctaaacgca caaaaccggg 180
 ctctcgtcag atttggcatg ttcttatatc aacttgcatt ttgatattt ttctttttct 240
 aattctttta tatttaagtt catgccacaa taaatcttgc ataatttatt tttagccaaa 300
 tgttatataa aaaagttgaa tgatcacctg cattatagtt aataaggtta ttgtgaaatt 360
 aaagtactta caatctaaaa ccaatggttt atagaatatt agattagcct gcaaaaagaca 420
 aatgtattac attgtcatgt ccigttagct tctatgaaaa taaaaataaa ttttagtgta 480
 agaattataa ttatccattg cttttaatga acagaaaatt tcttattgat taattgactg 540
 ggggggaggt gctgatcttg ttcttcccac tcataatat ctttttattc ttcaaagaaa 600
 tagagcaagt aatctttatg cagtagtttg gggttctggt tggttcatta accactcatt 660
 ccataaaga ctgtagtggt ccatgaatta tcgtttgitt atatggtaa aattatgtga 720
 taagtattta ttgctactc tacagtttga tactctctct ttggggataa atgcttgagt 780
 actctttttc gcccaagatg cataaaa 807

<210> 81
 <211> 1395
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

<400> 81

acttgccctga gagggttggg gcttctgaac aggctgcatg ttcacacat ttgaaagaaa 60
 ctgttggaac acctactctt gatgcatctc aaccagccc aactgctact cccagagata 120
 ttgaggcttt tggccgatct ctaagaccaa acattgtttt gaatcataat ttctccttgt 180
 tggatcaagt tcaatctgca agaaacatgg agactgatcc tagtaatcgg gatgtcaaga 240
 gattgaaagt ttctgataat atgggtgggg acaaacagct ggtagattcc aaccatgggc 300
 aacagttgtc atatgggiat gataatgtgg tcaaagatgg gtggtcaggt aataattcca 360
 tgccatcatc agatcctaata atgctaagct tttcaacaaa gccacttgat ggacagtaca 420
 caaatgcate ttctcaagag gaggttgggt atggtaaaaa aattgctctt aatgttgctg 480
 acagtaacaa agcagcctct gttaaaagt attattctct ggtaaactct caaatggcac 540
 catcatgggt tgagcgatat ggaactttta aaaatggtaa gatgttgcca atgtacaatg 600
 cacagaaaat gactgctgct aagataatgg accagccttt cattgtagca aaccaattca 660
 gatagtttgc gctttcataa ttcagtagag caaatcaga gtgtcagtga tgctcagcta 720
 agtaatgcta gtgaaagtcc aatgcctgct ttagctgcaa ataagcatgc agactctcag 780
 ttatcgacac ctgctgttga acctgactta cttattatga gaccgaagaa gcgaaaaagt 840
 gccacatctg aactcatacc atggcataaa gaactgttac agggttctga aaggcttcga 900
 gatcagcagg ggttgccaaa actaagtgat ttaatgtgct tatttttcgg tgttgctatt 960
 gttgggttag taaaagatcc catgtctcca gttgatattg tgttgtttca attgttttga 1020
 aagaaaacgg tgtgtttcca tagtgtcagt atgactattt taatattggt ttatgtttat 1080
 caatataatca agtatttggt ttccataaac ttaaaatttc ttactatgtg gcagtgtggc 1140
 agaattagac tgggctcaaa gtgcaagcag attgattgaa aaggtttgggt tataataaaa 1200
 tcagtctacg catgaatcta taattctata atttatgagt tcactttact ctgtataatt 1260

ataattatag gttgaagaca gtgtggaggt agttgaagat ttgccagcag tggatgaagtc 1320
 aaaaagaaga cttgtcttgt actactcagc ttatgcagca acaacttagt cctcctccag 1380
 ctgcaggcag gcgag 1395
 <210> 82
 <211> 618
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)
 <400> 82
 atttcittata ctcaaatttt tggtagcctt ctttccttca ataaaatttc ttcttttata 60
 catgtgtgtg tgtgtgtttg gatgttgga ataaatttct gccagaggat ttgaagatga 120
 agagtccata agtttgttga ttacttgata caatciaata gagtatttta accggcccat 180
 ttttttctt gggctaaagt gatgtaacat ctaacaagtg ttgaggagat aaaacatttt 240
 caaggagttt gattgttga tatctagagc aattgtaggg ttttattgta ttcattgatgc 300
 ttcttaatca ttcaaattgt ttgtgccttt tcatgttata gctttgtgaa gaggagttac 360
 tcaaggaaga agcgctttta gtaaaaaaac aactatttc ctttagtttt attaagact 420
 tgtatgcaga ttggacaaca ctttagggat ggctacttgc ataaagaaga atttaagata 480
 gtttatgttg ctccaatgaa ggtatgttga tgcttttgtt ttcttttaca tttctctatt 540
 cagatttgct ttttgttccc tgcatttggc tgccattact catttctaag tatagattct 600
 tgcctttcc aggctttg 618
 <210> 83
 <211> 1085
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)
 <400> 83
 tctttcgcca gcttgcctgc tgcagtaaga tccaaccttt atggtgggat tctatgtcct 60
 ggataaatct caaaggtgct atgccttga gtacaaaaca gctgttcatg cagtactcct 120
 ttttgaaga agatggtaga aggaatagga ggtggcaata ctggtggtt gctatcactt 180
 ggtctacttg gcagcttcga aaccgaattc tgttctctgg agcgactttt gatggaaca 240

aattggttga agacgccact ttcttaatgt ggacttggct tcataatttg gagaaggatt 300
ttactattca tttcaatcac tgggccagta acttcaaaca tcattttttg cagtagtagg 360
ggtgtttttt gggttcatat cacatgtatt ttcttccat attttggttc ctaatcagac 420
ttatgttgcc tgattgagga accatattta tgggtgctaa ctctgtattt agtacctctg 480
gtacttttct aatatatata tagttttatc ttgtctgac aaaaaaaaaa aagtactcat 540
ttgtctattc ctgtaaagtg gcaaggaaat aatcagtagc tttaaatca tctgatgigt 600
ggatgtgaca caaattacaa cataaatcat gtttaaggata tgaaaagtat gtactcatta 660
gtctcttcca tcaactaagc aaagcaacat ggaaatcatc tgtagctgag agtgactatt 720
aaattgtaag atttggaggt catggacctc atgtttatag ggacagtaaa attatccaat 780
taccxaaacc tttagacaat ctgaaatgca cacataatat ggtacaacag ttctaaatgg 840
ggcaggtaag tagcattcat tgctcaatat gtctataatt caagaatgaa gctttacatt 900
tagtgcatat ttggacctca gattggctta tttttgcttt aagaaaagct tatgatcaaa 960
atgttcaata aaaaacttaa agcttctttt ttttttcag tgtaaaatag tcagaaattc 1020
agaaccagat tgcacttagc cagttgtata taaaactatc caatggccat aaagaagaca 1080
gatca 1085
<210> 84
<211> 1052
<212> DNA
<213> 大豆 (Glycine max)

<400> 84

aagttcactc ttaactaatg ttttttact gtattcccta gctatatttc agactggtgt 60
gtgacagtct tttttgttc atagatattg cggaagcttg aagaacgtgg ggctgacct 120
gaccgcttgt atgagatgga ggaaaaagac attggggcat taattcgta tgcgcctgga 180
ggaagggtat gcaactttta ctagaatgat tttcgaagat ttccatcaga ggttggttcg 240
gatgttgaag aaatgctgat taatgtttc ttatcccttc ccttttttag ttggtcaagc 300
aacacctagg glattttcca tcaattcagt tatcagcaac tgtgagtcca attaccagaa 360

ctgtgttgaa ggtatttcat gatgaagatt tttttttcca gactgctcag ttgacatttt 420
 ttcattgatt tcatcacatc aaaaagcctt gatacctaata tctgcatcac cactcattat 480
 tttcaggttg atctggteat tacgctgtt ttcatttggga aagatcgttt tcatggtaact 540
 gctcaacggtt ggtggatttt ggtagagggtg aataaatttt catgtgatga ttggtcacat 600
 tglaaattcc ttggtttttg ttaaaaactc tgatctcttg ttataaaagg agaaatttat 660
 caagatgaag agaaagactt tcaaagagaa aggaggatga ggaatcctcc taaacaaagg 720
 aacaaaacag aaaacaacta ggaagaaaga gataatcaga gaaacaaatc ttcccagttg 780
 ctcgatataa ctttcagtga aatgctaaa gaaaccccct ttaaagcaaa tagatactga 840
 gcacctgac ttataccaaa tcatgtgacg tgctaaagaa acctccttta aaaatactag 900
 aacagcttgt agcatatgta gcagatttat acaaaaaatt agcttcttta cttctgtcaa 960
 aacctgaaa accaatcatc gataattggt tttgagactt aggacacacc caacattaac 1020
 tgaaaatgct gaataagtaa tgccagggag gg 1052
 <210> 85
 <211> 855
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)
 <400> 85
 tagaattaca ggtctggaga agtatctgaa gactgtagat tcggtgcggg attggattct 60
 gtttcatata tactttttta acaacataag ttaatttttc atatagtttt ttatttaatt 120
 ttataaatat tttgaataaa accaaaaata tatgtaagtc gttcgtacat aagacgcgtt 180
 aaacgicagt acttaataat aataatatag tgtaagaaac tcaactgggg aagtcataa 240
 aaaaataaaa gtataaatac aagaaaaatg aactaagaaa gtgtgtactt atgtgctaata 300
 tagcaagatc gtiggaacaa aaagccaaat tgactgggtac tttctcgta atttcttcaa 360
 ttttcattgt ttcgttaaat actagtggca tgtccgtcaa aagtcaaaag ccacatattg 420
 atgaaattgt gttgtagaa taattaatta attacttgca gagcaaatct cctccacaat 480
 ttttcttttt tctctaccc aagagacttc ctttcaactc agatactctt tgattctctt 540

caggaaaaca tcaactaatt aaaatctaatt tttgtctttg atactctttg tccgcggaat 600
 tcaccacccc caccttctca atttgtttgc tttctgcttt cttacctctt ttttctcaga 660
 tttcatttgg ttgatccttt cttcaattct tcttctgggt ttgtagttgt ttttttatct 720
 gacttgtggt tctaaaatcc atgaaccgta tgtgatttcc agtgtctttt tctttttcca 780
 gattcccaga gagaaaaaag aaaaaatcct tttgtttgtg tgagactgta aggatcaatt 840
 ggttgagttc tccta 855
 <210> 86
 <211> 1066
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)
 <400> 86
 gtatggggcg attcaggagg tggaatctgc aatacaagag cttgaaggga acaatgaggg 60
 gaatgtaatg ttgacagaaa ctgttggacc tgaacacata gccgaggttg ttagccgttg 120
 gactggtata cctgtgacaa ggcttggcca aaacgataaa gaaaggttga ttggtcttgc 180
 tgacagattg caccagagag ttgtggggca agaccaagca gttaatgctg ttgctgaagc 240
 tgtgctgaga tcaagagctg ggcttggaa acctcagcaa ccaactgggt ccttcttgtt 300
 cttgggtcca actggtgttg gcaagactga gctttcaaag gcacttgctg agcaactctt 360
 cgatgacgaa aatcaattgg tgagaattga catgctgaa tacatggaac aacactctgt 420
 ttcgcggttg attggtgcac caccaggtg tgtggattga cattttcaca tttcagttta 480
 ttgttagttt tctgtatgaa ctacagataa ctgactcatt gtttcgactt tcaggtatgt 540
 tggacatgaa gaaggaggtc aactaactga agctataagg cggaggcctt atagtgtgtt 600
 actctttgat gaagtggaaa aggcacacac atctgtgttt aacactctcc ttcaagtctt 660
 ggatgatggg aggttaactg atggccaagg ccgtactgtg gacttccgaa acactgtcat 720
 tatcatgacc tccaaccttg gtgcagagca tctcctcact ggactttcag gaaaatcttc 780
 aatgcaagta gcccgatgata gagtgatgca agaggtatgt ctcttgacac catttgttta 840
 atatgtatga caaaggtctt tgtgctgtgt tttgacttgt gaccttgtct gttgaatttg 900

ttgtaacagg tgaggaggca ttttaggcca gagttgttga accggctcga tgaattgtt 960
 gtatttgatc ctctttcaca cgagcaacta aggaagggtca caaggttaca aatgaaggac 1020
 gttgctagtc gtcttgetga gagaggaata gccattggca gtgacc 1066
 <210> 87
 <211> 890
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)
 <220>
 <221> 未确定
 <222> (719).. (719)
 <223> n = a、t、g 或 g
 <400> 87
 attatgaagt atgtgacaga atttggtttt caatatattt ctgacaatta gggattgcac 60
 gggaaaatga acagcgacca gagaagtat ccttaaagaa gcaattgaag cggaaatgac 120
 tagaacaaaa tcccaatctt gtccaaaacc cagttatgtg tggatatgga gtgggtgctg 180
 ccagtaacca gcccatggaa atcttgaact gtagccaacc aagtgagaac ttgcttatat 240
 attaactttc tgaggaatac aataaaaaaa aattattttt ccttgaagtg atatgttttt 300
 tcctgtcata cttggtatat tggatttagg aagtcctca aatgtatata acagcttata 360
 ttacatgctc tcttgtggta atgcattttc ttggctctaa agattttggc catttttagta 420
 gataatgtca aggtagttag atttgagaat tagtgctctt agctgtactc acattagtgt 480
 tggaaacctgt tcttctact tgtttatgtt tattgagaca ggtacatgg cttgtggcaa 540
 ggtgatattt tctaattgta tataaatata acctataaaa atgtagacc tttatgagcc 600
 tggaggatca aagaatggaa aatggaattt ggtttattac attcataggg gcgaaatgaa 660
 atatgctgca tcatgattac cggcagacta aatccaata aatcatcctt ttttctgana 720
 ggaatggtcc cgcccagttt ggaaaaaact acaggtatct tttgaccgtt tgtggaagct 780
 ctatgagtcg gttaaaccgc taactctatt cttttatag caaggtgtct tctttttcga 840
 gtaaacaat caaatctctt aaaaaaagc tccggataac ttatgtttca 890

<210> 88
 <211> 640
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

<400> 88

aataaatgtc atggactatg atatacctga gcttgttggt tttattcaag aggaacatca 60
 gcaatttgtc aaggatactt gcattggtaa gggagtgtca ccagaaggca agtgtatgtc 120
 agaagattgt gcagtaaadc atgatccaat gtcattgtcac ttgagaatg acttgaacct 180
 ccgaagagat tcaaatctaa gaactatgga agcaatgtca atcaattcaa atgggccaga 240
 gtttgaatct aaacctctta cccttaagga tgccatggaa ttttatgatt caagaggttt 300
 agtcatggat ggtgaagagg attcaggata caatatttca attgaccacc tcacaaagaa 360
 gacaatacca gagaccatta gagaggtgag aacttttaac ctcatccttg tgcattttac 420
 gtctttggac gaggagttaa ttgtttttta gaatattgcc actaagacat taatacttat 480
 attctaagca atataaaata tactgtggac tcgtcttctc ttttagcatg gttggtgaaa 540
 cccctacat caatgtacat cttctctttt gttcatatg cttgattgta tgattgataa 600
 aagattgaaa caagacttaa taatcatata gggagttacc 640

<210> 89
 <211> 993
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

<400> 89

atcattttca aagagtgtat atttttttt tttaaatgc tgagttccta aatataatcc 60
 aaacactgaa ttgaggagtc aagtgtgtg tgtgtaagac attgcaaat aagttaccac 120
 aaattcaccg aagtttcata gatattgtct tattgttatt tgatcctgaa acatgctagc 180
 aggattaata aaaagaataa aaatgttacc agctgcaacta gtatagtttt gatcctgtca 240
 tcctttctag caatggttcc attccttgaa tacacttcat ctgaatgacc aattttatcc 300
 ttggcacctt cattcttttc aatggaatca atgttggtgg agctcacacc actggaatac 360
 acttcaccg aatgaccaat tttattcttg gaaccttcat tcttttcaat ggaatcaatg 420

ttggtggagc tcacaacact tgaatacact tcacccaaat gaccaatfff attccttgca 480
 ccttcatttt tttcaatgca atcaatggtg atagagctca caacacttga agtcagctcc 540
 atgatctget cagactttgt tcctttgtca tcaattgcat cctcagtagt tgtctctggc 600
 atatcttcat aagtagagag ttgacagaa tcgctgaaag aaactctfff aatfffaggc 660
 gttattgggc tttctaactt agaaacatct gattcaacca ttgacataga aaatctttgt 720
 atcggaccag gttggataaa aaaatttcta ccctttgacc aaatfffgtt agagtagtct 780
 ttggttgtcc tccatctctt cagtttcgtg ctgccactgc tactttggct actggaagag 840
 cctttaaagg tattaagttt caattcatcc gtttcgctcg atgtggaatt tggagagacc 900
 ctctcaagct ccagaacaga atttggagcc tgcctfffcc cccaagatc cttgggtgga 960
 tgttgccccc aaagctatct cttactgaag gaa 993

 <210> 90
 <211> 804
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)

 <400> 90

 caagcttgca tgccctgcagt aaatatgcca tcaatatgag caagtgagca acagcctaaa 60
 aattgttggga atgtttatgg ttagagattt aattggtttg catgattttg gtatttctat 120
 ttattcataa ttggagaca cggatcatat aactttagga tttagatcaa gtagagtggc 180
 tttaaaataa atcaggaatt gaatttaatt agttgtagat caaatttagt tggggttctt 240
 gcactagtaa agttatgatt cttatggttt tcagtaggag ctaatcctgt atfffgaatt 300
 tacttatata gaatttgatc atttcagaat gatctgtag gtttcattta ccaccctta 360
 cataccattt tttatcttca catctaaatt cttcttcctc tttggcgcac atcaacagga 420
 cagacaaaat aaaatttaac ctgcctfffcc tagaagataa gttttgaggg ctattaatag 480
 tactctcaac ggttatgctt ttgacttagt tgaacatttg ttcattgctt ttgattggct 540
 cccccagtct tctcaatagc agtatcatca tcaacacaat cattctcctc tgccactacc 600
 aactagtgct gagactactc ctaactctcc ttcgccaact ccatttcctc cgactttggt 660

tccacttgat gatctcccca ttgaacttca taaaaatata tgttccactc aatacatctc 720
 attatgttac cttaacctta acctatcatt gtttgtctct ttccctattat gctagtcttt 780
 tgtgtttgat cctgtcatcc tgag 804
 <210> 91
 <211> 749
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)
 <400> 91
 tggcgcacca gaatggggac tgccgtccac agttccaatg atgacacttt acagtccata 60
 tcattcaaat ttigtggac cttcatatca tcatccagga gctgaatcta ttaatcagat 120
 gtggtcgacg aatgctcatc acttgcaggc gatccctaata tataattatc ctcacctta 180
 tagttatacc tatgattata attatacagc tcccgttggt caccattacc atgtccctcc 240
 tgcgccattg tttcataact ctttggttca aaattctgtg ggagatgaaa ataatggagc 300
 aactaccaat agtactgttg ctacaatttc agatgaagct agagaggaaa ttctggtgaa 360
 atttcgaaac tttaacaat ttgacgttgt tgaagacggt tcagaccatc actttgttaa 420
 tgccgactct tccatgcaac aggtagcctt ttaatgcaat tttttcttc cagttttaat 480
 ctttaattatt taggtttaca tacagtcaat ttatttcatg aacagcattc aaagaattgg 540
 gctaaaagaa tccagggaga gtggaagtca ttggagaagg atttaccagg tgagagttag 600
 ttcgattagt attcatgtca taaattggct aaaatatttt cttatctat ccaacttttt 660
 gtatttaatt aaattgattt cttttacaag ccaatggatt tggactggat gaattggatt 720
 cccaatttgg cattaatat gctaaaggg 749
 <210> 92
 <211> 685
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)
 <400> 92
 acccttcaga actgaatatt gctaacacac aaggcaacaa ccaaacttac acgacaaaca 60

tccacactaa aactgaaaa cacaccttct tgcttgttca tcccgaagtt tggcatcaaa 120
 ttctttgcta ggaggataact ttggcaaact tgaaggatca caaggtagag gctttgttgt 180
 aaagaactaa atagcaagca aacccaaaagg agacagtcac gacatgcata ttgaagtatc 240
 agcaacaata atttaccatcc aaaataaaaat agaaattaaa gcaacaatgc agttgagtaa 300
 gagataatga ataaatacac acgaatatgc gataacatat caggatatat aagtgaggac 360
 ttgcaataat agtaacaata agaattttct actatattac attccttgag gcaatacagg 420
 ttaggacttg caacaatagc aacaataaag agacaacaaa ggagcatcaa tttgattaaa 480
 gcaaaaggaa aacatgcaca aaaatgacaa aaaattccaa gttgtcata ttttgagaa 540
 tacacaacct aagtttgaaa tataatttaa tccaactctt tttaccaaca tgaacatcca 600
 ctcttcgtta tgtgtactga ctgatattat aaaatgtact caagtagtct gaaaaattca 660
 tcatgaattt catacctcac tcttc 685

 <210> 93
 <211> 652
 <212> DNA
 <213> 大豆 (Glycine max)

 <400> 93

 attgtgattt tcaactggtt gtgagagtgc aaaagaattg ttcagttgaa tgtgcaaaat 60
 tgcttgatc agttgaaatg cacctatgaa tttgtatitt tcttttttat gacaaagggc 120
 atgtagaata tgattatatt ttgtttgaat agtgtggggg agcattactg tttttttttt 180
 tttggaaaa aaaatctgat gtggtagtgg tgtctgattc acatgtggaa aattcttatg 240
 gattgggaaa gaatattgat tgtttccttt tctcacagtg ctggtggtga aagcagtgga 300
 ttcttgcac tcagagttca gggctgtgga taatttggtt gtgtgcaata ccaaccgtgt 360
 ccttaaagct ttccagaatg ctcgagttgg atcccatgta agcattcccc ttgatttata 420
 taacctttat gcaaatgtac atttaatatg atgctcaatg ctcaagggtt caaggctaat 480
 aaacttgta actgttttga ttgtaattgg tagagatgac cttaagcca ttgggctgat 540
 cttgatgcct ttatgtattt tgacattttt accaaaaaca taactaatat aggaacccaa 600

aaacttagga ttcgattagg gagaacctaa ggctgcccat taaaacttga gc 652

<210> 94
 <211> 821
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)

<220>
 <221> 未确定
 <222> (798)..(798)
 <223> n = a、t、c 或 g

<400> 94

attccataac ggtttgcaac tcttgaagat cgtgactctg gtcgtgtcac tcctgcgtat 60

cgcgcctggg agcaacaaga ttagttgttc ctctcatggc ttcaatccac cgtttctgct 120

cccattcttc gaaatttcat cggctgcact agtttgtggc ttctctagga caaatccac 180

aactattttc atgctcatac aaatgcaaag gcacggccac ttcgtacaga gctgcatcaa 240

ctcactcttg aaggctgtac tatttctgat tatttgactg agattcagaa tcttgttgat 300

tcttttactg ctattgggtga tccaatttct atttgcgaac atgttgacat tattattgaa 360

gaatgtgtac cagaaaacta tgagtcctct gtttgcaca tcaataatag atctgaacct 420

ctcactattg atgaaatcaa aactgttctt ctgggcatg aggctcagat tgacaaatc 480

aggaagaagg cagtggtttc ggtaaatgtt gcttccacat ccaactgtgtc ttctgtgact 540

aatccatctc atgctaattt tggaggtttc agaatcagaa tcagagtcag tataaaaaca 600

gaggacgtag cagtattcag tgttacatct gtcagaagtt tggcatgat gttgccaact 660

gctggcacag gccctcaact tcctatgctc tgctccttat cctatgttgg cacaatttcc 720

caccatgect cagctttatt ccaatttctt tggagctgct ctgeatttcc ctcttatctg 780

tttatgcagg ctctgtntc tcaacaatgc cagcagccac t 821

<210> 95
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)

<400> 95

ctctagagtc gaccctgcag ttattatagt gacagaagag gaaaagtcac cactgactcat 60
 atgtaaaaga aaagatagaa aatgatgaaa ggacaaggga aaaacactac actaattaag 120
 tcaatttcat tacatcatta gaaaaggaca tgagggggga aaagaaaatg ttgtgaggca 180
 attacatgg gtatttgagg tgggaacata atctttagta catacfaat ttctgtgtat 240
 acattatagc atgtcccttt tttttttttt ctattctcaa gtigaattgg acagtaatag 300
 attaatgttg taggatgcca agcacacaaa cattgagaat atattgatct tggctggaga 360
 tcatctatac cgaatggatt acatggacct tgtgcagtta aacatgttaa ttttttgtat 420
 cagagctgtg taattatcaa gacaattaag gcaattatat taggctttaa gttcttctca 480
 ctacttgta ttgaaattta ttactaatgg tttctatga atatttttca tcattcacia 540
 aatcaaggca attaattaac acaaaaaaaaa ctagtctat gtttcttttc tcttaccctt 600
 cttatgttca tacaccaagt cttttgaata atttttgcca aaggttcaa agtttttaga 660
 cacaccgagt tcatacatgg agtgtttctt aattttattt tcacaatttt tgctgattat 720
 ctatctttta taattaat 738

 <210> 96
 <211> 710
 <212> DNA
 <213> 大豆(Glycine max)

 <400> 96

 tgtgatgctg tcaagagtgt tgtctacaaa ttttgcacac cgagatacta gatgcctcaa 60
 aattaagata ttaatttcag caataggtaa tgaataattt cttatggatg acagtctaga 120
 ttctctctc aaaaggagaa tcttctaac aaactcattt taactcttga aattgtaagt 180
 attaattacg ttaatctttt tattaattac tttaatattg tccctttttt gtgaatactt 240
 attataaaa cagacaacia aaataagaat tttgtgaagt caaagattaa aatgattgg 300
 gcatagactc taaagcaaat gggagtttac tcaaatggtt tttctttttc aattgggtca 360
 tatagtgaca tactatttta gtggccacta gattgtcatg agagtggaca taaatggac 420
 caaatcagcc atatcaggta tgtgggaagc gcactcatat agctaagtgc attgtttcca 480

catgaaattt cttactcttt tgagactcaa agtacctat ctttagctaa tgcctgcatg	540
aaatgctgggc atatatgcac atgggtcctt tcagattata atgtggtaga agttagaact	600
agaaccagaa gctatactaa ccttggtaat tcgacaaaaa actaccaggt cgcgagagag	660
gttctggctg gggctttctt ctccttctat tgtgtccatc taaacgtttt	710
<210>	97
<211>	954
<212>	DNA
<213>	大豆(Glycine max)
<400>	97
agtcgacctg caggaaaagt tgtaataaag gtaattaaat gctacaatat aatgattgac	60
aaaaacatta tctgttttagg aacaaatgga ttatatttta tgagacttaa acattgatga	120
aaaaaatggt caagcatcaa aagttgttat cagtcaatat ctctgtcaat aaatatccag	180
gacaagagtt gtgagccaac aatgaccatt cgttttgtaa tctgttatta tagcatatta	240
ttttgccctc tctataagag ggattaactc tttgactgaa aatacagaga aatattttac	300
aagccataaa tgcatttatt tggcctaaaa aacttaacac tttctttttg gccatacttg	360
tccgtgaaaa acgaaatttg ttggaatfff tcagggccaa aactgaaaat taaaaattaa	420
attgaaaaaa tgaaaatagc agataaaacg atttgaatga aagtaaaaat ttgtgagggg	480
attagagaat gttgagtaga gtgaaaatgg atcacgtacc gaataggaat gaggaacaag	540
agagagctcc gagaataacg aggatccctt cgccaagaaa cccttcaggc ttcagccttc	600
accgagaagc cgatcgagga acaggaaccc tagctgtcgt gaacgagaga gagtccgcag	660
tgcagttcac tgaatattca gtcacaact ttttttccc gaaacgggtc gggtcgaacc	720
aaaccgggta caaaacggag cggtttttaa cccgtttcac tgaatattcg gttcactgaa	780
tttgattagt ttgatcccta aaattaaaga ttaaattaat cactagtaat aattgtacca	840
aacttgacag acacacacc tatcagliaag agctagtcta cctcggccta gaatacagac	900
taattacca aaggttccag agaacaaatg aagtactgca ggcatgcaag ctgg	954
<210>	98
<211>	730

<212>	DNA	
<213>	大豆 (Glycine max)	
<400>	98	
ttttattttc	aaattcttct	tgttacaaaa actttttaac tttttgatgg gtaaaatgta 60
caaataaacc	attaattttg	agcacttatt gatccttcac gaggttttct tctaaataaa 120
gttatacaca	ggtatggatc	gttgtatgca agaccacttc ttgagaagct tagggaagat 180
ggtgtataca	tgaggcctct	gggtaatgtc atttatctgt tgtgtggacc ctgcacatct 240
ccagaagttt	gcaatcaact	actcgtcaaa cttcttaggc ggcttgaaga atttgacgta 300
tgtaagaatt	gaagtggatg	aagtggataa gtctaataatt cctgctatgg attttggcta 360
agtttattgc	tactattatt	ttttgtgggg gaggaggaag gggcatgaat tgtaaatcca 420
agggttgcaa	ttagcttggg	ttttttcaa ttcagttgat gtattttatt tataaataaa 480
aatgtatct	tatttcaatt	cccacctcc ccccattttt aagatgttat taataaaaat 540
gttaaagtat	ttaatcattt	tctttcaata tttttgaaa aaaaatcaag ttatgtaatt 600
aaaaatatat	attaactgga	aacaaaacca gaataaatta aatagtcaat aggtctagta 660
acaattgaat	agagtgtgag	taattgtaaa tttttgaaa taatttttta attttatggg 720
ataaaaaaat		730
<210>	99	
<211>	1061	
<212>	DNA	
<213>	大豆 (Glycine max)	
<400>	99	
agcagagtgc	aacaaataga	aaagggaaaa catccatttc aatagaaaga aaggttgagc 60
tgcaaattgt	tgattaccaa	tgcaatgggc ttcttccatc attatcagga acatcagggt 120
cagcattcca	ttttgaaaca	acgtggtaaa ggaaagctgt ctgaccatat tgtgcagcaa 180
catgcgttgt	ctgtgtccaa	gcaaatcata attagtaaaa ttaacattta cagccacacg 240
cttgtgcttc	aagtaaaaca	agaatcccaa actaccaaat tagcagatgt aaccagaaat 300
agacagccag	gtataagaga	tacataacat gctccaaatg ccttaccoca gcaatctctt 360

gaataaaggg aaaatgaatc acagcaatct aacctgatat ccattcatat cggcagcact 420
 cactcgagca ccctcctgga gtaaaagttc cgcaacctga atagcacccc gaaccgact 480
 ccaatgtaag gctgtctggc cagtatgata cgttgattt acatctcccc catgctgcca 540
 accacaaatc aaccagttaa tttaggataa gactaattcc atacttaata tcaagccaaa 600
 tttggctaca tacattcaat tgcaaaacaa acaaacacca cattcgattt ccatttccat 660
 aacacaaaca tgacctaaa gccaacctga gctgagctga gctgagctga gctgagctaa 720
 gctactttaa caaattcaaa ccacaaaaaa catcataatc aaatgttctt ctctttctaca 780
 tctatatcat tccttcctta aacagcaata agtaactaat tcttacattt tcttttcttg 840
 gagtaaaaa atagtaattc agcgagtgcc aaaataacat acgcattcaa acaagcacia 900
 taaaagcaaa gtaagcaaag caaacacaat tcaacaaacc gatcaaagaa cctcaatgat 960
 gtactgagca gcggcagtgc gattgttgag agcagcccac tgaagcgcgt agtatcccaa 1020
 cccgtcgggc tcggtgacgg ggcaaccctc ttgctccacc a 1061

 <210> 100
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工的

 <400> 100

 tctgggaggc agc 13

 <210> 101
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 人工的

 <400> 101

 tgggagacag cctt 14

<210>	102	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	102	
ctcgttcccc atgaa		15
<210>	103	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	103	
aagctcgttc tccatg		16
<210>	104	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	104	
agatgtaaac ttgttataaa g		21
<210>	105	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	105	
ttgttatgaa gtgatttta		19
<210>	106	

<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	106	
tttgaggaa atatg		15
<210>	107	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	107	
tttttgagg aagtatg		17
<210>	108	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	108	
ctcactetca atatc		15
<210>	109	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	109	
cactetcaag atcac		15
<210>	110	
<211>	15	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	110	
agtggtcct	taa	15
<210>	111	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	111	
agtggtcct	caa	15
<210>	112	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	112	
aaggtcgaaa	att	13
<210>	113	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	113	
aggtcgagaa	ttgt	14
<210>	114	
<211>	16	
<212>	DNA	

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	114	
cagtcaggta attaaa		16
<210>	115	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	115	
cagtcacgta attaa		15
<210>	116	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	116	
actgcccttc tgc		13
<210>	117	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	117	
aactgctct tctg		14
<210>	118	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	人工的	
<400>	118	
aggtgaagag cctggt		16
<210>	119	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	119	
aggtgaggag cctgt		15
<210>	120	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	120	
tttcaataac aatccc		16
<210>	121	
<211>	13	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	121	
caatagcaat ccc		13
<210>	122	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

<220>		
<223>	人工的	
<400>	122	
tgacacataac tcttc		15
<210>	123	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	123	
tgacacagaac tctt		14
<210>	124	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	124	
tggttgagca aaag		14
<210>	125	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	125	
tggttgaaca aaag		14
<210>	126	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	人工的	
<400>	126	
ttgtaagtac	tttaatttc	19
<210>	127	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	127	
agattgtaag	cactttaa	18
<210>	128	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	128	
aatgtgatca	aagatg	16
<210>	129	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	129	
aatgtggtca	aagat	15
<210>	130	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	

<400>	130	
cacacatgta tataagaag		19
<210>	131	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	131	
cacacatgta taaaaga		17
<210>	132	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	132	
cacatcctca catcag		16
<210>	133	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	133	
acatccacac atcag		15
<210>	134	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	

<400>	134	
ctctgatgga atcat		15
<210>	135	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	135	
tgatggaaat cttc		14
<210>	136	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	136	
cttccccatt tgagttt		17
<210>	137	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	137	
ttccccagtt gagttt		16
<210>	138	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	138	

ttgtcacggg tatac	15
<210>	139
<211>	16
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	人工的
<400>	139
tgtcacaggt atacca	16
<210>	140
<211>	15
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	人工的
<400>	140
tctactcaaa tggcc	15
<210>	141
<211>	19
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	人工的
<400>	141
attatctact aaaatggcc	19
<210>	142
<211>	16
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	
<223>	人工的
<400>	142

ccagagtatg aatcta	16
<210> 143	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工的	
<400> 143	
ccagagtttg aatcta	16
<210> 144	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工的	
<400> 144	
tcaatgaaat caatgttg	18
<210> 145	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工的	
<400> 145	
ttcaatggaa tcaatg	16
<210> 146	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工的	
<400> 146	
aaggcaggtt aaattt	16

<210>	147	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	147	
aaaaggcagg ctaaat		16
<210>	148	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	148	
cagctcccgt tggt		14
<210>	149	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	149	
agctcctggt gttca		15
<210>	150	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	150	
ttggatgtaa attattgt		18

<210>	151	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	151	
atgtaaacta ttgttgct		18
<210>	152	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	152	
aatgctgagt tggatc		16
<210>	153	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	153	
atgctcgagt tggat		15
<210>	154	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	154	
ctctcgtggc ttca		14
<210>	155	

<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	155	
ctctcatggc ttcaa		15
<210>	156	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	156	
ttgtgcagtt aaacat		16
<210>	157	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	157	
tgtgcaggta aacat		15
<210>	158	
<211>	14	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	158	
catgggcct ttca		14
<210>	159	
<211>	15	

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	159	
atgggtccat tcaga		15
<210>	160	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	160	
ccgttctgta accgg		15
<210>	161	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	161	
tccgttttgt aaccg		15
<210>	162	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	162	
attgaagtgg ataagtc		17
<210>	163	
<211>	17	
<212>	DNA	

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	163	
ttgaagtgga tgaagtg		17
<210>	164	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	164	
taccacgttg tttcaaa		17
<210>	165	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工的	
<400>	165	
tttaccacat tgtttc		16