



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102802404 B

(45) 授权公告日 2015.03.04

(21) 申请号 201080024250.9

(22) 申请日 2010.06.21

(30) 优先权数据

09163385.9 2009.06.22 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011.12.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/058741 2010.06.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/149628 EN 2010.12.29

(83) 生物保藏信息

NCIMB 41627 2009.06.19

NCIMB 41631 2009.06.19

NCIMB 41630 2009.06.19

NCIMB 41629 2009.06.19

NCIMB 41626 2009.06.19

NCIMB 41628 2009.06.19

(73) 专利权人 瑞克斯旺种苗集团公司

地址 荷兰德利尔

(72) 发明人 C·M·P·范登 P·M·埃金克

D·B·德拉戈尔

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 李瑛

(51) Int. Cl.

A01H 5/08(2006.01)

审查员 马越

权利要求书2页 说明书9页 附图11页

(54) 发明名称

不依赖于受精的番茄的果实形成

(57) 摘要

本发明涉及包含不依赖于受精的果实形成性状的番茄植物,其中所述性状可通过渐渗现象从其代表性种子依据保藏号 NCIMB 41626、NCIMB 41627、NCIMB 41628、NCIMB 41629、NCIMB 41630 或 NCIMB 41631 保藏于 NCIMB 的植物获得。可通过以下方法获得这样的番茄植物:将其代表性种子为依据保藏号 NCIMB 41626、NCIMB 41627、NCIMB 41628、NCIMB 41629、NCIMB 41630 或 NCIMB 41631 保藏于 NCIMB 的植物与未显示出该性状的植物杂交,以获得 F1 群;使来自 F1 群的植物自花受粉,以获得 F2 群;防止 F2 植物传粉并且使果实形成;和选择产生果实的植物作为显示出不依赖于受精的果实形成的植物。本发明进一步涉及单性结实果实、植物的种子和植物的繁殖材料。

1. 其代表性种子依据保藏号 NCIMB41626、NCIMB41627、NCIMB41628、NCIMB41629、NCIMB41630 或 NCIMB41631 保藏于 NCIMB 的番茄植物在产生包含不依赖于受精的果实形成性状的番茄植物中的用途。

2. 如权利要求 1 中所要求的用途,其中所述包含不依赖于受精的果实形成性状的番茄植物是通过从其代表性种子依据保藏号 NCIMB41626、NCIMB41627、NCIMB41628、NCIMB41629、NCIMB41630 或 NCIMB41631 保藏于 NCIMB 的植物渐渗所述性状产生的。

3. 如权利要求 1 或 2 中所要求的用途,其中不依赖于受精而形成的果实基本上没有显示出负面多效性作用。

4. 如权利要求 3 中所要求的用途,其中负面多效性作用选自中空的果实、畸形的果实和改变的叶子形态。

5. 如权利要求 1 或 2 中所要求的用途,其中不依赖于受精而形成的果实具有以下特征中的一个或多个:

- a) 大小基本上与受精后形成的果实的大小相似;
- b) 果实中存在胶质,并且至少几乎完全不存在种子;
- c) 着色和成熟过程与受精后形成的番茄果实相当。

6. 如权利要求 1 或 2 中所要求的用途,其中该番茄植物是杂种、双单倍体或近交体。

7. 如权利要求 1 或 2 中所要求的用途,其中不依赖于受精而形成的果实是至少 90% 无籽的。

8. 如权利要求 7 中的要求的用途,其中不依赖于受精而形成的果实是至少 95% 无籽的。

9. 如权利要求 8 中的要求的用途,其中不依赖于受精而形成的果实是至少 98% 无籽的。

10. 如权利要求 9 中的要求的用途,其中不依赖于受精而形成的果实是至少 99% 无籽的。

11. 如权利要求 10 中的要求的用途,其中不依赖于受精而形成的果实是 100% 无籽的。

12. 生产包括不依赖于受精的果实形成性状的番茄植物的方法,包括:

a) 将其代表性种子依据保藏号 NCIMB41626、NCIMB41627、NCIMB41628、NCIMB41629、NCIMB41630 或 NCIMB41631 保藏于 NCIMB 的植物与未显示出该性状的植物杂交,以获得 F1 群;

b) 使来自 F1 群的植物自花受精,以获得 F2 群;

c) 防止 F2 植物传粉并且使果实形成;和

d) 选择产生果实的植物作为显示出不依赖于受精的果实形成的植物。

13. 如权利要求 12 中所要求的方法,其中通过将花朵去雄来防止传粉。

14. 如权利要求 12 或 13 中所要求的方法,其中形成的果实基本上没有显示出负面多效性作用。

15. 如权利要求 14 中所要求的方法,其中负面多效性作用选自中空的果实、畸形的果实和改变的叶子形态。

16. 如权利要求 12 中所要求的方法,其中不依赖于受精而形成的果实具有以下特征中的一个或多个:

- a) 大小基本上与受精后形成的果实的大小相似;
- b) 果实中存在胶质,并且至少几乎完全不存在种子;

- c) 着色和成熟过程与受精后形成的番茄果实相当。
17. 如权利要求 12 中所要求的方法, 其中该番茄植物是杂种、双单倍体或近交体。
18. 如权利要求 12 中所要求的方法, 其中不依赖于受精而形成的果实是至少 90% 无籽的。
19. 如权利要求 18 中所要求的方法, 其中不依赖于受精而形成的果实是至少 95% 无籽的。
20. 如权利要求 19 中所要求的方法, 其中不依赖于受精而形成的果实是至少 98% 无籽的。
21. 如权利要求 20 中所要求的方法, 其中不依赖于受精而形成的果实是至少 99% 无籽的。
22. 如权利要求 21 中所要求的方法, 其中不依赖于受精而形成的果实是 100% 无籽的。
23. 食品, 包括通过权利要求 12-22 任一项中所要求的方法生产的番茄植物的果实, 或其部分。
24. 如权利要求 23 中所要求的食品, 包括加工形式的通过如权利要求 12-22 任一项中所要求的方法生产的番茄植物的果实。
25. 在其基因组中具有导致不依赖于受精的果实形成性状的表型表达的遗传信息的细胞用于生产包含不依赖于受精的果实形成性状的番茄植物的用途, 所述遗传信息存在于其代表性种子依据保藏号 NCIMB41626、NCIMB41627、NCIMB41628、NCIMB41629、NCIMB41630 或 NCIMB41631 保藏于 NCIMB 的番茄植物中。
26. 在其基因组中具有导致不依赖于受精的果实形成的遗传信息的组织培养物用于生产包含不依赖于受精的果实形成性状的番茄植物的用途, 所述遗传信息存在于其代表性种子依据保藏号 NCIMB41626、NCIMB41627、NCIMB41628、NCIMB41629、NCIMB41630 或 NCIMB41631 保藏于 NCIMB 的番茄植物中。
27. 如权利要求 1-11 的任一项中所定义的植物的种质在生产包含不依赖于受精的果实形成性状的番茄植物中的用途。

## 不依赖于受精的番茄的果实形成

### 发明领域

[0001] 本发明涉及植物和植物部分,特别是果实状蔬菜,关于它们的果实形成模式进行了改变。更特别地,本发明涉及显示出果实形成不依赖于受精的番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 植物。该果实形成模式常常称为单性结实。本发明还涉及能够生长成显示出依赖于受精的果实形成的植物的种子。

[0002] 本发明进一步涉及获得所述具有改变的基因型的植物及其种子的方法,所述植物及其种子显示出改变的不依赖于受精的果实形成模式。

### [0003] 发明背景

[0004] 果实状蔬菜如番茄的育种针对最优地适于专业生产环境的商业品种的生产,以便产生适于销售的产品。在选择过程中,需要考虑许多涉及输入和输出性状的特征。在这方面非常重要的性状之一涉及果实形成,特别是在不利环境条件(如高温或低温和干旱)下的果实形成。这样的条件对于正常的传粉可能是有害的,并因此对受精是有害的,这会导致差的果实形成,并且因此造成产率损失。当不依赖于受精的果实形成或单性结实利用为性状时,可以明显促进经济上更有效的番茄果实生产是重要的特征。

[0005] 除了有助于收成保证性,单性结实对于果实品质也是重要的。已经提及单性结实的番茄果实与结籽的果实相比具有更好的风味以及更高的干物质含量。较高水平的可溶性固体对于加工用于酱生产的工业中的番茄尤其重要。此外,这样的果实对于鲜切工业是有利的,鲜切工业需要不会渗漏的坚实果实。此外,需要从果实中除去种子的工业或家庭应用可以从单性结实得到很大益处。

[0006] 果实形成通常依赖于受精。受精是其中胚珠内所含的卵细胞和中央细胞与通过花粉管递送的精细胞融合的过程。这种所谓双受精作用是这样一步骤,其引发一连串导致胚芽和胚乳形成并最终导致成熟种子形成的事件。发育中的种子和周围的组织产生刺激胚珠长大并且发育成肉质果的信号。

[0007] 显然,受精产生了一定的发育障碍,其阻止果实形成。这种机制确保果实形成要依赖于种子的形成,这表明了种子散布的生物学作用。然而,在果实形成的最初步骤中起作用的生理学和分子事件的知识是不完整的。已经广泛证明了涉及植物激素生长素和赤霉素,尽管它们的精确作用仍然是难以捉摸的。包括番茄的许多植物物种中,生长素或赤霉素应用至未受精胚珠导致了果实形成。事实上,当温室条件不是最理想的时候在实践中应用这些激素来改善果实形成。尽管生长素和赤霉素的应用具有一些实践价值,但是其提高了成本并且可能导致果实形状的不规则性。除了这些外部影响,还认为激素生长素和赤霉素在受精依赖性果实形成过程中也起着作用,尽管不清楚哪个组织是这些激素的实际来源。此外,这些激素的等级以及下游调控网络在很大程度上仍然是未知的。其他激素,如细胞分裂素、脱落酸、乙烯和油菜素甾醇类似乎在果实形成中也起着作用。

[0008] 看来很可能在受精依赖性果实形成中涉及许多基因。然而,在这方面,目前只有几个基因得到了表征。例如,番茄的 DGT(横生)、ARF7 和 IAA9 基因以及 AUCSIA 基因已经得到了详细表征。在拟南芥中,已经描述了 *fwf* 突变体,其在 ARF8 基因中含有突变,其导致单

性结实长角果的形成。已经提出了在受精时形成的生长素可提高抑制 ARF8 活性,其导致果实形成的响应。ARF8 基因中的遗传损伤可以刺激生长素关于 ARF8 灭活的作用。尽管在果实形成中所涉及的大多数基因仍然有待发现,一般的概念是胚珠长成果实得到有效抑制,直至传粉和受精发生。

[0009] 已经描述了许多番茄的突变,其显示了某种形式的单性结实。pat 突变体已经被描述为单性结实的,尽管该突变体具有多效性作用,如短花药(同源转化)、异常雄蕊和低繁殖力。因此,pat 突变体尚未在用于单性结实品种研发的商业育种中实施。

[0010] 用于番茄单性结实的另一个潜在遗传资源是 pat2 突变体。该突变与依赖于遗传背景的植物生长特征相互作用,这使得该突变不能广泛地应用。

[0011] 此外,已经描述了 pat3/pat4 突变体,其是多基因的,并且其显示出减小的果实大小。

[0012] 天然突变的不良副作用刺激了对实现番茄单性结实的转基因方法的研究。实际上对于番茄已经描述了不同的转基因方法,其中已经成功实现了单性结实。这些方法中的许多干扰生长素动态平衡或信号传导。在胚珠特异性启动子(如 DefH9)的控制下,生长素生物合成基因 *iaaM* 的超表达导致果实的单性结实生长。这样的方法需要微调,这意味着,对于正常的果实长大,需要最佳的生长素产生水平。

[0013] 生长素响应因子 S1AFR7 或 S1ARF8 或信号传导因子 S1IAA9 的下调导致单性结实。此外,所谓的 AUCSIA 基因的下调导致果实的单性结实生长。在大多数情况下,观察到强烈的多效性作用,如中空、畸形的果实或改变的叶子形态。

[0014] 对赤霉素信号传导的转基因干扰也能够导致单性结实。例如, S1De11a 基因表达的下调导致单性结实,尽管在这种情况下,也观察到对果实和叶子的强烈多效性作用。通过转基因产生番茄单性结实其他实例是通过查耳酮合成酶基因或 MADS 盒基因 TM8 和 TM29 表达的下调。在这些实例中,也观察到强烈的多效性作用。

[0015] 这些实例表明干扰果实发育的不同方法能够导致某种形式的单性结实,即,果实形成的开始与受精胚珠所产生的引发剂是分开的。然而,在许多情况下,所得到的植物显示出多效性作用,当干扰激素功能时,看来这是明显的。因此,对于番茄单性结实的遗传资源存在着强烈需求,这些资源使得果实的形成不依赖于受精并且其不会导致强烈的负面多效性作用。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明的目的是改善显示出不依赖于受精的果实形成的番茄突变体。本发明进一步的目的是改善不依赖于受精的果实形成,而对植物的生长和发育没有负面多效性作用。

[0018] 因此,本发明涉及显示出不依赖于受精的果实形成的番茄植物 (*Solanum lycopersicum* L.),可通过将第一番茄亲本植物与第二番茄亲本植物杂交获得,其中亲本之一是从其代表性样品依据表 1 中所列 NCIMB 保藏号之一保藏的种子生长得到的植物或其后代植物,并且选自显示出不依赖于受精的果实形成的杂交番茄植物的后代。从中进行选择的后代适宜地是 F2 代。

[0019] 本发明的番茄植物基本上不显示多效性作用。不依赖于受精而形成的果实具有以下特征中的一个或多个:

[0020] a) 大小基本上与受精后形成的果实的大小相似;

- [0021] b) 果实中存在胶质,并且至少几乎完全不存在种子;
- [0022] c) 着色和成熟过程与受精后形成的番茄果实相当。
- [0023] 六个代表性突变体的M4的种子于2009年6月19日保藏于NCIMB Ltd. (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen, AB219YA)。
- [0024] 表1显示了保藏号。
- [0025] 表1
- [0026] 单性结实番茄突变体的保藏号
- [0027]

名称	突变体编号(内部命名)	NCIMB 编号
<i>Solanum lycopersicum</i>	1667 (M4 1667-09R. 452400)	NCIMB 41626
<i>Solanum lycopersicum</i>	2019 (M4 2019-09R. 452500)	NCIMB 41627
<i>Solanum lycopersicum</i>	3475 (M4 3475-09R. 452800)	NCIMB 41628
<i>Solanum lycopersicum</i>	5364 (M4 5364-09R. 453200)	NCIMB 41629
<i>Solanum lycopersicum</i>	5879 (M4 5879-09R. 453500)	NCIMB 41630
<i>Solanum lycopersicum</i>	6162 (M4 6162-09R. 453700)	NCIMB 41631

- [0028] 可以通过突变方法来获得本发明的显示出不依赖于受精的果实形成的植物,特别是没有多效性作用,该方法包括:
- [0029] a) 用诱变剂处理待改变的番茄植物物种的M0种子,以获得M1种子;
- [0030] b) 从由此获得的M1种子种植植物,以获得M1植物;
- [0031] c) 任选地重复步骤b)和c)n次,以获得M1+n种子;
- [0032] d) 在温室中,在实际生长条件下使由此获得的M1+n种子发芽,并且通过去雄防止花朵的传粉;和
- [0033] e) 选择显示出从去雄的花朵长出果实的植物。
- [0034] 通过化学诱变合适地诱发突变,该化学诱变可以通过使种子与一种或多种诱变剂接触来进行,所述诱变剂特别是烷基化诱变剂,如甲烷磺酸乙酯(ems)、硫酸二乙酯(des)、乙撑亚胺(ei)、丙烷磺内酯、N-甲基-N-亚硝基尿烷(mnu)、N-亚硝基-N-甲脒(NMU)、N-乙基-N-亚硝基脒(enu)、叠氮化钠。
- [0035] 或者,通过辐射来诱发突变,该辐射例如选自x-射线、快中子、UV辐射。
- [0036] 还可以通过遗传工程,如通过使用嵌合寡核苷酸、同源重组、引入与内源性产物竞争的修饰的靶基因、通过RNA干扰下调、人造微RNA等来诱发突变。
- [0037] 根据本发明,果实的特征在于大小与受精花朵的果实相似,果实通常充满胶质,但不存在种子,果实显示出正常的着色和成熟过程。
- [0038] 由于单性结实是偶发的并且只在去雄时或植物是雄性不育或使得植物雄性不育

时才会发生,因此可以通过自花传粉来产生本发明的植物的种子。

[0039] 优选地,本发明的方法进一步包括使不依赖于受精的果实形成的等位基因渐增,而没有多效性作用。

[0040] 本发明进一步涉及用于获得具有改变的基因型的植物或植物部分的方法,该植物或植物部分显示出不依赖于受精的果实形成,而没有多效性作用。

[0041] 本发明的植物或植物部分在其基因组中具有负责不依赖于受精的果实形成而没有多效性作用的遗传信息。该遗传信息存在于保藏的种子中,并且可以通过各种方法,例如杂交和选择或通过分子技术引入到其他植物中。

[0042] 所要求的植物的后代也是本发明的一部分。后代不仅是第一代而且是所有进一步的世代,只要保留不依赖于受精的果实形成。后代通常具有如下祖先,其是具有产生不依赖于受精果实的能力的植物,如在来自保藏种子的植物中所发现的。祖先不仅包括恰在植物之前的那一代,而且还包括之前的多代。更特别地,该祖先是来自保藏种子的植物或从其派生的进一步的世代。

[0043] 发明详述

[0044] 番茄果实的形成是一种涉及许多基因的受到强烈调控的发育过程。启动果实发育的主要引发剂是受精。受精产生信号,该信号通过其空间和时间活性导致胚珠生长,其最终形成可采收的果实。推断还可以通过基因中的遗传损伤来移除通常通过受精相关过程而提升的障碍,所述基因中的遗传损伤在限制受精发生前的果实生长中具有特定的作用。到目前为止的大多数研究干扰激素动态平衡和信号传导中所涉及的遗传因素。因为植物激素与发育功能的过剩有关,因此多效性的风险看来是显著的。

[0045] 果实形成中所涉及的大多数基因是目前未知的。在导致本发明的研究中,因此决定采取一种不偏性方法,其中在番茄中应用了随机遗传改变。这种不偏性方法包括化学或物理随机诱变程序,并与有效的表型选择程序结合。通过在某些条件下种植植物来实现这种选择程序,在所述条件中,可以监控单性结实潜能,以此可以鉴定已经获得了不依赖于受精的果实形成且没有多效性作用的那些突变体。这种筛选方法的明显优势是可以直接监控性状的特性,即,就大小、性状、胶质形成和成熟而言,可以明确地判断营养性发育以及无种子果实的正常生长。

[0046] 因此,所采用的方法包括以下步骤:

[0047] 1. 通过用诱变剂(如甲烷磺酸乙酯(ems))处理种子或植物组织来产生突变群。

[0048] 2. 建立有效的表型筛选,其中该筛选是基于去雄花朵的果实形成,去雄完全阻止了传粉并因此阻止了受精。果实是没有种子的,并且就它们的大小、形状、胶质形成和成熟而言,与未处理的几乎同基因的对照植物相当。

[0049] 3. 选定的突变体关于单性结实、大小、形状、胶质形成和成熟以及不存在多效性作用的表征。

[0050] 为了形成遗传变异性,可以使用诱导的突变。本领域技术人员已知几种化学或物理处理可以用来诱导植物品种(如番茄)中的遗传突变。例如,可以在含有不同浓度的诱变剂(如ems)的溶液中处理番茄的种子。Ems主要烷基化DNA链的G残基,这在DNA复制过程中,引起与T的配对,替代了C。因此,GC碱基对以有效剂量的ems和植物的错配修复系统的活性决定的频率变成了AT碱基对。Ems的有效剂量取决于所用的浓度、种子大小和

其他物理特性,以及种子在 ems 溶液中的培养时间。

[0051] 通常将已经用 ems 处理过的种子称为 M1 种子。作为处理的结果, M1 种子的组织在其细胞的基因组中含有随机的点突变,并且存在于将形成种系组织(生发细胞)的细胞亚群中的那些将传递至称为 M2 的下一代。其单倍不足以引起不育性或诱导胚芽致死性的突变或其组合将不会传递至 M2 代中。如上对于使用 ems 所述的相似程序也适用于其他诱变剂。M2 群可以用于针对降低的黄化秧苗的三重反应的筛选程序中。本领域技术人员清楚任何携带遗传改变的番茄植物种群可以用作这样的表型筛选的起始材料。

[0052] 为了确定突变的番茄植物的去雄花朵的响应,使用了正常的温室,其中种植和栽培了 7000 株突变的植物,就营养、修剪和害虫控制而言,使用实践条件。当头两个花团的正常果实形成后,将下一个花团的花朵全部去雄。定时监控去雄花朵的果实生长。在已经产生了果实形成的那些情况下,检查果实不存在种子以及它们的大小、形状、胶质形成和成熟。

[0053] 令人惊讶地发现了可以鉴定到低频率的显示出不依赖于受精的果实形成且没有任何多效性作用的突变体。此外,果实是没有种子的,并且就大小、形状、胶质形成和成熟而言,与受精的对照果实相当。将以这种方式鉴定出的单性结实突变体自交时,获得了正常的产生种子的果实。因此,通过这种方法鉴定的单性结实性状是偶发的。

[0054] 为了证实所鉴定的突变体的单性结实性状的遗传性质,在与用于最初筛选相似的条件种植采收的 M3 种子。最初鉴定的单性结实突变体再次显示出大小、形状、胶质形成和成熟与受精的对照果实相当的无种子果实。这证实了通过本发明所述的方法鉴定的单性结实突变体的遗传性质。

[0055] 尽管所鉴定的单性结实突变体是相当的,观察到的较小差异反映出影响最初群体中的这种性状的不同突变基因座或相同基因座的不同等位基因形式的存在。

[0056] 在隐性突变的情况下,可以通过进行等位性试验来容易地区分这两种可能性,该试验包括将两种应当是或应当形成纯合的突变事件杂交,并测定杂交体的表型。在突变的等位性情况下,单性结实果实发育在 F1 中是明显的,而在通过不同隐性基因座决定突变体表型的情况下,将不会是这种情况。在具有显性突变的一个事件和具有隐性突变的一个事件的情况下,这两者之间的 F1 显示出单性结实性状,但当性状在 F2 中分离时,显示出突变不是等位的。当两个事件的突变是显性时,那么 F1 显示出单性结实性状,并且如果它们不是等位的,该性状在 F2 中分离,但如果存在突变的等位性,则全部 F2 将表达该性状。

[0057] 因为应用随机突变来产生起始群,因此在实验条件下,遗传背景中的突变也有助于植物表型的改变。为了区分遗传背景中的不同强度的单个突变和突变的结合作用,进行回交来形成统一的遗传背景,用于不同的单性结实事件。为了测定单性结实中涉及的特定基因座的突变是否展示出多效性作用,这样的程序进一步相关。

[0058] 在一个实施方案中,由本发明的植物产生的单性结实果实与受精后形成的果实相比,是至少 80% 无籽的。

[0059] 在一个实施方案中,由本发明的植物产生的单性结实果实与受精后形成的果实相比,是至少 90% 无籽的。

[0060] 在一个实施方案中,由本发明的植物产生的单性结实果实与受精后形成的果实相比,是至少 95% 无籽的。

[0061] 在一个实施方案中,由本发明的植物产生的单性结实果实与受精后形成的果实相

比,是至少 99%无籽的。

[0062] 在一个实施方案中,由本发明的植物产生的单性结实果实与受精后形成的果实相比,是 100%无籽的。

[0063] 在一个实施方案中,本发明涉及显示出不依赖于受精的或单性结实果实形成性状的番茄植物,其中通过将依据表 1 中所列的任一个保藏号保藏于 NCIMB 的种子长出的植物进行渐渗来获得所述性状。

[0064] 在一个实施方案中,本发明涉及显示出不依赖于受精的或单性结实果实形成性状的番茄植物,其中通过从依据表 1 中所列的任一个保藏号保藏于 NCIMB 的种子长出的植物来渐渗现象所述性状。

[0065] 如在此所用的“渐渗现象”旨在表示通过杂交、回交和选择将性状引入不带有该性状的植物中。

[0066] 应当注意到如果明确限定了一个或多个选择标准,本领域技术人员将能够鉴定任何更多世代中携带该性状的后代。对于本发明的性状,可以通过种植来自最初的杂交和自花受粉步骤得到的种子的 F2 植物,防止由此获得的植物传粉并选择产生与显示出单性结实果实形成的植物一样的果实的植物来鉴定未携带单性结实果实形成性状的植物与携带如依据表 1 中所列的任一个保藏号保藏的代表性种子的植物中所发现的单性结实果实形成性状的植物之间杂交的后代。

[0067] 在一个实施方案中,本发明涉及包括不依赖于受精的果实形成性状的番茄植物,该植物可以通过以下方法获得:

[0068] a) 将其代表性种子为依据保藏号 NCIMB 41626、NCIMB 41627、NCIMB41628、NCIMB 41629、NCIMB 41630 或 NCIMB 41631 保藏于 NCIMB 的植物与未显示出该性状的植物杂交,以获得 F1 群;

[0069] b) 使来自 F1 群的植物自花受粉,以获得 F2 群;

[0070] c) 防止 F2 植物传粉并且使果实形成;和

[0071] d) 选择产生果实的植物作为显示出不依赖于受精的果实形成的植物。

[0072] 可以以各种方式来防止传粉。首先是可以将花朵去雄。

[0073] 作为替换方案,以上方法的步骤 a) 中所用的携带单性结实性状的植物可以是或可以形成雄性不育,特别是遗传上雄性不育 (GMS) 或细胞质雄性不育 (CMS)。这样的 GMS 植物不是从保藏的种子直接种植得到的植物,但携带与从保藏的种子种植得到的植物中发现的一样的单性结实性状。因此,可以通过使用步骤 a) 中对于雄性不育纯合的番茄植物来防止以上方法的步骤 c) 中的传粉,并且选择 F2 中的雄性不育植物,作为防止传粉的方法。

[0074] 使用以下测试可以测定显示出单性结实果实形成的植物的基因组中负责本发明性状的遗传信息是否存在,即,不依赖于受精的果实形成。待测试的植物对负责不依赖于受精的果实形成的遗传信息应当是或应当形成纯合的。本领域技术人员知道怎样获得对待测试性状纯合的植物。

[0075] 然后将该植物与携带负责纯合状态的本发明性状的遗传信息的测交植物杂交。如果作为负责本发明性状的相同遗传信息的结果,待测试的植物具有不依赖于受精的果实形成,则第一代杂种和连续世代的所有后代植物将表达该性状。如果待测试植物的不依赖于受精的果实形成是基因组不同部分的结果,例如,另一个基因或基因座,在第一代杂种和 /

或连续世代中将会发生分离。测交植物可以是携带纯合状态的本发明性状的任何植物，如从保藏的种子直接种植得到的植物或其保留性状的后代。

[0076] 在本发明的一个实施方案中，提供了一种番茄植物，其果实显示出不依赖于受精的果实形成，并且因此与从依据表 1 中所列的任一个保藏号保藏于 NCIMB 的包含本发明单性结实性状的种子种植得到的测交植物，或其包含单性结实性状（该性状包括于其代表性种子是依据表 1 中所列的任一个保藏号保藏于 NCIMB 的番茄植物中）的后代或当从其衍生并包含单性结实性状的植物杂交时，所述杂交的第一代后代 (F1) 的植物对于单性结实性状显示出 1:0 的分离。在测交植物和本发明的植物中，单性结实性状以纯合状态存在。如果通过自交获得，第二代和更多世代的植物对于不依赖于受精的果实形成也显示出 1:0 的分离。

[0077] 本发明的不依赖于受精的果实形成在番茄植物的基因组中具有遗传基础。使用上述的与测交植物的杂交，可以鉴定植物为本发明的植物。测交植物可以是其代表性种子是依据保藏号 NCIMB 41626、NCIMB 41627、NCIMB 41628、NCIMB 41629、NCIMB 41630 或 NCIMB 4163 保藏于 NCIMB 的任何植物。当任一个保藏植物中所含的负责单性结实性状的遗传信息存在于植物中时，植物就是本发明的植物。

[0078] 根据本发明的番茄植物尤其可以长成以下果实类型：牛番茄、樱桃番茄、什锦番茄、中间番茄、李形番茄、圆形番茄等。

[0079] 本发明进一步涉及本发明的番茄植物的种子和适于有性繁殖的植物其他部分，即，繁殖材料。这样的部分例如选自小孢子、花粉、子房、胚珠、胚囊和卵细胞。此外，本发明涉及适于营养繁殖的植物部分，特别是插条、根、茎、细胞、原生质体等。

[0080] 根据再一个方面，本发明提供了本发明的番茄植物的组织培养物。该组织培养物包括可再生细胞。这样的组织培养物可以源自叶子、花粉、胚芽、子叶、胚轴、分生细胞、根、根尖、花药、花朵、种子和茎。

[0081] 本发明还涉及本发明的番茄植物的后代。可以通过本发明的植物或其后代植物的有性或营养繁殖来产生这样的后代。再生的后代植物以其代表性种子得到保藏（表 1）的植物之一的相同或相似方式生长。这表示这样的后代具有对于本发明的番茄植物所述的相同特征。除此之外，可以改变植物的一个或多个其他特征。例如通过诱变或通过用转基因转化来实现这样的附加改变。

[0082] 如在此所用的，词语“后代”用来表示与显示出不依赖于受精的果实形成的本发明的植物杂交产生的子代或第一代和所有更多的后裔。本发明的后代是任何与携带导致不依赖于受精的果实形成的性状的本发明植物杂交的后裔。

[0083] “后代”还包括通过营养传代或繁殖从本发明的其他植物获得的携带本发明性状的植物。

[0084] 此外，本发明涉及杂交种子和生产杂交种子的方法，其包括将第一个亲本植物与第二个亲本植物杂交，并且采收所得到的杂交种子。在性状是隐性的情况下，两个亲本植物对于不依赖于受精的果实形成性状都需要是纯合的，使得杂交种子携带本发明的性状。它们对于其他性状不是必需统一的。

[0085] 显然提供本发明性状的亲本未必是从保藏的种子直接种植得到的。亲本也可以是来自种子的后代植物或是来自鉴定为具有或通过其他方式获得了本发明性状的种子的后

代植物。

[0086] 在一个实施方案中,本发明涉及携带本发明的性状的番茄植物和通过从合适的来源引入负责该性状的遗传信息(通过常规育种,或遗传改变,特别是通过同源转基因(cisgenesis)或转基因(transgenesis))获得所述性状的番茄植物。同源转基因是使用来自作物自身或来自性别相当的供体植物的编码(农业)性状的天然基因的植物的遗传改变。转基因是使用来自不可杂交的物种的基因或合成基因的植物的遗传改变。

[0087] 在一个实施方案中,通过从保藏的种子种植得到的植物或从其获得的有性或营养后代来形成获得遗传信息的来源。

[0088] 本发明还涉及本发明植物的种质。种质由生物体所有遗传的特征组成,并且根据本发明,至少包括本发明的不依赖于受精的果实形成性状。

[0089] 本发明进一步涉及显示出不依赖于受精的果实形成性状的番茄植物的细胞。这样的番茄植物的每个细胞携带导致所述性状的表型表达的遗传信息。细胞可以是单独的细胞或可以是番茄植物或番茄植物部分的一部分,如番茄果实。

[0090] 本发明还涉及通过本发明的植物产生的单性结实番茄果实。此外,本发明涉及番茄果实的一部分,和从番茄果实产生的加工产品,如酱、汁、汤、沙司等。

[0091] 在本说明书中,术语“单性结实”、“单性结实果实形成”和“不依赖于受精的果实形成”可互换使用。它们全部表示以一定方式阻止受精时形成的果实,特别是通过去雄或因为植物是雄性不育的,不管是遗传、细胞质或是化学的。

[0092] 将在以下的实施例中进一步说明本发明。这些实施例不以任何方式来限制本发明。在该实施例中,参照以下附图:

[0093] 图1:单性结实番茄突变体的果实的表型与对照的比较。图A显示了从阴性对照植物的传粉的(左)和去雄的花朵(右)长出的果实。与传粉果实得到的果实相比,去雄导致果实生长强烈下降。图B显示了单性结实突变体3475传粉(左)或去雄(右)时的果实。突变体显示了无种子果实的形成(参见以下的详细内容)。

[0094] 图2-11:单性结实突变体M41667-09R.452400(NCIMB 41626)、M42019-09R.452500(NCIMB 41627)、M43475-09R.452800(NCIMB41628)、M45364-09R.453200(NCIMB 41629)、M45879-09R.453500(NCIMB 41630)和M46162-09R.453700(NCIMB 41631)的果实的比较。左图显示了来自去雄花朵的果实,右图是受精的花朵。

## 实施例

[0095] 实施例1

[0096] 番茄通过甲烷磺酸乙酯(ems)的遗传改变

[0097] 通过在室温下将大约10,000粒种子浸入0.5%(w/v)ems的充气溶液中24小时,用ems处理番茄育种系TR306的种子。

[0098] 使处理过的种子发芽,并且在温室中种植所得到的植物,以产生M2种子。

[0099] 成熟后,采收M2种子,并且散装在一个集合中。将所得到的M2种子的集合作为起始材料来鉴定含有不依赖于受精的果实形成的单个M2植物。

[0100] 通过测定漂白植物的出现来评价遗传改变程序的效率,漂白植物表示了由于直接

或间接涉及叶绿素形成或累积的基因的改变而引起的叶绿素丧失。

#### [0101] 实施例 2

[0102] 已经获得了不依赖于受精的果实形成性状的番茄植物的鉴定

[0103] 将 M2 番茄种子在土壤钟发芽并且生长成小的植株。随后,将大约 7000 株随机选择的植物转移至温室钟,其中根据常规番茄栽培时间来进行培育。每株植物的头两个花团座果后,用手将第三个花团的所有花朵去雄,以防止传粉。定时监控植物,以确定哪个突变体显示出了不依赖于受精的果实形成。第一个标准是大小与相同植物上作为传粉和受精结果长出的正常有种子果实相似的果实的形成。作为第二个标准,选择不含有种子和通常充满胶质的果实。基于这些标准,选择了 3 株编号为 3475、5364 和 5879 的单性结实突变体,作为这次筛选中监控的 7000 株植物中的最好事件。选择的单性结实突变体的果实显示于图 1 中。

#### [0104] 实施例 3

[0105] 后代中不依赖于受精的果实形成的证实

[0106] 通过选定的编号为 1667、2019、3475、5364、5879 和 6162 的单性结实突变体的自花传粉来产生 M3 种子。根据常规番茄栽培实践,在温室中种植每个 M3 群中的总共 7 或 12 株植物。在该实验中包括了未显示出单性结实果实形成的 M2 植物作为阴性对照(图 2)。在每株植物上,用手将第三个花团的花朵去雄,并监控果实形成。观察到对于源自突变体 1667(图 3)、2019(图 4)、3475(图 5)、5364(图 7)、5879(图 9) 和 6162(图 11) 的 M3 群的每株植物,观察到去雄的花团显示出单性结实果实形成,即,果实显示出正常的大小、不含种子,通常充满胶质,并且显示出正常的成熟。这表明了通过本发明给出的方法鉴定的单性结实性状具有遗传基础。

[0107] 还通过插条繁殖了 3475、5364 和 5879 的 M2 植物。这些植物产生了显示出与相应的 M3 植物相同的果实特征的果实(各自为图 6、8 和 10)。

#### [0108] 实施例 4

[0109] F1 和 F2 代的产生

[0110] 为了证明本发明的不依赖于受精的果实形成性状还可以引入其他番茄类型中,与各种其他番茄系进行了杂交。所得到的 F1 和 / 或 F2 后代从去雄的花朵产生的果实在外观和特征上与相同植物的受精花朵长出的果实相似。

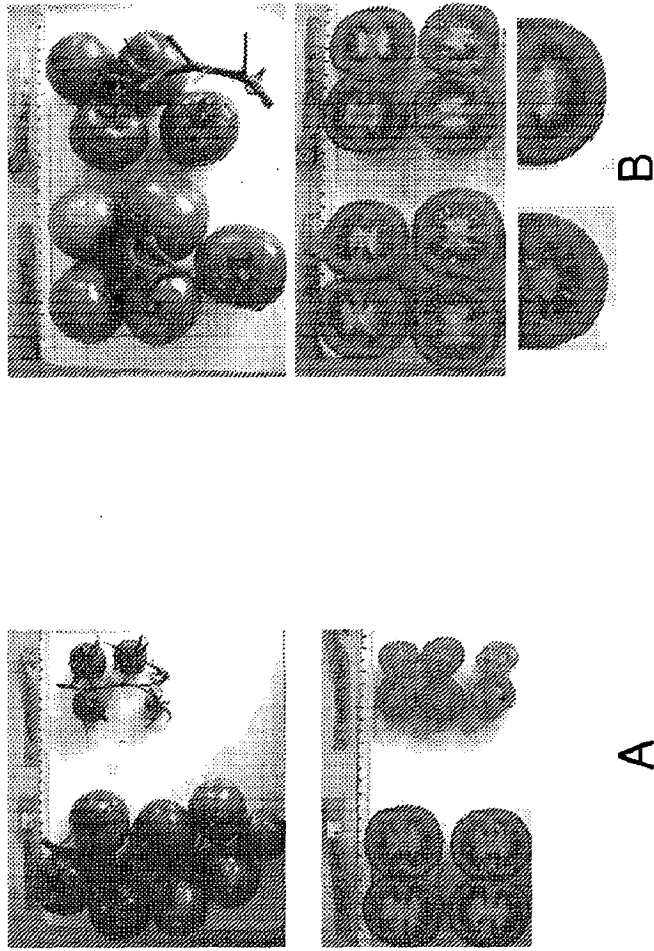
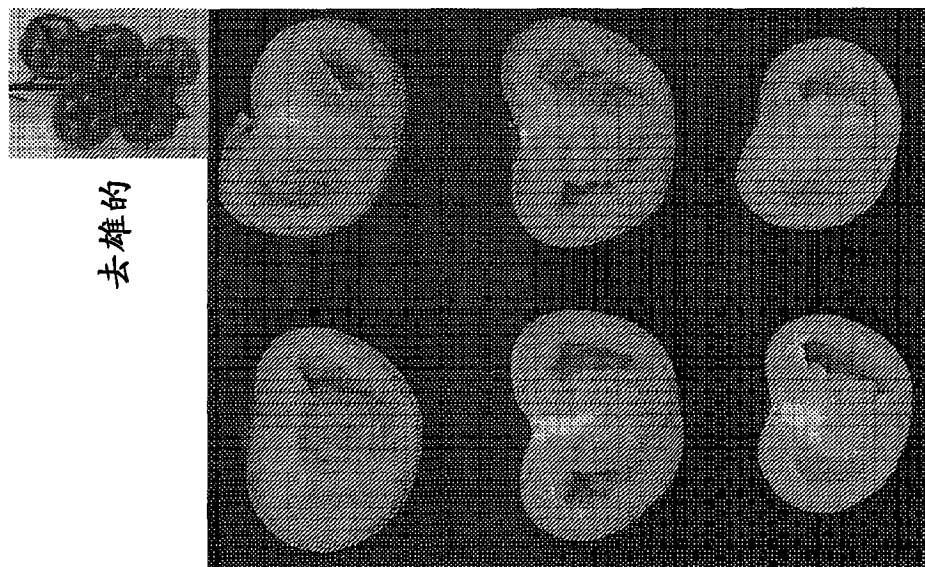


图 1

对照=未突变的背景基因型



去雄的	未去雄的
800,74	2416,90
100,78	42,55
面积 (mm <sup>2</sup> )	
标准偏差	

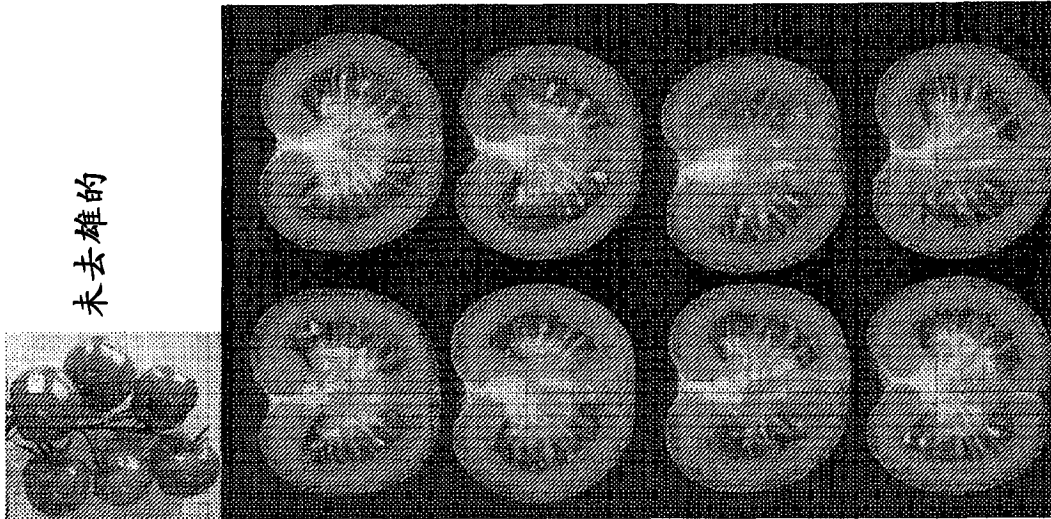
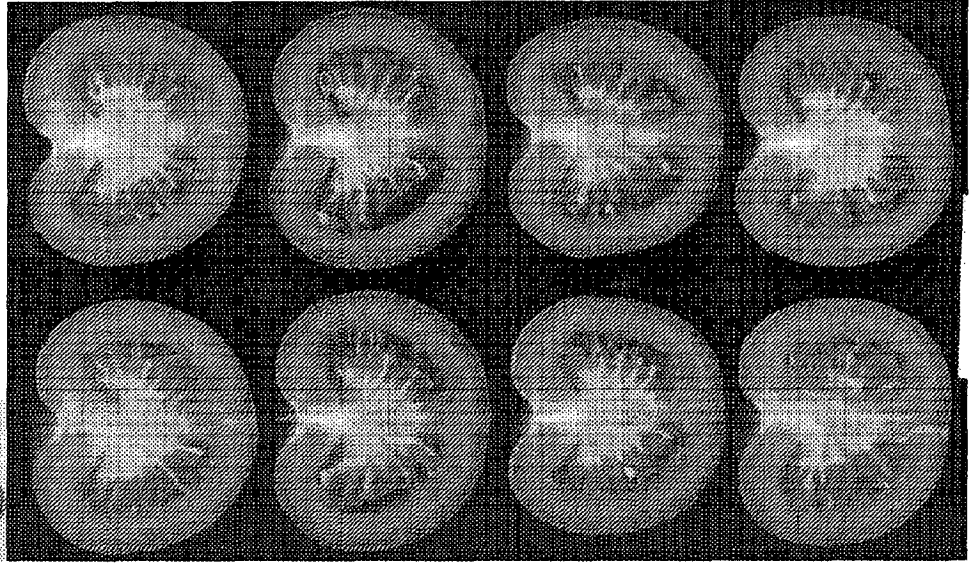
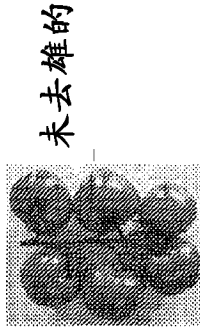
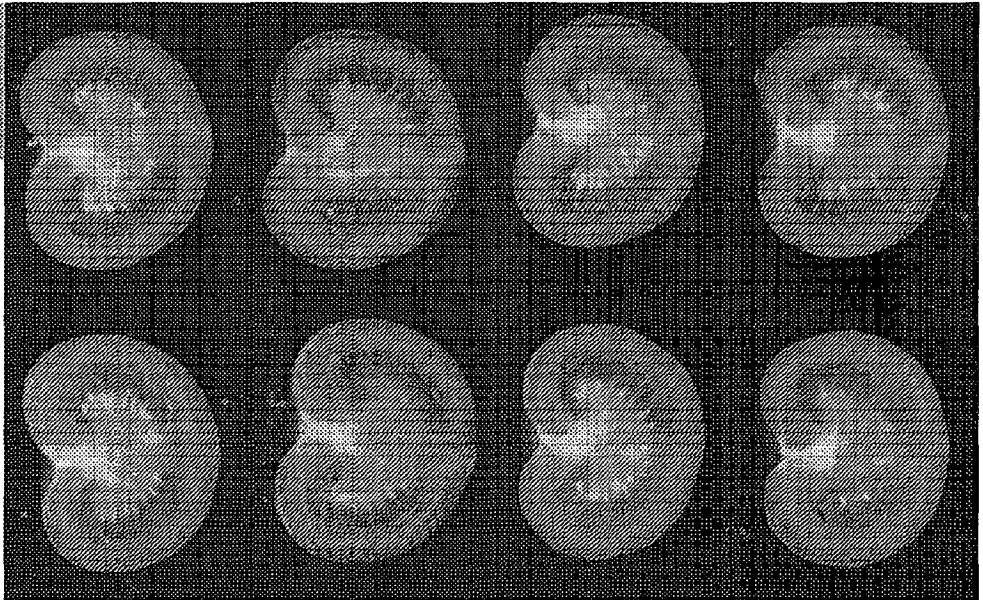
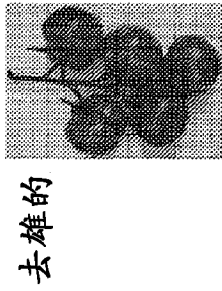


图 2

M3 1667



	去雄的	未去雄的
面积 (mm <sup>2</sup> )	1789.64	2778.92
标准偏差	62.45	85.24

图 3

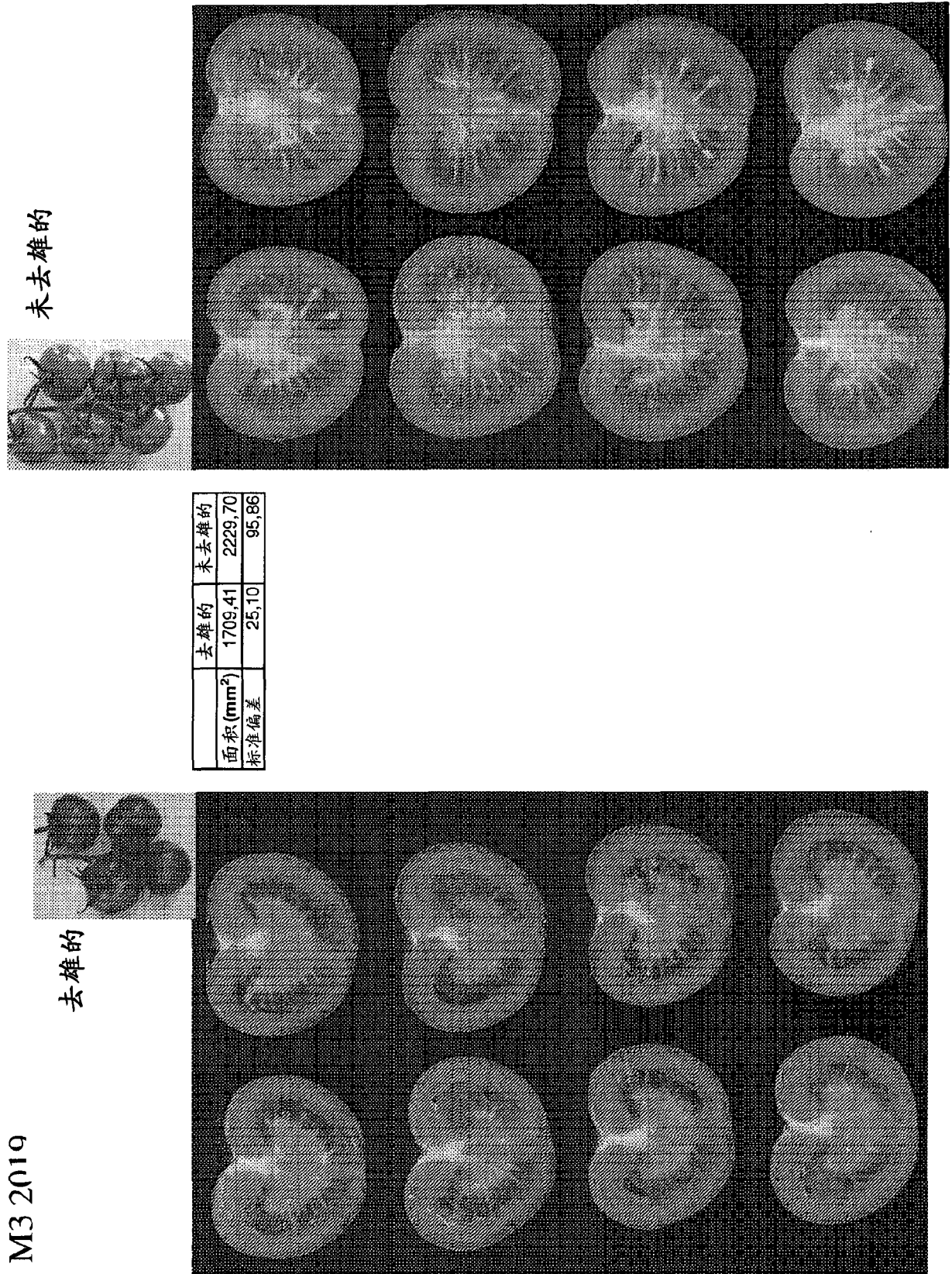
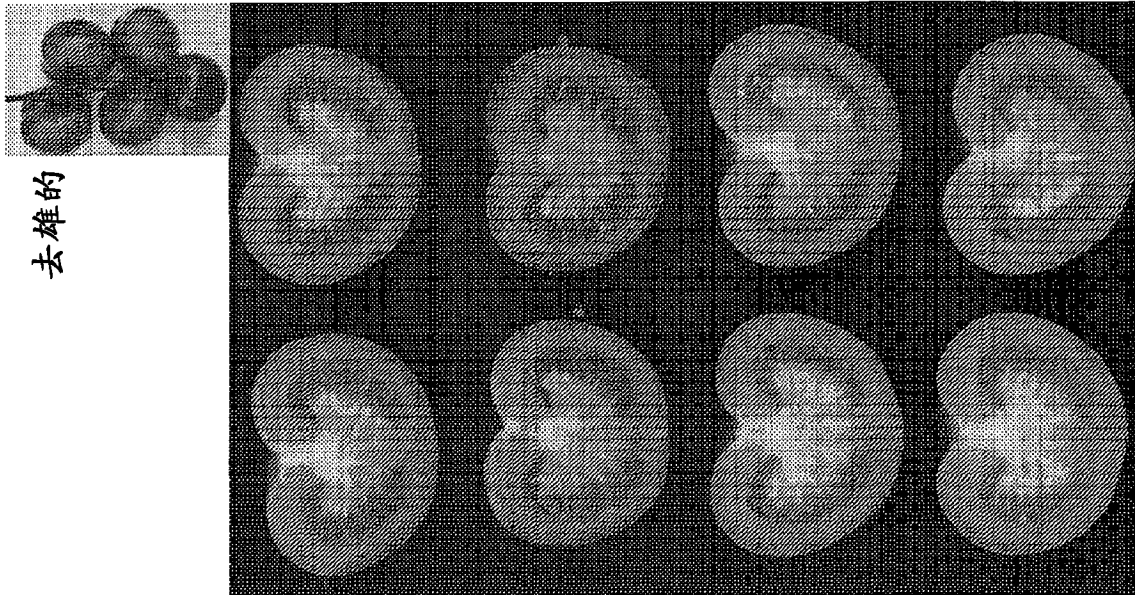
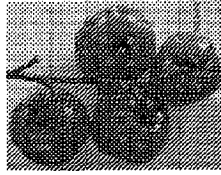


图 4

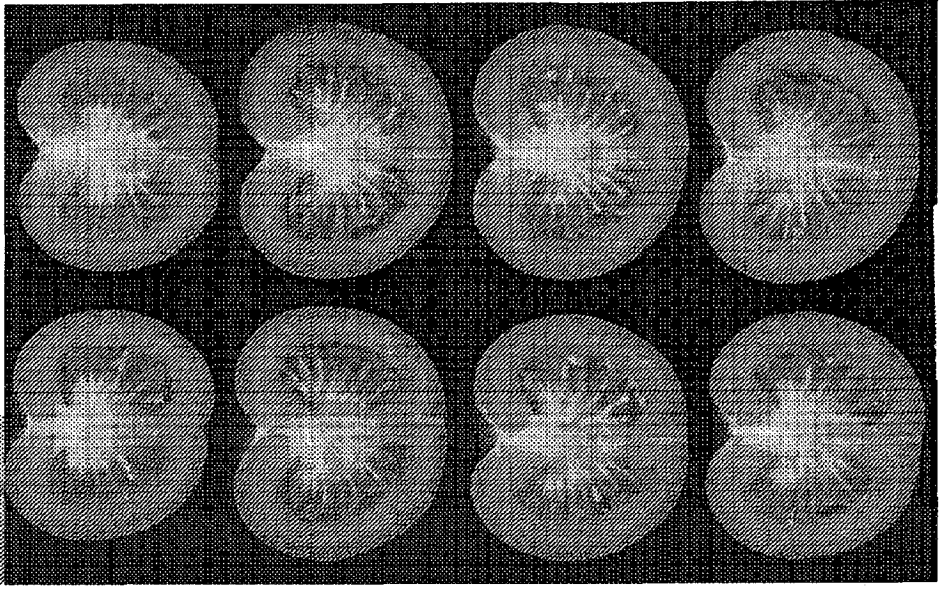
M3 3475



去雄的



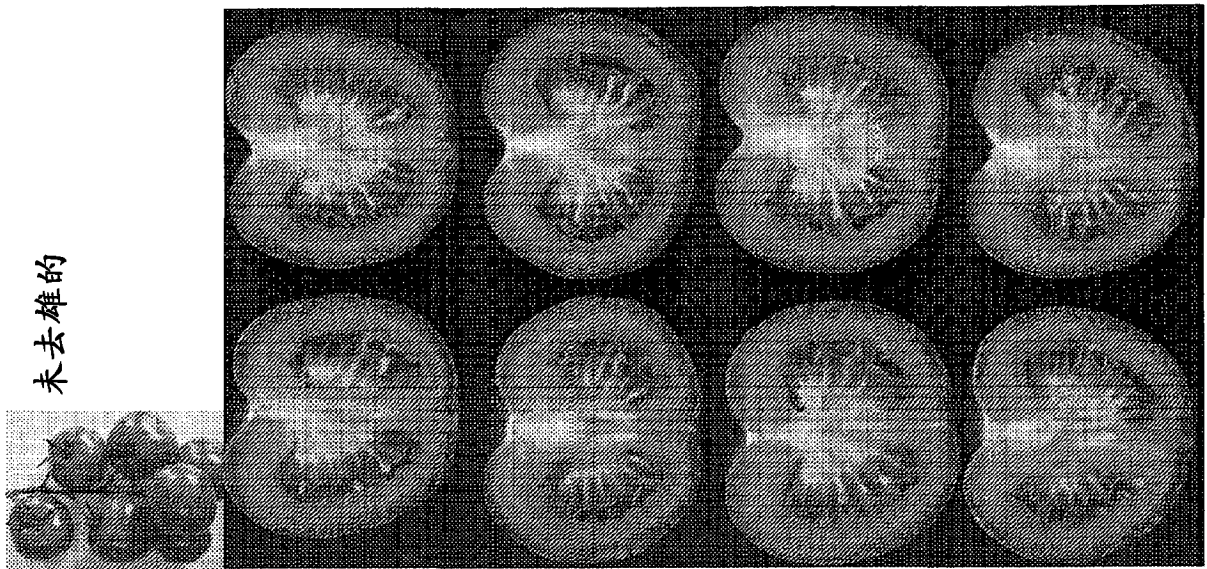
未去雄的



去雄的	未去雄的
1918,28	2861,30
面积(mm <sup>2</sup> )	
标准偏差	130,14
69,92	

图 5

M2 3475



面积(mm <sup>2</sup> )	去雄的	未去雄的
标准偏差	2137,68	2702,39
	83,29	102,89

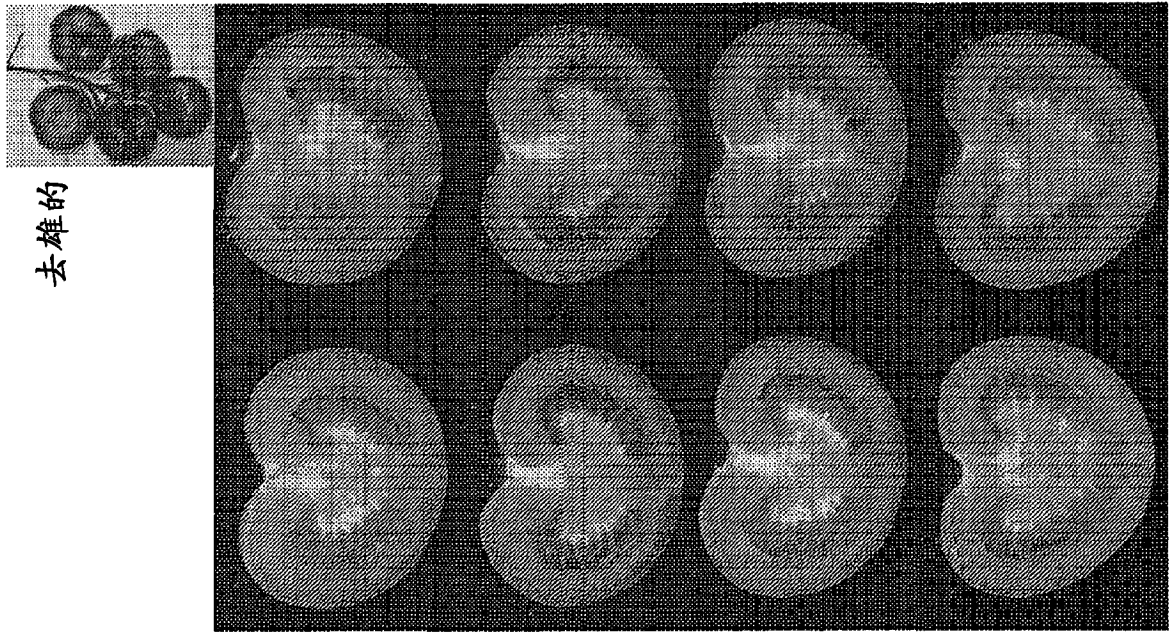
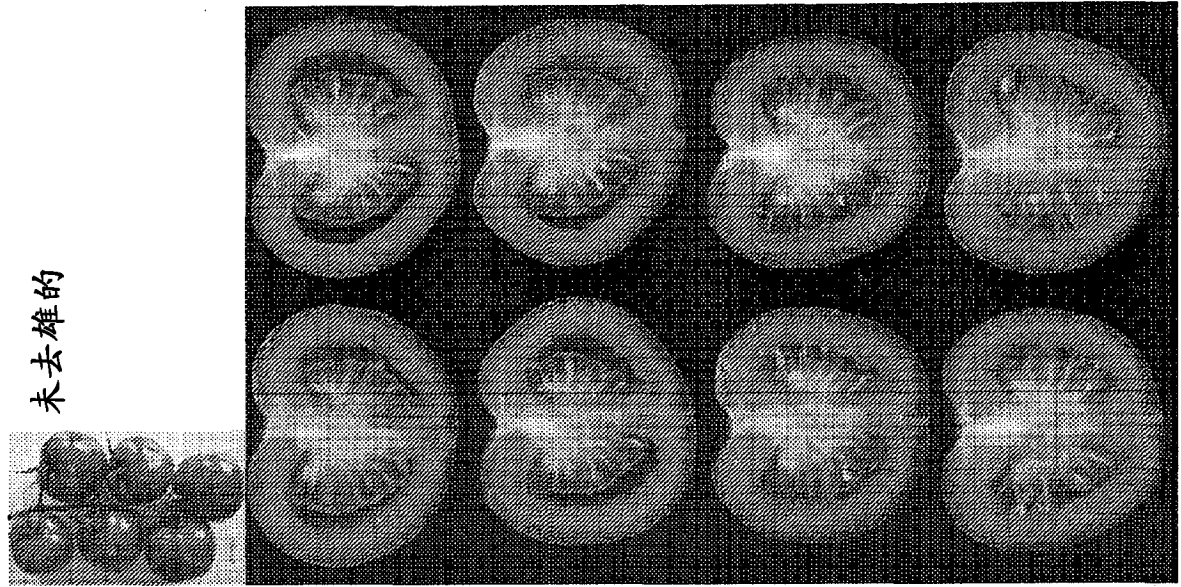


图 6

M3 5364



面积(mm <sup>2</sup> )	去雄的	未去雄的
标准偏差	1844,94	2642,87
	83,27	57,49

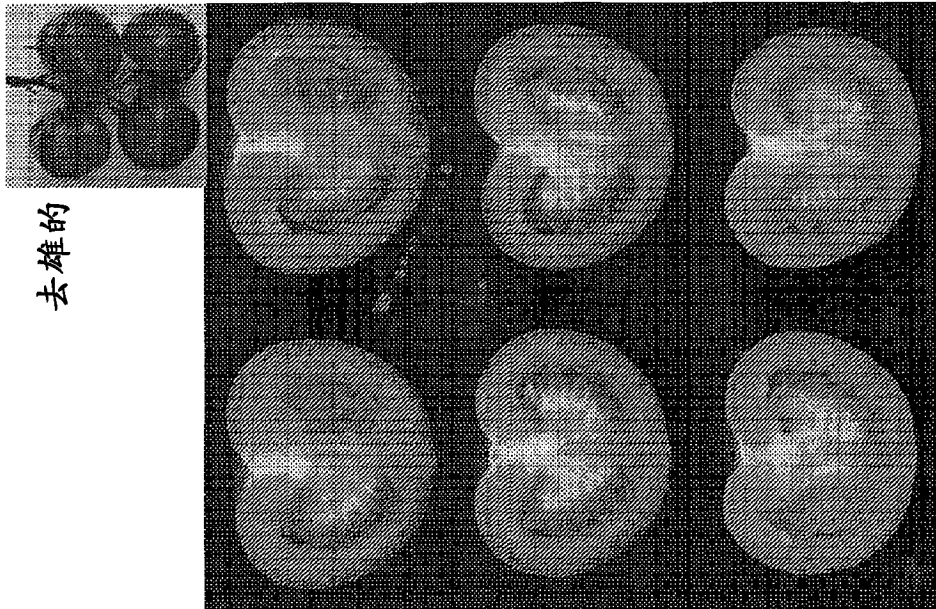
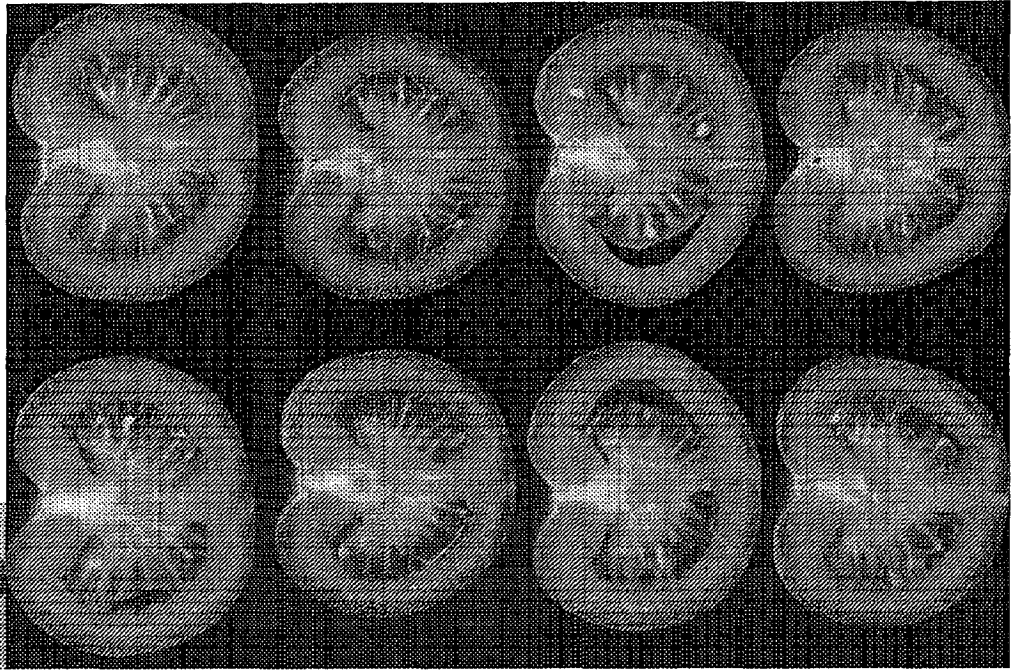


图 7

M2 5364

未去雄的



去雄的	未去雄的
2446,15	2846,86
面积 (mm <sup>2</sup> )	
133,25	169,40
标准偏差	

去雄的

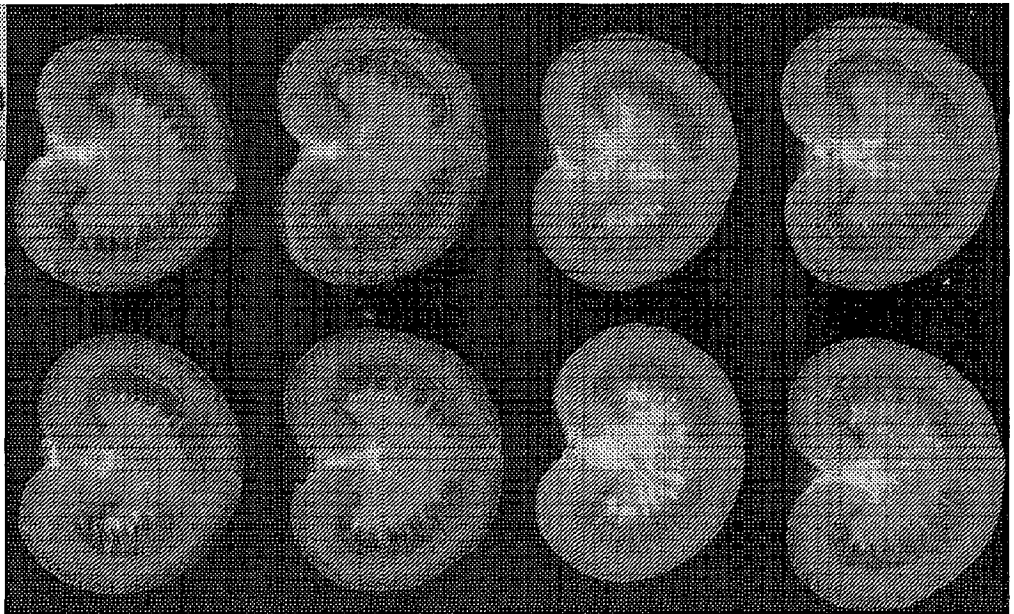


图 8

M3 5879

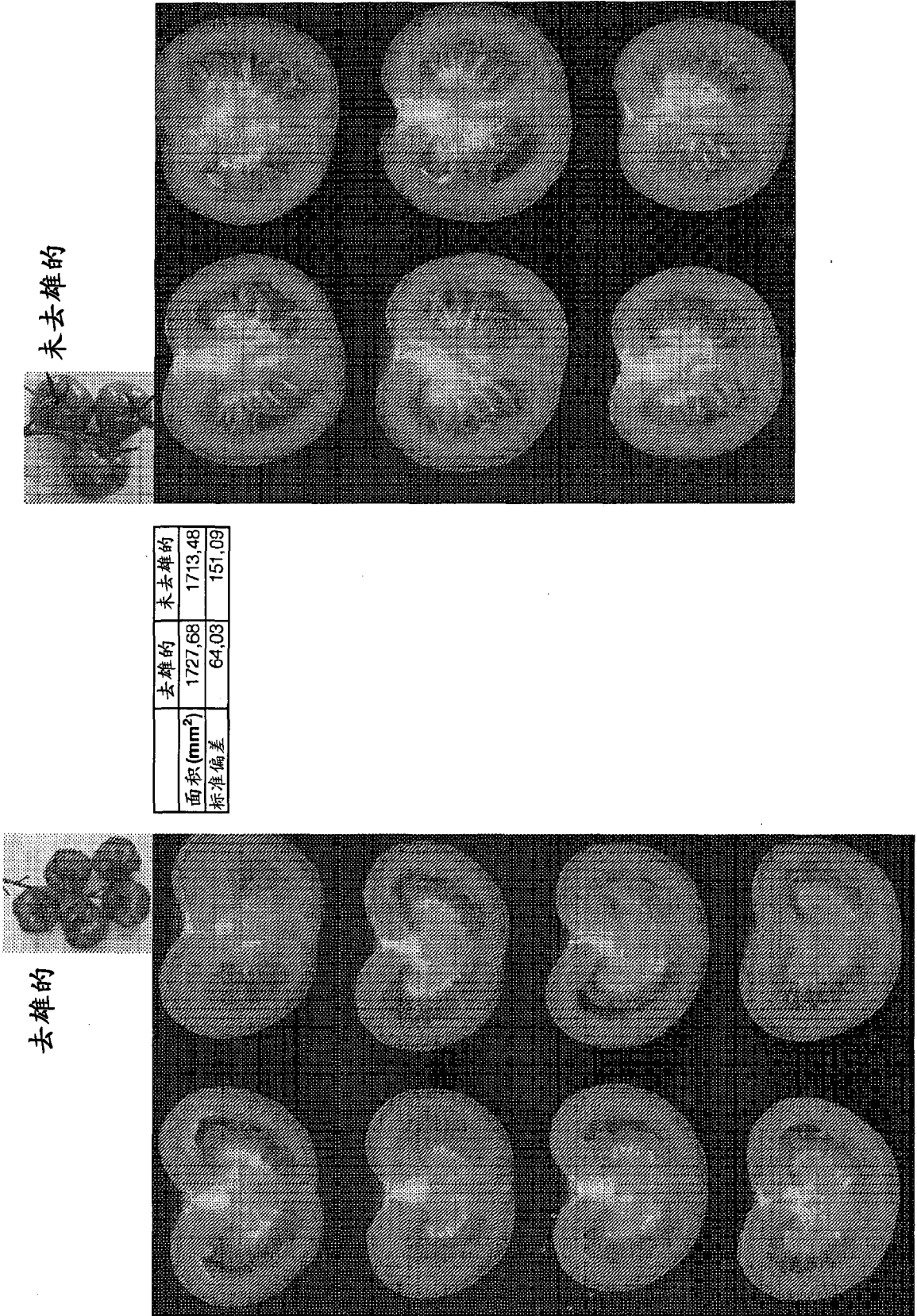
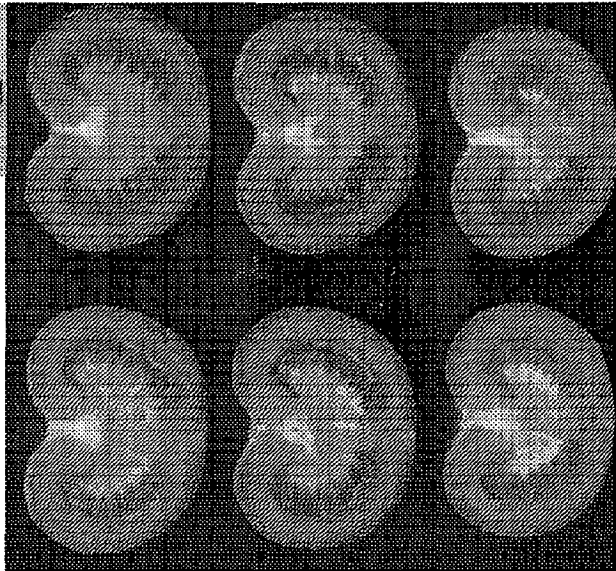


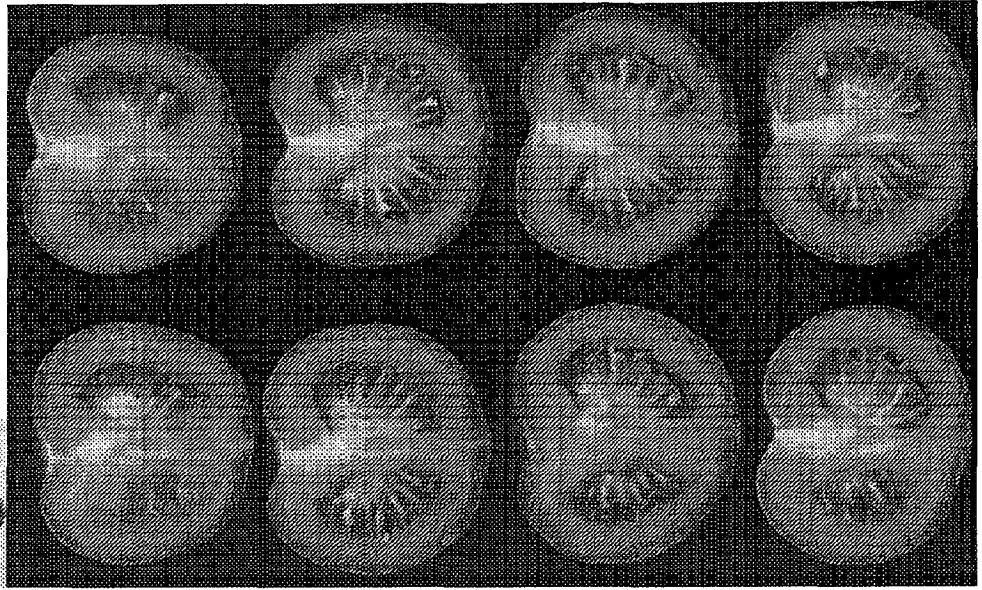
图 9

M2 5879

去雄的



未去雄的



去雄的	未去雄的
2274,18	2488,62
面积 (mm <sup>2</sup> )	
135,06	76,31
标准偏差	

图 10

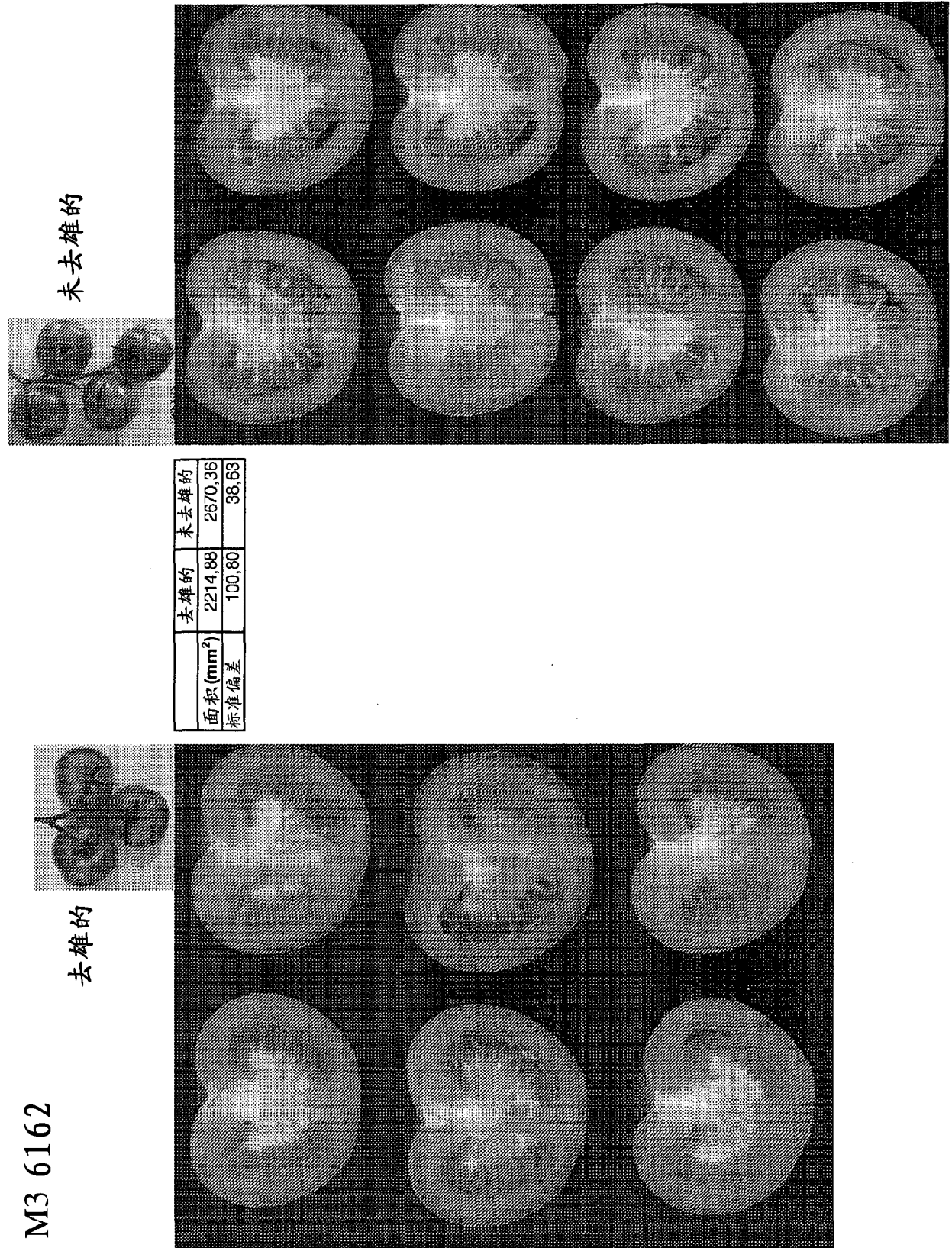


图 11