



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102098909 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 31

(21) 申请号 200980124059. 9

(22) 申请日 2009. 04. 22

(30) 优先权数据

61/047479 2008. 04. 24 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 12. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/041390 2009. 04. 22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/132089 EN 2009. 10. 29

(73) 专利权人 孟山都技术有限公司

地址 美国密苏里州

(72) 发明人 G. J. 巴利 V. C. 孔奇比多

B. J. 拉瓦利

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 权陆军 郭文洁

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

A01H 4/00 (2006. 01)

A01H 5/10 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 20060288444 A1, 2006. 12. 21, 说明书第 0006-0007 段, SEQUENCE LISTING.

US 20060288444 A1, 2006. 12. 21, 说明书第 0006-0007 段, SEQUENCE LISTING.

Monteros M. J. 等. Mapping and Confirmation of the 'Huyuuga' Red-Brown Lesion Resistance Gene for Asian Soybean Rust. 《CROP SCIENCE》. 2007, 第 47 卷 829.

HYTEN D. L. 等. Map Location of the Rpp1 Locus That Confers Resistance to Soybean Rust in Soybean. 《CROP SCIENCE》. 2007, 第 47 卷 837-840.

审查员 李安

权利要求书2页 说明书31页
序列表31页 附图3页

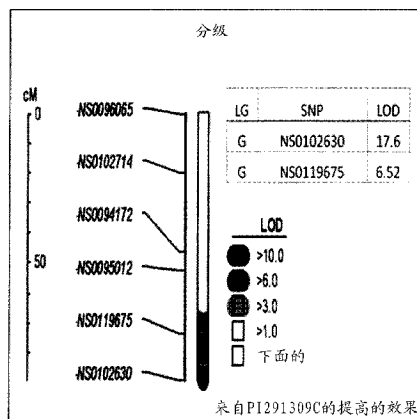
(54) 发明名称

鉴定大豆中亚洲大豆锈病抗性数量性状基因座的方法和其组合物

(57) 摘要

本发明属于植物育种和疾病抗性的领域。更具体地,本发明包括培育含有数量性状基因座的大豆植物的方法,所述数量性状基因座与对亚洲大豆锈病(ASR)的抗性相关,亚洲大豆锈病是与层锈菌属物种相关的真菌病。本发明进一步包括种质、以及含有赋予对疾病抗性的数量性状基因座(QTL)的种质的用途,用于在 ASR 抗性的育种计划中种质渗入到优良种质中。

CN 102098909 B



1. 一种生产亚洲大豆锈病(ASR)抗性大豆植物的方法,包括:
 - a. 进行标志物辅助的选择来鉴定具有 ASR 抗性基因座 14 的大豆植物,其中 ASR 抗性基因座 14 可以从 PI291309C 获得并作图在靠近 *Rpp1* 的连锁群 G 上的区域,并且其中所述标志物辅助的选择包括使用与选自以下标志物中的一种或多种连锁的标志物分子:
能够由 SEQ ID NO: 1 的核酸序列确定的 NS0095012、能够由 SEQ ID NO: 2 的核酸序列确定的 NS0119675、以及能够由 SEQ ID NO: 3 的核酸序列确定的 NS0102630 ;和
 - b. 产生所述大豆植物的子代,其中所述子代具有所述 ASR 抗性基因座 14 并展现了对 ASR 的至少部分抗性。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述 ASR 抗性基因座 14 是可以通过选自 NS0095012、NS0119675 和 NS0102630 的一种或更多种标志物鉴定的。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述标志物辅助的选择利用选自由单碱基延伸(SBE)、等位基因特异性引物延伸测序(ASPE)、DNA 测序、RNA 测序、基于微阵列的分析、普通 PCR、等位基因特异性延伸、杂交、质谱法、连接、延伸-连接以及 Flap 核酸内切酶介导的分析构成的组的分析来进行。
4. 基本上纯化的核酸分子用于检测与亚洲大豆锈病(ASR)抗性相关的基因座的用途,所述核酸分子包括选自由 SEQ ID NO :1-3、9-14、41-46、57-62 和 73-75 和其互补物构成的组的核酸序列。
5. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述 ASR 由选自豆薯层锈菌或山马蝗层锈菌的真菌引起。
6. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中被选择的植物在植物育种程序中是供体植物。
7. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中被选择的植物在植物育种程序中是接受者植物。
8. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述标志物分子与所述 ASR 抗性基因座 14 遗传连锁并且具有 2 或更大的机会比率的 \log_{10} (LOD 分值)。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述 LOD 分值大于 10。
10. 权利要求 8 的方法,其中所述标志物分子位于 ASR 抗性基因座 14 的 30 cM 之内。
11. 权利要求 8 的方法,其中所述 LOD 分值为 3 或更大。
12. 权利要求 8 的方法,其中所述 LOD 分值为 4 或更大。
13. 权利要求 8 的方法,其中所述标志物分子位于 ASR 抗性基因座 14 的 15cM 之内。
14. 权利要求 8 的方法,其中所述标志物分子位于 ASR 抗性基因座 14 的 5cM 之内。
15. 权利要求 8 的方法,其中所述标志物分子位于 ASR 抗性基因座 14 的 1cM 之内。
16. 权利要求 8 的方法,其中所述标志物分子位于 ASR 抗性基因座 14 的 1Mb 之内。
17. 权利要求 8 的方法,其中所述标志物分子位于 ASR 抗性基因座 14 的 100Kb 之内。
18. 权利要求 8 的方法,其中所述标志物分子位于 ASR 抗性基因座 14 的 1Kb 之内。
19. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述标志物分子位于选自以下的标记物的 15cM 之内,所述标记物选自 NS0095012、NS0119675、NS0102630。
20. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述标志物分子位于选自以下的标记物的 5cM 之内,所述标记物选自 NS0095012、NS0119675、NS0102630。
21. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述标志物分子位于选自以下的标记物的 1cM

之内,所述标记物选自 NS0095012、NS0119675、NS0102630。

22. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述标志物分子位于选自以下的标记物的 1Mb 之内,所述标记物选自 NS0095012、NS0119675、NS0102630。

23. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述标志物分子位于选自以下的标记物的 100 Kb 之内,所述标记物选自 NS0095012、NS0119675、NS0102630。

24. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述标志物分子位于选自以下的标记物的 1 Kb 之内,所述标记物选自 NS0095012、NS0119675、NS0102630。

25. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述标志物分子选自 NS0095012、NS0119675、NS0102630。

鉴定大豆中亚洲大豆锈病抗性数量性状基因座的方法和其组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2008 年 4 月 24 日提交的美国临时申请 NO. 61/047, 479 的根据 35 U. S. C. § 119 (e) 的权益。该申请的全部内容通过引用合并在本文中。

[0003] 序列表的加入

[0004] 序列表含有 2009 年 4 月 6 日创建的 25, 543 字节(在 Microsoft Windows® 中测量的)大小的名为“pa_54987b. txt”的文件, 包含 80 个核苷酸序列, 通过完全引用合并在本文中。

发明领域

[0005] 本发明属于植物育种和疾病抗性的领域。更具体地, 本发明包括培育含有数量性状基因座的大豆植物的方法, 所述大豆植物与对豆薯层锈菌(*Phakopsora pachyrhizi*) 和山马蝗层锈菌(*Phakopsora meibomiae*) 引起的亚洲大豆锈病(ASR) 的抗性相关。本发明进一步包括种质、赋予对 ASR 的抗性的新的数量性状基因座(QTL), 以及在为了对 ASR 的抗性的育种计划中将新的 QTL 种质渗入到优良种质中的方法。

[0006] 发明背景

[0007] 大豆, *Glycine max* (L.) Merril 是在世界范围内生长的作为植物油和蛋白质的原始来源的主要经济作物之一(Sinclair and Backman, *Compendium of Soybean Diseases*, 3rd Ed. APS Press, St. Paul, MN, p. 106 (1989))。低胆固醇和高纤维膳食的不断增长的需求也提高了大豆作为健康食品的重要性。

[0008] 在美国大豆产量每年受到疾病的负面影响。每公顷的高产量对于农户的利润率是关键, 特别是在大豆的低价格时期期间。由大豆疾病引起的财务损失对于农村经济以及对市区的联合产业的经济是重要的。这些损失的效应最终传遍世界范围内的大豆市场。

[0009] 亚洲大豆锈病(在此称为 ASR) 已经在东半球和西半球被报道。在东半球, ASR 在澳大利亚、中国、印度、日本、台湾地区和泰国被报道。在西半球, ASR 已经在巴西、哥伦比亚、哥斯达黎加和波多黎各被观察到。ASR 可能是毁灭性的疾病, 如在台湾的某些地区报道的, 引起高达 70 到 80% 的损失。严重感染的植物仅有更少的豆荚和质量不良的更小的种子(Frederick *et al.*, *Mycology* 92: 217-227 (2002))。ASR 在 1994 年在美国夏威夷被首次观察到。后来在 2004 年秋季 ASR 传播到美国陆地, 推测是热带风暴活动的结果。模型预测表明, ASR 在整个美国东南部广泛分布, 随后的田间和实验室观察确认了这种分布。

[0010] 两个真菌物种, 豆薯层锈菌 Sydow 和山马蝗层锈菌(Arthur) Arthur 引起 ASR。不象其他的锈病, 豆薯层锈菌和山马蝗层锈菌感染异乎寻常地广泛的植物物种。已知豆薯层锈菌天然地感染豆类的 17 个属中的 31 个物种, 以及在有控制的条件下感染 26 个其他属的 60 个物种。已知豆薯层锈菌天然地感染豆类的 19 个属中的 42 个物种, 以及 12 个其他属的 18 个其他物种被人工地感染。19 个属中的二十四种植物物种是两种菌的宿主(Frederick *et al.*, *Mycology* 92: 217-227 (2002))。

[0011] 评估可能潜在地含有赋予对 ASR 的抗性的 QTL 的植物是费时的,需要大量的生物学防范空间。培养豆薯层锈菌需要使用批准的生物防范通风橱。此外,用于生长 ASR 抗性测试的植物的温室和生长箱必需以防止生物体的事故性释放的方式建造,特别是在还没有观察到这些生物体的地区。豆薯层锈菌的不同的培养物可能保持有不同的毒力因子。随着时间的过去,新的豆薯层锈菌菌株可能被引入美国。两种主要宿主是豆薯 (*Pachyrhizuserosus* (L.)Urban)和豇豆 (*Vignaunguiculata* (L.)Walp.),都在佛罗里达发现。豆薯层锈菌和山马蝗层锈菌一个广泛自然化的宿主是野葛 (*Pueraria montana*(Lour.) Merr. var. *lobata* (Willd.)Maesen & S. M. Almeida ex Sanjappa & Predeep)。由于野葛是在美国东南方部常见的杂草,它可能充当接种体的持续不断的来源。豆薯层锈菌和山马蝗层锈菌是同种寄生的(没有交替寄主)和短生活史的(具有夏孢子和冬孢子芽孢期),仅在活的宿主上专性病原体存活和繁殖。其他宿主可能充当病原体的越冬储主,以及接种体的构建体。病原体非常适合于长距离散布,因为孢子可以被风容易地携带,使得它成为进入新的无锈病区域的理想的手段。传播的最初的手段是孢子,其可以被风或落下的雨水携带。

[0012] 由于豆薯层锈菌的不同培养物可能保持针对已知的和怀疑的抗性基因的不同的毒力因子,于是在大豆基因组中不同的 ASR 抗性基因座预期对于它们所赋予抗性的豆薯层锈菌和 / 或山马蝗层锈菌的菌株是不同的。因而,被设计以将针对 ASR 的抗性培育入大豆中的任何育种计划将可能需要涉及来自大豆基因组中不同的抗性基因座的多因子抗性,以赋予针对 ASR 的强的抗性,无论豆薯层锈菌群体如何变化。并且,培育在其他地理位置使用的大豆作物需要选择对影响这些区域的具体菌株的抗性,除了提供这些区域中农民喜欢的那些农学性状之外。因此存在着强大的动机来鉴定大豆中新的 ASR 抗性基因座,以及将期望的等位基因种质渗入到优良的大豆种质中。已经开发了方法来评估可能潜在地含有赋予对 ASR 的抗性的 QTL 的植物(美国专利申请 NO. 20080166699)。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供了将等位基因种质渗入到大豆植物中的方法,包括:使至少一种 ASR 抗性大豆植物与至少一种其他大豆植物杂交以形成群体;用来自 ASR 抗性基因座 14、15 和 16 构成的组的至少一种核酸标志物筛选所述群体,来确定来自所述群体的一种或更多种大豆植物是否含有来自 ASR 抗性基因座 1 到 8 构成的组的至少一种 ASR 抗性基因。在各种实施方式中,所述至少一种标志物位于所述抗性基因的 30 cM、15 cM、5 cM 或 1 cM 之内,或所述抗性基因的 1Mb、100 Kb 或 1 Kb 之内。

[0015] 在另一个方面,本发明提供了通过以下产生的优良大豆植物,包括:使至少一种 ASR 抗性大豆植物与至少一种其他大豆植物杂交以形成群体;用来自 ASR 抗性基因座 14、15 和 16 构成的组的至少一种核酸标志物筛选所述群体,来确定来自所述群体的一种或更多种大豆植物是否含有来自 ASR 抗性基因座 1 到 8 构成的组的至少一种 ASR 抗性基因。在一个实施方式中,所述优良大豆植物展现了至少一种转基因性状。在更具体的实施方式中,所述至少一种转基因性状可以是除草剂耐受性、提高的产量、昆虫控制、真菌病抗性、病毒抗性、线虫抗性、细菌病抗性、支原体病抗性、修饰的油生产、高油生产、高蛋白生产、萌芽和幼苗生长控制、增强的动物和人类营养、低棉籽糖、环境压力抗性、提高的可消化性、改进的加工性状、改进的风味、氮固定、杂交种子生产、降低的变应原性或其任何组

合。在又更具体的实施方式中,除草剂耐受性可以为草甘膦、麦草畏、草铵膦、磺酰脲、溴苯腈、2,4-二氯苯氧乙酸、达草灭除草剂或其任何组合来赋予。在又一个实施方式中,所述优良大豆植物展现了对 ASR 诱导真菌的至少一个种类的至少部分抗性,更具体地,所述 ASR 诱导真菌可以是豆薯层锈菌或山马蝗层锈菌或两者。

[0016] 本发明还提供了将至少一种 ASR 抗性等位基因种质渗入到大豆植物中的方法,包括步骤:使 ASR 抗性大豆植物与第二大豆植物杂交以形成群体;用选自 SEQ ID NO:1 到 8 和 SEQ ID NO:73 到 80 构成的组的至少一种核酸标志物筛选所述群体;从所述群体中选择出包含与 ASR 抗性大豆植物相应的至少一种基因型的至少一种大豆植物。在特定的实施方式中,所述选择的大豆植物展现了如此处描述的、不差于约 3、或不差于约 2 的对 ASR 的抗性反应分级。在更特别的实施方式中,所述方法进一步包括分析所述选择的大豆植物对 ASR 诱导病原体的抗性的步骤。在另一个特定的实施方式中,所述基因型通过单碱基延伸(SBE)、等位基因特异性引物延伸测序(ASPE)、DNA 测序、RNA 测序、基于微阵列的分析、普通 PCR、等位基因特异性延伸、杂交、质谱法、连接、延伸-连接或 Flap 核酸内切酶介导的分析来测定。在再更特定的实施方式中,所述方法进一步包括使所述选择的大豆植物与另一种大豆植物杂交的步骤;以及更进一步包括从所述选择的大豆植物获得种子的步骤。在又一个特定的实施方式中,所述群体中至少一种大豆植物针对选自 SEQ ID NO:1 和 2 构成的组的大豆基因组 DNA 标志物,以及针对 SEQ ID NO:3 来基因分型。

[0017] 在另一个方面,本发明提供了优良大豆植物,其通过以下产生:

[0018] 使 ASR 抗性大豆植物与第二大豆植物杂交以形成群体;用选自 SEQ ID NO:1 到 8 和 SEQ ID NO:73 到 80 构成的组的至少一种核酸标志物筛选所述群体;从所述群体中选择包含与 ASR 抗性大豆植物相应的至少一种基因型的一种或更多种大豆植物。在一个实施方式中,所述优良大豆植物展现了至少一种转基因性状。在更具体的实施方式中,所述转基因性状可以是除草剂耐受性、提高的产量、昆虫控制、真菌病抗性、病毒抗性、线虫抗性、细菌病抗性、支原体病抗性、修饰的油生产、高油生产、高蛋白质生产、萌芽和幼苗生长控制、增强的动物和人类营养、低棉籽糖、环境压力抗性、提高的可消化性、改进的加工性状、改进的风味、氮固定、杂交种子生产、降低的变应原性或其任何组合。在又更具体的实施方式中,除草剂耐受性可以为草甘膦、麦草畏、草铵膦、磺酰脲、溴苯腈、2,4-二氯苯氧乙酸、达草灭除草剂或其任何组合来赋予。在又其他的实施方式中,所述优良大豆植物展现了对 ASR 诱导真菌的至少一个种类的至少部分抗性,更具体地,所述 ASR 诱导真菌可以是豆薯层锈菌或山马蝗层锈菌或两者。

[0019] 本发明还提供了用于检测与 ASR 抗性相关的基因座的基本上纯化的核酸分子,包括选自 SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:80 和其互补物构成的组的核酸序列。

[0020] 进一步的,本发明提供了至少 15、16、17、18 或 20 个核苷酸的分离的核酸分子,其与包括或邻近于多态性的大豆 DNA 的任一链中相同长度的序列具有至少 90% 的同一性,用于检测代表所述多态性的分子标志物,其中所述分子标志物选自 SEQ ID NO:1 到 8 构成的组。在另一个实施方式中,本发明提供了至少 15、16、17、18 或 20 个核苷酸的分离的核酸分子,其与包括或邻近于多态性的大豆 DNA 的任一链中相同长度的序列具有至少 95%、或优选 98%、或更优选 99% 或甚至 100% 的同一性,用于检测代表所述多态性的分子标志物,其中所述分子标志物选自 SEQ ID NO:1 到 8 构成的组。在特定的实施方式中,所述分离的核

酸进一步包含可检测标记物,或提供了可检测标记物的掺入。更特别地,所述可检测标记物可以是同位素、荧光团、氧化剂、还原剂、核苷酸或半抗原。在又更特定的实施方式中,所述可检测标记物可以通过化学反应添加到核酸上,或通过酶反应来掺入。在本发明的另一个实施方式中,所述分离的核酸在严格杂交条件下与所述分子标志物的至少一个等位基因杂交。在更具体的实施方式中,所述分子标志物是 SEQ ID NO :1、2、3、4、5、6、7 或 8 ;所述分离的核酸是至少 90% 相同于提供的探针的寡核苷酸,所述提供的探针相应于所述特定的分子标志物,其分别是 :SEQ ID NO :25 和 26、27 和 28、29 和 30、31 和 32、33 和 34、35 和 36、37 和 38、或 39 和 40。

[0021] 本发明还提供了一组寡核苷酸,其包含 :一对寡核苷酸引物,各自长度至少 12 个连续核苷酸,允许包含分子标志物或处于分子标志物之内的 DNA 片段的 PCR 扩增,所述分子标志物选自由 SEQ ID NO :1 到 8 构成的组 ;以及至少一种检测寡核苷酸,其允许所述扩增的片段中多态性的检测,其中所述检测寡核苷酸的序列至少百分之 95 相同于包括或邻近于所述多态性的大豆 DNA 片段的任一链中相同数量的连续核苷酸的序列。在一个实施方式中,所述检测寡核苷酸包含至少 12 个核苷酸,提供了可检测标记物的掺入或进一步包含可检测标记物。在更具体的实施方式中,所述可检测标记物选自由同位素、荧光团、氧化剂、还原剂、核苷酸和半抗原构成的组。在另一个实施方式中,所述检测寡核苷酸和所述寡核苷酸引物在严格杂交条件下与所述分子标志物的至少一个等位基因杂交。再其他的实施方式包括第二检测寡核苷酸,其能够检测所述分子标志物的不同的第二多态性、或同一多态性的不同的等位基因。在又更具体的实施方式中,所述分子标志物是 SEQ ID NO :1、2、3、4、5、6、7 或 8 ;所述寡核苷酸引物至少 90% 相同于提供的引物,所述提供的引物相应于所述特定的分子标志物,其分别是 :SEQ ID NO :9 和 10、11 和 12、13 和 14、15 和 16、17 和 18、19 和 20、21 和 22、或 23 和 24 ;以及所述检测寡核苷酸包含核酸,所述核酸至少 90% 相同于提供的探针,所述提供的探针相应于所述特定的分子标志物,其分别是 :SEQ ID NO :25 和 26、27 和 28、29 和 30、31 和 32、33 和 34、35 和 36、37 和 38、或 39 和 40。

[0022] 本发明还提供了将等位基因种质渗入到大豆植物中的方法,包括 :提供大豆植物的群体 ;针对选自 SEQ ID NO :1 到 8 和 SEQ ID NO :73 到 80 的组的大豆基因组核酸标志物,将所述群体中的至少一种大豆植物基因分型 ;以及从所述群体中选择包含与 ASR 抗性相关的等位基因的一种或更多种大豆植物,其中所述 ASR 抗性等位基因选自由 SEQ ID NO :73 到 SEQ ID NO :80 构成的组。在一个实施方式中,提供群体包括使 ASR 抗性大豆植物与第二大豆植物杂交来形成群体。在另一个实施方式中,所述选择的一种或更多种大豆植物在存在 ASR 的情况下展现了与缺乏 ASR 抗性等位基因的大豆植物相比提高的谷粒产量。更特别地,提高的谷粒产量可以是在存在 ASR 的情况下与缺乏 ASR 抗性等位基因的大豆植物相比至少 0.5 Bu/A、至少 1.0 Bu/A 或至少 1.5 Bu/A。

[0023] 核酸序列的简要说明

[0024] SEQ ID NO :1 是来自大豆 (*Glycine max*) 的与 ASR 抗性基因座 14 相关的基因组序列。

[0025] SEQ ID NO :2 是来自大豆 (*Glycine max*) 的与 ASR 抗性基因座 14 相关的基因组序列。

[0026] SEQ ID NO :3 是来自大豆 (*Glycine max*) 的与 ASR 抗性基因座 14 相关的基因组序

列。

[0027] SEQ ID NO :4 是来自大豆(*Glycine max*)的与 ASR 抗性基因座 15 相关的基因组序列。

[0028] SEQ ID NO :5 是来自大豆(*Glycine max*)的与 ASR 抗性基因座 15 相关的基因组序列。

[0029] SEQ ID NO :6 是来自大豆(*Glycine max*)的与 ASR 抗性基因座 15 相关的基因组序列。

[0030] SEQ ID NO :7 是来自大豆(*Glycine max*)的与 ASR 抗性基因座 16 相关的基因组序列。

[0031] SEQ ID NO :8 是来自大豆(*Glycine max*)的与 ASR 抗性基因座 16 相关的基因组序列。

[0032] SEQ ID NO :9 是用于 SEQ ID NO :1 的扩增的正向 PCR 引物。

[0033] SEQ ID NO :10 是用于 SEQ ID NO :1 的扩增的反向 PCR 引物。

[0034] SEQ ID NO :11 是用于 SEQ ID NO :2 的扩增的正向 PCR 引物。

[0035] SEQ ID NO :12 是用于 SEQ ID NO :2 的扩增的反向 PCR 引物。

[0036] SEQ ID NO :13 是用于 SEQ ID NO :3 的扩增的正向 PCR 引物。

[0037] SEQ ID NO :14 是用于 SEQ ID NO :3 的扩增的反向 PCR 引物。

[0038] SEQ ID NO :15 是用于 SEQ ID NO :4 的扩增的正向 PCR 引物。

[0039] SEQ ID NO :16 是用于 SEQ ID NO :4 的扩增的反向 PCR 引物。

[0040] SEQ ID NO :17 是用于 SEQ ID NO :5 的扩增的正向 PCR 引物。

[0041] SEQ ID NO :18 是用于 SEQ ID NO :5 的扩增的反向 PCR 引物。

[0042] SEQ ID NO :19 是用于 SEQ ID NO :6 的扩增的正向 PCR 引物。

[0043] SEQ ID NO :20 是用于 SEQ ID NO :6 的扩增的反向 PCR 引物。

[0044] SEQ ID NO :21 是用于 SEQ ID NO :7 的扩增的正向 PCR 引物。

[0045] SEQ ID NO :22 是用于 SEQ ID NO :7 的扩增的反向 PCR 引物。

[0046] SEQ ID NO :23 是用于 SEQ ID NO :8 的扩增的正向 PCR 引物。

[0047] SEQ ID NO :24 是用于 SEQ ID NO :8 的扩增的反向 PCR 引物。

[0048] SEQ ID NO :25 是用于 SEQ ID NO :1 的 SNP 的检测的探针。

[0049] SEQ ID NO :26 是用于 SEQ ID NO :1 的 SNP 的检测的探针。

[0050] SEQ ID NO :27 是用于 SEQ ID NO :2 的 SNP 的检测的探针。

[0051] SEQ ID NO :28 是用于 SEQ ID NO :2 的 SNP 的检测的探针。

[0052] SEQ ID NO :29 是用于 SEQ ID NO :3 的 SNP 的检测的探针。

[0053] SEQ ID NO :30 是用于 SEQ ID NO :3 的 SNP 的检测的探针。

[0054] SEQ ID NO :31 是用于 SEQ ID NO :4 的 SNP 的检测的探针。

[0055] SEQ ID NO :32 是用于 SEQ ID NO :4 的 SNP 的检测的探针。

[0056] SEQ ID NO :33 是用于 SEQ ID NO :5 的 SNP 的检测的探针。

[0057] SEQ ID NO :34 是用于 SEQ ID NO :5 的 SNP 的检测的探针。

[0058] SEQ ID NO :35 是用于 SEQ ID NO :6 的 SNP 的检测的探针。

[0059] SEQ ID NO :36 是用于 SEQ ID NO :6 的 SNP 的检测的探针。

- [0060] SEQ ID NO :37 是用于 SEQ ID NO :7 的 SNP 的检测的探针。
- [0061] SEQ ID NO :38 是用于 SEQ ID NO :7 的 SNP 的检测的探针。
- [0062] SEQ ID NO :39 是用于 SEQ ID NO :8 的 SNP 的检测的探针。
- [0063] SEQ ID NO :40 是用于 SEQ ID NO :8 的 SNP 的检测的探针。
- [0064] SEQ ID NO :41 是相应于 SEQ ID NO :1 的 ASR 抗性等位基因的杂交探针。
- [0065] SEQ ID NO :42 是相应于 SEQ ID NO :1 的 ASR 易感性等位基因的杂交探针。
- [0066] SEQ ID NO :43 是相应于 SEQ ID NO :2 的 ASR 抗性等位基因的杂交探针。
- [0067] SEQ ID NO :44 是相应于 SEQ ID NO :2 的 ASR 易感性等位基因的杂交探针。
- [0068] SEQ ID NO :45 是相应于 SEQ ID NO :3 的 ASR 抗性等位基因的杂交探针。
- [0069] SEQ ID NO :46 是相应于 SEQ ID NO :3 的 ASR 易感性等位基因的杂交探针。
- [0070] SEQ ID NO :47 是相应于 SEQ ID NO :4 的 ASR 抗性等位基因的杂交探针。
- [0071] SEQ ID NO :48 是相应于 SEQ ID NO :4 的 ASR 易感性等位基因的杂交探针。
- [0072] SEQ ID NO :49 是相应于 SEQ ID NO :5 的 ASR 抗性等位基因的杂交探针。
- [0073] SEQ ID NO :50 是相应于 SEQ ID NO :5 的 ASR 易感性等位基因的杂交探针。
- [0074] SEQ ID NO :51 是相应于 SEQ ID NO :6 的 ASR 抗性等位基因的杂交探针。
- [0075] SEQ ID NO :52 是相应于 SEQ ID NO :6 的 ASR 易感性等位基因的杂交探针。
- [0076] SEQ ID NO :53 是相应于 SEQ ID NO :7 的 ASR 抗性等位基因的杂交探针。
- [0077] SEQ ID NO :54 是相应于 SEQ ID NO :7 的 ASR 易感性等位基因的杂交探针。
- [0078] SEQ ID NO :55 是相应于 SEQ ID NO :8 的 ASR 抗性等位基因的杂交探针。
- [0079] SEQ ID NO :56 是相应于 SEQ ID NO :8 的 ASR 易感性等位基因的杂交探针。
- [0080] SEQ ID NO :57 是相应于 SEQ ID NO :1 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。
- [0081] SEQ ID NO :58 是相应于 SEQ ID NO :1 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。
- [0082] SEQ ID NO :59 是相应于 SEQ ID NO :2 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。
- [0083] SEQ ID NO :60 是相应于 SEQ ID NO :2 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。
- [0084] SEQ ID NO :61 是相应于 SEQ ID NO :3 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。
- [0085] SEQ ID NO :62 是相应于 SEQ ID NO :3 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。
- [0086] SEQ ID NO :63 是相应于 SEQ ID NO :4 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。
- [0087] SEQ ID NO :64 是相应于 SEQ ID NO :4 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。
- [0088] SEQ ID NO :65 是相应于 SEQ ID NO :5 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。
- [0089] SEQ ID NO :66 是相应于 SEQ ID NO :5 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。

针。

[0090] SEQ ID NO :67 是相应于 SEQ ID NO :6 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。

[0091] SEQ ID NO :68 是相应于 SEQ ID NO :6 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。

[0092] SEQ ID NO :69 是相应于 SEQ ID NO :7 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。

[0093] SEQ ID NO :70 是相应于 SEQ ID NO :7 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。

[0094] SEQ ID NO :71 是相应于 SEQ ID NO :8 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。

[0095] SEQ ID NO :72 是相应于 SEQ ID NO :8 的 ASR 抗性等位基因的单碱基延伸(SBE)探针。

[0096] SEQ ID NO :73 是相应于 SEQ ID NO :1 的 ASR 抗性等位基因 1。

[0097] SEQ ID NO :74 是相应于 SEQ ID NO :2 的 ASR 抗性等位基因 2。

[0098] SEQ ID NO :75 是相应于 SEQ ID NO :3 的 ASR 抗性等位基因 3。

[0099] SEQ ID NO :76 是相应于 SEQ ID NO :4 的 ASR 抗性等位基因 4。

[0100] SEQ ID NO :77 是相应于 SEQ ID NO :5 的 ASR 抗性等位基因 5。

[0101] SEQ ID NO :78 是相应于 SEQ ID NO :6 的 ASR 抗性等位基因 6。

[0102] SEQ ID NO :79 是相应于 SEQ ID NO :7 的 ASR 抗性等位基因 7。

[0103] SEQ ID NO :80 是相应于 SEQ ID NO :8 的 ASR 抗性等位基因 8。

[0104] 附图的简要说明

[0105] 附图 1 描绘了连锁群 G 上的 ASR 基因座 14 的位置。右侧是群体的 LOD 曲线的图例。黑色柱表明 NS0102630 的位置的置信区间(LOD>10)。灰色柱表明 NS0119675 的位置的置信区间(LOD>2)。

[0106] 附图 2 描绘了连锁群 C2 上的 ASR 基因座 15 的位置。右侧是群体的 LOD 曲线的图例。黑色柱表明 NS0093385 的位置的置信区间(LOD>10)。暗色柱表明 NS0118716 的位置的置信区间(LOD>2)。

[0107] 附图 3 描绘了连锁群 D2 上的 ASR 基因座 16 的位置。右侧是群体的 LOD 曲线的图例。灰色柱表明 NS0113966 的位置的置信区间(LOD>2)。

[0108] 发明的详细说明

[0109] 所提供的定义和方法限定了本发明,并指导本领域普通技术人员实践本发明。除非另有说明,术语将根据相关领域中普通技术人员常规的使用来理解。分子生物学中的常见术语的定义还可以在 Alberts *et al.*, *Molecular Biology of The Cell*, 5th Edition, Garland Science Publishing, Inc.: New York, 2007; Rieger *et al.*, *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; King *et al.*, *A Dictionary of Genetics*, 6th ed, Oxford University Press: New York, 2002; 以及 Lewin, *Genes IX*, Oxford University Press: New York, 2007 中找到。使用在 37 CFR § 1.822 中列出的 DNA 碱基的命名。

[0110] “等位基因”是指特定基因座上选择性的序列；等位基因的长度可以小到 1 个核苷酸碱基，但一般是更大的。等位序列可以作为核酸序列、或作为由所述核酸序列编码的氨基酸序列来表示。

[0111] “基因座”是通常通过参考点来找到的基因组序列上的位置；例如，作为基因、基因的部分或基因间区域的短的 DNA 序列。本发明的基因座包含群体中的一种或更多种多态性，即，在某些个体中存在的选择性的等位基因。

[0112] 如在此使用的，“多态性”是指在一个或多个个体的群体中处在一个或多个基因座上核酸序列的一种或更多种变异的存在。所述变异可以包括、但不限于一个或多个碱基改变、一个或多个核苷酸的插入或一个或多个核苷酸的删除。多态性可能来自核酸复制中的随机过程、通过诱变、作为移动的基因组元件的结果、来自拷贝数变异和在减数分裂的过程期间，例如，不等交换，基因组加倍以及染色体破裂和融合。变异通常可以在群体内发现，或可能在群体内以低频率存在，前者在一般的植物育种中具有更大的实用性，后者可能与罕有的但是重要的表型变异相关。有用的多态性可以包括单核苷酸多态性 (SNP)、DNA 序列中的插入或删除 (Indels)、DNA 序列的简单序列重复 (SSRs)、限制性片断长度多态性以及标签 SNP。遗传标志物、基因、DNA 衍生的序列、单体型、RNA 衍生的序列、启动子、基因的 5' 非翻译区、基因的 3' 非翻译区、microRNA、siRNA、QTL、卫星标志物、转基因、mRNA、ds mRNA、转录分布、甲基化模式可能包含多态性。

[0113] 如在此使用的，“标志物”是指多态的核酸序列或核酸特征。标志物可以由一个或多个特定的变体序列、或由共有序列代表。在另一种意义上，“标志物”是分离的变体或这样的序列的共有体。在广义上，“标志物”可以是可检测的特征，其可以用于辨别生物体之间的可遗传的差异。这样的特征的实例可以包括遗传标志物、蛋白质组成、蛋白质水平、油的组成、油水平、碳水化合物组成、碳水化合物水平、脂肪酸组成、脂肪酸水平、氨基酸组成、氨基酸水平、生物聚合物、药物、淀粉组成、淀粉水平、可发酵的淀粉、发酵产量、发酵效力、能量产量、次级化合物、代谢物、形态学特征和农学特征。

[0114] 如在此使用的，“标志物分析”是指利用特定的方法检测特定基因座上的多态性的方法，例如，至少一种表型的测量（例如，种子颜色、花颜色或其他视觉上可检测的性状）、限制性片断长度多态性 (RFLP)、单碱基延伸、电泳、序列比对、等位特异性寡核苷酸杂交 (ASO)、随机扩增的多态性 DNA (RAPD)、基于微阵列的技术以及核酸测序技术，等等。

[0115] 如在此使用的，“分型”是指任何方法，通过所述方法测定给定的大豆基因组多态性的具体等位形式。例如，单核苷酸多态性 (SNP) 通过测定存在哪个核苷酸（即，A、G、T 或 C）来分型。插入 / 删除 (Indels) 通过确定是否存在 Indel 来测定。Indels 可以通过多种分析，包括但不限于标志物分析来分型。

[0116] 如在此使用的，用语“邻近于”，当用于描述与含有多态性的 DNA 杂交的核酸分子时，是指一种核酸，其与直接邻接或近乎邻接所述多态性核苷酸碱基位置的 DNA 序列杂交。例如，可以用于单碱基延伸分析的核酸分子“邻近于”所述多态性。

[0117] 如在此使用的，“询问位置”是指固相支持物上的物理位置，其可以被查询来获得一个或多个预定的基因组多态性的基因分型数据。

[0118] 如在此使用的，“共有序列”是指构建的 DNA 序列，其鉴定基因座上等位基因中的 SNP 和 Indel 多态性。共有序列可以基于基因座处 DNA 的任一链，并且表明基因座中每个

SNP 的任一种的核苷酸碱基,以及基因座中所有 Indels 的核苷酸碱基。因而,虽然共有序列可能不是实际的 DNA 序列的拷贝,共有序列对于精确设计用于基因座中实际多态性的引物和探针是有用的。

[0119] 如在此使用的,术语“单核苷酸多态性”也由缩写“SNP”来表示,是指在单个位点处的多态性,其中所述多态性构成了单个碱基对改变、一个或更多个碱基对的插入、或一个或更多个碱基对的删除。

[0120] 如在此使用的,术语“单体型”是指由至少一个多态性分子标志物的等位基因所定义的单体型窗口内的染色体区域。在每个单体型窗口中独特的标志物指纹图谱组合定义了该窗口的个体单体型。进一步的,由例如重组导致的单体型中的改变,可能引起单体型的修饰,从而它仅包含与所述性状可操作连接的,例如,通过与基因、QTL 或转基因的物理连接连接的、原始(亲本)单体型的一部分。单体型中的任何这样的改变将被包括在什么构成单体型的我们的定义中,只要基因组区域的功能完整性不变或被改善。

[0121] 如在此使用的,术语“单体型窗口”是指染色体区域,其是通过本领域技术人员已知的统计分析来建立的,并且处于连锁不平衡中。因而,在位于这个区域内的一个或更多个分子标志物基因座处两个近交个体(或两个配子)之间的状态一致(identity by state)被作为完整区域的血统一致(identity-by-descent)的证据。每个单体型窗口包括至少一个多态性分子标志物。单体型窗口可以沿着基因组中每个染色体来作图。单体型窗口本身不是固定的,考虑到分子标志物的不断提高的密度,本发明预期单体型窗口的数量和大小是演变的,窗口的数量提高以及它们相应的大小降低,因而产生在根据标志物基因座的状态一致来确定血统一致方面不断提高的置信程度。

[0122] 如在此使用的,“基因型”是指表型的遗传组分,它可以利用标志物间接地表征,或由核酸测序直接地表征。适合的标志物包括表型特征、代谢分布、遗传学标志物或其他类型的标志物。基因型可以构成至少一个遗传标志物基因座的等位基因,或至少一个单体型窗口的单体型。在某些实施方式中,基因型可以代表单个基因座,在其他实施方式中,它可以代表基因座的基因组广度上的集合。在另一个实施方式中,基因型可以反映染色体的一部分、全部染色体、基因组的一部分、全部基因组的序列。

[0123] 如在此使用的,“表型”是指受到基因表达的影响的细胞或生物体的可检测的特征。

[0124] 如在此使用的,“连锁”是指在杂交中产生配子类型的相对频率。例如,如果基因座 A 具有基因“A”或“a”、基因座 B 具有基因“B”或“b”,具有 AABB 的亲本 I 与具有 aabb 的亲本 B 之间的杂交将产生四种可能的配子,其中基因分离为 AB、Ab、aB 和 ab。无效的期望是存在着进入四种可能的基因型的每一种的独立的相等的分离,即,没有每个基因型的配子 1/4 的连锁。与 1/4 不同的配子到基因型的分离被归因于连锁。

[0125] 如在此使用的,“连锁不平衡”是在单个世代中许多个体的群体中配子类型的相对频率的情境下定义的。如果等位基因 A 的频率是 p 、a 是 p' , B 是 q 以及 b 是 q' ,则基因型 AB 的期望的频率(没有连锁不平衡)是 pq , Ab 是 pq' , aB 是 $p'q$, ab 是 $p'q'$ 。与预期频率的任何偏离被称为连锁不平衡。当处于连锁不平衡中时,两个基因座被称为是“遗传地连锁的”。

[0126] 如在此使用的,“数量性状基因座(QTL)”是指基因座,其控制在某种程度上可数字

地表示的、通常连续地分布的性状。

[0127] 如在此使用的,“免疫性”是指 ASR 疾病表型,其不展现肉眼可见的病变、或不与小疱或存活的孢子相关的红-褐色病变,和具有的长度平均起来不大于在可比较条件下分析的易感表型的平均病变长度的约四分之一,并且覆盖不超过叶子表面积约二十分之一。完全免疫性的数字分值是 1;具有小的但可见的病变或变色的免疫性,数字分值是 1.5。

[0128] 如在此使用的,“抗性”是指 ASR 疾病表型,其展现了免疫性或红褐色病变,所述红褐色病变可能或可能不与小疱或活的孢子相关,或可能在孢子形成方面延迟,具有的长度平均起来为在可比较条件下分析的易感表型的平均病变长度的约四分之一,以及与叶表面积覆盖的百分比成反比而变化的抗性程度。如果叶子的低于约 50% 被病变覆盖,抗性的数字分值是 2,如果叶子的大于约 50% 被覆盖,分值是 3。如果叶子的约 50% 面积被红褐色病变覆盖,数字分值 2.5。

[0129] 如在此使用的,“易感性”是指 ASR 疾病表型,其展现了与含有活的孢子的小疱相关的棕黄色病变,具有在使用的标准分析条件下平均约 2 mm 到 5 mm 的长度(美国申请 11805667),易感性的程度与叶表面积覆盖的百分比成正比地变化。如果叶子的低于约 50% 被病变覆盖,易感性的数字分值是 4,如果叶子的大于约 50% 被覆盖,分值是 5。如果叶子的约 50% 面积被棕黄色病变覆盖,数字分值 4.5。

[0130] 响应分值也可以反映多个叶片或测试的平均分值,从而这样的分值可能具有整数之间的数字值,一般表示为小数。

[0131] 如在此使用的,“抗性等位基因”是指分离的核酸序列,其包括与对 ASR 的抗性相关的多态的等位基因。

[0132] 如在此使用的,术语“大豆”是指 *Glycine max*,包括可以用大豆育种的所有植物品种,包括野生大豆物种。

[0133] 如在此使用的,术语“包含”是指“包括但不限于”。

[0134] 如在此使用的,术语“优良系”是指任何系,其来自对优越的农学性能的培育和选择。优良植物是来自优良系的任何植物。

[0135] 本发明提供了 ASR 抗性 QTL,其作图在靠近 Rpp1 的连锁群 G 上的区域;然而,本发明的称为 ASR 抗性基因座 14 与 Rpp1 不同在于覆盖叶子的约低于 25% 表面积的病变的红褐色表型,而 Rpp1 一般赋予对 ASR 的免疫性。本发明还提供了用于选择和种质渗入来源于 PI291309C 的来源的能赋予对 ASR 的抗性的 QTL 的方法和组合物。提供了位于 ASR 抗性基因座 14 上的 QTL。

[0136] 本发明提供了 ASR 抗性 QTL,其作图在连锁群 C2 上的区域;本发明的称为 ASR 抗性基因座 15 具有覆盖叶子的约低于 25% 表面积的病变的红褐色表型。本发明进一步提供了 ASR 抗性 QTL,其作图在连锁群 D2 上的区域;本发明的称为 ASR 抗性基因座 16 具有覆盖叶子的约低于 25% 表面积的病变的红褐色表型。本发明还提供了用于选择和种质渗入来源于 PI507009 的来源的能赋予对 ASR 的抗性的 QTL 的方法和组合物。提供了位于 ASR 抗性基因座 15 和 16 上的 QTLs。

[0137] 在本发明中,一种 ASR 抗性基因座,ASR 抗性基因座 14 位于连锁群 G 上。用于监视 ASR 抗性基因座 14 的种质渗入的 SNP 标志物包括选自由 NS0119675、NS0095012 和 NS0102630 构成的组的那些。说明性的 ASR 抗性基因座 14 SNP 标志物 DNA 序列 SEQ ID NO :

1 可以利用 SEQ ID NO :9 和 10 标明的引物来扩增,用 SEQ ID NO :25 和 26 标明的探针来检测 ;SEQ ID NO :2 可以用 SEQ ID NO :11 和 12 标明的引物扩增,用 SEQ ID NO :27 和 28 标明的探针来检测 ;SEQ ID NO :3 可以用 SEQ ID NO :13 和 14 标明的引物扩增,用 SEQ ID NO :29 和 30 标明的探针来检测。

[0138] 类似地,本发明,一种 ASR 抗性基因座,ASR 抗性基因座 15 位于连锁群 C2 上。用于监视 ASR 抗性基因座 15 的种质渗入的 SNP 标志物包括选自由 NS0093385、NS0118716 和 NS0127833 构成的组的那些。说明性的 ASR 抗性基因座 15 SNP 标志物 DNA 序列 SEQ ID NO :4 可以利用 SEQ ID NO :15 和 16 标明的引物来扩增,用 SEQ ID NO :31 和 32 标明的探针来检测 ;SEQ ID NO :5 可以用 SEQ ID NO :17 和 18 标明的引物扩增,用 SEQ ID NO :33 和 34 标明的探针来检测 ;SEQ ID NO :6 可以用 SEQ ID NO :19 和 20 标明的引物扩增,用 SEQ ID NO :35 和 36 标明的探针来检测。

[0139] 在本发明中,一种 ASR 抗性基因座,ASR 抗性基因座 16 位于连锁群 D2 上。用于监视 ASR 抗性基因座 16 的种质渗入的 SNP 标志物包括选自由 NS0113966 和 NS0118536 构成的组的那些。说明性的 ASR 抗性基因座 16 SNP 标志物 DNA 序列 SEQ ID NO :7 可以用 SEQ ID NO :21 和 22 标明的引物扩增,用 SEQ ID NO :37 和 38 标明的探针检测 ;SEQ ID NO :8 可以用 SEQ ID NO :23 和 24 标明的引物扩增,用 SEQ ID NO :39 和 40 标明的探针检测。

[0140] 本发明还提供了包含选自由 SEQ ID NO :73 到 80 和其互补物构成的组的核酸分子的大豆植物。本发明还提供了包含选自由 SEQ ID NO :1 到 8、其片段和两者的互补物构成的组的核酸分子的大豆植物。本发明还提供了包含选自由 SEQ ID NO :9 到 72、其片段和两者的互补物构成的组的核酸分子的大豆植物。

[0141] 在一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :73 到 75 的 3 种核酸分子和其互补物。在另一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :1 到 3 的 3 种核酸分子、其片段和两者的互补物。在进一步的方面,所述大豆植物包含选自由 SEQ ID NO :9 到 14 和 25 到 30、其片段和其互补物构成的组的 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 种核酸分子。

[0142] 在另一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :76 到 78 的 3 种核酸分子和其互补物。在另一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :4 到 6 的 3 种核酸分子、其片段和两者的互补物。在进一步的方面,所述大豆植物包含选自由 SEQ ID NO :15 到 20 和 31 到 36、其片段和其互补物构成的组的 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 种核酸分子。

[0143] 在另一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :79 和 80 的 2 种核酸分子和其互补物。在另一个方面,所述大豆植物包含 2 种核酸分子 SEQ ID NO :7 和 8,其片段和两者的互补物。在进一步的方面,所述大豆植物包含选自由 SEQ ID NO :21 到 24 和 37 到 40、其片段和其互补物构成的组的 2、3、4、5、6、7 或 8 种核酸分子。

[0144] 在另一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :76 到 80 的 5 种核酸分子和其互补物。在另一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :4 到 8 的 5 种核酸分子、其片段和两者的互补物。在进一步的方面,所述大豆植物包含选自由 SEQ ID NO :15 到 24 和 31 到 40,其片段和其互补物构成的组的 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 种核酸分子。

[0145] 在另一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :73 到 78 的 6 种核酸分子和其互补物。在另一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :1 到 6 的 6 种核酸分子、其片段和两者的

互补物。在进一步的方面,所述大豆植物包含选自由 SEQ ID NO :9 到 20 和 25 到 36,其片段和其互补物构成的组的 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 种核酸分子。

[0146] 在另一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :73、74、75、79 和 80 的 5 种核酸分子和其互补物。在另一个方面,所述大豆植物包含 SEQ ID NO :1、2、3、7 和 8 的 5 种核酸分子,其片段和两者的互补物。在进一步的方面,所述大豆植物包含选自由 SEQ ID NO :9 到 14 和 21 到 30 和 37 到 40,其片段和其互补物构成的组的 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 种核酸分子。

[0147] 本发明还提供了包含 ASR 抗性基因座 14 的大豆植物。所述等位基因可以是纯合的或杂合的。本发明还提供了包含 ASR 抗性基因座 15 的大豆植物。所述等位基因可以是纯合的或杂合的。本发明还提供了包含 ASR 抗性基因座 16 的大豆植物。所述等位基因可以是纯合的或杂合的。本发明还提供了包含来自 ASR 抗性基因座 14、15 和 16 构成的组的两种或更多种 ASR 抗性基因座的大豆植物。所述等位基因可以是纯合的或杂合的。

[0148] 在一个实施方式中,任何单独的 ASR 抗性基因座 14、15 或 16,或这些 ASR 抗性基因座的任何组合,可以与育种计划中的一种或更多种其他 ASR 抗性基因座组合,来产生具有至少两种 ASR 抗性基因座的大豆植物,如美国专利申请 11/805667 中描述的。

[0149] 如在此使用的,ASR 是指任何 ASR 变体或分离物。本发明的大豆植物可以对能够引起或诱导 ASR 的一种或更多种真菌有抗性。在一个方面,本发明提供了对 ASR 有抗性或耐受的植物,以及用于筛选对层锈菌属引起的 ASR 有抗性或易感性的大豆植物的方法和组合物。在优选的方面,本发明提供了用于筛选对红薯层锈菌有抗性或易感性的大豆植物的方法和组合物。在另一个方面,本发明提供了对原始分离自密苏里州东南部的红薯层锈菌菌株“MBH1”有抗性的植物,以及用于筛选大豆植物对红薯层锈菌菌株“MBH1”的抗性或易感性的方法和组合物。

[0150] 本发明进一步提供了,选择的植物来自大豆属的成员构成的组,更具体地来自 *Glycine arenaria*、*Glycine argyrea*、*Glycine canescens*、*Glycine clandestine*、*Glycine curvata*、*Glycine cyrtoloba*、*Glycine falcate*、*Glycine latifolia*、*Glycine latrobeana*、*Glycine max*、*Glycine microphylla*、*Glycine pescadrensis*、*Glycine pindanica*、*Glycine rubiginosa*、*Glycine soja*、*Glycine sp.*、*Glycine stenophita*、*Glycine tabacina* 和 *Glycine tomentella* 构成的组。

[0151] 当通过任何方法分析对 ASR 的抗性或易感性、并根据此处描述数字分值的来分级时,本发明的植物包括具有 1 到 5 的抗性水平的大豆植物,1 是完全免疫,2 是基本上抵抗的抗性,3 是部分抵抗的中度抗性,4 是中度易感的,5 是易感的。

[0152] 在优选的方面,本发明提供了要分析对 ASR 的抗性或易感性的大豆植物,通过确定大豆植物是否具有 1 到 5 的抗性水平的任何方法,根据在此描述的数字分值,1 是完全免疫,2 是基本上抵抗的抗性,3 是部分抵抗的中度抗性,4 是中度易感的,5 是易感的。

[0153] 根据 ASR 对产量的一般公认的影响,本发明的另一个方面提供了具有一种或更多种 ASR 抗性基因座的大豆植物或其衍生物,其展现了与缺乏 ASR 抗性基因座的大豆植物相比在存在 ASR 的情况下提高的谷粒产量。在某些实施方式中,在存在 ASR 的情况下本发明的植物的谷粒的提高与缺乏 ASR 抗性基因座的大豆植物相比是至少 0.5、1、1.5、2.0、2.5 或

3 蒲式耳 / 英亩。

[0154] 本发明的疾病抗性 QTL 可以导入优良大豆自交系中。“优良系”是指任何系,其来自对优越的农学性能的培育和选择。对农民或大豆育种者商业上可获得的优良大豆品种的非限制性实例包括 AG00802、A0868、AG0902、A1923、AG2403、A2824、A3704、A4324、A5404、AG5903 和 AG6202 (Asgrow Seeds, Des Moines, Iowa, USA);BPR0144RR、BPR 4077NRR 和 BPR 4390NRR(Bio Plant Research, Camp Point, Illinois, USA);DKB17-51 和 DKB37-51 (DeKalb Genetics, DeKalb, Illinois, USA);和 DP 4546 RR 和 DP 7870 RR (Delta & Pine Land Company, Lubbock, Texas, USA);JG 03R501、JG 32R606C ADD 和 JG 55R503C (JGL Inc., Greencastle, Indiana, USA);NKS13-K2 (NK Division of Syngenta Seeds, Golden Valley, Minnesota, USA);90M01、91M30、92M33、93M11、94M30、95M30 和 97B52 (Pioneer Hi-Bred International, Johnston, Iowa, USA);SG4771NRR 和 SG5161NRR/STS (Soygenetics, LLC, Lafayette, Indiana, USA);S00-K5、S11-L2、S28-Y2、S43-B1、S53-A1、S76-L9 和 S78-G6 (Syngenta Seeds, Henderson, Kentucky, USA)。优良植物是来自优良品种的代表性的植物。

[0155] 本发明的 ASR 抗性基因座还可以导入包含一种或更多种转基因的优良大豆植物中,所述转基因赋予除草剂耐受性、提高的产量、昆虫控制、真菌病抗性、病毒抗性、线虫抗性、细菌病抗性、支原体病抗性、修饰的油生产、高油生产、高蛋白质生产、萌芽和幼苗生长控制、增强的动物和人类营养、低棉籽糖、环境压力抗性、提高的可消化性、工业酶、药物蛋白质、肽和小分子、改进的加工性状、改进的风味、氮固定、杂交种子生产、降低的变应原性、生物聚合物和生物燃料等等。在一个方面,所述除草剂耐受性选自由草甘膦、麦草畏、草铵膦、磺酰脲、溴苯腈和达草灭除草剂构成的组。这些性状可以通过植物生物技术的方法作为大豆中的转基因来提供。

[0156] 单种或复数种疾病抗性 QTL 等位基因可以从含有所述等位基因的任何植物(供体)导入任何接受者大豆植物。在一个方面,接受者大豆植物可以含有其他的 ASR 抗性基因座。在另一个方面,接受者大豆植物可以含有转基因。在另一个方面,当维持导入的 QTL 时,提供疾病抗性 QTL 的植物的遗传贡献可以通过回交或其他适合的方法来降低。在一个方面,大豆植物中来自供体材料的核遗传材料可以小于或约 50%、小于或约 25%、小于或约 13%、小于或约 5%、3%、2% 或 1%,但是该遗传材料含有感兴趣的 ASR 抗性基因座。

[0157] 含有所描述的一种或更多种 ASR 抗性基因座的植物可以是供体植物。含有抗性基因座的大豆植物可以,例如,通过利用能够检测与抗性相关的标志物多态性的核酸分子来筛选。在一个方面,供体植物选自由 PI291309C 和 PI507009 构成的组。在另一个方面,供体植物来源于 PI291309C 或 PI507009。在另一个方面,供体植物通过将至少一种 ASR 抗性基因从这些系中的每一个中一起带入供体植物中的有性杂交、转化或其他基因组合方法而来源于 PI291309C 和 PI507009 两者。供体植物可以是易感的系。在一个方面,供体植物也可以是接受者大豆植物。

[0158] 进一步理解的是,本发明的大豆植物可以展现任何相对成熟群体的特征。在一个方面,所述成熟群体选自由 000、00、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 构成的组。

[0159] 当然,QTL 的等位基因可以包含多个基因或其他遗传因子,甚至是处于连续基因组区域或连锁群,例如单体型之内的。如在此使用的,疾病抗性基因座的等位基因因而可以包

括超过一种基因或其他遗传因子,其中每个单独的基因或遗传组分也能够展现等位变异,其中每个基因或遗传因子也能够引发对所讨论的数量性状的表型效应。在本发明的一个方面,QTL的等位基因包含也能展现等位变异的一种或更多种基因或其他遗传因子。术语“QTL的等位基因”的使用因而不意图排除包含超过一种基因或其他遗传因子的QTL。特别地,本发明中的“QTL的等位基因”可以指单体型窗口内的单体型,其中表型可以是疾病抗性。单体型窗口是连续的基因组区域,其可以用一组一种或更多种多态性标志物来定义和追踪,其中所述多态性表明血统一致性。窗口内的单体型可以由每个标志物处等位基因的独特指纹图谱来定义。如在此使用的,等位基因是占据染色体上给定基因座的基因的几种可选择形式之一。当存在于染色体上的给定基因座处的所有等位基因相同时,该植物在该基因座处是纯合的。如果存在于染色体上的给定基因座处的等位基因不同,该植物在该基因座处是杂合的。本发明的植物可以是在任何特定的ASR基因座处、或对于特定的多态性标志物是纯合的或杂合的。

[0160] 本发明还提供了本发明的植物的部分。植物部分无限制地包括种子、胚乳、胚珠、花粉、茎、插枝、细胞、原生质体和组织培养物。在本发明的特别优选的方面中,所述植物部分是种子。

[0161] 本发明还提供了大豆种子的容器,其中所述种子的大于50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%包含选自由ASR抗性基因座14、15和16构成的组的至少一种基因座。

[0162] 大豆种子的容器可以含有任何数量、重量或体积的种子。例如,容器可以含有至少、或大于约10、25、50、100、200、300、400、500、600、700、80、90、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000颗或更多颗种子。在另一个方面,容器可以含有约、或大于约1克、5克、10克、15克、20克、25克、50克、100克、250克、500克或1000克的种子。做为选择,所述容器可以含有至少或大于约0盎司、1盎司、5盎司、10盎司、1磅、2磅、3磅、4磅、5磅、10磅、15磅、20磅、25磅或50磅或更多种子。

[0163] 大豆种子的容器可以是本领域可获得的任何容器。例如,容器可以是盒子、袋子、罐子、包、小袋、胶卷、桶或管。

[0164] 在另一个方面,大豆种子的容器中含有的种子可以是处理的或未处理的大豆种子。在一个方面,所述种子可以被处理以改善萌芽,例如,通过引发所述种子,或通过消毒来对抗种子携带的病原体。在另一个方面,种子可以包被任何可获得的包被物来改善,例如,种植性、出苗以及对抗种子携带的病原体的保护。种子包被物可以是任何形式的种子包被物,包括但不限于,丸化、薄膜包被物或外壳。

[0165] 本发明的植物或其部分可以在培养物中生长和再生。从各种组织类型再生大豆植物的方法,以及大豆的组织培养的方法是本领域已知的(参见,例如Widholm *et al.*, *In Vitro Selection and Culture-induced Variation in Soybean*, In Soybean: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology, Eds. Verma and Shoemaker, CAB International, Wallingford, Oxon, England (1996))。植物例如大豆的再生技术可以用作多种组织或细胞类型的起始材料。特别是对于大豆,已经开发了从某些分化的组织类型例如分生组织 Cartha *et al.*, *Can. J. Bot.* 59:1671-1679 (1981)、胚轴部分 Cameya *et al.*, *Plant Science Letters* 21: 289-294 (1981)和茎节部分 Saka *et al.*, *Plant Science Letters*, 19: 193-201 (1980); Cheng *et al.*, *Plant Science Letters*, 19:

91-99 (1980) 开始的再生过程。已经报道了来自体细胞胚的完整性成熟的大豆植物的再生,所述体细胞胚从不成熟的大豆胚的外植体产生(Ranch *et al.*, *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 21: 653-658 (1985)。还报道了通过器官发生和胚胎发生从组织培养物再生成熟的大豆植物(Barwale *et al.*, *Planta* 167: 473-481 (1986);Wright *et al.*, *Plant Cell Reports* 5: 150-154 (1986)。

[0166] 本发明还提供了通过筛选疾病抗性或易感性从大豆植物中选择的疾病抗性大豆植物,所述选择包括询问基因组核酸中标志物分子分子的存在,所述标志物分子与大豆植物中疾病抗性相关的 QTL 的等位基因是遗传连锁的,其中 QTL 的等位基因也位于与 ASR 抗性相关的连锁群上。

[0167] 将等位基因种质渗入到大豆植物中的方法,包括(A)使包含选自由 SEQ ID NO:73 到 80 构成的组的核酸分子的至少一种第一大豆植物与至少一种第二大豆植物杂交以形成群体,(B)筛选具有一种或更多种核酸标志物的所述群体,来确定来自所述群体的一种或更多种大豆植物是否含有所述核酸分子,和(C)从所述群体中选择包含选自由 SEQ ID NO:73 到 80 构成的组的核酸分子的一种或更多种大豆植物。

[0168] 本发明还包括将等位基因种质渗入到大豆植物中的方法,包括:(A)使至少一种 ASR 抗性大豆植物与至少一种 ASR 敏感性大豆植物杂交以形成群体;(B)筛选具有一种或更多种核酸标志物的所述群体,来确定来自所述群体的一种或更多种大豆植物是否含有至少一种 ASR 抗性等位基因,其中每种 ASR 抗性等位基因处在选自由 ASR 抗性基因座 14、15 和 16 构成的组的抗性基因座上。

[0169] 本发明包括分离的核酸分子。这样的分子包括能够检测与 ASR 基因座遗传地或地理地连锁的多态性的那些核酸分子。这样的分子可以称为标志物。可以通过可用的技术获得与选自由 ASR 抗性基因座 14、15 和 16 构成的组的基因座连锁的其他标志物。在一个方面,所述核酸分子能够检测位于距离选自由 ASR 抗性基因座 14、15 和 16 构成的组的基因座小于 30、20、10、5、2、或 1 厘摩(centimorgans)的标志物的存在或缺乏。具有相应的作图位置的示范性的核酸分子在美国专利申请 NO. 2005/0204780、2005/0216545 和系列号 NO. 60/932, 533 中提供了,其可以用于方便本发明的基因座的选择和种质渗入。在另一个方面,标志物展现了 2 或更大、3 或更大、或 4 或更大的 ASR 抗性的 LOD 分值,利用本领域已知的方法,例如 Qgene Version 2.23 (1996)和默认参数测量。在另一个方面,所述核酸分子能够检测选自由 ASR 抗性基因座 14、15 和 16 构成的组的基因座中的标志物。在进一步的方面,核酸分子选自由 SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:80、其片段、其互补物和能够与一种或更多种这些核酸分子特异性杂交的核酸分子构成的组。

[0170] 在优选的方面,本发明的核酸分子包括在中度严格条件,例如,约 $2.0 \times SSC$ 和约 $65^\circ C$ 下与 SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:80 中列出的核酸分子或其互补物或任一者的片段的一种或更多种特异性杂交的那些。在特别优选的方面中,本发明的核酸将在高度严格条件下与 SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:80 中列出的核酸分子、或互补物或任一者的片段的一种或更多种特异性杂交。在本发明的一个方面中,本发明的优选的标志物核酸分子具有 SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:80 中所列的核酸序列,或其互补物或任一者的片段。在本发明的另一个方面,本发明的优选的标志物核酸分子与 SEQ ID NO:1 到 SEQ ID NO:80 中所列核酸序列或其互补物或任一者的片段具有 80% 到 100% 或 90% 到 100% 之间的序列同一性。在本

发明的进一步的方面中,本发明的优选的标志物核酸分子与 SEQ ID NO :1 到 SEQ ID NO :80 中所列序列或其互补物或任一者的片段享有 95% 到 100% 之间的序列同一性。在本发明的更优选的方面,本发明的优选的标志物核酸分子与 SEQ ID NO :1 到 SEQ ID NO :80 中所列核酸序列或其互补物或任一者的片段享有 98% 到 100% 之间的序列同一性。在本发明的更优选的方面,本发明的优选的标志物核酸分子与 SEQ ID NO :1 到 SEQ ID NO :80 中所列核酸序列或其互补物或任一者的片段享有 99% 到 100% 之间的序列同一性。在本发明的更优选的方面中,本发明的优选的标志物核酸分子与 SEQ ID NO :1 到 SEQ ID NO :80 中所列核酸序列或其互补物或任一者的片段享有 100% 的序列同一性。

[0171] 核酸分子或其片段能够在某些情况下与其他核酸分子特异性杂交。如此处使用的,如果两个分子能形成反平行的双链核酸结构,则称为两个核酸分子能相互特异性的杂交。如果核酸分子显示出完全的互补性,则称核酸分子是另一个核酸分子的“互补物”。如此处使用的,当分子之一的每一个核苷酸与另一个分子的核苷酸互补时,称为分子显示出“完全的互补性”。如果分子以足够的稳定性相互杂交以使它们在至少常规的“低严格”条件下保持相互退火,称为两个分子是“最低度互补的”。类似地,如果分子可以以足够的稳定性相互杂交以允许它们在常规的“高严格”条件下保持相互退火,称为分子是“互补的”。由 Sambrook 等人在 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)* 中,以及 Haymes 等人在 *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, DC (1985)* 描述了常规的严格条件。因而从完全互补的偏离是可允许的,只要这种偏离不完全地排除了分子形成双链结构的能力。为了使核酸分子作为引物或探针,仅需在序列中充分的互补,以使得在所采用的特定溶剂和盐浓度下能形成稳定的双链结构。

[0172] 如此处使用的,基本上同源的序列是在高度严格条件下同与其相比较的核酸序列的互补物特异性的杂交的核酸序列。本发明的核酸探针和引物在严格条件下与目标 DNA 序列杂交。术语“严格杂交条件”被定义为一些条件,在所述条件下探针或引物与目标序列而不与非目标序列特异性地杂交,其可以经验性地确定。术语“严格条件”是根据 Sambrook *et al.*, 1989, 9.52-9.55 节中讨论的具体杂交操作,对于核酸探针与目标核酸(即,与感兴趣的特定核酸序列)的杂交功能性地定义的。还参见 Sambrook *et al.*, 1989, 9.47-9.52, 9.56-9.58; Kanehisa 1984 *Nucl. Acids Res.* 12:203-213; 和 Wetmur *et al.* 1968 *J. Mol. Biol.* 31:349-370。促进 DNA 杂交的适合的严格条件,例如,6.0 × 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 约 45°C, 之后是在 50°C 用 2.0 × SSC 洗涤,对本领域的技术人员是公知的,或可在 *Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. 1989, 6.3.1-6.3.6* 中找到。例如,洗涤步骤中的盐浓度可以选自 50°C 下的约 2.0 × SSC 的低严格度,到 50°C 下约 0.2 × SSC 的高严格度。此外,洗涤步骤中的温度可以从室温下、约 22°C 的低严格条件提高到约 65°C 的高严格条件。温度和盐可以都变化,或者温度或盐浓度保持不变而另一个变量发生改变。

[0173] 例如,对于高严格度,利用 DNA 或 RNA 探针或引物的杂交可以在 65°C 6 × SSC、0.5% SDS、5 × Denhardt's、100 μg/mL 非特异性的 DNA (例如,超声化的鲑鱼精子 DNA) 下进行,65°C 下 0.5 × SSC、0.5% SDS 洗涤。

[0174] 期待的是,如果保持探针或引物与目标序列的结合的特异性,低严格杂交条件,例

如,低杂交和 / 或洗涤温度,可以用于鉴定具有低序列相似性程度的相关序列。因而,本发明的核苷酸序列可以利用它们的能力来与 DNA、RNA 或 cDNA 片段的互补段选择性地形成双螺旋分子。

[0175] 核酸分子的片段可以是任何大小的片段,说明性的片段包括 SEQ ID NO :1 到 SEQ ID NO :80 中列出的核酸序列和其互补物的片段。在一个方面,片段可以是 15 到 25、15 到 30、15 到 40、15 到 50、15 到 100、20 到 25、20 到 30、20 到 40、20 到 50、20 到 100、25 到 30、25 到 40、25 到 50、25 到 100、30 到 40、30 到 50 和 30 到 100 个核苷酸。在另一个方面,片段可以大于 10、15、20、25、30、35、40、50、100 或 250 个核苷酸。

[0176] 其他遗传学标志物可以用于选择具有与本发明的大豆的真菌病抗性相关的 QTL 的等位基因的植物。公众标志物数据库的实例包括,例如,Soybase,美国农业部农业研究所(Agricultural Research Service,United States Department of Agriculture)。

[0177] 本发明的遗传学标志物包括“显性”或“共显性”标志物。“共显性标志物”揭示了两种或更多种等位基因的存在(每个二倍体个体两个)。“显性标志物”揭示了仅单个等位基因的存在。显性标志物表型的存在(例如,DNA 的条带)是等位基因以纯合或杂合的状态存在的指示。显性标志物表型的缺乏(例如,没有 DNA 条带)仅是存在“某些其他的”不确定的等位基因的证据。对于其中个体主要是纯合的、基因座主要是二态的群体来说,显性和共显性的标志物是同样地重要的。随着群体变得更为杂合和多等位性,共显性标志物常常变得比显性标志物更代表基因型的信息。

[0178] 在另一个实施方式中,可以利用与本发明的 QTL 的等位基因遗传连锁或相关的标志物,例如单序列重复标志物(SSR)、AFLP 标志物、RFLP 标志物、RAPD 标志物、表型标志物、同工酶标志物、单核苷酸多态性(SNP)、插入或删除(Indels)、单特征多态性(SFPs,例如,Borevitz *et al.* 2003 Gen. Res. 13:513-523 中描述的)、微阵列转录作用分布、DNA 衍生的序列和 RNA 衍生的序列。

[0179] 在一个实施方式中,对于遗传多态性的存在或缺乏的基于核酸的分析可以用于培育群体中种子的选择。用于遗传多态性分析的各种各样的遗传学标志物是可获得的,是本领域技术人员已知的。所述分析可以用于选择包含或与遗传学标志物连锁的基因、QTL、等位基因或基因组区域(单体型)。

[0180] 在此,核酸分析方法是本领域已知的,包括,但不限于,基于 PCR 的检测方法(例如,TaqMan 分析)、微阵列方法和核酸测序方法。在一个实施方式中,DNA、RNA 或 cDNA 的样品中多态性位点的检测可以通过核酸扩增方法的运用来促成。这些方法特异性地提高跨越多态性位点、或包括所述位点的多核苷酸、以及位于多态性位点的远端或近端的序列的浓度。这样的扩增的分子可以通过凝胶电泳、荧光检测方法或其他手段容易地检测。

[0181] 实现这样的扩增的方法采用聚合酶链式反应(PCR)(Mullis *et al.* 1986 Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273;欧洲专利 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;和美国专利 4,683,194),利用能够与近端序列杂交的引物对,所述近端序列在其双链形式中限定了多态性。

[0182] DNA 序列中的多态性可以通过本领域公知的多种有效方法,包括但不限于,在美国专利 5,468,613 和 5,217,863;5,210,015;5,876,930;6,030,787;6,004,744;6,013,431;

5, 595, 890 ;5, 762, 876 ;5, 945, 283 ;5, 468, 613 ;6, 090, 558 ;5, 800, 944 ;和 5, 616, 464 中公开的那些来检测或分型, 所有这些通过将它们完全引用来合并在本文中。然而, 本发明的组合和方法可以与任何多态性分型方法一起使用, 来对大豆基因组 DNA 样品中的多态性分型。使用的这些大豆基因组 DNA 样品包括但不限于, 直接从大豆植物分离的大豆基因组 DNA、克隆的大豆基因组 DNA、或扩增的大豆基因组 DNA。

[0183] 例如, DNA 序列中的多态性可以通过与等位基因特异性寡核苷酸(ASO) 探针杂交来检测, 如美国专利 5, 468, 613 和 5, 217, 863 中公开的。美国专利 5, 468, 613 公开了等位基因特异性寡核苷酸杂交, 其中核酸序列中的单个或多个核苷酸变异可以通过一种过程在核酸中检测, 在所述过程中含有所述核苷酸变异的序列被扩增, 点在膜上, 并用标记的序列特异性寡核苷酸探针处理。

[0184] 目标核酸序列也可以通过如美国专利 5, 800, 944 中公开的探针连接方法来检测, 其中感兴趣的序列被扩增并与探针杂交, 随后连接来检测探针的标记的部分。

[0185] 微阵列也可以用于多态性检测, 其中寡核苷酸探针集以重叠方式组装来呈现单个序列, 从而在一个点上目标序列中的差异将引起部分探针杂交(Borevitz *et al.*, *Genome Res.* 13:513-523 (2003); Cui *et al.*, *Bioinformatics* 21:3852-3858 (2005)。在任一种微阵列上, 预期的是将存在复数个目标序列, 其可以代表基因和 / 或非编码区域, 其中每个目标序列通过一系列重叠寡核苷酸而不是通过单个探针来呈现。这种平台提供了多种多态性的高通量筛选。单特征多态性(SFP) 是通过寡核苷酸阵列中单个探针检测的多态性, 其中特征是阵列中的探针。通过基于微阵列的方法的目标序列分型在美国专利 6, 799, 122 ; 6, 913, 879 和 6, 996, 476 中公开。

[0186] 目标核酸序列也可以通过如美国专利 5, 616, 464 中公开的探针连接方法、采用至少一对探针来检测, 所述探针具有与目标核酸序列的邻近部分同源的序列, 并具有侧链, 所述侧链在所述探针与所述目标核酸序列碱基配对时非共价地结合来形成茎。所述侧链的至少一种具有可光活化的基团, 其可以与所述茎的另一侧链成员形成共价的交联。

[0187] 检测 SNP 和 Indels 的其他方法包括单碱基延伸(SBE)方法。SBE 方法的实施例包括, 但不限于, 美国专利 6, 004, 744、6, 013, 431、5, 595, 890、5, 762, 876 和 5, 945, 283 中公开的那些。SBE 方法基于邻近于多态性的核苷酸引物的延伸, 来在引物的延伸时掺入可检测的核苷酸残基。在某些实施方式中, SBE 方法利用三种合成的寡核苷酸。寡核苷酸中的两种充当 PCR 引物, 并与大豆基因组 DNA 的基因座的序列互补, 所述序列侧翼于含有要分析的多态性的区域。在含有多态性的大豆基因组的区域扩增之后, PCR 产物与第三寡核苷酸(称为延伸引物)混合, 所述第三寡核苷酸被设计为在存在 DNA 聚合酶和两种差异化标记的二脱氧核苷三磷酸的情况下与扩增的邻近多态性的 DNA 杂交。如果模板上存在所述多态性, 标记的二脱氧核苷三磷酸之一可以在单碱基链延伸中添加给引物。然后通过测定两种差异的标记物的哪一种被添加到延伸引物中来推断存在的等位基因。纯合的样品将仅引起两种标记的碱基之一被掺入, 将仅检测到两种标记物之一。杂合的样品存在两种等位基因, 因而将指导两种标记物的掺入(到延伸引物的不同分子中), 因而将检测到两种标记物。

[0188] 在检测多态性的优选的方法中, SNPs 和 Indels 可以通过美国专利 5, 210, 015 ; 5, 876, 930 ; 和 6, 030, 787 中公开的方法来检测, 其中寡核苷酸探针具有与探针的 5' 和 3' 末端共价连接的 5' 荧光报告物染料和 3' 猝灭染料。当探针完整时, 报告物染料与猝灭染

料的接近引起报告物染料荧光的抑制,例如,通过 Forster 型能量转移。在 PCR 正向和反向引物与侧翼于多态性的目标 DNA 的特异性序列杂交期间,杂交探针与扩增的 PCR 产物内含有多态性的序列杂交。在随后的 PCR 循环中,具有 5' → 3' 核酸外切酶活性的 DNA 聚合酶裂解探针,并从猝灭染料上分离报告物染料,产生报告物的提高的荧光。

[0189] 对于 QTL 作图,包括的标志物应当是有来源诊断性的,以作出关于后来的群体的推理。SNP 标记物对于作图是理想的,因为特定 SNP 等位基因来自特定物种中现存群体的独立来源的可能性是非常低的。因而,SNP 标志物对于跟踪和辅助 QTL 的种质渗入,特别是对于单体型来说,是有用的。

[0190] 其他标志物分子的遗传连锁可以通过基因作图模型来建立,例如,无限制地,Lander 等人所报道的侧翼标志物模型(Lander *et al.* 1989 *Genetics*, 121:185-199),以及基于其中描述的最大可能性方法和在软件包 MAPMAKER/QTL 中实现的间隔作图(Lincoln and Lander, *Mapping Genes Controlling Quantitative Traits Using MAPMAKER/QTL*, Whitehead Institute for Biomedical Research, Massachusetts, (1990)。其他软件包包括 Qgene, Version 2.23 (1996), Department of Plant Breeding and Biometry, 266 Emerson Hall, Cornell University, Ithaca, NY)。使用 Qgene 软件是特别优选的方法。

[0191] 与假定没有 QTL 效应的 MLE 一起,计算标志物的存在的最大可能性估计(MLE),来避免假阳性。然后根据 $LOD = \log_{10}$ 来计算机会比率的 \log_{10} (LOD) (假定没有连锁的 QTL 的 QTL/MLE 存在的 MLE)。LOD 值基本上代表了相比 QTL 的缺乏,更可能出现假定 QTL 的存在的数据的程度。以给定的置信度,比方说 95% 来避免假阳性的 LOD 阈值,将取决于标志物的数量和基因组的长度。表明 LOD 阈值的图形在 Lander *et al.* (1989) 中阐述,由 Arús and Moreno-González, *Plant Breeding*, Hayward, Bosemark, Romagosa (eds.) Chapman & Hall, London, pp. 314-331 (1993) 进一步描述。

[0192] 可以使用其他的模型。已经报道了间隔作图的的许多修改版和可选择的方法,包括利用非参数方法。(Kruglyak *et al.* 1995 *Genetics*, 139:1421-1428)。也可以使用多重回归方法或模型,其中性状在大量的标志物上回归(Jansen, *Biometrics in Plant Breed*, van Oijen, Jansen(eds.) Proceedings of the Ninth Meeting of the Eucarpia Section Biometrics in Plant Breeding, The Netherlands, pp. 116-124(1994); Weber and Wricke, *Advances in Plant Breeding*, Blackwell, Berlin, 16 (1994))。操作组合了间隔作图和回归分析,从而表型以给定的标志物间隔在单个推定的 QTL 上、同时在充当“辅助因子”的多个标志物上回归,已经由 Jansen 等(Jansen *et al.* 1994 *Genetics*, 136:1447-1455)和 Zeng (Zeng 1994 *Genetics* 136:1457-1468)报道。一般地,辅助因子的使用降低了估计的 QTL 位置的偏见和采样误差(Utz and Melchinger, *Biometrics in Plant Breeding*, van Oijen, Jansen (eds.) Proceedings of the Ninth Meeting of the Eucarpia Section Biometrics in Plant Breeding, The Netherlands, pp. 195-204 (1994),从而改善了 QTL 作图的精确性和效率(Zeng 1994)。这些模型可以延伸到多环境实验来分析基因型-环境相互作用(Jansen *et al.* 1995 *Theor. Appl. Genet.* 91:33-3)。

[0193] 合适的作图群体的选择对于图谱构建是重要的。合适的作图群体的选择取决于采用的标志物系统的类型(Tanksley *et al.*, *Molecular mapping in plant chromosomes. chromosome structure and function: Impact of new concepts* J.P. Gustafson and R.

Appels (Eds.) Plenum Press, New York, pp. 157-173 (1988))。必需考虑作图群体中使用的亲本的来源(适应的对比外来的)。染色体配对和重组率在远缘杂交(适应的 \times 外来的)中可能被严重地扰动(抑制),一般产生大大降低的连锁距离。当与近缘杂交(适应的 \times 适应的)中的子代相比时,远缘杂交通常将提供分离群体,具有相对大的多态性系列。

[0194] F_2 群体是自我授粉(自交)的第一代。通常,单独的 F_1 植物自交来产生孟德尔氏(1:2:1)式分离所有基因的群体。利用共显性标志物系统从完全分类的 F_2 群体获得最大的遗传信息(Mather, Measurement of Linkage in Heredity: Methuen and Co., (1938))。对于显性标志物来说,需要子代测试(例如, F_3 , BCF_2)来鉴定杂合子,使得它相当于完全分类的 F_2 群体。然而,这个过程常常是禁止性的,因为后代测定中涉及的成本和时间。 F_2 个体的后代测试常常在图谱构建中使用,其中表型不一致地反映基因型(例如,疾病抗性),或其中性状表达受 QTL 控制。来自后代测试群体(例如, F_3 或 BCF_2)的分离数据可以用于图谱构建。标志物辅助的选择然后可以用于根据标志物-性状图谱相关来交配子代(F_2 , F_3),其中连锁群没有通过重组事件完全地分离(即,最大不平衡)。

[0195] 重组自交系(RIL)(遗传相关的系;通常 $>F_5$,从连续自交的 F_2 系发展向纯合)可以用作作图群体。从显性标志物获得的信息可以通过利用 RIL 来最大化,因为所有的基因座是纯合的或几乎是纯合的。在紧密连锁的情况下(即,约 $<10\%$ 重组),在 RIL 群体中评估的显性和共显性标志物提供了相比回交群体中的任一标志物类型更多的每个个体的信息(Reiter *et al.* 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89:1477-1481)。然而,随着标志物之间的距离变得更大(即,基因座变得更为独立),RIL 群体中的信息显著地降低。

[0196] 回交群体(例如,从成功的品种(轮回亲本)和带有前者中不存在的性状的另一个品种(供体亲本)之间的交配产生的)可以用作作图群体。可以进行对轮回亲本的一系列回交来恢复大部分它的期望的性状。因而,产生了由几乎同轮回亲本一样的个体组成的群体,但是每个个体带有来自供体亲本的基因组区域的改变的数量或嵌合性。如果轮回亲本中的所有基因座是纯合的,以及供体和轮回亲本具有相反的多态性标志物等位基因,回交群体对于作图显性标志物可能是有用的(Reiter *et al.* 1992)。利用共显性或显性标志物从回交群体获得的信息小于从 F_2 群体获得的,因为每个植物采样了一个、而不是两个重组配子。然而,随着 RIL 群体中连锁的基因座之间的距离提高(即,约 $.15\%$ 重组),当与 RIL 相比时,回交群体是更为情报性的(在低标志物饱和度下)。提高的重组可能对于紧密连锁的拆分是有益的,但是在具有低标志物饱和度的图谱的构建中可能是不希望的。

[0197] 通过多次回交来产生一系列个体而产生的近等基因系(NIL)可以用作作图群体,所述个体除了询问中的性状或基因组区域之外在遗传组成方面几乎是相同的。在用 NIL 作图时,仅一部分多态的基因座预计被作图到选择的区域。

[0198] 批量分离分析(BSA)是为快速鉴定标志物和感兴趣的性状之间的连锁而开发的方法(Michelmore *et al.* 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9828-9832)。在 BSA 中,两种批量的 DNA 样品来自单次交配的分选群体中抽取。这些批量含有特定性状(对特定疾病的抗性或易感性)或基因组区域相同、但在不连锁的区域中随机的个体(即,杂合的)。与目标区域不连锁的区域在 BSA 的许多个体的批量样品之间将不会不同。

[0199] 本发明的植物可以是来自育种计划的一部分或从育种计划产生的。育种方法的选择取决于植物繁殖的方式、要改善的性状的遗传率、以及商业上使用的栽培种的类型(例

如, F1 杂交栽培种、纯系栽培种, 等等)。栽培种是植物物种的种类或品种, 其是通过培育有意地产生或选择并维持的。

[0200] 如在此使用的, 术语子代是指遗传学的后代。本发明提供了通过有性或营养生殖产生的、从种子生长的、从上述植物部分再生的、或从栽培种或子代植物的组织培养物再生的子代。

[0201] 分子培育常常被称为标志物辅助的选择(MAS)和标志物辅助的培育(MAB), 其中 MAS 是指在分子标志物基因型的基础上进行培育判定, MAB 是代表植物育种中分子标志物的运用的通称。在这些类型的分子育种计划中, 遗传标志物等位基因可以用于鉴定在一个标志物基因座、几个基因座或单体型上含有期望的基因型的植物, 预计其将会将期望的基因型以及期望的表型转移给它们的子代。标志物在植物育种中是高度有用的, 因为只要建立了, 它们不受环境或上位相互作用的影响。此外, 某些类型的标志物适合于高通量检测, 允许以低成本的方式快速鉴定。

[0202] 以下列出了培育本发明的植物的选择的、非限制性方法。育种计划可以利用标志物辅助的选择(MAS)对任何交配的子代来增强。MAS 是一种选择过程, 其中感兴趣的性状不根据性状本身、而是根据与之连锁的标志物来选择。例如, 如果 MAS 被用于选择患有疾病的个体, 疾病的水平不被定量, 而是与疾病连锁的标志物等位基因被用于测定疾病存在。假定是, 连锁的等位基因与感兴趣的基因和 / 或数量性状基因座(QTL) 相关。MAS 对于难以测量的性状、表型昂贵的、展现低遗传率的和 / 或在晚期植物发育中表达的性状是有用的。要理解的是, 本发明的核酸标志物可以用于 MAS (培育) 计划中。进一步理解的是, 任何商业的和非商业的栽培种可以在育种计划中使用。一些因素, 例如, 出苗活力、营养活力、压力耐受性、疾病抗性、分支、开花、结实率 (seed set)、种子大小、种子密度、直立性 (standability)、可脱粒性等等, 一般将支配所述选择。

[0203] 对于高度可遗传的性状, 在单个位置上评估的优越的个体植物的选择将是有效的, 而对于具有低遗传率的性状, 选择应当基于从相关植物的科的复本评估中获得的平均值。流行的选择方法通常包括谱系选择、修改的谱系选择、混合选择和轮回选择。在优选的方面, 进行回交或轮回育种计划。

[0204] 遗传的复杂性影响了育种方法的选择。回交育种可以用于将高度可遗传的性状的一个或几个有利的基因转移到期望的栽培种中。这种方法已经广泛地用于培育疾病抗性栽培种。各种轮回选择技术被用于改善由许多基因控制的数量性遗传的性状。

[0205] 培育系可以在代表商业目标区域的环境中测试和与合适的标准物比较两个或更多个世代。最好的系是新的商业栽培种的候选物; 在性状方面仍然缺陷的那些可以用作亲本来产生用于进一步选择的新的群体。

[0206] 系谱育种和轮回选择育种方法可以用于从培育群体开发栽培种。育种计划将来自两个或更多个栽培种或各种广泛来源的期望的性状组合到培育库中, 通过自交和期望的表型的选择从所述培育库中开发栽培种。可以评估新的栽培种来确定其具有商业潜力。

[0207] 回交育种已经被用于将简单地遗传的、高度可遗传的性状转移到期望的纯合栽培种或自交系中, 其是轮回亲本。要转移的性状的来源被称为供体亲本。在初始的交配中, 保持了供体亲本的表型的个体被选择, 并与轮回亲本重复地交配(回交)。产生的植物预计具有轮回亲本(例如, 栽培种)的大多数特质, 此外, 期望的性状从供体亲本转移。

[0208] 单籽传操作严格地说是指种植分离群体,每个植物收获一个种子的样品,利用一个种子的样品来种植下一代。当群体从 F_2 推进到期望的近交水平时,系所衍生于的植物将各自追查至不同的 F_2 个体。由于某些种子发芽或某些植物产生至少一个种子的失败,每个世代群体中植物的数量降低。结果,当世代推进完成时,不是所有的在群体中原始采样的 F_2 植物都被子代表。

[0209] 通常用于不同性状和作物的其他育种方法的描述可以在几本参考书之一中找到(Allard, "Principles of Plant Breeding," John Wiley & Sons, NY, U. of CA, Davis, CA, 50-98, 1960; Simmonds, "Principles of crop improvement," Longman, Inc., NY, 369-399, 1979; Sneepand Hendriksen, "Plant breeding perspectives," Wageningen (ed), Center for Agricultural Publishing and Documentation, 1979; Fehr, *In: Soybeans: Improvement, Production and Uses*, 2nd Edition, *Monograph.*, 16:249, 1987; Fehr, "Principles of variety development," *Theory and Technique*, (Vol. 1) and *Crop Species Soybean* (Vol. 2), Iowa State Univ., Macmillan Pub. Co., NY, 360-376, 1987)。

[0210] 对传统的QTL作图的替代涉及通过对比单独的标志物对单体型作图来实现更高的分辨率(Fan *et al.* 2006 *Genetics* 172:663-686)。这种方法追踪称为单体型的DNA块,如多态标志物所定义的,其在作图群体中被假定是血统一致的。这种假定产生了更大的有效样品大小,提供了QTL的更大的分辨率。测定表型和基因型之间的相关性的统计显著性的方法,在单体型的情况下,可以通过本领域已知的任何统计测试,使用需要的任何公认的统计显著性阈值来测定。特定方法和显著性的阈值的应用是本领域普通技术人员的能力之内的。

[0211] 进一步理解的是,本发明提供了包含本发明的核酸分子的细菌、病毒、微生物、昆虫、哺乳动物和植物细胞。

[0212] 如在此使用的,“核酸分子”,其是天然发生的分子或另外地可以是“基本上纯化的”,如果希望,是指从在其天然状态下与之通常相关的基本上所有其他分子中分离的分子。更优选的,基本上纯化的分子是制品中存在的优势物质。基本上纯化的分子可以是大于约60%地没有、优选的约75%地没有、更优选的约90%地没有、以及最优选的约95%地没有天然混合物中存在的其他分子(不包括溶剂)。术语“基本上纯化的”不意图涵盖以它们的天然状态存在的分子。

[0213] 对于结构性特质,例如,核酸与另一个核酸分子杂交的能力,或蛋白质被抗体结合(或与其他分子竞争这样的结合)的能力,本发明的试剂优选的是“生物学活性的”。做为选择,这样的特质可以是催化的,因而涉及试剂介导化学反应或应答的能力。

[0214] 本发明的试剂也可以是重组的。如在此使用的,术语重组是指任何试剂(例如,DNA、肽,等等),其间接地来自或产生于核酸分子的人类操作。

[0215] 本发明的试剂可以用便于试剂的检测的试剂来标记(例如,荧光标记物(Prober *et al.* 1987 *Science* 238:336-340; Albarella *et al.*, 欧洲专利 144914)、化学标记物(Sheldon *et al.*, 美国专利 4, 582, 789; Albarella *et al.*, 美国专利 4, 563, 417)、修饰的碱基(Miyoshi *et al.*, 欧洲专利 119448)。

[0216] 现在一般性地描述了本发明,通过参考以下的实施例将更容易地理解本发明,实

施例通过举例的方式提供,而不意图是本发明的限制,除非指明了。

实施例

[0217] 实施例 1. 利用离脱叶分析对大豆登记物的 ASR 抗性的测试

[0218] 四十种推定的 ASR 抗性登记物被筛选 ASR 抗性。对 ASR 的抗性的叶片分析对这 40 个系进行,适合的易感的登记物作为对照,如美国专利申请 11/805667 中描述的。植物按照从 1 到 5 的数字分值表明抗性程度来计分,1- 是免疫的,2- 展现小于叶面积的约 50% 的红色 / 褐色病变,3- 展现大于叶面积的约 50% 的红色 / 褐色病变,4- 展现小于叶面积的约 50% 的棕色病变,5- 展现大于叶面积的约 50% 的棕色病变,即,完全易感的。当用来自密苏里州东南部的豆薯层锈菌 MBH1 的北美分离物感染时,对于登记号 PI291309C、成熟的 - 组 -2 系,以及对于 PI507009、成熟的 - 组 -6 系,获得在多个测试中平均锈病严重度分值为 1.5。

[0219] PI291309C 和 PI507009 各自与大豆系 MV0079 杂交来产生 F2 作图群体,其个体用 104 种 SNP 来基因分型,并测试 ASR 抗性。SNP 根据亲本的指纹图谱分布和基因组覆盖度来选择。在 PI291309C 中发现的 ASR 抗性基因座,称为 ASR 抗性基因座 14,被作图到靠近 Rpp1 基因的公众大豆遗传连锁图谱上的连锁群 G (附图 1)。PI291309C 中表征的 ASR 抗性基因座在单体型基础上不同于含有称为 Rpp1 的 ASR 抗性基因座的大豆系,以及在对密苏里州东南部豆薯层锈菌菌株 MBH1 的表型应答方面不同。发现三种 SNP 标志物,NS0095012 ($P < 0.0050$) 和 NS0102630 和 NS0119675 (每一个的 $P < 0.0010$) 处于与 ASR 抗性基因座 14 疾病表型应答的高度连锁不平衡中,因而与 ASR 抗性基因座 14 相关。所有三种 SNP 标志物被鉴定为在监视 ASR 抗性基因座 14 的阳性种质渗入方面是有用的。SNP 标志物 NS0095012 相应于 SEQ ID NO :1 ;NS0119675 相应于 SEQ ID NO :2 ;以及 NS0102630 相应于 SEQ ID NO :3。

[0220] ASR 抗性基因座 15 在 PI507009 中发现,作图到公众大豆遗传连锁图谱的连锁群 C2 (附图 2)。发现三种 SNP 标志物,NS0127833 ($R Sq > 0.050$) 和 NS0118716 和 NS0093385 (每一个的 $R Sq > 0.200$) 处于与 ASR 抗性基因座 15 疾病表型应答的高度连锁不平衡中,因而与 ASR 抗性基因座 15 相关。所有三种 SNP 标志物被鉴定为在监视 ASR 抗性基因座 15 的阳性种质渗入方面是有用的。SNP 标志物 NS0093385 相应于 SEQ ID NO :4 ;NS0118716 相应于 SEQ ID NO :5 ;以及 NS0127833 相应于 SEQ ID NO :6。

[0221] ASR 抗性基因座 16 在 PI507009 中发现,作图到公众大豆遗传连锁图谱的连锁群 D2 (附图 3)。发现两种 SNP 标志物,NS0118536 ($R Sq > 0.050$) 和 NS0113966 ($R Sq > 0.150$) 处于与 ASR 抗性基因座 16 疾病表型应答的连锁不平衡中,因而与 ASR 抗性基因座 16 相关。两种 SNP 标志物被鉴定为在监视 ASR 抗性基因座 16 的种质渗入方面是有用的。SNP 标志物 NS0113966 相应于 SEQ ID NO :7 ;NS0118536 相应于 SEQ ID NO :8。表 1 列出了 SNP 标志物、它们的染色体位置、SNP 位置、抗性位点基因和每种 SNP 的抗性位点基因的 SEQ ID NO :编号。

[0222] 实施例 2. 检测 ASR 抗性的示范性的标志物分析

[0223] 在一个实施方式中,DNA、RNA 或 cDNA 的样品中多态性位点的检测可以通过核酸扩增方法的运用来促成。这些方法特异性地提高跨越多态性位点、或包括所述位点的多核苷酸、以及位于多态性位点的远端或近端的序列的浓度。这样的扩增的分子可以通过凝胶电

泳、荧光检测方法或其他手段容易地检测。用于扩增和检测与 ASR 抗性相关的基因组区域的示范性的引物和探针在表 2 中给出。

[0224] 实施例 3. 对检测具有 ASR 抗性基因座的大豆植物有用的寡核苷酸杂交探针

[0225] 寡核苷酸也可以用于利用基于杂交的 SNP 检测方法检测或分型与在此公开的 ASR 抗性基因座相关的多态性。提供了能够与包括多态性的分离的核酸序列杂交的示范性的寡核苷酸。设计以实验上确定的严格度来辨别在此提出的多态性的等位状态的分析, 处在本领域技术人员的能力之内。示范性的分析包括 Southern 印迹、Northern 印迹、微阵列、原位杂交和基于杂交的多态性检测的其他方法。用于基于杂交的 SNP 检测的示范性的寡核苷酸在表 3 中提供。这些寡核苷酸可以用放射性标记物、荧光团或其他化学发光的手段可检测地标记, 来帮助利用本发明的方法、与来自一种或更多种大豆植物的基因组的或扩增的核酸的样品的杂交的检测。

[0226]

表1. ASR抗性基因座14、15和16的SNP标志物的列表，标明了每个标志物的抗性和易感性等位基因。抗性等位基因相应于35个碱基对的核酸序列，其包括与ASR抗性相关的多态性。

标志物	连锁群	染色体位置	ASR 抗性 基因座	SEQ ID NO.	SNP 位置	有利的亲本	抗性等位 基因	易感性 等位基因	抗性等位 基因的 SEQ ID NO.
NS0095012	G	85.2	14	1	99	P1291309C	G	T	73
NS0119675	G	113.0	14	2	53	P1291309C	A	T	74
NS0102630	G	132.1	14	3	186	P1291309C	C	A	75
NS0093385	C2	129.4	15	4	109	P1507009	T	C	76
NS0118716	C2	149.9	15	5	366	P1507009	C	T	77
NS0127833	C2	171.2	15	6	57	P1507009	T	C	78
NS0113966	D2	49.6	16	7	332	P1507009	G	A	79
NS0118536	D2	75.5	16	8	286	P1507009	C	T	80

[0227]

表2. 用于检测ASR抗性的示范性的分析。

标志物	标志物 SEQ ID NO	SNP 位置	SEQ ID NO 正向引物	SEQ ID NO 反向引物	SEQ ID NO 探针1	SEQ ID NO 探针2
NS0095012	1	99	9	10	25	26
NS0119675	2	53	11	12	27	28
NS0102630	3	186	13	14	29	30
NS0093385	4	109	15	16	31	32
NS0118716	5	366	17	18	33	34
NS0127833	6	57	19	20	35	36
NS0113966	7	332	21	22	37	38
NS0118536	8	286	23	24	39	40

[0228]

表3. 寡核苷酸杂交探针

标志物	标志物 SEQ ID NO	SNP 位置	杂交探针1	探针 SEQ ID NO	检测的 等位基因
NS0095012	1	99	CTGGCTTTGTGGGGCA	41	抗性
NS0095012	1	99	CTGGCTTTTGGGGCA	42	易感性
NS0119675	2	53	TCCTCTGAACATACTG	43	抗性
NS0119675	2	53	TCCTCTGATCATACTG	44	易感性
NS0102630	3	186	CAAGTGATCTTGAGAG	45	抗性
NS0102630	3	186	CAAGTGATAATTGAGAG	46	易感性
NS0093385	4	109	CTCACCTTTAGTTACA	47	抗性
NS0093385	4	109	CTCACCTTCAGTTACA	48	易感性
NS0118716	5	366	CTACAGACCCCTATGTG	49	抗性
NS0118716	5	366	CTACAGACTCTATGTG	50	易感性
NS0127833	6	57	CATGCTAGTGTATCAG	51	抗性
NS0127833	6	57	CATGCTAGCGTATCAG	52	易感性
NS0113966	7	332	GATGCATAGAGATTGA	53	抗性
NS0113966	7	332	GATGCATAAAGATTGA	54	易感性
NS0118536	8	286	ATACTAAACGGCTGGT	55	抗性
NS0118536	8	286	ATACTAAATGGCTGGT	56	易感性

[0229] 实施例 4. 对于通过单碱基延伸方法检测具有 ASR 抗性基因座的大豆植物有用的寡核苷酸探针

[0230] 寡核苷酸也可以用于通过基于单碱基延伸 (SBE) 的 SNP 检测方法检测或分型与在此公开 ASR 抗性相关的多态性。用于基于 SBE 的 SNP 检测的示范性的寡核苷酸在表 3 中提供。SBE 方法基于与邻近多态性的序列杂交的核苷酸引物的延伸，来在引物的延伸时掺入可检测的核苷酸残基。还预期的是，SBE 方法可以使用三种合成的寡核苷酸。寡核苷酸的两种充当 PCR 引物，并与基因座的序列互补，所述序列侧翼于含有要分析的多态性的区域。可以用于分型本发明中公开的多态性的示范性的 PCR 引物在表 4 中标记为“正向引物 SEQ ID”和“反向引物 SEQ ID”的列中提供。在含有多态性的区域的扩增之后，PCR 产物与延伸引物杂交，所述延伸引物与邻近于所述多态性的扩增的 DNA 退火。然后提供 DNA 聚合酶和

两种差异化标记的二脱氧核苷三磷酸。如果模板上存在所述多态性,标记的二脱氧核苷三磷酸之一可以在单碱基链延伸中添加给引物。然后通过测定两种差异的标记物的哪一种被添加到延伸引物中来推断存在的等位基因。纯合的样品将仅引起两种标记的碱基之一被掺入,将仅检测到两种标记物之一。杂合的样品存在两种等位基因,因而将指导两种标记物的掺入(到延伸引物的不同分子中),因而将检测到两种标记物。

[0231]

表4. 用于单碱基延伸 (SBE) 分析的探针 (延伸引物)

标志物	标志物 SEQ ID NO	SNP 位置	探针 (SBE)	抗性 等位基因	SBE 探针 SEQ ID NO	正向引物 SEQ ID NO	反向引物 SEQ ID NO
NS0095012	1	99	TGTCAAAATGCTGGCTTT	G	57	9	10
NS0095012	1	99	AATTGGAAATTGCCCCA	C	58	9	10
NS0119675	2	53	ATTACCAAAATCCTCTGA	A	59	11	12
NS0119675	2	53	TTAGAAAGACCCAGTATG	T	60	11	12
NS0102630	3	186	AGAGAAACTCAAGTGAT	C	61	13	14
NS0102630	3	186	CACATACTCACTCTCAA	G	62	13	14
NS0093385	4	109	ATTTAAAGACTCACCTT	T	63	15	16
NS0093385	4	109	TTAAACTTGGTGTA ACT	T	64	15	16
NS0118716	5	366	TGACACTAGCTACAGAC	C	65	17	18
NS0118716	5	366	ATTCTCACCTCACATAG	C	66	17	18
NS0127833	6	57	ACCATGAGTCATGCTAG	T	67	19	20
NS0127833	6	57	TTGAATTTCCCTGATAC	T	68	19	20
NS0113966	7	332	GTTCTTGAAGATGCATA	G	69	21	22
NS0113966	7	332	CATCAACTACTCAATCT	G	70	21	22
NS0118536	8	286	CAGAACAATACTAAA	C	71	23	24
NS0118536	8	286	AAATCCAGAACCCAGCC	C	72	23	24

[0232] 实施例 5. 标志物向候选大豆系的筛选的掺入。

[0233] ASR 是侵入性病原体, 可以快速地发展。ASR 在南美洲和中国战胜了单个的抗性基因。因此, 关键的是堆叠抗性基因来提供更广泛的更持久的抗性。必需鉴定新的抗性来

源以促进堆叠抗性基因座。已经从通过离脱叶技术(美国申请 11/805667) 筛选 ASR 抗性的、来自日本、中国、越南和印度尼西亚的超过 5000 个 PIs 鉴定了许多抗性 PIs。抗性种质必须优先考虑进一步表征,例如分子作图。

[0234] 为了优先考虑研究工作,对早先鉴定的 ASR 抗性基因座 *Rpp1*、*Rpp2*、*Rpp3* 和 *Rpp4* 筛选了新的抗性 PIs。利用与 *Rpp* 基因相关的诊断性 SNP (美国申请 11805667),分析来自新的抗性 PIs 的叶组织的 DNA,来确定这些 PIs 是否含有与 *Rpp1*、*Rpp2*、*Rpp3* 和 *Rpp4* 相应的单体型。具有不与 *Rpp1*、*Rpp2*、*Rpp3* 和 *Rpp4* 相关的单体型、对于任何层锈菌属分离物或任何地理学的有利表型的 PIs 被给予群体发育以及抗性基因座的分子作图的优先级。此外,对于具体的地理的或特定的层锈菌属分离物,具有匹配表征了的 *Rpp* 来源的单体型的单体型 PIs 同样给予群体发展和未表征的抗性决定簇的作图的优先权,所述表征了的 *Rpp* 来源与具有有利表型的未表征区域相关。已知单体型快速筛选因而具有的优点是,最小化在可能包括早先刚表征的基因座的候选物的生物分析上消耗的工作量,容许工作集中于早先未表征的新的候选物。技术人员将立即看出,单体型筛选过程可以包括与表征的抗性表型相关的、以及不与未表征的抗性区域连锁的任何已知的单体型,包括包含了本发明中公开的标志物的那些单体型。

[0235] 实施例 6. 对层锈菌属的美国和美国外的种类的差异化响应的种质杂交测试。

[0236] 对于与对层锈菌属的不同种类的抗性的差异化联系,本发明的 ASR 抗性基因座和标志物对杂交测试单体型是有用的。与针对北美分离物相比,早先描述的 *Rpp* 抗性基因赋予针对层锈菌属南美分离物的较少的抗性;然而,LG C2 看起来具有接近 NS0137477 的有利的单体型(AA,美国申请 11805667 中的 SEQ ID 90),其确认了对南美层锈菌属分离物的耐受性。因此,在这个 SNP 处具有有利的等位基因,或在 LG C2 的远端区域中含有稀有的 SNP 等位基因的 PIs,对于在巴西和全世界具有 ASR 疾病压力的其他地理位置中的国际性测试给予优先权。另外,发现对层锈菌属的北美分离物有抗性的 PIs,对于缺乏对层锈菌属北美分离物的抗性的 PIs 的国际测试给予优先权,虽然最后测试了所有的,以确保不错过对层锈菌属的任何美国以外的分离物的抗性、耐受性或免疫性的可能的资源。随着这些 PIs 的国际测试的完成,发展了对全世界的层锈菌属分离物的抗性分布,本发明的分子标志物和单体型提供了在区域基础上描述相应 PIs、以及相关的 PIs 的重要性的基础。在给定位具有有利的表型的 PIs 在群体发展和作图工作中使用,以鉴定与抗性表型相关的分子标志物。

[0237] 实施例 7. 多个抗性基因座向大豆种质中的积累。

[0238] 在其他方面,本发明的方法和组合物对于多种抗性基因座向单独的系中的积累是有用的。在本发明的优选的实施方式中,产生了群体,其包含来自 ASR 抗性的新来源的一种或更多种抗性基因座,所述基因座为了在北美洲和南美洲的测试被种质渗入到优选的遗传背景中。一旦发展了 ASR 抗性群体,通过回交固定了 ASR 抗性基因座和选择了农学上优良的遗传性,国内地和国际地评估近等基因系(NILs)。同时,具有独特的 ASR 抗性单体型 NIL 被互交和 / 或正向培育来堆叠两种或更多种有利的 ASR 等位基因。这些单独的和堆叠的组合允许为给定的地理区域开发定制的和耐久的 ASR 抗性品种。当层锈菌属分离物在给定的区域中改变时,单个 NIL 也充当差异物,并提供接下来应当部署哪种抗性资源的了解。对于这些结果,本发明的标志物的使用对本领域技术人员将是显而易见的。例如,两种抗性

系(例如, PI291309C 和 PI507009),或具有包含 ASR 抗性基因座 14、ASR 抗性基因座 15 和 ASR 抗性基因座 16 的 ASR 抗性的系,是选自包含 ASR 抗性基因座 14、ASR 抗性基因座 15 和 ASR 抗性基因座 16 的组的三种 ASR 抗性基因座的供体亲本,通过用 SEQ ID NO :1-8 指示的分子标志物来筛选、以及选择带有一种或更多种所述分子标志物的所述抗性等位基因、呈现一种或更多种所述 ASR 抗性基因座的系来监视,其中 ASR 抗性基因座 14 的 SNP 标志物选自自由 NS0095012 (SEQ ID 1)、NS0119675 (SEQ ID 2)和 NS0102630 (SEQ ID 3)构成的组,每个标志物的抗性等位基因在表 3 中标明。并且,ASR 抗性基因座 15 的一种或更多种 SNP 标志物选自自由 NS0093385 (SEQ ID 4)、NS0118716 (SEQ ID 5)和 NS0127833 (SEQ ID 6)构成的组,每个标志物的抗性等位基因在表 3 中标明。并且,ASR 抗性基因座 16 的一种或更多种 SNP 标志物选自自由 NS0113966 (SEQ ID 7)和 NS0118536 (SEQ ID 8)构成的组,每个标志物的抗性等位基因在表 3 中标明。对本领域技术人员明显的是,这样的方法此外可以用于将本发明的一种或更多种抗性基因座与本领域已知的一种或更多种抗性基因座组合。

[0239] 一种或更多种抗性基因座的种质渗入通过对轮回亲本的重复回交、伴随着利用上述标志物选择以保持来自供体亲体的一种或更多种 ASR 抗性基因座来实现。这种回交操作在品种开发的任何阶段实现,与优越的农学特征或一种或更多种感兴趣的性状的培育一起发生,所述感兴趣的性状包括转基因的和非转基因的性状。

[0240] 做为选择,采用正向培育方法,其中在与敏感的亲本杂交之后可以监视一种或更多种 ASR 抗性基因座的成功种质渗入,随后的世代对于一种或更多种 ASR 抗性基因座、以及对于一种或更多种感兴趣的其他性状,包括转基因和非转基因的性状来基因分型。

[0241] 在本说明书中引用的所有专利和非专利文献通过完全引用来合并在本文中,其程度与特定的或单独的指示通过引用来合并每个单独的个体相同。可从万维网的某些互联网地址获得的在此引用的文件也通过完全引用合并在本文中。在此通过它们的“NCBI 登记号”引证的某些生物学序列可以通过 ncbi.nlm.nih.gov 的万维网上的国家生物技术信息学中心来获取。

[0242] 可以对在此描述和说明的方法进行各种修改而不背离本发明的范围,期望的是,在前述的说明书中含有的、或在附图中显示的所有内容应当被看作是说明性的而不是限制性的。已经说明和描述了本发明的原理,对本领域的技术人员显而易见的是,可以在安排和细节上对本发明进行修改而不背离这种原理。安排和细节中的所有这样的修改被认为属于附随的权利要求的精神和范围之内。因而,本发明的广度和范围不应由任何上述的示范性的实施方式来限制,而应当仅根据以下附加的权利要求和它们的等价物来限定。

序列表

<110>	Baley, George James Concibido, Vergel C La Vallee, Bradley J.	
<120>	鉴定大豆中亚洲大豆锈病抗性数量性状基因座的方法和其组合物	
<130>	46-21 (54987)	
<150>	61/047479	
<151>	2008-04-24	
<160>	80	
<210>	1	
<211>	466	
<212>	DNA	
<213>	大豆	
<400>	1	
	aattgaattt ggctcacaat gacttcggtt ctgtgattcc ttccaagttt ggettgtga	60
	aaaatttgag gtacttgaat ttgtcaaagc ctggcttttt ggggcaaatt ccaattgaga	120
	ttggtcttct acaaagatg gctactcttg acttatctac ttcgtttact ttagagcata	180
	ctctaaaact tgagaagcca aacataggag tgcttatgaa gaacctcaca gaaatcacag	240
	aactctacct agatggtgta atggtatctg ctactggaaa ggagtggctt catgcattat	300
	cttcaatgca aaagcttcaa gttttgagca tgcctcctg taacctctca ggaccaattg	360
	attcttcaact gtcaaagctt aagtctctct cagtgattca attgaatttg acaatgtgt	420

caagtcagtc accagaatcc ttggcaaate tctcaaattt gaccac	466
<210> 2	
<211> 733	
<212> DNA	
<213> 大豆	
<400> 2	
tgagaacact gccaaagctt ttggcatct tcctattac caatcctct gaacatactg	60
ggtcttctaa aggtccttgg gacaaaccag tgtttcacca aaaacactga acaagttatt	120
ccaaagatgc tggtagggcaa tgcaaaaaca aatgagaaaa agattcagaa ctcatttcga	180
tattgaacat tggtagcaca tgatggttg ttgactttta cattttgacc tatgtttccc	240
attgaaatt tcttttctt ttctgcgtgg gtaattaaca ttatagtgat agtaccctct	300
ttttgtaatt tcagttgatt ctgtttggtt gtttaagttac tccatttaat tgtataatct	360
tgttgatgga cattattaaa catcctaaat tcatttttt ttagtaatct gttgcttata	420
ctttttacag tgaaaaatg tcatgtaact gatgcttcaa atcctgcttt aagttaccaa	480
gagactatgg agccttctgt atctaaagaa acacctaatt caggaaaaac tgatatgcaa	540
cttgagagtc agatatttag taataaagta gaaagtatta acagatctgc tgctactgac	600
atgccagagc ctgaaaagtt gctctcagct taccaaatg atggtgaagc aaatgatttg	660
ctgatggcat ctactcctga caatcagggt gcaactgaag gccatacagg tgctgcagge	720
atgagctg gc	733
<210> 3	
<211> 941	
<212> DNA	
<213> 大豆	

<400>	3		
		caagcttggt gctgcagaa aaagcacatg ggatagttgt taatagtttt gaagagttgg	60
		aagcagaata tgttgaagag tgtcaaagat ttacggacca tagggtatgg tgtgttgggc	120
		ctgtgtcgct gtcaaataag gatgacaagg acaaggctat gagaagtaag agaaactcaa	180
		gtgatattga gaggagat gtgaagtggc ttgattcatg gcctccgagg tcagtgattt	240
		atgtttgcct tggtagccta aaccgtgcaa cgccagagca gttgatagag ctcgggttag	300
		gattggaagc gacaaaaagg ccattcattt ggggtccttag aggtgcatat ggaagagagg	360
		agatggagaa gtggctggtg gaagatgggt ttgaagagag ggtgaaaggg agagggtttt	420
		tgatcaaggg ttgggtgcca caagtgttga tcttatcaca tagagcaata ggagcgttca	480
		tgacacattg cggatggaat tccacactcg aagggtttg tgctggcgtg ccgttggtaa	540
		ctttctctct gtttgctgag cagttcatca atgagaaact tgtacaagtg gtgaagattg	600
		gcgtgagtgt gggagctgaa tctgttgttc acttgggtga agaagataag tctcgggttc	660
		aggtgaccag agaaaatggt ctggattcta ttgaaaggta atgggagaat ggccaaaaaa	720
		aaaaaaaaata taggaaaggg ctttaaagta ttccgccatt ggcagggaaa gcaaaaaaaaa	780
		aagtgggttt ttttctcac atggtcttac tcattgggcc atatacttt ggagggttaa	840
		ccaagttaa ccagggttct atttttgtt ttcaacacca attgcttttc tcaagggtca	900
		accttaacc caattgtct tccgaaga tttttttt a	941
<210>	4		
<211>	435		
<212>	DNA		
<213>	大豆		

<400>	4		
		aggcatcgga agatgagaag actgatgccc caaaagcaat tgagagtaca cccagtcga	60
		cacccagtc tacttctgga attgaggatt tatttaaaga ctcacctta gttacaccaa	120
		gttactcc agaaaaacca caaaaagatc taaaaaatga tatcatgagc ctctttgaga	180
		aggatgtgc cagtgttca ataggtttgt ttaaggctga gttacttctt tgagttata	240
		tatatata tggtagaaa tgettttaa aatatacaca ttctatattg ttgacattc	300
		ctcctgccc gatgtgagtt attatccaag acacaaaac aagtgaattt agttgtcga	360
		cgatctctat ccttagatgg gttttatgt tttggtatgt gaataagatt ttacctgacc	420
		cagtaattg gacat	435
<210>	5		
<211>	431		
<212>	DNA		
<213>	大豆		
<400>	5		
		ctttccttgc tggtttgget gcatcaggtg tactaacgtc tgctttgagg ttaattacaa	60
		aagcagcatt tgagaaaact aagaacggtc ttcgcaaagg agccagtaag ttcagctctc	120
		cagagcttaa gacatttgat aattcagagt ttagccgcat tcatgtttaa catagaaaat	180
		tgaaaaaaaaa aatatttagc ttatgcaatt gttactag ctttatttc tatttttca	240
		atgtgcaga aacaagtttt caaattgatt tttactctt ttatacaac tcatgaagat	300
		atgaggttta ttgaagattg tggaaattaat atgcttttaa taagatattg aactageta	360
		cagaccctat gtgagtgag aatcctgtgg tttatgttgt gaacttcacc tagtagaata	420

agactttggt a	431
<210> 6	
<211> 1166	
<212> DNA	
<213> 大豆	
<400> 6	
tctgaaacaa agaaagctgt gccaatggac atagatctga ccatgagtca tgctagcgta	60
tcagggaat tcaatactca tgcaacaaat ggcaaagaga ttgaagtaat tgatttagaa	120
aatgatgatt ccattcaaga agagaagtca atcgacaata tggatagaaa gtacgttttt	180
cctgcttct tccccctgg atattttatg ttatctttt taagcgttct tttatccaat	240
ctctcaaatt tagtgtttgt taggatctaa tttatctatt tttttatcc ttgctttcag	300
ttacttagtg aaaatatcag ctggagcata tagttttaa cacccttcat ttacttgcca	360
ctctcttct aatatgttgt cttgaaatca caggacagag actatgtttc ctggccttga	420
aggtttttct agccatgctc aaaatgctgc tgacatgcat gatgttcagg atggatatgg	480
gcttatgata tcagagttgc ttgggccaga tttccctaac tgttcttcag tacctgggtga	540
cataaactct gtgcacaatg aaatgggcct tcaaagtgga acggtacaat gctacctca	600
aattgagata tttttgatg catgtccttt taatataacc tttgtgact tgattgttgc	660
tgcatgcctt tataatcaac aatgaaatga ttctttatc tgagaagatt tttcttaata	720
atcataatg atgattttct cataattca ttcttttctg ttcaggggac acttgctgag	780
gatgattcca tatatatgct gcttggagaa ttaagtatga cagattttta ttaatggttt	840

gttttcttat ttgttttttt ttttttttgc acagcaaaaa tcgatataga attttatata	900
taatgaagta ctaggtgtac tgcatacagg ataaagagta caaggcaaaa ttgcctaacc	960
catctgaaaa ttacaagata acattagctg aagccaaaaa gaatcaacce ctaagacaac	1020
tcctccctca aactagtgga ccattgatta aatgaatat ggaaatcttt gtccatacat	1080
tttaaccagg cccatgaatg gaataaagct tcatccatga cttatttggt aagtgtacct	1140
gtgattcatg ttagttgata ttgat	1166
<210>	7
<211>	807
<212>	DNA
<213>	大豆
<400>	7
cagcttgcac gctgcagat ttgtcataat ttagcatttt tttcttttg aaacattcca	60
atacctttct ttcaaatcat tacctaaaga ggtaaaataa tgattgaaac aactgtgaac	120
aaattgttcc taatggctaa aagaggcaag acaaagtcac ctaatacagt tttgtggatg	180
aataaaattg acaaggaact tgaccatggc agaagtattt gtaagcaaag tatttcatct	240
tgaaattagc aatgtaagt tgtgtgagga tctttagaga ccaaaatcga gttaaacttt	300
tggagccaat ttcggttctt gaagatgcat agagattgag tagttgatgt gaaaagatga	360
agcggaatgg aaaaaatttt aaaaaatgag agaaaaattg aggggagaat ggttcattg	420
ggcaaccgtg gaagaaaaac ttgatctaca cgatattatt tcagacactc aattgccata	480
attaaattta agggtttaaa atctcagtaa tacctgaaag attaaaaata caattaaacc	540
tgaaaaatat ggctcacatt ttgagaatgg gggagatatg tcaaatgaag tataaaccaa	600

gttatttatt gacaggcttg tatacaaagt gatttagatc accggactat caacaaaata	660
actcattetc caattacttt tatatagatc ttgtagtgct gtttcgctat agcaaagaag	720
aaaaaaaaag gaaacaagga gagaaaatga agaaatgaag caaagattat agaaaaataa	780
agaaatggga gagagataga gagacta	807
<210>	8
<211>	467
<212>	DNA
<213>	大豆
<400>	8
tggatgccag aagaatttga acagcatcaa agcaaaggta aacaggatct aggtacttgg	60
atgagccett tattttcaaa atccaaccac atcctctttt agccgtctcc atcttaaaag	120
taacaaaata tattacatta atttaaagca taacctcttc aaaaaaaaaat taaagcatag	180
aaaaatatgt tcaagacceca atcactgagg caaagtgtgc taagcccagt ctgctacaca	240
tgtagggtta gctacattag agcctaacca gaacaaaata ctaaaccgct ggttctggaa	300
ttgatcaat tataatggca ttcagaaaaa aaaattgttt tagaactagt aaaaatgtaa	360
atagcttttt tcgtatgctc aatttaacc tgctccatga caataaccgt aaatattttt	420
tttgagtaa aaaccgaatg catgtgagaa agtgatatga gcgaata	467
<210>	9
<211>	26
<212>	DNA
<213>	人工序列
<220>	

<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	9	
	ttgctgaaaa atttgaggta cttgaa	26
<210>	10	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	10	
	agaccaatctcaattggaatttgc	24
<210>	11	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	11	
	ctttttggca tctttcctattacca	25
<210>	12	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 人工序列描述：合成的引物

<400> 12

gtttgtccca aggaccttta gaag

24

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的引物

<400> 13

acaaggacaa ggctatgaga agtaaga

27

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的引物

<400> 14

ggccatgaat caagccactt

20

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	15	
	acttctggaa ttgaggattt atttaaagac	30
<210>	16	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	16	
	ctttttgtgg ttttctgga gttaaac	27
<210>	17	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	17	
	tggaattaat atgcttttaa taagatattg aca	33
<210>	18	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	18	
	gaagtctaca acataaacca caggattc	28
<210>	19	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	19	
	ccaattgaca tagatctgac catga	25
<210>	20	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	20	
	gccatttggt gcatgagtat tga	24
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 人工序列描述：合成的引物

<400> 21

ggagcaatt tcggttcttg

20

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的引物

<400> 22

cgcttcatct tttcacatca actac

25

<210> 23

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的引物

<400> 23

agctacatta gagcctaacc agaacaa

27

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的引物

<400> 24

ttctgaatgc cattataatt gatcaaa

27

<210> 25

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 25

tgctggcttt gtggg

15

<210> 26

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 26

tgctggcttt ttg

13

<210> 27

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 27

cctctgaaca tactgg

16

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 28

cctctgatca tactgg

16

<210> 29

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 29

ctcactctca atatac

15

<210> 30

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	30	
	cactctcaag atcac	15
<210>	31	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	31	
	caccttcagt tacaccaa	18
<210>	32	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	32	
	tcacctttag ttacaccaa	19
<210>	33	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 33

cctcacatag ggtct

15

<210> 34

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 34

acctcacata gagtct

16

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 35

tttcctgat acgctagc

18

<210> 36

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	36	
	cctgatacac tagcatg	17
<210>	37	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	37	
	agatgcataa agattg	16
<210>	38	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	38	
	agatgcatag agattg	16
<210>	39	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 39

ccagccgttt agtatt

16

<210> 40

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 40

aaccagccat ttagt

15

<210> 41

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 41

ctggctttgt gggca

16

<210> 42

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 42

ctggcttttt ggggca

16

<210> 43

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 43

tcctctgac atactg

16

<210> 44

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 44

tcctctgatc atactg

16

<210> 45

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	45	
	caagtgatct tgagag	16
<210>	46	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	46	
	caagtgatat tgagag	16
<210>	47	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	47	
	ctcaccttta gttaca	16
<210>	48	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	48	
	ctcaccttca gttaca	16
<210>	49	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	49	
	ctacagacc tatgtg	16
<210>	50	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	50	
	ctacagactc tatgtg	16
<210>	51	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 51

catgctagtg tatcag

16

<210> 52

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 52

catgctagcg tatcag

16

<210> 53

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 53

gatgcataga gattga

16

<210> 54

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	54	
	gatgcataaa gattga	16
<210>	55	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	55	
	atactaaacg gctggt	16
<210>	56	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	56	
	atactaaatg gctggt	16
<210>	57	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	57	
	tgtcaaatgc tggcttt	17
<210>	58	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	58	
	aattggaatt tgcccca	17
<210>	59	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	59	
	attaccaaat cctctga	17
<210>	60	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	60	
	ttagaagacc cagtatg	17
<210>	61	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	61	
	agagaaactc aagtgat	17
<210>	62	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	62	
	cacataactca ctetcaa	17
<210>	63	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 63

atttaaagac tcacctt

17

<210> 64

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 64

ttaaacttgg tgtaact

17

<210> 65

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 65

tgacactagc tacagac

17

<210> 66

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 66

attctcacct cacatag

17

<210> 67

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 67

accatgagtc atgctag

17

<210> 68

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的探针

<400> 68

ttgaatttcc ctgatac

17

<210> 69

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	69	
	gttcttgaag atgcata	17
<210>	70	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	70	
	catcaactac tcaatct	17
<210>	71	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	71	
	cagaacaaaa tactaaa	17
<210>	72	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223>	人工序列描述：合成的探针	
<400>	72	
	aaattccaga accagcc	17
<210>	73	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	大豆	
<400>	73	
	tgtcaaatgc tggctttgtg gggcaaattc caatt	35
<210>	74	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	大豆	
<400>	74	
	attaccaaatt cctctgaaca tactgggtct tctaa	35
<210>	75	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	大豆	
<400>	75	
	agagaaactc aagtgatctt gagagtgagt atgtg	35
<210>	76	
<211>	35	

<212>	DNA	
<213>	大豆	
<400>	76	
atttaaagac tcaccttag ttaccaag ttaa		35
<210>	77	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	大豆	
<400>	77	
tgactagc tacagacct atgtgagtg agaat		35
<210>	78	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	大豆	
<400>	78	
accatgagtc atgctagtgt atcaggaaa tcaa		35
<210>	79	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	大豆	
<400>	79	
gttcttgaag atgcatagag attgagtagt tgatg		35
<210>	80	

<211> 35
<212> DNA
<213> 大豆

<400> 80

cgacaa tactacg ctgtctg aatt

35

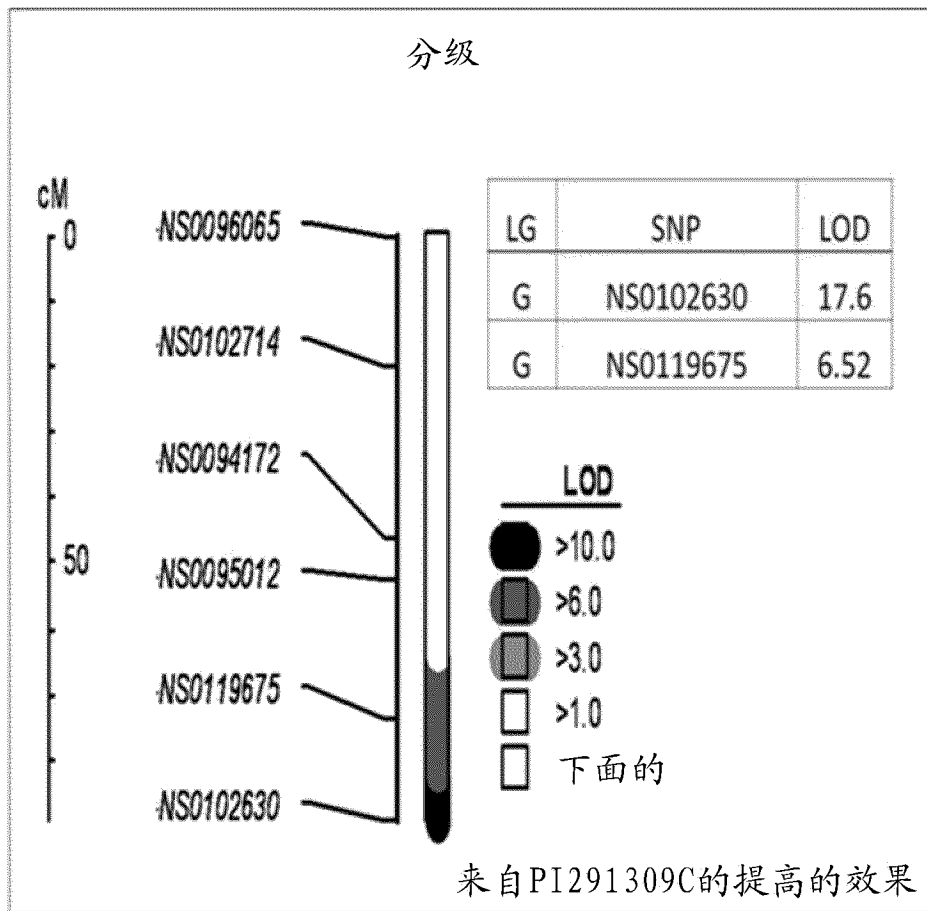


图 1

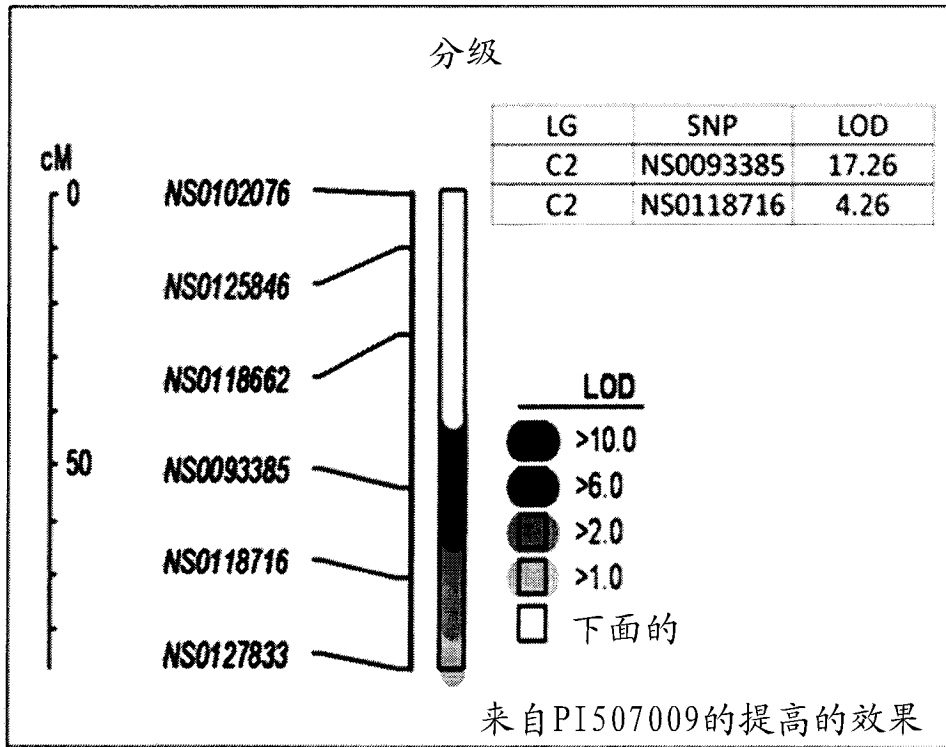


图 2

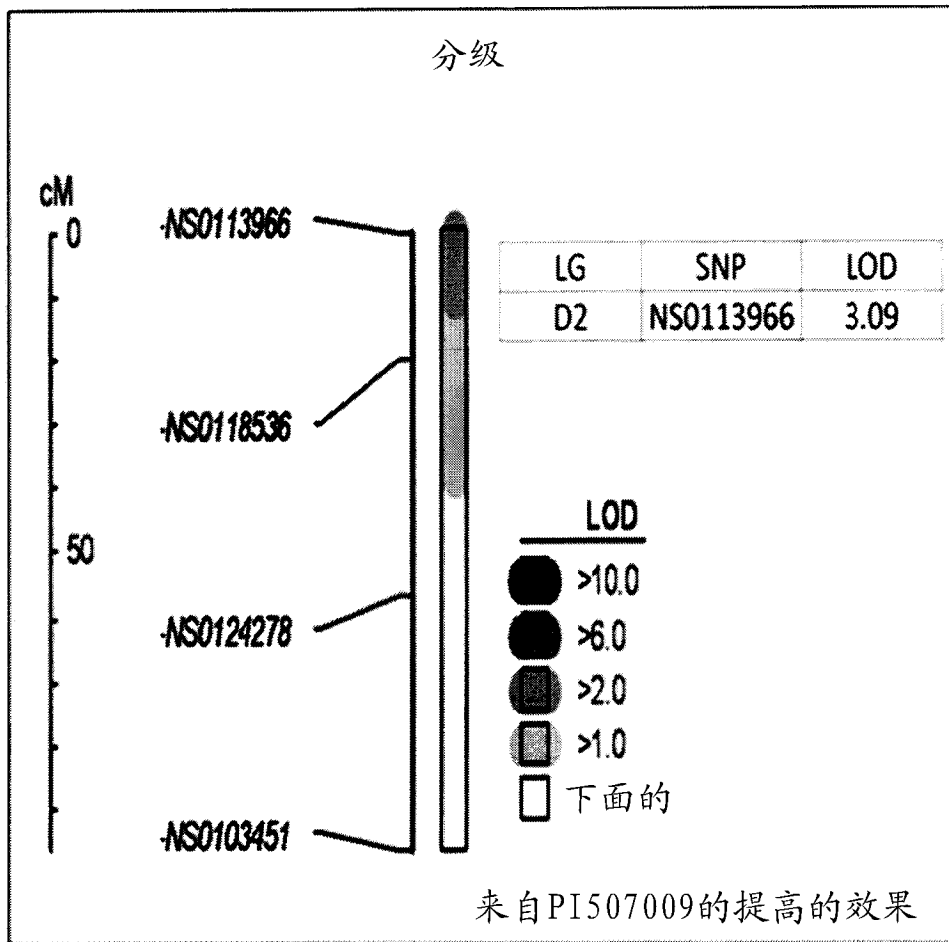


图 3