



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103347382 B

(45)授权公告日 2016.09.14

(21)申请号 201180064260.X

C12N 15/82(2006.01)

(22)申请日 2011.11.02

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103347382 A

US 7154021 B2,2006.12.26,

US 6096944 A,2000.08.01,

CN 101827518 A,2010.09.08,

CN 1814810 A,2006.08.09,

CN 101501217 A,2009.08.05,

(43)申请公布日 2013.10.09

(30)优先权数据

61/410,783 2010.11.05 US

南海洋等.基于大豆胞囊线虫病抗性候选基

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.07.05

因rhg1的InDel标记开发与鉴定.《作物学报》

.2009,第35卷(第7期),第1236-1243页.

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/058986 2011.11.02

B. X. Qiu et.al.,.RFLP markers

associated with soybean cyst nematode

resistance and seed composition in a

'Peking'3'Essex' population.《Theor Appl

Genet》.1999,第98卷第356-364页.

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/061513 EN 2012.05.10

Ying-Hui Li et.al.,.Development of

SNP markers and haplotype analysis of the

candidate gene for rhg1, which confers

resistance to soybean cyst nematode in

soybean.《Mol Breeding》.2009,第24卷第63-76

页.

(73)专利权人 农业基因遗传学有限公司

地址 美国印第安纳州

(72)发明人 白永和 吕芳 T.W.格里恩

小罗伯特.E.穆尔 B.赫杰斯

S.P.昆帕特拉 R.拉姆

D. M. Webb et.al.,.Genetic mapping of

soybean cyst nematode race-3 resistance

loci in the soybean PI 437.654.《Theor

Appl Genet》.1995,第91卷第574-581页. (续)

(74)专利代理机构 北京市嘉元知识产权代理事

务所(特殊普通合伙) 11484

代理人 张永新

审查员 陈仕高

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

C12N 15/29(2006.01)

权利要求书1页 说明书26页

序列表3页 附图12页

(54)发明名称

与SCN抗性连锁的大豆标志物

(57)摘要

本公开内容关注用于鉴定大豆中的SCN抗性表型的组合物和方法。在一些实施方案中,本公开内容关注用于实施标志物辅助育种和选择携带大豆中SCN抗性的一种或多种决定子的植物的方法。

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 | 101 | 102 | 103 | 104 | 105 | 106 | 107 | 108 | 109 | 110 | 111 | 112 | 113 | 114 | 115 | 116 | 117 | 118 | 119 | 120 | 121 | 122 | 123 | 124 | 125 | 126 | 127 | 128 | 129 | 130 | 131 | 132 | 133 | 134 | 135 | 136 | 137 | 138 | 139 | 140 | 141 | 142 | 143 | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 | 154 | 155 | 156 | 157 | 158 | 159 | 160 | 161 | 162 | 163 | 164 | 165 | 166 | 167 | 168 | 169 | 170 | 171 | 172 | 173 | 174 | 175 | 176 | 177 | 178 | 179 | 180 | 181 | 182 | 183 | 184 | 185 | 186 | 187 | 188 | 189 | 190 | 191 | 192 | 193 | 194 | 195 | 196 | 197 | 198 | 199 | 200 | 201 | 202 | 203 | 204 | 205 | 206 | 207 | 208 | 209 | 210 | 211 | 212 | 213 | 214 | 215 | 216 | 217 | 218 | 219 | 220 | 221 | 222 | 223 | 224 | 225 | 226 | 227 | 228 | 229 | 230 | 231 | 232 | 233 | 234 | 235 | 236 | 237 | 238 | 239 | 240 | 241 | 242 | 243 | 244 | 245 | 246 | 247 | 248 | 249 | 250 | 251 | 252 | 253 | 254 | 255 | 256 | 257 | 258 | 259 | 260 | 261 | 262 | 263 | 264 | 265 | 266 | 267 | 268 | 269 | 270 | 271 | 272 | 273 | 274 | 275 | 276 | 277 | 278 | 279 | 280 | 281 | 282 | 283 | 284 | 285 | 286 | 287 | 288 | 289 | 290 | 291 | 292 | 293 | 294 | 295 | 296 | 297 | 298 | 299 | 300 | 301 | 302 | 303 | 304 | 305 | 306 | 307 | 308 | 309 | 310 | 311 | 312 | 313 | 314 | 315 | 316 | 317 | 318 | 319 | 320 | 321 | 322 | 323 | 324 | 325 | 326 | 327 | 328 | 329 | 330 | 331 | 332 | 333 | 334 | 335 | 336 | 337 | 338 | 339 | 340 | 341 | 342 | 343 | 344 | 345 | 346 | 347 | 348 | 349 | 350 | 351 | 352 | 353 | 354 | 355 | 356 | 357 | 358 | 359 | 360 | 361 | 362 | 363 | 364 | 365 | 366 | 367 | 368 | 369 | 370 | 371 | 372 | 373 | 374 | 375 | 376 | 377 | 378 | 379 | 380 | 381 | 382 | 383 | 384 | 385 | 386 | 387 | 388 | 389 | 390 | 391 | 392 | 393 | 394 | 395 | 396 | 397 | 398 | 399 | 400 | 401 | 402 | 403 | 404 | 405 | 406 | 407 | 408 | 409 | 410 | 411 | 412 | 413 | 414 | 415 | 416 | 417 | 418 | 419 | 420 | 421 | 422 | 423 | 424 | 425 | 426 | 427 | 428 | 429 | 430 | 431 | 432 | 433 | 434 | 435 | 436 | 437 | 438 | 439 | 440 | 441 | 442 | 443 | 444 | 445 | 446 | 447 | 448 | 449 | 450 | 451 | 452 | 453 | 454 | 455 | 456 | 457 | 458 | 459 | 460 | 461 | 462 | 463 | 464 | 465 | 466 | 467 | 468 | 469 | 470 | 471 | 472 | 473 | 474 | 475 | 476 | 477 | 478 | 479 | 480 | 481 | 482 | 483 | 484 | 485 | 486 | 487 | 488 | 489 | 490 | 491 | 492 | 493 | 494 | 495 | 496 | 497 | 498 | 499 | 500 | 501 | 502 | 503 | 504 | 505 | 506 | 507 | 508 | 509 | 510 | 511 | 512 | 513 | 514 | 515 | 516 | 517 | 518 | 519 | 520 | 521 | 522 | 523 | 524 | 525 | 526 | 527 | 528 | 529 | 530 | 531 | 532 | 533 | 534 | 535 | 536 | 537 | 538 | 539 | 540 | 541 | 542 | 543 | 544 | 545 | 546 | 547 | 548 | 549 | 550 | 551 | 552 | 553 | 554 | 555 | 556 | 557 | 558 | 559 | 560 | 561 | 562 | 563 | 564 | 565 | 566 | 567 | 568 | 569 | 570 | 571 | 572 | 573 | 574 | 575 | 576 | 577 | 578 | 579 | 580 | 581 | 582 | 583 | 584 | 585 | 586 | 587 | 588 | 589 | 590 | 591 | 592 | 593 | 594 | 595 | 596 | 597 | 598 | 599 | 600 | 601 | 602 | 603 | 604 | 605 | 606 | 607 | 608 | 609 | 610 | 611 | 612 | 613 | 614 | 615 | 616 | 617 | 618 | 619 | 620 | 621 | 622 | 623 | 624 | 625 | 626 | 627 | 628 | 629 | 630 | 631 | 632 | 633 | 634 | 635 | 636 | 637 | 638 | 639 | 640 | 641 | 642 | 643 | 644 | 645 | 646 | 647 | 648 | 649 | 650 | 651 | 652 | 653 | 654 | 655 | 656 | 657 | 658 | 659 | 660 | 661 | 662 | 663 | 664 | 665 | 666 | 667 | 668 | 669 | 670 | 671 | 672 | 673 | 674 | 675 | 676 | 677 | 678 | 679 | 680 | 681 | 682 | 683 | 684 | 685 | 686 | 687 | 688 | 689 | 690 | 691 | 692 | 693 | 694 | 695 | 696 | 697 | 698 | 699 | 700 | 701 | 702 | 703 | 704 | 705 | 706 | 707 | 708 | 709 | 710 | 711 | 712 | 713 | 714 | 715 | 716 | 717 | 718 | 719 | 720 | 721 | 722 | 723 | 724 | 725 | 726 | 727 | 728 | 729 | 730 | 731 | 732 | 733 | 734 | 735 | 736 | 737 | 738 | 739 | 740 | 741 | 742 | 743 | 744 | 745 | 746 | 747 | 748 | 749 | 750 | 751 | 752 | 753 | 754 | 755 | 756 | 757 | 758 | 759 | 760 | 761 | 762 | 763 | 764 | 765 | 766 | 767 | 768 | 769 | 770 | 771 | 772 | 773 | 774 | 775 | 776 | 777 | 778 | 779 | 780 | 781 | 782 | 783 | 784 | 785 | 786 | 787 | 788 | 789 | 790 | 791 | 792 | 793 | 794 | 795 | 796 | 797 | 798 | 799 | 800 | 801 | 802 | 803 | 804 | 805 | 806 | 807 | 808 | 809 | 810 | 811 | 812 | 813 | 814 | 815 | 816 | 817 | 818 | 819 | 820 | 821 | 822 | 823 | 824 | 825 | 826 | 827 | 828 | 829 | 830 | 831 | 832 | 833 | 834 | 835 | 836 | 837 | 838 | 839 | 840 | 841 | 842 | 843 | 844 | 845 | 846 | 847 | 848 | 849 | 850 | 851 | 852 | 853 | 854 | 855 | 856 | 857 | 858 | 859 | 860 | 861 | 862 | 863 | 864 | 865 | 866 | 867 | 868 | 869 | 870 | 871 | 872 | 873 | 874 | 875 | 876 | 877 | 878 | 879 | 880 | 881 | 882 | 883 | 884 | 885 | 886 | 887 | 888 | 889 | 890 | 891 | 892 | 893 | 894 | 895 | 896 | 897 | 898 | 899 | 900 | 901 | 902 | 903 | 904 | 905 | 906 | 907 | 908 | 909 | 910 | 911 | 912 | 913 | 914 | 915 | 916 | 917 | 918 | 919 | 920 | 921 | 922 | 923 | 924 | 925 | 926 | 927 | 928 | 929 | 930 | 931 | 932 | 933 | 934 | 935 | 936 | 937 | 938 | 939 | 940 | 941 | 942 | 943 | 944 | 945 | 946 | 947 | 948 | 949 | 950 | 951 | 952 | 953 | 954 | 955 | 956 | 957 | 958 | 959 | 960 | 961 | 962 | 963 | 964 | 965 | 966 | 967 | 968 | 969 | 970 | 971 | 972 | 973 | 974 | 975 | 976 | 977 | 978 | 979 | 980 | 981 | 982 | 983 | 984 | 985 | 986 | 987 | 988 | 989 | 990 | 991 | 992 | 993 | 994 | 995 | 996 | 997 | 998 | 999 | 1000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|

[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

J.G. Shannon et.al.,.Registration of S01-9269 Soybean Germplasm Line Resistant to Soybean Cyst Nematode with Seed Oil Low in Saturates.《CROP SCIENCE》.2005,第45卷第1673-1674页.

D. Wang et.al.,.Loci underlying resistance to Race 3 of soybean cyst nematode in Glycine soja plant introduction 468916.《Theor Appl Genet》.2001,第103卷第561-566页.

1. 一种用于鉴定包含大豆品种中至少一种SCN抗性决定子的植物的方法,该方法包括:  
从所述植物分离核酸分子;并  
对分离的核酸分子筛选与所述大豆品种中的SCN抗性表型连锁的标志物,其中所述标志物与SEQ ID NO:10的标志物遗传连锁,且所述标志物的存在指示所述大豆品种中的至少一种SCN抗性决定子。
2. 依照权利要求1的方法,其中所述与所述大豆品种中的SCN抗性表型连锁的标志物在大豆连锁群G中。
3. 依照权利要求1的方法,其中所述分离的核酸分子是基因组DNA。
4. 依照权利要求1的方法,其中所述SCN抗性表型是对SCN品种3的SCN抗性。
5. 依照权利要求1的方法,其中使用竞争性等位基因特异性聚合酶链式反应实施对所述分离的核酸分子筛选与所述大豆品种中的SCN抗性表型连锁的标志物。
6. 依照权利要求1的方法,其中所述大豆品种中的所述至少一种SCN抗性决定子是NCSB\_004074。
7. 依照权利要求1的方法,其进一步包括对于所述与大豆品种中的SCN抗性表型连锁的标志物确定所述植物的基因型。
8. 一种用于生成SCN抗性大豆植物的方法,该方法包括:  
将具有SCN抗性性状的大豆植物与来自感兴趣的大豆品种的大豆植物杂交;  
使用标志物辅助选择来鉴定如下的F<sub>1</sub>大豆植物,该F<sub>1</sub>大豆植物包含与具有所述SCN抗性性状的大豆植物中的SCN抗性表型连锁的标志物,其中所述标志物与SEQ ID NO:10的标志物遗传连锁,且F<sub>1</sub>大豆植物具有感兴趣的大豆品种的任何期望的性状;并  
繁殖鉴定的F<sub>1</sub>大豆植物,由此生成SCN抗性大豆植物。
9. 依照权利要求8的方法,其中所述与具有所述SCN抗性性状的大豆植物中的SCN抗性表型连锁的标志物在大豆连锁群G中。
10. 依照权利要求8的方法,其中所述感兴趣的大豆品种是SCN易感性大豆品种。
11. 依照权利要求8的方法,其中所述SCN抗性是对SCN品种3的抗性。
12. 依照权利要求8的方法,其中使用竞争性等位基因特异性聚合酶链式反应实施标志物辅助选择。

## 与SCN抗性连锁的大豆标志物

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求2010年11月5日提交的美国临时专利申请流水号61/410,783的权益。

### 发明领域

[0003] 本公开内容涉及植物疾病抗性。在一些实施方案中,本公开内容涉及大豆中的大豆孢囊线虫(SCN)抗性。在具体的实施方案中,本公开内容涉及用于鉴定生物体中的SCN抗性性状,例如,与SCN抗性紧密连锁的分子标志物的组合物和方法。其它实施方案涉及用于将SCN抗性性状导入宿主生物体中的组合物和方法,例如其通过使用与SCN抗性紧密连锁的分子标志物来进行。

[0004] 发明背景

[0005] 大豆(*Glycine max*)是全世界作为植物油和蛋白质的主要来源种植的主要经济作物之一。低胆固醇和高纤维饮食的需要增加已经提高大豆作为食物的重要性。超过10,000种大豆品种现在已经引入美国,其中有限的数目形成从杂交和选择程序开发的栽培种的遗传基础。Johnson和Bernard, *The Soybean*, Norman编, Academic Press, N.Y., 第1页-第73页, 1963。

[0006] 大豆孢囊线虫(SCN, 大豆异皮线虫(HG) (*Heterodera glycines* Ichinohe))是美国及世界上大多数其它主要大豆生产国的单一最具损害的影响大豆的有害生物。估计美国的产量降低在2003年和2004年中介于约290万和340万吨之间,这导致估计每年损失约15亿美元。Wrather等(2001); Wrather和Koennig(2006)。SCN表型是一种非常复杂的性状,其由多个基因(隐性和显性两者)控制。Concibido等(2004)。SCN表型测定是费时的、成本和劳动力密集的。

[0007] SCN感染引起多种症状,其可以包括叶和茎的缺绿症、根坏死、种子产量损失、以及对根和嫩芽生长的抑制。SCN感染的地上症状对于SCN感染不是独特的,并且可以与营养物缺乏,特别是铁缺乏,来自干旱的应激、除草剂损伤或另一种疾病混淆。感染的第一病征是具有已经阻碍生长的发黄叶的植物组。病原体也可能难以在根上检出,因为矮小的根也是应激或植物疾病的一种常见症状。SCN成年雌性和孢囊是约1/32英寸长的,并且如此在不放大的情况下可见。在根上观察成年雌性和孢囊是检测及诊断田间SCN感染的唯一准确的方式。

[0008] SCN的存在在初始土壤侵袭时通常是不明显的。SCN群体密度在土壤中必须增加,直到它足以引起植物上的地上症状或产量降低。群体密度在达到显著数目前可以花费数年。如此,当前的SCN损伤是已经生成几年的侵袭的结果。虽然大豆是SCN的主要宿主,但是其它豆科植物可以充当宿主,例如:青豆(*green bean*)、食荚菜豆(*snap bean*)、干豆(*dry bean*)、红豆(*red bean*)、利马豆(*lima bean*)、绿豆(*mung bean*)、矮菜豆(*bush bean*)、赤豆(*Adzuki bean*)、豌豆(*garden pea*)、和豇豆(*cowpea*)。SCN生命周期中有30天。如此,单一生长季节涵盖多个寄生物世代。此外,SCN卵在孵化前可以在土壤中保持完整达数年。

[0009] 过去,SCN群体通过比较其在一组四种大豆种质系上的繁殖与标准SCN易感性大豆

栽培种上的繁殖给予以“品种(race)”名称。最常使用的品种方案鉴定16种SCN品种。品种名称容许线虫学家和大豆育种人员共享如下的信息,该信息关于某些SCN群体在含有对SCN的抗性的某些基因的大豆品种上繁殖的能力。

[0010] 在2003年,开发出HG类型测试以替换品种测试。此新测试包括抗性的7种来源(种质系),并且结果以百分比显示,指示来自土壤样品的线虫群体在7种品系之每种上增加多少。此测试指示哪些抗性来源对于测试的特定田地会是良好的,以及哪些会是较差的。由于抗性的遗传来源目前在商品化大豆品种中是有限的,轮作这些“抗性来源”以延迟有毒力的SCN群体的建立是重要的。

[0011] 在美国发现SCN后不久,鉴定出SCN抗性来源。Ross和Brim(1957)Plant Dis.Rep.41:923-4。一些品系,诸如Peking和PI88788快速掺入育种程序中。Peking由于其缺乏农艺学不想要的性状而广泛用作抗性来源,其中Pickett作为第一种SCN抗性栽培种推广。某些SCN抗性群体可以克服抗性栽培种的认识导致其它SCN抗性来源的广泛筛选。PI88788作为品种3和4抗性的通用来源出现,尽管它针对品种4具有大于10%(但小于20%)的孢囊指数,并且Peking及其衍生物作为品种1和3的通用来源出现。随后,PI437654鉴定为具有对所有已知品种的抗性,并且将其SCN抗性回交入Forrest中。目前,存在有超过130种已知具有SCN抗性的PI。PI209332和PI90763是其它例示性SCN抗性大豆育种系。不是所有具有相同抗性来源的品种都具有相当的产量,它们也不相同地响应SCN。

[0012] 抗性大豆品种是可用于管理SCN的最有效的工具。SCN密度在种植抗性大豆时通常降低,因为大多数SCN幼年虫不能在抗性品种的根上进食并发育。然而,在任何自然侵袭的田间,少许SCN幼年虫(<1%)会能够在目前可用的抗性品种上繁殖。可以在抗性大豆品种上繁殖的SCN幼年虫的数目在重复种植抗性品种时可以增加。最后,若在受到侵袭的田间生产大豆时每次种植SCN抗性大豆,则SCN群体在抗性品种上可能也能够与在易感性品种上一样繁殖。幸运地,能在抗性品种上繁殖的SCN幼年虫的数目在种植易感性大豆品种时下降,因为这些线虫不与土壤中不能以抗性品种为食的其它SCN幼年虫充分竞争食物。

[0013] 认为SCN品种3是美国中西部大豆生产州的最主要品种。已经针对对品种3的抗性的遗传学和育种付出相当大的努力。虽然Peking和PI88788两者都对SCN品种3有抗性,经典的遗传学研究提示了它们含有品种3抗性的不同基因。Rao-Arelli和Anand(1988)Crop Sci.28:650-2。品种3抗性可能在三种或四种不同基因的控制下。同上;还可见Mansur等(1993)Crop Sci.33:1249-53。定位至连锁群G的一种主要SCN抗性QTL是rhg1。Concibido等(1996)Theor.Appl.Genet.93:234-41。其它SCN抗性QTL定位至连锁群A2、C1、M、D、J、L25、L26、和K。同上;美国专利5,491,081。至少根据就不同SCN品种而言占总表型变化的不同比例,SCN抗性QTL以品种特异性方式运行。Concibido等(1997)Crop Sci.37:258-64。然而,连锁群G上的rhg1基因座对于开发对任何鉴定的SCN品种的抗性可以是必要的。但可见Qui等(1999)Theor.Appl.Genet.98:356-64。

[0014] 与SCN性状连锁的标志物包括RFLP、SSR和SNP。可以使用本公开内容中鉴定的SNP标志物来进行SCN基因型分型,从而支持育种程序。使用目前公开的SNP标志物来实施SCN基因型分型以支持育种程序提供了:成本和时间节约、期望后代的早期检测、和更精确的且快速的SCN抗性大豆品种商业化。

[0015] 发明概述

[0016] 可以使用与SCN表型连锁的分子标志物来促进大豆中SCN抗性性状的标志物辅助选择。在与SCN基因型分型相比时,标志物辅助选择就时间、成本和劳动力而言提供相当多的优点。令人惊讶地,本文中公开了鉴定为在大豆基因组中SCN疾病抗性QTL区之内或附近且在亲本基因型中多态性的15种SNP标志物之中,仅三种与SCN抗性性状连锁。然后,这三种SNP标志物在SCN抗性大豆品种的标志物辅助选择中提供卓越的效用。

[0017] 本文中描述了与SCN抗性表型连锁(例如,连锁;紧密连锁;或极端紧密连锁)的核酸分子标志物。在具体的例子中,分子标志物可以是SNP标志物。本文中还描述了使用与SCN抗性表型连锁的核酸分子标志物(例如但不限于)以鉴定具有SCN抗性表型的植物、将SCN抗性表型导入新植物基因型中(例如,经由标志物辅助育种或遗传转化进行)、以及栽培有可能具有SCN抗性表型的植物的方法。

[0018] 进一步描述了用于将SCN表型导入大豆的手段和用于鉴定具有SCN表型的植物的手段。在一些例子中,用于将SCN表型导入大豆的手段可以是与SCN表型连锁(例如,连锁;紧密连锁;或极端紧密连锁)的标志物。在一些例子中,用于鉴定具有SCN表型的植物的手段可以是与同SCN表型连锁(例如,连锁;紧密连锁;或极端紧密连锁)的标志物特异性杂交的探针。

[0019] 本文中还描述了自具有SCN表型的植物衍生的植物和植物材料,如使用本文中描述的分子标志物鉴定的。如此,描述了使用一种或多种与SCN抗性表型连锁的分子标志物通过标志物辅助选择生成的大豆植物。

[0020] 附图简述

[0021] 图1a和1b包括已经在SCN文献中报告的与SCN抗性有关的QTL的列表。

[0022] 图2包括大豆基因组,包括染色体和连锁群(LG)的表示。

[0023] 图3包括大豆染色体18(连锁群G)、和与SCN抗性有关的QTL和QTL间隔以及位于其中的SNP的表示。

[0024] 图4包括大豆染色体8(连锁群A<sub>2</sub>)、和与SCN抗性有关的QTL和QTL间隔以及位于其中的SNP的表示。

[0025] 图5包括大豆染色体11(连锁群B<sub>1</sub>)、和与SCN抗性有关的QTL和QTL间隔以及位于其中的SNP的表示。

[0026] 图6包括大豆染色体20(连锁群I)、和与SCN抗性有关的QTL和QTL间隔以及位于其中的SNP的表示。

[0027] 图7包括24种大豆SCN相关栽培种或亲本系在4种SNP基因座上的簇。还包括显示使用的24种大豆栽培种和SCN定位亲本的表。在表中,第一行样品和第二行中的最后两个样品是SCN易感性的(绿色),而第二行中的前10个样品是SCN抗性的(黄色)。第二行中的最后三个样品是两个SCN定位群体的亲本系。

[0028] 图8包括96种品系在显示与SCN抗性性状共分离的三个SNP基因座上的簇。

[0029] 图9包括归入定位群体的SCN指数的分布。柱状图显示了0.01至3.8的范围,均值为0.63,且中值为0.465。

[0030] 序列表

[0031] 使用核苷酸碱基的标准字母缩写显示所附序列表中所列的核酸序列,如37C.F.R. §1.822中限定的。仅显示每种核酸序列的一条链,但是应当理解互补链通过对展示链的任

何提及而包括在内。在所附序列表中：

[0032] SEQ ID NO:1显示了在KBiosciences竞争性等位基因特异性PCR SNP基因型分型系统(KASPar<sup>TM</sup>)测定法中使用的对rhg1-3995等位基因特异性的引物序列：GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGAATTATGTTGGGTTTTTTTCTTTCTGT。

[0033] SEQ ID NO:2显示了在KASPar<sup>TM</sup>测定法中使用的对rhg1-3995等位基因特异性的第二引物序列：GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAATTATGTTGGGTTTTTTTCTTTCTGG。

[0034] SEQ ID NO:3显示了在KASPar<sup>TM</sup>测定法中使用的针对rhg1-3995的共同反向引物序列：GCCCAGAAAAAGGGATAAATAACGGATA。

[0035] SEQ ID NO:4显示了在KASPar<sup>TM</sup>测定法中使用的对NCSB\_004074等位基因特异性的引物序列：GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATTATGTTGTAACACAA ATTTGCACCTCAT。

[0036] SEQ ID NO:5显示了在KASPar<sup>TM</sup>测定法中使用的对NCSB\_004074等位基因特异性的第二引物序列：GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGTTGTAACACAAATTTGCACCTCAG。

[0037] SEQ ID NO:6显示在KASPar<sup>TM</sup>测定法中使用的针对NCSB\_004074的共同反向引物序列：CTATACAATAATCGTAATTCATTGTAT。

[0038] SEQ ID NO:7显示了在KASPar<sup>TM</sup>测定法中使用的对BARC\_010889-01691等位基因特异性的引物序列：GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAAAAATAAAATTGATCATCACATATGGTTAG。

[0039] SEQ ID NO:8显示了在KASPar<sup>TM</sup>测定法中使用的对BARC\_010889-01691等位基因特异性的第二引物序列：GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAAAAATAAAATTGATCATCACATATGGTTAA。

[0040] SEQ ID NO:9显示了在KASPar<sup>TM</sup>测定法中使用的针对BARC\_010889-01691的共同反向引物序列：TAAGTGAGGGCAATGTATTAGTATYAAGTA。

[0041] SEQ ID NO:10显示了标志物NCSB\_004074序列：CACGATTTTGTGTGTACATAAATTACTATACAATAATCGTAATTCATTGTATTAC[A/C]TGAGGTGCAATTTGTGTACATAATTGTAATTTTATTGTACGATAAAAACTATAAC。

[0042] SEQ ID NO:11显示了标志物BARC\_010889-01691序列：CTCTTCACACCTTTAAGGAAGTTAGTACCATTCCACTATTCAAGTATTTTTTTAATTCAAAATTATTAAGTGAGGGC A A T G T A T T A G T A T N A A G T A [ C / T ] TAACCATATGTGATGATCAATTTTATTTTTCATGGCTTTGTGCGAAAGTAACATTATATTGTGGTTTTAATGAAAA TCTGTGATTTGCAT。

[0043] SEQ ID NO:12显示了标志物rhg1-3995序列：TCTGATAACTATGACAGCATCTTCCAAGATAATGACTTCCAAGTCCAACACTGGCTCTGTACATTTGAACTAATTT TATATCATTTATCTATTGTGATTGAAATATAAAATTGAAGTGATGTGAACAATACAAATCACATCTTGAATTTAAAT ATCTAACAACTGGAACAAATAAGAGGCCAGAAAAAGGGATAAATAACGGATAACAAG[A/C] CAGAAAGAAAAAAACCCAACATAATTCCAACCTCAAAATTCCTCAATAAAAAGTTTAACATGTAAATTTACTTGG AAACAAAACCTCATAACCAATAATAATAATAAAGAAATCAGTTTATAGCATTAATTTGGGATGCTCTGCTTGT ATGCAATGGCACAACCTTACCCTCAAGATTGCAAAACACAGATGAGTAACAGATGCAATGTGAATCAATAAAAAGT ATTGTTGCGTTGTTGATGACACAACCTTACTCATAAAAAATGCAT。

[0044] 发明详述

[0045] I.几个实施方案的概述

[0046] 具体实施方案包括在96种测试的大豆系中显示与大豆孢囊线虫(SCN)抗性性状共

分离的三种例示性SNP标志物(rhg1-3995、BARC\_010889\_01691、和NCSB\_004074)。与SCN抗性共分离的标志物与此性状连锁,并且因此可用于标志物辅助选择和育种。本文中公开了用于鉴定与SCN抗性连锁的这三种例示性SNP标志物的策略。提供了大豆基因组中这三种例示性SNP标志物的物理图谱位置。使用本文中所描述的三种例示性SNP标志物,开发出使用KBiosciences竞争性等位基因特异性PCR SNP基因型分型系统(KASPar™)的特异性测定法来快速且准确地鉴定携带SCN抗性性状的植物。虽然本发明的实施方案通过提及与SCN抗性连锁的三种例示性SNP标志物进行描述,但是本领域技术人员应当领会可以使用本文中描述的技术来鉴定其它等价的标志物。与SCN抗性连锁的SNP标志物可以例如在SCN基因型分型中使用以从大豆育种群体选择SCN抗性个体。

[0047] 大豆孢囊线虫(SCN)抗性是一种非常复杂的性状。SCN侵袭可以由一种或多种不同大豆异皮线虫品种引起,针对每种所述大豆异皮线虫品种的抗性可能需要位于不同连锁群上的不同抗性基因。见表1。表1中公开的三种标志物均位于连锁群G中。认为连锁群G中的一种或多种SCN抗性基因造成对品种3和14的抗性。

[0048] 使用本文中所描述的策略来鉴定其它连锁群(例如A2、B1、和I)中与SCN抗性连锁的标志物。如此,还提供了用于鉴定此类标志物的方法。也使用通用策略来定位其它感兴趣的性状。该策略比传统的定位策略更有效,并且在分子育种程序中可以是特别有用的。

[0049] 表1:SCN抗性来源

[0050]

| 抗性种质     | 大豆孢囊线虫<br>品种 | 连锁群(LG) |
|----------|--------------|---------|
| PI 88788 | 3、14         | G       |
| Peking   | 1、3、和5       | G、A2、和B |



[0051]

| 抗性种质          | 大豆孢囊线虫<br>品种         | 连锁群(LG)                                    |
|---------------|----------------------|--------------------------------------------|
| PI 437654     | 所有                   | G (Rhgl)、A2 (Rhg4)、B、C1、L25、<br>L26、M、和D1a |
| PI 90763      | 3                    |                                            |
| PI<br>438489B | 1、2、3、5、和<br>14      | G、E、A1、B1、和C1                              |
| PI 89772      | 1、2、3、和5             | G、E、A1、C1、C2、和D1a                          |
| PI209332      | 所有                   | G (Rhgl)、和A2 (Rhg4)                        |
| PUSCN14       | 3                    | A、G、B、I、和F                                 |
| Hartwig       | 3                    |                                            |
| Forrest       | 3                    | G和A2                                       |
| Pyramid       | 3、14 (来自PI<br>88788) | A2、D、和G                                    |

[0052] II. 术语

[0053] 定位群体:如本文中所使用的,术语“定位群体”可以指用于基因定位的植物群体。定位群体通常自亲本基因型的受控杂交获得。对开发定位群体的杂交设计和亲本选择、和使用的标志物类型的决定取决于要定位的基因、标志物的利用度、和分子图谱。定位群体内的植物的亲本在核酸序列和表型水平两者必须具有对于一种或多种感兴趣的性状足够的变化。使用亲本的核酸序列的变化来追踪定位群体的植物中的重组事件。有信息的多态性标志物的利用度取决于核酸序列变异的量。

[0054] 回交:回交方法可以用于将核酸序列导入植物中。几十年以来已经广泛使用回交技术来将新性状导入植物中。N.Jensen编,Plant Breeding Methodology,John Wiley& Sons, Inc., 1988。在一个典型的回交方案中,将感兴趣的初始品种(回归亲本)与携带要转移的感兴趣基因的第二品种(非回归亲本)杂交。然后,将来自此杂交的所得后代与回归亲本再次杂交,并重复该过程,直到获得如下的植物,其中在来自非回归亲本的转移基因外,在转化植物中恢复回归植物的基本上所有期望的形态学和生理学特征。

[0055] KBiosciences竞争性等位基因同源性PCR SNP基因型分型系统(KASPar™): KASPar™是一种用于测定SNP基因型的商品化同质荧光系统(KBiosciences Ltd., Hoddesdon, UK)。KASPar™测定法包含SNP特异性“测定混合物”(其含有三种未标记的引物)和“反应混合物”(其含有所有其它需要的组分,例如通用荧光报告系统)。在这些混合物外,用户提供有FRET能力的读板仪、微量滴定板、和含有约5ng/L DNA的DNA样品,等等。

[0056] 典型的KASPar™测定法包括下列步骤:等位基因特异性引物设计(例如,使用

PrimerPicker™进行,其是一项在KBiosciences网站经由因特网可用的免费服务),制备包含等位基因特异性引物的反应混合物,在微量滴定板中混合反应混合物与DNA样品,热循环,在荧光读板仪中读板,以及对荧光数据绘图并评分。将来自每份样品的数据在二维图像上一起绘图,其中x和y轴对应于FAM和VIC荧光数值。具有相同SNP基因型的样品在图上聚簇在一起(即,A/A、A/a、和a/a)。关于KASPar系统(包括针对常见问题的解决办法的指导)的更多技术信息可获自KBiosciences Ltd.(例如,KASPar SNP基因型分型系统试剂手册)。

[0057] 连锁的、紧密连锁的、和极端紧密连锁的:如本文中所使用的,基因或标志物间的连锁可以指染色体上的基因或标志物显示一起传递到下一代个体的可测量概率的现象。两种基因或标志物彼此越接近,此概率变得越接近(1)。如此,术语“连锁的”可以指以大于0.5的概率(其从独立分类预期,其中标志物/基因位于不同染色体上)与某个基因一起传递的一种或多种基因或标志物。在基因的存在促成个体中的表型时,与该基因连锁的标志物可以说成与该表型连锁。如此,术语“连锁的”可以指标志物和基因之间,或者标志物和表型之间的关系。

[0058] 因为染色体上的两种基因或标志物的接近性与基因或标志物会一起传递到下一代个体的概率正相关,所以术语“连锁的”在本文中也可以指同一染色体上位于在彼此的约2.0Mb内的一种或多种基因或标志物。如此,两种“连锁的”基因或标志物可以相隔约2.1Mb, 2.00Mb, 约1.95Mb, 约1.90Mb, 约1.85Mb, 约1.80Mb, 约1.75Mb, 约1.70Mb, 约1.65Mb, 约1.60Mb, 约1.55Mb, 约1.50Mb, 约1.45Mb, 约1.40Mb, 约1.35Mb, 约1.30Mb, 约1.25Mb, 约1.20Mb, 约1.15Mb, 约1.10Mb, 约1.05Mb, 约1.00Mb, 约0.95Mb, 约0.90Mb, 约0.85Mb, 约0.80Mb, 约0.75Mb, 约0.70Mb, 约0.65Mb, 约0.60Mb, 约0.55Mb, 约0.50Mb, 约0.45Mb, 约0.40Mb, 约0.35Mb, 约0.30Mb, 约0.25Mb, 约0.20Mb, 约0.15Mb, 约0.10Mb, 约0.05Mb, 约0.025Mb, 和约0.01Mb。与大豆中的SCN表型“连锁的”标志物的具体例子包括大豆基因组的染色体18上的核苷酸序列。

[0059] 如本文中使用的,术语“紧密连锁的”可以指同一染色体上位于在彼此的约0.5Mb内的一种或多种基因或标志物。如此,两种“紧密连锁的”基因或标志物可以相隔约0.6Mb, 约0.55Mb, 0.5Mb, 约0.45Mb, 约0.4Mb, 约0.35Mb, 约0.3Mb, 约0.25Mb, 约0.2Mb, 约0.15Mb, 约0.1Mb, 和约0.05Mb。

[0060] 如本文中使用的,术语“极端紧密连锁的”可以指同一玉米染色体上位于在彼此的约100kb内的一种或多种基因或标志物。如此,两种“极端紧密连锁的”基因或标志物可以相隔约125kb, 约120kb, 约115kb, 约110kb, 约105kb, 100kb, 约95kb, 约90kb, 约85kb, 约80kb, 约75kb, 约70kb, 约65kb, 约60kb, 约55kb, 约50kb, 约45kb, 约40kb, 约35kb, 约30kb, 约25kb, 约20kb, 约15kb, 约10kb, 约5kb, 和约1kb。与大豆中的SCN表型“极端紧密连锁的”标志物的具体例子包括rhg1-3995、BARC\_010889\_01691、和NCSB\_004074。

[0061] 鉴于前述内容,应当领会与特定基因或表型连锁的标志物包括与基因或表型紧密连锁的那些标志物,和与基因或表型极端紧密连锁的那些标志物。SCN表型的连锁的、紧密连锁的、和极端紧密的遗传标志物可用于标志物辅助育种程序以鉴定SCN抗性大豆品种,以及将此性状育种到其它大豆品种中以赋予SCN抗性。

[0062] 基因座:如本文中使用的,术语“基因座”指基因组上与可测量的特征(例如,性状)对应的位置。SNP基因座通过与基因座内含有的DNA杂交的探针限定。

[0063] 标志物:如本文中使用的,标志物指可以用于鉴定具有特定等位基因的植物的基因或核苷酸序列。标志物可以描述为给定基因组基因座处的变异。遗传标志物可以是短的DNA序列,诸如单碱基对变化(单核苷酸多态性,或“SNP”)周围的序列。或长的DNA序列,例如小卫星/简单序列重复(“SSR”)。“标志物等位基因”指特定个体中存在的标志物型式。

[0064] 如本文中使用的,术语标志物可以指大豆染色体DNA的克隆区段(例如,包含rhg1-3995、BARC\_010889\_01691、或NCSB\_004074的区段),并且也或者备选地可以指与大豆染色体DNA的克隆区段互补的DNA分子(例如,与包含rhg1-3995、BARC\_010889\_01691、或NCSB\_004074的区段互补的DNA)。

[0065] 在一些实施方案中,可以经由使用核酸探针检测植物中的标志物存在。探针可以是DNA分子或RNA分子。可以通过本领域中已知的手段,例如使用DNA分子模板合成RNA探针。探针可以含有标志物的整个或部分的核苷酸序列和来自植物基因组的额外的、连续的核苷酸序列。这在本文中称为“连续探针”。所述额外的、连续的核苷酸序列称为初始标志物的“上游”或“下游”,这取决于来自植物染色体的连续核苷酸序列是在初始标志物的5'还是3'侧,如按照惯例理解的。如本领域普通技术人员公认的,可以几乎无限重复获得标志物中包含的额外的、连续的核苷酸序列的方法(仅受限于染色体的长度),由此沿着玉米染色体鉴定其它标志物。可以在本发明的一些实施方案中使用所有上文所描述的标志物。

[0066] 可以合成或通过克隆制备寡核苷酸探针序列。合适的克隆载体是本领域技术人员公知的。寡核苷酸探针可以是标记的或未标记的。存在用于标记核酸分子的极其多种技术,包括例如但不限于:通过缺口平移的放射性标记;随机引发;用末端脱氧转移酶(deoxytransferase)的加尾;等等,其中采用的核苷酸例如用放射性<sup>32</sup>P标记。可以使用的其它标记物包括例如但不限于:荧光团(例如FAM和VIC)、酶、酶底物、酶辅因子、酶抑制剂,等等。或者,自身或其它反应剂一起提供可检测信号的标记物的使用可以用受体结合的配体替换,其中受体是标记的(例如,通过上文指定的标记物进行),从而自身或其它试剂一起提供可检测信号。参见例如Leary等(1983)Proc.Natl.Acad.Sci.USA80:4045-9。

[0067] 探针可以含有与初始标志物的核苷酸序列不连续的核苷酸序列;此探针在本文中称为“非连续探针”。非连续探针的序列与基因组上的初始标志物的序列足够接近地定位,从而非连续探针与相同基因(例如SCN抗性)遗传连锁。例如,在一些实施方案中,非连续探针可以位于大豆基因组上的初始标志物的500kb,450kb,400kb,350kb,300kb,250kb,200kb,150kb,125kb,100kb,0.9kb,0.8kb,0.7kb,0.6kb,0.5kb,0.4kb,0.3kb,0.2kb,或0.1kb内。

[0068] 探针可以是要检测的标志物的精确拷贝。探针也可以是包含核苷酸序列或由核苷酸序列组成的核酸分子,所述核苷酸序列与主题生物体的(例如,大豆)染色体DNA的克隆区段是基本上相同的。如本文中使用的,术语“基本上相同的”可以指超过85%相同的核苷酸序列。例如,基本上相同的核苷酸序列与参照序列可以是85.5%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或99.5%相同的。

[0069] 探针也可以是与要检测的标志物的精确拷贝(“DNA靶物”)“特异性可杂交”或“特异性互补”的核酸分子。“特异性可杂交”和“特异性互补”是如下的术语,其指示足够的互补性程度,使得核酸分子和DNA靶物之间发生稳定的且特异性的结合。核酸分子与要特异性可杂交的其靶序列不需要是100%互补的。在存在有足够的互补性程度以避免核酸在期望特异

性结合的条件下,例如在严格杂交条件下对非靶序列的非特异性结合时,核酸分子是特异性可杂交的。

[0070] 产生特定严格性程度的杂交条件会随选择的杂交方法的性质及杂交核酸序列的组成和长度而有所变化。一般地,杂交的温度和杂交缓冲液的离子强度(尤其是 $\text{Na}^+$ 和/或 $\text{Mg}^{++}$ 浓度)会决定杂交严格性,尽管清洗次数也影响严格性。关于获得特定严格性程度需要的杂交条件的计算是本领域普通技术人员已知的,并且例如在Sambrook等(编)Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第2版,卷1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 第9章和第11章;及Hames和Higgins(编)Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, 1985中讨论。关于核酸杂交的更为详细的用法说明书和指导可以参见例如Tijssen, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," 于Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, 部分I, 第2章, Elsevier, NY, 1993; 及Ausubel等编, Current Protocols in Molecular Biology, 第2章, Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY, 1995。

[0071] 如本文中所使用的,“严格条件”涵盖仅在杂交分子与DNA靶物之间存在有小于50%错配时发生杂交的条件。“严格条件”包括其它特定的严格性水平。如此,如本文中使用的,“中等严格性”条件是具有超过50%序列错配的分子不会杂交的那些条件;“高严格性”条件是具有超过20%错配的序列不会杂交的那些条件;而“非常高严格性”的条件是具有超过10%错配的序列不会杂交的那些条件。

[0072] 以下内容是代表性的非限制性杂交条件。

[0073] 非常高的严格性(检测共享至少90%序列同一性的序列):于65°C在5xSSC缓冲液中15-30分钟杂交,持续16小时;在2x SSC缓冲液中于室温清洗两次,各15分钟;并在0.5x SSC缓冲液中于65°C清洗两次,各20分钟。

[0074] 高严格性(检测共享至少80%序列同一性的序列):在5x-6x SSC缓冲液中于65-70°C杂交16-20小时;于室温在2x SSC缓冲液中清洗两次,各5-20分钟;并在1x SSC缓冲液中于55-70°C清洗两次,各30分钟。

[0075] 中等严格性(检测共享至少50%序列同一性的序列):在6x SSC缓冲液中于室温至55°C杂交16-20小时;于室温至55°C在2x-3x SSC缓冲液中清洗至少两次,各20-30分钟。

[0076] 就上文讨论的所有探针而言,探针可以包含其它核酸序列,例如启动子、转录信号、和/或载体序列。可以使用上文讨论的任何探针来限定与牵涉SCN抗性的基因紧密连锁的其它标志物,并且如此鉴定的标志物可以等同于本公开内容中命名的例示性标志物,并且如此在本发明的范围内。

[0077] 标志物辅助育种:如本文中使用的,术语“标志物辅助育种”可以指在一种或多种复杂性状(例如SCN抗性)方面直接育种的方法。在当前的实践中,植物育种人员尝试鉴定与农艺学期望的性状连锁的容易地可检出的性状,诸如花颜色、种皮外观、或同工酶变体。植物育种人员然后通过追踪容易地可检出的性状的分离来追踪分离的育种群体中的工艺学性状。然而,存在着可用于植物育种中使用的非常少的这些连锁关系。

[0078] 标志物辅助育种提供了用于改善植物品种的时间和成本有效的方法。应用标志物辅助育种的几个例子牵涉使用同工酶标志物。参见例如 Tanksley 和 Orton 编(1983)

Isozymes in Plant Breeding and Genetics, Amsterdam: Elsevier。一个例子是与对番茄中的线虫有害生物的抗性的基因关联的同工酶标志物。受到称作Mi的基因控制的抗性位于番茄的染色体6上,并且与Aps1(即一种酸性磷酸酶同工酶)非常紧密连锁。Aps1同工酶标志物间接选择Mi基因的用途提供如下的优点,即可以用标准的电泳技术明确测定群体中的分离;可以在幼苗组织中对同工酶标志物评分,消除对将植物维持至成熟的需要;以及同工酶标志物等位基因的共显性容许区别纯合子和杂合子。参见Rick(1983)于 Tanksley 和 Orton, 见上文。

[0079] 数量性状基因座:如本文中使用的,术语“数量性状基因座”(QTL)可以指已经鉴定为可能地成为数量性状,或表型基础的DNA序列(例如,基因、非编码序列、和/或基因间序列)的DNA段,所述数量性状或表型在程度上有所变化,并且可以归因于两种或更多种DNA序列(例如基因、非编码序列、和/或基因间序列)或其表达产物及其环境之间的相互作用。可以在分子上鉴定数量性状基因座(QTL)以帮助定位含有牵涉规定数量性状的序列的基因组区。

[0080] 如本文中使用的,术语“QTL间隔”可以指与成为QTL性状基础的基因连锁的DNA段。QTL间隔通常但不必然大于QTL自身。QTL间隔可以含有相对于QTL的5'和/或3'的DNA段。

[0081] 序列同一性:如本文中在两种核酸或多肽序列的背景中所使用的,术语“序列同一性”或“同一性”可以指两种序列中在规定的比较窗里为了实现最大对应性而比对时相同的残基。

[0082] 如本文中所使用的,术语“序列同一性百分比”可以指通过在比对窗里比较两个最佳比对序列(例如,核酸序列)测定的数值,其中为了两个序列的最佳比对,比较窗中序列的部分与参照序列(其不包含添加或缺失)相比可以包含添加或缺失(即,缺口)。通过测定两个序列中存在相同核苷酸或氨基酸残基的位置的数目以产生匹配位置数目,将匹配位置的数目除以比较窗中位置的总数,并将结果乘以100以产生序列同一性百分比来计算百分比。

[0083] 用于比对比较序列的方法是本领域中公知的。各种程序和比对算法记载于例如: Smith和Waterman(1981)Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman和Wunsch(1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson和Lipman(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins和Sharp(1988)Gene 73:237-44; Higgins和Sharp(1989)CABIOS 5:151-3; Corpet等(1988)Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang等(1992)Comp. Appl. Biosci. 8:155-65; Pearson等(1994)Methods Mol. Biol. 24:307-31; Tatiana等(1999)FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50。序列比对方法和同源性计算的详细考虑可以参见例如 Altschul等(1990)J. Mol. Biol. 215:403-10。

[0084] 国立生物技术信息中心(NCBI)基本局部比对搜索工具(BLAST™; Altschul等(1990))可获自几个来源,包括国立生物技术信息中心(Bethesda, MD)以及在因特网上,其与几种序列分析程序结合使用。如何使用此程序来测定序列同一性的描述在因特网上在BLAST™的“帮助”部分下可得到。为了比较核酸序列,可以采用BLAST™(Blastn)程序的“对2种序列Blast”功能,其使用设置为缺省参数的缺省BLOSUM62矩阵进行。与参照序列具有甚至更大相似性的核酸序列在通过此方法评估时会显示增加的百分比同一性。

[0085] 单核苷酸多态性:如本文中使用的,术语“单核苷酸多态性”(SNP)可以指在基因组(或其它共享序列)中的单核苷酸在物种成员或个体中的配对染色体间有所不同时发生的

DNA序列变异。在群体内,可以给SNP指派较小等位基因频率,其是特定群体中观察到的某个基因座处的最低等位基因频率。这仅是在单核苷酸多态性方面两种等位基因频率中的较小者。预期不同群体展现出至少略微不同的等位基因频率。特定群体可以展现出显著不同的等位基因频率。在一些例子中,与SCN抗性连锁的标志物是SNP标志物。

[0086] SNP可以落入基因的编码序列、基因的非编码区内,或基因间的基因间区中。编码序列内的SNP由于遗传密码的简并性而不会必然改变生成的蛋白质的氨基酸序列。两种形成都生成相同多肽序列的SNP称作“同义的”(有时称作沉默突变)。若生成不同多肽序列,则它们称作“非同义的”。非同义变化可以是错义或无义,其中错义变化导致不同氨基酸,而无义变化导致过早的终止密码子。不在蛋白质编码区中的SNP可以仍然具有基因剪接、转录因子结合、或非编码RNA序列的后果。SNP通常是双等位基因的,并且如此容易在植物和动物中测定。Sachidanandam(2001)Nature409:928-33。

[0087] 性状或表型:术语“性状”和“表型”在本文中可互换使用。出于本公开内容的目的,特别感兴趣的性状是SCN抗性。

[0088] III.与感兴趣的性状连锁的标志物的基于QTL的鉴定

[0089] A.概述

[0090] 在一些实施方案中,使用与传统定位方法不同的策略来定位性状(例如SCN抗性)。例如,可以依照如下的策略定位性状,为了方便,所述策略可以描述为包含四个步骤。在第一步中,可以测定与要定位的性状对应的QTL间隔靶区。在第二步中,可以选择位于靶基因组(例如,大豆基因组)的测定QTL间隔内或附近的标志物(例如SNP标志物)。在第三步中,可以设计特异性引物,其促进个体受试者就选定的标志物而言的基因型分型。在具体的例子中,设计特异性引物以用于KASPar™基因型分型测定法。在第四步中,可以使用特异性引物来筛选在所述性状方面显示分离的群体以鉴定与该性状连锁的那些标志物。

[0091] B.与感兴趣的性状连锁的标志物及其鉴定

[0092] QTL间隔靶区的测定及标志物的鉴定。

[0093] 可以通过本领域技术人员可用的任何技术测定QTL。例如,最初可以通过参照已知促成特定性状的基因的位置测定与感兴趣的特定性状对应的QTL的物理位置。在一些实施方案中,可以分别在染色体8、11、18、和20上的至少四个区域上鉴定SCN抗性基因。参见例如Concibido等(1996)Theor.Appl.Genet.93:234-41,Concibido等(1997)Crop Sci.37:258-64,Meksem等(1999)Theor.Appl.Genet.99:1131-42,Qui等(1999)Theor.Appl.Genet.98:356-64,Meksem等(2001)Mol.Breeding7:63-71,Li等(2009)Mol.Breeding24:63-76,Wu等(2009)Theor.Appl.Genet.118:1093-105;美国专利5,491,081,6,096,944,6,162,967,6,271,437,6,284,948,6,300,541,6,538,175,7,154,021,7,485,770;U.S.S.N.s20020129402,20020144310,20030005491,20030135881,20060225150,20060253919,20080072352,及20090100537;及国际PCT公开文本No.W01995020669A2,W02001051627A2,和W02008153804A2。在一些实施方案中,将最初鉴定的QTL分组或分成不太复杂的或广泛的一系列QTL,其在基因组中可以具有相同或与最初鉴定的QTL的边界不同的边界。

[0094] 在一些实施方案中,可以选择有可能含有与QTL性状连锁的标志物的DNA区。此区域可以称为QTL间隔。例如,QTL间隔可以是如下的DNA区,其包含QTL和在5'和3'方向之任一

或两者接近QTL的额外的基因组DNA。在一些实施方案中,QTL间隔可以是约4Mb,约3.5Mb,约3Mb,约2.5Mb,约2Mb,约1.5Mb,或约1Mb。

[0095] 在具体的实施方案中,可以搜索靶基因组以鉴定物理上位于QTL和QTL间隔之中、附近、或之间的标志物。若含有已知标志物的位置的参照图谱可用于靶基因组,则可以使用参照图谱来鉴定标志物。例如,也可以通过软件诸如BLAST<sup>TM</sup>搜索靶基因组的核酸序列。在一些实施方案中,可以鉴定SNP标志物。在一些实施方案中,可以鉴定如下的标志物,其在物理上位于与SCN抗性性状对应的大豆基因组的QTL和QTL间隔之中、附近、或之间。在具体的例子中,在物理上位于与SCN抗性性状对应的大豆基因组的QTL和QTL间隔之中、附近、或之间的鉴定的SNP标志物可以选自下组:表2中列出的标志物。

[0096] 在其它实施方案中,具体的标志物可以选自在物理上位于与感兴趣的性状对应的QTL和QTL间隔之中、附近、或之间的鉴定的标志物,该标志物在会生成定位群体的亲本系间是多态性的。给定标志物在亲本系间的多态性与在自亲本系生成的定位群体中追踪重组事件的能力直接相关。

[0097] 在具体的例子中,选择亲本大豆系间的多态性标志物以筛选SCN抗性定位群体,从而测定哪些(若有的话)多态性标志物与SCN抗性性状连锁。此类标志物可以分离,从而SNP标志物的一种等位基因专门在SCN抗性个体中出现,而SNP标志物的另一种等位基因专门在SCN易感性个体中出现。可以通过将SCN抗性的一种品种与SCN易感性的另一品种杂交生成定位群体。在实施方案中,定位群体可以包含约10,约20,约30,约40,约50,约60,约70,约80,约90,约95,约100,约150,约200,约250,约300,约350,约400,约450,约500,或更多个群体。在一些实施方案中,可以将SCN抗性大豆种系98860-71与一种或多种SCN易感性种系(例如,75213和6CH026-035)杂交以创建定位群体。

[0098] 在一些实施方案中,多态性标志物可以是与同感兴趣的SCN抗性性状对应的基因或QTL连锁的或在同感兴趣的SCN抗性性状对应的基因或QTL内的单核苷酸多态性(SNP)。可以使用本领域中已知的任何DNA测序法,包括但不限于Sanger测序或高通量测序(“Next Generation”)方法(其遍及感兴趣的区域实现短的或长的序列阅读)通过经过整个含有基因或QTL的区域的测序检测这些SNP标志物。在此类实施方案中,在使用通过测序进行基因型分型来检测SNP标志物的情况中,可以使用与含有感兴趣的基因或QTL中的SNP的区域的侧翼序列对应的引物来进行测序化学,从而遍及感兴趣的区域测序。在此类实施方案中,在使用不同基因型来遍及整个感兴趣的区域测序以检测本文中例示的SNP时,在本文中例示的SNP外还可以鉴定其它SNP。在此类实施方案中,针对植物在感兴趣的SCN抗性性状方面的标志物辅助选择,可以利用自身(个别SNP)或与同例示的序列(单元型)连锁的其它SNP组合的本文中例示的SNP来区别基因型。

[0099] 引物设计和连锁筛选。

[0100] 寡核苷酸探针(例如,引物)可以设计为特异性检测在物理上位于与感兴趣的性状对应的QTL和QTL间隔之中、附近、或之间的标志物。一般地,寡核苷酸探针可以设计为使得仅与标志物的一种等位基因特异性杂交。在一些实施方案中,两种寡核苷酸探针设计为检测SNP标志物,使得每种与另一种探针不特异性杂交的SNP等位基因特异性杂交。如本领域技术人员理解的,针对特定标志物的寡核苷酸探针的长度或组成可以在不使探针对标志物的一种等位基因非特异性的情况下随建立的原则而变化。

[0101] 在一些实施方案中,寡核苷酸探针可以是探针。在具体的实施方案中,引物可以设计为在KASPar™基因型分型测定法中检测标志物。在具体的实施方案中,引物可以设计为使用KASPar™基因型分型测定法检测与大豆中SCN抗性表型连锁的标志物。在这些和其它实施方案中,检测系统可以为对定位群体中的个体测定基因型提供高通量且方便的形式,这可以极大促进携带特定基因或性状的个体的鉴定,并且也可以极大促进标志物辅助选择程序的执行或实现。

[0102] 在具体的实施方案中,寡核苷酸探针可以是设计为在TAQMAN®基因型分型测定法中检测标志物的引物。此方法利用对与SCN抗性基因紧密连锁的标志物特异性的引物和含有单核苷酸多态性(SNP)的经荧光标记的探针。用荧光染料诸如FAM标记与抗性有关的SNP探针,而用不同荧光染料诸如VIC标记与易感性有关的探针。数据以荧光染料信号的存在或缺乏分析。检测系统可以为对定位群体中的个体测定基因型提供高通量且方便的形式,诸如多路技术(multiplexing),这可以极大促进携带特定基因或性状的个体的鉴定,并且也可以极大促进标志物辅助选择程序的执行或实现。

[0103] 其它标志物可以鉴定为与本文中命名的任何例示性标志物(例如,表3中列出的标志物,诸如例如rhg1-3995、BARC\_010889\_01691、和NCSB\_004074)等同,例如通过测定例示性标志物与别的标志物之间的重组频率进行。此类测定可以利用基于Mather(1931), The Measurement of Linkage in Heredity, Methuen & Co., London的方法的正交比较方法,接着是测定重组频率的最大概率的测试。Allard(1956)Hilgardia 24: 235-78。若重组频率的数值小于或等于0.10(即,10%),则出于在目前公开的方法中使用的目的,认为所述别的标志物等同于特定的例示性标志物。

[0104] 可以在本发明的实施方案中鉴定与任何和所有SCN抗性基因连锁的标志物。此外,可以在本发明的实施方案中鉴定控制针对所有SCN HG品种的任何和所有抗性贡献基因座的标志物。

[0105] 用于提供大豆中的SCN抗性的手段可以是SNP标志物等位基因,属于或源自种系98860-71的大豆植物中的所述SNP标志物等位基因的检测提供至少强烈的指示,即包含核酸序列的植物具有SCN抗性表型。在一些例子中,用于提供大豆中的SCN抗性的手段是选自下组的标志物:表3中列出的标志物。在具体的例子中,用于提供大豆中的SCN抗性的手段是选自下组的标志物:rhg1-3995、BARC\_010889\_01691、和NCSB\_004074。

[0106] 用于鉴定具有SCN抗性表型的大豆植物的手段可以是在对自属于或源自具有SCN抗性基因型的种质98860-71的大豆植物获得的样品添加时呈现可检测信号的分子,但是该手段在对自属于或源自没有SCN抗性表型的种质98860-71的大豆植物获得的样品添加时没有呈现可检测信号。核酸的特异性杂交是可检测信号,因此,与同SCN抗性表型连锁的SNP标志物等位基因特异性杂交的核酸探针可以是用于鉴定具有SCN抗性表型的大豆植物的手段。在一些例子中,用于鉴定具有SCN抗性表型的大豆植物的手段是与同SCN抗性表型连锁的标志物特异性杂交的探针。

[0107] C. 使用与感兴趣的性状连锁的标志物的方法

[0108] 使用与感兴趣的性状(例如,大豆中的SCN抗性)连锁的核酸分子标志物来鉴定具有感兴趣的性状的植物的方法可以使植物开发人员节约成本,因为此类方法可以消除对开发(例如,通过将具有SCN抗性的大豆植物品种与易受攻击的植物品种杂交进行)期间生成



的表型个体植物的需要。

[0109] 在具体的实施方案中,可以使用与大豆中的SCN抗性连锁的标志物来转移含有一种或多种SCN抗性决定子的DNA段。在具体的实施方案中,标志物可以选自标志物的组,其包含表3中列出的标志物和作为其等同物的标志物。在一些实施方案中,标志物可以选自下组:rhg1-3995、BARC\_010889\_01691、和NCSB\_004074。在一些实施方案中,用于使用与大豆中的SCN抗性连锁的标志物来转移含有一种或多种SCN抗性决定子的DNA段的方法可以包括用与同SCN抗性表型连锁的标志物特异性可杂交的探针分析两个亲本植物的基因组DNA;将两个亲本植物基因型有性杂交以获得后代群体,并对那些后代分析与SCN抗性表型连锁的标志物的存在;将含有与SCN抗性表型连锁的标志物的后代与受体基因型回交以生成第一回交群体,然后继续回交程序,直到获得包含由亲本基因型展现的任何期望的性状和SCN抗性表型的最终后代。在具体的实施方案中,通过在每个世代的SCN标志物分析选择在每个杂交和回交步骤中获得的个体后代。在一些实施方案中,用与同SCN抗性表型连锁的标志物特异性可杂交的探针分析两个亲本植物的基因组DNA揭示亲本植物之一包含较少的与探针特异性杂交的连锁标志物,或者无一与探针特异性杂交的连锁标志物。在一些实施方案中,通过个体植物的序列变异选择每次杂交和/或回交中获得的个体后代。

[0110] 在一些实施方案中,可以使用与SCN抗性表型连锁的标志物通过遗传转化将一种或多种SCN抗性决定子导入植物(例如大豆)中。在具体的实施方案中,标志物可以选自标志物的组,其包含表3中列出的标志物和作为其等同物的标志物。在一些实施方案中,通过遗传重组将一种或多种SCN抗性决定子导入植物中的方法可以包括用与同SCN抗性表型连锁的标志物特异性可杂交的探针分析植物(例如大豆)的基因组DNA以鉴定植物中的一种或多种SCN抗性决定子;例如通过提取基因组DNA,并用一种或多种酶限制性内切核酸酶消化基因组DNA来分离植物基因组DNA中包含与SCN抗性表型连锁的标志物的区段;任选地,扩增分离的DNA区段;将分离的DNA区段导入宿主植物的细胞或组织中;并用与同SCN抗性表型连锁的标志物特异性可杂交的探针分析宿主植物的DNA以鉴定宿主植物中的一种或多种SCN抗性决定子。在具体的实施方案中,可以将分离的DNA区段导入宿主植物中,使得它稳定整合入宿主植物的基因组中。

[0111] 在一些实施方案中,可以使用与SCN抗性表型连锁的标志物来将一种或多种SCN抗性决定子导入其它生物体,例如植物中。在具体的实施方案中,标志物可以选自下组:表3中列出的标志物和作为其等同物的标志物。在一些实施方案中,用于将一种或多种SCN抗性决定子导入与大豆不同的生物体中的方法可以包括用与同SCN抗性表型连锁的标志物特异性可杂交的探针分析植物(例如,大豆植物)的基因组DNA以鉴定植物中的一种或多种SCN抗性决定子;例如通过提取基因组DNA,并用一种或多种酶限制性内切核酸酶消化基因组DNA来分离植物基因组DNA中包含一种或多种SCN抗性决定子的区段;任选地,扩增分离的DNA区段;将分离的DNA区段导入与大豆不同的生物体中;并用与同SCN抗性表型连锁的标志物特异性可杂交的探针分析与大豆不同的生物体的DNA以鉴定生物体中的一种或多种SCN抗性决定子。在其它实施方案中,可以将分离的DNA区段导入生物体中,使得它稳定整合入生物体的基因组中。

[0112] 在一些实施方案中,可以使用与SCN抗性表型连锁的标志物来鉴定具有一种或多种SCN抗性决定子的植物。在一些实施方案中,植物可以是大豆植物。例如,植物可以是种质

98860-71的大豆植物。在具体的实施方案中,可以自植物提取核酸分子(例如,基因组DNA或mRNA)。然后,可以使提取的核酸分子与一种或多种探针接触,所述探针与同SCN抗性表型连锁的标志物特异性可杂交。一种或多种探针与提取的核酸分子的特异性杂交指示植物中一种或多种SCN抗性决定子的存在。

[0113] 在一些实施方案中,可以同时使用与多个SCN抗性决定子连锁的标志物。在其它实施方案中,可以使用仅与一个SCN抗性决定子连锁的标志物。在具体的例子中,可以同时使用与对于一种或多种特定的SCN HG品种(例如,品种1、品种2、品种3、品种5、和品种14)而言的SCN抗性连锁的标志物,例如,可以同时使用与就不同SCN HG品种而言的SCN抗性连锁的多个标志物。

[0114] 提供以下实施例以例示某些具体的特征和/或实施方案。这些实施例不应解释为将公开内容限于所描述的具体特征或实施方案。

## 实施例

[0115] 实施例1:材料和方法

[0116] 使用24种大豆栽培种和SCN定位亲本来鉴定与SCN抗性表型连锁的标志物。14种栽培种是SCN易感性的:75110,75155,75163,99630,99726,95895-755PRU,99345-31,75192,75209,75159,Essex,Williams82,75213,和6CH026-035。10种栽培种是SCN抗性的:Maverick,Peking,PI209332,PI437654,99811,99294,Forrest,PI88788,PI437654,和98860-71。

[0117] SCN生物测定法:实施SCN生物测定法以产生通过将SCN抗性大豆品种98860-71与SCN易感性大豆品种75213和6CH026-035杂交生成的定位群体的表型信息。表3中列出了使用的定位群体的表型信息。产业没有分类大豆品种中抗性水平的统一方法。因此,根据“SCN得分”分类抗性水平:SCN得分0-10=R(抗性);SCN得分10.1-29.9=MR(中等抗性);SCN得分30.0-59.9=MS(中等易感性);以及60+=S(易感性)。通过将测试系与已知的易感性和抗性品系比较测定SCN指数值。指数得分直接基于对样品观察到的SCN易感性的百分比。例如,若测试系在9个植物之每个上具有10个孢囊,且Williams(易感性)在9个之每个上具有100个孢囊,则测试系分类为具有10%的指数。最终的指数是9个植物的得分的平均值。

[0118] KASPar<sup>TM</sup>反应:通过提供具有SNP的DNA序列使用KLIMS<sup>TM</sup>(KBioscience Laboratory Management System)中的PrimerPicker<sup>TM</sup>工具设计KASPar<sup>TM</sup>引物。基于KASPar<sup>TM</sup>化学,对每种SNP序列设计三种引物A1(等位基因特异性引物1)、A2(等位基因特异性引物2)、和C(共同反向引物)。制备每个KASPar<sup>TM</sup>反应的测定混合物,如在KASPar<sup>TM</sup>SNP基因型分型系统v2.0中一样。最终的反应体积是每个反应5 $\mu$ L,其包含1 $\mu$ L DNA模板(5ng/ $\mu$ L)、2.5 $\mu$ L 2X反应混合物、0.06875 $\mu$ L测定混合物、0.04 $\mu$ L 50mM MgCl<sub>2</sub>、和1.39125 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。在384孔形式中实施测定法。测定法期间使用的热循环条件依照制造商的用法说明书:94°C持续15分钟;94°C持续10秒,57°C持续5秒、及72°C持续10秒的20个循环;以及94°C持续10秒,57°C持续20秒,和72°C持续40秒的22个循环。将PCR板离心,并在分光荧光计(Tecan GENios<sup>TM</sup>, Männedorf, Switzerland)上于室温阅读等位基因特异性FAM和VIC强度。使用Kluster Caller<sup>TM</sup>在KLIMS<sup>TM</sup>上直接加载并分析数据。

[0119] 实施例2:与SCN抗性基因连锁的QTL和QTL间隔的物理位置的鉴定

[0120] 最初通过研究SCN文献鉴定SCN抗性中牵涉的QTL。图1a和1b中列出了SCN文献中找到的最初鉴定的SCN关联QTL。

[0121] 通过在SCN文献中最初鉴定的QTL表,通过参照大豆基因组图谱确定牵涉对不同SCN品种的抗性的几种独特的QTL间隔。参见例如图2。例如,确定连锁群(LG)G上的QTL间隔,如图3中显示的;确定LG A<sub>2</sub>上的QTL间隔,如图4中显示的;确定LG B<sub>1</sub>上的QTL间隔,如图5中显示的;并确定LG I上的QTL间隔,如图6中显示的。表2列出了与对不同SCN品种的抗性有关的例示性QTL及其相应的确定的QTL间隔。

[0122] 实施例3:在物理上位于与SCN抗性基因连锁的QTL和QTL间隔之中/附近/之间的SNP标志物的鉴定

[0123] 使用BLAST™对大豆基因组搜索SNP标志物,其在物理上位于确定的QTL间隔之中、附近、或之间。假设这些中的一些SNP标志物可以与SCN抗性表型连锁。选择总共79种SNP标志物以使用24种大豆系(14种SCN易感性和10种SCN抗性)进行初始筛选,从而测定这些SNP标志物中的哪些(若有的话)与SCN抗性表型连锁。79种标志物的25种位于LG G上,12种标志物位于LGA<sub>2</sub>上,22种标志物位于LG B<sub>1</sub>上,并且20种标志物位于LG I上。表2中列出了所有79种选择的标志物。

[0124] 表2:用于用24种大豆系筛选的79种SNP的表

[0125]

| 标志物               | SNP 等位<br>基因 | 连锁群 | 染色体 |
|-------------------|--------------|-----|-----|
| BARC_018419_02911 | [C/T]        | A2  | 8   |
| BARC_025811_05088 | [C/T]        | A2  | 8   |
| BARC_040339_07714 | [A/G]        | A2  | 8   |
| NCSB_001710       | [A/T]        | A2  | 8   |
| NCSB_001716       | [T/C]        | A2  | 8   |
| NCSB_001717       | [A/C]        | A2  | 8   |
| NCSB_001718       | [A/G]        | A2  | 8   |
| NCSB_001719       | [A/C]        | A2  | 8   |
| BARC_007704_00081 | [T/A]        | B1  | 11  |
| BARC_010169_00537 | [C/T]        | B1  | 11  |
| BARC_013547_01157 | [A/T]        | B1  | 11  |
| BARC_018557_03202 | [A/G]        | B1  | 11  |
| BARC_018649_03221 | [C/T]        | B1  | 11  |
| BARC_025703_04999 | [C/G]        | B1  | 11  |
| BARC_035379_07178 | [G/T]        | B1  | 11  |
| BARC_904050_01007 | [A/T]        | B1  | 11  |
| NCSB_002644       | [A/G]        | B1  | 11  |
| NCSB_002645       | [A/G]        | B1  | 11  |
| NCSB_002646       | [A/G]        | B1  | 11  |
| NCSB_002647       | [A/T]        | B1  | 11  |
| NCSB_002648       | [T/G]        | B1  | 11  |
| NCSB_002649       | [T/C]        | B1  | 11  |
| NCSB_002650       | [C/G]        | B1  | 11  |
| NCSB_002651       | [T/C]        | B1  | 11  |
| NCSB_002652       | [T/C]        | B1  | 11  |
| NCSB_002653       | [A/C]        | B1  | 11  |
| NCSB_002654       | [A/C]        | B1  | 11  |
| NCSB_002655       | [A/C]        | B1  | 11  |

[0126]

| 标志物               | SNP 等位<br>基因 | 连锁群 | 染色体 |
|-------------------|--------------|-----|-----|
| NCSB_002656       | [A/G]        | B1  | 11  |
| NCSB_002657       | [A/C]        | B1  | 11  |
| BARC_003180_00257 | [C/T]        | G   | 18  |
| BARC_010889_01691 | [C/T]        | G   | 18  |
| BARC_012237_01755 | [A/C]        | G   | 18  |
| BARC_015377_01829 | [A/C]        | G   | 18  |
| BARC_027452_06569 | [A/T]        | G   | 18  |
| BARC_028299_05817 | [C/G]        | G   | 18  |
| BARC_035305_07162 | [A/T]        | G   | 18  |
| BARC_G01475_00237 | [A/C]        | G   | 18  |
| NCSB_004072       | [A/G]        | G   | 18  |
| NCSB_004073       | [A/G]        | G   | 18  |
| NCSB_004074       | [A/C]        | G   | 18  |
| NCSB_004078       | [A/G]        | G   | 18  |
| NCSB_004079       | [C/G]        | G   | 18  |
| NCSB_004080       | [C/G]        | G   | 18  |
| NCSB_004081       | [A/G]        | G   | 18  |
| NCSB_004082       | [T/C]        | G   | 18  |
| NCSB_004083       | [A/G]        | G   | 18  |
| NCSB_004084       | [A/T]        | G   | 18  |
| NCSB_004085       | [A/T]        | G   | 18  |
| NCSB_004086       | [A/T]        | G   | 18  |
| NCSB_004097       | [T/C]        | G   | 18  |
| NCSB_004098       | [T/C]        | G   | 18  |
| NCSB_004107       | [T/G]        | G   | 18  |
| NCSB_004108       | [A/C]        | G   | 18  |
| NCSB_004109       | [C/G]        | G   | 18  |
| rhgl_2564         | [G/-]        | G   | 18  |

[0127]

| 标志物         | SNP 等位<br>基因 | 连锁群 | 染色体 |
|-------------|--------------|-----|-----|
| rhg1_3995   | [A/C]        | G   | 18  |
| rhg1_689    | [A/C]        | G   | 18  |
| rhg1_757    | [T/C]        | G   | 18  |
| NCSB_004874 | [A/G]        | I   | 20  |
| NCSB_004875 | [T/G]        | I   | 20  |
| NCSB_004877 | [A/T]        | I   | 20  |
| NCSB_004879 | [A/G]        | I   | 20  |
| NCSB_004882 | [A/T]        | I   | 20  |
| NCSB_004883 | [A/G]        | I   | 20  |
| NCSB_004884 | [T/G]        | I   | 20  |
| NCSB_004886 | [T/C]        | I   | 20  |
| NCSB_004887 | [T/G]        | I   | 20  |
| NCSB_004889 | [A/G]        | I   | 20  |
| NCSB_004890 | [T/C]        | I   | 20  |
| NCSB_004891 | [T/C]        | I   | 20  |
| NCSB_004893 | [T/C]        | I   | 20  |
| NCSB_004894 | [T/C]        | I   | 20  |
| NCSB_004895 | [A/G]        | I   | 20  |
| NCSB_004897 | [T/C]        | I   | 20  |
| NCSB_004898 | [A/T]        | I   | 20  |
| NCSB_004899 | [A/C]        | I   | 20  |
| NCSB_004900 | [A/T]        | I   | 20  |
| NCSB_004903 | [T/G]        | I   | 20  |

[0128] 实施例4:KASPar™测定法开发

[0129] 使用KASPar™基因型分型测定法实施亲本24种品系中79种SNP标志物的初始筛选。确认75种SNP标志物。

[0130] 确认LG G(Gm18)上的21种SNP标志物:NCSB\_004072, BARC\_015277\_01929, NCSB\_004073, NCSB\_004074, NCSB\_004075, NCSB\_004076, NCSB\_004077, NCSB\_004078, NCSB\_004079, NCSB\_004080, NCSB\_004081, NCSB\_004082, NCSB\_004083, NCSB\_004084, NCSB\_004085, NCSB\_004086, NCSB\_004097, NCSB\_004098, NCSB\_004107, NCSB\_004108, 和NCSB\_004109。

[0131] 确认LG A2(Gm08)上的12种SNP标志物:BARC\_025911\_05089, BARC\_019419\_02921, NCSB\_001710, NCSB\_001711, NCSB\_001712, NCSB\_001713, NCSB\_001714, NCSB\_001715, NCSB\_001716, NCSB\_001717, NCSB\_001718, 和NCSB\_001719。

[0132] 确认LG B1(Gm11)上的22种SNP标志物:NCSB\_002644, NCSB\_002645, NCSB\_002646, NCSB\_002647, NCSB\_002648, NCSB\_002649, NCSB\_002650, NCSB\_002651, NCSB\_002652, NCSB\_002653, NCSB\_002654, NCSB\_002655, NCSB\_002656, NCSB\_002657, BARC\_007704\_00091, BARC\_010269\_00537, BARC\_904050\_01007, BARC\_019557\_03202, BARC\_018649\_03221, BARC\_025703\_04999, BARC\_013547\_01157, 和BARC\_035379\_07178。

[0133] 确认LG I(Gm20)上的20种SNP标志物:NCSB\_004974, NCSB\_004975, NCSB\_004977, NCSB\_004979, NCSB\_004882, NCSB\_004883, NCSB\_004884, NCSB\_004886, NCSB\_004887, NCSB\_004889, NCSB\_004880, NCSB\_004882, NCSB\_004883, NCSB\_004884, NCSB\_004885, NCSB\_004887, NCSB\_004888, NCSB\_004899, NCSB\_004900, 和NCSB\_004903。

[0134] 初始筛选将44种SNP标志物鉴定为在24种亲本系之中多态性的。选择24种多态性标志物(NCSB\_001716(LG A<sub>2</sub>), NCSB\_002645(B<sub>1</sub>), NCSB\_002646(B<sub>1</sub>), NCSB\_002648(B<sub>1</sub>), NCSB\_002651(B<sub>1</sub>), NCSB\_002652(B<sub>1</sub>), NCSB\_002654(B<sub>1</sub>), NCSB\_002656(B<sub>1</sub>), BARC\_013547\_01157(B<sub>1</sub>), NCSB\_004073(G), NCSB\_004074(G), NCSB\_004078(G), NCSB\_004080(G), NCSB\_004084(G), NCSB\_004085(G), NCSB\_004097(G), NCSB\_004109(G), BARC\_012237\_01755(G), rgh1-689(G), rgh1-757(G), rgh1-2564(G), rgh1-3995(G), 和NCSB\_004900(I))以用通过将SCN抗性大豆品种98860-71与SCN易感性大豆品种75213和6CH026-035杂交生成的定位群体进行进一步连锁测试。图7显示了来自四种多态性标志物的KASPar<sup>TM</sup>测定法的代表性基因型分型数据。

[0135] 15种SNP标志物在SCN抗性和易感性亲本之间是多态性的。随后, 针对定位群体中的93个个体筛选这15种多态性SNP标志物。

[0136] 针对定位群体的个体测试的在亲本系间多态性的15种SNP标志物中, 仅三种SNP显示与SCN抗性性状共分离:NCSB\_004074、BARC\_010889\_01691、和rgh1-3995。图8。表3中列出了用于在这三种标志物方面对个体基因型分型的KASPar<sup>TM</sup>引物序列。

[0137] 表3:SNP标志物的KASPar<sup>TM</sup>引物序列

[0138]

|                         |                                                                          |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| rhg1-3995A1             | GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGAATTATGTTGGGT<br>TTTTTTTCTTTCTGT (SEQ ID NO:1)    |
| rhg1-3995A2             | GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAATTATGTTGGGTT<br>TTTTTTTCTTTCTGG (SEQ ID NO:2)    |
| rhg1-3995C1             | GCCCAGAAAAAAGGGATAAATAACGGATA<br>(SEQ ID NO:3)                           |
| NCSB_004074<br>A1       | GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATTATGTTGTAACAC<br>AAATTTGCACCTCAT (SEQ ID NO:4)    |
| NCSB_004074<br>A2       | GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGTTGTAACACAAA<br>TTTGCACCTCAG (SEQ ID NO:5)       |
| NCSB_004074<br>C1       | CTATACAACTAAATCGTAATTCCATTGTAT<br>(SEQ ID NO:6)                          |
| BARC_010889<br>-01691A1 | GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGAAAAAATAAAATTG<br>ATCATCACATATGGTTAG (SEQ ID NO:7) |
| BARC_010889<br>-01691A2 | GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGAAAAAATAAAATTG<br>ATCATCACATATGGTTAA (SEQ ID NO:8) |
| BARC_010889<br>-01691C1 | TAAGTGAGGGCAATGTATTAGTATYAAGTA<br>(SEQ ID NO:9)                          |

[0139] 使用大豆栽培种Williams82的基因组核酸序列作为参照, BARC\_010889\_01691在染色体18上位于1,674,511bp; NCSB\_004074在染色体18上位于1,663,671bp; 并且rhg1-3995在染色体18上位于1,714,741bp。所有三种连锁标志物(NCSB\_004074、BARC\_010889\_01691、和rhg1-3995)位于rhg1基因座(rhg1-3995)内,或在连锁群G(BARC\_010889\_01691和NCSB\_004074)上与其接近。

[0140] 对于抗性和中等抗性表型,所有三种连锁标志物基因型与表型一致。就易感性品系而言, BARC\_010889\_01691与表型具有5处错配, NCSB\_004074具有9处错配,而rhg1-3995具有6处错配。见表4。

[0141] 表4:源自两个定位群体及3个亲本的93个品系的表型得分和基因型得分的比较。R=抗性; MR=中等抗性; S=易感性; MS=中等易感性; 及X=不一致性。



[0142]

| 样品    | SCN抗性 | SCN 得分 | rhgl_39<br>95 | NCSB_0040<br>74 | BARC_0<br>10889_01<br>691 |
|-------|-------|--------|---------------|-----------------|---------------------------|
| 40779 | R     | 1.00   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40785 | R     | 1.60   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29110 | R     | 2.30   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40780 | R     | 2.30   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29148 | R     | 2.50   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40781 | R     | 2.50   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40799 | R     | 2.50   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29226 | R     | 3.10   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40910 | R     | 4.00   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29040 | R     | 4.10   | C:A           | A:A             | T:T                       |
| 40908 | R     | 4.50   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 19152 | R     | 4.70   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29149 | R     | 4.80   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29023 | R     | 5.60   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40907 | R     | 5.80   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40959 | R     | 6.10   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29181 | R     | 6.50   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29151 | R     | 6.60   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 19209 | R     | 6.90   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40989 | R     | 7.10   | C:C           | A:A             | T:T                       |

[0143]

| 样品                 | SCN抗性 | SCN 得分 | rhg1_39<br>95 | NCSB_0040<br>74 | BARC_0<br>10889_01<br>691 |
|--------------------|-------|--------|---------------|-----------------|---------------------------|
| 29189              | R     | 7.60   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 21692              | R     | 8.30   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29089              | R     | 8.80   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 21553              | R     | 9.00   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40833              | R     | 9.20   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 21642              | R     | 9.60   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29228              | R     | 9.70   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40957              | R     | 9.80   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29191              | MR    | 10.2   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40935              | MR    | 10.7   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 98860-71(P<br>l-R) | R/MR  | 11.3   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 21648              | R/MR  | 11.8   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 19155              | MR    | 12.4   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40808              | MR    | 12.6   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40940              | MR    | 13.0   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40831              | MR    | 13.7   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40932              | MR    | 14.5   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29180              | MR    | 16.9   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40937              | MR    | 17.9   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40958              | MR    | 19.6   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40936              | MR    | 21.5   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 41022              | X     | 22.7   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 19182              | MR    | 23.3   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40810              | X     | 27.5   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 41015              | X     | 27.6   | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29039              | MS    | 31.70  | A:A           | C:C             | C:C                       |

[0144]

| 样品          | SCN抗性 | SCN 得分 | rhg1_39<br>95 | NCSB_0040<br>74 | BARC_0<br>10889_01<br>691 |
|-------------|-------|--------|---------------|-----------------|---------------------------|
| 29212       | MS    | 37.50  | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40905       | X     | 39.70  | A:A           | A:A             | C:C                       |
| 40834       | X     | 46.50  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40906       | MS    | 46.60  | A:A           | A:A             | C:C                       |
| 41016       | MS    | 46.80  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29179       | MS    | 48.10  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29119       | MS    | 59.50  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29021       | MS    | 59.80  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29142       | S     | 61.90  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40939       | S     | 66.40  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 41026       | S     | 67.90  | C:C           | C:C             | C:C                       |
| 40909       | S     | 68.90  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29150       | S     | 70.60  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40942       | S     | 71.20  | A:A           | A:A             | C:C                       |
| 40711       | S     | 71.50  | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40931       | S     | 73.80  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 21633       | S     | 75.00  | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29190       | S     | 79.70  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29229       | S     | 79.90  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40938       | S     | 80.10  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40873       | X     | 81.50  | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 29222       | S     | 81.90  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40941       | S     | 84.00  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40934       | S     | 85.70  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29376       | S     | 88.90  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 75213(P2-S) | S     | 88.90  | A:A           | C:C             | C:C                       |

[0145]

| 样品                   | SCN抗性 | SCN 得分 | rhg1_39<br>95 | NCSB_0040<br>74 | BARC_0<br>10889_01<br>691 |
|----------------------|-------|--------|---------------|-----------------|---------------------------|
| 40990                | S     | 90.10  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29224                | S     | 90.60  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29399                | S     | 93.50  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40798                | X     | 96.40  | A:A           | A:A             | C:C                       |
| 21693                | X     | 98.00  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 21684                | X     | 98.10  | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 6CH026-03<br>5(P3-S) | S     | 101.20 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 41014                | S     | 109.40 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 41027                | S     | 125.60 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29514                | S     | 130.00 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 21688                | S     | 133.90 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40992                | S     | 134.40 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 21700                | S     | 134.60 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40991                | S     | 138.80 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40782                | S     | 147.00 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 29639                | S     | 163.20 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40783                | S     | 178.20 | C:C           | A:A             | T:T                       |
| 40778                | S     | 187.40 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 21683                | S     | 204.40 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40809                | S     | 207.70 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40835                | S     | 212.90 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 40832                | S     | 215.20 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 21694                | S     | 254.90 | A:A           | C:C             | C:C                       |
| 21698                | S     | 380.00 | A:A           | C:C             | C:C                       |

[0146] 一旦我们鉴定出具有这3种SNP标志物的任何易感性基因型,存在有0%假阴性率。换言之,我们可以使用3种标志物以完美的准确度鉴定SCN易感性表型。我们还可以以约10-18%(5或9除以51,即易感性样品的总数)的“假阳性”率预测SCN抗性基因型。因此,在鉴定的SCN抗性基因型中,预期它们中的仅5-9%会展现出SCN易感性表型。

[0147] 实施例5:LG A<sub>2</sub>、LG B<sub>1</sub>、和LG I中与SCN抗性表型连锁的SNP标志物

[0148] 使用BLAST™对大豆基因组搜索SNP标志物,该SNP标志物在物理上位于连锁群A<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>、和I上与SCN抗性有关的QTL间隔之中、附近、或之间。通过BLAST™搜索产生SNP标志物的表。选择多种SNP标志物以使用SCN易感性和SCN抗性大豆品系进行初始筛选,从而测定连锁群A<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>、和I中的这些SNP标志物的哪些(若有的话)与SCN抗性表型连锁。

[0149] 使用KASPar™基因型分型测定法实施亲本系中的选定SNP标志物的初始筛选。确认一组选定的SNP标志物,其子集鉴定为在亲本系间多态性的。使用至少一种多态性SNP标志物以用通过将SCN抗性大豆品种与一种或多种SCN易感性大豆品种杂交生成的定位群体进行连锁测试。针对定位群体中的个体筛选这些多态性SNP标志物中的一种或多种。

[0150] 在定位群体的个体中与SCN抗性性状共分离的SNP鉴定为连锁群A<sub>2</sub>、B<sub>1</sub>、和I上与SCN抗性亲本品种中的SCN抗性连锁的标志物。连锁的标志物基因型匹配定位群体的个体中观察到的表型。

[0151] 实施例6:与种质JTN-5109中SCN抗性表型连锁的SNP标志物

[0152] 选择在物理上位于与SCN抗性有关的QTL间隔之中、附近、或之间的多种SNP标志物(例如选自下组的SNP标志物:表3中列出的标志物)以使用SCN抗性大豆品种JTN-5109和SCN易感性大豆系进行初始筛选,从而测定这些SNP标志物中的哪些(若有的话)与大豆品种JTN-5109中的SCN抗性表型连锁。

[0153] 使用KASPar™基因型分型测定法实施亲本系中的选定SNP标志物的初始筛选。确认一组选定的SNP标志物,其子集鉴定为在大豆品种JTN-5109和SCN易感性亲本系间多态性的。使用至少一种多态性SNP标志物以用通过将大豆品种JTN-5109与一种或多种SCN易感性大豆品种杂交生成的定位群体进行连锁测试。针对定位群体中的个体筛选这些一种或多种多态性SNP标志物。

[0154] 在定位群体的个体中与SCN抗性性状共分离的SNP鉴定与大豆品种JTN-5109中的SCN抗性连锁的标志物。连锁的标志物基因型匹配定位群体的个体中观察到的表型。

[0155] 实施例7:与除品种3外的HG品种中的SCN抗性表型连锁的SNP标志物

[0156] 通过将选自下组的SCN抗性大豆品种与一种或多种SCN易感性大豆品种杂交明确针对除品种3外的HG品种开发定位群体:PI88788,Peking,PI437654,PI90763,PI438489B,PI89772,PI209332,PUSCN14,Hartwig,Forrest,和Pyramid。

[0157] 使用BLAST™对大豆基因组搜索SNP标志物,该SNP标志物在物理上位于与就特定HG品种而言的SCN抗性有关的QTL间隔之中、附近、或之间。通过BLAST™搜索产生SNP标志物的表。选择多种SNP标志物以使用选定的SCN抗性大豆品种和SCN易感性品种进行初始筛选,从而测定哪些SNP标志物(若有的话)与就特定HG品种而言的SCN抗性表型连锁。

[0158] 使用KASPar™基因型分型测定法实施亲本系中的选定SNP标志物的初始筛选。确认一组选定的SNP标志物,其子集鉴定为在亲本系间多态性的。使用至少一种多态性SNP标志物以用通过将选定的SCN抗性大豆品种与一种或多种SCN易感性大豆品种杂交生成的定位群体进行连锁测试。针对定位群体中的个体筛选这些一种或多种多态性SNP标志物。

[0159] 在定位群体的个体中与SCN抗性性状共分离的SNP鉴定与就特定HG品种而言在SCN抗性亲本品种中的SCN抗性连锁的标志物。连锁的标志物基因型匹配定位群体的个体中观察到的表型。

## 序列表

|        |       |                                                                                                                                                   |    |
|--------|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| [0001] | <110> | 陶氏益农公司 (Dow AgroSciences)<br>Bai, Yonghe<br>Lu, Fang<br>Greene, Thomas W<br>Moore, Robert E<br>Hedges, Bradley<br>Kumapala, Siva P<br>Kam, Raghav |    |
|        | <120> | 与 SCN 抗性连锁的大豆标志物                                                                                                                                  |    |
|        | <130> | 2971-P10108.1PC                                                                                                                                   |    |
|        | <160> | 12                                                                                                                                                |    |
|        | <170> | PatentIn version 3.4                                                                                                                              |    |
|        | <210> | 1                                                                                                                                                 |    |
|        | <211> | 51                                                                                                                                                |    |
|        | <212> | DNA                                                                                                                                               |    |
|        | <213> | 人工的                                                                                                                                               |    |
|        | <220> |                                                                                                                                                   |    |
|        | <223> | rhgl-3995 引物                                                                                                                                      |    |
|        | <400> | 1<br>gaaggtagacc aagttcatgc tggaaattatg ttgggttttt ttctttctg t                                                                                    | 51 |
|        | <210> | 2                                                                                                                                                 |    |
|        | <211> | 50                                                                                                                                                |    |
|        | <212> | DNA                                                                                                                                               |    |
|        | <213> | 人工的                                                                                                                                               |    |
|        | <220> |                                                                                                                                                   |    |
|        | <223> | rhgl-3995 引物                                                                                                                                      |    |
|        | <400> | 2<br>gaaggtagga gtaacggat tgaattatg ttgggttttt ttctttctg                                                                                          | 50 |
|        | <210> | 3                                                                                                                                                 |    |
|        | <211> | 29                                                                                                                                                |    |
|        | <212> | DNA                                                                                                                                               |    |
|        | <213> | 人工的                                                                                                                                               |    |
|        | <220> |                                                                                                                                                   |    |
|        | <223> | rhgl-3995 引物                                                                                                                                      |    |
|        | <400> | 3<br>gcccgaaaa aaggatataa taacggata                                                                                                               | 29 |
|        | <210> | 4                                                                                                                                                 |    |
|        | <211> | 51                                                                                                                                                |    |
|        | <212> | DNA                                                                                                                                               |    |
|        | <213> | 人工的                                                                                                                                               |    |
|        | <220> |                                                                                                                                                   |    |
|        | <223> | NCSB_004074 引物                                                                                                                                    |    |
|        | <400> | 4<br>gaaggtagacc aagttcatgc ttttattggt taacacaaat ttgcacctca t                                                                                    | 51 |
|        | <210> | 5                                                                                                                                                 |    |
|        | <211> | 48                                                                                                                                                |    |
|        | <212> | DNA                                                                                                                                               |    |
|        | <213> | 人工的                                                                                                                                               |    |
|        | <220> |                                                                                                                                                   |    |
|        | <223> | NCSB_004074 引物                                                                                                                                    |    |
|        | <400> | 5<br>gaaggtagga gtaacggat taatttgtat cacaattttg caactctcg                                                                                         | 48 |
|        | <210> | 6                                                                                                                                                 |    |

[0002]

```

<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> NCSB_004074 引物

<400> 6
ctatacaact aaatcgtaat tccattgtat 30

<210> 7
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> BARC_010889-01691 引物

<400> 7
gaaggtagacc aagttcatgc tgaaaaaata aaattgatca tcacataagg ttag 54

<210> 8
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> BARC_010889-01691 引物

<400> 8
gaaggtagacc gtcacaggat tgaaaaaata aaattgatca tcacataagg ttaa 54

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> BARC_010889-01691 引物

<400> 9
taagttaggg caatgtatta gtaiyaagta 30

<210> 10
<211> 121
<212> DNA
<213> 大豆 (Glycine max)

<400> 10
cacgattttg ttgtgttaca taaattacta tacaactaaa tctgaattcc attgtattac 60
mtgaggigca aaattgtgtt acaacataat tgaatttta ttgtacgata aaactataa 120
c 121

<210> 11
<211> 189
<212> DNA
<213> 大豆 (Glycine max)

<220>
<221> misc_feature
<222> (92)..(92)
<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 11
ctcttcacac ctttaaggaa gtttagtacc tccaciatl caagtatttt tttaattca 60
aaattattaa gtgaggcgaa tgtattagta tnaaglayta accatatgtg atgaicaatt 120
ttatttttcc aaggttttgt cgaagaatac attatattgt ggtttttaat gaaaaictgt 180
gatttgcat 189

```

<210> 12  
 <211> 490  
 <212> DNA  
 <213> 大豆 (Glycine max)  
  
 <400> 12  
 tctgataact atgacagcat ctccaagat aatgacttc aagtccaac actggetctg 60  
 tacatttgaa ctaattttat atcatttatt taittgigatt gaaatataaa attgaagta 120  
 tgtgaacaat acaaatcaca tcttgaattt aatatctaa caactggaa aaataagagg 180  
 [0003] cccagaaaaa agggataaat aacggataac aagmcagaaa gaaaaaaaaa ccaacataat 240  
 iccaacttca aatttcactc aataaaaagt ttacatgta aatttactig gaaacaaaac 300  
 tcataaccac taataataat aataaagaa atcagtitta tagcattaat tigggatgct 360  
 ctgcttgat gcaaatggca caaccttacc ctaagatig caaancacag atgagtaaca 420  
 gatgcaatgt gaatcaataa aaagtattgt tgcgttggtg atgacacaa cttactcata 480  
 aaaaatgcat 490



| Id | Problema    | Algoritmo   | Complexidad | Forma    | Notas    | Referencias   | Estado   | Fecha      | Resolución |
|----|-------------|-------------|-------------|----------|----------|---------------|----------|------------|------------|
| 1  | Problema 1  | Algoritmo A | O(N)        | Forma 1  | Notas 1  | Referencia 1  | Resuelto | 2023-01-01 | 2023-01-01 |
| 2  | Problema 2  | Algoritmo B | O(N^2)      | Forma 2  | Notas 2  | Referencia 2  | Resuelto | 2023-01-02 | 2023-01-02 |
| 3  | Problema 3  | Algoritmo C | O(N^3)      | Forma 3  | Notas 3  | Referencia 3  | Resuelto | 2023-01-03 | 2023-01-03 |
| 4  | Problema 4  | Algoritmo D | O(N^4)      | Forma 4  | Notas 4  | Referencia 4  | Resuelto | 2023-01-04 | 2023-01-04 |
| 5  | Problema 5  | Algoritmo E | O(N^5)      | Forma 5  | Notas 5  | Referencia 5  | Resuelto | 2023-01-05 | 2023-01-05 |
| 6  | Problema 6  | Algoritmo F | O(N^6)      | Forma 6  | Notas 6  | Referencia 6  | Resuelto | 2023-01-06 | 2023-01-06 |
| 7  | Problema 7  | Algoritmo G | O(N^7)      | Forma 7  | Notas 7  | Referencia 7  | Resuelto | 2023-01-07 | 2023-01-07 |
| 8  | Problema 8  | Algoritmo H | O(N^8)      | Forma 8  | Notas 8  | Referencia 8  | Resuelto | 2023-01-08 | 2023-01-08 |
| 9  | Problema 9  | Algoritmo I | O(N^9)      | Forma 9  | Notas 9  | Referencia 9  | Resuelto | 2023-01-09 | 2023-01-09 |
| 10 | Problema 10 | Algoritmo J | O(N^10)     | Forma 10 | Notas 10 | Referencia 10 | Resuelto | 2023-01-10 | 2023-01-10 |
| 11 | Problema 11 | Algoritmo K | O(N^11)     | Forma 11 | Notas 11 | Referencia 11 | Resuelto | 2023-01-11 | 2023-01-11 |
| 12 | Problema 12 | Algoritmo L | O(N^12)     | Forma 12 | Notas 12 | Referencia 12 | Resuelto | 2023-01-12 | 2023-01-12 |
| 13 | Problema 13 | Algoritmo M | O(N^13)     | Forma 13 | Notas 13 | Referencia 13 | Resuelto | 2023-01-13 | 2023-01-13 |
| 14 | Problema 14 | Algoritmo N | O(N^14)     | Forma 14 | Notas 14 | Referencia 14 | Resuelto | 2023-01-14 | 2023-01-14 |
| 15 | Problema 15 | Algoritmo O | O(N^15)     | Forma 15 | Notas 15 | Referencia 15 | Resuelto | 2023-01-15 | 2023-01-15 |
| 16 | Problema 16 | Algoritmo P | O(N^16)     | Forma 16 | Notas 16 | Referencia 16 | Resuelto | 2023-01-16 | 2023-01-16 |
| 17 | Problema 17 | Algoritmo Q | O(N^17)     | Forma 17 | Notas 17 | Referencia 17 | Resuelto | 2023-01-17 | 2023-01-17 |
| 18 | Problema 18 | Algoritmo R | O(N^18)     | Forma 18 | Notas 18 | Referencia 18 | Resuelto | 2023-01-18 | 2023-01-18 |
| 19 | Problema 19 | Algoritmo S | O(N^19)     | Forma 19 | Notas 19 | Referencia 19 | Resuelto | 2023-01-19 | 2023-01-19 |
| 20 | Problema 20 | Algoritmo T | O(N^20)     | Forma 20 | Notas 20 | Referencia 20 | Resuelto | 2023-01-20 | 2023-01-20 |

图 1a

[illegible]

图1a(续)



[illegible]

图1b(续)

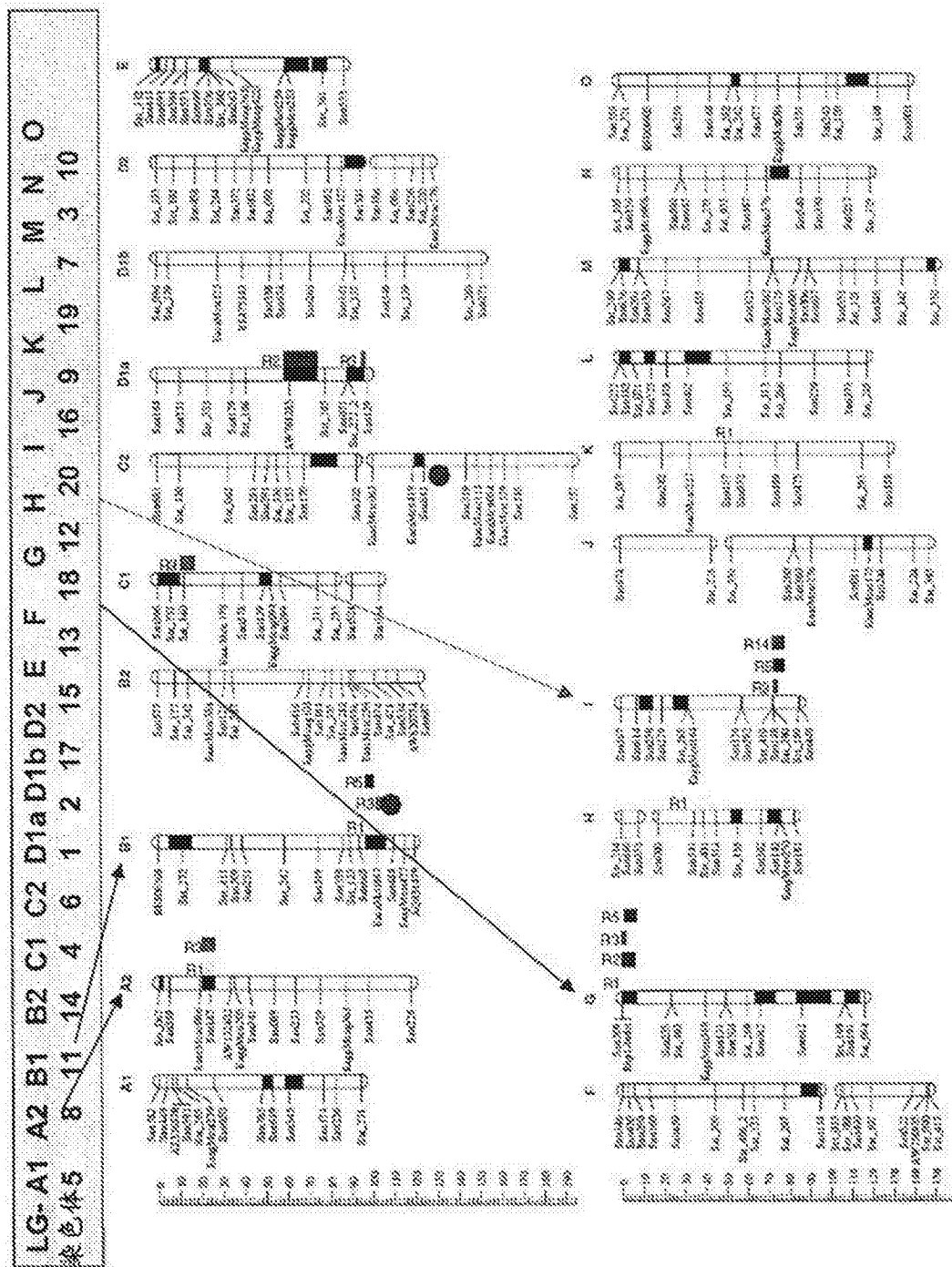


图2

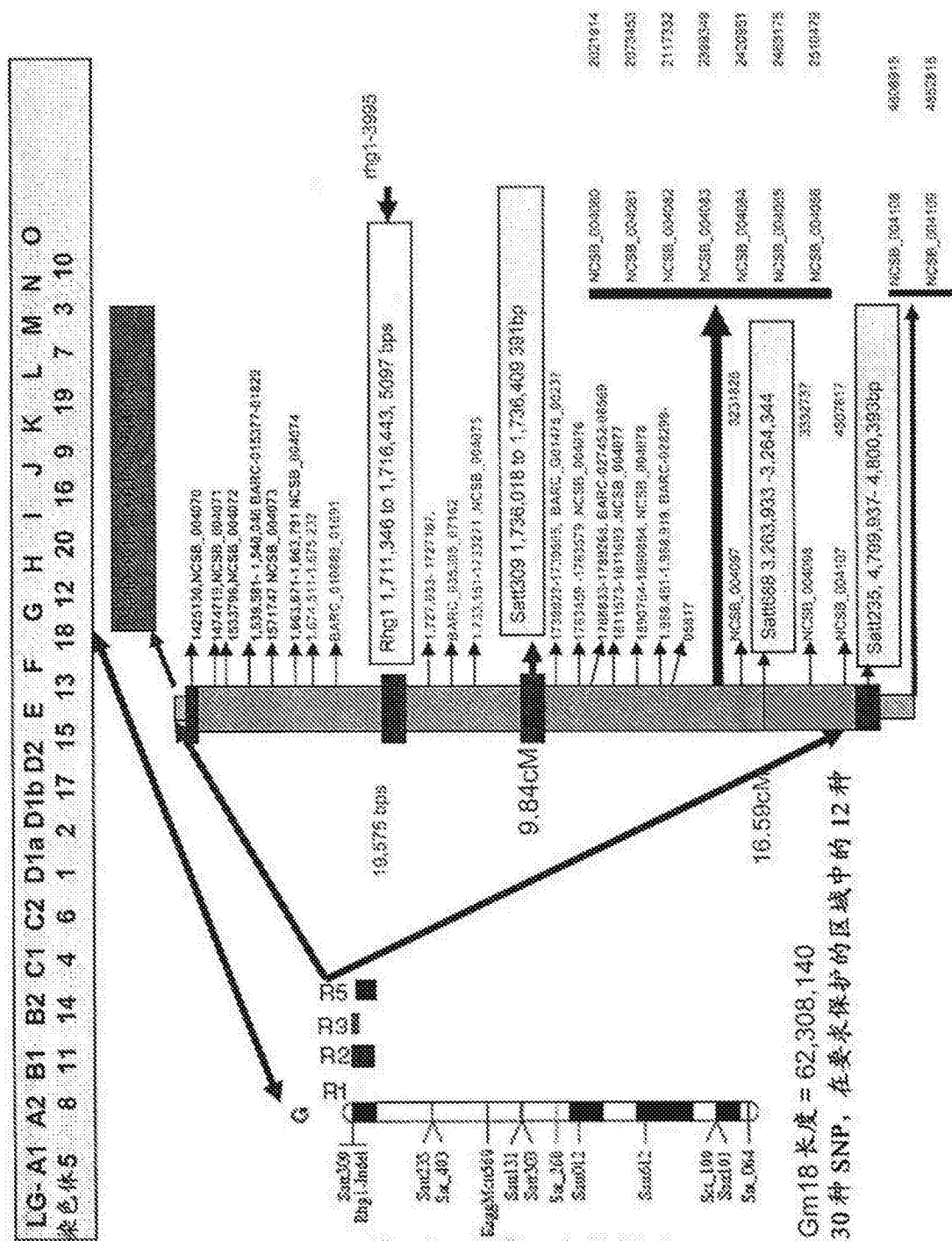
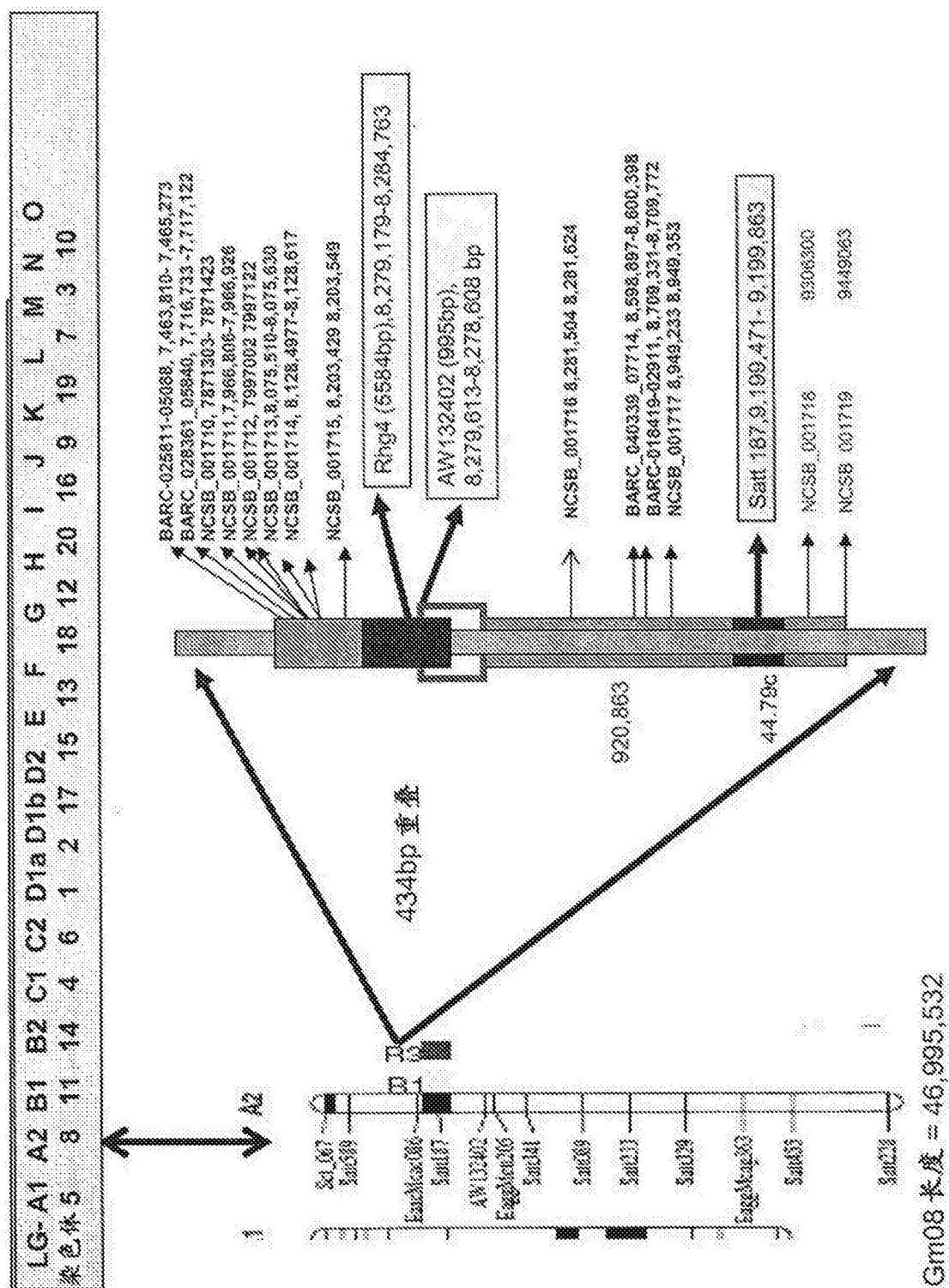


图3



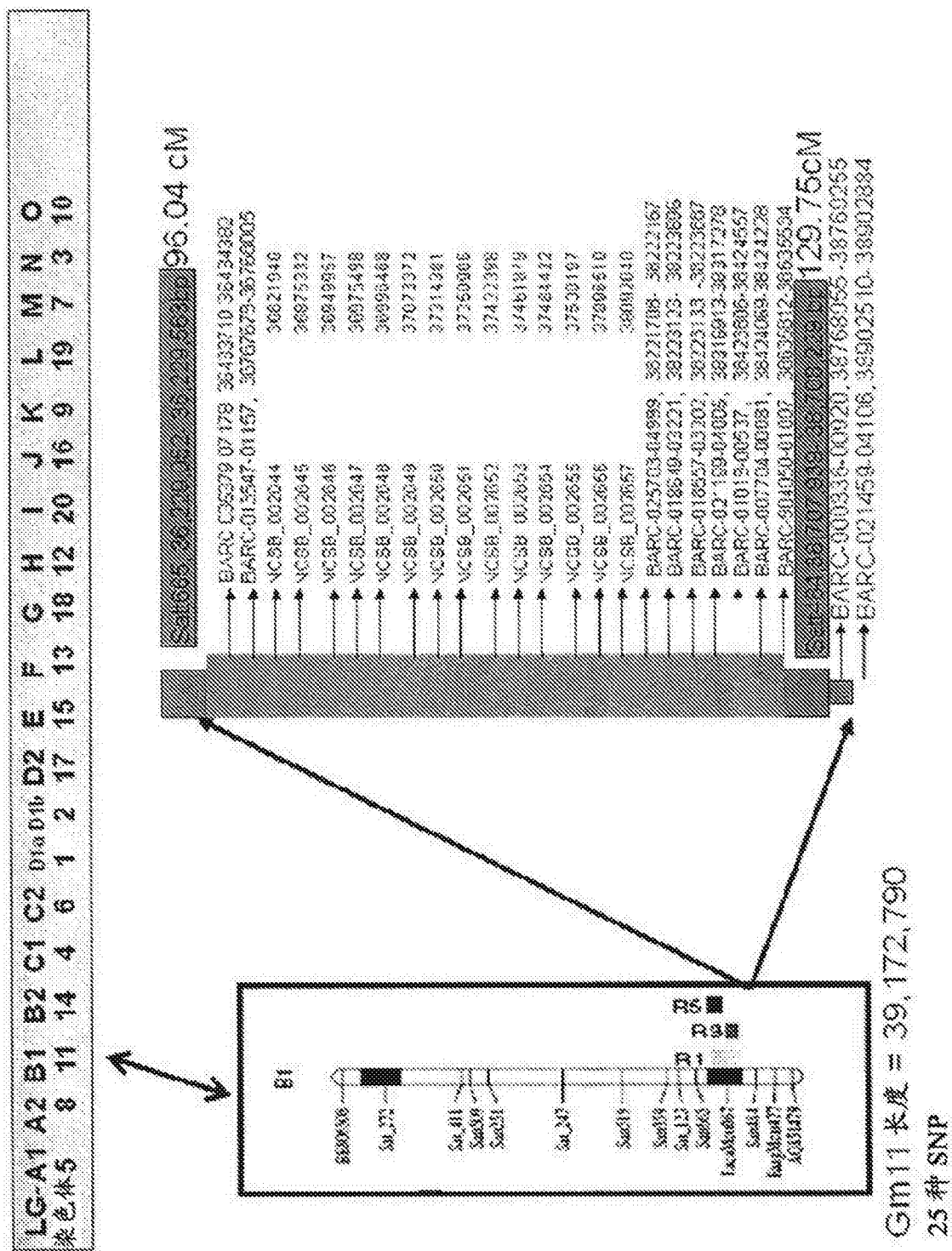


图5





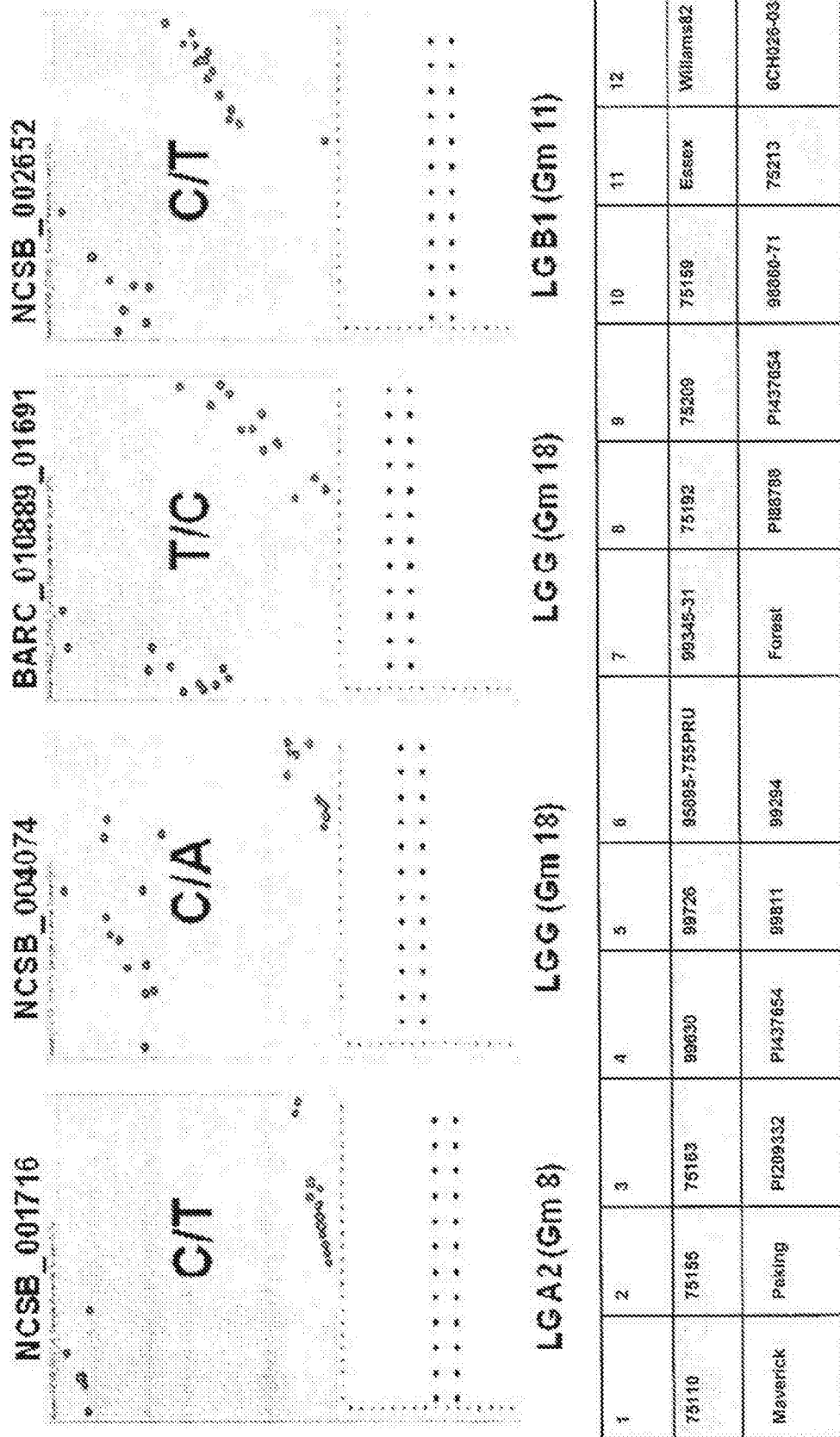


图7

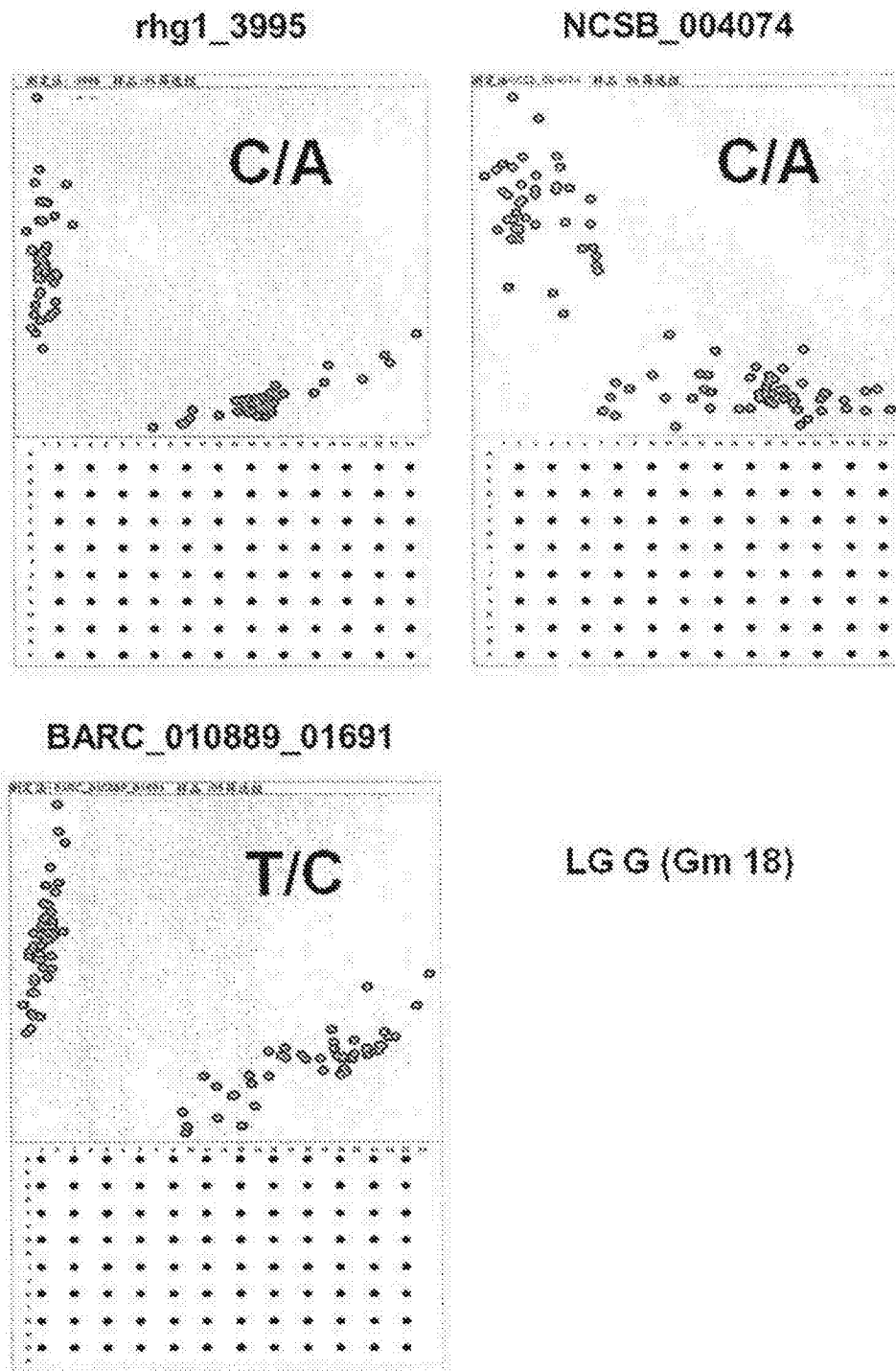


图8

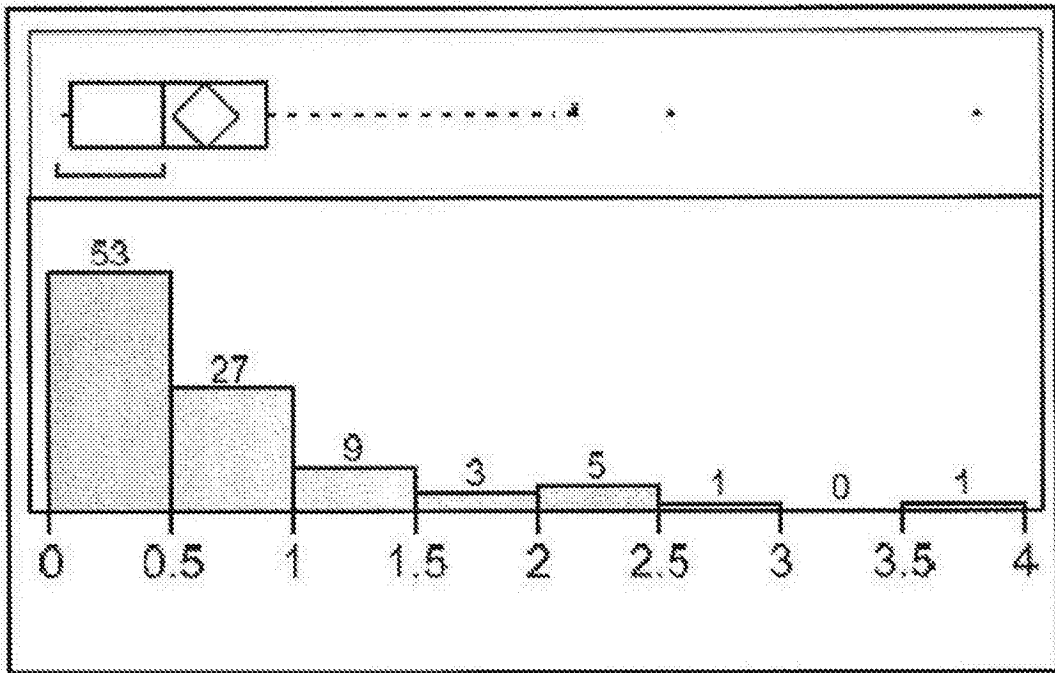


图9