



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101998824 A

(43) 申请公布日 2011.03.30

(21) 申请号 200980112375.4

高文祥

(22) 申请日 2009.02.12

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(30) 优先权数据

代理人 封新琴

61/028,052 2008.02.12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2010.10.12

A01H 5/00 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

C12N 5/04 (2006.01)

PCT/US2009/033955 2009.02.12

(87) PCT申请的公布数据

WO2009/102890 EN 2009.08.20

(83) 生物保藏信息

PTA-8715 2007.10.17

(71) 申请人 陶氏益农公司

地址 美国印第安纳州

(72) 发明人 詹姆斯·T·格迪斯

马克·克里斯托弗 罗伯特·本森

权利要求书 3 页 说明书 24 页 序列表 10 页

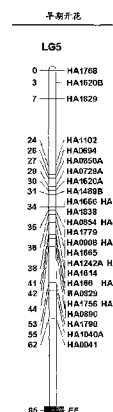
附图 6 页

(54) 发明名称

向日葵中的显性早熟性突变和基因

(57) 摘要

本发明部分涉及自发向日葵突变的发现。本发明牵涉“早熟”突变及相关近交物/杂种开发。本发明进一步提供了一种单显性基因，其在向日葵近交等位基因系和近等基因杂种中赋予早熟性。没有此基因用于工业中杂种开发的效用的已知现有教导或提示。本发明还提供了一种新的且独特的向日葵近交系，称作H120R。本发明包括拥有此突变基因的种子、通过种植这些种子生成的植物、和其拥有此突变基因及相关早熟性性状的子代。本发明还包括用于生成此类向日葵种子和植物（包括近交物和杂种）的方法。可以通过例如将所述近交系与其自身或者与另一向日葵品系杂交来产生此类植物。



1. 一种早熟的向日葵植物,其包含对所述向日葵植物赋予早期开花和 / 或早期成熟表型的突变的、显性单基因,其中所述基因的主要基因座可以经由 DNA 标志物而定位到连锁群 5 的一端。

2. 权利要求 1 的早熟的向日葵植物,其包含如存在于 ATCC#PTA-8715 中的早熟性基因。

3. 由权利要求 1 的植物产生的种子,其中所述种子包含所述基因。

4. 权利要求 1 的植物的子代植物,其中所述子代植物包含所述基因。

5. 一种确定基因组测试样品是否包含能够对植物赋予早期开花和 / 或早熟性表型的基因的方法,所述基因组测试样品获自测试植物或所述测试植物的组织、种子、或部分,所述测试植物包含基因组,并且所述方法包括对所述测试样品测定所述基因组中 SEQ ID NO : 63 或 SEQ ID NO :82 中的至少一种单核苷酸多态性 (SNP) 的存在,其中存在所述至少一种 SNP 指明所述基因组中存在所述早期开花基因,并且所述基因组中不存在所述至少一种 SNP 指明缺乏所述基因的野生型植物。

6. 权利要求 5 的方法,所述方法包括从所述测试植物获得基因组 DNA,扩增所述基因组 DNA 的区段以形成扩增子,并确定所述扩增子是否包含所述至少一种 SNP。

7. 权利要求 6 的方法,所述方法包括对所述扩增子测序。

8. 权利要求 6 的方法,其中使用包含 SEQ ID NO :64 和 SEQ ID NO :65 的引物来扩增所述基因组 DNA 以形成所述扩增子。

9. 权利要求 5 的方法,其中如果所述植物包含所述早期开花基因,则所述测试植物包含 SEQ ID NO :66,并且如果所述植物缺乏所述 SNP 并且是野生型,则所述植物包含 SEQ ID NO :67。

10. 权利要求 5 的方法,其中所述方法包括确定所述测试植物的基因组在 SEQ ID NO : 66 的第 9 位是否包含鸟嘌呤,这指明所述早期开花基因。

11. 权利要求 5 的方法,其中所述方法包括确定所述测试植物的基因组在 SEQ ID NO : 66 的第 9 位是否包含腺嘌呤,这指明野生型。

12. 权利要求 5 的方法,其中所述方法包括确定所述测试植物的基因组在 SEQ ID NO : 67 的残基 6 处是否包含鸟嘌呤,这指明所述早期开花基因。

13. 权利要求 5 的方法,其中所述方法包括确定所述测试植物的基因组在 SEQ ID NO : 67 的残基 6 处是否包含腺嘌呤,这指明野生型。

14. 权利要求 5 的方法,其中所述方法包括确定所述测试植物的基因组是否包含 SEQ ID NO :82,其中在 SEQ ID NO :82 的残基 65 处为胞嘧啶,这指明所述测试植物包含所述早期开花基因。

15. 权利要求 5 的方法,其中所述方法包括确定所述测试植物的基因组是否包含 SEQ ID NO :63,其中在 SEQ ID NO :63 的残基 65 处为胸腺嘧啶,这指明野生型。

16. 一种产生早熟植物的方法,所述方法包括权利要求 5 的步骤,选择包含所述基因的早熟植物,并种植和繁殖所述早熟植物。

17. 一种选择性育种的方法,所述方法包括权利要求 5 的步骤,其进一步包括选择对于 SEQ ID NO :82 测试呈阳性的植物,并进一步育种所述阳性植物。

18. 权利要求 17 的方法,所述方法包括将所述阳性植物与另一植物杂交。

19. 权利要求 17 的方法,其中所述植物是向日葵。

20. 权利要求 18 的方法,其中将所述植物与选自下组的品系的向日葵植物杂交:观赏品系和食用品系。

21. 一种繁殖植物的方法,所述植物具有早期开花表型,所述方法包括权利要求 5 的步骤,所述方法进一步包括种植所述阳性植物,并自交所述阳性植物。

22. 一种选择早熟植物的方法,所述方法包括权利要求 5 的步骤,并选择所述早熟植物用于进一步育种和 / 或繁殖。

23. 一种包含基因组的植物,其在所述基因组中包含 SEQ ID NO :66。

24. 权利要求 7 的植物,所述植物进一步包含稳定掺入所述基因组中的 SEQ ID NO :82。

25. 一种包含早期开花基因的植物,所述植物包含基因组,所述基因组包含在所述基因组中的 SEQ ID NO :82 中的至少一种单核苷酸多态性 (SNP),所述基因组在 SEQ ID NO :82 的残基 65 处包含胞嘧啶。

26. 权利要求 25 的植物,其中所述基因组包含 SEQ ID NO :82 中的两种多态性。

27. 权利要求 25 的植物,其中所述植物是向日葵。

28. 权利要求 25 的植物,其中与所述野生型植物相比,所述植物展现早期开花表型。

29. 权利要求 25 的植物,其中所述植物是能够在 35 天中开花的向日葵。

30. 根据权利要求 5 鉴定的向日葵植物。

31. 权利要求 25 的植物的部分,所述部分包含所述基因。

32. 权利要求 31 的植物部分,其中所述部分是种子或花粉。

33. 一种用于鉴定与早期开花相关的标志物基因座的存在的方法,所述方法包括从权利要求 25 的植物获得多核苷酸序列,所述序列对于包含所述基因的植物而言是独特的和区别性的。

34. 权利要求 33 的方法,其中所述方法包括使用一组引物。

35. 一种分离的多核苷酸,其与选自下组的序列 (或所述序列的互补物) 杂交:SEQ ID NO :82、SEQ ID NO :66、SEQ ID NO :63、SEQ ID NO :64、SEQ ID NO :65、和 SEQ ID NO :67,其中在 55°C 和 0.2X 盐 (SSPE 或 SSC) 的条件下维持杂交。

36. 权利要求 35 的多核苷酸,其中所述多核苷酸是探针。

37. 权利要求 35 的多核苷酸,其中所述多核苷酸是引物。

38. 一种分离的多核苷酸,其与 SEQ ID NO :63 相比包含 SEQ ID NO :82 中存在的至少一种单核苷酸多态性。

39. 一种确定测试植物是否包含早期开花基因的方法,所述测试植物包含基因组,并且所述方法包括对所述植物测定所述基因组中 SEQ ID NO :66 或 SEQ ID NO :67 的存在,其中所述基因组中存在 SEQ ID NO :66 指明所述基因组中存在所述早期开花基因,并且所述基因组中存在 SEQ ID NO :67 指明野生型植物。

40. 一种加速感兴趣的基因向向日葵植物中渐渗的方法,所述方法包括:

将含有感兴趣基因的供体植物与包含早期开花基因的向日葵植物杂交以获得 F1 向日葵植物;

将 F1 植物与具有基因组的良种向日葵亲本植物回交;

并将所述回交的子代的一个或多个后续世代回交以重新获得至少一种新的良种亲本向日葵植物,其包含所述良种向日葵亲本的基因组和所述感兴趣的基因。

41. 权利要求 40 的方法,其中所述新的良种亲本包含早期开花性状和感兴趣的基因两者。

42. 权利要求 40 的方法,其中所述方法进一步包括从新的良种亲本中的所述感兴趣基因分离出所述早期开花基因。

43. 权利要求 40 的方法,其中所述方法包括使用所述早期开花基因的至少一种分子标志。

44. 通过权利要求 40 的方法产生的植物。

45. 权利要求 44 的植物,其中所述植物是观赏或食用向日葵。

46. 一种包含突变的、显性单基因的早熟的向日葵植物,与包含所述基因的野生型型式的植物相比,其引起早期开花和 / 或成熟,其中所述基因的主要基因座可以经由微卫星或 SSR 标志物而定位到连锁群 5 的一端。

向日葵中的显性早熟性突变和基因

[0001] 发明背景

[0002] 向日葵是为动物和人类两者供应食物的一种重要且有价值的大田作物。植物育种人员的持续目的是开发稳定的、高产率向日葵杂种,它们在农艺学上是可靠的,使得所使用土地上生成的种子量最大化。为了实现这个目的,向日葵育种人员必须选择和开发这样的向日葵植物,其具有的性状促成用于生成杂种的卓越亲本品系。

[0003] 向日葵 (*Helianthus annuus* L.) 可以通过自花传粉和异花传粉技术两者来育种。向日葵头部 (花序) 通常由与共同的基底 (花托) 相连的约 1,000 至 2,000 个个体盘花构成。圆周周围的花是既没有雄蕊也没有雌蕊的舌状边花。剩余的花是两性的且雄蕊先熟的盘花。

[0004] 当开花起始于自合瓣花冠部分外露的管出现时发生向日葵的天然传粉。管由五个聚药花药形成,并且花粉在管的内表面上释放。花柱快速延长,并迫使柱头通过该管。柱头的两个裂片向外张开,并且易于接受花粉,但是最初它们自身的花粉达不到。虽然这很大程度上阻止个体花的自花传粉,但是花通过昆虫、风和重力而暴露于来自同一头部上的其它花的花粉。

[0005] 对有前景的高级育种系进行彻底地测试并与代表商业目标区域的环境中的合适标准品比较至少三年。最好的品系是新商业栽培种的候选;那些在少数几个性状方面仍有缺陷的品系作为亲本使用以产生供进一步选择用的新种群。

[0006] 这些过程 (它们通向最终的上市 (marketing) 和销售 (distribution) 步骤) 从进行第一次杂交的时间起通常花费 8 至 12 个世代。因此,新栽培种的开发是耗时的过程,其需要精确的预先计划、资源的有效使用和最低限度的方向变化。

[0007] 最困难的任务是鉴定遗传上卓越的个体,因为对于大多数性状,真实基因型的值被其它混杂的植物性状或环境因素掩盖。一种鉴定卓越植物的方法是观察其相对于其它实验植物和广泛种植的标准栽培种的性能 (performance)。如果单次观察没有结论,则重复观察可提供对其遗传价值的更好评估。

[0008] 每年,植物育种人员选择种质来推进到下一世代。将这种种质在独特的且不同的地理、气候和土壤条件下种植,然后在生长期期间和结束时进行进一步选择。开发出的近交系是不可预测的。这种不可预测性的产生是由于育种人员的选择发生在独特的环境中,在 DNA 水平上没有对照 (使用常规的育种流程),而且产生数百万不同的可能的遗传组合。具有本领域普通技术的育种人员不能预测最终会开发出的最后所得品系,只是可能以非常粗略且大体的方式。同一育种人员不能通过使用完全相同的初始亲本和相同的选择技术来产生相同的品系两次。这种不可预测性导致花费大量的研究资金来开发卓越的新型向日葵近交系。

[0009] 关于通常用于不同性状和作物的育种方法的描述可以参见数本参考书之一 (例如 Allard, 1960 ; Simmonds, 1979 ; Sneep 等, 1979 ; Fehr, 1987)。

[0010] Heaton 等报告了突变向日葵,但是所述突变的基因座是未知的。T. C. Heaton 等, 1981, "Rapid Conversion of Maintainer Lines to Cytoplasmic

Sterility,” Proceedings Sunflower Forum and Research Workshop, 第 23 页。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明部分涉及自发向日葵突变的发现。本发明涉及“早熟 (early)”突变及相关近交物 / 杂种开发。本发明进一步提供了一种单显性基因, 其在向日葵近交等位基因系 (isoline) 和近等基因杂种中赋予早熟性。没有此基因用于工业中杂种开发的效用的已知现有教导或提示。本发明还提供了一种新的且独特的向日葵近交系, 称作 H120R。

[0013] 本发明包括拥有此突变基因的种子、通过种植这些种子生成的植物、和其拥有此突变基因及相关早熟性性状的子代。本发明还包括用于生成此类向日葵种子和植物 (包括近交物和杂种) 的方法。可以通过例如将所述近交系与其自身或者与另一向日葵品系杂交来生成此类植物。本发明进一步涉及此类植物和用于生成此类向日葵植物的方法, 所述向日葵植物在其遗传物质中还含有一种或多种转基因。还提供了本发明向日葵植物的部分, 诸如例如从近交植物获得的花粉和近交植物的胚珠, 其中这些部分包含本发明的早熟性基因。

[0014] 本发明可以显著降低物候期萌发开花 (phenophase emergence flowering), 而不影响充盈期。本发明还可以显著提高 IC。还可以使用本发明来为需要较短成熟的其它地理环境 (geography) 对较早熟等位基因系中非常晚熟的、良种近交物进行基因转变。还可以使用本发明来提高密度耐受性, 并用于间作。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 显示了 H120R 等位基因系的照片, 其显示了晚熟阿根廷品系 H120R 与其早熟突变型式之间的花发育比较。

[0017] 图 2 显示了基因型 X223 (MG2em) 和 MG2 的 (A) 叶面积指数和由作物截取的 (B) 入射辐射比例 (Qd) 与离第一次开花的时间之间的关系。当比符号大时, 垂直的工形线指明标准偏差。

[0018] 图 3 显示了基因型 X223 (MG2em) 和 MG2 的种子重量与离第一次开花的时间之间的双线性关系。当比符号大时, 垂直的工形线指明标准偏差。

[0019] 图 4 显示了基因型 X223 (MG2em) 和 MG2 的收获指数 (在合成成本方面校正) 与离第一次开花的时间之间的双线性关系。当比符号大时, 垂直的工形线指明标准偏差。

[0020] 图 5 显示了早期开花 (EF) 基因的主要基因座的遗传学图。参见实施例 8。

[0021] 图 6 显示了用于标志物开发的策略。

[0022] 图 7 显示了在本发明的早期开花基因侧翼的标志物。

[0023] 图 8 显示了加速的渐渗 (introgression) 策略。

[0024] 序列简述

[0025] SEQ ID NO :1-60 是正向和反向引物, 如实施例 8 中所讨论的。

[0026] SEQ ID NO :61 是 HA1805 正向引物。

[0027] SEQ ID NO :62 是 HA1805 反向引物。

[0028] SEQ ID NO :63 是基因组序列, 其包含两个单核苷酸多态性 (SNP) 基因座, 如实施例 9 中所讨论的; SEQ ID NO :82 显示了 SNP, 如在早期开花 / 早熟基因 / 品系中找到的。

[0029] SEQ ID NO :64 是用于扩增“R”SNP 基因座的正向引物。

[0030] SEQ ID NO :65 是用于扩增“R”SNP 基因座的反向引物。

[0031] SEQ ID NO :66 是在 R 基因座处包含早熟核苷酸 / 多态性的探针。

[0032] SEQ ID NO :67 是在 R 基因座处包含野生型核苷酸的探针。

[0033] SEQ ID NO :68-81 是实施例 9 中所讨论的标志物序列。

[0034] SEQ ID NO :82 是基因组序列,其包含两个单核苷酸多态性 (SNP),如实施例 9 中所讨论的;如在早期开花 / 早熟基因 / 品系中找到的 SNP 存在于残基 65 (“Y” 基因座) 和 125 (“R” 基因座) 处。

[0035] 发明详述

[0036] 本发明部分涉及自发向日葵突变的发现。本发明涉及“早熟”突变及相关近交物 / 杂种开发。本发明进一步提供了一种单显性基因,其在向日葵近交物和杂种 (包括近交等位基因系和近等基因杂种) 中赋予早熟性。没有关于此基因用于工业中杂种开发的效用的已知现有教导或提示。本发明还提供了一种新的且独特的向日葵近交系,称作 H120R。在 H792A 近交物增加区组 (increase block) 的苗圃行 2290141 中发现了所述突变。图 1 是 H120R 等位基因系的照片,其显示了晚熟阿根廷品系 H120R 与其早熟突变型式之间的花发育比较。

[0037] 此基因是通过向日葵育种群体中的天然突变产生的。最初使用它来创建超早熟型式的早熟近交物,其追求对短成熟区的适应。随后,其用于标准化超晚熟近交物的潜在用途得到理解和应用。

[0038] 由主题基因赋予的主题性状的遗传力表现为质量的 (单一的且不完全的显性)。效果被视为明显显性的,但是存在“基因剂量”效果的一些指征。

[0039] 此基因的插入 (例如通过回交) 会容许在较早环境中直接使用经基因转变的晚熟向日葵近交物。它还可以用于其它作物中的转基因研究和开发。

[0040] 所述基因可以容许具有期望性状 (数量的和质量的) 的晚熟基因型移入较早 (较短季节) 环境中。可以对其它作物的转基因开发应用相同的观念。也就是说,也可以对此性状育种或者以其它方式导入其它非向日葵作物中。例如,凭借成功的应用,可以获得热带玉米种质供例如美国中部玉米带使用。另外,中部玉米带种质可以向北方移动。

[0041] 早熟基因还可以具有作为回交性状的辅助的效用,它的一些例子包括胞质雄性不育或咪唑啉酮 (imidazilinone) (IMI) 抗性。如果用期望的供体性状选择杂合早期开花回交 F1 子代,则可以缩短基因转变 (conversion) 周期。(当选择期望的成熟时,自交会在基因转变的最终阶段发生。)

[0042] 可以通过育种的回交方法来将此基因转移到其它向日葵近交物。仅需要一种经基因转变的近交物来开发赋予较早成熟的杂种。

[0043] 对于广泛范围的常规回归亲本成熟,早熟突变基因表现为赋予在到开花的天数上 (并因此在成熟上) 的相对成比例减少。成比例开花 / 成熟修饰是期望的,因为对于所有近交物,并且因此对于杂种,对于受限制上市区域 (restricted marketing area) 在相同的天数中成熟都是不想要的。

[0044] 本发明包括拥有此突变基因的种子、通过种植这些种子产生的植物、和其拥有此突变基因及相关早熟性性状的子代。本发明还包括用于产生此类向日葵种子和植物 (包括近交物和杂种) 的方法。可以通过例如将此类近交系与其自身或与另一向日葵品系杂交来产生此类植物。本发明进一步涉及此类植物和用于产生在其遗传物质中还含有一种或多种

转基因的此类向日葵植物的方法。还提供了本发明的向日葵植物的部分,诸如例如自近交植物获得的花粉和近交植物的胚珠,其中这些部分包含本发明的早熟性基因。

[0045] “早熟性”意为到生理学成熟的平均时间(其中生理学成熟定义为完成向日葵植物种子充盈的时间),其范围为约 60 天至约 90 天之间。在一些实施方案中,这可以从约 60 天至约 70 天。

[0046] “早期开花”意为到向日葵植物开花的平均时间,其范围为约 48 天至约 66 天之间。在一些实施方案中,这可以从约 48 天至约 55 天。

[0047] 通过常规的筛选,预期 EM 植物可以在早熟性和早期开花方面变化约 10%。

[0048] 对于 EM 和野生型,头部大小(头部外围)、干种子重量和/或产率在统计学上是相同的。

[0049] CNE840B 是 H840B 的早熟突变体基因转变。即它们在遗传学上相同,只是 CNE840B 具有突变,而 H840B 没有。CNE840B 是 H840B(作为回归亲本) x 早熟突变供体亲本的回交 5 衍生(backcross 5 derivation)。

[0050] 作为本公开内容的一部分,已经根据布达佩斯条约于 2007 年 10 月 17 日保藏了早熟向日葵品系 CNE840B(包含早熟性基因)的至少 2500 粒种子,并且在没有限制的前提下(但受制于专利权)通过美国典型培养物保藏中心(ATCC)Manassas, VA 20110-2209 使公众可以获得。保藏物被称为 ATCC 保藏号 PTA-8715。保藏物会在没有限制的前提下在 ATCC 保藏机构(其是公共保藏机构)保持 30 年,或者在最新的要求之后的 5 年期间,或者达该专利的有效寿命,以较长者为准,并且在该期间里若其变得不能存活,则会被替换。

[0051] 所保藏的种子是本发明的一部分。明显地,可以从这些种子种植植物,并且此类植物是本发明的一部分。本发明还涉及这些植物中含有的 DNA 序列。其相关早熟子代(包括亲本植物和此类子代植物在杂交中的用途)是本发明的一部分。本发明的检测方法和试剂盒可以涉及鉴定任何保藏物和/或其子代品系。

[0052] 在其它方面,本发明提供了可再生的细胞(包含此类基因),用于例如组织培养。优选地,组织培养物会能够再生具有前述向日葵植物的生理学和形态学特征的植物,并能够再生与前述近交向日葵植物具有基本上相同基因型的植物。优选地,在此类组织培养物中的可再生细胞会是胚、花粉、胚珠、叶、茎、皮层、髓(pith)、总苞苞片(involucral bract)、边花、盘花、冠毛(pappi)、瘦果、蜜腺、花间苞片(interfloral bract)、花托、毛状体柱头、花药、花柱、花丝、萼、果皮、种皮、胚乳、胚、根、根尖、种子等。更进一步,本发明提供了自本发明的组织培养物再生的早熟的向日葵植物。

[0053] 与回归亲本的 68 和 75 天相比, H418R 和 H120R 的早熟等位基因系中到开花的时间分别是 62 天和 66 天。对于牵涉正常的早熟品系向早熟突变体基因转变的比较,在一处位置,在组 1F3 早熟突变体衍生(具有非常早熟分离 F3 衍生中的基因)中开花在种植后少至 35-37 天发生,相对于正常(组 1 衍生)非常早熟(组 1)近交物的 48 天。在另一处位置,早熟突变体等位基因系及其晚期成熟回归亲本 H840B(阿根廷近交物)的到开花天数分别是 64 对 80。成熟分类从回归亲本的组 7(非常晚)改变成组 3 的早熟突变体基因转变(适度早)。

[0054] 主题基因还可以堆叠其它性状。这可以多种方式实现。与其它品系(具有其它性状)的杂交育种是本领域中已知的。参见例如 CLEARFIELD™ 向日葵(Helianthus annuus)

品系 X81359。还有,可以对主题性状和 / 或其它性状进行遗传工程化改造以获得包含期望性状组合的植物。例如,可以将观赏和食用 (confectionary) (用于人类消费) 品系和品种与主题早熟性基因进行渐渗。参见例如:

[0055] Yue 等 (2007) “Experimenting with marker-assisted selection in confection sunflower germplasm enhancement.” 第 29 届向日葵研究研讨会 (Sunflower Research Workshop), 2007 年 1 月 10-11 号, Fargo, ND (在网站 sunflowerusa.com/research/research-workshop/documents/Yue_Experiment_Marker_07.pdf 上可获得)。

[0056] Miller 等 (2006) “Registration of three low cadmium (HA 448, HA 449, and RHA 450) confection sunflower genetic stocks.” *Crop Science*. 46 :489-490 (2006 年 1 月 1 日)。

[0057] “Interspecific hybridisation and cytogenetic studies in ornamental sunflower breeding,” J. Atlagic 等, *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45(1)93-97, 2005 年 2 月 21 日出版。

[0058] “Genes for pollen fertility restoration in sunflowers.” *Euphytica*, 第 27 卷, 第 2 期 / 1978 年 6 月, 第 617 页 - 第 627 页。

[0059] 一些性状和品系的一些其它例子在下列专利参考文献中:

[0060]

美国专利或美国 申请流水号	题目或主题	申请提交日期 (若可适用的话)
61/015,591	Low Saturated-Fat Sunflower and Associated Methods	2007 年 12 月 20 日
USSN 11/245,991 (公布为 2006/0112450A1)	Sunflower Seed with High Delta-Tocopherol Content	2005 年 10 月 7 日
60/721,181	High Oleic Imidazolinone Resistant Sunflower	2005 年 9 月 28 日
USPNs 4,627,192 和 4,743,402	High Oleic Sunflower	
USPN 5,276,264	Sunflower Products having Lower Levels of Saturated Fatty Acids	
USPN 6,977,328	Sunflower Seed having Low Saturated Oil Content (also high oleic)	
USPN 6,956,156	Inbred Sunflower Line H1063R (also high oleic and imidazolinone resistant)	

[0061] 通过提及将本文中所提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请、和公开文本以它们不与本说明书的明确教导矛盾的程度完整收入。

[0062] 以下是例示用于实施本发明的方法的实施例。这些实施例不应解释为限制性的。

除非另有说明,所有百分比按重量计,而所有溶剂混合物比例按体积计。

[0063] 实施例

[0064] 实施例 1 :农艺学测试和样品结果

[0065] 此基因是通过向日葵育种群体中的天然突变产生的。最初使用此基因来创建超早熟型式的早熟近交物,其追求对短成熟区域的适应。随后,其用于标准化超晚熟近交物的潜在用途得到理解和应用。

[0066] 为了启动向日葵中 em 基因的特征,进行了一组实验,其使用下列基因型来进行:

[0067] MG2 H757A*H120R 野生型

[0068] X223 H757A*EM229135R 早熟突变体类型

[0069] EM229135R = H120Rem(BC2F7 纯合的)

[0070] 一些突出部分如下:

[0071]

表1.在早熟性特性上形成对比的两种向日葵杂种的到开花时间(DtoFLW)和生理学成熟时间(DtoPhM)的平均值。G: 基因型, d.m.s: 显著差异。*=注意DTF的降低, 但是种子充盈期的长度相同

属性	基因型		P	d.m.s $\alpha=0.10$
	X223	MG2	G	
DtoFLWB (天)	56*	67	0.00	1
DtoPhM (天)	89	99	0.11	11

表2.在早熟性特性上形成对比的两种向日葵杂种的第一次开花(LAI_{13/16})和生理学成熟(LAIMF)后接近13 (X223)和16 (MG2)天的叶面积指数、叶的开始(onset of leaf) (SLS)、叶衰老的速率(LSR)和第一次开花(Qd_{13/16})和生理学成熟(QdMF)后接近13 (X223) y 16 (MG2)天由作物截取的入射辐射的比例的平均值。*=注意LAI的降低, 有相继的较低的遮光率(light interception ratio)

属性	基因型		P	d.m.s $\alpha=0.10$
	X223	MG2	G	
LAI _{13/16}	1.80*	3.40	0.01	0.53
LAI _{PhM}	1.63*	2.69	0.17	0.17
SLS (天)	32.5	30.9	0.53	7.1
LSR (LAI天 ⁻¹)	-0.104	-0.198	0.14	0.130
Qd _{13/16}	0.848	0.959	0.01	0.041
Qd _{MF}	0.836*	0.903	0.24	0.132

表3.在早熟性特性上形成对比的两种向日葵杂种的农业学特性和头部直径(HEAD_DIAM)、叶柄长度(PET LENG)和高度(HEIGHT)的平均值。

属性	基因型		P	d.m.s
----	-----	--	---	-------

[0072]

	X223	MG2	G	$\alpha=0.10$
头部厚度†	薄的	薄的		
头部形状††	扁平的	扁平的		
颈弯曲 ‡	30	30		
HEAD DIAM (cm)	16.2	18.9	0.05	2.2
PET LENG (cm)	13.1	16.3	0.00	0.46
高度(m)	1.18	1.88	0.00	0.15

[0073] †头部厚度

[0074] ††头部形状

[0075] ‡头部方向

[0076] 图 2 显示了基因型 X223 (MG2em) 和 MG2 的 (A) 叶面积指数和由作物截取的 (B) 入射辐射比例 (Qd) 与离第一次开花的时间之间的关系。当比符号大时,垂直的工形线指明标准偏差。

[0077]

表 4.在早熟性特性上形成对比的两种向日葵杂种的油产率(OIL YLD)、籽粒号(#GRAINS)、籽粒重量(GW)、籽粒充盈率(FR)、从开花到籽粒充盈结束的时间(FD)和头部周围(PER)、中间(INT)和内部(CEN)部分的核百分比(%E)和籽粒油浓度(OIL%)的平均值;*=最显著的差异

属性	基因型		<i>P</i>	d.m.s $\alpha=0.10$
	X223	MG2	G	
OILYLD (kg/ha)	1049	1374	0.15	466
#GRAINS m-2	6078*	8109	0.10	2342
GW PER (mg)	70.86	65.89	0.47	18.15
GW INT (mg)	60.91	57.83	0.37	8.59
GW CEN (mg)	48.40	50.79	0.33	7.73
FR PER (mg d-1)	2.21	2.66	0.15	0.63
FR INT (mg d-1)	2.16	2.61	0.53	1.97
FR CEN (mg d-1)	1.71	1.43	0.61	2.25
FD PER (天)	31.1	31.2	0.96	6.8
FD INT (天)	33.6	32.7	0.80	10.6
FD CEN (天)	35.2	40.0	0.32	15.2
OIL%	45.8	46.6	0.60	4.01

[0078] 图 3 显示了 Colón 2002/03 中种植的基因型 X223 (MG2em) 和 MG2 的种子重量与离第一次开花的时间之间的双线性关系。当比符号大时,垂直的工形线指明标准偏差。

[0079]

表5.在早熟性特性上形成对比的两种向日葵杂种的第一次开花(BMco12/15)和生理学成熟(BMCoMF)后接近12 (X223)和15 (MG2)天的油校正的籽粒产率(YLD)、油校正的生物量、第一次开花和生理学成熟后12 (X223)和15 (MG2)天之间的油校正的生物量(Δ BMco12/15-MF)生成和油校正的生物量的日生成的平均值。12/15: 第一次开花后的天数(12天X223和15天MG2), MF: 生理学成熟。

属性	基因型		P	d.m.s $\alpha=0.10$
	X223	MG2	G	
通过OIL校正的YLD (g m ⁻²)	378	490	0.14	159
BMco12/15 (g m ⁻²)	644	1277	0.00	200
BMcoMF (g m ⁻²)	1014	1810	**0.00	251
Δ BMco12/15-MF (g m ⁻²)	371	534	0.00	52
RBMco12/15-MF (g m ⁻² 天 ⁻¹)	21.3	33.7	0.02	5.05

**=注意YLD、生物量、比率、和HI是不同的

表6.在早熟性特性上形成对比的两种向日葵杂种的收获指数(HI)、每日HI增加比率(HIR)和HI增加的线性阶段的持续时间(HID)的平均值。*测定为油校正的籽粒干物质与油校正的地上干物质的比率。

属性	基因型		P	d.m.s $\alpha=0.10$
	X223	MG2	G	
HI *	0.526	0.466	0.01**	0.020
HIR (IC 天 ⁻¹)	0.0163	0.0140	0.75	0.015
HID (天)	31.7	34.1	0.41	7.5

[0080] 图4显示了 Colón 2002/03 中种植基因型 X223 (MG2em) 和 MG2 的收获指数 (在合成成本方面校正) 与离第一次开花的时间之间的双线性关系。当比符号大时, 垂直的工形线指明标准偏差。

[0081] 实施例 2: 表征基因显性、基因剂量和将 em 基因应用于缩短物候期而不影响充盈期

[0082] 可以使用主题突变 / 突变基因来显著缩短向日葵生长周期中的物候期“萌发开花”(V1-R5.1), 而不影响随后的充盈期 (R5.5-R9); 可以使用它来基因转变较早熟“等位基因系”中的非常晚熟的“显示降低的基因型环境相互作用的良种近交物”, 用于需要较短成熟的其它地理环境。

[0083] 已经将两种近交物基因转变 (BC4+) 并固定 (H840B 和 H418R), 并将一种部分基因转变 (BC2F7) 但固定 (H120R)。H840B 和 H120R 两者的 em 型式完全适合通常在北美洲使用的成熟。这些近交系的 em 型式甚至已经可用于创建 mg 3 的杂种, 分别是回归近交物 mg 7

和 mg 6。此杂种表现得比 8377NS 更早熟并接近 SF270。

[0084] 使用 H840B 来生成在过去具有非常好的锈病耐受性的实验性杂种。它们在性能上是突出的,但是非常晚且高的。一旦所引用的问题已经被 em 基因的效果消除,便可以使用新的 em 型式来再创建那些杂种,并将它包括在“良种集合”中。

[0085] 基于多次观察,所述基因遗传力表现为质量的(单一且不完全显性的)。效果被视为明显显性的,但是存在“基因剂量”效果的一些指征。若这是真实的,则它会容许通过使用杂合或纯合两种形式的基因来为不同成熟组创建等位基因杂种(iso-hybrid),这还会扩展良种种质的用途。

[0086] 已经设计了一系列实验(RCBD)来证明/否认所述假设,目的在于通过下列基因型的研究来明确鉴定遗传力模式和基因作用:

表7.

登录代码	Gen	基因型
H840B		Ee
[0087] H840Bem		EE
H840B/H840Bem	F1	ee/EE
(H840B/H840Bem)@	F2	EE;Ee;ee
H840B//H840B/H840Bem	BC1F1(-)	ee//ee/EE

[0088]

表8.

登录代码	Gen	基因型
H418R		Ee
H418Rem		EE
H418R/H418Rem	F1	Ee
(H418R/H418Rem)@	F2	EE, Ee, ee
H418R//H418R/H418Rem	BC1F1(-)	ee//ee/EE
H418Rem//H418R/H418Rem	BC1F1(+)	EE//ee/EE

表9.

登录代码	Gen	基因型
[0089] H840B/H418R	F1	ee/ee
H840B/H418Rem	F1	ee/EE
H840Bem/H418R	F1	EE/ee
[0090] H418R/H840Bem	F1	ee/EE
H840Bem/H418Rem	F1	EE/EE

[0091] 在早熟性相关测量外,还会测量对诸如 PHGT、HDIAM、SDIAM、#LEAF 等性状的多效影响。

[0092] 实施例 3:此基因容许将向日葵边界扩展到具有更短的生长期和更有限的水可用

度的区域的用途

[0093] 由于所述物候期的显著缩短,此基因的使用可容许通过联合使用来自其它区域的良种等位基因杂种来将向日葵边界扩展到具有更短的生长期和更有限的水可用度的区域。由于基因对其它性状的多效影响,可能需要作物空间分布的变化来使作物生产率最大化。已经广泛测试了诸如 Sunwheat 和 Sunola 等前例,但是具有遗传背景局限性。

[0094] 还已经设置了实验来相对于生长和发育参数和产率要素研究这种基因效果,并量化等位基因杂种中多种多样的空间分布的效果。

表9.

登录代码	Gen	基因型
H757A/H120R	F1	(ee/ee)
H757A/H120Rem	F1	(ee/EE)
H840A/H418R	F1	(ee/ee)
[0095] H840A/H418Rem	F1	(ee/EE)

用下列各项进行因子设计:

行距:

0.70cm和0.35cm

植物群体:

35,000、65,000、和95,000pl/ha

[0096] 实施例4:主题基因加速其它性状的渐渗的用途

[0097] 由于此基因的遗传力,它是一种非常有力的工具以通过在整个回交过程期间保持杂合形式的 em 基因来加速其它性状的渐渗。必须将基因渐渗到供体或回归物中。

[0098] EE XX * ee xx

[0099] Ee Xx * ee xx

[0100] ee XX Ee Xx*ee xx

[0101] ee XX Ee Xx @ → ee XX 复原

[0102] 实施例5:对基因的进一步表征和测序

[0103] 由于我们的基因转变的状态,可以容易地对基因定位、测序、并且最终在不同作物中转化(早熟性是非常容易鉴定的)。

[0104] H840Bem*H840B F1

[0105] (H840Bem*H840B)@ F2

[0106] 实施例6:此基因在向日葵杂种产品中的用途

[0107] 随着早熟突变近交等位基因系的开发接近完成,测试的下一阶段是测定这种基因在向日葵杂种产品中的实际用途。完成了有限的杂种测试,其比较杂种 MG2 的早熟突变体型式相对于其正常的组6成熟型式和类似的组3成熟的其它杂种的性能。

[0108] 实施例7:将基因插入植物中

[0109] 本发明的一个方面是用主题多核苷酸序列转化植物。

[0110] 可以使用能够在植物中表达基因的异源启动子区域。如此,对于植物原位(in planta)表达,本发明的DNA在合适的启动子区域的控制下。通过使用此类构建体来获得植

物原位表达的技术是本领域中已知的。

[0111] 可以使用本领域中公知的许多技术来将本发明的基因插入植物细胞中。例如,包含大肠杆菌 (*E. coli*) 中的复制系统和容许选择经转化的细胞的标志物的大量克隆载体可用于准备好将外来基因插入高等植物中。载体包括例如 pBR322、pUC 系列、M13mp 系列、pACYC184 等。因此,可以将异源序列在合适的限制性位点插入载体中。使用所得的质粒来转化入大肠杆菌中。在合适的营养培养基中培养大肠杆菌细胞,然后将其收获,并裂解。回收质粒。一般进行序列分析、限制性分析、电泳、和其它生化 - 分子生物学方法作为分析的方法。每次操作后,可以切割所使用的 DNA 序列,并将其连接到下一 DNA 序列。可以将每种质粒序列克隆到相同的或另外的质粒中。

[0112] 根据将期望的基因插入植物中的方法,其它 DNA 序列可能是必要的。如果例如使用 Ti 或 Ri 质粒来转化植物细胞,那么必须至少将 Ti 或 Ri 质粒 T-DNA 的右侧边界,但是常常为右侧和左侧边界连接作为要插入的基因的侧翼区域。已经深入研究了 T-DNA 转化植物细胞的用途,并且充分记载于 EP 120 516 ;Hoekema (1985) 于: *The Binary Plant Vector System*, Offset-durkkerij Kanters B. V., Alblasterdam, 第 5 章 ;Fraley 等, *Crit. Rev. Plant Sci.* 4 :1-46 ;及 An 等 (1985) *EMBO J.* 4 :277-287。

[0113] 一旦所插入的 DNA 已经被整合在基因组中,它在那里便是相对稳定的,而且通常不再出来。它通常含有选择标志,其为经转化的植物细胞赋予对杀生物剂或抗生素,诸如卡那霉素、G418、博来霉素、潮霉素、或氯霉素等的抗性。因此,个别采用的标志物应当容许选择经转化的细胞,而不是不含所插入 DNA 的细胞。

[0114] 大量技术可用于将 DNA 插入植物宿主细胞中。那些技术包括使用根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 或发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 作为转化剂用 T-DNA 进行的转化、融合、注射、生物射弹 (微粒轰击)、或电穿孔以及其它可能的方法。如果使用土壤杆菌来转化,那么必须将要插入的 DNA 克隆入特殊的质粒中,即克隆入中间载体中或者克隆入二元载体中。可以通过因与 T-DNA 中的序列同源的序列而实现的同源重组来将中间载体整合入 Ti 或 Ri 质粒中。Ti 或 Ri 质粒还包含对于转移 T-DNA 必要的 *vir* 区域。中间载体在土壤杆菌中不能复制其自身。可以依靠辅助质粒来将中间载体转移入根癌土壤杆菌中 (接合)。二元载体能在大肠杆菌和土壤杆菌两者中复制其自身。它们包含选择标志基因和接头或多聚接头,其由右侧和左侧 T-DNA 边界区域框出。可以将它们直接转化入土壤杆菌中 (Holsters 等 [1978] *Mol. Gen. Genet.* 163 :181-187)。作为宿主细胞使用的土壤杆菌要包含携带 *vir* 区域的质粒。*vir* 区域是将 T-DNA 转移入植物细胞中必需的。另外的 T-DNA 可以包含在内。使用如此转化的细菌来转化植物细胞。有利地,可以将植物外植体与根癌土壤杆菌或发根土壤杆菌一起培养以将 DNA 转移入植物细胞中。然后可以在合适的培养基 (其可以含有供选择用的抗生素或杀生物剂) 中从受感染的植物材料 (例如叶的碎片、茎的区段、根,而且还有原生质体或悬浮培养的细胞) 再生整株植物。然后可以对如此获得的植物测试所插入 DNA 的存在。在注射和电穿孔的情况中,对质粒没有提出特殊的要求。有可能使用普通的质粒,诸如例如 pUC 衍生物。

[0115] 经转化的细胞在植物内部以常见的方式生长。它们可以形成生殖细胞,并将转化的性状传送到子代植物。可以以普通的方式培养此类植物,并将它们与具有相同的经转化的遗传因子或其它遗传因子的植物杂交。所得的杂种个体具有相应的表型特性。

[0116] 实施例 8 :关于早期开花突变基因的别的信息

[0117] 表征。表 10 显示了纯合的基因转变的亲本中相对于其正常的回归亲本显著更早的开花和更短的高度。发育的多个杂合回交 F1 阶段中的表 11 基因转变指明主要为显性的基因作用 (不完全显性)。表 12 中前 3 对杂种比较显示了由早熟突变基因赋予的关于显性的别的支持性证据。纯合与杂合等位基因杂种之间的最后两个比较指明有可能的基因剂量效果——两个亲本中的基因可以早于一个亲本中的基因,差异取决于谱系。假定基因的显性性质,通过选择 BCnF1 世代中的早熟分离物以与良种回归亲本进一步回交来进行传统的回交,从而容易实现向良种亲本中的渐渗。一旦完全渗入,便将 BCnF1 自交以选择 BCnF2 群体中个别的纯合子 EM 分离物。可以观察随后的 BCnF3 家族行中纯合性的存在。

表10.比较纯合EM基因转变与回归亲本之间到开花的亲本天数和高度。

名称	DTF	Ht (in)
EM BC5 H840A	65	63
H840A	85	68
EM BC4 CN2922R	53	46
CN2922R	71	64
EM BC4 H120R	53	46
H120R	67	61
EM BC4 H535A	54	57
H535A	66	63
EM H1063R	44	35
H1063R	58	53
EM BC5 H418R	49	35
H418R	59	46

[0118]

表11.比较杂合BCF1基因转变与回归亲本品系之间到开花的天数。

名称	DTF
EM BC2F1 ON2343B	54
ON2343B	61
EM BC1F1 HO00537B	58
HO00537B	71
EM BC1F1 CN2798B	63
CN2798B	68
EM BC1F1 HO00587B	59
HO00587B	65
EM BC1F1 CN1907R	56
CN1907R	73

[0119]

[0120]

EM BC1F1 ON1938R	59
ON1938R	71
EM BC1F1 ONN947R	56
ONN947R	62
EM BC3F1 HOU98510R	51
HOU98510R	59
EM BC3F1 MOC0666R	57
MOC0666R	62
EM BC2F1 H324B	38
H324B	49

[0121]

表12.比较具有一个、两个、或没有EM亲本的杂种之间到开花的时间和高度。(连续的)两年。		
名称	DTF	Ht (in)
H757A x EM H120R	60	na
H757A x H120R	78	na
H757A x EM H418R	57	na
H757A x H418R	65	na
CN1703A x EM H1063R	56	42
CN1703A x H1063R	65	68
EM 840A x EM CN2922R	61	73
EM 840A x CN2922R	66	84
EM 840A x EM H1063R	56	58
H840A x EM H1063R	57	60

[0122] 表 13 和表 14 显示了早期开花突变体的别的多效效果。表 13 中的原始数据显示了叶数目、宽度、和长度的一般性降低;较短的叶柄;较小的头部大小;和较短的植物高度。这似乎为表 14 结果的原因,所述表 14 结果显示了与正常的杂种相比,EM 杂种的显著较小的叶面积指数(对于开花后 13 和 16 天)、遮光率(开花后 13 和 16 天)、和生物量(开花后 13 和 16 天,和在生理学成熟时)。然而,对于 EM 杂种,收获指数比率(籽粒物质/总共的地上植物干物质)显著更大。这对于较高的群体使用是好的,其在下文在基因效用下的第 3 点中讨论。

[0123]

表13.比较EM与正常类型之间的植物性状测量结果。						
植物类型	叶数目	叶宽度 (in.)	叶长度 (in.)	叶柄长度 (in.)	头部宽度 (in.)	植物 ht (in.)
EM近交物(4)	25.5	8.5	9	5.2	5.2	50.5
正常的近交物	33	9.3	9.7	5.6	7	63.8
EM杂种(2)	28.5	12.1	12.1	5.6	10	55.9
正常的杂种	34.5	12	13.2	6.1	12	70.4

表14.第一次开花和生理学成熟(MF)后13和16天的EM和正常杂种的叶面积指数(LAI)、遮光率(Qd)、和生物量(BM);和收获指数(HI)比较。

[0124]

杂种	LAI	LAI	Qd	Qd	BM	BM	HI*
	13/16	MF	13/16	MF	13/16	MF	
H757A x EM H120R	1.8	1.63	0.85	0.84	644	1014	0.526
H757A x H120R	3.4	2.69	0.96	0.90	1277	1810	0.466
P	0.01	0.17	0.01	0.24	0.00	0.00	0.01

*按籽粒干物质与地上干物质的比率测定。

[0125] 使用微卫星或 SSR(简单序列重复)标志物和来自杂交 MOC0666R x CNE418.312 的 F3 家族的开花数据将早期开花基因的主要基因座定位在连锁群 5 的一端上。参见图 5。

[0126] 向日葵中的图通常通过连锁群查阅。连锁群 5 对应于由 Steve N. Knapp 博士的小组发表的图。参见 Yu 等, (2003)“Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower,”Crop Sci. 43 :367-387 ;和 Tang 等 (2002)“Simple sequence repeat map of the sunflower genome,”Theor Appl Genet 105 :1124-1136。由欧洲科学家开发的图的连锁群数目不同于由 Knapp 博士的小组开发的。还没有在向日葵中定义染色体编号。

[0127] 以下是连锁群 5 上定位的 SSR 标志物的引物序列和图位置,其中定位了早期开花基因座 (EF)。

[0128]

[0129]

标志物	图位(cM)	正向引物序列	反向引物序列
HA1768	0	AAATCCACAAGGATGCTCAATC SEQ ID NO:1	GGAGATCATACAAAGCGTTATCGT SEQ ID NO:2
HA1620B	3	HEX-TTTCGTGATGGTGATTGATGATT SEQ ID NO:3	CAGCAACTCTGACCGTTTTCATTA SEQ ID NO:4
HA1829	7	CATTGAGGACGAGAAAGCCAGT SEQ ID NO:5	GTCCGTACCCCTGTTTGAGCTT SEQ ID NO:6
HA1102	24	TGTTACACAGCTCCCGTCTAA SEQ ID NO:7	CACACACACAACAACCTGACC SEQ ID NO:8
HA0694	26	GCCGTGAATAATGGGATTGA SEQ ID NO:9	GATTGGGTCAGCTTGTGTGA SEQ ID NO:10
HA0850A	27	CCCTGGAGTGTAITGCCGTTA SEQ ID NO:11	ATCCGTCTGCTGCCTAATCC SEQ ID NO:12
HA0729A	29	TGAAACGTAGTAACCTGCCAAA SEQ ID NO:13	TTGGACGACCTCGGTATCTT SEQ ID NO:14
HA1620A	30	HEX-TTTCGTGATGGTGATTGATGATT SEQ ID NO:15	CAGCAACTCTGACCGTTTTCATTA SEQ ID NO:16
HA1489B	31	CTTATTCCAAGGACGCATAGTCG SEQ ID NO:17	CGATGGTATGATTCTCGACGTTA SEQ ID NO:18
HA1666	34	FAM-ATTTCAACCCTCACTCCACAC SEQ ID NO:19	TACCGGCTGGATATGGAGAAT SEQ ID NO:20
HA1485	34	GGGAAGTGGGCTTGTCTATGTAT SEQ ID NO:21	AACACACCCGAAATCACCTATGAA SEQ ID NO:22
HA1838	34	AGAGGAATGAGATCGGGTTGAT SEQ ID NO:23	GTGGGACAACTCAGCAACGTC SEQ ID NO:24
HA0037	35	GAACATGGCCATAACTCATAGACG SEQ ID NO:25	CCTTCGACCCCAACATC SEQ ID NO:26
HA0654	35	ACGCACATGAGAGAGAAAGAG SEQ ID NO:27	ACCTTCGACCCCAACATCAAG SEQ ID NO:28
HA1779	35	ATTGTTCCTGGTTCGGTATCC SEQ ID NO:29	CATGTCTGATCTTCGGGACTTC SEQ ID NO:30
HA0031	36	CTCACGAAACTCTTTCATGCTG	CTCTCACACTTACTGAAC SEQ ID NO:32

标志物	图位(cM)	正向引物序列 SEQ ID NO:31	反向引物序列
HA1665	36	FAM-CCTAAGGGGATGAATCTCTTTCSEQ ID NO:33	AACTTCCAATGTTCTCTCCAACCAT SEQ ID NO:34
HA0908	36	TTGTCTTCATCTGCGGTGTA SEQ ID NO:35	TTGCTGTTGTTGATCGGTGT SEQ ID NO:36
HA0870	38	GTGCGTTGGCTCTTAATGAT SEQ ID NO:37	AGTGATGGCATTCCTCCAAATTT SEQ ID NO:38
HA1614	38	HEX-GTGATCCGAGTTGTGGATGTTT SEQ ID NO:39	GTTAGATGGCAACCCAAAGTGAT SEQ ID NO:40
HA1242A	38	GGTGATGATGGAGGAGCAACTG SEQ ID NO:41	CACTCAACCATTTGTTCTCCAC SEQ ID NO:42
HA1667	41	FAM-GAACTCCGGTTAGTCTTCCGAC SEQ ID NO:43	GCAATTAAAGTCTGCGTTTCAGTTT SEQ ID NO:44
HA0907	41	CATGAACATCGCCCAATTCAG SEQ ID NO:45	TGCAAGGAACCATCAGAAATC SEQ ID NO:46
HA0829	42	TTGTCAATGTATGGGCTTTTGG SEQ ID NO:47	ATCCAACAGGTGTGCGGAAT SEQ ID NO:48
HA0890	44	CACTTCATCCTCTCCCCTCCTT SEQ ID NO:49	GGCGTGTGTGTTGGGTATT SEQ ID NO:50
HA1756	44	ACACGAGTCCCAACCTGAATG SEQ ID NO:51	ACCTGAAATGCAAATCTCTACAGG SEQ ID NO:52
HA1930	44	TAGGCAATAACTTTGGGCGAAT SEQ ID NO:53	CCTGAAATGCAAATCTCTACAGG SEQ ID NO:54
HA1790	53	TCCCCAAACTTGCGGTAGGT SEQ ID NO:55	CATTACAACACAGCTCCTTCC SEQ ID NO:56
HA1040A	55	CCTGGAACCTGAACCGAGAAC SEQ ID NO:57	GCCGTGAACAGAGAGAGGA SEQ ID NO:58
HA0041	62	CTAGCAACCAACCTCATTG SEQ ID NO:59	GTCTCCTTCTCTTCTCGGC SEQ ID NO:60
EF	85		

[0130] 每个引物对对应于图上的一个标志物。使用这些引物来从定位群体的两个亲本（一个是早期开花的，另一个是正常开花的）扩增 DNA。它们中的每一个扩增了在两个亲本

之间有多态性的 DNA 片段。然后使用这些引物来扩增定位群体（自其构建图谱）的个体植物。

[0131] 基因效用。

[0132] 1) 可以使用基因来将较晚成熟的良种近交物基因转变成较早熟的等位基因系，用于需要较早成熟杂种的其它地理环境或培养实践。如此，一个有益的后果是为育种人员创建的扩展的遗传基础和多能性。表 6 结果显示了这种想法的效用。雌性和雄性近交物 H840A 和 CN2922R 是适应于中部至北部阿根廷的非常晚期成熟的品系，用于开发组 6-8 杂种。H535A 是用于生成晚熟杂种的组 6 雌性。H1063R 是中期成熟 (medium maturing) 的雄性，用于组 2-5 杂种开发。表 6 中提供了它们的 EM 基因转变的测交。特别值得注意的是，结果是通过 EM 2922R 测交显示的——6 种 EM 2922R 杂种中的 5 种构成组 2 杂种。结果显示了非常竞争性的结果，其中 ON3403A 测交针对正常组 2、3、4、和 5 检验。

[0133]

表15.来自2006年的早熟突变体和常规杂种比较。3处位置，6次重复。

名称	Fem Flr	Mal Flr	Hyb Flr	Hyb Mat	Ap (1-9)	Ht (in.)	Hlth (1-9)	H2O (%)	Yld (lb/ac)	Oil (%)	OPA (lb/ac)	18:1 (%)
8N510 (CN1703A / H1063R)	65	59	65	5	6	68	6	12.2	2625	46.4	1218	67.6
ON3403A / EM BC4 CN2922R	64	55	58	2	6	65	6	10.5	2618	46.0	1205	53.1
8H350DM (H251A / OND163R)	61	60	60	3	5	70	5	11.5	2538	46.7	1187	90.8
8N251 (H251A / CN1229R)	61	55	59	2	6	67	6	10.8	2478	51.2	1268	73.1
ON3403A / EM BC1 CN2922R	64	56	60	2	6	65	6	10.6	2371	46.1	1092	56.2
EM BC5 H840A / CN2922R	65	71	66	6	6	85	8	13.1	2327	39.4	918	19.4
EM BC5 H840A / HO207746R	65	57	63	5	6	76	8	12.8	2304	43.1	992	62.3
EM BC3 H535A / HOU98510R	57	63	58	3	6	62	6	11.1	2302	44.3	1020	72.4
8N453DM (CN2343A / OND163R)	65	60	61	4	6	65	6	11.9	2292	52.4	1202	73.4
EM BC5 H840A / EM BC4 CN2922R	65	55	61	4	7	73	7	11.5	2250	45.0	1012	19.8
H251A / EM BC4 CN2922R	61	56	57	2	6	56	5	10.4	2220	45.7	1014	67.0
EM BC3 H535A / CN1229R	57	71	57	3	5	61	6	10.9	2191	45.7	1000	27.7
EM BC3 H535A / OND163R	57	60	57	2	4	58	5	10.2	2119	48.7	1032	75.3
EM BC2 H535A / EM BC2 CN2922R	57	56	58	2	6	59	5	10.5	2108	43.4	916	26.1
H251A / EM BC1 CN2922R	61	56	57	2	5	53	5	10.9	2092	47.4	992	46.9
EM BC3 H535A / MOC0666R	57	65	59	3	6	64	8	11.6	1985	44.7	887	64.9
SF270 (C8283A / 687R)	58	59	58	2	5	54	5	10.8	1974	44.2	873	38.5
EM BC2 H535A / H1063R	57	59	58	2	4	63	6	10.8	1970	45.0	887	64.5
H535A / EM H1063R	68	46	56	2	4	53	5	10.6	1780	50.1	892	63.9
CN1703A / EM H1063R	65	46	56	2	5	42	5	10.4	1574	43.3	682	63.9
EM BC5 H840A / EM H1063R	65	46	56	2	4	58	6	10.8	1416	46.2	654	64.4
H840A / EM H1063R	85	46	57	3	4	60	5	11.6	1334	46.1	616	65.1
avg			59		5.6	62	5.6	11.2	2130	46.2	961	56.8
CV									20.6			

[0134] 2) 可以使用所述基因来生成由于短的生活史产生的超早期开花 / 成熟植物，用于遗传研究。H324B (参见表 11 的底部) 的 BC2F1 基因转变显示了这种潜力 (相对于其组 1 回归亲本 H324B 的 49 天在 38 天中 (in 38days) 开花)。

[0135] 3) 所述基因的多效性效果 (降低的生物量 (降低的叶冠层、高度) 但更高的收获指数) 使杂种有利于高密度群体改善产率和与正常的较晚成熟的杂种竞争。表 16 显示了这种想法。以每英亩 36,000 株植物种植的所有 EM H1063R 杂种出产高于以 18,000 ! 种植的同种杂种。所述 EM 杂种比 8N251 和 8N270 组 2 检验杂种显著更早地开花，而且具有更低的种子收获湿度。可以销售这些非常早熟的杂种，用于较晚种植日期或小麦后的复种 (double cropping)。会使用具有较高种植密度的较窄的行来进行额外的研究。

表16.以30英寸的行以每英亩18,000和36,000株种植的EM杂种和检验的性能结果。

名称	fem flr	FLR	MST	TW	YLD	OIL %	OPA	OLE
8N251-HPOP		56	24.8	27.6	1779	52.3	930	65.2
8N251		56	27.2	27.9	1778	52.3	930	65.2
ON3403A x EM H1063R-HPOP	64	48	19.8	28.5	1885	47.7	898	90.2
8N270		55	27.9	28.2	1978	44.2	874	81.6
8N270- HPOP		55	23.8	27	1955	44.2	864	81.6
CN3351A x EM H1063R-HPOP	62	47	15.4	27.5	1795	48.0	862	64.5
CN2343A x EM H1063R-HPOP	62	47	16.1	28.3	1829	44.5	813	63.9
H251A x EM H1063R-HPOP	61	45	13.9	25.5	1863	43.4	809	86.8
CN2343A x EM H1063R	62	47	21.5	30.5	1639	44.5	729	63.9
ON3403A x EM H1063R	64	48	20.4	26.4	1526	47.7	727	90.2
CN3351A x EM H1063R	62	47	19.4	27.9	1499	48.0	720	64.5
H251A x EM H1063R	61	45	17.8	26.6	1512	43.4	657	86.8
平均数		49.7	20.7	27.7	1753	46.7	818	75.4
CV					14.6			

[0136] 4) 基因可变为一种有力的工具以通过在回交过程期间保持杂合形式的早熟突变体基因来加速其它性状的渐渗。在下文的例子中,已经将所述EM基因向具有期望基因的供体亲本(由加下划线的基因型所标明)中进行了渐渗。回归亲本以粗体标示。

[0138] 开始: EE XX * ee xx

[0139] BC0 Ee Xx * ee xx

[0140] BC1 ee xx Ee xx Ee Xx * ee xx

[0141] BC2-BCn ee xx Ee xx Ee Xx * ee xx

[0142] BCnF2 自交至复原 ee XX

[0143] 图8中标示了另一种方案,其中预期基因称作“YFG”。如由图8所显示的,将Clearfield供体中的Clearfield基因(举例来说)与EM突变体亲本杂交,给出杂合EM/CL F1。可以将F1子代(用作CL性状的供体)与良种回归亲本杂交。在3个回交阶段的每个,然后使用分子标志将每次杂交的子代与回归亲本杂交(其中每次回交,从EM、CL和EM/CL子代选择EM/CL)以复原回归亲本。通过使用分子标志进行的第三次回交,可以复原回归亲本的大部分基因组,其会含有感兴趣的基因(Clearfield基因)。

[0144] 同样的结果可以使用视觉选择(没有分子标志)在5轮回交后实现。然而,分子标志和主题早熟基因大大地加速了周期。例如,每个周期可以减少例如20天。如此,例如,可以通过实施本发明来每年获得三至四个世代。

[0145] 总之,可以在“供体”与“回归”亲本之间进行杂交。然后,将F1和后续世代与回归亲本杂交(回交)。回交世代汇聚于单一基因型上。每个世代,“供体”亲本的遗传分布会减半(halved)。

[0146] 令人满意的回归亲本通常来自建立的栽培种。供体亲本通常提供期望的特征。有足够数目的回交来重建回归亲本。

[0147] 这些回交方法可以为育种人员提供高度的控制。可以预先描述要改善的性状。这些方法是可重复的。不需要广泛的田间试验。另外,对记笔记和记录保持的需要降低。

[0148] 5) 向日葵早期开花突变体基因的效用通过拓宽经济上卓越的遗传组合的适应性

来为其它作物中转基因开发的已知现有公开内容提供令人兴奋的可能性。关于其它植物物种中存在的类似的显性基因作用没有已知的现有公开内容。还可以将所述基因进一步定位和测序。还可以进行基因优化以进行别的转化。还可以开发 TaqMan 或侵入物测定法 (invader assay) 来帮助渐渗。

[0149] 实施例 9 :别的标志物的开发

[0150] 材料和方法

[0151] 在本实施例中汇总了用于标志物开发的策略,并在图 6 中进行描绘。为连锁群 5 (LG 5) 的下部端粒区选择和开发了标志物,并筛选了所述标志物在 MOC0666R x CNE418R 定位群体的亲本品系 MOC0666R 和 CNE418R 之间的多态性,所述 MOC0666R x CNE418R 定位群体先前用于定位早期开花 (EF) 突变基因。然后在 MOC0666R x CNE418R 定位群体中定位多态性标志物。对于在 MOC0666R 和 CNE418R 之间单态性的标志物,设计了引物以扩增其基因组基因座。将来自 MOC0666R 和 CNE418R 两者的扩增子克隆并测序以鉴定两种亲本品系之间的单核苷酸多态性 (SNP) (若有的话)。开发 TaqMan MGB 等位辨别测定法以定位鉴定的 SNP。采用 JoinMap 4.0 (Van Ooijen, 2004) 来定位新开发的标志物。

[0152] 结果

[0153] SSR 标志物开发

[0154] 对 3 种 SSR 标志物筛选 MOC0666R 与 CNE418R 之间的多态性 (表 17)。一种 SSR 标志物 (HA1805) 是多态性的,并且来自 MOC0666R 和 CNE418R 的扩增子分别是 240bp 和 235bp。相应地,使用下列 PCR 引物和反应条件用 HA1805 确定 MOC0666R x CNE418R 定位群体的基因型。在 ABI 3730 测序仪上解析 PCR 产物。

[0155] HA1805 正向引物 :5' -6FAM-GAAGTTGGGAGGGTTGTTCAAG-3'

[0156] (SEQ ID NO :61)

[0157] HA1805 反向引物 :5' -CCTCCTGTTGGAACACCAAAT-3' (SEQ ID NO :62)

[0158] PCR 成分 :

[0159] 4ng gDNA

[0160] 1 X PCR 缓冲液 (Qiagen, Valencia, California)

[0161] 0.25 μ M 正向引物

[0162] 0.25 μ M 反向引物

[0163] 1mM $MgCl_2$

[0164] 0.1mM 的每种 dNTP

[0165] 0.4% PVP

[0166] 0.04 个单位 HotStar Taq DNA 聚合酶 (Qiagen, Valencia, California)

[0167] 总体积 :4.8 μ l

[0168] 热循环仪设置 :

[0169] 步骤 1 :94°C 达 12 分钟

[0170] 步骤 2 :94°C 达 30 秒

[0171] 步骤 3 :55°C 达 30 秒

[0172] 步骤 4 :72°C 达 30 秒

[0173] 步骤 5 :重复步骤 2、3 和 4 达 35 个循环

[0174] 步骤 6 :72℃达 30 分钟

[0175] SNP 标志物开发

[0176] 使用 5 对引物来从 MOC0666R 和 CNE418R 两者扩增 5 处基因组基因座以开发 SNP 标志物（表 17）。

[0177]

表17: 所测试的标志物。

F名称	序列	R名称	序列	注释
1) SSR				
HA1659F-NED	GGTCTTTTGTAGAGGCGTGAT (SEQ ID NO: 68)	HA1659R	CGTTTCCCATTTACATCATCTT (SEQ ID NO: 70)	
HA1805F-FAM	GAAGTTGGGAGGTTGTTC AAG (SEQ ID NO: 61)	HA1805R	CCTCCTGTTGGAACACCAAAT (SEQ ID NO: 62)	多态的
ZVG24ssrF-FAM	AAGCTTTGATCCGGGTTTCT (SEQ ID NO: 69)	ZVG24ssrR	GCCTTTCTTCCCGCA (SEQ ID NO: 71)	
2) SNP				
ZVG23snpF	CTGAATTGGAACACGAGCAA (SEQ ID NO: 72)	ZVG23snpR	TCTCCAGCCTTCAGCGTTAT (SEQ ID NO: 77)	单态的
ZVG24snpF	TGAGTCTTACGTGGCAAACG (SEQ ID NO: 73)	ZVG24snpR	TGTCGCACAGGAAGTTTGAG (SEQ ID NO: 78)	单态的
HT120F	TACAAAGAAAGAGGGCGAGA (SEQ ID NO: 74)	HT120R	AACATAAGAAAACCATATTCAAATCA (SEQ ID NO: 79)	SNP
HT137F	TCCGTCTGGACTCAAAACTC (SEQ ID NO: 75)	HT137R	CCAGAAAGCACTCAAGAGGA (SEQ ID NO: 80)	SNP
HT151F	GTACGTCAACGATGCATTG (SEQ ID NO: 76)	HT151R	TATCATTCCTCCACCGAGAA (SEQ ID NO: 81)	单态的

[0178] 基于来自限制性片段长度多态性 (RFLP) 探针 ZVG23 和 ZVG24 的序列 (Kolkman 等 2007) 设计了两个引物对 (ZVG23snpF/R 和 ZVG24snpF/R)。HT120F/R、HT137F/R、和 HT151F/R

R 的引物序列来自 Lai 等 (2005)。在来自 HT120F/R 和 HT137F/R 的扩增子中找到了 SNP。为 HT120F/R 扩增子中的一个 SNP 基因座开发了 TaqMan MGB 等位基因辨别测定法 (参见下文), 并使用此测定法来确定 MOC0666R x CNE418R 定位群体的基因型。

[0179] 来自 MOC0666R/CNE418R 的 HT120F/R 扩增子中有两个 SNP 基因座 (加下划线)。

[0180] TACAAAGAAAGAGGGCGAGAATTGCGGATAAAAAGAAAAGAATTGCGAAGGCGAAATCCGAGGCY(T/C)GCAGAGTATCAGAACTTCTTGCTACGAGATTGAAGGAACAGAGAGAAAAGGCGGAGCGAR(A/G)AGCTTAGCAAAGAAAAGGTCGAGACTTTCTGCTGCTTCGAAACCTTCTATTGCAGCATAAGTTAACAAGTTTTTCAGGGTAATTTTCAATAATGATTTGAATATGGTTTTCTTATGTT (SEQ ID NO :63 (野生型, 其中 Y = T 且 R = A) 和 SEQ ID NO :82 (早熟突变体, 其中 Y = C 且 R = G))

[0181] 为 R 基因座开发了 TaqMan 测定法, 并且将所述 SNPO 标志物称作 DAS HA SNP 2008。使用下列序列, 如指明的:

[0182] 5' -ACGAGATTGAAGGAACAGAGAGAAA-3' (正向引物 (SEQ ID NO :64),

[0183] 5' -GCAGCAGAAAGTCTCGACCTTT-3' (反向引物 (SEQ ID NO :65),

[0184] 5' -6FAM-CGGAGCGAGAGCT-3' (探针 1 ;SEQ ID NO :66), 和

[0185] 5' -VIC-AGCGAAAGCTTAGC-3' (探针 2 ;SEQ ID NO :67)。

[0186] 实时 PCR 成分:

[0187] 25ng gDNA

[0188] 1X Taqman Universal PCR Master Mix

[0189] 22.5 μ M 正向引物

[0190] 22.5 μ M 反向引物

[0191] 5 μ M 探针 1

[0192] 5 μ M 探针 2

[0193] 总体积: 25 μ l

[0194] Bio-Rad iCycler 设置:

[0195] 步骤 1 :95°C 达 15 分钟

[0196] 步骤 2 :94°C 达 30 秒

[0197] 步骤 3 :60°C 达 1 分钟

[0198] 步骤 4 :重复步骤 2 和 3 达 65 个循环

[0199] 步骤 5 :4°C 长时间

[0200] 定位新的标志物

[0201] 使用 JoinMap 4.0 (Van Ooijen, 2006) 来定位 HA1805 和 DAS HA SNP 2008 (图 7)。HA1805 和 DAS HA SNP 2008 两者均与 EF 突变型基因紧密连锁, 分别在 EF 突变型基因下部 1.4 和 1.8cM。这两种标志物是优质的、共显性标志物, 其可以容易地用于例如在育种程序中促进选择早期开花。

[0202] 实施例 9 的参考文献:

[0203] Kolkman, J. M., S. T. Berry, A. J. Leon, M. B. Slabaugh, S. Tang, W. Gao, D. K. Shintani, J. M. Burke 和 S. J. Knapp. 2007. Single nucleotide polymorphisms and linkage disequilibrium in sunflower. *Genetics* 177 :457-468.

[0204] Lai, Z., K. Livingstone, Y. Zou, S. A. Church, S. J. Knapp, J. Andrews, and

L. H. Rieseberg. 2005. Theor Appl Genet 111 :1532-1544.

[0205] Van Ooijen, J. W. 2006. JoinMap 4.0, Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.

[0001]

序列表

<110> 陶氏益农公司(DOW AGROSCIENCES LLC)

<120> 向日葵中的显性早熟性突变和基因

<130> DAS-128

<160> 82

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 向日葵(Helianthus annuus)

<400> 1

aaatccacaa ggatgctcaa tc

22

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> 向日葵

<400> 2

ggagatcata caaagcgta tcgt

24

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> 向日葵

<400> 3

tttcgtgatg gtgattgatg att

23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> 向日葵

<400> 4

cagcaactct gaccgtttca tta

23

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> 向日葵

<400> 5

cattgaggac gagaagccag t

21

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 向日葵

<400> 6

gttccgtacc ctgtttgagc tt

22

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> 向日葵

<400> 7

tgttcacagc tcccgtctaa

20

<210> 8

<211> 21

[0002]

<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 8	
cacacacaca acaacctgac c	21
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 9	
gccgtgaata atgggattga	20
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 10	
gattgggtca gcttgtgtga	20
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 11	
ccctggagtg tatgtccgtt a	21
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 12	
atccgtctgc tgcctaattcc	20
<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 13	
tgaaacgtag taacctgcc a	22
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 14	
ttggacgacc tcggtatctt	20
<210> 15	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 15	
tttcgtgatg gtgattgatg att	23
<210> 16	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 16	
cagcaactct gaccgtttca tta	23

[0003]

<210> 17	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 17	
cttattccaa ggacgcatag tcg	23
<210> 18	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 18	
cgatggtatg attctcgacg tta	23
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 19	
atttcaccct cactcccaca c	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 20	
taccggtgg atatggagaa t	21
<210> 21	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 21	
gggaagtggg ctgtctatg tat	23
<210> 22	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 22	
aacacaccga aatcacctat gaa	23
<210> 23	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 23	
agaggaaatga gatcggttg at	22
<210> 24	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 24	
gtgggacaac tcagcaacgt c	21
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	

[0004]

<213>	向日葵	
<400>	25	
	gaacatggcc ataactcata gacg	24
<210>	26	
<211>	16	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	26	
	ccttcgaccc aacatc	16
<210>	27	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	27	
	acgcacatga gagagaaaga g	21
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	28	
	accttcgacc caacatcaag	20
<210>	29	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	29	
	atttgttcct gglttcggtat cc	22
<210>	30	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	30	
	catgtctgat cttcgggact tc	22
<210>	31	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	31	
	ctcacgaaac tcttcatgct g	21
<210>	32	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	32	
	ctctcacact tactgaac	18
<210>	33	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	33	
	cctaagggga tgaattctct ttc	23

[0005]

<210>	34	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	34	
	aacttccaat gttctccaac cat	23
<210>	35	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	35	
	ttgtcttcat ctgcgtgtga	20
<210>	36	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	36	
	ttgctgttgt tgatcggtgt	20
<210>	37	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	37	
	gtgcgttggc tcttatgat	20
<210>	38	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	38	
	agtgatggca ttccaattt	20
<210>	39	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	39	
	gtgatccgag ttgtggatgt tc	22
<210>	40	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	40	
	gtagatggc aaccaagt at	22
<210>	41	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	
<400>	41	
	ggtgatgatg gaggagcaac tg	22
<210>	42	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	向日葵	

[0006]

<400> 42 cactcaacca ttgttctccc ac	22
<210> 43 <211> 22 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 43 gaactccggt tagtcttccg ac	22
<210> 44 <211> 24 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 44 gcaattaagt ctgcgtttca gttt	24
<210> 45 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 45 catgaacatc gccaatcag	20
<210> 46 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 46 tgcaaggaac catcagaatc	20
<210> 47 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 47 ttgtcatgta tgggctttgg	20
<210> 48 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 48 atccaacagg tgtgcggaat	20
<210> 49 <211> 21 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 49 cacttcattcc tctccctcct t	21
<210> 50 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 50 ggcgtgtgtg ttgggttatt	20

[0007]

<210> 51
<211> 21
<212> DNA
<213> 向日葵

<400> 51
acacgagtcc caacctgaat g

21

<210> 52
<211> 24
<212> DNA
<213> 向日葵

<400> 52
acctgaaatg caaatctcta cagg

24

<210> 53
<211> 22
<212> DNA
<213> 向日葵

<400> 53
taggcaataa ctttgggcga at

22

<210> 54
<211> 23
<212> DNA
<213> 向日葵

<400> 54
cctgaaatgc aaatctctac agg

23

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> 向日葵

<400> 55
tccccaaact tgcgtgtagg t

21

<210> 56
<211> 23
<212> DNA
<213> 向日葵

<400> 56
cattacaaac cacagtcct tcc

23

<210> 57
<211> 20
<212> DNA
<213> 向日葵

<400> 57
cctggaactg aaccgagaac

20

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> 向日葵

<400> 58
gccgtgaaac agagagagga

20

<210> 59
<211> 19
<212> DNA
<213> 向日葵

[0008]

<400> 59 ctagcaacca acctcattg	19
<210> 60 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 60 gtctccttct ctttctcggc	20
<210> 61 <211> 22 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 61 gaagttggga gggttggtca ag	22
<210> 62 <211> 21 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 62 cctcctgttg gaacaccaa t	21
<210> 63 <211> 240 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 63 tacaagaaa gagggcgaga attgctgata aaaagaaaag aattgcgaag gcgaaatccg	60
aggctgcaga gtatcagaaa cttcttgcta cgagattgaa ggaacagaga gaaaggcgga	120
gcgaaagctt agcaaagaaa aggtcgagac tttctgctgc ttcgaaacct tctattgcag	180
cataagttaa caagttttca gggtaatctt acaatgattt gaatatggtt ttcttatgtt	240
<210> 64 <211> 25 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 64 acgagattga aggaacagag agaaa	25
<210> 65 <211> 22 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 65 gcagcagaaa gtctcgacct tt	22
<210> 66 <211> 13 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 66 cggagcgaga gct	13
<210> 67 <211> 14 <212> DNA <213> 向日葵	

[0009]

<400> 67 agcgaaagct tagc	14
<210> 68 <211> 23 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 68 ggtcttttgt ttagaggcgt gat	23
<210> 69 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 69 aagctttgat ccgggtttct	20
<210> 70 <211> 23 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 71 cgtttcccca ttacatcat ctt	23
<210> 71 <211> 16 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 71 gcctttcttc ccagca	16
<210> 72 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 72 ctgaattcga acacgagcaa	20
<210> 73 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 73 tgagtcttac gtggcaaacg	20
<210> 74 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 74 tacaaagaaa gagggcgaga	20
<210> 75 <211> 20 <212> DNA <213> 向日葵	
<400> 75 tccgtctgga ctcaaaactc	20

[0010]

<210> 76	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 76	
gtacgtcaac gatgcatttg	20
<210> 77	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 77	
tctccagcct tcagcgttat	20
<210> 78	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 78	
tgtcgcacag gaagtttgag	20
<210> 79	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 79	
aacataagaa aaccatattc aaatca	26
<210> 80	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 80	
ccagaagcac ttcaagagga	20
<210> 81	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 81	
tatcattcct ccaccgagaa	20
<210> 82	
<211> 240	
<212> DNA	
<213> 向日葵	
<400> 82	
tacaaagaaa gagggcgaga attgcggata aaaagaaaag aattgcgaag gcgaaatccg	60
aggccgcaga gtatcagaaa cttcttgcta cgagattgaa ggaacagaga gaaaggcgga	120
gcgagagctt agcaaagaaa aggtcgagac tttctgctgc ttcgaaacct tctattgcag	180
cataagttaa caagttttca gggttaatttc acaatgattt gaatatgggtt ttcttatggt	240

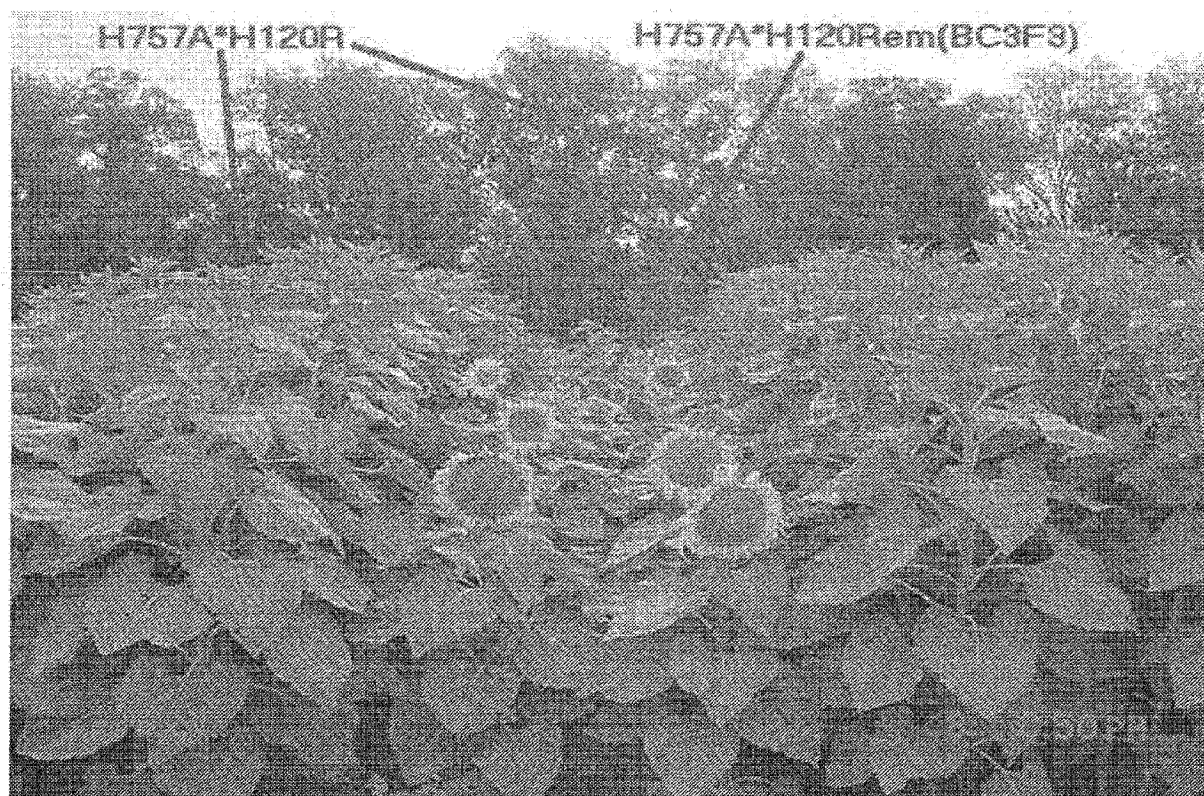


图 1

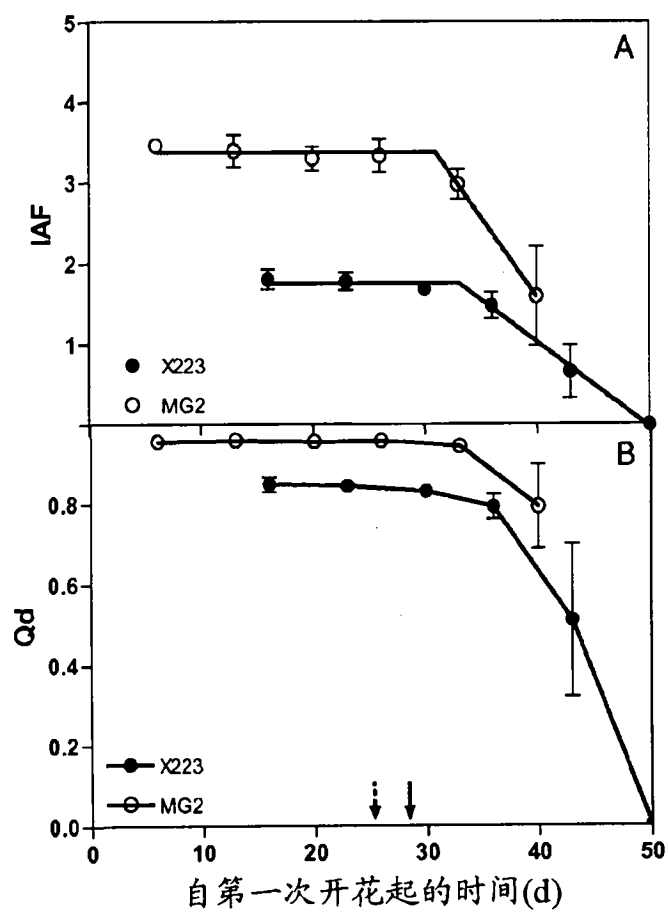


图 2

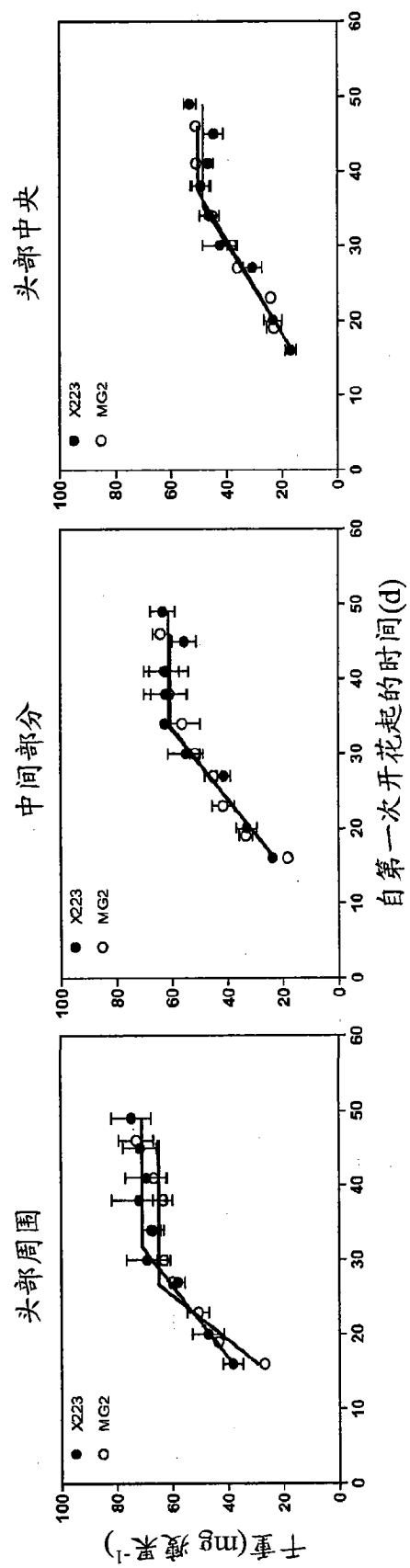


图 3

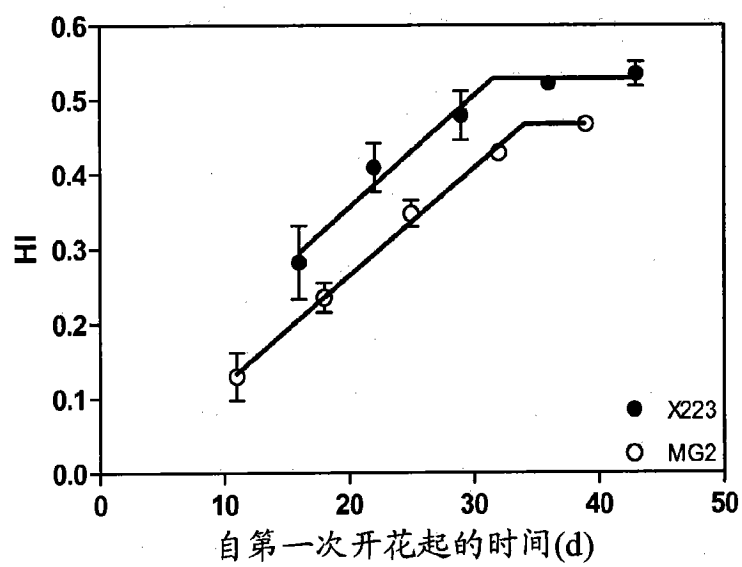


图 4

早期开花

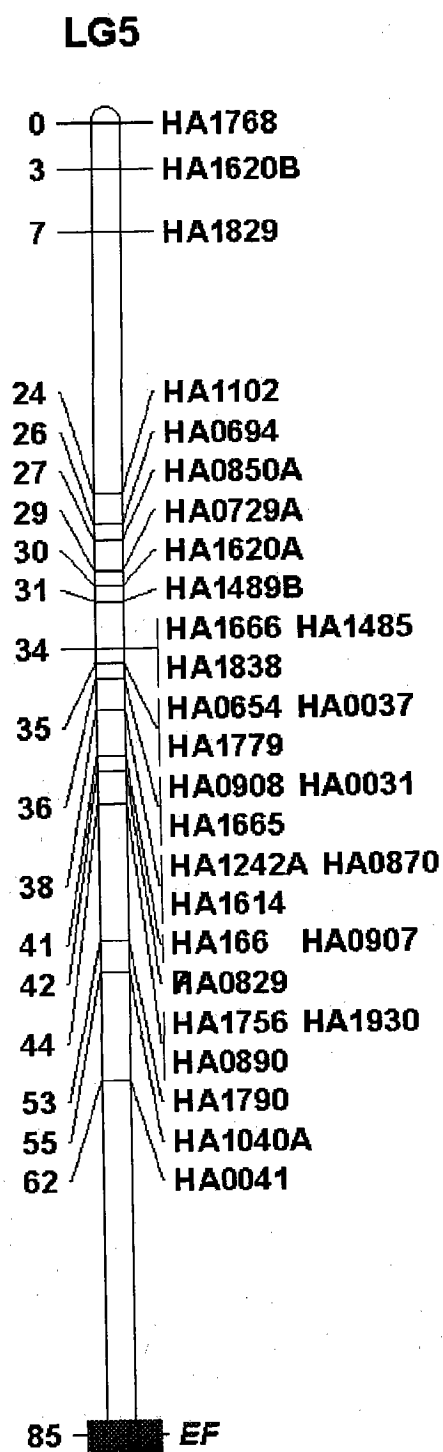


图 5

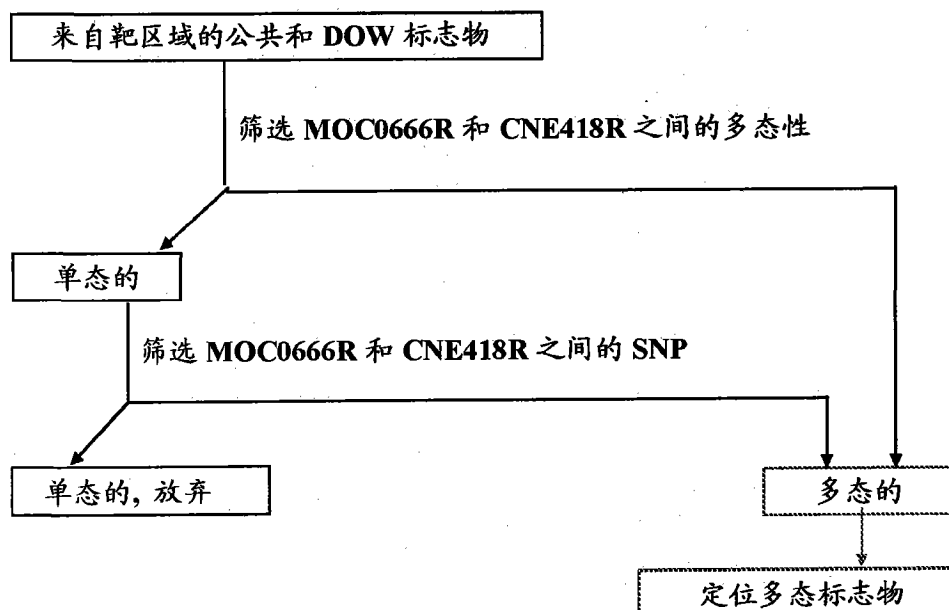


图 6 :标志物开发策略

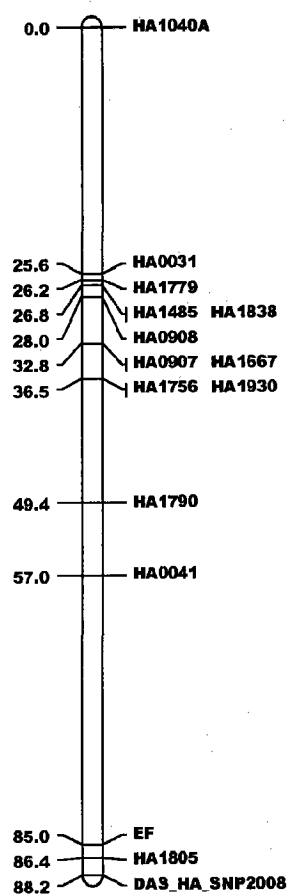


图 7:与早期开花 (EF) 突变基因紧密连锁的标志物 HA1805 和 DAS_HA_SNP2008

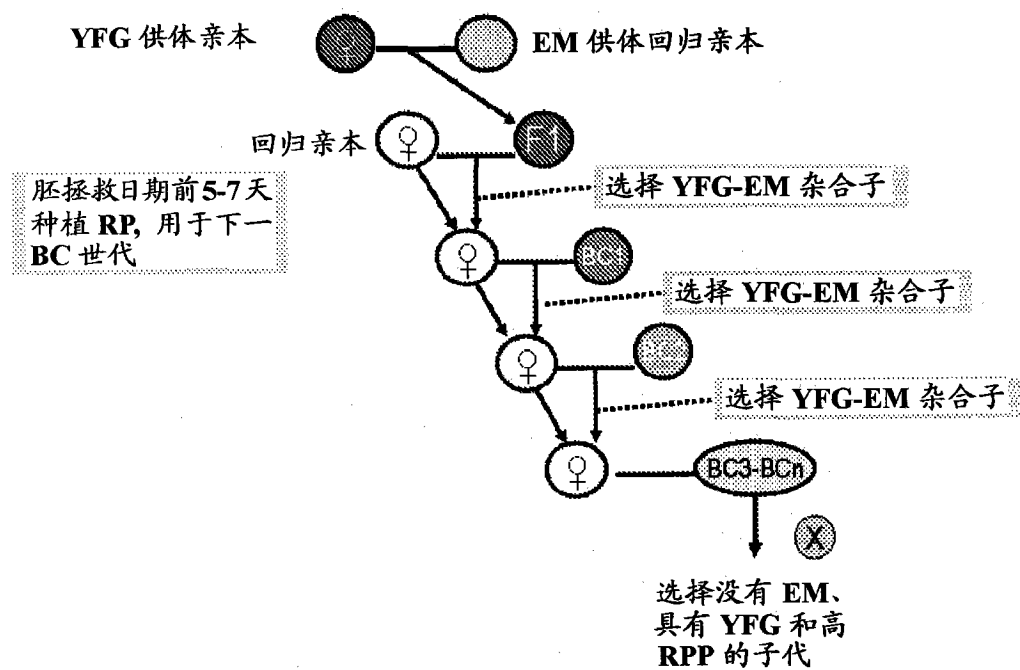


图 8