



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 99802627.1

[45] 授权公告日 2004 年 7 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1158391C

[22] 申请日 1999.2.18 [21] 申请号 99802627.1
[30] 优先权
[32] 1998.2.20 [33] US [31] 09/026,601
[86] 国际申请 PCT/EP1999/001058 1999.2.18
[87] 国际公布 WO1999/042609 英 1999.8.26
[85] 进入国家阶段日期 2000.8.2
[71] 专利权人 辛根塔参与股份公司
地址 瑞士巴塞尔
[72] 发明人 J·J·贝克
审查员 姜 涛

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 32 页

[54] 发明名称 用聚合酶链式反应检测小麦和大麦
的真菌病原体

[57] 摘要

本发明描述了来自小麦真菌病原体(包括偃麦草核腔菌和圆核腔菌)的种和株的核糖体 RNA 基因区域的内部转录间隔(ITS)DNA 序列。鉴定了来自这些序列之中的在利用基于 PCR 的技术检测真菌分离株中有用的特异性引物。

1. 一种用于真菌内部转录间隔 DNA 序列的基于扩增的检测之寡核苷酸引物，其中该引物选自 SEQ ID No:7-28。

2. 一对用于真菌内部转录间隔 DNA 序列的基于扩增的检测之寡核苷酸引物，其中至少一种所述寡核苷酸引物对中的寡核苷酸引物是权利要求 1 的寡核苷酸引物。

3. 依照权利要求 2 的一对寡核苷酸引物，其中该引物对选自如下引物对：

SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:9;
SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:15;
SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:14;
SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:9;
SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:4;
SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:20;
SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:26;
SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:19; 及
SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28。

4. 依照权利要求 3 的一对寡核苷酸引物，其中该引物对选自如下引物对：

SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:9;
SEQ ID NO:11 和 SEQ ID NO:15;

SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:14;
SEQ ID NO:17 和 SEQ ID NO:20;
SEQ ID NO:18 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:10 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:26;
SEQ ID NO:23 和 SEQ ID NO:19;
SEQ ID NO:24 和 SEQ ID NO:19; 及
SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28。

5. 依照权利要求 3 的一对寡核苷酸引物, 其中该引物对是下引物对:

SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:9; 或
SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:19。

6. 依照权利要求 3 的一对寡核苷酸引物, 其中该引物对是:
SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:4。

7. 一种检测真菌病原体的方法, 包括:

(a) 从感染真菌病原体的植物叶子中分离 DNA;
(b) 用依照权利要求 1 中的至少一对寡核苷酸引物将所述 DNA 进行聚合酶链式反应; 及

(c) 通过观察所述聚合酶链式反应的扩增产物, 检测真菌病原体。

8. 权利要求 7 的方法, 其中检测的真菌病原体是偃麦草核腔菌。

9. 权利要求 7 的方法, 其中检测的真菌病原体是偃麦草核腔菌或圆核腔菌。

10. 权利要求 7 的方法, 其中检测的真菌病原体是偃麦草核腔菌或 *Drechslera sorokiniana*。

11. 一种检测真菌病原体的方法, 包括:

(a)从感染真菌病原体的植物叶子中分离 DNA;

(b)用依照权利要求 2 的一对寡核苷酸引物将所述 DNA 进行聚合酶链式反应; 及

(c)通过观察聚合酶链式反应的扩增产物, 检测真菌病原体。

12. 权利要求 11 的方法, 其中步骤 b)中使用的寡核苷酸引物对依据权利要求 4, 且检测的真菌病原体是偃麦草核腔菌。

13. 权利要求 11 的方法, 其中步骤 b)中使用的寡核苷酸引物对依据权利要求 5, 且检测的真菌病原体是偃麦草核腔菌和/或圆核腔菌。

14. 权利要求 11 的方法, 其中步骤 b)中使用的寡核苷酸引物对依据权利要求 6, 且检测的真菌病原体是偃麦草核腔菌和/或 *Drechslera sorokiniana*。

15. 一种检测选自偃麦草核腔菌、圆核腔菌和 *Drechslera sorokiniana* 的一种或多种真菌病原体的方法, 包括:

(a)设计至少一种标记的多核苷酸探针, 包括

i)具有与偃麦草核腔菌核糖体 RNA 之内部转录间隔区的至少 10 个连续核苷酸互补的序列之核酸区域,

ii)一种标记部分, 含有当所述探针与另一核酸分子杂交时提供信号的标记,或该标记的结合位点;

(b)从感染真菌病原体的植物组织中分离 DNA;

(c)将 b)的 DNA 与 a)的探针杂交; 及

(d)通过检测标记检测在感染的植物组织中存在的真菌病原体偃麦草核腔菌、圆核腔菌和/或 *Drechslera sorokiniana*, 其中标记的检测显示发生了 c)的杂交。

16. 检测真菌病原体的检测试剂盒, 含有至少一个权利要求 1 的引物。

用聚合酶链式反应检测小麦和大麦的真菌病原体

本发明涉及引物在聚合酶链式反应测定法中的用途，用以检测小麦和大麦真菌病原体。使用这些引物能够检测真菌病原体的特定分离株，并监测植物种群的疾病发生。

每年植物病害所造成的农作物大量减产，不仅使农场主遭受经济损失，而且，在世界许多地方也会造成当地人口的营养供应不足。杀真菌剂的广泛使用为抵抗植物病原体的侵袭提供了相当的安全性。可是，尽管在杀真菌剂上的花费达一百万美元，1981年，世界范围内农作物减产量仍达到农作物产值的大约10%(James, 1981; 种子科学和技术 (Seed Sci. & Technol., 9: 679-685)。

疾病破坏过程的严重性依赖于病原体的进攻性和宿主的反应。大多数植物培育计划的目的之一是增强宿主植物对疾病的抵抗力。一般地，不同品种的病原体与同种作物的不同品种之相互作用不同，许多来源的宿主抵抗力仅对抗特殊的病原体品种。此外，一些病原体品种表现出疾病症状的早期征象，但对农作物几乎不造成危害。Jones 和 Clifford (1983; 谷类病害 (Cereal Disease), John Wiley) 报道，预期病原体的毒性形式应答引入到宿主栽培品种中的抵抗力在病原体种群中出现，因此有必要监测病原体种群。另外，有几例报道抵抗特定杀真菌剂的真菌菌株的进化。早在1981年，Fletcher 和 Wolfe (1981; Proc, 1981 Brit.Crop Prot.Conf.) 提出，24%的春大麦禾白粉种群和53%的冬大麦白粉病种群在应答杀真菌剂三唑醇上显示出很大的差异，这些种群在不同品种中分布不同，在大多数易感的品种中也产生高发生率的不易感类型。类似的真菌对杀真菌剂的敏感性有变异的情况也有报道，仅举几个例子：小麦白粉病菌（对抗三唑醇），葡萄孢属 (Botrytis)（对抗苯菌灵），核腔菌属 (Pyrenophora)（对抗 organomercury），Pseudocercospora (对抗 MBC-型的杀真菌剂)

以及针对三唑的 *Mycosphaerella fijiensis* (Jones 和 Clifford: 谷类疾病, John Wiley, 1983) 。

小麦是当前国际市场最重要的农业商品, 占世界可耕地的大约 20%(1977; 小麦疾病概略(Compendium of Wheat Diseases), Amer. Phytopath.Soc. 第 1 页)。世界小麦供给的 80% 生长在北美洲、欧洲、中国和苏联。每年由于疾病全世界小麦产量损失大约 20%。

偃麦草核腔菌(*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.) (syn. 毛嘴核腔菌 (*P.trichostoma* (Fr.) Fckl))、无性型的偃麦草德氏霉菌 (*Drechslera tritici-repentis*, (Died.) Shoem) (syn. 偃麦草长蠕孢菌 (*Helminthosporium tritici-repentis* Died.))造成全世界的小麦黄褐斑(也称黄斑) (1977; 小麦疾病概略, Amer. Phytopath.Soc, 42 页)。在澳大利亚、南美洲和北美洲, 此病害造成的小麦减产达 3%-50%, 目前被认为是北达科他州最重要的小麦叶子疾病(Zhang 等, 1997, 植物病理学 (Phytopathology), 87 卷: 154-160)。它还可造成叶斑与其它叶子病原体的混合感染。当前的疾病控制措施包括使用杀真菌剂, 以及如下栽培实践: 破坏小麦茬、用无病原体的种子和宽行播种植物以减少叶子密度和小麦株冠的相对湿度。

圆核腔菌 (*Pyrenophora teres* Drechs.)、无性型 *Drechslera teres*(Sacc.) Shoem.(syn. 大麦网斑长蠕孢 (*Helminthosporium teres* Sacc.))主要在大麦中引起大麦网斑病; 然而, 小麦中也有散发的感染发生(Jones 和 Clifford; 谷类病害, John Wiley, 1983)。由于大麦网斑病造成的产量降低一般在 10-40%之间。在含有易感栽培品种的农田中产量降低可达 100%。(1982; 大麦疾病概略 (Compendium of Barley Diseases), Amer.Phytopath.Soc, 22 页)。除了影响谷物的全面产量和重量外, 此疾病还降低糖含量, 这就减少了麦芽浸膏产量, 并由此降低谷类的酿造品质。

由上述看来, 真正有必要开发一项能在感染过程早期鉴别特殊的病原体真菌品种的技术。在疾病症状变得明显之前, 通过鉴定农作物种群地段的病原体的特异品种, 农业学家就可以评估已鉴别过的农作

物品种中病原体进一步发育可能带来的后果，如果认为有必要使用的话，可选择一种合适的杀真菌剂。

基于上述，本发明的主要目的是提供一种在感染过程早期鉴别病原体真菌特异品种的方法。因此，本发明提供了在不同的真菌致病型中有变异的内部转录间隔(ITS)DNA 序列，此 DNA 序列在发明的方法中是有用的，可以用它们获得基于聚合酶链式反应 (PCR) 的诊断方法的引物。这些引物在 PCR 反应后产生独特条带，其中 DNA 模板来自特定真菌致病型，并由此用来鉴别在疾病症状出现之前宿主植物中特定真菌致病型是否存在。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了用于真菌病原体偃麦草核腔菌的新的 ITS1 和 ITS2 DNA 序列。在另一个优选实施方案中，本发明提供了用于检测偃麦草核腔菌的衍生于 ITS 的诊断引物。在另外的优选实施方案中，本发明提供了新的衍生于 ITS 的诊断引物，其不仅可用于偃麦草核腔菌的诊断，而且令人惊讶的是，还可诊断圆核腔菌和 *Drechslera sorokiniana*。因此本发明是针对鉴别植物病原体真菌，尤其是那些引起小麦黄褐斑的真菌的不同致病型，这样一种长期以来始终需求但未能满足的需求。

本发明为评估特定农作物品种和病原体株之间关系的潜在危害，以及对正确判断使用多种可利用的杀真菌剂武器提供了可能性。另外，本发明可用于对扩大的地理区域中特定病原体品种的发生和传播提供详细信息。本发明提供一种尤其适用于长潜伏期疾病的检测方法。

也提供了可用于实施本发明的试剂盒。此试剂盒对鉴定真菌病原体偃麦草核腔菌尤其有用。

特别是，本发明提供了分离自真菌病原体核糖体 RNA 基因区域的 DNA 分子，其中该 DNA 分子是偃麦草核腔菌的 IST1 或 IST2。本发明还提供了检测偃麦草核腔菌的方法，包括：

- (a) 确定偃麦草核腔菌的 ITS1 或 ITS2 的核苷酸序列；
- (b) 设计至少一种 PCR 引物，其与 (a) 中确定的核苷酸序列的至少 10 个核苷酸有序列相同性；

- (c) 从感染偃麦草核腔菌的植物组织中分离 DNA;
- (d) 用 (b) 的一种或多种引物将 (c) 中的 DNA 进行聚合酶链式反应扩增; 及
- (e) 通过观察 (d) 中聚合酶链式反应的扩增产物检测偃麦草核腔菌。

在一个优选的实施方案中, 本发明提供了分离自偃麦草核腔菌核糖体 RNA 基因区域的内部转录间隔序列, 其中该内部转录间隔序列选自: SEQ ID NO: 29 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 29 的 366-526 核苷酸; SEQ ID NO: 30 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 30 的 366-526 核苷酸; SEQ ID NO: 31 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 31 的 366-526 核苷酸; SEQ ID NO: 32 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 32 的 366-526 核苷酸; SEQ ID NO: 33 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 33 的 366-526 核苷酸; SEQ ID NO: 34 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 34 的 366-526 核苷酸; SEQ ID NO: 35 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 35 的 366-527 核苷酸; SEQ ID NO: 36 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 36 的 366-526 核苷酸; SEQ ID NO: 37 的 31-209 核苷酸; SEQ ID NO: 37 的 367-527 核苷酸; SEQ ID NO: 38 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 38 的 366-526 核苷酸; SEQ ID NO: 39 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 39 的 368-534 核苷酸; SEQ ID NO: 40 的 31-208 核苷酸; SEQ ID NO: 40 的 366-527 核苷酸。

本发明还提供了一种用于基于扩增检测真菌内部转录间隔 DNA 序列的寡核苷酸引物, 其中该引物与发明中的内部转录间隔序列至少 10 个连续的核苷酸有序列相同性。本发明还提供了用于基于扩增检测真菌内部转录间隔 DNA 序列的一对寡核苷酸引物, 其中至少一种所述引物是与本发明中的内部转录间隔序列至少 10 个连续的核苷酸有序列相同性的寡核苷酸引物。本发明另外还提供了一种用于检测真菌病原体的诊断试剂盒, 包含至少一种与本发明中的内部转录间隔序列至少 10 个连续的核苷酸有序列相同性的引物。

依照另外的实施方案, 本发明提供了一种用于检测真菌病原体的

方法，包括：

- (a) 从感染真菌病原体的植物叶子中分离 DNA；
- (b) 用至少一种本发明的引物将所述 DNA 进行聚合酶链式反应扩增；及
- (c) 通过观察所述聚合酶链式反应扩增的产物检测所述的真菌病原体。

在发明这种方法的一个实施方案中，真菌病原体是偃麦草核腔菌。在本发明这种方法的另一个实施方案中，真菌病原体是圆核腔菌。在本发明这种方法的另外一个实施方案中，真菌病原体是 *Drechslera sorokiniana*。

本发明还提供了一种用于检测偃麦草核腔菌的方法，包括：

- (a) 设计至少一种 PCR 引物，其与本发明所述的内部转录间隔序列的至少 10 个连续的核苷酸序列有序列相同性。
- (b) 从感染偃麦草核腔菌的植物组织中分离 DNA；
- (c) 用 (a) 中的一种或多种引物将 (b) 中的 DNA 进行聚合酶链式反应扩增；及
- (d) 通过观察 (c) 中聚合酶链式反应的扩增产物检测偃麦草核腔菌。

本发明还另外提供了一种用于检测偃麦草核腔菌的方法，包括：

- (a) 设计至少一种多聚核苷酸标记探针，包括：
 - (i) 一种具有与本发明内部转录间隔区的至少 10 个连续的核苷酸序列互补的序列之核酸区域，及
 - (ii) 一种标记部分，其包含当该探针与另外的核酸分子杂交时提供信号的一种标记，或是该标记的一种结合位点；
- (b) 从感染偃麦草核腔菌的植物组织中分离 DNA；
- (c) 将 (b) 中的 DNA 与 (a) 中的探针进行杂交；以及
- (d) 通过检测标记来检测偃麦草核腔菌，其中检测到标记表明 (c) 中所述的杂交已发生。

在另一种实施方案中，本发明涉及用于基于扩增检测真菌内部转录间隔区 DNA 序列的寡核苷酸引物，其中该引物选自 SEQ ID No:7-

28. 优选的, 本发明提供了一对用于基于扩增检测真菌内部转录间隔区 DNA 序列的寡核苷酸引物, 其中至少一种所述引物选自 SEQ ID No:7-28。在一个特别优选的实施方案中, 引物对选自如下引物: SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 28。在一个优选实施的方案中, 寡核苷酸引物对是 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 9 或者 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 19。在另一个优选实施方案中, 寡核苷酸引物对是 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 4。

本发明也提供了一种用于检测偃麦草核腔菌的方法, 包括:

- (a) 从感染偃麦草核腔菌的植物叶子中分离 DNA;
- (b) 用上述的 DNA 作为模板用聚合酶链式反应扩增偃麦草核腔菌的内部转录间隔序列的一部分, 所用的一对寡核苷酸引物对选自: SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 20; SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 13 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 26; SEQ ID NO: 23 和 SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 19; 以及 SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 28; 以及
- (c) 通过观察扩增的内部转录间隔序列的一部分检测偃麦草核腔菌。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种用于检测圆核腔菌的方法，包括：

- (a)从感染圆核腔菌的植物叶子中分离 DNA；
- (b)用该 DNA 作为模板，用聚合酶链式反应扩增圆核腔菌的内部转录间隔序列的一部分，使用的一对寡核苷酸引物是 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 9 或者 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 19；及
- (c)通过观察扩增的内部转录间隔区的一部分检测圆核腔菌。

在另外的一个实施方案中，本发明提供了一种用于检测 *Drechslera sorokiniana* 的方法，包括：

- (a)从感染 *Drechslera sorokiniana* 的植物叶子中分离 DNA；
- (b)用上述 DNA 作为模板，用聚合酶链式反应扩增 *Drechslera sorokiniana* 的内部转录间隔序列的一部分，使用的一对寡核苷酸引物是 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 4；及
- (c)通过观察扩增的内部转录间隔区的一部分检测 *Drechslera sorokiniana*。

下面是序列表中所列序列的简要说明（“nt's”=序列中的核苷酸编号）：

- SEQ ID NO: 1 – 寡核苷酸引物 ITS1。
- SEQ ID NO: 2 – 寡核苷酸引物 ITS2。
- SEQ ID NO: 3 – 寡核苷酸引物 ITS3。
- SEQ ID NO: 4 – 寡核苷酸引物 ITS4。
- SEQ ID NO: 5 – M13 通用 20-引物。
- SEQ ID NO: 6 – 在实施例 2 中使用的反向引物。
- SEQ ID NO: 7 – 寡核苷酸引物 JB629。
- SEQ ID NO: 8 – 寡核苷酸引物 JB630。
- SEQ ID NO: 9 – 寡核苷酸引物 JB631。
- SEQ ID NO: 10 – 寡核苷酸引物 JB632。
- SEQ ID NO: 11 – 寡核苷酸引物 JB633。

SEQ ID NO: 12 – 寡核苷酸引物 JB634.

SEQ ID NO: 13 – 寡核苷酸引物 JB635.

SEQ ID NO: 14 – 寡核苷酸引物 JB636.

SEQ ID NO: 15 – 寡核苷酸引物 JB637.

SEQ ID NO: 16 – 寡核苷酸引物 JB638.

SEQ ID NO: 17 – 寡核苷酸引物 JB651.

SEQ ID NO: 18 – 寡核苷酸引物 JB652.

SEQ ID NO: 19 – 寡核苷酸引物 JB653.

SEQ ID NO: 20 – 寡核苷酸引物 JB654.

SEQ ID NO: 21 – 寡核苷酸引物 JB655.

SEQ ID NO: 22 – 寡核苷酸引物 JB656.

SEQ ID NO: 23 – 寡核苷酸引物 JB657.

SEQ ID NO: 24 – 寡核苷酸引物 JB658.

SEQ ID NO: 25 – 寡核苷酸引物 JB659.

SEQ ID NO: 26 – 寡核苷酸引物 JB660.

SEQ ID NO: 27 – 寡核苷酸引物 JB675.

SEQ ID NO: 28 – 寡核苷酸引物 JB676.

SEQ ID NO: 29 – 偃麦草核腔菌分离株 6715、119-2-3、DL22、PTR4A、44184、205、403、109、407、1316、和 223 的 ITS 区域的共同 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'-末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8S rRNA 基因(209-365 核苷酸)、内部转录间隔区 2(366-526 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(527-579 核苷酸)。

SEQ ID NO: 30 – 偃麦草核腔菌分离株 6715 的第 2 和 4 号克隆的 ITS 区的共同 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'-末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8S rRNA 基因(209-365 核苷酸)、内部转录间隔区 2(366-526 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(527-579 核苷酸)。

SEQ ID NO: 31 – 偃麦草核腔菌分离株 119-2-3 的第 2-2 号克隆的

ITS 区的 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8S rRNA 基因(209-365 核苷酸)、内部转录间隔区 2(366-526 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(527-579 核苷酸)。

SEQ ID NO: 32-偃麦草核腔菌分离株 DL22 的第 1-1 号克隆的 ITS 区的 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8Sr RNA 基因(209-365 核苷酸)、内部转录间隔区 2(366-526 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(527-579 核苷酸)。

SEQ ID NO: 33-偃麦草核腔菌分离株 PTR4A 的第 2-3 号克隆的 ITS 区的 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8Sr RNA 基因(209-365 核苷酸)、内部转录间隔区 2(366-526 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(527-579 核苷酸)。

SEQ ID NO: 34-偃麦草核腔菌分离株 44184 的第 3-1 号克隆的 ITS 区的 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8S rRNA 基因(209-365 核苷酸)、内部转录间隔区 2(366-526 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(527-579 核苷酸)。

SEQ ID NO: 35-偃麦草核腔菌分离株 205 的第 4-2 号克隆的 ITS 区的 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8S rRNA 基因(209-365 核苷酸)、内部转录间隔区 2(366-527 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(528-580 核苷酸)。

SEQ ID NO: 36-偃麦草核腔菌分离株 403 的第 5-2 号克隆的 ITS 区的 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8S rRNA 基因(209-365 核苷酸)、内部转录间隔区 2(366-526 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(527-579 核苷酸)。

SEQ ID NO: 37 –偃麦草核腔菌分离株 109 的第 6-2 号克隆的 ITS 区的共同 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-209 核苷酸)、5.8S rRNA 基因(210-366 核苷酸)、内部转录间隔区 2(367-527 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(528-580 核苷酸)。

SEQ ID NO: 38 –偃麦草核腔菌分离株 407 的第 7-3-2 号克隆的 ITS 区的 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8S rRNA 基因(209-365 核苷酸)、内部转录间隔区 2(366-526 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(527-579 核苷酸)。

SEQ ID NO: 39 –偃麦草核腔菌分离株 1316 的第 8-1 号克隆的 ITS 区的 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8S rRNA 基因(209-367 核苷酸)、内部转录间隔区 2(368-534 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(535-587 核苷酸)。

SEQ ID NO: 40 –偃麦草核腔菌分离株 223 的第 9-2 号克隆的 ITS 区的 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-208 核苷酸)、5.8S rRNA 基因(209-365 核苷酸)、内部转录间隔区 2(366-527 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(528-580 核苷酸)。

SEQ ID NO: 41 –圆核腔菌分离株 36570 的第 10-1 号克隆的 ITS 区的 DNA 序列。其包括按照 5'-3'的方向依次是: rRNA 基因小亚基的 3'- 末端(1-30 核苷酸)、内部转录间隔区 1(31-209 核苷酸)、5.8SrRNA 基因(210-366 核苷酸)、内部转录间隔区 2(367-536 核苷酸)和 rRNA 基因大亚基的 5'-端(537-590 核苷酸)。

本发明提供了用于鉴定植物致病真菌的不同致病型的独特 DNA 序列。特别是,此 DNA 序列可用作基于 PCR 的方法鉴定真菌致病型的引物。本发明中的 DNA 序列,包括特定真菌致病型的核糖体 RNA 基

因区域的内部转录间隔序列，以及来自这些区域可鉴定特定致病型的引物。这些来自病原体种或属内的不同致病型的 ITS DNA 序列，在种或属的不同成员间有变化，可用于鉴定那些特定成员。

生物医学研究人员使用基于 PCR 的技术已经有一些时间，并且比较成功地用于检测受感染的动物组织中的病原体。但直到最近，这项技术才用于检测植物病原体。用对病原体线粒体基因组序列特异的 PCR 方法已经检测到受感染小麦中 *Gaumannomyces graminis* 的存在（Schlesser 等，1991；应用和环境微生物学（Applied and Environ. Microbiol），57:553-556），随机扩增的多态性 DNA（即 RAPD）标记物能够区分 *Gremmeniella abietina* 的多种品种，它是造成针叶树 *scleroderis* 溃疡的因素。美国专利 No.5,585,238（在此处全文引用作为参考）描述了衍生于 *Septoria*、*Pseudocercospora*、以及 *Mycosphaerella* 的株的核糖体 RNA 基因区域 ITS 序列之引物，及它们在利用基于 PCR 的技术鉴定这些真菌分离株中的应用。另外，WO95/29260（在此处全文引用作为参考）描述了衍生于镰孢菌属（*Fusarium*）的株的核糖体 RNA 基因区域 ITS 序列之引物，及它们在利用基于 PCR 的技术鉴定这些真菌分离株中的应用。另外，美国专利 No.5,800,997（在此处全文引用作为参考）描述了衍生于尾孢菌属、长蠕孢属、球梭孢属和柄锈菌属的核糖体 RNA 基因区域 ITS 序列的引物，及它们在利用基于 PCR 的技术鉴定这些真菌分离株中的应用。

因为核糖体基因的拷贝数较高，所以适宜用作分子探针的靶序列，尽管成熟的 rRNA 序列之间高度保守，但非转录和转录间隔序列通常很少保守，因此适于作为靶序列用于检测近来演化的多样性。真菌 rRNA 基因是以单位形式组成的，其中每个单位编码 18S（小亚基）、5.8S 和 28S（大亚基）三个成熟的亚单位。这些亚单位被两个约 300bp 的内部转录间隔序列 ITS1 和 ITS2 分开（White, 等，1990；在：PCR 实验步骤；Innes 等编 315-322）。另外，转录单位被非转录间隔序列（NTS）所分开。ITS 和 NTS 序列尤其适宜检测不同真菌病原体的特定致病型。

本发明中的 DNA 序列来自不同植物病原体的核糖体 RNA 基因区域的内部转录间隔序列。来自病原体种或属内的不同致病型的 ITS DNA 序列在种或属不同的成员中有变化。病原体的 ITS 序列被确定后, 这些序列可以和其它的 ITS 序列一起排列起来, 然后就可根据 ITS 序列得获引物。就是说, 可以根据真菌致病型中在序列上有最大差异的 ITS 序列之间的区域设计引物。基于上述的序列和引物可用于鉴别特定病原体。

具体的目的 DNA 序列包括来自偃麦草核腔菌和圆核腔菌的 ITS DNA 基因序列。这样的 ITS DNA 序列公布于 SEQ ID NO: 29-41。衍生于这些 ITS 序列的典型的寡核苷酸引物序列公布于 SEQ ID NO: 7-28。这些序列可用在基于 PCR 的方法中鉴定目的病原体。因此, 根据本发明申请人公开的内容, 可首次用基于 PCR 的诊断方法对引起小麦黄褐斑的真菌病原体进行检测。

在 PCR 分析中使用本发明引物序列的方法是本领域所熟知的。例如, 见美国专利 No.4,683,195 和 4,683,202, 还有 Schlessner 等 (1991) 应用和环境微生物学, 57: 553-556。还有 Nazar 等人 (1991; 生理学和分子植物病理学 (Physiol. and Molec. Plant Pathol.), 39: 1-11), 其用 PCR 扩增揭示了黑白轮枝孢 (*Verticillium albo-atrum*) 和大丽花轮枝孢 (*Verticillium dahliae*) 的 ITS 区域的差异, 并因此将两个种区分开; Johanson 和 Jeger (1993; Mycol.Res.97:670-674), 其用类似的技术区分了香蕉病原体 *Mycosphaerella fijiensis* 和 *Mycosphaerella musicola*。

本发明中的 ITS DNA 序列可用本领域熟知的方法从真菌病原体中克隆。一般地, 从真菌隔离菌群中分离 DNA 的方法是周知的。见, Raeder & Broda (1985) 应用微生物学通讯 (Letters in Applied Microbiology) 2: 17-20; Lee 等 (1990) 真菌遗传学时事传报 (Fungal Genetics Newsletter) 35: 23-24; 以及 Lee 和 Taylor (1990) 在: PCR 方法: 方法和应用指南 (A Guide to Methods and Applications), Innes 等. (编); 282-287 页。

另外, 可用 PCR 扩增确定目的 ITS 序列。在另一实施方案中, 扩增整个 ITS 区域的引物是根据 White 等人(1990; 在 PCR 方法; Innes 等编。315-322 页) 的报道设计的, 将扩增的 ITS 序列亚克隆到 pCRII 克隆载体上。亚克隆的序列既包含左臂 ITS(ITS1)和右臂 ITS(ITS2), 又包含定位在其中的 5.8s rRNA 基因。对偃麦草核腔菌的几种分离株和来自圆核腔菌的一种分离株进行了这样的工作。

已确定的 ITS 序列与每一种病原体类群相比较, 以找出这在用 PCR 区分不同的种和/或株的实验中有用的差异。确定的 ITS DNA 序列示于 SEQ ID NO: 29-41。通过差异性的鉴定, 可以合成多种引物, 并通过 PCR 扩增进行测试。用作 PCR 扩增测试的模板首先是纯化的病原体 DNA, 接着是分离自受感染的宿主植物组织的 DNA。这样, 就有可能鉴别成对的诊断性引物, 即鉴定一种特定病原体种或株, 但并非此病原体的另一个种或株。引物也设计在种群序列中有最大保守性的区域, 以开发种属特异性引物, 以及鉴定引起某种疾病的几种真菌病原体中任一个的引物。例如, 也设计引物以检测偃麦草核腔菌和圆核腔菌。

优选的引物组合能够区分感染的宿主组织(即曾感染过一种特异的病原体种或株的宿主组织)中不同的种或株。本发明提供能实现检测圆核腔菌和偃麦草核腔菌的多种引物。本发明中的引物是根据真菌 ITS 区域的序列差异而设计的。序列间最小一个碱基对的差异可允许设计一种区别性的引物。设计针对真菌 DNA 特定的 ITS 区域的引物可以和设计针对核糖体 DNA 编码区域中的保守序列区域的引物组合, 用于扩增种特异的 PCR 片段。一般, 为达到好的灵敏度, 引物应该有一个介乎约 60~70°C 的理论上的变性温度, 应避免明显的二级结构和引物组合之间 3'端的重叠。引物一般要与 ITS1 或 ITS2 的至少连续 5-10 个核苷酸有序列相同性。在一个优选的实施方案中, 引物大约是 5-30 核苷酸碱基的任何长度, 优选的长度是至少 10 个核苷酸碱基。

作为上述 PCR 诊断技术的一种替代技术, 一种特异的真菌 DNA ITS 区域可用来设计多聚核苷酸标记探针, 每种探针包括一种标记部

分和与 ITS1 或 ITS2 至少 5-10 个连续的核苷酸互补的序列的核酸区域。在一个优选的实施方案中，这些探针的互补核酸区域约是 5-30 个核苷酸碱基长度，优选是至少 10 个核苷酸碱基长。探针的标记部分可包括提供信号的标记或是此标记的一种结合位点。这些多核苷酸标记探针可用于真菌的检测方法，包括如下：（a）设计至少一种多聚核苷酸标记探针，其包括具有与真菌病原体（如偃麦草核腔菌）的 ITS1 和 ITS2 的至少 5-10 个连续核苷酸碱基互补的序列的一种核酸区域，以及标记部分，其中包含当该探针与其它核酸分子杂交时可提供信号的标记，或该标记的一种结合位点；（b）从感染真菌病原体的植物组织中分离 DNA；（c）将上述（b）中的 DNA 和（a）中的探针杂交；及（d）通过检测标记检测真菌病原体，其中检测到标记说明（c）中的杂交已发生，真菌病原体是存在的。可根据本领域已知的任何方法来设计和检测标记，通过诸如放射性同位素、荧光、或平面光波导的应用。例如，美国专利 No. 4,868,105、WO95/33198、和 WO95/33198，所有这些在此处引用作为参考。

本发明导致了包含进行该方法的各种必要成分的试剂盒。这样的试剂盒可包含一个已分隔好的载体以紧凑地放置一个或多个容器，比如试管或小试剂瓶。其中的一个容器可包含未标记的或是可检测的标记 DNA 引物或探针，其可以为冷冻干燥形式存在或必要时在合适的缓冲液中。一个或多个容器可包含一种或多种用于 PCR 反应的酶或试剂。这些酶可能单独存在，或是以冷冻干燥形式或在合适的缓冲液中混合存在。最后，试剂盒还可含有其它施行本发明技术中所需的成分，比如缓冲液、提取试剂、酶、吸管、板、核酸、核苷三磷酸、滤纸、胶体物质、转移物、放射自显影设备等等。

实施例

下面的实施例表明了可用于分离 ITS 序列、选择合适的引物序列、检验引物的选择性和诊断效率、以及用这些引物来检测疾病和真菌分离株的一般实验步骤。这些实施例仅以举例方式给出但并不仅限于此。

此处所用的标准的重组 DNA 和分子克隆技术是本领域所熟知的，并由下列的研究者阐述：J.Sambrook,E.F.Fritsch 和 T.Maniatis: 分子克隆 (Molecular Cloning): 实验室手册 (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor 实验室, Cold Spring Harbor, NY(1989); T.J.Silhavy,M.L.Berman 和 L.W.Enquist, 基因融合实验 (Experiments with Gene Fusions), Cold Spring Harbor 实验室, Cold Spring Harbor, NY(1984); 以及 Ausubel,F.M.等, 分子生物学最新步骤 (Current Protocols in Molecular Biology), 由 Greene Publishing Assoc.和 Wiley-Interscience 出版(1987)。

实施例 1: 真菌分离株和真菌基因组 DNA 的提取

所使用的真菌分离株及它们的来源见表 1。用来自 PDA 培养物(马铃薯葡萄糖琼脂)的菌丝体片段接种，将真菌在 150ml 马铃薯葡萄糖培养基中培养。培养物在水平摇床上 28°C 振荡培养 7-11 天。另外，也可直接从 PDA 平板上分离菌丝体。离心使菌丝体成团状，然后液氮中研磨，采用 LEE 和 Taylor 的方法提取基因组总 DNA (1990; In: PCR 方法: 方法及应用指南 Innes 等人编; 282-287 页)。

表 1: 测试的分离株的来源

分离株	生物	来源	发现地
6715	偃麦草核腔菌	ATCC ¹	---
44184	偃麦草核腔菌	ATCC ¹	澳大利亚
205	偃麦草核腔菌	Novartis ²	Vasteras,瑞典
109	偃麦草核腔菌	Novartis ²	Vallskog,瑞典
403	偃麦草核腔菌	Novartis ²	Vattholma,瑞典
223	偃麦草核腔菌	Novartis ²	Vasteras,瑞典
407	偃麦草核腔菌	Novartis ²	Vattholma 瑞典
1316	偃麦草核腔菌	Novartis ²	Vallskog, 瑞典
PTR3B	偃麦草核腔菌	L.Franc ³	North Dakota
PTR4A	偃麦草核腔菌	L.Franc ³	North Dakota
PTR1	偃麦草核腔菌	L.Franc ³	North Dakota
148-1-1	偃麦草核腔菌	L.Franc ³	North Dakota
119-2-3	偃麦草核腔菌	L.Franc ³	North Dakota
83-A-3-1	偃麦草核腔菌	L.Franc ³	North Dakota
DL22	偃麦草核腔菌	L.Franc ³	Minnesota
36570	圆核腔菌	ATCC ¹	丹麦
11404	<i>Drechslera sorokiniana</i>	ATCC ¹	Minnesota
44234	谷类丝核菌 (<i>Rhizoctonia cerealis</i>)	ATCC ¹	荷兰
R-9420	禾谷镰孢 (<i>Fusarium graminearum</i>)	P.Nilson ⁴	Washington
62215	黄色镰孢 (<i>Fusarium culmorum</i>)	ATCC ¹	瑞士
18222	<i>Microdochium nivale</i>	ATCC ¹	苏格兰
44643	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i> -W 型	ATCC ¹	德国
308	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i> -R 型	Novartis ⁵	---
24425	颖枯壳针孢 (<i>Septoria nodorum</i>)	ATCC ¹	Montana
26517	小麦壳针孢(<i>Septoria tritici</i>)	ATCC ¹	Minnesota
60531	草本枝孢 (<i>Cladosporium herbarum</i>)	ATCC ¹	新西兰
52476	落花生尾孢 (<i>Cercospora arachidicola</i>)	ATCC ¹	Oklahoma
HS-1	麦根腐长蠕孢(<i>Hilminthosporium sativum</i>)	Novartis ²	瑞典
DT-1	圆核腔菌	Novartis ²	瑞典
DR-1	偃麦核腔菌	Novartis ²	瑞典

¹美国典型培养物保藏中心, Rockville, Maryland, 美国

²Novartis Sweden AB, 261 23 Landskrona, 瑞典

³Len Francel 博士, North Dakota State University, Fargo, North Dakota, 美国

⁴Paul Nelson 博士, Penn State University, State College, Pennsylvania, 美国

⁵Novartis Crop Protection Limited, Basel, 瑞士

实施例 2: 内部转录间隔 (ITS) 区域的分离

从 10 ng 偃麦草核腔菌分离株 6715、119-2-3、DL22、PTR4A、44184、205、403、109、407、1316、223 和圆核腔菌分离株 36570 分离的基因组 DNA 中, 用 50pmol 的引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; SEQ ID NO:1) 和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; SEQ ID NO:4), PCR 扩增大约 600bp 长的内部转录间隔 (ITS) 区域片段。用实施例 4 所述的方法进行 PCR。用 Invitrogen 公司的(San Diego,CA) TA 克隆试剂盒(批号 K2000-01) 和 PCR2.1 克隆载体克隆 ITS 的 PCR 产物。采用引物 ITS1(SEQ ID NO: 1), ITS2(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'; SEQ ID NO:2), ITS4(SEQ ID NO: 4) 以及 M13 通用引物-20(5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'; SEQ ID NO: 5)和反向引物(5'-AACAGCTATGACCATG-3'; SEQ ID NO: 6), 通过 Applied Biosystem(Foster City,CA) 自动测序仪用双脱氧法来确定 ITS 区域的 DNA 序列。ITS 引物 ITS1、ITS2、ITS3 和 ITS4 在 White 等人(1990: 在: PCR 实验步骤; Innes 等编, 315-322 页)中有详细描述。

实施例 3: 小麦 DNA 的提取

用大块浸解法从小麦提取 DNA。大块浸解法用于从数种田地中自然感染的麦田小麦叶子中分离 DNA, 以优化用于高通量分析的田地取样方法。

下面是大块浸解法的实验步骤:

(1) 将适量的小麦叶子置于 Bioreba(Reinach,瑞士)的耐高强度塑料

袋 (cat#490100) 中。称取植物组织重量, 盛叶子的塑料袋要去皮(塑料袋重)。

(2) 每个重量(克)的小麦组织加入等体积(ml)的 Muller 提取缓冲液(0.1%W/V 的吐温-80; 0.04M Tris-CL, pH7.7; 0.15M NaCl; 0.1%W/V 牛血清白蛋白-Pentex 第五组分; 0.1%W/V 叠氮钠; 200mM EDTA)。将 Bioreba Homex 6 匀浆器置于 70 以浸软组织。研磨叶子直至组织呈纤维状。

(3) 汇集若干袋子的提取液, 使用时充分震荡混匀。将提取液等份分装到置于冰上的微量离心管中。

(a) 将 100 μ l 浓缩提取物煮沸 5 分钟。

(b) 将煮沸的提取物置于冰上。

(c) 将煮沸浓缩的提取物 10 μ l 加入到 90 μ l 无菌的蒸馏水中做 1:10 稀释。

(d) 将稀释的提取物于冰上保存备用。

实施例 4: 聚合酶链式反应扩增

用 Perkin Elmer/Cetus (Norwalk, CT; part no: N808-0009) 的 GeneAMP 试剂盒进行聚合酶链式反应扩增, 在 50 μ l 的反应终体积含: 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCL, pH8.3, 含有 dTTP、dATP、dCTP 和 dGTP 各 200 μ M, 每种引物 50pmol, 2.5 个单位的 Taq 聚合酶, 和 10ng 基因组 DNA 或 1 μ l 1:10 稀释的植物提取物。在 Perkin Elmer/Cetus Model 9600 热循环仪上反应 30-40 个循环: 94°C, 15 秒; 50°C -70°C, 15 秒; 72°C, 45 秒。每种 PCR 样品取 10 μ l 上样于 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳, 分析引物。

实施例 5: 寡核苷酸的合成和纯化

通过诸如整合 DNA 技术 (Coralville, IA) 或 Midland Certified 试剂公司 (Midland, Texas) 合成寡核苷酸 (引物)。

实施例 6: 种特异性引物的选择

将来自偃麦草核腔菌的多种分离株和圆核腔菌的一个分离株的 ITS 序列排列比较。下面的表 2 中所示的寡核苷酸引物是基于对排列序列的分析根据实施例 5 合成的。引物设计在真菌种之间的序列中有最大差异的区域。引物还设计为针对在种间高度保守的区域以形成属特异性引物。另外,也合成了已发表的核糖体基因特异性引物 ITS1、ITS2、ITS3 和 ITS4 (White 等, 1990;在: PCR 实验步骤; Innes 等编, 315-322 页), 并与 ITS 区域特异的引物结合用于测试。

表 2: 设计用于真菌检测的引物

引物模板	引物	引物序列
18s rDNA	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'(SEQ ID NO:1)
5.8 s rDNA	ITS2	5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'(SEQ ID NO:2)
5.8 s rDNA	ITS3	5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3'(SEQ ID NO:3)
25 s rDNA	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'(SEQ ID NO:4)
偃麦草核腔菌	JB629	5'-GTACTACTTGTTTCCTTGGCG-3'(SEQ ID NO:7)
偃麦草核腔菌	JB630	5'-TCAGTTGCAATCAGCGTCAG-3'(SEQ ID NO:8)
偃麦草核腔菌	JB631	5'-TGGACAAGAGCGCAAATAATG-3'(SEQ ID NO:9)
偃麦草核腔菌	JB632	5'-ATGAAGCCGGACTGGGATA-3'(SEQ ID NO:10)
偃麦草核腔菌	JB633	5'-ATGAAGCCGGACTGGGATAGGG-3'(SEQ ID NO:11)
偃麦草核腔菌	JB634	5'-CGCTGCCTTGCCCGTCTGGC-3'(SEQ ID NO:12)
偃麦草核腔菌	JB635	5'-CGCTGCCTTGCCCGTCT-3'(SEQ ID NO:13)
偃麦草核腔菌	JB636	5'-CATGGACGCGCGACCGC-3'(SEQ ID NO:14)
偃麦草核腔菌	JB637	5'-CATGGACGCGCGACCGCGGC-3'(SEQ ID NO:15)
偃麦草核腔菌	JB638	5'-CTCCGAAACCAGTAGGCC-3'(SEQ ID NO:16)
偃麦草核腔菌	JB651	5'-GATAGGGCCTCGCTGCCTTGC-3'(SEQ ID NO:17)
偃麦草核腔菌	JB652	5'-GATAGGGCCTCGCTGCCT-3'(SEQ ID NO:18)
偃麦草核腔菌	JB653	5'-AAGGTTGAAAGAAGCTTCATGG-3'(SEQ ID NO:19)
偃麦草核腔菌	JB654	5'-CAAAAGGTTGAAAGAAGCTTCATGG-3'(SEQ ID NO:20)
偃麦草核腔菌	JB655	5'-AAGCCGGACTGGGATAGG-3'(SEQ ID NO:21)
偃麦草核腔菌	JB656	5'-CAAAAGGTTGAAAGAAGC-3'(SEQ ID NO:22)
偃麦草核腔菌	JB657	5'-GCCGGACTGGGATAGGGC-3'(SEQ ID NO:23)
偃麦草核腔菌	JB658	5'-GGACTGGGATAGGGCCTC-3'(SEQ ID NO:24)
偃麦草核腔菌	JB659	5'-GAAGCTTCATGGACGCGCG-3'(SEQ ID NO:25)
偃麦草核腔菌	JB660	5'-GGCGAGTCTCGGGAGAGA-3'(SEQ ID NO:26)
偃麦草核腔菌	JB675	5'-GCCGGACTGGGATAGGGCCCT-3'(SEQ ID NO:27)
偃麦草核腔菌	JB676	5'-GGCGAGTCTCGGGAGAGAGAC-3'(SEQ ID NO:28)

实施例 7: 对纯化的真菌基因组 DNA 之引物特异性的确定

用不同的引物组合 (表 3) 根据实施例 4 进行 PCR, 以扩增单一特异性片段。特异的 PCR 扩增产物是根据每种目的真菌株 18S 和 25S 核糖体 DNA 亚单位之间的 ITS 区域设计的引物而获得的。

表 3: 来自 ITS 的诊断性 PCR 引物

引物特异性	5'引物	3'引物	扩增片段的大小
偃麦草核腔菌	JB629 (SEQ ID NO: 7)	JB631 (SEQ ID NO: 9)	390bp
偃麦草核腔菌	JB633 (SEQ ID NO: 11)	JB637 (SEQ ID NO: 15)	485bp
偃麦草核腔菌	JB629 (SEQ ID NO: 7)	JB636 (SEQ ID NO: 14)	411bp
圆核腔菌/偃麦草核腔菌	ITS1 (SEQ ID NO: 1)	JB631 (SEQ ID NO: 9)	500bp
偃麦草核腔菌/ D.sorokiniana	JB630 (SEQ ID NO: 8)	ITS4 (SEQ ID NO: 4)	433bp
偃麦草核腔菌	JB651 (SEQ ID NO: 17)	JB654 (SEQ ID NO: 20)	473bp
偃麦草核腔菌	JB652 (SEQ ID NO: 18)	JB653 (SEQ ID NO: 19)	498bp
偃麦草核腔菌/ 圆核腔菌	ITS1 (SEQ ID NO: 1)	JB653 (SEQ ID NO: 19)	448bp
偃麦草核腔菌	JB629 (SEQ ID NO: 7)	JB653 (SEQ ID NO: 19)	438bp
偃麦草核腔菌	JB630 (SEQ ID NO: 8)	JB653 (SEQ ID NO: 19)	357bp
偃麦草核腔菌	JB632 (SEQ ID NO: 10)	JB653 (SEQ ID NO: 19)	512bp
偃麦草核腔菌	JB635 (SEQ ID NO: 13)	JB653 (SEQ ID NO: 19)	482bp
偃麦草核腔菌	JB657 (SEQ ID NO: 23)	JB660 (SEQ ID NO: 26)	393bp
偃麦草核腔菌	JB657 (SEQ ID NO: 23)	JB653 (SEQ ID NO: 19)	508bp
偃麦草核腔菌	JB658 (SEQ ID NO: 24)	JB653 (SEQ ID NO: 19)	503bp
偃麦草核腔菌	JB675 (SEQ ID NO: 27)	JB676 (SEQ ID NO: 28)	392bp

实施例 8: 针对感染真菌的植物组织之引物特异性和与其它谷类真菌病原体交叉反应性的确定

如实施例 3 所述从健康小麦叶子和感染偃麦草核腔菌的小麦叶子中提取总基因组 DNA。如实施例 4 所述的方法进行 PCR, 检测列于表 3 的针对来自小麦组织的 DNA 之引物组合。依据实施例 1 所述获得纯化的真菌基因组 DNA, 并用诊断性引物依据实施例 4 所述进行 PCR 分析。也检测了其它的真菌 DNA 种和分离株的诊断性引物与之交叉反应的能力。这些实验结果如下:

从所有列于表 1 的偃麦草核腔菌分离株的 DNA 和感染偃麦草核腔菌的小麦组织中, 偃麦草核腔菌特异性引物组合 JB675(SEQ ID NO:27)和 JB676(SEQ ID NO:28)扩增出一条 392bp 的片段。此引物组合不能从健康小麦组织和列于表 1 的下述一般的谷类病原体纯化的基因组 DNA 扩增出诊断片段, 如: 圆核腔菌、*R.cerealis*、*D.sorokiniana*、禾谷镰孢、黄色镰孢、*M.nivale*、*P.herpotrichoides* R-致病型和 *P.herpotrichoides* W 致病型、颖枯壳针孢、草本枝孢、小麦壳针孢、落花生针孢和麦根腐长蠕孢。用下述偃麦草核腔菌特异性引物组合: JB658 (SEQ ID NO: 24) 和 JB653 (SEQ ID NO: 19); JB657 (SEQ ID NO: 23) 和 JB653 (SEQ ID NO: 19); JB657 (SEQ ID NO: 23) 和 JB660 (SEQ ID NO: 26); JB652 (SEQ ID NO: 18) 和 JB653 (SEQ ID NO: 19); JB629 (SEQ ID NO: 7) 和 JB631 (SEQ ID NO: 9) 也得到类似的诊断结果。偃麦草核腔菌特异性引物 JB633 (SEQ ID NO: 11) 和 JB637 (SEQ ID NO: 15) 也产生类似结果。

引物 JB651(SEQ ID NO:17)和 JB654(SEQ ID NO:20)从偃麦草核腔菌分离株#6715 和#DL22 的 DNA 中扩增出一条 473bp 的片段。这些引物从健康小麦的 DNA 中扩增出一条稍小的片段, 大约 400bp。这些引物不能从列于表 1 的下述普通谷类病原体如: 圆核腔菌、*R.cerealis*、*D.sorokiniana*、禾谷镰孢、黄色镰孢、*M.nivale*、*P.herpotrichoides* R-致病型和 *P.herpotrichoides* W 致病型、颖枯壳针

孢、草本枝孢、小麦壳针孢、落花生针孢和麦根腐长蠕孢扩增纯化的基因组 DNA。

从偃麦草核腔菌分离株#6715 和 DL22 的 DNA 中, 引物组合 JB635(SEQ ID NO:13)和 JB653(SEQ ID NO:19)扩增了一条 482bp 的片段; 引物组合 JB632(SEQ ID NO:10)和 JB653(SEQ ID NO:19)扩增了一条 512bp 的片段; 引物组合 JB630(SEQ ID NO:8)和 JB653(SEQ ID NO:19)扩增了一条 357bp 的片段; 引物组合 JB629(SEQ ID NO:7)和 JB653(SEQ ID NO:19)扩增了一条 438bp 的片段。这些引物组合不能从 *D.sorokiniana* 分离株#11404 和圆核腔菌分离株#36570 的 DNA 扩增出任何片段。引物组合 JB629(SEQ ID NO:7)和 JB636(SEQ ID NO:14)从偃麦草核腔菌分离株#6715DNA 扩出一条 411bp 的片段, 但不能从 *D.sorokiniana* 分离株#11404 和颖枯壳针孢分离株#24425 的 DNA 中扩增出片段。引物 JB630(SEQ ID NO:8)和 ITS4(SEQ ID NO:4)从偃麦草核腔菌分离株#6715 的 DNA 和 *D.sorokiniana* 分离株#11404 的 DNA 中扩出一条 433bp 的片段, 但从颖枯壳针孢分离株#24425 和小麦壳针孢分离株#26517 的 DNA 中不能扩增出片段。

引物组合 ITS1(SEQ ID NO:1)和 JB653(SEQ ID NO:19) 从分离自偃麦草核腔菌和圆核腔菌的 DNA 中扩增了一条 448bp 的片段。这种引物组合不能从健康小麦组织和下述列于表 1 的一般的谷类病原体如 *R.cerealis*、*D.sorokiniana*、禾谷镰孢、黄色镰孢、*M.nivale*、*P.herpotrichoides* R-致病型和 *P.herpotrichoides* W 致病型、颖枯壳针孢、草本枝孢、小麦壳针孢、落花生针孢的纯化的基因组 DNA 扩增出诊断片段。用引物组合 ITS1(SEQ ID NO:1)和 JB631(SEQ ID NO:9)得到类似诊断的结果。

尽管本发明关于其特定实施方案做了阐述, 应当理解多种变化、修饰和更多的实施方案是可能存在的, 因此, 所有这些变化、修饰、和更多的实施方案都应看作属于本发明的范围。

序列表

<110> Novartis AG

<120> 用聚合酶链式反应检测小麦和大麦的真菌病原体

<130> PF/5-30426/A/CC1984

<140>

<141>

<150> US 09/026,601

<151> 1998-02-20

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

ITS1

<400> 1

tccgtaggtg aacctgcgg

19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

ITS2

<400> 2

gctgcgttct tcatcgatgc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

ITS3

<400> 3

gcatcgatga agaacgcagc

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

ITS4

<400> 4

tcctccgctt attgatatgc

20

<210> 5

<211> 17

<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: M13 通用 20 引物		
<400> 5		
gtaaaacgac ggccagt	17	
<210> 6		
<211> 16		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 实施例 2 中使用的反向引物		
<400> 6		
aacagctatg accatg	16	
<210> 7		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 引物	JB629	
<400> 7		
gtactacttg tttccttggc g	21	
<210> 8		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 引物	JB630	
<400> 8		
tcagttgcaa tcagcgtcag	20	
<210> 9		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 引物	JB631	
<400> 9		
tggacaagag cgcaaataat g	21	
<210> 10		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 引物	JB632	
<400> 10		
atgaagccgg actgggata	19	

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物 JB633

<400> 11
 atgaagccgg actgggatag gg 22

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物 JB634

<400> 12
 cgctgccttg cccgtctggc 20

<210> 13
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物 JB635

<400> 13
 cgctgccttg cccgtct 17

<210> 14
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物 JB636

<400> 14
 catggacgcg cgaccgc 17

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物 JB637

<400> 15
 catggacgcg cgaccgcggc 20

<210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 引物 JB638

<400> 16

ctccgaaacc agtaggcc		18
<210> 17		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 引物	JB651	
<400> 17		
gatagggcct cgctgccttg c		21
<210> 18		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 引物	JB652	
<400> 18		
gatagggcct cgctgcct		18
<210> 19		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 引物	JB653	
<400> 19		
aagggttgaaa gaagcttcat gg		22
<210> 20		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 引物	JB654	
<400> 20		
caaaagggttg aaagaagctt catgg		25
<210> 21		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 引物	JB655	
<400> 21		
aagccggact gggatagg		18
<210> 22		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列的描述: 引物	JB656	

<400> 22
caaaaggttg aaagaagc 18

<210> 23
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物 JB657

<400> 23
gccggactgg gatagggc 18

<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物 JB658

<400> 24
ggactgggat agggcctc 18

<210> 25
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物 JB659

<400> 25
gaagcttcat ggacgcgcg 19

<210> 26
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物 JB660

<400> 26
ggcgagtctc gggagaga 18

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物 JB675

<400> 27
gccggactgg gatagggcct c 21

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 引物 JB676

<400> 28
ggcgagtctc gggagagaga c

21

<210> 29
<211> 579
<212> DNA
<213> 僵麦草核腔菌

<400> 29
tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60
ctcgtgcct tgcccgctctg ggcgcattat caccatgtc tttttgcgta ctacttggtt 120
ccttggcggy tccgcccgcg aattggacct tattcaaacc tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca 240
tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat 300
cgaatctttg aacgcacatt ggcgcctttg gtattccaaa gggcatgcct gttcgagcgt 360
catttgatcc ctcaagcttt gcttgggtgtt gggcgctctt tctctctccc gagactcgcc 420
ttaaatacat tggcagccgg cctactggtt tcggagcgca gcacattatt tgcgctcttg 480
tccagccgcy gtcgcgcgtc catgaagctt ctttcaacct tttgacctcg gatcaggtag 540
ggataccgcg tgaacttaag catatcaata agcggagga 579

<210> 30
<211> 579
<212> DNA
<213> 僵麦草核腔菌

<400> 30
tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60
ctcgtgcct tgcccgctctg ggcgcattat caccatgtc tttttgcgta ctacttggtt 120
ccttggcggy tccgcccgcg aattggacct tattcaaacc tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca 240
tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat 300
cgaatctttg aacgcacatt ggcgcctttg gtattccaaa gggcatgcct gttcgagcgt 360
catttgatcc ctcaagcttt gcttgggtgtt gggcgctctt tctctctccc gagactcgcc 420
ttaaatacat tggcagccgg cctactggtt tcggagcgca gcacattatt tgcgctcttg 480
tccagccgcy gtcgcgcgtc catgaagctt ctttcaacct tttgacctcg gatcaggtag 540
ggataccgcg tgaacttaag catatcaata agcggagga 579

<210> 31
<211> 579
<212> DNA
<213> 僵麦草核腔菌

<400> 31
tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60
ctcgtgcct tgcccgctctg ggcgcattat caccatgtc tttttgcgta ctacttggtt 120
ccttggcggy tccgcccgcg aattggacct tattcaaacc tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca 240
tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat 300
cgaatctttg aacgcacatt ggcgcctttg gtattccaaa gggcatgcct gttcgagcgt 360
catttgatcc ctcaagcttt gcttgggtgtt gggcgctctt tctctctccc gagactcgcc 420
ttaaatacat tggcagccgg cctactggtt tcggagcgca gcacattatt tgcgctcttg 480
tccagccgcy gtcgcgcgtc catgaagctt ctttcaacct tttgacctcg gatcaggtag 540
ggataccgcg cgaacttaag catatcaata agcggagga 579

<210> 32
<211> 579
<212> DNA
<213> 僵麦草核腔菌

<400> 32
tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60
ctcgtgcct tgcccgctctg ggcgcattat caccatgtc tttttgcgta ctacttggtt 120
ccttggcggy tccgcccgcg aattggacct tattcaaacc tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca 240

```

tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat 300
cgaatccttg aacgcacatt gcgcctcttg gtattccaaa gggcatgcct gttcgagcgt 360
catttgatcc ctcaagcttt gcttggtggt gggcgtcttg tctctctccc garactcgcc 420
ttaaaatcat tggcagccgg cctactggtt tcggarcgca gcacattatt tgcgctcttg 480
tccagccgcg gtcgcgcgtc catgaagctt ctttcaacct tttgacctcg gatcaggtag 540
ggatacccg cgaacttaag catatcaata agcggagga 579

```

<210> 33

<211> 580

<212> DNA

<213> 偃麦草核腔菌

<400> 33

```

tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60
ctcgctgcct tgcccgtctg gcgccatatt caccatgtc tttttgcgta ctacttggtt 120
ccttggcggg tccgcccgcc aattggacct tattcaaacc tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca 240
tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcaggattc agtgaatcat 300
cgaatccttg aacgcacatt gcgcctcttg gtattccaaa gggcatgcct gttcgagcga 360
catttgatcc ctcaagcttt gcttggtggt gggcgtcttg tctctctccc nractcgcc 420
cttaaaawcm ttggcmrccg gcctactggt ttcsagmgc agcacattat ttgogctctt 480
gtccagccgc ggtcgcgcg ccatgaagct tctttcaacc ttttgacctc ggatcaggta 540
gggatacccg ctgaacttaa gcatatcaat aagcggagga 580

```

<210> 34

<211> 579

<212> DNA

<213> 偃麦草核腔菌

<400> 34

```

tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60
ctcgctgcct tgcccgtctg gcgccatatt caccatgtc tttttgcgta ctacttggtt 120
ccttggcggg tccgcccgcc aattggacct tattcaaacc tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca 240
tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat 300
cgaatccttg aacgcacatt gcgcctcttg gtattccaaa gggcatgcct gttcgagcgt 360
catttgatcc ctcaagcttt gcttggtggt gggcgtcttg tctctctccc gagactcgcc 420
ttaaaatcat tggcagccgg cctactggtt tcggarcgca gcacattatt tgcgctcttg 480
tccagccgcg gtcgcgcgtc catgaagctt ctttcaacct tttgacctcg gatcaggtag 540
ggatacccg cgaacttaag catatcaata agcggagga 579

```

<210> 35

<211> 580

<212> DNA

<213> 偃麦草核腔菌

<400> 35

```

tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60
ytcgctgcct tgcccgtctg gcgccatatt caccatgtc ttttkcgta mtamtgttt 120
ccttggcggg tccgcccgcc aattggacct tattcaaacc tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca 240
tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat 300
cgaatccttg aacgcacatt gcgcctcttg gtattccaaa gggcatgcct gttcgagcgt 360
catttgatcc ctcaagcttt gcttggtggt gggcgtcttg tctctctccc gagactcgcc 420
ttaaaatcat tggcagccgg gcctactggt ttcsagmgc agcacattat ttgogctctt 480
gtccagccgc ggtcgcgcg ccatgaagct tctttcaacc ttttgacctc ggatcaggta 540
gggatacccg ctgaacttaa gcatatcaat aagcggagga 580

```

<210> 36

<211> 579

<212> DNA

<213> 偃麦草核腔菌

<400> 36

```

tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60

```

```

ctcgctgcct tgcccgctctg ggcgcattatt caccatgtc tttttgcgta ctacttggtt 120
ccttggcggg tccgcccgc aattggacct tattcaaacc tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca 240
tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat 300
cgaatctttg aacgcacatt ggcgcctttg gtattccaaa gggcatgcct gttcgagcgt 360
catttgtagc ctcaagcttt gcttggtgtt gggcgctctg tctctctccc gagactcgcc 420
ttaaatacat tggcagccgg cctactggtt tcggagcgca gcacattatt tgcgctcttg 480
tccagcgcg gtcgcgcgct catgaagctt ctttcaacct tttgacctcg gatcaggtag 540
ggatacccg tgaaacttaag catatcaata agcggagga 579

```

<210> 37

<211> 580

<212> DNA

<213> 僵麦草核腔菌

<400> 37

```

tccgtagggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60
ctcgctgcct tgcccgctctg ggcgcattatt caccatgtc tttttgcgta ctacttggtt 120
ccttggcggg tccgcccgc aattggacct tattcaaacc ttttttttca gttgcaatca 180
gsctcagcaa aacaaatgta atcaattaca actttcaaca acggatctct tggttctggc 240
atcgatgaag aacgcagcga aatgcgataa gtatgtgtaa ttgcagaatt cagtgaatca 300
tcgaatcttt gaacgcacat tgcgcctttt ggtattccaa agggcatgcc tgttcgagcg 360
tcatttgtag cctcaagctt tgccttggtt tgggtgtctt gtctctctcc cgagactcgc 420
cttaaaatca ttggcagccg gcctactggt ttccggagcg agcacattat ttgcgctctt 480
gtycarccgc ggtcgcgcgt ccatgaagct tctttcaacc ttttgacctc ggatcaggta 540
gggatacccg ctgaactwaa gcatatcaat aagcggarga 580

```

<210> 38

<211> 579

<212> DNA

<213> 僵麦草核腔菌

<400> 38

```

tccgtagggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60
ctcgctgcct tgcccgctctg ggcgcattatt caccatgtc tttttgcgta ctacttggtt 120
ccttggcggg tccgcccgc aattggacct tattcaaacc tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca 240
tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat 300
cgaatctttg aacgcacatt ggcgcctttg gtattccaaa gggcatgcct gttcgagcgt 360
catttgtagc ctcaagcttt gcttggtgtt gggcgctctg tctctctccc gagactcgcc 420
ttaaatacat tggcagccgg cctactggtt tcggagcgca gcacattatt tgcgctcttg 480
tycagccgcg gtcgcgcgct catgaagctt ctttcaacct tttgacctcg gatcaggtag 540
ggatacccg tgaaacttaag catatcaata agcsgarga 579

```

<210> 39

<211> 587

<212> DNA

<213> 僵麦草核腔菌

<400> 39

```

tccgtagggtg aacctgcgga nggatcatwa cacaaatatg amccggact gggatagggc 60
ctcgctgcct tgcccgctctg ggcgcattatt caccatgty tntttgcgta ctamttggtt 120
ccttggcggg tccgcccgc aattggacct tattcaaacc tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca 240
tcgatgaaga acscagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgcaatca 300
tcgaatcttt gaaacgcaca ttgcgcctt tgggtatwca aagggcatgc ctggtcgagc 360
gtcatttgta ccctccaagc tttgccttgg gtgttgggog tcttgtctct ctcccsagac 420
tcgcyttaa atcattgggc agcsggccta ctggtttccg gagcgcarca matttatttg 480
csctcttgct masccgggt cgcgcgtcca tgaarettct tycaaccttt tgacctcgga 540
tcaggtaggg ataccgcgtg aacttaagca tatcaataag cggagga 587

```

<210> 40

<211> 580

<212> DNA

<213> 僵麦草核腔菌

<400> 40

```

tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aagccggact gggatagggc 60
ctcgctgcct tgcccgctctg gcgccatatt caccatgtc tttttgsgta ctactkgttt 120
ccttggcggg tccgcccgcc aattggacct tattcaaacy tttttttcag ttgcaatcag 180
cgtcagcaaa acaaatgtaa tcaatkacaa ctttcaacaa cggatctctc ggttctggca 240
tcgatgaaga acgcagcgaa atgcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat 300
cgaatctttg aacgcacatt gcgccctttg gtattccaaa gggcatgcct gttcgagcgt 360
catttgtaac ctcaagcttt gcttgggtgtt gggcgctctg tctctctccc garactcgcc 420
ttaaaatcat tggcagccgg cctactgggtt tcggagcgca gcacattatt tgcgctcttg 480
tccagccgcg gtcscscgt ccatgaagct tctttcaacc ttttgamctc ggatcaggta 540
gggatacccg ctgaacttaa gcatatcaat aagcggagga 580

```

<210> 41

<211> 590

<212> DNA

<213> 圆核腔菌

<400> 41

```

tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaaatatg aaggcagatt gggtagtccc 60
cgsttttggg gggttgccca ttctggcgcc atattcacc atgtcttttg cgtactactt 120
gtttccttgg cgggctcgcc cgccaattgg actttattca aacctttttt tattgcaatc 180
agcgtcagca aaacaatgta atcaattaca actttcaaca acggatctct tggttctggc 240
atcgatgaag aacgcagcga aatgcgataa gtagtgtgaa ttgcagaatt cagtgaatca 300
tcgaatcttt gaacgcacat tgcgcccttt ggtattccaa agggcatgcc tgttcgagcg 360
tcatttgtac cctcaagctt tgcttgggtgt tgggcgtctt ttgtctctcc cccgagactc 420
gccttaaaaa cattggcagc cggcctactg gtttcggagc gcagcacatt atttgcgctc 480
ttgtycagcc gcggtcgcg gcctcatgaag cttttttttt ttttcagcct tttgactctc 540
ggatcaggta gggatacccg ctgaacttaa gcatatcaat aagcggagga 590

```