

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 02829029.1

[51] Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 5/14 (2006.01)

A01N 25/00 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1311078C

[22] 申请日 2002.11.27 [21] 申请号 02829029.1

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 27 [33] JP [31] 089622/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2002/012392 2002.11.27

[87] 国际公布 WO2003/080838 日 2003.10.2

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.26

[73] 专利权人 国立大学法人筑波大学

地址 日本茨城县筑波市

[72] 发明人 渡边和男 渡边纯子

[56] 参考文献

WO0129239A2 2001.4.26

WO0006753A1 2000.2.10

WO9954490A2 1999.10.28

Homologues of a single resistance – gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and anematode Edwin A. G. van der Vossen et al, The Plant Journal, Vol. 23 No. 5 2000

The Rx Gene from Potato Controls Separate Virus Resistance and Cell Death Responses Abdelhafid Bendahmane et al, The Plant Cell, Vol. 11 1999

番茄抗根结线虫 Mi 基因研究进展 彭德良等, 沈阳农业大学学报, 第 32 卷第 3 期 2001

审查员 黄 磊

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘 玥 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 27 页 附图 4 页

[54] 发明名称

根结线虫 (Meloidogyne) 抗性基因及其用途

[57] 摘要

本发明涉及一种优良的根结线虫抗性基因及应用该基因的方法。更具体地, 本发明涉及一种新的不受高温影响、适用于多种根结线虫物种和品系且对其具有数量抗性的根结线虫抗性基因, 并涉及引入了该基因的具有根结线虫抗性的转基因植物。

-
1. 由下列 DNA 组成的基因，其中所述 DNA 由 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列组成。
 2. 根据权利要求 1 的基因，其中根结线虫抗性是数量抗性，其抗性水平的提高依赖于基因拷贝数目。
 3. 一种重组载体，其含有根据权利要求 1 的基因。
 4. 由根据权利要求 1 的基因转化的植物细胞。
 5. 一种生产根结线虫抗性转基因植物的方法，该方法通过把根据权利要求 1 的基因导入到植物实现。
 6. 用于控制根结线虫的制剂，其含有根据权利要求 1 的基因。

根结线虫 (Meloidogyne) 抗性基因及其用途

技术领域:

本发明涉及一种新的根结线虫抗性基因。更具体地, 本发明涉及一种新的不受高温影响、并适用于多种根结线虫物种和品系且对其具有数量抗性的根结线虫抗性基因。本发明进一步涉及应用该基因的方法。

技术背景:

线虫属于动物, 组成一个庞大的门, 是一种寄生于植物或动物的有害的生物体。一般寄生于植物的根结线虫长度为 1mm 或更短。然而它们从植物的细胞胞质中吸取营养成分, 由此造成的危害在世界范围内约为每年 10 亿美元。迄今为止, 已经鉴定出了约 70 种属于根结线虫属 (Meloidogyne) 的根结线虫。因为它们寄生于所有种类的农作物和多种杂草, 所以据报道, 它们所危害的植物超过 2000 种, 包括甘薯、番茄和马铃薯。

当一种植物感染了根结线虫, 在初期其地上部分观察不到明显的症状可以有效地用来判断是否寄生了线虫; 但虫瘿或结已经在其地下部分形成。物种及其变体不同, 虫瘿或结的大小也是不同的, 通常情况下约为 1-2mm。因此, 虫瘿或结有时是难以肉眼观察到的, 尽管位于虫瘿或结表面或根上的卵块是可以肉眼观察到的。最明显的症状是在根或块茎上出现一条垂直的裂缝, 并且线虫在各个发育阶段均寄生于被感染的根或块茎上。根结线虫感染不仅降低农作物的产量, 而且大大降低或削减被感染的根或块茎的市场价值。而且产生的根或块茎上的裂缝使其它的病原生物很容易地侵害植物, 从而提高了混合感染的可能性 (Hooker, W.J., Compendium of Potato Diseases, 97-98 页, 1981, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, U. S. A.; Jansson 和 Raman, Sweet Potato Pest Management, 1-12 页, 1991, Westview Press, Boulder, Colorado, U. S. A.; Jones 等, Compendium of Tomato Diseases, 49-50 页, 1991, APS PRESS, St. Paul, Minnesota, U. S. A.)。

寄生于马铃薯的根结线虫属线虫有如下四种: 花生根结线虫

(*Meloidogyne* (M.) *arenaria* Chitwood); 南方根结线虫 (*M. incognita* Chitwood); 北方根结线虫 (*M. hapla* Chitwood); 和爪哇根结线虫 (*M. javanica* Chitwood)。其中南方根结线虫在世界范围的马铃薯中发病率最高 (Hooker, W.J., *Compendium of Potato Diseases*, 97-98 页, 1981, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, U.S.A.)。在日本 Kyushu 马铃薯种植区发现了线虫感染, 当地的气候温和。因此授予农作物抗性或发展害虫综合控制技术是所希望的。

对于马铃薯, 在较长时间内是通过农作物轮作来控制根结线虫的。这项技术对于降低线虫的种群密度是有效的; 然而, 对于杂食性根结线虫来说, 仅仅通过农作物轮作来控制根结线虫是困难的, 因为农作物轮作周期是有限的。另外, 根结线虫的种群密度也可以通过施用有机肥料在氨态氮的作用下得以控制。这项技术现在在非洲、亚洲和中南美洲仍然使用, 尽管这不是一项根本的控制根结线虫的方法。用二氯丙稀、甲基溴等进行土壤熏蒸是最快速作用的一项技术。然而, 这项技术对生态系统和农民存在不利的影响。

目前, 增强寄主马铃薯线虫抗性的技术已经处于试验阶段, 并生成了许多抗性品系 (Watanabe 等, *Amer. Potato J.* 71: 599-604, 1994; Watanabe 等, *Breeding Science* 45: 341-347, 1995; Watanabe 等, *Breeding Science* 46: 329-336, 1996; Watanabe 等, *Beeding Science* 49: 53-61, 1999; Watanabe 和 Watanabe, *Plant Biotechnology* 17: 1-16, 2000)。对线虫特别是南方根结线虫具有高度抗性的四倍体马铃薯栽培种, 迄今为止还没有生成。

已经尝试使用近缘的具有根结线虫抗性的野生二倍体来赋予栽培品种的抗性。基于表现型的遗传分析或育种经验, 发现近缘野生二倍体含有根结线虫抗性基因 (Rmi), 并且发现这些基因具有数量抗性和加性效应 (Iwanaga 等, *J. Amer. J. Hort Sci.*, 114 (6): 1008-1113, 1989; Watanabe 等, *Breeding Sci.*, 46: 323-369, 1996; Watanabe 等, *Breeding Sci.*, 49: 53-61, 1999)。在前面所述的文献中, 报道了由 Rmi 基因引起的抗性不受温度的影响, 并且在高温下仍然具有活性。但是还未分离出 Rmi, 其序列也是未知的。因为栽培种马铃薯是同源四倍体, 因此其遗传方式是复杂的。因此, 培育有用的抗性品种

现在还不能实现。

现在,对于番茄和马铃薯,仅鉴定出一组根结线虫抗性基因组在几个基因图谱中的位置。例如,对于番茄,报道了抗南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫的秘鲁番茄 (*Lycopersicon. peruvianum*) 衍生的 Mi 基因位于第 6 号染色体上 (Messeguer 等, *Theor. Appl. Genet.*, 82: 529-536, 1991; Ho 等, *Plant J.*, 2: 971-982, 1992)。据报道抗南方根结线虫、爪哇根结线虫的秘鲁番茄衍生的 Mi3 基因位于 12 号染色体 (Yaghoobi 等, *Theor. Appl. Genet.*, 91: 457-464, 1995)。Williamson 等的研究组分离了 Mi 基因,并说明了其组成 (Rossi 等, *Proc Natl Acad. Sci.*, 95: 9750-9754, 1998; Milligan 等, *Plant Cell*, 10: 1307-1319, 1998)。因为 Mi 基因受高温的影响,在感染的起始阶段即感染后 24-48 小时期间,由于高温其抗性不利地失活。

对于马铃薯,报道了抗根结线虫 (*Meloidogyne chitwoodi*) 品系 1 的 Rmc 1 位于 *S. bulbocastanum* 的 11 号染色体 (Brown 等, *Theor. Appl. Genet.*, 92: 572-576, 1996)。关于南方根结线虫的抗性传递,据报道有两种可能: 1) 两个或更多的基因参与抗性 (Gomez 等, *Amer. Potato J.*, 60: 353-360, 1983); 和 2) 细胞质参与抗性发展 (Gomez 等, *Amer. Potato J.*, 60: 353-360, 1983; Iwanaga 等, *J. Amer. Hort. Sci.*, 114: 1108-1013, 1989)。再有,发现南方根结线虫抗性是由 5 或 6 个抗性基因控制的加性和数量抗性 (Watanabe 等, *Breed. Sci.*, 9: 53-61, 1999; Watanabe 等, 已提交)。

通常,植物对病原体的强抗性一般是高度特异性的。Flor 提出的“基因对基因”假说提出高度特异性抗性基于植物抗性基因和病原体的无毒基因的相互作用 (Flor, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 9: 275-296, 1971)。一般假说认为配体-受体模式是基因对基因分子识别的一种机制 (Gabriel 和 Rolfe, *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 365-391, 1990)。

迄今为止,分离的抗性基因基于基因产物的功能或结构的相似性被分为 5 类 (Baker 等, *Science*, 276: 726, 1997; Bergelson 等, *Science* 292: 2281-2285, 2001; Dangl 和 Jones, *Nature* 411: 826-833, 2001)。I 类抗性基因具有核苷酸结合位点 (NBS) 和富亮氨酸重复 (LRR), 而且据推论这些区域与抗性发展的信号传递有关。分离的 I 类基因的例

子包括：抗烟草花叶病毒 (tobacco mosaic virus) 的烟草 N 基因 (Whitham 等, Cell, 78:1101-1105, 1994); 抗亚麻栅锈菌 (*Melampsora lini*) 的亚麻 L6 (Lawrence 等, Plant Cell, 7:1195-1206, 1995) 和 M (Anderson 等, Plant Cell, 9:641-651, 1997) 基因; 抗寄生霜霉 (*Peronospora parasitica*) 的拟南芥菜 (*Arabidopsis thaliana*) RPP5 基因 (Bent, Plant Cell, 8:1757-1771, 1996), 及其抗丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 的 RPS2 (Bent 等, Science 265:1856-1860, 1993; Mindrinos 等, Cell, 78:1089-1099, 1994) 和 RPM1 (Grant 等, Science, 269: 843-846, 1995) 基因; 抗丁香假单胞菌的番茄 PRF 基因 (Salmeron 等, Cell 86:123-133, 1996) 及其抗尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 的 12C-1 基因 (Ori 等, Plant Cell 9: 521-531, 1997)。再有, 前面所述的抗根结线虫的秘鲁番茄衍生 Mi 基因同样具有 NBS 和 LRR (Milligan 等, Plant Cell 10:1307-1319, 1998)。

属于第 I 类的蛋白在 C 末端侧有不完整的 LRR, 在它的 N 末端侧有不完整的 NBS。在 ATP 酶、GTP 酶等中发现了 NBS, 由 3 个基元组成并包含一个 P 环 (Traut, Eur J. Biochem., 229:9-19, 1994)。通常, 第一个激酶 1a 结构域形成一个磷酸结合环, 激酶 2 结构域在其下游。据推测固定在激酶 2 结构域的天冬氨酸调整对磷酸移动必需的金属结合位点。激酶 3a 结构域位于其下下游, 具有通常与 ATP 的嘌呤相互作用的酪氨酸和精氨酸 (Traut, Eur J. Biochem., 229:9-19, 1994)。该 NBS 的存在表明激酶活性或 G 蛋白在激活抗性中扮演着重要的角色 (Hammond-Kosack 和 Jones, 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48: 575-607, 1997)。

在多种蛋白中发现了 LRR 区, 并且认为其通常在酵母、果蝇、人、或其它物种中与蛋白-蛋白之间的相互作用有关 (Kobe 和 Deisenhofer, Nature, 366:751-756, 1993)。然而, 关于植物对害虫的抗性, 推测 LRR 区起着配体结合结构域的功能, 该配体结合结构域由无毒 (Avr) 基因形成, 或者促进抗性 (R) 基因产物和其它涉及防御信号转导蛋白之间的相互作用 (Bent, Plant Cell, 8:1757-1771, 1996)。

马铃薯是世界范围内的主要的农作物, 从发达国家如美国和日本

的高投入农业到发展中国家如非洲、亚洲和拉丁美洲的低投入农业，马铃薯总是和生产体系的宽范围相一致的优良农作物。马铃薯被在世界范围内广泛种植，被用作饲料、工业淀粉、和发酵原料，也用作食品如主食、蔬菜、或零食 (Harris, P.M. The Potato Crop, Chapman and Hall, London, 1978; International Potato Center <http://www.cgiar.org/cip/2004>)。从产品产量和卡路里供给量的观点来看，马铃薯都是最重要的农作物之一，尤其对于发展中国家。在这些国家中，人口在快速地增长，对于这种有价值的食物来源，在未来几年急切希望提高马铃薯产品的量和马铃薯的产量。

由于害虫而失去大量的马铃薯，并且在许多地区包括热带、亚热带、和温带地区，由根结线虫所造成的损失尤其严重 (Hooker, W.J., Compendium of Potato Diseases, 97-98 页, 1981, The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, U.S.A)。

遗憾的是，对由根结线虫所造成的损失还没有根本的解决办法，因而阐明抗性基因的结构和功能是人们所期待的。

发明公开内容

本发明的一个目的是提供一种解决由根结线虫所造成的严重损失的方法，这通过发现一种优良的根结线虫抗性基因实现，该基因可广泛适用于多种根结线虫物种。

本发明者已经基于如 NBS 或 LRR 核酸序列筛选出了二倍体马铃薯品系，NBS 或 LRR 通常包含于一组植物抗性基因中。结果，成功地分离了一种新的具有优良根结线虫抗性的基因。同时还利用上述基因成功地生产出了具有优良根结线虫抗性的转基因植物，从而完成了本发明。

具体地，本发明涉及如下 (1) - (8) 的内容。

(1) 由下列 (a) 或 (b) 的 DNA 组成的基因：

- (a) 由 SEQ ID NO:1 表示的核苷酸序列组成的 DNA；或
- (b) 在严谨条件下，与由 SEQ ID NO:1 所示的核苷酸序列组成的 DNA 互补的核苷酸序列组成的 DNA 杂交，并且赋予宿主根结线虫抗性的 DNA。

(2) 根据 (1) 的基因，其中根结线虫抗性是数量抗性，抗性水平依赖于基因拷贝数目。

- (3) 一种重组载体, 含有根据(1)的基因。
- (4) 把根据(1)的基因引入到宿主中而得到的一种转化体。
- (5) 根据(4)的转化体, 其中宿主是一种植物。
- (6) 根据(5)的转化体, 其中植物属于茄科(Solanaceae)。
- (7) 一种生产根结线虫抗性转基因植物的方法, 这通过把根据(1)的基因引入到植物实现。
- (8) 用于控制根结线虫的制剂, 其含有根据(1)的基因。

1. 新的根结线虫抗性基因

(1) 根据本发明的基因的特征

根据本发明的基因是一种新的从二倍体马铃薯品系中分离的根结线虫抗性基因。该基因与普通的根结线虫抗性基因在下述方面存在区别:

- (i) 不同于单显性的根结线虫抗性基因如番茄抗性基因(Mi 基因), 本发明的基因是“数量抗性”, 抗性水平根据基因拷贝数目而加强。
- (ii) 不同于番茄的抗性基因, 其抗性不会因为高温敏感而丧失; 并且
- (iii) 本发明的基因可广泛适用于多个根结线虫物种和品系。

(2) 本发明基因的分离

本发明的基因可从二倍体马铃薯基因型 85.37.38 的基因组 DNA 或 cDNA 文库中筛选得到, 根据序列信息如通常存在于植物抗性基因的 NBS 或 LRR, 得知二倍体马铃薯基因型 85.37.38 具有根结线虫抗性基因(Watanabe 等, Amer.Potato J.71:599-604, 1994)。例如根据 Hammond-Kosack 和 Jones 等的一般理论, 可从已知植物抗害虫基因的保守序列如 NBS 或 LRR 序列设计引物(Ann.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.48:575-607, 1997)。这些引物可以用于扩增从上述二倍体马铃薯品系的 cDNA 文库中分离的感兴趣的基因。

(3) 核苷酸序列

可以根据常规技术来确定所获得的基因的核苷酸的序列。可以应用常规技术来进行核苷酸测序, 如 Maxam 和 Gilbert 的化学修饰法、利用 M13 噬菌体进行的双脱氧核苷酸链终止法、或利用核苷酸序列自

动分析仪（如 ABI PRISM 377 DNA 测序系统，Perkin-Elmer）。

SEQ ID NO:1 表示通过上述方法确定的本发明根结线虫抗性基因的核苷酸序列。根据本发明的根结线虫抗性基因并不局限于上述序列。还包括在严谨条件下与由 SEQ ID NO:1 核酸序列组成的基因杂交的基因，只要本发明（1）所叙述的基因的特征，即根结线虫抗性可赋予宿主。例如，在严谨条件下，钠的浓度在 10mM-300mM 之间，温度在 25℃ - 70℃ 之间。优选钠浓度在 50mM-100mM 和温度在 42℃ - 55℃。

本发明基因的核苷酸序列一旦被确定，本发明的基因可以通过化学合成、以该基因的 cDNA 或基因组 DNA 为模板的 PCR、或用一段以每个核苷酸序列作为探针的 DNA 片段杂交而得到。

2. 载体

本发明提供了一种含有本发明基因的重组载体。把根据本发明的基因引入到合适的载体，如质粒，保持不变，并用合适的限制性内切酶消化，或连接到合适的接头（Linker）以制备上述重组载体。这样的载体的例子包括 pUC 载体如 pUC18、pUC19、pUC118、和 pUC119，和二元载体如 pBI110、pBI121，和 pGA482。尤其当使用农杆菌（*Agrobacterium*）二元载体时，外源基因插入二元载体边缘序列的中间，并且该重组载体可以在大肠杆菌（*E. coli*）中扩增。随后，该扩增了的重组载体通过冻融、电穿孔、或其它方法被引入到如根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）LBA4404，EHA101，EHA105 或 C58C1Rif^R。所得物被用作转化载体。

为了使外源基因在宿主中表达，需要在该基因的上游和下游分别连接上一个启动子和一个终止子。可以使用任一启动子和终止子，没有特别的限制，只要它们能在宿主中发挥功能。如果宿主是植物，启动子序列的例子包括花椰菜花叶病毒（cauliflower mosaic virus）（CaMV）衍生的 35S 转录物（The EMBO J. 6: 3901-3907, 1987），玉米泛素（Plant Mol. Biol. 18: 675-689, 1992），胭脂碱合酶（NOS）基因，和章鱼碱（OCT）合酶基因启动子。终止子序列的例子包括花椰菜花叶病毒衍生的和胭脂碱合酶基因衍生的终止子。

为了更有效地筛选出感兴趣的转化体，优选导入一个有效的选择标记基因。选择标记基因的例子包括赋予卡那霉素抗性的基因、赋予

植物抗生素潮霉素抗性的潮霉素磷酸转移酶基因 (hpt)、和赋予植物 bialaphos 抗性的膦丝菌素乙酰基转移酶 (bar) 基因。这些选择标记基因和本发明的基因可以组合到同一个载体中。可选择地, 可以使用分别包含在不同载体中的 2 类重组 DNAs。

3. 转化体

本发明也提供了引入了本发明基因的转化体。通过使用本发明上述载体转化宿主而生成该转化体。对于宿主没有特别的限制, 只要本发明的基因可以在其中发挥功能。宿主优选为植物, 例子包括茄科 (Solanaceae) 植物、旋花科 (Convolvulaceae) 植物如甘薯、和十字花科 (Brassicaceae) 植物包括根作物如萝卜。本发明的基因被认为可在超过 2000 种的植物中发挥有效功能。茄科植物如马铃薯、烟草和番茄是特别优选的。本发明所使用的“植物”一词是指培养的植物细胞、栽培植株、植物器官(如叶、花瓣、茎、根、根状茎、或种子)、或植物组织(如表皮、韧皮部、薄壁组织、木质部或维管束)。例如, 当培养的植物细胞、整株植物、植物器官、或植物组织作为宿主时, 本发明的基因被引入一块上述植物中, 这通过农杆菌 (Agrobacterium) 二元载体方法, 粒子枪方法, 聚乙二醇方法, 或其它方法实现。从而可以得到所需要的转化体。可选择地, 可以通过电穿孔的方法将基因引入原生质体来制备转化体。

转导了本发明基因的转化体可以通过选择标记筛选或本发明基因的功能分析, 即根结线虫抗性, 来进行选择。生成的转化体, 特别是一种转基因植物, 可以在装有土壤或蛭石的盆中培养和扦插繁殖。这样繁殖的转基因植物及其所有后代均包括在本发明的转化体范围之内, 只要它们包含了本发明的基因。

4. 根结线虫抗性的转基因植物

引入了本发明根结线虫抗性基因的转基因植物对多种根结线虫物种表现出强有力的抗性。另外, 本发明基因所赋予的抗性是“数量抗性”, 抗性水平根据引入的基因数目而加强。应该注意到, 通常的根结线虫抗性基因不具备数量抗性。相应地, 本发明的基因可以通过增加所引入基因的数目来生成具有更强根结线虫抗性的转基因植物。

迄今已鉴定出的根结线虫抗性基因受温度的影响, 当暴露于高于某一特定温度水平时会丧失它们的抗性 (Mi 基因通常在 28℃失活)。

然而，本发明的转基因植物即使在 33℃ - 35℃ 高温栽培时，仍然能够保持对根结线虫的抗性。相应地，引入了本发明基因的转基因植物可以在温带或热带地区保持其根结线虫抗性，在这些地区温度相对较高。

因而，本发明可提供新的根结线虫抗性转基因植物及其生产方法。

5. 其它

根据本发明的基因赋予了宿主优良的根结线虫抗性，尤其是茄科植物，如马铃薯、烟草和番茄。相应地，该基因和含有该基因的组合物可以用作控制根结线虫的制剂。在根结线虫造成严重损失的地区，本发明的基因、引入了本发明基因的转基因植物和含有本发明基因用于控制根结线虫的制剂均具有控制损失和提高农作物生产力的重要效果。

附图简述：

图 1 显示通过 Southern 杂交证实的基因引入结果。

图 2 显示通过 RT-PCR 证实的基因引入结果，其中 2A 代表引物 RKN，2B 代表引物 Start2x2 和 PotaLRR。

图 3 的照片显示根部在感染根结线虫 42 天后的情况，其中 3A 代表转基因植物，3B 代表对照，3C 代表 TA209。

图 4 显示根部在感染根结线虫 42 天后的显微照片 (X40)，其中 4A 代表转基因植物，4B 代表对照。

本说明书包括作为本申请优先权文件的日本专利申请号 2002 - 089622 说明书的部分或全部公开内容。

实施本发明的最好方式：

下面结合实施例对本发明作出更加详细的描述，尽管本发明的技术范围不受实施例的限制。

实施例 1 基因功能域的分离

根据已知具有抗性基因的二倍体马铃薯基因型 85.37.38 的基因组 DNA 设计如下引物 (Watanabe 等, Amer. Potato J. 71: 599-604, 1994)，并通过 PCR 分离基因。根据已知的害虫抗性植物基因的保守功能域，如 NBS 或 LRR 序列，设计所述引物。

正向引物: 5' - GATCCATTCTATAATGTCTCACT-3' (SEQ IN NO:2)
 反向引物: 5' - CTATCTATAAGATCTTTAATCA-3' (SEQ IN NO:3)
 分离的 Rmi 候选基因命名为“片段#93”, 并且检查了其全长序列 (SEQ ID NO:1) 及其与已知基因的同源性 (表1)。

表 1

基因	同源性
短茎茄 (<i>Solanum acaule</i>) NBS-LRR 蛋白	69%
马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>) RGC	70%
马铃薯 NBS-LRR 蛋白	69%
马铃薯抗病性蛋白 Gpa	69%
马铃薯 Rx 蛋白	69%
卡茄椒 (<i>Capsicum chacoense</i>) 抗病性蛋白 BS2	54%
番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>) Prf 蛋白	54%
番茄 PRF 蛋白	52%
醋栗番茄 (<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>) Prf 蛋白	53%
番茄 tospovirus 抗性蛋白 D 蛋白	54%
拟南芥菜推定蛋白	96%
拟南芥菜 RPP13 蛋白	48%
拟南芥菜 rpp8 蛋白	47%
稻 (<i>Oryza sativa</i>) 推定抗病性蛋白	47%
拟南芥菜病毒抗性蛋白	48%
拟南芥菜抗病性蛋白 RPM1 同源基因	48%
羽裂芥菜 NBS/LRR 抗病性蛋白 RPM1 蛋白	51%
欧洲油菜 (<i>Brassica napus</i>) 抗病性同源基因 9N 蛋白	49%
稻 RPP1h 蛋白	47%
稻 RPR1 蛋白	46%
欧洲油菜抗病性蛋白	48%
普通小麦 (<i>Triticum aestivum</i>) 条锈病抗性蛋白 Yr10 蛋白	53%
普通小麦条锈病抗性蛋白 Yr10 蛋白	52%
稻 Pi-b 蛋白	86%
稻 Pib 蛋白	56%

尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 蛋白

50%

外源基因插入到二元载体的边缘序列之间，生成的重组载体在大肠杆菌中扩增。随后，扩增了的重组载体通过冻融、电穿孔或其他方法引入如根癌农杆菌 LBA4404, EHA101, EHA105 或 C58C1Rif^R。所得产物用于生成转基因植物。

实施例 2 载体构建

(1) 插入二元载体

分离的候选 Rmi 基因 (片段 #93) 用 BamHI 切开，连接到 pTarget 载体一次，再用 BamHI 切开，然后连接到二元载体 pBE2113NotI。生成的重组载体引入大肠杆菌 DH5 α 中并在其中扩增得到用于农杆菌引入载体 (马铃薯 RKN: pBE2113NotI)。

(2) 电穿孔

通过电穿孔，二元载体 (马铃薯 RKN: pBE2113NotI) 引入到根癌农杆菌 LBA4404 菌株 (Gibco BRL)。具体地，储存在 -80°C 下的根癌农杆菌 LBA4404 在冰中融化，在洁净工作台条件下，将约 $20\mu\text{l}$ 加入于 1.5ml Eppendorf 管中。加入 DNA ($100\text{ng}/\mu\text{l}$, $1\mu\text{l}$)，保持混合物于冰中，产物转移到试管中用于电穿孔。

(3) 基因引入确定

随后，加入 $50\mu\text{l}$ YM 培养基，进行抽吸，并转移至 15-ml Falcon 管中。加入 YM 培养基到总量 1ml ，于 225rpm 和 30°C 震动培养 3 小时。3 小时后，取 $200\mu\text{l}$ 培养物涂布于含卡那霉素的 YM 琼脂培养基中， 30°C 培养 48-56 小时，生成的菌落用 PCR 和 DNA 测序来确定基因引入。

(4) 菌落 PCR

取下已经鉴定为引入了基因的根癌农杆菌 LBA4404 菌株的菌落，使用具有如表 2 所述的组合物的反应溶液进行菌落 PCR。取下生成的 PCR 产物 ($1\mu\text{l}$) 与少量蓝色汁液混合。混合物进行电泳，凝胶包含 2% 溶解在 0.5% TAE 中的琼脂糖。使用 λ Hind III 标记 (标记 II, Boehringer Mannheim)。然后，含有表 2 所述组合物的溶液分装于 8 连管 (8-strip tubes)，并安装于 PCR 仪 (GeneAmp9600, Perkin-Elmer)。

表 2

物质	需要量
缓冲液 x10	2.5 μ l
MgCl ₂ (150mM)	0.5 μ l
dNTP x10	2 μ l
正向引物 (PoMi-F-1, 1pmol/ μ l)	2.5 μ l
反向引物 (PoMi-R-1, 1pmol/ μ l)	2.5 μ l
Taq 聚合酶 (10U/ μ l)	0.25 μ l
模板	任意
dH ₂ O	+ α
总量	25 μ l

加入上述反应溶液于 1.5-ml Locking 管中, 加入 80 μ l 75% 的异丙醇, 随后混合。室温放置 15 分钟, 并离心 20 分钟 (室温最大速)。去掉上清液, 再加入 250 μ l 75% 的异丙醇, 随后混合。然后, 混合物离心 5 分钟 (室温最大速), 去掉上清液, 离心产物在通风房间内晾干。随后, 每管加入 25 μ l 模板抑制剂 (TSR) 并混合, 将混合物离心沉淀, 并在 95℃ Heat Block 热激 3 分钟。产物放置在冰上并转移到 DNA 测序 310 专用管。然后进行 DNA 测序。

取已经鉴定为引入了基因的根癌农杆菌 LBA4404 菌株的菌落, 在含有 100mg/l 卡那霉素的 YEB 培养基中震动培养过夜, 温度为 30℃, 每分钟转数为 225。将培养的细胞溶液 (每管 850 μ l) 注入冰上的冷冻管中, 加入 150 μ l 甘油, 然后用石蜡封口膜包裹密封试管, 并且用涡旋混合仪混合管中的溶液。然后再用塑料包裹, 并浸入预冷至 -20℃ 的 99.5% 乙醇中, 在冷冻室中 -20℃ 冷冻约 10 分钟。然后, 储存在预冷至 -80℃ 的储存容器中。

实施例 3 转基因植物的制备

制备了应用实施例 2 制备的载体来引入根结线虫抗性基因结构域的转基因植物。使用再分化和早期种植并对线虫敏感的二倍体 *Nicotiana benthamiana* (科的一种植物) 作为宿主植物。平行地, 该基因被引入到线虫敏感型四倍体马铃薯种, 即 Desiree。

(1) 用根癌农杆菌侵染植物

在冰中冻融实施例 2 制备的根癌农杆菌 LB4404 菌株。在洁净的工作台条件下, 将 YEB 培养基 (40ml) 加入于 Falcon 管中, 在其上加入抗生素, 随后反向混合。混合物分装, 每管 10ml。加入根癌农杆菌 LB4404 菌株 ($10\mu\text{l}$), 并在震动培养仪中培养, 过夜 (28°C , 225rpm), 并用分光光度计分析培养物在 600nm 下的吸光度。一旦吸光度约为 2, 则用 YEB 培养基稀释培养溶液, 使吸光度在 0.6-0.8 之间。

传代培养 2-3 周的植物用外科手术刀在无菌滤纸上作上标记, 划分为根、茎、和叶, 然后浸入无菌水防止变干。标记的植物片段浸入吸光度调整在 0.6-0.8 之间的根癌农杆菌溶液中 7 分钟, 转移到无菌滤纸, 充分除去水分, 并培养于共培养培养基 3 天。此处所用的共培养培养基包含 1mg/l 的苜蓿基腺嘌呤 (BA)、35mg/l 的反式玉米素核苷和 0.1mg/l 的吲哚乙酸。

(2) 在共培养培养基上传代培养

如上所述, 制备共培养培养基, 每个培养皿中加入 20ml, 其上放置无菌圆滤纸, 移入感染的植物, 培养 3 天。

表 3

改良的 MS 培养基的组成: 加入 30g 蔗糖于如下的组合物中, 使总量为 1 升, PH 值用 KOH 或 HCl 调整至 5.9, 然后加入 2.5gGellan 胶。

溶液号	成分	物质	最终浓度	溶液浓度
溶液 1 (20ml/l)	NH_4NO_3	硝酸铵	1,650mg	82.5g/l
	KNO_3	硝酸钾	1,900mg	95.0 g/l
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	二水氯化钙	440mg	22.0 g/l
溶液 2 (10ml/l)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	七水硫酸镁	370mg	37.0 g/l
	KH_2PO_4	磷酸二氢钾	170mg	17.0 g/l
溶液 3 (20ml/l)	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	二水乙二胺四乙酸 二钠	37.3mg	1.87 g/l
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	七水硫酸亚铁	27.8mg	1.39 g/l
溶液 4 (10ml/l)	H_3BO_3	硼酸	6.2mg	620mg/l
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	四水硫酸锰	22.3mg	2,230 mg/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	七水硫酸锌	8.6mg	860 mg/l
	KI	碘化钾	0.83mg	83 mg/l
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	钼酸钠	0.25mg	1ml/l
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	五水硫酸铜	0.025mg	1 ml/l
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	六水氯化钴	0.025mg	1 ml/l
溶液 5	硫胺素-HCl	维生素 B1-HCl	0.5mg	50mg/l
	肌醇	肌醇	0.1mg	10 mg/l
	吡哆醇	盐酸吡哆醇	0.5mg	50 mg/l
(10ml/l)	烟酸	烟酸	5mg	500 mg/l
	甘氨酸	甘氨酸	2mg	200 mg/l
	生物素	D-生物素	0.05mg	5 mg/l
	叶酸	叶酸	0.5mg	50 mg/l

(1) 在愈伤组织形成性培养基上传代培养

加入 1 mg/l 的苄基腺嘌呤、0.1mg/l 的 NAA、150mg/l 的卡那霉素和 200mg/l 的羧苄青霉素于表 3 所示的改良 MS 培养基中来制备愈伤组织形成性培养基。制备好的培养基倒入培养皿中，每个培养皿 20ml。在共生培养基中培养 3 天的植物片段在上述愈伤组织形成性培养基上继续进行传代培养。

(4) 生苗培养基上传代培养

加入 150mg/l 的卡那霉素和 200mg/l 的羧苄青霉素于表 3 所示的改良 MS 培养基中来制备生苗培养基, 制备好的培养基倒入培养皿中, 每个培养皿 20ml。在愈伤组织形成性培养基中培养约 2 周并生成了愈伤组织的植物片段, 在上述生苗培养基中继续进行传代培养。然后在室内进行整天光照(荧光)培养。

(3) 在含 MS 培养基的试管中传代培养

将表 3 所示的改良 MS 培养基倒入试管中, 每管 5ml, 并在高压灭菌器中灭菌。在生苗培养基中再分化的植株中, 将完全独立的植株作为单个品系于无菌试管中进行传代培养。

(4) 生根培养基上传代培养

加入卡那霉素(75mg/l)和 100mg/l 的羧苄青霉素于表 3 所示的改良 MS 培养基中, 产物倒入培养瓶中, 每瓶 40ml 制成生根培养基。在含 MS 培养基的试管中培养了 1-2 周, 长到 2-3cm 的植株继续在上述生根培养基中传代培养, 每瓶约 3 株。

(5) 条件

在花盆中装满商业购买的蔬菜用土, 将在生根培养基上培养约 3 周, 已经长根的植株转移到花盆中生长。

实施例 4 通过 Southern 杂交证实基因引入

再生植株生长在选择培养基上, 即含有卡那霉素的培养基, 根据根部生长状况选择生长良好的品系作为转基因植株的临时候选植株。转基因候选植株应用 Southern 杂交来证实基因引入。

(1) 试验方法

提取上述候选转基因植株的临时候选株系的 DNA, 用实施例 1 中的引物 (SEQ ID Nos: 2 和 3) 进行 PCR, 扩增根结线虫抗性基因结构域。

通过 PCR 证实的引入了基因结构域的株系进行 Southern 杂交, 使用实施例 1 中确定的 Rmi (SEQ ID NO: 1) 序列作为探针, 并且估计引入的基因数目。杂交条件如表 4 所示。

表 4

步骤	条件	时间
烘干	80℃	2 小时
预杂交	55℃	4 小时
杂交	55℃	17 小时
首次洗涤	55℃	10 分钟两次
二次洗涤	室温	5 分钟两次
曝光	黑暗	3 小时

(2) 结果

根据图 1 所示的结果，在对照中也发现了阳性反应。认为发生这些阳性反应是因为对照基因含有可与非转基因植物杂交的同源结构域。因此，在与对照不同的条件下仍然具有条带和与对照相比具有更多条带数量的植株鉴定为引入了基因的植株。

实施例 5 通过 RT-PCR 证实基因引入

(1) 试验方法

1) cDNA 的合成

在研钵中用液氮将植株研成粉末，使用常规技术提取 mRNA。用表 5 所示的反应组合物并使用加入 dT 到随机 9 聚体制备的引物和属于 Takara RNA PCR 试剂盒 (Takara) 的 M13 引物 M4 进行 mRNA 的反转录，以合成 cDNA。所使用的引物和反应条件如下所示：

表 5
反转录反应组合物

MgCl ₂	4 μl
10 × RNA PCR 缓冲液	2 μl
dNTP 混合物	2 μl
RNA 酶抑制剂	0.5 μl
反转录酶	1 μl
随机 9 聚体或寡聚 dT - 衔接头 (Adaptor) 引物	1 μl
模板 mRNA	9.5 μl
总量	20 μl

<使用随机 9 聚引物的反应>

随机 9 聚体: dp (5' - N N N N N N N N N-3')

反应条件: 30℃ 预温育 10 分钟;

一个循环, 42℃ 30 分钟, 99℃ 5 分钟, 和 55℃ 5 分钟。

<使用寡聚 DT-衔接头引物的反应>

加入寡聚 dT 到寡聚 DT-衔接头而制备的引物: 使用 M13 引物 M4
5' - gttttcccagtcacgac-3' (SEQ ID NO: 4)

反应条件: 一个循环, 42℃ 30 分钟, 99℃ 5 分钟, 和 55℃ 5 分钟。

2) PCR

随后, 使用所得到的 cDNA 进行 PCR。使用 GeneAmp 9600 (Applied Biosystems) 进行 PCR, 引物 (RKN, Start2x2, 和 PotaLRR) 和反应条件如下所示。

<PCR 使用引物 RKN>

引物 RKN-F1: GTTGGTCATGAAAATGAA (SEQ ID NO: 5)

引物 RKN-R1: ATATTGCTCTTCCAATCA (SEQ ID NO: 6)

表 6
使用引物 RKN 进行 PCR 的反应组合物

成分	需要量
10×缓冲液	5 μl
MgCl ₂ (150mM)	1 μl
DNTP (2mM)	4 μl
正向引物 (RKN-F1, 1pmol/μl)	5 μl
反向引物 (RKN-R1, 1pmol/μl)	5 μl
Taq-聚合酶 (10 μ/μl)	0.5 μl
模板	275ng
dH ₂ O	+ α
总量	50 μl

反应条件：共 30 个循环，95℃ 10 分钟，95℃ 1 分钟，55℃ 2 分钟和 72℃ 3 分钟

最后在 72℃ 延伸 10 分钟

<使用引物 Start2x2 和 PotaLRR 的反应>

引物 Start2x2: ATGGCTTATGCTGCTATTACTTGT (SEQ ID NO: 7)

引物 PotaLRR: CTAAGTGATACAGACCTCAACAGA (SEQ ID NO: 8)

表 7

使用引物 Start2x2 和 PotaLRR 进行 PCR 的反应组合物

物质	需要量
缓冲液	5 μ l
MgCl ₂	1 μ l
DNTP	4 μ l
正向引物 (Start2x2 - F, 1pmol/ μ l)	5 μ l
反向引物 (PotaLRR - 1, 1pmol/ μ l)	5 μ l
Taq-聚合酶 (10 μ / μ l)	0.5 μ l
模板	275ng
dH ₂ O	+ α
总量	50 μ l

反应条件：共 30 个循环，95℃ 10 分钟，95℃ 1 分钟，55℃ 2 分钟和 72℃ 3 分钟

最后在 72℃ 延伸 10 分钟

3) 电穿孔

上述得到的 PCR 产物由于电穿孔，比较条带的区别，来估计基因引入的发生率。

(2) 结果

RT-PCR 的结果显示在图 2 中。当使用 PKN、Start2x2 引物和 PotaLRR 时，对照中没有发现条带，而在候选转基因植株（植株 8 和 9）中发现了条带。从而证实了基因引入并在转基因植株中转录。

实施例 6 转基因植株的抗性评估

(1) 试验方法

证明引入了基因的转基因 *Nicotiana benthamiana* (如 1、8、14 和 18 号)，非转基因 *Nicotiana benthamiana* 和线虫敏感型番茄品种 TA209 用南方根结线虫进行感染。可以肉眼观察和显微检查植物地上部分和根部的情况。

证明引入了基因的转基因 *Nicotiana benthamiana* (如 1、8、14

和 18 号)、非转基因 *Nicotiana benthamiana* 和线虫敏感型番茄品种 TA209 种植在感染南方根结线虫的土壤中培养来评估其抗性。根据常规技术来进行评估 (Williamson 等, Plant Cell, 1998), 使用罂红 (Sigma-Aldrich) 对根结线虫卵进行染色, 并以存在或不存在卵和卵的数量来评估抗性。同时检查了根部是否存在虫瘿。从而检测了引入基因的数量和线虫抗性之间的相互关系。

(2) 结果

关于转基因植株的地上部分的情况, 与非转基因植株和 TA209 不同的是其黄化的程度没有进一步发展。根结的数量也较少。在显微镜下进一步观测根部, 在转基因植株的根部没有观察到类似根结的变形根结。然而, 在非转基因植株和 TA209 的根部, 观察到类似根结的变形根结, 且在该处观察到了类似线虫卵的阴影。因此证明引入了本发明基因的转基因植株具有高度根结线虫抗性 (图 3 和 4)。

再有, 本发明的转基因植株可以维持其根结线虫抗性, 即使培养和种植在 33℃ - 35℃ 的高温环境下。从而证实本发明的基因不同于 Mi 基因 (在 28℃ 时失活), 其不受高温的影响。

实施例 7 野生型烟草根结线虫抗性评价

(1) 试验方法

根据实施例 3 所描述的方法使用实施例 2 制备的载体, 将根结线虫抗性基因引入到野生型烟草。引入了基因的品系进行 Southern 杂交和 RT-PCR 以鉴定基因引入。进一步, 种植转基因植株于感染了根结线虫的土壤中, 并在温室中生长 6 周, 白天 (16 小时) 温度为 30℃ - 35℃, 夜晚 (8 小时) 温度为 25℃ - 30℃。然后评价其根结线虫抗性。通过下述方式进行抗性评价, 首先观察根部是否有根结, 然后显微观察没有根结的植株。结果如表 8 所示。

(2) 结果

从表 8 可以明显看出, 本发明的根结线虫抗性基因具有数量抗性, 与普通的根结线虫抗性基因如番茄的 mi 基因是不同的。

表 8

品系	Southern 杂交	RT-PCR *	抗性 **
	引入基因的数目		
<i>N. benthamiana</i>	对照	N	S
IK-1	I	N	S
IK-2	I	N	S
IK-3	I	P	MR
IK-4	3	P	HR
IK-6	2	P	R
IK-7	0	--	S
IK-11	1	P	MR
IK-12	1	P	MR
IK-14	2	P	R
IK-15	3	P	HR
IK-16	0	--	MS
IK-17	0	--	S
IK-18	0	--	MS
IK-19	0	--	S
IK-20	0	--	S
IK-24	1	N	MS

1) 数值: 引入的基因的数目

I: 与对照相同

2) N: 阴性; P: 阳性; --: 未评估

3) HR: 既没有发现根结也没有发现卵。

R: 在根部没有发现根结, 但发现了一些卵。

MR: 在根部发现一些根结和卵。

MS: 在根部发现许多根结。

S: 在整个根部均发现了许多根结。

实施例 8 栽培种马铃薯根结线虫抗性评估

(1) 试验方法

使用实施例 2 制备的载体, 根据实施例 3 所描述的方法将线虫抗性基因引入到栽培种马铃薯 (Desiree)。引入了该基因的物种进行 Southern 杂交、PCR 和 RT-PCR 以鉴定基因引入。然后, 将转基因植株种植在感染了根结线虫的土壤中, 并在温室中生长 6 周, 白天 (16 小

时)温度为 30℃ - 35℃, 夜晚(8 小时)温度为 25℃ - 30℃。以实施例 7 中同样的方式评价其线虫抗性。作为对照的未处理的 Desiree、根结线虫敏感型 Atzimba (马铃薯)、TA209 和 *N. benthamiana*, 在同样的条件下生长并随后进行评价。结果如表 9 所示。

(2) 结果

从表 9 中可明显看出, 本发明的根结线虫抗性基因在栽培种马铃薯中表现出数量抗性。

表 9

品系	Southern 杂交 ¹⁾	RT-PCR ²⁾	抗性 ³⁾	PCR ⁴⁾
引入的基因数目				
Desiree	对照	N	S	N
RKN-2	2	P	R	P
RKN-15	2	P	R	P
RKN-16	3	P	HR	P
RKN-29	3	P	R	P
RKN-34	2	P	R	P
RKN-36	3	P	HR	P
RKN-37	2	P	MR	P
RKN-38	2	P	R	P
RKN-39	2	P	R	P
RKN-40	3	P	HR	P
RKN-101	1	N	S	N
RKN-103	1	P	MR	P
RKN-104	1	P	S	P
RKN-105	1	P	MR	N
RKN-106	1	N	S	N
RKN-107	2	P	R	P
RKN-108	2	P	MR	P
RKN-110	1	P	MS	P
RKN-111	3	P	HR	P
RKN-135	3	P	R	P
对照				
<i>N. benthamiana</i>	--	N	S	N
TA209 番茄	--	N	S	N
Atzimba	--	N	S	N

1) 数值: 引入基因的数目; I: 与对照和未处理品系表现相同的品系。

2) N: 阴性; P: 阳性

3) HR: 既没有发现根结也没有发现卵。

R: 在根部没有发现根结, 但发现了一些卵。

MR: 在根部发现一些根结和卵。

MS: 在根部发现许多根结。

S: 在整个根部均发现了许多根结。

4) N: 阴性; P: 阳性

在本文中的所有公开物、专利和专利申请共同以全文引作本文参考。

工业实用性

本发明提供了一种新的根结线虫抗性基因, 该基因不受高温的影响, 可广泛适用于多种根结线虫物种和品系且对其具有数量抗性。该基因能够赋予主要农作物高度根结线虫抗性, 如马铃薯、番茄和烟草。

序列表的无格式文本:

SEQ ID NO: 2: 人工序列描述: 引物

SEQ ID NO: 3: 人工序列描述: 引物

SEQ ID NO: 4: 人工序列描述: 引物

SEQ ID NO: 5: 人工序列描述: 引物

SEQ ID NO: 6: 人工序列描述: 引物

SEQ ID NO: 7: 人工序列描述: 引物

SEQ ID NO: 8: 人工序列描述: 引物

<110> Japan as Represented by President of The University of Tsukuba

<120> 根结线虫抗性基因及其用途

<130> PH-1611-PCT

<140> CN02829029.1

<141> 2002-11-27

<150> JP 2002-89622

<151> 2002-03-27

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2613

<212> DNA

<213> 马铃薯 (*Solanum tuberosum*)

<220>

<221> misc_feature

<222> (110)..(110)

<213> n 代表任何碱基

<220>

<221> misc_feature

<222> (1435)..(1435)

<213> n 代表任何碱基

<220>

<221> misc_feature

<222> (2519)..(2520)

<213> n 代表任何碱基

<400> 1

```
atggccttatg ctgctattac ttgtcttatg agaaccatac aacaatctat tcaacttact 60
ggatgtaatt tgcaatcatt ctatgaaaag ttggaatcct tgagagcttn ttggagaaa 120
cacacgggca atcttgatgc attgaaaagc ttggaagctg aaatcataga acttgatgc 180
actacagaag atattttgga cttggaatca agaaatgtta aaaatccaat ttcaagaata 240
atagcttttt ggaaacttca ttctctcttg aaacaagcag taggacgcat tgattccacg 300
```

```

ctgaacaagt ggatggaaat gcagaacatg tacacccaaa ggaaagatga agaagcacat 360
aacttgatc ttgctagtag tgcatcaatg tctcaacatg ttgtggagcc tcaggatatg 420
atggttggac atgaaaatga actcgagatg atcatgcagg atcagcttgc tagaggagca 480
agtgaacttg aagttgtctc cattgtaggt atggggggca tcggttaagac aactttggct 540
gacaaaattt ataatgatcc attcataatg tcacactttg acattcgtgc aaaagctact 600
gtttcacaag agtattgcgc gaaaaatgta tgcctaagtc ttctttcttc tataagtgga 660
aagagcaatg agcatcaaga tgatgggcaa ctagctgac gactgcaaaa aagtctaaaa 720
gggaggaggt atttagtagt cattgatgac atatggaccg aacgagcttg ggatgatatg 780
aaactatgtt tcccagattg taactgtgga agcagaatac tgctgacaac tcggaatatg 840
gaagtagcta agtatgctag ctcaggtaag cctcctaaga atcaaatgcg actcttgaat 900
attgatgaaa gttggaagtt actaccaggt agagtctttg taaaaaactg tttctccctt 960
gaatttgaac aacttgggaa acaaattgct cttaaatgcg ggggattacc ttagctattt 1020
atcgttattg ctggagttct gtctaattt ggtgagtcac ttgatgaatg gacaagtgtt 1080
gcagagaatg taagttcagt ggtaagtaca gatcacaatg tacaatgcat gagagtgttg 1140
gcgttgagtt atcatcactt accacatcac ttgagagcgt gttttctata ttttgcaata 1200
ttcccgaggg atacagtgat tttgtgaat aaacttgtga aattatggac agcagagggt 1260
tttttgaaga cagaaatgat gaaaagtata gaagaagttg cagaaaaatg tgtaaagat 1320
cttatagata gaaatttagt tttgtccaa agggtgagta gttttgatgg aaaaataaaa 1380
gcttttgtaa tgcatgatgt gatccgtgaa ctctgcttga gagaagctcg aaacncaaat 1440
tttgtgaatg ttataatgga taatcaaaat ccatgtgaac aatccatgaa ttattccaca 1500
aaggaggttc ggataagtat ccaatccaaa ctgctgcca atcagttgtc tatggtttgt 1560
aataacgatt cctattctgt tctcgttttt actgaagatc cctcaagctc aagaatgggtg 1620
cagggttga agcatttcaa ggtactaaga gtacttatct tgcttcgggt gcattgcatg 1680
tttcccaatt gcatagttga actatttcac ttgagatata taggtttgag tgtttactcg 1740
tccactaatg attgggatat ttgttttcca tcctcaatag ctgccttga gtatttgcaa 1800
actttaatac ttaagtttcc aacatctctc ggatggaagt tcactagact tttcagatta 1860
ccatcgagta ttttcaagat gtcgcaattg aggcactctat cttggactg gaattacttg 1920
aatggacatg aatctagcga gagatcaagt tgggttttga gaaatcttga gtgtctgtct 1980
ggatggaatc ctttatcttg tacttcttcg gtttttagac tacttccgaa tgtaaagaag 2040
ttgcaaatat gtggtatcca agaagactac ataagaaagg acaaggtctt tgatgatctt 2100
tgtctgctaa atcagcttac agaattgaaa tttaagatta gaaagatgat tggaagagca 2160
atatatgata catcttttgt tcttctctct ctaggtgctt ttccgaagaa ccttaagaag 2220
ttagctttta caggtagctg ttgcatgtg aaggatttgg agattcttgg taagttgcct 2280
aaactcgagg ccttcaaaact aggatatgat gcctgcattg gtactgattg ggaagtaggt 2340
gaggaagggt ttccacactt gaagttcttg cgattgaagc atttgtactt gcataactgg 2400
agagctagta gtgatcattt tccacgactt gaacgactag tcattaaccg tcgttgagac 2460
atgtattcga tccacagga tttgtagac ataaccacac ttcagctgat tcatataann 2520
gactctgcaa aatctgttgg gaactccgcc aagaagattc agcaggaaat tgaagacagc 2580
tatggaagtt ctgttgaggt ctgtatcagt tag 2613

```

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400> 2

gatccattct ataatgtctc act

23

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400> 3

ctatctataa gatctttaat ca

22

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400> 4

gttttcccag tcacgac

17

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 引物

<400> 5

gttggtcatg aaaatgaa

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：引物

<400> 6

atattgctct tccaatca

18

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：引物

<400> 7

atggcttatg ctgctattac ttgt

24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：引物

<400> 8

ctaactgata cagacctcaa caga

24

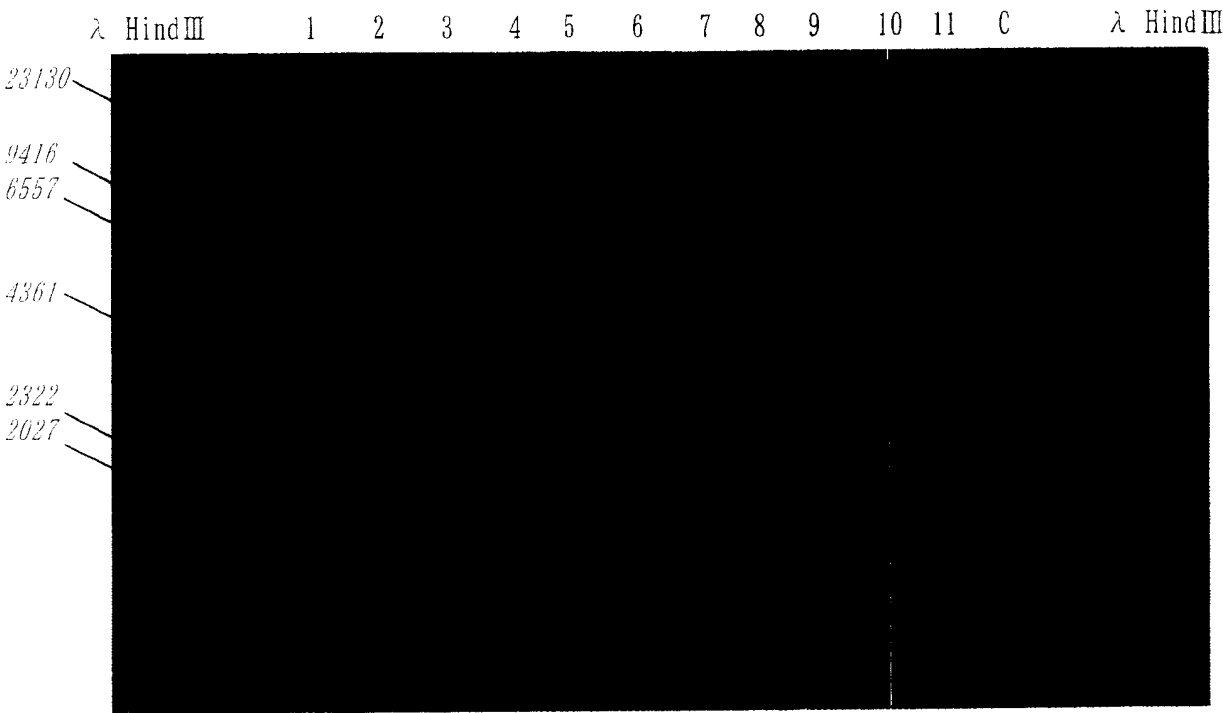
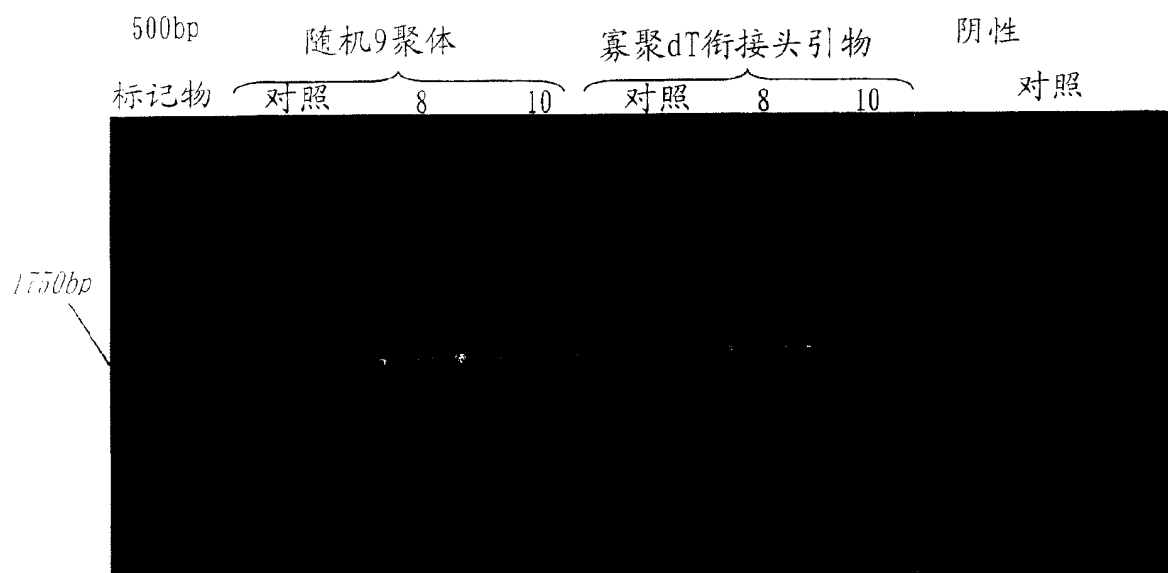


图 1

2A 引物: RKN



2B 引物: Start2 x 2, PotaLRR

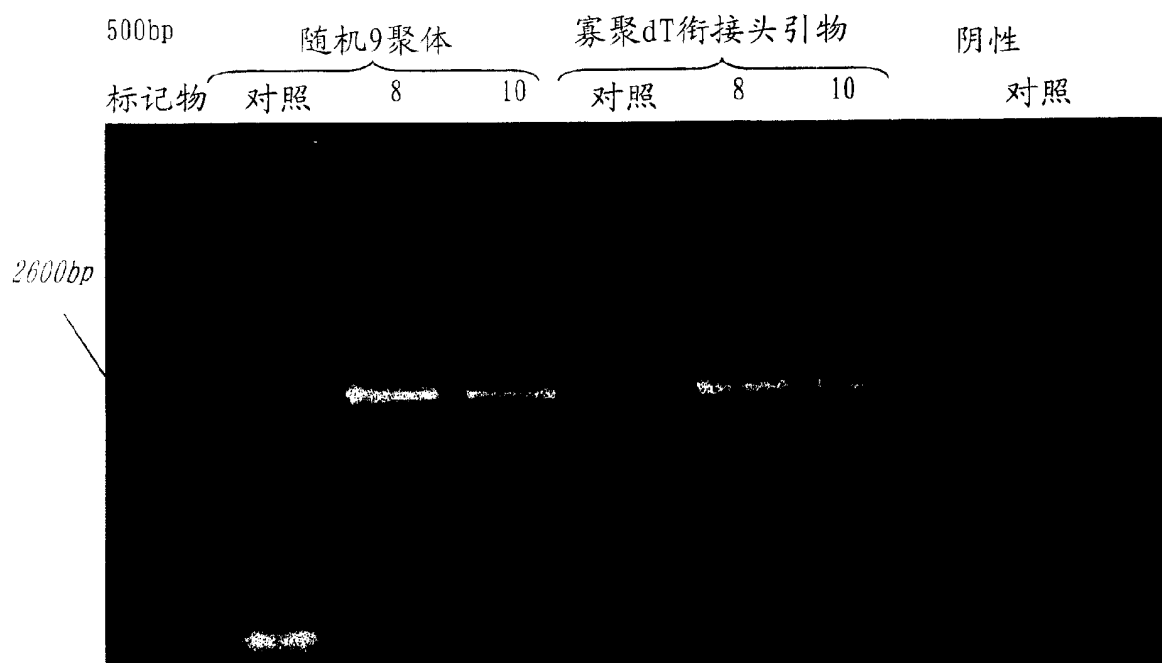
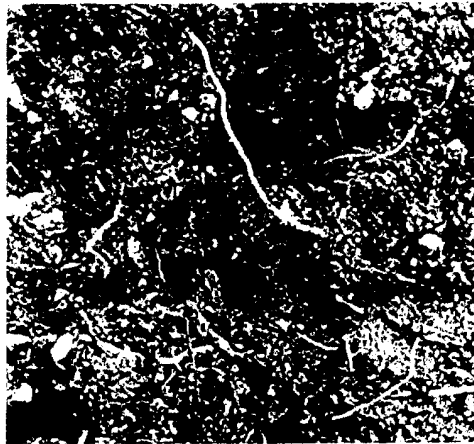
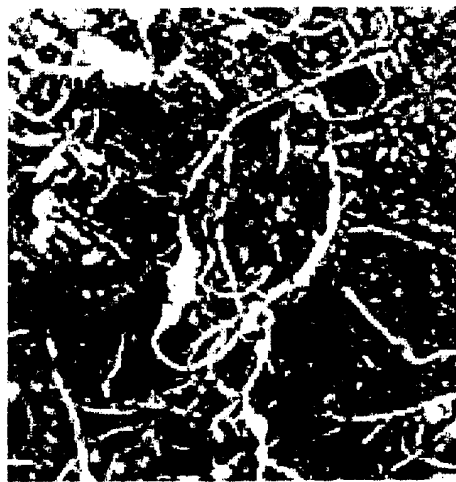


图 2

3A: 转化体



3B: 对照



3C: TA209

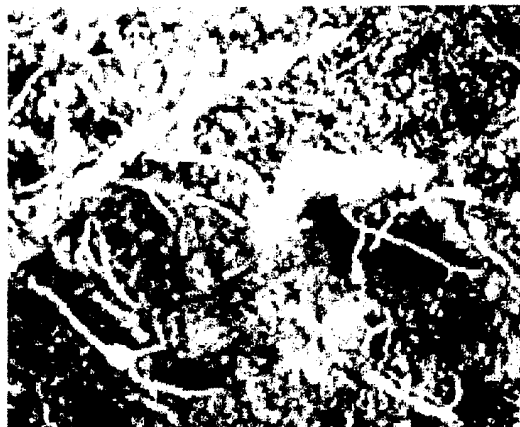


图 3

4A: 转化体



4B: 对照



图 4