



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105367640 A

(43) 申请公布日 2016.03.02

(21) 申请号 201510666884.9

C12N 15/29(2006.01)

(22) 申请日 2015.10.15

(71) 申请人 中国农业科学院作物科学研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号

(72) 发明人 朱振东 孙素丽 王晓鸣 段灿星
武小菲

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

代理人 王文君

(51) Int. Cl.

C07K 14/415(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

豌豆抗白粉病 er1 等位基因 er1-8 及其编码
蛋白

(57) 摘要

本发明涉及豌豆抗白粉病 er1 新等位基因 er1-8 及其编码蛋白,该等位基因位于豌豆遗传图谱第 VI 连锁群的 er1 基因座位上。豌豆资源 G0004389 经过人工接种白粉菌分离物 EPYN,结果表明 G0004389 对白粉病分离物 EPYN 产生免疫反应。本发明对豌豆抗白粉病资源 G0004389 的 er1 候选基因 PsML01cDNA 序列进行测定,获得的序列与野生型感病品种的 PsML01cDNA 序列进行比对分析,发现 G0004389 的 PsML01cDNA 序列,与野生型感病基因 PsML01cDNA 序列相比,在 1340-1342bp 处有 3 个碱基 GTG 缺失,这一缺失导致翻译过程中移码突变并造成 PsML01 蛋白的第 447 个氨基酸(缬氨酸)缺失,从而引起 PsML01 蛋白功能的变化。这与已鉴定的 7 个 er1 等位基因的突变位置和突变方式均不相同,表明这是一个 er1 的新等位基因,命名为 er1-8,从而为豌豆资源抗白粉病的分子育种提供新的基因资源。

1. er1-8 蛋白,其特征在于,其氨基酸序列如 Seq ID No. 1 所示,或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。
2. 编码权利要求 1 所述蛋白的豌豆抗白粉病 er1 等位基因 er1-8。
3. 如权利要求 2 所述的等位基因 er1-8,其特征在于,其 cDNA 序列如 Seq ID No. 2 所示。

豌豆抗白粉病 er1 等位基因 er1-8 及其编码蛋白

技术领域

[0001] 本发明涉及植物病理学、遗传育种及分子生物学领域,具体地说,涉及豌豆抗白粉病 er1 新等位基因 er1-8 及其编码蛋白。

背景技术

[0002] 豌豆 (*Pisum sativum* L.) 是世界上重要的食用豆类作物。我国是世界上第一大菜用豌豆生产国和第三大干豌豆生产国 (FAOSTAT 数据)。由白粉菌 (*Erysiphe pisi* D. C.) 引起的白粉病是豌豆的主要病害之一,在全球范围内引起严重经济损失 (Nisar et al., 2011; Fondevilla et al., 2012)。

[0003] 防治豌豆白粉病最为经济、有效且环境安全的方法是种植抗病品种。目前,国外已经鉴定了大量的抗白粉病豌豆资源,并在抗性资源中鉴定了 3 个独立遗传的抗白粉病基因 (er1、er2 和 Er3) (Harland et al., 1948; Heringa et al., 1969; Fondevilla et al., 2007)。迄今,除在豌豆资源 JI 2480 中鉴定豌豆抗白粉病基因 er2 和在豌豆野生种 *P. fulvum* 中鉴定 Er3 外,大量抗性资源筛选和遗传分析方面的研究表明,许多不同地理起源的抗白粉病豌豆资源的抗性均由 er1 控制 (Tiawari et al., 1997; Ghafoor et al., 2012; Liu et al., 2003; Vaid et al., 1997)。目前生产中应用的抗白粉病豌豆资源的抗性均由 er1 控制。随着豌豆分子标记的开发和遗传图谱的构建,抗病基因 er1 被定位在豌豆遗传图谱的第 6 连锁群 (LG VI) (Timmerman et al., 1994)。抗病基因 er1 对白粉菌表现抗病或者免疫的机制是抑制病原菌对寄主的表皮细胞的入侵。抗病基因 er1 具有抗病持久而且不受外界环境的影响,在欧盟等国已广泛应用于栽培育种中。近来研究表明 er1 基因是由于豌豆 PsML0 同源基因序列发生基因插入、缺失、移位、替换等基因突变导致功能丧失而产生的。目前,基于突变的位置和方式不同而已发现了 7 个 er1 等位基因,分别是 er1-1、er1-2、er1-3、er1-4、er1-5、er1-6 和 er1-7,其中只有等位基因 er1-2 是由于插入大的未知基因片段产生的,其它 er1 等位基因都是由单碱基突变或小片段缺失引起的 (Humphry et al., 2011; Pavan et al., 2011; Sun et al., 2015a; 2015b)。

[0004] 豌豆在我国已有 2000 多年的栽培历史,豌豆白粉病已对我国豌豆生产造成严重威胁。然而,我国对豌豆抗白粉病的研究较少,目前主要集中在豌豆抗白粉病的资源筛选,并在中国豌豆资源中发现了对中国白粉菌分离物 EPYN 和 EPBJ 均表现免疫的较好资源 (彭化贤等, 1991; 曾亮等, 2012; 王仲怡等, 2013; 付海宁等, 2014)。最近,在这些抗病资源中,鉴定了抗病基因 er1-1、er1-2、er1-6 和 er1-7。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供豌豆抗白粉病 er1 新等位基因 er1-8 及其编码蛋白。

[0006] 为了实现本发明目的,本发明提供的 er1-8 蛋白,其氨基酸序列如 Seq ID No. 1 所示,或该序列经替换、缺失或添加一个或几个氨基酸形成的具有同等功能的氨基酸序列。

[0007] 本发明还提供编码所述蛋白的豌豆抗白粉病 er1 等位基因 er1-8,其 cDNA 序列如

Seq ID No. 2 所示。

[0008] 本发明进一步提供所述等位基因 er1-8 在豌豆资源抗白粉病的分子育种中的应用。

[0009] 为了明确豌豆抗白粉病资源 G0004389 的抗病 er1 等位基因,本发明对 G0004389 的 er1 候选基因 PsML01cDNA 进行测序。序列分析结果显示 G0004389 的 PsML01cDNA 序列与野生型感病基因 PsML01cDNA 序列相比,在 1340-1342bp 处存在 3 个碱基 GTG 缺失,这一缺失导致翻译过程中移码突变并造成 PsML01 蛋白第 447 个氨基酸(缬氨酸)缺失,从而引起 PsML01 蛋白功能的变化。这与已鉴定的 7 个 er1 等位基因的突变位置和突变方式均不相同,表明这是一个 er1 的新等位基因,将其命名为 er1-8。该等位基因位于豌豆遗传图谱第 VI 连锁群的 er1 基因座位上。

[0010] 本发明通过对豌豆抗白粉病资源 G0004389 的 er1 候选基因 PsML01cDNA 序列分析,发现了新的抗性等位基因 er1-8。确定了新等位基因 er1-8 的 cDNA 序列。本发明首次鉴定了 er1 的新等位基因 er1-8,对豌豆抗白粉病育种工作具有重要意义,通过育种手段可有效控制豌豆白粉病的发生,减轻该病害造成的经济损失,并为豌豆资源抗白粉病的分子育种提供新的基因资源。

附图说明

[0011] 图 1 为本发明中抗病资源 G0004389(左)和感病品种坝豌 6 号(右)接种豌豆白粉菌分离物 EPYN 10 天后的表型。

[0012] 图 2 为本发明中控制豌豆白粉病抗性的功能基因 PsML01 的结构以及抗病资源 G0004389 和野生型豌豆感病资源在基因 PsML01 的第 15 个外显子的核苷酸序列比对结果。

具体实施方式

[0013] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例均按照常规实验条件,如 Sambrook 等分子克隆实验手册(Sambrook J&Russell DW, Molecular cloning: a laboratory manual, 2001),或按照制造厂商说明书建议的条件。

[0014] 实施例 1 豌豆抗白粉病资源 G0004389 的表型鉴定

[0015] 将抗病豌豆资源 G0004389 和感病对照品种坝豌 6 号以及抗病对照品种 YI 分别播种于以粗蛭石为基质的 250mL 的纸杯中,每杯播 5 粒,于 18~26℃ 的温室培养,待豌豆苗第 3 或第 4 茎节叶片展开时,采用抖落法接种白粉菌分离物 EPYN 的分生孢子(NCBI, Accession number :KR957355),接种后置于 18~22℃ 温室培养。采用 0~4 级的病害严重度分级标准,0 级:无病;1 级:病斑上有淡薄菌丝层,可见绿色叶面,不产生孢子;2 级:菌丝层较厚,不透绿,产生一定量孢子;3 级:菌丝层厚,产孢量较多;4 级:产孢量多,病斑上的菌丝层全被孢子覆盖(Vaid et al., 1997; Rana et al., 2013)。接种 10 天后感病对照品种病害严重度达 4 级后调查各供试资源的发病情况。抗性评价标准为:0 级为免疫(I),1~2 级为抗病(R),3~4 级为感病(S)。对表现为免疫和抗病的豌豆资源进行重复鉴定。

[0016] 接种 10 天后,感病对照品种坝豌 6 号所有植株的叶片、茎秆和卷须上全部覆盖厚的菌丝层,并产生大量分生孢子,茎秆和卷须也布满菌丝体和分生孢子,病害严重度为 4 级,表现感病;抗病对照品种 YI (PI 391630) 叶片、茎秆和卷须上均无可见症状,病级为 0,

表现免疫。对照品种对分离物 EPYN 的表型反应与王仲怡等 (2013) 的鉴定结果相同。抗性资源 G0004389 的表现型与抗病对照 YI 相同,对分离物 EPYN 表现免疫反应。

[0017] 抗病资源 G0004389 和感病品种坝豌 6 号接种豌豆白粉菌分离物 EPYN 10 天后的表型如图 1 所示。

[0018] 实施例 2 抗性资源的 er1 候选基因 PsML01cDNA 序列鉴定

[0019] 用 RNAPrep 植物总 RNA 提取试剂盒 (离心柱型,购自天根生化)提取豌豆资源 G0004389、感病对照品种坝豌 6 号以及抗病对照品种 YI (含 er1-4 等位基因)的植物总 RNA。具体操作方法如下:

[0020] 1) 取约 100mg 豌豆幼嫩叶片在液氮中迅速研磨成粉末,加入 450 μ L RL (使用前加入 β -巯基乙醇至终浓度为 1%),涡旋剧烈震荡混匀;

[0021] 2) 将所有溶液转移至过滤柱 CS 上 (过滤柱 CS 放在收集管中),12000rpm 离心 5min,小心吸取收集管中的上清至 RNase-free 的离心管中;

[0022] 3) 缓慢向离心管中加入 0.5 倍体积的无水乙醇,混匀,将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中,静置 2min,12000rpm 离心 1min,倒掉收集管中的废液;

[0023] 4) 向吸附柱 CR3 中加入 500 μ L 去蛋白液 RW1,静置 2min,12000rpm 离心 1min,倒掉收集管中的废液;

[0024] 5) DNase I 工作液的配制:取 10 μ L DNase I 储存液放入新的 RNase-free 离心管中,加入 70 μ L RDD 溶液,轻柔混匀;

[0025] 6) 向吸附柱 CR3 中央加入 80 μ L 的 DNase I 工作液,室温放置 20min;

[0026] 7) 向吸附柱 CR3 中加入 350 μ L 去蛋白液 RW1,静置 2min,12000rpm 离心 1min,倒掉收集管中的废液;

[0027] 8) 向吸附柱 CR3 中加入 500 μ L 漂洗液 RW (使用前加入无水乙醇),室温静置 2min,12000rpm 离心 1min,倒掉收集管中的废液;

[0028] 9) 重复步骤 8);

[0029] 10) 12000rpm 离心 2min,倒掉废液,将吸附柱 CR3 置于室温放置数分钟,彻底晾干残留的漂洗液;

[0030] 11) 将吸附柱 CR3 放入一个新的 RNase-free 离心管中,向吸附膜的中间位置悬空滴加 50 μ L RNase-free ddH₂O,室温放置 10min,12000rpm 离心 2min,得到 RNA 溶液;

[0031] 12) RNA 完整性检测:普通琼脂糖凝胶电泳,电泳条件:胶浓度 1.2%;1 \times TBE 电泳缓冲液;150V;15min。

[0032] 用 BioRT 逆转录扩增 (RT-PCR) 试剂盒 (两步法) 合成 mRNA 第 1 条 cDNA 链,用 PsML01 特异性引物对 PsML01F/PsML01R (5'-AAAATGGCTGAAGAGGGAGTT-3' / 5'-TCCACAAATCAAGCTGCTACC-3') 进行 PCR 扩增 (Paven et al., 2013)。PCR 扩增产物经 1.5% TBE 琼脂糖凝胶电泳检测,采用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (离心柱型,购自天根生化) 回收并纯化 PCR 产物。将纯化后的 PCR 产物克隆到 pZeroBack 载体或 pMG-T 载体 (购自天根生化) 中,送北京六合华大基因科技股份有限公司测序,利用 ClustalX2 软件分析抗病、感病品种之间的 PsML01cDNA 序列差异,并与已知的野生型豌豆品种 PsML01cDNA 序列 (GenBank: FJ463618) 进行比对分析 (Humphry et al. 2011)。控制豌豆白粉病抗性的功能基因 PsML01 的结构如图 2 所示,该基因包括 14 个内含子和 15 个外显子。

[0033] 结果表明感病对照坝豌6号的PsML01cDNA序列与野生型PsML01序列(FJ463618)完全相同。抗病对照YI的PsML01cDNA序列与野生型PsML01序列(GenBank:FJ463618)不同,发现抗病资源G0004389的PsML01cDNA与野生型PsML01cDNA序列相比,在1340-1342bp处发生3个碱基GTG缺失(SEQ ID NO. 2)。这一缺失导致翻译过程中移码突变并造成PsML01蛋白的第447个氨基酸——缬氨酸(V)缺失(SEQ ID NO. 1),从而引起PsML01蛋白功能的变化。这与已鉴定的7个er1等位基因的突变位置和突变方式均不相同,表明这是一个er1的新等位基因,将其命名为er1-8。该等位基因位于豌豆遗传图谱第VI连锁群的er1基因座位上,从而为豌豆资源抗白粉病的分子育种提供新的基因资源。

[0034] 抗病资源G0004389和野生型豌豆感病品种在基因PsML01的第15个外显子的核苷酸序列比对结果如图2所示。

[0035] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

[0036] 参考文献

[0037] FAOSTAT 2015. Available online:<http://faostat3.fao.org>(accessed on 13June 2015).

[0038] Fondevilla S,Rubiales D.Powdery mildew control in pea:a review.Agron Sustainable Dev. 2012 ;32:401 - 409.

[0039] Fondevilla S,Torres AM,Moreno MT,Rubiales D.Identification of a new gene for resistance to powdery mildew in *Pisum fulvum*,a wild relative of pea. Breed Sci, 2007 ;57:181 - 184.

[0040] Ghafoor A,McPhee K.Marker assisted selection(MAS)for developing powdery mildew resistant pea cultivars.Euphytica. 2012 ;186(3):593 - 607.

[0041] Harland SC.Inheritance of immunity to mildew in Peruvian forms of *Pisum sativum*.Heredity. 1948 ;2:263 - 269.

[0042] Heringa RJ, Van Norel A,Tazelaar MF.Resistance to powdery mildew(*Erysiphe polygoni* D.C.)in peas(*Pisum sativum* L.).Euphytica 1969 ; 18:163 - 169.

[0043] Humphry M, Reinstädler A,Ivanov S,Bisseling T,Panstruga R.Durable broad-spectrum powdery mildew resistance in pea erlplants is conferred by natural loss-of-function mutations in PsML01.Mol Plant Pathol.2011 ;12:866 - 878,

[0044] Liu SM,O'Brien L,Moore SG.A single recessive gene confers effective resistance to powdery mildew of field pea grown in northern New South Wales. Aust J Exp Agric. 2003 ;43:373 - 378.

[0045] M.Nisar,A.Ghafoor,Linkage of a RAPD marker with powdery mildew resistance erlgene in *Pisum sativum* L.,Russ. J.Genet. 2011 ;47:300 - 304.

[0046] Pavan S,Schiavulli A,Appiano M,Marcotrigiano AR,Cillo F,Visser RGF,et al.Pea powdery mildew erlresistance is associated to loss-of-function mutations

at a MLO homologous locus. *Theor Appl Genet.* 2011 ;123:1425 - 1431.

[0047] Sun S, Fu H, Wang Z, Duan C, Zong X, Zhu Z. Discovery of a novel *er1* allele conferring powdery mildew resistance in Chinese pea (*Pisum sativum* L.) landraces. *Plos One.* 2015a ;Submitted.

[0048] Sun SL, Wang ZY, Fu HN, Duan CX, Wang XM, Zhu ZD. Resistance to powdery mildew in the pea cultivar Xucaili conferred by the gene *er1*. *The Crop J.* 2015b ;doi:10.1016/j.cj.2015.07.006.

[0049] Timmerman GM, Frew TJ, Weeden NF. Linkage analysis of *er1*, a recessive *Pisum sativum* gene for resistance to powdery mildew fungus (*Erysiphe pisi* DC). *Theor Appl Genet.* 1994 ;88:1050 - 1055.

[0050] Tiwari KR, Penner GA, Warkentin TD. Inheritance of powdery mildew resistance in pea. *Can J Plant Sci.* 1997 ;77:307 - 310.

[0051] Vaid A, Tyagi PD. Genetics of powdery mildew resistance in pea. *Euphytica.* 1997 ;96:203 - 206.

[0052] 付海宁, 孙素丽, 朱振东, 段灿星, 杨晓明. 加拿大豌豆品种(系)抗白粉病表型和基因型鉴定. *植物遗传资源学报*, 2014, 15:1028-1033.

[0053] 彭化贤, 姚革, 贾瑞林, 梁红云. 豌豆抗白粉病资源鉴定研究. *西南农业大学学报*, 1991, 13(4):384-386.

[0054] 王仲怡, 包世英, 段灿星, 宗绪晓, 朱振东. 豌豆抗白粉病资源筛选及分子鉴定. *作物学报*, 2013, 39:1030 - 1038.

[0055] 曾亮, 李敏权, 杨晓明. 豌豆种质资源白粉病抗性鉴定. *草原与草坪*, 2012, 32:35 - 38.

[0001]

序列表

<110> 中国农业科学院作物科学研究所
 <120> 豌豆抗白粉病 *er1* 等位基因 *er1-8* 及其编码蛋白
 <130> KHP151116541.4
 <160> 4
 <170> PatentIn version 3.5

 <210> 1
 <211> 573
 <212> PRT
 <213> 豌豆抗病品种 G0004389
 <400> 1
 Met Ala Glu Glu Gly Val Lys Glu Arg Thr Leu Glu Glu Thr Pro Thr
 1 5 10 15
 Trp Ala Val Ala Val Val Cys Leu Val Leu Leu Ala Val Ser Ile Leu
 20 25 30
 Ile Glu His Ile Ile His Val Ile Gly Lys Trp Leu Lys Lys Arg Asn
 35 40 45
 Lys Asn Ala Leu Tyr Glu Ala Leu Glu Lys Ile Lys Gly Glu Leu Met
 50 55 60
 Leu Leu Gly Phe Ile Ser Leu Leu Leu Thr Val Phe Gln Asp Asn Ile
 65 70 75 80
 Ser Lys Ile Cys Val Ser Gln Lys Ile Gly Ser Thr Trp His Pro Cys
 85 90 95
 Ser Thr Ser Asn Thr Lys Ala Lys Ala Lys Ser Asp Glu Ser Leu Asp
 100 105 110
 Tyr Lys Thr Asn Asn Asp Arg Lys Leu Leu Glu Tyr Phe Asp Pro Ile
 115 120 125
 Pro Arg Arg Ile Leu Ala Thr Lys Gly Tyr Asp Lys Cys Phe Asp Lys
 130 135 140
 Gly Gln Val Ala Leu Val Ser Ala Tyr Gly Ile His Gln Leu His Ile
 145 150 155 160
 Phe Ile Phe Val Leu Ala Leu Phe His Ile Leu Gln Cys Ile Ile Thr
 165 170 175
 Leu Thr Leu Gly Arg Ile Lys Met Arg Lys Trp Lys Thr Trp Glu Asp
 180 185 190
 Glu Thr Arg Thr Val Glu Tyr Gln Phe Tyr Asn Asp Pro Glu Arg Phe
 195 200 205
 Arg Phe Ala Arg Asp Thr Thr Phe Gly Arg Arg His Leu Ser Met Trp
 210 215 220
 Ala Gln Ser Pro Ile Leu Leu Trp Ile Val Ser Phe Phe Arg Gln Phe
 225 230 235 240
 Phe Gly Ser Ile Ser Arg Val Asp Tyr Met Ala Leu Arg His Gly Phe
 245 250 255

[0002]

Ile Met Ala His Leu Pro Pro Gly His Asp Ala Gln Phe Asp Phe Gln
 260 265 270
 Lys Tyr Ile Ser Arg Ser Ile Glu Glu Asp Phe Lys Val Val Val Gly
 275 280 285
 Ile Ser Pro Thr Ile Trp Leu Phe Thr Val Leu Phe Leu Leu Thr Asn
 290 295 300
 Thr His Gly Trp Tyr Ser Tyr Tyr Trp Leu Pro Phe Leu Pro Leu Ile
 305 310 315 320
 Val Ile Leu Leu Val Gly Ala Lys Leu Gln Met Ile Ile Thr Lys Met
 325 330 335
 Gly Leu Arg Ile Gln Asp Arg Gly Glu Val Ile Lys Gly Ala Pro Val
 340 345 350
 Val Glu Pro Gly Asp His Leu Phe Trp Phe Asn Arg Pro His Leu Leu
 355 360 365
 Leu Phe Thr Ile His Leu Val Leu Phe Gln Asn Ala Phe Gln Leu Ala
 370 375 380
 Phe Phe Ala Trp Ser Thr Tyr Glu Phe Ser Ile Thr Ser Cys Phe His
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Ala Asp Ser Val Ile Arg Ile Thr Val Gly Val Val Ile
 405 410 415
 Gln Thr Leu Cys Ser Tyr Val Thr Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Val Thr
 420 425 430
 Gln Met Gly Ser Thr Met Lys Pro Thr Ile Phe Asn Glu Arg Ala Thr
 435 440 445
 Ala Leu Lys Asn Trp His His Thr Ala Lys Lys Gln Val Lys Gln Ser
 450 455 460
 Asn His Ser Asn Asn Thr Thr Pro Tyr Ser Ser Arg Pro Ser Thr Pro
 465 470 475 480
 Thr His Ala Met Ser Pro Val His Leu Leu His Arg His Thr Ala Gly
 485 490 495
 Asn Ser Asp Ser Leu Gln Thr Ser Pro Glu Lys Ser Asp Tyr Lys Asn
 500 505 510
 Glu Gln Trp Asp Ile Glu Gly Glu Gly Pro Thr Ser Leu Arg Asn Asp
 515 520 525
 Gln Thr Gly Gln His Glu Ile Gln Ile Ala Gly Val Glu Ser Phe Ser
 530 535 540
 Ser Thr Glu Leu Pro Val Arg Ile Arg His Glu Ser Thr Ser Gly Ser
 545 550 555 560
 Lys Asp Phe Ser Phe Glu Lys Arg His Leu Gly Ser Asn
 565 570

<210> 2

<211> 1722

<212> DNA

<213> 豌豆抗病品种 G0004389

[0003]

<400> 2	
atggctgaag agggagttaa ggaacgaact ttggaagaaa caccaacttg ggcgttgca	60
gttgtgtgtc ttgtgtgtct agctgtttca atcttaattg aacatattat tcatgttatt	120
ggaaagtggg tgaagaagag aaacaaaaat gctctttatg aagctttgga aaagatcaaa	180
ggagagccta tgctactagg attcatatcc ttgcttctaa ctgtcttcca agataatatt	240
tctaaaaatg gcgtateaca aaaaattgga tcaacttggc atccttgttc cacttcaaac	300
acaaaggcca aggcataaat tgatgaatca ttagactata aaaceaacia tgatagaaaa	360
ctcttggagt attttgatcc taitctctgg agaattcttg ctacaaaagg atatgataaa	420
tgttttgata agggtaaggt tgcattagtt tctgcatatg gaattcacca aciccatata	480
ttcatttttg tgcctggcact attcatatc cttcaatgta taataacatt aactttggga	540
agaatcaaga tgaggaagtg gaagacttgg gaagatgaga caagaacagt tgaatatcaa	600
ttttataatg atccigagag gtttaggttt gcaagggaca caacatttgg aagaaggcac	660
ttgagcaagt gggctcagtc acctattttg ttatggattg ttagectctt cagacaattc	720
tttggatcta tcaatagagt tgattatatg gctcttaggc atggatttat catggetcat	780
cttctctcag gacatgatgc acaatttgat ttccaaaagt atataagtag atcaattgaa	840
gaggatttta aagtgttgtt aggaataagt ccaactatct ggctcttcac agtcttttct	900
cttcttacia atacatcatg gtggtattct tattatttgg ttcatttct tccactaatt	960
gtaatcttat tagttgtgtc taagttacia atgatcataa caaaaatggg attaaggatt	1020
caagacagag gagaagtaat caagggtgca cctgtgggtg agcctggaga tcaccttttc	1080
tggttcaatc gtcctcacct tctctctctc acgattcacc ttgttctctt tcagaatgcc	1140
tttcaacttg ctttttttgc ttggagtaca tatgagtttt ccataacctc ttgcttcac	1200
aaaacaactg cagatagtgt cattagaatc actgtagggg ttgtaataca aactctatgt	1260
agctatgtga ctttgcctct ttatgctcta gtcacacaga tgggatcaac catgaaacca	1320
accattttca acgaaagagc aacagcgtt aagaactggc accacacagc caaaaagcag	1380
gtaaaacaga gcaaccactc aaacaacacg acaccgtatt caagcagccc atcaacceca	1440
acacatgcc a tgtctctgt tccctgtc catagacaca ctgctggaaa cagcagcagt	1500
ctacaaactt ctccggaaaa gtctgattat aaaaatgaac agtgggatat tgaaggagaa	1560
ggaccaactt cctaagaaa cgatcaaca gggcaacatg agattcaaat agegggtgtc	1620
gagtcatttt cgtaaccga attgccggtt agaattagac atgaaagcac ctctggttca	1680
aaagattttt ctctcgagaa gcgccacta gggagcaatt ag	1722
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 3	
aaaatggctg aagagggagt t	21
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 4	
tccacaaate aagctgetac c	21

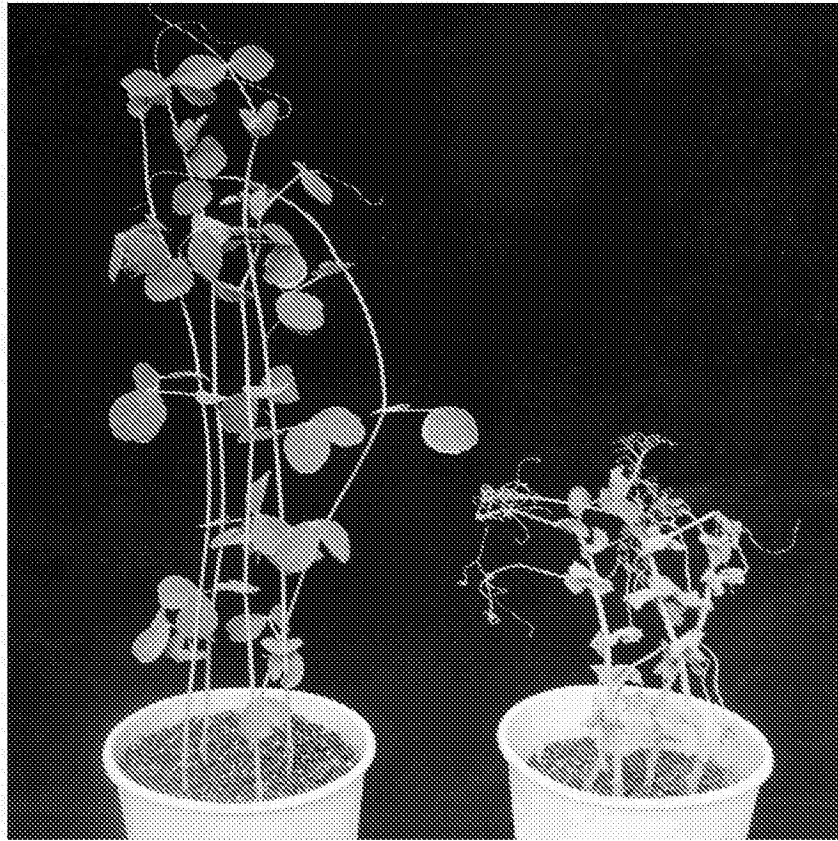


图 1

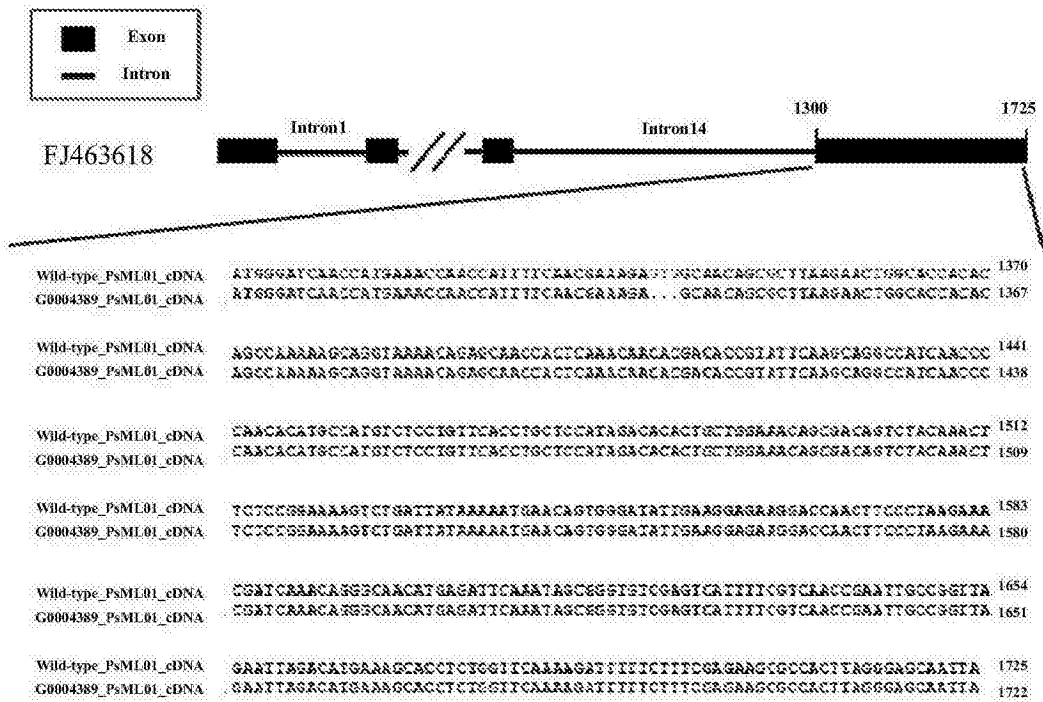


图 2