



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105483020 B

(45)授权公告日 2019.01.01

(21)申请号 201510979147.4

(22)申请日 2015.12.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105483020 A

(43)申请公布日 2016.04.13

(83)生物保藏信息
CGMCC No. 10767 2015.05.13

(73)专利权人 广西大学
地址 530004 广西壮族自治区南宁市西乡塘区大学东路100号

(72)发明人 黄荣韶 姚裕群 蓝芳 李良波

(74)专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理有限公司 11279

代理人 王正茂

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

C12P 1/02(2006.01)

A01N 63/04(2006.01)

A01P 3/00(2006.01)

C12R 1/77(2006.01)

(56)对比文件

CN 104805017 A,2015.07.29,

CN 104805017 A,2015.07.29,

CN 104142375 A,2014.11.12,

WO 2011158936 A,2011.12.22,

CN 101389764 A,2009.03.18,

审查员 全弘扬

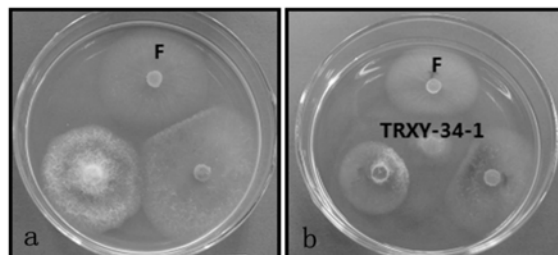
权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

越南槐内生真菌TRXY-34-1在防治三七根腐病中的应用

(57)摘要

本发明公开了一种越南槐内生真菌TRXY-34-1,越南槐内生真菌TRXY-34-1的分类命名为腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)TRXY-34-1,菌株的ITS序列如SEQ ID NO.1所述,保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏日期:2015年05月13日,保藏号:CGMCC No.10767。本发明首次从药用植物越南槐的根中分离筛选到一株内生真菌(*Fusarium solani*)TRXY-34-1,该菌对三七根腐病菌具有很强的抑制作用,为三七真菌病害的生物防治领域带来广阔的应用前景。



1. 一种越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物在防治三七根腐病中的应用,其特征在在于:越南槐内生真菌TRXY-34-1的分类命名为腐皮镰孢 (*Fusarium solani*) TRXY-34-1,保藏号:CGMCC No.10767;

所述的越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物的制备方法,操作步骤如下:

(1) 将越南槐内生真菌TRXY-34-1接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基平面皿中,置于温度为28℃下培养20天,所得培养材料切成块状并转移到无菌固体培养基中,置于28℃发酵60天;

(2) 发酵完成后,用发酵物2倍的甲醇浸泡发酵物并超声40min,然后过滤;

(3) 重复步骤(2)两次,合并两次滤液进行减压浓缩成浸膏,得到内生真菌TRXY-34-1发酵物的甲醇粗提物,即为越南槐内生真菌TRXY-34-1代谢产物。

2. 根据权利要求1所述越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物在防治三七根腐病中的应用,其特征在在于:步骤(1)中所述的无菌固体培养基含400g马铃薯,20g的右旋糖和20g蔗糖。

越南槐内生真菌TRXY-34-1在防治三七根腐病中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及一种越南槐内生真菌TRXY-34-1在防治三七根腐病中的应用。

背景技术

[0002] 现代农业对植物病害的防治过度依赖于化学农药的使用,大量化学农药的施放不仅对生态环境具有长期的破坏作用,也引起农产品品质下降,农药残留超标、病原菌的耐药性以及对人畜有害等诸多问题。寻找更为安全、有效的病害防治方法具有重大的意义,利用生物的方法来防治植物病害可以有效解决上述问题。

[0003] 三七(*Panax notoginseng* F.H.chen)又名田七、金不换等,具有显著的活血化瘀、消肿定痛功效,是一种中国传统名贵药材。以三七为主要原料制成的中成药如“云南白药”和“片仔癀”等广为流传。近年来,对三七原材料的需求日益增长。但是栽培过程中的真菌病害严重影响了三七生长。目前,在三七种植上,防治真菌病害过度依赖化学农药,大量化学农药的使用不仅影响了三七的品质,也造成了三七药材的大量农药残留。

[0004] 三七根腐病为三七主要病害之一,在产区俗称“绿臭”,主要症状为苗期的芽腐及其芦头和芽基结合处的褐色水渍状病变直至蔓延至整个茎杆基部。该病出苗期就有发生,4、5月病害停滞,6-9月进入多雨季节,进入发病高峰期。根腐病有多种类型,据报道其症状大都由三七根腐病菌(*Fusarium solani*) (简称*F.solani*)引起。

[0005] 这个真菌病害是造成多年来三七产品质量和产量下降的主要原因之一。在广西三七的传统道地产区,由于低海拔及高温多湿的气象条件,这种病害往往是同时发生的,造成了三七的大量减产甚至绝收,给种植户带来了巨大的经济损失。为了控制这个真菌病害,大量的化学农药被使用,造成了三七产品的大量农药残留,严重的污染了环境,大大的威胁了人们的健康。因此,开展生物防治三七真菌病害对三七产业的可持续发展是非常迫切和必要的。为此筛选出能同时拮抗这种病害的拮抗菌具有重大意义,筛选进而开发利用拮抗菌也是有效控制三七真菌病害最具发展潜力的防治措施之一。

[0006] 公开于该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不应当被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种越南槐内生真菌TRXY-34-1在防治三七根腐病中的应用,从而能有效的防治三七种植过程中出现的三七根腐病,从而提高三七的产量以及质量。

[0008] 为实现上述目的,本发明提供的技术方案如下:

[0009] 一种越南槐内生真菌TRXY-34-1,越南槐内生真菌TRXY-34-1的分类命名为腐皮镰孢(*Fusarium solani*) TRXY-34-1,菌株的ITS序列如SEQ ID NO.1所述,保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏日期:2015年05月13日,保藏号:CGMCC No.10767。

[0010] 优选的是,所述越南槐内生真菌TRXY-34-1代谢产物的制备方法为:

[0011] (1) 将越南槐内生真菌TRXY-34-1接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基平面皿(PDA平板)中,置于温度为28℃下培养20天,所得培养材料切成块状并转移到无菌固体培养基中,置于28℃发酵60天;

[0012] (2) 发酵完成后,用发酵物2倍的甲醇浸泡发酵物并超声40min,然后过滤;

[0013] (3) 重复步骤(2)两次,合并两次滤液进行减压浓缩成浸膏,得到内生真菌TRXY-34-1发酵物的甲醇粗提物,即为越南槐内生真菌TRXY-34-1代谢产物。

[0014] 优选的是,步骤(1)中所述的无菌固体培养基含400g马铃薯,20g的右旋糖和20g蔗糖。

[0015] 如上述制备所得越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物在防治三七根腐病中的应用。

[0016] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0017] 本发明首次从药用植物越南槐的根中分离筛选到一株内生真菌(*Fusarium solani*) TRXY-34-1,该菌对三七根腐病菌具有很强的抑制作用,为三七真菌病害的生物防治领域带来广阔的应用前景。

附图说明

[0018] 图1是本发明越南槐内生真菌TRXY-34-1与三七根腐病的平板对峙培养,其中F为三七根腐病菌(*Fusarium solani*),a为空白对照,b为实验组。

[0019] 图2是本发明越南槐内生真菌TRXY-34-1菌株形态特征,其中,a1为菌落形态,b1为菌体形态。

[0020] 图3为越南槐内生真菌TRXY-34-1菌株基于ITS序列的系统进化树。

[0021] 图4是根据本发明菌株越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌的菌丝生长的抑制效果;其中第1、第5个为空白对照即不含药的PDA平板;第2、第3、第4个为阳性对照多菌灵粉剂;第6、第7、第8为菌株TRXY-34-1的代谢产物,且浓度分别为2mg/ml,4mg/ml,8mg/ml;F为三七根腐病菌*Fusarium solani*。

具体实施方式

[0022] 下面结合具体实施方式进行详细描述,但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。甲醇为市购分析纯甲醇。2X TagMasterMix购自宝生物工程有限公司(Takara),Primer-1、Primer-2由华大基因合成。

[0023] 实施例1

[0024] 菌株的分离、筛选及鉴定

[0025] 一、菌株的分离

[0026] 供试材料:采自广西天等县石灰岩地区的野生越南槐。

[0027] 供试菌株:由广西大学植物病理研究所提供。

[0028] 培养基:1000ml马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA培养基),PDA培养基含马铃薯300g、

葡萄糖20g、琼脂20g和氯霉素0.1g,培养基pH值为 6.0 ± 0.2 。

[0029] 表面消毒:将长为6-8cm、宽为1-2cm新鲜健康的越南槐根用流水冲洗30min以冲干净泥沙,然后将洗净的越南槐根用无菌水漂洗2次,风干表面水分,移到超净工作台,在无菌条件下,将越南槐根用体积浓度为75%乙醇浸泡1min,无菌水漂洗2次,次氯酸钠(有效氯1%)浸泡2min,无菌水洗3次,无菌吸水纸吸干表面备用。

[0030] 菌株的分离、纯化:表面消毒好的越南槐根,无菌条件下,用无菌木片刮去表皮,用无菌枝剪剪去越南槐根的两端,余下部分用无菌小刀和无菌镊子分开木质部和韧皮部,并用无菌枝剪剪成0.5cm长的组织块,无菌转接至制备好的PDA培养基(含氯霉素),28℃培养。取表面消毒最后一次漂洗液涂布在PDA平板上,作为阴性对照。每天观测,待组织周围长出菌丝,挑取单一菌丝,接于无抗生素的PDA培养基。长出的菌落,如果菌落形态不一致,继续挑取单一菌丝转接PDA培养基,直至平板上新长出的菌落的外部形态一致。

[0031] 将分离到的内生真菌接种于PDA平板内,28℃下培养20天后待用。将三七根腐病菌接种于PDA平板,28℃下培养3天后待用。

[0032] 二、筛选

[0033] 采用平板对峙法对供试越南槐内生真菌进行菌体抑菌活性的初筛。

[0034] 首先,无菌条件下,用灭菌打孔器将内生真菌和三七根腐病菌制成6mm菌饼;在处理组中,将内生真菌菌饼转接到含PDA的培养皿中央,然后在内生真菌的菌饼周围等径3cm处放置三七根腐病菌菌饼,每株内生真菌重复3皿;在对照组中,PDA的培养皿中央不接内生真菌菌饼,在PDA的培养皿中央周围等径3cm处放置三七根腐病菌菌饼,重复3皿。然后28℃下培养,定期观测。待对照组中菌丝长至PDA的培养皿平板中央,在处理组中,测量三七根腐病菌菌饼中心到内生真菌菌饼中心之间三七根腐病菌的生长半径为处理生长半径;在对照组中,测量三七根腐病菌菌饼中心到PDA的培养皿中心之间三七根腐病菌的生长半径为对照生长半径。最后,根据以下公式,计算抑菌率:

[0035] 对照生长量=对照生长半径-菌饼半径

[0036] 处理生长量=处理生长半径-菌饼半径

[0037] 抑制率% = $\frac{\text{对照生长量} - \text{处理生长量}}{\text{对照生长量}} \times 100\%$

[0038] 结果共得到4株对三七根腐病菌抑制作用都很强的拮抗越南槐内生真菌菌株,其中一株名称为TRXY-34-1,对三七根腐病菌的抑制率为65%。

[0039] 三、鉴定

[0040] (一) 菌株形态特征

[0041] 菌体形态特征观察:将待鉴定的内生菌真菌菌株TRXY-34-1接种在PDA培养基上,置于28℃培养,分别在5、14及20天观察其培养特征和颜色变化。取稳定成熟的颜色特征作为其培养特征,作为鉴定的依据。观察记录气生菌丝的颜色,菌落的大小、颜色、组织形状、表面形状等作为参考特征。

[0042] 孢子形态特征观察:将待鉴定的内生菌真菌菌株TRXY-34-1作插片培养,当在PDA培养基上不产孢子,将菌丝转接于含无菌越南槐根的低营养培养基(四分之一浓度PDA)上以诱导孢子,将所观察到的形态结果显微照相,如图2所示。

[0043] (二) 菌株ITS序列及其系统发育学分析

[0044] DNA模板的制备:

[0045] 试剂: (1) 裂解缓冲液: Tris-Ac (pH 7.8) 40mM, NaAc 20mM, EDTA 1mM, SDS 1% (w/v);

[0046] (2) 5M NaCl溶液。

[0047] DNA提取:

[0048] 加600 μ L提取液 (Tris-Ac (pH 7.8) 40mM, NaAc 20mM, EDTA 1mM, SDS 1%) 到1.5ml离心管 (EP管), 用棒刮取少量菌丝放入EP管研磨, 65 $^{\circ}$ C水浴30min, 离心转速12000r/min, 离心10min;

[0049] 取离心所得上清液400 μ L, 加5M NaCl 100 μ L, 冰浴10min;

[0050] 然后在温度为4 $^{\circ}$ C下保持离心转速为12000r/min, 离心10min, 取上清液; 加上清液0.6倍异丙醇与上清液混匀 (或2倍无水乙醇) 冰浴1h, 保持离心转速12000r/min, 离心10min, 弃去上清液后所得余下物质晾干, 加20 μ L双蒸水 (ddH₂O), 取1-2 μ L做DNA模板。

[0051] PCR扩增ITS序列:

[0052] (1) PCR仪: ABI 3730-XL DNA测序仪 (Applied Biosystems, USA);

[0053] (2) 扩增引物: ITS1 (5'-T C C G T A G G T G A A C C T G C G G-3') 如SEQ ID NO.2所示, 和ITS4 (5'-T C C T C C G C T T A T T G A T A T G C-3') 如SEQ ID NO.3所示;

[0054] (3) 扩增体系:

[0055] ITS序列PCR扩增体系如表1所示: 表1.

[0056]

反应物	加样量
2X TagMasterMix	25 μ L
Primer-1	1 μ L
Primer-2	1 μ L
Template DNA	2 μ L
ddH ₂ O	21 μ L
反应总体积	50 μ L

[0057] 注: 表1中的Template DNA为上述制成DNA模板。

[0058] PCR反应条件如表2所示:

[0059] 表2.

[0060]

步骤	温度	时间
----	----	----

[0061]

步骤 1	95°C	3 min
步骤 2	94°C	30sec
	55°C	30 sec
	72°C	30 sec
步骤 3	72°C	10min

[0062] 注:表2中步骤2进行30个循环。

[0063] PCR扩增产物的电泳检测:

[0064] 电泳条件为1%的琼脂糖凝胶(含Goldview 5 μ l/100ml), 1 \times TBE电泳缓冲液, 90V电压电泳1小时, PCR产物上样量为3 μ L, 与1 μ L Loading dye混匀后点样。

[0065] 在254nm紫外下观察结果, 以TaKaRa公司的DL1000 DNA Marker为核酸标准分子量参照物, 确定扩增片段长度。扩增产物带应在标准物400-700bp的位置上。

[0066] PCR产物纯化和测序: 由深圳华大基因科技有限公司进行。

[0067] 系统进化树的构建:

[0068] 将所测的ITS序列与GenBank基因库中已测定的真菌的ITS序列进行比对, 根据比对结果下载相关序列。通过MEGA 6.0的邻接算法(Neighbor-joining NJ)进行系统分析并构建系统进化树, 如图3所示。

[0069] 结果:

[0070] (一) 菌株形态特征

[0071] 菌落形态特征: PDA培养基上, 菌落圆形, 基内菌丝灰白色, 辐射状, 气生菌丝白色, 棉絮状, 如图2中a1所示。

[0072] 孢子形态特征: 大部分弯月形, 偶见条形; 大型分生孢子: (5.00~6.25) μ m \times (23.75~40.00) μ m; 小型分生孢子: (3.75~5.00) μ m \times (8.75~13.75) μ m, 如图2中b1所示。

[0073] (二) 菌株ITS序列及其系统发育学分析

[0074] 利用引物ITS1和ITS4, 从菌株基因组DNA中扩增出一条500-600bp大小的片段, 经测序并将测序结果通过GenBank中BLASTn比对。结果表明, 菌株TRXY-34-1与Fusarium属中的真菌有很高的碱基序列相似性, 因此下载GenBank中Fusarium属的参考菌株序列, 用于系统发育分析, 以Thelonectria属中的Thelonectria westlandica (KF569844) 和Thelonectria trachosa (KF569842) 作为外群。在构建的系统进化树中, TRXY-34-1与Fusarium solani及Fusarium oxysporum的多个株系聚在一起形成支持强度为99%的末端分支。碱基相似性比较结果表明, TRXY-34-1与Fusarium solani及Fusarium oxysporum碱基序列没有差异, 序列相似性为100%。综合形态学和分子生物学特征, 将菌株初步鉴定为Fusarium solani。

[0075] 实施例2

[0076] 菌株的代谢产物对三七根腐病菌的抑制作用

[0077] 一、菌的发酵培养和发酵产物的提取

[0078] (1) 将越南槐内生真菌TRXY-34-1接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基平面皿(PDA平板)中,置于温度为28℃下培养20天,所得培养材料切成块状并转移到无菌固体培养基(含400g马铃薯、20g的右旋糖和20g蔗糖)的2升的锥形瓶中,置于28℃条件下发酵60天;

[0079] (2) 发酵完成后,用发酵物2倍的甲醇浸泡发酵物并超声40min,然后用纱布过滤,取滤液;

[0080] (3) 重复步骤(2)两次,合并两次滤液进行减压浓缩成浸膏,得到内生真菌TRXY-34-1发酵物的甲醇粗提物,即为越南槐内生真菌TRXY-34-1代谢产物。

[0081] 二、越南槐内生真菌TRXY-34-1代谢产物对三七根腐病菌的菌丝生长的抑制作用

[0082] 用菌丝生长法测定菌株TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌菌丝生长的抑制活性。将菌株TRXY-34-1的代谢产物和多菌灵粉剂(阳性对照)分别制成含2mg/mL, 4mg/mL, 8mg/mL浓度代谢产物的含药平板。在无菌条件下,用打孔器将三七根腐病菌制成6mm菌饼,把三七根腐病菌菌饼接到各含药平板中央为处理,以不含药平板中央接的三七根腐病菌菌饼为阴性对照,所有处理和对照重复三次,所有平板置于28℃培养。药物浓度按多菌灵粉剂的田间应用浓度设置。待阴性对照长满培养皿时,分别测量对照菌落和处理菌落的生长直径,并根据以下公式,计算抑制率:

[0083] 阴性对照生长量=阴性对照生长直径-菌饼直径

[0084] 处理生长量=处理生长直径-菌饼直径

[0085] 抑制率% = $\frac{\text{阴性对照生长量} - \text{处理生长量}}{\text{阴性对照生长量}} \times 100\%$

[0086] 三、越南槐内生真菌TRXY-34-1代谢产物对三七根腐病菌的最小抑菌浓度

[0087] 用肉汤稀释法测定菌株TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌的最小抑菌浓度。将在PDA培养基中培养5天的三七根腐病菌菌饼接种于含0.2%吐温80(v/v)的PDB液体培养基中,28℃,150r/min摇床培养7天,然后将培养物转到三角瓶,并倒入含0.2%吐温80的无菌双蒸水,用磁性棒搅拌30min,将溶液用无菌纱布过滤,得到孢子溶液,并用血球计数板将孢子浓度调节到每毫升 10^4 个孢子备用。将菌株的代谢产物用1%DMSO溶解成80mg/mL的代谢产物处理浓度,取5支无菌试管依次排列在试管架上,分别编号为1、2、3、4、5,每管分别加入1ml含0.2%吐温80的无菌双蒸水,然后将1ml 80mg/mL的菌株甲醇粗提物溶液加入编号为1的试管中并依次在各管中进行两倍连续稀释,并将1ml上述所得孢子溶液(10^4 个/ml)分别加入各管中,从而获得最终的TRXY-34-1代谢产物的处理浓度:20mg/ml(编号1试管),10mg/ml(编号2试管),5mg/ml(编号3试管),2.5mg/ml(编号4试管),1.25mg/ml(编号5试管)。1ml的1%DMSO和1ml的8mg/mL氟硅唑乳油分别代替代谢产物执行上述处理过程而作为阴性对照和阳性对照,所有处理和对照重复三次。最后,各管28℃,150r/min摇床培养5天。TRXY-34-1的代谢产物的MIC值为完全抑制三七根腐病菌可见生长的最小粗提物浓度。

[0088] 结果:

[0089] 菌株越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌菌丝生长的百分抑制率如表3中所示:

[0090] 表3.

[0091]

处理	浓度	真菌病原 (均值±标准差)
	mg/mL	<i>F. solani</i>
多菌灵粉剂	2	100.00±0.00
	4	100.00±0.00
	8	100.00±0.00
TRXY-34-1	2	68.10±0.66*
	4	91.10±0.36*
	8	94.90±0.46*

[0092] 注:表中阳性对照多菌灵粉剂含50%多菌灵;表中*表示数据通过单因素方差分析的LSD比较后,菌株TRXY-34-1的代谢产物和阳性对照多菌灵粉剂在相同浓度下,在 $P_{0.05}$ 水平上具显著性差异。

[0093] 菌株越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌菌丝生长的抑制结果表明,菌株越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌的菌丝生长均具有非常好的抑制效果,从表3可以看出TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌*F. solani*菌丝生长的百分抑制率为68.10-94.90%。与阳性对照多菌灵粉剂比较,菌株TRXY-34-1的甲醇粗提物,对三七根腐病菌*F. solani*菌丝生长的抑制效果略低于对照。

[0094] 越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌生长的最小抑菌浓度如表4所示:

[0095] 表4.

[0096]

处理	MIC (mg/ml)
	<i>F. solani</i>
氟硅唑乳油	0.5
TRXY-34-1	10

[0097] 注:表中阳性对照氟硅唑乳油有效成分含量为400mg/mL。

[0098] 菌株越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌生长的最小抑菌浓度测试结果表明,菌株越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌均具有较强的抑制作用,从表4可以看出越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物对三七根腐病菌*F. solani*的最小抑菌浓度为10mg/ml。

[0099] 从表3和表4可知,菌株越南槐内生真菌TRXY-34-1的代谢产物中含有很强的抑真菌或杀真菌的成分,因此,在三七根腐病菌的生态防治上,菌株越南槐内生真菌TRXY-34-1具有突出的潜力。

[0100] 前述对本发明的具体示例性实施方案的描述是为了说明和例证的目的。这些描述并非想将本发明限定为所公开的精确形式,并且很显然,根据上述教导,可以进行很多改变和变化。对示例性实施例进行选择 and 描述的目的在于解释本发明的特定原理及其实际应

用,从而使得本领域的技术人员能够实现并利用本发明的各种不同的示例性实施方案以及各种不同的选择和改变。本发明的范围意在由权利要求书及其等同形式所限定。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 广西大学

<120> 越南槐内生真菌 TRXY-34-1 在防治三七根腐病中的应用

<130> 中誉威圣

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 502

<212> DNA

<213> *Fusarium solani*

<400> 1

gattcgaggt caacattcag aagtgggtg ttttacggca tggccgcgcc gctctccagt 60

tgcgaggtgt tagctactac gcaatggaag ctgcggcggg accgccactg tattgaggg 120

acggcgtgtg cccacagggg gcttctgccg atccccaacg ccaggcccgg gggcctgagg

180

gttgtaatga cgctcgaaca ggcatgcccg ccagaatact ggcgggdcgca atgtgcgttc 240

aaagattega tgattcactg aattctgcaa ttcacattac ttatcgatt tcgctgcgtt 300

cttcatcgat gccagagcca agagatccgt tgttgaaagt ttaatttat ttgcttgtt 360

actcagaaaa acattataaa aacagagtta ggggtcctct ggcgggggdcg gccctgtt 420

acagggccgt ctgtcccgc cgaagcaacg ttttaggtat gttcacaggg ttgatgagtt 480

gtataactcg gtaatgatec ct

502

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造序列

<400> 2

tccgtaggtg aacctgcgg

19

[0002]

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造序列

<400> 3

tcttccgctt attgatatgc

20

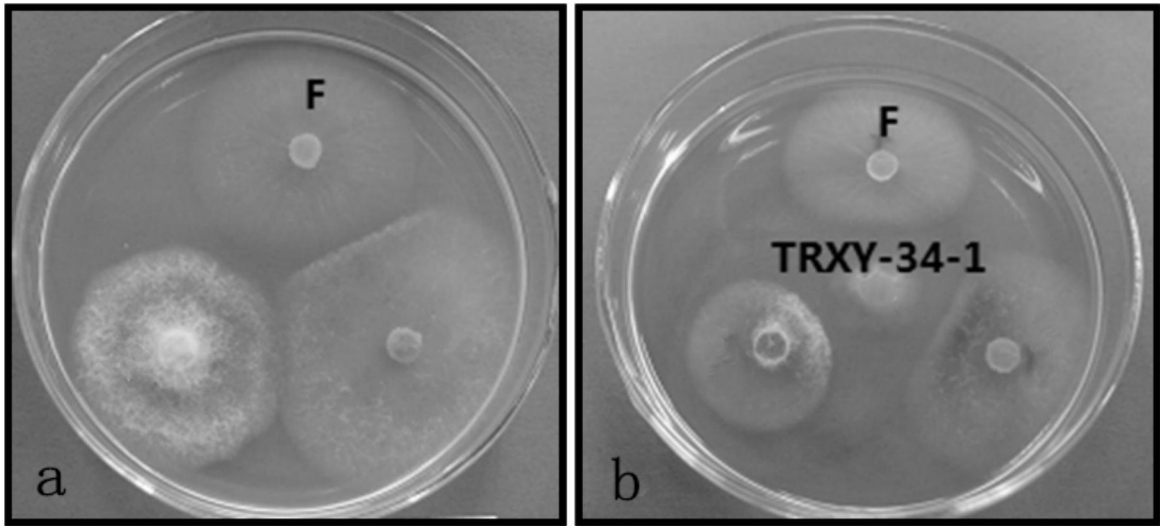


图1

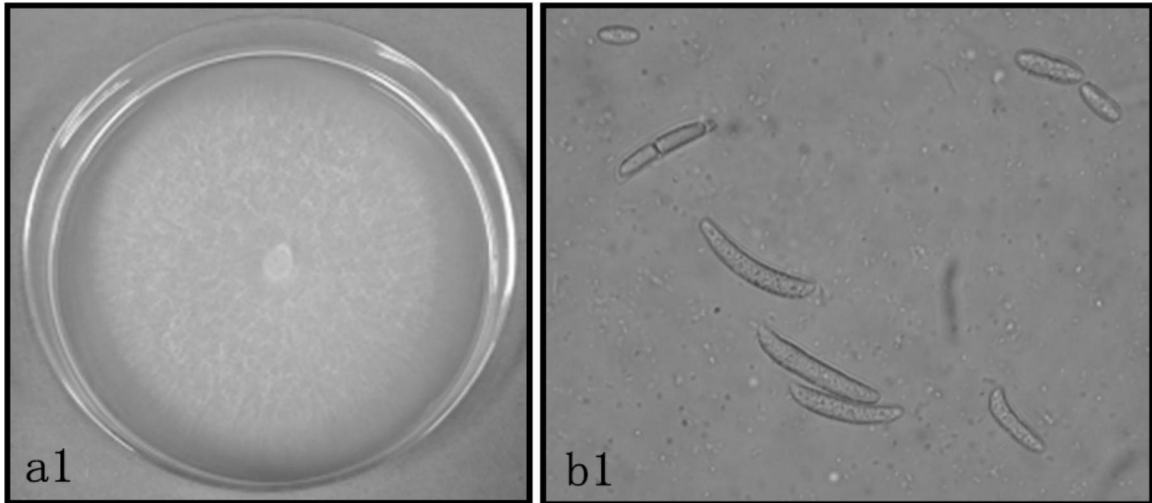


图2

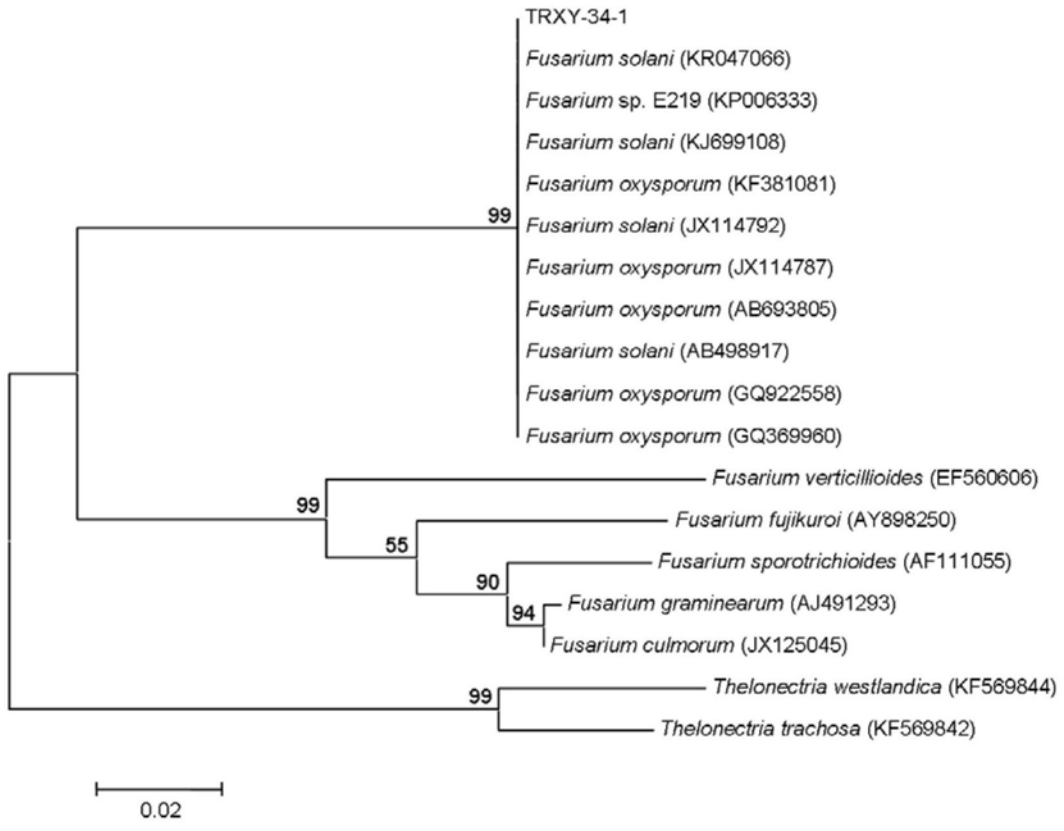


图3

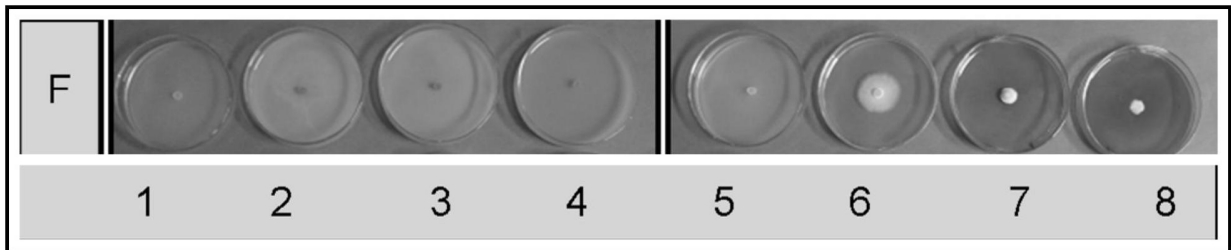


图4