



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110499389 A

(43)申请公布日 2019. 11. 26

(21)申请号 201910934802.2

(22)申请日 2019.09.29

(71)申请人 云南省烟草农业科学研究院
地址 650021 云南省昆明市圆通街33号

(72)发明人 黄昌军 刘勇

(74)专利代理机构 昆明大百科专利事务所
53106

代理人 李云

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6895(2018.01)

C12N 15/11(2006.01)

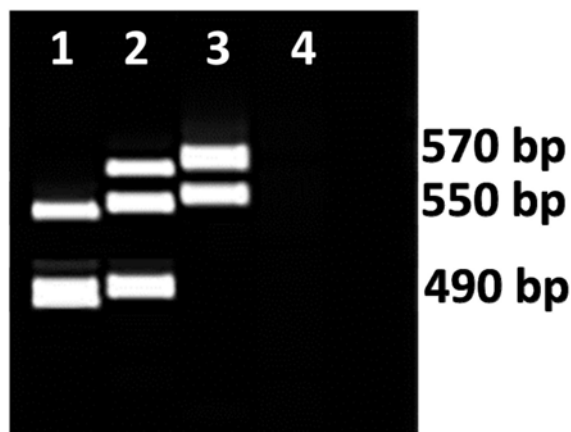
权利要求书1页 说明书15页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

与烟草抗斑萎病位点RTSW紧密连锁的共显性标记引物、鉴别方法及其应用

(57)摘要

与烟草抗斑萎病位点RTSW紧密连锁的共显性标记引物、鉴别方法及其应用,所述分子标记引物由引物1和引物2的两条单链DNA组成。本发明的共显性标记引物能够特异性的对烟草基因组DNA进行标记鉴定,检测烟草材料基因组DNA中RTSW的等位基因类型,不仅可以鉴定是否含有抗斑萎病位点RTSW,而且可以鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型,可靠且使用方便,与以往的抗斑萎病标记相比,具有与目标基因RTSW紧密连锁、准确性高、成本低廉、检测效率高等优点,可大大提高抗烟草斑萎病基因RTSW品种的筛选效率,极大地缩短抗病烟草品种的育种周期,提高育种效率。



1. 与烟草抗斑萎病位点RTSW紧密连锁的共显性标记引物,其特征在于,所述引物由引物1和引物2的两条单链DNA组成;

所述引物1序列为Seq ID No.1:

RTSW_Marker3_F 5' -CCTATGAAGCAACGAAGCGATA-3' ;

所述引物2序列为Seq ID No.2:

RTSW_Marker3_R 5' -GTTGACTGTTGACTGTTGATTAGAG-3' 。

2. 采用如权利要求1所述引物鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 分别以待鉴定烟草、烟草斑萎病抗源Polalta与斑萎病感病品种K326的基因组DNA为模板,用由引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物对基因组DNA进行PCR扩增,在含RTSW基因的植株扩增得到所特有的片段大小为490bp,其序列为SEQ ID No.3;在不含RTSW基因的植株扩增得到所特有的片段大小为570bp,其序列为SEQ ID No.4;

(2) 将扩增的PCR产物通过电泳检测或者测序,按照如下方法鉴别并确定待鉴定烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型:

1) 如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳或测序后的条带仅与Polalta的带型相同,且含有大小为490bp的条带,则待鉴定烟草为抗斑萎病烟草或候选为抗斑萎病烟草,且基因型为抗性RTSW基因位点纯合;

2) 如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳或测序后的条带仅与K326的带型相同,且含有大小为570bp的条带,则待鉴定烟草为感斑萎病烟草或候选为感斑萎病烟草,且基因型为感病rtsw基因位点纯合;

3) 如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳或测序后的条带同时含有与Polalta和K326带型相同的条带,且大小分别为490bp和570bp,则待鉴定烟草为抗斑萎病烟草或候选为抗斑萎病烟草,且基因型为抗病RTSW/rtsw,基因位点杂合。

3. 权利要求1所述与烟草抗斑萎病位点RTSW紧密连锁的共显性标记引物在烟草斑萎病抗病基因定位、克隆或选育烟草抗斑萎病品种中的应用。

4. 如权利要求2所述的采用所述引物鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的方法,其特征在于,提取待鉴定烟草DNA时,采用烟草的种子、叶片、根、花器任意一个部位或几个部位的组织。

5. 如权利要求2所述的采用所述引物鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的方法,其特征在于,所述的用由引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物进行PCR扩增,PCR的反应体系如下:分别以待鉴定烟草、烟草斑萎病抗源Polalta与斑萎病感病品种K326的基因组DNA为模板,PCR扩增体系:2×Premix Ex TaqMix PCR Buffer 12.5μL,10μmol/L引物1和引物2各0.5μL,50ng/μL模板DNA 1μL,加灭菌双蒸水使总体积为25μL;PCR反应程序为:94℃预变性5min;然后进入35个循环:94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s;循环结束后72℃延伸10min;4℃保存。

6. 如权利要求2所述的采用所述引物鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的方法,其特征在于,所述由引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物包含在Seq ID No.1或Seq ID No.2的5'端或3'端分别增加1~30个碱基扩增得到的基本相同DNA片段的引物。

与烟草抗斑萎病位点RTSW紧密连锁的共显性标记引物、鉴别方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学技术领域,特别是涉及可鉴别烟草抗斑萎病基因位点RTSW的分子标记及其在烟草RTSW抗病基因定位、克隆或选育烟草抗斑萎病品种中的应用。

背景技术

[0002] 烟草斑萎病是由正番茄斑萎病毒属(Orthotospovirus)病毒的侵染所造成的烟草病害。该属病毒是寄主范围最广、发生最为严重的一类植物病毒,其美洲型代表种番茄斑萎病毒(Tomato Spotted Wilt Virus,TSWV)已对我国云南烟区的烟叶生产构成了较大的威胁。最近几年从云南各地(州、市)县采集样品检测结果看,云南全省烟草上TSWV均有分布并有扩大和加重的趋势。而更让人忧虑的是目前云南省的烤烟主栽品种均不抗TSWV,田间调查发现现有的主栽烤烟品种K326、红花大金元、云烟87等均能被TSWV侵染,成为TSWV流行、爆发的潜在因素。烟草斑萎病常用的防治手段主要依赖防治传毒介体蓟马,但由于蓟马具有发育历期短、个体小易隐蔽、对杀虫剂极易产生抗药性等特点,所以现有的防治措施难以取得理想的控制效果,因而,选育抗斑萎病的烤烟品种是最经济、最有效的手段。

[0003] 野生烟草资源含有丰富的抗性基因。研究表明花烟草(Nicotiana glauca)对TSWV具有很好的抗性。接种TSWV仅在接种叶表现过敏性坏死症状,在系统叶中检测不到病毒的存在。经过一系列的常规杂交和回交转育,研究人员已将该抗性基因从花烟草抗性转育至烤烟品种中,育成抗病育种中间材料Polalta。Nicotiana glauca和Polalta对TSWV的抗性是由显性的单基因(命名为RTSW)位点控制。

[0004] 但令人遗憾的是,抗病基因RTSW尚未被克隆。在短时间内无法克隆抗病基因的情况下,开发和抗病基因紧密连锁的分子标记成为烟草斑萎病抗病育种的重要手段。迄今为止,国际上仅有H.Moon和J.S.Nicholson(2007)开发了相应的分子标记,但其AFLP标记存在和抗性基因遗传距离较远,连锁不紧密,开发的SCAR标记在实际应用中存在容易产生假阳性的问题。而且这两种标记都无法区分抗性位点的纯合/杂合基因型,限制了这些标记的大规模应用。在利用RTSW进行烟草抗斑萎病的育种过程中,其杂交或回交后代中会分离出该基因的不同基因型单株,这就需要对杂交或回交后代植株进行单株基因型的检测,选择出RTSW纯合或杂合的单株,用于随后进一步的回交或自交。共显性标记(codominance marker)是能同时检测出显性和隐性等位基因、能够区分纯合和杂合基因型的遗传标记。因此,开发可用于鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的共显性标记,可以建立一种简便、快速、准确、灵敏的鉴定烟草抗斑萎病基因方法,弥补现有技术的不足。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决现有技术的不足,提供一种与烟草抗斑萎病位点RTSW紧密连锁的共显性标记引物和采用所述引物鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的方法以及所述引物在烟草斑萎病抗病基因定位、克隆或选育烟草抗斑萎病品种中的应用具体

应用,该分子标记引物及鉴别方法可用于筛选含有RTSW抗病基因位点的资源和育种单株,并可以精确的获得含有RTSW抗病基因位点的纯/杂合基因型,达到简便、快速、准确、灵敏的鉴定烟草抗斑萎病基因位点方法的效果,为选育出高抗斑萎病的烟草育种材料提供技术手段。

[0006] 在本发明的上下文中,术语“抗斑萎病基因位点RTSW”是指包含烟草斑萎病抗病基因(RTSW基因)野生烟染色体片段的位点。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用了以下技术方案:

[0008] 与烟草抗斑萎病位点RTSW紧密连锁的共显性标记引物,所述引物由引物1和引物2的两条单链DNA组成;

[0009] 所述引物1序列为Seq ID No.1:

[0010] RTSW_Marker3_F 5' -CCTATGAAGCAACGAAGCGATA-3' ;

[0011] 所述引物2序列为Seq ID No.2:

[0012] RTSW_Marker3_R 5' -GTTGACTGTTGACTGTTGATTAGAG-3' ;

[0013] 采用所述引物鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的方法,步骤如下:

[0014] (1) 分别以待鉴定烟草、烟草斑萎病抗源Polalta与斑萎病感病品种K326的基因组DNA为模板,用由引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物对基因组DNA进行PCR扩增,在含RTSW基因的植株扩增得到所特有的片段大小为490bp,其序列为SEQ ID No.3;在不含RTSW基因的植株扩增得到所特有的片段大小为570bp,其序列为SEQ ID No.4;

[0015] (2) 将扩增的PCR产物通过电泳检测或者测序,按照如下方法鉴别并确定待鉴定烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型:

[0016] 1) 如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳或测序后的条带仅与Polalta的带型相同,且含有大小为490bp的条带,则待鉴定烟草为抗斑萎病烟草或候选为抗斑萎病烟草,且基因型为抗性RTSW基因位点纯合;

[0017] 2) 如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳或测序后的条带仅与K326的带型相同,且含有大小为570bp的条带,则待鉴定烟草为感斑萎病烟草或候选为感斑萎病烟草,且基因型为感病rtsw基因位点纯合;

[0018] 3) 如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳或测序后的条带同时含有与Polalta和K326带型相同的条带,且大小分别为490bp和570bp,则待鉴定烟草为抗斑萎病烟草或候选为抗斑萎病烟草,且基因型为抗病RTSW/rtsw,基因位点杂合。

[0019] 本发明提供了所述所述与烟草抗斑萎病位点RTSW紧密连锁的共显性标记引物在烟草斑萎病抗病基因定位、克隆或选育烟草抗斑萎病品种中的应用。

[0020] 进一步地,本发明在提取待鉴定烟草DNA时,采用烟草的种子、叶片、根、花器任意一个部位或几个部位的组织。

[0021] 进一步地,本发明所述的用由引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物进行PCR扩增,PCR的反应体系如下:分别以待鉴定烟草、烟草斑萎病抗源Polalta与斑萎病感病品种K326的基因组DNA为模板,PCR扩增体系:2×Premix Ex TaqMix PCR Buffer 12.5μL, 10μmol/L引物1和引物2各0.5μL, 50ng/μL模板DNA 1μL,加灭菌双蒸水使总体积为25μL;PCR反应程序为:94℃预变性5min;然后进入35个循环:94℃变性30s, 55℃退火30s, 72℃延伸30s;循环结束后72℃延伸10min;4℃保存。

[0022] 本发明所述由引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物包含在Seq ID No.1或Seq ID No.2的5'端或3'端分别增加1~30个碱基扩增得到的基本相同DNA片段的引物。

[0023] 本发明与现有技术相比,其有益效果为:

[0024] 本发明的引物是与RTSW基因位点紧密连锁的标记,本发明所建立的分子标记方法是基于PCR技术产生共显性标记,可用于抗病基因的图位克隆和分子标记辅助选择,通过检测抗斑萎病基因位点来预测烟草对斑萎病的抗性,鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型,可以在烟草的实生苗阶段进行淘汰选择,不仅节约生产成本而且大大提高选择效率,进而加速烟草抗斑萎病育种进程。

[0025] 具体体现在以下几点:

[0026] 1.紧密连锁:实验证明,利用本方法对烟草育种材料辅助鉴定的结果与抗性鉴定结果完全一致,而利用以往的抗斑萎病AFLP和SCAR标记,有部分结果和抗性鉴定不一致,表明该方法能够用于烟草抗斑萎病育种的分子标记辅助选择。

[0027] 2.准确性高:利用本方法对烟草育种材料辅助鉴定的结果,条带清晰,带型差别明显,而以往的抗斑萎病SCAR标记扩增片段在100-200bp之间,极易和引物二聚体所在的条带位置产生混淆。与以往的抗斑萎病标记相比,该检测方法克服了假阳性高、稳定性差等问题,准确率达100%。

[0028] 3.成本低廉:本研究利用普通PCR体系,PCR产物经过电泳即可完成检测,有效降低高通量检测成本。

[0029] 4.检测效率高:与以往的抗斑萎病AFLP标记相比,本研究仅仅只用一次电泳分析,克服了以往检测需要聚丙烯凝胶电泳的缺点,极大地提高了检测效率。

[0030] 5.操作简单:用本发明标记检测育种材料的抗烟草斑萎病基因RTSW操作简单,不仅节省生产成本,而且大大提高抗烟草斑萎病基因RTSW品种的筛选效率,极大地缩短抗病烟草品种的育种周期,提高育种效率。

附图说明

[0031] 图1是本发明以分子标记引物1和引物2为引物,对基因组DNA进行扩增的产物电泳检测结果,泳道1为抗病亲本Polalta,泳道2为烟草斑萎病抗源Polalta(♂)与主栽感病品种K326(♀)杂交F1单株;泳道3为感病亲本K326;

[0032] 图2为本发明以引物1和引物2为引物对烟草斑萎病抗源Polalta(♂)与主栽感病品种K326(♀)杂交后代BC6F3分离群体210个单株扩增产物的电泳检测结果。

具体实施方式

[0033] 下面结合实施例对本发明作进一步的详细描述。

[0034] 与烟草抗斑萎病位点RTSW紧密连锁的共显性标记引物,所述引物由引物1和引物2的两条单链DNA组成;

[0035] 所述引物1序列为Seq ID No.1:

[0036] RTSW_Marker3_F 5' -CCTATGAAGCAACGAAGCGATA-3' ;

[0037] 所述引物2序列为Seq ID No.2:

[0038] RTSW_Marker3_R 5' -GTTGACTGTTGACTGTTGATTAGAG-3' 。

[0039] 采用所述引物鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的方法,具体步骤如下:

[0040] (1) 分别以待鉴定烟草、烟草斑萎病抗源Polalta与斑萎病感病品种K326的基因组DNA为模板,用由引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物对基因组DNA进行PCR扩增,利用由分子标记RTSWMarker3的引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物对基因组DNA进行PCR扩增,在含RTSW基因的植株扩增得到所特有的片段大小为490bp,其序列为SEQ ID No.3;在不含RTSW基因的植株扩增得到所特有的片段大小为570bp,其序列为SEQ ID No.4。提取待鉴定烟草DNA时,可以采用烟草的种子、叶片、根、花器任意一个部位或几个部位的组织。对烟草DNA的提取方法为本领域常规的提取方法,可以为CTAB法、SDS提取法、ROSE一管法、TPS提取法等,也可以直接采用商用试剂盒进行DNA的提取。对本领域技术人员而言,可以理解,也可以DNA化学合成的方法得到本发明的分子标记。

[0041] 在用由引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物对基因组DNA进行PCR扩增时,PCR的反应体系如下:分别以待鉴定烟草、烟草斑萎病抗源Polalta与斑萎病感病品种K326的基因组DNA为模板,PCR扩增体系:2×Premix Ex TaqMix PCR Buffer 12.5μL,10μmol/L引物1和引物2各0.5μL,50ng/μL模板DNA 1μL,加灭菌双蒸水使总体积为25μL;PCR反应程序为:94℃预变性5min;然后进入35个循环:94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s;循环结束后72℃延伸10min;4℃保存。

[0042] 所述序列Seq ID No.3如下:

[0043] GTTGACTGTTGACTGTTGATTAGAGATAAAACAGATCACAAGATTCTTGATTAATAGTTACTTCTTGATCAACTTGAACCTGCTTGCATTATAATATGAGAAATTACCTTGACTTTCCCTTTTAAACAAATGGAAGCAAAAATATATAAATGACTAAGACGGAAAAAAGATGTTAACAATCGACCAGATCGATTATTTCCAAATTTAATGAAAGTAGACTTTGCTATAACAATGAGCATGAGCTGGTTAATAACAAATTTAGTAGCCATTGTTGCTTTTTTTTTTCTTCCCAATTA GCTTATGCCTATGATCTCAATCCTCTACAAGACATATATGTTGGAGTTAAAGACACTAACGCTTCTGGTAAATCATATCCTTCTATAGTCAGGAAAGCTTTTTTATCGAATTTCTTCTTCTTCTATTTTAAATAATATTGTATGTTATATTATAGTGGTATAAAAGCATGTATCGCTTCGTTGCTTCATAGG;

[0044] 所述序列Seq ID No.4如下:

[0045] GTTGACTGTTGACTGTTGATTAGAGATAAAACAGATCACAAGTTCTGGATTAACAGTTACTTCTTGATCAACTTGAACCTGCTTGTATTTTAAATATGAGAAATTACCTTGACTTTCCCTTTTAAACAAATGGAAGCAAAAATATATAAATGACTAAGACGGAAACAAGATGTTAACAATTGACCAGATCGAACTATAAGTTATAGACTCCTCAGCTGGTTGTTTCGTAAAAGAAAAAAGTATAACACGCTAACTCCTTACCAAACAACAATTGTTTCCAAATTTAATGAAAGTAGACTTTGCTATAACAATGAGCATGAGCTGGTTAATAACAATTTAGTAGCCATTGCTGCTTTTTTTTTTCTTCCCAATTAGCTTATGCCTATGATCTCAATCCTCTACAAGACATATGTGTTGGAGTTAAAGACACTAACGCTTCTGGTAAATCATATCCTTCTATAGTCAGGAAAGCTTTTTTACCGAATTTCTTCTTTTTTCTATTTTATAACAATATTGTATGTTATATTATAGTGGTATAAAAGCATGTATCGCTTCGTTGCTTCATAGG。

[0046] (2) 将扩增的PCR产物通过电泳检测或者测序扩增产物,按照如下方法鉴别并确定待鉴定烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型:

[0047] 1) 如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳后的条带与Polalta的带型相同,且含有大小为490bp的条带,则待鉴定烟草为抗斑萎病烟草或候选为抗斑萎病烟草,且基因型为抗性RTSW基因位点纯合(RTSW/RTSW);

[0048] 2) 如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳后的条带与K326的带型相同,且含有大

小为570bp的条带,则待鉴定烟草为感斑萎病烟草或候选为感斑萎病烟草,且基因型为感病rtsw基因位点纯合(rtsw/rtsw);

[0049] 3) 如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳后的条带同时含有与Polalta和K326带型相同的条带,且大小分别为490bp和570bp,则待鉴定烟草为抗斑萎病烟草或候选为抗斑萎病烟草,且基因型为抗病RTSW基因位点杂合(RTSW/rtsw)。

[0050] 本发明所述鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的共显性标记引物可应用于烟草斑萎病抗病基因定位、克隆或选育烟草抗斑萎病品种。利用本发明的引物,以待检测的烟草基因组DNA为模板进行PCR,可以得到检测烟草中是否含有烟草抗斑萎病基因位点RTSW并可以鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型。所述检测可以是PCR检测的方法,具体地,可以使用由引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物对基因组DNA进行PCR扩增。所述检测还可以通过高通量测序方法检测是否含有本发明所述引物序列及扩增产物。

[0051] 本领域技术人员熟知,在Seq ID No.1或Seq ID No.2序列中,可在其5'端或3'端分别增加1~30个碱基,所增加的碱基类型可根据烟草基因组DNA上与Seq ID No.1或Seq ID No.2相匹配区域的碱基类型并依据碱基配对原则来确定,由此得到的引物与Seq ID No.1或Seq ID No.2的扩增产物基本相同(上游和下游引物之间的DNA序列相同)。因此,上述在Seq ID No.1或Seq ID No.2的5'端或3'端分别增加1~30个碱基并能扩增得到基本相同DNA片段的引物,均包括在本发明的引物中。

[0052] 本发明利用了包含RTSW抗斑萎病基因位点的抗TSWV烟草材料:Polalta,未包含RTSW抗斑萎病基因位点的感TSWV材料K326以及烟草斑萎病抗源Polalta(♂)与主栽感病品种K326(♀)杂交及回交、自交获得的BC6F3后代。以上烟草材料均为常见的烟草种质资源,公众可从烟草种质资源保存单位或云南省烟草农业科学研究院获得。限制性内切酶、卡拉霉素、壮观霉素,Taq DNA聚合酶2×Premix Ex TaqMix均购自大连宝生物公司。其他化学试剂均为市售产品。*N. tabacum* (K326)的参考基因组序列已在(Edwards et al., 2017, A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *Bmc Genomics* 18, 448.)中公开,公众可从https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_tabacum/genome获得。

[0053] 本发明的一个具体的操作实例如下:

[0054] 1、利用分离群体烟草抗性鉴定构建抗感池及转录组测序。

[0055] 取将烟草斑萎病抗源Polalta(♂)与主栽感病品种K326(♀)杂交及回交、自交获得的BC6F3后代210株,利用无毒基因浸润的方法进行TSWV抗病性鉴定。4~5片叶时,选取完全展开的顶部叶片,在同一张叶片上选取三个位置分别接种pK2-35S-NSm、pK2-35S-NSs、pK2-35S-NSm+p2300-35S-Sw-5b。其中pK2-35S-NSs作为阴性对照,pK2-35S-NSm+p2300-35S-Sw-5b为阳性对照,阳性对照在所有的烟草上都会产生过敏性坏死。烟苗接种后20~28℃的光照培养室中培养72h,调查观察待检测烟草叶片上pK2-35S-NSm引起的过敏坏死(HR反应)。210株中有161株产生HR反应,为抗性单株,49株没有HR反应,为感病单株。结果见表1

[0056] 从161株抗性单株和49株感病单株中分别随机选择40株构建抗性池(R-pool)和感病池(S-pool),其构建方法为分别从选取的抗病40株单株中每株取0.1g叶片,共计4g混合后构建抗性池(R-pool),碾磨成粉末后送样进行转录组测序。利用相同的方法构建感

性池(S-pool)并送样测序。

[0057] 转录组测序选用华大基因的BGI500测序平台进行,抗/池每个样品测序获得12Gb的测序数据。

[0058] 2、抗性连锁分子标记的筛选。

[0059] 将转录组获得的抗/感池数据分别比对至K326参考基因组,通过SNP分型,共发现抗/感池之间Delta值大于0.4的SNP位点共计6047个,其SNP主要集中于K326的7号染色体,因此将抗斑萎病基因定位于第7号染色体。调取SNP存在的Reads并根据K326的基因组为参考基因组进行序列拼接。利用这些SNP所在的基因组序列进行高频SNP搜索,共获得含有SNP富集的31个序列用于开发抗斑萎病相关的分子标记。提取烟草抗斑萎病亲本材料Polalta、感斑萎病亲本材料K326、烟草斑萎病抗源Polalta(♂)与主栽感病品种K326(♀)杂交F1的基因组DNA,根据获得的31个序列设计引物,PCR扩增后进行电泳筛选双亲间的多态性标记。最终获得本发明所述的由引物1和引物2的两条单链DNA组成的PCR引物,用该引物对基因组DNA进行PCR扩增,在双亲间有明显的多态性。

[0060] PCR扩增体系:2×Premix Ex TaqMix PCR Buffer 12.5μL,10μmol/L上游引物1和下游引物2各0.5μL,25ng/μL模板DNA 2μL,加灭菌双蒸水使总体积为25μL;PCR反应程序:94℃预变性5min;然后进入35个循环:94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s;循环结束后72℃延伸10min;4℃保存。

[0061] 电泳结果表明:从图1所示结果表明,利用由引物1和引物2、的两条单链DNA组成的PCR标记引物对上述Polalta、K326及F1材料进行PCR扩增,所有材料都得到扩增,没有假阴性结果出现,表明本研究所验证的PCR反应体系完全正常,符合检测要求。PCR产物进行电泳比较分析,泳道1为抗病亲本Polalta,PCR扩增产物经电泳后含有两个条带,其中490bp大小的条带为明显的特异性条带,550bp大小的条带为非特异性条带;泳道2为烟草斑萎病抗源Polalta(♂)与主栽感病品种K326(♀)杂交F1单株,PCR扩增产物经电泳后三条条带,大小分别490bp和570bp为明显的特异性条带,550bp大小的条带为非特异性条带;泳道3为感病亲本K326,PCR扩增产物经电泳后含有两个条带,其中570bp大小的条带为明显的特异性条带,550bp大小的条带为非特异性条带。表明双亲间利用此标记存在多态性。将来源于抗病亲本的490bp特异性条带和来源于感病亲本的550bp条带割胶回收进行克隆测序获得分子标记序列SEQ ID No.3和SEQ ID No.4。

[0062] 3、利用烟草斑萎病抗源Polalta(♂)与主栽感病品种K326(♀)杂交及回交、自交获得的BC6F3后代分离群体210个单株对多态性标记进行验证。

[0063] 对其单株编号,分别提取210个不同单株的DNA样品,按照传统的核酸提取方法CTAB法,以纯化后的基因组DNA作为模板,利用上述引物对基因组DNA进行PCR扩增。PCR扩增体系:2×Premix Ex TaqMix PCR Buffer 12.5μL,10μmol/L引物1和引物2各0.5μL,25ng/μL模板DNA 2μL,加灭菌双蒸水使总体积为25μL;PCR反应程序:94℃预变性5min;然后进入35个循环:94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸30s;循环结束后72℃延伸10min;4℃保存。取PCR反应产物进行电泳检测验证。

[0064] 所述引物1序列为Seq ID No.1:

[0065] RTSW_Marker3_F 5' -CCTATGAAGCAACGAAGCGATA-3' ;

[0066] 所述引物2序列为Seq ID No.2:

[0067] RTSW_Marker3_R 5' -GTTGACTGTTGACTGTTGATTAGAG-3' ;

[0068] 电泳结果表明:图2为本申请人建立的鉴别烟草抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的共显性标记的电泳分析。从分析结果来看,条带亮度高,条带清晰易辨认,条带大小差别明显。如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳后的条带与Polal1ta的带型相同,且含有大小为490bp的条带,则待鉴定烟草为抗斑萎病烟草或候选为抗斑萎病烟草,且基因型为抗性RTSW基因位点纯合(RTSW/RTSW);如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳后的条带与K326的带型相同,且含有大小为570bp的条带,则待鉴定烟草为感斑萎病烟草或候选为感斑萎病烟草,且基因型为感病rtsw基因位点纯合(rtsw/rtsw);如果待鉴定烟草的PCR扩增产物经电泳后的条带同时含有与Polal1ta和K326带型相同的条带,且大小分别为490bp和570bp,则待鉴定烟草为抗斑萎病烟草或候选为抗斑萎病烟草,且基因型为抗病RTSW基因位点杂合(RTSW/rtsw)。

[0069] 通过标记检测结果发现,仅含有490bp带型的单株有39株(抗性纯合,RTSW/RTSW),仅含有570bp带型的单株有50株(感病纯合,rtsw/rtsw),杂合带型121株(抗性位点杂合)。抗性检测纯度鉴定结果表明,210个单株中,160个为抗病植株,50个为感病植株,与标记检测结果一致,准确率达到100%。通过将本发明所建立的快速鉴定烟草抗斑萎病基因位点RTSW的分子标记结果和抗性鉴定结果对比后发现,210个样品的抗性鉴定结果完全一致,表明该方法结果稳定可靠准确性极高,没有出现假阳性结果(见表1)。

[0070] 表1 BC6F3群体抗性鉴定及标记检测结果统计

编号	接种无毒基因有无 HR, 抗病/感病	PCR 产物	抗性鉴定及标记检测结果是否符合
感病亲本	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
抗病亲本	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
1	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
2	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
3	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
4	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
5	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
6	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
7	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
8	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
9	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
10	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
11	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
12	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
13	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
14	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
15	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
16	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
17	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
18	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
19	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
20	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
21	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
22	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
23	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
24	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
25	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
26	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
27	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
28	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
29	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
30	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
31	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
32	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
33	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
34	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
35	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
36	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
37	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
38	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
39	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
40	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
41	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
42	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合

[0071]

[0072]

43	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
44	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
45	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
46	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
47	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
48	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
49	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
50	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
51	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
52	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
53	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
54	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
55	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
56	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
57	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
58	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
59	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
60	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
61	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
62	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
63	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
64	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
65	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
66	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
67	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
68	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
69	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
70	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
71	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
72	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
73	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
74	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
75	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
76	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
77	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
78	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
79	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
80	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
81	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
82	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
83	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
84	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
85	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
86	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
87	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
88	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
89	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
90	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
91	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
92	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
93	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合

[0073]

94	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
95	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
96	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
97	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
98	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
99	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
100	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
101	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
102	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
103	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
104	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
105	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
106	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
107	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
108	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
109	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
110	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
111	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
112	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
113	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
114	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
115	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
116	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
117	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
118	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
119	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
120	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
121	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
122	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
123	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
124	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
125	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
126	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
127	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
128	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
129	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
130	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
131	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
132	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
133	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
134	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
135	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
136	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
137	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
138	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
139	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
140	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
141	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
142	无 HR, 感病	RTSW/rtsw	符合
143	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
144	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合

[0074]

145	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
146	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
147	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
148	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
149	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
150	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
151	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
152	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
153	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
154	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
155	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
156	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
157	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
158	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
159	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
160	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
161	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
162	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
163	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
164	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
165	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
166	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
167	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
168	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
169	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
170	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
171	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
172	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
173	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
174	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
175	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
176	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
177	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
178	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
179	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
180	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
181	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
182	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
183	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
184	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
185	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
186	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
187	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
188	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
189	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
190	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
191	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
192	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
193	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
194	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
195	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合

[0075]	196	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
	197	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
	198	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
	199	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
	200	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
	201	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
	202	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
	203	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
	204	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
	205	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
	206	有 HR, 抗病	RTSW/RTSW	符合
	207	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
	208	无 HR, 感病	rtsw/rtsw	符合
	209	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合
	210	有 HR, 抗病	RTSW/rtsw	符合

[0076] 4、抗斑萎病位点RTSW等位基因类型的验证

[0077] 从上述第3点中的BC6F3群体210个单株中随机选取抗性RTSW基因位点纯合 (RTSW/RTSW), 基因型为感病rtsw基因位点纯合 (rtsw/rtsw), 且基因型为抗病RTSW基因位点杂合 (RTSW/rtsw) 各5株自交留种, 获得BC6F4种子并每株播种30株做左右, 对BC6F4每个单株进行抗病性检测, 确定BC6F4单株的等位基因类型。从表2可以看出随机选择的BC6F3单株后代抗/感分离比完全符合BC6F3单株的标记检测结果, 表明该方法结果稳定可靠准确性极高, 没有出现假阳性结果。

[0078] 表2部分BC6F3单株自交留种后BC6F4单株抗病性检测

[0079]

BC6F3 单株编号	标记检测基因型	BC6F4 抗: 感	推测 BC6F3 单株基因型	BC6F4 抗性鉴定与 BC6F3 标记检测结果是否符合
1	rtsw/rtsw	0:27	rtsw/rtsw	符合
8	RTSW/rtsw	22:6	RTSW/rtsw	符合
4	RTSW/RTSW	31:0	RTSW/RTSW	符合
12	rtsw/rtsw	0:30	rtsw/rtsw	符合
20	RTSW/rtsw	21: 8	RTSW/rtsw	符合
26	RTSW/RTSW	27:0	RTSW/RTSW	符合
36	RTSW/rtsw	23:7	RTSW/rtsw	符合
64	RTSW/RTSW	31:0	RTSW/RTSW	符合
84	RTSW/rtsw	24:9	RTSW/rtsw	符合
98	RTSW/RTSW	30:0	RTSW/RTSW	符合
104	rtsw/rtsw	0:28	rtsw/rtsw	符合
137	RTSW/rtsw	22: 7	RTSW/rtsw	符合

[0080] 由此可见, 本发明所提供的检测烟草对斑萎病抗性的方法可靠、简便、实用, 在烟草种质资源评价和育种标记的辅助选择中具有重要应用前景, 同时为培育对斑萎病高抗的烟草品种提供了参考依据。

[0081] 实施例中未注明的具体技术或条件的, 按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过购买获得的常规产品。

[0082] 以上实施例仅用于说明本发明, 而不应视为限定本发明的范围, 凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰, 皆应属本发明的涵盖范围。

[0083]

核苷酸序列表

<110> 云南省烟草农业科学研究院

<120> 与烟草抗斑萎病位点 RTSW 紧密连锁的共显性标记引物、鉴别方法及其应用

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> RTSW_Marker3_F

<400> 1

cctatgaagc aacgaagcga ta

22

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> RTSW_Marker3_R

<400> 2

gttgactggtt gactggtgat tagag

25

<210> 3

<211> 490

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

[0084]

gttgactgtt gactgttgat tagagataaa acagatcaca agattcttga ttaatagtta 60
 cttcttgatc aacttgaacc tgcttgcatt ataatatgag aaattacctt gactttcctt 120
 tttacaacat ggaagcaaaa atattataaa tgactaagac ggaaaaaaga tgtaacaat 180
 cgaccagatc gattatttcc aaatttaatg aaagtagact ttgctataac aatgagcatg 240
 agctggttaa taacaaattt agtagccatt gttgcttttt tttccttcc caattagctt 300
 atgcctatga tctcaatcct ctacaagaca tatatgttgg agttaagac actaacgctt 360
 ctggtaaate atatecttct atagtcagga aagctttttt atcgaatttc ttcttcttcc 420
 tattttaaat aatattgtat gttatattat agtgttgata aaagcatgta tcgcttcggt 480
 gcttcatagg 490

<210> 4

<211> 570

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gttgactgtt gactgttgat tagagataaa acagatcaca aggttctgga ttaacagtta 60
 cttcttgatc aacttgaacc tgcttgtatt ttaatatgag aaattacctt gactttcctt 120
 tttacaacat ggaagcaaaa atattataaa tgactaagac ggaacaaga tgtaacaat 180
 tgaccagatc gaactataag ttatagactc ctcagctggt tgtttcgtaa aagaaaaaaaa 240
 agtataacac gctaactcct taccaacaa acaattggtt ccaatttaa tgaaagtaga 300
 ctttgctata acaatgagca tgagctgggt aataacaact ttagtagcca ttgctgcttt 360
 ttttcttcc caattagctt atgcctatga tctcaatcct ctacaagaca tatgtgttgg 420
 agttaagac actaacgctt ctggtaaate atatecttct atagtcagga aagctttttt 480
 accgaatttc ttcttttcc tattttatac aatattgtat gttatattat agtgttgata 540

[0085]

aaagcatgta tcgcttcggt gttcatagg

570

序列表

<110> 云南省烟草农业科学研究院

<120> 与烟草抗斑萎病位点RTSW紧密连锁的共显性标记引物、鉴别方法及其应用

<141> 2019-09-29

<160> 4

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> RTSW_Marker3_F

<400> 1

cctatgaagc aacgaagcga ta 22

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> RTSW_Marker3_R

<400> 2

gttgactggt gactgttgat tagag 25

<210> 3

<211> 490

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 3

gttgactggt gactgttgat tagagataaa acagatcaca agattcttga ttaatagtta 60
 cttcttgatc aacttgaacc tgcttgatt ataatatgag aaattacctt gactttcctt 120
 tttaacaaat ggaagcaaaa atattataaa tgactaagac ggaaaaaaga tgtaacaat 180
 cgaccagatc gattatttcc aaatttaatg aaagtagact ttgctataac aatgagcatg 240
 agctgggttaa taacaaatgt agtagccatt gttgcttttt ttttccttcc caattagctt 300
 atgcctatga tctcaatcct ctacaagaca tatatggttg agttaaagac actaacgctt 360
 ctggtaaate atatccttct atagtcagga aagctttttt atcgaatttc ttcttcttcc 420
 tatttttaa atattgtat gttatattat agtggtgata aaagcatgta tcgcttcggt 480
 gcttcatagg 490

<210> 4

<211> 570

<212> DNA

<213> 人工序列()

<400> 4

gttgactggt gactgttgat tagagataaa acagatcaca aggttctgga ttaacagtta 60

cttcttgatc aacttgaacc tgcttgtatt ttaatagag aaattacctt gactttcctt 120
ttaaacaat ggaagcaaaa atattataaa tgactaagac ggaacaaga tgtaacaat 180
tgaccagatc gaactataag ttatagactc ctacagctggt tgtttcgtaa aagaaaaaaa 240
agtataacac gctaactcct taccaaaca acaattgttt ccaatttaa tgaaagtaga 300
ctttgctata acaatgagca tgagctggtt aataacaact ttagtagcca ttgctgcttt 360
tttttcttcc caattagctt atgcctatga tctcaatcct ctacaagaca tatgtgttgg 420
agttaaagac actaacgctt ctggtaaate atatccttct atagtcagga aagctttttt 480
accgaatttc ttcttttcc tattttatac aatattgtat gttatattat agtgttgata 540
aaagcatgta tcgcttcggt gttcatagg 570

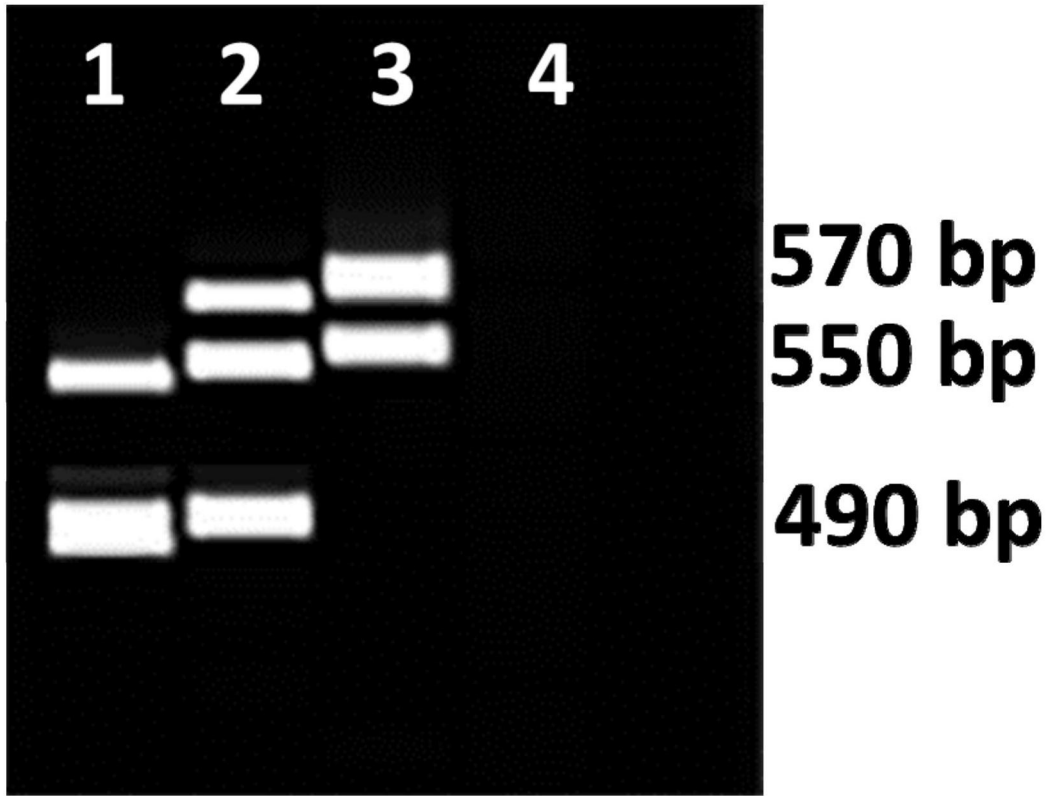


图1

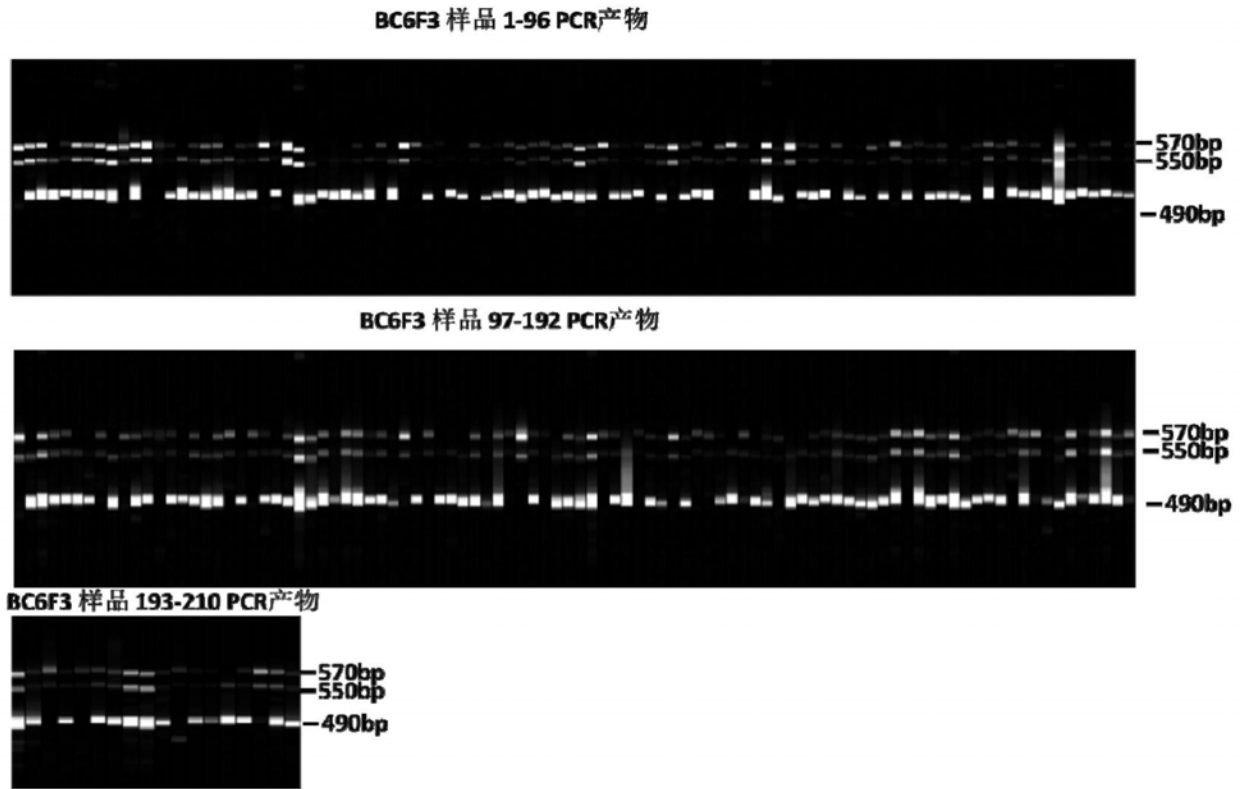


图2