

1. 一种小麦抗条锈病基因YrLumai15,其特征在于,所述小麦抗条锈病基因YrLumai15为如下i)或ii)或iii)所示的核酸分子:

- i) 核苷酸序列是SEQ ID NO.1所示的核酸分子;
- ii) 核苷酸序列是SEQ ID NO.3所示的核酸分子;
- iii) 除i)或ii)以外的编码SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的核酸分子。

2. 由权利要求1所述的小麦抗条锈病基因YrLumai15编码的蛋白;所述蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 携带权利要求1所述的小麦抗条锈病基因YrLumai15的重组表达载体或基因工程菌。

4. 权利要求1所述的小麦抗条锈病基因YrLumai15在如下(1)或(2)中的应用:

- (1) 提高植物对条锈病的抗性;
- (2) 培育抗条锈病植物品种;

所述植物为麦族植物。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述植物为小麦、大麦或黑麦。

6. 携带权利要求1所述的小麦抗条锈病基因YrLumai15的重组表达载体或基因工程菌在培育条锈病抗性提高的麦族植物中的应用;

所述麦族植物为小麦、大麦或黑麦。

7. 小麦抗条锈病基因YrLumai15编码的蛋白在提高植物对条锈病的抗病性中的应用;

小麦抗条锈病基因YrLumai15编码的蛋白为如下(A1)或(A2)任一所示的蛋白质:

- (A1) 由序列表中SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列组成的蛋白质;
- (A2) 在(A1)中所限定的蛋白质的N端和/或C端连接蛋白标签后得到的融合蛋白;

所述植物为小麦、大麦或黑麦。

8. 一种提高植物条锈病抗性的方法,其特征在于,包括:将SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因转入植物中,获得条锈病抗性提高的植物;

或者上调植物基因组中SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因的表达,筛选得到条锈病抗性提高的植物;

所述植物为小麦。

9. 一种降低植物条锈病抗性的方法,其特征在于,包括:抑制植物基因组中SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因的表达,筛选得到条锈病抗性降低的植物;

抑制植物基因组中的抗条锈病基因的表达的方法包括:突变或敲除SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因的全部或者部分序列;或者使用干扰RNA干扰SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因的表达;或者使用基因沉默系统使SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因沉默;

所述植物为小麦。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于,将SEQ ID NO.1所示的抗条锈病基因进行如下(1)-(5)至少一项突变:

- (1) 将第211位G碱基突变为A碱基;
- (2) 将第1396位G碱基突变为A碱基;
- (3) 将第2023位G碱基突变为A碱基;
- (4) 将第2633位G碱基突变为A碱基;

(5) 将第1503位G碱基突变为C碱基。

小麦抗条锈病基因YrLumai15及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子遗传学技术领域,具体涉及一种小麦抗条锈病基因YrLumai15及其应用。

背景技术

[0002] 小麦条锈病(wheat stripe rust or yellow rust)是由小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f.sp.*tritici*.,Pst)侵染引起的世界性气传病害。该病害对我国小麦生产具有毁灭性危害,流行年份可导致小麦减产40%以上,甚至绝收(马占鸿,2018)。

[0003] 传统的药剂防治不仅增加了生产成本,还会对生态环境产生威胁,最为经济有效且绿色环保的条锈病防控措施是培育和推广抗病小麦品种。在当下条锈小种变异速度过快,且主栽品种抗性遗传基础狭隘的抗病育种瓶颈下,Yr基因组合利用对条锈菌有非常好的抗性效果,培育具有多个抗病基因聚合的持久抗病品种成为抗病育种的主要方向(冯晶等,2022)。然而,在小麦庞大的基因组中分离抗病基因是一项极大的挑战,在当前已被命名的83个抗条锈病基因中,仅有7个基因被克隆(Fu et al.,2009)(Krattinger et al.,2009)(Moore et al.,2015)(Clemence et al.,2018)(Klymiuk et al.,2018)(Zhang et al.,2019)(Athiyannan et al.,2022)。因此,迫切需要发掘更多的抗病基因,以丰富抗病基因的多样性。

[0004] 小麦的1B染色体短臂被黑麦的1R染色体短臂取代形成小麦-黑麦1BL/1RS易位系,1BL/1RS品种带有来自黑麦多个抗病基因,包括抗条锈病基因Yr9等(Magoetal.,2015)。小麦品种鲁麦15高抗条锈,兼抗叶锈和秆锈,对条中22-28号生理小种免疫,对条中29号生理小种表现高抗(孙兰珍等,1994)。该品种中携带来自1RS染色体的全生育期抗条锈病基因,与远端标记Iag95连锁(Mago et al.,2002),但从未有人将其成功分离,所以抗病基因的序列以及编码蛋白信息都不明确,难以充分发挥其抗病潜力。

发明内容

[0005] 针对上述现有技术,本发明从小麦品种鲁麦15中分离克隆得到抗条锈病基因YrLumai15.YrLumai15基因与小麦抗条锈病表型连锁,且该基因的突变会导致小麦抗条锈病表型的丧失。因此,YrLumai15基因可以提供条锈病抗性,在小麦抗条锈病品种的培育中具有重要的应用价值。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 本发明的第一方面,提供一种小麦抗条锈病基因YrLumai15,所述小麦抗条锈病基因YrLumai15为如下i)或ii)或iii)或iv)所示的核酸分子:

[0008] i) 核苷酸序列是SEQ ID NO.1所示的核酸分子;

[0009] ii) 核苷酸序列是SEQ ID NO.3所示的核酸分子;

[0010] iii) 除i)或ii)以外的编码SEQ ID NO.2所示氨基酸序列的核酸分子;

[0011] iv) 与i)或ii)的核苷酸序列具有90%或90%以上同一性且表达相同功能蛋白质

的核酸分子。

[0012] 其中,小麦抗条锈病基因YrLumai15的全长cDNA序列如SEQ ID NO.1所示;YrLumai15基因编码的蛋白(即YrLumai15蛋白),其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;YrLumai15基因组全长表达框架,包括启动子、基因组编码区和终止子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0013] 本发明的第二方面,提供一种由上述小麦抗条锈病基因YrLumai15编码的蛋白。

[0014] 携带上述小麦抗条锈病基因YrLumai15的重组表达载体、转基因细胞系或基因工程菌也是本发明的保护范围。

[0015] 本发明的第三方面,提供小麦抗条锈病基因YrLumai15在如下(1)或(2)中的应用:

[0016] (1) 调控植物对条锈病的抗性;

[0017] (2) 培育抗条锈病植物品种。

[0018] 上述应用中,所述植物优选为禾本科植物;进一步优选为麦族植物;更优选的,所述植物为小麦、大麦或黑麦。

[0019] 本发明的第四方面,提供携带小麦抗条锈病基因YrLumai15的重组表达载体、转基因细胞系或基因工程菌在培育条锈病抗性提高或降低的麦族植物中的应用。

[0020] 优选的,所述麦族植物为小麦、大麦或黑麦。

[0021] 本发明的第五方面,提供小麦抗条锈病基因YrLumai15编码的蛋白在如下(1)或(2)中的应用;

[0022] (1) 提高植物对条锈病的抗病性;

[0023] (2) 制备防治条锈病的药剂。

[0024] 优选的,小麦抗条锈病基因YrLumai15编码的蛋白为如下(A1)或(A2)任一所示的蛋白质:

[0025] (A1) 由序列表中SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列组成的蛋白质;

[0026] (A2) 在(A1)中所限定的蛋白质的N端和/或C端连接蛋白标签后得到的融合蛋白。

[0027] 其中,(A1)和(A2)所述的蛋白质可人工合成,也可先合成其编码基因,再进行生物表达得到。

[0028] 上述蛋白中,蛋白标签是指利用DNA体外重组技术,与目的蛋白一起融合表达的一种多肽或者蛋白,以便于目的蛋白的表达、检测、示踪和/或纯化。其中,为了使(A1)中的蛋白质便于纯化,可在(A1)的蛋白质的氨基末端或羧基末端连接上标签。所述标签可以为Poly-Arg(通常为6个RRRRR),Poly-His(通常为6个HHHHHH),FLAG(DYKDDDDK),Strep-tag II(WSHPQFEK)或c-myc(EQKLISEEDL)。

[0029] 上述应用中,所述植物优选为禾本科植物;进一步优选为麦族植物;更优选的,所述植物为小麦、大麦或黑麦。

[0030] 本发明的第六方面,提供一种提高植物条锈病抗性的方法,包括:将SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因转入植物中,获得条锈病抗性提高的植物;

[0031] 或者上调植物基因组中SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因的表达,筛选得到条锈病抗性提高的植物。

[0032] 上述方法中,将抗条锈病基因转入小麦或大麦中的方法包括:聚乙二醇法、农杆菌介导法或基因枪轰击法。

[0033] 上述方法中,上调植物基因组中的抗条锈病基因的表达的方法包括:导入能够激活或提高抗条锈病基因的转录水平或翻译水平或蛋白活性的DNA片段;或者控制特异小RNA分子的合成,上调抗条锈病基因mRNA的积累。

[0034] 上述方法中,所述植物优选为禾本科植物;进一步优选为麦族植物;更优选的,所述植物为小麦、大麦或黑麦。

[0035] 本发明的第七方面,提供一种降低植物条锈病抗性的方法,包括:抑制植物基因组中SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因的表达,筛选得到条锈病抗性降低的植物。

[0036] 上述方法中,抑制植物基因组中的抗条锈病基因的表达的方法包括:突变或敲除SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因的全部或者部分序列;或者使用干扰RNA干扰SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因的表达;或者使用基因沉默系统使SEQ ID NO.1或SEQ ID NO.3所示的抗条锈病基因沉默。

[0037] 优选的,将SEQ ID NO.1所示的抗条锈病基因进行如下(1)-(6)至少一项突变:

[0038] (1) 将第211位G碱基突变为A碱基;

[0039] (2) 将第1396位G碱基突变为A碱基;

[0040] (3) 将第2023位G碱基突变为A碱基;

[0041] (4) 将第2107位G碱基突变为T碱基;

[0042] (5) 将第2633位G碱基突变为A碱基;

[0043] (6) 将第1503位G碱基突变为C碱基。

[0044] 本发明的第八方面,提供一种用于鉴定小麦抗条锈病基因YrLumai15的分子标记YrLumai15-2728,所述分子标记YrLumai15-2728是基于YrLumai15编码区区域设计的PCR标记,其核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0045] 用于扩增分子标记YrLumai15-2728的引物为YrLumai15-FP(SEQ ID NO.5)和YrLumai15-RP(SEQ ID NO.6)。用引物扩增后,若出现1261bp的特异条带,则表示携带小麦YrLumai15基因;若出现非特异性扩增,则建议相应的小麦不抗小麦条锈病。

[0046] 本发明的第九方面,提供上述分子标记YrLumai15-2728或用于扩增分子标记YrLumai15-2728的引物在如下(1)-(3)任一项中的应用:

[0047] (1) 抗条锈病基因的鉴定;

[0048] (2) 植物育种;

[0049] (3) 植物条锈病防治。

[0050] 上述应用中,所述植物优选为禾本科植物;进一步优选为麦族植物;更优选的,所述植物为小麦、大麦或黑麦。

[0051] 本发明的有益效果:

[0052] 本发明首次从小麦品种鲁麦15中分离克隆得到一个新的抗条锈病基因YrLumai15。研究发现,YrLumai15基因与小麦抗条锈病表型连锁,且该基因的突变会导致小麦抗条锈病表型的丧失。因此,YrLumai15基因可以提供条锈病抗性,在小麦抗条锈病品种的培育中具有重要的应用价值。

附图说明

[0053] 图1:抗病型YrLumai15的突变体在苗期高感小麦条锈病;其中1-5为不同的感病突变体,6、7为诱变亲本鲁麦15。

[0054] 图2:用Iag95标记检测感病突变体;其中1-5为5个感病突变体2365、3289、3530、2333与3222。

[0055] 图3:YrLumai15基因结构及鲁麦15感条锈病突变体的突变位点;2365、3289、3530、2333与3222代表5个突变体,其中2365携带2个突变位点。

[0056] 图4:鉴定小麦YrLumai15基因的分子标记YrLumai15-2728;其中鲁麦15为携带抗条锈病基因YrLumai15的亲本材料,CB037-PstS为感条锈病材料; F_2 -R为鲁麦15/CB037-PstS组合 F_2 群体中携带YrLumai15基因的单株, F_2 -S为不携带YrLumai15基因的单株。

具体实施方式

[0057] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0058] 正如背景技术部分所介绍的,在病原菌持续的演化的形势下,新的抗条锈病基因的发掘不仅重要且无法终止。小麦品种鲁麦15表现高抗小麦条锈病,为了分离其抗条锈病基因,我们将鲁麦15使用甲基磺酸乙酯(Ethyl methanesulfonate,EMS)进行诱变处理,筛选感条锈病类型突变体,通过分析感条锈病突变体所共有的突变基因,以鉴定亲本鲁麦15中的抗病基因。

[0059] 对3000余份 M_4 代鲁麦15突变体进行接菌鉴定,筛选到5份感条锈病突变体。所用条锈菌生理小种为CYR29,CYR31及CYR32混合孢子。突变体表型如图1所示。

[0060] 对诱变亲本鲁麦15和5份感病突变体材料进行RNA-seq测序,并进行SNP-calling,获取突变体材料和突变亲本鲁麦15之间的单碱基差异。然后对SNP进行分析,以转录本为单位统计SNP数量,发现转录本transcript/1460上有6个SNP,分别对应感病的5个突变体。

[0061] 然后我们结合同样含有1BL/1RS易位的科农9204参考基因组数据进行分析,找到对应的基因序列TraesKN1B01HG01710,确认基因的全长编码区。

[0062] 综上,本发明对随机抽选的5份感病突变体进行RNA-seq测序,发现与诱变亲本鲁麦15相比,鉴定为感病的5份突变体均在同一个基因上发生了单碱基突变(EMS诱变突变的碱基是随机的,多个独立突变体在同一个转录本上发生突变的几率极低,如果5个突变体均在同一个转录本上发生突变,则足以证明该转录本的与抗病表型的关系)。因此,本发明将这个基因命名为YrLumai15。YrLumai15基因的全长cDNA序列如SEQ ID NO.1所示;YrLumai15基因编码的蛋白(即YrLumai15蛋白),其氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示;YrLumai15基因组全长表达框架,包括启动子、基因组编码区和终止子,其核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。具体如下:

[0063] YrLumai15基因的全长cDNA序列:

[0064] ATGGATATTGTCACGGGTGCCATTGCCAACCTGATCCCCAAGCTGGGAGAGCTGCTTGTGGGGGAGTCAAGCTGCACAAGGGCGTCAAGAAAAATATCGAGGACCTCCTGAAAGAGCTCAAGACCATGAACGCTGCGCTCATCAAGATTGGTGAGGTGCCCGGACCAGCTCGACAGCCAAGACAAGCTTTGGGCCGATGAGGTCAGAGAGCTCTCTCT

ACGTCATTGAGGATGTGGTGGACAAGTTCCTCGTACGGGTCCATGGCATTGAGCCCGATGACAACACTAACGGATT
CAAGGGGCTCGTCAAGAGGACCACCAAGTTGTTGAAGAAGGTCGTGGATAAGCATGGGATAGCTCACGCGATCAAG
GACATCAAGAAGGAACTCCATGAGGTGGCTGCTAGGCGTGACAGGAACAAGTTCGATGGTATTGCTTCTACTCCTA
CTGAAGCAATCGATCCTCGTCTTCATGCTCTCTACATAGAAGCCGCAGAGCTAGTTGGCATCTATGGGAAGAGGGA
TCAGGCACTCATGAGTTTGGCTCTCCTTGGAGGGCGATGATGCCTCTACCAAGAACTGAAGAAGGTCTCCATTGTT
GGATTTGGAGGGTTGGGCAAGACCACTCTTGCCAGAGCAGTATACGAGAAGATTAAAGGTGATTTTGGTTGCCACG
CATTTGTTCTGTGCGGCAGAACCCCTGATATCAAGAAGGTTTTTCAGGGATATCCTCATTGACCTCCGAAAATCAAA
CTCAGATCCTAGCAACTCTAACTCAGATCTTGTGATACTGGATGCAACACAGCTTATCGACAAGCTTCGTGAATTC
CTTGAGAACAAGAGGTACCTCGTAATAATTGATGATATATGGGATGAAAAATTGTGGAGATACATCAACCTTGCTT
TCTCTATCAATAACAATCTAGGAAGTCGGCTAATCACCACAACCCGAGATTTTCGATGTCTCCAAATCATGCTGCTC
ATCAGCTGATGATTCAATTTATCATATGAAACCTCTTTGTACCAATGACTCCAGAAGGCTCTTCTATAAAAGAGTA
TTTGCCGACGCTAGTGGATGTCCAAGTGAATTTGAACAAGTGTCTAAAGATATATTGAAGAAATGTGGCGGGGTAC
CACTAGCCATCATTACTATTGCAAGTCTTTGGCTAGTGGCCAGCAAGTGAAACCAAAGCATGAGTGGGATATTCT
ACTCCAGTCCCTTGGCTCCGGAGTAACAAAAGATAATAGTTTTGGCTGAGATGCGGAGAATACTATCTTTTCAGCTAT
TATAATCTACCGTCTCATCTGAAAACCTTGTCTACTTTACCTATGTATATATCCAGAAGATAGCACCATTGGTAGAG
ATAGACTGATATGGAAGTGGGTGGCCGAAGGATTTGTCCACCATGGAGATCAAGGGACCAGCCTGTTTTTGGTCGG
ATTAACACTACTTCAACCAGCTCATTAATAGAAGTATGATCCAGCCTATATATGATAATGCAGGCCAGGTATATGCT
TGCCGTGTACATGATATGGTTCTGGACCTTATCTGCAACTTGTACATGAAGCAAAGTTTGTAAATCTATTGGATG
CCACTGGGAATAGCACATCTTACAAAAGTAATGTTTCGTCGTTTGTCCCTTCAGAATAAAAATGAAGATCATCAAGC
CAAGCCTCTCACAAATATCATGAGTATGTCACGAGTGAGGTCCATTACTATCTTTCCACCTGCTGTTAGTATCATG
CCAAGTCTGTCAATGTTTGAAGTCTGAGTGTACTTGATCTGTGCAACTGTGATTTGGGACAAAGTAGCAGCCTGC
AGCTTAACCTAAAGGGTGTGTACATTTAATCCACCTAAGGTACCTTGGTCTAGCAGGCACTCAAATTAGTGAAC
CCCAGTCTGAGATAGGAAACCTGCAGTTTTTGGAGGTGTTGGATCTTGGAGATAATTATGAGCTAGATGAATTGCCT
TCCACTCTTTTCAAATTGAGAAGATTAATCTACCTAAATGTTTATCTCTTTAAGGTGGTTCCAACCTCCTGGTGTGT
TGCAGAATCTGACATGCATAGAAGTGTGAGGGGGATCTTGGTCTCTCTGAACATTATTGCACAAGAGCTTGGCAA
CCTGGCAAGGCTGAGGGAGCTTTCGATTCGCTTCAAGGATGGTAGTTTGGATTTGTATGAAGGTTTCGTGAATTCT
CTGTGCAACCTACATCACATAGAATGCCTAAGTATTGGTTGGAATTCTGAAAAACGCTTTTTGAACTGATGGATC
TCTTGGGAGAACGCTGGGTGCCTCCTGTACATCTCCGCGAATTTGTGTCTAGGATGCCAGCCAACCTCTCTGCACT
GCGAGGGTGGACAAAGAGAGACCCCTCGCATCTCTCCAACCTCTCCAAGTTAATCCTCTCGTCAGTGAAGGAAGTG
CAGCAGGAGGACGTGAAAATCATTGGGGGGTGTGTCCCTTCGCCGTCTCTGGATAAAGAGCACCCACCAAACAC
AGCGGCTGCTAGTCATCCCTACAGATGGGTTCCGCTGTATGGTAGAATTTTACTTGAATTGTGGGTTAGCAGCGCA
GATAATGTTTGAACCAGGAGCTTTCGCGAGGGCGGAAGAAGTTACGTTACGCCTGGGCGTGGGGTGGCAAAAGAG
GATGGAACCTGTGGCTTCGAATTGGGCGTGCAGGGGAACCTGCTCTCCCTTCGGCGGCAGGTCTGGGTTAGGATGT
ATTGTGGTGGAGTGAGGGTTGGGGAGGCAAAGAAAGCGGAGGCTGCGGTGAGGCACGCACTCGAAGCCCATCCCAA
TCATCCCAGGATTTATATTGATATGTGCCCGCTATAGCAGAAGATGCTCATGATGACGATTTGTGCGAGGACGAG
GAGATCTGA。

[0065] YrLumai15基因编码的蛋白：

[0066] MDIVTGAIANLIPKLGELLVGEYKLVKKNIEDLLKELKTMNAALIKIGEVPPDQLDSQDKLWADE
VRELSYVIEDVVDKFLVRVHGI EPDDNTNGFKLVKRTTKLLKKVVDKHGIAHAIKDIKKELHEVAARRDRNKFDG

IASTPTEAIDPRLHALYIEAAELVGIYKRDQALMSLLSLEGDDASTKKLKKVSI VGFGLGKTTLARAVYEKIKG
 DFGCHAFVVPVQNPDIKKVFRDILIDLKNSNDPSNSNSDLVILDATQLIDKLREFLENKRYLVI IDDIWDEKLWR
 YINLAFSINNLSRLITTTTRDFDVSKSCSSADDSIYHMKPLCTNDSRRLFYKRVFADASGCPSEFEQVSKDILK
 KCGGVPLAIIITIASALASGQQVKPKHEWDILLQSLGSGVTKDNSLAEMRRILSFSYYNLPSHLKTCLLYLCIYPED
 STIGRDRLIWKVVAEGFVHHGDQGTSLFLVGLNYFNQLINRSMIQPIYDNAGQVYACRVHDMVLDL ICNLSHEAKF
 VNLLDATGNSTSSQSNVRRSLQKNEDHQAKPLTNIMSMSRVRISITIFPPAVSIMP SLSMFEVLSVLDLSNCDLG
 QSSSLQLNLKGVVHLIHLRYLGLAGTQISELPTEIGNLQFLEVLDLGDNYELDEL PSTLFLKLRRLIYLN VYLFKVV
 PTPGVLQNLTCIEVLRGILVSLNIIAQELGNLARLRELSIRFKDGSLDLYEGFVNSLCNLH HIECLSIGWNSEKTS
 FELMDLLGERWVPPVHLREFVSRMPSQLSALRGWTKRDP SHLSNLSKILSSVKEVQ QEDVEIIGLLSLRRLWIK
 STHQTQRLLVIPTDGFRCMVEFYLNCGLAAQIMFEPGALPRAEEVTFSLGVRVAKEDGNCGFELGVQGNLLSLRRQ
 VWWRMYCGGVRVGEAKKAEEAVRHAEHPNHPRIYIDMCPRIAEDA HDDDLCEDDEI。

[0067] YrLumai15基因组全长表达框架：

[0068] CATCAATAACGATTAAGTACCTGGCAGAGAAATTAATTAATGAAATAATATTTTACAGACTTAAAGT
 ATGGGTAATTCAAATAGGCATGTAGGAGGATGCGCTCCTGGGTGAAAGAAATGATATTCTTGGTGTAAAAAGTTC
 TGGAAGAACGTACACATGTACATGTCCGCATCCTATGTGTAGATGTGATTTTGCATGCAAAACACAATTTTTGTGG
 CCCGTGTGAAACCCAAAATGGGCCAGCTGGTTTTCTTTGGCACAACCCAATTTATGTCTATGGGGCGGTCCGAGA
 CTCGGAGTTGACGTCCGAGGGGACGGTGTGTATGGCAGTGAGGCGTATGGTGGCATGGATCTGCTCCACCATGAG
 GCAGCATGCTTGGCCGAGCCACCTCTTCTCAGACGTCGTCCGCTTGGATGCCTCGATGACCTCCCATAATGCCT
 TCGCGTTTTTTCGACGACGGCCACGGGCGCCATCTCCGTGGAGGTCAATGAACGGAGCCGGACCTAGTCGTCGTC
 GAAGAAAGATGGCATGCACATGATTGAAGCAGAGCCGCACCGGCTAGATCCGACCTTCTGGGTCACCTGGCAGACG
 CCAGCCGCTAGCGCCTTGGACTCCGGGAGCTGTTACAGGCTCAGATGGCGCGGCACGATAAGCTAGCGGCGACAAG
 GAGTGCATACGACAGTGATACACCGAAGCTGTATGACTGACGCCACACGACTAGGGACAGCAGAAATGCCTCCAT
 CCTAGGATGCATTCTCCCTGGCAATCGGTGGGGGATGACACGAAGCTCGAAGAGCCTCCCTGTCCATCCGCTTGC
 GGCAGAGGGCGACATAGAGGCGAGTCCATCGGAGGCACAGAGCTTGAGTCCCTCGCCGCGAGCGCATCCCAAT
 CATTCCGATAAGCCTCGCTGTCAGAGTCCGCTATGTCCGAGCAGAGGGCAACGAGGAGGGGAGATGATTGTGATGG
 AGCGGTTGAGAATGAGGACCCGATGTTTGGTTTGGGGTGGGGTATATGTGGGGTTGGAGTGAGCCAGCCTGGGCC
 GGTGACGCGCCCATATCTGCCCACATATGGGTTGGGTTTGACCACGCAACAAACACACACAACAACACCAACA
 CAGAGACAAACAAACAAGGATACAATAGACTACAGAAAAAGCTAGCAGGCCACGACAAAGCACTAACACAAAG
 CTTGACAAACAATGCATTGATCGACGCCACGATCTTGTGCAAGAGGATACAAAAGCCAGGGAGGTGGCTTGCCA
 CCGGAAGAAACCTGTGTGCCATCAAATCCCTGAGGCCACACCTGCGTCACACCAAACATCTCCGCCCAAAGAAG
 GCACCACCTGCCCTCTCGGCCTAGTTCGTAAGGCGCCGCCCGTCCGGTATGGCGGAGTTGCTCCCCTGAGCATGC
 ATGGATATTGAACAACCAGAGGCCAAGGTAGGATGACAAGCACCAACACCTCATCTCACGAGACACCTCATCACT
 TGCACCTCTCTCCTTCAAAAACCCACCACAGTGCACGACCCAACTGCCGGACGAAAGCACCACCGAAGACGCAGATA
 GAAGAAATGCACGACGCCATGGGGCAACTGGAGCTCTAGCAGGAACCTATCTACCACTGAGCACCACCAAT
 GAAGAACAATCAACCGCAAACAGCTGCGACCACCTGCGCGACAGCAATGCCTGCCCTCCCGTTGTCCAAAGCTGA
 CGCCTTGAAGAAGGCGAACGACACCGGAGCGCCGCCGCTGCCAAAATCCCAAGCCCTAGGTCAACCCGCTACATCT
 GACGAACCAAAGGCCACCGAAAATCCCGGTGTGGCGGGGTTAGCCAAGTTGCACGCCAAGCAACCACCTTCTCAGA
 ATCTTGCGCCAAGAGCATGTGGAGACGGCCCTCGGGCCATGACCCACATCCATCGCCGCTTCCGCGCGCGCGGC
 CAAGGGGACTGCTCGTAGCCACGGCGTCCGCCACCTGCTGCAAGGGAGTGACGCCCTTGCCATGGGGGCGCTGCC

TCAGATCAAGAACCCCCCCCCCTCCACATGGACCATGGGGCGGAGAAGATCCTCGCCGCCCTTCCTCGGCGGC
CGTGTGGGCTGCCCGGCGACCCCTCAGGCAACGACGAGAGGGAGGAAAGGGGAGGGGATCTGGTGTGGCGGCGCT
AGGGTTTTCGCCATGGAGGGGCGACGCGAGGGGAGGGGAAGGGGAGCCACACAAAATCTAGAGATAACTAGCAAGG
TCATTTGCCCTGTACGTGTGAGGTGGGTTCGAGGGTTCTGGTTGTAGATGGTCTTAGCGTAGTGAATATGATTAT
ATTTTTATGTTATTTTGATCTATGATGTTACCTCGGCATCCCTGTGAAAAATATATCAAGGAGATGGGACTAGTTA
AGAGTTAAGAGTCATTTTCATATTTTTGAATTGCAGAACGCAAGTAGTAAGAGAATATAACTAGCTGGTGAAGATTC
CCTTTGGACGAAATTGATTAGGAAAACATGTATTATATTTAAAGATCTTTGAATTTGTCATCAGACGAAGTTTCT
AACCATATAATATTTTTGCATAGTATACCTGTTTTATTAGTCAAATCAAACATCTAAACCACCGACTTATAAACTC
AATCAGAAGTATATAGTCCCTCCGTCATAGGACATGGAGGGAGTACTTCTTAGAGCATCTCCAGCCGTTGGCCC
CAAGGACGTGTCGAAAACCGCCGCTGGGGGCGAGCCGGCGCTAGTTTCGGCTTGGGTGCCAGTTCGTTCCAGTC
GCCGGCCCCCAGGTCGCCCCCCAGGCGCCGATATCGGCCATTTTTCGGTGCTTTCAGCCATTTTCGGCGCTTTT
CAGCCCTTTTCTGGCGAAAACGGCCAGGCTCGACGTTGTCGTAATAGTTCACATAGATAGATAGATAGTTTAC
ATATATAGATAGATAGATAGTTTACATAATCTTAACTCTACGATAGATAGATAAATAGATAGTTTACATAGTCTTC
TCCTACGACCTACTACTACTAGTCATTCTCCGACTCGGACTCTTCTCGGTGATGTCTCCTCCGATGTCTCAGCG
TAGGTGTCAAGGAACCGCTCGTCGGTGAAGTCCCAGGAGGACGCATCTCCTAGCTCGACGTTGGACTTAGCGATCG
CCCTCCGCGCTCGCTTGTCTCGCAATAAGCCGCTCGTCTTCTCCTCTTCTTCTCCTCCTCCGCCCTTCTCGGC
CAAGAACTGGTGTCTCGATGAAGTCTTGGCGTAAGTTTTGGCGCCACGTCGCCATGGCTTCTCATCCATCTCG
GCCAAGTTGAGATGATGCGCCCGCTACGGTCTTCCGACGATTTTCGTCGGTCTAAGCCGCGGGGAGGCGCCA
GCTCCTGTGCCGCTCCAGAGTCGGCACGTCCGTGAAGTTCATGTCCCAACGGGAACGCCGAGGCGCCACGCCGC
AGCGTCGTACGCGCGGGCGCCCTCCTGAGCGGTGTCGAAGTTCCGAGGCGGAGGCGCACGTGCCCCACTGAATC
TTGGCAGAGTAGGTGCCAGACGGACGAACCCGGACGCCGCGGTAGCCCCACCTCCCCGGCGGCGAGGCGGCATGG
GGGCGCAGTGCATGTCGGCGACGAAACAGCCAGCGGCCGGAGGGGCGCAGTGCGTGGCAGTGTGGAGAGTGCGGTG
GGGCGATGGGGCTGCGGTGTGGGCGTTGACCGGCGAGGTAGGCTGCTTTTATAGCCGAGCTCGGGCGGCGAGAGG
CGCATGCCAGGCGACGCGTGGCGGTGCCCCGTGGTGCCGGGCGACGCGACGGGCCGCTGGGCGGCATCAATGGCAG
GCGACGGCTCGGCAGTGCGGCAGCTTTGGCATTGATTCCC CGGGAACCGAGGCGATGAGGACGACGAAGCAGCGC
GTCGCTGACAGGGCGGGCCCATCACATTCGCGCCAAAAACGCTCGCCCCGGCGCCCCAGGCGACCCAGCGCCC
CGGGTTCGGGTGGGTCCGCCGGCGCCAGTTTCGGCCCAATCCGGCAATTTTCGGCGTCTGGGGGCGCGACTGGG
CCATTTTTTTCAGCGCCGGCGCCTAAAAAGTGGCCTTGGGGGGGGGGCGGCTGGAGATGCTCTTAGCGTTTCTTTT
TGTAGTAGCTGGTAATAATCGAGTTCCTCCGTCCAGTTTGAAATTTTGGTTTGGTTGAGAGTATTGACTGGGATGG
GGATCTTTTCGATTTTCGGGTGCTTGAATTATGATTCTCGCCATCCTTCAACTCTGGATCCTCCATCCTTCAAAAACA
ACAACTACCAAAAACACGAACTCAACGGCGTCTGAATTGATTTTTTTTTTAAATACAAATAATAATCTAAAATTGC
TAATTTCTTTTGAACACACACGATCTAGTGTATACTCATGTGAAAAGTAAGGAATGATTTTCTGGTATTCTGA
GTGAAAGAAAACAAAATCGACATTGTATAAATGTTACTATTTCGCGCTTTTTTACTCATAATATATATTTTGCCTTG
AAGTCAACTTTAGTCCTCCATTGTGAATTTTTTTTATACGAGTATAACACTAGATCACATATGTTTCCAAAATGTT
CCAGAAATTTTTGAACTGTATTGCAGTTTCTCAATTATTATTTTCAGTTCAGGTGCATTGGGACCCAAGACCCATTG
GGTATAACCAACCGCAAATGTGTGCATGAAGGAGAGAGAGAGGGGTAAATGCATGATGTGGACTGAGCAACCAACT
GAGAGAGATTGAGAGAAATGAGAGAAGAGTAAATACAGTGAAGCAATGGGATATGTCATTGTTTTCTCTGAATCCC
TGTCTCTCTATGACCCACTGCACTGAATGATTACATCAACGAAAACTGTACTGTTCCGAGGGATCGTGGGCTCT
GTTATCTCTTCCAAGAGCATACTGCTAGTAATTTCTCTCTTGATTGATTGTTGTTGTGGGTCTTCTCGCCTCCA

CTGAGTGCTCCCTTCCTCTCGTCTCAGTCATCTCCATCTTTTCAAGTTGTGAACTGAAACTATGTGCTTATTCTAC
AGTTTAGCCTATATATGTTTCATGATCCCTCAGTTTTGTAGGTATGGTTTCAGCTTCTGTTACAGTTTAAACGCACGT
TCATGAACTGAAACTATGCTTCCCTAGCACTAGTACCCAAAGGCATTGAGTATCACTACCAAACCGAAATTTTC
AAACTGAACAGAGGGATCCAATTATTTACCGGTTGCAAAGATGAACGCTAGTGAGTAAAATTAGTAGTGTCAATTC
CTGATAAGTGCATGAAGGATGGAGAGATGGTAGATGCCTGGCAGGTGCATGAGGGAGATTGAGAGAAATGAGAGGA
CGTACAATTATTGTCTCTTGAGTCACTGTCCCTGTATGACCCACTGCACTGAATGATTGCATGACCCACTGTACAA
TTATTCAGAGGCATCGTGGGTGCTCTCTTATCTCTTGACCTGCTGTTGTTAGTCTTCCCTGCTCCTCATCTCCAC
CACCGACAGAAGAGTGCTCCCTTCCTCGCATCTCAGTCCTCTCCTCCATTGCGCGCCCTATTGGTGATCTCATCCA
ACCTCCGACTCCGAGCTCGCCCGTGGACATTTTTGGGTATATTTCTTGTCGATTTGTTTCCAGTTAAAGTAGCAAT
GCTTGCATCTAAAAGTTATATTTCTCCTGCTTGAGATTCTGATCCATTTGTGTTGATTGAATCCAGGGTGGGATC
GTGGGGCTCTGTATCTTTCTAGTTCAGAGTACTATTGTGCTTCCCTGCTCCTCGTCTCCGCTTCCAAGTACGCGC
CTGGTAAAAATTTCACTCCCATCTTTATTGCTATTCTCTTCTTATTAATCTGCTGATTTGCTAGATTGTAAAGTTC
TTATTACTTATTCTTCCAGATCGAGTGAAGCGACCTCCGCTGCCGCTTGTGCCCTAGGACGCAGTTGTGTCTCTGC
TCTGTCTGCTCTGCTGGTGAAGCATCAACGGTGATGGCCATCCGGTGTGATGCCGCCGCTGTGTGCTGCTCTGC
CGTGAAGTATCAAAGGTGGGTTTAGATGGATATCGCAGTTTGGATTGGCAACTCACTTCTAGAGCTCGTTGAAATT
AAAGCGTCACACTGTTTGGATTGGATTACAGCTCCCCATATTCATCTATTTGTAGGTTCCGGTTATTATTCAGA
GCAACACGCTCACGGATCTGACCTCTGGTGCCAGCCGCCGCTTCCGCTTGTGTGCCCAACACGACCATCCG
ACGAAGACGCGCCGTTGTGTTCTGCTCTACTGTGAAGCACCAAAGGTGGGCTTGGTCCAGATCCCTACATTCATC
GATTTGGCTTGGCAACTCCGTTCTAGAGCTTGATTGTGTTACAGATCCCTACATTCATCGATTTGCAGGTTTCCA
GTTAATTGATCCAGAGAGCTCTCATGGATATTGTACGGGTGCCATTGCCAACCTGATCCCCAAGCTGGGAGAGCT
GCTTGTGGGGGAGTACAAGCTGCACAAGGGCGTCAAGAAAAATATCGAGGACCTCCTGAAAGAGCTCAAGACCATG
AACGCTGCGCTCATCAAGATTGGTGAGGTGCCGCCGACCAGCTCGACAGCCAAGACAAGCTTTGGGCCGATGAGG
TCAGAGAGCTCTCCTACGTCATTGAGGATGTGGTGGACAAGTTCCTCGTACGGGTCCATGGCATTGAGCCCAGTGA
CAACACTAACGGATTCAAGGGGCTCGTCAAGAGGACCACCAAGTTGTTGAAGAAGGTCGTGGATAAGCATGGGATA
GCTCACGCGATCAAGGACATCAAGAAGGAACTCCATGAGGTGGCTGCTAGGCGTGACAGGAACAAGTTCGATGGTA
TTGCTTCTACTCCTACTGAAGCAATCGATCCTCGTCTTCATGCTCTCTACATAGAAGCCGCAGAGCTAGTTGGCAT
CTATGGGAAGAGGGATCAGGCACTCATGAGTTTGCTCTCCTTGGAGGGCGATGATGCCTCTACCAAGAACTGAAG
AAGGTCTCCATTGTTGGATTTGGAGGGTTGGGCAAGACCCTTGGCCAGAGCAGTATACGAGAAGATTAAAGGTG
ATTTTGGTTGCCACGCATTTGTTCCGTGTCGGGCAGAACCCTGATATCAAGAAGGTTTTTCAGGGATATCCTCATTGA
CCTCCGAAAATCAAACCTCAGATCCTAGCAACTCTAACTCAGATCTTGTGATACTGGATGCAACACAGCTTATCGAC
AAGCTTCGTGAATTCCTTGAGAACAAGAGGTATGCATCACTTACAGCAAAAATTGTGCACTATTATGACATGATTAT
TTCATATGCTAGTTGTACAAGTAATACCGAAAGTGTCTAAACATATTGTAGCGGGAGGGTTCAGAATAATTTTTCC
ATTGAGGCCACCTTACTGGCATATGCAGTTCACACTAACTGTAGACCTTCTAGGTGATAAATTTCAAGCATGTA
GAAGTTTATACTATGTTACTATGTCTGAAACTTATTGGCATTGGTCCAGGAAATCCATCTAAACATTTTTGCGTTAC
ACCAAAGTGAGTGTAATGACAACCTGTAACAAGTAAGGAAAGAAAGAGGAAGATAAATGTTACAAAAATTTAAATCA
AACTTATTACCATTTCTTTCTTAACCCACCTAGTTTTAAAACACATATTCTAAAGGTGGCGATGCGTGCCAAAGG
CTGCCAATAAACTTCCTAAAAATATTGTATATTGGATCCAAACAAGAAGTTAAATTTGCCCTTCACCAACTCATT
TATTCACCATGTATGCCTTTTTTTCTGGAGACAACTATCAGCAAAAATATAGATGAAAAGACACTTCTTTTTCCGT
ACAACCCCTTAGACACATCAATGGACCAGATCTGCCTCTACCCCTTCATAAGAAAGGTATGATTGTCCTTTTAC

GAAATACGTCTCCCGGACCGTACAACAGGGAGCAGTAAACTGGGCCGCCCCAACAGCAAACGATGCACGTAGTGGA
CTTGTACTGAAACAGTGGAACAGCCTAAAAAATTTAAATTCATTCTAGCAAGTATCGAGCACAAGACCTCCCACAT
TAACACAAACCAACACAACCACTTGATTGAGGCAGCTATCTTGACTAATTTGCAGCGCGGCCTTTTAAGAACTATG
ACCAGTGACATATTTGACCATTATTTTGGATATTAGAACGTGACTTTTTTAAAACGTGGACATTTTTCCAAAATGT
AAACAAATGTTTTAAAATTTCTAACAAATTTTCCGAAAAGTGGAACACATTTATAAAGTCTCAACCAATTTAAAATA
ATGAGACTTTTTTTAAAATTTCTGACAATTTTTTAAACACAAACTATTTGAAACTTGAAACTTGTTTGAAAATGCG
GCCATTTTTTGGTATTTTCGAACTTTATTGAGAAATATGAATAAATAAATAAATAAATAAATATGTTGAACATTTT
TTGAAGTTTTCGATTTTGAAAGATAAAAAGATTCATGTACCTTTTTTAAACATTTCCAAAACAGGTTAAAACCGGCC
TAAAACCATCTAACAAAGTTCTCAAACCGGCATCTGCAGAGGCAACGAACAAAATTAAGATGGGCTGGATTATGTT
CAATCGTATCGATTGTGTGTGTGAGAAACAACAACCTGTTTGACGTAATAAATGTCAAATAGAGTTCCCTCAACAC
ATGCCCGATGGGATCGTTGTCGTCGCTAGTTAAGCCAACGGCTAACCATTTTGTCTTCTTTCAAATATTTTTTAGAA
TTTTGAAACTTGTTCAAAAAATTTGAAAATTTTGAATACCTGCAATGTTCTTCTTTCAAATATTTTTTAGAA
ATTTCAAAAAATCTGGAATCTCAAAAAATGTTTCGTGTTCTCGAATATCTGTTCACAAAAGAAGAAATGCACGTG
TTTCAAAAAATGATAATTTTATAGAAAAGTAAGAATTCCTATTTTTTGTTCAAAATTTTTTATCAACTGTTTCAAAT
TTGTTATCAATTGTCGAAAAGGTGTTTAAACTTGTAATTTTTTTCATAAATAAATTTAAATTTCAAATTTGTTTACA
AATTTCAAGAGATGGTTAGTTCACAACAAAATGTTTCATGTTGGTTGATAATGACAGAAGTTACAAATAACAAAAGC
TTTTAAATTTGGGAAAATTTACATGCTCATGGGACTCTGTCTGGCCTAGTCTAGCACACTCCTCTCAACTAGTGGCC
TTTTGACTATGGATAAATGACCCCACTTTTTTAGCAGCCTGGTACGGACACATGAGGCATCCGTGCTAGGTTTG
AACGACTTCCGACATTGTTTGCATGTTGTGACATGTCCAACCATTTATTGGTCCTTTTTCATCAAGAAAACCTAG
AAAAGGAATTTCTTTCCAAAACCTCAAACAACCTGGCATGGTGTCTAGAATTGGCCATATAAGCTCATGGAATAAAT
TTGGGTTCATATGATGGATGCCGAAAATGGTCTCAAGCGGACCCTTCTCGCCTACTTGAACACTCCATGATAGGTG
TGAATGAATTTCCAATAACATGGTCTAATTTAAGACATGCATGAAATGACCCCACTTTTGCAAGCAGGTGGGAAT
GCCCCGGTAGGCATCCATGATAGTTTGAACGAATTCCTACACCATATGTAAGTTGCGTCACGTCTAGCCATTTA
TTGGTCATTTTTTATTGAGAAAACCTCAAAAAATGCAAGAGTTGTGCAAAAACCTCAAACAGTTGGCCTGATACCTTG
AAATGGTCATGCATGGCCATGAAAACAAAATTTGGGTCCATTTAAGGGATGTGCAAAAACGAGTTGCTCCCAAACGG
ACCATTTTGGACCCAAACACTCTCTGTTGAACATGATATTTTATTGGAAATCTCAGGATCGACCTCAACTTTTGCA
AGCAGGTTGGCATGCCATGTTAGGCGTCCGACCATTTATGGGGCTATTTTACCGAGAAAACCTTAGAAAAAGCA
AACTTGTCAAAAACCGAAATAACTTGTATGGTGCCTTCAAATGGTGTCAATGAAAAAAATTTGGGGCCAGTTCAA
GGGTGTGATATGAGAATATGAAGCCTATTATTTTGGAGATGGGAATGAAGCAAATATTTAGGTCGTTGAAAACATG
CTATACGGACCAATGAAGCATGCTAAATTTTGAAGTTGATGTGGAGGCAAAAAACGTAGTTTTTGGTGCCTGTAAAT
GAATAGAGACGATTTTTTTTGGTGTCAATTTTAGTTGCACTGGAAGTAAATTTTGGTAACATTGGATAATTTTTTTG
CTTGATCGATTATTTTCTTTAAAATCTTGAATTAGTTTTTCTAAGGTTTATTTTGTCTTCTTAAATCGGTGATTTG
TTTCCAACTCGTGTGATCTATGGGCAGTTATTAGTATCCACCAAGCACATTTAGAAAAAGCTTTGCTGGCGCACG
TTCTATGCCTTCCAATCGGATCTGTGTGTCAGTTTCTACATATTGAATGATGATGAAGTGGTCTGATCTGATTACT
AGCAGTTCTCTTCTTTTAGCGTCACATCTGGCGCATGAACAAGTAAATCAAATGTTGTAGGTAGTACAGCAGCCG
TAGGTCTTCCAGTTGGTTACTGCCAGTGGATCGTTACAGAGAGGTAACCGCATCGATTCTCATTACCACCATCTAA
TTTTGAATGTTATGGAAAAAATTAATGGGCGAGCCAGGACGCCAGAATGTTAAAGAAAAATATTTATGGGCCTAG
CCCATGACGCGTGGGGGCGACTATTTCGCACAGAGTTTTTTTTTTTTCATGGCTATTCGCACAGAGTTGGGCACTCC
AAATGAACAAACATATGGCGTATACGTCTCAGCGGACAACCCATCATGCATGCAAAAATGGATACGATATGTGAAA

TGTCTGTA CTATCCTTTATACGTTTTAGAGGGGGTGTACCGAAGCAAACTCATGAAAAGATAATGCCATACTA
TTTGAGTGAGTCTCCAAGTGGTTCATTAGCTGCCATATATTAATTGGTGGGCCAATCTATACTAGGATCTTTTCG
ATATATCTACCTGACCATTTAACTTCTGTAGTTAATTGTATTCTACATATGGTCACTGATTCAGCAATTGCTAGT
TGTGTTTTACTCCCTTGAATCTTAAATATTTATTCATTTTTGTTTGTGCGTTTTAAGATGCATGCCTGTTACGAGTTT
GTTTCTGAATATACGCCCTTATAGATTGTTAGTTCACCCATATATTCGTATGCCCTCAGTTTTTTGATATGTGTA
GACCTTACACTGATGCTCTGAACTAATGTAGGTACCTCGTAATAATTGATGATATATGGGATGAAAAATTGTGGAG
ATACATCAACCTTGCTTTCTCTATCAATAACAATCTAGGAAGTCGGCTAATCACCACAACCCGAGATTTTCGATGTC
TCCAAATCATGCTGCTCATCAGCTGATGATTCAATTTATCATATGAAACCTCTTTGTACCAATGACTCCAGAAGGC
TCTTCTATAAAAGAGTATTTGCCGACGCTAGTGGATGTCCAAGTGAATTTGAACAAGTGTCTAAAGATATATTGAA
GAAATGTGGCGGGGTACCACTAGCCATCATTACTATTGCAAGTGCTTTGGCTAGTGGCCAGCAAGTGAACCAAAG
CATGAGTGGGATATTCTACTCCAGTCCCTTGGCTCCGGAGTAACAAAAGATAATAGTTTGGCTGAGATGCGGAGAA
TACTATCTTTCAGCTATTATAATCTACCGTCTCATCTGAAAACCTTGCTACTTTACCTATGTATATATCCAGAAGA
TAGCACCATTGGTAGAGATAGACTGATATGGAAGTGGGTGGCCGAAGGATTTGTCCACCATGGAGATCAAGGGACC
AGCCTGTTTTTGGTCGGATTAACTACTTCAACCAGCTCATTAATAGAAGTATGATCCAGCCTATATATGATAATG
CAGGCCAGGTATATGCTTGCCGTGTACATGATATGGTCTGGACCTTATCTGCAACTGTGCACATGAAGCAAAGTT
TGTTAATCTATTGGATGCCACTGGGAATAGCACATCTTCACAAAGTAATGTTTCGTCGTTTGTCCCTTCAGAATAAA
AATGAAGATCATCAAGCCAAGCCTCTCACAAATATCATGAGTATGTCACGAGTGAGGTCCATTACTATCTTTCAC
CTGCTGTTAGTATCATGCCAAGTCTGTCAATGTTTGAAGTTCTGAGTGTACTTGATCTGTGCAACTGTGATTTGGG
ACAAAGTAGCAGCCTGCAGCTTAACTAAAGGGTGTGTACATTTAATCCACCTAAGGTACCTGGTCTAGCAGGC
ACTCAAATAGTGAACCTCCGACTGAGATAGGAAACCTGCAGTTTTTGGAGGTGTTGGATCTTGGAGATAATTATG
AGCTAGATGAATTGCCTTCCACTCTTTTCAAATTGAGAAGATTAATCTACCTAAATGTTTATCTCTTTAAGGTGGT
TCCAACTCCTGGTGTGTTGCAGAATCTGACATGCATAGAAGTGTGAGGGGGATCTTGGTCTCTCTGAACATTATT
GCACAAGAGCTTGGCAACCTGGCAAGGCTGAGGGAGCTTTCGATTTCGCTTCAAGGATGGTAGTTTGGATTTGTATG
AAGGTTTTCGTGAATTCTCTGTGCAACCTACATCACATAGAATGCCTAAGTATTGGTTGGAATTCTGAAAAACGTC
TTTTGAACTGATGGATCTCTTGGGAGAACGCTGGGTGCCTCCTGTACATCTCCGCGAATTTGTGTCTAGGATGCCC
AGCCAACCTCTCTGCACTGCGAGGGTGGACAAAGAGAGACCCCTCGCATCTCTCCAACCTCTCCAAGTTAATCCTCT
CGTCAGTGAAGGAAGTGCAGCAGGAGGACGTGGAATCATTGGGGGGTTGCTGTCCCTTCGCCGTCTCTGGATAAA
GAGCACCCACAAACACAGCGGCTGCTAGTCATCCCTACAGATGGGTTCCGCTGTATGGTAGAATTTTACTTGAAT
TGTGGGTTAGCAGCGCAGATAATGTTTGAACCAGGAGCTTTGCCGAGGGCGGAAGAAGTTACGTTACGCCTGGGCG
TGCGGGTGGCAAAAGAGGATGGAACCTGTGGCTTCGAATTTGGGCGTGCAGGGGAACCTGCTCTCCCTTCGGCGGA
GGTCTGGGTTAGGATGTATTGTGGTGGAGTGAGGGTTGGGGAGGCAAAGAAAAGCGGAGGCTGCCGTGAGGCACGCA
CTCGAAGCCCATCCCAATCATCCCAGGATTTATATTGATATGTGCCCGGTATAGCAGAAGGTAATCAGCCGCAC
CTAACTACTCAGCTCAACTCCCATCCCAGTCATCCCCTGATTAGGTATATGTTTTTTTCGAAATGATGGACTGAC
ATTATTACTTTCTGCATTGATTTTGTATCTCTGAATCTACCAAGATGCTCATGATGACGATTTGTGCGAGGACGAGG
AGATCTGATTTCTGATCCAGAGCGTCTCACATTGCATCAGATGTGCTCTCAGGTATGTAGCAGATATTTGCATGTT
ATGTTTTCCATCTTTCTCCCTCGTCTAGAGCTCAGCTTTTCGTTTCATTCACCGACTATGCTATAGTGATTATACG
GAAATTAGAAACAGATTAAGGTATTTACAAAATTGCTTAGACACAAGGATCTGATCAGAAAAGTGAACCTGGCAG
TGTACTGTGAAACCTGCCAGTCTTTTTTTGGCAAAGGGCTGATGAAAGAAAATAATTATTTTATGCAAATTTGT
AGAAGGATAGTTAATAATGGGGAATTAGCCACAGATCTATCTTTATGTAAGCATATCTCTGTAGCTAGAGTACTAC

ATGCTAATTTCTCTTTATGTAAGCATATCTCTGTAGCTAGAGTACTACACGCTAATTTCACTGCTCTAAAATTTAG
GGGGGTCTGTATGGTGAAGCTGCTGAGCTATGGCATCAATTTCTTGCTGATCGTGAAGTTTTAGTCTTGAGGAA
TGAGCAAGATTCATGTAGATGACCCACAAAATAAATATTCATTTAAATGGCTTCTAGAGAAGAATGAAGTATTTT
CCGTGCATCCTATGTTTATAGCTTTGAAAGCTCAACAAGTGAAATGACTAGAAAATAAATTTTGGTATGTAAAAGG
TCAACTTAATACCATAGTATTTTTGTGGTTAGCATTAGAAAATAGTATCAGCAGAGTTGATCTGAAGCGTCGAGGT
AGTGTGGTATAGGAAAGTGTCTTTTTCGAAGTAGAAAATAGCCAGTGCATCTTCTAAAGTGTGGTTGCTTGT
ATATTTGCTTTTTGTGTGACAGTCCGGATTTGTGATTGGGTGATGAATCCAGGGATAAAGATAGGAGTTTGT
TTTTGCTGGGATAGGGTCAGTTATTTAGTCTATTTGAAAAGCGAGGAATGATAATTGCTTGAAAACATTTTTTCC
ATGGATCCCAACTGAGTGTAGGTTGTAAAGTTTCATATGGTATGTTTTATTAGTCTAGCTTACAAAGGAAAGAATT
TCAGGATGTGCAGGTGGCAGGGCGCGGCTTACTGCTGGTGGCATCGAGGATACATGTTTCACAAACATTTTGG
TGGGCGCCGGACGTGCCAAGAATGGAAGTTGTGTGATGAGCTTCTTTAAATAGCTAAGAAAGAGATATTGCTTTG
TTTTGTAATGAATAAGTAAGGGCGTTGGAGTGAATTACAAGGATACCTTTGCTTTGCTTCAGTTGAGGGCCATCGT
TGCTGCTCTGTTTTGCTCTGTTTTTGTTTTTAAAGCTGAACCGGACAAACCTGAGGTTGTATTATCAGTTTCGTG
ATGAGTGAATGAGGGGTCACCTAAGCTCCTAATTCGAATAAAACTGTGATTCAGTGTGGGATTTGTTACTTG
AAAAATATTAAGTATTTTCTATTTTTAGTGTGTGCTTCCAAGTACAAGCAGTAGTATTTTAAAGTGTGCTTCC
ATCTAACAAGCATGTATACCCCATGGTAGCAAATTATTTTCGTATTTTTGGAAGTGTCTCGCGAAAGGACCTA
GAACGAAAAGGGCTATATATGTTTGTACAGAGAGTGGCAGAGCTACAATGAAAAAGATGAAGAGCACAGAACTTC
AAATTTTGGAGCATATAAACTATTGAGTGAATTATATATTTATACGCTACCAAATTAGAAATTATTGTTAAACCGT
GAGCTAGTAACAATGGCTTTGTTCTGAACCTGTATAAACTTTAAAGTGGCTTTTGTGGGCAAACATCACTATTC
TAATGAGCCATTGACGAAATTTTCCACCCGGCTGACTCTTTTGTGTAGTCCCAGCAGTTAGGTGCCACACCACA
CTGTGTAGCGCCTGACTGATAGGCGCTACACGCCTAGCCAGAGTCACATCCCGGTTGTCTGAAACTTGCTAAGCC
AATGTGCAAAGTCTGAGAGTTAGGCGCTACACTGTATAGGCGTTGCACTAGTGGCTACAATATTAGCCACTACATC
TAGAAGCAGCCCGCTTTTGGGGAGTACTTCATCACTGAACTTGGTAAGAAAAAAAAAATCTCTGAATTCGCTT
TTGAGCATACTTCAAACTGAACTTCAAAAAATTGAAAACCTGAAAAAAGGAAAGAAAAAAAAAACATTAGTGCCA
AACTGCCTCTCACCCTCACCTATGCTAAGAAAAATGAAAAGGAAAGAAAGAAAAAAGCAGCACCAGTACGCT
GATAAAAAAGATATGCAGAGCTCTGAAGTATGCTACTGAACATAGATTAACACTGAAGTATAGACAGCGGTAATGT
AATCCCACAACACTACAGCGAGACAGACATCACATGGGAAAAAGATCACCGGCGAGCAGGCGACGGGCGGTGATTCC
GGGCGAGCATGCTATATATCCATCCCCTCCTCCTCCTCCCGCTGCTCCGGTCCGCCTCCGCCTCCCTCGTCGGC
GACGCCCGACCTCGCTGTTCCGGAGGCAGCATCGATCATCTGCTATTCGCGGGCATCAATCAAGTGAATCCCAA
GCACGCCCTGACCCTCACTCTCGTCATCCGTCTCCTTCCATTAATCCTATATATAATTATATACAGTATCTCTCTC
AGTGGTGTGCTCACTCACCACACCCAAGGTGTTTGACAAAATGACCAACTAAGATAAGGGTGGCTTTCACAGCA
CGTACTAGTAGTATTTGTGTTTTCTTTCTCTCTGCTAATGTAACATAATGTGGGTCTAACATTTCTAATGTCGTGG
GTGGCAGTGTGAGCGGCTGCAGCTGCACATGACGCCCTCAGTGCTGATTTGCCGCGGATGCATGCTGCCATAGTA
GTGCTGGAGGACGCCGATCAGCCTGTTTCAAGAAATCGAGGCTGCTTCTGACGCCCTTGAATTAAGTACTCGACGAA
ATGCACAGGAGAGAGAGAGACTGCGGTCCACCACAACAACGACACTATTGGCAGGTGTGTAACAACCTTGCTTGCT
TCACTCTCTTCTATTTTTCTGCATGTAGATTAATGTACTAGTTTATGAATGCATAGTTTGTAGCATGTCCGGCTC
CTCCCCACCACCTTAGAGCGCACCCGCTGCTCTTCCCGCTCGACTGCAGGCGTGAGCTCCGACGACCCTTCC
TATAGCGTTAGCACTGCTCACGTCCGCTCAAGGCACTGCCTCCATCCGTCCAGTTTGAATTTGGGACGTGTATCT
TTGGGTCTCGGGTCCGATGCATCCGAAAAGAGAGAAATAATTTAGAAATTTCAAAAAATAAATCAAATTTGTGATT

TGTTTAGAACAAACATGATATTGTGTTACACTCATGTCAAAAGATTACGAATGAATGACTTTCATGTACTCTAGG
CGAAAGAAACCAAAATCGACGCTATATAAAAGTTACTATTTATGCTTTTATACTCACTATATAATATCTTTTTTGC
CCTCAAGTCATTCTTTCGCAAACTTTCTATACGAGTATAACACTATATCAAGTATGCTTCCAAAATGTTCTAGAA
TTTTGCGACCTTTTTTGCAATTTCTAAATTATTTTTTCAGTTCAGATGCATTGGGTATTTTCGGTATCTGATTGCC
TTTGAGTATTTTATAGGAGTAATATGCATGCTGTGGACTGACCAAACTGAGAGAGATTCAGAGAAATGAGAAG
AGAGTAAATGCAGTGAAGCATGGCTGGTGCCTGGTGGACGGACCATATACAGTGGTATGTAATTATTTTCTCTGAA
TCCCTGTGTCTCTATGACCCACTGAATAAACACATCATCCAAAAGCAGTTCTGAGGGAGTGTGGGGCTTCTTTC
CACGCCACCCACCGAAAGCACTGATGAACAAACACATGAGCCGAAAGCATTACTGTTCCGAGGGATTCTGATCTT
GACTTGCTGTTGTGGGTCTTCTCTGCTCCTCGCCTCCACTGAGTGTCCCTTCTTCTCGTCTAAGTCTCTCCTT
CTTTTCAAGTTGTTTATTCTCCTGAACTATGTTTTTATTGTTACAGTTTAGCATTGTTTCATGATCGCCAGTTT
TTGTAGGCAAGGTTTAAAGCTCTGAACTTCCAAACCATAATTAGTTTCATATTGGGGTCTGTGGCGCGGATTTGT
TAGCTTTACACGTTCTCGATTCTTGTGCTACCTTCAATATGGTGCAGAATTTGTGTTGTTAAGAGCATCTCCAAC
AGCCGCGCTATACTAGCGCCACGCCTGAAAAACGCCATTTTAGCGCGCGCAACGCGTCCAGCGG
GCGCCAAAAACGCGCGCGCTAAAACGAGTTGGGCGCGCTGGTGAATGCCCCATCCCGCGCTGTTGATTTGGA
GCGTTCACTTCCGCGCGGCACACTCTCGCGCGCGCAACTCATTTCTCCACCGCGCTCGTTGCTCCCC
GCTCTCTCCCTCCATCCGGCCGCGCGCGCGCGCTCGCGCCGCCCGCGCGCTCGCGCCGCC

[0069] 研究发现,YrLumai15基因与小麦抗条锈病表型连锁,且该基因的突变会导致小麦抗条锈病表型的丧失。因此,YrLumai15基因可以提供条锈病抗性,在小麦抗条锈病品种的培育中具有重要的应用价值。

[0070] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本申请的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本申请的技术方案。

[0071] 本发明实施例和对比例中所用的试验材料均为本领域常规的试验材料,均可通过商业渠道购买得到。未注明详细条件的实验方法是按照常规试验方法或按照供应商所建议的操作说明书进行的。其中:

[0072] 本发明利用的实验材料为3000余份鲁麦15EMS突变体、野生型鲁麦15(抗病对照材料)、CB037-PstS(感病对照材料);使用的条锈病小种为混合孢子(CYR29,CYR31,CYR32)、单一小种CYR34。

[0073] 本发明的小麦材料种植于大田和生长室,大田冬季小麦一般于每年10月初种植,次年6月份收获。需要接菌的材料需要在20行中插入2行感病对照做诱发行,田间正常管理;生长室种植需提前在培养皿中将小麦进行发芽处理,待种子长出2cm嫩茎时移栽,按研究目的将材料移栽至小方盆或者加仑盆中。生长室生长条件为:白天温度控制在23℃,光照16h;夜间温度18℃,黑暗8h。采用人工接种的方法对小麦条锈菌生理小种接种。田间条锈菌生理小种接种一般采用注射接菌+喷孢子水的综合接种方法,接菌时间一般在每年的3月份进行;人工气候箱接菌一般采用涂抹接菌法,若发病不充分则重新进行涂抹接菌或者注射接菌。

[0074] 本发明所涉及的PCR引物及序列见表1。

[0075] 表1:本发明中应用到的PCR引物

引物名称	引物序列 (5'到3'端)	序列编号
YrLumai15-FP	TGTCGTTTTAAGATGCATGCCT	SEQ ID NO .5
YrLumai15-RP	ATTCATCTAGCTCATAATTATCTC	SEQ ID NO .6
YrLumai15-MF1	CTGTGAAGCACCAAAGGTGGGC	SEQ ID NO .7
[0076] YrLumai15-MR1	GAACCCTCCCCTACAATATGTTTAGA	SEQ ID NO .8
YrLumai15-MF2	TGTCGTTTTAAGATGCATGCCT	SEQ ID NO .9
YrLumai15-MR2	ATTCATCTAGCTCATAATTATCTC	SEQ ID NO .10
YrLumai15-MF3	GATCTGTGCGAACTGTGATTTGGGAC	SEQ ID NO .11
YrLumai15-MR3	AGCGTGAGTAGTTAGGTGCGG	SEQ ID NO .12

[0077] 实施例1:感病突变体的筛选

[0078] 本发明利用甲基磺酸乙酯 (Ethyl methanesulfonate, EMS) 诱变野生型鲁麦15, 自交至M₄代时, 将3000余份突变体接种混合孢子 (CYR29, CYR31, CYR32) 鉴定表型, 筛选到5份鲁麦15感条锈病突变体。对5份感病材料对应的M₅代接种混合孢子 (CYR29, CYR31, CYR32) 验证, 5份材料中有4份表现为感病; 若换用毒性更强CYR34的接种M₅代, 5份材料均表现为感病。提取感病材料的DNA, 使用1BL/1RS连锁标记Iag95进行验证, 检测结果显示感病单株均具有鲁麦15的遗传背景 (图1、图2)。

[0079] 实施例2: 利用转录组学分离YrLuma.i15基因

[0080] 本发明利用RNA-seq测序结果, 比对分析抗病材料鲁麦15和5个感病突变体的转录组, 并利用GATK (Genome Analysis Toolkit) 进行SNP-calling, 对SNP进行过滤和分析。总RNA的提取采用TRIzol试剂及相关方法 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)。RNA测序涉及的文库构建和高通量双端测序 (HiSeq 2500, Illumina; paired-end, PE150) 由北京贝瑞和康生物技术有限公司承担 (Berry Genomics Company, Beijing, China)。

[0081] 本发明发现一个新基因, 将其命名为YrLumai15基因, 其序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3所示。在进行RNA-seq测序的5个感病突变体均在该基因上发生了单碱基突变。

[0082] 实施例3: 对感病突变体的测序确认

[0083] 根据该基因设计扩增引物, 扩增引物的序列如SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.10、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.12所示。对实施例2中的5个突变体扩增后进行测序, 将测序数据与突变体亲本YrLumai15的基因区域比对, 发现5个感病突变体在该基因上发生了单碱基突变 (表2), 且均与实施例2中转录组测序的结果一致。

[0084] 表2: 感病突变体中YrLumai15基因的突变情况¹

突变体编号	植株世代	YrLumai15 ² 碱基替换	YrLumai15 ³ 氨基酸替换
2365	M5	G211A	E71K
2365	M5	G1396A	V466I
[0085] 3289	M5	G2023A	V675M
3530	M5	G2107T	Q703*
2333	M5	G2633A	G878D
3222	M4	G1503C	Q501H

[0086] ¹本表格描述了5个突变体在YrLumai15区域的突变情况。

[0087] ²左侧字母为抗病型YrLumai15基因的碱基,中间数字代表cDNA水平相对于起始密码子ATG的碱基位置,右侧字母为突变后的碱基。

[0088] ³左侧字母为抗病型YrLumai15蛋白中对应的氨基酸,中间数字代表相对于首位氨基酸的位置,右侧字母为突变后的氨基酸。

[0089] 实施例4:YrLumai15-2728标记检测YrLumai15基因

[0090] YrLumai15-2728标记是基于YrLumai15编码区区域设计的PCR标记,其核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0091] 用于扩增YrLumai15-2728的引物为YrLumai15-FP(SEQ ID NO.5)和YrLumai15-RP(SEQ ID NO.6)。用引物扩增后,若出现1261bp的特异条带,则表示携带小麦YrLumai15基因;若出现非特异性扩增,则建议相应的小麦不抗小麦条锈病。

[0092] 具体方法如下:

[0093] 1.材料选择

[0094] 本实施例中采用的植株材料为含有YrLumai15基因的小麦品种鲁麦15,不含有YrLumai15基因的感病小麦品种CB037-PstS。

[0095] 2.小麦基因组DNA提取,具体方法如下:

[0096] (1)取叶片装入带有钢珠的离心管中,放于液氮中冷冻30-60s。

[0097] (2)取出离心管,置于适配器中,放于组织研磨器振荡研磨至粉末状(18HZ,40s)。

[0098] (3)迅速加入800 μ L含RNA酶(100 μ g/mL)的DNA提取液,置于37-42 $^{\circ}$ C水浴30分钟,每隔10分钟上下颠倒5-6次。

[0099] (4)将水浴后的样品置于4 $^{\circ}$ C或冰上放置10min。短暂离心后加入400 μ L 4 $^{\circ}$ C预冷的6M乙酸铵,上下颠倒混匀,然后置于4 $^{\circ}$ C或冰上放置15min。

[0100] (5)12,000rpm离心10min,吸取上清液450 μ L转入含有450 μ L异丙醇和45 μ L醋酸钠的新离心管中,颠倒混匀,然后于-20 $^{\circ}$ C放置30min。

[0101] (6)12,000rpm离心10min,倒掉上清液,然后加入75%乙醇500 μ L,12,000rpm离心10min,然后倒掉上清液。

[0102] (7)重复上述步骤6。

[0103] (8)用量程为200 μ L的移液枪吸出多余液体,在超净台上吹干至离心管中无酒精味挥发。

[0104] (9)加ddH₂O 100 μ L,4 $^{\circ}$ C过夜溶解DNA。DNA溶解后,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0105] 3.DNA质量检测

[0106] 检测DNA纯度:待DNA溶解完全后,将分光光度计进行校准,取1 μ L DNA溶液置于分光光度计检测其纯度和浓度。

[0107] 检测DNA质量:取2 μ L DNA分装到200 μ L离心管中,加入3 μ L 6 \times Loading Buffer、15 μ L ddH₂O,利用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量。

[0108] DNA纯度要求:DNA纯度检测时注意A260/A280理论值在1.8左右。低于1.6则表示可能存在蛋白质等的杂质,高于2.0则表示可能存在RNA的污染。

[0109] DNA质量要求:完整的DNA电泳结果显示存在一条明亮清晰的条带,若存在拖尾或小片段则可能存在一定的降解。

[0110] 4.PCR扩增体系和程序如下:

[0111] 依表3在冰上配制体系。

[0112] 表3.反应体系组成

	药品	体积
	2×Taq MasterMix Buffer	7.5μL
	模板 DNA	1μL (~100ng/μL)
[0113]	上游引物 (10μM)	0.5μL
	下游引物 (10μM)	0.5μL
	ddH ₂ O	5.5μL
	总体积	15μL

[0114] 配制好反应体系后,在PCR仪上进行PCR扩增,PCR反应程序如下:

[0115] 95°C预变性3min;

[0116] 95°C变性15s;

[0117] 55°C退火15s;

[0118] 72°C延伸30s;

[0119] 72°C后延伸5min;

[0120] 15°C保存。

[0121] 将PCR扩增产物进行凝胶电泳分析,结果如图4所示。

[0122] 综上所述,突变体突变位点分析结果表明,YrLumai15基因的突变会导致小麦抗条锈病表型的丧失,且该抗病基因可通过标记YrLumai15-2728进行检测。因此,YrLumai15基因组全长表达框架 (SEQ ID NO.3) 的表达提供小麦抗条锈病的能力,该基因的突变会导致小麦抗条锈病性状的丧失。

[0123] 以上所述仅为本申请的优选实施例而已,并不用于限制本申请,对于本领域的技术人员来说,本申请可以有各种更改和变化。凡在本申请的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本申请的保护范围之内。

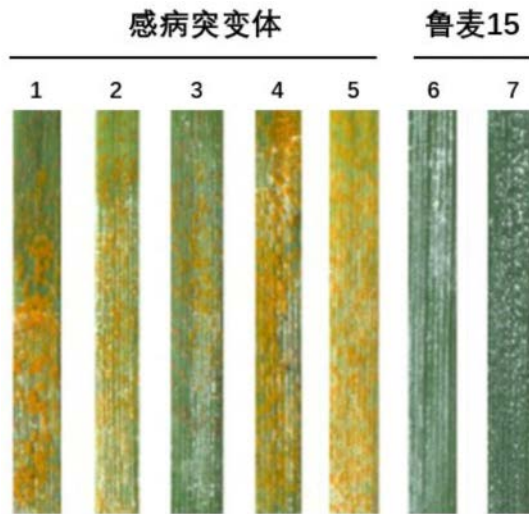


图1

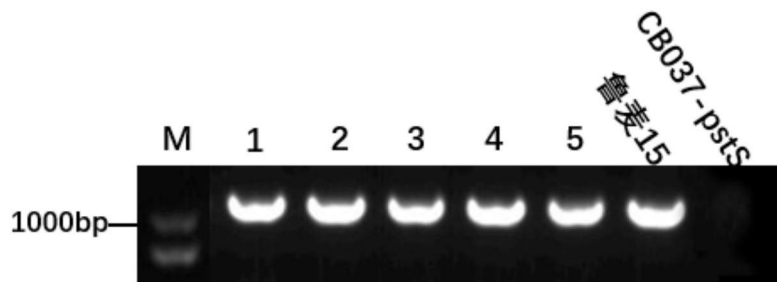


图2

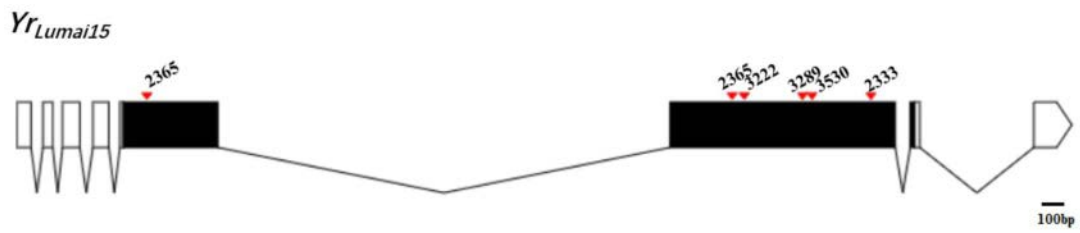


图3

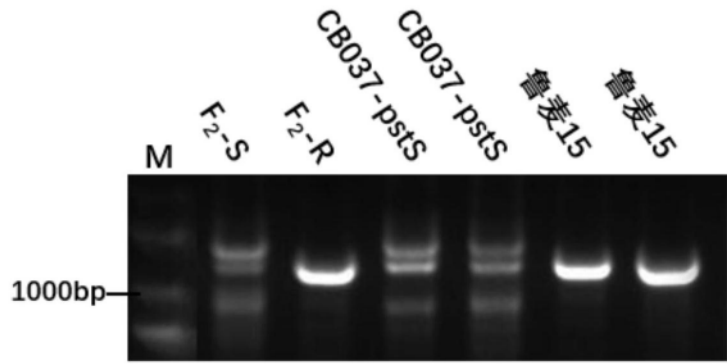


图4