



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105567600 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201610058155. X

A01P 21/00(2006. 01)

(22) 申请日 2016. 01. 28

C12R 1/07(2006. 01)

(66) 本国优先权数据

201510690179. 2 2015. 10. 21 CN

(83) 生物保藏信息

CCTCCNO: M2014423 2014. 09. 17

(71) 申请人 河南大学

地址 475004 河南省开封市明伦街 85 号

(72) 发明人 安国勇 王淼 王刚 程慧洁

(74) 专利代理机构 郑州睿信知识产权代理有限公司 41119

代理人 牛爱周

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006. 01)

A01N 63/00(2006. 01)

A01P 3/00(2006. 01)

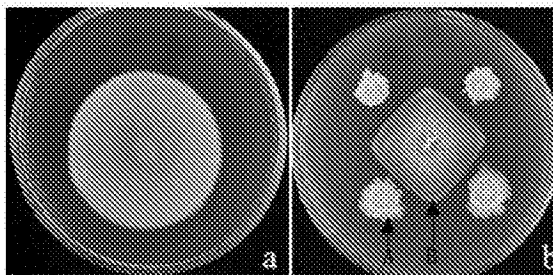
权利要求书1页 说明书7页  
序列表2页 附图1页

(54) 发明名称

黄萎病菌拮抗菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种黄萎病菌拮抗菌及其应用,属于作物病害生物防治技术领域。本发明中黄萎病菌拮抗菌为短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus)Y106,保藏编号:CCTCC NO:M2014423,保藏日期:2014年9月17日,保藏单位:中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址:中国武汉.武汉大学。该菌株为革兰氏阳性,嗜温、好氧,可耐受65℃高温;主要形态特征为:细杆状,两端钝圆,多以单个或链状排列形式存在;对黄萎病病原菌大丽轮枝菌具有拮抗作用,可抑制病原菌孢子萌发,在一定程度上抑制棉花黄萎病发作。



1. 黄萎病菌拮抗菌,其特征在於:黄萎病菌拮抗菌的名称为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106,保藏编号:CCTCC NO:M2014423。
2. 如权利要求1所述的黄萎病菌拮抗菌在制备用于防治作物黄萎病的生防菌剂中的应用。
3. 如权利要求1所述的黄萎病菌拮抗菌在制备微生物肥料中的应用。
4. 如权利要求1所述的黄萎病菌拮抗菌在防治作物黄萎病方面的应用。
5. 如权利要求1所述的黄萎病菌拮抗菌在促进作物植株生长方面的应用。
6. 用于防治作物黄萎病的生防菌剂,其特征在於:其包含权利要求1中的黄萎病菌拮抗菌。
7. 微生物肥料,其特征在於:其包含权利要求1中的黄萎病菌拮抗菌。

## 黄萎病菌拮抗菌及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种棉花黄萎病菌拮抗菌,同时还涉及该拮抗菌的应用,属于作物病害生物防治技术领域。

### 背景技术

[0002] 棉花是我国重要的经济作物,大部分省区都有种植。棉花黄萎病(*Verticillium wilt*)由黄萎病菌引起的一种土壤传播疾病,在世界各棉花产区均有分布,并呈日益蔓延的趋势。该病害侵染棉花维管束系统,素有“棉花的癌症”之称,并可以使果类、豆类、蔬菜类等其他植物感病,造成农产品品质和产量下降。如何有效控制棉花黄萎病的发生、减轻其危害从而保障棉花的稳产高产已经引起了人们的广泛关注。

[0003] 棉花黄萎病菌具有适应能力强、寄主范围广、致病力分化明显、传播途径多样、作用机理复杂等特点。由于缺乏优质的抗源材料,抗病育种工作受到限制,目前尚无针对该病害的高抗棉花品种。而常用的化学杀真菌剂缺乏专一性,会造成抗药菌株的产生,导致环境污染。因此,开发高效低毒、专一性强的化学药剂和生物防治制剂已迫在眉睫。

[0004] 利用拮抗微生物进行生物防治被认为是防治黄萎病最有潜力的方法。近年来,先后发现了一些对棉花黄萎病有拮抗作用的细菌、真菌和放线菌,拮抗细菌中研究的最多的是芽孢杆菌,如公告号CN102443559B的发明专利公开的用于防治棉花黄萎病的芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)41B-1(保藏编号:CGMCC No.5582),公告号CN104082344A的发明专利公开的阿萨尔基亚芽孢杆菌(*Bacillus axarquiensisi*)等。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种黄萎病菌拮抗菌。

[0006] 同时,本发明还提供一种黄萎病菌拮抗菌的用途。

[0007] 最后,本发明还提供一种用于防治作物黄萎病的生防菌剂。

[0008] 为了实现以上目的,本发明所采用的技术方案是:

[0009] 黄萎病菌拮抗菌,其名称为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106,保藏编号:CCTCC NO:M2014423,保藏日期:2014年9月17日,保藏单位:中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址:中国武汉.武汉大学(湖北省武汉市武昌珞珈山武汉大学保藏中心)。

[0010] 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106是从土壤样品中分离出的一种棉花根际细菌,为革兰氏阳性,嗜温、好氧,可耐受65℃高温。主要形态特征为:细杆状,两端钝圆,多以单个或链状排列形式存在。短小芽孢杆菌Y106在LB平板上菌落不透明,呈乳白色,圆形,有黏性,润湿、光滑;培养72小时以上,菌落边缘开始皱缩,呈锯齿状。

[0011] 黄萎病菌拮抗菌的培养方法:

[0012] 1)试管斜面培养

[0013] 采用改良型LB培养基,28~32℃下培养1~3天,获得试管种。改良型LB培养基配方为:酵母提取物1~3%,蛋白胨0.5~2%,葡萄糖1~4%,NaCl 1~3%,琼脂1.8~2%;pH

7.0。

[0014] 2)培养皿划线培养

[0015] 采用上述改良型LB培养基,划线接种短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106,封口膜封口后于28~32℃下培养1~2天,获得用于液体扩大培养的单菌落。

[0016] 3)液体扩大培养

[0017] 将划线培养得到的单菌落接种到液体培养基中,在温度25~37℃、转速200~300rpm下振荡培养2~5天,即得。液体培养基配方为:酵母提取物1~3%,蛋白胨0.5~2%,葡萄糖1~4%,NaCl 1~3%;pH 7.0。

[0018] 黄萎病菌拮抗菌的用途,包括:黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)在制备用于防治作物(尤其是棉花)黄萎病的生防菌剂中的应用,或者黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)在制备微生物肥料(尤其是微生物有机肥)中的应用。

[0019] 黄萎病菌拮抗菌的用途,还包括:黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)在防治作物(尤其是棉花)黄萎病方面的应用,或者黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)在促进作物(尤其是棉花)植株生长方面的应用。

[0020] 用于防治作物黄萎病的生防菌剂或者微生物肥料,其包含黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)。

[0021] 本发明的有益效果:

[0022] 本发明中黄萎病菌拮抗菌为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106(CCTCC NO:M2014423),是从土壤样品中分离出的一种棉花根际细菌,为革兰氏阳性,嗜温、好氧,可耐受65℃高温。主要形态特征为:细杆状,两端钝圆,多以单个或链状排列形式存在。短小芽孢杆菌Y106在LB平板上菌落不透明,呈乳白色,圆形,有黏性,润湿、光滑;培养72小时以上,菌落边缘开始皱缩,呈锯齿状。

[0023] 本发明中黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)对黄萎病病原菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)具有拮抗作用,可抑制病原菌孢子萌发,在一定程度上抑制棉花黄萎病发作。

[0024] 保藏证明和存活证明说明

[0025] 保藏菌株:短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106,保藏编号:CCTCC NO:M2014423,保藏日期:2014年9月17日,保藏单位:中国典型培养物保藏中心(CCTCC),保藏地址:中国武汉.武汉大学(湖北省武汉市武昌珞珈山武汉大学保藏中心)。

## 附图说明

[0026] 图1为试验例1中短小芽孢杆菌Y106与大丽轮枝菌991的对峙培养效果图;

[0027] 图2为试验例2中短小芽孢杆菌Y106菌液对大丽轮枝菌gfp77孢子萌发的抑制效果图;

[0028] 图3为试验例3中不同处理下棉苗的发病情况。

## 具体实施方式

[0029] 下述实施例仅对本发明作进一步详细说明,但不构成对本发明的任何限制。

[0030] 实施例1

[0031] 黄萎病菌拮抗菌的分离和筛选方法,包括以下步骤:

[0032] 1)棉花收获后,从河南各棉花种植区取棉花根际土壤53份作为拮抗菌分离的材料;

[0033] 2)选用改良的LB培养基,采用稀释涂布平板法对53份土壤材料进行菌种分离,共分离获得537株细菌;

[0034] 3)采用平板对峙培养法对分离得到的菌株进行筛选,其中14株细菌对棉花黄萎病原菌有明显拮抗作用,编号为Y106的菌株拮抗效果最为明显,抑菌率约为30%。

[0035] 1、拮抗菌形态学观察结果

[0036] 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106在LB平板上菌落不透明,呈乳白色,圆形,有黏性,润湿、光滑;培养72小时以上,菌落边缘开始皱缩,呈锯齿状。

[0037] 2、拮抗菌的鉴定分类

[0038] 1)细胞形态及理化检验

[0039] 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106为革兰氏阳性,嗜温、好氧,可耐受65℃高温。主要形态特征为:细杆状,两端钝圆,多以单个或链状排列形式存在。

[0040] 2)16S rRNA基因序列测定结果

[0041] 纯化菌株Y106,取单菌落划线培养,送上海生工生物技术服务公司进行测序,测序结果见序列表中SEQ ID NO.3,结果显示与短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)的同源。

[0042] 测序引物如下:

[0043] 正向引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(如SEQ ID NO.1所示),

[0044] 反向引物1495R:5'-CTACGGCTACCTGTTACGA-3'(如SEQ ID NO.2所示)。

[0045] 黄萎病菌拮抗菌的培养:

[0046] 1)试管斜面培养

[0047] 采用改良型LB培养基,30℃下培养2天,获得试管种。改良型LB培养基配方为:酵母提取物2%,蛋白胨1%,葡萄糖2.5%,NaCl 2%,琼脂1.9%;pH 7.0。

[0048] 2)培养皿划线培养

[0049] 采用上述改良型LB培养基(直径9mm培养皿),划线接种短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106,封口膜封口后于30℃下培养1天,获得用于液体扩大培养的单菌落。

[0050] 3)液体扩大培养

[0051] 将划线培养得到的单菌落接种到液体培养基中(500mL三角瓶,每瓶装200mL),在温度32℃、转速250rpm下振荡培养(摇床)3天,即得。液体培养基配方为:酵母提取物2%,蛋白胨1%,葡萄糖2.5%,NaCl 2%;pH 7.0。

[0052] 将培养得到的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106送至中国典型培养物保藏中心保藏,保藏编号:CCTCC NO:M2014423,保藏日期:2014年9月17日,保藏地址:中国武汉·武汉大学(湖北省武汉市武昌珞珈山武汉大学保藏中心)。

[0053] 实施例2

[0054] 黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)在制备用于防治棉花黄萎病的生防菌剂中的应用。具体为:取黄萎病菌拮抗菌扩大培养,收集菌体,无菌水稀释后得液态菌剂。菌种扩大培养及菌体收集方法均为现有技术,此处不再赘述。

[0055] 黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)在防治棉花黄萎病方面的应用。具体为:将

棉花种子置于上述液态菌剂中,浸种,再取出种子晾干即可。菌剂浓度及浸种操作均为现有技术,此处不再赘述。

[0056] 实施例3

[0057] 黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)在制备微生物有机肥中的应用。具体为:取黄萎病菌拮抗菌扩大培养,收集菌体,无菌水稀释后得液态菌剂。方法同实施例2。

[0058] 黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)在促进棉花植株生长方面的应用。具体为:取上述液态菌剂,在棉花苗期(或初花期)灌根(或喷施)即可。

[0059] 实施例4

[0060] 用于防治作物黄萎病的生防菌剂,制备步骤包括:取黄萎病菌拮抗菌(CCTCC NO:M2014423)扩大培养,收集菌体,无菌水稀释后得液态菌剂。微生物肥料的制备步骤同上。

[0061] 试验例

[0062] 1、短小芽孢杆菌Y106与大丽轮枝菌(*Verticilium dahliae*)991的平板对峙试验

[0063] 1)病原菌孢子悬液的制备

[0064] 将棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌(*Verticilium dahliae*)991(由中国农业科学院农产品加工研究所惠赠)接种于PDA平板上固体培养,待菌落铺满平板后,在超净台上将真菌孢子刮取到无菌水中,过滤除去菌丝,采用血球计数板直接计数孢子数量,再将孢子悬液浓度调整至 $5 \times 10^7$ 个/mL。

[0065] 2)黄萎病菌拮抗菌悬液的制备

[0066] 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106液体扩大培养后,离心收集菌体,以无菌水悬浮,通过平板菌落计数法计算菌悬液浓度,调节菌液浓度至 $3.77 \times 10^7$ cfu/mL。

[0067] 3)平板对峙试验方法

[0068] 在超净台上用移液枪吸取2.5 $\mu$ L病原菌孢子悬液并接种到PDA培养基中,于25 $^{\circ}$ C培养箱中倒置培养,待真菌生长至直径约3.5cm时,在距离真菌边缘1.5cm(1~1.5cm均可)处接种黄萎病菌拮抗菌悬液2.5 $\mu$ L,继续于25 $^{\circ}$ C培养箱中倒置培养,观察真菌生长状况,试验设三个平行两次重复。

[0069] 抑菌率及抑菌直径的计算如下:

[0070] 抑菌率(%)=[(对照真菌生长直径-处理真菌生长直径)/对照真菌生长直径] $\times$ 100%;

[0071] 抑菌直径(cm)=对照真菌生长直径-处理真菌生长直径。

[0072] 4)试验结果

[0073] 对短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106与棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌(*Verticilium dahliae*)991的平板对峙培养试验进行连续观察,结果显示短小芽孢杆菌Y106对大丽轮枝菌991有明显抑制作用(见图1和下表1),表明短小芽孢杆菌Y106对棉花黄萎病病原菌有一定的拮抗作用,可以作为潜力生防菌株。

[0074] 图1中,a为大丽轮枝菌991菌落,b为大丽轮枝菌991与短小芽孢杆菌Y106对峙培养;图1b中A为短小芽孢杆菌Y106,B为大丽轮枝菌991。

[0075] 表1短小芽孢杆菌Y106与大丽轮枝菌991的平板对峙试验结果

	处理时间	抑菌直径 (cm)	对照 (cm)	抑菌率 (%)
[0076]	7天	3.42	4.91	30.35
	9天	3.61	5.42	33.39
[0077]	11天	3.69	6.14	33.90

[0078] 2、短小芽孢杆菌Y106对大丽轮枝菌(*Verticilium dahliae*)gfp77孢子萌发抑制试验

[0079] 棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌(*Verticilium dahliae*)gfp77为大丽轮枝菌(*Verticilium dahliae*)991的pCH-sGFP载体转化株,荧光信号强烈,与大丽轮枝菌991在生长和致病力方面无显著差异,由中国农业科学院农产品加工研究所惠赠。选用gfp77取代991进行孢子萌发抑制实验,可以通过紫外光照射快速分辨病原菌与其他杂菌,有效减少数据统计中杂菌的干扰。

[0080] 1)病原菌孢子悬液的制备

[0081] 大丽轮枝菌(*Verticilium dahliae*)gfp77孢子悬液制备同试验例一中大丽轮枝菌991,浓度为 $5 \times 10^6$ 个/mL。

[0082] 2)黄萎病菌拮抗菌悬液的制备

[0083] 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106悬液制备同试验例一,分别制成 $9.43 \times 10^6$ cfu/mL、 $1.72 \times 10^7$ cfu/mL、 $2.77 \times 10^7$ cfu/mL 3个浓度梯度。

[0084] 3)无菌土的制备

[0085] 称取土壤30g,放入广口玻璃瓶中,加封口膜灭菌后冷却至室温备用。

[0086] 4)试验方法

[0087] 取5mL病原菌孢子悬液,分别与5mL不同浓度的黄萎病菌拮抗菌悬液混合,装入喉头喷雾器中,于超净工作台上均匀喷洒灭菌土(作为试验组),加封口膜封上,于25°C培养箱中培养5天;对照1组为喷洒10mL无菌水于灭菌土;对照2组为喷洒10mL等比混合的病原菌孢子悬液与无菌水。5天后,从试验组和对照组中分别取10g土样,与90mL无菌水混合制备土壤悬液。采用稀释涂布平板法,将土壤悬液以 $10^{-1}$ 为梯度倍比稀释,涂布氯霉素、潮霉素双抗平板。将涂布的平板倒置于25°C培养箱中培养3天(3~4天均可),观察记录菌落生长情况,统计菌落生长数目。试验设三个平行两次重复。

[0088] 5)试验结果

[0089] 如图2和下表2所示,在病原菌孢子悬液浓度不变时,随着短小芽孢杆菌Y106悬液浓度的增加,大丽轮枝菌gfp77菌落数目呈减少趋势。图2中,a为对照1组,b为对照2组,c~e为不同浓度黄萎病菌拮抗菌悬液处理试验组,c~e中拮抗菌悬液浓度依次为 $9.43 \times 10^6$ cfu/mL、 $1.72 \times 10^7$ cfu/mL、 $2.77 \times 10^7$ cfu/mL。

[0090] 表2不同浓度短小芽孢杆菌Y106菌液处理后大丽轮枝菌gfp77菌落的数目

[0091]

Y106 菌液的浓度 (cfu/mL)	0	$9.43 \times 10^6$	$1.72 \times 10^7$	$2.77 \times 10^7$
gfp77 菌落数目 (个)	14	10	7	5

[0092] 3、短小芽孢杆菌Y106对棉花黄萎病的生防(盆栽)试验

[0093] 1)病原菌孢子悬液和黄萎病菌拮抗菌悬液的制备

[0094] 制备步骤同试验例一,其中大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)991孢子悬液的浓度为 $1 \times 10^7$ 个/mL,短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106悬液的浓度为 $1.72 \times 10^7$ cfu/mL。

[0095] 2)无菌土的制备

[0096] 取500cm<sup>3</sup>放入广口玻璃瓶中,加封口膜灭菌后冷却至室温备用。

[0097] 3)棉花幼苗的准备

[0098] 把棉花种到塑料土钵中,每钵2株,在棉花培养箱中生长15天左右(第一片真叶完全展开)时,将棉花幼苗从土钵中取出,在根尖处剪去2cm,备用。

[0099] 4)生防试验

[0100] 分别取30mL病原菌孢子悬液和黄萎病菌拮抗菌悬液,混合,以喉头喷雾器均匀喷洒于灭菌土上并搅拌均匀,再将土壤分装于一次性塑料土钵中;将剪过根的棉花移栽至土钵中,每钵2株,置于棉花培养箱中,在温度20℃下培养20天,根据下列分级标准统计棉花发病情况。试验设1组对照,对照组为30mL病原菌孢子悬液和30mL无菌水的混合液喷洒无菌土,试验共重复6次。

[0101] 棉花黄萎病苗期发病级分级标准:

[0102] 0级:健苗、无病状;

[0103] 1级:1-2片子叶发病,子叶变黄、变软,真叶未显病状;

[0104] 2级:子叶和1片真叶表现病状;

[0105] 3级:2片真叶表现病状;

[0106] 4级:全部叶片表现病状,直到叶片脱落,顶心枯死。

[0107] 发病率及病情指数的计算如下:

[0108] 发病率(%) = 发病株数/调查总株数 × 100%

[0109] 病情指数 =  $\Sigma$ (发病级代表值 × 各级病株数) × 100 / (调查总株数 × 最高级发病代表值)

[0110] 5)生防试验结果

[0111] 如图3和下表3所示,经短小芽孢杆菌Y106菌液处理后,棉花苗期黄萎病病害病情指数和发病率明显降低,6次重复试验平均防效为32.5%。图3中a为对照组,b为处理试验组。

[0112] 表3短小芽孢杆菌Y106生防试验结果

	处理	病情指数	发病率(%)	防效(%)
[0113]	对照组	57.8a	76.47a	/
	短小芽孢杆菌 Y106	39.0c	52.94c	32.5a

[0114] 注:表中数据为6次重复试验平均值,其后相同字母表示差异不显著(P>0.05)。



[0115] 试验结果表明,短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)Y106对棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌(*Verticilium dahliae*)991具有较好的拮抗效果和防治效果,具备良好的应用开发前景。在生防菌对病原菌(大丽轮枝菌)孢子萌发抑制试验中,为排除杂菌干扰特选取携带gfp基因和潮霉素抗性基因的*Verticilium dahliae* 991突变株*Verticilium dahliae* gfp77进行测定,结果显示生防菌株可通过抑制病原菌孢子萌发达达到生防效果。

	<110> 河南大学	
	<120> 黄萎病菌拮抗菌及其应用	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<221> 正向引物 27F	
	<222> (1)..(20)	
	<400> 1	
	AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG	20
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0001]	<221> 反向引物 1495R	
	<222> (1)..(20)	
	<400> 2	
	CTACGGCTAC CTTGTTACGA	20
	<211> 1471	
	<212> DNA	
	<213> 扩增序列	
	<221> 16S rRNA 扩增序列	
	<222> (1)..(1471)	
	<400> 3	
	GACGAACGCT GCGGCGTGC CTAATACATG CAAGTCGAGC GGACAGAAGG GAGCTTGCTC	60
	CCGGATGTTA GCGGCGGACG GGTGAGTAAC ACGTGGGTAA CCTGCCTGTA AGACTGGGAT	120
	AACTCCGGGA AACCGGAGCT AATACCGGAT AGTTCCTTGA ACCGCATGGT TCAAGGATGA	180
[0002]		

AAGACGGTTT	CGGCTGTCAC	TTACAGATGG	ACCCGCGGCG	CATTAGCTAG	TTGGTGGGGT	240
AATGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATGCGTAGCC	GACCTGAGAG	GGTGATCGGC	CACACTGGGA	300
CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	CAGCAGTAGG	GAATCTTCCG	CAATGGACGA	360
AAGTCTGACG	GAGCAACGCC	GCGTGAGTGA	TGAAGGTTTT	CGGATCGTAA	AGCTCTGTTG	420
TTAGGGAAGA	ACAAGTGCGA	GAGTAACTGC	TCGCACCTTG	ACGGTACCTA	ACCAGAAAGC	480
CACGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	TGGCAAGCGT	TGTCCGGAAT	540
TATTGGGCGT	AAAGGGCTCG	CAGGCGGTTT	CTTAAGTCTG	ATGTGAAAGC	CCCCGGCTCA	600
ACCGGGGAGG	GTCATTGGAA	ACTGGGAAAC	TTGAGTGCAG	AAGAGGAGAG	TGGAATTCCA	660
CGTGTAGCGG	TGAAATGCGT	AGAGATGTGG	AGGAACACCA	GTGGCGAAGG	CGACTCTCTG	720
GTCTGTAACT	GACGCTGAGG	AGCGAAAGCG	TGGGGAGCGA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGT	780
AGTCCACGCC	GTAACGATG	AGTGCTAAGT	GTTAGGGGGT	TTCCGCCCTT	TAGTGCTGCA	840
GCTAACGCAT	TAAGCACTCC	GCCTGGGGAG	TACGGTCGCA	AGACTGAAAC	TCAAAGGAAT	900
TGACGGGGGC	CCGCACAAGC	GGTGGAGCAT	GTGGTTTAAT	TCGAAGCAAC	GCGAAGAACC	960
TTACCAGGTC	TTGACATCCT	CTGACAACCC	TAGAGATAGG	GCTTTCCCTT	CGGGGACAGA	1020
GTGACAGGTG	GTGCATGGTT	GTCGTCAGCT	CGTGTCGTGA	GATGTTGGGT	TAAGTCCCGC	1080
AACGAGCGCA	ACCCTTGATC	TTAGTTGCCA	GCATTTAGTT	GGGCACTCTA	AGGTGACTGC	1140
CGGTGACAAA	CCGGAGGAAG	GTGGGGATGA	CGTCAAATCA	TCATGCCCTT	TATGACCTGG	1200
GCTACACACG	TGCTACAATG	GACAGAACAA	AGGGCTGCGA	GACCGCAAGG	TTTAGCCAAT	1260
CCCATAAATC	TGTTCTCAGT	TCGGATCGCA	GTCTGCAACT	CGACTGCGTG	AAGCTGGAAT	1320
CGCTAGTAAT	CGCGGATCAG	CATGCCGCGG	TGAATACGTT	CCCGGGCCTT	GTACACACCG	1380
CCCGTCACAC	CACGAGAGTT	TGCAACACCC	GAAGTCGGTG	AGGTAACCTT	TATGGAGCCA	1440
GCCGCCGAAG	GTGGGGCAGA	TGATTGGGGT	G			1471

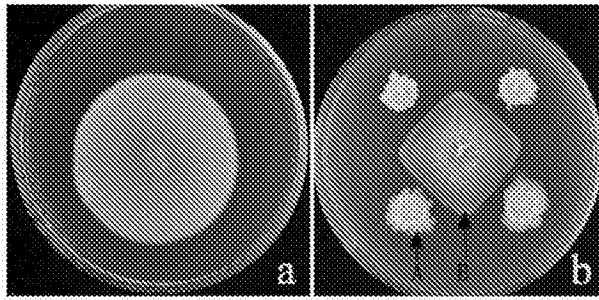


图1

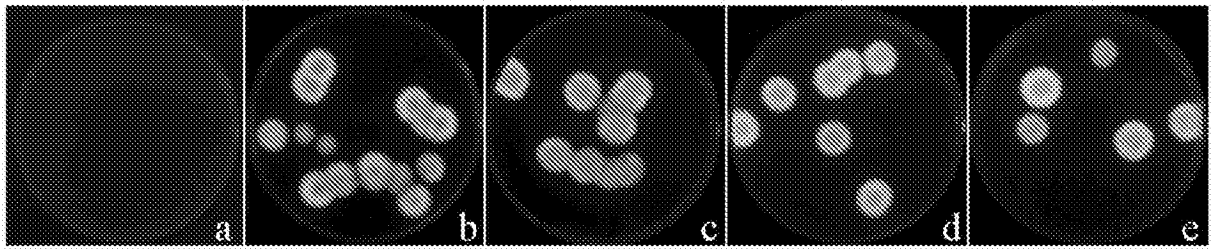


图2

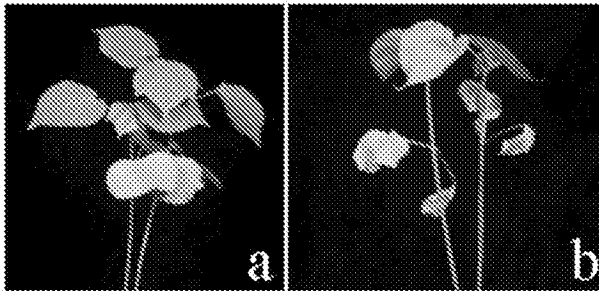


图3