



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117343845 A

(43) 申请公布日 2024. 01. 05

(21) 申请号 202210744848.X

C12Q 1/18 (2006.01)

(22) 申请日 2022.06.28

A01N 43/40 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

A01N 43/54 (2006.01)

GDMCC No:62516 2022.06.06

A01N 47/26 (2006.01)

(71) 申请人 广东省林业科学研究院

A01P 3/00 (2006.01)

地址 510000 广东省广州市天河区广汕一路233号

C12R 1/645 (2006.01)

(72) 发明人 黄华毅 龙永彬 肖丽娜 陈刘生
扈丽丽 单体江 赵丹阳 黄咏槐

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

专利代理师 孙凤侠

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图3页

(54) 发明名称

一种杜英疫病病原菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种杜英疫病病原菌及其应用。所述杜英疫病病原菌为杜英生假隐丛赤壳 (*Pseudocryphonectria elaeocarpicola*) DY-01 菌株,该菌株已于2022年6月6日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC NO: 62516,保藏地址为:广东省广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。该菌对杜英属植物具有强致病性,有利于研究与防治杜英属植物枝条干枯和整株枯死现象,为杜英疫病的研究奠定基础,能够用于杜英疫病防治药剂筛选与开发,从而为防治杜英疫病研究提供理论支持,为杜英疫病的防治研究提供研究材料和理论基础。



1. 一种杜英疫病病原菌,其特征在於,所述杜英疫病病原菌为杜英生假隐丛赤壳(*Pseudocryphonectria elaeocarpicola*) DY-01菌株,该菌株已于2022年6月6日保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏编号为GDMCC NO:62516,保藏地址为:广东省广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

2. 权利要求1所述杜英疫病病原菌的ITS基因,其特征在於,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

3. 权利要求1所述杜英疫病病原菌的LSU基因,其特征在於,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

4. 权利要求1所述杜英疫病病原菌的 $tef1$ 基因,其特征在於,其核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

5. 权利要求1所述杜英疫病病原菌的 $rpb2$ 基因,其特征在於,其核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

6. 权利要求1所述杜英疫病病原菌在筛选或开发防治杜英疫病药物方面的应用。

7. 权利要求2-5任一所述基因在筛选或开发防治杜英疫病药物方面的应用。

8. 权利要求1所述杜英疫病病原菌在指导防治杜英疫病方面的应用。

9. 杀菌农药在防治杜英疫病方面的应用,或在制备防治杜英疫病的药物方面的应用,其特征在於,所述杀菌农药为福美双、嘧霉胺、啶酰菌胺中的一种或任几种。

10. 杀菌农药在抑制权利要求1所述杜英疫病病原菌方面的应用,或在制备抑制权利要求1所述杜英疫病病原菌的药物方面的应用,其特征在於,所述杀菌农药为福美双、嘧霉胺、啶酰菌胺中的一种或任几种。

一种杜英疫病病原菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物病害防治技术领域,具体涉及一种杜英疫病病原菌及其应用。

背景技术

[0002] 杜英属(*Elaeocarpus*)植物为杜英科(*Elaeocarpaceae*)常绿乔木或大灌木,是热带、亚热带常绿阔叶林森林群落的重要组成树种。杜英属植物是华南和西南地区乡土树种的重要代表类型之一,树干通直,树形分层明显,新叶萌发或老叶脱落前多呈现鲜红的颜色,花型雪白奇特,果实形如珍珠而呈蓝绿色,在园林树种中独具特色。广东省共有20种杜英属植物,现已有11种杜英属植物被广泛应用于庭院观赏、道路绿化、小区及森林公园景观营造等方面。

[0003] 随着杜英属植物的广泛种植,杜英属植物病害也愈发严重。杜英疫病是杜英属植物的主要病害,该病菌可引起植株枝条枯死甚至整株枯死。杜英疫病的发生危害,会影响杜英属植物的景观价值和经济价值,给园林产业带来巨大的经济损失。

[0004] 目前,在生产上尚缺乏可供利用的防治杜英疫病的化学杀菌剂,由于市面上的杀菌剂种类较多,能有效防治杜英疫病的杀菌剂尚不明确,因此,需要对常用的杀菌剂进行对杜英疫病病原菌的室内毒力测定,筛选出抑制效果更好的杀菌剂,更好的适应农林生产需要。但是,目前还未有关于杜英疫病病原菌鉴定及生物学特性的研究报道,杀菌剂筛选与开发工作难以有效开展。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是现有对杜英疫病病原菌研究不足的问题,通过大量研究探索,分离并鉴定了一种新发现的杜英疫病的病原菌,即杜英生假隐丛赤壳 *Pseudocryphonectria elaeocarpicola*,其对杜英属植物具有强致病性,有利于对杜英属植物疫病进行防治研究,提高杜英属植物的存活率,为杜英疫病的防治研究提供研究材料和理论基础。

[0006] 本发明的首要目的在于提供一种杜英疫病病原菌。

[0007] 本发明的另一目的在于提供所述杜英疫病病原菌的ITS基因、LSU基因、*tef1*基因、*rpb2*基因。

[0008] 本发明的又一目的在于提供所述杜英疫病病原菌及其基因在筛选或开发防治杜英疫病药物,以及指导防治杜英疫病方面的应用。

[0009] 本发明通过以下技术手段实现上述发明目的:

[0010] 本发明采用组织分离法对广东省广州市荔湾区美华中学校园水石榕(*Elaeocarpus hainanensis*)上采集的发病枝干木质进行病原菌分离,通过柯赫氏法则验证、病原菌形态学特征观察、DNA提取PCR扩增以及ITS、LSU、*tef1*和*rpb2*基因测序分析,对病原菌进行分离鉴定,利用活体接种法测定病原菌致病性,并对病原菌生物学特性进行研究,获得了一种新发现的杜英疫病的病原菌。经形态特征和基于ITS、LSU、*tef1*和*rpb2*四段序列

的最大似然法和贝叶斯推理法分析,鉴定为杜英生假隐丛赤壳(*Pseudocryphonectria elaeocarpicola*)。

[0011] 本发明杜英生假隐丛赤壳(*Pseudocryphonectria elaeocarpicola*)的形态特征和生物学特性:在PDA培养基(马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂20g,水1000mL)上生长的菌落全缘,扁平,有气生菌丝,菌落白色至灰鼠色,形成大量的橙色分生孢子聚集而成橙色的分生孢子团;最适生长温度为30℃,最适pH值为4。该菌对杜英属植物具有强致病性。

[0012] 因此,本发明提供以下方案及应用:

[0013] 一种杜英疫病病原菌,所述杜英疫病病原菌为杜英生假隐丛赤壳(*Pseudocryphonectria elaeocarpicola*)DY-01菌株,该菌株已于2022年6月6日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(Guangdong Microbial Culture Collection Center,简称GDMCC),保藏编号为GDMCC NO:62516,保藏地址为:广东省广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

[0014] 所述杜英疫病病原菌的ITS基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0015] 所述杜英疫病病原菌的LSU基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0016] 所述杜英疫病病原菌的tef1基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0017] 所述杜英疫病病原菌的rpb2基因,其核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0018] 所述杜英疫病病原菌在筛选或开发防治杜英疫病药物方面的应用。

[0019] 所述杜英疫病病原菌在指导防治杜英疫病方面的应用。

[0020] 所述杜英疫病病原菌的ITS基因、LSU基因、tef1基因、rpb2基因在筛选或开发防治杜英疫病药物方面的应用。

[0021] 所述杜英疫病病原菌的ITS基因、LSU基因、tef1基因、rpb2基因在指导防治杜英疫病方面的应用。

[0022] 另外,本发明还基于该病原菌,研究了能够抑制该病原菌从而防治杜英疫病的药剂,包括福美双、嘧霉胺、啶酰菌胺中的一种或任几种。

[0023] 本发明具有以下有益效果:

[0024] 本发明通过大量研究探索,分离并鉴定了一种新发现的杜英疫病的病原菌,即杜英生假隐丛赤壳(*Pseudocryphonectria elaeocarpicola*),其对杜英属植物具有强致病性,有利于研究与防治杜英属植物枝条干枯和整株枯死现象,有利于对杜英属植物疫病进行防治研究,为杜英疫病的研究奠定基础,能够用于杜英疫病防治药剂筛选与开发,从而为防治杜英疫病、提高杜英属植物的存活率提供理论支持,为杜英疫病的防治研究提供研究材料和理论基础。

附图说明

[0025] 图1为DY-01菌株对杜英属植物的致病性;其中,A和D为DY-01菌株对水石榕(*Elaeocarpus hainanensis*)的致病性;B和E为DY-01菌株对尖叶杜英(*Elaeocarpus apiculatus*)的致病性;C和F为DY-01菌株对山杜英(*Elaeocarpus sylvestris*)的致病性。

[0026] 图2为DY-01菌株的形态图;其中,A为分生孢子座横切面形态(比例尺为300μm);B为分生孢子座纵切面形态(比例尺为300μm);C为产孢细胞形态(比例尺为10μm);D为分生孢子形态(比例尺为10μm)。

[0027] 图3为DY-01菌株在PDA培养基上的培养形态;其中,A和B为DY-01菌株在PDA培养基上的培养形态;C和D为DY-01菌株在PDA培养基上形成的橙色分生孢子。

[0028] 图4为DY-01菌株基于ITS、LSU、tef1和rpb2四段序列的最大似然分析系统发育树。分支上方的数字表示ML bootstrap值(左,ML-BS \geq 50%)和贝叶斯后验概率(右,BPP \geq 0.9)。

具体实施方式

[0029] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0030] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0031] 实施例1杜英疫病病原菌的分离纯化

[0032] 经调查发现,广东省广州市多个地区均有杜英疫病的发生危害,溃疡病危害杜英属植物的主干和枝条,病原菌侵染枝干并迅速扩散,造成枝条或整株枯死。

[0033] 本发明材料采集自广东省广州市荔湾区美华中学校园种植的发病水石榕病斑部位木质。采用组织分离法,取病健交界处木质组织块经75%酒精消毒2min,1.25%的次氯酸钠消毒4min,75%的酒精消毒1min,然后在蒸馏水中漂洗2min,并在干燥的无菌滤纸上吸干。消毒后的木质组织吸干后,用灭过菌的双刃刀片将木质组织切成5mm \times 5mm的小块,置于PDA培养基(马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂20g,水1000mL)进行培养,分离纯化后,对分离到的纯化菌株进行4 $^{\circ}$ C保存。

[0034] 结果表明:通过分离纯化后,获得的纯化菌株24株,其菌落形态均一致,为单一种类菌株,因此,选择其中的一株纯化菌株DY-01开展后续致病性测试。

[0035] 实施例2病原菌致病性测试

[0036] 根据科赫、史密斯提出的微生物致病性确定条件对实施例1分离得到的病原菌供试菌株DY-01进行致病性测定。

[0037] 在PDA平板上培养4d的病原菌菌落边缘和空白的PDA平板上,用打孔器分别打出直径为6mm的菌饼和空白PDA块,备用;选取胸径大小接近的2年生水石榕和尖叶杜英苗木及胸径大小接近的3年生山杜英苗木,用75%的酒精对所有苗木的主干进行表面消毒,备用。

[0038] 对准备好的苗木在高度接近的位置进行烫伤处理,而后进行接种,处理组的苗木烫伤部位接种病原菌菌饼,而对照组的苗木烫伤部位则接种空白PDA块,接种后用蘸无菌水的脱脂棉保湿,用保鲜膜将其固定;然后将所有接种完的苗木移入25 $^{\circ}$ C、相对湿度70%~80%的培养室中,光照和黑暗交替培养,3d后解除保湿,每种杜英属植物的处理组和对照组分别接种5株供试苗木,10d后调查水石榕和尖叶杜英的发病率,15d后调查山杜英的发病率,拍照记录并观察发病情况。并对发病苗木进行再分离、纯化,与原始病原菌做比较。

[0039] 发病率的计算公式如下:发病率=发病的苗木总数/总的苗木数 \times 100%。

[0040] 结果表明:病原菌DY-01菌丝块接种烫伤的杜英属植物苗木,3d后所有接种病原菌的苗木接种部位都有明显的褐变坏死,而对照组苗木未出现褐变坏死情况;接种10d后水石榕和尖叶杜英处理组苗木均出现整株枯死情况,接种15d后山杜英处理组苗木也均出现整株枯死情况,与田间症状相似,而对照组苗木均未发病。对接种发病后的病部木质组织进行

再分离、纯化,获得与原始菌株形态相似的病原菌,根据科赫、史密斯提出的法则,确定病原菌DY-01为杜英疫病的病原菌(如图1和表1)。

[0041] 表1病原菌DY-01对三种杜英属植物的致病性

	寄主植物	接种时间 (d)	发病率 (%)	
			处理组	对照组
[0042]	水石榕	10	100	0
	尖叶杜英	10	100	0
	山杜英	15	100	0

[0043] 实施例3病原菌DY-01的鉴定

[0044] 1、病原菌形态学鉴定

[0045] 通过解剖水石榕病害木质组织上的分生孢子座,观察病原菌分生孢子座、分生孢子梗、分生孢子细胞及分生孢子的形态。

[0046] 将病原菌DY-01接种在PDA培养基上,25℃恒温培养箱黑暗培养5d后,观察并拍照。记录病原菌菌落形态、颜色,作为病原菌生态学鉴定的依据。

[0047] 形态解剖结果表明:病原菌DY-01分生孢子座聚生或单生于寄主树皮上,近球形至枕形,黄色至橙色,多房,单孔,形成长橙色卷须。分生孢子梗圆柱形,无隔膜,透明,有时退化为分生孢子细胞。分生孢子内腔内衬有分生孢子细胞,菌形,壶腹状,顶端渐减或截形,透明,光滑。分生孢子二形。小分生孢子微小,无隔膜,透明,光滑,圆柱形,直。大分生孢子无隔,透明,光滑,扁圆形,直或略弯曲(如图2)。

[0048] 培养结果表明:病原菌DY-01在PDA培养基上生长时,菌落全缘,扁平,有气生菌丝,白色至灰鼠色,形成大量的橙色分生孢子聚集而成橙色的分生孢子团(如图3)。

[0049] 2、病原菌多基因序列分析

[0050] 刮取生长在玻璃纸上的病原菌DY-01菌丝体,提取病原菌基因组DNA,保存于4℃备用。分别利用真菌ITS、LSU区域、tef1和rpb2基因的如下引物对进行扩增:

[0051] 引物对ITS1(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3');

[0052] 引物对LR0R(5'-GTACCCGCTGAACTTAAGC-3')和LR5(5'-ATCCTGAGGGAACTTC-3');

[0053] 引物对EF1-688F(5'-CGGTCACTTGATCTACAAGTGC-3')和EF2(5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3');

[0054] 引物对RPB2-5F(5'-GATGACAGAGATCATTTTCGG-3')和RPB2-7cR(5'-CCCATAGCTTGTGGCCAT-3');

[0055] 聚合酶链式反应(PCR)条件如下:在94℃预变性5min,94℃变性30s、在48℃(ITS和LSU)或54℃(tef1)或55℃(rpb2)退火50s,72℃延伸1min,35个循环,72℃延伸10min,用2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,扩增产物使用上海英杰生物科技有限公司(北京)的ABI PRISM 3730XL DNA分析仪和BigDye Terminator Kit v.3.1(Invitrogen,Waltham,MA,USA)进行DNA测序。

[0056] 测序结果,杜英疫病病原菌DY-01的ITS基因、LSU基因、tef1基因、rpb2基因的核苷

酸序列分别如SEQ ID NO.1-4所示。

[0057] 测序获得的序列使用SeqManv.7.1.0组装,参考序列是根据最近的出版物从NCBI中检索到的。使用MAFFTv.6比对序列,并使用MEGA v.7.0.21手动校正。使用最大似然和贝叶斯推理方法对四个基因(ITS-LSU-tef1-rpb2)进行联合多基因系统发育学分析。

[0058] 病原菌的PCR扩增产物电泳结果表明:病原菌的扩增条带都清晰、明亮,没有明显的非特异性杂带,符合预期的扩增结果。

[0059] 测序和序列分析结果表明:病原菌DY-01在系统发育树中形成了一个独立分枝,是一个未知的新种(如图4)。

[0060] 最终,通过综合形态学特征和序列分析结果,将杜英疫病病原菌DY-01鉴定为隐丛赤壳科(Cryphonectriaceae)下的一个新属新种,命名为杜英生假隐丛赤壳(*Pseudocryphonectria elaeocarpicola*),并于2022年6月6日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(Guangdong Microbial Culture Collection Center,简称GDMCC),保藏编号为GDMCC NO:62516,保藏地址为:广东省广州市先烈中路100号大院59号楼5楼。

[0061] 实施例4杜英生假隐丛赤壳DY-01菌株的生物学特性研究

[0062] 取直径为6mm的病原菌菌饼接种至PDA培养基中心,分别置于10℃、15℃、20℃、25℃、28℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃恒温培养箱中培养,每个处理重复5次;用浓度为5mol/L的HCL和NaOH溶液将PDA培养基pH调成4、5、6、7、8、9、10、11、12、13,制成培养基平板,取直径6mm病原菌菌饼接种于不同pH培养基,置于28℃恒温培养箱中培养,每个处理重复5次。恒温培养5d后观察菌落形态并采用十字交叉法测量菌落直径。

[0063] 结果如表2和表3所示。

[0064] 表2温度对病原菌菌丝生长的影响

温度(℃)	10	15	20	25	28	30	35	40	45
平均菌落直径(mm)	0	26.0	56.3	60.0	74.3	83.0	12.8	0	0

[0066] 表3pH对病原菌菌丝生长的影响

pH值	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
平均菌落直径(mm)	85	77.8	76.8	74.1	73.5	68.8	65.9	59.1	17.6	0

[0068] 由表2可知,病原菌在15-35℃均能生长,在25-30℃生长较快,在30℃时长势最好,平均菌落直径为83.0mm。

[0069] 由表3可知,病原菌在pH值4-12均能生长,在pH值为4时菌落直径最大,平均菌落直径为85mm。

[0070] 实施例5杜英生假隐丛赤壳DY-01在指导防治杜英疫病中的应用(毒力实验)

[0071] 1、毒力实验试剂(厂家、农药类型、浓度梯度和单位)

[0072] 98%福美双原药(中国农科院植保所廊坊农药厂)

[0073] 97%嘧霉胺原药(中国农科院植保所廊坊农药厂)

[0074] 95%啶酰菌胺原药(中国农科院植保所廊坊农药厂)

[0075] 表4毒力实验农药类型、浓度梯度和单位

药剂		浓度					浓度单位	
[0076]	福美双	原药	50	25	12.5	1.563	0.781	µg/mL
	嘧霉胺	原药	0.1	0.05	0.025	0.0125	0.00625	mg/mL
	啶酰菌胺	原药	0.4	0.2	0.05	0.0125	0.00625	mg/mL

[0077] 2、室内毒力实验结果

[0078] 供试的3种杀菌剂对杜英疫病病原菌菌丝生长毒力测定结果如表5-7所示。

[0079] 表5福美双防治杜英疫病病原菌毒力效果

供试农药	浓度(µg/mL)	浓度对数	抑制率(%)	抑制率几率值
[0080] 福美双	50	1.6990	67.7019	5.4607
	25	1.3979	67.2188	5.4462
	12.5	1.0969	46.4803	4.9116
	1.5625	0.7959	34.0580	4.5889
	0.78125	0.4949	3.4161	3.1647

[0081] 表6嘧霉胺防治杜英疫病病原菌毒力效果

供试农药	浓度(mg/mL)	浓度对数	抑制率(%)	抑制率几率值
[0082] 嘧霉胺	0.1	-1.0000	93.0668	6.5845
	0.05	-1.3010	62.4394	5.2905
	0.025	-1.6021	51.1309	4.9802
	0.0125	-1.9031	17.9793	4.0396
	0.00625	-2.2041	9.4305	3.4861

[0083] 表7啶酰菌胺防治杜英疫病病原菌毒力效果

供试农药	浓度(mg/mL)	浓度对数	抑制率(%)	抑制率几率值
[0084] 啶酰菌胺	0.4	-0.3979	42.8850	4.8204
	0.2	-0.6990	41.4715	4.7836
	0.05	-1.3010	18.9553	4.1177
	0.0125	-1.9031	8.4882	3.6258
	0.00625	-2.2041	8.1516	3.6009

[0085] 由表5-7可知,各药剂浓度与抑制率结果表明,药剂浓度与抑制率都成正相关关系,不同的供试药剂,抑制率也不相同。其中福美双抑菌效果较好,其次是嘧霉胺,啶酰菌胺

抑制效果不明显。

[0086] 通过拟合毒力回归方程并计算 EC_{50} 作为参考,除啮酰菌胺 EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) >100 外,其余药剂皆有明显抑菌效果,其中福美双表现最佳。

[0087] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 广东省林业科学研究院

<120> 一种杜英疫病病原菌及其应用

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 623

<212> DNA

<213> 杜英生假隐丛赤壳ITS序列

<400> 1

```

ggacttgttg cctcacgggc gcaccccaga taccctttgt gaacttatat atttatcgtt 60
gcctcggcgc tgagcccggg gggggttggg aaagaagaac aggactcgtt cctgttcttg 120
ttttccccc cctcccctct cggccgtccc tcacaaggga cggttgcttg ggagcaggcc 180
cgccggcggc ccgctaaact cttgttttgt aaaacatgct tcttctgagt gaatcatgac 240
acaaaaatga atcaaaactt tcaacaacgg atctcttggg tctggcatcg atgaagaacg 300
cagcgaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac 360
gcacattgcg cccgctggaa ttccagcggg catgcctggt cgagcgtcat ttcaaccctc 420
aagcctggct tgggttggg gcactacctg tacaacggtg ggctctgaaa tttagtggcg 480
ggctcgttaa gactctgagc gtagtagttt tttcaacct cgctttggaa ggattagcgg 540
ctgctcttgc cgtaaaacc cctaaatttt ctgaaatttt gacctcgat caggtaggaa 600
taccgctga acttaagcat atc 623

```

<210> 2

<211> 843

<212> DNA

<213> 杜英生假隐丛赤壳LSU序列

<400> 2

```

aacagggatt gccctagtaa cggcgagtga agcggcaaca gctcaaattt gaaatctggc 60
ttcggcccga gttgtaattt gcagaggatg tttctggcgc ggtgccttcc gagttccctg 120
gaacgggacg ccacagaggg tgagagcccc gtatggttg acaccaagcc tgtgtgaaac 180
tccttcgacg agtcgagtag tttgggaatg ctgctcaaaa tgggaggtaa atctcttcta 240
aagctaaata ccggccagag accgatagcg cacaagtaga gtgatcgaac gatgaaaagc 300
accttgaaaa gggggttaaa cagtacgtga aattgttgaa agggaagcgc ttgtgaccag 360
acttgcccg ggcggttcat ccggggttct ccccggtgca ctccgtccg ctcaggccag 420
catcggtttt cgttggggga taagaacggc aggaacgtgg ccctccttcg ggtgggtggt 480
atagcctgcc gtacgatacc ctgacgggga ccgaggttc cgctccgcaa ggatgctggc 540
gtaatggtca tcagcgacc gtcttgaac acggaccaag gagtcgtcca ttagagcgag 600
cgtttgggtg tcaaaccgc acgcgtaatg aaagtgaat taggtgagag cttcggcgca 660

```

tcatcgaccg atcctgatgt tctcggatgg atttgagtaa gagttttaac ggacggaccc 720
 gaaagacagt gaactatgct tgtatagggt gaagccagag gaaactctgg tggaggctcg 780
 cagcggttct gacgtgcaaa tcgatcgtca aatatgagca tgggggcgaa agactaatcg 840
 aac 843

<210> 3

<211> 646

<212> DNA

<213> 杜英生假隐丛赤壳tef1序列

<400> 3

aggtcgagaa ggaaggtatg tatcaatcag ccgcgcatta cacattgatc tctgctttcc 60
 accgccaaat tcacccgtac gagcagcagc agcagcagca gcaacgctgt gtgctgtctc 120
 agccgcctgc cctgtttcgc ccagcgcaca ttttgttctt tttttctggt gcggggttca 180
 gccgttttgc tcttatctga gataaacgtg accaacccct gtacaccgcc acctcagaac 240
 ataccccctc ccccaccaac gcaatcatgc acctcgataa gcccttgatg atgatgtaa 300
 tgctaacatt acttgacagc tgccgagctc ggtaagggtt cttcaagta cgctgggtc 360
 cttgacaagc tcaaggccga gcgtgagcgt ggtatcacca tcgacattgc cctgtggaag 420
 ttcgagactc ccaagtacta tgtcaccgtc attggtacgt tccttcccac ctctccacta 480
 tatgccctgg cgatgtcata caggcggcgc agtccggtat ctccagaccg gctcctgtgc 540
 ctatgaccct tcgctggtcc agtccttcca cttgaccgag tctgctgaca cctggttctc 600
 acagacgctc ccggtcaccg tgatttcac tacaacatga tcaactg 646

<210> 4

<211> 829

<212> DNA

<213> 杜英生假隐丛赤壳rpb2序列

<400> 4

gggcgtgatg gaaagctggc caagcctcgt cagctgcaca acaccactg gggcttggtc 60
 tgtcctgcag agacacccga gggccaggct tgtggtcttg tcaaaaacct gtcgctcatg 120
 tgctacgtca gtgtcggctc accagcggag cctatcaagg acttcatggt ccagcgcac 180
 atggaagtgc tggaggaata cgagcccggc gctagccctg acgccaccaa aatcttcatc 240
 aatggcacgt gggttggtgt ccatagtcag ccggcgcatt tggctactct cgtgcaagaa 300
 cttcgacgcc ggtgcattat ctctcacgag gtttctctgg tgcgagacat tcgtgatcgc 360
 gagttcaaga tcttctccga cgccggctga gtgatgcggc ctcttttctg cgtcaataca 420
 ccggacaatg agacaggagc cgaggagggc acctagccc ttaccaagga acatgttagg 480
 cgtcttgagg atgatgcaaa gtactccaga aagaaggatg acgaggacta ttttggttg 540
 gatggcctgc aaaacagcgg tgtcattgag tatctcgac ccgaagaaga ggagaccgcc 600
 atgatttgta tgaccctga agacctcgag gaattccgcc agcgaagct ccgaggaaag 660
 ggcgccaagg acgaagaacc cgaggacgag ggcaggagct tgaacgcccg tgtcaagacc 720
 aggatcaatc cggatattca catgtacacc cactgtgaaa tccatcccgc catgcttctc 780
 ggaatctgcg ccagcatcat tcccttcccg gatcacaacc agtgagta 829



图1

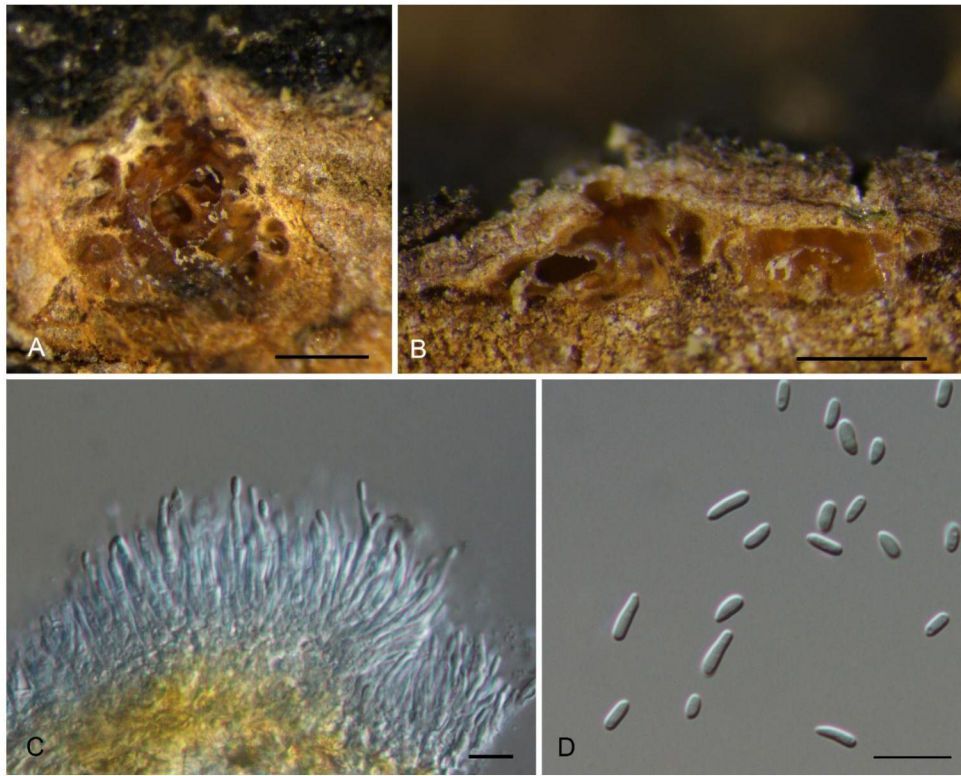


图2

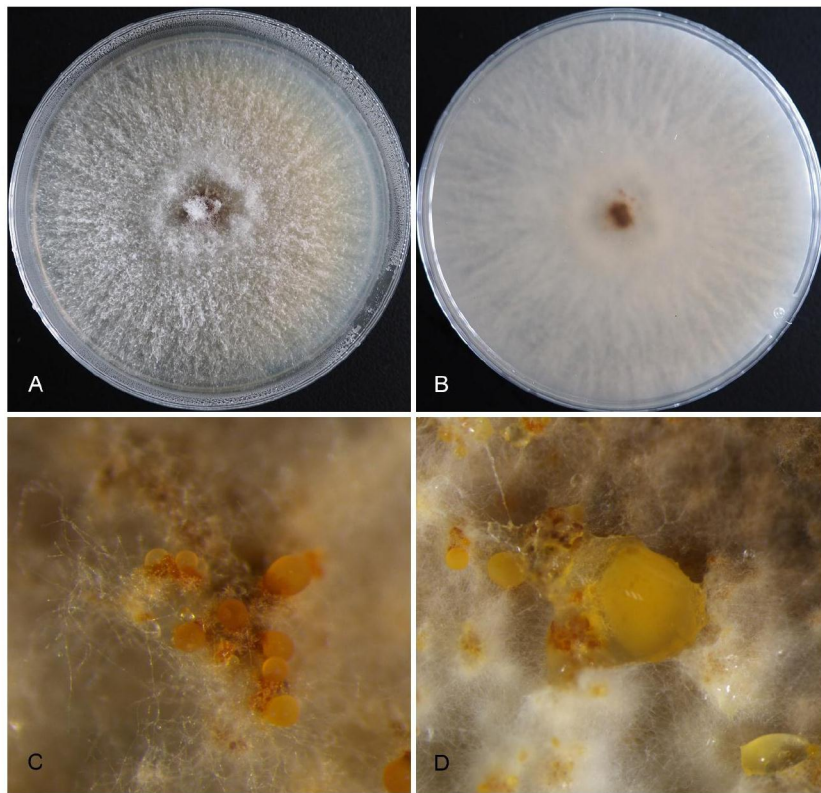


图3

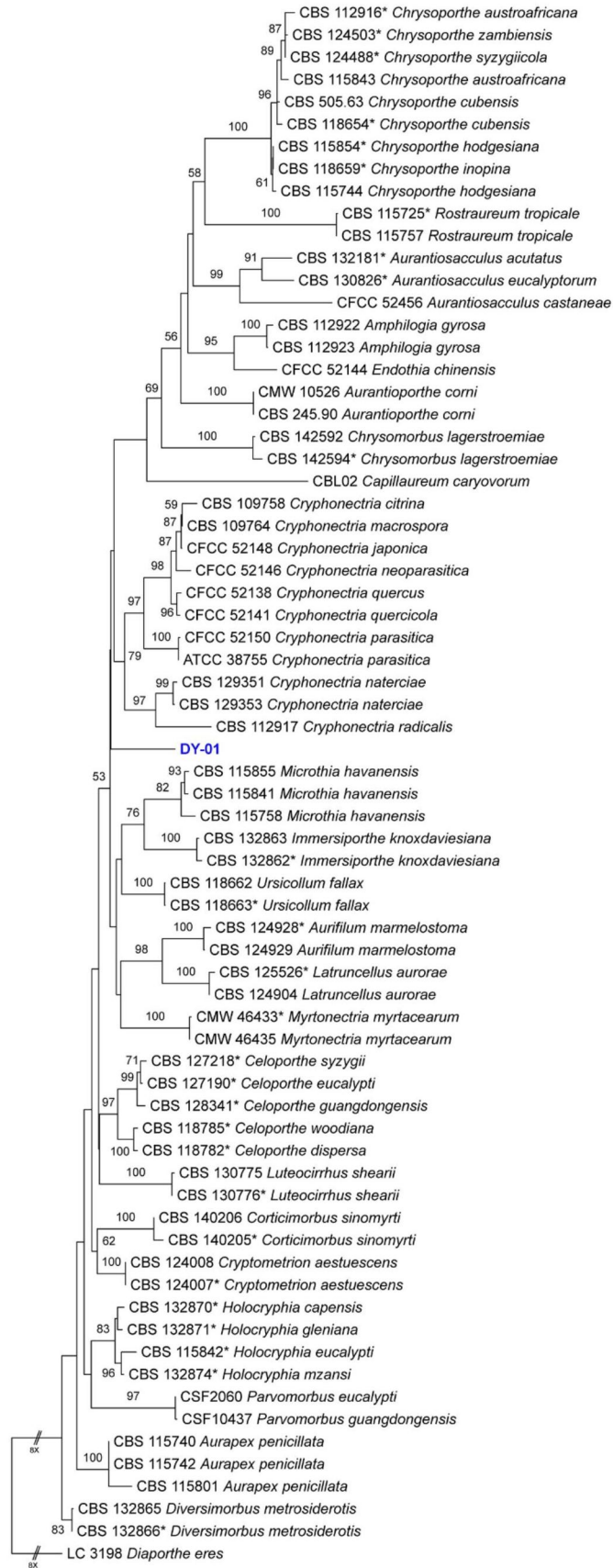


图4