

农杆菌介导的大麦 *Mlo* 反义基因转化小麦获得抗白粉病后代

赵同金^{1,*}, 刘恒^{1,2,*}, 赵双宜¹, 陈惠民¹, 夏光敏^{1,**}

¹山东大学生命科学学院, 植物细胞工程与种质创新教育部重点实验室, 济南250100; ²山东中医药大学科研中心, 济南250355

摘要: 从大麦‘斯特林’幼叶总RNA中分离 *Mlo* 基因 cDNA 完整编码区, 反向连接到植物双元载体(pBI-121.2) 35S 启动子下游, 通过农杆菌介导的苗端转化法获得两种小麦基因型(‘烟优2801’和‘烟优361’)的转基因小麦。T₀代405株中有55株PCR检测阳性, 平均转化率达到13.58%, T₀和T₁基因组DNA Southern杂交可以证明大麦 *Mlo* 基因片段已整合到小麦基因组中并可传递到后代。两种基因型的转基因小麦T₀和T₁植株在温室及大田中均表现出对白粉病抗性的提高。农杆菌介导的苗端转化法可以简单、快速、高效地获得转基因株系; 排除体细胞变异对转基因植株的影响; 克服基因型对农杆菌转化的限制, 是小麦遗传转化的一种实用方法。

关键词: 转基因小麦; 农杆菌转化; 白粉病; 大麦 *Mlo* 反义基因

Transgenic Wheat Progenies Resistant to Powdery Mildew Generated by *Agrobacterium* Transformation of Barley *Mlo* Anti-Sense Gene

ZHAO Tong-Jin^{1,*}, LIU Heng^{1,2,*}, ZHAO Shuang-Yi¹, CHEN Hui-Min¹, XIA Guang-Min^{1,**}

¹The Key Laboratory of Plant Cell Engineering and Germplasm Innovation, Ministry of Education, School of Life Sciences, Shandong University, Jinan 250100, China; ²Centre of Scientific and Research, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Complete coding region sequence of *Mlo* cDNA from barley cultivar ‘Stirling’ was cloned and inserted into the *Bam*HI site of binary vector pBI121.2, driven by 35S promoter in reverse direction. Two wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes ‘Yanyou2801’ and ‘Yanyou361’ were transformed by *Agrobacterium tumefaciens* with shoot apical meristem transformation method. A total of 55 T₀ transgenic plants were obtained, and the average transformation frequency was as high as 13.58%, Southern blot proved *Mlo* gene was integrated into T₀ wheat genome and inherited to T₁ progenies. The T₀ and T₁ transgenic plants of both genotypes showed higher resistance to powdery mildew than the controls in both green house and field. The shoot apical meristem transformation with *A. tumefaciens* is a simple, dependable and efficient method to generate transgenic wheat. It can overcome the difficult of the restriction to transformation of different wheat genotypes, and can get rid of the somoclonal variations due to tissue culture of immature embryos and calli.

Key words: transgenic wheat; *Agrobacterium* transformation; powdery mildew; barley *Mlo* anti-sense gene

真菌性病害对植物的生长和发育可造成巨大的威胁, 严重影响其产量和品质。白粉病是由白粉菌引起的真菌性病害, 能侵染650多种单子叶植物和9000多种双子叶植物(Schulze-Lefert和Vogel 2000)。麦类白粉病能危害小麦、大麦及燕麦等, 尤以小麦受害最严重。小麦感染白粉菌后, 可导致叶细胞死亡, 光合作用下降, 呼吸作用加强, 减产10%到15%, 严重者可达到20%以上。常规抗病育种在小麦育种中发挥着重要的作用, 但是由于育种周期长、对白粉病的抗性单一、抗性弱, 加之白粉菌生理小种繁多、变异快, 严重影响小麦品种的使用周期。在小麦及其近缘种中已定位了多个白

粉病抗性基因, 并已应用到常规抗病育种中。大麦 *Mlo* 基因是通过Co⁶⁰等诱变处理获得的一种广谱、持久抗白粉病的突变体, Büschges等(1997)通过图位克隆法获得其基因及其cDNA, 对其基因结构、功能和作用机理的研究结果表明: 该基因编码一个七次跨膜蛋白, 有钙离子结合区、酪氨酸激酶区、核定位信号, 可能与钙信号传递有关。但是它与己

收稿 2010-05-03 修定 2010-05-11

资助 国家“863”项目(2001AA241032)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: xiagm@sdu.edu.cn; Tel: 0531-88564525)。

知的抗病基因所具有的典型的信号分子结构无明显的同源性,因而是一种新的抗病基因(Devoto等1999, 2003; Elliott等2002)。该基因隐性突变后可引起叶细胞壁次生加厚,导致部分叶细胞自发性的编程死亡,诱导植株的系统获得性抗性,并可合成一种酚类杀菌物质(pCHA),该物质在体内和体外试验中均表现出很强的抗真菌活性(Kim等2002)。小麦是大麦的近缘种,其*Mlo*基因之间有92%的同源性,可能有着相同或类似的抗病作用机理,通过大麦*Mlo*基因双链RNA轰击小麦培养细胞,确实可以大大增强小麦对白粉菌的抵抗力(Schweizer等2000)。本研究采用反义RNA技术,向普通小麦基因组中导入大麦*Mlo*反义表达基因,期望在转录水平上产生广谱抗白粉病的转基因小麦。

农杆菌Ti质粒介导的基因转移具有操作简单、成本低、整合位点较稳定、拷贝数低、转化效率高、整合后外源基因结构变异较小等优点,该方法自创建以来,在双子叶植物遗传转化中得到广泛应用。后来随着对农杆菌转化植物细胞原理的深入认识,通过添加外源信号物质如乙酰丁香酮(AS)及其衍生物等也可以实现农杆菌对单子叶植物的转化。近年来,农杆菌转化玉米(Chan等1993)、水稻(Grimsley等1987)及小麦(Xia等1999; Xue等2004)都有成功的报道。虽然人们已经实现了农杆菌转化小麦的突破,但由于小麦离体培养受基因型的影响大,易发生体细胞无性系变异等原因(薛哲勇等2004a, b),使得农杆菌介导的幼胚和愈伤组织转化仍然受到很大的限制。本文报道利用农杆菌介导的苗端转化法(国家发明专利号:ZL200410075774.7),成功地实现了大麦*Mlo*反义基因转化小麦,获得抗白粉病转基因后代。

材料与amp;方法

1 材料

小麦(*Triticum aestivum* L.)基因型‘烟优361’(‘济麦19’)和‘烟优2801’为优质高产推广品种和品系,但对白粉病较为敏感,由烟台农科院小麦育种室提供;大麦(*Hordeum vulgare* L.)‘斯特林’由济南卢堡啤酒有限公司提供。植物表达载体pBI121.2为本室自存。RT-PCR试剂盒、平端连接试剂盒购自TaKaRa公司;DNA片段回收试剂盒购自MBI

公司;ECL标记及检测试剂盒购自Roche公司,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 大麦*Mlo*基因cDNA的分离及反义表达载体的构建取常温光照培养7d大麦幼叶材料20g,采用Piffanelli等(2002)报道的一步法提取总RNA,按TaKaRa公司的RNA PCR Kit (AMV) Ver2.1的要求进行反转录,克隆引物根据报道的*Mlo*基因序列设计(Büschges等1997)(P1: GTGCATCTGCGTGTGCGTA; P2: CAGAACTTGTCTCATCCCTG)。PCR反应条件为:94℃ 3 min; 94℃ 20 s, 56.7℃ 20 s, 72℃ 2 min, 循环32次; 72℃延伸7 min。大麦*Mlo*-PCR产物与pBI-121.2载体反向连接,新载体命名pBI-*Mlo*。

2.2 农杆菌介导小麦的转化农杆菌介导的小麦遗传转化采用苗端转化法(Zhao等2006)。将含有pBI-*Mlo*质粒的农杆菌菌株接种到20 mL含有50 mg·L⁻¹卡那霉素+50 mg·L⁻¹利福平的YEP液体培养基中,于28℃、170 r·min⁻¹振荡培养12~24 h, 10 000 r·min⁻¹离心3 min,弃上清液。用加有100 μmol·L⁻¹ AS的MB2液体培养基重悬菌体,稀释至OD值1.0左右。小麦种子经升汞表面消毒后室温萌发2~3 d,于4℃春化处理30 d,幼苗长到2~5 cm后,切去胚芽鞘及一半的子叶,露出生长点,用tip从切口处滴加带有目的基因的农杆菌菌液,在弱光潮湿条件下20℃左右恢复生长5~6 d,新叶片长出后移栽并正常管理。

2.3 转基因植株的PCR分析以大麦*Mlo*基因设计引物, P1: TATCCCTGCTCCTCATCGT; P2: CGGACCTCCTCTGTCGTTA。PCR条件为:94℃ 3 min; 94℃ 20 s, 56.7℃ 20 s, 72℃ 2 min, 循环32次; 72℃延伸7 min。

2.4 转基因植株的基因组Southern杂交 pBI-*Mlo*质粒DNA 0.1 μg,转基因植株及阴性对照小麦的基因组DNA 30 μg,经限制性内切酶HindIII和EcoRI双酶切后,0.8%的琼脂糖凝胶电泳16~18 h (15 V, 4℃),转移到尼龙膜上,按照Roche公司的Random prime labeling and detection system进行杂交,探针为随机引物法(Zhao等2006)标记的大麦*Mlo*基因特异片段。

2.5 转基因植株的抗病性分析选取转基因植株的

后代在温室及田间种植, 以未转基因的植株间隔为对照。对以上植株作白粉病接种, 并在苗圃的中央用高感白粉病的品种‘辉县红’做白粉病的诱发区, 按病斑的多少计反应型。抗感标准分为5级: 0级为免疫, 无病斑; 1级为高抗, 基部叶有1~3处病斑; 2级为中抗, 中部叶有少量病斑; 3级为中感, 上部叶及穗部有较多病斑; 4级为高感, 叶及穗部有大量病斑。统计植株发病情况, 计算反应级数。

实验结果

1 大麦 *Mlo* 基因的克隆及反义表达载体的构建

*Mlo*基因序列与Büschges等(1997)报道的序列一致, 序列号为: Z83834.1。pBI-*Mlo* 载体见图1。

2 小麦转基因植株的 PCR 分析

将上述载体转入农杆菌菌株 *AGL1*, 分别对两种受体小麦‘烟优2801’和‘烟优361’进行遗传转化, 利用PCR对所得植株(T_0 代)的目的基因进行检测, 结果见表1。对‘烟优361’小麦阳性植株23号(图2-B)的后代13株 T_1 代株系进行PCR分析, 9株表现出阳性(图3), 可以证明大麦*Mlo*基因已经整合到小麦基因组中并遗传给后代。

3 小麦转基因植株的基因组 Southern 杂交分析

pBI-*Mlo* 质粒经 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切, 可切

表1 转大麦 *Mlo* 反义基因 T_0 代植株 PCR 检测结果

Table 1 PCR positive analysis of T_0 transgenic wheat

批次	实验植株数		阳性植株数		转化率/%	
	‘烟优2801’	‘烟优361’	‘烟优2801’	‘烟优361’	‘烟优2801’	‘烟优361’
第1批	19	70	3	6	15.79	8.57
第2批	127	84	14	11	11.02	13.09
第3批	64	41	14	7	21.88	17.07
合计	210	195	31	24	14.76	12.31

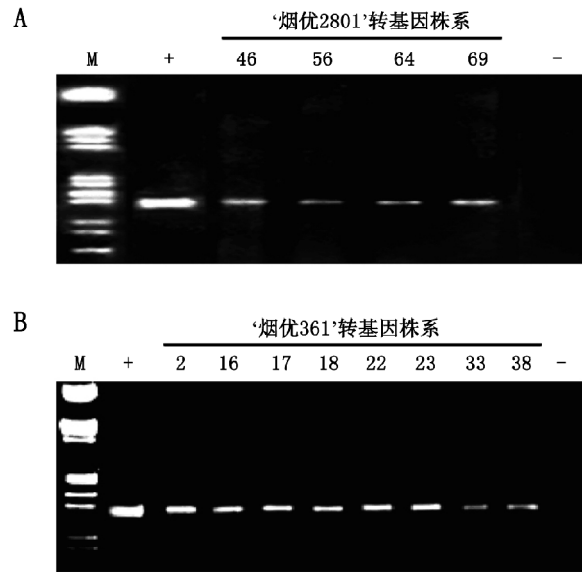


图2 转基因植株 T_0 代 *Mlo* 基因的 PCR 分析

Fig.2 PCR analysis of the *Mlo* transgenic T_0 plants

M: 分子量标准 λ DNA/*Hind*III+*Eco*RI; +: 质粒DNA扩增片段(1 322 bp)。A: 转基因植株‘烟优2801’; 46、56、64、69: 转基因阳性植株; -: 非转基因对照植株。B: 转基因植株‘烟优361’; 2、16、17、18、22、23、33、38: 转基因阳性植株; -: 非转基因对照植株。

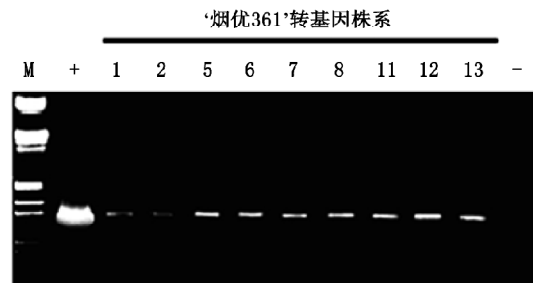


图3 转基因植株 T_1 代 *Mlo* 基因的 PCR 分析

Fig.3 PCR analysis of the *Mlo* transgenic T_1 plants

M: 分子量标准 λ DNA/*Hind*III+*Eco*RI; +: 质粒DNA扩增片段(1 322 bp); 1、2、5、6、7、8、11、12、13: ‘烟优361’ T_0 代阳性株系23号的后代转基因阳性植株; -: 非转基因对照植株。

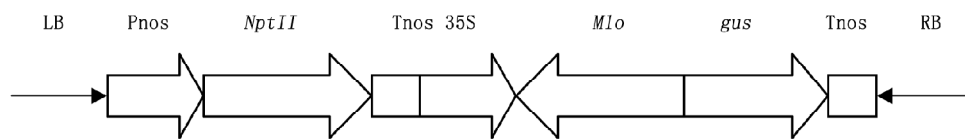


图1 pBI-*Mlo* 质粒 T-DNA 区结构图

Fig.1 T-DNA region of the plasmid pBI-*Mlo*

LB 和 RB 为 T-DNA 左右边界序列, Pnos 和 Tnos 为 nos 基因的启动子和终止子, 35S 为 35S 启动子, *Npt*II 为卡那霉素抗性基因, *Mlo* 为大麦 *Mlo* 反义基因, *gus* 为大肠杆菌葡萄糖苷酸酶基因。

下 4.8 kb 左右的片段。转基因植株和对照小麦基因组DNA经 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切后进行 Southern 杂交分析。结果表明: ‘烟优 2801’ 的 T_0 代和 T_1 代转基因植株 46 和 69 植株中均出现 4.8 kb 的杂交带; ‘烟优 361’ 的 T_0 代转基因的 2、16 和 23 植株中均出现 4.8 kb 的杂交带。‘烟优 2801’ 的 T_1 代转基因植株的 Southern 杂交表明, 46-1、46-2、69-7 和 69-8 均有 4.8 kb 杂交信号(图 4)。转基因植株和非转基因植株在 4.0 kb、3.5 kb 和 2.0 kb 均出现杂交信号, 很可能是小麦基因组 DNA 经 *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切后, 其 *Mlo* 基因片段因与大麦 *Mlo* cDNA 同源性较高, 发生杂交的结果所致。

4 转基因植株外源基因的表达及抗病性分析

分别对转基因植株的 T_0 和 T_1 代进行温室和田间的白粉病抗性分析, 以白粉病敏感品种 ‘辉县红’ 为抗原来源, 从苗期(两叶一心期)到开花灌浆期, 均可观察到小麦白粉病的发生。‘烟优 2801’ 和 ‘烟优 361’ 对照在温室中的发病比较明显, 特别是在开花期和成熟期, 而大麦 *Mlo* 转 ‘烟优 2801’ 和 ‘烟优 361’ 的 T_0 代阳性植株对白粉病的抗性明显高于亲本对照 1 到 2 个级别(表 2), 虽然未达到免疫水平, 但也普遍达到高抗水平。部分抗性植株的下部叶片有少量病斑, 旗叶也有零星感染, 但总体比亲本对照发病延迟, 症状减轻。由同一 T_0 植株产生的 T_1 株系其抗病程度发生明显分离, 少部分株系表现为对白粉病敏感, 有部分株系的分离比符合单基因

遗传。大田中的部分 T_1 代株系也表现为明显提高的抗病表型(图 5)。

讨 论

抗病育种是作物育种学家的重要目标之一, 而小麦白粉病的抗性育种具有重要理论和实践意义。由于病原微生物和植物的长期进化和适应, 抗性基因与病原微生物的激活物应特异性识别, 才能引发植物的抗病性反应(Dale 等 1989)。因这种识别是特异性的, 目前所分离的绝大多数抗病基因对病原菌的抗性均具有很强的专一性, 这就决定了其不能识别其他生理小种所产生的激活物, 导致其抗病谱较窄, 而不同病原菌生理小种的快速变异往往使这些抗性基因失效。许多抗病基因的产物均具有 NBS-LRR 结构域, 这就为分离其编码基因提供了有利条件(Marks 等 1989)。但植物中有部分病原菌生理小种产生广谱性和强抗性的突变, 例如来自

表 2 T_0 代 *Mlo* 转基因植株的白粉病抗性分析

Table 2 Resistance analysis of T_0 *Mlo* transgenic plants to Powdery mildew

植株	反应级数	
‘烟优 2801’	对照植株	2.76
	阳性植株	1.20
‘烟优 361’	对照植株	2.50
	阳性植株	1.73

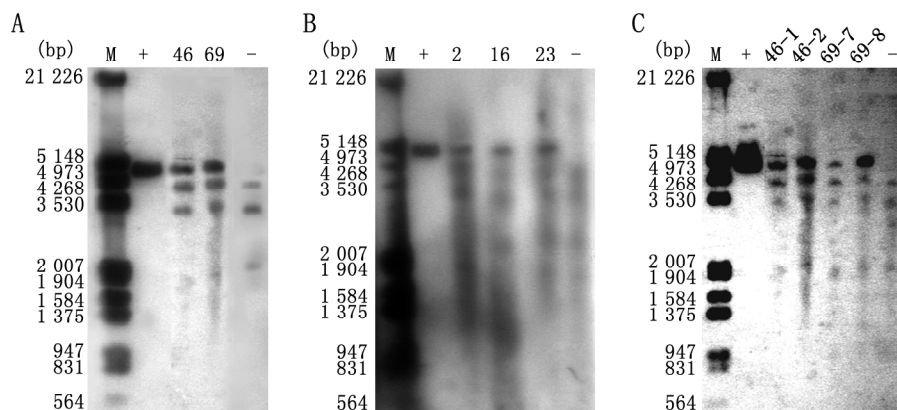


图 4 *Mlo* 转基因植株的基因组 Southern 杂交分析

Fig.4 Genomic Southern analysis of the *Mlo* transgenic plants

M: 分子量标准 λ DNA/*Hind*III+*Eco*RI; +: *Hind*III 和 *Eco*RI 双酶切的 pBI-*Mlo* 质粒。A: ‘烟优 2801’ T_0 代; 46、69: 转基因植株; -: 非转基因对照植株。B: ‘烟优 361’ T_0 代; 2、16 和 23: 转基因植株; -: 非转基因对照植株。C: ‘烟优 2801’ T_1 代; 46-1、46-2、69-7 和 69-8 分别为 46 和 69 的两个转基因植株后代; -: 非转基因对照植株。



图5 T_1 代 *Mlo* 转基因植株田间白粉病抗性分析

Fig.5 Resistance analysis of T_1 *Mlo* transgenic plants to Powdery mildew

A: 非转基因对照小麦‘烟优2801’; B: 转基因‘烟优2801’ T_1 69-1 株系。

簇毛麦的 *Pm21*、拟南芥的 *Rpw8.1* 和 *Rpw8.2*、大麦的 *Mlo* 等。它们对白粉病的抗性反应显然不符合基因-基因假说, 而且从其基因结构、蛋白产物的性质分析与已知的典型抗病基因无明显的同源性, 这说明植物对白粉病的广谱抗性可能有着完全不同的机理。

大麦 *Mlo* 基因产物定位于质膜上, 是一个具有7个跨膜区的膜蛋白, 含有钙结合区、激酶作用区和 NBS 位点。虽然我们尚不清楚 *Mlo* 基因的隐性突变或缺失如何导致植物对白粉病产生广谱而持久的抗性; 只存在于植物界的 *Mlo* 基因产物的作用是什么; 其突变后是如何引起植物细胞壁的次生加厚、合成并积累 pCHA 物质、引起叶细胞的编程死亡、诱发整个植株产生系统获得性的抗性 (Schweizer 等 2000), 但 Schweizer 等(2000)将 *Mlo* 大麦 RNA 双链引入小麦培养细胞, 已经实现了单细胞水平对白粉病的抗性, 结合我们用大麦反义 *Mlo* 转化小麦的结果, 说明由 *Mlo* 基因的缺失、突变和抑制其表达而获得的对白粉病的广谱抗性在植物界可能具有相同的机理。

虽然已报道有多种方法可以成功转化小麦, 但比较常用的方法还是以基因枪法和农杆菌感染法为主。基因枪法转化小麦虽然操作简单, 不受小麦基因型的影响, 但转化效率较低, 且容易产生多拷贝插入而引起目的基因沉默现象 (Zhao 等 2006)。农杆菌介导的遗传转化法已成功实现了原生质体、胚性愈伤组织、幼胚、花序的转化, 获得的转基因植株也多为单拷贝插入, 表现为孟德尔遗传, 但目的基因的转化率一般在 3% 以下。更重要的是许多广范栽培的小麦品种难以建立高效的再生体系, 因而小麦的农杆菌转化还受到小麦基因型的严格限制 (薛哲勇等 2004a, b)。由于受到体细胞无性系变异、染色体削减等影响, 所获得的转基因植株可能出现不育而无法获得转基因后代 (薛哲勇等 2004a)。我们通过农杆菌感染幼苗生长点将大麦 *Mlo* 反义基因导入两种不同基因型的栽培小麦基因组中, T_0 代平均转化率可达 13.71%, 通过 PCR 和基因组 DNA Southern blot 验证, 大麦 *Mlo* 基因已整合到小麦基因组中并遗传到 T_1 代, 使受体小麦对白粉病的抗性明显提高。同样, 本课题组采用相同的方法也实现了葡聚糖酶和几丁质酶基因对小麦的转化, 转基因小麦对白粉病的抗性也有明显提高 (Zhao 等 2006)。由于小麦种子萌发 1~4 d 的幼苗生长点较小, 在农杆菌感染部分细胞后, 只有少数能产生纯合系, 其他的容易发育成嵌合体, 这就要求在进一步的工作中对阳性植株进行抗生素筛选, 以获得较多的转基因纯系 (Zhao 等 2006)。

参考文献

- 薛哲勇, 贺晨霞, 孙松, 夏光敏(2004a). 农杆菌介导的胆碱脱氢酶基因(*betA*)转化小麦及影响转化的因素. 山东大学学报(理学版), 39 (3): 104~115
- 薛哲勇, 支大英, 任伟, 夏光敏(2004b). 根瘤农杆菌介导将大麦叶片型 $\alpha 2$ 硫堇 *DB4* 基因导入小麦获得转基因植株及后代. 高技术通讯, 19: 34~38
- Büsches R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J et al (1997). The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, 88 (5): 695~705
- Chan MT, Chang HH, Ho SL, Tong WF, Yu SM (1993). *Agrobacterium* mediated production of transgene rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene. *Plant Mol Biol*, 22: 491~506
- Dale PJ, Marks MS, Brown MM, Woolston CJ, Gunn H, Boulton

- MI, Mullineaux PM, Lewis DM, Kemp JM, Chen DF, Gilmour DM, Flavell RB (1989). Agroinfection of wheat: inoculation of *in vitro* grown seedlings and embryos. *Plant Sci*, 63 (2): 237~245
- Devoto A, Hartmann HA, Piffanelli P, Elliott C, Simmons C, Taramino G, Goh CS, Cohen FE, Emerson BC, Schulze-Lefert P, Panstruga R (2003). Molecular phylogeny and evolution of the plant-specific seven-transmembrane MLO family. *J Mol Evol*, 56 (1): 77~88
- Devoto A, Piffanelli P, Nilsson I, Wallin E, Panstruga R, von Heijne G, Schulze-Lefert P (1999). Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the MLO family in plants. *J Biol Chem*, 274 (49): 34993~35004
- Elliott C, Zhou F, Spielmeier W, Panstruga R, Schulze-Lefert P (2002). Functional conservation of wheat and rice *Mlo* orthologs in defence modulation to the powdery mildew fungus. *Mol Plant Microbe Interact*, 15 (10): 1069~1077
- Grimsley N, Hohn T, Davis JW, Hohn B (1987). *Agrobacterium* mediated delivery of infectious maize straw virus into maize plants. *Nature*, 325: 177~179
- Kim MC, Panstruga R, Elliott C, Müller J, Devoto A, Yoon HW, Park HC, Cho MJ, Schulze-Lefert P (2002). Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, 416 (6879): 447~451
- Marks MS, Kemp JM, Woolston CJ, Dale PJ (1989). Agroinfection of wheat: a comparison of *Agrobacterium* strains. *Plant Sci*, 63 (2): 247~256
- Piffanelli P, Zhou F, Casais C, Orme J, Jarosch B, Schaffrath U, Collins NC, Panstruga R, Schulze-Lefert P (2002). The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiol*, 129 (3): 1076~1085
- Schweizer P, Pokorný J, Schulze-Lefert P, Dudler R (2000). Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant J*, 24 (6): 895~903
- Schulze-Lefert P, Vogel J (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends Plant Sci*, 5 (8): 343~348
- Xia GM, Li ZY, He CX, Chen HM, Richard B (1999). Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytophysiol Sin*, 25 (1): 22~28
- Xue ZY, Zhi DY, Xue G.P, Zhang H, Zhao YX, Xia GM (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na⁺. *Plant Sci*, 167: 859~899
- Zhao TJ, Zhao SY, Chen HM, Zhao QZ, Hu ZM, Hou BK, Xia GM (2006). Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling. *Plant Cell Rep*, 25: 1199~1204