

禾谷镰孢菌 β -微管蛋白基因克隆及其与 多菌灵抗药性关系的分析

李红霞 陆悦健 王建新 周明国*

(南京农业大学 农业部病虫害监测与治理重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 应用 3 对引物,从禾谷镰孢菌(*Gibberella zeae*)对多菌灵(MBC)的敏感菌株(MBC^S)和田间及室内诱导抗药性菌株(MBC^R)中扩增 β -微管蛋白基因。该基因全长 1631bp,包含 3 个内含子,编码 447aa,与其他常见植物病原丝状真菌 β -微管蛋白基因的氨基酸同源性达 95.12%~99.30%。MBC^S 和 MBC^R 菌株核苷酸序列分析表明, MBC^R 菌株未发生任何位点的突变,说明 *G. zeae* 对 MBC 的抗药性机制并非像其他丝状真菌一样由 β -微管蛋白 198 位氨基酸突变所致。

关键词 :禾谷镰孢菌 β -微管蛋白,多菌灵抗药性

中图分类号 :S481 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2003)04-0424-06

小麦赤霉病(Wheat Scab)是中国长江中下游冬麦区和东北春麦区发生的重要病害,造成严重的产量损失,病菌产生的赤霉毒素对人畜有较大的毒害作用。其病原菌的无性态为禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum* Schw),有性态为玉蜀黍赤霉(*Gibberella zeae* (Schew.) Retch)。我国长期以来采用以多菌灵为主的化学药剂进行扬花期喷雾防治,取得良好的防效。多菌灵是一种内吸性的苯并咪唑类杀菌剂,其作用位点单一,易产生抗药性。1991 年周明国等^[1]首先获得了室内诱变的抗药性菌株,并于 1992 年首次在浙江海宁检测到田间抗多菌灵的小麦赤霉病菌株,随后连续多年的监测结果表明抗性菌株比例呈上升趋势,但抗药性水平较低。

苯并咪唑类杀菌剂与病原真菌 β -微管蛋白结合,抑制微管功能,进而阻止细胞有丝分裂。近年来对许多病原真菌的抗性检测发现 β -微管蛋白基因的点突变,蛋白的三维构象发生改变,阻止药剂与靶标结合,导致抗药性的产生。田间抗药性菌株的突变位点一般位于 β -微管蛋白 198 或 200 位氨基酸,198 位氨基酸突变表现与乙霉威和 N-苯氨基甲酸酯类杀菌剂的负交互抗性^[2~4],但人工诱变抗药性菌株中还涉及到 β -微管蛋白第 6、50、134、165、167、241、257 位氨基酸的突变^[5]。本研究在已获得 *G. zeae* 抗药性菌株 β -微管蛋白基因部分序列,并已知 198 和 200 位氨基酸未发生突变的基础上^[6],获得 *G. zeae* β -微管蛋白的全序列,以确定 β -微管蛋白是否存在别的突变位点,导致 *G. zeae* 对多菌灵抗药性的产生。

基金项目 国家自然科学基金(30070510、30200181)教育部《高等学校骨干教师资助诸》项目

* 通讯作者。Tel 86-25-4395249; Fax 86-25-4395641; E-mail: mgzhou@njau.edu.cn

作者简介 李红霞(1975-),女,新疆阿勒泰人,在读博士生,从事植物病原真菌抗药性与分子生物学研究。

E-mail: hxli2002@yahoo.com.cn

收稿日期 2002-11-08,修回日期 2003-02-11

1 材料和方法

1.1 供试菌株

实验室提供 5 个菌株,其中包括 1 个野生敏感菌株 ZF43 2 个田间抗药性菌株 ZF2045 和 ZF2058 2 个室内诱导突变体 43-7-C 和 43-7。

1.2 药剂敏感性测定

敏感菌株在含 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 和 1.4 μ g/mL 多菌灵(Methyl benzimidazole carbamate MBC)的 PSA 培养基(马铃薯 200g 蔗糖 20g 琼脂 20g 去离子水 1000mL , pH6.8)上培养。抗药性菌株在含 0、1、5、10、20 μ g/mL MBC 和含 0、1.875、3.75、7.5、15、30、60 μ g/mL 乙霉威(N-phenylcarbamate NPC)的 PSA 上培养。以上菌株均在 25 $^{\circ}$ C 条件下培养 5d。根据 EC_{50} 值确定敏感性水平,确定其对 MBC 和 NPC 敏感性表型。

1.3 基因组 DNA 提取

预培养的菌碟转入绿豆汤液体培养基(绿豆 30g 去离子水 1000mL) 25 $^{\circ}$ C 摇培 6d ,产孢后孢子转入 PS(马铃薯 200g 蔗糖 20g 去离子水 1000mL , pH6.8)中 250r/min 摇床培养 2d 收集菌丝冻干,液氮研磨。取 0.2g 菌丝,加 800 μ L 提取缓冲液(100mmol/L LiCl ; 10mmol/L EDTA ;10mmol/L Tris-HCl , pH8.0 ;10g/L SDS ,高压灭菌),充分震荡,60 $^{\circ}$ C 温育 30min ,10000r/min 离心 4min 后,用苯酚:氯仿:异戊醇(25 :24 :1)抽提 4 次至无中间层,上清液加 2 倍无水乙醇沉淀干燥后溶于 50 μ L TE(含 20 μ g/mL RNAase) 37 $^{\circ}$ C 水浴 20min。取 5 μ L 经 0.6% 琼脂糖电泳检测。

1.4 PCR 扩增及测序

根据已知植物病原真菌 β -微管蛋白基因设计 3 对引物(表 1)。引物对 BAF6 和 CP-1 用于扩增 β -微管蛋白基因 5'端约 700bp ,由于 β -微管蛋白基因第一个编码区只有 12bp ,因此正向引物 BAF6 3'端的 12bp 是特异性的,而该引物 5'端的 12bp 是根据与模式菌株粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*) β -微管蛋白基因第一个编码区相接序列而设计的;引物对 B1 和 B3 用于扩增该基因中间片段约 850bp ,针对目标序列的 198 位氨基酸;引物对 BAF3 和 END3 用于扩增该序列的 3'端约 1.2kb。B1/B3 的扩增产物与前后两对引物的扩增产物有部分重复。引物 B1/B3 的扩增条件参照文献[6],BAF6/CP-1 和 BAF3/END3 的扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5min ,60 $^{\circ}$ C 50s ,94 $^{\circ}$ C 40s ,72 $^{\circ}$ C 80s ,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 5min ,4 $^{\circ}$ C 保存。

表 1 用于 PCR 扩增的引物
Table 1 Primers used for PCR amplify

Primers	Amino acid positions ^a	Nucleotide positions ^b	Sequence(5' ~ 3')	Direction
BAF6	1 ~ 4	1 ~ 12	ACAACCGCCAACATGCGTGAGATT	+
BAF3	43 ~ 51	368 ~ 391	GCTCGAGCGCATGAACGTCTACTT	+
B1	134 ~ 142	688 ~ 712	A(AG)AT(CT)ACCCA(CT)TC(CT)CT)GGTGGTGG	+
CP ~ 1	99 ~ 106	672 ~ 695	GGTGATCTGGAACCCCTGGAGGCA	-
B3	409 ~ 416	1488 ~ 1511	CTCCAT(CT)TC(AG)TCCAT(ACT)CC(CT)TC(AG)CC	-
END3	443 ~ 447	1615 ~ 1631	AT(TC)TAC(CT)TCCTCGCCCTCAA	-

a. The positions correspond to the number of amino acid sequence of the β -tubulin gene from the typical carbendazim-resistant fungus , *Neurospora crassa* ; b. The positions correspond to the number of nucleotide sequence of the β -tubulin gene from *Gibberella zeae* (Fig 2).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

回收、纯化引物对 BAF6/CP-1、B1/B3 和 BAF3/END3 的 PCR 产物 ,分别与 pGEM® -T Easy Vector(Promaga)连接 转化 *E. coli* DH5 α 在含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上筛选白色菌落 ,碱裂解法提取质粒 DNA 验证阳性克隆 ,由上海联合基因公司完成测序 ,将以上 3 对引物的测序结果用 DNAClub 软件分析 ,去除重复部分后得到完整的基因(见图 2)。最后用 BAF6/END3 验证 ,反应条件 :94℃ 5min ;48℃ 1min ;94℃ 1min ;72℃ 3min ;30 个循环 ;72℃ 5min ,回收特异性条带后电泳并照相。

1.5 序列同源性分析

DNAClub 分析序列 ,检索 GenBank 和 EMBL 基因数据库 ,通过 BLAST 比较 *G. zeae* 与其他常见植物病原丝状真菌 β -微管蛋白基因的同源性 ,明确有无突变位点。

2 结果和分析

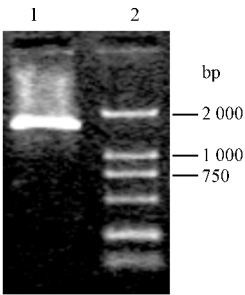
2.1 *G. zeae* 对 MBC 敏感性测定

供试菌株对 MBC 的敏感性结果显示(表 2)。敏感菌株对 MBC 的 EC_{50} 值小于1 μ g/mL ,无论是田间或诱导抗性菌株的 EC_{50} 值均在 10 μ g/mL 左右 ,抗药性水平不高。所以目前仍能用多菌灵或其复配剂防治小麦赤霉病。

表 2 *G. zeae* 菌株对多菌灵(MBC)敏感性测定

Table 2 Testing sensitivity of carbendazim(MBC) to *G. zeae* isolates

Strains	Type of strains	Regression equation	Relativity	EC_{50} (μ g/mL)	Phenotype
ZF43	Wild MBC-sensitivity	$Y = 5.2385 + 3.4693 X$	0.9902	0.8540	MBC ^S
ZF2054	Field MBC-resistance	$Y = 2.0036 + 3.0789 X$	0.9994	9.4012	MBC ^R
ZF2058	Field MBC-resistance	$Y = 3.0191 + 0.9907 X$	0.9944	9.7852	MBC ^R
43 - 7	Induced MBC-resistance	$Y = 3.3048 + 1.9091 X$	0.9894	9.1965	MBC ^R
43-7-C	Induced MBC-resistance	$Y = 2.0878 + 2.8440 X$	0.9901	10.507	MBC ^R



MBC^R 菌株在含 NPC 系列浓度的 PSA 培养基上的生长速率一致 ,差异不显著 ,无法测定其 EC_{50} 值 ,说明 MBC^R 菌株与 NPC 间不存在负交互抗药性。

2.2 序列分析

测序结果显示小麦赤霉病菌的 β -微管蛋白基因全长 1631bp (图 1) ,GenBank 序列号为 AY303689 包含 3 个内含子 ,大小分别是 181bp、58bp 和 48bp ,3 个内元都有相似的 5'(GTNNGT)和 3' (TGA)序列 ;外元(G + C)mol% 为 57.12mol% ,有 4 个编码区 ,分别位于 1 ~ 12bp、194 ~ 217bp、276 ~ 398bp、447 ~ 1628bp 间 ,共 1341bp 编码 447 个氨基酸(图 2)。比较 MBC^S 和 MBC^R 菌株 ,MBC^R 菌株未发生任何位点的突变 ,明确了 *G. zeae* 对 MBC 产生抗药性的原因不是由于 β -微管蛋白基因发生点突变所至。与其他丝状真菌抗药性产生机制不同。

图 1 引物 BAF6/END3 的 PCR 产物

Fig.1 PCR product of BAF6/END3 primers
1. PCR product ;
2. Marker(DL 2000).

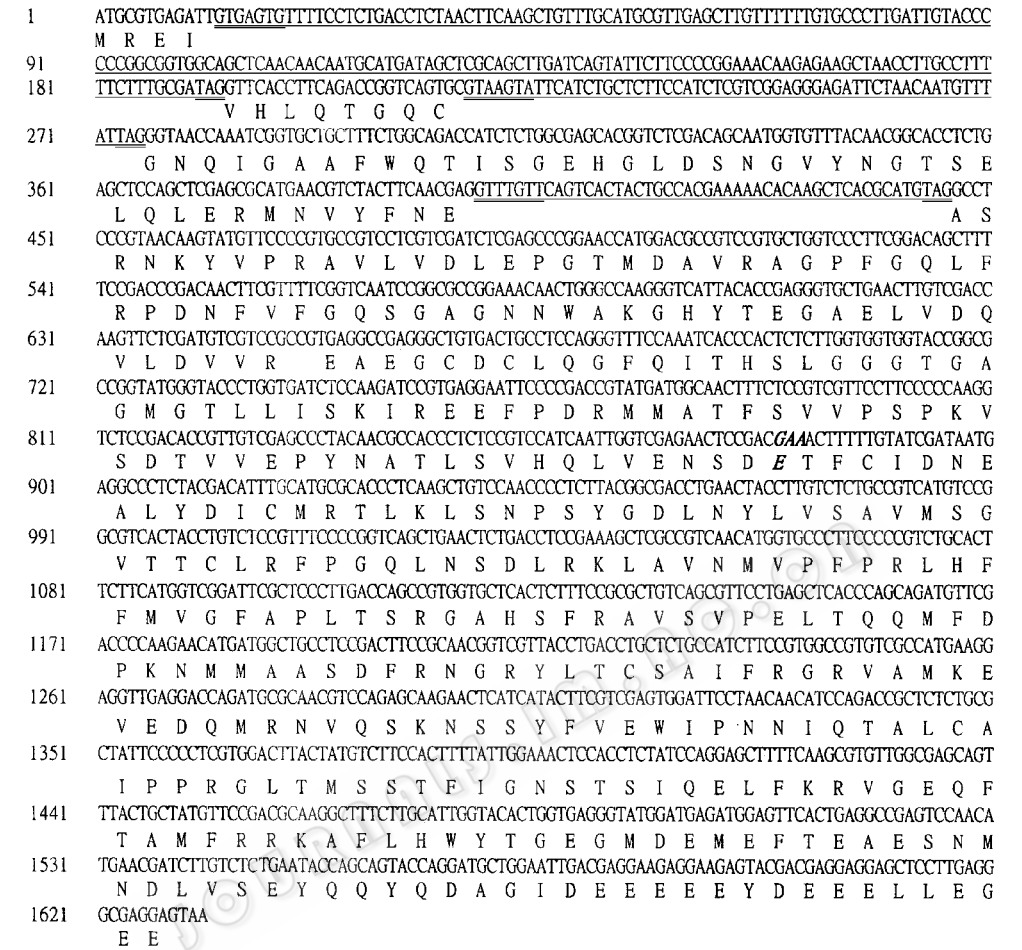


图 2 小麦赤霉菌野生型菌株的 β -微管蛋白基因的核酸序列及推断的氨基酸序列

Fig.2 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the β -tubulin gene of *Gibberella zeae* wild-type strain

Introns are underlined ;5'-donor and 3'-acceptor sites are double underlined ;Left figures indicate the nucleotide sequence.

2.3 同源性比较

通过 BLAST 与已知几种常见植物病原真菌 β -微管蛋白基因进行比较 ,发现氨基酸水平上同源性很高 ,达 95.12% ~ 99.30%(见表 3) ,因此该基因可以被确定为 β -微管蛋白基因。但所含内元数及内元大小不同。

3 讨论

苯并咪唑类杀菌剂在连续使用 2 ~ 3 年后易产生抗药性 ,且抗药频率高 ,对某些病害如灰霉病已失去防治价值。多菌灵在中国已连续用于防治小麦赤霉病近 30 年 ,但 *G. zeae* 对多菌灵的抗药性田间发生频率仍然较低^[7] ,在大多数地区用多菌灵防治赤霉病仍有一定的防治价值。从抗药性表型来看 ,抗药水平显著低于其他病原真菌如油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)^[8] 和灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)^[9] ,前者 EC_{50} 值均在 10 μ g/mL 左

右,且与乙霉威无负交互抗药性,后两种抗药性真菌的 EC_{50} 大于 $100\mu\text{g/mL}$,且与乙霉威存在负交互抗药性。

表 3 小麦赤霉病菌的 β -微管蛋白基因与其他常见植物病原真菌同源性比较

Table 3 Comparison of β -tubulin gene of *G. zeae* with that of other common plant pathogenic fungi

Plant pathogenic fungi	Accession number of nucleotide and amino acid sequence	Homology at amino acid level/%	The number and size of introns
<i>Gibberella zeae</i>	AY303689 , /	/	3(181 58 48bp)
<i>Gibberella pulicris</i> (tub2)	AF414866 , AAN03787	99.30	3(197 57 48bp)
<i>Gibberella fujikurio</i>	U27303 , AAB18275	99.07	4(179 59 48 49bp)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f.sp. <i>aeschyromene</i>	U14138 , AAA62875	96.98	6(184 58 71 56 71 53bp)
<i>Colletotrichum graminicola</i>	M34492 , AAA33046	96.98	6(202 59 76 60 71 58bp)
<i>Botryotinia fukeliana</i>	Z69263 , CAA93254	96.28	6(135 53 69 56 52 56bp)
<i>Neurospora crassa</i>	M13630 , AAA33617	95.81	6(240 74 68 65 73 57bp)
<i>Rhynchosporium secalis</i>	X81046 , CAA56936	95.12	6(132 55 77 70 52 50bp)
<i>Venturia inaequalis</i>	M97951 , AAA34230	96.74	6(107 53 51 52 50 56bp)

只用引物对 BAF6/END3 的扩增结果会出现非特异性条带,而用 3 对引物扩增特异性高,扩增片段长度适中测序准确率高。序列分析发现 *G. zeae* β -微管蛋白基因共有 3 个内元,而同源性较高的病原真菌中 *Gibberella pulicaris* 和 *Gibberella fujikurio* 也分别有 3 个和 4 个内元,少于其他真菌的 6 个内元。且 *G. zeae* β -微管蛋白基因 3 个内元的 5' 剪切处共有 GTNNGT 序列,略微不同于其他丝状真菌的 GTANGT 序列^[1]。

G. zeae β -微管蛋白氨基酸水平上和其他丝状真菌同源性很高,但其抗药性菌株并未像这些病原菌一样存在点突变,导致抗药性的产生。本实验室已研究发现 *G. zeae* 对多菌灵的抗药性是由单基因控制的,因此必定存在别的未知蛋白质或 α -微管蛋白与多菌灵结合,要了解 *G. zeae* 对多菌灵产生抗药性的原因,今后的研究工作应从蛋白角度入手。

参 考 文 献

[1] 周明国,叶钟音,刘经芬. 杀菌剂抗药性研究进展. 南京农业大学学报,1994,17(3) :33 ~ 41.

[2] Fujimura M , Kamakura T , Inoue H , et al . Sensitivity of *Neurospora crassa* to benzimidazoles and N-phenylcarbamates : effect of amino acid substitutions at position 198 in β -tubulin. *Pesticide biochemistry physiology* , 1992 44(3) :165 ~ 173.

[3] Koeneaadt H , Jones A L . Resistance to benomyl conferred by mutations in codon 198 or 200 in the beta-tubulin gene of *Neurospora crassa* and sensitivity to diethofencarb conferred by codon 198. *Phtopathology* , 1993 , 83 :850 ~ 854.

[4] Yarden O , Katan T . Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea* . *Phytopathology* , 1993 83 :1478 ~ 1483.

[5] Yan K , Dickman M B . Isolation of a β -tubulin gene from *Fusarium moniliforme* that confers cold-sensitive benomyl resistance. *Applied and Enviromental Microbiology* , 1996 62(8) :3053 ~ 3056.

[6] 陆悦健,周明国,叶钟音,等. 抗苯并咪唑的小麦赤霉病菌 β -tubulin 基因序列分析与特性研究. 植物病理学报, 2000 30(1) :30 ~ 34.

[7] 周明国,王建新. 禾谷镰孢菌对多菌灵的敏感性基线及抗药性菌株生物学性质研究. 植物病理学报, 2001 31 (4) :365 ~ 370.

[8] 李红霞,周明国,陆悦健. 应用 PCR 方法检测油菜菌核病菌对多菌灵的抗药性. 菌物系统, 2002 21(3) :370 ~ 374.

[9] 李红霞,陆悦健,王建新,等. 四种不同植物病原真菌与多菌灵抗药性相关基因突变的比较. 南京农业大学, 2002 25(3) :41 ~ 44.

[10] Gurr S J , Unkles S E , Kingdom J R . The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi . In : Kingdom J R . ed . Gene Structure in Eukaryotic Microbes , vol 22 . Oxford : IRL Press , 1987 . 93 ~ 139 .

Cloning of β -tubulin Gene from *Gibberella zeae* and Analysis its Relationship with Carbendazim-resistance

Li Hongxia Lu Yuejian Wang Jianxin Zhou Mingguo*

(Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Disease and Insects , Ministry of Agriculture , Nanjing Agriculture University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : Whole β -tubulin genes from wild carbendazim(MBC)-sensitive isolate , field MBC-resistant isolate and induced MBC-resistant mutant of *Gibberella zeae* were cloned and sequenced with 3 pairs of primers . These genes have 1631bp length , including 3 introns , encoding 447 amino acid . The homology of amino acid tubulin gene of *G. zeae* with that of other common plant pathogenic filamentous fungi is from 95.12% ~ 99.30% . Sequence comparison among MBC^s , field MBC^R and induced MBC^R isolates revealed there was no mutation , even one . So it can be concluded that the mechanism of MBC-resistance to *G. zeae* is different from other filamentous fungi caused by point mutation at amino acid position 198 or other position of β -tubulin gene .

Key words : *Gibberella zeae* , β -tubulin , MBC-resistance

Foundation item :Chinese National Nature Science Foundation(30070510 , 30200181) ; Program for Key Teachers in Higher Education Institutions of MOE

* Corresponding author . Tel 86-25-4395249 ; Fax 86-25-4395641 ; E-mail : jingzhou@niau.edu.cn

Received date :11-08-2002

2002 年《微生物学报》审稿专家名单

2002 年以下专家为本刊审阅过稿件 , 在此表示忠心地感谢 ! (按姓氏汉语拼音排序)

白逢彦	鲍时翔	蔡文启	陈冠军	陈洪章	陈剑平	陈民钧	陈润生	陈三凤	陈文新
陈新文	陈永青	程光胜	程元荣	丁 鉴	丁久元	丁清泉	东秀珠	樊美珍	方 勤
高培基	葛 诚	龚建华	龚祖坝	郭 俊	郭三堆	郭顺星	郭志儒	韩文瑜	何忠效
赫荣乔	洪 健	胡福泉	胡丰林	胡学智	胡远扬	还连栋	黄大昉	黄 力	黄秀梨
黄耀煌	江 宁	姜文侠	蒋立科	荆玉祥	焦瑞身	柯家骏	孔显良	孔宪刚	雷肇祖
李电东	李阜棣	李季伦	李琦涵	李 钦	李若瑜	李顺鹏	李育阳	李 元	李增智
廖延雄	梁宗琦	林 敏	林稚兰	刘华珍	刘双江	刘杏忠	刘秀梵	刘志恒	刘志敏
刘志培	娄无忌	陆承平	陆德如	罗信昌	马清钧	闵 航	潘兹书	彭珍荣	钱世钧
钱新民	邱并生	曲音波	茹炳根	邵宗泽	沈 萍	盛 军	施巧琴	苏国富	孙君社
孙 明	孙志浩	孙忠富	谭华荣	唐国敏	唐 宏	田杰生	涂长春	汪洪刚	王敖全
王 东	王金生	王惠莲	王 平	王以光	王用楫	王有智	王正祥	吴克刚	吴 润
夏春谷	夏桂先	向 华	肖 天	谢 红	邢来君	徐 冲	徐德强	徐冠珠	徐 虹
徐建国	许建和	许周善	杨海花	杨建民	杨玢婉	杨寿钧	杨苏声	杨蕴刘	姚 斌
于嘉林	余泽华	喻子牛	袁 生	袁正宏	袁志明	袁中一	张博润	张楚瑜	张惠展
张建中	张 杰	张素琴	张小青	张渝英	张 正	章克昌	郑 平	赵大健	赵乃昕
郑天凌	钟耀明	周俊初	周培瑾	周雪平	邹国林	朱宝泉	朱关福	朱厚础	朱圣庚
朱玉贤	庄玉辉	诸葛健							