

# 芒果炭疽病菌 $\beta$ -微管蛋白基因的克隆及其与 多菌灵抗药性发生的关系

詹儒林<sup>1</sup> 郑服丛<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>中国热带农业科学院南亚热带作物研究所 湛江 524091)

(<sup>2</sup>中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 儋州 571737)

**摘 要** 参照豆科合萌属 (*Aeschynomene*) 作物炭疽病菌的 *tub1* 和 *tub2* 基因序列设计了 2 对引物, 分别从芒果 (*Mangifera*) 炭疽病菌对多菌灵 (MBC) 田间抗药性 (MBC<sup>R</sup>) 和敏感 (MBC<sup>S</sup>) 的菌株中扩增  $\beta$ -微管蛋白基因。结果只有以 *tub2* 为参照设计的引物扩增到了特异片段。进一步对全基因进行了克隆和测序。该基因序列全长 1344bp, 编码 447aa, 其核苷酸和氨基酸序列与豆科合萌属炭疽病菌的 *tub2* 基因高度同源。对芒果炭疽病菌抗、感菌株  $\beta$ -微管蛋白氨基酸序列进行比较分析, 发现第 181、237 和 363 位氨基酸发生了突变, 而其它位置 (如第 198 位或 200 位) 均不变。

**关键词** 芒果炭疽病菌  $\beta$ -微管蛋白, 多菌灵抗药性, 点突变

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2004) 06-0827-03

芒果炭疽病是芒果的严重病害, 其病原菌为 *Colletotrichum gloeosporioides* Penf (C. g. M.)。我国长期以来主要依赖多菌灵等苯并咪唑类杀菌剂进行防治, 取得了很好的效果。但多菌灵等苯并咪唑类杀菌剂是单作用位点的内吸性杀菌剂, 病菌容易产生抗药性。由于此类药剂被长期频繁的大量使用, 某些热带地区的芒果园中已出现了病菌对其敏感性下降而导致防效显著降低的现象, 笔者 2002 年在广东省湛江市和海南省海口市的某些果园中检测到了高频率的抗药性 (另文报道)。

苯并咪唑类杀菌剂的作用机理主要是与病菌的  $\beta$ -微管蛋白结合影响微管的形成, 从而阻止细胞的有丝分裂, 而抗药性的产生主要是  $\beta$ -微管蛋白基因发生点突变, 使氨基酸的三维结构改变, 从而降低了药剂的亲合力, 使病菌表现抗药性<sup>[1]</sup>。大多数植物病原真菌田间抗药性菌株的突变位点是  $\beta$ -微管蛋白的第 198 或 200 位氨基酸<sup>[3-5]</sup>。但也有因其它位点突变而引起抗药性的报道<sup>[6-9]</sup>。目前还未见有关芒果炭疽病菌对多菌灵抗药性的研究报道, 因此, 本研究以在广东和海南等热带地区芒果园检测到的田间抗药性菌株为材料, 对抗、感菌株  $\beta$ -微管蛋白基因进行了克隆和全序列测定, 以明确  $\beta$ -微管蛋白基因是否存在突变位点, 探究芒果炭疽病菌对多菌灵产生抗药性的分子机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 4 个芒果炭疽病菌供试菌株均由本实验室分离保存, 包括 2 个田间抗性菌株 ZR51 和 ZR43, 2 个敏感菌株

ZS19 和 ZS44。其中两个抗性菌株在含 500 $\mu$ g/mL 多菌灵的平板上仍能生长良好, 而两个敏感菌株的 MIC (minimal inhibitory concentration) 分别为 0.110 $\mu$ g/mL 和 0.130 $\mu$ g/mL (另文报道)。

**1.1.2 质粒、转化受体菌种和试剂** : pMD18-T Vector, *Escherichia coli* JM109, T4DNA 连接酶, X-Gal, IPTG,  $\lambda$  DNA/HindIII Markers, BamH I, Premix Taq, dNTPs, Marker DL2000 均为 TaKaRa 公司产品, 其它常用化学试剂为国产分析纯。

### 1.2 DNA 的提取

参照文献 [2] 的方法并略有改进。先用灭过菌的接种针挑取培养 4d 的供试菌的菌落边缘菌丝体, 放入 PD 液体培养基中摇菌培养 6d, 然后以 4000r/min 离心 10min 收集菌体, 再置于冷冻真空干燥器中干燥。将干燥的菌体进一步用于 DNA 的提取。

### 1.3 引物的设计

参照 GenBank 中 (ACCESSION : U14138, M90977) 豆科合萌属炭疽病菌 [*Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Aeschynomene* (C. g. A.)] 的  $\beta$ -微管蛋白基因 *tub1* 和 *tub2* 全序列, 分别设计两对引物 P<sub>1-1</sub> (5'-ACGCAGGTGAAGACACTGGTT-3') 和 P<sub>1-2</sub> (5'-TGCCAGTGAAATTATGAGGGA-3') 和 P<sub>3-1</sub> (5'-CCTATCCTCGGT-CAAGCCCA-3') 和 P<sub>3-2</sub> (5'-GAAGCCCATGTCTTGGCAAA-3') 扩增 C. g. M 的  $\beta$ -微管蛋白基因全序列, 理论上这两对引物能扩增的片段长度约为 1671bp 和 1995bp。引物委托北京三博远志生物技术责任有限公司合成。

### 1.4 $\beta$ -微管蛋白基因的克隆和鉴定

$\beta$ -微管蛋白基因的 PCR 扩增反应体系 (50 $\mu$ L) : 25 $\mu$ L

基金项目: 农业部农业结构调整重大技术研究专项项目 (2002-15-01A)

\* 通讯作者。Tel 86-898-23300141; Fax 86-898-23300107; E-mail: zwbhyjs@public.dzptt.hi.cn

作者简介: 詹儒林 (1968 - ), 男, 广东人, 助理研究员, 硕士, 主要研究方向为分子植物病理学。Tel : 86-759-2858093; Fax : 86-759-2859124; E-mail : zhanrulin555@163.com

收稿通知 2004-03-15, 修回日期 2004-07-14

Premix *Taq* ( 1.25U/25 $\mu$ L ) , 1 $\mu$ L ( 100ng ) DNA Templates ,  $P_{1-1}$  (  $P_{3-1}$  )和  $P_{1-2}$ (  $P_{3-2}$  )均为 5mmol/L 各取 4 $\mu$ L ,16 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。反应条件 94 $^{\circ}$ C 5 min 94 $^{\circ}$ C 1 min 55 $^{\circ}$ C 30s 72 $^{\circ}$ C 2min 30 个循环 72 $^{\circ}$ C 10 min 4 $^{\circ}$ C保存。取反应产物 10 $\mu$ L 进行电泳分析。

采用 TaKaRa 公司的 DNA 回收试剂盒对各供试菌株的 PCR 目的片段进行回收和纯化 ,并克隆于 pMD18-T 载体中。又分别转化 *E. coli* JM109 ,并涂布在含氨苄青霉素、X-Gal 和 IPTG 的 LB 培养平板上 ,过夜培养后挑选白色菌落进行小量培养 ,并提取质粒 DNA ,通过酶切鉴定重组质粒。委托上海孟德基因有限责任公司对所获得的不同菌株的目的片段进行  $\beta$ -微管蛋白基因序列的测定。

1.5 抗、感菌株  $\beta$ -微管蛋白基因全序列的比较 :比较 C. g. M 与 C. g. A 的  $\beta$ -微管蛋白基因的同源性及两者的变异位点 ;以 DNAssist 分析软件比较 C. g. M 抗、感菌株  $\beta$ -微管蛋白基因的

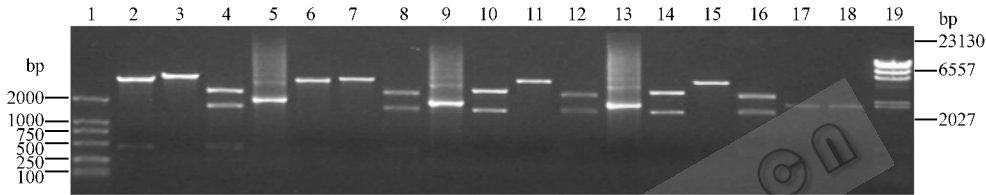


图 1 酶切及 PCR 法鉴定重组质粒 DNA 图谱

Fig. 1 Map of enzyme digested and PCR amplified products of recombinant plasmids DNA

1. Marker DL2000 ; 2 , 6 , 10 , 14. Digested by *Bam*H I ; 3 , 7 , 11 , 15. Digested by *Hind*III ; 4 , 8 , 12 , 16. Digested by *Bam*H I and *Hind*III ; 18. PCR product of ZS44 isolate ; 19.  $\lambda$  DNA / *Hind*III Markers.

2.3 C. g. M  $\beta$ -微管蛋白基因全序列及抗、感菌株  $\beta$ -微管蛋白基因氨基酸序列的比较

各菌株的目的片段经测序后得到的 DNA 长度约 2kb ,其核苷酸序列与 C. g. A *tub2* 同源性达 99.3% ,其中含 6 个内含子。编码核苷酸序列长为 1344bp ,编码 447 个氨基酸 ,与 C. g. A *tub2* 基因的氨基酸同源性达 99.6% ,因此可以断定所获目的片段均含  $\beta$ -微管蛋白 *tub2* 基因。C. g. A 与 C. g. M 的 *tub2* 氨基酸序列也偶有不同 ,如 198 和 371 位。

核苷酸的序列比较发现 ,抗、感菌株间存在着不少碱基的差异 ,但只有在第 1024、1192 和 1623 位碱基的突变才导致编码氨基酸的改变 ,在上述位点 ,敏感菌株中分别为 G、A 和 A 抗性菌株中分别为 A、G 和 T。这 3 个碱基的突变相应地导致了编码第 181、237 和 363 位氨基酸的改变 ,敏感菌株中分别为赖氨酸( Lys ) 丙氨酸( Ala )和亮氨酸( Leu ) ,抗性菌株中分别为谷氨酸( Glu ) 苏氨酸( Thr )和甲硫氨酸( Met )。其它位点(如第 198 或 200 位点)均没有发现变异。

3 讨论

对许多真菌来说 ,其抗药性与  $\beta$ -微管蛋白基因变异有关 ,而且主要是由于个别碱基的变化而产生抗药性的。常见的现象是  $\beta$ -微管蛋白基因的第 198 位氨基酸的编码碱基发生变化 ,如在粗糙脉孢菌( *Neurospora crassa* )的抗性突变中 ,原来编码的甘氨酸变成了谷氨酸<sup>[3]</sup> ,在灰霉病菌( *Botrytis cinerea* )中 ,谷氨酸变成了丙氨酸<sup>[4]</sup> ,而在苹果黑星病菌( *Venturia inaequalis* )中 ,该位点的氨基酸突变随着抗药性水平的高

核苷酸和氨基酸全序列 ,找出突变点。

2 结果和分析

2.1 C. g. M  $\beta$ -微管蛋白基因的 PCR 扩增

在  $P_{1-1}$ 、 $P_{1-2}$  和  $P_{3-1}$ 、 $P_{3-2}$  两对引物中 ,只有后者扩增到约 2kb 的特异片段 ,与理论扩增片段大小( 1995bp )相近。

2.2 C. g. M  $\beta$ -微管蛋白基因的 PCR 产物的克隆和鉴定

图 1 表明 ,*Bam*HI 有两个酶切位点 ,有两条带 ;*Hind*III 有一个酶切位点 ,只出现一条带 ,大小为载体和插入片段之和 ,约 468( 2692 + 1995 )bp ;*Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切后可见有 3 条带 ,其中一条带分子量较小 ,约 500bp。可以推断该质粒中存在插入片段 ,且该片段中存在 *Bam*HI 酶切位点。经 PCR 法进一步验证 ,插入片段的大小与以基因组为模板所扩增的片段大小一致。以上证据可确定目的片段已插入到载体中。

低而不同 ,在高抗菌株中 ,原来的谷氨酸变成丙氨酸 ,中抗菌株中 ,则由谷氨酸变成甘氨酸<sup>[5]</sup>。除了在 198 位氨基酸基因序列发生变化以外 ,不同的植物病原菌还可在其他位置发生突变而产生抗药性。在构巢曲霉( *Aspergillus nidulans* )中 ,导致抗药性的基因突变发生在微管蛋白 *benA* 基因上<sup>[6]</sup>。在绒泡菌属( *Phyvarum* spp. )中 ,引起抗药性的突变分别发生在 4 个基因位点上 ,它们分别是 *benA*、*benB*、*benC*、*benD*<sup>[7]</sup>。在酿酒酵母( *Saccharomyces cerevisiae* )中 ,导致抗药性的突变发生在 *tub2* 基因的第 241 位氨基酸上 ,原来的精氨酸变成了组氨酸<sup>[8,9]</sup>。在苹果黑星病菌( *V. inaequalis* )中 ,导致抗药性的突变发生在第 200 位氨基酸上 ,原来的苯并氨酸变成了酪氨酸<sup>[5]</sup>。在本研究中 ,通过比较抗、感菌株的 *tub2* 基因氨基酸序列 ,发现在第 181、237 和 363 三个位点发生了突变 ,这些突变均有可能导致芒果炭疽病菌对多菌灵产生抗药性 ,说明该菌对多菌灵产生抗药性的分子机制与其它真菌可能相同 ,

都是  $\beta$ -微管蛋白基因发生点突变 ,但突变的氨基酸位点比较特殊 ,与已有的报道均不相同 ,不是常见的第 198 位或 200 位的突变 ,因此还有待进一步通过定向突变检测等研究确认 3 位氨基酸突变与 C. g. M 对多菌灵抗感性间的关系。

上述的分析发现 ,在发生抗药性突变的菌株中 , $\beta$ -微管蛋白各种氨基酸的变化并没有一定的规律 ,不同的病原菌或同一病菌在不同位点上并没有发现由某些固定的氨基酸所控制 ,但个别氨基酸的改变有可能导致  $\beta$ -微管蛋白三维构象的变化 ,降低了药剂与  $\beta$ -微管蛋白的亲合力而引起抗药性。另外 ,通过比较病原菌抗、感菌株的形态特征、生长速率、产

孢能力及致病力等生物学功能,发现抗性菌株在这些方面并没有特异性,与抗性水平的高低没有相关性(另文报道)。说明了真菌抗性菌株的微管蛋白在结构上虽然有了细微的变化,但这种变化并不损害微管系统的正常功能。

本研究获得了 C. g. M  $\beta$ -微管蛋白的全基因序列,该基因氨基酸序列与 C. g. A *tub2* 的同源性达 99.6%,可肯定此基因为 C. g. M 的 *tub2* 基因,但 C. g. A 有两条  $\beta$ -微管蛋白<sup>[12]</sup>,而在 C. g. M 中只扩增到 *tub2* 基因。抗药性分子机理分析表明,在  $\beta$ -微管蛋白氨基酸发生突变而引起对杀菌剂产生抗药性的具有二条  $\beta$ -微管蛋白的真菌中,*tub2* 基因的突变是形成抗药性的主要原因<sup>[10,11]</sup>,而也有报道将抗药性菌株的 *tub1* 基因转化到野生敏感菌株中后也能产生抗药性的现象<sup>[12]</sup>。因此在本研究中,对所获得的 *tub2* 基因全序列进行比较分析,对探究芒果炭疽病菌抗药性的分子机理具有重要意义。

炭疽病是芒果上的主要病害,本研究获得了 C. g. M  $\beta$ -微管蛋白的全基因序列并初步明确了其对多菌灵产生抗药性的机制,在此基础上可以通过定向突变等方法检验其真实性,然后进一步采用分子生物学技术如 Real-time PCR 快速、简便地监测田间抗药性群体的发展动态,这对于治理抗药性、延长药剂的使用寿命及降低生产成本具有重要的意义。致谢 对中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室的张树珍研究员所提供的帮助表示衷心感谢。

参 考 文 献

[ 1 ] 周明国,叶钟音.植物病原菌对苯并咪唑类及相关杀菌剂的抗药性.植物保护,1987,13(2):31-33.  
[ 2 ] Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lters in Applied Microbiology*, 1985, 1: 17-20.

[ 3 ] Koenrad H, Jones A L. Resistance to binomyl conferred by mutation in codon 198 or 200 of the beta-tubulin gene of *Neurospora crassa* and sensitivity to diethofencarb conferred by codon 198. *Phytopathology*, 1993, 83(8):850-853.  
[ 4 ] Yanden 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(12):1478-1483.  
[ 5 ] Koenraad H, Sonerville S C, Jones A L. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl resistant field strains of *Venturia inaequalis* other plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, 1992, 82(11):1348-1354.  
[ 6 ] May G S, Tsang M L-S, Smith H, et al. *Aspergillus nidulans*  $\beta$ -tubulin genes are unusually divergent. *Gene*, 1987, 55:231-243.  
[ 7 ] Burland T G, Schedl T, Gull K et al. Genetic analysis of resistance to benzimidazoles in *Physarum*: differential expression of  $\beta$ -tubulin genes. *Genetics*, 1984, 108:123-141.  
[ 8 ] Neff N F, Thomas J J, Grisafi P, et al. Isolation of the  $\beta$ -tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function *in vivo*. *Cell*, 1983, 33:211-219.  
[ 9 ] Thomas J H, Neff N F, Botstein D. Isolation and characterization of mutation in the  $\beta$ -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1985, 112:715-734.  
[ 10 ] Buhr T L, Dickman M B. Isolation and characterization of a  $\beta$ -tubulin-encoding gene from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene*. *Gene*, 1993, 124:121-125.  
[ 11 ] Osmani S A, Oakley B R. Cell cycle and tubulin mutations in filamentous fungi. In: Bennet J W, Lasure L L, ed. New York: More Gene Manipulations in Fungi. Academic Press, 1991, 107-125.  
[ 12 ] Panaccione D G, McKiernan M, Hanau R M. *Colletotrichum graminicola* transformed with homologous and heterologous benomyl-resistant genes retains expected pathogenicity to corn. *MolPlantMicrobe Interact*, 1988, 1:113-120.

Cloning of  $\beta$ -Tubulin Gene and Their Correlation with Conferred Carbendazim Resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz in Mango

ZHAN Ru-Lin<sup>1</sup>    ZHENG Fu-Cong<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Southern Subtropical Crops Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang 524091, Zhanjiang, China)  
(<sup>2</sup> Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

**Abstract**: The total DNA isolated from MBC-resistant and MBC-sensitive isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (C. g. M) of mango were used as templates in PCR amplification using consensus oligo nucleotide primers designed according to the known sequence data of  $\beta$ -tubulin-encoding gene (*tub1* and *tub2*) of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschyromene* (C. g. A). Only the primers designed according to C. g. A *tub2* amplified specific fragments. These amplified fragments were cloned and sequenced. The results showed that these fragments have 1344bp and deduced 447 amino acid, which were highly homologous to C. g. A *tub2*. MBC-resistant isolates did not carry the allelic mutation at amino acid codes 198 and 200 of  $\beta$ -tubulin gene in comparison with the sensitive isolates. However, the amino acid altered in codes 181, 237 and 363.

**Key words**: *Colletotrichum gloeosporioides* Penz  $\beta$ -tubulin gene, Carbendazim-resistance, Single base-pair point mutation

Foundation item: The Special Project of Great Technological Research in Agricultural Restructure of Agriculture Ministry  
\* Corresponding author. Tel: 86-898-23300141; Fax: 86-898-23300107; E-mail: zwbhyjs@public.dzptt.hi.cn  
Received date: 03-15-2004