

禾谷镰孢菌 α -微管蛋白基因克隆及其与多菌灵抗药性关系分析

陈长军 李俊 祁之秋 王建新 周明国*

(南京农业大学植保学院 南京 210095)

摘 要 根据禾谷镰孢菌参考菌株 NRRL31084(PH-1)的 α -微管蛋白基因核苷酸序列设计 4 对引物,采用 PCR 方法克隆并测序了禾谷镰孢菌 (*Fusarium graminearum*) 对多菌灵(MBC)不同敏感性表型的 6 个中国菌株的 α -微管蛋白基因全序列。DNA 序列对照表明中国的 3 个敏感菌株和 3 个抗药菌株的 α -微管蛋白基因核苷酸序列同源性没有差异,多菌灵抗药性与 α -微管蛋白无关。该基因全长 1718bp,含有 6 个内元,编码 449 aa;与 NRRL31084 的 α -微管蛋白基因核苷酸序列同源性为 99%,存在 5 个差异核苷酸,与其所编码的氨基酸序列同源性为 99.78%;与其他 6 种真菌 α -微管蛋白基因所编码的氨基酸序列同源性为 37%~86%。

关键词 禾谷镰孢菌 α -微管蛋白基因,多菌灵抗药性

中图分类号 S482.2 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)02-0288-04

禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)是中国小麦赤霉病的主要致病真菌。中国长期以来主要采用多菌灵在扬花期喷雾,取得了较好的防治效果。多菌灵是具有内吸性的苯并咪唑类杀菌剂,一般使用 2~3 年后,会出现许多抗药性病原菌^[1-3]。但中国连续使用多菌灵防治小麦赤霉病近 20 年后,1992 年才首次检测到对多菌灵具有抗性的禾谷镰孢菌田间抗性菌株。尽管华东地区中、高抗药性菌株在群体中的比例不断上升^[4],但其它地区至今仍没有关于禾谷镰孢菌对多菌灵的抗性报道。

许多研究表明,苯并咪唑类杀菌剂的作用机制是与病原菌的 β -微管蛋白结合,阻止其与 α -微管蛋白组装微管或使已组装的微管解聚,使纺锤体不能形成,阻止真菌细胞的有丝分裂^[5]。对几种植物病原菌抗药性的分子生物学研究表明,病原菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性主要是因编码 β -微管蛋白 198~200 位氨基酸的单核苷酸突变,使 198 位的谷氨酸改变为丙氨酸或甘氨酸或赖氨酸而表现高水平抗药性,或使 200 位苯并氨酸改变为酪氨酸而表现中等水平的抗药性。这是因为单个氨基酸的改变导致了蛋白质的三维构象改变,从而阻止或降低了药剂与靶标结合^[4,5]。在人工诱变菌株中除上述位点外还涉及 β -微管蛋白其它一些位点,如 165、257 等位的氨基酸变异^[6]。虽然遗传学研究表明,禾谷镰

孢菌对多菌灵的抗药性与其它许多真菌一样,是由单个核基因控制的^[7],但是禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)对多菌灵(Carbendazim, MBC)的抗药性机制并非像其它丝状真菌那样由于 β -微管蛋白基因突变所致^[9,10]。本文旨在进一步研究与 β -微管蛋白装配微管的另一组份 α -微管蛋白基因是否发生基因突变而导致该病原菌对多菌灵抗药性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 :用于 α -微管蛋白克隆的 6 个菌株,包括 3 个野生敏感菌株 ZF43、ZF2032 和 ZF43-2 (多菌灵的 EC_{50} 分别为 0.5414 μ g/mL、0.6288 μ g/mL 和 0.8015 μ g/mL,菌株缩写为 S),1 个田间中抗菌株 ZF5X (EC_{50} 为 8.8766 μ g/mL,MR),1 个田间高抗菌株 JT04 (EC_{50} 为 20.9495 μ g/mL,HR),1 个室内诱导高抗突变体 ZF52-7 (EC_{50} 为 20.6620 μ g/mL,HR)。

1.1.2 试剂 :pGEMT Easy Vector 为 Promega 公司产品,Amp、X-Gal、IPTG、dNTP 和 Taq 酶购于上海 Sangon 公司。

1.2 基因组 DNA 提取

预培养的菌碟转入绿豆汤液体培养基(绿豆 20g,去离子水 1000mL,煮沸 30min,过滤,取上清即可),25 $^{\circ}$ C 摇培 6d,产孢后将孢子转入 PS(马铃薯

基金项目 国家自然科学基金项目(30070510,30200181),国家“863 计划”(2002AA244041)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-25-84395641 E-mail:mgzhou@mail.njau.edu.cn

作者简介 陈长军(1967-)男,江苏盐城人,助理研究员,博士,主要从事农药学及其抗药性分子机制等方面的研究。E-mail:ccj100cn@163.com

收稿日期 2004-09-03,修回日期 2004-12-30

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 DNA 提取缓冲液(100mmol/L LiCl; 10mmol/L EDTA; 10mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 10g/L SDS),充分震荡,60 $^{\circ}$ C 温育 60min,用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 2 次至无中间层,上清液加 1 倍体积异丙醇沉淀,离心,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 0.9% 琼脂糖电泳检测。

1.3 PCR 方法分段扩增 α -微管蛋白基因

根据小麦赤霉病菌全基因数据库禾谷镰孢菌参考菌株 PH-1 α -微管蛋白基因 DNA 序列(FG00639.1 TBA-SORMA tubulin α -chain)设计 4 对引物(表 1),其中引物对 F4 和 R5 及引物对 α -F 和 Rm 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 5min,94 $^{\circ}$ C 1min,54 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2.5min,36 个循环,72 $^{\circ}$ C 15min。引物对 α -Ri 和 α -Fi 及引物对 Fm 和 α -Rr 的退火温度分别为 56 $^{\circ}$ C 2 min,55 $^{\circ}$ C 1min,其他条件同引物对 F4 和 R5。PCR 反应体系 50 μ L: ddH₂O 37.5 μ L, dNTP 0.2 μ mol/L, 10 \times buffer(10mmol/L Tris-HCl, 50mmol/L KCl, 0.1% Triton 100) 5 μ L, MgCl₂ 2mmol/L, Primer X(所需扩增片段的上游引物) 1 μ mol/L, Primer Y(所需扩增片段的下游引物) 1 μ mol/L, Taq 聚合酶 2.5U, 模板 DNA 100ng。

表 1 用于禾谷镰孢菌 α -微管蛋白基因全序列扩增的 PCR 引物

Table 1 Primers synthesized for PCR of the α -tubulin gene of *F. graminearum*

Primers	Primer length/bp	Nucleotide positions *	Sequences 5' ~ 3'
R5	18	1400 ~ 1393	TTCTCGGGAGCCTGGTAG
F4	21	756 ~ 776	AGAGCAAGCTGGAGTTCTGTG
α -F	21	1 ~ 21	ATGCGTGAGGTCATTAGCATC
Rm	18	1265 ~ 1281	CGTACCACGGTACAACA
α -Ri	18	675 ~ 692	AAAAGGTGAGGAAGCCAC
α -Fi	19	3 ~ 21	GCGTGAGGTCATTAGCATC
Fm	20	812 ~ 831	CGAGCCCTACAACCTCTATCC
α -Rr	25	1718 ~ 1694	TTAGTACTCAGCCTCCAACCTCTCA

* The corresponding position on the nucleotide sequence of the α -tubulin gene from *F. graminearum*.

1.4 PCR 扩增产物纯化和序列同源性分析

合成的 PCR 产物进行胶回收,分别与 pGEMT Easy Vector 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,将测序结果用 Bioedit 软件分析。

Bioedit 分析序列,检索 GenBank 和 EMBL 基因数据库,通过 BLAST 比较与参考菌株的 α -微管蛋白基因同源性和禾谷镰孢菌与其他常见真菌 α -微管蛋白基因的同源性,明确禾谷镰孢菌对多菌灵的抗性和敏感菌株的基因之间有无核苷酸突变位点。

2 结果和分析

2.1 禾谷镰孢菌 α -微管蛋白基因的序列分析

利用表 1 中 4 对引物对禾谷镰孢菌 α -微管蛋白基因分段扩增的 PCR 产物,经测序,获得禾谷镰孢菌的 α -微管蛋白基因(基因登录号为 AY860418)全长 1718 bp,包含 6 个内含子,分别起始于禾谷镰孢菌 α -微管蛋白基因编码的第 9、22、31、57、234、265 个氨基酸,大小分别为 94 bp、56 bp、63bp、52bp、50bp、57bp。阅读框 G + C 的 mol% 为 54.19,有 7 个编码区,分别位于 1 ~ 25bp、120 ~ 160bp、221 ~ 246bp、307 ~ 383bp、436 ~ 965bp、1013 ~ 1433bp、1493 ~ 1718bp 间,共 1350 bp,编码 449 个氨基酸,分子量为 49.97kD,理论等电点(pI)为 4.98,具有磷酸结合位点(第 142 ~ 148 个氨基酸)和 GTP 结合位点(第 60 ~ 65 个氨基酸),多个 N-十四烷基化、蛋白质 C 磷酸化和酪蛋白 II 磷酸化位点。

2.2 同源性比较

测定的 6 个对多菌灵不同敏感性中国菌株的核苷酸序列完全一致,说明中国菌株的 α -微管蛋白基因核苷酸序列保守性强。但通过 BLAST 与禾谷镰孢菌参考菌株 NRRL31084 α -微管蛋白基因全序列比较,共发现 5 个差异核苷酸,469 位 C \rightarrow T, 509 位 G \rightarrow C, 637 位 C \rightarrow G, 1056 位 C \rightarrow T, 1158 位 T \rightarrow C,其中 509 位核苷酸的差异,造成其编码的第 82 位丙氨酸(GCT)变成了脯氨酸(CCT);其他 4 个差异核苷酸均在氨基酸三联密码字的第 3 个核苷酸上,所编码氨基酸没有改变;与 NRRL31084 α -微管蛋白基因编码的氨基酸序列同源性 99.78%。与该菌微管蛋白基因家族的 α_2 -微管蛋白基因所编码的氨基酸序列同源性最高(69%),和其他成员所编码的氨基酸序列同源性 28% ~ 37% 和其他微管蛋白基因的同源性 46% ~ 52%。与其它 6 种真菌 α -微管蛋白基因所编码的氨基酸序列同源性在 37% ~ 86%(表 2),比较了禾谷镰孢菌对多菌灵的敏感和抗药菌株 α -微管蛋白基因的全序列,未发现任何位点的突变,表明禾谷镰孢菌对多菌灵产生抗药性不是由于 α -微管蛋白基因发生点突变所致。

表 2 禾谷镰孢菌与其他 6 种真菌的 α -微管蛋白基因的同源性比较Table 2 Comparison of the deduced amino acid sequence of α -tubulin gene from *F. graminearum* with that from other six-species of fungi

Fungi	Name of gene	Homology at amino acid level/%	Accession number of gene and protein	The number and size of introns
<i>Histoplasma capsulatum</i>	α_1 -tubulin	64	M28358 ,AAA61688.1	4(80 ,110 ,113 ,79 ,78)
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	α_2 -tubulin	80	AF321053 ,AAK11179.1	6(91 ,111 ,61 ,57 ,162 ,50)
<i>C. lagenarium</i>	α_1 -tubulin	70	AF321052 ,AAK11178.1	4(192 ,73 ,65 ,53)
<i>Septoria tritici</i>	α -tubulin	78	Y14509 ,CAA74849	4(103 ,119 ,56 ,58)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	α_1 -tubulin	66	K02841 ,AAA35350.1	1(190)
<i>S. pombe</i>	α_2 -tubulin	67	K02842 ,AAA35351.1	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	α_3 -tubulin	37	M28428 ,AAAA35181.1	- - - - - *
<i>Nurospora crassa</i>	αB -tubulin	86	X79404 ,CAA5594.1	- - - - -
<i>S. cerevisiae</i>	α_1 -tubulin	65	M28429 ,AAA35180.1	- - - - -

* No statistic figures for the full-length nucleotide sequence of gene was not obtained.

3 讨论

序列分析发现中国菌株和参考菌株 NRRL31084 (PH-1)之间存在 5 个差异核苷酸,可能是由于它们所处的地理环境差异造成了遗传多样性。参考菌株属于禾谷镰孢菌第七连锁群(Lineage),是北美和欧洲的优势种群,全世界均有分布,可引起大麦和小麦的赤霉病^[12]。该菌株从美国的 Michigan 洲分离得到产孢能力强,对大麦和小麦具有很强的致病力^[13]。

禾谷镰孢菌的微管蛋白基因家族是由 α -、 α_2 -、 β -、 γ -和 1 个未命名的微管蛋白基因组成^[14],它们和微管相关蛋白基因等因子相互作用构成细胞内复杂的微管网络系统,但 α -微管蛋白基因在翻译后最终能够形成同型(Isotype) α -微管蛋白的数量及其在时空上的表达规律等仍不清楚。

已知禾谷镰孢菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性不同于其它真菌由于 β -微管蛋白的改变造成对该类药剂的抗药性^[9,10]。也有一些报道表明,一些生物的 α -微管蛋白发生突变,也可引起对某些农药的抗性,例如,二硝基苯胺类除草剂^[15](Dinitroaniline)如氟乐灵(Trifluralin)和氨磺乐灵(Oryzalin)是作用于 α -微管蛋白的一类除草剂,杂草对其产生抗药性的机制是由于 α -微管蛋白基因(tau1)编码的第 239 位苏氨酸(Thr)突变为异亮氨酸(Ile)和第 268 位甲硫氨酸(Met)突变为苏氨酸(Thr),在原纤丝中 α -微管蛋白 239 位的苏氨酸靠近 α -微管蛋白和 β -微管蛋白组成的异二聚体相互作用部位。但是,本研究表明禾谷镰孢菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗性与 α -微管

蛋白无关。

虽然串珠镰孢(*F. moniliforme*)^[16]、*F. lycopersici*^[17]和尖镰孢(*F. oxysporum*)^[18]对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性生化机制各不相同,但和其它大多数病原真菌一样均是由于 β -微管蛋白基因突变造成对该类药剂的抗药性。禾谷镰孢菌的多菌灵抗性菌株能够正常生长和发育,具有很高的适合度^[19],这说明该菌的抗药基因编码的蛋白可以降低与多菌灵的结合,但还不足以引起抗药菌株生存能力的下降。禾谷镰孢菌对多菌灵抗性菌株和敏感菌株的 α -、 β -微管蛋白基因没有发生突变,因此可以进一步从 α_2 -和 γ -微管蛋白和微管相关蛋白等基因探寻禾谷镰孢菌对多菌灵的抗药性基因。

参 考 文 献

- [1] Bollen G J ,Scholten G. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Netherlands Journal of Plant Pathology* ,1971 **77** :83 - 90.
- [2] Schroeder W T ,Providenti R. Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits. *Plant Disease Reporter* ,1969 **53** :271 - 275.
- [3] Wicks T. Tolerance of the apple scab fungus to benzimidazole fungicides. *Plant Disease Reporter* ,1974 ,**58** :886 - 889.
- [4] 王建新,周明国,陆悦建,等. 小麦赤霉病菌抗药性群体动态及其治理药剂. 南京农业大学学报 2002 **25** (1) :43 - 47.
- [5] Fujimura M , Kanakura T , Yamaguchi I. Action mechanism of diethofencarb to a benzimidazole -resistant mutant in *Neurospora crassa* . *J Pesti Sci* ,1992 ,**17** :237.
- [6] Koeneaade 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. *Phytopathology* ,1993 **83** :850 - 854.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [7] Yarden O ,Katan T. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 on beta-tubulin that correlates with benomyl resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* , 1993 **83** :1478 – 1483.
- [8] Yan K ,Dickman M B. Isolation of a β -tubulin gene from *Fusarium moniliforme* that confers cold-sensitive benomyl resistance. *Applied and Environmental Microbiology* ,1996 **62**(8) 3053 – 3056.
- [9] 李红霞 ,陆悦健 ,王建新 ,等. 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. *微生物学报* ,2003 **43** (4) 424 – 429.
- [10] 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.
- [11] 袁善奎 ,周明国. 玉蜀黍赤霉(*Gibberella zeae*)对多菌灵的抗药性遗传. *遗传学报* ,2003 **30**(5) 474 – 478.
- [12] Trail F ,Common R. Perithecial development by *Gibberella zeae* : a light microscopy study. *Mycologia* ,2000 **92** , 130 – 138.
- [13] O 'donnell K , Kistler H C , Tacke B K , *et al.* Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum* , the fungus causing wheat scab. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2000 **97** :7905 – 7910.
- [14] <http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/antion/fusarium/findfeatures.cgi?page=showfeatures&FEATURETYPES=GENE&GENEBYHMMER=1&GENEPFAMNAME=tubulin>
- [15] Yamamoto E , Zeng L , Baird W V. Alpha-tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica*. *Plant Cell* ,1998 **10**(2) :297 – 308.
- [16] Ishii H ,Takeda H. Differential binding of a N-phenylformamidoxime compound in cell-free extracts of benzimidazole-resistant and -sensitive isolates of *Venturia nashicola* , *Botritis cinerea* and *Gibberella fujikuroi*. *Neth J Plant Pathol* ,1978 **95**(suppl.1) :99.
- [17] Gessler C , Sozzi D , Kern H. Benzimidazole fungicides : mode of action and problems (in German). *Ber Schweiz Bot Ges* ,1980 **90** : 50.
- [18] Gasztonyi M , Jisepovits G , Milnar A , *et al.* Biochemical background of resistance to benomyl in genetically different strains of *Fusarium oxysporum*. *Pestic Biochem Physiol* ,1987 **29** :17.
- [19] 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.

Cloning of α -tubulin gene from *Fusarium graminearum* and analyzing its relationship with carbendazim-resistance

CHEN Chang-jun LI Jun QI Zhi-qiu WANG Jian-xin ZHOU Ming-guo*

(College of Plant Protection , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : The full-length nucleotide sequence of α -tubulin gene from each of 6 *Fusarium graminearum* strains from China which had different carbendazim (MBC) sensitivity phenotypes were separated using PCR with 4 primer sets designed in accordance with nucleotide sequence of the gene from the reference isolate , NRRL 31084 (PH-1). The DNA sequence comparison showed that there was no difference in the nucleotide sequence of α -tubulin gene amongst 3 sensitive and 3 resistant strains from China. This result demonstrates that there is no relationship between MBC-resistance and α -tubulin gene. The full-length of the gene spans 1718 bp , including 6 introns , encoding 449 amino acids. With 99% homology , there is 5 nucleotide differences in α -tubulin gene between PH-1 isolate and the 6 strains from China. The homology of the deduced amino acid sequence of the gene is 99.78% between the 6 strains and PH-1 isolate , and 37% ~ 86% between the 6 strains and other 6 species of fungi.

Key words : *Fusarium graminearum* , α -tubulin gene , MBC-resistance