

## 水稻恶苗病菌 (*Fusarium fujikuroi*) $\beta$ -微管蛋白基因克隆及与多菌灵抗药性关系

马晓伟, 邢春杰, 于金凤, 王勇, 陈子豪, 王建新, 周明国, 陈长军\*

南京农业大学植物保护学院, 江苏省农药学重点实验室, 南京 210095

**摘要:** 【目的】揭示水稻恶苗病菌 (*Fusarium fujikuroi*) 对多菌灵的抗药性与其  $\beta$ -微管蛋白基因的相关性。【方法】结合形态学和 *TEF-1 $\alpha$*  基因序列对分离菌株进行鉴定; 根据近源种拟轮枝镰孢菌 (*Fusarium verticillioides*) 核基因组测序菌株 7600 的  $\beta$ -微管蛋白核苷酸序列设计引物, 采用 PCR 方法克隆并比对分析了 *F. fujikuroi* 对多菌灵不同敏感性表型的 5 个菌株的  $\beta$ -微管蛋白基因全序列; 利用实时定量技术 (qRT-PCR) 分析了  $\beta$ -微管蛋白基因在上述 5 个菌株中的表达特性。【结果】*F. fujikuroi* 的  $\beta$ -微管蛋白基因核苷酸序列 (GenBank 登录号: JQ026022) 全长 1671 bp, 包含 4 个内含子, 编码 447 个氨基酸残基; 2 个敏感性菌株和 3 个抗药性菌株的  $\beta$ -微管蛋白基因核苷酸序列同源性 100%; 在无药剂处理下该基因在 2 个敏感性菌株中的表达水平显著高于 3 个抗药性菌株 ( $p = 0.05$ ), 且对同一菌株而言, 药剂处理能够显著提高  $\beta$ -微管蛋白基因表达水平 ( $p = 0.05$ ), 但在相同药剂处理条件下, 菌株间差异不显著。【结论】*F. fujikuroi* 对多菌灵的抗药性机制与  $\beta$ -微管蛋白无关, 有待进一步研究。

**关键词:** 水稻恶苗病菌,  $\beta$ -微管蛋白基因, 表达特性, 多菌灵抗药性

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012)05-0581-07

水稻恶苗病是各水稻产区的主要病害之一, 在我国分布极广, 常造成严重的产量损失。过去通常认为恶苗病的病原菌无性态为串珠镰孢菌 (*Fusarium moniliforme* Sheld), 有性态为藤仓赤霉 (*Gibberella fujikuroi*)。目前的研究表明, *F. moniliforme* 是建立在一个宽泛的“种”的概念基础之上, 有性态为藤仓赤霉复合种 (*Gibberella fujikuroi* species complex, GFC)。近年来, 随着分子生物学等技术的不断发展和完善, 该技术广泛用于植物病原菌的鉴定, 作为常规形态学鉴定的补充, 如镰孢属

内病原菌鉴定<sup>[1]</sup>。2003年 Seifert 等提出将“*F. moniliforme*”种名废弃<sup>[2]</sup>。目前研究认为, 水稻恶苗病的病原菌为拟轮枝镰孢菌 (*Fusarium verticillioides*)、水稻恶苗病菌 (*Fusarium fujikuroi*) 和层出镰孢菌 (*Fusarium proliferatum*), 病株典型症状为徒长, 植株细弱, 叶片狭长, 黄化, 受到病原菌侵染的种子萌发率下降, 其中 *F. fujikuroi* 致病力最强<sup>[3]</sup>。

到目前为止, GFC 复合种至少由 10 个不同的交配群组成, 该复合种内成员形态特征非常相似, 难以

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171880, 30971891)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-84395641; E-mail: ccj100cn@yahoo.com.cn

作者简介: 马晓伟 (1987-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为杀菌剂毒理与抗药性。E-mail: maxiaoweiyang@126.com

收稿日期: 2011-12-08; 修回日期: 2012-02-26

区分,例如 *F. proliferatum* 和 *F. fujikuroi*,仅采用形态分类学方法常导致鉴定错误<sup>[4]</sup>,因此,TEF-1 $\alpha$  基因被广泛用于 GFC 复合种内的病原菌分子生物学鉴定<sup>[5]</sup>。

苯并咪唑类杀菌剂具有广谱、高效、作用靶标位点单一和内吸性特点。其代表品种多菌灵 (Carbendazim, MBC) 和以多菌灵为主的混/复配药剂被广泛用于防治镰孢菌引起的病害。该类杀菌剂主要作用于病原菌的  $\beta$ -微管蛋白,由于药剂作用位点单一,选择性强,病原菌在药剂选择压力下很容易产生抗药性<sup>[6]</sup>。1996年, Yan K 等发现,在 *F. moniliforme* 中,  $\beta$ -微管蛋白基因 (GenBank 登录号: U27303.1) 突变导致该病原菌对多菌灵杀菌剂产生抗药性<sup>[7]</sup>,但该研究并未明确该菌株的种类,根据其在 NCBI 数据库公布的基因序列,可以确定其研究菌株为 *F. verticillioides*,有性型为 GFC 交配群 A。1997年,陆悦健等仅克隆了 871 bp 的水稻恶苗病菌  $\beta$ -微管蛋白基因,未发现与多菌灵抗药性相关的突变<sup>[8]</sup>,但是,作者没有明确所研究病原菌的具体种名,所以,到目前为止,仍然不能确定我国 *F. fujikuroi* 对多菌灵抗药性机制。为此,本研究 2010 年在江苏盐城地区采集水稻恶苗病病株,进行病原菌分离与单孢纯化,依据形态学和 TEF-1 $\alpha$  基因检测结果进行鉴定,得到 5 株对多菌灵具有不同敏感性的 *F. fujikuroi* 菌株,从  $\beta$ -微管蛋白全基因入手,研究其与多菌灵产生抗药性的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株:**2010 年从江苏盐城地区采集发病株并进行单孢分离,得到 5 株对多菌灵具有不同敏感性的水稻恶苗病菌 (*F. fujikuroi*) 菌株,包括 2 个野生敏感性菌株 YC3、YC15 (多菌灵的 EC<sub>50</sub> 分别为 1.47 和 1.52  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MIC < 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 菌株缩写为 S), 2 个田间中抗菌株 YCA、YCB (EC<sub>50</sub> 分别为 3.34 和 3.21  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  < MIC < 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MR), 1 个田间高抗菌株 YC42 (EC<sub>50</sub> = 5.44  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , MIC > 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , HR)。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**DNA 胶回收纯化试剂盒、高保真 LA Taq DNA 聚合酶、pMD19-T 载体、总 RNA 提取试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 及其他生化试

剂均购自宝生物工程 (大连) 有限公司,实时定量 PCR 仪 (ABI7500, USA)。

### 1.2 总 DNA 的提取

参照参考文献 [9] 方法提取菌株 DNA, -20 $^{\circ}\text{C}$  保存,用于 TEF-1 $\alpha$  基因和  $\beta$ -微管蛋白基因全长的克隆。

### 1.3 病原菌鉴定

采用形态学和分子生物学相结合的方法进行病原菌鉴定。将菌株接种在 PSA 平板上, 25 $^{\circ}\text{C}$  下培养 7 d, 观察菌落形态与孢子形态; 参照参考文献 [5] 的方法设计引物, 扩增分离菌株的 TEF-1 $\alpha$  基因, 胶回收后送至上海生工生物工程技术有限公司双向测序。通过 NCBI 的 BLAST 程序进行同源性分析, 检索出相似性较高的序列, 使用 Clustal X 和 MEGA4.1 软件绘制系统进化树, 用 Bootstrap 分析评估树的稳定性。

### 1.4 $\beta$ -微管蛋白基因克隆与分析

参考近源种 *F. verticillioides* 核基因组测序菌株 7600 的  $\beta$ -微管蛋白核苷酸序列 (Broad Institute 登录号: FVEG\_04081.3), 在 ORF 的两端设计基因特异引物, 正向引物: 5'-CCCATTCTCTCCTCCTTC-3', 反向引物: 5'-TAGCGGCCAGTTATTTTCAG-3'。PCR 反应体系 25  $\mu\text{L}$ , 其中含有 1 单位的 LA Taq 酶、10  $\times$  buffer 2.5  $\mu\text{L}$ 、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.5  $\mu\text{L}$ 、2.5 mmol/L dNTP 4  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的正向引物和反向引物各 1  $\mu\text{L}$ 、DNA 模板 25 ng, ddH<sub>2</sub>O 补足至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min。PCR 产物经回收后连接到 pMD19-T 载体上, 送往上海生工生物工程技术有限公司进行 PCR 产物双向测序。

BioEdit 软件分析序列, 检索 GenBank 数据库, 通过 BLAST 比较与参考菌株及其他常见真菌的  $\beta$ -微管蛋白基因同源性, 明确水稻恶苗病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。

### 1.5 不同敏感性水平菌株中 $\beta$ -微管蛋白基因表达特性分析

**1.5.1 总 RNA 的提取:**参照参考文献 [9] 收集孢子, 将孢子分别转入空白和含多菌灵的 PS 中, 多菌灵浓度分别设为每个菌株 1 个 EC<sub>50</sub> 时的浓度, 250 r/min 摇床培养 24 h, 收集菌丝, 冻干, 根据 TaKaRa

说明书方法提取总 RNA 及合成 cDNA 第一链。将合成的 cDNA 第一链稀释 10 倍后,于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存,用于 qRT-PCR 分析。

**1.5.2 实时荧光定量 qRT-PCR 分析:**根据近源种 *F. verticillioides* 核基因组测序菌株 7600 的 actin 基因序列(Broad Institute 登录号:FVEG\_03116.3),设计内参基因特异引物为: actinF (5'-CGAGTGCCGAGAAGGAAG-3')/actinR (5'-TTGAAGCCGTCTGGAAGC-3')。根据本试验测序得到的  $\beta$ -微管蛋白基因转录因子序列设计基因特异引物为: $\beta$ -F (5'-TGCTCATCGCTTCCTCAG-3')/ $\beta$ -R (5'-ACCATTGTAGACACCATTGC-3')。反应体系 20  $\mu\text{L}$ ,其中含已稀释的 cDNA 2  $\mu\text{L}$ ,上、下游引物分别为 0.15 pmol/L,SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (2 $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ ,ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 补足至 20  $\mu\text{L}$ 。反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$  30 s;95 $^{\circ}\text{C}$  5 s,60 $^{\circ}\text{C}$  34 s 40 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$  15 s 60 $^{\circ}\text{C}$  1 min 95 $^{\circ}\text{C}$  15 s。数据分析采用 7500 system 软件和  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  的方法<sup>[10]</sup>,每个处理进行 3 次重复,采用 DPS 软件进行统计分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 形态学鉴定和分子鉴定

**2.1.1 形态学鉴定:**25 $^{\circ}\text{C}$  培养 7 d 后,菌落棉絮状,气生菌丝白色至淡芋紫,菌落背面呈白色、米黄色,或紫色(图 1-A);图 1 为菌株 YC15 形态特征,小型分生孢子多,适宜条件下可见串生,长椭圆形,无色透明,产孢梗为复瓶梗(图 1-B);大型分生孢子镰刀型,较直细 2-5 个隔膜,其中 3 个隔膜的居多(图 1-C),未见厚垣孢子,参考文献<sup>[4]</sup>初步鉴定为 *F. fujikuroi*。

**2.1.2 分子生物学鉴定:**5 株菌株的 TEF-1 $\alpha$  基因扩增结果如图 2 所示,对片段进行回收、测序,得到 650 bp 的序列,通过 NCBI 进行同源性比较,发现分离菌株的 TEF-1 $\alpha$  基因序列与 *F. fujikuroi* 该基因的核苷酸序列同源性达 99%。在构建的基于 TEF-1 $\alpha$  基因序列的系统发育树中(图 3),分离菌株与 *F. fujikuroi* (GQ848526) 和 *F. fujikuroi* (HQ622562) 聚合,且置信度高达 98%。

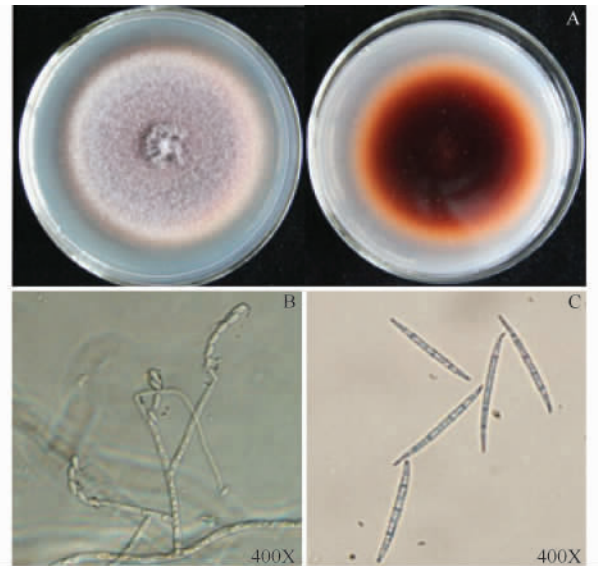


图 1 分离菌株的形态特征

Fig. 1 Morphology characteristics of isolated strains. A: Colony and mycelia; B: Conidiophore and microconidia; C: Macroconidia.

综合形态学和分子生物学特征,将分离菌株鉴定为 *F. fujikuroi*。

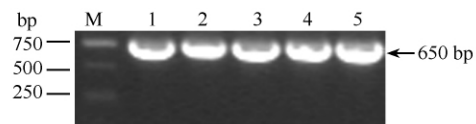


图 2 分离菌株的 TEF-1 $\alpha$ -PCR 扩增图谱

Fig. 2 TEF-1 $\alpha$ -PCR patterns of isolated strains. M: DL2000 DNA marker; 1-5: Isolates YC3, YC15, YCA, YCB and YC42.

### 2.2 $\beta$ -微管蛋白基因的扩增与序列分析

分离菌株的  $\beta$ -微管蛋白基因的扩增结果如图 4 所示,条带大小约为 1700 bp。对片段进行回收、测序,获得 *F. fujikuroi* 的  $\beta$ -微管蛋白基因的核苷酸序列(GenBank 登录号:JQ026022),全长 1671 bp,包含 4 个内含子,大小分别为 174 bp、58 bp、48 bp 和 50 bp;外显子(G+C)的 mol% 为 54.10,有 5 个编码区,分别位于 1-12、187-210、269-392、441-1230、1281-1671 bp 间,共 1341 bp,编码一个由 447 个氨基酸残基组成的蛋白。核苷酸序列分析表明,5 个对多菌灵不同敏感性菌株的  $\beta$ -微管蛋白基因核苷酸序列同源性为 100%,表明 *F. fujikuroi* 对多菌灵产生抗药性不是由  $\beta$ -微管蛋白基因发生点突变所致。

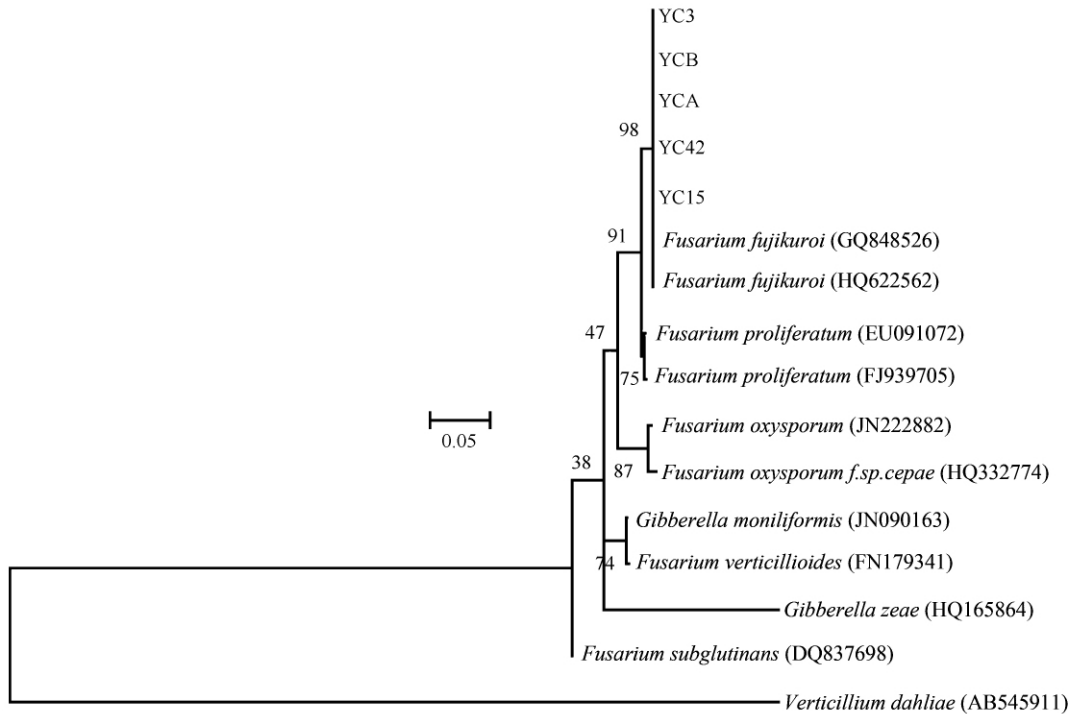


图3 基于 TEF-1 $\alpha$  基因序列构建的分离菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of isolated strains based on TEF-1 $\alpha$  gene sequences. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

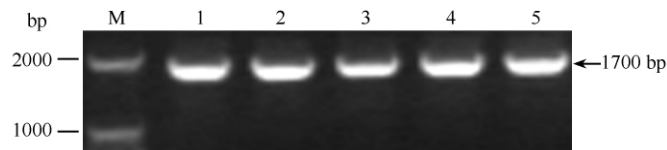


图4 分离菌株的  $\beta$ -微管蛋白基因的 PCR 产物电泳图谱

Fig. 4  $\beta$ -tubulin gene PCR patterns of isolated strains. M: DL2000 DNA marker; 1-5: Isolates YC3, YC15, YCA, YCB and YC42.

### 2.3 不同敏感性菌株中 $\beta$ -微管蛋白基因表达特性分析

采用实时荧光定量 PCR 技术分别分析了在无/有药剂处理条件下不同敏感性水平菌株中的  $\beta$ -微管蛋白基因表达特性 (图 5)。

**2.3.1 无药剂处理条件下:**  $\beta$ -微管蛋白基因在敏感菌株 YC3, YC15 中的表达水平显著高于抗性菌株 YCA, YCB, YC42 ( $p = 0.05$ ), 但不同抗性菌株间差异不显著。

**2.3.2 在药剂处理条件下:** 在各自菌株的 1 个  $EC_{50}$  浓度处理 24 h 后, 对同一个敏感菌株或抗性菌株而言, 药剂处理后菌体中的  $\beta$ -微管蛋白基因表达水平较未用药剂处理显著增强 ( $p = 0.05$ ), 但敏感菌株和抗性菌株间差异不显著。

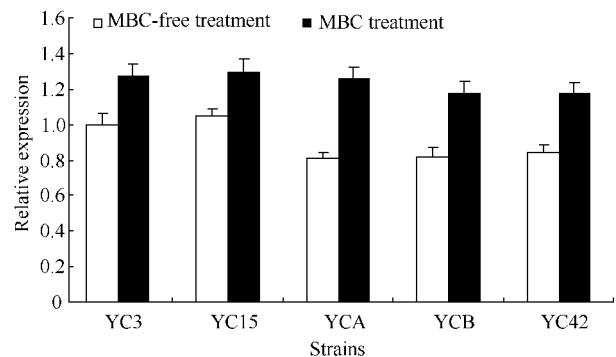


图5 实时荧光定量 qRT-PCR 分析  $\beta$ -微管蛋白基因在对多菌灵不同敏感性菌株中的表达

Fig. 5 Expression of  $\beta$ -tubulin gene in MBC<sup>S</sup> and MBC-resistant strains of *F. fujikuroi* using qRT-PCR.

### 3 讨论

本研究依据形态学特征和  $TEF-1\alpha$  基因进行鉴定, 获得了 5 株对多菌灵 (MBC) 不同敏感性水平的 *F. fujikuroi* 菌株; 对不同敏感性水平菌株的  $\beta$ -微管蛋白基因全长进行比对分析, 发现  $\beta$ -微管蛋白未发生突变; qRT-PCR 结果表明, 在无药剂处理下该基因在 2 个敏感菌株中的表达水平均显著高于 3 个抗性菌株, 但不同抗性菌株间差异不显著; 对同一菌株而言, 多菌灵处理能够显著提高  $\beta$ -微管蛋白基因表达水平, 但在相同药剂处理条件下, 菌株间差异不显著。本研究结果表明 *F. fujikuroi* 对多菌灵产生抗药性与  $\beta$ -微管蛋白无关, 而抗性菌株的  $\beta$ -微管蛋白基因表达水平下降, 可能是由于其他相关基因突变导致, 有待进一步研究验证。

*F. fujikuroi* 对多菌灵产生抗药性机制完全不同于 *F. verticillioides*。本研究以 *F. verticillioides* 的  $\beta$ -微管蛋白的基因为参考序列, 设计引物, 对从我国盐城采集的对多菌灵不同敏感性水平菌株进行克隆和序列比对, 没有发现基因突变, 这表明 *F. fujikuroi* 对多菌灵产生抗药性机制完全不同于 *F. verticillioides*。*F. verticillioides* 的  $\beta$ -微管蛋白第 50 位氨基酸由酪氨酸 (Tyr) 突变为天冬酰胺 (Asp) 导致其对多菌灵产生抗药性。进一步研究表明, *F. fujikuroi* 敏感菌株中  $\beta$ -微管蛋白基因表达水平显著高于抗性菌株, 但药剂处理 (各自菌株的 1 个  $EC_{50}$  浓度处理 24 h) 均能够显著提高不同敏感性的菌株的  $\beta$ -微管蛋白基因表达水平, 这表明在药剂处理下该基因表达上调不是导致 *F. fujikuroi* 对多菌灵产生抗药性机制的原因。

GFC 复合种内成员间的分子鉴定宜选用  $TEF-1\alpha$  基因。镰孢菌的分类和鉴定比较困难, 本研究初期选用 rDNA ITS 片段进行分子鉴定, 发现 rDNA ITS 片段并不能很好地区分 *F. fujikuroi*、*F. verticillioides* 和 *F. proliferatum*, 而  $TEF-1\alpha$  基因可以将三者区别开来, 且重复性好, 这与 Geiser 研究一致<sup>[5]</sup>。

植物病原真菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性是由  $\beta$ -微管蛋白点突变造成的, 这些位点通常涉及第 6 位氨基酸 (His $\rightarrow$ Tyr)<sup>[11]</sup>、第 50 位氨基酸 (Tyr $\rightarrow$ Cys)<sup>[12]</sup>、167 位氨基酸 (Phe $\rightarrow$ Tyr)<sup>[13-14]</sup>、198 位氨基酸 (Glu $\rightarrow$ Ala\Gln\Gly\Lys\Val)<sup>[15-17]</sup>、200 位氨基酸 (Phe $\rightarrow$ Tyr)<sup>[16-17]</sup>、240 位氨基酸 (Leu $\rightarrow$ Phe)<sup>[16,18]</sup>。镰孢菌的微管蛋白家族通常包含多个微管蛋白基因, 它们和微管相关蛋白基因等因子相互作用构成菌体复杂的微管网络系统<sup>[19]</sup>。因此, 作者正从微管蛋白基因家族其他成员、微管相关蛋白和其他与微管装配相关的因子入手探寻 *F. fujikuroi* 对多菌灵的抗药性分子机制。

### 参考文献

- [1] 吕国忠, 赵志慧, 孙晓东, 姜子德, 杨红. 串珠镰孢菌种名的废弃及其与腾仓赤霉复合种的关系. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2010, 29(1): 143-151.
- [2] Seifert KA, Aoki T, Baayen RP, Brayford D, Burgess LW, Chulze S, Gams W, Geiser D, Leslie JF, Logrieco A, Marasas WFO, Nirenberg HI, O'Donnell K, Rheeder J, Samuels GJ, Summerell BA, Thrane U, Waalwijk C. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research*, 2003, 107(6): 643-644.
- [3] Wulff EG, Sørensen JL, Lübeck M, Nielsen KF, Thrane U, Torp J. *Fusarium* spp. associated with rice Bakanae: ecology, genetic diversity, pathogenicity and toxigenicity. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(3): 649-657.
- [4] Heng MH, Salleh B, Zakaria L. Molecular identification of *Fusarium* species in *Gibberella fujikuroi* Species Complex from rice, sugarcane and maize from Peninsular Malaysia. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(10): 6722-6732.
- [5] Geiser DM, Jimenez-Gasco MD, Kang SC, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K. FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 2004, 110(4): 473-479.
- [6] 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 (*Plant Protection*), 1987, 13(2): 31-33.

- [ 7 ] Yan K , Dickman MB. Isolation of a  $\beta$ -tubulin gene from *Fusarium moniliforme* that confers cold-sensitive benomyl resistance. *Applied and Environmental Microbiology* , 1996 , 62(8) : 3053-3056.
- [ 8 ] 陆悦健,周明国,叶钟音. 水稻恶苗病菌对苯并咪唑类杀菌剂抗药性分子机理研究初探. 菌物系统 (*Mycosystema*) , 1997 , 16(3) : 235-240.
- [ 9 ] 陈长军,周立邦,毕朝位,李红霞,王建新,周明国. 小麦赤霉病菌对多菌灵的抗药性与  $\alpha 2$ -微管蛋白序列无关析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) , 48(10) : 1356-1361.
- [10] Livak KJ , Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* , 2001 , 25(4) : 402-408.
- [11] Ma Z , Yoshimura M , Michailides TJ. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology* , 2003 , 69(12) : 7145-7152.
- [12] McKay GJ , Egan D , Morris E , Brown AE. Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based method. *Mycological Research* , 1998 , 102(6) : 671-676.
- [13] Gafur A , Tanaka C , Shimizu K , Ouchi S , Tsuda M. Molecular analysis and characterization of the *Cochliobolus heterostrophus* beta-tubulin gene and its possible role in conferring resistance to benomyl. *The Journal of General and Applied Microbiology* , 1998 , 44(3) : 217-223.
- [14] Baraldi E , Mari M , Chierici E , Pondrelli M , Bertolini P , Pratella GC. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears , pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology* , 2003 , 52(3) : 362-370.
- [15] Luck JE , Gillings MR. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. *Mycological Research* , 1995 , 99(12) : 1483-1488.
- [16] Albertini C , Gredt M , Leroux P. Mutations of the  $\beta$ -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acutormis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* , 1999 , 64(1) : 17-23.
- [17] Koenraadt H , Somerville SC , Jones AL. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* , 1992 , 82(11) : 1348-1354.
- [18] McKay GJ , Cooke LR. A PCR-based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. *FEMS Microbiology Letters* , 1997 , 152(2) : 371-378.
- [19] Gasztonyi M , Jisepovits G , Milnar A , Hornok L. Biochemical background of resistance to benomyl in genetically different strains of *Fusarium oxysporum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* , 1987 , 29(1) : 17.

# Cloning $\beta$ -tubulin from *Fusarium fujikuroi* to analyze its relationship with carbendazim resistance

Xiaowei Ma , Chunjie Xing , Jinfeng Yu , Yong Wang , Zihao Chen , Jianxin Wang , Mingguo Zhou , Changjun Chen\*

College of Plant Protection , Nanjing Agricultural University , Key Laboratory of Pesticides of Jiangsu Province , Nanjing 210095 , China

**Abstract:** [Objective] We studied the resistance of *Fusarium fujikuroi* against carbendazim , to confirm whether the resistance was related to the  $\beta$ -tubulin gene. [Methods] The isolated strains were identified based on TEF-1 $\alpha$  gene sequence and morphological characteristics. The whole nucleotide sequence of  $\beta$ -tubulin gene was analyzed from different sensitive strains by the primers designed according to the nucleotide sequence of  $\beta$ -tubulin gene from the sequenced strain 7600 of *F. verticillioides*. Real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was applied to analyze the expression pattern of  $\beta$ -tubulin gene from different sensitive strains treated with or without carbendazim. [Results] The full-length nucleotide sequence of  $\beta$ -tubulin gene (Accession Number: JQ026022) was cloned from different sensitive strains of *F. fujikuroi* , which spanned 1671 bp with 4 introns , encoding 447 amino acids. This gene showed 100% nucleotide sequence homology between sensitive and resistant strains. The expression of the  $\beta$ -tubulin gene in 2 sensitive strains was significantly higher than 3 resistant strains when these strains were cultured on carbendazim-free media ( $p = 0.05$ ). Carbendazim at the concentration of their EC<sub>50</sub> caused the expression of the gene from the five strains increasing significantly ( $p = 0.05$ ) in comparison with that of strains treated without carbendazim. However , there was no significant difference between strains when treated with carbendazim. [Conclusion] The resistance of *F. fujikuroi* against carbendazim was irrelative to  $\beta$ -tubulin gene.

**Keywords:** *Fusarium fujikuroi* ,  $\beta$ -tubulin gene , expression pattern , carbendazim-resistance

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(31171880 , 30971891)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84395641; E-mail: cej100cn@yahoo.com.cn

Received: 8 December 2011 / Revised: 26 February 2012

## 《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先将请2位专家进行初审,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。