

小麦赤霉病菌对多菌灵的抗药性与 α_2 -微管蛋白序列无关析

陈长军, 周立邦, 毕朝位, 李红霞, 王建新, 周明国*

(南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要:【目的】研究小麦赤霉病菌对多菌灵的抗药性与 α_2 -微管蛋白基因的相关性。【方法】比较对多菌灵不同敏感性水平菌株间在药剂作用下的形态学特征及其 α_2 -微管蛋白基因异同。【结果】当敏感菌株和田间抗菌株均在各自 EC₅₀ 和 EC₉₀ 浓度作用下, 两者分生孢子芽管和初生菌丝均表现畸形, 肿胀, 分支增多。根据小麦赤霉病菌核基因组测序菌株 NRRL31 084 (PH-1) 的 α_2 -微管蛋白基因核苷酸序列设计 4 对引物, 采用 PCR 方法克隆并测定了小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*) 对多菌灵 (MBC) 不同敏感性表型的 8 个中国菌株的 α_2 -微管蛋白基因全序列。DNA 序列比对结果表明中国的 4 个敏感菌株和 4 个抗药性菌株的 α_2 -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_2 -微管蛋白无关。该基因全长 1712 bp, 含有 4 个内元, 编码 453 aa; 与 NRRL31 084 的 α_2 -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 100%; 与其他 9 种真菌 α_2 -微管蛋白基因所编码的氨基酸序列同源性为 64%~89%。【结论】小麦赤霉病菌对多菌灵的抗药性与 α_2 -微管蛋白序列无关。

关键词: 小麦赤霉病菌; α_2 -微管蛋白基因; 形态学特征; 多菌灵抗药性

中图分类号: Q482.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1356-06

小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*) 是中国小麦赤霉病的主要致病真菌。我国长期以来主要采用多菌灵 (Carbendazim, MBC) 在扬花期喷雾, 取得了较好的防治效果。多菌灵是苯并咪唑类杀菌剂代表品种, 是该类药剂最终发生生物学效应的活性成分, 具有广谱、高效、内吸性的特点。多菌灵一般使用 2~3 年后, 许多植物病原菌对其产生抗药性^[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小麦赤霉病菌田间抗性菌株。在此以后, 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小麦赤霉病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, 从而阻碍纺锤体形

成, 进而干扰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, 小麦赤霉病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], 但是小麦赤霉病菌 (*F. graminearum*) 对多菌灵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]。在串珠镰孢中, β -微管蛋白基因突

基金项目: 国家“973 项目”(2006CB101900); 国家自然科学基金项目(30070510, 30200181); 博士点基金(20050307064)

*通讯作者。Tel: +86-25-84395641; 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, 副教授, 博士, 主要从事农药学及其抗药性分子机制等方面的研究。

收稿日期: 2008-04-15; 修回日期: 2008-06-07

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

变导致该病原菌对多菌灵杀菌剂产生抗药性,同时对环境温度更加敏感^[11];同时求证在小麦赤霉病菌中,多菌灵是否也像在构巢曲霉^[12]中一样干扰病原菌的细胞分裂,为此,本文从形态毒理和 α_2 -微管蛋白基因入手,研究小麦赤霉病菌对多菌灵抗药性机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:用于 α_2 -微管蛋白克隆的8个菌株,包括4个野生敏感菌株ZF43、ZF2032和ZF43-2(多菌灵的 EC_{50} 分别为0.54、0.63和0.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$,菌株缩写为S)和ZF2021(EC_{50} =0.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 EC_{90} =0.87 $\mu\text{g}/\text{mL}$),2个田间中抗菌株ZF52(EC_{50} 为8.88 $\mu\text{g}/\text{mL}$,MR)和NT-7(EC_{50} =9.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 EC_{90} =40.49 $\mu\text{g}/\text{mL}$),1个田间高抗菌株JT04(EC_{50} 为20.95 $\mu\text{g}/\text{mL}$,HR),1个室内诱导高抗突变体ZF52-7(EC_{50} 为20.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$,HR)。

1.1.2 主要试剂和仪器:pGEMT Easy Vector (Promega), Amp、X-Gal、IPTG、dNTP和Taq酶(上海生工)。仪器为Leica Microsystems Wetzlar GmbH 020-525.024, Leica DMR, Germany。

1.2 抗药性菌株和敏感菌株在多菌灵作用下形态学特征

将1.3所制成的敏感菌株ZF2021和中抗菌株NT-7菌碟分别接入3%绿豆汤中,在25 $^{\circ}\text{C}$ 下摇培(150 r/min)6 d,收集孢子,用新鲜的绿豆汤悬浮,制成 10^5 个/mL的分生孢子悬浮液。再取分生孢子悬浮液50 μL 均匀涂布到分别含所涂布菌株1个 EC_{50} 和1个 EC_{90} 浓度多菌灵的水琼脂平板上,置于25 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养6至8 h时,在显微镜下观察形态学特征。水为空白对照。

1.3 α_2 -微管蛋白基因克隆及其与病原菌对多菌灵抗药性关系分析

预培养的菌碟转入绿豆汤液体培养基(绿豆20 g,去离子水1000 mL煮沸30 min,过滤,取上清即可),25 $^{\circ}\text{C}$ 摇培6 d,产孢后将孢子转入PS(马铃薯200 g,蔗糖20 g,去离子水1000 mL,pH6.8)中250 r/min摇床培养2 d,收集菌丝,冻干,液氮研磨。取0.2 g菌丝,加800 μL DNA提取缓冲液(100 mmol/L LiCl; 10 mmol/L EDTA; 10 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 10 g/L SDS),充分震荡,60 $^{\circ}\text{C}$ 温育60 min,用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提2次至无中间层,取上清液并加1倍体积异戊醇沉淀,离心,干燥后溶于50 μL TE(含20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNA ase),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴20 min。取5 μL 经0.9%琼脂糖电泳检测。

根据小麦赤霉病菌全基因数据库(<http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/antion/fusarium/findfeatures.cgi?page=showfeatures&sFEATURETYPES=GENE&GENEBYHMMER=1&GENEPFAMNAME=tubulin>)小麦赤霉病菌参考菌株PH-1 α_2 -微管蛋白基因DNA序列(FG00639.1 TBA_SORMA tubulin α_2 -chain)设计4对引物(表1),引物对 $n\alpha_2$ -F1和 $n\alpha_2$ -R1扩增条件为94 $^{\circ}\text{C}$ 5min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1min, 36次循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 15min。引物对 $n\alpha_2$ -F2和 $n\alpha_2$ -R2、 $n\alpha_2$ -F4和 $n\alpha_2$ -R4及 $n\alpha_2$ -F3和 $n\alpha_2$ -R3的退火温度分别为54 $^{\circ}\text{C}$ 1min、52 $^{\circ}\text{C}$ 1min和53 $^{\circ}\text{C}$ 1min,其他条件同引物对 $n\alpha_2$ -F1和 $n\alpha_2$ -R1。其中 $n\alpha_2$ -F3和 $n\alpha_2$ -R3扩增时去引物二级结构,热启动。50 μL PCR反应体系中含 $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$ 37.5 μL , dNTP 0.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 10 \times buffer (10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton 100) 5 μL , MgCl_2 2 mmol/L, primer X(所需扩增片段的上游引物) 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$, primer Y(所需扩增片段的下游引物) 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$, Taq聚合酶 2.5 U, 模板DNA 100 ng。

表1 用于小麦赤霉病菌 α_2 -微管蛋白基因全序列扩增的PCR引物
Table 1 Primers synthesized for PCR of the α_2 -tubulin gene of *F. graminearum*

Primers	Primer Length/bp	Nucleotide positions ^a	Sequences (5'→3')
$N\alpha_2$ -F1	18	1-20	ATGGAAGGGCGAGGTATGTTT
$n\alpha_2$ -R1	18	687-670	CAGTTGCTGGGTTGTGG
$N\alpha_2$ -F2	17	976-992	GCACCTCAACCGTCTCA
$n\alpha_2$ -R2	18	1616-1509	TCTCCTTCTCCATACCC
$n\alpha_2$ -F3	19	1115-1133	TACGCTCCTGTCATTCTG
$n\alpha_2$ -R3	25	1689-1713	CGGGCTTCTCTTGAGCTCATGATC
$n\alpha_2$ -F4	19	668-686	ATCCACAACCCAGACAAC
$n\alpha_2$ -R4	19	1113-1095	CAGAAATGACAGGAGCGTA

^aThe corresponding position on the nucleotide sequence of the α_2 -tubulin gene from *F. graminearum*.

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_2 -微管蛋白基因同源性和小麦赤霉病菌与其他常见真菌 α_2 -微管蛋白基因的同源性, 明确小麦赤霉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。

2 结果和分析

2.1 抗药性菌株和敏感菌株在多菌灵作用下形态学特征

在含药条件下, 药剂均能引起敏感菌株和田间中抗菌株分生孢子所形成的芽管肿胀、畸形, 菌丝分支异常, 不能正常扩展和生长, 分生孢子细胞肿胀(图1)。分别在对应菌株 1 个 EC₅₀ 作用下, 抗药性菌株和敏感菌株在形态学上差异小。在各自 1 个 EC₉₀ 浓度下, 药剂抑制敏感菌株芽管形成, 分生孢子细胞肿胀; 而在相应条件下, 田间中抗菌株所形成的初生菌

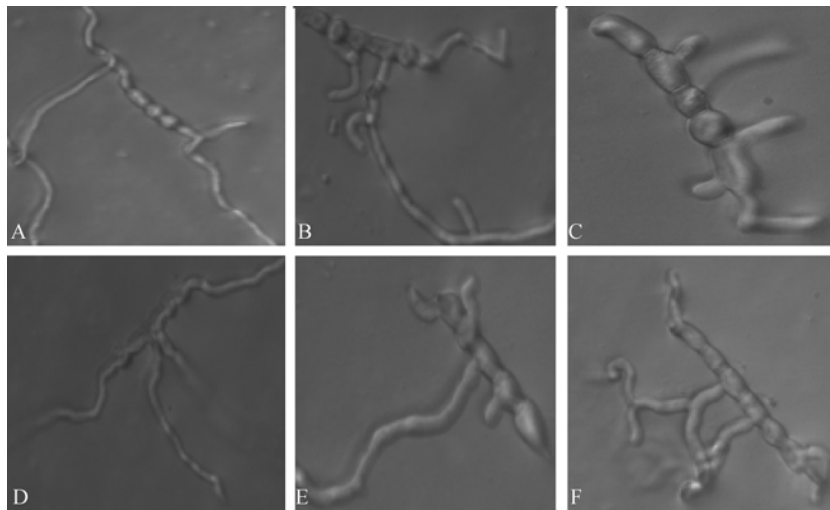


图1 抗药性菌株和敏感菌株在多菌灵作用形态学特征

Fig. 1 Morphological characteristics of MBC^S and MBC-resistant strains of *F. graminearum* treated with carbendazim (MBC). A, B, C, D, E and F presented morphological characteristics of conidium germination and germlings of carbendazim-sensitive strain, ZF2021 (EC₅₀=0.57 μ g/mL, EC₉₀=0.87 μ g/mL) and field moderately carbendazim-resistant strain, NT-7 (EC₅₀=9.23 μ g/mL, EC₉₀=40.49 μ g/mL), respectively. Both the sensitive strain and moderately resistant strain all produced tube with swelled abnormality or germlings with more branches or cells of conidium swelled greatly, when treated with carbendazim at its EC₅₀ or EC₉₀(\times 200). Water is for CK.

丝畸形, 扭曲和肿胀。在无药条件下, 敏感菌株和田间中抗菌株的分生孢子均能形成正常芽管, 初生菌丝能够正常分支和扩展。

2.2 α_2 -微管蛋白基因克隆及其病原菌对多菌灵抗药性关系分析

2.2.1 小麦赤霉病菌 α_2 -微管蛋白基因的序列分析: 利用表 1 中 4 对引物对小麦赤霉病菌 α_2 -微管蛋白基因分段扩增的 PCR 产物, 经测序, 获得小麦赤霉病菌的 α_2 -微管蛋白基因的核苷酸序列(基因登录号为 EU430270), 全长 1712 bp, 包含 4 个内含子, 位于 *F. graminearum* α_2 -微管蛋白基因的第 5、24、128、216 个氨基酸, 大小分别是 191、53、55、53 bp。外显子(G+C)的 mol% 为 54.52, 有 5 个编码区, 分别位于 1~12、204~262、316~626、601~1185、1239~1712 bp 间, 共

1362 bp, 相应的编码 453 个氨基酸, 分子量为 50.48 kDa, 理论等电点(pI)为 4.77, 具有磷酸结合位点和 GTP 结合位点, 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。

2.2.2 同源性比较及其与病原菌抗药性关系分析: 测定的 8 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_2 -微管蛋白基因核苷酸序列保守性强。但通过 BLAST 与小麦赤霉病菌参考菌株 NRRL31084 α_2 -微管蛋白基因全序列比较, 共发现 5 个差异核苷酸, 460 位 T \rightarrow C, 622 位 T \rightarrow C, 706 位 C \rightarrow T, 775 位 T \rightarrow C, 1398 位 C \rightarrow T, 它们均在氨基酸三联密码字的第三个核苷酸上, 所编码氨基酸没有发生改变, 与参考菌株氨基酸序列同源性 100%。与该菌微管蛋白基因家族中其他微管蛋白基因同源性比较, 结果表明与

α_2 -微管蛋白基因氨基酸水平同源性最高(69%),和其他微管蛋白基因氨基酸序列的同源性27%~39%;与 α -微管蛋白基因EST序列同源性高达72%,和其他微管蛋白基因的同源性47%~54%。与9种常见真菌 α -微管蛋白基因进行比较,发现氨基酸水平同源性的同源性在64%~89%(表2),与*C. lagenarium*的 α_2 -微管蛋白基

因同源性最高(89%),与*Histoplasma capsulatum*的 α -微管蛋白基因同源性最低(64%)。真菌所含内含子数目和大小因真菌不同而不同。比较了小麦赤霉病菌对多菌灵的敏感和抗药菌株 α_2 -微管蛋白基因的全序列,未发现任何位点的突变,表明小麦赤霉病菌对多菌灵产生抗药性不是由于 α_2 -微管蛋白基因发生点突变所致。

表2 小麦赤霉病菌与其他9种真菌的 α_2 -微管蛋白基因的同源性比较

Table 2 Comparison the deduced amino acid sequence of alpha₂-tubulin gene from *F. graminearum* with that from other nine-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	89	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	67	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 were obtained.

3 讨论

序列分析发现,中国菌株和小麦赤霉病菌核基因组测序菌株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。

本文研究表明,小麦赤霉病菌对多菌灵产生抗药性与 α_2 -微管蛋白突变无关。已有研究表明小麦赤霉病菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性机制与其它真菌不同^[9,10]。同时也有一些报道表明,一些生物的 α -微管蛋白发生突变,也可引起对某些农药或者医药的抗性。在农业上,例如,二硝基苯胺类除草剂^[14](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*)编码的氨基酸发生突变,导致与 β -微管蛋白互作关系的改变。在医药中,如长春新碱(Vincristine),它是一种用于人体肿瘤治疗的药物,作用靶标为微管蛋白。在哺乳动物中,已经鉴定了6个 α -微管蛋白和7个 β -微管蛋白的同功异构蛋白(Isotype)。有研究表明,肿瘤细胞 β -微管蛋白的两种同功异构蛋白(β I and β IV)和 α -微管蛋白一种同功异构蛋白(α II)过量表达导致肿瘤细胞对长春新碱亲和力和显著下降,从而使肿瘤细胞产生抗药性^[15]。也有报道同样以微管蛋白为靶标的抗肿瘤

药物紫杉醇(paclitaxel),由于肿瘤细胞 α -微管蛋白乙酰化水平提高导致其对该药物的不敏感^[16]。因此,小麦赤霉病菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗性是否与 α_2 -微管蛋白乙酰化水平提高或者选择性表达其同功异构蛋白(Isotype)有关有待进一步研究。

本文从形态学研究表明,小麦赤霉病菌对多菌灵产生抗药性的田间中抗菌株在其EC₅₀和EC₉₀浓度作用下,分生孢子的芽管及其形成初生菌丝的形态学特征与敏感菌株相似,即抗药性菌株和敏感性菌株在各自EC₅₀和EC₉₀浓度作用下形态学特征相近,两者差异仅在抗、感菌株EC₅₀和EC₉₀的不同导致药剂作用浓度的差异。这与灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)对多菌灵产生抗药性菌株在多菌灵作用下的形态特征截然不同,因为后者的抗药性菌株的分生孢子萌发和初生菌丝与敏感菌的形态学特征完全一样(未发表)。另一方面,与小麦赤霉病菌同属的植物病原菌串珠镰孢(*F.moniliforme*)^[17]、*Flycopersici*^[18]和尖镰孢(*F.oxysporum*)^[19]对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性生化机制虽然各不相同,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。小麦赤霉病菌的多菌灵抗性菌株在无多菌灵作用下能够与野生敏感菌株一样正常生长和发育,具有很高的适合度^[20],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剧烈下降;而在多菌

灵作用下, 药剂虽然能够引起抗药性菌株分生孢子芽管致畸, 肿胀, 初生菌丝分支增多, 但是能够抵御更高的药剂浓度。

小麦赤霉病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^[21], 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。 α -微管蛋白与 β -微管蛋白在 γ -微管蛋白、微管相关蛋白及其他因子的介导下组装成微管^[22]。小麦赤霉病菌对多菌灵抗性菌株和敏感菌株的 α -^[23]、 α_2 -、 β -^[9]、 γ -微管蛋白基因^[24]均没有发生突变, 因此可以进一步从未微管蛋白基因、微管相关蛋白和其他与微管装配相关的因子探寻小麦赤霉病菌对多菌灵的抗药性分子机制。

参 考 文 献

- [1] Bollen GJ, 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 WT, Provvidenti 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, 陆悦健, 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(*J Nanjing Agricultural University*), 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] Koeneade H, Jones AL. 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. *Photopathology*, 1993, 83: 850–854.
- [7] 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(*Acta Genetica Sinica*), 2003, 30(5): 474–478.
- [8] 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
- [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(*Acta Microbiologica Sinica*), 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(*Acta Phytopathologica Sinica*), 2000, 30(1): 30–34.
- [11] Yan K, Dickman MB. Isolation of a β -tubulin gene from *Fusarium moniliforme* that confers cold-sensitive benomyl resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(8): 3053–3056.
- [12] Davidse LC, Flach W. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol*, 1977, 72: 174–193
- [13] Trail F, Common R. Perithecial development by *Gibberella zeae*: a light microscopy study. *Mycologia*, 2000, 92, 130–138.
- [14] O'donnell K, Kistler HC, Tacke BK, 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.
- [15] <http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/antion/fusarium/findfeatures.cgi?page=showfeatures&FEATURETYPES=GENE&GENEBYHMMER=1&GENEPFAMNAME=tubulin>, 2008-4-20.
- [16] Margolis RL, Wilson L. Microtubule treadmills possible molecular machinery. *Nature*, 1981, 293(5835): 705–711.
- [17] Yamamoto E, Zeng L, Baird WV. Alpha-tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica*. *Plant Cell*, 1998, 10 (2): 297–308.
- [18] Sirotnak FM, Danenberg KD, Chen J, et al. Markedly decreased binding of vincristine to tubulin in vinca alkaloid-resistant Chinese hamster cells is associated with selective overexpression of α and β tubulin isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 269, 21–24.
- [19] Banerjee A. Increased levels of tyrosinated α -, β III-, and β IV-tubulin isotypes in paclitaxel-resistant MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293: 598–601.
- [20] Ishii H, Takeda H. Differential binding of a N-phenylformamido compound in cell-free extracts of benzimidazole-resistant and -sensitive isolates of *Venturia nashicola*, *Botrytis cinerea* and *Gibberella fujikuroi*. *Neth J Plant pathol*, 1978, 95(suppl.1): 99–108.
- [21] 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.
- [22] 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(*Acta Phytopathologica Sinica*), 2001, 31(4): 365–370.
- [23] 陈长军, 李俊, 祁之秋, 王建新, 周明国. 禾谷镰孢菌 α_2 微管蛋白基因克隆及其与多菌灵抗药性关系分析. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(2): 288–291.
- [24] 陈长军, 王建新, 周明国. 禾谷镰孢菌 γ -微管蛋白基因克隆及其与多菌灵抗药性关系分析. 植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*), 2005, 35(2): 161–167.

Resistant mechanism of *Fusarium graminearum* against carbendazim,unrelative to alpha2-tubulin gene

Changjun Chen, Libang Zhou, Chaowei Bi, Hongxia Li
Jianxin Wang, Mingguo Zhou*

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

Abstract: [Objective] We studied the resistance of *Fusarium graminearum* against carbendazim, to confirm if the resistance was related to the whole nucleotide sequence of alpha₂-tubulin. [Methods] The whole nucleotide sequence of alpha₂-tubulin and morphological characteristic were analyzed from different sensitive strains when treated with carbendazim. [Results] The results indicated that both sensitive strains and moderately resistant strains produced tube with swelled abnormality or germlings with more branches or cells of conidium swelled greatly, when treated with carbendazim at their EC₅₀ or EC₉₀. The full-length nucleotide sequence of α_2 -tubulin gene from each of 8 *F. graminearum* strains from China, which had different carbendazim (MBC) sensitivity phenotypes, were separated by using PCR with 4 primer sets designed in accordance with nucleotide sequence of the gene from the genomic sequencing strain, NRRL 31084 (PH-1). The DNA sequence comparison showed no difference in the nucleotide sequence of α_2 -tubulin gene among 4 sensitive and 4 resistant strains. This result demonstrates that there was no relationship between MBC-resistance and alpha₂-tubulin gene. The full-length of the gene spanned 1712 bp, including 4 introns, encoding 453 amino acids. With 100% homology, there were 5 nucleotide differences in alpha₂-tubulin gene between PH-1 isolate and the 6 strains from China. The homology of the deduced amino acid sequence of the gene was 100% among the 6 strains and PH-1 isolate, and 64%-89% among other 9 species of fungi. [Conclusion] The resistance of *F. graminearum* against carbendazim was irrelative to the nucleotide sequence of alpha₂-tubulin.

Keywords: *Fusarium graminearum*; alpha₂-tubulin gene; morphology characteristics; carbendazim-resistance

Supported by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2006CB101900), the National Natural Science Foundation of China (30671048,30671384) and the Doctor Funding of Chinese Education Department (20050307064)

*Corresponding author. E-mail: mgzhou@mail.njau.edu.cn

Received: 15 April 2008/ Revised: 7 June 2008

《微生物学报》答作者问——关于投稿

问: 在学术会议上发表过的论文能否在《微生物学报》上发表?

答: 这要分两种情况。

- (1) 如果论文集属于正式出版物, 有正式书号或刊号, 则不能再在本刊发表;
- (2) 如果不是正式出版物, 属于交流材料, 则论文可以投稿本刊。

问: 投稿时都需要哪些手续? 是否还需要纸稿?

答: 从 2006 年起, 本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供:

- (1) 论文研究内容所属单位的介绍信(请注意: 在此强调的是研究内容所属单位, 通常是第一单位), 介绍信主要应证明该文的作者署名无误, 未一稿两投及不涉及保密问题。介绍信模板可从本刊主页“下载专区”或“远程投稿时”下载。
- (2) 在接到经过编辑部内审后 E-mail 发出的“稿件受理通知”后, 需要及时补寄纸样的 1 份稿件和介绍信, 并缴纳 100 元稿件受理费。

问: 审稿费需邮局汇款还是转帐?

答: 邮局汇款! 中科院微生物所共有 4 个期刊编辑部, 因此提醒您在办理汇款时一定要注意以下几点, 否则在登记汇款、办理发票时会造成混乱! 编辑部在收到汇款之后, 将以挂号信形式及时寄回发票。

- (1) 切忌在邮寄来的纸样材料中加入 100 元现金!
- (2) 在收款人一栏填写“微生物学报编辑部”;
- (3) 在备注栏中注明“稿件编号”+“第一作者姓名”;
- (4) 通过邮局汇 100 元审稿费, 汇款后请登陆本刊网站, 填写“汇款时间”、“发票单位”和收“发票地址”等信息。编辑部会在收到后及时登记“收款时间”和“寄发票时间”, 作者可随时查询不必打电话来询问。