

陈长军, 李俊, 于俊杰, 等. 禾谷镰孢菌微管相关蛋白基因 (*map*) 克隆及其与多菌灵抗药性关系分析 [J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 160-163

禾谷镰孢菌微管相关蛋白基因 (*map*) 克隆 及其与多菌灵抗药性关系分析

陈长军, 李俊, 于俊杰, 王建新, 周明国*

(南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 根据禾谷镰孢菌 (*Fusarium graminearum*) 测序菌株 NRRL31084 (PH-1) 的微管相关蛋白基因 (*map*) 核苷酸序列设计 4 对引物, 采用 PCR 方法测定了禾谷镰孢菌对多菌灵 (MBC) 不同敏感性表型的 6 个中国菌株的 *map* 全序列。DNA 序列比对表明, 中国的 3 个敏感菌株和 3 个抗药菌株的 *map* 核苷酸序列相似性没有差异, 表明多菌灵抗药性与微管相关蛋白无关。该基因全长 1 793 bp, 含有 6 个内含子, 编码 199 个氨基酸; 与 NRRL31084 的 *map* 核苷酸序列相似性为 99.39%, 存在 10 个差异核苷酸, 与其所编码的氨基酸序列相似性为 100%。

关键词: 禾谷镰孢菌; 微管相关蛋白基因 (*map*); 多菌灵; 抗药性

中图分类号: S482.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2030 (2009) 01-0160-04

Cloning of microtubule-associated proteins gene (*map*) from *Fusarium graminearum* and analyzing its relationship with carbendazim-resistance

CHEN Chang-jun, LI Jun, YU Jun-jie, WANG Jian-xin, ZHOU Ming-guo*

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

Abstract: The full-length nucleotide sequence of microtubule-associated proteins gene (*map*) from each of 6 *Fusarium graminearum* strains from China which had different carbendazim (MBC) sensitivity phenotypes were cloned using PCR with 4 primer pairs designed in accordance with nucleotide sequence of *map* from the genome-sequenced isolate, NRRL31084 (PH-1). The DNA sequence comparison showed that there was no difference in the nucleotide sequence of *map* among 3 sensitive and 3 resistant strains from China. This result demonstrated that there was no relationship between MBC-resistance and *map* gene. The full-length of the gene spans 1 793 bp, including 6 introns, encoding 199 amino acids. With 99.39% homology, there were 10 nucleotide differences in *map* gene between PH-1 isolate and the 6 strains from China. The homology of the deduced amino acid sequence of the gene was 100% between the 6 strains and PH-1 isolate.

Key words: *Fusarium graminearum*; microtubule-associated proteins gene (*map*); carbendazim (MBC); resistance

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, 在 1992 年才首次检测到对多菌灵具有抗药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], 但其他地区至今仍没有关于禾谷镰孢菌对多菌灵的抗药性报道。

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 β -微管蛋白与 α -微管蛋白组装成微管或使已组装的微管解聚, 导致纺锤体不能形成, 进而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 位和 200 位氨基酸密码子的单核苷酸突变, 使 198 位的谷氨酸改变为丙氨酸或

收稿日期: 2007-09-18

基金项目: 国家 973 项目 (2006CB101900); 国家自然科学基金项目 (30671048, 30671348); 教育部高等学校博士点基金项目 (20050307034); 江苏省科技攻关项目 (BG2006328); 国家 863 计划项目 (2008AA10Z414)

作者简介: 陈长军, 副教授, 博士, 硕导, 主要从事农药学及抗药性分子机制研究。* 通讯作者: 周明国, 教授, 博导, E-mail: mgzhou@njau.edu.cn

甘氨酸或赖氨酸而表现出高水平抗药性, 或使 200 位苯并氨酸改变为酪氨酸而表现出中等水平的抗药性。这是因为单个氨基酸的改变导致了所编码的蛋白质三维构象改变, 从而阻止或降低了药剂与靶标结合的亲和性^[4-5]。在人工诱变的抗药性突变体中除上述位点外还涉及 β -微管蛋白其他一些位点, 如 165、257 等位点的氨基酸变异^[6-8]。虽然遗传学研究表明, 禾谷镰孢菌对多菌灵的抗药性与其他许多真菌一样, 是由单个核基因控制的^[9], 但是禾谷镰孢菌对多菌灵 (carbendazim, MBC) 的抗药性机制并非像其他丝状真菌那样由于 β -微管蛋白基因突变所致^[10-11]。有资料表明 α -^[12] 和 γ -^[13] 微管蛋白基因没有发生突变, 与该病原菌对多菌灵产生抗药性无关。本文旨在进一步研究在微管蛋白装配过程中起重要作用的微管相关蛋白 (MAP) 是否发生基因突变而导致禾谷镰孢菌对多菌灵产生抗药性。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

用于 *map* 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 0.54、0.63 和 0.80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 1 个田间中抗菌株 ZF52, EC_{50} 为 8.88 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 1 个田间高抗菌株 JT04, EC_{50} 为 20.95 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 1 个室内诱导高抗突变体 ZF52-7, EC_{50} 为 20.66 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2 试剂

pGEMT Easy Vector (Promega), Amp、X-Gal、IPTG、dNTP 和 *Taq* 酶 (上海生工生物工程公司)。

1.3 基因组 DNA 提取

核基因组提取方法参照文献 [12]。

1.4 PCR 方法分段扩增微管相关蛋白基因 (*map*)

根据小麦赤霉病菌全基因数据库 (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/fusarium_graminearum/GeneDetails.html?sp=S7000000078537991) 禾谷镰孢菌测序菌株 NRRL31084 (PH-1) *map* DNA 序列 (FG10740, hypothetical protein) 设计 4 对引物 (表 1)。引物对 MAPF 和 MAPR 的扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 36 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 15 min (去引物二级结构, 热启动)。引物对 MF1 和 MR1、MF2 和 MR2、MF3 和 MR3 退火温度分别为 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、58.6 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 和 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (去引物二级结构, 热启动), 其他条件同引物对 MAPF 和 MAPR。50 μL PCR 反应体系中含双蒸水 37.5 μL , dNTP 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 10 \times Buffer (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, 0.1% Triton 100) 5 μL , MgCl_2 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 上、下游引物各 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, *Taq* 聚合酶 2.5 U, 模板 DNA 100 ng。

表 1 用于禾谷镰孢菌微管相关蛋白基因 (*map*) 全序列扩增的 PCR 引物

Table 1 Primers synthesized for PCR to clone microtubule-associated proteins gene (*map*) of *Fusarium graminearum*

引物 Primers	引物大小/bp Primer length	核苷酸位置 Nucleotide positions	序列 5'→3' Sequences 5'→3'
MAPF	25	826 ~ 850	AAGCGCAAGGCTGAGGCCGAGCGCA
MAPR	25	1 266 ~ 1 290	ACTTCATGCCTGTGGGGAACATAC
MR1	20	888 ~ 908	AATACATACGGGAATACGAT
MF1	20	391 ~ 401	GTGAGTTGGCTGGGTGCTG
MR2	20	391 ~ 411	AGCAGCCAGCCCAACTCAC
MF2	25	1 ~ 25	TACCGCGACCTGCATGGATTCCATG
MR3	25	1 769 ~ 1 793	CTAGCGCTCACTGGTATACTTGAGC
MF3	19	1 237 ~ 1 255	ATTTATGAGGAGCACAAAGG

1.5 回收、纯化

扩增的 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, 测序结果用 Bioedit 软件分析。

1.6 序列相似性分析

Bioedit 分析序列, 检索 GenBank 和 EMBL 基因数据库, 通过 BLAST 比较与测序菌株的 *map* 相似性以及禾谷镰孢菌与其他生物 *map* 的相似性, 明确禾谷镰孢菌对多菌灵的抗性和敏感菌株基因之间有无核苷酸突变位点。

2 结果与分析

2.1 禾谷镰孢菌微管相关蛋白基因 (*map*) 的序列分析

利用表1中4对引物对禾谷镰孢菌 *map* 分段扩增 PCR 产物, 经测序和拼接, 获得禾谷镰孢菌 *map* (基因登录号: EU430269) 全长 1 793 bp, 包含 6 个内含子, 分别起始于禾谷镰孢菌 *map* 编码的第 7、15、48、98、171 和 186 个氨基酸, 大小分别为 346、35、204、68、56 和 324 bp。阅读框 G + C 的 mol% 为 49.3, 有 7 个编码区, 分别位于 1 ~ 21、368 ~ 390、426 ~ 526、731 ~ 879、1 048 ~ 1 265、1 322 ~ 1 366 和 1 751 ~ 1 793 bp 之间, 共 600 bp, 编码 199 个氨基酸, 相对分子质量为 4.997×10^4 , 理论等电点为 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 相似性比较

测定的 6 个对多菌灵不同敏感性中国菌株的核苷酸序列, 经比对核苷酸序列完全一致, 说明中国菌株的 *map* 核苷酸序列保守性高。但通过 BLAST, 与禾谷镰孢菌测序菌株 NRRL31084 的 *map* 全序列比对, 共发现 10 个差异核苷酸: 86 位 G→A, 102 位 T→C, 479 位 G→A, 636 位 T→C, 664 位 T→A, 665 位 C→T, 699 位 T→C, 1 337 位 T→C, 1 381 位 G→A 和 1 715 位 G→A, 它们均在氨基酸三联密码子的第 3 个核苷酸上, 所编码氨基酸没有改变; 6 个中国菌株与 NRRL31084 *map* 的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列相似性分别为 99.39% 和 100%。比较了禾谷镰孢菌对多菌灵的敏感和抗药菌株 *map* 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 *map* 发生点突变所致。

3 讨论

本研究序列分析发现, 中国菌株和测序菌株 NRRL31084 (PH-1) 之间存在 10 个差异核苷酸, 这可能是由于它们所处的地理环境差异造成了遗传多样性。NRRL31084 测序菌株属于禾谷镰孢菌第 7 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^[14]。该菌株从美国的 Michigan 州分离得到, 产孢能力强, 对大麦和小麦具有很强的致病力^[15]。

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 *map* 等因子相互作用构成细胞内复杂的微管网络系统, 但 *map* 在翻译后最终能够形成同工异构体 (isotype); 微管相关蛋白 (MAP) 的数量及其在时、空上的表达规律等仍不清楚。

微管在组装过程中, 除了上述 3 种蛋白 (α -、 β -、 γ -微管蛋白) 外, 还需与其他 3 类蛋白作用。第 1 类是与微管结合, 促进微管组装和对已组装的微管起稳定作用的结构微管相关蛋白, 如 MAP1B、MAP2、Tau^[15]; 第 2 类是机动蛋白, 它们可以利用 ATP 水解形成的化学能沿着微管运动, 如 inestin、dynein 及其衍生物; 第 3 类是来源复杂的一类蛋白, 包括通常不称之为微管相关蛋白但与微管相关并且可以一起被纯化的一类蛋白, 如糖解酶 (GAPDH、aldolase)、激酶 (蛋白激酶 A、GSK-3 和 c-mos)、生物合成蛋白 (延长因子 EF-1 α , 甚至是完整的核糖体)、膜受体蛋白 (dynamin 和 G 蛋白)、转运 mRNA 的核蛋白等。在微管的组装过程中, Tau 具有保护微管免受药物对微管解组装的诱导^[16-18]。

微管相关蛋白在微管组装过程中, 可以与微管结合, 促进微管组装和组装的微管稳定, 对有丝分裂和有丝分裂间期的微管具有调节作用^[19]。*map* 过量表达或者过低表达均可以引起生物发育畸形^[20-21]。微管相关蛋白在微管组装过程中的详尽功能仍不清楚。

本研究表明, 禾谷镰孢菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗性与微管相关蛋白无关。已知禾谷镰孢菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性不同于其他真菌由于 β -微管蛋白的改变造成对该类药剂的抗药性^[5-8]。即使同属于镰孢菌属的串珠镰孢 (*F. moniliforme*)^[8,22] 和尖镰孢 (*F. oxysporum*)^[23] 对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性生化机制也各不相同。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^[24], 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 -、 γ -微管蛋白基因没有发生突变, 因此可以进一步从 α_2 -微管蛋白、未命名微管蛋白和其他与微管组装相关的基因探寻禾谷镰孢菌对多菌灵的抗药性分子机制。

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 [J]. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1971, 77: 83-90
- [2] Schroeder W T, Provvidenti R. Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits [J]. Plant Dis Rep, 1969, 53: 271-275
- [3] Wicks T. Tolerance of the apple scab fungus to benzimidazole fungicides [J]. Plant Dis Rep, 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 [J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(1): 43-47
- [5] Fujimura M, Kamakura T, Inoue H, et al. Action mechanism of diethofencarb to a benzimidazole-resistant mutant in *Neurospora crassa* [J]. J Pest Sci, 1992, 17: 237-242
- [6] Koenvaadt 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 [J]. Phytopathology, 1993, 83: 850-854
- [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* [J]. 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 [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(8): 3053-3056
- [9] 袁善奎, 周明国. 玉蜀黍赤霉(*Gibberella zeae*) 对多菌灵的室内抗药突变体的诱导及其抗药性遗传分析 [J]. 遗传学报, 2004, 31(4): 363-368
- [10] 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 [J]. 微生物学报, 2003, 43(4): 424-429
- [11] 陆悦健, 周明国, 叶钟音. 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 [J]. 植物病理学报, 2000, 30(1): 30-34
- [12] 陈长军, 李俊, 祁之秋, 等. 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 [J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 287-291
- [13] 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 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(2): 161-167
- [14] Trail F, Common R. Perithecial development by *Gibberella zeae*: a light microscopy study [J]. Mycologia, 2000, 92: 130-138
- [15] 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 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 7905-7910
- [16] Takemura R, Okabe S, Umeyama T, et al. Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or Tau [J]. Journal of Cell Science, 1992, 103: 953-964
- [17] Kosik K S, McConlogue L. Microtubule-associated protein function: lessons from expression in *Spodoptera frugiperda* cells [J]. Cell Motil Cytoskeleton, 1994, 28: 195-198
- [18] Barlow S, Gonzalez-Garay M L, West R R, et al. Stable expression of heterologous microtubule-associated proteins (MAPs) in Chinese hamster ovary cells: evidence for differing roles of MAPs in microtubule organization [J]. J Cell Biol, 1994, 126: 1017-1029
- [19] Olson K R, McIntosh J R, Olmsted J B. Analysis of MAP4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras [J]. J Cell Biol, 1995, 130: 639-650
- [20] Teng J, Takei Y, Harada A, et al. Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization [J]. J Cell Biol, 2001, 155: 65-76
- [21] Takano T, Sawai C, Takeuchi Y. Radial and tangential neuronal migration disorder in ibotenate-induced cortical lesions in hamsters: immunohistochemical study of reelin, vimentin, and calretinin [J]. J Child Neurol, 2004, 19: 107-115
- [22] Ishii H, Takeda H. Differential binding of a N-phenylformamidoxime compound in cell-free extracts of benzimidazole-resistant and-sensitive isolates of *Venturia nashicola*, *Botrytis cinerea* and *Gibberella fujikuro* [J]. Eur J Plant Pathol, 1989, 95(suppl. 1): 99-108
- [23] Gasztonyi M, Josepovits G, Molnár A, et al. Biochemical background of resistance to benomyl in genetically different strains of *Fusarium oxysporum* [J]. Pestic Biochem Physiol, 1987, 29: 17-24
- [24] 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 [J]. 植物病理学报, 2001, 31(4): 365-370