

陈洪娜, 李建文, 孙文秀. 水稻纹枯病病菌  $\beta$ -微管蛋白基因克隆及其与多菌灵抗药性的关系[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(21): 106-108.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.028

# 水稻纹枯病病菌 $\beta$ -微管蛋白基因克隆及其与多菌灵抗药性的关系

陈洪娜, 李建文, 孙文秀

(湿地生态与农业利用教育部工程研究中心/长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025)

**摘要:**测定湖北省不同地区水稻纹枯病病菌对多菌灵的敏感性, 结果发现, 抗性菌株的抗药性水平不高。根据常见植物病原真菌  $\beta$ -微管蛋白基因设计引物, 从水稻纹枯病病菌对多菌灵的敏感和抗性菌株中扩增  $\beta$ -微管蛋白基因, 均获得了大小为 695 bp 的基因片段, 其中含有 1 个 53 bp 的内含子, 与粗糙链孢菌具有较高的同源性。序列分析结果表明, 水稻纹枯病病菌抗性菌株  $\beta$ -微管蛋白基因的第 271、第 453、第 612 位碱基发生了突变, 分别由 T、T、T 突变为 G、C、C, 但这 3 个位点相对应的氨基酸却没有发生变化。此外, 内含子的第 15 位碱基由 G 突变为 A。由此可见, 水稻纹枯病病菌对多菌灵抗药性的产生与  $\beta$ -微管蛋白基因的变异有一定的关系。

**关键词:**湖北省; 水稻纹枯病病菌;  $\beta$ -微管蛋白; 基因克隆; 多菌灵抗药性; 碱基突变

**中图分类号:** S435.111.4+2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)21-0106-03

水稻是我国主要的粮食作物之一, 在全球的粮食生产和供应中占有重要地位。在水稻生长和生产过程中, 水稻纹枯病的发生严重影响了其质量和产量, 给我国及世界各国的经济造成了巨大损失。水稻纹枯病由立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn) 侵染引起, 该病原菌寄主范围广、变异快、易产生抗药性。目前, 主要采用化学药剂防治水稻纹枯病, 却也导致了病原菌抗药性的产生并呈上升趋势。

苯并咪唑类杀菌剂能够通过病原菌  $\beta$ -微管蛋白结合, 影响微管的形成或使已形成的微管解聚, 阻止细胞的有丝分裂<sup>[1]</sup>, 从而达到抑制病原菌的生长繁殖和侵入。但由于该类杀菌剂作用位点单一、选择性强, 使得病原菌在药剂选择压力下易产生抗药性<sup>[2]</sup>。其中, 多菌灵是一种应用广泛的广谱性杀菌剂, 对多种作物由真菌引起的病害具有良好的防治效果, 但也产生了不同程度的抗药性。近年来研究发现, 大多数植物病原菌抗多菌灵菌株的突变位点发生在  $\beta$ -微管蛋白的第 198、第 200 位氨基酸上<sup>[3-5]</sup>, 使氨基酸的三维结构发生了改变, 降低了药剂的亲合力<sup>[6]</sup>。但也有因为  $\beta$ -微管蛋白其他位点突变而引起病原菌抗多菌灵的研究报道<sup>[7-12]</sup>。更有研究表明,  $\beta$ -微管蛋白不同氨基酸位点的突变可以引起病原菌对多菌灵敏感性的差异<sup>[13]</sup>。目前尚未见到有关水稻纹枯病病菌对多菌灵抗药性的研究报道, 本研究以筛选到的多菌灵敏感性和抗性菌株为试验材料, 对  $\beta$ -微管蛋白基因进

行克隆和测序, 以明确  $\beta$ -微管蛋白是否发生基因突变, 探索水稻纹枯病病菌对多菌灵产生抗药性的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 供试菌株** 2014 年从湖北武汉、荆州、宜昌等地区采集水稻纹枯病病株并进行分离纯化, 共获得 134 株菌株。在含有 1.0  $\mu\text{g/mL}$  多菌灵的 PDA 培养基 (200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、20 g 琼脂、1 000 mL 蒸馏水) 上进行抗性和敏感性菌株的筛选, 随机选取 3 株抗性菌株 wkb2、wka3、wkd3 和 3 株敏感性菌株 wka2、wkb3、wkc1 用于本研究。

**1.1.2 主要试剂** 大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$  和 pEASY-T1 载体, 均购自北京全式金生物技术有限公司; 氨卡青霉素 (Amp)、X-gal、IPTG、dNTP、T<sub>4</sub> DNA 连接酶和 Taq 酶, 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 药剂敏感性测定** 将 3 个敏感菌株分别接种在含 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0  $\mu\text{g/mL}$  多菌灵的 PDA 培养基上, 再将 3 个抗性菌株分别接种在含 0、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8  $\mu\text{g/mL}$  多菌灵的 PDA 培养基上, 25  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 2 d, 十字交叉法测量各菌落的直径。通过对菌丝生长抑制率和药剂的有效浓度对数值之间的线性回归分析, 求出药剂的 EC<sub>50</sub>, 测定供试菌株对多菌灵的敏感性表型。

**1.2.2 基因组 DNA 的提取** 将供试菌株菌块接种到 PD 液体培养基 (200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、1 000 mL 蒸馏水) 中, 25  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养, 5 d 后无菌过滤收集菌丝, 冻干, 液氮研磨。采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取基因组 DNA, 并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.3 PCR 扩增及测序** 根据已知植物病原真菌  $\beta$ -微管蛋白基因序列设计 1 对引物为 Rs-F (3'-GTGAGTGAGAACCACCTCCA-5') 和 Rs-R (3'-ACGTTGTTGG GGATCCACTC-

收稿日期: 2016-06-14

基金项目: 长江大学长江青年人才基金 (编号: 2015cqr18); 湿地生态与农业利用教育部工程研究中心开放基金 (编号: KF201410)。

作者简介: 陈洪娜 (1992—), 女, 江苏连云港人, 硕士研究生, 主要从事微生物学研究。Tel: (0716) 8066257; E-mail: 1242952938@qq.com。

通信作者: 孙文秀, 博士, 副教授, 主要从事植物病害的生物防治研究。Tel: (0716) 8066257; E-mail: wenxiusun@163.com。

5'),以供试菌株基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增条件:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。将 PCR 扩增产物进行回收,与 pEASY-T1 载体连接,转化大肠杆菌 DH5α。在含 Amp、X-gal、IPTG 的 LB 平板(10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、5 g NaCl、15 g 琼脂、1 000 mL 蒸馏水)上筛选白色菌落,提取质粒 DNA 进行 PCR 验证,阳性克隆送至济南博尚生物科技有限公司测序。

1.2.4 序列分析 采用 DNAsclab 软件分析序列,用 DNAMAN 软件进行序列同源性比较,比较水稻纹枯病病菌抗、感菌株  $\beta$ -微管蛋白基因片段的核苷酸和氨基酸序列,找出突变位点。

表 1 水稻纹枯病病菌对多菌灵的敏感性测定

菌株	菌株类型	毒力回归方程	相关系数	EC <sub>50</sub> 及其 95% 置信区间(μg/mL)
wka2	敏感性	y = 6.52 + 1.84x	0.914 6	0.310 5(0.026 1~0.424 3)
wkb3	敏感性	y = 6.84 + 0.87x	0.966 8	0.293 1(0.010 5~0.283 0)
wke1	敏感性	y = 6.21 + 1.00x	0.939 9	0.300 1(0.015 0~0.545 5)
wkb2	抗性	y = 6.48 + 2.60x	0.809 6	0.566 1(0.006 1~0.897 5)
wka3	抗性	y = 6.54 + 3.53x	0.927 4	0.645 7(0.235 2~0.858 6)
wkd3	抗性	y = 6.61 + 3.46x	0.921 5	0.628 4(0.206 7~0.852 4)

2.2 序列分析

通过引物 Rs-F 和 Rs-R 对供试水稻纹枯病病菌的  $\beta$ -微管蛋白基因进行 PCR 扩增,测序结果表明,6 个菌株均获得了同等大小的基因片段,片段长度为 695 bp,其核苷酸序列与菌株 AG-1-1A 的  $\beta$ -微管蛋白基因同源性达 99.9%。同时,通过与典型模式菌粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)的  $\beta$ -微管蛋白基因比较发现,供试水稻纹枯病病菌  $\beta$ -微管蛋白

2 结果与分析

2.1 水稻纹枯病病菌对多菌灵的敏感性测定

测定从湖北省分离获得的水稻纹枯病病菌菌株对多菌灵的敏感性,发现 23.13% 的菌株在含有 1.0 μg/mL 多菌灵的 PDA 培养基上能够正常生长,表明产生了一定的抗药性<sup>[14]</sup>。分别测定供试 6 个菌株对多菌灵的敏感性,结果如表 1 所示,敏感性菌株对多菌灵的 EC<sub>50</sub> 平均值为 0.301 2 μg/mL,抗性菌株对多菌灵的 EC<sub>50</sub> 平均值为 0.613 4 μg/mL,说明菌株的抗药性水平不高,多菌灵可以继续用来防治水稻纹枯病。

基因片段均含有 53 bp 的内含子,其位置与粗糙脉孢菌的内含子 6 相似<sup>[15]</sup>,可以明确该片段为  $\beta$ -微管蛋白基因。由图 1 可知,抗性菌株  $\beta$ -微管蛋白基因的第 271、第 453、第 612 位碱基发生了突变,即敏感菌株中分别为 T、T、T,抗性菌株中分别突变为 G、C、C,且突变率为 100%,但这 3 个位点相对应的氨基酸却没有发生变化。此外,内含子的第 15 位碱基由 G 突变为 A。而报道较多的第 198、第 200 位氨基酸并未发生突变。

	CACTCACCTCTCTGGTGGAGGTACTGGTGCTGGTATGGGTACTCTCTTGATCTCCAAGAT	60
136	T H S L G G G T G A G M G T L L I S K I	
	CCGTGAGGAGTTTCCCGACCGAATGATGTGCACGTTCTCGGTGCTTCTTCCCCCAAGGT	120
156	R E E F P D R M M C T F S V V P S P K V	
	CTCGGATACCGTTGTCTGAGCCTTACAATGCCACTCTTTCGGTCCACAGCTCGTTGAGAA	180
176	S D T V V E P Y N A T L S V H Q L V E N	
	CTCTGACGAGACTTTTTCGATTGACAACGAGGCCCTTGACGATACTGCTTCCGCAAGCT	240
196	S D E T F C I D N E A L Y D I C F R T L	
	TAAGCTCTCTACTCCTACGTACGGCGATCTTAAACATCTCGTATCTATCGTCAATGTCTGG	300
216	K L S T P T Y G D L N H L V S I V M S G	
	TGTTACCACTGCTTGCGCTTCCCTGCTCAGCTTAACCTGACTTGGCCTGCTGCTGT	360
236	V T T C L R F P G Q L N S D L R K L A V	
	CAACATGGGTAAAGTCGTACGCCTTTGATTGCTGATTTGATACTGATTATGTGATATGCA	420
256	N...M	
	GTTCCTTTCCTCGTTTGCACCTTCTCATGGTTGGCTTTGCGCCTTTGACCGCGCTGGT	480
258	V P F P R L H F F M V G F A P L T A R G	
	TCGGTTACGTACCGCGCTGTCTCCGTCCCTGAATCACCCAACAAATGTTGATGCCAAG	540
278	S V Q Y R A V S V P E L T Q Q M F D A K	
	AACATGATGGTGCTTCTGACCCTCGCCACGCGCTTACCTCACCGTGTGCTGCCTTCTTC	600
298	N M M A A S D P R H G R Y L T V A A F F	
	CGCGGCAAGGTTCGATGAAGGAAGTCGAAGAGCAGATGCAGAAGCTTCAGAACAAGAAC	660
318	R G K V S M K E V E E Q M Q N V Q N K N	
	TCGGCCTACTTCTGTCGAGTGGATCCCCAACCAAGCT	695
338	S...A Y F V E W I P N N	

两边数字分别表示该序列的核苷酸数、粗糙脉孢菌  $\beta$ -微管蛋白的氨基酸数,方框表示抗性菌株突变的碱基,下划线表示内含子

图1 水稻纹枯病病菌敏感性菌株  $\beta$ -微管蛋白基因的部分核苷酸及氨基酸序列

3 讨论与结论

大多数研究表明,植物病原真菌对多菌灵的抗药性与  $\beta$ -微管蛋白基因变异有关,且由个别碱基突变导致氨基酸变异,从而产生抗药性。报道最多的是  $\beta$ -微管蛋白的第

198、第 200 位氨基酸发生突变。例如,粗糙脉孢菌(*N. crassa*)抗性菌株中  $\beta$ -微管蛋白的第 198 位氨基酸由甘氨酸变成了谷氨酸,第 200 位氨基酸由苯丙氨酸变成了酪氨酸<sup>[3]</sup>;油菜菌核病病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)  $\beta$ -微管蛋白的第 198 位氨基酸由谷氨酸突变为丙氨酸<sup>[16]</sup>;胶孢炭疽菌

(*Colletotrichum gloeosporioides*) 抗性菌株  $\beta$ -微管蛋白的第 200 位氨基酸由苯丙氨酸突变成了酪氨酸<sup>[17]</sup>; 小麦赤霉病病菌(*Gibberella zeae*) Js484 菌株的第 200 位氨基酸由苯丙氨酸变为酪氨酸, Js519 菌株的第 198 位氨基酸由谷氨酸变为谷氨酰胺<sup>[18]</sup>等。除此之外, 芒果炭疽病病菌(*C. gloeosporioides*) 抗性菌株  $\beta$ -微管蛋白的第 181、第 237、第 363 位氨基酸发生了突变, 而其他位置(如第 198 位或第 200 位)均不变<sup>[19]</sup>。也有研究表明, 一些植物病原真菌对多菌灵抗药性的产生与  $\beta$ -微管蛋白基因无关, 如水稻恶苗病病菌(*Fusarium fujikuroi*)<sup>[20]</sup>、禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)<sup>[21]</sup>等。

本研究通过测定水稻纹枯病病菌对多菌灵的敏感性发现抗药性水平不高, 可以将多菌灵和井冈霉素交替使用来防治水稻纹枯病, 防止抗药性的产生和提高。比较了抗、感菌株的  $\beta$ -微管蛋白基因序列, 发现第 271、第 453、第 612 位碱基发生了突变, 敏感菌株中分别为 T、T、T, 而抗性菌株中分别为 G、C、C, 但这 3 个位点碱基的突变却没有导致相应氨基酸发生变化。而且报道较多的第 198、第 200 位氨基酸也未发生突变。此外, 内含子的第 15 位碱基由 G 突变为 A。这些突变均有可能导致水稻纹枯病病菌对多菌灵产生抗药性, 也说明该病原菌对多菌灵产生抗药性的分子机制与其他真菌可能相同, 但还有待于进一步确认这 3 个位点突变与多菌灵抗药性之间的关系。

上述研究结果表明, 在对多菌灵产生抗药性的植物病原真菌中,  $\beta$ -微管蛋白基因的突变没有表现出一定的规律。本研究中水稻纹枯病病菌  $\beta$ -微管蛋白基因碱基的突变没有引起氨基酸的变化, 可能与多菌灵的抗药性水平有一定的关系。此外, 设计引物时主要考虑了第 198、第 200 位的氨基酸位点, 获得的  $\beta$ -微管蛋白基因没有包含全部突变位点, 使本研究结果与以往报道不一致。为此, 在本研究的基础上通过单核苷酸多态性(SNP)分子标记技术<sup>[22]</sup>进一步分析水稻纹枯病病菌  $\beta$ -微管蛋白基因单个碱基的突变与多菌灵抗药性之间的关系, 建立一种快速、准确、灵敏的检测抗性菌株和监测抗性群体发展动态的方法, 这对于治理抗药性、延长药剂的使用寿命及降低生产成本等具有重要意义。

## 参考文献:

- [1] Fujimura M, Kamakura T, Yamaguchi I. Action mechanism of diethofencarb to a benzimidazole-resistant mutant in *Neurospora crassa* [J]. Journal of Pesticide Science, 1992, 17(4): 237-242.
- [2] 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[J]. 植物保护, 1987(2): 31-33.
- [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 [J]. 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* [J]. Phytopathology, 1993, 83(12): 1478-1483.
- [5] Koenraad H, Somerville 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 [J]. Phytopathology, 1992, 82(11): 1348-1354.
- [6] 黄世文, 黄雯雯, 王玲, 等. 水稻主要病虫害“傻瓜”式防控技术理论与实践(1) [J]. 中国稻米, 2009(4): 13-16.
- [7] May G S, Tsang L S, Smith H, et al. *Aspergillus nidulans*  $\beta$ -tubulin genes are unusually divergent [J]. Gene, 1987, 55(2): 231-243.
- [8] Burland T G, Schedl T, Gull K, et al. Genetic analysis of resistance to benzimidazoles in *Physarum*: differential expression of  $\beta$ -tubulin genes [J]. Genetics, 1984, 108(1): 123-141.
- [9] Neff N F, Thomas J H, Grisafi P, et al. Isolation of the  $\beta$ -tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function in vivo [J]. Cell, 1983, 33(1): 211-219.
- [10] Thomas J H, Neff N F, Botstein D. Isolation and characterization of mutation in the  $\beta$ -tubulin gene of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Genetics, 1985, 111(4): 715-734.
- [11] Ma Z, Michailides T J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi [J]. Crop Protection, 2005, 24(10): 853-863.
- [12] Kawchuk L M, Hutchison L J, Verhaeghe C A, et al. Isolation of the  $\beta$ -tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in *Gibberella pulicaris* [J]. Plant Pathology, 2002, 24(2): 233-238.
- [13] 仇剑波. 禾谷镰孢菌  $\beta$ -微管蛋白基因定点突变及敲除对多菌灵敏感性和基因表达谱的影响 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 39-59.
- [14] 袁梦思, 李建文, 孙文秀. 苯并咪唑类杀菌剂对水稻纹枯病菌的室内毒力测定 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(7): 1710-1712.
- [15] Edelmann S E, Staben C. A statistical analysis of sequence features within genes from *Neurospora crassa* [J]. Experimental Mycology, 1994, 18(1): 70-81.
- [16] 李红霞, 陆悦健, 周明国, 等. 油菜菌核病菌  $\beta$ -微管蛋白基因与多菌灵抗药性相关突变的研究 [J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(2): 56-60.
- [17] 邓维萍, 梅馨月, 杨敏, 等. 胶孢炭疽菌及两种疫霉菌对苯酰菌胺的敏感性与  $\beta$ -微管蛋白氨基酸突变的相关性分析 [J]. 农药学报, 2012, 14(2): 143-150.
- [18] 曾凡松, 尹合兴, 史文琦, 等.  $\beta_1$ -和  $\beta_2$ -微管蛋白基因在赤霉病菌抗多菌灵中的作用 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(4): 695-704.
- [19] 詹儒林, 郑服丛. 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 [J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 827-829.
- [20] 马晓伟, 邢春杰, 于金凤, 等. 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 [J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 581-587.
- [21] 李红霞, 陆悦健, 王建新, 等. 禾谷镰孢菌  $\beta$ -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.
- [22] 谢海强, 孙岩岩, 盘道兴, 等. 贵州本地山羊 *STAT5A* 基因第 10 外显子 SNP 研究 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 30-33.