

# 香蕉枯萎病菌4号生理小种 $\beta 2$ -微管蛋白基因敲除与表型分析

刘远征<sup>1,2,3</sup>, 漆艳香<sup>1</sup>, 曾凡云<sup>1</sup>, 丁兆建<sup>1</sup>, 何 壮<sup>1,2</sup>, 彭 军<sup>1</sup>, 张 欣<sup>1</sup>, 谢艺贤<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国热带农业科学院环境与植物保护研究所,海口 571101; <sup>2</sup>海南大学热带农林学院,海口 570228;  
<sup>3</sup>中国热带农业科学院海口实验站,海口 570102)

**摘 要:**【目的】克隆并鉴定香蕉枯萎病菌(Foc4) $\beta 2$ -微管蛋白( $\beta 2$ -*tub*)基因,阐明 $\beta 2$ -*tub*在多菌灵的抗药性及在病原菌致病过程中发挥的作用。【方法】采用PCR技术克隆了 $\beta 2$ -*tub*的序列全长,并对其进行生物信息学分析。应用Split-marker同源重组技术获得Foc4的 $\beta 2$ -*tub*基因敲除突变体,并对其突变体的生物学表型、致病力及其对多菌灵的敏感性进行测定。【结果】生物信息学分析表明,Foc4  $\beta 2$ -*tub* 基因全长为1 694 bp,cDNA 编码区全长1 347 bp,由4个内含子和5个外显子组成,编码蛋白含448个氨基酸。Foc4对多菌灵表现为敏感( $EC_{50}=0.51 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),与Foc4相比, $\beta 2$ -*tub* 基因敲除突变体对多菌灵的敏感性( $EC_{50}=0.36 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )表现显著增强,差异显著( $p < 0.05$ )。与Foc4相比, $\beta 2$ -*tub* 基因敲除突变体的生物学表型没有变化,对巴西蕉苗的致病力明显减弱。【结论】 $\beta 2$ -*tub* 基因具有高度保守性, $\beta 2$ -*tub* 基因敲除突变体对细胞壁选择性压力、氧化压力和渗透压力均没有影响,但致病力下降,同时 $\beta 2$ -*tub* 基因的变化会引起Foc4对多菌灵抗性的改变。

**关键词:** 香蕉枯萎病菌; $\beta 2$ -微管蛋白;基因敲除;致病力

中图分类号: S668.1 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2018)12-1467-11

## Gene knockout and phenotype analysis of the $\beta 2$ -tubulin in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4

LIU Yuanzheng<sup>1,2,3</sup>, QI Yanxiang<sup>1</sup>, ZENG Fanyun<sup>1</sup>, DING Zhaojian<sup>1</sup>, HE Zhuang<sup>1,2</sup>, PENG Jun<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>1</sup>, XIE Yixian<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences Environment and Plant Protection Institute, Haikou 571101, Hainan, China; <sup>2</sup>Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China; <sup>3</sup>Haikou Experimental Station Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570102, Hainan, China)

**Abstract:** 【Objective】The objective of this study was to clone and identify the  $\beta 2$ -tubulin ( $\beta 2$ -*tub*) gene of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 (Foc4), and reveal the function of  $\beta 2$ -*tub* in resistance of Foc4 to carbendazim and its role in the pathogenic process of Foc4. 【Methods】Based on the sequences of  $\beta 2$ -*tub* gene (XM\_011327927.1) of *Fusarium graminearum* and the complete genome sequence of the Foc4 54006 strain (JH658279.1), specific primers were designed. A full-length sequence of  $\beta 2$ -*tub* gene from Foc4 was cloned by PCR amplification, and sequence characterization, phylogenetic clustering and protein domains of  $\beta 2$ -*tub* gene were also analyzed, respectively. The signature domains were analyzed by SMART software and the phylogenetic tree was built by MEGA 6.0.  $\beta 2$ -*tub* knockout mutants of Foc4 were obtained by split-marker homologous recombination technology. Sensitivity of Foc4 and its knockout mutants to carbendazim was tested by inoculating their mycelium onto PDA plates with different concentrations of carbendazim, respectively. The biological phenotypes in-

收稿日期:2018-03-22 接受日期:2018-09-07

基金项目:国家自然科学基金(31471738、31571957、31661143003);现代农业产业技术体系专项(CARS-31-07);农业部南亚办专项(151721301082352712);热科院托举工程项目(1630042018010)

作者简介:刘远征,男,在读硕士研究生,研究方向为微生物学。Tel: 15799032289, E-mail: 18754382266@126.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13707599196, E-mail: yixian81@126.com

cluding the growth rate of colonies, the amount of sporulation, the form of mycelium, selective pressure of cell wall, oxidation pressure and osmotic pressure of Foc4 and its knockout mutants were tested. In addition, the pathogenicity of Foc4 and its knockout mutants was tested by pot culture root drenching method. Foc4 and its knockout mutants were treated with 15 Brazil banana seedlings (Cavendish AAA). Each seedling was irrigated with 20mL spores suspension, and aseptic water was used as a control. The corm of Brazil banana was cut longitudinally after 30 d, and the browning degree of the bulb and the condition of the chlorosis of the outer leaves were observed. 【Results】Bioinformatics analysis revealed that the complete DNA and cDNA sequences of  $\beta 2$ -*tub* from Foc4 were 1 694 bp and 1 347 bp, respectively. The cDNA of  $\beta 2$ -*tub* included 5 exons and 4 introns and encoded a protein of 448 amino-acids. Moreover, the  $\beta 2$ -*tub* was highly conserved. Compared with other plant pathogenic fungi, the gene was highly homologous. In Foc4, the  $\beta 1$ -*tub* protein encoded 446 amino-acids. The homology of DNA sequence of  $\beta 1$ -*tub* and  $\beta 2$ -*tub* was 64.67%, the homology of amino acid sequence was 76.34%, and they had the same domain. The phylogenetic tree showed that  $\beta 2$ -*tub* was closely related to *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. graminearum*. The  $\beta 2$ -*tub* gene is highly conserved in biological evolution with other common plant pathogenic fungi. After two rounds of PCR amplification, the upstream and downstream recombination fragments required for homologous recombination for protoplast transformation were successfully amplified by split-marker. The sensitivity test of Foc4 and its knockout mutants to carbendazim showed that the  $\beta 2$ -*tub* gene was related to the resistance of Carbendazim. The  $EC_{50}$  value of Foc4 to carbendazim was  $0.51 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , and the  $EC_{50}$  values of  $\beta 2$ -*tub* gene knockout mutant to carbendazim was  $0.36 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Both were sensitive to carbendazim, however, the sensitivity to carbendazim of  $\beta 2$ -*tub* gene knockout mutant increased significantly. Compared with Foc4, the growth rate, the sporulation quantity and the mycelial morphology of the  $\beta 2$ -*tub* gene knockout mutant were not changed, and the difference was not significant. Sensitivity analysis of stress factors showed that  $\beta 2$ -*tub* gene knockout mutants had no influence on cell wall selective pressure, oxidative stress and osmotic pressure. The results of pathogenicity test showed that the leaves of the plants inoculated with wild strains were yellow and wilted, most of which were yellow in the lower leaves, and the browning of the bulbs was serious by the incision of the bulbs. However, a few leaves of the plants inoculated with the  $\beta 2$ -*tub* gene knockout mutant strain were yellow, and the bulbs appeared slightly browning. There was no leaf yellowing in the control plants inoculated with  $\text{H}_2\text{O}$ , and no browning in the corms. According to the disease index statistics, the results showed that the average disease index (42.24) of the inoculated strain of  $\beta 2$ -*tub* gene knockout mutant was significantly lower than the average disease index (59.17) of Foc4 wild fungi. 【Conclusion】Foc4 wild strains and  $\beta 2$ -*tub* gene knockout mutant strains all maintained high sensitivity to carbendazim. Furthermore, the knockout mutants showed a significant increase in sensitivity to carbendazim, indicating that the change of  $\beta 2$ -*tub* gene caused the resistance of wild strain to carbendazim. The gene of  $\beta 2$ -*tub* was highly conserved and had a typical microtubule protein domain. The biological phenotypes of  $\beta 2$ -*tub* knockout mutants, including growth rate, sporulation, hyphae morphology, selective pressure on cell wall, oxidative pressure and osmotic pressure, were not significantly different, but their pathogenicity to Brazil banana seedlings decreased significantly.

**Key words:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*;  $\beta 2$ -*tubulin*; Gene knockout; Pathogenicity

香蕉枯萎病是破坏香蕉维管束导致植株死亡的毁灭性土传病害,其病原菌为尖孢镰刀菌古巴转化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc),其中4

号生理小种(Foc4)是最主要的致病小种。这种病原真菌腐生能力很强,在土壤中可长期存活,属于典型的潜伏性侵染<sup>[1]</sup>。香蕉枯萎病已给香蕉种植者和香

蕉产业造成巨大的经济损失<sup>[2]</sup>,在实际生产中,防治香蕉枯萎病有一定的困难,缺乏有效的方法。采用生物防治和种植抗病品种是当前该病综合治理中较为有效的方法<sup>[3]</sup>。然而,生产中使用化学杀菌剂、生物药剂的防治效果并不理想<sup>[4-5]</sup>,目前最主要的防治方法是栽培抗枯萎病的香蕉品种,但其也易因病原菌的进化而逐渐丧失抗病性<sup>[6]</sup>。人们对于香蕉枯萎病菌的致病分子机制还在不断探索中,近年来,对于香蕉枯萎病的致病机制与致病相关基因的研究已经在G蛋白、过氧化氢酶、转录因子和MAPK通路等方面取得了一定进展<sup>[7-11]</sup>,但到目前为止其发病的具体机制仍不明确,这也在一定程度上阻碍了香蕉抗枯品种的选育。

苯并咪唑类杀菌剂(如多菌灵)具有广谱、高效和内吸性等特点,被广泛用于防治镰刀菌引起的病害。该类杀菌剂主要作用于病原菌的 $\beta$ -微管蛋白,通过抑制纺锤体的形成,进而抑制细胞有丝分裂,但由于药剂作用位点单一,病原菌在药剂选择压力下较易产生抗药性<sup>[12-13]</sup>,使得药剂防治效果下降。近年来,也有关于镰刀菌对多菌灵产生抗药性的报道<sup>[14]</sup>,对于 $\beta$ -微管蛋白的研究主要集中在由于基因的突变而产生的抗药性方面<sup>[15]</sup>。

为了阐明香蕉枯萎病菌 $\beta$ 2-*tub*基因是否在抗药性及在病原菌致病过程中发挥作用,笔者利用Split-marker同源重组技术敲除香蕉枯萎病菌 $\beta$ 2-*tub*基因,并对其敲除突变体的生长速度、产孢量、致病力及对多菌灵敏感性等生物学特性进行分析,完善该基因的具体功能,以期对香蕉枯萎病菌对多菌灵等苯并咪唑类杀菌剂产生的抗药性及其致病机制的研究提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试药剂 将98%多菌灵原药(湖北康宝泰精细化工有限公司)溶解于0.1 mol·mL<sup>-1</sup>盐酸中,配成10 mg·mL<sup>-1</sup>的母液,然后用无菌水将母液稀释配成1 mg·mL<sup>-1</sup>工作液。

Congo Red(刚果红,CR)购于北京拜尔迪生物技术有限公司;Calcofluor White Stain(荧光增白剂,CFW)购于Sigma-aldrich(北京);HygromycinB(潮霉素B)溶液购于AMRESCO(北京)。

1.1.2 供试菌株和香蕉品种 香蕉枯萎病菌4号生

理小种(*F. oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4),由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带果树病害课题组鉴定,保存。试验接种用香蕉品种为巴西蕉(Cavendish, AAA, 5~7枚叶片)。

### 1.2 方法

1.2.1 Foc4野生型菌株对多菌灵的敏感性测定 参照曾凡松等<sup>[16]</sup>的方法对Foc4野生菌株进行多菌灵敏感性测定。将Foc4野生型菌株的菌饼接种到0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0和2.0  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> 7个处理终质量浓度的多菌灵PDA平板中。28 °C下培养7 d,每个处理重复3皿,试验设3次重复。最终计算抑制中浓度 $EC_{50}$ 。

1.2.2 香蕉枯萎病菌基因组DNA的制备 将野生菌株接种到PDA培养基上,28 °C培养7 d,收集新鲜菌丝,用液氮进行快速冷冻。基因组DNA提取按照Fungal DNA Kit(OMEGA)说明书进行。

1.2.3  $\beta$ 2-微管蛋白基因克隆与分析 参考*Fusarium graminearum*  $\beta$ 2-微管蛋白( $\beta$ 2-*tub*)基因(GenBank登录号:XM\_011327927.1)及香蕉枯萎病菌热带4号生理小种菌株54006的全基因组序列(GenBank登录号:JH658279.1),在 $\beta$ 2-*tub*基因ORF两端设计基因特异性引物对:TUBU2-F(5'-GAAAGCG-GAACAAATCCCTCCA-3')/TUBU2-R(5'-CTCACTAACACATTCAGGCTCTCC-3'),扩增Foc4野生型菌株的 $\beta$ 2-*tub*基因。PCR扩增反应在PTC200 PCR仪(MJ RESEARCH)上进行。PCR反应总体积25  $\mu$ L,其中10 $\times$  PCR缓冲液(Mg<sup>2+</sup> Plus)2.5  $\mu$ L, dNTP混合物(2.5 mmol·L<sup>-1</sup>)2  $\mu$ L,引物对各0.5  $\mu$ L(20  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>),0.2  $\mu$ L *Taq*酶(5 U· $\mu$ L<sup>-1</sup>),模板DNA 100 ng,无菌超纯水补足至25  $\mu$ L。PCR扩增程序:94 °C预变性5 min,95 °C变性30 s,65 °C退火30 s,72 °C延伸2 min;35个循环,最后72 °C延伸10 min。

PCR产物经回收后连接到T-Vector pMD19(Simple)载体上,转化*E. coli* DH5 $\alpha$ ,经菌液PCR初步验证的阳性克隆送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。将测序得到的序列与GenBank数据库进行同源性分析,利用SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)工具对 $\beta$ 2-*tub*基因进行蛋白结构域分析。通过BLAST搜索分析 $\beta$ 2-*tub*基因的同源性,用Clustal X(2.0)软件进行多序列比对,采用MEGA 6.0软件以邻近相接法(neighbor-joining, NJ)构建系

统进化树。

1.2.4  $\beta 2$ -*tub* 基因敲除重组片段扩增 参考Foc4野生型基因组 DNA 测序序列,采用 Split-marker 重组技术进行 PCR 扩增获得 $\beta 2$ -*tub* 基因敲除重组片段。设计引物 FOC4TUB2-LBCK 和 FOC4TUB2-HPH-

LB-R、FOC4TUB2-HPH-RB-F 和 FOC4TUB2-RBCK (表 1) 扩增  $\beta 2$ -*tub* 基因上下游片段。设计引物 HYG-F 和 HYG-R (表 1) 扩增潮霉素(HYG)基因片段。重组 PCR 用引物 FOC4TUB2-LB-F 和 HYG-R1、HYG-F1 和 FOC4TUB2-HPH-RB-F (表 1) 来扩增

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Sequence of the primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')
HYG-F	CTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGT
HYG-R	CCCGTTCGGCATCTACTCTATTC
HYG-R1	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA
HYG-F1	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA
HPT-LBCK	GACAGACGTCGCGGTGAGTT
HPT-RBCK	TCTGGACCGATGGCTGTGTAG
FOC4TUB2-LBCK	TCCTTGGTCTCTCAAACGG
FOC4TUB2-HPH-LB-R	ACCTCCACTAGTCCAGCCAAGGTCTTACAGCAGGGTTGCCG
FOC4 TUB2-LB-F	GCACCACCAGAGAGCCGATT
FOC4TUB2-HPH-RB-F	GAATAGAGTAGATGCCGACCGGGTGTGAGAGTGAGATTTGTGTGC
FOC4 TUB2-RBCK	CCCCTTCTCCCTTTGGTAAA
FOC4 TUB2-RB-R	GACGAGAGTGAGAAGGTTGTGAAC
TUB2-CKFP	CCATCGATGTTGTGCGACAC
TUB2-CKRP	GTACTCGCTGACCAAGTCGTG

用于同源重组的上下游重组片段。

1.2.5 原生质体制备及转化 Foc4 野生型菌株原生质体制备参照王飞燕等<sup>[17]</sup>的方法进行。PEG 介导的原生质体转化参照徐齐君等<sup>[18]</sup>的方法略作改进。分别取 50  $\mu$ L 的上下游重组片段,缓慢加入到 300  $\mu$ L 原生质体中,轻轻混匀,室温放置 20 min;缓慢滴加 1.5~2 mL PTC 溶液,室温放置 20 min;将上述反应液加入到再生培养基(含有 100  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>氨苄青霉素和 50  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>潮霉素 B)中,混匀后,倒于培养皿上;于 28  $^{\circ}$ C 培养 3~7 d 后获得转化子,并连续培养 3 代获得稳定转化子。

1.2.6  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体鉴定 采用 CTAB 法<sup>[19]</sup>提取 Foc4 野生型菌株与  $\beta 2$ -*tub* 基因敲除转化子的基因组 DNA,根据  $\beta 2$ -*tub* 基因上游片段和潮霉素基因序列设计引物 FOC4TUB2-LBCK 和 HPT-RBCK (表 1),根据潮霉素基因序列和  $\beta 2$ -*tub* 基因下游片段设计引物 HPT-LBCK 和 FOC4TUB2-RBCK (表 1),根据  $\beta 2$ -*tub* 基因全长设计内源特异引物 TUB2-CKFP 和 TUB2-CKRP,根据潮霉素全长片段设计特异引物 HYG-F 和 HYG-R (表 1),利用这 4 对引物对转化子进行 PCR 鉴定,引物 TUB2-CKFP/TUB2-CKRP 无扩增条带,而引物 FOC4TUB2-LBCK/HPT-LBCK、HPT-RBCK/FOC4TUB2-RBCK 和 HYG-F/HYG-R 可以扩出目的片段的敲除转化子为阳性  $\beta 2$ -*tub* 基因敲

除突变体。

1.2.7  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体对多菌灵的敏感性测定 将  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体接种到含有不同浓度多菌灵的 PDA 平板中,方法同 1.2.1,其中 Foc4 野生型菌株作为对照,并计算  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体的抑制中浓度  $EC_{50}$ 。

1.2.8  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体生长特性分析 生长形态和生长速率测定:将 Foc4 和  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体的 5 mm 新鲜菌饼接种到 PDA 和 MM 平板上,28  $^{\circ}$ C 培养,分别在接种后 2、4、6 和 7 d 观察拍照,并于每天测量菌落直径,试验 3 次重复,每次设 3 个重复。

产孢量分析:分别从  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体和 Foc4 (均培养了 7 d) 的 PDA 平板上打 7 mm 的菌饼 3 个,加入无菌水后震荡打碎,然后采用血球计数板计数,试验 3 次重复。

菌丝显微观察:分别从长有  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体和 Foc4 (均培养了 7 d) 的 PDA 平板上取少量菌丝到载玻片上,制片后进行显微观察。

1.2.9  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体对胁迫因子的敏感性分析 Foc4 野生型菌株和  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体菌株在 PDA 平板活化生长 7 d,打取 7 mm 的菌饼分别接种于含有 Congo Red (终质量浓度 100  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>), Calcofluor White Stain (终质量浓度 100  $\mu$ g $\cdot$ mL<sup>-1</sup>), NaCl (终浓度 0.7 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>), Sorbitol (终浓度 1.2 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>),

$H_2O_2$  (终浓度  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 minimal medium (MM) 平板上, 未处理的 MM 平板作为对照,  $28^\circ\text{C}$  培养 7 d 后观察并拍照记录, 计算抑菌率, 试验 3 次重复, 每次设 3 个重复。抑制率/%=(对照组菌落直径-试验组菌落直径)/对照组菌落直径 $\times 100$ 。

1.2.10  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体致病性测定分析 分别将 Foc4 野生型菌株和  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体接种于 100 mL 的 PDB 培养液中, 置于  $28^\circ\text{C}$ 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  的摇床中恒温震荡培养 3 d, 过滤收集分生孢子, 用无菌水重悬分生孢子, 悬浮液至每 mL  $10^6$  个孢子。采用盆栽伤根淋灌法测定菌株的致病性。Foc4 与敲除突

变体均处理 15 株巴西蕉苗, 每株苗浇灌 20 mL 孢子悬浮液, 以无菌水作为对照, 3 次重复。按照常规方法栽培管理, 30 d 后纵向切开巴西蕉球茎, 观察球茎褐变程度及外部叶片黄化情况, 参考谢子四等<sup>[20]</sup>的病情调查分级标准, 记录每株蕉苗的发病级别并进行病情指数的统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生菌株对多菌灵敏感性测定

对 Foc4 野生型菌株进行多菌灵敏感性的测定 (图 1)。结果表明, Foc4 野生型菌株对多菌灵表现

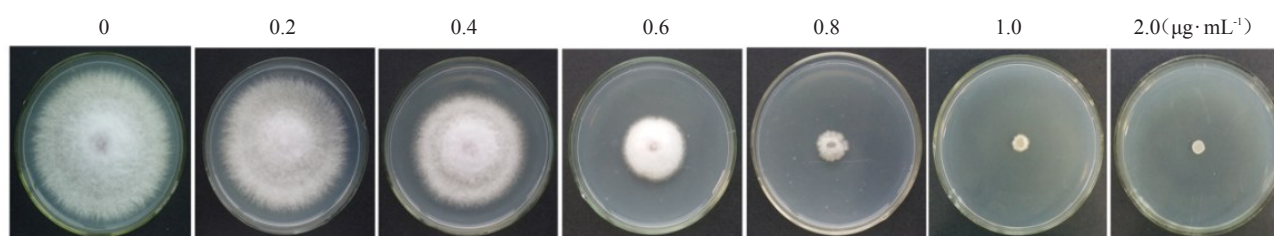


图 1 Foc4 在不同浓度多菌灵 PDA 平板上的菌落生长情况

Fig. 1 Colony growth of Foc4 on potato dextrose agar (PDA) supplemented with carbendazim at different concentrations

为敏感 ( $EC_{50}=0.51 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

### 2.2 $\beta 2$ -*tub* 基因的序列分析和同源性比较

Foc4 的  $\beta 2$ -*tub* 基因全长 1 694 bp, cDNA 全长 1 347 bp, GenBank 登录号: MF668109。该基因序列包含 4 个内含子和 5 个外显子, 编码一个由 448 个氨基酸残基组成的蛋白。

经 BLAST 分析、Clustal X 比对, Foc4 中  $\beta 2$ -*tub* 基因的氨基酸序列, 与尖孢镰刀菌番茄专化型 (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) (XP\_018235853.1) 和禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*) (ACI42314.1) 等几种常见植物病原真菌的  $\beta 2$ -*tub* 氨基酸序列高度同源 (图 2)。

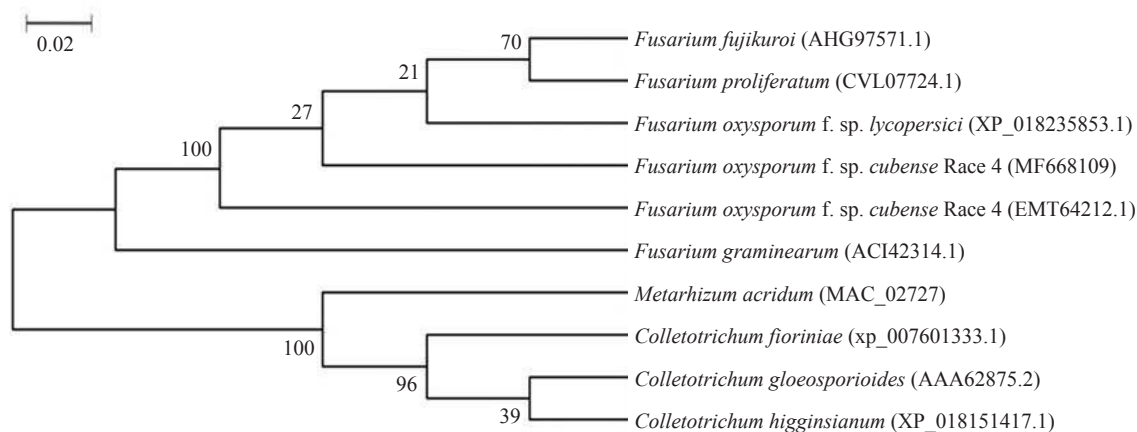


图 2  $\beta 2$ -*tub* 系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of  $\beta 2$ -*tub*

在香蕉枯萎病菌中,  $\beta 1$ -*tub* 和  $\beta 2$ -*tub* 基因的 DNA 序列同源率为 64.67%, 氨基酸序列同源率为

76.34%,  $\beta 1$ -*tub* 和  $\beta 2$ -*tub* 基因所编码的蛋白具有相同的结构域 (图 3)。

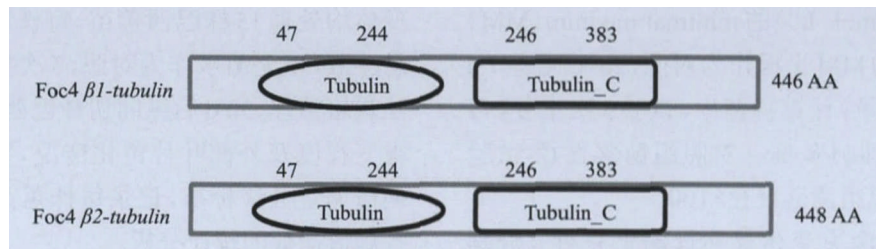


图3  $\beta 1$ -*tub* 和  $\beta 2$ -*tub* 基因的蛋白结构域比较

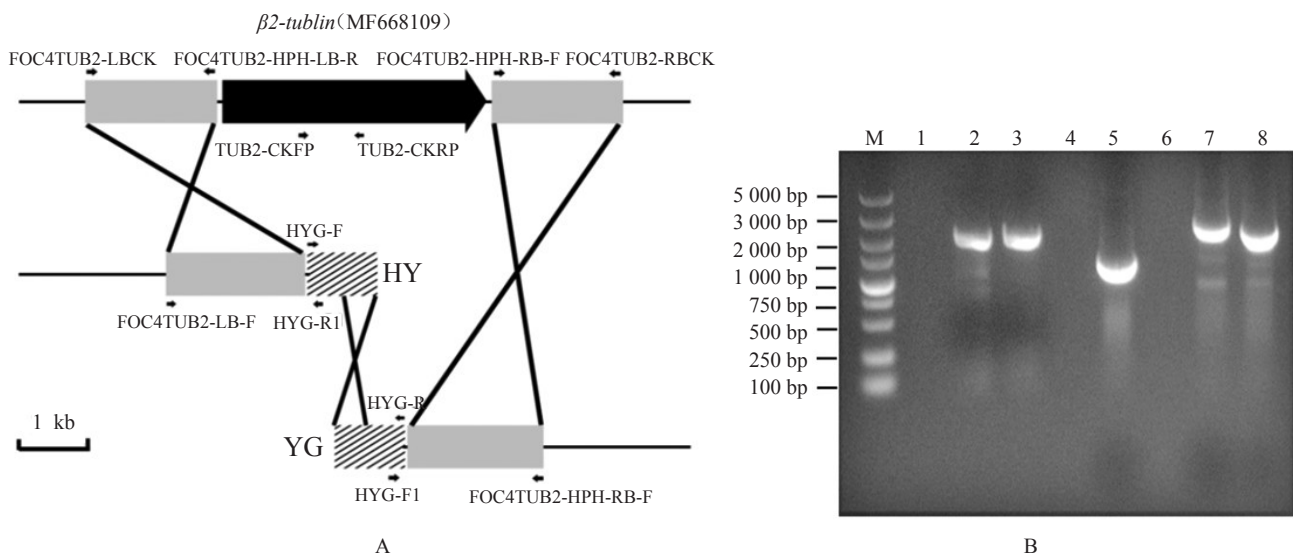
Fig. 3 Comparison of the protein domain of  $\beta 1$ -*tub* and  $\beta 2$ -*tub* genes

### 2.3 $\beta 2$ -*tub* 基因敲除重组片段扩增与突变体获得

采用 Split-marker 重组技术原理(图4-A), 进行 PCR 扩增。扩增目的条带如图4-B所示, 第一轮 PCR 扩增的上下游片段, 大小约为 1 963 bp 和 1 966 bp, 同时扩增出潮霉素(HYG)基因片段, 大小约为 1 376 bp; 第二轮 PCR 扩增出用于原生质体转化的上下游重组片段, 大小约为 2 524 bp 和 2 303 bp。

### 2.4 $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体的 PCR 鉴定

经过潮霉素抗性筛选和再生培养, 获得  $\beta 2$ -*tub* 敲除转化子。分别提取 Foc4 野生型菌株基因组 DNA 和敲除转化子基因组 DNA, 并以此为模版, 分别用引物 FOC4TUB2- LBCK/HPT- LBCK、HPT- RBCK/FOC4TUB2- RBCK、HYG- F/HYG- R 和 TUB2-CKFP/TUB2-CKRP 进行 PCR 扩增, 鉴定阳性



A. Split-marker 同源重组敲除  $\beta 2$ -*tub* 基因示意图; B. 上下游重组片段的二轮 PCR 扩增: 1, 4, 6. 水(对照); 2~3. 第一轮 PCR 扩增上下游片段; 5. HYG 基因扩增条带; 7~8. 第二轮 PCR 扩增上下游重组片段; M. DNA Marker DL 5000。

A. Schematic map for Split-marker homologous recombination knockout  $\beta 2$ -*tub* gene; B. Two rounds of PCR amplification of upstream and downstream recombination fragments. 1, 4, 6. Water as a control; 2-3. Upstream and downstream fragments of PCR amplification in the first round; 5. Amplification bands of HYG gene; 7-8. Upstream and downstream recombinant fragments of second round PCR amplification; M. DNA Marker DL 5000.

图4  $\beta 2$ -*tub* 基因敲除重组片段的扩增

Fig. 4 Amplification of  $\beta 2$ -*tub* gene knockout recombinant fragments

转化子。以其中 3 个转化子用引物 FOC4TUB2- LBCK/HPT- LBCK 和 HPT- RBCK/FOC4TUB2- RBCK 进行 PCR 扩增, 分别扩增出约 2.4 kb 和 2.0 kb 的目的条带, 与预计大小一致, 而 Foc4 野生型 DNA 模版无扩增条带(图 5-A)。用引物 HYG- F/HYG- R 进行 PCR 扩增, 获得约 1.4 kb 的目的条带, 与预计大

小一致, 而以 Foc4 基因组 DNA 为模版无此扩增条带(图 5-B)。用引物 TUB1-CKFP/TUB1-CKRP 进行 PCR 扩增,  $\beta 2$ -*tub* 敲除转化子无扩增条带, 以 Foc4 基因组 DNA 为模版扩增得到约 0.9 kb 的条带(图 5-C), 与预计大小一致。这些结果表明, 这 3 个转化子的  $\beta 2$ -*tub* 基因已被敲除, 故将其分别命名为  $\Delta\beta 2$ -

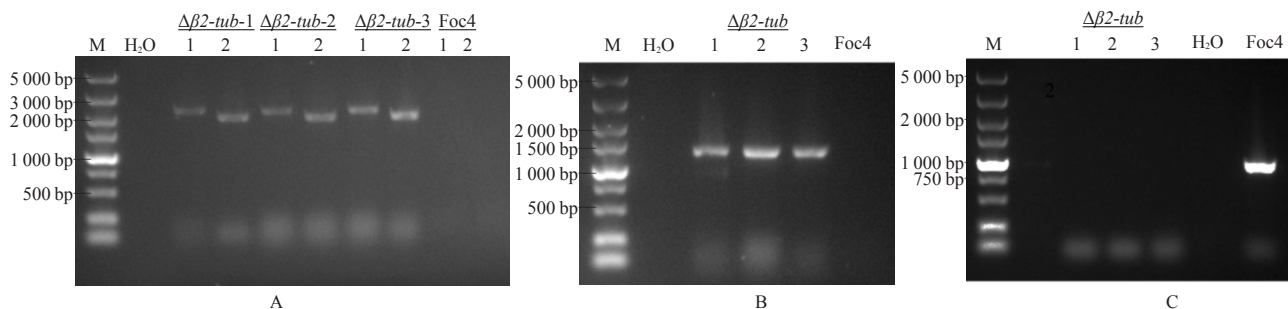


图 5 PCR 验证  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体  
 Fig. 5 Identification of  $\beta 2$ -*tub* knockout mutants by PCR

A: 1~2.  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体上下游重组片段 PCR 扩增, 条带大小分别为 2 356 bp、2 059 bp, H<sub>2</sub>O 和 Foc4 为对照, M. DNA Marker DL 5000; B:  $\Delta\beta 2$ -*tub*-1、2、3. 敲除突变体潮霉素 PCR 扩增, 条带大小为 1 376 bp, H<sub>2</sub>O 和 Foc4 为对照, M. DNA Marker DL 5000; C:  $\Delta\beta 2$ -*tub*-1、2、3. 敲除突变体内源基因 PCR 扩增, H<sub>2</sub>O 和 Foc4 为对照, 条带大小为 919 bp, M. DNA Marker DL 5000.

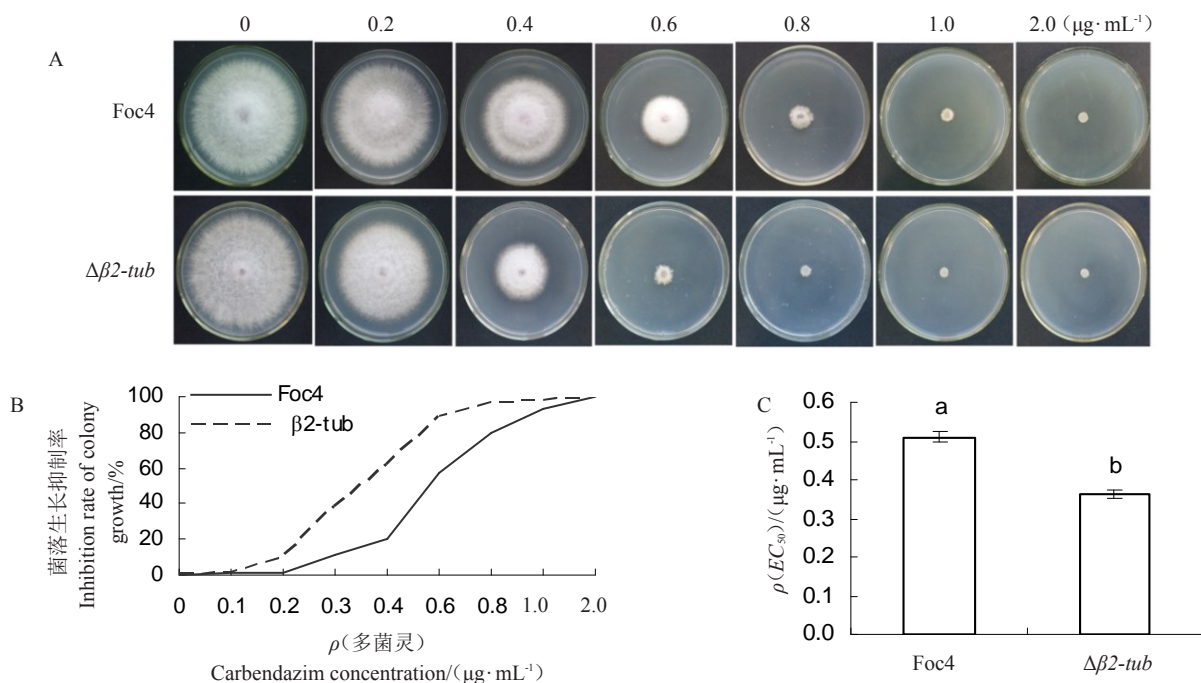
A: 1-2. PCR amplification of knockout mutants of upstream and downstream recombinant fragments, the band sizes were 2 356 bp and 2 059 bp, H<sub>2</sub>O and Foc4 were used controls, M. DNA Marker DL 5000; B:  $\Delta\beta 2$ -*tub*-1、2、3. PCR amplification of HYG gene from knockout mutants, the band sizes was 1 376 bp, H<sub>2</sub>O and Foc4 were used controls, M. DNA Marker DL 5000; C:  $\Delta\beta 2$ -*tub*-1、2、3. PCR amplification of endogenous gene from knockout mutants, H<sub>2</sub>O and Foc4 were used controls, the band sizes was 919 bp, M. DNA Marker DL 5000.

*tub*-1、 $\Delta\beta 2$ -*tub*-2 和  $\Delta\beta 2$ -*tub*-3。选取  $\Delta\beta 2$ -*tub*-1 敲除突变体作为研究对象进行后续试验研究。

### 2.5 $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体对多菌灵的敏感性测定分析

将 Foc4 野生型菌株和  $\Delta\beta 2$ -*tub* 菌株分别接种在

含有不同浓度多菌灵的 PDA 平板中, 测定  $\Delta\beta 2$ -*tub* 菌株对多菌灵敏感性(图 6-A)。结果表明,  $\Delta\beta 2$ -*tub* 对多菌灵的敏感性( $EC_{50}$ =0.36  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )表现为显著增强, 与 Foc4 野生型菌株对多菌灵的敏感性( $EC_{50}$ =0.51  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )相比较差异显著(图 6-B、C), 说明  $\Delta\beta$



A. Foc4 野生型菌株和  $\Delta\beta 2$ -*tub* 在不同浓度多菌灵的 PDA 平板上的菌落生长情况; B. Foc4 和  $\Delta\beta 2$ -*tub* 对多菌灵的剂量反应曲线; C. Foc4 和  $\Delta\beta 2$ -*tub* 对多菌灵的抑制中浓度  $EC_{50}$ ; 表中误差线代表 3 次生物学重复的标准误差, 不同小写字母代表在  $p < 0.05$  显著差异。下同。

A. Colony growth of Foc4 and  $\Delta\beta 2$ -*tubulin* on potato dextrose agar (PDA) supplemented with carbendazim at different concentrations; B. Dose-response curves of Foc4 and  $\Delta\beta 2$ -*tub* mutants to MBC; C. The half maximal effective concentration of Foc4 and  $\Delta\beta 2$ -*tub* to MBC; The error line in the table represents the standard error of three biological repetitions, and different small letters indicate significant difference at  $p < 0.05$ . The same below.

图 6  $\beta 2$ -*tub* 敲除突变体对多菌灵的敏感性分析  
 Fig. 6 Sensitivity analysis of  $\beta 2$ -*tub* knockout mutants to MBC

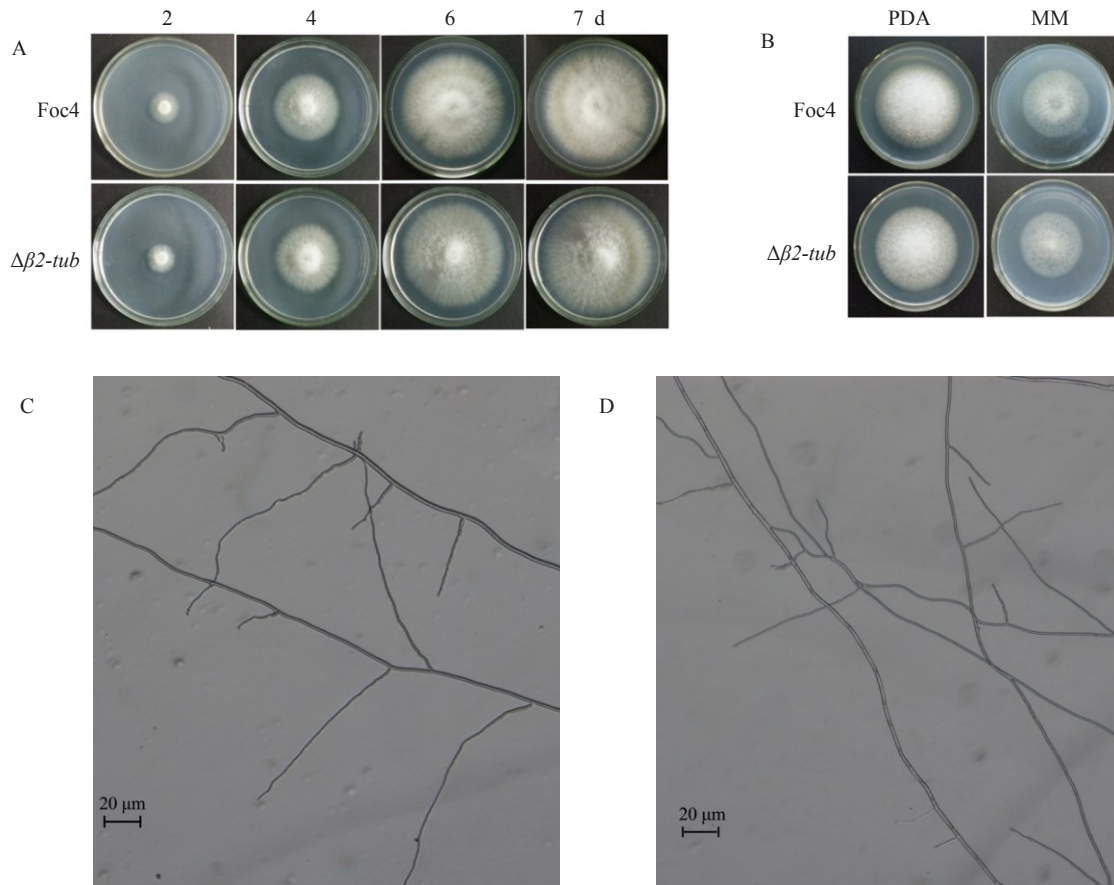
*2-tub* 对多菌灵的抗性显著下降。

## 2.6 $\beta 2-tub$ 基因敲除突变体的生长特性分析

### 2.6.1 $\beta 2-tub$ 基因敲除突变体的生长速度和产孢量分析

将 *Foc4* 野生型菌株和  $\Delta\beta 2-tub$  突变体菌株分别接种于 MM 和 PDA 培养基上, 每天测量菌落直径大小, 结果显示,  $\Delta\beta 2-tub$  与 *Foc4* 的菌落生长速度基

本一致, 差异不显著(图 7-A、B)。通过计算平板菌落生长的孢子产量, 结果表明,  $\Delta\beta 2-tub$  的孢子数(每  $\text{mm}^2$   $1.355 \times 10^6$ )与 *Foc4* 的孢子数(每  $\text{mm}^2$   $1.232 \times 10^6$ )差异不显著。通过光学显微镜观察 *Foc4* 和  $\Delta\beta 2-tub$  的菌丝, 结果发现  $\Delta\beta 2-tub$  的菌丝生长正常(图 7-C、D)。



A. *Foc4* 和  $\Delta\beta 2-tub$  的 PDA 平板菌落生长形态(2、4、6 和 7 d); B. *Foc4* 和  $\Delta\beta 2-tub$  在 PDA 和 MM 培养基上生长 5 d 的菌落形态; C. *Foc4* 野生型菌株菌丝生长形态; D.  $\Delta\beta 2-tub$  菌株菌丝生长形态。

A. The colonies morphology of *Foc4* and  $\Delta\beta 2-tub$  on the PDA plate (2, 4, 6 and 7 d); B. Growth of colonies for 5 days of *Foc4* and  $\Delta\beta 2-tub$  on PDA and MM mediums; C. The mycelial growth form of *Foc4*; D. The mycelial growth form of  $\Delta\beta 2-tub$ .

图 7 敲除突变体生长特性分析

Fig. 7 Analysis of growth characteristics of knockout mutants

### 2.6.2 $\beta 1-tub$ 基因敲除突变体对胁迫因子的敏感性分析

在含有  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CR (Congo Red) 和  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CFW (Calcofluor White) 条件下, *Foc4* 野生型菌株和  $\Delta\beta 2-tub$  突变体菌株的生长均受到相同程度的抑制; 在含  $0.7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl 和  $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Sorbitol 的培养基上, *Foc4* 和  $\Delta\beta 2-tub$  均表现出一致的长势, 生长没有受到抑制; 在含  $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  的培养基中, *Foc4* 和  $\Delta\beta 2-tub$  的生长均受到相同程度的抑制(图 8)。以上结果表明,  $\Delta\beta 2-tub$

对细胞壁选择性压力、氧化压力和渗透压均不敏感。

### 2.7 $\beta 2-tub$ 基因敲除突变体的致病性

将 *Foc4* 和  $\Delta\beta 2-tub$  突变体菌株分别接种巴西蕉 (Cavendish, AAA) 幼苗。30 d 后观察, 结果发现接种野生菌株的巴西蕉苗叶片出现黄化枯萎现象, 植株下部叶片大部分褪绿、变黄, 且切开球茎观察到球茎部位褐化严重, 而接种  $\Delta\beta 2-tub$  菌株的巴西蕉苗植株下部少数叶片变黄, 球茎出现褐化现象, 接种  $\text{H}_2\text{O}$



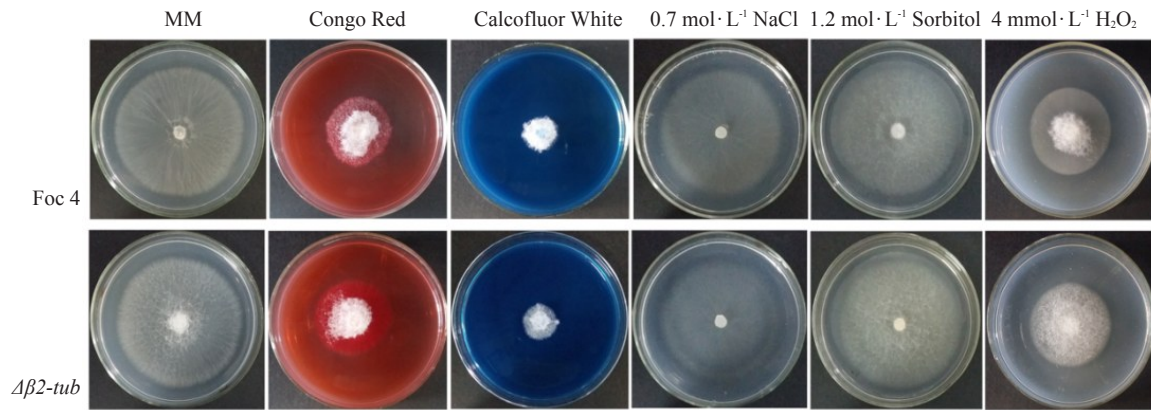
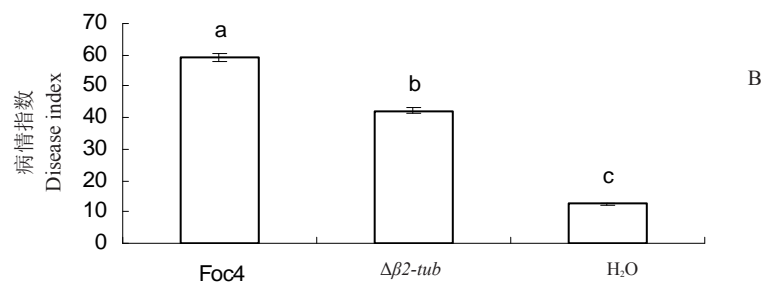


图 8  $\beta 2$ -*tub* 基因敲除突变体在不同胁迫因子的 MM 平板上 (生长 7 d) 的菌落情况

Fig. 8 Effects of stress factors on colony growth of wild type and  $\Delta\beta 2$ -*tub* on the MM plate (growth of 7 days)

的对照巴西蕉苗没有出现叶片黄化现象, 且球茎无褐化现象(图 9-A)。根据病情指数统计, 结果显示, 接种  $\Delta\beta 2$ -*tub* 菌株的巴西蕉苗平均病情指数(42.24)

显著低于 Foc4 接种的平均病情指数(59.17)(图 9-B)。这表明  $\beta 2$ -*tub* 基因在 Foc4 的致病力方面发挥重要作用。



A. Foc4 野生型菌株和  $\Delta\beta 2$ -*tub* 菌株侵染巴西蕉的球茎发病症状对比。Foc4. 野生型菌株侵染的巴西蕉苗,  $\Delta\beta 2$ -*tub*. 敲除突变体菌株侵染的巴西蕉苗, H<sub>2</sub>O. 对照; B. 巴西蕉苗病情指数。Foc4. 野生型菌株侵染的巴西蕉苗,  $\Delta\beta 2$ -*tub*. 敲除突变体菌株侵染的巴西蕉苗, H<sub>2</sub>O. 对照。

A. The corm phenotype of banana inoculated by WT and  $\Delta\beta 2$ -*tub*. Foc4. Phenotype of banana inoculated by WT,  $\Delta\beta 2$ -*tub*. Phenotype of banana inoculated by  $\Delta\beta 2$ -*tub*, H<sub>2</sub>O was used control; B. The disease indexes of the banana. Foc4. Phenotype of banana inoculated by WT,  $\Delta\beta 2$ -*tub*. Phenotype of banana inoculated by  $\Delta\beta 2$ -*tub*, H<sub>2</sub>O was used control.

图 9  $\beta 2$ -*tub* 基因敲除突变体的致病力测定

Fig. 9 Pathogenicity test of  $\beta 2$ -*tub* mutant strain

### 3 讨论

在真核生物中, 微管普遍存在, 并且在真核蛋白中具有高度保守性<sup>[21]</sup>,  $\beta 2$ -*tub* 是微管结构最主要的

成分, 作为微管蛋白的主要组成之一, 同时也是多菌灵等苯并咪唑类杀菌剂的作用靶标<sup>[22]</sup>。大多数病原真菌对苯并咪唑类药剂的抗性与  $\beta 2$ -*tub* 的变化有关。其中, 灰葡萄孢菌对苯并咪唑类药剂的抗性是

由于 $\beta$ -微管蛋白的变化引起的,而禾谷镰刀菌是由于 $\beta 2$ -*tub*的变化而引起的抗药性<sup>[23]</sup>。在真菌基因组中,存在1个或2个 $\beta 2$ -*tub*基因<sup>[24]</sup>。在植物病原真菌中,也有一些 $\beta 2$ -*tub*被报道,如灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)存在1个 $\beta 2$ -*tub*基因,禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)存在2个 $\beta 2$ -*tub*基因<sup>[25]</sup>。本研究中,笔者克隆并鉴定了香蕉枯萎病菌的 $\beta 2$ -*tub*基因,发现与 $\beta 1$ -*tub*基因氨基酸序列高度同源,编码相同的结构域,并且与其他植物病原真菌的 $\beta 2$ -*tub*基因存在很高的同源性,基因高度保守。

本研究测定了Foc4对多菌灵的敏感性,发现多菌灵对Foc4有很好的抑菌活性,这与范鸿雁等<sup>[25]</sup>测定香蕉枯萎病菌对多菌灵的敏感性、毕朝位等<sup>[26]</sup>测试禾谷镰孢菌对多菌灵敏感性所得结果一致。与Foc4野生菌相比, $\beta 2$ -*tub*基因敲除突变体对多菌灵的敏感性显著增强,其 $EC_{50}$ 值显著低于野生菌株,这与曾凡松等<sup>[16]</sup>研究禾谷镰刀菌 $\beta 2$ -*tub*基因敲除突变体对多菌灵超敏感的结果一致。然而, $\beta 2$ -*tub*基因敲除突变体的生物学表型与野生菌差别不明显,无论是在菌落生长形态、生长速率、产孢量、菌丝生长形态方面,还是对细胞壁选择性压力、氧化压力和渗透压力方面均差异不显著,这与毕朝位等<sup>[26]</sup>比较禾谷镰刀菌2个 $\beta 2$ -*tub*基因敲除突变体的生物学表型与野生菌的研究结果存在差异<sup>[26]</sup>。同时,本研究还发现 $\beta 2$ -*tub*基因的缺失导致香蕉枯萎病菌的致病力减弱,这与刘圣明<sup>[27]</sup>研究禾谷镰刀菌 $\beta 2$ -*tub*基因敲除突变体的致病力降低结果一致。综上所述, $\beta 2$ -*tub*基因在进化过程中存在高度保守性,但在不同植物病原菌中, $\beta 2$ -*tub*发挥不同的功能。敲除了 $\beta 2$ -*tub*基因,突变体菌株对多菌灵的敏感性增强,对巴西蕉苗的致病力降低,因此,笔者推测 $\beta 2$ -*tub*基因在Foc4对多菌灵的抗药性及致病力等方面发挥重要功能,但是对Foc4致病性的具体调控机制还需进一步研究。

## 4 结 论

香蕉枯萎病菌野生菌株和 $\beta 2$ -*tub*基因敲除突变体菌株对多菌灵均保持很高的敏感性,其中, $\beta 2$ -*tub*基因敲除突变体对多菌灵表现为敏感性显著增加,这表明 $\beta 2$ -*tub*基因的缺失会引起突变体对多菌灵抗性的改变。 $\beta 2$ -*tub*基因高度保守,具有典型的微管蛋白结构域。 $\beta 2$ -*tub*基因敲除突变体的生物学表

型,包括生长速率、产孢量、菌丝形态、对细胞壁选择性压力、氧化压力和渗透压力均不存在明显差异,但对巴西蕉苗的致病力显著降低。

## 参考文献 References:

- [1] PLOETZ R C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Phytopathology*, 2006, 96(6): 648.
- [2] HWANG S C, KOW H. Cavendish banana cultivars resistant to fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan [J]. *Plant Disease*, 2004, 88(6): 580-588.
- [3] 彭埃天,宋晓兵,凌金锋,刘景梅. 香蕉枯萎病菌4号生理小种分子检测与枯萎病生物防治研究进展[J]. *果树学报*, 2009, 26(1): 77-81.  
PENG Aitian, SONG Xiaobing, LING Jinfeng, LIU Jingmei. Advances in research on molecular detection and biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4[J]. *Journal of Fruit Science*, 2009, 26(1): 77-81.
- [4] 郭立佳,杨腊英,彭军,王国芬,梁昌聪,刘磊,黄俊生. 不同药剂防治香蕉枯萎病效果评价[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(1): 188-192.  
GUO Lijia, YANG Laying, PENG Jun, WANG Guofen, LIANG Changcong, LIU Lei, HUANG Junsheng. Evaluation of control affection of fungicides on Fusarium Wilt of banana[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29(1): 188-192.
- [5] 宁家相,王振通. 几种药剂对香蕉枯萎病防治效果研究[J]. *农家科技旬刊*, 2016(1): 1.  
NING Jiexiang, WANG Zhentong. Study on the effect of prevention and control of several chemicals on Fusarium Wilt of banana [J]. *Farm Technology Magazine*, 2016(1): 1.
- [6] LIN B, SHEN H. *Fusarium oxysporum*, f. sp. *cubense* [M]. Singapore: Springer, 2017.
- [7] 齐兴柱,杨腊英,黄俊生. FOC4的2个过氧化氢酶基因的克隆与表达分析及其引起的香蕉苗活性氧迸发研究[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(15): 163-169.  
QI Xingzhu, YANG Laying, HUANG Junsheng. Cloning and expression analysis of two catalase gene of FOC4 and the study on the oxidative burst in banana by FOC4[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(15): 163-169.
- [8] 王小琳,李春强,杨景豪,李文彬,孙建波,彭明. 香蕉枯萎病菌4号生理小种*cat1*基因敲除与表型分析[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(2): 335-342.  
WANG Xiaolin, LI Chunqiang, YANG Jinghao, LI Wenbin, SUN Jianbo, PENG Ming. Gene knockout and phenotype analysis of the *catalase-1* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(2): 335-342.
- [9] DING Z J, LI M, SUN F, XI P G, SUN L H, ZHANG L H, JIANG Z D. Mitogen-activated protein kinases are associated with the regulation of physiological traits and virulence in *Fu-*

- sarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0122634.
- [10] GUO L J, YANG L Y, LIANG C C, WANG J, LIU L, HUANG J S. The G-protein subunits FGA2 and FGB1 play distinct roles in development and pathogenicity in the banana fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Physiological & Molecular Plant Pathology, 2016, 93: 29-38.
- [11] QI X, GUO L J, YANG L Y, HUANG J S. Foatf1, a bZIP transcription factor of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, is involved in pathogenesis by regulating the oxidative stress responses of Cavendish banana (*Musa* spp.) [J]. Physiological & Molecular Plant Pathology, 2013, 84(5): 76-85.
- [12] 林兰稳,奚伟鹏,黄赛花. 香蕉镰刀菌枯萎病防治药剂的筛选 [J]. 生态环境学报, 2003, 12(2): 182-183.  
LIN Lanwen, XI Weipeng, HUANG Saihua. Screening of preventive fungicide of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Ecology and Environment, 2003, 12(2): 182-183.
- [13] 王芳,李静,洪文兴. 几种杀菌剂对香蕉枯萎病菌的抑制作用 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48(1): 100-101.  
WANG Fang, LI Jing, HONG Wenxing. Antifungal activity of several fungicides to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from banana [J]. Hubei Agricultural Science, 2009, 48(1): 100-101.
- [14] QIU J B, HUANG T T, XU J Q, BI C W, CHEN C J, ZHOU M G.  $\beta$ -Tubulins in *Gibberella zeae*: their characterization and contribution to carbendazim resistance [J]. Pest Management Science, 2012, 68(8): 1191-1198.
- [15] CHEN C J, YU J J, BI C W, ZHANG Y N, XU J Q, WANG J X. Mutations in a beta-tubulin confer resistance of *Gibberella zeae* to benzimidazole fungicides [J]. Phytopathology, 2009, 99(12): 1403-1411.
- [16] 曾凡松,尹合兴,史文琦,汪华,杨立军,龚双军,张学江,向礼波,喻大昭.  $\beta$ 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.  
ZENG Fansong, YIN Hexing, SHI Wenqi, WANG Hua, YANG Lijun, GONG Shuangjun, ZHANG Xuejiang, XIANG Libo, YU Dazhao. Function analysis of  $\beta$ 1-tub and  $\beta$ 2-tub in resistance of *Gibberella zeae* to carbendazim [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(4): 695-704.
- [17] 王飞燕,郭立佳,杨腊英,汪军,王国芬,黄俊生. 尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种 *fpd1* 基因敲除与表型分析 [J]. 热带作物学报, 2015, 36(8): 1462-1468.  
WANG Feiyan, GUO Lijia, YANG Laying, WANG Jun, WANG Guofen, HUANG Junsheng. Construction and phenotype analysis of the *fpd1* deletion mutants of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(8): 1462-1468.
- [18] 徐齐君,胡小平,陈婷,赵俊兴. PEG介导的棉花枯萎病菌原生质体转化体系的建立 [J]. 棉花学报, 2012, 24(3): 222-228.  
XU Qijun, HU Xiaoping, CHEN Ting, ZHAO Junxing. Protoplast transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* mediated by polyethylene glycol [J]. Cotton Science, 2012, 24(3): 222-228.
- [19] 漆艳香,谢艺贤,张欣,张辉强. 香蕉枯萎菌基因组 DNA 提取方法的研究 [J]. 生物技术, 2004, 14(6): 32-34.  
QI Yanxiang, XIE Yixian, ZHANG Xin, ZHANG Huiqiang. Study of DNA extraction methods in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Biotechnology, 2004, 14(6): 32-34.
- [20] 谢子四,张欣,陈业渊,罗石荣,魏守兴. 10份香蕉种质对枯萎病的抗性评价(简报) [J]. 热带作物学报, 2009, 30(3): 362-364.  
XIE Zisi, ZHANG Xin, CHEN Yeyuan, LUO Shirong, WEI Shouxing. Assessment of banana germplasm for resistance to *Fusarium wilt* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30(3): 362-364.
- [21] 李红霞,陆悦健,王建新,周民国. 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.  
LI Hongxia, LU Yuejian, WANG Jianxin, ZHOU Mingguo. Cloning of  $\beta$ -tubulin gene from *Gibberella zeae* and analysis its relationship with carbendazim-resistance [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(4): 424-429.
- [22] LIU X, YIN Y, WU J, JIANG J, MA Z H. Identification and characterization of carbendazim-resistant isolates of *Gibberella zeae* [J]. Plant Disease, 2010, 94(9): 1137-1142.
- [23] 刘圣明. 灰葡萄孢菌抗多菌灵  $\beta$ -微管蛋白基因在禾谷镰孢菌中的表达研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.  
LIU Shengming. Expression of the  $\beta$ -tubulin gene of carbendazim-resistant *Botrytis cinerea* transferred into *Fusarium graminearum* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [24] LUDUENA R F. Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications [J]. International Review of Cytology, 1998, 178(178): 207-275.
- [25] 范鸿雁,谢艺贤,张辉强. 几种杀菌剂对香蕉枯萎病菌的室内毒力测定 [J]. 农药, 2004, 43(3): 142-143.  
FAN Hongyan, XIE Yixian, ZHANG Huiqiang. Toxicity of several fungicides to the banana vascular wilt pathogen [J]. Chinese Journal of Pesticides, 2004, 43(3): 142-143.
- [26] 毕朝位. 禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum* Schwabe 两个  $\beta$ -微管蛋白基因功能及对多菌灵的抗药性分子机制 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.  
BI Chaowei. Functions of two  $\beta$ -tubulin genes and carbendazim-resistance mechanisms in *Fusarium graminearum* Schwabe [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.
- [27] LIU S, DUAN Y, GE C. Functional analysis of the  $\beta$ 2-tubulin gene of *Fusarium graminearum* and the  $\beta$ -tubulin gene of *Botrytis cinerea* by homologous replacement [J]. Pest Management Science, 2013, 69(5): 582-588.