

土壤拮抗放线菌 S-5210-6 活性产物 抑菌谱及其作用机制

陈 丽¹ 疏秀林² 安德荣^{1*} 谢芳芹¹ 李 晶¹

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室,
陕西 杨凌 712100; 2. 广东省微生物研究所, 广州 510070)

摘要: 为了明确拮抗性放线菌 S-5210-6 在植物病害生物防治中的实用价值, 并为其后续的生防制剂的研发提供科学依据, 在离体条件下采用生长速率法和抑菌圈法和在活体条件下采用盆栽法对其活性产物的抑菌谱进行测定。结果表明, 在离体条件下 S-5210-6 活性产物对病原细菌具有选择性抑制作用, 对供试的病原真菌均有较强的抑制作用; 在温室条件下, 对专性寄生病原菌黄瓜霜霉病菌, 不仅能阻止其菌丝的入侵, 而且对已侵入的菌丝有很好的治疗作用。采用生长速率法和孢子萌发法对 S-5210-6 菌株活性产物作用机制进行了研究, 结果表明, S-5210-6 菌株活性产物不仅能强烈抑制病原菌菌丝的生长和分生孢子的萌发, 而且经 S-5210-6 活性产物处理的病原菌菌丝和初萌发的分生孢子, 接种寄主植物后, 其致病性明显减弱, 病斑的扩展减慢, 且致病性的减弱程度与活性产物的浓度呈正相关关系。

关键词: 拮抗放线菌; S-5210-6 活性产物; 抑制作用; 致病性

Inhibiting range and mechanism of the active product of S-5210-6

CHEN Li¹ SHU Xiu-lin² AN De-rong^{1*} XIE Fang-qin¹ LI Jing¹

(1. College of Plant Protection, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, Guangdong Province, China)

Abstract: A study on inhibiting range and mechanism of the active product of S-5210-6 was launched for the sake of evaluating the application significance of the S-5210-6 for the biological control of plant diseases, and providing scientific basis for the follow up research on their development. The inhibiting range of the active product of S-5210-6 was studies by means of mycelium growth rate and inhibition zone *in vitro* and potted plant *in vivo*, respectively. The active product of S-5210-6 had a selective inhibition to pathogenic bacteria and a wide-range of inhibition to pathogenic fungi. It had a strong antagonistic action to 12 pathogens *in vitro*. To obligate parasite pathogens like *Pseudoperonospora cubensis*, the active product of S-5210-6 could not only hold back the infection of mycelia, but also heal the spot where infected by mycelia. The mechanism of the active product of S-5210-6 was studies. The active product of S-5210-6 had a strong inhibition of the mycelia growth and spore germination, and the pathogenicity of mycelia and spore was reduced after treated with the active product of S-5210-6. With the high concentration of the active product of S-5210-6, their pathogenicity was remarkably reduced.

Key words: Antagonistic actinomycete; the active product of S-5210-6; inhibition effect; pathogenicity

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助 (No. 200558)

作者简介: 陈丽, 女, 1975 年生, 助理研究员, 主要从事微生物资源开发利用, email: chenli5262@sina.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: anderong323@163.com; 收稿日期: 2007-01-30

生物农药来源于自然,具有环境兼容性好、持效期长、低毒、对人畜和天敌安全等特点,因此越来越受到重视^[1]。拮抗性微生物是生物农药的重要来源之一,加强拮抗菌的筛选及其应用基础研究对于大力发展生物农药具有巨大的促进作用。据统计,在 1000 多种抗生素中约有 2/3 以上是由放线菌产生的,放线菌种类繁多,代谢功能各异,是一类有着广泛实际用途的微生物资源。从 Cohn (1872) 发现放线菌以来,已经报道了 69 个属 1687 个种^[2],用在植物病害生物防治中的主要是链霉菌属及其相关类群^[3]。

秦岭是我国长江、黄河的分水岭和南北气候的分界线,是我国东西和南北生物的交汇过渡地带,被誉为“世界生物基因库”,其放线菌资源具有巨大的培养潜力,因此进一步开展放线菌抑菌活性物质的研制和开发,对于放线菌资源的发掘利用及农作物病虫害的综合治理具有重要的意义。本实验室从 1988 年开始,对秦岭山区不同生态环境原始森林土壤中放线菌资源进行了研究,分离筛选出多株具有强烈抑制作用的菌株^[4],其中 S-5210-6 菌株对水稻稻瘟病菌、小麦赤霉病菌等多种病原菌具有强烈的拮抗和溶菌作用,初步判定其为链霉菌属淡紫灰类群^[5]。为了明确该活性物质在植物病害生物防治中的实用价值,并为其后续的生防制剂的研发提供科学依据,作者对其活性产物的抑菌谱及作用机制进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:链霉菌属放线菌 S-5210-6 菌株由本实验室提供。

1.1.2 供试病原菌:水稻稻瘟病菌 *Pyricularia grisea*、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、番茄叶霉病菌 *Fulvia fulva*、小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、番茄枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、番茄早疫病菌 *Alternaria solani*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*、小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces graminis*、黄瓜霜霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis*、油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、茄青枯病菌 *Rolstonia solanacearum*、巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*、水稻白叶枯病菌 *Xan-*

thomonas oryzae pv. *oryzae*、黄瓜细菌性角斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*、马铃薯环腐病菌 *Clavibacter michiganensis* pv. *sepedonicum*、白菜软腐病菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 均由西北农林科技大学植物病理学实验室菌库提供。

1.1.3 S-5210-6 活性产物的制备:将 S-5210-6 菌株发酵液经沉淀预处理后,用乙酸乙酯进行萃取,浓缩,浓缩物用甲醇溶解,加蒸馏水离心,得黄褐色的粗提物,用丙酮溶解收集备用。

1.1.4 供试植物:番茄(毛粉 802)购自西安阳光种业有限公司;黄瓜(秋魁)购自西安阳光种业有限公司;烟草(NC89)由本实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 S-5210-6 活性产物的抑菌谱测定:离体试验:S-5210-6 活性产物对真菌的抑制作用采用菌丝生长速率法^[6]。将 1.1.3 中制备的黄褐色粗提物与溶化的 PDA 培养基混合,制备成不同浓度的混合药液培养基,以无菌水作对照,待培养基凝固后,接种病原真菌菌饼,置于 26℃ 恒温箱中培养 4 天,测量菌落直径,计算菌丝生长抑制率。抑制率(%) = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径)/对照菌落直径] × 100。S-5210-6 活性产物对细菌的抑制作用采用抑菌圈法^[6]。将 1.1.3 中制备的黄褐色粗提物稀释成不同浓度的药液,用消毒镊子夹取灭菌圆形滤纸片投入药液中,1 min 后取出,放在吸水纸上 5 min,用镊子夹取带药滤纸片放入含菌液的 NA 培养基上,在 4℃ 冰箱中放置 4 h,然后取出放在 26℃ 恒温箱中培养 36 h 取出,用卡尺交叉测量抑菌圈的直径。活体试验:对于专性寄生病原菌黄瓜霜霉病菌采用活体培养的方法,以 2.5 mL/L 的农抗-120 和无菌水作对照,进行如下处理:①保护作用的测定:每棵黄瓜植株上先喷 S-5210-6 不同浓度粗提物,48 h 后,用悬滴法接种霜霉孢子,保湿 48 h,7 天后测定病斑数,根据位点发病率计算防治效果;②治疗作用测定法:先接种霜霉孢子,保湿 48 h,再接种不同浓度粗提物,7 天后测量病斑直径,并计算防治效果。

1.2.2 S-5210-6 活性产物对病原菌菌丝生长的抑制作用:采用生长速率法^[6]。

1.2.3 S-5210-6 活性产物对病原菌菌丝致病性的影响:将病原菌接种在含 10 ~ 100 μg/mL 活性粗提物的 PDA 培养基和空白对照 PDA 培养基上,在 24℃ 下培养 3 天后,用打孔器在各菌边缘取直径为 5 mm 的菌丝块。然后接种到离体叶片中央,每一浓度接

种 3 片叶片。在 24℃ 光照培养箱内培养 96 h 后测量病斑大小。

1.2.4 S-5210-6 活性产物对病原菌分生孢子萌发的抑制作用^[7,8]:将 1 mL 病原菌分生孢子悬浮液分别加到含不同浓度粗提物的 4 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基中,充分混匀。吸取孢子培养液混合物置于灭菌的凹玻片,放在培养皿内,28 ~ 30℃ 保湿培养 16 h 后,镜检孢子萌发情况,凡是芽管超过孢子短直径一半时即为萌发,计算分生孢子萌发抑制率。萌发抑制率(%) = [(对照萌发率 - 处理萌发率)/对照萌发率] × 100。

1.2.5 S-5210-6 活性产物对初萌发的病原菌分生孢子致病性的影响:将 1 mL 病原菌分生孢子悬浮液加在 4 mL 葡萄糖溶液中,振荡培养(120 r/min, 25℃) 8 h。待孢子萌发率达 95% 以上时,再往混合液中添加活性粗提物至终浓度,每浓度重复 3 次,继续振荡培养。5 min 后每隔一定时间离心除去药液,再加入等体积葡萄糖液,重新悬浮分生孢子。用移液器吸取 100 μL 孢子葡萄糖液混合物,接种在植物叶片中

央。置于光照培养箱内 24℃ 培养 96 h 后,测量各接种点周围病斑直径。

2 结果与分析

2.1 S-5210-6 活性产物的抑菌谱测定

结果表明,S-5210-6 菌株抑菌谱较广,在离体条件下,其活性产物对病原细菌具有选择性抑制作用,对白菜软腐病菌、茄青枯病菌、枯草杆菌和巨大芽孢杆菌具有较强的抑制作用,对水稻白叶枯病菌、黄瓜细菌性角斑病菌和马铃薯环腐病菌没有明显的抑制作用;对供试的 12 种病原真菌均有较强的抑制作用,其中对番茄叶霉病菌、小麦赤霉病菌、水稻稻瘟病菌、小麦根腐病菌、烟草赤星病菌和番茄早疫病病菌的抑制作用最强,对棉花枯萎病菌、小麦全蚀病菌、玉米大斑病菌、番茄枯萎病菌、水稻纹枯病菌和油菜菌核病菌的抑制作用次之;在温室条件下,S-5210-6 活性产物对专性寄生菌黄瓜霜霉病菌,不仅能阻止其菌丝的入侵,而且对已侵入的菌丝有很好的治疗作用(表 1 ~ 3)。

表 1 S-5210-6 活性产物对供试病原真菌的抑制作用

Table 1 Inhibition of S-5210-6 active product on pathogenic fungi

病原真菌 Pathogenic fungus	抑制作用 Inhibition effect			
	100 μg/mL	50 μg/mL	25 μg/mL	10 μg/mL
番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulva</i>	+++	+++	++	+
棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	++	+	-	-
小麦全蚀病菌 <i>Gaeumannomyces graminis</i>	++	++	+	-
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	+++	+++	++	++
水稻稻瘟病菌 <i>Pyricularia grisea</i>	+++	++	+	-
玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	++	+	+	-
番茄枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	++	++	-	-
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	+++	+++	++	+
烟草赤星病菌 <i>Alternaria alternate</i>	+++	+++	++	++
水稻纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	++	++	+	-
番茄早疫病病菌 <i>Alternaria solani</i>	+++	+++	++	++
油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	++	++	+	-

注:“+++”抑制率为 75% ~ 100%;“++”抑制率为 50% ~ 75%;“+”抑制率为 30% ~ 50%;“-”抑制率 ≤ 30%。Note:“+++”indicate inhibition rate 75% - 100%;“++” indicate inhibition rate 50% - 75%;“+”indicate inhibition rate 30% - 50%;“-” indicate inhibition rate ≤ 30%.

2.2 S-5210-6 活性产物对菌丝生长的抑制作用

结果表明,小麦根腐病菌在含 S-5210-6 活性产物的 PDA 培养基上菌丝生长受到明显的抑制作用,且各浓度之间存在着显著性差异,随着活性产物浓度增高,对小麦根腐病菌的抑制作用增强。以浓度的对数值 X 为横坐标、抑制率概率值 Y 为纵坐标进行毒力回归相关分析,得出毒力回归方程 $Y =$

$1.1846X + 3.5525$, EC_{50} 为 16.67 μg/mL。此外,经活性产物处理后的小麦根腐病菌菌落稀薄、菌丝生长极慢并且粗细不均匀,在显微镜下观察菌丝膨大成串珠状、短而粗、分枝增多、聚集成丛枝状,有的生长菌丝的顶端畸形,形成膨胀泡后破裂,导致细胞内物质泄漏(图 1)。

表 2 S-5210-6 活性产物对供试病原细菌的抑制作用

Table 2 Inhibition of S-5210-6 active product on pathogenic bacteria

病原细菌 Pathogenic bacteria	抑制作用 Inhibition effect		
	100 μg/mL	50 μg/mL	25 μg/mL
白菜软腐病菌 <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	+++	+++	++
茄青枯病菌 <i>Rolstonia solanacearum</i>	+++	++	+
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	++	+	+
巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	++	++	+
水稻白叶枯病菌 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	-	-	-
黄瓜细菌性角斑病菌 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	-	-	-
马铃薯环腐病菌 <i>Clavibacter michiganensis</i> pv. <i>sepedonicum</i>	-	-	-

注：“+++”抑菌圈直径≥20 mm；“++”抑菌圈直径 10~20 mm；“+”抑菌圈直径<10 mm；“-”无抑制作用。Note：“+++” indicate inhibition zone ≥20 mm；“++” indicate inhibition zone 10~20 mm；“+” indicate inhibition zone <10 mm；“-” indicate having no inhibition.

表 3 S-5210-6 活性产物对黄瓜霜霉病菌的抑制效果

Table 3 Inhibition of S-5210-6 active product on *Pseudoperonospora cubensis*

处理(μg/mL) Treatment	平均病斑直径(mm) Average diameter of scads	位点发病率(%) Spot infection rate	防治效果(%) Controlling effect
保护作用 Protection			
100		14.3	85.58
10		25.7	74.09
1		30.5	69.25
农抗-120 Nongkang-120		20.1	79.74
治疗作用 Therapy			
100	1.9		84.43
10	4.5		63.11
1	5.1		58.20
农抗-120 Nongkang-120	3.2		73.77
CK	12.2	99.20	

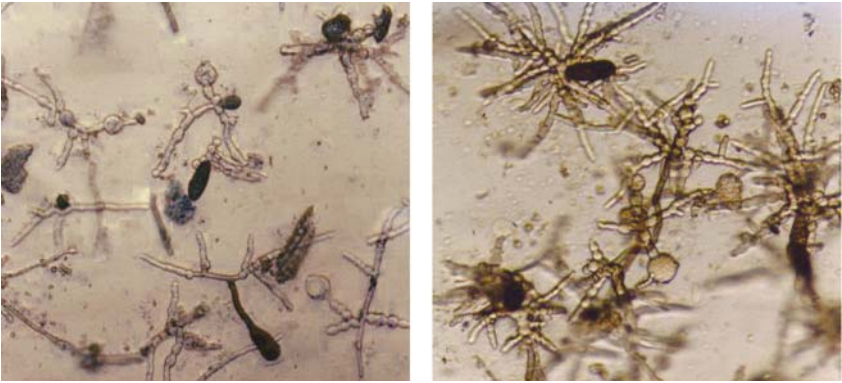


图 1 光学显微镜下小麦根腐病菌菌丝形态 (400 ×)

Fig. 1 The shape of mycelia of *Bipolaris sorokiniana* under optical microscope (400 ×)

注:左为对照,右为处理。下同。Note: Left: CK, Right: Treated with the active product of S-5210-6, the following figures same.

2.3 S-5210-6 活性产物对菌丝致病性的影响

用不同浓度 S-5210-6 活性产物处理番茄叶霉病菌丝后,接种到离体番茄叶片上保湿培养。结果表明,用 S-5210-6 活性产物处理的番茄叶霉病菌丝在番茄叶片上的致病性受到明显的抑制,对照处理的病斑直径为 11.5 mm,10、50 和 100 μg/mL 处理的

病斑直径分别为 10.9、7.8 和 2.9 mm。这充分说明番茄叶霉病菌菌丝致病性的抑制程度与活性产物的浓度呈正相关。随着活性产物浓度增加,菌丝的致病性减弱,病斑扩展减慢。

2.4 S-5210-6 活性产物对分生孢子萌发的抑制作用

结果表明,S-5210-6活性产物在5~100 μg/mL

浓度范围内对烟草赤星病菌和番茄叶霉病菌分生孢子萌发均具有明显的抑制作用,且抑制强度与活性产物的浓度呈正相关(表4)。经 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理的分生孢子几乎不萌发(图2,图3),最低浓度处理对烟草赤星病菌和番茄叶霉病菌分生孢子的萌发抑制率分别为 35.32% 和 20.76%(表4)。

表 4 S-5210-6 活性产物对烟草赤星病菌和番茄叶霉病菌分生孢子萌发的抑制作用(16 h)
Table 4 Inhibition of S-5210-6 active product on spores germination of *Alternaria alternata* and *Fulvia fulva*

病原真菌	浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	萌发率(%)	抑制率(%)	病原真菌	浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	萌发率(%)	抑制率(%)
Pathogenic fungus	Concentration	Germination rate	Inhibition rate	Pathogenic fungus	Concentration	Germination rate	Inhibition rate
烟草赤星病菌 <i>Alternaria alternata</i>	100	0.0	100.00	番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulva</i>	100	0.0	100.00
	50	5.0	94.68		50	10.3	88.80
	25	15.3	83.70		25	25.0	72.83
	10	42.1	55.21		10	54.7	40.54
	5	60.8	35.32		5	72.9	20.76
	CK	94.0	—		CK	92.0	—

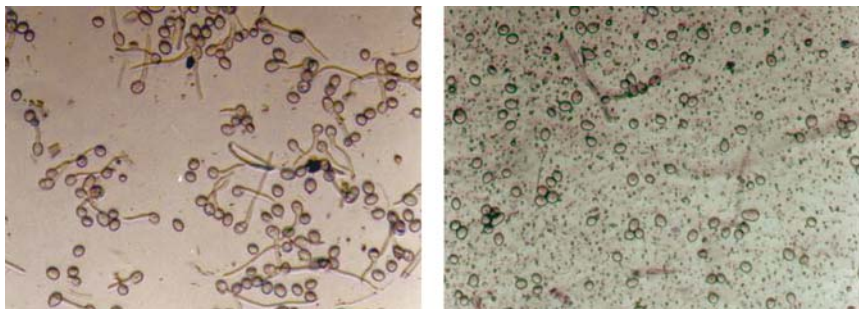


图 2 光学显微镜下的番茄叶霉病菌孢子萌发形态(400 $\times$)
Fig. 2 The shape of germinated-spores of *Fulvia fulva* under optical microscope (400 $\times$)

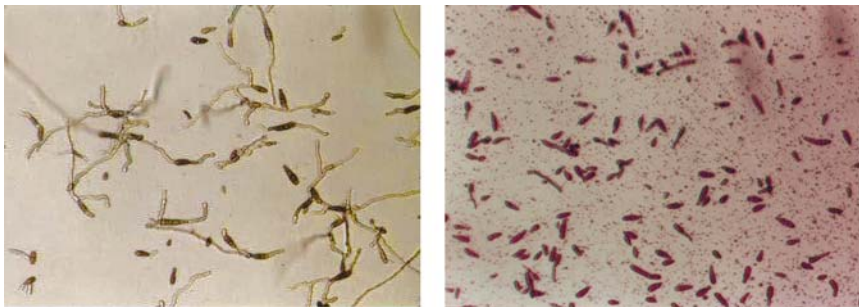


图 3 光学显微镜下的烟草赤星病菌孢子萌发形态(400 $\times$)
Fig. 3 The shape of germinated-spores of *Alternaria alternata* under optical microscope (400 $\times$)

2.5 S-5210-6 活性产物对初萌发的分生孢子致病性的影响

结果显示,用 S-5210-6 活性产物处理初萌发的烟草赤星病菌分生孢子后,再接种到植物叶片上时,分生孢子的致病性受到明显抑制,病斑扩展减慢,且分生孢子致病性受到的抑制程度与活性产物浓度和处理的时间有关,浓度越高,处理时间越长,抑制效果越明显(表5)。

3 讨论

在目前已发现的 28 种能抑制作物病原真菌的放线菌素中抑菌谱较广的有 6 种^[9]。本试验所选的 13 种供试真菌属于 2 种不同类型的真菌,其中水稻瘟病菌、小麦赤霉病菌、番茄叶霉病菌、小麦根腐病菌、棉花枯萎病菌、玉米大斑病菌、番茄枯萎病菌、番茄早疫病菌、烟草赤星病菌、小麦全蚀病菌和黄瓜霜霉病菌属于产孢丝状真菌,主要依靠病部产生的

表 5 S-5210-6 活性产物对初萌发的烟草赤星病菌分生孢子致病性的影响
Table 5 The effect of the pathogenicity of newly-germinated conidia of *Alternaria alternata*
treated with S-5210-6 active product

浓度 (μg/mL) Concentration	处理时间 Treatment time (min)				
	5	10	15	30	60
0	12.1	11.8	11.9	12.1	12.3
25	10.2	9.5	8.9	8.0	7.3
50	8.5	8.2	7.0	6.0	5.5
75	7.6	6.0	4.4	0.0	0.0
100	4.5	3.1	0.0	0.0	0.0

分生孢子传播;油菜菌核病菌和水稻纹枯病菌属于非产孢丝状真菌,其侵染主要依赖后期形成的菌核。试验结果表明,S-5210-6 菌株活性产物对供试的 13 种病原真菌均有较强的抑制作用,同时对病原细菌具有选择性抑制作用,这说明 S-5210-6 菌株有较广的抑菌谱,具有很好的研究前景。

作用机制试验表明 S-5210-6 菌株活性产物不仅能强烈抑制病原菌菌丝的生长和分生孢子的萌发,而且可造成病原菌菌丝生长畸形,菌丝短粗、膨大成串珠状、丛枝聚集,因而使菌丝不能向前扩展,失去了侵袭能力。这可能与活性物质抑制菌丝和孢子的呼吸作用有关,也可能与活性物质产生几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶等溶菌酶有关。据报道,病原真菌的细胞壁是以几丁质为骨架,以 β -1,3-葡聚糖酶为主要填充物所组成的。处于生长过程中的真菌菌丝尖端几丁质多呈裸露状态而易被水解酶所攻击,其结果导致真菌细胞破裂,生长受阻或者细胞死亡,阻止病害的发生发展^[10]。

研究抗生素作用机制的常用方法包括生物测定、细胞形态观察和生理生化测定等。随着分子生物学的快速发展,分子技术日益渗透于抗生素作用机制的研究中。自从成功地克隆了对苯来特具有抗性的 β -微管蛋白质基因后,越来越多的分子生物学技术应用于病原真菌的研究中^[11,12]。这些研究可以了解杀菌剂的作用位点、发现新的特异性作用靶点和专化性靶标酶,并通过直接作用位点的突变而研究靶标酶的作用机制。本研究仅进行了作用机制相关方面的生物测定,关于该活性物质作用机制的生化测定(包括核酸、细胞壁、蛋白质、细胞膜)以及抗病相关性酶等均有待于进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- 1 安德荣. 生物制药的原理及方法 - 抗生素的制备. 北京: 中国科学文化出版社, 2002
- 2 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯, 等. 放线菌研究与应用. 北京: 科学出版社, 1990
- 3 魏艳敏, 刘大群, 田世民, 等. 放线菌 (*Streptomyces* spp.) 对几种蔬菜病原菌的拮抗作用. 河北农业大学学报, 2000, 23(3): 65 - 68
- 4 安德荣, 慕小倩, 刘翠娟, 等. 土壤拮抗微生物的分离和筛选. 微生物学杂志, 2002, 22(5): 1 - 3
- 5 疏秀林, 安德荣, 张勤福. 土壤拮抗放线菌 S-5210-6 的筛选及其初步分类鉴定. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004, 32(12): 57 - 60
- 6 张兴, 王兴林编. 植物化学保护实验指导. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2000, pp. 66 - 67
- 7 Slawechi R A, Ryan E P, Young D H. Novel fungi toxicity assays for inhibition of germination-associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondite* spores. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 69(2): 597 - 601
- 8 Walker R, Innes C M J, Allan E J. The potential biocontrol agent *Pseudomonas antimicrobica* inhibits germination of conidia and outgrowth of *Botrytis cinerea*. Letters in Applied Microbiology, 2001, 32: 346 - 348
- 9 沈寅初, 张一宾. 生物农药. 北京: 化学工业出版社, 2001
- 10 王燕, 宗兆锋, 程联社. 放线菌在植物病害生物防治中的应用. 杨凌职业技术学院学报, 2005, 4(3): 21 - 23
- 11 李树正, 张素华. 杀菌剂筛选方法的研究. 农药, 1997, 36(9): 20 - 24
- 12 Orbach M J, Porro E B, Yanofsky C. Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. Molecular Cellular and Biology, 1986, 6(7): 2451 - 2461