

文章编号: 1000-5692(2001)03-0281-05

绿僵菌不同菌株 DNA 多态性的 RAPD 分析

张立钦, 林新春, 毛胜凤

(浙江林学院 资源与环境系, 浙江 临安 311300)

摘要: 采用 RAPD-PCR 技术分析了 4 个绿僵菌菌株的 DNA 遗传多态性。从 160 条引物中筛选出 27 条引物, 对各菌株进行 PCR 扩增, 结果 4 个绿僵菌菌株共扩增出 334 个位点, 其中多态性位点 299 个, 占 89.5%, 表明各菌株间具有较丰富的遗传多态性。菌株 DNA 多态性与原寄主和孢子形态表现出明显的相关性, 但与对松墨天牛幼虫的毒力间未表现出相关性。图 2 表 4 参 7

关键词: 绿僵菌; 随机扩增多态性 DNA (RAPD); 分子标记; 松墨天牛

中图分类号: Q946; S763.1 **文献标识码:** A

金龟子绿僵菌 (*Metarrhizium anisopliae*) 是虫生真菌用于害虫生物防治最主要的微生物杀虫剂之一, 分布地域广, 寄主多, 自然资源丰富。前人研究指出不同来源的菌株对寄主昆虫的毒力具有明显的差异, 且不同菌株的形态特征、生化特征以及适生性与其毒力的关系也受到普遍关注^[1-9]。这些差异是否具有遗传物质基础, 以及不同菌株间的遗传多态性, 是值得进一步探讨的问题。Leal 等^[7] 已应用 RAPD 技术对绿僵菌不同菌株 DNA 进行体外随机扩增, 分析 DNA 序列的多态性, 在种及种下水平的进化和分类等方面揭示各种信息。

本试验利用 RAPD 技术对不同来源的 4 个金龟子绿僵菌菌株的 DNA 进行扩增, 通过对 DNA 图谱的系统聚类, 分析其特异性、多态性以及与原寄主和毒力等指标的相关性。

1 材料和方法

1.1 供试菌株来源

供试 4 个菌株来源见表 1。

表 1 金龟子绿僵菌菌株来源一览表

Table 1 Host and distribution of 4 *M. anisopliae* strains

菌株	寄主	采集地点	来源
MF ₁	松墨天牛 <i>Monochamus alternatus</i>	浙江余杭	由 MF ₂ 放菌后发病自然感染
MF ₂	松墨天牛 <i>Monochamus alternatus</i>	浙江余杭	由 MF ₂ 放菌后发病自然感染
MF _a	竹节虫 <i>Diapheromera femorata</i>	安徽岳西	安徽农业大学提供
WZW ₃	稻象虫 <i>Sitophilus granarius</i>	浙江温州	浙江亚热带作物研究所提供

收稿日期: 2001-08-20; 修回日期: 2001-05-20

基金项目: 浙江省“151 人才”基金资助项目(浙人专 1999-27)

作者简介: 张立钦(1961-), 男, 浙江温州人, 教授, 博士, 从事生物防治和森林病理学研究。

1.2 菌体制备

将保存于 PPDA 斜面的各供试菌株分别移植于直径 90 mm 的 PPDA 平板, 在 25 °C 无光照恒温箱内生长 2 d, 刮取菌丝, -20 °C 保存备用。

1.3 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取采用改进的 CTAB 法。取约 500 mg 菌丝放入研钵, 加液氮迅速研磨成粉末。将粉末移入盛有 600 μ L 65 °C 预热的 CTAB 提取液 [10 mg \cdot kg⁻¹ CTAB, 50 mg \cdot kg⁻¹ PVP, 1.4 mol \cdot L⁻¹ Na, 20 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 350 mmol \cdot L⁻¹ β -巯基己乙酸] 的 1.5 mL 离心管, 振荡混匀, 于 65 °C 保温 30 min。取出离心管于冰水混合物中迅速冷却。随后加入 600 μ L 氯仿-异戊醇 (24:1), 混匀, 10 000 s⁻¹ 离心 10 min。取上清液转管, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, -20 °C 下放置 2 h。10 000 s⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 将沉淀风干, 加 600 μ L 双蒸水充分溶解, 10 000 s⁻¹ 离心 5 min。将上清液转管, 加入 300 μ L 饱和酚和 300 μ L 氯仿-异戊醇混合液, 混匀, 10 000 s⁻¹ 离心 10 min。取上清, 再加氯仿-异戊醇混合液抽提 2 次。取上清, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, -20 °C 下过夜。取出离心管, 10 000 s⁻¹ 离心 10 min, 弃上清, 将沉淀物用 70% 乙醇洗涤, 再用无水乙醇洗 1 次, 风干。加入 100 μ L FE 溶解沉淀。利用凝胶比色确定样品 DNA 浓度。

1.4 扩增及产物检测

反应采用 20 μ L 扩增体系: 5 ng 模板 DNA, 10 pmol 引物, dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 各为 200 μ mol \cdot L⁻¹ (上海生工生物工程有限公司), 2 μ L 10 \times 反应缓冲液 [10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3), 2.0 mol \cdot L⁻¹ MgCl₂, 500 mmol \cdot L⁻¹ KCl], 16.67 \times 10⁻⁹ mol \cdot s⁻¹ Taq 酶 (上海生工生物工程有限公司), 加 25 μ L 石蜡油覆盖。PCR 扩增在 PE-9600 扩增仪上进行。反应条件为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 40 °C 退火 30 s, 70 °C 延伸 90 s, 循环 38 次, 72 °C 延伸 7 min。扩增产物经 10 mg \cdot kg⁻¹ 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭) 电泳分离。电泳结束后, 在紫外灯下观察照相。

2 结果与分析

表 2 引物序列及扩增情况

Table 2 Ribonucleotide sequence of the random primers and their amplified RAPD bands

2.1 引物筛选

以菌株 Mf₂ 为等模板 DNA 从美国 Operon 公司生产的 OPAF, OPAG, OPAO, OPAS, OPAT, OPAU, OPAV 等 OPAX 等 8 组共 160 条引物中初筛出 52 条引物, 然后, 再以 Mf₂, Mf₃ 和 Mf₄ 为模板 DNA 进行复筛, 选取 27 条进行扩增 (表 2)。

PAPD 扩增带的有无分别用 “1” 和 “0” 表示, 缺失用 “-” 表示, 建立数据文件, 利用加拿大 Alberta 大学开发的 POPGEN 32 软件包进行统计分析。其中遗传距离采用 Nei's (1978) 方案进行计算。

2.2 绿僵菌菌株 RAPD 扩增结果

用筛选出的 27 个引物对绿僵菌 4 个菌株进行扩增, 共扩增

引物序列号	核苷酸序列	总位点数	多态性位点数
AV14	CTCCGGATCA	8	6
AF05	CCCGATCAGA	21	19
AF16	TCCCGGTGAG	19	15
AF18	GTGTCCCTCT	10	10
AF19	GGACAAGCAG	12	9
AU05	GAGCTACCGT	12	11
AU15	TGCTGACGAC	16	15
AO19	GTTCICGGAC	14	14
AG09	CCGAGGGGTT	10	10
AT01	CAGTGGTTC	10	9
AT02	CAGGTCTAGG	11	11
AT03	GACTGGGAGG	16	16
AT05	ACACCTGCCA	15	14
AT12	CTGCCTAGCC	9	9
AT13	CTGGTGGAG	12	11
AT14	GTGCCCACT	12	8
AT15	TGACGCACGG	13	12
AT18	CCAGCTGTGA	11	9
AX10	CCAGGCTGAC	12	10
AX11	TGATTGCGGG	11	10
AX18	GTGTGCAGTC	9	9
AS07	GACGAGCAGG	12	7
AS09	TGAGTCCCC	12	11
AS11	ACCGTGCCGT	10	9
AS12	TGACCAGGCA	11	11
AS18	GTTGCCCACT	11	10
AS19	TGACAGCCCC	15	14
合计		334	299

出 334 个位点 (分子量在 100~3 200 bp 之间), 平均每个引物产生 12.4 个, 其中多态性位点 299 个, 占总位点数的 89.5%。绿僵菌 RAPD 扩增结果见图 1。

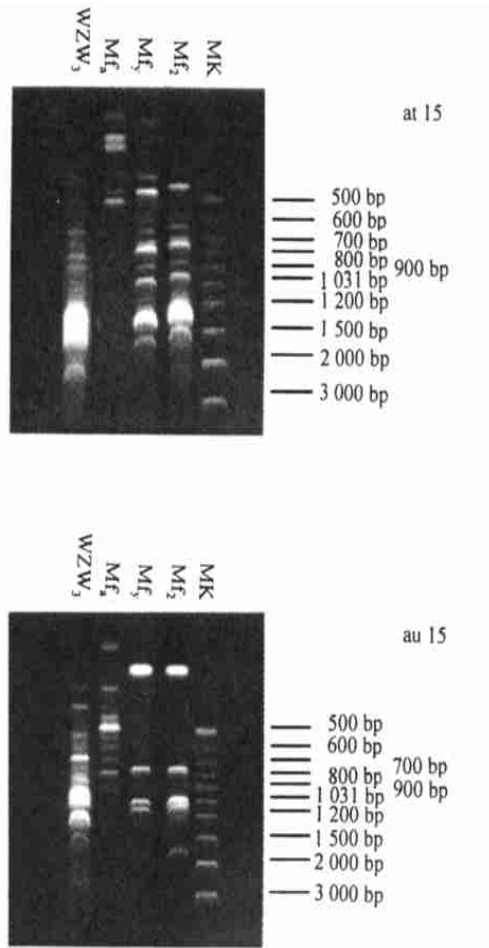


图 1 随机引物 at 14 和 au 15 扩增 4 个绿僵菌菌株 DNA 的电泳结果
Figure 1 Amplification profiles of 4 strains generated by primer at 15 and au 15

2.3 聚类分析

27 个引物对金龟子绿僵菌不同菌株 DNA 扩增谱带, 运用 POPGEN 32 软件对金龟子绿僵菌扩增谱带进行统计分析, 建立遗传距离 (GD) 和相似性 (GI) 矩阵及聚类系统树 (表 3, 表 4, 图 1, 图 2)。结果表明, Mf₂ 和 Mf_y 亲缘关系最近, 聚为一类后与 Mf_a 再聚为一类, WZW₃ 与其余 3 个菌株差别很大, 遗传距离值都在 0.89 以上。

表 3 金龟子绿僵菌菌株间遗传距离及相似性

Table 3 The genetic distance and genetic similarity of 4 strains of *M. anisopliae*

GD/ GI	Mf ₂	Mf _y	WZW ₃	Mf _a
Mf ₂	* * * *	0.865 3	0.350 3	0.497 0
Mf _y	0.144 7	* * * *	0.407 2	0.500 0
WZW ₃	1.049 0	0.898 5	* * * *	0.410 2
Mf _a	0.699 2	0.693 1	0.891 2	* * * *

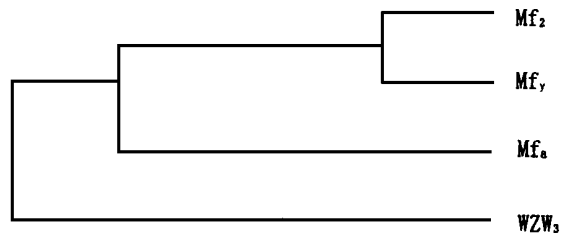


图 2 4 个金龟子绿僵菌菌株的 UPGMA 聚类树状图
Figure 2 Dendrogram of 4 *M. anisopliae* strains generated by UPGMA

表 4 27 个引物扩增 4 个金龟子绿僵菌菌株的 RAPD 谱带数

Table 4 Binary Presence-absence data matrix for RAPD fragments of 4 *M. anisopliae* strains by 27 primers

菌株	引 物								
	AF5	AF16	AF18	AF19	AT1	AT2	AT3	AT5	AT12
Mf ₂	000011010111110010001	1100110001111111001	011101010100	111110110111	0110111111	0010001011	1100000011111111	001010001010100	000011001
Mf _y	000011010111110010000	0110110001111111001	011101010100	111110010111	0111101110	00100011010	1101100011111111	001110000110100	111011000
WZW ₃	011100011111111101110	011001111011100100	1100101011	0010110111000	0010000000	0100000000	00111110010000000	111101000000000	000000110
Mf _a	110010100100001010001	1111100000111100010	0000001100	00101101110	1111011000	1001111111	011101101101111	001100111011011	001110000

续表 4

菌株	引 物								
	AT13	AT14	AT15	AT18	AX11	AX18	AS7	AS11	AS12
Mf ₂	001011111111	101111110110	011111111011	01011001100	0000111111	011110011	011101110101	100001111	0010101111
Mf _y	001011111100	101111110110	011111111111	11011001100	0010111110	011110010	011101010101	100001111	01101100010
WZW ₃	11010000100	111011011000	011100000000	01001100000	01111000010	100101000	101111011101	1111110000	11110100000
Mf _a	011101011100	11101011011	10010111110011	01101110111	1010011111	011010111	001001010111	1000101110	00001101010

续表 4

菌株	引 物								
	AS18	AS19	AV14	AG9	AU5	AU15	AO19	AX10	AS9
Mf ₂	10011011011	000101101110101	101111100	101011110	000101101011	010000010011001	10000111100010	001110100110	110000110111
Mf _y	10011011000	100101111110100	111011100	1011011110	001101101001	010000010011001	11110111100010	001110100110	110000110110
WZW ₃	01001100000	11101011100000	0110100000	110100110000	101011111100000	00111100011000	111101100000	010010000000
Mf _a	10111010100	001110100001110	00011111	0011100111	000010110111	0011010111110110	00000000101101	110110111011	01111100100

3 小结与讨论

3.1 不同金龟子绿僵菌菌株 DNA 图谱多态性

金龟子绿僵菌 4 个菌株 DNA 多态性差异非常明显, 除 Mf₂ 与 Mf_y 比较接近外, 遗传距离均在 0.69 以上。金龟子绿僵菌聚类结果与传统分类完全一致。Mf_y 是 Mf₂ 菌株放菌在余杭防治松墨天牛后从感病天牛上分离出来的, RAPD 标记表明 Mf_y 与原菌株相比已经产生了一定的遗传变异, 但相似性较高 (0.8653)。与 Mf₂ 和 Mf_y 同为一个变种的 Mf_a, 其寄主是寄主竹节虫, 它们间的 DNA 图谱差异相对较大, 相对另一变种 WZW₃, 其亲缘关系更远。WZW₃ 与其余菌株差异都很大, 遗传距离值都在 0.89 以上。Mf₂, Mf_a 和 WZW₃ 的分生孢子大小为 5.71 μm × 2.9 μm, 6.68 μm × 3.41 μm, 14.51 μm × 5.6 μm, 与聚类结果相关。Mf₂, Mf_a 和 WZW₃ 对松墨天牛的毒力大小分别为 100%, 78.57% 和 85.71%, 与聚类结果不相关。因此说明, 菌株 DNA 多态性与菌株原寄主和孢形态指标表现出显著相关性, 而与对松墨天牛毒力指标未表现出相关性。

绿僵菌不同菌株 DNA 多态性明显, 运用 RAPD 分子标记很容易把它们区分开来, 是一种非常有效的方法。目前这项技术已应用于菌种及种下水平的进化和分类等的研究, 从本质上揭示各种信息。Leal 等用 RAPD 鉴定了 20 株金龟子绿僵菌^[7], 一些菌株可表明明显的地理型, 另一些不同来源的菌株则不表现出地理型差异。Bidochka 等 (1994) 用 RAPD 研究了 24 株浸染蝗虫的绿僵菌和白僵菌的种间差异, *M. anisopliae* 不同菌株之间 PCR 扩增片段的差异水平与 *M. anisopliae*, *M. flavoide* 和 *B. bassiana* 之间差异水平相当, 认为这种现象暗示着 *M. anisopliae* 可能包括一种亚种。

本研究也表明绿僵菌不同菌株 DNA 差异非常大, 相对植物而言要大得多, 因此传统上的分种及种下依据值得进一步研究。

3.2 RAPD 反应的主要影响因子

3.2.1 dNTP 浓度 本研究采用 dNTP 的浓度为 200 μmol·L⁻¹。在比较实验中发现, 继续提高 dNTP 的

浓度并不能增加扩增产物的量, 浓度过低 (低于 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 时, 扩增产物的量明显下降, 表现为带较暗淡。

3.2.2 Mg^{2+} 浓度 Mg^{2+} 在 RAPD 反应中受到其他成分如 dNTP 和 EDTA 浓度的影响。dNTP 和 EDTA 都会螯合 Mg^{2+} , 使溶液中的自由 Mg^{2+} 数量减少。在 Mg^{2+} 浓度分别为 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的对比实验中, 以浓度为 $2.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的效果为好。降低 Mg^{2+} 浓度虽然可以提高扩增的特异性, 但浓度过低时扩增的条带数量明显减少; 增加 Mg^{2+} 浓度则使扩增的特异性下降。

3.2.3 退火温度及时间 退火温度一般以引物的 T_m 值为参考。在一定温度范围内, 扩增产物的特异性与退火温度成正比。此外, 退火温度与物种的基因组特性也有一定关系。在扩增时, 我们设置了 36°C , 38°C , 40°C , 42°C 和 44°C 等一系列退火温度, 都有扩增产物, 其中又以 40°C 为好。通常退火时间越长, 引物与模板非特异性配对机率增加, 产生非特异性扩增产物的机率也相应加大。据大多数文献报道, 30 s 的时间足以使引物与模板结合, 因此本实验定为 30 s。

参考文献:

- [1] 朱衡, 翟峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适用于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34-40.
- [2] 周永红, 吕国忠, 刘伟成, 等. 采用 PCR-RFLP 和 RAPD 对球壳孢目真菌系统学的研究[J]. 菌物系统, 1998, 17(2): 160-166.
- [3] 林华峰, 黄勃, 李增智, 等. 白僵菌不同菌株 DNA 扩增图谱与其来源的相关性分析[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 73-78.
- [4] 张道海, 王未名, 陆文华. 生防真菌的分子生物学研究[A]. 李增智. 中国虫生真菌研究与应用[C]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 32-36.
- [5] 张立钦, 吴鸿, 刘军. 松墨天牛优良白僵菌菌株筛选[J]. 南京林业大学学报, 2000, 24(2): 33-37.
- [6] Yang X, Quiros C F. Identification and classifications of celery cultivars with RAPD markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 205-212.
- [7] Leal S C M. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae* by RAPD-PCR[J]. *Mycol Res*, 1994, 98(9): 1077-1081.

Analysis on isolates of *Metarrhizium anisopliae* by RAPD

ZHANG Li-qin, LIN Xin-chun, MAO Sheng-feng

(1. Department of Resources and Environment, Zhejiang Forestry College, Lin'an, 311300, Zhejiang, China)

Abstract: DNA of *Metarrhizium anisopliae* isolates was analyzed by RAPD. Twenty-seven primers screened and optimized out of 160 primers were applied to the proliferation of PCR. Three-hundred-four loci have been proliferated in 4 strains of *M. anisopliae*, 299 loci out of which are of polymorphism and account for 89.5%. All these suggest that each strain has an abundant genetic polyorphism. There is some correlation between DNA polymorphism of strains and their original hosts, size of conidiospore, distributions, but no obvious correlation between DNA polymorphism and virulence on *Monochamus alternatus* larvae.

Key words: *Metarrhizium anisopliae*; random amplified polymorphic DNA; molecular markers; *Monochamus alternatus*