

文章编号: 1000-5692(2005)03-0306-04

寄生松墨天牛的球孢白僵菌不同菌株 DNA 多态性的 RAPD 分析

杨毅^{1,2}, 周祖基¹, 张立钦², 马良进², 林新春², 高洁^{1,2}

(1. 四川农业大学 林学院园艺学院, 四川 雅安 625014; 2. 浙江林学院 生命科学学院, 浙江 临安 311300)

摘要: 采用 RAPD 技术对 21 个不同来源的寄生松墨天牛 *Monochamus alternatus* 的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 菌株的 DNA 指纹图谱进行了测定。从 RAPD 结果可知寄生松墨天牛的白僵菌菌株间具有丰富的遗传多态性。聚类分析把 21 个寄生松墨天牛的白僵菌菌株分为两大类群: ① B₁, B₁₄, B₄, B₅, B₆, B₇, B₈, B₁₂, B₁₃, B₁₀, F-263, B_{xs}, B₂, B₁₁, B_r, B_z, B₉; ② B₃, B₁₅, B₂, B₇。结果表明菌株 DNA 多态性与采集地之间有一定的相关性, 与对松墨天牛幼虫的毒力未表现出相关性。图 2 表 2 参 11

关键词: 松墨天牛; 白僵菌; 随机扩增多态性 DNA; 分子标记

中图分类号: S763 **文献标识码:** A

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* (简称白僵菌) 作为生物防治的作用物已在多种农林害虫防治中得到广泛的应用。前人^[1-3] 对不同来源(采集地、寄主)的白僵菌研究表明: 其多态性与寄主和毒力之间未表现出相关性, 与采集地之间是否相关尚无统一论。用白僵菌防治松墨天牛 *Monochamus alternatus* 是生物防治松材线虫病 *Bursaphelenchus xylophilus* 最有前景的途径之一^[4]。近年来, 采用 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 技术对白僵菌种间及种下水平的遗传分化等进行研究, 表明 RAPD 技术可有效地从分子水平揭示出各菌株遗传分化和亲缘关系等信息^[5]。本实验利用 RAPD 技术对不同来源的 21 个寄生松墨天牛的白僵菌菌株的 DNA 进行扩增, 通过对 DNA 图谱的系统聚类, 分析其特异性、多态性以及采集地和毒力等指标的相关性。

1 材料和方法

1.1 供试菌株来源

供试的 21 个球孢白僵菌菌株均由浙江林学院森保实验室分离、保存, 其来源见表 1。

1.2 菌体制备

将各供试菌株分别移植于铺有滤纸的 PPDA 培养基平板, 在 25 °C 无光照恒温箱内培养 5 d, 刮取菌丝, -20 °C 保存备用。

1.3 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取采用改良 CTAB 法。取约 500 mg 菌丝放入研钵, 加液氮迅速研磨成粉末。将

收稿日期: 2004-12-20; 修回日期: 2005-04-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30240070)

作者简介: 杨毅, 硕士研究生, 从事森林病害防治研究。E-mail: ls_xy007@126.com

粉末移入盛有 600 μL 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 CTAB 提取液 [10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ CTAB, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ PVP, 1.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na, 20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 8.0), 350 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -巯基已乙酸] 的 1.5 mL 离心管, 振荡混匀, 于 65 $^{\circ}\text{C}$ 保温 30 min。取出离心管于冰水混合物中迅速冷却。随后加入

表 1 材料来源

Table 1 The origin of materials

菌株	寄主	菌株来源
B ₁ ~ B ₄ , B ₆ ~ B ₁₅	松墨天牛	中国江苏 (自然感染)
B ₅	松墨天牛	B ₆ 菌株的变异分离菌株
F-263	松墨天牛	日本 (优良菌株)
B ₃₅	松墨天牛	中国浙江象山 (自然感染)
B ₁	生产菌株	中国福建白僵菌厂家 (从菌粉中分离)
B ₂	生产菌株	中国浙江白僵菌厂家 (从菌粉中分离)
B ₁₂ , B ₁₇	松墨天牛	中国浙江余杭 (自然感染)

600 μL 氯仿-异戊醇 (24:1), 混匀, 1 万 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液转管, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 2 h。1 万 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 将沉淀风干, 加 600 μL 双蒸水充分溶解, 1 万 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。将上清液转管, 加入 300 μL 饱和酚和 300 μL 氯仿-异戊醇混合液, 混匀, 1 万 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取上清液, 再加氯仿-异戊醇混合液抽提 2 次。取上清液, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜。取出离心管, 1 万 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 将沉淀物用体积分数为 70% 乙醇洗涤, 再用无水乙醇洗 1 次, 风干。加入 10 μL TE 溶解沉淀。利用凝胶比色确定样品 DNA 浓度。

1.4 引物筛选

从上海生物工程有限公司生产的 200 个引物中筛选出扩增效果较好的引物 30 个, 对所有样品进行 PCR 扩增 (引物名称序列及扩增谱带情况见表 2)。

表 2 引物序列及扩增情况

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

引物	引物序列	扩增位点数	多态性位点数	引物	引物序列	扩增位点数	多态性位点数
S5	TGCGCCCTTC	11	8	S294	GGTCGATCTG	12	10
S12	CCTTGACGCA	16	14	S375	CTCCTGCCAA	9	6
S33	CAGCACCCAC	9	7	S387	AGGCGGGAAC	14	13
S34	TCTGTGCTGG	8	6	S426	GAGACGCACA	12	8
S51	AGCGCCATTG	8	6	S436	AAGCGACTCTG	13	12
S66	GAACGGACTC	8	5	S450	TCAGAGCGCC	11	9
S108	GAAACACCCC	13	10	S456	TGGGCGGTTC	9	8
S199	GAGTCAGCAG	6	4	S466	GTCGGCTGAC	11	8
S207	GGCAGGCTGT	7	4	S467	GTCATGCCA	13	12
S216	GGTGAACGCT	13	13	S468	ACATCGCCCA	9	7
S243	CTATGCCGAC	10	8	S481	GGGACGATGG	16	15
S253	GGCTGGTTCC	6	4	S484	AGTGGCTGTA	10	8
S266	AGGCCCGATG	5	3	S502	CACAGCTGCC	10	8
S269	GTGACCGAGT	12	9	S549	TGGCGATCTA	16	14
S279	CAAAGCGCTC	9	5	S590	CCGCATCTTG	9	7
				合计		315	251

1.5 扩增及产物检测

扩增反应体积为 20 μL , 内含 ddH₂O 9.8 μL , 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂ 2 μL , 10 \times buffer 2 μL , 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP 2 μL (上海生工生物工程有限公司), 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 2 μL , 模板 DNA 5 ng, 83.35 $\times 10^{-3}$ $\text{kat} \cdot \text{L}^{-1}$ TaqDNA 聚合酶 0.3 μL (上海生工生物工程有限公司), 反应在 PerkinElmer 9600 上进行, 反应参数如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min 后, 38 个循环的 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 40 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增产物经 10 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭) 电泳分离, GeneRuler 100 bp DNA 作标记物, VDS 凝胶自动成像系统观察拍照。

1.6 谱带的统计分析

RAPD 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 (genetic distance) 采用 Nei's (1978)

方案进行计算。

2 结果与分析

2.1 寄生松墨天牛的白僵菌 RAPD 扩增结果

用筛选出来的 30 个引物对寄生松墨天牛的 21 个白僵菌菌株进行扩增, 共扩增出 315 个位点(分子量在 300~3 000 bp 之间), 平均每个引物产生 10.5 个, 其中多态性位点 251 个, 占总位点数的 79.7%(表 2)。表明同样寄生松墨天牛的白僵菌各菌株间具有丰富的多态性。寄生松墨天牛的白僵菌不同菌株 RAPD 扩增结果见图 1。

2.2 菌株聚类分析

30 个引物对寄生松墨天牛的白僵菌不同菌株 DNA 扩增谱带经 POPGEN 32 软件统计分析, 建立遗传距离和相似性矩阵及聚类系统树(图 2)。结果表明寄生松墨天牛的白僵菌不同菌株 DNA 有很大的变异, 遗传距离值为 0.009 2~0.669 0, 遗传相似度为 51.22%~99.09%。B₆ 与 B₆ 在 PPDA 培养基上的分离株 B₅ 的遗传相似度为 99.09%, 表明经人工继代培养后菌株间产生了一定的变异。聚类分析表明 21 个寄生松墨天牛的白僵菌菌株可分为两大类群: ① B₁, B₁₄, B₄, B₅, B₆, B₇, B₈, B₁₂, B₁₃, B₁₀, F-263, B_{xs}, B₂, B₁₁, B_f, B_z, B₉; ② B₃, B₁₅, B_{y2}, B_{y7}。来自浙江余杭的 2 个菌株(B_{y2}, B_{y7})聚为一支。来自江苏的 15 个菌株除 B₃ 和 B₁₅ 外均聚为一类, 2 个生产菌株(B_f, B_z)聚为一支并且和 F-263, B_{xs} 一起与大多数来自江苏的菌株聚为一类。

分析寄生松墨天牛的白僵菌不同菌株 DNA 多态性与菌株来源的关系。结果表明: 菌株采集地与菌株 DNA 多态性的有一定的相关性, 来自浙江余杭的 B_{y2} 和 B_{y7} 聚为一支, 来自江苏的大多数菌株也聚为一类。但同样来自江苏的 B₃ 和 B₁₅ 却没有与其他 13 个江苏菌株聚为一类而是与来自浙江余杭的 2 个菌株聚为一类, 来自浙江象山的 B_{xs} 也归入多数江苏菌株所在的一类。究其原因可能是这几个菌株的采集地与同聚为一类的菌株采集地有相似的生境。2 个生产菌株聚为一支, 有相近的遗传距离, 说明它们可能有相似的遗传基础。毒力测试表明: 各菌株对松墨天牛 3 龄幼虫的白僵率高低顺序为: B_{xs}, B₆> B₇> B₁₃> F-263> B₉> B₁₂> B₁₅> B₂> B₁₄> B₄> B₅> B₃> B₁> B_{y7}> B_f> B₁₀> B_z> B_{y2}> B₈> B₁₁。与聚类结果没有显著关联, 表明白僵菌各菌株 DNA 多态性与对松墨天牛幼虫的毒力未表现出相关性。

3 讨论

对 21 个白僵菌菌株的 DNA 多态性研究表明寄生松墨天牛的白僵菌菌株间具有丰富的遗传多态性, 说明自然界存在丰富的松墨天牛白僵菌资源。

林华峰等^[1]对 28 个球孢白僵菌菌株进行 RAPD 分析表明其多态性与菌株的采集地未表现出相关性。方志刚等^[5]对 16 个白僵菌菌株进行 RAPD 分析表明其多态性与采集地有一定的相关性。王成树等^[3]对球孢白僵菌不同菌株培养特征指标分析结果支持菌株间的亲缘关系取决于地理来源。本试验结果表明, 21 个寄生松墨天牛的白僵菌菌株 DNA 的多态性与采集地有一定的相关性。笔者认为真菌的

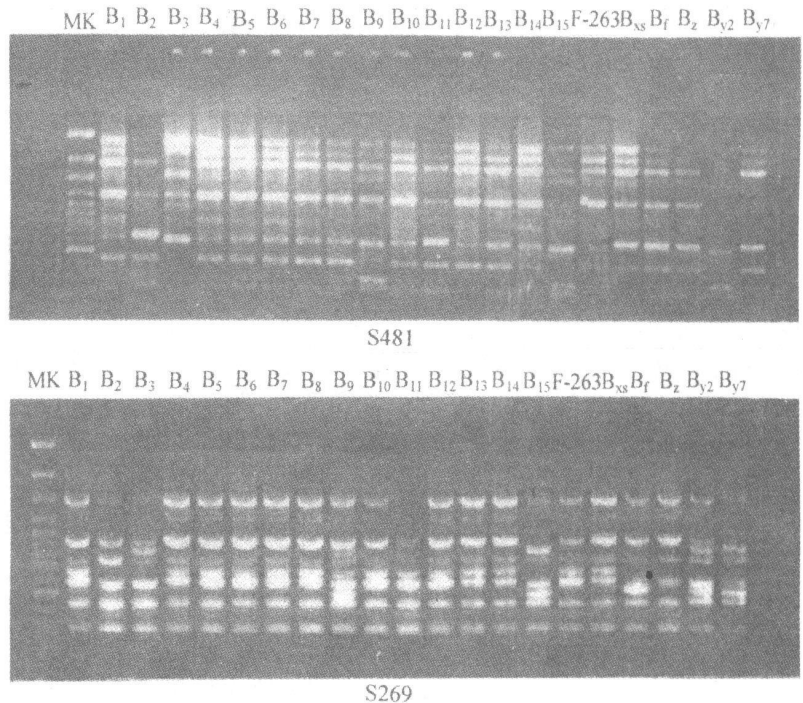


图 1 随机引物 S481 和 S269 扩增 21 个寄生松墨天牛的白僵菌菌株 DNA 的电泳结果

Figure 1 Electrophoresis of PCR products amplified with S481 and S269 in 21 *Bauveria bassiana* strains

生长对生境要求很严格, 温度、湿度和光照对真菌的生长影响很大, 白僵菌菌株 DNA 多态性与采集地的相关性更大程度上是反映菌株 DNA 多态性与其生境的相关性, 因此来自不同采集地但具有相似生境的菌株间会表现出较近的亲缘关系。同时, 试验结果表明白僵菌菌株 DNA 的多态性与对松墨天牛幼虫的毒力不表现相关性。自然感染菌株经人工继代培养后对原寄主毒力有所下降。因为继代培养中白僵菌菌株通过菌落局变产生了可遗传的变异^[1], 所以在生产防治中应注意监测施用菌株的毒力。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 李增智, 黄勃, 樊美珍, 等. 利用 RAPD-PCR 检测 3 种白僵菌及球孢白僵菌种内变异[J]. 菌物系统, 1998, 17(2): 185-189.
- [3] 王成树, 黄勃, 王四宝, 等. 球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 培养特征多样性与寄生及地理来源的相关性分析[J]. 生物多样性, 2002, 10(2): 196-201.
- [4] 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(3): 33-37.
- [5] 方志刚, 张立钦, 林新春. 不同球孢白僵菌菌株 DNA 的 RAPD 分析[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2001, 25(4): 65-68.
- [6] 张立钦, 林新春, 毛胜凤. 绿僵菌不同菌株 DNA 多态性的 PARF 分析[J]. 浙江林学院学报, 2001, 18(3): 281-285.
- [7] 黄勃, 李振刚, 樊美珍, 等. 粉拟青霉种内 RAPD 多态性分析[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 62-67.
- [8] 汪永庆, 徐来祥, 张知彬. RAPD 技术的标准化问题[J]. 动物学杂志, 2000, 35(4): 57-60.
- [9] 农向群. 快速提取白僵菌 DNA 方法的比较与改进[J]. 中国病毒学, 2000, 15(专刊): 126-129.
- [10] 焦锋, 楼程富. RAPD 技术应用中的一些问题及对策[J]. 西北农业学报, 2000, 9(4): 98-102.
- [11] 唐晓庆, 樊美珍, 李增智. 球孢白僵菌继代培养中菌落局变现象及环境影响因素的研究[J]. 真菌学报, 1996, 15(3): 188-196.

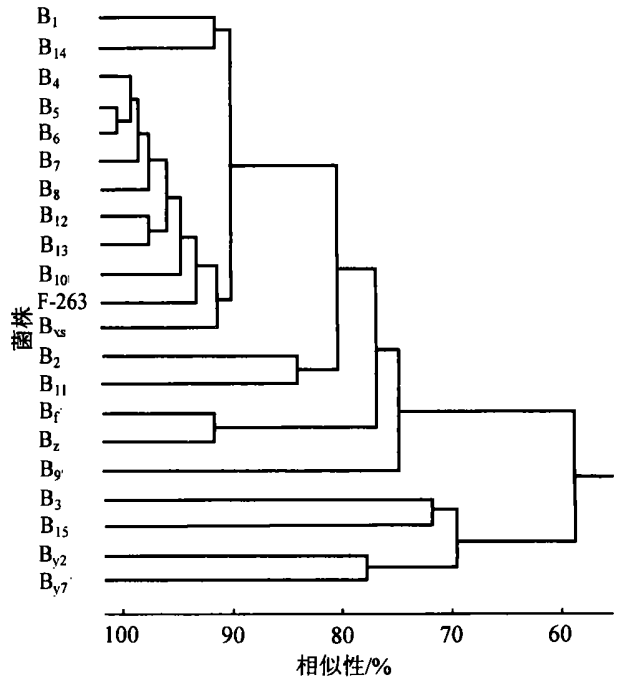


图 2 21 个寄生松墨天牛的白僵菌菌株的 UPGMA 聚类树状图

Figure 2 Dendrogram of 21 parasitic *Beauveria bassiana* on *Monochamus alternatus* strains clustered by UPGMA

RAPD analysis of DNA polymorphism of parasitic *Beauveria bassiana* in *Monochamus alternatus*

YANG Yi^{1,2}, ZHOU Zu-ji¹, ZHANG Li-qin², MA Liang-jin², LIN Xin-chun², GAO Jie^{1,2}

(1. College of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China; 2. School of Life Sciences Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: DNA amplified fingerprints of 21 parasitic *Beauveria bassiana* strains in *Monochamus alternatus* from different sources were tested by means of RAPD technique. Distinct genetic diversity among 21 strains of parasitic *B. bassiana* in *M. alternatus* was found. The results of clustering analysis showed that 21 strains can be divided into two groups: (1) B₁, B₁₄, B₄, B₅, B₆, B₇, B₈, B₁₂, B₁₃, B₁₀, F-263, B_{vs}, B₂, B₁₁, B_f, B_z and B₉; (2) B₃, B₁₅, B_{v2}, B_{v7}. DNA polymorphism of *B. bassiana* was correlated with geographic origins, but not with the virulence to *M. alternatus* larvae. [Ch, 2 fig. 2 tab. 11 ref.]

Key words: *Monochamus alternatus*; *Beauveria bassiana*; RAPD; molecular markers