

一株松褐天牛白僵菌菌株的初步研究

蔡三山¹, 王义勋¹, 查玉平¹, 陈京元^{1*}

(湖北省林业科学研究院 武汉 430075)

关键词: 白僵菌; 松褐天牛; ITS 序列; 分子鉴定

Preliminary Study on a *Beauveria* sp. Isolated from

Monochamus alternatu

Cai Sanshan Wang Yixun Zha Yuping Chen Jingyuan

(Hubei Academy of Forestry Wuhan 430075)

Abstract: Based on cultivation and extracting genomic DNA of a *Beauveria* sp. isolated from *Monochamus alternatu*, we amplified a DNA fragment, which length is about 500bp, with the fungal universal primers, ITS4 and ITS5. Sequence analysis shows that the length of ITS1 of this strain is 161bp, that of 5.8S is 158bp and that of ITS2 is 161bp. Phylogenetic analysis demonstrates that this strain maybe a new species of Genus *Beauveria*.

Keywords: *Beauveria* sp; *Monochamus alternatu*; ITS Sequence; Molecular Identification

作为松材线虫的主要传播媒介, 松褐天牛除了本身钻蛀寄主导致树势衰亡以外, 它传播的松材线虫病已给我国林业生产和国民经济造成了巨大的损失, 作为松材线虫的有效传播媒介, 控制松褐天牛是防止松材线虫病传播蔓延的有效途径。虫生真菌作为一类重要的天敌生物资源, 其可贵的流行潜力始终吸引着人们。白僵菌属 *Beauveria* Vuill. 是全球分布的最常见的土壤虫生真菌 (Rehner 等, 2003)。尽管科学家们在开发白僵菌作为生物杀虫剂方面做了大量的努力, 但收效甚微, 其主要原因就是难于识别和鉴定白僵菌属的种, 从而导致对寄主范围、致病方式和致病过程中毒性代谢物的作用等的遗传背景的了解的缺乏 (Rehner 等, 2005)。本文利用基于 ITS 序列的分子鉴定技术, 对一株分离自松褐天牛的白僵菌菌株进行了初步鉴定。

1. 材料和方法

1.1 供试菌株

供试白僵菌菌株由福建农林大学森林昆虫实验室分离提供, 该菌株寄主为松褐天牛, 编号为 FJ-1。

* 通讯作者, E-mail: jingyuanchen@hotmail.com

1.2 菌株保存和培养

将白僵菌菌株 FJ-1 试管斜面保存于 4℃，定期转管保存。从试管斜面上取一小块菌种放于 PDA 平板上，25℃倒置培养 7 天，供提取基因组 DNA 使用。

1.3 菌株基因组 DNA 的提取方法

菌株基因组 DNA 的提取方法参照 Liu 等（2000）的方法。

1.4 引物的合成

根据真菌扩增 ITS 序列的要求合成真菌 ITS 序列通用引物 ITS-4（5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'）和 ITS-5（5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'），引物的合成由北京鼎国昌盛生物技术有限公司完成。

1.5 PCR 扩增条件

PCR 扩增的反应体系为 25 μL，反应组分为：10×reaction buffer 2.5 μL，2.5mmol·L⁻¹ MgCl₂ 1.5 μL，10 pmol·L⁻¹ 上下游引物各 0.5 μL，10 mmol·L⁻¹ dNTP 2 μL，5 U·μL⁻¹ Taq 酶 0.25 μL，模板 DNA 提取液 1 μL，灭菌水补足 25 μL。以灭菌水代替模板 DNA 作为阴性对照。混合液在 PCR 仪上进行扩增，反应程序为：95℃变性 5min，进入循环，94℃变性 30s，56℃退火 45s，72℃延伸 1min，30 个循环后 72℃延伸 10min。取 5 μL 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳，EB 染色后，于紫外灯下观察，并于凝胶成像系统上检测。

1.6 PCR 产物的直接测序、分析和系统发育树构建

利用引物 ITS-4 对 PCR 产物进行直接测序，测序工作由北京鼎国昌盛生物技术有限公司完成。将测得的序列送 NCBI 比对和分析，并利用 Mega5.05 构建系统发育树。

2. 结果

菌株 FJ-1 经培养、基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增，得到一条约 500 多 bp 的条带，对该 PCR 产物测序并分析表明：该菌株的 ITS1 序列为 161bp，5.8S 序列 158bp，ITS2 序列为 161bp，总长度为 470bp。利用该序列与白僵菌属的其他种和亲缘关系较近的属构建系统发育树，其结果如图 1。从图 1 可以看出，菌株 FJ-1 为一独立的分支，该菌株可能为白僵菌属的一个新种。

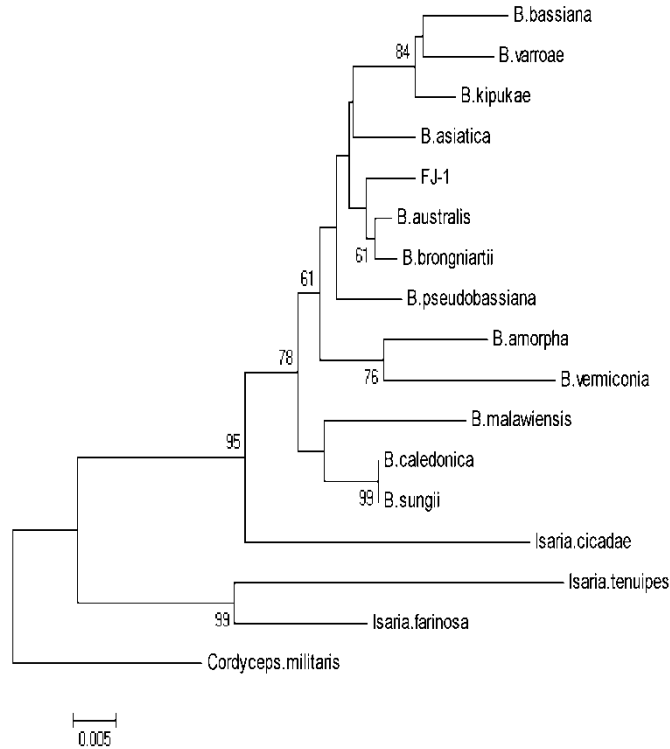


图 1 利用 FJ-1 和其它亲缘关系较近的种的 ITS 序列构建的系统发育树

3. 结论与讨论

在最近对白僵菌属的分类研究中，de Hoog (1972) 确定了三个种，包括 *B. bassiana*、*B. brongniartii* 和 *B. alba* (现在为 *Engyodontium album*) (de Hoog, 1978)。后来又识别了其它的 4 个种，包括 *B. vermiconia* (de Hoog 等, 1975)、*B. amorpha* (Samson 等, 1982)、*B. caledonica* (Bisset 等, 1986) 和 *B. malawiensis* (Rehner 等, 2006)。Rehner 等 (2011) 根据对白僵菌菌株的 4 个位点 (包括 RPB1、RPB2、TEF 和 Bloc) 部分序列的测定和系统发育分析，又划分出了 6 个新种，包括 *B. varroae*、*B. kipukae*、*B. pseudobassaria*、*B. asiatica*、*B. australis* 和 *B. sungii*，并对每个种进行了形态学描述。本文初步鉴定的新种也需要在测定 4 个位点序列的基础上进行系统发育分析，以获得确切的结果，同时需要对其进行形态学上的描述。

参考文献

- Bissett J, Widden P. 1986. A new species of *Beauveria* from Scottish moorland soil. *Can J Bot* 66:361–362.
- de Hoog GS. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Stud Mycol* 1:1–41.
- de Hoog, GS. and Rao, V. (1975). Some new hyphomycetes. *Persoonia* 8: 207-212.
- de Hoog, GS. (1978). Notes on fungicolous hyphomycetes and their relatives. *Persoonia* 10:33-81.
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. 2000. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of clinical microbiology* 38: 471
- Rehner SA and Buckley EP. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic

- fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). *Molecular Ecology Notes* 3: 409–411
- Rehner SA, Aquino de Muro M, Bischoff JF. 2006. Description and phylogenetic placement of *Beauveria malawiensis* sp. nov. (Clavicipitaceae, Hypocreales). *Mycotaxon* 98: 137–145.
- Rehner SA, Minnis D, Sung GH, Luangsa-ard JJ, deVotto L, Humber RA, 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103: 1055–1073.
- Samson RA, Evans HC. 1982. Two new *Beauveria* spp. From South America. *J Invert Pathol* 39:93–97.