

两株椰心叶甲分离物的鉴定及其系统发育分析*

郭立佳 黄俊生** 宋妍 许天委

(中国热带农业科学院环境与植物保护所海南省热带农业有害生物检测监控重点实验室 儋州 571737)

摘要 采用形态学方法对2株从自然罹病死亡的椰心叶甲虫尸上分离到的致病菌株 Dz01 和 Ma4 进行了鉴定,发现2个菌株在菌丝、瓶梗和分生孢子等形态特征上与金龟子绿僵菌小孢变种基本一致,可将2个菌株鉴定为金龟子绿僵菌小孢变种。基于 Dz01 和 Ma4 菌株和其它31个代表绿僵菌主要种或变种菌株 rDNA 上 ITS1-5.8S-ITS2 区序列构建的最大简约树显示,Dz01 和 Ma4 菌株均聚在金龟子绿僵菌小孢变种所构成的分支中,这为2个菌株形态学鉴定结果提供了分子依据。

关键词 虫生真菌,核糖体,内转录间隔区,进化树

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0406-04

The Identification of Two Isolates from Cadaver of *Brontispa longissima*(Gestro) and Their Phylogeny*

GUO Li-Jia HUANG Jun-Sheng** SONG Yan XU Tian-Wei

(Key Laboratory for Boleful Brology Detection and Monitor of Tropical Agriculture of Hainan

Province Environment and Plant Protection Institute Chinese Academy of Tropical Agricultural Science , Danzhou 571737)

Abstract The strains Dz01 and Ma4 were isolated from cadavers of *Brontispa longissima*(Gestro), and were confirmed to be pathogenicity to *Brontispa longissima*(Gestro). After microscopical observation of the morphological characters of mycelium , phialide and conidia from two isolates , they were found to be identical to *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* , so they were identified as *M. anisopliae* var *anisopliae* . The Maximum Parsimony tree constructed based on the sequences of ITS1-5.8S-ITS2 regions in ribosomal DNA from two isolates and 31 other isolates which represent different species or variety species of genus *Metarhizium* obtained from GenBank database showed that two isolates clustered together in the clade which was composed of the isolates classified as *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* . This provided the molecular data for the result of morphological identification of Dz01 and Ma4 isolates .

Key words Entomogenous fungus , Ribosomal DNA , Internal transcribed spacers , Phylogenetic tree

在中国椰心叶甲(*Brontispa longissima*(Gestro))属于外来有害生物,该外来有害生物在华南地区给棕榈科植物特别是椰子树造成极大危害^[1],从自然罹病死亡的椰心叶甲虫尸中分离致病真菌用于防治,是椰心叶甲防治的重要策略。我们对2株从自然罹病死亡的椰心叶甲虫尸分离到的且经过生物测定确定为致病菌的菌株即 Dz01 和 Ma4,依据形态学分类鉴定方法进行了鉴定,在此基础上测定了2个菌株 rDNA 的 ITS1-5.8S-ITS2 区域序列,并与相近种的一些菌株 ITS1-5.8S-ITS2 区域序列一起进行了

聚类分析,以期从形态学和分子水平上确定2个致病菌株的正确归属,为进一步分离和筛选椰心叶甲高致病力菌株提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 Dz01 和 Ma4 菌株的培养和形态观察

Dz01 和 Ma4 菌株分别分离自海南儋州和海口采集到的自然罹病死亡的椰心叶甲虫体,2个菌株经单孢分离纯化后,转接于 SDAY(4%葡萄糖、1%蛋白胨、2%琼脂)和 PPDA 培养基(马铃薯葡萄糖琼

*科技部“国家科技基础条件平台工作”(No. 2004-DKA30560);农业部南亚热作专项(LY2004-5)

**通讯作者 Tel: 0898-23300187, E-mail: H888111@126.com

收稿日期:2006-06-14,修回日期 2006-09-18

脂培养基加 1% 蛋白胨) 上培养 3d ~ 4d 后挑取少量菌丝体和分生孢子制片, 在 Nikon 80i 显微镜上用 400 × 倍数观察和拍照。

1.2 菌丝体基因组 DNA 的提取

从 PPDA 培养基平板上刮下 Dz01 和 Ma4 菌株的孢子粉分别接于 100mL 马铃薯葡萄糖培养液中 (250mL 锥形瓶装) 在 28℃、200r/min 的摇床上振荡培养 3d ~ 5d 后, 真空抽滤收集菌丝体, 保存于 -20℃ 冰箱中备用。菌丝体基因组 DNA 的提取参照刘少华等^[2] 尿素提取法。提取的 2 个菌株基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测和紫外分光光度仪测 OD_{260} 值后, 将样品稀释至约 10ng/μL 备用。

1.3 rDNA 的 ITS1-5.8S-ITS2 区域 PCR 扩增

采用 Curran^[3] 等 rDNA 的 ITS1-5.8S-ITS2 区域扩增引物 TW81(5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') 和 AB21(5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') 对 Dz01 和 Ma4 两个菌株基因组 DNA 进行扩增, 扩增反应体系为: 10 × PCR Buffer 5μL (含 20mmol/L MgCl₂), dNTPs (各 50 mmol/L) 4μL, 20μmol/L 正反向引物各 1.0μL, Taq DNA polymerase (2 U/μL) 0.7μL, 10ng/μL 模板 DNA 1.0μL, 最后以重蒸水补足至 50μL。扩增反应条件为: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 65℃ 退火 30s (每循环降 1℃), 72℃ 延伸 1min, 15 个循环, 然后 94℃ 变性 30s, 50℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 35 个循

环, 最后 72℃ 延伸 10min。

1.4 PCR 扩增产物的克隆与测序

PCR 扩增产物采用北京鼎国生物技术有限公司 DNA 片段回收试剂盒回收纯化后, 按照宝生物工程 pMD-18T Vector 试剂盒说明, 取适量回收 DNA 片段与 1μL PMD-18T 载体在 16℃ 循环水浴锅连接过夜, 重组质粒转化 *E. coli* XL1-Blue 菌株, 挑取经酶切鉴定和 PCR 检测为阳性的菌落寄往宝生物工程大连有限公司测序部测序。

1.5 Dz01 和 Ma4 菌株 ITS1-5.8S-ITS2 区域序列比对与聚类分析

将 Dz01 和 Ma4 菌株 rDNA 的 ITS1-5.8S-ITS2 区域序列与从 GenBank 数据库下载的 31 个代表绿僵菌主要种或变种的菌株和 1 个球孢白僵菌菌株 rDNA 的 ITS1-5.8S-ITS2 区域序列 (表 1) 使用 BioEdit 7.0 中 Clustal W 程序进行比对, 完成比对后人工删除 5' 和 3' 端非可比对序列并进行必要的校对。将上述经过比对的序列使用聚类分析软件 Paup 4.0 beta 10 按最大简约法 (Maximum Parsimony) 法进行聚类分析, 使用启发式搜索, 树二等分再连接分支交换 (TRB), 各种核苷酸替代同等加权, 空位 (gaps) 视为信息缺失 (missing information), 自展检验 (bootstrap analysis) 重复 1000 次。

表 1 GenBank 数据库下载的参照菌株 rDNA-ITS 序列信息

菌种学名	菌株	GenBank 登录号	菌种学名	菌株	GenBank 号
<i>Beauveria bassiana</i>	FI 297	AF139856	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	FI 1029	AF135210
<i>Metarhizium album</i>	FI MaF	AF137067		FI 1091	AF135214
<i>M. flavoviride</i> Type E	FI 152	AF139855		FI 1045	AF135213
	FI 1173	AF139854		FI 1027	AF134150
<i>M. flavoviride</i> var. <i>novazealandicum</i>	FI 1124	AF139852		FI 1031	AF135211
	FI 1125	AF139853		FI 1156	AF135216
<i>M. flavoviride</i> var. <i>pemphigum</i>	FI 72	AF139850		FI 163	AF136375
<i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i>	FI 1172	AF138272		FI 203	AF136376
	FI 403	AF138271		FI 23	AF137055
<i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>	FI 402	AF138268		FI 328	AF137057
	FI 405	AF138267		FI 1034	AF135212
<i>M. anisopliae</i> var. <i>acidum</i>	FI 987	AF137062		FI 1114	AF135215
	FI 1028	AF137064		FI 114	AF137054
<i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i>	FI 147	AF137065		FI 208	AF136928
	FI 1042	AF137066	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	FI 388	AF137060
<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	FI 700	AF137056		FI 389	AF137061

2 结果与分析

2.1 Dz01 和 Ma4 菌株形态观察

Ma4 菌株菌丝分枝,有隔,无色光滑,宽 $2.2\mu\text{m}$ ~ $3.2\mu\text{m}$;分生孢子梗单生或分枝,分枝顶端具 2~5 个柱形的瓶梗,大小为 $(5.2\sim 9.0)\mu\text{m} \times (2.5\sim 3.2)\mu\text{m}$,其上产生向基式的分生孢子链;单个分生孢子无色,柱形两端钝圆,大小为 $(4.5\sim 8.6)\mu\text{m} \times (1.8\sim 2.9)\mu\text{m}$ (图 1)。其在 PPDA 上菌落呈绒毛状,菌落边缘白色,中央产生暗绿色分生孢子层, $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 7d 左右,菌落直径约为 3.5cm,培养 14d 菌落直径约为 7.6cm。Dz01 菌株的菌丝、分生孢子梗、瓶梗和分生孢子等形态特征基本与 Ma4 菌株一致(图 2),但生长较慢,在 PPDA 上 $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 7d 菌落直径约为 3.1cm,培养 14d 菌落直径约为 6.8cm。Ma4 和 Dz01 菌株在 SDAY 培养基上培养菌落呈棉絮状,其上分生孢子层薄,气生菌丝层较厚。上述 2 个菌株的形态特征与 Tulloch 和 Driver 等^[4,5]描述的金龟子绿僵菌小孢变种 *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* 基本一致,因而依据形态学特征可将 2 个菌株鉴定为金龟子绿僵菌小孢变种。

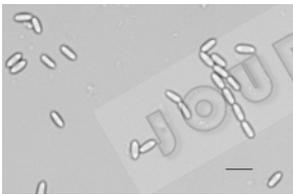


图 1 Dz01 菌株分生孢子形态



图 2 Ma4 菌株分生孢子形态

2.2 Dz01 和 Ma4 菌株 ITS1-5.8S-ITS2 区域克隆及测序结果

采用 PCR 方法扩增 Dz01 和 Ma4 菌株 ITS1-5.8S-ITS2 区域并进行克隆测序,结果表明所扩增的 2 个菌株 ITS1-5.8S-ITS2 区域均为 547bp,将序列提交至 GenBank,分别获得登录号为 DQ650708 和 DQ650709。

2.3 ITS1-5.8S-ITS2 序列比对和进化树构建

经过 BioEdit7.0 软件包中的 Clustal W 程序排序后,ITS1-5.8S-ITS2 序列总长度为 637,其中变异位点为 226,信息位点为 154 个,将 ITS1-5.8S-ITS2 作为一个共同的数据矩阵运用 Paup4 beta10 软件以 FI 297 菌株(*Beauveria bassiana*)作为功能性外分支(Functional outgroup)进行运算,将空位处理作数据缺失(Missing)得到一个最简约树(图 3),这个简约树总步长为 393 步,一致性指数 $CI = 0.7888$,保持性指数 $RI = 0.8811$ 。

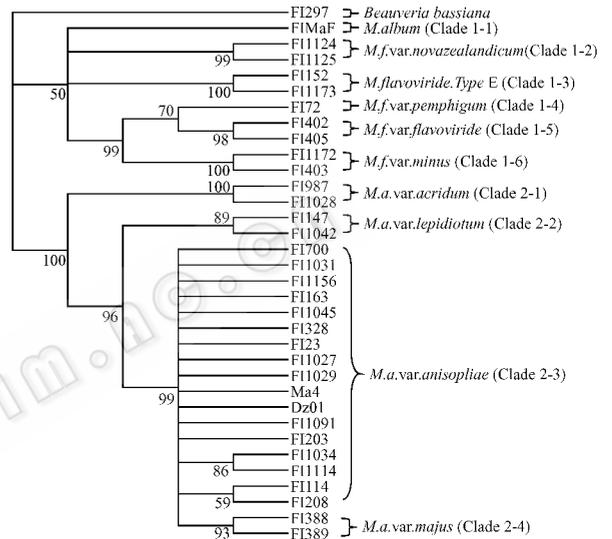


图 3 基于 rDNA-ITS 序列构建的绿僵菌属最大简约树

M. a. = *Metarhizium anisopliae*, *M. f.* = *Metarhizium flavoviride*, 分支上的数值代表大于 50% 的自展支持率

2.4 Dz01 和 Ma4 菌株分类地位研究

由最大简约树可见绿僵菌属的种或变种可以聚成两个主要分支,1 个分支(Clade 1)由白色绿僵菌 *Metarhizium album* Petch 和黄绿绿僵菌 *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal 4 个变种和 E 型组成,其支持率为 50%,另 1 个分支(Clade 2)由金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae*(Metschn.) Sorokin 的 4 个变种组成的,支持率为 100%,该分支又可分为 4 个亚分支,金龟子绿僵菌小孢变种 *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* 和大孢变种 *Metarhizium anisopliae* var *majus* 各占其中 1 个亚分支(Clade 2-3 2-4),支持率均为 99%,本研究 Dz01 和 Ma4 菌株落在金龟子绿僵菌小孢变种所在的亚分支上。

3 讨论

分生孢子梗和分生孢子的形状颜色等形态特征进行了观察,发现2个菌株的形态特征与Tulloch描述的金龟子绿僵菌小孢变种形态特征基本一致,因而鉴定为金龟子绿僵菌小孢变种。在此基础上测定了2个菌株的ITS1-5.8S-ITS2区域序列,并与绿僵菌其它种或变种代表性菌株的ITS1-5.8S-ITS2区域序列一起进行聚类分析,研究它们在绿僵菌属中的分类地位,结果所构建最大简约树将2个菌株聚在金龟子绿僵菌小孢变种类群中,这就从分子水平上支持了2个菌株为金龟子绿僵菌小孢变种,与形态学鉴定结果正好得以相互验证。

不同种或变种的绿僵菌在地理分布和寄主范围上有所差异,现已知金龟子蚱蜢变种 *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* 只侵染蚱蜢和蝗虫^[4],金龟子绿僵菌大孢变种 *Metarhizium anisopliae* var. *majus* 主要分离自鞘翅目的二疣犀甲(*Oryctes rhinoceros*)、蛴螬类和同翅目的蝉^[4,6,7]寄主范围相对较窄。金龟子绿僵菌小孢变种不仅地理分布广泛,而且寄主范围也广^[4],已知寄主有等翅目、鞘翅目、直翅目、半

翅目及鳞翅目的多种昆虫。我们对鉴定为金龟子绿僵菌小孢变种的2个菌株进行了室内虫效实验,结果表明Dz01和Ma4可以侵染直翅目的蝗虫、鳞翅目的甘蔗二点螟、等翅目的白蚁、半翅目的蟑螂,这在一定程度上支持Dz01和Ma4菌株为金龟子绿僵菌小孢变种。

参考文献

- [1]李红梅,孙江华,韩红香,等. 中国森林病虫, 2005, 24(6): 5~8.
- [2]刘少华,陆金萍,朱瑞良,等. 植物病理学报, 2005, 35(4): 362~365.
- [3]Curran J, Driver F, Ballard JWO, et al. Mycological Research, 1994, 9: 547~552.
- [4]Driver F, Milner R J, Trueman W H. Mycos Res, 2000, 102(2): 134~150.
- [5]Tulloch M. Trans. br. Mycol. Soc, 1976, 66(3): 407~411.
- [6]林华峰,李世广,张磊,等. 应用生态学报, 2006, 17(2): 351~355.
- [7]刘爱英. 真菌学报, 1988, 7(3): 191~192.