

# 10 株白僵菌菌株 ITS 序列测定和系统发育分析

蔡三山<sup>1</sup>, 欧阳静<sup>2</sup>, 王义勋<sup>1</sup>, 查玉平<sup>1</sup>, 洪承昊<sup>1</sup>, 陈京元<sup>1\*</sup>

(1. 湖北省林业科学研究院, 湖北 武汉 430075; 2. 湖北省公安县植物保护局, 湖北 公安 434300)

**摘要:**通过对 10 株白僵菌菌株进行培养和提取基因组 DNA, 并利用真菌 ITS 序列通用引物 ITS4 和 ITS5 进行 PCR 扩增, 均得到了 1 条长约 500 bp DNA 产物。分别对该产物进行序列测定和分析表明, 这 10 株白僵菌菌株的 ITS 序列长为 490~494 bp; 利用 ITS 序列构建系统发育树表明, 菌株 YD-1、YD-2、JN-1、QC-1、SY-1、YC-1、YC-2、GA-1 和 FJ-2 均为球孢白僵菌(*Beauveria bassania*), 而菌株 FJ-1 很可能为白僵菌属的一个新成员。

**关键词:**白僵菌; ITS 序列; 系统发育

**中图分类号:**S763.15      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2016)05-0182-06

## Internal Transcribed Spacer Region Sequencing and Phylogenetic Analysis of 10 Strains of *Beauveria* spp.

CAI San-shan<sup>1</sup>, OUYANG Jing<sup>2</sup>, WANG Yi-xun<sup>1</sup>, ZHA Yu-ping<sup>1</sup>, HONG Cheng-hao<sup>1</sup>, CHEN Jing-yuan<sup>1\*</sup>

(1. Hubei Academy of Forestry, Wuhan, Hubei 430075, China;

2. Bureau of Plant Protection, Gong'an County, Gong'an, Hubei 434300, China)

**Abstract:** Based on cultivation and extracting genomic DNA of 10 strains of *Beauveria* spp., we amplified a DNA fragment with a length of about 500 bp and the fungal universal primers, ITS4 and ITS5. Sequence analysis showed that the length of ITS region of 10 strains was from 490 bp to 494 bp. Phylogenetic analysis demonstrated that the 9 strains, including YD-1, YD-2, JN-1, QC-1, SY-1, YC-1, YC-2, GA-1, and FJ-2 belonged to *Beauveria bassania* and the left strain FJ-1 maybe a new member of genus *Beauveria*.

**Key words:** *Beauveria* spp.; ITS Region; phylogenetic analysis

能够感染杀虫的菌物包括卵菌、壶菌、接合菌(虫霉目)和子囊菌等, 种类达 1 000 多种<sup>[1]</sup>; 我国关于森林虫生真菌调查和应用研究已具一定历史, 例如樊美珍<sup>[2]</sup>等(1987)对西北主要林木害虫的病原真菌种类进行了调查, 屈邦选<sup>[3-4]</sup>等(1990 和 1991)和周嘉熹<sup>[5]</sup>等(1991)分别开展了利用白僵菌防治杨十斑几丁虫和黄斑星天牛的应用研究。白僵菌属(*Beauveria*)是全球分布最常见的土壤虫生真菌, MacLeod(1954)将 8 个近似种组合进 *B. bassiana*, 4 个近似种组合进 *B. tenella* (Sacc.) Siemaszko<sup>[6]</sup>(1972 年被 de Hoog 组合进 *B. brongniartii*)。广义的球孢白僵菌寄主范围很广, 至少包括 15 目、149

科的 700 多种昆虫和 6 科 7 属 13 种蜚蠊<sup>[7]</sup>; 广义的布氏白僵菌寄主范围虽然稍窄, 但也至少包括 7 目 70 种<sup>[8]</sup>。在开发白僵菌作为生物杀虫剂方面, 前人做了大量工作, 但效果一直不理想, 主要原因就在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缺乏了解<sup>[9]</sup>。在最近对白僵菌属的分类研究中, de Hoog(1972)确定了 3 个种, 包括 *B. bassiana*、*B. brongniartii* 和 *B. alba*<sup>[10]</sup>(现在为 *Engyodontium album*)<sup>[11]</sup>。后来又识别了其他 4 个种, 包括 *B. vermiconia*<sup>[12]</sup>、*B. amorpha*<sup>[13]</sup>、*B. caledonica*<sup>[14]</sup> 和 *B. malawiensis*<sup>[15]</sup>。Rehner<sup>[16]</sup>等(2011)根

收稿日期: 2015-11-20    修回日期: 2016-02-14

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费项目(201404409)。

作者简介: 蔡三山, 男, 副研究员, 研究方向: 森林病虫害防治。E-mail: 328217811@qq.com

\* 通信作者: 陈京元, 男, 研究员, 博士, 研究方向: 森林保护。E-mail: jingyuanchen@hotmail.com

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。Schoch<sup>[17]</sup>等(2012)通过对真菌 6 个 DNA 区域的分析,建议将 ITS 序列作为真菌通用 DNA 条形码(DNA barcode)。本文通过对 10 株不同来源的白僵菌菌株进行 ITS 序列测定,并利用其进行系统发育分析,以期对这 10 个菌株进行快速分子鉴定,为下一步的研究工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试的 10 株白僵菌菌株采集信息见表 1。

1.2 菌株保存和培养

将 10 个白僵菌菌株试管斜面保存于 4℃,定期转管保存。从试管斜面上取 1 小块菌种放于 PDA 平板上,25℃倒置培养 7 d,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<sup>[18]</sup>。

1.4 引物合成

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'-TCCTCCGCTTATTG-ATATGC-3') 和 ITS-5 (5'-GGAAGTAAAAGTC-GTAAACAAGG-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,2.5 mmol · L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL,10 pmol · L<sup>-1</sup> 上下游引物各 0.5 μL,10 mmol · L<sup>-1</sup> dNTP 2 μL,5 U · μL<sup>-1</sup> 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 5 min,进入循环,94℃变性 30 s,56℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,30 个循环后 72℃延伸 10 min。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。利用 DNAMAN 软件对序列校对和剪切,并提交 GenBank,并利用 Mega6.06 软件构建系统发育树和利用 DnaSP5.10.01 软件进行 *Beauveria bassiana* ITS 序列的单核苷酸多态性分析。

表 1 10 株白僵菌菌株采集信息  
Table 1 Collection information of 10 strains of *Beauveria* spp.

菌株编号	菌株分离寄主	僵虫采集地点	菌株提供单位
YD-1	马尾松毛虫( <i>Dendrolimus punctatus</i> ) Walker)	湖北宜都	当阳市白僵菌厂
YD-2	马尾松毛虫( <i>Dendrolimus punctatus</i> )	湖北宜都	当阳市白僵菌厂
JN-1	玉米螟( <i>Pyrausta nubilalis</i> )	吉林	吉林省农科院
QC-1	马尾松毛虫( <i>Dendrolimus punctatus</i> )	湖北蕲春	当阳市白僵菌厂
SY-1	蛱蝶	辽宁沈阳	当阳市白僵菌厂
YC-1	马尾松毛虫( <i>Dendrolimus punctatus</i> )	湖北宜昌	本研究室
YC-2	马尾松毛虫( <i>Dendrolimus punctatus</i> )	湖北宜昌	本研究室
GA-1	杨小舟蛾( <i>Micromelalopha troglodyta</i> )	湖北公安	本研究室
FJ-1	松褐天牛( <i>Monochamus alternatus</i> )	福建	福建农林大学森林昆虫室
FJ-2	松褐天牛( <i>Monochamus alternatus</i> )	福建	福建农林大学森林昆虫室

2 结果与分析

2.1 10 株白僵菌 ITS 序列构成及其 GenBank 登录号

利用 10 个菌株培养所得菌丝体提取基因组 DNA,并用该基因组 DNA 在引物 ITS-4 和 ITS5 作用下进行 PCR 扩增,所获产物进行琼脂糖凝胶电泳均得到 1 条长度约 500 bp 的 DNA 条带,然后对该 DNA 条带进行纯化、回收并测序;用 DNAMAN 5.2.2 软件对测得的每一菌株相应序列进行反复校

对,同时去除两端不确定的序列;进一步分析每一菌株所得序列的构成,并将其提交 GenBank 数据库,获得了相应于该 10 株白僵菌 ITS 序列的登录号(表 2)。

2.2 白僵菌及相近属种的 ITS 序列比较及其系统发育分析

参阅文献[17],利用登录号从 GenBank 下载相应菌种的 ITS 序列,并将其和 10 个菌株的 ITS 序列一起用 MEGA6.06 软件的 Alignment 程序对所有序列进行多重对位排列(multiple alignments),手

动将对位排列结果中 5′ 和 3′ 端的非对位排列区 (unalignable region) 去除, 然后利用 MEGA6.06 软件进行系统发育分析和系统进化树的构建; 用 Kimura2-parameter 模式计算遗传距离, 所有对位排列结果中的空位 (gaps) 或缺失数据 (missing data) 作完全删除 (complete deletion) 处理, 进化距离分析采用邻位相连法 (NJ, neighbor-joining); 系统树的每个分支的统计学显著性分析以自展法 (bootstrap) 进行检验, 重复次数为 1 000 次。利用这 10 菌株及近源种属的 ITS 序列构建系统发育树 (图

1)。从图 1 可看出, 测 ITS 序列的 10 个菌株中, 除 FJ-1 菌株外, 其他 9 菌株 (包括 YD-1、YD-2、JN-1、QC-1、SY-1、YC-1、YC-2、GA-1 和 FJ-2) 均为 *Beauveria bassiana*; 通过 MEGA6.06 软件对菌株 FJ-1、*B. asiatica*、*B. australis* 和 *B. brongniartii* 的 ITS 序列构建系统发育树 (图 2)。从图 2 可看出, 菌株 FJ-1 很可能为 *Beauveria* 属的 1 个新种, 而且该新种与 *B. asiatica*、*B. australis* 和 *B. brongniartii* 3 个种在进化关系上极为密切。

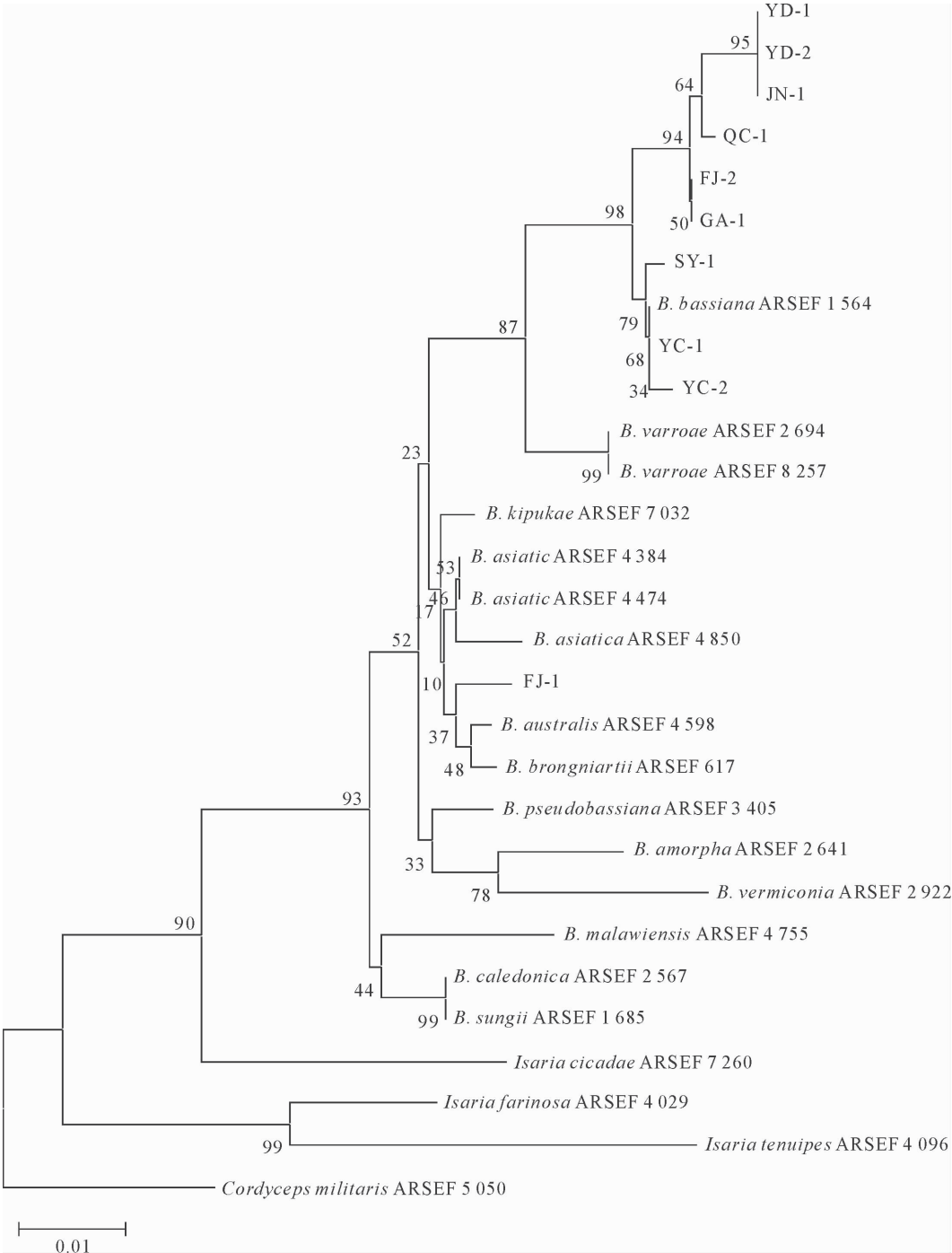


图 1 10 菌株与其他近源种属的 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree constructed through ITS sequences of 10 and other strains related to genus *Beauveria*

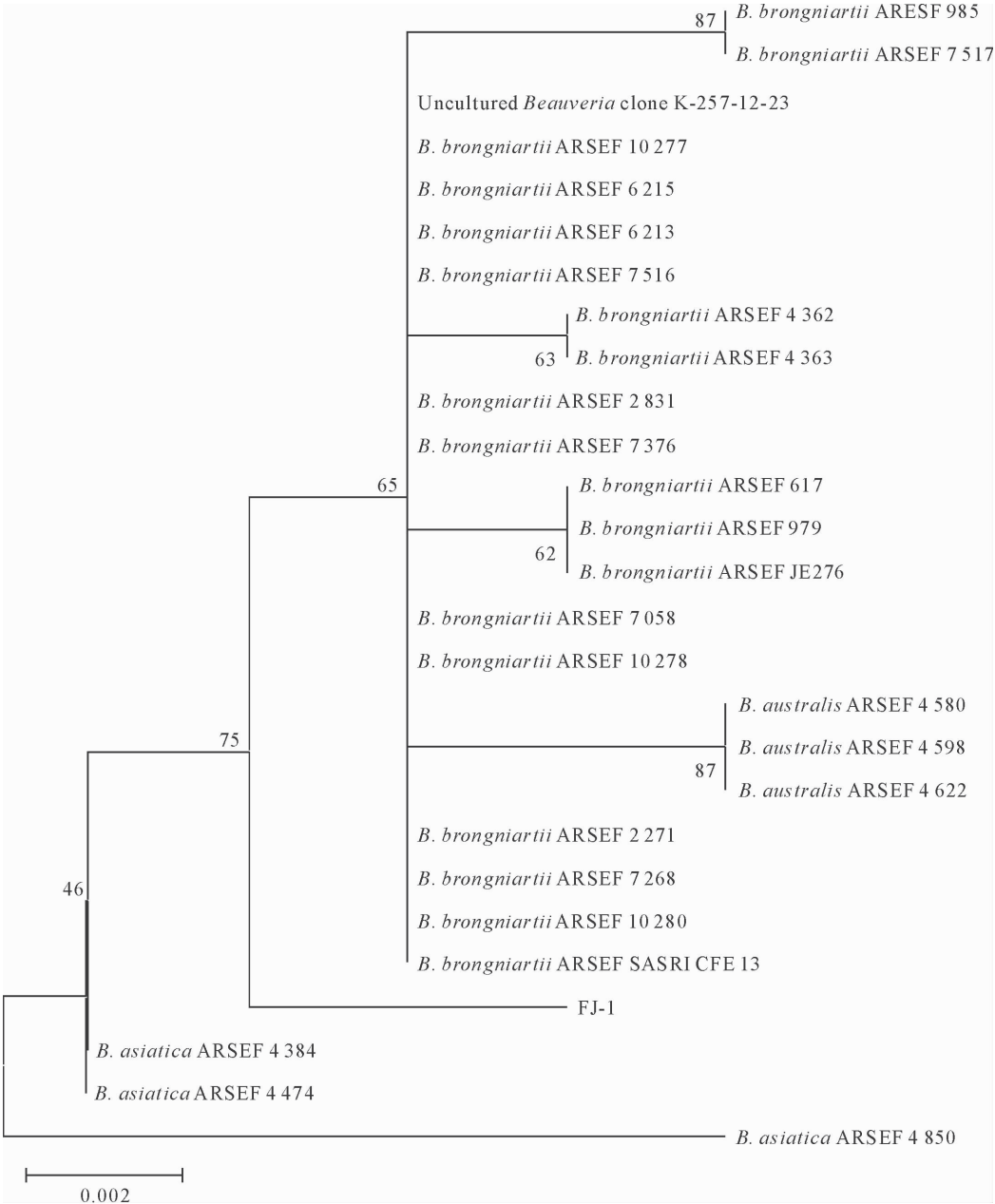


图 2 菌株 FJ-1 与其近源种 *B. asiatica*、*B. australis* 和 *B. brongniartii* 的 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree constructed through ITS sequences of FJ-1 strain and other strains belonging to *B. asiatica*、*B. australis* and *B. brongniartii*

表 2 10 株白僵菌的 ITS 序列长度分析结果

Table 2 Analysis results of ITS sequence length of 10 strains of *Beauveria* spp. bp

菌株	ITS1 长度	5.8S 长度	ITS2 长度	ITS 序列总长	GenBank 登录号
YD-1	159	156	176	491	KF772861
YD-2	159	156	176	491	KF772862
JN-1	161	156	177	494	KF772863
QC-1	159	156	175	490	KF772864
SY-1	159	156	177	492	KF772865
YC-1	159	156	176	491	KF772866
YC-2	159	156	177	492	KF772867
GA-1	159	156	177	492	KF772868
FJ-1	159	156	176	491	KF772869
FJ-2	159	156	175	490	KF772870

2.3 Beauveria bassiana ITS 序列的单核苷酸多态性

将上文通过 ITS 序列鉴定为 *Beauveria bassiana* 的 9 个菌株和菌株 *Beauveria bassiana* ARSEF 1 564 共 10 菌株的 ITS 序列(全长 494 bp)利用 DnaSP5.10.01 软件进行单核苷酸多态性分析,发现该段序列共 11 个 SNP,全部为单核苷酸的替换,有 4 个 InDel 位点,核苷酸多态性值( $P_i$ )为 0.007 76,平均核苷酸差异数(Average number of nucleotide differences) $k$  为 3.800;在 11 个 SNP 中,单态突变位点(Singleton variable sites)6 个,双突变为 5 个(位点:18、41、114、151 和 341),三突变为 1 个(位点:40),简约信息位点(Parsimony informative sites)5 个,均为双突变(位点:39、45、219、421 和 442)。

3 结论与讨论

2005 年 Rehner 等尝试将细胞核核糖体基因间区(ITS)和延伸因子 1- $\alpha$ (EF1- $\alpha$ )结合使用来推断白僵菌的系统发育,首次成功地将 68 个来自世界各地的球孢白僵菌菌株划分成 2 个不相关的支系:全球分布且具有有性型的支系和欧洲、北美支系,这些隐含的谱系皆表现出洲际特征分布的特点;他们分割复合种的初步尝试为白僵菌属分类的系统研究构筑了一个种系发育的框架<sup>[9]</sup>。在此基础上,他们用 4 个位点(包括核基因间区(Bloc)序列以及 *RPB1*、*RPB2* 和 *TEF* 等 3 个部分基因构建了全球除南极洲以外的各大洲的 1 192 个菌株系统发育树,该系统树具有支持率很高的 12 个分支,其中 6 个分支代表了 6 个被承认的种:多形白僵菌 [*B. amorpha* (Höhn.) Minnis, Rehner & Humber]、(狭义)球孢白僵菌、布氏白僵菌、苏格兰白僵菌 (*B. caledonica* Bissett & Widden)、马拉维白僵菌 (*B. malawiensis* Rehner & de Muro)和蠕孢白僵菌 (*B. vermiconia* de Hoog & Rao);其余的 6 个分支被描述为新种,包括在他们的白僵菌通过形态特征无法与狭义球孢白僵菌区分的 3 个隐含种蜂螨白僵菌 (*B. varroea* Rehner & Humber)、夏威夷白僵菌 (*B. kipukae* Rehner & Humber)和假球孢白僵菌 (*B. pseudo-bassiana* Rehner & Humber)以及无法与狭义布氏白僵菌区分的 2 个隐含种亚洲白僵菌 (*B. asiatica* Rehner & Humber)和澳洲白僵菌 (*B. australis* Rehner & Humber);此外,还有一种尚未查明的虫草的无性型成氏白僵菌 (*B. sungii* Rehner & Humber)<sup>[19]</sup>。Liu 等(2001)描述的小蟬草 (*Cordyceps sobolifera*)的无性型新种小蟬草白僵菌 (*B. sobo-*

*lifera*)未纳入 Rehner 等(2011)的系统,也可能是 一种未知的白僵菌<sup>[20]</sup>。由图 1 和图 2 可以看出,菌株 FJ-1 是白僵菌属中介于亚洲白僵菌 (*B. asiatica*)这一分支与另一分支[布氏白僵菌 (*B. brongniartii*)和澳洲白僵菌 (*B. australis*)]间的白僵菌新类群。

正如本文前言部分所提到的,Schoch 等(2012)通过对真菌 6 个 DNA 区域的分析,提出了将 ITS 序列作为真菌通用 DNA 条形码的建议,在文中 Schoch 等也补充到对于那些分类学上划分范围比较窄的真菌群组,可能有必要附加的 DNA 条形码。本研究通过测定 10 个白僵菌的 ITS 序列,并利用其进行系统发育树的构建,将 9 菌株鉴定为球孢白僵菌,恰恰为利用 ITS 序列作为真菌 DNA 条形码提供了佐证。另外,造成菌株 FJ-1 分类地位暂时的不确定性有如下几方面的原因:1)缺乏形态学上的描述;2)该类的菌株只有 1 株,在构建系统发育树时,不能成系统群(Clade);3)白僵菌属为 Schoch 等提到那些分类学上划分范围比较窄的真菌群组。对照上面分析的原因,要确定菌株 FJ-1 所代表是白僵菌属的一个新成员,有必要开展如下工作:分离和收集更多的白僵菌菌株,以获得与 FJ-1 同一类群的菌株,从而提供更多关于这一类群的遗传信息;按照 Rehner 等(2011)的观点,对 FJ-1 菌株的 4 个位点(包括 *RPB1*、*RPB2*、*TEF* 和 *Bloc*)进行测定,用以构建以作为补充性的 DNA 条形码;对 FJ-1 菌株进行形态学上的观察和描述。

参考文献:

[1] 王成树. 虫生真菌研究与应用的发展与机遇[J]. 菌物学报, 2012,31(3):305-306.  
WANG C S. Advances and challenges in investigation and application of entompathogenic fungi[J]. Mycosystema, 2012,31 (3):305-306.

[2] 樊美珍,郭超,郭士英,等. 西北地区主要林木害虫致病微生物种类初报[J]. 西北林学院学报,1987,2(1):120-126.  
FAN M Z, GUO C, GUO S Y, et al. A list of species of pathogenic microorganism about forest insects mainly in Northwest China[J]. Journal of Northwest Forestry University, 1987,2 (1):120-126. (in Chinese)

[3] 屈邦选,陈辉,谢成祥,等. 杨十斑吉丁虫的研究——I 生物学特性及天敌[J]. 西北林学院学报,1990,5(4):11-17.  
QU B X, CHEN H, XIE C X, et al. Study on *Melanophila decastigma* Fabricious—I biological characteristics and natural enemies [J]. Journal of Northwest Forestry University, 1990,5 (4):11-17. (in Chinese)

[4] 屈邦选,陈辉,刘复玳,等. 杨十斑吉丁虫的研究——II 发生规律及防治[J]. 西北林学院学报,1991,6(1):28-32.  
QU B X, CHEN H, LIU F D, et al. Study on *Melanophila decastigma* Fabricious—II occurring regularity and its control

[J]. Journal of Northwest Forestry University,1991,6(1):28-32. (in Chinese)

[5] 周嘉熹,唐明,孜那提古丽,等. 黄斑星天牛幼虫期致病菌的研究[J]. 西北林学院学报,1992,7(3):7-11  
ZHOU J X,TANG M,GULI Z N T,*et al.* Infection by fungi on larvae of *Anoplophora nobilisbricious* ganglbauer [J]. Journal of Northwest Forestry University, 1992, 7 (3): 7-11. (in Chinese)

[6] MACLEOD D M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* L. [J]. Canadian Journal of Botany, 1954,32:818-890.

[7] 李增智. 球孢白僵菌昆虫寄主名录[M]//中国虫生真菌研究与应用(第一卷). 北京:学术期刊出版社,1988.

[8] 农向群. 布氏白僵菌的研究与应用[J]. 植物病理学报,2000,27:83-87.  
NONG X Q. A review of the researches and applications of Brongniart’s white muscardine fungus *Beauveria brongniartii* Petch [J]. Acta Phytophylacica Sinica,2000,27:83-87. (in Chinese)

[9] REHNER S A,BUCKLEY E P. Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) [J]. Molecular Ecology Notes,2005,3:409-411.

[10] DE HOOG G S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodonium* gen. nov [J]. Stud Mycol,1972,1:1-41.

[11] DE HOOG G S. Notes on fungicolous hyphomycetes and their relatives [J]. Persoonia,1978,10:33-81.

[12] DE HOOG G S,RAO V. Some new hyphomycetes [J]. Persoonia,1975,8:207-212.

[13] SAMSON R A,EVANS H C. Two new *Beauveria* spp. from south America[J]. J Invert Pathol,1982,39:93-97.

[14] BISSETT J,WIDDEN P. A new species of *Beauveria* from scottish moorland soil[J]. Can. J. Bot. ,1986,66:361-362.

[15] REHNER S A,AQUINO DE M M,Bischoff J F. Description and phylogenetic placement of *Beauveria malawiensis* sp. nov. (Clavicipitaceae,Hypocreales)[J]. Mycotaxon,2006.98:137-145.

[16] REHNER S A,MINNIS D,SUNG G H,*et al.* Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*[J]. Mycologia,2011,103:1055-1073.

[17] SCHCH C L,SEIFERT K A,HUHNDORF S,*et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi[J]. PNAS,2012,109:6241-6246.

[18] LIU D,COLOE S,BAIRD R,*et al.* Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR[J]. Journal of clinical microbiology, 2000,38:471.

[19] 李增智,黄勃,陈名君,等. 分子时代的白僵菌研究[J]. 菌物学报,2011,30(6):823-835  
LI Z Z,HUANG B,CHEN M J,*et al.* Studies on the genus *Beauveria* in molecular era[J]. Mycosystema,2000,38:471.

[20] LIU Z Y,LIANG Z Q,WHALLEY A J S,*et al.* A new species of *Beauveria*, the anamorph of *Cordyceps soboli fera* [J]. Fungal Diversity,2001(7):61-70.

[10] 胡厚臻,侯文娟,潘启龙,等. 配方施肥对刨花润楠幼苗生长和光合生理的影响[J]. 西北林学院学报,2015,30(6):39-45.  
HU H Z ,HOU W J,PAN Q L,*et al.* Effects of formulated fertilization on the growth and photosynthetic physiological properties of *Machilus pauhoi* seedlings[J]. Journal of Northwest Forestry University,2015,30(6):39-45. (in Chinese)

[11] 郑勇平,孙鸿有,董汝湘,等. 杉木不同世代不同类型种子园遗传改良增益研究[J]. 林业科学,2007,43(3):20-27.  
ZHENG Y P,SUN H Y,DONG R X,*et al.* A study on realized and genetic gains of different generations and types in seed orchards of Chinese fir (*Cunninghamia lanceolata*) [J]. Scientia Silvae Sinicae,2007,43(3):20-27. (in Chinese)

[12] 赵燕,王辉,李吉跃. 氮、磷、钾对毛白杨幼苗光合生理的影响[J]. 西北林学院学报,2015,30(5):34-38.  
ZHAO Y,WANG H,LI J Y. Effects of Nitrogen,Phosphorus and Potassium on photosynthetic physiology of *Populus tomentosa* seedlings[J]. Journal of Northwest Forestry University,2015,30(5):34-38. (in Chinese)

[13] 洪伟,吴承祯. 试验设计与分析—原理·操作·案例[M]. 北京:中国林业出版社,2004:7-12.

[14] 梁一池. 树木育种原理与方法[M]. 厦门:厦门大学出版社,1998:162-168.

[15] 郭祥泉,洪伟,吴承祯,等. “t”检验法则在闽北抗寒-速生邓恩桉优株筛选的应用[J]. 应用与环境生物学报,2009,15(3):385-389.  
GUO X Q,HONG W,WU C Z,*et al.* Application of “t” determination principle in selection of *Eucalyptus dun nii* elite trees with cold-resistant and rapid-growth genotypes in northern Fujian, China[J]. Chin. J. Appl. Environ Biol. , 2009, 15 (3):385-389. (in Chinese)

[16] 郭祥泉. 邓恩桉栽培学[M]. 北京:中国林业出版社,2015:212-270.

(上接第 137 页)