

球孢白僵菌混菌培养的遗传学分析

王成树* 丁德贵** 王四宝 李增智

(农业部农作物病虫害鼠害生物防治资源研究及利用重点实验室 北京 100081)

(安徽农业大学经济昆虫菌物研究所 合肥 230036)

摘 要 放线酮抗性及 34℃ 耐受性不同的球孢白僵菌两营养亲和单孢株经混合培养,能够形成异核体。在分生孢子形成的单倍化过程中,异核体中的染色体或其片段发生连续丢失,至少经 4 代准性循环,遗传性状才会趋于相对稳定。遗传标记及 RAPD 分析表明,异核体中染色体的丢失并非随机的,重组株的遗传性状表现为倾向选择,即子代主要只表现为某一母株的遗传性状,另一亲本型性状被完全抑制或其遗传物质被丢失。混合比例不同、培养介质不同可影响准性生殖过程及倾向选择频率。混菌培养有利于优良性状的保持。

关键词 球孢白僵菌,异核体,染色体丢失,倾向选择

中图分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2000)05-0545-50

利用出发菌株营养缺陷型、抗药性或颜色突变等遗传标记,分析不同遗传背景的真菌混合培养或原生质体融合的遗传规律均有报道,尤其是关于有性生殖真菌(主要是子囊菌和担子菌)交配型检验的研究。真菌有性生殖阶段,遗传规律符合孟德尔的分离定律和独立分配定律,而无性繁殖阶段,由菌丝连联进行准性生殖的分离、分配规律并不十分清楚。带不同遗传性状的球孢白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil.] 菌株,经混合培养可形成强制异核体(forced heterocarcon),期间没有双倍体形成,或者极不稳定^[1~3]。Silvevia 和 Azevedo^[4]进行金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)原生质体融合研究时认为,融合子分生孢子的产生是由所谓准减数分裂(parameiosis)过程进行单倍化而形成的。

本文以球孢白僵菌不同遗传标记菌株为材料,通过混合配对培养、RAPD 分析,以探讨一些现象产生的原因,同时混菌培养还将有利于优良菌株的选育,防治菌种退化。

1 材料和方法

1.1 初始菌株

从安徽农业大学虫生菌研究室收藏的 200 多株白僵菌菌株中筛选出带一定标记的 21 个菌株,经感染马尾松毛虫(*Dendrolimus punctatus*)复壮,得到 15 个纯分离物。由极限稀释法^[5],每个分离物得到 10~20 个单孢株,经 120 μg/mL 放线酮(Fluka, AG)抗性及 34℃ 下测定萌发率,得到带明显不同标记的两个单孢株 5S03 及 S151,将其作为出发菌株进行混合培养研究。两菌株表现为营养亲和。

农业部农作物病虫害鼠害生物防治资源研究及利用重点实验室资助(LOBCR-98-01)

* 现于中国农业大学攻读微生物专业博士 ** 现工作单位 安徽省森林病虫害防治总站

作者简介 王成树(1970—),男,讲师,主要从事虫生真菌生物学,遗传学及生态学研究

收稿日期:1999-03-12,修回日期:1999-09-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.2 SDAY 培养基

葡萄糖 40g,蛋白胨 10g,琼脂 20g,酵母粉 10g,蒸馏水定容至 1L。

1.3 继代培养

出发菌株 5S03 及 S151 孢子经 0.5 % Tween - 80 稀释,得到 10⁷ 孢子/mL 悬浮液,各取 2mL 于试管中充分混和,取 0.1mL 涂布于 SDAY 平板,25 ± 1℃ 下培养 11 ~ 13d^[2]。挑取孢子稀释,同样方法继代培养 6 代,分别编号为 BS - 1 至 BS - 6,测定各培养物菌落生长速率、产孢量,记数孢子在含 120μg/mL 放线酮下 24h 和 34℃ 下 36h 于 SDAY 培养基上的萌发率。各检测 10 个视野约 500 孢子。

1.4 不同比例混菌培养

取 1.3 孢悬液,5S03 与 S151 按体积比 1:4、2:3、1:1、3:2 及 4:1 各配制 5mL,充分混和后,取 0.1mL 同样方法于 SDAY 平板上涂布培养 15d,培养物分别编号为 M1 ~ M5,测定各培养物菌落生长速率、产孢量及孢子对放线酮的抗性和在 34℃ 下的萌发率。

1.5 混菌感染

取 1.3 孢悬液,S151 和 5S03 按体积比 1:4、2:3、1:1、3:2 及 4:1 各配制 5mL,充分混和,浸液法感染玉米螟(*Ostrinia nubilalis*)2 ~ 3 龄幼虫,虫尸纯分离物分别编号为 BM1、BM3、BM4 及 BM5,其中 2:3 菌悬液感染虫尸分离失败。

1.6 RAPD 检测

1.6.1 DNA 提取 由上述实验共得到 17 个待测物(表 1),分别挑取一定量孢子接种于 4 % 葡萄糖、1 % 蛋白胨、2 % 及 1 % 酵母粉的液体培养基中,25 ± 1℃、150r/min 培养 48h,抽滤、洗涤菌块 3 次,晾干。称取 0.1g,氯化苄法提取 DNA^[6]。

1.6.2 RAPD 反应:采用 25μL 反应体系:Tris·HCl10mmol/L,pH8.3;KCl50mmol/L;Mg²⁺ 2.5mmol/L;dNTP0.2mmol/L;Taq 酶 1.5U、primer 0.2mmol/L(Canada Sangon Ltd.)模板 DNA 5 ~ 10ng。反应循环参数:95℃,5min;94℃,1min,36℃,1min,72℃,2min 循环 35 次 最后 72℃,10min。反应共使用 11 个引物(表 2)。扩增产物经 1.5 % 琼脂糖电泳,EB 染色后,拍照。

表 1 试验供试菌株

Table 1 Parental strains and their different cross products

No.	Code of strains	No.	Code of strains
1	5S03 Parental single spore strain	10	BM3,S151:5S03 = 1:1 Isolation from infection
2	S151 Parental single spore strain	11	BM4,S151:5S03 = 3:2 Isolation from infection
3	BS - 1 The first generation culture of cross incubation	12	BM5,S151:5S03 = 4:1 Isolation from infection
4	BS - 2 The second generation culture of cross incubation	13	M1,S151:5S03 = 4:1 Culture
5	BS - 3 The third generation culture of cross incubation	14	M2,S151:5S03 = 3:2 Culture
6	BS - 4(The forth generation culture of cross incubation)	15	M3,S151:5S03 = 1:1 Culture
7	BS - 5 The fifth generation culture of cross incubation	16	M4,S151:5S03 = 2:3 Culture
8	BS - 6 The sixth generation culture of cross incubation	17	M5,S151:5S03 = 1:4 Culture
9	BM1,S151:5S03 = 1:4Isolation from infection		

1.7 分析方法

由不同引物扩增的 DNA 片段,根据对应位点的有无编码为 1 或 0,由单匹配相关系数(SM)^[7]得到数据矩阵,由非加权数组算术平均数法(UPGMA)进行聚类分析。

$$SM = \frac{n_{xy} + n_{00}}{n_{xy} + n_x + n_y + n_{00}}$$

n_{xy} ,表示样本 X、Y 片段均存在的位点数 ; n_x 为样本 X 片段存在的位点数 ; n_y 为样本 Y 片段存在的位点 ; n_{00} 为样本 X、Y 片段均不存在的位点数。

2 结果分析

2.1 标记遗传分析

获得的 2 个单孢出发株,5S03 对放线酮和 34℃ 萌发条件表现出 100 % 的抗逆性,而 S151 在此条件下被完全抑制 ;生长速率 S151 大于 5S03,两者的产孢量没有显著差异。经 1 : 1 比例混合培养后,各继代培养物孢子对放线酮及 34℃ 的抗性除 BS-1 低于 5S03 外,其它各代与 5S03 没有显著性差异,各继代培养物产孢量同出发株均没有显著差异(表 3)。不同混合比例培养物的抗性,随 5S03 所占比例的增大,孢子萌发率逐渐接近 5S03。各培养物的产孢量,M3、M5 同出发株没有差异,M1、M2、M4 的产孢量均偏低,其中 M1 的产孢量最低(表 4)。混菌培养后,生长速率只有 BS-2 显著高于出发株,其它各培养物要么同出发株 5S03 没有差异,要么同 S151 没有差异。

表 3 继代培养产物的生物学性状

Table 3 Characteristics of different subcultured products

Strains	Growth rate/(mm/d)	Log of sporulation	Resistance rate to acidione/%	Germination rate at 34℃/%
5S03	3.41±0.55cB*	7.42±0.09aA	100aA	100aA
S151	4.13±0.14bB	7.28±0.08aA	0bC	0cC
BS-1	4.08±0.18bB	7.23±0.15aA	82.68±1.40cB	79.72±3.53bB
BS-2	4.99±0.22aA	7.43±0.15aA	95.51±1.89abA	97.04±1.50aA
BS-3	4.19±0.33bB	7.41±0.12aA	98.47±0.40aA	98.73±0.98aA
BS-4	3.56±0.61cB	7.37±0.20aA	96.21±1.40abA	96.57±0.50aA
BS-5	4.25±0.26bB	7.16±0.20aA	97.06±4.67abA	96.42±0.64aA
BS-6	3.56±0.07cB	7.26±0.08aA	94.40±1.55bA	99.00±0.80aA

Means(±se)labelled with the same letter are not significantly different(Duncan’s new multiple range test,small letter,p<0.05 ;capital,p<0.01),hereafter.

表 4 不同比例混合培养产物的生物学性状

Table 4 Characteristics of different mix-incubation products in different ratio

Strains	Growth rate/(mm/d)	Log of sporulation	Resistance rate to acidione/%	Germination rate at 34℃/%
5S03	3.41±0.55bB	7.42±0.09abAB	100aA	100aA
S151	4.13±0.14aA	7.28±0.08bcABC	0eE	0dD
M1	3.34±0.16bB	6.82±0.08eD	32.79±3.32dD	36.44±4.02cC
M2	3.28±0.46bB	7.09±0.15dc	73.65±4.36cC	75.38±6.68bB
M3	3.56±0.04bAB	7.36±0.02abcAB	88.49±0.79bB	93.08±1.41bB
M4	3.11±0.11bB	7.17±0.08cdBC	81.22±2.68bB	92.32±7.17aA
M5	3.25±0.08bB	7.53±0.03aA	98.02±1.29aA	97.50±1.28aA

表 2 PCR 扩增引物

Table 2 Primers used for DNA random amplification

Primer	Sequence
S7	GGTGACGCAG
S10	CTGCTGGGAC
S23	AGTCAGCCAC
S31	CAATCGCCGT
S33	CAGCACCCAC
S141	CCCAAGGTCC
S144	GTGACATGCC
S146	AAGACCCCTC
S156	AATGACTGTG
S160	AACGGTGACC
S359	GGACACCACT

2.2 RAPD 分析

使用 11 个引物共扩增出 140 条带,平均每个引物扩增约 13 条带。经计算,5S03 和 S151 的单匹配相似系数为 0.421,遗传差异较大(图 1)。各获得菌株的 PCR 扩增片段中,一方面均具有与出发株相同的特征带,如 S144 扩增产物,几乎每个菌株均具 5S03 的 3 条主带,BS-5、BS-6、BM1、BM3、BM4 和 M3 又与 S151 有明显相同带;另一方面也有新带产生,如 BS-5、BS-6、BM1、BM3、BM4、M3 被 S10 扩增的片段中,均有 2 个出发菌株不具备的带产生。S151 的 2 条主带,S144、S10 均没有在各获得菌株中扩增出来。就各菌株遗传相似性大小来看,出发株 5S03 与各获得株单匹配相似系数的平均值为 0.6686,而 S151 与各获得株 SM 平均值为 0.5379, t 检验差异显著($t = 3.183, t_{0.01} = 2.467$)。

6 个继代培养物之间的遗传相似率也相距甚远(图 2),只有 BS-2、BS-3、BS-4 能在 0.796 的水平上聚为一类。第四代以后的培养物同前者相似率较低,而 BS-5 与 BS-6 之间的 SM 值又达到 0.771,相似性开始增大。两者之间相似性最高的为 BM5 和 M1,两者均为 S151:5S03=4:1 比例的分离、培养物。1:1 比例的 BM3 与 M3 之间的 SM 值为 0.779,而 BM1 与 M5、BM4 与 M2 之间的相似系数均较低。

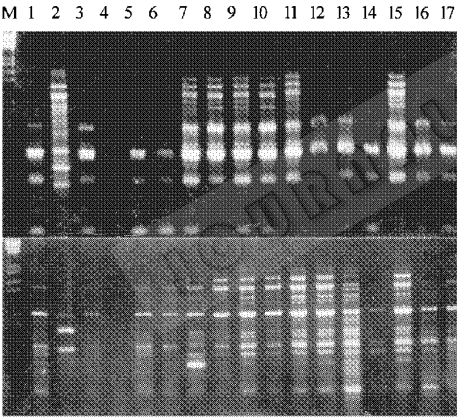


图 1 S140(上)与 S10 扩增的 DNA 片段

Fig.1 DNA bands amplified by primer S144(up)and S10(down) The series number here and the followings are the same as table 1

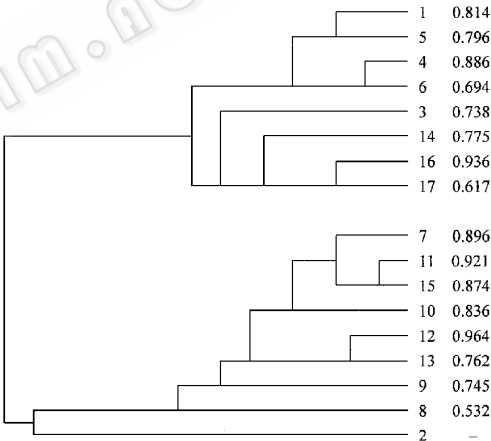


图 2 不同试验菌株的 UPGMA 聚类结果

Fig.2 UPGMA cluster diagram of different trial strains

3 讨论

3.1 异核体形成

由只有进行显性标记的 RAPD 分析可以看出,各获得株与出发株遗传差异较大,各扩增带中既有母株特征带,又有新产生的带,说明 5S03 与 S151 混合培养中产生了异核体。双亲本菌株中有些特异带(尤其是 S151)在各重组株中没有出现,说明异核体的染色体或其片段在其菌丝阶段有丢失现象发生。Paccola-Meirelles 和 Azevedo^[1]、Bello 和 Pac-

cola-Meirelles^[2]也发现类似现象。继代培养物的各代之间差异较大,说明染色体丢失、交换、重组不是在一个世代的菌丝阶段完成的,对白僵菌而言,至少在 4 代以后,遗传性状才会趋于相对稳定。或许这就是为什么同样经脉冲电泳分析,Pfeifer 和 Khachatourians^[8]发现球孢白僵菌 GK2016 有 8 条染色体,而 Viaud 等^[9]分析 9 株白僵菌,发现有 1 株为 5 条,3 株为 6 条,4 株为 7 条,1 株为 8 条。同一出发株的不同单孢株^[10],或同一单孢株的不同分离子^[5]之间均存在遗传差异,可能均与准性循环中染色体丢失、交换、重组过程没有稳定有关。分析中还可以看出,同样混合比例下,离体培养和活体培养重组株间的相似率有大、有小,这既可能是由于分离纯化过程中,传代次数不同引起的,也可能是培养介质不同影响了准性循环的过程。

3.2 倾向选择遗传

从混菌培养分析可以看出,放线酮抗性及 34℃ 耐受性单孢株同敏感株“杂交”,子代培养物几乎均表现为抗药性和温度耐受性。带互补遗传标记的白僵菌菌株在准性生殖中表现为倾向选择(preferential selection)遗传,即子代主要只表现为某一母株的遗传性状,另一亲本型性状被完全抑制或丢失。就平均相似率来看,各重组株与 5S03 的遗传相似性要明显高于 S151,同时表现出倾向性。Bello 和 Paccola-Meirelles^[2]在不同营养缺陷型及苯菌灵(benomyl)抗药性标记的球孢白僵菌中发现,烟酸缺陷型 252/J11 与硫胺素缺陷型 252/J10 配对,97.7% 的重组株表现为烟酸缺陷型,252/J11 与生物素缺陷型 252/J12 配对时,95.1% 也表现为烟酸缺陷型。这种现象说明,真菌准性生殖过程中染色体丢失不是随机的,其选择丢失及选择表达规律还值得进一步研究。出发母株在混合培养中所占的比例不同,可以影响倾向选择性状发生的频率。

3.3 生产应用

生产上通过不同优良性状菌株(种)混合培养、筛选,可获得遗传稳定的生产菌株(种)。从马铃薯叶甲(*Leptinotarsa decemlineata*)上分离的野生殖球孢白僵菌 28 同产杀虫毒素的产磺白僵菌(*B. surfuresscens*) 2 融合杂交,融合子 25 不仅对马铃薯叶甲毒力增加,对玉米螟的 LT_{50} 也降低了 3d^[11]。然而,虫生真菌的毒力是由多基因决定的^[12],金龟子绿僵菌的强制异核体对玉米螟的毒力便没有出发株高^[3]。

球孢白僵菌在人工培养基上继代培养后具毒力衰退现象^[13],单孢分离株的毒力下降更快^[14],报道认为这种毒力衰退是暂时的,而不是发生了遗传变异。唐晓庆等^[15]研究认为,继代培养中白僵菌菌株通过菌落局变(saltation)产生了可遗传的变异。本文研究认为,菌株毒力的下降可能与准性生殖中染色体的丢失、重组、交换有关。本研究中的 2 个单孢株杂交,虽然没有明显的增效作用,但继代培养 6 代,产孢量没有下降,说明具有生产应用意义,因为产孢量与菌株毒力呈显著正相关^[16]。

致谢 本研究农业部农作物病虫害鼠害生物防治资源研究及利用重点实验室基金课题,项目完成过程中得到开放室主任万方浩博士、中国农业科学院生物防治研究所高松先生、杨怀文所长的大力支持,在此一并致谢。

参 考 文 献

[1] Paccola-Meirelles L D, Azevedo J L. *J Invertebr Pathol* 1999; 57: 172-176. 中国科学出版社联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [2] Bello V A, Paccola-Meirelles L D. *J Invertebr Pathol*, 1998, **72** :119~125
- [3] Riba G, Azevedo J L, Messias, C, *et al.* *J Invertebr Pathol*, 1985, **46** :20~25
- [4] Silveira W D, Azevedo J L. *Enzyme Microb Technol*, 1987, **9** :149~152.
- [5] 梁宗琦, Fox R T V. *菌物系统*, 1997, **16**(3) :216~223.
- [6] 朱 衡, 瞿 峰, 朱立煌. *真菌学报*, 1994, **13**(1) :34~40.
- [7] Sokal R R, Karten I. *Univ Kan Sci Bull*, 1958, **38** :1409~1438.
- [8] Pfeifer T A, Khachatourians G G. *J Invertebr Pathol*, 1993, **61** :231~235.
- [9] Viaud M, Couteaudier Y, Levis C, *et al.* *Fungal Gen Biol*, 1996, **20** :175~183.
- [10] 李增智, 黄 勃, 樊美珍, 等. *真菌学报*, 1998, **17**(2) :185~189.
- [11] Couteaudier Y, Viaud M, Riba G. *Microb Ecol*, 1996, **32** :1~10.
- [12] St Leger R J, Joshi L. The application of molecular techniques to insect pathology with emphasis on entomopathogenic fungi. In Lacey L A ed. *Manual of Techniques in Insect Pathology*. San Diego :Academic Press Inc, 1997. 367~394.
- [13] Fargues J. *Entomophaga*, 1972, **17** :319~337.
- [14] Samsinakova A, Kalalova S. *J Invertebr Pathol*, 1983, **42** :156~161.
- [15] 唐晓庆, 樊美珍, 李增智. *真菌学报*, 1996, **15**(3) :45~53.
- [16] 王成树, 王四宝, 李增智. *农业生物技术学报*, 1998, **6**(3) :245~249.

GENETICAL ANALYSIS ON CROSS INCUBATION OF *BEAUVERIA BASSIANA*

Wang Chengshu Ding Degui Wang Sibao Li Zengzhi

(Key Laboratory of Biocontrol Resources and Utilization, Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

(Institute of Economic Entomology and Mycology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract : Heterokaryon of *Beauveria bassiana* was formed during the cross incubation of two vegetative compatible strains with genetic markers of actidione resistance and 34°C tolerance. The chromosome(s) or its fragment successive losses, recombination and segregation led to haploidization during the conidia formation period. After at least 4 generations of parasexual cycle, the genetic character of heterokaryon could get to relative stable. Genetic marker and RAPD analysis indicated that the combinants showed the phenomenon of preferential selection of one parental type by unrandom chromosome loss and the gene of the other parental strain was suppressed or lost completely. Different culture medium, *in vivo* or *in vitro*, and different mixture ratio of original strain spores could affect parasexual process and then the preferential selection. The results also demonstrated the heterosis effect of cross culture.

Key words : *Beauveria bassiana*, Heterokaryon, Chromosome lossage, Preferential selection