应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(5):1401—1406

一种褐飞虱病原真菌的分子生物学鉴定*

林华峰** 李茂业 张松影 李世广 张承启

(安徽农业大学植物保护学院 合肥 230036)

摘 要 从田间褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 罹病虫体分离得到一株绿僵菌,以该菌为供试菌体,采用氯化苄法、CTAB 法以及裂解液法分别提取了该菌的基因组 DNA;以 ITS1 和 ITS4 为绿僵菌通用引物,对供试菌株的 rDNA ITS 序列进行 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳检测和序列分析,并在核酸序列数据库中进行同源序列对比。实验结果表明裂解液法提取的该种绿僵菌的基因组 DNA 纯度高且质量好,氯化苄法次之,CTAB 法不适合提取此菌的基因组 DNA;分子鉴定结果显示该菌为绿僵菌属黄绿绿僵菌(*Metarhizium flavoviride*)。明确侵染褐飞虱的绿僵菌种类,进而掌握其生物学特征和对寄主的致病性,对于利用其对褐飞虱进行生物防治具有重要的意义。

关键词 绿僵菌,DNA 提取,分子鉴定

Molecular biological identification of entomogenous fungi isolated from the brown planthopper

LIN Hua-Feng** LI Mao-Ye ZHANG Song-Ying LI Shi-Guang ZHANG Cheng-Qi

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract Three different methods were used to extract genomic DNA from a strain of *Metarhizium* spp. isolated from the surface of infected *Nilaparvata lugens* (Stål) collected from rice fields; benzyl chloride, CTAB and cracking solution. The fungus' rDNA ITS sequence was amplified with the primers ITS1 and ITS4, and the amplified ITS sequence detected by agarose gel electrophoresis and analyzed in Genebank. The results show that the cracking solution method obtained the highest quantity of the purest DNA, the benzyl chloride method was the next best and the CTAB method was not suitable. Homologous sequence contrast conducted in the DNA sequence database identified the fungus as *Metarhizium flavoviride*. Identifying the entomogenous fungi that infect *N. lugens* is an important first step in determining their control potential with respect to this pest.

Key words *Metarhizium* spp., DNA extraction, molecular identification

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål) 是目前广大稻区最主要害虫,用化学农药防治所带来的"3R"问题早已引起人们的高度重视,用生物农药防治该虫是近年来人们正在探索的一条途径。由于该虫是刺吸式口器,用病毒、细菌等必须通过肠胃系统发挥作用的微生物来防治,难以奏效。而真菌是可以从昆虫体表直接侵入的一类微生物,用其防治刺吸性害虫较为理想(殷凤鸣,1993;张五一,1996;曹卫平等,2006)。发现有利用价值的昆虫病原真菌的常用方法是:从罹病的虫体上分离真菌,鉴定后进行进一步开发应用研究。过去,真菌的鉴定分类主要依据其培养特征和镜下形态特征,这些特征往往只能做定性的描述,在近缘种和种下菌株鉴定方面难以做到精准的界定,且现在也难找到全球公认的统一标准和工具书。近年来,随着分子生物学技术的发展,借助于 PCR 技术扩增病原菌核糖体 ITS (internal transcribed spacer),即间隔区,可以为真菌的分类鉴定和分子遗传检测提供丰富的遗传信息(王小欣,2006;苏宇等,2009;赵杰,2004),根据国际公认 NCBI 中基因库注册的已知种资料,通过转录间隔区的 DNA 序列比对,就能根据同源性程度,很方便地鉴定真

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(200803003)。

**通讯作者,E-mail: hf. lin@163.com

收稿日期:2011-08-05,接受日期:2011-08-22

菌种类(周权,2005)。国内对褐飞虱病原真菌仅有有限几篇提及(耿博闻和张润杰,2005;刘苏等,2010),对其种类鉴定尚未用到分子生物学技术,甚至对菌种的培养形态特征也未见系统描述。本课题组在对褐飞虱的研究中,从罹病僵虫分离获得一种病原真菌,从培养形态特征方面初步鉴定为一种绿僵菌,但不好确定具体种类,为此,作者对该菌的核糖体 DNA 的 ITS 序列进行测定,通过在 NCBI 比对,对其种类进行了鉴定,成功地实践了用核糖体 DNA 的 ITS 序列比对的方法鉴定了褐飞虱的昆虫病原真菌,并在具体操作技术方面积累了一些经验。该项技术中,对 DNA 的提取目前报道的有 3 种方法,但对不同材料提取的效果不同,作者对 3 种方法进行了比较,对其优劣进行了评价。

1 材料与方法

1.1 试验菌种

供试菌株是从安徽霍邱县稻田中褐飞虱罹病虫体分离所得,对褐飞虱室内致死率达 84% 以上(另文报道),培养使用萨氏培养基(SDAY):蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,酵母粉 10 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL。在 26℃ 恒温培养箱中培养,待长出大量菌丝后冷冻备用。

1.2 基因组 DNA 提取

1.2.1 氯化苄法 参见张莉莉等(2003)。

1.2.2 CTAB 法 参见吴发红等(2009);杨艳秋等(2009)。

1.2.3 裂解液法 参见王建营和郑小波(2003)。

1.3 DNA 样品检测——琼脂糖凝胶电泳

称取琼脂糖粉末,加入 100 mL0.5% TBE 缓冲液制成 0.8% 的胶。待冷却至 50 ℃ 左右,加入适量 EB(溴化乙锭),摇匀,迅速倒入制胶槽。待胶充分凝固后拔出梳子,将凝胶放入盛有 0.5% TBE 的电泳槽中。将 DNA 试样和 DNA Marker 适量点入上样孔,在 U = 100 V,I = 50 mA 的条件下进行电泳 50 min 左右并在紫外凝胶成像系统中拍照。

1.4 核糖体 DNA ITS 的 PCR 扩增

1.4.1 通用引物 由上海生物工程有限公司合成用于核糖体 DNA ITS 区域的核苷酸引物,引物序列为:ITS1 5′-GTTTCCGATAGGTGAACCTGC-3′,ITS4 5′-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3′。

1.4.2 PCR 反应体系

25 μL 反应体系:

上游引物	4 μL
下游引物	4 μL
10 × PCR Buffer	10 μL
Mg^{2+} (2.5 mmol/L)	6 μL
dNTP(10 mmol/L)	2 μL
Taq DNA 聚合酶	2 μL
ddH2O 补齐到	70 μL

分装到 4 个 PCR 管中,并向除阴性对照外的 3 个管中加入 0.5 μL 模板 DNA。

1.4.3 PCR 方案

94℃	预变性	4 min	1 个循环;
94℃	变性	1 min	
56℃	退火	1 min	
72℃	延伸	2 min	
		共进行 35 个循环;	
72℃	延伸	10 min	1 个循环;
25℃	降温	5 min	1 个循环。

PCR 反应完成后,将反应产物放置于 4℃ 条件下保存,用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测反应产物数量及分子量大小。

1.4.4 PCR 产物 DNA 胶回收 向吸附柱 CA2 中(吸附柱放入收集管中)加入 500 μL 平衡液 BL,12 000 r/min 离心 1 min,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中。

将单一的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下放入洁净的离心管中,称取重量。

向胶块中加入 3 倍体积溶胶液 PN,50℃ 水浴放置 10 min,不断温和地上下翻转离心管,以确保胶块充分溶解。

将上一步所得溶液加入到一个吸附柱 CA2 中(吸附柱放入收集管中),室温放置 2 min,12 000 r/min离心 30 ~ 60 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱 CA2 放入收集管中。

向吸附柱 CA2 中加入 600 μL 漂洗液 PW,12 000 r/min离心 30 ~ 60 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放入收集管中。

向吸附柱 CA2 中加入 600 μL 漂洗液 PW,12 000 r/min离心 30 ~ 60 s,倒掉废液。

将吸附柱 CA2 放回收集管中,12 000 r/min 离心 2 min,尽量除尽漂洗液。将吸附柱 CA2 置于室

温放置数分钟,彻底晾干,以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。

将吸附柱放入一个干净的离心管中,向吸附膜中间位置悬空滴加适量洗脱缓冲液 EB,室温放置 2 min。12 000 r/min 离心 2 min,收集 DNA 溶液。

1.5　T 载体连接(10 μL 体系)

加 5 μL T 载体与 DNA 样品连接完成后的液体至大肠杆菌中混匀,然后冰上放置 30 min,接着 42℃水浴 50 s,加入 800 μL 培养基静置 5 min,摇床 1 h 后涂平板。37℃培养 12 ~ 15 h,待菌斑长出后,用移液枪随机挑取均匀的菌斑连同枪头一起放到 1 mL LB 培养基中,37℃摇床培养 10 ~ 12 h。

1.6　核糖体 DNA ITS 序列分析

载体连接后的 PCR 产物由上海生物工程有限公司测序。所得核苷酸序列在 NCBI 中与所在 Genbank 上注册的基因序列进行同源性比较。

2　结果与分析

2.1　3 种方法提取 DNA 结果的电泳图谱比较

用氯化苄法、CTAB 法、裂解液法分别提取了该绿僵菌的基因组 DNA,并经琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明:

①裂解液法(图 1)提取的样品中杂质少,在电泳后的凝胶上样孔中基本上看不见杂质的残留,而采用氯化苄法和 CTAB 法提取的 DNA 样品经电泳检测后在凝胶点样孔中能清晰的看见杂质的存在。

②裂解液法和氯化苄法在提取的过程中 DNA 只有微量的降解,从图 1 和图 2 上可得知 DNA 仅出现了一丝的弥散现象。而 CTAB 法提取的 DNA 降解明显,图 3 中电泳后的胶片上拖尾现象严重。

③裂解液法和氯化苄法提取的 DNA 电泳条带单一、明亮而整洁,而 CTAB 法所提取的 DNA 条带模糊而暗淡。

④就整个提取过程的用时而言,裂解液法和 CTAB 法大约需要 4 h,而氯化苄法则至少需要8 h。

由此可见,这 3 种方法中裂解液法最适合提取此菌的基因组 DNA,氯化苄法次之,CTAB 法不适宜用于该菌的基因组 DNA 提取。

2.2　3 种方法提取 DNA 浓度比较

经核酸蛋白质分析仪检测(表 1),可看出:

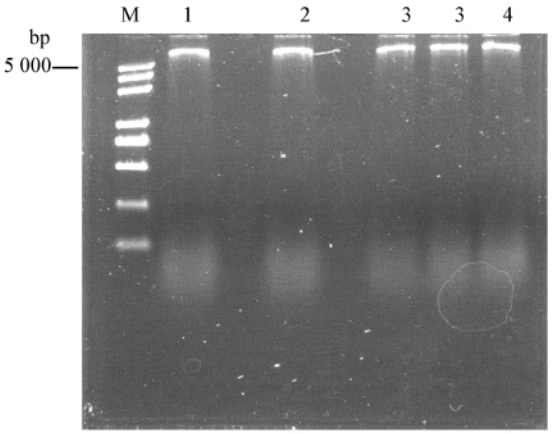

图 1　裂解液法提取的 DNA 图谱

Fig. 1　DNA profile of cracking solution

M: 分子标记, DL5000 DNA Marker, DL5000;
1 – 4: 4 次重复 Four replicates. 图 2、图 3 同。
The same for Fig. 2 and Fig. 3.

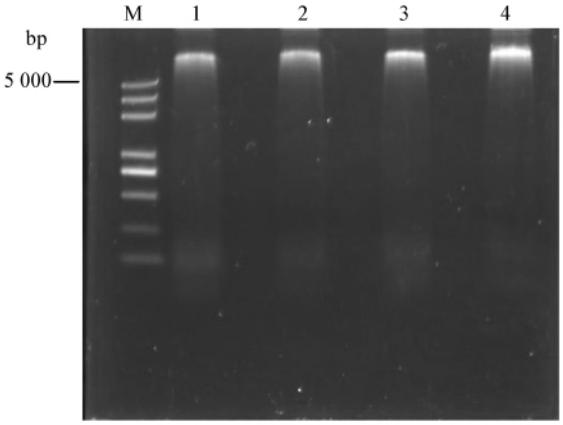

图 2　氯化苄法提取的 DNA 图谱

Fig. 2　DNA profile of benzyl chloride

①CTAB 法所提取的 DNA 样品浓度看起来显著高于其他 2 种方法,而实际上并非如此。CTAB 即十六烷基三甲基溴化铵,是一种阳离子型去污剂,它能与细胞内的核酸形成复合物,这些复合物在低盐溶液中会因溶解度的降低而沉淀,而在高盐溶液中可解离。表 1 中 CTAB 法提取的 DNA 浓度实际上是细胞总核酸的浓度,即 DNA 与 RNA 的浓度之和。

②纯 DNA 的 AD260/AD280 比值为 1.8,如果此比值偏低,表示受到蛋白(芳香族)或酚类物质的污染,若此比值偏高很可能是样品中含有 RNA 或 DNA 部分降解引起的。表 1 中每个 DNA 样品

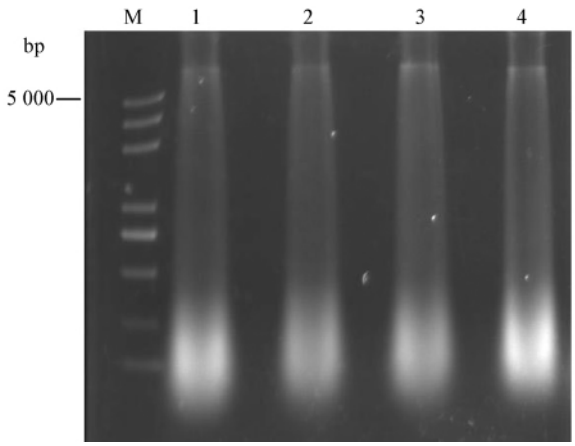

图 3 CTAB 法提取的 DNA 图谱

Fig. 3 DNA profile of CTAB

的 AD260/AD280 均大于 1.8，说明提取的 DNA 样品中没有被蛋白质或酚类污染，但可能有少部分 DNA 降解或含有 RNA。

表 1 3 种方法提取的 DNA 样品比较

Table 1 Comparison in DNA extraction samples of three methods

方法 Treatment	AD260/AD280	浓度 (ng/μL) Concentration	平均浓度 (ng/μL) Average concentration
氯化苄法 Benzyl chloride method	1.87	427.1	377.1
	1.89	237.4	
	1.90	409.3	
	1.90	434.5	
CTAB 法 CTAB method	2.11	2300.7	2728.9
	2.13	1933.1	
	2.04	3709.1	
	2.09	2972.5	
裂解液法 Cracking solution method	2.11	197.5	188.6
	2.11	186.3	
	2.12	195.6	
	2.08	174.8	

注：每个 DNA 样品均是溶解在 100 μL TE 缓冲液中。
Each DNA sample is dissolved in buffer solution of 100 μL TE.

③氯化苄法提取的 DNA 样品浓度较裂解液法明显高且吸光度比值更接近于 1.8，但裂解液法所提取的 DNA 样品浓度完全满足后续的分子生物学实验要求，加上它能被测得较理想的电泳图谱，应是提取真菌 DNA 的首选方法。

2.3 PCR 扩增产物的分子量

为了检测待测菌株的 ITS 片段大小，以待测菌株的基因组 DNA 为模板，用特异性引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测之后得知其片段大小在 550 bp 左右。

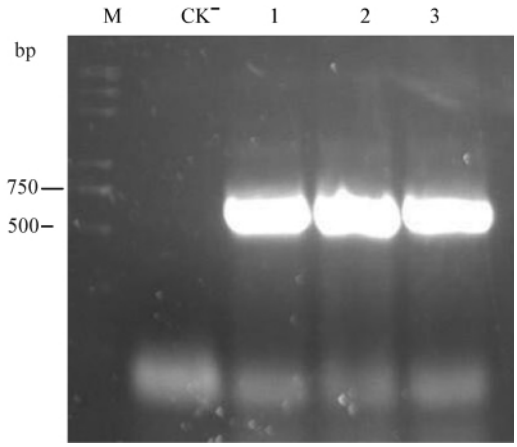

图 4 PCR 产物图谱

Fig. 4 The profile by PCR

M：分子标记，DL5000 DNA Marker，DL5000；
1－3：3 次重复 Three replicates；
CK⁻：阴性对照 Negative control.

2.4 核糖体 DNA ITS 序列分析与同源性比对

PCR 产物经上海生物工程有限公司进行序列测定，结果见图 5：

将此序列与 NCBI 中的 AF339580.1、AF280632.1 和 EF468978.1 序列进行同源性比较，得知该菌株与 NCBI 中注册的黄绿绿僵菌 (*Metarhizium flavoviride*) 菌株的同源性为 99%，从而推断该菌株为黄绿绿僵菌。

3 讨论

由于持续施用化学农药所造成的褐飞虱再猖獗、抗药性和农药污染等副作用，生物防治褐飞虱的研究与应用日益显示出其重要性（蒲蛰龙和李增智，1996）。昆虫病原真菌具有较强的表皮侵入能力，且对环境无污染，是防治刺吸类害虫的理想的生防作用物。明确昆虫病原真菌种类，进而掌握其生物学特征和对寄主的致病性，对于利用其对褐飞虱进行生物防治具有重要的意义。绿僵菌

AAGTATAAGCAATTTATACAGCGAAACTGCGAATGGCTCATTATATAAGTTATCGTTTATTTGATAGTA
CCTTACTACTTGGATAACCGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTAAAAATCCCGACTTCGGAAGG
GATGTATTTATTAGATTAAAAACCAATGCCCCTCGGGGCTCTCTGGTGATTCATGATAACTTCTCGAA
TCGCACGGCCTTGCGCCGGCGATGGTTCATTCAAATTTCTTCCCTATCAACTTTCGATGTTTGGGTAG
TGGCCAAACATGGTTGCAACGGGTAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGAAGGAGCCTGAGA
AACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCCGATCCGGGGAGGTAG
TGACAATAAATACTGATACAGGGCTTCTTTCGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCT
TAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGT
ATATTAAAGTTGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACCTTGGGCCTGGCTGGCCGGTCCGCCTCA
CCGCGTGTCACTGGTCCGGCCGGGTCTTTCCCTCTGTGGAACCACATGCCCTTCACTGGGCGTGGC
GGGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGCTCCAGGCAGGCCTATGCTCGAATACATT
AGCATGGAATAATGAAATAGGACGTGCGGTTCTATTTTGTTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAA
TAGGGACAGTCGGGGGC

图 5　核糖体 DNA ITS 序列

Fig. 5　Sequence of rDNA – ITS

作为一类极具应用潜力的杀虫真菌,已被很多国家登记注册(李春香等,2006),并大规模的投入生产和推广使用,主要用于防治蝗虫、蟑螂、蛴螬和白蚁等(蒲蛰龙和李增智,1996; Smon and Mattew,2001; 代鹏等,2005; 林华峰等,2006)。本文所研究的黄绿绿僵菌对褐飞虱的毒力较强,在形态学研究的基础上,通过分子鉴定,更为可靠地明确了其种类。将实验所测得的该绿僵菌 rDNA ITS 序列与 NCBI 中 Genbank 所注册的 AF339580.1、AF280632.1 和 EF468978.1 3 个黄绿绿僵菌菌株的 rDNA ITS 序列进行同源性比较,结果显示同源性为 99%,从而推断该菌为绿僵菌属黄绿绿僵菌(*Metarhizium flavoviride*),为此菌的进一步开发利用提供了科学依据。

真菌 DNA 的提取方法有很多,其主要区别在于破壁的途径以及破壁后分离核酸、蛋白质的方法各异。本实验中采用氯化苄法、CTAB 法以及裂解液法提取绿僵菌基因组 DNA,均能提取一定浓度的基因组 DNA,特别是用裂解液法提取所获得的 DNA 样品可直接用于后续的分子生物学实验,是一种简便、省时、高效的方法。如果用氯化苄法,DNA 提取液的 pH 值对提取结果十分重要,因为氯化苄需要在弱碱性条件下与多糖上的羟基作用来进行破壁反应。作者在一开始采用氯化苄法时配制 DNA 提取液过程中,没有将其中 EDTA 的 pH 值调至 8.0,而只注重将整个溶液的 pH 值调至 9.0,找到原因后经过改正才得到了较好的结果。

参考文献(References)

曹卫平,冯书亮,王金耀,2006. 白僵菌防治刺吸式口器害虫研究与应用进展. 中国生物防治,22(S1):129—134.

代鹏,宋妍,许天委,2005. 绿僵菌的研究进展. 热带农业科学,25(2):73—77.

耿博闻,张润杰,2005. 田间噻嗪酮与黄绿绿僵菌对褐飞虱的协同防治. 中山大学学报,44(3):78—81.

李春香,安彦杰,张淑红,2006. 绿僵菌防治农林害虫研究进展. 唐山师范学院学报,28(5):4—6.

蒲蛰龙,李增智,1996. 昆虫真菌学. 安徽科学技术出版社. 323—326.

林华峰,李世广,张磊,2006. 绿僵菌大孢变种的生物学特征及其对蛴螬的毒力研究. 应用生态学报,17(2):351—353.

刘苏,林华峰,李茂业,2010. 金龟子绿僵菌对褐飞虱若虫的毒力测定. 农药,49(7):527—529.

Smon B, Mattew BT, 2001. Adult survival, maturation, and reproduction of the desert locust *Schistocerca gregaria* infected with the fungus *Metarhizium anisopliae* var acridum. *Invertebr. Pathol.*, 78:1—8.

苏宇,张泽华,农向群,2009. 分子标记技术在绿僵菌研究中的应用. 中国生物防治,25(1):78—82.

王建营,郑小波,2003. 苎麻疫霉群体的 RAPD 分析. 菌物

系统,22(2):228—234.

王小欣,2006. 杀虫真菌的分离、鉴定及其特性初步研究. 硕士学位论文. 武汉:华中农业大学. 5—10.

吴发红,黄东益,黄小龙,2009. 几种真菌 DNA 提取方法比较. 中国农学通报,25(8):62—64.

杨艳秋,王丽,贺丹,2009. 病原真菌 DNA 提取方法及简单重复序列聚合酶链式反应体系的优化. 中国组织工程研究与临床康复,13(50):9924—9927.

殷凤鸣,1993. 白僵菌优良菌株筛选及其酯酶同工酶测定. 中国虫生真菌的研究与应用(二),北京:中国农业科技出版社. 119—123.

张莉莉,张苓花,史剑斐,2003. 利用氯化苄法提取真菌基因组 DNA 及其分子生物学分析. 大连轻工业学院学报,19(1):36—39.

张五一,1996. 粉拟青霉菌株的筛选. 福建林业科技,23(3):38—42.

赵杰,2004. ITS 序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用. 陕西农业科学,(4):35—37.

周权,2005. 绿僵菌 ACCC30104 菌株的分子鉴定. 安徽农业大学学报,30(1):5—7.