

# 四株白僵菌的分类鉴定及生物学特征初步研究

宋 健<sup>1</sup>,曹伟平<sup>1</sup>,甄 伟<sup>2</sup>,陈 丹<sup>1</sup>,杜立新<sup>1</sup>

(1. 河北省农林科学院 植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 农业部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室, 河北 保定 071000; 2. 河北小五台山国家级自然保护区管理局, 河北 张家口 075700)

**摘要:** 以在不同寄主中分离纯化得到的白僵菌菌株 HFW-05、TE-07、Lu-08、Dj-04 为供试菌株,通过对 4 株球孢白僵菌 ITS 区序列和酯酶同工酶图谱分析,明确了 4 株供试菌株的种间分类和酯酶型、生物学特征。结果表明 4 株白僵菌为球孢白僵菌种下的不同酯酶型。

**关键词:** 球孢白僵菌; 分类鉴定; 生物学特性

中图分类号: S476.12 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)增刊-0374-03

## Preliminary Study of the Classification Identification and Biological Characteristics of Four *Beauveria bassiana*

SONG Jian<sup>1</sup>, CAO Wei-ping<sup>1</sup>, ZHEN Wei<sup>2</sup>, CHEN Dan<sup>1</sup>, DU Li-xin<sup>1</sup>

(1. Plant Protection Institute, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, JPM Center of Hebei Province, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture, Baoding 071000, China; 2. Hebei Xiaowutai Mountain Nature Reserve, Zhangjiakou 075755, China)

**Abstract:** In this study, isolated in different host purified bassiana strain HFW-05, TE-07, Lu-08, Dj-04 strains tested through four *Beauveria bassiana* ITS region sequences and esterase isozyme pattern analysis to clear the four tested strains between the classification and esterase type and biological characteristics of four bassiana *Beauveria bassiana* under different esterase type.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; Classification and identification; Biological characteristics

白僵菌是当今虫生真菌研究的主要对象之一,寄主范围广,致病力强,效果好,对人、畜、作物无毒害,世界上许多国家均已将白僵菌用于害虫防治<sup>[1]</sup>。白僵菌作为目前最常见的昆虫病原真菌之一,分类一直以来比较混乱,ITS 区对于白僵菌的种间分类具有重要作用。酯酶同工酶作为一种分子标记,被作为白僵菌种下分型的重要依据而得到广泛应用。河北省农林科学院植物保护研究所收集分离到 4 株白僵菌,本研究对 4 株白僵菌进行种间分类及种下分型鉴定,并对其生物学特征进行初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 HFW-05、TE-07、Lu-08、Dj-04 这 4 菌株是河北省农林科学院植物保护研究所杀虫微

生物实验室在不同寄主中(寄主昆虫分别为烟粉虱、松毛虫、棉铃虫、金针虫)分离纯化得到。

1.1.2 供试培养基 SDY: 葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,酵母浸粉 10 g,蒸馏水 1 000 mL,自然 pH;

SDAY: 葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,酵母浸粉 10 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL,自然 pH。

### 1.2 方法

1.2.1 ITS 序列分析 参考 Khemika Songiang 的方法略加修改<sup>[2]</sup>称取 10 g 白僵菌干菌丝,液氮研磨,加入细胞裂解液,65℃水浴 30 min,连续抽提数次,去 RNA,电泳检测。

真菌 ITS 区通用引物(正向引物 ITS-F: 5'-TCC TCCGCTTATTGATATGC-3',反向引物 ITS-R: 5'-GG AAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')由上海生工合成。PCR 扩增 50 μL 反应体系包括:1 μL DNA 模板,5 μL

收稿日期: 2012-04-26

基金项目: 河北省财政项目(F12C10034); 国家“948”项目(2011-G4); 国家“863”项目(2011AA10A201); 国家“863”项目(2011AA10A203)

作者简介: 宋 健(1980-),女,河北涿州人,助理研究员,硕士,主要从事杀虫微生物研究。

通讯作者: 杜立新(1978-),男,河北武安人,助理研究员,博士,主要从事生物防治研究。

10 × *Taq* 酶缓冲液 0.5 μL *Taq* 聚合酶 (5 U/μL), 10 mmol/L dNTP 1 μL, 10 mmol/L 正向和反向引物各 1 μL, 无菌水补足到 50 μL。PCR 反应条件: 95℃ 下预变性 3 min; 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 2 min。取 PCR 产物 3 μL, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。上海生工完成测序。测序后, 将菌株的 ITS 序列与 GenBank 核酸数据库中相关菌株进行同源性比较。

1.2.2 酯酶同工酶酶谱分析 将白僵菌菌丝体刮下, 用滤纸吸去菌丝体表面的水分, 称重。加等量的 TEB 浸提液 (Tris-H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>-EDTA 各 0.1 mmol/L 等量混合), 反复冻溶、研磨, 取出匀浆, 离心 (10 000 r/min, 5 min), 取上清液备用。采用聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳, 酯酶同工酶染色液染色<sup>[3]</sup>。观察并比较菌株酯酶同工酶酶谱。

1.2.3 孢悬液的配置 取一定量孢子粉装于 30 mL 含 0.05% (v/v) OP 乳化剂的无菌水中, 用组织研磨器研磨, 倒入灭过菌的小烧杯中, 漩涡振荡混匀。浓度用血球计数板计数。

1.2.4 四菌株营养生长和产孢量 用平板培养法分别测定菌株的生长速率和产孢量。取 5 μL 菌悬液 (1 × 10<sup>7</sup> 孢子/mL) 点于盛有上述培养基的平皿中心, 于 (27 ± 1) °C (L:D = 14:10) 下培养, 每天定时测量菌落直径, 14 d 后测定产孢量, 将孢子刮至一定体积含 0.05% (v/v) OP 乳化剂的无菌水中, 血球

计数板计数, 计算产孢量。

1.2.5 胞外蛋白酶、几丁质酶活性测定 4 株白僵菌胞外蛋白酶、几丁质酶通过摇床振荡培养获得。30 mL 液体培养基装入 250 mL 三角瓶, 接种 1 mL 孢悬液 (终浓度为 1 × 10<sup>7</sup> 孢子/mL), (27 ± 1) °C 下振荡 (200 r/min) 培养 6 h 开始取样, 并观察菌株生长状态, 每隔 2 h 取样一次, 12 000 r/min 离心, 取上清液于 -20℃ 保存。胞外蛋白酶活性测定采用 Folin 酚法<sup>[4]</sup>, 反应 30 min, 以每分钟催化分解酪蛋白生成 1 μg 酪氨酸的酶量为一个酶活单位 (pU)。几丁质酶活性的测定参考 Mauch<sup>[5]</sup> 的方法略有改动, 缓冲液为 0.1 mol/L pH 值 6.4 的磷酸缓冲液, 保温时间 30 min, 硼酸-氢氧化钾缓冲液为 0.1 mol/L, pH 值 10.2, 吸光值测定波长 540 nm。酶活单位规定为试验条件下每分钟内释放 1 μg 还原糖所需要的酶量为一个活力单位 (mU)。

## 2 结果与分析

### 2.1 白僵菌的分类

2.1.1 ITS 序列分析 4 株白僵菌 ITS 基因长度均为 597 bp, 且序列完全相同 (图 1), 登录 GenBank 检索结果表明, 与供试菌株 ITS 序列同源性最高的菌株为球孢白僵菌 2 700, 同源性为 99%, 表明 4 株白僵菌均为球孢白僵菌。

```

1   TTCCTCCGGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTGAGGTCA
61  ACGTTCAGAAAGTTGGGTGTTTTACGGCGTGGCCGCGTCGGGGTTCCGGTGCGAGCTGTAT
121 TACTGCGCAGAGGTCGCCGCGGACGGGCCGCACTCCATTCAGGGCCGGCGGTGTGCTG
181 CCGGTCCCCAACGCCGACCCCCCAAGGGGAGGTCGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAG
241 GCATGCCCGCCAGAATGCTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACTGG
301 ATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCGTTTCGCTGCGTTCCTTCATCGATGCCAGAGCCAA
361 GAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTGTTTGCCTTGCGGCGTATTCAGAAGATG
421 CTGGAATACAAGAGTTTGAGGTCCCCGGCGGGCCGCTGGTCCAGTCCGCGTCCGGGCTGG
481 GGCGAGTCCGCCGAAGCAACGATAGGTACAGAAAGGGTTAGGGAGTTGAAAACCTC
541 GGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGAGACCTTGTACGATTTTACTTCCA
  
```

图 1 供试菌株 ITS 基因序列

Fig. 1 ITS sequence of the strain

2.1.2 酯酶同工酶结果分析 4 株白僵菌酯酶同工酶图谱具有明显的多样性 (图 2)。HFW-05 菌株有 3 条条带, 其中强带、弱强带、弱带各有 1 条, Lu-08、Dj-04、TE-07 菌株均有 2 条条带, 条带位置相同, 但带的强弱不同, Lu-08 有 1 条强带, 1 条弱强带; Dj-04 有 2 条弱带; TE-07 有 1 条强带, 1 条弱强带, 但弱强带较 Lu-08 弱。结果表明 4 株白僵菌为球孢白僵菌种下的不同类型。



图 2 球孢白僵菌酯酶同工酶酶谱

Fig. 2 Esterase isoenzymograms of *Beauveria bassiana*

## 2.2 四菌株营养生长和产孢量

将四菌株 SDAY 真菌培养基上培养,培养条件为 $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,测定其菌落生长直径、培养 14 d 的产孢量,结果见表 1。从表 1 可以看出,在供试培养基上,菌株 HFW-05 菌落生长最快,14 d 时菌落大小为

45.33 mm,Dj-04 生长最慢,2 d 时未观察到白色菌落,14 d 时菌落大小为 37.50 mm。血球计数板测定各菌株 14 d 时产孢量,其中 HFW-05 和 TE-08 菌株的产孢量显著高于另外 2 个菌株,分别为  $3.61 \times 10^9$ ,  $3.74 \times 10^9$  个/mL。

表 1 SDAY 培养基上四菌株菌落生长和产孢量

Tab.1 Growth of four isolates colonies on SDAY media

菌株 Isolate	菌落直径/mm Diameter of colony							产孢量/( $\times 10^9$ 个/mL) Conidia production
	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d	
HFW-05	5.67	13.17	21.75	27.75	29.75	39.50	45.33a	3.61a
TE-07	5.17	13.50	21.92	29.25	35.50	38.50	41.25a	2.51b
Lu-08	5.25	14.67	22.08	28.33	31.20	35.67	38.50a	3.74a
Dj-04	0	6.00	16.50	23.00	27.33	30.75	37.50a	1.91b

## 2.3 胞外蛋白酶、几丁质酶活性

测定 4 株白僵菌不同生长时间的胞外蛋白酶、几丁质酶活性,结果见图 3。由图 3 可以看出,HFW-05 菌株胞外蛋白酶、几丁质酶活性最高时为培养 15,17 h,较早于另 3 株菌,HFW-05、TE-07 菌株胞外蛋白酶、几丁质酶活性较高于同时段 Lu-08、

Dj-04 菌株活性。观察各培养时间的生长特征发现,供试菌株胞外蛋白酶、几丁质酶活性最高时对应的菌丝生长状态相同。分生孢子开始出芽时胞外蛋白酶活性最高,出芽 2 h 后菌丝开始分叉生长时几丁质酶活性最高。

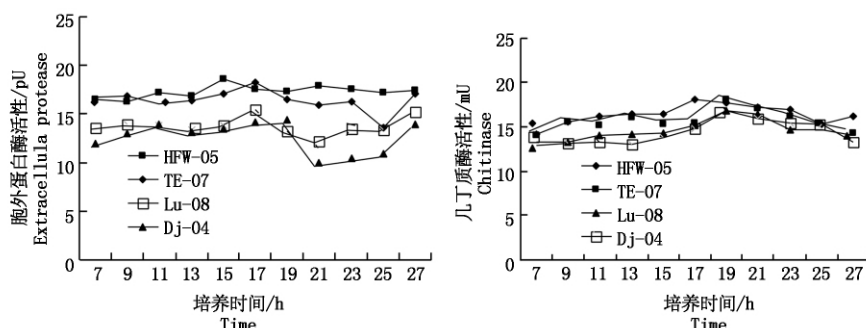


图 3 四株白僵菌不同生长状态下胞外蛋白酶和几丁质酶活性

Fig.3 The extracellular protease and chitinase under different states of growing

## 3 结论与讨论

自白僵菌被发现、分离以来,世界各国已从各种昆虫寄主和土壤中分离到大量的白僵菌株。本研究对实验室收集保存的 4 株白僵菌进行 ITS 区序列测定和酯酶同工酶酶谱分析,确定了供试菌株的分类地位。ITS 区序列测定结果表明四菌株均为球孢白僵菌,酯酶同工酶酶谱具有明显的多样性,表明供试菌株为球孢白僵菌种下的 4 个不同类型。

白僵菌菌株具有不同的寄主范围、对不同昆虫有不同的致病力,在田间表现出不同的防治效果。这些差异的存在与菌株的生长和产孢能力以及分泌胞外水解酶的能力相关,昆虫病原真菌在入侵寄主时遇到的第一道防线是几丁质屏障—体壁。因而研究明确菌株的生长和产孢能力以及几丁质酶活力是进一步深入研究以及开发利用的基础。对四菌株的研究表明:在 SDAY 培养基上,菌株的生长和产孢能

力存在差异,胞外蛋白酶、几丁质酶活力与菌丝生长时期存在时间上的相关性,分生孢子开始出芽时胞外蛋白酶活性最高,几丁质酶活力出现高峰时,是细胞快速分裂、菌丝旺盛生长的对数期。这可能为胞外蛋白酶、几丁质酶参与体壁穿透过程提供佐证。

## 参考文献:

- [1] Dunn P H, Mechals B J, Ewen A B. The history of biological control with *Nosema locustae* Lessons for locust management[J]. *Insect Sci Applic*, 1999, 19(4): 333 - 350.
- [2] Khemika S, Tawee D, Paranya C, et al. Cloning and expression of Chitinase gene isolated from insect pathogenic fungi *Beauveria bassiana* in *Escherichia coli* [J]. *Chiang Mai J Sci* 2006, 33(3): 347 - 355.
- [3] 北京大学生物系遗传教研室. 遗传学实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1984: 272 - 273.
- [4] Lowry O H, Rosbrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with folin phenol reagent[J]. *Journal of biological chemistry*, 1951, 193: 265 - 275.
- [5] Mauch F, Hadwiger L, Boller T. Ethylene: Symptom, not signal for the induction of Chitinase and  $\beta$ -1,3-Glucanase in pea pods by pathogens and elicitors[J]. *Plant Physiol*, 1984, 76: 607 - 611.