

粉拟青霉种内 nrDNA ITS 分析

黄勃^{1,2} 王成树¹ 王滨¹ 樊美珍¹ 李增智^{1*}

1(安徽农业大学微生物防治省重点实验室, 合肥 230036)

2(中国科学院微生物研究所真菌地衣系统学重点实验室, 北京 100080)

摘要:通过对 20 株粉拟青霉(*Paecilomyces farinosus*) ITS1-5.8S-ITS2 (rDNA) 区域序列测定, 确定了粉拟青霉 ITS 序列, 而韩国学者测定的粉拟青霉 ITS 序列应为细脚拟青霉(*P. tenuipes*) 的序列。序列比较发现, 韩国 2 株未定名的拟青霉(*Paecilomyces* spp.) 菌株(KACC40219、KACC40221) 应为粉拟青霉。基于本研究构建的邻接树推断, 粉拟青霉的有性型可能是一种虫草。粉拟青霉的起源应为单源的。不同的粉拟青霉菌株的 ITS 序列具有多态性, 源于同一地区的菌株的 ITS 变异也较大。ITS 序列的证据表明, 粉拟青霉菌株间的差异与地理来源及寄主均无相关性。

关键词:粉拟青霉, 邻接树, 内转录间区, 多态性

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1005-0094(2003)06-0480-06

nrDNA ITS analysis of *Paecilomyces farinosus* isolates

HUANG Bo^{1,2}, WANG Cheng-Shu¹, WANG Bin¹, FAN Mei-Zhen¹, LI Zeng-Zhi^{1*}

1 Provincial Key Laboratory of Microbial Control of Anhui, Anhui Agricultural University, Hefei 230036

2 Systematic Mycology & Lichenology Laboratory, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080

Abstract: nrDNA ITS(ITS1-5.8S-ITS2) regions of 20 isolates of *Paecilomyces farinosus* were sequenced, and its correct ITS sequence was obtained. The results showed that the ITS of *P. farinosus* reported by Korean researchers was actually that of *P. tenuipes*. Two unidentified Korean isolates of *Paecilomyces* (KACC40219 and KACC40221) were identified as *P. farinosus* based on molecular data. The neighbour-joining tree showed that *P. farinosus* is monophyletic, and the teleomorph of *P. farinosus* was tentatively identified as a *Cordyceps* species. Sequence polymorphisms of the nrDNA ITS region exist among different isolates of *P. farinosus* with the same geographic origins. The molecular data proved that genetic diversity of different isolates of *P. farinosus* is not related to geographic origins and hosts.

Key words: *Paecilomyces farinosus*, neighbour-joining tree, ITS, polymorphism

粉拟青霉(*Paecilomyces farinosus*)是一种世界常见的土栖性真菌, 据研究, 它可以侵染几乎所有目的昆虫(Samson, 1974)。因其广泛的寄主和广布的地域, 粉拟青霉被视为极有应用前景的生物防治的后备菌种。

Samson 等认为该种的某些重要的分类性状存在高度变异(如: 菌株具孢梗束或无)(Samson, 1974; Samson *et al.*, 1988), 但 Chew *et al.* (1998) 研究认为, 根据对采自加拿大东部的不同菌株的研究, 不能将孢梗束的有无作为进一步划分粉拟青霉

菌株类型的依据。因此, 划分菌株类型的依据可能是寄主或是地理来源。

近年来, 飞速发展的分子技术尤其是测序技术, 为研究系统发育关系提供了有效的手段。编码核糖体 RNAs 的 DNA 序列已被普遍用于真菌中各个分类阶元的系统关系和遗传差异的研究, 而其中的内转录间区(ITS)由于变异性较强, 适用于通过序列分析研究真菌的种级分类。早在 1991 年 Nazar 等就发现用 ITS 序列的差异可以鉴定和区分黑白轮枝孢(*Verticillium albo-atrum*) 和大丽花轮枝孢(*V.*

dahliae)这两种重要的植物病原真菌(Nazar *et al.* , 1991),迄今有许多国内外学者用此区域的序列研究真菌的种间系统发育关系和分子分类,并在种间的亲缘关系和疑难种的确定上得到了大量有价值的结论(Kiss *et al.* , 2001;王宏凯等,2001;Tuthill & Frisvad, 2002;Kang *et al.* , 2002;陈永青等,2002;章初龙,徐同,2002)。

对于虫生真菌来说,该方法的成功应用解决了长期以来颇有争议的绿僵菌属(*Metarhizium*)的分类难题。Driver 等将 ITS1 和 ITS2 的序列作为绿僵菌属分类的第一依据,确认了甚有疑义的白色绿僵菌(*M. abluum*)并将原来只有各 2 个变种的黄绿绿僵菌(*M. flavoviride*)和金龟子绿僵菌(*M. anisopliae*)分别划分为 5 个变种和 4 个变种(Driver *et al.* , 2000)。此外在布氏白僵菌(*Beauveria brongniartii*)

不同菌株的 ITS 序列变异的研究中发现,ITS1 和 ITS2 区域点突变都较大,因此该种可能存在隐含种(Neueglis *et al.* , 1994)。

本研究的目的是通过 nrDNA ITS1 - 5.8S - ITS2 区域(以下简称 nrDNA ITS 区)序列来考察粉拟青霉菌株的遗传差异是与寄主相关还是与地理来源相关,以及了解粉拟青霉的遗传的单一性。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

供试的 20 株粉拟青霉以及细脚拟青霉(*Paecilomyces tenuipes*)、蛹拟青霉(*P. militaris*)和蝉拟青霉(*P. cicadae*)由安徽农业大学经济昆虫菌物研究所分离和保存。其寄主及来源地见表 1。

表 1 供试的 20 株粉拟青霉菌株和其他 3 种拟青霉的来源

Table 1 Insect hosts and geographic origins of 20 tested isolates of *Paecilomyces farinosus* and three species of *Paecilomyces*

菌株号 Isolate code	寄主 Host	采集地 Location	登录号 Accession no.
1. 粉拟青霉 <i>Paecilomyces farinosus</i>			
RCEF97	鳞翅目幼虫 Lepidoptera	云南 Yunnan	AF368794
RCEF99	油松毛虫 <i>Dendrolimus tabulaeformis</i>	北京 Beijing	AF368795
RCEF103	鳞翅目幼虫 Lepidoptera	北京 Beijing	AF368796
RCEF446	鳞翅目幼虫 Lepidoptera	安徽潜山 Qianshan, Anhui	AF368797
RCEF450	鳞翅目幼虫 Lepidoptera	安徽宣州 Xuanzhou, Anhui	AF368789
RCEF632	蚂蚁 Formicidae	安徽岳西 Yuexi, Anhui	AF368788
RCEF640	象鼻虫 Curculionidae	安徽岳西 Yuexi, Anhui	AF368780
RCEF647	隐翅虫 Staphilodea	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368781
RCEF651	小蠹虫 Scolytidae	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368786
RCEF652	蜂 Hymenoptera	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368792
RCEF655	椿象 Pentatomidae	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368782
RCEF656	十眼盘瓢虫 Coccinellidae	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368787
RCEF672	耳叶蝉 Ledridae	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368783
RCEF673	黑蚂蚁 Formicidae	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368784
RCEF679	鳞翅目幼虫 Lepidoptera	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368778
RCEF680	蜘蛛 Arachnida	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368779
RCEF685	虎甲 Cicindelidae	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368793
RCEF696	鳞翅目幼虫 Lepidoptera	安徽天堂寨 Tiantangzhai, Anhui	AF368785
RCEF773	鳞翅目幼虫 Lepidoptera	云南 Yunnan	AF368791
RCEF774	鳞翅目蛹 Lepidoptera	云南 Yunnan	AF368790
2. 细脚拟青霉 <i>Paecilomyces tenuipes</i>			
RCEF209	鳞翅目蛹 Lepidoptera	安徽霍山 Huoshan, Anhui	AF368808
3. 蛹拟青霉 <i>Paecilomyces militaris</i>			
RCEF202	鳞翅目蛹 Lepidoptera	安徽霍山 Huoshan, Anhui	AF368807
4. 蝉拟青霉 <i>Paecilomyces cicadae</i>			
RCEF191	蝉 Cicadea	浙江 Zhejiang	AF368801

1.2 DNA 提取

SDAY 培养基, 25°C 培养 7 天。刮取长在玻璃纸上的平板培养物后采用氯化苯法提取 DNA(朱衡等, 1994)。

1.3 nrDNA ITS1 - 5.8S - ITS2 区的扩增及序列分析

扩增绿僵菌属 nrDNA ITS 区所用引物为 TW81 (5'-GTTTCCGATAGGTGAACCTGC-3') 和 AB28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')(Curran *et al.*, 1994), 引物由 Sangon 公司合成。PCR 反应体系(25 μ L)含有: 2.5 μ L 10 \times Taq 酶缓冲液(Sangon 公司), dNTP(Promega 公司)各 200 μ mol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, 引物 0.12 ng, Taq 酶 1.5 U(Sangon 公司), 模板 DNA 10 ng ~ 1 μ g, 加 30 μ L 石蜡油覆盖。扩增反应在英国 Techine 公司生产的 PCR 仪上进行: 95°C 3 min, 1 个循环; 94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 2 min, 35 个循环; 最后 72°C 10 min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶(含 EB)中电泳 2 h 检测。

PCR 扩增产物用 WizardTM PCR Preps DNA Purification System 纯化试剂盒纯化, 方法按 Promega 公司提供的操作步骤进行。纯化的 PCR 扩增产物和 T-vector 的体外连接方法如下: 取自制的 T-vector 1 μ L, 纯化的 PCR 扩增产物 1.5 μ L, T4 连接酶 Buffer 1 μ L, T4 连接酶(8 U/ μ L) 0.2 μ L, 补水至 10 μ L, 15°C 下温育 4 h。重组质粒的热激转化的方法参照 Sambrook *et al.*(1989)所描述的方案进行。用灭菌的 Tip 头挑可能含有目的 nrDNA ITS 的重组白斑单菌落 2 ~ 3 个, 于 4 mL LB 培养基(含抗生素)中, 37°C 下以 250 rpm 剧烈摇晃培养过夜。可能的阳性重组质粒 DNA 的提取采用碱裂解法, 具体步骤与 Sambrook *et al.*(1989)所描述的方案基本相同, 用 Pvu 酶切鉴定。每个样品选取一个含有目的片段的克隆, 由上海基康生物技术有限公司进行 DNA 序列测定。其方法为: 质粒的纯化采用 PEG 纯化法; DNA 测序采用双脱氧测序法, 选用通用引物 T₁ 和 T₃ 在 ABI 3700 型测序仪上进行双向测序。

1.4 数据分析

DNA 序列的排定(alignment)使用 Clustal W 程序(Thompson *et al.*, 1994)。以嗜热子囊菌属中的 *Thermoascus crustaceus* 为外群, 用 Neighbor-joining 方法构建系统树。邻接树的生成和重复抽样分析(bootstrap analysis)使用 Treecon 软件包中的 Treecon

W。

2 结果与讨论

2.1 粉拟青霉 nrDNA ITS 序列及其邻接树的构建

测序所得粉拟青霉 20 个菌株的 nrDNA ITS 区的准确序列已全部在 GenBank 中注册, 其序列号见表 1。各菌株的 nrDNA ITS 区片段总长在 498 ~ 501 bp 范围, 其中 ITS1、5.8S 和 ITS2 rDNA 的长度范围分别为 178 ~ 181 bp、158 bp 和 161 ~ 162 bp。这表明它们之间的长度变异是很小的。从 GenBank 中查寻到虫草属所在的麦角菌科其他属的 nrDNA ITS 区的序列, 包括麦角菌属(*Claviceps*)、香柱菌属(*Epiclhoe*)、丛赤壳属(*Nectria*)、线囊座菌属(*Balansia*)、新赤壳属(*Neocosmospora*)、*Echinodothis*、*Myriogenospora* 等 7 属的 12 个种, 结合我们所测的细脚拟青霉(*P. tenuipes*)、蛹拟青霉(*P. militaris*)和蝉拟青霉(*P. cicadae*)以及韩国学者登录的 1 株细脚拟青霉(AF224689)、1 株粉拟青霉(AF237664)和 2 株未鉴定到种的拟青霉(KACC40219、KACC40221)的相应序列, 构建了粉拟青霉及部分其他种的邻接树(见图 1)。该邻接树显示, 这 20 株粉拟青霉呈现高度的序列相似性。

2.2 韩国学者(Park, Ha & Lee)测定的粉拟青霉 nrDNA ITS 序列的正确性

我们于 1998 年开始对拟青霉属部分种的 nrDNA ITS 区进行克隆测序, 此时在 GenBank 上未发现有此类真菌的序列登录, 韩国学者 Park 等于 2000 年 3 月 30 日登录了拟青霉属部分种的 nrDNA ITS 区的序列, 其中包括粉拟青霉和细脚拟青霉。然而本研究结果和 Park 等登录的序列有一定的差异: Park 等登录的粉拟青霉(登录号 AF237664)与他们自己测定的细脚拟青霉序列(AF224689)仅有 2 个碱基的差异, 与本研究测定的细脚拟青霉(AF368808)比较也只相差 5 个。图 1 显示, AF237664、AF368808 和本研究测定的细脚拟青霉聚为一类。因此, Park 等登录的粉拟青霉序列实际上是细脚拟青霉的序列。另一方面, Park 等登录的 2 株未鉴定到种的拟青霉(KACC40219、KACC40221)和粉拟青霉菌株 RCEF656 的 nrDNA ITS 区的序列相比分别仅缺失 1 个和 2 个碱基; KACC40221 与本研究中的粉拟青霉差异最大的菌株 RCEF450 仅有 8 个碱基不同(图 2), 只占其整个

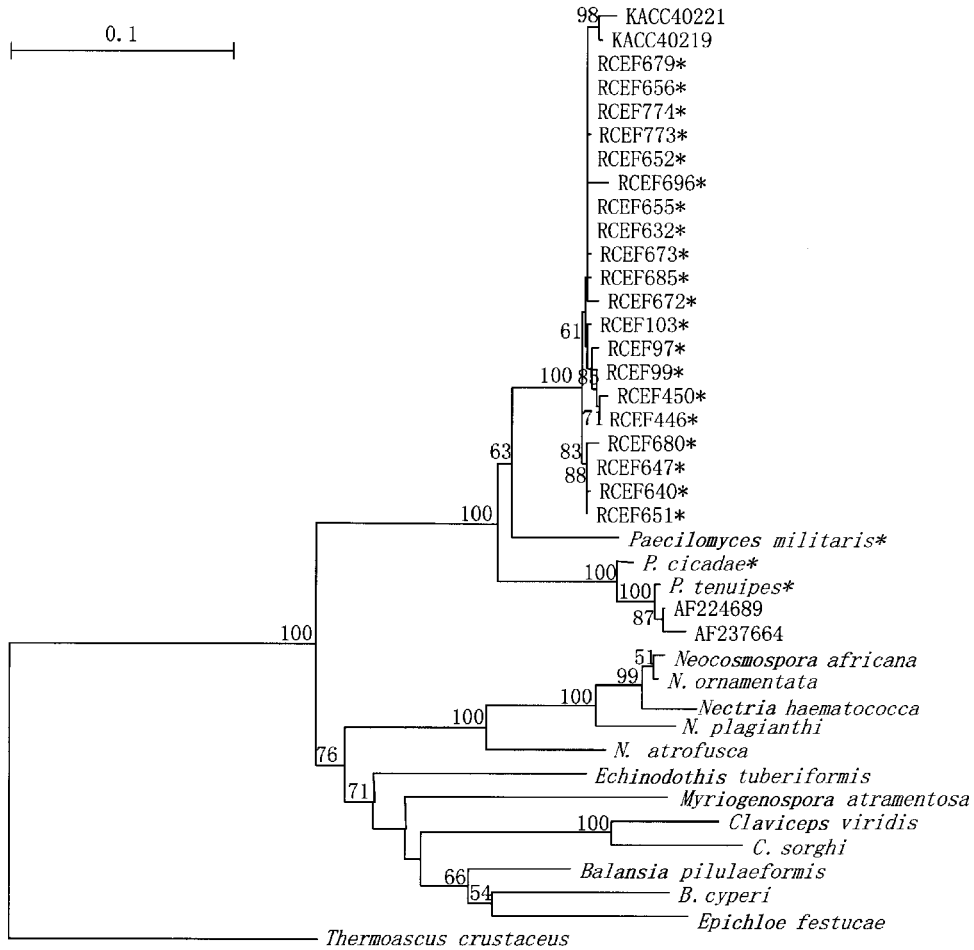


图1 基于粉拟青霉及其部分拟青霉种和麦角菌科部分种的 nrDNA ITS1 - 5.8S - ITS2 区域序列构建的邻接树(分支上的数值为自展分析支持率,其中右上方有星号的为我们测定的序列)

Fig.1 A neighbour-joining tree based on nrDNA ITS1 - 5.8S - ITS2 region sequences of *Paecilomyces* spp. and other species of Clavicipitaceae. Numbers above the branches indicate bootstrap values. Samples with asterisk were sequenced by the present authors.

ITS 序列的 2.4%。我们曾对本研究中的所有粉拟青霉菌株进行过仔细的形态学鉴定,发现它们的形态完全符合原描述。另外在我们对大别山进行的为期一年的虫生真菌资源调查中还发现,粉拟青霉竟占所采虫生真菌标本总数的 26.95%。鉴于这种真菌的常见性、供试菌种形态和原描述的一致性以及它们 nrDNA ITS 区序列的同源性,可以断定我们所研究的菌株确系粉拟青霉。尽管我们不了解 KACC40219、KACC40221 这两个韩国菌株的形态特征,但可以推测,这 2 株未鉴定到种的拟青霉均为粉拟青霉。

2.3 粉拟青霉有性型的推测

粉拟青霉是世界上常见的虫生真菌之一,其有性型尚无明确报道。有报道 *Spicaria longipes* 和 *S. pulvinata* 的有性型分别是虫壳 *Torrubiella gonyletici-*

da 和 *T. pulvinata* (Petch, 1937; Mains, 1949),而这两种 *Spicaria* 皆被 Samson 视为粉拟青霉的异名 (Samson, 1974)。Samson (1974) 对粉拟青霉的有性型是虫壳的推论表示怀疑,其理由有二:一是虽然这两种虫壳的分生孢子变幅落在粉拟青霉的范围内,但多少要大于典型的粉拟青霉菌株;二是 *Spicaria* 和 *Torrubiella* 之间并没有培养的证据。从邻接树分析,所有 22 株粉拟青霉(包括 KACC40219、KACC40221)和蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 的无性型蛹拟青霉、蝉花 (*C. cicadae*) 的无性型蝉拟青霉及高雄山虫草 (*C. takaomontana*) 的无性型细脚拟青霉聚为一类,其支持率为 100%。除虫草属外,麦角菌科中可查寻到 ITS 序列的 7 个属 12 个种全部聚为一类,支持率也达 76%。以粉拟青霉 RCEF656 菌株为例,它与细脚拟青霉及蛹虫草的碱基差异分

等 2001)。如果菌株差异和地理来源相关的话,来自同一地区的菌株应有相同或相似的 ITS,而来自不同地区的菌株应有不同的 ITS;距离越远,ITS 变异越大。然而,本研究的结果并非如此。从序列排序比较看,本研究所有菌株的 ITS 最大差异为 9 个碱基,而同为天堂寨的 RCEF696 和 RCEF680 碱基差异竟高达 8 个之多;相反,来自云南的 RCEF774、来自安徽岳西的 RCEF632 和来自安徽天堂寨的 RCEF652 却共有 1 种 ITS 型,且 RCEF652 与韩国的 KACC40219 仅有 1 个碱基的差异。从这些证据看,粉拟青霉菌株间差异与地理来源并不相关。这与我们先前通过 RAPD 研究得到的结果不一致(黄勃等 2001),究其原因可能是用于 RAPD 研究的菌株较少,代表性不强所致。在对金龟子绿僵菌小孢变种(*Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*)的 ITS 序列测定中也同样发现,来自不同大陆的菌株具相同的 ITS 序列(Driver *et al.*, 2000)。

参考文献

- Chen Y-Q (陈永青), Jiang Z-D (姜子德) and Qi P-K (戚佩坤). 2002. Application of RAPD and ITS region sequence analysis on classification and identification of *Phomopsis. Mycosystema*(菌物系统), **21**(1): 39-46. (in Chinese)
- Chew J. S. K., Strongman D. B. and MacKay R. M. 1998. Comparisons of twenty isolates of the entomopathogenic *Paecilomyces farinosus* by analysis of RAPD markers. *Mycological Research*, **102**(10): 1257-1258.
- Curran J., Driver F., Ballard J. W. O. and Milner R. J. 1994. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research*, **98**: 547-552.
- Driver F., Milner R. J. and Trueman W. H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*, **104**(1): 134-150.
- Huang B(黄勃), Li Z-G(李振刚), Fan M-Z(樊美珍) and Li Z-Z(李增智). 2001. Intraspecific polymorphism in *Paecilomyces farinosus* by analysis of RAPD. *Mycosystema*(菌物系统), **20**(1): 62-67. (in Chinese)
- Kang J. C., Crous P. W., Mehau G. R. A., Serdani M. and Song S. M. 2002. Phylogenetic analysis of *Alternaria* spp. associated with apple core rot and citrus black rot in South Africa. *Mycological Research*, **106**(11): 1151-1162.
- Kiss L., Cook R. T. A., Saenz G. S., Cunnington J. H., Takamatsu S., Pascoe I., Baedin M., Nicot P. C., Sato Y. and Rossman A. Y. 2001. Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. *Mycological Research*, **105**(6): 684-697.
- Mains E. B. 1949. New species of *Torrubiella*, *Hirsutella* and *Gibellula*. *Mycologia*, **41**: 303-310.
- Nazar R. N., Hu X., Schmidt J., Culham D. and Robb J. 1991. Potential use of PCR amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogen. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **39**: 1-11.
- Neueglis C., Brygoo Y., Vercambre B. and Ribe G. 1994. Comparative analysis of molecular and biology characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycological Research*, **98**: 322-328.
- Petch T. 1937. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of British Mycological Society*, **21**: 34-67.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd edn.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1-1062.
- Samson R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. *Study in Mycology*, **6**: 1-119.
- Samson R. A., Evans H. C. and Latge J. P. 1988. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer-Verlag, Berlin, 1-187.
- Thompson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**: 4673-4680.
- Tuthill D. E. and Frisvad J. C. 2002. *Eupenicillium bovisfimosum*, a new species from dry cow manure in Wyoming. *Mycologia*, **94**(2): 240-246.
- Wang H-K(王洪凯), Zhang T-Y(张天宇) and Zhang M(张猛). 2001. Application of sequencing of 5.8S rDNA, ITS1 and ITS2 on identification and classification of *Alternaria* at species level. *Mycosystema*(菌物系统), **20**(2): 168-173. (in Chinese)
- Zhang C-L(章初龙) and Xu T(徐同). 2002. Molecular phylogenetic analysis of section *Trichoderma* and *Pachybasium* in the Genus *Trichoderma*. *Mycosystema*(菌物系统), **21**(4): 538-546. (in Chinese)
- Zhu H(朱衡), Qu F(瞿峰) and Zhu L-h(朱立煌). 1994. Isolation of genomic DNAs from fungi using benzyl chloride. *Acta Mycologica Sinica*(真菌学报), **13**(1): 41-47. (in Chinese)