

蔡悦, 聂勇, 吴茜茜, 等. 广东省鼎湖山国家级自然保护区球孢白僵菌遗传多样性研究[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(1): 92-100.
CAI Yue, NIE Yong, WU Qianqian, et al. Genetic diversity of *Beauveria bassiana* in Dinghu Mountain National Nature Reserve in Guangdong Province[J].
Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(1): 92-100.

广东省鼎湖山国家级自然保护区球孢白僵菌 遗传多样性研究

蔡悦^{1,2}, 聂勇³, 吴茜茜¹, 黄勃²

(1 合肥学院 生物与环境工程系, 安徽 合肥 230601; 2 安徽农业大学 微生物防治安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230036;
3 安徽工业大学 建筑工程学院, 安徽 马鞍山 243002)

摘要:【目的】了解广东省球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 的群体遗传结构、基因流、菌株分化、遗传变异和寄主类型, 以及与生态环境的相关性, 为筛选优良生产菌株提供后备种质资源。【方法】采用 SSR 分子标记对广东省鼎湖山国家级自然保护区(以下简称“DHS”)采集的 81 株球孢白僵菌进行遗传结构和多样性分析。【结果】使用 8 对 SSR 引物扩增 81 个菌株产生多态位点数为 58 个, 多态位点比率为 100%, 其中, 引物 Ba12 多态位点数最多(10 个)。通过 Popgene 32 软件包分析发现, DHS 球孢白僵菌种群 Nei's 基因多样性指数 (h) 为 0.212 6, Shannon 信息指数 (I_s) 为 0.348 7, 可见其遗传多样性水平较高, 群体异质性强。将群体分别按照寄主和土壤、不同寄主目划分为不同亚群进一步分析, 发现土壤亚群遗传多样性水平 ($h=0.192 5$, $I_s=0.309 9$) 略高于寄主亚群 ($h=0.176 9$, $I_s=0.278 3$), 种群间遗传分化程度较弱 ($N_m=1.662 9$, $G_{st}=0.130 7$); 不同寄主目群体间的遗传分化较小且基因流明显。基于 UPGMA 聚类分析发现, 各分支菌株的分布趋势与分离基质、不同寄主目均没有相关性。【结论】DHS 球孢白僵菌遗传谱系与分离基质和寄主来源均无明显相关性, 不同生态环境和寄主类型的影响共同维持了 DHS 球孢白僵菌种群内遗传变异的多样性。

关键词: 球孢白僵菌; SSR 分子标记; 遗传多样性; 聚类分析; 鼎湖山国家级自然保护区

中图分类号: Q938.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)01-0092-09

Genetic diversity of *Beauveria bassiana* in Dinghu Mountain National Nature Reserve in Guangdong Province

CAI Yue^{1,2}, NIE Yong³, WU Qianqian¹, HUANG Bo²

(1 Department of Biological and Environmental Engineering, Hefei University, Hefei 230601, China;

2 Anhui Province Key Laboratory of Microbial Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

3 School of Civil Engineering and Architecture, Anhui University of Technology, Ma'anshan 243002, China)

Abstract: 【Objective】 To understand the population genetic structure, gene flow, strain differentiation of *Beauveria bassiana* in Guangdong Province, analyze the correlation between genetic variation and host type, ecological environment, and provide a large number of reserved germplasm resources for screening and production of superior strains. 【Method】 The genetic variation and diversity of 81 *B. bassiana* isolates from Dinghu Mountain National Nature Reserve of Guangdong Province (DHS) were assessed using SSR markers.

收稿日期: 2018-05-08 网络首发时间: 2018-12-28 14:39:08

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20181227.1104.022.html>

作者简介: 蔡悦(1984—), 男, 讲师, 博士, E-mail: caiyue@hfuu.edu.cn; 通信作者: 黄勃(1969—), 男, 教授, 博士, E-mail: bhuang@ahau.edu.cn

基金项目: 安徽省教育厅自然科学研究重点项目 (KJ2015A277); 合肥学院人才科研基金项目 (15RC03); 合肥学院硕士点培育项目 (1080461810)

【Result】 Eight SSR primers were amplified to produce 58 polymorphic points, the percentage of polymorphic loci was 100%, and the number of polymorphic points of primer Ba12 was the largest (10). Nei's genetic diversity index (h) was 0.212 6 and Shannon's information index (I_s) was 0.348 7 based on the analysis using the Popgene 32 software package, which indicated the genetic diversity and population heterogeneity levels of *B. bassiana* were high in DHS. Eighty-one strains of *B. bassiana* were divided into different subpopulations according to host/soil and insect order respectively. The genetic diversity of soil subpopulation ($h=0.192 5$, $I_s=0.309 9$) was slightly higher than that of host subpopulation ($h=0.176 9$, $I_s=0.278 3$), suggesting a generally low genetic differentiation among subpopulations ($N_m=1.662 9$, $G_{st}=0.130 7$). Genetic differentiation among subpopulations in different insect order was low and was associated with strong gene flow. The distribution of isolates had no obvious correlation with isolation medium or insect orders based on UPGMA clustering. 【Conclusion】 The genetic lineage of *B. bassiana* in DHS is not correlated with isolation medium or insect orders. The diversification of *B. bassiana* population in DHS is maintained by different ecological environment and host type.

Key words: *Beauveria bassiana*; SSR marker; genetic diversity; clustering analysis; Dinghu Mountain National Nature Reserve

白僵菌属 *Beauveria* Vuill. 为全球分布的最常见的土栖虫生真菌, 包含球孢白僵菌 *B. bassiana* 和布氏白僵菌 *B. brongniartii* 2 个重要种类。在害虫生物防治领域最受关注的是球孢白僵菌, 该菌寄主范围很广, 已记载的寄主包括 15 目 149 科 700 余种昆虫以及蜱螨目的 6 科 10 余种螨和蜱^[1]。在许多国家, 球孢白僵菌被广泛运用于农业和林业害虫的生物防治, 且效果显著^[2]。自 20 世纪 70 年代以来, 我国利用球孢白僵菌制剂防治松毛虫 *Dendrolimus punctatus* 和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis*, 其应用面积达上百万公顷, 成为世界上最大和最成功的生物防治案例之一^[3]。由于球孢白僵菌寄主多样, 地理分布极为广泛, 不同菌株的侵染力^[4]、传播力、产孢潜力、抗逆性^[5]及对寄主昆虫的毒力存在较大差异, 因此自然群体具有较大异质性和较高遗传多样性。最早开始研究球孢白僵菌群体变异的是美国康奈尔大学的 Leger 等^[6], 他们通过等位酶分析将 146 株来自世界各地的白僵菌划分为 47 个独特基因型, 其中球孢白僵菌复合种存在 3 个世界广布的优势基因型, 而且不同基因型菌株间的染色体重组十分罕见。近年来相关的研究主要有: Fernandes 等^[7]利用多位点酶电泳 (MLEE)、AFLP 和 ITS 位点对来自巴西和美国的白僵菌群体进行分析; Garrido-Jurado 等^[8]利用 28S 内含子和 EF1-a 对西班牙的球孢白僵菌群体的联合分析; Prabhukarthikeyan 等^[9]采用 RAPD 技术对印度地区的球孢白僵菌群体的研究等。国内由王成树等^[10]率先开展了球孢白僵菌群体遗传变异的调查, 特别是近期有研究团队对我国

北方和南方不同省份的球孢白僵菌种群分别进行了遗传多样性和种群异质性研究, 基本明确了大部分地区球孢白僵菌种群的遗传结构特征^[11-12]。然而我国南方广东省的球孢白僵菌只有 20 株, 来自鼎湖山国家级自然保护区的菌株更只有 5 株, 尚未得到系统深入的研究。2011 年 Meyling 等^[13]通过 rDNA 序列和简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR) 技术对丹麦 Bakke garden 地区附近耕地和田边篱的白僵菌进行分子系统发育和遗传变异分析。2012 年, Meyling 等^[14]继续采用 SSR 标记研究来自瑞士花粉甲虫 *Meligethes aeneus* 的白僵菌群体, 进一步揭示了群内菌株的基因型多样性。研究表明 SSR 标记应用于白僵菌的生态学研究, 可显示其他标记不能反映的大量多态性水平, 为识别种内变异、判定种群遗传结构和异质性奠定基础, 加深人们对群体生态系中发生变化和机制的理解。

虽然国内外研究球孢白僵菌遗传多样性的报道多见, 但对我国华南地区特别是广东省白僵菌的研究较少, 同时采用技术新和重复性好的 SSR 标记来研究白僵菌群体遗传变异在国内也很少有人涉足。鼎湖山国家级自然保护区位于广东省肇庆市鼎湖区, 属南亚热带季风湿润型气候, 面积 1 155 hm², 森林覆盖率达 78.8%, 阳光充足, 雨量充沛, 地理环境十分优越。本研究选择鼎湖山作为中国广东省代表, 检测球孢白僵菌群体的遗传多样性, 通过 SSR 标记对该地区球孢白僵菌种群进行聚类分析, 进而考察种群的遗传分化和基因流, 从分子生态学角度评估种群菌株的分布和遗传变异情况。

1 材料与amp;方法

1.1 样品及分离

在广东省鼎湖山自然保护区 (简称 DHS) 采集僵虫或土样, 使用燕麦选择性培养基分离样品, SDAY 培养基纯化^[15], 记录菌落的色泽、形态和

生长速度等宏观特征。PDA 平板培养后, 在显微形态初步鉴定出白僵菌的基础上, 利用 Bloc-DGGE 分型联合 EF 位点的序列测定进行准确判定, 共有 81 株白僵菌菌株确定为狭义球孢白僵菌^[16]。所有菌株保藏于安徽农业大学微生物防治安徽省重点实验室, 具体信息见表 1。

表 1 鼎湖山球孢白僵菌菌株的分离基质和采集时间

Table 1 Isolation medium and collecting time of *Beauveria bassiana* isolates in Dinghu Mountain

菌株编号 Isolate number	采集时间 Collecting time	分离基质 Substrate	菌株编号 Isolate number	采集时间 Collecting time	分离基质 Substrate
RCEF1273	2004-08	鳞翅目蛹 Lepidoptera pupa	DHS110922-t1	2011-09	土壤 Soil
RCEF1274	2004-08	缘蝽科 Heteroptera: Coreidae	DHS110922-t2	2011-09	土壤 Soil
RCEF1275	2004-08	鞘翅目 Coleoptera	DHS110922-t3	2011-09	土壤 Soil
RCEF1276	2004-08	叶甲科 Coleoptera: Chrysomelidae	DHS110922-t4	2011-09	土壤 Soil
RCEF1277	2004-08	鳞翅目幼虫 Lepidoptera larva	DHS110922-t5	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-1	2011-09	叩甲科 Coleoptera: Elateridae	DHS110922-t6	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-2	2011-09	毒蛾科 Lepidoptera: Lymantridae	DHS110922-t7	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-3	2011-09	瓢甲科 Coleoptera: Coccinellidae	DHS110922-t8	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-4	2011-09	步甲科 Coleoptera: Carabidae	DHS110922-t9	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-5	2011-09	小蠹科 Coleoptera: Scolytidae	DHS110922-t10	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-6	2011-09	胡蜂科 Hymenoptera: Vespidae	DHS110922-t12	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-7	2011-09	叶甲科 Coleoptera: Chrysomelidae	DHS110922-t13	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-8	2011-09	鞘翅目 Coleoptera	DHS110922-t14	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-9	2011-09	飞虱科 Homoptera: Delphacidae	DHS110922-t15	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-10	2011-09	小蠹科 Coleoptera: Scolytidae	DHS110922-t16	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-11	2011-09	叶甲科 Coleoptera: Chrysomelidae	DHS110922-t17	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-12	2011-09	缘蝽科 Heteroptera: Coreidae	DHS110922-t18	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-14	2011-09	蚊科 Hymenoptera: Formicidae	DHS110922-t19	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-15	2011-09	步甲科 Coleoptera: Carabidae	DHS110922-t20	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-16	2011-09	小蠹科 Coleoptera: Scolytidae	DHS110922-t21	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-17	2011-09	蟋蟀科 Orthoptera: Gryllidae	DHS110922-t22	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-18	2011-09	枯叶蛾科 Lepidoptera: Lasiocampidae	DHS110922-t23	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-19	2011-09	蚊科 Hymenoptera: Formicidae	DHS110922-t24	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-20	2011-09	蚊科 Hymenoptera: Formicidae	DHS110922-t26	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-21	2011-09	小蜂科 Hymenoptera: Chalcididae	DHS110922-t25	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-22	2011-09	小蠹科 Coleoptera: Scolytidae	DHS110922-t27	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-23	2011-09	象甲科 Coleoptera: Curculionidae	DHS110922-t28	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-24	2011-09	鳞翅目幼虫 Lepidoptera larva	DHS110922-t29	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-25	2011-09	叶甲科 Coleoptera: Chrysomelidae	DHS110922-t30	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-26	2011-09	鳞翅目幼虫 Lepidoptera larva	DHS110922-t31	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-27	2011-09	鳞翅目幼虫 Lepidoptera larva	DHS110922-t32	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-28	2011-09	鳞翅目成虫 Lepidoptera adult	DHS110922-t33	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-30	2011-09	蝽科 Heteroptera: Pentatomidae	DHS110922-t34	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-32	2011-09	蚜科 Homoptera: Aphididae	DHS110922-t35	2011-09	土壤 Soil

续表 1 Continued table 1

菌株编号 Isolate number	采集时间 Collecting time	分离基质 Substrate	菌株编号 Isolate number	采集时间 Collecting time	分离基质 Substrate
DHS110922-33	2011-09	蚁科 Hymenoptera: Formicidae	DHS110922-t36	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-34	2011-09	小蠹科 Coleoptera: Scolytidae	DHS110922-t37	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-35	2011-09	叶蝉科 Homoptera: Cicadellidae	DHS110922-t38	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-36	2011-09	粉虱科 Homoptera: Aleyrodidae	DHS110922-t39	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-37	2011-09	蝽科 Heteroptera: Pentatomidae	DHS110922-t40	2011-09	土壤 Soil
DHS110922-39	2011-09	象甲科 Coleoptera: Curculionidae	DHS110922-t42	2011-09	土壤 Soil
			DHS110922-t43	2011-09	土壤 Soil

1.2 菌丝体制备与 DNA 提取

将上述供试菌株制成孢子悬浮液, 取 0.2 mL 转接于加铺玻璃纸的 SDAY 培养基平板上, 恒温培养箱中 (25±1) °C 条件下培养 3~5 d, 将长满全皿且未大量产孢的菌丝在无菌条件下取出, 置于 1.5 mL 已

灭菌的 Eppendorf 管中, 冷冻干燥后于 -20 °C 保存备用。采用改良的氯化苜法提取纯化基因组 DNA^[16]。

1.3 SSR-PCR 扩增

根据 Meyling 等^[13]综合使用的 8 对引物对菌株进行 PCR 扩增, 引物基本信息见表 2。

表 2 SSR-PCR 使用的引物
Table 2 Primers for SSR-PCR

位点 Locus	重复序列 Repeat motif	碱基重复长度/bp Base repeat length	引物序列(5'→3') Primer (5'→3')
Ba6	GTT	114	F: GCGATTGACGAAAAGCTAGA R: ACTTGCTTTGCTGTTGCACA
Ba8	AAG	210	F: TGTTGCCGACACGAATTGT R: GGCTCAAGCGCAAAGAGAAA
Ba12	CTT	231	F: GGGTCCATCATGTACGGC R: AGGCGTATACAGGTCGTG
Ba13	AAG	161	F: CAGGCAACAACACGATTTCA R: ATGCCATCTACGACTTTATGA
Ba16	TGC	121	F: GCCACATTTCTACTGTTG R: TGTCGCCTTTGTGACCAAG
Ba20	AAG	182	F: GCATCGTATCCCTTTTCACA R: GGAGGCGGTGGTGAAGG
Ba21	GTG+GTC	188	F: ACGAGTATTGGTGTGGGTA R: GCAACACAACGCCCAAG
Ba22	AAG	152	F: GAAAAAGGCCCGCAGCAAC R: CCTCGTGAATCTCGGTCAG

PCR 循环程序为 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 以上 3 步 35 个循环; 然后 72 °C 延伸 10 min, 5 °C 保存。通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物质量。选取条带单一清晰的样品进行测序胶 (PAGE) 电泳, 检测不同微卫星引物的扩增效果及其特异性。

1.4 SSR-PCR 产物测序胶电泳

参照蒲顺昌等^[17]的方法, 将 SSR-PCR 产物在 Sequi-Gen® GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell 测序胶电泳仪上电泳, 并通过硝酸银染色检测结果。

1.5 电泳图谱统计

对 SSR 标记按共显性标记进行数据统计, 根据 SSR 条带的迁移率不同识别多态性条带。对扫描后的电泳图谱进行人工读带, 各泳道中迁移率相同的条带视为相同基因型, 迁移率不同的条带视为不同基因型, 将迁移率相同的菌株分别合并后进行下一轮电泳。在最终测序胶板中, 分别统计每种条带包含菌株的数量。最后利用 Bandscan V5.0 软件和人工读带相结合的方法将图谱数据转化成 0, 1 矩阵 (“1” 为有条带, 代表显性基因; “0” 为无

条带,代表隐性基因)。

1.6 数据分析

利用 Popgene 32 软件包计算 DHS 球孢白僵菌种群的观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (h)、Shannon 信息指数 (I_s)、多态位点比率 (P)、种群内基因多样性 (H_s)、总基因多样性 (H_t) 等指标,并分析群体的遗传分化系数 (G_{st})、基因流 (N_m)、遗传距离 (D) 和遗传一致度 (I) 等指标^[18]。在此基础上使用 NTSYSpc 2.1 通过非加权法 (UPGMA) 对数据矩阵进行聚类分析,根据遗传相似系数将群体菌株分为不同的亚种群,检测群体菌株的遗传相似度和异质性。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物多态性分析

8 个引物扩增 81 个菌株共扩增出 58 个位点,其中多态位点数也是 58 个,多态位点比率 (P) 为 100%,单个引物的扩增位点数 6~10 个,平均 7.25

个。其中,引物 Ba12 扩增位点数最多,为 10 个,扩增位点数最少的引物是 Ba13、Ba16 和 Ba21,扩增位点数均为 6 个。Nei's 基因多样性指数 (h) 范围为 0.169 1(Ba12)~0.259 0(Ba16),平均为 0.212 6;Shannon 信息指数 (I_s) 范围为 0.291 8(Ba12)~0.417 0(Ba16),平均为 0.348 7(表 3)。部分菌株的电泳图谱见图 1。

2.2 遗传多样性分析

2.2.1 球孢白僵菌种群总体遗传多样性分析 对鼎湖山国家级自然保护区 81 株球孢白僵菌作为整体进行遗传多样性分析,结果表明, h 为 0.212 6, I_s 为 0.348 7, P 为 100%,说明鼎湖山球孢白僵菌群体具有较高的遗传多样性。由于多态位点比率不能确定扩增条带在频率上的均匀程度,同时受到样本大小和条带总数的影响,只是衡量种群遗传多样性的一个粗略估计值,在此情况下 h 和 I_s 作为衡量指标更加可靠。

2.2.2 基于寄主和土壤亚种群的遗传多样性和遗传分化分析 将鼎湖山国家级自然保护区球孢白

表 3 SSR 引物多态性指数

Table 3 Polymorphic indexes of SSR primers

引物 Primer	扩增条带数 No. of amplified bands	多态性条带 No. of polymorphic bands	多态位点比率/% Percentage of polymorphic loci (P)	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity (h)	Shannon 信息指数 Shannon's information index (I_s)
Ba6	8	8	100	0.184 6±0.182 3	0.300 7±0.242 5
Ba8	8	8	100	0.180 1±0.166 4	0.301 6±0.214 6
Ba12	10	10	100	0.169 1±0.121 8	0.291 8±0.177 1
Ba13	6	6	100	0.254 6±0.149 7	0.407 0±0.191 2
Ba16	6	6	100	0.259 0±0.129 9	0.417 0±0.162 4
Ba20	7	7	100	0.222 9±0.150 3	0.364 0±0.197 9
Ba21	6	6	100	0.251 2±0.169 0	0.397 7±0.218 8
Ba22	7	7	100	0.224 8±0.130 3	0.372 9±0.162 8
总计 Total	58	58	100	0.212 6±0.145 4	0.348 7±0.192 0
均值 Mean	7.25	7.25			

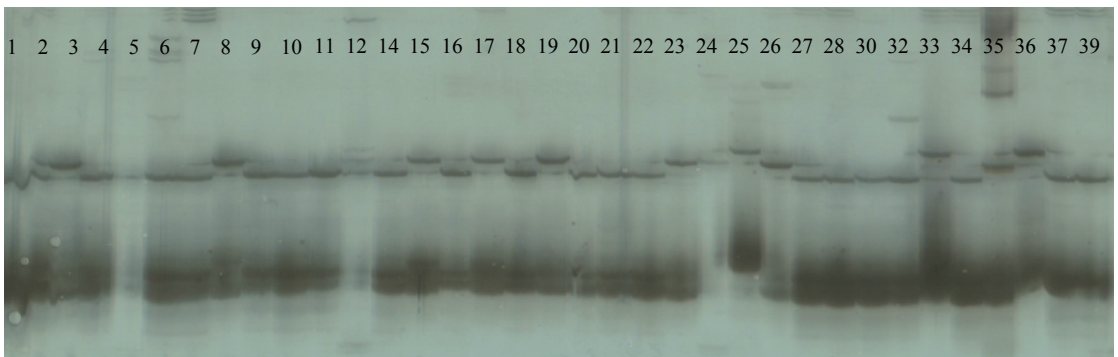


图 1 引物 Ba22 扩增建立的 SSR 指纹图谱 (样品 1~39)

Fig. 1 SSR fingerprint amplified by primer Ba22 (Strains 1-39)

僵菌种群按分离基质(寄主和土壤)划分为不同的亚群进行分析, 结果显示, 各亚种群遗传多样性指标均低于整体水平(表 4), 且指标 h 、 I_s 和 P 的变化趋势一致。寄主亚群的 h 为 0.176 9, I_s 为 0.278 3, P 为 68.97%, 均低于土壤亚群, 土壤亚群的 h 为 0.192 5, I_s 为 0.309 9, P 为 77.59%, 意味着从土壤分离出的菌株遗传多样性相对较高。总体上看, 鼎湖山地区球孢白僵菌寄主和土壤亚群多样性水平存在差异但并不明显, 意味着不同基质对球孢白僵菌群体遗传多样性产生的影响较小。

研究寄主和土壤亚种群的遗传分化和基因流发现, 鼎湖山群体总基因多样性(H_t)=0.212 5, 群内基因多样性(H_s)=0.184 7, 基因流(N_m)=1.662 9, 遗传分化系数(G_{st})=0.130 7。种群 N_m 大于阈值 1, 表明亚群体间的基因交流明显, 来自寄主和土壤的菌株并不是孤立的, 而是相互影响的。根据群体分化的划分标准^[19], 种群表现为中度分化 ($0.05 > G_{st} >$

0.15), 其总变异只有 13.07% 来自种群间, 而 86.93% 的变异存在于种群内, 表明来自不同基质的球孢白僵菌遗传分化程度较弱, 这可能与种群微生态环境的差异较小有关。

鼎湖山球孢白僵菌亚种群间遗传一致度和遗传距离的研究结果显示, 不同分离基质亚种群的遗传一致度(J)为 0.931 9, 遗传距离(D)为 0.070 5, 与种群遗传分化的结果基本一致。由于种群间的基因流较高, 导致遗传一致度高, 减少了不同亚群体间因遗传漂变引起的遗传分化。

2.2.3 基于不同寄主目亚种群的遗传多样性和遗传分化分析 将 40 株球孢白僵菌按寄主目划分为 6 个亚群, 分析不同亚群体的遗传多样性水平(表 5)。种群总体 h 和 I_s 分别为 0.176 9 和 0.278 3, 与按不同分离基质计算所得的指标一致。各亚群 P 范围在 34.48%(半翅目)~58.62%(鞘翅目), 均低于整体水平(68.97%)。 h 为 0.137 9(半翅目)~0.180 0(鳞翅目),

表 4 鼎湖山不同分离基质球孢白僵菌亚种群的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of *Beauveria bassiana* subpopulations isolated from different medium in Dinghu mountain

亚种群 Subpopulation	样本数 Sample size	观测等位基因数 Observed number of alleles (N_a)	有效等位基因数 Effective number of alleles (N_e)	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index (h)	Shannon 信息指数 Shannon's information index (I_s)	多态位点比率/% Percentage of polymorphic loci (P)
寄主 Host	40	1.689 7±0.466 7	1.290 1±0.349 8	0.176 9±0.182 5	0.278 3±0.255 4	68.97
土壤 Soil	41	1.775 9±0.420 7	1.293 1±0.289 2	0.192 5±0.158 4	0.309 9±0.226 5	77.59
鼎湖山 Dinghu mountain	81	2.000 0±0.000 0	1.318 7±0.271 8	0.212 6±0.145 4	0.348 7±0.192 0	100.00

表 5 鼎湖山不同寄主球孢白僵菌亚种群的遗传多样性

Table 5 Genetic diversity of *Beauveria bassiana* subpopulations from different insect orders in Dinghu mountain

亚种群 Subpopulation	样本数 Sample size	观测等位基因数 Observed number of alleles (N_a)	有效等位基因数 Effective number of alleles (N_e)	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index (h)	Shannon 信息指数 Shannon's information index (I_s)	多态位点比率/% Percentage of polymorphic loci (P)
鞘翅目 Coleoptera	17	1.586 2±0.496 8	1.285 1±0.368 7	0.168 5±0.191 4	0.260 0±0.269 3	58.62
鳞翅目 Lepidoptera	8	1.482 8±0.504 1	1.304 8±0.362 3	0.180 0±0.199 5	0.268 1±0.289 9	48.28
膜翅目 Hymenoptera	6	1.413 8±0.496 8	1.237 7±0.322 1	0.145 6±0.184 1	0.220 5±0.272 3	41.38
同翅目 Homoptera	4	1.413 8±0.496 8	1.303 4±0.384 3	0.172 4±0.210 5	0.250 7±0.303 7	41.38
半翅目 Hemiptera	4	1.344 8±0.479 5	1.234 5±0.339 5	0.137 9±0.194 1	0.202 9±0.283 9	34.48
直翅目 Orthoptera	1	1	1	0	0	0
总计 Total	40	1.689 7±0.466 7	1.290 1±0.349 8	0.176 9±0.182 5	0.278 3±0.255 4	68.97

I_s 为 0.202 9(半翅目)~0.268 1(鳞翅目)。各亚种群遗传多样性指标由高至低依次为鳞翅目、同翅目、鞘翅目、膜翅目、半翅目和直翅目。

进一步研究不同寄主目亚种群间的遗传分化情况, 结果表明各群体 H_t 平均值为 0.182, H_s 平均值为 0.134, 由表 6 可知, G_{st} 范围在 0.023(鞘翅目/鳞翅目)~0.568(半翅目/直翅目), N_m 范围在 0.191(半翅目/直翅目)~10.445(鞘翅目/鳞翅目)。除直翅目亚种群外的其他亚群间的 N_m 大于 1, 表明球孢白僵

菌在各寄主间的基因交流流畅, 导致分离自各目寄主的菌株遗传分化水平较低。除直翅目外的亚种群 G_{st} 最大值为 0.089(同翅目/半翅目) 仅表现为中度分化, 而鞘翅目/鳞翅目、鞘翅目/膜翅目、鞘翅目/同翅目以及鳞翅目/同翅目亚种群的遗传分化系数低于分化阈值 0.05, 表明各群体间不存在分化。综上所述, 鼎湖山地区球孢白僵菌不同寄主群体间的遗传分化较小, 各亚种群间基因交流流畅。

表 6 鼎湖山不同寄主划分的球孢白僵菌亚种群间的遗传分化和基因流¹⁾

Table 6 Genetic differentiation and gene flow among *Beauveria bassiana* subpopulations from different insect orders in Dinghu mountain

亚种群 Subpopultaion	CL	LP	HY	HO	HE	OT
鞘翅目 Coleoptera (CL)		10.445	10.326	4.960	3.522	0.396
鳞翅目 Lepidoptera (LP)	0.023		4.132	4.955	3.278	0.400
膜翅目 Hymenoptera (HY)	0.024	0.057		4.487	2.691	0.250
同翅目 Homoptera (HO)	0.048	0.048	0.053		2.571	0.357
半翅目 Hemiptera (HE)	0.066	0.071	0.085	0.089		0.191
直翅目 Orthoptera (OT)	0.387	0.385	0.500	0.412	0.568	

1) 对角线上方数据为基因流 (N_m), 下方数据为遗传分化系数 (G_{st})

1) Data above diagonal were gene flow (N_m), data below diagonal were genetic differentiation coefficient (G_{st})

2.3 聚类分析

采用 UPGMA 法对鼎湖山球孢白僵菌群体进行基于遗传相似系数的聚类分析, 结果表明, 遗传相似系数在 0.77 处, 81 株球孢白僵菌可明显聚

为 3 个分支, 其中有 49 株属于分支 I, 占总数的 60.49%, 分支 II 和 III 分别包含 5 株和 27 株。由图 2 可知, 位于不同分支的菌株分别来自于寄主或土壤, 分支 I 中的土壤菌株较多 (32 株), 分支 III 中

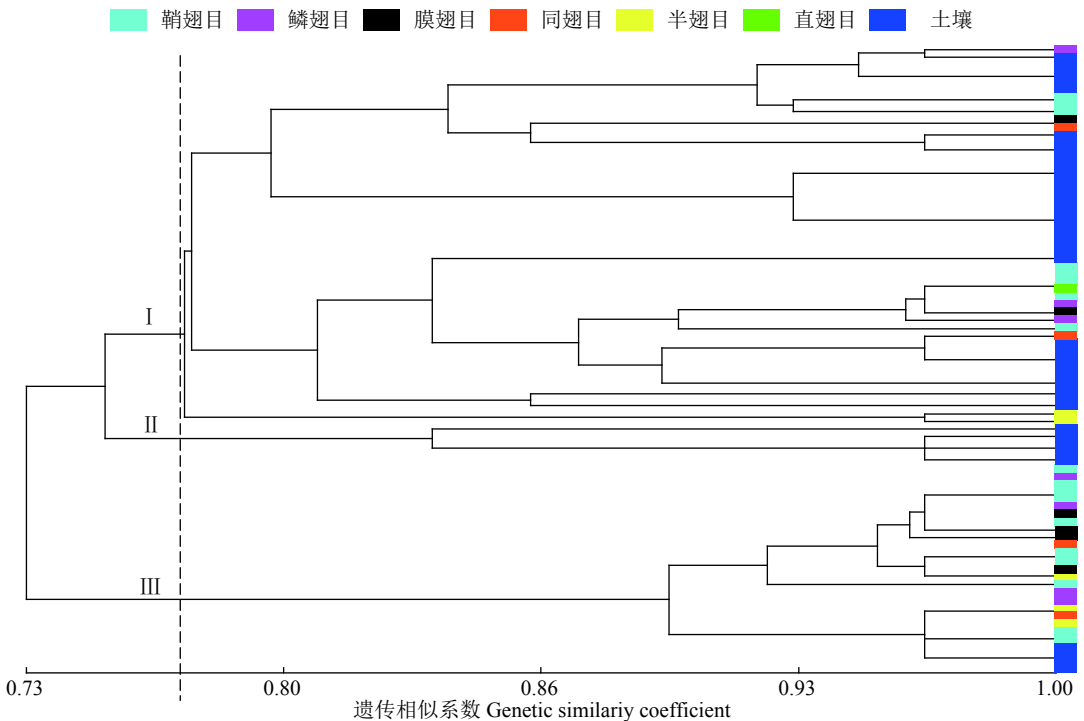


图 2 基于遗传相似系数的鼎湖山 81 株球孢白僵菌 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 81 isolates in Dinghu Mountain based on genetic similarity coefficient

的寄主菌株较多(23株),而分支II中的5株球孢白僵菌均来自土壤。种群遗传相似系数范围在0.73~1.00,所有菌株在遗传相似系数小于0.8时聚为不同分支,而分支I中(优势类群)的菌株数低于总数的70%,表明鼎湖山地区球孢白僵菌种群的优势性低异质性强,暗示着较高的遗传多样性。总体上看,鼎湖山球孢白僵菌群体并未表现出按分离基质聚类的趋势,来自寄主和土壤的菌株在各分支中随机分布。

进一步考察各分支中菌株的寄主类型发现(图2),分支I中有7株寄主为鞘翅目,4株为鳞翅目,2株为膜翅目,2株为同翅目,来自半翅目和直翅目的各有1株;分支III中来自鞘翅目寄主的菌株为9株,鳞翅目4株,膜翅目4株,半翅目3株,同翅目2株。不同寄主的菌株在2个分支中均有分布,从聚类图来看,寄主群体并未表现为按不同目进行聚类的趋势,表明鼎湖山地区球孢白僵菌对以上寄主无明显偏好,寄主专化性较弱。

3 讨论与结论

在球孢白僵菌遗传多样性的研究中,张正坤等^[20]利用10个锚定简单重复序列(Inter SSR, ISSR)引物扩增吉林省49个菌株,共扩增出90个位点,其中多态位点数86个,占比95.56%,扩增产物长度在200~1500 bp。Prabhukarthikeyan等^[9]使用15对引物用于RAPD分析,其中6对引物多态性为100%,其他引物为50.00%~88.89%,而产物片段大小在100~2500 bp。由此可见,由于SSR标记采用了特异性的双向引物,扩增片段一般小于500 bp,具有多态性高、稳定性好和检测高效等优点,为球孢白僵菌群体遗传结构和群内基因型变异的调查提供了更合理的技术方法和途径。Meyling等^[14]认为并非所有的SSR标记都适用于表征白僵菌群体的多样性,但筛选的SSR标记在白僵菌分支中能检测到最高水平的遗传变异,且一致性最高。今后在涉及白僵菌遗传结构的研究时,提前将群体按照某种要素划分后再进一步分析较为稳妥。

基于SSR标记的广东省鼎湖山国家级自然保护区球孢白僵菌遗传多样性分析表明,使用8对引物扩增81个菌株共扩增出58个位点,其中多态位点数也是58个,多态位点比率(P)为100%。群体Nei's基因多样性指数(h)为0.2126,Shannon信息指数(I_s)为0.3487,遗传多样性水平较高。胡晓磊等^[11]利用ISSR标记对我国南方地区球孢白僵菌种群进行遗传多样性分析,结果表明南方地区球孢白僵菌

的遗传多样性水平较高,种群异质性较强,且变异主要由不同采集地以及采集地内部不同微生境间的差异造成。因此以上结果可能与外部生态环境形成的选择性压力和不同生境下的物种多样性有关^[21]。

依据不同分离基质(寄主和土壤)将鼎湖山81株球孢白僵菌划分为不同的亚种群进行分析,发现土壤亚群多样性水平指标(h 为0.1925, I_s 为0.3099)略高于寄主亚种群(h 为0.1769, I_s 为0.2783),种群基因流(N_m)为1.6629,遗传分化系数(G_{st})为0.1307,意味着86.93%的变异存在于种群内,亚群体间基因交流明显,种群遗传分化程度较弱。这可能是由于自然保护区内球孢白僵菌群体微生态环境差异较小,影响了其携带的球孢白僵菌群体间的遗传分化。李旻等^[22]应用ISSR标记对安徽大别山地区的球孢白僵菌遗传多样性进行了研究,结果表明遗传变异主要来自居群内,各居群间的群体遗传变异较小,与本研究结果基本一致。有研究表明,由真菌孢子扩散与传播而导致的基因流在很大程度上影响着真菌群体的遗传结构^[23],更重要的是球孢白僵菌的生活史是腐生和寄主交替进行,该特征在某一地区寄主零星分布时对菌株的存活非常有利^[24]。在球孢白僵菌流行时菌株可通过介质的流动而进入土壤中宿存,等待时机继续侵染不同寄主昆虫以延续自身的传播和流行。同时土壤中本身就存在一定数量稳定的球孢白僵菌群体,例如存在于根际的球孢白僵菌等,在综合作用下很可能导致土壤亚群表现出相对较高的多样性水平。

本研究将来自寄主的40株球孢白僵菌根据不同寄主目划分为6个亚群体进行遗传多样性分析,结果表明鳞翅目、同翅目和鞘翅目亚种群的多样性水平较高,而半翅目亚种群多样性水平最低。进一步考察球孢白僵菌不同寄主目亚群体间的遗传分化,发现不同寄主目亚群体间的遗传分化程度较弱。不同亚群体间的基因流造成整个群体的遗传一致度高,减少了不同亚群体间因遗传漂变引起的遗传分化。Luan等^[25]通过ISSR标记对中国安徽引起蝗螂流行病的球孢白僵菌群体进行了遗传结构分析,结果显示这些菌株被划分为5个致病型,且来自不同蝗螂种的球孢白僵菌分离株间存在明显的基因流,表明这些菌株缺乏寄主专化性。这一结果支持球孢白僵菌不是寄主专性的种类,而是世界广布、寄主谱广的机会性昆虫病原的观点。基于遗传相似系数的UPGMA聚类分析结果表明,鼎湖山球孢白僵菌群体并未表现按不同分离基质聚类的趋势,来自寄主和土壤的菌株在各分支中随机分布。同时整个群

体表现为优势性低异质性高,意味着群体遗传多样性较高。将聚类分析中的菌株进一步具体到寄主目,发现不同寄主目菌株在含有寄主的 2 分支中均有分布,这 2 分支中的菌株也并未按照不同寄主目分别聚在不同的分支,这表明球孢白僵菌对上述寄主无明显偏好,寄主专化性较弱。

综上所述,不同生态环境、分离基质和寄主类型的影响共同维持了鼎湖山自然保护区球孢白僵菌种群遗传变异的多样性,防止近交衰退。本研究结果有助于对鼎湖山自然保护区球孢白僵菌群体遗传结构、基因流和遗传分化有更全面地认识,通过理解不同影响因素在球孢白僵菌群体遗传变异中的作用,为筛选优良的生产菌株提供充足的种质资源。

参考文献:

- [1] 李增智. 球孢白僵菌的昆虫寄主名录[J]. 中国虫生真菌研究与应用, 1988, 1(1): 240-255.
- [2] MEYLING N V, EILENBERG J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control[J]. *Biol Control*, 2007, 43(2): 145-155.
- [3] 李增智. 我国利用真菌防治害虫的历史、进展及现状[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 699-711.
- [4] RODRIGUEZ-GONZÁLEZ Á, MAYO S, GONZÁLEZ-LÓPEZ Ó, et al. Inhibitory activity of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma* spp. on the insect pests *Xylotrichus arvicola* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrisomelidae: Bruchinae)[J]. *Environ Monit Assess*, 2017, 189(12): 1-8.
- [5] 李鸿文, 冯明光. 球孢白僵菌不同菌株分生孢子的耐热能力[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2008, 34(2): 158-162.
- [6] ST LEGER R J, ALLEE L L, MAY B, et al. World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp.[J]. *Mycol Res*, 1992, 96(12): 1007-1015.
- [7] FERNANDES E K K, MORAES A M L, PACHECO R S, et al. Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: Comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species[J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(3): 760-774.
- [8] GARRIDO-JURADO I, MARQUEZ M, ORTIZ-URQUIZA A, et al. Genetic analyses place most Spanish isolates of *Beauveria bassiana* in a molecular group with world-wide distribution[J]. *BMC Microbiol*, 2011, 11(1): 84.
- [9] PRABHUKARTHIKEYAN S R, KEERTHANA U, ARCHANA S, et al. Analysis of genetic diversity among different isolates of *Beauveria bassiana* by RAPD PCR[J/OL]. *J Biol Control*, 2017, 31 (1). <https://doi.org/10.18311/jbc/2017/15581>.
- [10] WANG C, SHAH F A, PATEL N, et al. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*[J]. *Environ Microbiol*, 2003, 5(10): 908-915.
- [11] 胡晓磊, 何玲敏, 陈雪, 等. 中国南方球孢白僵菌的遗传多样性和种群遗传结构[J]. *中国生物防治学报*, 2013, 29(1): 31-41.
- [12] 何玲敏, 胡晓磊, 陈雪, 等. 中国北方球孢白僵菌的遗传多样性和种群遗传结构[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(11): 3087-3095.
- [13] MEYLING N V, LUBECK M, BUCKLEY E P, et al. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats[J]. *Mol Ecol*, 2009, 18(6): 1282-1293.
- [14] MEYLING N V, PILZ C, KELLER S, et al. Diversity of *Beauveria* spp. isolates from pollen beetles *Meligethes aeneus* in Switzerland[J]. *J Invert Pathol*, 2012, 109(1): 76-82.
- [15] 王滨, 樊美珍, 李增智. 球孢白僵菌选择性培养基的筛选[J]. *安徽农业大学学报*, 2000, 27(1): 23-28.
- [16] 蔡悦. 球孢白僵菌的繁殖与自然群体交配型关系的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [17] 蒲顺昌, 秦丽, 陈名君, 等. 马尾松林中球孢白僵菌寄主转移和专化性的 SSR 标记分析[J]. *菌物学报*, 2013, 32(4): 698-709.
- [18] 盖红梅, 任民. SSR 数据处理宏程序 DataTrans 1.0 [J/OL]. 分子植物育种 (网络版), 2011, 9 (48): 1359-1365. <http://mpb.chinese.sophiapublisher.com>.doi:10.5376/mpb.cn.2011.09.0048
- [19] TAKAHATA N, NEI M. Fst and Gst Statistics in the finite island model[J]. *Genetics*, 1984, 107(3): 501-504.
- [20] 张正坤, 孟鑫睿, 张佳诗, 等. 吉林省球孢白僵菌遗传多样性与亚洲玉米螟化性相关性分析[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(6): 836-844.
- [21] AMOS W, HARWOOD J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations[J]. *Philos Trans R Soc B: Biol Sci*, 1998, 353(1366): 177-186.
- [22] 李旻, 王四宝, 樊美珍, 等. 森林生态系中球孢白僵菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *遗传*, 2006, 28(8): 977-983.
- [23] 陈雪娇, 李云飞, 孙娟娟, 等. 利用 ISSR 标记分析红脂大小蠹微生境中球孢白僵菌遗传多样性[J]. *菌物学报*, 2014, 33(5): 1015-1024.
- [24] BIDOCHKA M, MENZIES F, KAMP A. Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences[J]. *Arch Microbiol*, 2002, 178(6): 531-537.
- [25] LUAN F, ZHANG S, CAI Y, et al. Identification of the molecular origin and development of a panzootic caused by *Beauveria bassiana* in praying mantis populations in eastern China[J]. *J Invert Pathol*, 2011, 108: 98-105.