

玉米根际球孢白僵菌群体遗传多样性的 ISSR 分析

齐永霞, 陈方新

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

摘要 为了明确玉米根际球孢白僵菌的遗传分化情况及亲缘关系,通过 ISSR-PCR 分子标记技术对分离自玉米根际的球孢白僵菌的遗传多样性进行了研究。从 40 个引物中共筛选出 11 个多态性高、稳定性好的引物用于正式的扩增分析,在 37 个菌株中共扩增出 83 条谱带,其中多态性条带占 69 条,多态性百分率为 83.13%。平均每引物扩增条带在 7.5 条。群体的多态位点百分率(PPL)为 83.13%,Nei 基因多样性指数(H)为 0.316 9,Shannon 信息指数(I)为 0.465 7。结果表明,分离自安徽省涡阳、萧县、蒙城三个地区的球孢白僵菌具有较高的遗传多样性。研究结果对进一步探讨玉米根际球孢白僵菌不同菌株的生防效果具有重要意义。

关键词 球孢白僵菌; 分子标记; 遗传分化; 遗传多样性

中图分类号: S 476.12 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2017184

Genetic diversity of *Beauveria bassiana* in maize rhizosphere by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers

QI Yongxia, CHEN Fangxin

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

Abstract To identify the genetic differentiation and genetic relationships among the isolates of *Beauveria bassiana* from maize rhizosphere, the genetic diversity of 37 *B. bassiana* strains was estimated by using inter-simple sequence repeats (ISSR) markers. Eleven of 40 ISSR primers were chosen for analysis of their reproducibility and high polymorphism. Each primer resulted in 7.5 markers and totally 83 fragments were amplified, in which 69 (83.13%) were polymorphic. Genetic diversity analysis revealed a relatively high level of intraspecific genetic diversity of *B. bassiana*. The percentage of polymorphic loci (PPL) was 83.13%; Nei's genetic diversity (H) was 0.316 9 and Shannon's information index (I) was 0.465 7. It suggested that the 37 *B. bassiana* strains isolated from Guoyang, Xiaoxian and Mengcheng had high genetic diversity. The results were of great significance for further studying the biological control effect of *B. bassiana* strains.

Key words *Beauveria bassiana*; molecular marker; genetic differentiation; genetic diversity

白僵菌 *Beauveria* sp. 是重要的生物防治资源,据报道,白僵菌可用于防治农、林、卫生等多种害虫,均取得良好的效果^[1-3]。球孢白僵菌 *B. bassiana* 是白僵菌属中最著名的种,其在自然界的寄主范围广泛,可侵染 15 目 149 科 700 多种昆虫,是极有利用价值的虫生真菌^[4-7]。随着分子生物学技术的飞速发展和新技术的不断涌现,人们已经开始利用分子生物学的研究技术对虫生真菌的遗传多样性进行研究,从而弥补了形态和培养性状高度变异给传统分类方法带来的困扰,给种下菌株的亲缘关系鉴定提供了可

靠的依据,有助于加强对虫生真菌遗传多样性的研究,并为释放菌株的检测和追踪提供可靠的依据。

迄今为止,已有多种 DNA 分子标记技术用于白僵菌的群体遗传多样性研究。丁德贵等^[8]利用酯酶同工酶研究了球孢白僵菌种群在松林中的寄主转移及遗传多样性对松毛虫持续控制的影响,分析结果表明松林中球孢白僵菌呈现出丰富的遗传多样性。方志刚等^[9]、林华峰等^[10]采用 RAPD 技术分析了球孢白僵菌菌株的遗传分化,发现菌株间具有较丰富的遗传多态性,且菌株 DNA 多态性与采集地

之间有一定的相关性。陈名君等^[11]利用 28S rDNA I 型内含子技术研究了琅琊山球孢白僵菌菌株的遗传多样性,结果显示同一地区的菌株在固定时间内有较丰富的菌株类型,种群的遗传结构多样化。ISSR(inter-simple sequence repeats,简称 ISSR)技术是一种新型的分子标记,在真菌的遗传多样性研究中广泛应用^[12]。该技术依据 SSR 广泛存在于真核基因组中,利用基因组中常出现的 SSR 本身设计引物,对 SSR 之间的序列进行扩增,其扩增的引物长度为 16~18 个碱基,引物通常由 1~4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成,不需要预先克隆和测序^[13-15]。与 RAPD 和 AFLP 等分子标记相比,由于其引物序列较长,退火温度高,DNA 用量小、安全性较高,可以快速、高效和灵敏地检测出基因组 DNA 的多态性,而且操作简单、成本较低,具有更高的重复性,是一种非常理想的检测种内遗传变异的分子标记^[16-17]。李旻等^[18]应用 ISSR 分子标记技术研究了安徽省大别山区不同海拔高度和不同时间段采集到的球孢白僵菌的遗传多样性,发现安徽省大别山区球孢白僵菌存在较高的遗传多样性,其中,种群间遗传变异相对较小,种群内表现出较高水平的遗传分化。胡晓磊等^[19]用 ISSR 技术分析了我国南方球孢白僵菌的遗传多样性及种群遗传结构,结果显示我国南方球孢白僵菌的遗传多样性水平较高,且种群异质性较强。

研究表明,球孢白僵菌广泛分布于不同的生态环境中,其中包括植物根际和组织^[20-21]。玉米是安徽省重要的粮、饲作物,其在生长过程中经常遭受地下害虫及土传病害的危害,为了了解球孢白僵菌在玉米根际的分布情况,作者从安徽省涡阳县、萧县和蒙城县 3 个玉米种植区广泛采集根际土样,通过稀释分离法共分离获得 37 个球孢白僵菌菌株^[22]。本文采用 ISSR-PCR 技术,旨在从分子水平上探明来自不同地区的玉米根际球孢白僵菌群体遗传结构及亲缘关系,探讨球孢白僵菌菌株 DNA 图谱与菌株的地理来源之间的相关性,为进一步研究 37 个菌株对玉米地下害虫及土传病害的生物防治效果提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的 37 个球孢白僵菌菌株从安徽省涡阳县、萧县、蒙城县采集的玉米根际土壤中分离获得,经形态学方法结合 rDNA ITS 鉴定为球孢白僵菌,其中

涡阳县 22 株,编号为 GY-1~GY-4、GY-6~GY-20、GY-22、GY-23、GY-25;蒙城县 9 株,编号为 MC-2、MC-7~MC-14;萧县 6 株,编号为 XX-1、XX-3、XX-5、XX-6、XX-12、XX-13。

SDAY 培养基^[23]:酵母浸出粉 10 g;蛋白胨 10 g;葡萄糖 40 g;琼脂 15 g;水 1 000 mL。

Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;dNTPs、DNA marker 等购于上海生工生物工程股份有限公司。40 个 ISSR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2 球孢白僵菌菌丝体制备

将供试菌株制成孢子悬浮液,取 0.2 mL 转接于铺有玻璃纸的 SDAY 培养基平板上,倒置于恒温光照培养箱中 25℃培养 4~6 d,将长满全皿而未大量产孢的菌丝体在无菌条件下取出,置于 5 mL 的灭菌离心管中,经冷冻干燥后于-20℃保存备用。

1.3 球孢白僵菌基因组 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法^[24]提取球孢白僵菌基因组 DNA。以 1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA。用 Eppendorf 分光光度计测得浓度后将样品浓度稀释到 50 ng/μL 备用。

1.4 球孢白僵菌的 ISSR 分析

1.4.1 引物的筛选

为了得到有效的 ISSR 分子标记,对合成的 40 条 ISSR 引物进行了前期预筛选试验。以 GY-1~GY-6、MC-2、MC-6、XX-1 和 XX-3 共 10 个菌株的 DNA 为模板,在 25 μL 反应体系中进行引物扩增效果及可重复性检测。最终从 40 条引物中选出 11 条扩增条带清晰、重复性好及多态性高的 ISSR 引物用于 37 个菌株的 PCR 扩增,引物编号及序列见表 1。

表 1 ISSR 扩增所用引物及其核苷酸序列¹⁾

Table 1 The primers used and their nucleotide sequences of ISSR		
引物号 Primer code	序列(5'-3') Sequence	复性温度/℃ Annealing temperature
P6	(AG) ₈ S	54
P11	(AG) ₈ C	54
P15	G(ACAG) ₃ ACAC	54
P19	DD(CCA) ₅	53.5
P53	(GTC) ₅ TC	54
P59	(AG) ₈ YC	50
UBC813	(CT) ₈ A	48
UBC834	(AG) ₈ YT	49
UBC807	(AG) ₈ T	50
UBC825	(AC) ₈ T	50
UBC821	(GT) ₈ T	49

1) Y=(C, T); S=(C, G); D=(A, G, T)。

1.4.2 ISSR-PCR 分析

ISSR-PCR 扩增反应采用 25 μL 反应体系:超纯

水(ddH₂O) 19.5 μL, 10× Buffer 缓冲液(含 Mg²⁺) 2.5 μL, dNTPs(浓度 2.5 mmol/L) 1.25 μL, 引物(浓度 10 μmol/L) 0.1 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL, 50 ng/μL 模板 DNA 0.5 μL。

ISSR-PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 复性温度复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

每个引物重复试验 3 次, 每次反应均设不加模板的空白对照。扩增结果用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 数据分析

将 ISSR 电泳胶图进行人工读带, 每条扩增片段计作 1 个多态性位点。ISSR 是显性标记, 每个样品的扩增带按照有或无记录, 有带记为 1, 无带记为 0。将 DNA 凝胶电泳图谱转换为数字矩阵。通过 NT-SYS-pc 2.1 生物软件进行 UPGMA 聚类分析, 构建各菌株的亲缘关系树状图, 利用 POPGEN 32 软件对全部种群和各单个种群分别进行遗传参数分析, 分别计算观测等位基因数(*N_a*)、有效等位基因数(*N_e*)、Nei(1973) 基因多样性指数(*H_e*)、Shannon 信息多样性指数(*I*)、多态位点百分率(*PPL*)、群体内基因多样性(*H_s*)、群体总基因多样性(*H_t*)、群体间的遗传分化系数(*G_{st}*)、Nei(1978) 遗传距离(*D*) 和遗传一致度(*I*) 等。

2 结果与分析

2.1 球孢白僵菌 ISSR 扩增产物的多态性

通过预试验, 对 40 条 ISSR 引物进行筛选, 调整确定不同引物的退火温度, 最终筛选出扩增条带清晰、结果稳定, 多态性好的 11 条引物对 37 个球孢白僵菌菌株进行多态性检测。由表 2 可以看出, 这 11 个引物均能从供试的 37 个菌株中扩增出清晰明亮条带, 条带分布合理。不同引物共扩增出 83 条谱带, 其中多态性谱带为 69 条, 多态性百分率为 83.13%。引物 P59((AG)₈YC) 扩增出的条带最多, 条带数为 12 条, 多态性条带为 10 条, 多态位点比率为 83.33%。引物 P6、P11、UBC813 和 UBC825 扩增条带的多态性位点比例最高, 均为 100%。引物 UBC813((CT)₈A) 扩增出的条带数最少, 只有 2 条。平均每个引物扩增的条带数为 7.5 条。结果表明, 11 个引物都具有一定的标记多态性, ISSR 标记能产生各自有效的多态性条带, 但多态性水平各不相同。为了分析地理来源对球孢白僵菌遗传多样性的影响, 供试菌株选自安徽省涡阳县、萧县和蒙城县三个不同的地区, ISSR 标记结果显示安徽省玉米根际球孢白僵菌存在丰富的遗传多样性, 但所测试的 11 个引物中没有能反映菌株与地理来源有特异性宗谱的特异引物。引物 P59 和 UBC834 的 ISSR 图谱见图 1。

表 2 供试引物及扩增特征

Table 2 Inter-simple sequence repeats (ISSR) primers and their properties

引物号 Primer code	扩增总条带数/条 No. of amplified bands	多态性条带数/条 No. of polymorphic bands	多态位点百分率/% Percentage of polymorphic loci	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index (<i>H_e</i>)
P6	8	8	100	0.302 9
P11	7	7	100	0.410 6
P15	10	7	70	0.237 6
P19	8	7	87.5	0.343 9
P53	7	6	85.7	0.319 5
P59	12	10	83.3	0.360 4
UBC813	2	2	100	0.467 7
UBC834	8	6	75	0.296 3
UBC807	8	6	75	0.252 2
UBC825	5	5	100	0.376 7
UBC821	8	5	62.5	0.263 4

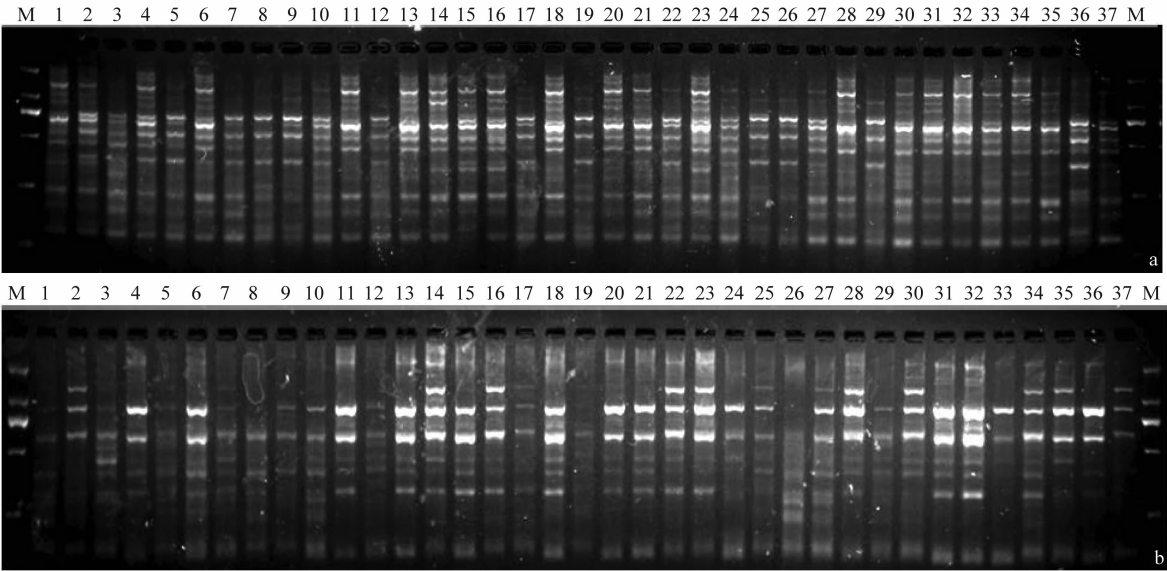
2.2 球孢白僵菌遗传多样性与群体遗传变异

对采自安徽省不同地区的 37 个菌株的群体遗传多样性研究结果表明: 在物种总体水平上, 球孢白僵菌具有很高的多态位点百分率(*PPL*), *PPL* = 83.13%(表 3), 平均每个位点的有效等位基因数

N_e = (1.558 9 ± 0.364 6), Nei 基因多样性指数 *H_e* = (0.316 9 ± 0.183 0), Shannon 信息指数 *I* = (0.465 7 ± 0.250 9)。在种群水平上, 各种群的多态位点百分率差异较大, 其中涡阳白僵菌种群的多态位点百分率(*PPL*) 为 81.93%, Nei 基因

多样性指数(*He*)为 0.319 7,Shannon 信息多样性指数(*I*)为 0.467 4;而蒙城白僵菌种群的多态位点百分率(*PPL*)为 68.67%,*Nei* 基因多样性指数(*He*)为 0.288 1,Shannon 信息多样性指

数(*I*)为 0.415 3;萧县白僵菌种群的多态位点百分率(*PPL*)为 39.76%,*Nei* 基因多样性指数(*He*)为 0.168 6,Shannon 信息多样性指数(*I*)为 0.242 8。



M: DL 2000 DNA Marker; 1~22: GY-1~GY-4, GY-6~GY-20, GY-22, GY-23, GY-25; 23~31: MC-2, MC-7~ MC-14; 32~37: XX-1, XX-3, XX-5, XX-6, XX-12, XX-13

图 1 引物 P59(a)和 UBC834(b)对白僵菌的 ISSR 图谱

Fig. 1 ISSR profiles of 37 DNA samples from *Beauveria bassiana* by the primers P59 (a) and UBC834 (b)

表 3 白僵菌地理种群内的遗传多样性

Table 3 Genetic variation in geographical populations of *Beauveria bassiana*

种群 Population	等位基因数 <i>Na</i>	有效等位基因数 <i>Ne</i>	<i>Nei</i> 's 基因多样性指数 <i>He</i>	Shannon's 信息多样性指数 <i>I</i>	多态位点百分率/% <i>PPL</i>
涡阳 GY	1.819 3±0.387 1	1.567 4±0.366 9	0.319 7±0.185 8	0.467 4±0.256 9	81.93
蒙城 MC	1.686 7±0.466 6	1.528 0±0.418 4	0.288 1±0.214 4	0.415 3±0.299 8	68.67
萧县 XX	1.397 6±0.492 4	1.307 3±0.406 6	0.168 6±0.217 1	0.242 8±0.308 5	39.76
物种水平 At species level	1.831 3±0.376 7	1.558 9±0.364 6	0.316 9±0.183 0	0.465 7±0.250 9	83.13

2.3 球孢白僵菌种群遗传分化程度的比较分析

用 POPGENE 32 计算出的遗传变异结果表明(表 4):白僵菌各种群间存在一定的遗传分化,3 个种群总的遗传多样性为 0.301 1,其中种群内遗传多样性为 0.258 8,*Nei* 基因分化系数为 0.140 4,表明有 14.04%的遗传变异存在于种群间,有 85.96%的遗传变异存在于种群内,种群内的遗传分化大于种群间的分化。种群间的基因流为 1.530 8。由表 3~5 可以看出,三个不同种群间的基因流动及其所引起的基因分化差异较大,其中涡阳县与蒙城县的基因流最大(4.563 7),基因分化系数最小(0.051 9),而两采样点的地理位置距离为 44 km。蒙城县与萧县的基因流最小(1.237 1),基因分化系数最大(0.168 1),两采样点的地理位置距离为 133 km。涡阳县与萧

县的基因流为 1.889 7,基因分化系数为 0.116 8,两采样点的地理位置距离为 84 km。表明遗传分化系数与地理位置没有一定的相关性。

表 4 白僵菌种群基因多样性 *Nei*'s 分析¹⁾

Table 4 Analysis of *Nei*'s gene diversity in *Beauveria bassiana* populations

种群 Population	总基因 多样性 <i>Ht</i>	种群内 基因多样性 <i>Hs</i>	基因 分化系数 <i>Gst</i>	基因流 <i>Nm</i>
平均 Mean	0.301 1	0.258 8	0.140 4	1.530 8
标准差 Standard deviation	0.034 0	0.027 8	—	—

1) *Ht* 为总基因多样性;*Hs* 为种群内基因多样性;*Gst* 为基因分化系数;*Nm* 为基因流。
Ht, Total gene diversity; *Hs*, Gene diversity within populations; *Gst*, Coefficient of gene differentiation; *Nm*, Gene flow.

表 5 白僵菌不同地理种群间的基因流和基因分化系数¹⁾
Table 5 Gene flow (*Nm*) and genetic differentiation coefficient (*Gst*) of *Beauveria bassiana* in different regions

种群 Population	涡阳 Guoyang	蒙城 Mengcheng	萧县 Xiaoxian
涡阳 Guoyang	—	4.563 7	1.889 7
蒙城 Mengcheng	0.051 9	—	1.237 1
萧县 Xiaoxian	0.116 8	0.168 1	—

1) 对角线上方数字为基因流 *Nm*, 对角线下方的数字为基因分化系数 *Gst*。
Upper diagonal is gene flow (*Nm*) and lower diagonal was genetic differentiation coefficient (*Gst*)。

2.4 不同地理区域白僵菌种群的遗传距离和遗传一致度

利用 POPGENE 32 软件对涡阳县、萧县和蒙城县 3 个种群两两种群间的 Nei 遗传一致度(*I*)和标准遗传距离(*D*)进行分析发现,不同地区间的遗传距离(*D*)在 0.048 8~0.124 4 之间,平均为 0.085 8;遗传一致度(*I*)在 0.883 0~0.952 4 之间,平均为 0.918 1 (表 3~6)。其中,涡阳、蒙城之间的遗传一致度最高(0.952 4),遗传距离最近(0.048 8);蒙城与萧县

之间的遗传一致度最低(0.883 0),遗传距离最远(0.124 4)。

表 6 白僵菌不同地理种群间的遗传一致度和遗传距离¹⁾
Table 6 Genetic identity (*I*) and genetic distance (*D*) of *Beauveria bassiana* in different regions

种群 Population	涡阳 Guoyang	蒙城 Mengcheng	萧县 Xiaoxian
涡阳 Guoyang	—	0.9524	0.9191
蒙城 Mengcheng	0.048 8	—	0.883 0
萧县 Xiaoxian	0.084 3	0.124 4	—

1) 对角线上方数字为 Nei 遗传一致度, 对角线下方的数字为 Nei 标准遗传距离。
Upper diagonal is Nei's genetic identity (*I*) and lower diagonal was Nei's standard genetic distance (*D*)。

2.5 聚类分析

根据供试菌株 ISSR-PCR 扩增条带的有无,以 0,1 记数,统计稳定、清晰出现的条带,根据个体间的相似系数,采用 NTSYS-PC 软件对数据进行 UP-GMA 聚类分析,构建 37 个球孢白僵菌菌株的遗传亲缘关系图谱。

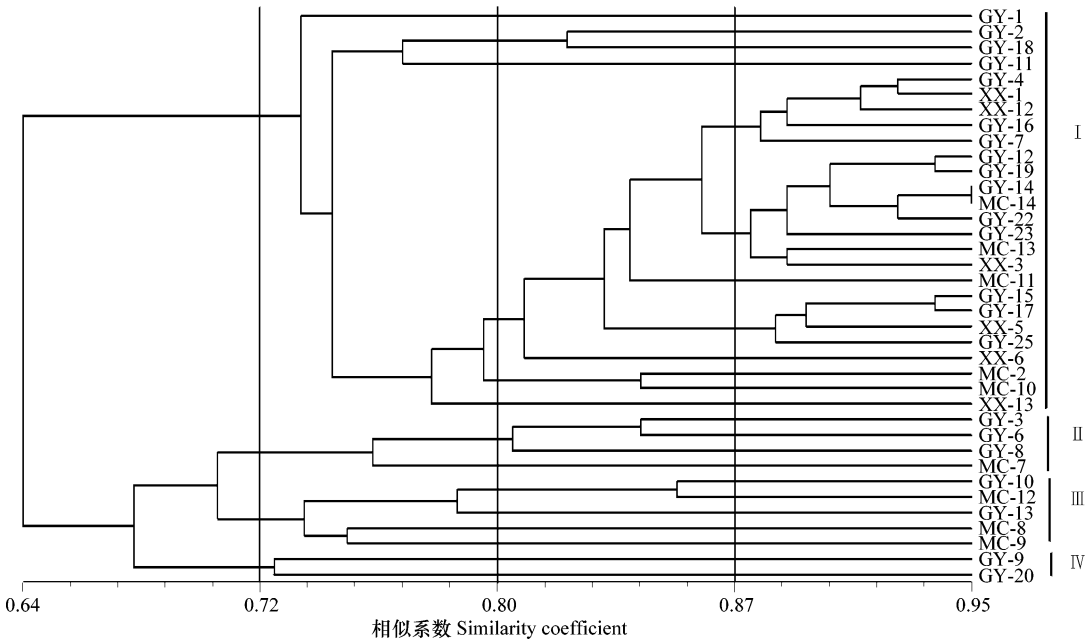


图 2 白僵菌 UPGMA 聚类图
Fig. 2 Dendrogram of UPGMA for 37 *Beauveria bassiana* isolates based on ISSR markers

从 ISSR 聚类图(图 2)可以看出,37 个供试菌株在 SM 相似系数为 0.64 时聚在一起,在相似系数为 0.72 时明显聚成四大类群:第一大类群(I 类)包含 GY-1、GY-2、GY-18、GY-11、GY-4、XX-1、XX-12、GY-16、GY-7、GY-12、GY-19、GY-14、MC-14、GY-22、GY-23、MC-13、XX-3、MC-11、GY-15、GY-17、XX-5、

GY-25、XX-6、MC-2、MC-10 和 XX-13 共 26 个菌株;第二大类群(II 类)包含 GY-3、GY-6、GY-8 和 MC-7 4 个菌株;第三大类群(III 类)是 GY-10、MC-12、GY-13、MC-8 和 MC-9 5 个菌株;第四大类群(IV 类)是 GY-9 和 GY-20 2 个菌株。其中,GY-14 和 MC-14 菌株亲缘关系最近,遗传相似系数达到

0.95。图2还可以看出,37个供试菌株并没有按照地理种群各自聚在一起,这进一步说明了种群间存在较少的遗传变异。

3 讨论与结论

ISSR分子标记与RAPD和AFLP等分子标记相比,由于其引物序列较长,退火温度高,具有更高的重复性,且操作简便,是一种理想的检测种内遗传变异的分子标记^[25-30]。但对于ISSR分子标记来说,不同引物的退火温度对试验结果的影响较大。退火温度过低,扩增特异性差,杂带较多,背景深;退火温度过高,引物与模板结合差,电泳条带弱,甚至没有扩增。在进行0/1矩阵统计时无法区分是否是杂带,或电泳条带弱,肉眼很难判断而导致一些有用位点被舍弃,杂带计入较多,直接导致试验结果的偏差,从而导致前期结果的偏差。本研究通过前期试验,调整了部分引物的退火温度。但本试验未研究分析其他因素例如仪器型号、反应体积等可能对扩增产物的影响。

作者通过预扩增试验从40个引物中筛选出扩增结果稳定,多态性好的11个引物对37个球孢白僵菌菌株进行了多态性扩增,分析扩增图谱发现,ISSR引物表现出很高的遗传多态性,多态性谱带达到了83.13%,并且扩增结果均具有很好的重复性。因此,ISSR分子标记是研究白僵菌等虫生真菌遗传多样性、群体结构等的有效方法。

采用POPGENE 32软件对采自安徽省不同地区的37个菌株的群体遗传多样性进行了分析,结果显示从安徽省3个不同地区分离的球孢白僵菌的遗传多样性水平较高,多态位点百分率(PPL)达到83.13%,Nei基因多样性指数为0.316 9,Shannon信息指数为0.465 7。遗传变异结果表明白僵菌各种群间存在一定的遗传分化,3个种群总的遗传多样性为0.301 1,其中种群内遗传多样性为0.258 8,Nei基因分化系数为0.140 4。采用NTSYS-PC软件,根据个体间的遗传距离构建出37个球孢白僵菌菌株的遗传亲缘关系图谱,结果显示37个供试菌株并没有按照地理种群各自聚在一起,聚类组的划分与地理来源无直接的相关性,这进一步说明了种群间存在较少的遗传变异,分析其原因可能是供试的37个球孢白僵菌菌株均分离自玉米根际土壤,而存在于根际土壤中的球孢白僵菌会受到土壤中复杂环境因素的影响。

响,为了适应相应的环境变化可能发生变异。本研究结果显示涡阳种群涉及所有类群,表明该种群的遗传异质性最高;其次是蒙城种群,不涉及第Ⅲ类群;而萧县种群的遗传异质性最低,所有7个菌株全部聚在第Ⅰ大类中。

参考文献

- [1] 苏筱雨,王婧,任晓婧,等. 美国白蛾高毒力白僵菌菌株的紫外线诱变育种[J]. 林业科学,2016,52(7):165-169.
- [2] 王义勋,王星冉,陈京元,等. 马尾松毛虫高毒力白僵菌菌株筛选[J]. 南方农业学报,2016,47(5):662-666.
- [3] REHNER S A, BUCKLEY E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs [J]. *Mycologia*, 2005, 97(1): 84-98.
- [4] LR D, LOPEZ F L, LIEDO P. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions [J]. *Journal of Economic Entomology*, 2016, 95(1): 36-43.
- [5] SEITER N J, GRABKE A, GREENE J K, et al. *Beauveria bassiana* is a pathogen of *Megacopta cribraria* (Hemiptera: Plataspidae) in South Carolina [J]. *Journal of Entomological Science*, 2016, 49(3): 326-330.
- [6] Galidevara S, Reineke A, Koduru U D. *In vivo* expression of genes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection of lepidopteran larvae [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2016, 136: 32-34.
- [7] ORESTE M, BUBICI G, POLISENO M, et al. Effect of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the *Trialeurodes vaporariorum*-*Encarsia formosa* system [J]. *Journal of Pest Science*, 2016, 89(1): 153-160.
- [8] 丁德贵,李增智,樊美珍,等. 球孢白僵菌种群在松林的寄主转移及遗传多样性对松毛虫持续控制的影响[J]. 应用生态学报, 2004,15(12):2315-2320.
- [9] 方志刚,张立钦,林新春. 不同球孢白僵菌菌株DNA的RAPD分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2001,25(4):65-68.
- [10] 林会峰,黄勃,李增智,等. 白僵菌不同菌株DNA扩增图谱与其来源的相关性分析[J]. 菌物系统,1999,18(1):73-78.
- [11] 陈名君,张中,樊美珍,等. 利用28S rDNA I型内含子研究琅琊山球孢白僵菌菌株的遗传多样性[J]. 菌物学报,2006,25(4):559-566.
- [12] ZIETKIEWICZ E, RAFALSK A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genome*, 1994, 20(2): 176-183.
- [13] 黄雯雯,王玲,刘连盟,等. 水稻纹枯病立枯丝核菌的分类及遗传多样性研究进展[J]. 中国稻米,2010,16(3):34-38.
- [14] 徐玉梅,刘小妹,王建明. ISSR标记技术在植物病原真菌研究

中的应用[J]. 中国农学通报, 2011, 27(9): 358 - 361.

- [15] 柳青, 李燕, 王德海, 等. 基于 ISSR 分子标记技术的稻水象甲遗传多样性研究[J]. 环境昆虫学报, 2016, 38(1): 102 - 112.
- [16] 李新风, 张光明, 畅引东, 等. 21 株马特组镰刀菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 应用生态学报, 2012, 23(5): 1339 - 1344.
- [17] XU G H, SU W Y, SHU Y J, et al. RAPD and ISSR-assisted identification and development of three new SCAR markers specific for the *Thinopyrum elongatum* E (Poaceae) genome [J]. Genetics & Molecular Research, 2012, 11(2): 1741.
- [18] 李旻, 王四宝, 樊美珍, 等. 森林生态系统中球孢白僵菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 遗传, 2006, 28(8): 977 - 983.
- [19] 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.
- [20] BING L A, LEWIS L C. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant growth stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner) [J]. Biocontrol Science and Technology, 1992, 2: 39 - 47.
- [21] OWNLEY B H, DEE M M, GWINN K D. Effect of conidial seed treatment rate of entomopathogenic *Beauveria bassiana* 11 - 98 on endophytic colonization of tomato seedlings and control

of Rhizoctonia disease [J]. Phytopathology, 2008, 98: S118.

- [22] 陈方新, 梅玉云, 张强, 等. 玉米根际土球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana*) 的分离与鉴定[J]. 核农学报, 2016, 30(1): 58 - 64.
- [23] 蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996.
- [24] 易润华, 朱西儒, 周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA [J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23(6): 72 - 73.
- [25] 高蕾, 姚雷. 9 个油用玫瑰品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2010, 28(5): 449 - 452.
- [26] 贾定洪, 郑林用, 王波, 等. 22 个毛木耳菌株的 ISSR 分析[J]. 西南农业学报, 2010, 23(5): 1595 - 1598.
- [27] 黄姝博, 胡永红, 吴冬, 等. 福建地区小叶亚麻藤遗传多样性 ISSR 分析[J]. 广西植物, 2010, 30(5): 601 - 607.
- [28] 吴晓清, 成海钟, 周玉珍, 等. 观赏贝母种质亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 北方园艺, 2010(18): 157 - 160.
- [29] 牟海飞, 林贵美, 邹瑜, 等. 利用 ISSR 分子标记分析香蕉品种的遗传多样性[J]. 西南农业学报, 2010, 23(4): 1206 - 1210.
- [30] 杨宝山, 王惠, 姜义仁, 等. 栗蚕种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(9): 93 - 95.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 66 页)

参考文献

- [1] 张林燕, 叶建仁. 狭叶十大功劳白粉病病原菌鉴定及化学防治的研究[J]. 中国森林病虫, 2009, 28(6): 17 - 19.
- [2] 余天虹, 苏薇薇, 容丽. 十大功劳属植物研究进展[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2015, 33(3): 115 - 120.
- [3] 陆小鸿. “全株药材”十大功劳[J]. 广西林业, 2015(7): 21 - 22.
- [4] 赵桂华, 姚源, 赵明扬, 等. 亚麻粉引起的狭叶十大功劳白粉病[J]. 中国森林病虫, 2007, 26(5): 43 - 44.
- [5] 刘乔丽, 欧阳兵, 周培根, 等. 狭叶十大功劳白粉病发生调查及其病原鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(3): 474 - 477.
- [6] 耿晓东, 周英, 陈君君. 狭叶十大功劳白粉病的发病规律及防治研究[J]. 黑龙江农业科学, 2013(5): 37 - 39.
- [7] DAMM U, CANNON P F, WOUDEBERG J H, et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex [J]. Studies in Mycology, 2012, 73(1): 37 - 113.
- [8] 谭海文, 黎起秦, 叶靖平, 等. 阔叶十大功劳炭疽病初报[J]. 植物病理学报, 2010, 40(4): 446 - 448.
- [9] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122 - 124.
- [10] YANG Y L, LIU Z Y, CAI L, et al. *Colletotrichum anthracnose* of Amaryllidaceae [J]. Fungal Diversity, 2009, 39(2): 123 - 146.
- [11] CAI L, HYDE K D, TAYLOR P, et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum* [J]. Fungal Diversity, 2009, 39(2): 183 - 204.
- [12] WEIR B S, JOHNSTON P R, DAMM U. The *Colletotrichum*

gloeosporioides species complex [J]. Studies in Mycology, 2012, 73(1): 115 - 180.

- [13] 李沛利, 李娟, 龚国淑, 等. 四川省鹅掌柴炭疽病病原菌的初步鉴定[J]. 植物病理学报, 2017, 47(3): 296 - 304.
- [14] 孙杨, 付全娟, 孙玉刚, 等. 櫻桃褐斑病病原菌生物学特性及品种抗性评价[J]. 植物保护, 2017, 43(4): 110 - 114.
- [15] LIMA N B, BATISTA M V, DE MORAIS M A, et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil [J]. Fungal Diversity, 2013, 61(1): 75 - 88.
- [16] LIU F L, TANG G T, ZHENG X J, et al. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32761.
- [17] PRIHASTUTI H, MCKENZIE E H C, HYDE K D, et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand [J]. Fungal Diversity, 2009, 39(2): 89 - 109.
- [18] JAYAWARDENA R S, HYDE K D, DAMM U, et al. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum* [J]. Mycosphere, 2016, 7(8): 1192 - 1260.
- [19] 刘倩丽, 周国英, 刘成峰, 等. 檀香炭疽病病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 热带作物学报, 2014, 35(11): 2266 - 2273.
- [20] 宋婷, 席军强, 焦健. 花椒炭疽病病原菌的生物学特性研究[J]. 中国农学通报, 2017, 33(13): 141 - 145.

(责任编辑: 田 喆)