

竹材木质素选择性降解菌株的分子鉴定

周国英, 李 河

(中南林业科技大学 资源与环境学院, 湖南 长沙 410004)

摘要: 鉴定 1 株从腐竹中筛选的高效选择性降解竹材木质素的优良菌株 ZNLD-18, 为生物法提取可纺性竹原纤维奠定基础。利用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增并测定菌株的 rDNA ITS 区序列, 序列总长 541 bp。把所得序列在 GenBank 中进行 Blast 搜索得到同源性较高的同属不同种菌株序列。比较这些序列的遗传距离, 显示菌株 ZNLD-18 与 *Trametes versicolor* 的 ITS 区序列同源性为 99% 以上。利用 PAUP 软件构建分子系统发育树, 通过对该树的分析并综合菌株的形态特征, 鉴定菌株 ZNLD-18 为白腐菌 *Trametes versicolor*。图 2 表 2 参 14

关键词: 微生物学; 竹材; 木质素; 选择性降解; 菌株; rDNA ITS; 分子鉴定

中图分类号: Q949.329 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2008)04-0497-05

Molecular identification of the strain ZNLD-18 selectively decomposing bamboo lignin

ZHOU Guo-ying, LI He

(College of Resources and Environment, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: This objective was to provide basis for the biological extracting of the spinning bamboo fiber. The strain ZNLD-18, separated from decaying bamboo, which was able to decompose selectively the bamboo lignin, was identified by polymerase chain reaction (PCR). The rDNA ITS sequences of the strain were amplified and tested by the fungi universal primers ITS1 and ITS4. The sequence length was 541 base pair (bp). The sequences were Blast searched within the GenBank to obtain the different strains' sequences with the similar homology. The comparison of the genetic distances of these sequences showed that the ITS sequences of ZNLD-18 and *Trametes versicolor* were with over 99% homology. A molecular phylogenetic tree was built with Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP) software. Given the analysis results of the tree and the morphological characteristics of the strain, ZNLD-18 was *Trametes versicolor*. [Ch, 2 fig. 2 tab. 14 ref.]

Key words: microbiology; bamboo wood; lignin; selectively decomposing; fungi strain; rDNA ITS; molecular identification

我国的竹材资源自然分布地域十分广阔, 仅湖南、江西、浙江 3 省的毛竹 *Phyllostachys pubescens* 林面积就占全国毛竹林总面积的 60%。竹子生长更新快, 分布广, 产量高, 与木材相比具有强度高, 韧性好, 硬度大的特点, 是结构材和纤维材的理想原料^[1]。近 20 a 来, 竹材的工业化利用得到了很大的发展, 竹业已成为我国林业发展的一个新的经济增长点^[2, 3]。特别是近几年来, 竹纤维作为服装领域新兴的纺织材料, 越来越受到人们的关注^[4]。它的问世为竹材的综合利用开辟了又一条途径。目前, 竹原纤维生物脱胶工艺还在起步阶段, 关于木质素生物降解的大量研究集中于苎麻 *Boehmeria nivea*,

收稿日期: 2007-07-03; 修回日期: 2008-03-11

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(04jj3055)

作者简介: 周国英, 教授, 博士, 从事林业微生物资源开发等研究。E-mail: gyzhou2118@yahoo.com.cn

亚麻 *Linum usitatissimum* 等麻类作物。在自然界中，能降解麻类作物的木质素并产生相应酶类的微生物只占少数^[5]。木质素的完全降解是真菌、细菌和微生物群落共同作用的结果，其中真菌起着主要作用^[6]，但竹原纤维的微生物脱胶研究未见报道^[7]。本文是竹材微生物脱胶工艺系列研究内容之一，主要是针对李河等^[8]分离筛选的能高效选择性降解竹材木质素的优良菌株 ZNLD-18 进行分子鉴定，为有效利用该微生物降解木质素从而获得可纺性竹原纤维提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 实验待鉴定的菌株为中南林业科技大学微生物实验室分离和筛选的高效且能选择性降解竹材木质素的 ZNLD-18 号菌株。

1.1.2 主要试剂 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)和聚合酶链式反应(PCR)试剂盒, pPCR-Script AMP SK(+)克隆载体, 5-溴-4-氯-3-吲哚- -D-半乳糖苷(X-Gal), 异丙基- -D 硫代半乳糖苷(IPTG)。

1.1.3 培养基 普通真菌培养(PDA 培养基)。

1.2 方法

1.2.1 菌株形态观察 将保存菌株接种于真菌培养基斜面上，置于生化培养箱中 25℃ 培养 72 h，观察并记录菌落特征和菌株形态特征。

1.2.2 基因组 DNA 抽提 采用 CTAB 方法提取样品基因组总 DNA^[9]，电泳检测合格后待用。

1.2.3 基因间隔序列(ITS)基因 PCR 扩增 引物：试验采用引物为通用引物，由上海生工合成。具体序列为 ITS 1: 5' TCCGTAGGTGAAACCTGCGG 3'; ITS 4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'。PCR 反应体系 (25 μL): 10 × 缓冲液 2.5 μL, dNTP (各 2.5 mmol·L⁻¹) 1 μL, 引物各 1 μL, Taq 酶 (83.35 nkat·L⁻¹) 0.25 μL, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 18.25 μL。PCR 反应条件: 95℃ 变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 40 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物的检测 取 5 μL PCR 产物, 10 g·kg⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 PCR 产物的克隆与转化 将 PCR 扩增产物纯化后克隆至载体上，再转化至大肠杆菌感受态细胞中，采用含 X-gal, IPTG, 氨苄青霉素普通培养基(Amp LB)蓝白斑平板法筛选克隆成功的菌落，阳性克隆用液体 LB 培养基培养。挑取白色菌落培养做 PCR 检测，剔除假阳性菌株，对克隆成功的菌株送上海生工做正反双向测序，以保证测序的准确率，利用 BioEdit 软件拼接得完整序列。

1.2.6 ITS 系统发育树的构建 将测得的序列与用 Blast 软件从 GenBank 搜索到的相关序列，用 CLUSTAL W^[10]软件进行对位排列后再进行手工校正。系统发育树分析采用 PAUP 4.0^[11]中的简约法进行，最大简约性(MP)分析选用分支界限法进行，对于由序列长度多态性所造成的空位(gap)，在运算中处理为缺失(missing)状态。利用 bootstrap(1 000 次重复) 检验各分支的置信度。序列间进化距离根据 Kimura-2 参数遗传距离模型用分子进化遗传分析软件(MEGA)^[12]计算。

2 结果与分析

2.1 选择性降解竹材木质素菌株的形态特征

将分离保存的 ZNLD-18 号菌株转接于真菌培养基进行活化培养，观察到的形态特征是菌落白色，大而疏松，表面绒毛状，与培养基结合较紧密。菌丝无色，长短、粗细不等，单个或数个相连，菌丝不分枝。壁平直、直径约为 3 ~ 7 μm。部分菌丝较细，直径约为 1.5 ~ 3.5 μm，弯曲。

2.2 菌株 ZNLD-18 的分子鉴定

2.2.1 菌株的 rDNA ITS 区 PCR 扩增结果 菌株的 rDNA ITS 区(含 5.8 S 区)PCR 扩增电泳结果显示条带特异、效果好。rDNA 用 TIANGEN 公司生产的 DNA 纯化试剂盒纯化后用于下一步的克隆、测序。

2.2.2 菌株 rDNA ITS 测序 ZNLD-18 菌株 rDNA ITS 区测序所用测序仪为 ABI PRISM 3730，测序试剂为 BigDye terminator v3.1。该菌株的 ITS 区段总长度为 541 bp，其中 ITS 1 从第 1 号碱基到第 183 号碱基共长 183 bp, 5.8 S 从第 184 号碱基到第 341 号碱基共长 158 bp, ITS 2 从第 342 号碱基到第

541 号碱基共长 200 bp, 序列结果如图 1。

图 1 ZNLD-18 菌株 rDNA ITS 序列

Figure 1 The ITS sequence of ZNLD-18 strain

2.2.3 ZNLD-18 菌株与同源性其他菌株的遗传距离 将所测 ZNLD-18 菌株的 ITS 区序列在 GenBank 核酸序列数据库中进行 BLASTN 搜索, 得到并下载同源性较高的同属不同种的 ITS 序列(表 1), 用 MEGA 3.1 软件根据 Kimura-2 双参数模型计算平均遗传距离, 结果见表 2。根据表 2 中菌种 ITS 区序列的遗传距离, 可以看出 ZNLD-18 号菌株的 ITS 区序列与 *Trametes versicolor* 的 ITS 区序列同源性约为 99%以上, 而与 *Trametes* 属其他种的 ITS 区同源性都小于 99%。Renske 等^[13]认为通过 ITS 区域比对, 序列相似性大于 99%, 鉴别为相同种; 序列相似性大于 95%且小于 99%, 鉴别为相同属; 序列相似性小于 95%, 鉴别为同科。因此, 可初步确定本试验筛选出的具有选择性降解竹材木质素的优良菌株 ZNLD-18 为 *Trametes versicolor*。

表 1 从 Genbank 中下载的同源性较高菌株

Table 1 Strains of higher consanguinity download from Genbank

编号	Genbank 接收号	种名	编号	Genbank 接收号	种名
2	EF422214	杂色云芝 <i>Trametes versicolor</i>	10	AY684171	桧柏褐褶菌 <i>Trametes junipericola</i>
3	AF139961	杂色云芝 <i>Trametes versicolor</i>	11	AY684173	绒毛栓菌 <i>Trametes pubescens</i>
4	AY684176	浅囊状栓菌 <i>Trametes gibbosa</i>	12	DQ013301	杂色云芝 <i>Trametes versicolor</i>
5	AB158313	毛栓菌 <i>Trametes hirsuta</i>	13	AY840587	杂色云芝 <i>Trametes versicolor</i>
6	AY684170	毛栓菌 <i>Trametes hirsuta</i>	14	DQ925487	绒毛栓菌 <i>Trametes pubescens</i>
7	AY684170	毛栓菌 <i>Trametes hirsuta</i>	15	AM084699	杂色云芝 <i>Trametes versicolor</i>
8	AF516556	毛栓菌 <i>Trametes hirsuta</i>	16	EF488416	裂褶菌 <i>Schizophyllum commune</i>
9	AY684180	毛栓菌 <i>Trametes uavediensis</i>			

表 2 ZNLD-18 菌株与 GenBank 中其他种 ITS 区遗传距离

Table 2 Genetic distance of ITS sequence of different population of strains

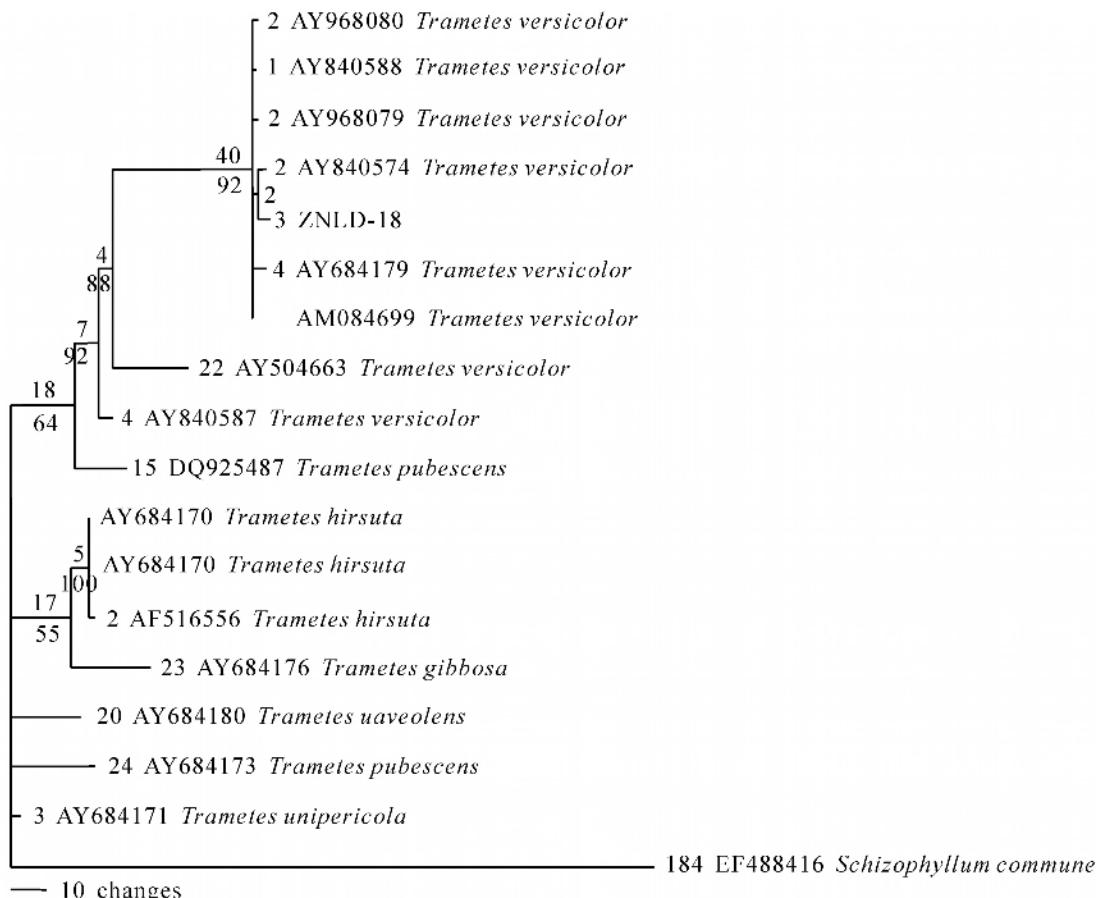
续表 2

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
8	0.049	0.049	0.058	0.052	0.067	0.005	0.005									
9	0.041	0.041	0.043	0.067	0.076	0.035	0.035	0.041								
10	0.027	0.032	0.030	0.058	0.067	0.027	0.027	0.032	0.019							
11	0.058	0.060	0.055	0.099	0.105	0.078	0.078	0.084	0.069	0.055						
12	0.011	0.016	0.011	0.078	0.075	0.046	0.046	0.052	0.038	0.024	0.057					
13	0.008	0.013	0.008	0.075	0.079	0.044	0.044	0.049	0.035	0.021	0.055	0.003				
14	0.027	0.032	0.029	0.081	0.090	0.055	0.055	0.060	0.046	0.032	0.060	0.024	0.021			
15	0.008	0.008	0.003	0.075	0.076	0.049	0.049	0.055	0.041	0.027	0.055	0.008	0.005	0.027		
16	0.390	0.395	0.394	0.362	0.393	0.375	0.375	0.384	0.370	0.362	0.399	0.389	0.389	0.385	0.390	

说明：1号为ZNLD-18号菌株。

2.3 菌株ZNLD-18系统发育树的分析

下载 GenBank 中同源性较高菌株的 ITS 序列与本实验所测的 ZNLD-18 号菌株 ITS 序列共同进行了比对，利用 Clustal X 软件将序列匹配排列后保存为 NEXUS 格式，用 PAUP 4.0 软件采用最大简约法构建系统发育树(图 2 中显示 bootstrap 值大于 50%)，结果见图 2。EF488416 (*Schizophyllum commune*) 为外类群(outgroup)，树枝上方数值表示菌株间的绝对遗传距离，树枝下方数值为 bootstrap 值。



Tree length为334, CI 为0.889 2, HI 为 0.110 8, RI 为0.762 8, RC 为0.678 3

图 2 基于分离菌株及来自 GenBank 的同属不同种的 ITS 序列构建的 MP 系统发育树

Figure 2 The MP Phylogeny tree of the strains base on ITS sequences

从分子系统树中可以看出, *Trametes* 属的不同种, 种间、种内距离在宽度和重叠排列上都不同。ZNLD-18 号菌株与 *Trametes versicolor* 聚在一支上, 基于系统树其他部分的分支上其他种的种内距离, 可推断 ZNLD-18 号菌株为白腐菌 *Trametes versicolor* 湖南株。这种根据系统树规律鉴定种的方法符合 Taylor 等^[14]概述的用 PSR (phylogenetic species recognition) 来作为鉴定进化种 (phylogenetic species) 的标准。此菌株能选择性降解竹材木质素而获得竹原纤维。

3 讨论

传统的真菌分类主要是根据子实体外观形态或微观的形态结构特征, 但表型特征受环境影响较大, 这就使得在不同环境条件下生长的同一种真菌经常表现出较大的形态差异, 给分类和鉴定带来困难。真核生物编码核糖体核酸的基因是一个串联的重复转录单位, 即 18 S rRNA-ITS-5.8 S rRNA-ITS-28 S rRNA, 约 100 ~200 拷贝, 包括编码区和非编码区, 分隔编码区 18, 5.8, 28 S rDNA 亚单位 ITS 为非编码区, 编码区序列相对保守, 而 ITS 在两代之间进化很快, 常发生变异, 在同一属种间甚或种内可有不同程度的差异, 所以 rDNA ITS 序列具有菌种分类鉴定的意义。

参考文献:

- [1] 詹祖光. 竹纤维——经济墙板初探[J]. 林产工业, 2000, 27 (3): 22.
- [2] 张齐生. 我国竹材加工利用要重视科学和创新[J]. 浙江林学院学报, 2003, 20 (1): 1 - 4.
- [3] 杨校生. 我国竹子产业的发展现状与趋势[J]. 今日科技, 2003(2): 4.
- [4] 张威, 唐雯, 马军. 功能性纺织纤维的开发与发展现状[J]. 山东纺织科技, 2004, 45 (1): 44 - 47.
- [5] 刘瑞刚. 棉纤维素在 NMMO 中溶解前后结晶结构的变化[J]. 中国纺织大学学报, 1998, 24 (4): 7 - 9.
- [6] 孙正茂, 肖克宇. 真菌木质素降解酶系的研究进展[J]. 广东饲料, 2006, 15 (2): 41 - 43.
- [7] 杨礼富. 红麻微生物脱胶研究进展[J]. 中国麻作, 2000, 22 (3): 34 - 38.
- [8] 李河, 周国英, 周德明. 用于提取可纺性竹原纤维菌株的选育[J]. 中南林学院学报, 2006, 26 (1): 48 - 52.
- [9] HILLIS D M, MORITZ C M, MABLE B K. Molecular Systematics[M]. Massachusetts: Sinauer Associates, 1990: 411 - 501.
- [10] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 4 673 - 4 680.
- [11] SWOFFORD D L. Phylogenetic Analysis Using Parsimony(and Other Methods) Version 4.0[CP/OL]. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 1998.
- [12] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 1.01 [CP/OL]. PA: Pennsylvania State University, 1993.
- [13] RENSKE L, PAULA L, THANW K, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (1): 327 - 333.
- [14] TAYLOR J W, JACOBSON D J, KROKEN S, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts on fungi [J]. Fungal Genet Biol, 2000, 31: 21 - 32.