

# 以 18S rDNA 序列鉴定一株产纤维素酶真菌

何毅婷<sup>1,2</sup>, 杨汝德<sup>1</sup>, 张广<sup>2</sup>, 黄耀威<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510006) (2. 清华大学深圳研究生院, 广东 深圳 518055)

**摘要:** 采用 18S rDNA 序列分析和形态鉴定对一株具有较高纤维素酶活性的真菌 HY12 进行了鉴定。18S rDNA 序列分析表明, 菌株 HY12 与木霉属多株菌的 18S rDNA 的同源性均在 99.0% 以上, 而与其中的绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 同源性达到 100.0%。从构建的系统进化树中可以看出, HY12 与 *Trichoderma viride* 共同构成一个分支, 并与哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 聚成一大枝。该菌形态鉴定与绿色木霉比较接近, 因此初步确定菌株 HY12 为绿色木霉菌。

**关键词:** 18S rDNA; 纤维素酶; 形态鉴定

中图分类号: Q55; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0638-03

## Identification of a Cellulose-producing Fungi based on 18S rDNA Sequence

HE Yi-ting<sup>1,2</sup>, YANG Ru-de<sup>1</sup>, ZHANG Guang<sup>2</sup>, HUANG Yao-wei<sup>1</sup>

(1. College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China) (2. Graduate School at Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China)

**Abstract:** A fungi HY12, possessing high cellulose activity, was identified by 18S rDNA sequence and morphological observation. The sequence data was compared with the published sequences of relative fungi strains in Genbank. The results showed that the homology of the 18S rDNA sequences of strain HY12 with those of several *Trichoderma* strains was more than 99.0%. As shown in the phylogenetic tree, strain HY12 and *Trichoderma viride* constituted a branch and they constituted a high-order branch together with *Trichoderma harzianum*. Besides, the strain HY12 was similar with *Trichoderma viride* in morphological character. So the strain HY12 belonged to the species of *Trichoderma viride*.

**Key words:** 18S rDNA; cellulose; morphological identification

纤维素类物质是自然界中最丰富的一种可再生资源, 全世界每年产生数以亿吨的木质纤维素, 除部分用于饲料, 造纸, 纺织和燃料加工外, 绝大部分被烧掉, 既破坏了生态平衡, 又污染环境, 且能量利用率低 (10% 左右)<sup>[1]</sup>。如将天然纤维素降解为可利用的糖液, 再进一步转化为酒精、菌体蛋白、气体燃料 (如氢气) 等物质, 对解决当今世界所面临的粮食短缺、能源危机和环境污染问题具有深远的意义<sup>[2]</sup>。因此开发和利用纤维素成为当今生物研究领域的一个热点问题。具有分解秸秆能力的微生物主要以真菌中的木霉为主, 木霉可产生纤维素酶, 其最大的潜在用途是把纤维素类物质酶解成葡萄糖<sup>[3]</sup>。*Trichoderma reesei* 是广泛应用的纤维素产生菌<sup>[4]</sup>, 其母株为菌株 QM6a 的 *T. viride*, Simmons 1977 年命名为 *T. reesei*,

收稿日期: 2008-03-05

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (04020061)

作者简介: 何毅婷 (1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事工业微生物和医药微生物方面的研究

并且选育了 QM9414, Rut C30, MCG77 等活性较高的 *T. reesei* 菌株。中国科学院上海植物生理研究所从 *T. pseudokoningii* 诱变得纤维酶活性较高的菌株 EA32867 和 N2278, 并在生产中广泛使用<sup>[5]</sup>。

DNA 的测序以及数据库的建立为微生物学家研究环境微生物多样性以及系统发育史提供了基础, 而 18S rRNA 基因的研究和分析使真核生物之间的进化关系和特定环境下微生物种群的鉴定成为可能。18S rDNA 内含有可变区间, 可用来研究和跟踪特定有机体和有机种群, 18S rRNA 的分析可用来解决真菌的分类和进化问题。作者筛选出的一株具有较高纤维素酶活性的真菌, 本研究对其 18S rRNA 基因片段进行扩增、测序分析, 并与在 GenBank 中相关的真菌序列进行比对, 构建系统发育树, 对其遗传分类地位进行了分析, 确定该菌为绿色木霉。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

菌株 HY12 由本实验室从土壤中分离得到。

## 1.2 培养基及培养条件

PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 加水定容到 1 L, pH 值自然, 固体培养基加入 2% 的琼脂粉。培养温度为 28 °C, 培养时间 3~5 d。

## 1.3 试剂和仪器

pMD20-T vector Kit、PCR 试剂盒, RNase, DNA 分子量标准 ( $\lambda$ -EcoT 14 Digest) 和 DNA 限制酶购至 Takara 公司, Agarose Gel DNA Purification Kit 购至 Invetrogen 公司, 其他常规试剂为国产分析纯试剂。德国 Eppendorf 公司 BioPhotometer 分光光度计; 德国 SORVALL 公司 Biofuge stratos 型高速冷冻离心机; 德国 Eppendorf 公司 Mastercycler gradient 梯度 PCR 仪; 德国 CHRIST 公司 ALPHA124 型真空冷冻干燥机; 美国 Bio2RAD 公司水平电泳仪; 美国 Pall 公司 PURELAB Plus 型纯水仪等。

## 1.4 形态鉴定

将待鉴定的真菌菌株接到 PDA 平板上, 置于 28 °C 下培养, 每隔 12 h 观察菌落的颜色和形态。待菌丝长到盖玻片上后, 每隔 12 h 于显微镜下观察菌丝、分生孢子梗及分生孢子的大小和形态。

## 1.5 霉菌总 DNA 提取

将试验菌株的孢子悬浮液接种于综合马铃薯液体培养基中, 28 °C, 200 r/min 振荡培养 2 d。过滤收集菌丝体, 冻干, 液氮研磨后转移至 EP 管中, 参考 Laura Elvia 等<sup>[6]</sup>的方法经改良后提取基因组 DNA 作为 RAPD2 PCR 反应的模板, 双蒸水(加入适量 10 mg/mL RNase) 溶解后置 -20 °C 保存备用。1% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度法检测模板 DNA 的质量。

## 1.6 PCR 扩增 18S rDNA

### 1.6.1 引物

本实验采用真菌 18S rDNA 通用引物 NS1 (5'-GTA-GTCATATGCTTGCTC-3') 及 NS8 (5'-TCCGCAGG-TTCACCTACGGA-3') 扩增供试菌 HY12 的 18S rDNA 片段。

### 1.6.2 PCR 反应

用标准的 PCR 反应体系进行 PCR 扩增, 反应体系为 50  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 34  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 5.0  $\mu$ L, dNTP 4.0  $\mu$ L, 引物 NS1 2  $\mu$ L, NS8 2  $\mu$ L, Taq 酶 1  $\mu$ L, 霉菌总 DNA 稀释至适当倍数 (\*100) 2  $\mu$ L。

循环条件: 94 °C 5 min, 循环 1 次; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 以上参数循环 35 次; 最后以 72 °C 循环 1 次结束。用 1% 的琼脂糖电泳, EB 染色后, 在紫外下观察条带,  $\lambda$ -EcoT 14 Digest 用作 DNA

分子量标准。

## 1.6.3 PCR 产物纯化, 连接及转化

采用 Agarose Gel DNA Purification Kit 纯化 PCR 产物, 以除去反应物中的聚合酶、核苷酸、引物和盐类, 将纯化后的适量 DNA 片段连接至 pMD20-T 载体上, 重组质粒转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  宿主细胞中, 使用选择性 LB 琼脂平板筛选含重组质粒的白色克隆, 碱法提取质粒, 并通过 PCR 验证准确并测序。

## 1.7 序列分析及分子进化树的构建

用 DNASTAR 软件分析测序结果, 并将序列与 GenBank 里面 13 株其他真菌(表 1) 的 18S rDNA 序列进行比对。应用 MEGA 3.0 软件构建系统发育树, 选用参数 p2 距离 (p2distance) 和成对删除 (pairwise deletion) 法, 将序列资料转换成距离后用 NJ 法构树, 并用 bootstrap 进行 1000 次渐启式复制以检验枝的置信度。

表 1 选自 Genbank 中用于比对的真菌菌株

Table 1 Selected fungi with published sequences in Genbank

菌种名	菌株名	登录号
Hypocreaoningii	ATCC 64262	AJ301990
Trichoderma spirate	S41	EF672340
Trichoderma viride	IFFI 13001	AF525230
Taphrina deformans	MUCL 30957	X69852
Trichoderma harzianum	ALI 232	AF548100
Trichoderma pseudokoningii	S-38	AF548101
Hypocrea lutea	IFO 9061	D14407
Hypocrea jecorina	RutC-30	AF548103
Hypomyces chrysospermus		M89993
Hypocrea rufa	GJS89-127	AY489694
Paecilomyces niphedodes	CBS 364.76	AY526471
Calcarisporium arbuscula		AY271796
Nectria lugdunensis	CS-950	AY357278

## 2 结果与讨论

### 2.1 形态鉴定

菌落在 PDA 培养基表面蔓延迅速, 首先形成白色菌丝薄层, 然后菌丝逐渐生长密集, 菌落表面呈环状排列, 孢子成熟后菌落呈铜绿色茸状, 整个菌落整齐而扁平, 菌丝体在培养基浅层伸展, 和培养基结合较为牢固, 并分泌黄绿色素。显微镜下观察到该菌菌丝透明, 分枝繁多且具横隔, 形成多分枝轮廓, 分生孢子梗直立无色, 小枝对生, 分生孢子圆形或椭圆形, 孢子壁不光滑, 单个呈绿色, 若干分生孢子在分生孢子梗上聚集成孢子头。初步鉴定为半知菌亚门, 丝孢纲, 丝孢目, 丛梗孢科, 木霉属。

### 2.2 18S rRNA 基因 PCR 克隆

参考 Laura Elvia 等<sup>[6]</sup>的方法经改良后提取基因组 DNA, 并以此 DNA 为模板, 通过 PCR 反应, 得到长

约为 1.8 kb 的片段, 如图 1。将 PCR 产物纯化后, 与 pMD20-T 载体连接, 转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 筛选得到阳性克隆, 将得到的重组质粒进行 PCR 鉴定。

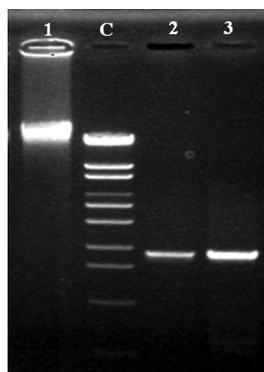


图 1 霉菌总 DNA 及 18S rDNA PCR 产物

Fig.1 PCR analysis of the total DNA and 18S rDNA of fungi

HY12

注: 1 霉菌总 DNA; 2 总 DNA 扩增的 PCR 产物; 3 重组质粒扩增的 PCR 产物; C  $\lambda$ -EcoT 14 Marker( 19329, 7743, 6223, 4254, 3472, 2690, 1882, 1489, 925)。

2.3 18S rDNA 序列分析

将菌株 HY12 的 18S rDNA 基因序列与 Genbank 内登录的 13 株不同种属的真菌的相应序列进行比对, 各菌株序列间的同源性和差异分析见表 2。

表 2 14 株真菌 18S rDNA 基因序列的差异性和同源性/%

Table 2 Difference and homology of 18 S rDNA sequences of the 14 kinds of fungi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1		99.0	99.3	98.6	98.9	98.4	98.5	98.7	98.4	100.0	99.6	97.3	97.0	97.5
2	1.0		98.9	97.4	98.2	98.7	98.1	97.9	96.0	99.0	99.0	95.1	95.8	95.2
3	0.7	1.1		99.5	99.0	98.3	99.5	99.3	98.9	99.5	99.5	97.5	97.4	97.7
4	1.4	2.6	0.5		99.5	98.3	99.5	99.9	98.9	99.5	99.5	97.5	97.4	97.2
5	1.1	1.8	1.7	0.5		98.6	100.0	99.6	98.8	99.9	99.9	97.6	97.4	97.6
6	1.6	1.3	0.5	1.7	1.4		98.5	98.4	98.0	97.9	97.9	94.2	96.4	96.0
7	1.5	1.9	0.5	0.5	0.0	1.5		99.6	99.8	99.8	99.8	96.7	97.4	96.6
8	1.3	2.1	0.7	0.1	0.4	1.6	0.4		98.9	99.6	99.6	97.6	97.4	96.6
9	1.6	4.0	1.1	1.1	1.2	2.0	0.2	1.1		98.8	98.8	97.4	96.4	96.7
10	0.0	1.0	0.5	0.5	0.1	2.1	0.2	0.4	1.2		99.6	94.0	97.5	96.6
11	0.4	1.0	0.5	0.5	0.1	2.1	0.2	0.4	1.2	0.4		94.0	97.5	96.6
12	2.7	4.9	2.5	2.5	2.4	5.8	3.3	2.4	2.6	6.0	6.0		97.5	95.1
13	3.0	4.2	2.6	2.6	2.6	3.6	2.6	2.6	3.6	2.5	2.5	2.5		95.2
14	2.5	4.8	2.3	2.8	2.4	4.0	3.4	3.4	3.3	3.4	3.4	4.9	4.8	

注: ①1~15 分别代表 HY12, *Hypocrea lutea*, *Trichoderma sp.*, *Trichoderma pseudokoningii*, *Hypocrea koningii*, *Taphrina deformans*, *Hypocrea rufa*, *Hypocrea jecorina*, *Hypomyces chrysospermus*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Calcarisporium arbuscula*, *Nectria lugdunensis*, *Paecilomyces niphedodes*; ②表的对角线下方为序列间的差异百分比, 上方为同源性。

将 HY12 菌株的 18S rRNA 基因部分序列与 GenBank 内登录的 13 株不同种属的真菌的相应序列进行比对 (图 2), 各株序列间的同源性和差异分析见

表 2。如表所示, 菌株 HY12 与 *Hypocrea lutea*, *Trichoderma spirate*, *Trichoderma viride* 和 *Trichoderma harzianum* 的同源性均在 99.0% 以上, 且与其中的 *Trichoderma viride* 同源性达到 100%, 确定该菌属于绿色木霉 (*Trichoderma viride*)。与 *Trichoderma harzianum* 相比, 菌株 HY12 在 310 bp 和 805 bp 是 C, 而这株菌则是 T。构建的分子进化树显示 *Trichoderma viride* 和 HY12 位于同一分支, 而这一分支与菌株 *Trichoderma harzianum* 聚成一大枝。

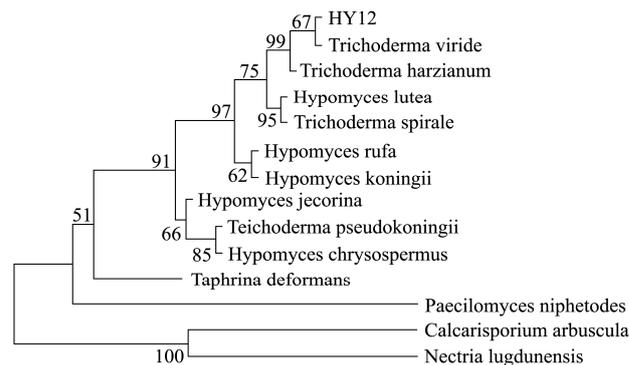


图 2 以 18S rRNA 基因序列为分子标记的真菌系统进化树

Fig.2 The positions of fungi based on 18S rRNA sequences in phylogenetic tree

结合形态鉴定和 18S rDNA 序列分析的结果, 我们确定该菌属于绿色木霉 (*Trichoderma viride*), 该菌具有较高纤维素酶活性, 可广泛应用于农作物废物秸秆等的综合处理, 对该菌的研究我们将作进一步报道。

参考文献

- [1] Ljungdahl LG, Eriksson KE. Ecology of microbial cellulose degradation[J]. Adv Microb Ecol, 1985, 5:237-299
- [2] Ohmiya K, Sakka K, Karita S, et al. Structure of cellulases and their applications[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 1997, 14:365-368
- [3] Samuels GJ. Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus [J]. Mycol. Res, 1996, 100:923-935
- [4] Esposito E, Silva M. Systematics and environmental application of the genus Trichoderma [J]. Crit Rev Microbiol, 1998, 24 (2) :89-98
- [5] 中国科学院上海植物生理研究所纤维素组, 上海酒精二厂. 二株高活力纤维素分解菌 EA32867 和 N2278 的获得极其特性的比较[J]. 微生物学报, 1978, 18 (1):27-38
- [6] Laura EV, Joseph O F. Comparison of methods for isolation of Mycobacterium avium complex DNA for use in PCR and RAPD fingerprinting[J]. J Microbiol Methods, 1995, 21(2): 151-161