

DOI: 10.5846/stxb201409271911

杨立霞, 马欣然, 王玉英, 闫绍鹏, 王秋玉. 三种白腐菌生物学特性与木质纤维素酶基因遗传多样性. 生态学报, 2016, 36(7): - - .

Yang L X, Ma X R, Wang Y Y, Yan S P, Wang Q Y. Biological Characteristics of Three White-Rot Fungi and Genetic Diversity of Lignocellulose Enzyme Related Genes. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(7): - - .

三种白腐菌生物学特性与木质纤维素酶基因遗传多样性

杨立霞^{1,2}, 马欣然¹, 王玉英¹, 闫绍鹏¹, 王秋玉^{1,*}

1 东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

2 呼伦贝尔学院生命科学与化学学院, 呼伦贝尔 021000

摘要:本文以采自东北林业大学帽儿山实验林场的 3 种白腐真菌——木蹄层孔菌 (*Fomes fomentarius*)、鲍姆鲍姆木层孔菌 (*Phellinus baumiibaumii*) 和火木层孔菌 (*Phellinus igniarius*) 为材料, 用菌落直径测量法比较 3 种白腐菌在 PDA 固体培养基上的生长速度, 采用菌丝体干重法比较其在 PDA 液体培养基中的生物量变化。结果显示: PDA 固体培养基上 3 种白腐菌均为快速生长类型, 其生长速度木蹄层孔菌 > 火木层孔菌 > 鲍姆鲍姆木层孔菌; PDA 液体培养基中生物量增长速度木蹄层孔菌 > 鲍姆鲍姆木层孔菌 > 火木层孔菌。用比色法测量其木质纤维素酶活性, 结果显示: 木蹄层孔菌产锰过氧化物酶和漆酶产酶量较高, 鲍姆鲍姆木层孔菌和火木层孔菌产木质素过氧化物酶产酶量较高; 木蹄层孔菌、鲍姆鲍姆木层孔菌和火木层孔菌三种白腐菌的三种主要木质素酶 (锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶) 的表达量, 种间差异显著 ($F = 3.75^*$ 、 5.20^{**} 、 3.01^*), 白桦木屑诱导处理与对照间差异显著 ($F = 3.84^*$ 、 4.19^* 、 5.28^*); 两种主要纤维素酶 (葡聚糖内切酶、葡聚糖外切酶) 的表达量, 种间差异不显著, 受碳源影响作用显著 ($F = 3.99^*$ 、 4.04^*)。筛选 29 对引物组合, 对 3 种白腐菌几种主要木质纤维素酶基因进行 TRAP—PCR 分子标记检测, 比较 3 菌种间遗传差异, 扩增总条带数为 357 条, 多态性条带数为 255 条, 多态性条带的比例为 71.43%, 其中木质素降解酶基因总多态位点比率为 73.77%, 纤维素降解酶基因总多态位点比率为 68.97%。3 种白腐菌的木质纤维素降解酶基因在种间均存在较高的遗传差异。因此, 特定基因的 TRAP 分子标记可以用于木腐菌的遗传变异分析。

关键词: 白腐菌; 木质纤维素降解酶; TRAP 分子标记; 遗传差异

Biological Characteristics of Three White-Rot Fungi and Genetic Diversity of Lignocellulose Enzyme Related Genes

YANG Lixia^{1,2}, MA Xinran¹, WANG Yuying¹, YAN Shaopeng¹, WANG Qiuyu^{*,1}

1 College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2 Biology and Chemistry Department of Hulunbuir College, Hulunbuir 021000, China

Abstract: We used three types of white-rot fungi, namely, *Fomes fomentarius*, *Phellinus baumii baumii*, and *P. igniarius*, as the study materials. The colony diameters and mycelial dry weights in different culture media were measured to compare their growth characteristics. Further, the activities of five lignocellulose degradation enzymes of the fungi were detected using colorimetry. The results showed that all the fungi were fast growing types: colony growth of *P. baumii baumii* in Potato Dextrose Agar medium was faster than that of *P. igniarius* and *F. fomentarius*, but mycelial biomass accumulation of *F. fomentarius* in liquid Potato Dextrose medium was the highest, followed by *P. baumii baumii* and *P. igniarius*. The manganese peroxidase (MnP) and laccase (Lac) productions of *F. fomentarius* were higher than that of the other two

基金项目: 国家基础科学人才培养基金-科研训练及科研能力提高项目 (015-41312309)

收稿日期: 2014-09-27; **网络出版日期:** 2015- -

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wqyll@sina.com

species, while the lignin peroxidase (Lip) yields of *P. baumii baumii* and *P. igniarius* were higher than that of *F. fomentarius*. The F-test value of three ligninolytic enzymes expressions among the three fungi species was 3.75*, 5.20** and 3.01* for lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase respectively, and the value for manganese peroxidase reaching a highly significant level. The wood chip treatment had significant difference from the control, and F-test value for lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase was 3.84*, 4.19* and 5.28* respectively. No clear variations among fungi species for the expressions of endoglucanase and exoglucanase were noted, while the expressions were obviously affected by the existence of carbon in the medium, and the F-test value was 3.99* and 4.04* for endoglucanase and exoglucanase respectively, both values reached a significant level. Target region amplification polymorphism (TRAP) was used to analyze the lignocellulose degradation enzyme gene polymorphisms in the three white-rot fungi by using 29 sets of selected primers. By using TRAP, we amplified 357 bands, including 255 polymorphic bands, with 71.43% of the total polymorphic loci percentage, where the polymorphic loci percentage of the lignin and cellulose degradation enzyme genes reached 73.77% and 68.97%, respectively. This result indicated that the lignocellulose degradation enzyme genes of the three white-rot fungi have high interspecific variations. Thus, we showed that TRAP molecular markers are useful for the analysis of variations among species of wood-rot fungi at the gene level.

Key Words: white-rot fungi; lignocellulose degradation enzymes; TRAP molecular marker; genetic variation

木腐菌是生态系统中森林微生物的重要组成部分,其分泌的多种酶能降解木材中的纤维素、半纤维素和木质素,将木纤维分解为简单的碳水化合物,营木质有机物腐生^[1-2]。按其对于木纤维降解类型不同,木腐菌分为白腐菌、褐腐菌和软腐菌三类^[3]。白腐菌因腐朽木材呈白色而得名,属于担子菌门的真菌,在长期的生物进化过程中形成了一套独特的木质素降解系统,是自然界中木质素的最有效降解物^[4]。

早期木腐菌研究主要集中于形态学与分类学,侧重于从自然界中筛选和人工诱变选育高酶活菌株^[5]。随着生物化学和分离技术的发展,有关木腐菌的木质纤维素酶组分的分离和降解机制研究逐渐展开,目前对结晶纤维素的水解机制已有初步了解^[6-9]。但由于天然木材中半纤维素和木质素与纤维素间紧密相连的特殊结构,天然木质纤维素难被降解的原因仍未被阐明^[10-12]。20 世纪 80 年代初 Kirk 和 Gold 分别从白腐菌模式菌种——黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) 中发现木质素过氧化物酶(简称 LiP 酶)和锰过氧化物酶(简称 MnP 酶),提出白腐真菌在降解木质素过程中,需要纤维素或葡萄糖作为木质素的共底物,是木质素生物降解研究的突破。LiP 酶、MnP 酶与后来发现的漆酶(简称 Lac 酶),共同构成了白腐菌的木质素降解酶系。因白腐菌具有木质纤维素降解特性,故在生物质能源利用、农业废弃物循环利用、造纸废液处理和环境保护、生物制浆、纺织印染、洗涤剂生产、食品饮料加工等领域拥有广阔的应用前景^[13-17]。

随着现代分子生物学技术的发展,白腐菌作为重要林木病原真菌,其群体遗传学的研究已进入分子水平,包括同工酶分析、氨基酸序列测定以及 DNA 序列变异分析等。分子标记技术为大规模进行林木病原真菌的遗传变异研究创造了有利的条件。靶位区域扩增多态性(Target Region Amplification Polymorphism, TRAP)分子标记,是由 Hu 和 Vick 在 SRAP 分子标记基础上提出的新型分子标记技术^[18-19]。TRAP 分子标记基于已知基因的 cDNA 或 EST 序列信息设计锚定引物,选择性扩增靶基因序列,随机引物富含 AT 或 GC 碱基,可与模板 DNA 中内含子或外显子区域配对,扩增产物可对靶基因序列进行多态性标记。该技术操作简单、多态性高、重复性好、共显性高、费用低、靶基因区域针对性强,是遗传多样性研究中较为理想的分子标记技术^[20-21]。

本研究以帽儿山采集的木蹄层孔菌(*Fomes fomentarius*)、鲍姆鲍姆木层孔菌(*Phellinus baumiibaumii*)和火木层孔菌(*Phellinus igniarius*)为对象,测定其生长速度、生物量变化以及木质纤维素相关酶活性,为木材腐朽机理研究和工业生产菌株选择提供基础数据;采用 TRAP 分子标记技术对 3 种白腐菌的木质纤维素酶相关基因多态性进行检测,为从特定基因水平上研究木腐菌遗传变异提供有用的信息。

1 材料与方法

1.1 实验材料 with 处理

本试验所用 3 种白腐菌为木蹄层孔菌、鲍姆鲍姆木层孔菌和火木层孔菌,采自黑龙江省东北林业大学帽儿山实验林场,三者均为白色腐朽菌类型^[22],基本特征如表 1 所示。

表 1 3 种木材腐朽菌的基本特征

Table 1 The main characteristics of three wood-rot fungi

木材腐朽菌 Wood rot fungi	分类地位 Taxonomic status	腐朽类型 Decaying type	常见宿主 The common host
木蹄层孔菌 (<i>Fomes fomentarius</i>)	多孔菌目 多孔菌科 层孔菌属	白色腐朽	白桦、枫桦、杨等阔叶树
鲍姆鲍姆木层孔菌 (<i>Phellinus baumii</i>)	锈革孔菌目 锈革菌科 木层孔菌属	白色腐朽	杨、栎、丁香等阔叶树
火木层孔菌 (<i>Phellinus igniarius</i>)	锈革孔菌目 锈革菌科 木层孔菌属	白色腐朽	白桦、杨、柳等阔叶树

无菌条件下,以 75%酒精清洗腐朽菌子实体表面,用解剖刀分离出菌种子实体内部污染较少、生长旺盛的小菌块,用 75%的酒精溶液消毒 1 min,无菌水清洗 3 次,滤纸吸干后接种于 PDA 固体平板培养基,23℃ 气候箱中避光培养,待菌丝长满培养基表面,选择无杂菌污染的菌丝连续转接 2 次,转接入含白桦木屑或麦麸试管内,23℃ 气候箱继续培养,待菌丝长满试管,4℃ 冰箱内保存待用^[23]。

1.2 菌丝生长特性比较

采用菌落直径法和菌丝干重法比较 3 种白腐菌的生物学特性^[24]。分别将 3 种白腐菌纯菌丝点种在 PDA 固体培养基(90 mm 径培养皿)平板中央位置,28℃ 气候箱避光倒置培养;每 12 h 测量菌落直径变化,直至菌丝长满平板。分别将 3 种白腐菌菌饼(直径 90 mm)接种于 100 mL 三角瓶内的 40 mL PDA 液体培养基中,28℃ 150 rpm 恒温振荡培养;每 48 h 取菌丝体,滤纸过滤得到粗菌丝体,用蒸馏水冲洗 3 次,100℃ 干燥箱中烘干至恒重,称量干重,比较 3 种白腐菌菌丝体生物量变化。每处理 3 次重复。

1.3 酶活性鉴定

1.3.1 木质素降解酶活性的测定

木质素降解酶粗酶液制备:无菌操作条件下,将 3 种白腐菌菌饼接种于 100 mL 三角瓶内 40 mL PDA 液体培养基中,每个菌种 2 个处理,处理样中加白桦木屑,对照样无木屑;28℃ 150 rpm 恒温振荡培养,定期取菌样培养液,4℃ 15000 rpm 离心 10 min 取上清液,得木质素降解相关酶粗酶液^[25]。每 3d 取一次菌样测定酶活,连续取 7 次测定,每次测定每个处理取 3 个重复菌样。每个处理中分别测定 3 种酶活,锰过氧化物酶(MnP 酶)测量见参考文献^[26]、漆酶(Lac 酶)的活性测量见参考文献^[27]、木质素过氧化物酶(LiP 酶)活性测量见参考文献^[28]。

1.3.2 纤维素降解酶活性的测定

产纤维素酶固体培养基配置:向 50 mL 三角瓶中加入 1 g 碳源物质和 10 mL 培养液,每个菌种 2 个处理,其碳源物质分别为白桦木屑和麦麸;培养液中各种无机盐的质量百分含量分别为:2% (NH₄)₂SO₄,0.1% KH₂PO₄,0.5% MgSO₄ · 7H₂O,0.01% CaCl₂,0.01% NaCl,0.005% FeSO₄ · 7H₂O,0.0016% MnSO₄ · H₂O,0.0014% ZnSO₄ · 7H₂O,0.002% CoCl₂。纤维素降解酶粗酶液制备:无菌操作条件下,将 3 种白腐菌接种于产纤维素酶固体培养基,28℃ 气候箱中培养,定期取菌样制备粗酶液,向培养瓶中加入 5 倍质量的蒸馏水浸泡 12h,双层纱布过滤得滤液,4℃ 15000 rpm 离心 10 min 取上清液,所得为纤维素降解相关酶粗酶液。每隔 4d 取一次菌样测定酶活,连续取 7 次测定,每次测定每个处理取 3 个重复菌样。每个处理中分别测定 2 种酶活,葡聚糖内切酶(EG 酶)和葡聚糖外切酶(EC 酶),活性测定见参考文献^[29]。

1.4 木质纤维素降解相关酶基因 TRAP 标记遗传变异检测

采用改良的 CTAB 法提取 3 种白腐菌的总 DNA^[30]。以来自 NCBI 数据库的木质纤维素降解相关酶基因

为靶标基因序列,设计固定引物,引物信息如表 2 所示。筛选具有较好扩增条带多态性的引物对,用于 3 菌种 TRAP-PCR 分子标记检测,每个处理 3 次重复。PCR 最佳反应条件:反应体系 20 μ L,模板 DNA 100 ng、固定引物(10 μ M) 2.0 μ L、随机引物(10 μ M) 2.0 μ L、dNTP (2 mM) 2.0 μ L、MgCl₂(25mM) 2.0 μ L、1 $\times$ Buffer (含 K⁺,不含 Mg²⁺) 2.0 μ L、Taq DNA 聚合酶 0.15 μ L、ddH₂O 7.85 μ L;PCR 程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 1min,35 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,5 个循环;94 $^{\circ}$ C 1 min,56 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 扩增产物经 1 $\times$ TAE 缓冲液,1.8%琼脂糖凝胶,100 V 缓冲电压电泳,UPS 凝胶成像系统(Universal Hood II, BioRad)检测电泳结果。

表 2 TRAP-PCR 引物碱基序列
Table 2 The bases sequence of primers for TRAP-PCR

引物类型 Primer type	靶基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'—3') Primer nucleotide sequence
固定引物 Anchor Primer	锰过氧化物酶	MnP1	ATGGCGCGTGAAGGTG
		MnP2	GGTGAGCGGAGGGAC
	漆酶	Lac1	ACAACTACAACAACCCGACTG
		Lac2	GTCTGGAAGCGGATTGTG
	木质素过氧化物酶	LiP1	CCCGAGCCCTTCGAT
		LiP2	CCCCGACCCTTCC
	纤维素二糖水解酶基因 I	CBH I 1	ATCTGCGACAAGGACGG
		CBH I 2	GGGTGACGACGGTAACCT
	纤维素二糖水解酶基因 II	CBH II 1	AGTCAACGGTCGGGA
		CBH II 2	GAAGTGGGTCTGCTACCG
	纤维二糖脱氢酶基因 I	CDH I	TCAACGACAACCCCGAC
		CDH I	GTCGGGGTTGTCGTTGA
	葡聚糖内切酶基因	EG1	ACGAGCCGCACGACAT
		EG2	TCGTGCGGCTCGTTTCAT
	β -葡萄糖苷酶基因	β 1	GTGGAAGGTGCTGCGGTA
		β 2	CAGGGAGGCGGACTGG
随机引物	/	em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Random Primer	/	em3	GACTGCGTACGAATGAC
	/	me1	TGAGTCCAAACCGGATA
	/	me2	TGAGTCCAAACCGGAGC

1.5 数据处理与统计分析方法

采用 SPSS17.0 统计学软件,对 3 种白腐菌的几种主要木质纤维素酶活性进行种间和处理间方差及显著性分析。

多态性百分率(Polymorphic percentage)是描述群体遗传变异量的参数,是指群体内多态性基因座的比例。公式为: $P = k / n \times 100\%$,其中 P 为多态位点百分比,k 为多态位点数,n 为测定的位点总数。

2 结果与分析

2.1 3 种白腐菌菌丝生长速度和生物量变化

PDA 固体培养基中,3 种白腐菌菌落直径在 16 d 培养过程中变化如图 1A 所示。3 菌种菌丝生长速度均匀,木蹄层孔菌和火木层孔菌的生长速度较快,菌丝的平均生长速度分别是 7.5 mm/d 和 6.9 mm/d,鲍姆鲍姆木层孔菌生长速度相对较慢,菌丝的平均生长速度是 5.6 mm/d,三者之间生长速度差异不明显,均属于快速生长的类型。

PDA 液体培养条件下,3 种白腐菌的菌丝生物量变化如图 1B 所示。生长 14 d 后,木蹄层孔菌生物量最

高,达到 6.14 g/L,其次为鲍姆鲍姆木层孔菌,达到 5.02 g/L,为同期木蹄层孔菌的 81.75%,火木层孔菌生物量最低,为 2.31 g/L,仅为同期木蹄层孔菌的 37.62%。木蹄层孔菌和鲍姆鲍姆木层孔菌的生长调整期相对较短,时间为 6 d,对数期的生长速度相对较快。火木层孔菌的生长调整期相对较长,时间为 10d,对数期的生长速度相对较慢。

火木层孔菌在液体培养基中的生长速度比鲍姆鲍姆木层孔菌快,而在固体培养基中的生物量却比鲍姆鲍姆木层孔菌小,由此可见火木层孔菌可能更适合在液体培养基中生长。

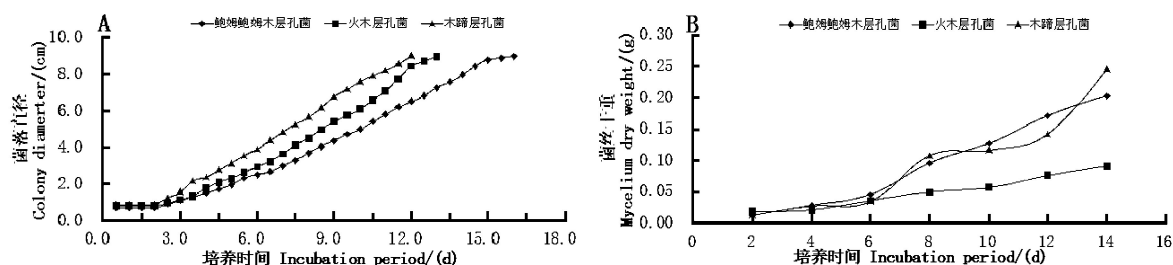


图 1 3 种白腐菌菌落生长速度和菌丝生物量变化曲线

Fig. 1 The mycelium growth and biomass changes of 3 white-rot fungi.

2.2 木质纤维素降解酶活性变化

2.2.1 3 种白腐菌木质素降解酶活性变化

不同培养条件下 3 种白腐菌产木质素降解相关酶活性变化如图 2 所示。培养初期 3 种菌产 LiP 酶、MnP 酶、Lac 酶量低,经 6-9 d 调整期后进入对数生长期,酶的表达量开始增加,18—21 d 后进入衰退期,产酶量逐渐下降。

木蹄层孔菌产 MnP 酶、Lac 酶量高于鲍姆鲍姆木层孔菌和火木层孔菌,并随着诱导时间的延长而增高;鲍姆鲍姆木层孔菌和火木层孔菌产 LiP 酶量高于木蹄层孔菌;3 种白腐菌 MnP 酶、Lac 酶、LiP 酶的表达量种间差异显著 ($F=3.75^*$ 、 5.20^{**} 、 3.01^*)。

3 菌种的 MnP 酶、Lac 酶、LiP 酶的表达量在处理与对照间差异显著 ($F=3.84^*$ 、 4.19^* 、 5.28^*)。图 2-A、B 显示木蹄层孔菌的 MnP 酶和 Lac 酶活性木屑诱导组略高于对照组;鲍姆鲍姆木层孔菌表达 Lac 酶活性极低,处理间差异不明显;火木层孔菌屑诱导组的 MnP 酶、Lac 酶活性高于对照组,白桦木屑对 MnP 酶、Lac 酶诱导作用的种间差异显著 ($F=3.85^*$ 、 5.27^{**})。图 2-C 中,木蹄层孔菌白桦诱导组 LiP 酶活性高于对照组,鲍姆鲍姆木层孔菌和火木层孔菌的对照组 LiP 酶活性高于白桦诱导组,白桦木屑诱导促进木蹄层孔菌 LiP 酶表达,抑制鲍姆鲍姆木层孔菌和火木层孔菌 LiP 酶表达,白桦木屑对 LiP 酶表达诱导作用的种间差异显著 ($F=4.16^*$)。

2.2.2 3 种白腐菌纤维素降解酶活性变化

不同培养底物诱导下,3 种白腐菌产纤维素降解相关酶活性变化如图 3 所示。3 菌种在培养初期均开始产葡聚糖内切酶(EG)和葡聚糖外切酶(EC),酶的表达量逐渐增加,对数生长期达到峰值后逐渐下降,但麦麸培养基中火木层孔菌的 EC 酶活性,在测量后期仍继续增长。麦麸作为碳源的培养基中 3 种白腐菌的酶活峰值出现时间晚于木屑做碳源的培养基。

3 菌种的 EG 酶、EC 酶表达量的种间差异不明显 ($F=1.63$ 、 1.65 , $P<0.05$)。碳源影响纤维素降解相关酶的表达量,白桦木屑作为碳源的培养基中,3 菌种表达的 EG 酶和 EC 酶活性较低,活性变化较小,菌种长势一般;麦麸作为碳源的培养基中,3 菌种表达的两种酶活性较高,活性变化较大,菌种长势旺盛,EG 酶、EC 酶活性处理间差异显著 ($F=3.99^*$ 、 4.04^*)。

2.3 木质纤维素降解酶基因 TRAP 标记遗传变异

2.3.1 TRAP 引物筛选结果

根据来自 NCBI 数据库的木质纤维素降解相关酶基因设计固定引物,通过 TRAP-PCR 预实验筛选针对 7

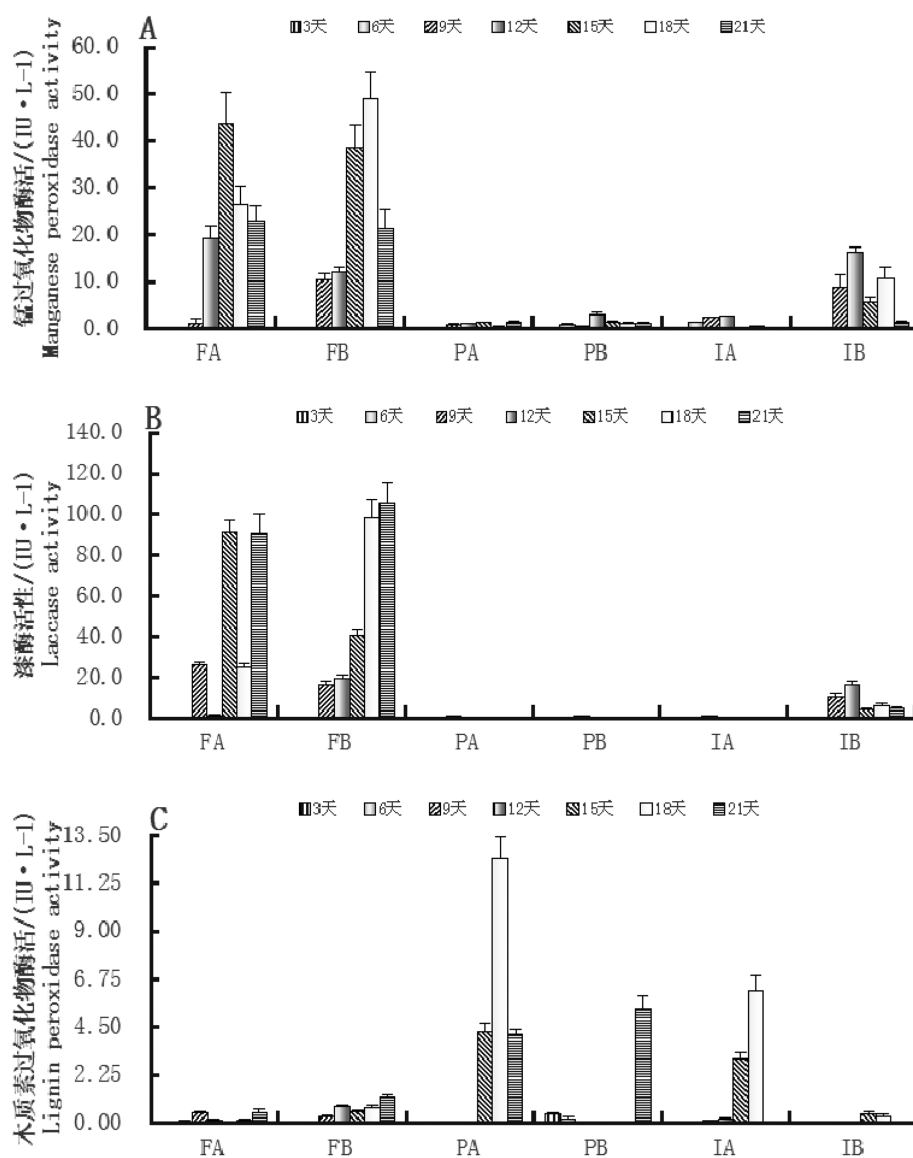


图2 不同培养条件下3种白腐菌木质素降解相关酶活性变化

Fig. 2 The activities of three main lignin degradation enzymes in 3 wood-rot fungi in different culturing conditions.

FA:木蹄层孔菌木屑培养 *F. fomentarius* in sawdust medium; FB:木蹄层孔菌麦麸培养 *F. fomentarius* in wheat bran; PA:鲍姆鲍姆木层孔菌木屑培养 *P. baumiibaumii* in sawdust medium; PB:鲍姆鲍姆木层孔菌麦麸培养 *P. baumiibaumii* in wheat bran; IA:火木层孔菌木屑培养 *P. igniarius* in sawdust medium; IB:火木层孔菌麦麸培养 *P. igniarius* in wheat bran

个木质纤维素酶基因的引物对,结果从64对引物中筛选出扩增条带清晰、多态性较好的引物对29对。其中以木质素降解酶基因为靶基因的引物对有15对,可标记MnP基因的1对,标记Lac基因的6对,LiP基因的8对;以纤维素降解酶基因为靶基因的引物对有14对,可标记CBH基因的引物10对,标记CDH基因的3对,标记EG基因的1对。所筛选引物对如表3所示。

2.3.2 3种白腐菌木质纤维素降解酶基因TRAP标记的遗传多态性

图4为3菌种木质纤维素相关酶基因TRAP-PCR扩增产物的部分电泳结果,表4为各酶基因的扩增条带的多态性统计。以3菌种的LiP酶基因为靶基因的8对引物扩增共产生94个条带,多态性条带为67条,木蹄层孔菌多态性比率为74.29%,鲍姆鲍姆木层孔菌多态性比率为73.53%,火木层孔菌多态性比率为64.00%,该基因总多态性条带比率为71.27%;以MnP酶基因为靶基因的1个引物对共扩增3个条带,多态性条带为2条,该基因总多态性条带比率为66.67%;以Lac酶基因为靶基因的6个引物对共扩增80个条带,多

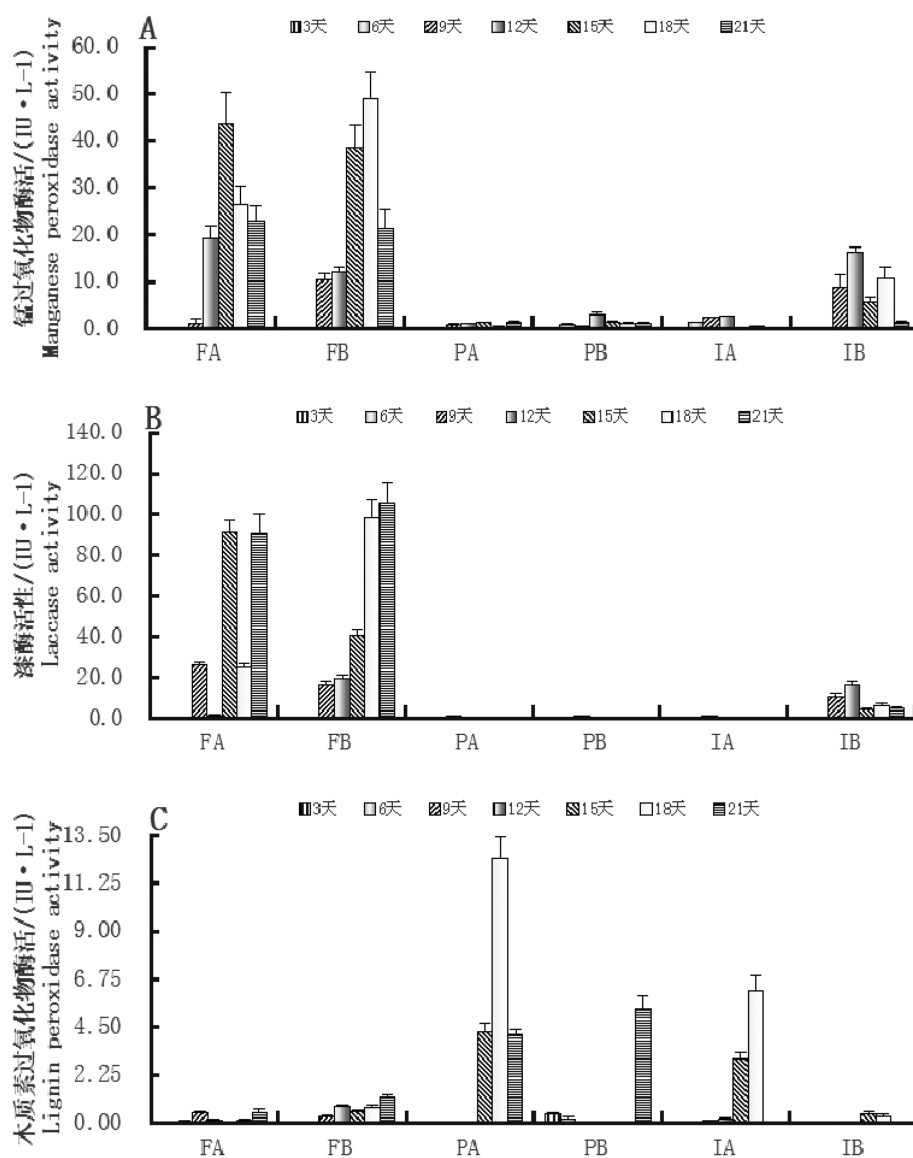


图3 不同碳源培养条件下3种白腐菌的纤维素降解相关酶活性变化。

Fig. 3 The activities of two cellulase degradation enzymes in 3 wood-rot fungi measured in different carbon source culture media.

FA:木蹄层孔菌对照 F. fomentarius control; FB:木蹄层孔菌木屑培养 F. fomentarius in sawdust medium; PA:鲍姆鲍姆木层孔菌对照 P. baumiibaumii control; PB:鲍姆鲍姆木层孔菌木屑培养 P. baumiibaumii in sawdust medium; IA:火木层孔菌对照 P. igniarius control; IB:火木层孔菌木屑培养 P. igniarius in sawdust medium

态性条带为 62 条,木蹄层孔菌多态性比率为 72.73%,鲍姆鲍姆木层孔菌多态性比率为 79.31%,火木层孔菌多态性比率为 79.31%,该基因总多态性条带比率为 77.50%;以 CBH I 酶基因为靶基因的 4 个引物对共扩增 58 个条带,多态性条带为 40 条,木蹄层孔菌多态性比率为 66.67%,鲍姆鲍姆木层孔菌多态性比率为 71.43%,火木层孔菌多态性比率为 68.42%,该基因总多态性条带比率为 68.97%;以 CBH II 酶基因为靶基因的 6 个引物对共扩增 65 个条带,多态性条带为 47 条,木蹄层孔菌多态性比率为 66.67%,鲍姆鲍姆木层孔菌多态性比率为 75.00%,火木层孔菌多态性比率为 73.91%,该基因总多态性条带比率为 72.31%;以 CDH I 酶基因为靶基因的 3 个引物对共扩增 40 个条带,多态性条带为 25 条,木蹄层孔菌多态性比率为 58.33%,鲍姆鲍姆木层孔菌多态性比率为 70.59%,火木层孔菌多态性比率为 54.55%,该基因总多态性条带比率为 62.5%;以 EG2 酶基因为靶基因的 1 个引物对共扩增 11 个条带,多态性条带为 8 条,木蹄层孔菌多态性比率为 80.00%,鲍姆鲍姆木层孔菌多态性比率为 66.67%,火木层孔菌多态性比率为 66.67%,该基因总多态性条带比率为 72.

73%;由此可见,除 MnP 酶基因外,3 种白腐菌的木质纤维素降解酶基因在种间均存在较高的遗传差异。

表 3 TRAP-PCR 扩增产物呈多态性引物对
Table 3 The selected primer sets of higher polymorphism in TRAP-PCR amplification

靶基因 Target genes	扩增产物呈多态性引物对 Primer sets of higher polymorphism	
木质素降解酶相关基因 Lignin degradation enzymes	LiP 基因	LiP1-em2、LiP1-em3、LiP1-me1、LiP1-me2、LiP2-em2、LiP2-em3、LiP2-me1、LiP2-me2
	MnP 基因	MnP2-em2
related genes	Lac 基因	Lac1-em2、Lac1-em3、Lac1-me1、Lac1-me2、Lac2-em2、Lac2-me2
纤维素降解酶相关基因 Cellulase degradation enzymes	CBH I 基因	CBH I 2-em2、CBH I 2-em3、CBH I 2-me1、CBH I 2-me2
	CBH II 基因	CBH II 1-me1、CBH II 1-me2、CBH II 2-em2、CBH II 2-em3、CBH II 2-me1、CBH II 2-me2
related genes	CDH I 基因	CDH I -em2、CDH I -me1、CDH I -me2
	EG 基因	EG2-me2

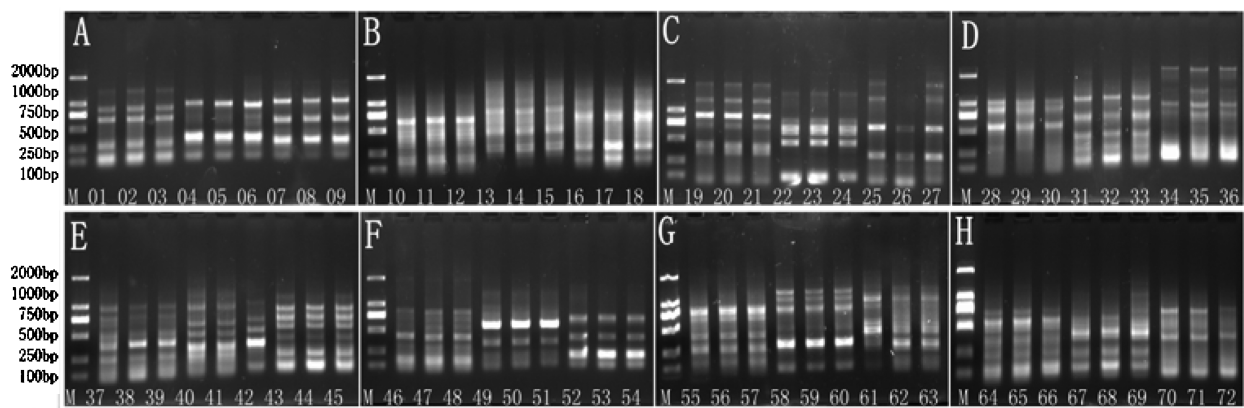


图 4 3 种白腐菌木质纤维素降解相关酶基因 TRAP-PCR 扩增产物电泳图

A-H 的扩增引物分别为 LiP1-em3、MnP2-em2、Lac1-me1、CBH I 2-me1、CBH II 1-em2、CBH II 2-me2、CDH I -me1、EG2-me2。泳道 1-3, 10-12, 19-21, 28-30, 37-39, 46-48, 55-57, 64-66 为木蹄层孔菌;泳道 4-6, 13-15, 22-24, 31-33, 40-42, 49-51, 58-60, 67-69 为鲍姆鲍姆木层孔菌;泳道 7-9, 16-18, 25-27, 34-36, 43-45, 52-54, 61-63, 70-72 为火木层孔菌, M 为 marker。

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of TRAP-PCR amplification result of 3white-rot fungi with chosen anchor primers.

The amplification primer pair for A toH is respectively LiP1-em3, MnP2-em2, Lac1-me1, CBH I 2-me1, CBH II 1-em2, CBH II 2-me2, CDH I -me1 and EG2-me2. 1-3, 10-12, 19-21, 28-30, 37-39, 46-48, 55-57, 64-66; *Fomes fomentarius*, 4-6, 13-15, 22-24, 31-33, 40-42, 49-51, 58-60, 67-69; *Phellinus baumiibaumii*, 7-9, 16-18, 25-27, 34-36, 43-45, 52-54, 61-63, 70-72; *Phellinus igniarius*, M; DL 2000 marker.

表 4 木质纤维素降解酶基因 TRAP 扩增位点多态性比较

Table 4 Polymorphism comparison of TRAP amplification loci for lignocellulose degradation enzyme genes

靶位基因 Target Gene	使用引物对数目 Number of used primer sets	菌种 Fungi	扩增总条带数目 Total bands amplified	多态性条带数目 Number of polymorphic bands	菌种内多态位点比率 Intraspecific polymorphic percentage	菌种间多态位点比率 Interspecific polymorphic percentage
LiP 基因	8	木蹄层孔菌	35	26	74.29%	71.27%
Lignin peroxidases		鲍姆鲍姆木层孔菌	34	25	73.53%	
genes		火木层孔菌	25	16	64.00%	
MnP 基因	1	木蹄层孔菌	3	2	66.67%	66.67%
Manganese peroxidases		鲍姆鲍姆木层孔菌	3	2	66.67%	
gene		火木层孔菌	3	2	66.67%	
Lac 基因	6	木蹄层孔菌	22	16	72.73%	77.50%
Laccase genes		鲍姆鲍姆木层孔菌	29	23	79.31%	
		火木层孔菌	29	23	79.31%	

续表

靶位基因 Target Gene	使用引物对数目 Number of used primer sets	菌种 Fungi	扩增总条带数目 Totle bands amplified	多态性条带数目 Number of polymorphic bands	菌种内多态位点 比率 Intraspecific polymorphic percentage	菌种间多态位点 比率 Interspecific polymorphic percentage
木质素降解酶 基因 Lignin degradation enzymes genes	15	木蹄层孔菌 鲍姆鲍姆木层孔菌 火木层孔菌	60 66 57 183	44 50 41 135	73.33% 75.76% 71.93%	73.77%
CBH I 基因 Cellobio hydrolase I genes	4	木蹄层孔菌 鲍姆鲍姆木层孔菌 火木层孔菌	18 21 19	12 15 13	66.67% 71.43% 68.42%	68.97%
CBH II 基因 Cellobiohydrolase II genes	6	木蹄层孔菌 鲍姆鲍姆木层孔菌 火木层孔菌	18 24 23	12 18 17	66.67% 75.00% 73.91%	72.31%
CDH I 基因 Cellobiosed hydrogenase I genes	3	木蹄层孔菌 鲍姆鲍姆木层孔菌 火木层孔菌	11 17 12	6 12 7	54.55% 70.59% 58.33%	62.50%
EG2 基因 Endoglucase gene	1	木蹄层孔菌 鲍姆鲍姆木层孔菌 火木层孔菌	5 3 3	4 2 2	80.00% 66.67% 66.67%	72.73%
纤维素降解酶 基因 Cellulase degradation enzymes genes	14	木蹄层孔菌 鲍姆鲍姆木层孔菌 火木层孔菌	53 65 56 174	35 47 38 120	66.04% 72.31% 67.86%	68.97%
总计 Totle	29	木蹄层孔菌 鲍姆鲍姆木层孔菌 火木层孔菌	113 131 113 357	79 97 79 255	69.91% 74.05% 69.91%	71.43%

3 讨论

白腐菌既可以表达木质素酶也可以表达纤维素酶,用于木质纤维素的降解。但不同的菌种间各种酶的表达存在很大差异,差异主要表现在表达量和表达时间上。

本研究的 3 种白腐菌分泌的三种主要木质素酶在表达量和表达时间上,种间存在很大差异。从表达量上看,木蹄层孔菌的 Lac 酶表达量很高,而鲍姆鲍姆木层孔菌的 Lac 酶表达量极低,不论是木屑诱导还是对照都几乎不表达;木蹄层孔菌偏好产 MnP 酶、Lac 酶,鲍姆鲍姆木层孔菌和火木层孔菌偏好产 LiP 酶。白桦木屑对 3 种白腐菌中 MnP 酶、Lac 酶表达有诱导促进作用,对鲍姆鲍姆木层孔菌和火木层孔菌产 LiP 酶有诱导抑制作用,诱导作用种间差异显著。从表达时间上看,白桦木屑诱导作用在种间差异显著,白桦木屑诱导作用在不同菌种的不同酶中出现或早或晚,到达产酶峰值出现时间或促进或延迟,种间差异显著。原因可能是不同菌种间的遗传差异以及对诱导物的响应各不相同所致。

本研究的 3 种白腐菌产纤维素降解酶能力的种间差异不明显,但酶的表达量和表达时间受碳源影响明显,不同处理间差异显著。原因可能在于纤维素降解酶系是多组分酶系,与其他的酶促反应有很大的区别,各组分之间存在复杂的协同反应关系,进而影响了 EG 酶和 EC 酶的表达量和活性变化。

以来自 NCBI 数据库的木质纤维素降解相关酶基因为靶标基因序列,设计固定引物,通过 TRAP-PCR 筛选能产生多态性条带的引物以用于菌种间遗传变异研究。针对 7 个木质纤维素酶相关基因使用筛选出的 29

对引物,对3种白腐菌进行TRAP-PCR扩增,产生总条带数为357条,多态性条带数为255条,平均每对引物扩增出的条带数为12.31条,条带的大小范围在100—2000 bp之间。其中以木质素降解相关酶基因为靶基因的15个引物对,共扩增183个条带,135条为多态性条带,木蹄层孔菌多态性比率为73.33%,鲍姆鲍姆木层孔菌多态性比率为75.76%,火木层孔菌多态性比率为71.93%,木质素降解酶基因总多态位点比率为73.77%;以纤维素降解相关酶基因为靶基因的14个引物对共扩增174个条带,120条为多态性条带,木蹄层孔菌多态性比率为66.04%,鲍姆鲍姆木层孔菌多态性比率为72.31%,火木层孔菌多态性比率为67.86%,纤维素降解酶基因总多态位点比率为68.97%。本研究表明3种白腐菌均显示较高的木质素和纤维素降解酶基因的遗传多态性。因此,特异基因的TRAP分子标记方法可用于木材腐朽菌种间遗传变异研究。

从形态分类学角度看,火木层孔菌和鲍姆鲍姆木层孔菌均为锈革菌科木层孔菌属菌种,而木蹄层孔菌为多孔菌科层孔菌属菌种。但从它们木质纤维素酶的胞外表达量和表达趋势,以及7个木质纤维素酶靶基因扩增产物电泳结果上看,火木层孔菌与木蹄层孔菌多态性条带相似度高,木蹄层孔菌与鲍姆鲍姆木层孔菌的条带相似程度低;而鲍姆鲍姆木层孔菌的特异性条带多,火木层孔菌与木蹄层孔菌特异性条带少。原因可能与火木层孔菌与木蹄层孔菌具有相同的寄主有关;同时,从基因进化关系上,木蹄层孔菌与火木层孔菌可能更近,与鲍姆鲍姆木层孔菌进化关系较远。当然,这一结果还有待于进一步探讨。

参考文献(References):

- [1] 池玉杰. 东北林区64种木材腐朽菌木材分解能力的研究. 林业科学, 2001, 37(5): 107-112.
- [2] 魏玉莲, 戴玉成. 木材腐朽菌在森林生态系统中的功能. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1935-1938.
- [3] 李坚. 木材保护学. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1999: 68-70.
- [4] 袁海生, 戴玉成, 曹云, 杨建. 白腐真菌染料脱色菌株的筛选及一色齿毛菌脱色条件的研究. 菌物学报, 2010, 29(3): 429-436.
- [5] 费尚芬, 鹿宁, 刘坤, 刘毅. 白腐菌纤维素酶高酶活菌株的筛选. 安徽农业科学, 2006, 34(1): 22-23.
- [6] Schwarze F W M R, Engels J, Mattheck C. Fungal Strategies of Wood Decay in Trees. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1999.
- [7] Kirk T K, Farrell R L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. Annual Review of Microbiology, 1987, 41: 465-501.
- [8] Kirk T K, Schultz E, Connors W J, Lorenz L F, Zeikus J G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Archives of Microbiology, 1978, 117: 277-285.
- [9] Deswal D, Khasa Y P, Kuhad R C. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 6065-6072.
- [10] 王希国, 杨谦, 燕红. 纤维素酶催化水解和氧化机制的研究进展. 林产化学与工业, 2005, 25(3): 125-130.
- [11] 王敏. 白腐菌降解木质素研究进展. 衡水学院学报, 2011, 13(1): 51-53.
- [12] 杨忠, 江泽慧, 费本华. 木材初期腐朽研究综述. 林业科学, 2006, 42(3): 99-103.
- [13] Young R A, Akhtar M. Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. New York: John Wiley & Sons Inc, 1997: 273-300.
- [14] 薛海燕. 降解玉米秸秆产纤维素酶和木质素酶菌种的筛选. 酿酒科技, 2008, (10): 44-47.
- [15] 吴志显, 池玉杰. 木材白腐菌对木质素生物降解机制的初步研究. 中国森林病虫, 2005, 24(3): 1-6.
- [16] 司静, 崔宝凯, 贺帅, 戴玉成. 微酸多年卧孔菌产漆酶条件优化及其在染料脱色中的应用. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 736-741.
- [17] 司静, 崔宝凯, 戴玉成. 东方栓孔菌在染料脱色中的应用及其脱色条件的优化. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(3): 364-371.
- [18] Hu J G, Vick B A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. Plant Molecular Biology Reporter, 2003, 21(3): 289-294.
- [19] Alwala S, Suman A, Arro J A, Veremis J C, Kimbeng C A. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. Crop Science, 2006, 46(1): 448-455.
- [20] 阙友雄, 陈天生, 许莉萍, 陈如凯. 甘蔗重要种质的TRAP标记遗传多样性分析. 农业生物技术学报, 2009, 17(3): 496-503.
- [21] 苗培明, 范玲. TRAP分子标记技术在植物分子遗传育种中的应用. 新疆农业科学, 2007, 44(S3): 50-52.
- [22] 戴玉成. 中国多孔菌名录. 菌物学报, 2009, 28(3): 315-327.
- [23] 曹宇, 徐晔, 王秋玉. 木蹄层孔菌不同居群间生长特性、木质素降解酶与SRAP标记遗传多样性. 生态学报, 2012, 32(22): 7061-7071.
- [24] Baldrian P, Větrovský T, Cajthaml T, Dobiášová P, Petránková M, Šnajdr J, Eichlerová I. Estimation of fungal biomass in forest litter and soil. Fungal Ecology, 2013, 6(1): 1-11.
- [25] 徐晔. 木蹄层孔菌地点间木质素降解酶与SRAP标记的遗传多样性[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [26] 徐淑霞, 张跃灵, 张世敏, 王学东, 吴坤. 黄孢原毛平革菌过氧化物酶的分离、纯化和酶学特性研究. 农业环境科学学报, 2007, 26(1): 295-300.
- [27] 董旭杰, 曹福祥, 陈静, 吕聪. 3种白腐菌木质素降解酶的比较. 中南林业科技大学学报: 自然科学版, 2007, 27(3): 131-135.
- [28] 曹宇. 海绵状白腐菌木质纤维素酶活性及其基因的遗传变异研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
- [29] Li C Z, Yoshimoto M, Fukunaga K, Nakao K. Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. Bioresource Technology, 2007, 98(7): 1366-1372.
- [30] He Y Q. An improved protocol for fungal and preparation. Mycosystema, 2000, 19(3): 434-434.