

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(11):1408-1414; 4 November 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

松材线虫伴生菌中产纤维素酶细菌的筛选、鉴定及其相关基因的克隆

牛秋红¹, 张林¹, 褚学英¹, 杜风光², 冯文生², 惠丰立¹, 柯涛¹, 樊永欣¹

¹南阳师范学院生命科学与技术学院, 南阳 473061

²河南天冠企业集团有限公司车用生物燃料技术国家重点实验室, 南阳 473000

摘要: 【目的】从松材线虫伴生菌中筛选出高效降解纤维素的细菌菌株, 初步鉴定后, 对其相应的纤维素酶基因尝试克隆。【方法】首先从河南南阳松材线虫病疫区采集到的木材样本中, 分离获得松材线虫。采用刚果红平板初筛法, 从松材线虫伴生菌中获得具有分泌较高活性纤维素酶的细菌菌株。基于该菌株的形态学、生理学及16 s rDNA 序列特征等对高活性菌株进行分类鉴定。设计兼并引物, 从高活性菌株中克隆该菌株的纤维素酶基因, 并进行序列分析。【结果】获得7株具有分泌较高活性纤维素酶的细菌菌株, 其中编号为C8的菌株酶活最高。经鉴定该菌株归为肠杆菌属, 命名为 *Enterobacter* sp. C8。进一步从C8菌株中成功克隆出该菌株的一个全长1104 bp的纤维素酶基因 (GenBank JQ845065), 在NCBI比对后发现该基因分别与产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) KCTC 2190的纤维素合成酶亚单位BcsC的核苷酸序列有97%的同源性, 氨基酸序列有92%的同源性; 与克雷白氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的endo-1,4-D-glucanase基因有82%的同源性, 与不可培养的细菌内切纤维素酶基因有82%的同源性。【结论】本文首次从松材线虫伴生菌中筛选到了一株简单的产纤维素酶的细菌菌株并从中克隆出了一个新型纤维素酶基因, 为下一步进行新能源的利用奠定了理论基础。

关键词: 松材线虫, 伴生菌, 纤维素酶, 筛选与鉴定, 基因克隆

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2012)11-1408-07

纤维素是地球上数量最大的可再生性能源物质, 每年全球由光合作用合成纤维素产物高达 1.15×10^{11} — 2.10×10^{11} t, 是人类社会赖以生存的基本物质来源^[1]。微生物利用其分泌的纤维素酶对纤维素的降解、转化是自然界碳素循环的重要环节, 对这个过程的有效利用可望在能源、饲料和食物的持续供应上发挥巨大的作用。

纤维素酶是一种复合酶, 主要由外切 β -葡聚糖酶、内切 β -葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶等组成, 还有很高活力的木聚糖酶活力。菌种选育是纤维素酶生产的基础性工作, 国内外许多专家进行了大量研究^[2]。自然界中能够降解纤维素的微生物种类繁多, 能够分泌纤维素酶的微生物来源很广。不同来源的纤维素酶其结构和功能相差很大。目前, 国内

基金项目: 国家自然科学基金(31100104); 校专项人才启动基金(ZX2011004); 河南省高等学校青年骨干教师资助项目; 车用生物燃料技术国家重点实验室开放课题资助项目

作者简介: 牛秋红(1979-), 女, 河南焦作人, 副教授, 博士, 从事线虫病病原细菌与其宿主相互关系的研究。Tel/Fax: +86-377-63525086;

E-mail: qiuhongniu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-05-15; 修回日期: 2012-06-21

外降解纤维素的微生物研究多集中于真菌, 比较典型的有木霉属 (*Trichoderma*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 和青霉属 (*Penicillium*)。而细菌繁殖和产酶速度快、发酵周期短, 遗传背景比较清楚, 更有利于工业生产, 故近年来应用细菌产纤维素酶日益引起重视。郭成栓等从一株产碱性纤维素酶的短小芽胞杆菌菌株 H9 中克隆到了编码葡聚糖内切酶的基因, 并对其基因序列及酶的结构域进行了分析预测^[3]; 刘永生等对地衣芽胞杆菌 GXN151 的纤维素酶基因 cel12A 的序列进行了分析并在大肠杆菌中进行了表达^[4]; 赵云、刘伟丰等人从多粘芽胞杆菌中克隆得到 β -葡萄糖苷酶基因 bglA^[5]。如果能够在某些特殊生物环境的细菌中寻找到高效、作用范围广泛的纤维素酶并研究其作用机制, 将会为人类大规模利用纤维素提供指导, 并为人类的新能源开发奠定理论基础。

松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 是松树的一种灾难性病害的病原生物, 是引发松树萎蔫病的主要原因, 为林木检疫的重要对象之一^[6]。早期研究表明, 松材线虫侵入林木的过程中, 会分泌纤维素酶帮助其分解植物细胞壁的纤维素, 并且能破坏木质部, 在松木早期致病过程中起到了关键作用, 是导致松树死亡的重要致病物质之一^[7-8]。事实上, 多项研究认为, 松材线虫病是由其携带的细菌产生的: Oku 等人从松材线虫虫体和感病松树体内分离到一种致病细菌, 可使松苗萎蔫, 首次提出该病与细菌有关^[9]。Kawazu 等提出该病的真正病原是松材线虫携带的致病细菌^[10]。而赵博光、洪英娣则认为松材线虫病看作是一种由松材线虫和细菌共同感染引起的复合侵染病害^[11-12]。基于以上观点, 松材线虫的伴生细菌很有可能也会分泌纤维素酶来促使其致病性。

本文从河南南阳松材线虫病疫区采集、分离到松材线虫。用无菌水清洗、研磨后, 利用刚果红平板筛选出松材线虫伴生细菌中能分泌纤维素酶的菌株, 并对其活性高的菌株进行初步鉴定, 进一步对其分泌的纤维素酶基因进行了克隆及分析。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Taq 酶、限制性内切酶、PCR Fragment Recovery

Kit 等分子生物学试剂 (TaKaRa); 引物合成及序列测定 (上海生工); PCR 仪、核酸电泳仪、紫外凝胶成像分析系统 (Biorad)、各型规格移液器 (Eppendorf); 小型离心机 (Eppendorf 5418); 恒温培养箱 (ZSD-1160 型, 上海智城分析仪器制造有限公司); 纯水制备系统 (Milipore)。

1.2 产纤维素酶细菌菌株的筛选

本实验用到的松木采自河南南阳疫区, 处理方法如下: 用无菌水将松木浸泡 3 d, 离心, 去上清, 对津液中的松材线虫条数进行镜检, 确保有足够量的松材线虫。将松材线虫接入培养于真菌灰葡萄孢上, 28℃ 培养一周后, 用无菌水将松材线虫洗入灭菌的离心管中, 清洗线虫 2-3 次。利用无菌研钵将虫体研磨, 稀释, 涂布于 CMC 培养基平板。培养 2 d 后, 加入 1 mg/mL 的刚果红溶液染色 2 h, 弃去染液, 加入适量 1 mol/L NaCl 溶液, 洗涤 1 h, 从菌落形成的透明圈直径大小筛选出可产生纤维素酶的菌株。

1.3 纤维素酶活测定

将上述筛选到的菌株分别进行纤维素酶活测定。在以下的研究中, 所有涉及到的量化实验均重复 3 次, 取平均值。

采用 DNS 比色法, 根据参照参考文献 [1, 13] 制备测酶活标准曲线并测定滤纸酶 (FPA) 活力和 CMC 酶活力。

规定 1 mL 酶底物反应液 1 min 内产生相当于 1 μ g/mL 葡萄糖的还原糖量规定为 1 国际单位 (1 IU)。

1.4 高活性细菌的分类鉴定

对得到的高活性菌株进行形态观察, 革兰氏染色实验按照常规方法进行。

细菌基因组的提取及 16S rDNA 的扩增参照参考文献^[14]。对扩增得到的序列分析, 利用 CLUSTALX 和 MEGA 3.1 软件构建系统发育树对菌株进行初步鉴定^[15-16]。

1.5 纤维素酶基因的克隆

选取与鉴定得到的菌株的同源性较高的细菌的已有纤维素酶序列, 从 GenBank 数据库中下载, 比对分析, 根据这些序列的保守区设计兼并引物, 尝试对筛选到的高活性菌株进行纤维素酶基因的扩增。兼并引物序列为: En1: ATGAACGCATTTTCGTGGGK KAC; En2: TTAGTGAGAACKTGCGCATKCC。PCR 扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 50 s, 72℃

1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min。扩增产物纯化后连接到 pMD18-T (TaKaRa) 克隆载体中, 筛选阳性克隆并进行测序 (上海生工生物技术有限公司)。将所得到的序列利用 Blast 软件在 GenBank 数据库中进行相似性搜索, 利用 DNAMAN 软件对扩增的序列与已知的纤维素酶基因序列进行核苷酸和氨基酸比对, 分析所得序列的特征。

2 结果和分析

2.1 产纤维素酶活细菌的筛选和分离

松材线虫伴生菌样品在 CMC 平板上分离纯化共得到 55 株细菌菌株。用刚果红染色后, 纤维素分

解菌的菌落周围均能形成红色的水解圈, 且水解圈的大小同酶活性的高低有一定的数量关系。因此, 刚果红纤维素平板透明圈筛选法可用于识别产纤维素酶的菌株, 还可用于初步判定酶活性高低^[17]。在初筛平板上共有 7 株菌的透明圈较明显 (图 1), 表 1 显示这七个菌株形成的透明圈直径、菌落直径及其比值大小。透明圈与直径比值最大的菌株为 C8 菌株, 初步认为该菌株产酶能力最大。虽然透明圈与菌落直径比值大小直接反映了酶浓度的高低, 但由于多种原因仅以此作为菌株产纤维素酶活力大小的唯一定量指标是不太可靠的^[15], 所以有必要对初筛得到的菌株进行液体发酵, 从而对其酶活进一步测定。



图 1 刚果红染色后呈现的酶水解纤维素透明圈

Fig. 1 Transparent circles by hydrolysis on the congo red plates.

表 1 刚果红 CMC 平板初筛结果

No. of strains	C8	C7	C5	E8	E9	F11	F12
Colony diameter (cm)	0.8	1.0	0.8	1.0	0.6	0.8	
(SD)	(0.2)	(0.3)	(0.2)	(0.1)	(0.1)	(0.3)	(0.1)
Diameter of transparent zone (cm)	4.2	3.8	1.4	1.2	1.0	0.8	1.0
(SD)	(1.0)	(1.2)	(0.6)	(0.7)	(0.2)	(0.1)	(0.2)
Diameter of transparent zone/ Colony diameter	5.25	3.8	1.75	1.2	1.125	1.33	1.125

2.2 纤维素酶活测定结果

首先制备测酶活标准曲线如下图所示:

对上述来自松材线虫伴生菌样本的七株菌进行酶活定量测定, 发现这 7 株细菌菌株对有较强的 FPA 酶活和 CMC 酶活, 其中细菌 C8 的 FPA 酶活和 CMC 酶活分别达到 5.48 U/mL 和 4.84 U/mL, 是这 7 株菌中酶活最高的, 此结果与刚果红平板初筛结果基本一致。具体的酶活测定结果见表 2。上述结果表明, 细菌 C8 菌株的纤维素酶活最强。

2.3 细菌 C8 菌株的鉴定

2.3.1 表型特征: 细菌 C8 兼性厌氧, G⁻, 细胞大小

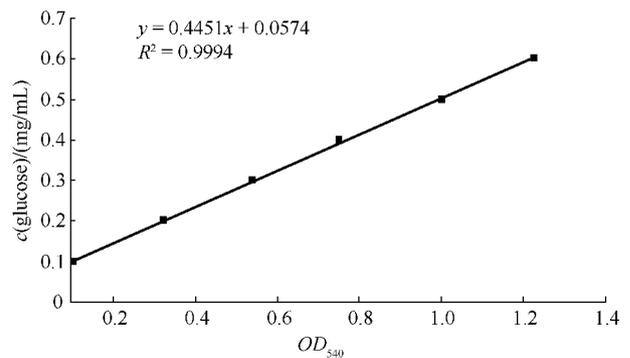


图 2 DNS 比色法测酶活标准曲线制备结果

Fig. 2 Standard curve results during enzyme activity assay by DNS colorimetric method.

为 (0.5 - 1.0) $\mu\text{m} \times$ (1.1 - 2.8) μm 。菌落形态为浅灰色、无光泽, 不透明, 表面光滑半湿润、边缘较厚呈环状隆起。菌株的主要形态特征为: 直杆状, 个体较大, 两端钝圆, 多以分散形式存在 (图 3)。通过运动性观察试验发现该菌株具有运动性。

2.3.2 16S rDNA 序列分析: 通过对菌株的 C8 的 16S rDNA 序列进行测定获得了 1413 个碱基

表 2 FPA 酶活和 CMC 酶活测定结果
Table 2 Results of FPA and CMC activity assays

No. of strains	FPA enzyme activity			CMC enzyme activity		
	OD (SD)	<i>c</i> (glucose) / (mg/mL)	Enzyme activity / (U/mL)	<i>OD</i> ₅₄₀ (SD)	<i>c</i> (glucose) / (mg/mL)	Enzyme activity / (U/mL)
C8	0.357 (0.2)	0.164522	5.48	0.216 (0.1)	0.145	4.84
C7	0.3 (0.1)	0.13915	4.64	0.2001 (0.1)	0.138	4.6
C5	0.23383 (0.1)	0.1097	3.66	0.1895 (0)	0.133	4.44
E8	0.2128 (0.1)	0.10003	3.34	0.1883 (0.1)	0.133	4.43
E9	0.2116 (0.1)	0.0998	3.33	0.1746 (0)	0.127	4.22
F11	0.2377 (0)	0.111	3.71	0.1992 (0.1)	0.105	3.52
F12	0.2182 (0.1)	0.103	3.42	0.1688 (0.1)	0.124	4.14
control	0.11633 (0)	-	-	0.019 (0)	-	-

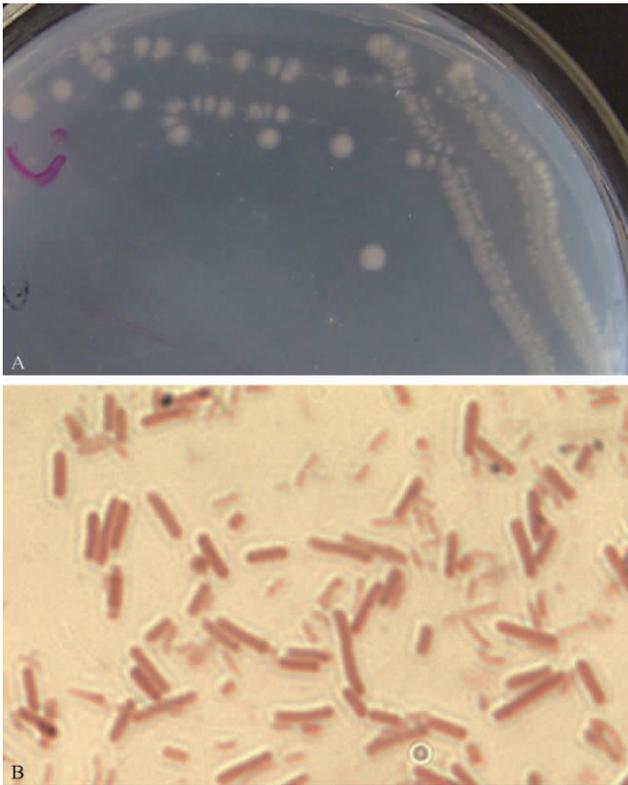


图 3 *Enterobacter* sp. 菌株 C8 形态学特征

Fig. 3 Morphological characterizations of *Enterobacter* sp. strain C8. A: colonial morphology; B: Result of Gram stain.

(GenBank 号 JN705915), 在 GenBank 比对后从中获得和 C8 菌株序列相近种的 16S rDNA 序列 18 个, 选择 *Bacillus subtilis* JX012292 作为外群构建了系统发育树如图 4 所示。其中, C8 与 *Enterobacter* sp. 关系较近, 聚成小群, 序列相似性均为 99%。

根据 16S rDNA 同源性比较, 结合菌株的形态学观察和生理学特征, 可基本将分离的菌株归属为 *Enterobacter* sp., 命名为 *Enterobacter* sp. C8。

2.4 纤维素酶基因的克隆及序列分析

以细菌 C8 菌株基因组 DNA 为模板, PCR 扩增纤维素酶基因, 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果显示在约 1.0 kb 处有一特异性扩增条带, 与预期的 DNA 片段大小相符。

将 PCR 产物酶连至质粒 pMD18-T, 随后转化大肠杆菌 XL-gold, 对获得的转化子进行菌落 PCR 验证阳性克隆, 得到两个转化子与原扩增产物大小一致的 DNA 片段。对获得的两个阳性转化子进行液体培养, 收集菌体后提取质粒。将此重组质粒送交上海生工进行序列测定。

扩增产物序列测定结果显示, 该 DNA 片段长为 1104 bp, 编码 368 个氨基酸。将该序列提交到 GenBank 数据库, 获得基因登录号 Bankit1525160, JQ845065。对克隆得到的基因序列与 GenBank 中已有纤维素酶基因进行相似性比对, 结果表明该序列与 *E. aerogenes* KCTC 2190 的纤维素合成酶亚单位 BcsC 的核苷酸序列有 97% 的同源性, 氨基酸序列有 92% 的同源性; 与 *Klebsiella pneumoniae* 的 endo- α , 4-D-glucanase 基因有 82% 的同源性, 与不可培养的细菌内切纤维素酶基因有 82% 的同源性 (表 3)。

3 讨论

21 世纪, 资源和环境问题是人类面临的最主要的挑战。纤维素资源是地球上含量最丰富的可再生资源, 是人类赖以生存的基本物质来源, 纤维素的利用和生物转化对解决世界能源危机、环境污染等问题具有重大意义。纤维素可被酸或酶水解成葡萄糖, 再经发酵生成乙醇等物质。酸水解法是为普遍的降解纤维素的方法, 但其反应需要在强酸、高温、高压、耐酸耐腐蚀的设备等条件下进行, 成本较

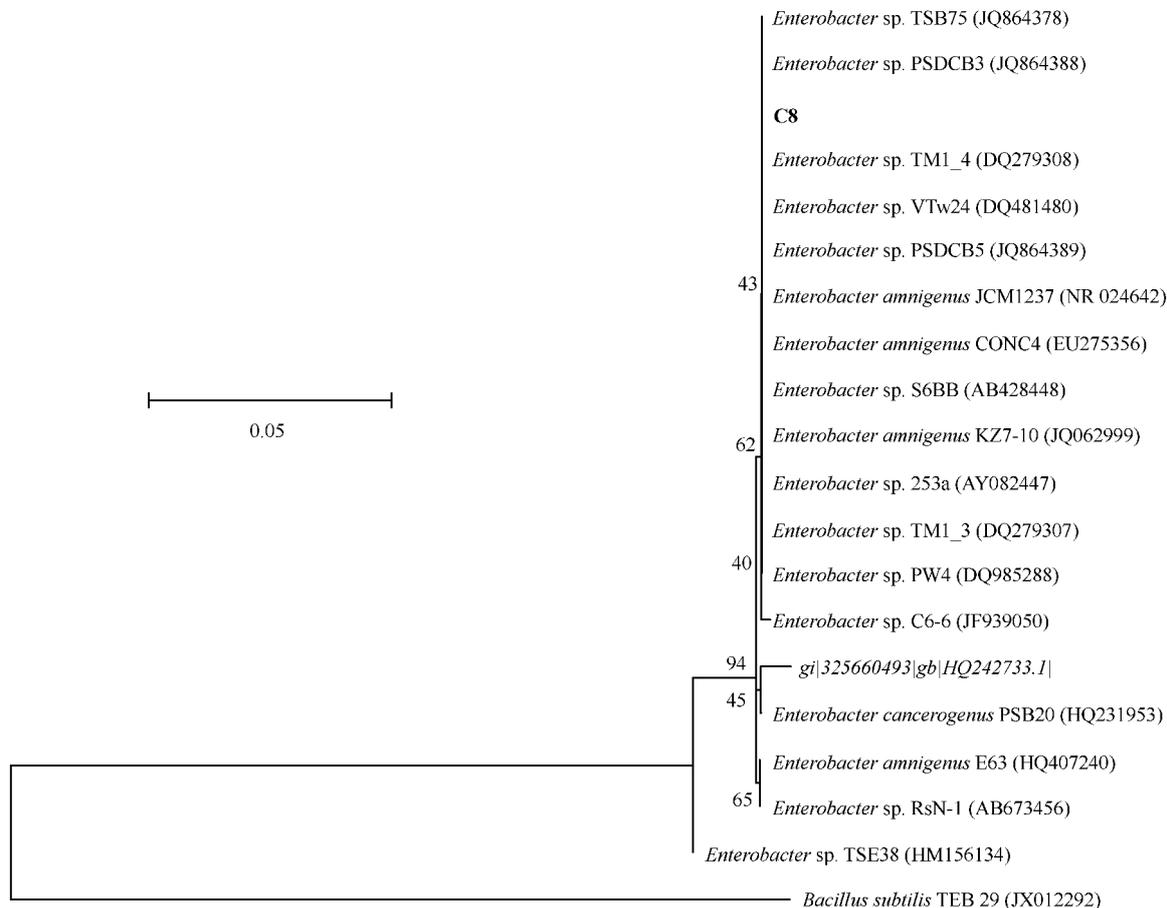


图 4 依据 16s rDNA 序列构建的菌株 C8 的系统发育树

Fig. 4 Neighbour-joining tree based on nearly completed 16S rDNA sequences

The scale bar indicates 0.05 substitutions per nucleotide position. Seqboot values were showed on the branches.

表 3 肠杆菌 C8 纤维素酶基因序列相似性比较

Table 3 Sequence similarity comparison of *Enterobacter* sp. C8 to others

GenBank No.	Source of the sequence	Homology of nucleic acid/%	Homology of amino acid/%
CP000653	<i>Enterobacter</i> sp. 638	84	80
CP002824	<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	97	92
FP929040	<i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394	80	77
CP001891	<i>Klebsiella variicola</i> At-22	82	80
CP000964	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	82	78
JN016742	Uncultured bacterium clone Mcel endocellulase gene	82	80
HM235918	<i>Klebsiella pneumoniae</i> cellulase gene	81	80
HM174251	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain celJV cellulase (cel) gene	81	80

高,其产生的废液还会造成严重的环境污染。而酶解纤维素只需在常温、常压条件下即可进行,没有特

殊的条件要求。

纤维素酶是由多种酶组分组成的复合酶,在生物酶降解纤维素中起着极其重要的作用。1906年,Seilliere从蜗牛的消化液中发现纤维素酶以来,人们已从多种微生物中分离到纤维素酶。目前,利用基因工程的方法对纤维素酶基因进行克隆表达和一级结构测定方面的研究已取得了一定进展,但由于纤维素酶的蛋白结晶比较困难,关于纤维素酶分子结构与功能关系的研究进展还比较缓慢。

研究发现典型的能用于生产的纤维素酶来源于真菌,如木霉属(*Trichoderma*)、曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)^[18-21]。事实上,细菌因具有易培养、生长快、易进行遗传改良等优势已经成为工业用纤维素酶资源的首选材料。

松材线虫是重要的外来有害生物,引起松材线虫病,造成松树大量死亡,带来严重的经济损失和生态破坏。松材线虫病发病致死速度快、传播蔓延迅

速、防治难度大的特点,被称为“松树癌症”。线虫致病机理研究方面有一种观点认为酶的破坏作用导致松树发病死亡,用扩散检测法从松材线虫分泌液和虫体浆的抽提液中分析有纤维素酶的存在^[22]。纤维素酶作为松材线虫的致病物质参与早期寄主发病过程。纤维素酶破坏松树薄壁细胞的细胞壁和细胞膜,影响水分的输导,导致松树萎蔫,起到在早期致病过程中的关键作用。而松材线虫携带的细菌在致病过程中起到至关重要的作用^[11,23]。据此,笔者推测松材线虫携带的细菌中有可能聚集着大量的分泌纤维素酶的菌株。

基于以上观点,本文从河南南阳疫区的松材线虫的伴生菌中,分离筛选到7株纤维素酶活高的细菌菌株,并对活性最高的菌株C8进行初步分类鉴定,认为其属于肠杆菌属,命名为 *Enterobacter* sp. C8。该菌株的FPA酶活和CMC酶活分别达到5.48 U/ml和4.84 U/ml。本文进一步通过设计兼并引物,PCR扩增方法从肠杆菌C8基因组DNA中克隆出一个纤维素酶基因,该基因编码368个氨基酸,该序列与 *E. aerogenes* KCTC 2190的纤维素合成酶亚单位BcsC的核苷酸序列有97%的同源性,氨基酸序列有92%的同源性;与 *Klebsiella pneumoniae* 的endo-1,4-D-glucanase基因有82%的同源性,与不可培养的细菌内切纤维素酶基因有82%的同源性。关于该基因有哪些特异性,还需要做进一步研究,比如异源表达,纯化,对其酶学性质进行分析等,为下一步对高纤维素酶活性的出发菌株的产酶条件优化、纤维素酶结构的了解及工程菌株构建等奠定一定的理论基础。

参考文献

- [1] 李振红,陆贻通. 高效纤维素降解菌的筛选. 环境污染与防治 (*Environmental Pollution & Control*), 2003, 32 (6): 3-5.
- [2] 李琼芳,刘明学,徐志鹏,康晋梅,苟清碧. 纤维素分解菌的分离及产酶条件研究. 安徽农业科学 (*Journal of Anhui Agricultural Sciences*), 2008, 23 (8): 18-21.
- [3] 郭成栓,崔堂兵,郭勇. β -1,4-葡聚糖内切酶基因的克隆及表达. 华南理工大学学报:自然科学版 (*Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition*), 2008, 36 (12): 36-39.
- [4] 刘永生,冯家勋,段承杰,赵广存,柏学亮. 地衣芽孢杆菌GXN151的纤维素酶基因cel12A的序列分析及其在大肠杆菌中的表达. 广西农业生物科学 (*Journal of Guaxi Agric and Biol Science*), 2003, 22 (3): 194-200.
- [5] 赵云,刘伟丰,毛爱军,江宁,董志扬. 多粘芽胞杆菌 (*Bacillus polymyxa*) β -葡萄糖苷酶基因在大肠杆菌中的表达、纯化及酶学性质分析. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2004, 20 (5): 741-744.
- [6] Mori T, Inoue T. Pine-wood nematode-induced ethylene production in pine stems and cellulase as an inducer. *Journal of Japanese For-estry Society*, 1986, 68 (2): 43-50.
- [7] Odani K. Early symptom development of the pine wilt disease by hydrolytic enzymes produced by the pine wood nematode cellulose as a possible candidate of the pathogen. *Journal of Japanese For-estry Society*, 1985, 67 (9): 366-372.
- [8] Yamamoto N. Cellulase exudation by the pine wood nematode & detection of activity in its crawlingtrack. *Journal of Japanese For-estry Society*, 1986, 68: 237-240.
- [9] Oku H, Shiraishi T, Ouchi S. Pinewilt toxin, the metabolite of a bacterium associated with a nematode. *Naturwissenschaften*, 1980, 67: 198-199.
- [10] Kawazu K, Zhang H, Yamashita H, Kanzaki H. Relationship between the pathogenicity of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, and phenylacetic acid production. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 1996, 60 (9): 1413-1415.
- [11] 赵博光,郭道森,高蓉,郭建. 细菌分离物B619与松材线虫病关系的初步研究. 南京林业大学学报 (*Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science edition*), 2000, 24 (4): 72-74.
- [12] 洪英娣,赵博光,曹越,韩正敏. 松材线虫携带细菌的致病性. 南京林业大学学报:自然科学版 (*Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science edition*), 2003, 27 (2): 45-48.
- [13] 李日强,辛小芸. 天然秸秆纤维素分解菌的分离选育. 上海环境科学 (*Shanghai Environmental Sciences*), 2002, 21 (1): 8-11.
- [14] Xu P, Li WJ, Xu LH, Jiang CL. A microwave-based method for genomic DNA extraction from Actinomycetes. *Microbiology*, 2003, 30 (4): 73-75.
- [15] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24: 4876-4888.
- [16] Kumars S, Tamura K, NeiM. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bio informatics*, 2004, 5: 150-163.
- [17] 包衍,王晓辉,张伟琼,罗江兰,聂明,肖明. 纤维素分解菌的选育及酶活测定. 生物学杂志 (*Journal of Biology*). 2007, 36 (5): 24-27.

- [18] Buchert JT, Oksanen J, Pere MS, Suurna'kki A, Viikari L. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry //Harmanand GE, Kubicek CP. ed. *Trichoderma and Gliocladium*. vol. Taylor & Francis, London: United Kingdom. 1998: 343-363.
- [19] Galante Y, De Conti A, Monteverdi R. Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries. In G. E. Harman and C. P. Kubicek (ed.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis, London, United Kingdom. 1998a: p. 327-342.
- [20] Galante Y, De Conti A, Monteverdi R. Application of *Trichoderma* enzymes in the textile industry//Harman GE, Kubicek CP. ed. *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis, London: United Kingdom. 1998b: 311-325.
- [21] Schmoll M, Schuster A, Silva Rdo N, Kubicek CP. The G-alpha protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) regulates cellulase gene expression in the presence of light. *Eukaryot Cell*, 2009, 8(3): 410-420.
- [22] 陈守常. 松材线虫病病原与致病机理研究进展. 四川林业科技 (*Sichuan Academy of Forestry*), 2010, 31(1):18-25.
- [23] Zhao BG, Wang H, Han S. Distribution and pathogenicity ofbacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China. *Nematology*, 2003, 5(6): 899-906.

Screening and identifying cellulose degrading bacteria associated with *Bursaphelenchus xylophilus* and cloning corresponding genes

QiuHong Niu^{1*}, Lin Zhang¹, Xueying Chu¹, Fengguang Du², Wensheng Feng², Fengli Hui¹, Tao Ke¹, Yongxin Fan¹

¹School of Life Science and Technology, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China

²State Key Laboratory of Motor Bio-fuel technology, Henan Tianguan Group Co. Ltd., Nanyang 473000, China

Abstract: [Objective] To screen, identify bacterial strains with high capability to degrade cellulose from bacteria associated with *Bursaphelenchus xylophilus* and to clone related genes. [Methods] First, we collected *B. xylophilus* samples from pine wood nematode disease areas in Nanyang, Henan province, China. Then, we obtained the bacterial strains with high cellulase activities by primarily screening according to Congo red plate methods. The bacterial strain was classified by phenotypic and genotypic characteristics. We designed degenerate primes according to the known endoglucanase gene sequences in GenBank to carry out PCR, and analyzed the cloned sequence. [Results] We obtained seven bacterial strains with high cellulase activities. Among them, the bacterial strain numbered C8 showed the highest cellulase activities. The bacterium was classified to be *Enterobacter* genus. The full length of a cellulase gene cDNA (1104 bp) (GenBank JQ845065) coding region was successfully cloned. The homogeneous analysis demonstrated that the deduced nucleotide and amino acid of the gene separately shared 97% and 92% with the cellulase from *E. aerogenes* KCTC 2190, and 82% with the endo-1,4-D-glucanase gene from *Klebsiella pneumoniae*, and 82% with the a cellulase gene from unculturable bacteria. [Conclusion] It was a novel cellulose gene cloned from *B. xylophilus* associated bacteria.

Keywords: *Bursaphelenchus xylophilus*, associated bacteria, cellulase, screening and identification, gene clone

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31100104), by the Scientific Research Foundation for importing doctors in Nanyang Normal University (zx2011004) and by the Foundation for University Key Youth Teacher by Henan Province, Foundation of State Key Laboratory of Motor Bio-fuel Technology

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-377-63525086; E-mail: qiuHongniu@yahoo.com.cn

Received: 15 May 2012/Revised: 21 June 2012