

分离自黑茶的散囊菌属真菌中的 NRPS 基因的检测和分布

王晗 王永 纪燕玲 王志伟*

(南京农业大学 生命科学学院 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】检测源自黑茶的散囊菌属分离菌株中的 NRPS 基因, 推测它们相应的次级代谢产物合成能力, 并考察了基于 NRPS 基因分布特征进行散囊菌属真菌遗传多样性分析的可能性。【方法】运用 IQS 法提取来自湖南、四川和湖北等地黑茶样品的 14 株散囊菌(*Eurotium* spp.)菌株的总 DNA, 利用特异性引物对菌株中 11 种 NRPS 基因片段进行 PCR 检测和序列分析, 并结合 UPGMA 法分析了 NRPS 基因的分布。【结果】各菌株分别含有 4–10 个 NRPS 基因片段。NRPS7、CPS1 基因在所有菌株中都可以检测到, 而 NRPS2、NRPS6 基因则仅在个别菌株中检测到; 其它 NRPS 基因的分布则呈现出多样性。来自同一块砖茶的菌株 Fw-30813-7、Fw-30813-4、Fw-30813-1 和 Fw-30925-5 之间, NRPS1、NRPS2、NRPS3、NRPS4 和 NRPS8 五个基因的分布存在差异, 显示出黑茶内散囊菌的遗传多样性。来自湖南白沙溪茶厂的茯砖样品的菌株 Fa-20719-3 不含有 NRPS5 和 NRPS8 基因; 而从湖南益阳茶厂茯砖茶 7 个分离菌株中均含有这两种基因。不同地点加工出来的黑茶样品中的散囊菌菌株之间存在一些明显的遗传差异。【结论】首次从我国黑茶中的散囊菌属分离菌株中检测到 NRPS 基因, 并推测了 NRPS 产物的多样性, 展示了其多样化分布特征, 提示 NRPS 基因的分析有可能成为衡量散囊菌遗传多样性的另一个尺度。

关键词: 黑茶, 散囊菌属, NRPS 基因, 分布特征

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970081, 30800156)

*通讯作者: Tel: 86-25-84395531; 信箱: zwwang@njau.edu.cn

收稿日期: 2012-04-26; 接受日期: 2012-08-28

Detection and distribution of NRPS genes in *Eurotium* spp. isolated from dark tea

WANG Han WANG Yong JI Yan-Ling WANG Zhi-Wei*

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Objective] NRPS genes in 14 *Eurotium* spp. strains obtained from dark tea samples were detected. The potential of secondary metabolite biosynthesis mediated by some NRPS genes were predicted. Distributive characteristics of NRPS genes may be useful for understanding the genetic diversity of *Eurotium* spp.. [Methods] Fourteen *Eurotium* strains were obtained from dark tea samples. Fungal genomic DNA samples were extracted by IQS DNA extraction method. Distribution of 11 NRPS genes were detected by specific DNA primers for these strains by PCR and analyzed by DNA sequencing and sequence analyses. UPGMA was conducted to discuss distribution pattern of NRPS genes. [Results] Numbers of NRPS genes involved in *Eurotium* strains tested were ranged from 4 to 10. NRPS7 and CPS1 genes were detected from all the *Eurotium* strains, while NRPS2 and NRPS6 genes were only detected in few strains, and other NRPS genes diverse. Fw-30813-1, Fw-30813-4, Fw-30813-7 and Fw-30925-5 from the same tea brick were different each other in detection of NRPS1, NRPS2, NRPS3, NRPS4 and NRPS8 genes, demonstrating an extremely high genetic diversity in *Eurotium* spp. from dark teas. NRPS5 and NRPS8 genes were not detected from strain Fa-20719-3 from Fuzhuan samples made in Baishaxi, Hunan, while detected from all of 7 strains obtained from Fuzhuan samples made in Yiyang, Hunan. Distinct genetic differences were demonstrated among *Eurotium* strains obtained from separate manufactures and sites. [Conclusion] Detection and distribution and genetic diversity of NRPS genes were first reported from *Eurotium* strains obtained from Chinese dark tea. Detection of NRPS genes could be effective as an easy method to evaluate genetic diversity of *Eurotium* spp..

Keywords: Dark tea, *Eurotium* spp., NRPS, Distribution

黑茶(主要成品有黑砖茶、茯砖茶、青砖茶、康砖茶、普洱茶等)在自然发酵过程中有多种微生物的参与,其中散囊菌属(*Eurotium*)真菌占主导地位^[1]。散囊菌在茶坯内生长,它们产生的各种酶类能促进茶叶中各种有机物质的有利转化,分解老茶中的淀粉和单宁物质,降低茶叶的苦涩味,使茶叶滋味醇和^[2]。散囊菌(*Eurotium* spp.)是

在植物体表等比较干燥的条件下,存在的一类真菌,它们往往能够合成多种次级代谢产物并分泌到细胞外^[3]。如赤散囊菌(*Eurotium rubrum*)等合成的 Epiheveadride 具有强烈抗烟曲霉[*Neosartorya fumigata* (*Aspergillus fumigatus*)]、马尼弗(氏)青霉菌 (*Penicillium marneffeii*)、深红色发癣菌 (*Trichophyton rubrum*)、须毛癣菌(*T. mentagrophytes*)

phytes)等真菌的活性^[4]; 蜡叶散囊菌 *E. herbariorum* 合成的 Cladosporin (枝孢菌素)具有抗真菌、抗细菌^[5]和抑制小麦胚芽鞘生长的作用^[6]; 阿姆斯特丹散囊菌(*E. amstelodami*)合成的 Questin 能通过肿瘤细胞和小鼠淋巴细胞抑制核苷输入^[7]。散囊菌产生的次生代谢产物种类多样, 并具有重要的生理功能。由此可见, 次生代谢产物的合成是散囊菌重要的生物学特征。

NRPS (Non ribosomal peptide synthetase)是一类由多个结构域组成的不依赖核糖体和 RNA 模板的肽合成酶, 各个结构域协同作用催化合成许多重要的肽类次级代谢产物, 如: 铁匮乏状态时螯合铁的嗜铁素(Siderophore)、对食草动物有毒性的麦角碱(Ergot alkaloids)和抗昆虫啃食的波胺(Peramine)等^[8-9]。NRP 是由一个或多个模块组成, 每个模块含有 3 个基本结构域和一些修饰结构域。基本结构域包括腺苷酸化结构域(A domain)、缩合结构域(C domain)、肽基载体蛋白结构域(T 或者 PCP domain); 修饰结构域有 N-甲基转移酶结构域(MT domain)和差向异构结构域(E domain)等。每一种催化结构域对应于核糖体肽合成系统的一种酶, 并有着相对稳定的保守结构^[10]。

关于真菌 NRPS 及其基因的研究在子囊菌中较多。至今, 人们用各种方法从各种真菌中发现了大量的 NRPS 基因。例如, 从黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、烟曲霉(*Neosartorya fumigata*)、构巢曲霉(*A. nidulans*)、米曲霉(*A. oryzae*)和土曲霉(*A. terreus*)中也分别发现了 20、14、14、18、22 种 NRPS 基因^[11-12]。从烟曲霉(*N. fumigata*)中发现的 NRPS 基因 *gliP* 与胶霉毒素(Gliotoxin)的产生有关^[12]。在玉米小斑病菌(*Cochliobolus heterostrophus*)的基因组中发现了 12 种 NRPS 基因^[13], 其 NRPS6 和氧化胁迫性和耐受力有关^[13-14]。在禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)中已经发现了 15 种可能

的 NRPS 基因^[15]。在 *Epichloae* 类真菌中已经发现了 13 种可能的 NRPS 基因^[9], 其中麦角碱和波胺合成基因的详细结构和具体功能等都已受到人们的关注^[16]。散囊菌产生的种类丰富的次生代谢产物中有些就可能是 NRPS 基因的产物。NRPS 基因在散囊菌次生代谢产物合成中可能起到重要的作用。但是, 至今尚无关于来自茯砖、康砖、青砖等黑茶的散囊菌次生代谢产物的研究或预测, 关于散囊属真菌的 NRPS 基因研究也尚未见报道。

本研究检测了自黑茶样品中分离得到的散囊菌菌株的 NRPS 基因, 调查了 NRPS 基因在散囊菌属真菌中的种类和分布, 预测了部分基因的功能, 同时调查了部分 NRPS 基因的碱基差异, 获得了黑茶中散囊菌属真菌的遗传多样性信息。

1 材料与方法

1.1 供试材料及其保藏

本研究采用了来自湖南、湖北和四川等地黑砖茶厂生产的黑茶样品的分离菌株 13 株以及分离自茯砖茶的菌株 011-1 (由浙江省卫生防疫站王志刚研究员提供)共 14 个菌株。菌株 Fw-30813-4 为谢瓦氏散囊菌(*Eurotium chevalieri*), 其余 13 株均为冠突散囊菌(*E. cristatum*) (表 1)。各菌株的长期保藏均于沙土管中室温下进行, 临时保藏在 CZG^[17]斜面上置于 4 °C-9 °C 的冰箱内。

1.2 菌株的培养和鉴定

菌株的鉴定通过各个菌株在 CZG 培养基上所产生的特有的菌落形态、菌落生长速度, 以及在显微镜下观察到各菌株的闭囊壳、子囊、子囊孢子等的形态特征进行。分离菌株的菌落特征和生长速度在 25 °C 培养 10 d 后观察, 将在 CZG 培养基和 PDA 培养基上繁殖的菌丝体分别制成水

表 1 供试菌株及其来源
Table 1 Fungal strains used in this study and their sources

菌株 Strain	砖茶编号 Sample	产地 Samples origin	砖茶样信息 Detail information
Fa-20719-3	Fa	湖南白沙溪	1958 年 9 月产茯砖成品, 中国茶叶公司精制
Fb-20801-2	Fb	湖南益阳	1977 年上半年“湘益”特制茯砖成品
F1-20701-13	F1	湖南益阳	2000 年产茯砖成品, 湖南益阳茶厂
F3-20608-2	F3	湖南益阳	1987 年产特制茯砖成品, 湖南益阳茶厂
F4-20608-1	F4	湖南益阳	1991 年 10 月 21 日产茯砖成品, 湖南益阳茶厂
F5-20608-1	F5	湖南临湘	2001 年 10 月 7 日产普茯成品, 湖南白石茶厂
Fw-30813-7, Fw-30813-4, Fw-30813-1, Fw-30925-5	Fw	湖南益阳	2002 年 6 月 12 日产精制茯砖, 湖南益阳茶厂
K1-20608-1	K1	四川雅安	2000 年康砖成品茶, 四川雅安茶厂
Q5-20703-1, Q5-20703-1f 011-1	B5	湖北赵李桥	2001 年产青砖茶小堆工艺跟踪品样 b5, 赵李桥茶厂
		湖南	茯砖(浙江省卫生防疫站)

浸片, 在显微镜下观察各菌株的闭囊壳和各种孢子的特征。用于总 DNA 提取的菌丝体在 CZG 培养基上培养 10 d 后获得。为避免琼脂混入菌丝体, 本研究将 0.22 μm 的微孔滤膜平铺在培养基表面, 在滤膜上进行菌株的培养, 获得菌丝体。

1.3 总 DNA 提取和 NRPS 基因检测

用 IQS 法提取菌株的总 DNA^[18], 经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测合格后备用。

参照 Johnson 等^[9]合成 NRPS1–NRPS9、CPS1 和 AC202 等 NRPS 基因的特异性引物, 其中 NRPS1–NRPS8 基因的引物根据特异性的腺苷酰化结构域和甲基转移酶结构域的保守区域设计简并引物获得^[19], NRPS9 基因的引物参照 *N. lolii* 的表达序列标签(EST)数据库设计^[9], AC202 和 CPS1 基因引物序列是根据已报道的序列设计^[20–21]。

除 NRPS2、NRPS5 和 NRPS8 外均采用巢式

引物, 用 PCR 方法进行 NRPS 检测。PCR 扩增参照文献[9]进行, 但做了以下调整: (1) 普通 PCR 扩增反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s; 56 °C 45 s; 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。(2) 巢式 PCR 扩增反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s; 56 °C 30 s; 72 °C 1 min, 外引物扩增 20 个循环后加内引物再扩增 25 个循环; 最后 72 °C 10 min。用每一种基因的特异性引物和各种散囊属真菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增反应。PCR 反应体系为 25 μL: 10×Reaction buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL, 上下游引物各 2 μL (巢式引物两对引物各加 1 μL), 模板 1 μL, *Taq* 酶 0.3 μL, 最后用双蒸水定容至 25 μL。PCR 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶电泳下进行检测。

1.4 检测到的部分 NRPS 基因的测序及序列特征的分析

将 PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行确

认后,将检测到的部分 NRPS 基因的 PCR 产物交上海美吉生物有限公司测序,所得序列在 NCBI 及相关基因组数据库中进行 BLAST 比对、分析。从 GenBank 中下载相似度高的基因片段,用 BioEdit、ClustalW、DNAssist 等生物软件,对 CPS1 基因等序列进行分析处理。根据 NRPS 基因的分布,分别赋值“1”和“0”,利用 NTSYS-pc version 2.10 软件以 UPGMA 法进行聚类,构建菌株间的亲缘关系树状图。

2 结果

2.1 分离菌株的 NRPS 基因检测

从各供试菌株中分别能检测到 4–10 个特异性的扩增片段,长度约 0.2–0.5 kb (图 1)。在 PCR 扩增和检测过程中,除少数菌株的 NRPS1 基因和 NRPS3 基因出现比较暗淡的第二条条带外,绝大部分的 PCR 产物始终只有单一条带出现。但是,这些单一条带有些较明亮,有些略暗,但始终没有出现模棱两可的条带,易于判别。特别是在检测 NRPS9 基因时,发现 Q5-20703-1、K1-20608-1、Fb-20801-2 等菌株得到了高亮度条带,和其它条带有明显的区别(图 1)。

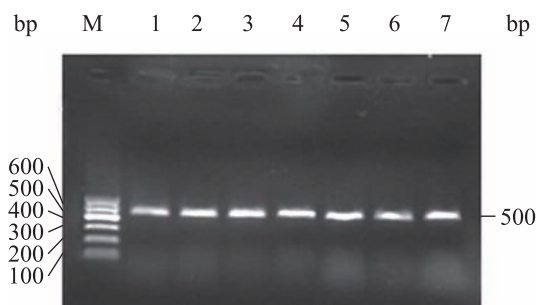


图 1 部分散囊菌菌株中 NRPS9 基因片段的扩增

Fig. 1 Amplification of NRPS9 gene involved in *Eu-rotium* spp. strains

Note: M: Marker; 1: F4-20608-1; 2: Q5-20703-1; 3: F3-20608-2; 4: Fw-30813-4; 5: 011-1; 6: Fb-20801-2; 7: K1-20608-1.

挑选除 NRPS1 和 NRPS6 外的其余 9 种 NRPS 基因合计 35 条序列经测序和序列比对分析,证明这些条带都与相应的 NRPS 基因相对应(数据未显示)。在所有供试菌株中, CPS1 和 NRPS7 的基因在所检测的全部菌株中都可以检测到, NRPS3、NRPS5 和 NRPS9 基因在绝大多数菌株中检测到,而 NRPS2 和 NRPS6 基因则仅在个别或少数菌株中检测到,其它 NRPS 基因则呈现出多样化差异(表 2)。

从供试的 14 个菌株中检测到 NRPS 基因个数最多的是 *E. chevalieri* Fw-30813-4, 含有 10 个 NRPS 基因,明显多于其它菌株,最少的是 F1-20701-13 菌株,仅含有 4 个 NRPS 基因(表 2)。

2.2 供试菌株间的遗传多样性

依据 NRPS 基因的检测结果,利用 NTSYS-pc version 2.10 软件进行计算,采用 UPGMA 法构建 14 个菌株的聚类树(图 2)。相似性系数 0.52 时,14 个菌株可分成三大支,从 2000 年产的茯砖茶菌株 F1-20701-13 和 2002 年产的茯砖茶菌株 Fw-30925-5 与其他菌株分成独立的 3 枝,显示这两个菌株与其他菌株之间存在砖茶品质和亲缘关系等差异;1977 年产的茯砖茶菌株 Fb-20801-2 和 2002 年产的茯砖茶菌株 Fw-30813-4 高度聚类;茯砖茶菌株 Fw-30813-7 和康砖茶菌株 K1-20608-1 高度聚类;来自不同品种砖茶的菌株 Fw-30813-1 和 Q5-20703-1 完全聚类。

用 11 个 NRPS 基因作为检测对象时,在所有 14 个被检测菌株中,只有来自湖南益阳的茯砖茶菌株 Fw-30813-1 和来自湖北赵李桥的青砖茶菌株 Q5-20703-1 显示了完全一样的 NRPS 基因分布,在 UPGMA 树中独立成组;其它菌株呈现了不同的聚类,说明用 NRPS 基因作为检测对象来评价菌株的遗传多样性是一种比较有效的方法(表 2, 图 2)。

表 2 散囊菌菌株中 NRPS 同源基因的检测和分布
Table 2 Detection and distribution of putative NRPS genes in *Eurotium* spp. strains

Strain	CPS1	AC202	NRPS1	NRPS2	NRPS3	NRPS4	NRPS5	NRPS6	NRPS7	NRPS8	NRPS9	Numbers of NRPS genes detected
F1-20701-13	+	—	+	—	—	—	+	—	+	—	—	4
F3-20608-2	+	+	—	—	—	—	+	—	+	+	+	6
F4-20608-1	+	+	+	—	+	—	+	—	+	—	+	7
F5-20608-1	+	+	+	—	+	—	+	—	+	+	—	8
Fw-30813-7	+	+	+	—	+	—	+	—	+	+	+	7
Fw-30813-4	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	10
Fw-30813-1	+	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	7
Fw-30925-5	+	+	—	—	—	+	+	—	+	—	+	6
Fb-20801-2	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+	9
Fa-20719-3	+	+	+	—	+	—	—	+	+	—	+	7
K1-20608-1	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	9
011-1	+	—	—	—	+	+	+	—	+	+	+	7
Q5-20703-1	+	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	7
Q5-20703-1f	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	6
Numbers of fungal strains detected	14	11	9	2	10	4	13	1	14	9	12	—

注: +: 存在该 NRPS 基因; —: 不存在该 NRPS 基因.

Note: +: The putative NRPS gene detected; —: The gene not detected.

2.3 NRPS 基因的序列及产物的推测

通过对部分菌株的 9 种 35 个不同的扩增产物测序后, 获得长度为 169–437 bp 的基因片段。通过 BLAST 比对, 均可在 NCBI 中找到与之对应的相似度较高的基因片段。例如: 菌株 Fa-20719-3 的 CPS1 基因类似序列与国外菌株 *Neotyphodium* sp. FaTG-3 的 NRPS 基因 CPS1 匹配, E 值为 $3e^{-77}$, 匹配一致性为 98% (表 3)。因此, 本研究从菌株 Fa-20719-3 中获得的这个基因被推测为 NRPS 基因——CPS1 基因。

根据基因片段的序列特征以及在 NCBI 数据库中信息比对的结果, 供试菌株中检测到的部分 NRPS 基因可能与介导合成一些甲基肽、波胺、嗜铁素等物质的 NRPS 基因有关。但是, 还有一

些 NRPS 基因的功能目前难以预测(表 3)。

2.4 CPS1 基因序列分析

经特异性引物扩增和测序, 从 14 个菌株中获得长度约 186 bp 的 CPS1 基因片段序列。

对不同来源的 14 个散囊菌的 CPS1 基因序列进行相互比对, 发现这些菌株的 CPS1 基因序列之间存在比较显著的多样性。在 14 个菌株中有 7 个菌株在第 78 个碱基处和其它菌株之间存在差异。Fa-20719-3、F3-20608-2 等 6 个菌株在第 173 个碱基处缺失 1 个碱基。分离自湖北青砖茶的 Q5-20703-1 菌株的 CPS1 基因和其它大多数菌株存在 4 个碱基的差异; 来源于不同地点、不同年份的茯砖茶样品的菌株 Fa-20719-3 和 Fb-20801-2 的 CPS1 基因只有两个碱基的差异。相反, 来源于湖

南益阳茶厂的 Fw-30813-1 菌株与其它分离自茯砖茶的菌株存在 10 个碱基的差别, 特别是与来源于同一块砖茶的 Fw-30813-7 之间 CPS1 基因存在着很大差别(图 3)。这些说明了分离自黑茶的散囊菌有着丰富的遗传多样性, 这种遗传多样性在益阳茶厂的茯砖茶产品中的散囊菌间表现更加突出。

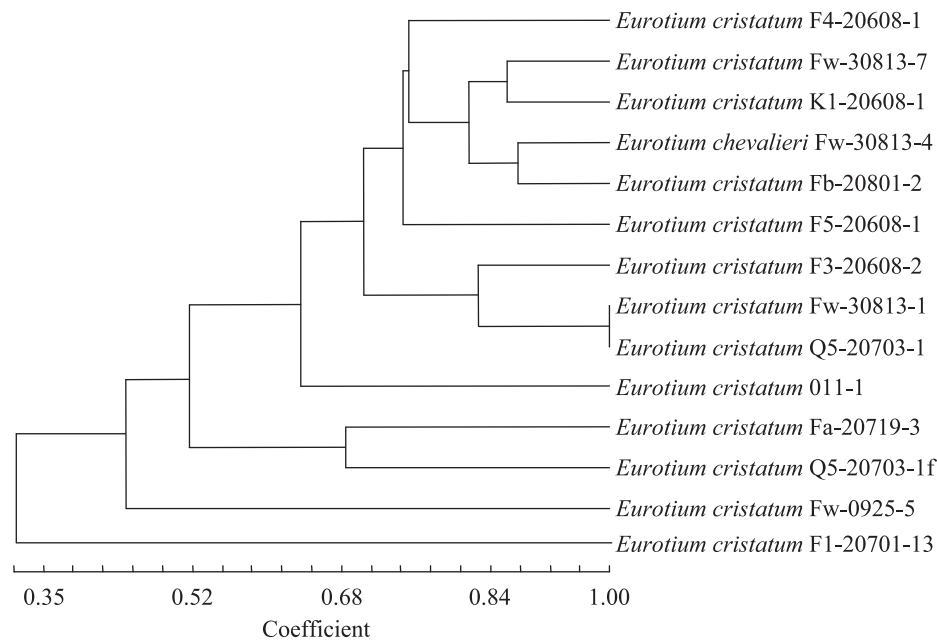


图 2 利用 UPGMA 法对供试 14 个散囊菌菌株的 11 个 NRPS 基因构建聚类树状图
Fig. 2 A dendrogram of 14 *Eurotium* strains generated by the UPGMA method based on a similarity matrix of 11 NRPS genes

注: 图中标尺上数字表示相似性系数。
Note: The numbers on the mark indicate the coefficient.

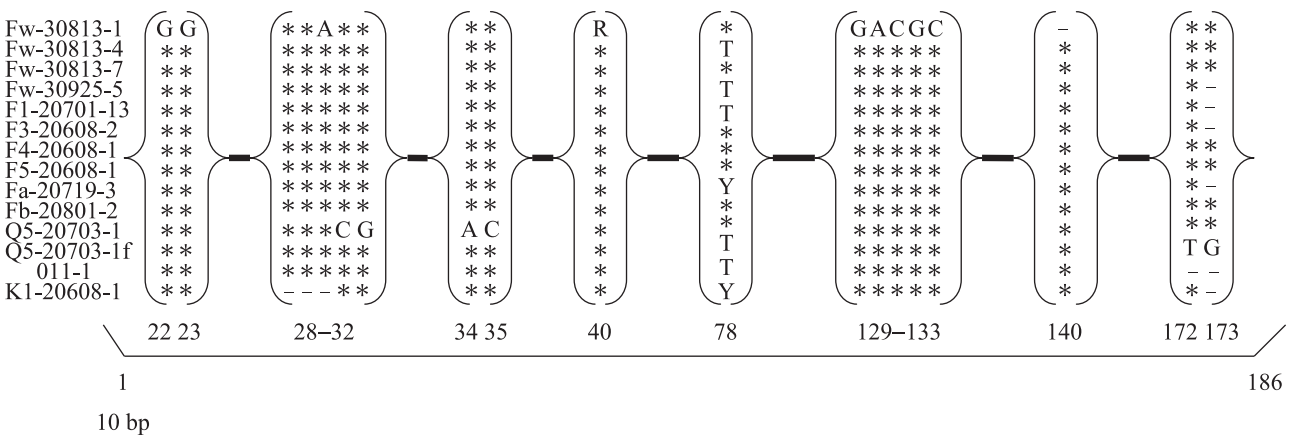


图 3 不同采集地点的散囊菌属真菌间的 CPS1 同源基因序列比对
Fig. 3 Alignment of putative CPS1 gene sequences of *Eurotium* spp. in different regions

注: *: 相同的碱基; R: A/G; Y: C/T; -: 不存在碱基。
Note: *: The same base; R: A/G ; Y: C/T ; -: Gap.

表 3 来自黑茶的散囊菌属真菌中检测到的 NRPS 同源基因及其预测功能
Table 3 Putative functions of each NRPS gene detected in *Eurotium* spp. obtained from Chinese brick teas

基因 Gene	最相似的基因 序列登录号 Top hit accession	E-值 E-value	最大相似度 Max identities (%)	预测的功能 Proposed function	文献 Reference	序列备注 Remarks
NRPS1	—	—	—	毒素类似物	Johnson 等 2007 ^[9]	未确认
NRPS2	—	—	—	嗜铁素(<i>A. nidulans</i> <i>sidC</i> 的产物)	Eisendle 等 2006 ^[22]	未确认
NRPS3	EF195368.1	6e ⁻⁷⁵	93	未知	Johnson 等 2007 ^[9]	JQ322644
NRPS4	EF195370.1	1e ⁻⁷⁰	93	未知	Johnson 等 2007 ^[9]	已确认*
NRPS5	—	—	—	未知	Johnson 等 2007 ^[9]	未确认
NRPS6	—	—	—	甲基肽	Weber 等 1994 ^[23]	未确认
NRPS7	EF195378.1	6e ⁻⁵⁸	99	甲基肽	Johnson 等 2007 ^[9]	已确认*
NRPS8	AB205145.1	8e ⁻⁹⁴	98	波胺	Tanaka 等 2005 ^[24]	JQ322643
NRPS9	EF195380.1	1e ⁻⁴⁰	91	嗜铁素(<i>A. nidulans</i> <i>sidC</i> 的产物)	Eisendle 等 2006 ^[22]	JQ322642
CPS1	EF195381.1	3e ⁻⁷⁷	98	植物病原原子囊菌的致病因子 (CPS1)	Lu 等 2003 ^[21]	已确认*
AC202	U30618.1	9e ⁻⁸⁴	96	未知	Panaccione 1996 ^[20]	JQ322645

注: NRPS1、2、5、6 基因未测序; *: 序列(约 186 bp)已确认, 因短于 200 bp, GenBank 未受理登录号。

Note: NRPS1, 2, 5, 6 genes are not sequenced; *: Accession numbers not accepted due to short sequence.

散囊菌的 CPS1 基因序列和曲霉属真菌的其它 NRPS 基因相差较大, 但经 <http://web.expasy.org/translate/> 在线网站翻译后的氨基酸序列和 *A. oryzae* RIB40 的 CPS1 基因的氨基酸(据全基因组序列推测)比较类似, 相似度高达 72%。

3 讨论

本文以来自黑茶样品的散囊菌菌株为材料, 通过检测其 NRPS 基因的种类和分布, 预测这些菌株是否具有某些 NRPS 基因介导合成的次生代谢产物的生产潜能, 为研究黑茶中散囊菌的次生

代谢产物提供方便, 同时提示了以 NRPS 基因角度阐述黑茶中散囊菌的遗传资源多样性的可能性。

在茶叶加工过程中, 茶多酚被转化产生 3 类活性化合物: 儿茶素的衍生物、儿茶素氧化聚合物、儿茶素和有机酸形成的络合物。这些化合物对于茶叶的滋味、香气、色泽形成起着重要作用。在黑茶的加工过程中, 茶叶经过渥堆发酵, 在散囊菌属真菌等微生物的作用下能合成多种次生代谢产物。这些代谢产物能更好地提高胃蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶的活性, 并能抑制脂肪酶的活性^[25]。有报道宣称, 牧民在长期饮用茯砖

茶后可导致中毒现象,引发了消费者对于黑茶及其散囊菌属真菌安全性问题的担忧^[26],研究表明并不是所有散囊菌属真菌都产生有毒物质^[27-28]。因此开展对黑茶中微生物的安全性研究显得既重要又迫切。目前有关散囊菌属真菌的安全性研究主要集中于菌体本身,而对其代谢产物的安全性问题研究得较少。

散囊菌属真菌中 rDNA 基因的 ITS1 和 ITS2 保守区可用于区分属间以及部分种间差别^[29],而不能很好地反映菌株乃至某些菌种之间的遗传多样性。这种现象在某些其它真菌中也能观察到。本研究从来自黑茶的散囊菌菌株中发现, NRPS 基因的分布、检测到的 NRPS 基因数呈现出比较多样的变化,采用 UPGMA 法构建的树图也反映了各个菌株之间的遗传多样性(表 2, 图 2)。通过各个 NRPS 基因在各个菌株中的分布反映出来的菌株遗传多样性差异具体表现在: (1) 不同种黑茶样品的分离菌株(如菌株 Fb-20801-2 和菌株 Fw-30813-4, 菌株 K1-20608-1 和 Fw-30813-7)的 NRPS 基因一定程度上完全聚类,来自不同种黑茶的菌株 Fw-30813-1 和 Q5-20703-1 聚为一支(图 2),表明样品差异对散囊菌的遗传多样性影响不显著。(2) 不同产地的同种黑茶中的散囊菌 NRPS 基因分布差异。如:从湖南白沙溪茶厂生产的茯砖样品分离到的菌株 Fa-20719-3 不含有 NRPS5 和 NRPS8;而从湖南益阳茶厂生产的茯砖样品分离到的菌株 Fb-20801-2 等 7 个菌株中均含有这两个基因片段(表 2)。这说明从不同地点加工出来的黑茶样品中的主要微生物可能存在一定的差异,这可能与不同茶厂的产品在品质上的差异也有某些关联。(3) 同一块黑茶(如湖南益阳产茯砖茶样品 Fw)中分离到的不同菌株中的 NRPS 基因分布也不同。如:菌株 Fw-30813-7、Fw-30813-4、Fw-30813-1 和 Fw-30925-5 中存在 NRPS1、NRPS2、NRPS3、NRPS4 和 NRPS8 五

个基因的分布差异(表 2),表明湖南益阳产的茯砖茶中的散囊菌的生物多样性十分丰富。(4) 菌株中检测的基因个数呈现明显差异, *E. chevalieri* Fw-30813-4 菌株中检测到及未检测到的 NRPS 基因个数多于其它散囊菌,不同种的菌株之间可能也存在 NRPS 基因分布的差异。(5) 即使在相似性系数很低时(如 0.52),分离自湖南益阳茶厂产茯砖成品的菌株 F1-20701-13、Fw-30925-5 与其它菌株的 NRPS 基因间就表现出显著差异(图 2),反映了菌株间较大的遗传差异。这些差异可能也与黑茶制作的年份和品质有某种关系。本研究从 NRPS 基因在各个菌株内的分布展示遗传多样性差异,在一定程度上说明来源于不同种黑茶样品的菌株之间存在着一定的差异,这种差异有可能与不同产地、不同年份黑茶品质的差异也有一定的关联。但是, NRPS 基因的分布特征,以及 NRPS 基因片段的序列能否反映散囊菌属真菌不同菌株间的系统进化关系,这尚有待于今后的进一步扩大菌株数量,开展更深入的研究。

NRPS 基因与合成一些重要次生代谢产物的合成潜能有关。这些代谢产物对于菌体本身和宿主的生长有重要影响,如: NRPS8 基因(*perA*)的产物介导昆虫拒食剂波胺的合成^[24]; CPS1 基因编码了一种与某些禾本科植物病原真菌的致病因子密切相关的腺苷酸合成酶^[21]; NRPS6 基因的产物能促进环孢霉素(Enniatin)、恩镰孢菌素(Cyclosporine)等甲基肽的合成^[23,30](表 3)。在 14 个供试菌株中只有 Fa-20719-3 菌株能检测到 NRPS6,该菌株可能具有合成甲基肽的潜能,值得关注(表 2, 表 3)。在所有菌株中都能检测到 CPS1 基因,说明这些菌株都可能潜在性地具有这个基因的功能,也可能暗示散囊菌与植物保持着某种关系(表 2, 表 3)。这些都有待于今后的进一步研究。

NRPS 基因的检测及功能预测大致有两类途

径,一类是从全基因组信息中进行分析,获得结构类似的序列后再进行具体的分析和论证^[31-32];另一类是利用各个 NRPS 基本结构域的保守序列设计兼并引物进行 PCR 检测后进行测序和分析^[33]。前者需要花费大量的资金和时间,且不能处理大量的菌株,但结果比较完整可靠;后者虽然结果不完整,往往会出现遗漏。但是,利用保守序列的 PCR 检测快速、便利,适合大量菌株的处理。要检测一种真菌的 NRPS 基因,将这两种方法有机地结合起来可能是更好的方法。NRPS 基因中保守的腺苷酰化结构域选择产物合成所需的氨基酸,它决定 NRPS 介导合成的代谢产物类型。保守的甲基转移酶结构域是一种修饰结构域,在酶的组装和转移过程中 A-MT 结构域能保持自身活性,最终决定代谢产物的类型^[33]。本研究的结果表明,依据 A-MT 结构域设计引物扩增出的黑茶散囊菌 NRPS 基因分布广泛,呈现出一定的多样性,说明这些菌株可能有合成多样化比较丰富的次级代谢产物的潜能(表 2, 表 3)。此外,除了含有 3 个基本结构域模块决定外,修饰模块也影响最终次生代谢产物的类型。所以,利用保守序列的 PCR 检测判断次生代谢产物的种类及类型,往往较从 NRPS 功能基因片段序列的同源性推测相应的次生代谢产物种类和类型更为丰富。

CPS1 片段在菌株之间存在显著的碱基数差异(图 3)。这种差异不仅有可能与不同黑茶样品的代谢产物有关,对研究不同来源的散囊菌属真菌的进化起源关系有一定帮助。经过和曲霉属真菌的其它 NRPS 基因比对发现碱基差异很大, CPS1 基因在曲霉属真菌中尚未发现,但和 *A. oryzae* RIB40 的全基因组氨基酸序列比对后,我们发现它与本研究中的 CPS1 基因的氨基酸序列相似度很高(72%),显示了 CPS1 基因可能是曲霉属真菌新的 NRPS 基因。散囊菌属真菌各菌株的 CPS1 基因核苷酸序列的差异从另一个侧面也展示了

这些菌株之间的差异。

系统发育和功能基因组分析的方法揭示了曲霉属中各成员 *N. fumigata*、*A. nidulans*、*A. flavus*、*A. oryzae* 和 *A. terreus* 的代表性菌株的 NRPS 具有丰富的多样性,这些 NRPS 基因的多肽产物在曲霉属真菌的生理、生态和致病性上都具有重要作用^[11-12]。但是,本研究的结果显示了同一种内不同菌株之间的 NRPS 差异的重要性可能与属内不同种的菌株之间的差异同样重要。这可能也成为显示真菌菌株遗传多样性的一个指标。

本研究的结果表明, NRPS 基因的分析可能也能成为真菌遗传多样性分析的一种有效手段。遗传多样性是真菌十分重要的生物学特征,研究真菌遗传多样性的主要手段有 RAPD、SSR、RFLP、AFLP、系统发育学分析等,更早的方法还有同工酶分析等方法。这些研究方法都有各自的特点,各有利弊。如有些难以用 RAPD 法检测出多样性的菌群,改用 SSR 法分析时则有可能有效检测出来。与 RAPD、SSR、RFLP、AFLP 等方法相比,利用 NRPS 基因进行遗传多样性检测时,条带比较清晰、易于判别,且检测结果的重复性好。这些结果揭示了菌群中各个菌株内的 NRPS 基因种类、分布以及基因的包括系统发育学分析在内的各种序列分析(表 2, 图 2)都能反应出菌群的遗传多样性。NRPS 基因的分析也有可能成为衡量真菌遗传多样性的另一个尺度。从 NRPS 基因的本质以及 NRPS 作用产物的功能上看,通过这种尺度反映出来的遗传多样性在次生代谢物合成能力的多样性以及菌株和其它生物的相互作用方面可能表现更加偏重一些。综合分离自各种不同来源黑茶产品菌株中各个 NRPS 基因的分布以及各菌株 CPS1 基因核苷酸序列的差异反映出来的遗传多样性,我们不难看出,黑茶加工厂(益阳茶厂)的散囊菌除有一定的物种多样性以外,遗传多样性也十分丰富(表 2)。

本研究一方面通过基因扩增说明了散囊菌属真菌中的 NRPS 基因及其分布,推测了这些菌株相应的次级代谢产物的合成能力,为研究散囊菌属真菌以及黑茶的安全性提供了一定的依据;另一方面快捷、简便地从基因角度研究散囊菌属真菌的遗传多样性,为其它真菌遗传多样性的研究提供了一种新思路和新方法。某些 NRPS 基因的功能已经通过基因敲除得以证实,但是大多数微生物体中的 NRPS 基因的功能还是未知的,需要进一步研究^[34](表 3)。以后的工作应着力于发现新的 NRPS 基因,推测出散囊菌属真菌更多的次生代谢产物。

致谢:浙江省卫生防疫站王志刚研究员、湖南省益阳市茶业局刘雪慧副局长提供了菌株,金磊和陈云兰也参与了部分实验,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 陈云兰,于汉寿,吕毅,等. 康砖和青砖茶中散囊菌的分离、鉴定及其生物学特性研究[J]. 茶叶科学, 2006, 26(3): 232–236.
- [2] Mo HZ, Zhu Y, Chen ZM. Microbial fermented tea—a potential source of natural food preservatives[J]. Trends in Food Science and Technology, 2008, 19(3): 124–130.
- [3] Slack GJ, Puniani E, Frisvad JC, et al. Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities[J]. Mycological Research, 2009, 113(4): 480–490.
- [4] Hosoe T, Fukushima K, Itabashi T, et al. A new nonadride derivative, dihydroepihevadride, as characteristic antifungal agent against filamentous fungi, isolated from unidentified fungus IFM 52672[J]. Journal of Antibiotics, 2004, 57(9): 573–578.
- [5] Podojil M, Sedmera P, Vokoun J, et al. *Eurotium* (*Aspergillus*) *repens* metabolites and their biological activity[J]. Folia Microbiologica, 1978, 23(6): 438–443.
- [6] Springer JP, Cutler HG, Crumley FG, et al. Plant growth regulatory effects and stereochemistry of cladosporin[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1981, 29(4): 853–855.
- [7] Su J, Zhen YS, Qi CQ, et al. Antibiotic C3368-A, a fungus-derived nucleoside transport inhibitor, potentiates the activity of antitumor drugs[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2004, 36(2): 149–154.
- [8] Finking R, Marahiel MA. Biosynthesis of nonribosomal peptides[J]. Annual Review of Microbiology, 2004, 58(1): 453–488.
- [9] Johnson R, Voisey C, Johnson L, et al. Distribution of NRPS gene families within the *Neotyphodium/Epichloë* complex[J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(11): 1180–1190.
- [10] Mootz HD, Schwarzer D, Marahiel MA. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases[J]. ChemBiochem, 2002, 3(6): 490–504.
- [11] Cramer RA Jr, Stajich JE, Yamanaka Y, et al. Phylogenomic analysis of non-ribosomal peptide synthetases in the genus *Aspergillus*[J]. Gene, 2006, 383: 24–32.
- [12] Cramer RA Jr, Gamcsik MP, Brooking RM, et al. Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production[J]. Eukaryotic Cell, 2006, 5(6): 972–980.
- [13] Lee BN, Kroken S, Chou DY, et al. Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress[J]. Eukaryotic Cell, 2005, 4(3): 545–555.
- [14] Oide S, Moeder W, Krasnoff S, et al. NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes[J]. Plant Cell, 2006, 18(10): 2836–2853.
- [15] Tobiasen C, Aahman J, Ravnholt KS, et al. Nonribosomal peptide synthetase (NPS) genes in *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. pseudograminearum* and identification of NPS2 as

- the producer of ferricrocin[J]. *Current Genetic*, 2007, 51(1): 43–58.
- [16] Fleetwood DJ, Scott B, Lane GA, et al. A complex ergovaline gene cluster in *Epichloë* endophytes of grasses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(8): 2571–2579.
- [17] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46–50.
- [18] 王永, 纪燕玲, 王晗, 等. 禾本科植物内生真菌的分离鉴定及基因组 DNA 的快速提取[J]. *南京农业大学学报*, 2012, 35(3): 52–56.
- [19] Johnson RD, Johnson L, Itoh Y, et al. Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(7): 742–753.
- [20] Panaccione DG. Multiple families of peptide synthetase genes from ergopeptine-producing fungi[J]. *Mycological Research*, 1996, 100(Pt4): 429–436.
- [21] Lu SW, Kroken S, Lee BN, et al. A novel class of gene controlling virulence in plant pathogenic ascomycete fungi[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(10): 5980–5985.
- [22] Eisendle M, Schrettl M, Kragl C, et al. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(10): 1596–1603.
- [23] Weber G, Schörgendorfer K, Schneider-Scherzer E, et al. The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame[J]. *Current Genetics*, 1994, 26(2): 120–125.
- [24] Tanaka A, Tapper BA, Popay A, et al. A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(4): 1036–1050.
- [25] 傅冬和, 刘仲华, 黄建安, 等. 茯砖茶不同萃取物对消化酶活性的影响[J]. *茶叶科学*, 2008, 28(1): 62–66.
- [26] Wong MH, Fung KF, Carr HP. Aluminium and fluoride contents of tea, with emphasis on brick and their health implications[J]. *Toxicology Letters*, 2003, 137(1/2): 111–120.
- [27] 王志刚, 程苏云, 童哲, 等. 茯砖茶中霉囊菌的产毒性研究 II. 冠突散囊菌的菌体毒性测定[J]. *茶叶科学*, 1994, 14(1): 69–73.
- [28] 肖文军, 傅冬和, 任国谱, 等. 茯茶毒理学试验报告[J]. *茶叶科学*, 2007, 27(4): 307–310.
- [29] Yazdani D, Zainal-Abidin MA, Tan YH, et al. Molecular identification of *Aspergillus* and *Eurotium* species isolated from rice and their toxin-producing ability[J]. *Microbiology*, 2011, 80(5): 720–727.
- [30] Haese A, Schubert M, Herrmann M, et al. Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*[J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 7(6): 905–914.
- [31] Bergmann S, Schumann J, Scherlach K, et al. Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*[J]. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(4): 213–217.
- [32] von Döhren H. A survey of nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes in *Aspergillus nidulans*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(1): S45–S52.
- [33] Walsh CT, Chen H, Keating TA, et al. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2001, 5(5): 525–534.
- [34] Stack D, Neville C, Doyle S. Nonribosomal peptide synthesis in *Aspergillus fumigatus* and other fungi[J]. *Microbiology*, 2007, 153(5): 1297–1306.