

# 四种红树植物根际土壤微生物 I 型和 II 型 PKS 基因的检测与多样性分析

马敏<sup>1,2Δ</sup> 唐敏<sup>3Δ</sup> 洪葵<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学 生命科学技术学院 湖北 武汉 430070)

(2. 武汉大学 药学院 湖北 武汉 430072)

(3. 海南医学院 海南 海口 571199)

**摘要:** 【目的】探究红树林土壤中聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)基因的多样性和新颖性。【方法】用 I 型和 II 型 PKS 基因酮基合成酶(Ketosynthase, KS)域的简并引物对海南清澜港红树林海莲、黄槿、银叶、老鼠簕 4 种红树根际土壤样品中 DNA 进行 PCR 扩增,之后利用 PCR-限制性酶切片段多样性(PCR-RFLP)和测序分析法对 I 型和 II 型 PKS 基因的多样性进行探讨。【结果】对得到的 72 条 I 型 PKS 基因的酮基合成酶 (Ketosynthase, KS)域 DNA 序列进行 PCR-RFLP 分析,共得到 51 个可操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTUs),其中 37 个 OTUs 为单克隆产生,没有明显的优势 OTU。选取了 26 个代表不同 OTU 的克隆进行测序分析,这些序列与 GenBank 中已知序列的最大相似率均未超过 85%。KS 域氨基酸序列的系统发育分析显示,所得 KS 域来源广泛,包括蓝细菌门(Cyanobacteria)、变形杆菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)和一些未可培养细菌;对 55 条 PKS II 基因 KS 域 DNA 序列的 PCR-RFLP 分析后共得到 25 个 OTUs,有两个明显的优势 OTUs,代表的克隆子数所占比例超过 10%。【结论】PCR-RFLP 分析表明红树林根际土壤存在着丰富多样的 I 型和 II 型 PKS 基因,且前者多样性更高;低的序列相似度表明所获得的 PKS I 基因 KS 域序列独特;系统发育分析表明得到的 PKS I 基因来源广泛。

**关键词:** 红树林根际土壤, 聚酮合酶基因, 多样性

基金项目: 欧盟第七框架项目(FP7) (No. 312184); 国家 973 计划项目(No. 2012CB721001)

\*通讯作者: Tel: 86-27-68752442; 信箱: kuihong31@whu.edu.cn

Δ 共同第一作者

收稿日期: 2012-09-28; 接受日期: 2012-12-18

# Detection of type I and II polyketide synthase genes in microorganisms from mangrove rhizosphere soil

MA Min<sup>1,2Δ</sup> TANG Min<sup>3Δ</sup> HONG Kui<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

(2. College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

(3. Hainan Medical University, Haikou, Hainan 571199, China)

**Abstract:** [Objective] We identified polyketide synthase (PKS) genes from mangrove soil. [Methods] Degenerate PCR primers were used to amplify ketosynthase (KS) domains associated with type I and II PKS genes from DNA of soil samples derived from the Qinglan Harbor (Hainan, China). The molecular diversity and phylogeny of type I and II PKS genes were analyzed by PCR-RFLP based cloning approach. [Results] A total of 72 clones and 51 OTUs were obtained, there was no dominant OTU and 37 OTUs were from single clone. Twenty-six clones of different OTUs were sequenced and the DNA sequences were translated into amino acid (AA) sequences. All identified KS domains showed the identities at AA level to their closest matches in GenBank at less than 85%. Phylogenetic analysis of these sequences indicated that the identified ketosynthase (KS) domains were clustered with those from diverse bacterial group, including Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria and some uncultured bacteria. A total of 55 clones containing Type II PKS gene KS domain DNA sequences were analyzed by PCR-RFLP. Only 25 OTUs were generated and there were two dominant OTUs which present more than 10% of clones in the clone library. [Conclusion] These results suggested the presence of diverse PKS I and PKS II genes in microorganisms from mangrove rhizosphere soil, and the diversity of PKS II gene is lower than the PKS I gene. Low KS domain sequence similarities indicated they possessed unique PKS I genes. Phylogeny deduced from the sequences of KS domains in PKS I genes showed that they distributed in different bacterial phyla.

**Keywords:** Mangrove rhizosphere soil, Polyketide synthase genes, Diversity

近年来随着新病原菌的出现以及老病原菌耐药抗药情况的日益凸显,寻找新型抗生素迫在眉睫,陆地资源已远远不能满足这一要求,研究热点转向了占地球面积70%的广阔生境——海洋<sup>[1]</sup>。红树林是位于陆地与海洋交汇地区潮间带的一种特殊生态系统,兼有陆地和海洋的性质

但又不同于二者,其具有强还原性、强酸性、高含盐量、营养丰富等特征<sup>[2]</sup>,从红树林环境中已分离获得的微生物可以看出,这里不仅微生物种类繁多而且功能多样<sup>[3]</sup>;对红树林及根际土壤的分子生态学研究<sup>[4-5]</sup>印证了其微生物类群的丰富多样性,并且从红树植物根际分离鉴定了多株放

线菌新种<sup>[6-9]</sup>。在我们的前期研究中,发现海莲、黄槿、银叶、老鼠簕等红树植物的根际土壤中有细胞毒活性的微生物数量较多<sup>[10]</sup>。

PKS 是催化聚酮类化合物如红霉素、阿维菌素、雷帕霉素、四环素、利福霉素等多种生物活性物质生物合成的一种多功能酶复合物,根据酶的组成和催化方式的不同可将其分为 I、II 和 III 三种类型。目前,筛选、鉴定和分析 PKS 基因是人们研究微生物次级代谢产物的一个重要方向,是开发生物活性物质的重要工作基础<sup>[11]</sup>。目前已有对海绵<sup>[12]</sup>、陆地土壤<sup>[13]</sup>、南极土壤<sup>[14]</sup>等环境样品中微生物次级代谢产物生物合成基因如 PKS 基因多样性的研究报道,但是迄今为止,未见关于红树植物根际土壤微生物 PKS 基因多样性研究的报道。

本研究的目的是以海莲、黄槿、银叶、老鼠簕等红树植物的根际土壤为研究对象,构建 PKS I 和 PKS II 型基因的 KS 域克隆文库,对文库进行 PCR-RFLP 分析以及对获得的克隆子序列进行系统发育分析,从而揭示红树林土壤中 PKS 基因的多样性和新颖性。所得结果将有助于人们更深入地了解红树林微生物次级代谢产物的基因资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集和保存

土壤样品于 2007 年 7 月采自海南省文昌市清澜港红树林保护区,分别为海莲(*Bruguiera sex-angula*)根际土壤(N 19°37'363", E 110°47'736")、老鼠簕(*Acanthus ilicifolius*)根际土壤(N 19°37'532", E 110°47'626")、银叶树(*Heritiera littoralis*)根际土壤(N 19°37'359", E 110°47'743")和黄槿树(*Hibiscus tiliscus*)根际土壤(N 19°37'360", E 110°47'739")。用自制采样器采集,取 0-20 cm 土层,土样分装于无菌塑料袋中,

迅速置于冰上并于当天运回实验室。取一份当天测量土壤水分含量、盐度及 pH 值;一份用于抽提土壤 DNA,冻存于-20 °C;其余迅速冻存于-70 °C 备用。

### 1.2 红树林根际土壤总 DNA 的提取

采用 FastPrep® SPIN Kit for Soil 试剂盒提取土壤样品总 DNA,每个土壤样品同时进行 3 个平行的总 DNA 提取,将所有提取的 DNA 混合起来以减少 DNA 提取的随机性偏差。

### 1.3 红树林根际土壤 PKS I 和 PKS II 基因的检测及文库的构建

**1.3.1 PKS 基因的 PCR 扩增及纯化:**分别采用 I 型 PKS 基因的 KS 域特异性引物 degKS2F.gc (5'-GCSATGGAYCCSCARCARGSVT-3')/degKS R5.gc (5'-GTSCCSGTSCCRTGSSCYTCSAC-3')<sup>[12]</sup>和 II 型 PKS 基因的 KS 域特异性引物 540F (5'-GGITGCACSTCIGGIMTSGAC-3')/1100R (5'-CCGATSGCICCSAGIGAGTG-3')<sup>[15]</sup>,以红树林根际土壤样品总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。用 25 μL PCR 反应体系,其中 DNA 模板 1 μL (50-100 ng), degKS2F.gc/540F (10 μmol/L) 1 μL, degKSR5.gc/1100R (10 μmol/L) 1 μL, 2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL,用 ddH<sub>2</sub>O 补至 25 μL。PCR 反应条件为: 95 °C 10 min; 95 °C 1 min, 55 °C (degKS2F.gc/degKSR5.gc)或 59 °C (540F/1100R) 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测后用凝胶回收试剂盒进行切胶回收纯化。

**1.3.2 转化克隆:**将纯化的 PKS I 和 PKS II 基因 PCR 产物连接到 pGEM®-T 载体上,再转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,用 X-gal 和 IPTG 进行蓝白斑筛选得到阳性克隆子。将筛选得到的阳性克隆子分别挑入到已加有 100 μL LB 液体培养基(含 100 mg/L Amp)的无菌 96 孔板中, 37 °C 培养 14-16 h, 每孔加入 100 μL 40% 无菌甘油, -70 °C 保存。

**1.3.3 插入片段的大小验证:** 采用通用引物 T7/SP6 对所挑取克隆子进行插入片段大小的验证。用 20  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系, 其中菌液 1  $\mu\text{L}$ , T7 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , SP6 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ,  $2\times\text{Taq}$  PCR MasterMix 10  $\mu\text{L}$ , 用 ddH<sub>2</sub>O 补至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  50 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1.5 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

## 1.4 红树林根际土壤 PKS I 和 PKS II 基因 KS 域的多样性分析

**1.4.1 KS 域的限制性酶切分析(PCR-RFLP)及系统发育分析:** 用核酸内切酶 *Msp* I 对文库中所有阳性克隆子进行 PKS I 和 PKS II 基因 KS 域扩增片段的限制性酶切分析, 借助 PhotoShop 软件, 分析酶切产物的谱型, 计算每个谱型的出现频率, 将具有不同谱型的克隆子进行测序。所获得的 KS 域序列用 VecScreen 在线分析载体序列所在位置, 并用 BioEdit 去除载体序列。通过 ORF Finder 在线分析序列的 ORF, 获得其编码的氨基酸序列。用 BLASTx search 在线比对, 选择各序列在 GenBank 库中最相似的序列作为参考序列。将本研所得序列与参考序列一起用 ClustalX 进行多序列比对。用 MEGA 软件, Neighbor-Joining 法构建系统发育树, Bootstrap 检验系统树, 自展数为 1 000。

**1.4.2 统计分析:** 用  $C=1-n_1/N$  公式(式中  $N$  为所分析的克隆总数,  $n_1$  为仅有 1 个克隆的 OTU)计算覆盖率 Coverage  $C^{[16]}$  以评估所构建的文库对环境微生物多样性的体现程度; 采用香农指数 Shannon-Wiener index ( $H'$ )<sup>[17]</sup> 评估文库所代表的环境微生物多样性程度; 采用 Chao1 物种多样性指数( $S_{\text{Chao1}}$ )<sup>[18]</sup> 预测环境中微生物的总种类数。 $H'$  和  $S_{\text{Chao1}}$  的计算公式分别为:

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i \quad P_i = n_i/N$$

$N$  为所分析的克隆总数,  $n_i$  为第  $i$  个 OTU 所

代表的克隆数;

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{F_1^2}{2(F_2 + 1)} - \frac{F_1 F_2}{2(F_2 + 2)^2}$$

式中,  $S_{\text{obs}}$  为文库中的 OTU 数,  $F_1$  和  $F_2$  分别为仅有 1 个和 2 个克隆的 OTU 数,  $S_{\text{Chao1}}$  特别适合于分析大多数 OTU 包含较少的个体的环境。

**1.4.3 核酸序列登录号:** 本研究所获得的 KS 域序列提交 GenBank 数据库, 数据库登录号为 EU625236–EU625261。

## 2 结果与分析

### 2.1 红树林根际土壤样品总 DNA 的提取

红树林根际土壤总 DNA 提取结果见图 1。本实验使用的是直接提取法, 样品中的微生物裂解得比较完全, 提取的基因组 DNA 得率较高, 因此能够很好地反映样品中微生物的多样性。但由于提取过程中存在一定的机械剪切力, 所提取的总 DNA 片段大小主要集中在 9–23 kb 之间。通过检测, 所提 DNA 纯度较高, 可以满足进一步的 PCR 分析。

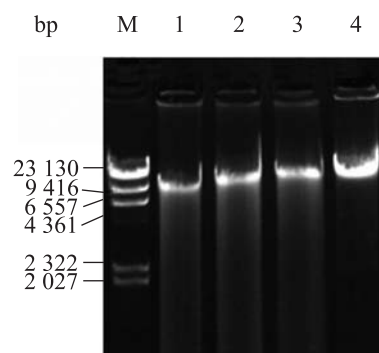


图 1 红树林土壤总 DNA 提取结果

**Fig. 1 Total DNA extracted from mangrove soil (1% agarose electrophoresis)**

注: M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III digest marker; 1–4 分别为海莲、黄槿、银叶和老鼠簕根际土壤样品。

Note: M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III digest marker; 1–4 represent DNA extracted from rhizosphere soil of *Bruguiera sexangula*, *Hibiscus tiliscus*, *Heritiera littoralis*, and *Acanthus ilicifolius*.

## 2.2 PKS 基因 KS 域片段的检测

利用 PKS I、PKS II 的特异性引物, 以 4 种红树根际土壤 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 以此探测红树林根际土壤中聚酮类化合物天然产生菌存在的可能性, 扩增结果见图 2。由图 2A 可知, 除海莲根际土壤 DNA 扩增未得到约 700 bp 的 PKS I 基因 KS 域的目的条带外, 其余 3 种红树根际土壤 DNA 扩增均得到目的条带。这表明, 黄槿、银叶、老鼠簕这 3 种红树根际土壤中可能存在 I 型聚酮化合物的产生菌。由图 2B 看出, 4 种红树根际土壤 DNA 的 PCR 扩增均得到约 550 bp 的 PKS II 基因 KS 域特征条带, 表明这 4 种红树根际土壤中可能存在 II 型聚酮化合物的产生菌。

## 2.3 红树林根际土壤 PKS I 和 PKS II 基因 KS 域克隆文库构建

上述 PCR 产物纯化后与载体连接, 之后进行转化, 对筛选出的阳性克隆子用 T7/SP6 引物进行插入片段的验证。通过验证, 分别获得 72 和 55 个有正确插入片段大小的 PKS I 和 PKS II 的阳性克隆子。

## 2.4 红树林根际土壤 PKS I 和 PKS II 基因 KS 域的 PCR-RFLP 分析

用核酸内切酶 *Msp* I 对文库中所有克隆子进行 PKS I 基因 KS 域扩增片段的限制性酶切分析, 每一个酶切图谱不同的基因型作为一个 OTU。PKS I 基因 KS 域克隆文库经 *Msp* I 酶切后, 72 个阳性克隆子共获得 51 个不同基因型的 KS 域 DNA 序列, 其中 37 个克隆子序列都是单一的基因型, 有些基因型所包含的克隆子数最多不超过 3 个, 没有明显的优势基因型。Coverage C、Shannon-Wiener index ( $H'$ ) 和  $S_{\text{Chao1}}$  值分别为 49%、3.849 和 210.7。理论上讲, 覆盖率 49% 表示所分析的克隆子序列仅能反映环境中约 50% 的 PKS I 基因多样性, 预测该环境中有 104 种 PKS I 基因。由于本研究中只采用了单酶切, 产生的基因型相对双酶切或多酶切的要低, 因此所获得克隆文库覆盖率可能低于 49%, 即该环境中的 PKS I 基因种类高于 104, 由此说明红树林根际土壤中 PKS I 基因多样性非常丰富。

PKS II 基因 KS 域克隆文库经 *Msp* I 酶切后, 55 个克隆子共获得 25 个不同基因型的 KS 域

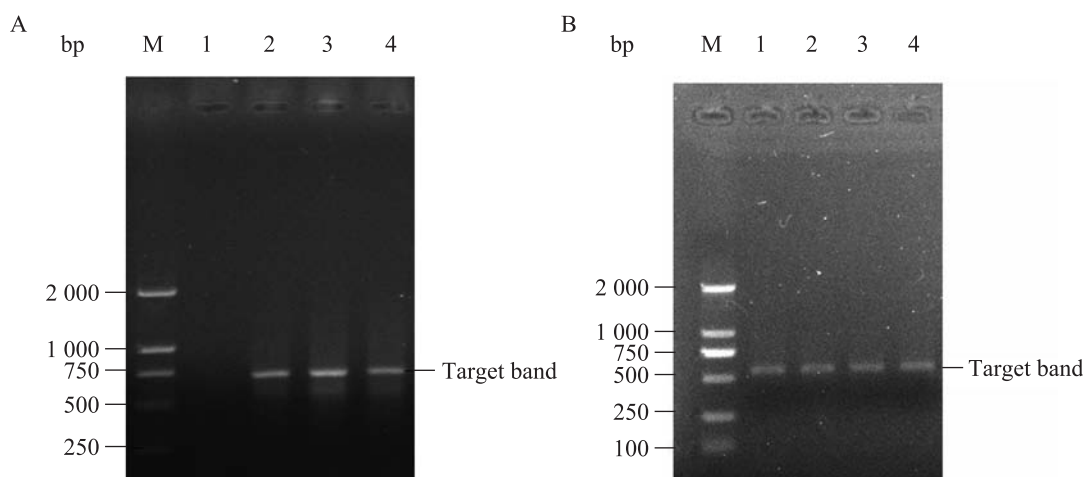


图 2 PKS I (A)、PKS II (B) 目的片段 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of mangrove soil total DNA using PKS I (A) and PKS II (B) specific primers

注: M: DL2000 marker; 1-4 分别为海莲、黄槿、银叶和老鼠簕根际土壤样品。

Note: M: DL2000 marker; 1-4 represent DNA extracted from rhizosphere soil of *Bruguiera sexangula*, *Hibiscus tiliaceus*, *Heritiera littoralis*, and *Acanthus ilicifolius*.

DNA 序列, 其中 14 个克隆子序列都是单一的基因型, 有两个基因型所占比例较高, 分别为 15% 和 11%。Coverage C、Shannon-Wiener index ( $H'$ ) 和  $S_{Chao1}$  值分别为 74%、2.928 和 41.2。从理论上讲, 覆盖率 74% 说明所分析的克隆能反映环境中约 3/4 的 PKS II 基因多样性, 预测该环境中有 33 种 PKS II 基因。由于本研究中只采用了单酶切, 产生的基因型相对双酶切或多酶切的要低, 因此所获得克隆文库覆盖率可能低于 74%, 即该环境中的 PKS II 基因种类高于 33。以上结果表明红树林根际土壤中 PKS II 基因多样性低于 PKS I

基因。

**2.5 红树林根际土壤 PKS I 基因 KS 域片段的系统发育分析**

由于 PKS I 基因的多样性远远高于 PKS II 基因, 所以针对 PKS I 基因进行 KS 域片段的系统发育分析。随机挑选 30 个具有不同 PCR-RFLP 谱型的克隆子进行测序, 共获得 26 个长度约 680 bp 的 KS 域 DNA 序列。所得序列 GC 含量范围从 43%–60%。采用 ORF Finder 将所得序列翻译成氨基酸序列, 通过 BLAST 进行比对分析, 结果如表 1 所示。测得的序列与 GenBank 中已知

表 1 测得的 PKS I 基因 KS 域片段在 NCBI 中的 BLAST 结果  
Table 1 The BLAST results of obtained KS domain sequences

原始名称 Primary name	NCBI 登录号 NCBI accession No.	GC 含量 GC content	相似性 Identity (%)	KS 域来源 Source of KS domains	所属类群 Groups
A5	EU625249	56	67	<i>Scytonema hofmanni</i> PCC 7110	Cyanobacteria
A7	EU625238	60	65	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	Cyanobacteria
A9	EU625236	55	66	<i>Microcoleus chthonoplastes</i> PCC 7420	Cyanobacteria
A11	EU625243	55	69	<i>Scytonema hofmanni</i> PCC 7110	Cyanobacteria
B9	EU625252	57	68	<i>Nostoc</i> sp. 152	Cyanobacteria
B11	EU625253	52	63	<i>Nodularia</i> sp. WH 0405	Cyanobacteria
C2	EU625244	57	71	<i>Oscillatoria sancta</i> PCC 7515	Cyanobacteria
C10	EU625239	60	69	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Cyanobacteria
D8	EU625257	50	67	<i>Nostoc</i> sp. ATCC 53789	Cyanobacteria
E3	EU625261	55	74	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Cyanobacteria
E8	EU625260	53	65	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Cyanobacteria
A6	EU625247	57	66	<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	Proteobacteria
D3	EU625237	55	64	<i>Sorangium cellulosum</i>	Proteobacteria
F5	EU625255	58	65	<i>Hydrogenophaga</i> sp. PBC	Proteobacteria
F7	EU625241	50	62	<i>Chondromyces crocatus</i>	Proteobacteria
B3	EU625248	60	74	<i>Brevibacillus laterosporus</i> LMG 15441	Firmicutes
B6	EU625246	57	60	<i>Clostridium papyrosolvens</i> DSM 2782	Firmicutes
E10	EU625259	56	74	<i>Paenibacillus polymyxa</i> SC2	Firmicutes
C9	EU625245	58	71	<i>Salinispora arenicola</i>	Actinobacteria
A4	EU625258	54	79	Uncultured bacterium	Mangrove forest soil
B5	EU625254	54	79	Uncultured bacterium	Greenhouse soil
B7	EU625240	55	78	Uncultured bacterium	Mangrove forest soil
E6	EU625251	55	69	Uncultured bacterium	Marine sponge
F3	EU625256	44	58	Uncultured bacterium	Lake sediment
F6	EU625242	53	83	Uncultured bacterium	Rhizosphere soil
F9	EU625250	55	69	Uncultured bacterium	Rhizosphere soil

KS 域序列相似度较低, 范围在 58%–83% 之间。已有的研究表明, 85% 的序列相似度可作为次级代谢产物预测的起始点<sup>[19–20]</sup>, 当 KS 序列与已知序列的相似度  $\geq 85\%$  时, 由该基因编码产生的化合物极有可能是已知化合物; 相反地, 可认为其是独特的序列, 从而认为包含有该 KS 序列的 PKS I 基因也是独特的。由此可以说明, 本研究中测得的 26 个 PKS I 基因 KS 域序列均是独特的。

将获得的 26 个 KS 域序列及其在 GenBank 中最相近的序列一起构建系统发育树, 结果见图 3。由图 3 可见, 这些 KS 域序列被分为 3 个分支 (Clade), 其中 Clade 1 中包含了 17 个 KS 序列, 这些序列主要与 Cyanobacteria 和 Proteobacteria 来源的 PKS I KS 域同源性最高。Clade 3 中 6 个 KS 域序列估计来源于“trans-AT”型 PKS 基因簇, 这一类型基因簇的标志是有一个或多个 AT 域由独立于 PKS 模块外的基因编码; 由这一类 PKS 合成的聚酮化合物包括抗肿瘤抗生素 Pederin<sup>[21]</sup>、Leinamycin<sup>[22]</sup>等。Moffitt 等<sup>[23]</sup>对 KS 域的活性模序 (Motif) 与其功能的关系进行研究, 发现了两个用于鉴别杂合 NRPS/PKS I 来源的 KS 域的 Motif, 它们分别是: 位于 KS 域半胱氨酸活性位点上游 22 AA 处的 N(DE)KD 序列, 及 KS 域的保守序列 VDTACSSS 被替换为 VQTACSTS (被替换的氨基酸残基以下划线标出)。将本研究获得的 KS 域 DNA 序列翻译成氨基酸序列后, 通过 ClustalX 软件分析发现, Clade 2 中的 3 条序列 (E6、B11、F3) 具有上述两个 Motifs, 见图 4。这一结果提示它们极有可能属于杂合 NRPS/PKS。

上述结果显示, 红树林根际土壤中 PKS I 基因分布广泛、多样性丰富, 其极有可能编码新的模块 PKS, 合成具有新结构、新功能的化合物。

### 3 讨论

聚酮类化合物是一类重要的天然产物, 许多

临床使用的抗生素都属于此类化合物。本研究从海莲、黄槿、银叶、老鼠簕等 4 种前期研究中分离到有较多活性微生物的红树林根际土壤中提取总 DNA, 利用聚酮类化合物生物合成基因的两种特异性引物来探测红树林根际土壤中次级代谢产物生物合成基因的多样性。通过对红树林根际土壤 I 和 II 型 PKS 基因 KS 域克隆文库的 PCR-RFLP 分析发现, 红树林根际土壤存在着丰富的 PKS 基因。相对于 PKS II 基因来说, PKS I 型基因更为丰富, 这可能是由于 I 型 PKS 相对于 II 型 PKS 来说结构较为复杂, 能够用于合成大环内酯类、聚醚类、多烯类等结构多样的化合物, 而 II 型 PKS 结构较为简单, 主要负责芳香类化合物的合成<sup>[24–25]</sup>。从 OTUs 上看, 基因之间差别较大, 且没有明显的优势基因型。通过克隆文库的覆盖率可以看出, PKS II 型基因的覆盖率 (74%) 要高于 PKS I 的覆盖率 (49%), 这也反映出 PKS I 基因的丰富度。

PKS I 基因 KS 域氨基酸序列的系统发育分析显示, 从红树林根际土壤样品所得的 KS 域序列分布广泛, 与 Cyanobacteria (主要是颤藻目 -Oscillatoriales 和念珠藻目 -Nostocales)、Proteobacteria (主要是 Delta-Proteobacteria 中的粘球菌目 -Myxococcales)、Firmicutes (主要为芽孢杆菌目 -Bacillales 和梭菌属 -Clostridia)、Actinobacteria 和一些未可培养来源的 KS 域序列聚集成簇, 这一结果与其它相关文献报道的结果基本一致<sup>[14]</sup>。但是, 其它相关研究中还获得了 Alph-、Beta-和 Gamma-Proteobacteria 来源的 KS 序列<sup>[12,14]</sup>, 这可能与红树林土壤中 Delta-和 Gamma-Proteobacteria 占优势有关<sup>[5]</sup>。在系统发育树中, 来源于 Cyanobacteria 的 KS 域与来源于 Proteobacteria 的 KS 域聚集成簇, 反映出这两类微生物中 PKS 基因在进化上存在着紧密联系。Cyanobacteria 和 Myxobacteria 是非丝状细菌里生



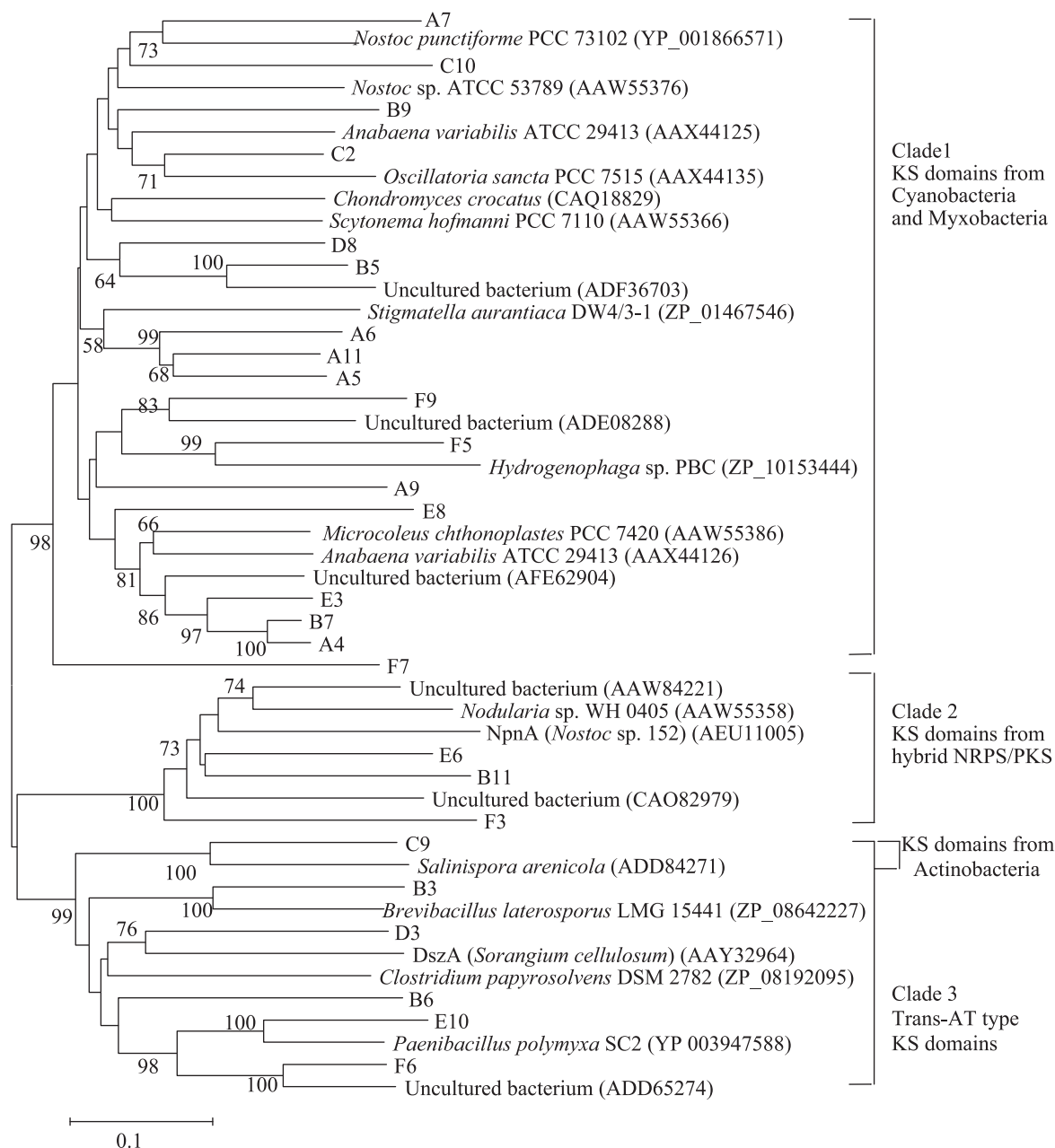


图 3 PKS I KS 域的系统发育分析图

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed from the PKS I KS fragment

注: 用从红树林根际土壤中获得 DNA 扩增得到的 PKS I 基因 KS 域片段构建的 Neighbor-Joining 树. 分支上的数值表示经 1 000 次计算后的置信度, 只显示  $\geq 50\%$  的 Bootstrap 值, 左下方的刻度尺表示 10% 的差异度, 从 GenBank 数据库中获得的序列在括号内标有其登录号.

Note: Neighbor-Joining tree constructed using aligned KS domain sequences from type I PKS genes cloned from genomic DNA derived from mangrove rhizosphere soil. Bootstrap values greater than 50% are shown at the nodes (1 000=100%). Scale bar=10% dissimilarity. Sequences followed by its accession number were derived from GenBank database.



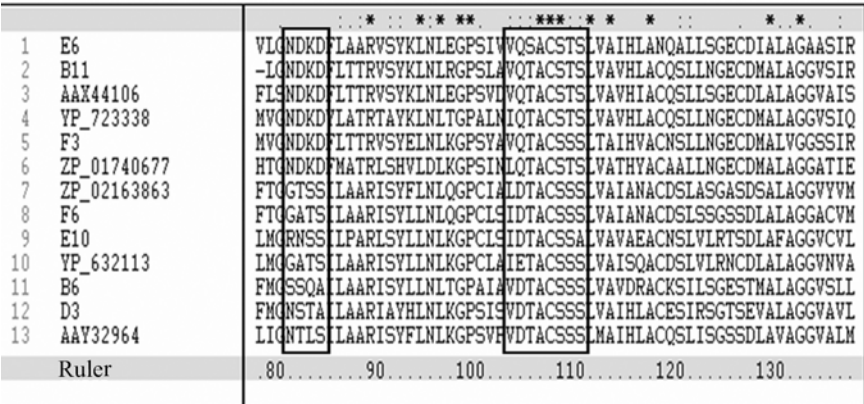


图 4 杂合 NRPS/PKS KS 域特征 motif 分析结果(两个特征 motif 分别用方框标出)

Fig. 4 Amino acid sequence alignment of the motifs for identification of hybrid NRPS/PKS enzyme complexes

Note: The motifs N (DE) KD and VQTASTS are marked by frame.

物活性次级代谢产物的的主要产生者。目前，由这两类细菌产生的生物活性次级代谢产物约占总微生物生物活性次级代谢产物的 10%，而且呈现逐年增加的趋势，因此这两类菌成为微生物产物的潜力产生菌<sup>[26]</sup>。本研究中与 Cyanobacteria 和 Myxobacteria 来源的 KS 域序列聚集成簇的序列所有 14 个(约占 53.8%)，而且这些序列在 NCBI 中比对后的相似性均小于 75%，表明这些 KS 域序列可能来自于 Cyanobacteria 和 Myxobacteria 中新 PKS 基因。此外，还有 6 个 KS 域序列是与未可培养细菌的 KS 域序列聚集成簇(约占 23%)，这些 KS 域序列在 3 个 Clade 中均有分布，由此可见这些未可培养细菌的来源也较广泛，也从侧面反映出红树林根际土壤微生物资源和次级代谢产物生物合成基因的多样性。

参 考 文 献

[1] Bull AT, Ward AC, Goodfellow M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(3): 573–606.

[2] 林鹏. 中国红树林生态系[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 3–10.

[3] Hong K, Gao AH, Xie QY, et al. Actinomycetes for

marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China[J]. Marine Drugs, 2009, 7(1): 24–44.

[4] 王岳坤, 洪葵. 红树林土壤细菌群落 16S rDNA V3片段 PCR 产物的 DGGE 分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 201–204.

[5] Liu SJ, Drake HL. Microbes and the Environment: Perspective and Challenges[M]. Beijing: Science Press, 2008: 52–58.

[6] 徐小雄, 阮继生, 洪葵, 等. 从红树植物根际土壤选择性分离小双孢菌[J]. 微生物学通报, 2009, 36(9): 1299–1304.

[7] Xu XX, Qu Z, Hong K, et al. *Asanoa hainanensis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Acrostichum speciosum* in a mangrove[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61: 2384–2388.

[8] Wang F, Xu XX, Qu Z, et al. *Nonomuraea wenchangensis* sp. nov., isolated from mangrove rhizosphere soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(Pt 6): 1304–1308.

[9] Wang C, Xu XX, Hong K, et al. *Micromonospora rhizosphaerae* sp. nov., isolated from mangrove rhizosphere soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(Pt 2): 320–324.

[10] 陈华, 洪葵, 庄令, 等. 海南红树林的微生物生

- 态分布及细胞毒活性评价[J]. 热带作物学报, 2006, 27(1): 59–63.
- [11] 董晓毅, 王梁华, 孙铭娟, 等. 东海洋山港沿岸土壤、海水样本中 I 型 PKS 基因的初步筛选鉴定与功能分析[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1359–1366.
- [12] Schirmer A, Gadkari R, Reeves CD, et al. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissolute*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4840–4849.
- [13] Wawrik B, Kutliev D, Abdivasievna UA, et al. Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and Central Asia[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(9): 2982–2989.
- [14] Zhao J, Yang N, Zeng R. Phylogenetic analysis of type I polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase genes in Antarctic sediment[J]. Extremophiles, 2008, 12(1): 97–105.
- [15] Wawrik B, Kerkhof L, Zylstra GJ, et al. Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(5): 2232–2238.
- [16] Good I. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. Biometrika, 1953, 40(34): 237–264.
- [17] Krebs CJ. Ecological methodology[M]. New York: Harper and Row, 1989: 364–378.
- [18] Chao A. Estimating population size for sparse data in capture-recapture experiments[J]. Biometrics, 1989, 45(2): 427–438.
- [19] Gontang EA, Gaudêncio SP, Fenical W, et al. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in Marine actinobacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(8): 2487–2499.
- [20] Reddy BV, Kallifidas D, Kim JH, et al. Natural product biosynthetic gene diversity in geographically distinct soil microbiomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(10): 3744–3752.
- [21] Piel J. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(22): 14002–14007.
- [22] Cheng YQ, Tang GL, Shen B. Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(24): 7013–7024.
- [23] Moffitt MC, Neilan BA. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations[J]. Journal of Molecular Evolution, 2003, 56(4): 446–457.
- [24] Metsä-Ketelä M, Salo V, Halo L, et al. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 180(1): 1–6.
- [25] Komaki H, Harayama S. Sequence diversity of type-II polyketide synthase genes in *Streptomyces*[J]. Actinomycetologica, 2006, 20(2): 42–48.
- [26] Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading[J]. Journal of Antibiotics, 2012, 65(8): 385–395.