

内生真菌 HND5 菌株抗香蕉枯萎病菌相关 非核糖体多肽合成酶基因簇的鉴定

杨 扬¹ 陈奕鹏¹ 周 维² 蔡吉苗¹ 王 宝¹ 黄贵修^{1*}

(1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 农业部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南省热带作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 海口 571101; 2. 广西壮族自治区农业科学院生物技术研究所, 香蕉抗病种质创制与病虫害防控联合实验室, 南宁 530007)

摘要: 为明确帚枝霉属内生真菌 *Sarocladium brachiariae* HND5 菌株具体的抑菌活性物质, 在全基因组测序数据的基础上, 利用生物信息学对抑菌活性物质合成基因簇进行定位, 通过聚类分析和系统发育树分析对基因簇合成产物进行鉴定, 并通过基因缺失突变构建及代谢组分析确定具体的抑菌活性物质。结果显示, HND5 菌株共含有 7 个非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)基因簇, 聚类分析结果表明基因簇 29 合成产物为噬铁素, 基因簇 30 合成产物为类环孢霉素类抗菌多肽; 系统发育树结合生物信息学结果显示基因簇 30 合成产物与已知环孢霉素结构差异大, 为一个新型非核糖体多肽; 将基因簇 30 NRPS 基因缺失突变后, HND5 菌株丧失抑菌活性; 同野生型菌株相比, 基因簇 30 NRPS 基因缺失突变体缺失一个分子量为 887.54 Da 的多肽类物质。表明 HND5 菌株的抑菌活性物质为一个分子量为 887.54 Da 的新型类环孢霉素非核糖体多肽, 基因簇 30 负责该多肽的生物合成。

关键词: 内生真菌; 香蕉枯萎病菌; 抑菌多肽; 非核糖体多肽合成酶

Identification of the non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) gene clusters involved in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the endophytic fungal isolate HND5

Yang Yang¹ Chen Yipeng¹ Zhou Wei² Cai Jimiao¹ Wang Bao¹ Huang Guixiu^{1*}

(1. Hainan Engineering Research Center for Biological Control of Tropical Crop Diseases and Insect Pests, Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture; Environmental and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan Province, China; 2. Joint Laboratory of Banana Resistant Germplasm Creation and Control of Diseases and Insect Pests, Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

Abstract: In order to identify the antifungal substances of the endophytic fungus *Sarocladium brachiariae* HND5 strain, bioinformatic methods were used to locate putative genes responsible for the biosynthesis of antifungal substances based on the whole genome sequence of this strain, and cluster analysis combined with phylogenetic analysis was used to identify the products of gene clusters and the exact antifungal substance was located by constructing deletion mutants and analyzing metabolome. The results showed that HND5 strain had seven non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) gene clusters; the prod-

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0202100), 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630042018016)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: hgxiu@vip.163.com

收稿日期: 2018-08-20

uct of cluster 29 was siderophore and the product of cluster 30 was cyclosporin-like non-ribosomal antifungal peptide based on cluster analysis. Phylogenetic analysis combined with bioinformatic analysis indicated that the product of cluster 30 was a new non-ribosomal peptide, the structure of which was very different from cyclosporin. HND5 strain lost its antifungal activity when cluster 30 NRPS gene was mutated by deletion. Compared with HND5 wild type strain, the deletion mutant of cluster 30 NRPS gene lost an 887.54 Da peptide. This study suggested that HND5 strain synthesized an 887.54 Da cyclosporin-like non-ribosomal peptide by gene cluster 30 as the antifungal substance.

Key words: endophytic fungus; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4; antifungal peptide; non-ribosomal peptide synthetase

尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4(FOC4)引起的香蕉枯萎病已经在全球多个产区暴发,严重威胁着香蕉产业发展,生物防治因绿色环保、无残留而备受青睐(Fravel et al., 2003; Thangavelu & Mustaffa, 2010; Akila et al., 2011)。目前已经发现多种生防菌株可以防治 FOC4,如解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 和 BEB33、枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* BEB2(付业勤等, 2009; 朱森林等, 2014),链霉菌 *Streptomyces albulus* NJZJSA2(Wu et al., 2015)、多产色链霉菌 *S. polychromogenes* 和绿色木霉 *Trichoderma viride* 等(周登博等, 2016)。除上述根围微生物外,内生菌因其独特的生态位也在生物防治中发挥着重要作用,如从野生酸枣中分离得到的芽胞杆菌 SZG-23(裴淑兰等, 2018)、从杨树中分离得到的黄绿木霉 *T. aureoviride*(杨蕾等, 2014)及从石斛中分离得到的解淀粉芽胞杆菌(何劲等, 2014)等。有关内生菌生防活性物质及生防机理的报道较少,限制了其开发利用。陈奕鹏等(2017)和霍珊珊(2012)从臂形草中分离得到的帚枝霉属内生真菌 *Sarocladium brachiariae* HND5 菌株可有效抑制 FOC4 的生长,明确该菌株的活性物质对其推广有重要意义。

真菌生防活性物质主要包括多肽类、聚酮类、萜类、生物碱类和挥发性物质等,具有抗菌、杀虫和抗病毒等多种功能(Aly et al., 2011),其中非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)合成的非核糖体多肽类次生代谢产物结构和功能具有多样性,是活性物质的重要组成部分(Walsh et al., 2001; Bills et al., 2014)。在已报道的真菌全基因组数据中,尚有 90% 非核糖体多肽及其相关合成基因功能未知(Nielsen et al., 2017)。真菌基因组中的非核糖体多肽相关合成基因以基因簇的形式存在,可利用 antiSMASH 等在线工具对其进行定位分析(Weber et al., 2015; Ebert et al., 2018)。NRPS 由

多个相对独立的功能域组成,其中腺苷酰化功能域因其序列保守,常被用于未知功能 NRPS 基因簇的进化分析及产物预测(Bushley & Turgeon, 2010)。

帚枝霉属主要由水稻鞘腐病菌 *Sarocladium oryzae*、尖狭帚枝霉 *S. attenuatum* 和紫色帚枝霉 *S. sinense* 等水稻病原菌,基利帚枝霉 *S. kiliense*、直立帚枝霉 *S. strictum* 等人类病原菌以及植物内生菌组成(Giraldo et al., 2015; Liu et al., 2017)。目前,仅从水稻鞘腐病菌发酵液上清液中分离得到浅蓝菌素和烟曲霉酸 2 种植物毒素,其它类型次生代谢产物未见报道(Bigirimana et al., 2015)。镰刀菌属和顶孢霉属与帚枝霉属亲缘关系最近,Anisha & Radhakrishnan(2015)从顶孢霉属中分离得到抗菌物质环孢霉素和 gliotoxin 等非核糖体多肽类次生代谢产物, Bahadoor et al. (2018) 从禾谷镰刀菌 *F. graminearum* 中分离得到合成的寄主专化型毒素 graminin 等非核糖体多肽类次生代谢产物。Hittalmani et al. (2016) 全基因组测序结果显示,水稻鞘腐病菌基因组中含有 7 个 NRPS 基因簇, 10 个聚酮类合成酶-非核糖体多肽合成酶杂合基因簇,表明该属真菌具有合成多种非核糖体多肽类次生代谢产物的遗传学基础。因此,研究非核糖体多肽类次生代谢产物,可进一步推动帚枝霉属真菌生防机理的研究。

为进一步明确帚枝霉属内生真菌 HND5 菌株的抑菌活性物质,本研究拟在全基因组数据的基础上,利用生物信息学对抑菌活性物质合成基因簇进行定位,采用聚类分析和系统发育树分析对基因簇产物进行鉴定,并通过基因缺失突变体的构建及代谢组分析确定具体的抑菌活性物质,以期为该内生真菌菌株生防机理的解析及实际应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:帚枝霉属内生真菌 HND5 菌株(My-

coBank 登录号 MB814539), 植物病原菌多主棒孢 *Corynespora cassiicola*、尖孢镰刀菌、FOC4 均由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所提供。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15~20 g、去离子水 1 L; 马铃薯葡萄糖 (potato dextrose, PD) 液体培养基: PDA 培养基中不添加琼脂粉; 完全培养基 (complete medium, CM): 酵母浸膏 6 g、酶水解干酪素 3 g、酸水解干酪素 3 g、蔗糖 10 g, 蒸馏水定容至 1 L; 再生培养基: 酵母浸膏 1 g、酶水解干酪素 1 g、蔗糖 342 g, 蒸馏水定容至 1 L。

试剂及仪器: TransStart FastPfu DNA Polymerase, 全式金生物技术(北京)有限公司; 限制性内切酶, 宝生物工程(大连)有限公司; 酶水解干酪素、酸水解干酪素、酵母浸膏, 索莱宝(北京)科技有限公司; 胰蛋白酶、酵母粉, 英国 OXOID 公司; DS2000 Marker, 天根生化科技(北京)有限公司; Southern blot 试剂盒, 瑞士罗氏生命科学公司; 色谱纯甲醇, 赛默飞世尔(中国)科技有限公司; XAD-16 大孔树脂, 美国西格玛奥德里奇公司; 其它试剂均为国产分析纯。ACQUITY UPLC-I 超高效液相色谱仪、Xevo G2-XS TOF 飞行时间高分辨质谱仪, 沃特世科技(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HND5 菌株 NRPS 基因簇预测与注释

利用在线分析工具 antiSMASH 3.0 (<https://fungismash.secondarymetabolites.org>) 使用默认值对 HND5 菌株的全基因组进行次生代谢产物预测。在 antiSMASH 预测结果的基础上, 利用 BLASTp 软件 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) 分析 NRPS 基因簇中全部基因的保守功能域, 并对 HND5 菌株基因簇 30 进行详细注释。

1.2.2 HND5 菌株 NRPS 产物的聚类分析

通过与已知功能和产物的 NRPS 腺苷酰化基团的聚类分析来鉴定 HND5 菌株 NRPS 的功能和合成产物。根据 antiSMASH 预测分析结果, 获得 HND5 菌株 NRPS 中腺苷酰化基团的氨基酸序列; 参照 Bushley & Turgeon (2010) 方法, 获得已知产物和功能的 NRPS 中腺苷酰化基团氨基酸序列。使用 MEGA 6.0 软件对 HND5 菌株中未知功能及已知功能的 NRPS 腺苷酰化基团进行排序, 采用最大似然法进行聚类分析, 1 000 次重复 (Tamura et al., 2013)。

1.2.3 基因簇 30 NRPS 产物的系统发育树分析

恩镰孢霉素合成酶及环孢霉素合成酶均具有较

好的抑菌活性, 对基因簇 30 中 NRPS 的腺苷酰化基团与环孢霉素合成酶及其同源合成酶的腺苷酰化基团进行系统发育分析。参照 Bushley et al. (2013) 方法获得环孢霉素合成酶及其同源合成酶的腺苷酰化功能域氨基酸序列, 利用 MEGA 6.0 软件对序列进行排序, 并采用最大似然法构建基因簇 30 中 NRPS、环孢霉素合成酶及其同源合成酶中的腺苷酰化功能域的系统发育树。

1.2.4 基因簇 30 NRPS 基因缺失突变体的构建与验证

使用 Split-marker 方法进行基因簇 30 NRPS 基因缺失突变体的构建 (Catlett et al., 2003)。首先以 HND5 菌株基因组为模板, 利用引物 C30-L-F (5'-GATGAGGCTATGCAGTTGACTGTAG-3')/C30-L-R (5'-CCAAGCCCCAAAAGTGCTCCTTCAATATCAAGATTGGAGAAATTCGGCCAGAGCT-3') 扩增获得目的片段左同源臂, 利用引物 C30-R-F (5'-AGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGC-TGCATCCAGTCCCCGACCATCATC-3')/C30-R-R (5'-TCTTTTGCCACTCACAGCGGGAGTC-3') 扩增获得目的片段右同源臂; 以 pSilent-1 载体为模板, 利用引物 HYG-F (5'-GAGCTCGGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTC-3')/HYG-R (5'-GGATCCGTCTTGACCGATTTCCTTGCGGTCCG-3') 扩增获得潮霉素抗性基因 5' 端, 利用引物 YG-F (5'-GAGCTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCC-3')/HYG-R (5'-GGATCCCTCGAATTCGTCGACGTAACTGGCT-3') 扩增获得潮霉素抗性基因 3' 端; 采用重叠 PCR 方法, 利用引物 C30-L-F (5'-GATGAGGCTATGCAGTTGACTGTAG-3')/HYG-R (5'-GGATCCGTCTTGACCGATTTCCTTGCGGTCCG-3') 连接目的片段左同源臂和潮霉素抗性基因 5' 端, 得到突变左臂; 同样采用重叠 PCR 方法, 利用引物 YG-F (5'-GAGCTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCC-3')/C30-R-R (5'-TCTTTTGCCACTCACAGCGGGAGTC-3') 连接目的片段右同源臂和潮霉素抗性基因 3' 端, 得到突变右臂。引物均由华大基因科技服务(深圳)有限公司合成。利用 CM 培养基制备 HND5 菌株原生质体感受态, 同时转入相等摩尔数的突变左臂和右臂, 涂布到含浓度 150 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的再生培养基筛选平板, 挑取抗潮霉素的 HND5 菌株转化子, 并提取转化子基因组, 利用突变体引物对 C30-Test-F (5'-GAGAAGTGTGCAAATGGTGTGTCGTCG-3')/C30-Test-R (5'-GGTCAACATAGCTTTCGACGTCTCG-3') 以及 C30-T-F (5'-GCCCCGTCTCCCTTGCCAGTGATAT-3')/HY-

R (5'-GGATCCGTCTTGACCGATTCTTGC GGTC-CG-3')对目标片段进行PCR检测以确定插入位置的正确性。PCR体系均按照 TransStart FastPfu DNA Polymerase 构建。基因簇30 NRPS基因左右臂, HYG左右臂扩增以及转化子检测PCR程序: 94℃预变性5 min; 94℃变性20 s; 58℃退火20 s; 72℃延伸20 s; 循环30次; 72℃延伸10 min。HYG左右臂与目的基因左右臂重叠PCR程序分2步, 第1步PCR, 不添加引物: 95℃预变性2 min; 95℃变性20 s; 58℃退火20 s; 72℃延伸45 s; 循环5次; 72℃延伸5 min; 第2步PCR, 向第1步PCR体系中加入引物: 95℃预变性5 min; 2: 95℃变性20 s; 68℃至48℃, 每个循环降低1℃; 72℃延伸45 s; 循环20次。使用被突变的腺苷酰化功能域片段和HYG片段设计的探针进行Southern blot杂交, 并按照Southern blot试剂盒说明书进行Southern blot检测, 当插入片段个数为1时, 即得到突变体。

1.2.5 基因簇30 NRPS基因缺失突变体的抑菌活性

利用400 mL PD液体培养基发酵野生型HND5菌株和基因簇30 NRPS基因缺失突变体, 28℃摇床暗培养21 d; 利用XAD-16大孔树脂抽提发酵液上清中的次生代谢产物, 用甲醇洗脱; 洗脱液旋转蒸干后使用1 mL甲醇溶解, 获得野生型HND5菌株及突变体的次生代谢产物。采用平板对峙法检测次生代谢产物的抑菌活性, 在PDA平板中间分别接种直径

2 mm的多主棒孢、尖孢镰刀菌和FOC4菌饼, 在菌饼周围放置3张直径5 mm的滤纸片, 每张滤纸片分别滴加5 μL色谱纯甲醇(阴性对照)、野生型HND5菌株的次生代谢产物及基因簇30 NRPS基因缺失突变体的次生代谢产物, 28℃培养5~7 d, 根据菌丝的生长情况确定突变体次生代谢产物的抑菌活性。

1.2.6 代谢组分液相色谱联合质谱分析

使用色谱仪和质谱仪对野生型HND5菌株和基因簇30 NRPS基因缺失突变体的代谢组分进行分析。使用ACQUITY UPLC BEH色谱柱进行物质分离, 流动相A为水, 流动相B为色谱纯甲醇, 流速为0.3 mL/min, 进样量为5 μL。梯度洗脱程序: 0~1 min, 5% B; 1~7 min, 5%~30% B; 7~7.5 min, 30%~95% B; 7.5~10 min, 95%~5% B; 10~15 min, 5% B。质谱使用电喷雾电离方式, 检测范围为10~1 200 Da。使用MassLynx 4.1软件中的Progenesis QI 2.0插件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 HND5菌株NRPS基因簇的预测与注释

antiSMASH分析结果显示, HND5菌株基因组存在31个次生代谢产物基因簇, 其中NRPS基因簇有7个。通过对这7个基因簇进行注释发现, 除NRPS基因外, 基因簇中还含有产物修饰、调控和转运等相关基因(图1), 是典型的NRPS合成基因簇。

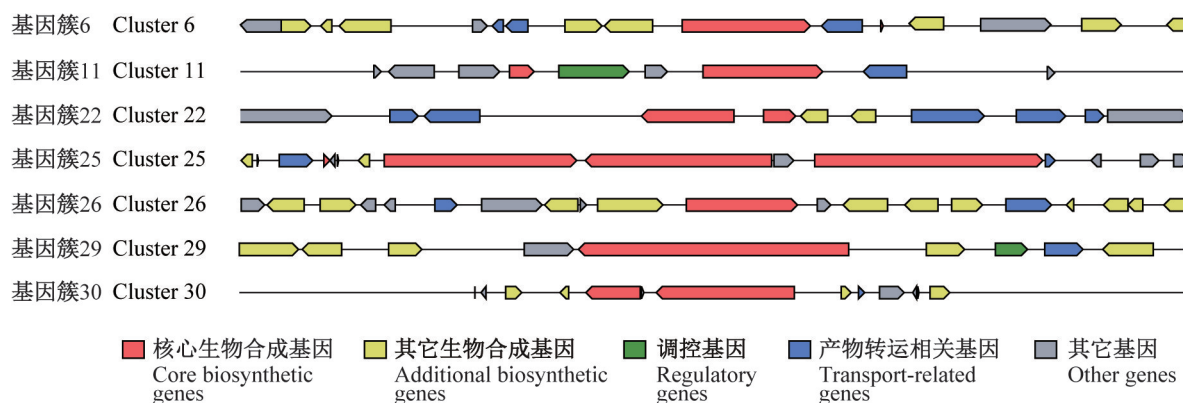


图1 HND5菌株基因组中非核糖体多肽合成酶基因簇注释示意图

Fig. 1 Schematic diagram of annotation of non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the genome of HND5 strain

2.2 HND5菌株NRPS基因簇产物的鉴定

聚类分析结果显示, 基因簇29中的NRPS的腺苷酰化功能域能与噬铁素合成酶的腺苷酰化功能域聚类, 基因簇30的NRPS的腺苷酰化功能域能与环孢霉素合成酶的腺苷酰化功能域进行聚类, 且均有50%以上的靴值支撑(Bootstrap=1 000), 其它基因

簇中的NRPS腺苷酰化功能域无法与已知功能的NRPS腺苷酰化功能域聚类(图2)。因此HND5菌株中的7个NRPS基因簇中基因簇29和基因簇30可能为合成产物, 其中基因簇29合成产物可能是噬铁素类物质, 基因簇30合成产物可能是环孢霉素类物质。

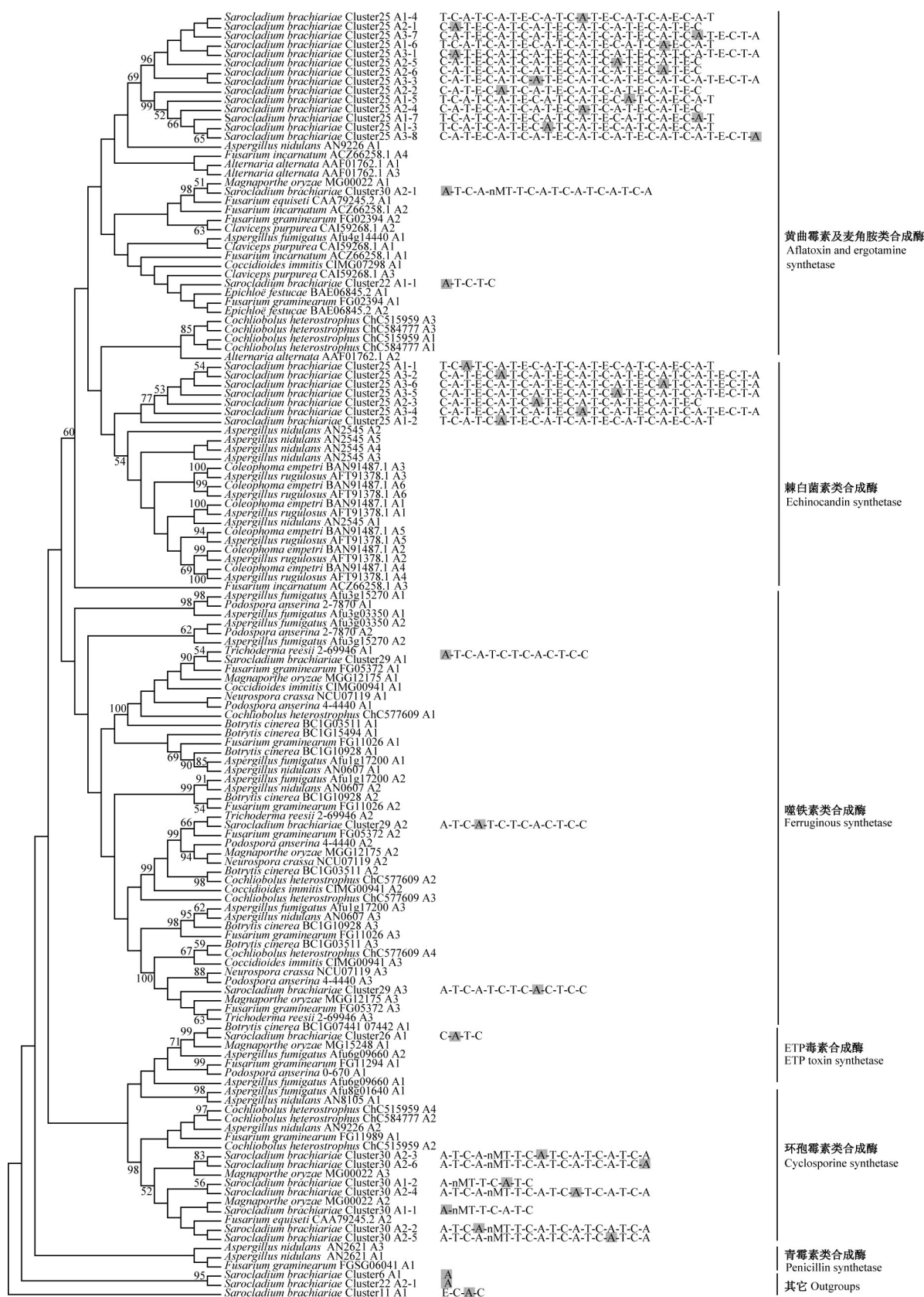


图2 HND5菌株中非核糖体多肽合成酶的腺苷酰化功能域与已知功能非核糖体多肽合成酶腺苷酰化功能域的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of the adenylation domains of HND5 strain and the adenylation domains

from other non-ribosomal peptide synthetases with known functions

阴影: 目标腺苷酰化功能域。Shadow label: target adenylation (A) domains.

2.3 HND5菌株基因簇30产物的鉴定

在 HND5 菌株 NRPS 基因簇功能鉴定的基础上,对基因簇 30 NRPS 进行进一步的注释和功能鉴定。系统进化树分析结果显示,基因簇 30 NRPS 的 2 个腺苷酰化基团与恩镰孢霉素合成酶腺苷酰化功能域同源关系最近,其它 5 个腺苷酰化功能域与环孢霉素合成酶腺苷酰化功能域有较好的同源关系(图 3)。尽管系统发育树结果显示基因簇 30 NRPS 与恩镰孢霉素合成酶及环孢霉素合成酶具有较近的

遗传关系,但是其功能域结构与环孢霉素合成酶、恩镰孢霉素合成酶的功能域结构明显不同:基因簇 30 NRPS 由 2 个开放阅读框组成,且有 1 个单独的腺苷酰化功能域(图 4)。基因簇 30 的详细注释结果显示,该基因簇中含有 1 个 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)合成酶基因,该基因在已知 NRPS 基因簇中未报道过,是一个新型非核糖体多肽修饰酶。

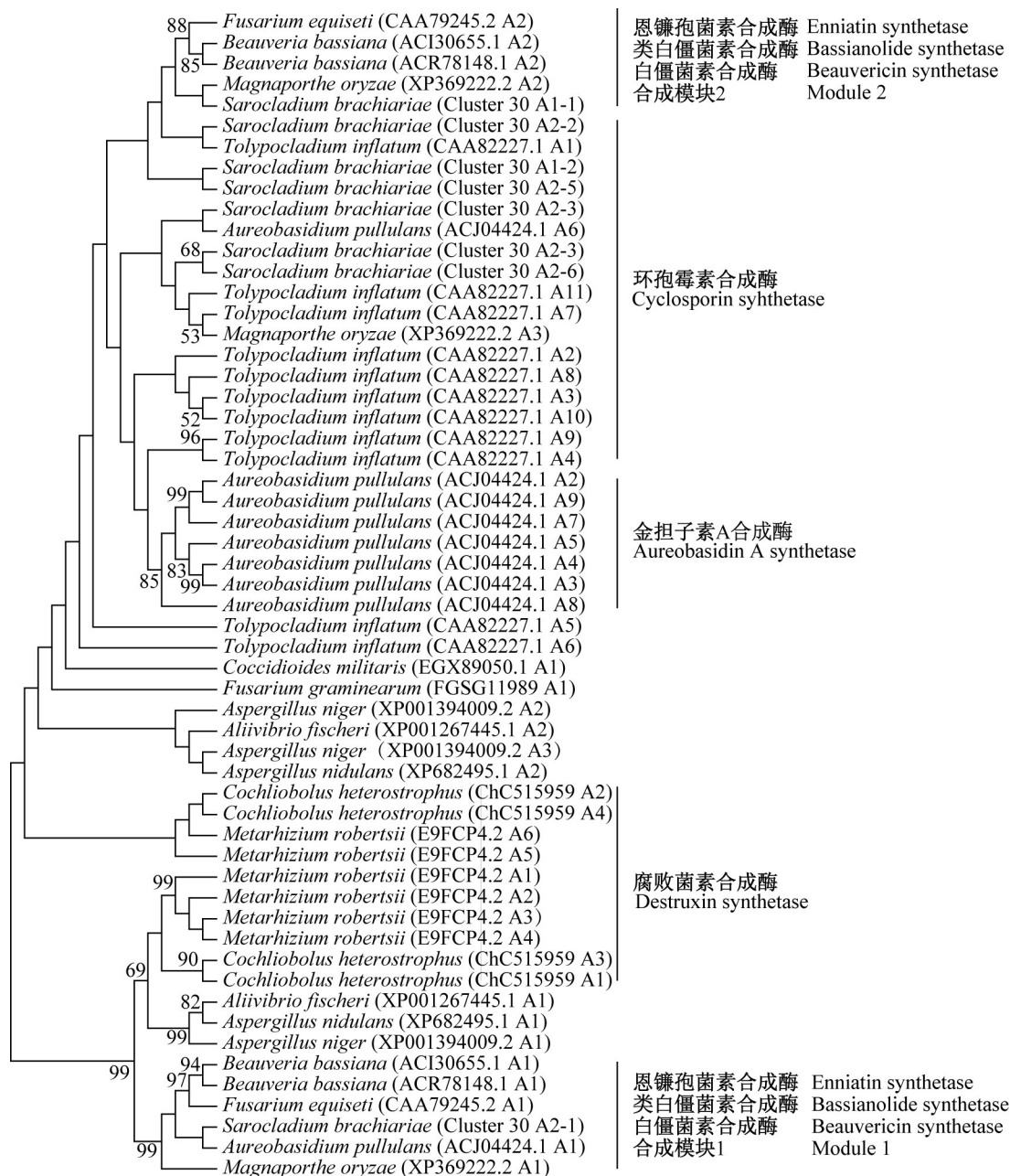


图 3 基于最大似然法构建基因簇 30 中非核糖体多肽合成酶腺苷酰化功能域与环孢霉素合成酶及其同源合成酶腺苷酰化功能域的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic analysis of adenylation domains in non-ribosomal peptide synthetases of cluster 30 and the adenylation domains in cyclosporin synthetases and the homologous synthetases with maximum likelihood method

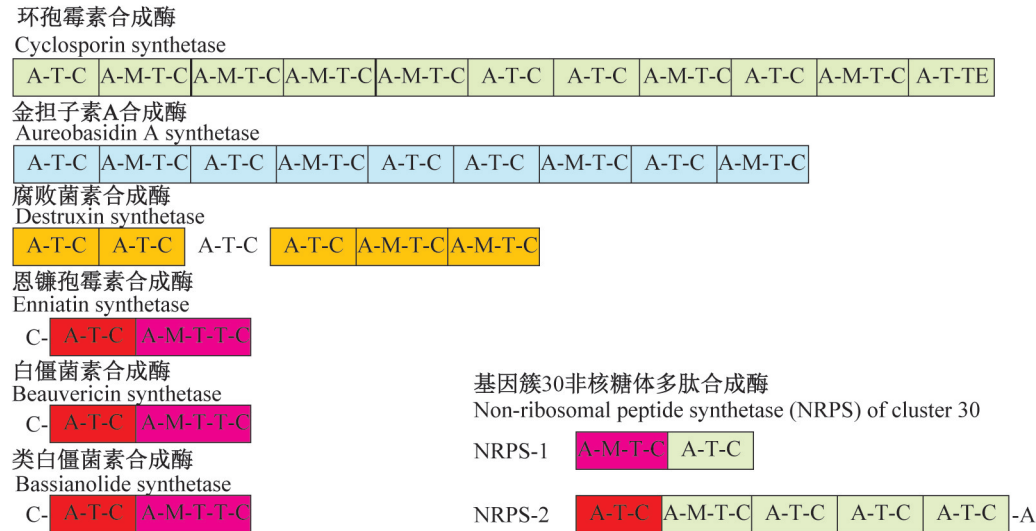


图4 基因簇30中非核糖体多肽合成酶功能域结构与环孢霉素合成酶及其同源合成酶功能域结构的比较

Fig. 4 Comparison of the module structure between non-ribosomal peptide synthetases of cluster 30 and cyclosporin synthetases and the homologues synthetases

2.4 HND5菌株NRPS基因缺失突变体

采用 Split-marker 方法获得多个HND5 菌株的基因簇30 NRPS基因缺失转化子;PCR 检测结果显示,转化子无法扩增到被突变片段而能扩增HYG 基因片段(图5);Southern blot 检测结果显示,野生型HND5 菌株可以获得一条腺苷酰化基团基因探针杂

交条带,潮霉素抗性基因探针没有杂交条带;而使用腺苷酰化基团基因探针杂交转化子无条带,潮霉素抗性基因探针杂交转化子可得到一个条带(图6),表明HND5 菌株基因簇30 NRPS基因缺失突变体构建成功。

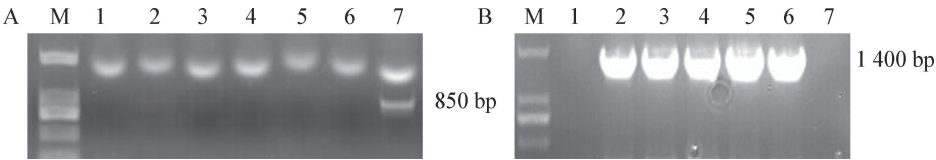


图5 HND5菌株基因簇30非核糖体多肽合成酶基因缺失突变体的PCR检测

Fig. 5 PCR detection of the gene mutants encoding the non-ribosomal peptide synthetase of cluster 30 in HND5 strain

A: 利用引物 C30-Test-F/C30-Test-R 扩增基因簇30 中 NRPS 基因被突变的片段; B: 利用引物 C30-T-F/HY-R PCR 检测 HYG 插入位置。M: DS2000 marker; 1: 阴性对照; 2~6: cluster 30 中 NRPS 基因缺失突变转化子; 7: 野生型 HND5 菌株。A: Amplification of the mutated fragment of the NRPS gene of cluster 30 by using the primers C30-Test-F/C30-Test-R; B: PCR test of HYG gene insertion position by using the primers C30-T-F/HY-R. M: DS2000 marker; 1: negative control; 2~6: cluster 30 NRPS encoding gene mutants; 7: wild type strain of HND5.

2.5 HND5菌株NRPS基因突变体的抑菌活性

平板抑菌试验显示,野生型HND5 菌株发酵液上清液提取物可有效抑制多主棒孢、尖孢镰刀菌和尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种3种病原菌的生长,而HND5 菌株基因簇30 NRPS基因突变体发酵液上清液提取物不能抑制3种真菌的生长(图7),表明NRPS基因参与合成的非核糖体多肽,是HND5 菌株主要的抗真菌活性物质。

2.6 代谢组分的液相色谱联合质谱分析

与野生型HND5 菌株代谢组分相比,基因簇30

NRPS基因缺失突变体代谢组分缺失了1种质核比为887.54的物质。一级质谱图显示,野生型HND5 菌株和基因簇30 NRPS基因缺失突变体均在8.53 min 处出现峰值(图8-A~B);二级质谱图显示,野生型HND5 菌株和基因簇30 NRPS基因缺失突变体在相同碰撞能量下的二级质谱碎片完全不同,其中野生型HND5 菌株的碎片质核比为409.17,而基因簇30 NRPS基因缺失突变体的碎片质核比为782.57(图8-C~D),表明两者虽然分子量相似,但是是不同的物质。

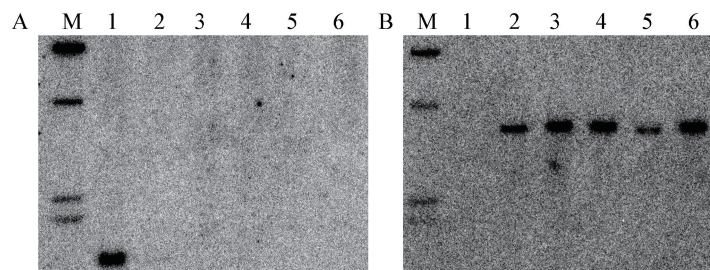


图6 HND5菌株基因簇30非核糖体多肽合成酶基因缺失突变体的Southern blot验证

Fig. 6 Southern blot verification of the non-ribosomal peptide synthetase of cluster 30 gene mutant in HND5 strain

A: NRPS基因缺失部分检测探针; B: HYG检测探针。M: λ -Hind III marker; 1: HND5菌株基因组Hind III酶切产物; 2~5: cluster 30 NRPS基因缺失突变体基因组Hind III酶切产物。A: Probe for mutated fragment detection; B: probe for HYG gene detection. M: λ -Hind III marker; 1: Hind III digested fragment of genomic DNA of wild type strain HND5; 2~5: Hind III digested fragment of genomic DNA of cluster 30 NRPS gene mutant of HND5 strain.

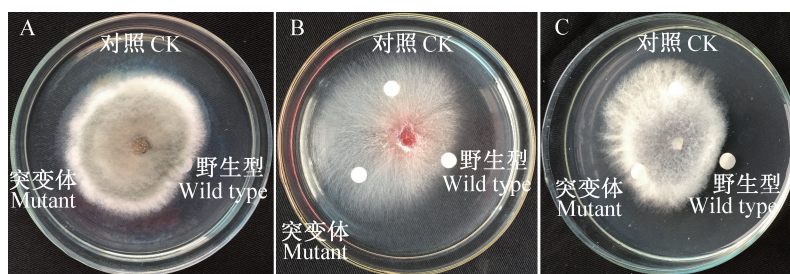


图7 野生型HND5菌株和基因簇30非核糖体多肽合成酶基因缺失突变体的抑菌活性

Fig. 7 Anti-fungal activity of wild type and non-ribosomal peptide synthetase of cluster 30 gene mutant of HND5 strain

A~C: 多主棒孢、尖孢镰刀菌、尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种; CK: 甲醇。A~C: *Corynespora cassiicola*, *Fusarium oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4, respectively; CK: methanol.

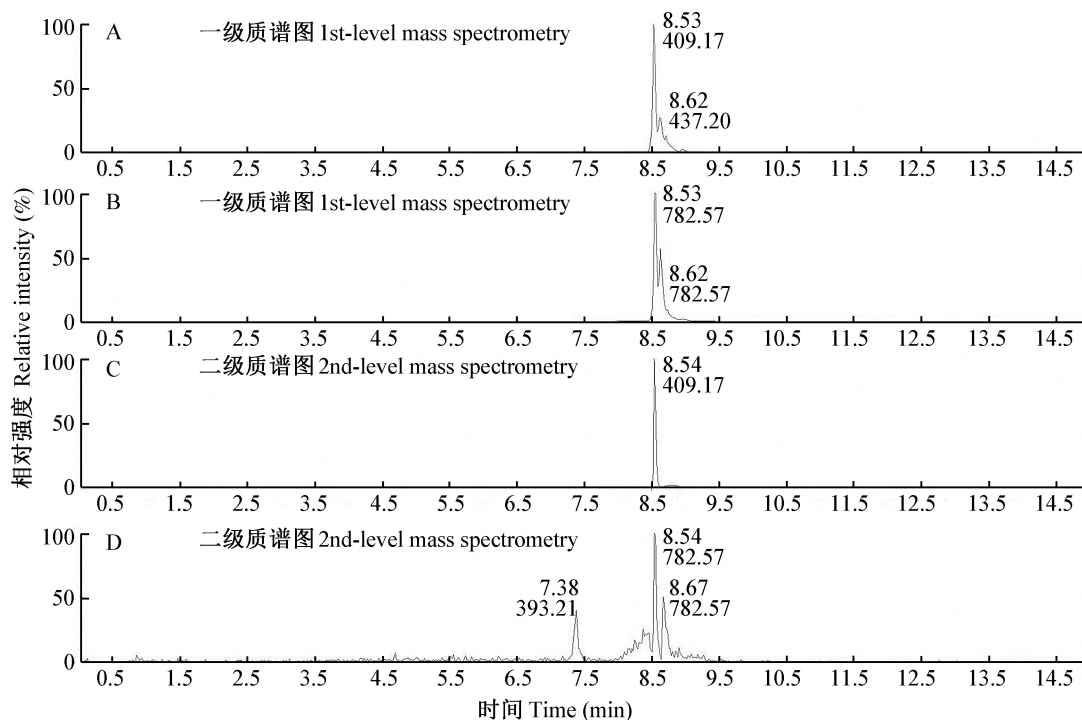


图8 野生型HND5菌株(A、C)和基因簇30非核糖体多肽合成酶基因缺失突变体(B、D)代谢组分子量为887.54 Da的质谱图

Fig. 8 887.54 Da mass spectrogram of the metabolomes of wild type HND5 strain (A, C) and non-ribosomal peptide synthetase gene deletion mutant of cluster 30 (B, D)

3 讨论

本研究根据生防内生真菌 HND5 菌株全基因组数据,利用 antiSMASH 鉴定得到了 7 个 NRPS 基因簇;Hittalmani et al.(2016)通过全基因组测序从水稻鞘腐病菌基因组中也鉴定得到 7 个 NRPS 基因簇,但未进行功能验证和产物鉴定,说明该属真菌具有合成多种非核糖体多肽类次生代谢产物的遗传学基础。本研究的腺苷酰化功能域聚类分析结果显示,HND5 菌株基因簇 29 的产物为噬铁素,基因簇 30 的产物为环孢霉素类物质。噬铁素类物质是一类重要的植物促生长物质,可促进植物对铁元素的吸收(Winterberg et al.,2010),说明 HND5 菌株具有促进植物生长的潜力。本研究仅关注了基因簇 30 合成的环孢霉素类抗菌物质,在今后的研究中将对 HND5 菌株噬铁素的促生效果进行进一步探讨。

环孢霉素是顶孢霉属真菌 *Acremonium luzulae* 产生的主要抗菌物质,如环孢霉素 C(Moussaïf et al.,1997)。Giraldo et al.(2015)的多基因序列进化分析结果显示,帚枝霉属与顶孢霉属亲缘关系近,原来多个顶孢霉属真菌重新被鉴定为帚枝霉属真菌,如基利顶孢霉 *Acremonium kiliense* 被重新鉴定为帚枝霉属。本研究结果表明帚枝霉属内生真菌 HND5 菌株基因簇 30 的可能产物为环孢霉素类物质,与 Giraldo et al.(2015)结果一致。Yang et al.(2018)研究结果显示,弯颈霉属中环孢霉素合成基因簇共有 1 个细胞色素 P450、1 个丙氨酸异构酶和 1 个氨基转移酶参与了环孢霉素的生物合成过程,而本研究结果表明在 HND5 菌株基因簇 30 中,仅含有 1 个细胞色素 P450 和 1 个 ACC 合成酶编码基因,与已知的环孢霉素生物合成基因簇差别明显;且基因簇 30 中 NRPS 的功能域结构与环孢霉素合成酶的功能域结构明显不同(Nilanonta et al.,2003),是一种新型类环孢霉素多肽。后期还需对该多肽的具体化学结构进行进一步解析。

含有环丙基结构的氨基酸在非核糖体多肽中存在较少,目前仅在假单胞病原菌合成的冠菌素中发现含有冠烷酸(coronamic acid, 1-amino-1-carboxy-2-ethylcyclopropane, CMA)这种环丙基氨基酸。假单胞菌通过非血红素铁酶催化的氯化反应,可以亮氨酸为底物合成 CMA (Vaillancourt et al.,2005; Tang et al.,2017)。本研究在 HND5 菌株基因簇 30 中发现 1 个 ACC 合成酶编码基因,该基因表达产物可以 S-腺苷蛋氨酸作为底物合成含有环丙基结构的

ACC(Zhang et al.,2004)。推测 ACC 可能作为基因簇 30 中非核糖体多肽的底物参与产物的合成,为一种新发现的含有环丙基结构的 NRPS 的底物氨基酸。该结果仅是生物信息学的分析结果,还需要进一步的试验验证。

缺失突变体构建是非核糖体多肽鉴定及合成途径解析的主要研究手段。Wang et al.(2012)通过构建绿僵菌 *Metarhizium* 的相关突变体解析了绿僵菌素的生物合成途径;Guo et al.(2013)在基因组数据的指导下构建了土曲霉 *Aspergillus terreus* 的相关突变体,通过构建的突变体成功解析了多硫代二酮哌嗪类物质的合成机理。本研究利用 Split-marker 方法构建了 HND5 菌株基因簇 30 NRPS 基因缺失突变体,并使用 PCR 技术及 Southern blot 两种方法对突变体进行验证,保证了结果的可靠性。超高效液相色谱、飞行时间高分辨质谱分析具有高灵敏度、高准确度及高分辨率等优点,可对微生物代谢产物进行全面精确的检测,如元超等(2018)就采用此方法对地衣内生真菌 *Pestalotiopsis* sp. 次生代谢产物进行了分析。本研究将突变体构建和液相色谱联合质谱检测相结合,准确定位了 HND5 菌株基因簇的合成产物,为内生真菌“从基因到产物”(Cacho et al.,2015)的研究提供了新方法。

在全基因组测序数据的支持下,本研究定位了生防内生真菌 HND5 菌株抗菌物质合成相关的 NRPS 基因簇,并通过质谱分析定位到了该基因簇的合成产物,但该物质的具体结构未解析,合成基因簇中的 ACC 修饰功能未知。下一步工作中将对该抑菌非核糖体多肽进行进一步鉴定和结构解析,并通过分析基因簇中修饰酶功能解析该非核糖体多肽的合成机理。

参 考 文 献 (References)

- Akila R, Rajendran L, Harish S, Saveetha K, Raguchander T, Samiyappan R. 2011. Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing *Fusarium* wilt in banana. *Biological Control*, 57(3): 175–183
- Aly AH, Debbab A, Proksch P. 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6): 1829–1845
- Anisha C, Radhakrishnan EK. 2015. Gliotoxin-producing endophytic *Acremonium* sp. from *Zingiber officinale* found antagonistic to soft rot pathogen *Pythium myriothylus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(7): 3458–3467

- Bahadoor A, Brauer EK, Bosnich W, Schneiderman D, Johnston A, Aubin Y, Aubin Y, Blackwell B, Melanson JE, Harris LJ. 2018. Gramillin A and B: cyclic lipopeptides identified as the nonribosomal biosynthetic products of *Fusarium graminearum*. *Journal of the American Chemical Society*, 140: 16783–16791
- Bigirimana VDP, Hua GKH, Nyamangyoku OI, Höfte M. 2015. Rice sheath rot: an emerging ubiquitous destructive disease complex. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1066
- Bills G, Li Y, Chen L, Yue Q, Niu XM, An Z. 2014. New insights into the echinocandins and other fungal non-ribosomal peptides and peptaibiotics. *Natural Product Reports*, 31(10): 1348–1375
- Bushley KE, Raja R, Jaiswal P, Cumbie JS, Nonogaki M, Boyd AE, Owensby CA, Knaus BJ, Elser J, Miller D, et al. 2013. The genome of *Tolypocladium inflatum*: evolution, organization, and expression of the cyclosporin biosynthetic gene cluster. *PLoS Genetics*, 9(6): e1003496
- Bushley KE, Turgeon BG. 2010. Phylogenomics reveals subfamilies of fungal nonribosomal peptide synthetases and their evolutionary relationships. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 26
- Cacho RA, Tang Y, Chooi YH. 2015. Next-generation sequencing approach for connecting secondary metabolites to biosynthetic gene clusters in fungi. *Frontiers in Microbiology*, 5: 774
- Catlett NL, Lee BN, Yoder OC, Turgeon BG. 2003. Split-marker recombination for efficient targeted deletion of fungal genes. *Fungal Genetics Newsletter*, 50: 9–11
- Chen YP, Yang Y, Shi T, Cai JM, Huang GX. 2017. Identification and fungistasis of volatile compounds produced by endophytic fungi HND5. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 38(4): 689–694 (in Chinese) [陈奕鹏, 杨扬, 时涛, 蔡吉苗, 黄贵修. 2017. 内生真菌 HND5 挥发性物质组分分析及其抑菌作用测定. *热带作物学报*, 38(4): 689–694]
- Ebert MK, Spanner RE, de Jonge R, Smith DJ, Holthusen J, Secor GA, Thomma BPHJ, Bolton MD. 2018. Gene cluster conservation identifies melanin and perylenequinone biosynthesis pathways in multiple plant pathogenic fungi. *Environmental Microbiology*, DOI: 10.1111/1462-2920.14475
- Fravel D, Olivain C, Alabouvette C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist*, 157(3): 493–502
- Fu YQ, Zhang KL, Pan XX, Cai JM, Gao HH, Huang GX. 2009. Identification of endophytic bacillus and its inhibition reaction to *F. oxysporum* f. sp. *cubense* of banana. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 30(1): 80–85 (in Chinese) [付业勤, 张科立, 潘溪心, 蔡吉苗, 高宏华, 黄贵修. 2009. 内生拮抗细菌 BEB2 的分子鉴定及其对香蕉枯萎病菌的抑制作用. *热带作物学报*, 30(1): 80–85]
- Giraldo A, Gené J, Sutton D, Madrid H, de Hoog GS, Cano J, Decock C, Crous PW, Guarro J. 2015. Phylogeny of *Sarocladium* (*Hypocreales*). *Persoonia*, 34: 10–24
- Guo CJ, Yeh HH, Chiang YM, Sanchez JF, Chang SL, Bruno KS, Wang CC. 2013. Biosynthetic pathway for the epipolythiodioxopiperazine acetylarnotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis. *Journal of the American Chemical Society*, 135(19): 7205–7213
- He J, Lei BX, Song ZF, Geng K, Kang JC. 2014. Determination of the inhibitory effect of endophyte DEB-2 on five pepper fungal pathogens in the laboratory. *Journal of Plant Protection*, 41(2): 157–162 (in Chinese) [何劲, 雷帮星, 宋贞富, 耿坤, 康冀川. 2014. 石斛内生细菌 DEB-2 对 5 种辣椒病原真菌的抑制作用. *植物保护学报*, 41(2): 157–162]
- Hittalmani S, Mahesh HB, Mahadevaiah C, Prasannakumar MK. 2016. *De novo* genome assembly and annotation of rice sheath rot fungus *Sarocladium oryzae* reveals genes involved in Helvolic acid and Cerulenin biosynthesis pathways. *BMC Genomics*, 17: 271
- Huo SS. 2012. Obtaining of GFP-transformants of endophytic fungi HND5 and its biocontrol potential to *Fusarium* wilt of banana. Master Thesis. Haikou: Hainan University (in Chinese) [霍珊珊. 2012. 内生真菌 HND5-GFP 转化子获得及其对香蕉枯萎病生防潜力分析. 硕士学位论文. 海口: 海南大学]
- Liu XB, Guo ZK, Huang GX. 2017. *Sarocladium brachiariae* sp. nov., an endophytic fungus isolated from *Brachiaria brizantha*. *Mycosphere*, 8(7): 827–834
- Moussaïf M, Jacques P, Schaarwächter P, Budzikiewicz H, Thonart P. 1997. Cyclosporin C is the main antifungal compound produced by *Acremonium luzulae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(5): 1739–1743
- Nilanonta C, Isaka M, Chanphen R, Thong-orn N, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. 2003. Unusual enniatins produced by the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum*: isolation and studies on precursor-directed biosynthesis. *Tetrahedron*, 59(7): 1015–1020
- Nielsen JC, Grijseels S, Prigent S, Ji B, Dainat J, Nielsen KF, Frisvad JC, Workman M, Nielsen J. 2017. Global analysis of biosynthetic gene clusters reveals vast potential of secondary metabolite production in *Penicillium* species. *Nature Microbiology*, 2: 17044
- Pei SL, Liu D, Liu HQ, Wang YH, Han JC, Liu HP. 2018. Study on screening, identification and detection of antibiotic activity of endophytic bacteria from wild jujube. *Journal of Plant Protection*, 45(4): 871–877 (in Chinese) [裴淑兰, 刘东, 刘慧芹, 王远宏, 韩巨才, 刘慧平. 2018. 野生酸枣内生细菌筛选、鉴定及其抑菌活性测定. *植物保护学报*, 45(4): 871–877]
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–2729
- Tang MC, Zou Y, Watanabe K, Walsh CT, Tang Y. 2017. Oxidative cyclization in natural product biosynthesis. *Chemical Reviews*, 117(8): 5226–5333
- Thangavelu R, Mustaffa M. 2010. A potential isolate of *Trichoderma viride* NRCB1 and its mass production for the effective management of *Fusarium* wilt disease in banana. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 4(2): 76–84
- Vaillancourt FH, Yeh E, Vosburg DA, O'Connor SE, Walsh CT. 2005.

- Cryptic chlorination by a non-haem iron enzyme during cyclopropyl amino acid biosynthesis. *Nature*, 436(7054): 1191–1194
- Walsh CT, Chen HT, Keating TA, Hubbard BK, Losey HC, Luo L, Marshall CG, Miller DA, Patel HM. 2001. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(5): 525–534
- Wang B, Kang Q, Lu Y, Bai L, Wang C. 2012. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4): 1287–1292
- Weber T, Blin K, Duddela S, Krug D, Kim HU, Bruccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, et al. 2015. antiSMASH 3.0: a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, 43(W1): 237–243
- Winterberg B, Uhlmann S, Linne U, Lessing F, Marahiel MA, Eichhorn H, Kahmann R, Schirawski J. 2010. Elucidation of the complete ferrichrome A biosynthetic pathway in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 75(5): 1260–1271
- Wu Y, Yuan J, E Y, Raza W, Shen Q, Huang Q. 2015. Effects of volatile organic compounds from *Streptomyces albulus* NJZJSA2 on growth of two fungal pathogens. *Journal of Basic Microbiology*, 55(9): 1104–1117
- Yang L, Zhou GY, Liang J, Ni Y, Lü Q, Zhang XY. 2014. Isolation, screening and identification of the endogenous microorganisms antagonizing poplar canker. *Journal of Plant Protection*, 41(4): 438–446 (in Chinese) [杨蕾, 周国英, 梁军, 倪杨, 吕全, 张星耀. 2014. 防治杨树溃疡病内生菌的分离筛选及鉴定. 植物保护学报, 41(4): 438–446]
- Yang XQ, Feng P, Yin Y, Bushley K, Spatafora JW, Wang CS. 2018. Cyclosporine biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* benefits fungal adaptation to the environment. *mBio*, 9(5): e01211-18
- Yuan C, Li G, Wang HY, Zhao JL, Guo YH, Ding G. 2018. The metabolites of endolichenic fungus *Pestalotiopsis* sp. *Mycosystema*, 37(2): 237–245 (in Chinese) [元超, 李刚, 王海英, 赵俊凌, 郭玉华, 丁刚. 2018. 地衣内生真菌 *Pestalotiopsis* sp. 次生代谢产物. 菌物学报, 37(2): 237–245]
- Zhang Z, Ren JS, Clifton IJ, Schofield CJ. 2004. Crystal structure and mechanistic implications of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: the ethylene-forming enzyme. *Chemistry & Biology*, 11(10): 1383–1394
- Zhou DB, Jing Tao, Zhang XY, Qi DF, Chen YF, Wang F. 2016. Screening and antibacterial activity of antagonistic bacteria against banana *Fusarium* wilt disease. *Journal of Plant Protection*, 43(6): 913–921 (in Chinese) [周登博, 井涛, 张锡炎, 起登凤, 陈宇丰, 王飞. 2016. 香蕉枯萎病拮抗菌筛选及其抑菌活性. 植物保护学报, 43(6): 913–921]
- Zhu SL, Liu XB, Cai JM, Chen YP, Huang GX. 2014. Isolation of endophytic bacterial BEB33 and its bio-control evaluation against banana *Fusarium* wilt. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 35(6): 1177–1182 (in Chinese) [朱森林, 刘先宝, 蔡吉苗, 陈奕鹏, 黄贵修. 2014. 内生细菌 BEB33 的分离、鉴定及对香蕉枯萎病的生防作用评价. 热带作物学报, 35(6): 1177–1182]

(责任编辑:张俊芳)