

基于微生物组扩增子 ITS 的茯砖茶发花特征真菌菌群演替规律分析

姚衡斌, 马敬宜, 冯瀚瀚, 赵仁亮*

(河南农业大学园艺学院茶学系 郑州 450046)

摘要 茯砖茶是一种微生物参与发酵的黑茶。菌花香是茯砖茶独特的香气品质,其成因可能与发花过程中的真菌演替有关。为揭示茯砖茶发花特征真菌菌群演替规律,以藪北种茶树为原料制成黑茶与白茶,之后同时、同地发花分别制成茯砖茶与白茶砖。采用微生物组扩增子 ITS 分析发花过程中真菌演替规律。结果表明:1)不同茶类在发花过程中的特征真菌丰度的变化规律不同。2)渥堆改变了茯砖茶的菌群结构及微生物生长环境,导致茯砖茶与其它茶类的发花真菌菌群演替有差异。3)茯砖茶发花特征真菌菌群演替规律:茯砖茶发花前期,由渥堆影响丰度较高的黑曲霉、局限曲霉、萨氏曲霉、歧皱青霉、西兰花青霉、汉逊德巴利酵母等在发花 6 d 出现丰度峰。发花第 9 天散囊菌属、卡利比克迈耶氏酵母、海洋嗜杀酵母等真菌出现丰度峰,黑曲霉、汉逊德巴利酵母、局限曲霉维持丰度;发花 12 d 假灰绿曲霉出现丰度峰,黑曲霉维持丰度。第 22 天花发结束,散囊菌属最终成为优势菌种。

关键词 微生物组扩增子 ITS; 发花; 茶叶发酵; 黑茶与白茶

文章编号 1009-7848(2023)01-0306-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.01.029

茯砖茶属于后发酵茶,微生物大量参与茯砖茶的后发酵过程^[1]。茯砖茶的后发酵工艺与其它黑茶稍有不同,主要分为 2 个阶段:一是黑毛茶阶段,刚采摘的鲜叶通过一系列工艺制成黑毛茶。渥堆是该阶段的主要工艺,是湿热作用、微生物及酶共同作用^[2]。二是发花阶段,黑毛茶经过气蒸、压制成型、发花等工艺步骤形成茯砖茶。发花也是一个微生物发酵过程,研究表明,发花阶段多种微生物迅速繁殖,茶砖中物质分解,代谢产物积累,微环境变化,菌群的不断演替,最终由散囊菌属(*Eurotium*)的 1 种或几种成为优势菌种,也就是“金花菌”,“金花”即是这些“金花菌”的闭囊壳。

“菌花香”是优质茯砖茶的特征香气,是评价茯砖茶优劣的重要标准。实践发现有“菌花”的茯砖茶不一定有“菌花香”。金友兰等^[3]分析发花白茶、发花红茶、茯砖茶的香气成分,结果发现不同茶类发花的香气物质存在显著差异。有研究表明^[4]不同产地的茯砖茶“菌花香”也不相同。推测可能由于不同的茶树品种和生长环境导致原料内涵物质的不同,意味着原料香气前体物质的种类及含量不同,且供后发酵微生物生长的碳源、氮源及多

种微量元素的种类及含量不同,因此不同地区的茯砖茶发花微生物菌群差异显著^[5],提示微生物可能是产生茯砖茶“菌花香”的关键因素。刘石泉等^[6-7]使用 DGGE 技术揭示优势微生物是随着发花过程而动态改变,表明“菌花香”可能并不只是冠突散囊菌(*Eurotium cristatum*)作用的结果,有其它微生物或微生物菌群进行代谢或提供胞外酶,多种微生物交替发酵共同形成“菌花香”。因此,对发花过程微生物的解析较为关键。

由于技术限制,过去对发花微生物的研究以优势菌株的分离,并通过形态学鉴定为主^[8],而微生物种类繁多,目前成功分离培养的微生物仅占全部的 0.1%~1.0%^[9]。后来发展出利用变性梯度凝胶电泳使不同的碱基排列的 DNA 片段在凝胶上分离获得微生物多样性的 PCR-DGGE 方法^[10]。研究人员使用 DGGE 技术研究茯砖茶微生物的群落结构,鉴定出多种酵母菌属、曲霉属、及数种不可培养微生物^[11]。DGGE 技术的缺点是通量较低,不能完整反映复杂的环境微生物群落。宏基因组学技术^[12]利用二代测序技术^[13]通量高的特点,将环境中的微生物全部 DNA 提取分箱^[14],能够获得较为完整的环境微生物的基因组信息^[15]。然而,宏基因组数据量大,分析较为困难,可以仅扩增微生物的特殊片段^[16]以达到获得环境微生物多样性及丰度的目的,这就是微生物组扩增子技术^[17]。

收稿日期: 2022-01-10

基金项目: 河南省科技攻关项目(222102110365)

第一作者: 姚衡斌,男,硕士生

通信作者: 赵仁亮 E-mail: zrenliang@henau.edu.cn

白茶经鲜叶萎凋干燥而成^[18],在常温下可以长期保存^[19],和茯砖茶一样有紧压茶产品。由于低级白茶所用原料与茯砖茶原料嫩度一致,因此选用白茶砖作为对照与黑茶一起发花制成发花白茶与茯砖茶。

本研究采用微生物组扩增子 ITS,对信阳罗山同一茶叶原料制成的黑茶与白茶进行发花试验。其中,白茶作为对照,围绕发花过程中的特征菌群演替规律,运用多种分析方法,通过两种茶类发花的对比分析,揭示茯砖茶发花特征真菌菌群演替规律,为阐明“菌花香”与微生物菌群的关系,合理控制发花过程,为我国茯砖茶发花工艺改进提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 样品采集与处理

本研究供试材料为申林茶业开发有限公司的藪北茶树品种^[20]。2020年6月18日采摘茶树鲜叶,采摘标准为1芽5~6叶。鲜叶采摘后分别使用黑茶及白茶初制工艺制成相应毛茶。2020年12月13日将两种毛茶均潮水至含水量28%,然后汽蒸10s,压制成砖茶。立即随机取3个平行样本,其中黑茶砖D1.1、D1.2、D1.3,白茶砖W1.1、W1.2、W1.3,将剩余茶砖置入全新的烘房,烘房温度28℃,湿度80%,分别在发花的第6天取样(D6.1、D6.2、D6.3、W6.1、W6.2、W6.3),第9天取样(D9.1、D9.2、D9.3、W9.1、W9.2、W9.3),第12天取样(D12.1、D12.2、D12.3、W12.1、W12.2、W12.3),第22天取样(D22.1、D22.2、D22.3、W22.1、W22.2、W22.3),取样后立即置于-80℃条件保存。

1.2 主要仪器与试剂

DYY-8C电泳仪,北京六一生物科技有限公司;Tanon 3500凝胶成像系统,上海天能生命科学有限公司。

高保真PCR预混缓冲液和高效高保真酶,New England Biolabs公司;胶回收试剂盒,QIA-GEN公司;建库试剂盒、NovaSeq6000测序平台,Illumina公司。

1.3 方法

1.3.1 真菌鉴定 提取全部样品DNA,检测DNA

的纯度和浓度。将DNA样本于离心管中稀释至1ng/μL。以稀释后的基因组DNA为模板,使用带Barcode的真菌ITS1区标准特异引物ITS5-1737F(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')及ITS2-2043R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'),进行PCR扩增。PCR产物使用2%琼脂糖凝胶进行电泳检测,合格的PCR产物进行磁珠纯化,采用PCR-ELISA定量,根据PCR产物浓度进行等量混样,混匀后使用2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,对目的条带使用胶回收试剂盒回收产物。使用建库试剂盒进行文库构建。构建好的文库经Qubit和Q-PCR定量,文库合格后测序。

1.3.2 数据分析 从下机数据中拆分各样本数据并去除Barcode和引物序列,然后使用FLASH(v1.2.7)^[21]对各样本的reads拼接,得到的拼接序列为Raw Tags,使用Qiime软件(v1.9.1)将Raw Tags中连续低质量(质量阈值≤19)碱基数达到3的低质量部分截去,并进一步过滤掉其中连续高质量碱基长度小于Tags长度75%的Tags。过滤掉含低质量碱基较多的序列^[22],得到高质量的Clean Tags。Clean Tags序列使用VSEARCH(v2.17.1)去除嵌合体序列^[23],得到最终的有效数据(Effective Tags)。

使用R软件(v2.15.3)制作稀释曲线,并确定抽平数,使用Uparse算法^[24](Uparse v7.0.1001)对抽平(Subsample)后的Effective Tags进行97%一致性聚类,共聚为566个OTUs,将OTUs序列数据上传至国家微生物科学数据中心(<https://www.nmde.cn/>),登录号为NMDCX0000111。

筛选出现频数最高的序列作为OTUs的代表序列,使用Qiime软件(v1.9.1)比对Unit(v8.2)^[25]数据库进行物种注释,使用MUSCLE(v3.8.31)^[26]比对序列,得到OTUs序列的系统发生关系。最后以样本数量最少的为标准进行均一化处理,以便后续分析。

使用Qiime软件(v1.9.1)计算Chao1、Shannon、Simpson、PD_whole_tree、Goods_coverage等指数,计算Unifrac距离、构建UPGMA聚类树,使用SPSS软件(v22)进行组间差异分析,使用R软件的pheatmap包(v1.0.12)绘制热图。

2 结果与分析

2.1 茯砖茶与白茶砖发花情况

两种类型的茶砖发花情况见图1。茯砖茶 D9

已有零星“金花菌”出现,D12出现大量“金花菌”,D22的“金花菌”茂盛。白茶砖中W12有零星“金花菌”,W22的“金花菌”较为茂盛。

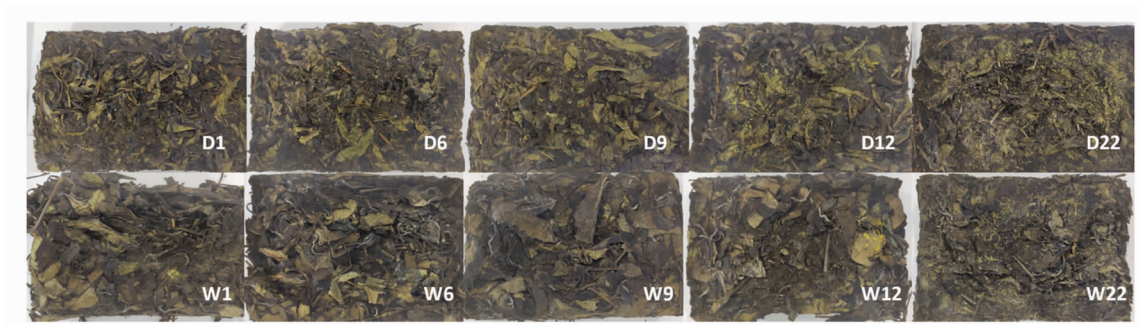


图1 两种类型茶砖发花过程

Fig.1 The flowering process of two types of tea bricks

2.2 扩增子测序结果

两类茶砖发花过程样本测序结果见表1。经质控所得 Effective Tags 在 Raw PE 中所占比例在 59.43%~67.24%之间。各样本 Effective Tags 经 97% 聚类注释后, 获得 OTUs 数量在 109~247 之间, 单个样本的 ITS1 序列数均超过 60 712 条, 因每个样品获得的 ITS1 序列数不同, 故对数据进行抽平。从各样本中随机抽取一定测序量的数据 (10, 6 922, 13 834, 20 746, 27 658, 34 570, 41 482 条序列), 统计所代表的 OTUs 的数目, 绘制稀疏曲线(图2)。当测序序列数达 41 482 条时, 各样本曲线趋于平缓, 表示测序深度充足且合理, 因此按 41 482 对数据进行抽平。

各样品非加权 UPGMA 聚类分析见图3。茯砖茶 D12 与 D22 聚为一类, 白茶砖 W12 与 W22 聚

为一类, 表明在发花最后 10 d 两类茶砖真菌菌群多样性存在差异。由非加权 Unifrac 距离及物种多样性堆积图可知, 各样本在不同发花时期真菌多样性差异不大。

再对各样品进行加权 UPGMA 聚类分析, 同时分析在门水平上的物种相对多样性及丰度。如图4所示, D1 与 W1 聚为一类, D6 与 W6 聚为一类, D22 与 W22 聚为一类, 表明发花前期及后期真菌群落丰度在茯砖茶及白茶砖间无显著差异, 而发花中期(第9天, 第12天)存在差异。由图4堆积图所示, 伴随发花过程, 子囊菌门相对丰度持续升高, 至 22 d 发花结束, 子囊菌门丰度占比在两类茶中均超过 90%, 表明发花过程与子囊菌门真菌的相对丰度上升有关。

表1 所有样本测序及质控结果

Table 1 Sequencing and quality control results of all samples

样品名	下机数据	拼接序列	高质量序列	有效序列	测序错误率<1%		有效数据率/ %
					Q20/%	Q30/%	
D1.1	110 214	105 851	104 810	67 850	91.98	86.29	61.56
D1.2	101 423	95 055	93 677	68 196	90.23	83.33	67.24
D1.3	106 538	100 631	70 921	66 578	90.12	83.32	62.49
D6.1	107 125	102 317	97 107	66 106	90.85	84.28	61.71
D6.2	100 638	95 585	90 301	64 743	90.78	84.3	64.33
D6.3	103 445	97 034	89 444	68 100	93.21	88.25	65.83
D9.1	101 836	100 683	100 501	67 443	99.17	98.14	66.23
D9.2	106 011	103 324	102 846	68 548	95.62	92.23	64.66
D9.3	107 903	102 423	97 443	68 418	91.84	85.94	63.41

(续表 1)

样品名	下机数据	拼接序列	高质量序列	有效序列	测序错误率<1%	测序错误率<0.1%	有效数据率/
					Q20/%	Q30/%	%
D12.1	96 837	96 091	95 921	61 767	99.16	98.08	63.78
D12.2	95 606	93 608	93 106	60 712	97.99	95.94	63.5
D12.3	101 313	100 693	100 594	64 720	99.21	98.11	63.88
D22.1	105 945	104 769	104 601	65 446	98.66	97.21	61.77
D22.2	94 723	93 586	93 422	61 292	98.73	97.26	64.71
D22.3	107 867	106 840	106 667	69 726	98.87	97.57	64.64
W1.1	100 467	94 415	89 829	64 792	91.07	84.41	64.49
W1.2	98 609	94 260	89 939	61 001	91.01	84.54	61.86
W1.3	109 066	104 304	99 177	66 221	90.71	83.95	60.72
W6.1	110 442	105 799	74 668	69 409	90.42	83.66	62.85
W6.2	112 871	107 383	101 687	67 082	90.6	83.73	59.43
W6.3	105 658	103 859	103 667	68 502	96.74	94.02	64.83
W9.1	103 595	100 907	100 552	67 098	95.3	91.49	64.77
W9.2	100 179	98 628	97 221	66 955	98.3	96.67	66.84
W9.3	109 257	107 403	105 927	67 004	98.26	96.62	61.33
W12.1	110 284	102 698	97 270	69 545	91.67	85.68	63.06
W12.2	100 272	92 220	91 887	61 014	92.96	87.41	60.85
W12.3	100 742	99 396	98 368	61 523	98.4	96.87	61.07
W22.1	110 212	108 680	108 521	67 334	98.49	96.98	61.09
W22.2	98 552	97 856	97 729	61 441	99.11	98.02	62.34
W22.3	106 946	105 665	105 492	68 386	98.75	97.44	63.94

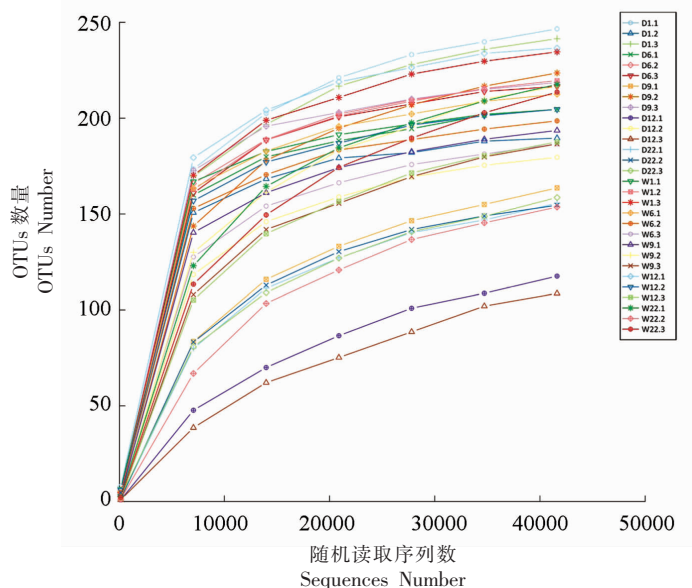


图 2 各样本物种稀疏曲线

Fig.2 Rarefaction Curve of samples

2.3 真菌群落多样性和丰度指数

对两类茶砖在发花过程各样品 OTUs 进行 Shannon、Simpson、Chao1、PD_whole_tree 等指数的统计分析,结果显示:两茶类 Shannon、Simpson 指

数均下降,茯砖茶中 Chao1 指数和 PD_whole_tree 下降,而白茶砖中无显著变化,Goods_coverage 显示测序覆盖度均在 99.9%以上(表 2)。

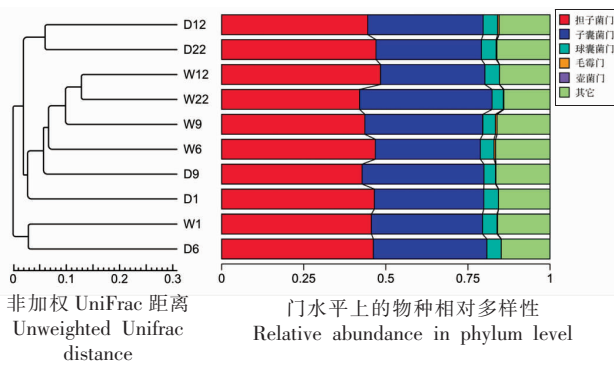


图3 基于非加权 UniFrac 距离的 UMGMA 聚类树

Fig.3 Unweighted UniFrac distance-based UMGMA cluster tree

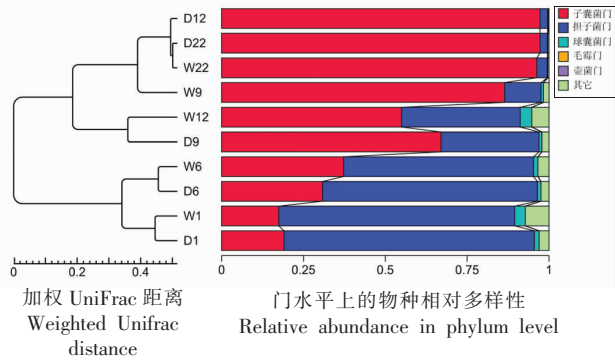


图4 基于加权 UniFrac 距离的 UPGMA 聚类树

Fig.4 Weighted UniFrac distance-based UPGMA cluster tree

表2 两茶类发花过程中的真菌群落多样性和丰度指数

Table 2 Fungi community diversity and abundance index in the flowering process of the two tea types

茶类	样品	OTUs	香农指数	辛普森指数	Chao1 指数	总发育树距离	测序覆盖率/%
茯砖茶	D1	226 ± 31.5 ^c	3.25 ± 0.28 ^{bc}	0.66 ± 0.07 ^{ab}	245 ± 41.0 ^b	32.2 ± 9.81 ^b	99.9
	D6	213 ± 7.57 ^c	3.24 ± 0.18 ^{bc}	0.70 ± 0.06 ^b	223 ± 3.66 ^{ab}	26.1 ± 4.65 ^{ab}	100.0
	D9	202 ± 33.2 ^{bc}	2.24 ± 1.79 ^{abc}	0.47 ± 0.35 ^{ab}	220 ± 29.8 ^{ab}	30.1 ± 6.34 ^{ab}	99.9
	D12	135 ± 38.6 ^a	0.89 ± 0.91 ^a	0.23 ± 0.27 ^a	167 ± 21.4 ^a	20.7 ± 1.80 ^a	99.9
	D22	156 ± 2.08 ^{ab}	0.95 ± 0.34 ^a	0.26 ± 0.17 ^a	188 ± 21.5 ^{ab}	20.8 ± 1.72 ^a	99.9
白茶砖	W1	220 ± 15.0 ^c	4.14 ± 0.53 ^c	0.76 ± 0.06 ^b	232 ± 19.4 ^b	29.2 ± 1.90 ^{ab}	99.9
	W6	199 ± 13.0 ^{bc}	2.85 ± 1.09 ^{abc}	0.56 ± 0.17 ^{ab}	218 ± 13.4 ^{ab}	28.8 ± 4.65 ^{ab}	99.9
	W9	199 ± 15.7 ^{bc}	1.62 ± 0.82 ^{ab}	0.34 ± 0.19 ^{ab}	228 ± 22.3 ^{ab}	27.3 ± 2.32 ^{ab}	99.9
	W12	210 ± 24.8 ^c	3.37 ± 2.07 ^{bc}	0.64 ± 0.36 ^{ab}	225 ± 17.5 ^{ab}	25.4 ± 2.33 ^{ab}	100.0
	W22	195 ± 35.8 ^{bc}	1.05 ± 0.34 ^a	0.26 ± 0.09 ^a	233 ± 55.0 ^b	27.5 ± 3.07 ^{ab}	99.9

2.4 总体真菌群落多样性和丰度

从微生物组扩增子(ITS)中共检测 566 个 OTUs,分属 5 门、19 纲、45 目、99 科、160 属、214 个菌株,其中有 131 个菌株鉴定至种水平。门水平上丰度依次是子囊菌门(Ascomycota)(60.4%)、担子菌门(Basidiomycota)(35.7%)、球囊菌门(Glomeromycota)(1.3%),壶菌门(Chytridiomycota)及毛霉门(Mucoromycota)丰度低于 1%。以可检测到的

最小真菌分类水平为基准,按丰度由高到低将总丰度前 100 的真菌排序见表 3。Top10 的真菌占总丰度的 93.77%,Top50 的真菌占总丰度的 97.20%,Top100 的真菌占总丰度的 97.35%,其它真菌总丰度小于 0.001%,未检出分类的 OTUs 占比 2.6144%,可见丰度 Top10、Top50、Top100 均超过 90%,可以较好地代表总体样本。

表3 丰度前 100 的真菌鉴定最小分类水平排序

Table 3 The top 100 fungi in abundance were identified by sorting at the minimum taxonomic level

真菌分类水平		丰度占比/%	排序
假灰绿曲霉	(<i>Aspergillus_pseudoglaucus</i>)	31.1841	1
粉侧担菌	(<i>Xenasma_pruinosum</i>)	25.7612	2
散囊菌属	(<i>Eurotium_sp</i>)	24.0034	3
交叉散尾鬼笔	(<i>Lysurus_cruciatus</i>)	7.5928	4
黑曲霉	(<i>Aspergillus_niger</i>)	1.7802	5
球囊霉科	(<i>Glomeraceae_sp</i>)	1.1220	6

(续表 3)

真菌分类水平		丰度占比/%	排序
黄孢红菇	(<i>Russula_amoenipes</i>)	0.7048	7
叶下小粉孢	(<i>Microidium_phyllanthi</i>)	0.6606	8
丝盖伞属	(<i>Inocybe_sp</i>)	0.5538	9
瘦茶渍属	(<i>Placopsis_sp</i>)	0.4037	10
塔宾曲霉	(<i>Aspergillus_tubingensis</i>)	0.2819	11
长裙竹荪	(<i>Phallus_indusiatus</i>)	0.2720	12
棘孢木霉	(<i>Trichoderma_asperellum</i>)	0.2660	13
全景马鞍菌	(<i>Helvella_panormitana</i>)	0.2227	14
无花果曲霉	(<i>Aspergillus_ficum</i>)	0.2038	15
产黄青霉	(<i>Penicillium_chrysogenum</i>)	0.2012	16
法夫雷丝盖伞	(<i>Inocybe_fawrei</i>)	0.2001	17
绣球菌属	(<i>Sparassis_sp</i>)	0.1443	18
小刺青霉	(<i>Penicillium_spinulosum</i>)	0.1423	19
古孢菌科	(<i>Archaeosporaceae_sp</i>)	0.1417	20
可可毛色二孢菌	(<i>Lasiodiplodia_theobromae</i>)	0.1334	21
环带欧巴菌	(<i>Obba_rivulosa</i>)	0.1330	22
伞菌目	(<i>Agaricales_sp</i>)	0.1031	23
隧道链担菌	(<i>Rhynchogastrema_tunnelae</i>)	0.0951	24
污核衣属	(<i>Porina_sp</i>)	0.0706	25
曲霉属	(<i>Aspergillus_sp</i>)	0.0674	26
热带假丝酵母	(<i>Candida_tropicalis</i>)	0.0600	27
地衣属	(<i>Phallus_sp</i>)	0.0583	28
红宝石珊瑚	(<i>Clavaria_rubicundula</i>)	0.0543	29
泡状拟海藻	(<i>Thalloidima_physaroides</i>)	0.0542	30
海洋嗜杀酵母	(<i>Wickerhamomyces_anomalus</i>)	0.0541	31
布氏白粉菌属	(<i>Blumeria_sp</i>)	0.0536	32
卡利比克迈耶氏酵母	(<i>Meyerozyma_caribbica</i>)	0.0464	33
小穴壳菌科	(<i>Dothioraceae_sp</i>)	0.0463	34
乌氏霉属	(<i>Uwebraunia_sp</i>)	0.0437	35
假球壳目	(<i>Pleosporales_sp</i>)	0.0298	36
山荆赤霉菌	(<i>Gibberella_baccata</i>)	0.0291	37
尾孢属	(<i>Cercospora_sp</i>)	0.0262	38
西兰花青霉	(<i>Penicillium_brocae</i>)	0.0247	39
伞菌纲	(<i>Agaricomycetes_sp</i>)	0.0194	40
赤曲霉	(<i>Aspergillus_ruber</i>)	0.0179	41
海棠花鬼笔	(<i>Phallus_haitangensis</i>)	0.0174	42
隐球酵母属	(<i>Cryptococcus_sp</i>)	0.0171	43
平脐蠕孢属	(<i>Bipolaris_sp</i>)	0.0162	44
金龟子绿僵菌	(<i>Metarhizium_anisopliae</i>)	0.0158	45
克鲁维毕赤酵母	(<i>Pichia_kluyveri</i>)	0.0154	46
青霉属	(<i>Penicillium_sp</i>)	0.0135	47
地丝双足囊菌	(<i>Dipodascus_geotrichum</i>)	0.0135	48
枝孢属	(<i>Cladosporium_sp</i>)	0.0134	49
支孢瓶霉属	(<i>Cladophialophora_sp</i>)	0.0134	50
假丝酵母属	(<i>Kurtzmaniella_sp</i>)	0.0111	51
岐皱青霉	(<i>Penicillium_steckii</i>)	0.0106	52
发酵毕赤酵母	(<i>Pichia_fermentans</i>)	0.0096	53
萨氏曲霉	(<i>Aspergillus_sydowii</i>)	0.0071	54

(续表 3)

真菌分类水平		丰度占比/%	排序
亚隔孢壳属	(<i>Didymella_sp</i>)	0.0071	55
东方伊萨酵母	(<i>Issatchenkia_orientalis</i>)	0.0069	56
变红镰刀菌	(<i>Fusarium_incarnatum</i>)	0.0048	57
半乳糖霉属	(<i>Galactomyces_sp</i>)	0.0044	58
汉逊德巴利酵母	(<i>Debaryomyces_hansenii</i>)	0.0044	59
塞伯林德纳氏酵母属	(<i>Cyberlindnera_sp</i>)	0.0043	60
伏革菌属	(<i>Corticium_sp</i>)	0.0039	61
哈茨木霉	(<i>Trichoderma_harzianum</i>)	0.0038	62
普通乌氏霉	(<i>Uwebraunia_communis</i>)	0.0036	63
冬青丽赤壳菌	(<i>Calonectria_ilicicola</i>)	0.0035	64
黑孢属	(<i>Nigrospora_sp</i>)	0.0033	65
局限曲霉	(<i>Aspergillus_restrictus</i>)	0.0032	66
近平滑假丝酵母	(<i>Candida_parapsilosis</i>)	0.0027	67
菜蚜暗壳腔菌	(<i>Setophaeosphaeria_citricola</i>)	0.0027	68
互生交链孢霉	(<i>Alternaria_alternata</i>)	0.0027	69
扁平云酵母菌	(<i>Kazachstania_humilis</i>)	0.0026	70
亚隔孢壳科	(<i>Didymellaceae_sp</i>)	0.0023	71
镰刀菌属	(<i>Fusarium_sp</i>)	0.0023	72
间座壳属	(<i>Diaporthe_sp</i>)	0.0022	73
帚状曲霉	(<i>Aspergillus_penicillioides</i>)	0.0021	74
小不整球壳属	(<i>Plectosphaerella_sp</i>)	0.0019	75
金黄色隐球酵母	(<i>Papiliotrema_flavescens</i>)	0.0019	76
丝衣霉菌属	(<i>Byssochlamys_sp</i>)	0.0019	77
黄曲霉	(<i>Aspergillus_flavus</i>)	0.0018	78
少孢哈萨克斯坦酵母	(<i>Kazachstania_exigua</i>)	0.0018	79
曲霉科	(<i>Aspergillaceae_sp</i>)	0.0017	80
子囊菌门	(<i>Ascomycota_sp</i>)	0.0016	81
黑团孢霉属	(<i>Periconia_byssoides</i>)	0.0016	82
黄连柱隔孢	(<i>Ramularia_pistaciae</i>)	0.0016	83
半日花间座壳	(<i>Diaporthe_helianthi</i>)	0.0015	84
瘦青霉	(<i>Penicillium_dierckxii</i>)	0.0015	85
叶酵母属	(<i>Phyllozyma_subbrunnea</i>)	0.0015	86
篮状菌属	(<i>Talaromyces_sp</i>)	0.0015	87
隐球酵母属	(<i>Papiliotrema_sp</i>)	0.0014	88
绦虫假丝酵母	(<i>Candida_tetrigidarum</i>)	0.0013	89
锈寄生孢	(<i>Sphaerellopsis_filum</i>)	0.0013	90
黑附球菌	(<i>Epicoccum_nigrum</i>)	0.0012	91
易脆毛霉	(<i>Mucor_fragilis</i>)	0.0012	92
牛肝菌属	(<i>Retiboletus_sp</i>)	0.0011	93
微色二孢属	(<i>Microdiplodia_sp</i>)	0.0011	94
黑木耳	(<i>Auricularia_auricula-judae</i>)	0.0011	95
帚状丝孢酵母	(<i>Trichosporon_coremiforme</i>)	0.0010	96
水晶类茎点霉	(<i>Similiphoma_crystallifera</i>)	0.0010	97
热带炭疽菌	(<i>Colletotrichum_tropicale</i>)	0.0010	98
苏门答腊青霉	(<i>Penicillium_sumatraense</i>)	0.0010	99
平座壳属	(<i>Kalmusia_sp</i>)	0.0010	100
其它	(<i>Others</i>)	2.6144	

注:表中微生物名称为中文及拉丁文全拼,文中多数情况仅写中文名。

2.5 发花过程真菌丰度动态变化

茯砖茶与白茶砖在发花过程中真菌丰度变化如图 5 所示。热图将 Top50 的真菌聚为 3 类 (I、II、III)。I 类真菌在两类茶中起始丰度较低,在发花各阶段分别有丰度峰,白茶砖中散囊菌属、假灰绿曲霉、海洋嗜杀酵母、卡利比克迈耶氏酵母等的丰度峰出现在 6~9 d,而在茯砖茶中丰度峰出现在 9~12 d,22 d 的散囊菌属丰度最高,最终成为优势菌种。II 类真菌在白茶砖中的丰度明显高于茯砖

茶,且在发花初期及中期丰度较高,茯砖茶的第 2 个丰度峰在 9 d,而白茶的第 2 个峰在 12 d,在 22 d 丰度降至最低。III 类真菌在茯砖茶中的丰度显然高于白茶,且茯砖茶丰度峰集中在 6 d,白茶砖中没有明显丰度峰。交叉散尾鬼笔、伞菌目、粉侧担菌在白茶中 1~6 d 比茯砖茶的丰度稍低,黑曲霉在茯砖茶中前 1~12 d 维持较高丰度,而在白茶砖中丰度维持较低水平。

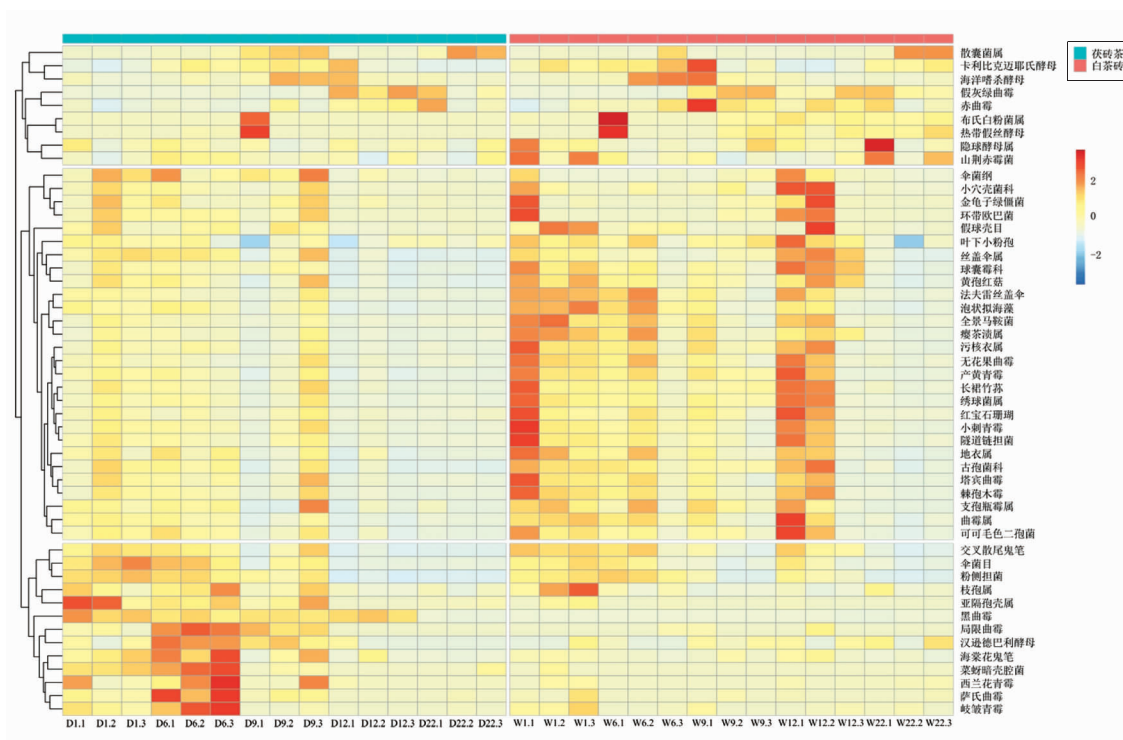


图 5 Top50 真菌的丰度动态热图

Fig.5 Heatmap of the abundance of Top50 fungi

2.6 Top10 的真菌动态变化

丰度 Top10 的真菌占总体样本丰度的 93.77%, 分别以堆积图 (图 6) 及热图 (图 7) 表示丰度动态变化。图 6 所示,在发花初期,散囊菌属与假灰绿曲霉在发花初期丰度较低(3%~6%),D9 与 W6 中散囊菌属大量繁殖,而 D12 与 W9 中散囊菌属丰度下降,假灰绿曲霉大量繁殖,22 d 散囊菌属丰度再度上升,在整个发花过程中,此两真菌交替成为优势菌种。粉侧担菌丰度较高(59.2%,49.2%),在茯砖茶中不断下降,在白茶砖中 12 d 有所回升,22 d 丰度降至较低水平(2%左右);而同为担子菌的交叉散尾鬼笔丰度变化与粉侧担菌保持同步,

且丰度平均为粉侧担菌的 35%(标准偏差 0.12)。黑曲霉在茯砖茶中 D1~D12 相对丰度由 5.2% 缓慢降至 3.8%,在 D22 骤降至 0.08%,而在白茶中由 W1 的 0.15% 缓慢降至 W22 的 0.07%,是 Top10 真菌中两类茶差别较大的菌种。图 7 所示热图将 Top10 真菌聚为两组,一组为散囊菌属、假灰绿曲霉、黑曲霉 3 种菌丰度变化各不相同;另一组 7 种真菌在两类茶内丰度变化相似,在茯砖茶中 D1 至 D9 丰度较高,且呈下降趋势,D12 至 D22 丰度骤降至较低水平,白茶砖中 W1 至 W9 丰度下降,W12 丰度有所上升,W22 骤降至较低水平。

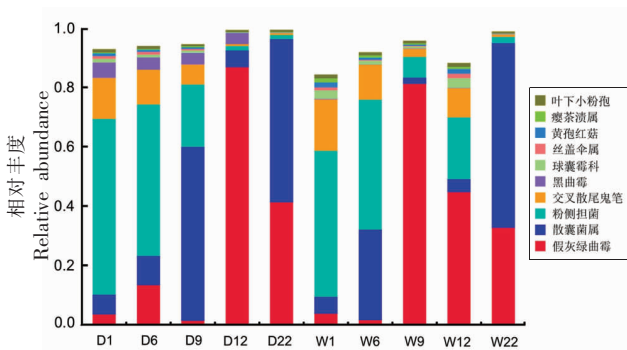


图6 Top10真菌的相对丰度动态堆积图

Fig.6 Dynamic accumulation relative abundance dynamics of Top10 fungi

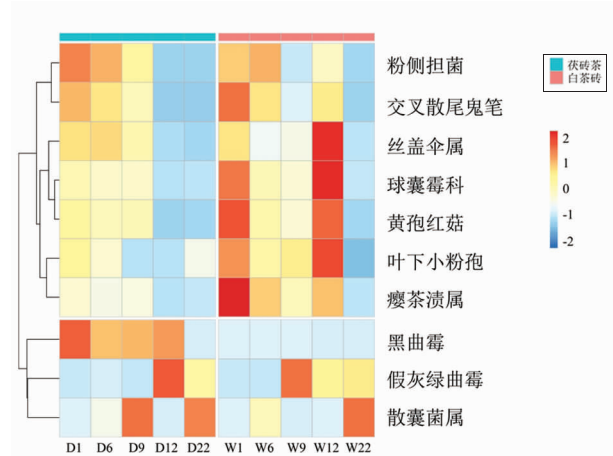


图7 Top10真菌的相对丰度动态热图

Fig.7 Dynamic heatmap of relative abundance of Top10 fungi

3 结论与讨论

本研究中,两类茶在22d均发花成功,且测序结果表明不同茶类的发花真菌多样性没有显著差异。有研究表明不同地区原料、不同环境的发花微生物有所不同^[27-28]。本试验控制原料相同,发花环境一致,证明毛茶加工工艺不同并不导致发花真菌多样性的显著差异,而茯砖茶与白茶砖“菌花香”的不同可能是由微生物菌群丰度动态变化不同所致。

由于散囊菌属ITS一区不能鉴定到种水平,因此将“金花菌”鉴定到属水平(散囊菌属)。有研究表明“金花菌”应归为散囊菌属^[29],相关研究较为明晰。本研究认为鉴定出的散囊菌属真菌即“金花菌”的1种或几种。

通过图5将Top50的真菌聚为3类,同时对比茯砖茶与白茶砖菌群演替的差异,获得茯砖茶发花特征真菌菌群演替规律,即:茯砖茶发花前期,第Ⅲ类真菌中的黑曲霉、局限曲霉、萨氏曲霉、岐皱青霉、西兰花青霉、汉逊德巴利酵母在D6出现丰度峰;之后D9散囊菌属、卡利比克迈耶氏酵母、海洋嗜杀酵母出现丰度峰,黑曲霉、汉逊德巴利酵母、局限曲霉维持丰度;D12假灰绿曲霉出现丰度峰,黑曲霉继续维持丰度,D22散囊菌属最终成为优势菌种。由于茯砖茶的原料是黑毛茶,其独特的工艺“渥堆”过程中黑曲霉、酵母菌、青霉、根霉是主要的微生物^[30],研究表明曲霉属在渥堆过程中能产生单宁酶、糖苷酶、漆酶等胞外酶^[31],与本研究茯砖茶中Ⅲ类真菌D1时期丰度高于白茶砖结果一致,表明茯砖茶发花特征真菌有一部分是渥堆大量繁殖的真菌,并在发花前期进行代谢与繁殖维持一定的丰度。图5的第Ⅱ类真菌在茯砖茶中的丰度明显低于白茶砖,可能是由于茯砖茶经过渥堆,某些微生物生长改变了微生物菌群结构^[32],消耗了部分营养物质;渥堆产生的较高温度使得不适的微生物丰度下降,Ⅱ类真菌丰度因此下降,并在发花过程中丰度持续下降,在D9有小幅回升,至D12丰度降至极低水平,Ⅱ类真菌在先前发花真菌研究中鲜有报道,而在茶叶内生真菌研究中有所报道^[33]。对比白茶砖中的丰度可知,Ⅱ类真菌可能在发花过程中是负贡献微生物,该结论指导白茶砖发花生产前处理应比茯砖茶增加灭菌步骤。Ⅰ类真菌是茯砖茶与白茶砖共有的发花真菌,大多在先前的研究中有报道,如散囊菌属是“金花菌”的集合,假灰绿曲霉是匍匐散囊菌的无性型,赤曲霉则是赤散囊菌的无性型^[29],这3种金花菌在发花过程中交替成为优势菌种,见图5。首先是散囊菌属(D9、W6),假灰绿曲霉与赤曲霉丰度峰同时出现(D12、W9~W12),最终散囊菌属成为优势菌种(D22、W22)。有研究表明假灰绿曲霉与赤曲霉聚在一个进化枝^[34],表明二者遗传距离较近,有较相似的演替规律。发花过程中酵母菌的研究鲜有报道。本研究中Ⅰ类真菌中卡氏酵母与海洋嗜杀酵母同时出现丰度峰(D9、W6),热带假丝酵母与隐球酵母属在茯砖茶发花过程的前10d为优势菌^[6],而本研究中茯砖茶中的丰度较

低,在白茶砖中、后期(W9~W22)的丰度较高,表明它们也可能不是茯砖茶发花的优势真菌。通过对比 I 类真菌在发花过程中丰度峰出现的时间,发现白茶砖中多数真菌丰度峰比茯砖茶中的丰度峰提前 3 d 左右出现,这可能是茯砖茶发花过程中菌群演替规律,可能是茯砖茶渥堆改变了 III 类菌群的丰度,同时消耗了茶砖的营养物质,这仍需进一步研究。

研究茯砖茶发花过程中特征真菌菌落演替是解析茶叶发花过程至关重要的一步,微生物组学的应用,能够将大多数微生物鉴定到种一级,能够深刻认知发花过程,对于后续分析各种微生物在发花过程中的作用奠定基础,对揭开真菌与茯砖茶品质风味形成的关系有重要意义。

参 考 文 献

- [1] ZHENG X, HONG X, JIN Y, et al. Characterization of key aroma compounds and relationship between aroma compounds and sensory attributes in different aroma types of Fu Brick Tea [J]. *Food Chemistry*: X, 2022, 13(1): 100248.
- [2] 张亚, 黄亚亚, 梁艳, 等. 黑茶渥堆工艺研究进展 [J]. *食品与机械*, 2017, 33(3): 216-220.
ZHANG Y, HUANG Y Y, LIANG Y, et al. Research progress on pile-fermentation of dark tea [J]. *Food & Machinery*, 2017, 33(3): 216-220.
- [3] 金友兰, 黄甜, 蒋容港, 等. 不同类型发花砖茶特征香气成分研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(3): 188-196.
JIN Y L, HUANG T, JIANG R G, et al. Characteristic volatile components of different types of fermented brick tea [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(3): 188-196.
- [4] 赵仁亮, 胥伟, 吴丹, 等. 不同地域边销茯砖茶感官特征及香气成分比较 [J]. *现代食品科技*, 2017, 33(10): 217-224.
ZHAO R L, XU W, WU D, et al. Comparison of the sensory characteristics and aroma components of Fu Brick Tea for sale in border areas of different regions [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(10): 217-224.
- [5] 赵仁亮, 吴丹, 姜依何, 等. 不同产区加工的茯砖茶中“金花”菌的分离及分子鉴定 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2016, 42(6): 592-600.
ZHAO R L, WU D, JIANG Y H, et al. Isolation and molecular identification of "Jinhua" fungi on the Fuzhuan tea produced in different regions [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2016, 42(6): 592-600.
- [6] 刘石泉, 赵运林, 胡治远. DGGE 法初步解析茯砖茶发花过程中真菌群落结构 [J]. *生态学杂志*, 2014, 33(10): 2687-2693.
LIU S Q, ZHAO Y L, HU Z Y. Analysis of fungal community structure during the Fahua-fermentation process of Fuzhuan Brick Tea by DGGE technology [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, 33(10): 2687-2693.
- [7] 刘石泉, 胡治远, 赵运林. 基于 DGGE 技术的茯砖茶发花过程细菌群变化分析 [J]. *生态学报*, 2014, 34(11): 3007-3015.
LIU S Q, HU Z Y, ZHAO Y L. Analysis of bacterial flora during the Fahua-fermentation process of Fuzhuan Brick Tea production based on DGGE technology [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(11): 3007-3015.
- [8] 刘作易, 秦京, 王迺亮. 茯砖茶“金花”菌分离及鉴定 [J]. *贵州农学院学报*, 1990, 9(1): 69-74.
LIU Z Y, QIN J, WANG N L. Isolation and identification of "Golden-Flower" fungus on the Fuzhan tea [J]. *Journal of Guizhou Agricultural College*, 1990, 9(1): 69-74.
- [9] 熊盈盈, 莫祯妮, 邱树毅, 等. 未培养环境微生物培养方法的研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2021, 48(5): 1765-1779.
XIONG Y Y, MO Z N, QIU S Y, et al. Research progress on culture methods of uncultured environmental microorganisms [J]. *Microbiology China*, 2021, 48(5): 1765-1779.
- [10] 徐玲玲, 刘亚洁, 李江, 等. 变性梯度凝胶电泳在微生物多样性分析中的应用及其技术发展 [J]. *东华理工学院学报*, 2007, 30(3): 279-282.
XU L L, LIU Y J, LI J, et al. Principle and technologic improvements about microorganism variety analyse of denaturing gradient gel electrophoresis [J]. *Journal of East China Institute of Technology*, 2007, 30(3): 279-282.
- [11] XU A, WANG Y, WEN J, et al. Fungal community associated with fermentation and storage of Fuzhuan Brick-Tea [J]. *International Journal of Food*

- Microbiology, 2011, 146(1): 14–22.
- [12] RIESENFELD C S, SCHLOSS P D, HANDELSMAN J. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities[J]. Annual Review of Genetics, 2004, 38(1): 525–552.
- [13] CAPORASO J G, LAUBER C L, WALTERS W A, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq Platforms[J]. The ISME Journal, 2012, 6(8): 1621–1624.
- [14] 楚雍烈, 杨娥. 宏基因组学及其技术的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2008, 29(6): 601–608.
- CHU Y L, YANG E. Research progress of metagenomics and its technology[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences), 2008, 29(6): 601–608.
- [15] LI Z, FENG C, LUO X, et al. Revealing the influence of microbiota on the quality of pu-erh tea during fermentation process by shotgun metagenomic and metabolomic analysis[J]. Food Microbiology, 2018, 76(1): 405–415.
- [16] FINDLEY K, OH J, YANG J, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin[J]. Nature, 2013, 498(7454): 367–370.
- [17] 刘永鑫, 秦媛, 郭晓璇, 等. 微生物组数据分析方法与应用[J]. 遗传, 2019, 41(9): 845–862.
- LIU Y X, QIN Y, GUO X X, et al. Methods and applications for microbiome data analysis[J]. Hereditas (Beijing), 2019, 41(9): 845–862.
- [18] 岳文杰, 金心怡, 陈明杰, 等. 基于非靶向代谢组学分析白茶室内自然萎凋过程代谢物的变化规律[J]. 茶叶科学, 2021, 41(3): 379–392.
- YUE W Y, JIN X Y, CHEN M J, et al. Analysis of metabolite changes in the natural withering process of Fu'an White Tea based on non-targeted metabolomics approach[J]. Journal of Tea Science, 2021, 41(3): 379–392.
- [19] ZHAO F, CHEN M, JIN S, et al. Macro-composition quantification combined with metabolomics analysis uncovered key dynamic chemical changes of aging white tea[J]. Food Chemistry, 2022, 366(1): 130593.
- [20] 张曙光, 董利娟, 贺利雄, 等. 薷北种质资源的利用研究[J]. 茶叶通讯, 2001, 1(2): 3–6.
- ZHANG S G, DONG L J, HE L X, et al. Study on utilization of germplasm resources in Yabukita tea plant[J]. Journal of Tea Communication, 2001, 1(2): 3–6.
- [21] MAGOC T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [22] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nature Methods, 2010, 7(5): 335–336.
- [23] HAAS B J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. Genome Research, 2011, 21(3): 494–504.
- [24] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996–998.
- [25] KÖLJALG U, NILSSON R H, ABARENKOV K, et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of Fungi[J]. Molecular Ecology, 2013, 22(21): 5271–5277.
- [26] EDGAR R C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(5): 1792–1797.
- [27] 赵仁亮, 胥伟, 吴丹, 等. 黑毛茶不同产区发花对茯砖茶品质的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(21): 8–14.
- ZHAO R L, XU W, WU D, et al. Quality evaluation of Fu Brick Tea fermented in different regions from the same raw tea materials[J]. Food Science, 2017, 38(21): 8–14.
- [28] 赵仁亮, 胥伟, 吴丹, 等. 基于 Illumina MiSeq 技术分析不同地域加工的茯砖茶中微生物群落多样性[J]. 生态学杂志, 2017, 36(7): 1865–1876.
- ZHAO R L, XU W, WU D, et al. Microbial community diversity of Fu Brick Tea produced in different regions by Illumina MiSeq technology[J]. Chinese Journal of Ecology, 2017, 36(7): 1865–1876.
- [29] 吕嘉彬, 杨柳青, 孟雁南. 茯砖茶中金花菌群的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 316–322.
- LÜ J L, YANG L Q, MENG Y N. Development of golden flower fungus community in Fuzhuan Brick Tea: A review[J]. Food Science, 2020, 41(9): 316–322.
- [30] 杨新河, 吕帮玉, 毛清黎, 等. 黑茶渥堆研究进展[J]. 广东农业科学, 2014, 41(14): 95–99.
- YANG X H, LÜ B Y, MAO Q L, et al. Research

- progress of pile-fermentation of dark tea [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014, 41(14): 95-99.
- [31] MA Y, LING T, SU X, et al. Integrated proteomics and metabolomics analysis of tea leaves fermented by *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamarii* and *Aspergillus fumigatus*[J]. Food Chemistry, 2021, 334(1): 127560.
- [32] 胥伟, 吴丹, 姜依何, 等. 黑茶微生物研究: 从群落组成到安全分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 3541-3552.
- XU W, WU D, JIANG Y H, et al. Microbial research on black tea: The community composition and food safety analysis[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(9): 3541-3552.
- [33] 王雪萍, 谭荣荣, 曹丹, 等. 茶树内生真菌研究进展[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(23): 5808-5812.
- WANG X P, TAN R R, CAO D, et al. Research progress on endophytic fungi of *Camellia sinensis*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(23): 5808-5812.
- [34] CHEN A J, HUBKA V, FRISVAD J C, et al. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Aspergillus* (Formerly *Eurotium*), and its occurrence in indoor environments and food[J]. Studies in Mycology, 2017, 88(1): 37-135.

Analysis on the Evolutionary Changes of Fungus Fermentation with the Characteristics of Fu Brick Tea Based on Microbiome Amplicator ITS

Yao Hengbin, Ma Jingyi, Feng Hanhan, Zhao Renliang*

(Department of Tea, College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046)

Abstract Fu brick tea is a kind of dark tea fermented with microorganisms. The fungal potpourri is the brick tea unique aroma quality, formed with fermentation is directly related to fungi flora succession. To reveal the characteristics of fungi flora of Fu brick tea fermentation succession law, the dark tea and white tea were made from Yabukita tea *Camellia sinensis* (L.) O. Ktze from Shenlin Tea Industry Development Co., Ltd., Luoshan County, Xinyang City, Henan Province. After that, the Fu brick tea and white tea brick are respectively made from flowers in the same place. Microbiome amplifiers ITS (Internally Transcribed Spacer) were used to analyze the succession law of fungus with fermentation characteristics of Fu brick tea. The results showed that: 1) There was no significant difference in the fungal diversity of different tea species during the fermentation process, but the difference was caused by the different variation rules of characteristic fungal abundance. 2) The piles-fermentation changes the flora structure and microbial growth environment of Fu brick tea, which directly leads to the significant difference in the flora succession of fermentation fungi between Fu brick tea and other types of tea. 3) Succession law of fungus flora with fermentation characteristics of Fu brick tea: In the early stage of Fu brick tea blossoming, *Aspergillus niger*, *Aspergillus restrictus*, *Aspergillus sydowii*, *Penicillium steckii*, *Penicillium brocae*, *Debaryomyces hansenii* with higher abundance affected by piles-fermentation, showed abundance peak on the 6th day of fermentation. After that, on the 9th day of fermentation, the abundance peaks of *Eurotium*, *Meyerozyma caribbica*, *Wickerhamomyces anomalus*, and other fungi appeared. *Aspergillus niger*, *Debaryomyces hansenii*, *Aspergillus restrictus* maintains abundance. On the 12th day of fermentation, *Aspergillus pseudoglaucus* had its peak abundance, *Aspergillus niger* continued to maintain its abundance. By the end of fermentation day 22, *Eurotium* was finally the dominant species.

Keywords microbiome amplifiers ITS; fermentation; tea fermentation; dark tea & white tea