

1 个含有 SDR 结构域 *PKS/NRPS* 基因的克隆

原晓龙¹, 李娟^{1,2}, 李云琴¹, 王毅¹

(1. 云南省林业科学院 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 国家林业局云南珍稀濒危森林植物保护和繁育重点实验室, 云南 昆明 650204; 2. 云南大学 中草药生物资源研究所云百草实验室, 云南 昆明 650091)

摘要: 聚酮和非核糖体多肽的复合化合物具有独特的生理活性, 它们由聚酮合酶/非核糖体肽合成酶(*PKS/NRPS*)催化合成。目前球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 中含 SDR 结构域的 *PKS/NRPS* 酶的生物合成机制尚不清楚, 采用基因挖掘技术从球孢白僵菌基因组中分离得到 1 个 *PKS/NRPS* 基因(命名 *Bbpk2*), 利用生物信息学分析对其功能进行预测并检测该基因在以 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦芽提取物和 $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母提取物为基本氮源培养基, 7 种碳源添加物和以 $1.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦芽糖和 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖为基本碳源培养基, 4 种氮源添加物培养基上的具体表达情况, 其中每种添加物含量为 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果显示: *Bbpk2* 基因长度为 12 051 bp, 编码 4 016 个氨基酸; 其结构域组织顺序为 KS-AT-DH-MT-KR-ACP-C-A-PP-SDR, 是一种含有 SDR 结构域的 *PKS/NRPS*; 系统进化分析发现, *BbPKS2* 与球孢白僵菌 JEF007 菌株(PMB64475.1)、头状虫草 *Tolypocladium capitatum*(PNY25600.1)等的 *PKS/NRPS* 蛋白聚在同个分支中, 可能参与一种聚酮/非核糖体多肽类化合物的生物合成; 比较不同氮源、碳源添加物对 *Bbpk2* 基因表达的影响, 发现该基因在添加了乳糖的培养基上的表达量是其他碳源添加物的 3.4 倍以上, 添加了牛肉浸粉的培养基上表达量是其他氮源添加物的 1.3 倍以上。该研究为下一步通过异源表达鉴定 *Bbpk2* 基因的具体功能, 及其调控机理研究和基因资源利用奠定基础。图 3 参 30

关键词: 森林保护学; 球孢白僵菌; 杂合 *PKS/NRPS*; 生物信息学分析

中图分类号: S763.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2019)06-1247-07

Gene cloning of a *PKS/NRPS* gene with an SDR domain

YUAN Xiaolong¹, LI Juan^{1,2}, LI Yunqin¹, WANG Yi¹

(1. Yunnan Provincial Key Laboratory of Cultivation and Exploitation of Forest Plants, Yunnan Academy of Forestry, Conservation of Rare, Endangered & Endemic Forest Plants, Public Key Laboratory of the State Forestry Administration, Kunming 650204, Yunnan, China; 2. Yunnan Herbal Laboratory, Institute of Herbal Biotic Resources, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China)

Abstract: The compound of a hybrid polyketide/nonribosomal peptide, which usually has some particular bioactive activity, is catalyzed by an enzyme of hybrid *PKS/NRPS*. A hybrid *PKS/NRPS* containing a SDR domain from *Beauveria bassiana* has not yet clearly elucidated. To investigate this type of gene, the present study obtained a hybrid *PKS/NRPS* gene (named *Bbpk2*) from *B. bassiana* using genome-mining, predicted its gene function with a bioinformatic analysis, and detected the expression level of *Bbpk2* in the medium by adding 7 carbon additives (adding $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of every carbon additives) using $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ malt extract and $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ yeast extract as basic medium, or 4 nitrogen additives (adding $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ of every carbon additives) using $1.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ maltose and $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ as basic medium, 3 replications every treatment. Results showed that the *Bbpk2* gene

收稿日期: 2018-10-09; 修回日期: 2019-02-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31860177); 云南省应用基础研究计划面上项目(2016FB055); 云南省林业科学院创新基金项目(QN2018-01)

作者简介: 原晓龙, 助理研究员, 从事分子生物学研究。E-mail: xiaolongy@126.com。通信作者: 王毅, 副研究员, 从事分子生物学研究。E-mail: 22825818@qq.com

had 12 051 bp, encoded 4 016 amino acids, and had a sequential domain organization of KS-AT-DH-MT-KR-ACP-C-A-PP-SDR. The proteins of BbPKS2 could belong to a hybrid *PKS/NRPS*, which was comprised of a short-chain dehydrogenase reductase (SDR) domain. BbPKS2, PMB64475.1 from the strain of *B. bassiana* JEF007, and PNY25600.1 from *Tolypocladium capitatum* were three hybrid *PKS/NRPS* proteins that clustered in the same clade meaning that BbPKS2 could take part in the biosynthesis of a compound belonging to the hybrid polyketides/nonribosomal peptides. Comparing the expression level of the *Bbpks2* gene when appending different C or N additives, the expression level of the *Bbpks2* gene with lactose added to the basic medium was found to be at least 3.4 times higher than the other C additives, and beef extract 1.3 times higher than the other N additives. The present study could provide some help in further identifying the specific function of the *Bbpks2* gene through heterologous expression and could provide a basis for explaining the molecular regulation mechanism when utilizing the gene resource of *B. bassiana*. [Ch, 3 fig. 30 ref.]

Key words: forest protection; *Beauveria bassiana*; hybrid *PKS/NRPS*; bioinformatics analysis

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 是一种可寄生在多种昆虫上具较强致病性的真菌, 已被广泛用作防治森林、农作物虫害的生物农药^[1-2]; 它产生大量如非核糖体多肽、聚酮类等次生代谢产物, 可抑制多种腐生或寄生线虫^[3-4]。聚酮、非核糖体多肽及其杂合化合物如聚酮中的红霉素^[5]、四环素^[6]; 非核糖体多肽中的青霉素、头孢霉素^[7-8]; 聚酮和非核糖体多肽的杂合化合物如他克莫司^[9]、雷帕霉素^[10]、博来霉素^[11]、埃博霉素^[12]等具有免疫抑制剂或抗肿瘤等生理活性^[13]。迄今为止, 球孢白僵菌中的聚酮和非核糖体多肽杂合型化合物仅有卵孢白僵菌素经基因敲除和异源表达鉴定的报道^[3]。聚酮类和非核糖体肽是2类典型的小分子天然次生代谢化合物, 分别由聚酮合酶(polyketide synthases, PKS)、非核糖体肽合成酶(nonribosomal peptide synthetases, NRPS)催化简单单体脂肪酸或氨基酸缩合形成^[13-14]。真菌聚酮合酶主要属于I型PKS^[13, 15], 其结构域通常包括酮体合成酶(ketosynthase, KS), 酰基转移酶(acyltransferase, AT), 脱水酶(dehydratase, DH), 甲基转移酶(methyltransferase, MT), 烯酯酰还原酶(enoylreductase, ER), 酮体还原酶(ketoreductase, KR), 酰基载体蛋白(acyl carrier pretein, ACP)和末端释放酶等^[13], 短链醇脱氢酶(short chain dehydrogenase/reductase, SDR)家族在PKS中属末端释放酶^[16], PKS中的SDR结构域对底物选择具一定的特异性^[17]; NRPS是一种由多模块组成的多酶复合体, 由腺苷酰化结构域(adenylation domain, A), 肽酰载体蛋白结构域(phosphopantetheine attachment site, PP)和缩合结构域(condensation domain, C)等3个核心结构域按照特定的时空顺序排列组成^[18]。真菌PKS/NRPS酶蛋白复合物含有N端的PKS组件和C端的NRPS组件^[19], 可催化生成含有酰基和氨酰基构件的聚酮和氨基酸或肽类型化合物的生物合成^[9, 20]; 同时聚酮和氨基酸或肽类化合物能够通过它们化学属性的混合, 扩展其产物的生物活性, 埃博霉素(epothilone)、雷帕霉素(rapamycin)和博来霉素(bleomycin)是这类混合分子中重要代表, 编码这些化合物的PKS/NRPS基因大小均约10 kb^[21]。随着高通量测序技术的发展, 真菌基因组数据不断增加, 基因组数据显示目前已通过结构鉴定、表型筛选和生物活性测定等传统方法分离的天然次生代谢产物仅为冰山一角, 真菌基因组中尚有大量的天然次生代谢产物生物合成基因存在; 该类基因大多数条件下处于沉默状态, 其参与合成的化合物大多尚未被鉴定^[22]; 应用基因组挖掘技术可将这些沉默的生物合成基因分离出来, 再通过改变培养基配方和条件或进行遗传学修饰等方式诱导以激发它们全部的次生代谢潜力^[23-24]。为了发掘球孢白僵菌中聚酮和非核糖体多肽杂合类化合物的生物合成基因, 本研究采用基因组挖掘的方式从其基因组数据中获得1条PKS/NRPS基因(命名*Bbpks2*), 通过生物信息学分析预测其潜在功能, 尝试寻找该基因的表达条件, 为最终确定其天然产物及对其异源表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养条件

昆虫致病真菌球孢白僵菌(菌株号: YH02)来源于云南云百草生物技术有限公司, 将YH02菌株接种在MY固体培养基(malt/yeast extract medium)上, 置于25℃恒温条件下培养, 每隔2周转接1次; 用于基因组DNA和总RNA提取的真菌接种于液体MY培养基中, 置于120 r·min⁻¹和25℃条件下培养5~

7 d 后, 收获约 0.5 g 菌丝体, 用吸水纸彻底吸干后在液氮环境下用研钵研磨成粉末用于基因组 DNA 和总 RNA 的提取。MY 培养基的具体配方麦芽糖 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母提取物 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 固体培养基配置时加 $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂。

1.2 试剂与器材

试验涉及试剂包括: 真菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司), 高保真聚合酶、真菌总 RNA 提取试剂盒(大连宝生物工程公司), 反转录试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司), 无缝克隆试剂盒(Biomiga)。主要使用仪器为 NanoDrop™ 2000 紫外分光光度计(赛默飞世尔科技有限公司)、Azure C300 凝胶成像系统(Azure Biosystems)、隔水式恒温培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂)、多功能组合摇床(江苏太仓实验设备厂)。

1.3 *Bbpks2* 基因的挖掘及克隆

首先以曲霉中已报道过的 PKS 基因为模板, 利用本地 BLAST(basic local alignment search tool)对球孢白僵菌基因组进行扫描, 获得可能含有 PKS 基因的重叠群(contigs), 然后利用 antiSMASH(<https://antismash.secondarymetabolites.org/>)软件进行验证, 并利用 GENEFISH 对重叠群进行开放阅读框扫描, 通过生物信息学分析获得白僵菌基因组中 *Bbpks2* 基因的 DNA 序列。

根据 DNA 序列设计 2 对特异引物(*Bbpks25F*: 5'-ATGTCCTTCGCACCAAAACGA-3'; *Bbpks2MR*: 5'-AACAGCACTGTCACTGTCCAC-3'; *Bbpks2MF*: 5'-AACGCTGGCTATAATGCTCTT-3'; *Bbpks23R*: 5'-GGCTTCCTGGAGCGGTAA-3')用于 *Bbpks2* 基因全长 cDNA 的克隆。以球孢白僵菌的 cDNA 为模板, 用 HiFi 高保真酶分别扩增出 *Bbpks2* 基因的 5' 片段和 3' 片段, 经 DNA 纯化试剂盒将这 2 个片段纯化后, 按照无缝克隆试剂盒说明书中的具体步骤将 *Bbpks2* 基因的 5' 片段和 3' 片段连接起来, 获取全长 cDNA。将该基因片段连接到克隆载体 Peasy-T3 上, 转化到 Trans-T1 感受态细胞中, 进行蓝白斑筛选后, 通过菌落 PCR 筛选含有插入片段的阳性克隆送到上海生工进行测序。

1.4 聚类分析方法

从美国生物技术信息中心(NCBI)上选择功能已知且鉴定过化合物的 PKS/NRPS 蛋白序列, 包括黄曲霉 *Aspergillus flavus*, 米曲霉 *A. oryzae* 中编码环匹阿尼酸(cyclopiazonic acid)生物合成的 *CpaA* 基因(BAI43678, BAG82673), 扩展青霉 *Penicillium expansum* 中编码球毛壳甲素(chetoglobosin A)生物合成的 *CheA* 基因(CAO91861), 棒曲霉 *A. clavatus* 中编码细胞松弛素 E(cytochalasin E)生物合成的 *CcsA* 基因 XM_001270542, 异孢镰刀菌 *Fusarium heterosporum* 中编码伊快毒素(equisetin)的 *EqiS* 基因(Q5SBL2), 水稻恶苗病菌 *Fusarium fujikuroi*, 串珠赤霉菌 *Gibberella moniliformis* 及假禾谷镰孢菌 *Fusarium pseudograminearum* 等真菌中编码镰刀菌素 C(fusarin C)生物合成的 *FusA* (AFP73394), *FusS* (AAT28740), *pks10* (EKJ71911)等基因, 烟曲霉 *Aspergillus fumigatus* 中编码假散囊菌素 A(pseurotin A)的 *PsoA* 基因 (ABS87601), 球孢白僵菌中编码卵孢白僵菌素(tenellin)的 *TenS* 基因(XP_008600657)等蛋白序列用于聚类分析, 采用 MEGA 7.0 中的 Clustal W 程序对所选择的 PKS 蛋白序列和球孢白僵菌中的 BbPKS1 蛋白序列进行比对后, 采用邻位相接法(neighbor-joining), 自检举 1 000 次, 其余采用默认参数构建系统进化树。依据聚类结果, 从基因起源与功能分化的角度预测该基因功能, 并进一步推测该基因产生的聚酮化合物。

1.5 *Bbpks2* 基因在不同培养基上的表达

根据分离得到的 *Bbpks2* 基因的 DNA 序列, 设计特异检测引物(*TBbpks2F*: TCTCCTTGGCAAGGT-TACTG; *TBbpks2R*: ACCACGCTCCATCATGTACT)。然后将球孢白僵菌培养在添加不同碳源、氮源的培养基上。不同碳源实验的基础培养基为 $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦芽浸粉, $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 酵母提取物, 分别添加 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 乳糖、甘露醇、麦芽糖、葡萄糖、山梨醇、果糖、肌醇; 不同氮源实验的基础培养基为 $1.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦芽糖, $6.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖, 分别添加 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 牛肉浸粉、酪蛋白胨、胰蛋白胨、马铃薯。培养 14 d 后, 从每种培养基上收获 0.5 g 菌丝体, 采用真菌总 RNA 提取试剂盒按照说明书步骤提取各自的总 RNA, 并选择浓度合适的 RNA 采用反转录试剂盒将其反转录成 cDNA, 再用特异引物 *TBbpks2F* 和 *TBbpks2R* 检测该基因的表达情况。

在琼脂糖凝胶电泳检测过程中, 各 PCR 产物和 1 kb DNA marker 的点样量均为 $2.5 \mu\text{L}$, 电泳结束

后,利用 Azure C300 凝胶成像系统自带的图像分析软件分析各条带的积分光密度,比较各 PCR 产物条带的积分光密度值,并以该值与 1 kb marker 的条带进行比较作为相对表达量绘制柱状图。

2 结果与分析

2.1 *Bbpks2* 基因全长 cDNA 的克隆及其序列分析

经无缝克隆获得 *Bbpks2* 基因的全长 cDNA。分析显示:*Bbpks2* 基因全长 12 051 bp,编码 4 016 个氨基酸;经过序列相似性及保守结构域的分析显示,该基因编码蛋白的结构域组织顺序为 KS-AT-DH-MT-KR-ACP-C-A-PP-SDR;该蛋白同时含有 PKS 和 NRPS 酶蛋白的结构域,由此推断该蛋白是一种 PKS/NRPS 酶蛋白复合体。

2.2 BbPKS2 蛋白的分子系统进化分析

球孢白僵菌中 BbPKS2 蛋白与其他真菌 PKS/NRPS 蛋白的分子系统进化树显示(图 1),该聚类树可分为 4 个较大的亚类(分支 I, II, III, IV),各个亚类间的结构域组织顺序存在差异,至少存在 1 个结构域的不同;镰刀菌属 *Fusarium* 真菌中编码伊快霉素、不同真菌中参与编码细胞松弛素 E 的酶蛋白聚到同一分支上,且二者亲缘关系明显较近。球孢白僵菌的 BbPKS2 蛋白与这 2 类酶蛋白被归类到分支 II 中,该亚类的结构域组织顺序为 KS-AT-DH-MT-KR-ACP-C-A-PP-SDR;BbPKS2 与球孢白僵菌 JEF007 菌株(PMB64475.1)、头状虫草 *Tolypocladium capitatum*(PNY25600.1)聚在一个亚分支中;推测 BbPKS2 蛋白所参与合成的天然次生代谢产物与伊快霉素、细胞松弛素 E 存在一定的结构相似性。

2.3 *Bbpks2* 基因在含有不同碳氮源添加物培养基上的表达

在含有不同碳氮源添加物的培养基上,*Bbpks2* 基因表达差异极其显著。当添加不同碳源添加物时

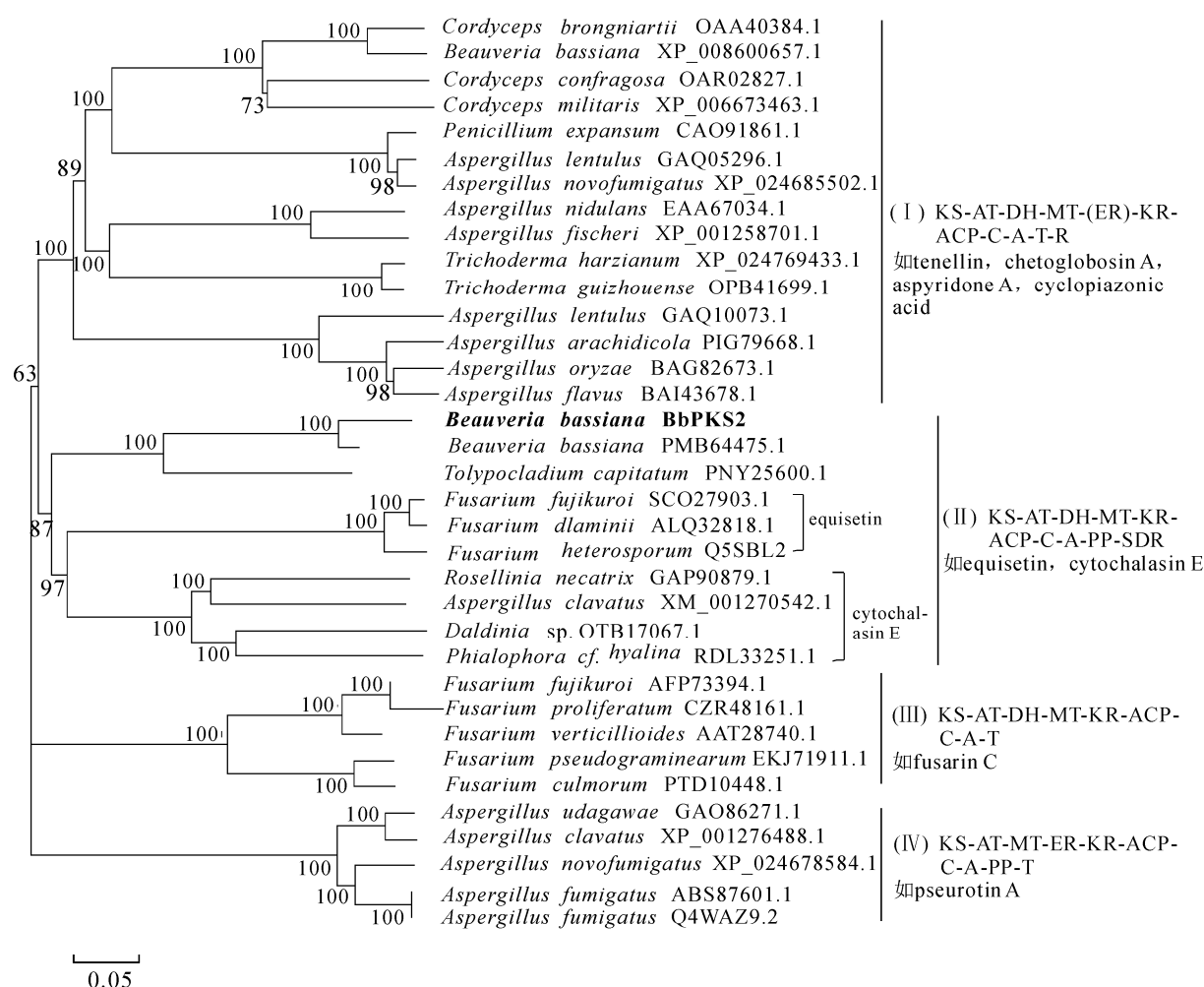


图 1 球孢白僵菌中 BbPKS2 蛋白与其他真菌中杂合 PKS/NRPS 蛋白的聚类分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of the protein BbPKS2 of *B. bassiana* and other relative fungal hybrid PKS/NRPS proteins

(图 2), 在乳糖培养基上, *Bbpks2* 基因的表达量最高, 其表达量显著高于其他培养基; 而在麦芽糖培养基上, *Bbpks2* 基因不表达; *Bbpks2* 基因表达量从高到低依次为乳糖, 葡萄糖, 山梨醇, 肌醇, 甘露糖, 果糖, 其中以乳糖为碳源添加物的培养基上其表达量最低至少为其他添加物的 3.4 倍以上。当添加不同氮源添加物时(图 3), *Bbpks2* 基因均有明显表达, 在含牛肉浸粉培养基上, *Bbpks2* 基因的表达量最高, 其表达量最低为其他的 1.3 倍以上; 而在含酪蛋白胨的培养基上, 该基因表达量最低。可见该基因受碳源中乳糖、氮源中牛肉浸粉的影响较大; 而受到碳源中麦芽糖、氮源中酪蛋白胨的影响则可以忽略。

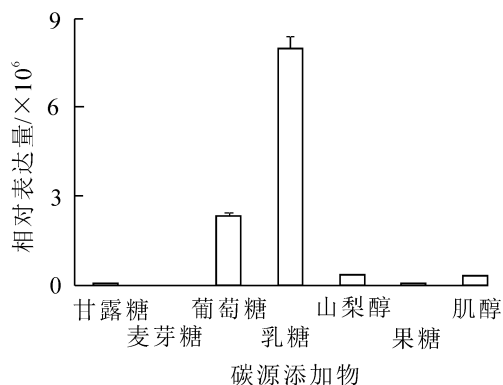


图 2 *Bbpks2* 基因在含有不同碳源培养基上的表达

Figure 2 Expression level of *Bbpks2* gene in the medium containing different carbon additives

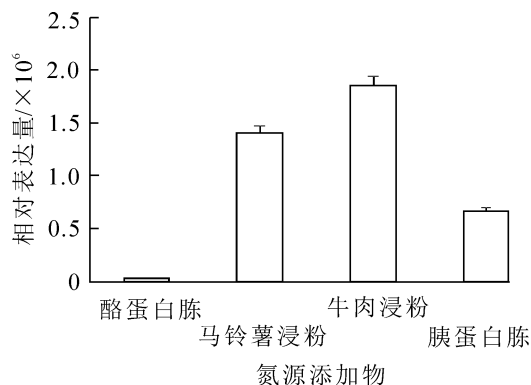


图 3 *Bbpks2* 基因在含有不同氮源添加物培养基上的表达

Figure 3 Expression level of *Bbpks2* gene in the medium containing different nitrogen additives

3 讨论

球孢白僵菌主要是在机械压力和酶共同作用下侵染昆虫寄主^[25], 在昆虫体内通过次生代谢途径中相关酶类所产生的毒素致死寄主^[1]。但该真菌次生代谢途径中所产生的毒素除少数外, 尚有大量的次生代谢产物生物合成基因未与相关化合物关联。结合基因组挖掘技术和一菌多产物策略(one strain many compounds, OSMAC)、异源表达等操作技术可促进该问题的解决, 从真菌基因组数据中可大量挖掘得到 *PKS*, *NRPS* 等生物合成基因, 通过序列相似性、结构域、基因片段的大小及聚类分析等初步推断该基因的功能, 初步了解该酶所参与合成化合物的某些结构^[15,26]。如编码 2-吡啶酮卵孢白僵菌素(2-pyrindone tenellin)酶蛋白的 *PKS/NRPS* 基因约 12.9 kb^[27], 编码镰刀菌素 C 酶蛋白的 *fusA* 基因(*PKS/NRPS*)约 11.9 kb^[28]; BALI 等^[17]在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中过量表达其 SDR 等末端释放结构域, 发现该结构域对结构中含有环己酮的底物具较高活性。同时因本研究中的 *Bbpks2* 基因尚未发现有较高同源性基因存在, 通过结构域分析推测该基因所编码的酶蛋白属于 *PKS/NRPS*, 参与聚酮/非核糖体多肽的生物合成, 且该化合物与伊快霉素、细胞松弛素 E 存在某些共同的结构; 通过比较分析伊快霉素、细胞松弛素 E, 综合分析该化合物可能含吡咯烷酮结构。

基因挖掘技术为迅速发现隐藏在基因组中的次生代谢产物生物合成基因和新生物合成机制提供了一种强力有效的方法。挖掘获得聚酮、非核糖体多肽等天然次生代谢产物的生物合成基因后, 通过系统变换培养条件, 如通过改变培养基配方、培养方式、渗透压及一菌多产物(OSMAC)等方式可选择性地上调转录因子, 诱导激发它们全部的产生次生代谢产物的潜力, 将基因组中沉默的 *PKS* 和 *NRPS* 等基因诱导表达出来^[22-23]。本研究通过分析 *Bbpks2* 基因在含不同碳氮源添加物培养基上的具体表达情况, 发现该基因在以乳糖为碳源、以牛肉浸粉为氮源的培养基上能够获得较大量的表达; 在含有不同培养基成分的培养基上, 该基因的表达情况差异显著; 在以麦芽糖为碳源的培养基上, 该基因不表达, 在以酪蛋白胨为氮源的培养基上, 该基因表达量显著低于在以牛肉浸粉、马铃薯浸粉和胰蛋白胨等作为氮源的培养基的表达量。这种同一基因在含不同成分培养基上出现表达差异的现象存在于许多真菌中, 如长松萝 *Usnea longissima* 中 *UsNRPS* 基因可被蔗糖和果糖强烈诱导, 而被天冬氨酸抑制^[29]; 通过 OSMAC 策略从邬氏黄丝曲霉 *Talaromyces wortmannii* 中获得 3 种新型的聚酮^[23]; 从三线镰刀菌 *Fusarium tricinctum* 在不

同培养基上培养筛选获得了2个新型的聚酮: fusarielin K 和 fusarielin L^[30]。这种基因在不同培养条件下的表达研究有助于找出不同次生代谢基因的最适表达培养基类型, 对通过真菌菌丝体获得新颖的次生代谢化合物, 及将相应化合物和具体基因关联起来具有指导意义。

本研究通过基因组挖掘技术从球孢白僵菌基因组中发掘得到了一个 *PKS/NRPS* 基因 *Bbpks2*, 克隆得到其全长 cDNA, 用聚类分析的方式对其终产物结构进行预测, 并通过添加不同碳源和氮源筛选能够诱导该基因表达的最佳培养基条件, 为球孢白僵菌中 *PKS/NRPS* 基因的异源表达及基因功能鉴定, 发掘新颖或具潜在生物活性的聚酮和非核糖体多肽杂合化合物奠定了前期基础。

4 参考文献

- [1] 宋晓兵, 彭埃天, 程保平, 等. 一株侵染柑橘木虱的球孢白僵菌的分离及鉴定[J]. 植物保护, 2017, **43**(4): 139 – 144.
SONG Xiaobing, PENG Aitian, CHENG Baoping, *et al.* Isolation and identification of a *Beauveria bassiana* strain infecting *Diaphorina citri* [J]. *Plant Prot*, 2017, **43**(4): 139 – 144.
- [2] 王月, 文斌, 马军, 等. 球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)对寒地温室4种害虫防控研究[J]. 生物灾害科学, 2017, **40**(4): 284 – 287.
WANG Yue, WEN Bin, MA Jun, *et al.* Control effects of *Beauveria bassiana* on 4 conservatory pests in frigid regions [J]. *Biol Disaster Sci*, 2017, **40**(4): 284 – 287.
- [3] XIAO Guohua, YING Shenghua, ZHENG Peng, *et al.* Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana* [J]. *Scic Rep*, 2012, **2**: 483. doi: 10.1038/srep00483.
- [4] 刘丹丹, 段玉玺, 陈立杰. Snf 907-76 发酵液杀线虫活性测定及活性物质分离纯化[J]. 农药, 2007, **46**(9): 644 – 646.
LIU Dandan, DUAN Yuxi, CHEN Lijie. Determine nematicidal of ferment liquid of Snf 907-76 and isolation and purification nematocide [J]. *Agrochemicals*, 2007, **46**(9): 644 – 646.
- [5] DONADIO S, STAVIER M J, MCALPINE J B, *et al.* Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis [J]. *Science*, 1991, **252**(5006): 675 – 679.
- [6] KIM E S, BIBB M J, BUTLER M J, *et al.* Sequences of the oxytetracycline polyketide synthase-encoding *otc* genes from *Streptomyces rimosus* [J]. *Gene*, 1994, **141**(1): 141 – 142.
- [7] AHARONOWITZ Y, COHEN G, MARTIN J F. Penicillin and cephalosporin biosynthetic genes: structure, organization, regulation, and evolution [J]. *Ann Rev Microbiol*, 1992, **46**: 461 – 495.
- [8] MARTIN F J. New aspects of genes and enzymes for beta-lactam antibiotic biosynthesis [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **50**(1): 1 – 15.
- [9] MOTAMEDDI H, SHAFIEE A. The biosynthetic gene cluster for the macrolactone ring of the immunosuppressant FK506 [J]. *Eur J Biochem*, 2010, **256**(3): 528 – 534.
- [10] SCHWECKE T, APARICIO J F, MOLNAR I, *et al.* The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(17): 7839 – 7843.
- [11] DU Liangcheng, SÁNCHEZ C, CHEN Mei, *et al.* The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase [J]. *Chem Biol*, 2000, **7**(8): 623 – 642.
- [12] TANG Li, SHAH S, CHUNG L, *et al.* Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster [J]. *Science*, 2000, **287**(5453): 640 – 642.
- [13] COX R J. Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets [J]. *Org Biomol Chem*, 2007, **5**(13): 2010 – 2026.
- [14] SESHIME Y, JUVVADI P R, KITAMOTO K, *et al.* *Aspergillus oryzae* type III polyketide synthase *CsyA* is involved in the biosynthesis of 3,5-dihydroxybenzoic acid [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, **20**(16): 4785 – 4788.
- [15] KROKEN S, GLASS N L, TAYLOR J W, *et al.* Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(26): 15670 – 15675.
- [16] SISKOS A P, BAERGA-ORTIZ A, BALI S, *et al.* Molecular basis of Celmer's rules: stereochemistry of catalysis by

- isolated ketoreductase domains from modular polyketide synthases [J]. *Chem Biol*, 2005, **12**(10): 1145 – 1153.
- [17] BALI S, O'HARE H M, WEISSMAN K J. Broad substrate specificity of ketoreductases derived from modular polyketide synthases [J]. *Org Biomol Chem*, 2006, **7**(3): 478 – 484.
- [18] CHALLIS G L, RAVEL J, TOWNSEND C A. Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains [J]. *Chem Biol*, 2000, **7**(3): 211 – 224.
- [19] 黎志凤, NGUIMBI E, 李越中, 等. 埃博霉素(Epothilones)的 PKS/NRPS 杂合基因簇[J]. 生物工程学报, 2003, **19**(5): 511 – 515.
- LI Zhifeng, NGUIMBI E, LI Yuezho, *et al.* The PKS/NRPS hetero-gene cluster of epothilones [J]. *Chin J Biotechnol*, 2003, **19**(5): 511 – 515.
- [20] BOETTGER D, HERTWECK C. Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids [J]. *Chem Biol Chem*, 2013, **14**(1): 28 – 42.
- [21] MIYANAGA A, KUDO F, EGUCHI T. Protein-protein interactions in polyketide synthase-nonribosomal peptide synthetase hybrid assembly lines [J]. *Nat Prod Rep*, 2018, **14**(1): 28 – 42.
- [22] BOK J W, HOFFMEISTER D, MAGGIOHALL L A, *et al.* Genomic mining for *Aspergillus* natural products [J]. *Chem Biol*, 2006, **13**(1): 31 – 37.
- [23] LIU Wencai, YANG Fan, ZHANG Ran, *et al.* Production of polyketides with anthelmintic activity by the fungus *Talaromyces wortmannii* using one strain-many compounds (OSMAC) method [J]. *Phytochem Lett*, 2016, **18**: 157 – 161.
- [24] YUAN Chao, GUO Yuhua, WANG Haiying, *et al.* Allelopathic polyketides from an endolichenic fungus *Myxotrichum* sp. by using OSMAC strategy [J]. *Sci Rep*, 2016, **6**: 19350.
- [25] 季香云, 杨长举. 白僵菌的致病性与应用[J]. 中国生物防治学报, 2003, **19**(2): 82 – 85.
- JI Xiangyun, YANG Changju. Infection and application of *Beauveria* spp. [J]. *Chin J Biol Control*, 2003, **19**(2): 82 – 85.
- [26] WEBER T, BLIN K, DUDDELA S, *et al.* antiSMASH 3.0-a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, **43**(W1): W237 – W243.
- [27] ELEY K L, HALO L M, SONG Z, *et al.* Biosynthesis of the 2-pyridone tenellin in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* [J]. *Chem Biol Chem*, 2007, **8**(3): 289 – 297.
- [28] SONG Z, COX R J, LAZARUS C M, *et al.* Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum* [J]. *Chem Biol Chem*, 2004, **5**(9): 1196 – 1203.
- [29] 原晓龙, 陈剑, 张传光, 等. 长松萝中非核糖体肽合成酶 NRPS 基因克隆与鉴定[J]. 西部林业科学, 2016, **45**(1): 14 – 20.
- YUAN Xiaolong, CHEN Jian, ZHANG Chuanguang, *et al.* The genetic clone and identification of non-ribosomal peptides synthetases (NRPS) from *Usnea longissima* [J]. *J West China For Sci*, 2016, **45**(1): 14 – 20.
- [30] HEMPHILL C F, SUREECHATCHAIYAN P, KASSACK M U, *et al.* OSMAC approach leads to new fusarielin metabolites from *Fusarium tricinctum* [J]. *J Antibiot*, 2017, **70**(6): 726 – 732.