草酸青霉线性五肽生物合成的比较转录组分析

刘 超，宋瑾怡，薛艳红，熊 泽*，刘士平
（三峡大学 生物与制药学院，湖北 宜昌 443002）

摘要：草酸青霉（*Penicillium oxalicum*）是一种重要的植物生防菌，从三峡河岸带分布的草酸青霉中，分离到一种线性五肽，该物质对柑橘致腐菌指状青霉（*P. digitatum*）具有极强的抑制作用。为了分析该五肽的生物合成机制，本研究采用 BGISEQ-500 平台，测定了 3 株不同五肽含量的草酸青霉（114-2，SG-4，SJ-3）cDNA 文库，并使用参考基因组对序列进行了比较。高通量测序结果表明，3 株草酸青霉平均产出了 6.55 GB 的序列数据，与有参转录组的平均比对率达到 91.65%。差异表达基因比较分析表明，相较于不产五肽的 114-2，在生产五肽的 SG-4 和 SJ-3 中，共有 1 648 个基因上调表达，1 251 个基因下调表达。AntiSMASH 分析表明，在草酸青霉基因组中可能存在 33 个非核糖体肽合成酶（NRPS），其中 15 个 NRPS 的表达与五肽物质的变化趋势一致。进一步的 RT-PCR 表达分析表明，基因簇 *PDE_01071* 可能是负责五肽合成的基因簇。

关键词：草酸青霉；线性五肽；生物合成；比较转录组；基因簇
中图分类号：Q 939.92　**文章编号：**1673-1689(2021)05-0037-08　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.05.005

Comparative Transcriptome Analysis of Linear Pentapeptide Biosynthesis in *Penicillium oxalicum*

LIU Chao，*SONG Jinyi*，*XUE Yanhong*，*XIONG Ze**，*LIU Shiping*
（College of Life Science and Pharmacy, Three Gorges University, Yichang 443002, China）

Abstract：*Penicillium oxalicum* is an important biocontrol microbe in plants. A linear pentapeptide was isolated from *P. oxalicum* distributed in the Three Gorges river bank, and it had an extremely strong inhibitory effect on *P. Digitatum*, a pathogen causing citrus rot. In order to explore the biosynthesis mechanism of linear pentapeptide, the cDNA libraries of three *P. oxalicum* strains (114-2, SG-4, SJ-3) with different pentapeptide contents were sequenced by the BGISEQ-500 platform, and the results were compared with the reference transcriptome. High-throughput sequencing produced 6.55 GB of data averagely, and the alignment rate with the reference transcriptome reached 91.65%. Compared with 114-2 without pentapeptide production, comparative analysis of differentially expressed genes showed that a total of 1 648 genes were up-regulated and 1 251 genes were down-regulated in SG-4 and SJ-3 that could produce pentapeptide. AntiSMASH analysis suggested that there might be 33 non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) genes in *P. oxalicum* genome, among which the expression of 15 NRPS was consistent with that of pentapeptide. Further RT-PCR

收稿日期：2020-01-22
基金项目：国家自然科学基金项目（31270389；31540065）。
* **通信作者：**熊 泽（1966—），女，高级实验师，主要从事微生物资源与利用研究。E-mail：956528829@qq.com

expression analysis showed that the gene cluster *PDE_01071* might be responsible for pentapeptide synthesis.

Keywords: *Penicillium oxalicum*, linear pentapeptide, biosynthesis, comparative transcriptome, gene cluster

草酸青霉(*P. oxalicum*)是一种广泛分布于土壤、根际、食物及动植物体内等环境中的丝状真菌[1],可防治番茄枯萎病、油菜菌核病、棉花炭疽病、柑橘绿霉病等 20 余种植物真菌性病害[2-3]。草酸青霉在溶磷、分解纤维素和生物修复等方面也发挥着重要作用[4-6]。2013 年,我国测定第一个草酸青霉菌株(114-2)的全基因组序列,并完成基因注释:其基因组共约 30 MB,预测有 10 013 个基因,编码 9 979 个蛋白质[7-9]。截止 2020 年 4 月,在 GenBank 数据库中共有 6 条草酸青霉的全基因组序列[7,10-11]。

前期从三峡河岸带地区筛选出两株草酸青霉 SG-4 和 SJ-3,发现其对柑橘致腐菌指状青霉有强烈抑制作用[12]。通过活性追踪和系统分离鉴定,得知其抑菌物质是一种新型线性五肽(图 1),结构是:O-Me-Baba-N-Me-Thr-Thr-N-Me-Val-Ser,其中 Baba 是 β-氨基丁酸。进一步研究表明该肽活性稳定,对人体安全,是一种潜在抗生素和食品添加剂[12]。

自然界中寡肽的生物合成途径有两种,分别是核糖体途径和非核糖体途径[13-14]。前者指通过依赖核糖体的翻译途径合成寡肽,是一种初生代谢,在其基因组中一般存在目标寡肽的重复序列;后者是由一种不依赖于翻译途径的非核糖体肽合成酶(NRPS,non-ribosomal peptide synthetase)所催化,是一种次级代谢,它是寡肽合成的主要途径[15-16]。许多非核糖体肽是常见的抗生素,它们在医药、食品工业发挥了巨大作用[17-19]。根据 NRPS 的催化特点和寡肽的结构,开发出一系列基于 NRPS 基因序列来分析预测寡肽的软件,如 fungiSMASH、NRPS predictor、Norine 等,这些软件为寡肽生物合成途径研究提供了有利条件[20-22]。

为揭示新型五肽在草酸青霉中的合成机制,本研究测定了 3 株不同草酸青霉菌株的转录组序列,通过分析差异基因,从表达水平上确定候选合成基因簇,为剖析新型五肽合成机理提供了实验依据。

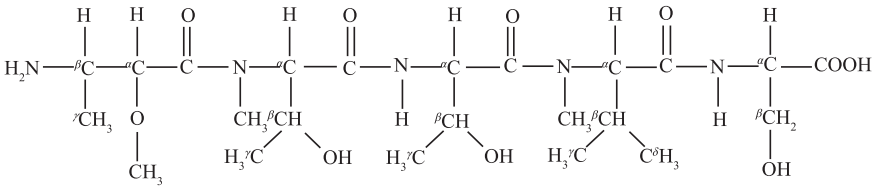


图 1 草酸青霉中的新型线性五肽

Fig. 1 New linear pentapeptide in *P. oxalicum*

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

BS-224s 电子天平:德国赛多利斯公司产品;SW-CJ-2FD 型双人实验操作台:苏州净化设备厂产品;XPX-9052 MBE 数显培养箱:上海博讯实业有限公司医疗设备厂产品;ZQZY-85BN 全自动控温摇床:上海知楚仪器有限公司产品;Master-s15 和泰纯水仪:上海和泰仪器有限公司产品;MyCycler™ Thermal PCR 仪:美国 BIO-RAD 公司产品;GDS-8000 凝胶成像系统:美国 UVP 公司产品;Allegra 64R 台式高速冷冻离心机:美国 BECKMAN 公司产品;DYCP-31DN 水平电泳仪:北京市六一仪器厂产品;YM30F 不锈钢智能型立式电热蒸汽消毒器:上海三申医疗器械有限公司产品;岛津高效液相色谱仪紫外-可见光检测器(SPD-16),C8 液相柱(YMC-Triart C8 250 mm×4.6 mm):岛津仪器苏州有限公司产品。

1.2 实验试剂

土豆:市售;葡萄糖:科密欧化学试剂有限公司

产品;琼脂:金燕海洋生物股份有限公司产品;色谱级乙腈:Tedia 公司产品;真菌 RNA 提取试剂盒:美国 Omega Bio-Tek 公司产品;Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit Ver.2 和 T3 Super PCR Mix:均为北京擎科新业生物技术有限公司产品。

1.3 实验菌株及培养基

草酸青霉 SG-4 和 SJ-3:来源于菌株均系三峡河岸带植物疏花水柏枝(*Myricaria laxiflora*)的内生真菌;114-2:来源于山东大学微生物技术国家重点实验室,由本实验室自行分离获得。以上菌株均保藏于 4 ℃的 PDA 固体斜面培养基。PDA 固体培养基:土豆 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 值自然,121 ℃灭菌 20 min。

1.4 发酵培养与 RNA 提取

将保存在 PDA 固体斜面的 3 株草酸青霉菌种活化培养 4 d,采用无菌操作取 1 环孢子接种于装有 200 mL 的 PDA 液体培养基三角摇瓶中(总容积 500 mL),于 28 ℃、120 r/min 条件下培养 7 d,采用 Omega 试剂盒提取总 RNA,提取方法按试剂盒的操作方法进行。

1.5 菌体质量测定和线性五肽相对丰度检测

将 200 mL PDA 液体中培养好的菌体抽滤,获取不同培养时间的菌丝和发酵液,菌丝烘干后称量。发酵液使用等体积无水乙醇混匀沉淀 24 h,将上清液旋蒸冻干获得粗提物,使用纯水将粗提物配制成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液。采用岛津高效液相色谱仪紫外-可见光检测器 (SPD-16),YMC-Triart C8 250 mm×4.6 mm、粒径 5 μm 的 C8 色谱柱进行反向高效液相分析。流动相 A 为乙腈,流动相 B 为纯水,超声脱气后使用;检测波长为 210 nm;进样体积为 80 μL;流量为 1mL/min,柱箱温度为 35 ℃,梯度洗脱:0~20 min,B 体积分数由 90%变为 0%。记录 5~6 min 处五肽相对峰面积。

1.6 转录组测序

将质量检测合格的 RNA 样品使用 BGISEQ-500,进行高通量 RNA-Seq,具体过程如下:先用带 OligodT 的磁珠富集有 polyA 尾巴的 mRNA,再用 DNA 探针杂交 rRNA,利用 RNaseH 选择性消化 DNA/RNA 杂交链,再用 DNaseI 消化掉 DNA 探针,纯化后即得到所需 RNA。然后将 RNA 片段化,用随机的 N6 引物进行反转录,进一步形成双链 DNA。将双链 DNA 末端补平并进行 5′端磷酸化,3′端形成突出一个“A”的粘末端,再连接一个 3′端有凸出“T”的鼓泡状的接头。然后连接产物通过特异的引物进行 PCR 扩增和上机测序。

1.7 转录组数据分析

转录组数据以草酸青霉 114-2 为参考基因组进行有参分析,用过滤软件 SOAPnuke 进行统计,用 Trimmomatic 进行过滤,得到高质量数据(clean reads);使用 HISAT 软件和 Bowtie2 软件将 clean reads 分别比对到参考基因组和参考基因序列上。根据比对结果,利用 RSEM 软件定量分析,并以 FPKM 计算基因表达水平。差异表达分析重点在于找出样本之间差异表达的基因,并对这些基因进行深入挖掘分析。在分析中,差异表达基因默认定义为 FDR≤0.001 且倍数差异在 1 倍以上的基因。筛选获得的差异表达基因,根据 GO (Gene Ontology)和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)注释进行结果分类,同时使用 R 软件中的 phyper 函数进行富集分析。

1.8 NRPS 分析

用线上工具 antiSMASH (https://fungismash.secondarymetabolites.org/#!/start?tdsourcetag=s_pcqq_aiomsg)分析草酸青霉 114-2 的基因组序列,统计草酸青霉次生代谢产物基因簇,根据线上产物预测功能及 NRPS 的 A 型结构域,结合转录组表达量分析 NRPS 基因簇。

1.9 RT-PCR 验证

使用 Oligo7 软件设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,使用反转录试剂盒将所提 RNA 反转录成 cDNA,添加引物进行 RT-PCR 验证,所用的引物序列见表 1。

表 1 实验中所用的引物序列

Table 1 Primer sequences in the experiment

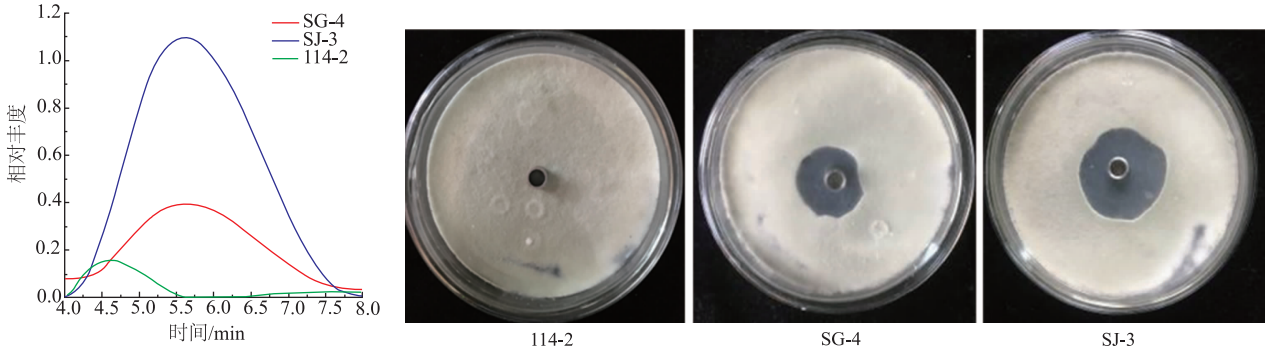
基因	序列(5′-3′)
PDE_01065 F	GCCACCAACTTTACGGAGCTCT
PDE_01065 R	GCACTTGAATTGGTCCAGCCT
PDE_01067 F	ATTATCGCATCATCGTCCTGT
PDE_01067 R	ACAATCACGACGGCTAAGACA
PDE_01069 F	TTTACTACTTCCGCCGCGTCT
PDE_01069 R	AAGCCAGCAATGTCCAAGAGC
PDE_01071 F	TCTACACCATCACCGCATCCAC
PDE_01071 R	GCGATGACCCAGAATTGAGCA
PDE_01077 F	GTTACAGACCGGCTTCCACCA
PDE_01077 R	TTCCATGAGCCGACGTCCAC
Actin F	CGCCTTCTACGTCTCCATTCAGG
Actin R	CGGTGGTGGAGAAAGTGTAGCC

2 结果与分析

2.1 不同草酸青霉菌株的生产能力比较

将 SG-4、SJ-3 和 114-2 这 3 株草酸青霉菌在 PDA 液体培养基中培养 7 天,收集发酵液后进行高效液相色谱分析发现，菌株 114-2 不产线性五肽,相比之下,来自于三峡河岸带的 SG-4 和 SJ-3 线性五肽产量很高(图 2(a)),同时对指状青霉显示出很强的抑制效应(图 2(b)),其中菌株 SJ-3 的产量明显高于菌株 SG-4(图 2(a))。

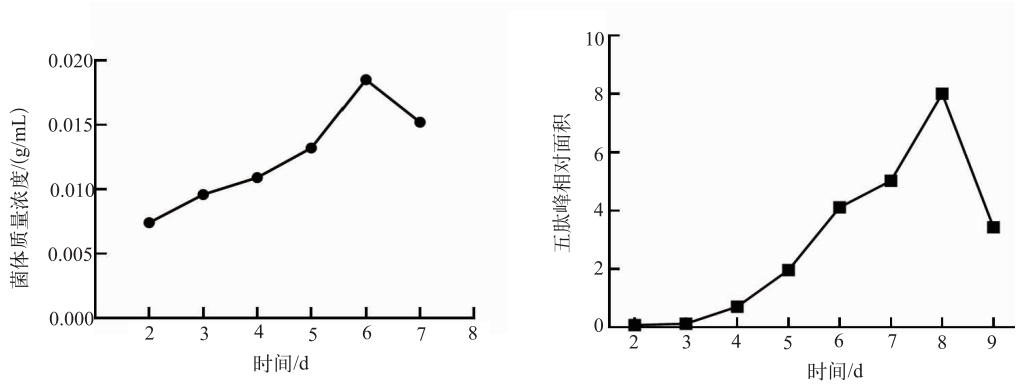
为了明确线性五肽的合成特点，以菌株 SG-4 为对象，分析了菌体生长规律和合成五肽的时期。结果显示,菌体的生长从第 6 天开始进入对数生长期(图 3(a)),而线性五肽在第 4 天开始累积,第 8 天达到最大值(图 3(b)),符合次生代谢产物的特点。由于大多数寡肽由非核糖体肽合成酶(NRPS, non-ribosomal peptide synthetase)所催化,因此推测五肽极有可能由 NRPS 基因簇负责合成。



(a)3株草酸青霉线性五肽相对丰度图　(b)3株草酸青霉对指状青霉抑菌图

图 2　不同草酸青霉的五肽产量及抑菌效果

Fig. 2　Pentapeptide productionand antifungal effect of *P. oxalicum* strains



(a)SG-4菌体质量浓度随时间变化曲线图　(b)五肽峰相对面积随时间变化曲线

图 3　SG-4 的生长曲线和五肽的合成时间

Fig. 3 Growth curve of SG-4 and synthesis time of pentapeptide

2.2 转录组测序质量分析

为明确线性五肽的生物合成机制,将上述 3 株草酸青霉在 PDA 培养基上生长 6 d 后提取其总 RNA,质检合格后在武汉华大基因科技有限公司使用 BGISEQ-500 平台进行了转录组测序。由于 114-2 有完整的序列注释信息，故在测序时使用它为参照序列进行分析。

将测序的原始数据(raw reads)中低质量、接头污染以及未知碱基含量过高的数据过滤后,平均每个菌株产生了 4 365 万条高质量数据(clean reads),平均容量达 6.55 GB,高质量数据比例接近97%。将所获得的 clean reads 使用 HISAT 进行参考基因组序列比对,平均比对率达到 91.65%(表 2)。上述结果表明,此次测序的质量有保证,结果可靠,而且 3 株草酸青霉的转录组序列均与参考基因组序列匹配程度高。

表 2 转录组测序概况

Table 2 A survey of transcriptome sequencing

菌株	高质量数据/10^6	高质量数据比例/%	净碱基数/GB	比对率/%
114–2	43.42	96.84	6.51	93.56
SG–4	43.68	97.06	6.55	90.44
SJ–3	43.85	96.70	6.58	90.95

注:“高质量数据比例”表示过滤后的数据中大于 20 个碱基的序列所占比例;“比对率”表示能比对上参考基因组的高质量数据比例。

2.3 差异表达基因分析

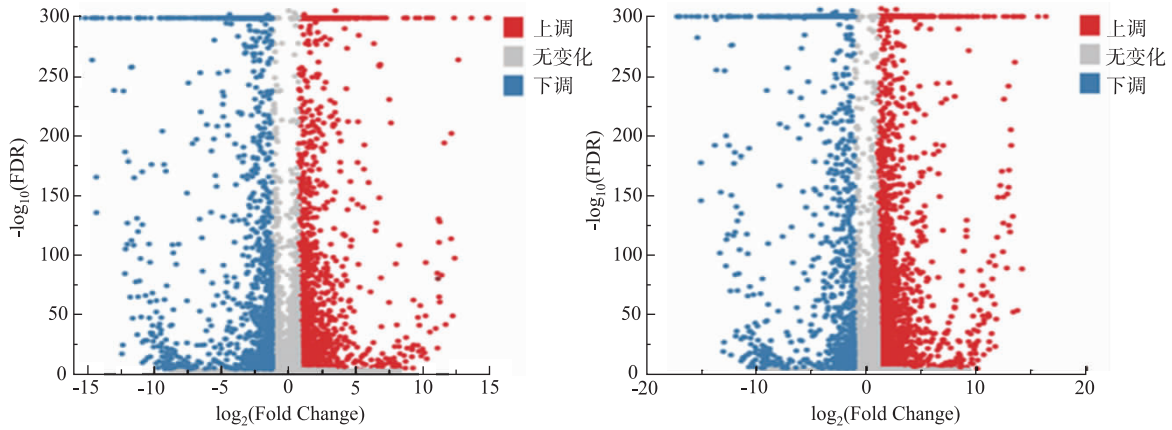
按照差异的倍数(|log2(Fold Change)|)和错误发现率(FDR)来筛选差异表达基因,分析中将同时满足|log2(Fold Change)|≥1 且 FDR≤0.001 的转录本确定为差异表达基因[23]。3 个转录组中的表达发生显著变化的基因数如表 3 所示。

表 3 差异表达的基因数

Table 3 Number of genes differentially expressed

比较组	上调基因数	下调基因数	总数	差异基因比例/%
S114–2 对 SG–4	1 648	1 251	2 899	31.69
S114–2 对 SJ–3	2 540	1 002	3 542	38.72
SG–4 对 SJ–3	1 150	343	1 493	16.32
114–2 对 SG–4 及 114–2 对 SJ–3	1 388	851	2 239	22.38

上述结果表明,产五肽的菌株 SG–4 和 SJ–3,其差异表达基因比例只有 16.32%,明显比不产五肽的菌株 114–2 要少,这说明产五肽菌株的遗传背景有一定的共性。因此,在后期的比较中重点关注在SG–4 和 SJ–3 中有相同变化趋势的基因, 即 114–2 对 SG–4 及 114–2 对 SJ–3 中的 2 239 个基因(图 4)。



(a)114-2对SG-4差异基因火山图 (b)114-2对SJ-3差异基因火山图

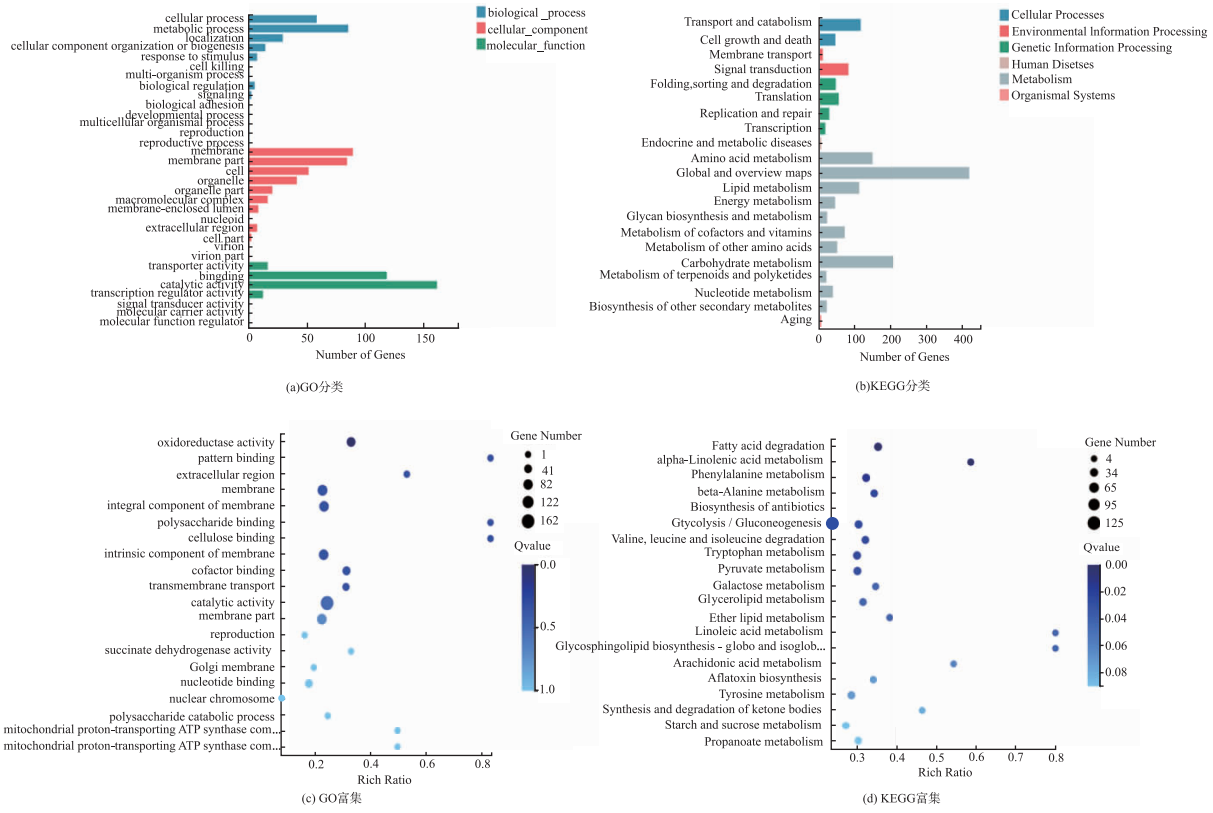
横坐标为 $\log_2$(Fold Change),代表基因在不同样本中表达倍数变化;纵坐标为– $\log_{10}$(FDR),代表 FDR 的变化。

图 4 在 114–2 对 SG–4 和 114–2 对 SJ–3 中的差异表达基因

Fig. 4 Differentially expressed genes in 114–2 vs SG–4 and 114–2 vs. SJ–3

2.4 差异表达基因的功能注释

对于 3 株草酸青霉(114–2,SG–4 和 SJ–3)共同差异表达的基因分别采用 GO (Gene Ontology)和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genesand Genomes)分类,富集分析了其可能的功能及所参与的细胞代谢过程。GO 分类表明,上述 1 823 个基因主要参与生物调节、细胞成分组织或生物发生、细胞进程、代谢过程、大分子复合物、细胞膜、细胞器及催化活性等生物学过程中(图 5(a))。而 KEGG 分类表明差异集中在糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢、物质转运及信号传导过程(图 5(b))。GO 富集表明,差异基因主要在调节催化活性、膜结构与功能、氧化还原代谢等过程中发挥作用(图 5(c)),KEGG 富集表明,差异基因主要集中在抗生素合成、脂肪酸分解和氨基酸代谢等途径(图 5(d))。



(a)与(b)中的 *X* 轴代表 GO 或 KEGG Pathway 上的基因数目,*Y* 轴代表功能或代谢途径分类。(c)与(d)中的 *X* 轴为富集比例,表示选定的基因集中注释到某一条目的基因数与本物种注释到该条目总基因数的比值,计算公式为 Rich Ratio = Term Candidate Gene Num / Term Gene Num;*Y* 轴表示确定的代谢路径,气泡的大小表示差异基因数目,颜色的深浅代表差异显著性大小。

图 5 差异基因表达分析

Fig. 5 Differential gene expression analyses

2.5 NRPS 分析

由于草酸青霉所合成的线性五肽很有可能是由 NRPS 催化合成,因此利用线上分析工具 antiSMASH[20],分析数据库内草酸青霉 114-2 的全基因组序列中可能的 NRPS 基因簇,发现共有 33 个可能的 NRPS。将这些 NRPS 在有参转录组中对应后,分析其相应的表达量(表 4)。分析结果表明,在 33 个 NRPS 中,共有 16 个 NRPS 的表达量与五肽合成的变化趋势一致(这 16 个 NRPS 在表 4 中用粗体给出),因此筛选范围进一步缩小。其中 *PDE_01071* 和 *PDE_01077* 属同一个基因簇,因此共筛选出 15 个基因簇。

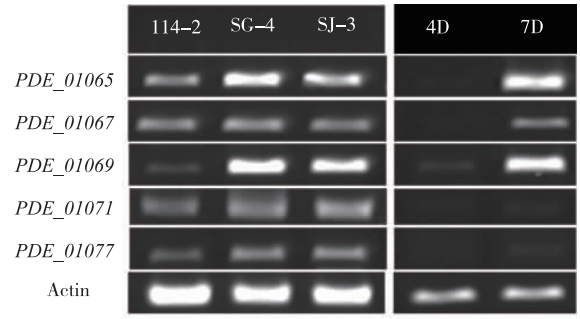
为保证筛选结果的正确性,对部分候选基因进行了 RT-PCR 验证。结果表明,大多基因的表达均与测序结果一致,尤其是 *PDE_01071* 基因簇,该基因簇中有 9 个基因的表达在 3 株菌株中均存在明显差异,相对于不产五肽的草酸青霉 114-2,均为上调基因,而且 RT-PCR 结果与测序表达结果完全一致(图 6(a)),特别是结合了不同时间的表达情况,在生长 4 d 时该基因簇基本不表达(图 6(b)),与五肽的生产时间相吻合,而且该基因簇中有多个甲基转移酶,说明该基因簇可能参与草酸青霉中线性五肽的合成。

表 4 草酸青霉中所有候选 *NRPS* 基因的表达量

Table 4 Expression of all candidate *NRPS* genes in *P. oxalicum*

基因名称	114-2	SG-4	SJ-3	A 结构域个数	基因名称	114-2	SG-4	SJ-3	A 结构域个数
PDE_00789	2.1	2.25	5.24	1	*PDE_04017*	6.81	13.84	13.93	1
PDE_00793	1.78	0.95	3.37	1	*PDE_04252*	0.3	2.47	2.86	1
PDE_00810	0.83	2.79	8.3	2	*PDE_09198*	0.96	4.92	8.54	1
PDE_01212	3.39	7.6	7.32	6	*PDE_02203*	0.13	0.12	0.16	1
PDE_01185	0.02	0.03	0.02	1	*PDE_03304*	146.85	0	0	1
PDE_01071	0.01	0.08	0.99	2	*PDE_04438*	0.97	0	0	1
PDE_01077	0.06	0.53	2.15	1	*PDE_05564*	1.73	3.03	4.96	1
PDE_01432	0.06	0.12	0.26	1	*PDE_06094*	0.02	0.04	0.18	1
PDE_02131	0.34	2.77	3.71	7	*PDE_06630*	0.05	0.03	0.03	1
PDE_02610	0.26	1.17	1.03	4	*PDE_07373*	36.4	21.93	34.69	1
PDE_03416	8.65	0.61	1.49	1	*PDE_08155*	28.43	52.31	79.89	1
PDE_04074	5.06	6.45	7.25	3	*PDE_08329*	0.51	1.18	1.14	1
PDE_04543	0.16	0.43	1.14	3	*PDE_09743*	0.45	0.02	0.42	0
PDE_07005	1.52	5.81	10.51	2	*PDE_08437*	27.72	15.47	39.3	1
PDE_07163	17.83	4.11	5.91	4	*PDE_04436*	–	–	–	1
PDE_01235	8.37	0.16	0.22	1	*PDE_06206*	–	–	–	2
PDE_02141	0.07	0.91	7.13	1					

注:红色表明控制五肽合成的可能性较大;*PDE_04436* 和 *PDE_06206* 是在本次测序中未能对应上的基因,"–"表示没有。



(a)不同菌株RT-PCR验证 (b)SG-4不同培养时间RT-PCR验证

图 6 RT-PCR 验证表达结果

Fig. 6 RT-PCR to verify the expression

3 结 语

本研究基于 BGISEQ-500 测序平台,分析比较了 3 株草酸青霉在培养 7 d 时的转录组测序数据,并基于草酸青霉 114-2 的全基因组进行了有参比对,同时对差异表达基因进行了分析;根据五肽的合成特点,筛选出一个最有可能负责草酸青霉中五肽合成的 NRPS,即 *PDE_01071* 基因簇。值得一提的是,该结果与正在进行的不同生长时期的无参转录组测序结果相吻合(另文发表),所有这些尝试为明确其生物合成机制奠定了基础。后面的工作中,需对基因簇成员进行针对性诱变,在明确酶活性和基因功能的基础上,对其合成机理进行解析。另外,NRPS 催化寡肽合成的过程和机理很复杂,目标产物是五肽,可是表 3 中候选 NRPS 的 A 结构域的数字很少有等于 5 的,这可能是由于在合成中采用了迭代模式。

参考文献:

[1] 杨丽萍. 拮抗菌 PY-1 菌株的鉴定及对油菜菌核病防治潜能的评估[D]. 武汉:华中农业大学,2007.

[2] YANG L,XIE J,JIANG D,et al. Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1-potential antibiotics against plant pathogenic fungi[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2008,24(7):909-915.

[3] LARENA I,SABUQUILLO P,MELGAREJO P. Biocontrol of fusarium and verticillium wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions[J]. **Journal of Phytopathology**,2003,151(9):507-512.

[4] 赵仁邦,靳存华,刘卫华. 草酸青霉 ZHJ6 固定化后对甲胺磷农药降解的影响[J]. 中国农学通报,2012,28(26):247-251.
[5] 廖续中,熊亚茹,王九祥,等. 草酸青霉纤维素酶基因和木聚糖酶基因的调控基因 POX05145 的鉴定[J]. 基因组学与应用生物学,2019,38(5):2034-2036.
[6] 陈莎莎,孙敏,王文超,等. 溶磷真菌固体发酵菌肥对玉米生长及根际细菌群落结构的影响[J]. 农业环境科学学报,2018,37(9):1910-1917.
[7] LIU G,ZHANG L,QU Y,et al. Long-term strain improvements accumulate mutations in regulatory elements responsible for hyper-production of cellulolytic enzymes[J]. **Scientific Reports**,2013,3:1569.
[8] LIU G,ZHANG L,QU Y,et al. Genomic and secretomic analyses reveal unique features of the lignocellulolytic enzyme system of *Penicillium decumbens*[J]. **PLoS One**,2013,8(2):e55185.
[9] 朱莹莹. LaeA 和 LaeA-like 蛋白调控草酸青霉无性发育及糖苷水解酶合成的研究[D]. 济南:山东大学,2015.
[10] ZHAO S,YAN Y S,FENG J X,et al. Comparative genomic transcriptomic and secretomic profiling of *Penicillium oxalicum* HP-7 and its cellulase and xylanase hyper-producing mutant EU2106,and identification of two novel regulatory genes of cellulase and xylanase gene expression[J]. **Biotechnology for Biofuels**,2016,9(1):203.
[11] GRIJSEELS S,POHL C,NIELSEN J C,et al. Identification of the decumbenone biosynthetic gene cluster in *Penicillium decumbens* and the importance for production of calbistrin[J]. **Fungal Biology and Biotechnology**,2018,5:18.
[12] 杨宇纯,肖梅,薛艳红,等. 草酸青霉中新型线性五肽的发现及对柑橘采后致腐菌拮抗活性研究[J]. 微生物学通报,2019,47(2):481-489.
[13] SÜSSMUTH R,MÜLLER J,MOLNÁR I,et al. Fungal cyclooligomer depsipeptides:from classical biochemistry to combinatorial biosynthesis[J]. **Natural Product Reports**,2011,28(1):99-124.
[14] RAMM S,KRAWCZYK B,SÜSSMUTH R D,et al. A Self-sacrificing N-methyltransferase is the precursor of the fungal natural product omphalotin[J]. **Angewandte ChemieInternational Edition**,2017,56(33):9994-9997.
[15] 韩梦瑶,陈晶晶,朱平,等. 非核糖体肽合成酶研究进展[J]. 药学学报,2018,53(7):1080-1089.
[16] 潘园园,刘钢. 中国丝状真菌次级代谢分子调控研究进展[J]. 遗传,2018,40(10):874-887.
[17] REIMER J M,ALOISE M N,HARRISON P M,et al. Synthetic cycle of the initiation module of a formylating nonribosomal peptide synthetase[J]. **Nature**,2016,529:239-242.
[18] TAKEDA K,KEMMOKU K,SATOH Y,et al. N-Phenylacetylation and nonribosomal peptide synthetases with substrate promis-cuity for biosynthesis of heptapeptide variants,JBIR-78 and JBIR-95[J]. **ACS Chemical Biology**,2017,12(7):1813-1819.
[19] ZHAO P,XUE Y,FENG S,et al. Fungi-derived lipopeptide antibiotics developed since 2000[J]. **Peptides**,2019,113:52-65.
[20] STEINIGER C,HOFFMANN S,SÜSSMUTH R D,et al. Harnessing fungal nonribosomal cyclodepsipeptide synthetases for mechanistic insights and tailored engineering[J]. **Chemical Science**,2017,8(11):7834-7843.
[21] PRIETO C,GARCÍA-ESTRADA C,LORENZANA D,et al. NRPSsp:non-ribosomal peptide synthase substrate predictor[J]. **Bioinformatics**,2012,28(3):426-427.
[22] RÖTTIG M,BLIN K,KOHLBACHER O,et al.NRPSpredictor2-a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity [J]. **Nucleic Acids Research**,2011,39:362-367.
[23] 何衍彪,詹儒林,常金梅,等. 基于 RNA-Seq 高通量测序技术的菠萝洁粉蚧转录组研究[J]. 基因组学与应用生物学,2019,38(9):3912-3918.