

研究报告

## 桑氏链霉菌 KJ40 全基因组测序及分析

张博阳 朱天辉\* 韩珊 王莹 李姝江 谯天敏

(四川农业大学林学院 四川 成都 611130)

**摘要:**【背景】桑氏链霉菌(*Streptomyces sampsonii*) KJ40 是一株具有防病、促生多重功能的放线菌,有作为生物农药的潜力。目前还没有相关研究报道 *S. sampsonii* 全基因组序列,这限制了其功能基因、代谢产物合成途径及比较基因组学等研究。【目的】解析 *S. sampsonii* KJ40 的基因组序列信息,以深入研究该菌株防病促生机制及挖掘次级代谢产物基因资源。【方法】利用 Illumina HiSeq 高通量测序平台对 KJ40 菌株进行全基因组测序,使用相关软件对测序数据进行基因组组装、基因预测和功能注释、预测次级代谢产物合成基因簇、共线性分析等。【结果】基因组最后得到 9 个 Scaffolds 和 578 个 Contigs,总长度为 7 261 502 bp, G+C% 含量平均为 73.41%, 预测到 6 605 个基因、1 260 个串联重复序列、804 个小卫星序列、67 个微卫星序列、90 个 tRNA、9 个 rRNA 和 19 个 sRNA。其中,2 429、3 765、2 890、6 063 和 1 911 个基因分别能够在 COG、GO、KEGG、NR 和 Swiss-Prot 数据库提取到注释信息。同时,还预测得到 21 个次级代谢产物合成基因簇。基因组测序数据提交至 NCBI 获得 GenBank 登录号: LORI000000000。*S. sampsonii* KJ40 与 *Streptomyces coelicolor* A3(2)、*Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 三株链霉菌基因组存在翻转、易位等基因组重排,3 个基因组共有 1 711 个蛋白聚类簇。【结论】研究为从基因组层面上解析 KJ40 菌株具有良好促生防病效果的内在原因提供基础数据,为深入了解链霉菌次级代谢合成途径提供参考信息,对 *S. sampsonii* 后续相关研究具有重要意义。

**关键词:** 桑氏链霉菌, 基因组, 基因注释, 次级代谢, 比较基因组分析

## Whole-genome sequencing and analysis of *Streptomyces sampsonii* KJ40

ZHANG Bo-Yang ZHU Tian-Hui\* HAN Shan WANG Ying LI Shu-Jiang  
QIAO Tian-Min

(College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

**Abstract:** [Background] *Streptomyces sampsonii* KJ40 is an actinomycete with functions of disease prevention and promoting plant growth, it has the potential as a biological pesticide. However, there

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31070578); Sichuan Provincial Department of Education Key Project (14ZA0015)

\*Corresponding author: Tel: 86-28-86291456; E-mail: zhuth1227@126.com

Received: May 25, 2017; Accepted: September 12, 2017; Published online (www.cnki.net): October 16, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(31070578); 四川省教育厅重点项目(14ZA0015)

\*通信作者: Tel: 86-28-86291456; E-mail: zhuth1227@126.com

收稿日期: 2017-05-25; 接受日期: 2017-09-12; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-10-16

is no relevant study in the genome of *S. sampsonii* until now, limiting the research of its functional genes, metabolites synthesis pathway and comparative genomics etc. **[Objective]** To analyze the genome information of the *S. sampsonii* KJ40 strain, and to research the mechanism of functions of the strain, and its secondary metabolite genes. **[Methods]** The whole genome of KJ40 strain was sequenced on the Illumina HiSeq platform, and then sequenced reads were assembled, the genes were predicted, the gene annotation, secondary metabolite biosynthesis and synteny were also analyzed with softwares. **[Results]** In the whole genome, 9 scaffolds and 578 contigs were obtained. The total length was 7 261 502 bp, the average GC content was 73.41%. It contained 6 605 genes, 1 260 tandem repeat sequences, 804 minisatellite DNAs, 67 microsatellite DNAs, 90 tRNAs, 9 rRNAs, and 19 sRNAs. Among them, 2 429, 3 765, 2 890, 6 063 and 1 911 genes were able to annotate in COG, GO, KEGG, NR and Swiss-Prot databases respectively. 21 secondary metabolite biosynthetic gene clusters were also obtained. The sequencing data from this article are available in the GenBank database (accession number LORI00000000). There were 1 711 proteins clustered among *S. sampsonii* KJ40, *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350. The analysis of synteny indicated that genome rearrangement and translocation happened among these genomes. **[Conclusion]** Our results show the genome information of KJ40 strain, it gives evidence that KJ40 is linked to disease prevention and promoting plant growth, and provided reference for understanding secondary metabolic synthesis pathway of *Streptomyces*, which is of great significance to the future research of *S. sampsonii*.

**Keywords:** *Streptomyces sampsonii*, Genome, Gene annotation, Secondary metabolism, Comparative genomic analysis

链霉菌属(*Streptomyces*)是一类严格好氧、具有高度分枝基内菌丝的革兰氏阳性细菌<sup>[1]</sup>, 是土壤中最常见的微生物类群之一<sup>[2]</sup>。链霉菌属最显著的特点是它复杂的发育周期和大量有生物活性的次级代谢产物, 其独特的生长发育周期需要特殊的代谢机制, 在这个过程中常伴随着次级代谢产物的产生<sup>[3]</sup>。目前, 市场上销售的抗生素超过 2/3 的种类来自链霉菌属。链霉菌属所产次级代谢产物涉及生物碱<sup>[4]</sup>、萜醌<sup>[5]</sup>、内酯<sup>[6]</sup>、黄酮<sup>[7]</sup>及酚<sup>[5]</sup>等, 除广泛应用的抗生素外, 还包括抗肿瘤<sup>[7]</sup>、抗细菌、抗真菌<sup>[8]</sup>、抗病毒<sup>[9]</sup>、抗寄生<sup>[5]</sup>、抗虫<sup>[10]</sup>、抑制酶活<sup>[11]</sup>等活性的代谢复合物, 以及胞外水解酶如淀粉酶<sup>[12]</sup>、几丁质酶<sup>[13]</sup>、纤维素酶<sup>[14]</sup>、果胶酶<sup>[15]</sup>、木聚糖酶<sup>[16]</sup>和蛋白酶<sup>[17]</sup>等。链霉菌属的次级代谢产物结构多样而且复杂, 决定了其生物活性的多样性, 被广泛应用于农业、畜牧业和医药健康行业, 对人类的生产生活至关重要。

链霉菌属的基因组往往具有很高的 G+C% 含量 (66%–74%), 染色体呈线状, 具有复杂结构, 是目

前已知最大的原核生物基因组。链霉菌属的模式菌株——天蓝色链霉菌 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)] 的全基因组测序于 2001 年在英国剑桥 Sanger 中心完成<sup>[18]</sup>, 这是放线菌中第一个完成全基因组测序的种。截至 2017 年 3 月, NCBI (National Center of Biotechnology Information, 美国国家生物技术信息中心, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上的数据显示与链霉菌相关的项目 889 个, 其中基因组测序的项目 261 个, 有 706 个链霉菌基因组公布, 其中 433 个是只鉴定到链霉菌属而未鉴定到种的菌株。随着测序技术的快速发展和测序价格的大幅下降, 越来越多的链霉菌基因组被测序, 更多链霉菌基因组数据的补充使其基因组的研究更加深入。

目前已经从健康的卫矛科树木 (*Maytenus aquifolia* Mart.)<sup>[19]</sup>、土壤<sup>[12-13,17,20-21]</sup>、长木蜂蜂粮<sup>[22]</sup>、海绵<sup>[23]</sup>、海洋沉积物<sup>[24-25]</sup>和药用植物<sup>[26]</sup>中分离到桑氏链霉菌 (*Streptomyces sampsonii*)。 *S. sampsonii* 具有明显的抗真菌活性, 能够抑制多种真菌生长, 如白色念珠菌 (*Candida albicans*)、黑曲霉菌

(*Aspergillus niger*)、石膏样小孢子菌(*Microsporium gypseum*)、毛癣菌属(*Trichophyton* sp.)<sup>[20]</sup>、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、阿切尔拟茎点霉(*Phomopsis archeri*)<sup>[12]</sup>和紫丝核菌(*Rhizoctonia violacea*)<sup>[13]</sup>等真菌。*S. sampsonii* 能够产多种胞外水解酶,其培养液和粗酶液能够抑制根结线虫卵的孵化并对幼虫有致死作用,促进番茄植株生长<sup>[17]</sup>;其代谢产物粗提物具有抗多形性胶质母细胞瘤(*Glioblastoma multiforme*, GBM)的能力<sup>[26]</sup>。*S. sampsonii* KJ40 是本实验室从四川省健康的杨树根际土壤中分离并保存的新菌株,对杨树紫纹羽病病原菌 *R. violacea* 有较好拮抗效果,具有防病、促生多重功能,在生产中能够发挥促生、增产和防病作用<sup>[27]</sup>,表现出了较好的应用前景,有作为生物农药的潜力。现阶段国内外关于 *S. sampsonii* 的研究主要集中在其抗菌、抗虫、抗肿瘤、促生等生物活性以及活性物质的分离纯化上,对其分子水平的研究仅限于菌种鉴定和近缘菌种系统发育。*S. sampsonii* 全基因组序列相关研究还未见报道,这限制了其功能基因、代谢产物合成途径以及比较基因组学等研究。本研究利用 Illumina HiSeq 高通量测序平台对 *S. sampsonii* 进行全基因组测序,同时对基因序列进行基因预测和功能注释,并预测了次级代谢产物合成基因簇,进行了比较基因组学研究,为揭示 *S. sampsonii* 生防作用机制、功能基因的挖掘与利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

牛肉膏、蛋白胨、氯化钠、琼脂等购于北京奥博星生物技术有限公司。离心机购于 Beckman 公司。

### 1.2 供试菌株

桑氏链霉菌(*Streptomyces sampsonii*) KJ40 为四川农业大学林学院森林保护林木病理实验室分离并保存。该菌株已于 2012 年 4 月 13 日保藏在北京市中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中

心,保藏编号为 CGMCC 5996。

### 1.3 *S. sampsonii* KJ40 的培养与基因组 DNA 提取

KJ40 菌株接种至牛肉膏蛋白胨(NA)培养基,25 °C 活化培养 4 d,然后转接至三角瓶液体培养基于 25 °C、140 r/min 培养 4 d,12 000 r/min 离心 20 min 收集菌体送至华大基因公司进行全基因组测序。

### 1.4 基因组测序和组装

同华大基因(深圳)公司合作,采用 Illumina 公司的 Paired-End 技术构建小片段和大片段基因组文库,其插入序列大小为 500 bp 和 6 000 bp,通过 Illumina HiSeq 4000 平台对基因组进行测序。原始的测序数据(Raw data)经过低质量 Reads 的过滤及去除含 N 碱基较多和 Adapter 污染的 Reads,获得高质量的 Reads 序列。运用 SOAPdenovo (Version 2.04)短序列组装软件<sup>[28-29]</sup>对 Clean Data 进行组装,经多次调整后,主要参数 *K* 设置为 37 获得最优组装结果,然后将 Reads 比对回组装获得的 Contigs 上,再根据 Reads 的 Paired-end 和 Overlap 关系,对组装结果进行局部组装和优化。

### 1.5 基因组组分析

获得 KJ40 菌株全基因组数据之后,应用相关软件对基因组进行结构分析,包括编码基因、重复序列和非编码 RNA 的预测。采用 Glimmer (Version 3.02)软件<sup>[30-32]</sup>进行组装结果的基因预测。通过 TRF (Tandem repeat finder) (Version 4.04)<sup>[33]</sup>软件预测串联重复序列,并根据重复单元长度及数目筛选出其中的微卫星以及小卫星序列。通过与 rRNA 库比对找到 rRNA,或通过 RNAmmer (Version 1.2)<sup>[34]</sup>软件预测得到 rRNA;通过 tRNAscan (Version 1.23)<sup>[35]</sup>软件预测 tRNA 区域和 tRNA 的二级结构;通过 Infernal 软件与 Rfam (Version 9.1)<sup>[36]</sup>数据库进行比对得到 sRNA。

### 1.6 基因通用功能注释

将基因的氨基酸序列分别与 GO (Gene ontology)、KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and

genomes)、COG (Cluster of orthologous groups of proteins)、Swiss-Prot、NR (Non-redundant protein database)数据库进行比对,完成蛋白序列功能注释。

### 1.7 次级代谢产物合成基因簇预测分析

antiSMASH<sup>[37]</sup>软件是一款专门用于细菌和真菌抗生素及次级代谢产物合成基因簇预测的专业软件。运用 antiSMASH 软件对 *S. sampsonii* KJ40 中次级代谢产物合成基因簇及其可能合成的化合物核心结构进行预测分析。

### 1.8 比较基因组学分析

将 *S. sampsonii* KJ40 的基因组序列根据参考菌 [*S. coelicolor* A3(2)和 *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350]的基因组序列基于 Mummer<sup>[38]</sup> 比对结果进行排序,然后根据 2 个基因组的总长度,将序列按一定比例缩小后,分别构建二维共线性图中的 X、Y 坐标轴,以及线性共线性图中的上、下坐标轴。做 BLAST 比对,将比对上的核酸序列区域,根据其位置信息按相同比例缩小后标到图上。利用 BLASTClust 对 KJ40 和参考基因组进行蛋白聚

类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组组装结果和基因组组分分析

*S. sampsonii* KJ40 基因组最后得到 9 个 Scaffolds 和 578 个 Contigs,总长度为 7 261 502 bp, G+C% 含量平均为 73.41%, N50 和 N90 的长度均为 7 182 059 bp, 占基因组总长度的 98.9%。基因组预测到 6 605 个基因,总长度为 6 372 177 bp, 平均长度为 965 bp, 占基因组全长的 87.75%。串联重复序列 1 260 个,总长为 136 306 bp,大小为 1–1 737 bp, 占基因组全长的 1.877 1%, 小卫星序列 804 个, 微卫星序列 67 个。*S. sampsonii* KJ40 基因组与部分已经完成基因组测序的链霉菌比较,与 *Streptomyces albidoflavus* NRRL B-1271、*Streptomyces albus* J1074、*Streptomyces exfoliates* NRRL B-2924 和 *Streptomyces globisporus* C-1027 基因组大小相近, G+C% 含量也与表 1 所列 11 种链霉菌相近,符合链霉菌基因组的基本特征。*S. sampsonii* KJ40 基因组测序数据提交至 NCBI, GenBank 登录号为 LORI00000000。

表 1 *S. sampsonii* KJ40 与其他部分链霉菌基因组比较

Table 1 Genome characters comparison of *S. sampsonii* KJ40 with other *Streptomyces*

菌株 Strain	基因组总长度 Total length of genome (bp)	Scaffolds 数量 Scaffolds number	G+C% 含量 G+C% content (%)	预测基因数 Predicted gene number	GenBank accession No.
<i>Streptomyces sampsonii</i> KJ40	7 261 502	9	73.41	6 605	LORI00000000
<i>Streptomyces albidoflavus</i> NRRL B-1271	7 084 693	115	73.40	6 057	JOI00000000.1
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	8 667 507	1	71.98	7 910	NC_003888.3
<i>Streptomyces albus</i> J1074	6 841 649	1	73.30	5 879	NC_020990.1
<i>Streptomyces exfoliates</i> NRRL B-2924	7 874 957	129	71.90	6 993	NZ_JNZP00000000.1
<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350	8 545 929	1	72.20	7 089	NC_010572.1
<i>Streptomyces somaliensis</i> DSM 40738	5 176 903	243	74.10	4 624	NZ_AJJM00000000.1
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> DSM 40736	8 548 109	1	70.80	7 589	NZ_ACEZ00000000.1
<i>Streptomyces globisporus</i> C-1027	7 608 611	1	71.55	6 730	NZ_CP013738.1
<i>Streptomyces resistomycificus</i> NRRL ISP-5133	9 098 934	141	69.70	8 924	NZ_JOBA00000000.1
<i>Streptomyces griseochromogenes</i> ATCC 14511	10 764 674	1	70.80	9 449	NZ_CP016279.1

*S. sampsonii* KJ40 基因组圈图见图 1, 基因组含有 90 个 tRNA、9 个 rRNA 和 19 个 sRNA, 有 2 429 个基因成功获得 COG 功能注释。COG 聚类分析发现其蛋白质功能主要集中在一般功能预测(General function prediction only) (405 个基因)、氨基酸代谢及转运(Amino acid transport and metabolism) (323 个基因)、转录(Transcription) (261 个基因)、碳水化合物转运和代谢(Carbohydrate transport and metabolism) (201 个基因)、能量产生及传递(Energy production and conversion) (198 个基因)、无机离子转运与代谢(Inorganic ion transport and metabolism) (189 个基因)、脂质转运与代谢(Lipid transport and metabolism) (170 个基因)、翻译、核糖体结构和生物合成

(Translation, ribosomal structure and biogenesis) (160 个基因)、次生代谢产物的合成、转运和代谢(Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism) (146 个基因)这些方面, 上述各功能注释的基因占 COG 功能注释总基因数的百分比依次为 16.7%、13.3%、10.7%、8.3%、8.2%、7.8%、7.0%、6.6%、6.0%。基因组 GC skew 在前导链中是正值, 而在滞后链中为负值, 在大多数原核基因组中, 前导链和滞后链在碱基组成上存在很明显的不同, 前导链富含 G 和 T, 而滞后链中的 A 和 C 更多一些<sup>[39]</sup>。

## 2.2 基因通用功能注释

### 2.2.1 GO 功能分类

*S. sampsonii* KJ40 基因组中, 3 765 个基因能够

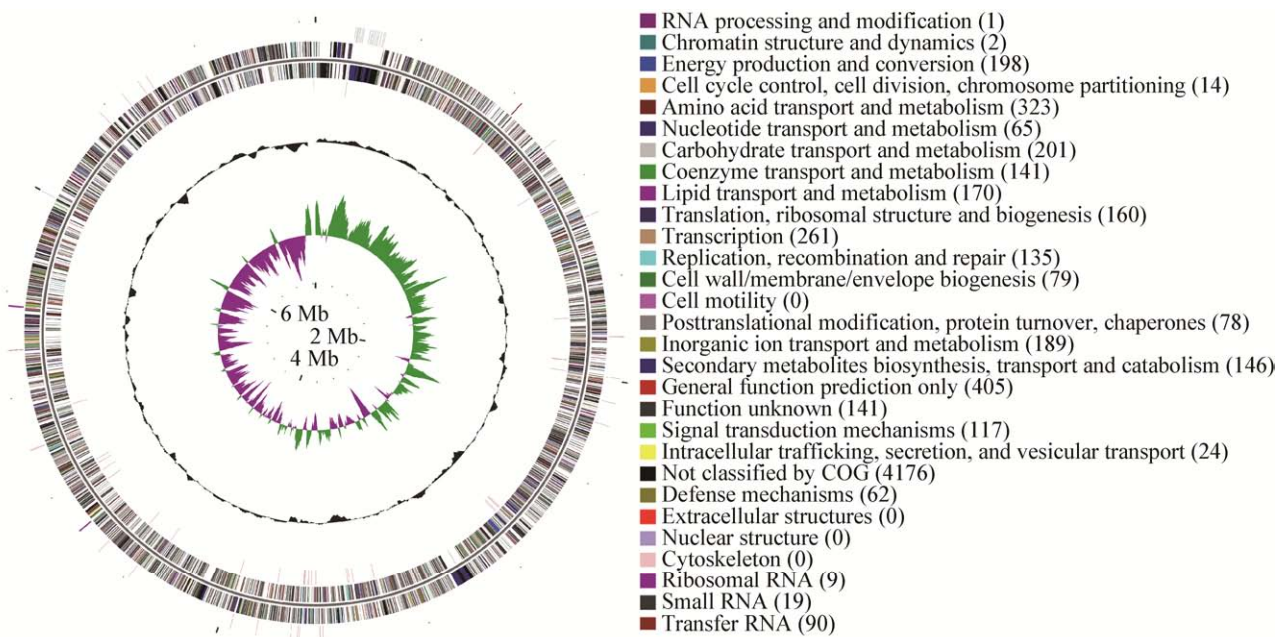


图 1 *S. sampsonii* KJ40 基因组圈图

Figure 1 Genomic map of the *S. sampsonii* KJ40

注: 由外至内, 第 1 圈表示正链的 ncRNA 分布, 包括 tRNA、rRNA 及 sRNA 三种类型(可参见右侧说明); 第 2 圈表示正链的 COG 注释基因分布, 以不同的颜色区分(可参见右下角说明); 第 3 圈表示负链的 COG 注释基因分布; 第 4 圈表示负链的 ncRNA 分布; 第 5 圈(黑色)表示 G+C% 含量, 以平均 G+C% 为基准线, 向外突出的表示高于均值, 向内突出的表示低于均值; 第 6 圈为 GC skew 值, 紫色表示小于 0, 绿色表示大于 0。

Note: From the outer to inner circle, the first circle is the distribution of sense strand of ncRNA, including tRNA, rRNA and sRNA; The second is the COG annotated genes of sense strand; The third is the COG annotated genes of antisense strand; The fourth circle is the distribution of antisense strand of ncRNA; The fifth circle is the GC content, the GC mean is the baseline, outward to the fourth circle represented GC content is higher than baseline, and inward is the opposite; The sixth is the value of GC skew, purple mean less than 0, green is shown opposite.

在 GO 数据库提取到注释信息, 按各基因功能可将其分为生物学过程(Biological process) (16 个分支)、细胞组分(Cellular component) (8 个分支)和分子功能(Molecular function) (9 个分支)三大亚类, 共 33 个分支(图 2)。其中, 生物学过程类别中涉及基因最多的是细胞过程和代谢过程, 细胞组分类别中涉及基因最多的是细胞和细胞部分, 分子功能类别中涉及基因最多的是结合和催化活性。GO 功能注释可以对所获得的预测基因进行深层次的标准化功能分类, 将更加便于研究者们理解基因背后所代表的生物学意义。

### 2.2.2 KEGG 代谢途径分析

KEGG 富集分析显示(图 3), 能对应到 KEGG pathway 的 2 890 个基因富集在 176 条代谢通路中, 其中涉及基因最多的通路主要有: 嘌呤代谢途径

(ko00230) (88 个基因), 糖酵解途径(ko00010) (75 个基因), 丁酸代谢途径(ko00650) (72 个基因), 氨基糖和核苷酸糖代谢(ko00520) (59 个基因), 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解途径(ko00280) (58 个基因), 以及精氨酸和脯氨酸代谢途径(ko00330) (58 个基因)。

### 2.2.3 Swiss-Prot 数据库和 NR 数据库注释

NR 全称为 Non-redundant protein database, 是一个非冗余的蛋白质数据库, 其特点在于内容比较全面, 但可靠性有待提高, 经过比对, *S. sampsonii* KJ40 基因组中有 6 063 个基因在 NR 数据库上得到注释。Swiss-Prot 是经过注释的蛋白质序列数据库, 其特点是可靠性较高, *S. sampsonii* KJ40 基因组中有 1 911 个基因的蛋白序列功能在该数据库中得到有意义的注释。

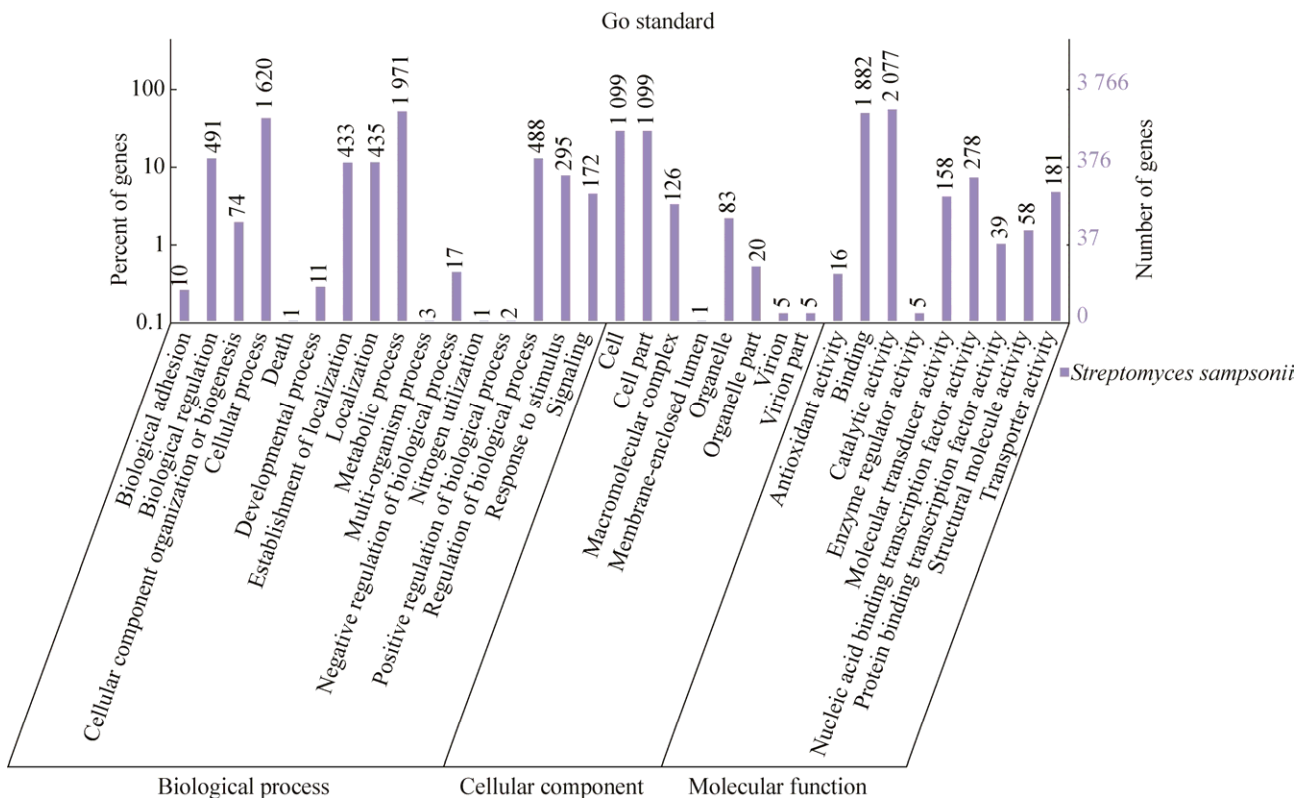
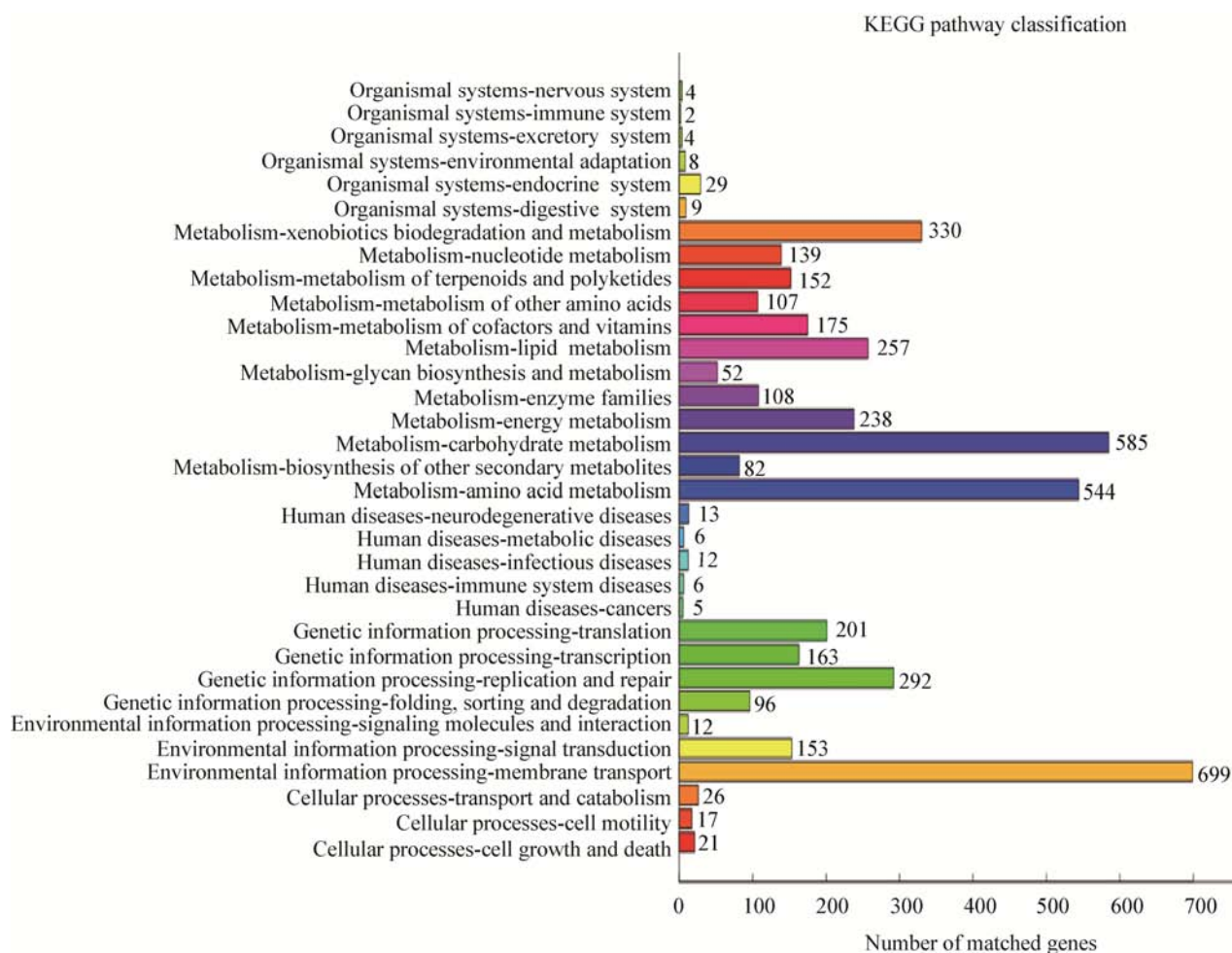


图 2 *S. sampsonii* KJ40 GO 功能分类图

Figure 2 GO functional classification map of *S. sampsonii* KJ40

图 3 *S. sampsonii* KJ40 KEGG 代谢通路二级分类图Figure 3 KEGG classification of metabolic pathways map of *S. sampsonii* KJ40

### 2.3 次级代谢产物合成基因簇预测分析结果

antiSMASH 软件预测 *S. sampsonii* KJ40 基因组得到 21 个基因簇(表 2)。其中, 编码聚酮合酶(Polyketide synthase, PKS)和非核糖体多肽合成酶(Non-ribosomal peptide synthase, NRPS)基因簇 10 个, 占预测到的基因簇总和的 47.6%, 6 个 NRPS 类型, 2 个 T1 PKS-NRPS, T2 PKS 和 T3 PKS 各 1 个, 剩下的 11 个基因簇主要参与了萜烯类、细菌素、四氢嘧啶类、铁载体、羊毛肽和丁内酯等化合物的合成。*S. sampsonii* KJ40 基因组编码的 2 个羊毛肽基因簇中, Cluster 1 与 *Streptomyces* sp. S4 参与抗霉素(Antimycin)合成基因簇的相似性为 100%, Cluster

10 与 *Streptomyces albus* 基因簇(Class 3 lantipeptide)的相似性为 100%。另外, Cluster 4 与 *Streptomyces anulatus* 的四氢嘧啶(Ectoine)合成基因簇的相似性为 100%, Cluster 5 与 *Streptomyces griseus* 的铁载体(Siderophore, Desferrioxamine B)合成基因簇的相似性为 100%, Cluster 18 与 *Streptomyces griseus* 的多环含特特拉姆酸大环内酰胺(Polycyclic tetramate macrolactams, PTMs)合成基因簇的相似性为 100%, Antimycin、Ectoine 和 Desferrioxamine B 的结构见图 4。预测得到的结果表明 *S. sampsonii* KJ40 具有合成多种次级代谢产物的潜力和基因元件, 具体能否合成这些次级代谢产物还与其培养条件等因素

表 2 *S. sampsonii* KJ40 次级代谢产物合成基因簇Table 2 Gene clusters of secondary metabolite of *S. sampsonii* KJ40

基因簇编号 Cluster ID	基因簇类型 Cluster type	起始位置 Start	终止位置 End	基因数 Gene number	最相似的已知基因簇 Most similar known cluster	相似基因比例 Ratio of genes show similarity (%)
Cluster 1	Lantipeptide-T1 PKS-NRPS	15 005	278 888	94	Antimycin biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces</i> sp. S4	100
Cluster 2	T3 PKS	305 539	321 150	17	Herboxidiene biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces chromofuscus</i>	7
Cluster 3	Bacteriocin-Terpene	433 602	457 492	27	Isorenieratene biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces griseus</i>	85
Cluster 4	Ectoïne	1 239 175	1 249 573	11	Ectoïne biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces anulatus</i>	100
Cluster 5	Siderophore	2 158 635	2 169 019	9	Desferrioxamine B biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces griseus</i>	100
Cluster 6	NRPS	2 414 234	2 447 244	29	—	—
Cluster 7	NRPS	2 950 359	3 061 543	50	Desotamide biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces Scopuliridis</i>	18
Cluster 8	NRPS	3 319 098	3 369 738	43	Gobichelin biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces</i> sp. NRRL.	27
Cluster 9	NRPS	4 085 120	4 122 908	19	Mannopeptimycin biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	40
Cluster 10	Lantipeptide	4 160 679	4 178 831	14	SAL-2242 biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces albus</i>	100
Cluster 11	Thiopeptide	4 474 826	4 497 435	17	—	—
Cluster 12	Terpene	4 997 809	5 018 783	20	—	—
Cluster 13	Terpene	5 334 743	5 357 028	21	Kanamycin biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1
Cluster 14	Siderophore	5 609 480	5 624 619	11	—	—
Cluster 15	Bacteriocin	5 976 848	5 988 176	11	—	—
Cluster 16	Bacteriocin	6 438 915	6 449 130	9	—	—
Cluster 17	Terpene	6 519 566	6 541 837	24	Hopene biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces coelicolor</i>	69
Cluster 18	T1 PKS-NRPS	6 594 803	6 624 755	17	SGR PTMs biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces griseus</i>	100
Cluster 19	NRPS	6 799 695	6 863 723	44	A40926 biosynthetic gene cluster from <i>Nonomuraea</i> sp. ATCC	3
Cluster 20	NRPS	6 876 144	6 916 537	37	Tetronasin biosynthetic gene cluster from <i>Streptomyces longisporoflavus</i>	3
Cluster 21	T2 PKS-Butyrolactone-Ectoïne	7 053 430	7 110 409	55	Kosinostatin biosynthetic gene cluster from <i>Micromonospora</i> sp. TP-A0468	47

Note: —: No similar genes predicted.

有关, 由于 *S. sampsonii* KJ40 的次级代谢产物相关文献报道较少, 未能就预测的次级代谢产物与其分离得到的已知次级代谢产物对应上。

## 2.4 比较基因组学分析

*S. coelicolor* A3(2)作为链霉菌属的模式菌株,

是最具代表性的土壤链霉菌, 可以产生很多天然活性化合物。由 NCBI 上数据分析发现, *S. sampsonii* KJ40 与 *S. coelicolor* A3(2)、*S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 相似性较高。*S. sampsonii* KJ40 基因组与 *S. coelicolor* A3(2)、*S. griseus* subsp. *griseus*



NBRC 13350 全基因组进行共线性分析, 结果见图 5。由图 5 可以看出, 3 株链霉菌基因组存在翻转、易位等基因组重排。利用 BLASTClust 对 *S. sampsonii* KJ40、*S. coelicolor* A3(2)、*S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 全基因组的蛋白进行聚类分析, 如图 6 所示, 1 711 个蛋白聚类簇为 3 个基因组共有的, 共有蛋白聚类簇中含有 *S. sampsonii* KJ40 的 3 205 个蛋白(占 *S. sampsonii* KJ40 参与比对总蛋白的 71%)、*S. coelicolor* A3(2)的 3 066 个蛋白[占 *S. coelicolor* A3(2)参与比对总蛋白的 75%]、*S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 的 3 009 个蛋白(占 *S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 参与比对总蛋白的 73%)。413 个蛋白聚类簇仅 *S. sampsonii* KJ40 与 *S. coelicolor* A3(2)共有, 525 个蛋白聚类簇仅 *S. sampsonii* KJ40 与 *S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 共有, 91 个蛋白聚类簇仅 *S. sampsonii* KJ40 含有, 在其他 2 个基因组中不存在。

### 3 讨论与结论

微生物基因组学理论和测序技术的发展为研究者们从阐明单个基因的功能向解析整个基因组

的表达调控提供了坚实的数据基础, 使我们能够快速、经济地完成微生物的全基因组测序和功能注释<sup>[40]</sup>。通过对链霉菌基因组序列的分析发现, 大量基因都涉及到了调控、转运、环境适应以及各种次级代谢活动, 对认识链霉菌的多样性、环境适应性以及链霉菌产生各种生物活性物质具有重要意义。国内外对 *S. sampsonii* 防病促生机制的研究很少, 对其研究主要有: 产生的蛋白水解酶类活力<sup>[41-42]</sup>; 抗药菌株的选育<sup>[43]</sup>; 抗菌活性物质的分离纯化<sup>[23]</sup>, 如抗菌蛋白<sup>[44]</sup>、七烯抗生素<sup>[20,45]</sup>。此前 *S. sampsonii* 基因组序列相关研究的空白及其分子水平研究的局限限制了其功能基因挖掘、代谢产物合成途径以及分子遗传等研究。本研究对 *S. sampsonii* 全基因组序列的测定, 为从基因组层面上解析其具有良好促生防病效果的内在原因奠定基础。

链霉菌属是公认的次级代谢产物主要来源, 次级代谢产物是指微生物生长到一定阶段才产生的化学结构十分复杂、对该生物无明显生理功能或并非是微生物生长和繁殖所必需的物质<sup>[46]</sup>。通过高通量测序手段, 解析链霉菌属次级代谢途径已经成为一种趋势。本研究中 COG 数据库注释到

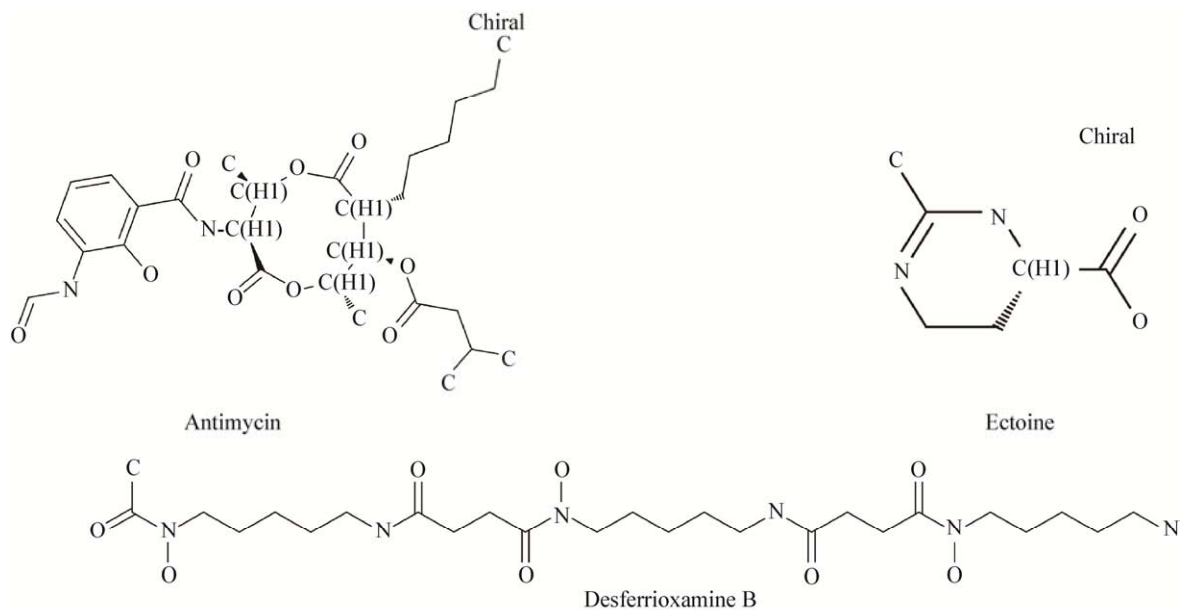


图 4 *S. sampsonii* KJ40 最相似的已知基因簇合成化合物结构

Figure 4 The structures of known gene clusters which are homologous to *S. sampsonii* KJ40

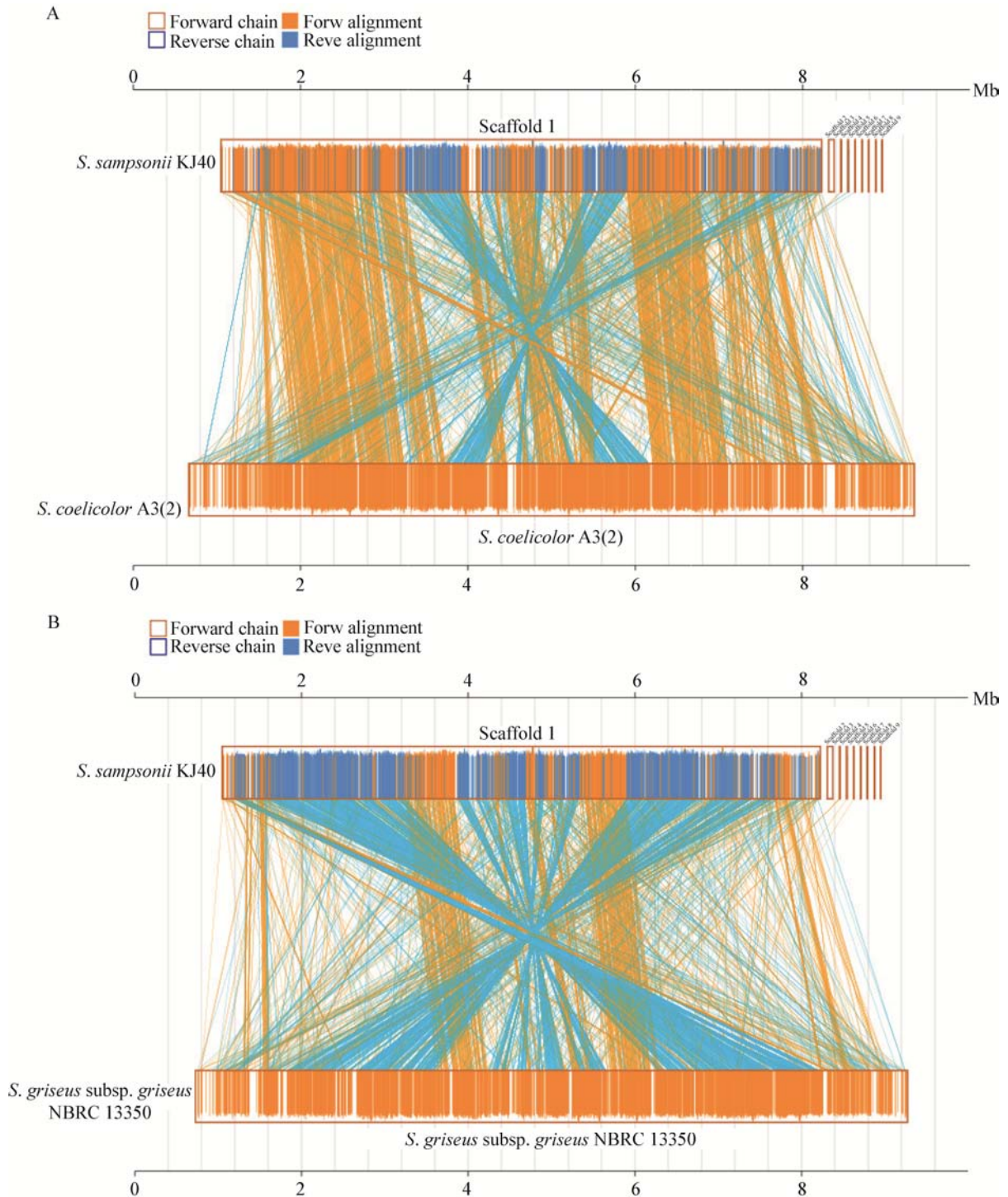


图 5 *S. samsonii* KJ40 与 *S. coelicolor* A3(2)和 *S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 的共线性分析

Figure 5 Synteny analysis of *S. samsonii* KJ40, *S. coelicolor* A3(2) and *S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350

注: A: *S. samsonii* KJ40 与 *S. coelicolor* A3(2)的共线性分析; B: *S. samsonii* KJ40 与 *S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 的共线性分析.

Note: A: Synteny analysis of *S. samsonii* KJ40 with *S. coelicolor* A3(2); B: Synteny analysis of *S. samsonii* KJ40 with *S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350.

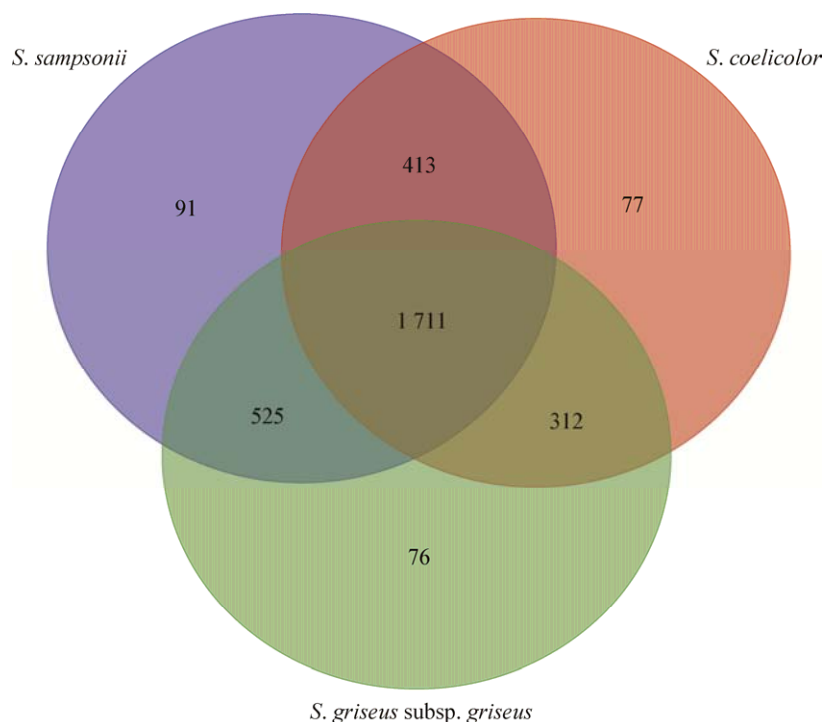


图 6 BLASTClust 蛋白聚类分类图

**Figure 6 BLASTClust classification of proteins into clusters**

注: *S. sampsonii* KJ40 的 4 510 个和 *S. coelicolor* A3(2) 的 4 084 个及 *S. griseus subsp. griseus* NBRC 13350 的 4 109 个蛋白参与分类. 图中所示的是共有和特有的聚类簇, 不是蛋白.

Note: A total protein of *S. sampsonii* KJ40 is 4 510, *S. coelicolor* A3(2) and *S. griseus subsp. griseus* is 4 084 and 4 109 separately. The number of in the figure means gene clusters.

*S. sampsonii* KJ40 基因组中有 146 个基因参与了次生代谢产物的合成、转运和代谢, 占注释到的总基因数的 6.0%。antiSMASH 软件预测到 *S. sampsonii* KJ40 基因组有 21 个次级代谢产物合成基因簇, 同时预测到 8 个化合物核心结构。基因簇类型有 NRPS、T1 PKS-NRPS、T2 PKS 和 T3 PKS, 其它还有参与萜烯、细菌素、四氢嘧啶、铁载体、羊毛肽和丁内酯等合成的基因簇。放线菌的大部分活性次级代谢产物由 PKS 途径和 NRPS 途径合成。PKS 基因广泛存在于细菌、真菌以及植物基因组之中, 其聚酮化合物产物是一大类具有广谱生物活性的化合物, 如抗真菌、抗细菌、抗肿瘤活性、免疫抑制剂活性、酶抑制剂活性等<sup>[47]</sup>。细菌和真菌在体内多肽的生物合成中, 会利用一种特殊的 NRPS 合成系统生成一些重要的多肽类物质, 包括青霉素、万古霉素、放线菌素 D、杆菌肽和环孢菌素 A 等<sup>[48]</sup>。

antiSMASH 软件还预测到基因组中存在与已知基因簇——抗霉素、羊毛肽、四氢嘧啶、铁载体、多环含特特拉姆酸大环内酰胺合成基因簇相似性较高的基因簇。抗霉素类化合物具有广泛的生物活性, 早期引起关注主要是抗霉素作为线粒体呼吸链电子传递抑制剂引起的抗真菌、抗虫及其杀鱼毒性<sup>[49]</sup>。Seipke 等<sup>[50]</sup>分析了链霉菌 *Streptomyces* sp. S4 的抗霉素 A 生物合成基因簇, 揭示了抗霉素类化合物生物合成主要是由 PKS 和 NRPS 共同催化完成的, *S. sampsonii* 基因组抗霉素合成基因簇所在 Cluster 1 中也预测到有 T1 PKS-NRPS。多数微生物会通过胞质内形成并积累相容性溶质来适应外部渗透压的变化<sup>[51]</sup>。其中, 四氢嘧啶类化合物作为细菌界分布最广泛的一类相容性溶质, 对嗜盐菌和非嗜盐菌都有很好的渗透压保护功能, 具有广泛的生物活性与药理活性<sup>[52]</sup>。一些研究表明, 铁载体不仅

对微生物的铁营养至关重要,而且它是根际促生细菌(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)抑制土壤病害的重要机制<sup>[53]</sup>,具有铁载体合成能力的微生物通过竞争铁元素,不仅能够改善自身的营养状况,还能够供给植物铁营养或通过与植物病原菌竞争铁营养达到生物防治的作用<sup>[54]</sup>。多环含特特拉姆酸大环内酰胺类似物是一类来自微生物或海绵的具有良好生物活性的天然产物<sup>[55]</sup>。在对基因组背景信息了解的基础上,可通过基因工程技术将次级代谢产物合成基因簇转移至不同的异源宿主中表达,这不仅能够激活沉默的生物合成基因簇,而且可将异源表达体系作为一个非常有用的工具通过组合生物合成生产更多结构新颖、功能独特的化合物<sup>[56]</sup>。在 *S. sampsonii* 基因组中发现这些参与抗菌、抗虫、促生相关生物活性化合物合成的基因簇,为解析 *S. sampsonii* 防病促生机制提供新的思路。

*S. sampsonii* 基因组符合链霉菌基因组基本特征,与 *S. coelicolor* A3(2)、*S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350 基因组比较,三者共有部分蛋白聚类簇,3株链霉菌基因组存在翻转、易位等基因组重排,基因组间既有保守性,又各自有独特性。本研究首次报道了 *S. sampsonii* 全基因组信息,为深入了解链霉菌次级代谢合成途径提供了参考信息,为解决链霉菌属间的进化、分类及鉴定等研究提供了参考数据,对以后 *S. sampsonii* 的相关研究具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. The Prokaryotes: Gammaproteobacteria[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014: 890
- [2] Hodgson DA. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria[J]. Advances in Microbial Physiology, 2000, 42: 47-238
- [3] Huang B, Liu N, Rong XY, et al. Effects of simulated microgravity and spaceflight on morphological differentiation and secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(10): 4409-4422
- [4] Manam RR, Teisan S, White DJ, et al. Lajollamycin, a nitro-tetraene spiro- $\beta$ -lactone- $\gamma$ -lactam antibiotic from the marine actinomycete *Streptomyces nodosus*[J]. Journal of Natural Products, 2005, 68(2): 240-243
- [5] Arumugam M, Mitra A, Jaisankar P, et al. Isolation of an unusual metabolite 2-allyloxyphenol from a marine actinobacterium, its biological activities and applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(1): 109-117
- [6] Tapiolas DM, Roman M, Fenical W, et al. Octalactins a and b: cytotoxic eight-membered-ring lactones from a marine bacterium, *Streptomyces* sp.[J]. Journal of the American Chemical Society, 1991, 113(12): 4682-4683
- [7] Huang R, Ding ZG, Long YF, et al. A new isoflavone derivative from *Streptomyces* sp. YIM GS3536[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2013, 48(6): 966-969
- [8] Arasu MV, Duraipandiyar V, Ignacimuthu S. Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect[J]. Chemosphere, 2013, 90(2): 479-487
- [9] Fujita Y, Kasuya A, Matsushita Y, et al. Structural elucidation of A-74528, an inhibitor for 2', 5'-phosphodiesterase isolated from *Streptomyces* sp.[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2005, 15(19): 4317-4321
- [10] Kaur T, Vasudev A, Sohal SK, et al. Insecticidal and growth inhibitory potential of *Streptomyces hydrogenans* DH16 on major pest of India, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. BMC Microbiology, 2014, 14(1): 227
- [11] Meng P, Guo YQ, Zhang Q, et al. A novel amino-oligosaccharide isolated from the culture of *Streptomyces* strain PW638 is a potent inhibitor of  $\alpha$ -amylase[J]. Carbohydrate Research, 2011, 346(13): 1898-1902
- [12] Malviya MK, Pandey A, Trivedi P, et al. Chitinolytic activity of cold tolerant antagonistic species of *Streptomyces* isolated from glacial sites of Indian Himalaya[J]. Current Microbiology, 2009, 59(5): 502-508
- [13] Li SJ, Zhu TH, Peng Y, et al. Characteristics of chitinase-produced by *Streptomyces sampsonii* with antimicrobial activity and its biocontrol to *Rhizoctonia violacea*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2014, 42(3): 116-121 (in Chinese)  
李姝江, 朱天辉, 彭艳, 等. 桑氏链霉菌产几丁质酶特性及对杨树紫纹病的生防作用[J]. 东北林业大学学报, 2014, 42(3): 116-121
- [14] Luo YQ, Zhang D, Feng HW, et al. Optimization of conditions for CMCase activity of Cellulase detected with DNS method for *Streptomyces griseorubens* (JSD-1)[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(3): 156-162 (in Chinese)  
罗艳青, 张丹, 冯海玮, 等. DNS 法检测灰略红链霉菌 JSD-1 产纤维素酶的 CMC 酶活条件的优化[J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 156-162
- [15] Kuhad RC, Kapoor M, Rustagi R. Enhanced production of an alkaline pectinase from *Streptomyces* sp. RCK-SC by whole-cell immobilization and solid-state cultivation[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20(3): 257-263
- [16] Xiong K, Xiong SY, Cui XT, et al. Research on xylanase from *Streptomyces* sp. L10608 hydrolysis substrate to generate specific prebiotics product[J]. Food and Fermentation

- Industries, 2017, 43(5): 49-55 (in Chinese)  
熊科, 熊苏玥, 崔晓亭, 等. 链霉菌 L10608 产木聚糖酶纯化及特异水解底物生成益生元型产物研究[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(5): 49-55
- [17] Kim SS, Kang SI, Kim JS, et al. Biological control of root-knot nematode by *Streptomyces sampsonii* KK1024[J]. Korean Journal of Soil Science & Fertilizer, 2011, 44(6): 1150-1157
- [18] Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Nature, 2002, 417(6885): 141-147
- [19] Pullen C, Schmitz P, Meurer K, et al. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae[J]. Planta, 2002, 216(1): 162-167
- [20] Jain PK, Jain PC. Isolation, characterization and antifungal activity of *Streptomyces sampsonii* GS1322[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2007, 45(2): 203-206
- [21] Charousová I, Medo J, Alenářová E, et al. Effect of fertilization on biological activity of community of soil streptomycetes[J]. Journal of Central European Agriculture, 2016, 17(4): 1134-1149
- [22] He CL. Study on anti-corrosion mechanism of bee bread of *Xylocopa tranquebarorum* (Swederus)[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Forestry University, 2009 (in Chinese)  
贺春玲. 长木蜂蜂粮防腐机理研究[D]. 南京: 南京林业大学博士学位论文, 2009
- [23] Wu HX, Ren DM, Chen HM, et al. Adsorption process of macroporous adsorption resin for antifungal substance from *Streptomyces sampsonii* HP-47[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(4): 117-120 (in Chinese)  
吴浩璋, 任大明, 陈红漫, 等. 大孔吸附树脂对桑氏链霉菌 HP-47 抗真菌活性物质的吸附工艺[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 117-120
- [24] Augustine D. Actinomycete isolates from Arabian Sea and bay of Bengal: biochemical, molecular and functional characterization[D]. Cochin: Doctoral Dissertation of Cochin University of Science and Technology, 2014
- [25] Li YD, Wang KY, Fan S, et al. Isolation of strain producing D-hydantoinase from marine and its simulation analysis of the enzyme catalytic channel[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2016, 24(5): 729-737 (in Chinese)  
李亚东, 汪康游, 樊帅, 等. 海洋来源的 D-海因酶产生菌的分离及酶催化通道模拟分析[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(5): 729-737
- [26] Savi DC, Haminiuk CWI, Sora G, et al. Antitumor, antioxidant and antibacterial activities of secondary metabolites extracted by endophytic actinomycetes isolated from *Vochysia divergens*[J]. International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences, 2015, 5(1): 347-356
- [27] Zhu TH, Li SJ, Lei MY, et al. Streptomyces sampsonii KJ40 strain and liquid preparations: CN, CN102703343A[P]. 2012-10-03 (in Chinese)  
朱天辉, 李妹江, 雷美艳, 等. 桑氏链霉菌 KJ40 菌株及其液体制剂: 中国, CN102703343A[P]. 2012-10-03
- [28] Li RQ, Zhu HM, Ruan J, et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing[J]. Genome Research, 2010, 20(2): 265-272
- [29] Li RQ, Li YR, Kristiansen K, et al. SOAP: short oligonucleotide alignment program[J]. Bioinformatics, 2008, 24(5): 713-714
- [30] Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, et al. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. Bioinformatics, 2007, 23(6): 673-679
- [31] Delcher AL, Harmon D, Kasif S, et al. Improved microbial gene identification with GLIMMER[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(23): 4636-4641
- [32] Salzberg SL, Delcher AL, Kasif S, et al. Microbial gene identification using interpolated Markov models[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(2): 544-548
- [33] Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(2): 573-580
- [34] Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(9): 3100-3108
- [35] Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(5): 955-964
- [36] Gardner PP, Daub J, Tate JG, et al. Rfam: updates to the RNA families database[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(Database): D136-D140
- [37] 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 Research, 2015, 43(W1): W237-W243
- [38] Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, et al. Versatile and open software for comparing large genomes[J]. Genome Biology, 2004, 5(2): R12
- [39] Marín A, Xia XH. GC skew in protein-coding genes between the leading and lagging strands in bacterial genomes: new substitution models incorporating strand bias[J]. Journal of Theoretical Biology, 2008, 253(3): 508-513
- [40] Wu F. Homology analysis and construction of gene library of 20 kb DNA in parasporal crystal from *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718[D]. Changsha: Master's thesis of Hunan Normal University, 2009 (in Chinese)  
吴峰. 苏云金芽胞杆菌 4.0718 菌株伴胞晶体中 20 kb DNA 基因文库的构建和同源性分析[D]. 长沙: 湖南师范大学硕士学位论文, 2009
- [41] Jain R, Agrawal SC, Jain PC. Proteolytic actinomycetes from Indian habitats[J]. Journal of culture collections, 2013, 6(1): 28-37
- [42] Jain PK, Jain R, Jain PC. Production of industrially important enzymes by some actinomycetes producing antifungal compounds[J]. Hindustan Antibiotics Bulletin, 2002, 45-46(1/4): 29-33
- [43] Yu Q, Zhu TH, Li SJ, et al. Mutation breeding of thiram-resistant mutants *Streptomyces sampsonii*[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2014, 42(7): 133-136, 142 (in Chinese)  
余琴, 朱天辉, 李妹江, 等. 耐福美双桑氏链霉菌生物型的选育[J]. 东北林业大学学报, 2014, 42(7): 133-136, 142
- [44] Peng Y, Zhu TH, Zhang BY, et al. Isolation, purification and partial characterization of an antifungal protein from

- Streptomyces sampsonii* KJ07[J]. Microbiology China, 2016, 43(9): 1980-1987 (in Chinese)  
彭艳, 朱天辉, 张博阳, 等. 桑氏链霉菌 KJ07 抗菌蛋白的分离纯化及部分特性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(9): 1980-1987
- [45] Du H, Lu H, Xu Y. Influence of geosmin-producing *Streptomyces* on the growth and volatile metabolites of yeasts during Chinese liquor fermentation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(1): 290-296
- [46] Xiao QC, Peng SL, Li EH, et al. Whole-genome sequencing and sequence analysis of *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847[J]. Genomics and Applied Biology, 2014, 33(4): 729-736 (in Chinese)  
肖前程, 彭思露, 李尔汉, 等. 茂原链霉菌 DSM 40847 全基因组测序及序列分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(4): 729-736
- [47] Wang H, Liu N, Huang Y. Phylogenomic analysis of modular polyketide synthases in actinomycetes and its application in product screening[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(10): 1293-1304 (in Chinese)  
王浩, 刘宁, 黄英. 放线菌模块型聚酮合酶的系统发育组学分析及其在聚酮类化合物筛选中的应用[J]. 微生物学报, 2010, 50(10): 1293-1304
- [48] Ming ZH, Pan JW, Zhu MY. Progress in nonribosomal peptide synthetases[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2002, 29(5): 667-669 (in Chinese)  
明镇寰, 潘建伟, 朱睦元. 非核糖体多肽合成酶研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(5): 667-669
- [49] Tan HS, Che Q, Li DH, et al. Progress in the research of antimycin-type compounds[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2015, 40(12): 892-900 (in Chinese)  
谭洪升, 车茜, 李德海, 等. 抗霉素类化合物的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(12): 892-900
- [50] Seipke RF, Barke J, Brearley C, et al. A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22028
- [51] Zhu DC, Liu XR. Compatible solutes ectoine and its derivate hydroxyectoine[J]. China Biotechnology, 2011, 31(2): 95-101 (in Chinese)  
朱道辰, 刘杏荣. 相容性溶质四氢嘧啶及其羟基化衍生物的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(2): 95-101
- [52] Chen SF. Syntheses of tetrahydro-pyrimidine compounds[J]. Chinese Journal of Synthetic Chemistry, 2017, 25(3): 223-229 (in Chinese)  
陈识峰. 四氢嘧啶类化合物的合成[J]. 合成化学, 2017, 25(3): 223-229
- [53] Chen W, Shu JH, Chen Y, et al. Screening, identification and fermentation condition optimum of a siderophore-producing bacteria WN-H3 from rhizosphere of ryegrass[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(10): 219-226 (in Chinese)  
陈伟, 舒健虹, 陈莹, 等. 黑麦草根际铁载体产生菌 WN-H3 的分离鉴定及其产铁载体培养条件的优化[J]. 生物技术通报, 2016, 32(10): 219-226
- [54] Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*[J]. Microbial Ecology, 2007, 53(2): 306-316
- [55] Luo YZ, Huang H, Liang J, et al. Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster[J]. Nature Communications, 2013, 4: 2894
- [56] Du DX. Advances on the heterologous expression of microbial secondary metabolite biosynthesis gene cluster[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2012, 37(8): 568-574,598 (in Chinese)  
杜东霞. 微生物次级代谢产物生物合成基因簇异源表达研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(8): 568-574,598