后基因组时代害虫生防真菌次级代谢产物的研究进展

亓兰达^{1,2†}, 魏鹏霖^{2†}, 张晗星², 陈国参¹, 张英涛¹, 尹文兵^{2*}

1. 河南省科学院生物研究所有限责任公司, 郑州 450008;

2. 中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101

*联系人, E-mail: yinwb@im.ac.cn

†同等贡献

收稿日期: 2020-1-9; 接受日期: 2020-3-5; 网络版发表日期: 2020-04-01

国家重点研发计划(批准号:2018YFA0900701)、国家自然科学基金(批准号: 21778075)和河南省科学院省级特聘研究员项目(批准号: 200505006)资助

摘要 真菌次级代谢产物在害虫生物防治方面起着重要作用, 而其中起杀虫作用的主要活性物质越来越受到人们关注. 近几年随着测序技术的发展, 利用基因组和生物信息技术挖掘真菌次级代谢产物的方式已成为新的热点, 这也为后基因组时代新的真菌生防制剂的发现提供了新的策略. 本文先后介绍了几种典型杀虫真菌, 阐述了其入侵及致病机制, 并对几种常见杀虫真菌所产的杀虫毒素的作用机制进行了介绍, 同时也对这些杀虫毒素的生物合成研究进展进行了梳理, 为真菌生防制剂的进一步开发提供思路, 最后对真菌次级代谢产物在生防制剂方面的应用进行了展望.

关键词 昆虫病原真菌, 真菌次级代谢产物, 生物合成, 生防制剂

真菌生物由于其丰富的多样性, 在微生物中一直占据着重要地位, 也是最早被发现可以作为防治害虫的微生物. 而且真菌次级代谢产物结构的多样化、对环境友好和无污染的特点, 在为生物防治提供了一个重要的开发源泉的同时, 也避免了使用化学农药造成的高残留污染问题^[1]. 与此同时, 研究发现真菌中虫生真菌的种类繁多, 并且大部分具有易于大规模工厂化生产、剂型多样和使用方便的优点, 这对于在农业生产中大幅度减少化学药剂使用、保护生态环境以及维持自然平衡具有极其的重要意义. 目前已发现的虫生

真菌共100多个属, 囊括800余种, 广泛分布于真菌的各个亚门, 其中大部分属于子囊菌亚门(Ascomycotina)肉座菌目(Hypocreales), 这些真菌分泌的代谢产物多数具有丰富的生物活性, 如杀虫、抑菌、抗氧化、抗病毒和抗肿瘤等^[2-4]. 真菌易传播、易繁殖的特点导致往往使用一次就能实现长期防控效果, 而且真菌次级代谢产物生物活性机理十分复杂致使有害生物难以产生抗药性的特点, 这表明虫生真菌在害虫生物防治中有着极大潜力. 经过科学家们的多年探索, 真菌生防制剂的研发已成为生物农药的研究热点之一, 近年来

引用格式: 亓兰达, 魏鹏霖, 张晗星, 等. 后基因组时代害虫生防真菌次级代谢产物的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2020, 50

Qi L D, Wei P L, Zhang H X, et al. Research advances in secondary metabolites of pest control fungi in the post-genomic era (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50, doi: [10.1360/SSV-2020-0014](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0014)

国际上真菌学科的研究热点也从分类学向真菌次级代谢产物的生物合成, 生物防治等领域发展^[5,6]. 本文介绍了几种常见杀虫真菌及其侵染机制, 阐述了这几种常见杀虫真菌分泌的几类杀虫毒素及其合成机理, 归纳了真菌次级代谢产物在生防制剂应用上的优点及局限性, 为真菌生防药物的进一步开发奠定了基础.

1 生物防治相关的真菌次级代谢产物

微生物在培养过程中会合成并分泌许多代谢产物, 其中含有少量的次级代谢产物, 次级代谢产物是微生物在生长到稳定期前后, 以结构简单、代谢途径较为明确、产量较大的初级代谢产物为前体, 经过一系列复杂的次级代谢途径合成的结构复杂的化合物. 这一类有机物对微生物本身起着次要功能, 产量比较低且生理功能不是特别明确. 大多数真菌以及少部分细菌都能合成次级代谢产物, 不同微生物分泌的次级代谢产物种类也不尽相同, 如有毒素、生物信息素、抗生素以及生长促进剂等^[7]. 根据其合成途径类型及次级产物结构, 可以把真菌次级代谢产物分为聚酮合酶(polyketide synthases, PKSs)合成的聚酮类、非核糖体多肽合酶(non-ribosomal peptide synthases, NRPSs)合成的非核糖体肽类、生物碱类(alkaloids)以及由萜类合酶(terpene synthases/ cyclases, TCs)合成的萜类化合物等. 这些次级代谢产物也是真菌对昆虫造成的毒害作用的主要作用物质, 其中白僵菌素、环孢菌素、破坏素和卵孢霉素是比较著名的真菌源杀虫毒素(图1)^[8-14], 利用能够分泌这些次级代谢产物的真菌, 通过发酵培养, 剂型加工等步骤制作而成的以杀虫真菌为有效成分的生物农药即称为真菌生防制剂. 作用到有害昆虫时, 它们能够削弱寄主的免疫防御或者破坏昆虫的肌肉系统, 降低寄主昆虫的活动能力等^[15,16]. 研究发现, 昆虫病原真菌的分生孢子在侵染寄主昆虫时, 首先会附着于昆虫体壁表面, 通过分泌体壁水解酶穿透寄主昆虫的体壁从而进入昆虫血腔, 如果能在寄主的免疫防御反应中存活下来, 就可以借助寄主体内的营养物质进行扩散繁殖, 最终由于其生长发育过程中分泌的次级代谢产物等毒素物质导致寄主昆虫死亡. 寄主昆虫死亡后, 菌丝穿透寄主体表, 产生分生孢子进行下一轮的增殖^[17], 在侵染过程中产生的杀虫毒素等次级代谢产物被认为是昆虫致死的主要原因.

图1 真菌中常见的杀虫毒素

Figure 1 Representatives of common insecticidal toxins from fungi

据统计, 昆虫和植物病害中的70%都是真菌性病害^[18,19], 因此, 真菌生防制剂在农业病虫害的控制上具有非常大的应用潜力. 利用杀虫真菌次级代谢产物对昆虫的杀伤作用研制而成的真菌生防制剂在使用中具有环境安全、便于扩散、对非目标生物无毒害等优点. 目前, 已经开发成真菌制剂的虫生真菌主要有球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)、金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)、玫烟色拟青霉(*Paecilomyces fumosoroseus*)以及蜡蚧轮枝菌(*Verticillium Lecanii*)、座壳孢(*Aschersonia*)等, 用这些真菌开发出的制剂均能防治多种农林害虫, 而在国内很早就开始应用白僵菌防治松毛虫和玉米螟、应用淡紫拟青霉防治线虫病等^[20,21].

2 典型杀虫真菌及其产生的杀虫毒素

罗伯茨绿僵菌(*Metarhizium robertsii*)和球孢白僵菌等昆虫病原真菌是农林害虫生物防治中应用比较广泛的虫生真菌, 在控制农业生态系统中害虫密度方面发挥着巨大作用, 并且它们的次级代谢产物种类也极其丰富, 其主要代谢产物为结构多样的破坏素(destruxins). 王成树课题组^[22]通过比较产破坏素的金龟子绿僵菌和不产破坏素的蝗绿僵菌(*Metarhizium acri-*

dum)的基因组信息确定了破坏素合成的目标基因簇,然后结合基因敲除与底物喂养实验,解析了参与破坏素合成与修饰基因的种类、作用与功能.进化发育分析表明,不同种类的绿僵菌,其破坏素合成基因簇构成与真菌杀虫作用相关.生物测定实验表明,破坏素主要通过改变昆虫血细胞中的 Ca^{2+} 平衡和细胞内高分子蛋白的磷酸化状态来破坏细胞的免疫作用或导致免疫细胞的程序性死亡,从而削弱寄主的免疫力.在鳞翅目昆虫中,破坏素通过激活寄主昆虫肌肉细胞中的 Ca^{2+} 通道,导致昆虫痉挛麻痹,最终造成昆虫死亡^[22,23].除此之外,有研究证明,破坏素在治疗癌症、骨质疏松症、阿尔茨海默氏病和乙型肝炎等方面具有较大潜力^[24-26].研究发现,昆虫病原真菌球孢白僵菌感染蚊子后能够通过分泌卵孢菌素下调蚊子中肠的免疫反应,而这种反应与蚊子中肠中的共生菌*Serratia marcescens*产生互作,使共生菌*S. marcescens*在中肠中过量繁殖并扩散从而促进了真菌对蚊子的杀伤作用,最终加速蚊子的死亡^[27].

淡紫拟青霉是子囊菌门、肉座菌目、蛇形虫草科、*Purpureocillium*属的一种丝状真菌,分布范围广,可从线虫、土壤、腐烂的植物、昆虫中分离得到,具有生命力强、适应性广、易于培养、孢子丰富、容易扩散的特点,其分泌的某些种类的代谢产物也具有较强的杀虫活性和生理效应.淡紫色拟青霉不仅可以产生几丁质酶促进线虫卵的孵化和提高线虫的死亡率,还可以产生抗生素leucinostatin和lilacin、水解酶类(细胞壁裂解酶、葡聚糖酶和丝蛋白酶)、促进植物生长的物质(类似生长素和细胞分裂素作用的物质)和对线虫有害的物质(乙酸).在植物寄生线虫防治应用上,淡紫色拟青霉具有杀虫活性高、作用时间长、使用安全、土壤适应力好(土壤中能迅速定殖、繁殖、传播)、抗药性强(对某些杀菌剂有一定的抗药性)等优点,现已成为我国开发应用的主要杀虫真菌之一^[28].

除淡紫拟青霉外,张克勤课题组^[29-31]的研究发现,厚垣孢普克尼亚菌(*Pochonia chlamydosporia*)分泌的次级代谢产物aurovertins, phomalactone, monorden等都对线虫具有毒杀活性,同时研究也发现,能够分泌杀线虫次生代谢产物的真菌在自然界广泛分布,其产生的次级代谢产物结构也不尽相同,具有非常大的应用潜力^[32,33].除了通过分泌毒素杀死线虫外,部分真菌还能捕食线虫,通过对捕食线虫真菌*Drechslerella ste-*

*nobrocha*的基因组研究发现,它能够形成捕食环,当线虫钻进捕食环并触碰到环的内表面,G蛋白偶联受体激活下游的信号通路,捕食环紧缩使线虫不能移动,但该真菌的次级代谢产物方面的研究却很少^[34].

以下是一些常见杀虫真菌产生的杀虫毒素介绍:环孢菌素(cyclosporin)最早于70年代初从虫生真菌以及土生真菌中分离并鉴定而来,它是由11个氨基酸组成的非核糖体环状多肽^[9,35].在众多环孢菌素产物中,环孢菌素A因为具有抗菌活性而备受关注,FDA于1983年批准其为用于器官移植的免疫抑制剂药物.迄今为止,共发现30余种结构与环孢菌素A类似的次级代谢产物,它们在免疫抑制、杀虫、抗真菌等方面都具有较高的活性^[36].

卵孢菌素(oosporein)是从染色卵孢霉(*Oospora colorans*)中分离出的一种二苯醌类化合物,具有较好的杀虫和抗菌活性^[10,37].而且研究发现许多昆虫病原真菌和植物病原真菌中也能合成卵孢菌素^[38,39].通过生物活性实验确认卵孢菌素可用于防治鳞翅目害虫和粉虱等,其作用机理是通过逃避宿主的免疫反应,从而使杀虫真菌在昆虫体内迅速生长,最终造成害虫的死亡^[40,41].

烟曲霉素(fumagillin)又名抗阿米巴药,是一种由碳氢氧三种元素组成的白色晶状固体,属于有机酸性物质.它是Hanson和Eble于1949年首次从一种特定的H-3曲霉菌株中分离出来的一种有效的真菌次级代谢产物,该菌株被命名为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)^[11].烟曲霉素可作为天然的不溶于水的抗生素,用于控制由蜜蜂微孢子虫(*Nosema apis*)引起的真菌病害,也是唯一一种对微孢子虫病有治疗特效的抗生素类药物,在欧洲已得到广泛使用^[42-44].此外,烟曲霉素在一些人类免疫缺陷疾病和癌症的治疗上也拥有巨大潜力^[45,46].

白灰质素(leucinostatins)是Arai等人^[12]于1972年从淡紫拟青霉的发酵液中分离提取获得的,经分析发现,白灰质素属于非核糖体肽类,其对多种革兰氏阳性菌和真菌具有毒杀活性,同时对肿瘤细胞有抑制活性^[12].通过对淡紫色拟青霉不同菌株的代谢产物分析发现,多种淡紫色拟青霉菌株均能分泌leucinostatins,并且这种次级代谢产物对线虫具有较强的毒杀作用.王刚等人^[47]通过对峙培养试验还发现,淡紫拟青霉产生的次级代谢产物leucinostatins对辣椒疫霉菌和马铃薯晚疫病菌的菌丝生长也存在抑制作用.

3 后基因组时代真菌杀虫毒素生物合成研究进展

随着分子生物学技术的不断发展, 为真菌次级代谢产物的研究提供了许多便利. 研究表明, 真菌次级代谢产物的合成基因在基因组中是成簇存在的(图2)^[48,49]. 而真菌杀虫毒素也不例外, 这些基因簇中的功能基因决定着真菌次级代谢产物的杀虫毒力以及对不良环境的耐受性^[50]. 新一代测序技术的发展, 生物信息技术的革新, 以及大量真菌基因组实现测序与分析, 标志着针对真菌次级代谢产物的研究已步入后基因组时代, 即不再局限于对编码次级代谢产物的某一基因或某一蛋白进行研究, 而是在基因组和宏观水平上全面分析参与全局调控的多个基因或多个蛋白共同产生的功能^[48]. 在虫生真菌方面, 绿僵菌、虫草菌蛹虫草、白僵菌等模式真菌的全基因组测序的完成, 对推动虫生真菌的遗传信息学研究、阐明真菌与昆虫的互作机理等具有重要的意义^[51~53]. 使用生物信息学相关分析软件对丝状真菌的基因组进行预测后发现, 它们的基因组中含有大量编码NRPSs, PKSs, NRPS-PKS杂合体、吡啶生物碱和萜类化合物的相关基因簇, 说明它们具有非常大的次级代谢产物挖掘潜力^[54~56].

目前真菌杀虫毒素的天然合成机制研究成果主要集中在非核糖体肽类、生物碱及聚酮化合物等主要几种分子合成途径的研究, 以及确认有效分子结构、鉴定合成基因簇、阐明代谢合成过程和转录调控元件功能方面.

王成树课题组^[22]通过对罗伯茨绿僵菌的系列基

因缺失与底物饲喂实验, 解析了参与破坏素合成与修饰基因的种类、作用与功能, 破解了绿僵菌合成破坏素的生物途径, 得出破坏素的合成途径主要受*dtxS1*, *dtxS2*, *dtxS3*和*dtxS4* 4个基因编码调控(图3A). 其中非核糖体肽合成酶DtxS1有6个A-T-C模块, 分别负责一个羧基羧酸和5个氨基酸加载、组装. 其中两个可以选择不同的氨基首先合成DtxB及其类似物. 细胞色素P450酶DtxS2通过一系列反应将DtxB转化为其他Dtx, 每一种都能产生一种新的衍生物. 醛缩酮还原酶DtxS3与天冬氨酸脱羧酶DtxS4分别负责Dtx的第一和最后底物的转化、前体修饰和组分比例的组成. 后续研究还发现, 绿僵菌突变菌株 Δ *dtxS1*由于NRP合成酶的缺失不能产生破坏素, 但这种缺失却诱导其产生新的次级代谢产物pseurotin A^[57].

球孢白僵菌能够合成非核糖体多肽类的白僵菌素(beauvericin)、类白僵菌素(bassianolide)和白僵菌环三肽(beauverilide), 以及苯醌类的卵孢菌素等. 通过对层生镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)中白僵菌素生物合成分析发现, 白僵菌素生物合成基因簇主要包括15个ORF基因, 其中重要的功能基因为*fpBeas*和*kivv*基因(图3B)^[58]. 环缩酚肽合成酶(CODS)编码基因*fpBeas*包含两个A-T-C模块, 2-酮异戊酸在酮异戊酸还原酶编码基因*kivv*的作用下作为硫酯安装在第一个模块中的T1结构域上, 随后L-Phe被FpBeas合成酶的A2结构域激活, 从而加载到第二个模块的两个T2结构域中, 最终D-Hiv和N-Me氨基酸的缩合形成二肽醇被CODS中的结构域C2催化, 合成产生白僵菌素. 而卵孢菌素在白僵菌的合成是一种包括7个功能基因的PKS合成途径

图2 生物合成基因簇示意图

Figure 2 Schematic overview of a biosynthetic gene cluster

图3 杀虫毒素生物合成基因簇。A: 破坏素; B: 白僵菌素; C: 卵孢菌素; D: 环孢菌素; E: 白灰质素; F: 烟曲霉素

Figure 3 Biosynthetic gene clusters of insecticidal fungi. A: destruxins; B: beauvericin; C: oosporein; D: cyclosporine; E: leucinostatin; F: fumagillin

(图3C)^[59]。聚酮合成酶OpS1首先合成前体物苔色酸(orsellinic acid), 通过羟化酶OpS4羟基化生成苯三酚, 该中间体被非酶促氧化为5,5'-双脱氧卵孢菌素或由特异性双加氧酶OpS7酶促生成多元酚。后者通过过氧化氢酶OpS5进一步生成二聚体卵孢菌素。OpS2是负向调节因子, OpS3具有锌指蛋白结构的转录因子, 调控基因簇的各基因的转录表达。

杨秀青等人^[60]在分析膨大弯颈霉(*Tolypocladium inflatum*)基因组信息后, 针对潜在参与环孢霉素生物合成的含有非核糖体多肽合成NRPS (SimA)和聚酮合成酶PKS (SimG)的基因簇开展了系列基因敲除、中间产物分离鉴定及底物喂养等实验, 鉴定了虫草无性型膨大弯颈霉合成环孢菌素的分子机制、调控机制和生物学功能(图3D)。其证明基因簇中的SimG途径负责合成非正常氨基酸2-丁烯基-4-甲基-苏氨酸Bmt, 消旋

酶SimB负责将L-丙氨酸转化为D-型丙氨酸, 再由SimA介导11个底物的顺序添加及环化生成CsA。研究还发现, bZIP类型转录因子SimL调控基因簇基因表达及产物合成, 亲环素(cyclophilin)SimC及胞外转运蛋白SimD共同参与保护产生菌合成CsA导致的细胞毒素。

王刚等人^[47]对可能参与白灰质素合成相关的NRPS合成基因酶(LcsA)、PKS合成酶(LcsC)、Acyl-CoA连接酶(LcsD)和硫酯酶(LcsE)分别进行基因敲除后确定了淡紫拟青霉中次级代谢产物Leucinostatin的合成途径(图3E)。解析发现, 合成起初丙氨酸通过A10结构域掺入十肽骨架, 随后通过硫酯键与LcsA连接, 在R结构域形成中间产物化合物, 并通过氨基转移酶LcsP发生氨基转移反应生成未羟基化亮氨酸, 随后未羟基化亮氨酸经历羟基化反应(这一过程可能会经过3个细胞色素P450编码基因*lcsI*, *lcsK*和*lcsN*的催化修饰)

中间产物2, 再中间产物2不同程度的甲基化反应被催化生成白灰质素A和白灰质素B。

烟曲霉素的代谢途径是先后经过Dhingra, Lin, Wiemann等人^[61-64]的工作共同阐明的(图3F)。他们通过制备烟曲霉烟曲霉素合成缺陷突变体, 克隆和表达在同一通路上酵母菌中的酶, 并对其进行中间产物为底物的酶活性体外研究, 阐明了合成烟曲霉素所需要两个构成分子(重排高氧倍半萜和聚酮衍生的四烯酸二酯)的合成途径。它们是由两个不同的生物合成分支途径产生, 随后通过酯化作用连接。该途径的一个分支是从焦磷酸法尼酯(FPP)经 β -反式佛手柑烯合酶氧化为 β -反式佛手柑烯的开始的。这个中间成分经历了3个循序渐进的催化氧化步骤。经Fma-P450催化转化, 它是一种单加氧膜酶。在这些氧化步骤中, β -反式-伯氨酸首次羟基化。在C5位置生成5-羟基 β -反式佛手酮, 在C9位置氧化偶联生成环丁烷, C5-C8键裂解中间组分5-酮基-cordycol。氧化的最后步骤, 通过Fma-P450将该化合物转化为5-酮-demethoxyfumagillol。C6位的羟基化和随后5-酮-脱甲基延胡索醇的甲基化, 继续这两个顺序转换后, 合成5-酮-延胡索醇。两种酶参与其中转化, Fma-C6H双加氧酶和Fma-MT羟基化和甲基化酶。最后一步是通过Fma-KR立体选择性地还原5-酮基烟酰胺, 酯化合成烟曲霉醇。

4 真菌次级代谢产物在害虫生物防治上的应用局限及展望

天然合成的真菌毒素之所以为人类发现和重视, 是因为真菌在侵染和定殖过程中, 其合成了一系列的复杂的结构多样的代谢产物。不同的阶段合成的化合物功能和作用不同, 造成了天然杀虫剂的高效性和专一性的特点, 其毒力和施用效果, 是人工合成的单一化合物杀虫剂所不能取代的。

以罗伯茨绿僵菌合成的破坏素为例, 破坏素包含5个氨基酸和1个羧基残基的一类六元环缩肽化合物, 具有 β 丙氨酸-丙氨酸-缬氨酸-异亮氨酸-脯氨酸或六吡啶羧酸- α 羟基酸组成的分子骨架^[22]。R(pipe-colic acid)取代基结构不同, 破坏素的产物不同。罗伯茨绿僵菌在寄主昆虫体内天然合成的破坏素至少16种结构类似物组成的混合物(图1)。研究发现, 破坏素的天然合成是有时间程序性的, 首先合成DtxB再由剪裁

酶CYP65修饰成其他Dtxs。dtxB基因敲除菌株毒力测试分析表明, DtxB/B2缺失杀虫毒力降低与真菌在昆虫中的昆虫血腔中的定殖能力较弱相关, DtxA和DtxE可能抑制细胞和体液免疫反应, 进而促进真菌在昆虫中的定殖, 完成整个杀虫的过程。从而, 这种根据不同阶段合成不同化合物来发挥作用的机制克服了因单一成分化学物药效不强而难以实现有效杀虫的缺点。但是, 破坏素及其衍生物的人工化学合成技术难度高, 价格昂贵, 即不经济又容易引入新的污染环境, 极大的限制了其于农业生产施用的前景。

虽然真菌分泌的次级代谢产物在害虫生物防治方面具有许多优点, 但实际上在真菌天然产物中多种次级代谢产物是混合存在的, 为了达到实验室研究标准往往还需要对这些次级代谢产物进行分离和纯化。为了缩短研究所需时间, 需要对真菌进行环境变量或者遗传上的操作。传统上, 想要获得适合工业化生产的高产菌株一般通过诱变筛选技术, 如紫外线照射、辐射、化学诱变剂等, 虽然通过这些方法成功获得许多优良的工程菌株, 但这些手段也会消耗大量的时间与资源^[65]。随着分子生物学的发展, 对真菌进行基因重组或基因工程改造已经在部分真菌上实现了次级代谢产物的高表达。通过激活真菌基因组中隐形基因簇使人们获得新型次级代谢产物或者提高次级代谢产物的表达水平, 这些手段在构巢曲霉和烟曲霉中已获得成功^[66-69]。由于大多数真菌很难进行遗传操作, 近年来通过异源表达真菌次级代谢产物合成的沉默基因簇成为发现真菌天然产物的一个有效的方法^[1]。大肠杆菌、酿酒酵母和构巢曲霉是3种常用的表达真菌基因的异源表达宿主。很多NRPs, PKs和NRP/PKs基因簇编码的化合物都在以大肠杆菌为宿主的表达系统中获得表达^[70]。

目前真菌杀虫剂的应用因为一些原因使得使用受到限制, 如较长的反应时间、毒力不稳定、受环境因子影响较大。杀虫真菌侵染寄主昆虫需要完成从定殖到合成毒力次级代谢产物, 破坏寄主细胞的免疫作用, 最终造成昆虫死亡的过程。整个定殖过程大概需要一周左右时间, 在大面积病疫出现的情况下, 杀虫周期过长, 不容易控制疫情, 导致经济损失风险过高, 比对同期施用化学杀虫剂效果差, 药效周期长, 在实际生产中没有竞争力。因此如何优化改进生物合成策略来合成生物来源的杀虫剂及其衍生物已成为国际科学家们

开发生物防治药物的一大难关。但真菌次级代谢生物防治药物合成成本低、药物施用方便和绿色环保的优点, 进一步说明了其巨大的潜力, 而新型次级代谢产物的不断挖掘将会快速推动真菌生物防治药剂的研发。

参考文献

- 1 Ma Z H, Li W, Yin W B. Progress in heterologous expression of fungal natural products-A review (in Chinese). *Acta Microbiol. Sin.*, 2015, 3: 429–440 [马紫卉, 李伟, 尹文兵. 真菌天然产物异源生产研究进展. *微生物学报*, 2015, 3: 429–440]
- 2 Mioso R, Toledo Marante F J, Herrera Bravo de Laguna I. The chemical diversity of the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015, 177: 781–791
- 3 Beemelmanns C, Guo H, Rischer M, et al. Natural products from microbes associated with insects. *Beilstein J Org Chem*, 2016, 12: 314–327
- 4 Donzelli BGG, Krasnoff SB. Chapter ten - molecular genetics of secondary chemistry in *Metarhizium* fungi. *Adv Genet*, 2016, 94: 365–436
- 5 Wang M, Han L, Wang Y L et al. Analyses of research hotspots and trends of mycology at home and abroad (in Chinese). *Mycosystema*, 2018, 37: 1540–1551 [王敏, 韩丽, 王雅兰, 等. 国内外菌物学研究热点和研究趋势分析——指导科研选题, 助力科技创新. *菌物学报*, 2018, 37: 1540–1551]
- 6 Yaegashi J, Oakley B R, Wang C C C. Recent advances in genome mining of secondary metabolite biosynthetic gene clusters and the development of heterologous expression systems in *Aspergillus nidulans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41: 433–442
- 7 Lyu H N, Liu H W, Keller N P, et al. Harnessing diverse transcriptional regulators for natural product discovery in fungi. *Nat Prod Rep*, 2020, 37: 6–16
- 8 Liu X Z, Li S D. Fungal secondary metabolites in biological control of crop pests. In: An Z Q. *Handbook of Industrial Mycology*. New York, Marcel Dekker, 2005. 828–855
- 9 Borel J F, Feurer C, Gubler H U, et al. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*, 1994, 43: 179–186
- 10 Kögl F, van Wessum G C. Untersuchungen über Pilzfarbstoffe XIV : Über Oosporein, den Farbstoff von *Oospora colorans* van Beyma. *Recl Trav Chim Pays-Bas*, 1944, 63: 5–12
- 11 Hanson F R, Eble T E. An antiphage agent isolated from *Aspergillus sp.* *J Bacteriology*, 1949, 58: 527–529
- 12 Arai T, Mikami Y, Fukushima K, et al. A new antibiotic, leucinoastatin, derived from *Penicillium lilacinum*. *J Antibiot*, 1973, 26: 157–161
- 13 Hamill R L, Higgins C E, Boaz H E, et al. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett*, 1969, 10: 4255–4258
- 14 Pedras M S C, Zaharia I L, Gai Y, et al. In planta sequential hydroxylation and glycosylation of a fungal phytotoxin: Avoiding cell death and overcoming the fungal invader. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 747–752
- 15 Schrank A, Vainstein M H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 2010, 56: 1267–1274
- 16 Wang C, Wang S. Insect pathogenic fungi: Genomics, molecular interactions, and genetic improvements. *Annu Rev Entomol*, 2017, 62: 73–90
- 17 Wang C, Hu G, St. Leger R J. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. *Fungal Genet Biol*, 2005, 42: 704–718
- 18 Pu Z L, Li Z Z. *Insect Mycology* (in Chinese). Hefei: Anhui Science and Technology Press, 1996. 554 [蒲蛰龙, 李增智. 昆虫真菌学. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1996. 554]
- 19 Zhu W G, Hu W Q, Chen J. Advance of chemical control of vegetable fungous diseases in protected cultural condition (in Chinese). *Modern Agrochemical*, 2010, 9: 16–20 [朱卫刚, 胡伟群, 陈杰. 保护地蔬菜真菌病害化学防治进展. *现代农药*, 2010, 9: 16–20]
- 20 Ji X Y, Yang C J. Infection and application of *Beauveria* spp. (in Chinese). *Chin J Bio Control*, 2003, 82–85 [季香云, 杨长举. 白僵菌的致病性与应用. *中国生物防治学报*, 2003, 82–85]
- 21 Sun M H, Liu X Z, Jin Z B. Effects of *Paecilomyces lilacinus* on egg hatching and juvenile mortality of *Heterodera glycines* (in Chinese). *ACTA Phytophyl Sin*, 2002, 57–61 [孙漫红, 刘杏忠, 晋治波. 淡紫拟青霉对大豆胞囊线虫卵及2龄幼虫的影响. *植物保护学报*, 2002, 57–61]
- 22 Wang B, Kang Q, Lu Y, et al. Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 1287–1292
- 23 Ruiz-Sanchez E, Lange A B, Orchard I. Effects of the mycotoxin destruxin A on *Locusta migratoria* visceral muscles. *Toxicon*, 2010, 56: 1043–1051

- 24 Chen H C, Chou C K, Sun C M, et al. Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res*, 1997, 34: 137–144
- 25 Nakagawa H, Takami M, Udagawa N, et al. Destruxins, cyclodepsipeptides, block the formation of actin rings and prominent clear zones and ruffled borders in osteoclasts. *Bone*, 2003, 33: 443–455
- 26 Itoh N, Okochi M, Tagami S, et al. Destruxin E decreases Beta-amyloid generation by reducing colocalization of beta-amyloid-cleaving enzyme 1 and beta-amyloid protein precursor. *Neurodegenerative Dis*, 2009, 6: 230–239
- 27 Wei G, Lai Y, Wang G, et al. Insect pathogenic fungus interacts with the gut microbiota to accelerate mosquito mortality. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 5994–5999
- 28 Oka Y, Koltai H, Bar-Eyal M, et al. New strategies for the control of plant-parasitic nematodes. *Pest Manag Sci*, 2000, 56: 983–988
- 29 Khambay B P S, Bourne J M, Cameron S, et al. A nematocidal metabolite from *Verticillium chlamydosporium*. *Pest Manag Sci*, 2000, 56: 1098–1099
- 30 Reeves C D, Hu Z, Reid R, et al. Genes for the biosynthesis of the fungal polyketides hypothemycin from *Hypomyces subiculosus* and radicicol from *Pochonia chlamydosporia*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74: 5121–5129
- 31 Niu X M, Wang Y L, Chu Y S, et al. Nematodetoxic aurovertin-type metabolites from a root-knot nematode parasitic fungus *Pochonia chlamydosporia*. *J Agric Food Chem*, 2009, 58: 828–834
- 32 Dong J Y, Li G H, Zhang K Q. Current advances in studies of nematocidal metabolites from fungi (in Chinese). *Mycosystema*, 2001, 286–296 [董锦艳, 李国红, 张克勤. 真菌杀线虫代谢物的研究进展. 菌物系统, 2001, 286–296]
- 33 Li J, Zou C, Xu J, et al. Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: Basis for biological control of plant-parasitic nematodes. *Annu Rev Phytopathol*, 2015, 53: 67–95
- 34 Liu K, Zhang W, Lai Y, et al. *Drechslerella stenobrocha* genome illustrates the mechanism of constricting rings and the origin of nematode predation in fungi. *BMC Genomics*, 2014, 15: 114
- 35 Bushley K E, Raja R, Jaiswal P, et al. The genome of *Tolypocladium inflatum*: evolution, organization, and expression of the cyclosporin biosynthetic gene cluster. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003496
- 36 Survase S A, Kagliwal L D, Annature U S, et al. Cyclosporin A—A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. *Biotech Adv*, 2011, 29: 418–435
- 37 Takeshita H, Anchel M. Production of oosporein and its leuco form by *Basidiomycete* species. *Science*, 1965, 147: 152–153
- 38 Cole R J, Kirksey J W, Cutler H G, et al. Toxic effects of oosporein from *Chaetomium trilaterale*. *J Agric Food Chem*, 1974, 22: 517–520
- 39 Seger C, Längle T, Pernfuss B, et al. High-performance liquid chromatography-diode array detection assay for the detection and quantification of the *Beauveria* metabolite oosporein from potato tubers. *J Chromatography A*, 2005, 1092: 254–257
- 40 Klingen I, Meadow R, Aandal T. Mortality of *Delia floralis*, *Galleria mellonella* and *Mamestra brassicae* treated with insect pathogenic hyphomycetous fungi. *J Appl Entomology*, 2002, 126: 231–237
- 41 Labbe R M, Cloutier C, Brodeur J. Prey selection by *Dicyphus hesperus* of infected or parasitized greenhouse whitefly. *Biocontrol Sci Tech*, 2006, 16: 485–494
- 42 Coyle C, Kent M, Tanowitz H B, et al. TNP-470 is an effective antimicrosporidial agent. *J INFECT DIS*, 1998, 177: 515–518
- 43 Bailey L. Effect of fumagillin upon *Nosema apis* (Zander). *Nature*, 1953, 171: 212–213
- 44 Katznelson H, Jamieson C A. Control of nosema disease of honeybees with fumagillin. *Science*, 1952, 115: 70–71
- 45 Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, et al. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*, 1990, 348: 555–557
- 46 Molina J M, Goguel J, Sarfati C, et al. Trial of oral fumagillin for the treatment of intestinal microsporidiosis in patients with HIV infection. *AIDS*, 2000, 14: 1341–1348
- 47 Wang G, Liu Z, Lin R, et al. Biosynthesis of antibiotic leucinostatin in bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum* and their inhibition on *Phytophthora* revealed by genome mining. *PLoS Pathog*, 2016, 12: e1005685
- 48 Li W, Wu G W, Y Y P, et al. Discovery of fungal natural product in the post-genomic era (in Chinese). *Mycosystema*, 2015, 34: 914–926 [李伟, 吴广畏, 杨玉萍, 等. 后基因组时代的真菌天然产物发现. 菌物学报, 2015, 34: 914–926]
- 49 Zhang Y Q, Wilkinson H, Keller N, et al. Secondary metabolite gene clusters. In: An Z Q. Handbook of Industrial Mycology. New York, Marcel Dekker, 2005. 405–438

- 50 Sanchez J F, Entwistle R, Corcoran D, et al. Identification and molecular genetic analysis of the cichorine gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *MedChemComm*, 2012, 3: 997–1002
- 51 Gao Q, Jin K, Ying S H, et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1001264
- 52 Zheng P, Xia Y, Xiao G, et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional chinese medicine. *Genome Biol*, 2011, 12: R116
- 53 Xiao G, Ying S H, Zheng P, et al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci Rep*, 2012, 2: 483
- 54 Li R, Li Z X, Ma K, et al. Strategy for efficient cloning of biosynthetic gene clusters from fungi. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 1087–1095
- 55 Li W, Yin W B. Genetic mining of the “dark matter” in fungal natural products. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 1250–1252
- 56 Keller N P. Fungal secondary metabolism: Regulation, function and drug discovery. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17: 167–180
- 57 Yi W J, Chen B, Yin Y, et al. Identification of pseurotin A from the destruxin non-producing mutant of *Metarhizium robertsii* (in Chinese). *Mycosystema*, 2019, 38: 1082–1089 [易文娟, 陈波, 殷颖, 等. 绿僵菌破坏素合成缺失株中分离鉴定pseurotin A. 菌物学报, 2019, 38: 1082–1089]
- 58 Zhang T, Zhuo Y, Jia X P, et al. Cloning and characterization of the gene cluster required for beauvericin biosynthesis in *Fusarium proliferatum*. *Sci China Life Sci*, 2013, 56: 628–637
- 59 Feng P, Shang Y, Cen K, et al. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 11365–11370
- 60 Yang X, Feng P, Yin Y, et al. Cyclosporine biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* benefits fungal adaptation to the environment. *mBio*, 2018, 9: e01211–01218
- 61 Dhingra S, Lind A L, Lin H C, et al. The fumagillin gene cluster, an example of hundreds of genes under veA control in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE*, 2013, 8: e77147
- 62 Lin H C, Chooi Y H, Dhingra S, et al. The fumagillin biosynthetic gene cluster in *aspergillus fumigatus* encodes a cryptic terpene cyclase involved in the formation of β -trans-bergamotene. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 4616–4619
- 63 Wiemann P, Guo C J, Palmer J M, et al. Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 17065–17070
- 64 Lin H C, Tsunematsu Y, Dhingra S, et al. Generation of complexity in fungal terpene biosynthesis: discovery of a multifunctional cytochrome P450 in the fumagillin pathway. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 4426–4436
- 65 Masurekar S P. Strain improvement for the production of fungal secondary metabolites. In: An Z Q. Handbook of Industrial Mycology. New York, Marcel Dekker, 2005. 616–642
- 66 Bergmann S, Schümann J, Scherlach K, et al. Genomics-driven discovery of pks-nrps hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 213–217
- 67 Maiya S, Grundmann A, Li S M, et al. The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: Identification of a gene encoding brevianamide f synthetase. *ChemBioChem*, 2006, 7: 1062–1069
- 68 Kosalková K, García-Estrada C, Ullán RV, et al. The global regulator laea controls penicillin biosynthesis, pigmentation and sporulation, but not roquefortine c synthesis in *Penicillium chrysogenum*. *Biochimie*, 2009, 91: 214–225
- 69 Li W, Yu J, Li Z, et al. Rational design for fungal laccase production in the model host *Aspergillus nidulans*. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 84–94
- 70 Li J, Neubauer P. *Escherichia coli* as a cell factory for heterologous production of nonribosomal peptides and polyketides. *New Biotech*, 2014, 31: 579–585

Research advances in secondary metabolites of pest control fungi in the post-genomic era

QI LanDa^{1,2}, WEI PengLin², ZHANG HanXing², CHEN GuoCan¹, ZHANG YingTao¹
& YIN WenBing²

1 Henan Academy of Science Institute of Biology Co., Ltd., Zhengzhou 450008, China

2 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Fungal secondary metabolites play an important role in the biological control of pests. The secondary metabolites produced by fungi, which are the main substance in biocontrol, have attracted more and more attention. With the development of sequencing technology in recent years, the use of genomic and bioinformatics technology to excavate fungal secondary metabolites has become a new hot spot, which also provide new strategies for the discovery of new fungal biocontrol agents in the post-genomic era. In this review, several typical insecticidal fungi and their invasion and pathogenic mechanisms were presented. Typically, insecticidal toxins produced by several common insecticidal fungi and the biosynthetic pathways were systematically summarized. Our review provides insights into the further development of fungal biocontrol agents. Finally, the application of fungal secondary metabolites in biocontrol agents was prospected.

entomopathogenic fungi, fungal secondary metabolites, biosynthesis, biocontrol agent

doi: [10.1360/SSV-2020-0014](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0014)