

基因组重排技术及其在真菌育种中的应用

王丽宁^{1,2}, 赵妍^{1,*}, 奚丽萍¹, 陈明杰^{1,2,*}

(1.上海市农业科学院食用菌研究所,上海市农业遗传育种重点开放实验室,
农业部南方食用菌资源利用重点实验室,国家食用菌工程技术研究中心,上海 201403;
2.上海海洋大学食品学院,上海 201306)

摘要:基因组重排(genome shuffling)是一种快速提高细胞表型的新颖的全基因组工程方法,它是基于多亲本的原生质体递归融合,提供了在缺少基因组序列数据或网络信息情况下的全基因组重组的优势。文中介绍了基因组重排的原理、优点及过程,概述了基因组重排在真菌育种中的应用,并展望了该技术的前景。

关键词:基因组重排,递归原生质体融合,真菌育种

Genome shuffling and its application in fungal-breeding

WANG Li-ning^{1,2}, ZHAO Yan^{1,*}, XI Li-ping¹, CHEN Ming-jie^{1,2,*}

(1.Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture of China, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201403, China;
2.College of Food Science & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: The technology of genome shuffling was a novel whole genome engineering approach for the rapid improvement of cellular phenotypes. Based on the recursive protoplast fusion with multi-parental strains, it offers the advantage of recombination throughout the entire genome without the necessity for genome sequence data or network information. This article introduced the principle, characteristics and process of genome shuffling, summarized its application in fungal-breeding and prospected the outlook of it.

Key words: genome shuffling; recursive protoplast fusion; fungal-breeding

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)18-0362-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.18.073

育种技术的发展经历了自然选育、诱变育种、杂交育种、原生质体融合育种、基因工程育种等几个阶段^[1-2],其中自然选育、诱变育种及杂交育种属于传统的育种方法。尽管传统的育种方法曾经发挥着巨大的作用^[3-5],但存在工程量巨大、耗时长且难于获取复杂表型的缺点。自从转基因技术问世以来,转基因微生物的研究取得了重大的进展^[6],但基因工程育种需要对目的菌株的遗传背景有较为深刻的了解,这在一定程度上限制了其应用。基因组重排(genome shuffling)又称基因组重组或基因组改组,是一种基于原生质体递归融合的新型分子育种技术^[7-9],是分子定向进化在全基因组水平上的延伸,它将重组的对象从单个基因扩展到整个基因组,从双亲本扩展到多亲本,从一轮原生质体融合扩展到多轮原生质

体融合,因此可以对菌株的目的性状进行更快以及更大范围的优化组合。基因组重排技术提出后,在细菌、放线菌以及真菌的育种上都展现出独特的优势,取得了较好的研究成果。

1 基因组重排的原理及优点

1.1 基因组重排的原理

基因组重排是将具有不同表型的菌株进行全基因组重组的一种手段,进行基因组重排首先需要构建一个含有各种不同正突变的基因组库(例如通过经典的诱变育种得到目的性状发生改进的不同的正突变菌株就构成了所需的基因组库),随后将选出的若干个正向突变株作为出发菌株,通过原生质体融合将这些正突变菌株的基因组进行随机重组,并筛选目的性状得到进一步改进的菌株来进行下一轮基因组重排,这样通过循环多轮的随机重组可以快速、高效地选育出表型得到较大改进的新菌株。

1.2 基因组重排的优点

与传统的育种方法相比,基因组重排具有更高的效率。人工选择育种对自然条件依赖性强、耗时

收稿日期:2013-12-31 * 通讯联系人

作者简介:王丽宁(1990-),女,硕士研究生,研究方向:食用菌遗传育种。

基金项目:国家食用菌产业技术体系[CARS-24]。

长、效率低;诱变育种正向突变率很低,筛选一株优良的生产菌株需要大量的时间和工作量,且连续的诱变会使菌株产生“疲劳效应”;原生质体融合技术可以扮演类似于有性生殖途径基因信息交流的作用,但仅限于双亲本之间的重组。基因组重排技术基于多亲本之间的递归融合,具有更大基因突变来源,递归融合还能使正向突变的表型聚集,多轮融合极大地提高了基因交换的概率。Zhang等^[7]发现2轮基因组重排取得的成果相当于20年经典育种才能完成。综上所述,扩大菌株的基因型和加速菌株进化速度是基因组重排技术最大的优势。此外基因组重排技术在无需了解微生物代谢途径、关键酶的表达基因、转录调控等背景知识的前提下,即可应用于菌株改良,尤其适合微生物代谢途径的遗传改造^[10],并且基因组重排技术具有操作简单、易推广、见效快等特点。

2 基因组重排的过程

简单来讲基因组重排的过程,即从亲本库中选择性状优良的菌株作为首轮融合的亲本进行融合,获得第一代融合株后,从中筛选出目的性状改进的菌株作为第二轮融合的亲本,以此类推进行多轮融合,主要包含以下操作步骤:

2.1 构建亲本库

亲本库即基因组重排中进行首轮原生质体融合的亲本集合体,包含了不同较好的性状以及多样性的差异。构建亲本库的方式主要有以下几种。

a.由突变体构建:从同一原始菌株出发,经理化诱变获得不同的正突变体。刘源慧^[11]对米曲霉(*Aspergillus oryzae*)FS-16分别进行紫外诱变和微波诱变,选取4株 α -淀粉酶产量提高的突变株与原始菌株FS-16作为亲本进行重排,得到了 α -淀粉酶酶活显著提高的重组子。

b.由种内不同菌株构建:同一种内的不同菌株,事实上可以看作是同一种微生物的不同自然突变体,其基因差异、融合频率以及融合子表型多样性都要优于同一菌株的不同突变体,这对优秀性状的整合或许更加有效。Gong等^[12]从自然界中筛选了5株产乙醇量较高的酿酒酵母(*Saccharomyce cerevisiae*)来构建亲本库,经基因组重排后得到的新菌株乙醇产量提高了2倍。

c.由不同种、属菌株构建:来自不同种、属的菌株,遗传差异相对更大,为融合后代提供了更丰富的基因型。Zhao等^[13]对轮枝霉(*Diasporangium sp.*)与黑曲霉(*Aspergillus niger*)进行基因组重排,获得了花生四烯酸产量提高的新菌株。

d.由DNA重组技术构建:该方法在细菌中已有研究报道,但目前真菌中应用较少。

2.2 融合与融合子的筛选

2.2.1 原生质体的制备与融合 原生质体的制备是融合的前提,制备原生质体主要参考的因素有菌龄、酶的种类、酶的浓度、酶解时间、温度、渗透压稳定剂、pH及再生培养基的设计等^[14-16]。诱导原生质体融合的方式有生物病毒法、化学法及电处理融合法等,

其中化学法和电处理融合法是当前最主要的促融方法。随着科学技术的进步,出现了一些新型的诱导原生质体融合的方法。Gong等^[17]用飞秒激光诱导红发夫酵母(*Phaffia rhodozyma*)进行细胞融合,在功率 $1.38 \times 10^4 \text{ W}$ 处理0.25s的情况下,酵母融合率达到了80%。Skelley等^[18]运用微流体技术对细胞配对和融合进行诱导,能正确配对和融合的细胞比例超过了50%,显著提高了融合效率。

2.2.2 融合子的筛选 从融合后产生的大量重组菌株中筛选出目的菌株关系到基因组重排的效率,因此筛选方法变得尤为重要。根据筛选目的不同,筛选方法也多样。筛选高产物的目的菌株时,主要依靠产物的物理和化学性质,如在琼脂培养基上的抑菌圈、透明圈及水解圈等。筛选对环境高耐受性的目的菌株时,则可以利用相应的选择培养基。此外,添加遗传标记也是一种有效的融合菌株筛选方法。翁艳军^[19]选用Met-缺陷型和Arg-缺陷型分别标记双亲,在基本培养基上筛选出营养互补的融合子。由于营养缺陷型的获取较为费时耗力,现在多使用灭活原生质体的标记方法,即首先采用热或者紫外线等手段使原生质体失活,然后用失活的原生质体进行融合,这种标记方法又分为单亲原生质体灭活和双亲原生质体灭活。Kang等^[20]分别利用紫外线和热灭活处理的亲本进行基因组重排研究,最终获得了表型理想的融合子。由于紫外线灭活损伤的主要是染色体,热灭活损伤的是细胞质,因此具有不同损伤位点的原生质体融合后通过互补作用能够再生,大大简化了融合子的筛选工作。近年来随着科学技术的发展,一些高通量的筛选方法和分析技术不断涌现,如液相色谱-质谱法、荧光激活细胞分选技术等,这些新技术显著提高了目的融合子的筛选效率。

2.2.3 递归融合 递归融合即从首轮重排的融合子中选出性状得到改进的融合子作为下一轮的亲本,将其制成原生质体再进行融合,重复以上步骤直至得到理想的融合子。递归融合的要义在于进行一轮融合后筛选出的融合菌株作为出发菌株,必须进入下一轮融合。

3 基因组重排在真菌育种中的应用

基因组重排技术经过十几年的发展,在真菌育种上已经有了诸多成功的应用,尤其在工业微生物的育种上发挥了重要的作用,并且体现出越来越显著的优势。

3.1 利用基因组重排技术提高真菌对环境的耐受性

真菌对环境的耐受性主要表现在以下几个方面:对产物的耐受性、对基质的耐受性、对副产物的耐受性、对生长环境(如温度、pH及溶剂等)的耐受性。基因组重排在改善真菌的耐受性方面比传统育种方法体现出更多的优势。El-Bondkly^[21]对海洋真菌曲霉菌(*Aspergillus Sp.* NRCF5)进行2种组合的复合诱变(亚硝基胍与紫外线、亚硝基胍与溴化乙锭)后,从中选出5株具有最高脱氧葡萄糖(2DG)耐受性的诱变株进行了4轮基因组重排,逐步将曲霉菌NRCF5对2DG的耐受性由0.1%(w/v)提高到1.0%(w/v)。酵母

作为一类重要的可利用真菌,研究者们以它为实验材料,借助基因组重排技术选育出多个对环境耐受性强的新菌株。Wei等^[22]通过4轮基因组重排过程,提高了克鲁斯假丝酵母(*Candida krusei*)对醋酸的抗性,同时对过氧化氢、热及冻融的抗性都有所增加;Shi等^[23]运用基因组重排技术,将工业酵母菌株SM-3的最高生长温度提高了20℃,对乙醇的耐受性提高了15%;Paramjit等^[24]对树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)进行4轮基因组重排后,发现其对硬木亚硫酸盐废液(HW SSL)的耐受浓度由65%(v/v)提高到了80%(v/v)以上,且重组子能更好地利用木糖和葡萄糖,产生更多的乙醇。这些研究结果表明,基因组重排是一种快速且有效提高真菌多重抗性的方法。

3.2 利用基因组重排技术提高真菌产物产量

很多真菌化合物对人类非常有益,如乙醇、酶、多糖等^[25-27],因此提高真菌代谢产物的产量可以在一定程度上扩大这些物质的来源、缩短制造周期、降低生产成本。然而代谢产物产量的提高依赖于基因水平上多个位点的协同变化,运用传统的方法来提高真菌产物产量工作量大且收获甚微。基因组重排基于多亲本的基因转移,能够使目的菌株的优良性状迅速聚集。Zhao等^[28]对树状多节孢(*Nodulisporium sylviform*)进行4轮基因组重排,获得了3株遗传性稳定的高紫杉醇生产菌株,采用薄层色谱法、高效液相色谱法以及液质联用技术对紫杉醇进行定性和定量分析,发现重组子F4-26的紫杉醇产量为516.37 μg/L,比基因组重排的亲本菌株提高了31.52%~44.72%。冯印^[29]将出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*) CICC 140334经诱变后获得的高产茁霉多糖突变株作为亲本进行4轮基因组重排,得到多糖产量比出发菌株提高了104.43%的重组子。此外研究者们还利用基因组重排技术,选育出高产纤维素酶^[30]、果糖基转移酶^[31]、中性蛋白酶^[32]以及α-淀粉酶^[11,33]的融合菌株,使人们对真菌的利用率得到显著提高。

3.3 利用基因组重排技术提高底物利用率及范围

在真菌表型工程改造中,真菌对于底物的高效利用能力也是期望获得的目的性状之一,真菌利用底物的能力也可通过基因组重排来提高。Kang等^[20]将出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*) N3.387进行3轮基因组重排后得到菌株F3-2,与野生型菌株相比,新菌株对原材料的利用率提高了29.0%。Zhao等^[13]将轮枝霉(*Diasporangium sp.*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)作为首轮基因组重排的亲本,经过3轮重排后获得了轮枝霉碳谱扩大的菌株,亲本菌株只能利用测试8种碳源中的4种,而重排后的新菌株能够利用全部的8种碳源,这可能是因为与黑曲霉重组后提高了轮枝霉的羧甲基纤维素酶活性,从而扩大了利用碳谱的范围。

3.4 利用基因组重排技术提高真菌遗传多样性

遗传多样性对丰富真菌种质资源、促进真菌进化、提高真菌对环境的耐受性等都具有重要意义。董计巧^[34]利用离子束诱变和基因组重排技术对斜卧青霉(*Penicillium decumbens*) JUAIO-1进行改造,并采

用RAPD技术对融合子及其出发菌株开展了遗传相似性分析,研究结果表明融合菌株和出发菌株既有遗传相似性,又在基因组水平上发生了改变。林峻等^[35]对碱性脂肪酶产生菌扩展青霉(*Penicillium expansum*) FS8486菌株和溜曲霉(*Aspergillus Tamarii*) FS-132进行2轮基因组重排,得到的重组子中酶活最高者较出发菌株FS8486提高了317%,在对亲本及子代菌株进行RAPD多态性分析时,发现经基因组重排的两子代菌株间的遗传距离(0.6593)要大于两亲本间的(0.544),表明基因组重排确实能够有效提高子代菌株的遗传多样性。

4 展望

基因组重排依赖于相对成熟的原生质体融合技术,在传统育种方法所提供的遗传多样性亲本的基础上,通过全基因组水平上的重组使得某一或某些优良性状集聚在后代中,为真菌菌种的性状改良提供了一个有利的平台。而正突变基因组库的建立是基因组重排的前提条件,其多样性以及与育种目标的相关性直接关系到重排的成功与否,因此在正突变基因组库的构建方面可能需要更多的探索。多亲本融合依赖于有效的融合方法以及高效的融合子筛选技术。相较于传统的化学融合与电融合,虽然新兴的融合技术(如激光诱导、微流体技术等)能够大幅度提高融合效率,但其使用范围受到限制,技术水平也有待进一步提高与完善。目前普遍使用的热灭活与紫外灭活标记,虽然可以简化融合子的筛选,但同样会给原生质体带来生理性损伤,影响融合效率,因此融合的标记技术可能需要开展深入研究。与此同时,目前真菌中高效的融合子筛选方法较少,应用水平较低,严重制约了基因组重排的效率,因此高通量的筛选方法是实现基因组重排的有力保证。

随着基因组重排技术的逐步完善以及与其他生物技术的结合,使其在真菌菌种改良中的作用越来越重要,目前基因组重排在酵母^[12,14,22-24]、青霉^[30,34-35]、曲霉^[11,31-33,36]等真菌的育种上已体现出巨大的优势。食用菌是重要的大型真菌,具有较高的营养价值与保健功能,既可食用也可药用^[37],因此食用菌菌种的改良具有重要经济意义,但目前基因组重排技术用于食用菌育种中的研究报道甚少。依据基因组重排在其他真菌菌种改良中所取得的成就,相信其也能够培育丰产、高抗的优质食用菌菌种方面发挥独特的优势。

参考文献

- [1] 赵超敏,车振明. 工业有益微生物育种技术的研究进展[J]. 食品研究与开发,2008,29(2):172-174.
- [2] 谭琦,潘迎捷,黄为一. 中国香菇育种的发展历程[J]. 食用菌学报,2000,7(4):48-52.
- [3] 李荣杰. 微生物诱变育种方法研究进展[J]. 河北农业科学,2009,13(10):73-76,78.
- [4] 吴帅,陈叶福,沈楠,等. 高耐性酿酒酵母的杂交育种[J]. 酿酒科技,2006(10):20-26.
- [5] 宋春艳,刘德云,尚晓冬,等. 香菇杂交新品种“申香16号”

的选育及示范推广[J]. 食用菌学报, 2010, 17(4): 11-14.

[6] 赵妹娟, 林俊芳, 王杰, 等. 安全选择标记的转基因食用菌研究进展[J]. 食用菌学报, 2007, 14(1): 55-61.

[7] Zhang YX, Perry K, Vinci VA, et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria[J]. Nature, 2002, 415: 644-646.

[8] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 707-712.

[9] Stephanopoulos G. Metabolic engineering by genome shuffling[J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 666-668.

[10] Petri R, Schmidt DC. Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2004(4): 298-304.

[11] 刘源慧. 应用基因组改组技术选育真菌 α -淀粉酶高产菌株[D]. 福州: 福建师范大学, 2011.

[12] Gong GL, Wang CL, Chen MH, et al. Genome shuffling to improve the ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Abstracts/Journal of Biotechnology, 2008(136S): S290-S344.

[13] Zhao M, Dai CC, Guan XY, et al. Genome shuffling amplifies the carbon source spectrum and improves aracidonic acid production in *Diasporangium* sp. [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2009(45): 419-425.

[14] 李洁, 王刚, 张利平. 产番茄红素红酵母基因组重排实验条件的优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(8): 228-231.

[15] 李灿明, 黄时海, 张云开. 灭活原生质体融合技术提高豆豉纤溶酶菌产酶量[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 140-142.

[16] 常登龙, 洪玉, 杨永军. 同种接合型酵母菌株Y2HGold的原生质体融合研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(12): 233-238.

[17] Gong JX, Zhao XM, Xing QR, et al. Femtosecond laser-induced cell fusion[J]. Applied Physics Letters, 2008, 92(9): 093901/1-093901/3.

[18] Skelley AM, Kirak O, Suh H, et al. Microfluidic control of cell pairing and fusion[J]. Nature Methods, 2009, 6(2): 147-152.

[19] 翁艳军, 赵作棋, 徐建国, 等. 青霉素产生菌的原生质体融合[J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28(3): 129-130.

[20] Kang JX, Chen XJ, Chen WR, et al. Enhanced production of pullulan in *Aureobasidium pullulans* by a new process of genome shuffling[J]. Process Biochemistry, 2011, 46: 792-795.

[21] El-Bondkly AMA. Molecular identification using ITS sequences and genome shuffling to improve 2-deoxyglucose

tolerance and xylanase activity of marine-derived fungus, *Aspergillus* Sp. NRCF5 [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167: 2160-2173.

[22] Wei PY, Li ZL, He P, et al. Genome shuffling in the ethanologenic yeast *Candida krusei* to improve acetic acid tolerance[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2008, 49: 113-120.

[23] Shi DJ, Wang CL, Wang KM. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36: 139-147.

[24] Paramjit KB, Pinel D, Martin VJJ, et al. Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling [J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 81: 179-186.

[25] 李科, 甘明哲, 付洁. 利用木糖产乙醇的真菌筛选及发酵条件优化[J]. 太阳能学报, 2010, 31(9): 1117-1122.

[26] 石文卿, 陶能国, 刘跃进, 等. 一株高产纤维素酶真菌的分离及产酶特性研究[J]. 环境工程学报, 2011, 5(6): 1435-1440.

[27] 肖建辉, 蒋依辉, 梁宗琦, 等. 食药真菌多糖研究进展[J]. 生命的化学, 2002, 22(2): 148-151.

[28] Zhao K, Ping WX, Zhang LN, et al. Screening and breeding of high taxol producing fungi by genome shuffling[J]. Science in China Series C: Life Sciences, 2008, 51(3): 222-231.

[29] 冯印. 基因组改组构建高产茁霉多糖菌株研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.

[30] 程艳飞. 基因组重排在产纤维素酶斜卧青霉菌种改造中的应用[D]. 济南: 山东大学, 2009.

[31] 何小妮, 陈子健, 蒋波, 等. 高产果糖基转移酶米曲霉菌株的选育[J]. 食品工业科技, 2013, 34(22): 135-140.

[32] 李立凤, 潘力, 彭昶, 等. 基因组改组: 几株同源酱油曲霉的多亲株电融合育种[J]. 中国调味品, 2006(7): 14-18.

[33] 张志国. 基因组改组选育米曲霉 α -淀粉酶高产菌株[D]. 福州: 福建师范大学, 2009.

[34] 董计巧. 离子注入和基因组重排提高青霉产纤维素酶能力及应用效果研究[D]. 济南: 山东大学, 2011.

[35] 林竣, 施碧红. 基因组改组技术快速提高扩展青霉碱性脂肪酶产量[J]. 生物工程学报, 2007, 23(4): 672-676.

[36] 潘力, 梁燕嫦, 苗小康, 等. 基于基因组改组的米曲霉沪酿3.042多亲株PEG介导融合育种[J]. 中国酿造, 2008(23): 70-73.

[37] 黄年来, 林志彬, 陈国良, 等. 中国食药真菌学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2010: 10-14.

(上接第350页)

[9] TD Sherman, KC Vaughn, SO Duke. A limited survey of the phylogenetic distribution of polyphenol oxidase[J]. Phytochemistry, 1991, 30: 2499-2506.

[10] Markkola AM, Ohtonen R, Tarvainen O. Peroxidase activity as an indicator of pollution stress in the fine roots of *Pinus sylvestris* [J]. Water, Air and Soil Pollution, 1990, 52: 149-156.

[11] 赵梅霞, 闫师杰, 肖丽霞, 等. 红外CO₂分析器测定果实呼吸强度参数初探[J]. 现代仪器, 2005(2): 30-32.

[12] Loaiza J, Cantwell M. Postharvest physiology and quality of cilantro[J]. HortScience, 1997, 32: 104-107.

[13] 王钦德, 杨坚. 食品实验设计与统计分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.

[14] Lamikanra O. Enzymatic effects on flavor and texture of fresh cut fruits and vegetables[A]. In: Lamikanra, O. Fresh cut fruits and vegetables: Science, Technology and Market[C]. CRC Press, LLC, 2002: 125-186.