

基因组改组及其在食用菌育种上的应用前景

刘芳, 谢宝贵

(福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002)

摘要:介绍了基因组改组技术的发展历程、技术特点及应用情况, 分析限制该技术广泛运用的因素, 同时对该技术在食用菌育种上的可行性进行初步探讨, 展望该技术在食用菌育种上的应用前景。

关键词: 基因组改组; 食用菌; 育种

中图分类号: Q 789

文献标识码: A

Genome shuffling and mushroom breeding

LIU Fang, XIE Baogui

(College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: The development, technical characteristics and application of genome shuffling is introduced. Factors that constrain its wide applications are discussed. The viability and prospect for its application in breeding new mushroom varieties are presented.

Key words: Genome shuffling; mushroom; breeding

基因组改组 (Genome shuffling) 技术是首先选择一个原始亲株, 通过诱变获得多个表型得到提高的正性突变株, 构建突变候选株文库, 以这些正性突变株进行第1轮多亲株融合, 获得第一代融合株; 再从中选择表型获得提高的菌株作为第2轮融合的亲本, 依此类推进行多轮的多亲株融合, 最终获得性状被提升的目的菌株。这样就将引起正性突变的不同基因重组到同一个或少数几个菌株中, 最终获得具有多重正向进化标记的目标菌株^[1-3]。

1 基因组改组技术的发展历程

1994年, Maxygen公司的Stemmer首先提出了在体外定向进化分子的方法DNA shuffling技术。其方法是: 将同源的DNA用DNAase I进行消化成片段, 然后将得到的随机片段无引物PCR, 使之重新随机装配, 从而获得了多种排列组合的突变基因库, 最后利用设计好的引物PCR, 得到预期的重组体^[2]。

基于相似的原理, Stemmer等^[2]将DNA shuffling技术延伸到家族改组上, 并提出了全基

因组改组育种思路。该方法将传统诱变与原生质体融合技术相结合, 快速选育高效的正向突变菌株。Genome shuffling技术是DNA shuffling技术在全基因水平的延伸, 它将重组的对象从单个基因扩展到整个基因组, 因此可以在更广泛的范围内对菌种的目的性状进行优化组合^[3]。

2002年, Zhang等^[4]在Nature上发表了首例基因组改组育种报道, 利用基因组改组技术以弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)营养缺陷型菌株为亲本通过四轮递推式融合, 迅速地使弗氏链霉菌的泰乐菌素产量得到提高。

目前, 科研工作者已经将基因组重组技术与DNA重组技术和代谢工程等其他生物技术相结合, 已经衍生出多种定向进化方法, 如外显子改组(exon shuffling)、DNA家族改组(family DNA shuffling)、StEP(交错延伸过程)、RACHITT(临时模板随机嵌合技术)、与产生杂交酶的渐增切割法相结合的SCRATCH技术等, 这些都将大幅改进微生物性状。随着Genome shuffling技术的不断完善与成熟, 将引起传统微生物育种的一场革命^[5]。

收稿日期: 2010-01-27 初稿; 2010-04-21 修改稿

作者简介: 刘芳(1980-), 女, 博士研究生, 助教, 主要从事微生物学研究(E-mail: liuyuan8011@yahoo.com.cn)

通讯作者: 谢宝贵(1962-), 男, 教授, 主要从事微生物学与食用菌学的研究(E-mail: mrefafu@163.com)

基金项目: 福建省教育厅科技项目(JA10109)

2 基因组改组技术的特点

2.1 比传统选育更快速有效

传统的育种方法包括自然选育、诱变育种、杂交育种。自然选育虽然方法简单，但筛选周期很长；诱变育种通常是将每一轮产生的突变体库中筛选出最优的一株菌株作为下一轮诱变的出发菌株，但长期诱变处理会造成菌种活力衰退，产量下降；而杂交育种技术在微生物不同种之间难以形成稳定的重组体。而基因组改组技术则是将一次诱变获得的若干正性突变株共同作为出发菌株，经过递推式的多轮融合实现较大范围内的基因重组，打破了不同种之间的育种界限，育种周期短效率高，并可以基本避免诱变选育中因多次诱变导致的“钝化”反应和“饱和现象”，在一定程度上克服了传统选育存在的缺点^[5]。

2.2 能提高子代菌株的遗传多样性

基因组改组技术源于原生质体融合技术，但两者最大区别在于基因组改组技术使用多亲本而非双亲本，由于DNA重组的随机性，并且进行多轮递推式融合，能产生各种各样的突变组合。因此经基因组改组的子代菌株间的遗传距离将高于两亲本间的遗传距离，这将大大增加子代群体内的遗传多样性，从而提高了获得优良性状菌株的几率，为进一步改良菌株提供丰富的资源^[5]。

2.3 产生的子代稳定性与安全性高

在自然进化过程中，常常通过有性生殖和基因重组来合理利用突变菌库中的基因差异，积累和强化有益变异，消除和淘汰有害突变，因此有可能产生跳跃性的进化。基因组改组技术正是巧妙地模拟和发展了自然进化过程，合理地利用了突变菌库中的大部分菌株，试验过程结合了工程学原理和人工设计，在实验室里实现微生物全细胞快速定向进化，剔除基因组中有害基因，累积有益变异基因，达到人工进化目标。用 del Cardayré 的话说：“它们原本就是在自然界中实实在在发生的事情，我们只是帮助这些菌株打破了它们之间的界限，加快了它们的遗传物质组合在一起的速度”^[4]。因此用基因组改组技术筛选出的菌株的稳定性更高。

由于基因组改组的目标是模拟自然进化过程，将多个亲本菌株的有益变异基因组合在一起，因此相对于人工诱变育种而言，基因组改组的多轮递推融合在很大程度上模拟了自然进化过程，不但提高了菌株的稳定性，同时也将诱变中产生的有害变异降到最低。相对基因工程产生的菌株而言，基因组

改组是利用生化手段让亲本中优良的基因自然地集中在一起，不存在利用外来基因进行拼接的可能，因此经基因组改组产生的菌株的安全性更高。

2.4 技术实用且费用较低

该技术对设备的要求不高，费用也较低（一轮基因组改组的费用略相当于一轮理化诱变的费用），同时该技术易于实施，在了解微生物遗传性状的基础上就可实现微生物的定向育种，不需要对微生物基因的结构和功能作非常详细了解^[6]，因此，在一般实验室条件下就可以开展该技术的相关试验。

3 限制基因组改组技术广泛应用的因素

基因组改组技术是一种有效的改良菌株方法，然而却未推广开来，主要是因为改组后菌株的高通量筛选方法限制了基因组改组的广泛应用。每轮基因组改组都能产生大量的改组菌株，这就要求筛选方法要目标明确且简单高效，这在改组产生生物活性物质的菌株和跨种跨属菌株间的融合改组时就显得尤为困难。目前已经开发了一些高通量筛选方法，有些方法集计算机控制、自动化操作、高灵敏度检测、数据自动采集和处理于一体，可以实现快速、微量、灵敏和大规模的筛选。其中一类比较重要的是荧光激活细胞分类法（fluorescence activated cell sorting, FACS），例如：Arnold 等利用山葵过氧化物酶（HRP）可以将苯酚或儿茶酚等具有羟基的芳香族化合物连接成可发出荧光的二聚体的原理，开发了一种高通量的荧光数字成像筛选方法，这种方法可以快速从改组后得到的大量菌株中筛选出加氧酶（该酶催化芳香族化合物的羟基化反应）活性得到提高的菌株^[2]。此外，凝胶微滴技术（gel micro drop technology）、细胞指示剂法（cell-cell indicator assay）等也在高通量筛选中有着成功的应用，但总的来说，由于高通量筛选方法都具有较强的专一性，亟需开发和完善针对各种微生物的高通量筛选方法来促进基因组改组推广运用^[3, 5]。

4 基因组改组技术在真菌育种上的应用

目前基因组改组技术应用于真核微生物已有许多成功的例子，尤其是在工业微生物上已开发出不少的产品，并呈日益增加的发展趋势。

4.1 利用基因组改组技术研究真菌的遗传规律

施巧琴等^[6]以碱性脂肪酶产生菌扩展青霉

(*Penicillium expansum*) FS8486 的 5 株 NTG 诱变突变株和 1 株分离自新疆火焰山口土样的能产少量的胞外脂肪酶耐热野生菌株溜曲霉 (*Aspergillus tamarii*) FS-132 作为亲本出发菌株, 经过两轮递推式原生质体融合, 最后获得的改组菌株 as50 和 B91。与原来出发菌株相比, 耐热性提高了 7℃, 产量提高了 3 倍以上。对亲本和改组菌株进行 RAPD 多态性分析, 初步确定基因组改组中由于 DNA 重组的随机性, 使子代菌株间的遗传距离高于两亲本间的遗传距离, 有效提高子代菌株的遗传多样性, 为研究亲本与子代菌株间的遗传规律提供了更广阔的空间^[7]。

4.2 利用基因组改组技术提高真菌的耐受性

陆筑凤等^[8]利用基因组改组技术, 以通过紫外诱变方法筛选获得的 5 个耐性有所提高的酿酒酵母正突变株作为出发菌, 进行连续融合, 复合筛选融合子, 最终获得了能耐受 46℃ 和 16% vol 乙醇浓度的酵母菌, 耐高温和耐酒精能力分别提高了 7% 和 33%。

王灏等^[9]以 3 株酿酒酵母菌作为出发菌株, 经紫外诱变和一系列平板筛选, 获得耐高温或耐乙醇性状有较大提高的 7 株正突变菌株, 以这些菌株作为出发菌株, 进一步用硫酸二乙酯诱变, 获得了乙醇耐受性能较高的菌株, 再经过 2 轮基因组改组, 筛选获得 14 株耐温和耐乙醇浓度都较出发菌株有了较大提高的菌株, 其中 R24 菌株在 35℃ 摆瓶发酵过程中, 能耐受的乙醇浓度为 12.93% vol, 比原始出发菌株提高约 5% vol, 从而选育出既耐受较高温度又耐受较高乙醇的菌株。该思路对于采用基因组改组技术选育同时具有多种性状的优良菌株有指导意义。

4.3 利用基因组改组技术选育优良菌株

Maxgen 公司利用基因组改组技术, 将野生型泰乐菌素 (tylosin) 产生菌 SF1 进行了一轮常规诱变, 在诱变后的 22 000 个菌株中得到 11 个正变菌株, 将这 11 个菌株进行 2 轮基因组改组后得到 7 个变异菌株, 其泰乐菌素的产量均高于 Eli Lilly 公司的 SF21 的泰乐菌素产量^[4]。Maxgen 公司的育种周期只有 1 年, 而 Eli Lilly 公司的菌株 SF21 则是花了 20 年经 20 轮传统诱变从 1×10^6 个 SF1 突变株中筛选得到的。由此可见, 基因组改组能在短期内大幅提高微生物代谢物的产量。

王明兹^[10]以拟茎点霉 *Phomopsis* sp A123 作为出发菌株, 经紫外和 NTG 诱变获得 8 株去乙酰基真菌环氧二烯 (deacetyl mycoepoxydiene,

DAM, 一种抗癌物质) 产量较高的菌株, 利用这 8 株菌株经不同方法灭活并进行基因组改组, 经过 2 轮融合改组, 极大地提高了 DAM 的产量, 改组前 A123 菌株 DAM 的产量只有 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而改组后的菌株 DAM 的产量可高达 $180 \sim 220 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

潘力等^[11]根据基因组改组技术, 将紫外线一氯化锂、NTG 复合诱变得到的米曲霉沪酿 3.042 的 8 株突变株作为候选株文库, 利用这些菌株分生孢子的原生质体经多亲株双灭活和 PEG 介导融合, 融合子经酪蛋白平板初筛, 以及中性蛋白酶酶活复筛, 再通过 2 轮融合重组, 筛选出 6 株高产中性蛋白酶的融合株。其中融合菌株 FI.41 酶活达到 $7412 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (干基), 比原始出发菌株 4212 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ (干基) 提高 1.76 倍, 而且得到的改组菌株具有良好的遗传稳定性, 证明了基因组改组技术在米曲霉育种上的可行性。

5 基因组改组技术在食用菌育种上的应用前景

2002 年, Stephanopoulos 在《Nature Biotechnology》上发表了题为“Metabolic engineering by genome shuffling”的综述性文章, 高度评价了基因组改组在代谢工程中的应用潜力, 认为该技术的出现是细胞改良中的一个重要里程碑^[12]。

基因组改组技术在食用菌育种上的运用国内还未有相关的文献报道。基因组改组技术可以通过跨属亲本或多亲本的递推融合和高通量筛选实现食用菌基因组改组。在技术上这是对食用菌传统育种方案的革新同时又避免了分子遗传育种的技术难题, 在育种目标上又能将所有亲本中的优良基因集合到食用菌子代细胞上, 这对于食用菌菌种改良具有非常重要的意义。例如, 在草菇育种研究方面, 草菇属高温性菌类, 对温度的要求苛刻。草菇生物学效率很低, 草菇商品采收期很短, 又不能低温储运^[13]。因此对草菇菌种的改良或基因改造一直是食用菌育种学家十分关注的课题, 以往传统的理化诱变往往耗时长且效果不明显; 基于现代分子生物学的基因转化和重组技术, 要求的设备和药品都价值不菲。采用基因组改组技术, 分别利用草腐生、杂生和木腐生食用菌等的原生质体与草菇原生质体进行多亲本递推融合, 使有利性状组合拼接, 实现草菇全细胞快速定向进化, 快速地选育出稳定优良的草菇菌株。

另外, 在草菇遗传研究方面, 人们对草菇有性

生殖行为、核的变化、交配类型等都缺乏科学、全面、系统的研究和了解,无法科学准确的描述草菇的生活史^[14],如果我们通过对草菇的基因组改组,就能筛选得到大量的不同表型的突变体,将这些突变体与亲本菌株进行生化、分子以及基因组学方面的比较,就可以从中更广泛、更深入地探讨草菇的遗传规律。

近年来,原生质体融合技术在食用菌育种上的应用取得了较大进展,先后获得了食用菌种内、种间、科间、甚至属间原生质体融合子^[15~19];并已从属间原生质体融合菌株中选育出优良品种在生产上广泛应用^[15],如四川省农科院在上世纪末用金针菇和凤尾菇进行融合得到了金凤二号这一优良食用菌品种^[18]。这使基因组改组技术在食用菌育种上的运用有了一定的技术基础,工业微生物基因组改组成功的例子也给食用菌基因组改组提供了借鉴,只要能建立改组后融合子的高通量筛选方法,基因组改组技术就会在食用菌育种上得到广泛应用。

5.1 当前食用菌融合子的筛选方法存在的问题

目前,适用于食用菌融合子的筛选方法主要有以下两种:一是先用不同的理化方法分别完全灭活亲本的原生质体,并进行融合,将融合处理后的菌液涂布在再生平板上,只要再生平板上有菌落出现就初步判定为融合子的菌落^[20]。二是先对两亲本进行理化诱变,产生不同的营养缺陷型菌株,进而分别制备原生质体并融合,然后涂布在基本培养基上,在基本培养基上若有菌落出现,就初步判定为融合子的菌落^[21~22]。但是这些方法都存在一定问题。如在第一种方法里,用理化方法完全灭活亲本,理化灭活方法在一定程度上对亲本造成伤害,产生的绝大多数融合子各方面性状比亲本差^[23]。第二种方法里,所用的理化诱变方法产生的菌株不稳定、且判定营养缺陷型菌株的工作量大,耗时长^[23]。因而这些筛选融合子的方法不适用于食用菌基因组改组的高通量筛选。

5.2 利用食用菌对抗生素的天然抗性的不同完成基因组改组的高通量筛选

在对食用菌进行分子转化和克隆的研究中发现不同科的食用菌对某种抗生素的抗性存在差别^[24],如草菇、双孢蘑菇中的大多数品种对一定浓度的潮霉素天然敏感,而平菇、金针菇中的绝大多数品种对一定浓度的潮霉素不敏感。因此在基因组改组中,就可以利用食用菌对抗生素的天然抗性的不同来完成高通量筛选。

本人在试验中发现,草菇(屏优1号)对50 ng·μL⁻¹的潮霉素敏感,而平菇(PL19、PL270等)对50 ng·μL⁻¹的潮霉素不敏感。因此就可利用50 ng·μL⁻¹的潮霉素的再生平板直接对融合产物进行初步筛选,能在50 ng·μL⁻¹的潮霉素再生平板上生长的草菇菌株就可初步判定为草菇与平菇的融合子。利用此法就可以对融合子进行高效且直观的筛选,且能为多轮递推融合提供效率上的保障,使利用基因组改组技术对草菇进行高效育种成为可能。

因此,食用菌基因组改组不仅应借鉴工业微生物基因组改组的方法和思路,还必须开发适用于食用菌的多种融合子高通量筛选方法,为食用菌高效育种开辟新道路。

参考文献:

- [1] 罗剑, 杨民和, 施巧琴, 等. 微生物菌种选育中的基因组改组技术及其应用进展 [J]. 生物技术, 2008, 18 (1): 81~83.
- [2] 李义勇, 张亚雄. 基因重组技术在工业微生物菌种选育中应用的研究进展 [J]. 中国酿造, 2009, 202 (1): 11~14.
- [3] 史晓昆, 王秀然, 刘东波. Genome Shuffling 技术在微生物遗传育种中的应用 [J]. 农业与技术, 2005, 25 (1): 145~147.
- [4] YING-XIN ZHANG, KIM PERRY, VICTOR A, et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria [J]. Nature, 2002, 415: 644~646.
- [5] 陈涛, 陈洵, 王靖宇, 等. DNA 及基因组改组在代谢工程中的应用 [J]. 化工学报, 2004, 55 (11): 1753~1758.
- [6] MELANIE BA BCOCK, ADAM PAVLICEK. Shuffling of Genes Within Low-Copy Repeats on 22q11 (LCR22) by Alu-Mediated Recombination Events During Evolution [J]. Genome Research, 2003, 13: 2519~2532.
- [7] 林峻, 施碧红, 施巧琴. 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.
- [8] 陆筑凤, 李超, 苗小康, 等. Genome shuffling 技术选育高耐性酿酒酵母 [J]. 酿酒科技, 2008, 169 (7): 23~25.
- [9] 王灏, 王航, 孟春, 等. 基因组改组技术选育耐高温、耐高乙醇酿酒酵母菌株的研究 [J]. 微生物学通报, 2007, 34 (4): 705~708.
- [10] 王明兹. 两株植物内生真菌 A123 与 TF5 基因组改组 [D]. 厦门: 厦门大学, 2008.
- [11] 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, 200 (23): 70~73.
- [12] STEPHANOPOULOS G. Metabolic Engineering by Genome Shuffling [J]. Nature Biotechnology, 2002, 20: 666~668.
- [13] Y LI, K Y CHA, Y Z WU, et al. The effect of lipids and temperature on the physiology and growth of *Volvariella volvacea* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21: 105~110.

- nology, 8: 621– 626.
- [14] SAMARAWIRA. A classification of the stages in the growth cycle of the cultivated paddy straw mushroom (*Volvariella volvacea* singer) and its commercial importance [J]. Economic Botany, 1979, 33 (2): 163– 171.
- [15] 任轩, 贾乐, 杨凤苓, 等. 食用菌原生质体融合育种研究进展 [J]. 生物技术通报, 2008 (2): 42– 44 53.
- [16] 范雷法, 潘慧娟. 食用菌属间原生质体融合研究初报 [J]. 中国食用菌, 2005, 24 (5): 21– 22.
- [17] 肖在勤, 谭伟, 彭卫红, 等. 金针菇与凤尾菇科间原生质体融合研究 [J]. 食用菌学报, 1998, 5 (1): 6– 12.
- [18] 彭卫红, 甘炳成, 郑林用, 等. 荚蒾与凤尾菇目间原生质体融合研究初报 [J]. 菌物学报, 2005, 24 (1): 42– 47.
- [19] J Zhao, S T Chang Interspecific hybridization between *Volvariella volvacea* and *V. bomby cina* by PEG– induced protoplast fusion [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1997, 13: 145– 151.
- [20] 罗立新. 细胞融合技术与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [21] 王春平, 韦强, 鲍国连. 微生物原生质体融合技术研究进展 [J]. 动物医学进展, 2008, 29 (5): 64– 67.
- [22] 王鑫, 车振明, 黄韬睿. 原生质体融合技术在微生物菌种选育中的应用 [J]. 食品研究与开发, 2008, 29 (10): 174– 176.
- [23] 邱雁临, 曾莹, 胡赛阳, 等. 原生质体融合子代的筛选和鉴定 [J]. 生物技术, 2003, 13 (6): 17– 19.
- [24] 刘玲, 叶博, 刘长江. 原生质体融合亲本菌株抗药性标记的筛选 [J]. 江苏农业科学, 2007 (3): 225– 227.

(责任编辑: 柯文辉)