



里氏木霉有性生殖的分子机理及其在遗传育种中的应用

罗宇航^{1,2}, 江贤章^{1,2}, 陈秀珍³, 董志扬³, 秦丽娜^{1,2*}

1 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350000

2 福建师范大学工业微生物教育部工程研究中心, 福建 福州 350000

3 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

罗宇航, 江贤章, 陈秀珍, 董志扬, 秦丽娜. 里氏木霉有性生殖的分子机理及其在遗传育种中的应用. 微生物学报, 2022, 62(2): 508–519.

Luo Yuhang, Jiang Xianzhang, Chen Xiuzhen, Dong Zhiyang, Qin Lina. Molecular mechanism of sexual reproduction in *Trichoderma reesei* and its application in strain engineering. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 508–519.

摘要: 将木质纤维素转化为可发酵糖用于生产生物燃料以及生物基化学品是实现碳中和的有效途径之一。木质纤维素降解酶在这一过程中发挥着重要作用。里氏木霉是应用最为广泛的纤维素酶、半纤维素酶工业生产菌株。长期以来, 里氏木霉一直被认为是红褐肉座菌的无性型, 只能进行无性繁殖, 菌种改良以经典诱变、基因育种等为主。直到近些年才证实里氏木霉可以进行有性生殖, 这一发现为里氏木霉通过遗传有性杂交育种提供了可能性。本文对里氏木霉有性生殖的分子机制以及研究进展进行了综述, 并结合作者多年来在里氏木霉菌种改造中的工作积累, 对里氏木霉菌株的遗传改良新策略提出展望。

关键词: 交配型; 雌性不育; 信息素; 节段性非整倍体; 重复诱导点突变

基金项目: 国家自然科学基金(31800060); 福建省科技计划项目资助(2019I0009)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31800060) and by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2019I0009)

*Corresponding author. E-mail: qinln@fjnu.edu.cn

Received: 17 August 2021; Revised: 15 October 2021; Published online: 9 November 2021

Molecular mechanism of sexual reproduction in *Trichoderma reesei* and its application in strain engineering

LUO Yuhang^{1,2}, JIANG Xianzhang^{1,2}, CHEN Xiuzhen³, DONG Zhiyang³, QIN Lina^{1,2*}

¹ School of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350000, Fujian, China

² Engineering Research Center of Industrial Microbiology of Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350000, Fujian, China

³ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Converting lignocellulose into fermentable sugars for the production of biofuels and bio-based chemicals is one of the effective ways to achieve carbon neutrality. Lignocellulose-degrading enzymes play an important role in this process. *Trichoderma reesei* is the most widely used strain for the production of cellulases and hemicellulases. For a long time, *T. reesei* has been considered as the asexual form of *Hypocrea jecorina*, which can only reproduce asexually. The strain improvement is mainly based on traditional mutagenesis and gene manipulation. The sexual cycle of *T. reesei* has been discovered over the last few years, which provides the possibility for the genetic crossbreeding of *T. reesei*. Combined with previous work in genetic breeding of *T. reesei* from our laboratory, this article comprehensively describes the sexual reproduction process, characteristics, and regulation mechanism of *T. reesei* and prospects the genetic improvement strategy, providing a reference for the further development and application of *T. reesei* as a cellulase- and recombinant protein-expressing host.

Keywords: mating type; female sterility; pheromone; segmental aneuploidy; repeat-induced point mutation

里氏木霉(*Trichoderma reesei*)是一种丝状子囊真菌(*Filamentous ascomycetes*),能够分泌多种纤维素和半纤维素水解酶,具有良好的生物安全性,胞外蛋白分泌量较大,作为纤维素酶以及重组蛋白的生产菌株具有广泛的应用领域^[1-5]。因此,对里氏木霉进行遗传改良提高菌种性能具有很好的应用前景。相较于利用分子生物学改良菌种的方法,有性生殖的策略无需完全清楚菌株的基因组信息,并且可能将不同菌株的优良特点在子代菌株中形成杂种优势^[6]。与传统的诱变育种容易产生回复突变相比,遗传杂交产生的突变株具有更好的稳定性。然而,目前对里氏木霉有性生殖的研究还处于起步阶段,国内相关方面的研究更是几乎空白。本文对里氏木霉的有性生殖过程、特点及其调控机

制的最新进展进行了全面阐述,并结合作者在里氏木霉遗传育种方面的研究对里氏木霉的遗传改良策略提出展望,为里氏木霉工程菌株的进一步开发与应用提供借鉴。

1 里氏木霉有性生殖方式的发现

第二次世界大战期间,Marry Mandels 和 Elwyn T. Reese 发现了一株能够降解结晶纤维素的真菌,并将其命名为 QM6a,这是里氏木霉首次被发现^[7]。经分子鉴定后发现红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*)基因序列与里氏木霉完全一致,然而,红褐肉座菌主要进行有性生殖,并且能够在自然环境中观察到子囊壳分离,因此里氏木霉当时被认为是红褐肉座菌的无性型变种,只能进行无性繁殖^[8]。

随着越来越多的木霉属被鉴定, Druzhinina 等对大量木霉进行了分子生物学特征分析, 发现不少木霉具有有性生殖的特点^[9], 并且没有证据表明里氏木霉存在生殖隔离, 因此里氏木霉开始被认为具有有性生殖的能力^[10]。此前里氏木霉有性生殖行为尚未被发现可能是由于自然环境条件不利于里氏木霉有性生殖。Schmoll 等在里氏木霉中筛选纤维素酶调节因子时, 发现了一个小核糖核酸并在之后证明其编码里氏木霉的肽信息素前体 HPP1, 进一步印证里氏木霉具备有性生殖的可能性^[11-12]。里氏木霉基因组测序表明 QM6a 具有交配型 MAT1-2 的基因结构, 证实了里氏木霉以异宗配合的方式进行有性生殖^[13]。Seidl 等用一株名为 CBS999.97 的里氏木霉与 QM6a 杂交, 首次让 QM6a 在子实体上产生子囊孢子^[13]。然而, QM6a 不能与其他交配类型相反的里氏木霉菌株形成子实体, 表现为雌性不育^[13]。这可能也是里氏木霉有性生殖方式一直未被发现的原因之一。至此, 里氏木霉才被彻底证实其具备有性生殖的能力。

2 里氏木霉有性生殖的遗传基础及其交配过程

2.1 里氏木霉的交配型及其基因

真菌的有性生殖根据交配型基因在单倍体

细胞中的分布不同, 分为异宗配合、同宗配合以及假同宗配合 3 种^[14]。异宗配合又可根据控制交配型不亲和性因子的对数分为: 二极性异宗配合和四极性异宗配合, 二极性异宗配合即真菌通常由一对等位点(idiomorph)控制着两种交配型, 等位点编码的转录调节因子负责调控特定交配型基因, 从而决定相应的交配型, 四极性异宗配合即真菌交配型由两对等位点决定, 具有 4 种交配型^[15]。里氏木霉属于二极性异宗配合菌, 其交配型按照 Turgeon 等提出的命名方式分为 MAT1-1 和 MAT1-2^[16]。

Seidl 等通过对基因组序列筛选发现里氏木霉 QM6a 交配型为 MAT1-2, 由于工业及研究中常用的里氏木霉菌株均为 QM6a 及其诱变株, 所以 Seidl 等对不同于 QM6a 的菌株 CBS999.97 基因组进行测序, 发现其交配型为 MAT1-1^[13]。里氏木霉 MAT1-1 位点的长度为 5.5 kb, 包含 3 个开放式阅读框, 分别为 *mat1-1-1*、*mat1-1-2* 和 *mat1-1-3*(图 1), 其中 *mat1-1-1* 编码独特的 MAT-alpha1 结构域; *mat1-1-2* 编码 A2 结构域; *mat1-1-3* 编码 HMG 结构域蛋白。MAT1-2 位点长度为 4.3 kb, 仅含 *mat1-2-1* 1 个开放阅读框, 该 ORF 编码独特的 HMG 结构域蛋白。同时, Seidl 等的研究显示, *mat1-1-1* 开放阅读框的 3'端超出了 MAT1-1 位点边界, MAT1-2 交配型菌株中也存在一段 *mat1-1-1* 序列, 但这一小段序列可能不具备功能^[13]。

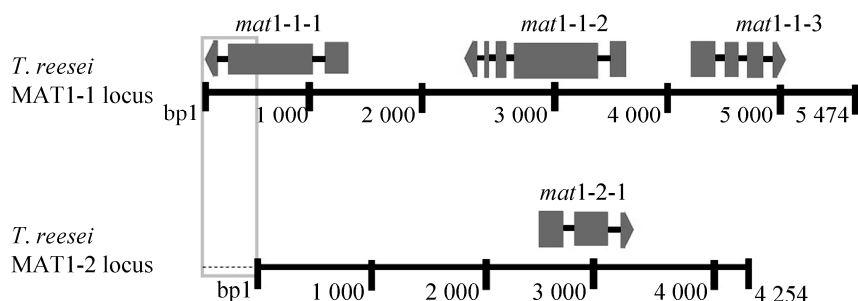


图 1 里氏木霉交配型位点^[13]

Figure 1 Mating type idiomorphs of *T. reesei*^[13].

2.2 里氏木霉的有性生殖过程

里氏木霉有性生殖方式没有在自然界中发现,可能是因为该过程对环境条件有一定要求,如光照、温度、水分、通风等。光照可以促进有性生殖的发生,而持续黑暗导致子实体的生成延迟,12 h/12 h 光暗交替是有性生殖的最适光照条件,温度保持在 18–22 °C,减少通风,增加水分都有利于有性生殖的发生^[13]。

Seidl 等 2009 年第一次在实验室条件下完成了里氏木霉的有性生殖,交配亲本为 MAT1-2 型的 QM6a 与 MAT1-1 型 CBS999.97。本实验室采用 MAT1-2 交配型 G.J.S. 89–7 与 MAT1-1 交配型 CBS999.97 也得到了相同的结果,见本实验室未发表数据图 2,具体过程为:首先将 2 种交配型不同的里氏木霉分生孢子接种在同一平板相隔 4 厘米的两侧(图 2A),这样做的目的是让交配双方释放信息素,让彼此感知到交配对象的存在。约一周后,菌丝连接处形成子实体(图 2B),通常,子实体上会有小水珠(图 2C)。子实体内的每个子囊在成熟后都会包裹 16 个呈线性排列的子囊孢子(图 2D、E)。在子实体形成的 1–2 周后,子囊孢子(图 2F)将被喷

射到培养皿盖上,呈白色雾状。子囊孢子可以萌发成新的菌株,完成有性生殖循环。

3 里氏木霉有性生殖过程中不同交配型间的分子识别机制

3.1 肽信息素

里氏木霉进行有性生殖离不开交配双方的识别,识别过程不仅要求交配双方感知到潜在交配对象的存在,并且要确定交配双方的交配型相反。除了化学信号外,肽信息素对于交配双方是否应该开始交配进行有性生殖也至关重要^[17]。在大多数异宗配合真菌中,信息素对雄性生殖能力至关重要,而信息素受体对雌性生殖能力至关重要^[18]。

信息素是一类易扩散的小分子物质,通过特定的信息素受体接收信号,并通过 MAPK 等途径传导^[19]。肽信息素在不同交配型物种中特异性表达^[19–21],真菌中的肽信息素前体经修饰后形成信息素,一般真菌中的肽信息素前体基因有 2 种类型;a 型、 α 型,其中 a 型信息素前体基因编码的多肽含有多个重复的假定信息素序列,该信息素序列与蛋白酶加工位点相邻,

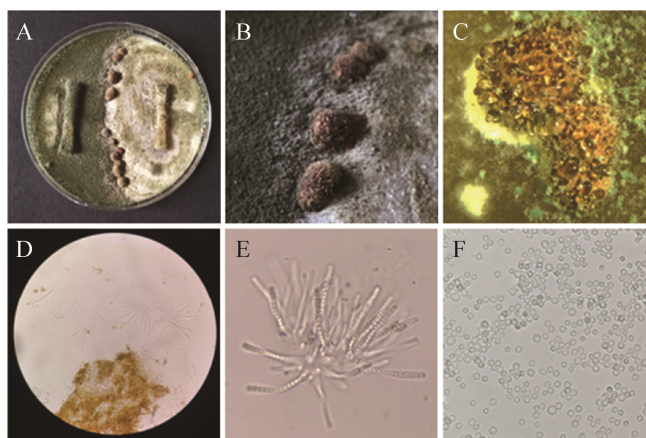


图 2 里氏木霉有性生殖过程

Figure 2 The sexual reproduction process of *T. reesei*. A: inoculation of agar slices from plates with sexually compatible strains, B and C: stromata with/without droplets of liquid forming on their surface, D and E: asci containing 16 ascospores, F: ascospores.

结构类似于酿酒酵母 α 因子前体基因和裂殖酵母 P 因子前体基因^[22]。里氏木霉的信息素系统近些年才被发现,对里氏木霉信息素系统的研究始于一类新的肽信息素前体的发现^[12]。里氏木霉中的肽信息素前体基因不同于一般真菌,里氏木霉中虽然有 α 型肽信息素前体基因 *ppg1*,但没有 α 型肽信息素前体基因,取而代之的是杂交型(h 型)肽信息素前体基因 *hpg1*。Schmoll 等发现里氏木霉中 α 型肽信息素前体基因位置存在几千个碱基的缺失,但发现 h 型肽信息素前体基因 *hpg1* 的 C 端具有 α 型信息素前体特有的 CAAX 结构域,*hpg1* 还包含 2 个 KEX 蛋白酶位点和 1 个 cAMP 依赖性磷酸化位点,同时具有 α 型和 α 型肽信息素前体基因的特征^[12],这也是 h 型肽信息素前体基因家族首次被发现。因此,一种观点认为 h 型肽信息素前体基因是进化过程中 α 型肽信息素前体基因丢失的补充基因。除木霉外,在丛赤壳菌属、赤霉菌属和镰刀菌属中也发现了具有类似 *hpg1* 特征的开放阅读框^[12]。与承担 α 型信息素作用的 h 型肽信息素前体相比,由 *ppg1* 编码的 α 型信息素具有与其他真菌相同的重复结构和 KEX 结构域。

3.2 信息素受体

信息素受体是信息素系统的重要组成部分,负责感知交配伴侣的存在。在异宗配合子囊菌中,存在 2 种肽信息素受体,它们与交配型相关,分别为 Ste2p 和 Ste3p,Ste2p 存在于交配型为 MAT1-2 的菌中,感知 α 型肽信息素,Ste3p 存在于交配型为 MAT1-1 的菌中,感知 α 型肽信息素^[23]。

木霉具有 2 种不同的信息素受体,分别为 HPR1 和 HPR2,HPR2 类似于 Ste2p,感知 α 型肽信息素,HPR1 类似于 Ste3p,感知 h 型肽信息素^[23]。为了使交配成功,交配双方都要能够

分泌信息素并且拥有 2 种信息素受体。里氏木霉的信息素受体具有严格的交配型专一性,HPR1 接收 HPP1 信号,HPR2 接收 PPG1 信号^[23]。Seibel 等发现里氏木霉的信息素受体在子囊孢子萌发过程中也起着一定的作用,这种调节与交配型相关^[23]。将完全可育野生型菌株 CBS999.97 和 QM6a 的信息素系统的调控进行比较,发现尽管 QM6a 的信息素前体和受体的转录模式与 MAT1-2 型的 CBS999.97 相似,但有性生殖开始时,QM6a 的 *hpg1* 转录水平与 CBS999.97 差异达 20 倍以上。尽管目前还不知道这种失调对雌性生殖能力的影响,但也许对 QM6a 的雌性不育有一定影响。

4 里氏木霉有性生殖过程的相关遗传现象

4.1 节段性非整倍体

节段性非整倍体(segmental aneuploidy, SAN)是减数分裂时,染色体通过交换增加或缺失一小段 DNA,导致染色体部分片段拷贝数发生变化的现象。

生物信息学分析显示,MAT1-2 型 CBS999.97 和 QM6a 的单倍体基因组相似,研究者在其基因组中的 scaffold 33 和 scaffold M 中发现了 SAN 现象^[24],scaffold 33 由 L 段(segment)和 N 段和端粒组成,而 scaffold M 由 D 段和 S 段以及端粒构成。减数分裂期间的同源重组或染色体交换或随机染色体分离导致 MAT1-1 型 CBS999.97 单倍体基因组在 MAT1-2 型 CBS999.97 基因组的基础上发生了相互易位(reciprocal exchange),S 段与 N 段的位置发生易位,L 段和 S 段以及端粒形成 scaffold X,D 段和 N 段以及端粒形成 scaffold F(图 3),MAT1-1 型 CBS999.97 菌株与 MAT1-2 型 CBS999.97 菌株或 QM6a 杂交经常(>90%)产生

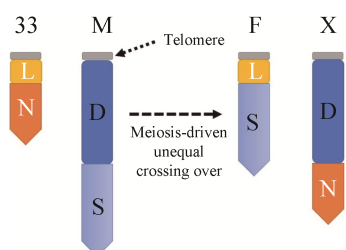


图3 里氏木霉 scaffold 33 与 scaffold M 之间的不平等交换^[24]

Figure 3 Unequal crossing-over between scaffold 33 and scaffold M. Scaffold M and scaffold 33 in MAT1-2 strain, and scaffold X and scaffold F in MAT1-1 strain^[24]. Unequal crossing-over driven by meiosis lead to exchange between N segment and S segment.

2 种类型的节段性非整倍体孢子(segmentally aneuploid ascospores)^[24]。第一种 SAN 子囊孢子包含 2 个 D 段但没有 L 段, 这种结构的子囊孢子能够萌发形成菌丝体, 产生白色分生孢子。D 段中存在碳水化合物活性酶(CAZy)基因簇, 该基因簇包含半纤维素酶或木聚糖酶(*abf1*, *bgl1*, *cip2*, *cel74a* 和 *xyn3*)^[25], 两个 D 段导致这些 SAN 菌株中木聚糖酶产量增加。L 段中含有里氏木霉聚酮化合物合成酶 4 基因(*tpks4*), PKS4 蛋白负责野生型菌株中的绿色分生孢子色素的产生^[26], 因此 *tpks4* 的缺失是导致白色

分生孢子产生的原因(图 4)。相比之下, MAT1-1 型 CBS999.97、MAT1-2 型 CBS999.97 及 QM6a 的分生孢子颜色为绿色。第二类 SAN 子囊孢子无法萌发, 其包含 2 个 L 段, 但缺少 D 段, D 段包含至少 113 个编码基因, 包括一些必需基因, 如类肌动蛋白基因(ID 111468), 这些基因的缺乏是节段性非整倍体子囊孢子无法萌发的原因^[26]。对里氏木霉子囊夹(hexadecad asci)中的 16 个子囊孢子进行分离, 并单独萌发子囊孢子, 对每个孢子的表型和基因组分析发现, 16 个子囊孢子分为 4 组, 每个组含有 4 个遗传信息几乎相同的子囊孢子, 这表明 16 个子囊孢子可能是通过减数分裂和 2 轮有丝分裂产生的^[26]。由于减数分裂前期的不平等交换, 这 2 种类型的 SAN 子囊孢子以不同的方式分配到 3 种子囊夹。I 型子囊夹出现概率约为 80%, 具有 8 个具有活性的整倍体子囊孢子, 4 个有活性的 SAN 子囊孢子和 4 个不具活性的 SAN 子囊孢子。II 型子囊夹出现概率约为 10%, 包含 8 个有活性的 SAN 子囊孢子和 8 个无活性的 SAN 子囊孢子。III 型子囊夹出现概率约为 10%, 具有 16 个具有活性的整倍体子囊孢子。3 种不同子囊夹的形成是由于在减数分裂过程中, 同源染色体非姐

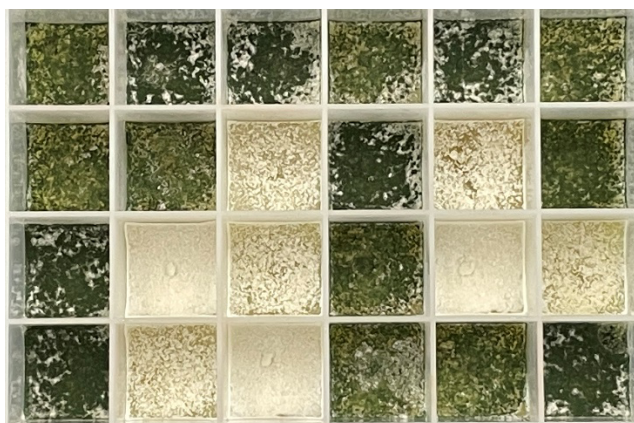


图4 里氏木霉有性杂交产生节段性非整倍体子代

Figure 4 Sexual crossing of *T. reesei* generates segmental aneuploidy filial generation.

妹染色单体间发生 1 次或 2 次交换导致的^[26]。这些发现符合染色体物种形成模型理论,该理论指出染色体重组会引起或导致杂合杂种不育,并成为新分化物种之间的生殖屏障。

对 QM6a 的多轮随机诱变产生了 QM9414 和 RUT-C30 等纤维素酶高产突变株,通过比较基因组序列发现,与 QM6a 相比,它们的基因组发生了多种染色体易位和缺失。正如染色体物种形成模型预测, MAT1-1 型 CBS999.97 与这些工业菌株杂交产生的子囊孢子大部分无法萌发。

4.2 重复序列诱导的点突变

重复序列诱导的点突变机制(repeat-induced point mutation, RIP)是第一个在真核生物中发现的基因组防御机制,这种机制仅发生于减数分裂期间,当有性生殖产生的后代基因组中存在某个基因的两个或多个拷贝时,该机制通过把 C 突变成 T,产生大量的 A-T 碱基对,形成 A-T 富集区域,从而使有性生殖产生的后代基因沉默^[27]。该过程仅发生在有性生殖过程中,是里氏木霉有性生殖过程中的重要遗传现象。

RIP 最早在粗糙脉孢霉中被发现,随后在里氏木霉中也发现了 RIP 的存在, Li 等通过野生型菌株 CBS999.97 和 3 个基因敲除株的成对杂交实验证明了这一点^[24]。 *blr1* 基因缺失株 *blr1Δ* 包含 2 个串联的潮霉素抗性基因(*hph*),其中 1 个是 N 端截短的 *hph-ΔN* 基因, *env1* 基因缺失株 *env1Δ* 和 *ku70* 基因缺失株 *ku70Δ* 各携带一份全长 *hph*。单孢分离和萌发后,所有存活的后代菌株均表现出潮霉素抗性,测序分析发现, *blr1Δ* 后代存在大量的 C-T 突变,而 *env1Δ* 和 *ku70Δ* 后代中没有,而后 Li 等又在 *env1* 和 *ku70* 的双基因缺失株 *env1Δku70Δ* 中非串联插入 2 个 *hph* 基因,其与野生型菌株杂交产生的

子代中同样发现了大量的 C-T 突变,证明里氏木霉中存在 RIP,且 RIP 不仅在串联重复序列之间,而且在两个非串联的重复序列中也发生^[24]。但并非所有子代都被 RIP 突变,仍有 9.3%的 *blr1Δ* 串联重复序列未被突变^[24]。RIP 的机制逐渐阐明使得通过有性杂交引入两个或多个重复序列成为可能,将来有望应用于基础研究以及工业应用中。

4.3 雌性不育

在发现 QM6a 能与野生型菌株 CBS999.97 进行有性生殖后, Seidl 等用野生型菌株 CBS999.97 的 MAT1-1 位点替换 QM6a 的 MAT1-2 位点,试图将不同交配型的 QM6a 诱变株进行杂交,以达到工业菌株遗传改良的目的,但发现 MAT1-1 型 QM6a 菌株无法形成子实体,表现为雌性不育的性状^[13],而后 Linke 等将 MAT1-1 型 CBS999.97 与 Qm6a 产生的子代与 QM6a 回交 8 次,使其重新获得了 MAT1-1 生殖能力,通过比较基因组分析发现 *ham5* 基因的缺失是导致子实体无法形成的原因^[28],在粗糙脉孢霉中, *ham5* 基因负责菌丝的相互作用和融合^[29],在 MAT1-1 型的 QM6a 中引入 *ham5* 等位基因可以互补 QM6a 的雌性不育性状,使之表现为雌性可育。

关于 QM6a 雌性不育形成的原因,一种观点认为是 QM6a 在实验室环境下长达几十年的驯化导致;另一种观点认为雌性不育是自然形成,在自然界中,雌性不育在种群中具有一定的选择性优势^[30]。丝状真菌雌性生殖结构的形成需要消耗机体能量,但真菌有性生殖却不一定进行,在自然界中真菌更倾向于无性繁殖,从而避免内能量的损失,这可能是里氏木霉在进化过程中未形成雌性生殖结构的原因。

5 里氏木霉有性生殖的影响因素

5.1 异三聚体 G 蛋白途径对里氏木霉有性生殖的影响

真菌需要对环境中的变化如阳光、信息素、营养等作出反应, 而对外部信号的接收和转导离不开机制复杂的信号转导途径(图 5)^[18,31], 在这些信号转导通路中, 异源三聚体 G 蛋白途径是最为重要的^[32]。异源三聚体 G 蛋白途径能够感知外部环境中信号并传导给下游途径, 在真菌中, 异源三聚体 G 蛋白途径参与调控有性生殖、次级代谢产物生成、菌丝分化等过程, 真菌中的 G 蛋白系统由 3 部分组成: G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)、G 蛋白(heterotrimeric G protein)和下游效应分子(effector), G 蛋白由 3 个亚单位组成: α 亚基, β 亚基和 γ 基。当收到外部信号刺激时, α 亚基发生构象改变, 并与 GDP 磷酸化生成 $G\alpha$ -GTP

复合体, β 亚基和 γ 亚基仍结合在一起, 并激活下游的效应分子, 产生各种级联反应^[32]。里氏木霉中含有 3 个 G- α 亚基(GNA1、GNA2 和 GNA3)、1 个 β 亚基(GNB1)和 1 个 γ 亚基(GNG1)^[33], 但却有多达大约 50 种 G 蛋白偶联受体^[34], 多 α 亚基有利于里氏木霉对各种外部信号做出反应, 但无论是缺失或是组成型激活 G 蛋白, 3 种 α 亚基都不会对有性生殖产生影响^[35]。

在里氏木霉有性生殖过程中, G 蛋白偶联受体接收到信息素信号后激活 G 蛋白 α 亚基, 使其与 G 蛋白 β 和 γ 亚基分离, 这 3 种亚基将信号传递给下游信号转导途径。这一过程受到严格调控, 途径的激活以及功能受到许多其他因素的影响。比如一种类光传感因子蛋白(phosducin-like proteins, PhLPs)对 G- β 和 G- γ 亚基的正确折叠起一定作用。Seo 等在 2006 年首次发现类光传感因子蛋白影响真菌的有性生殖^[36], 而光又能调节里氏木霉 I 类类光传感因子蛋白

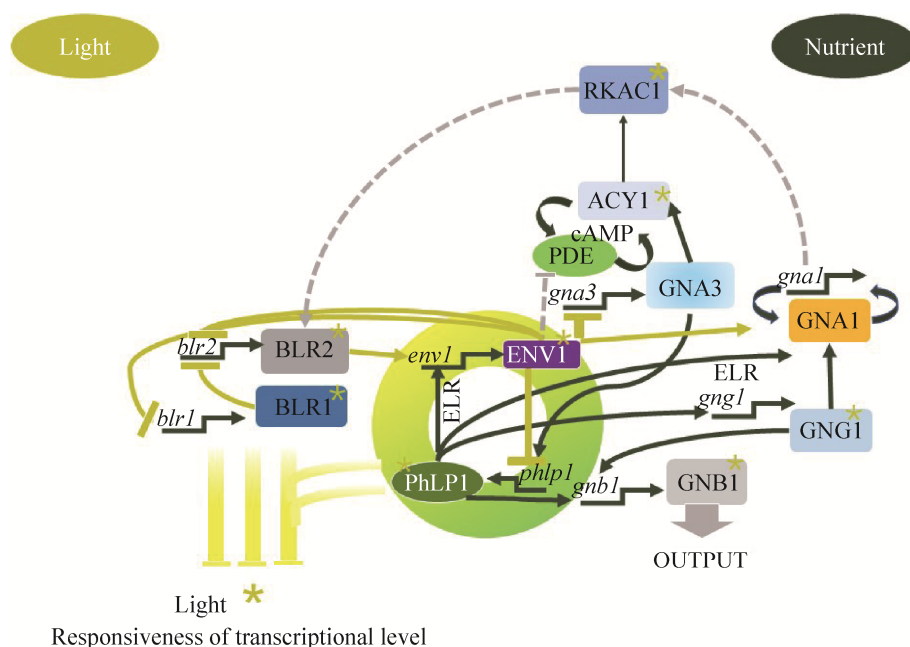


图 5 里氏木霉中营养和光信号对有性生殖的影响^[31]

Figure 5 Effects of nutrition and light signals on sexual development in *T. reesei*^[31]. Arrows indicate positive influence while plungers indicate a negative effect. Dashed lines show hypotheses deduced from results in other fungi. Asterisks indicate an effect on light responsiveness of transcriptional levels.

基因 *phlp1* 的转录以及纤维素酶基因表达, GNB1 和 GNG1 的调控靶标包括与性发育相关的众多基因(图 5)^[37]。Dattenböck 等又发现 PHLP1 与 ENV1 通过异源三聚体 G 蛋白途径将光响应与养分和环境信号联系起来并相互调控(图 5)^[20], 而光和营养是有性生殖的必要条件。Schuster 等发现 PHLP1 的缺失会严重影响子实体的形成并减少子囊孢子的释放, 而 GNB1 的缺失导致几乎没有子囊孢子释放, GNG1 的缺失却对性生殖没有明显影响^[37]。同时, Schuster 等还发现在光照条件下, PHLP1、GNB1、GNG1 的缺失都会导致 h 型肽信息素前体基因 *hpl1* 转录水平下降。

5.2 cAMP 途径对里氏木霉有性生殖的影响

Schmoll 等发现里氏木霉中 cAMP 水平受异源三聚体 G 蛋白途径的影响^[38]。cAMP 途径是 G 蛋白信号转导的下游途径之一, cAMP 途径的腺苷酸环化酶缺失会导致子实体形成的延迟或子实体尺寸的减小从而影响有性生殖^[39]。Schuster 等发现在里氏木霉中, 缺乏蛋白激酶 A(PKAC1)或腺苷酸环化酶(ACY1)等 cAMP 途径重要组成部分会导致严重的生长缺陷, 缺乏 ACY1 或 PKAC1 会导致子实体的形成延迟, 但对子实体的大小没有明显影响, 同时他们也证明了 ACY1 和 PKAC1 对于雄性可育不是必需的, 因此 cAMP 途径对里氏木霉的有性生殖具有一定的调控作用, 但对有性生殖不是必需的^[39]。

5.3 光响应途径对里氏木霉有性生殖的影响

光照对多种模式真菌的菌丝生长、无性繁殖和有性生殖至关重要, 如构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*)、粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*)、卷枝毛霉 (*Mucor circinelloides*) 和里氏木霉 (*T. reesei*)^[40–42]。多种模式真菌有性生殖和无性生殖之间的平衡受光照的影响很大^[23], 其中里氏

木霉的有性生殖发生在光照或明暗交替环境下, 但持续的光照会扰乱子实体的形成^[18], 而在持续的黑暗环境中, 有性生殖的发生明显延迟, 其子囊壳生长较慢, 体积较大, 在子座中的位置更深, 朝向上部表面的颈部更长^[13]。

里氏木霉中的光感受器有 3 种: 蓝光受体 1、2 (BLR1, BLR2) 和光适应蛋白 ENV1。尽管光在里氏木霉的有性生殖中起着重要作用, 但 BLR1 和 BLR2 在有性生殖中不是必需的, 并且未发现对生殖能力的影响存在性别差异。BLR1 或 BLR2 或两者同时缺失会导致子实体数量减少, 体积增大, 而子座的干重仅略降低。因此, BLR1 和 BLR2 对子实体的形成有积极影响(图 5)^[17], 然而, 持续光照对 BLR1 和 BLR2 介导的有性生殖有负面影响^[18]。

与 BLR1 和 BLR2 相比, ENV1 对有性生殖的影响更为显著。ENV1 与粗糙脉孢霉中的光照受体蛋白 VVD 直系同源, 都为 PAS/LOV 结构域蛋白, 在粗糙脉孢霉中, VVD 能够阻断光响应, 并且使粗糙脉孢霉能够区分日光和月光^[43]。在里氏木霉中, ENV1 能够抑制 BLR1/BLR2 的活性从而抑制光响应途径(图 5)。env1 基因缺失株 *env1Δ* 在恒定光照下长时间表达光诱导基因, 表明 *env1* 是光照输入的负调控因子, 其存在关闭了 BLR1 和 BLR2 调控的基因表达^[44]。ENV1 还可以通过两种途径介导 cAMP 途径——通过影响 G-α 亚基转录水平的作用影响 cAMP 水平^[37]或者通过对 cAMP 磷酸二酯酶(PDE)的抑制作用抑制 G-α 亚基的输出(图 5)^[31]。

BLR1, BLR2 和 ENV1 3 个感光体都参与信息素系统的调节, 均负调控信息素前体基因 *hpl1* 和 *ppg1* 以及信息素受体基因 *hpr1* 和 *hpr2* 的转录水平^[31]。除了调节信息素系统外, BLR1、BLR2 和 ENV1 还负调控交配型基因 *mat1-2-1*, 而 ENV1 的调控作用最为明显。因此, 光感受

器在里氏木霉的有性生殖中起重要作用,并且在调节级联中的交配型基因上游起作用。

5.4 影响里氏木霉有性生殖的其他因素

Chen 等对不同条件下能够进行有性生殖和不能进行有性生殖的雌性可育木霉菌株分别进行转录组分析,发现二者的基因表达存在一定的差异。在里氏木霉能进行有性生殖的条件下,大约 200 个基因表现出两倍以上下调,287 个基因转录水平上调,显著上调的基因中包含大量与纤维素和半纤维素代谢、电子传递、氧化还原调节和蛋白质折叠有关的基因,30 多种糖苷水解酶或纤维素结合蛋白、几种肽酶和蛋白酶、代谢蛋白、G-蛋白偶联受体、各种转运蛋白和渗透酶在能进行有性生殖的条件下转录水平上调^[45]。这些结果表明,里氏木霉具有复杂的多层级调控网络,这种调控反映了环境和营养因素对有性生殖的影响。

6 问题与展望

目前,基于无性繁殖的里氏木霉分子育种存在诸多问题:如可用的筛选标记有限,在进行多基因操作时,需要通过循环使用同一种筛选标记或通过共同转化多个不带筛选标记的片段实现,步骤非常繁琐并且成功率不高^[4,46-47],另外,里氏木霉的孢子为多核孢子,遗传转化后产生的转化子多为杂核状态,在传代过程中,遗传性状很难保持稳定。有性杂交育种可以很好地解决这些问题,但由于目前工业上使用的菌株均为 QM6a 改造而来,具有雌性不育的特点,相互之间进行杂交需要首先对其进行遗传改造,使之变为雌性可育。然而,经过多轮诱变的高产菌株也极有可能形成染色体易位和缺失,即便采用分子生物学手段使其恢复为完全可育,高产菌株之间进行杂交极可能导致产生的子囊孢子无法萌发。将这些高产工业菌株与完

全可育的野生型菌株杂交又存在工业菌株的高产性能丢失的风险。因此,从自然界中重新筛选纤维素酶高产并且完全可育的野生型菌株,通过反复杂交,利用杂种优势进一步提高菌株性能极有可能获得遗传性能稳定的高产菌株。

里氏木霉有性生殖方式的发现不仅有助于里氏木霉的遗传育种发展,也为里氏木霉众多未知基因的功能鉴定提供了可能性。通过诱变获得的突变型菌株中通常有成千上万的基因发生突变,在没有有性生殖杂交工具的情况下,要明确哪些基因与特定的突变表型相关是非常困难的。而有性生殖技术为采用集群分离分析法(bulk segregation analysis, BSA)鉴定与突变表型相关的基因奠定了基础^[48]。另外,作为纤维素酶、半纤维素酶的主要生产菌株,通常需要在里氏木霉中植入其他来源的木质纤维素降解酶基因进行酶系复配,而传统的操作手段可以引入的外源基因非常有限。若采用有性生殖杂交技术将表达不同纤维素酶基因的菌株进行多轮杂交,再结合特定底物上的生长表型,有望快速、高效地筛选出最佳酶系复配组合的工程菌株。综上,里氏木霉有性生殖方面的研究在菌株的遗传改良、未知基因的功能鉴定以及基因水平上的酶系复配方面具有重要的理论和应用价值。

参考文献

- [1] 徐晓,程驰,袁凯,薛闯. 里氏木霉产纤维素酶研究进展. 中国生物工程杂志, 2021, 41(1): 52-61.
Xu X, Cheng C, Yuan K, Xue C. Research progress of cellulase production in *Trichoderma reesei*. *China Biotechnology*, 2021, 41(1): 52-61. (in Chinese)
- [2] Chen XZ, Song BR, Liu ML, Qin LN, Dong ZY. Understanding the role of *Trichoderma reesei* Vib1 in gene expression during cellulose degradation. *Journal of Fungi*, 2021, 7(8): 613.
- [3] Qin LN, Cai FR, Dong XR, Huang ZB, Tao Y, Huang JZ, Dong ZY. Improved production of heterologous lipase in *Trichoderma reesei* by RNAi mediated gene silencing of an endogenic highly expressed gene. *Bioresource Technology*, 2012, 109: 116-122.

- [4] Jiang XZ, Du JW, He RN, Zhang ZY, Qi F, Huang JZ, Qin LN. Improved production of majority cellulases in *Trichoderma reesei* by integration of *cbh1* gene from *Chaetomium thermophilum*. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1633.
- [5] 董欣睿, 秦丽娜, 陶勇, 黄建忠, 董志扬. 糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 漆酶 POXA1 在里氏木霉中的高效表达及酶学性质. *微生物学报*, 2012, 52(7): 850–856.
Dong XR, Qin LN, Tao Y, Huang JZ, Dong ZY. Overexpression and characterization of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* in *Trichoderma reesei*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(7): 850–856. (in Chinese)
- [6] 鲍大鹏. 食用菌杂交育种中的科学问题. *食用菌学报*, 2020, 27(4): 1–24.
Bao DP. Scientific problems in crossbreeding of edible fungi. *Acta Edulis Fungi*, 2020, 27(4): 1–24. (in Chinese)
- [7] Hinterdobler W, Beier S, Kindel S, Schmoll M. Sexual development, its determinants, and regulation in *Trichoderma reesei*. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Amsterdam: Elsevier, 2020: 185–206.
- [8] Hinterdobler W, Li GF, Spiegel K, Basyouni-Khamis S, Gorfer M, Schmoll M. *Trichoderma reesei* isolated from Austrian soil with high potential for biotechnological application. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 552301.
- [9] Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Kubicek CP. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 2006, 47, 55–64.
- [10] Lieckfeldt E, Kullnig C, Samuels GJ, Kubicek CP. Sexually competent, sucrose- and nitrate-assimilating strains of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) from south American soils. *Mycologia*, 2000, 92(3): 374.
- [11] Schmoll M, Zeilinger S, Mach RL, Kubicek CP. Cloning of genes expressed early during cellulase induction in *Hypocrea jecorina* by a rapid subtraction hybridization approach. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(9): 877–887.
- [12] Schmoll M, Seibel C, Tisch D, Dorner M, Kubicek CP. A novel class of peptide pheromone precursors in ascomycetous fungi. *Molecular Microbiology*, 2010, 77(6): 1483–1501.
- [13] Seidl V, Seibel C, Kubicek CP, Schmoll M. Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *PNAS*, 2009, 106(33): 13909–13914.
- [14] 雍明丽, 于俊杰, 刘永峰. 交配型基因在真菌有性生殖中的作用研究进展. *江苏农业学报*, 2019, 35(5): 1254–1261.
Yong ML, Yu JJ, Liu YF. Research advances in the role of mating type genes in sexual reproduction of fungi. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 35(5): 1254–1261. (in Chinese)
- [15] 施笑笑, 王教瑜, 王艳丽, 孙国昌. 子囊菌交配型位点与交配型基因研究进展. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1572–1581.
Shi XX, Wang JY, Wang YL, Sun GC. Mating type genes in ascomycetes: a review. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1572–1581. (in Chinese)
- [16] Turgeon BG, Yoder OC. Proposed nomenclature for mating type genes of *Filamentous ascomycetes*. *Fungal Genetics and Biology*, 2000, 31(1): 1–5.
- [17] Ni M, Feretzaki M, Sun S, Wang XY, Heitman J. Sex in fungi. *Annual Review of Genetics*, 2011, 45(1): 405–430.
- [18] Wilson, Wilken, Van Der Nest, Wingfield, Wingfield. It's all in the genes: the regulatory pathways of sexual reproduction in *Filamentous ascomycetes*. *Genes*, 2019, 10(5): 330.
- [19] Frawley D, Bayram Ö. The pheromone response module, a mitogen-activated protein kinase pathway implicated in the regulation of fungal development, secondary metabolism and pathogenicity. *Fungal Genetics and Biology*, 2020, 144: 103469.
- [20] Dattenböck C, Tisch D, Schuster A, Monroy AA, Hinterdobler W, Schmoll M. Gene regulation associated with sexual development and female fertility in different isolates of *Trichoderma reesei*. *Fungal Biology and Biotechnology*, 2018, 5(1): 1–11.
- [21] Martín JF, Van Den Berg MA, Ver Loren Van Themaat E, Liras P. Sensing and transduction of nutritional and chemical signals in filamentous fungi: impact on cell development and secondary metabolites biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107392.
- [22] Seike T. The evolution of peptide mating pheromones in fission yeast. *Current Genetics*, 2019, 65(5): 1107–1111.
- [23] Seibel C, Tisch D, Kubicek CP, Schmoll M. The role of pheromone receptors for communication and mating in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Fungal Genetics and Biology*, 2012, 49(10): 814–824.
- [24] Li WC, Huang CH, Chen CL, Chuang YC, Tung SY, Wang TF. *Trichoderma reesei* complete genome sequence, repeat-induced point mutation and partitioning of CAZyme gene clusters. *bioRxiv*, 2017, DOI:10.1101/120071.
- [25] Häkkinen M, Valkonen MJ, Westerholm-Parvinen A, Aro N, Arvas M, Vitikainen M, Penttilä M, Saloheimo M, Pakula TM. Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 1–21.
- [26] Chuang YC, Li WC, Chen CL, Hsu PWC, Tung SY, Kuo HC, Schmoll M, Wang TF. *Trichoderma reesei* meiosis generates segmentally aneuploid progeny with higher xylanase-producing capability. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 30.
- [27] Van Wyk S, Wingfield BD, De Vos L, Van Der Merwe NA, Steenkamp ET. Genome-wide analyses of

- repeat-induced point mutations in the ascomycota. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 622368.
- [28] Linke RT, Thallinger GG, Haarmann T, Eidner J, Schreiter M, Lorenz P, Seiboth B, Kubicek CP. Restoration of female fertility in *Trichoderma reesei* QM6a provides the basis for inbreeding in this industrial cellulase producing fungus. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8(1): 1–10.
- [29] Jonkers W, Leeder AC, Ansong C, Wang YX, Yang F, Starr TL, Camp DG, Smith RD, Glass NL. HAM-5 functions as a MAP kinase scaffold during cell fusion in *Neurospora crassa*. *PLoS Genetics*, 2014, 10(11): e1004783.
- [30] Tisch D, Pomraning KR, Collett JR, Freitag M, Baker SE, Chen CL, Hsu PWC, Chuang YC, Schuster A, Dattenböck C, Stappeler E, Sulyok M, Böhmendorfer S, Oberlerchner J, Wang TF, Schmoll M. Omics analyses of *Trichoderma reesei* CBS999.97 and QM6a indicate the relevance of female fertility to carbohydrate-active enzyme and transporter levels. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(22).
- [31] Schmoll M, Wang TF. 17 sexual development in *Trichoderma*. Growth, Differentiation and Sexuality. Cham: Springer International Publishing, 2016: 457–474.
- [32] Lengeler KB, Davidson RC, D'Souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(4): 746–785.
- [33] Schuster A, Bruno KS, Collett JR, Baker SE, Seiboth B, Kubicek CP, Schmoll M. A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 1.
- [34] Gruber S, Omann M, Zeilinger S. Comparative analysis of the repertoire of G protein-coupled receptors of three species of the fungal genus *Trichoderma*. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 108.
- [35] Bazafkan H, Dattenböck C, Stappeler E, Beier S, Schmoll M. Interrelationships of VEL1 and ENV1 in light response and development in *Trichoderma reesei*. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175946.
- [36] Seo JA, Yu JH. The phosducin-like protein PhnA is required for G $\beta\gamma$ -mediated signaling for vegetative growth, developmental control, and toxin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(2): 400–410.
- [37] Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(3): 787–799.
- [38] Schmoll M, Schuster A, Silva RDN, Kubicek CP. The G-alpha protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) regulates cellulase gene expression in the presence of light. *Eukaryotic Cell*, 2009, 8(3): 410–420.
- [39] Schuster A, Tisch D, Seidl V, Kubicek CP, Schmoll M. Roles of protein kinase A and adenylate cyclase in light-modulated cellulase regulation in *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78: 2168–2178.
- [40] Dos Reis TF, Mellado L, Lohmar JM, Silva LP, Zhou JJ, Calvo AM, Goldman GH, Brown NA. GPCR-mediated glucose sensing system regulates light-dependent fungal development and mycotoxin production. *PLoS Genetics*, 2019, 15(10): e1008419.
- [41] Fuller KK, Loros JJ, Dunlap JC. Fungal photobiology: visible light as a signal for stress, space and time. *Current Genetics*, 2015, 61(3): 275–288.
- [42] Idnurm A, Verma S, Corrochano LM. A glimpse into the basis of vision in the kingdom Mycota. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(11): 881–892.
- [43] Malzahn E, Ciprianidis S, Káldi K, Schafmeier T, Brunner M. Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell*, 2010, 142(5): 762–772.
- [44] Castellanos F, Schmoll M, Martínez P, Tisch D, Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Esquivel-Naranjo EU. Crucial factors of the light perception machinery and their impact on growth and cellulase gene transcription in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(5): 468–476.
- [45] Chen CL, Kuo HC, Tung SY, Hsu PW, Wang CL, Seibel C, Schmoll M, Chen RS, Wang TF. Blue light acts as a double-edged sword in regulating sexual development of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *PLoS One*. 2012, 7(9): e44969. DOI:10.1371/journal.pone.0044969.
- [46] 安莉颖, 易欣欣, 秦丽娜, 施思, 陶勇, 伍红, 董志扬. 里氏木霉 RutC30 常温常压等离子体(ARTP)诱变筛选 pyr4 基因缺陷型菌株及转化系统的建立. *菌物学报*, 2014, 33(6): 1272–1280.
- An LY, Yi XX, Qin LN, Shi S, Tao Y, Wu H, Dong ZY. Isolation of *Trichoderma reesei* RutC30 pyr4 gene mutant by atmospheric room temperature plasma (ARTP) and establishment of a transformation system. *Mycosystema*, 2014, 33(6): 1272–1280. (in Chinese)
- [47] 吴鸿清, 秦丽娜, 陈秀珍, 黄建忠, 董志扬. 里氏木霉双基因同步缺失菌株的构建与甘露聚糖酶表达研究. *菌物学报*, 2014, 33(6): 1281–1291.
- Wu HQ, Qin LN, Chen XZ, Huang JZ, Dong ZY. Expression of mannanase in *Trichoderma reesei* by construction of a simultaneous double-gene disruption strain. *Mycosystema*, 2014, 33(6): 1281–1291. (in Chinese)
- [48] Heller J, Zhao JH, Rosenfield G, Kowbel DJ, Gladieux P, Glass NL. Characterization of greenbeard genes involved in long-distance kind discrimination in a microbial eukaryote. *PLoS Biology*, 2016, 14(4): e1002431.

(本文责编 张晓丽)