



研究报告

一株粗糙脉孢菌的分离、鉴定及其基因组变异和功能分析

林标声^{1,2} 何玉琴¹ 陈小红¹ 罗茂春^{*1,2}

1 龙岩学院生命科学学院 福建 龙岩 364012

2 预防兽医学与生物技术福建省高等学校重点实验室 福建 龙岩 364012

摘要:【背景】粗糙脉孢菌 LY03 是从武平传统“红菌豆腐”中分离得到的主要发酵菌株。【目的】研究粗糙脉孢菌 LY03 菌株的基因组信息,揭示武平传统“红菌豆腐”发酵特性。【方法】采用形态学观察、ITS 鉴定、重测序及框架图测序对所分离的 LY03 菌株进行鉴定和基因组信息解析。【结果】武平传统“红菌豆腐”中分离得到的主要发酵菌株 LY03 确定为粗糙脉孢菌,将其在中国普通微生物菌种保藏管理中心进行专利保藏,保藏号为 CGMCC 3.19233。LY03 菌株比对到参考基因组上的总 Read 数目为 95.85%,测序对应深度的位点占全基因组 76.13%;各变异类型在内含子区域均无变异,主要变异存在于基因组的外显子区域,具体变异数量为:单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)位点变异总数 203 128 个、插入缺失(insertion/deletion, InDel)突变总和 26 859 个、拷贝数变异(copy number variation, CNV)增加和减少的拷贝总数 1 039 个、结构变异(structure variation, SV)注释的变异总数 777 个;LY03 菌株基因组序列长度为 30 538 737 bp、(G+C)mol%为 52.24%、编码 5 550 个基因、编码基因占比 24.3%,参与了氨基酸代谢(amino acid metabolism)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、能量产生与转化(energy production and conversion)等多种物质的代谢途径转化过程。【结论】对武平传统“红菌豆腐”主要发酵菌株的鉴定及基因组信息分析有利于揭示其产品发酵的特性及其发酵菌株遗传信息的本质,并为将来产品发酵性能的提高及推广提供理论依据。

关键词: 红菌豆腐, 粗糙脉孢菌, 分离鉴定, 基因组, 序列分析

Isolation, identification, genome variation and functional analysis of a strain form *Neurospora crassa*LIN Biao-Sheng^{1,2} HE Yu-Qin¹ CHEN Xiao-Hong¹ LUO Mao-Chun^{*1,2}

1 College of Life Sciences, Longyan University, Longyan, Fujian 364012, China

2 Fujian Provincial Key Laboratory for the Prevention and Control of Animal Infectious Diseases and Biotechnology, Longyan, Fujian 364012, China

Abstract: [Background] *Neurospora crassa* LY03 was the main fermentation strain isolated from

Foundation item: Special Fund in Fujian Province for the Development of Science and Technology Under the Guidance of the Central Committee (2018L3003)

***Corresponding author:** Tel: 86-597-2797255; E-mail: fjylmc@163.com

Received: 21-07-2019; **Accepted:** 27-09-2019; **Published online:** 06-11-2019

基金项目: 中央引导地方科技发展专项资金资助项目(2018L3003)

***通信作者:** Tel: 0597-2797255; E-mail: fjylmc@163.com

收稿日期: 2019-07-21; **接受日期:** 2019-09-27; **网络首发日期:** 2019-11-06

traditional “Red fungus tofu” in Wuping. **[Objective]** The genomic information of *Neurospora crassa* LY03 strain was studied to reveal the fermentation characteristics of traditional “Red fungus tofu” in Wuping. **[Methods]** Morphological observation, ITS identification, resequencing and frame diagram sequencing were used to identify the isolated LY03 strains and analyzed the genome information. **[Results]** The main fermentation strain LY03 isolated from traditional “Red fungus tofu” in Wuping was identified as *Neurospora crassa*, and preserved in the China General Microbiological Culture Collection Center with preservation number CGMCC 3.1923. The total number of reads in LY03 strain compared to the reference genome was 95.85%, and the site of sequencing corresponding depth accounted for 76.13% of the whole genome. There was no variation in the intronic region of each variant type, and the main variation existed in the exon region of the genome, and the specific number of variation was as follows: The total number of SNP site variants was 203 128, InDel mutations was 26 859, copies increased and decreased by CNV was 1 039, variation in SV comments was 777. The genome sequence length of LY03 strain was 30 538 737 bp, (G+C)mol% was 52.24%, encoding 5 550 genes, accounting for 24.3% of the coding genes, which was involved in the metabolic pathway transformation of amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, energy production and conversion and other substances. **[Conclusion]** The identification and genome information analysis of the main fermentation strains of traditional “Red fungus tofu” in Wuping are helpful to reveal the fermentation characteristics of the products and the essence of the genetic information of the fermentation strains, and to provide a theoretical basis for the improvement of the fermentation performance and the popularization of the products in the future.

Keywords: Red fungus tofu, *Neurospora crassa*, Isolation and identification, Genome, Sequencing and analysis

“红菌豆腐”产于福建省武平县，历史悠久，是当地的一种传统美食，因其成品表面长满橙红色的菌丝，因此被当地人称为“红菌豆腐”，常被当作味精使用^[1]。红菌豆腐使用的原料为黄豆磨制豆浆后过滤的豆渣，在其上面撒上红菌丝后 2–3 d 迅速发酵而成，发酵后的红菌豆腐具有甘鲜、甜润的口感，格外鲜美，为食物增鲜增香。据研究，红菌豆腐还具有重要的保健作用，它能改善人体肠道功能，增加肠道蠕动性，并能将吸附肠道里的油脂排出体外，对肠道内的毒素进行清理，减轻肝脏解毒负担；此外，红菌豆腐里含有的纳豆激酶具有降低血粘度的作用，适合“三高”人群食用^[2–3]。红菌豆腐的制作实现了豆渣的废物利用，具有良好的商业价值。中国每年有 9 000 万 t 的豆渣，这些豆渣得不到合理的利用，产生资源浪费，如能够对红菌豆腐进行深入研究，创造出更加优良品种的产品，将是一项非常可观的创业致富之路^[4]。但是，长久以来红菌豆腐略带一点神秘色彩，其主要发酵菌株“红菌”从何而来、具有怎样的生长规律，为什么这些“红菌”

可以分解发酵豆渣，这些菌株和其他食品中已报道研究的发酵菌株种属亲缘关系如何，这些问题亟待学者研究解决。

因此，本研究从武平传统“红菌豆腐”中分离主要的发酵菌种，对其进行内源转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)鉴定及基因组测序，揭示其种属亲源关系和基因组变异情况，并对相关基因的功能进行分析，从分子水平上探讨红菌豆腐中红菌发酵豆渣的特性，以期为提高红菌豆腐发酵底物豆渣的转化效率、创造出更优品质的发酵产品并最终实现产品标准化工业生产提供理论 基础。

1 材料与方法

1.1 分离材料

红菌豆腐：从市场购买的福建省武平县“红菌豆腐”。

1.2 培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 25.0, 琼脂 20.0, pH 自然。

1.3 主要试剂和仪器

RNase A、蛋白酶 K, 北京全式金生物技术有限公司; 各 DNA marker、限制性内切酶、RNA 提取及反转录试剂, 宝生物工程(大连)有限公司; 引物合成, 北京奥维森基因科技有限公司。

PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 稳压稳流电泳, 上海琪特分析仪器有限公司; 凝胶成像系统, 上海复日科技有限公司。

1.4 菌株的分离和基本形态特征鉴定

用无菌镊子或接种铲挖一小块红菌豆腐表面菌丝到 PDA 平板中, 30 °C 培养 24–48 h, 观察各分离平板培养后长出的菌丝形态特征, 挑选无污染、菌丝粗壮的平板用于菌株平板菌落形态特征和显微镜菌丝形态观察。

1.5 菌株的基因组 DNA 提取

取所挑选的菌丝少许, 按李再新等^[5]的方法进行真菌菌丝的 DNA 提取。

1.6 菌株 ITS 的 PCR 扩增和测序

以提取的 DNA 样品作为 PCR 反应的扩增模板, 分别采用真菌通用引物(ITS1、ITS4)进行扩增^[6], 扩增片段长度 600 bp 左右; PCR 反应体系(30 µL): PCR *TaqMix* 15.0 µL, 正、反向引物(10 µmol/L)各 1.5 µL, ddH₂O 11.0 µL, DNA 模板 1.0 µL。PCR 反应条件: 94 °C 120 s; 94 °C 30 s, 52 °C 20 s, 72 °C 20 s, 33 个循环; 72 °C 5 min。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物片段长度与产量, 经凝胶回收纯化后送北京奥维森基因科技有限公司进行测序。将所测得各菌株的 ITS 序列在 NCBI 数据库进行比对, 下载相近菌株的序列信息, 寻找相似性最高的 10 株基因序列, 按照软件 DNAMAN 重新构建系统发育进化树, 确定各菌株的分类学地位^[7]。

1.7 菌株的重测序及分析

利用高通量测序技术对已有参考基因组物种的不同个体进行测序, 获得单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism, SNP)、插入缺失(insertion/deletion, InDel)、结构变异(structure variation, SV)、拷贝数变异(copy number variation,

CNV)等遗传变异信息。

所提取的菌株基因组 DNA 样品在进行文库构建之前都进行了严格检测^[8], 样品检测合格后上机所得的有效测序数据与参考基因组进行比对, 用于分析所提取菌株基因组的遗传变异信息^[9]。

1.8 菌株基因组框架图的构建及功能分析

采用全基因组鸟枪法(whole genome shotgun, WGS)策略构建文库, 运用基于 Illumina MiSeq 测序平台的第二代测序技术对所分离菌株进行基因组测序分析^[10], 测序工作由北京奥维森基因科技有限公司完成。所测得的高通量测序数据采用 SPAdes genome assembler V3.11.1 软件对经过 Kmer 校正的数据进行拼接、组装, 构建菌株基因组框架图进行基因组分析和功能注释, 具体参照宋昭昭等^[11]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的基本形态特征鉴定

从武平“红菌豆腐”中分离得到了多株发酵菌株, 其中编号 LY03 的菌株其菌丝生长速度快、无污染、菌丝粗壮(图 1), 形态特征与市场购买的红菌豆腐表面菌丝基本一致, 将其回接预先炒干处理的豆渣, 经 2–3 d 发酵同样制得了品质基本一致的红菌豆腐(图 2), 因而选定 LY03 菌株作为红菌豆腐发酵研究的目的菌株, 并作进一步的分析。结果表明: 所挑选的 LY03 菌株符合真菌的基本形态及生物学特征, 具有疏松网状的菌丝, 菌丝透明, 无色或灰色, 有分枝和分隔。



图 1 LY03 菌株平板菌落特征

Figure 1 Characteristics of LY03 strain colony on plate



图2 不同来源的“红菌豆腐”

Figure 2 “Red fungus tofu” from different sources

注: A: LY03 菌株发酵; B: 市场购买。

Note: A: Fermentation products of LY03 strain; B: Products purchased in the market.

2.2 LY03 菌株的 ITS 测序进化关系分析

所分离 LY03 菌株的 PCR 电泳图和测定的序列如图 3、4 所示, LY03 菌株 PCR 产物大小 600 bp 左右, 与预期长度相符。所获得的 LY03 菌株 ITS 测序序列登录 NCBI 进行 BLAST 比对, Neighbor-Joining 法构建 LY03 菌株的系统进化树, 结果如图 5 所示, 所分离的 LY03 菌株与脉孢菌属(*Neurospora*)几个菌株的亲缘关系最近, 相似性均达 98% 以上, 综合 LY03 菌株的形态特征以及 ITS 序列分析结果, 将其鉴定为粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*), 俗称红色面包霉, 并将该菌株提交中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC) 进行专利保藏, 保藏号为 CGMCC 3.19233。

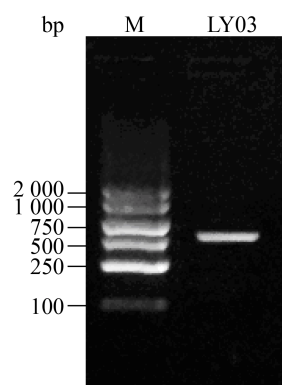


图3 LY03 菌株的 ITS 序列 PCR 电泳图

Figure 3 PCR electrographic diagram of ITS sequence from LY03 strain

Note: M: DL2000 DNA Marker.

2.3 LY03 菌株重测序结果分析

2.3.1 与参考基因组的比对结果

LY03 菌株 18S rRNA 基因样品 OD_{260}/OD_{280} 为 2.03、质量等级 B 级, 复合建库要求, 上机测试后获得原始测序数据质量控制结果为: 原始下机测定量 937 972 800 bp, 有效率 100%, (G+C)mol% 为 51.62%; 使用 BWA 程序把获得的有效测序数据比对到参考基因组中, 比对到参考基因组上的总 Read 数目为 95.85%、测序对应深度的位点占全基因组的 76.13%。图 6 为 LY03 菌株的测序深度分布图及累积分布图, 展示了测序数据对参考基因组的覆盖情况。

>LY03 18S rRNA gene

```
TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAAGTTTCAGCGGGTATTCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTTAG
AAATGGGGGGTTTACGGCAAGAACCCGCCGACGACCATAGCGATGTAGAGTTACTACGCTC
GGTGTGACTAGCGAGCCCGCCACTGATTTTGAGGGACCGCGGACAGCCGCGGATCCCCAACG
CAAGCAGAGCTTGATGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCTCGCCAGAATACTGGCGAG
CGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACCTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTT
CGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTGAATTTTAA
AGTTTACTCAGAGAGACATAAAATATCAAGAGTTTAGTTTCGGCACTCCGGCGGGCAGCCTCC
CGCGAGCGGGAGACCCGAGGATCCGGGAGGGCCCCGAGGGCCTTCCGGACCGCCAGCGCCG
AGGCAACCGTACGGGTAAGATTCGCGATGGTTTGTGGGAGTTTTGCAACTCTGTAATGATCCC
TCCGCTGGTTACCAACGAGACCTTGTTACGACTTTTACTTCC
```

图4 LY03 菌株的 ITS 测序序列

Figure 4 ITS sequencing sequence of LY03 strain

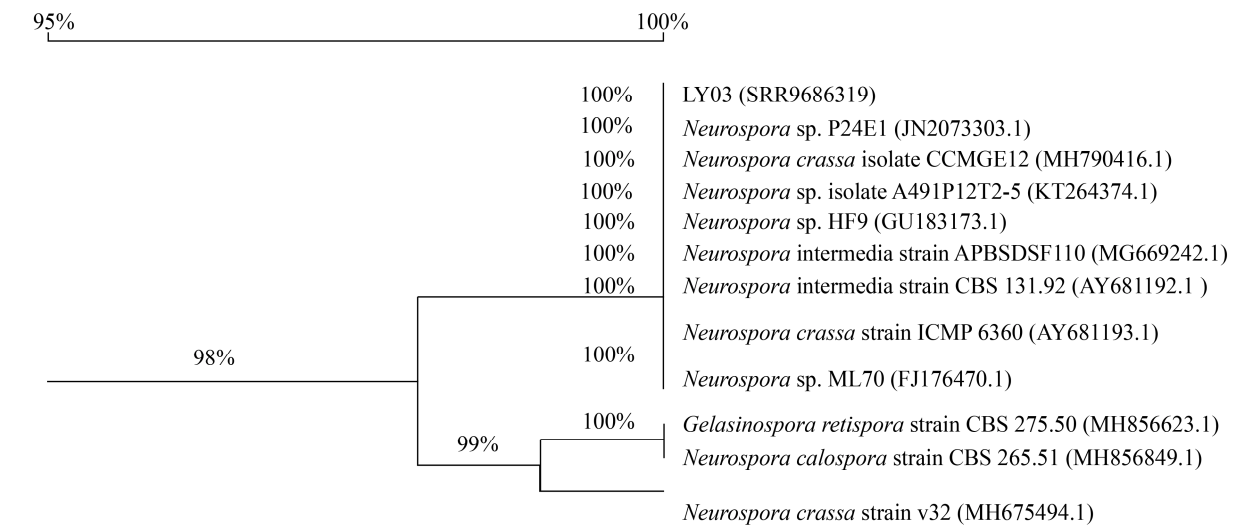


图 5 LY03 菌株同源进化树
Figure 5 Homologous evolutionary tree of LY03 strain

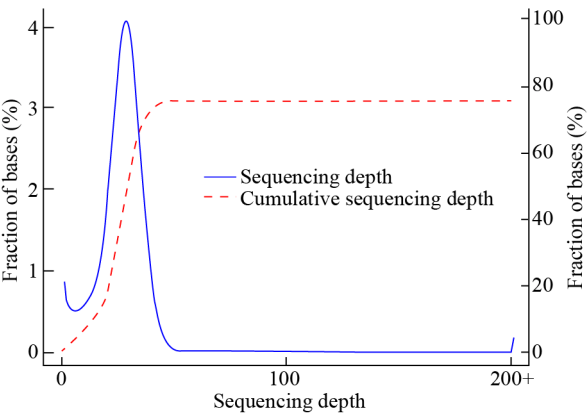


图 6 LY03 菌株测序深度及累计分布图
Figure 6 Sequencing depth distribution and cumulative sequencing depth chart of LY03 strain

2.3.2 基因组的变异分析

LY03 菌株 SNP、InDel、SV、CNV 遗传变异信息的分析结果如表 1、图 7 所示，与已有参考基因组相比，LY03 菌株全基因组杂合比率为 0.071%、SNP 位点变异总数为 203 128 个(占整个基因组 0.665 1%)、InDel 突变总和为 26 859 个(占 0.088 0%)、CNV 增加和减少的拷贝总数为 1 039 个(占 0.003 4%)、SV 注释的变异总数为 777 个(占 0.002 5%)；此外，在统计时发现所有的变异类型中，变异主要存在外显子区域(exonic)，内含子区(intronic)变异的统计数均为 0；突变基因为假设蛋

表 1 LY03 菌株基因组变异的比较分析
Table 1 Comparative analysis of genome variation of LY03 strain

变异类型 Variation type	变异数 Number of variants	小计 Sum
SNP 注释 SNP annotation		
全基因组杂合比率 Genome-wide heterozygous ratio (%)	0.071	
SNP 位点总数 Total number of SNP loci	203 128	
InDel 注释 InDel annotation		
插入突变总和 Sum of insertion mutations	14 460	26 859
缺失突变总和 Total deletion mutation	12 399	
CNV 注释 CNV annotation		
拷贝数增加的数量 Number of copies increased.	15	1 039
拷贝数减少的数量 Number of copies reduced	1 024	
SV 注释 SV annotation		
大片段的插入 The insertion of large fragments	0	777
缺失 Deletion	470	
倒置 Inversion	29	
染色体内部迁移 Chromosome internal migration	17	
染色体间的迁移 Interchromosome migration	261	

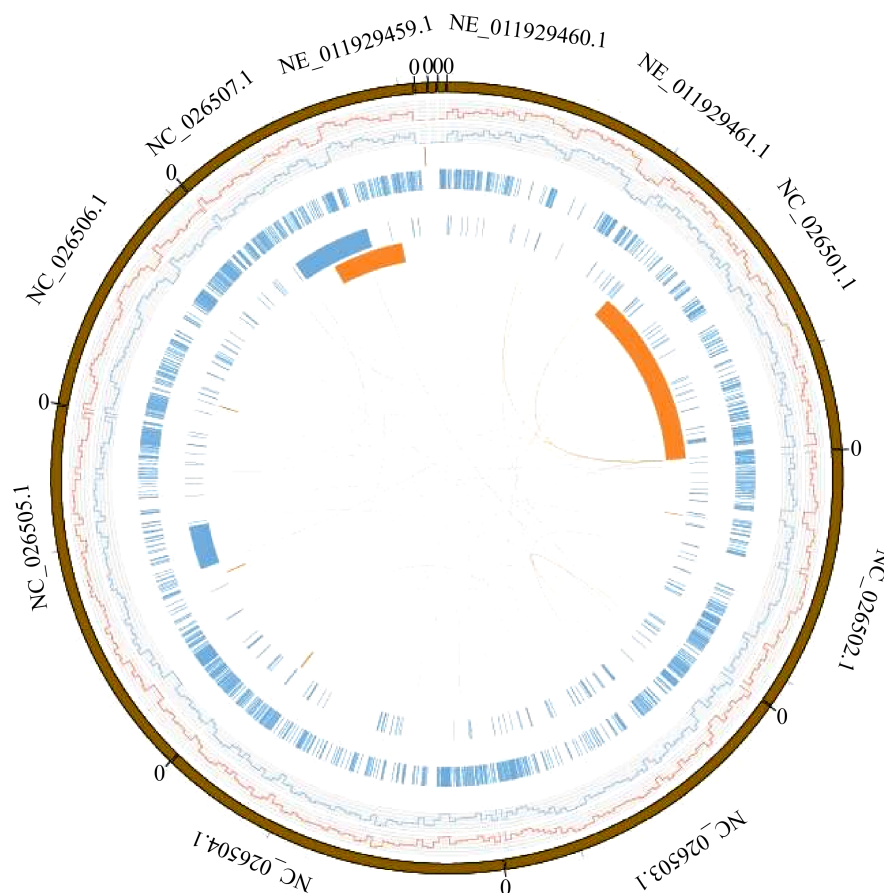


图 7 LY03 菌株基因组结构变异 Circos 分布图

Figure 7 Circos distribution figure of genome structure variation of LY03 strain

注：由外到内依次为：染色体、SNP、InDel、CNV 拷贝数增加数、CNV 拷贝数减少数、SV 大片段插入、SV 缺失、SV 倒置、SV 染色体内部迁移、SV 染色体间的迁移。

Note: The order from outside to inside was chromosome, the increase of SNP, InDel, CNV copy number, the decrease of CNV copy number, the insertion of SV large fragment, SV deletion, SV inversion, SV chromosome internal migration and SV chromosome migration.

白(hypothetical protein)、氨基酸转运体(amino acid transporter)、氨基酸渗透酶(amino acid permease)、芳香氨基酸氨基转移酶(aromatic amino acid Aminotransferase)、精氨酸 N-甲基转移酶(arginine N-methyltransferase)、蛋白激酶激活剂(protein kinase activator)、蛋白精氨酸 N-甲基转移酶 1 (protein arginine N-methyltransferase 1)、MAC 1 相互作用蛋白 1 (MAC1 interacting protein 1)、富马酸水合酶(fumarate hydratase)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine protein kinase)等与菌株生长、氨基酸代谢调节有关的基因，分布于

NW_011929461.1、NC_026501.1、NC_026502.1 等 10 条序列上，但在突变基因中未发现与纤维素酶(cellulose)有关的基因。

2.4 LY03 菌株框架图测序基因组功能分析结果

2.4.1 菌株序列测定的基本信息

LY03 菌株通过二代测序获得高质量的基因组序列，该基因组中总碱基数为 974 Mb。经过序列拼接得到 3 021 个 Scaffold，其中 2 961 个大于 500 bp，(G+C)mol%为 52.24%，序列长度为 30 538 737 bp。预测该菌株编码 5 550 个基因，基因总长度为 7 420 212 bp，编码基因占基因组百分比为 24.3%。

将测序原始数据上传至 NCBI 数据库, 获得 BioProject ID: SRR9686319。

2.4.2 菌株编码基因蛋白的功能注释

将 LY03 菌株所预测的基因蛋白编码序列输入基因产物功能数据库(gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、真核生物蛋白相邻类的聚簇(clusters of orthologous groups for eukaryotic complete genomes, KOG)、非冗余蛋白质序列数据库(non-redundant proteins sequence database, NR)和 Swiss-Prot 蛋白质序列资料库(Swiss-Prot protein sequence database, Swiss-Prot)等各功能数据库中进行比对(diamond, $E \text{ value} \leq 1e^{-5}$), 选定得分最高的比对结果进行注释, LY03 菌株的编码基因在上述各个数据库中注释到的基因个数(非冗余)分别为: GO 3 951 个、KEGG 5 260 个、KOG 1 832 个、NR 5 250 个和 Swiss-Prot 2 486 个。

GO 注释表明: LY03 菌株的基因功能与各个方面的细胞代谢密切相关, GO 数据库三大分类

统计中基因种类和数量最多的是生物过程(biological process), 而分子功能(molecular function)和细胞组成(cellular component)注释到的基因种类和数量基本相同。共有 18 204 个基因成功获得 GO 功能注释, 数量最多的几个类别分别是: 细胞过程(cellular process) 2 154 个, 代谢过程(metabolic process) 2 137 个, 催化活性(catalytic activity) 2 021 个, 结合(binding) 2 111 个(图 8)。

KEGG 注释表明, LY03 菌株基因组中共有 3 518 个基因得到注释, 数量最多的几个代谢通路类别分别是: 翻译(translation) 292 个, 碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism) 246 个, 转运与分解代谢(transport and catabolism) 220 个, 其中氨基酸代谢(amino acid metabolism)注释到的基因数量也较多, 达 200 个(图 9)。各分类类型统计表明, 在“代谢(metabolism)”这一大类中, 各种代谢均注释到较多的基因数量, 表明 LY03 菌株代谢功能种类较多, 能参与多种物质的代谢途径转化。

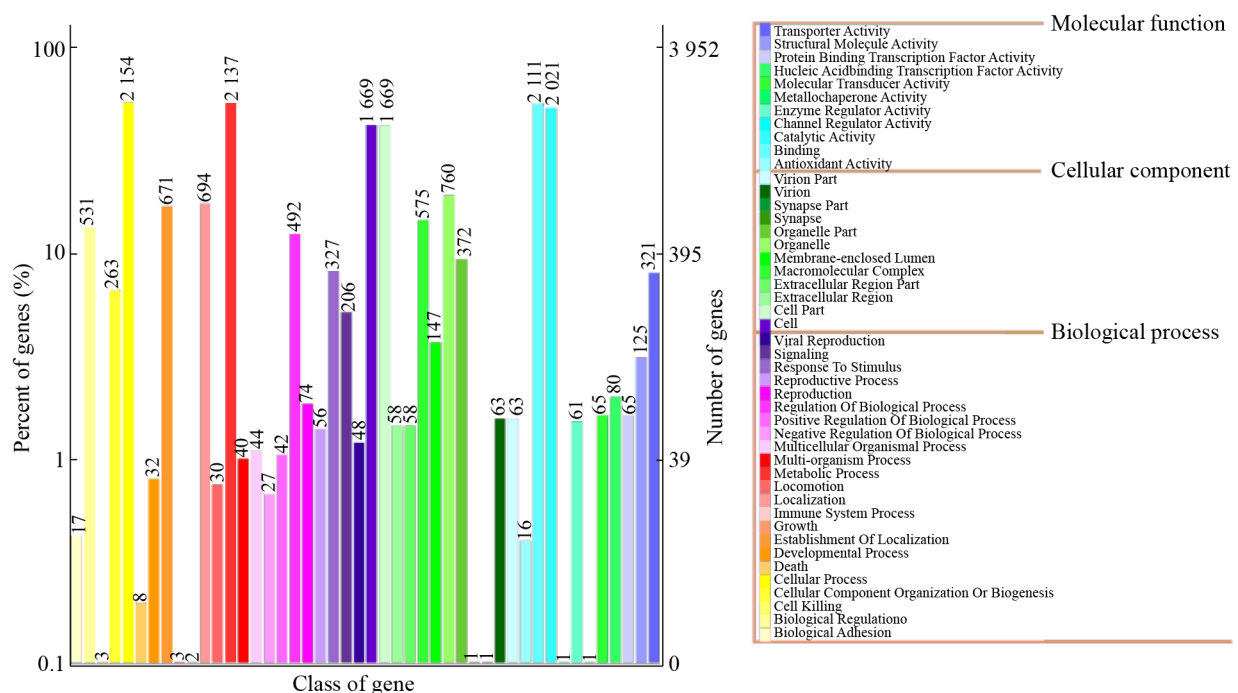


图 8 LY03 菌株的 GO 注释

Figure 8 GO annotation of LY03 strain

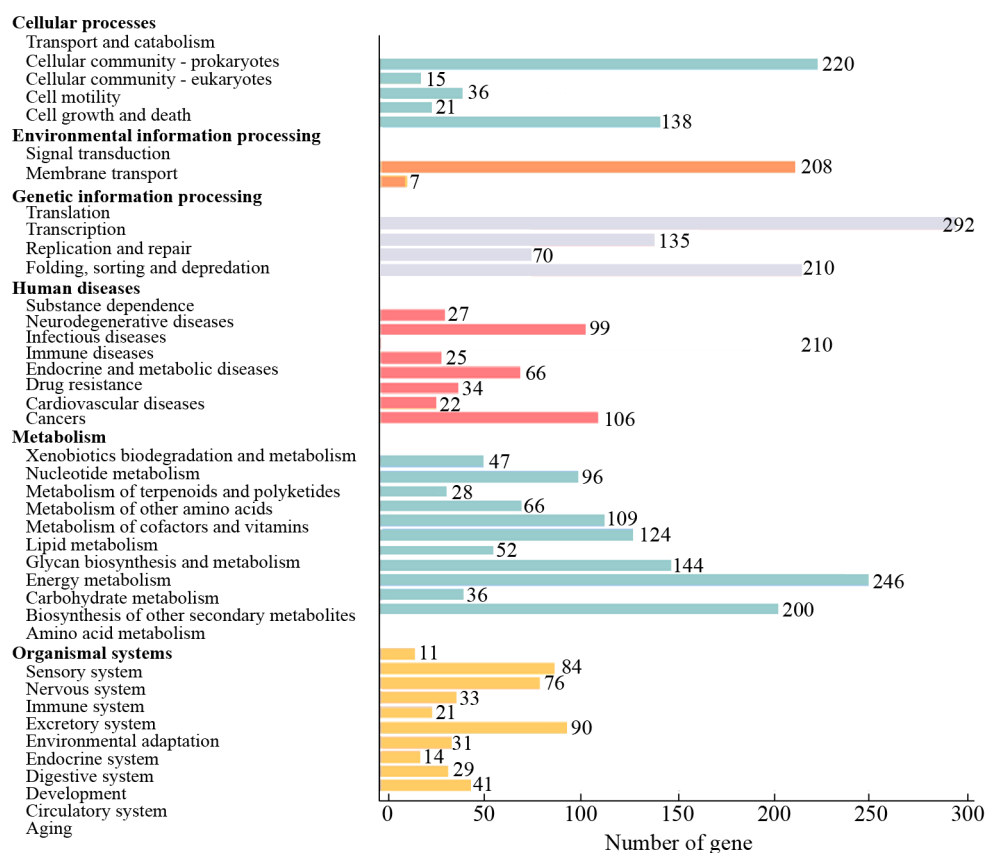


图9 LY03 菌株的 KEGG 分析统计

Figure 9 KEGG analysis and statistics of LY03 strain

KOG 数据库中 2 020 个基因得到注释(图 10), 数量最多的几个类别分别是翻译(translation)、核糖体结构与生物发生(ribosomal structure and biogenesis) 209 个、翻译后修饰(posttranslational modification)、蛋白质周转(protein turnover)、蛋白伴侣(chaperones) 209 个、一般功能预测(general function prediction only) 189 个; 此外, 还发现能量产生与转化(energy production and conversion)和氨基酸转运和代谢(amino acid transport and metabolism)注释到的基因数也较多, 分别为 154 个和 143 个, 表明 LY03 菌株中参与该类反应过程的基因数较多。

3 讨论与结论

粗糙脉孢菌在发酵工业中具有广泛的用途^[12], 产纤维素酶尤其是该类菌株应用研究的主

要方向^[13-15]。本研究从武平传统“红菌豆腐”中分离得到了其主要的发酵菌株粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*) LY03, 该菌基因组重测序结果表明, 与参考基因组相比, LY03 菌株基因组整体变异较小, 特别是在编码基因结构上不存在差异, 其基因组中含有丰富的纤维素酶(cellulase)基因(集中在 NC_026502.1 序列中), 验证了粗糙脉孢菌应该是优良的纤维素酶生产菌株来源。LY03 菌株基因组突变序列中发现了一些与菌株生长和氨基酸代谢调节有关基因的变异, 但未发现其中含有纤维素酶(cellulase)相关基因变异, 因而推测 LY03 菌株具有纤维素分解能力的同时, 其蛋白代谢相关基因的变异可能有利于增强其对红菌豆腐的蛋白分解能力。研究表明, 豆渣的营养成分中主要为碳水化合物(含纤维素、多糖等, 占 50%–64%)和蛋白质(占 18%–26%)^[16-17], 因而红菌豆腐发酵过程及品质与

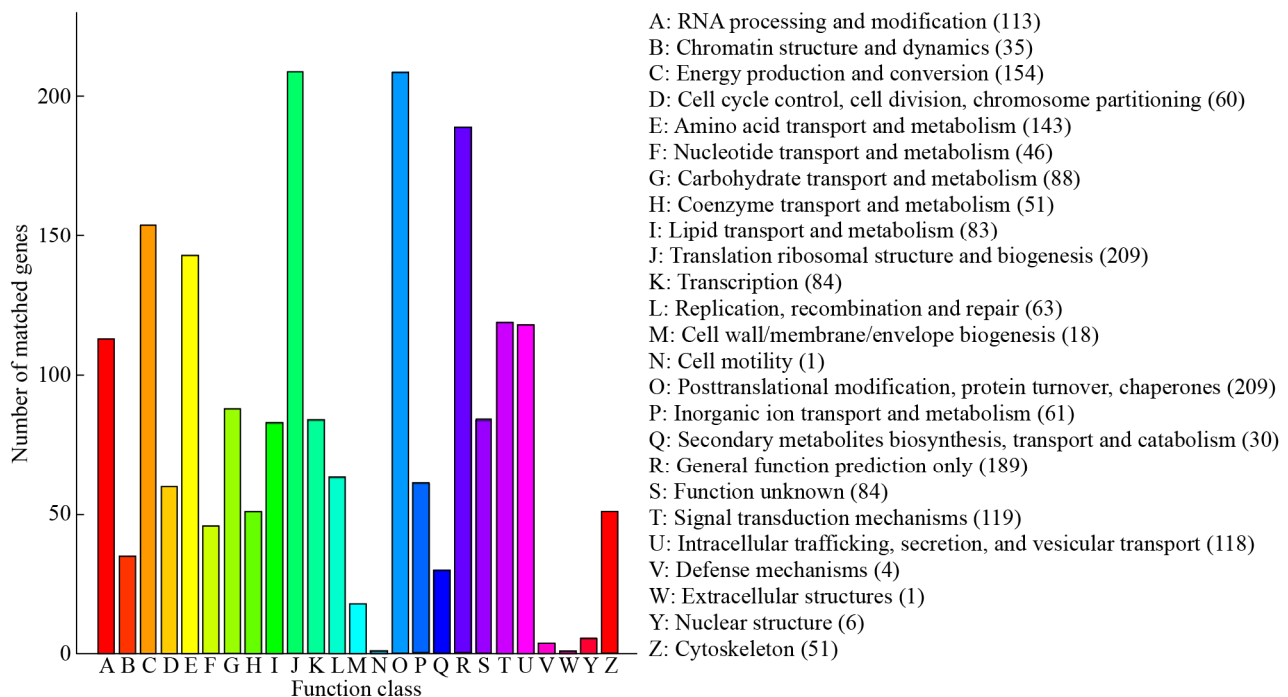


图 10 LY03 菌株的 KOG 功能分类

Figure 10 KOG function classification of LY03 strain

豆渣中碳水化合物、蛋白质的转化密切相关。本研究中, LY03 菌株基因组 GO、KEGG、KOG 编码基因蛋白的功能注释表明, 其基因组序列编码 5 550 个基因, 参与的代谢途径、代谢功能种类较多, 与多种物质的代谢途径转化过程密切相关。其中, GO 数据库注释到 LY03 菌株基因组中 2 137 个基因参与了代谢过程(metabolic process), 占注释基因总数的 11.74%, 在所有基因注释类型中排列第 2 位, 表明 LY03 菌株基因组中大量基因参与了红菌豆腐发酵的各代谢过程; KEGG 和 KOG 注释进一步表明, LY03 菌株基因组及编码蛋白参与的各种代谢过程中, 碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism) (占注释基因总数的 6.99%)、氨基酸代谢(amino acid metabolism) (占 5.69%)、能量产生与转化(energy production and conversion) (占 7.62%) 和氨基酸转运和代谢(amino acid transport and metabolism) (占 7.08%) 占据较大的比重, 再次验证了 LY03 菌株基因组编码的基因及其蛋白与红菌豆腐发酵过程密切相关, 在红菌豆腐发酵过程中参

与了各种能量、碳水化合物和氨基酸的代谢。因而, LY03 菌株基因组序列的分析对认识粗糙脉孢菌参与红菌豆腐发酵过程的代谢及调控具有重要意义。

微生物基因组学的研究正式启动于 20 世纪 90 年代后期, 其分析的基础是微生物全基因组的核苷酸序列, 通过这些序列的测序、功能解析来研究微生物的完整生物学功能^[18]。总体来看, 微生物基因组的研究投入少、收效快、目标明确, 引起研究者越来越多的重视。截至目前, 许多微生物基因组, 如 *Escherichia coli*^[19]、*Lactobacillus*^[20]、*Bacillus subtilis*^[21]、*Saccharomyces cerevisiae*^[22] 等模式微生物菌株均已被或正在被测序, 并已有国内外学者进行了大量的研究报道。微生物基因组学不仅可以研究微生物菌株的基因结构和基因功能特性, 还可深入地分析功能基因的代谢途径、各调控因子之间的相互作用、互作机制等。目前, 随着二代高通量测序技术的迅猛发展, 基因组测序已经成为细菌基因组研究不可或缺的重要工具, 其中微生物基因组的重测序个体可进行特定功能基因分析、

进化分析等,其以较低的价格将单个参考基因组信息扩增为生物群体的遗传特征,能为所测序微生物菌株的后续功能研究提供理论基础^[23-24]。因此,本论文对武平传统“红菌豆腐”主要发酵菌株 LY03 进行分离、鉴定及基因组重测序,分析其基因组变异、功能,有利于揭示红菌豆腐发酵本质,为在分子水平上发酵的相关基因、代谢过程的调控提供理论基础,为最终实现红菌豆腐的工业化生产提供科学依据^[25-26]。

REFERENCES

- [1] Zhong GG. Hakka red fungus bean curd dregs[J]. Sichuan Cuisine, 2010(7): 77 (in Chinese)
钟国光. 客家的红菌豆腐渣[J]. 四川烹饪, 2010(7): 77
- [2] Yan XH. Red bean curd fungus[J]. Hakka Cultural Heritage Vision, 2016(2): 14-15 (in Chinese)
严修鸿. 红心豆腐菌[J]. 客家文博, 2016(2): 14-15
- [3] Mo L, Zheng L. Red fungus bean curd head[J]. Chinese Cuisine, 2015(5): 125 (in Chinese)
茉莉, 郑莉. 红菌豆腐头[J]. 中国烹饪, 2015(5): 125
- [4] Chen L, Yong F, Zhong AY. Local food, local love[J]. Chinese Cuisine, 2015(2): 101-103 (in Chinese)
陈莉, 永方, 钟安源. 乡土美食, 乡土情意[J]. 中国烹饪, 2015(2): 101-103
- [5] Li ZX, Lei YL, Liu DY, et al. Molecular cloning and sequence analysis of partial 18S rDNA of mold in Koji[J]. Food Science, 2009, 30(1): 211-213 (in Chinese)
李再新, 雷云玲, 刘达玉, 等. 甜酒曲中霉菌 18S rDNA 克隆及其序列分析[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 211-213
- [6] Ning ZY, Dong L, Liao HJ, et al. Pathogen diagnosis of strawberry root rot caused by *Fusarium* in Changfeng county, Anhui province[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2017, 44(1): 130-134 (in Chinese)
宁志怨, 董玲, 廖华俊, 等. 安徽省长丰县草莓根腐病病原的鉴定[J]. 安徽农业大学学报, 2017, 44(1): 130-134
- [7] He YF, Liu SJ, Huang H, et al. Separation and identification of fungi from bayberry in storage period and its clustering analysis based on ITS sequence[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2018, 9(18): 4845-4850 (in Chinese)
何郁菲, 刘淑娟, 黄浩, 等. 杨梅贮藏期真菌的分离鉴定及基于 ITS 序列的聚类分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(18): 4845-4850
- [8] Zhang ZQ. Whole-genome sequencing and genomic analysis of *Candida albicans* CA6184[D]. Nanchang: Master's Thesis of Nanchang University, 2016 (in Chinese)
张志勤. 白假丝酵母菌 CA6184 全基因组测序及分析[D]. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 2016
- [9] Zhou ML, Xia Y, Liu Y, et al. The genome re-sequencing and pathogenicity-associated genes analyzing in a non-pathogenic strain of rice sheath blight fungus *Rhizoctonia solani*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017, 47(6): 756-766 (in Chinese)
周梦琳, 夏园, 刘尧, 等. 水稻纹枯病菌不致病菌株基因组重测序以及致病力相关基因分析[J]. 植物病理学报, 2017, 47(6): 756-766
- [10] Al-Bulushi IM, Bani-Uraba MS, Guizani NS, et al. Illumina MiSeq sequencing analysis of fungal diversity in stored dates[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 72
- [11] Song ZZ, Jia YL, Huang ZX, et al. Isolation, identification, and genomic sequencing analysis of an endophytic biocontrol strain of *Pennisetum giganteum*[J]. Pratacultural Science, 2019, 36(3): 632-639 (in Chinese)
宋昭昭, 贾雨雷, 黄在兴, 等. 一株巨菌草内生防菌的分离、鉴定及其基因组测序分析[J]. 草业科学, 2019, 36(3): 632-639
- [12] Zhu FM, Han CY, Peng Y, et al. Preparation of protein feed by solid state fermentation of rice straw by *Neurospora crassa*: CN, 103229888B[P]. 2014-10-01 (in Chinese)
祝发明, 韩春元, 彭勇, 等. 粗糙脉孢菌固态发酵稻草制备蛋白饲料的方法: 中国, 103229888B[P]. 2014-10-01
- [13] Guo QH, Xiong BT, Chen SL. Optimization of cellulase production conditions of *Neurospora*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2018, 33(2): 151-155 (in Chinese)
郭清华, 熊本涛, 陈少林. 粗糙脉孢菌产纤维素酶培养条件的优化[J]. 西北林学院学报, 2018, 33(2): 151-155
- [14] Zhang LX, Bai JH, Hao RL, et al. The culture conditions optimization of cellulases fermentation and species identification of *Neurospora crassa*[J]. China Feed, 2018(1): 27-31 (in Chinese)
张玲秀, 白建华, 郝瑞林, 等. 一株粗糙脉孢菌的鉴定及产纤维素酶发酵工艺优化[J]. 中国饲料, 2018(1): 27-31
- [15] Matsu-Ura T, Dovzhenok AA, Coradetti ST, et al. Synthetic gene network with positive feedback loop amplifies cellulase gene expression in *Neurospora crassa*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018, 7(5): 1395-1405
- [16] Zhou YN, Chai H, Chu Q, et al. The variable pattern of nutrition components in *Bacillus natto* fermentation of bean residue[J]. Food Research and Development, 2016, 37(23): 170-174 (in Chinese)
周亚楠, 柴贺, 初琦, 等. 纳豆芽孢杆菌发酵豆渣营养成分变化研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(23): 170-174
- [17] Zhu YW, Long B, Long Y, et al. Determination and content claim of nutrients in Okara[J]. Food Research and Development, 2017, 38(8): 117-120 (in Chinese)
祝义伟, 龙勃, 龙勇, 等. 豆渣中营养成分的检测及其含

- 量声称[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(8): 117-120
- [18] Huang Y. The research of microbial genomics based on high-throughput sequencing[D]. Beijing: Master's Thesis of Academy of Military Medical Sciences, 2013 (in Chinese)
- 黄勇. 基于高通量测序的微生物基因组学研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院硕士论文, 2013
- [19] Uhlich GA, Paoli GC, Zhang XM, et al. Whole-genome sequence of *Escherichia coli* serotype O157:H7 Strain PA20[J]. Genome Announcements, 2017, 5(2): e01460-16
- [20] Wang SJ, Zhu H, He F, et al. Whole genome sequence of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* N1115, isolated from traditional Chinese fermented milk[J]. Genome Announcements, 2014, 2(2): e00059-14
- [21] Li EH, Yang HL, Wang XL, et al. Whole-genome sequencing and analysis of inosine- producing strain *Bacillus subtilis* ATCC 13952[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(12): 1560-1567 (in Chinese)
- 李尔汉, 杨慧林, 王筱兰, 等. 甘生产菌枯草芽孢杆菌 ATCC 13952 的全基因组测序及序列分析[J]. 微生物学报, 2015, 55(12): 1560-1567
- [22] Matheson K, Parsons L, Gammie A. Whole-genome sequence and variant analysis of W303, a widely-used strain of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. G3: Genes, Genomes, Genetics, 2017, 7(7): 2219-2226
- [23] Peng Z. Isolation and whole genome resequencing of *Pasteurella multocida* originated from pigs[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- 彭忠. 猪多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及全基因组重测序[D]. 武汉: 华中农业大学博士论文, 2018
- [24] Wang QH, Shi YQ, Zhu Y, et al. Whole genome sequencing analysis of a small colony mutant strain of *Staphylococcus aureus*[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2017, 38(5): 77-80 (in Chinese)
- 王奇惠, 时永强, 祝宇, 等. 一株金黄色葡萄球菌小菌落突变株全基因组测序分析[J]. 动物医学进展, 2017, 38(5): 77-80
- [25] Zhang YY, Liu PH, Liu XL. Research advances of *Neurospora crassa* and its applications in fermentation industry[J]. Shandong Science, 2011, 24(3): 37-42 (in Chinese)
- 张妍妍, 刘佩卉, 刘新利. 粗糙脉孢菌及其在发酵工业中的应用研究[J]. 山东科学, 2011, 24(3): 37-42
- [26] Huberman LB, Coradetti ST, Glass NL. Network of nutrient-sensing pathways and a conserved kinase cascade integrate osmolarity and carbon sensing in *Neurospora crassa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(41): E8665-E8674