

丝状真菌抗逆相关基因研究进展及其应用

廖敏^{1,2}, 周权²

(1. 宿州职业技术学院农艺系, 宿州 234100; 2. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

摘要: 丝状真菌作为真菌中一类重要的微生物类群, 在食品加工、酶剂和有机酸的生产、生物防治等方面发挥着重要作用。但是在实际应用当中, 由于丝状真菌的生长、代谢等严格受到自身抗逆性能及对外界环境的适应性能的影响, 因此丝状真菌的应用受到环境条件的严格限制。而菌株的抗逆相关基因直接决定了其自身的抗逆能力及环境的适应能力。因此, 就丝状真菌抗逆相关基因的研究方法及其在提升菌株抗逆性能的应用上进行了综述, 为今后的丝状真菌菌株的改良及规模化的运用具有推动作用。

关键词: 丝状真菌; 抗逆相关基因; 菌株改良

中图分类号: Q949.32

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2016)01-0062-05

Research progress on the genes related to stress-tolerance of filamentous fungi

LIAO Min^{1,2}, ZHOU Quan²

(1. Department of Agronomy, Suzhou Vocational Technical College, Suzhou 234100;

2. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Filamentous fungus is one of the economically important fungi in the production of food, enzymes, organic acids and biocontrol agents. The growth and metabolism of filamentous fungi are strictly limited by the environmental conditions and their stress tolerance and adaptability to the multiple environments. The stress tolerance and adaptability of those fungi are directly regulated by the genes involved in stress response. In this paper, we reviewed the advances in the research on the genes involved in stress responses and the applications in enhancing the ability to tolerate the environmental stresses. This review can provide the main impetus for improvement of filamentous fungi and a large-scale application in the future.

Key words: filamentous fungi; genes related to stress-tolerance; strain improvement

丝状真菌作为广泛存在于自然界的一类重要真菌, 在工业生产、农业的害虫防治、医药保健及基础生物学的研究当中起着重要的作用。例如, 两种重要的抗生素工业菌-产头孢菌素的顶头孢霉和产青霉素的产黄青霉; 广泛用于生产蛋白酶等酶类的黑曲霉及生产柠檬酸等有机酸的米曲霉; 已被普遍用于农林害虫的防治的白僵菌和绿僵菌等^[1-2]; 还有一些人或动物的致病菌如烟曲霉等。因此, 由于丝状真菌在经济上的重要地位, 再加上其结构相对简单, 多年来一直被广泛的研究。

尽管丝状真菌已普遍运用于工业化生产、真菌

杀虫剂的制备等, 但是丝状真菌作为严格的活体微生物, 其生产效率及致病能力除了菌株本身还取决于外界环境条件, 这也严重限制了丝状真菌在生产上的应用。然而, 当前对于丝状真菌的研究主要集中在培养条件优化、菌株筛选等方面, 对于影响自身抗逆性能及对外界环境的适应性能起着决定性作用的抗逆相关基因的研究工作明显落后。因此, 加强对丝状真菌的抗逆相关基因的研究, 便于以后通过分子手段获得环境适应性强的生产菌株, 以及改造人和动物的致病菌以降低其致病力等。本文通过对丝状真菌抗逆相关基因研究方法及其利用进行了

收稿日期: 2015-04-30

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金(KJ2014A0179)资助。

作者简介: 廖敏, 副教授。E-mail: liaomin3119@126.com

综述, 对将来菌株的定向改造具有重要意义。

1 研究方法

近年来, 随着不少丝状真菌全基因组测序的完成, 抗逆相关基因的研究逐渐成为丝状真菌研究的一个热点。抗逆相关基因的鉴定及功能的分析主要有针对一系列抗逆相关基因研究的组学(基因组、转录组和蛋白组)方法、及针对一个或者多个抗逆相关基因研究的基因敲除等方法。

1.1 组学方法

1.1.1 基因组 通过基因组学的方法鉴定抗逆相关基因, 其实主要是利用后基因组研究, 即功能基因组学。功能基因组学主要是利用基因组所提供的信息, 运用生物学方法分析该基因对于真菌在抗逆环境中的作用。随着构巢曲霉、粗糙脉胞菌、稻瘟菌和绿僵菌等丝状真菌全基因组测序的完成, 可以通过对基因功能的注释, 获得一系列与抗逆相关的基因信息。通过全基因组测序发现, 稻瘟菌、禾谷镰刀菌和稻瘟菌都具有编码 G-蛋白偶联受体的基因, G-蛋白偶联受体是机体在环境应激反应信号通路的重要组成部分之一^[3]。高强等通过全基因组测序发现金龟子绿僵菌和蝗绿僵菌都具有一系列含锌乙醇脱氢酶基因, 它们参与了与真菌抗逆性密切相关的甘露醇的合成, 以及两种绿僵菌都含有一个组氨酸传感器(HK)和一个反应调节效应器(RR), 这两个基因作为分子通路控制开关在真菌抵抗逆境起着关键作用^[4]。对蛹虫草和白僵菌的全基因组测序发现它们都含有多种参与真菌应激反应的蛋白激酶, 这些蛋白激酶在金龟子绿僵菌和蝗绿僵菌基因组中都有存在, 甚至更多^[4-6]。

1.1.2 转录组 继全基因组测序之后, 利用转录组测序技术研究不同环境条件下丝状真菌基因的差异表达等, 从而确定丝状真菌的抗逆相关基因得到广泛的应用^[7-9]。人们利用转录组测序方法研究酮类和乙酰苯类物质处理前后的粗糙脉胞菌发现, 大量表达 ABC 转运蛋白等参与氧化应激反应的蛋白基因差异表达明显^[10]。Wang 等通过转录组测序分析热胁迫前后的绿僵菌分生孢子发现, 参与表达热休克蛋白及海藻糖积累的基因差异表达显著, 同时也发现了大量其他参与热应激反应的基因^[11]。

1.1.3 蛋白组 蛋白质是生物功能的主要体现者, 且蛋白质有其自身特有的活动规律, 随着后基因组时代的到来, 蛋白质组学技术的广泛应用对于丝状真菌抗逆相关基因的研究起了极大的推动作用。利

用蛋白质组学的方法, 国外学者通过分析环境变化和外界压力条件下烟曲霉的蛋白质表达变化, 发现大量与烟曲霉处于氧化应激状态的谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶等抗逆蛋白, 从而也确定了表达这些抗逆蛋白的基因^[12]。同样人们利用蛋白质组学技术研究碳饥饿等逆境下的脉胞菌的蛋白质的差异表达发现, 多种参与 RNA、蛋白质合成(包括两个翻译起始因子 Eif3a 和 Eif3c)的蛋白质差异表达显著, 从而说明表达这些差异蛋白的基因在菌株缺少碳源的逆境中起着重要作用^[13]。

1.2 特定抗逆相关基因的研究方法

1.2.1 基因敲除 基因敲除是通过构建重组敲除载体, 对丝状真菌内某一特定基因破坏或者替换掉, 然后观察菌株的生理生化特性的变化来推测基因功能。近年来, 通过农杆菌介导的基因敲除来研究及鉴定丝状真菌的抗逆基因已得到广泛的应用。敲除掉 OS-2 MAP 激酶的粗糙脉胞菌生长速度相对于原始菌株减慢的同时, 其高盐的耐受性、抗性氧化能力明显下降^[14]。敲除促分裂素原活化蛋白激酶(MAPK)的葡萄孢菌基因的突变株抗氧化等逆境生长能力明显降低^[15]。白僵菌的 3 个超氧化物歧化酶(SOD1、SOD4 和 SOD5)被分别敲掉后发现, 菌株的抗氧化、抗辐射能力明显的下降^[16]; 两个 14-3-3 蛋白基因被敲除后发现白僵菌的耐渗透压、抗氧化及防辐射能力也大大减弱^[17]; 分别敲除掉 5 个过氧化氢酶基因(catA, catB, catC, catD 和 catP)的突变体菌株抗氧化、耐热和抗紫外的能力明显降低^[18]。绿僵菌的甘露醇-1-磷酸脱氢酶(MPD)和甘露醇脱氢酶(MTD)被敲除后导致菌株菌丝和孢子内的甘露醇含量急剧下降, 从而菌株抗氧化、耐高温及防辐射能力下降^[19]。

1.2.2 过表达 将丝状真菌目标基因与启动子(如三磷酸甘油醛脱氢酶启动子 P_{gpdA} 等)连接后, 构建过表达载体后将其转化到丝状真菌中并过量表达后, 以此来研究其表型及生理生化特征来阐明目标基因功能^[20]。目前, 过表达技术已被成功应用于丝状真菌的抗逆相关基因的研究。有学者在构巢曲霉过表达了中性粒细胞激活蛋白基因(*napA*)发现其抗氧化等逆境耐受力较原始菌株有明显提高, 说明 *napA* 基因在构巢曲霉的抗逆生长过程中起到重要作用^[21]。有相关学者在白僵菌中过表达了过氧化物酶后发现其抗逆能力明显的提高^[22-23]; 在白僵菌中过表达了烟曲霉的酪氨酸酶, 菌株抗紫外辐射能力有显著的提高^[24]。将构巢曲霉的谷胱甘肽过氧化物

酶基因导入蛹虫草中发现,退化蛹虫草菌株得到了明显的复壮,其抗氧化能力也有显著的提高^[25]。

1.2.3 T-DNA 标签技术 T-DNA 标签技术主要就是基于农杆菌介导的遗传转化方法将 T-DNA (或携带抗性标签) 随机插入到真菌基因组内,以此来研究失活基因的功能。由于在丝状真菌中,农杆菌介导的转化效率较高,因此 T-DNA 标签技术已被用来检测丝状真菌的抗逆基因^[26-27]。Schumacher 等人通过 T-DNA 标签随机插入到灰霉病菌基因组内获得大量突变菌株,通过筛选发现一个编码 GATA 转录因子的毒力相关基因,此基因失活的突变株不仅对光强度极为敏感,抗氧化能力相对野生菌株也明显降低^[28]。Luo 等通过构建球孢白僵菌 T-DNA 突变体库,并筛选出高温高渗敏感性突变体株,最终鉴定出了参与菌株逆境胁迫反应的相关抗逆基因^[29]。

1.2.4 RNAi 技术 近年来, RNA 干涉 (RNA interference, RNAi) 技术因其极速简便、通用性强、靶向性高等优势得以快速的发展与应用。其主要是利用已知的真菌目的基因结构构建双链 RNA 的载体,导入细胞后引发目的基因的 mRNA 的降解,可以研究基因的功能。目前,已经有越来越多的国内外学者利用 RNAi 技术来研究丝状真菌的抗逆基因^[30]。Thewes 等人通过 RNAi 技术发现盘基网柄菌内含有一个与酵母菌 Crz1 同源的假定锌指转录因子-依赖钙调磷酸酶转录因子 (*TacA*), *TacA* 不仅在盘基网柄菌生长过程中起着重要作用,同时也是该菌在逆境下生长不可缺少的重要基因^[31]。

2 抗逆相关基因在菌株改良中的应用

丝状真菌抗逆性相关基因的研究对于提高真菌的抗逆性能的基因工程改造提供了明确的靶点基因,同时也为工业用菌的大规模生产应用打下基础。大量的研究发现,通过基因工程改良获得抗逆性高的菌株是一种非常有效的方法。

曲霉属和青霉属内的几种真菌已被广泛用于工业生产,早在上世纪就有学者通过过表达等手段改造菌株以获得抗逆性强的菌株,增强菌株的环境适应能力。例如 Lee 等人通过在构巢曲霉内过表达 *flbA* 基因发现其能够提前在菌丝顶端生成产孢结构,同时期抗逆能力也有了显著的提高^[32]。同样,碱性亮氨酸拉链转录因子一直以来被认为在真核生物应对逆境中起到重要作用, Yin 等人在构巢曲霉内分别过表达了 5 种碱性亮氨酸拉链转录因子 (*RsmA*、*NapA*、*ZipA*、*ZipB* 和 *ZipC*), 发现其中

两种 (*RsmA*、*NapA*) 突变菌株在逆境生长能力明显提高^[33]。Conesa 等人通过在黑曲霉菌株内过表达钙联结蛋白后,发现突变菌株抗逆境能力明显增强,同时锰过氧化物酶产量也有明显提升^[34]。Sigl 等人利用过表达方法在产黄青霉基因组内插入了表达鲨烯环氧酶的基因,从而使突变菌株具有了特比萘酚抗性,而且对菌株的正常生长没有影响,这为以后其他菌株增加抗逆相关基因提供了理论基础^[35]。

木霉是一种重要的防治植物病害的生防菌,通过在木霉内过表达 *TvDim 1* 基因的转化子, Moran 等人不仅发现其应对氧化环境反应能力增强,对氧化环境的适应能力也明显提高^[36]; Yang 等人通过根瘤农杆菌介导的方法在哈茨木霉内转入了 *SOD* 基因,突变株在 40℃ 和 2 mol L⁻¹ NaCl 的条件下仍能保持对核盘菌的抑制能力,说明 *SOD* 基因提高了木霉耐盐和耐热能力^[37]。

我国学者利用对白僵菌 β -微管蛋白的定点突变方法,获得了具有对一定多菌灵浓度抗性的球孢白僵菌菌株,而且菌株的其它性状没有明显的减弱^[38]。因此,通过对丝状真菌的抗逆相关基因的研究,并利用基因工程技术对菌株进行改造,这极大的提高了菌株抗逆能力,增强了菌株环境适应力。

3 总结与展望

目前,广泛存在于自然界的丝状真菌已普遍被应用于工业生产、生物防治,然而作为活体微生物,其生长性状、致病力等因受限于外界环境条件,严重限制了丝状真菌在工业、农业生产上的应用。丝状真菌内抗逆相关基因对于真菌的逆境生存能力起着至关重要的作用,因此阐明丝状真菌内的抗逆相关基因的研究逐渐成为了热点。

针对真菌抗逆相关基因的研究主要包括基因进行功能注释和改变基因的表达量两大部分,首先通过对基因进行功能注释来预测其是否与真菌抗逆相关,然后通过改变此基因的表达量,然后观察菌株在不同的逆境环境下的生长状态,最终确定该基因对于真菌在逆境生长中的作用。其中改变基因表达量主要有两大途径:一是降低或者终止该基因的表达,例如基因敲除、RNAi 等;二是增加其表达量,例如过表达技术等。由于丝状真菌遗传多样复杂性,如某些丝状真菌具有多核、或者某一基因的功能被生物体的其它代谢途径补偿等,仅仅通过改变某一基因的表达量后观察该菌的表型变化,来确定该基因的抗逆功能显得相对片面。因此在今后的抗逆相关基因的研究中,针对抗逆相关通路的研究将会引

起人们的重视^[39]。

截止到目前, 通过基因工程技术来改良菌株的抗逆性已获得显著的成效, 但是重组菌株的稳定性及安全性少有考虑。因此, 这些改良的重组菌株是否可以广泛的应用于大规模生产, 尚待进一步的研究验证。

参考文献:

- [1] DE FARIA M R, WRAIGHT S P. Myco-insecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types [J]. *Bio Control*, 2007, 43: 237-256.
- [2] BARNES A I, SIVA-JOTHY M T. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity[J]. *Bio Sci*, 2000, 267: 177-182.
- [3] ZHANG Y, ZHANG K, FANG A, et al. Specific adaptation of *Ustilagoidea vires* in occupying host florets revealed by comparative and functional genomics [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3489
- [4] GAO Q, JIN K, YING S H, et al. Genome sequencing and comparative transcriptomics of the model entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. acridum*[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(1): e1001264.
- [5] XIAO G H, YING S H, ZHENG P, et al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*[J]. *Sci Rep*, 2012, 2: 483.
- [6] ZHENG P, XIA Y L, XIAO G H, et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine[J]. *Genome Biol*, 2011, 12: R116.
- [7] LIN J Q, ZHAO X X, ZHI Q Q, et al. Transcriptomic profiling of *Aspergillus flavus* in response to 5-azacytidine[J]. *Fungal Genet Biol*, 2013, 56:78-86.
- [8] RIES L, PULLAN S T, DELMAS S, et al. Genome-wide transcriptional response of *Trichoderma reesei* to lignocellulose using RNA sequencing and comparison with *Aspergillus niger*[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 541.
- [9] ROKAS A, GIBBONS J G, ZHOU X, et al. The diverse applications of RNA-Seq for functional genomic studies in *Aspergillus fumigatus*[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2012, 1273: 25-34.
- [10] GONÇALVES A P, SILVA N, OLIVEIRA C, et al. Transcription profiling of the *Neurospora crassa* response to a group of synthetic (thio) xanthenes and a natural acetophenone[J]. *Genomics Data*, 2015, 4: 26-32.
- [11] WANG Z X, ZHOU X Z, MENG H M, et al. Comparative transcriptomic analysis of the heat stress response in the filamentous fungus *Metarhizium anisopliae* using RNA-Seq[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98: 5589-5597.
- [12] VÖDISCH M, ALBRECHT D, LESSING F, et al. Two-dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. *Proteomics*, 2009, 9: 1407-1415.
- [13] XIONG Y, CORADETTI S T, Li X, et al. The proteome and phosphoproteome of *Neurospora crassa* in response to cellulose, sucrose and carbon starvation[J]. *Fungal Genet Biol*, 2014, 72:21-33.
- [14] KAMEI M, YAMASHITA K, TAKAHASHI M, et al. Deletion and expression analysis of beta-(1,3)-glucanase genes in *Neurospora crassa*[J]. *Fungal Genet Biol*, 2013, 52: 65-72.
- [15] HELLER J, RUHNKE N, ESPINO J J, et al. The mitogen-activated protein kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* is required for pathogenic development and has broad regulatory functions beyond stress response[J]. *Mol Plant Microbe In*, 2012, 25(6): 802-816.
- [16] LI F, SHI H Q, YING S H, et al. Distinct contributions of one Fe- and two Cu/Zn-cofactored superoxide dismutases to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*[J]. *Fungal Genet Biol*, 2014, 9:1-13.
- [17] LIU Q, LI J G, YING S H, et al. Unveiling equal importance of two 14-3-3 proteins for morphogenesis, conidiation, stress tolerance and virulence of an insect pathogen[J]. *Environ Microbiol*, 2014, 1111: 1462-2920.
- [18] WANG Z L, ZHANG L B, YING S H, et al. Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses[J]. *Environ Microbiol*, 2013, 15: 409-418.
- [19] WANG Z L, LU J D, FENG M G. Primary roles of two dehydrogenases in the mannitol metabolism and multi-stress tolerance of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. *Environ Microbiol*, 2012, 14(8): 2139-50.
- [20] PUNT P J, ZEGERS N D, BUSSCHER M, et al. Intracellular and extracellular production of proteins in *Aspergillus* under the control of expression signals of the highly expressed *Aspergillus nidulans* gpdA gene[J]. *J Biotechnol*, 1991, 17: 19-33.
- [21] YIN W B, REINKE A W, SZILÁGYI M, et al. bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 1): 77-88.
- [22] ALI S, XIA J M, REN S X, et al. Catalase production influences germination, stress tolerance and virulence of *Beauveria bassiana* conidia[J]. *Pak J Zool*, 2012, 44: 537-544.
- [23] CHANTASINGH D, KITIKHUN S, KEYHANI N O, et al. Identification of catalase as an early up-regulated gene in *Beauveria bassiana* and its role in entomopathogenic fungal virulence[J]. *Biol Control*, 2013, 67: 85-93.
- [24] SHANG Y F, DUAN Z B, HUANG W, et al. Improving UV resistance and virulence of *Beauveria bassiana* by genetic engineering with an exogenous tyrosinase gene[J]. *J Invertebr Pathol*, 2012, 109: 105-109.
- [25] XIONG C H, XIA Y L, ZHENG P, et al. Increasing oxidative stress tolerance and subculturing stability of *Cordyceps militaris* by overexpression of a glutathione peroxidase gene[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 2009-2015.
- [26] COMBIER J P, MELAYAH D, RAFFIER C, et al. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the symbiotic ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2003, 220: 141-148.

- [27] WANG D Y, HE D, LI G Q, et al. An efficient tool for random insertional mutagenesis: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus*[J]. *J Microbiol Meth*, 2013, 98: 114-118.
- [28] SCHUMACHER J, SIMON A, COHRS K C, et al. The transcription factor BcLTF1 regulates virulence and light responses in the necrotrophic plant pathogen *Botrytis cinerea*[J]. *PLoS Genet*, 2014, 10(1): e1004040.
- [29] LUO Z H, ZHANG Y J, JIN K, et al. Construction of *Beauveria bassiana* T-DNA insertion mutant collections and identification of thermosensitive and osmosensitive mutants[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49: 1301-1305.
- [30] QUOC N B, NAKAYASHIKI H. RNA silencing in filamentous fungi: from basics to applications. *Genetic Transformation Systems in fungi, Volume 2*[M]. Springer International Publishing, 2015: 107-124.
- [31] THEWES S, KROHN S, SCHMITH A, et al. The calcineurin dependent transcription factor TacA is involved in development and the stress response of *Dictyostelium discoideum*[J]. *Eur J of Cell Biol*, 2012, 91(10): 789-799.
- [32] LEE B N, ADAMS T H. Overexpression of flbA, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of brIA and premature initiation of development[J]. *Mol Microbiol*, 1994, 14(2): 323-334.
- [33] YIN W B, REINKE A W, SZILÁGYI M, et al. bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 1): 77-88.
- [34] CONESA A, JEENES D, ARCHER D B, et al. Calnexin overexpression increases manganese peroxidase production in *Aspergillus niger*[J]. *Appl Environ Microb*, 2002, 68(2): 846-851.
- [35] SIGL C, HANDLER M, SPRENGER G, et al. A novel homologous dominant selection marker for genetic transformation of *Penicillium chrysogenum*: Overexpression of squalene epoxidase-encoding ergA[J]. *J Biotechnol*, 2010, 150(3): 307-311.
- [36] MORÁN-DIEZ M E, CARDOZA R E, Gutiérrez S, et al. TvDim1 of *Trichoderma virens* is involved in redox-processes and confers resistance to oxidative stresses[J]. *Curr Genet*, 2010, 56(1): 63-73.
- [37] YANG L, YANG Q, SUN K, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of SOD gene to *Trichoderma harzianum*[J]. *World J Microb Biot*, 2010, 26(2): 353-358.
- [38] ZOU G, YING S H, SHEN Z C, et al. Multi-sited mutations of beta-tubulin are involved in benzimidazole resistance and thermotolerance of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*[J]. *Environ Microbiol*, 2006, 8(12): 2096-105.
- [39] ORTIZ-URQUIZA A, KEYHANI N O. Stress response signaling and virulence: insights from entomopathogenic fungi[J]. *Curr Genet*, 2015, 61(3): 239-249.