

23 株酵母菌株遗传亲缘关系的 SRAP 分析

栾春艳¹, 李晓玲¹, 王 健², 郑国斌², 龚大春¹, 姚 娟²

(1.三峡大学化学与生命科学学院,湖北 宜昌 443002;2.酵母功能湖北省重点实验室,湖北 宜昌 443003)

摘 要: 探讨酵母菌株间的遗传亲缘关系以及遗传多样性,为酵母菌株的分类和鉴定提供科学依据。利用 44 个 SRAP(sequence-related amplified polymorphism)引物组合对 23 株酿酒酵母菌株进行聚类分析、主成分分析及遗传多样性的评价。结果表明,从 160 个 SRAP 引物组合中筛选得到 44 个多态性引物组合,共检测到 529 条 DNA 带,其中多态性条带有 465 个,多态性条带百分率为 86.20%,平均每个引物组合产生多态性条带 10.1 个。各菌株遗传相似系数在 0.531~0.813 之间,平均遗传相似系数为 0.671;根据 UPGMA 聚类分析,23 株酵母菌株在遗传相似系数 0.610 处被分为两大类群,在遗传相似系数 0.705 处被进一步划分为 6 个亚类群。第 1 大类又分为 a(包括 1、2、4、7、10、11、12、14 和 13 号酵母菌株)、b(包括 15、16、19、20 和 21 号酵母菌株)、c(包括 17 和 23 号酵母菌株)及 d(18 号酵母菌株);第 2 大类分为 a(包括 3、8、9 和 6 号酵母菌株)和 b(包括 5 和 22 号酵母菌株)。主成分(PCA)分析结果与此一致。这也与形态及生理特性的分类基本相似。SRAP 标记技术能很好地用于酿酒酵母遗传亲缘关系、菌株鉴定和分类的研究,是一种经济、有效和可靠的分子标记技术。

关键词: 酿酒酵母; SRAP 标记; 遗传亲缘关系; 聚类分析

中图分类号:TS261.1;Q93-3;TS262.3;TQ926 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2013)06-0035-05

Analysis of the Genetic Relations of 23 Yeast Strains by SRAP Markers

LUAN Chunyan¹, LI Xiaoling², WANG Jian², ZHENG Guobin², GONG Dachun¹ and YAO Juan²

(1.College of Chemistry and Life Science, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002;

2.Angel Yeast Co.Ltd., Yichang, Hubei 443003, China)

Abstract: In this study, the genetic relations and genetic diversity among 23 *Saccharomyces cerevisiae* strains were investigated by using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers to provide scientific data for the classification and the identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. UPGMA cluster analysis, principal coordinate analysis (PCA) and genetic diversity analysis of 23 *S.cerevisiae* strains were carried out by using 44 SRAP primer combinations. The results showed that 44 SRAP primer combinations generated a total of 529 scorable bands, with an average of 11.6 bands per primer pair, of which 465 (86.20 %) were polymorphic. The average number of polymorphic bands amplified by per primer combination was 10.1. The genetic similarity coefficient among all strains varied from 0.531 to 0.813 with the average coefficient as 0.671. UPGMA method cluster analysis showed that 23 strains were classified into two main cluster groups with the genetic similarity coefficient of 0.610 and further divided into six subgroups with the genetic similarity coefficient of 0.705. Group I was further divided into four subgroups: group Ia (including No.1,2,4,7,10,11,12,14 and 13 strain), group Ib (including No.15,16,19,20 and 21), group c (including No.17 and 23 strain) and group d (including 18 strain). Group II was also divided into two subgroups: group a (including No.3,8,9 and 6 strain) and group b (including No.5 and 22 strain). Principal coordinate analysis (PCA) results were almost the same and the results were also consistent with morphological and physiological data of these strains. SRAP markers could be used for the study of genetic relations of *S. cerevisiae* strains and their classification and identification and it was a simple, efficient and reliable method.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; SRAP marker; genetic relations; cluster analysis

工业生产上应用的酵母菌大多属于酵母属(*Saccharomyces* Meyen ex Rees),在自然界中分布很广。有很多酵母菌在酿造、食品、医药工业等方面有着重要的经济价值,其不仅在面包、啤酒、果酒生产中起着关键的作用,而且利用酵母菌体还可提取核苷酸、辅酶 A、细胞色素 C、

凝血质及核黄素等贵重药物^[1-2]。酵母菌作为一种重要的工业微生物资源,对其鉴定并确定遗传亲缘及进化关系具有非常重要的意义。

传统的菌株鉴定及遗传亲缘关系分析一般采用形态特征、繁殖特性和生理生化特性观察的方法^[3-4],通常需

基金项目:安琪酵母股份有限公司分子生物学技术平台建设项目(SDHZ20100138)。

收稿日期:2013-01-07

通讯作者:李晓玲,lxiaolinggz@126.com。

优先数字出版时间:2013-04-03;地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1051.TS.20130403.0907.001.html>。

要做60~90次试验,不仅繁琐、费时,而且也会因实验条件的不同导致重现性不好^[5]。此外,随着酵母新品种的选育和变异类型的调查发现,出现同物异名、同名异物现象,以及酵母菌种源和菌种间的亲缘关系模糊不清,缺乏完善的品种分类系统等一系列问题,对酵母属酵母菌株有待作进一步的分类和亲缘关系研究。就一个相关企业而言,分析酵母菌种的特性指标,了解本企业与其他竞争者的酵母菌株在遗传方面的差异性,以及分析酵母经过若干年大生产驯化后遗传性能的变化,在某些特定条件下维护了本企业的正当权益,具有重大的经济意义和菌种保护意义。

近年来,DNA分子标记技术的引入对微生物分类鉴定产生了巨大的推动作用,使其分类鉴定工作由一般的表型特征鉴定深化到分子水平和遗传型特征的鉴定^[6]。SRAP是一种基于PCR技术的新的DNA分子标记,由Li和Quiros^[7]于2001年提出,具有简便、稳定、中等产率和容易获得选择条带序列的特点。SRAP利用其独特的引物设计对基因组的开放阅读框(ORFs)进行特异扩增,上游引物长17 bp,对外显子进行特异扩增,下游引物长18 bp,对内含子区域、启动子区域进行特异性扩增,因个体不同及物种的内含子、启动子和间隔序列的不同,产生基于内含子和外显子的SRAP多态性。SRAP标记具有简便、稳定、中等产率的特点,在基因组中分布均匀,适合基因定位、基因克隆及遗传多态性分析,目前已经在松茸、毛木耳和灵芝等真菌及内生真菌等遗传多态性及基因型鉴定中得到了应用^[8-11]。本研究应用SRAP标记对安琪酵母股份有限公司菌株保藏中心保藏的23株酵母菌进行了分子标记鉴定,为酵母菌的遗传分析和亲缘关系鉴定提供分子水平基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

采用安琪酵母股份有限公司菌种保藏中心用于研究的酵母菌,这些菌种是从葡萄、梨、柑橘等水果表皮、果园土壤、酒厂等地采集分离而来,编号为1,2,3……21,22,23,共23株。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA的提取

使用酵母基因组DNA提取试剂盒提取DNA,试剂盒购于北京三博远志生物技术有限公司。以酵母菌的液体培养基为实验材料,进行基因组总DNA的提取。用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,通过紫外分光光度计测定DNA的浓度和纯度,并将DNA浓度稀释为50 ng/ μ L备用。

1.2.2 引物筛选

按照Li和Quiros(2001)^[7]等提出的原则设计16个正向引物和10个反向引物,得到160个引物组合,由上海生工生物技术有限公司合成,所用的引物组合见表2。从160对引物中筛选出44对扩增条带较多、亮度清晰的引物。PCR扩增反应体系为:总体积为25 μ L,含50 ng模板DNA,50 ng引物,1.5 μ L dNTPs(2.5 mmol/L),2.0 μ L MgCl₂ (25 mmol/L),1.0 U Taq DNA聚合酶,1 $\times$ PCR缓冲液。反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性1 min,37 $^{\circ}$ C退火1 min,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,扩增5个循环;94 $^{\circ}$ C变性1 min,52 $^{\circ}$ C退火1 min,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,扩增25个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

1.2.3 数据记录与处理

用引物对23个样品基因组DNA进行PCR扩增反应,对获得清晰可重复的DNA条带进行统计。同一引物扩增出的产物,在同一位点上,有扩增条带的为阳性,记录为1;没有条带的为阴性,记录为0。从上到下逐条记录,转换成0、1矩阵,输入Excel表格中。依据SRAP-PCR扩增产物的结果,记录统计各引物对扩增多态性信息含量,其中每个引物对的多态性比率(%)=引物对扩增的多态性谱带数/总谱带数 $\times$ 100%。采用NTSYS-pc 2.10软件计算遗传相似系数,然后用UPGMA(unweighted pair group method arithmetic average)进行聚类分析,构建树状图,同时利用NTSYSpc 2.10软件进行主成分三维散点图分析。

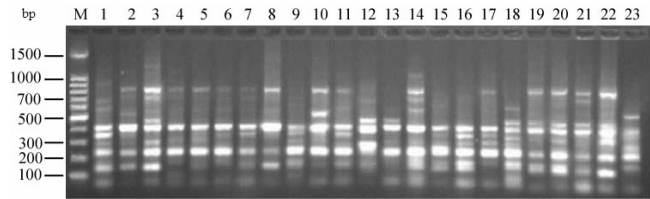
2 结果与分析

2.1 SRAP扩增结果的多态性分析

采用筛选得到的多态性较高的44对SRAP引物组合对23株酵母菌株进行PCR扩增,共扩增出529条谱带,多态性条带为465个,平均每个SRAP引物组合扩增出11.6条带,多态性条带为10.1个,多态性条带百分率为86.20%,其中以引物组合me6-em5、me6-em6、me6-em9、me14-em10为最高,多态性百分率达100.00%(表2)。结果表明,本研究所用菌株基因型丰富,遗传多样性较高,具有丰富的遗传变异,同时说明SRAP标记对酵母菌株具有较强的鉴别能力。图1为引物组合me2-em5对23个酵母菌的扩增结果。

2.2 遗传相似系数和UPGMA聚类结果分析

采用NTSYS-pc 2.10软件计算了23株酵母菌株的Nei's遗传相似系数,遗传距离用Microsoft excel软件计算(遗传距离=1-遗传相似系数)。结果见表2。23株酵母菌株的Nei's遗传相似性系数变化范围为0.531~0.813,表明不同个体之间存在一定的遗传差异,平均遗



注: M: DL1500; 1~23:酵母菌株。

图1 引物组合 me2-em5 对 23 株酵母菌株的 SRAP 扩增
传相似系数为 0.671。其中,5 号与 21 号酵母菌株之间的

遗传相似性系数最小(0.5312),亲缘关系最远,8 号与 9 号酵母菌株之间的遗传相似性系数最大(0.81),亲缘关系最近。

聚类结果表明,当遗传相似系数为 0.610 时,可将 23 株酵母菌株分成两大类,第 一类包括 1、2、4、7、10、11、12、14、13、15、16、19、20、21、17、23 和 18 号酵母菌株;第 二类包括 3、8、9、6、5 和 22 号共 6 株酵母菌株。在遗传相似系数为 0.705 时,23 株酵母菌株可进一步分为 6 个

表 1 44 对 SRAP 引物的扩增结果

序号	引物组合	序列 5' → 3'	扩增条带数	多态性条带数	多态性条带百分率(%)
1	Me1+Em6	TGA GTC CAA ACC GGA TA GAC TGC GTA CGA ATT GCA	16	14	87.50
2	Me1+Em8	TGA GTC CAA ACC GGA TA GAC TGC GTA CGA ATT AGC	19	18	94.74
3	Me2+Em5	TGA GTC CAA ACC GGA GC GAC TGC GTA CGA ATT AAC	11	9	81.82
4	Me2+Em9	TGA GTC CAA ACC GGA GC GAC TGC GTA CGA ATT AGC	12	11	91.67
5	Me3+Em1	TGA GTC CAA ACC GGA AT GAC TGC GTA CGA ATT AAT	15	13	86.67
6	Me3+Em3	TGA GTC CAA ACC GGA AT GAC TGC GTA CGA ATT GAC	12	9	75.00
7	Me3+Em4	TGA GTC CAA ACC GGA AT GAC TGC GTA CGA ATT TGA	13	10	76.92
8	Me3+Em6	TGA GTC CAA ACC GGA AT GAC TGC GTA CGA ATT GCA	7	5	71.43
9	Me3+Em9	TGA GTC CAA ACC GGA AT GAC TGC GTA CGA ATT AGC	14	13	92.86
10	Me4+Em2	TGA GTC CAA ACC GGA CC GAC TGC GTA CGA ATT AAT	13	11	84.62
11	Me6+Em3	TGA GTC CAA ACC GGT AG GAC TGC GTA CGA ATT GAC	12	11	91.67
12	Me6+Em5	TGA GTC CAA ACC GGT AG GAC TGC GTA CGA ATT AAC	10	10	100.00
13	Me6+Em6	TGA GTC CAA ACC GGT AG GAC TGC GTA CGA ATT GCA	7	7	100.00
14	Me6+Em9	TGA GTC CAA ACC GGT AG GAC TGC GTA CGA ATT AGC	9	9	100.00
15	Me8+Em1	TGA GTC CAA ACC GGT GT GAC TGC GTA CGA ATT AAT	9	8	88.89
16	Me8+Em4	TGA GTC CAA ACC GGT GT GAC TGC GTA CGA ATT TGA	7	6	85.71
17	Me8+Em5	TGA GTC CAA ACC GGT GT GAC TGC GTA CGA ATT AAC	16	15	93.75
18	Me8+Em6	TGA GTC CAA ACC GGT GT GAC TGC GTA CGA ATT GCA	13	12	92.31
19	Me8+Em7	TGA GTC CAA ACC GGT GT GAC TGC GTA CGA ATT ATG	9	8	88.89
20	Me2+Em8	TGA GTC CAA ACC GGA GC GAC TGC GTA CGA ATT AGC	14	13	92.86
21	Me8+Em9	TGA GTC CAA ACC GGT GT GAC TGC GTA CGA ATT AGC	13	12	92.31
22	Me9+Em3	TGA GTC CAA ACC GGT CA GAC TGC GTA CGA ATT GAC	10	8	80.00
23	Me9+Em4	TGA GTC CAA ACC GGT CA GAC TGC GTA CGA ATT TGA	12	10	83.33
24	Me9+Em5	TGA GTC CAA ACC GGT CA GAC TGC GTA CGA ATT AAC	14	11	78.57
25	Me9+Em7	TGA GTC CAA ACC GGT CA GAC TGC GTA CGA ATT ATG	15	14	93.33
26	Me10+Em4	TGA GTC CAA ACC GGT CA GAC TGC GTA CGA ATT TGA	11	10	90.91
27	Me10+Em5	TGA GTC CAA ACC GGT CA GAC TGC GTA CGA ATT AAC	12	10	83.33
28	Me10+Em7	TGA GTC CAA ACC GGT CA GAC TGC GTA CGA ATT ATG	15	12	80.00
29	Me11+Em10	TGA GTC CAA ACC GGA TG GAC TGC GTA CGA ATT TAG	16	15	93.75
30	Me12+Em3	TGA GTC CAA ACC GGA CA GAC TGC GTA CGA ATT GAC	9	7	77.78
31	Me12+Em4	TGA GTC CAA ACC GGA CA GAC TGC GTA CGA ATT TGA	7	5	71.43
32	Me12+Em5	TGA GTC CAA ACC GGA CA GAC TGC GTA CGA ATT AAC	11	10	90.91
33	Me13+Em10	TGA GTC CAA ACC GGG AT GAC TGC GTA CGA ATT TAG	12	11	91.67
34	Me14+Em3	TGA GTC CAA ACC GGG CT GAC TGC GTA CGA ATT GAC	10	9	90.00
35	Me14+Em10	TGA GTC CAA ACC GGG CT GAC TGC GTA CGA ATT TAG	14	14	100.00
36	Me15+Em5	TGA GTC CAA ACC GGT AA GAC TGC GTA CGA ATT AAC	13	11	84.62
37	Me15+Em6	TGA GTC CAA ACC GGT AA GAC TGC GTA CGA ATT GCA	14	13	92.86
38	Me15+Em7	TGA GTC CAA ACC GGT AA GAC TGC GTA CGA ATT ATG	11	10	90.91
39	Me15+Em8	TGA GTC CAA ACC GGT AA GAC TGC GTA CGA ATT AGC	21	19	90.48
40	Me15+Em9	TGA GTC CAA ACC GGT AA GAC TGC GTA CGA ATT AGC	14	11	78.57
41	Me16+Em3	TGA GTC CAA ACC GGT GC GAC TGC GTA CGA ATT GAC	8	6	75.00
42	Me16+Em6	TGA GTC CAA ACC GGT GC GAC TGC GTA CGA ATT GCA	9	8	88.89
43	Me16+Em8	TGA GTC CAA ACC GGT GC GAC TGC GTA CGA ATT AGC	8	6	75.00
44	Me16+Em10	TGA GTC CAA ACC GGT GC GAC TGC GTA CGA ATT TAG	12	11	91.67
总计 Total			529	465	86.20

表2 Nei's 遗传相似度(左下)和遗传距离(右上)

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	-	0.2344	0.3970	0.2779	0.3686	0.3970	0.3043	0.3686	0.3894	0.3081	0.3535	0.2854	0.3440	0.2949	0.3062	0.3270	0.3270	0.2968	0.3686	0.3176	0.3233	0.3535	0.2930
2	0.7656	-	0.3705	0.2325	0.4291	0.4045	0.2930	0.3610	0.3403	0.2665	0.2930	0.2779	0.2911	0.2571	0.2457	0.2892	0.3610	0.3043	0.3119	0.2911	0.2703	0.3913	0.3195
3	0.6030	0.6295	-	0.3989	0.2854	0.2836	0.4026	0.2590	0.2570	0.4026	0.4480	0.4762	0.4272	0.4083	0.4008	0.4367	0.4178	0.3875	0.4178	0.4121	0.4405	0.2930	0.3837
4	0.7221	0.7675	0.6011	-	0.4197	0.3006	0.2911	0.3667	0.3270	0.2495	0.3025	0.2873	0.2930	0.2665	0.2590	0.2873	0.3667	0.3365	0.3289	0.3233	0.2798	0.4234	0.3440
5	0.6314	0.5709	0.7146	0.5803	-	0.3724	0.4272	0.2760	0.3270	0.4348	0.4499	0.3932	0.4405	0.4102	0.4178	0.4650	0.4121	0.3781	0.4499	0.4367	0.4688	0.2911	0.3667
6	0.6030	0.5955	0.7164	0.6994	0.6276	-	0.4178	0.2552	0.2949	0.4291	0.4253	0.3762	0.4159	0.3970	0.4197	0.4367	0.4329	0.4102	0.4243	0.3819	0.3989	0.3573	0.3951
7	0.6957	0.7070	0.5974	0.7089	0.5728	0.5822	-	0.3629	0.3308	0.2552	0.2873	0.2609	0.2741	0.2703	0.2665	0.4100	0.3667	0.3176	0.3403	0.3535	0.3138	0.3705	0.3440
8	0.6314	0.6390	0.7410	0.6333	0.7240	0.7448	0.6371	-	0.1871	0.3629	0.4008	0.3440	0.3837	0.3611	0.3535	0.3894	0.4234	0.3478	0.3592	0.3648	0.3932	0.2798	0.3781
9	0.6106	0.6597	0.7430	0.6730	0.6730	0.7051	0.6692	0.8129	-	0.3176	0.3837	0.3308	0.3705	0.3705	0.3516	0.3951	0.4329	0.3989	0.3686	0.3667	0.3648	0.3157	0.3989
10	0.6919	0.7335	0.5974	0.7505	0.5652	0.5709	0.7448	0.6371	0.6824	-	0.2363	0.2439	0.2609	0.2570	0.2495	0.2609	0.3705	0.2911	0.2741	0.3195	0.2949	0.3970	0.3327
11	0.6465	0.7070	0.5520	0.6975	0.5501	0.5747	0.7127	0.5992	0.6163	0.7637	-	0.2457	0.2779	0.2817	0.2930	0.3289	0.4499	0.2873	0.3327	0.3308	0.3138	0.3667	0.3819
12	0.7146	0.7221	0.6238	0.7127	0.6068	0.6238	0.7391	0.6560	0.6692	0.7561	0.7543	-	0.2136	0.1947	0.2779	0.3214	0.3629	0.2798	0.3251	0.2892	0.3100	0.3667	0.3214
13	0.6560	0.7089	0.5728	0.7070	0.5595	0.5841	0.7259	0.6163	0.6295	0.7391	0.7221	0.7864	-	0.2079	0.2495	0.3157	0.3610	0.3195	0.2968	0.2949	0.3157	0.4367	0.4026
14	0.7051	0.7429	0.5917	0.7335	0.5898	0.6030	0.7297	0.6389	0.6295	0.7430	0.7183	0.8053	0.7921	-	0.2420	0.2892	0.3611	0.2741	0.3043	0.3176	0.3119	0.3800	0.3081
15	0.6938	0.7543	0.5992	0.7410	0.5822	0.5803	0.7335	0.6465	0.6484	0.7505	0.7070	0.7221	0.7505	0.7580	-	0.2060	0.3384	0.2779	0.2476	0.2722	0.2665	0.4140	0.3043
16	0.6730	0.7108	0.5633	0.7127	0.5350	0.5633	0.6900	0.6106	0.6049	0.7391	0.6711	0.6786	0.6843	0.7108	0.7940	-	0.2949	0.3138	0.2798	0.2703	0.2457	0.4234	0.3100
17	0.6730	0.6390	0.5822	0.6333	0.5879	0.5671	0.6333	0.5766	0.5671	0.6295	0.5501	0.6371	0.6390	0.6389	0.6616	0.7051	-	0.3214	0.3403	0.3195	0.3025	0.3705	0.2684
18	0.7032	0.6957	0.6125	0.6635	0.6219	0.5898	0.6824	0.6522	0.6011	0.7089	0.7127	0.7202	0.6805	0.7259	0.7221	0.6862	0.6786	-	0.2987	0.3081	0.3062	0.3214	0.2722
19	0.6314	0.6881	0.5822	0.6711	0.5501	0.5747	0.6597	0.6408	0.6314	0.7259	0.6673	0.6749	0.7032	0.6957	0.7524	0.7202	0.6597	0.7013	-	0.2514	0.2684	0.4008	0.3478
20	0.6824	0.7089	0.5879	0.6767	0.5633	0.6181	0.6465	0.6352	0.6333	0.6805	0.6692	0.7108	0.7051	0.6824	0.7278	0.7297	0.6805	0.6919	0.7486	-	0.2476	0.3762	0.3195
21	0.676	0.7297	0.5595	0.7202	0.5312	0.6011	0.6862	0.6068	0.6352	0.7051	0.6862	0.6900	0.6843	0.6881	0.7335	0.7543	0.6975	0.6938	0.7316	0.7524	-	0.4197	0.2873
22	0.6465	0.6087	0.7070	0.5766	0.7089	0.6427	0.6295	0.7202	0.6843	0.6030	0.6333	0.6333	0.5633	0.6200	0.5860	0.5766	0.6295	0.6786	0.5992	0.6238	0.5803	-	0.3251
23	0.7070	0.6805	0.6163	0.6560	0.6333	0.6049	0.6560	0.6219	0.6011	0.6673	0.6181	0.6786	0.5974	0.6919	0.6957	0.6900	0.7316	0.7278	0.6522	0.6805	0.7127	0.6749	-

亚类群:第 1 类分为 a(包括 1、2、4、7、10、11、12、14 和 13 号酵母菌株), b(包括 15、16、19、20 和 21 号酵母菌株), c(包括 17 和 23 号酵母菌株), d(18 号酵母菌株);第 2 类分为 a(包括 3、8、9 和 6 号酵母菌株), b(包括 5 和 22 号酵母菌株)。综上所述,SRAP 标记的多态性水平可以揭示酵母菌株之间的遗传变异水平。

2.3 酵母菌株主成分(PCA)分析

主成分分析主要是从空间上展示不同材料、特别是不同分类群之间的关系,能够更直观地表现类群间的亲缘关系。综合使用主成分分析和聚类分析是研究物种遗传多样性较常用的方法。对供试 23 株酵母菌株进行主成分(PCA)分析,结果表明,前 3 个主成分所包含的信息量占总信息量的 33.4%,其中第 1 主成分所包含的信息量为 16.92%,第 2 主成分所包含的信息量为 9.26%,第 3 主成分所包含的信息量为 7.22%,选取前 3 个主成分作三维散点图(图 3)。位置相近者表示亲缘关系较近,远则表示亲缘关系较远,可以更加直观地揭示菌株间的亲缘关系。将位置靠近的供试酵母菌株划归在一起,结果表明,主成分分析结果与聚类分析结果基本一致,支持 UPGMA 聚类结果,主成分分析结果更直观地表明了不同酵母菌株之间的亲缘关系。从图 3 可知,通过不同层面、不同方向,更加直观清晰地显示 23 株酵母菌株之间的遗传亲缘关系,大部分酵母菌株按各自类型聚类,说明这些聚在一起的资源间遗传亲缘关系较近。

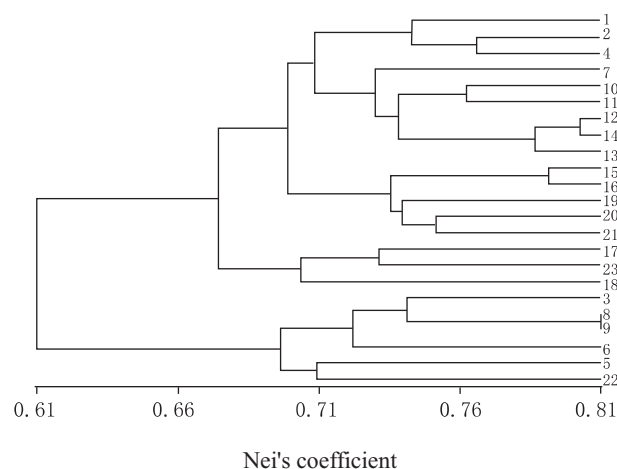


图2 SRAP 聚类分析树形图

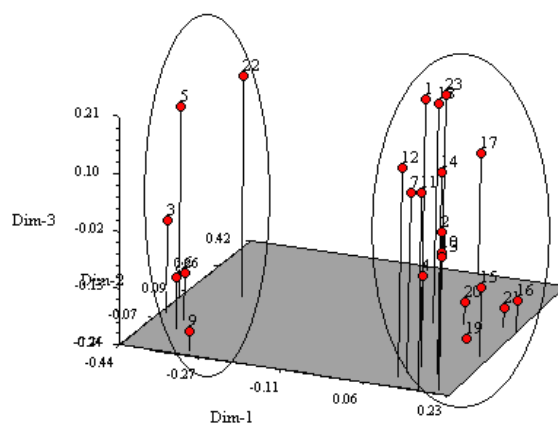


图3 基于 SRAP 的主成分分析分布图(PCA)

3 讨论

SRAP 标记是一种新的基于 PCR 的 DNA 分子标记技术,其多态性和重现性都好。本研究结果显示,以 44 对 SRAP 引物组合对 23 株酵母菌株进行 PCR 扩增,共扩增出 529 条谱带,多态性条带为 465 个,多态性条带百分率为 86.20%,揭示了丰富的多态性和遗传多样性,证明 SRAP 标记是研究酵母菌株遗传多态性和进行遗传鉴定的一种有效方法。

在本研究中,23 株酵母菌株的 Nei's 遗传相似性系数变化范围为 0.53~0.81,表明不同菌种之间存在一定的遗传差异。采用 UPGMA 聚类分析和主成分分析,可将 23 个菌种主要分为两大类,第 1 大类包括 1、2、4、7、10、11、12、14、13、15、16、19、20、21、17、23 和 18 号共 17 株酵母菌株;第 2 大类包括 3、8、9、6、5 和 22 号共 6 株酵母菌株,进一步细分为 6 个亚群,第 1 大类又分为 a(包括 1、2、4、7、10、11、12、14 和 13 号酵母菌株)、b(包括 15、16、19、20 和 21 号酵母菌株)、c(包括 17 和 23 号酵母菌株)及 d(18 号酵母菌株);第 2 大类分为 a(包括 3、8、9 和 6 号酵母菌株)和 b(包括 5 和 22 号酵母菌株)。这与形态学与生理特性的分类基本一致,也与 ISSR 标记的分类一致(另文发表)。每个类群所含的种的形态学特征和发酵性能相似,第 1 大类酵母形态一般为球形有光泽,除 18 号菌株 1450 发酵性能优良外,其余的发酵性能良好,第 2 大类酵母一般为椭圆形有光泽,发酵能力一般,其中 18 号菌株在 6 个亚群中单独聚为一类,与其他菌株间遗传距离较远,而且在指纹谱带分析中 18 号菌株有特异性谱带带。通过 SRAP 标记分析,进一步从分子水平上鉴定出发酵性能优良的 18 号菌株 1450,可作为工业生产的潜力株,为今后菌株的改良和选育提供了分子基础。本研究在国内外首次采用 SRAP 标记对酵母的遗传亲缘关系进行分析,结果也表明了 SRAP 标记是酵母菌种鉴定、遗传关系分析及新品种选育的一种经济、有效

和可靠的分子标记技术。

参考文献:

- [1] 王定昌,赖荣婷. 酵母的用途[J]. 粮油食品科技, 2002, 10(1): 12-16.
- [2] 赵龙飞,徐亚军,周红杰. 酵母菌综合利用的研究发展[J]. 食品研究开发, 2004, 25(4): 29-32.
- [3] 哈瑞根(英)著. 李卫华,方红,廉慧锋译. 食品微生物实验室手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2004.
- [4] Deák T and Beuchat LR. Handbook of Food Spoilage Yeasts [M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1996.
- [5] 周春艳,张秀玲,王冠蕾. 酵母菌的 5 种鉴定方法[J]. 中国酿造, 2006(8): 51-52.
- [6] Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts: Ataxonomic study[M]. New York: Elsevier, 1998.
- [7] Li G, Quiros C F. Sequence related amplified polymorphism (SRAP), A new marker system based on simple PCR reaction: its application to mapping and genotyping in *Brossica* [J]. Theor. Appl. Genet., 2001, 103: 455-461.
- [8] Ma DL, Yang GT, Mu LQ, et al. Application of SRAP in the genetic diversity of *Tricholoma matsutake* in northeastern China [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(38): 6244-6250.
- [9] Yu MY, Ma B, Luo X, et al. Molecular diversity of *Auricularia polytricha* revealed by inter-simple sequence repeat and sequence related amplified polymorphism markers [J]. Current Microbiology, 2008, 56(3): 240-245.
- [10] Sun SJ, Gao W, Lin SQ. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(3): 537-543.
- [11] Li X, Liu JJ, Chen JH, et al. Screening of camptothecin production and SRAP analysis of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* Decne [J]. China Biotechnology, 2011, 31(7): 60-64.

安琪酵母优质葡萄酒辅料适应更多需求

葡萄酒产业在中国已有近百年的历史,但真正的大发展时期还是近三十年;最近几年,此产业开始驶入发展的快车道。

致力于中国本土葡萄酒产业发展的安琪酵母股份有限公司,其专业的酿酒团队在葡萄酒的技术研究及应用方面卓有成效。

目前,全球葡萄酒业的发展趋势呈现出专业化、高端化、差异化的转变。而葡萄酒酵母作为发酵过程的关键要素,需要满足不同变化的葡萄原料、品质与酿造工艺需求。多年来,安琪公司在着力投入研究葡萄酒菌种的同时,更加注重了关于葡萄酒相关辅料的研究,以适应市场更多新的需求。

目前安琪公司已经形成了除葡萄酒酵母以外的发酵营养剂、甘露糖蛋白、酵母细胞壁等葡萄酒发酵应用系列产品。这些产品能很好的辅助酿酒师在发酵过程中合理调配平衡酵母营养,保持发酵度、质量及风味的最优化;提高葡萄酒中甘露糖蛋白的含量以改善葡萄酒的结构和口感,从而有效提升葡萄酒的品质。

酿造美好生活,安琪公司正携手中国葡萄酒产业,共同驶向美好的明天。(戴浩林)