

研究报告

## 酿酒酵母乙酸耐受性相关的微卫星分子标记筛选

肖银<sup>1,2</sup> 胡芸<sup>2</sup> 张梁<sup>1,2\*</sup> 石贵阳<sup>1,2</sup>

(1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:**【目的】筛选与酵母乙酸耐受性状紧密相关的微卫星分子标记。【方法】以两株表型差异菌株 YHA 和 YLA 作为亲本构建 F<sub>2</sub> 代菌株共计 160 株, 选取 15 个微卫星位点通过 PCR 方法在 40 株子代中扩增产物, 利用 SPSS 11.5 软件分析耐酸性状与微卫星序列间的相关性。【结果】找到 3 个与乙酸耐受性状相关的微卫星位点, 其中位点 14P<sub>2</sub> 与酵母乙酸耐受性状有极显著的正相关性 ( $P < 0.01$ ), 15P<sub>2</sub> 和 15P<sub>3</sub> 与酵母乙酸耐受性具有显著的负相关性 ( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ ); 此外对于微卫星位点 14P<sub>2</sub>, 耐酸亲本 YHA 在该位点的基因片段 (344 bp) 在子代耐酸菌株中出现频率达到 70.6%, 而不耐酸亲本 YLA 的基因片段 (331 bp) 在子代不耐酸菌株中出现的频率达 91.3%。【结论】微卫星 14P<sub>2</sub> 的等位基因在子代菌株中的遗传具有明显的偏好性, 该微卫星位点与某种耐酸基因存在一定的连锁遗传, 为酵母分子标记辅助育种提供了有价值的遗传标记。

**关键词:** 微卫星, 酿酒酵母, 乙酸耐受性, 分子标记辅助育种

## Screening of microsatellite markers associated with acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*

XIAO Yin<sup>1,2</sup> HU Yun<sup>2</sup> ZHANG Liang<sup>1,2\*</sup> SHI Gui-Yang<sup>1,2</sup>

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] To screen microsatellite markers associated with acetic acid tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. [Methods] One hundred and sixty segregants were obtained by crossing two yeasts (high acetate tolerant YHA and low acetate tolerant YLA) with different phenotypes. The alleles of 15 microsatellite markers were amplified from 40 offspring yeasts and SPSS 11.5 software was used to analysis the relationship between acetic acid tolerance and microsatellite markers. [Results] Three microsatellite loci were identified. Among them marker 14P<sub>2</sub> had significant positive correlation with acid tolerance ( $P < 0.01$ ), marker 15P<sub>2</sub> and marker 15P<sub>3</sub> had significant negative correlation with acid tolerance ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ). Furthermore, 70.6% of high tolerant individuals

基金项目: 江苏省杰出青年基金项目(No. BK20140002); 中国霍英东教育基金项目(No. 131020); 新世纪优秀人才项目(No. NCET-11-0665)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918235; 信箱: zhangl@jiangnan.edu

收稿日期: 2015-01-15; 接受日期: 2015-03-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-27

contained the marker 14P<sub>2</sub> (344 bp) derived from YHA, the high tolerant strain; 91.3% of low tolerant individuals contained the marker 14P<sub>2</sub> (331 bp) derived from YLA, the low tolerant strain.

**[Conclusion]** This study indicated that the microsatellite marker 14P<sub>2</sub> has the obvious tendency of heredity correlative with genes for acetic acid tolerance, it can be used in molecular marker assisted selection.

**Keywords:** Microsatellite, *Saccharomyces cerevisiae*, Acetic acid tolerance, Marker assisted breeding

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 又称出芽酵母、面包酵母, 是一类重要的工业微生物, 被广泛应用于食品焙烤、啤酒、酒精、白酒、黄酒、葡萄酒和清酒的酿造、有机酸的生产、环保等方面, 具有重要的工业应用价值。酵母在进行工业乙醇生产时, 时常面临副产物乙酸的胁迫, 最终导致细胞的死亡和发酵过程的终止。因此, 研究酵母的乙酸耐受性, 对耐酸菌株的选育具有重要的经济价值和现实意义。

在抗逆性选育研究工作中, 利用分子生物学技术敲除基因后观察表型的变化, 以此获得优良表型的菌株。由于表型易受环境的影响, 不同的基因型和环境因子的结合会产生相似的表型<sup>[1-2]</sup>。因而在遗传机制不太明确的情况下对目标性状的选择是耗时和费力的。随着现代分子技术的发展, 分子标记以其遗传稳定、不受环境影响等优势被广泛用于辅助育种。

微卫星是一类由几个(少于10个)碱基组成的基序串联重复而成的 DNA 序列, 又称简单序列重复序列(Simple sequence repeats, SSRs), 在真核生物基因组中广泛存在且均匀分布, 在酵母中, 每 100 kb 就有 1.8 个微卫星<sup>[3-4]</sup>。微卫星标记由核心序列和两侧保守的侧翼序列构成, 其核心序列由于重复次数及重复程度不同从而造成了微卫星位点的高度多态性<sup>[5]</sup>。微卫星标记广泛应用于微生物、动植物和人类的亲缘分析、亲缘鉴定、遗传多样性等领域。此外, 微卫星还作为分子标记用于农作物的辅助育种工作<sup>[6-7]</sup>。Xie 等<sup>[6]</sup>发现, 稻草九号染色体上微卫星 RM566 位点与稻草酸性纤维性状连锁, 可用于筛选低酸性纤维含量的植株以提高稻草降解率。Zhang 等<sup>[7]</sup>获得了 2 个大米耐温相关微卫星位点,

RM3735 和 RM3586, 其中 RM3735 位点被用于大米耐温选育时的辅助分子标记。

本研究通过采用选取酵母基因组 15 个微卫星标记, 寻找与酵母乙酸耐受性性状密切相关的分子标记, 为进行分子辅助育种提供理论依据, 同时也为乙酸耐受性性状的 QTL 定位提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 对实验室保藏的 50 株酿酒酵母菌株进行乙酸耐受性表型筛选, 获得 2 株乙酸表型差异显著的酵母, 菌株编号为 CICC 1374 和 CICC 31144, 购于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)。将上述 2 株酵母涂布于 McClary 生孢培养基进行产孢培养<sup>[8]</sup>, 根据 Huxley 等<sup>[9]</sup>的方法获得子代单倍体, 对子代单倍体再次表型筛选, 最后获得一株乙酸耐受性表型值为 130 mmol/L 的菌株, 命名为 YHA; 一株对乙酸较敏感, 表型值为 30 mmol/L 的菌株, 命名为 YLA。YHA 和 YLA 均为单倍体菌株, 细胞接合型分别是 *MATa* 和 *MATalpha*。为获得稳定的单倍体, 将上述单倍体菌株的 HO 基因剔除, 并对剔除 HO 基因的两单倍体菌株再杂交获得 F<sub>1</sub> 代菌株。F<sub>1</sub> 代菌株经过 5 d 的产孢培养后, 分离获得 160 株 F<sub>2</sub> 代孢子分离群体, 从中选取耐酸和不耐酸共计 40 株菌作为本实验研究对象。

**1.1.2 微卫星引物:** 根据文献[10]中报道的微卫星位点, 选取其中 15 个并根据其两端保守序列设计引物, 引物上游 5'端标记荧光基团, 由上海生工生物工程股份有限公司合成, 在两亲本中具有多态性的引物位点序列详细信息见表 1。

### 1.2 方法

**1.2.1 酵母基因组 DNA 的提取<sup>[11]</sup>:** 采用酸性玻璃

珠破壁法抽提酵母全基因组 DNA, 用去离子水溶解沉淀, 加入 RNase 去除 RNA, 提取的 DNA 样品经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和纯度, 置于 -20 °C 保存。

**1.2.2 HO 基因敲除:** 利用 PCR 介导的基因破坏法对 HO 基因进行剔除<sup>[12]</sup>。酵母 DNA 片段间同源重组效率非常高, 一般仅需 40 bp, PCR 介导基因破坏法和酵母基因序列结合可将 HO 基因替换成抗性

标记基因, 抗性标记基因一般为 G418 抗性基因 KanMX。构建 HO 基因敲除组件, 首先是设计 6 条引物, 通过普通 PCR 分别扩增 HO 基因的上下游同源片段及带有 G418 抗性标记的 KanMX 基因扩增片段, 再通过降落 PCR 扩增得到以上三片段的融合片段, 即构建出了 HO 基因敲除组件。抗性标记的扩增引物序列根据含有选择标记基因的质粒 PKD13 序列设计, 相关引物信息详见表 2, 其中引

表 1 酵母的 8 个在亲本之间具有多态性的微卫星位点的引物序列  
Table 1 Primer sequences of 8 polymorphic microsatellite loci between the parents in yeast

编号 No.	位点 Loci	染色体位置 Chromosome position	引物 Primers (5'→3')	重复数 Repeat numbers
1	14P <sub>1</sub>	ChrXIV43234	F TTGTCGCAGATGATGTAGTA R GCAATGGGTGAAGAACTC	(AT) <sub>11</sub>
2	14P <sub>2</sub>	ChrXIV135742	F AACTTCCTCTAACCGATGTC R TTAAGTGCCGCTTACTCTG	(ATAC) <sub>6</sub> (AT) <sub>4</sub>
3	14P <sub>3</sub>	ChrXIV333082	F TAGTAGTCCGTTCCACCAA R ATTGCTGCTGCTGTTGTT	(CAG) <sub>3</sub> (ACA) <sub>5</sub> (CAG) <sub>3</sub>
4	14P <sub>4</sub>	ChrXIV512296	F AGGACGAAGAAGACGATAAG R GAAGACTAAGGAGACAGCAA	(TC) <sub>4</sub> (AT) <sub>12</sub>
5	14P <sub>5</sub>	ChrXIV605519	F GTACCAGATGTTCTCCACTT R CTGTTAATGACAAGGCAAGG	(TA) <sub>16</sub> (AT) <sub>5</sub>
6	15P <sub>1</sub>	ChrXV62906	F ACTTGATCTGACATCCTTCTC R CGTCATTTCCGAAAGTTCTT	(TCA) <sub>10</sub> (GTA) <sub>4</sub>
7	15P <sub>2</sub>	ChrXV326091	F GGACGCACATATCTATAACAAG R GTCGCTTATGCTCTTATGATG	(AT) <sub>13</sub> (TG) <sub>4</sub>
8	15P <sub>3</sub>	ChrXV822907	F TGATGCTGGTGATGATGG R GAATCGGATTGTAACGCTAA	(TGT) <sub>21</sub>

表 2 HO 基因敲除引物  
Table 2 Primer sequences for knocking out of HO gene

引物 Primer	序列 Sequences (5'→3')
HOL-F	ATCCTCATAAGCAGCAATC
HOL-R	<i>GCATACATTATACGAAGTTATCAA</i> ACTCACCTTCAACTGTC
HOR-F	<i>ATGTATGCTATACGAAGTTATA</i> AATCATGTCGAGGCTGCTA
HOR-R	ACAAATCAGTGCCGGTAAAC
Kan-F	<u>CATTCCCAATGACAGTTGAAGGTGAGTTT</u> GATAACTTCGTATAATGTATGC
Kan-R	<u>TCTCCACACAGCAGCCTCGACATGATT</u> TATAACTTCGTATAGCATAAC

注: 斜体序列为 KanMX 基因的互补序列; 下划线序列为 HO 基因的互补序列。

Note: The italic sequence were complementary with KanMX gene; The underlined sequence was complementary with HO gene.

物 HOL-F 和 HOL-R 扩增 HO 基因的上游序列, 引物 HOR-F 和 HOR-R 扩增 HO 基因下游引物, 引物 Kan-F 和 Kan-R 扩增 KanMX 基因, 斜体序列与 KanMX 基因上下游互补, 下划线序列与 HO 基因上下游互补。

HOL、HOR 和 KanMX 基因扩增总体体系均为 25  $\mu\text{L}$ : 其中 5 $\times$ Prime STAR buffer ( $\text{Mg}^{2+}$  plus) 5  $\mu\text{L}$ , 2.5 mmol/L dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(25  $\mu\text{mol}$ )各 0.5  $\mu\text{L}$ , Prime STAR DNA 聚合酶(2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , DNA 模板(50–100 ng) 1  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ 。HOL 和 HOR 扩增条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  4 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。KanMX 基因的 PCR 扩增条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  4 min; 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 52  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  100 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。

**1.2.3 酵母乙酸耐受性表型的测定:** 根据 Mira 等<sup>[13]</sup>的方法加以适当改进。待测菌株接种于 10 mL YPD<sup>[14]</sup>液体培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜, 取 500  $\mu\text{L}$  菌液转接至新鲜的 10 mL YPD 液体培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 20 h, 测定细胞 OD<sub>600</sub> 并适当稀释, 取 5  $\mu\text{L}$  菌液点种于乙酸梯度平板上(乙酸浓度分别为 20、30、50、70、90、110、130 和 150 mmol/L), 以稀释 100 倍在不含乙酸 YPD 平板上生长的菌落作为参照, 如某浓度乙酸平板培养后的菌落与对照相当, 则判定该浓度为此菌的乙酸表型值。

**1.2.4 微卫星 PCR 扩增:** 通过对两亲本菌株的 PCR 扩增筛选, 初步确定两亲本间具有多态性的微卫星位点, 并用相应的引物对 40 株子代酵母进行 PCR 扩增, PCR 扩增体系为 25  $\mu\text{L}$ , 其中: *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ Buffer (含有  $\text{Mg}^{2+}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物(25  $\mu\text{mol}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板(50–100 ng) 1  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 52–58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  35 s, 进行 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存(不同引物退火温度不同)。扩增

产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 送至上海申速生物技术有限公司进行基因分型。利用 ABI3730x1 测序仪, 以 ROX500 为内标进行毛细管电泳。GeneScan 3.7 软件根据每条泳道的分子量内标, 将泳道内的所有条带解读为不同的长度, 最终获得完整的基因型数据库。

**1.2.5 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳:** PCR 产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上分离, 上样量为 3  $\mu\text{L}$ , 恒压 110 V, 电泳 3 h。电泳结束后, 采用快速银染法<sup>[15]</sup>对 PAGE 胶进行染色, 并用凝胶成像仪拍照保存。

**1.2.6 酵母乙酸耐受性性状与微卫星等位基因片段的相关性分析:** 采用 SPSS 11.5 软件对所选微卫星位点扩增出的片段长度与酵母乙酸耐受性性状这两个变量进行皮尔逊检验(Pearson correlation), 判断微卫星等位基因与酵母乙酸耐受性性状之间是否具有相关性。

**1.2.7 差异等位基因片段克隆与测序:** 对差异片段进行胶回收, 目的片段与 pMD18 vector 连接, 转化大肠杆菌 JM109, 挑取阳性克隆并测序。

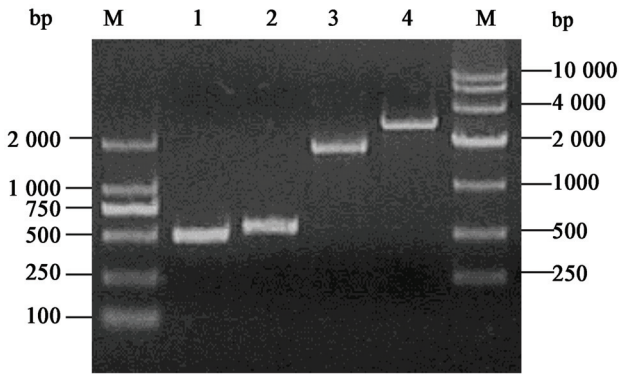
**1.2.8 极显著相关性位点在耐酸酵母中验证:** 在 F<sub>2</sub> 代中选取 6 株未作为本实验研究菌株的其他耐酸菌株, 选取与乙酸耐受性性状有极显著相关性的微卫星位点, 以该位点的引物对上述菌株进行 PCR 扩增, 统计特异性条带出现频率, 以验证所筛选标记的准确性。

## 2 结果与分析

### 2.1 HO 基因敲除

所构建的 HO 基因突变盒组件 HOL-Kan-HOR 的总长为 2 632 bp, 如图 1 所示。其中上游同源臂 HOL 基因片段长度为 490 bp, KanMX 基因片段长度为 1 697 bp, 下游同源臂 HOR 基因片段长度为 546 bp。

大量扩增 HO 基因敲除盒, 将 HO 基因敲除盒转入酵母后, 从含有 250 mg/L G418 的平板上选择转化子, 抽提 DNA 进行 PCR 验证。如果 HO 基因



**图 1 HOL-KanMX-HOR 突变盒构建过程电泳图**  
**Figure 1 The electrophoresis results in the construction of the mutation box**

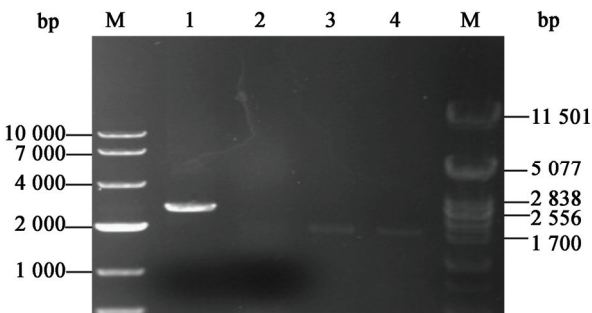
注: M: 核酸标准分子量; 1: HO 上游同源片段; 2: HO 下游同源片段; 3: KanMX 基因片段; 4: HOL-KanMX-HOR 敲除组件。

Note: M: Marker; 1: Upstream homologous fragment of HO gene; 2: Downstream homologous fragment of HO gene; 3: Fragment of KanMX; 4: Knock out components of HOL-KanMX-HOR.

剔除, 则会出现 2 632 bp 的条带, 否则会出现 1 761 bp 的条带。如图 2 所示, 泳道 2 表明 HO 基因被成功敲除。

**2.2 微卫星多态性检测**

微卫星位点作为遗传多样性研究的可能性与其在群体中的遗传特性相关。通过亲本菌株的筛选, 在 15 个微卫星位点中获得 8 个具有多态性的



**图 2 基因 HO 敲除电泳验证图**  
**Figure 2 The electrophoresis results in the deletion process of HO gene**

注: M: 核酸标准分子量; 1: 敲除 HO 基因; 2-4: 未敲除 HO 基因。

Note: M: Marker; 1: Knockout of HO gene; 2-4: Contain HO gene.

位点, 扩增结果如表 3 所示。表 3 揭示出两亲本在选定的微卫星位点上的基因型差异较大, 说明筛选后的微卫星在子代群体中遗传多样性丰富, 具有较高的选择潜力。

8 个微卫星位点对应的差异等位基因在 40 株 F<sub>2</sub> 代菌株中的扩增带谱统计汇总于表 4。表 4 中微卫星位点 14P<sub>2</sub>, 在耐酸亲本中扩增出 344 bp, 在不耐酸亲本中扩增出 331 bp, 子代耐酸组 16 株菌株(乙酸表型值为 110 mmol/L)中共有 13 株扩增出 344 bp 片段(70.6%), 而不耐酸组 24 株(表型值为 30-90 mmol/L)中共有 22 株扩增出 331 bp 片段(91.3%), 该位点的差异等位基因对酵母乙酸耐受性具有非常明显的偏好性, 揭示出该微卫星位点与某种耐酸基因可能存在一定的连锁遗传。

**2.3 SPSS 相关性分析**

利用 SPSS 11.5 统计软件对筛选的 8 个多态性微卫星位点和酵母乙酸耐受性表型性状进行相关性分析, 结果如表 5 所示。从表 5 可以看出, 14P<sub>2</sub> 与酵母乙酸耐受性为极显著正相关, 相关系数为 0.540; 15P<sub>2</sub> 与酵母乙酸耐受性成极显著负相关性, 相关系数达-0.611; 15P<sub>3</sub> 与酵母乙酸耐受性为显著负相关。

**2.4 极显著相关位点等位基因的克隆与测序**

选取与酵母乙酸耐受性呈极显著正相关性的

**表 3 微卫星位点在亲本中 PCR 扩增差异条带统计**  
**Table 3 The statistic of the different banding patterns of the parents**

位点 Loci	扩增产物长度 Length of PCR product (bp)	
	YHA	YLA
14P <sub>1</sub>	209	213
14P <sub>2</sub>	344	331
14P <sub>3</sub>	256	253
14P <sub>4</sub>	388	374
14P <sub>5</sub>	397	399
15P <sub>1</sub>	391	388
15P <sub>2</sub>	271	273
15P <sub>3</sub>	242	271





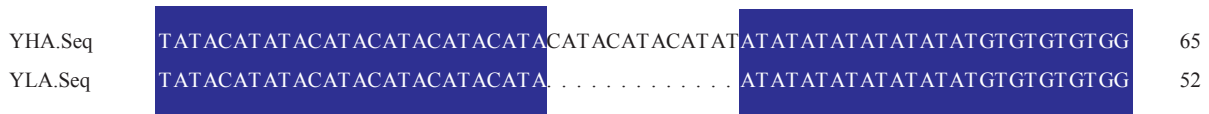


图3 微卫星 14P<sub>2</sub> 位点两个基因型序列比对结果

Figure 3 Sequence alignment of two genotypes of microsatellite locus 14P<sub>2</sub>

TGTGTGTGGTATGGAGTATTATTCTAAAATTATGAAAGGACATTCCAAACTCGTTGCCACCTTGTTTACATTCTGGCTCTATCCATACTCAACTCCTCTATTTGCCGCGATCAGAATCGATATCGATATCCTGCAGCTTCCAGAGTAAGCGGCACTTAAA-3'。

序列测序得到的片段长度与基因分型得到的片段大小基本一致, 证明本实验用基因分型得到的结果具有可靠性。使用 DNAMAN 软件, 对测序的上述两亲本等位基因进行序列比对。图 3 显示不耐酸亲本核心序列缺少 3 个(CATA)重复片段。

2.5 微卫星位点 14P<sub>2</sub> 在耐乙酸酵母菌株中扩增验证

在子代个体中任意选取其他 6 株耐乙酸酵母菌株(乙酸表型值为 110 mmol/L), 选用微卫星位点 14P<sub>2</sub> 进行 PCR 扩增, PCR 扩增的条件及体系详见 1.2.4, 进一步对结果进行验证, 图 4 显示在 6 株子代耐酸菌株中, 5 株出现此耐酸等位基因, 出现频率为 83.8%。泳道 3 极微量的条带, 可能微卫星引物结合部位的点突变、插入或者缺失阻碍微卫星的扩增<sup>[16]</sup>, 本实验中出现这种情况作为没有扩增出目的片段处理。泳道 2 除了目的条带外, 还出现了大

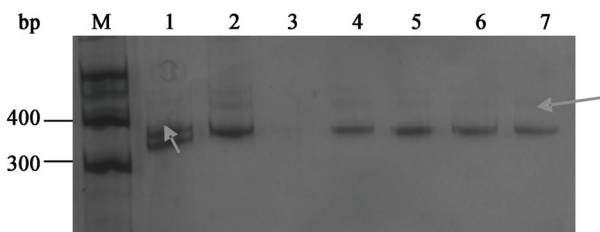


图4 微卫星 14P<sub>2</sub> 位点在耐酸菌中 PCR 扩增谱带  
Figure 4 Banding pattern of microsatellite locus 14P<sub>2</sub> in strains resistant to acetic acid

注: M: 核酸标准分子量; 1: 两亲本基因型; 2-7: 耐酸验证菌。

Note: M: Marker; 1: Parental genotypes; 2-7: The acetic acid tolerant strains for verifying.

于 400 bp 的条带, 除了银染的灵敏度高的原因, 还受微卫星位点的特征的影响, PCR 扩增的“滑动效应”会导致产物不均一, 此外微卫星位点与基因组其他位置可能存在部分相似性, 产生一些非特异性条带, 可以通过分析微卫星的大小将其排除, 或者也可以通过基因分型进行排除。

3 结论与讨论

酵母乙酸耐受性研究在乙醇工业生产中具有重要的经济价值。然而, 由于对乙酸耐受性的生理生化机制还不够清楚, 阻碍了对其遗传机理的进一步了解, 使得通过遗传改造来提高菌株的耐受性较为困难。酵母乙酸耐受性是一个受多基因控制的复杂性状, 而且在随机因素、环境因素及其相互作用的影响下, 酵母表现型与基因型之间往往出现不一致的现象。现代分子遗传学研究大多集中于控制遗传性状的几个基因或者某个代谢途径的多个基因上, 并未从全基因组水平研究多个与性状相关基因及其之间的协同互作。近年来, 结合 DNA 分子标记技术的遗传基因组学成为研究基因表达的遗传学机制的热点。

目前, 微卫星标记辅助育种技术多用于动植物、水产类的研究中, 而在微生物方面较少报道。本研究中, 利用两株乙酸耐受性表型性状具有显著差异的菌株进行杂交构建子二代群体, 首次对微卫星标记与酵母乙酸耐受的相关性进行了研究, 通过群体水平筛选发现 14P<sub>2</sub> 位点与乙酸耐受性表型的相关性达极显著水平, 相关系数达到 0.540 (P<0.01)。耐酸亲本 YHA 等位基因(片段长 344 bp)在子代耐酸菌株中出现频率达到 70.6%, 而不耐酸亲本 YLA 基因 331 bp 片段在子代不耐酸菌株中出现的频率达 91.3%。该等位基因在子代群体中的遗

传具有明显偏好性,表明该微卫星位点可能与某个耐酸基因存在一定的连锁关系<sup>[17]</sup>。同时,在另外6株耐酸样本菌株中验证了上述结果。实验结果显示,多个微卫星位点均与酵母乙酸耐受性性状相关,表明酵母乙酸耐受性性状是一种数量性状,受多个基因控制,印证了有机酸机制的复杂性,同时为解析酵母乙酸耐受性的复杂遗传变异和复杂性状的基因定位提供了依据。国内外对酵母DNA进行分子标记并QTL定位的报道较少,目前仅对酵母耐乙醇<sup>[18]</sup>、耐高温<sup>[19]</sup>、产孢率<sup>[20]</sup>和抗药性<sup>[21]</sup>性状进行了基因定位。因此,作者将致力于酵母的微卫星标记并进一步绘制分子连锁图,以期完成酵母耐乙酸性状的基因定位,使分子标记辅助育种发挥更大的作用。

## 参考文献

- [1] Flint J, Mott R. Finding the molecular basis of quantitative traits: successes and pitfalls[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2001, 2(6): 437-445
- [2] Schafer AJ, Hawkins JR. DNA variation and the future of human genetics[J]. *Nature Biotechnology*, 1998, 16(1): 33-39
- [3] Field D, Wills C. Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(4): 1647-1652
- [4] Tautz D, Renz M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1984, 12(10): 4127-4138
- [5] Weber JL. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub>(dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms[J]. *Genomics*, 1990, 7(4): 524-530
- [6] Xie J, Wu X, Jin L, et al. Identification of simple sequence repeat (SSR) markers for acid detergent fiber in rice straw by bulked segregant analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(20): 7616-7620
- [7] Zhang GL, Chen LY, Xiao GY, et al. Bulk segregant analysis to detect QTL related to heat tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(4): 482-487
- [8] Li H, Liu LL, Li J. The screening of sporogenous medium and haploid separation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 2008(6): 22-24 (in Chinese)
- [9] 李华, 刘丽丽, 李娟. 酿酒酵母产孢培养基的筛选及单倍体的分离[J]. *酿酒科技*, 2008(6): 22-24
- [9] Huxley C, Green ED, Dunham I. Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR[J]. *Trends in Genetics*, 1990, 6(8): 236
- [10] Hu XH, Wang MH, Tan T, et al. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genetics*, 2007, 175(3): 1479-1487
- [11] Jubany S, Tomasco I, Ponce de León I, et al. Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *FEMS Yeast Research*, 2008, 8(3): 472-484
- [12] Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, et al. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(14): 3329
- [13] Mira NP, Palma M, Guerreiro JF, et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid [J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1): 79-91
- [14] Novick P, Schekman R. Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(4): 1858-1862
- [15] Wang FG, Zhao JR, Guo JL, et al. An improved PAGE/rapid silver staining method used in maize SSR markers[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12(5): 606-607 (in Chinese)
- [15] 王凤格, 赵久然, 郭景伦, 等. 一种改进的玉米 SSR 标记的 PAGE/快速银染检测新方法[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(5): 606-607
- [16] Ede AJ, Crawford AM. Mutations in the sequence flanking the microsatellite at the KAP8 locus prevent the amplification of some alleles[J]. *Animal Genetics*, 1995, 26(1): 43-44
- [17] Gao GQ, Chang YM, Han QX, et al. Screening of microsatellite markers associated with cold tolerance of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.)[J]. *Hereditas*, 2010, 32(3): 248-253 (in Chinese)
- [17] 高国强, 常玉梅, 韩启霞, 等. 大黄鱼耐低温性状相关微卫星标记的筛选[J]. *遗传*, 2010, 32(3): 248-253
- [18] Hu XH, Wang MH, Tan T, et al. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Genetics*, 2007, 175(3): 1479-1487
- [19] Steinmetz LM, Sinha H, Richards DR, et al. Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast[J]. *Nature*, 2002, 416(6878): 326-330
- [20] Deuschbauer AM, Davis RW. Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast[J]. *Nature Genetics*, 2005, 37(12): 1333-1340
- [21] Perlstein EO, Ruderfer DM, Ramachandran G, et al. Revealing complex traits with small molecules and naturally recombinant yeast strains[J]. *Chemistry & Biology*, 2006, 13(3): 319-327