

УДК 663.252.41: 575.22

UDC 663.252.41: 575.22

03.00.00 Биологические науки

Biology

**АПРОБАЦИЯ МЕТОДА
ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ ВИННЫХ
ДРОЖЖЕЙ РОДА SACCHAROMYCES НА
ОСНОВЕ АНАЛИЗА ГЕНОМНЫХ
УЧАСТКОВ INTER-DELTA**

**APPROBATION OF GENOTYPING METHOD
OF WINE YEAST (GENUS SACCHAROMYCES)
BY THE ANALYSIS OF INTER-DELTA
GENOMIC REGION**

Супрун Иван Иванович
к.б.н., зав. лабораторией
SPIN-код (РИНЦ): 7124-5304
supruni@mail.ru

Suprun Ivan Ivanovich
Cand.Biol.Sci., head of the laboratory
RSCI SPIN: 7124-5304
supruni@mail.ru

Токмаков Сергей Вячеславович
к.б.н., научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ): 3196-9049

Tokmakov Sergey Vyacheslavovich
Cand.Biol.Sci., staff scientist
RSCI SPIN: 3196-9049

Агеева Наталья Михайловна
д.т.н., профессор, главный научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ): 3807-3865

Ageeva Natalia Mikhailovna
Dr.Sci.Tech., main scientific worker, professor
RSCI SPIN: 3807-3865

Прах Антон Владимирович
к.с.-х.н., старший научный сотрудник
SPIN-код (РИНЦ): 6369-8889
Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский институт садоводства и виноградарства, Россия, г. Краснодар, ул. 40 лет Победы, 39

Prakh Anton Vladimirovich
Cand.Agr.Sci., senior scientific worker
RSCI SPIN: 6369-8889
North-Caucasian Zonal Research Institute of Horticulture and Viticulture, Russia, Krasnodar, 40 let Pobedy street, 39

В ходе исследований было выполнено генотипирование некоторых коммерческих штаммов винных дрожжей с использованием анализа Inter-delta последовательностей генома. Оптимизировали экспериментальные параметры ПЦР идентификации и определили оптимальную упрощенную методику экстракции ДНК из высушенных препаратов культур дрожжей. Апробированный метод показал высокий уровень информативности и может быть использован для анализа генетического разнообразия винных дрожжей в сочетании с SSR-маркерами

The study was performed to genotype some commercial wine yeast strains using the assay of Inter-delta genomic sequences. Experimental parameters of PCR to identify were optimized and optimal simplified method of DNA extraction from dried preparations of yeast cultures was define. Proven method showed a high level of resolution and can be used for the analysis of genetic diversity wine yeast in combination with SSR-markers

Ключевые слова: ВИННЫЕ ДРОЖЖИ, SACCHAROMYCES CEREVISIAE, ШТАММЫ, ДНК-МАРКИРОВАНИЕ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ, INTER-DELTA ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОМА

Keywords: WINE YEAST, SACCAROMYCES CEREVISIAE, STRAINS, DNA-MARKERS, IDENTIFICATION, INTER-DELTA GENOMIC SEQUENCES

Введение

Современная винодельческая промышленность располагает большим количеством и разнообразием винных дрожжей, обладающих отличающимися физиолого-биохимическими свойствами – спирто-,

сульфито-, холодо- и термоустойчивостью. Кроме того, выделены современные расы дрожжей, способные формировать определенные ароматы и воздействовать на вкус вина. По результатам анализа комплекса биохимических характеристик дрожжей в ходе брожения относительно недавно были выведены штаммы чистых дрожжевых культур с необходимыми метаболическими показателями, что позволило добиться большей воспроизводимости брожения и стабильных качественных показателей вина. В последние 15-20 лет, в целях обеспечения отрасли виноделия, в мире, ведется селекция новых штаммов, как за счет отбора лучших естественных штаммов, так и за счет скрещивания штаммов и последующего отбора в потомстве лучших образцов, позволяющих получать высококачественные виноматериалы. При этом необходимо получение способных к споруляции штаммов с образованием жизнеспособных аскоспор. Большинство промышленных штаммов – диплоиды или ануеплоиды, и редко – полиплоиды [1]. Не до конца выяснен вопрос, имеют ли какие-либо преимущества полиплоидные коммерческие штаммы. Когда были созданы гомо- и гетерозиготные штаммы с плоидностью от одного до восьми, было показано, что гетерозиготные триплоиды и тетраплоиды проявляли более высокую ферментативную активность, чем гомозиготные штаммы с большей или меньшей плоидностью. Таким образом, было показано, что скорее гетерозиготность, чем плоидность влияет на характеристики культуры [2].

Очевидно, что, в связи с созданием широкого перечня новых коммерческих штаммов винных дрожжей, а также с актуальностью исследований, направленных на поиск штаммов, обладающих ценными характеристиками, в естественных условиях, особую важность приобретает вопрос оценки генетической идентичности используемых штаммов и изучения их генетического разнообразия. На генетическом уровне возможно в короткие сроки выполнить максимально точную

идентификацию принадлежности имеющейся культуры винных дрожжей к определенному штамму [3, 4].

За многие годы развития биотехнологии, было разработано несколько методик дифференциации дрожжевых штаммов, тем не менее, развитие ДНК технологии открыло новые подходы для дифференциации дрожжей в пищевой промышленности. Из молекулярно-биологических методов дифференциации дрожжевых штаммов следует выделить хроматографию, белковый электрофорез, гель-электрофорез дрожжевых хромосом в импульсном поле. Однако наибольшую распространенность получили методы, основанные на анализе структуры ДНК, которая не зависит от каких либо физиологических особенностей, что делает ДНК анализ одним из самых точных. Методы молекулярно-генетического анализа, позволяют в экспресс режиме идентифицировать генетическую чистоту дрожжевой культуры, как и оценивать уровень генетического разнообразия природных популяций.

Из методов, основанных на анализе полиморфизма ДНК следует выделить следующие: анализ полиморфизма длин фрагментов рестрикции митохондриальной ДНК (RFLP), ДНК-фингерпринтинг с использованием микросателлитных маркеров, анализ интер-дельта фрагментов генома и AFLP - анализ (amplified fragment length polymorphism). При этом к наиболее перспективным методам следует отнести метод на основе анализа микросателлитных локусов (SSR) и участков генома, известных как интер-дельта (inter- δ). SSR-маркеры – простые повторяющиеся последовательности – широко используются в генотипировании и при конструировании генетических карт. Их широкое применение обусловлено равномерным покрытием генома, высоким полиморфизмом, мультиаллельностью, кодоминантным характером наследования и воспроизводимостью. Эти характеристики сделали SSR-маркеры одними из наиболее часто используемых молекулярных ДНК-маркеров для

выявления генетического разнообразия, ассоциативного картирования, картирования генетического сцепления, популяционного и эволюционного анализа.

Микросателлитный анализ может быть рассмотрен, как один из наиболее удобных и точных методов делимитации *S. cerevisiae*. В настоящее время имеется ряд работ по изучению популяционных взаимосвязей дрожжей [5]. Необходимо отметить, что SSR-анализ может быть наиболее востребован при изучении генетического разнообразия и генетической идентификации штаммов, имеющих близкое происхождение [6]. В тоже время, для предварительного определения видовой принадлежности, а также первичной идентификации и оценки степени генетической близости успешно используется метод, основанный на анализе полиморфизма δ -последовательностей, которые в большом количестве содержатся в геноме.

Это постоянно повторяющиеся элементы размером 0,3 kb, которые фланкируют TY1 ретротранспозон. В лабораторных штаммах, TY1 элемент представлен примерно 35 копиями, распределенными по геному дрожжей. Около 100 копий δ -последовательностей представлены в геноме, как часть TY1 элементов или самостоятельно. Статистическое распределение этих элементов примерно один на каждые 150 kb. Хотя δ -последовательности чаще всего сконцентрированы около генов тРНК, δ -последовательности, прямые или обратные, расположены на достаточных для их амплификации генетических расстояниях [7].

Две последовательности, комплементарные консенсусным последовательностям 5' конца δ -последовательности были использованы в качестве маркеров. Таким образом, в результате ПЦР амплифицировались фрагменты различной длины, расположенные между двумя соседними δ -последовательностями. Каждый штамм имел свой уникальный набор фрагментов. Полученные праймерные пары способны дифференцировать

штаммы дрожжей на основании полиморфизма длин амплифицированных фрагментов. Проводились работы, в которых было изучено большое количество промышленных образцов и во всех случаях штаммы имели различный набор амплифицированных фрагментов. Данный метод обладает высокой воспроизводимостью, но, иногда, у образцов на электрофореграммах могут присутствовать бледные бэнды с различной интенсивностью свечения, независящей от остального мультипаттерного набора бэндов. Это может быть объяснено доступностью ДНК-матрицы для ПЦР в конкретном участке, что и определяет эффективность при гибридизации праймера. В связи с этим, также, возникал вопрос о стабильности таких фрагментов, что связано с потенциальной мобильностью ТУ-элементов. Воспроизводимость была доказана на различных штаммах на разных стадиях культивирования и при различных условиях культивирования. Данный метод позволяет, помимо прямой дифференциации штаммов, выявлять и контаминацию другими дрожжами до 1% [7].

Учитывая перспективность использования для генетической идентификации штаммов винных дрожжей метода, основанного на анализе полиморфизма δ -последовательностей, в задачу наших исследований входило выполнение апробации ДНК - маркерного анализа на основе использования праймерных пар – $\delta 1 + \delta 2$ и $\delta 1 + \delta 12$ и генотипирование некоторых коммерческих штаммов. Кроме того, для упрощения методологической составляющей ДНК-маркерного анализа, была выполнена апробация экспресс методики экстракции ДНК.

Объекты и методы исследований

Объектами исследования послужили активные сухие дрожжи - коммерческие штаммы винных дрожжей, используемые в виноделии: ERBSLÖH Oenoferm Bouquet (*Sacch. cerevisiae*), Zymaflore X5 (*Sacch.cerevisiae*), SP49 (Association de *Sacch. cerevisiae* et *Sacch.cerevisiae*

galastose), EC 1118 (*Sacch. cerevisiae*(ex bayanus)), Ləfood I fantastici 4 *S. cerevisiae* var. *bayanus*, Sacch.cerevisiae I laFORT7. BO 213 LaFORT, Primavera (*Sacch. cerevisiae*), Pro Elif (*S. cerevisiae*). Все образцы, за исключением образца Pro Elif (*S. cerevisiae*) были представлены высушенным препаратом культуры. Указанный образец представлял желатинизированные гранулы содержащие инкапсулированные клетки.

Для экстракции ДНК апробировали упрощенный метод с общей продолжительностью экстракции около 1,5-2 часов, использованный ранее для получения проб ДНК с уровнем чистоты, достаточным для проведения ПЦР-амплификации из культуры фитопатогенного гриба *Venturia inequalis*. Использовали экстрагирующий буфер следующего состава: 200 mM TrisHCL (pH 8,5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS. Для экстракции 30-40 мг пробы лиофильно высушенных дрожжей гомогенизировали в 300 мкл экстрагирующего буфера и инкубировали в течение 10 минут при 65С. Этап инкубации был введен нами в протокол экстракции, т. к. в оригинальной методике инкубация при 65° С отсутствует. Далее экстракцию проводили по методике, описанной Zhang [8].

Для амплификации использовали праймерные пары $\delta 1 + \delta 2$ и $\delta 1 + \delta 12$ и [9]. ПЦР проводили по следующей программе: денатурация при 95° С 2 мин, затем 35 циклов – 30 с при 95° С, 43,2° С – 1 мин, 72° С – 1 мин; финальная элонгация при 72° С – 10 мин. Электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле в 0,5X ТБЕ буфере при напряжении 150V в течении 40 минут. После окрашивания гелевых пластин в бромистом этидии, продукты ПЦР визуализировали и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты исследований

В соответствии с поставленными задачами, на первом этапе исследования апробировали упрощенную методику экстракции ДНК, указанную в разделе «Материалы и методы исследования». Проверка

наличия ДНК в пробах, выполненная методом электрофореза полученных проб в 1,5% агарозном геле, показала, что для всех образцов, за исключением образца Pro Elif (*S. cerevisiae*) экстракция ДНК прошла успешно – на электрофореграмме присутствовал фрагмент с предполагаемой молекулярной массой превышающий 4-5 тысяч пар оснований (отмечен стрелкой).

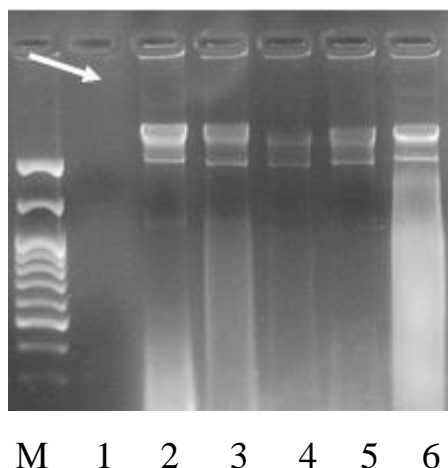
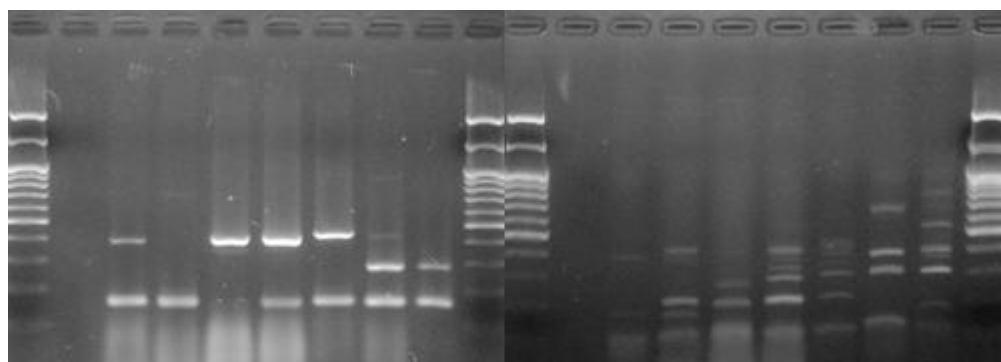


Рисунок 1 Проверка наличия ДНК в экстрагированных пробах

Примечание: М – маркер молекулярной массы ДНК; 1 – Pro Elif , 2 – ERBSLÖN Oenoferm Bouquet, 3 - Zymaflore X5, 4 – SP49, 5 – EC 1118, 6 – Læfood I fantastici 4

Неудовлетворительная экстракция ДНК по образцу Pro Elif (*S. cerevisiae*) может быть связана с тем, что данный образец представлял собой не лиофильно-высушенную культуру дрожжей, а абсорбированные в желатиновых гранулах дрожжевые клетки. Тем не менее, на этапе апробации экспериментальных параметров ПЦР этот образец был включен в эксперимент, с целью исключить ошибочность выводов, основанных на проверке в агарозном геле.



А

Б

М 1 2 3 4 5 6 7 8 М М 1 2 3 4 5 6 7 8 М

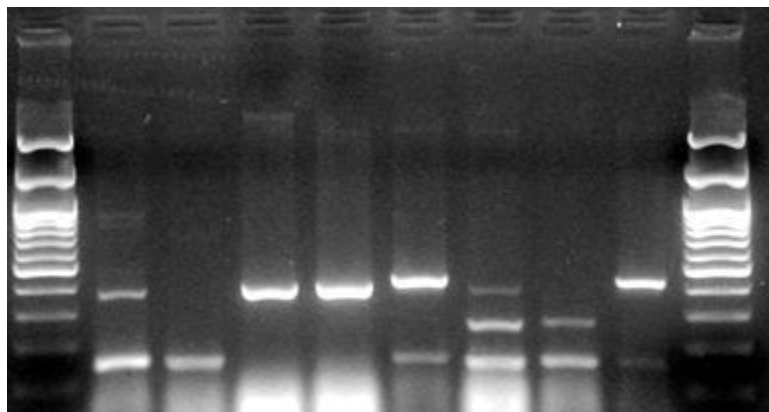
Рисунок 2 Апробация условий ПЦР с праймерными парами $\delta 1 + \delta 2$ и $\delta 1 + \delta 12$

Примечание: М – маркер молекулярной массы ДНК; 1 - 8 штаммы дрожжей: 1 – Pro Elif, 2 – ERBSLÖH Oenoferm Bouquet, 3 – Zymaflore X5, 4 – SP49, 5 – EC 1118, 6 – Ləfood I fantastici 4, 7 – Cerevisiae I laFORT, 8 – BO 213 LaFORT

На рисунке А представлены результаты ПЦР с праймерной парой А ($\delta 1$ и $\delta 2$) при концентрации каждого праймера 0,48 mM, на рисунке Б – результаты ПЦР с праймерной парой Б ($\delta 1$ и $\delta 12$) при концентрации каждого праймера 0,32 mM. Результаты апробации подтвердили, что пробу ДНК образца дрожжей, абсорбированных в желатиновых гранулах Pro Elif (*S. cerevisiae*) не удалось экстрагировать с использованием предложенного метода. Видно, что амплификация лучше проходит при повышенной концентрации праймеров в реакционной смеси, а именно 0,48 mM (3 мкл рабочего раствора праймеров) на реакцию. Таким образом, было установлено, что оптимальной концентрацией праймеров в ПЦР-смеси является 0,48 mM.

На следующем этапе эксперимента выполнили ПЦР анализ восьми штаммов винных дрожжей с использованием повышенной концентрации праймеров (0,48 mM). На рисунках 3 и 4 представлены результаты электрофореза амплифицированных фрагментов, полученных с

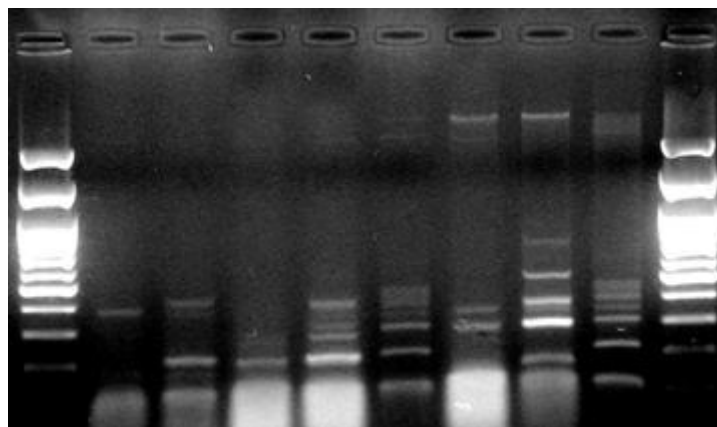
использованием комбинаций праймеров $\delta 1 + \delta 2$ и $\delta 1 + \delta 12$ для восьми изученных штаммов.



М 1 2 3 4 5 6 7 8 М

Рисунок 3 Детекция полиморфизма с праймерной парой $\delta 1 + \delta 2$

Примечание: М – маркер молекулярной массы ДНК; 1-8 штаммы дрожжей: 1 – ERBSLÖH Oenoferm Bouquet, 2 – Zymaflore X5, 3 – SP49, 4 – EC 1118, 5 – Læfood I fantastici 4, 6 – Cerevisiae I laFORT, 7 – BO 213 LaFORT, 8 – PRIMAVERA



М 1 2 3 4 5 6 7 8 М

Рисунок 4 Детекция полиморфизма с праймерной парой $\delta 1 + \delta 12$

Примечание: М – маркер молекулярной массы ДНК; 1-8 штаммы дрожжей: 1 – ERBSLÖH Oenoferm Bouquet, 2 – Zymaflore X5, 3 – SP49, 4 – EC 1118, 5 – Læfood I fantastici 4, 6 – Cerevisiae I laFORT, 7 – BO 213 LaFORT, 8 – PRIMAVERA

Анализ электрофореграмм позволяет говорить о том, что праймерная пара $\delta 1 + \delta 12$ пара позволяет амплифицировать от двух до шести фрагментов в спектре. При этом максимальное количество фрагментов, получаемое с комбинацией праймеров $\delta 1 + \delta 2$ - три. Это согласуется с данными, полученными рядом исследователей ранее [7, 9]. Анализируя суммарный спектр, полученный в двух комбинациях праймеров можно сделать заключение о высоком уровне полиморфизма, выявляемом с использованием данных ДНК-маркеров. Все изученные штаммы, за исключением двух имеют достоверно разные наборы фрагментов. В тоже время, образцы *Læfood I fantastici 4 S. cerevisiae* и PRIMAVERA (номера на электрофорезе 5 и 8, соответственно) имеют идентичные спектры амплификации. Это может быть связано с возможно высоким уровнем их генетической близости. Как было сказано ранее, для выявления генетических различий между близкими по происхождению образцами более оптимально использование SSR-генотипирования. Несмотря на это можно сделать вывод о высокой эффективности использованных ДНК-маркеров, т. к. с применением двух праймерных пар были получены уникальные спектры для большинства изученных генотипов *S. cerevisiae*.

Таким образом, в результате выполненной работы была подтверждена высокая эффективность использования *inter- δ* ДНК-маркеров для генотипирования штаммов винных дрожжей, оптимизированы условия ПЦР для более высокого уровня амплификации фрагментов и определена упрощенная методика экстракции ДНК, позволяющая получать пробы из высушенных препаратов дрожжевых культур с уровнем чистоты, достаточным для проведения ПЦР.

Литература

1. Snow, R. Genetic improvement of wine yeast. In *Yeast Genetics Fundamental and Applied Aspects*, Spencer JFT, Spencer DM, Smith ARW (eds). Springer-Verlag: New York, 1983. p. 439-459.

<http://ej.kubagro.ru/2015/08/pdf/36.pdf>

2. Hammond, J. R. M. Yeast genetics. In *Brewing Microbiology*, Priest FG, Campbell I (eds). Chapman and Hall: London, 1996. p. 45-82.
3. Degre, R. Wine yeast strain identification / R. Degre, D. Y. Thomas, J. Ash [et al.] // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1989. – V. 40. – p. 309-315.
4. Pretorius, I. S. The impact of yeast genetics recombinant DNA technology on the wine industry / I. S. Pretorius, T. J. Westhuizen // *S. Afr. J. Enol. Vitic.* – 1991. – V. 12. – p. 3-31.
5. Schuller, D. Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions / D. Schuller, F. Cardoso, S. Sousa [et al.] // 2112. – *PLoS ONE* 7(2): e32507. doi:10.1371/journal.pone.0032507.
6. Hennequin, C. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains / C. Hennequin, A. Thierery, G. F. Richard [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – V. 39. – p. 551-559.
7. Ness, F. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction / F. Ness, F. Lavallee, D. Dubourdieu [et al.] // *J. Sci. Food Agric.* – 1993. – V. 63. – p. 89-94.
8. Zhang, L. Genetic diversity and temporal dynamics of *venturia inaequalis* populations following two apple scab epidemics in pennsylvania: in *Plant Pathology*. – 2010. – p. 24-33.
9. Legras, J.-L. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation / J.-L. Legras, F. Karst // *FEMS Microbiology Letters*, 2003. – V. 221. – p. 249-255.

References

1. Snow, R. Genetic improvement of wine yeast. In *Yeast Genetics Fundamental and Applied Aspects*, Spencer JFT, Spencer DM, Smith ARW (eds). Springer-Verlag: New York, 1983. p. 439-459.
2. Hammond, J. R. M. Yeast genetics. In *Brewing Microbiology*, Priest FG, Campbell I (eds). Chapman and Hall: London, 1996. p. 45-82.
3. Degre, R. Wine yeast strain identification / R. Degre, D. Y. Thomas, J. Ash [et al.] // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1989. – V. 40. – p. 309-315.
4. Pretorius, I. S. The impact of yeast genetics recombinant DNA technology on the wine industry / I. S. Pretorius, T. J. Westhuizen // *S. Afr. J. Enol. Vitic.* – 1991. – V. 12. – p. 3-31.
5. Schuller, D. Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions / D. Schuller, F. Cardoso, S. Sousa [et al.] // 2112. – *PLoS ONE* 7(2): e32507. doi:10.1371/journal.pone.0032507.
6. Hennequin, C. Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains / C. Hennequin, A. Thierery, G. F. Richard [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – V. 39. – p. 551-559.
7. Ness, F. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction / F. Ness, F. Lavallee, D. Dubourdieu [et al.] // *J. Sci. Food Agric.* – 1993. – V. 63. – p. 89-94.
8. Zhang, L. Genetic diversity and temporal dynamics of *venturia inaequalis* populations following two apple scab epidemics in pennsylvania: in *Plant Pathology*. – 2010. – p. 24-33.
9. Legras, J.-L. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation / J.-L. Legras, F. Karst // *FEMS Microbiology Letters*, 2003. – V. 221. – p. 249-255.