

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(11):1371-1377; 4 November 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150067

乳酸菌微进化的研究进展

宋宇琴, 孙志宏, 张和平*

内蒙古农业大学, 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

摘要: 乳酸菌是食品工业中重要的微生物, 乳酸菌微进化研究有助于深入解析其生物学功能与机制。随着分子生物学的发展, 多位点序列分型 (Multi-locus Sequence Typing, MLST) 及基因组重测序 (Whole-genome re-sequencing) 等技术手段应运而生, 使得从分子水平上阐述乳酸菌的系统发育和种群进化关系成为可能。MLST 已被广泛用于乳酸菌遗传多样性和种群结构等微进化研究中, 近期, 测序成本的锐减使全基因组测序技术在乳酸菌微进化研究中的优势日益突显。本文对乳酸菌微进化的理论基础、研究方法和意义进行了阐述, 并介绍了全基因组测序技术在乳酸菌微进化方面的应用, 旨在为乳酸菌微进化分析研究提供新思路。

关键词: 乳酸菌, 微进化, 全基因组测序技术

中图分类号: Q93 **文章编号:** 0001-6209(2015)11-1371-07

乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 是一类革兰氏染色呈阳性, 发酵碳水化合物以乳酸为主要代谢终产物的兼性厌氧细菌的总称, 共包含有乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属、片球菌属、明串珠菌属、肠球菌属等 43 个属, 这些属又可划分为 373 个种和亚种。乳酸菌发酵历史悠久, 广泛应用于乳制品、肉制品、青贮饲料、谷物和果蔬等的生产加工中, 在人类生产、生活中发挥着重要作用, 是食品工业中重要的微生物。目前, 已发现乳酸菌可以栖居于人和动物肠道及其他器官中, 尤其是益生乳酸菌能够调节肠道微生态平衡, 具有抗肿瘤、降胆固醇、降血压、延缓衰老等功效^[1]。

随着分子生物学理论和生物技术的发展, 大量基因组的完成以及功能基因的不断破译为乳酸菌的深层次研究提供了新基础, 研究人员不断开发新的分子生物学方法和手段对乳酸菌分类鉴定、基因功

能及其系统发育和种群进化进行分析研究。乳酸菌微进化研究是从分子水平上了解乳酸菌的系统发育关系并重塑其进化历程, 为揭示其生物学功能的形成和进化机制提供遗传学基础, 有利于将其更好的应用于食品工业中。

1 乳酸菌微进化的理论基础

生物进化的研究体现在两个层次上: 宏进化 (macroevolution) 和微进化 (microevolution)。微进化, 也称“种内进化”, 指的是同一生物种内或近缘物种之间的进化, 是一个导致种内分化的过程, 着重于研究基因对性状的影响以及选择压力对基因变异的作用^[2]。微进化中基因的遗传变异通常具有可明确阐述的分子与遗传基础, 可以追溯其发生发展的过程, 有规律可循, 因此是生物学领域关注的焦点之一。

基金项目: 国家自然科学基金 (31430066); 内蒙古自然科学基金 (2012MS0507)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-471-4319940; E-mail: hepingsdd@vip.sina.com

作者简介: 宋宇琴 (1990-), 女, 内蒙古武川县人, 博士研究生, 研究方向为乳品生物技术方向。E-mail: songyqnd@163.com

收稿日期: 2015-02-05; **修回日期:** 2015-04-14

1.1 微进化的动力

现代达尔文主义理论将生物的进化定义为群体内基因频率的改变,因此,从分子水平上来说,对进化的研究,即对微进化的研究,就是对某一群体的等位基因频率的动态变化的研究^[3]。微进化的动力包括:基因突变、基因重组、遗传漂变和自然选择^[2]。基因突变包括核苷酸的替代、插入/缺失、重组和基因转换,是进化的绝对动力;基因重组在一定程度上可以增加遗传变化,但不会改变等位基因频率;遗传漂变对中性突变的突变子的固定方面发挥着重要作用,尤其在小群体中;自然选择是指自然环境对基因变异的选择作用,正向选择淘汰群体中的变异,而平衡的选择增加其变异^[4]。

1.2 乳酸菌的遗传变异机制

遗传变异的稳定遗传是细菌最终适应新环境的基础。目前发现的乳酸菌的遗传变异机制有两大类:一类是基因水平转移(Horizontal Gene Transfer, HGT),乳酸菌基因组中基因水平转移(HGT)是个普遍的进化事件^[5]。大量证据显示乳酸菌为了快速适应新环境,可通过HGT从环境中获得一段遗传物质以期适应新环境而生存^[6-7]。另一方面,乳酸菌在微进化中不断获得新基因片段的同时,还具有将“无用”基因片段不断钝化、缺失的能力,以维持其遗传物质的相对平衡。2006年,Makarova等^[8]对9株乳酸菌基因组分析发现,在营养丰富的环境中,合成途径中相关酶类有不同程度的缺失,这种突变不断积累,最终形成了不同的营养缺陷型乳酸菌菌株。这种基因钝化、缺失的现象不仅出现在德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、格氏乳杆菌(*Lactobacillus gasseri*)和约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)亚群中,也频繁出现在基因组容量较大的干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)和植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)中^[5]。

另一类就是其自身基因的变异,包括点突变(不导致编码氨基酸变异的同义突变或导致编码氨基酸变异的非同义突变)、基因重组、短重复序列变异等^[2]。通过非同义突变率(d_N 或 K_A)和同义突变率(d_S 或 K_S)的比值可判定一个突变位点的选择压力($d_N/d_S < 1.0$ 表示负向选择; $d_N/d_S = 1.0$ 为中性进化; $d_N/d_S > 1.0$ 为正向自然选择)^[9-10]。2012年,Bachmann等^[11]对3株乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的遗传稳定性进行研究,结果显示3株菌在

乳中连续培养1000代后,其基因组中分别发生了4、6和21处点突变,包括编码氨基酸合成、转运和DNA错配修复 $mutL$ 基因等出现了SNP突变,其 d_N/d_S 值均大于1,显示出菌株为适应新环境正经历着正向选择压力,基因组的变异是菌株为了适应从植物体到乳的生境过渡而经历的进化过程。

2 乳酸菌微进化的研究方法

乳酸菌为原核生物,其微进化的研究,只能借助于保守序列的比较研究,通过高分辨率的标志区分不同菌株的种群结构,再根据这些变异的种群分布揭示细菌可能的微进化历程,为了揭示未知的细菌种群结构变异,科学家们已经发展了很多DNA指纹分析技术和基于核酸序列的分析手段。

2.1 基于DNA指纹图谱的微进化研究方法

随着分子生物学的不断发展,大量分子分型技术和方法被引入到乳酸菌的分型研究中,比如随机扩增多态DNA技术(Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD)^[12]、变性梯度凝胶电泳标记技术(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)^[13]、限制性片段长度多态性分析技术(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)^[14]、扩增片段长度多态性分析技术(Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)^[15]以及脉冲场凝胶电泳技术(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)^[16-17]等技术,都是基于电泳技术,以不同菌株基因组DNA图谱的差异为依据进行乳酸菌的分型研究。但是,这些技术分辨率较低、重现性低,在亲缘关系较近菌种的鉴定中实用性越来越少,并且仅局限于实验室的条件下,不能够实现数据的交流和比较。因此对于近缘菌种的分析,需要一个更方便可靠且分辨率更高的方法。

2.2 基于DNA序列差异的微进化研究方法

为了进一步深入研究细菌的基因型以及微进化,出现了一系列基于DNA序列差异的分析技术与方法。早期的有基于单个基因的16S rRNA基因间隔区(Intergenic Spacer Region, ISR)^[18]、重复基因外回文序列分析技术(Repetitive Extragenic Palindromic Sequences, Rep-PCR)等;随后,基于多个看家基因部分片段的核苷酸序列分析被用于乳酸菌的基因分型研究^[19],如多位点可变数目串联重复序列分析技术

(Multiple-locus Variable-number Tandem-repeat Analysis, MLVA)^[20]、多位点序列分型技术 (Multi-locus Sequence Typing, MLST)^[16,21] 等。其中 MLST 一度成为最成熟和最具标准化的分析手段,因其简便快速、重复性强和分辨率高等优点,被广泛应用于乳酸菌遗传多样性、种群结构及微进化的研究中。

2004年, de Las Rivas 等^[22]首次利用 MLST 技术对 18 株分离自酒类酒球菌 (*Oenococcus oeni*) 的 5 个管家基因进行了多位点序列分型, 研究显示重组是 *Oenococcus oeni* 菌株遗传多样性增加的主要原因。2007年, Cai 等^[23]采用 6 个等位基因的 MLST 技术分析了 40 株分离自植物、人肠道、人血液以及不同地区干酪中 *L. casei*, 结果表明分离自不同环境中的菌株由于特定的环境使其发生了特定的遗传进化, 其遗传特性与分离环境相关, 并提出乳酸菌在不同自然环境选择的作用下经历的进化过程是可追溯的。2011年, 为了验证婴儿肠道中 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 是否来源于母亲, Makino 等^[24]采用 MLST 技术研究了 8 对母亲和婴儿肠道的 207 株 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*。研究发现分离株的聚类大都以不同的家庭为单位, 表明该菌株可能由母亲传递给婴儿。2013年, Dan 等采用 MLST 技术对分离自中国和蒙古国的自然发酵乳制品中的 50 株乳明串珠菌 (*Leuconostoc lactis*) 进行了种群结构分析, 结果表明 *Leuconostoc lactis* 存在种内重组现象, 但其明显地形成了高度克隆的两个亚群^[25]。

越来越多的研究表明, 在遗传多样性分析方面, MLST 是行之有效的技术手段^[26]。研究人员不断利用 MLST 技术鉴定得到许多新的物种, 如 *L. delbrueckii* subsp. *sunkii* 和 *L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii* 的发现^[27-28]。在种群结构和微进化分析方面, MLST 也显示出来较大的潜力, 可检测种群内频繁的重组现象, 追溯不同生境下各种群结构的进化历程, 但遗憾的是, 相较于全基因组来说, MLST 位点所携带的遗传信息十分有限, 其揭示的遗传进化关系大都局限于笼统的种群结构分群信息, 给微进化的分析带来一定难度。

近年来, 随着高通量测序技术的不断出现, 基于全基因组范围内 DNA 序列差异分析的全基因组测序技术 (Whole-genome sequencing) 不断用于细菌群

体遗传学和微进化的研究^[29], 以其低成本、高通量和耗时短等特点为乳酸菌微进化、代谢多样性及其功能基因的研究注入了强劲的驱动力。

3 基因组重测序技术及其在乳酸菌微进化中的应用

3.1 基因组重测序技术概述

基因组重测序技术 (Whole-genome re-sequencing) 是指对已知基因组序列的物种进行不同个体的基因组测序, 在此基础上检测个体或群体的基因差异或结构差异, 进而进行遗传进化分析^[30]。其原理是将重测序结果与已知序列比对, 寻找单核苷酸多态性位点 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP)、插入缺失位点 (Insertion/Deletion, InDel)、结构变异位点 (Structure Variation, SV) 及拷贝数变化 (Copy Number Variations, CNV), 发现大量基因差异, 实现遗传进化分析及重要性状候选基因的预测。

3.2 基因组重测序技术在乳酸菌中的应用

2001年完成的乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403) 全基因组测序是乳酸菌的破冰之作, 随后进入乳酸菌基因组测序的高峰阶段, 我国也于 2008 年完成第一株 *L. casei* Zhang 的全基因组测序^[31]。到目前为止, 已有 80% 以上的乳酸菌种完成了全基因组序列测定, 陆续破译的乳酸菌基因组不仅解析了相应的生物代谢途径, 同时为从全基因组水平分析乳酸菌的进化历程提供了参考序列。

2009年, Cai 等^[32]以 *L. casei* ATCC 334 基因组序列为参考菌株, 对 21 株分离自植物、人体以及不同地区干酪中的 *L. casei* 进行了全基因组微阵列的比较基因组杂交分析 (comparative genome hybridization, CGH), 结果显示与参考菌株相比, 分离自不同环境中的 *L. casei* 菌株具有各自独特的功能基因, 说明这些菌株在适应不同环境的同时, 基因发生不同程度的插入或缺失, 这与 Cai 等 2007 年采用 MLST 技术分析所得结果一致, 不仅验证了 MLST 方案的准确性, 也说明基因组重测序技术是研究乳酸菌微进化的行之有效的技术手段。

近年来, 随着基因组测序技术不断更新, 测序通量显著递增, 测序成本锐减, 使得大批量、大规模测定乳酸菌的某一类群成为可能, 越来越多的学者尝

试着从全基因组角度解析乳酸菌的群体遗传与物种分化过程。2013年,Smokvina等以*L. casei* Zhang、ATCC334、BL23为参照序列,采用基因组测序技术完成了34株*L. casei*分离株的基因组重测序,系统分析了*L. casei*不同菌株糖代谢能力的差异^[33]。结果显示,*L. casei*包含多个磷酸烯醇式丙酮酸运输系统(Phosphoenolpyruvate Transport System,PTS),相对于*L. johnsonii*和*L. acidophilus*多出10-20个完整的PTS系统,使得这些菌株可利用更多种类的糖,指示出该菌可适应更多的生境。进一步分析乳源*L. casei*分离株编码的PTS系统相对较少,推测可能是适应了乳中营养环境,钝化、丢弃了长期不使用的部分转运系统。同时,Toh等^[34]通过对*L. casei*、*L. paracasei*和*L. rhamnosus*基因组比较分析时也发现类似的现象,这些充分说明了*L. casei*为适应不同环境而发生了定向的微进化历程。

2014年,内蒙古农业大学的孙志宏^[35]采用基因组重测序技术完成了146株*Lactobacillus*模式菌株基因组的测定,结合公共数据库中已完成的3株*Lactobacillus*模式菌株的全基因组序列,站在全基因组的角度对整个乳杆菌属各种系的进化关系进行了诠释。该研究建立了含有72个基因的*Lactobacillus*核心基因集,深入解析了149株*Lactobacillus*模式菌株的种系发育情况和物种分化历程,结果表明*Lactobacillus*基因组遗传多样性远高于传统细菌分类学定义中的“科”,而且以72个核心基因为依据可将乳杆菌模式菌株分为2个大的进化分支:*Oenococcus*、*Pediococcus*、*Weissella*、*Leuconostoc*和*Lactobacillus*属于一个进化分支*Lactobacillus* complex,而属于同一祖先分化的*Lactococcus*、*Streptococcus*和*Enterococcus*处于*Lactobacillus* complex分化前的另一个分支。

对于每个生物体来说,基因组包含了整个生物体的遗传信息。上述研究结果均表明,全基因组测序技术能够完整地反映基因组DNA上的遗传信息,进而比较全面地揭示基因组的复杂性和多样性,成为研究乳酸菌微进化的强有力的技术手段。

4 乳酸菌微进化的研究意义

细菌微进化研究反应了环境对种群进化的塑造

和影响。乳酸菌是重要的食品工业微生物,其遗传背景和进化历程是研究、开发乳酸菌的首要基础。研究乳酸菌的微进化机制,首先可以对乳酸菌进行进化溯源,这有利于阐明乳酸菌各种属间的亲缘及进化关系,重建乳酸菌系统发育树,从而为建立针对乳酸菌的更精确、快速的分类鉴定体系提供理论依据。其次,随着益生菌概念的提出,乳酸菌的益生特性不断被验证,但仍有许多未知的功能尚未被发现,研究乳酸菌的微进化机制,可以从分子水平上解析其生物学功能的形成和进化机制,找到益生特性的关键基因,进而针对相关基因开展基础研究,并拓宽乳酸菌的应用范围,这有利于深入发掘国内丰富的乳酸菌资源。同时,在乳酸菌的抑菌性及工业生产中发酵特性等方面的研究中,乳酸菌的微进化研究也可以为发酵剂菌株筛选与制备提供强有力的理论基础,筛选出具有我国自主知识产权的优良菌种,并使其更好的应用于食品工业。这些均对我国食品工业的长远发展有着相当重要的战略意义。此外,乳酸菌微进化作为生物进化的一部分,其研究可以极大的丰富现代进化理论,还可以从基因突变率等方面对传统的进化模型如分子钟^[4]等进行验证。

5 展望

纵观现有的微进化研究方法,仅以单个基因为研究对象的16S rRNA基因序列同源性研究,并不能真实的反映乳酸菌在自然界各种生境中的进化关系,而基于多个管家基因位点的核酸序列分析方法,如MLST技术,虽然具有分辨率高、数据可靠、重复性好,不同实验数据便于比较,有利于全球范围内菌株间的数据标准化等诸多优点,但此类方法毕竟只局限于整体基因组上的个别位点,这很有可能漏掉十分关键的遗传信息,导致分析所构建的种群结构与真实的存在过多偏差。最近几年高通量测序技术的迅猛发展,使大规模测定细菌全基因组序列成为可能,研究学者可综合利用群体遗传学、微生物学、生物信息学等方法,对完整的基因组数据进行深度挖掘,全面、系统地了解乳酸菌基因组的结构和组成,从而为乳酸菌微进化机制的研究开辟新思路。

参考文献

- [1] Zhang Y, Guo X, Guo JL, He QW, Li H, Song YQ, Zhang HP. *Lactobacillus casei* reduces susceptibility to type 2 diabetes via microbiota-mediated body chloride ion influx. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5654.
- [2] Yang RF. Advances in microevolution of pathogenic bacteria. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2009, 21(4): 479-484. (in Chinese)
杨瑞馥. 致病性细菌微进化的研究进展. *生命科学*, 2009, 21(4): 479-484.
- [3] Pevsner J. Bioinformatics and functional genomics. 2nd ed. Hoboken, N. J.: Wiley-Blackwell, 2009.
- [4] Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford: Oxford University Press, 2000.
- [5] Zhang WY, Meng H, Zhang HP. Progress on the genomics of lactic acid bacteria-A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(9): 1270-1275. (in Chinese)
张文羿, 孟和, 张和平. 乳酸菌基因组学研究进展. *微生物学报*, 2008, 48(9): 1270-1275.
- [6] Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, Souther N, Dobson A, Duong T, Callanan M, Lick S, Hamrick A, Cano R, Klaenhammer TR. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(11): 3906-3912.
- [7] Koistinen KM, Plumed-Ferrer C, Lehesranta SJ, Karenlampi SO, von Wright A. Comparison of growth-phase-dependent cytosolic proteomes of two *Lactobacillus plantarum* strains used in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 273(1): 12-21.
- [8] Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Díaz-Muñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(42): 15611-15616.
- [9] Achtman M, Morelli G, Zhu PX, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, Vogler AJ, Wagner DM, Allender CJ, Easterday WR, Chenal-Francois V, Worsham P, Thomson NR, Parkhill J, Lindler LE, Carniel E, Keim P. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(51): 17837-17842.
- [10] Feil EJ, Maiden MC, Achtman M, Spratt BG. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, 16(11): 1496-1502.
- [11] Bachmann H, Starrenburg MJC, Molenaar D, Kleerebezem M, van Hylckama Vlieg JE. Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome Research*, 2012, 22(1): 115-124.
- [12] Solieri L, Giudici P. Development of a sequence-characterized amplified region marker-targeted quantitative PCR assay for strain-specific detection of *Oenococcus oeni* during wine malolactic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(23): 7765-7774.
- [13] Kesmen Z, Kacmaz N. Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. *Journal of Food Science*, 2011, 76(5): M276-M283.
- [14] Yu J, Du XH, Wang WH, Zhang JC, Liu WJ, Sun ZH, Sun TS, Zhang HP. Phenotypic and genotypic characteristics of lactic acid bacteria isolated from sour congee in Inner Mongolia of China. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2011, 57(4): 197-206.
- [15] Tanigawa K, Watanabe K. Multilocus sequence typing reveals a novel subspeciation of *Lactobacillus delbrueckii*. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 3): 727-738.
- [16] Picozzi C, Bonacina G, Vigentini I, Foschino R. Genetic diversity in Italian *Lactobacillus sanfranciscensis* strains assessed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 7): 2035-2045.
- [17] Sawadogo-Lingani H, Lei V, Diawara B, Nielsen DS, Møller PL, Traore AS, Jakobsen M. The biodiversity of predominant lactic acid bacteria in dolo and pito wort for the production of sorghum beer. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(4): 765-777.

- [18] Sun TS, Wu RN, Jin Y, Sun ZH, Menghe B, Zhang HP. Identification of *Lactobacillus* isolated from koumiss by 16S-23S rDNA intergenic DNA sequence comparisons. *Food and Fermentation Industries Editorial Staff*, 2006, 32(9): 1-4. (in Chinese)
孙天松, 乌日娜, 靳焯, 孙志宏, 孟和毕力格, 张和平. rDNA 间区序列测定在乳杆菌鉴定中的应用. *食品与发酵工业*, 2006, 32(9): 1-4.
- [19] Yu J, Sun ZH, Liu WJ, Bao QH, Zhang JC, Zhang HP. Phylogenetic study of *Lactobacillus acidophilus* group, *L. casei* group and *L. plantarum* group based on partial *hsp 60*, *phe S* and *tuf* gene sequences. *European Food Research and Technology*, 2012, 234(6): 927-934.
- [20] Chiou CS, Hung CS, Torpdahl M, Watanabe H, Tung SK, Terajima J, Liang SY, Wang YW. Development and evaluation of multilocus variable number tandem repeat analysis for fine typing and phylogenetic analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 142(1/2): 67-73.
- [21] Maiden MCJ, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, McCarthy ND. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(10): 728-736.
- [22] de Las Rivas B, Marcobal Á, Muñoz R. Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7210-7219.
- [23] Cai H, Rodriguez BT, Zhang W, Broadbent JR, Steele JL. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 8): 2655-2665.
- [24] Makino H, Kushiro A, Ishikawa E, Muylaert D, Kubota H, Sakai T, Oishi K, Martin R, Ben Amor K, Oozeer R, Knol J, Tanaka R. Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(19): 6788-6793.
- [25] Dan T, Liu WJ, Sun ZH, Lv Q, Xu HY, Song YQ, Zhang HP. A novel multi-locus sequence typing (MLST) protocol for *Leuconostoc lactis* isolates from traditional dairy products in China and Mongolia. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 150.
- [26] Xu HY, Sun ZH, Liu WJ, Yu J, Song YQ, Lv Q, Zhang JC, Shao YY, Menghe B, Zhang HP. Multilocus sequence typing of *Lactococcus lactis* from naturally fermented milk foods in ethnic minority areas of China. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(5): 2633-2645.
- [27] Adimpong DB, Nielsen DS, Sørensen KI, Vogensen FK, Sawadogo-Lingani H, Derckx PM, Jespersen L. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *jakobsenii* subsp. nov., isolated from dolo wort, an alcoholic fermented beverage in Burkina Faso. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt 10): 3720-3726.
- [28] Kudo Y, Oki K, Watanabe K. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *sunkii* subsp. nov., isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(Pt 11): 2643-2649.
- [29] Li RQ, Li YR, Fang XD, Yang HM, Wang J, Kristiansen K, Wang J. SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. *Genome Research*, 2009, 19(6): 1124-1132.
- [30] van Vliet AH. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 302(1): 1-7.
- [31] Zhang WY, Yu DL, Sun ZH, Wu RN, Chen X, Chen W, Meng H, Hu SN, Zhang HP. Complete genome sequence of *Lactobacillus casei* Zhang, a new probiotic strain isolated from traditional homemade koumiss in Inner Mongolia, China. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(19): 5268-5269.
- [32] Cai H, Thompson R, Budinich MF, Broadbent JR, Steele JL. Genome sequence and comparative genome analysis of *Lactobacillus casei*: insights into their niche-associated evolution. *Genome Biology and Evolution*, 2009, 1: 239-257.
- [33] Smokvina T, Wels M, Polka J, Chervaux C, Brisse S, Boekhorst J, van Hylckama Vlieg JE, Siezen RJ. *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68731.
- [34] Toh H, Oshima K, Nakano A, Takahata M, Murakami M, Takaki T, Nishiyama H, Igimi S, Hattori M, Morita H. Genomic adaptation of the *Lactobacillus casei* group. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75073.
- [35] 孙志宏. 乳杆菌属基因组多态性及德氏乳杆菌保加利亚亚种微进化研究. 内蒙古农业大学博士论文, 2014.

Microevolution of lactic acid bacteria - A review

Yuqin Song, Zhihong Sun, Heping Zhang*

Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering Ministry of Education, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) are important organisms in the food industry. The study of microevolution of LAB is helpful in understanding of the biological function and mechanism of these microbes. With the development of molecular biology, a large number of technical means have emerged, such as multilocus sequence typing (MLST) and whole-genome re-sequencing, which enable the study of the phylogenetic and population evolution of LAB at genetic level. MLST has already been widely used on microevolution research of LAB to analyze the genetic diversity and population structure. Moreover, recently, as a result of the declining in sequencing cost, the advantage of whole genome sequencing technology is increasingly highlighted. This article elucidates the principle, methods and scientific significance of researching LAB microevolution, as well as introduces the application of whole genome sequencing in these aspects to provide new insights into further research.

Keywords: lactic acid bacteria, microevolution, whole genome sequencing

(本文责编: 李磊, 王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31430066), and the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (2012MS0507)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-471-4319940; E-mail: hepingdd@vip.sina.com

Received: 5 February 2015/Revised: 14 April 2015