

研究报告

## 云南香格里拉葡萄酒产区酿酒相关酵母菌的生物多样性

杨宽<sup>1</sup> 毛如志<sup>1</sup> 赵悦<sup>1</sup> 何迟<sup>2</sup> 王慧玲<sup>2</sup> 曹建宏<sup>3</sup> 速伟<sup>4</sup> 何霞红<sup>1\*</sup>

(1. 云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程研究中心 云南 昆明 650201)

(2. 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室 云南 昆明 650201)

(3. 香格里拉酒业股份有限公司 云南 迪庆 674412)

(4. 云南省玉溪市澄江县植保植检站 云南 玉溪 652500)

**摘要:**【背景】云南香格里拉高原葡萄酒产区位于云南三江并流世界自然遗产保护区内,微生物资源丰富,其中与葡萄酒酿造相关的野生酵母种类也非常多样。【目的】研究香格里拉葡萄酒产区酿酒相关酵母菌的种类多样性和酿酒酵母的遗传多样性。【方法】从香格里拉金沙江和澜沧江两岸选取5个葡萄园进行成熟葡萄样品的采集,分别对葡萄果皮和自然发酵过程中的酵母菌进行分离,运用WL营养琼脂鉴定培养基(Wallerstein laboratory nutrient agar)和26S rDNA D1/D2区序列分析法对酵母的种类进行鉴定,用SSR分子标记的方法研究酿酒酵母的遗传多样性。【结果】从香格里拉葡萄酒产区成熟浆果上共分离到230株野生酵母,鉴定为13属18种,其中有10种酵母为香格里拉地区首次发现。用SSR分子标记的方法对香格里拉分离到的47株酿酒酵母进行遗传多样性分析,47株酿酒酵母被分为24种基因型,11个微卫星位点共检测到70个等位基因,平均多态信息含量(PIC)为0.640,平均观测杂合度(Ho)为0.166,平均期望杂合度(He)为0.693。【结论】香格里拉葡萄酒产区酵母菌资源丰富,表现出较高的物种多样性和中等程度的酿酒酵母遗传多样性。研究该产区酵母菌的多样性,为香格里拉酵母资源多样性的保护和利用奠定基础。

**关键词:** 香格里拉葡萄酒产区, 酵母菌, 分子鉴定, 生物多样性

**Foundation item:** Academician Free Exploration Project of Yunnan Provincial Science and Technology Department (2016HA014)

**\*Corresponding author:** E-mail: hexiahong@hotmail.com

**Received:** January 09, 2018; **Accepted:** May 07, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 06, 2018

**基金项目:** 云南省科技厅院士自由探索项目(2016HA014)

**\*通信作者:** E-mail: hexiahong@hotmail.com

**收稿日期:** 2018-01-09; **接受日期:** 2018-05-07; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-06-06

## Biodiversity of wine-related yeasts isolated from Shangri-La wine-producing region of Yunnan

YANG Kuan<sup>1</sup> MAO Ru-Zhi<sup>1</sup> ZHAO Yue<sup>1</sup> HE Chi<sup>2</sup> WANG Hui-Ling<sup>2</sup>  
CAO Jian-Hong<sup>3</sup> SU Wei<sup>4</sup> HE Xia-Hong<sup>1\*</sup>

(1. The National Center for Agricultural Biodiversity, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

(2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Kunming, Yunnan 650201, China)

(3. Shangri-La Wine Limited by Share Ltd., Diqing, Yunnan 674412, China)

(4. Plant Inspection Station of Chengjiang County, Yuxi, Yunnan 652500, China)

**Abstract:** [Background] Shangri-La wine-producing region of Yunnan is located in the Three Parallel Rivers National Park, and its microbial resources are abundant. The variety of wild-yeasts associated with wine making is also very diverse. [Objective] To study the diversity of yeasts and the genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* in Shangri-La wine-producing region. [Methods] Five vineyards from the Shangri-La Jinsha River and Lancang River were selected to collect ripe grape samples and separate the yeasts from the grape peel and fermentation process. The yeast species were identified by WL (Wallerstein laboratory nutrient agar) identification medium and 26S rDNA D1/D2 domain sequence analysis. The genetic diversity of *S. cerevisiae* was studied by SSR molecular markers. [Results] A total of 230 wild yeasts isolated from grape berries were identified as 13 genera and 18 species, of which 10 species were found for the first time in Shangri-La. Genetic diversity of 47 *S. cerevisiae* strains was analyzed by SSR molecular markers, and 47 strains of *S. cerevisiae* were divided into 24 genotypes. 70 alleles were observed by microsatellite markers among the 47 strains. The average polymorphism information content (PIC) was 0.640. The mean observed heterozygosity (Ho) was 0.166, and the mean expected heterozygosity (He) was 0.693. [Conclusion] There are abundant yeast resources in the Shangri-La Wine-producing region, which shows the high species diversity of yeast and moderate genetic diversity of *S. cerevisiae*. Study on the diversity of yeast in this area, it aims to lay a foundation for the conservation and utilization of the diversity of Shangri-La's yeast resources.

**Keywords:** Shangri-La wine-producing region, Yeasts, Molecular identification, Biodiversity

香格里拉地区位于云南省西北部,地处青藏高原横断山区腹地,是滇、川、藏三省的交界处,同时也处于云南三江并流世界自然遗产保护区内,该保护区目前是我国面积最大的世界自然遗产地,也是我国生物多样性最丰富的地区之一<sup>[1]</sup>,包含了丰富的地质地貌、生物物种和生态系统多样性<sup>[2]</sup>。香格里拉位于该保护区的中心位置,区域内包含雪山、草甸、原始森林、高原湖泊、湿地和河谷等不同的自然景观<sup>[3]</sup>,同时还包含高山半寒冷半湿润、亚热带半湿润-半干旱和亚热带干旱等不同的气候,因此造就了“一山分四季,十里不同天”的立体气候特征<sup>[4]</sup>。香格里拉地区多样的地理气候环境,蕴含着丰富的微生物资源,有学者曾对香格里拉地区大

型真菌资源进行了调查,包括珍贵的野生菌松茸等<sup>[5]</sup>,李绍兰等<sup>[6]</sup>研究了香格里拉地区的白马雪山自然保护区中高山松林、杉林、高山杜鹃灌丛和草甸植被下野生酵母菌的多样性。子建文等<sup>[7]</sup>对云南香格里拉地区山脉土壤中微生物的数量分布进行了调查分析。

香格里拉葡萄酒产区的葡萄园主要建在金沙江和澜沧江流域海拔1 700–2 800 m的干热和干冷河谷地带,是目前世界上海拔最高的酿酒葡萄产区之一。该地区光照充足,有效积温高,降雨量小,紫外线强,昼夜温差大,非常有利于优质酿酒葡萄的种植<sup>[8]</sup>。酵母菌是酿造葡萄酒过程中很重要的一类微生物,成熟的葡萄皮上则存在大量的野生酵母

菌<sup>[9]</sup>,从葡萄园中分离野生酵母菌,有望筛选到发酵性能优良、产香良好、具有本土特色的优质酿酒酵母菌株。Capece 等<sup>[10]</sup>对意大利 2 个葡萄酒产区的酿酒酵母多样性进行了研究,发现 2 个地区的酿酒酵母具有高度的多样性,并且酵母的类群和产区地理特征有很大的关系。Schuller 等<sup>[11]</sup>研究了不同葡萄酒产区以及不同葡萄品种相关酿酒酵母的种群结构和遗传多样性,结果表明,不同葡萄园中的酿酒酵母种群差异受多个因素影响,不同葡萄品种上的酿酒酵母遗传差异更明显。Kántor 等<sup>[12]</sup>对葡萄浆果上的细菌和酵母菌的数量进行了研究,最后鉴定出 10 个属的酵母菌。Garofalo 等<sup>[13]</sup>研究了一个本土葡萄品种“Nero di Troia”从果实到葡萄酒发酵过程中酵母种群的动态变化。

微卫星标记作为一种经典的分子标记方法,自 1989 年 Litt 等<sup>[14]</sup>扩增到人类基因组 SSR (Simple sequence repeats)序列以来,其在动植物的遗传与进化<sup>[15-17]</sup>、遗传育种<sup>[18-19]</sup>、分子生态学<sup>[20]</sup>以及种质资源鉴定<sup>[21]</sup>等方面都得到了广泛的应用,由于其高度的多态性、呈孟德尔共显性遗传、稳定性好等优点,在微生物群体的遗传与分化研究中也得到了很好的应用。Pérez 等<sup>[22]</sup>用 RAPD (Random amplified polymorphic DNA)、CPAS (Cleaved amplified polymorphic sequence)和 SSR 3 种方法研究了酿酒酵母菌株的基因特性,结果表明,SSR 具有更高的多态性和更容易获得遗传图谱的特点。Gallego 等<sup>[23]</sup>也比较了 RAPD、AFLP (Amplified fragment length polymorphism)和 SSR 3 种方法对酿酒酵母菌株的分型效果,SSR 同样优于其他方法。基于此,国内外的一些研究者用 SSR 方法对葡萄园以及酿酒厂的酿酒酵母遗传多样性做了大量的研究<sup>[24-26]</sup>,本实验则选取 11 个微卫星多态性位点对香格里拉葡萄酒产区金沙江和澜沧江河谷两岸葡萄园中的野生酵母菌遗传多样性进行分析,研究两个酵母群体的遗传差异性,并与商业酿酒酵母作对比,比较野生酵母和商业酵母之间的遗传差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株分离材料

从香格里拉葡萄酒产区金沙江和澜沧江河谷流域选取 5 个 5 年以上的葡萄园采集成熟的赤霞珠葡萄样品,其中采样点斯农(SN)、江坡(JP)和阿东(AD)属于澜沧江流域,东水(DS)和东旺(DW)属于金沙江流域,从成熟葡萄的果皮和自然发酵过程中分离野生酵母菌株。商业酵母 UV43、F15 和安琪酵母由香格里拉酒业股份有限公司提供。

#### 1.1.2 培养基

酵母分离培养基(YEPD, g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母浸粉 10.0, 蛋白胨 20.0, 琼脂 20.0, 为了防止细菌污染添加 100 mg/L 的氯霉素。酵母菌富集培养基是将 YEPD 中的琼脂去掉,做成液体培养基。酵母菌鉴定培养基(WL营养琼脂培养基<sup>[27]</sup>)(g/L): 酵母浸粉 4.0, 胰蛋白胨 5.0, 葡萄糖 50.0, 磷酸二氢钾 0.55, 氯化钾 0.425, 氯化钙 0.125, 硫酸镁 0.125, 氯化铁 0.002 5, 硫酸锰 0.002 5, 溴甲酚绿 0.022, 琼脂 20.0, pH 5.5。

以上培养基均在  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min 后使用。

#### 1.1.3 引物

PCR 扩增酵母菌 26S rDNA D1/D2 区序列引物为 NL1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' 和 NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'<sup>[28]</sup>。微卫星位点和相关引物见表 1。

#### 1.1.4 主要试剂和仪器

酵母菌基因组提取试剂盒、 $2 \times Taq$  PCR Mastermix、DNA Marker, 北京天根生化科技有限公司; 氯霉素, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 蛋白胨、酵母浸粉、葡萄糖、琼脂粉、磷酸二氢钾, 西陇化工股份有限公司。

生化培养箱, 上海恒一科学仪器有限公司; 全温震荡培养箱, 常州申光仪器有限公司; 超净工作台, 苏净安泰; 数显恒温水浴锅, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 高压灭菌锅, 致微(厦门)仪器有限公司; 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; PCR

表 1 本实验所用的 11 个微卫星位点和引物信息  
Table 1 Characteristics of the 11 microsatellite loci used as genetic markers in this study

位点 Locus	重复类型 Repeat	引物序列 Primers (5'→3')	荧光标记 Fluorochrome	参考文献 References
C3	CAA <sub>(13)</sub>	F: CTTTTTATTACGAGCGGGCCAT R: AAATCTCATGCCTGTGAGGGGTAT	FAM	[29]
C4	TAA+TAG(i)	F: GAGAAAAATGCTGTTTATTCTGACC R: CCTCCGGGACGTGAAATAAC	FAM	[29]
C5	(GT) <sub>30</sub>	F: TGACACAATAGCAATGGCCTTCA R: GCAAGCGACTAGAACAACAATCACA	FAM	[29]
C6	(CA) <sub>13</sub>	F: GTGGCATCATATCTGTCAATTTTATCAC R: CAATCAAGCAAAAGATCGGCCCT	FAM	[29]
C12/SCAAC1	(CAA) <sub>26</sub>	F: TGCTGCAGCTGTTGTCTTGGTAGG R: CAAGCACAGGCGCAGGCACAAC	HEX	[29]
C8	(TAA) <sub>13</sub>	F: CAGGTCGTTCTAACGTTGGTAAAATG R: GCTGTTGCTGTTGGTAGCATTACTGT	HEX	[29]
YPL009C	(CTT) <sub>23</sub>	F: CTGCTCAACTTGTGATGGGTTTGG R: CCTCGTTACTATCGTCTTCATCTTGC	HEX	[30]
C11	(GT) <sub>20</sub>	F: TTCCATCATAACCGTCTGGGATT R: TGCCTTTTTCTTAGATGGGCTTTC	FAM	[30]
Sc-AAT3	(AAT) <sub>23</sub>	F: TGGGAGGAGGGAAATGGACAG R: TTCAGTTACCCGCACAATCTA	FAM	[31]
SC8132X	(GAA) <sub>16</sub>	F: CTGCTCAACTTGTGATGGGTTTGG R: CCTCGTTACTATCGTCTTCATCTTGC	HEX	[32]
YGL028C	(SerSerSerThr) <sub>9</sub>	F: GGCAACACTCAAAGTCAGCA R: GCTGTTTCTGTGTGGATGA	FAM	[33]

扩增仪, Eppendorf 公司; 电泳仪, 北京六一仪器有限公司; 葡萄酒成分快速分析仪, 丹麦福斯有限公司。

1.2 方法

1.2.1 野生酵母菌株分离方法

果皮上酵母菌的分离: 称量约 10 g 的赤霞珠葡萄浆果, 放入盛有酵母菌富集培养基的三角瓶中, 28 °C、120 r/min 条件下培养 24 h, 培养液稀释至 10<sup>-2</sup> 或 10<sup>-3</sup> 后取 0.2 mL 涂布于 YEPD 固体培养基上, 28 °C 培养 2–3 d, 根据菌落颜色和形态的不同, 随机挑取 10–15 个菌落进行划线纯化, 经 3 次纯化后放入 4 °C 下保存备用。

自然发酵过程中酵母菌的分离: 将采集的成熟葡萄样品人工除梗破碎后放入 10 L 的玻璃罐中进行自然发酵, 用葡萄酒成分快速分析仪监测发酵过程, 分别在发酵的前、中、后期取发酵液 0.1 mL, 加入 0.9 mL 无菌水中进行梯度稀释至 10<sup>-5</sup> 或 10<sup>-6</sup>, 取 0.1 mL 稀释后的发酵液涂布于 YEPD 固体培养基, 28 °C 培养 2–3 d。根据菌落的颜色和形态差异,

在每个发酵时期分别选取 10–15 个菌落进行划线纯化, 经 3 次纯化后放入 4 °C 保存备用。

1.2.2 酵母菌的鉴定

将分离纯化到的酵母菌用划线法接种到 WL 培养基上, 28 °C 培养 5 d 后根据菌落的颜色和形态初步鉴定酵母的种属<sup>[34]</sup>, 并对形态相似的菌株进行归类。基于 WL 的培养结果, 在每种培养类型中选取 1–2 株进行 26S rDNA D1/D2 区序列分子鉴定。

1.2.3 酵母基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

酵母菌基因组的提取使用酵母菌基因组提取试剂盒。PCR 扩增 26S rDNA D1/D2 区序列, PCR 反应体系: 双链总 DNA 模板各 2 μL, 上、下游引物(0.4 μmol/L)各 2 μL, Master Mix 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min, 4 °C 保存。PCR 产物送至北京擎科生物技术有限公司进行测序, 然后将测序结果在 NCBI 进行 BLAST 搜索比对, 比较供试菌株与 GenBank 中相应菌株的相似性, 根据 Kurtzman 和 Robnett<sup>[35]</sup> 的酵母菌分类

标准,同种内不同菌株间 D1/D2 区序列差异不超过 1%,则它们应属于同一个种,再结合前面的菌落形态分析,初步确定酵母菌的种属。为了进一步确认供试菌株与酵母菌模式菌株的亲缘关系,下载相关模式菌株的 26S rDNA D1/D2 区序列,用 MEGA 7.0 构建系统发育树,比较各菌株之间的亲缘关系。

#### 1.2.4 酿酒酵母菌株间的微卫星分析

对分离出的酿酒酵母进行遗传多样性分析,主要分析金沙江和澜沧江两流域的酿酒酵母与商业酵母间的遗传差异。从相关文献中选出 30 对引物进行多态性检测,选择 11 对多态性丰富的引物对样本进行处理。酿酒酵母的 DNA 提取同样采用试剂盒法。PCR 反应体系(15  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 7.5  $\mu$ L,正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 4.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 63  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。用带荧光的接头引物和正向引物对一次扩增的产物进行二次扩增,扩增产物会带上荧光标记。带有荧光标记的 PCR 产物进行稀释后与分子量内标混合,用测序仪进行毛细管电泳,用 GeneMapper 4.1 进行准确位点的数据分析,获得扩增产物大小。然后用 PopGene 32 软件分析酵母群体的 11 个微卫星位点上的 Shannon 指数、观测杂合度(Ho)、期望杂合度(He)以及金沙江和澜沧江两个酵母群体的遗传分化指数 *Fst*、Nei's 遗传距离和遗传相似系数。用 Cervus 3.0 软件计算各微卫星位点的多态信息含量(PIC)。用 Population 1.2.32 软件以非加权算术平均数(Unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)法构建相关酵母菌株的系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 野生酵母菌的 WL 培养基初步鉴定

从香格里拉 5 个葡萄园中的葡萄皮上和自然发酵过程中共分离到 230 株酵母菌,全部接种到 WL 培养基上,培养 5 d 后根据菌落颜色和形态初步鉴定酵母菌的种属,并对形态相似的菌株进行归类。

Cavazza 等<sup>[27]</sup>研究表明,根据菌落的颜色和形态, WL 培养基可以区分在葡萄酒自然发酵过程中出现的大多数典型的酵母菌。230 株酵母菌的培养结果见表 2。

230 株酵母菌被分为 18 个培养类型,对照 Cavazza 等的描述以及前人的验证及补充<sup>[27,34,36]</sup>,根据菌落的颜色和形态,初步可以鉴定 I 类是酿酒酵母(*S. cerevisiae*), II 类是葡萄汁有孢汉逊酵母(*Hanseniaspora uvarum*), IV 类是戴尔凯氏有孢圆酵母(*Torulaspora delbrueckii*), X 类是拜耳接合酵母(*Zygosaccharomyces bailii*), XI 是克鲁维毕赤酵母(*Pichia kluyveri*), XII 类为美极梅奇酵母(*Metschnikowia pulcherrima*), XIII 是一种红酵母(*Rhodotorula*),其他 11 类酵母菌未见有相关描述,但对其进行整理归类,为下一步的分子鉴定提供参考。

### 2.2 酵母菌的 26S rDNA D1/D2 区序列分子鉴定

根据 WL 培养基的初步归类,在每个培养类型中随机选取 1-2 株酵母菌进行分子鉴定,对菌株的 26S rDNA D1/D2 区序列进行测序,在 NCBI 上进行 BLAST 比对,比对结果见表 3,根据 Kurtzman 等<sup>[35]</sup>的酵母菌分类标准,同种内不同菌株间 D1/D2 区序列相似率大于 99%一般可认为是同一个种,结合 WL 培养基鉴定,则可以鉴定出大部分的种。同时下载相关模式菌株序列与供试菌株一起建立系统发育树,显示各菌株间及与模式菌株的亲缘关系。

根据表 3 的序列比对结果,供试菌株与模式菌株的相似性均为 99%,根据 Kurtzman 等的酵母菌分类标准,22 个测序菌株共鉴定为 13 属 18 个种,其中 AD3-1、SN1-9 为酿酒酵母(*S. cerevisiae*), DW2-3、DS2-2 为葡萄汁有孢汉生酵母(*H. uvarum*), SNP-7、DW1-4 为季也蒙毕赤酵母(*Meyerozyma guilliermondii*), SNP-1、JPP-6 为汉逊氏德巴利酵母(*Debaryomyces hansenii*), SN1-10 为 *Candida oleophia*, SN1-11 为 *Hyphopichia burtonii* 等,结合

WL 培养基培养特征和聚类, 可以确定 230 株酵母菌的种属。下载 18 株相关模式菌株的 26S rDNA D1/D2 区序列和 22 株测序菌株用 N-J 法构建系统发育树, 结果如图 1 所示, 被鉴定为同一个种的菌株和相关模式菌株聚在同一个分支上, 表明他们的亲缘关系较近, 而不同种菌株则处于不同的分支上。总体来看, 22 个供试菌株分布在两个大的分支上, 分属于两个大的类群, 以酿酒酵母为代表的子囊菌类(Ascomycetous)及以红酵母属和隐球酵母属的担

子菌类(Basidiomycetous), 其中 AD3-1 (*Pichia*)、DWP-9 (*Candida*) 的子囊菌和 SNP-9 (*Cryptococcus*)、ADP-2 (*Rhodotorula*)的担子菌聚在一个大的分支上, 说明这几种酵母虽然分属于不同的门水平, 但相对于子囊菌类中的其他种, 他们具有更近的亲缘关系。根据 WL 培养聚类分析和分子生物学鉴定方法, 分离的 230 株最终被鉴定为 13 属 18 种, 这充分说明了香格里拉葡萄酒产区酵母菌种类的多样性。

表 2 230 株酵母菌在 WL 培养基上的形态分型结果  
Table 2 Types classed by WL nutrient medium of the 230 strains

培养类型 Type	菌落颜色及形态 Color and morphology of colonies	菌株编号 Strains No.
I	Medium green, edge cream, whole paniculate, surface: smooth, opaque, creamy	SN1-9, 13, 15; SN2-1, 2, 4, 7, 10; SN3-1-10; DS1-4, 6, 10, 11; DS2-1-3, 6, 8, 9; DS3-1-10; DW2-4, 6, 7, 10-15; DW3-1-10; DWP-8; AD1-13, 14; AD2-1, 3, 6, 9; AD3-1, 3, 5, 7, 8, 10-13, 15; ADP-4; JP1-7, 8, 10; JP2-1-4, 8, 10-15; JP3-1-10
II	Dark green, flat, surface: smooth, opaque, buttered	SN1-1, 3-5, 7, 8, 12, 14; SN2-3, 5, 6, 8, 9; SN3-5; SNP-3, 5, 6, 8, 9; AD1-1, 2, 4-12, 15; AD2-2, 4, 5, 7, 8, 10; AD3-2, 4, 6, 9, 14; ADP-1, 5, 7, 9, 10; DW1-8-10; DW2-9; DWP-1-3, 7; JP1-1-6, 9; JP2-5-7, 9; JPP-1-5, 7-10; DS1-1-3, 5, 8, 9, 12-15; DS2-4, 5, 7, 10; DSP-3-10
III	White with light green, flat colony, surface: smooth, opaque	SN1-10; DW2-1, 2, 5
IV	Cream color, surface: smooth, spherical convex, opaque, creamy	SN1-6; ADP-3
V	White, surface: surface dry, villous	SN1-11
VI	Milky white, spherical protruding, surface: smooth, opaque	SN1-2
VII	White, spherical protruding, surface: smooth, opaque	SNP-1, 2, 4; JPP-6
VIII	White with light green, spherical bulge, surface: smooth, opaque, radiate edges	SNP-7, 10; DW1-4, DW2-3
IX	Light green, spherical protruding, surface: smooth, buttered	SNP-9
X	Creamy and light green, the shape of a rounded roof, surface: smooth, creamy	DW1-1-3, 5-7; DW2-8
XI	White, surface: wrinkled, rough, central volcanic	AD1-3
XII	Cream color with red, surface: papillary protuberance, opaque	ADP-8
XIII	Smooth, opaque, radiate edges, surface: smooth, sticky, buttered	ADP-2, 6
XIV	Center green, edge transparent, spherical convex, surface: smooth, buttered	DS1-7
XV	White, spherical convex, surface: rough, villous	DWP-6
XVI	Light green, creamy, flat, surface: smooth, opaque	DWP-9, 10
XVII	Light green, spherical protruding, surface: smooth, opaque	DWP-4, 5
XVIII	White, central bulge, smooth: rough, radiate edges	DSP-1

注: P: 从果皮上分离的菌株; 1、2、3 分别代表自然发酵的前、中、后期。  
Note: P: Peel surfaces; 1, 2, 3 behind the letter represent the first, middle, and late stages of natural fermentation.

表 3 22 株代表菌株的分子鉴定结果

Table 3 Molecular identification results of 22 representative strains

菌株编号 Strain No.	片段长度 Size (bp)	相关模式菌株 Type strain	相似性 Identity (%)	GenBank 登录号 GenBank accession No.
AD3-1	581	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KY109420)	99	MF769586
SN1-9	587	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (KY109420)	99	MF769605
DW2-3	584	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (KY107853)	99	MF769587
DS2-2	588	<i>Hanseniaspora uvarum</i> (KY107853)	99	MF769604
SN1-10	426	<i>Candida oleophia</i> (KY106621)	99	MF769588
ADP-3	585	<i>Torulaspora delbrueckii</i> (KY109859)	99	MF769589
SN1-11	535	<i>Hyphopichia burtonii</i> (KY107885)	99	MF769590
SN1-2	586	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (KY110104)	99	MF769591
SNP-1	581	<i>Debaryomyces hansenii</i> (KY107560)	99	MF769592
JPP-6	580	<i>Debaryomyces hansenii</i> (KY107560)	99	MF769606
SNP-7	579	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (KY108546)	99	MF769593
DW1-4	583	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (KY108546)	99	MF769607
SNP-9	591	<i>Cryptococcus heveanensis</i> (KY108201)	99	MF769594
DW1-3	607	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> (KY110236)	99	MF769595
AD 1-3	578	<i>Pichia kluyveri</i> (KD108826)	99	MF769596
ADP-8	479	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (JX188179)	99	MF769597
ADP-2	581	<i>Rhodotorula glutinis</i> (KY109044)	99	MF769598
DS1-7	546	<i>Candida humilis</i> (KY106507)	99	MF769599
DWP-6	578	<i>Saccharomycopsis crataegensis</i> (NG-055364)	99	MF769600
DWP-9	570	<i>Candida californica</i> (EF550230)	99	MF769601
DWP-4	565	<i>Issatchenkia terricola</i> (NG-055108)	99	MF769602
DSP-1	569	<i>Pichia kudriavzevii</i> (KY108855)	99	MF769603

2.3 酿酒酵母的微卫星遗传多样性分析

2.3.1 微卫星位点的多态性和酵母群体的遗传多样性

随机选取 20 株金沙江葡萄园分离的酿酒酵母和 27 株澜沧江分离的酿酒酵母作为样本材料, 选取 11 个多态性好的微卫星位点(表 1)对它们进行遗传多样性分析, 经微卫星分析(表 4), 47 株酿酒酵母在 11 个位点上共表现出 24 个基因型, 说明在所分离的某些菌株当中具有相同的基因型。每个微卫星位点均表现出较高的多态性, 多态信息含量可以反映微卫星标记的多态性水平, 度量群体内遗传变异的高低<sup>[37]</sup>, 根据 Botstein 等<sup>[38]</sup>提出的 PIC 判断标准: 当  $PIC < 0.25$  时, 该位点为低度多态; 当  $0.25 < PIC < 0.50$  时, 为中度多态; 当  $PIC > 0.50$  时,

为高度多态。本试验中的 11 个位点的 PIC 在 0.474–0.794 之间变化, 平均值为 0.640, 其中在 YGL028C 位点为中度多态, 其他都为高度多态性位点。11 个微卫星位点共检测出 70 个等位基因, 其中在 C5 位点上检测到 10 个等位基因, 表现出较高的等位基因多样性, Sc-AAT3 位点仅检测出 3 个等位基因, 等位基因最少, 平均每个位点的等位基因数为 6.364 个。11 个位点的观测杂合度( $H_o$ )值在 0.022–0.617 之间, 平均值为 0.166, 期望杂合度( $H_e$ )介于 0.507–0.828 之间, 平均值为 0.693, 杂合度是衡量酿酒酵母群体遗传变异情况的一个参数, 杂合度越高说明群体的遗传多样性越高, 整体来看, 香格里拉葡萄酒产区所选取的 47 株酿酒酵母在一定程度上处于中等遗传多样性水平。

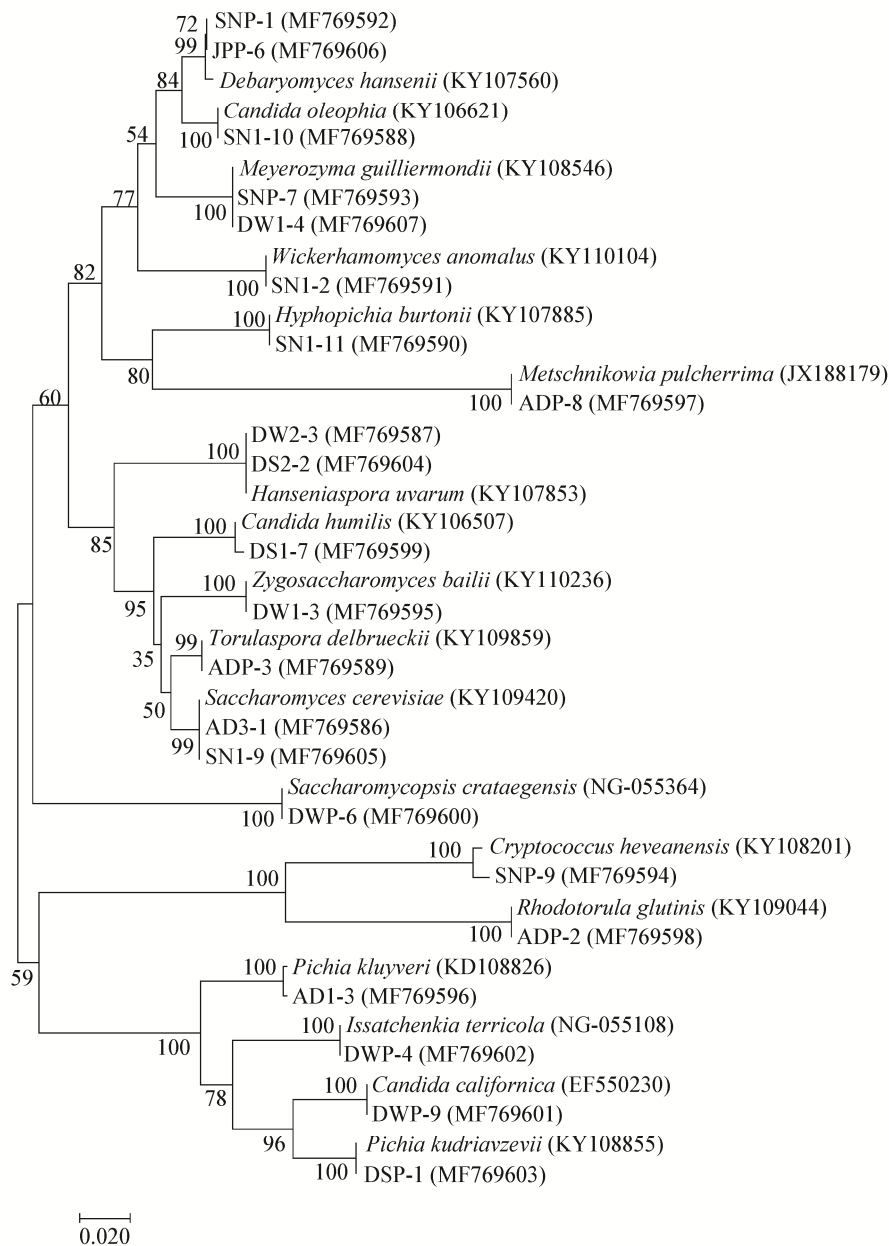


图 1 基于 26S rDNA D1/D2 区序列采用 Neighbor-Joining 法绘制的系统发育树  
Figure 1 Phylogenetic tree constructed from Neighbor-Joining analysis based on the 26S rDNA D1/D2 domain sequences

2.3.2 金沙江流域酵母群体和澜沧江流域酵母群体的遗传分化

运用软件 Popgene 32 和 Cervus 3.0 计算金沙江和澜沧江流域酵母菌群体的香农指数(Shannon index)和多态信息含量(PIC)(表 5)。金沙江群体和澜沧江群体的平均 Shannon 指数分别是 1.380 和 0.922, 11 个位点的平均多态信息含量分别是 0.659

和 0.456。Shannon 指数是反映群体遗传多样性的一个重要参数, 结果显示金沙江酵母群体遗传多样性大于澜沧江群体。 $F_{st}$  统计值  $F_{st}$  代表着群体的遗传分化程度, 根据 Wright<sup>[39]</sup> 的建议, 群体之间的  $F_{st}$  在 0.05–0.15 之间, 为中等程度的遗传分化;  $F_{st}$  在 0.15–0.25 之间, 群体间遗传分化较大; 当  $F_{st}$  为 0.25 以上时, 说明群体间存在很大的遗传差异<sup>[40]</sup>。金沙

江酵母群体和澜沧江酵母群体的平均  $F_{st}$  为 0.137, 说明 2 个群体之间存在中等程度的遗传分化。根据 Nei<sup>[41]</sup>的方法计算了 2 个酵母群体之间的遗传距离 (Genetic distance) 和遗传相似性系数 (Genetic identity), 结果表明 2 个酵母群体的遗传相似性系数为 0.534 7, 遗传距离为 0.626 0。遗传距离也是描述群体之间遗传变异程度的一个参数, 本研究金沙江和澜沧江 2 个酵母群体的遗传距离为 0.626 0, 与遗传分化指数  $F_{st}$  相吻合, 2 个群体之间出现了中等程度的遗传分化。相反, 遗传相似系数用来表示 2 个群体之间亲缘关系的远近, 遗传相似性系数越接近 1, 则表明它们之间的亲缘关系越接近, 本研究中的 2 个酵母群体的遗传相似性系数为 0.534 7, 说明了 2 个酵母群体之间的亲缘关系处于中等水平, 同时也说明 2 个群体之间出现了一定的遗传分化。

2.3.3 50 株酵母菌株的聚类分析

以菌株间的 Dice 相似系数构建 47 株野生分离酵母和 3 株商业酵母的聚类图(图 2), 说明 47 株野生分离菌株和 3 株商业菌株的亲缘关系, 从聚类图中可以看出, 菌株 AD2-1、AD2-3、AD2-6、AD2-9、AD3-11、ADP-4、SN3-1、SN2-2、DW3-3与来源于

法国 Laffort 公司生产的 F15 酿酒酵母聚在一个分支, 具有相同的基因型; SN3-10 和商业酵母 UV43 聚在一个分支, 亲缘关系较近; DS1-4 和国产本土酿酒酵母安琪酵母聚在同一个分支, 基因型相似, 其中商业酵母 F15 和 UV43 是香格里拉酿酒厂

表 4 47 株酿酒酵母在 11 个微卫星位点上的等位基因数目、观测杂合度、期望杂合度和多态信息含量

Table 4 The number of alleles, observed heterozygosity, expected heterozygosity and polymorphism information content of 47 strains of *S. cerevisiae* at the 11 selected microsatellite loci

微卫星位点 SSR locus	等位基因数 Allele number	多态信息 含量 PIC	观测杂 合度 Ho	期望杂 合度 He
C11	7	0.644	0.106	0.698
C5	10	0.728	0.149	0.767
C6	5	0.660	0.064	0.714
Sc-AAT3	3	0.574	0.022	0.656
YGL028C	6	0.474	0.152	0.507
C3	5	0.633	0.133	0.684
C4	5	0.614	0.106	0.681
C8	9	0.794	0.617	0.828
SC8132X	6	0.686	0.152	0.734
YPL009C	6	0.685	0.130	0.732
C12-SCAAC	8	0.544	0.196	0.625

表 5 11 个微卫星位点上 2 个酵母群体的 Shannon 指数和多态信息含量

Table 5 The Shannon index and polymorphism information content of two yeast populations at the selected 11 microsatellite loci

微卫星位点 SSR locus	澜沧江		金沙江	
	Lancang River		Jinsha River	
	香农指数 Shannon's index	多态信息含量 PIC	香农指数 Shannon's index	多态信息含量 PIC
C11	0.956	0.470	1.399	0.724
C5	1.097	0.519	1.729	0.716
C6	0.813	0.417	1.367	0.661
Sc-AAT3	0.844	0.435	1.077	0.535
YGL028C	0.630	0.316	1.048	0.594
C3	0.874	0.422	1.334	0.611
C4	0.813	0.417	1.235	0.555
C8	1.541	0.718	1.835	0.789
SC8132X	0.956	0.470	1.479	0.694
YPL009C	0.956	0.470	1.473	0.735
C12-SCAAC	0.659	0.358	1.203	0.630
Mean	0.922	0.456	1.380	0.659

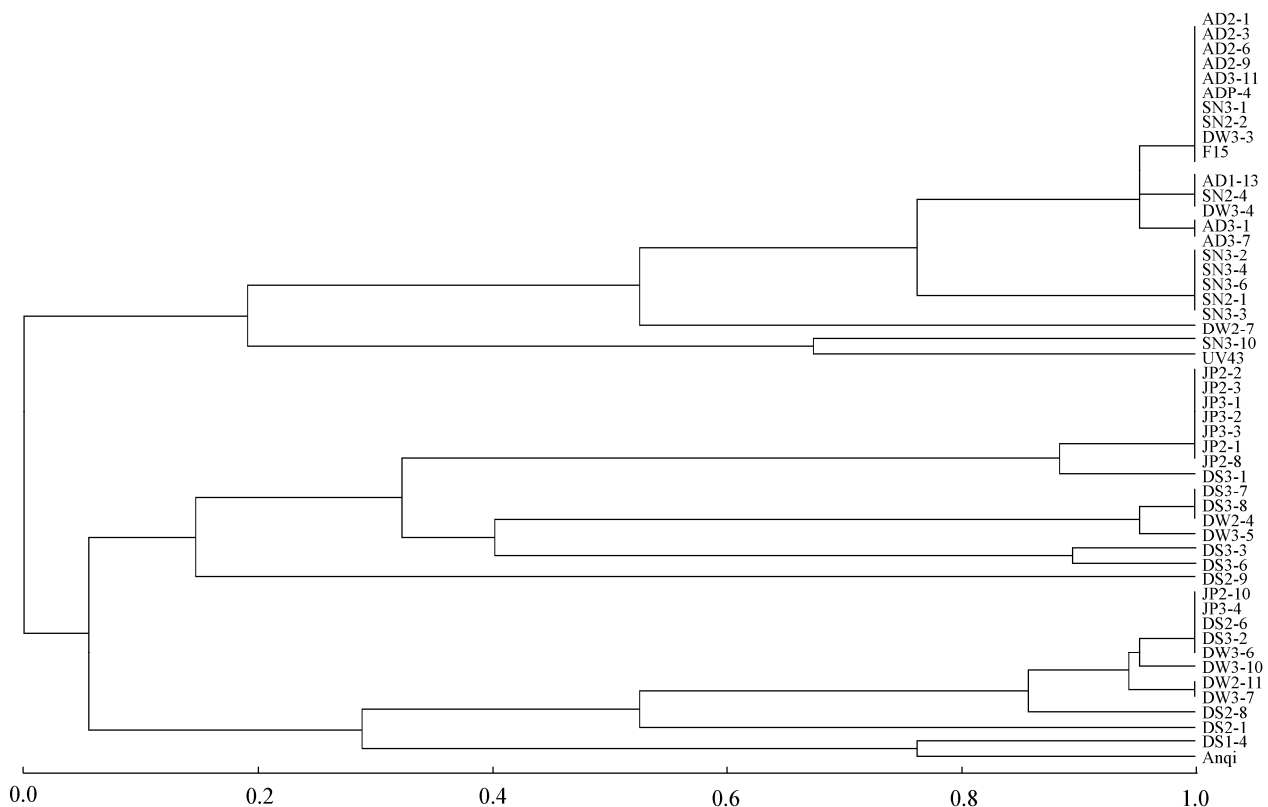


图2 以UPGMA法构建的50株酿酒酵母菌株的亲缘关系聚类图

Figure 2 Dendrogram showing genetic relationship among 50 yeast strains built by UPGMA method

的常用酵母,安琪酵母则不常用,但都能在葡萄园中找到与三者基因型相似的菌株,这些菌株可能是由葡萄的货运运输带到了葡萄园中。值得提出的是,金沙江酵母群体和澜沧江酵母群体在聚类图上并没有明显的界线,并且2个群体中某些酵母菌株具有相同的基因型,前文提到2个酵母群体具有一定的遗传分化,但考虑到人为因素,每年的葡萄集中采摘和货运运输可能会引起两地酵母群体的交流。另外,同一个葡萄园中分离的菌株更容易聚在一起,而不同葡萄园中的酵母菌株则分布在不同的分支上,考虑到金沙江和澜沧江两岸葡萄园地形和海拔差异较大,小气候丰富,可能会造成不同葡萄园中酵母群体的差异。

### 3 讨论与结论

本研究从香格里拉葡萄酒产区成熟浆果上共分离到230株野生酵母,经WL培养基培养和26S

rDNA D1/D2区序列分子鉴定,230株酵母菌共分为13属18种,其中分离到酿酒酵母(*S. cerevisiae*) 98株,占比42.60%,主要分离于自然发酵的中后期,葡萄汁有孢汉生酵母(*H. uvarum*) 97株,占比42.17%,主要分离于果皮上以及发酵前期,从分离结果来看,这2种酵母菌为所分离酵母群体中的优势种。商敬敏等<sup>[42]</sup>对香格里拉葡萄酒产区德钦地区葡萄园土壤中酵母菌多样性进行了研究,共分离到8属8种;史涛涛<sup>[43]</sup>研究了德钦冰葡萄自然发酵过程中酵母菌的动态变化,共分离到12种酵母菌。相对于前人的研究,本试验首次分离到的酵母菌有10种,分别是 *T. delbrueckii*、*H. burtonii*、*W. anomalus*、*M. guilliermondii*、*C. heveanensis*、*Z. parabaili*、*C. humilis*、*S. crataegensis*、*C. californica*、*P. kudriavzevii*。香格里拉葡萄园主要位于金沙江和澜沧江两岸的干热和干冷河谷中,地形复杂,海拔差

异大, 气候多样, 微生物资源丰富, 前人的研究和试验的结果也充分证明了香格里拉具有丰富的酵母资源多样性。

酿酒酵母的品种和用途有很多, 有专业酿造红酒、啤酒、白酒的以及专业生产面包的, 不同用途反映酵母菌株的内在遗传差异, 铁春燕等<sup>[37]</sup>利用微卫星分子标记的方法研究了不同工业酿酒酵母的种内遗传差异, 结果表明, 不同用途的酿酒酵母菌株具有不同的基因型。在葡萄园中, 酿酒酵母不同菌株间的遗传差异受葡萄酒产区气候条件、地理位置、海拔高度以及葡萄园面积等因素的影响<sup>[44]</sup>。裴颖芳<sup>[45]</sup>研究了新疆和宁夏葡萄酒产区葡萄自然发酵过程中酿酒酵母菌株的遗传多样性, 运用 Interdelta 指纹图谱和 *COXI* 基因指纹图谱的方法, 从新疆地区分离到的 59 个酵母菌株被区分为 23 个基因型, 宁夏地区分离到 290 株酿酒酵母可区分为 33 种基因型, 而且 2 个产区的酿酒酵母菌株具有明显的遗传差异性。Schuller 等<sup>[46]</sup>研究了葡萄牙西北部葡萄酒产区酵母群体的多样性, 在 3 个葡萄园中对葡萄样品进行连续 3 年的采样, 共分离到 1 620 株酿酒酵母, 用 mtDNA RFLP 的方法进行分析, 得到了 297 种图谱, 说明该产区内也具有丰富的酿酒酵母遗传多样性。香格里拉葡萄酒产区的葡萄园主要位于金沙江和澜沧江两岸的河谷地带, 虽然同位于香格里拉市境内, 但两流域间的气候特征和土壤类型都有明显的差异。用 SSR 分子标记的方法对香格里拉分离到的 47 株酿酒酵母进行遗传多样性分析, 其中金沙江流域 20 株, 澜沧江流域 27 株, 47 株酿酒酵母被分为 24 种基因型, 11 个微卫星位点共检测到 70 个等位基因, 平均多态信息含量为 0.640, 表现出一定的遗传多样性, 其中两个流域的酵母群体的平均遗传分化指数  $F_{st}$  为 0.137, 遗传相似性系数为 0.534 7, 遗传距离为 0.626 0, 说明 2 个酵母群体之间出现了中等程度的遗传分化。以 UPGMA 法构建 47 株分离菌株和 3 株商业酵母的聚类图, 发现一些葡萄园中分离的

酵母和商业酵母菌株具有相同的基因型, 推测应该是酒厂商业酵母通过人为因素或者葡萄货运运输进入到葡萄园, 然后定殖, 与野生酵母形成共生状态。

对香格里拉葡萄酒产区野生酵母进行收集整理, 有望从中筛选到发酵性能优良, 可以酿造具有本土特色的优质葡萄酒的酵母资源。李双石等<sup>[47]</sup>以河北产区赤霞珠自然发酵过程中分离的本土酵母菌株 Y14 和进口商业活性干酵母 F15 的发酵性能进行了对比研究, 结果显示, 本土优选酿酒酵母菌株 Y14 发酵酒产生香气物质种类较多。蒋文鸿等<sup>[48]</sup>从昌黎赤霞珠葡萄上分离到 4 株酿酒酵母, 从中筛选出 2 株耐受性好的酵母与 2 种商业酵母做对比发酵实验, 结果表明本土野生酵母 a 较市售的发酵葡萄酒感官评价高。Liu 等<sup>[49]</sup>首先对新疆鄯善地区的酵母菌多样性进行了研究, 从中筛选到 8 株酿酒酵母, 对其进行发酵香气分析和感官品评, 并与商业酵母 F15 作对比, 结果表明有 7 株本土酵母比 F15 产生更多的酯类物质, 本土酵母菌株 LFE1225 的感官评价最高。Šuranská 等<sup>[50]</sup>从南摩拉维亚葡萄酒产区长相思、黑皮诺葡萄浆果上和自然发酵的葡萄汁中分离出酿酒酵母, 并运用基因分型技术将不同的菌株进行区分, 最后选出一些有代表性的菌株和商业酵母 BS6 进行发酵性能比较, 结果他们更喜欢利用本土酿酒酵母去酿酒, 因为本土酿酒酵母可以加强产区特色。Senses-Ergul 等<sup>[51]</sup>在葡萄自然发酵过程中分离到 20 株酿酒酵母, 对这些酵母菌的耐受性和发酵特性进行了研究, 最终筛选到 4 株各项性能比较优良的酵母菌株, 利用这些酵母菌有望能够生产具有产地特征香气的葡萄酒。从香格里拉葡萄酒产区分离的这些酵母菌的发酵性能和香气分析有待进一步的研究, 以期利用这些酵母菌可以生产出具有显著产区特色的葡萄酒。

香格里拉是一个新兴的、具有高原特色的葡萄酒产区, 该地区的气候、地理多样性非常丰富, 蕴藏着丰富的微生物资源。香格里拉金沙江和澜沧江两岸的葡萄园中, 吸引和聚集了大量的葡萄酒相关

酵母, 本研究在 5 个葡萄园中共分离到 230 株 18 种酵母菌, 发掘这些酵母资源对于酵母菌多样性的保护和利用奠定了基础。另外, 酿酒酵母作为葡萄酒发酵过程当中最重要的一类微生物, 本土酿酒酵母更能够凸显产地葡萄酒的质量和风格特色, 所以对香格里拉葡萄酒产区酿酒酵母的遗传多样性进行研究, 可为将来优良菌株的选育提供理论基础。

## REFERENCES

- [1] Yunnan Sanjiang Flow Administration Bureau. An overview of the world natural heritage “three parallel rivers” and the protection progress[J]. Chinese Landscape Architecture, 2010, 26(5): 52-55 (in Chinese)  
云南省三江并流管理局. 世界自然遗产地——“三江并流”的概况及其保护工作的进展[J]. 中国园林, 2010, 26(5): 52-55
- [2] Chen G. Nature resources value & protection and management strategy of Yunnan Provincial Three Parallel Rivers national Park[D]. Beijing: Master’s Thesis of Beijing Forestry University, 2005 (in Chinese)  
陈虹. 云南三江并流保护区的自然资源价值和保护管理策略[D]. 北京: 北京林业大学硕士学位论文, 2005
- [3] Sun KQ. Issues and approaches of the three parallel rivers Yunnan protected areas of the world natural heritage[J]. Resources & Industries, 2010, 12(6): 118-124 (in Chinese)  
孙克勤. 世界自然遗产云南三江并流保护区存在的问题和保护对策[J]. 资源与产业, 2010, 12(6): 118-124
- [4] Luo YH, Zhou DY, Zhu RH, et al. Primary study on environment of geology and bionomics in the area of world natural inheritance-the three rivers juxtaposition[J]. Journal of Geological Hazards and Environment Preservation, 2008, 19(2): 94-97 (in Chinese)  
骆银辉, 周道银, 朱荣华, 等. 世界自然遗产——“三江”并流区地质生态环境特征及其成因初探[J]. 地质灾害与环境保护, 2008, 19(2): 94-97
- [5] Wang L, Song DS, Liang JF, et al. Macrofungus resources and their utilization in Shangri-La County, Northwest in Yunnan Province[J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2006, 15(3): 79-80 (in Chinese)  
王岚, 宋鼎珊, 梁俊峰, 等. 滇西北香格里拉县大型真菌资源及其利用现状[J]. 植物资源与环境学报, 2006, 15(3): 79-80
- [6] Li SL, Chen YW, Yang LY, et al. A study on yeasts of Yunnan II: yeasts of Baima snow-ountain Natural Reserve[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences), 2002, 24(6): 469-470,477 (in Chinese)  
李绍兰, 陈有为, 杨丽源, 等. 云南酵母菌的研究 II: 白马雪山自然保护区的酵母菌[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2002, 24(6): 469-470,477
- [7] Zi JW, Zi YH, Tang H, et al. Distribution of soil microbes and the results of drug sensitivity in the mountains of Shangri-La[J]. Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China, 2015, 25(10): 1150-1153 (in Chinese)  
子建文, 资云海, 唐辉, 等. 香格里拉地区山脉土壤微生物分布及药敏结果[J]. 西南国防医药, 2015, 25(10): 1150-1153
- [8] Mao RZ, Zhang GT, Du F, et al. Study on the relationship between the berry quality composition and altitude gradient for ‘Rose Honey’ in the Widely Shangri-La Valley[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(3): 283-297 (in Chinese)  
毛如志, 张国涛, 杜飞, 等. 大香格里拉河谷区海拔梯度变化与‘玫瑰蜜’葡萄品质形成的关系[J]. 果树学报, 2016, 33(3): 283-297
- [9] Belin JM. Recherches sur la repartition des levures à la surface de la grappe de raisin[J]. Vitis, 1972, 11: 135-145
- [10] Capece A, Granchi L, Guerrini S, et al. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from two italian wine-producing regions[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1018
- [11] Schuller D, Cardoso F, Sousa S, et al. Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different grape varieties and winemaking regions[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e32507
- [12] Kántor A, Kačániová M, Kluz M. Natural microflora of wine grape berries[J]. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2015, 4(S1): 32-36
- [13] Garofalo C, Tristezza M, Grieco F, et al. From grape berries to wine: population dynamics of cultivable yeasts associated to “Nero di Troia” autochthonous grape cultivar[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32(4): 59
- [14] Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene[J]. American Journal of Human Genetics, 1989, 44(3): 397-401
- [15] Goodisman MAD, Matthews RW, Crozier RH. Hierarchical genetic structure of the introduced wasp *Vespa germanica* in Australia[J]. Molecular Ecology, 2001, 10(6): 1423-1432
- [16] An HS, Lee JW, Kim HY, et al. Genetic differences between wild and hatchery populations of Korean spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) inferred from microsatellite markers[J]. Genes & Genomics, 2013, 35(5): 671-680
- [17] Fang W, Cheng H, Duan Y, et al. Genetic diversity and relationship of clonal tea (*Camellia sinensis*) cultivars in China as revealed by SSR markers[J]. Plant Systematics and Evolution, 2012, 298(2): 469-483
- [18] Karakousis A, Barr AR, Chalmers KJ, et al. Potential of SSR markers for plant breeding and variety identification in Australian barley germplasm[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2003, 54(12): 1197-1210
- [19] Moloney C, Griffin D, Jones PW, et al. Development of diagnostic markers for use in breeding potatoes resistant to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3 using germplasm derived

- from *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* CPC 2802[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120(3): 679-689
- [20] Brown MJF, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P. Queen-controlled sex ratios and worker reproduction in the bumble bee *Bombus hypnorum*, as revealed by microsatellites[J]. Molecular Ecology, 2003, 12(6): 1599-1605
- [21] Belamkar V, Selvaraj MG, Ayers JL, et al. A first insight into population structure and linkage disequilibrium in the US peanut minicore collection[J]. Genetica, 2011, 139(4): 411-429
- [22] Pérez MA, Gallego FJ, Hidalgo P. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 205(2): 375-378
- [23] Gallego FJ, Pérez MA, Núñez Y, et al. Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Food Microbiology, 2005, 22(6): 561-568
- [24] Pereira L, Duarte FL, Ramos PT, et al. Populational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different appellations of origin and grape varieties by microsatellite analysis[A]//Proceedings of the 12th International Congress on Yeast[C]. Ukraine: ICY, 2008: 1029
- [25] Zhang LY, Huang YZ, Liu YL. Genetic diversity analysis of *saccharomyces cerevisiae* strains by microsatellite marker technique[J]. Food Science, 2014, 35(1): 130-133 (in Chinese)  
张留燕, 黄英子, 刘延琳. 利用微卫星标记分析酿酒酵母的遗传多样性[J]. 食品科学, 2014, 35(1): 130-133
- [26] Schuller D, Pereira L, Alves H, et al. Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments[J]. Yeast, 2007, 24(8): 625-636
- [27] Cavazza A, Grando MS, Zini C. Rilevazione della flora microbica dimostie vini[J]. Vigne vini, 1992, 9: 17-20
- [28] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1997, 35(5): 1216-1223
- [29] Legras JL, Ruh O, Merdinoglu D, et al. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 102(1): 73-83
- [30] Ezeronye OU, Legras JL. Genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from palm wine in eastern Nigeria. Comparison with other African strains[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(5): 1569-1578
- [31] Franco-Duarte R, Umek L, Zupan B, et al. Computational approaches for the genetic and phenotypic characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast collection[J]. Yeast, 2009, 26(12): 675-692
- [32] Vaudano E, Garcia-Moruno E. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis[J]. Food Microbiology, 2008, 25(1): 56-64
- [33] Jubany S, Tomasco I, de León IP, et al. Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. FEMS Yeast Research, 2008, 8(3): 472-484
- [34] Yang Y, Xu YW, Xue JX, et al. Validate the identification effect of WL nutrient agar on wine yeast[J]. Journal of Microbiology, 2007, 27(5): 75-78 (in Chinese)  
杨莹, 徐艳文, 薛军侠, 等. WL 营养琼脂对葡萄酒相关酵母的鉴定效果验证[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 75-78
- [35] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1998, 73(4): 331-371
- [36] Yang XF, Su L, Liu SW. Using WL medium to identify related yeasts in wine fermentation period[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2006(4): 4-7 (in Chinese)  
杨雪峰, 苏龙, 刘树文. 利用 WL 营养培养基鉴定葡萄酒中的相关酵母菌[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2006(4): 4-7
- [37] Tie CY, Hu Y, Zhang L, et al. Genetic analysis of industrial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) based on sequencing of 26S rRNA gene D1/D2 domain and microsatellite markers[J]. Mycosystema, 2014, 33(4): 894-904 (in Chinese)  
铁春燕, 胡芸, 张梁, 等. 利用 26S rDNA D1/D2 区序列和微卫星标记分析各种工业酿酒酵母的种内遗传差异[J]. 菌物学报, 2014, 33(4): 894-904
- [38] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331
- [39] Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating[J]. Evolution, 1965, 19(3): 395-420
- [40] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers[J]. Molecular Ecology, 2002, 11(2): 155-165
- [41] Nei M. Molecular population genetics and evolution[A]//Neuberger A, Tatum EL. Frontiers of Biology[M]. North Holland: Amsterdam-Oxford, 1975: 1-288
- [42] Shang JM. Study on identification and tolerance of wine-related yeast from Penglai and Deqin[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Polytechnic University, 2012 (in Chinese)  
商敬敏. 蓬莱、德钦产地葡萄酒相关酵母的分离鉴定及其耐受性研究[D]. 济南: 山东轻工业学院硕士学位论文, 2012
- [43] Shi TT. Identification of yeast population dynamics of spontaneous fermentation associated with ice grapes in Deqin wine region, Yunnan and Screening of *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Jinan: Master's Thesis of Qilu University of Technology, 2013 (in Chinese)  
史涛涛. 云南德钦产区冰葡萄自然发酵过程中酵母的动态变化以及优良酿酒酵母的筛选[D]. 济南: 齐鲁工业大学硕士学位论文, 2013
- [44] Valero E, Cambon B, Schuller D, et al. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts[J]. FEMS Yeast Research, 2007, 7(2): 317-329
- [45] Pei YF. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains

- during the spontaneous fermentations of wine from XinJiang and NingXia regions[D]. Xianyang: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2009 (in Chinese)
- 裴颖芳. 新疆和宁夏地区葡萄自然发酵中酿酒酵母菌株遗传多样性分析[D]. 咸阳: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2009
- [46] Schuller D, Alves H, Dequin S, et al. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 51(2): 167-177
- [47] Li SS, Li B, Li WL, et al. Application of indigenous yeast strain in the wine making[J]. Food Science and Technology, 2012, 37(8): 87-91 (in Chinese)
- 李双石, 李淳, 李文蕾, 等. 天然酵母菌株在葡萄酒酿造中的应用研究[J]. 食品科技, 2012, 37(8): 87-91
- [48] Jiang WH, Yan B, Tao YS. Isolation and screening of *Saccharomyces cerevisiae* from grape harvested in Changli[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(12): 202-206, 209 (in Chinese)
- 蒋文鸿, 严斌, 陶永胜. 昌黎赤霞珠葡萄相关酿酒酵母的分离与筛选[J]. 食品工业科技, 2014, 35(12): 202-206, 209
- [49] Liu N, Qin Y, Song YY, et al. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains in Shanshan County (Xinjiang, China) for winemaking and their aroma-producing characteristics[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(11): 1781-1792
- [50] Šuranská H, Vránová D, Omelková J. Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(1): 181-190
- [51] Senses-Ergul S, Ozbas ZY. Characterization of some indigenous *Saccharomyces cerevisiae* isolates obtained during vinification of 'Kalecik Karasi' and 'EMIR' grapes grown in Central Anatolia[J]. Ciência E Técnica Vitivinícola, 2016, 31(2): 51-62
- ~~~~~

## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 本刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者专业和研究背景的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。