

## 葡萄果粒表皮酵母菌多样性研究

王 慧<sup>1</sup> 张立强<sup>1</sup> 刘天明<sup>1\*</sup> 王庆国<sup>1</sup> 谢 荣<sup>2</sup>

(1. 山东轻工业学院 济南 250353)  
(2. 甘肃农业大学农学院 兰州 730070)

**摘要:** 从新疆、甘肃、陕西、宁夏、山东主要酿酒葡萄产区收集葡萄果粒并分离得到酵母 258 株, 利用 26S rDNA 的 D1/D2 区序列分析并结合形态学、生理学特征对这些菌株进行了分类学研究, 探讨了这些地区葡萄果粒表皮酵母的物种多样性及其分布。共鉴定出 13 属 26 种, 其中优势属为汉逊酵母属 *Hanseniaspora* (5 种), 假丝酵母属 *Candida* (4 种), 毕赤酵母属 *Pichia* (4 种) 和伊萨酵母属 *Issatchenkia* (2 种)。对分离自不同地域的同种内不同菌株进行了 D1/D2 序列分析比较, 以探讨不同地理起源地酵母种内序列稳定性及其变异。

**关键词:** 酵母菌, 多样性, 26S rDNA D1/D2, 序列分析

## Species Diversity of Yeasts on the Surface of Grape

WANG Hui<sup>1</sup> ZHANG Li-Qiang<sup>1</sup> LIU Tian-Ming<sup>1\*</sup> WANG Qing-Guo<sup>1</sup> XIE Rong<sup>2</sup>

(1. College of Food and Biologic Engineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250353)  
(2. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070)

**Abstract:** 258 yeast strains were isolated from the surface of grapes, collected from wine grape cultivation areas in Xinjiang, Gansu, Shaanxi, Ningxia and Shandong Provinces. These strains were identified mainly based on the 26S rDNA D1/D2 domain sequence analysis and morphological and physiological characterization. Among them, 26 species belonging to 13 genera were recognized. The dominant genera identified were *Hanseniaspora* (5 species), *Candida* (4 species), *Pichia* (4 species) and *Issatchenkia* (2 species). D1/D2 sequence variation were compared among the strains of the same species from different areas.

**Keywords:** Grape yeast, Species diversity, 26S rDNA D1/D2 domain, Sequence analysis

在葡萄酒生产中, 酵母作为主要的发酵微生物不仅对葡萄酒产量、质量和发酵生产管理影响很大, 而且对葡萄酒特色和风格的形成有重要贡献。在多年种植葡萄的园区, 有多种天然酵母与其寄主相伴而生, 经长期的自然选择和进化演变, 逐渐孕育了一批适于当地环境条件和葡萄品种的优势天然酵母, 时常在葡萄酒生产中, 随同原料进入发酵罐, 参与

酒的酿造过程, 对中国特色的产地葡萄酒的品质和风格形成发挥了不可替代的重要作用。宁夏贺兰山, 甘肃武威, 新疆吐鲁番、石河子, 山东胶东半岛是中国葡萄栽培的最适生态区, 也是酿酒葡萄原料和葡萄酒的主要生产基地。这些地域葡萄果粒上附生酵母菌种的构成研究国内至今未见报道。基于此, 我们对新疆、甘肃、陕西、宁夏, 山东的主要酿酒葡

萄产地的酵母资源进行了系统的收集和分类鉴定。

酵母菌的常规鉴定主要依赖于形态和生理特征,然而,这些特征均是表型性状,且会随着环境的变化有所改变,造成菌株鉴定结果的不稳定性<sup>[1]</sup>。随着DNA序列分析技术的日趋成熟和简易化,rRNA基因(rDNA)及其转录间区(ITS)的序列分析已经被广泛应用于酵母菌的分类鉴定以及系统学研究。Kurtzman和Robnett<sup>[2]</sup>以及Fell<sup>[3]</sup>等的研究表明大亚基rRNA基因(26S rDNA)中的D1/D2区域能将绝大部分分子囊菌酵母和担子菌酵母的种区分开来,而种内不同菌株间D1/D2区域序列差异一般在1%以内,碱基差异在1%以上则可能代表不同的种。几乎所有已知酵母菌种模式菌株的26S rDNA D1/D2区和大多数种模式菌株的ITS序列已经被测定并公布于GenBank/EMBL/DDBJ等国际核酸序列数据库,这使酵母菌的分类鉴定更加快捷和准确。本研究利用26S rDNA D1/D2序列分析,并结合形态及生理学特征,探讨了中国主要酿酒葡萄产区葡萄果粒上酵母菌物种的多样性及其分布。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:**于2006年8~10月在新疆吐鲁番、石河子,甘肃武威黄羊河、宁夏贺兰山东麓、陕北以及山东烟台酿酒葡萄产区采集成熟的葡萄果粒或压榨汁。样品运抵实验室后,立即分离酵母菌。

**1.1.2 菌株的分离和保藏:**菌种分离采用酵母菌富集培养基<sup>[4]</sup>和分离纯化培养基<sup>[5]</sup>。菌株分离方法:称取果皮1.0 g,加入50 mL灭菌的液体富集培养基(加30 ppm亚硫酸钠)中,25℃摇床培养48 h。不同梯度稀释后涂布于分离纯化平板上,25℃培养48 h,经多次划线纯化,获得单菌落。纯化的菌落保藏于-70℃超低温冰箱中备用。

### 1.2 形态学观察

根据酵母菌分类学鉴定标准方法对供试菌株进行形态学观察<sup>[6]</sup>。

### 1.3 26S rDNA D1/D2 基因的扩增及测序

**1.3.1 基因组总DNA的提取:**采用玻璃珠法<sup>[7]</sup>。实验所用试剂均购自TaKaRa公司。

**1.3.2 PCR扩增与测序:**正向引物NL1(5'-GCA-TATCGGTAAGCGGAGGAAAAG-3'),反向引物NL4(5'-GGT CCGTGTTC AAGACGG-3')。PCR扩增程序:95℃,5 min;94℃,1 min,53℃,8 min,72℃,1 min 20 s)共36个循环;72℃,10 min。电泳确认目

标产物有无及效果。

**1.3.3 PCR扩增产物的测序:**所得PCR产物经纯化送交北京华大基因公司测序。

### 1.4 酵母菌的多样性分析

对所测菌株的26S rDNA D1/D2序列图谱校正,提交GenBank,并在GenBank/EMBL/DDBJ等国际核酸序列数据库中进行同源序列搜索(BLAST search),以比较测试菌株与酵母菌种模式菌株对应序列的相似程度,并结合形态学及生理学特征分析对其做出鉴定。菌株间的序列比较用Clustal-X软件完成<sup>[8]</sup>。用Neighbor-Joining方法进行分子系统学分析<sup>[9]</sup>,并进行1000次bootstrap统计学检验<sup>[10]</sup>,用TreeView软件显示系统树<sup>[11]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 酵母菌类群

从新疆、甘肃、宁夏、陕西、山东的多个酿酒葡萄产区采集得到葡萄果粒(或压榨汁)99份,共分离得到酵母258株(表1)。形态学特征将分离菌株归类,选出每类中的代表性菌株对其进行26S rDNA D1/D2区序列分析。结果表明,分离菌株属于13个不同的属:有孢汉逊酵母属*Hanseniaspora*,伊萨酵母属*Issatchenkia*,酿酒酵母属*Saccharomyces*,毕赤酵母属*Pichia*,假丝酵母属*Candida*,有孢圆酵母属*Torulaspota*,梅奇酵母属*Metschnikowia*,红酵母属*Rhodotorula*,克勒克酵母属*Kloeckera*,隐球酵母菌属*Cryptococcus*,德巴利酵母属*Debaryomyces*,丝孢酵母属*Trichosporon*,拟威尔酵母属*Williopsis*,共26种(表2)。这一结果显示,葡萄果粒表皮上具有丰富的酵母资源。

从表1和表2可见,在5个地域中,山东收集及

表1 酿酒葡萄产区采集地点及采集样品、分离菌株、属和种数量

Table 1 Sampling locations in wine grape cultivation areas and numbers of samples collected, yeast strains isolated, genera and species identified

采集地点 Location collected	数量(Number)			
	样品 (Samples collected)	分离菌株 (Strains isolated)	种 Species	属 Genera
山东	26	83	15	9
甘肃	21	58	21	10
新疆	15	30	17	10
陕西	19	49	18	10
宁夏	18	38	19	10
总计	99	258	26	13

表 2 酿酒葡萄产区酵母种类及其地理分布  
Table 2 Distribution of yeast species in wine grape cultivation areas in China

种名 Species	山东 Shandong	甘肃 Gansu	陕西 Shaanxi	宁夏 Ningxia	新疆 Xinjiang
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	+	+	+	+
<i>H. clermontiae</i>	+	+	+	+	+
<i>H. vineae</i>	+	+	+	+	+
<i>H. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+
<i>H. opuntiae</i>	-	+	-	-	-
<i>Issatchenkia orientalis</i>	+	+	+	+	+
<i>I. terricola</i>	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	+	+	-
<i>Pichia guilliermondii</i>	+	+	+	+	+
<i>P. galeiformi</i>	-	+	+	+	+
<i>P. fermentans</i>	+	+	+	+	+
<i>P. kluyveri</i>	-	+	+	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+	+	+
<i>C. stellata</i>	+	+	+	+	+
<i>C. atmosphaerica</i>	-	+	-	+	-
<i>C. ethanolica</i>	-	-	-	+	-
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	+	+	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	+	+	+	-
<i>Rh. kratochvilovae</i>	-	-	-	-	+
<i>Kodamaea ohmeri</i>	-	-	+	-	-
<i>Cryptococcus uzbekistanensis</i>	-	-	-	-	+
<i>Cryptococcus laurentii</i>	+	+	+	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	-	+	+
<i>Trichosporon asahii</i>	-	+	-	-	-
<i>Williopsis californica</i>	-	-	-	-	+

注：“+”表示该地区有分布；“-”表示未分离到。

Note: “+” refers to the distribution area; “-” refers to not identified.

分离的菌株最多，但鉴定出的属、种最少；甘肃、新疆、陕西和宁夏鉴定出的酵母菌属数为 10，同时，甘肃种的数量最多；新疆分离的菌株数目最少，鉴定的属数量并不少于其他省份，有 2 种酵母菌只在新疆分离得到。

在鉴定出的 13 个属中，*Hanseniaspora*、*Pichia*、*Candida*、*Issatchenkia* 这 4 个属为酿酒葡萄产区的优势属，有着广泛的分布，其中，种数最多的是 *Hanseniaspora* 属，有 5 个种，最为常见的种是 *H. uvarum*、*H. vineae* 和 *H. guilliermondii*，它们在各地都有分布。属于 *Candida* 和 *Pichia* 的种也有 4 个，其中 *Candida tropicalis*、*Candida stellata* 和 *Pichia guilliermondii* 最常见。*Issatchenkia* 有两个种，在各地地区均有分布。属于 *Rhodotorula* 的种也有两个，只

有 *Rhodotorula mucilaginosa* 在四个地区均有发现，而 *Rh. kratochvilovae* 仅在新疆分离得到。还有另外 7 个属各分离到一个种。其中 *Metschnikowia pulcherrima*、*Torulaspora delbrueckii* 和 *Cryptococcus laurentii* 是常见的种，在各地均有分布。除了新疆，在 4 个地域只鉴定到 5 株酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*，说明葡萄果粒表皮不是酿酒酵母菌的主要来源(表 2)<sup>[12]</sup>。

## 2.2 酵母菌多样性分析

按照 Kurtzman 和 Robnett<sup>[2]</sup>和 Fell<sup>[3]</sup>等的研究，以 26S rDNA D1/D2 序列相似性低于 99% 作为不同的操作分类单元。供试菌株与发表的模式菌株在 D1/D2 序列同源相似率比较后，结合形态及生理学特征确定的分类地位如表 3 所示。两株序列相似率为 100%，23 株

为 99%, 还有 1 株小于 99%。序列登录于 GenBank, 详见表 3 中的 GenBank accession numbers。

### 2.3 同种不同地域酵母菌株的序列差异

选取 *Hanseniaspora uvarum* 中的 5 株供试菌株

进行 26S rDNA D1/D2 序列的分析比较, 在 GenBank 等数据库中进行相似性搜索, 选定其中同源性较高的相关菌株并与其构建系统发育树(图略), 对种内菌株 D1/D2 区差异分析见表 4。

表 3 分离菌株的序列分析结果  
Table 3 Yeasts identified by sequence analysis of the 26S rDNA D1/D2 region

属 Genera	种 Species	菌株 Strain	与模式菌株的序列相似性 Sequence similarity to type strain	GenBank accession number
<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. uvarum</i>	ZYMLZ II	99%	EF550182
	<i>H. clermontiae/meyri</i>	HYHH	99%	EF550176
	<i>H. vineae</i>	ZYBS	98 %	EF550178
	<i>H. guilliermondii</i>	XJXP1	99%	EF550190
	<i>H. opuntiae</i>	HTM1A	99%	EU004082
<i>Issatchenkia</i>	<i>I. Orientalis</i>	GSDC1-1	99%	EF585438
	<i>I. terricola</i>	HYHP	99%	EF585439
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	ZYFJZ II	99%	EF550181
<i>Pichia</i>	<i>P. guilliermondii</i>	XJ48B	99%	DQ869073
	<i>P. galeiformis</i>	XJKEL3	99 %	EF644453
	<i>P. fermentans</i>	XJ3C	100%	EF585441
	<i>P. kluyveri</i>	YQYHY	99%	EF585435
<i>Candida</i>	<i>C. tropicalis</i>	XJTG2	99%	EF550184
	<i>C. stellata</i>	GSMRZ1	99%	EF550186
<i>Torulaspora</i>	<i>C. atmosphaerica</i>	NX7B	99%	EF571843
	<i>C. ethanolica</i>	NX7E	99%	EF571842
	<i>T. delbrueckii</i>	ZYY73 I	99%	EF550175
<i>Metschnikowia</i>	<i>M. Pulcherrima</i>	HYHBY1	99%	EF550188
<i>Rhodotorula</i>	<i>Rh. mucilaginosa</i>	SHANXI	100%	EF585440
<i>Kloeckera</i>	<i>Rh. kratochvilovae</i>	XJ54D	99%	DQ778989
	<i>Kodamaea. ohmeri</i>	YQYCHIXZ	99%	EF585442
<i>Cryptococcus</i>	<i>C. uzbekistanensis</i>	XJ48A	99%	DQ869064
	<i>C. laurentii</i>	HYHHUI	99%	EU004083
<i>Debaryomyces</i>	<i>D. hansenii var fabryi</i>	XJ54A	99%	DQ869068
<i>Trichosporon</i>	<i>T. asahii</i>	YQYMLZ	99%	EU004084
<i>Williopsis</i>	<i>W. californica</i>	XJ54C	99%	DQ869077

注: 菌株缩写含义 ZY:张裕; HYH:甘肃黄羊河; GSDC:甘肃宕昌; NX: 宁夏; YQY:宁夏玉泉营; XJ:新疆

Note: Abbreviations of strains ZY:Zhangyu; HYH:Gansu Huangyanghe; GSDC:Gansu Dangchang; NX:Ningxia.; YQY:Ningxia; Yuquanying; XJ:Xinjiang

表 4 *Hanseniaspora uvarum* 种内菌株间 26S rDNA D1/D2 区碱基差异分析表  
Table 4 Base analysis of the same species based on 26S rDNA D1/D2 of *Hanseniaspora uvarum*

菌株编号 Strain no.	GenBank accession number	差异碱基位点 The positions with base difference						
		44	57	110	147	220	484	574
HTMLZ1A	EU004082	C	T	T	-	T	C	-
ZYMLZ2	EF55018	C	A	C	-	C	C	-
YQYMLZC	EF585433	T	A	T	C	T	T	-
GSKE2	EU004081	C	A	T	-	T	C	-
XJYP2	EF644480	C	A	T	-	T	T	T
NRRL Y-1614	U84229	C	A	T	-	C	C	T

注: “-”表示此处碱基空缺。模式菌株: NRRL Y-1614; 供试菌株 ZY: 张裕; GS: 甘肃; HT: 甘肃; YQY: 宁夏玉泉营; XJ: 新疆

Note: “-” refers to base lack. Type strain: NRRL Y-1614; ZY: Zhangyu; GS: Gansu; HT: Gansu; YQY: Ningxia Yuquanying; XJ: Xinjiang

经系统发育树分析, 供试菌株 ZYMLZ2、HTMLZ1A、GSKE2 与模式菌株 U84229 聚为一支, YQYMLZC 与 YP2 聚为一支。其中, ZYMLZ2 与模式菌株亲缘关系最近, 而 YP2 距离最远。从地理起源上看, 甘肃的两个菌株聚在了一起, 宁夏和新疆的菌株聚在一起。

由表 4 可知, 供试菌株 HTMLZ1A 与模式菌株有 3 处碱基不同, 碱基差异率为 0.55%, 菌株 ZYMLZ2、GSKE2 和 YP2 与模式菌株各有 2 处不同, 差异率为 0.36%, YQYMLZC 与模式菌株有 5 处不同, 差异率为 0.9%。由此可见, 同种内菌株之间 26S rDNA D1/D2 仍存在碱基差异, 差异一般存在于 D1/D2 区的开头和末尾。这些差异可能与酵母菌因适应不同生态环境而发生的自然变异有关。

### 3 讨论

本研究考察了山东烟台、宁夏贺兰山东麓、甘肃武威、新疆吐鲁番和陕西北部等地区的葡萄果粒表皮酵母菌资源。结果表明在上述各个地域酵母菌种构成基本相似。四个优势属 *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Issatchenkia* 在各地都有广泛分布。而 *Kodamaea ohmeri* 仅在陕西分离到, *Trichosporon asahii* 和 *Hanseniaspora opuntiae* 只在甘肃分离到, *Williopsis californica* 和 *Rhodotorula kratochvilovae* 只在新疆得到。各采集地的种类分布也具有一定的相似性。各地均可鉴定到 *Issatchenkia* 和 *Cryptococcus* 属的所有种。在 4 个地域均有发现的种有: *Saccharomyces cerevisiae*、*Cryptococcus laurentii* 和 *Rhodotorula mucilaginosa*。此外, 还有 1 个种在 3 省有分布。

本研究对属于同种分离自不同地域的菌株进行了 D1/D2 序列比较分析。以广布种葡萄酒有孢汉逊酵母 *Hanseniaspora uvarum* 为代表分析, 表明了不同地区的菌株之间具有相同或者相似的序列。4 个菌株与模式菌株同源性均在 99% 以上, 其微小差异反映了菌株间亲缘关系密切而又各不相同。对与模式菌株碱基序列同源性为 98% 的供试菌株 ZYBS, 结合形态、生理生化特征进一步确认了分类地位, 使鉴定结果准确、可靠。此外, 对分离菌株的酿酒

特性试验正在研究之中, 从而为各生态区酵母菌种资源合理利用提供理论依据, 并在此基础上筛选出适应各产地葡萄酒生产需要的酵母菌种构成。

### 参 考 文 献

- [1] 白逢彦, 梁慧燕, 贾建华. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义. 菌物系统, 2002, **21**(1): 27-32.
- [2] Kurtzman C, Robnett C. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts for analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, **73**(4): 331-371.
- [3] Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(3): 1351-1371.
- [4] 周德庆. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 2002, pp.98.
- [5] 冯克宽, 王明谊, 曾家豫. 酵母菌的分离及鉴定. 西北师范大学学报(自然科学版), 1997, **33**(2): 56-59.
- [6] Yarrow D, Kurtzman CP, Fell J W. The Yeasts, a Taxonomic Study, 4rd edn. *Elsevier Science Publishers, Amsterdam*, 1998, pp.77-100.
- [7] 奥斯柏 F, 金斯顿 R.E., 塞德曼 J.G., et al., 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998, pp.522-523.
- [8] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(24): 4876-4882.
- [9] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**(4): 406-425.
- [10] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, **39**(4): 783-791.
- [11] Page RDM. Review: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci*, 1996, **12**(4): 357-358.
- [12] Ciani M, Mannazu I, Marinangeli P, et al. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, **85**(2): 159-164