

# DNA 分子标记技术在酿酒酵母菌株遗传多样性分析中的应用

裴颖芳, 刘延琳

(西北农林科技大学葡萄酒学院/陕西省葡萄-葡萄酒工程中心, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 本文介绍了 RAPD、mtDNA-RFLP、微卫星 DNA (microsatellite)、Interdelta 指纹图谱以及线粒体 DNA COX1 基因指纹图谱等 5 种 DNA 分子标记技术的方法和原理及其优缺点, 同时探讨了 DNA 分子标记技术在国内、外酿酒酵母菌株区分中的应用状况与前景。

**关键词:** 酿酒酵母菌株; RAPD; mtDNA-RFLP; interdelta 指纹图谱; COX1 基因; 微卫星 DNA

## Application of DNA Molecular Markers in Genetic Diversities of *Saccharomyces cerevisiae* Strains

PEI Ying-fang, LIU Yan-lin

(College of Enology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry/Shaanxi Engineering Research Center for Viti-Viniculture, Yangling 712100, Shannxi)

**Abstract:** The basic principles of the methods concerning five DNA molecular markers including random amplified polymorphic DNA (RAPD), fragment length polymorphism of mitochondrial DNA (mtDNA-RFLP), microsatellite DNA, interdelta fingerprinting and mtDNA COX1 gene fingerprinting were introduced in this paper, including illustration of both the advantages and the disadvantages of each method. Besides, the application and prospect of these DNA molecular markers in differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains were discussed and reviewed.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae* strains; RAPD; mtDNA-RFLP; interdelta fingerprinting; COX1 gene; micro-satellite DNA

## 0 引言

遗传标记 (genetic markers) 在种质资源的遗传多样性研究和育种工作中有着十分重要的地位。目前, 应用较为广泛的遗传标记有形态标记 (morphological markers)、细胞标记 (cytological markers)、生化标记 (biological markers) 和分子标记 (molecular markers) [1]。前 3 种标记都是对基因表达结果的间接反映, 标记数目有限, 多态性较差, 易受环境条件的影响 [2]。而 DNA 分子标记是直接在 DNA 分子上检测生物间的差异, 是 DNA 水平遗传变异的直接反映。DNA 分子标记不受环境与基因表达与否的限制, 数量极多, 遍及整个基因组, 多态性高, 遗传稳定 [3]。所以, DNA 分子标记从它诞生之日起, 就引起了生物学家极大的兴趣, 在酿酒酵母菌株的遗传多样性研究

中也发挥着重要作用, 成为国外近年来的研究热点。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 广泛应用于食品发酵 [4-8]、医药 [9] 和环保 [10] 等领域。在工业生产的纯种发酵时代, 要求能在菌株水平实现发酵的微生物学控制, 如在食品发酵中, 为了监测酿酒酵母菌株变化 [11-13], 在医药中, 为了确保酿酒酵母菌种种质的纯度 [9, 14], 在葡萄酒酿造中, 发酵过程的微生物学监控、发酵优势菌的检测、不同地理起源的酿酒酵母菌株的甄别等, 都需要进行酿酒酵母菌株区分 [15-17], 通过菌株区分而揭示其遗传多样性。常规的遗传和生理生化手段难以达到菌株水平的区分, 必须借助于 DNA 分子标记方法来完成。目前, 应用于酿酒酵母菌株区分的最广泛、最有应用前景的 DNA 分子标记技术有: 随机扩增多态性 DNA 标记法 (RAPD) [18-23]、线粒体 DNA 限制性片段长度多态性分析 (mtDNA-

收稿日期: 2009-07-23; 接受日期: 2009-09-25

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目 (nycytx-30)、国家“863”计划专项 (2007AA10Z314)

作者简介: 裴颖芳, 硕士研究生。E-mail: yingfangpei@126.com。通信作者刘延琳, 教授, 博士。E-mail: lylsun@yahoo.com.cn

RFLP)<sup>[24-26]</sup>、微卫星 DNA 标记法<sup>[27-31]</sup>、Interdelta 指纹图谱法<sup>[32-37]</sup>以及 COX1 基因指纹图谱法等<sup>[38]</sup>。本文介绍这几种 DNA 分子标记方法的原理及优缺点,并探讨其在酿酒酵母菌株区分中的应用状况与前景。

## 1 RAPD 标记法

RAPD 技术是 1990 年由美国科学家 Williams 在 PCR 技术的基础上发展起来的。RAPD 采用随机的寡聚核苷酸为引物,以不同菌株的基因组 DNA 内的核苷酸序列的不同,通过 PCR 扩增反应,产生不同的 PCR 扩增产物,显示出不同菌株之间的差异,因此可以应用于酿酒酵母的分类分型<sup>[39]</sup>。由于其可检测到生物体的整个基因组 DNA,大大简化了技术过程和工作强度,在菌种的鉴定、基因遗传图谱制作、数量性状基因研究、自然群体中遗传变异及种间杂交的研究、流行病学调查和菌株鉴别上均发挥了重要的作用<sup>[13,19,40-44]</sup>。

### 1.1 RAPD 技术在酿酒酵母菌株区分中的应用

Martinez 等<sup>[45]</sup>为了确保所获得酵母单菌落的地方性遗传背景,利用 RAPD、mtDNA-RFLP 以及脉冲场凝胶电泳 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 分析本土酿酒酵母单菌落的地理起源和遗传多样性,在 RAPD 技术中,采用 27 个引物进行了酿酒酵母单菌落的区分,发现大多数酿酒酵母单菌落与其地理起源有很高的相关性,同地理起源的酿酒酵母单菌落间的平均相似系数为 0.7,是 3 种方法中获得相似值最高的,认为 RAPD 技术具有更强的菌株区分能力。Romano 等<sup>[46]</sup>利用 RAPD 技术对分离自意大利葡萄园不同葡萄品种的酿酒酵母单菌落进行菌株区分,80 个野生酿酒酵母单菌落中被区分为 12 种不同的基因型,即 12 株不同的酿酒酵母菌株,用这些遗传背景不同的菌株进行发酵试验,可以更高效地获得对葡萄酒质量有突出贡献的优良菌株。徐勇等<sup>[47]</sup>对 6 个属的 21 个酵母菌株的基因组 DNA 的多态性进行了 RAPD 分析,研究表明,RAPD 能够检测出酵母种内微小的遗传差异,其特征谱带可作为酵母菌种鉴定的特征标记。

### 1.2 RAPD 优缺点

RAPD 技术优点:①速度快、成本低,在较短时间内可分析大量样本,既省时又省力;②RAPD 多态性灵敏度高,可检测到单个碱基的置换;③设计引物时不需预先知道模板的序列信息;④DNA 用量少,随机引物可从生物技术公司低价购置等。但是,由于 RAPD 技术本身的原因如引物较短、复性温度较低,

因而重复性及特异性较低,对反应中的许多因素的变化敏感<sup>[47]</sup>。另外,引物的筛选和反应条件的优化也往往需要花费较多的时间。

## 2 mtDNA-RFLP 分析

线粒体 DNA 限制性片段长度多态性分析 (mtDNA-RFLP) 是利用不种或同种生物的线粒体 DNA 经限制性内切酶消化,产生大量的、分子量不等的 DNA 片段,利用凝胶电泳技术分离被酶解的 DNA 片段后,产生不同的条带,进行差异性分析,从而将不同菌株区分开<sup>[24-25]</sup>。由于 mtDNA 较小,适于进行限制性酶切分析,而且不同的菌株具有一定的 mtDNA 限制性酶切图谱<sup>[48]</sup>。

### 2.1 mtDNA-RFLP 在酿酒酵母菌株区分中的应用

国外的一些葡萄酒厂已将 mtDNA-RFLP 技术引入到葡萄酒的发酵控制<sup>[24-25]</sup>。通过对发酵过程中酿酒酵母的菌株区分,揭示发酵过程中酿酒酵母菌株的生态变化和多样性。González 等<sup>[49]</sup>对来自不同样品的 1 307 个酿酒酵母单菌落进行了 mtDNA *Hinf*I 酶切分析,得到 47 株不同的酿酒酵母菌株,每个菌株中包含 1—10 个酿酒酵母单菌落。同时发现这 47 株酿酒酵母中,在葡萄汁只发现 2 个菌株,而在发酵中期,这 47 株酿酒酵母菌株都存在,在发酵末期,只有部分菌株存在。Agnolucci 等<sup>[50]</sup>用 *Rsa*I 酶对 *S. bayanus*、*S. pastorianus* 和 *S. cerevisiae* 菌株 mtDNA 进行酶切分析时,发现其图谱间的相似性为 20%,证明 mtDNA-RFLP 标记法能够区分同种菌株。Lopes 等<sup>[24]</sup>利用 mtDNA-RFLP 和 killer biotype 分析法,对来自阿根廷 Patagonia 地区不同品种葡萄自然发酵过程中分离的 112 个本土酿酒酵母单菌落进行了菌株区分,发现这 112 个本土酿酒酵母单菌落中 mtDNA-RFLP 产生 37 种不同的酶切图谱,而 killer biotype 法只产生了 19 种不同图谱,结合两种分析法,在 112 个酿酒酵母单菌落总共有 42 个酿酒酵母菌株,同时也说明 mtDNA-RFLP 具有更强的菌株区分能力。较多的研究表明<sup>[18-19,24-26,49]</sup>,mtDNA-RFLP 具有同脉冲电泳核型分析 (PFGE) 相同或相当的菌株鉴别能力,所以近些年来,mtDNA-RFLP 分析法已逐渐取代了 PFGE 在酵母菌株区分上的经典地位。

### 2.2 mtDNA-RFLP 的优缺点

优点<sup>[51-53]</sup>:①方法较为简便;②影响因子少;③稳定性高;④背景清楚。但是,在实际工作中,往往要反复进行酶切,才可能获得满意的谱带,造成时间

的延误和成本的增加。

### 3 微卫星 DNA 分子标记法

微卫星指“短 DNA 序列的重复”,也被称为“简单重复序列 (simple sequence repeats, SSRs)”,其串联重复的核心序列为 1—6 bp,其中最常见的是双核苷酸重复,多为 (CA) $n$  或 (TG) $n$  重复,也有一些微卫星重复单位为 3 个核苷酸,极少数为 4 个核苷酸或更多<sup>[27,29]</sup>。值得注意的是,并不是所有的微卫星都严格按照重复单位的碱基组成串联重复,这种重复可能被另外一些核苷酸所打断,形成不完整的微卫星<sup>[31]</sup>。这可能是由于碱基的替换、错配及不均等交换所致<sup>[54-55]</sup>。微卫星 DNA 由于核心序列重复次数的不同以及重复程度的不同而造成了每个座位的多态性,这种多态性的信息量丰富。微卫星位点是由微卫星的核心序列与其两侧的侧翼序列构成。侧翼序列使微卫星位点具有特异性,微卫星 DNA 本身重复单位数的变异是形成微卫星位点多态性的基础,多态性常表现为复等位性。其原理是:根据微卫星序列两端的互补序列设计引物,通过 PCR 反应扩增微卫星片段,扩增片段进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,根据分离片段的多态性来区分不同的菌株<sup>[31]</sup>。

#### 3.1 微卫星 DNA 标记在酿酒酵母菌株区分中的应用

在葡萄牙, Schuller 等<sup>[56]</sup>从自然发酵的葡萄汁中分离鉴定出 361 株酿酒酵母单菌落,用 6 个微卫星引物进行 PCR 扩增与 mtDNA 限制性酶切分析,结果表明 *S. cerevisiae* 和 *S. bayanus* 是葡萄酒发酵过程中的优势菌株。Laitila 等<sup>[57]</sup>利用微卫星引物 M13 对麦芽糖生产过程中分离的 700 株酵母单菌落进行 MSP-PCR 指纹分析,经初步归类后鉴定出 25 种子囊菌酵母和 18 种担子菌酵母。Dorit 等<sup>[27]</sup>研究利比里亚极端酸性环境中的酵母菌,利用微卫星引物 M13 对分离的 207 株 *S. Domingos* 和 58 株 *R. Tinto* 酵母进行 MSP-PCR 指纹分析,并把代表性菌株进行了 26S rDNA D1/D2 测序,经 GenBank 内同源序列搜索以及 BLAST 分析,相似性在 99%以上。Ewa 等<sup>[58]</sup>分离了啤酒酿造中的 15 株酵母菌。通过 API32C 系统鉴定其中 7 株为 *Candida sake*,利用微卫星引物 M13 及 RAPD 分析了 *Candida sake* 的多态性。与其它 *Candida* 相比,这些菌株的相似性比例为 37%。不同研究报道中关于微卫星的菌株区分能力有所差异<sup>[27-31,56]</sup>,这可能同其所用的微卫星引物不同有关。

#### 3.2 微卫星 DNA 分子标记的优缺点

微卫星 DNA 分子标记的优点:①多态性丰富;②数量多且分布均匀;③等显性遗传;④微卫星标记具有保守性;⑤易检测、重复性好、省时,适于自动化分析<sup>[58]</sup>。其不足<sup>[27,29,31,55]</sup>是:①开发和合成新的 SSR 引物投入高、难度大;②现有的 SSR 标记数量有限,不能标记所有的功能基因,不能构建饱和的 SSR 遗传图谱;③SSR 座位突变率高,对变异反应非常敏感;④从某些生物中获得微卫星的过程极其复杂;⑤在自动测序凝胶上进行电泳并被自动确定长度时,电脑得出的长度与真正长度存在差异,造成单个碱基变化以及额外的大小估计问题;⑥在种群研究中某些等位基因由于在引导位点上的替换、插入、删减或其它原因所造成的无法扩增可导致无效等位基因的出现,给种群研究带来困难等<sup>[59]</sup>。

### 4 Interdelta 指纹图谱分析

利用 PCR 对 Interdelta 序列进行扩增,最早是 1993 年由 Ness 等<sup>[60]</sup>提出。Interdelta 序列是指在酿酒酵母反转座子 Ty1/ Ty2 的两端均有一个同向重复序列,简称  $\delta$  元件 (delta element),同时 Interdelta 序列还包括酿酒酵母中约 100 个独立的  $\delta$  元件,称为单独  $\delta$ s。Timothy 等<sup>[61]</sup>在研究无性酵母白色念珠菌的长末端重复序列家族中,比较了酿酒酵母的几个长末端重复序列 Interdelta、omega、sigma 和 tau,其中 Interdelta 序列数量最多,如独立 Interdelta 序列大小在 334 bp 左右,数目在 251 个左右。而且 Interdelta 序列之间差异非常丰富,同时 Interdelta 序列的数目和位置在种内具有一定的差异性,所以被作为基因标记用于区分酿酒酵母菌株<sup>[33-37]</sup>。由于酵母 Interdelta 序列数目上和长短上的差异,扩增出的条带多态性丰富,因此,利用 Interdelta 指纹图谱分析,能够将酿酒酵母菌株区分开来。

#### 4.1 Interdelta 指纹图谱在酿酒酵母菌株区分中的应用

Legras 和 Karst<sup>[62]</sup>设计了一对新的引物 (delta12-delta21) 对 53 株酿酒酵母 (包括工业酿酒酵母、实验室酿酒酵母和野生酿酒酵母) 进行了 PCR 扩增分析。扩增结果与 BLAST 数据库中计算得来的虚拟电泳图谱比较分析,得出:所有检测到的条带都对应于一个计算出来的可能条带,同时,与原先的引物比较,优化的引物所扩增出的条带明显增多,多态性更加丰富,具有很好的菌株区分能力。Ayoub 等<sup>[35]</sup>在利用多位点测序技术 (MLST) 分析酿酒酵母类型多样性研究时,

应用 Interdelta 序列指纹图谱来比较多位点测序技术的菌株区分能力。他们对 84 株酿酒酵母, 包括 65 株分离的酵母、11 株商业酵母、5 株亚洲酵母和 3 株模式酵母进行了分析, 得出: Interdelta 序列指纹图谱的菌株区分能力达到 99.90%, 而多位点测序技术的菌株区分能力达到 92.27%, 说明 Interdelta 序列指纹图谱具有更好的菌株区分能力。Schuller 等<sup>[56]</sup>对 23 株商业酿酒酵母进行了微卫星、优化的 Interdelta 指纹图谱以及线粒体 DNA 限制性片段长度多态性分析 (mtDNA-RFLP), 研究表明, 使用优化的 delta 引物对酿酒酵母菌株进行 Interdelta 指纹图谱分析时, 具有与 mtDNA-RFLP 及 PFGE 相当的菌株区分能力, 这表明利用 Interdelta 序列指纹图谱对酿酒酵母菌株的区分具有非常好的应用前景。

在进行酿酒酵母的菌株筛选和酿酒特性研究时, 利用 Interdelta 技术也是非常有效的。用常规的生理生化 and 遗传标记无法区分在发酵过程中分离获得的大量酿酒酵母单菌落, 而通过 Interdelta 分型, 就可获得遗传背景不同的菌株, 这样可大大降低筛选的工作强度, 提高工作效率。

#### 4.2 Interdelta 指纹图谱的优缺点

Interdelta 指纹图谱的优点: ①在酿酒酵母中分布广泛, 如在酿酒酵母 S288C 的基因组中, 约有 300 个 Interdelta 序列; ②多态性丰富, 使用了由 Legras<sup>[62]</sup>设计的一对引物 (delta12-delta21) 后, 能产生更加丰富的条带, 多态性更加明显; ③方法简单, 操作容易, 如只需要进行 PCR 扩增和电泳分析检测即可获得结果, 不需要投入大量的仪器设备。但存在扩增条带中有暗带, 对分析不便, 且只适用于酿酒酵母菌株的区分。

### 5 COX1 基因指纹图谱分析

COX1 基因是线粒体细胞色素氧化酶亚基 I 基因, 这种嵌合基因编码了细胞色素酶最大的亚基, 到目前为止, COX1 基因是含内含子数目最多的基因, 且其内含子的数目和位置具有很高的多态性<sup>[38,63]</sup>。据报道在酵母种间以及种内水平上, COX1 基因中内含子的数目和位置都有变化, 如在酿酒酵母中, 菌株 FY1679 含有 7 个内含子, 而菌株 D273-10B 含有 6 个内含子<sup>[64-66]</sup>。因而可利用 COX1 基因的这种多态性作为一种酵母菌株遗传多样性分析的工具<sup>[38]</sup>。

#### 5.1 COX1 基因指纹图谱的应用

López 等<sup>[38]</sup>为了增加对新商业酵母菌株的介绍,

依据线粒体 COX1 基因中内含子数目和位置的多态性, 建立了一种新的菌株区分法——COX1 基因指纹图谱法。发现使用 3L、3R、4L 和 5R 这 4 条引物时, 能取得更好的扩增结果。同时发现 COX1 基因指纹图谱具有较强的菌株区分能力。然而目前 COX1 基因指纹图谱在酿酒酵母菌株区分上应用还较少, 而在其它物种的鉴定和遗传多样性研究上有一些报道<sup>[67-70]</sup>。

#### 5.2 COX1 基因指纹图谱的优缺点

COX1 基因指纹图谱法优点: ①操作简单、快速; ②多态性丰富; ③能够同时适用于酿酒酵母和非酿酒酵母菌株的区分<sup>[38]</sup>。但同时也存在一定的不稳定性<sup>[38]</sup>。另外, 其对非酿酒酵母菌株的区分, 还需进行大量的研究以进行利用评价。

### 6 应用评述和展望

随着生物标记技术及分子生物学的迅猛发展, DNA 分子标记技术也在不断完善。本文所介绍的几种分子标记技术, 是现阶段酿酒酵母菌株区分和遗传多样性研究中最广泛、简便和有效的技术, 每种方法对菌株的区分能力, 都能达到 90%以上。但每种方法都各有其优缺点。从菌株的鉴别能力方面比较, RAPD、mtDNA-RFLP 及 Interdelta 序列指纹图谱技术已能满足研究和生产的需要。而微卫星 PCR 技术还需研究开发更好的微卫星引物, 以进一步提高其对菌株的区分能力。就使用的简便性而言, 除 mtDNA-RFLP 外, 其它 4 种方法都是基于 PCR 技术, 程序简单、快速、易于掌握和使用。而微卫星技术由于所用的引物需要进行荧光标记, 其结果也需要上测序胶或毛细管电泳进行分析, 所需的设备较为昂贵, 所以不太方便在生产上推广应用。

虽然 mtDNA-RFLP 技术相比于其它基于 PCR 的菌株区分技术较为繁琐, 费时, 但随着技术手段的不断改进, 试验操作的逐步规范, 及对商品化试剂盒研制进程的加快, mtDNA-RFLP 技术将会在酵母菌种鉴定和菌株区分上继续发挥作用。

酿酒酵母的 Interdelta 指纹图谱分析技术是最有生产应用前景的技术, 可以替代 mtDNA-RFLP 技术应用到生产单位, 达到快速、简便、准确地在发酵过程中进行微生物纯度和优势菌株监控的目的。使用优化的 delta 引物对酿酒酵母菌株进行 Interdelta 指纹图谱分析时, 具有与 mtDNA-RFLP 及 PFGE 相当的菌株区分能力, 其诸多优点是现阶段其它方法无法比拟的, 将在酿酒酵母菌株的区分和遗传多样性研究、菌种鉴

定、污染菌株检测、开发特定地区酿酒酵母菌株资源及酿酒酵母筛选中发挥重要作用。COX1 基因指纹图谱分析技术具有与 Interdelta 同样的简便性,但 COX1 基因指纹图谱的菌株鉴别能力的稳定性,还需要更多的研究进行验证。

Interdelta 和 COX1 的不足之处是,同一菌株在不同实验室的图谱分型结果可能有所差异,希望发展标准工作程序、试剂盒以及计算机联用技术,以便更方便、快速、准确地区分不同的酵母菌株,实现研究成果的有效共享。RAPD 也存在同样的问题,而且其所用引物比之于前二者更具有多样化特征,不同实验室的工作往往难以具有可比性。而对于微卫星 PCR 技术,还需研究开发更有效的、具有通用性的微卫星引物,以进一步提高其对菌株的区分能力,并充分发挥其良好的结果共享特性。

鉴于几种 DNA 分子标记技术都有其优缺点,因此在酿酒酵母菌株区分中,一般需要结合两种或两种以上的方法,简单化、自动化和商业化是发展的趋势。根据本实验室几年来在这方面的体会,要在发酵过程中进行酿酒酵母的菌株区分、菌株动态和遗传多样性研究,Interdelta fingerprinting 已可以满足生产和研究需要。对于亲缘关系特别近的菌株或菌种的鉴定,可结合 COX1 基因的指纹图谱进行分析,必要时再对难以区分的菌株进行 mtDNA-RFLP 分析。

虽然国内在酿酒酵母遗传多样性方面的研究还鲜有报道,但可以预见,DNA 分子标记技术除了在酵母菌株区分、菌种的鉴定、遗传多样性研究方面不断发挥重要作用外,还会在酿酒酵母生态学、流行病学调查、分子遗传图谱构建、目的性状基因标记、自然群体中遗传变异及种间杂交的研究、遗传质量检测、系谱分析、亲源关系鉴定、群体间遗传距离分析、进化和分子标记辅助育种等方面具有非常广阔的应用前景。

## References

- [1] 陈国福,张春云,王广策,张宝玉.用于赤潮藻分子系统学研究的遗传及分子标记.海洋科学进展,2008,26(4):522-531.  
Chen G F, Zhang C Y, Wang G C, Zhang B Y. Genetic and molecular markers used for phylogenetic analysis of red-tide algae. *Advances in Marine Science*, 2008, 26(4): 522-531. (in Chinese)
- [2] 陈兆波.分子标记的种类及其在作物遗传育种中的应用.现代生物医学进展,2009,9(11):2179-2181,2148.  
Chen Z B. The types of molecular markers and their utilization on crop genetic breeding. *Progress in Modern Biomedicine*, 2009, 9(11): 2179-2181, 2148. (in Chinese)
- [3] 曾淇,曾逢刚,李明芳,郑学勤.分子标记技术在荔枝研究中的应用.热带作物学报,2009,30(4):544-550.  
Zeng Q, Zan F G, Li M F, Zheng X Q. Advances on application of molecular markers in litchi researches. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2009, 30(4): 544-550. (in Chinese)
- [4] 苏东海,胡丽花,苏东民.传统主食发酵剂及其微生物的研究现状.农产品加工,2009,(3):50-52,72.  
Su D H, Hu L H, Su D M. Concerning traditional starter cultures of staple foods and the research of their microorganism. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2009, (3): 50-52, 72. (in Chinese)
- [5] 莫重文.酵母酱油的开发利用.中国调味品,2009,34(1):56-62,68.  
Mo C W. Development and utilization of yeast sauce. *China Condiment*, 2009, 34(1): 56-62, 68. (in Chinese)
- [6] 马旭光,张宗舟.航天诱变啤酒酵母菌株的复壮与筛选.中国酿造,2008(21):72-75.  
Ma X G, Zhang Z Z. Rejuvenation and screening of space mutation *Saccharomyces cerevisiae* strains. *China Brewing*, 2008(21): 72-75. (in Chinese)
- [7] 段学辉,牛春铃,欧阳军梅.酒精酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 4-S 的高密度培养及其酒精发酵性能.南昌大学学报:工科版,2008,30(4):311-315.  
Duan X H, Niu C L, Ouyang J M. High density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* 4-S and its fermentation performance. *Journal of Nanchang University: Engineering & Technology*, 2008, 30(4): 311-315. (in Chinese)
- [8] Urso R, Rantsiou K, Dolci P, Rolle L, Comi G, Cocolin L. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Research*, 2008, 8(7): 1053-1062.
- [9] Muller L A, McCusker J H. Microsatellite analysis of genetic diversity among clinical and nonclinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates suggests heterozygote advantage in clinical environments. *Molecular Ecology*, 2009, 18(13): 2779-2786.
- [10] 李科,靳艳玲,甘明哲,刘晓风,赵海.木质纤维素生产燃料乙醇的关键技术研究现状.应用与环境生物学报,2008,14(6):877-884.  
Li K, Jin Y L, Gan M Z, Liu X F, Zhao H. Progress in research of key techniques for ethanol from lignocellulose. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2008, 14(6): 877-884. (in Chinese)
- [11] Stringini M, Comitini F, Taccari M, Ciani M. Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food*

- Microbiology*, 2009, 26(4): 415-420.
- [12] Ezeronye O U, Legras J L. Genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from palm wine in eastern Nigeria. Comparison with other African strains. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(5): 1569-1578.
- [13] Andrade M J, Rodríguez M, Sánchez B, Aranda E, Córdoba J J. DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107(1): 48-58.
- [14] de Llanos R, Querol A, Planes A M, Fernández-Espinar M T. Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates and their association with non-clinical strains. *Systematic & Applied Microbiology*, 2004, 27(4): 427-435.
- [15] Legras J L, Merdinoglu D, Cornuet J M, Karst F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Molecular Ecology*, 2007, 16(10): 2091-2102.
- [16] Cappello M S, Blevé G, Grieco F, Dellaglio F, Zacheo G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(6): 1274-1280.
- [17] Pulvirenti A, Rainieri S, Boveri S, Giudici P. Optimizing the selection process of yeast starter cultures by preselecting strains dominating spontaneous fermentations. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(3): 326-332.
- [18] Tofalo R, Chaves-López C, Di Fabio F, Schirone M, Felis G E, Torriani S, Paparella A, Suzzi G. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 130(3): 179-187.
- [19] Bovo B, Andrighetto C, Carlot M, Corich V, Lombardi A, Giacomini A. Yeast population dynamics during pilot-scale storage of grape marcs for the production of Grappa, a traditional Italian alcoholic beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 129(3): 221-228.
- [20] Corte L, Lattanzi M, Buzzini P, Bolano A, Fatichenti F, Cardinali G. Use of RAPD and killer toxin sensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* strain typing. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99(3): 609-617.
- [21] Foschino R, Gallina S, Andrighetto C, Rossetti L, Galli A. Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products. *FEMS Yeast Research*, 2004, 4(6): 609-618.
- [22] Guerra J B, Araújo R A, Pataro C, Franco G R, Moreira E S, Mendonça-Hagler L C, Rosa C A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal *Brazilian cachaça*. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 33(2): 106-111.
- [23] Andrighetto C, Psomas E, Tzanetakis N, Suzzi G, Lombardi A. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 30(1): 5-9.
- [24] Lopes C A, Lavalle T L, Querol A, Caballero A C. Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae* diversity study. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2006, 89(1): 147-156.
- [25] Castrejón F, Codón A C, Cubero B, Benítez T. Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25(3): 462-467.
- [26] Juhász A, Engi H, Pfeiffer I, Kucsera J, Vágvölgyi C, Hamari Z. Interpretation of mtDNA RFLP variability among *Aspergillus tubingensis* isolates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, 91(3): 209-216.
- [27] Schuller D, Casal M. The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2007, 91(2): 137-150.
- [28] Howell K S, Bartowsky E J, Fleet G H, Henschke P A. Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 38(4): 315-320.
- [29] Jubany S, Tomasco I, Ponce de León I, Medina K, Carrau F, Arrambide N, Naya H, Gaggero C. Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Research*, 2008, 8(3): 472-484.
- [30] Masneuf-Pomarède I, Le Jeune C, Durrens P, Lollier M, Aigle M, Dubourdiou D. Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* using microsatellite markers. *Systematic and Applied Microbiology*, 2007, 30(1): 75-82.
- [31] Pérez M A, Gallego F J, Martínez I, Hidalgo P. Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 33(6): 461-466.
- [32] Lopes C A, van Broock M, Querol A, Caballero A C. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, 93(4): 608-615.
- [33] Le Jeune C, Erny C, Demuyter C, Lollier M. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a

- spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 2006, 23(8): 709-716.
- [34] Charpentier C, Colin A, Alais A, Legras J L. French Jura flor yeasts: genotype and technological diversity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2009, 95(3): 263-273.
- [35] Ayoub M J, Legras J L, Saliba R, Gaillardin C. Application of multi locus sequence typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(4): 699-711.
- [36] Demuyter C, Lollier M, Legras J L, Le Jeune C. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97(6): 1140-1148.
- [37] Ciani M, Mannazzu I, Marinangeli P, Clementi F, Martini A. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, 85(2): 159-164.
- [38] Lo'pez V, Fernández-Espinar M T, Barrio E, Ramón D, Querol A. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 81: 63-71.
- [39] 吴少慧, 张成刚, 张忠泽. RAPD 技术在微生物生物多样鉴定中的应用. *微生物学杂志*, 2000, 20(2): 44-47.
- Wu S H, Zhang C G, Zhang Z Z. Application of RAPD in microbial biodiversity identification. *Journal of Microbiology*, 2000, 20(2): 44-47. (in Chinese)
- [40] Fernández-Espinar M T, López V, Ramón D, Bartra E, Querol A. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 70(1/2): 1-10.
- [41] Di Maro E, Ercolini D, Coppola S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117(2): 201-210.
- [42] Cocolin L, Pepe V, Comitini F, Comi G, Ciani M. *Enological and genetic traits of Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research*, 2004, 5(3): 237-245.
- [43] Teresa Fernández-Espinar M, Barrio E, Querol A. Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*, 2003, 20(14): 1213-1226.
- [44] Tornai-Lehoczki J, Dlauchy D. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 62(1-2): 37-45.
- [45] Martinez C, Cosgaya P, Va'squez C, Gac S, Ganga A. High degree of correlation between molecular polymorphism and geographic origin of wine yeast strains. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103: 2185-2195.
- [46] Romano P, Capece A, Serafino V, Romabiello R, Poeta C. Biodiversity of wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* as tool to complement and optimize wine quality. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24: 1797-1802.
- [47] 徐 勇, 张 博, 勇 强, 黄敏仁, 余世袁. 利用 RAPD 分子标记研究酵母菌的亲缘关系. *林产化学与工业*, 2005, 25 (1): 1-3.
- Xu Y, Zhang B, Yong Q, Huang M R, Yu S Y. Analysis of polygenetic affinities among yeast strains with random amplified polymorphism dna analysis. *Chemistry & Industry of Forest Products*, 2005, (1): 1-3. (in Chinese)
- [48] Baleiras C M, Eijnsma B, Hofstra H, Huis in't Veld J H, van der Vossen J M. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 41-46.
- [49] Gonza'lez S S, Barrio E, Querol A. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated form Tenerofe (Canary island, Spain). *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102: 1018-1025.
- [50] Agnolucci M, Scarano S, Santoro S, Sassano C, Toffanin A, Nuti M. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous *Saccharomyces* spp. strain associated to natural fermentation of 'Malvasia delle Lipari'. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 45: 657-662.
- [51] Lopes C A, Rodriguez M E, Sangorrín M, Querol A, Caballero A C. Patagonian wines: implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 2007, 34(2): 139-149.
- [52] Schuller D, Alves H, Dequin S, Casal M. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 51(2): 167-177.
- [53] Petersen K M, Møller P L, Jespersen L. DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 69(1-2): 11-24.
- [54] Sturm J, Grossmann M, Schnell S. Influence of grape treatment on the wine yeast populations isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 101(6): 1241-1248.
- [55] Broun P, Tanksley S D. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequence in the tomato genome. *Molecular Genetics and Genomics*, 1996, 250: 39-49.
- [56] Schuller D, Valero E, Dequin S, Casal M. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology*

- Letters*, 2004, 231: 9-26.
- [57] Laitila A, Wilhelmson A. Yeasts in an industrial malting ecosystem. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2006, 33: 953-966.
- [58] Walczak E, Czaplinska A, Barszczewski W, Wilgosz M, Wojtatowicz M, Robak M. RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of *Candida* genus yeasts isolated in brewing. *Food Microbiology*, 2007, 3: 305-312.
- [59] Cubillos F A, Vásquez C, Faugeron S, Ganga A, Martínez C. Self-fertilization is the main sexual reproduction mechanism in native wine yeast populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 67(1): 162-170.
- [60] Ness F, Lavalley F, Dubourdiou D, Aigle M, Dulau L. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Science of Food and Agriculture*, 1993, 62: 89-94.
- [61] Goodwin T J D, Poulter R T M. Multiple LTR-retrotransposon families in the asexual yeast *Candida albicans*. *Genome*, 2000, 10: 174-191.
- [62] Legras J L, Karst F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 221: 249-255.
- [63] Clark-Walker G D. Evolution of mitochondrial genomes in fungi. *International Revisions in Cytology*, 1992, 14: 89-127.
- [64] Hardy C M, Clark-Walker G D. Nucleotide sequence of the *COX1* gene in *Kluyveromyces lactis* mitochondrial DNA: evidence for recent horizontal transfer of a group II intron. *Current Genetics*, 1991, 20: 99-114.
- [65] Sekito T, Okamoto K, Kitano H, Yoshida K. The complete mitochondrial DNA sequence of *Hansenula wingei* reveals new characteristics of yeast mitochondria. *Current Genetics*, 1995, 28: 39-53.
- [66] Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 1998, 440: 325-331.
- [67] 陈红玲, 林瑞庆, 李国清, 翁亚彪, 吴绍强, 宋慧群, 朱兴全. 线粒体 *cox1* 序列分析支持北半球欧氏对盲囊线虫是一个新种. 中国预防兽医学报, 2005, 27(1): 29-35.
- Chen H L, Lin R Q, Li G Q, Weng Y B, Wu S Q, Song H Q, Zhu X Q. Sequence analysis of mtDNA *cox 1* gene indicates that *Contracecum ogorhini* from the northern hemisphere represents a new species. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 27(1): 29-35. (in Chinese)
- [68] 曹 湛, 翁亚彪, 林瑞庆, 李明伟, 邹丰才, 何 芳, 朱兴全. 几种拟地新线虫种间及种内线粒体 *lsrRNA* 及 *cox1* 基因的多态性. 中国兽医学报, 2005, 25(6): 600-603.
- Cao Z, Weng Y B, Lin R Q, Li M W, Zou F C, He F, Zhu X Q. Polymorphisms in mitochondrial *lsrRNA* and *cox1* genes within and between members of *Pseudoterranova decipiens* Complex. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2005, 25(6): 600-603. (in Chinese)
- [69] Arizono N, Shedko M, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Takeda K, Hashimoto K. Mitochondrial DNA divergence in populations of the tapeworm *Diphyllobothrium nihonkaiense* and its phylogenetic relationship with *Diphyllobothrium klebanovskii*. *Parasitology International*, 2009, 58 (1): 22-28.
- [70] Oliveira D C, Raychoudhury R, Lavrov D V, Werren J H. Rapidly evolving mitochondrial genome and directional selection in mitochondrial genes in the parasitic wasp *Nasonia* (hymenoptera: pteromalidae). *Molecular Biology and Evolution*, 2008, 25(10): 2167-2180.

(责任编辑 曲来娥)