

网络出版时间:2014-04-25 15:48

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.013

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.013.html>

昆明葡萄酒相关酵母菌的分离与鉴定

刘小珍^{1,2}, 张汉尧²

(1 农业部农业微生物资源收集与保藏重点实验室, 北京 100081;

2 西南林业大学 西南地区生物多样性保育国家林业局重点实验室, 云南 昆明 650224)

[摘要] **【目的】**分离鉴定云南昆明葡萄产区的葡萄酒相关酵母, 为该地葡萄酿酒酵母资源的筛选及其利用奠定基础。**【方法】**以采自昆明官渡区三瓦村的葡萄浆果为材料, 将葡萄果皮用灭菌的液体 SelMed 富集培养基进行培养, 经稀释再培养以获得酵母单菌落, 采用 ITS 序列分析和 RFLP 鉴定分离的相关菌种, 并利用微卫星指纹图谱对酿酒酵母的不同菌株进行鉴定。**【结果】**从云南昆明葡萄产区葡萄果皮上分离获得了 207 个单克隆菌落。PCR 扩增和 RFLP 分析表明, 这些单菌落分属于 3 个属, 分别为梅奇酵母属(*Metschnikowia*)、红酵母属(*Rhodotorula*)和酿酒酵母属(*Saccharomyces*), 其中梅奇酵母属出现频率最高, 并有 23 个酿酒酵母单菌落。微卫星分析结果表明, 23 个酿酒酵母菌落分属于 4 个菌株, 其中 1 个为商业菌株 X5。**【结论】**在昆明的葡萄园中至少栖息了 3 个属 5 个种的酵母, 包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、金佩梅奇酵母(*Metschnikowi chrysoperlae*)、美极梅奇酵母(*Metschnikowi pulcherrima*)和核果梅奇酵母(*Metschnikowi fructicola*)等。分离到的葡萄酒相关酵母部分源于欧洲, 可能随着葡萄植株被引进到昆明。

[关键词] 葡萄酒; 酵母菌; ITS 序列; 微卫星分析; 昆明

[中图分类号] TS261.1⁺1; TS262.61 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2014)05-0135-06

Isolation and identification of wine related yeasts in Kunming

LIU Xiao-zhen^{1,2}, ZHANG Han-yao²

(1 Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China;

2 Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China, State Forest Administration,

Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China)

Abstract: **【Objective】**This study focused on the isolation and identification of grape wine related yeasts in Kunming, Yunnan Province, to improve the screening of wine related yeasts and their subsequent use. **【Method】**Using grape fruits from Sanwa village, Guandu District, Kunming, sterile liquid SelMed enrichment medium was used to cultivate the yeasts from grape skin and monoclonal yeasts were obtained after dilution and culturing. ITS sequence analysis and RFLP analysis were used to identify related species, and microsatellites were used to access the different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **【Result】**207 monoclonal isolates fingerprints were obtained from grape skin of Kunming, Yunnan. PCR and RFLP analysis revealed that these colonies belonged to 3 genera, *Metschnikowia*, *Rhodotorula*, and *Saccharomyces*. *Metschnikowia* was the richest genera, and 23 colonies belonged to *S. cerevisiae*. Microsatellite analysis showed that these *S. cerevisiae* colonies belonged to four strains, and one was commercial strain X5. **【Con-**

[收稿日期] 2013-04-23

[基金项目] 农业部农业微生物资源收集与保藏重点实验室开放基金项目(KLMRCP2012-01);教育部留学回国人员科研启动基金项目(212209);西南林业大学面上科研基金项目(SWFU-IP2010.21)

[作者简介] 刘小珍(1975—), 女, 江西永丰人, 讲师, 硕士, 主要从事生物技术研究。

[通信作者] 张汉尧(1975—), 男, 福建永定人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事植物和微生物分子遗传研究。

E-mail: hanyaoz@163.com

clusion】In vineyards of Kunming, there were at least five yeasts belonging to 3 genera, including *S. cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Metschnikowia chrysoperlae*, *Metschnikowia pulcherrima*, and *Metschnikowia fructicola*. Some of the isolated yeasts originated from Europe, which may be introduced to Kunming together with the grape plants.

Key words: wine; yeast; ITS sequence; microsatellite; Kunming

酵母作为主要的发酵微生物不仅对葡萄酒质量和发酵过程影响很大,而且对葡萄酒色泽、香气、感官质量及风格的形成有重要贡献^[1]。用不同菌株发酵生产的葡萄酒,其酒质和风味差别很大。所以寻找能够适应当地葡萄原料特性、有利于形成地域葡萄酒风格的新土著酵母菌株及新酵母种已成为研究的焦点^[2-6]。目前,ITS 序列的差异分析已被广泛用于酵母种属水平的鉴定^[7-8]。Zhang 等^[9]在新西兰 8 个酒厂中分离了 1 279 个菌株,这些菌株分属 9 个属 27 个种,这些菌种的 ITS 与已发表的大部分酵母菌 ITS 序列存在或多或少的差异。Li 等^[10]对中国葡萄产区的酿酒酵母进行了 ITS 分析,发现共有 8 个属的 17 个酵母种在中国有分布。朱丽霞等^[11]则对新疆慕萨莱思地区的葡萄酒相关酵母进行了多样性分析,发现共有 7 个属 13 个种的酵母。王泽举等^[12]通过对酵母菌 5.8S 核糖体 RNA ITS 区域的 PCR 扩增,以及限制性酶切片多态性(RFLP)图谱分析和 26S rDNA D1/D2 区、5.8S-ITS 区的序列分析,将供试菌株鉴定为 4 个属 4 个种。此外,分子指纹图谱已被广泛用于群体中个体差异的研究^[13]。Schuller 等^[14]对葡萄园中发酵相关的酿酒酵母进行了微卫星指纹分析。Howell 等^[15]则对发酵期间酿酒酵母的遗传多样性进行了微卫星分析。云南昆明具有典型的气候特征和独特的地理条件,是我国早熟葡萄的重要产地之一,蕴含着丰富的酵母菌资源。但目前尚未见有关云南昆明葡萄产区酿酒酵母资源的相关研究报道。

本研究拟分离云南昆明葡萄产区的酿酒酵母资源,并运用 ITS 分析鉴定其种属,采用微卫星分析鉴定不同酿酒酵母菌株,旨在为这些高原酵母资源的进一步利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄浆果于 2012-08 采自昆明官渡区三瓦村(在葡萄园内多点采样,并注意采集植株各个部位的浆果),取果皮 1.0 g,加入 50 mL 灭菌的液体 SelMed 富集培养基中,28 ℃摇床培养 2 d。梯度稀

释后涂布于分离纯化平板上,28 ℃培养 3 d 后,结合菌落颜色和形态选取多个菌落进行保藏。

1.2 试剂

所用引物由上海生物工程公司合成;Taq DNA 聚合酶、dNTPs、RNase 购自上海生物工程公司;pMD18-T Vector、DNA Marker 购自大连宝生物工程公司;酵母基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;2×Power Taq PCR MasterMix 为北京百泰克生物技术有限公司产品。其他常规试剂为国产分析纯产品。

1.3 DNA 提取

按照试剂盒说明书进行提取。将菌种采用划线法接种到新的培养基上,获得单菌落。接种单菌落酵母到 10 mL 酵母试管培养基(YPD 培养基)中,28 ℃培养 18 h;取 1.5 mL 酵母培养液,12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体;加入 600 μL 山梨醇 buffer,5 μL 10 U/μL 溶菌酶(Lyticase),30 ℃处理 30 min;4 000 r/min 离心 10 min,向沉淀中加入 200 μL 缓冲液 GA 重悬;加入 20 μL 蛋白酶 K 混匀,加入 4 μL RNase(100 mg/mL),室温放置 5 min;加入 220 μL 缓冲液 GB,颠倒混匀,70 ℃放置 10 min;加 220 μL 无水乙醇充分颠倒混匀,所得溶液和沉淀都加入吸附柱中,12 000 r/min 离心 30 s,向吸附管中加入 500 μL 缓冲液 GD,12 000 r/min 离心 30 s,向吸附柱中加入 500 μL 漂洗液 PW 洗 2 次,最后加入 30 μL ddH₂O 洗脱柱子上的酵母基因组 DNA。

1.4 ITS 序列的扩增及 RFLP 分析

使用通用引物进行分析,其中上游引物 ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';下游引物 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应体系为 15 μL:双链总 DNA 模板 1.0 μL,上下游引物各 1.0 μL,2×Power Taq PCR MasterMix 7.5 μL,用双蒸水补足至 15 μL。PCR 反应程序:95 ℃预变性 5 min;95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 60 s,共 35 个循环;最后 72 ℃终延伸 7 min,产物于-20 ℃保存。PCR 产物检测:取 PCR 产物 5 μL 用 EB 染色,用质量浓度为 30 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,用凝胶成像仪照相。

采用 2 种限制性内切酶 *Hae*Ⅲ 和 *Hinf*Ⅰ 对大于 700 bp 的 PCR 扩增产物进行酶切分析,反应体系及反应条件见文献[9]。

1.5 ITS 序列分析

将 PCR 产物委托中美泰和生物技术(北京)有限公司测序。运用 NCBI 网站上的 BLAST 比对测序结果,从 GenBank 中查找与目的基因序列同源性

最高且已知分类地位的菌种进行分离菌株鉴定。另外,从 GenBank 中提取所有与目的基因序列相关且已知的标准菌株序列。

1.6 微卫星分析

酿酒酵母的微卫星指纹图谱构建参照 Zhang 等^[9]的方法进行,所用引物见表 1。

表 1 酿酒酵母微卫星分析所用的引物及序列
Table 1 List of *Saccharomyces cerevisiae* microsatellite primers and sequence

位点 Locus	引物序列 Primer sequences	荧光标记 Fluorochrome	重复类型 Repeat	所在染色体 Chromosome
MATalphaa	GGTGCATTTGTCATCCGTC CAGCACGGAATATGGGACT CAATGATTAAAATAGCATAGTCGG	FAM	—	iii
YML091C	GTGTCTAAGCCTCTTCAAGCATGAC GTGTCTGGACAATTTTGCCACCTTA	NED	(AAT) ₃₅	xiii
YOR267C	GTGTCTCGATGTTGACGATGATTG GTGTCTTGAAGCATGTGGTAGTAGACG	HEX	(CAA) ₂₀	xv
YPL009C	GTGTCTGGGTTTTGGATTTTTATGGA GTGTCTTTCAATTTTCCTCTTTTACCAC	FAM	(GAA) ₁₆	xvi
YDR160W	GTGTCTGAGGAGGAAATGGACAG GCCTGAAGATGCTTTTAG	NED	(AAT) ₂₃	iv
YBR240C	TTTCCAACCAATCTGCGA CCATTTGGTTCTAGTGCGG	FAM	(AT) ₁₈	ii
YLL049W	GCAACATAATGATTTTGAGGT GTGTCTTGTGTGAGCATAGTGGAGAA	FAM	(TA) ₁₉	xii
YFR028C	GTGTCTTGACACAATAGCAATGGCCTTCA GCAAGCGACTAGAACACAATCACA	HEX	(GT) ₃₀	vi
YGL139W	GTGTCTCTTTTTATTTACGAGCGGGCCAT AAATCTCATGCCGTGAGGGGTAT	FAM	(CAA) ₁₃	vii
YGL014W	GTGTCTCAGTTCGTCTAACGTTGGTAAAATG GCTGTTGCTGTGGTAGCATTACTGT	NED	(TAA) ₁₃	vii
YOL109W	GTGTCTAGGAGAAAAATGCTGTTTATTCTGACC TTTTCTCCGGGACGTGAAATA	HEX	(TAA) ₁₃ (TAG) ₅	xv

2 结果与分析

2.1 昆明地区葡萄表皮酵母菌株的菌落特征

本研究从采集的葡萄浆果表皮中共分离到了 207 个单克隆菌落。培养观察显示,其中以菌落形态深红色的平滑菌落居多,为 37 个;外观形态为奶油色且粗糙凸起的最少,仅有 5 个;外观形态为乳白色且平滑凸起的有 35 个;外观形态为奶油色平滑凸起、黄色平滑凸起、灰色平滑凸起的菌落数分别为 31,26 和 23 个;还有较少部分菌落外观形态呈黄色干燥凸起、乳白色粗糙凸起和灰白色粗糙凸起,分别为 19,17 和 14 个。

2.2 酿酒相关酵母的 ITS 分析与鉴定

ITS 扩增产物在 30 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳检测得到 350~800 bp 条带,符合理论预期的 ITS 区片段大小,部分扩增结果见图 1。再进一步对大于 700 bp 的 PCR 扩增产物进行 RFLP 分析,最终筛选得到了 23 个酿酒酵母单菌落。随机选取 ITS 扩增片段大小相同且外观形态有一定差异的菌落各

3 个送中美泰和生物技术(北京)有限公司测序。ITS 序列分析结果表明:实测的 ITS 长度为 318~771 bp,而 G+C 的含量则为 39.9%~48.9%(表 2),所有菌落分属于 3 个属 5 个种,其中梅奇酵母属(*Metschnikowia*)有 3 个种,分别为金佩梅奇酵母(*M. chrysoperlae*)、美极梅奇酵母(*M. pulcherri-ma*)和核果梅奇酵母(*M. fructicola*);红酵母属(*Rhodotorula*)有 1 个种,为胶红酵母(*R. mucilaginosa*);酿酒酵母属(*Saccharomyces*)有 1 个种,为酿酒酵母(*S. cerevisiae*)。在鉴定出的 3 个属中,梅奇酵母属(*Metschnikowia*)在昆明地区葡萄果粒中出现频率最高,为昆明地区的优势酵母属。

2.3 酿酒酵母的 SSR 分析

SSR 分析结果表明,所分离出来的 23 个酿酒酵母分属 4 个不同的菌株(具有不同的 SSR 指纹图谱),其中菌株 KA17 的 SSR 图谱见图 2。将这些菌株的指纹图谱与国际酿酒酵母指纹图谱库比对后,发现其中有 1 个与欧洲商用菌株 X5 的指纹图谱完全一致,另外 3 个菌株的指纹图谱并未匹配到亲缘

关系明显较近的国际菌株,表明在昆明的葡萄植株上栖息着具有自己遗传特征的酿酒酵母居群。

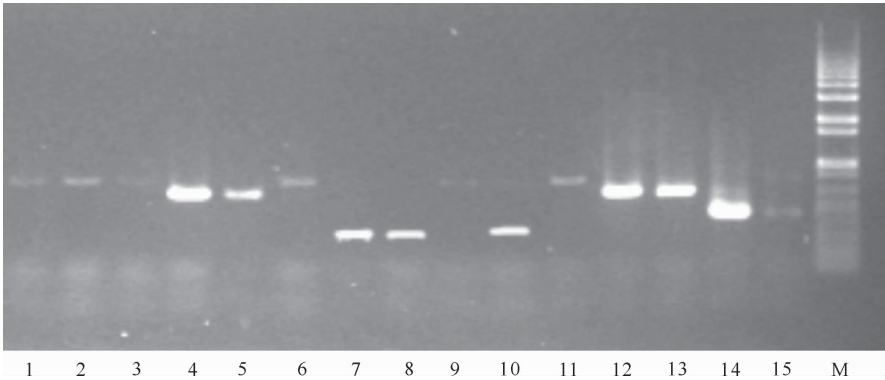


图 1 云南昆明部分酵母菌落 ITS 区 PCR 扩增电泳图谱
1~15. 酵母菌落 ITS-PCR 的扩增产物;M. Marker, 为 1 kb plus ladder (Invitrogen)
Fig. 1 ITS-PCR electrophoresis of some yeast colonies of Kunming, Yunnan
1—15. ITS-PCR products of yeast colonies;M. Marker, was 1 kb plus ladder (Invitrogen)

表 2 5 种酿酒相关酵母的 ITS 序列长度和 G+C 含量

Table 2 Lengths and G+C contents of ITS sequences of 5 yeast species

编号 Number	种名 Species	ITS 序列 ITS sequence	
		长度/bp Length	G+C 含量/% Content of G+C
1	美极梅奇酵母 <i>M. pulcherrima</i>	369	44.4
2	金佩梅奇酵母 <i>M. chrysoperlae</i>	358	44.1
3	核果梅奇酵母 <i>M. fruticola</i>	318	43.7
4	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	771	39.9
5	胶红酵母 <i>R. mucilaginosa</i>	603	48.9

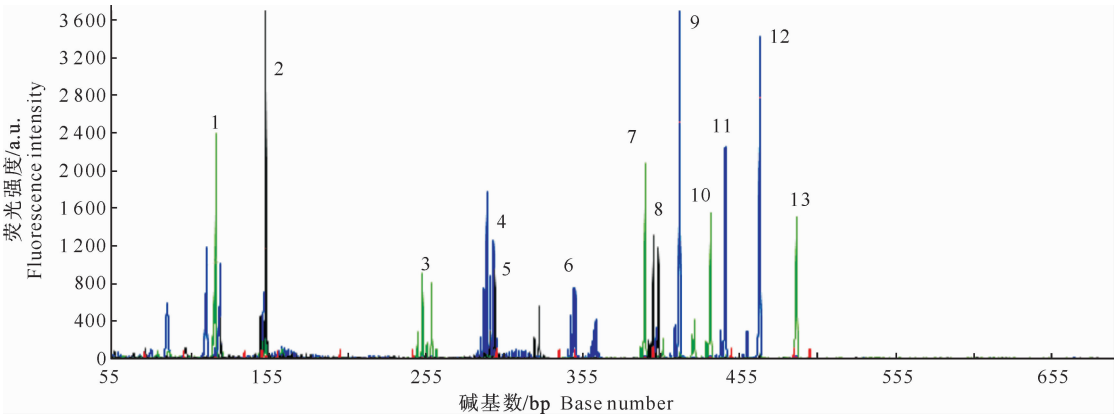


图 2 酿酒酵母菌株 KA17 的微卫星指纹图谱
1,3,7,10,13. YOR267C、YFR028C、YOL109W 扩增的产物;2,5,8. YML091C、YDR160W、YGL014W 扩增的产物;
4,6,9,11,12. MAT alphaa、YPL009C、YBR240C、YLL049W、YGL139W 扩增的产物

Fig. 2 Microsatellite fingerprinting of *Saccharomyces cerevisiae* strain KA17

1,3,7,10,13. PCR products of YOR267C, YFR028C, and YOL109W; 2,5,8. PCR products of YML091C, YDR160W and YGL014W;
4,6,9,11,12. PCR products of MAT alphaa, YPL009C, YBR240C, YLL049W, and YGL139W

3 讨 论

目前,传统多是通过形态学、生理生化性状等对酿酒酵母进行分析,然后将试验结果与标准系统进行对比得出鉴定结论。但在菌落形态研究中发现,外形相似的菌落,却可能分属于不同的属,如外形虽

皆为乳白色、奶酪状中间突起,但有些是酿酒酵母(如 KA04),有些却是梅奇酵母(如 KA13);有些外形有一定差异的菌落却是同一种菌种,如表面光滑、光亮的 KA17 与边缘光滑、暗淡的 KB38 均属于酿酒酵母。酵母属菌种显微形态主要以单细胞形式存在,显微观察结果表明,各属间的细胞性状很接近,

属内种间的细胞差异几乎观察不到(数据未列出)。因此,形态学观察无法提供有效的分类学信息。酵母属各种间生理生化差异有限,而且这些菌种的表型性状不稳定。有研究表明,以生理生化指标为依据,有时可将同一菌株的冷冻干燥保藏株和多代斜面保藏株鉴定为不同的种^[16]。因此,仅将生理生化特征差异作为酵母属各种间的分类依据并不可靠,而且该方法也可能将种水平之下菌株之间的差异误认为是种间差异。

本研究收集了昆明官渡区三瓦村的葡萄酒相关酵母,对其形态特征、培养特征等进行了研究,并运用 5.8S-ITS 扩增片段的 RFLP 分析及序列分析确定了菌株的种类归属。本研究结果表明,自昆明葡萄浆果果皮中分离鉴定出的所有酿酒相关酵母菌株分属于梅奇酵母属、红酵母属、酿酒酵母属等,其中梅奇酵母属出现频率最高,为昆明地区葡萄表皮酵母的优势属。需要指出的是,本研究是用 SelMed 富集培养基培养后再分离鉴定的,而富集培养后的分离鉴定不易反映真实的菌落结构。上述酵母在以往的研究^[7-9]中均出现过,且以往关于葡萄园中葡萄酒相关酵母的研究结果以梅奇酵母属为优势或常见属的报道也较多^[17-20]。另外,本研究还进一步用微卫星指纹图谱对分离筛选的 23 个酿酒酵母进行了鉴定,并发现了 1 株与欧洲商用菌株 X5 指纹图谱完全一致的菌株,但该菌株在昆明地区并未用于酿酒,而在欧洲得到了广泛应用,因此推测该菌株很可能是从欧洲的酒庄逃逸到葡萄植株上,而后随葡萄植株(或接穗)被引进到昆明。值得注意的是,不同研究报告中关于微卫星的菌株区分能力有一定差异^[1,13],这可能与其所用的微卫星引物不同有关。传统的酵母菌分类及鉴定准确率较低,本研究在分子水平上以 DNA 序列为分类的依据,大大提高了菌种分类的准确率。

4 结 论

1)本研究在分子水平上以 DNA 序列及微卫星指纹图谱为鉴定的依据,大大提高了菌种鉴定的准确率,并可将鉴定水平提高至种下水平。

2)在昆明的葡萄园中至少栖息了 5 种酵母,包括酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、胶红酵母(*R. mucilaginosa*)、以及梅奇酵母属的金佩梅奇酵母(*M. chrysoperlae*)、美极梅奇酵母(*M. pulcherrima*)和核果梅奇酵母(*M. fructicola*)等。

3)分离自昆明官渡区三瓦村的葡萄酒相关酵母

部分可能源于欧洲,是随葡萄植株(或接穗)被引进到昆明的。

[参考文献]

- [1] Romano P, Capece A, Serafino V, et al. Biodiversity of wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* as tool to complement and optimize wine quality [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(9): 1797-1802.
- [2] Pretorius I S. Tailoring wine yeasts for the new millenium; Novel approaches to the ancient art of winemaking [J]. Yeast, 2000, 16(8): 675-729.
- [3] Caruso M, Fiore C, Contursi M, et al. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002, 18(2): 159-163.
- [4] Cocolin L, Manzano M, Rebecca S, et al. Monitoring of yeast population changes during a continuous wine fermentation by molecular methods [J]. American Journal of Enology and Viticulture, 2002, 53(1): 24-27.
- [5] Espinosa J C, Fernandez-Gonzalez M, Ubeda J, et al. Identification of wine yeasts by PCR-RFLP without previous isolation on plate [J]. Food Technology and Biotechnology, 2002, 40(2): 157-160.
- [6] Martinez C, Cosgaya P, Vázquez C, et al. High degree of correlation between molecular polymorphism and geographic origin of wine yeast strains [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(6): 2185-2195.
- [7] Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, et al. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(1): 329-337.
- [8] Dlačhy D, Tornai-Lehoczi J, Peter G. Restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA as a taxonomic tool in yeast identification [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1999, 22(3): 445-453.
- [9] Zhang H Y, Lee S A, Bradbury J, et al. Yeasts isolated from New Zealand vineyards and wineries [J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2010, 16(3): 491-496.
- [10] Li S S, Cheng C, Li Z, et al. Yeast species associated with wine grapes in China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 138(1/2): 85-90.
- [11] 朱丽霞, 李红梅, 郭东起, 等. 新疆慕萨莱思自然发酵过程中酵母菌表型多样性及优势菌分析 [J]. 食品科学, 2012, 33(7): 142-147.
Zhu L X, Li H M, Guo D Q, et al. Phenotype diversity and dominant species of yeasts during spontaneous fermentation process of Musalais from Xinjiang [J]. Food Science, 2012, 33(7): 142-147. (in Chinese)
- [12] 王泽举, 王汝瑛, 孙悦, 等. 几株酵母菌的分子系统学鉴定 [J]. 食品科学, 2012, 33(15): 195-200.
Wang Z J, Wang R Z, Sun Y, et al. Molecular phylogenetic identification of wine-related yeasts [J]. Food Science, 2012, 33

(15):195-200. (in Chinese)

[13] Bradbury J E,Richards K D,Niederer H A,et al. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains [J]. Antonie van Leeuwenhoek,2005,89(1):27-37.

[14] Schuller D,Casal M. The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis [J]. Antonie van Leeuwenhoek,2007,91(2):137-150.

[15] Howell K S,Bartowsky E J,Fleet G H,et al. Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation [J]. Letters in Applied Microbiology,2004,38(4):315-320.

[16] 白逢彦,贾建华,梁慧燕. 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 [J]. 菌物系统,2002,21(1):27-32.

Bai F Y,Jia J H,Liang H Y. Molecular taxonomic study on the problematic *Candida* strains based on 26S rDNA D1/D2 domain sequence comparison [J]. Mycosystema,2002,21(1):27-32. (in Chinese)

[17] Nurgel C,Erten H,Canbas A,et al. Yeast flora during the fermentation of wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Emir and *Kalecik karasi* grown in Anatolia [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2005,21(6/7):1187-1194.

[18] Sipiczki M. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion [J]. Applied and Environmental Microbiology,2006,72(10):6716-6724.

[19] Lopandic K,Tiefenbrunner W,Gangl H,et al. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines [J]. FEMS Yeast Res,2008,8(7):1063-1075.

[20] Comitini F,Ciani M. Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes [J]. Annals of Microbiology,2008,58(3):489-493.

(上接第 134 页)

[26] 葛钟麟. 中国经济昆虫志,第 10 册. 同翅目: 叶蝉科 [M]. 北京:科学出版社,1966:170.

Kuoh C L. Economic insect fauna of China: Fasc. 10. Homoptera:Cicadellidae [M]. Beijing: Science Press,1966:170. (in Chinese)

[27] 朱俊庆. 小绿叶蝉发生趋势预测 [J]. 茶叶科学,1986,6(2):41-46.

Zhu J Q. Prediction of seasonal abundance of the tea green leafhopper, *Empoasca flavescens* [J]. Journal of Tea Science,1986,6(2):41-46. (in Chinese)

[28] 巫厚长,涂徐孙,程雪尧,等. 竹醋液对田间防治斜纹夜蛾和茶小绿叶蝉的增效研究 [J]. 中国农学通报,2008,24(7):381-383.

Wu H C,Tu X S,Cheng X Y,et al. Study on the enhance effects of bamboo vinegar added to insecticide on controlling *Spodoptera litura* and *Empoasca flavescens* in the field [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2008,24(7):381-383. (in Chinese)

[29] 朱建国,况荣平,扈克明,等. 茶小绿叶蝉在不同茶树品种上的生长发育生殖及空间分布 [J]. 动物学研究,1993,14(3):241-245.

Zhu J G,Kuang R P,Hu K M,et al. The development, reproduction and spatial distribution on lesser green leafhopper (*Empoasca flavescens*) on different tea cultivars [J]. Zoological Research,1993,14(3):241-245. (in Chinese)

[30] Hazarika L K,Bhuyan M,Hazarika B N. Insect pests of tea and their management [J]. Annual Review of Entomology,2009,54:267-284.

[31] Andrews E A. Insect pests of tea in North-East India during the Season 1919 [J]. Quarterly Journal of the Indian Tea Association,1920(2):27-36.

[32] Delong D M. A revision of the American species of *Empoasca* known to occur north of Mexico [J]. United States Department of Agriculture, Washington, DC. Technical Bulletin,1931,231:1-59.

[33] Cendana S M,Baltazar C R. A biological study of *Empoasca flavescens* Fabricius (Cicadellidae, Homoptera) [J]. Philipp Agr,1947,31:1-22.

[34] Muraleedharan N. Pest control in Asia [M]//Tea. The Netherlands:Springer,1992:375-412.

[35] Yoo J,Lee J H,Kim D S,et al. Comparison of major infestations between conventional tea growing and organic tea growing at sulloc tea plantation in Jeju Island [J]. Korean Journal of Organic Agriculture,2011,19:13-16.

[36] 赵冬香,陈宗懋,程家安. 茶小绿叶蝉优势种的归属 [J]. 茶叶科学,2000,20(2):101-104.

Zhao D X,Chen Z M,Cheng J A. Belongingness of tea leafhopper dominant species [J]. Journal of Tea Science,2000,20(2):101-104. (in Chinese)

[37] 中国科学院动物研究所. 中国农业昆虫(上) [M]. 北京:农业出版社,1986.

Institute of Zoology,Chinese Academy of Science. Chinese agricultural entomology (I) [M]. Beijing: Agricultural Press,1986. (in Chinese)