

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201909012

# 基于高通量测序技术的香格里拉葡萄酒产区 根际微生物多样性研究\*

杨 敏, 殷 绒, 张国涛, 邵建辉, 杜 飞, 邓维萍, 朱书生\*\*

(云南农业大学, 农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 云南生物资源  
保护与利用国家重点实验室, 云南 昆明 650201)

**摘要:**【目的】明确香格里拉地区不同区域葡萄根际土壤微生物群落多样性, 为香格里拉产区葡萄根际微生物资源的筛选和利用提供理论依据。【方法】采集香格里拉地区 4 个不同葡萄园中葡萄根际土壤, 提取土壤微生物总 DNA, 应用 Illumina Miseq 高通量测序技术分析根际土壤微生物多样性。【结果】根际土壤微生物高通量测序分析结果表明: 根际真菌的测定可以将其归类到 6 门 131 属, 其中子囊菌门和担子菌门为优势菌; 根际细菌的测定可以将其归类到 50 门 467 属, 其中变形菌门、放线菌门和酸杆菌门是优势类群。不同海拔葡萄园的土壤样品中真菌相对丰度较高的为镰刀菌属 (*Fusarium*)、*Laetisaria*、生赤壳属 (*Bionectria*)、和 *Archaeorhizomyces*, 细菌相对丰度较高的为红游动菌属 (*Rhodoplanes*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 和 *Steroidobacter*。不同葡萄园间根际土壤菌群丰度存在差异, 达日葡萄园土样中真菌的丰度增加明显, 包括镰刀菌属 (*Fusarium*)、生赤壳属 (*Bionectria*)、毛壳菌属 (*Chaetomium*)、白赤壳属 (*Haematonectria*)、丝核菌属 (*Rhizoctonia*) 和拟青霉属 (*Paecilomyces*); 奔子栏葡萄园土样中细菌的丰度增加明显, 包括拟杆菌属 (*Bacteroides*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、席藻属 (*Phormidium*)、*Blautia*、德沃斯氏菌属 (*Devosia*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。冗余分析结果表明: 土壤的电导率、有机质含量、碱解氮和速效钾对根际细菌群落组成影响较大, 而速效磷和 pH 值影响不明显。【结论】香格里拉产区葡萄根际微生物多样性丰富, 其中达日葡萄园土样中真菌丰度明显增加的种类较多, 奔子栏葡萄园土样中细菌的丰度增加明显。不同区域根际细菌群落受土壤的电导率、有机质含量、碱解氮和速效钾含量影响较大。香格里拉产区葡萄园根际微生物多样性的研究为利用和开发产区特色微生物提供了理论依据。

**关键词:** 赤霞珠; 根际微生物; 多样性; 香格里拉; 高通量测序

中图分类号: S 154.3; S 663.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 03-0392-09

## Study on the Grape Rhizosphere Microbial Diversity in Shangri-La Wine Region by High-throughput Sequencing Technology

YANG Min, YIN Rong, ZHANG Guotao, SHAO Jianhui,  
DU Fei, DENG Weiping, ZHU Shusheng

(Key Laboratory of Agrobiodiversity and Pest Management, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University,  
State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Kunming 650201, China)

**Abstract:** [Purpose] To clarify the community diversity of rhizosphere microbes from different

收稿日期: 2019-09-15 修回日期: 2020-03-30 网络首发时间: 2020-06-18 09:15:50

\*基金项目: 云南省中青年后备人才项目 (2017HB024); 云南省万人计划青年拔尖人才项目; 国家自然科学基金项目 (31760535)。

作者简介: 杨敏 (1981—), 女, 四川南充人, 博士, 副教授, 主要从事作物多样性与病害控制研究。

E-mail: yangminscnc@126.com

\*\*通信作者 Corresponding author: 朱书生 (1979—), 男, 云南曲靖人, 博士, 教授, 主要从事作物多样性与病害控制研究。E-mail: shushengzhu79@126.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200617.0920.001.html>



*Cabernet sauvignon* grown areas in Shangri-La, providing theoretical basis for screening and utilizing microorganism resources in Shangri-La region. [Methods] The rhizosphere soils were collected from different vineyards of Shangri-La, soil microbial total DNA was extracted, the microbial community structure and diversity were analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing system. [Results] The results of rhizosphere soil microbial analysis showed that rhizosphere fungi could be classified into 131 genera in 6 phyla, and the predominant fungi included Ascomycete and Basidiomycete, rhizosphere bacteria could be classified into 50 phyla and 467 genera, among which Proteobacteria, Actinomycetes and Acidobacteria were the dominant phyla. In different vineyards of Shangri-La, the dominant fungi identified in soil were *Fusarium*, *Laetisaria*, *Bionectria* and *Archaeorhizomyces*; and the dominant bacteria were *Rhodoplanes*, *Bacteroides*, *Nitrospira* and *Steroidobacter*. However, the abundance of rhizosphere microbe was different among different vineyards. The abundance of fungi in soil sample from Dari vineyard increased significantly, including *Fusarium*, *Bionectria*, *Chaetomium*, *Haematonectria*, *Rhizoctonia* and *Paecilomyces*, while the abundance of bacteria in the soil samples from Benzilan vineyard was significantly increased, including *Bacteroides*, *Rhodococcus*, *Phormidium*, *Blautia*, *Devosia* and *Bacillus*. The results of redundancy analysis showed that soil conductivity, organic matter content, alkali-hydrolyzable nitrogen and available potassium had a great influence on rhizosphere bacterial community composition, but the effect of available phosphorus and pH value was not obvious. [Conclusion] The grape rhizosphere microbial diversity in the Shangri-La region is very rich, the fungi abundance in Dari vineyard was increased significantly, while the bacteria abundance in Benzilan vineyard was up-regulated significantly. The soil conductivity, organic matter content, alkali-hydrolyzable nitrogen and available potassium in different areas have great influence on rhizosphere bacterial community. The study of grape rhizosphere microbial diversity in Shangri-La could provide a theoretical basis for the utilization and development of characteristic microorganisms in this area.

**Keywords:** *Cabernet sauvignon*; rhizosphere microbes; diversity; Shangri-La; high-throughput sequencing

香格里拉地区是中国生物多样性最丰富的地区之一, 包含了丰富的地质地貌、生物物种和生态系统多样性<sup>[1]</sup>。香格里拉葡萄产区位于青藏高原南缘横断山区金沙江和澜沧江流域海拔1 700~3 000 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。该区域具有土壤沙质深厚、昼夜温差大、降雨量少和光照辐射量大等独特的生态环境, 因而能够生产优质的酿酒葡萄原料<sup>[2-3]</sup>。

酿酒葡萄在生长过程中, 受葡萄园土壤类型、地理地形、光照、降水量和昼夜温差等自然因素的影响<sup>[4]</sup>。目前, 世界上许多葡萄酒产地如西班牙、意大利、法国、美国和澳大利亚等的本土微生物菌群已经被广泛研究, 中国葡萄栽培区域广阔, 葡萄种植区复杂多样的生态地理条件势

必蕴藏着丰富的微生物资源。魏玉洁等<sup>[5]</sup>应用高通量测序技术对新疆产区葡萄果实、叶片及果园土壤微生物多样性进行了研究, 结果显示: 土壤中的微生物种类数量多、种类复杂, 其次是叶片和果实上的微生物。酿酒葡萄种植园复杂的微生物区系为筛选利用葡萄酒产区特色微生物提供了理论支撑。

土壤微生物的深入研究依赖于研究方法的不断发展。传统的微生物平板分离培养法建立于19世纪末, 它主要利用不同营养成分的培养基对土壤可培养微生物进行分离培养, 然后通过各种微生物菌落形态及其菌落数来测定微生物的种类及数量<sup>[6]</sup>, 其优点是成本低和易操作, 可以提供活的、异养类型的种群信息。但土壤微生物数量巨大, 种类繁多, 传统方法遗漏了土壤中绝大多

数不可培养的微生物,难以反映土壤微生物群落的丰度及其作用机制。90年代后期以 rRNA 为基础的分子指纹图谱技术、克隆文库法以及高通量测序技术的快速发展极大地推动了植物根际微生物研究的进展。分子生物学的方法不再依赖微生物培养,它比微生物培养技术能够更加全面地揭示根际土壤中微生物的信息。随着现代分子生物学的不断发展,高通量测序技术广泛应用于根际微生物的研究中,是目前应用非常普遍的新一代测序技术,能够通过从土壤样品中直接提取全部微生物的总 DNA,构建宏基因组文库,将得到的数据进行序列拼接和注释,还可与数据库中已提交的已知微生物种类比对,从而确定土壤中微生物的种类等,能更加真实全面地揭示环境中根际微生物群落的复杂性和多样性<sup>[7]</sup>。

随着云南香格里拉产区葡萄与葡萄酒研究的深入开展,与葡萄酒相关的酵母研究也备受关注。目前,研究主要集中在该区域独特的地理气候对酿酒葡萄生长和品质的影响<sup>[3,8-9]</sup>、酿酒葡萄自然发酵液中酿酒酵母和非酿酒酵母菌的分离鉴定和多样性<sup>[10-11]</sup>等方面,对于葡萄园中根际微生物的研究未见相关报道。本研究利用高通量测序技术分析香格里拉产区 4 个不同区域葡萄园中葡萄根际土壤微生物的多样性,揭示不同区域微生物群落之间的区别和联系,为香格里拉产区葡萄根际微生物资源的筛选和利用提供理论依据,以期为该产区优质葡萄酒原料的生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

试验共采集香格里拉地区 4 个区域的土壤,分别为云南省德钦县奔子栏镇、达日村、斯农村及阿东村不同海拔的酿酒葡萄园(表 1)。栽培品种均为 10 年生赤霞珠(*Cabernet sauvignon*)。取样工作均在葡萄采收期进行,每一海拔高度随机选取 3 个葡萄园,每个葡萄园以“S”形取样法分别选取 5 个样点,以树干为中心,挖取离树干约 30 cm 的行内土壤,从挖出的土壤中轻轻取出根系,抖落根系上附着的大块土壤,然后收集根系上附着的粒状或粉状土壤,将 5 个样点的根际土均匀混合成 1 个土壤样本。将来自不同采样点的

表 1 供试土壤样品采集地信息

Tab. 1 Information of soil sample collection sites

葡萄园 vineyards	经纬度 longitude and latitude	海拔/m altitude
奔子栏 Benzilan (BZL)	N28°14.40', E99°18.19'	2 030.0
达日 Dari (DR)	N28°36.53', E99°09.98'	2 213.2
斯农 Sinong (SN)	N28°29.48', E98°48.15'	2 252.5
阿东 Adong (AD)	N28°33.80', E98°52.28'	2 635.0

葡萄根际土低温运回实验室,过 2 mm 筛后将每个土样分成 2 组,一组置于-80℃冰箱,另一组自然风干用于理化性质的测定。

### 1.2 土壤理化性质测定

风干及过筛后的土壤样品进行以下理化性质分析:pH 值、电导率、有机质、碱解氮、速效钾和有效磷。pH 值使用 pH 计测定;电导率使用电导率仪测定;有机质测定采用重铬酸钾容量法—水合热法测定;碱解氮采用 NaOH 碱解—扩散法测定;速效钾采用醋酸铵浸提法测定;有效磷采用碳酸氢钠浸提—钼锑抗比色法测定<sup>[12]</sup>。

### 1.3 土壤总 DNA 的提取及 ITS 和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

土壤样品总 DNA 采用 PowerSoil® DNA Isolation Kit 试剂盒进行提取。采用引物 IFS5-1737F 和 ITS2-2043R 扩增土壤真菌 ITS<sub>1</sub> 区;采用引物 515F 和 907R 扩增土壤细菌 16S rRNA 基因 V3~V4 区。50 μL PCR 反应体系为:2× Premix Taq 25 μL,引物(10 mmol/L)各 1.0 μL,DNA 模板 3.0 μL,灭菌超纯水 20 μL。PCR 反应条件为:95℃变性 5 min;94℃变性 30 s,52℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 30 个循环;72℃反应 10 min,扩增后的 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带并进行浓度测定。

### 1.4 高通量测序及分析

经纯化检测后的样品送到北京计算中心进行 Illumina Miseq 高通量测序。测序得到的原始下机数据(Raw reads)经过拼接和过滤,得到高质量的 Tags 数据(Clean Tags),然后进行 Tags 截取、过滤和除嵌合体序列的处理,得到最终的有效数据(Effective Tags)。基于质控合格的有效数据进行后续生物信息分析:根据特定的阈值(默认选取 97%)进行 OTU 聚类,并进行物种注释和物种分类分析;后续基于 OTU 的分析,可以获得样品的丰度信息、样本内 α 多样性指数和样本间

β 多样性指数信息；通过多种统计比较，可以挖掘样品之间的群落结构和物种组成差异。

1.5 数据统计分析

利用 Microsoft Excel 2013 进行数据处理，用 SPSS 19.0 软件 Duncan’s 法进行单因素方差分析。将门和属水平上的分类信息进行聚类，应用软件 R (Pheatmap) 绘制 Heatmap 图。用冗余分析 (redundancy analysis, RDA) 明确土壤理化性质对土壤根际细菌群落的影响。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

由表 2 可知：阿东葡萄园土壤的电导率、有效磷和速效钾含量均显著高于其他 3 个葡萄园，但 pH 值显著降低；斯农葡萄园土壤的碱解氮和有机质含量高于或显著高于其他 3 个葡萄园，但电导率相对较低；达日和奔子栏葡萄园的土壤碱解氮、有机质和速效钾含量均明显偏低。不同葡萄园土壤理化性质差异可能与当地的种植水平和施肥管理措施有关。

2.2 土壤根际微生物物种多样性分析

2.2.1 土壤根际真菌物种多样性分析

由表 3 可知：香格里拉不同海拔土壤真菌 OTU 数间存在差异，斯农和阿东显著高于奔子栏

和达日葡萄样地中土壤真菌 OTU 数 ( $P<0.05$ )。随着测序深度的增加，覆盖率达到了 99.62%~99.83%。由多样性指数分析结果可知：群落丰富度指数 ACE 与 Chao1 均随葡萄园样地海拔的升高而呈现增加的趋势，其中斯农和阿东葡萄园样地的丰富度指数显著高于其他 2 个葡萄园样地 ( $P<0.05$ )；阿东葡萄园的 Shannon 指数和 Simpson 指数均显著高于其他 3 个葡萄园样地，且其他 3 个葡萄园间不存在显著差异。

2.2.2 土壤根际细菌物种多样性分析

由表 4 可知：斯农葡萄园样地土壤细菌的 OTU 数显著高于奔子栏和达日葡萄园 ( $P<0.05$ )。随着测序深度的增加，测序覆盖率达到了 94.80%~95.97%，说明测得的序列几乎涵盖了所有的属。由细菌物种多样性指数分析结果可知：细菌群落丰富度指数 ACE 与 Chao1 均随葡萄园样地海拔的升高而呈现为先增加后降低的趋势，其中斯农葡萄园样地的丰富度指数显著高于其他 3 个葡萄园样地；不同葡萄园样地间的 Shannon 指数无显著差异；奔子栏葡萄园样地的 Simpson 指数显著低于其他 3 个葡萄园样地 ( $P<0.05$ )，而其他 3 个葡萄园间不存在显著差异；斯农葡萄园的 Shannon 指数与 Simpson 指数均略高于其他 3 个葡萄园样地。

表 2 不同葡萄园中供试土壤样品理化性质

Tab. 2 Physical and chemical properties of tested soil samples in different wine vineyards

理化性质 physical and chemical properties	BZL	DR	SN	AD
电导率/( $\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) electronic conductivity	167.87±0.28 c	182.80±5.50 b	164.17±2.20 c	262.00±1.73 a
碱解氮/( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) alkali-hydrolyzale nitrogen	20.87±1.23 c	20.89±3.08 c	36.34±1.08 a	31.82±0.49 b
有机质/( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) organic matter	93.43±4.52 c	176.73±18.90 b	351.93±8.45 a	335.76±7.48 a
有效磷/( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) available phosphorous	234.66±11.52 b	238.34±8.62 b	221.53±9.32 b	317.30±15.56 a
速效钾/( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) available potassium	74.88±0.00 c	33.33±2.26 d	84.47±0.00 b	282.64±2.26 a
pH	7.23±0.03 a	7.26±0.01 a	7.25±0.01 a	7.16±0.01 b

注：同行数据后不同小写字母表示处理间有显著差异 ( $P<0.05$ )；下同。

Note: Data in the same line with different lowercase letters indicated significant difference ( $P<0.05$ ); the same as below.

表 3 不同葡萄园中供试土样真菌物种多样性指数

Tab. 3 Fungal diversity indexes in tested soil samples from different vineyards

评价指标 evaluation index	BZL	DR	SN	AD
OTU	943±6 c	1 179±86 b	1 866±100 a	1 873±42 a
覆盖率/% coverage	99.83	99.81	99.65	99.62
ACE	1 114±9 b	1 278±36 b	2 141±179 a	2 234±27 a
Chao1	1 120±38 b	1 306±24 b	2 144±228 a	2 243±23 a
Shannon	5.19±0.15 b	5.58±0.11 b	5.82±1.09 b	6.95±0.12 a
Simpson	0.920 0±0.02 b	0.934 4±0.00 b	0.918 8±0.05 b	0.976 7±0.00 a



表 4 不同葡萄园中供试土样细菌物种多样性指数  
Tab. 4 Bacterial diversity indexes in tested soil samples from different vineyards

评价指标 evaluation index	BZL	DR	SN	AD
OTU	9 435±113 b	8 950±320 c	10 158±195 a	9 659±120 ab
覆盖率/% coverage	95.97	95.53	94.80	95.13
ACE	11 752±139 d	12 733±339 c	14 588±112 a	13 711±63 b
Chao1	11 436±171 d	12 292±325 c	14 303±27 a	13 397±146 b
Shannon	10.55±0.00 a	10.97±0.00 a	11.25±0.00 a	11.08±0.00 a
Simpson	0.996 0±0.29 b	0.998 4±0.00 a	0.998 8±0.00 a	0.998 5±0.04 a

2.3 香格里拉不同海拔高度葡萄园根际微生物门水平群落结构组成分析

2.3.1 不同葡萄园真菌门水平群落结构组成

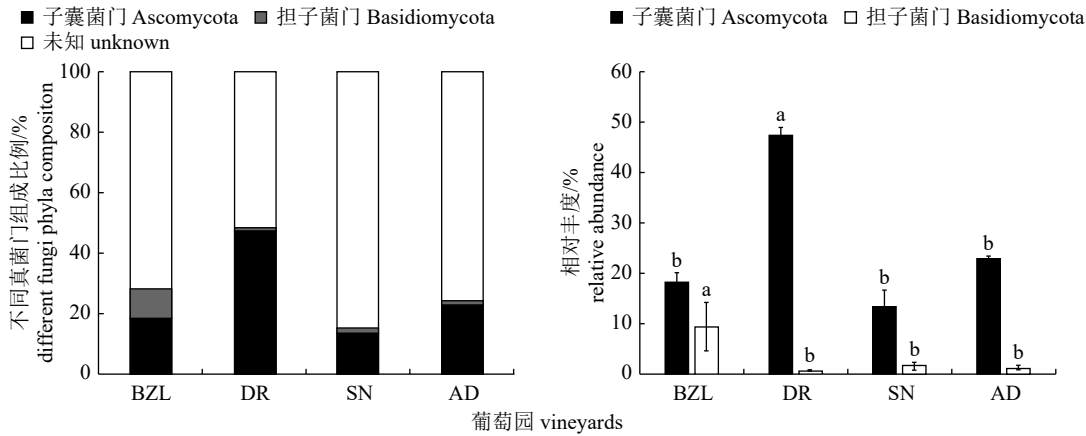
试验将土壤样品中测序获得的真菌 OTU 归类到 6 门 14 纲 39 目 71 科 131 属。在所有样品中都能检测到 2 个门水平上的物种 (图 1), 分别为子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota), 其平均值分别为 25.58% 和 3.28%, 共占据了全部真菌组成的 28.86%。在这 2 个类群中, 子囊菌门的相对丰度在达日葡萄园土样中显著高于其他 3 个葡萄园土样, 其次是阿东, 丰度最低的是斯农葡萄园; 担子菌门的相对丰度在奔子栏葡萄园土样中显著高于其他 3 个葡萄园土样 (图 1)。

2.3.2 不同葡萄园细菌门水平群落结构组成

试验将土壤样品中测序获得的细菌 OTU 归类到 50 门 147 纲 229 目 299 科 467 属。有 13 个门的物种在所有样品中均为优势类群 (图 2), 分别为变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actin-

obacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadete)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、浮霉菌门 (Planctomycete)、厚壁菌门 (Firmicutes)、TM7、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、WS3 和蓝细菌门 (Cyanobacteria)。其中, 香格里拉不同海拔高度葡萄园中的优势菌均为变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria) 和酸杆菌门 (Acidobacteria), 其平均值分别为 30.38%、17.48% 和 12.55%, 共占全部细菌组成的 60.41%。在这些类群中, 变形菌门的相对丰度在达日葡萄园土样中明显高于其他 3 个葡萄园土样; 放线菌门的相对丰度在奔子栏葡萄园土样中明显高于其他 3 个葡萄园土样; 酸杆菌门的相对丰度在斯农和阿东葡萄园土样中明显高于其他 2 个葡萄园土样 (图 2)。

香格里拉不同海拔高度的葡萄园中, 奔子栏葡萄园土样中占优势的 3 个门为放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmi-



注: 不同小写字母表示处理间有显著差异 ( $P < 0.05$ )。  
Note: Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

图 1 不同葡萄园土壤样品真菌在门水平的优势类群相对丰度  
Fig. 1 Relative abundance of dominant groups of fungi in different vineyard soil samples at phylum level

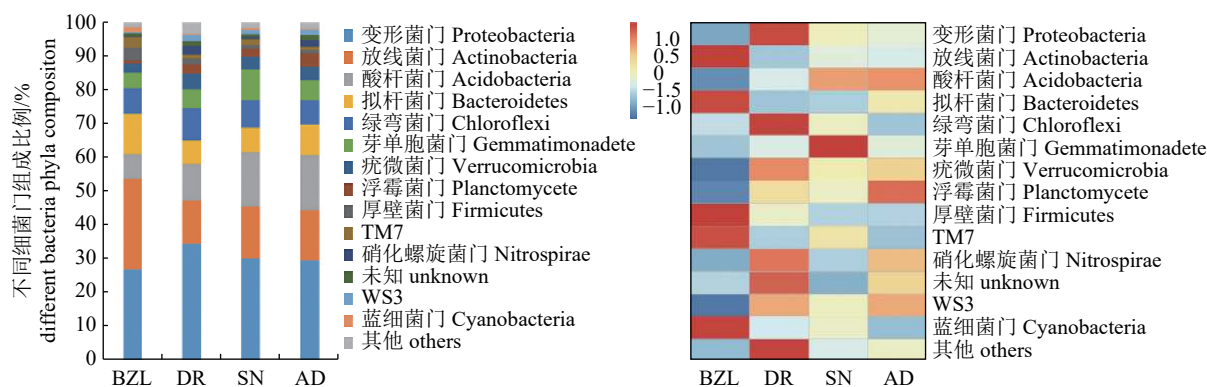


图2 不同葡萄园土壤样品细菌在门水平的优势类群相对丰度

Fig. 2 Relative abundance of dominant groups of bacteria in different vineyard soil samples at phylum level

cutes)、TM7 和蓝细菌门 (Cyanobacteria), 而变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、浮霉菌门 (Planctomycete)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae) 和 WS3 相对丰度较低; 达日葡萄园土样中占优势的为变形菌门 (Proteobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、浮霉菌门 (Planctomycete)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae) 和 WS3, 而放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和 TM7 相对丰度较低; 斯农葡萄园土样中占优势的为酸杆菌门 (Acidobacteria) 和芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes), 而拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和硝化螺旋菌门 (Nitrospirae) 相对丰度较低; 阿东葡萄园土样中占优势的为酸杆菌门 (Acidobacteria)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、浮霉菌门 (Planctomycete)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae) 和 WS3, 而绿弯菌门 (Chloroflexi)、厚壁菌门 (Firmicutes)、TM7 和蓝细菌门 (Cyanobacteria) 相对丰度较低 (图 2)。

## 2.4 香格里拉不同海拔高度葡萄园根际微生物属水平群落结构组成分析

### 2.4.1 不同葡萄园真菌属水平群落结构组成

由图 3 可知: 香格里拉不同葡萄园土样中丰度较高的真菌可分为 10 个属, 其中丰度最高的分别为镰刀菌属 (*Fusarium*)、*Laetisaria*、生赤壳属 (*Bionectria*) 和 *Archaeorhizomy*。奔子栏葡萄园土样中明显增加的属为 *Laetisaria*, 而丛赤壳属 (*Neonectria*) 的丰度则相对较低; 达日葡萄园土样中丰度明显增加的菌群较多, 包括生赤壳属 (*Bionectria*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、丝核菌属 (*Rhizoctonia*)、拟青霉属 (*Paecilomyces*)、白赤壳属 (*Haematonectria*) 和毛壳菌属 (*Chaetomium*); 斯农葡萄园土样中 *Archaeorhizomy* 和丛赤壳属 (*Neonectria*) 丰度明显增加, 生赤壳属 (*Bionectria*) 的丰度则相对较低; 阿东葡萄园土样中轮枝孢属 (*Verticillium*) 和丛赤壳属 (*Neonectria*) 丰度明显增高, 镰刀菌属 (*Fusarium*) 和拟青霉属 (*Paecilomyces*) 的丰度则相对较低。

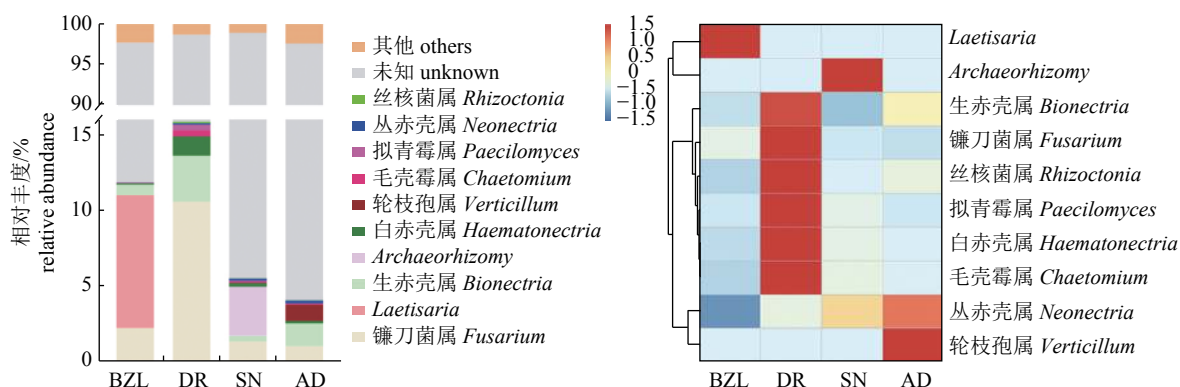


图3 不同葡萄园土壤样品真菌在属水平的优势类群相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of dominant groups of fungi in different vineyard soil samples at genus level

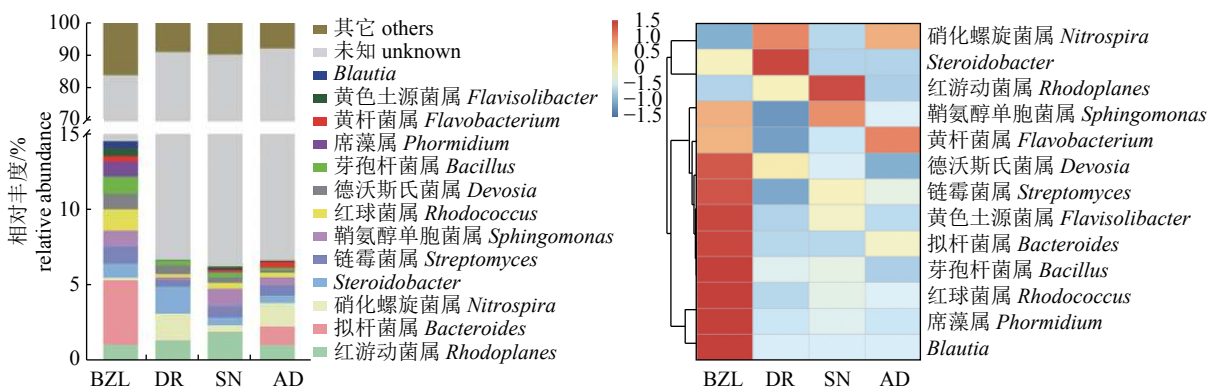


图 4 不同葡萄园土壤样品细菌在属水平的优势类群相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of dominant groups of bacteria in different vineyard soil samples at genus level

2.4.2 不同葡萄园细菌属水平群落结构组成

丰度较高的 13 个属的细菌在香格里拉不同葡萄园土样中的分布如图 4 所示。其中丰度较高的细菌为红游动菌属 (*Rhodoplanes*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*)、*Steroidobacter*、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)。香格里拉不同海拔高度的葡萄园中，奔子栏葡萄园土样中丰度明显增加的菌群较多，包括鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、德沃斯氏菌属 (*Devosia*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、黄色土源菌属 (*Flavisolibacter*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、

席藻属 (*Phormidium*) 和 *Blautia*，而红游动菌属 (*Rhodoplanes*) 和硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 丰度较低；达日葡萄园土样中明显增加的属为硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 和 *Steroidobacter*，其他菌属均表现较低的丰度；斯农葡萄园土样中红游动菌属 (*Rhodoplanes*) 和鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 丰度明显增加，其他菌属的丰度较低；阿东葡萄园土样中硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 和黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 丰度明显增高，其他菌属的丰度均较低。

2.5 土壤理化性质对根际细菌群落的影响

由图 5 可知：电导率、有机质含量、碱解氮和速效钾对根际细菌群落组成影响较大，而速效

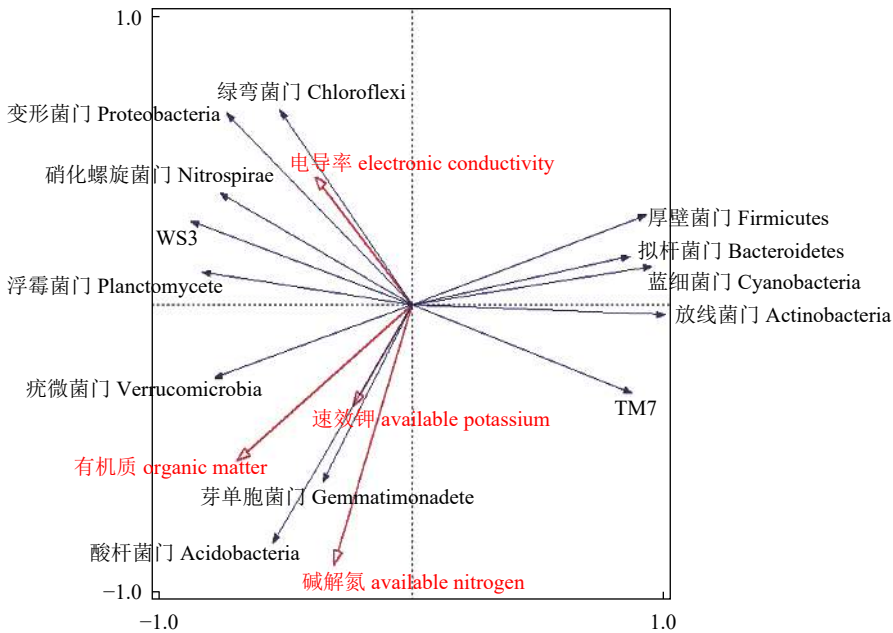


图 5 土壤样品细菌群落与土壤理化因子的冗余分析

Fig. 5 Redundancy analysis between bacterial communities and soil chemical properties



磷和 pH 值的影响不明显。绿弯菌门 (Chloroflexi)、变形菌门 (Proteobacteria)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、WS3、浮霉菌门 (Planctomycetes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia) 的丰度变化与电导率呈正相关;芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、变形菌门 (Proteobacteria)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、WS3、浮霉菌门 (Planctomycetes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia) 的丰度变化与有机质含量呈正相关;速效钾含量与芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、WS3、浮霉菌门 (Planctomycetes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia) 丰度变化呈正相关;碱解氮含量与芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、浮霉菌门 (Planctomycetes) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia) 的丰度变化呈正相关。厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、蓝细菌门 (Cyanobacteria) 和放线菌门 (Actinobacteria) 的丰度则与电导率、有机质含量、碱解氮和速效钾含量呈负相关。

### 3 讨论

本研究对香格里拉产区 4 个不同海拔葡萄园根际土壤微生物多样性分析结果表明:根际真菌的测定可以将其归类到 6 门 14 纲 39 目 71 科 131 属,其中子囊菌门 (Ascomycota) 和担子菌门 (Basidiomycota) 为优势菌;根际细菌的测定可以将其归类到 50 门 147 纲 229 目 299 科 467 属。有 13 个门水平上的物种在所有样品中均为优势类群,分别为:变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadete)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、浮霉菌门 (Planctomycete)、厚壁菌门 (Firmicutes)、TM7、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、WS3 和蓝细菌门 (Cyanobacteria)。已有研究表明:葡萄园土壤是一个天然的微生物菌株资源库,为微生物生长提供必需的碳源(氨基酸、有机酸和碳水化合物)、氮源和生长因子等<sup>[5,13]</sup>。在自然界中,根际微生物与土壤和植物之间存在着复杂的关系网<sup>[14]</sup>,一方面直接影响着土壤肥力与养分循环<sup>[15]</sup>,另一方面影响着植物生长和健康<sup>[16]</sup>。

因此,深入研究土壤微生物群落结构不仅可以揭示植株与微生物的生态关系,对开发利用有益的土壤微生物也有重要意义。

香格里拉产区葡萄根际微生物多样性分析结果显示:不同海拔的葡萄园的土壤样品中真菌相对丰度较高的为镰刀菌属 (*Fusarium*)、*Laetis-aria*、生赤壳属 (*Bionectria*) 和 *Archaeorhizomyces*,细菌相对丰度较高的为红游动菌属 (*Rhodoplanes*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、硝化螺旋菌属 (*Nitrospira*) 和 *Steroidobacter*。新疆产区 3 个不同葡萄园的土壤微生物研究结果显示:真菌的主要类群为酵母菌属 (*Saccharomyces*)、粪壳菌属 (*Sordaria*)、*Tetracladium* 和地丝霉属 (*Geomyces*);丰度最大的细菌为 *Kaistobacter*、节杆菌属 (*Arthrobacter*) 和斯克爾曼氏菌属 (*Skermanella*)<sup>[5]</sup>。由此可见,香格里拉产区的优势土壤微生物与新疆产区存在非常明显的差异。新疆是中国十大酿酒葡萄产区之一,而香格里拉产区是高原特色酿酒葡萄的新兴产区,二者的气候和土壤均存在较大差异,这可能是导致二者根际微生物差异明显的重要原因。已有研究表明:酿酒葡萄品质是由其品种特性和生长环境共同决定的,要种出果实品质上乘且具有明显风味的酿酒葡萄,气候和土壤条件非常重要<sup>[17]</sup>。葡萄根际微生物是葡萄根际微生态系统的重要组成部分,随着根际微生物群落的消长变化,葡萄根际微生态环境随之发生改变,影响葡萄果实品质的形成<sup>[18]</sup>。因此,需要进一步深入分析中国代表性的酿酒葡萄种植区根际微生物的组成和功能,并将根际微生物群落的变化与植株生长、果实品质和葡萄酒风味进行关联分析,或许可以从根际微生物的角度解析不同产区葡萄酒独特的风味。

RDA 分析是为了检测微生物群落组成与环境变量土壤理化性质之间的关系。在香格里拉的不同区域,土壤的电导率、有机质含量、碱解氮和速效钾对根际细菌群落组成影响较大,而速效磷和 pH 值影响不明显。绿弯菌门 (Chloroflexi)、变形菌门 (Proteobacteria)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirae)、WS3、浮霉菌门 (Planctomycetes)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 的丰度与土壤理化性质呈正相关,而厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、蓝细菌门 (Cyanobacteria)



和放线菌门 (Actinobacteria) 的丰度则与土壤理化性质呈明显的负相关关系。土壤根际细菌群落结构受根际土壤微环境诸多因素的影响, 如质地、矿物成分和有机质等, 而施肥、耕作和种植等不同葡萄园管理方式及重金属、有机污染物等外部因素有可能影响土壤的理化性质, 从而改变根际微生物群落的组成和分布<sup>[19-21]</sup>。

香格里拉葡萄产区是目前世界上海拔最高的酿酒葡萄产区之一。该区域独特的地理气候可能导致根际中某些微生物的选择性富集, 达日葡萄园土样中真菌丰度明显增加的种类较多, 奔子栏葡萄园土样中细菌的丰度增加明显。在特殊的环境条件甚至是环境胁迫下, 植物可以通过改变根系分泌物的组成和丰度来特异性地选择根际微生物群落组成<sup>[22-23]</sup>。因此, 后续试验亟需深入分析香格里拉产区特殊环境下特有的根际微生物种群, 并研究这些特征微生物的出现与哪些环境气象因子相关。

#### [ 参考文献 ]

- [1] 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, 2005.
- [2] 杨明攀, 康登昭, 蒋通, 等. 云南高原酿酒葡萄的特点及梅里冰葡萄酒成分分析[J]. 酿酒科技, 2007(10): 37. DOI: [10.13746/j.njkj.2007.10.010](#).
- [3] 张国涛, 朱书生, 何霞红, 等. 香格里拉地区不同留果量对赤霞珠果实品质的影响[J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2017, 32(5): 879. DOI: [10.16211/j.issn.1004-390X\(n\).2017.05.019](#).
- [4] RIBERAU-GAYON P, DUBOURDIEU D, DONECHE B. Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications[M]. New York: John Wiley and Sons, 2006.
- [5] 魏玉洁, 邹弯, 马文瑞, 等. 应用高通量测序技术研究新疆产区葡萄果实、叶片及果园土壤微生物多样性[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 162. DOI: [10.7506/spkx1002-6630-201806026](#).
- [6] YING Y X, DING W L, LI Y. Characterization of soil bacterial communities in rhizospheric and nonrhizospheric soil of *Panax ginseng*[J]. Biochemical Genetics, 2012, 50(11/12): 848. DOI: [10.1007/s10528-012-9525-1](#).
- [7] 王新珍, 王凤花, 孙瑞波, 等. 高通量测序技术及其在微生物分子生态学研究中的应用[J]. 中国生态农业学报, 2018, 26(10): 1593. DOI: [10.13930/j.cnki.cjea.180695](#).
- [8] 张国涛, 毛如志, 何霞红, 等. 香格里拉不同留叶数摘心对‘赤霞珠’葡萄果实品质的影响[J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2016, 31(5): 806. DOI: [10.16211/j.issn.1004-390X\(n\).2016.05.006](#).
- [9] 孙庆扬, 赵悦, 朱怡凡, 等. 香格里拉产区‘赤霞珠’葡萄果实品质积累规律[J]. 北方园艺, 2019(1): 42. DOI: [10.11937/bfy.20181629](#).
- [10] 杨宽, 毛如志, 赵悦, 等. 云南香格里拉葡萄酒产区酿酒相关酵母菌的生物多样性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2708. DOI: [10.13344/j.microbiol.china.180065](#).
- [11] 赵悦, 孙庆扬, 杨宽, 等. 香格里拉产区特色非酿酒酵母及自然发酵葡萄酒香气成分的研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(10): 93. DOI: [10.11882/j.issn.0254-5071.2018.10.018](#).
- [12] 杜森, 高祥照. 土壤分析技术规范[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [13] WAWRIK B, KERKHOF L, KUKOR J, et al. Effect of different carbon sources on community composition of bacterial enrichments from soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 6776. DOI: [10.1128/AEM.71.11.6776-6783.2005](#).
- [14] 孙跃志. 农作物根际微生物群落组成研究概述[J]. 农业灾害研究, 2019, 9(4): 120. DOI: [10.19383/j.cnki.nyzhyj.2019.04.050](#).
- [15] 张仕颖, 张乃明, 王瑾. 不同种植年限葡萄根际微生物区系及其与肥力因子的相关分析[J]. 云南农业大学学报 (自然科学), 2015, 30(1): 101. DOI: [10.16211/j.issn.1004-390X\(n\).2015.01.017](#).
- [16] ERWIN A, SIMON P, ANNA M, et al. Assessment of rhizobacteria from grapevine for their suppressive effect on the parasitic nematode *Xiphinema index*[J]. Crop Protection, 2012, 42: 36. DOI: [10.1016/j.cropro.2012.08.013](#).
- [17] 夏文旭. 酿酒葡萄根际土壤肥力与微生物多样性及生理活性研究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2016.
- [18] MARASCO R, ROLLI E, FUSI M, et al. Plant growth promotion potential is equally represented in diverse grapevine root-associated bacterial communities from different biopedoclimatic environments[J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 491091. DOI: [10.1155/2013/491091](#).
- [19] GANS J, WOLINSKY M, DUNBAR J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil[J]. Science, 2005, 309: 1387. DOI: [10.1126/science.1112665](#).
- [20] CORDERO-BUESO G, ARROYO T, SERRANO A, et al. Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(1): 23. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.021](#).
- [21] TAN Y, CUI Y S, LI H Y, et al. Rhizospheric soil and root endogenous fungal diversity and composition in response to continuous *Panax notoginseng* cropping practices[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 194: 10. DOI: [10.1016/j.micres.2016.09.009](#).
- [22] 韦海波, 毛心怡, 毛立晖, 等. 干旱胁迫对长雄野生稻根际微生物群落结构的影响[J]. 南昌大学学报 (理科版), 2018, 43(6): 596. DOI: [10.13764/j.cnki.ncdl.2018.06.017](#).
- [23] LUO L F, GUO C W, WANG L T, et al. Negative plant-soil feedback driven by re-assembly of the rhizosphere microbiome with the growth of *Panax notoginseng*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1597. DOI: [10.3389/fmicb.2019.01597](#).

责任编辑: 何馨成