

DOI: 10.11929/j.swfu.202106045

引文格式: 陈瑞, 杨德强, 赵长林. 基于高通量测序天麻土壤细菌群落结构分析 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学), 2023, 43(1): 74–87.

基于高通量测序天麻土壤细菌群落结构分析

陈 瑞¹ 杨德强² 赵长林¹

(1. 西南林业大学生物多样性保护学院, 云南昆明 650233; 2. 云南国诚农业发展有限公司, 云南昭通 657000)

摘要: 采集昭通彝良莽山镇不同年份种植天麻的土壤样品, 记录采集样本名称和样品编号; 选取其中3组, 通过高通量测序技术, 分析天麻种植土壤原壤、一麻壤和方竹壤的细菌群落结构变化及不同土壤中细菌物种丰度的差异。结果表明: 原壤中特有细菌 OTU > 方竹壤 > 一麻壤; 种植并收获一茬箭麻后, 与原壤相比一麻壤中特有细菌明显减少, 优势细菌丰度降低; 种植方竹修复后, 方竹壤中特有细菌数量恢复。说明通过种植当地经济作物方竹能修复天麻土壤细菌群落结构。

关键词: 天麻; 土壤; 细菌; 群落结构; 高通量测序

中图分类号: Q939; Q145 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-1914(2023)01-0074-14

Soil Bacterial Community Structure Analysis of *Gastrodia elata* Based on High Throughput Sequencing

Chen Rui¹, Yang Deqiang², Zhao Changlin¹

(1. College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming Yunnan 650233, China;
2. Yunnan Guocheng Agricultural Development Co., Ltd., Zhaotong Yunnan 657000, China)

Abstract: Soil samples of *Gastrodia elata* planted in different years were collected from Qiaoshan Town, Yiliang County, Zhaotong, Yunnan Province. The sample names and numbers were recorded in the book. Three groups were selected to analyze the bacteria changes in community structure and differences in species abundance among the original soil, a crop soil of *G. elata* planting soil and bamboo soil by high throughput sequencing technology. The results showed that the endemic bacteria OTU in the original soil was higher than bamboo soil and a crop soil; compared with the original soil, the endemic bacteria and the abundance of dominant bacteria decreased significantly after planting and harvesting; the number of endemic bacteria in the soil was restored based on the restoration experiment of bamboo planting, which indicated that the bacterial community structure in the soil of *G. elata* may be restored by rotation of local commercial crop bamboo.

Key words: *Gastrodia elata*; soil; bacteria; community structure; high throughput sequencing

天麻 (*Gastrodia elata*) 又名赤箭、离母、独摇草, 为兰科天麻属多年生共生草本植物, 主产于中国云南、贵州、湖南、湖北、陕西、四川等省, 其中云南省昭通市彝良县、永善县、绥阳县

等地区所产天麻为特色道地药材。天麻性平, 味甘, 归肝经, “此草独茎而叶攒其端, 无风自动, 故曰鬼独摇草, 天麻可用于头痛眩晕、肢体麻木、癫痫抽搐等症的治疗”^[1]。此外, 天麻广

收稿日期: 2021-06-16; 修回日期: 2021-12-20

基金项目: 云南省科技厅重点基础研究项目 (202001AS070043) 资助; 科技创新基金项目 (KY21008) 资助。

第1作者: 陈瑞 (1997—), 女, 硕士研究生。研究方向: 天麻连作障碍。Email: fungichenrui@163.com。

通信作者: 赵长林 (1985—), 男, 博士, 教授。研究方向: 天麻连作障碍。Email: fungichanglinz@163.com。

泛应用于食品领域, 其块茎中主要化学成分有天麻素、香荚兰醇、酚性化合物^[2], 能增强细胞免疫和机体非特异性免疫^[3-5]。然而, 天麻栽培存在连作障碍, 目前研究表明药用植物连作产生的化感自毒物质引起的土壤微生态变化是其发生连作障碍的重要原因^[6]。连作障碍是指在同一块土地上连续栽培同种作物时, 尽管在正常的栽培管理条件下, 也出现长势变弱、产量减少、品质降低、病虫害加重的现象, 其主要原因包括: 土传病害的影响、土壤微生物的影响、植物化感自毒作用、土壤酶活性变化、理化性质的改变。随着天麻栽培面积的不断扩大及中药材规范化种植的推行, 药用植物栽培中主要是土壤环境恶化导致连作障碍进而严重影响中药材规范化种植及种植基地建设, 连作障碍已成为限制天麻生产发展和体系构建的重要因素^[7-12]。

引起药用植物连作障碍的原因主要有三方面, 一是土壤微生物引起的病害, 二是根际化感作用, 三是土壤养分不足或营养元素缺失^[13]。前人研究证实, 作物根系分泌物、植株残茬腐解物为病原菌营造了良好的繁殖条件, 丰富的营养和寄主使病原菌快速增殖, 导致土壤病原菌的不断积累造成重茬问题, 由于植物残渣分解物和植物根系分泌物改变了根际微生物群落组成致使土壤微生物的比例失调引起连作障碍^[14-15]; 导致连作障碍发生的原因并非单一因素, 不同作物连作产生的主导因素也有所不同, 因此如何解决作物连作障碍一直是农林领域世界性的难题^[16]。

近年来, 我国药用植物与作物连作障碍研究逐渐受到重视, 该领域快速发展, 科研水平不断提升^[10]。但我国天麻连作障碍研究较少, 仍有许多卡脖子问题困惑麻农, 本研究基于在云南省昭通市彝良县荞山镇开展天麻种植前后及方竹修复后土样的采样, 用宏基因组测序方法揭示天麻种植土壤细菌群落结构变化, 进而为后期搞清天麻连作障碍成因及破障菌剂开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土样采集于云南省昭通市彝良县荞山镇, 该镇属于昭通地区天麻主产地, 位于 $104^{\circ}16'14''$ E, $27^{\circ}39'33''$ N, 平均海拔1650 m, 年均气温11℃, 年均降水量860 mm。山高坡陡, 常年多雾, 土壤为酸性或微酸性土, 含有丰

富的腐殖质, 适宜于天麻的生长。本研究分批次采样, 采样过程中土样设置3个重复, 使用50 mL康宁离心管进行分装, 确保土样完整无污染。取样完成后低温保藏, 每个样本置于-80℃冰箱中保存。本次采样区域为麻农开展林下种植天麻片区的天麻原始土、天麻1年土和方竹轮作土。采集土壤样品名称编号分组见表1。

表1 土壤样品编号及分组
Table 1 Soil sample number and assigned group

样品编号	样品分组	样品名称
Zhaochangl 019		
Zhaochangl 020	charlle001	天麻原始土
Zhaochangl 021		
Zhaochangl 015		
Zhaochangl 016	charlle002	天麻1年土
Zhaochangl 017		
Zhaochangl 032	charlle006	方竹轮作土
Zhaochangl 033		

1.2 试验方法步骤

1.2.1 基因组DNA提取

使用特定的DNA提取试剂盒, 提取样本的总基因组, DNA提取后使用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测DNA。

1.2.2 PCR扩增

引物: 16S引物V3+V4区域;
341F: CCTACGGNGGCWGCAG;
806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT。

1.2.3 PCR产物检测、纯化和定量

电泳检测, 使用Thermo Scientific公司Gene-JET试剂盒纯化并回收产物。

1.2.4 建库测序

用illumina测序平台进行测序, 主要有如下3个步骤: 1) PE reads拼接: 使用FLASH v1.2.7软件; 2) Tags过滤: 使用Trimmomatic v0.33软件; 3) 去除嵌合体: 使用UCHIME v4.2软件。

1.2.5 数据分析

划分OTU(Operational taxonomic units)、多样性及差异性分析, 利用QIIME2^[17]进行数据处理: 拼接(vsearch)^[18], 去除引物(cutadapt)^[19], 过滤低质量数据^[20], 基于有效数据进行去噪和物种分类分析, 形成扩增子序列变屏(AmpliCon Se-

quence Variants, ASV) 和物种分类等级的物种特征表 (Feature table)。

1.2.6 聚类分析

使用 QIIME (Version 1.8.0) 软件^[17]中的 UCLUST^[21]对 Tags 在 97% 的相似度水平下进行聚类、获得 OTU，基于 Siva (细菌) 分类学数据库，用柱形图显示各样品的分类学注释和 OTU 个数。

1.2.7 物种组成分析

利用相关软件绘制样本各分类学水平下的群落结构图，用特定的物种分类树进行研究，利用 Venn^[22]图展示样本之间共有、特有 ASV 数目，直观地表现出样本间 ASV 的重合情况，结合 ASV 所代表的物种，找出不同环境中的核心微生物。

1.2.8 物种差异分析

通过统计分析，找出分组间丰度变化差异显著的物种，比较组内差异和组间差异的大小，判断不同分组间的群落结构差异是否具有显著意义。在门、纲、目、科、属、种水平下进行组间物种差异显著性分析和物种 Metastat 差异分析；用软件 STAMP^[23]做组间的 Welch's t-test 检验，找出差异显著的物种。

1.2.9 物种多样性分析

进行 Alpha、Beta 多样性分析，并对物种注释在各个分类水平上进行群落结构的统计分析。通过 UniFrac 分析^[24]利用系统进化的信息来比较样本间的物种群落差异，主要有：

1) 主成分分析：主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 将多组数据的差异反映在坐标图上，通过分析不同样品 OTU (97% 相似性) 组成反映样品的差异和距离。

2) 主坐标分析：主坐标分析 (Principal coordinates analysis, PCoA) 与 PCA 类似，基于 binary jaccard, bray curtis, unweighted unifrac 和 weighted unifrac 距离进行分析，选取贡献率最大的主坐标组合进行作图展示。

3) 主加权组平均分析：通过非加权组平均法 (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean, UPGMA)，所产生的聚类树聚类分析，树枝的距离和聚类的远近可以观察样本间相似性。

4) 基于 OTU-Table 和上述 4 种距离矩阵绘制样本聚类热图，从聚类中了解样本之间的相似性，进行多样性指数与环境因子的相关性

分析。

2 结果与分析

2.1 土样细菌 OTU 组成与分析

基于有效 OTU 数据进行去噪和物种分类得到各个样本细菌 ASV (图 1)，由图 1 可知 Zhaochang 1021 细菌 ASV 最大，为 2034；Zhaochang 019 细菌 ASV 最小，为 1038，样本的细菌总 ASV 为 3004。

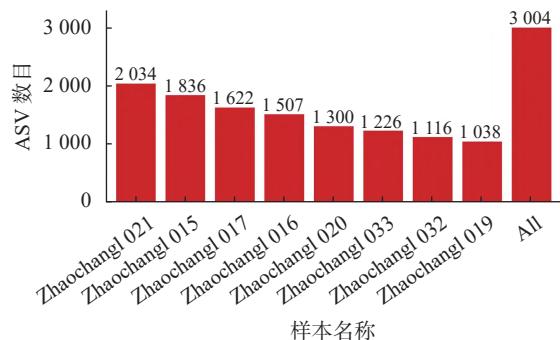


图 1 各样本 ASV

Fig. 1 ASV number per sample

将丰度小于 0.001 的 ASV 过滤掉，比较 3 组样本细菌 ASV (图 2)，由图 2 可知 3 组样本共有细菌 ASV 为 95，从 charlle001、charlle002 和 charlle006 特有细菌 ASV 可知，原壤 charlle001 特有细菌数量最多，其次为方竹壤 charlle006，二者均高于一麻壤 charlle002 所含有的特有细菌数量。结果表明：天麻原壤具有最多的特有细菌，但种植 1 年天麻后土壤中特有细菌减少，随后将地方经济作物方竹种植于一麻壤后，土壤中特有细菌数量呈现回升趋势。

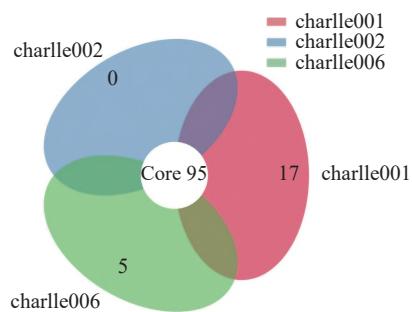


图 2 3 组样本 ASV 花瓣图

Fig. 2 ASV petal maps of 3 groups of samples

3 组样本细菌系统发育树结果见图 3，不同颜色的扇形表示 3 个不同的样品，扇形的大小表示该样品在该分类上相对丰度的比例大小。饼图下方的拉丁名代表相应的分类阶元，从系统发育分类树上可明确 3 组样本细菌按门主要可分为 Acidobacteria、Chloroflexi、Firmicutes、Proteobacteria、Planctomycetes 和 Verrucomicrobia；按纲主要可分为 Actinobacteria、Alphaproteobacteria、Ana-

erolineae、Chloroflexi、Gammaproteobacteria、Holophagae、Ktedonobacteria、Pedosphaerae、Phycisphaerae、Planctomycetia 和 Verrucomicrobiae；按目主要可分为 Bryobacterales、Burkholderiales、Cthoniobacterales、Ktedonobacterales、Pedosphaerales、Lachnospirales、Rhizobiales、Solibacterales 和 Tepidospaerales；按科主要可分为 Bacteoidales、Bryo-

bacteraceae、Chthoniobacteraceae、Koribacteraceae、Ktedonobacteraceae、Lachnospiraceae、Muribaculaceae、Nitrosomonadaceae、Pedosphaeraceae 和 Solibacteraceae；按属主要可分为 *Acidibacter*、*Acidothermus*、*Bryobacter*、*Clostridia*、*Koribacter*、*Solibacter* 和 *Udaeobacter*。

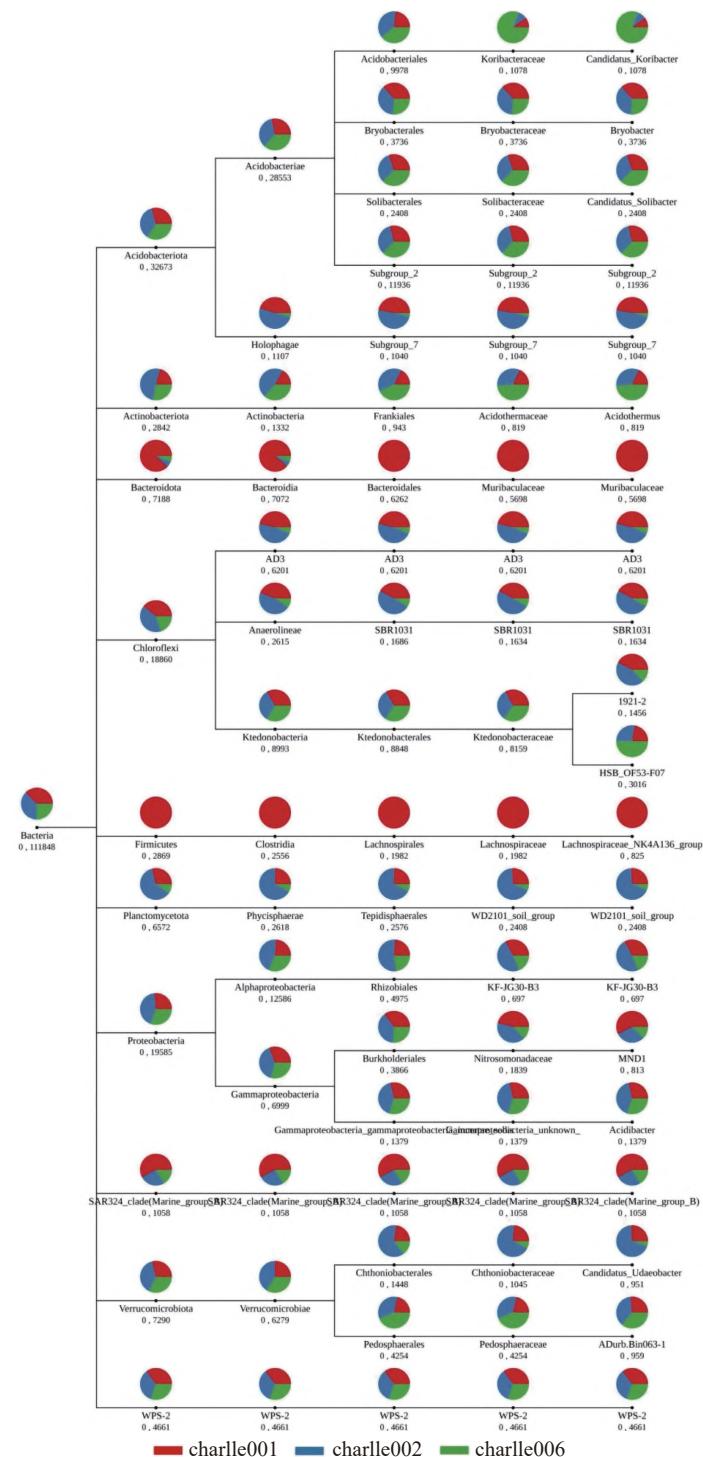


图 3 样本细菌分类学系统发育树

Fig. 3 The taxonomic phylogenetic tree of the sample bacteria

2.2 土样细菌群落结构及相对丰度

本研究将丰度低的部分物种合并为 Others 在图 4 中显示, 图 5 中 Unknown 代表未得到分类学注释的 ASV, 一种颜色代表一个物种, 色块长度表示物种所占相对丰度比例。单个样本在门水平分析的样本丰度(图 4)和种水平分析的样本丰度(图 5)分析结果表明: 样本丰度按门等级主要可分为 Acidobacteria、Actinobacteriota、Bacteroidota、Chloro-

flexi、Firmicutes、Gemmatimonadota、Latescibacterota、Myxococcota、Nitrospirota、Patescibacteria、Planctomycetota、Proteobacteria、SAR324、Verrucomicrobiota 和 WPS-2, 其中 Acidobacteria 丰度占比最大; 按种等级主要可分为 Bellilinea 和 Holophaga; 其中未得到分类学注释的细菌物种 Unknown 丰度所占比例较大。

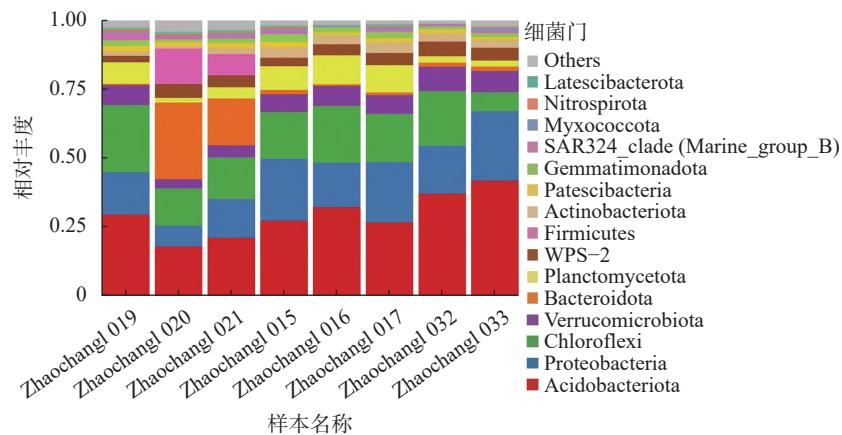


图 4 单个样本在门水平上的相对丰度
Fig. 4 Relative abundance of a single sample

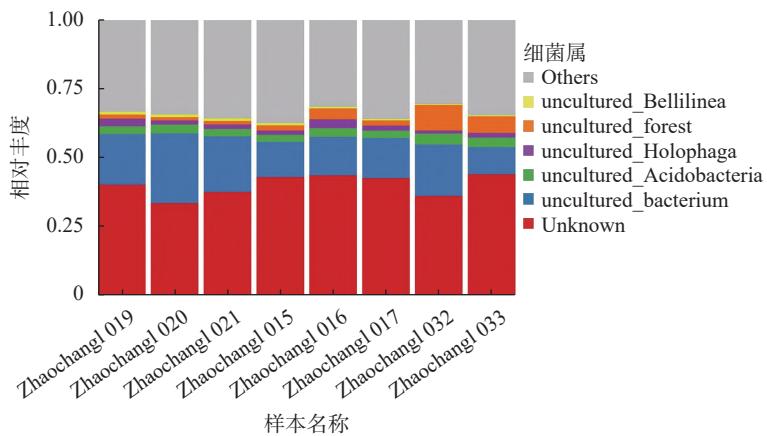


图 5 单个样本在种水平上的相对丰度
Fig. 5 Relative abundance of a single sample

组间样本丰度门水平分析(图 6)表明: 3 个组中 Acidobacteria 细菌丰度最大, charllle006 > charllle002 > charllle001; Proteobacteria 细菌丰度 charllle006 > charllle002 > charllle001; Gemmatimonadota 细菌丰度 charllle001 > charllle002 > charllle006; Verrucomicrobiota 细菌丰度 charllle006 > charllle002 > charllle001。

通过 circos^[25]绘制物种丰度与样本相互关系(图 7), 揭示各分组样本中不同物种所占的比

例以及物种在不同分组中的比例关系。筛选相对丰度大于 0.01 的物种以目水平绘图, 第 1 圈左半边为物种, 右边为样本分组, 第 2 圈左边一半为物种中各样的比例, 右边一半为样本中各物种的比例, 内 2 圈与外 2 圈标注相同, 最里面连线为物种丰度与样本分组之间的连线。在系统分类的细菌目中, 3 组优势菌组成较为相似, 均以 Acidobacterales、AD3、Bacteroidales、Burkholderiales、Bryobacterales、Ktedonobacterales、Pe-

dospaerales、 Rhizobiales、 Subgroup-2、 和 WPS-2 细菌为优势菌，但各优势菌相对丰度有一定差异。其中，charlle001 目水平相对丰度较大的主要优势菌依次为：Bacteroidales > Subgroup-2 > Ktedonobacterales>AD3>Acidobacterales>WPS-2> Bryobacterales > Burkholderiales > Rhizobiales > Pedosphaerales；charlle002 目水平相对丰度较大的主要优势菌依次为：Subgroup-2 > Acidobacterales > AD3 > Ktedonobacterales > Rhizobiales > WPS-2 > Burkholderiales > Pedosphaerales > Bryobacterales > Bacteroidales；charlle006 目水平相对丰度较大的主要优势菌依次为：Subgroup-2 > Acidobacterales > Ktedonobacterales > Pedosphaerales > WPS-2 > Rhizobiales > Burkholderiales > Bryobacterales > Bacteroidales > AD3。Bacteroidales 细菌丰度在 charlle001 中最大（20%），在 charlle002 和 charlle006 中几乎没有；Subgroup-2 细菌丰度在 charlle006 中最大（20%），在 charlle001 中最小（10%）；Acidobacterales 细菌丰度在 charlle006 中最大（18%），在 charlle001 中最小（8%）；Ktedonobacterales 细菌丰度在 charlle006 中最大（14%），在 charlle001 和 charlle002 中较小。上述结果表明，3 组土样主要优势菌属大致相同，但各组优势菌相对丰度存在较大差异；原壤 charlle001 中 Bacteroidales 细菌较多，但通过种植 1 年天麻后，一麻壤 charlle002 中 Bacteroidales 细菌急剧减少，且细菌物种数量也呈减少趋势；方竹壤中 Subgroup-2、Ktedonobacterales 细菌丰度呈现回升态势，均在 10% 以上。进而可以得出结论：该地区原壤通过种植天麻导致土壤中细菌物种总数和总丰度呈降低趋势，通过种植方竹，一麻壤得到修复，物种总数和总丰度再次回升，进而推测天麻连作障碍与土壤中细菌物种总数和丰度密切相关。

通过门水平 Heatmap 热图聚类分析(图 8)显示物种丰度与不同物种的相似情况，图 8 中包含物种信息及样本信息。2 个物种丰度越相似，距离越近，枝长越短；横向聚类表示不同样本的各物种丰度的相似情况，默认最多展示丰度最高的前 35 个物种。研究结果显示：1) Zhaochangl

019、Zhaochangl 020、Zhaochangl 021 聚至 charlle 001；Zhaochangl 015、Zhaochangl 016、Zhaochangl 017 聚至 charlle 002；Zhaochangl 032、Zhaochangl 033 聚至 charlle 006；2) 全部样本聚为两个大类：charlle001 与 charlle 006 (group I)、charlle002 (group II)，结果揭示两类细菌物种总丰度存在差异；3) 原壤中 Zhaochangl 020 和 Zhaochangl 021 样品内 4 门 Bacteroidales、Campilobacterota、Cyanobacteria 和 Firmicutes 细菌丰度极高，而一麻壤和方竹壤样品内该 4 门细菌丰度极低；原壤中 Zhaochangl 019、Zhaochangl 020 和 Zhaochangl 021 样品内 3 门 Actinobacteriota, Myxococcota, Proteobacteria 细菌丰度较低，而一麻壤和方竹壤样品内该 3 门细菌丰度较高。该结果揭示天麻原壤经过种植 1 年天麻，细菌群落发生变化，有益细菌减少，再次种植天麻将导致连作障碍，如一麻壤种植方竹后，其方竹壤内有益细菌再次增加，待方竹丰收后，该样地还可继续种植天麻，进而提升土地利用效率。样品 Zhaochangl 019 内 4 门 Bacteroidales、Campilobacterota、Cyanobacteria、Firmicutes 细菌丰度较低，推测主要原因为该采样点附近有可能种植过天麻。

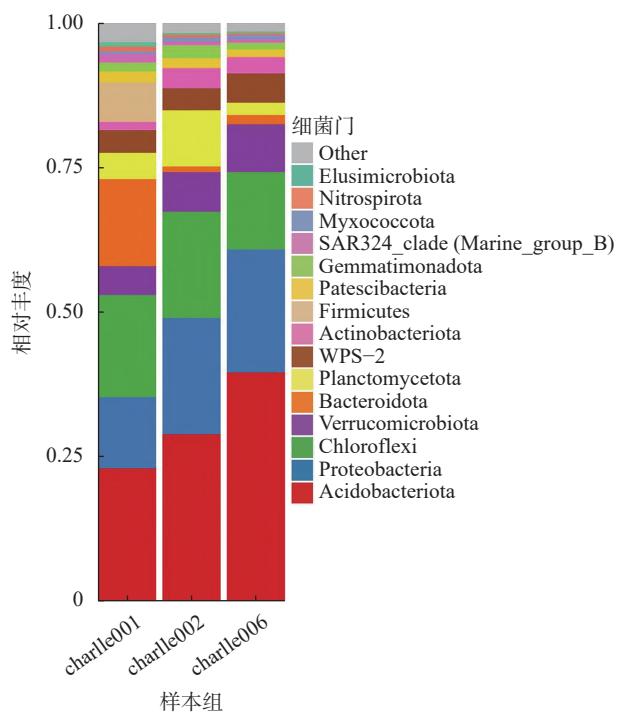


图 6 组间样本在门水平的相对丰度
Fig. 6 Relative abundance of samples among groups

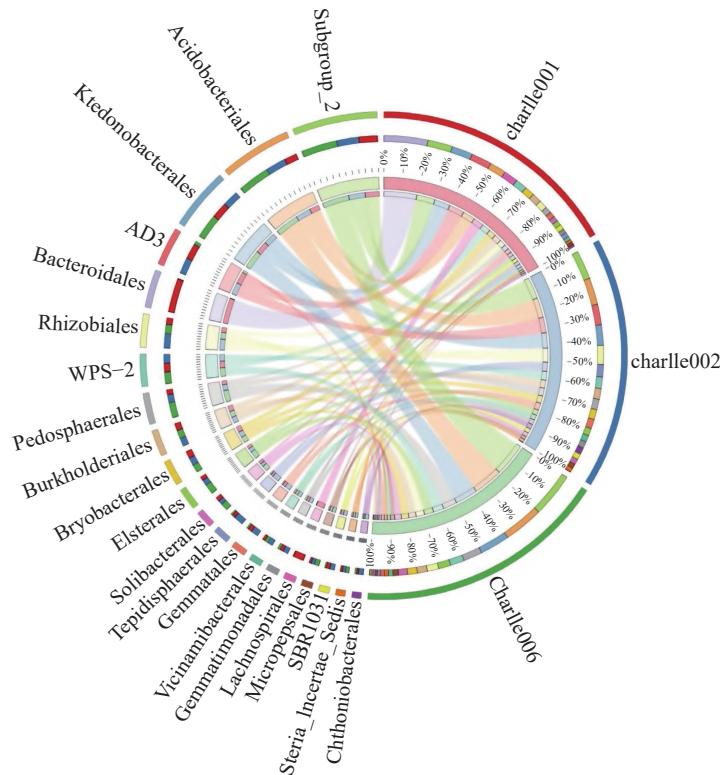


图 7 样本与物种丰度 circos 图
Fig. 7 Circos plots of samples and species abundance

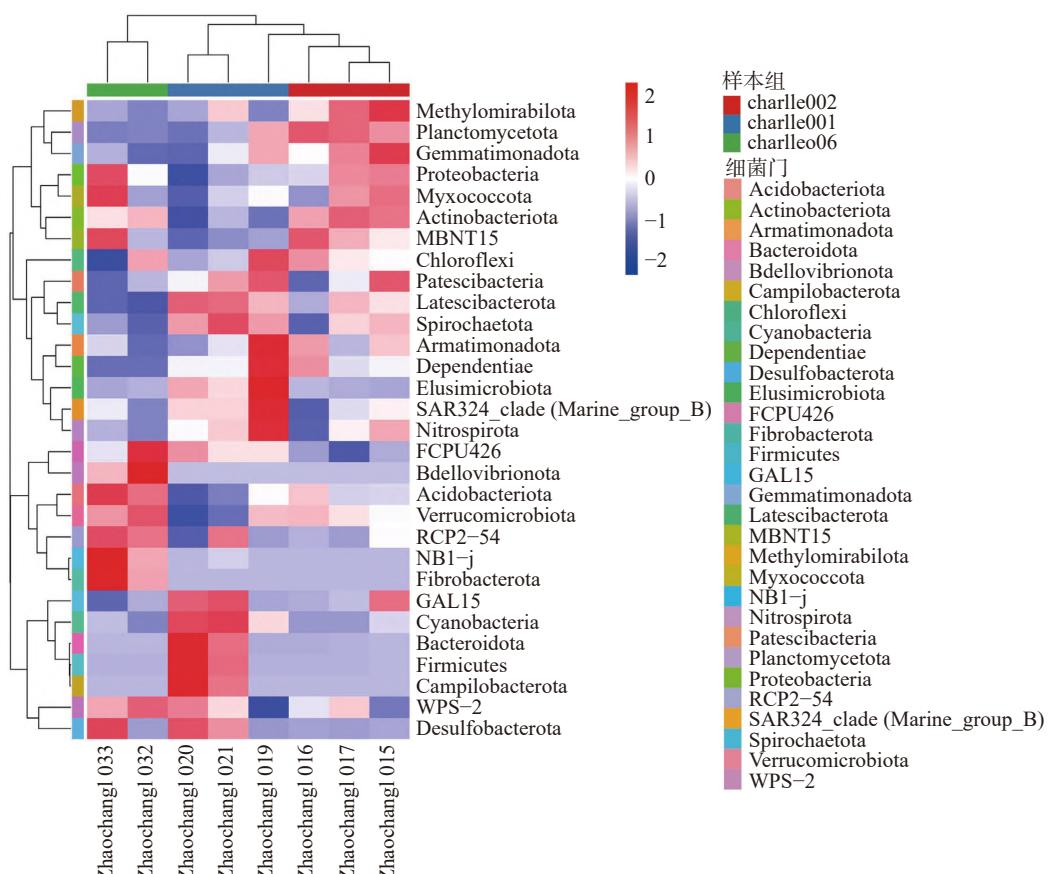


图 8 物种相对丰度聚类热图
Fig. 8 Clustering heatmap of relative species abundance

2.3 土样细菌多样性分析

使用 Qiime2 软件, 对样本 Alpha 多样性指数进行评估。为比较样本间的多样性指数, 分析时将 Feature table 先均一化之后再计算多样性指数。Alpha 多样性是反映丰富度和均匀度的综合指标, 丰富度表示物种的有无和群落中物种分配

上的均匀性, 即物种丰度大小是否均匀, 群落丰富度的指数主要包括 Richness、Chao1 和 Ace 等指数。既考虑丰富度又考虑均匀性的指数包括 Shannon 和 Simpson 等指数, 各样本 Alpha 多样性指数值统计如表 2 所示。

表 2 样本细菌 Alpha 多样性指数统计
Table 2 Statistical analysis of bacterial Alpha diversity index of the samples

样本编号	物种个数	香农指数	物种数指数	辛普森指数	物种丰度均匀度指数	测序深度指数
Zhaochangl 015	1836	9.912 860 056	1946.478 088	0.997 762 385	1934.577 044	0.983 119 949
Zhaochangl 016	1507	9.326 345 670	1583.593 407	0.995 054 632	1612.916 375	0.985 337 243
Zhaochangl 017	1622	9.758 308 921	1654.126 482	0.997 646 857	1668.206 785	0.990 844 718
Zhaochangl 019	1038	8.863 921 286	1054.280 255	0.995 133 837	1066.566 350	0.994 850 154
Zhaochangl 020	1300	8.520 081 206	1478.609 442	0.992 111 997	1494.109 961	0.979 329 089
Zhaochangl 021	2034	9.535 546 580	2307.680 617	0.996 090 718	2391.069 226	0.964 308 705
Zhaochangl 032	1116	8.785 073 482	1198.544 715	0.993 430 451	1182.039 421	0.989 771 833
Zhaochangl 033	1226	9.232 064 423	1278.561 728	0.996 481 185	1284.121 757	0.990 630 141

表 2 中各样本细菌物种数及 Alpha 多样性指数揭示样本 Zhaochangl 015、Zhaochangl 016、Zhaochangl 017 物种数较均衡, 原壤样本 Zhaochangl 021 物种数最大, Zhaochangl 019 物种数最小。辛普森指数越大, 对应样本中细菌群落多样性越小, Zhaochangl 015 的辛普森指数最大, 其次是 Zhaochangl 017, 表明这两种样本中细菌群落多样性较小。

使用 R 语言 ggplot2 包绘制 PCA 散点图(图 9), 组间 PCA 分析结果表明: 纵坐标水平显示方竹壤 charlle006 介于原壤 charlle001 和一麻壤 charlle002 之间, 3 组样本中各样本离散程度不同, 其原因可能与采样点距离不同有关。PCoA 分析(图 10)结果表明: charlle002 和 charlle006 样本聚类较近, charlle001 样本较分散, 该结果与细菌群落聚类分析结果一致。

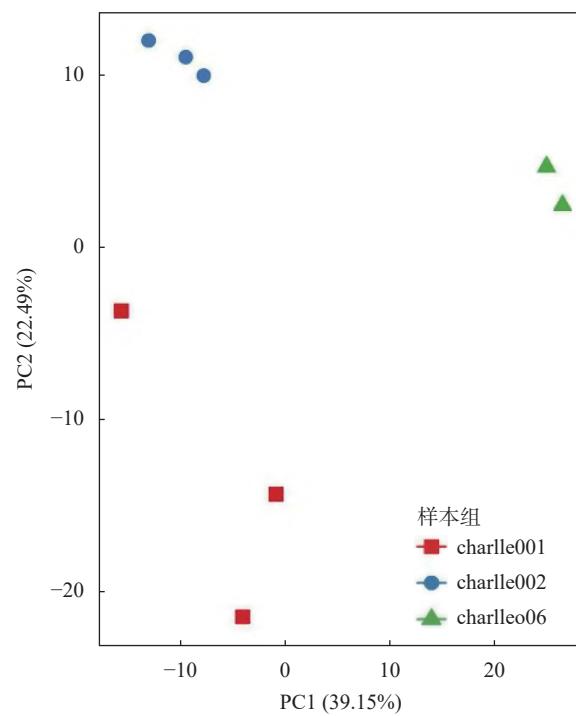


图 9 样本 PCA 散点图
Fig. 9 Sample PCA scatter plot

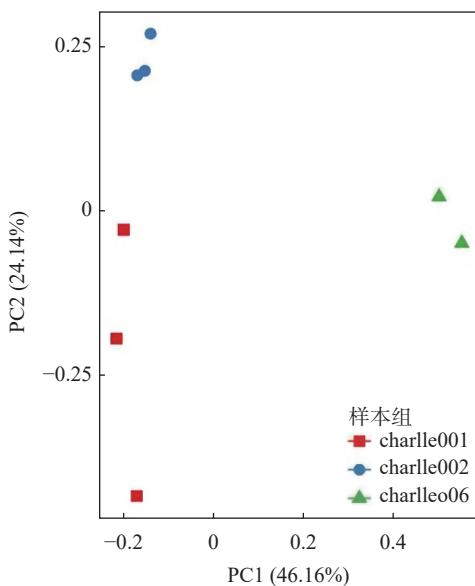


图 10 样本 PCoA 分析图
Fig. 10 Sample PCoA analysis graphics

通过 R 语言 ggplot2 采用非加权配对平均法对样本进行层次聚类，以判断各样本间物种组成的相似性。样本层次聚类树和相对丰度（图 11）分析表明：Acidobacteriota、Chloroflexi 和 Proteobacteriota 细菌为样本主要优势菌，样本 Zhaochangl 020 和 Zhaochangl 021 中 Acidobacteriota 细菌丰度明显较低，原壤 Zhaochangl 020、Zhaochangl 021 中 Bacteroidota 和 Firmicutes 细菌丰度较高，而一麻壤和方竹壤中几乎没有，推测 Bacteroidota 和 Firmicutes 细菌可能是天麻种植土壤中的有益菌。一麻壤的 3 样本聚类为一支，表明样本细菌组成与丰度较相似。方竹壤两样本 Zhaochangl 032 和 Zhaochangl 033 聚为一类，样本中 Acidobacteriota 丰度最大，同时 Verrucomicrobiota 丰度也较大。

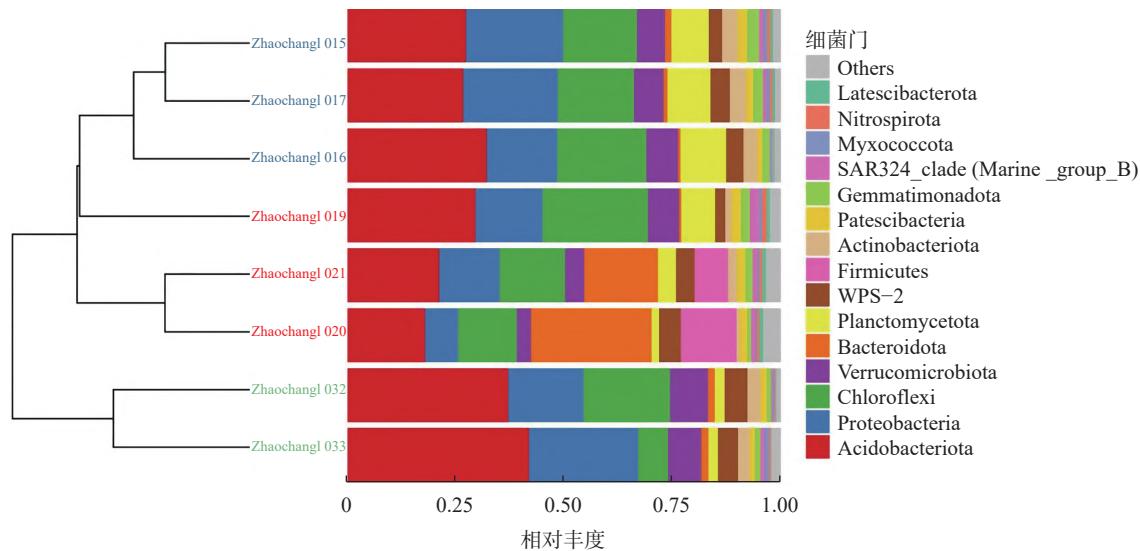


图 11 UPGMA 样本聚类树分析
Fig. 11 UPGMA sample cluster tree analysis

2.4 样本细菌差异分析

通过 R 语言 pheatmap 绘制样本聚类热图（图 12），根据颜色梯度的变化可直观地看出样本间的差异性。图 12 中左侧和上方展示了样本的聚类关系，中间颜色梯度变化代表各样本表达量，红色越深表示样本表达量越高。图 12 中颜色梯度变化明显，同组样本聚类在一起表明样本间具相似性；charlle006 两个样本与 charlle002 的 3 个样本距离较远，揭示两组间细菌群落组成差异较大。

LDA Effect Size^[26] 分析能够在组与组之间寻

找具有统计学差异的 Biomarker，即组间差异显著的物种。不同组中丰度差异显著物种包括细菌的门、纲、目，柱状图的长度代表差异物种的影响大小。图 13 表明：charlle001 中显著差异细菌为 p-Bacteroidota、c-Bacteroidia 和 o-Anaerolineales；charlle002 中显著差异细菌为 o-Tepidisphaerales、c-Holophagae、o-Nitrospirales、p-Nitrospirota 和 c-Nitrospiralia；charlle006 中显著差异细菌为 c-Acidobacteria、p-Acidobacteriota、o-Acidobacterales、c-Ktedonbacteria、o-Ktedonbacteriales、o-Elsterales 和 o-Solibacterales。

在目水平做组间 Welch's 检验，3 组样本 charlle001、charlle002 和 charlle006 两两比较做组间物种差异分析（图 14），图 14 左边为组间差异物种丰度展示，右边为组间差异置信度展示。图 14a 表明：原壤 charlle001 和方竹壤 charlle006 组间细菌 Pedosphaerales 和 Acidobacteriales 相对丰度差异显著，且两目细菌在 charlle006 中丰度更高，其余各目细菌差异不明显。

原壤 charlle001 和一麻壤 charlle002 组间图 14b 表明：Rhizobiales、Chthoniobacterales、Pir-ellulales、Holophagales、Xanthomonadales、Gai-ellales、Fankiales 和 Solirubrobacterales 细菌相对丰度差异显著，其中 Rhizobiales 最为突出，该目细菌在 charlle002 中丰度极高。

图 14c 表明：一麻壤 charlle002 和方竹壤 charlle006 组 Tepidisphaerales、Gemmatales、Pe-dosphaerales 和 Chthoniobacterales 细菌相对丰度差异显著，Pedosphaerales 在 charlle006 中丰度更高，而 Tepidisphaerales、Gemmatales 和 Chthoniobac-

terales 在 charlle002 中丰度更高，其余细菌无显著差异。

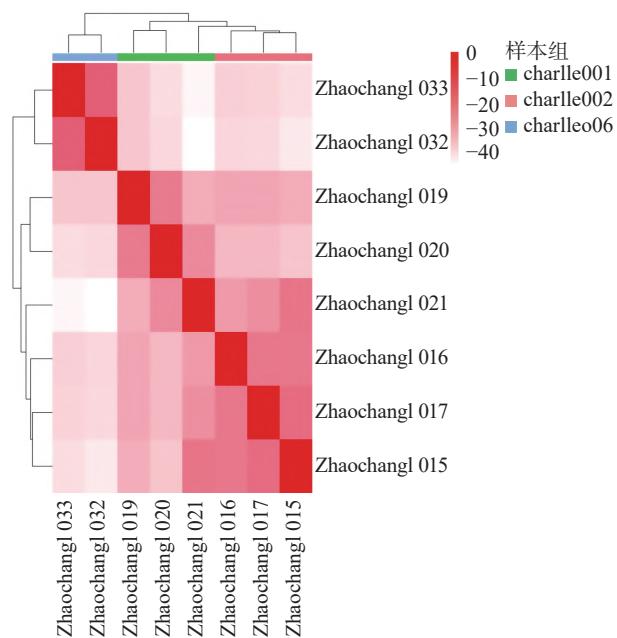


图 12 样本聚类热图
Fig. 12 Sample clustering heatmap

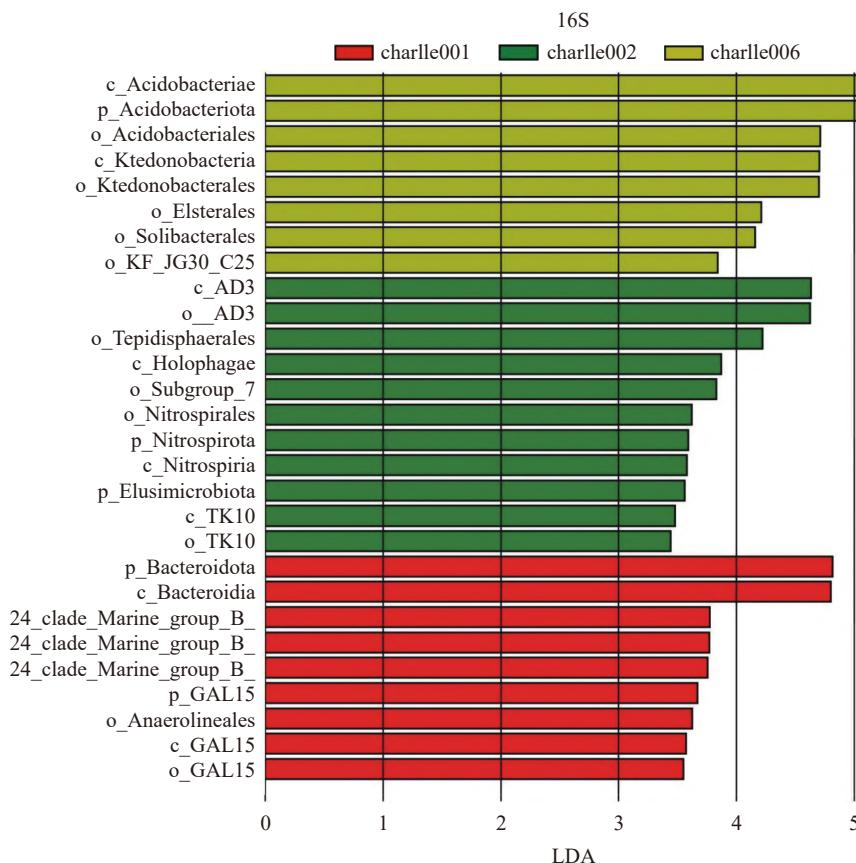


图 13 差异物种 LDA 柱状图
Fig. 13 LDA histogram of different species

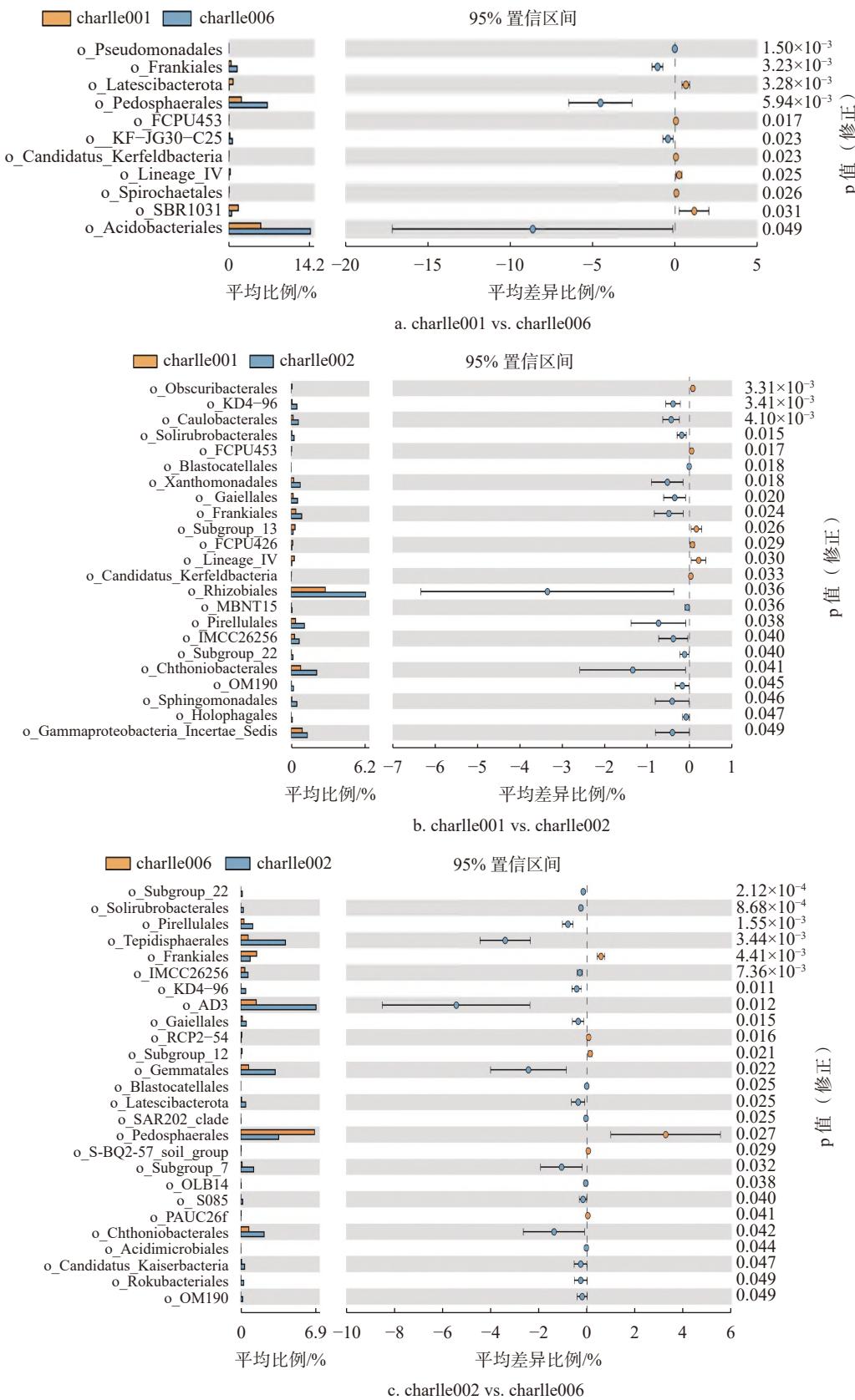


图 14 样本微生物群落差异比较

Fig. 14 Comparison of microbial community differences in samples

3 结论与讨论

本研究共分析8个土样Zhaochangl 015、Zhaochangl 016、Zhaochangl 017、Zhaochangl 019、Zhaochangl 020、Zhaochangl 021、Zhaochangl 032、Zhaochangl 033，分为3组原壤charlle001、一麻壤charlle002、方竹壤charlle006。土壤高通量测序分析结果揭示了各个土样细菌种类与物种丰度，并通过各样本细菌组成和群落结构数据搞清了彝良县荞山镇天麻种植区土样优势细菌为Acidobacteria、Actinobacteriota、Bacteroidota、Chloroflexi、Firmicutes、Gemmatimonadota、Latescibacterota、Myxococcota、Nitrospirota、Patescibacteria、Planctomycetota、Proteobacteria和Verrucomicrobiota。

3组样本群落结构比较表明：1) Acidobacteria为优势细菌，其次是Proteobacteria和Chloroflexi；2) Firmicutes、Bacteroidota细菌在原壤中丰度最高，而在一麻壤和方竹壤中几乎没有；3) 组内各样本细菌群落组成较相似，但不同样本中各细菌丰度不同。

各组间细菌数比较：3组样本共有细菌ASV为95个，基于charlle001、charlle002和charlle006特有细菌ASV分析表明：原壤charlle001特有细菌数量最多，其次为方竹壤charlle006，二者均高于一麻壤charlle002特有细菌数量。原壤与一麻壤优势细菌比较分析显示：优势细菌Acidobacteria、Planctomycetota和Proteobacteria在原壤中丰度明显低于一麻壤中，且原壤中Bacteroidota、Firmicutes两门细菌丰度显著高于一麻壤；一麻壤与方竹壤优势细菌比较分析显示：Chloroflexi和Planctomycetota在一麻壤中丰度明显高于方竹壤，但方竹壤优势细菌Acidobacteria丰度最大且Bacteroidota细菌丰度高于一麻壤；原壤与方竹壤优势细菌比较分析显示：方竹壤中Acidobacteria、Proteobacteria丰度显著高于原壤。云南省内关于森林及农田土壤细菌多样性的测序研究表明，正常土壤中优势细菌门主要为Proteobacteria、Actinobacteria、Acidobacteria、Firmicutes和Gemmatimonadetes^[27-28]，土壤细菌群落的多样性和丰度越高，越有利于植株生长，土壤微生物的相对丰度发生改变，其功能也发生相应变化^[29]，基于上述分析推断Firmicutes、Bacteroidota细菌是天麻种植土壤中重要有益菌；猜测天麻连作障碍原因与其土壤微生物群落结构和丰度变

化有紧密的关联，而连作菌塘种植方竹能缓解并一定程度修复天麻连作土壤。

连作障碍是农业生产中普遍存在的问题，连作导致农作物减产和病虫害等问题的发生，故称“障碍”，对很多农作物^[30-36]造成不可估量的经济损失。由于大部分药用植物特别是栽培根类药材的连作障碍问题较突出，药材品质和产量均大幅下降^[16,37-47]。天麻是我国特有的名贵中药材，也是近年发展迅速的中药大品种之一，因其对气候、土壤、真菌等环境有特殊要求，因此传统上云南省以昭通市境内为主要种植地。近年来，中药材已规范化种植，栽培土壤环境恶化及连作障碍问题备受关注，随着社会需求量不断增加，天麻栽培面积扩大，天麻价格不断上涨，连作障碍已成为限制天麻生产的重要因素。天麻产业发展与产品质量提升和连作障碍的矛盾，已成为制约现代云药产业健康持续发展的主要屏障。因此，明确天麻土壤微生物群落结构是揭开连作障碍的第一层面纱。

引起药用植物连作障碍因素较多，其中植物根际土壤以及根际微生物是重要的环境和生物因子^[48-49]。邓文祥等^[50]通过对白及(*Bletilla striata*)根部内生真菌的筛选，揭示土壤理化性质影响白及根部内生真菌物种组成。土壤微生物研究对探讨植物生长有重大意义，土壤微生物结构的多样性，加强了土壤自肥作用^[51]，但连作常引起植物根际微生物变化，引起土壤病原菌增多肥力下降等问题，使作物产量和品质下降^[52]，如随着灵芝栽培年数增加，灵芝种植土壤中优势菌多样性降低，病原菌增多^[53]。大部分研究表明细菌与土壤肥力相关，冯金玲等^[54]试验5种栽培模式说明土壤细菌可作为判断土壤肥力状况的生物学指标。研究土壤微生物群落结构均表明：土壤中真菌数量、真菌与细菌数量比值越低，土壤生态系统稳定程度越高，抑制病害能力越强，在连作障碍土壤微生物研究中常见细菌型土壤转变为真菌型土壤^[55-58]。

作物连作后根际土壤微生态发生改变，主要表现在有益菌数目减少、病原菌数目增多，基于研究连作土壤微生物菌群演替规律，明确引入特殊土壤功能菌和有益微生物，可抑制病原菌增殖，同时恢复稳定的微生物群落并防控连作障碍^[58]。基于 Illumina Hi Seq 高通量测序技术，探讨植物与微生物的互作关系，研究连作土壤中细菌群落或真菌群落多样性及丰度，提高有益菌群

在土壤中的比例，降低有害菌群在土壤中的相对含量，研究结果推动了人类对连作障碍的认知^[59]。本研究通过高通量测序技术揭示3种类型天麻土壤细菌在种群组成、数量和分布上存在差异性，并明晰了连作前后及修复后细菌物种数量及组成的变化，与前人对连作白术(*Atractylodes macrocephala*)根际土壤变化^[44]和连作土壤微生物区系分析、调控及高通量研究分析结果相似^[60]，但大部分细菌的分类仅限于属的水平，测序分析无法定位到特定细菌物种，且同一属的不同细菌种在土壤中可能会行使不同的功能，不同属的细菌也可能在土壤中行使同样的功能，研究所得到的结果可能会有偏差。

天麻连作障碍一直被视为该领域的卡脖子问题，其连作机制与修复方案未曾问世，只因其基础研究一直搁浅，因此研究天麻土壤中微生物结构组成及丰度变化，便于接下来对天麻种植土壤更深层次的研究和探索。

〔参考文献〕

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [2] 郭兰萍, 黄璐琦, 谢晓亮. 道地药材特色栽培及产地加工技术规范 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2016.
- [3] 陈维红, 罗栋. 天麻素、天麻多糖药理作用研究进展 [J]. 中国药物评价, 2013, 30(3): 132–134, 141.
- [4] Qiu F, Liu T T, Qu Z W, et al. Gastrodin inhibits the activity of acid-sensing ion channels in rat primary sensory neurons [J]. European Journal of Pharmacology, 2014, 731(12): 50–57.
- [5] Wang H N, Zhang R G, Qiao Y T, et al. Gastrodin ameliorates depression-like behaviors and up-regulates proliferation of hippocampal-derived neural stem cells in rats: involvement of its anti-inflammatory action [J]. Behavioural Brain Research, 2014, 266: 153–160.
- [6] 周洁, 郭兰萍, 黄璐琦, 等. 植物化感作用及其在中药材栽培中的应用 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2007, 9(5): 34–38.
- [7] 张重义, 林文雄. 药用植物的化感自毒作用与连作障碍 [J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(1): 189–196.
- [8] 吴红森, 林文雄. 药用植物连作障碍研究评述和发展透视 [J]. 中国生态农业学报(中英文), 2020, 28(6): 775–793.
- [9] 张菊, 李艳萍, 赵远, 等. 药用植物连作障碍及其缓解措施研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2019, 40(11): 86–88.
- [10] 檀国印, 杨志玲, 袁志林, 等. 药用植物连作障碍及其防治途径研究进展 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(4): 197–204.
- [11] 庄月娥, 陈华观. 药用植物连作障碍及其分子生态机制研究进展 [J]. 海峡药学, 2015, 27(11): 4–8.
- [12] 周芳, 曹国璠, 李金玲, 等. 药用植物连作障碍机制及其缓解措施研究进展 [J]. 山地农业生物学报, 2019, 38(3): 67–72.
- [13] 简在友, 王文全, 孟丽, 等. 人参属药用植物连作障碍研究进展 [J]. 中国现代中药, 2008, 10(6): 3–5.
- [14] Yang C, Crowley D E, Menge J A. 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35(2): 129–136.
- [15] 郑良永, 胡剑非, 林昌华, 等. 作物连作障碍的产生及防治 [J]. 热带农业科学, 2005, 25(2): 58–62.
- [16] 赵晓萌. 连作对西洋参生长发育的影响及根际化感物质的研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [17] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 [J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 852–857.
- [18] Rognes T, Flouri T, Nichols B, et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics [J]. PeerJ, 2016, 4: e2584.
- [19] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads [J]. EMBnet journal, 2010, 17(1): 10–12.
- [20] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing [J]. Nature Methods, 2013, 10(1): 57–59.
- [21] Knight R, Vrbanac A, Taylor B C, et al. Best practices for analysing microbiomes [J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(7): 410–422.
- [22] Chen H B, Boutros P C. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R [J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 35.
- [23] Parks D H, Tyson G W, Hugenholtz P, et al. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles [J]. Bioinformatics (Oxford, England), 2014, 30(21): 3123–3124.
- [24] Lozupone C, Knight R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8228–8235.
- [25] Krzywinski M, Schein J, Birol I, et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics [J]. Genome Research, 2009, 19(9): 1639–1645.
- [26] Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic bio-

- marker discovery and explanation [J]. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60.
- [27] 王春香, 田宝玉, 吕睿瑞, 等. 西双版纳地区热带雨林土壤酸杆菌 (Acidobacteria) 群体结构和多样性分析 [J]. *微生物学通报*, 2010, 37(1): 24–29.
- [28] 薛银刚, 刘菲, 周璐璐, 等. 基于高通量测序的工业园区地下水和土壤细菌群落结构比较研究 [J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(6): 107–115.
- [29] 杨广容, 马燕, 蒋宾, 等. 基于 16S rDNA 测序对茶园土壤细菌群落多样性的研究 [J]. *生态学报*, 2019, 39(22): 8452–8461.
- [30] 张旭辉. 接种根瘤菌对豌豆重茬障碍的缓解效应研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2021.
- [31] 贾茹, 张迪, 马晓东, 等. 大蒜连作障碍研究进展 [J]. *北方园艺*, 2014(19): 207–210.
- [32] 王宏忠. 黑龙江省大豆连作障碍因子分析及调控措施研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [33] 吕卫光, 余廷园, 诸海涛, 等. 黄瓜连作对土壤理化性状及生物活性的影响研究 [J]. *中国生态农业学报*, 2006, 14(2): 119–121.
- [34] 程增颜. 不动杆菌 P13 菌株的分离及缓解黄瓜连作障碍的应用 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [35] 柴继宽. 轮作和连作对燕麦产量、品质、主要病虫害及土壤肥力的影响 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [36] 熊湖. 连作对马铃薯的连作障碍及缓解方法研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- [37] 李自博. 人参根系自毒物质在连作障碍中的化感作用及其缓解途径研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- [38] 林茂兹. 太子参连作障碍及其分子生态学机制研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [39] 张海花. 丹参 miRNA 对连作障碍的响应及其在次生代谢调控中的作用研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [40] 马小奇. 半夏的连作障碍效应研究及其缓解措施初探 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [41] 何志贵. 半夏连作障碍发生机制与轮作修复研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [42] 孙雪婷, 李磊, 龙光强, 等. 三七连作障碍研究进展 [J]. *生态学杂志*, 2015, 34(3): 885–893.
- [43] 裴聰. 三七连作障碍自毒物质降解菌的研究 [D]. 杭州: 浙江理工大学, 2016.
- [44] 陈慧. 连作白术根际土壤变化及 PGPR 菌肥缓解白术连作障碍研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2014.
- [45] 李振. 地黄特异响应连作障碍基因、miRNAs 鉴定及 miR5054 沉默转化植株的创制 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2019.
- [46] 刘红彦, 王飞, 王永平, 等. 地黄连作障碍因素及解除措施研究 [J]. *华北农学报*, 2006, 21(4): 131–132.
- [47] 陈慧, 郝慧荣, 熊君, 等. 地黄连作对根际微生物区系及土壤酶活性的影响 [J]. *应用生态学报*, 2007, 18(12): 2755–2759.
- [48] 肖艳红, 李菁, 刘祝祥, 等. 药用植物根际微生物研究进展 [J]. *中草药*, 2013, 44(4): 497–504.
- [49] 全妙华, 余朝文, 陈东明, 等. 基于高通量测序的两种典型忽地笑栽培土壤根际真菌群落多样性 [J]. *微生物学通报*, 2018, 45(10): 2105–2111.
- [50] 邓文祥, 赵漫丽, 王自林, 等. 基于高通量测序白及根部内生真菌的物种组成分析 [J]. *西南林业大学学报 (自然科学)*, 2021, 41(2): 76–84.
- [51] 马瑞丰, 刘金福, 吴则焰, 等. 格氏栲林土壤微生物结构的多样性特征研究 [J]. *西南林业大学学报*, 2014, 34(4): 14–19.
- [52] 赵官成, 梁健, 淡静雅, 等. 土壤微生物与植物关系研究进展 [J]. *西南林业大学学报*, 2011, 31(1): 83–88.
- [53] 袁源, 黄海辰, 叶丽云, 等. 灵芝连作土壤真菌群落分析 [J]. *菌物学报*, 2019, 38(12): 2112–2121.
- [54] 冯金玲, 郑新娟, 杨志坚, 等. 5 种栽培模式对油茶土壤微生物及酶活性的影响 [J]. *西南林业大学学报*, 2016, 36(2): 10–16.
- [55] Chen Y D, Du J F, Li Y, et al. Evolutions and managements of soil microbial community structure drove by continuous cropping [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 839494.
- [56] Mukerji K, Singh G. Microbial activity in the rhizosphere root exudates as determinant of rhizospheric microbial biodiversity [J]. *Soil Biology*, 2006, 7: 39–53.
- [57] Ibekwe A M, Kennedy A C, Frohne P S, et al. Microbial diversity along a transect of agronomic zones [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39(3): 183–191.
- [58] 王飞, 李世贵, 徐凤花, 等. 连作障碍发生机制研究进展 [J]. *中国土壤与肥料*, 2013(5): 6–13.
- [59] 杨瑞平. 西瓜连作障碍缓解技术及其机理研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [60] 薛超, 黄启为, 凌宁, 等. 连作土壤微生物区系分析、调控及高通量研究方法 [J]. *土壤学报*, 2011, 48(3): 612–618.

(责任编辑 张 坤)

