广西植物 Guihaia Jan. 2026, 46(1): 186-198 http://www.guihaia-journal.com

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202412010

代英超, 童根平, 陈如兵, 等, 2026. 不同生长年限短萼黄连根内及根际微生物群落多样性研究 [J]. 广西植物, 46(1): 186-198.

DAI Y C, TONG G P, CHEN R B, et al., 2026. Microbial community diversity in roots and rhizosphere soils of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* with different growth years [J]. Guihaia, 46(1): 186-198.

不同生长年限短萼黄连根内及根际微生物群落多样性研究

代英超[1], 童根平[1], 陈如兵[2,3,4], 楼柯浪[2,3,4], 吴晓俊[2,3,4], 梁卫青[2,3,4], 浦锦宝[2,3,4], 陈翠婷[2,3,4*]

(1. 浙江清凉峰国家级自然保护区管理局, 浙江 临安 311323; 2. 浙江省中医药研究院 药用资源研究中心, 杭州 311308; 3. 道地药材品质评价和开发浙江省工程研究中心, 杭州 311308; 4. 药用植物学浙江省中医药重点学科, 杭州 311308)

摘 要: 为揭示不同生长年限短萼黄连根组织及根际土壤中的微生物群落的特征和多样性,该研究采用Illumina高通量测序技术对一年生、两年生和多年生短萼黄连的根内及根际土壤进行测序研究。结果表明:(1)根际土壤微生物群落的α多样性指数(Shannon、Ace、Chao 1)及总操作分类单元(OTUs)数量均显著高于相同生长年限的根组织样品。(2)不同年限短萼黄连根内以变形菌门、放线菌门和子囊菌门为优势菌门,慢生根瘤菌属、根瘤菌属菌群、游动放线菌属和 *Leptodophora* 为优势菌属;根际土壤则以变形菌门、放线菌门、子囊菌门和被孢菌门为优势菌门,norank_f_Xanthobacteraceae、慢生根瘤菌属、norank_f_norank_o_Vicinamibacterales、*Epicoleosporium* 和被孢霉属为优势菌属。(3)短萼黄连根内及根际土壤微生物多样性随生长年限变化显著,尤以第一至第二年为关键转变期。(4)LEfSe分析显示,根内及根际土壤中标志菌群随短萼黄连生长呈现动态变化。一年生根内显著富集游动放线菌属、假诺卡氏菌属、*Epicoleosporium*,其根际土壤则显著富集MND1、鞘脂单胞菌属、*Epicoleosporium*;多年生根内显著富集慢生根瘤菌属、*Steroidobacter*、酵母属,其根际土壤则富集慢生根瘤菌属、Candidatus_Xiphinematobacter、木霉属。综上认为,该研究初步阐明了短萼黄连根内及根际微生物群落的结构特征及演替规律,为未来研制促进短萼黄连生长发育及病害防控的微生物制剂提供了重要的理论支撑。

关键词: 短萼黄连, 根际微生物, 群落多样性, 高通量测序, 生长年限

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2026)01-0186-13

Microbial community diversity in roots and rhizosphere soils of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* with different growth years

DAI Yingchao[1], TONG Genping[1], CHEN Rubing[2,3,4], LOU Kelang[2,3,4], WU Xiaojun[2,3,4], LIANG Weiqing[2,3,4], PU Jinbao[2,3,4], CHEN Cuiting[2,3,4*]

收稿日期: 2025-04-15 **接受日期:** 2025-05-19

基金项目: 杭州市生态补偿专项(杭环便函〔2023〕361号); 浙江省磐安县中药材绿色发展示范项目(磐中药发202007)。

第一作者: 代英超(1989—),硕士,工程师,主要从事植物分类与资源利用研究,(E-mail)767191206@qq.com。

*通信作者: 陈翠婷,博士,助理研究员,主要从事药用植物次生代谢及育种研究,(E-mail)chencuiting@zju.edu.cn。

(1. *Qingliangfeng National Nature Reserve of Zhejiang*, Lin'an 311323, Zhejiang, China; 2. *Center for Medicinal Resources Research*, *Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine*, Hangzhou 311308, China; 3. *Zhejiang Engineering Research Center for Quality Assessment and Development of Dao-Di Herb*, Hangzhou 311308, China; 4. *Zhejiang Key Discipline in Traditional Chinese Medicine for Pharmaceutical Botany*, Hangzhou 311308, China)

Abstract: To investigate the characteristics and diversity of microbial communities in roots and rhizosphere soils of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* with different growth years, this study employed Illumina high-throughput sequencing technology to sequence the roots and rhizosphere soils of 1-year-old, 2-year-old, and perennial plants. The results were as follows: (1) The α diversity indices (Shannon, Ace, Chao 1) and the number of total operational taxonomic units (OTUs) in the rhizosphere soils of microbial communities were significantly higher than those in the root tissue samples of the same growth year. (2) Microorganisms in roots were predominantly composed of Proteobacteria, Actinobacteriota, and Ascomycota as the dominant phyla, with *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, *Actinoplanes*, and *Leptodophora* as predominant genera; in contrast, the rhizospheric soils exhibited Proteobacteria, Actinobacteriota, Ascomycota, and Mortierellomycota as the dominant phyla, while norank_f_Xanthobacteraceae, *Bradyrhizobium*, norank_f_norank_o_Vicinamibacterales, *Epicoleosporium*, and *Mortierella* were identified as the dominant genera. (3) The microbial diversity in both roots and rhizosphere soils of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* exhibited significant changes with growth years, especially during the critical transition from the first to the second year. (4) LEfSe analysis demonstrated dynamic shifts in signature microbial communities in roots and rhizosphere soils across the growth stages of *Coptis chinensis* var. *brevisepala*. 1-year-old roots were significantly enriched with *Actinoplanes*, *Pseudonocardia* and *Epicoleosporium*, while their rhizosphere soils were notably enriched with MND1, *Sphingomonas* and *Epicoleosporium*; in contrast, *Bradyrhizobium*, *Steroidobacter* and *Saccharomycopsis* were significantly enriched in perennial roots, and *Bradyrhizobium*, Candidatus_Xiphinematobacter and *Trichoderma* were preferentially enriched in perennial rhizosphere soils. Through this project, the structural characteristics and succession patterns of microbial communities in roots and rhizosphere soils of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* are preliminarily elucidated, providing a theoretical foundation for developing microbial agents to enhance growth and disease resistance.

Key words: *Coptis chinensis* var. *brevisepala*, rhizospheric microorganism, community diversity, high-throughput sequencing, growth years

短萼黄连(*Coptis chinensis* var. *brevisepala*)属多年生草本植物,体内富含小檗碱,具有清热燥湿、泻火解毒等功效(茆菁华和刘学医,2012)。然而,长期受人为过度采挖以及生境破坏影响,其种群数量锐减,自然资源也渐趋枯竭。目前,在安徽宣城、江苏宜漂山区、浙西部分山区等原产地,短萼黄连已难觅踪迹,仅在自然保护区有零星分布(刘学医,2008)。鉴于其濒危现状,自 2013 年起,短萼黄连被列为中国国家二级重点保护野生植物。当前,短萼黄连只作为“宣黄连”收载于《安徽省中药饮片炮制规范》中,而并未收入《中国药典》(张莉和张小平,2005;陈萍萍和刘学医,2012)。

植物内生菌是指在植物生长的某一时期或整个生命周期内,存在于植物体内且未导致宿主植物出现明显病害的一类微生物群体(王志伟等,2015)。内生菌与植物形成了互惠共生关系,对植物的生长、次生代谢产物积累和抗逆性提升具有重要影响。杜佳慧等(2022)研究发现,多花黄精内生菌可显著提高种子发芽势和发芽率,促进幼苗生长。此外,从石榴叶内生真菌 *Phoomopsis liquidambari* 代谢产物中分离得到的 4-羟基肉桂酸,能有效猝灭病原菌群体感应,抑制病原菌生长(Zhou et al.,2022)。根际作为植物与土壤相互作用的关键区域,存在特定的微生物种群,这些微生物与植物根系相互作用,并受根系分泌物调节(程龙媛等,2024)。根际微生物在植物适应性调节、养分吸收和免疫激活等方面发挥重要作用(刘京伟等,2021;华喆等,2024)。植物根际促生细菌在根际微生物中具有绝对的数量优势,能在不同胁迫条件下促进植物生长。摩西管柄囊霉(*Funneliformis mosseae*)和根内球囊霉(*Glomus intraradices*)可通过增强青冈栎的抗氧化酶活性,

提升其耐旱能力(李娇娇和曾明,2020)。程龙媛等(2024)研究表明,内生菌和根际微生物协同调控药用植物的生长与品质。在干旱环境下,对黄芪、甘草、枸杞施用深色有隔内生菌,可增加根际微生物丰度,助力药用植物旱地种植(He et al., 2019, 2022a, b)。因此,研究植物、内生菌及根际微生物间的互作,对药用植物种植及其可持续发展具有重要指导意义。

连作障碍是药用植物种植中常见的问题,土壤微生物群落结构失衡被认为是连作障碍形成的重要原因。随着种植年限的增加,枳壳(吴微微等,2024)、党参(孟彤彤等,2023)等药用植物根际微生物群落结构发生显著变化,有益细菌和真菌丰度下降,潜在致病菌属丰度上升,这可能与植物根系分泌的特异性物质相关。刘云露(2019)发现,酚酸降解菌在黄连种植年份较高的根际土壤中富集,推测这与黄连根系持续向土壤中释放酚酸有关。因此,研究不同种植年限药用植物的根际微生物特征,对解决连作障碍问题至关重要。

短萼黄连作为濒危植物,与常见植物相比,其微生物群落可能具有独特的组成和功能,这可能与其生存策略、环境适应性及濒危机制密切相关。然而,目前对短萼黄连的研究主要集中在资源调查、种群保护和濒危机制探讨等,有关其微生物菌群的研究还未见国内外文献报道。本研究以浙江省清凉峰自然保护区为研究区域,采用高通量测序方法,通过对一年生、两年生和多年生短萼黄连根组织和根际土壤的微生物群落结构与多样性进行系统分析,拟探讨以下问题:(1)短萼黄连根部内生菌群落和根际土壤菌群结构特征及二者的联系如何;(2)短萼黄连根内及根际微生物群落随生长年限的变化规律,以及各生长阶段的优势微生物类群(有益和有害菌株)。本研究结果有望为短萼黄连的后续人工繁育和保护利用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2024 年 1 月上旬,在浙江清凉峰国家级自然保护区的短萼黄连群落中采集健康植株样品。采集样品时,随机选取 1 m × 1 m 大小的样方,在每个样方中选取 1 株健康短萼黄连植株。短萼黄连经浙江省中医药研究院浦锦宝研究员鉴定。鉴于短萼黄连野外种群数量少、多为极小种群的濒危现状,为尽量减少对物种及其原生境的干扰,本研究选择龙塘山分布点(118°54′04″E、30°06′37″N,海拔 910.93 m)的短萼黄连群落作为采样区。该区种群个体数量适中且能够较好地代表短萼黄连的自然生境。短萼黄连是多年生植物,常规按照叶片数目判断生长年限(一年生:1~2 片真叶;两年生:3~5 片真叶;多年生:10 片真叶及以上)(张莉和张小平,2005)。一年生、两年生和多年生短萼黄连各 5 株,共计 15 株,用无菌刷去除大块土壤,保留 1 mm 左右的土壤附着在根上,将植物根部放入无菌管中,加入 50 mL PBS 缓冲液,用无菌镊子用力搅拌,以便从根表面分离根际土,移除根后,低温高速离心,沉淀即为根际土样本。根组织采用 75% 的酒精消毒 5 min,无菌水冲洗,0.1% 的次氯酸钠消毒 10 min,最后用无菌水冲洗,无菌滤纸吸干表面水分,将处理后的根际土壤和根组织样本装入无菌管中,存于 -80 ℃。一年生、两年生和多年生短萼黄连根分别编号 Root1、Root2 和 Root3,根际土壤分别编号为 RS1、RS2 和 RS3,每个处理 5 份样本。

1.2 基因组 DNA 提取及 PCR 扩增

根据 E.Z.N.A.® soil DNA kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, U.S.)操作手册,提取微生物群落的总基因组 DNA。经 DNA 质量评估,以及 DNA 纯度和浓度测定后,合格的 DNA 作为模板用于 PCR 扩增,具体使用以下引物:对根组织样本的 16S V5- V7 可变区域采用 799F (5′-AACMGGATTAGATACCCKG-3′) 和 1193R (5′-ACGTCATCCCCACCTTCC-3′);对土壤样本中 16S V4 可变区使用 515F(5′-GTGCCAGCMGCCGCGG-3′) 和 806R (5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′;对所有样本中的 ITS 区域使用 ITS1F (5′-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3′) 和 ITS2R (5′-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3′)。PCR 反应体系:5×Pro Taq 10 μL,上游引物(5 μmol · L^{-1}) 0.8 μL,下游引物(5 μmol · L^{-1})0.8 μL,模板 DNA 10 ng · $μL^{-1}$,用水补足至 20 μL。扩增程序:95 ℃ 预变性 3 min,接着进行 27 个循环(95 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 45 s),72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。

1.3 文库构建与测序

使用 NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq Kit 构建 PCR 产物的文库。过程包括：(1)接头连接；(2)通过磁珠筛选去除接头自连的片段；(3)利用 PCR 扩增富集文库模板；(4)使用磁珠回收 PCR 产物，获得最终文库。利用上海美吉生物医药科技有限公司 Illumina PE300/PE250 平台进行测序。

1.4 高通量测序数据质控与统计分析

先使用 Fastp(https://github.com/OpenGene/fastp,version 0.19.6)对双端原始测序数据进行质量筛查，再使用 FLASH(http://www.cbcb.umd.edu/software/flash,version 1.2.11)进行拼接。拼接后，应用 UPARSE 11(http://drive5.com/uparse/)对数据进行可操作分类单位(operational taxonomic units,OTUs)聚类，聚类阈值设定为 97%相似度，并去除嵌合体序列。剔除叶绿体和线粒体序列后，抽平各样本，确保 99.09%以上的序列覆盖度(Good's coverage)。使用 RDP classifier(http://rdp.cme.msu.edu/, version 2.11)结合 Silva 16S rRNA 数据库(v138)和 UNITE 真菌 ITS 数据库(v8.0)进行物种注释，置信度为 70%，并统计群落结构。

所有数据分析在美吉生物云平台(https://cloud.majorbio.com)上进行，具体流程如下：使用 mothur 软件计算 α 多样性指数，并结合 Kruskal-Wallis 秩和检验分析组间差异；基于 Bray-Curtis 距离进行 PCoA 分析，结合 ANOSIM 检验评估微生物群落结构相似性及组间差异显著性；采用 LEfSe 分析(LDA 阈值>3.5，P<0.05)识别各组从门到属层级上的显著丰度差异的微生物类群。

2　结果与分析

2.1 不同年限短萼黄连根内及根际微生物测序数据统计

从 30 个根组织和土壤样本中分别获得 1 335 630条和 1 149 786 条细菌优化序列，平均长度分别为 377 bp 和 256 bp。通过 97%相似度聚类，高质量序列共分别聚类成 6 102 个和 13 304 个细菌 OTUs。真菌 ITS 测序结果显示，根组织和土壤样本分别获得 1 526 973 条和 762 136 条真菌优化序列，平均长度分别约为 257 bp 和 238 bp，最终分别聚类为 1 675 个和 4 214 个 OTUs。无论是细菌还是真菌群落，根组织样本的有效序列均高于根际土壤样本，但 OTUs 数目则显著低于根际土壤样本。

通过构建稀释曲线发现，随着抽取序列数的增加，曲线在达到一定高度后趋于平稳(图 1)，表明测序的深度足以覆盖样品中的大多数细菌和真菌种类，并且样本数量可满足后续生物信息学分析的需求。

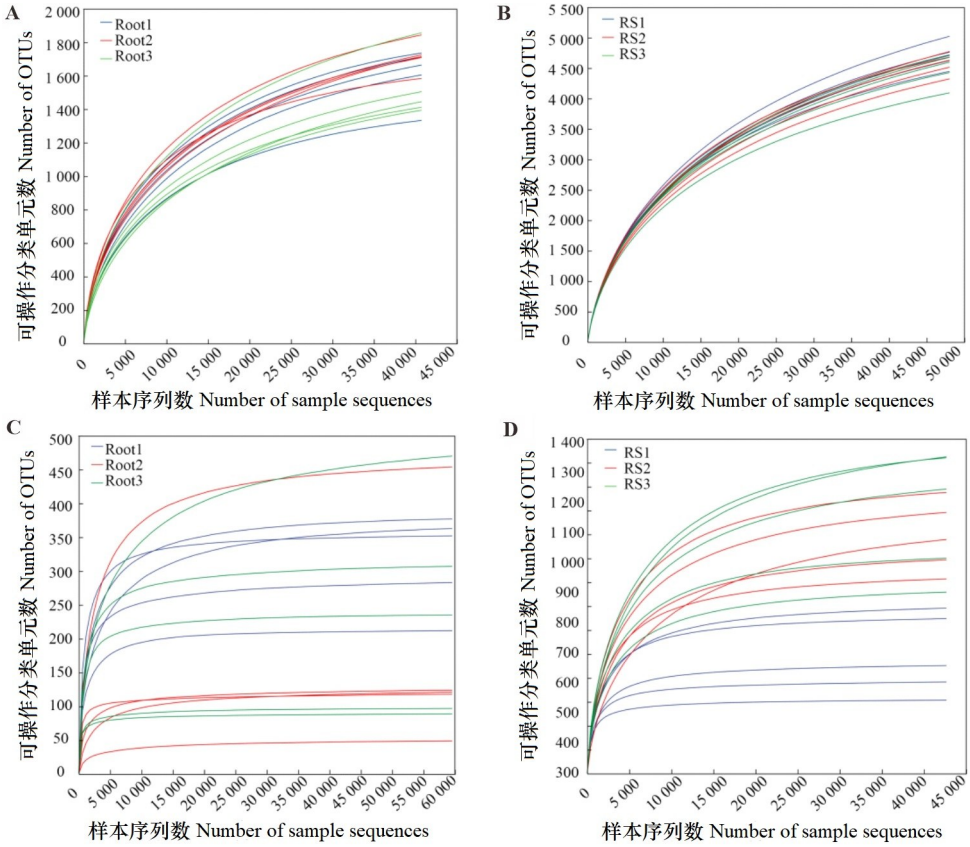
2.2 不同年限短萼黄连根内及根际微生物群落多样性分析

供试样本的微生物群落的丰度指数(Ace、Chao 1)和多样性指数(Shannon、Simpson)见表 1。无论在根组织样本还是根际土壤样本中，随着生长年限的增加，细菌的 Ace 指数和 Chao 1 指数无显著变化，而细菌 Shannon 指数呈下降趋势，Simpson 指数呈上升趋势，说明生长年限对细菌群落丰度影响不大，但对细菌多样性影响显著。

在真菌方面，随着生长年限的增加，根内真菌的 Ace 指数和 Chao 1 指数无显著性差异，而 Shannon 指数和 Simpson 指数呈先降后升趋势。根际土壤中真菌 Ace 和 Chao 1 指数逐年升高，但在两年生和多年生间无显著性差异；Shannon 指数和 Simpson 指数变化不显著，说明所选生长年限的短萼黄连对根际土壤中真菌的多样性作用较小。进一步比较同一年限短萼黄连根内和根际微生物多样性指数，结果显示，无论是细菌还是真菌，根际土壤中的 Ace 指数、Chao 1 指数和 Shannon 指数均显著高于根组织样本，说明其微生物物种丰富度和多样性高于根内生菌。

2.3 不同年限短萼黄连根内和根际土壤样品比较分析

基于 Bray-Curtis 算法，利用主坐标(principal co-ordinates analysis,PCoA)进行基于 OTUs 水平的微生物群落组成相似度分析。经 ANOSIM 检验表明，在细菌水平上，同一生长年限短萼黄连根和根际土样本中细菌聚集在一起，不同生长年限的样本分离(根：R^2 = 0.695，P = 0.001；根际土：R^2 = 0.700，P = 0.001)，解释率分别为 49.36%和 43.16%(图 2：A、B)。在真菌水平上，同一生长年限根内真菌没有聚在一起，组间不能很好分离(图 2：C)。然而，同年根际土 RS1、RS2、RS3 样本聚集在一起，不同年限之间样本可分离(R^2 = 0.828，P = 0.001)，组间差异显著可见，解释率为 43.46%(图 2：D)。



Root1、Root2、Root3 分别对应一年生、两年生和多年生的根样本；RS1、RS2、RS3 分别对应一年生、两年生和多年生的根际土壤样本。下同。

Root1, Root2, Root3 correspond to 1-year-old, 2-year-old, and perennial root samples, respectively; RS1, RS2, RS3 correspond to 1-year-old, 2-year-old, and perennial soil samples, respectively. The same below.

图 1 不同生长年限短萼黄连根内和根际土壤细菌(A、B)和真菌(C、D)的稀释曲线

Fig. 1 Dilution curves for bacteria (**A**, **B**) and fungi (**C**, **D**) in roots and rhizosphere soils of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* in different growth years

2.4 不同年限短萼黄连根内和根际细菌群落特征分析

2.4.1 *细菌群落结构分析* 在短萼黄连根和根际土壤中分别获得 6 102 个和 13 304 个细菌 OTUs。其中，根组织中分类地位明确的细菌有 32 门 97 个纲 228 个目 408 个科 814 个属 1 627 个种；根际土壤中分类地位明确的细菌有 51 门 156 个纲 380 个目 625 个科 1 207 个属 2 770 个种。为了解不同组别独有和共有的物种数量，绘制了 OTUs 和属水平下的物种韦恩图。OTUs 韦恩图显示，Root1、Root2 和 Root3 中有1 692个共有细菌 OTUs，占各生长年限根内细菌 OTUs 总数的 45.18%、45.28% 和 52.92%，特有的细菌 OTUs 分别有 1 431 个、1 114 个和 732 个(图 3:A)。根际土壤中有 5 196 个共有细菌 OTUs，分别占各生长年限细菌 OTUs 总数的 54.54%、59.73%和 60.20%，这说明随着生长年限的增加，根际土壤中特有的细菌 OTUs 数量呈下降趋势，一年生根际土壤中独有的细菌 OTUs 类型最多，为 2 484 个(图 3:B)。

在门分类水平上，根样本中以变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)和黏球菌门(Myxococcota)为主要优势细菌门，其中变形菌门的丰度随年限增加而增加，占比分别为 48.82%、72.44%和 75.27%(图 3:E)。在根际土壤中，优势菌门为变形菌门、酸杆菌门(Acidobacteria)和放线菌门，其中变形菌门丰度占比先降后升，在 RS1 中最高，酸杆菌门丰度占比逐年升高，而放线菌门丰度占比逐年下降(图 3:F)。

表 1　根内和根际微生物多样性指数

Table 1　Diversity indices of microbial communities in roots and rhizosphere soils

指数 Index	细菌 Bacteria						真菌 Fungi					
	Root1	Root2	Root3	RS1	RS2	RS3	Root1	Root2	Root3	RS1	RS2	RS3
Ace	1 842 ± 206a	2 012 ± 167a	1 842 ± 257a	5 999 ± 386a	5 876 ± 283a	5 736 ± 385a	322 ± 70a	177 ± 165a	246 ± 164a	505 ± 172b	1 034 ± 158a	1 152 ± 287a
Chao 1	1 787 ± 189a	1 960 ± 153a	1 801 ± 254a	5 859 ± 368a	5 697 ± 311a	5 612 ± 357a	322 ± 69a	177 ± 165a	245 ± 163a	508 ± 174b	1 040 ± 162a	1 161 ± 293a
Shannon	5.14 ± 0.26a	5.27 ± 0.19a	4.73 ± 0.39b	7.07 ± 0.04a	6.96 ± 0.06b	6.94 ± 0.11b	4.05 ± 0.40a	2.04 ± 1.52b	3.66 ± 0.38a	4.44 ± 0.19a	4.79 ± 0.81a	5.04 ± 0.37a
Simpson	0.022 ± 0.01b	0.023 ± 0.01b	0.044 ± 0.02a	0.003 ± 0.00b	0.003 ± 0.00ab	0.004 ± 0.00a	0.05 ± 0.02a	0.44 ± 0.37b	0.06 ± 0.03a	0.05 ± 0.02a	0.06 ± 0.09a	0.03 ± 0.02a

注：Root1、Root2、Root3 分别对应一年生、两年生和多年生的根样本；RS1、RS2、RS3 分别对应一年生、两年生和多年生的根际土壤样本。数值后的不同字母表示组内不同年限样本间差异显著（$P<0.05$）。

Note: Root1, Root2, Root3 correspond to 1-year-old, 2-year-old, and perennial root samples, respectively; RS1, RS2, RS3 correspond to 1-year-old, 2-year-old, and perennial soil samples, respectively. Different letters after values indicate significant differences among samples of different years within the group ($P<0.05$).

在属水平上，Root1、Root2 和 Root3 中共有细菌 493 个，独有细菌分别有 70 个、73 个和 42 个（图 3：C）。进一步分析细菌群落组成结构，发现根样本中主要以慢生根瘤菌属（*Bradyrhizobium*）、根瘤菌属菌群（*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*）和生丝微菌属（*Hyphomicrobium*）等组成（图 3：G）。其中，慢生根瘤菌属、根瘤菌属菌群、*Steroidobacter*、贪噬菌属（*Variovorax*）的相对丰度随着短萼黄连生长年限的增加而增加。值得注意的是，假诺卡氏菌属（*Pseudonocardia*）、链霉菌属（*Streptomyces*）、*Galbitalea*、细杆菌属（*Microbacterium*）等在 Root1 中相对丰度较高，但是在 Root2、Root3 中丰度极低。在根际土壤中，共有 772 个细菌属，RS1、RS2、RS3 分别有 200 个、51 个、38 个独有细菌属（图 3：D）。共有细菌属中相对丰度较大的依次为 norank_f_norank_o_Vicinamibacterales、norank_f_Xanthobacteraceae 和慢生根瘤菌属（图 3：H）。norank_f_Nitrososphaeraceae、norank_f_Vicinamibacteraceae、norank_f_norank_o_norank_c_bacteriap25、芽孢杆菌属（*Bacillus*）在 Root2、Root3 中相对丰度高；而 norank_f_norank_o_Gaiellales 在 Root1 中相对丰度较高。

2.4.2 *细菌群落标志物种分析*　通过对短萼黄连根内和根际土壤细菌测序结果进行 LEfSe 分析（LDA 阈值 >3.5），分别获得了 25 个和 7 个差异显著的细菌属（图 4：A、C）。Root1、Root2、Root3 中各有 8 个、6 个、11 个差异显著菌属，其中在 Root1 中显著富集的 Top 3 菌属是游动放线菌属（*Actinoplanes*）、假诺卡氏菌属、链霉菌属，在 Root2 中是生丝微菌属、norank_f_SC-I-84、鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*），在 Root3 中是慢生根瘤菌属、*Steroidobacter*、*Tardiphaga*（图 4：B）。RS1、RS2、RS3 中分别有 3 个、2 个、2 个显著差异菌属，RS1 中最富集菌属为 MND1、鞘脂单胞菌属、unclassified_f_Comamonadaceae，RS2 中为 norank_f_norank_o_norank_c_bacteriap25 和 norank_f_Nitrososphaeraceae，RS3 中为慢生根瘤菌属和 Candidatus_Xiphinematobacter（图 4：D）。

2.5 不同年限短萼黄连根内和根际真菌群落特征分析

2.5.1 *真菌群落结构分析*　从短萼黄连根组织样本中共获得 1 675 个真菌 OTUs，分布在 12 门 49 个纲 126 个目 268 个科 483 个属 619 个种；根际土壤样本中获得 4 214 个 OTUs，分布在 14 门 67 个纲 167 个目 420 个科 908 个属 1 378 个种。OTUs 韦恩图显示，Root1、Root2 和 Root3 中共有 172 个真菌 OTUs，独有真菌 OTUs 分别为 565 个、239 个、372 个（图 5：A）。根际土壤样本中共有真菌 OTUs 数量为 624 个，分别占各生长年限总数的 40.52%、26.11% 和 23.22%。随着生长年限的增加，根际土壤中特有真菌 OTUs 数量呈上升趋势，RS3 中独有的真菌 OTUs 最多，为 1 024 个（图 5：B）。

为进一步阐明不同生长年限短萼黄连根组织

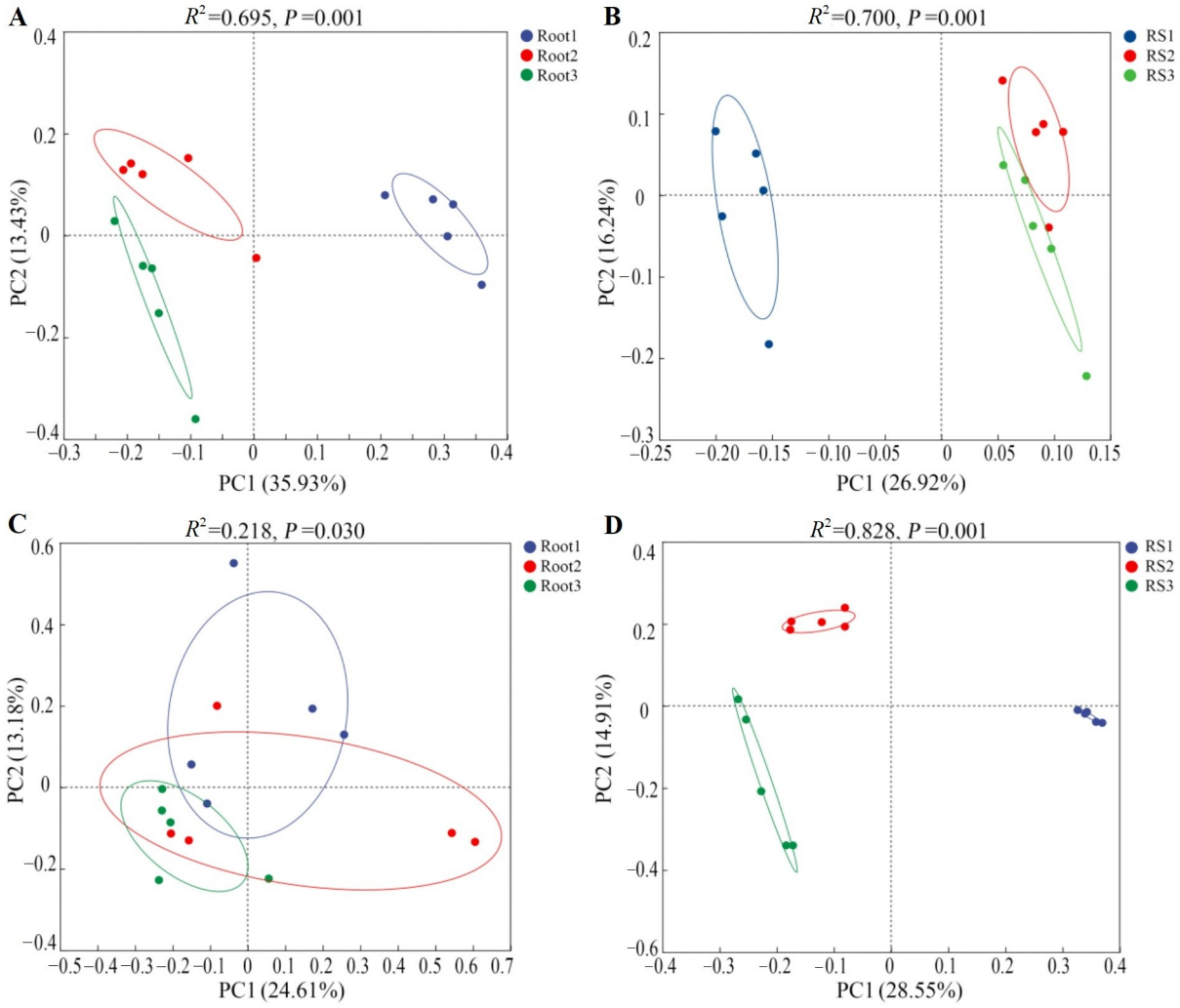
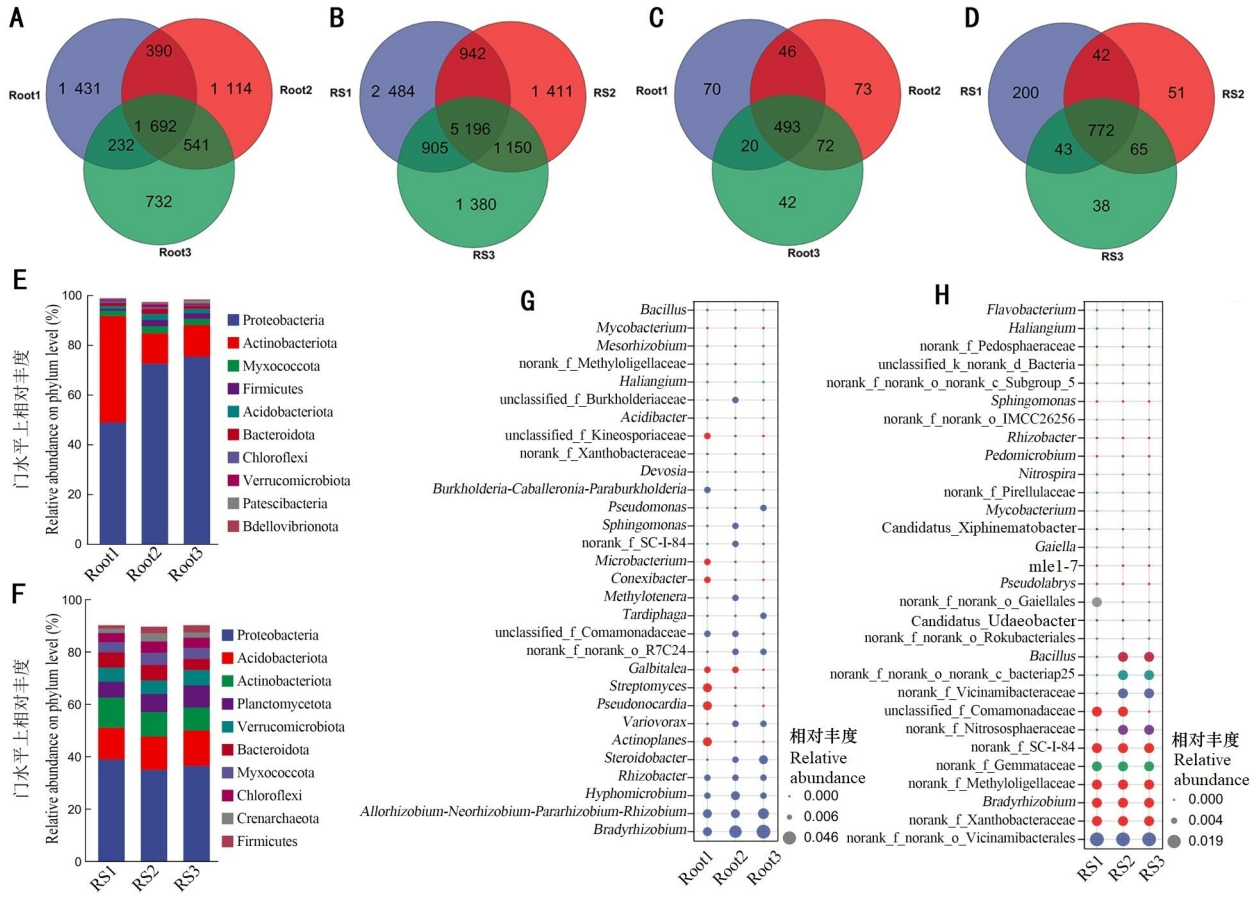


图 2 不同生长年限短萼黄连根内和根际土中细菌(A、B)和真菌(C、D)的 PCoA 图

Fig. 2 PCoA plots of bacteria (**A**, **B**) and fungi (**C**, **D**) in roots and rhizosphere soils of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* in different growth years

和根际土壤样本中菌群结构差异,对丰度 Top 10 的优势真菌门和 Top 30 的优势真菌属的组成结构和相对丰度变化进行分析,结果如图 5:E-H 所示。在排除未分类和其他真菌分类外,根组织中的优势真菌门主要有子囊菌门(Ascomycota)、球囊菌门(Glomeromycota)、担子菌门(Basidiomycota)(图 5:E)。其中,子囊菌门丰度占比最高,分别为 59.07%、48.67%、59.52%。根际土壤中的优势真菌门主要由子囊菌门、担子菌门和被孢菌门(Mortierellomycota)等组成(图 5:F)。其中,子囊菌门和被孢菌门的丰度随着年限的增加呈先升后降的趋势,在 RS2 中比例最高,分别达到 75.21% 和 4.99%,而担子菌门的丰度在 RS1 中占比最高,达 10.44%,在 RS2 和 RS3 间差异不大。

在属水平下,Root1、Root2、Root3 中共有真菌 115 个,独有真菌分别有 145 个、49 个、69 个(图 5:C)。共有真菌主要为未分类真菌属(unclassified_k_Fungi)、*Leptodophora*、Tetracladium_f_Helotiaceae、unclassified_f_Plectosphaerellaceae 和 *Titaea*(图 5:G)。在根际土壤中,共有真菌 315 个,独有真菌分别有 77 个、129 个、141 个(图 5:D),主要优势真菌属为未分类真菌属、*Epicoleosporium*、unclassified_o_Helotiales、*Cryptosporiopsis*、木霉属(*Trichoderma*)(图 5:H)。



A、**B**. OTU 韦恩图；**C**、**D**. 属水平韦恩图；**E**、**F**. 门水平上细菌的相对丰度；**G**、**H**. 属水平上细菌的相对丰度。

A, **B**. OTU Venn diagram; **C**, **D**. Venn diagram on genus level; **E**, **F**. Relative abundance of bacteria on phylum level; **G**, **H**. Relative abundance of bacteria on genus level.

图 3　短萼黄连根内和根际土壤中细菌群落分析

Fig. 3　Analysis of bacteria communities in roots and rhizosphere soils of *Coptis chinensis* var. *brevisepala*

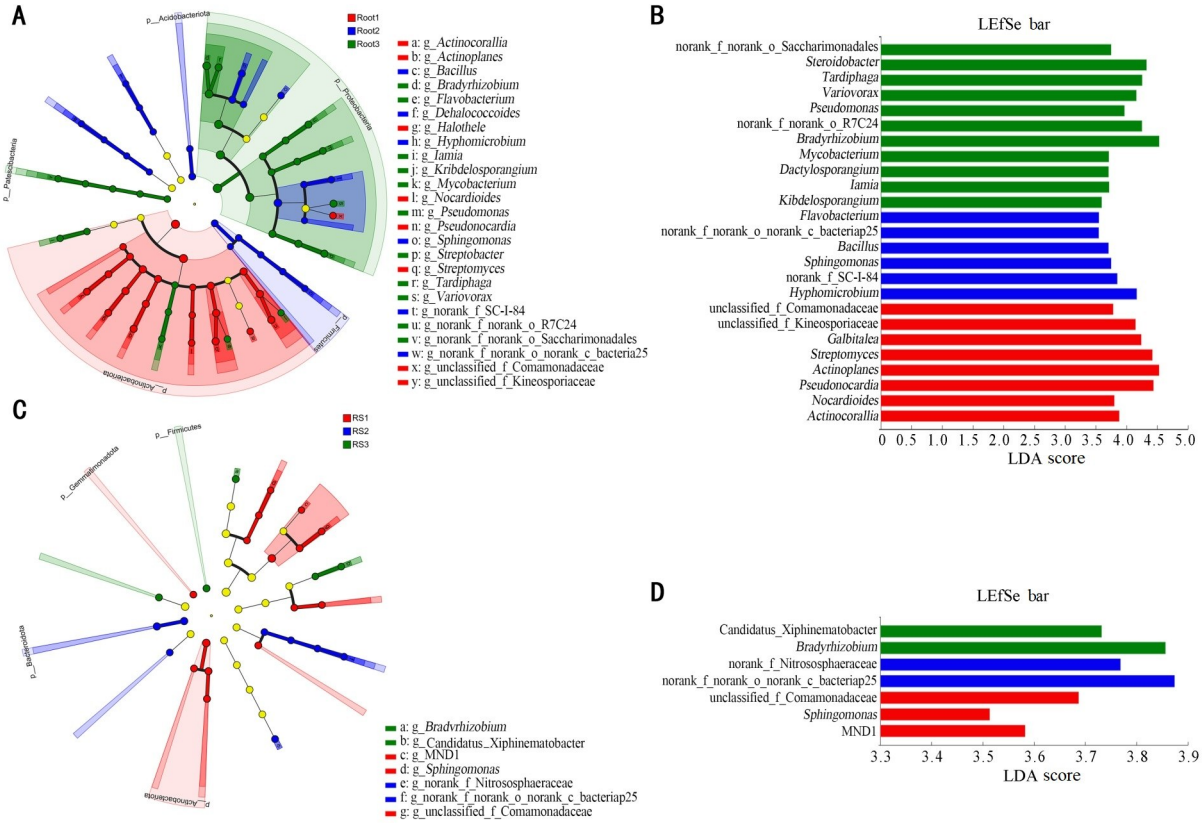
其中，尽管 *Epicoleosporium* 在各年限样本中占比均较高，但是其相对丰度随着短萼黄连生长不断下降。上述结果表明，随着短萼黄连的生长，根内和根际土壤中的真菌群落结构发生了一定的改变。

2.5.2 真菌群落标志物种分析　真菌 LEfSe 分析（LDA 阀值 > 3.5）显示，在根组织和根际土壤中分别鉴定到 16 个和 23 个优势真菌属（图 6：A、C）。其中，Root1、Root2、Root3 中分别有 11 个、0 个、5 个，Root1 中优势真菌属为 unclassified_o_Pleosporales、*Epicoleosporium*、刺盘孢属（*Colletotrichum*）等，Root3 中为酵母属（*Saccharomycopsis*）、*Ilyonectria*、Ceratobasidiaceae_gen_Incertae_sedis（图 6：B）。在根际土壤样本中，RS1、RS2、RS3 中分别有 6 个、9 个、8 个差异显著真菌属，其中 RS1 中优势真菌属有 *Epicoleosporium*、unclassified_f_Mycosphaerellaceae、*Tricellula* 等，RS2 中有 *Plectosphaerella*、unclassified_o_Pleosporales、*Apiospora* 等，RS3 中有木霉属、杯盘菌属（*Ciboria*）、*Cryptosporiopsis* 等（图 6：D）。

3　讨论与结论

3.1 根内和根际微生物群落结构特征及比较分析

在本研究中，同一生长年限的短萼黄连根际微生物的总 OTUs 数目、独有 OTUs 数目、共有 OTUs 数目以及多样性指数 Ace、Chao 1 和 Shannon 均显著高于根内生菌群，说明短萼黄连根际微生物群落的丰富度与多样性均高于根内生菌。根



淡黄色点表示在组间无显著性差异或对差异无显著影响的微生物类群;其他色点表示显著富集并影响组间差异的微生物类群。下同。

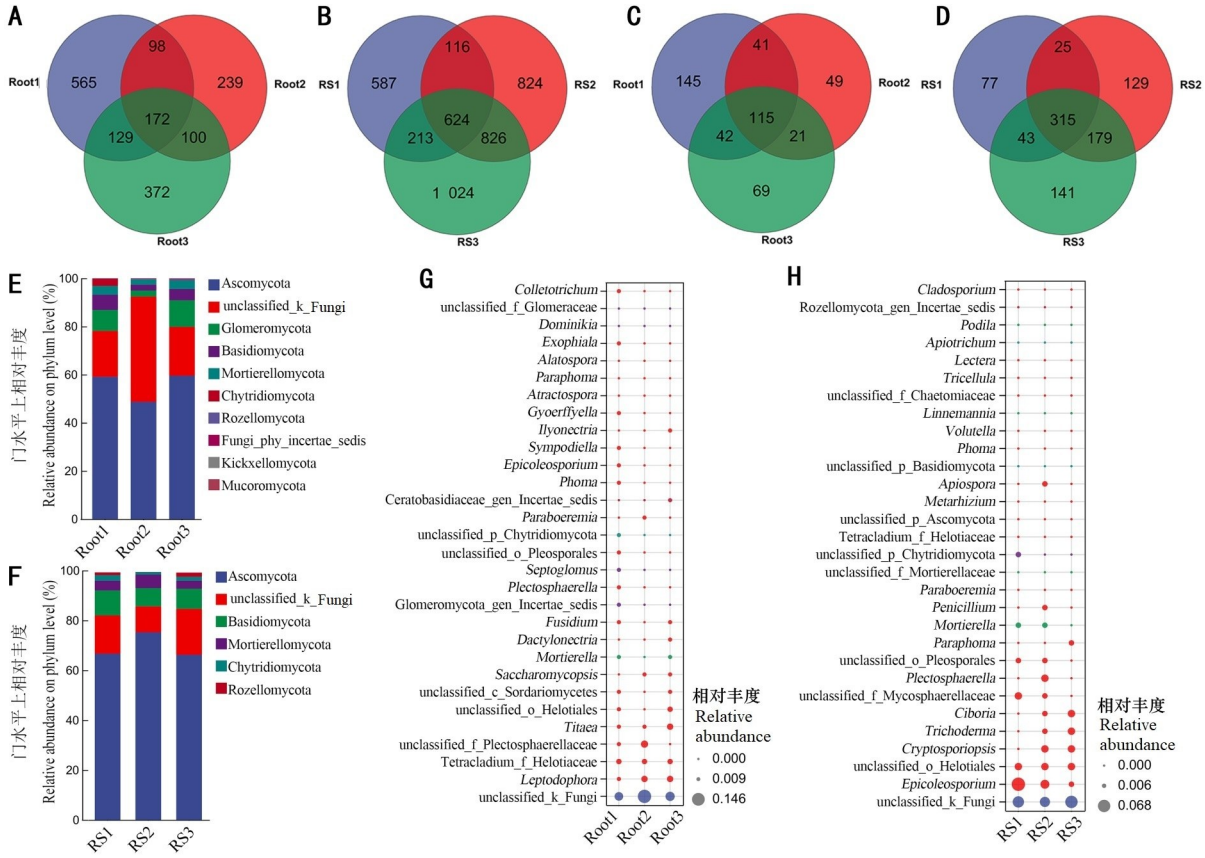
Light yellow dots indicate groups with no significant difference or no significant influence on group variation; other colored dots indicate microbial groups significantly enriched in specific groups, impacting group differences. The same below.

图 4 不同生长年限短萼黄连根内(A、B)和根际土壤(C、D)中细菌 LEfSe 分析

Fig. 4 LEfSe analysis of bacteria in roots (**A**, **B**) and rhizosphere soils (**C**, **D**) of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* in different growth years

内与根际微生物相互作用构成了一种复杂的动态生态关系。有研究表明,根际微生物的群落丰富度与多样性显著高于根内生菌群,如项小燕等(2024)通过研究大别山五针松根际微生物和内生菌群落特征,发现根际微生物的总 OTUs 数目和 α 多样性指数均明显大于根内生菌,与本研究结果一致。

有研究推测,植物体内部分内生菌源自土壤,土壤微生物通过侵入宿主植物并与之共同进化,逐渐演变为内生菌。因此,植物内生菌与根际微生物在种类多样性方面存在一定的相关性。在特定条件下,植物内生菌与根际微生物还可实现相互转变。例如,Ju 等(2020)研究发现,醉马草的内生真菌 *Epichloë gansuensis* 对其根际微生物群落的多样性与丰富度具有显著影响;Chen 等(2022)通过对淫羊藿不同生长阶段叶内生真菌和根际土壤微生物的多样性分析,发现两者之间存在相互转变的现象。本研究通过对短萼黄连根内和根际土壤中微生物组成的比较分析发现,变形菌门和放线菌门均为二者共有的优势细菌菌门,其中变形菌门的丰度占比最高;子囊菌门、担子菌门和被孢菌门为二者共有的优势真菌菌门,其中子囊菌门为第一优势真菌菌门,这与梁浩等(2022)在雅连中的研究结果一致,同时也进一步验证了栖息地核心微生物一致的观点(Markov & Laudet,2022)。综上认为,短萼黄连根际土壤微生物的丰富度及多样性显著高于根内生菌群,但二者在核心菌门组成上具有相似性。



A、**B**. OTU 韦恩图；**C**、**D**. 属水平韦恩图；**E**、**F**. 门水平上真菌的相对丰度；**G**、**H**. 属水平上真菌的相对丰度。

A, **B**. OTU Venn diagram; **C**, **D**. Venn diagram on genus level; **E**, **F**. Relative abundance of fungi on phylum level; **G**, **H**. Relative abundance of fungi on genus level.

图 5　短萼黄连根内和根际土壤中真菌群落分析

Fig. 5　Analysis of fungi communities in roots and rhizosphere soils of *Coptis chinensis* var. *brevisepala*

3.2 生长年限对短萼黄连根内及根际微生物群落特征的影响

比较不同生长年限短萼黄连根内及根际土壤微生物多样性，发现其微生物群落结构和组成存在显著差异。特别是在第一年至第二年间，根组织和根际土壤中微生物群落的组成与多样性发生了显著变化，成为群落结构转变的关键期。此外，短萼黄连根际土壤中细菌的指数 Ace、Chao 1 和 Shannon 明显高于真菌，而 Simpson 指数则显著低于真菌，说明短萼黄连根际土壤中细菌物种比真菌更为丰富且多样性较高，属于健康的“细菌型”土壤。随着短萼黄连生长年限的增加，根际土壤中细菌的数量与多样性逐渐下降，真菌的数量和多样性则逐步增加，表明根际土壤正在经历由“细菌型”向“真菌型”的转变，这与刘成（2024）关于黄连连作显著降低根际土壤细菌数量并提高真菌数量的研究结果相契合。值得注意的是，随着生长年限的增加，根内生菌的丰度及多样性变化趋势与根际微生物一致，表明生长年限也能显著影响根内生菌环境。研究显示，根系分泌物在根际土壤的理化性质、根表面及随后根组织内部的微生物群落方面发挥着多重积极作用（张丹等，2015；Zhuang et al.，2024）。在黄连种植过程中，根部会不断向土壤中释放酚酸类化感物质，土壤内酚酸类化感物质浓度逐年上升，最终引起土壤微生态环境的改变（刘云露，2019；刘成，2024）。在短萼黄连与黄连中，根际微生物群落多样性和结构组成的变化规律一致，可能与两者的根系分泌物相似有关，但其参与植物-微生物相互作用的具体机制还不确定，仍有待进一步研究。

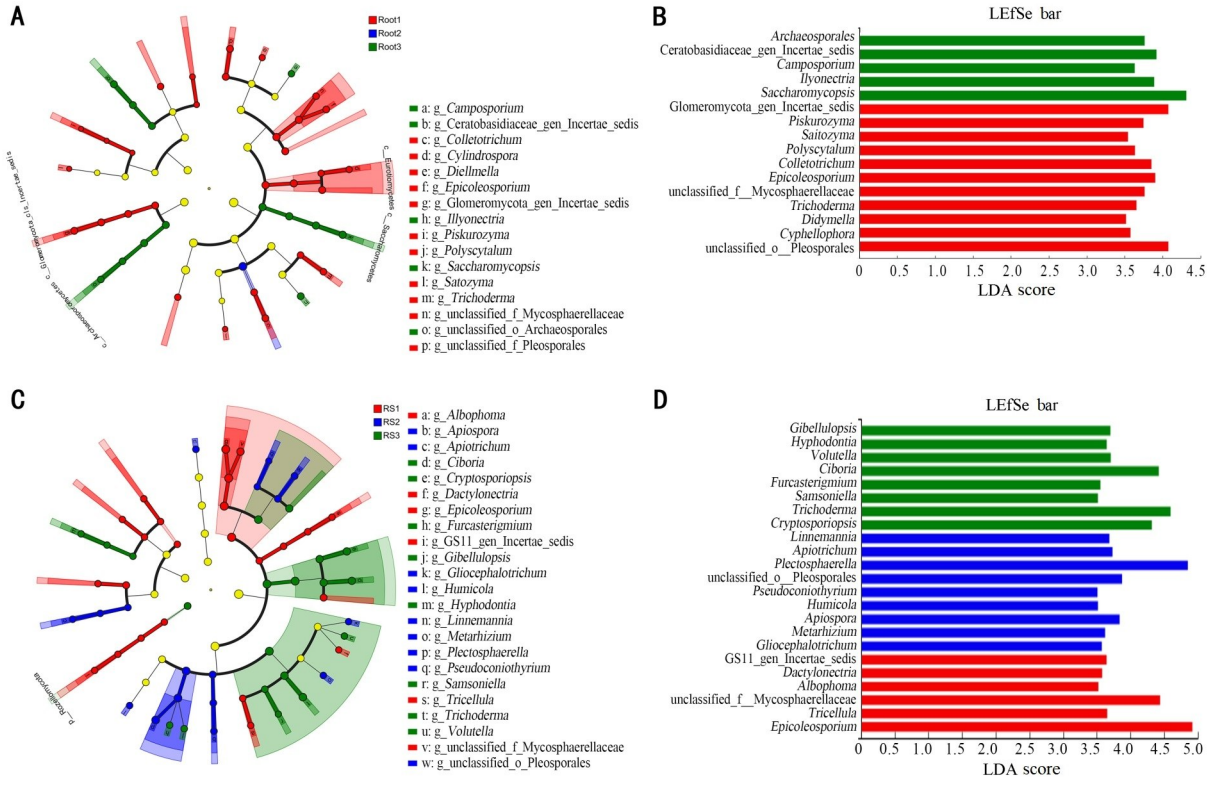


图 6 不同生长年限短萼黄连根内(A、B)和根际土壤(C、D)中真菌 LEfSe 分析

Fig. 6 LEfSe analysis of fungi in roots (**A**, **B**) and rhizosphere soil (**C**, **D**) of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* in different growth years

随着短萼黄连生长年限的增加,其根部优势细菌的丰度比例发生了较大变化。然而,在根际土壤中,变形菌门和酸杆菌门始终在细菌丰度占比最大,这与冼康华等(2022)在不同生长年限华重楼根际土壤细菌类群特征的研究规律保持一致。游动放线菌属和链霉菌属为常见放线菌,在土壤有机质的转化方面起着重要作用。游动放线菌属和链霉菌属是 Root1 中的核心优势属,在 Root1 中丰度最高,这意味着它们可能是促进短萼黄连早期生长的关键菌属。根瘤菌属是一种植物促生菌,具有产生生长素、乙烯等植物激素和解磷等作用,能够促进植物生长(霍佳慧等,2022)。本研究中,慢生根瘤菌属以较高丰度存在于短萼黄连所有样本中且随着短萼黄连的生长其丰度不断富集,是 Root3 和 RS3 中占主导地位的菌属,说明该菌属可能在短萼黄连生长和环境适应中发挥了关键作用,但还需进一步验证。拟孢囊菌属(*Kibdelosporangium*)和微杆菌属(*Mycobacterium*)是稀有放线菌属,具有特异性次级代谢潜力(Ma et al., 2024);*Steroidobacter* 是一种与土壤氮代谢密切相关的菌属(Xun et al., 2021),这些菌属在 Root3 中显著富集,推测可能与短萼黄连后期生长及次生代谢相关。真菌 LEfSe 分析显示,*Epicoleosporium* 是 Root1 和 RS1 中的优势真菌群落。*Epicoleosporium* 包含多种植物病害真菌,这表明 *Epicoleosporium* 可能是短萼黄连早期生长阶段的主要病原体。*Plectosphaerella* 作为多种植物的病原体而广为人知,它们会导致果实、根部和颈部腐烂塌陷(Carlucci et al., 2012)。*Gibellulopsis* 中唯一有效物种被证明是中国甜菜枯萎病的病原菌(Zhou et al., 2017)。本研究中,*Plectosphaerella* 和 *Gibellulopsis* 分别显著存在于 RS2 和 RS3 中,表明这两个菌属可能是短萼黄连中后期发病的主要原因。综上所述,短萼黄连在不同生长阶段可能受特定有益菌株(一年生为游动放线菌属;两年生和多年生为慢生根瘤菌属)与有害菌株(一年生为

Epicoleosporium；两年生为 *Plectosphaerella*；多年生为 *Gibellulopsis*）的影响，进而构建起植物-微生物动态互作关系。

本研究通过分析短萼黄连根内生菌和根际微生物群落特征，阐明了根内和根际微生物在群落结构与组成特征上的异同点；通过揭示不同生长年限根内和根际微生物多样性的动态变化规律，明确了生长年限对短萼黄连根内和根际微生物多样性的影响。本研究结果表明，特定的有益微生物（一年生为游动放线菌属；两年生和多年生为慢生根瘤菌属）可能在短萼黄连不同生长阶段发挥关键作用，为后续探讨短萼黄连生长发育与微生物的相互作用，分离有益微生物等提供了理论依据。对不同年限短萼黄连病原菌（一年生为 *Epicoleosporium*；两年生为 *Plectosphaerella*；多年生为 *Gibellulopsis*）的研究，也能为今后短萼黄连的病虫害防治和科学栽培奠定基础，促进短萼黄连的科学保护和可持续发展。此外，本研究仅针对浙江清凉峰国家级自然保护区的短萼黄连种群展开，所得结论可能存在一定的局限性。因此，未来应尽可能扩大采样范围，覆盖更多分布区域，以验证结论的普适性，为完善短萼黄连种群保护策略提供更全面的数据支持。

参考文献：

CARLUCCI A, RAIMONDO M L, SANTOS J, et al., 2012. *Plectosphaerella* species associated with root and collar rots of horticultural crops in southern Italy [J]. Persoonia, 28: 34-48.

CHEN J W, WU Y, ZHUANG X, et al., 2022. Diversity analysis of leaf endophytic fungi and rhizosphere soil fungi of Korean Epimedium at different growth stages [J]. Environmental Microbiome, 17(1): 52.

CHEN P P, LIU X Y, 2012. Ecological characteristics and cultivation research of Xuanhuanglian [J]. Chinese Wild Plant Resources, 31(5): 75-77. [陈萍萍, 刘学医, 2012. 宣黄连的生态学特征和栽培研究 [J]. 中国野生植物资源, 31(5): 75-77.]

CHENG L Y, ZHANG G H, SUN Y, et al., 2024. Research progress on tripartite interaction of medicinal plants-endophytic fungi-rhizosphere microbes [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 55(15): 5264-5273. [程龙媛, 张国卉, 孙燕, 等, 2024. 药用植物-内生菌-根际微生物互作研究进展 [J]. 中草药, 55(15): 5264-5273.]

DU J H, XU W F, YANG X D, et al., 2022. Isolation and screening of endophytes producing indole acetic acid from *Polygonatum cyrtonema* Hua. and its effect on seed germination of *Polygonatum* [J]. Biotechnology Bulletin, 38(12): 223-232. [杜佳慧, 徐伟芳, 杨晓冬, 等, 2022. 多花黄精产吲哚乙酸内生菌的分离筛选及其对黄精种子萌发的影响 [J]. 生物技术通报, 38(12): 223-232.]

HE C, WANG W Q, HOU J L, 2019. Plant growth and soil microbial impacts of enhancing licorice with inoculating dark septate endophytes under drought stress [J]. Frontiers in Microbiology, 10: 2277.

HE C, LIU C, LIU H F, et al., 2022a. Dual inoculation of dark septate endophytes and *Trichoderma viride* drives plant performance and rhizosphere microbiome adaptations of *Astragalus mongholicus* to drought [J]. Environmental Microbiology, 24(1): 324-340.

HE C, HAN T T, TAN L, et al., 2022b. Effects of dark septate endophytes on the performance and soil microbiota of *Lycium ruthenicum* under drought stress [J]. Frontiers in Plant Science, 13: 898378.

HUA Z, ZI H Y, LIAO Y W K, et al., 2024. Research advances in functional progresses and factors of rhizosphere microorganisms in regulating forest growth [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 35(11): 3190-3198. [华喆, 自海云, 廖杨文科, 等, 2024. 调控林木生长的根际微生物功能过程及其影响因素研究进展 [J]. 应用生态学报, 35(11): 3190-3198.]

HUO J H, BI S J, YU X H, et al., 2022. Research progress on the mechanism of plant growth promoting rhizobacteria [J]. Modern Agricultural Science and Technology(9): 90-96. [霍佳慧, 毕少杰, 于欣卉, 等, 2022. 植物根际促生菌作用机制研究进展 [J]. 现代农业科技(9): 90-96.]

JU Y, ZHONG R, CHRISTENSEN M J, et al., 2020. Effects of *Epichloe gansuensis* endophyte on the root and rhizosphere soil bacteria of *Achnatherum inebrians* under different moisture conditions [J]. Frontiers in Microbiology, 11: 747.

LI J J, ZENG M, 2020. Ecological significance of arbuscular mycorrhiza on plant rhizosphere stress [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 31(9): 3216-3226. [李娇娇, 曾明, 2020. 丛枝菌根对植物根际逆境的生态学意义 [J]. 应用生态学报, 31(9): 3216-3226.]

LIANG H, ZHANG Y Y, RUAN Y Y, et al., 2022. Correlation analysis of soil microbial community and alkaloid content in rhizosphere soil of *Coptis deltoidea* [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 45(11): 2541-2549. [梁浩, 张亚玉, 阮音音, 等, 2022. 雅连根际土壤微生物群落及与其生物碱

含量相关性分析［J］. 中药材, 45(11): 2541-2549.］

LIU C, 2024. Effect of companion cultivation on the alleviation of continuous cropping obstacles in *Coptis chinensis* ［J］. Jiangsu Agriculture Sciences, 52(13): 161-169.［刘成, 2024. 伴生栽培对黄连连作障碍的缓解效应［J］. 江苏农业科学, 52(13): 161-169.］

LIU J W, LI X Z, YAO M J, 2021. Research progress on assembly of plant rhizosphere microbial community［J］. Acta Microbiologica Sinica, 61(2): 231-248.［刘京伟, 李香真, 姚敏杰, 2021. 植物根际微生物群落构建的研究进展［J］. 微生物学报, 61(2): 231-248.］

LIU X Y, 2008. Resources investigation and quality study of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* in Anhui［D］. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine.［刘学医, 2008. 安徽短萼黄连资源调查和质量研究［D］. 济南: 山东中医药大学.］

LIU Y L, 2019. Soil microbial diversity and degradation mechanism of phenolic acid degradation microbes in soil of *Coptis chinensis*［D］. Chongqin: Southwest University.［刘云露, 2019. 黄连土壤微生物多样性及其酚酸降解菌筛选与降解机制［D］. 重庆: 西南大学.］

MA M J, YU W C, SUN H Y, et al., 2024. Genus-specific secondary metabolome in *Allokutzneria* and *Kibdelosporangium*［J］. Synthetic and Systems Biotechnology, 9(3): 381-390.

MAO J H, LIU X Y, 2012. Pharmacognostic study of *Coptis chinensis* var. *brevisepala*［J］. Lishizhen Medicine and Materia Medica, 23(9): 2219-2220.［茆菁华, 刘学医, 2012. 短萼黄连的生药学研究［J］. 时珍国医国药, 23(9): 2219-2220.］

MARKOV G V, LAUDET V, 2022. How plants grow their microbiome［J］. Current Biology, 32(3): R97-R100.

MENG T T, CUI X S, ZHU N, et al., 2023. Root microbial community structure and diversity of *Codonopsis pilosula* in different growth years［J］. Journal of Chinese Medicinal Materials, 54(15): 4992-5002.［孟彤彤, 崔兴帅, 朱宁, 等, 2023. 不同生长年限党参根系微生物群落结构和多样性研究［J］. 中草药, 54(15): 4992-5002.］

WANG Z W, JI Y L, CHEN Y G, 2015. Studies and biological significances of plant endophytes［J］. Microbiology China, 42(2): 349-363.［王志伟, 纪燕玲, 陈永敢, 2015. 植物内生菌研究及其科学意义［J］. 微生物学通报, 42(2): 349-363.］

WU W W, HAN X, WANG J P, et al., 2024. Alterations with plantation years of *Fructus aurantii* on rhizosphere microbiome and soil properties［J］. Acta Pedologica Sinica, 61(6): 1729-1740.［吴微微, 韩雪, 王继朋, 等, 2024. 种植年限对枳壳根际微生物群落和土壤性质的影响［J］. 土壤学报, 61(6): 1729-1740.］

XIAN K H, SU J, FU C M, et al., 2022. Microbial diversity in rhizosphere soil of *Paris polyphylla* var. *chinensis* in different growth years［J］. Guihaia, 42(12): 2087-2098.［冼康华, 苏江, 付传明, 等, 2022. 不同生长年限华重楼根际土壤微生物多样性研究［J］. 广西植物, 42(12): 2087-2098.］

XIANG X Y, RUAN S R, ZHANG Y, et al., 2024. Community characteristics and functional diversity of the rhizosphere microbiota and endophyte from *Pinus dabeshanensis*［J］. Guihaia, 45(1): 31-43.［项小燕, 阮思睿, 张颖, 等, 2024. 大别山五针松根际微生物和内生菌群落特征及功能多样性［J］. 广西植物, 45(1): 31-43.］

XUN W B, LIU Y P, LI W, et al., 2021. Specialized metabolic functions of keystone taxa sustain soil microbiome stability［J］. Microbiome, 9(1): 35.

ZHANG D, ZHONG G Y, CAO W G, et al., 2015. Study on accumulation and decrease law of phenolic acids in soil of cultivation base of *Coptis chinensis*［J］. World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 17(7): 1419-1424.［张丹, 钟国跃, 曹纬国, 等, 2015. 重庆黄连种植土壤中酚酸类物质累积与消减规律的研究［J］. 世界科学技术-中医药现代化, 17(7): 1419-1424.］

ZHANG L, ZHANG X P, 2005. Study on the population characteristics and endangerment mechanism of *Coptis chinensis* var. *brevisepala* in Anhui［J］. Chinese Journal of Applied Ecology, 16(8): 1394-1398.［张莉, 张小平, 2005. 安徽短萼黄连种群特性及其濒危机制探讨［J］. 应用生态学报, 16(8): 1394-1398.］

ZHOU J W, JI P C, JIANG H, et al., 2022. Quorum sensing inhibition and metabolic intervention of 4-hydroxycinnamic acid against *Agrobacterium tumefaciens*［J］. Frontiers in Microbiology, 13: 830632.

ZHOU Y, ZHAO Z Q, GUO Q Y, et al., 2017. First report of wilt of sugar beet caused by *Gibellulopsis nigrescens* in the Xinjiang region of China［J］. Plant Disease, 101(7): 1318.

ZHUANG Y, WANG H, TAN F R, et al., 2024. Rhizosphere metabolic cross-talk from plant-soil-microbe tapping into agricultural sustainability: Current advance and perspectives［J］. Plant Physiology and Biochemistry, 210: 108619.

（责任编辑 周翠鸣）