

艾比湖盐碱地肉苁蓉与锁阳土壤微生物群落分析

郑 燕^{1,3}, 孙 晓^{1,2}, 缪雨静^{1,2}, 江 媛^{1,4}, 阿里穆斯⁵, 黄林芳^{1,2*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药用植物研究所, 国家中医药管理局中药资源保护重点研究室, 北京 100193; 2. 中药资源教育部工程研究中心, 北京 100193; 3. 江西中医药大学, 江西 南昌 330000; 4. 大理大学, 云南 大理 671000; 5. 民族医药教育部重点实验室(中央民族大学), 中央民族大学药学院, 北京 100081)

摘要: 为探讨极端生境-盐碱地下两种典型寄生药用植物肉苁蓉与锁阳的土壤微生物群落特点, 本文基于微生物组-生态因子策略, 对新疆艾比湖的肉苁蓉与锁阳土壤进行16S扩增子测序, 分析土壤微生物群落的组成, 并结合核心微生物组丰度及生态气候因子进行冗余分析和相关性分析。结果表明肉苁蓉土壤微生物群落多样性显著高于锁阳, 肉苁蓉与锁阳核心微生物组为海单胞菌属 *Marinomonas*、盐单胞菌科 *Halomonadaceae*、根瘤菌目 *Rhizobiales*、嗜盐单胞菌属 *Halomonas* 及 *Acidimicrobiales*。可区别二者土壤微生物群落的6个特异性生物标记物为微球菌科 *Micrococcaceae*、*Echinicola* 及 *Glutamicibacter*、*Galbibacter*, 假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas*、*Marinobacterium_rhizophilum*。冗余分析和相关性分析结果表明最干季度平均温度与最冷季度平均温度、粘土含量及土壤质地分类是影响肉苁蓉与锁阳土壤微生物群落组成的主要生态因子。本文为后期寻找肉苁蓉与锁阳的微生物分子标记, 促进品质提高提供理论依据。

关键词: 肉苁蓉; 锁阳; 土壤微生物群落; 生态因子

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)04-1178-10

Analysis of the soil microbial community of *Cistanche deserticola* and *Cynomorium songaricum* in the saline-alkali soil of Ebinur Lake

ZHENG Yan^{1,3}, SUN Xiao^{1,2}, MIAO Yu-jing^{1,2}, JIANG Yuan^{1,4}, BORJIGIDAI Almaz⁵, HUANG Lin-fang^{1,2*}

(1. Key Lab of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of China, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China; 2. Engineering Research Center of Chinese Medicine Resource, Ministry of Education, Beijing 100193, China; 3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330000, China; 4. Dali University, Dali 671000, China; 5. Key Laboratory of Ethnomedicine (Minzu University of China), Ministry of Education, School of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Abstract: To explore the characteristics of soil microbial communities of *Cistanche deserticola* and *Cynomorium songaricum*, two typical parasitic medicinal plants that live in an extreme saline alkali environment, 16S PCR was used to sequence the soil microbial communities of *C. deserticola* and *C. songaricum* in Ebinur Lake, Xinjiang. Redundancy analysis and correlation analysis were carried out based on the abundance of core microbiome and ecoclimatic factors. The results show that the diversity of the soil microbial community of *C. deserticola* was significantly higher than that of *C. songaricum*. The core microbial groups of *C. deserticola* and *C. songaricum* were *Marinomonas*, *Halomonadaceae*, *Rhizobiales*, *Halomonas*, and *Acidimicrobiales*. Six specific biomarkers were identified as *Micrococcaceae*, *Echinicola*, *Glutamicibacter*, *Galbibacter*, *Pseudoalteromonas*, and *Marinobacterium_rhizophilum*.

收稿日期: 2020-11-18; 修回日期: 2021-01-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073960, U1812403-1); 国家外专局一带一路专项 (T2017052); 科技部 (2018FY100701).

*通讯作者 E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1771

rhizophilum. The results of redundancy analysis and correlation analysis show that the average temperature in the driest season and the average temperature in the coldest season, and the clay content and soil texture classification were the main ecological factors affecting the composition of these soil microbial communities. This study provides a theoretical basis for finding molecular markers of *C. deserticola* and *C. songaricum* and promoting the quality of *C. deserticola* and *C. songaricum*.

Key words: *Cistanche deserticola*; *Cynomorium songaricum*; soil microbial community; ecological factor

艾比湖地区位于中纬度地带的西北干旱区, 是国内最具代表性的温带干旱区湿地荒漠生态系统^[1], 盐碱化土壤广泛分布^[2]。其典型的植被群落有梭梭群落、芦苇群落、盐节木群落和盐角草群落等^[3]。鉴于其生境的特殊性, 近几年国内外学者对艾比湖周边植物微生物群落进行了大量研究。Jin等^[4]应用 Illumina HiSeq PE250 测序技术, 分析 6 个土壤样本固氮微生物的多样性, 结合相关的理化因子并利用 RDA 分析法探究土壤理化性质和固氮微生物菌落结构及相关性; Yang等^[5]从艾比盐湖中分离出的一种水解淀粉且极嗜盐的古细菌 [BD-3 (T) 菌株], 并进行了表型和基因型分析, 确定其分类地位。Xin等^[6]从艾比湖中分离出了一种新型的极嗜盐古细菌 XF10T。

肉苁蓉与锁阳均为艾比湖盐碱地特殊生境下的全寄生药用植物, 肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 为列当科肉苁蓉属寄生植物^[7], 又名大芸, 为药食两用植物, 主要分布在北非、阿拉伯和亚洲国家。在中国、韩国和日本, 肉苁蓉肉质茎通常被用作补品, 以改善记忆力、增强性功能、保护肝脏、补肾等^[8]。锁阳 (*Cynomorium songaricum*) 为锁阳科 (*Cynomoriaceae*) 锁阳属 (*Cynomorium*) 多年生肉质寄生草本植物, 多寄生于蒺藜科 (*Zygophyllaceae*) 白刺属 (*Nitraria*) 植物的根部, 属专性根寄生植物^[9,10], 具有调节肾功能、提高机体免疫力、抗氧化等广泛的药理作用^[11]。锁阳属荒漠植物, 药用资源主要分布在甘肃、内蒙古、新疆、宁夏等地区的沙漠和半沙漠地带^[12]。肉苁蓉的寄主植物为梭梭 (*Haloxylon ammodendron*) 及白梭梭 (*Haloxylon persicum*), 锁阳的寄主植物为白刺属 (*Nitraria* L.)、红砂属 (*Reaumuria* L.)、猪毛菜属 (*Salsola* L.) 等^[13]。

土壤微生物组是陆地生态系统植物多样性和生产力的重要驱动因素, 直接参与了植物获得养分和土壤养分循环两个过程, 充分研究药用植物土壤微生物, 可以发挥土壤微生物组在改善植物营养、提高养分利用率和降低化肥施用量方面的作用^[14]。Yue等^[15]表征了菊芋沿土壤盐度梯度生长的微生物群落结构和盐渍土的各种特性, 并使用 RDA 分析和基因组组装在沿海盐渍土壤上进行了扩增以及宏基因组测序, 鉴定了对盐胁迫具有高响应能力并可能在盐渍土中起关键作用的

微生物, 强调了古细菌在微生物群落响应中的重要作用盐胁迫; Ai等^[16]采用高通量测序技术对野生竹叶兰根围土壤、根表、根内 3 个生态位真菌的种类及生物学功能进行鉴定与预测, 为揭示竹叶兰与根系真菌的营养关系以及共生真菌的开发提供了依据; Dong等^[17]基于 MetaCoMET 与共存网络两种方法对采自湖南、四川和贵州的药用杜仲树皮真菌群落进行了核心真菌组分析, 表明在 OTU (operational taxonomic units) 水平上, 核心真菌组共有 16 个分类单元, 优势菌是从赤壳科一未定真菌, 其次为 *Fusarium pseudensiforme*、一种黄丝菌 *Cephalothecaceae* sp. 和一种镰刀菌 *Fusarium* sp. 等。研究相同生境下肉苁蓉与锁阳土壤微生物能进一步为“中药品质生态学”理论提供支撑。

肉苁蓉与锁阳具有“补肾阳, 益精血”^[18]的作用, 且均为典型的特殊生境下的全寄生植物, 为研究二者土壤微生物差异, 本研究通过对肉苁蓉和锁阳的土壤进行 16S 扩增子测序, 分析比较两物种土壤微生物群落组成和功能差异, 并结合产地附近的生态气候及土壤数据, 通过对微生物组-生态因子的相关性分析探讨影响肉苁蓉与锁阳土壤微生物群落的潜在生态机制, 为道地药材品质生态学理论研究提供科学依据。

材料与方法

材料 本研究实验材料肉苁蓉 (ABR1、ABR2、ABR3) 与锁阳 (ABS1、ABS2、ABS3、ABS4) 样品 (表 1) 于 2017 年 5 月采集自新疆艾比湖。将表面土层挖开, 露出肉苁蓉与锁阳, 将样品 10 cm 处土壤一起取出并装入无菌袋, 放置于干冰中冻存后, 运到实验室。后将土壤样品过 2 mm 筛, 除去植物组织、根和石块等, 置于 -20 °C 的冰箱中。

DNA 提取及 16S 扩增子测序 使用 DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.) 对收集到的 8 组样品提取 DNA, 获得的 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和分光光度法 (260 nm/280 nm 光密度比) 质量检测。肉苁蓉与锁阳土壤微生物多样性检测: 选取细菌 16S rDNA V3-V4 区, DNA 样本送至北京奥维森基因科技有限公司, 利用 Illumina Miseq PE300 高通量测序平

台测序。细菌 16S rDNA V3-V4 扩增引物为 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGA CTACNNGGTATCTAAT-3')。PCR 反应体系 (总体积为 25 μL): 12.5 μL KAPA 2G Robust Hot Start Ready Mix、1 μL Forward Primer (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1 μL Reverse Primer (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、5 μL DNA (加入的 DNA 总量为 30 ng), 最后加 5.5 μL dd H₂O 补足至 25 μL 。反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。测序原始序列上传至 NCBI 的 SRA 数据库。

数据统计分析 通过 Illumina MiSeq 平台进行 Paired-end 测序, 下机数据经 QIIME (v1.8.0) 软件过滤、拼接、去除嵌合体, 去除打分低于 20、碱基模糊、引物错配或测序长度小于 150 bp 的序列。根据 barcodes 归类各处理组序列信息, 聚类为用于物种分类的 OTU, OTU 相似性设置为 97%。通过 RDP Classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) 算法基于细菌数据库 (Silva 128) 对 OTU 代表序列进行比对分析, 并在界、门、纲、目、科、属水平注释群落的物种信息。使用 R 中 ggplot2 包绘制物种在门水平和属水平上的丰度直方图及饼图。再利用 Mothur 软件 (version 1.31.2) 进行 α 多样性分析 (包括 Shannon、Simpson、observed species 和 Chao1 等 4 个指数)。基于 Unweighted Unifrac 距离, 使用 R (v3.1.1) 软件包的 pheatmap 进行聚类分析。经过 UniFrac 算法利用系统进化的信息比较样品

间物种群落差异, 并进行 beta 多样性 (beta diversity) 分析。通过在线分析网站 Microbiome Analyst (<http://www.microbiomeanalyst.ca/>) 获得核心微生物组 (Core microbiome), 结合 LDA Effect Size (LEfSe)^[19] 及随机森林 (Random forest) 分析预测生物标记物。使用 TBtools^[20] 绘制核心微生物组及生物标记物的丰度热图。

结果与分析

1 肉苁蓉与锁阳土壤微生物群落组成特征

对艾比湖周边的 7 个肉苁蓉与锁阳土壤细菌样品 16S DNA 的 V3 和 V4 区域进行高通量测序, 经数据前处理质控后, 分析得到 18 122~34 142 条待分析数据 (clean reads)。经聚类分析, 7 个样品含 3 582 个可操作分类单元 (OTU) (表 1), 其中肉苁蓉样品 OTU 介于 1 082~1 145, 锁阳样品 OTU 介于 523~1 063。基于非加权 unifrac 距离的非度量多维尺度分析 (non-metric multidimensional scaling, NMDS) 结果 (图 1a) 显示, 肉苁蓉与锁阳土壤微生物群落明显区分。非加权 unifrac 距离聚类结果 (图 1b) 显示两个物种土壤样品微生物群落被聚为两支, 表明 7 个土壤样本组间差异大于组内差异。

两个物种的土壤中, 细菌类群主要包括 16 门、46 纲、73 目、100 科及 130 属。肉苁蓉土壤中优势菌门 (图 2a、d) 为变形菌门 Proteobacteria (48.91%)、放线菌门 Actinobacteria (18.79%) 和拟杆菌门 Bacteroidetes

Table 1 Species sample information and operational taxonomic units (OTU) results

Sample ID	Species	Origin	Longitude	Latitude	Altitude /m	Raw-tags	Clean-tags	Final-tags	OTU
ABR1	<i>Cistanche deserticola</i>	Ebinur Lake, Xinjiang	83.358 675 00	44.881 659 00	211	34 987	24 308	16 616	1 082
ABR2	<i>Cistanche deserticola</i>	Ebinur Lake, Xinjiang	83.152 770 00	44.745 757 88	199	42 291	33 320	24 889	1 145
ABR3	<i>Cistanche deserticola</i>	Ebinur Lake, Xinjiang	83.356 425	44.825 635	215.43	47 478	34 142	25 491	1 102
ABS1	<i>Cynomorium songaricum</i>	Ebinur Lake, Xinjiang	83.056 123 00	44.619 095 00	240	29 775	25 340	19 745	1 022
ABS2	<i>Cynomorium songaricum</i>	Ebinur Lake, Xinjiang	83.332 234 00	44.662 856 00	165	19 735	18 122	16 102	743
ABS3	<i>Cynomorium songaricum</i>	Ebinur Lake, Xinjiang	83.152 770 00	44.745 757 88	199	20 496	18 653	16 441	680
ABS4	<i>Cynomorium songaricum</i>	Ebinur Lake, Xinjiang	83.356 425	44.825 635	215.43	25 391	23 259	20 150	1 063

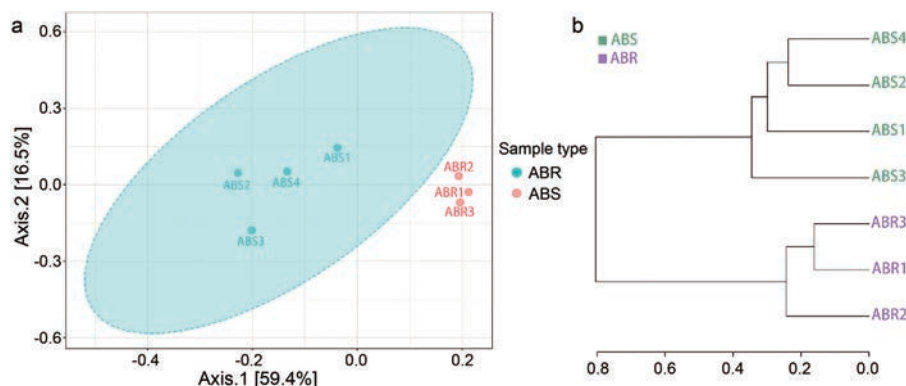


Figure 1 Clustering information of soil microorganisms of *C. deserticola* and *C. songaricum*. (a) PCoA plot based on the unweighted UniFrac distance matrix of the 16S rRNA gene amplicons; (b) Based on unweighted unifrac distance diversity clustering tree

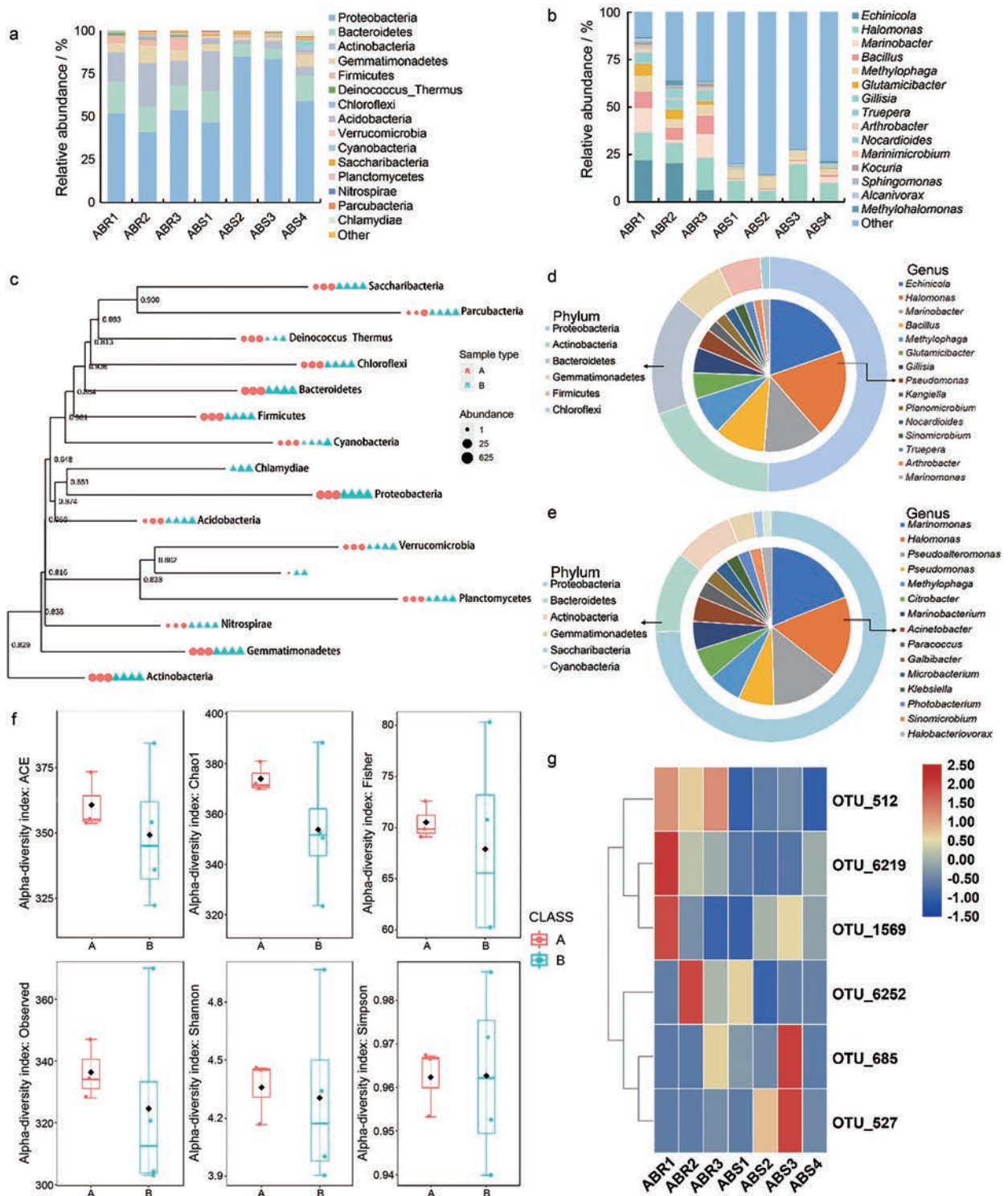


Figure 2 Classification of microbial community composition of *C. deserticola* and *C. songaricum*. a: Histograms of phyla abundances; b: Histograms of genus abundances; c: Phylogenetic tree at the phylum level; d: Pie chart of the top 6 microbial phylum-level species and their top 15 genus-level of *C. deserticola*; e: Pie chart of the top 6 microbial phylum-level species and their top 15 genus-level of *C. songaricum*; f: Within-sample diversity (α -diversity). ACE, which is used as an indicator of species richness in ecology. The higher the value, the richer the community species. Chao1 index, which indicates the bacterial community richness (expressed as the projected total number of OTU in each sample). Fisher, in which along with the number (richness), the abundance of organisms (evenness) is also measured to describe the actual diversity of a community. g: Heatmap of core microbial abundance of *C. deserticola* and *C. songaricum*. ABR: *C. deserticola*; ABS: *C. songaricum*. OTU_527: *Marinomonas*, OTU_512: Halomonadaceae, OTU_6219: Rhizobiales, OTU_1569: *Halomonas*, OTU_6252: Actinobacteria, OTU_685: *Halomonas*

(16.03%) 等。属水平上的优势菌属 (图 2b、2d) 为 *Echinicola* (7.4%)、嗜盐单胞菌属 *Halomonas* (7.11%) 和海杆菌属 *Marinobacter* (4.73%) 等。锁阳土壤中优势菌门 (图 2a、2e) 为变形菌门 Proteobacteria (70.54%)、拟杆菌门 Bacteroidetes (10.86%) 和放线菌门 Actinobacteria (7.89%)。属水平上的优势菌属 (图 2b、2e) 为海单胞菌属 *Marinomonas* (8.62%)、嗜盐单胞菌属 *Halomonas* (7.46%) 和假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* (6.37%)。图 2c 显示了门水平上细菌类群的系统进化关系, 圆形大小显示了细菌群落的丰度。图 2d 和 2e 分别展示了肉苁蓉和锁阳丰度前六的菌门及丰度前五的属类别。结果表明, 肉苁蓉与锁阳土壤微生物的优势菌群类别在门和属水平上总体相似, 但其丰度存在差异。

Alpha 多样性 (样本内多样性) 指一个特定区域或者生态系统内的多样性, 常用的度量指标有 Chao1 丰富度估计量 (Chao1 richness estimator)、香农-威纳多样性指数 (Shannon-Wiener diversity index)、辛普森多样性指数 (Simpson diversity index) 等, 且数值越大, 群落多样性越高^[21]。图 2f 显示, ACE、Chao1、Fisher、observed species、Shannon 和 Simpson 六个多样性数值结果一致, 肉苁蓉均高于锁阳, 表明肉苁蓉土壤微生物多样性

高于锁阳。

根据 OTU 的样本最小百分比及相对丰度获得的肉苁蓉与锁阳土壤核心微生物组为海单胞菌属 *Marinomonas* (OTU_527)、盐单胞菌科 Halomonadaceae (OTU_512)、根瘤菌目 Rhizobiales (OTU_6219)、嗜盐单胞菌属 *Halomonas* (OTU_1569)、Acidimicrobiales (OTU_6252) 及嗜盐单胞菌属 *Halomonas* (OTU_685) 等。核心微生物组丰度热图 (图 2g) 显示, 肉苁蓉与锁阳土壤中盐单胞菌科 Halomonadaceae (OTU_512)、根瘤菌目 Rhizobiales (OTU_6219) 丰度较高。

2 肉苁蓉与锁阳土壤微生物群落差异分析

LEfSe 分析可以实现分组比较的内部进行亚组比较分析, 从而找到组间在丰度上有显著差异的生物标记物^[1]。图 3a 列举了 LDA score 大于 2 的前 15 个生物标记物。采用随机森林方法 ($n = 1\ 000$) 鉴定了 6 个肉苁蓉及锁阳土壤微生物生物标记物, 见 3c。图 3b 表明随机森林方法设置参数为 1 000 个树时, 整体的错误率最低 (error = 0)。肉苁蓉土壤微生物微球菌科 Micrococcaceae (OTU_4258)、*Echinicola* (OTU_3086)、*Glutamicibacter* (OTU_4625) 与锁阳土壤微生物 *Galbibacter* (OTU_2920)、假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* (OTU_734)、*Marinobacterium_rhizophylum* (OTU_861)

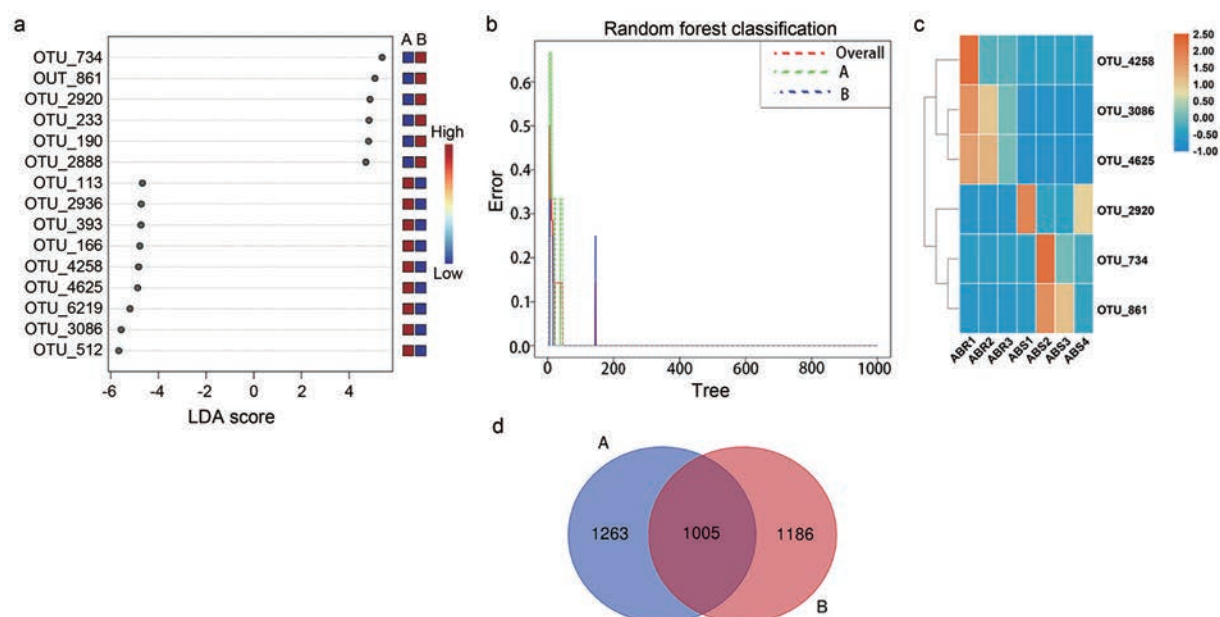


Figure 3 Differential microbial profiles of *C. deserticola* and *C. songaricum*. a: Graphical summary at OTU level in group sample type of the top 15 biomarkers by LEfSe; b: Cumulative error rates obtained through RF classification. The overall error rate is represented by the red line, whilst the error rates for each class are represented by the green and blue lines. c: Heatmap of biomarkers microbiome abundance of *C. deserticola* and *C. songaricum*; d: Common/unique OTU of *C. deserticola* and *C. songaricum*; A: *C. deserticola*; B: *C. songaricum*. OTU_734: *Pseudoalteromonas*; OTU_861: *Marinobacterium_rhizophylum*; OTU_233: Gammaproteobacteria; OTU_190: *Acinetobacter_calcoacetivus*; OTU_2888: Sphingobacteriaceae; OTU_113: Gemmatimonadetes; OTU_2936: *Gillisia*; OTU_393: Rhodothermaceae; OTU_166: *Bacillus*; OTU_4258: Micrococcaceae; OTU_3086: *Echinicola*; OTU_4625: *Glutamicibacter*; OTU_2920: *Galbibacter*

热图显示丰度较高,与LDA得分值结果相呼应。肉苁蓉和锁阳土壤样品共有OTU为1 005,肉苁蓉土壤样品特有OTU为1 263,锁阳土壤样品特有OTU为1 186,表明肉苁蓉土壤微生物丰度高于锁阳,与图2f结果一致(图3c)。

3 两个物种气候及土壤因子分析

本研究气候变量数据来自WorldClim数据库(<https://www.worldclim.org/>) 1970~2000年的监测数据。包含18个生态因子,分别为年均温(bio 1)、昼夜温差月均值(bio 2)、等温性(bio 3)、温度季节性变化标准差(标准偏差 $\times 100$)(bio 4)、最暖月最高温(bio 5)、最冷月最低温(bio 6)、年均温变化范围(bio 7)、最湿季度平均温度(bio 8)、最干季度平均温度(bio 9)、最暖季度平均温度(bio 10)、最冷季度平均温度(bio 11)、年平均降水量(bio 12)、最干月降水量(bio 13)、降水量变异系数(bio 14)、最湿季度降水量(bio 15)、最干季度降水量(bio 16)、最暖季度降水量(bio 17)、最冷季度降水量(bio 18),见表2。

土壤数据来自数据库HWSD(<https://geodata.pku.edu.cn/index.php?c=content&a=show&id=730>)。根据采样点经纬坐标,通过Arcgis的“多值提取至点”工具提取样本土壤信息,后挑选出与植物生长相关的13个土壤因子,包括:基本饱和度(T_BS)、黏性层土壤的阳离子交换能力(T_CEC_CLAY)、粘土含量(T_CLAY)、土壤的阳离子交换能力(T_CEC_SOIL)、可交换钠盐(T_ESP)、碎石体积百分比(T_GRAVEL)、有机碳含量(T_OC)、酸碱度(T_PH)、土壤容量(T_REF_BULK)、沙含量(T_SAND)、淤泥含量(T_SILT)、交换性盐基(T_TEB)、USDA土壤质地分类(T_USDA_TEX),见表3。

4 相关性分析

基于微生物群落-生态因子相关性分析的研究新体系,对肉苁蓉与锁阳10个土壤核心微生物组的丰度与18个气候因子数据及13个土壤因子进行相关性分析,以分析相同产地的不同物种的土壤微生物群落组成特征差异的生态机制。首先利用CANOCO 5软件^[22]分析DCA(species-sample)结果,筛选RDA和CCA的模型^[15]。DCA分析结果纵径长度(lengths of gradient)的第一轴值为1.16(小于4),故本研究选用RDA模型进行分析。为挖掘影响肉苁蓉与锁阳土壤微生物群落结构的主导生态因素,根据Effects值进行重分析,方差解释变量为58.7%。结果(表4、图4a)表明土壤质地分类(T_USDA_TEX, $P = 0.18$, $F = 2.1$)、最干季度平均温度(bio 9, $P = 0.516$, $F = 0.8$)、等温性(bio 14, $P = 0.5$, $F = 0.7$)、粘土含量(T_CLAY, $P =$

Table 2 The climatic factors of *C. deseritcola* and *C. songaricum*. bio 1 = Annual mean temperature ($^{\circ}\text{C} \times 10$); bio 2 = Mean diurnal range [mean of monthly (max temp - min temp)]; bio 3 = Isothermality (bio 2/bio 7) ($\times 100$); bio 4 = Temperature seasonality (standard deviation $\times 100$); bio 5 = Max temperature of warmest month ($^{\circ}\text{C} \times 10$); bio 6 = Min temperature of coldest month ($^{\circ}\text{C} \times 10$); bio 7 = Temperature annual range (bio 5 - bio 6); bio 8 = Mean temperature of wettest quarter ($^{\circ}\text{C} \times 10$); bio 9 = Mean temperature of driest quarter ($^{\circ}\text{C} \times 10$); bio 10 = Mean temperature of warmest quarter ($^{\circ}\text{C} \times 10$); bio 11 = Mean temperature of coldest quarter ($^{\circ}\text{C} \times 10$); bio 12 = Annual precipitation (mm); bio 13 = Precipitation of driest month (mm); bio 14 = Precipitation seasonality (coefficient of variation); bio 15 = Precipitation of wettest quarter (mm); bio 16 = Precipitation of driest quarter (mm); bio 17 = Precipitation of warmest quarter (mm); bio 18 = Precipitation of coldest quarter (mm)

ID	x	y	bio 1	bio 2	bio 3	bio 4	bio 5	bio 6	bio 7	bio 8	bio 9	bio 10	bio 11	bio 12	bio 13	bio 14	bio 15	bio 16	bio 17	bio 18
ABR1	83.358 68	44.881 66	9.770 83	12.558 3	22.668 5	1 560.76	36.3	-19.1	55.4	25.45	-11.25	27.25	-11.25	150	5	44.724 1	63	17	57	17
ABR2	83.152 77	44.745 76	9.687 5	11.141 7	20.982 4	1 502.94	35.2	-17.9	53.1	24.716 7	-10.35	26.666 7	-10.35	159	6	40.382 1	62	18	56	18
ABR3	83.356 43	44.825 63	10.008 3	12.7	22.924 2	1 550.69	36.6	-18.8	55.4	25.6	-10.833 3	27.45	-10.833 3	146	5	43.909 1	61	17	56	17
ABS1	83.056 12	44.619 1	9.987 5	12.375	22.874 3	1 520.46	36.2	-17.9	54.1	25.25	-10.45	27.033 3	-10.45	153	6	43.318 4	64	19	57	19
ABS2	83.332 23	44.662 86	10.083 3	12.9	23.454 5	1 530.41	36.4	-18.6	55	25.5	-10.5	27.25	-10.5	155	6	42.945 6	64	19	57	19
ABS3	83.152 77	44.745 76	9.687 5	11.141 7	20.982 4	1 502.94	35.2	-17.9	53.1	24.716 7	-10.35	26.666 7	-10.35	159	6	40.382 1	62	18	56	18
ABS4	83.356 43	44.825 63	10.008 3	12.7	22.924 2	1 550.69	36.6	-18.8	55.4	25.6	-10.833 3	27.45	-10.833 3	146	5	43.909 1	61	17	56	17

Table 3 The soil factors of *C. deserticola* and *C. songaricum*. T_BS = Basic saturation; T_CEC_CLAY = Cation exchange capacity of clay soil; T_CLAY = Clay content; T_CEC_SOIL = Soil cation exchange capacity; T_ESP = Exchangeable sodium salt; T_GRAVEL = Volume percentage of gravel; T_OC = Organic carbon content; T_PH = PH; T_REF_BULK = Soil capacity; T_SAND = Sand content; T_SILT = Silt content; T_TEB = Exchangeable base; T_USDA_TEX = USDA soil texture classification

ID	T_BS	T_CACO3	T_CEC_CLAY	T_CLAY	T_CEC_SOIL	T_ECE	T_ESP	T_GRAVEL	T_OC	T_PH	T_REF_BULK	T_SAND	T_SILT	T_TEB	T_USDA_TEX
ABR1	28	0	21	10	5	0.1	5	10	0.7	5.1	1.58	75	15	1.5	11
ABR2	93	0	55	22	16	0.1	2	9	1	6.6	1.4	42	36	14	9
ABR3	28	0	21	10	5	0.1	5	10	0.7	5.1	1.58	75	15	1.5	11
ABS1	87	0	45	22	17	0.1	2	4	1.65	6.6	1.39	39	39	9.8	9
ABS2	91	0	38	49	24	0.1	1	4	1.19	6.2	1.24	19	32	22.7	3
ABS3	93	0	55	22	16	0.1	2	9	1	6.6	1.4	42	36	14	9
ABS4	28	0	21	10	5	0.1	5	10	0.7	5.1	1.58	75	15	1.5	11

0.914, F = 0.2) 与肉苁蓉及锁阳核心微生物组及生物标记物相关。

Pearson 相关性分析结果 (图 4b) 与 RDA 结果 (图 4a) 相呼应, 最干季度平均温度 (bio 9) 与最冷季度平均温度 (bio 11) 对 Alphaproteobacteria (OTU_6219) 及微球菌科 Micrococcaceae (OTU_4258) 呈显著负相关。粘土含量 (T_CLAY) 及土壤质地分类 (T_USDA_TEX) 与假交替单胞菌属 *Pseudoalteromonas* (OTU_734) 呈极显著负相关。粘土含量 (T_CLAY)、交换性盐基 (T_TEB) 及土壤质地分类 (T_USDA_TEX) 对 *Marinobacterium_rhizophylum* (OTU_861) 有显著影响。

为分析肉苁蓉与锁阳特有微生物与生态因子相关性, 利用肉苁蓉与锁阳 10 个核心微生物组与 18 个气候因子数据及 13 个土壤因子进行相关性分析。采用 Pearson 相关系数, 选择系数值绝对值大于 0.5 的值, 采用 Cytoscape 3.7.1^[23] 构建核心微生物组-生态因子网络图。图 4c 和图 4d 分别展示了肉苁蓉与锁阳土壤核心微生物与生态因子的关联网。肉苁蓉土壤生物标记物土壤微生物微球菌科 Micrococcaceae (OTU_4258) 与最暖季度降水量 (bio 17) 呈极显著正相关。土壤中盐单胞菌科 Halomonadaceae (OTU_512) 与 *Marinobacterium_rhizophylum* (OTU_861) 受环境影响较大。

锁阳土壤核心微生物组中 (图 4d), *Glutamibacter* (OTU_4625) 与最暖季度降水量 (bio 17) 呈极显著负相关, 与最湿季度降水量 (bio 15) 呈显著正相关。嗜盐单胞菌属 *Halomonas* (OTU_685) 与年均温 (bio 1)、昼夜温差月均值 (bio 2)、等温性 (bio 3)、最暖月最高温 (bio 5)、最湿季度平均温度 (bio 8) 及降水量变异系数 (bio 14) 呈负显著相关。根瘤菌目 Rhizobiales (OTU_6219) 与最干月降水量 (bio 13) 及基本饱和度 (T_BS) 呈极显著负相关, 与可交换钠盐 (T_ESP) 呈显著正相关。两个网络关联图显示, 生态因子对于肉苁蓉土壤微生物群落组成的影响更大。

讨论

本研究对新疆艾比湖肉苁蓉和锁阳土壤进行微生物组-生态因子的综合相关性分析, 且比较两个物种共有核心微生物组和特异微生物组, 结合两个产地 10 个核心生物群落丰度及 18 个气候生态因子数据与 13 个土壤因子进行冗余和相关性分析, 挖掘影响肉苁蓉和锁阳土壤微生物群落组成和功能的生态因子。

取样地点位于新疆艾比湖湿地自然保护区, 是准噶尔盆地西部最低洼地和水盐的汇集中心。保护区东西长 102.63 km, 南北宽 72.3 km, 总面积 2 670.85 km², 地跨精河县、博乐市和阿拉山口口岸区, 92% 在精河县

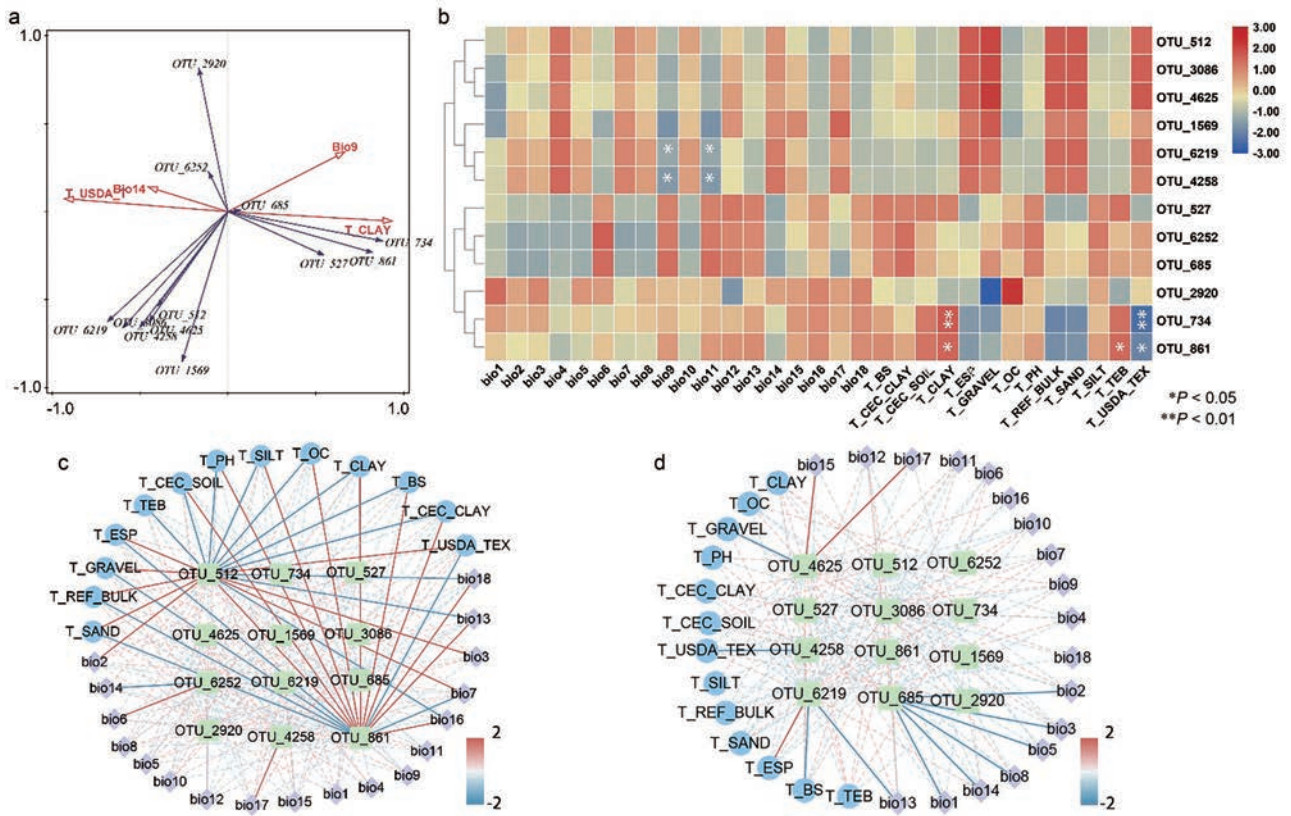


Figure 4 Correlation analysis based on key microbiomes (six core microbiomes and six biomarkers), 18 ecological factors and 13 soil factors. a: RDA plot of overall key microbiomes, biomarkers, ecological factors, and soil factors by Canoco; b: Heatmap for correlation analysis of the key microbiomes, ecological factors, and soil factors of *C. deserticola* and *C. songaricum*; c: Core microbiomes abundance networks of *C. deserticola* reveal that OTU modules are related to ecological factors and soil factors; d: Key microbiomes abundance networks of *C. songaricum* reveal that OTU modules are related to ecological factors and soil factors

Table 4 Redundancy analysis of bacterial communities and ecological factors

Name	Explain/%	Contribution/%	pseudo-F	P	Canonical eigenvalue	Explanatory variable
T_USDA_TEX	29.6	50.4	2.1	0.18		
bio 9	11.9	20.3	0.8	0.516	0.587	58.7%
bio 14	13.5	23.0	0.9	0.494		
T_CLAY	3.7	6.3	0.2	0.914		

内。本研究表明肉苁蓉与锁阳核心微生物组为海单胞菌属 *Marinomonas*、盐单胞菌科 *Halomonadaceae*、根瘤菌目 *Rhizobiales*、嗜盐单胞菌属 *Halomonas* 及 *Acidimicrobiales*。*Halomonas* 细菌菌株是嗜盐菌，高浓度的 NaCl 为最佳生长条件，研究表明，在无盐条件，pH 7.0~10.0 时也能生长，它能积累甘氨酸甜菜碱、胞外酸和谷氨酸，作为渗透保护剂^[24]，说明盐单胞菌科 *Halomonadaceae* 及嗜盐单胞菌属 *Halomonas* 对肉苁蓉与锁阳具有渗透保护作用，增加抗盐胁迫能力。

艾比湖地区属典型的大陆性干旱气候，年降水量约 105.17 mm，年蒸发量约 2 221.3 mm，年平均气温 7.7 °C，最高气温 42.23 °C，最低气温 -36.4 °C，年日照时数 2 699.87 h^[25]，盐碱胁迫与冷热胁迫严重。内蒙古与

甘肃锁阳土壤样本的采样点均属于温带大陆性气候，处于寒冷干旱的戈壁沙漠地带，气温日较差、年较差均较大，气候干燥，太阳辐射能强，并且土壤贫瘠，极端气候频繁，干旱胁迫及冷热胁迫严重。本课题组^[1]前期研究表明，在内蒙古及甘肃锁阳土壤中 5 个核心微生物组是节杆菌属 *Arthrobacter*、链霉菌属 *Streptomyces*、芽孢杆菌属 *Bacillus*、副球菌属 *Paracoccus* 和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*，为促进植物生长的根际细菌 (PGPR)，具有在干旱环境下增强植物抵御干旱胁迫的能力，但在该研究中，锁阳土壤微生物中含 0.06% 节杆菌属 *Arthrobacter*、0.05% 链霉菌属 *Streptomyces*、0.31% 芽孢杆菌属 *Bacillus* 及 0.03% 鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*。造成这种差异原因可能为内蒙古及甘肃地

区干旱胁迫较艾比湖地区强。

不同生境下锁阳核心微生物差异较大,基于本课题组前期提出的“中药品质生态学”理论^[26],微生物群落与中药的质量密切相关,可进一步提出艾比湖与内蒙产锁阳是否质量也存在较大差异,是否可以根据微生物群落预测植物最佳生态产区。后期本课题组也会进一步关注艾比湖产锁阳与内蒙产的品质质量,对上述问题进行深入研究讨论。

本研究基于LEfSe法和随机森林方法得到肉苁蓉与锁阳土壤微生物群落的6个差异生物标记物,其中在肉苁蓉样本中得分较高的为微球菌科Micrococccaceae、*Echinicola*及*Glutamicibacter*,锁阳样本中得分较高的为*Galbibacter*、假交替单胞菌属*Pseudoalteromonas*及*Marinobacterium_rhizophilum*。差异生物标记物不仅可鉴别不同产地锁阳的土壤微生物群落,还是影响肉苁蓉与锁阳品质变异的潜在因子^[1]。

本研究结合6个核心微生物组及生物标记物,获得肉苁蓉与锁阳土壤的关键微生物组。将关键微生物组的丰度与生态因子的冗余分析和关联分析发现,同时影响肉苁蓉与锁阳土壤微生物群落组成的主要生态因子是最干季度平均温度与最冷季度平均温度、粘土含量、土壤质地分类。与本课题组前期研究^[10]发现影响锁阳生长的主要生态因子是年相对湿度及1月和7月平均温度相符。生态环境因子对药用植物次生代谢物合成积累具有重要影响^[27],本研究表明,气候因子(最干季度平均温度与最冷季度平均温度)与土壤因子(粘土含量、土壤质地分类)对肉苁蓉与锁阳微生物具显著影响,三者进一步影响药材质量,故明晰气候因子对微生物的影响能为建立药材优质生产基地提供科学依据。

通过对肉苁蓉和锁阳土壤微生物分析,明晰了特殊生境下的两种全寄生药用植物的土壤微生物,丰富了艾比湖地区土壤微生物资源。研究结果为后期寻找肉苁蓉与锁阳的微生物分子标记,促进肉苁蓉与锁阳生长、分子育种及品质提高研究奠定基础。

作者贡献: 实验设计为黄林芳,实验实施为郑燕和孙晓,缪雨静、江媛与阿里穆斯进行实验评估,郑燕执笔,通讯作者审校。

利益冲突: 不涉及任何利益冲突。

References

- [1] Sun X, Lin YL, Li BL, et al. Analysis and function prediction of soil microbial communities of *Cynomorium songaricum* in two daodi-origins [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 1334-1344.
- [2] Wang YS, Zhang Y, Xie H, et al. The analysis of characteristics of the soil microorganisms in different saline and alkali environment in Aibil Lake Wetland [J]. J Arid Land Resour Environ (干旱区资源与环境), 2009, 23: 133-137.
- [3] Yang J, Quan J, Yu ZL, et al. Research progress of *Saussurea costus* [J]. Asia-Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2019, 15: 181-184.
- [4] Jin XT, Hu WG, He SB, et al. Diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms in *Salicornia europaea* community of Ebinur Lake wetland during different periods [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2019, 59: 1600-1611.
- [5] Yang Y, Cui HL, Zhou PJ, et al. *Haloarcula amylolytica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Aibi salt lake in Xin-Jiang, China [J]. Int J Syst Evol Micr, 2007, 57: 103.
- [6] Xin H, Itoh T, Zhou P, et al. *Natrinema versiforme* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50: 1297-1303.
- [7] Chen J, Xie CX, Chen SL, et al. Numerical analysis on the suitability of *Cistanche deserticola* in producing area [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 1396-1401.
- [8] Sun X, Li L, Pei J, et al. Metabolome and transcriptome profiling reveals quality variation and underlying regulation of three ecotypes for *Cistanche deserticola* [J]. Plant Mol Biol, 2020, 102: 253-269.
- [9] Gu ZR, Ma TX, Sun LP, et al. Near infrared spectroscopy of rhizosphere soil of Psammophyte *Cynomorium songaricum* and its relationship with environmental factors [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2020, 31: 935-938.
- [10] Huang LF, Xie CX, Chen SL, et al. Regional suitability evaluation on desert herba *Cynomorii* [J]. Bull Bot (植物学报), 2010, 45: 205-211.
- [11] Ma ZX, Sun LP, Gu ZR, et al. Comprehensive quality evaluation of *Cynomorium songaricum* from different growing areas based on grey correlation analysis and TOPSIS model . [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2020, 42: 2680-2686.
- [12] Liu GD, Chen GL, Li W, et al. Genetic and phytochemical diversities of *Cynomorium songaricum* Rupr. in Northwest China indicated by ISSR markers and HPLC-fingerprinting [J]. Biochem Syst Ecol, 2013, 48: 34-41.
- [13] Chen JY, Chen XL, Guo NN, et al. Difference of parasitism between *Cynomorium songaricum* and *Cistanche deserticola* [J]. Guihaia (广西植物), 2016, 36: 1312-1317.
- [14] Zhu YG, Shen RF, He JZ, et al. Soil microbiome in China: progress and prospect [J]. Bull Chin Acad Sci, 2017, 32: 554-565.
- [15] Yue Y, Shao T, Long X, et al. Microbiome structure and function in rhizosphere of *Jerusalem artichoke* grown in saline land [J]. Sci Total Environ, 2020, 724: 138259.
- [16] Ai Y, Xie TX, Liu JF, et al. Community structure and biological function of symbiotic fungi in the root system of *Cymbidium* [J].

- Mycosystema (菌物学报), 2019, 38: 1631-1642.
- [17] Dong CB, Yang J, Zhang ZY, et al. Core microbiome of fungi in the bark of medicinal plant *Eucommia ulmoides* [J]. Mycosystema (菌物学报), 2019, 38: 611-619.
- [18] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [M]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [19] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST [J]. Bioinformatics, 2010, 26: 2460-2461.
- [20] Chen CJ, Chen H, Zhang Y, et al. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. Mol Plant, 2020, 13: 1194-1202.
- [21] Langille M, Zaneveld J, Caporaso J, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31: 814-821.
- [22] Lai JS. Canoco 5: a new version of an ecological multivariate data ordination program [J]. Biodiver Sci, 2013, 21: 765-768.
- [23] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Res, 2003, 13: 2498-2504.
- [24] Romano I, Giordano A, Lama L, et al. *Halomonas campaniensis* sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy [J]. Syst Appl Microbiol, 2005, 28: 610-618.
- [25] He Y, Hu WG, Ma DC, et al. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing microorganisms in relation to soil environment in rhizosphere soil of *Halocnemum strobilaceum* in Ebinur Lake wetland [J]. Acta Sci Circum (环境科学学报), 2017, 37: 1967-1975.
- [26] Huang LF, Chen SL. Quality ecology on Chinese medicines: new emerging cross discipline [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 1-11.
- [27] Hou Y, Ma Y, Zou LS, et al. The effects of ecological factors on the secondary metabolites in medicinal plants and their research methods [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2015, 26: 187-190.