

• 药材与资源 •

地黄中主要次生代谢产物在根际土壤中分布及其对细菌群落特征的影响

刘寒笑¹, 耿晓桐², 王丰青³, 张娟¹, 刘庆普¹, 张宝¹, 雷敬卫¹, 张晓霞^{4*}, 谢彩侠^{1*}

1. 河南中医药大学 河南省中药质量控制与评价工程技术研究中心, 河南 郑州 450046

2. 信阳农林学院制药工程学院, 河南 信阳 464000

3. 河南农业大学农学院, 河南 郑州 450002

4. 郑州铁路职业技术学院药学院, 河南 郑州 451460

摘要:目的 分析地黄 *Rehmannia glutinosa* 中的次生代谢产物在地黄根际土壤中的分布特征及其对根际土壤细菌群落特征的影响, 为揭示地黄连作土壤形成过程中根系分泌物与根际微生物之间互作机制的研究提供理论参考。方法 以7、8、10月金九地黄根际土壤为研究对象, 采用 HPLC 分析3个时期地黄根际土壤中苯乙醇苷类、环烯醚萜苷类及酚酸类次生代谢产物的分布; 通过 Illumina MiSeq 高通量测序法分析根际土壤中细菌群落的结构特征; 利用 SIMCA 14.1、SPSS 27 等软件分析3个生长时期根际土壤中次生代谢产物及细菌群落结构的差异性, 筛选出引起两者差异性的主要次生代谢产物和标志性菌群, 并结合 Canoco 5.0 软件分析两者之间的相关性。结果 地黄3个生长时期根际土壤中均检测到6种苯乙醇苷类成分、3种环烯醚萜苷类成分及5种酚酸类成分, 各单体成分的含量变化差异较大, 其中香豆酸、异类叶升麻苷、红景天苷、香草酸为主要差异物质; 地黄根际土壤中优势细菌的相对丰度随生育进程而发生变化, 门水平及属水平上的放线菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、不明蓝藻菌属、Gaiella 的相对丰度逐渐降低, 酸杆菌门、拟杆菌门、浮霉菌门、疣微菌门、热酸菌属、不明酸杆菌属的相对丰度则逐渐增加; 相关性分析及冗余分析表明根际土壤中次生代谢产物与细菌群落结构之间存在着一定相关性, 其中香豆酸、对羟基苯甲酸对根际细菌群落结构的影响较大。结论 地黄中的主要次生代谢产物在地黄根际土壤中均可以检测到, 而且对根际土壤细菌群落的结构特征产生了一定影响。

关键词: 地黄; 根际土壤; HPLC; 次生代谢产物; 高通量测序; 细菌群落; 香豆酸; 异类叶升麻苷; 红景天苷; 香草酸

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)10-3445-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.022

Distribution of major secondary metabolites from *Rehmanniae Radix* in rhizosphere soil and their effects on bacterial community characteristics

LIU Hanxiao¹, GENG Xiaotong², WANG fengqing³, ZHANG Juan¹, LIU Qingpu¹, ZHANG Bao¹, LEI Jingwei¹, ZHANG Xiaoxia⁴, XIE Caixia¹

1. Henan Provincial Engineering Technology Research Center for Quality Control and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. School of Pharmaceutical Engineering, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, China

3. College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

4. College of Pharmacy, Zhengzhou Railway Vocational and Technical College, Zhengzhou 451460, China

Abstract: Objective To investigate the distribution characteristics of secondary metabolites in rhizosphere soil of Dihuang (*Rehmanniae Radix*) and their effects on bacterial community characteristics in rhizosphere soil, and to provide theoretical reference for the study of the interaction mechanism between root exudates and rhizosphere microorganisms during the formation of *Rehmanniae Radix* continuous cropping soil. **Methods** The rhizosphere soil of Jinjiu *Rehmanniae Radix* in July, August, and October was selected as the research object. First, the distribution of secondary metabolites of phenylethanoids, iridoid glycosides, and phenolic acids in the rhizosphere soil of three

收稿日期: 2023-12-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82073952); 国家自然科学基金资助项目(82104331); 河南科技攻关项目(222102310359)

作者简介: 刘寒笑, 硕士研究生, 主要从事中药质量控制研究工作。E-mail: lhx1220@foxmail.com

*通信作者: 谢彩侠, 教授, 主要从事中药质量控制研究工作。E-mail: nanyang.ccx@163.com

张晓霞, 副教授, 主要从事中药质量控制研究工作。E-mail: zhangxiaoxia@zzrvtc.edu.cn

periods was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Secondly, the structural characteristics of bacterial community in rhizosphere soil were analyzed by Illumina MiSeq high-throughput sequencing. Finally, SIMCA 14.1 and SPSS 27 software were used to analyze the differences of secondary metabolites and bacterial community structure in rhizosphere soil among the three growth stages, and the main secondary metabolites and marker bacteria that caused the differences were screened out. Canoco 5.0 software was used to analyze the correlation between them. **Results** A total of six phenylethanoids, three iridoid glycosides and five phenolic acids were detected in the rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* during the three growth stages. The content of each monomer varied greatly, with coumaric acid, heterologous cimicifuga glycoside, salidroside and vanillic acid being the main difference substances. The relative abundance of dominant bacteria in the rhizosphere soil changed with the growth process. At the phylum and genus levels, the relative abundance of Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi, *Unidentified Cyanobacteria* and *Gaiella* gradually decreased, while that of Acidobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, *Acidothermus* and *Unidentified Acidobacteria* gradually increased. Results of correlation analysis and redundancy analysis showed that there was a certain correlation between secondary metabolites and bacterial community structure in rhizosphere soil, with coumaric acid and p-hydroxybenzoic acid having greater effects on rhizosphere bacterial community structure. **Conclusion** The main secondary metabolites of *Rehmanniae Radix* can be detected in the rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix*, and have certain effects on the structural characteristics of bacterial community in rhizosphere soil.

Key words: *Rehmanniae Radix*; rhizosphere soil; high performance liquid chromatography; secondary metabolite; high-throughput sequencing; bacterial community; coumaric acid; heterologous cimicifuga glycoside; salidroside; vanillic acid

地黄为玄参科 (Scrophulariaceae) 地黄属 *Rehmannia* L. 多年生草本植物, 入药部位为干燥块根, 其应用范围广泛, 具有良好的药用价值。鲜地黄清热生津、凉血止血; 生地黄清热凉血、养阴生津; 熟地黄滋阴补血、益精填髓^[1-2]。研究表明地黄中含有的环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、糖类等成分具有多种药理作用, 被广泛应用于治疗各种疾病。地黄在《神农本草经》中被列为上品, 并且逐渐成为现代中国临床治疗中常用的中药之一, 因此市场需求量巨大。但是由于地黄是传统的道地中药材, 其道地产区在古怀庆府 (今河南焦作一带), 是著名的“四大怀药”之一^[3-4]。因受其道地性的限制, 所以种植面积非常有限, 且地黄在种植过程中存在着严重的连作障碍, 是已知块根类药材中连作障碍最严重的药用植物之一, 其连作障碍突出表现为块根不能膨大, 多须根, 每茬收获后需隔 8~10 年方可再次种植, 严重影响了地黄的产量及质量^[2,5]。

据文献报道, 根际土壤中化感物质的不断积累及微生物种群的结构变化是引起地黄连作障碍的 2 大重要原因^[6-7]。地黄在生长发育过程中, 其植株会通过根系分泌、叶片淋溶、植物残体腐解等方式向土壤释放环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类及酚酸类等次生代谢产物。这些次生代谢产物是地黄的主要药效成分, 其中酚酸类成分已经被证实是引起药用植物连作障碍的重要化感物质^[8], 随着地黄生育期的推进, 这些次生代谢产物在地黄块根及根际土壤中不断积累。研究表明, 地黄在长期连作后, 根际土壤中的微生物种群发生了明显变化, 具体表现为细菌

种类及数量不断减少, 真菌种类及数量不断增多, 土壤微生物类型由“细菌型”向“真菌型”过渡^[9-11]。由此推测地黄连作障碍的产生可能是因为地黄在生长发育过程中不断向根际土壤释放次生代谢产物, 而这些次生代谢产物中的某些成分为化感物质, 其在土壤中不断积累引起了土壤理化性质的改变, 进而导致微生物种群特征的变化及土壤微生物生态的失衡, 对下茬地黄的生长发育产生了抑制作用, 促使了地黄连作障碍的形成。目前关于地黄生长过程中根际土壤中次生代谢产物的分布和微生物种群结构的变化特征研究较少, 以及两者之间互作产生的连作土壤特征也尚不清楚。本课题组前期研究发现, 7、8、10 月是地黄植株中某些成分含量差异较大的时期^[4], 为了进一步分析地黄根际土壤中次生代谢产物的分布及其对细菌群落结构的影响, 本实验选取怀地道地产区金九地黄为研究对象, 通过 HPLC 及 Illumina MiSeq 高通量测序法分析地黄中环烯醚萜苷、苯乙醇苷及酚酸 3 类次生代谢产物在地黄根际土壤中的分布特征以及相应根际土壤中的细菌群落结构特征, 并结合多元统计分析、相关性分析及冗余分析等方法筛选出对根际土壤细菌结构影响较大的次生代谢产物, 为地黄连作障碍问题的研究提供新的思路。

1 材料与试剂

1.1 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪 (美国沃特斯科技术有限公司); KQ-700DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); AL204 型万分之一电子

天平 (梅特勒-托利多仪器上海有限公司); MS105DU 型十万分之一电子天平 (奥豪斯仪器有限公司); HH-S₂ 型双孔智能水浴锅 (巩义市予华仪器有限公司); 101-3AB 型电热恒温鼓风干燥箱 (北京中兴伟业仪器有限公司); 10~100 μL 移液枪 (艾本德国际贸易有限公司)。

1.2 试剂

地黄苷 A、地黄苷 D、红景天苷、松果菊苷、2'-乙酰毛蕊花糖苷、梓醇、异类叶升麻苷、羟基酪醇对照品 (成都曼思特生物科技有限公司, 批号分别为 MUST-150513、MUST-150412、MUST-14071814、MUST-17030701、MUST-17031504、MUST17102510、MUST-17041816、MUST-17081503, 质量分数均 ≥ 98.00%); 阿魏酸、香豆酸、香草酸、丁香酸、对羟基苯甲酸 (成都克洛玛生物科技有限公司, 批号分别为 CHB180206、CHB170801、CHB170802、CHB180207、CHB180227, 质量分数均 ≥ 98.00%); 益母草苷对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 L10A6Y2298, 质量分数 ≥ 98.00%); 肉苁蓉苷 A 对照品 (成都德思特生物科技有限公司, 批号为 DST180105-051, 质量分数 ≥ 98%); 毛蕊花糖苷对照品 (四川维克奇有限公司, 批号为 17020715, 质量分数 ≥ 98.00%); 甲醇 (分析纯, 天津市致远化学试剂有限公司); 娃哈哈纯净水; 蒸馏水; 无菌水; 琼脂糖凝胶。GeneJET 胶回收试剂盒、Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒 (赛默飞世尔科技公司)。

1.3 样品

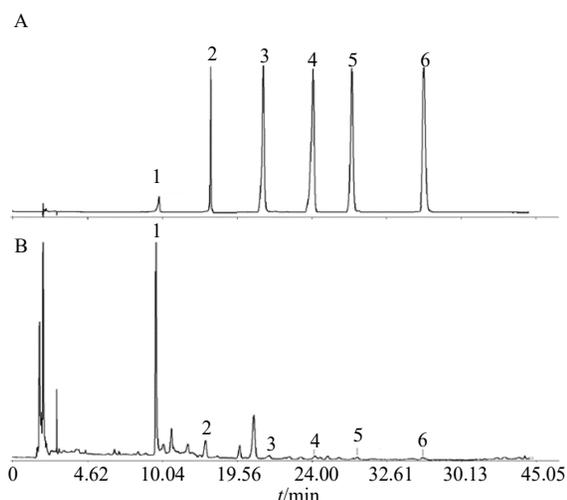
本研究所用的金九地黄来自于道地产区河南省温县武德镇亢村怀地黄种植基地, 分别于 7 月 28 日、8 月 24 日、10 月 18 日运用五点取样法进行采样, 经河南中医药大学董诚明教授鉴定为玄参科地黄属植物地黄 *R. glutinosa* Libosch. 的新鲜块根。采集地黄块根上附着的土壤并仔细刮刷保存, 作为根际土壤样品。将地黄根际土壤置于阴凉通风处阴干, 研磨后过 40 目筛, 其中一部分根际土壤保存于干燥器中, 用于 HPLC 测定; 另一部分根际土壤置于 -40 °C 保存, 用于微生物测定。

2 方法

2.1 苯乙醇苷类成分含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长 290 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 流动相为 0.1% 醋酸水溶液 (A)-乙腈 (B),

梯度洗脱 (0~10 min, 97%~85% A; 10~35 min, 85%~78% A; 35~50 min, 78%~60% A); 进样量 20 μL。色谱图见图 1。



1-红景天苷; 2-松果菊苷; 3-肉苁蓉苷 A; 4-毛蕊花糖苷; 5-异类叶升麻苷; 6-2'-乙酰毛蕊花糖苷。
1-salidroside; 2-echinoside; 3-cistanche glycoside A; 4-verbasoside; 5-heterologous cimicifuga glycoside; 6-2'-acetylacteoside.

图 1 对照品 (A) 和样品 (B) 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC of control (A) and samples (B)

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取异类叶升麻苷、肉苁蓉苷 A、毛蕊花糖苷、红景天苷、松果菊苷、2'-乙酰毛蕊花糖苷各对照品适量, 色谱甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得质量浓度分别为 0.024 5、0.043 9、0.830 0、0.063 7、0.019 3、0.017 4 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取地黄根际土壤 30.0 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 精密加入 60% 甲醇 60 mL, 称定质量, 65 °C 加热回流 2 h, 冷却至室温, 60% 甲醇补足质量, 摇匀滤过, 取续滤液 40 mL 于蒸发皿中, 水浴挥干, 色谱甲醇溶解并定容至 2 mL 量瓶中, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.4 标准曲线的建立 分别配制适当质量浓度的 6 种苯乙醇苷类成分对照品溶液, 按照“2.1.1”项下的色谱条件, 测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 得到各对照品的回归方程, 见表 1。

2.1.5 方法学考察 精密取地黄根际土壤供试品溶液, 按照“2.1.1”项下方法分别进行精密度、重复性、稳定性及加样回收率试验, 结果表明各实验的 RSD 均 < 5%, 说明该仪器精密度和该方法重复性良

表 1 苯乙醇苷类成分线性方程

Table 1 Linear equations for composition of phenylethanoides

| 成分 | 回归方程 | R ² | 线性范围/(mg·mL ⁻¹) |
|--------|--|----------------|-----------------------------|
| 红景天苷 | $Y=667\ 233.545\ 9 X+1\ 492.574\ 6$ | 0.998 0 | 0.004 9~0.006 4 |
| 松果菊苷 | $Y=13\ 522\ 941.130\ 0 X+1\ 644.398\ 1$ | 0.999 4 | 0.000 3~0.002 5 |
| 肉苁蓉苷 A | $Y=168\ 501\ 070.830\ 0 X-6\ 914.071\ 3$ | 0.999 2 | 0.001 2~0.009 5 |
| 毛蕊花糖苷 | $Y=25\ 316\ 006.404\ 4 X-8\ 614.318\ 3$ | 0.998 2 | 0.001 5~0.011 6 |
| 异类叶升麻苷 | $Y=25\ 788\ 647.010\ 0 X-2\ 953.661\ 8$ | 0.999 0 | 0.000 2~0.001 9 |

好, 样品在 24 h 内稳定性良好, 方法准确可靠。

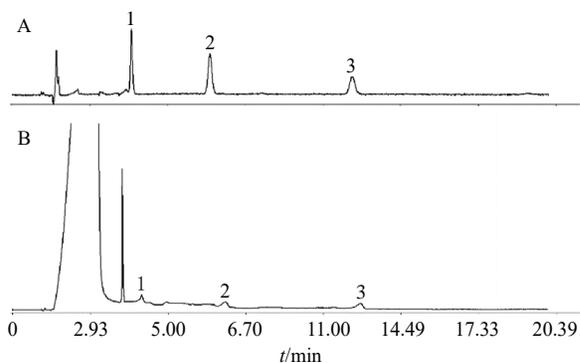
2.2 环烯醚萜苷类成分含量测定

按照崔锦鹏等^[12]的文献方法进行测定, 每个样品重复 3 次, 结果取其平均值。色谱图和对照品回归方程见图 2 和表 2。方法学考察实验中, 精密取地黄根际土壤供试品溶液, 按照上述方法分别进行精密度、重复性、稳定性及加样回收率试验, 结果表明各实验的 RSD 均 < 5%, 说明该仪器精密度和该方法重复性良好, 样品在 24 h 内稳定性良好, 方法准确可靠。

2.3 酚酸类成分含量测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 SunFireC₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长 280 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 流动相为 0.1% 醋酸水溶液 (A)-甲醇 (B), 梯度洗脱 (0~16 min, 80% A; 16~40 min; 80%~68% A); 进样量 20 μL。色谱图见图 3。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取香豆酸、对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、阿魏酸各对照品适量, 色谱甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得质量浓度分别为 0.066 0、0.016 1、0.023 6、0.012 5、0.011 2 mg/mL 的混合对照品溶液。



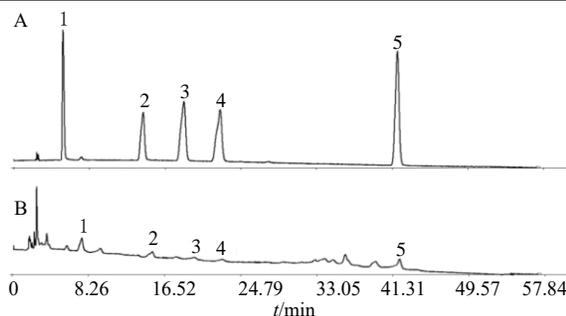
1-梓醇; 2-地黄苷 D; 3-益母草苷。
1-catalpol; 2-rehmannioside D; 3-leonuride.

图 2 对照品 (A) 和样品 (B) 高效液相色谱图
Fig. 2 HPLC of control (A) and samples (B)

表 2 环烯醚萜苷类成分线性方程

Table 2 Linear equations for composition of iridoid glycosides

| 成分 | 回归方程 | R ² | 线性范围/(mg·mL ⁻¹) |
|-------|-------------------------------------|----------------|-----------------------------|
| 梓醇 | $Y=3\ 047\ 588.119\ 8 X-839.407\ 0$ | 0.999 0 | 0.008 5~0.109 6 |
| 地黄苷 D | $Y=2\ 938\ 463.565\ 1 X+528.778\ 3$ | 0.999 2 | 0.009 3~0.074 8 |
| 益母草苷 | $Y=5\ 928\ 382.171\ 0 X-48.586\ 8$ | 0.999 4 | 0.005 4~0.172 0 |



1-香豆酸; 2-对羟基苯甲酸; 3-香草酸; 4-丁香酸; 5-阿魏酸。
1-coumaric acid; 2-*p*-hydroxybenzoic acid; 3-vanillic acid; 4-syringic acid; 5-ferulic acid.

图 3 对照品 (A) 和样品 (B) 高效液相色谱图
Fig. 3 HPLC of control (A) and samples (B)

2.3.3 供试品溶液的制备 取地黄根际土壤 30.0 g, 精密称定, 置于锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 60 mL, 称定质量, 65 °C 水浴回流提取 6 h, 冷却至室温, 70% 乙醇补足质量, 摇匀滤过, 取续滤液 40 mL 于蒸发皿中, 水浴挥干, 色谱甲醇溶解并定容至 1 mL 量瓶中, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.3.4 标准曲线的建立 分别配制适当质量浓度的 5 种酚酸类成分对照品溶液, 按照“2.3.1”项下的色谱条件, 测定峰面积, 以峰面积积分为纵坐标, 对照品质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 得到各对照品的回归方程, 见表 3。

2.3.5 方法学考察 精密取地黄根际土壤供试品溶液, 按照“2.3.1”项下方法分别进行精密度、重复性、稳定性及加样回收率试验, 结果表明各实验的 RSD 均 < 5%, 说明该仪器精密度和该方法重复性良

表 3 酚酸类成分线性方程

Table 3 Linear equations for composition of phenolic acids

| 成分 | 回归方程 | R ² | 线性范围/(mg·mL ⁻¹) |
|--------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------|
| 香豆酸 | Y=30 296 397.150 0 X-6 948.273 2 | 0.999 8 | 0.000 1~0.026 4 |
| 对羟基苯甲酸 | Y=19 530 031.990 0 X-9 547.704 8 | 0.998 0 | 0.000 3~0.010 7 |
| 香草酸 | Y=33 394 202.980 0 X-13 645.614 1 | 0.999 4 | 0.001 5~0.014 2 |
| 丁香酸 | Y=36 812 875.630 0 X-13 282.675 2 | 0.998 8 | 0.001 0~0.012 5 |
| 阿魏酸 | Y=57 777 611.170 0 X-32148.787 0 | 0.998 8 | 0.000 7~0.006 7 |

好, 样品在 24 h 内稳定性良好, 方法准确可靠。

2.4 地黄根际土壤微生物高通量测序

2.4.1 根际土壤 DNA 的提取和 PCR 扩增 采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 方法提取样品中的基因组 DNA, 再利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 以稀释至 1 ng/μL 的基因组 DNA 为模板, 使用特异引物 515F 和 806R、528F 和 706R 对 16S rRNA、18S rRNA 基因的 V4 高可变区片段进行 PCR 扩增。将 PCR 产物利用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测及纯化, 剪切回收目的条带即可用于下一步基因文库的构建。

2.4.2 文库构建及测序数据处理 使用 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒进行文库构建, 经检测合格后, 利用 Ion S5™XL 进行上机测序。根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据, 截去 Barcode 序列和引物序列后使用 FLASH 对每个样本的 reads 进行拼接, 得到的拼接序列为原始序列; 将原始数据经过严格的过滤处理后得到高质量的 Tags 序列, 再对其低质量部分进行剪切; 最后得到的 Tags 通过与物种注释数据库进行比对检测嵌合体序列, 去除嵌合体序列后, 即得到最终的有效序列。

2.4.3 操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 聚类 and 物种注释 对最终得到的有效序列以 97% 的一致性将其聚类为 OTUs, 并选取 OTUs 代表

性序列进行物种注释分析, 在门、属水平上统计各样本的群落组成及相对丰度。再以样本中数据量最少的为标准对各样本的数据进行均一化处理, 最后对 OTUs 进行 α 多样性指数分析、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe), 并结合 SPSS27、Canoco5.0 软件对根际土壤次生代谢产物与细菌丰度进行相关性分析, 筛选对根际土壤细菌群落特征影响较大代谢产物。

3 结果与分析

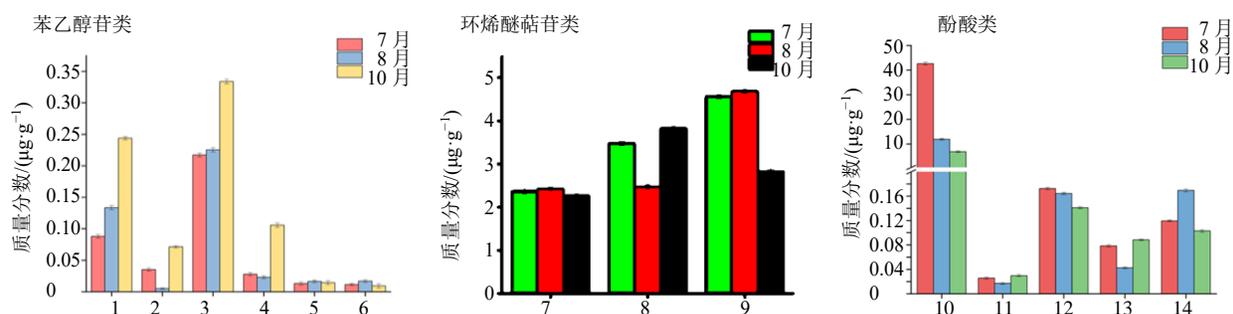
3.1 地黄 3 个生长时期根际土壤中次生代谢产物特征分析

3.1.1 地黄 3 个生长时期根际土壤中次生代谢产物的含量特征 地黄 3 个生长时期根际土壤中 3 类次生代谢产物的含量测定结果 (表 4) 表明, 地黄根际土壤中均可以检测到地黄中主要的 3 类次生代谢产物, 其中 6 种苯乙醇苷类成分中红景天苷和肉苁蓉苷 A 的含量相对较高, 3 种环烯醚萜苷类成分中地黄苷 D 的含量较高, 5 种酚酸类成分中香豆酸的含量较高。另外, 地黄 3 个生长时期根际土壤中不同次生代谢产物的变化规律存在着一定差异性 (图 4), 其中苯乙醇苷类成分中的红景天苷、肉苁蓉苷 A、松果菊苷、毛蕊花糖苷的含量总体呈现出上升趋势, 异类叶升麻苷、2'-乙酰毛蕊花糖苷的含量基本稳定; 环烯醚萜苷类成分中地黄苷 D 的含量总体呈

表 4 地黄根际土壤中次生代谢产物含量结果

Table 4 Results of secondary metabolites content in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix*

| 生长期 | 质量分数/(μg·g ⁻¹) | | | | | | |
|------|----------------------------|---------|----------|---------|---------|------------|---------|
| | 红景天苷 | 松果菊苷 | 肉苁蓉苷 A | 毛蕊花糖苷 | 异类叶升麻苷 | 2'-乙酰毛蕊花糖苷 | 梓醇 |
| 7 月 | 0.087 9 | 0.035 1 | 0.217 1 | 0.028 0 | 0.013 1 | 0.011 4 | 2.366 6 |
| 8 月 | 0.133 5 | 0.005 0 | 0.225 3 | 0.023 1 | 0.016 4 | 0.016 9 | 2.426 2 |
| 10 月 | 0.243 8 | 0.071 3 | 0.333 8 | 0.105 7 | 0.014 3 | 0.009 3 | 2.262 5 |
| 生长期 | 质量分数/(μg·g ⁻¹) | | | | | | |
| | 地黄苷 D | 益母草苷 | 香豆酸 | 对羟基苯甲酸 | 香草酸 | 丁香酸 | 阿魏酸 |
| 7 月 | 3.482 6 | 4.569 9 | 42.588 6 | 0.025 6 | 0.172 4 | 0.078 4 | 0.119 5 |
| 8 月 | 2.472 2 | 4.684 8 | 11.891 4 | 0.017 0 | 0.164 2 | 0.042 6 | 0.169 3 |
| 10 月 | 3.828 8 | 2.826 4 | 6.867 3 | 0.029 7 | 0.141 0 | 0.088 3 | 0.103 0 |



1-红景天苷; 2-松果菊苷; 3-肉苁蓉苷 A; 4-毛蕊花糖苷; 5-异类叶升麻苷; 6-2'-乙酰毛蕊花糖苷; 7-梓醇; 8-地黄苷 D; 9-益母草苷; 10-香豆酸; 11-对羟基苯甲酸; 12-香草酸; 13-丁香酸; 14-阿魏酸。

1-salidroside; 2-echinoside; 3-cistanche glycoside A; 4-verbascoside; 5-heterologous cimicifuga glycoside; 6-2'-acetylacteoside; 7-catalpol; 8-dihuang glycosiderehmannioside D; 9-leonuride; 10-coumaric acid; 11-hydroxybenzoic acid; 12-vanillic acid; 13-syringic acid; 14-ferulic acid.

图 4 地黄 3 个生长时期 3 类次生代谢产物含量变化规律

Fig. 4 Changes in contents of three secondary metabolites in three growth stages

现上升趋势，益母草苷的含量则呈现下降趋势，梓醇的含量较为稳定；酚酸类成分中的香豆酸含量随着生育期的推进急剧下降，香草酸、阿魏酸的含量也呈现下降趋势，对羟基苯甲酸、丁香酸的含量则呈现上升趋势。

3.1.2 地黄 3 个生长时期根际土壤中次生代谢产物的 PCA 根际土壤中 3 类次生代谢产物的分析结果表明，地黄在 3 个生长时期根际土壤中次生代谢产物含量之间存在着差异，为进一步分析地黄根际土壤中 3 个时期次生代谢产物的整体差异特征，利用 SIMCA 14.1 软件对 3 个时期次生代谢产物归一化后的数据进行 PCA，剔除异常样本，建立无样本监督的 PCA 模型（图 5）。可以看出 3 个时期根际土

壤中 3 类次生代谢产物的整体特征存在差异，明显按时期聚为 3 类。

3.1.3 地黄 3 个生长时期根际土壤次生代谢产物的正交偏最小二乘法判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA）为了排除同一时期不同样品组内差异对同时期样品组间差异的干扰，进一步对地黄根际土壤中 3 类次生代谢产物的特征进行 OPLS-DA，结果发现地黄根际土壤中 3 类次生代谢产物在 7、8、10 月各自聚为一类（图 6）。对所建立的 OPLS-DA 模型进行 200 次置换检验，结果显示置换后的 R^2 、 Q^2 值均高于原始的 R^2 、 Q^2 值，表明所建模型可靠，未出现过拟合现象。

3.1.4 地黄 3 个生长时期根际土壤潜在差异次生代谢产物的筛选 PCA 及 OPLS-DA 结果表明，地黄 3 个时期根际土壤中次生代谢产物特征具有明显差异。

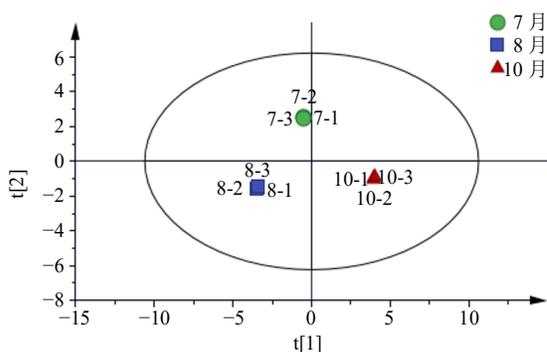


图 5 地黄 3 个生长时期根际土壤中次生代谢产物 PCA 得分图

Fig. 5 PCA score plot of secondary metabolites in rhizosphere soil during three growth stages of *Rehmannia Radix*

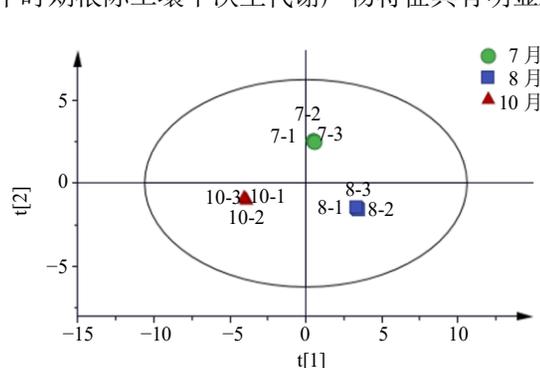


图 6 地黄 3 个生长时期根际土壤中次生代谢产物 OPLS-DA 得分图

Fig. 6 OPLS-DA score plot of secondary metabolites in rhizosphere soil during three growth stages of *Rehmannia Radix*

为了筛选引起其差异的主要次生代谢产物，本研究利用地黄 3 个生长时期根际土壤次生代谢产物建立的 OPLS-DA 模型筛选变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) 值>1 的成分，并进行 T-test 检验计算

其 P 值，选择 VIP>1 且 P<0.05 的物质为潜在的差异成分。在地黄根际土壤中的 3 类次生代谢产物中共筛选到 4 个 VIP 值>1 的成分，且 P 均<0.05 或 0.01，其中 2 个为苯乙醇苷类成分，2 个为酚酸类成分 (表 5)。

表 5 地黄 3 个生长时期根际土壤中次生代谢产物差异物质筛选

Table 5 Screening of differential substances of secondary metabolites in rhizosphere soil of *Rehmanniae radix* during three growth stages

| 差异物质 | VIP 值 | P 值 | | |
|--------|----------|------------|-------------|-------------|
| | | 7 月 vs 8 月 | 7 月 vs 10 月 | 8 月 vs 10 月 |
| 香豆酸 | 1.197 88 | 0.000 0 | 0.000 0 | 0.000 0 |
| 异类叶升麻苷 | 1.136 15 | 0.000 0 | 0.001 3 | 0.000 1 |
| 红景天苷 | 1.045 82 | 0.000 0 | 0.000 0 | 0.000 0 |
| 香草酸 | 1.034 40 | 0.000 0 | 0.000 0 | 0.000 0 |

3.2 地黄 3 个生长时期根际土壤的细菌群落特征分析

3.2.1 细菌群落测序数据结果分析 基于 Ion S5™XL 测序平台对构建的小片段文库进行单端测序，平均每个样品测得 83 117 条 reads，经过拼接及过滤低质量序列等质控处理，平均每个样品得到 78 997 条有效数据，质控有效率达 95.0%。

3.2.2 细菌群落 OTU 聚类和物种注释分析 为研究各样本的物种组成，将所有样本经过数据前处理的有效数据以 97% 的一致性进行 OTUs 聚类，共得到 10 278 个 OTUs。通过与数据库 Silva132 比对，进行物种注释，并对不同分类层级进行统计。10 278 个 OTUs 可以全部注释到数据库 Silva132 (100.00%)，其中注释到界水平的比例为 100.00%，门水平的比例为 85.84%，纲水平的比例为 74.53%，目水平的比例为 61.20%，科水平的比例为 50.01%，属水平的比例为 28.51%。根据聚类得到的 OTUs 分析结果和研究需求，分析不同样本之间共有和特有的 OTUs，当样本数小于 5 时，对所有样本进行均一化处理之后绘制成韦恩图，图中每个圈代表一组样本，圈和圈重叠部分的数字代表样本组之间共有的 OTUs 个数，没有重叠部分的数字代表样本组的特有 OTUs 个数。结果表明，地黄 3 个生育期内共有 OTUs 数为 5 317 个，见图 7。

3.2.3 α 多样性指数分析 α 多样性指数包括 Shannon、Simpson、Chao1、ACE、goods_coverage、PD-whole-tree 指数等，其中 Shannon 指数和 PD_whole_tree 指数是表征样品中微生物多样性的指标，其值越大，说明群落多样性越高；Simpson 指数表征群落内物种分布的多样性与均匀度；Chao1

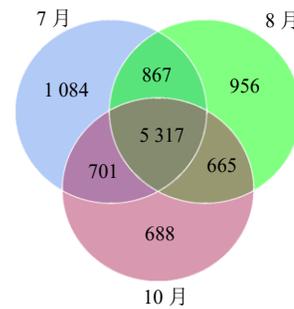


图 7 地黄 3 个生长时期根际土壤中细菌群落的 OTU 聚类结果韦恩图

Fig. 7 Venn diagram of OTU clustering results of bacterial communities in rhizosphere soil during three growth stages of *Rehmanniae Radix*

指数和 ACE 指数主要是反映样品 OTUs 数目多少的指标，Chao1 指数越小，ACE 指数越大，微生物群落 OTUs 数目越多。

不同样本在 97% 一致性阈值下的 α 多样性指数结果表明，3 个生长时期地黄根际土壤样品的细菌群落多样性较高，且 goods_coverage 指数均大于 0.98，表明根际微生物样品的测序深度覆盖率 > 98%，能够较全面地反映土壤细菌群落的种类和结构。Chao1 指数表现为 7 月 < 10 月 < 8 月，ACE 指数则表现为 7 月 > 8 月 > 10 月，说明 7 月份根际微生物 OTUs 数目较多；Shannon 指数表现为 7 月 > 8 月 > 10 月，说明 7 月份样品多样性最高。

3.2.4 物种相对丰度及变化规律分析 根据物种注释结果及丰度水平，分别从门水平和属水平上选取最大丰度排名前 10 的优势细菌，分析地黄根际土壤细菌群落的变化特征。结果显示 3 个时期根际土壤中的优势细菌种类基本一致，门水平上丰度排名前

10 的分别为变形菌门、放线菌门、酸杆菌门、厚壁菌门、绿弯菌门、拟杆菌门、芽单胞菌门、浮霉菌门、疣微菌门、奇古菌门；属水平上丰度排名前 10 的

别为不明梭菌属、热酸菌属、片球菌属、不明蓝藻菌属、不明酸杆菌属、*Gaiella*、乳酸杆菌属、芽孢杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、*Haliangium*（图 8）。

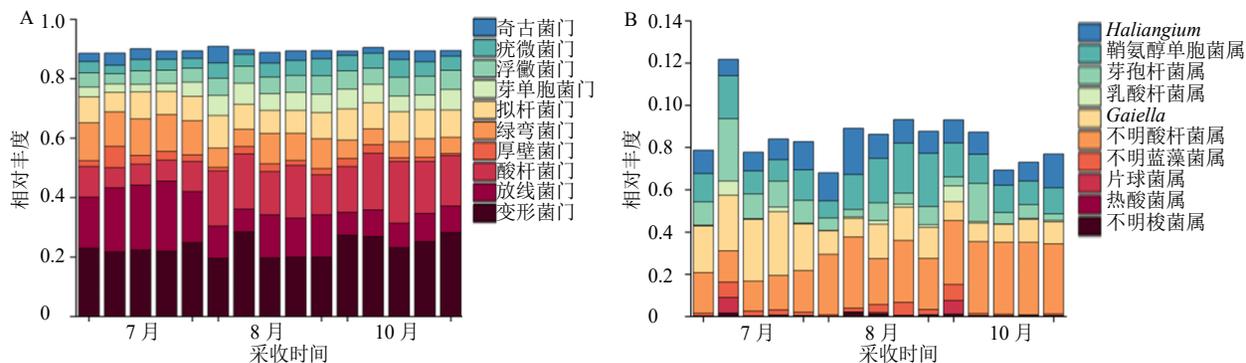
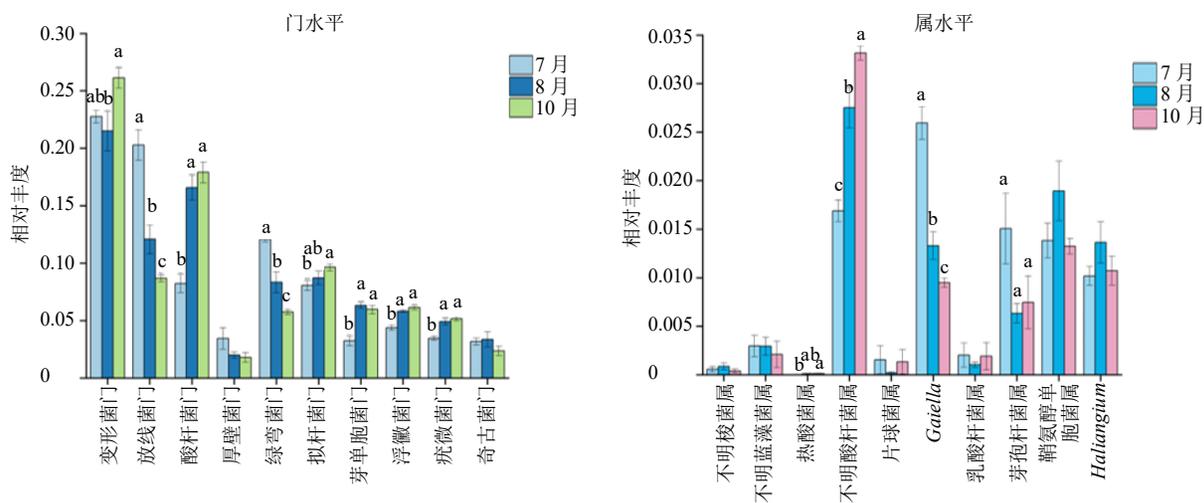


图 8 门水平 (A) 及属水平 (B) 地黄根际土壤细菌相对丰度排名图

Fig. 8 Ranking map of bacterial abundance in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* at phylum (A) and genus (B) levels

为了进一步分析地黄 3 个时期根际土壤中优势细菌群落的差异，从门和属 2 个分类水平上对地黄 3 个时期优势细菌的丰度均值进行比较，结果发现在地黄生长发育过程中，门水平上，放线菌门、厚壁菌门、绿弯菌门的相对丰度逐渐降低，而酸杆菌门、拟杆菌

门、浮霉菌门、疣微菌门的相对丰度则逐渐增加。属水平上，不明蓝藻菌属、*Gaiella* 的相对丰度逐渐降低，而热酸菌属、不明酸杆菌属的相对丰度则逐渐增加，且差异显著性 *t* 检验显示 3 时期 2 水平下优势细菌的相对丰度差异大多数达到显著或极显著水平（图 9）。



不同字母的两组在统计学上具有显著性差异， $P < 0.05$ 。

The two groups with different letters were statistically significant, $P < 0.05$.

图 9 门水平及属水平地黄根际土壤细菌相对丰度趋势图

Fig. 9 Trend map of relative abundance of bacteria in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* at phylum and genus levels

3.2.5 PCA 为了进一步分析微生物群落构成，利用 *simica14.1* 软件进行 PCA，基于 OTU 水平的 PCA 结果显示，共筛选出 3 个主成分，累计方差贡献率 94.7%，可以基本上反映样品的细菌群落特征。所有样品均位于置信区间内，3 个时期根际土壤中微生物群落特征均按照 7、8、10 月 3 个时期各自聚为一类，但同一时期的 5

个样本之间也存在一定差异（图 10）。

3.2.6 LEfSe 利用 LEfSe 对 3 个时期地黄根际土壤细菌群落的线性判别分析 (LDA) 值进行分析，以 $LDA > 4$ 为标准筛选引起 3 个时期根际土壤细菌群落特征差异的标志性菌群（图 11）。结果表明 3 个时期地黄根际土壤中无共有的细菌群落，且细

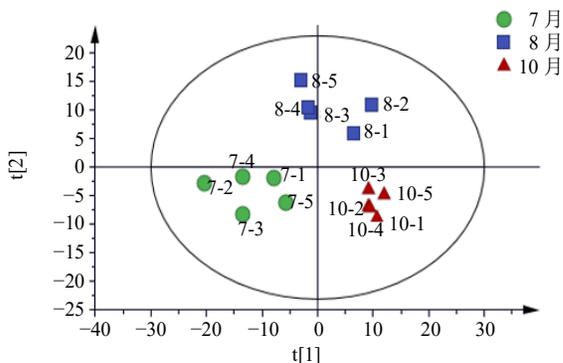


图 10 地黄 3 个生长时期根际土壤细菌群落特征 PCA 得分图

Fig. 10 PCA score plot of bacterial community characteristics in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* in three growth stages

菌群落特征差异较大。其中，7 月份特有的差异显著物种为放线菌门、绿弯菌门、不明放线菌纲、嗜热菌纲、*o-Gaiellales*、微球菌目、厌氧绳菌纲；8 月份特有的差异显著物种为吡咯单胞菌科、芽单胞菌门；10 月份特有的差异显著物种为酸杆菌门、不明酸杆菌目、不明酸杆菌纲、变形菌门、不明酸杆菌科、芽单胞菌目、不明芽单胞菌纲、芽单胞菌科。

3.3 地黄根际土壤中细菌群落物种丰度与 3 类次生代谢产物的关系分析

3.3.1 地黄根际土壤细菌群落物种丰度与 3 类次生代谢产物的相关性分析 为了探讨地黄根际土壤中的次生代谢产物与细菌群落丰度的相关性，利用 SPSS 27 对根际土壤成分及细菌群落门水平和属水平下物种丰度进行相关性分析（表 6、7），相关系

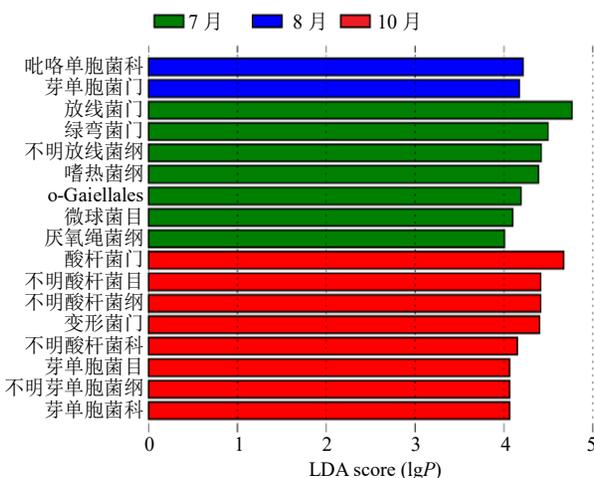


图 11 地黄 3 个生长时期根际土壤细菌群落的 LDA 值分布柱状图

Fig. 11 Histogram of LDA value distribution of bacterial community in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* during three growth stages

数绝对值越大，相关性越高，正数表示正相关，负数表示负相关。结果表明，无论从门水平还是属水平上分析，根际土壤中的各类成分对细菌群落的物种丰度均有一定的相关性，3 类次生代谢产物中的香豆酸在门水平上对酸杆菌门、厚壁菌门、浮霉菌门、疣微菌门的影响较大，对羟基苯甲酸、肉苁蓉苷在属水平上对不明梭菌属、不明蓝藻菌属的影响较大。

3.3.2 地黄根际土壤细菌群落物种丰度与 3 类次生代谢产物的冗余分析 为了进一步研究根际土壤 3 类次生代谢产物对细菌群落物种丰度影响的贡献度，利用 Canoco 5.0 软件基于距离的冗余分析 (db-RDA) 对根际土壤成分对细菌群落门水平、属水平物种丰度的解释度进行分析（表 8）。根际土壤中 3

类次生代谢产物对根际细菌的解释度表明，红景天苷、丁香酸解释了根际土壤中门水平上细菌群落变化的 87.7%；香豆酸、对羟基苯甲酸、松果菊苷解释了根际土壤中属水平上细菌群落变化的 84.4%，说明酚酸类中的丁香酸、香豆酸、对羟基苯甲酸和苯乙醇苷类成分中的红景天苷、松果菊苷成分对细菌群落特征的影响在统计学上达到显著水平。

4 讨论

根际是指植物根系周围受根系生长影响的土体，是植物根系与外界环境进行物质与能量交换的主要场所。存在于植物根际的微生物称为根际微生物，而由植物自身合成，并通过根系分泌到土壤环境中的物质称为根系分泌物^[9]。根际土壤中根系分泌物与根际微生物相互作用和往复调控，共同构成

表6 地黄根际土壤次生代谢产物与门水平根际优势菌群相关性分析

Table 6 Correlation analysis of secondary metabolites in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* and dominant flora in rhizosphere at phylum level

| 成分 | 相关系数 | | | | | | | | | |
|------------|--------|--------|----------|---------|--------|--------|--------|----------|----------|--------|
| | 变形菌门 | 放线菌门 | 酸杆菌门 | 厚壁菌门 | 绿弯菌门 | 拟杆菌门 | 芽单胞菌门 | 浮霉菌门 | 疣微菌门 | 奇古菌门 |
| 红景天苷 | 0.851 | -0.892 | 0.808 | -0.802 | -0.943 | 0.990 | 0.653 | 0.833 | 0.816 | -0.896 |
| 松果菊苷 | 0.979 | -0.335 | 0.180 | -0.171 | -0.455 | 0.623 | -0.047 | 0.224 | 0.195 | -0.956 |
| 肉苁蓉苷 A | 0.947 | -0.768 | 0.655 | -0.648 | -0.845 | 0.934 | 0.468 | 0.688 | 0.666 | -0.973 |
| 毛蕊花糖苷 | 0.978 | -0.689 | 0.564 | -0.556 | -0.777 | 0.887 | 0.362 | 0.600 | 0.576 | -0.993 |
| 异类叶升麻苷 | -0.408 | -0.566 | 0.691 | -0.698 | -0.454 | 0.268 | 0.837 | 0.658 | 0.680 | 0.322 |
| 2'-乙酰毛蕊花糖苷 | -0.872 | 0.036 | 0.124 | -0.134 | 0.166 | -0.359 | 0.346 | 0.080 | 0.110 | 0.822 |
| 梓醇 | -0.995 | 0.430 | -0.280 | 0.271 | 0.544 | -0.700 | -0.056 | -0.323 | -0.294 | 0.981 |
| 地黄苷 D | 0.860 | -0.014 | -0.147 | 0.156 | -0.143 | 0.337 | -0.367 | -0.103 | -0.132 | -0.809 |
| 益母草苷 | -0.978 | 0.687 | -0.562 | 0.554 | 0.776 | -0.886 | -0.360 | -0.598 | -0.574 | 0.993 |
| 香豆酸 | -0.380 | 0.987 | -1.000** | 1.000** | 0.959 | -0.883 | -0.974 | -0.999** | -1.000** | 0.464 |
| 对羟基苯甲酸 | 0.895 | -0.087 | -0.074 | 0.083 | -0.216 | 0.406 | -0.297 | -0.029 | -0.059 | -0.850 |
| 香草酸 | -0.869 | 0.876 | -0.787 | 0.781 | 0.931 | -0.985 | -0.627 | -0.814 | -0.796 | 0.911 |
| 丁香酸 | 0.839 | 0.027 | -0.187 | 0.196 | -0.103 | 0.299 | -0.404 | -0.143 | -0.173 | -0.785 |
| 阿魏酸 | -0.857 | 0.007 | 0.154 | -0.163 | 0.137 | -0.331 | 0.373 | 0.109 | 0.139 | 0.805 |

*P<0.05 **P<0.01

表7 地黄根际土壤次生代谢产物与属水平根际优势菌群相关性分析

Table 7 Correlation analysis of secondary metabolites in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* and dominant flora in rhizosphere at genus level

| 成分 | 相关系数 | | | | | | | | | |
|------------|---------|---------|--------|--------|--------|----------------|--------|--------|---------|-------------------|
| | 不明梭菌属 | 不明蓝藻菌属 | 热酸菌属 | 不明酸杆菌属 | 片球菌属 | <i>Gaiella</i> | 乳酸杆菌属 | 芽孢杆菌属 | 鞘氨醇单胞菌属 | <i>Haliangium</i> |
| 红景天苷 | -0.590 | -0.967 | 0.866 | 0.917 | 0.101 | -0.860 | 0.135 | -0.639 | -0.323 | -0.089 |
| 松果菊苷 | -0.984 | -0.878 | 0.284 | 0.390 | 0.758 | -0.273 | 0.780 | 0.066 | -0.886 | -0.750 |
| 肉苁蓉苷 A | -0.756 | -0.999* | 0.732 | 0.804 | 0.321 | -0.724 | 0.353 | -0.451 | -0.526 | -0.310 |
| 毛蕊花糖苷 | -0.826 | -0.997 | 0.649 | 0.730 | 0.428 | -0.639 | 0.459 | -0.345 | -0.621 | -0.418 |
| 异类叶升麻苷 | 0.722 | 0.127 | 0.610 | 0.517 | -0.973 | -0.619 | -0.964 | -0.847 | 0.896 | 0.976 |
| 2'-乙酰毛蕊花糖苷 | 0.992 | 0.693 | 0.018 | -0.095 | -0.919 | -0.030 | -0.932 | -0.363 | 0.984 | 0.914 |
| 梓醇 | 0.960 | 0.922 | -0.381 | -0.482 | -0.687 | 0.370 | -0.712 | 0.037 | 0.833 | 0.679 |
| 地黄苷 D | -0.989 | -0.676 | -0.040 | 0.072 | 0.928 | 0.052 | 0.940 | 0.384 | -0.988 | -0.923 |
| 益母草苷 | 0.828 | 0.996 | -0.647 | -0.728 | -0.430 | 0.638 | -0.461 | 0.343 | 0.623 | 0.420 |
| 香豆酸 | 0.003 | 0.631 | -0.995 | -0.977 | 0.503 | 0.996 | 0.473 | 0.969 | -0.295 | -0.513 |
| 对羟基苯甲酸 | -0.997* | -0.728 | 0.033 | 0.145 | 0.898 | -0.021 | 0.913 | 0.315 | -0.974 | -0.893 |
| 香草酸 | 0.617 | 0.975 | -0.849 | -0.902 | -0.134 | 0.842 | -0.169 | 0.613 | 0.355 | 0.123 |
| 丁香酸 | -0.982 | -0.645 | -0.081 | 0.031 | 0.942 | 0.093 | 0.953 | 0.421 | -0.994 | -0.938 |
| 阿魏酸 | 0.988 | 0.671 | 0.047 | -0.065 | -0.930 | -0.059 | -0.943 | -0.390 | 0.989 | 0.926 |

*P<0.05 **P<0.01

表8 根际土壤中苯乙醇苷类、环烯醚萜苷类及酚酸类次生代谢物对根际土壤细菌群落结构的影响

Table 8 Effects of phenylethanoids, iridoid glycosides and phenolic acids secondary metabolites in rhizosphere soil on bacterial community structure

| 分类 | 因子 | 解释度/% | P 值 |
|-----|--------|-------|-------|
| 门水平 | 红景天苷 | 63.0 | 0.004 |
| | 丁香酸 | 24.7 | 0.004 |
| 属水平 | 香豆酸 | 40.8 | 0.004 |
| | 对羟基苯甲酸 | 36.0 | 0.002 |
| | 松果菊苷 | 7.6 | 0.044 |

了一个复杂的生态系统^[13]。药用植物中的根系分泌物主要是各类次生代谢产物，这些次生代谢产物不仅是药用植物中主要的药效成分，也可能是引起药用植物连作障碍的重要化感物质^[14-15]。文献报道^[16]，7月份是地黄连作障碍效应产生的起始期和敏感期。本研究发现，地黄根际土壤中3类次生代谢产物中香豆酸的含量在7月最高，说明地黄次生代谢产物中香豆酸等酚酸类物质可能是引起地黄连作障碍的重要化感自毒物质。从7~10月，地黄根际土壤3类次生代谢产物中红景天苷、松果菊苷、肉苁

蓉苷 A、毛蕊花糖苷、地黄苷 D、对羟基苯甲酸、丁香酸的含量在生育期基本呈现出上升趋势,说明地黄根系分泌的大多数次生代谢产物从苗期到块根膨大末期已经完成了原始积累。次生代谢产物中的某些化感物质不断积累能够招募聚集在根际周围的微生物,包括有益微生物及有害微生物,并会对其种类和丰度产生一定的促进或抑制作用^[17]。Lopes 等^[18]的研究表明玉米根系分泌物中的茉莉酸、蔗糖、海藻糖等有助于玉米不同发育阶段根际细菌群落的聚集,而 Mishra 等^[19]发现热带入侵杂草的根系分泌物会破坏土壤微生物结构,促进致病菌在其根际中的积累。

药用植物根际微生物群落特征在一定程度上反映着土壤微生态系统的稳定性,微生物群落结构越复杂、物种丰富度越高,说明土壤微生态环境越稳定^[20-21]。本实验的细菌群落特征结果分析显示,随着地黄 3 个生长期根际土壤次生代谢物的不断变化,其细菌群落结构特征也不断发生变化,相关性分析和冗余分析发现,香豆酸、肉苁蓉苷 A、对羟基苯甲酸对门水平和属水平上的优势细菌的相关性在统计学上达到显著水平,而红景天苷、丁香酸、香豆酸、对羟基苯甲酸、松果菊苷等对细菌群落结构的影响较大,说明在地黄生长发育过程中,地黄中主要的次生代谢产物在根际土壤中的不断积累会引起根际土壤中细菌群落结构特征发生变化,这种变化是多种化学成分综合作用的结果,但各成分对细菌群落的影响机制仍有待进一步研究。

根系分泌物介导的植物-微生物间的根际互作关系,也称之为根际对话机制,目前已经成为国内外关于药用植物障碍研究的重要领域^[21]。文献报道,连作地黄根际土壤中化感物质的不断积累使细菌群落结构趋于单一化,有益菌的种类及数量都大量降低、病原菌上升^[11,22]。而放线菌、厚壁菌等有益菌群可以提高代谢物的产生、促进植物生长调节、降低病虫害,并且可以通过配合养分循环来维持土壤的生物平衡^[23-24]。因此药用植物在栽培过程中根际土壤微生物群落特征变化是引起连作障碍的重要原因,祁建军^[25]也认为地黄在种植后根际微生物种群结构发生变化,可能是引起其连作障碍的主要原因。以上研究再次证明了连作障碍的产生是根系分泌物和根际微生物互相作用的结果,根系分泌物中的化感自毒物质不断积累直接或间接影响了土壤理化性质的改变,使得根际微生物群落失

调,从而对正茬或下茬同种或同科药用植物的生长产生抑制作用,形成了药用植物的连作障碍^[9-10]。本研究在分析了 3 个主要生长期内地黄根际土壤中 3 类次生代谢产物及微生物细菌群落特征的基础上,结合相关性分析及冗余分析对次生代谢产物与细菌群落的相关性和解释度进行综合分析,筛选出了对地黄根际土壤微生物细菌群落特征影响较大的次生代谢产物,初步分析了引起地黄根际土壤中细菌群落特征改变的主要物质,为地黄连作障碍的研究提供了一定的理论参考,但是关于地黄生长过程中真菌群落特征、标志性菌群的功能及相关次生代谢产物对微生物群落特征的影响机制还有待于进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王瑞飞,王妍,姜恬,等.连作地黄根际土壤中固氮酚酸细菌的分离鉴定[J].江苏农业科学,2017,45(10):229-232.
- [2] 王清泉,宋景,李亚男,等.地黄多糖的提取纯化及药理作用研究进展[J].中草药,2023,54(11):3734-3744.
- [3] 冷慕婵.地黄内生真菌及其次生代谢产物的相关性研究[D].郑州:河南中医学院,2014.
- [4] 葛楠,闫广利,孙晖,等.熟地黄药效物质基础研究进展[J].中草药,2023,54(1):292-302.
- [5] 王明道,楚梦晓,曹宏丽,等.地黄连作障碍的自毒物质及转化菌株的发现与鉴定[J].信阳师范学院学报:自然科学版,2021,34(2):208-215.
- [6] 吴廷娟,谢小龙,董诚明.地黄对土壤动物数量和群落结构的影响[J].核农学报,2017,31(11):2273-2278.
- [7] 詹忠根.地黄分子鉴定及功能基因研究进展[J].中草药,2019,50(22):5611-5620.
- [8] 谢星光,陈晏,卜元卿,等.酚酸类物质的化感作用研究进展[J].生态学报,2014,34(22):6417-6428.
- [9] 祝蕾,严辉,刘培,等.药用植物根际微生物对其品质形成的影响及其作用机制的研究进展[J].中草药,2021,52(13):4064-4073.
- [10] 章云云,朱端卫,王晓,等.植物根系分泌物的作用及其与药用植物连作障碍的关系[J].湖北农业科学,2014,53(6):1241-1245.
- [11] 张重义,陈慧,杨艳会,等.连作对地黄根际土壤细菌群落多样性的影响[J].应用生态学报,2010,21(11):2843-2848.
- [12] 崔锦鹏,耿晓桐,张宝,等.地黄中环烯醚萜苷类成分在根际土壤中的分布特征研究[J].时珍国医国药,2022,33(10):2492-2497.
- [13] 郑梅霞,陈宏,朱育菁,等.七叶一枝花根际与非根际

- 土壤细菌群落多样性 [J]. 福建农业学报, 2020, 35(12): 1357-1367.
- [14] 吴红淼, 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.
- [15] 郭兰萍, 黄璐琦, 蒋有绪, 等. 药用植物栽培种植中的土壤环境恶化及防治策略 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(9): 714-717.
- [16] 张重义, 尹文佳, 李娟, 等. 地黄连作的生理生态特性 [J]. 植物生态学报, 2010, 34(5): 547-554.
- [17] 郭凤仙, 刘越, 唐丽, 等. 药用植物根际微生物研究现状与展望 [J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(5): 12-21.
- [18] Lopes L D, Wang P, Futrell S L, *et al.* Sugars and jasmonic acid concentration in root exudates affect maize rhizosphere bacterial communities [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2022, 88(18): e0097122.
- [19] Mishra A K, Sudalaimuthasari N, Hazzouri K M, *et al.* Tapping into plant-microbiome interactions through the lens of multi-omics techniques [J]. *Cells*, 2022, 11(20): 3254.
- [20] 胡峻峰, 曾建荣, 刘键锤, 等. 广藿香间作生姜与豇豆对其根际微生物群落多样性的影响 [J]. 中药材, 2022, 45(10): 2316-2321.
- [21] 吴林坤. 根系分泌物介导下的连作地黄根际互作与作用机制研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
- [22] 陈慧. 地黄连作对土壤微生物的影响 [D]. 福州: 福建农林大学, 2008.
- [23] Bhatti A A, Haq S, Bhat R A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health [J]. *Microb Pathog*, 2017, 111: 458-467.
- [24] Chepsergon J, Moleleki L N. Rhizosphere bacterial interactions and impact on plant health [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2023, 73: 102297.
- [25] 祁建军. 地黄种质遗传关系及根际土壤微生物多样性研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2007.

[责任编辑 时圣明]