须根自然腐解对滇重楼生长及其活性成分含量的影响

赵顺鑫[1], 魏祖晨[1], 黎海灵[2], 赵晶晶[1], 郭冬琴[1*], 周浓[1*]

(1. 重庆三峡学院 生物与食品工程学院 三峡库区道地药材绿色种植与深加工重庆市工程实验室, 重庆 404120; 2. 大理大学 药学院, 云南 大理 671000)

[摘要] **目的:**研究添加外源性须根在自然腐解条件下对滇重楼生长发育和入药品质的影响。**方法:**通过室温盆栽试验,研究不同须根施用量自然腐解对滇重楼根系菌根侵染率、生理生化指标以及重楼皂苷含量的影响。**结果:**施加不同须根量自然腐解处理对滇重楼根系丛枝菌根(AM)真菌的侵染率无显著性影响,与侵染强度存在部分显著性差异;滇重楼叶片光合色素含量随须根施用量的增加显著降低,叶绿素总量最大降幅达78.7%;滇重楼叶片中可溶性蛋白、可溶性糖和丙二醛含量总体呈上升趋势,3种保护酶活性反应程度不同,过氧化物酶和丙二醛最大增幅达181.6%和200.0%;在滇重楼根系中上述6种成分含量有不同程度减少,过氧化物酶和丙二醛最大降幅达44.6%和69.7%;不同须根处理会降低滇重楼活性成分的含量,4种皂苷总含量降幅最大达58.9%,总皂苷含量最大降幅达46.9%。**结论:**须根自然腐解会影响滇重楼的根系土壤微生物环境、减少滇重楼叶片光合色素含量和破坏滇重楼细胞稳定性等,干扰滇重楼的生长发育,降低其药用成分含量,导致滇重楼发生连作障碍。

[关键词] 滇重楼; 须根腐解; 连作障碍; 侵染率; 生理生化; 活性成分

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)20-0138-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211218

[网络出版地址] https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210824.0904.001.html

[网络出版日期] 2021-08-24 14:26

Influences of Natural Fibrous Root Decay on Growth and Active Component Content of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*

ZHAO Shun-xin[1], WEI Zu-chen[1], LI Hai-ling[2], ZHAO Jing-jing[1], GUO Dong-qin[1*], ZHOU Nong[1*]

(1. *Chongqing Engineering Laboratory for Green Cultivation and Deep Processing of Three Gorges Reservoir Area's Medicinal Herbs*, *College of Food and Biological Engineering*, *Chongqing Three Gorges University*, *Chongqing* 404120, *China*; 2. *College of Pharmacy*, *Dali University*, *Dali* 671000, *China*)

[**Abstract**] **Objective:** To explore the effect of natural decay of exogenously added fibrous roots on the growth and development of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and its medicinal quality. **Method:** The effects of natural decay of fibrous roots at different amounts on mycorrhizal infection rate, physiological and biochemical indexes, and saponin contents of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* were studied in pot culture experiments at room temperature. **Result:** The results showed that the infection rate of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the root of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* was not significantly affected by different fibrous root treatments, but there were significant differences in infection intensity. The photosynthetic pigment content in the leaves declined significantly with the increase in fibrous root amount, and the total chlorophyll was decreased by 78.7% at most.

[收稿日期] 20210624(024)

[基金项目] 重庆市自然科学基金项目(cstc2018jcyjAX0267)

[第一作者] 赵顺鑫,在读硕士,从事药用植物栽培与环境微生物研究,E-mail:zsxin165@163. com

[通信作者] *郭冬琴,副教授,硕士生导师,从事药用植物栽培与微生物营养研究,E-mail:guodongqin1997@163. com;

*周浓,教授,硕士生导师,从事药用植物栽培与质量控制研究,Tel:023-58576130,E-mail:erhaizn@126. com

The contents of soluble protein, soluble sugar and malondialdehyde in the leaves of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* showed an overall upward trend. The activities of the three protective enzymes varied. The peroxidase and malondialdehyde were reduced by 181.6% and 200.0% at most. In the root system of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, the contents of the above-mentioned six components decreased to varying degrees, with the largest reductions of peroxidase and malondialdehyde reaching 44.6% and 69.7%. Different fibrous root treatments resulted in a decrease in active component content of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*. The total content of the four saponins was decreased by 58.9% at most, and the total saponin content by 46.9%. **Conclusion:** The natural decay of fibrous roots affects the soil microbial environment of root system, reduces the photosynthetic pigment content in leaves, and destroys the stability of cells, thus interfering with the growth and development of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*, reducing its medicinal components, and causing continuous cropping obstacles.

［**Keywords**］ *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*; fibrous root decay; continuous cropping obstacle; infection rate; physiological and biochemical; active components

滇重楼为百合科重楼属多年生药用草本植物，其根茎为入药部分，作为西南地区的道地药材，具有消肿止痛、清热解毒和凉肝定惊的功效[1-2]。研究发现滇重楼具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等药理作用，同时也是楼莲胶囊、云南白药、抗病毒颗粒等多种常用中成药的主要原料[3]。我国每年对滇重楼的需求量达上千吨，且随着中医药产业的快速发展这个数字以每年20%的幅度递增[4]，但滇重楼繁殖率一直较低，自然条件下其药用部位根状茎的生长十分缓慢，从种子到成品药材的周期达10年以上，滇重楼的这一特性使得其药材资源的匮乏限制了相关制药产业的发展。因此，大规模的人工栽培滇重楼已成为解决市场供需不平衡，实现滇重楼资源可持续利用和野生资源有效保护的必由之路。

连作对作物植株的形态、叶片的光合特性和活性氧代谢会产生一定地影响[5]，从而导致栽培作物出现产量降低、生长状况变差和品质下降的情况。大量的市场需求使得滇重楼人工种植不得不面对连作障碍这一中药材栽培过程中的常见问题。连作障碍不仅对中药材生长发育产生影响，还会加重土传病害以及根系分泌物和残茬腐解物引起的植株自毒作用，我国70%左右的人工栽培根茎类药材均存在连作障碍[6-7]。据报道，连作条件下残留的丹参须根自然腐解能够改变土壤理化性质、增加有机酸类、小分子醛和脂肪酸类等化感物质的含量，显著降低了丹参植株对土壤中营养元素的吸收和主要活性物质丹参酮的含量[8-10]；高浓度细辛根系腐解液会抑制小麦和黄瓜的种子萌发与幼苗生长，且会对作物体内的蛋白质和叶绿素含量及根系活力产生抑制作用[11]。大田栽培条件下，随着滇重楼种植年限的增加，其根际土壤中细菌和真菌受到不同程度的影响，从而使其土壤微生物类型由“细菌型”逐渐转化为“真菌型”，土壤肥力随着种植年限的增加从高肥力向低肥力转变，导致滇重楼药用品质下降幅度明显[12]。早期调查发现，随着生长年限的增加，滇重楼老根茎部位的须根会自然腐解，但须根腐解后产生的化学物质是否影响到滇重楼的生长发育和化学成分的含量，不可而知。为此，本研究采用室温盆栽实验，通过施加不同用量的滇重楼须根模拟自然腐解过程，探究其对四年生和五年生滇重楼植株根系侵染率、生理生化以及入药品质的影响，以期能为解决滇重楼连作障碍提供一定的理论依据。

1　材料

1.1　仪器　LC-20A型高效液相色谱仪，UV-2450型紫外-可见分光光度计(日本岛津集团)；BX-53F型荧光生物照相显微镜(日本奥林巴斯集团)；ZXFD-A5250型鼓风干燥箱(上海智城分析仪器制造有限公司)；ME204E型1/1万电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

1.2　试药　对照品薯蓣皂苷元，重楼皂苷Ⅰ，重楼皂苷Ⅱ，重楼皂苷Ⅵ，重楼皂苷Ⅶ(中国食品药品检定研究院，批号分别为111539-200001，111590-201103，111591-201103，111592-201203，111593-200402，纯度均≥98%)，乙腈(色谱纯，德国默克公司)；其他实验使用试剂均为分析纯，水均为去离子超纯水。

1.3　材料　用于深埋的滇重楼须根采自收获后滇重楼商品药材的废弃须根、用于盆栽的滇重楼四年生幼苗(2011年12月种子育苗)和五年生幼苗(2010

年12月种子育苗),均来自云南省大理州农业科学推广研究院种植基地,经重庆三峡学院生物与食品工程学院周浓教授鉴定为百合科重楼属植物云南重楼*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*。

2 方法

2.1 试验设计 2015年10月,采用室温盆栽方法,栽培基质采用未种植滇重楼的耕层土与河沙按体积比3∶1均匀混合后过2 mm筛所得的混合物。将滇重楼的须根洗净晾干,埋于4 cm深处的土壤中,试验用土量约4.375 kg/盆。参照刘伟等[8]实验方案,共设置6个处理:CK1,四年生滇重楼空白对照,不施加须根;S1,四年生滇重楼施加须根17.5 g;S2,四年生滇重楼施加须根35 g;CK2,五年生滇重楼空白对照,不施加须根;S3,五年生滇重楼施加17.5 g须根;S4,五年生滇重楼施加35 g须根。每个处理组均设置5次重复,每盆种植3株生长良好,状况接近的滇重楼。生长期间按滇重楼人工栽培常规种植管理。

2016年8月,选取滇重楼新鲜健康叶片,用于相关指标的测定。2016年11月,滇重楼倒苗后对其进行采收,用蒸馏水将收获的根茎洗净后,置于鼓风干燥箱中,35 ℃烘干样品至恒重,粉碎后过80目筛,封存备用,后续用于滇重楼品质测定分析;收取的须根采用文献[13]方法对其进行前处理,须根在冰水中洗净,剪切成1.0~1.5 cm的根段后浸没于FAA固定液(50%乙醇-冰乙酸-甲醛按体积比90∶5∶5配置而成),置于4 ℃冰箱内低温固定保存。

2.2 指标测定 采用张志良等[14]方法对滇重楼叶片光合色素的含量进行测定。超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的测定分别采用氮蓝四唑法、紫外分光光度法及愈创木酚显色法进行测定[15];参考邹琦[16]的方法对可溶性糖和丙二醛(MDA)含量进行测定,采用李合生[17]的方法对可溶性蛋白含量进行测定。从FAA固定液中随机选取30条滇重楼根段,采用GERDEMANN等[18]方法对其进行染色、制片、镜检,根据TROUVELOT等[19]方法统计AM真菌的侵染率和侵染强度。

2.3 重楼根茎的品质分析 利用超高效液相色谱对滇重楼根茎中4种重楼皂苷含量进行测定[20];参照杨骁等[21]方法测定滇重楼总皂苷含量。

2.4 数据分析 实验数据处理采用Microsoft Excel 2010进行,单因素方差分析运用SPSS 22.0软件。

3 结果与分析

3.1 须根腐解对滇重楼根系丛枝菌根(AM)真菌生态特征的影响 结果显示,滇重楼根系AM真菌的侵染率受不同施加量须根处理的影响不显著,AM真菌对滇重楼根系的侵染率为100%;而滇重楼根系AM真菌的侵染强度受不同施加量须根处理的影响不同,CK1处理组49.17%,S1处理组44.58%,S2处理组36.40%,而CK2处理组36.31%,S3处理组35.43%,S4处理组34.44%,部分呈明显水平差异($P<0.05$),滇重楼根系菌根的侵染强度均随须根施入量增加呈现下降的趋势。

3.2 须根腐解对滇重楼叶片光合色素含量的影响

由表1可知,不同须根处理对滇重楼叶片光合色素含量的影响部分呈明显水平差异($P<0.05$),与CK1和CK2组相比,不同须根处理的光合色素含量随须根施入量增加呈减少的趋势,其中叶绿素总量最大降幅达78.7%(S2)。相较于CK1,S1与S2的类胡萝卜素含量分别减少0.7%和53.1%,叶绿素b含量分别减少0.2%和74.4%,只有叶绿素a含量呈现先增加后降低的趋势,分别增加9.5%和减少80.1%;S3与S4处理较CK2,类胡萝卜素含量分别减少10.7%和49.4%,叶绿素a含量分别减少18.8%和51.9%,叶绿素b含量分别减少6.9%和48.6%。整体上来说,与CK1和CK2组相比,施加较少的须根(17.5 g)对滇重楼叶片的光合色素含量无显著影响,但施加过多的须根(35 g)将对滇重楼叶片的光合色素含量产生严重影响,从而影响叶片的光合作用强度,说明相同生存环境下施加须根处理会让滇重楼叶片的捕光能力呈现下降趋势。见表1。

3.3 须根腐解对滇重楼叶片及根系保护酶活性的影响 施加外源性须根处理对滇重楼叶片及根系中3种保护酶活性产生不同的影响,部分呈明显水平差异($P<0.05$)。与CK1组相比,S1与S2处理的滇重楼叶片中SOD和POD活性呈现先减弱后增强的趋势,但均低于CK1,SOD活性分别降低14.1%和12.6%,POD活性依次降低67.4%和11.8%,CAT活性随须根施入量增加呈现先增强后减弱的趋势,分别提升7.8%和减弱23.5%,根系中SOD活性呈现先增强后减弱的趋势,分别增加3.9%和降低25.2%,POD活性表现为先减弱后增强的趋势,但均低于CK1,分别减少44.6%和21.4%,CAT活性随须根施入量增加呈现减弱趋势,分别减少41.0%和48.4%;S3与S4处理组的滇重楼叶片中SOD活性均低于CK2,分别降低6.2%和5.4%,CAT和POD活性

表1 不同须根量自然腐解处理对滇重楼叶光合色素含量的影响($\bar{x}\pm s$, n=10)

Table 1 Effect of different decomposition fibrous root treatments on photosynthetic pigment content of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* leaves ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	类胡萝卜素/mg·g^{-1}	叶绿素a/mg·g^{-1}	叶绿素b/mg·g^{-1}	叶绿素总量/mg·g^{-1}	叶绿素a/b
CK1	135.486±0.669^{c}	1.395±0.008^{d}	0.429±0.002^{d}	1.824±0.010^{d}	3.262±0.006^{b}
S1	134.590±0.503^{c}	1.528±0.005^{c}	0.428±0.003^{c}	1.956±0.008^{c}	3.569±0.014^{a}
S2	63.481±0.815^{e}	0.278±0.006^{f}	0.110±0.011^{f}	0.389±0.017^{f}	2.540±0.218^{d}
CK2	208.818±0.815^{a}	2.352±0.009^{a}	0.681±0.002^{a}	3.032±0.011^{a}	3.454±0.007^{a}
S3	186.388±0.548^{b}	1.911±0.008^{b}	0.634±0.003^{b}	2.545±0.010^{b}	3.013±0.008^{c}
S4	105.721±0.486^{d}	1.131±0.005^{e}	0.350±0.004^{e}	1.481±0.009^{e}	3.230±0.026^{b}

注:同一列不同的小写字母代表P<0.05(表2~4同)。

随须根施入量增加呈现升高趋势,且均高于CK2,CAT活性分别增加30.6%和76.2%,POD活性分别增加181.6%和172.5%,根系中SOD活性表现为先增强后减弱的趋势,分别增加103.2%和降低27.0%,POD活性表现出升高的趋势,分别升高12.6%和90.2%,CAT活性随须根施入量增加而减弱,分别减少28.4%和15.0%。整体上来说,施入外源性滇重楼须根对其根系CAT活性降低幅度较大,其次是SOD和POD,但不同年份的滇重楼根系酶活性受须根自然腐解影响效果不尽相同,表明滇重楼根系酶活性对须根自然腐解反应敏感,外源性须根会对滇重楼根系保护酶活性产生的作用。见表2。

表2 不同须根量自然腐解处理对滇重楼叶及根系中SOD,POD和CAT活性的影响($\bar{x}\pm s$, n=10)

Table 2 Effect of different decomposition fibrous root treatments on activities of SOD, POD and CAT in leaves and roots of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* ($\bar{x}\pm s$, n=10)

U·g^{-1}

组别	SOD		POD		CAT	
	叶	根	叶	根	叶	根
CK1	988.0±0.176^{a}	381.2±0.387^{c}	9 891.2±0.133^{a}	2 264.2±0.450^{b}	349.1±0.492^{b}	152.2±0.311^{a}
S1	848.9±0.264^{b}	396.1±0.116^{e}	3 223.4±0.290^{e}	1 253.7±0.212^{f}	376.4±0.001^{a}	89.8±0.912^{b}
S2	863.7±0.588a^{b}	285.2±0.614^{d}	8 720.4±0.501^{c}	1 779.4±0.431^{e}	266.9±0.531^{c}	78.6±0.103^{bc}
CK2	970.7±0.474^{ab}	223.1±0.304^{f}	3 124.5±0.175^{f}	1 917.8±0.011^{d}	132.7±0.953^{f}	92.3±0.134^{b}
S3	910.8±0.259^{ab}	453.5±0.001^{a}	8 799.3±0.862^{b}	2 158.7±0.011^{c}	173.3±0.256^{e}	66.2±0.177^{c}
S4	918.7±0.176^{ab}	162.8±0.268^{b}	8 515.7±0.935^{d}	3 648.7±0.008^{a}	233.8±0.707^{d}	78.5±0.022^{bc}

3.4 须根腐解对滇重楼叶片及根系中MDA,可溶性糖,可溶性蛋白含量的影响　不同须根量自然腐解处理对滇重楼叶片及根系中MDA,可溶性糖和可溶性蛋白含量具有增强或抑制的调节作用,部分呈明显水平差异(P<0.05),见表3。与CK1组相比,S1与S2处理的滇重楼叶片中MDA含量随须根施入量增加而增加,分别增加200.0%和188.2%,可溶性糖和可溶性蛋白含量表现为先增加后减少的趋势,可溶性糖分别增加31.3%和减少8.3%,可溶性蛋白分别增加25.6%和降低6.6%,根系中MDA含量随须根施入量增加而减少,分别减少27.3%和22.7%,可溶性糖含量呈现先降低后增加的变化趋势,分别减少13.8%和增加33.8%,可溶性蛋白含量稍有增加;与CK2组相比,S3和S4处理的叶片中MDA含量呈逐渐增加的趋势,分别增加145.4%和84.8%,可溶性糖含量增多,分别增加28.1%和42.1%,可溶性蛋白含量呈先减少后增多的趋势,分别减少1.5%和增加16.1%,根系中MDA和可溶性糖含量均随须根施入量增加呈下降的变化趋势,其中MDA分别减少54.5%和69.7%,可溶性糖分别减少12.6%和49.0%,可溶性蛋白含量随须根施入量增加稍有下降。

3.5 不同须根量处理对滇重楼根茎中皂苷成分含量的影响　不同须根量自然腐解处理对滇重楼根茎中总皂苷含量及4种重楼皂苷的次生代谢过程均产生了影响。与对照组相比,须根处理的总皂苷含量均低于对照,且随须根施入量增加呈下降趋势,S1与S2处理的总皂苷含量较CK1分别减少17.4%和38.4%,S3与S4处理的总皂苷含量较CK2分别减少45.0%和46.9%;除17.5 g须根四年生处理(S1)和

表3 不同须根量自然腐解处理对滇重楼叶及根系中MDA,可溶性糖和可溶性蛋白含量的影响（$\bar{x}\pm s$,n=10）

Table 3 Effect of different decomposition fibrous root treatments on contents of MDA, soluble sugar and soluble protein in leaves and roots of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*（$\bar{x}\pm s$,n=10）

处理组	MDA/μmol·g^{-1}		可溶性糖/μmol·g^{-1}		可溶性蛋白/mg·g^{-1}	
	叶	根	叶	根	叶	根
CK1	0.017±0.013^{d}	0.022±0.008^{b}	3.450±0.285^{b}	0.833±0.029^{d}	2.583±0.093^{c}	2.194±0.012^{d}
S1	0.051±0.001^{bc}	0.016±0.003^{c}	4.529±0.050^{a}	0.718±0.001^{d}	3.245±0.054^{a}	2.262±0.008^{ab}
S2	0.049±0.003^{bc}	0.017±0.007^{b}	3.165±0.815^{b}	1.115±0.030^{c}	2.412±0.041^{d}	2.244±0.026^{bc}
CK2	0.033±0.001^{cd}	0.033±0.002^{a}	1.157±0.094^{c}	2.103±0.031^{a}	2.612±0.026^{c}	2.272±0.012^{a}
S3	0.081±0.002^{a}	0.015±0.002^{c}	1.482±0.054^{c}	1.839±0.069^{b}	2.572±0.013^{c}	2.222±0.004^{c}
S4	0.061±0.008^{ab}	0.010±0.002^{c}	1.644±0.110^{c}	1.072±0.100^{c}	3.032±0.040^{b}	2.228±0.003^{c}

五年生处理(S3)根茎中重楼皂苷Ⅶ含量高于CK1和CK2外,重楼皂苷Ⅰ,重楼皂苷Ⅱ,重楼皂苷Ⅵ,重楼皂苷Ⅶ含量及其总含量均远低于CK1和CK2,且随须根施入量增加呈现下降趋势,其中重楼皂苷Ⅰ减少最多达91.1%(S2),重楼皂苷Ⅱ减少最多达92.0%(S3),重楼皂苷Ⅵ减少最多达84.1%(S1),重楼皂苷Ⅶ减少最多达24.9%(S4),4种皂苷总含量降幅最大达58.9%。见表4。

表4 不同须根量自然腐解处理对滇重楼根茎中皂苷成分含量的影响（$\bar{x}\pm s$,n=10）

Table 4 Effect of different decomposition fibrous root treatments on content of saponin in rhizome of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*（$\bar{x}\pm s$,n=10） mg·g^{-1}

处理组	重楼皂苷Ⅰ	重楼皂苷Ⅱ	重楼皂苷Ⅵ	重楼皂苷Ⅶ	总皂苷
CK1	0.404±0.095^{a}	0.933±0.134^{a}	0.289±0.026^{a}	0.896±0.156^{ab}	7.816±0.148^{a}
S1	0.244±0.009^{abc}	0.787±0.010^{a}	0.046±0.004^{b}	1.029±0.039^{a}	5.825±0.692^{b}
S2	0.036±0.001^{c}	0.338±0.023^{b}	0.064±0.010^{b}	0.753±0.051^{b}	4.815±0.694^{b}
CK2	0.343±0.174^{ab}	0.828±0.146^{a}	0.095±0.038^{b}	0.666±0.093^{bc}	4.535±0.415^{b}
S3	0.124±0.060^{c}	0.066±0.014^{c}	0.083±0.028^{b}	1.051±0.060^{a}	2.494±0.188^{c}
S4	0.138±0.106^{bc}	0.068±0.012^{c}	0.088±0.024^{b}	0.500±0.055^{c}	2.409±0.070^{c}

4 讨论

据报道,AM真菌能与滇重楼植株根系形成具有互利关系的共生体,增强植株对营养物质的吸收,从而提高滇重楼药材的药用品质与产量[22-23]。与对照组相比,施加不同须根量自然腐解处理的滇重楼根系均能与AM真菌形成良好的共生关系,菌根侵染率无显著性差异,但菌根侵染强度随须根施加量增加呈现下降趋势,这说明滇重楼须根的自然腐解将会影响滇重楼幼苗的菌根活力,菌根活力的降低不利于滇重楼根系从土壤中吸收矿物质,造成植株长势变差,并且对土壤病原菌的抗性减弱,从而进一步影响其生长发育和入药品质。甾体皂苷类作为滇重楼主要有效成分具有消炎、抗肿瘤、止血、镇痛等药理活性[24]。2020年版《中华人民共和国药典》(一部)中重楼药材项下【含量测定】限定了重楼皂苷Ⅰ,Ⅱ,Ⅵ和Ⅶ总量不得少于0.60%[1]。施加不同须根量自然腐解处理会对滇重楼根茎中的重楼皂苷含量产生影响,滇重楼4种皂苷和总皂苷含量随着须根施用量的增加而减少,但均符合限量规定;相同处理对比,四年生滇重楼4种重楼皂苷含量及其总含量均高于五年生滇重楼,总皂苷含量也呈现出四年生高于五年生。研究结果与周浓等[12]对不同移栽年限滇重楼根茎品质分析的结果相似,这表明须根腐解会降低滇重楼药用品质,滇重楼连作障碍的形成可能也与之有关。

药用植物光合作用的强弱可由其叶片光合色素的含量反映,其在光能的吸收、转化和传递过程以及避免光氧化损害中扮演着重要的角色。谢敬宇[25]以人参为供试材料,发现人参根系腐解物产生的化感作用会加剧叶片膜质过氧化的程度,致使细胞膜结构受到破坏,叶绿素含量显著下降。高志华等[26]发现草莓根系分泌物所含自毒物质会使草莓叶片中的叶绿素含量降低,并且在同一时期,随着根系分泌物提取液浓度的增加其对草莓的不利影响效果在加强,通过这一现象,初步认为草莓根系腐解液是导致草莓发生连作障碍的原因之一。本

实验中,随着自然腐解须根施加量的增加,四年生和五年生滇重楼叶片中的叶绿素含量呈现逐步降低的状态,这与谢敬宇[25]在人参和高志华等[26]在草莓上的研究结果一致,说明滇重楼叶片内的叶绿素含量减少导致叶片的光合作用强度降低,从而抑制了滇重楼植株的生长。

对于绿色植物而言,叶片中的类胡萝卜素可以有效地吸收并转移光系统中过多的能量,类胡萝卜素含量降低会致使叶绿素分子遭受光氧化损伤,而光氧化损伤会引起叶片内的电解质渗漏率和膜脂过氧化产物MDA含量增加。可溶性糖和可溶性蛋白会影响植物体细胞膜的渗透调节,参与了植物细胞的新陈代谢,能有效提高植物的逆境生存能力[27],当两者含量较高时,植物的代谢活性也比较高[28]。人参根系腐解物产生的化感作用会加剧叶片细胞膜质过氧化的程度,致使细胞膜结构遭到破坏,细胞内溶物向膜外渗透,胞内渗透调节物质的含量明显增加[25];草莓根系分泌物会升高草莓叶片细胞膜的相对透性,增加MDA的含量,使其SOD活性降低,且在同一时期,随着根系分泌物提取液浓度的增加其对草莓的不利影响在逐渐增大[26]。本实验表明,施入外源性滇重楼须根自然腐解会使滇重楼叶片中可溶性蛋白,MDA和可溶性糖的含量增加;在滇重楼根系中会减少MDA和可溶性糖的含量,而可溶性蛋白含量与对照组相比较差别不大。由此可知,须根自然腐解导致滇重楼处于胁迫生长环境中,从而使滇重楼叶片细胞膜脂过氧化程度加剧,破坏了滇重楼叶片细胞膜系统的稳定性,降低了滇重楼叶片细胞的新陈代谢活性,从而抑制了滇重楼的生长发育,这也迫使滇重楼启动自我保护机制,叶片中活性物质含量增加,增强了滇重楼叶片活性,提高了滇重楼的抗逆能力,削弱了施入外源性须根自然腐解对滇重楼生长发育的影响;施入外源性滇重楼须根自然腐解使得滇重楼根系细胞膜脂过氧化程度降低,有助于加强滇重楼根系细胞膜系统的稳定性,增加了根系细胞的生理活性,促进了滇重楼的生长发育。总的来说,施入外源性须根对滇重楼叶片和根系MDA,可溶性糖和可溶性蛋白含量的敏感性不同。

CAT,POD和SOD是植物体内抗氧化抗逆系统的重要组成,能够削弱植物因受到外界胁迫诱导产生的活性氧的影响,从而减少超氧化自由基对植物细胞膜系统的损伤,保护细胞膜系统,以最大程度地减少植株本身受到伤害[29-30]。随着蔗草秸秆还田量的增加,小麦幼苗叶片内的SOD酶活性增强,而POD酶活性减弱[31];张学鹏等[32]研究发现,低浓度西兰花茎叶腐解液可以提高幼苗SOD和POD酶活性,高浓度腐解液会抑制幼苗SOD和POD酶活性。本实验中,不同须根处理对滇重楼叶片和根系内的3种保护酶有不同程度的影响,与对照组相比,须根自然腐解能增强滇重楼叶片CAT活性,降低根系CAT活性;滇重楼叶片和根系中的POD活性在四年生幼苗中受到抑制,而在五年生幼苗中促进其活性;须根自然腐解对滇重楼叶片中SOD的活性没有显著影响,但在根系处理中,17.5 g须根量显著增加SOD活性,35 g须根量减少SOD反应。说明须根自然腐解能提高滇重楼叶片清除过氧化自由基的能力,增加其根系有害物质活性氧的累积,提高滇重楼叶片对抗逆环境,而根系适应逆环境能力减弱。

综上所述,连作条件下残留的须根自然腐解会通过减少滇重楼叶片光合色素含量和破坏细胞稳定性等方法来干扰滇重楼的生长发育,并降低其药用成分重楼皂苷的含量,导致了滇重楼的连作障碍形成,且连作障碍效果随种植年限增加而增强;建议在滇重楼实际采收过程中采取深挖的采收方法,以避免须根残留在土壤中,一定程度上可以减少须根腐解造成滇重楼连作障碍的发生。本实验采用的是盆栽试验,具有一定的局限性,须根自然腐解对滇重楼生长发育与品质的影响仍需进行大田实验栽培以进一步验证本实验的结果。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:271-272.
[2] 王骞,丁媛,杨敏,等. 滇重楼品质与产地和表型性状相关性分析[J]. 中国中药杂志,2019,44(15):3203-3212.
[3] 金琳,马永军,戴雪雯,等. 滇重楼品质差异研究进展[J]. 中药材,2019,42(6):1448-1452.
[4] 杨丽英,杨斌,王馨,等. 滇重楼新品种选育研究进展[J]. 农学学报,2012,2(7):22-24,36.
[5] 侯慧,董坤,杨智仙,等. 连作障碍发生机理研究进展[J]. 土壤,2016,48(6):1068-1076.
[6] 陈玲,董坤,杨智仙,等. 连作障碍中化感自毒效应及间作缓解机理[J]. 中国农学通报,2017,33(8):91-98.
[7] 张冉. 西洋参土壤水提液对土壤微生物群落、养分和酶活性的影响[D]. 西安:陕西师范大学,2017.
[8] 刘伟,魏莹莹,孙鹏,等. 须根自然腐解对白花丹参生

长及其活性成分含量的影响[J]. 中国中药杂志,2015,40(13):2548-2552.
[9] 刘伟,吕海花,周洁,等. 须根腐解对丹参根际土壤基本理化性质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(7):42-45.
[10] 刘伟,魏莹莹,吕海花,等. 须根腐解对丹参根际土壤化感物质的影响[J]. 中药材,2016,39(10):2203-2206.
[11] 张秋菊,朱诗禹,张连学. 细辛根系浸提液和腐解液对小麦和黄瓜的化感效应[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2014,40(3):267-272.
[12] 周浓,戚文华,肖国生,等. 滇重楼根际微生物分布与甾体皂苷含量的相关性[J]. 中国中药杂志,2015,40(6):1055-1060.
[13] 潘兴娇,张杰,路风中,等. 重楼属植物根茎有效成分与菌根侵染率、土壤营养成分之间的相关性[J]. 中国药房,2016,27(22):3037-3040.
[14] 张志良,瞿伟菁,李小方. 植物生理学实验指导[M]. 4版. 北京:高等教育出版社,2009:58-82.
[15] 陈建勋,王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州:华南理工大学出版社,2002:45-46.
[16] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000:62-174.
[17] 李合生. 植物生理生化实验原理与技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000:169-184.
[18] GERDEMANN J W. Relation of a large soil-borne spore to phycomycetous mycorrhizal infections [J]. Mgcologia,1955,47(5):619-632.
[19] TROUVELOT A, KOUGH J L, GIANINAZZI P V. Mesure du taux de mycorhization VA d'un systeme radiculaire. Recherche de methodes d'estimation ayant une significantion fonctionnelle [M]. Paris: INRA Publications,1986:217-224.
[20] 谷文超,郭冬琴,杨敏,等. 超高效液相色谱法测定野生与栽培滇重楼根茎及须根中9种甾体皂苷的含量[J]. 中药新药与临床药理,2020,31(7):838-847.
[21] 杨骁,张振秋. 重楼中总皂苷的含量测定[J]. 中华中医药学刊,2007,25(11):2420-2422.
[22] 韦正鑫,郭冬琴,李海峰,等. AM真菌对滇重楼光合参数及生理指标的影响[J]. 中国中药杂志,2015,40(20):3945-3952.
[23] 朱芙蓉,周浓,杨敏,等. 不同丛枝菌根真菌对滇重楼幼苗根际土壤养分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(22):86-95.
[24] 巨博雅,朱厚达,李燕敏,等. 重楼药材和混伪品中5种皂苷的含量及对《中国药典》2015年版重楼含量测定修订的探讨[J]. 中国中药杂志,2020,45(8):1745-1755.
[25] 谢敬宇. 人参根系腐解物对人参和十字花科植物及其病原菌的化感作用[D]. 长春:吉林农业大学,2013.
[26] 高志华,张学英,葛会波,等. 草莓根系分泌物障碍效应的模拟研究[J]. 植物营养与肥料学报,2008,14(1):189-193.
[27] 张建,许锦鹏,蒋细旺. 养殖废弃物生物有机肥对辣椒抗寒性的影响[J]. 长江蔬菜,2015(6):48-53.
[28] 艾吉尔·阿不拉,李丕军,王文月. 4个造林树种缓苗期生理生化特性分析[J]. 广东农业科学,2017,44(3):80-86.
[29] 李晓曼,王建军. 丛枝菌根真菌对镍胁迫桂花幼苗光合作用及抗氧化酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(21):223-227.
[30] 赵宝泉,邢锦城,王静,等. 水杨酸对盐胁迫下杭白菊幼苗生长和生理特性的影响[J]. 吉林农业大学学报,2020,42(4):370-379.
[31] 陈遂中,杨德松. 薰草秸杆还田对小麦的化感作用[J]. 新疆农垦科技,2017,40(4):29-32.
[32] 张学鹏,宁堂原,张洁莹,等. 西兰花茎叶腐解液对不同蔬菜幼苗的化感效应[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2016,47(4):481-486.

[责任编辑 顾雪竹]