

· 药学基础 ·

## 地黄生长过程中根际土壤挥发性有机物与细菌群落特征分析

李伟峰<sup>1</sup>, 耿晓桐<sup>2</sup>, 龚海燕<sup>1</sup>, 王丰青<sup>3</sup>, 雷敬卫<sup>1</sup>, 谢彩侠<sup>1\*</sup>, 张重义<sup>4\*</sup>

(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, 郑州 450046;

2. 信阳农林学院, 河南 信阳 464000; 3. 河南农业大学, 郑州 450046;

4. 福建农林大学, 福州 350021)

**[摘要]** 目的:分析地黄生长过程中根际土壤挥发性有机物(VOCs)、细菌群落特征的变化,以及VOCs与细菌群落结构的关系,为地黄连作土壤形成过程中的特征评价及连作土壤微生物的调控研究奠定基础。方法:以地黄7月、8月、10月3个主要生长时期的根际土壤为研究对象,采用气相色谱-质谱法(GC-MS)测定根际土壤乙酸乙酯部位及二氯甲烷部位中VOCs的相对含量,运用高通量测序法测定其根际细菌群落结构特征,利用SPSS 24、SIMCA 14.1等分析3个时期根际土壤VOCs、细菌群落结构的差异性,筛选引起其差异的主要VOCs和标志性菌群,并分析VOCs与细菌群落结构的相关性。结果:地黄3个生长时期根际土壤不同部位中的VOCs存在差异,其中乙酸乙酯部位的VOCs差异物质有间苯二甲酸二辛酯、2-辛基-1-十二烷醇、对甲苯甲酸-2-乙基己酯,二氯甲烷部位的则包括间苯二甲酸二(2-乙基己基)酯、邻苯二甲酸二(2-丙基戊基)酯、对甲苯甲酸-2-乙基己基酯。地黄从苗期到块根膨大末期,其根际土壤中放线菌门、厚壁菌门和绿弯菌门等优势菌门的相对丰度逐渐降低,而且各生长时期的根际土壤均有可以表征自己特有的细菌群落。相关性分析表明,地黄根际土壤VOCs对根际细菌群落结构有影响,其中以酯类、醇类等成分对根际细菌群落结构的影响较大。结论:在地黄的生长过程中,根际土壤的特征表现为酯类和醇类等主要VOCs含量发生变化和主要有益菌群相对丰度的逐渐降低,而且根际土壤VOCs对细菌群落结构的塑造有一定作用。

**[关键词]** 地黄; 根际土壤; 气相色谱-质谱法(GC-MS); 细菌群落特征; 挥发性有机物; 高通量测序法; 连作障碍

**[中图分类号]** R22;R28;R931;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)22-0149-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220255 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220129.1525.017.html>

**[网络出版日期]** 2022-01-30 11:37

### Analysis of Characteristics of Volatile Organic Compounds and Bacterial Communities in Rhizosphere Soil During Growth of Rehmanniae Radix

LI Weifeng<sup>1</sup>, GENG Xiaotong<sup>2</sup>, GONG Haiyan<sup>1</sup>, WANG Fengqing<sup>3</sup>, LEI Jingwei<sup>1</sup>,

XIE Caixia<sup>1\*</sup>, ZHANG Zhongyi<sup>4\*</sup>

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

2. Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464000, China;

3. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China;

4. Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the changes of volatile organic compounds (VOCs) and bacterial

**[收稿日期]** 2021-11-22

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82073952,81872950)

**[第一作者]** 李伟峰,在读硕士,从事中药质量控制研究,E-mail:1954155131@qq.com

**[通信作者]** \* 谢彩侠,博士生导师,教授,从事中药质量控制研究,E-mail:nanyang.xcx@163.com;

\* 张重义,博士生导师,教授,从事中药资源可持续利用研究,Tel:0371-63555721,E-mail:zyzhang@fafu.edu.cn

community characteristics in rhizosphere soil during the growth of *Rehmanniae Radix*, as well as the relationship between VOCs and bacterial community structure, so as to lay the foundation for the evaluation of the characteristics of continuous cropping soil and the regulation of continuous cropping soil microorganisms. **Method:** The rhizosphere soil during the three main growth periods of *Rehmanniae Radix* in July, August and October was used as the research object. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to determine the relative contents of VOCs in ethyl acetate and dichloromethane parts in rhizosphere soil. The characteristics of rhizosphere bacterial community structure was determined by high-throughput sequencing, SPSS 24, SIMCA 14.1 and other software were used to analyze the differences of VOCs and bacterial community structure in rhizosphere soil of the three periods, and the main VOCs and iconic bacteria that caused the differences were screened, and the correlation between VOCs and bacterial community structure was analyzed. **Result:** There were differences in VOCs in different parts of rhizosphere soil during the three growth stages of *Rehmanniae Radix*. Among them, and the main VOCs that cause differences were dioctyl isophthalate, 2-octyl-1-dodecanol and 2-ethylhexyl *p*-toluic acid in the ethyl acetate part, and 1,3-benzenedicarboxylic acid, di(2-propylpentyl) phthalate and 2-ethylhexyl *p*-toluenecarboxylic acid in the dichloromethane part. From the seedling stage to the end of tuber enlargement of *Rehmanniae Radix*, the relative abundance of dominant bacteria such as Actinobacteria, Firmicutes and Chloroflexi in the rhizosphere soil was gradually decreased, and there were unique bacterial communities in rhizosphere soil of each growth stage. Correlation analysis showed that the VOCs in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* had an impact on the rhizosphere bacterial community structure, especially the components of esters and alcohols. **Conclusion:** During the growth of *Rehmanniae Radix*, the characteristics of rhizosphere soil are mainly manifested in the content changes of main VOCs such as esters and alcohols and the gradual decrease of the abundance of the main beneficial bacteria, and the VOCs in rhizosphere soil play a certain role in shaping the structure of bacterial community.

**[Keywords]** *Rehmanniae Radix*; rhizosphere soil; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); bacterial community characteristics; volatile organic compounds; high-throughput sequencing; continuous cropping obstacle

地黄为玄参科地黄属多年生草本植物,始载于《神农本草经》,道地产区为古怀庆府(河南焦作),主要含有环烯醚萜苷、苯乙醇苷、多糖与黄酮等化学成分,具有增强免疫力、调节血糖、抗氧化、抗肿瘤等药理作用<sup>[1]</sup>。地黄多以块根入药,临床应用广泛、需求量大,但其种植存在严重的连作障碍,一般一茬后需间隔8~15年才可再次种植<sup>[2-3]</sup>,严重制约道产区地黄种植业的发展。据报道,连作障碍的产生主要是“植物-土壤-微生物”系统内多种因素综合作用的结果<sup>[4-5]</sup>,土壤理化性质、微生物群落改变及化感自毒效应是导致药用植物连作障碍的三大因素<sup>[6]</sup>,其中由酚酸、萜类等物质产生的化感效应是造成地黄连作障碍的主要原因<sup>[7-8]</sup>。随着地黄种植年限的增加,根际土壤细菌种类大量减少,微生物群落特征较空白土壤趋于单一化,头茬与重茬土壤中的主导细菌群落存在差异<sup>[9]</sup>,因此,地黄连作障碍的产生可能是因为种植过程中化感物质的不断积累影响了根际土壤微生物群落特征,进而引起根

际土壤微生态不断恶化,最终形成连作土壤。地黄连作土壤是在该药材生长发育过程中逐渐形成的,地黄在头茬土壤上完成其生长发育过程后,生长的土壤就具备了连作土壤的特点,在此过程中伴随着土壤中化学成分、微生物群落等生态系统的不断改变,但目前关于头茬地黄生长过程中土壤化学成分及微生物群落结构的变化尚未见报道,连作土壤形成过程中的相应特征也不清楚,导致连作障碍的形成机制一直未能得到科学阐释。

地黄根际土壤中化学成分种类较多,一方面来源于根系分泌、植株腐解、淋溶等<sup>[10]</sup>,另一方面来源于动植物及微生物等多种代谢途径的产物。这些次生代谢产物是化感自毒物质,同时也是药用植物的有效成分<sup>[11]</sup>。挥发性有机物(VOCs)作为一种重要的信号物质,除了植物能释放外,微生物也能释放,VOCs能够直接或间接促进植物的生长发育<sup>[12-13]</sup>,也是植物化感物质的重要来源,但目前相关研究较少。本课题组前期研究发现7、8、10月份是

地黄生育期内根际土壤酚酸、总环烯醚萜苷等物质含量变化差异较大的时期,为了进一步分析头茬地黄这几个生长时期根际VOCs、根际细菌群落结构的系统变化特征及两者之间的联系,本实验选取道地产区不耐连作的85-5地黄为研究对象,利用气相色谱-质谱法(GC-MS)、高通量测序技术结合多元统计方法分析地黄生长过程中7、8、10月份3个时期根际土壤中VOCs和细菌群落结构的变化特征,筛选影响地黄根际细菌群落特征主要的VOCs,为地黄连作障碍化感物质的研究及缓解地黄连作障碍微生物菌肥的研发提供理论依据。

## 1 材料

700-7980A型气相色谱-质谱联用仪(美国安捷伦科技公司),NOVO G100型基因扩增仪(北京诺禾致源科技股份有限公司),ZHPL-200型立式振荡培养箱(天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司),101-3AB型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司),AL204型1/10万电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

琼脂糖凝胶、GeneJET胶回收试剂盒、Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒(Thermo Scientific公司,分别为16500500、K0692、4471252),水为无菌水,乙酸乙酯、二氯甲烷为色谱纯,其他试剂均为分析纯。以河南省温县武德镇亢村怀地黄种植基地的85-5地黄为研究对象,按照五点取样法随机选取5~10株长势一致的地黄植株,将其块根上附着的土壤仔细刮刷保存,作为根际土壤样品,每次采样重复3次。将部分土壤样品置通风处阴干,研磨后过40目筛,保存于干燥器中,用于GC-MS分析,另一部分置于-40℃保存,用于微生物测定。

## 2 方法与结果

### 2.1 地黄根际土壤VOCs的GC-MS分析

**2.1.1 供试品溶液的制备** 称取地黄根际土壤约20g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入乙酸乙酯25mL,30℃摇床处理1h,静置24h,超声处理1h(300W,40kHz),放冷,定性滤纸滤过,续滤液30℃浓缩至干,分别用乙酸乙酯定容至2mL量瓶中,过0.45μm微孔滤膜,即得乙酸乙酯部位供试品溶液;二氯甲烷部位供试品溶液制备所用试剂为二氯甲烷,其他制备工艺同乙酸乙酯部位。

**2.1.2 GC色谱条件** 乙酸乙酯部位:DB-5MS色谱柱(0.25mm×30m,0.10μm),进样口温度250℃,流速设定1.0mL·min<sup>-1</sup>,载气氦气(He)和氮气(N<sub>2</sub>,纯度99.999%),程序升温(50℃保持2min,以

10℃·min<sup>-1</sup>升温至130℃并保持4min,5℃·min<sup>-1</sup>升温至150℃并保持1min,以4℃·min<sup>-1</sup>升温至210℃并保持4min,以5℃·min<sup>-1</sup>升温至250℃并保持5min),进样量5μL,不分流。二氯甲烷部位:程序升温(50℃保持2min,以10℃·min<sup>-1</sup>升温至120℃并保持1min,以3℃·min<sup>-1</sup>升温至180℃并保持5min,3℃·min<sup>-1</sup>升温至220℃并保持1min,5℃·min<sup>-1</sup>升温至240℃并保持5min),进样量设定2μL,其他条件同乙酸乙酯部位。

**2.1.3 质谱条件** 电子轰击离子源(EI),电子能量70eV,离子源温度230℃,四级杆温度150℃,接口温度270℃,溶剂延迟时间9min,采集方式SCAN扫描,扫描范围*m/z* 40~450。

**2.1.4 数据处理** 利用Agilent MassHunter Qualitative Analysis(7890B)软件以峰面积比>0.001为标准对峰进行过滤,以色谱峰峰谷间连线为基线对峰进行积分,根据保留时间将峰进行对齐,采用内标归一化处理数据。使用面积归一化法计算地黄根际土壤乙酸乙酯部位、二氯甲烷部位中VOCs的总离子流图,各成分通过系统MS谱库检索、人工图谱解析、文献核对等方法进行综合分析鉴定。

### 2.2 地黄根际土壤细菌群落的高通量测序

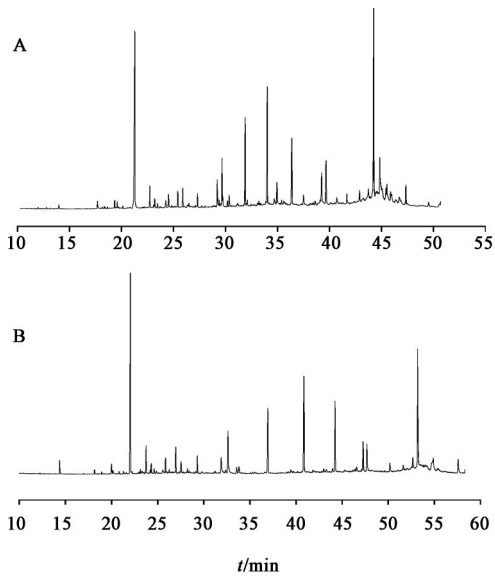
**2.2.1 基因组DNA提取和聚合酶链式反应(PCR)扩增** 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法对样本的基因组DNA进行提取,并利用琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度;取适量的DNA样本于离心管中,用无菌水稀释至1mg·L<sup>-1</sup>。以稀释后的基因组DNA为模板,根据测序区域的选择,使用特异引物515F(5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')和引物806R(5'-GACTACHVGGGTWTCTAAT-3')对16S rRNA基因的V4高变区片段进行扩增,528F(5'-GCCTCCCTCGCCATCAG-GCGGTAATTCCAGCTCAA-3')和706R(5'-GCCTTGCCAGCCCTCAG-AATCCRAGAATTTACCTCT-3')对18S rRNA基因的V4高变区片段进行PCR扩增,PCR产物利用2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,对目的条带产物进行回收和纯化;回收和纯化产物利用建库试剂盒进行文库的构建,构建好的文库经过Qubit定量和文库检测合格后,利用Ion S5™ XL进行上机测序。

**2.2.2 生物信息处理** 根据条形码序列和PCR扩增引物序列,从下机数据中拆分出各样品数据,截去条形码引物序列后进行去除嵌合体序列的处理,得到最终有效数据,进行操作分类单元(OTUs)聚类分析、物种注释分析、Alpha多样性分析、LEfSe分析

等,利用SPSS 24对地黄根际细菌群落丰度与根际土壤VOCs进行相关性分析。

### 2.3 地黄根际土壤VOCs的GC-MS特征分析

**2.3.1 地黄根际土壤不同部位中VOCs的检测** 利用GC-MS从乙酸乙酯部位检测到了56个VOCs,包括酯类成分18个,烷烃类成分11个,醇类成分8个,酰胺类成分3个,硫醇类、呋喃类、炔烃类、酮类成分各2个,醌类、酚类、酸类、醛类、酸酐类、吡喃类、环烃类、烯烃类成分各1个,具体化合物信息见增强出版附加材料。从二氯甲烷部位中检测到了50个VOCs成分,包括烷烃类、酯类成分各13个,醇类成分8个,嘧啶类、酮类成分各3个,硫醇类、酰胺类成分各2个,烯烃类、炔烃类、酚类、腈类、醛类、呋喃类成分各1个,具体化合物信息见增强出版附加材料。GC-MS色谱图见图1。



注:A.乙酸乙酯部位;B.二氯甲烷部位  
图1 地黄根际土壤不同部位中VOCs的GC-MS  
Fig. 1 GC-MS of VOCs in different parts in Rehmanniae Radix rhizosphere soil

**2.3.2 主要VOCs相对含量的特征分析** 根据地黄3个时期根际土壤中不同种类VOCs的相对含量,对其VOCs含量特征进行分析,结果发现2个部位中相对含量较高的VOCs均涉及酯类、烷烃、醇类和酮类等,但这几类成分在地黄3个时期根际土壤中的相对含量存在差异,其中7月样品中酯类成分的相对含量较高,8月样品中醇类和酮类等成分的相对含量较高,而10月样品中烷烃类成分的相对含量则较高,见图2。另外,酰胺类是乙酸乙酯部位中的相对含量较高的一类成分,而且其在8月样品中的相对含量明显高于其他2个月份。

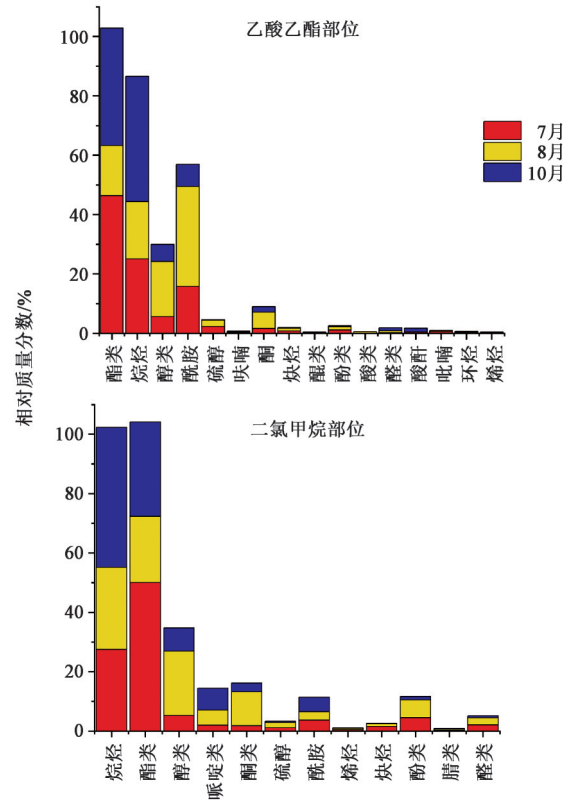


图2 地黄3个生长时期根际土壤中不同种类VOCs的相对质量分数  
Fig. 2 Relative contents of different kinds of VOCs in rhizosphere soil of Rehmanniae Radix during three growth periods

**2.3.3 VOCs特征的主成分分析(PCA)** 为了分析地黄3个时期根际土壤乙酸乙酯部位及二氯甲烷部位中的VOCs整体特征,利用SIMCA 14.1软件分别对乙酸乙酯部位与二氯甲烷部位各时期VOCs归一化后的数据进行降维分析,剔除异常样本,建立无样本监督的PCA模型,得分图见增强出版附加材料。结果乙酸乙酯部位筛选出了3个主成分(PC),PC1~PC3的贡献率分别为68.7%、19.4%、8.64%,累计贡献率96.7%,三者荷载依次为38.472、10.864、4.838;二氯甲烷部位共筛选出3个PC,PC1~PC3的贡献率分别为80.3%、9.62%、4.67%,累计贡献率94.6%,三者荷载依次为40.15、4.81、2.335。说明所有样品均位于置信区间内,3个时期根际土壤中乙酸乙酯部位、二氯甲烷部位VOCs的特征均按照7月、8月、10月3个时期各自聚为一类,但同一时期的3个样本间也存在一定差异。

**2.3.4 根际土壤VOCs特征的偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)** 为了排除同一时期不同样品组内差异对同一时期不同样品组间差异的干扰,进一步对地黄根际土壤不同部位VOCs的特征进行PLS-DA,得分图见增强出版附加材料。结果发现3个时期样本

差异明显,各自分布在不同的空间。为避免建立的PLS-DA模型出现过度拟合而影响分析结果的准确性,进行200次置换检验,结果表明所建模型可靠,未出现过度拟合现象。

**2.3.5 地黄3个生长时期根际土壤中潜在差异VOCs的筛选** 为分析引起地黄VOCs差异的主要物质,利用建立的PLS-DA模型筛选3个时期变量投影重要性(VIP)值>1的成分,并进行t检验计算其P,选择VIP值>1且P<0.05的物质作为潜在的差异成分,部分成分的VIP值见增强出版附加材料。结果发现地黄根际土壤的乙酸乙酯部位VOCs在PLS-DA模型中共得到13个VIP值>1的成分,其中3个成分在3个时期之间的差异达到显著水平,包括2个酯类成分、1个醇类成分;二氯甲烷部位共得到12个VIP值>1的成分,其中3个成分在3个时期的差异达到显著水平,均为酯类成分,见表1。

表1 地黄3个生长时期根际土壤不同部位中VOCs差异物质筛选  
Table 1 Screening of VOCs differential substances in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* at three growth stages

部位	差异物质	VIP值	P		
			A	B	C
乙酸乙酯	间苯二甲酸二辛酯	3.334 4	0.019 4	0.016 0	0.000 1
	2-辛基-1-十二烷醇	2.749 3	0.001 3	0.001 6	0.048 4
	对甲苯甲酸-2-乙基己酯	1.073 5	0.035 5	0.009 3	0.013 3
二氯甲烷	间苯二甲酸二(2-乙基己基)酯	2.970 3	0.000 4	0.000 1	0.000 0
	邻苯二甲酸二(2-丙基戊基)酯	1.532 8	0.018 8	0.003 2	0.000 2
	对甲苯甲酸-2-乙基己酯	1.235 6	0.000 0	0.000 0	0.000 0

注:A.7月样品与8月样品比较;B.7月样品与10月样品比较;C.8月样品与10月样品比较(表3同)

**2.4 地黄3个生长时期根际土壤的细菌群落特征分析**

**2.4.1 细菌群落测序数据分析** 基于 Ion S5™ XL 测序平台,利用单端测序(Single-end)方法,构建小片段文库进行单端测序。通过对reads剪切过滤,平均每个样品测得83 117条reads,经过质控平均得到78 997条有效数据,质控有效率达95.0%。

**2.4.2 细菌群落OTUs水平分析** 经数据前处理,以97%的一致性(identity)将序列聚类为OTUs,通过与数据库Silva 132比对,进行物种注释,并对不同分类层级进行统计,结果表明10 004个OTUs可以注释到数据库Silva 132(100.00%),其中注释到

界水平比例100.00%,门水平比例85.21%,纲水平比例73.63%,目水平比例60.51%,科水平比例49.84%,属水平比例28.41%。

**2.4.3 细菌群落稀释曲线分析** 从地黄3个生长时期根际土壤样品中细菌群落的稀释曲线可以看出,随着测序数量的增加,所得到的OTUs数量增加,曲线的斜率逐渐减小直至平坦,样品所得序列的覆盖度均达到90%,说明本研究的测序量合理,可以反映样品中细菌群落的种类和结构,见图3。

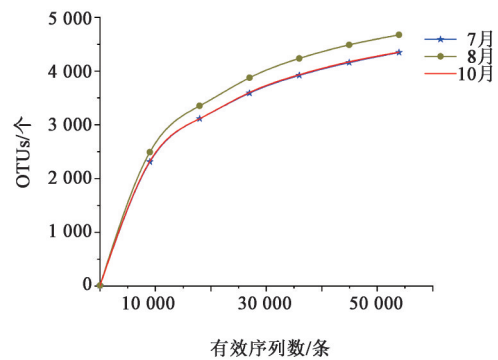


图3 地黄3个生长时期根际土壤中细菌群落稀释曲线  
Fig. 3 Dilution curve of bacterial community in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* during three growth periods

**2.4.4 细菌群落Alpha多样性分析** 由Alpha多样性指数结果可知,3个生长时期地黄根际土壤样品具有较高的细菌群落多样性,且其根际微生物样品的覆盖率均>98%,表明测序读长可以进行此项分析,见表2。Chao1指数和ACE指数主要是判断菌群丰度的指标,Chao1指数和ACE指数越大,微生物群落OTUs数目越多;Shannon指数是估算样品中微生物多样性的指标之一,其值越大,说明群落多样性越高。对85-5地黄根际土壤3个时期样品的细菌群落多样性Chao1指数、ACE指数和Shannon指数取平均值,结果发现Chao1指数表现为7月>8月>10月,ACE指数则表现为8月>7月>10月,说明8月份根际微生物OTUs数目较多;Shannon指数表现为8月>10月>7月,说明8月份样品多样性最高。

**2.4.5 细菌群落结构的变化规律** 根据物种注释结果,分别从门和属2个分类水平上,按照丰度水平,选择丰度较高的前10个优势细菌,并且将其他非优势细菌物种合并称为Others,分析地黄根际土壤细菌群落的变化特征。门水平上丰度排名前10位的分别为变形菌门、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;在属水平上丰度排名前10位的分别为不明梭菌属、嗜酸栖热菌属、片球菌属、不

表2 地黄3个生长时期根际土壤样品的细菌群落多样性指数  
Table 2 Diversity index of bacterial community in rhizosphere soil samples of *Rehmanniae Radix* during three growth periods

样品	编号	Shannon 指数	Chao1 指数	ACE 指数	Goods-coverage 指数
7月样品	1	10.385	4 094.133	4 093.339	0.991
	2	10.418	5 194.091	5 294.227	0.981
	3	10.218	9 097.494	6 142.699	0.971
	4	10.155	4 871.642	5 009.526	0.982
	5	10.376	5 137.844	5 223.206	0.982
8月样品	1	10.656	5 305.599	5 372.442	0.982
	2	10.639	5 326.116	5 469.248	0.981
	3	10.659	5 284.294	5 414.636	0.982
	4	10.652	5 169.854	5 294.941	0.983
	5	10.606	5 068.858	5 222.187	0.983
10月样品	1	10.474	5 319.227	5 416.912	0.981
	2	10.274	4 881.379	5 005.663	0.982
	3	10.460	4 789.424	4 896.023	0.985
	4	10.307	4 747.323	4 854.588	0.984
	5	10.230	4 771.901	4 888.634	0.983

明蓝细菌属、不明酸性细菌属、*g-Gaiellales*、乳酸杆菌属、芽孢杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、赭黄嗜盐囊菌属。为了进一步分析地黄不同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值进行比较,见图4,结果发现随着地黄的生长发育,从门水平上看,放线菌门、厚壁菌门、绿弯菌门相对丰度逐渐降低,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;从属水平上看,不明酸性细菌属相对丰度逐渐增加,芽孢杆菌属相对丰度逐渐降低;3个

时期两水平下的优势细菌差异显著性 *t* 检验结果表明,各时期各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,检验结果见表3。

**2.4.6 细菌群落特征的PCA** PCA结果显示,共筛选出13个主成分,累计方差贡献率95.4%,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月、8月、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,PCA得分图见增强出版附加材料。

**2.4.7 细菌群落特征的LEfSe分析** 为了探讨引起3个时期85-5地黄根际土壤细菌群落差异的细菌标志物,利用LEfSe对不同时期地黄根际土壤细菌群落的线性判别分析(LDA)值及微生物进化分支图进行分析。结果表明3个时期地黄根际土壤中细菌群落特征的LDA值分布及进化分支特征存在一定差异。若以LDA值>4为筛选标准,3个生长时期地黄根际土壤之间无共有的细菌群落。其中,亚硝基球藻目、*g-Gaiellales*、诺卡菌科、微球菌目、杆菌目等是7月份特有的差异显著物种,吡喃单胞菌科、不明酸杆菌科、类杆菌目等是8月份特有的差异显著物种,鞘脂单胞菌科是10月份特有的差异显著物种。

**2.5 地黄根际土壤细菌相对丰度与VOCs的相关性分析** 为探讨地黄根际土壤中VOCs对根际土壤细菌群落结构的影响,利用SPSS 24从门水平和属水平上对根际土壤细菌群落的物种丰度与VOCs相对含量进行相关性分析,结果表明无论从门水平还是属水平上看,85-5地黄根际土壤中乙酸乙酯和二氯甲烷2个部位中VOCs对细菌群落的物种丰度均有影响,其中以酯类、醇类成分的影响程度较大,见

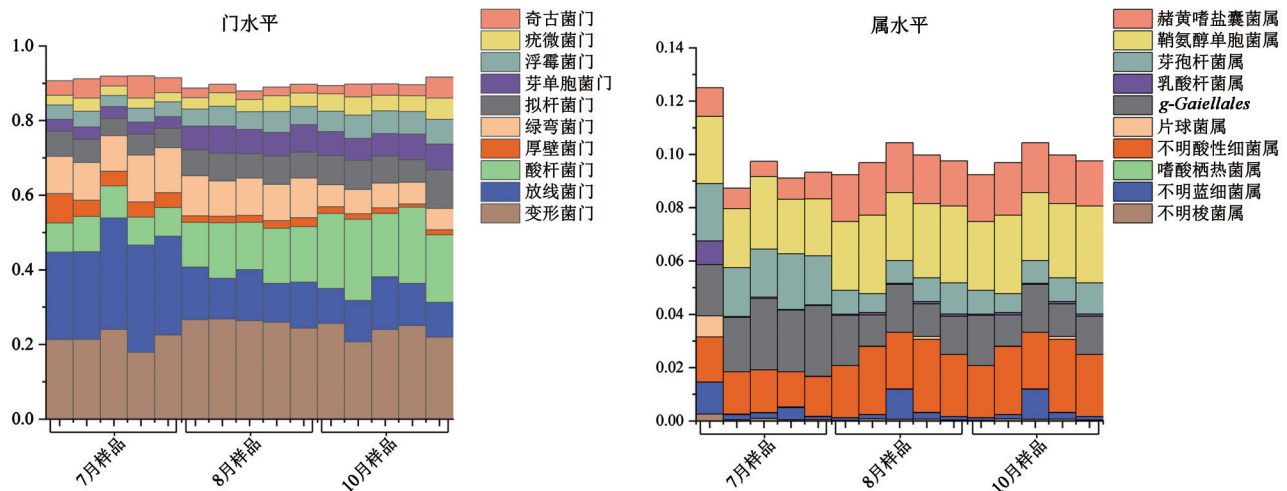


图4 门和属水平上地黄3个生长时期根际土壤中细菌物种的相对丰度

Fig. 4 Abundance of bacterial species in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* during three growth periods at levels of phylum and genus

表3 门和属水平上地黄3个生长时期根际土壤中优势细菌差异性t检验

Table 3 Test t for difference of dominant bacteria in rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix* during three growth periods at different levels

水平	种类	A	B	C	水平	种类	A	B	C
门	变形菌门	0.016	0.271	0.053	属	不明梭菌属	0.431	0.203	0.690
	放线菌门	0.001	0.000	0.330		不明蓝细菌属	0.798	0.519	0.270
	酸杆菌门	0.001	0.000	0.003		嗜酸栖热菌属	0.136	0.631	0.338
	厚壁菌门	0.025	0.007	0.074		不明酸性细菌属	0.015	0.001	0.003
	绿弯菌门	0.300	0.003	0.001		片球菌属	0.446	0.427	0.907
	拟杆菌门	0.012	0.056	0.404		<i>g-Gaiellales</i>	0.016	0.002	0.057
	芽单胞菌门	0.000	0.000	0.417		乳酸杆菌属	0.495	0.422	0.883
	浮霉菌门	0.004	0.001	0.009		芽孢杆菌属	0.001	0.000	0.043
	疣微菌门	0.041	0.004	0.030		鞘氨醇单胞菌属	0.097	0.000	0.000
	奇古菌门	0.029	0.354	0.144		赭黄嗜盐囊菌属	0.001	0.610	0.000

表4-表7。结果发现地黄根际土壤2个部位中VOCs在门水平上对酸杆菌门、绿弯菌门、浮霉菌门及疣微菌门影响较大,属水平上对不明蓝细菌属、不明酸性细菌属、鞘氨醇单胞菌属影响较大。

表4 地黄根际土壤乙酸乙酯部位VOCs与门水平细菌群落特征的相关性分析

Table 4 Correlation analysis between VOCs and bacterial community characteristics at phylum level in ethyl acetate part of rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix*

化合物	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
$\beta$ -石竹烯	-0.421	0.890	-1.000 <sup>1)</sup>	0.925	0.939	-0.977	-0.812	-0.997 <sup>1)</sup>	-0.995	0.427
2,5-二叔丁基-1,4-苯醌	-0.080	0.677	-0.930	0.735	1.000 <sup>2)</sup>	-0.844	-0.559	-0.909	-0.969	0.087
异恶唑烷-3,5-二甲酯	0.468	-0.913	1.000 <sup>1)</sup>	-0.943	-0.920	0.987	0.841	1.000 <sup>1)</sup>	0.988	-0.474
峰9	0.742	-0.997 <sup>1)</sup>	0.929	-1.000 <sup>2)</sup>	-0.731	0.982	0.975	0.948	0.875	-0.746
2-亚甲基5 $\alpha$ -胆甾烷-3 $\beta$ -醇	0.026	-0.636	0.909	-0.698	-0.998 <sup>1)</sup>	0.813	0.513	0.885	0.954	-0.033
油酸酰胺	-0.014	0.627	-0.904	0.689	0.998 <sup>1)</sup>	-0.806	-0.502	-0.879	-0.950	0.021
邻苯二甲酸二(2-丙基戊基)酯	-0.999 <sup>1)</sup>	0.758	-0.398	0.702	0.037	-0.565	-0.848	-0.447	-0.280	0.999 <sup>1)</sup>
十六硫醇	-0.035	0.643	-0.913	0.704	0.999 <sup>1)</sup>	-0.819	-0.521	-0.889	-0.957	0.042
4-甲氧基-3-[(2-硝基苯氧基)甲基]苯甲醛	0.439	-0.899	1.000 <sup>2)</sup>	-0.932	-0.932	0.981	0.823	0.998 <sup>1)</sup>	0.992	-0.445
峰44	-0.306	0.828	-0.989	0.871	0.974	-0.944	-0.734	-0.980	-1.000 <sup>1)</sup>	0.313
峰45	-0.725	0.147	0.298	0.066	-0.625	0.112	-0.295	0.246	0.415	0.721
11,14-二十碳二烯酸甲酯	-0.354	0.855	-0.995	0.894	0.962	-0.959	-0.767	-0.989	-1.000 <sup>1)</sup>	0.360
峰56	0.615	-0.970	0.979	-0.987	-0.838	1.000 <sup>2)</sup>	0.922	0.989	0.946	-0.620

注:<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ (表5-表7同)

### 3 讨论

VOCs是学术界高度关注的一类特殊的信号物质,许多研究发现,根际微生物可以通过释放VOCs显著影响植物生长<sup>[14-16]</sup>,而植物也可以通过释放VOCs来抑制土壤病原菌生长或招募更多的有益微生物以抵御病虫害的侵染。本研究结果表明地黄根际土壤VOCs主要以酯类、烷烃类和醇类成分为主,但3个主要生长时期VOCs各成分的含量存在差异,进一步筛选后发现酯类成分可能是引起

根际土壤VOCs变化的潜在差异成分,其中差异成分间苯二甲酸二辛酯等被鉴定为植物化感自毒物质<sup>[17]</sup>。7月份是地黄连作障碍效应产生的起始期和敏感期<sup>[2]</sup>,而本研究结果发现这一时期根际土壤中酯类成分的相对含量较高,但二者之间是否存在一定相关性尚需进一步研究确认。

根际是根-土壤-微生物相互作用的热区,在根际各个因素的相互作用过程中,微生物受到各种生物或非生物因素的调控,进而形成具有特定结构与

表5 地黄根际土壤乙酸乙酯部位VOCs与属水平细菌群落特征的相关性分析

Table 5 Correlation analysis between VOCs and bacterial community characteristics at genus level in ethyl acetate part of rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix*

化合物	不明梭菌属	不明蓝细菌属	嗜酸栖热菌属	不明酸性细菌属	片球菌属	<i>g-Gaiellales</i>	乳酸杆菌属	芽孢杆菌属	鞘氨醇单胞菌属	赭黄嗜盐囊菌属
β-石竹烯	0.929	1.000 <sup>2)</sup>	0.388	-1.000 <sup>2)</sup>	0.867	0.987	0.870	0.955	0.692	0.065
异恶唑烷-3,5-二甲酯	-0.947	-0.998 <sup>1)</sup>	-0.436	0.999 <sup>2)</sup>	-0.892	-0.994	-0.895	-0.969	-0.653	-0.013
峰8	-0.517	-0.799	0.247	0.791	-0.390	-0.688	-0.395	-0.581	-0.988	-0.655
峰9	-1.000 <sup>1)</sup>	-0.919	-0.717	0.924	-0.993	-0.972	-0.993	-0.995	-0.356	0.329
峰11	0.422	0.730	-0.350	-0.721	0.290	0.606	0.295	0.491	0.999 <sup>1)</sup>	0.732
三氯乙酸十四烷基酯	0.242	-0.139	0.861	0.126	0.376	0.028	0.371	0.165	-0.809	-0.998 <sup>1)</sup>
2,6,10-三甲基十二烷	0.288	-0.091	0.884	0.077	0.421	0.077	0.416	0.213	-0.779	-1.000 <sup>1)</sup>
油酸	-0.297	0.082	-0.889	-0.068	-0.429	-0.086	-0.424	-0.222	0.773	1.000 <sup>2)</sup>
对甲氧基肉桂酸辛酯	0.317	0.649	-0.453	-0.639	0.180	0.513	0.185	0.390	0.998 <sup>1)</sup>	0.804
十二烷基琥珀酸酐	-0.428	-0.735	0.344	0.726	-0.296	-0.611	-0.301	-0.497	-0.998 <sup>1)</sup>	-0.728
邻苯二甲酸二(2-丙基戊基)酯	0.694	0.375	1.000 <sup>2)</sup>	-0.387	0.789	0.524	0.786	0.636	-0.406	-0.899
十六硫醇	0.712	0.923	-0.001	-0.918	0.605	0.846	0.610	0.764	0.918	0.448
4-甲氧基-3-[(2-硝基苯氧基)甲基]苯甲醛	-0.936	-1.000 <sup>1)</sup>	-0.406	1.000	-0.877	-0.990	-0.879	-0.960	-0.678	-0.046
11,14-二十碳二烯酸甲酯	0.899	0.998 <sup>1)</sup>	0.319	-0.997	0.828	0.972	0.831	0.930	0.743	0.138
峰56	-0.988	-0.973	-0.586	0.976	-0.957	-0.998	-0.959	-0.997 <sup>1)</sup>	-0.512	0.161

表6 地黄根际土壤二氯甲烷部位VOCs与门水平细菌群落特征的相关性分析

Table 6 Correlation analysis between VOCs and bacterial community characteristics at phylum level in dichloromethane part of rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix*

化合物	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
Z-1-氯-1-烯-3-丁炔	-0.383	0.871	-0.998 <sup>1)</sup>	0.908	0.953	-0.968	-0.787	-0.993	-0.998 <sup>1)</sup>	0.389
二氯甲烷	-0.104	0.694	-0.938	0.751	1.000 <sup>1)</sup>	-0.856	-0.578	-0.918	-0.974	0.110
5-羟基-3,3,4,4-四甲基-二氢呋喃-2-酮	-0.443	0.901 <sup>1)</sup>	-1.000	0.934	0.931	-0.982	-0.826	-0.999 <sup>1)</sup>	-0.992	0.449
五氯苯甲腈	0.997	-0.833	0.509	-0.785 <sup>1)</sup>	-0.162	0.663	0.907	0.555	0.397	-0.997 <sup>1)</sup>
叶绿醇	0.660	-0.983	0.965	-0.995	-0.804	0.997 <sup>1)</sup>	0.944	0.978	0.925	-0.665
2,6,10-三甲基十四烷	-0.317	0.834	-0.991 <sup>2)</sup>	0.876	0.972	-0.948	-0.741	-0.982	-1.000 <sup>2)</sup>	0.323
棕榈酸甲酯	-0.390	0.874	-0.998 <sup>1)</sup>	0.911	0.95	-0.970	-0.791	-0.994	-0.998 <sup>1)</sup>	0.396
N-(4-溴丁-1-基)哌啶-2-酮	0.262	-0.801	0.982 <sup>1)</sup>	-0.848	-0.984	0.928	0.702	0.970	0.998 <sup>1)</sup>	-0.269
9,10-环氧硬脂酸甲酯	-0.551	0.948 <sup>1)</sup>	-0.992	0.971	0.878	-0.998 <sup>1)</sup>	-0.889	-0.997 <sup>1)</sup>	-0.968	0.556
8,8-二戊基十七烷	0.014	-0.627	0.904	-0.689	-0.998 <sup>1)</sup>	0.806	0.502	0.879	0.95	-0.021
2-甲基-二十三烷	0.114	-0.702	0.942	-0.758	-1.000 <sup>1)</sup>	0.861	0.586	0.922	0.977	-0.120
N-(2-溴-2-丙烯基)-N-丁基乙酰胺	0.021	-0.633	0.907	-0.694	-0.998 <sup>1)</sup>	0.810	0.509	0.883	0.953	-0.028
N-(4-溴-正丁基)-哌啶-2-酮	0.358	-0.857	0.996 <sup>1)</sup>	-0.897	-0.960	0.961	0.770	0.990	0.999 <sup>1)</sup>	-0.365
异十六醇	0.262	-0.801	0.982	-0.848	-0.984	0.928	0.702	0.970	0.998 <sup>1)</sup>	-0.269

功能的根际微生物群落<sup>[18]</sup>。本研究发现在7—10月,随着地黄从苗期到块根膨大末期,其根际土壤细菌群落结构发生变化,其中放线菌门、厚壁菌门和绿弯菌门等优势菌门的相对丰度逐渐降低,酸杆菌门的相对丰度逐渐增加,而且各发育时期的根

际土壤均有可以表征自己特有的细菌群落。放线菌是广泛分布于土壤中的优势微生物类群,对土壤有机物的矿化和保护植物有着重要作用<sup>[19]</sup>。据报道,番茄根际土壤中厚壁菌和放线菌丰度的破坏导致其青枯病的发生<sup>[20]</sup>,而芽孢杆菌属于厚壁菌门,

表7 地黄根际土壤二氯甲烷部位VOCs与属水平细菌群落特征的相关性分析

Table 7 Correlation analysis between VOCs and bacterial community characteristics at genus level in dichloromethane part of rhizosphere soil of *Rehmanniae Radix*

化合物	不明梭菌属	不明蓝细菌属	嗜酸栖热菌属	不明酸性细菌属	片球菌属	<i>g-Gaiellales</i>	乳酸杆菌属	芽孢杆菌属	鞘氨醇单胞菌属	赭黄嗜盐囊菌属
Z-1-氯-1-烯-3-丁炔	0.913	0.999 <sup>1)</sup>	0.349	-0.999 <sup>1)</sup>	0.846	0.979	0.849	0.942	0.722	0.107
2,4-二叔丁基苯酚	0.394	0.709	-0.378	-0.699	0.260	0.581	0.265	0.464	1.000 <sup>1)</sup>	0.753
5-羟基-3,3,4,4-四甲基-二氢呋喃-2-酮	0.938	1.000 <sup>1)</sup>	0.411	-1.000 <sup>2)</sup>	0.879	0.990	0.882	0.962	0.674	0.041
苯甲酸乙基己酯	-0.416	-0.726	0.355	0.717	-0.284	-0.601	-0.289	-0.486	-0.999 <sup>1)</sup>	-0.736
2-壬酮	-0.333	0.044	-0.905	-0.031	-0.463	-0.123	-0.458	-0.258	0.749	1.000 <sup>1)</sup>
2-甲基十八烷	0.999 <sup>1)</sup>	0.908	0.736	-0.914	0.996	0.965	0.996	0.992	0.330	-0.355
对甲苯甲酸-2-乙基己基酯	0.302	-0.076	0.891	0.063	0.434	0.091	0.429	0.227	-0.770	-1.000 <sup>2)</sup>
叶绿醇	-0.996	-0.958	-0.632	0.962	-0.973	-0.993	-0.974	-1.000 <sup>2)</sup>	-0.460	0.219
1-十六烷醇	0.362	0.684	-0.410	-0.675	0.227	0.553	0.232	0.433	1.000 <sup>2)</sup>	0.775
棕榈酸甲酯	0.916	1.000 <sup>1)</sup>	0.356	-0.999 <sup>1)</sup>	0.850	0.980	0.852	0.944	0.717	0.099
正二十四烷	-0.303	-0.638	0.466	0.627	-0.166	-0.500	-0.171	-0.377	-0.997 <sup>1)</sup>	-0.812
3,5,24-三甲基四十烷	0.923	1.000 <sup>2)</sup>	0.374	-1.000 <sup>1)</sup>	0.860	0.984	0.863	0.950	0.703	0.080
十二硫醇	0.381	0.699	-0.392	-0.689	0.246	0.570	0.251	0.451	1.000 <sup>2)</sup>	0.762
正二十七烷	-0.413	-0.723	0.359	0.714	-0.280	-0.598	-0.285	-0.482	-0.999 <sup>1)</sup>	-0.739
9,10-环氧硬脂酸甲酯	0.973	0.988	0.520	-0.990	0.931	1.000 <sup>2)</sup>	0.933	0.988	0.578	-0.083
N-(4-溴-正丁基)-哌啶-2-酮	-0.901	-0.998 <sup>1)</sup>	-0.324	0.997 <sup>1)</sup>	-0.831	-0.973	-0.834	-0.932	-0.740	-0.133

是土壤中的一种有益菌,可以改善植物根际土壤的生态环境,是微生物菌肥的主要来源,有促进植物营养吸收的作用<sup>[21]</sup>,因此,根际土壤中主要有菌群丰度的逐渐降低是地黄连作土壤形成过程中的表现特征。

目前有学者针对地黄根际土壤中环烯醚萜苷、糖类等成分对根际土壤微生物的影响进行研究,发现这些化合物所产生的间接生态效应会造成根际微生物群落失衡<sup>[22-23]</sup>。本文研究结果表明,无论从门水平还是属水平上看,85-5地黄根际土壤中的VOCs对细菌群落结构均有不同程度的影响,其中对细菌群落结构影响较大的VOCs以酯类和醇类成分为主,这与GC-MS筛选出来的3个时期主要VOCs差异物质相一致。据报道,部分酯类成分可能会导致根际土壤生态系统退化,影响植物的生长发育<sup>[24]</sup>;同时,1-二十醇等醇类化合物具有较强的化感作用<sup>[25]</sup>。因此,在头茬地黄的生长过程中,其根际土壤中VOCs和细菌群落结构均发生了相应改变,而且根际土壤VOCs在细菌群落结构的塑造方面起到了一定作用。后期可选择本文筛选出的对细菌群落结构影响较大的VOCs,研究其对地黄生长及根际土壤中优势细菌的影响机制,探究地黄连作障碍的产生机制,为地黄微生物菌肥的研制及地

黄土壤微生态环境的改善提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 陈金鹏,张克霞,刘毅,等.地黄化学成分和药理作用的研究进展[J].中草药,2021,52(6):1772-1784.  
 [2] 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.  
 [3] 马丽,王广飞,王明星,等.连作对怀地黄块根生长和品质的影响[J].中国中医药现代远程教育,2011,9(4):76-77.  
 [4] 徐娇,黄萱,周涛,等.天麻种植对土壤微生物群落结构的影响分析[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(19):10-16.  
 [5] 王佩,孟广云,毛如志,等.不同环境栽培对天麻土壤理化性质、微生物、代谢物的影响[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(14):164-174.  
 [6] 凡续晨,刘强,徐钰惟,等.中药材连作障碍研究进展[J].四川农业科技,2021(11):28-30.  
 [7] 陈慧,郝慧荣,熊君,等.地黄连作对根际微生物区系及土壤酶活性的影响[J].应用生态学报,2007,18(12):2755-2759.  
 [8] 杜家方.地黄连作障碍发生的生物机制及其消减措施研究[D].武汉:华中农业大学,2020.  
 [9] 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.
- [10] 杜家方. 地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)根区土壤中酚酸类物质的化感作用研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2009.
- [11] 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.
- [12] 王恩召. 水稻根区细菌挥发性有机物对病原菌的抑制作用[D]. 北京:中国农业科学院, 2020.
- [13] 古力, 陶晓赛, 王丰青, 等. 基于GC-MS代谢组学分析间作玉米下地黄根际土壤中挥发性有机物特征[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10):102-108.
- [14] MASSALHA H, KORENBLUM E, THOLL D, et al. Small molecules below-ground: The role of specialized metabolites in the rhizosphere [J]. *Plant J*, 2017, 90(4):788-807.
- [15] PIECHULLA B, LEMFACK M C, KAI M. Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi [J]. *Plant Cell Environ*, 2017, 40(10):2042-2067.
- [16] RAZA W, MEI X L, WEI Z, et al. Profiling of soil volatile organic compounds after long-term application of inorganic, organic and organic-inorganic mixed fertilizers and their effect on plant growth[J]. *Sci Total Environ*, 2017, 607-608:326-338.
- [17] 黄钰芳, 张恩和, 张新慧, 等. 兰州百合连作障碍效应及机制研究[J]. 草业学报, 2018, 27(2):146-155.
- [18] BULGARELLI D, SCHLAEPPI K, SPAEPEN S, et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2013, 64:807-838.
- [19] 丁红利. 添加秸秆对土壤有机质和微生物群落及其演替的影响[D]. 重庆:西南大学, 2016.
- [20] LEE S M, KONG H G, SONG G C, et al. Disruption of Firmicutes and Actinobacteria abundance in tomato rhizosphere causes the incidence of bacterial wilt disease[J]. *ISME J*, 2020, 15(1):330-347.
- [21] 黄钦, 尉广飞, 常瑞雪, 等. 微生物肥料发展现状及其在中药材种植中的应用[J]. 中国现代中药, 2022, 24(1):153-159.
- [22] 刘峰, 温学森, 刘彦飞, 等. 水苏糖对地黄根际土壤微生物失衡的影响[J]. 中草药, 2007, 429(12):1871-1874.
- [23] 刘峰, 张恒, 丁月芳, 等. 梓醇对地黄根际土壤微生物的影响[J]. 光明中医, 2011, 26(9):1799-1801.
- [24] 崔佳佳. 两种典型化感自毒物质对兰州百合生长及微生物作用研究[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2021.
- [25] 韩丽梅, 沈其荣, 王树起, 等. 大豆根茬木霉腐解产物的鉴定及其化感作用的研究[J]. 应用生态学报, 2002, 13(10):1295-1299.

[责任编辑 刘德文]