

不同栽培模式对粗茎秦艽根际土壤微生物多样性与次生代谢产物含量的影响

加多五尼¹, 甲使阿咪¹, 马鸿宇¹, 叶更生¹, 陈晨², 苟恺军², 任艳¹, 拉目加^{1*}, 曾锐¹
(1. 西南民族大学药学院, 成都 610041; 2. 西南民族大学青藏高原研究院, 成都 610041)

[摘要] 目的:探讨不同栽培模式对粗茎秦艽产量及其根际土壤微生物多样性和次生代谢产物含量的影响。方法:以不同栽培模式粗茎秦艽及其根际土壤为研究对象,采用高通量测序技术,分析根际土壤中细菌和真菌群落组成及优势菌群和差异微生物;采用高效液相色谱法测定不同栽培模式粗茎秦艽中环烯醚萜类成分含量。结果:相较于地膜种植,采取无地膜种植与间作牡丹、白芸豆、土豆和玉米等作物后,粗茎秦艽鲜品增产16.11%~17.68%、22.48%~26.34%、29.37%~32.19%、34.82%~36.57%和35.34%~39.71%,干品增产19.75%~23.17%、25.86%~29.32%、30.18%~34.94%、35.22%~39.87%和39.72%~43.73%,龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苷和獐牙菜苦苷4种环烯醚萜类成分总含量分别提高10.17%~37.83%、5.93%~47.44%、9.09%~28.84%和10.71%~28.57%。根际土壤中细菌和真菌群落多样性明显增高($P<0.05$),其中粪壳菌纲(Sordariomycetes)、锤舌菌纲(Leotiomycetes)、银耳菌纲(Tremellomycetes)、散囊菌纲(Eurotiomycetes)、镰刀菌属(*Fusarium*)和支孢瓶霉属(*Cladophialophora*)等致病菌群相对丰度降低,变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)和放线菌门(Actinobacteriota)等有益菌群比例增高且逐渐成为优势菌群。结论:粗茎秦艽不同栽培模式可影响其产量和根际土壤微生物群落多样性及环烯醚萜类成分的累积,无地膜种植和间作模式具有一定优势,可为粗茎秦艽种植提供理论参考。

[关键词] 粗茎秦艽; 间作; 根际土壤; 微生物多样性; 环烯醚萜

[中图分类号] R284.2; R285; R289; R287; R22; R2-031; R33; R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)10-0192-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230419 **[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.20230323.1415.001.html>

[网络出版日期] 2023-03-27 14:05:32

Effect of Different Cultivation Modes on Microbial Diversity and Secondary Metabolites of Rhizosphere Soil of *Gentiana crassicaulis*

JIADUO Wuni¹, JIASHI Ami¹, MA Hongyu¹, YE Gengsheng¹, CHEN Chen², GOU Kaijun², REN Yan¹,
LA Mujia^{1*}, ZENG Rui¹

(1. School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of different cultivation modes on the yield of *Gentiana crassicaulis* and its microbial diversity and secondary metabolite content in the rhizosphere soil. **Method:** With *G. crassicaulis* of different cultivation modes and its rhizosphere soil as the research objects, the composition of bacterial and fungal communities, dominant bacteria, and differential microorganisms in the rhizosphere soil were analyzed by high-throughput sequencing technology. HPLC was used to determine the content of iridoids in *G. crassicaulis* with different cultivation modes. **Result:** Compared with plastic film mulching, planting without mulch and intercropping of peony, white kidney bean, potato, and corn increased the yield of fresh products by

[收稿日期] 2022-11-29

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2017YFC1700705);西南民族大学研究生创新型科研项目(CX2021SZ93)

[第一作者] 加多五尼,在读硕士,从事中药资源与栽培研究,E-mail:jh12578@163.com

[通信作者] *拉目加,讲师,从事藏医医药文献及藏药品质鉴定,E-mail:lhamojap@126.com

16.11%-17.68%, 22.48%-26.34%, 29.37%-32.19%, 34.82%-36.57%, and 35.34%-39.71%, respectively, and increased the yield of dry products by 19.75%-23.17%, 25.86%-29.32%, 30.18%-34.94%, 35.22%-39.87%, and 39.72%-43.73%. The total content of four iridoids, including gentiopicrin, loganic acid, sweroside, and swertiamarin, increased by 10.17%-37.83%, 5.93%-47.44%, 9.09%-28.84%, and 10.71%-28.57%, respectively. The diversity of bacterial and fungal communities in the rhizosphere soil increased significantly ($P < 0.05$). The relative abundance of pathogenic bacteria such as Sordariomycetes, Leotiomyces, Tremellomycetes, Eurotiomycetes, *Fusarium*, and *Cladophialophora* decreased, and the proportions of beneficial bacteria such as Proteobacteria, Acidobacteria, and Actinobacteriota increased and they gradually became the dominant bacteria. **Conclusion:** Different cultivation modes can affect the yield of *G. crassicaulis* and its microbial diversity and iridoid content in the rhizosphere soil. Cultivation without mulch and intercropping patterns have certain advantages, which can provide theoretical references for the planting of *G. crassicaulis*.

[**Keywords**] *Gentiana crassicaulis*; intercropping; rhizosphere soil; microbial diversity; iridoids

粗茎秦艽是中药秦艽的主流基原品种^[1],主要分布于云南、四川、贵州和西藏等省区海拔2 700~4 500 m的高山地区^[2]。其以干燥根入药,含龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苷和獐牙菜苦苷等化学成分,具有祛风湿、清湿热、止痹痛和退虚热的功效^[3]。中医常用于风湿痹痛,中风半身不遂,筋脉拘挛,骨节酸痛,湿热黄疸,骨蒸潮热,小儿疳积发热等^[4]。粗茎秦艽在中医药发展中有着重要的地位和作用,随着其市场需求的增加和野生资源的枯竭,粗茎秦艽中药材资源日渐匮乏,探索粗茎秦艽合理栽培模式,提高粗茎秦艽产量与品质,是促进粗茎秦艽资源可持续发展的有效途径。

目前,粗茎秦艽传统栽培模式存在诸多问题与困难:①过度依赖地膜,严重危害土壤环境,影响土壤透气性,降低粗茎秦艽出苗率;②施用化肥、农药、植物生长调节剂过多,导致土壤理化性质劣化,抑制粗茎秦艽生长,出现叶片畸形、干枯脱落、整株死亡等现象;③连作障碍导致粗茎秦艽的形态结构、生理生化性质、次生代谢产物的积累及形成、药材药性、药效均发生不同程度的改变,甚至出现局部死苗、部分种苗不发芽的情况。且根结线虫及叶斑病等病虫害严重^[5],其患病率分别高达87.63%和93.74%,粗茎秦艽患根结线虫病后在须根或侧根上形成大小不等的瘤状根结,根结内有乳白色线虫,造成粗茎秦艽根系发育受阻,根系腐烂,进而造成植株生长衰弱和枯死;粗茎秦艽患叶斑病后叶片出现棕褐色圆形或椭圆形病斑,严重时病斑汇合,叶片枯死,最后导致整株枯萎。总之,粗茎秦艽连作障碍及病虫害会严重影响粗茎秦艽生长状况,导致粗茎秦艽产量低,药材质量参差不齐^[6]。

近年来,粗茎秦艽生态种植相关研究国内外鲜见报道。结合中药生态农业发展模式,运用生物多样性的原理,合理搭配作物群体,将粗茎秦艽与其他作物间作,可使光能、水分、土壤、空间等资源得到充分的利用^[7],同时运用生态位的原理,利用间作生态位之间的竞争,合理调控根际土壤微环境,提高根际土壤细菌和真菌的群落及其结构多样性^[8],可有效防止土传病害,改善土壤肥力,降低连作障碍与病虫害,促进土壤有机质的积累,对植株根部的生长和营养的吸收有着促进作用^[9],多样化的根际土壤微生物促进中药材根际土壤有机质和矿物质的分解和合成,有利于提高中药材产量和次生代谢产物的积累,达到优质高产的目的,对实现粗茎秦艽资源可持续发展具有重要的意义。土豆、玉米、白芸豆和牡丹等作物与粗茎秦艽间作,提高粗茎秦艽产量与品质,同时经济作物增收,符合中药生态农业的发展理念^[10]。据此,本研究利用高通量测序技术,研究根际土壤微生物群落组成结构的多样性,结合不同栽培模式粗茎秦艽产量及次生代谢产物含量的变化,探讨不同栽培模式对粗茎秦艽产量、根际土壤微环境及次生代谢产物含量的影响,以期解决粗茎秦艽栽培过程中的连作障碍,改善粗茎秦艽根际土壤环境,降低病虫害,提高粗茎秦艽的产量和品质,为粗茎秦艽生态种植提供理论参考。

1 材料与设计

1.1 样品 选择移栽后1年的粗茎秦艽作为供试样品,样品采集于云南省丽江市玉龙县鲁甸乡新主村可宝生中药材种植基地,经西南民族大学青藏高原研究院刘圆教授鉴定为粗茎秦艽 *Gentiana*

crassicaulis。

1.2 仪器与试剂 Illumina Miseq 测序平台(美国 Illumina 公司), Tanon-2500 型凝胶成像分析仪(上海天能科技有限公司), NanoDrop 2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司), QIAxtractor 型高通量核酸自动纯化仪(德国 Qiagen 公司, 型号 SN002358), Waters2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), RD-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(北京中普科技有限公司)。

MagPure Soil DNA LQ Kit 提取试剂盒(广州美基生物科技有限公司, 批号 D6356-02); Qubit dsDNA Assay Kit 检测试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司, 批号 Q32854); Tks Gflex DNA Polymerase 聚合酶(日本 Takara 公司, 批号 R060B); AMPure XP 磁珠(美国 Illumina 公司, 批号 A63880); 马钱苷酸、龙胆苦苷(四川省成都康邦生物科技有限公司, 批号分别为 wkq22031202、wkq22071708); 乙腈(美国 Fisher 公司, 批号 6710384); 色谱甲醇、分析甲醇(天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号分别为 348604LR、2022061302); 细菌上游引物 343F 5'-TACGGRAGGCAGCAG-3'(批号 2203102320), 下游引物 798R 5'-AGGGTATCTAATCCT-3'(批号 2203102319), 真菌上游引物内转录间隔区(ITS) 1F 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'(批号 CKOY202-04), 下游引物 ITS2 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'(批号 CKOY202-05), 均由上海欧易生物医学科技有限责任公司合成。

1.3 试验设计 田间试验在云南省丽江市玉龙县鲁甸乡新主村可巴生(27°23'2.77"N, 99°45'8.62"E) 中药材种植基地进行, 基地海拔 2 800 m, 年降雨量 1 000 mm, 年均气温 17 °C, 无霜期 231 d, 试验地土壤土层较深厚, 以湿润和富腐殖质的肥沃壤土或砂壤土为主。试验共设置地膜种植、无地膜种植、间作玉米、间作土豆、间作白芸豆和间作牡丹 6 种不同的栽培模式。试验小区按完全随机设计, 每种模式设 3 个重复, 小区面积为 3 m×8 m=24 m², 试验样地总面积 432 m²。行株距均为 45 cm, 试验地深耕 30 cm, 耙平, 依排水方向拉线翻耕; 开沟垄, 垄高 20 cm, 沟宽 30 cm, 厢面宽 90 cm。试验开展前, 所有试验小区连续地膜栽种粗茎秦艽, 形成不同连作茬数的处理样地。

2 方法

2.1 土壤样品采集 土壤样品采集于 2021 年 9 月 16 日。采用随机取样法, 采集粗茎秦艽根际附着土

壤, 每种模式重复采集 3 份土样。采集的土壤样本立即装入无菌自封袋并编号, 迅速置于 4 °C 便携式冷藏箱中, 转移储存于实验室 -80 °C 冰箱; 并采集各土壤样本的粗茎秦艽植株, 取干燥根茎测定粗茎秦艽中 4 种环烯醚萜类成分含量, 土壤样本委托上海欧易生物医学科技有限公司检测。

2.2 粗茎秦艽次生代谢产物含量测定 采用高效液相色谱法(HPLC)测定不同栽培模式粗茎秦艽中龙胆苦苷、马钱苷酸、獐芽菜苷和獐芽菜苦苷 4 种环烯醚萜类成分的含量。精密称取不同栽培模式粗茎秦艽粉末 0.5 g, 加入甲醇 20 mL, 称定质量; 超声处理 30 min, 冷却并重新称定质量, 甲醇补足失重, 滤纸过滤后取滤液用 0.45 μm 微孔滤膜二次过滤, 精密量取 1.5 mL 待测。采用 RD-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)和 0.05% 磷酸水(B)作为流动相, 梯度洗脱 0~9 min, 10%~12%A; 9~12 min, 12%~15%A; 12~20 min, 15%~20%A; 20~25 min, 20%~24%A; 25~28 min, 24%~26%A; 28~32 min, 26%~28%A; 32~38 min, 28%~30%A; 38~40 min, 30%~33%A; 进样量 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 240 nm。

2.3 高通量测序

2.3.1 DNA 提取与聚合酶链式反应(PCR)扩增 采用 DNA 抽提试剂盒(DNeasy PowerSoil Kit)对样本的基因组 DNA 进行提取, 以基因组 DNA 为模板, 根据测序区域的选择, 通过细菌 16SrRNA V3-V4 区引物(扩增长度 460 bp) 343F(5'-TACGGRAGGCAGCAG-3') 和 798R(5'-AGGGTATCTAATCCT-3'), ITS1 区引物(扩增长度 350 bp) ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'), 合成带有 Barcode 的特异引物, 使用 Takara 公司的 Tks Gflex DNA Polymerase 进行两轮 PCR 扩增^[11]。反应体系为 15 μL 的 Gflex PCR Buffer(2×)、1 μL 的 primer F(5 mmol·L⁻¹)、1 μL 的 primer R(5 mmol·L⁻¹)、50 ng 的 DNA 模板、0.6 μL 的 Tks Gflex DNA Polymerase(1.25 U·μL⁻¹)、用 dd H₂O 补足 30 μL。程序为 94 °C 预变性 5 min, 1 个循环数; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 20 s, 26 个循环数; 72 °C 延伸 5 min。

2.3.2 文库构建和测序 利用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop2000 对 PCR 扩增产物进行电泳检测, 并使用 AMPure XP beads(Beads-产物 0.8:1)试剂盒进行纯化, 然后使用 Qubit dsDNA Assay Kit 试剂盒进行 Qubit 定量, 使用 MagPure Soil DNA LQ Kit 建库

试剂盒基于二代测序平台进行文库构建。

2.4 数据处理与分析 使用QIIME软件(1.8.0版)中的UCLUST对测序序列在97%的相似度水平下进行聚类获得分类单元(OTU)物种注释结果,使用QIIME 2软件包挑选出各个ASV的代表序列与数据库进行比对注释,16S使用(Silva, <http://www.arb-silva.de>)数据库比对,ITS使用(UNITE, <https://unite.ut.ee/index.php>)数据库比对;物种比对注释使用q2-feature-classifier软件默认参数进行分析,在phylum(门), class(纲), order(目), family(科), genus(属), species(种)层面上进行分类学注释。利用Excel 2019对实验数据进行整理,采用SPSS 22.0软件进行单因素方差分析和Spearman相关性分析($P<0.05$),通过KRONA、Mothur(v.1.30版)软件对物种注释、物种丰富度和多样性指数等进行计算与分析,图形处理采用Adobe Illustrator CS5、Excel 2019软件处理。

3 结果与分析

3.1 不同栽培模式对粗茎秦艽根际土壤微生物群落多样性的影响

3.1.1 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物群落 α 多样性指数分析 α 多样性反映生物环境内物种的丰富度和多样性程度, chao1指数衡量物种的丰富度,其数值越大,表示物种越丰富; Shannon指数则反映物种的多样性,其数值越大,表示物种多样性越高,物种分布越均匀。从表1和表2可以得出,相较于地膜种植,采取无地膜种植与间作玉米、白芸豆、土豆和牡丹等作物后,粗茎秦艽根际土壤细菌和真菌的chao1指数与Shannon指数均显著增高。表明地膜种植粗茎秦艽使其根际土壤微生物丰富度和多样性降低,采取无地膜种植与间作白芸豆、牡丹、土豆和玉米等作物,可显著提高粗茎秦艽根际土壤细菌和真菌群落丰富度及结构多样性。

3.1.2 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物群落Beta多样性分析 细菌和真菌的聚类分析结果表明,同一栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物分别聚为一类,无地膜种植模式有一个样品与地膜种植模式聚为一类,其组成与地膜种植模式相近,见图1;不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤细菌和真菌群落整体相似性较低,结合主坐标分析,可以看出不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物群落的相对分散程度不同,地膜种植模式粗茎秦艽的根际土壤微生物群落则相对分散,距离较远,见增强出版附加材料。与地膜种植和无地膜种植相比,间作白芸

表1 不同栽培模式下粗茎秦艽根际土壤细菌 α 多样性指标

Table 1 Diversity indices of bacterial α in rhizosphere soil of *G. crassicaulis* under different cultivation modes

栽培模式	Shannon 指数 ($\bar{x}\pm s, n=3$)	chao1 指数 ($\bar{x}\pm s, n=3$)	覆盖率/%
地膜	8.57±0.23	968.17±123.96	99.97
无地膜	8.76±0.08 ¹⁾	1 095.71±117.05 ¹⁾	99.96
间作土豆	9.22±0.17 ²⁾	1 300.24±158.80 ²⁾	99.95
间作玉米	9.11±0.06 ²⁾	1 233.86±80.54 ²⁾	99.96
间作白芸豆	8.93±0.17 ¹⁾	1 120.23±108.47 ¹⁾	99.95
间作牡丹	9.04±0.11 ²⁾	1 176.37±44.53 ¹⁾	99.95

注:与地膜栽培模式比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2、表4同)

表2 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤真菌 α 多样性指标

Table 2 Diversity indices of fungi α in rhizosphere soil of *G. crassicaulis* under different cultivation modes

栽培模式	Shannon 指数 ($\bar{x}\pm s, n=3$)	chao1 指数 ($\bar{x}\pm s, n=3$)	覆盖率/%
地膜	6.10±0.58	210.29±51.98	99.99
无地膜	6.44±0.17 ¹⁾	420.99±18.14 ¹⁾	99.99
间作土豆	7.03±0.25 ²⁾	473.93±49.86 ²⁾	99.99
间作玉米	7.37±0.31 ²⁾	496.45±51.83 ²⁾	99.99
间作白芸豆	6.96±0.37 ¹⁾	457.02±73.64 ²⁾	99.99
间作牡丹	6.87±1.07 ¹⁾	450.19±96.84 ²⁾	99.99

豆、牡丹、玉米和土豆等4种栽培模式粗茎秦艽的根际土壤微生物群落较为集中,重复较近。地膜种植模式粗茎秦艽的根际土壤微生物群落则相对分散,距离较远。表明不同栽培模式对粗茎秦艽根际土壤细菌和真菌群落组成存在差异且影响较大。

3.2 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物群落组成分析

3.2.1 根际土壤细菌群落组成 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤细菌在门水平的变化规律见图2。相对丰度前15的菌群分别为变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、拟杆菌门(Bacteroidota)、粘菌门(Myxococcota)、厚壁菌门(Firmicutes)、硝化菌门(Nitrospirota)、迷踪菌门(Elusimicrobiota)、骸骨菌门(Patescibacteria)、蛭弧菌门(Bdellovibrionota)、Dependentiae与绿弯菌门(Chloroflexi)。相较于地膜种植,无地膜种植和间作其他作物后,根际土壤优势细菌比例逐渐增高。其中,无地膜种植模式中的优势细菌为变形菌门,酸杆菌门、粘菌门和迷踪菌门是间作白芸豆模式优势细菌,放线菌门和芽单

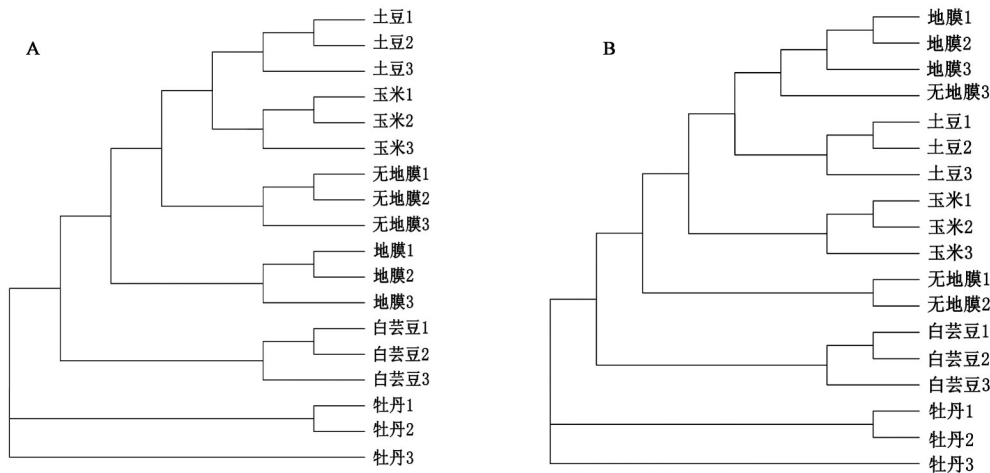


图1 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤细菌(A)与真菌(B)聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis of bacteria (A) and fungi (B) in rhizosphere soil of *G. crassicaulis* under different cultivation modes

孢菌门是间作玉米模式优势细菌,间作牡丹模式优

势细菌则是拟杆菌门、厚壁菌门和硝化菌门。

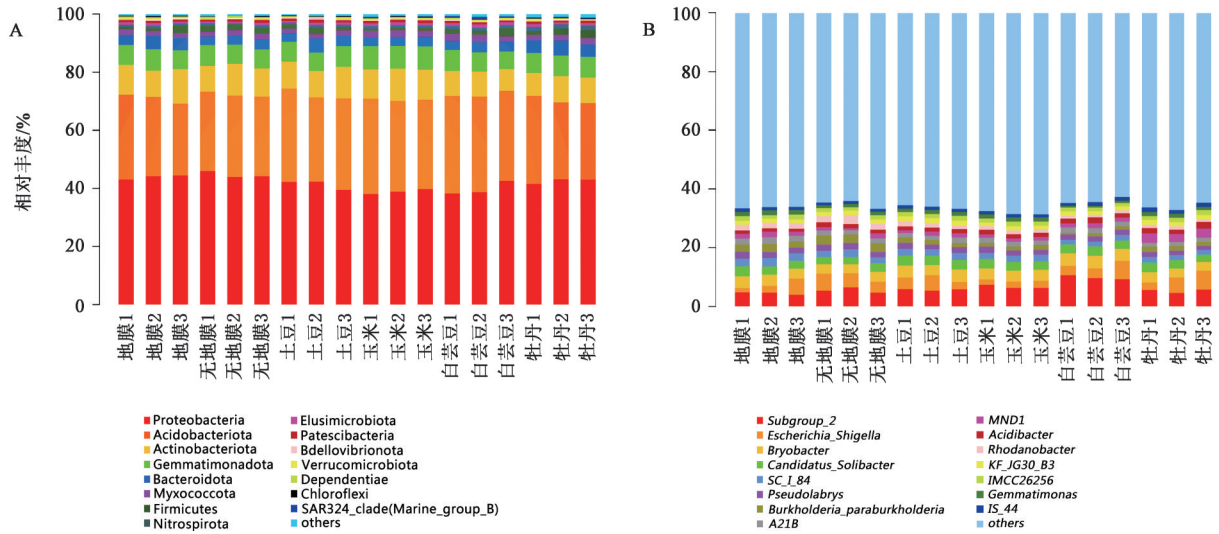


图2 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤细菌在门水平(A)及属水平(B)的结构特征

Fig. 2 Structural characteristics of bacteria at phylum level (A) and genus level (B) in rhizosphere soil of *G. crassicaulis* under different cultivation modes

粗茎秦艽根际土壤细菌在属水平的分析结果表明, *Subgroup_2* 和 *Bryobacter* 是间作白芸豆模式优势细菌, 大肠埃希菌属 (*Escherichia Shigella*)、伯克霍尔德里氏菌属 (*Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*) 和罗河杆菌属 (*Rhodanobacter*) 是无地膜种植模式优势菌群, 念珠菌固体杆菌属 (*Candidatus Solibacter*) 是间作土豆模式优势菌群, 而酸杆菌属 (*Acidibacter*) 和 *MND1* 则是间作牡丹模式优势菌属。

模式粗茎秦艽根际土壤细菌群落组成存在差异。

3.2.2 根际土壤真菌群落组成分析 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤真菌在门水平、纲水平和属水平的变化见图3。在门水平, 子囊菌门 (*Ascomycota*)、担子菌门 (*Basidiomycota*)、接合菌门 (*Zygomycota*)、球囊菌门 (*Glomeromycota*)、罗兹菌门 (*Rozellomycota*) 和壶菌门 (*Chytridiomycota*) 是真菌群落优势菌群, 其在不同栽培模式中所占比例不同。子囊菌门 (*Ascomycota*) 在间作牡丹模式中相对丰度最大, 担子菌门 (*Basidiomycota*) 是间作玉米模式优势菌门, 接合菌门 (*Zygomycota*)、球囊菌门 (*Glomeromycota*) 和罗兹菌门 (*Rozellomycota*) 则是间作土豆模式优势菌门, 壶菌门

(Chytridiomycota)在无地膜种植模式中相对丰度最高。

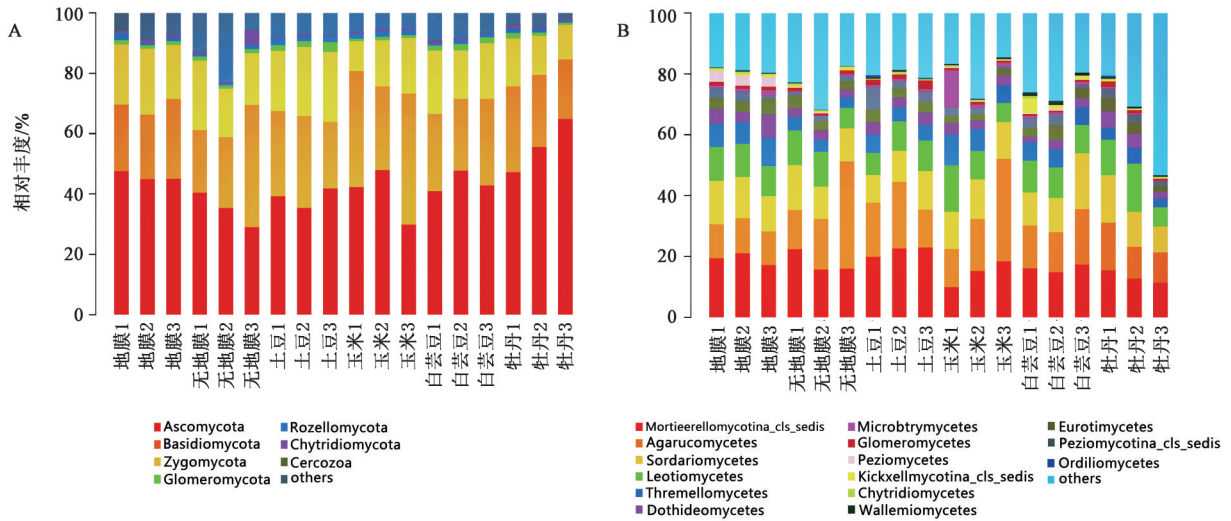


图3 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤真菌在门水平(A)、纲水平(B)结构特征

Fig. 3 Structural characteristics of fungi at phylum level (A) class level (B) in rhizosphere soil of *G. crassicaulis* under different cultivation modes

在纲的水平分析结果表明,锤舌菌纲(Leotiomyces)、银耳菌纲(Tremellomyces)、座囊菌纲(Dothideomyces)、散囊菌纲(Eurotiomyces)、粪壳菌纲(Sordariomyces)和盘菌纲(Pezizomyces)等致病真菌在地膜种植模式中的相对丰度显著高于其他模式,见图3。而采取无地膜种植和间作其他作物后,上述致病真菌比例降低。

同样在属水平,镰刀菌属(*Fusarium*)、支孢瓶霉属(*Cladophialophora*)及薄齿藓属(*Leptodontidium*)等致病真菌属在地膜种植模式中成为优势菌属,而采取无地膜种植和间作其他作物后,粗茎秦艽根际促生菌属被孢霉属(*Mortierella*)、白环菇属(*Leucoagaricus*)、*Minimedusa*、*Knufia*、腐质霉属(*Humicola*)及角菌根菌属(*Ceratobasidium*)的相对丰度显著增高,见图4。

综上,不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤真菌群落组成及相对丰度差异显著。地膜种植模式中致病真菌相对富集,是导致粗茎秦艽质量和产量低以及根腐病等病虫害严重的原因。采取无地膜种植或间作其他作物后,降低了致病真菌的比例,有益真菌相对丰度显著增高。

3.3 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物丰度聚类与主成分分析 在种水平上对6种不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物进行聚类分析并绘制热图见增强出版附加材料,颜色越接近红色说明微生物在对应样本中的数量越高,聚集越显著,越接

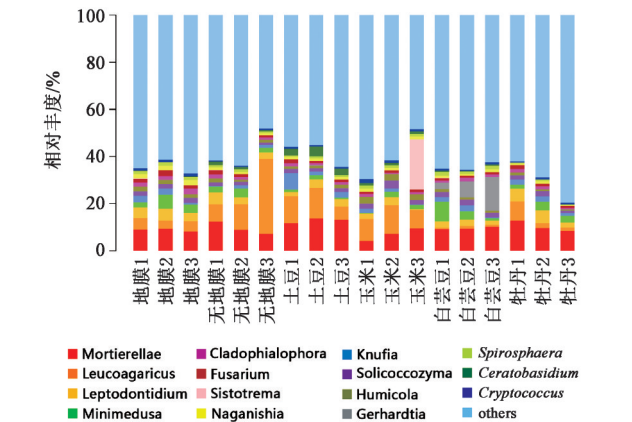


图4 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤真菌在属水平结构特征

Fig. 4 Structural characteristics of fungi at genus level in rhizosphere soil of *G. crassicaulis* under different cultivation modes

近于蓝色含量越少,聚集度越低。从热图中可以看出不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物聚类的位置不同,其中地膜种植与无地膜种植两种模式的微生物种类聚集在中部;间作牡丹和白芸豆2种模式的微生物聚集在右下角,间作玉米和土豆2种模式微生物种类聚集在中上部;表明不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物群落之间存在明显的差异。同时在种水平对粗茎秦艽根际土壤微生物群落的Beta多样性进行分析,评估其群落组成相似性及差异性,见表3。从LDA值可以看出,地膜种植模式主要作用微生物是根瘤菌目(Rhizobiales),无地膜种植模式主要作用微生物是变形菌门(Proteobacteria),间作玉米模式主要作用微生物则

是放线菌门(Actinobacteriota),间作土豆模式主要作用微生物为酸杆菌目(Acidobacteriales),而伯克氏菌目(Burkholderiales)和亚硝化单胞菌科(Nitrosomonadaceae)则是间作牡丹模式主要作用微生物,间作白芸豆模式5个主要作用微生物中丰度最高的是酸杆菌纲;结合进化分支图可知,地膜种植模式包括4种3科1目,无地膜种植模式包括2种

2科1目,套种土豆模式包括2种1科1目和2种未知微生物,间作白芸豆模式包括3种4科4目1纲,间作牡丹模式包括3种3科3目1纲,套种玉米模式包括1种1科1纲,不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤优势菌群占比不同,表明不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物群落组成结构具有显著性差异,见图5。

表3 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物群落LDA贡献值

Table 3 LDA contribution values of rhizosphere soil microbial communities of *G. crassicaulis* under different cultivation modes

组别	生物标志物	LDA 贡献值	组别	生物标志物	LDA 贡献值
地膜	Rhizobiales	4.18	间作玉米	uncultured	4.31
	Xanthobacteraceae	4.05		Actinobacteriota	4.35
	Sphingomonadales	3.67		Polyangia	3.60
	SC_I_84	3.80		Acidobacteriales	4.34
	SC_I_84	3.84		Pseudonocardiaceae	3.75
	Sphingomonadaceae	3.70		<i>Puia</i>	3.77
	<i>Gemmatimonas</i>	3.66		Elusimicrobiota	4.05
	<i>Gemmatimonas</i>	3.67		Muribaculaceae.Other	1.78
	A21b	3.72		SJA_28	3.27
	<i>Pseudolabrys</i>	3.72		Polyangiales	3.07
间作土豆	Acidobacteriales	4.52	无地膜	<i>Pseudolabrys</i>	3.72
	<i>Bradyrhizobium</i>	3.51		Proteobacteria	4.91
	uncultured	3.65		Burkholderiaceae	4.02
	Acidobacteriales	3.82		Paraburkholderia	4.02
	Acidobacteriaceae_Subgroup_1_	3.86		Xanthomonadales	3.92
	Acidobacteriales	3.81		Rhodanobacteraceae	3.92
间作牡丹	Nitrospiraceae	3.66	间作白芸豆	uncultured	3.78
	Nitrospirales	3.69		Acidobacteriae	4.77
	Nitrospira	3.65		Bryobacteriales	3.93
	Nitrospirota	3.67		Subgroup_2	4.47
	Nitrosomonadaceae	4.13		Micropepsales	3.75
	Unknown_Family	3.68		Diplorickettsiales	3.52
	Burkholderiales	4.48		Acidobacteriota	4.71
	Gammaproteobacteria_Incertae_Sedis	3.64		Diplorickettsiaceae	3.54
	MND1	3.98		Subgroup_2	4.47
	<i>Nitrospira</i>	3.65		<i>Bryobacter</i>	3.93
	<i>Acidibacter</i>	3.67		Bryobacteraceae	3.90
	IS_44	3.54		Micropepsaceae	3.72

3.4 不同栽培模式对粗茎秦艽产量及次生代谢产物含量的影响

3.4.1 不同栽培模式粗茎秦艽产量分析 对比不同栽培模式粗茎秦艽产量,发现地膜种植模式粗茎秦艽产量最低,分别为鲜品(1 853.78~

2 167.53 kg·hm⁻²)和干品(1 142.21~1 418.18 kg·hm⁻²);间作玉米模式粗茎秦艽产量最高,分别为鲜品(2 508.91~3 028.26 kg·hm⁻²)和干品(1 595.89~2 038.35 kg·hm⁻²);其次为间作土豆模式,分别为鲜品(2 361.27~2 960.23 kg·hm⁻²)和干品(1 544.49~

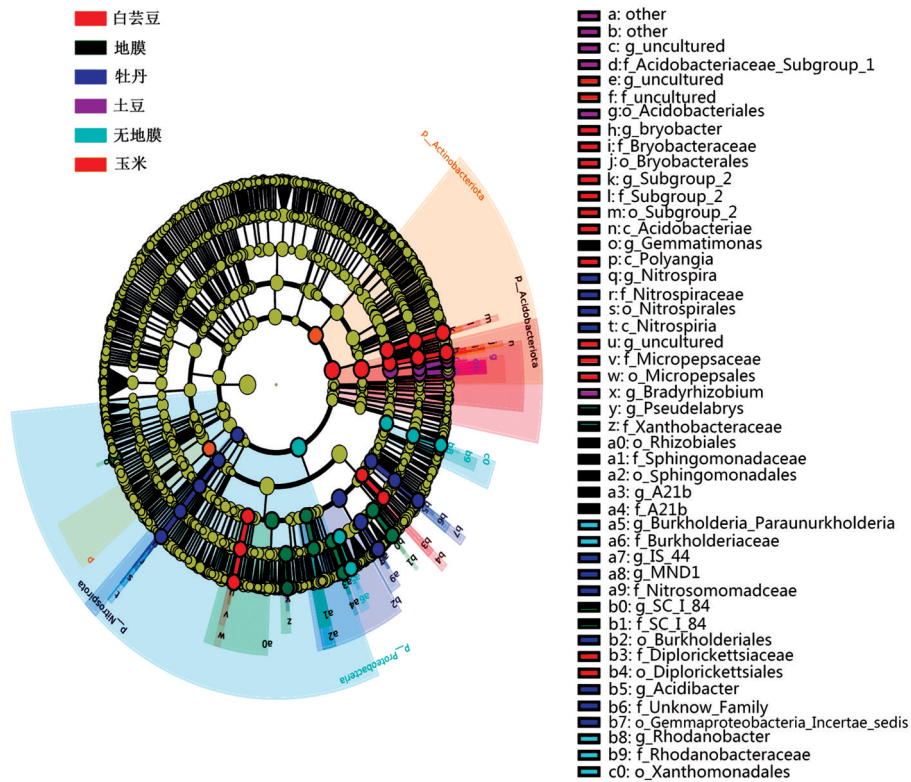


图5 不同栽培模式粗茎秦艽根际微生物差异物种的进化分支

Fig. 5 Clade map of rhizosphere soil microorganisms under different cultivation modes of *G. crassicaulis*

1 983.61 kg·hm⁻²);间作白芸豆模式排第3,分别为鲜品(2 397.45~2 865.26 kg·hm⁻²)和干品(1 486.92~1 913.69 kg·hm⁻²);间作牡丹模式排第四,分别为鲜品(2 269.73~2 738.46 kg·hm⁻²)和干品(1 437.58~1 833.99 kg·hm⁻²);无地膜种植模式排第5,分别为鲜品(2 152.51~2 550.75 kg·hm⁻²)和干品(1 367.79~1 746.77 kg·hm⁻²)。相较于地膜种植,采取无地膜

种植与间作牡丹、白芸豆、土豆和玉米等作物后,粗茎秦艽鲜品分别增产 16.11%~17.68%、22.48%~26.34%、29.37%~32.19%、34.82%~36.57% 和 35.34%~39.71%,干品分别增产 19.75%~23.17%、25.86%~29.32%、30.18%~34.94%、35.22%~39.87% 和 39.72%~43.73%。不同年度不同栽培模式粗茎秦艽产量见表4。

表4 不同年度不同栽培模式粗茎秦艽产量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Yield of *G. crassicaulis* under different cultivation mo ($\bar{x} \pm s, n=3$)

kg·hm⁻²

栽培模式	2019		2020		2021	
	鲜品	干品	鲜品	干品	鲜品	干品
地膜	1 853.78±21.98	1 142.21±65.57	2 026.93±13.56	1 337.38±11.32	2 167.53±13.56	1 418.18±12.71
无地膜	2 152.51±83.08	1 367.79±36.43	2 370.14±31.76	1 614.15±18.42	2 550.75±24.84	1 746.77±6.45
间作土豆	2 361.27±62.70	1 544.49±50.62	2 694.09±31.33	1 879.61±11.08	2 960.23±23.07	1 983.61±3.69
间作玉米	2 508.91±67.28	1 595.89±18.23	2 867.91±29.74	1 937.17±2.23	3 028.26±29.61	2 038.35±2.23
间作白芸豆	2 397.45±53.41	1 486.92±13.32	2 553.25±31.53	1 846.41±20.96	2 865.26±29.14	1 913.69±11.17
间作牡丹	2 269.73±77.67	1 437.58±53.46	2 452.75±41.01	1 721.69±10.94	2 738.46±29.03	1 833.99±10.94

3.4.2 不同栽培模式粗茎秦艽次生代谢产物含量分析 次生代谢产物是中药疗效的物质基础,其治疗效果取决于中药材中次生代谢产物的含量^[12]。不同栽培模式粗茎秦艽次生代谢产物含量分析结果见表5。其中龙胆苦苷含量从高到低分别为间作

土豆(57.85 mg·g⁻¹)>间作玉米(54.69 mg·g⁻¹)>间作牡丹(52.06 mg·g⁻¹)>间作白芸豆(50.57 mg·g⁻¹)>无地膜种植(46.24 mg·g⁻¹)>地膜种植(41.97 mg·g⁻¹);马钱苷酸含量从高到低为间作土豆(12.43 mg·g⁻¹)>间作玉米(11.23 mg·g⁻¹)>间作牡丹(9.73 mg·g⁻¹)>

间作白芸豆 ($9.28 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) > 无地膜种植 ($8.93 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) > 地膜种植 ($8.43 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。无地膜种植和间作白芸豆、牡丹、玉米、土豆等模式粗茎秦艽的次生代谢产物含量与地膜种植模式粗茎秦艽具有显著差异,采取无地膜种植和间作白芸豆、牡丹、玉米和土豆后,龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苷和獐牙菜苦苷等成分含量分别提高 10.17%~37.83%、5.93%~47.44%、9.09%~28.84% 和 10.71%~28.57%。其中间作土豆和玉米两种模式粗茎秦艽的龙胆苦苷与马钱苷酸的总量分别为 7.43% 和 6.71%, 远高于

于2020年版《中国药典》标准 2.50%。

粗茎秦艽根际土壤微生物与次生代谢产物的相关性分析结果,表明粗茎秦艽根际土壤细菌和微生物总量与龙胆苦苷和马钱苷酸两种成分呈正相关 ($P<0.01$),与獐牙菜苷和獐牙菜苦苷两种成分呈显著正相关 ($P<0.05$);根际土壤真菌与龙胆苦苷和马钱苷酸两种成分呈正相关 ($P<0.05$),与獐牙菜苷和獐牙菜苦苷两种成分无显著相关性;这进一步表明粗茎秦艽次生代谢产物含量与其根际土壤微生物密切相关。见表6。

表5 不同栽培模式粗茎秦艽次生代谢产物含量测定 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

种植模式	马钱苷酸	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	獐牙菜苷	总含量
地膜	8.43±1.65	3.19±0.75	41.97±11.14	0.56±0.15	50.55±11.29
无地膜	8.93±0.90	3.48±0.35	46.24±8.38 ¹⁾	0.62±0.18	58.17±8.44 ¹⁾
间作土豆	12.43±0.90 ²⁾	4.11±0.16 ²⁾	57.85±2.38 ²⁾	0.72±0.16 ¹⁾	70.07±2.55 ²⁾
间作白芸豆	9.28±3.29 ¹⁾	3.65±1.29 ¹⁾	50.57±1.41 ²⁾	0.69±0.10 ¹⁾	63.87±3.81 ¹⁾
间作牡丹	9.73±6.15 ¹⁾	3.88±0.83 ¹⁾	52.06±8.96 ²⁾	0.78±0.54 ²⁾	66.55±10.91 ²⁾
间作玉米	11.23±1.67 ²⁾	4.08±0.31 ²⁾	54.69±4.97 ²⁾	0.67±0.1 ¹⁾	68.54±5.30 ²⁾

表6 不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物与次生代谢产物的相关性

Table 6 Correlation between rhizosphere soil microorganisms and secondary metabolites of *G. crassicaulis* in different cultivation patterns

微生物	龙胆苦苷	马钱苷酸	獐牙菜苷	獐牙菜苦苷
土壤细菌	0.976 ²⁾	0.984 ²⁾	0.657 ¹⁾	0.101 ¹⁾
土壤真菌	0.470 ¹⁾	0.223 ¹⁾	0.064	0.297
微生物总量	0.113 ²⁾	0.153 ²⁾	0.277 ¹⁾	0.425 ¹⁾

注:相关性¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

4 讨论

4.1 不同栽培模式影响粗茎秦艽根际土壤微生物群落组成及其结构多样性 不同栽培模式的粗茎秦艽根际土壤细菌和真菌群落组成及结构多样性具有显著差异,采取无地膜种植和间作土豆、玉米、白芸豆和牡丹等作物后,粗茎秦艽根际土壤细菌和真菌群落多样性显著增高,致病菌属消失或比例下降,有益菌属比例增高成为优势菌群,这些有益微生物具有固氮、溶磷、解钾、产生铁载体和激素的能力,可有效改善根际土壤菌群结构^[13-14]。邱黛玉等^[15]间作大蒜对根际土壤微生物的影响作用比较显著,生长后期间作大蒜作用下各处理较当归单作明显减缓了细菌,放线菌的减少速度,对真菌数量的增加有明显的抑制作用。本研究中,致病菌群在

地膜种植模式中大量聚集,导致粗茎秦艽根际土壤微生物出现从细菌型到真菌型的转变,镰刀菌属及支孢瓶霉属在特定条件下可分泌毒素^[16],这与地膜种植模式粗茎秦艽易患叶斑病和根腐病等病虫害相关。通过根际土壤微生物聚类分析,表明不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物相对丰度差异显著,且不同栽培模式粗茎秦艽根际土壤微生物优势菌群不相同。综上表明,不同栽培模式,影响粗茎秦艽根际土壤微生物群落组成及其结构多样性,合理的间作模式和无地膜种植可以改善粗茎秦艽根际土壤微环境。

4.2 不同栽培模式影响粗茎秦艽产量及品质 不同栽培模式不仅影响根际土壤微生物结构组成多样性,还影响粗茎秦艽产量及次生代谢产物的积累与形成,进一步影响其药材品质^[17]。主要通过改善根际土壤微环境,调控根际土壤微生物多样性,提高有益菌群比例,提高粗茎秦艽产量及促进次生代谢产物的积累和形成^[18],从而提高品质。罗影子等^[19]研究表明,天麻根际土壤微生物群落结构及其代谢产物对于调控植物生长、改善植物营养和抵御病虫害等胁迫都具有重要的作用。本研究中,采取无地膜种植和间作玉米、土豆、白芸豆和牡丹等作物后,粗茎秦艽根际土壤中变形菌、放线菌、嗜热菌、酸微菌和酸杆菌等有益菌群比例增高成为优势

菌群,变形菌和放线菌可以产生多种抗生素和植物生长所需的激素,嗜热菌促进土壤有机物的降解,酸杆菌具有合成活性物质的能力,抑制病原菌的生长^[20],酸杆菌可降解植物残体多聚物、参与铁循环、促进光合作用和参与单碳化合物的代谢, γ -变形杆菌纲的细菌能形成固氮的根瘤菌,对根际土壤有利,而硝化螺旋菌可以减少亚硝酸盐在土壤中的积累,增加植物可利用的氮素营养^[21-22]。这些有益菌群,通过调控根系土壤微环境平衡,有效降低粗茎秦艽连作障碍及其病虫害,促进粗茎秦艽生长,促进次生代谢产物尤其是药用活性成分的合成和积累,进而提高粗茎秦艽产量及其品质。

5 小结

本研究揭示了不同栽培模式对粗茎秦艽产量及根际土壤微生物和次生代谢产物的影响,结果证实了合理的间作模式和无地膜种植可以改善粗茎秦艽根际土壤微环境,调控根际土壤细菌和真菌群落结构组成,促进粗茎秦艽次生代谢产物的积累和形成,提高粗茎秦艽产量的同时提升了粗茎秦艽药材的品质,也可提高土地生产利用率,为粗茎秦艽的生态化及规范化种植进一步推广奠定理论基础,从而有利于粗茎秦艽资源的可持续利用。

[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,2020:1088.
- [2] 杨晓,马子豪,马婕,等. 粗茎秦艽种子萌发过程的转录组及关键因子分析[J]. 中草药,2021,52(1):219-226.
- [3] 杨飞霞,王玉,夏鹏飞,等. 秦艽化学成分和药理作用研究进展及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药,2020,51(10):2718-2731.
- [4] 李春雪,曾锐,高元平,等. 粗茎秦艽醇提物体外经皮渗透性研究[J]. 中草药,2020,51(11):2914-2921.
- [5] 张亚琴,陈雨,雷飞益,等. 药用植物化感自毒作用研究进展[J]. 中草药,2018,49(8):1946-1956.
- [6] 吴红森,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.
- [7] 郭秀芝,彭政,王铁霖,等. 间套作体系下种间互作对药用植物影响的研究进展[J]. 中国中药杂志,2020,

45(9):2017-2022.

- [8] 何雅祺,王鑫鑫,张弛,等. 间作、套种模式在中药材栽培中的效应研究进展[J]. 江苏农业学报,2021,37(4):1077-1083.
- [9] 余斐,苏艳,李吉跃,等. 植物根际促生菌促生机理研究[J]. 广东林业科技,2017,33(2):107-112.
- [10] 郭兰萍,康传志,周涛,等. 中药生态农业最新进展及展望[J]. 中国中药杂志,2021,46(8):1851-1857.
- [11] WU L, WEN C, QIN Y, et al. Phasing amplicon sequencing on Illumina Miseq for robust environmental microbial community analysis[J]. BMC Microbiol,2015,15:125.
- [12] 王升,蒋待泉,康传志,等. 药用植物次生代谢在中药材生态种植中的作用及利用[J]. 中国中药杂志,2020,45(9):2002-2008.
- [13] 余斐,苏艳,李吉跃,等. 植物根际促生菌促生机理研究[J]. 广东林业科技,2017,33(2):107-112.
- [14] 曾美娟,钟永嘉,刁勇. 药用植物根际促生菌促生机理研究进展[J]. 生物技术通报,2017,33(11):13-18.
- [15] 邱黛玉,沈鹏瑞,张磊,等. 大蒜对膜侧栽培当归连作、轮作土壤环境及产量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(3):156-162.
- [16] 彭政,郭秀芝,徐扬,等. 药用植物与根际微生物互作的研究进展与展望[J]. 中国中药杂志,2020,45(9):2023-2030.
- [17] 刘长征,周良云,廖沛然,等. 何首乌-穿心莲间作对何首乌根际土壤放线菌群落结构和多样性的影响[J]. 中国中药杂志,2020,45(22):5452-5458.
- [18] 王琪,王红兰,孙辉,等. 蚕豆间作对羌活次生代谢产物及根际土壤微生物多样性的影响[J]. 中国中药杂志,2022,47(10):2597-2604.
- [19] 罗影子,黄明进,王大昌,等. 不同产量下天麻根际土壤微生物多样性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(1):133-140.
- [20] 王光华,刘俊杰,于镇华,等. 土壤酸杆菌门细菌生态学研究进展[J]. 生物技术通报,2016,32(2):14-20.
- [21] SHIRAIISHI A, MATSUSHITA N, HOUGETSU T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. [J]. Syst Appl Microbiol,2010,33(5):269-274.
- [22] 何冬梅,王海,陈金龙,等. 中药微生态与中药道地性[J]. 中国中药杂志,2020,45(2):290-302.

[责任编辑 顾雪竹]