

连作条件下地黄药用品质及土壤微生态特性分析*

李振方^{1,2} 杨燕秋² 谢冬凤² 朱兰芳² 张自冠² 黄木极²
刘宗泉² 张重义^{2,3} 林文雄^{1,2**}

(1. 生物农药与化学生物学教育部重点实验室 福州 350002; 2. 福建农林大学农业生态研究所 福州 350002;
3. 河南农业大学中药材研究所 郑州 450002)

摘 要 怀地黄是我国著名“四大怀药”之一,在其种植过程中存在着非常严重的连作障碍。本研究探讨了连作对地黄药用品质的影响,并从土壤微生态方面分析了连作障碍造成地黄药用品质下降的原因。从怀地黄道地产区河南省焦作地区和地黄主产区山西省临汾地区分别采集正茬地黄及其正茬土壤、重茬地黄及其重茬土壤和未种植地黄的对照土壤,利用生药学研究方法对两个产区正茬和重茬地黄的药用品质进行评价,并对 4 种土样的自毒作用潜力、土壤微生物群落和土壤酶活性指标进行测定分析。结果表明,道地产区与非道地产区地黄品质的差异达到显著水平($P < 0.05$,下同),但正茬与重茬地黄的品质差异显著高于产区之间差异;两产区地黄连作均显著抑制地黄幼苗生长;连作还造成根际土壤细菌数量减少,土壤真菌和放线菌数量增多,土壤微生物类型由“细菌型”向“真菌型”过渡;与正茬土壤相比,连作根际土壤中土壤脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶的活性显著下降,土壤多酚氧化酶、纤维素酶和蛋白酶的活性有所增加,但土壤磷酸酶活性在两个产区连作土壤中呈现相反的变化趋势。由此可见,连作会引起土壤酶活性和土壤微生态区系的变化,降低了地黄对营养物质的吸收利用,进而造成地黄药用品质下降。

关键词 连作障碍 地黄 自毒作用 正茬 重茬 根际微生物 土壤酶

中图分类号: S567.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-3990(2012)02-0217-08

Effects of continuous cropping on the quality of *Rehmannia glutinosa* L. and soil micro-ecology

LI Zhen-Fang^{1,2}, YANG Yan-Qiu², XIE Dong-Feng², ZHU Lan-Fang², ZHANG Zi-Guan²,
HUANG Mu-Ji², LIU Zong-Quan², ZHANG Zhong-Yi^{2,3}, LIN Wen-Xiong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Agroecology, Fujian Agriculture and Forest University, Fuzhou 350002, China; 3. Institute of Chinese Herbal Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract *Rehmannia glutinosa* L. is one of Chinese herbal medicines with serious cultivation obstacles. In this study, samples of newly cultivated and continuously cropped *R. glutinosa* soil and uncultivated soil were collected in *R. glutinosa* genuine producing area in Jiaozuo City of Henan Province and *R. glutinosa* production area in Linfen City of Shanxi Province. *R. glutinosa* samples also were collected from the same areas. The soil samples were then evaluated in relation to *R. glutinosa* quality under continuous cropping, and *R. glutinosa* quality decline mechanisms were explored in terms of soil micro-ecological (soil microbes and enzyme) activities. The results showed that *R. glutinosa* quality in the genuine producing area was significantly different ($P < 0.05$) from that in the production area. However, the quality differences of *R. glutinosa* between newly cultivation and continuous cropping were significantly higher than those between different producing areas. Continuous cropping in the two areas significantly inhibited *R. glutinosa* seedling growth. While continuous cropping reduced the number of rhizosphere bacteria, it increased fungi and actinomycetes populations. This resulted in the transition from bacteria-populated to fungi-populated soil type. Compared with newly cultivated *R. glutinosa* soil, continuously cropped *R. glutinosa* soil significantly decreased the activities of urease, sucrase and catalase ($P < 0.05$) while slightly in-

* 国家自然科学基金项目(30772729)和福建省自然科学基金项目(2008J0051)资助

** 通讯作者: 林文雄(1957—), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物生理与分子生态学。E-mail: wenxiong181@163.com

李振方(1981—), 男, 博士研究生, 研究方向为药用植物生理与分子生态学。E-mail: sxlizhenfang@163.com

收稿日期: 2011-05-07 接受日期: 2011-08-26

creased the activities of polyphenoloxidase, cellulose and protease in the two areas. However, phosphatase activity in continuously cropped *R. glutinosa* soil exhibited the opposite trend for the two areas. Therefore, speculation was put forward that auto-toxicity changed the soil micro-ecology and somehow affected soil enzyme activity, thereby reducing *R. glutinosa* ability to absorb nutrients.

Key words Cultivation obstacle, *Rehmannia glutinosa* L., Auto-toxicity, Newly planted soil, Continuously cropped soil, Rhizosphere microbe, Soil enzyme

(Received May 7, 2011; accepted Aug. 26, 2011)

中药在疾病防治中的作用日益明显,其国内外需求量日益增加,但在农业生产特别是药用植物栽培中存在着连作障碍,严重制约了农业产品的形成,而以根类、根茎类入药的药用植物尤为明显,有60%存在严重的连作障碍^[1-2]。地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)在我国河南、山西、山东等省市均有栽培品种,尤以河南省焦作地区(古怀庆府)的地黄(怀地黄)最具药用价值,成为焦作地区最具盛名的道地药材——“四大怀药”之一。但玄参科多年生草本植物地黄却存在非常严重的连作障碍。在同一地块上种植1茬地黄后,须经8~10年后方可再种,重茬连作会出现地上部生长不良,根部不能正常膨大,不能形成具有商品价值的块根,严重影响地黄中药材的产量和品质^[3]。由于连作障碍的影响,目前地黄主产区已经由其道地产区向山西晋南地区和山东地区转移,这也严重影响了怀地黄现代化生产和区域经济的发展^[4-5]。在连作障碍成因及其作用机理不明的情况下,大部分药农往往加大肥料的投入以期提高产量,结果反而造成病虫害频发,提高了生产成本,导致农残超标,还严重影响怀地黄的品质,更为严重的是大量施用农药、化肥,造成“农药残留、抗性和再猖獗”的问题,并污染农田土壤及水体环境,最终危及人类健康。如何解决连作障碍已经成为怀地黄栽培中亟待解决的问题,该问题的解决也将为其他药用植物连作障碍问题的突破提供参考。

造成药用植物连作障碍的主要原因有:①土壤营养失衡^[6-7];②药用植物分泌的自毒物质产生的自毒作用^[8-9];③土壤微生态环境劣化引起病原微生物数量增加和病虫害加剧^[10-11]。研究认为,药用植物分泌的化感物质不仅可以直接作用于下茬作物产生自毒作用,还可以刺激或诱导土壤微生物区系发生变化,而这些微生物也能通过吞噬和消化作用改变自毒物质的数量和种类进而影响药用植物的生长^[12-14]。刘峰等^[15]通过研究水苏糖铵盐培养液对土壤细菌生长的影响,得出大多数土壤细菌不能很好地利用水苏糖作为其能源物质,因此可能造成根际细菌的种类和数量大幅下降,仅少数可较好利用水苏糖的土壤细菌活动旺盛,这些能够良好利用水苏糖的土壤细菌有可能作为“优势菌”大量繁殖,从而造成地黄

根部土壤微生物失衡。王明道等^[16]运用传统平板培养方法及变性梯度凝胶电泳(DGGE)分析法发现,地黄连作引起土壤根际、根外细菌数量减少,根际放线菌数量增加,根外数量变化不大,但真菌种类和数量都有较大变化,木霉和黄曲霉数量增加,土壤生态系统已开始失调。鞠会艳和韩丽梅^[17]研究表明,连作和轮作大豆根分泌物对半裸镰孢菌、粉红粘帚菌和尖镰孢菌尤其是对半裸镰孢菌的生长有明显化感促进作用。

基于此,本研究从怀地黄道地产区河南省焦作地区和地黄主产区山西省临汾地区分别采集正茬地黄及其正茬土壤,以及重茬地黄及其重茬土壤和对照土壤,首先进行两个产区正茬和重茬地黄的品质评价,探讨连作障碍对地黄药用品质的影响。进一步探讨两个产区连作与非连作土壤样品自毒作用潜力,从土壤理化性质和土壤微生态方面探讨连作障碍引起地黄药用品质下降的原因,以期对怀地黄连作障碍的形成过程进行探讨,对研究连作障碍的消减技术提供理论依据与实践参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2009年11月分别在怀地黄道地产区河南省焦作地区和地黄主产区山西省临汾地区采集种植1年地黄的正茬土壤及其块根、连作1年地黄的重茬土壤及其地黄块根,以及邻近未种地黄的耕作田土作为对照土壤。采用五点取样法取样,采集耕作层0~15 cm的地黄根际土壤,根据Fujii等^[18]介绍的方法,采用抖落的方式使粘着在根部的土壤脱落下来。轻轻抖动就能脱落下来的为根圈土壤,需用力抖动才能脱落的土壤为根际土壤,最后仍粘附于根系上的土壤用干净毛刷刷下,即为根表土壤;混合根际和根表土壤,作为试验用根际土壤。取样后分别混合各取样点样品,分为3等份保存。进行道地产区与非道地产区正茬与重茬地黄的药用成分评价,进一步分析其土壤自毒作用和土壤微生态对其药用成分的影响。

1.2 地黄样品药用成分分析

1.2.1 地黄粗提物测定

将采集的正茬和重茬地黄块根,除去芦头及泥

沙,参照中国药典(2005版)规定的测定方法,对不同样品地黄做水分(烘干法)、水浸出物、醇浸出物、总灰分以及酸不溶性灰分测定。

1.2.2 梓醇标准曲线的线性范围考察

精密称量梓醇对照品5.0 mg,用甲醇定容至25 mL容量瓶中,摇匀。精密吸取0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、2.5 mL、5.0 mL,分别用甲醇定容至25 mL,摇匀,制得浓度分别为4 g·mL⁻¹、8 g·mL⁻¹、16 g·mL⁻¹、24 g·mL⁻¹、40 g·mL⁻¹的标准溶液,经0.22 μm的滤膜过滤后,5 L进样量,进样waters 2695高效液相色谱仪,以梓醇浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标作回归方程。

1.2.3 地黄样品梓醇提取

结合中国药典(2005版)和刘长河等^[19]的方法并略作修改,进行地黄样品中梓醇提取。取不同材料地黄鲜样,经80℃减压干燥24 h,切碎磨粉后,精密称取10 g,加水60 mL,称重,加热回流1 h,加热过程补足损失水分,过滤,弃去初滤液,精密吸取续滤液10 mL,以水饱和正丁醇提取8次,每次10 mL,合并正丁醇提取液,减压回收正丁醇相,残渣加甲醇溶解,并定容于10 mL量瓶中,作为供试溶液。

将上述梓醇粗提物,经0.22 μm的滤膜过滤后,5 L进样量,进样waters 2695高效液相色谱仪,色谱柱为Zorbax Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(0.6:99.4);流速为1.0 mL·min⁻¹,柱温25℃,检测波长是210 nm。以出峰保留时间和峰面积对4种地黄样品的梓醇含量进行分析。

1.2.4 加样回收率计算

在上述试验基础上,精密称取已知梓醇含量的4份地黄样品,每份约250 mg,分别加入0.9 mg梓醇标准品,每个样品3次重复,按照梓醇粗提方法制备供试溶液,用高效液相色谱仪(high performance liquid chromatography, HPLC)测定梓醇的含量。回收率计算公式:回收率(%)=(样品加标后梓醇实际测定值-样品未加标前梓醇含量)/加入标准品量×100%。

1.3 地黄自毒作用的生物测试

采用土壤-琼脂三明治法进行地黄自毒作用的测定^[20]。分别称取6种土壤样品4 g、20 g、100 g于13 cm(高)×6.2 cm(直径)组培瓶中,倒入20 mL冷却至约45℃左右浓度为0.7%的琼脂溶液,充分混匀,待固化后再加入少量浓度为0.4%的琼脂溶液覆盖于0.7%的琼脂表面,冷却后每个组配瓶中均匀点播萌发露白的“温85-5”地黄种子20粒,进行3次重复,以同等重量的沙子为对照。置入26℃控温光照培养箱中,每日光照时间12 h(8:00—20:00),光照强度为(4.17±0.18)×10³ lx,保持培养室内相对湿度为50%。14 d后测

量地黄胚根长,进行地黄自毒作用效应分析。

生物测试获得的原始数据均转化为抑制率(inhibition rate, IR),作为地黄自毒作用效应指标:IR=(T_i-T₀)/T₀×100%,IR>0表示存在促进作用,IR<0表示存在抑制作用,IR越小抑制作用越强,式中T_i为测试项目的处理值,T₀为对照值。

1.4 根际土壤微生物数量的测定

细菌、真菌、放线菌计数采用稀释涂布平板法^[21]。称取10 g鲜土置于无菌三角瓶(250 mL)中,加入90 mL无菌水和10粒直径5 mm的玻璃珠,37℃、180 r·min⁻¹恒温振荡30 min,静置30 s后,取上层菌液10 mL按照10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵和10⁻⁶ 4个稀释梯度进行稀释。

分别从10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 3个浓度的土壤稀释液中吸取200 μL均匀涂布于细菌和放线菌固体培养基上;从10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 3个土壤稀释液中吸取200 μL均匀涂布于真菌固体培养基上。每个梯度进行3次重复。

置于37℃恒温培养箱中培养3~5 d后计数。细菌培养采用葡萄糖牛肉膏蛋白胨培养基,真菌采用PDA培养基,放线菌采用淀粉硝酸钾培养基(高氏1号)。微生物数量以每克样品的菌数表示:每克样品的菌数=同一个稀释度3次重复的菌落平均数×5×稀释倍数。

1.5 根际土壤酶活性的测定

根际土壤酶活性的测定方法参照关松荫^[22]的方法并稍作修改。采用苯酚钠比色法测定土壤脲酶,采用3,5-二硝基水杨酸比色法测定土壤蔗糖酶,采用磷酸苯二钠法测定土壤碱性磷酸酶,采用蒽酮比色法测定纤维素酶,采用紫色没食子酸比色法测定土壤多酚氧化酶,采用Folin-Ciocalteu法测定土壤蛋白酶,采用高锰酸钾滴定法测定过氧化氢酶。

1.6 数据分析

试验原始数据的整理采用Excel软件完成,差异显著性检测采用DPS v7.05版软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 不同产区正茬与重茬地黄药用品质评价

2.1.1 梓醇线性梯度范围考察

以梓醇标准品将浓度为4 g·mL⁻¹、8 g·mL⁻¹、16 g·mL⁻¹、24 g·mL⁻¹、40 g·mL⁻¹的标准溶液等量进样5 μL于waters 2695高效液相色谱仪后,根据紫外检测结果,以梓醇浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标作回归方程,如表1所示,得到线性方程为y=21 672x-13.651, R²=0.999 9,表明梓醇浓度在4~40 g·mL⁻¹时呈线性关系。

表 1 梓醇线性关系测定结果
Table 1 Result of linear relation of catalpol

项目 Item	浓度梯度 Concentration gradient (g·mL ⁻¹)				
	4	8	16	24	40
进样量 Sample amount (g)	0.02	0.04	0.08	0.12	0.2
峰面积 Peak area	432.14	828.67	1 725.37	2 591.98	4 322.73
线性方程 Linear equation	$y=21\ 672x-13.651\ R^2=0.999\ 9$				

2.1.2 地黄样品加标回收率试验结果

对 4 个样品进行加标回收, 结果如表 2 所示, 计

算平均回收率为 99.22%, 回收效果较好, 表明上述梓醇提取和 HPLC 定量方法适合。

2.1.3 不同产区正茬与重茬地黄梓醇含量

将 4 个地黄样品的梓醇提取物, 以 5 μL 进样量, 按照梓醇标准品的洗脱体系进行洗脱, 以其出峰保留时间和峰面积对 4 种地黄样品的梓醇含量进行定量分析, 由测试样品(相对浓度为 16 mg·mL⁻¹)和梓醇对照品的高效液相色谱图可以看出, 在保留时间为 12.46 min 左右检测到梓醇的特征性色谱峰 (图 1)。

表 2 不同产区正茬与重茬地黄样品的加标回收率试验结果
Table 2 Marked recovery rate of samples of newly cultured and continuously cropped rehmannia in different regions

样品名称 Sample name	样品质量 Sample quality (g)	梓醇含量 Catalpol content (mg)	标样添加量 Adding amount of the standard substance (mg)	梓醇实际测定值 Measured catal- pol content (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	总回收率 Total recovery rate (%)
焦作正茬地黄 Newly cultured rehmannia in Jiaozuo	0.250 3	2.220 9	0.900 1	3.110 0	98.78	99.97 (n=9)	99.61 (n=36)
	0.249 6	2.214 7	0.898 7	3.105 5	99.12		
	0.250 6	2.223 7	0.901 2	3.143 0	102.01		
焦作重茬地黄 Continuously cropped rehmannia in Jiaozuo	0.249 8	1.646 4	0.896 3	2.554 8	101.35	99.12 (n=9)	
	0.251 1	1.655 0	0.901 5	2.540 5	98.23		
	0.250 9	1.653 7	0.901 2	2.535 0	97.79		
临汾正茬地黄 Newly cultured rehmannia in Linfen	0.250 1	1.860 0	0.907 5	2.764 7	99.69	99.30 (n=9)	
	0.250 4	1.862 2	0.899 6	2.756 6	99.42		
	0.250 1	1.860 0	0.907 3	2.756 3	98.79		
临汾重茬地黄 Continuously cropped rehmannia in Linfen	0.250 0	1.340 8	0.899 2	2.226 2	98.47	100.05 (n=9)	
	0.250 1	1.341 3	0.898 2	2.246 6	100.57		
	0.249 9	1.508 4	0.901 5	2.419 8	101.10		

表中所示数据为 3 次重复的平均值, 下同。Values are means of three replicates. The same below.

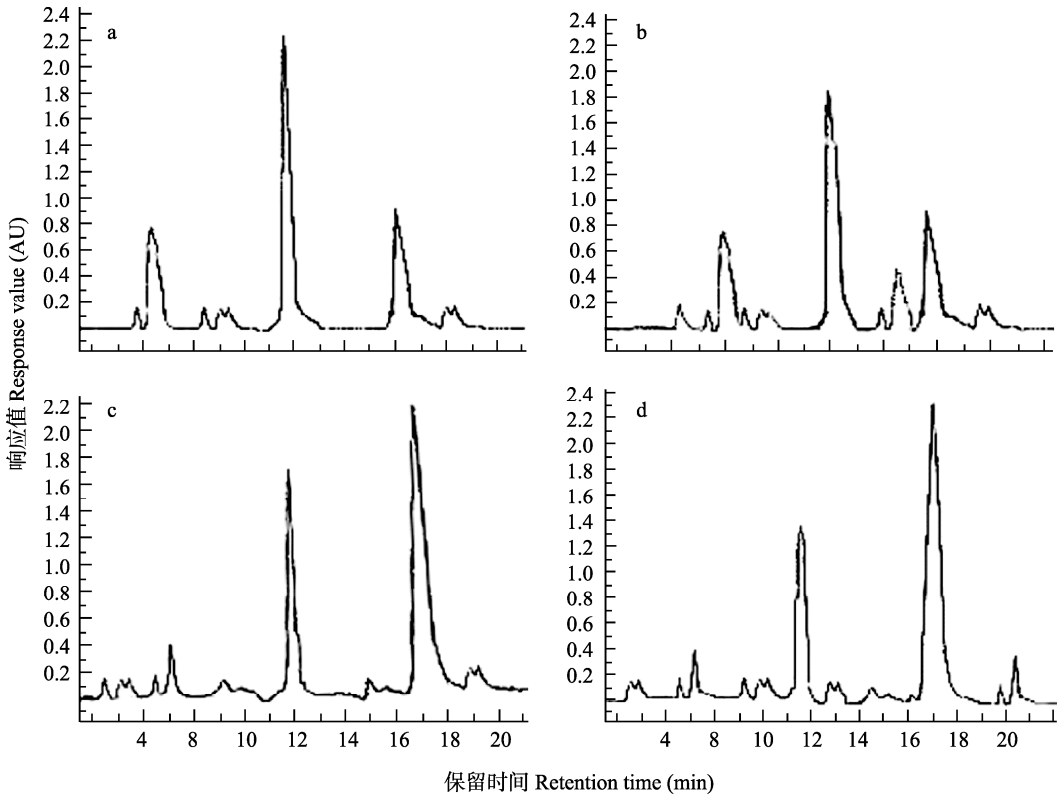


图 1 焦作和临汾地区正茬地黄(a, b)和重茬地黄(c, d)中梓醇的液相色谱定量分析

Fig. 1 Quantitative analysis of catalpol on newly cultured (a,b) and continuously cropped (c,d) rehmannia in Jiaozuo (a,c) and Linfen (b,d)

如表 2 所示, 依据正茬和重茬梓醇色谱峰面积计算得出正茬地黄梓醇含量分别为 $8.873 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (焦作)和 $7.437 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (临汾), 而其重茬地黄的梓醇含量为 $6.591 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (焦作)和 $5.363 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (临汾), 均能符合药典中的含量规定(不低于 0.2%)。

2.1.4 不同产区正茬与重茬地黄的质量

由表 3 可以看出, 两个产区正茬和重茬地黄的水分含量达到 $820 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 左右, 且重茬地黄水分含量要低于正茬地黄; 两个产区正茬和重茬地黄水浸出物含量差异达显著水平($P<0.05$, 下同), 且两地区重茬地黄的水浸出物含量高于正茬地黄, 其中焦作重茬地黄水浸出物含量最高($893.974 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), 临汾正茬地黄水浸出物含量最低($879.616 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$); 醇浸出物含量与水浸出物含量趋势相同, 两地区重茬地黄的醇浸出物含量高于正茬地黄; 两产区正茬地黄总还原糖含量之间没有较大差异, 但重茬地黄的总还原糖含量均显著低于正茬地黄; 两产区重茬地黄的灰分均显著高于正茬地黄; 对两产区正茬与重茬地黄的测定结果进行方差分析发现, 道地产区正茬地黄和重茬地黄中梓醇含量均高于非道地产区, 但其差异均未达显著水平, 两产区重茬地黄中梓醇含

量均显著低于正茬地黄。

由此可见, 虽然道地药材与非道地药材在水分含量、浸出物总量、总还原糖、灰分水平以及梓醇含量等测定指标上存在差异, 部分指标差异甚至达到显著水平, 但与正茬地黄相比, 连作造成地黄药用品质下降明显, 特别是浸出物总量、总还原糖和梓醇含量等指标的测定结果更为明显。这表明连作造成地黄药用品质下降作用明显, 甚至超过其产区间品质差异。

2.2 不同产区正茬与重茬地黄的自毒作用

对地黄自毒作用的生物测试结果表明, 道地产区与非道地产区地黄的茬后土壤(包括正茬土和重茬土)均对地黄幼苗存在抑制作用(表 4)。与沙子对照相比, 不同地黄产区对照土壤对地黄幼苗生长有促进作用, 但处理浓度与作用效果之间线性关系不明显, 且不同产区地黄对照土壤对地黄的促进差异不显著。两产区正茬土壤对地黄幼苗具有抑制作用, 抑制率达到 30%, 且抑制效果与处理浓度正相关, 即随着处理浓度增加, 作用效果越明显, 但两产区间抑制效果无显著差异。两地黄产区重茬土壤对地黄幼苗具有抑制作用, 抑制率最高达到 70%以上,

表 3 焦作和临汾正茬和重茬地黄质量性状指标比较

Table 3 Quality characters of newly cultured and continuously cropped rehmannia in Jiaozuo and Linfen $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

样品名称 Sample name	水分 Water content	水浸出物 Water extraction substance	醇浸出物 Ethanol extraction substance	总还原糖 Total reducing sugar	总灰分 Total ash content	酸不溶灰分 Acid insoluble ash content	梓醇含量 Catalpol content
焦作正茬地黄 Newly cultured rehmannia in Jiaozuo	821.312b	889.732b	145.681b	81.152a	39.537c	12.531c	8.873a
焦作重茬地黄 Continuously cropped rehmannia in Jiaozuo	819.684b	893.974a	153.549a	69.105b	41.153b	13.336b	6.591b
临汾正茬地黄 Newly cultured rehmannia in Linfen	830.105a	879.616c	148.306b	80.546a	40.579bc	13.414b	8.437a
临汾重茬地黄 Continuously cropped rehmannia in Linfen	829.947a	886.597b	155.515a	58.472b	42.833a	14.926a	5.363b

同列不同小写字母表示差异达 5%显著水平($n=3$) Data with different small letters within the same column are significantly different at 0.05 level ($n=3$).

表 4 焦作和临汾地区正茬与重茬地黄土壤浸提物对地黄的自毒作用

Table 4 Auto-toxicity effects of aqueous extracts from soils of newly cultured and continuously cropped rehmannia in Jiaozuo and Linfen

样品名称 Sample name	土壤浸提物浓度 Concentration of aqueous extracts ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	0.2		1.0		5.0	
	胚根长度 Radicle length (cm)	抑制率 IR (%)	胚根长度 Radicle length (cm)	抑制率 IR (%)	胚根长度 Radicle length (cm)	抑制率 IR (%)
焦作对照土 Uncultivated soil in Jiaozuo	2.90a	2.47	2.93a	3.53	2.86a	0
焦作正茬土 Newly cultured soil in Jiaozuo	2.00b	-28.27	1.98b	-30.04	1.94b	-32.17
焦作重茬土 Continuously cropped soil in Jiaozuo	1.68c	-40.64	1.53c	-45.94	0.73c	-74.48
临汾对照土 Uncultivated soil in Linfen	2.87a	1.41	2.87a	1.41	2.93a	2.41
临汾正茬土 Newly cultured soil in Linfen	1.98b	-30.04	1.96b	-30.74	1.96b	-31.46
临汾重茬土 Continuously cropped soil in Linfen	1.66c	-41.34	1.49c	-47.35	0.76c	-73.43

随处理浓度增加,作用效果加强;而且在试验过程中发现,高浓度的重茬土处理中有部分地黄幼苗表现出根部腐烂,根毛消失主根变短,叶片变小变厚,生长出现歧化。由此可见,地黄茬后土壤对地黄幼苗的抑制作用虽因其土壤品质不同,作用潜力不同,但其作用效果与作用趋势相同,既重茬土壤的抑制效果要显著高于正茬土壤。

2.3 不同产区正茬与重茬地黄根际土壤微生物数量变化

应用稀释平板法研究两产区重茬与正茬地黄土壤的微生物数量变化,结果表明(表5):种植地黄能引起土壤细菌发生明显变化,与未种植地黄的对照相比正茬土壤细菌数量显著增加,两产区分别增加197.43%和200.33%,均达到显著水平;与正茬土壤相比,地黄重茬种植造成土壤细菌数量下降,分别比正茬土壤下降48.55%和51.03%,但与对照相比却显著增加,分别增加53.00%和47.07%,均达到显著水平。

随着地黄种植年限的增加真菌数量增多,与对照相比,正茬土壤真菌数量分别增加 64.38%和59.52%,差异达到显著水平;重茬土壤真菌数量分别增加 166.43%和 173.56%,差异达到显著水平。

放线菌数量的变化趋势与真菌相同,即随着种植年限的增加而增多,差异达到显著水平,但增幅不大;正茬土壤和重茬土壤中放线菌数量均高于对照,分别增加42.37%、51.60%和78.96%、80.47%。

由此可见,细菌对连作的反应较敏感,随着种植年限的增加土壤真菌数量逐年增多,而对地黄种植年限的反应相对滞后。由同一种植年限的真菌与细菌比值(fungi/bacteria)可以看出,随着种植年限的增加,地黄土壤微生物类型由“细菌型”逐步向“真菌型”过渡。

2.4 不同产区正茬与重茬地黄根际土壤酶活性变化

对两个产区的正茬与重茬土壤进行酶活性测定,结果显示(表 6),地黄栽培能引起土壤酶活性发生显著变化,虽然由于两个地黄产区的地理差异等因素使得土壤酶活性存在差异,部分土壤酶活性甚至差异达到显著水平,但随地黄种植年限增加,两个产区的同种土壤酶活性的变化趋势基本相同。其中,土壤脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶的活性随着种植年限的增加而下降,土壤多酚氧化酶、纤维素酶和蛋白酶的活性随着种植年限增加而增加,但土壤磷酸酶活性却随着种植年限增加在不同产区土壤中呈现相反的变化趋势。

表 5 焦作和临汾地区正茬与重茬地黄根际土壤微生物数量的测定

Table 5 Rhizospheric soil microorganism number of newly cultured and continuously cropped rehmannia in Jiaozuo and Linfen $\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$

样品名称 Sample name	细菌 Bacteria ($\times 10^6$)	真菌 Fungi ($\times 10^4$)	放线菌 Actinomycetes ($\times 10^6$)	真菌/细菌 Fungi/ bacteria
焦作对照土 Uncultivated soil in Jiaozuo	5.83c	8.31c	3.28c	1.43
焦作正茬土 Newly cultured soil in Jiaozuo	17.34a	13.66b	4.67b	0.79
焦作重茬土 Continuously cropped soil in Jiaozuo	8.92b	22.14a	5.87a	2.48
临汾对照土 Uncultivated soil in Linfen	6.14c	7.98c	3.43c	1.30
临汾正茬土 Newly cultured soil in Linfen	18.44a	12.73b	5.32a	0.69
临汾重茬土 Continuously cropped soil in Linfen	9.03b	21.83a	6.19a	2.42

表 6 焦作和临汾地区正茬和重茬地黄土壤样品中土壤酶活性

Table 6 Enzymes activities of soils of newly cultured and continuously cropped rehmannia in Jiaozuo and Linfen

样品名称 Sample name	脲酶 Urease [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}(\text{soil})$]	蔗糖酶 Sucrase [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}(\text{soil})$]	磷酸酶 Phosphatase [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}(\text{soil})$]	纤维素酶 Cellulase [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}(\text{soil})$]	多酚氧化酶 Polyphenol oxidase [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}(\text{soil})$]	蛋白酶 Protease [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}(\text{soil})$]	过氧化氢酶 Catalase [$\text{mL}(0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{KnMO}_4) \cdot \text{g}^{-1}(\text{soil})$]
焦作对照土 Uncultivated soil in Jiaozuo	2.35b	20.34a	0.39a	0.058b	0.112c	0.053d	2.87a
焦作正茬土 Newly cultured soil in Jiaozuo	1.57c	14.52c	0.32b	0.092b	0.327b	0.112c	2.02c
焦作重茬土 Continuously cropped soil in Jiaozuo	0.58e	5.48e	0.24a	0.154a	0.455a	0.274a	1.38e
临汾对照土 Uncultivated soil in Linfen	3.24a	18.55b	0.33b	0.055b	0.098c	0.187b	2.77a
临汾正茬土 Newly cultured soil in Linfen	2.16b	15.67c	0.41a	0.085b	0.345b	0.196b	2.46b
临汾重茬土 Continuously cropped soil in Linfen	1.01d	8.32d	0.45a	0.186a	0.642a	0.321a	1.95d

随着种植年限的增加土壤脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶的活性下降。其中, 焦作产区的地黄重茬土壤脲酶活性比正茬和对照土壤下降63.06%和75.32%, 临汾产区的地黄重茬土壤比正茬和对照土壤下降53.24%和68.83%。两个产区的重茬土壤中蔗糖酶活性也分别比对照下降73.06%和55.15%。过氧化氢酶活性也呈相同的降低趋势, 分别下降51.92%和29.60%。

而两个产区多酚氧化酶活性重茬土壤与正茬土壤相比分别增加39.14%和86.09%, 达显著水平。对纤维素酶和蛋白酶而言, 焦作产区重茬分别比正茬和对照增加67.39%、165.52%和144.64%、416.98%, 差异均达显著水平。临汾产区土壤中的纤维素酶和蛋白酶的变化趋势与焦作产区相一致, 随连作年限的增加, 重茬土壤纤维素酶活性和蛋白酶活性也分别增加118.82%、238.18%和63.78%、71.66%。

而两种产区土壤中的磷酸酶活性变化却呈相反变化。随着种植年限的增加, 焦作产区土壤磷酸酶活性降低, 重茬分别比正茬土壤和对照降低25.00%和38.46%, 达到显著水平。而临汾产区土壤酶活性却随种植年限增加而增高, 重茬分别比正茬和对照土壤酶活性增加9.76%和36.36%, 达到显著水平。

3 讨论与结论

地黄连作障碍在药用植物栽培中非常明显, 在同一地块上种植1茬地黄后, 须经8~10年方可再种, 地黄连作障碍迫使地黄栽培必须进行土地的轮换, 这造成了怀地黄主产区由河南省古怀庆府地区(今河南省焦作地区)向山西晋南地区转移, 目前山西省地黄产量已占全国地黄产量的65%以上, 成为地黄的重要产区, 年产量约1.5万 t。本研究小组对“温85-5”地黄栽培种调查发现, 焦作地区怀地黄正茬产量平均为45 000~52 500 kg·hm⁻², 而临汾地区产量为30 000~45 000 kg·hm⁻², 地黄产量存在明显差异。本研究对两个产区地黄品质评价结果表明, 道地药材与非道地药材在水分含量、浸出物总量、总还原糖、灰分水平以及梓醇含量等药用品质方面也存在差异, 部分指标差异甚至达到显著水平。但与重茬地黄相比, 连作造成地黄药用品质下降明显, 特别是浸出物总量、总还原糖和梓醇含量等指标的测定结果更为明显, 表明连作造成地黄药用品质下降作用明显, 甚至超过其产区间品质差异。可见, 不同产区间地黄品质差异主要体现在单位面积产量上, 而连作与非连作栽培不仅会造成地黄产量下降, 还明显降低其药用成分含量。

目前, 对地黄连作引起的地黄产量和品质下降的研究已日益增多, 造成地黄连作障碍的原因普遍

有3种, 即土壤营养失衡、植物的自毒作用以及土壤微生态环境劣化而引起病原微生物数量增加和病虫害加剧。多数研究认为, 地黄分泌的化感物质不仅可以直接作用于下茬作物产生自毒作用, 还可以刺激或诱导土壤微生物群落结构发生变化, 也说明地黄自毒物质在连作障碍中起到了诱导和趋化作用。从土壤-琼脂三明治法对不同产区地黄的茬后土壤自毒作用潜力评价结果可以看出, 不同产区地黄茬后土壤提取物均对地黄幼苗具有抑制作用, 且随着处理浓度增加, 抑制作用越明显, 高浓度的重茬土处理中有部分地黄幼苗表现出根部腐烂、根毛消失、主根变短、叶片变小变厚、生长出现歧化。由此可见, 地黄连作障碍与其生长土壤养分关系不大而与其生长和生物特性相关。这与本研究小组前期单独对地黄正茬土壤进行的自毒作用研究结果相一致^[23]。该试验也进一步证实了地黄连作障碍特别是地黄自毒作用在不同产区土壤中均能明显抑制地黄生长, 进而造成其产量下降、品质降低。

许多试验研究也发现, 植物自毒作用不仅抑制植株的生长和种子萌发^[24], 还影响土壤微生物群落结构发生变化^[25,11]。对不同种植年限地黄土壤根基微生物数量分析发现, 地黄连作还造成根际土壤细菌数量减少, 土壤真菌和放线菌数量增多, 随着种植年限增加, 地黄土壤微生物类型由“细菌型”逐步向“真菌型”过渡, 这与陈慧等^[10]结果不一致, 可能与土样采集时间等因素有关。但多数学者研究发现连作会造成土壤微生物类群从“细菌型”向“真菌型”转化, 导致地力衰竭^[26], 并把真菌数量作为土壤肥力的一个重要判定指标^[27-28]。王明道等^[16]也利用DGGE分析法对地黄的连作问题进行了研究。本研究表明, 地黄连作引起土壤细菌数量减少, 像镰刀菌、木霉和黄曲霉等真菌种类和数量增加, 说明连作的土壤生态系统已开始失调, 这可能是地黄连作障碍产生的原因。许多研究还从连作土壤中分离培养出大量病原真菌, 从各方面阐述了作物连作障碍中土壤微生态环境劣化引起病原微生物数量增加这一造成连作障碍的重要原因^[6,29]。

土壤酶是表征土壤中物质、能量代谢旺盛程度和土壤质量水平的一个重要生物指标, 分析不同连作年限地黄土壤酶活性不仅可以了解或预测某些营养物质的转化情况以及土壤肥力的演变趋势, 还可以进一步了解连作条件植物对营养物质的吸收利用情况。本研究结果表明, 地黄连作导致土壤脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶的活性随着种植年限的增加而下降, 土壤多酚氧化酶、纤维素酶和蛋白酶的活性随着种植年限的增加而增加, 但土壤磷酸酶活性却

随着种植年限增加而在不同产区土壤中呈现相反的变化趋势。可推测,地黄连作障碍表现出的营养物质的利用下降与自毒物质所引起的根际微生物种群、土壤酶活性等多种微生态因子相关。因此,在不同地域中种植地黄,其忌地年限可能不同,但这种栽培地块的更换并不能从根本上消除地黄连作障碍。此外,本研究小组也在进行自毒物质的生态效应研究,分析自毒物质介导下的土壤微生物区系变化规律,进一步从根际生态学方面探讨地黄连作障碍形成原因。

参考文献

- [1] 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
- [2] 赵杨景.植物化感作用在药用植物栽培中的重要性和应用前景[J].中草药,2000,31(8):1-4
- [3] 张重义,林文雄.药用植物的化感自毒作用与连作障碍[J].中国生态农业学报,2009,17(1):189-196
- [4] 郭巧生.药用植物栽培学[M].北京:高等教育出版社,2004:58-60
- [5] 杜家方,尹文佳,张重义,等.不同间隔年限地黄土壤的自毒作用和酚酸类物质含量[J].生态学报,2009,28(3):445-450
- [6] 喻敏,余均沃,曹培根,等.百合连作土壤养分及物理性状分析[J].土壤通报,2004,35(3):377-379
- [7] 梁银丽,除志杰,徐福利,等.黄土高原设施农业中的土壤连作障碍[J].水土保持学报,2004,18(4):134-136
- [8] 杜家方,尹文佳,李娟,等.连作地黄根际土壤中酚酸类物质的动态变化[J].中国中药杂志,2009,34(8):948-952
- [9] 李明,马永清,税军峰.南瓜组培根根系分泌物的化感效应研究[J].应用生态学报,2005,16(4):744-749
- [10] 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
- [11] 刘红彦,王飞,王永平,等.地黄连作障碍因素及解除措施研究[J].华北农学报,2006,21(4):131-132
- [12] Inderjit. Soil microorganisms: An important determinant of allelopathic activity[J]. Plant and Soil, 2005, 274(1/2): 227-236
- [13] 金扬秀,谢关林,孙祥良,等.大蒜轮作与瓜类枯萎病发病的关系[J].上海交通大学学报:农业科学版,2003,21(1):9-12
- [14] 官会林,陈昱君,朱海春,等.三七病株根际土壤微生物特征研究[J].农业与技术,2005,25(6):56-58
- [15] 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,2007,38(12):1871-1874
- [16] 王明道,吴宗伟,原增艳,等.怀地黄连作对土壤微生物区系的影响[J].河南农业大学学报,2008,42(5):532-538
- [17] 鞠会艳,韩丽梅.连作大豆根分泌物对根腐病原菌及种子萌发的影响[J].吉林农业大学学报,2002,24(4):45-49
- [18] Fujii Y, Furubayashi A, Hiradate S. Rhizosphere soil method: A new bioassay to evaluate allelopathy in the field[C]//Proceedings and Selected Papers of the Fourth World Congress on Allelopathy. Wagga Wagga: Charles Sturt University, 2005
- [19] 刘长河,李更生,黄迎新,等.不同产地地黄中梓醇含量比较[J].中医研究,2001,14(5):10-13
- [20] 孙红艳,林瑞余,叶陈英,等.化感小麦种质资源的筛选与评价[J].中国生态农业学报,2008,16(4):894-899
- [21] 张文婷,来航线,王延平,等.黄土高原不同植被坡地土壤微生物区系特征[J].生态学报,2008,28(9):4228-4234
- [22] 关松荫.土壤酶及其研究法[M].北京:农业出版社,1987:28-80
- [23] 李振方,齐晓辉,李奇松,等.地黄自毒物质提取及其生物指标测定[J].生态学报,2010,30(10):2576-2584
- [24] 冯志红,闫立英,王久兴,等.连作栽培中自毒物质对黄瓜种子萌发和幼苗生长的影响[J].种子,2005,24(6):41-44
- [25] 邱立友,戚元成,王明道,等.植物次生代谢物的自毒作用及其与连作障碍的关系[J].土壤,2010,42(1):1-7
- [26] 高玉峰,贺字典.影响土壤真菌多样性的土壤因素[J].中国农学通报,2010,26(10):177-181
- [27] 徐文修,罗明,李银平,等.作物茬口对连作棉田土壤环境及棉花产量的影响[J].农业工程学报,2011,27(3):271-275
- [28] 季尚宁,肖玉珍,田慧梅,等.土壤灭菌对连作大豆生长发育的影响[J].东北农业大学学报,1996,27(4):326-329
- [29] 何江华,付香斌,马东明,等.地黄块根膨大过程中土壤化感物质含量及微生物数量变化研究[J].河南科学,2008,26(11):1369-1372