中国生态农业学报(中英文)
Chinese Journal of Eco-Agriculture
中文核心期刊
中国科技核心期刊
中国精品科技期刊
百种中国杰出学术期刊
中国科学引文数据库源刊

强还原和淹水处理对地黄连作障碍的消减效应

古力，李烜桢，李明杰，余志坚，林梅桂，王建明，谢加唯，张重义

引用本文:
古力, 李桢, 李明杰, 等. 强还原和淹水处理对地黄连作障碍的消减效应[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2021, 29(8): 1305–1314.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.210114

(向下翻页，阅读全文)

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

马铃薯与玉米复合种植对土壤化感物质及土壤细菌群落结构的影响

Effects of potato and maize compound planting on soil allelochemicals and soil bacterial community structure

中国生态农业学报(中英文). 2020, 28(6): 794–802 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.190780

甘肃中部沿黄灌区马铃薯连作对土壤化学和生物学性质的影响

Effect of continuous potato monoculture on soil chemical and biological properties in Yellow River Irrigation Area in central Gansu Province

中国生态农业学报. 2017, 25(4): 581–593 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.160848

PLFA方法研究连作对加工番茄根际土壤微生物群落结构的影响

Microbial community structure in rhizosphere soils of long–term continuously cropped processing tomato based on PLFA method

中国生态农业学报. 2017, 25(4): 594–604 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.160844

茄子与香蕉轮作配施生物有机肥对连作蕉园土壤微生物区系的影响

Effect of eggplant–banana rotation with bioorganic fertilizer treatment on soil microflora in banana continuous cropping orchard

中国生态农业学报. 2017, 25(1): 78–85 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.160609

马铃薯连作栽培对土壤微生物多样性的影响

Effects of continuous potato cropping on the diversity of soil microorganisms

中国生态农业学报. 2015(5): 589–596 https://doi.org/10.13930/j.cnki.cjea.140888

中国生态农业学报(中英文) 2021 年 8 月 第 29 卷 第 8 期
Chinese Journal of Eco-Agriculture, Aug. 2021, 29(8): 1305−1314

DOI: 10.13930/j.cnki.cjea.210114

古力, 李烜桢, 李明杰, 余志坚, 林梅桂, 王建明, 谢加唯, 张重义. 强还原和淹水处理对地黄连作障碍的消减效应[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2021, 29(8): 1305−1314

GU L, LI X Z, LI M J, YU Z J, LIN M G, WANG J M, XIE J W, ZHANG Z Y. Alleviating effect of strong reduction and flooding treatment on continuous cropping obstacles in *Rehmannia glutinosa*[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2021, 29(8): 1305−1314

强还原和淹水处理对地黄连作障碍的消减效应*

古 力[1,3], 李烜桢[2], 李明杰[1,3], 余志坚[1], 林梅桂[1], 王建明[1], 谢加唯[1], 张重义[1,3**]

(1. 福建农林大学农学院 福州 350002; 2. 河南农业大学林学院 郑州 450002; 3. 福建农林大学作物遗传育种与综合利用教育部重点实验室 福州 350002)

摘 要: 地黄是我国著名的大宗中药材, 但是在其栽培过程中存在严重的连作障碍现象, 至今尚未得到有效解决。为了开发地黄连作障碍消减技术, 本文研究了强还原和淹水处理对连作地黄关键生长指标, 连作土壤理化性质、细菌群落结构及其生物学功能的影响。结果表明, 强还原和淹水处理提高了连作土壤中瘤胃球菌属和肠球菌属等厌氧异养型细菌的相对丰度, 形成了富含 Fe^{2+}和有机酸等抑制病原菌的土壤环境; 其中, 强还原处理后土壤中 Fe^{2+}和有机酸含量比连作对照分别提高 4.73 倍和 3.54 倍, 淹水处理后土壤中 Fe^{2+}和有机酸含量比连作对照分别提高 1.65 倍和 1.12 倍。同时, 假单胞菌属等益生菌群落在处理后的土壤中迅速重建。然而, 强还原和淹水处理对土壤理化性质和细菌群落结构的影响存在一定差异, 二者对地黄连作障碍的消减效果也有所不同: 添加秸秆等有机物的强还原处理后连作土壤的有机质含量、碱解氮、速效磷和速效钾含量均有所提高, 而淹水处理效果不明显; 淹水处理的细菌香农指数和 Chao1 指数均有所下降, 强还原处理的细菌香农指数有所下降, 而 Chao1 指数有所上升, 且细菌群落组成的变化也有所不同。强还原和淹水处理均可有效提高连作地黄的存活率和产量, 并且以强还原处理效果较优, 其存活率和产量比连作对照分别提高 1.94 倍和 4.04 倍。因此, 强还原和淹水处理能够改善连作土壤的理化性质及其微生物群落结构, 达到消减地黄连作障碍的效果, 有效提高连作地黄的存活率和产量。

关键词: 地黄; 强还原; 淹水; 土壤 Fe^{2+}含量; 土壤有机酸含量; 土壤微生物群落; 连作障碍

中图分类号: R282.2 开放科学码(资源服务)标识码(OSID):

Alleviating effect of strong reduction and flooding treatment on continuous cropping obstacles in *Rehmannia glutinosa**

GU Li[1,3], LI Xuanzhen[2], LI Mingjie[1,3], YU Zhijian[1], LIN Meigui[1], WANG Jianming[1], XIE Jiawei[1], ZHANG Zhongyi[1,3**]

(1. College of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 3. Key Laboratory of Ministry of Education for Genetics, Breeding and Multiple Utilization of Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

* 国家自然科学基金项目(82073962, 82073965)、国家重点研发计划课题(2017YFC1700705)、福建省自然科学基金项目(2020J01531)和福建农林大学杰出青年基金(Kxjq20010)资助

** 通信作者: 张重义, 主要研究方向为中药资源可持续利用。E-mail: hauzzy@163.com
古力, 主要研究方向为中药资源可持续利用。E-mail: guli5101@163.com

收稿日期: 2021-03-05 接受日期: 2021-05-08

* This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (82073962, 82073965), the National Key Research and Development Program of China (2017YFC1700705), the Natural Science Foundation of Fujian Province (2020J01531) and the Distinguished Youth Fund of Fujian Agriculture and Forestry University (Kxjq20010).

** Corresponding author, E-mail: hauzzy@163.com

Received Mar. 5, 2021; accepted May 8, 2021

Abstract: *Rehmannia glutinosa* is a popular medicinal herb in China. During *R. glutinosa* cultivation, serious consecutive monoculture problems are often encountered and have not yet to be effectively resolved. Preliminary studies found that an imbalance in the microbial communities in the rhizosphere soils is the main reason for consecutive monoculture problems; the abundance of pathogenic microorganisms significantly increased, whereas the beneficial microorganisms were inhibited. Therefore, it is important to control and alleviate the consecutive monoculture problem by inhibiting and balancing pathogenic microbes. This study sought to develop critical technology for alleviating the consecutive monoculture problems of *R. glutinosa* with strong reducing and flooding measures that may effectively inhibit the proliferation of pathogenic microbes. The key indices of treated *R. glutinosa* were analyzed, including plant growth and development, the physical and chemical properties of continuous cropping soil, the bacterial community structure, and its biological functions. The results indicated that the strong reducing and flooding treatments significantly increased the relative abundance of anaerobic heterotrophic bacteria, including *Ruminococcus* and *Enterococcus*, in the continuous cropping soils. This enhanced soil denitrification, creating special soil environments rich in Fe^{2+} and organic acids that inhibited pathogenic bacteria. Compared with the control soils, in the soils treated with strong reducing, the Fe^{2+} and organic acid levels increased by 4.73 times and 3.54 times, respectively, and in the soils treated with flooding, the same values increased by 1.65-fold and 1.12-fold, respectively. Concurrently, the beneficial bacteria community, such as *Pseudomonas*, was rapidly rebuilt in the treated soils; these bacteria have important roles that inhibit the proliferation of pathogens. The two methods, reducing and flooding, have different effects on the soil physical and chemical properties and the bacterial community structure of the consecutive cropping soils. Thus, the two methods have different efficiencies for alleviating the consecutive monoculture problem of *R. glutinosa*. Due to addition of straws, the strong reducing method increased contents of organic matter, available nitrogen, available phosphorus and available potassium of the consecutive cropping soils, while the flooding method did not show these effects. The Shannon index and Chao1 index under flooding decreased, while Shannon index decreased and Chao 1 index increased under the strong reduction. Both methods effectively increased the survival rate and yield of replanted *R. glutinosa*. The survival rate and yield of continuous cropping *R. glutinosa* treated with strong reducing increased by 1.94 times and 4.04 times, respectively, compared with those of the control plants. In contrast, the strong reducing treatment has more optimized effects that alleviate the consecutive monoculture problems of *R. glutinosa*. Both treatments alleviate the consecutive monoculture problem and improve the survival rate and yield of replanted *R. glutinosa* via improvements in the physical and chemical properties of the continuous cropping soils and their microbial communities. This study provides an important theoretical basis and technical reference for future studies of the strategies used to alleviate the consecutive monoculture problem during *R. glutinosa* production.

Keywords: *Rehmannia glutinosa*; Strong reduction; Flooding; Soil Fe^{2+} content; Soil organic acid content; Soil microbial community; Continuous cropping obstacle

地黄(*Rehmannia glutinosa*)为玄参科(Scrophulariaceae)多年生草本植物，以块根入药，因其用药历史悠久、临床疗效确切而被广泛种植，并成为我国常用大宗药材之一。然而，地黄生产中存在严重的连作障碍问题，每茬地黄收获后须间隔 8~10 年方可再种[1-2]。连作地黄大多表现为植株生长发育受阻，病害加剧，地下部块根不能正常膨大，产量和品质显著下降，甚至死亡造成绝收[3-4]。随着现代中药农业的发展，药用植物规模化、单一化连续种植现象凸显，由此导致的中药材产量降低、品质变劣、病虫害加重等连作障碍问题日趋严重[5]。据统计，约占 70%以上以根(或根茎)部入药的药用植物普遍存在一定程度的连作障碍，甚至由此引发一些药材的消亡或道地产区变迁，严重制约了中药材的可持续安全生产，如人参(*Panax ginseng*)、西洋参(*Panax quinquefolius*)、地黄(*Rehmannia glutinosa*)、三七(*Panax pseudoginseng*)和当归(*Angelica sinensis*)等[3,6-10]。

越来越多的证据表明：连作障碍的诱发是“植物-土壤-微生物”系统中各种量效关系综合作用的结果，其中土壤环境改变介导的根际微生态失衡是其主要诱因[11-14]。自然条件下，植物的健康生长和生物量的积累在极大程度上依赖于植物自身及其与根际微生物群落结构的关系[15-16]。因此，研究快速、安全、环保、有效的连作障碍消减策略和技术手段，成为推动中药资源可持续利用，实现中药材有序、安全、有效生产保障供给的必由之路。

土壤强还原技术被认为是一种环境友好的土壤改良技术，达到短时间内杀灭土传病原菌的目的[17-18]。同时，生产中水旱轮作被认为是目前克服连作障碍的经典耕作模式，表明淹水处理可能是消减地黄连作障碍的有效途径[3]。目前，淹水处理技术在应对作物病害发生方面取得了良好效果[19]，而添加有机物料后进行淹水处理的土壤强还原技术也在消减三七连作障碍中得到较好应用[20]。但是，这些技术在消减地黄连作障碍的研究中鲜见报道。本试验通过强还原和淹水处理连作土壤的方法，研究其对连作地

黄生长、土壤理化性质及其根际土壤微生物群落结构的影响, 为地黄连作障碍消减技术研究提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料与试验地点

本试验于 2019 年在地黄道地产区河南省武陟县选择 2018 年度已种植过地黄的地块儿(重茬地)开展。试验田土壤基础肥力如下: 土壤有机质含量为 25.6 g·kg^{-1}, 碱解氮含量为 318.6 mg·kg^{-1}, 速效磷含量为 20.5 mg·kg^{-1}, 速效钾含量为 153.2 mg·kg^{-1}, pH 为 8.3。试验材料选用地黄‘温 85-5’品种, 其种栽(繁殖材料)由河南省温县农业科学研究所提供, 经河南省中医药研究院张留记研究员鉴定为玄参科植物地黄。

1.2　试验设计

试验设置 3 个处理, 即连作(CK)、连作地淹水处理(FD)和连作地强还原处理(SRA), 每个处理设置 3 个小区重复, 每个小区面积为 50 m^2 (5 m×10 m), 小区按照随机区组排列。其中, 连作对照不添加任何物料处理; 淹水处理直接将小区地块灌溉至田间最大持水量之后覆膜以隔绝空气 30 d, 移除覆膜后晾晒 10 d; 强还原处理先在土壤表层均匀平铺牛粪和粉碎的小麦秸秆, 其用量分别为 11 250 kg·hm^{-2}和 3750 kg·hm^{-2}, 并旋耕使物料与表层(0~20 cm)土壤均匀混合, 随后将小区地块灌溉至田间最大持水量并覆膜以隔绝空气 30 d, 移除覆膜后晾晒 10 d。淹水处理和强还原处理移除覆膜晾晒后与连作对照地块土壤含水量保持一致。3 个处理均于 2019 年 4 月 28 日(淹水和强还原处理后 40 d)栽植地黄, 栽种前 2~3 d, 将所选种栽掰成 3~4 cm 的小段, 放入过筛后的草木灰中拌种, 处理好的种栽置于阳光下暴晒, 使表面干燥后栽植。各小区地黄株距均为 20 cm, 行距均为 25 cm, 均设置 2 行作为保护行, 其他农事操作按照常规方法进行。

1.3　地黄农艺性状测定

不同处理地黄均于 2019 年 10 月 25 日收获, 并对各小区进行植株成活率和块根鲜重(单株地黄的所有块根鲜重)等农艺指标测定。成活率以小区内所有地黄收获时存活植株数与出苗后定株数的百分比计算; 块根鲜重以各小区随机选择 10 株测定取平均值, 不同处理的块根鲜重分别为 3 个重复小区的平均值; 各处理地黄产量分别为同一处理 3 个重复小区所有地黄测产的平均值。

1.4　土壤理化性质检测

待淹水和强还原处理结束后, 分别于 2019 年 4 月 25 日取不同处理后 0~20 cm 的耕层土壤进行理化性质测定。每个处理包含 3 个土壤样品(3 个重复小区, 每个小区 1 个土壤样品), 每个土壤样品由 5 个小样点(五点取样法)组成, 每个小样点的取土部位、深度、数量应力求一致, 要避开沟渠、田埂等无代表性地段。剔除动植物残体, 5 个小样点等量均匀混合后, 用“四分法”弃去多余部分, 最后每个土壤样品保留 1 kg。土壤样品在阴凉处自然风干后, 过 2 mm 筛子后装入自封袋备用。土壤有机质含量采用重铬酸钾容量法检测; 速效磷含量采用 $NaHCO_3$ 溶液浸提、钼锑抗比色法检测; 速效钾含量采用醋酸铵浸提、火焰光度计(上海傲谱, UV7500)检测; 碱解氮含量测定采用碱解扩散法; 土壤有机酸含量测定采用 Montgomery 比色法; Fe^{2+}含量测定采用邻菲罗啉比色法[21]。

1.5　地黄梓醇含量分析

于 2019 年 10 月 25 日同时对不同处理的地黄进行采收, 各处理分别取 5 株代表性地黄块根用于梓醇含量的测定, 取 5 份样品的平均值作为该处理地黄的梓醇含量。取每株代表性地黄的全部块根, 用水清洗干净后去除表面水分, 并使用烘箱 60 ℃烘干后研成粉末, 每份样品取单株地黄块根混合样 5 g 备用。采用王太霞等[22]的方法使用 HPLC 对地黄块根中梓醇含量进行测定, 根据峰面积计算梓醇含量。

1.6　土壤的细菌群落结构分析

分别对 3 个处理 9 个小区的土壤进行取样, 土壤样品采集参照土壤理化性质检测取样方法, 经过“四分法”每个土壤样品保留 0.5 kg, 过 2 mm 筛子后迅速保存在–80 ℃用于土壤基因组 DNA 的提取。采用 CTAB 法提取土壤 DNA, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度和浓度, 并取适量的样品于离心管中, 使用无菌水稀释样品至 1 ng·μl^{-1}。以 341F (5’-CCTAYGGGRBGCASCAG-3’) 和 806R (5’-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3’)对细菌 16S 的 V3+V4 区进行 PCR, 根据 PCR 产物浓度进行等混样, 充分混匀后使用 1×TAE 浓度 2%的琼脂糖胶电泳纯化 PCR 产物。随后, 使用 Illumina 公司 TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation Kit 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, 使用 NovaSeq 6000 进行上机测序。随后分别利用香农指数(Shannon index)和 Chao1 指数对不同处理土壤的微生物多样性进行分析; 利用 PCoA 和 UPGM

对不同处理土壤细菌群落结构进行主成分分析和系统发育树构建; 利用 Faprotax 软件对不同处理样本中细菌功能进行预测和差异分析。

1.7 数据分析

采用 Excel 2010 和 SPSS 13.0 软件进行数据处理和方差分析。

2 结果与分析

2.1 强还原和淹水处理对连作地黄存活率、块根生物量、产量和品质的影响

2.1.1 对存活率、块根生物量的影响

对收获期地黄生长状况的田间观察发现, 未做处理的连作地块(对照)中地黄植株死亡现象较为严重, 存活率仅为 21.5%; 淹水处理的连作地块中地黄的存活率为 43.1%, 相比对照有显著提升($P<0.05$); 而强还原处理的连作地块中地黄的存活率为 63.2%, 与对照和淹水处理相比均显著提升($P<0.05$) (图 1)。同时, 生物量测定结果显示, 对照处理的地黄地下块根多形成纤维根, 不能正常膨大, 而淹水和强还原处理的地黄块根均有所膨大, 其地下部单株鲜重分别为 165.0 g 和 192.9 g, 相比对照分别显著增加 46.7%和 71.5%。表明对连作土壤进行淹水和强还原处理均可有效缓解地黄的连作障碍效应(图 1)。

2.1.2 对产量和梓醇含量的影响

如图 1 可知, 通过对连作土壤进行强还原和淹水处理后种植地黄的产量均高于连作对照, 且三者之间差异均达显著水平, 其中强还原和淹水处理的地黄产量较连作对照分别增加 4.04 倍和 1.93 倍($P<0.05$)。同时, 对地黄药用指标性成分梓醇含量的测定结果显示, 强还原和淹水处理对其影响不同, 其中强还原处理高于连作对照, 而淹水处理则略低于连作对照, 但三者之间差异均未达显著水平($P>0.05$), 表明强还原和淹水处理对地黄品质不会造成较大影响。

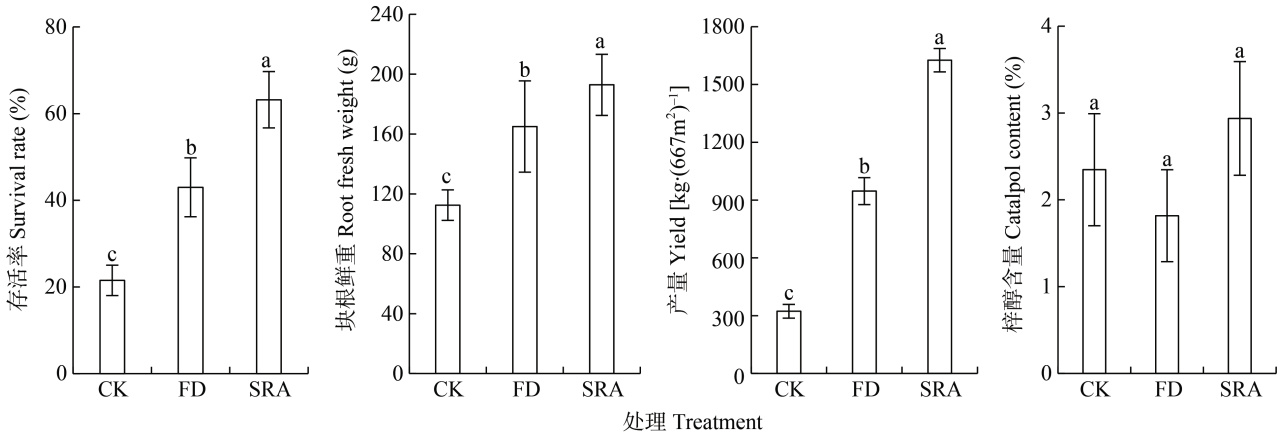

图 1 强还原和淹水处理对连作地黄存活率、块根鲜重、产量和梓醇含量的影响

Fig. 1 Effects of strong reduction and flooding on survival rate, root fresh weight, yield and catalpol content of the continuously cropped *Rehmannia glutinosa*

CK、FD 和 SRA 分别表示连作对照、连作地淹水处理和连作地强还原处理。图中不同小写字母表示不同处理在 $P<0.05$ 水平差异显著。

CK, FD and SRA denote continuous cropping control, flooding of continuously cropping soil and strong reduction of continuously cropping soil, respectively. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments at $P<0.05$ level.

2.2 强还原和淹水处理对地黄连作土壤化学性质的影响

由表 1 可知, 与连作对照相比, 强还原和淹水处理均可提高连作土壤中有机质和碱解氮含量, 但淹水处理与连作对照相比未达到显著性差异($P>0.05$), 而强还原处理后的连作土壤中有机质和碱解氮含量比连作对照分别显著增加 59.8%和 58.9% ($P<0.05$)。然而, 强还原和淹水处理对连作土壤中速效磷和速效钾的影响存在显著性差异, 淹水处理后速效磷和速效钾含量相比连作土壤而言均略有下降, 而强还原处理则显著提升($P<0.05$), 并与连作对照和淹水处理均达到显著性差异。此外, 连作土壤经过强还原和淹水处理后, 土壤中 Fe^{2+}含量和有机酸含量均出现大幅度提升, 且三者之间均达到显著性差异($P<0.05$)。与连作对照相比, 强还原处理后土壤中 Fe^{2+}含量和有机酸含量分别提高 4.73 倍和 3.54 倍, 淹水处理后土壤中 Fe^{2+}含量和有机酸含量分别提高 1.65 倍和 1.12 倍。试验结果表明, 强还原和淹水处理后连作土壤的化学性质发生了显著变化, 突出体现在有机质含量、碱解氮含量、Fe^{2+}含量和有机酸含量等方面, 并且表现出强还原处理对连作土壤化学性质的影响高于淹水处理的趋势。

表 1　强还原和淹水处理对地黄连作土壤化学性质的影响

Table 1　Effects of strong reduction and flooding on chemical properties of continuous cropping soil of *Rehmannia glutinosa*

指标 Indicator	连作对照 Continuous cropping	淹水处理 Flooding of continuously cropping soil	强还原处理 Strong reduction of continuously cropping soil
有机质含量 Organic matter content ($g \cdot kg^{-1}$)	20.33±1.84b	23.87±6.52ab	32.50±5.01a
碱解氮含量 Alkaline hydrolysis nitrogen content ($g \cdot kg^{-1}$)	0.25±0.04b	0.26±0.05b	0.39±0.04a
速效磷含量 Available phosphorus content ($mg \cdot kg^{-1}$)	23.93±6.66b	13.70±1.65c	27.60±4.62a
速效钾含量 Available potassium content ($mg \cdot kg^{-1}$)	152±16.50ab	134±3.46b	193±20.70a
Fe^{2+}含量 Fe^{2+} content ($cmol \cdot kg^{-1}$)	0.32±0.05c	0.85±0.12b	1.83±0.23a
有机酸含量 Organic acid content ($cmol \cdot kg^{-1}$)	0.36±0.05c	0.76±0.21b	1.64±0.26a

同行不同小写字母表示不同处理在 $P<0.05$ 水平差异显著。Different lowercase letters in the same line indicate significant differences among different treatments at $P<0.05$ level.

2.3　强还原和淹水处理对地黄连作土壤中细菌群落结构的影响

由图 2 可知，与连作对照相比，淹水处理的细菌香农指数和 Chao1 指数均有所下降；强还原处理的细菌香农指数有所下降，而 Chao1 指数有所上升；但是三者之间均未达显著性差异水平。这些结果表明强还原和淹水处理在一定程度上会降低连作土壤中的细菌多样性。同时，三者间细菌多样性差异并不显著，也表明连作土壤经过处理后可以快速地完成细菌群落重建，形成丰富的微生物群落环境。此外，淹水处理的不同样本间细菌群落多样性变化幅度较大。对不同处理土壤中细菌群落进行 PCoA 分析显示，不同处理间样本各自能够较好地聚成一类，表明不同处理间细菌群落构成具有较大差异(图 3)。然而，基于布雷柯蒂斯距离对不同处理土壤细菌群落的系统发育树构建结果显示，强还原处理和淹水处理距离较近成为一簇，而连作对照处理单独成为一簇，表明相比连作对照而言，强还原处理和淹水处理后的土壤中细菌群落结构更为相近(图 3)。

2.4　强还原和淹水处理对地黄连作土壤中细菌群落组成及其功能的影响

由图 4 可知，对相对丰度前 10 位的细菌门分析显示，强还原和淹水处理较大地改变了地黄连作土壤的细菌群落组成。其中，强还原处理主要提高了变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)和厚壁菌门(Firmicutes)的丰度，降低了放线菌门(Actinobacteria)、泉古菌门(Crenarchaeota)、疣微菌门(Verrucomicrobiota)和梭杆菌门(Fusobacteria)的丰度；淹水处理主要提高了变形菌门和酸杆菌门(Acidobacteriota)的丰度，降低了放线菌门、拟杆菌

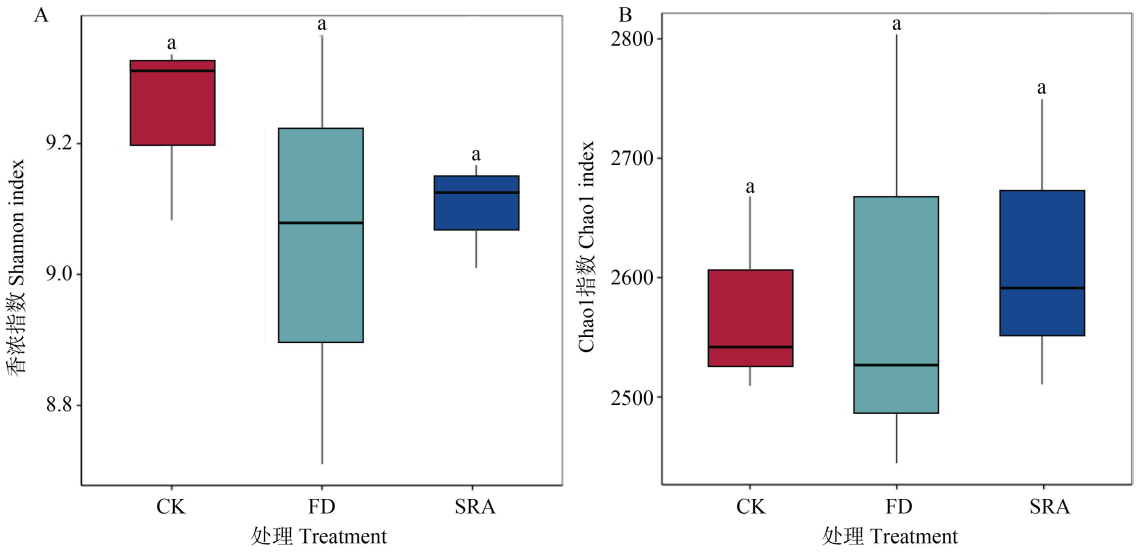

图 2　强还原和淹水处理对地黄连作土壤细菌群落多样性的影响

Fig. 2　Effects of strong reduction and flooding on bacterial community diversity of continuous cropping soil of *Rehmannia glutinosa*

CK、FD 和 SRA 分别表示连作对照、连作地淹水处理和连作地强还原处理。图中不同小写字母表示不同处理在 $P<0.05$ 水平差异显著。CK, FD and SRA denote continuous cropping control, flooding of continuously cropping soil and strong reduction of continuously cropping soil, respectively. Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments at $P<0.05$ level.

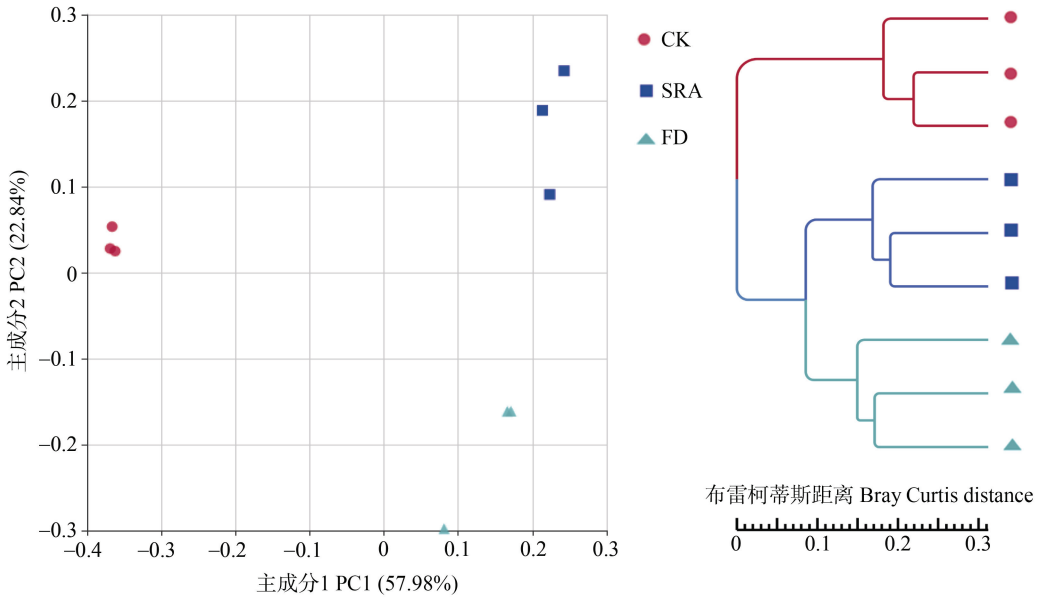

图 3 强还原和淹水处理下地黄连作土壤细菌群落的主成分分析及系统发育树构建

Fig. 3 Principal component analysis and phylogenetic tree construction of soil bacterial communities of continuous cropped *Rehmannia glutinosa* under strong reduction and flooding treatments

CK、FD 和 SRA 分别表示连作对照、连作地淹水处理和连作地强还原处理。CK, FD and SRA denote continuous cropping control, flooding of continuously cropping soil and strong reduction of continuously cropping soil, respectively.

门、泉古菌门、疣微菌门和梭杆菌门的丰度。对相对丰度前 15 位的细菌属分析显示，强还原处理主要提高了假单胞菌属(*Psuedomonas*)、RB41 属、肠球菌属(*Enterococcus*)、瘤胃梭菌属(*Rumenococcus*)、脱硫单胞菌属(*Desulfuromonas*)、普罗维登斯菌属(*Providencia*)和摩根氏菌属(*Morganella*)的丰度；淹水处理主要提高了假单胞菌属、RB41 属、肠球菌属、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、普罗维登斯菌属、摩根氏菌属和肠杆菌属的丰度；二者均降低了芽孢杆菌属(*Bacillus*)、诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、念珠菌属(Candidatus nitrososphaera)和鞘脂菌属(*Sphingobacterium*)。

如图 5 所示，对富集的前 30 种细菌代谢功能进行分析，强还原和淹水处理后土壤中细菌代谢功能与连作对照之间存在较大差异。强还原处理中硫呼吸、铁呼吸、反硝化、亚硝酸盐呼吸、甲醇氧化和固氮作用等代谢过程增强，淹水处理中硝酸盐还原和几丁质分解等代谢过程增强，而连作对照土壤中细菌群落主要呈现为硝化作用、纤维素分解和光合自养等代谢过程。可见，强还原和淹水处理后连作土壤中的细菌群落呈现由自养型为主向异养型转变的趋势。

3 讨论

地黄为我国常用大宗药材之一，具有用药历史悠久、市场需求量大等特点。但是，地黄生产中存在严重的连作障碍问题，导致地黄的市场需求和道地产区生产能力之间存在极大的矛盾[23]。在生产实际中，药农对连作障碍缺乏科学的认知，通常利用加大农药和肥料的施用量来解决这一棘手问题，不仅增加了生产成本，还导致农残超标，地黄品质变劣[3-4]。连作障碍导致的中药农业生境破坏、生物多样性下降、病虫害发生猖獗以及农药、化肥过量施用带来的农田生态系统恶化等问题严重制约了地黄的可持续安全生产和区域经济的健康发展[4,24]。目前，关于地黄连作障碍的研究多集中在其分子形成机制方面[25-27]，而关于具体的消减策略研究相对较少。茹瑞红等[28]研究认为食用菌菌渣可以通过降解酚酸类物质达到消减地黄连作障碍的目的。然而，外源添加有益微生物防控连作障碍与有益微生物是否能够成功定殖并发挥作用密切相关，其效果往往并不稳定[29]。地黄的存活率及其块根生长状况是衡量连作障碍严重程度的重要指标[14,30]。本研究中强还原和淹水处理均提高了连作地黄的存活率和块根的膨大程度，有效达到消减地黄连作障碍的效果，与三七连作障碍消减技术研究结果一致[20]。同时，梓醇具有降血糖、缓泻、抗肝炎病毒等多种生物活性，被 2020 版《中国药典》列为地黄品质评价的指标性成分。本研究中发现不同处理间梓醇含量没有显著性差异，表明强还原和淹水处理连作土壤后种植地黄不会对其品质造成较大影响。

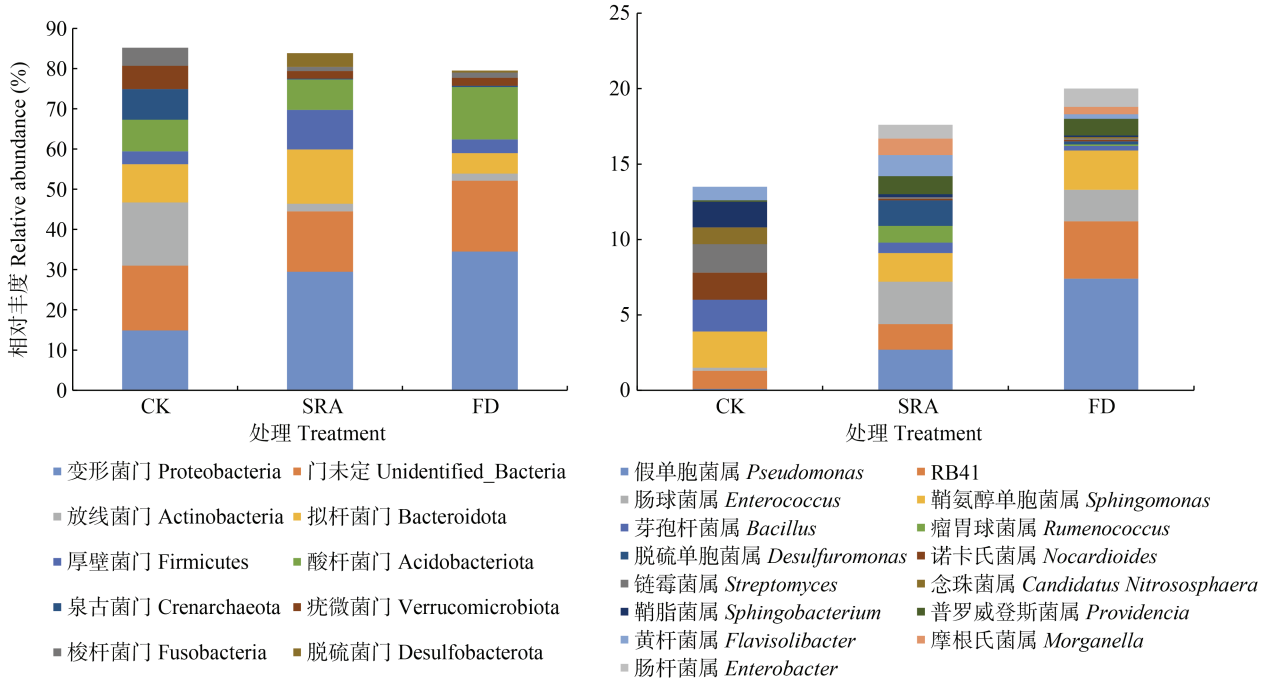

图 4　强还原和淹水处理对地黄连作土壤细菌群落组成的影响

Fig. 4　Effects of strong reduction and flooding on the composition of bacterial community of continuous cropping soil of *Rehmannia glutinosa*

CK、FD 和 SRA 分别表示连作对照、连作地淹水处理和连作地强还原处理。CK, FD and SRA denote continuous cropping control, flooding of continuously cropping soil and strong reduction of continuously cropping soil, respectively.

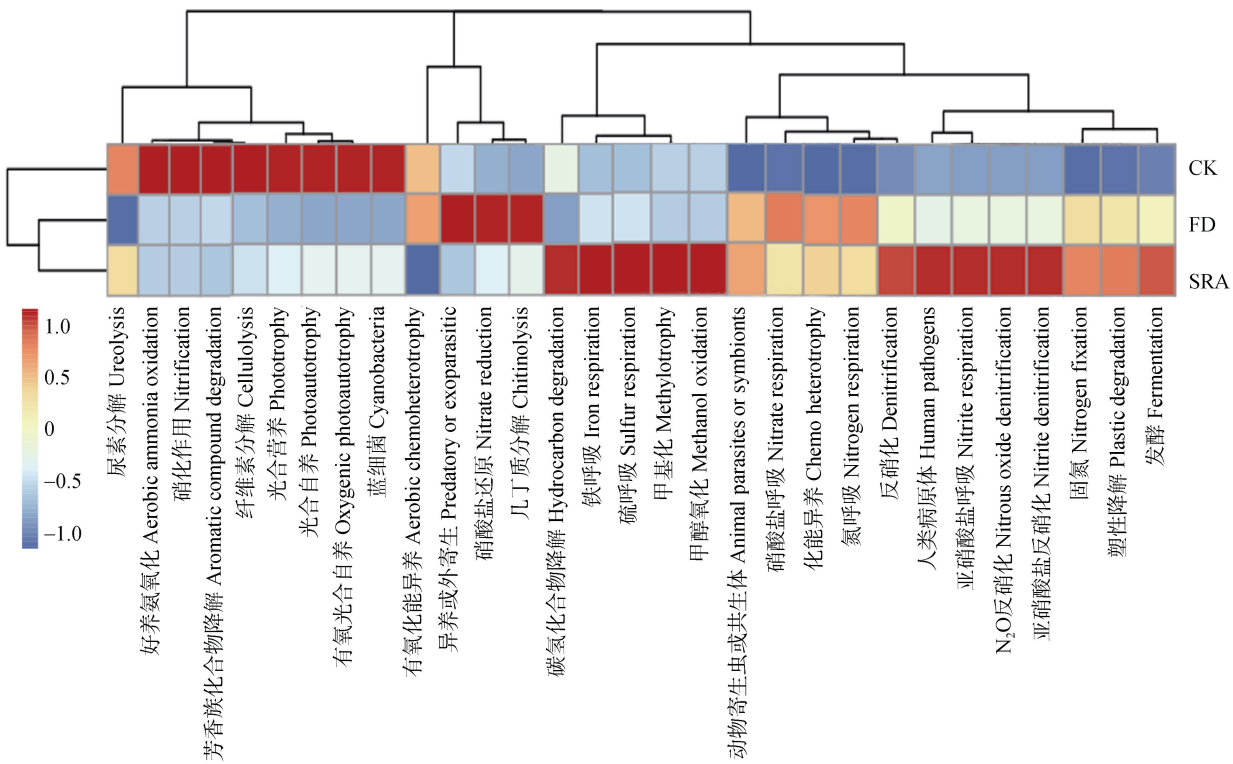

图 5　强还原和淹水处理对地黄连作土壤细菌群落功能的影响

Fig. 5　Effects of strong reduction and flooding on the function of bacterial community of continuous cropping soil of *Rehmannia glutinosa*

CK、FD 和 SRA 分别表示连作对照、连作地淹水处理和连作地强还原处理。CK, FD and SRA denote continuous cropping control, flooding of continuously cropping soil and strong reduction of continuously cropping soil, respectively.

随着研究的不断深入，人们对于连作障碍诱发成因的认识已不再局限于化感物质积累、元素缺失或微生物群落结构变化等单一事件。越来越多的研究表明，土壤环境中各种量效关系综合作用诱发的根际微生态失衡是导致连作障碍的主要诱因[13-14]。本研究采用强还原处理后连作土壤的有机质含量、碱解氮、速效磷和速效钾含量均有所提高，而淹水处理则与连作对照无显著性差异，表明添加秸秆等有机物进行的强还原反应更有利于连作土壤化学性质的改善[19]。与此同时，本研究中强还原和淹水处理均有效提高了地黄连作土壤中的 Fe^{2+}和有机酸含量，研究表明土壤中 Fe^{2+}和有机酸含量的提升能够有效抑制病原菌的增殖[31-32]。耿建建等[21]研究发现提高土壤中 Fe^{2+}和有机酸含量能够有效抑制尖孢镰刀菌的增殖，而专属型尖孢镰刀菌被认为是地黄连作障碍的关键致病菌[33]，表明土壤 Fe^{2+}和有机酸含量的提升为消减地黄连作障碍提供了重要的环境条件。

土壤环境在很大程度上决定了植物的根际微生物群落结构[34-35]，并通过土壤微生物反馈调节植物群体构成及个体生长发育[36]。根据本研究的香农指数显示，不同处理的细菌群落多样性均较高，并且强还原和淹水处理与连作对照之间并未形成显著性差异，表明强还原和淹水处理后在晾晒过程中土壤细菌群落多样性能够快速地完成重建，而在厌氧发酵过程中可能产生的有毒有害物质可以快速分解或再氧化，避免对后期栽种的植物造成影响[17]。然而，本研究中强还原和淹水处理对连作土壤的细菌群落组成及其微生态功能带来了较大的影响。整体来看，强还原和淹水处理中厌氧型、异养型细菌丰度增加，土壤中反硝化作用增强，可能会导致土壤中有机氮被氨化，而研究表明铵态氮的积累有利于土壤抑菌环境的形成[37-38]。进一步分析发现，强还原处理主要通过提高变形菌门和厚壁菌门，淹水处理主要通过提高变形菌门和酸杆菌门完成了新的细菌群落构建，与前人报道类似[39]。在属水平上，强还原和淹水处理后连作土壤中肠球菌属、假单胞菌属和普罗维登斯菌属等细菌群落的相对丰度均提高，而胃瘤球菌属则特异的在强还原处理后的连作土壤中出现，可能由于强还原处理中添加的物料富含纤维素，而胃瘤球菌属细菌主要依赖分解纤维素类物质的原因[40]。研究表明，肠球菌属等革兰氏阳性菌主要通过发酵碳水化合物产生有机酸[41]，而有机酸则可起到杀灭土传病原菌的作用[31-32]。假单胞菌属中多数菌群通常被研究者以益生菌的身份公认为生物因子，具有抑制病原菌、促进植物生长的作用[42]。由此推断强还原和淹水处理对连作障碍的消减作用可能包括消杀病原菌和益生菌群落重建等多方面的协同作用。其中，消杀病原菌的过程可能由胃瘤球菌属等菌群分解作用产生碳水化合物，而肠球菌属等菌群则以此为原料产生有毒的有机酸，进而杀灭病原菌。然而，强还原和淹水处理执行该过程的具体菌群类别可能还存在着差异。此外，Fe^{2+}含量和益生菌群落结构的重建可能发挥着重要作用。

4 结论

强还原和淹水处理对地黄连作障碍均有一定的消减作用，有效提高了连作地黄的存活率和地下块根的膨大进程，并以强还原处理的效果较好。本试验中对连作障碍的消减作用是强还原和淹水处理对土壤化学性质改变和微生物群落结构重建的综合体现。强还原和厌氧环境条件中反硝化作用的增强、厌氧异养型细菌相对丰度的提高改变了连作土壤中原有的微生物种群关系和碳氮代谢过程，形成了富含 Fe^{2+}、有机酸等消杀病原菌的土壤环境。胃瘤球菌属、肠球菌属和假单胞菌属等优势菌属的相互协作在此过程中发挥了重要作用。由此可见，土壤强还原和淹水处理可以作为一种快速有效消减地黄连作障碍的技术手段，提高土壤资源利用周期，但其内在机制仍需进一步深入研究和验证。

参考文献 References

[1] ZHANG B, LI X Z, WANG F Q, et al. Assaying the potential autotoxins and microbial community associated with *Rehmannia glutinosa* replant problems based on its ‘autotoxic circle’[J]. Plant and Soil, 2016, 407(1/2): 307–322

[2] CHEN A G, GU L, LI M J, et al. Identification of *Rehmannia glutinosa* L. NB-ARC family proteins and their typical changes under consecutive monoculture stress[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2018, 40(5): 95

[3] 张重义，李明杰，陈新建，等. 地黄连作障碍机制的研究进展与消减策略[J]. 中国现代中药, 2013, 15(1): 38–44
ZHANG Z Y, LI M J, CHEN X J, et al. Research advancement and control strategy of consecutive monoculture problem of *Rehmannia glutinosa* L.[J]. Modern Chinese Medicine, 2013, 15(1): 38–44

[4] 陈爱国，李明杰，张宝，等. 连作介导的药用植物及其根际微生态灾变机制研究展望[J]. 中国现代中药，2016，18(2): 239–245
CHEN A G, LI M J, ZHANG B, et al. Review on catastrophe mechanism of medicinal plant and its rhizosphere microecosystem mediated by consecutive monoculture[J]. Modern Chinese Medicine, 2016, 18(2): 239–245

[5] 郭兰萍，周良云，莫歌，等. 中药生态农业——中药材GAP 的未来[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3360–3366

GUO L P, ZHOU L Y, MO G, et al. Ecological agriculture: future of Good Agriculture Practice of Chinese materia medica[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 40(17): 3360–3366

[6] 雷锋杰, 张爱华, 张秋菊, 等. 人参、西洋参化感作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(17): 2221–2226
LEI F J, ZHANG A H, ZHANG Q J, et al. Advances in research on allelopathy of ginseng and American ginseng[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2010, 35(17): 2221–2226

[7] 焦晓林, 杜静, 高微微. 西洋参根残体对自身生长的双重作用[J]. 生态学报, 2012, 32(10): 3128–3135
JIAO X L, DU J, GAO W W. Autotoxicity and promoting: dual effects of root litter on American ginseng growth[J]. Acta Ecologica Sinica, 2012, 32(10): 3128–3135

[8] 孙雪婷, 李磊, 龙光强, 等. 三七连作障碍研究进展[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 885–893
SUN X T, LI L, LONG G Q, et al. The progress and prospect on consecutive monoculture problems of *Panax notoginseng*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2015, 34(3): 885–893

[9] 杨莉, 任晶, 韩梅, 等. 人参根系分泌物中酸性物质的化感活性与互作效应[J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(5): 570–574
YANG L, REN J, HAN M, et al. Allelopathy and interaction of acidic materials in ginseng root exudates[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2017, 39(5): 570–574

[10] XIN A Y, LI X Z, JIN H, et al. The accumulation of reactive oxygen species in root tips caused by autotoxic allelochemicals—A significant factor for replant problem of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels[J]. Industrial Crops and Products, 2019, 138: 111432

[11] BULGARELLI D, ROTT M, SCHLAEPPI K, et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota[J]. Nature, 2012, 488(7409): 91–95

[12] LAPIN D, VAN DEN ACKERVEKEN G. Susceptibility to plant disease: more than a failure of host immunity[J]. Trends in Plant Science, 2013, 18(10): 546–554

[13] HAICHAR F E Z, SANTAELLA C, HEULIN T, et al. Root exudates mediated interactions belowground[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2014, 77: 69–80

[14] CHEN A G, GU L, XU N, et al. *NB-LRRs* not responding consecutively to *Fusarium oxysporum* proliferation caused replant disease formation of *Rehmannia glutinosa*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(13): E3203

[15] SCHMIDT J E, BOWLES T M, GAUDIN A C M. Using ancient traits to convert soil health into crop yield: impact of selection on maize root and rhizosphere function[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 373

[16] SASSE J, MARTINOIA E, NORTHEN T. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome?[J]. Trends in Plant Science, 2018, 23(1): 25–41

[17] 蔡祖聪, 张金波, 黄新琦, 等. 强还原土壤灭菌防控作物土传病的应用研究[J]. 土壤学报, 2015, 52(3): 469–476
CAI Z C, ZHANG J B, HUANG X Q, et al. Application of reductive soil disinfestation to suppress soil-borne pathogens[J]. Acta Pedologica Sinica, 2015, 52(3): 469–476

[18] MOMMA N, KOBARA Y, UEMATSU S, et al. Development of biological soil disinfestations in Japan[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(9): 3801–3809

[19] 李云龙, 王宝英, 常亚锋, 等. 土壤强还原处理对三七连作障碍因子及再植三七生长的影响[J]. 土壤学报, 2019, 56(3): 703–715
LI Y L, WANG B Y, CHANG Y F, et al. Effects of reductive soil disinfestation on obstacles and growth of replant seedlings in Sanqi ginseng mono-cropped soils[J]. Acta Pedologica Sinica, 2019, 56(3): 703–715

[20] 顾志光, 马艳, 安霞, 等. 麦秸淹水处理对连作土壤性状和辣椒疫病田间防控效果的影响[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(9): 1762–1769
GU Z G, MA Y, AN X, et al. Effects of wheat straw with flooding on soil properties and *Phytophthora* blight control in continuous chili pepper cropping field[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(9): 1762–1769

[21] 耿建建, 赵艳, 王蓓蓓, 等. 稻秆淹水处理对高发病香蕉园土壤理化性状及病原菌的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3): 87–90
GENG J J, ZHAO Y, WANG B B, et al. Effect of rice straw flooding on soil physical and chemical properties and pathogenic bacteria in high-incidence banana garden[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(3): 87–90

[22] 王太霞, 李景原, 胡正海. 怀地黄营养器官中梓醇的积累动态[J]. 中草药, 2004, 35(2): 208–209
WANG T X, LI J Y, HU Z H. Accumulation trends of catalpol in vegetative organs of *Rehmannia glutinosa* var. huechingensis[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2004, 35(2): 208–209

[23] 王鑫. 河南省特色农产品四大怀药的出口现状、存在问题与对策[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 400–402
WANG X. Status, existing problems and countermeasures of export of the four major Huai medicines of Henan Province[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2013, 41(7): 400–402

[24] 李明杰, 冯法节, 张宝, 等. 多元组学背景下地黄连作障碍形成的分子机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3): 413–419
LI M J, FENG F J, ZHANG B, et al. Advances on molecular mechanisms of *Rehmannia glutinosa* consecutive monoculture problem formation in multi-omics era[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(3): 413–419

[25] LI M J, YANG Y H, FENG F J, et al. Differential proteomic analysis of replanted *Rehmannia glutinosa* roots by iTRAQ reveals molecular mechanisms for formation of replant disease[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 1–21

[26] XIE Z M, YANG C Y, CHEN A G, et al. Identification and expression analysis of leucine-rich repeat receptor-like kinase family reveals the roles of resistance proteins during formation of replant disease in *Rehmannia glutinosa* Libosch[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2019, 22(3): 487–496

[27] GU L, WU Y F, LIN M G, et al. Identification of mapk cascade genes response to consecutive monoculture stress in

Rehmannia glutinosa[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2020, 24: 591–602

[28] 茹瑞红, 李烜桢, 黄晓书, 等. 食用菌菌渣缓解地黄连作障碍的研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3036–3041
RU R H, LI X Z, HUNAG X S, et al. Effect of substrate of edible mushroom on continuously cropping obstacle of *Rehmannia glutinosa*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(16): 3036–3041

[29] 胡展育, 游春梅, 张铁. 三七连作障碍的探讨[J]. 文山学院学报, 2011, 24(3): 6–11
HU Z Y, YOU C M, ZHANG T. Discussing the obstacles caused by continuous notoginseng cropping[J]. Journal of Wenshan University, 2011, 24(3): 6–11

[30] 古力, 牛苗苗, 郑红艳, 等. 连作地黄的植株形态生理效应研究[J]. 中药材, 2013, 36(5): 691–695
GU L, NIU M M, ZHENG H Y, et al. Effect of continuous cropping of *Rehmannia* on its morphological and physiological characteristics[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2013, 36(5): 691–695

[31] MOMMA N, KOBARA Y, MOMMA M. Fe^{2+} and Mn^{2+}, potential agents to induce suppression of *Fusarium oxysporum* for biological soil disinfestation[J]. Journal of General Plant Pathology, 2011, 77(6): 331–335

[32] HUANG X Q, WEN T, ZHANG J B, et al. Toxic organic acids produced in biological soil disinfestation mainly caused the suppression of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense[J]. BioControl, 2015, 60(1): 113–124

[33] 李振方, 杨燕秋, 吴林坤, 等. 地黄强致病型病原菌的分离及其专化型鉴定[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(11): 1426–1433
LI Z F, YANG Y Q, WU L K, et al. Isolation of highly pathogenic pathogens and identification of formae speciales of *Rehmannia glutinosa* L.[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2013, 21(11): 1426–1433

[34] BAKKER M G, MANTER D K, SHEFLIN A M, et al. Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management[J]. Plant and Soil, 2012, 360(1/2): 1–13

[35] METCALF J L, XU Z Z, WEISS S, et al. Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition[J]. Science, 2016, 351(6269): 158–162

[36] OLANREWAJU O S, AYANGBENRO A S, GLICK B R, et al. Plant health: feedback effect of root exudates-rhizobiome interactions[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(3): 1155–1166

[37] 金相灿, 崔哲, 王圣瑞. 连续淹水培养条件下沉积物和土壤的氮素矿化过程[J]. 土壤通报, 2006, 37(5): 909–915
JIN X C, CUI Z, WANG S R. Nitrogen mineralization processes of sediments and soil under continuously waterlogged incubation conditions[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2006, 37(5): 909–915

[38] 杨敏芳, 朱利群, 韩新忠, 等. 耕作措施与秸秆还田对稻麦两熟制农田土壤养分、微生物生物量及酶活性的影响[J]. 水土保持学报, 2013, 27(2): 272–275, 281
YANG M F, ZHU L Q, HAN X Z, et al. Effects of tillage and crop residues incorporation on soil nutrient, microbial biomass and enzyme activity under rice-wheat rotation[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2013, 27(2): 272–275, 281

[39] MOWLICK S, INOUE T, TAKEHARA T, et al. Changes and recovery of soil bacterial communities influenced by biological soil disinfestation as compared with chloropicrin-treatment[J]. AMB Express, 2013, 3(1): 1–12

[40] LATHAM M J, WOLIN M J. Fermentation of cellulose by *Ruminococcus flavefaciens* in the presence and absence of *Methanobacterium* ruminantium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977, 34(3): 297–301

[41] HOLDEMAN L V, MOORE W E C. New genus, *Coprococcus*, twelve new species, and emended descriptions of four previously described species of bacteria from human feces[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1974, 24(2): 260–277

[42] BERGSMA-VLAMI M, PRINS M E, RAAIJMAKERS J M. Influence of plant species on population dynamics, genotypic diversity and antibiotic production in the rhizosphere by indigenous *Pseudomonas* spp[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 52(1): 59–69