

地黄自毒物质提取及其生物指标测定

李振方^{1,2}, 齐晓辉², 李奇松², 戴林泉^{1,2}, 林茂兹^{1,2}, 张重义^{2,3}, 林文雄^{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:连作障碍在药用植物地黄(*Rehmannia glutinosa* L.)栽培中尤其明显,同一地块上种植一茬地黄后,须经8—10a后方可再种。从怀地黄主产区河南省焦作地区采集种植1a地黄的地后土壤,采用不同溶剂提取地黄土壤自毒物质并利用生物测试确定抑制率最强的土壤提取液作温室栽培实验以确定对植物生理指标的影响。利用高效液相色谱法(HPLC)对土壤提取液和根系分泌物进行比较,并利用高效液相色谱、傅立叶变换红外光谱(FTIR)和电喷雾离子阱质谱(ESI-MS)技术鉴定地黄连作自毒物质的化学成分。生物测试结果表明水和甲醇提取的地黄地后土壤自毒物质对地黄生长具有最强的抑制作用;在培养器中加入浓度0.5g/mL的水和甲醇提取液对地黄胚根的抑制率分别达17%和26%,当浓度增至5.0g/mL时,抑制率增加到70%以上。盆栽结果显示甲醇提取的自毒物质导致地黄地上部叶绿素含量减少,根系活力下降,明显抑制了地黄体内超氧化物歧化酶、过氧化物歧化酶、过氧化物酶的活性,加剧了地黄膜质过氧化,以及引起地黄植体内生长素类激素含量下降。高效液相色谱法显示土壤提取液和根系分泌物具有相似图谱。电喷雾离子阱质谱分析共检测到6个特征物质:香草酸、D-甘露醇、二十六烷酸苯羟基酯、毛蕊花糖苷、 β -谷甾醇和胡萝卜苷。

关键词:地黄;连作障碍;自毒作用;自毒物质;电喷雾离子阱质谱

Extraction, bioassay, and chemical identification of *Rehmannia glutinosa* L. autotoxins

LI Zhenfang^{1,2}, QI Xiaohui², LI Qisong², DAI Linquan², LIN Maozi^{1,2}, ZHANG Zhongyi^{2,3}, LIN Wenxiong^{2,*}

1 Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education China, 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: Obstacles for recropping are especially severe in the production of *Rehmannia glutinosa*, a Chinese medicinal herb. It takes 8 to 10 years before one can replant a *Rehmannia glutinosa* to the same field where the crop had been grown. In this study, five different solvents were used to extract potential autotoxins from the soil samples taken from a major *Rehmannia glutinosa* production area in Jiao-zuo, Henan Province after harvesting the crop. Bioassay was conducted to test the inhibition rate (IR) of the five soil extracts on *Rehmannia glutinosa* radicle growth. Soil extract that had the greatest IR was selected for a greenhouse growth study and various physiological and biochemical parameters were measured. Finally, HPLC analysis was used to compare soil extracts with root exudates, and ESI-MS analysis was used to identify the chemical compositions of the soil extracts. Bioassay results demonstrated that water and methanol extracted soil autotoxins had the greatest IR; by adding 0.5 g/mL concentration of soil extracts to a germination study, the IR to *Rehmannia glutinosa* radicle growth was 17% and 26% for water and methanol extracts, respectively, and the IR reached above 70% when the concentration was increased to 5.0 g/mL. Greenhouse study exhibited that methanol extracted soil autotoxins had resulted in (1) decreased root activities and chlorophyll contents, (2) decreased activities of SOD, CAT, and POD, (3) enhanced membranaceous peroxidation, and (4) decreased growth hormones contents. HPLC analysis showed very similar

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30772729);福建省自然科学基金资助项目(2008J0051)

收稿日期:2009-03-23; **修订日期:**2009-09-13

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wenxiong181 @ 163. com

chromatograms between the methanol extracts and the root exudates. ESI-MS analysis detected six characteristic substances: vanillic acid, D-mannitol, 2[4'-hydroxyphenyl]-ethyl hexacosanoate, verbascoside, β -sitosterol, and daucosterol.

Key Words: *Rehmannia glutinosa* L.; obstacles for recropping; autotoxicity; autotoxins; ESI-MS

连作障碍在农业生产中普遍存在,在药用植物栽培中尤其明显,以根类、根茎类入药的药用植物有 60% 存在严重的连作障碍^[1-2]。怀地黄作为我国著名“四大怀药”之一,已经成为我国常用大宗药材,但是其药用植物——玄参科多年生草本植物地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch.)^[3]却存在非常严重的连作障碍(或复种连作障碍)。在同一地块上种植一茬地黄后,须经 8—10a 后方可再种,重茬连作会发生严重的连作障碍现象,表现为地黄地上部生长不良,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^[4-6]。

研究认为造成药用植物连作障碍的主要原因有:①土壤营养失衡^[7-9];②药用植物分泌的自毒物质产生的自毒作用^[10-13];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^[1,14-17]。对多种药用植物的连作障碍问题的相关研究认为,作为化感作用特殊形式的植物自毒作用是发生连作障碍的重要因素之一,已成为连作障碍研究的一个重要方面。

据此,本研究在怀地黄主产区河南省焦作地区采集种植一年地黄后的茬后土壤以及未种植地黄的对照土壤,利用生物测试方法进行地黄自毒作用潜力评价,利用高效液相色谱、傅立叶变换红外光谱(FTIR)电喷雾离子阱质谱(ESI-MS)技术对地黄连作自毒物质进行化学鉴定,还进一步利用模拟连作实验对地黄连作自毒作用的生理生化特性进行研究,以期地为地黄连作障碍的形成机理和连作障碍的控制技术研究提供有重要参考价值的理论依据与实践参考。

1 材料与方法

1.1 试验设计

采集河南省焦作市温县种植一茬地黄后根际土壤作为试验供试土样,邻近未种地黄的耕作田土作为对照。土样风干后过 1mm 孔径细筛,称取 5kg 土样等分为 5 份,分别用蒸馏水、石油醚、氯仿、乙酸乙酯和甲醇各 1L,浸提 48h 后过滤,收集滤液(labeled I—V)。上述 5 份粗提取分别减压浓缩成凝膏状,超纯水溶解为 5 个浓度梯度,分别为 5、2、1、0.5、0.2 g/mL,对照设为 0 g/mL 记为 CK。g/mL 表示单位质量土样用 1 mL 水浸提的自毒物质。

1.2 自毒作用生物测试方法

分别吸取上述 5 个梯度的自毒物质粗提物 labeled I—V 的水溶液各 5mL 加入到放有灭菌滤纸的烧杯中,均匀点播经萌发露白的“温 85-5d”地黄种子 50 粒,进行 3 次重复,以对照土的水浸提液为对照。置入 26℃控温光照培养箱中,每日光照时间 12h (8:00—20:00),光照强度为 $(4.17 \pm 0.18) \times 10^3$ lx,保持培养室内相对湿度为 50%。7d 后测量地黄幼苗的胚根长,研究地黄幼苗在上述 5 种萃取物(labeled I—V)在 5 个浓度梯度上的自毒作用效应分析。

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: $IR = (T_i - T_0) \div T_0 \times 100\%$,*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, T_0 为对照值。获得的数据采用 DPS 软件进行统计分析。根据生物测试结果选择自毒作用最明显的萃取物,外源添加到正茬地黄中进行地黄自毒作用的生理生化指标分析和地黄自毒物质鉴定。

1.3 自毒作用的生理生化指标测定

在生物测试实验基础上,选择抑制效率最高的有机相提取地黄自毒物质,将自毒物质用超纯水溶解。于 2007 年 3 月中旬在福建农林大学农业生态研究所可控温室中砂培盆栽“温 85-5d”地黄(盆容量 5L、规格 45cm × 35cm × 15cm,沙子量为 4L),向内添加 1L 营养液(营养液成分为只含有大量元素的 1/4MS 培养基:硝

酸钾 1900mg/L, 硝酸铵 1650mg/L, 磷酸二氢钾 170mg/L, 硫酸镁 370mg/L, 氯化钙 440mg/L)。待地上部长出苗 3cm 后每盆定植 5 株。至地黄叶片开始充分展开(约 14d), 一次性添加自毒物质水溶液 200mL, 自毒物质分 0.2 g/mL、1 g/mL、2 g/mL 3 个浓度梯度添加, 对照浓度设为 0 g/mL, 重复 3 次。处理 14d 后, 采集叶片和新生根系保存于液氮中进行如下指标测定。

1.3.1 总叶绿素含量和根系活力测定

采用叶绿素仪(型号 SPAD502)测定叶片中叶绿素含量, 读数用 SPAD 值表示。每盆测定地黄 3 株, 测定对象选取充分展开的功能叶 3 片, 每次测量重复 3 次, 取其平均值。

采用氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定地黄根系活力(根系脱氢酶活), 测定 485nm 处 OD 值, 以 TTC 还原量表示根系活力(mg/(g · hFW))。

1.3.2 保护酶系统指标测定

分别取地黄叶片和地黄新生根各 1.0g, 进行超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、膜质过氧化产物(MDA)的测定, 参照王学奎和朱广廉^[18-9]等方法进行。

(1) POD 活性的测定

反应混合液: 0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH6.0)100mL, 愈创木酚 56μL, 加热搅拌至溶解, 冷却后, 加入 30% H₂O₂ 38μL, 混匀, 冰箱保存。取 50μL 酶液, 加入 3mL 反应混合液, 以 50μL 磷酸缓冲液代替酶液作为空白, 470nm 处比色。以每分钟内 OD₄₇₀ 变化值表示酶活性大小(ΔOD₄₇₀/(g · minFW))。

(2) SOD 活性的测定

取 50μL 酶液, 加入 3.9 ml 反应混合液(含 50mmol/L pH7.8 的磷酸缓冲液、77.12μmol/L 硝基四唑蓝(NBT)、0.1mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)和 13.37mmol/L 蛋氨酸)和 0.1mL 80.2 μmol/L 核黄素, 以不加酶液作为参照, 放在 3000Lx 下照光 10min 后, 于 560nm 处测定 OD 值, 以每分钟抑制 NBT 光氧化还原 50% 的酶用量为一个酶活性单位(U/gFW)。

(3) CAT 活性的测定

过氧化氢还原法测定 CAT 活性。反应混合液为: 含 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0), 30% H₂O₂ 100μL, 冰箱保存。取 100μL 酶液, 加入反应混合液 6mL, 用 100μL 磷酸缓冲液代替酶液作为对照空白, 于 240nm 处比色, 以每分钟内 OD₂₄₀ 变化值表示酶活性大小(U/(g · minFW))。

(4) MDA 含量的测定

参照朱广廉等的方法^[19]。测定 OD₅₃₂、OD₆₀₀ 和 OD₄₅₀ 值, 按公式 $C(\mu\text{mol/L}) = 6.45(OD_{532} - OD_{600}) - 0.56OD_{450}$ 计算 MDA 含量(nmol/gFW)。

1.3.3 地黄内源激素含量测定

生长素(IAA)、赤霉素(GA)、脱落酸(ABA)和玉米素(ZR)测定应用酶联免疫(ELISA)法, 具体方法参照购自中国农业大学的酶联免疫试剂盒, 每个样品重复测 3 次取平均值, 单位为 ng/g。

1.4 自毒物质的检测与鉴定方法

收集水培地黄的根系分泌物, 通过高效液相色谱技术与选取的自毒物质粗提物进行验证分析后进行自毒物质的除杂和物质鉴定。

1.4.1 自毒物质和地黄根系分泌物的 RP-HPLC 验证分析

将地黄幼苗砂质培养 60d 后, 移栽至水培营养液中(该营养液中除 N、P、K 3 种元素外不含其它元素), pH 值调至 7.0。悬浮培养 21d 后收集此水培营养液, 0.45μm 微孔滤膜过滤后, 进入 Agilent1100 型液相色谱仪, 与生物测试效率最高的地黄自毒物质进行对比分析, 定性分析以色谱峰的出峰顺序和保留时间以及物质的吸光度值为依据。

色谱条件为: Hypersil-ODS C₁₈ 色谱柱(4.0mm × 250mm, 5μm), 流动相为乙腈-水(2:98), 流速为 0.6mL/min, 进样量为 20μL, 检测波长为 210nm。

1.4.2 自毒物质的除杂与鉴定

称取生物测试效率最高的自毒物质粗提物 25mg,乙醇 5mL 浸提除杂,12000g/min 离心后去除上清,用 5ml 乙醇洗涤除杂,反复 5 次。回收沉淀用甲醇溶解并定容至 25mL,经 0.45μm 微孔滤膜过滤后用 Cary 50 Probe 型可见-紫外分光光度计(美国 VARIAN)进行全波长扫描确定提取物的吸光度,利用傅立叶变换红外光谱(FTIR,美国 Thermo Nicoler 公司,AVATAR360 型红外光谱)确定自毒物质的主要官能团,进一步用电喷雾离子阱质谱仪(ESI-MS,美国 Thermo-Finnigan 公司)进行组分数量和各组分分子量的分析,获得不同位素峰簇 m/z 信息后利用生物信息学进行物质查询。

电喷雾离子阱质谱条件为:毛细管温度 275℃,毛细管电压 5V,喷雾电压为 4.5kV,载气(氮气)流速 15mL/min。

2 结果与分析

2.1 自毒物质的生物生物测试结果

从表 1 可以看出,不同萃取部位获得的自毒物质对地黄的作用效果存在差异,同种处理水平下,水和甲醇的提取物对地黄的抑制强度显著高于对照和其他 3 个萃取部位的作用效果,尤以甲醇粗提物对地黄的抑制作用最明显;随着处理浓度增加,水浸提和甲醇萃取的自毒物质对地黄的抑制强度增加,自毒作用效果提高,抑制效果与其作用浓度呈正相关。

表 1 5 种溶剂提取的地黄土壤自毒物质在 5 种浓度水平上对地黄的抑制率

Table 1 The inhibition rate of <i>Rehmannia glutinosa</i> radicle by five soil extracts at five concentration gradients										
因素 Factors	0.2/(g·mL ⁻¹)		0.5/(g·mL ⁻¹)		1/(g·mL ⁻¹)		2/(g·mL ⁻¹)		5/(g·mL ⁻¹)	
	RL/cm	IR/%	RL/cm	IR/%	RL/cm	IR/%	RL/cm	IR/%	RL/cm	IR/%
CK	0.97±0.05 a	0	1.01±0.05 a	0	0.93±0.05 b	0	0.91±0.07 b	0	0.99±0.04 b	0
PEE	0.90±0.06 d	-7.22	0.96±0.06 b	-4.95	0.99±0.07 ab	6.45	1.04±0.04 a	14.29	1.06±0.04 a	7.07
CE	0.92±0.03 c	-5.15	0.96±0.07 b	-4.95	1.02±0.06 a	9.68	1.04±0.08 a	14.29	1.03±0.08 a	4.04
EAE	0.95±0.06 b	-2.06	0.91±0.05 c	-9.90	0.87±0.04 bc	-6.45	0.81±0.04 c	-10.99	0.74±0.04 c	-25.25
ME	0.87±0.05 e	-10.31	0.75±0.06 e	-25.74	0.49±0.04 e	-47.31	0.32±0.03 e	-64.84	0.24±0.03 d	-75.76
WE	0.94±0.06 bc	-3.09	0.84±0.05 d	-16.83	0.67±0.07 d	-27.96	0.55±0.04 d	-39.56	0.29±0.03 d	-70.71

注:表中数据为 3 次重复的平均值,同一列后缀相同小写字母的数据为未达到 5% 的显著水平;RL 代表地黄胚根长度,IR 表示抑制率,CK 代表对照,PEE 代表石油醚相萃取的自毒物质,CE 代表氯仿相萃取的自毒物质,EAE 代表乙酸乙酯相萃取的自毒物质,ME 代表甲醇相萃取的自毒物质,WE 代表水相萃取的自毒物质

2.2 自毒物质对地黄生理生化指标的影响

2.2.1 对总叶绿素含量和根系活力的影响

从图 1 可以看出,随着甲醇提取物作用浓度的增加,地黄叶片总叶绿素含量逐渐降低,依次比对照降低了 21.8%、42.8% 和 54.6%,达到显著水平;自毒物质作用浓度增加,地黄幼苗根系活力下降,与对照相比依次

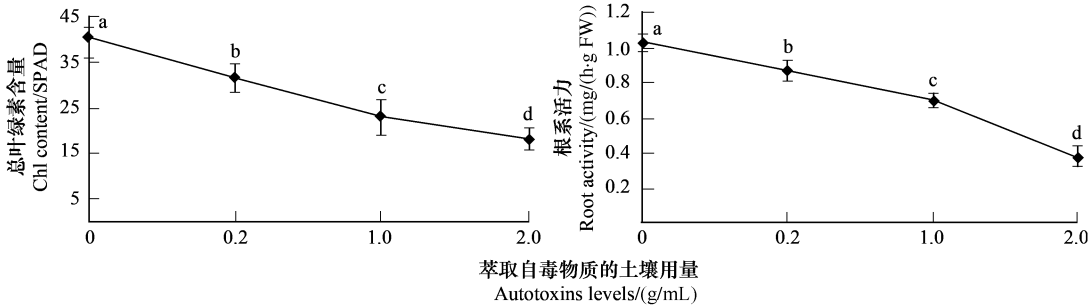


图 1 甲醇提取自毒物质对地黄叶绿素含量和根系活力的影响

Fig. 1 Chlorophyll content and root activity of *Rehmannia glutinosa* affected by methanol extracted soil autotoxins

注:图中数据为 3 次重复的平均值,图中所缀不同小写字母表示差异达到 5% 的显著水平

下降了 15%、31.7% 和 63.7%, 且处理间差异显著。表明地黄自毒作用不仅影响地黄地上部中叶绿素的合成减少和分解加快, 还造成地黄根系活力下降, 影响地黄根系生理过程。

2.2.2 对保护酶活性和膜质过氧化物的影响

由图 2 可以看出, 当作用浓度低于 0.2 g/mL 时, 地黄幼苗根部 POD 活性、叶部 SOD 和 CAT 活性均呈上升趋势, 随着处理浓度的增加三者又均呈下降趋势; 而叶部 POD 活性与处理浓度呈正相关, 但 POD 活性显著低于相同处理水平下根部 POD 活性; 根部 CAT 活性与处理浓度呈负相关, 其酶活性均低于叶片中 CAT 活性。由此可知, 随着自毒物质作用浓度的增大, 地黄保护酶系统受损加大, 自由基增多, 从而加剧植物膜质过氧化。正如图 2 所示, 随着处理浓度的增加, 地黄幼苗叶部和根部 MDA 含量上升, 也进一步证实了自毒物质对地黄的生理伤害过程。

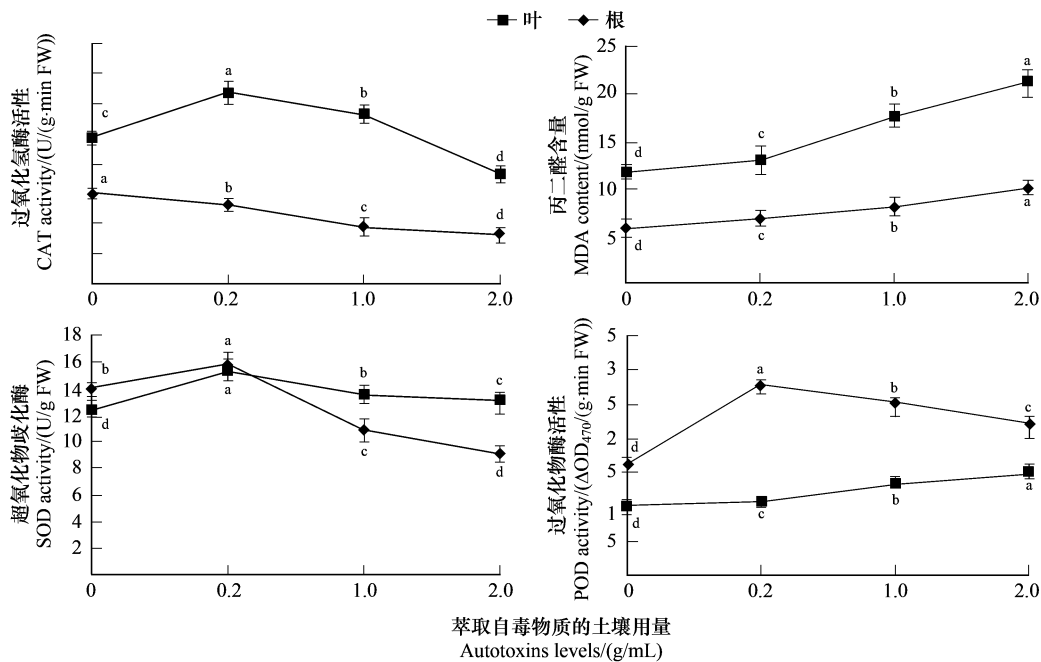


图 2 不同浓度甲醇提取自毒物质对地黄 SOD、POD、MDA、CAT 的影响

Fig. 2 SOD, POD, MDA, CAT of *Rehmannia glutinosa* leaf and root affected by methanol extracted soil autotoxins

注: 图中数据为 3 次重复的平均值, 图中所缀不同小写字母表示差异达到 5% 的显著水平

2.2.3 对地黄内源激素的影响

从图 3 可以看出, 随着处理浓度的增加, 植株内源生长素 (IAA) 和玉米素 (ZT) 累积量下降, 且显著低于对照; 而内源脱落酸 (ABA) 在地黄植株内累积量呈显著上升趋势; 内源赤霉素 (GA) 累积量在处理浓度为 0.2 g/mL 时达到最高, 为 1400 ng/g, 随着作用浓度加大呈下降趋势。

2.3 自毒物质的验证与鉴定

2.3.1 甲醇提取物与水培地黄根系分泌物的验证

地黄连作自毒物质的甲醇提取物与水培地黄根系分泌物进行紫外区吸收光谱扫描显示, 两种测试样品均在 210 nm 左右波长下有最大吸收, 而对照土壤则在 210 nm 处没有最大吸收。

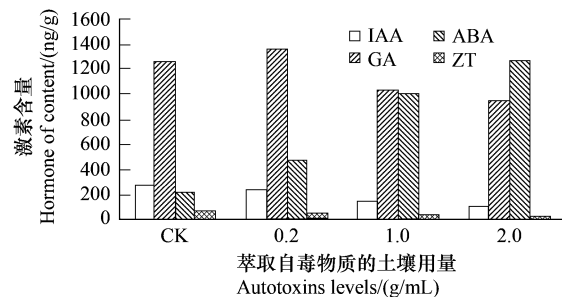


图 3 甲醇提取自毒物质对地黄内源激素的影响

Fig. 3 Endogenous hormones of *Rehmannia glutinosa* affected by methanol extracted soil autotoxins

注: 图中 CK 代表对照, IAA 代表吲哚乙酸类生长素物质, GA 代表赤霉素类物质, ABA 代表脱落酸类物质, ZT 代表玉米素类物质

HPLC 结果显示,相同的色谱条件下,地黄连作自毒物质的甲醇提取物(吸光度值为 85.7mAU 和 44.3mAU)与水培地黄根系分泌物(吸光度值为 2147.8mAU 和 2129.3mAU)具有相同的特征性色谱峰(保留时间 6.0min 左右),而对照土壤中则无此特征性色谱峰(图 4)。

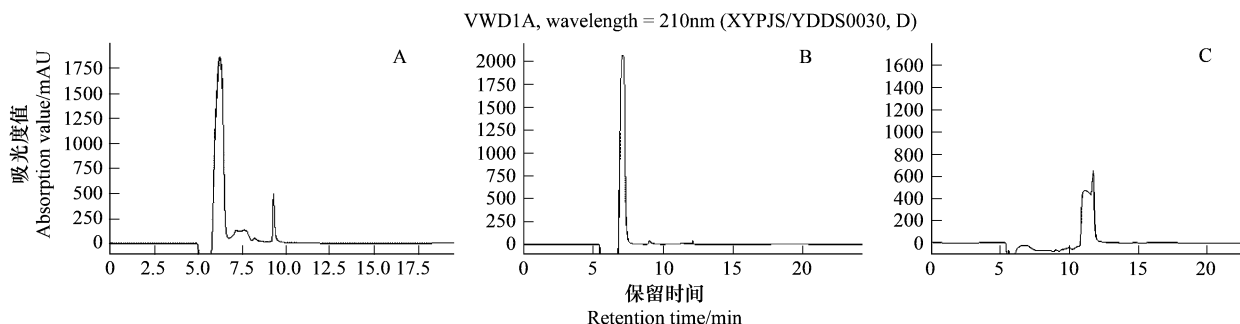


图 4 高效液相色谱法对自毒物质的验证

Fig. 4 The chromatogram of soil extracts and root exudates of *Rehmannia glutinosa* generated by HPLC

A 图为地黄土壤甲醇提取物, B 图为地黄根系分泌物, C 图为对照土壤甲醇提取物

2.3.2 地黄自毒物质中甲醇提取物的鉴定

如图 5 所示, FTIR 分析结果表明,地黄茬后土壤甲醇提取物组分中含有一OH (3395 cm^{-1})、C=O (1691 cm^{-1}) 以及苯环骨架结构 (1450 cm^{-1}) 等官能团结构,由于检测到 625 cm^{-1} (C—Cl) 和 3396 cm^{-1} (—OH) 处有较宽的红外吸收,推测样品中含有比较多强负电性基团,所以 ESI-MS 分析采用负离子模式进行以排除电离干扰。

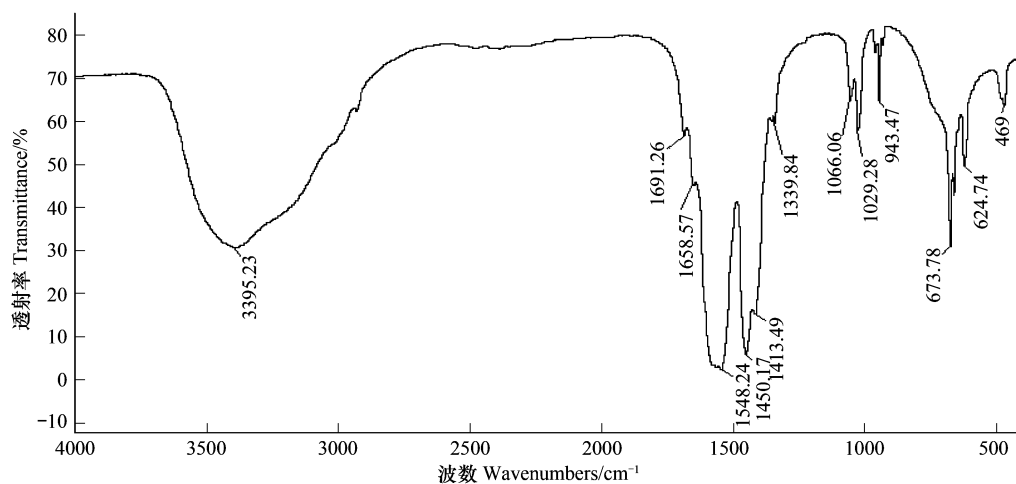


图 5 甲醇提取物中地黄自毒物质官能团结构分析的傅里叶红外光谱

Fig. 5 The spectrometry of FTIR analysis on functional groups in the methanol extracted soil autotoxins

进一步应用电喷雾离子阱质谱分析共检测到 10 个明显的同位素峰簇(图 6),根据其质谱信息 m/z 和 FTIR 分析的官能团信息进行生物信息学解谱分析后得到 6 个峰簇的检测结果。

峰 1 选侧峰 m/z 为 205,推测离子为 $[M + Na]^+$,实际分子量为 182,结构鉴定信息进行生物信息学和文献查阅后推测为香草酸。

峰 2 选侧峰 m/z 为 363,推测离子为 $[2M - H]^-$,实际分子量为 182,结构鉴定信息进行生物信息学和文献查阅后推测为 D-甘露醇。

峰 3 基峰 m/z 为 516,推测为样品准分子,实际分子量为 516,结构鉴定信息进行生物信息学和文献查阅后推测为推测为二十六烷酸苯羟基乙酯。

峰4 基峰 m/z 为 670, 推测离子为 $[M-COOH]^-$, 实际分子量为 625, 结构鉴定信息进行生物信息学和文献查阅后推测为毛蕊花糖苷。

峰5 基峰 m/z 为 827, 推测离子为 $[2M-H]^-$, 实际分子量为 414, 结构鉴定信息进行生物信息学和文献查阅后推测为 β -谷甾醇。

峰6 选侧峰 m/z 为 1153, 推测离子为 $[2M-H]^-$, 实际分子量为 577, 结构鉴定信息进行生物信息学和文献查阅后推测为胡萝卜苷。

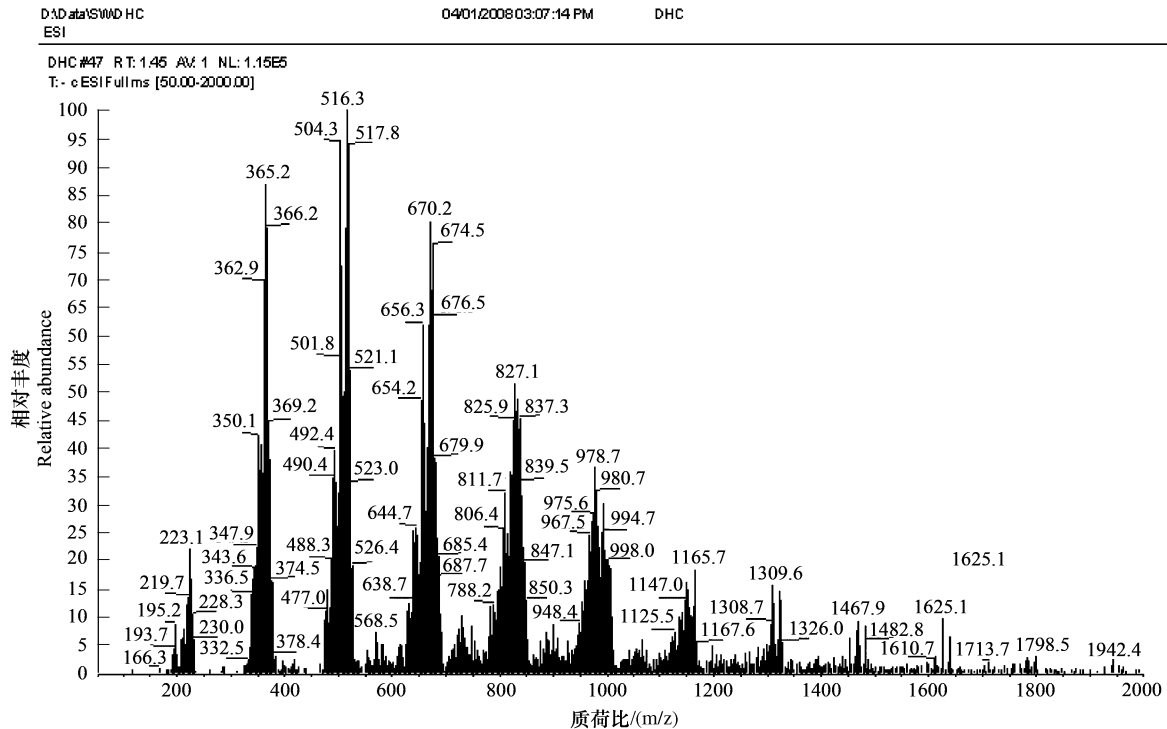


图6 甲醇提取物中的地黄自毒物质电喷雾离子阱质谱总离子流图谱

Fig. 6 The total ion chromatogram of methanol extracted soil autotoxins from ESI-MS analysis

3 讨论

植物在正常的生命活动过程中,会向环境释放一些影响其他植物生长的次生代谢物质,这些次生代谢物质在土壤中积累,对植物自身也具有毒害作用,即化感自毒作用^[5,13]。本研究通过离子阱质谱分析共检测到6种自毒物质分别为香草酸、D-甘露醇、二十六烷酸苯羟基乙酯、毛蕊花糖苷、 β -谷甾醇和胡萝卜苷,均属于化感物质范畴^[20]。刘红彦等^[21]通过对土壤灭菌和块根、残叶灭菌添加的盆栽试验研究,发现地黄的连作障碍可能来自前茬地黄块根的分泌物(或前茬微生物的分解产物),其次是残叶降解的遗留物。郝群辉等^[21]也从地黄根际土壤中分离到邻苯二甲酸正丁酯、邻苯二甲酸异丁酯等12种次生代谢物质。就当前连作障碍热点研究的设施园艺作物中番茄、黄瓜和辣椒等作物的组织和根系分泌物中也分离出了包括苯甲酸、肉桂酸和阿魏酸在内的十余种自毒物质^[22-23]。这些自毒物质不仅直接损害保护酶系统,引起机体内活性氧增多,启动膜脂过氧化,从而改变植物膜功能,还破坏植物生长调节系统使细胞分裂和生长受阻,还会参与植物高级代谢过程进而影响植物光合作用和物质储运^[24-26]。本研究通过生物测试发现地黄茬后土壤中确实存在抑制地黄生长的自毒物质,进一步研究自毒作用的生理生化指标发现,地黄自毒物质可直接作用于地黄干扰地黄自身的抗氧化防御系统,导致地黄叶绿素含量减低和根系活力下降,改变地黄内源激素水平,抑制地黄正常生长。

研究资料表明,植物自毒物质经微生物的转化和放大作用在土壤中累积还会引起土壤微生物生态系统的群体结构功能发生改变,甚至诱导植物害虫群体数量增加引发严重植物病虫害,进而间接影响植物的生长过程。陈慧^[16]等研究发现地黄连作后土壤微生物区系及肥力状况良好,但随种植年限的增加,土壤中放线菌、氨化

细菌、好气性固氮菌、硫化细菌、反硝化细菌和嫌气性纤维素分解菌增加,而好气性纤维素分解菌减少,根际微生物群落结构改变,土壤微生态环境劣化。何江华^[27]等研究结果显示,地黄块根膨大过程中根际土壤中放线菌、真菌数量均明显增加。王明道^[17]等研究表明,地黄连作后土壤微生物多样性发生了较大变化,细菌数量减少,木霉和黄曲霉数量增加,土壤生态系统已开始失调。

由此可见,地黄自毒作用是导致其连栽障碍的一个重要原因,自毒物质不仅直接抑制地黄正常生长,还通过其根际微生态系统与土壤微生物相互作用间接改变土壤理化性质,诱导土壤有害微生物菌群增多,间接抑制地黄的发育过程。但地黄自毒物质诱导其根际微生物群落变化的原因及自毒物质与土壤微生物的互作关系仍须进一步探索。

致谢:美国蒙大拿州立大学农业调查与研究中心 Chen Chengci 教授在本论文的撰写和修改过程中给予帮助,特此致谢。

References:

- [1] Guo L P, Huang L Q, Jiang Y X, Lü D M. Soil deterioration during cultivation of medicinal plants and ways to prevent it. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, 31(9):714-717.
- [2] Gao W W, Zhao Y J, Wang Y P, Chen S L. A review of research on sustainable use of medicinal plants cropland in China. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, (31)20:1665-1668.
- [3] Ding Z M. *Rehmannia glutinosa* L. Beijing: China Press of Traditional Chinese Medicine, 2001.
- [4] Wen X S, Zhao H Y, Li X E, Ma X J, Yang S L, Zheng J H. Viral diseases of *Rehmannia glutinosa* reveal any symptoms in different varieties of *Rehmannia glutinosa* L. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2002, 27(3):225-227.
- [5] Wen X S, Yang S L, Wei J H, Zheng J H. The cultivated history and its species textual of *Rehmannia glutinosa* L. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2002, 33(10):946-949.
- [6] Zhang Z Y, Lin W X. Continuous cropping obstacle and allelopathic autotoxicity of medicinal plants. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2009, 17(1):189-196.
- [7] Yu M, Yu J W, Cao P G, Liang H D, Xiao H D, Wang Y B, Cui Z X. Agrochemical characteristics of soil for continuous cropping Lily. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35(3):377-379.
- [8] Liang Y L, Chen Z J, Xu F L, Zhang C E, Du S N, Yang Y G. Soil continuous cropping obstacles in facility agriculture on Loess Plateau. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2004, 18(4):134-136.
- [9] Li X E, Chen S L, Wei S Q, Wei J H, Lan J, Zhao R H. Radixrehmanniae analysis and grades divided of *Rehmannia glutinosa* L. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, 31(4):344-346.
- [10] Chen C B, Wang Y Y, Liu J Y, Yan S, Xu S Q, Zhang L X. The Identify for the alldochemical of the soil of Ginseng Rhizospher. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2006(2):12-14.
- [11] Ma R J, Hui J R, Zhu H, Li J, Zhao Q F. Allelopathy of *Angelica sinensis* at vegetative period. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2008, 16(6):1483-1488.
- [12] Hao Q H, Liu H Y, Wang F, Zhang Y J. The GC-MS analysis of extracts from the rhizosphere soil of *Rehmannia glutinosa*. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2007, (2):78-80.
- [13] Wang Y P, Zhao Y J, Shao D, Yang J S. A preliminary study of american ginseng root exudates. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2005, 30(3):229-231.
- [14] Hou H Q, Zhang Z C, Lei C Y, Chen R, Zhang D S. Biological characteristics of *Rehmannia mosaic virus* (ReMV). *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(9):406-408.
- [15] Guan H L, Chen Y J, Zhu H C, Zhang W D, Yin F, Yang J Z, Liu S Q. Characteristic study of rhizome-microorganism in soil of diseased *Panax notoginseng*. *Agriculture & Technology*, 2005, 25(6):56-58.
- [16] Chen H, Hao H R, Xiong J, Qi X H, Zhang Z Y, Lin W X. Effects of successive cropping *Rehmannia glutinosa* on rhizosphere soil microbial flora and enzyme activities. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(12):2755-2759.
- [17] Wang M D, Wu Z W, Yuan Z Y, Chen H G, Wu K, Jia X C. Effects of *Rehmannia glutinosa* Libosch. continuous cropping on microbial communities. *Journal of Henan Agricultural University*, 2008, 42(5):532-538.
- [18] Wang X K. Principles and Techniques of plant physiology biochemical experiments (3rd Edition). Beijing: Higher Education Press, 2003.
- [19] Zhu G L, Zhong H W, Zhang A Q. Plant physiol experiment. Beijing: Peking University Press, 1990.

- [20] Rice E L. Allelopathy. 2nd ed. New York: Academic Press Inc, 1984.
- [21] Liu H Y, Wang F, Wang Y P, Lu T T. The causes and control of continuous cropping barrier in Dihuang (*Rehmannia glutinosa* Li bosch.). Journal of North China Agriculture, 2006, 21(4): 131-132.
- [22] Hao Q H, Liu H Y, Wang F, Zhang Y J. The GC-MS analysis of extracts from the rhizosphere soil of *Rehmannia glutinosa*. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2007, (2): 78-80.
- [23] Hu Y S, Jia X C. Factors analysis of continuous cucumber cropping obstacle and its preparatory bioremediation. Nan Jing Agricultural University, 2005.
- [24] Wang R H, Zhou B L, Zhang Q F, Liang H, Fu Y W. Effects of vanillin and cinnamic acid in root exudates of eggplants on *Verticillium dahliae* etc. Acta Ecologica Sinica, 2006, (9): 3152-3155.
- [25] Dong Z H, Lin W X. Current status and prospects of allelopathy research in agriculture. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2001, 9(1): 80-83.
- [26] Chen D M, Lin W X. Status and prospects of rice allelopathy research. Journal of Fujian Agricultural University (Natural Science), 2000, 29(3): 281-285.
- [27] He J H, Fu X B, Ma D M, Jia X C, Wang M D. Changes of phenolic acid content and rhizosphere microbial population in soil during tuberous root expansion of *Rehmannia glutinosa* Libosch. Henan Science, 2008, 26(11): 1369-1372.

参考文献:

- [1] 郭兰萍, 黄璐琦, 蒋有绪, 吕冬梅. 药用植物栽培种植中的土壤环境恶化及防治策略. 中国中药杂志, 2006, 31(9): 714-717.
- [2] 高微微, 赵杨景, 王玉萍, 陈士林. 我国药用植物栽培地的可持续利用研究. 中国中药杂志, 2006, (31)20: 1665-1668.
- [3] 丁自勉. 地黄. 北京: 中国中医药出版社, 2001.
- [4] 温学森, 赵华英, 李先恩, 马小军, 杨世林, 郑俊华. 地黄病毒病在不同品种中的症状表现. 中国中药杂志, 2002, 27(3): 225-227.
- [5] 温学森, 杨世林, 魏建和, 郑俊华. 地黄栽培历史及其品种考证. 中草药, 2002, 33(10): 946-949.
- [6] 张重义, 林文雄. 药用植物化感自毒作用与连作障碍. 中国生态农业学报, 2009, 17(1): 189-196.
- [7] 喻敏, 余均沃, 曹培根, 梁火娣, 潘洪东, 王蕴波, 崔志新. 百合连作土壤养分及物理性状分析. 土壤通报, 2004, 35(3): 377-379.
- [8] 梁银丽, 陈志杰, 徐福利, 张成娥, 杜社妮, 严勇敢. 黄土高原设施农业中的土壤连作障碍. 水土保持学报, 2004, 18(4): 134-136.
- [9] 李先恩, 陈士林, 魏淑秋, 魏建和, 兰进, 赵润怀. 地黄适生地分析及等级划分. 中国中药杂志, 2006, 31(4): 344-346.
- [10] 陈长宝, 王艳艳, 刘继永, 焉石, 许世泉, 张连学. 人参根际土壤中化感物质鉴定. 特产研究, 2006(2): 12-14.
- [11] 马瑞君, 惠继瑞, 朱慧, 李晶, 赵庆芳. 当归营养期的化感作用. 中国生态农业学报, 2008, 16(6): 1483-1488.
- [12] 郝群辉, 刘红彦, 王飞, 张玉军. 怀地黄根际土壤水提物 GC/MS 分析. 河南农业科学, 2007, (2): 78-80.
- [13] 王玉萍, 赵杨景, 邵迪, 杨峻山. 西洋参根系分泌物的初步研究. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 229-231.
- [14] 侯红琴, 张振臣, 雷彩艳, 陈冉, 张德胜. 地黄花叶病毒(ReMV)生物学特性研究初报. 中国农学通报, 2007, 23(9): 406-408.
- [15] 官会林, 陈昱君, 朱海春, 张无敌, 尹芳, 杨建忠, 刘士清. 三七病株根际土壤微生物特征研究. 农业与技术, 2005, 25(6): 56-58, 70.
- [16] 陈慧, 郝慧荣, 熊君, 齐晓辉, 张重义, 林文雄. 地黄连作对根际微生物区系及土壤酶活性的影响. 应用生态学报, 2007, 18(12): 2755-2759.
- [17] 王明道, 吴宗伟, 原增艳, 陈红歌, 吴坤, 贾新成. 怀地黄连作对土壤微生物区系的影响. 河南农业大学学报, 2008, 42(5): 532-538.
- [18] 王学奎主编. 植物生理学实验指导(第三版). 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [19] 朱广廉, 钟海文, 张爱琴. 植物生理学实验. 北京: 北京大学出版社, 1990: 242-248.
- [21] 刘红彦, 王飞, 王永平, 鲁传涛. 地黄连作障碍因素及解除措施研究. 华北农学报, 2006, 21(4): 131-132.
- [22] 郝群辉, 刘红彦, 王飞, 张玉军. 怀地黄根际土壤水提物的 GC-MS 分析. 河南农业科学, 2007, 2: 78-80.
- [23] 胡元森, 贾新成. 黄瓜连作障碍因子分析及其生物措施修复探讨. 南京农业大学, 2005.
- [24] 王茹华, 周宝利, 张启发, 廉华, 付亚文. 茄子根系分泌物中香草醛和肉桂酸对黄萎菌的化感效应. 生态学报, 2006, (9): 3152-3155.
- [25] 董章杭, 林文雄. 作物化感作用研究现状及前景展望. 中国生态农业学报, 2001, 9(1): 80-83.
- [26] 陈冬梅, 林文雄. 水稻化感作用研究现状与展望. 福建农林大学学报, 2000, 29(3): 281-285.
- [27] 何江华, 付香斌, 马东明, 贾新成, 王明道. 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. 河南科学, 2008, 26(11): 1369-1372.