

不同种植年限对特殊药材土壤化学性质和微生物多样性的影响

张英英^{1,2,3}, 魏玉杰^{1,2,3}, 吴之涛^{1,2,3}, 杨宪忠^{1,2,3}

(1.甘肃省农业工程技术研究院,甘肃 武威 733006;2.甘肃省特种药源植物种质创新与安全利用重点实验室,甘肃 武威 733006;
3.武威市祁连山区道地中药材生态栽培技术创新中心,甘肃 武威 733006)

摘要:以不同种植年限特殊药材根际土壤为材料,采用 IlluminaNovaSeq 高通量测序法和常规分析方法,分析了种植年限(0 a,1 a,4 a,24 a)对根际土壤化学性质及微生物群落多样性的影响。结果表明:连续种植 24 a 后,土壤电导率、硝态氮含量显著高于其他种植年限。特殊药材连作对土壤细菌 α -多样性指数均无显著影响,但土壤细菌丰富度和多样性减少;连续种植 24 a 真菌 α -多样性指数中 ACE 指数、Chao1 指数显著高于种植 1 a,真菌丰富度和多样性增加。细菌群落 Proteobacteria(变形菌门)、Acidobacteria(酸杆菌门)、Actinobacteria(放线菌门)为优势菌门,*Sphingomonas*(鞘氨醇单胞菌属)、*Xanthomonadaceae*(黄单胞菌科)相对丰度随着种植年限增加呈明显上升趋势,未知菌属 *RB41*、*Lysobacter*(溶杆菌属)相对丰度呈下降趋势。土壤真菌群落 Mortierellomycota(被孢霉门)、Ascomycota(子囊菌门)、Basidiomycota(担子菌门)为优势菌门,*Mortierella*(被孢霉属)相对丰度随种植年限增加呈先增后降趋势,*Fusarium*(镰刀菌属)、*Cladosporium*(枝孢属)、*Aspergillus*(曲霉属)相对丰度均随种植年限增加呈先降后升趋势,连续种植 24 a 土壤 *Fusarium* 相对丰度高于种植 1 a,4 a,*Fusarium* 相对丰度增加是导致特殊药材连作障碍的重要原因。Basidiomycota(担子菌门)、Ascomycota(子囊菌门)、Chytridiomycota(壶菌门)、Mucoromycota(毛霉门)相对丰度与土壤电导率、硝态氮呈正相关,pH、硝态氮、电导率等理化性质改变是影响土壤微生物群落变化的重要因素。

关键词:根际微生物;连作;高通量测序;土壤微生物群落

中图分类号:S567;S154.36 **文献标志码:**A

Effects of different cropping years on soil chemical properties of special medicine source plant

ZHANG Yingying^{1,2,3}, WEI Yujie^{1,2,3}, WU Zhitao^{1,2,3}, YANG Xianzhong^{1,2,3}

(1.Gansu Academy of Agri-Engineering Technology, Wuwei, Gansu 733006, China; 2.Key Laboratory of the Special Medicine Source Plant for Germplasm Innovation and Safety Utilization in Gansu Province, Wuwei, Gansu 733006, China;
3.Wuwei Technology Innovation Center of Genuine Medicinal Materials Ecological Cultivation in Qilian Mountain Area, Wuwei, Gansu 733006, China)

Abstract: Illumina high throughput sequencing technology and conventional analysis method was employed to investigate soil bacterial and fungal communities, soil chemical properties in special medicine source plant with different cropping histories of 0, 1, 4, and 24 years. The results indicated that the electrical conductivity and nitrate nitrogen in the 24 years were significantly higher than those in other years. Soil fungi diversity analysis showed that the index of ACE and Chao1 in the 24 years soils were higher than those in 1 year and the richness and diversity of soil fungi increased. But it had no significant effects on soil bacterial α -diversity index, the richness and diversity of soil bacteria decreased. The predominant phyla of soil bacterial were Proteobacteria, Acidobacteria and Actinobacteria in all soil samples. *Sphingomonas* and *Xanthomonadaceae* showed an obvious upward trend with the increase of planting years, while *RB41* and *Lysobacter* showed a downward trend. The predominant phyla in soil fungal

收稿日期:2022-03-23

修回日期:2022-09-15

基金项目:财政部、农业农村部“国家中药材产业技术体系”(CARS-21);甘肃省青年科技基金计划项目(20JR10RA483);甘肃省青年科技基金计划项目(20JR5RA068)

作者简介:张英英(1991-),女,甘肃武威人,硕士,助理研究员,主要从事土壤生态与中药材栽培研究。E-mail:495285884@qq.com

通信作者:魏玉杰(1967-),男,甘肃通渭人,博士,研究员,主要从事中药材栽培与新品种选育研究。E-mail:gswwwwj67@163.com

were Mortierellomycota, Ascomycota and Basidiomycota in all soil samples. The relative abundance of Mortierella increased first and then decreased. *Fusarium*, *Cladosporium* and *Aspergillus* decreased first and then increased with the planting years. The relative abundance of *Fusarium* for 24 years was higher than that for 1 and 4 years. The increase of *Fusarium* relative abundance was an important reason for the obstacle of continuous cropping. Redundancy analysis suggested that fungal Basidiomycota, Ascomycota, Chytridiomycota and Mucoromycota were evidently interrelated to electrical conductivity and soil nitrate nitrogen in the soils respectively. The changes of soil pH, nitrate nitrogen and electrical conductivity were important factors affecting the changes of soil microbial community under continuous cropping of special medicines source plant.

Keywords: rhizosphere microorganism; continuous cropping; Illumina sequencing; soil microbial community

特殊药材包含吗啡、可待因等 30 多种生物碱^[1],是重要的药源植物,其果实的乳汁、果壳、种子嫩苗均可入药,有镇痛、镇静、止咳等多种药用功效。生产上特殊药材采用封闭式管理,在同一地块连续种植十余年,导致土壤理化性质恶化,霜霉病等病害频发,使植株长势变弱,产量和品质下降,这已成为影响特殊药材规范化栽培和生产的重要问题。特殊药材轮作倒茬在实际生产中难以运用,连作模式难以避免,深入了解特殊药材连作障碍的产生机理,探索能够缓解或克服其连作障碍的有效方法已成为特殊药材种植过程中亟待解决的关键问题。

连作障碍是多种原因共同作用的结果,前人研究发现造成连作障碍的原因有以下 3 点:一是土壤养分失衡,有害代谢产物积累,矿质元素含量发生变化,特别是随种植年限的增加,养分供给不平衡,微生物种群失衡,导致土壤质量严重下降^[2];二是连作后土壤微生物结构及多样性的变化,导致土壤性质恶化,微生物群落结构失衡,主要表现为根际土壤微生物由细菌型向真菌型发展^[3];三是药材自身根系分泌物的毒害作用,植株地上部和根系会分泌出某些特殊物质抑制其生长和发育,产生自毒作用,包括酸类、酯类等已被报道的化感自毒物质很容易在土壤中积累,造成土壤理化性质恶化并对植株的生物膜系统及保护酶系统造成损害,特别是随着连作年限增加,根系分泌物增加,使得根际微生物群落失调,植株抗逆能力下降,根际环境逐渐变为酸性,有利于真菌的生长而细菌数量则逐渐减少^[4-5]。药用植物与根际微生物之间存在着复杂的相互作用关系,药用植物通过根系分泌物对根际微生物的多样性和丰富度产生影响,而根际微生物的代谢产物对药用植物的生长发育、营养吸收、抗病能力、品质等都有重要的影响^[4,6]。目前,对于药用植物连作障碍的研究主要集中在地黄、三七、人参等方面^[6-8],引起连作障碍的原因也不尽相同。虽

然各种缓解连作障碍的种植模式被不断提出,但关于药用植物连作障碍产生的机制以及根际微生物克服或缓解连作障碍的机制等问题还需更深入的研究。

本研究从药用植物-土壤-微生物的互作关系方面入手,利用 IlluminaNovaSeq 高通量测序技术,对不同种植年限特殊药材根际土壤微生物群落结构和多样性进行深度研究,并揭示根际微生物、环境因子之间的相互关联及其互作效应,为克服特殊药材种植引起的连作障碍提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验概况及土壤样品的采集

试验地位于平原和沙漠戈壁边缘交汇地带,平均海拔 1 700 m,年平均气温约 7.6℃,多年平均降水量约 190 mm,年蒸发量约 2 400 mm,年均日照时数 2 724.8 h,年降水分布不均,主要集中在 5—9 月。试验区土壤为灌漠土,试验共设 4 个处理:种植特殊药材 1 a(Y1),连续种植特殊药材 4 a(Y2),连续种植特殊药材 24 a(Y3),试验地均属同一封闭区域的相邻地块,因特殊性统一封闭管理,种植、施肥及其他管理措施保持一致,肥料种类及用量均一致;对照(CK)为同一封闭区域没有种植过特殊药材的相邻地块,当年施肥量与其他处理一致。于开花期每个处理样地随机选取 15 株特殊药材,收集根系表面 0~5 mm 的土壤,混合均匀,一部分保存于-80℃低温冷冻用于 DNA 提取,一部分风干后用于土壤理化性质测定,一部分 4℃冰箱保存,用于土壤硝态氮和铵态氮含量测定。

1.2 土壤理化性质测定

有机质、pH 值、电导率、全氮、碱解氮、全磷、有效磷、速效钾、有效态铜、有效态锌、有效态铁、有效态锰均参照鲍士旦等^[9]的相关标准方法进行测定;铵态氮、硝态氮分别用土壤铵态氮、土壤硝态氮试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司生产)提取,SP-

765 型紫外可见光分光光度计(上海光谱仪器有限公司)测定。

1.3 土壤 DNA 提取和高通量测序

土壤微生物 DNA 提取:每个土样分别称取 0.500 g,3 次重复,用 PowerSoil © DNAIsolationKit 试剂盒提取土壤微生物基因组总 DNA。所有土壤样品的细菌 16S rDNA V3+V4 区扩增用引物 338F (5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3′) 和引物 806R (5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′) 进行,所有土壤样品的真菌 ITS1F-ITS2R 区扩增用引物 ITS1F (5′-CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA-3′) 和 ITS2R (5′-GCTGCGTTCT-TCATCGATGC-3′) 进行,PCR 产物由 AMPureXT beads (BeckmanCoulterGenomics, Danvers, MA, USA) 纯化, Qubit (Invitrogen, USA) 定量。扩增子用于测序,扩增子文库的大小和数量分别在 Agilent 2100 生物分析仪 (Agilent, 美国) 和 Illumina (KapaBiosciences, Woburn, MA, 美国) 的文库定量试剂盒上进行评估。在 NovaSeq PE250 平台上对库进行排序。样品在 Illumina NovaSeq 平台上进行测序,测序由 TSINGKE 提供。建库和测序工作委托北京擎科生物科技有限公司完成。

1.4 测序数据处理与分析

使用 Trimmomatic v 0.33 软件,对测序得到的 Raw Reads 进行过滤,然后使用 Cutadapt 1.9.1 软件进行引物序列的识别与去除,得到不包含引物序列的 Clean Reads;再使用 Usearchv 10 软件,通过 overlap 对每个样品的 Clean Reads 进行拼接,然后根据不同区域的长度范围对拼接后数据进行长度过

滤,使用 UCHIMEv 4.2 软件,鉴定并去除嵌合体序列,得到最终有效数据 (Effective Reads)。划分 OTUs,进行多样性分析、差异分析、相关性分析。

1.5 统计分析

利用 SPSS 19.0 软件,采用单因素方差分析方法,检验土壤化学性质及高通量测序得到的微生物丰富度、多样性指数之间的差异。检验水平为 $\alpha < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同种植年限对特殊药材根际土壤化学性质及微量元素的影响

由表 1 可知,不同种植年限对特殊药材根际土壤的 pH 没有显著影响,但与 CK 相比,各处理均有下降。全氮、碱解氮、全磷、速效钾、有效态铁和有效态锰均表现为 Y1 处理显著高于其他处理。有机质含量 Y1 显著高于 Y3 与 CK,与 Y2 差异不显著。有机质、全氮、碱解氮、铵态氮、全磷、有效磷、有效态铜、有效态铁、有效态锰含量整体均随种植年限增加呈现先增后降趋势。电导率与硝态氮均表现为 Y3 处理显著高于其他处理,电导率分别为 CK、Y1、Y2 处理的 7.20 倍、4.26 倍、2.00 倍,硝态氮分别为 CK、Y1、Y2 处理的 21.28 倍、8.13 倍、3.61 倍,随着种植年限增加表现出明显的增加趋势,均表现为 Y3>Y2>Y1>CK;速效钾表现为 CK 显著低于 Y1、Y3 处理,与 Y2 处理差异不显著,有效态锌表现为 Y1、Y2、Y3 显著高于 CK,2 个指标均表现为 Y1>Y3>Y2>CK。

表 1 不同种植年限对特殊药材根际土壤化学性质及微量元素的影响

Table 1 Effects of different cropping years on soil chemical properties and trace elements of special medicinal rhizosphere soil							
处理 Treatment	pH	电导率 Electrical conductivity /(us · cm ⁻¹)	有机质 Organic matter /(g · kg ⁻¹)	全氮 Total nitrogen /(g · kg ⁻¹)	碱解氮 Alkaline nitrogen /(mg · kg ⁻¹)	铵态氮 Ammonium nitrogen /(mg · kg ⁻¹)	硝态氮 Nitrate nitrogen /(mg · kg ⁻¹)
CK	9.14±0.06a	84.63±6.43b	11.00±0.38bc	0.40±0.16b	61.67±4.06b	0.45±0.10b	5.15±0.57b
Y1	8.81±0.24a	142.90±38.06b	12.37±0.43a	1.04±0.09a	109.33±7.22a	1.68±0.38a	13.48±2.52b
Y2	8.86±0.08a	304.83±103.94b	11.93±0.09ab	0.68±0.01b	72.33±1.33b	1.04±0.38ab	30.36±4.59b
Y3	8.86±0.18a	608.97±93.93a	10.04±0.25c	0.65±0.03b	60.67±3.18b	0.72±0.10b	109.63±15.29a
处理 Treatment	全磷 Total phosphorus /(g · kg ⁻¹)	有效磷 Available phosphorus /(mg · kg ⁻¹)	速效钾 Available potassium /(mg · kg ⁻¹)	有效态铜 Available copper /(mg · kg ⁻¹)	有效态锌 Available zinc /(mg · kg ⁻¹)	有效态铁 Available iron /(mg · kg ⁻¹)	有效态锰 Available manganese /(mg · kg ⁻¹)
CK	0.51±0.01b	12.10±1.76b	67.00±3.06c	1.33±0.03a	0.57±0.05c	8.70±0.84b	5.23±0.23b
Y1	0.63±0.02a	58.63±10.30a	429.00±73.51a	1.44±0.10a	2.83±0.19a	12.30±0.85a	12.10±0.55a
Y2	0.53±0.01b	42.17±9.96a	98.67±21.62bc	1.25±0.03a	1.27±0.06b	8.17±0.73b	6.40±1.07b
Y3	0.50±0.04b	40.53±5.52a	226.00±46.80b	0.98±0.03b	2.70±0.22a	4.50±0.32c	4.33±0.45b

注:同列不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level.

2.2 不同种植年限对特殊药材根际土壤微生物 α -多样性指数的影响

α -多样性指数是反映微生物群落丰富度和均匀度的综合指标。由表 2 可知,细菌 Coverage 指数为 0.9969~0.9970,真菌 Coverage 指数为 0.9994~0.9997,表明其测序结果能够全面反映土壤细菌和真菌的多样性。不同种植年限对特殊药材土壤细菌 α -多样性指数均无显著影响,但 Chao1 指数、Simpson 指数、Shannon 指数均表现为 CK 高于其他处理。除 Chao1 指数外,ACE 指数、Shannon 指数、Simpson 指数均随着种植年限增加呈先增后降趋势,土壤细菌丰富度和多样性减少。真菌 α -多样性指数中 ACE 指数 Y3 显著高于 Y1、Y2,Chao1 指数为 Y3 显著高于 Y1,Simpson 指数、Shannon 指数各处理间差异均不显著。真菌 α -多样性指数均随着种植年限先降后升,其中除 Simpson 指数外,Y1 处

理其余真菌 α -多样性指数均最小,后随种植年限增加土壤真菌丰富度和多样性增加。

2.3 不同种植年限对特殊药材根际土壤微生物群落 OTU 群落聚类的影响

如图 1A、1B 所示(见 155 页),不同种植年限特殊药材根际土壤细菌和真菌 OTU 数量存在一定差异,CK、Y1、Y2、Y3 处理土壤细菌 OTU 数量分别为 768、653、661、758,共有的土壤细菌 OTU 数量为 467,CK、Y1、Y2、Y3 特有 OTU 数量分别为 79、38、30、81。CK、Y1、Y2、Y3 处理土壤真菌 OTU 数量分别为 334、293、315、356,共有的土壤真菌 OTU 数量为 141,CK、Y1、Y2、Y3 特有 OTU 数量分别为 61、9、16、65。真菌和细菌群落特有 OTU 数量均为 Y3 处理最高,细菌、真菌群落 OTU 数量随种植年限增加先降低后增加。

表 2 不同种植年限对特殊药材根际土壤微生物 α -多样性指数的影响

Table 2 Effects of different cropping years on microbial α -diversity index in rhizosphere soil of special medicinal materials					
类别 Classification	α -多样性指数 α -Diversity index	处理 Treatment			
		CK	Y1	Y2	Y3
细菌 Bacteria	ACE	676.99 $\pm$ 12.46a	665.58 $\pm$ 14.47a	678.19 $\pm$ 23.47a	649.44 $\pm$ 39.41a
	Chao1	673.85 $\pm$ 12.77a	655.02 $\pm$ 29.22a	632.00 $\pm$ 27.02a	640.16 $\pm$ 37.01a
	Simpson	0.9900 $\pm$ 0.0011a	0.9805 $\pm$ 0.0082a	0.9866 $\pm$ 0.0016a	0.9796 $\pm$ 0.0023a
	Shannon	7.5826 $\pm$ 0.0150a	7.0342 $\pm$ 0.4568a	7.4334 $\pm$ 0.0438a	7.0901 $\pm$ 0.0381a
	Coverage	0.9970 $\pm$ 0.0002a	0.9967 $\pm$ 0.0003a	0.9973 $\pm$ 0.0003a	0.9969 $\pm$ 0.0002a
真菌 Fungus	ACE	261.34 $\pm$ 12.46ab	216.93 $\pm$ 24.36b	223.84 $\pm$ 25.30b	325.70 $\pm$ 18.75a
	Chao1	225.77 $\pm$ 8.16ab	206.61 $\pm$ 13.77b	222.10 $\pm$ 24.50ab	269.93 $\pm$ 15.48a
	Simpson	0.8896 $\pm$ 0.006a	0.7547 $\pm$ 0.050a	0.7385 $\pm$ 0.191a	0.8894 $\pm$ 0.027a
	Shannon	4.6738 $\pm$ 0.1472a	3.3209 $\pm$ 0.3636a	3.7624 $\pm$ 1.1022a	5.0230 $\pm$ 0.4458a
	Coverage	0.9997 $\pm$ 0.0000a	0.9994 $\pm$ 0.0001a	0.9997 $\pm$ 0.0000a	0.9994 $\pm$ 0.0001a

注:同行不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著。
Note: Different lowercase letters in the same line indicate significant difference at $P<0.05$ level.

2.4 不同种植年限特殊药材根际土壤微生物门水平上的群落组成

不同种植年限特殊药材根际土壤细菌共有 22 门 47 纲 106 目 187 科 380 属 415 种。其中细菌门水平上的群落组成及相对丰度如图 2A(见 155 页)所示,细菌门水平前 10 位基本一致,分别为 Proteobacteria(变形菌门)、Acidobacteria(酸杆菌门)、Actinobacteria(放线菌门)、Chloroflexi(绿弯菌门)、Gemmatimonadetes(芽单胞菌门)、Bacteroidetes(拟杆菌门)、Rokubacteria(己科河菌门)、Nitrospirae(硝化螺旋菌门)、Planctomycetes(浮霉菌门)、Firmicutes(厚壁菌门),其他类群的相对丰度占比为 0.62%~3.61%。Proteobacteria、Acidobacteria、Actinobacteria 为优势菌门,其中 Proteobacteria 在 CK、Y1、Y2、Y3 处理中的相对丰度分别为 35.77%、40.03%、

39.08%、41.30%,Y3 最高,CK 最低;Acidobacteria 相对丰度分别为 25.44%、12.36%、17.48%、15.12%,CK 显著高于 Y1 和 Y3;Actinobacteria 相对丰度分别为 10.89%、16.86%、9.24%、12.74%,各处理间差异不显著。在 Chloroflexi 中 Y1、Y2、Y3 均高于 CK,分别提高了 45.91%、100.64%、39.00%,Y2 与 CK 差异显著;Bacteroidetes 中 Y1 显著高于 CK,Rokubacteria 中 CK 显著高于 Y1 和 Y3;与 CK 相比,Proteobacteria、Chloroflexi、Bacteroidetes 相对丰度均升高,Acidobacteria、Rokubacteria 相对丰度均降低。

不同种植年限特殊药材根际土壤真菌共有 12 门 25 纲 56 目 112 科 176 属 189 种。其中真菌门水平上的群落组成及相对丰度如图 2B(见 155 页)所示,真菌优势菌门前 3 位基本一致,分别为 Mortierellomycota(被孢霉门)、Ascomycota(子囊菌门)、

Basidiomycota(担子菌门),其他类群的相对丰度占比为 1.61%~11.86%。其中 Mortierellomycota 在 CK、Y1、Y2、Y3 处理中的相对丰度分别为 49.64%、69.16%、54.21%、41.83%,Y1 最高,Y3 最低;Ascomycota 相对丰度分别 38.33%、23.92%、26.65%、41.28%;Basidiomycota 相对丰度分别 8.87%、5.30%、7.28%、10.27%,上述优势菌门各处理间差异均不显著。其他类群中 Olpidiomyota Y2 处理显著高于其他处理,Chytridiomycota Y3 处理显著高于 Y1、CK 处理。除 CK 外,其余各处理 Mortierellomycota 相对丰度随种植年限增加呈降低趋势,表现为 Y1>Y2>Y3;Ascomycota、Basidiomycota、Chytridiomycota 相对丰度随种植年限增加而增加,均表现为 Y3>Y2>Y1。

2.5 不同种植年限特殊药材根际土壤微生物属水平上的群落组成

如图 3A 所示,不同种植年限特殊药材根际土壤细菌优势属前 10 位基本一致,包括 *Sphingomonas* (鞘氨醇单胞菌属)、未知菌 *RB41*、*Lysobacter* (溶杆菌属)和 7 种不可培养的未知菌属。其他属在 CK、Y1、Y2、Y3 处理中的相对丰度分别为 56.56%、60.19%、58.04%、60.22%。优势菌属 *Sphingomonas* 在 CK、Y1、Y2、Y3 处理中的相对丰度分别为 5.33%、9.28%、10.53%、13.07%,Y2、Y3 显著高于 CK。Subgroup6 在各处理的相对丰度分别为 11.52%、5.62%、7.83%、7.44%,CK 显著高于 Y1。Gemmatimonadaceae 在各处理的相对丰度分别为 5.38%、4.26%、5.70%、5.11%,各处理间差异不显著;*RB41* 相对丰度分别为 6.92%、2.99%、1.99%、1.38%,CK 处理显著高于其他处理。Xanthomonadaceae 相对丰度分别为 1.19%、3.32%、3.08%、4.65%,Y1、Y3 处理显著高于 CK;*Lysobacter* 相对丰度分别为 1.95%、2.22%、1.61%、1.31%,Y1 显著高于 Y3。其他未知菌属间差异不显著。总体上,*Sphingomonas*、Xanthomonadaceae 相对丰度随着种植年限增加呈明显上升趋势,*RB41* 呈下降趋势,*Lysobacter* 呈先升后降趋势。

如图 3B 所示,在属水平上土壤微生物真菌群落种类变化及相对丰度存在差异,4 个处理中 *Mortierella* (被孢霉属)和 *Fusarium* (镰刀菌属)是优势种群,*Mortierella* 在 CK、Y1、Y2、Y3 处理中的相对丰度分别为 49.54%、68.81%、53.86%、32.94%,各处理间差异不显著;*Fusarium* 在各处理的相对丰度分别为 16.67%、4.18%、9.78%、22.34%,其中 Y3 显著高于 Y1、Y2,与 CK 不显著。*Solicoccozyma* 在各处理的相对丰度分别为 2.89%、4.18%、2.41%、0.06%,Y1 显著高于 Y3;Y2 处理中 *Olpidium* 相对丰度达到

7.86%,显著高于其他处理;Y1 处理 *Thelebolus* 相对丰度达到 5.43%,显著高于其他处理;*Schizophyllum*、*Cladosporium*、*Aspergillus* 在 Y3 中的相对丰度分别为 3.31%、0.80% 和 1.44%,均高于其他处理。*Mortierella*、*Solicoccozyma*、*Thelebolus* 相对丰度均随种植年限增加呈先增加后下降趋势,*Fusarium*、*Schizophyllum*、*Cladosporium*、*Aspergillus* 相对丰度均随种植年限增加呈先减少后增加趋势。

2.6 土壤微生物群落 PCoA 分析

细菌群落 PCoA 分析结果表明(图 4A),群落组成的变异受 11 个主坐标成分的控制,主坐标成分的特征值均大于 0.523,其中前 2 个主坐标成分影响最大,PC1 和 PC2 分别解释 38.64%和 24.08%的方差变异,二者累计贡献率为 62.72%;PC1 主坐标成分可将 CK 的细菌群落与 Y1、Y2、Y3 明显区分开,PC2 可将 Y3 与 CK、Y1、Y2 明显区分开。除 Y1 外,其余处理组内变异均较小。真菌群落 PCoA 分析结果表明(图 4B),群落组成的变异受 11 个主坐标成分的控制,主坐标成分的特征值均大于 1.146,其中前两个主坐标成分影响最大,PC1 和 PC2 分别解释 32.87%和 17.22%的方差变异,二者累计贡献率为 50.09%,各处理间组间差异较大,但 PC1 处理能区分不同种植年限的真菌群落变化。

2.7 环境因子对根际土壤微生物群落的影响

细菌群落 RDA 分析结果表明(图 5A),RDA1 和 RDA2 分别解释 29.85%和 21.59%的方差变异,二者累计贡献率为 51.44%。土壤细菌群落主要受 pH、电导率、硝态氮、有效磷、速效钾的影响较大。其中,Acidobacteria、Rokubacteria、Nitrospirae 与 pH 呈正相关,与其他环境因子呈负相关;土壤硝态氮和有效磷是影响 Chloroflexi、Gemmatimonadetes、Planctomycetes 的主要环境因子;Proteobacteria 与 pH 呈负相关,与其他环境因子均呈现正相关;Firmicutes、Actinobacteria、Bacteroidetes 与有机质、全磷、碱解氮、速效钾呈正相关。

真菌群落 RDA 分析结果表明(图 5B),RDA1 和 RDA2 分别解释 32.23%和 16.91%的方差变异,二者累计贡献率为 49.14%。土壤真菌群落主要受 pH、电导率、硝态氮、有效磷、全磷、铵态氮、碱解氮、有机质的影响较大。Basidiomycota、Ascomycota、Chytridiomycota、Mucoromycota 与电导率和土壤硝态氮呈正相关,Olpidiomyota 与有效磷呈正相关;pH 与 Monoblepharomycota、Rozellomycota、Glomeromycota 呈正相关,与其他环境因子呈负相关;Zoopagomycota、Kickxellomycota 与有机质、全氮、全磷、碱解氮、速效钾、铵态氮呈正相关。

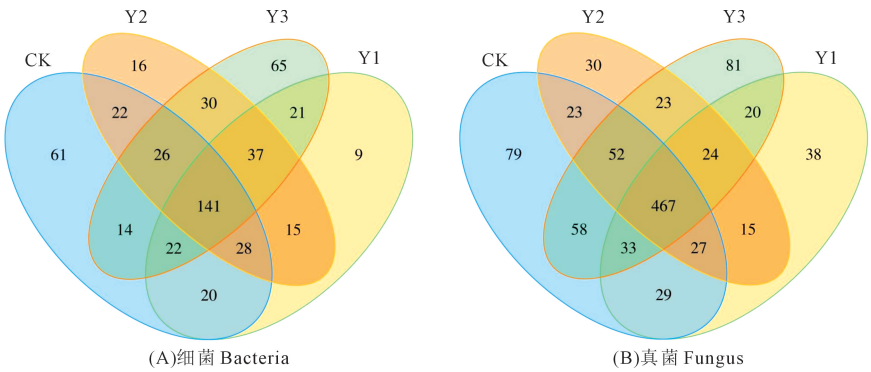


图 1 不同种植年限特殊药材根际土壤细菌和真菌群落的 OTU 韦恩图

Fig.1 Venn diagram based on OTU of bacterial and fungal communities in rhizosphere soil of special medicinal materials with different cropping years

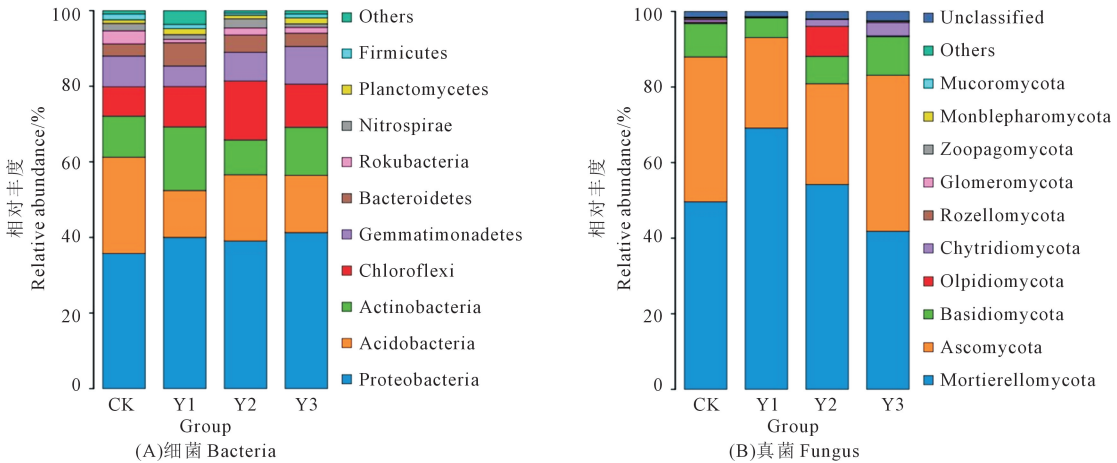


图 2 不同种植年限特殊药材根际土壤微生物群落组成在门水平上的相对丰度

Fig.2 Relative abundance of rhizosphere soil microbial community composition of special medicinal materials at phylum level in different cropping years

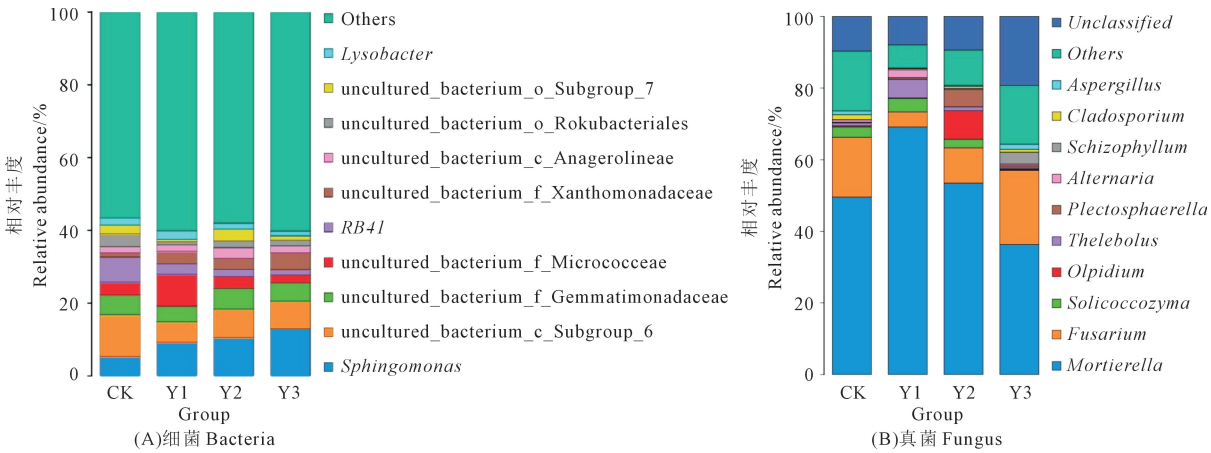


图 3 不同种植年限特殊药材根际土壤微生物群落组成在属水平上的相对丰度

Fig.3 Relative abundance of rhizosphere soil microbial community composition of special medicinal materials at genus level in different cropping years

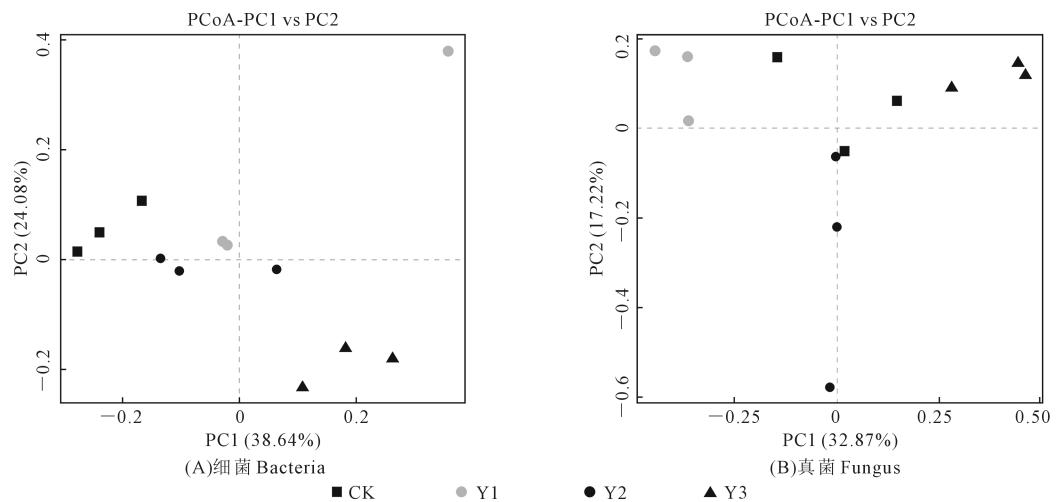
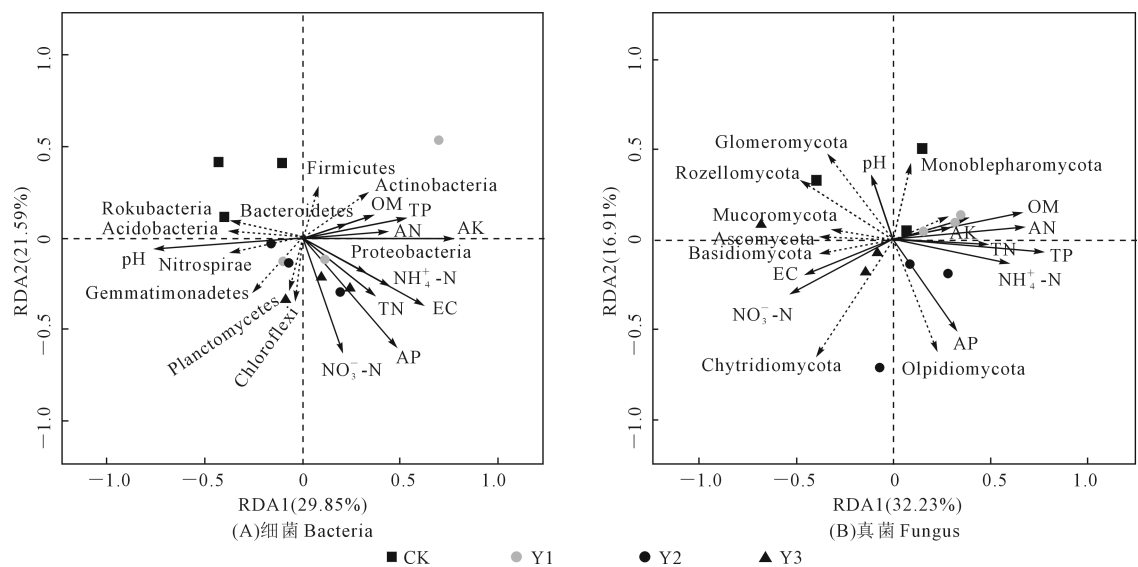


图 4 土壤微生物群落 PCoA 分析
Fig.4 PCoA analysis of soil microbial community



注:OM—有机质;TP—全磷;TN—全氮;AN—碱解氮;AK—速效钾;AP—有效磷;EC—电导率; NO_3^- -N—硝态氮; NH_4^+ -N—铵态氮。
Note:OM—Organic matter;TP—Total phosphorus;TN—Total nitrogen;AN—Alkaline nitrogen;AK—Available potassium;AP—A-
available phosphorus;EC—Electrical conductivity; NO_3^- -N—Nitrate nitrogen; NH_4^+ -N—Ammonium nitrogen.

图 5 土壤理化性质与微生物群落 RDA 分析

Fig.5 RDA analysis of soil physical and chemical properties and microbial community

3 讨论

3.1 种植年限对土壤理化性质的影响

连作障碍效应突出表现在土壤性质恶化、养分失衡、微生物区系变化,病虫害频发及自毒作用严重等方面^[2-4]。本研究表明随着种植年限增加,土壤 pH 较对照下降,这与前人在附子、枸杞等^[10-11]中药材连作研究的结果相一致。可能是连作导致土壤养分失衡,硝态氮大量积累,从而导致 pH 下降。本研究表明土壤有机质、碱解氮、铵态氮、全磷、有

效磷及微量元素含量均随种植年限增加而呈现先增后降的趋势,电导率和硝态氮含量随种植年限增加而明显增加。土壤硝态氮过量富集,直接导致土壤次生盐渍化、养分失衡、土壤结构破坏等问题^[12],这与丛微等^[8]对人参连作土壤硝态氮含量显著增加,影响人参吸收硝态氮的研究结果相一致。但王娟英等^[13]研究认为怀牛膝连作土壤全磷、碱解氮、速效磷和速效钾含量上升,而全氮、全钾并无明显变化。上述药用植物连作后对土壤理化性质的影响均与本研究结果存在差异,原因可能是不同药用

植物对养分的需求不同,养分吸收规律存在差异,长期连作可能会造成某些土壤营养元素缺乏或富集,导致土壤养分失衡^[7];另外不同地区、不同种类的药用植物管理措施不同,施用的肥料种类、数量及土壤性质有较大差异,连续的化肥过量施用打破养分平衡,可能导致土壤酸化,理化性质变劣,加剧了根系化感自毒作用,根系产生的自毒化感物质对土壤微生物种群数量、结构产生不利影响^[14],这可能是造成连作障碍的重要原因。但有研究认为土壤理化性质改变不是导致连作障碍的主导因子^[15],连作也可能改善土壤根际微环境,提高土壤养分状况^[13]。因此,不同药用植物连作对土壤理化性质的影响存在差异。

3.2 种植年限对土壤微生物多样性和群落结构的影响

不同种植年限的特殊药材土壤细菌 α -多样性中 ACE 指数、Shannon 指数、Simpson 指数均随着种植年限的增加呈先增后降趋势,真菌 α -多样性中 ACE 指数、Chao1 指数 Y3 显著高于 Y1,真菌 α -多样性指数均随着特殊药材种植年限先降低后增加,土壤真菌丰富度和多样性增加,土壤细菌丰富度和多样性减少。这与地黄^[6]、枸杞^[11]、丹参^[16]连作的研究结果基本一致,均表现为连作使土壤细菌群落微生物多样性减少。但李晶晶等^[17]研究认为随种植年限增加,设施百合红壤中细菌 Shannon 指数、Simpson 指数显著升高,真菌 Shannon 指数、Simpson 指数显著下降,连作可能导致土壤细菌微生物种群多样化。这与本研究结果相反,可能与土壤类型、作物种类、栽培措施等不同有关。

土壤微生物群落失衡是导致药用植物连作障碍的重要原因^[3-5]。本研究表明不同种植年限特殊药材根际土壤细菌群落门水平 Proteobacteria、Acidobacteria、Actinobacteria 为优势菌门,Proteobacteria 与 Actinobacteria 各处理间差异不显著,二者均为碱性土壤中的优势菌门,广泛存在于各种类型土壤中,适应性较强^[18]。Acidobacteria 随着种植年限增加相对丰度下降,前人研究表明酸杆菌门在动植物残体多聚物及纤维素降解、铁循环、单碳化合物代谢等方面具有重要作用^[19],丛微等^[8]研究认为酸杆菌门相对丰度的减少可能导致土壤中硝酸盐、亚硝酸盐和铁等金属含量的增加,不利于人参的生长,这与本研究结果相似。而李晶晶等^[17]对设施百合连作研究认为酸杆菌门丰度随连作年限增加而上升,变形杆菌和放线菌门的丰度则随连作年限的增加呈下降趋势,这与本研究结果存在较大差异,可

能与作物种类、土壤类型不同相关。

本研究表明不同种植年限土壤细菌群落优势菌属分别是 *Sphingomonas*、未知菌 *RB41*、*Lysobacter* 等,*Sphingomonas*、*Xanthomonadaceae* 随着种植年限增加呈明显上升趋势。研究表明鞘氨醇单胞菌能够耐受贫瘠和恶劣环境,其特殊的代谢调控机制能抵抗外界不利的环境变化,也能降解土壤中的有毒物质^[20];连作引起的土壤养分失衡及土壤性质恶化,可能激发鞘氨醇单胞菌防御机制和生物代谢,使其相对丰度增加。本研究还表明,连作使 *Xanthomonadaceae* 相对丰度明显增加,*Lysobacter* 相对丰度下降,与地黄、附子等^[6,10]中药材连作后土壤微生物群落变化研究结果相似,*Xanthomonas* 致病形式多样,侵染范围广,而 *Lysobacter* 对病原真菌等有突出的拮抗作用,在生物防治病原菌和线虫方面优势明显^[21]。因此,土壤有益细菌减少、有害细菌增加是影响特殊药材连作的重要原因,因现有分析手段有限,本研究还有很多未知属种需进一步深入探究。

本研究表明土壤真菌群落门水平 Mortierellomycota 相对丰度随种植年限增加呈先增后降趋势,Ascomycota、Basidiomycota、Chytridiomycota 随种植年限增加而明显增加。土壤真菌群落属水平 *Mortierella*、*Solicoccozyma*、*Thelebolus* 均随种植年限增加呈先增后降趋势,*Fusarium*、*Cladosporium*、*Aspergillus* 均随种植年限增加呈先降后增趋势。大多研究认为,根际土壤中的病原微生物是植物发生土传病害的主要来源,Yuan 等^[22]研究认为发病土壤中 Ascomycota 的相对丰度更高,而在健康土壤中 Mortierellomycota 更多,较高的尖孢镰刀菌相对丰度是发病土壤的一个重要特征,而某些被孢霉真菌参与有机物料的降解,在提升产量以及改善土壤质量方面具有重要作用^[23]。栽培人参土壤优势真菌为子囊菌门、担子菌门,人参连作导致子囊菌门的相对丰度增加^[24],二者是分解土壤中纤维素、降解高木质素的关键菌群^[25],可能会促进微生物及周围环境对植物组织的破坏,进而引起植物病害。镰刀菌属是引起农作物病害的重要病原真菌之一,其侵染寄主范围较广,可引起作物根、茎、叶等腐烂,能产生真菌毒素等多种次生代谢产物,导致作物发病减产^[26],这可能是引起特殊药材连作障碍的重要原因。王悦等^[27]认为镰刀菌属是丹参枯萎病和根腐病的主要病原菌,刘世鹏等^[10]研究认为附子连作后镰刀菌属和木霉属丰度增加,真菌群落结构失衡,致使附子减产。而枝孢属能寄生植物地上部分引起植物病害,是常见的病原真菌^[28]。慕东艳等^[29]对黑龙江省药用植

物根际土壤真菌多样性调查认为 *Aspergillus*、*Fusarium* 是 14 种药用植物根际土壤真菌的优势菌群,曲霉属真菌是药材主要污染菌之一^[30]。因此, *Mortierella* 等有益真菌减少, *Fusarium*、*Cladosporium*、*Aspergillus* 等有害真菌的增加可能是导致特殊药材微生物菌群失衡、发生连作障碍的重要原因。

3.3 环境因子对根际土壤微生物群落的影响

本研究结果表明土壤细菌群落受 pH、电导率、硝态氮、有效磷、速效钾的影响较大;土壤真菌群落受 pH、电导率、硝态氮、有效磷、全磷、铵态氮、碱解氮、有机质的影响较大。Basidiomycota、Ascomycota、Chytridiomycota、Mucoromycota 与电导率和土壤硝态氮呈正相关。连作可能影响土壤理化性质及根系微生物生长代谢,使根系微生态环境发生改变,有害微生物及致病菌增加,土壤 pH、硝态氮、电导率等理化性质改变是影响特殊药材连作土壤微生物群落变化的重要因素。

4 结 论

随着种植年限增加,特殊药材根际土壤细菌丰富度和多样性减少,土壤真菌丰富度和多样性增加, *Sphingomonas*、*Xanthomonadaceae* 等相对丰度明显上升,未知菌属 *RB41*、*Lysobacter* 相对丰度下降。 *Fusarium*、*Cladosporium*、*Aspergillus* 等有害真菌相对丰度呈先降后升趋势, *Fusarium* 相对丰度增加是导致特殊药材连作障碍的重要原因。特殊药材连续种植 24 a 后,电导率与硝态氮含量显著高于其他种植年份,土壤 pH、硝态氮、电导率等理化性质改变是影响特殊药材连作土壤微生物群落变化的重要因素。

参 考 文 献:

[1] 魏玉杰, 张金文, 何庆祥, 等. 不同生态区罂粟种质的遗传多样性 ISSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(2): 239-243.
WEI Y J, ZHANG J W, HE Q X, et al. ISSR genetic diversity of opium poppy germplasms in different ecological zones[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(2): 239-243.

[2] 侯慧, 董坤, 杨智仙, 等. 连作障碍发生机理研究进展[J]. 土壤, 2016, 48(6): 1068-1076.
HOU H, DONG K, YANG Z X, et al. Advance in mechanism of continuous cropping obstacle[J]. Soils, 2016, 48(6): 1068-1076.

[3] 郭凤仙, 刘越, 唐丽, 等. 药用植物根际微生物研究现状与展望[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(5): 12-21.
GUO F X, LIU Y, TANG L, et al. Research status and prospect on rhizosphere microbiome of medicinal plants[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2017, 19(5): 12-21.

[4] 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.

ZHANG Z Y, LIN W X. Continuous cropping obstacle and allelopathic autotoxicity of medicinal plants [J]. Chinese Journal of Ecoagriculture, 2009, 17(1): 189-196.

[5] 孙浩, 黄璐明, 黄璐琦, 等. 基于生态位理论的药用植物化感作用与连作障碍的探讨[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(17): 2197-2200.
SUN H, HUANG L M, HUANG L Q, et al. Study on medicinal plant allelopathy and soil sickness based on ecological niche[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2008, 33(17): 2197-2200.

[6] 吴林坤, 黄伟民, 王娟英, 等. 不同连作年限野生地黄根际土壤微生物群落多样性分析[J]. 作物学报, 2015, 41(2): 308-317.
WU L K, HUANG W M, WANG J Y, et al. Diversity analysis of rhizosphere microflora of wild *R. glutinosa* grown in monocropping for different years[J]. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(2): 308-317.

[7] 杨野, 王丽, 郭兰萍, 等. 三七不同间隔年限种植土壤中、微量元素动态变化规律研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4): 580-587.
YANG Y, WANG L, GUO L P, et al. Study on dynamic change of middle and micro element in *Panax notoginseng* plant soils with different interval year[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(4): 580-587.

[8] 丛微, 喻海茫, 于晶晶, 等. 人参种植对林地土壤细菌群落结构和代谢功能的影响[J]. 生态学报, 2021, 41(1): 162-171.
CONG W, YU H M, YU J J, et al. Effects of ginseng cultivation on soil microbial community structure and metabolic functions in forest land[J]. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(1): 162-171.

[9] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
BAO S D. Soil and agricultural chemistry analysis [M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000.

[10] 刘世鹏, 韦洁敏, 李智, 等. 连作对附子根际土壤微生物群落结构的影响[J]. 中国微生物学杂志, 2020, 32(5): 520-526.
LIU S P, WEI J M, LI Z, et al. Effect of continuous cropping on structure of microbial community in *Aconitum carmichaeli* Debx rhizosphere soil [J]. Chinese Journal of Microecology, 2020, 32(5): 520-526.

[11] 纳小凡, 郑国旗, 邢正操, 等. 连作对再植枸杞根际细菌群落多样性和群落结构的影响[J]. 土壤学报, 2017, 54(5): 1280-1292.
NA X F, ZHENG G Q, XING Z C, et al. Effects of monocropping on diversity and structure of the bacterial community in rhizosphere of replanted *Lycium barbarum* L. [J]. Acta Pedologica Sinica, 2017, 54(5): 1280-1292.

[12] 巨晓棠, 张福锁. 中国北方土壤硝态氮的累积及其对环境的影响[J]. 生态环境, 2003, 12(1): 24-28.
JU X T, ZHANG F S. Nitrate accumulation and its implication to environment in North China [J]. Ecology and Environment, 2003, 12(1): 24-28.

[13] 王娟英, 许佳慧, 吴林坤, 等. 不同连作年限怀牛膝根际土壤理化性质及微生物多样性[J]. 生态学报, 2017, 37(17): 5621-5629.
WANG J Y, XU J H, WU L K, et al. Analysis of physicochemical properties and microbial diversity in rhizosphere soil of *Achyranthes bidentata* under different cropping years [J]. Acta Ecologica Sinica, 2017, 37(17): 5621-5629.

[14] 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.
WU H M, LIN W X. A commentary and development perspective on

- the consecutive monoculture problems of medicinal plants [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture (Chinese & English), 2020, 28 (6): 775-793.
- [15] 梁银丽, 陈志杰, 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.
- LIANG Y L, CHEN Z J, XU F L, et al. Soil continuous cropping obstacles in facility agriculture on Loess Plateau[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2004, 18(4): 134-136.
- [16] 周冰谦, 赵恒强, 王晓, 等. 不同连作年限山地丹参根际土壤细菌群落结构变化及其多样性分析[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34 (9): 3980-3985.
- ZHOU B Q, ZHAO H Q, WANG X, et al. Diversity analysis and characteristic of bacterial community in rhizosphere soil of *Salvia miltiorrhiza* Bge. in different continuous cropping years [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2019, 34 (9): 3980-3985.
- [17] 李晶晶, 续勇波. 连作年限对设施百合土壤微生物多样性的影响 [J]. 土壤通报, 2020, 51(2): 343-351.
- LI J J, XU Y B. Effects of continuous cropping years of lily on soil microbial diversities under greenhouse cultivation [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2020, 51(2): 343-351.
- [18] 王钰, 潘媛, 伍晓丽, 等. 不同种植模式下黄连根际土壤理化特性及细菌群落结构变化[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(3): 582-590.
- WANG Y, PAN Y, WU X L, et al. Variation in physicochemical properties and bacterial community structure in rhizosphere soil of *Coptis chinensis* tow cropping modes [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(3): 582-590.
- [19] 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.
- WANG G H, LIU J J, YU Z H, et al. Research progress of *Acidobacteria* ecology in soils [J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32 (2): 14-20.
- [20] 胡杰, 何晓红, 李大平, 等. 鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 431-437.
- HU J, HE X H, LI D P, et al. Progress in research of *Sphingomonas* [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2007, 13(3): 431-437.
- [21] 王娜, 武坤毅, 崔浪军, 等. 溶杆菌属细菌鉴定及生防机制概况 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(5): 174-182, 191.
- WANG N, WU K Y, CUI L J, et al. Advance in bacteria identification and biocontrol mechanism of *Lysobacter* spp. [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2015, 43(5): 174-182, 191.
- [22] YUAN J, WEN T, ZHANG H, et al. Predicting disease occurrence with high accuracy based on soil macroecological patterns of *Fusarium* wilt [J]. The ISME Journal, 2020, 14(12): 2936-2950.
- [23] 黄芳芳. 农药对三七根际土壤被孢霉的影响及其田间定殖能力 [D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- HUANG F F. Effect of pesticides on mortierella in rhizospheric soil of *Panax notoginseng* and their colonization ability in the field [D]. Kunming: Yunnan University, 2017.
- [24] 董林林, 牛玮浩, 王瑞, 等. 人参根际真菌群落多样性及组成的变化[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3): 443-449.
- DONG L L, NIU W H, WANG R, et al. Changes of diversity and composition of fungal communities in rhizosphere of *Panax ginseng* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42 (3): 443-449.
- [25] 安娜, 高纪超, 韩雅棋, 等. 施粪肥对人参栽培土壤理化性质和真菌群落结构的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2019, 41(6): 695-706.
- AN N, GAO J C, HAN Y Q, et al. Effects of manure application on soil physicochemical properties and fungal community structure in ginseng-planted soil [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2019, 41(6): 695-706.
- [26] 屈佳欣, 方香玲. 植物病原真菌镰刀菌孢子形成与萌发机理研究进展[J]. 中国草地学报, 2021, 43(8): 106-113.
- QU J X, FANG X L. Research progress on the spore formation and germination mechanism of plant pathogenic fungus *Fusarium* [J]. Chinese Journal of Grassland, 2021, 43(8): 106-113.
- [27] 王悦, 杨贝贝, 王浩, 等. 不同种植模式下丹参根际土壤微生物群落结构变化[J]. 生态学报, 2019, 39(13): 4832-4843.
- WANG Y, YANG B B, WANG H, et al. Variation in microbial community structure in the rhizosphere soil of *Salvia miltiorrhiza* Bunge under three cropping modes [J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39 (13): 4832-4843.
- [28] 张中义. 中国真菌志-第十四卷-枝孢属、黑星孢属、梨孢属[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- ZHANG Z Y. Flora fungorum sinicorum-Volume 14-*Gladaxporism*, *Fusicladium*, *Pyricularia* [M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [29] 慕东艳, 吕国忠, 孙晓东, 等. 黑龙江省药用植物根际土壤真菌多样性[J]. 生态学报, 2013, 33(1): 229-237.
- MU D Y, LV G Z, SUN X D, et al. Fungal diversity in rhizosphere soil of medicinal plants in Heilongjiang Province [J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(1): 229-237.
- [30] 郭梦月, 庞晓慧. 中药材污染曲霉属真菌鉴定研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(16): 3933-3941.
- GUO M Y, PANG X H. Research progress on identification of *Aspergillus* fungi in traditional Chinese medicinal materials [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(16): 3933-3941.