

· 中药农业 ·

草甘膦对党参生长 根腐病及根际土壤微生物的影响[△]杨姗姗¹, 仲彩萍², 王仪^{1,3}, 刘紫祺^{1,3}, 邵慧慧^{1,3}, 孙新荣², 高微微^{1,3*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

2. 甘肃省定西市渭源县农业技术推广中心, 甘肃 定西 748200;

3. 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

[摘要] 目的: 探究除草剂草甘膦对党参生长、根腐病发生和药用成分的影响及可能的土壤微生态机制。方法: 调查同一地块中草甘膦处理组和对照组党参的存苗数、鲜质量和发病情况, 采用高效液相色谱法(HPLC)测定党参炔苷含量、分光光度法测定多糖含量, 采用扩增子技术测定根际土壤微生物群落变化。结果: 施用草甘膦能够显著降低党参的存苗数($P<0.05$), 对党参地上部生长有一定抑制作用; 根腐病发病率及病情指数高于对照组, 分别增加了34.51%和34.81%($P<0.05$); 党参炔苷和多糖的含量降低。另外, 草甘膦处理对党参根际土壤微生物的多样性及真菌群落结构影响较小, 但细菌群落中伯克霍尔德氏菌目(Burkholderiales)和鞘脂单胞菌目(Sphingomonadales)显著增加($P<0.05$)。结论: 施用草甘膦对党参生长有一定抑制作用, 导致根腐病加重, 这可能与部分根际细菌的相对丰度变化有关。

[关键词] 党参; 草甘膦; 生物量; 根腐病; 根际微生物

[中图分类号] R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2022)10-1932-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20210604005

Effects of Glyphosate on Growth, Root Rot and Rhizosphere Soil Microbes of *Codonopsis pilosula*YANG Shan-shan¹, ZHONG Cai-ping², WANG Yi^{1,3}, LIU Zi-qi^{1,3}, SHAO Hui-hui^{1,3}, SUN Xin-rong², GAO Wei-wei^{1,3*}

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Weiyuan County Agricultural Technology Promotion Center, Dingxi 748200, China;

3. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Beijing 100193, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of herbicide glyphosate on the growth, root rot occurrence, and medicinal ingredients of *Codonopsis pilosula* and the possible soil micro-ecological mechanism. **Methods:** This study investigated the number of seedlings, fresh quality and disease status of *C. pilosula* in glyphosate treatment group and control group in the same *C. pilosula* planting plot. High performance liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometry were used to determine the content of lobetyolin and polysaccharides, respectively, and amplicon sequencing was performed to detect the microbial community in rhizosphere soil. **Results:** The application of glyphosate significantly reduced the number of seedlings of *C. pilosula* ($P<0.05$), and also had a certain inhibitory effect on the growth of the aerial parts of *C. pilosula*. The incidence rate and disease index of root rot in glyphosate treatment group were higher than those of the control group, increasing by 34.51% and 34.81%, respectively ($P<0.05$), and the content of lobetyolin and polysaccharides decreased. In addition, glyphosate had no remarkable effect on the microbial diversity and fungal community structure in the rhizosphere soil of *C. pilosula*, but Burkholderiales and Sphingomonadales in the bacterial community increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion:** Glyphosate had a certain inhibitory effect on the growth of *C. pilosula*, aggravating root rot, which might be related to the relative abundance of some rhizosphere bacteria.

[Keywords] *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.; glyphosate; biomass; root rot; rhizosphere microbes

[△] [基金项目] 甘肃省科技计划项目(21CX6NJ206); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-031)

* [通信作者] 高微微, 研究员, 研究方向: 中药资源生态研究; Tel: 010-57833423, E-mail: wwga@implad.ac.cn

随着中药材种植劳动力成本的增加,草害问题逐渐凸显,而除草剂的应用对中药材产量及质量的影响研究相对缺乏。党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 为桔梗科党参属多年生草本植物,是常用大宗药材之一,具有健脾益肺、养血生津之功效^[1]。甘肃省渭源县是中国党参之乡,主产白条党参是市场上党参药材的主流产品^[2]。根据笔者调查,为解决党参栽培种植中的草害问题,近年来,甘肃党参产区开始应用除草剂。草甘膦(glyphosate)是一种高效、低毒、广谱的非选择性除草剂,一般在前茬作物收获后施用,目前,尚无草甘膦对党参影响的报道。本研究就甘肃渭源县使用草甘膦对党参生长、病害发生、内在质量及土壤微生物群落的影响展开调查,以期对党参种植中除草剂的使用提供参考。

1 材料

1.1 样品

样品由甘肃省定西市渭源县农业技术推广中心孙新荣高级农艺师鉴定为党参 *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf. 的根。

1.2 仪器

ABT 220-4M型电子分析天平(上海岛韩实业有限公司);PHS-25型pH计(上海仪电科学仪器有限公司);DZ-9001型振荡器(常州梅香仪器有限公司);1200型高效液相色谱仪及二极管阵列检测器(DAD)、Spectr AA 55型原子吸收分光光度计(美国Agilent公司);721型紫外-可见分光光度计(赛默飞世尔科技公司);Miseq-300型基因测序仪(美国Illumina公司);TAS-990F型火焰分光光度计(深圳市亿鑫仪器设备有限公司)。

1.3 试剂

对照品党参炔苷(批号:SL8240,纯度>98%)、D(+)-无水葡萄糖(批号:1122A0231,纯度≥98%)均购于北京索莱宝科技有限公司;乙腈[色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];浓硫酸、硼酸、硝酸、高氯酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);苯酚(批号:P815401,上海麦克林生化科技有限公司);氢氧化钠(批号:M32207,上海迈瑞尔化学技术有限公司);水为娃哈哈纯净水。

2 方法

2.1 调查区概况

调查区位于甘肃省定西市渭源县清源镇马家窑村,前茬作物为蚕豆,土壤基础肥为有机质19.26 g·kg⁻¹、全氮1.35 g·kg⁻¹、全钾13.6 g·kg⁻¹、全磷2.76 g·kg⁻¹、全钙43.84 g·kg⁻¹、全铁32.15 g·kg⁻¹、全镁11.94 g·kg⁻¹,pH为8.13。调查区内有施用草甘膦处理组(GP)面积300 m²,空白对照组(CK)面积250 m²。GP于2019年8月蚕豆收获后在杂草叶面喷施74.70%草甘膦铵盐(剂量为2.25 kg·hm⁻²),2020年4月种植党参。

2.2 检测样品采集

2020年7月下旬党参生长季调查党参存苗数,2020年10月中下旬党参收获时调查党参生长及发病情况。GP及CK分别测定3个点,每个点计数1 m²的党参的存苗数,称量地上及地下部鲜质量,统计根腐病发病率及病情指数;将党参根60℃干燥箱中干燥,粉碎过60目筛,室温密封保存,用于测定党参炔苷及多糖含量。同时,挖取土壤样品,去除地表1~5 cm的表土,挖取根5 cm范围内距地表5~15 cm处的土壤作为根际土壤,密封,4℃低温保存,3 d内转移至-80℃保存,1个月内测定根际土壤微生物组(北京奥维森基因科技有限公司)。

2.3 党参根腐病分级标准及病情指数计算

党参根腐病严重度分级标准参照孙新荣等^[3]报道方法。0级:不发病;1级:地上茎叶1/2以下萎蔫,根部外观正常,内部维管束1/2以下出现黄色病变,或地上茎叶1/2以下枯黄,茎叶基部和根部出现1~3个病斑;3级:地上茎叶1/2以上萎蔫,根内部维管束1/2(含1/2)以上出现黄色或红色病变,或地上茎叶1/2(含1/2)以上枯黄,茎叶基部和根部出现3个以上病斑并开始腐烂;5级:地上茎叶全部青枯,根部维管束全部变为黄色或红色,出现软腐,或地上茎叶全部枯黄,根部腐烂在1/2以下;7级:地上茎叶枯死,根部全部腐烂。病情指数按公式(1)计算。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{各级代表值})}{(\text{总株数} \times \text{最高病级代表值})} \times 100 \quad (1)$$

2.4 党参中成分含量测定

党参炔苷的提取和测定：参照高石曼等^[4]报道方法，精密称定党参细粉1 g，加70%甲醇30 mL，超声提取2次，每次30 min。色谱柱为Waters XBridge C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，进样量为10 μL；流动相为水(A)-乙腈(B)，梯度洗脱(0~8 min, 5%B; 8~10 min, 5%~8%B; 10~25 min, 8%~15%B; 25~26 min, 15%~20%B; 26~36 min, 20%B; 36~48 min, 20%~37%B; 48~55 min, 37%~60%B; 55~70 min, 60%B; 70~80 min, 60%~90%B; 80~90 min, 90%B)；流速0.8 mL·min⁻¹；检测波长为267 nm；柱温为30 ℃。

多糖的提取和测定：参照高石曼等^[4]报道方法，精密称定党参细粉0.25 g，加入80%乙醇150 mL，加热回流提取1 h，滤过，残渣加水150 mL，加热回流1 h，滤过，滤液定容至250 mL。精密量取上述液体2 mL用水定容至10 mL，取1 mL加入等体积5%苯酚及浓硫酸5 mL，摇匀，于紫外-可见分光光度计490 nm下测定吸光度。

2.5 党参根际土壤微生物测定

取土壤样本0.4 g，使用MOBIO PowerSoil® DNA提取试剂盒提取土壤总DNA。细菌群落用通用正向引物(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和反向引物(5'-GTGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增16S rRNA基因的V3-V4区；真菌群落用通用正向引物(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和反向引物(5'-TGCGTTCTTCATCGATGC-3')扩增内转录间隔区(ITS)1区。使用Illumina平台对聚合酶链式反应(PCR)产物进行双端测序并分析^[5]。

2.6 数据处理

对原始数据进行筛选，去除测序和建库过程中人为添加的引物、接头及测序过程中产生的低质量序列(quality score<20)。采用Mothur V1.37.0软件去除<200 bp的原始片段。采用USEARCH V8.1.1861软件参照Gold和UNITE数据库移除嵌合体。采用UPARSE软件将序列按照97%的相似度聚类为操作分类单元(OTU)。为了减少对稀有OTU的过度估计，从随后的分析中去除Singletons OTUs(即样品中仅出现1次的OTU)。利用Ribosomal Database Project(RDP)数据库对具有代表性的OTU序列进行比对和注释。采用QIIME V1.8软件分析Coverage、Chao1、Simpson和Shannon指数^[6]。用独立样本t检验分析比较各处理间生长指标、病害指标及群落结构指标差异的显著性(阈值设为0，以P<0.05为差异有统计学意义)。

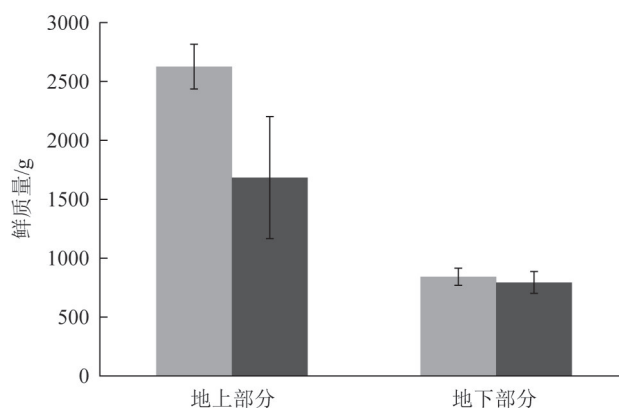
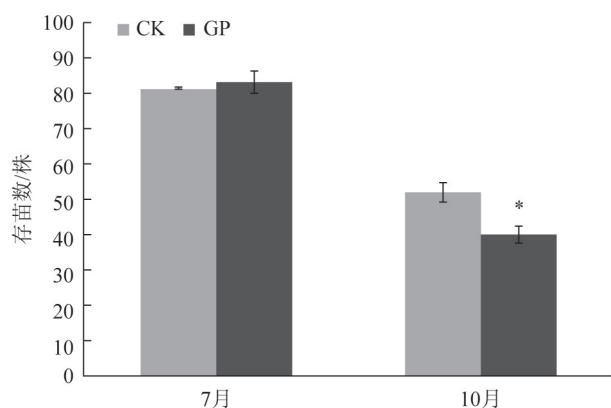
3 结果与分析

3.1 草甘膦对党参存苗及生长的影响

调查结果发现，施用草甘膦对生长季(7月)党参存苗数影响较小但可显著降低收获季(10月)党参的存苗数(P<0.05)，与CK相比，存苗数下降23.08%；在党参收获时，GP党参根生物量降低35.93%，地上部分的生物量降低5.03%，但与CK相比差异无统计学意义(图1)。

3.2 草甘膦对党参根腐病发生的影响

采用根腐病病情指数评价党参收获时根腐病发生情况，结果显示，GP平均发病率和平均病情指数与CK相比均显著上升(P<0.05)，分别提高了



注：*P<0.05；图2~3同。

图1 草甘膦对党参生长期1 m²的党参存苗数及收获期每平方米鲜质量的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)

34.51%和34.81% (图2)。施用草甘膦加重了根腐病的发生。

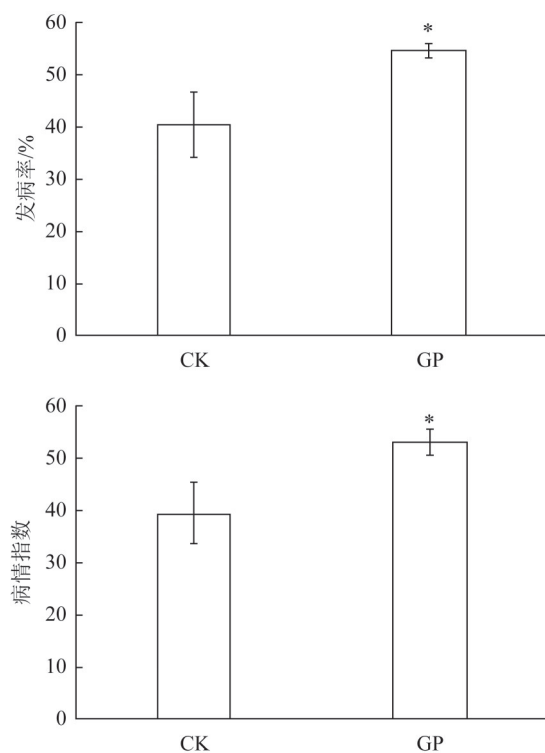


图2 草甘膦对党参根腐病发生的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.3 草甘膦对党参中成分含量的影响

党参炔苷和多糖含量测定结果显示, GP党参炔苷平均质量分数与CK相比减少9.87%, 但差异无统计学意义; 多糖质量分数显著下降 ($P<0.05$), 比CK降低42.10% (图3)。这说明草甘膦的使用主要导致多糖含量下降, 对党参炔苷含量也有一定影响。

3.4 草甘膦对党参根际土壤微生物多样性的影响

对党参根际土壤样品细菌16S rDNA的V3-V4区、真菌ITS高通量测序结果进行分析, 分别得到336 234、505 537条优化序列, 用聚类的方法生成20 208、3331个OTU。OTU的聚类分析覆盖了党参根际土壤微生物的97%以上, 表明该测序结果能反应党参根际土壤微生物群落的变化情况。

α -多样性的分析结果表明, 对于细菌, GP的Chao1指数及Shannon指数有所降低, Simpson指数无变化; 对于真菌, GP的Chao1指数及Simpson指数增加, Shannon指数降低, 但差异无统计学意义, 说明草甘膦处理对党参根际土壤微生物 α -多样性影响不大 (表1)。

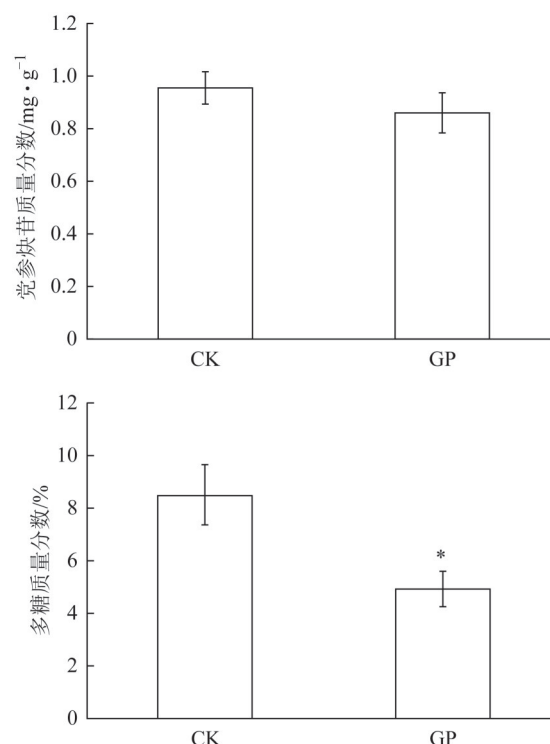


图3 草甘膦对党参炔苷和多糖质量分数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

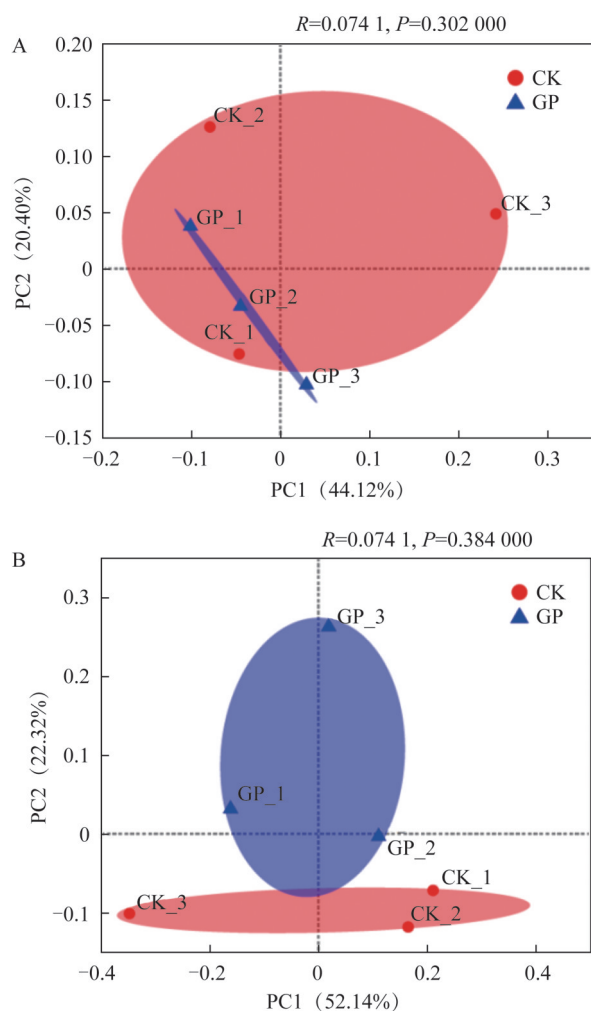
表1 党参根际土壤微生物的 α -多样性

类别	组别	覆盖率	Chao1指数	Simpson指数	Shannon指数
细菌	CK	0.978 5	4337±80	0.003 5±0.000 4	6.74±0.09
	GP	0.980 6	4288±110	0.003 5±0.000 4	6.69±0.05
真菌	CK	0.997 6	943±68	0.044 8±0.006 7	4.03±0.17
	GP	0.997 3	970±89	0.068 3±0.022 6	3.83±0.10

β -多样性指数主坐标分析 (PCoA) 显示, GP根际土壤细菌群落与CK重合 ($R=0.950 6$, $P>0.05$, 图4A), 根际真菌群落与CK相邻 ($R=0.074 1$, $P>0.05$, 图4B), 草甘膦对党参根际土壤微生物群落组成无显著影响。

3.5 草甘膦对党参根际土壤细菌群落组成和丰度的影响

对党参根际土壤样品中细菌群落组成进行分析, 共检测到41个门。其中, 变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidota)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和芽单胞菌门 (Gemmatimonadota) 的相对丰度均大于1%, 是党参根际土壤中的优势菌门, 其他35个门的丰度占比均小于1% (图5A)。与CK相比, Chloroflexi的相对丰度降低了19.97%、Bacteroidota的相对丰度增加27.37%, 但差异无统计学意义。



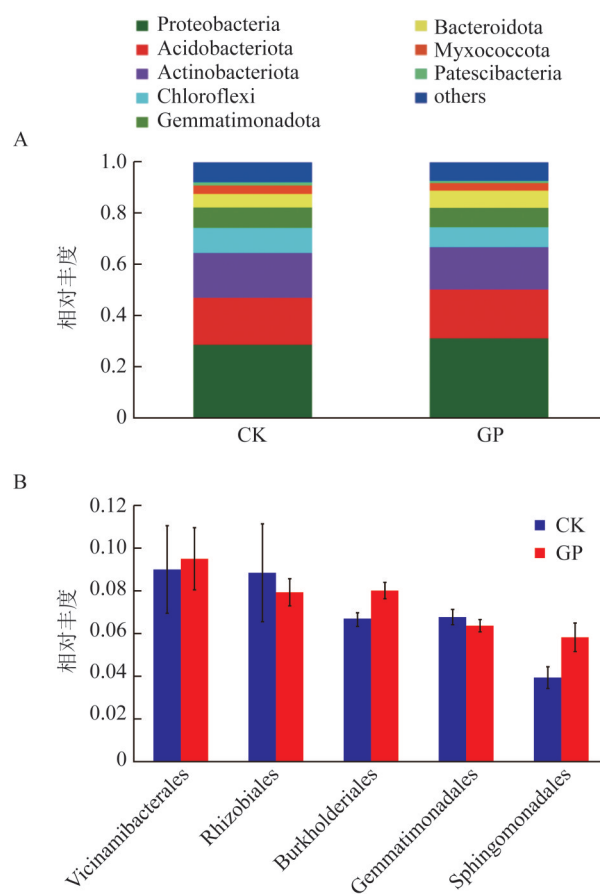
注：A. 细菌；B. 真菌。

图4 党参根际土壤细菌和真菌微生物 OTU 水平 PCoA

对所有相对丰度>5%的5个细菌优势菌目进行分析，结果显示，草甘膦处理组中 *Vicinamibacterales*、伯克霍尔德氏菌目 (*Burkholderiales*)、鞘脂单胞菌目 (*Sphingomonadales*) 的相对丰度分别比CK增加了 5.56%、20.15%和47.96%，而根瘤菌目 (*Rhizobiales*) 和芽单胞菌目 (*Gemmatimonadales*) 的相对丰度分别下降了 10.31%和 5.93%，其中 *Burkholderiales* 和 *Sphingomonadales* 差异有统计学意义 ($P<0.05$, 图5B)。

3.6 草甘膦对党参根际土壤真菌群落组成和丰度的影响

从纲水平对党参根际土壤样品中真菌群落组成进行分析，共检测到 40 个纲，其中，盘菌纲 (*Pezizomycetes*)、粪壳菌纲 (*Sordariomycetes*)、座囊菌纲 (*Dothideomycetes*)、被孢霉纲 (*Mortierellomycetes*) 和银耳纲 (*Tremellomycetes*) 5 个纲的相对丰度均大



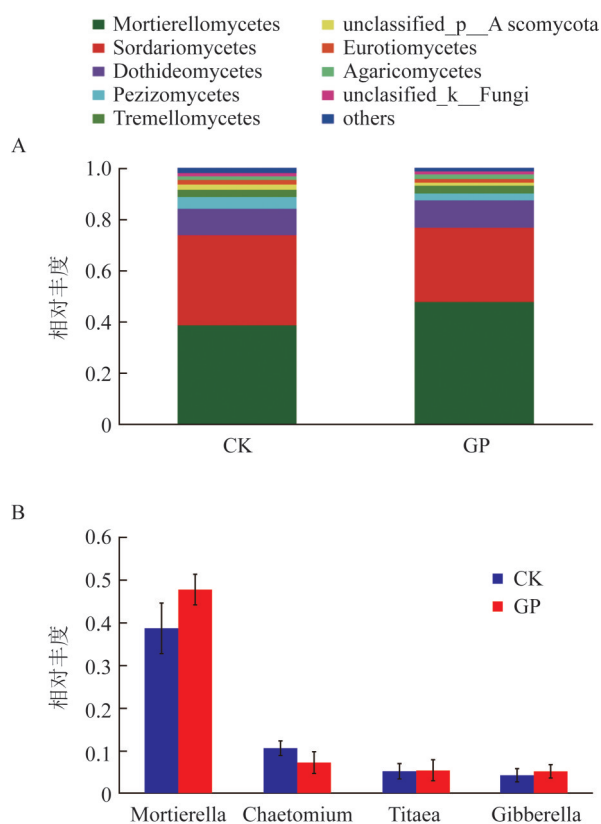
注：A. 门水平上的相对丰度；B. 部分目水平上的相对丰度。

图5 党参根际土壤细菌群落在门和部分目水平上的相对丰度 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

于1%，是党参根际土壤中的优势菌纲，其余 35 个纲的相对丰度占比均小于1% (图6A)。与CK相比，GP中 *Mortierellomycetes*、*Dothideomycetes* 和 *Tremellomycetes* 的相对丰度增加了 23.36%、3.10%和 8.79%，*Sordariomycetes*和 *Pezizomycetes* 的相对丰度降低了 17.23%和 42.09%，但差异无统计学意义。从属水平对党参根际土壤样品中相对丰度>5%的4个真菌优势菌目进行分析，结果显示，GP中被孢霉属 (*Mortierella*)、*Titaea* 和赤霉属 (*Gibberella*) 的相对丰度分别增加了 23.36%、4.26%和 17.78%，毛壳菌属 (*Chaetomium*) 的相对丰度下降了 32.01%，但与CK相比，差异无统计学意义 (图6B)。

4 讨论

草甘膦是世界上使用最广泛的除草剂之一，具有高效、低毒、广谱等特点，易与土壤有机物或矿物质结合而失去活性，被认为是一种相对安全的除



注：A. 纲水平上的相对丰度；B. 部分属水平上的相对丰度。

图6 党参根际土壤真菌群落纲和部分属水平上的相对丰度 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

草剂^[7]。然而，笔者在甘肃党参产区调查时发现，当地施用草甘膦8个月后种植党参，仍然出现生长势减弱的现象。本研究结果证实，草甘膦可显著降低收获季党参的存苗数、加重根腐病的发生，并降低党参炔苷和多糖的含量。由于草甘膦在土壤中的半衰期一般只有3~40 d^[8]，从2019年8月前茬作物蚕豆收获后使用到2020年4月种植党参间隔8个月，理论上草甘膦已完全降解，草甘膦对党参不存在直接抑制作用，7月田间存苗数的调查结果支持了上述推测。有研究报道，草甘膦可导致玉米和大豆根际土壤中 *Proteobacteria* 相对丰度增加、*Acidobacteria* 相对丰度降低^[9]。因此，笔者认为草甘膦对党参的影响可能来源于间接的土壤微生物的改变。

土壤微生物多样性是评价土壤微生物群落特征和稳定性的重要指标，土壤微生物组成与植物的生长与健康密切相关^[10]。本研究发现，虽然GP与CK相比根际土壤细菌及真菌多样性差异无统计学意义，但可显著增加根际土壤细菌中 *Burkholderiales*

和 *Sphingomonadales* 的相对丰度。以往研究表明，*Burkholderiales* 包含多种植物病原，如伯克霍尔德菌 *Burkholderia plantarii* 是引起水稻秧苗细菌性立枯病的重要病原菌之一，其侵染性、繁殖力及适应性均很强，严重威胁中国水稻生产^[11-13]；*Sphingomonadales* 可作用于有机磷化合物的生物降解，具有很好的农药降解能力^[14]，其相对丰度增加可能与草甘膦的降解相关。本研究基于所有微生物 OTUs 计算的多样性指数，在CK与GP差异无统计学意义，但部分细菌丰度发生显著改变，导致群落结构发生一定变化。

施用草甘膦导致的根腐病加重，与土壤微生物虽然有一定关系，但很可能只是原因之一，其他作用因子还有待进一步研究探讨。本次调查样地的草甘膦用量为通用的剂量，鉴于草甘膦对党参的综合影响，党参种植地应尽量避免除草剂草甘膦的施用。

参考文献

- [1] 朱恩圆, 贺庆, 王峰涛, 等. 党参化学成分研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(1): 94-95.
- [2] 王艳, 陈秀蓉, 王引权, 等. 甘肃省党参病害种类调查及病原鉴定[J]. 山西农业科学, 2011, 39(8): 866-868, 871.
- [3] 孙新荣, 仲彩萍, 张西梅, 等. 甘肃定西地区党参根腐病病原鉴定与防治研究[J]. 植物保护, 2020, 46(5): 290-297.
- [4] 高石曼, 刘久石, 孙恬, 等. 不同栽培措施对党参药材化学质量的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3753-3760.
- [5] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nat Methods, 2013, 10(10): 996-998.
- [6] SCHLOSS P D, GEVERS D, WESTCOTT S L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies[J]. PLoS ONE, 2011, 6(12): e27310.
- [7] BENBROOK C M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally[J]. Environ Sci Eur, 2016, 28(1): 3.
- [8] MAMY L, BARRIUSO E, GABRIELLE B. Environmental fate of herbicides trifluralin, metazachlor, metamitron and sulcotrione compared with that of glyphosate, a substitute broad spectrum herbicide for different glyphosate-resistant crops[J]. Pest Manag Sci, 2005, 61(9): 905-916.
- [9] NEWMAN M M, HOILETT N, LORENZ N, et al. Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities[J]. Sci Total Environ, 2016, 543: 155-160.

- [10] 纳小凡,郑国琦,彭励,等. 不同种植年限宁夏枸杞根际微生物多样性变化[J]. 土壤学报,2016,53(1): 241-252.
- [11] AZEGAMI K, NISHIYAMA K, WATANBE Y, et al. *Pseudomonas plantarii* sp. nov., the causal agent of rice seedling blight[J]. Int J Syst Bacteriol, 1987, 37(4): 475.
- [12] AZEGAMI K, NISHIYAMA K, WATANABE Y, et al. Tropolone as a root growth-inhibitor produced by a plant pathogenic *Pseudomonas* sp. causing seedling blight of rice[J]. Jpn J Phytopathol, 1985, 51(3): 315-317.
- [13] URAKAMI T, ITO-YOSHIDA C, ARAKI H, et al. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(2): 235-245.
- [14] 欧阳主才,王奕恒,李小妮,等. 鞘氨醇单胞菌株 XJ 对农药的降解效能[J]. 华南农业大学学报,2008,29(2): 47-49.

(收稿日期: 2021-06-04 编辑: 戴玮)