

不同地黄种质连作障碍效应分析

田云鹤¹,王丰青^{2*},李明杰¹,索艳飞²,李连珍²,张 宝¹,张重义^{1*}
(1. 福建农林大学 中药材 GAP 研究所,福建 福州 350002; 2. 河南农业大学 农学院,河南 郑州 450002)

摘要: 为了研究连作对不同地黄种质资源生长发育的影响,筛选耐连作种质资源,以 18 份地黄种质资源为材料,研究头茬与连作栽培条件下的冠幅、叶片数、叶片长、叶片宽、茎粗、块根数、块根长度、块根直径、块根鲜质量等农艺性状的差异,基于耐连作指数进行主成分分析、相关分析和聚类分析。结果表明,18 份地黄种质资源对于连作的响应差异明显,栽培地黄均表现连作障碍,野生地黄都耐连作。栽培地黄的连作障碍表现为叶片变小、叶片数减少、块根变细、须根增多、单株块根产量降低。其中金状元块根的耐连作指数最大,单株产量受影响最小;北京 3 号植株地上部分连作障碍最轻。9 个性状中前 4 个主成分特征值的累积贡献率达 82.489%。叶片长、茎粗、块根数、块根直径的耐连作指数与单株块根鲜质量的耐连作指数显著或极显著相关。聚类分析把 18 份种质资源分为栽培地黄与野生地黄两类。地黄种质资源在耐连作方面存在丰富的遗传变异。

关键词: 地黄; 种质资源; 连作障碍; 农艺性状

中图分类号: S567.23 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)08-0098-06

Effect Analysis of Continuous Cropping Obstacle on Different
R. glutinosa Germplasm Resources

TIAN Yunhe¹,WANG Fengqing^{2*},LI Mingjie¹,SUO Yanfei²,LI Lianzhen²,ZHANG Bao¹,ZHANG Zhongyi^{1*}
(1. Institute of Chinese Crude Drugs GAP,Fujian Agriculture and Forestry University,Fuzhou 350002,China;
2. College of Agronomy,Henan Agricultural University,Zhengzhou 450002,China)

Abstract: To study the effect of continuous cropping obstacles on the growth of different germplasm resources,and screen germplasm of *R. glutinosa* resistant to continuous cropping, using 18 *R. glutinosa* germplasm resources as plant materials,the differences in crown width,leaf length,leaf width,leaf number,stem diameter,tuberous root number,tuberous root length,tuberous root diameter and fresh weight of tuberous root per plant between first-year plants and second-year plants were researched. And phenotypic differences among different germplasm resources were compared by principal component analysis,cluster analysis and correlation analysis based on the tolerance index of continuous cropping disease(TCC). The results showed that there were notable differences among 18 *R. glutinosa* germplasm resources in response to continuous cropping. All 14 cultivars showed various degrees of replant problems,but the four wild germplasms showed good tolerance to replant problems. The performance of replant problems in *R. glutinosa* cultivars were as follows: size of leaf and number of leaf decreased,diameter of tuberous root reduced, number of fibrous root increased, and fresh weight of tuberous root per plant declined. Jinzhuangyuan showed the smallest continuous cropping effect in tuberous weight with the largest, whereas Beijing No. 3

收稿日期:2015-01-16
基金项目:国家自然科学基金项目(81274022,81473299);高等学校博士学科点专项科研基金(博导类)项目(20123515110005);河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A360007)
作者简介:田云鹤(1990-),女,河南安阳人,在读硕士研究生,研究方向:中药资源与分子生态。E-mail:yunhe_tian13@163.com
* 通讯作者:王丰青(1977-),男,河南兰考人,讲师,博士,主要从事药用植物资源与分子生物学研究。
E-mail:heauzyxcw@126.com
张重义(1963-),男,河南温县人,教授,博士生导师,主要从事中药资源可持续利用研究。
E-mail:zyzhang@fafu.edu.cn

showed the lightest replant problems in aboveground parts of plants. The first four principal components which accounted for 82.489% of total variance were extracted from the principal component analysis. Leaf length, stem diameter and number of tuberous root were significantly or high significantly correlated with tuberous root weight per plant. The 18 germplasm resources could be divided into two clusters, which belonged to cultivars and wild germplasms, respectively. The results showed that there were ample morphological diversities in TTC of nine traits of 18 *R. glutinosa* germplasms.

Key words: *R. glutinosa*; germplasm resource; continuous cropping obstacles; agronomic trait

地黄(*Rehmannia glutinosa* L.)为玄参科地黄属的多年生草本植物,以块根入药,为我国常用大宗药材。在其道地产区河南焦作地区的种植面积约 1.5 万 hm²,产值数十亿元^[1]。然而,地黄栽培中却存在着非常严重的连作障碍问题,需间隔 8~10 a 以上才可再次种植^[2],严重阻碍了地黄产业的可持续发展。而且,连作障碍是 70% 根(根茎)类药用植物种植过程中普遍遇到的问题^[2]。因此,分析连作障碍产生的原因,研究其形成的生理和分子机制,探寻有效缓解连作障碍的方法,已经成为科研人员关注的焦点。

连作障碍是指在正常的栽培管理措施下,同一块地连续多年种植相同作物(连作)造成作物产量降低、品质变劣、生长状况变差、病虫害发生加剧的现象^[3]。连作导致的病虫害加重问题可通过选育抗病虫害品种结合物理、化学、生物及生态手段进行防治消除,而化感自毒导致的生长受阻问题除了进行轮作外,迄今仍无其他有效办法彻底解决。由于真正引起药用植物连作障碍的化感自毒物质目前仍未明确,土壤微生物制剂针对性不强,轮作年限又太长(地黄 8~10 a,三七 10 a 以上),限制了药材种植基地的建设,道地产区药材种植规模逐年萎缩,主产区外迁,导致进入商业流通的道地药材比重越来越低,严重制约了中药农业的可持续发展。连作障碍作物的形成及加重的原因复杂多样,各因素之间相互关联、相互影响,是植物和土壤系统内多种因素相互综合作用的结果^[3]。建立合理的轮作制度^[3-5]、合理增施土壤微生物制剂^[6-8]等方法可以在一定程

度上缓解地黄的连作障碍。曲运琴等^[9]发现连作对地黄品种北京 3 号、85-5 和硬三块的生长影响显著不同,说明地黄对连作的响应存在基因型差异。因此,通过收集不同遗传类型的地黄种质资源,开展科学的耐连作评价和鉴定,并运用传统的育种手段选育耐连作的地黄品种,能够有效缓解地黄的连作障碍效应。然而,对不同类型的地黄种质资源连作障碍效应的研究,目前未见报道。本研究以 18 份不同来源的地黄种质为材料,通过分析连作栽培时农艺性状的变化特点,评价不同地黄种质的耐连作特性,筛选耐连作的地黄种质资源,为选育耐连作地黄品种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料与种植

试验材料有 3 类,第 1 类:85-5、金九、红薯王、北京 1 号、金状元、生津、山东种、北京 3 号、白状元、9302 和沁怀 1 号等 11 份种质资源为怀地黄产区主栽品种,第 2 类:85-5 优选、012-2 和 012-5 等 3 份种质资源为栽培品种的变异类型,第 3 类:WT1-1、WT2-1、WT3-1 和 WT5-1 等 4 份种质资源为野生地黄(表 1)。经河南省中医药研究院张留记研究员鉴定,所有种质资源均为 *Rehmannia glutinosa* L.。

2013 年 4 月中旬播种。栽培品种及其变异类型选取直径为 2.0~2.5 cm 的块根,野生地黄选取直径为 0.8~1.2 cm 的块根,掰成长 2.5~3.0 cm 的

表 1 地黄种质资源及其来源

序号	种质资源	类型	序号	种质资源	类型
1	85-5	栽培品种	10	白状元	栽培品种
2	金九	栽培品种	11	012-2	栽培品种变异类型
3	红薯王	栽培品种	12	9302	栽培品种
4	北京 1 号	栽培品种	13	沁怀 1 号	栽培品种
5	金状元	栽培品种	14	012-5	栽培品种变异类型
6	生津	栽培品种	15	WT1-1	野生
7	山东种	栽培品种	16	WT2-1	野生
8	北京 3 号	栽培品种	17	WT3-1	野生
9	85-5 优选	栽培品种变异类型	18	WT5-1	野生

小块,用 50% 多菌灵 600 倍液浸种 20 min,晾干后按照株距 25 cm、行距 50 cm,每个材料种植 30 株,地黄材料采用小区随机排列的方式播种于河南农业大学中药材连作隔离池内,每个材料均设头茬(10 a 以内没有种过地黄的土壤)和连作(2012 年种植过 1 茬地黄的土壤)2 种植方式,重复 3 次,统一按照常规大田管理。

1.2 测定项目与方法

于 9 月 25 日调查地黄地上部性状,于 11 月 10 日块根收获时调查地下部性状。每小区随机选取生长一致的 10 株进行调查。

地上部位:冠幅为植株叶片沿垂直行向伸展到的最大直线距离。茎粗以莲座叶基部作为调查部位,测定其直径。叶片选取茎顶部完全展开的 3 片叶,叶长为叶尖至叶柄的长度,叶宽为叶片中部最宽处的宽度,取平均值。叶片数为性状调查时所有未枯死的叶片数量。

地下部位:块根数为显著膨大且直径超过 0.5 cm 的肉质根数量。块根长度为块根膨大部位(不包括芦头)的直线长度,块根直径为块根最粗部位的直径,均测定单株所有块根,取平均值。单株块根鲜质量为单株所有膨大的块根去掉芦头和根尖的鲜质量。

茎粗、块根长度和直径以游标卡尺测定,精确到 0.1 mm;冠幅、叶长和叶宽以直尺测定,精确到 0.1 cm;块根鲜质量以 1% 天平称量,精确到 0.001 g。

1.3 数据处理和统计分析

表型性状观察值均为 10 次重复的数值型观察值的平均值。耐连作指数(tolerance index of continuous cropping disease, TCC) = 连作栽培植株性状测定值/头茬栽培植株性状测定值。TCC 值越大表明越耐连作, TCC = 1 说明没有连作障碍, TCC 值越小表明连作障碍越严重。

应用 DPS v7.05 对 18 份地黄种质资源的 9 个性状耐连作指数特征值进行主成分分析、相关分析和聚类分析,聚类分析时进行数据标准化转换,采用 WPGMA(weighted pair group method with averaging)法进行聚类。

2 结果与分析

2.1 连作条件下不同地黄种质资源的生长特性

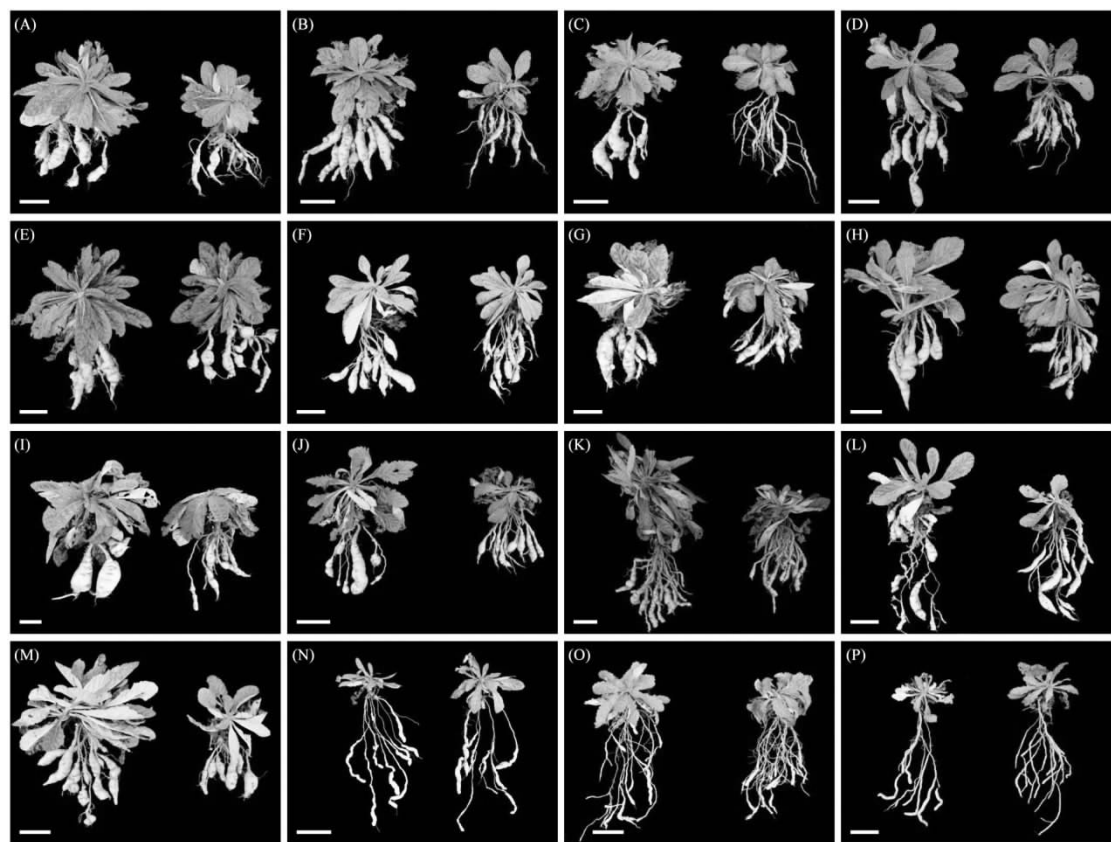
田间试验结果(图 1)表明,与头茬地黄相比,连作条件下 14 个栽培地黄品种及栽培变异类型的植株无论地上部分或是地下部分均表现为不同程度的表

型性状变异(图 1A-M,未显示 012-5)。总体而言,地上部叶片长度和宽度不同程度变小,冠幅变小,叶片数减少;地下部分,块根膨大受阻显著,膨大的块根直径变小,须根增多,单株块根鲜质量下降明显。而 4 个野生地黄种质资源(图中未显示 WT5-1)在连作种植时地上部叶片和地下部分块根虽也有一定程度的变化,但较栽培地黄在连作下的变化要小得多(图 1N-P)。

通过比较 18 个地黄种质资源 9 个表型性状的耐连作指数(表 2)表明,18 份种质资源中除北京 3 号和 WT5-1 以外,地上部分冠幅、叶片数、叶片长和叶片宽的耐连作指数均为小于 1,均表现为连作障碍,冠幅、叶片数、叶片长和叶片宽的耐连作指数小于 0.8 的种质分别为 10 份、5 份、13 份、5 份, 85-5 和北京 1 号 2 个种质资源 4 个性状的耐连作指数均小于 0.8,连作障碍最为严重。北京 3 号和 4 个野生地黄 4 个性状的耐连作指数均大于 0.8,连作障碍表现最轻。除 85-5 和红薯王以外,茎粗的耐连作指数均大于 0.8,其中 WT1-1 等 3 个野生地黄和生津、9302 等 2 个栽培地黄的耐连作指数大于 1,表现出丰富的遗传变异。18 份种质资源中,4 个野生地黄和金状元、山东种、北京 3 号、85-5 优选等 4 个栽培地黄地下部分块根数的耐连作指数大于 1,表现为连作块根数增加,其余 10 份材料连作块根数较少。块根长度、直径和单株鲜质量的耐连作指数小于 0.8 的分别有 4 份、9 份和 14 份,大于 1 的分别有 4 份、4 份和 3 份。可以看出,块根长度的遗传变异最为丰富,说明连作对不同地黄块根长度的影响差异很大。块根是地黄的收获部位,所有栽培地黄单株块根鲜质量的耐连作指数均小于 0.7,其中红薯王、85-5、85-5 优选和白状元的耐连作指数小于 0.3,表现为严重的连作障碍。4 份野生地黄单株块根鲜质量的耐连作指数均大于 0.9,其中 3 份的耐连作指数甚至大于 1,说明连作障碍很轻甚至没有连作障碍。

2.2 基于耐连作指数的主成分分析

对 9 个单项性状耐连作指数进行主成分分析(表 3),结果表明,在所有主成分构成中,前 3 个综合指标的累积贡献率达 82.489%,能代表 9 个单项指标的绝大部分信息。第 1 主成分的特征向量中,冠幅、叶片长和单株块根鲜质量的值最大,构成变异的主要来源,可用于有效评价地黄种质资源耐连作特性。第 2 主成分主要反映的是叶片数、茎粗和块根长度,贡献率为 20.457%。第 3 主成分主要反映了叶片宽度和块根直径,贡献率为 10.950%。



A. 85-5; B. 金九; C. 红薯王; D. 北京 1 号; E. 金状元; F. 生津; G. 山东种; H. 北京 3 号; I. 85-5 优选;
J. 白状元; K. 012-2; L. 9302; M. 沁怀 1 号; N. WT1-1; O. WT2-1; P. WT3-1

图 1 地黄种质资源连作种植的株型表现

表 2 18 份地黄种质资源 9 个性状的耐连作指数

种质资源	冠幅	叶片数	叶片长	叶片宽	茎粗	块根数	块根长度	块根直径	单株块根 鲜质量
85-5	0.721	0.656	0.718	0.782	0.782	0.862	0.715	0.683	0.266
金九	0.727	0.829	0.759	0.805	0.814	0.837	0.686	0.822	0.336
红薯王	0.693	0.976	0.733	0.816	0.792	0.892	0.750	0.479	0.232
北京 1 号	0.662	0.753	0.634	0.754	0.973	0.911	0.971	0.818	0.567
金状元	0.743	0.749	0.753	0.963	0.915	1.154	1.045	0.925	0.693
生津	0.731	0.728	0.765	0.975	1.056	0.718	0.942	0.729	0.590
山东种	0.686	0.806	0.689	0.778	0.935	1.115	0.814	0.763	0.446
北京 3 号	0.969	1.092	0.810	0.976	0.871	1.048	0.904	0.708	0.415
85-5 优选	0.744	0.936	0.790	0.916	0.830	1.172	0.818	0.534	0.292
白状元	0.780	0.828	0.759	0.858	0.890	0.964	1.077	0.648	0.298
012-2	0.854	0.778	0.767	0.899	0.947	0.893	0.912	0.735	0.427
9302	0.864	0.826	0.735	0.792	1.126	0.734	1.043	0.918	0.585
沁怀 1 号	0.864	0.842	0.763	0.894	0.996	0.990	0.865	0.781	0.421
012-5	0.656	0.914	0.605	0.724	0.875	0.833	0.879	1.028	0.469
WT1-1	0.895	0.863	0.918	0.923	1.136	1.460	0.720	0.861	1.079
WT2-1	1.000	0.859	0.917	0.978	1.168	1.138	1.141	1.152	1.079
WT3-1	0.848	0.969	0.903	0.860	1.012	1.432	0.954	1.227	1.230
WT5-1	1.036	1.181	0.966	1.027	0.940	1.400	0.607	1.181	0.947
平均值	0.804	0.866	0.777	0.873	0.948	1.031	0.880	0.833	0.576
标准差	0.117	0.130	0.097	0.090	0.117	0.228	0.148	0.210	0.308

2.3 基于耐连作指数的相关分析

将不同地黄种质资源 9 个性状的耐连作指数进

行相关分析(表 4),结果表明,单株块根鲜质量的耐

连作指数与块根直径的耐连作指数极显著相关,说

表 3 地黄种质资源表型性状耐连作指数的主成分分析结果

项目	主成分		
	1	2	3
冠幅	0.401	-0.071	0.314
叶片数	0.252	-0.449	-0.053
叶片长	0.428	-0.158	0.144
叶片宽	0.335	-0.130	0.577
茎粗	0.283	0.496	0.058
块根数	0.360	-0.205	-0.280
块根长度	0.023	0.592	0.345
块根直径	0.325	0.246	-0.493
单株块根鲜质量	0.407	0.229	-0.320
特征值	4.597	1.841	0.986
贡献率/%	51.082	20.457	10.950
累计贡献率/%	51.082	71.539	82.489

明块根直径的耐连作指数极显著影响单株块根鲜质量的耐连作指数,连作种植时选择块根直径耐连作

表 4 地黄种质资源 9 个性状耐连作指数的相关关系

性状	冠幅	叶片数	叶片长	叶片宽	茎粗	块根数	块根长度	块根直径
叶片数	0.553							
叶片长	0.833 **	0.511						
叶片宽	0.720 *	0.383	0.765 *					
茎粗	0.491	-0.091	0.423	0.308				
块根数	0.501	0.500	0.741	0.470	0.234			
块根长度	0.046	-0.312	-0.129	0.058	0.458	-0.205		
块根直径	0.474	0.269	0.453	0.192	0.527	0.453	0.168	
单株块根鲜质量	0.565	0.256	0.710 *	0.424	0.724 *	0.700 *	0.163	0.828 **

注：* 表示 $P < 0.05$ ，** 表示 $P < 0.01$ 。

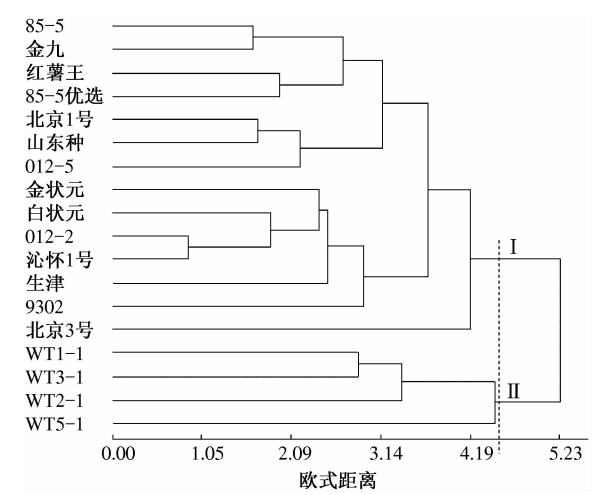


图 2 基于耐连作指数的地黄种质资源聚类结果

栽培地黄中,85-5、金九、红薯王和 85-5 优选的冠幅、叶片长、茎粗、块根直径的耐连作指数均在 0.85 以下,单株块根鲜质量的耐连作指数在 0.35 以下,聚为一个小的类群,表现为非常严重的连作障碍。北京 1 号、山东种和 012-5 的冠幅、叶片长的

指数高的地黄种质对于提高单株块根产量是有效的。叶片长、茎粗的耐连作指数与单株块根鲜质量的耐连作指数的相关性也均达到显著水平,也可作为测定指标在育种时用于选择耐连作的地黄种质资源。

2.4 基于耐连作指数的聚类分析

采用 DPS v7.05 统计软件对 9 个性状耐连作指数数据进行标准化转换后,采用 WPGMA 法对 18 份地黄种质资源进行聚类分析(图 2),结果表明,当聚类距离约 4.58 时,将 18 份地黄种质资源分为栽培地黄和野生地黄 2 个类群。类群 I 为 14 份栽培地黄品种和变异类型,在单个性状耐连作指数上变异幅度较大,连作障碍较为严重。类群 II 为 4 份野生地黄品种,单个性状耐连作指数上变异幅度小,表现为耐连作。

耐连作指数均在 0.7 以下,叶片宽的耐连作指数在 0.8 以下,单株块根鲜质量的耐连作指数在 0.4 ~ 0.6,单独聚为一个小的类群,表现为地上性状的连作障碍非常严重,地下性状的连作障碍比较严重。金状元的地下性状指标中单株块根鲜质量的耐连作指数最大,且块根数、块根长度、块根直径的耐连作指数也很大,连作障碍最轻,而地上性状冠幅和叶片长度的耐连作指数较低,连作障碍明显,与白状元、012-2、沁怀 1 号、生津、9302 等为同一个小的类群。北京 3 号地上性状的耐连作指数均在 0.8 以上,地下性状中块根数增加,单株块根鲜质量的耐连作指数较低,与其他栽培地黄连作表现不一致,单独为一个小分支。

野生地黄除了 WT1-1 和 WT5-1 块根长度的耐连作指数较小外,其他种质性状的耐连作指数普遍较大,甚至有多个性状如块根数的耐连作指数大于 1,表现为连作增益。

3 结论与讨论

基于比较转录组学的差异表达基因检测结果显示,地黄体内存在的上千基因在连作条件下呈现增强表达或抑制表达,调控药用植物的生长发育^[10-12]。那么,在药用植物中必定存在感知化感自毒物质的基因,通过一系列的信号传导调控连作障碍形成^[13]。说明地黄的连作障碍也受基因控制,自然界必然存在携带连作不敏感基因的种质资源。本研究结果表明,18 份地黄种质资源对连作的响应存在明显的差异,栽培地黄连作障碍严重,野生地黄耐连作。而且,不同栽培地黄品种(系)对于连作的响应也存在一定程度的差异。栽培地黄连作栽培时整株生长不同程度受抑制,表现为叶片变小,叶片数减少,茎变细,须根增多,块根膨大缓慢,单株产量降低;野生地黄连作栽培时农艺性状变化不明显。因此,通过杂交、选择、诱变和遗传修饰等手段,将有可能选育出耐连作的地黄品种,降低连作障碍的危害,缩短轮作间隔年限。

本研究发现,4 个野生地黄都耐连作,但是农艺性状表现较差,叶片较小,数量少,块根产量低,可作为亲本与栽培地黄杂交。所有的栽培地黄种质资源均表现程度不同的连作障碍,没有筛选到完全耐连作的栽培地黄。由于地黄的种质资源非常丰富,有大量的农家品种、地方品种和野生资源,可广泛收集不同类型的地黄种质进行耐连作评价。本研究中,栽培地黄品种金状元的块根受连作影响较小,但叶片受连作影响较大,而北京 3 号的表现恰恰相反,可通过杂交选育块根和叶片受连作影响都比较小的耐连作品种。基于耐连作指数的聚类分析把 18 份种质资源分为野生地黄和栽培地黄,与传统分类结果一致。选择杂交亲本可根据遗传距离的大小进行,尽可能优缺点互补,并以栽培地黄为母本。

参考文献:

[1] 郭冠瑛,王丰青,范华敏,等.地黄化感自毒作用与连

作障碍机制的研究进展[J].中国现代中药,2012,14(6):35-39.

[2] 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.

[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.

[4] 李娟,黄剑,张重义,等.地黄化感自毒作用消减技术研究[J].中国中药杂志,2011,36(4):405-408.

[5] 欧小宏,金航,郭兰萍,等.平衡施肥及土壤改良剂对连作条件下三七生长与产量的影响[J].中国中药杂志,2012,37(13):1905-1911.

[6] 李自刚,王新民,刘太宇,等.复合微生物菌肥对怀地黄连作障碍修复机制研究[J].湖南农业科学,2008(5):62-65.

[7] Harleen K, Rajwant K, Surinder K, et al. Taking ecological function seriously: Soil microbial communities can obviate allelopathic effects of released metabolites[J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4700.

[8] 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.

[9] 曲运琴,任东植,姚勇.地黄品种间抗连作障碍差异研究初报[J].陕西农业科学,2011,57(4):103-105.

[10] Li M J, Yang Y H, Chen X J, et al. Transcriptome/degradome-wide identification of *R. glutinosa* miRNAs and their targets: The role of miRNA activity in the replanting disease[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68531.

[11] 王丰青,田云鹤,李明杰,等.地黄 Aux/IAA 家族基因 *RgIAA1* 的克隆和表达分析[J].中国中药杂志,2013,38(23):4033-4039.

[12] Yang Y H, Li M J, Chen X J, et al. De novo characterization of the *Rehmannia glutinosa* leaf transcriptome and analysis of gene expression associated with replanting disease[J]. Molecular Breeding, 2014, 34(3): 905-915.

[13] 郭冠瑛,李明杰,王鹏飞,等.地黄连作障碍中钙信号系统的异常变化分析[J].中国中药杂志,2013,38(10):1471-1478.