

堇菜属植物的研究进展

杨 姗 姗, 明 晓, 朱 蕊 蕊, 高 亦 珂

(北京林业大学 园林学院 北京 100083)

摘 要: 对堇菜属植物的开花生理、繁殖方法、分子生物学、育种学研究及园林园艺的应用研究等方面进行了简要的综述。提出目前中国堇菜的研究工作需要更加注重新的园林园艺上的应用方式和新品种的培养。

关键词: 堇菜属; 开花生物学; 分子生物学; 育种; 应用

中图分类号: S 681.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)11-0114-04

堇菜属(*Viola*)植物多年生,少数为2 a 生草本植物,稀为半灌木,具根状茎。地上茎发达或缺少,有时具匍匐枝。单叶,互生或几生,全缘、锯齿或分裂;托叶小或大,呈叶状,离生或不同程度地与叶柄合生。花两性,两侧对称,单生,稀为2 花。花分为开放花和闭锁花,开放花开放具花冠生于春季,闭锁花不具花冠生于夏季^[1]。

世界上约有堇菜属植物 525 ~ 600 种(Ballard^[2], 1996),其中中国约 110 种^[1]。堇菜属植物广布于世界温带地区,欧洲的阿尔卑斯(Alps)及地中海、亚洲的喜马拉雅(Himalayas)及东亚和南美洲的安地斯(Andes)及巴塔哥尼亚(Patagonia)为该属的分布和演化中心^[3];我国南北各省区均有分布,以西南的种类最多,其中四川省及云南省均分布有 54 种;东北地区的种类次之,有 42 种;华北、华中及华南地区各有 20 余种;新疆产 22 种^[3]。

第一作者简介: 杨姗姗(1987-),女,在读本科,现从事野生宿根花卉堇菜与耬斗菜的育种研究。E-mail: isaiah77@163.com。

通讯作者: 高亦珂(1966-),女,博士,副教授,现主要从事园林植物应用与园林植物资源育种工作。E-mail: gaoykcn@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家大学生创新性实验计划资助项目(GCS07013)。

收稿日期: 2009-06-20

堇菜属植物用途广泛,不仅具有观赏价值,可作为地被盆栽以及森林美化,而且具有止痛消炎、清热解毒、抗氧化、抗免疫缺陷等药理作用。由于堇菜属植物具有综合性开发利用价值,其经济利用和学术研究越来越受到人们的关注^[4]。近年来,堇菜属植物的研究在中国已逐渐受到重视。

1 堇菜属植物的研究

在国外,堇菜是最早用于商业性种植的植物之一。大约公元前 400 年,人们已经在 Attica(希腊的一座城市)建造专类苗圃来培育堇菜,然后在雅典的市场中出售。英国的冰冻果子露(Sherbet)中加入了堇菜,亚洲的医生用堇菜种子榨油来解蝎子毒。堇菜的花被用来装饰房间,叶子被用来做成沙拉和食物,人们也用堇菜来造酒。

由于受到皇室的喜爱,堇菜属植物的栽培和育种在 18 世纪的欧洲就已经得到了空前的发展。仅 1881 年巴黎市场 1 a 出售约 60 亿束堇菜价值约 577 000 法郎。堇菜香精的提取技术以及如何收获堇菜的花来制成酸碱指示剂(Syrup of Violets)促进了堇菜种植在欧洲的进一步发展。19 世纪 40 ~ 50 年代,随着俄国堇菜(*Russian violet*)的引种,布里斯托尔(Bristol)和巴斯(Bath)地区的

Advances in Emergence and Inhibition in The Tissue Culture Browning of *Phalaenopsis*

ZHAO Ying, YANG Shu-hua, GE Hong

(Key Laboratory of Horticultural Crops Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The advances in Browning mechanisms and the related anti-browning techniques in tissue culture of *phalaenopsis* were reviewed. Furthermore, heat-shock treatment was mentioned as a new effective method for browning inhibition, which providing more theoretical references to resolve the tissue culture browning of *phalaenopsis*.

Key words: *Phalaenopsis*; Tissue culture; Browning mechanism; Anti-browning techniques; Review

堇菜苗圃开始繁荣起来。堇菜工业在美国的发展与英国相似,到19世纪末期,在东海岸线和西海岸线周边的各个州的市和镇的周边都能找到堇菜的种植苗圃。堇菜的英文名称是 *Violet*, 在中国早期的译制品中被称为紫罗兰,也曾多次出现在外国文学作品及电影之中。

在中国,堇菜属植物一般被用作药物,历史悠久。徐国兵和徐新建1997年发表的《堇菜属几种药用植物的草本考证^[7]》中记载,堇菜属植物最早见于《五十二病方》,称之为“堇”。记录了药用部位、炮制和服用法。《名医别录》中首次记载了堇菜的功效主治马毒疮、蝎毒和痈肿;并且首次称之为“堇菜”。《食疗本草》中记载堇菜味苦,治寒热、鼠瘻、瘰癧生疮、结核聚气、下淤血、霍乱、蛇咬等。此外,有记载堇菜属植物的书籍还有《新修本草》、《证类本草》、《履巉岩本草》、《本草纲目》、《植物名实图考》等。

2 堇菜属植物的开花生物学研究

堇菜属植物的繁殖系统非常特殊,既存在具有吸引传粉者开放的花冠,雄蕊5枚,可异花授粉的开放花,也存在不具花冠,雄蕊2枚,且与柱头紧密接触自花授粉的闭锁花。在北京地区开放花从3月初开始进入花期,持续到5月中旬,3月末到4月初为盛花期。单花花期2~7 d不等。闭锁花4月产生,持续到8月末^[9]。

2.1 大孢子发生和雌配子体发育的研究

丁军业和王臣(2007)^[7]对早开堇菜(*Viola prionantha* Bunge)大孢子的发生和雌配子体发育进行了观察。结果显示,早开堇菜胚囊发育属蓼型。大孢子母细胞经过减数分裂产生线状大孢子四分体,合点端的大孢子或第1大孢子具功能(一般的植物仅有第1个大孢子具功能),这可能是闭锁花结实率较高的一个原因。对早开堇菜闭锁花大孢子的发生和雌配子体发育进行观察的过程中并没有发现任何异常现象,因此认为春季的完全花和夏季的闭锁花均能结出可育的种子的现象,可能是其遗传机制与其外部环境相适应的结果。

2.2 堇菜属植物授粉机制的研究

Freitas L(2002)^[11]等人研究了巴西南部高海拔地区的堇菜属植物 *V. cerasifolia* 和 *V. subdimidiata* 的开花生理和传粉者的行为。结果表明,堇菜属植物的基本构造符合“产蜜花”的形态。但是,不正常的钩状花药突出物,极其微小的产蜜量和传粉者的活动暗示了 *V. cerasifolia* 和 *V. subdimidiata* 正在用花粉替代花蜜来酬谢传粉者。

2.3 堇菜属植物的花粉离体培养和柱头可授性试验

刘绮丽(2006)^[9]等人研究了紫花地丁的开放花柱头可授性,以及花粉的活力。试验结果表明,开放花开放前柱头已可授,此后一直处于可授状态直至开花末期。花药在开放花前期开裂,开裂后花粉一直保持较高活力,在中期达到最高,直到末期花粉活力仍保持在

20%左右。

张春宇等人(2007)^[12]以球果堇菜为试材,研究了不同浓度蔗糖、硼酸及柱头提取物的液体培养基对花粉离体萌发的影响,筛选出适合花粉萌发的最适培养基,并对20℃、4℃、-20℃3种条件下贮藏的花粉生活力进行研究,结果表明,10%蔗糖是最适宜浓度。球果堇菜花粉对硼酸较为敏感,15 mg/L 硼酸的液体培养基,花粉萌发率最高,达到89.53%;浓度较高时(>20 mg/L)硼酸对花粉萌发则有抑制作用。柱头提取物对球果堇菜花粉萌发影响不大。球果堇菜花粉的生活力随贮藏时间的延长逐渐下降。贮藏3~12 d的花粉,3种温度条件下贮藏的花粉,生活力差别不显著,仍能保持较高的生活力。而贮藏18 d后,花粉生活力急剧下降,在4℃下贮藏18 d和24 d的花粉,萌发率最高,可达49.65%和23.12%。4℃下贮藏的花粉生活力最高。

2.4 堇菜属植物产生开放花条件的研究

Cortes-Palomec 等人(2006)^[13]在自然环境下研究了影响 *Viola striatad* 的开放花产生的生态因素。试验结果表明,开放花的产生在某些情况下(并非所有情况下)与开花高峰的1~2周的光照有关。各种联系表明磷和钙对开放花的产生非常重要,而光照、镁、氮含量和土壤pH值对开放花的产生也有重要影响。开放花的结实率差异显著,从1%~100%都有可能,这是由于授粉者活动的不同而导致的。

2.5 堇菜属植物开放花和闭锁花繁殖特征的研究

Theresa Marie Culley B S(2001)^[14]选取2种重要的林下植被 *Viola pubescens* 和 *Viola canadensis* 为试验材料,研究了堇菜出现开放花闭锁花联合交配系统的基因序列和因素。结果表明,虽然每株植物产生相近数量的开放花和闭锁花,但是开放花的种子的成熟和散种率是闭锁花的2倍。2种花的果实里的种子数量相近,种子质量和出苗率相近。开放花可以异花授粉,但是没有授粉者拜访的花也能通过延迟的自花授粉机制来进行自交。虽然开放花和闭锁花在繁殖中都很重要但是,开放花可能提供更多的种子。开放花的自交率非常高,但是年与年之间的自花授粉率差异大,这可能是由于年与年之间授粉者可获得性的差异。

自交的一种潜在的影响会使遗传变异下降。*Viola pubescens* 的杂交系统中,闭锁花和开放花自交都能够促进种群分化,开放花异交可以促进种群间的基因漂流和基因的多样性。

刘绮丽(2006)^[9]等人对北京地区一扰动生境中紫花地丁(*Viola yedoensis*)开放花和闭锁花的产量、结实率和种子质量等繁殖特征进行了比较。试验结果表明,在扰动生境中,大部分种子都是通过闭锁花闭花受精形成的,因为紫花地丁个体往往形成更多的闭锁花,而且闭锁花的结实率显著高于开放花的结实率。但是,开放花

产生的种子更大,因而可能具有更高的幼苗存活率。在不利生境中,闭锁花能保障植物繁殖和一定的种子产生。而开放花则产生更多的异交种子以适应新的生境。

3 堇菜属植物分子生物学研究

3.1 DNA 提取方法研究

国外研究将分子生物学技术应用到了生态、进化、繁殖等各个方面。McCreary、Culley^[1415]等人用ISSR标记法测定遗传的多样性和居群的基因结构,从而使生态学、遗传学方面的研究更具说服力。

中国目前对堇菜属植物的分子生物学研究集中在方法的探讨上。由于蔓茎堇菜组织细胞内富含多糖、粘液质等,因而提取其基因组DNA的难度较大,CTAB能较好地去除多糖类杂质。2005年,代容春等人^[23]研究了蔓茎堇菜(*Viola diffusa* Ging.)基因组DNA的分离提取方法。在细胞核裂解之前,除去细胞质中的多糖等杂质,然后采用CTAB法分别从野生植株叶片、组培植株叶片、愈伤组织及悬浮培养细胞4种新鲜材料中成功地分离提取了蔓茎堇菜基因组DNA。所提取的DNA,可直接用于限制性内切酶酶切,并适用于RAPD分析。

2005年,代容春等人^[23]以SDS作为解离剂,采用常规SDS法、改进的SDS法及SDS高盐低pH法分离提取蔓茎堇菜基因组DNA。比较3种方法的提取效果,结果表明,改进的2种SDS法有效地抑制了多酚氧化酶的氧化,除多糖的效果较好,纯度较高,而常规SDS法提取蔓茎堇菜DNA中含有较多杂质对Taq聚合酶的活性有抑制作用。因此,常规SDS法DNA得率高但完整性及纯度较差;改进的SDS法DNA质量好但得率相对较低;只有SDS高盐低pH法是最为理想的提取方法,不同组织提取的DNA可直接用于限制性内切酶酶切,并适于进行RAPD分析。

3.2 遗传多样性的研究

1998、1999、2001和2002年,McCreary提取了来自26个群落的3个种的堇菜*Viola flettii*, *Viola cuneata*和*Viola ocellata*(都是*Viola canadensis*组的近亲种)的DNA。使用ISSR标记对*V. flettii* DNA的分析显示了其多型的等位基因有65%的不同,而且南方与北方的群落出现了性状分离。对*V. flettii*的生态方面的数据表明更高海拔的环境导致低的遗传;越往南分布群落越小。因此认为,利用保护2个区域的居群(重点在于于保护更好的为环境)来保护*V. flettii*的遗传多样性能够有助于维持这种本土种的适应性。

自然栖息地的分裂会导致居群的地理上和基因上的隔离造成下降的遗传变异和增加的遗传距离,从而对植物居群产生负面影响。为了检验这种影响是否在城市景观中发生,Culley等人^[21]在美国俄亥俄州的西南部的辛辛那提的都市区对6个*Viola pubescens*居群的基因结构进行了描述。利用ISSR标记法,放大了所有城市

居群的51对等位基因。结果表明,在居群间基因距离相似和缺乏独特的等位基因的情况下,城市居群保持了高度的遗传变异(多型基因座百分比 $P_p=80.7\%$)。地理距离和基因距离是相互关联的,所有的居群通过区域来分组。在主坐标分析中,城市居群中的个体聚为一类,与农业居群和密歇根居群不聚为一类。分子方差分析表明,大部分的遗传变异在俄亥俄州西南部、俄亥俄州中部或北部以及密歇根等地居群内(69.1%)和居群间(22.2%)有显著差别。平均 F_{st} 为0.38,说明了大量的群体分化。

4 堇菜属植物的育种研究

4.1 杂交育种的研究

堇菜属植物在国外的育种具有悠久栽培和育种历史。1865年,Graham F J所培育的“沙皇(The Czar)”成为了第1个获得英国皇家园艺协会荣誉的品种^[9]。1905年,伦敦已经培育出了重瓣的“Comte de Brazza”和“Marie Louise”。欧洲、美国的堇菜类植物分为耐寒的单花堇菜、耐寒的双花堇菜、有香味的Parma堇菜(较不耐寒)等,迄今为止,每个类别下都有成百的堇菜品种。欧美国家以及日本韩国等亚洲国家一直都很重视堇菜的育种工作,分别成立了堇菜协会,建立了相关网站,每年都会报道新的堇菜品种。

然而,中国对除三色堇类堇菜外的堇菜属植物的育种研究几乎为零。已见报道的文献中,仅有杨鹏鸣^[21]等人对堇菜属植物的杂交研究中引入了紫花地丁和早开堇菜品系。杨姗姗等仅对其观赏性状进行了分析,而在试验方法中并未使其参与到杂交之中。

4.2 诱变育种研究

2007年,张楠楠等^[24]用不同浓度的秋水仙素溶液不同时间处理紫花地丁种子和幼苗:用浓度为0.1%、0.2%、0.4%、0.8%处理种子,处理时间分别为4、16、24 h,处理温度为25℃;用浓度为0.05%、0.1%、0.2%、0.4%的秋水仙素处理子叶刚脱离种皮时的幼苗,处理时间为4、8、16 h,处理温度为25℃。结果发现,种子处理中以0.8%浓度处理10 h效果最佳,诱变率达到46.7%。幼苗处理中以0.2%处理16 h和0.8%处理8 h效果最好,诱变率达到80%。诱变后产生的多倍体植株与二倍体植株相比,具有茎增粗、叶片加厚且叶色浓绿、染色体数目加倍等特点。

5 堇菜属植物在园林园艺中的应用

近年来,堇菜属植物由于耐旱、适应性强、开花早、花色鲜艳、绿期长、易成活、便于管理等优点,及堇菜属植物独特的春、秋两季不同的开花现象对堇菜属植物开展中间杂交和新品种的选育、繁殖、栽培的研究有较强的可操作性^[13]。因此,堇菜属植物的开发利用已逐步受到各地重视。

堇菜按照观赏部位可分为观花类,和观叶类。观花

类按花色分为白花类,如鳞茎堇菜(*V. bulbosa*)、阴地堇菜(*V. yezoensis*)、堇菜(*V. verecunda*)、白花堇菜(*V. patrinii*)等;黄花类,如双花黄堇菜(*V. biflora*)、圆叶小堇菜(*V. rockiana*)、纤茎堇菜(*V. tenuissima*)等;紫花类,如紫花地丁(*V. philippica*)、早开堇菜(*V. prionantha*)、裂叶堇菜(*V. dissecta*)、斑叶堇菜(*V. variegata*)等。观叶类堇菜属植物有斑叶堇菜(*V. variegata*)和维西堇菜^[19]。

根据植株高度和园林应用的关系,可将堇菜属植物划分为三大类:高株型(株高 30 cm 以上),为花坛、花境及花丛中花卉布置的优良材料;中株型(株高 6~30 cm)可用于花坛和花丛的布置及花境的镶边,同时还可与其他植物组合栽培来营造层次感和增加色彩丰富度;铺地型(株高 6 cm 以下),可用于地被覆盖、岩石园^[17]。

堇菜属植物在园林园艺中的应用方式多样,在国内主要用于园林绿地和森林景观。在国外,堇菜属植物还被用于微型盆栽、树状景观、微型切花等^[19]。

6 堇菜属植物研究展望

从堇菜属植物的药用价值方面的利用来看,中国已经较为成熟,对于遗传学、生态进化等方面的研究中国还尚未起步。目前,中国较为重视的是堇菜属植物在园林中的应用,因此当前最需要受到重视的应当为堇菜属植物在园林园艺中的应用形式的开发和新品种的开发。堇菜属植物在中国的应用不应仅仅局限于用在点缀草坪等方面,应当开发更多的应用方式如微型盆栽、微型切花、树状堇菜等。中国的野生堇菜资源丰富,广泛分布于全国各地,有堇菜属植物约 110 多种,占世界的约 1/5,为堇菜的育种研究提供了充足的种质资源。目前,堇菜属的植物在中国园林园艺中的应用已经受到了广泛的重视,更需要培养出符合园林园艺种植需要、生产需要、观赏需要的具有中国自主知识产权的新品种。因此,对堇菜的育种研究应当受到重视。

参考文献

[1] 王庆瑞.中国植物志[M].51卷.北京:科学出版社,1991.
[2] Bland H E. Phylogenetic relationships and in fragerenic groups in Viola (Violaceae) based on morphology, chromosome numbers, natural hybridization and Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences[D]. PhD Thesis, University of Wisconsin Madison, 1996.
[3] 周劲松,龚琴,黎昌汉,等.中国堇菜属植物资源及园林应用评价[J].广东园林,2008(3):49-52.
[4] 孙彬,屈爱桃.紫花地丁研究进展[J].内蒙古中医药,2008(6):50-51.

[5] Ballard H E, Sytsma K J, Kowal R R. Shrinking the violets: phylogenetic relationships of infrageneric groups in Viola (Violaceae) based on internal transcribed spacer DNA sequences [J]. Systematic Botany, 1999, 23(4): 439-458.
[6] Coombs R E. Violets: the history and cultivation of scented violets [M]. British Library Cataloguing in Publication Data, 1981.
[7] 徐国兵,徐新建.堇菜属几种药用植物的草本考证[J].中药材,1997,20(7):371-373.
[8] 段春燕,侯小改,李连方.现代植物分类方法在植物学分类研究中的应用-以堇菜为例[J].生物学通报,2004,39(10):17-18.
[9] 刘绮丽,刘香梅,刘薇薇,等.紫花地丁开放和闭锁花繁殖特征的研究[J].北京师范大学学报(自然科学版),2006,42(6):605-609.
[10] 丁军业,王臣.早开堇菜大孢子发生和雌配子体发育的研究[J].哈尔滨师范大学自然科学报,2007,23(2):96-100.
[11] Leandro Freitas, Marlies Sazima. Floral Biology and Pollination Mechanisms in Two Viola Species From Nectar to Pollen Flowers [J]. Annals of Botany, 2003, 91: 311-317.
[12] 张春宇,阮燕晔,孙晓梅.球果堇菜花粉离体萌发的研究[J].辽宁农业科学,2007(3):38-39.
[13] Cortes-Palomoe A C, Ballard Jr. H E Influence of annual fluctuation in environmental conditions on chasmogamous flower production in Viola striata [J]. Journal of the Torrey Botanical Society, 2006, 133(2): 312-320.
[14] Theresa Marie Culley. B. S. The Reproductive Biology, Mating System, and Genetic Consequences of Chasmogamous and Cleistogamous Flower Production in Violets (Viola) [D]. Phd thesis. The Ohio State University, 2000.
[15] 段春艳,李连方,侯小改.野生紫花地丁和早开堇菜的栽培表现[J].中国种业,2006(7):60-61.
[16] 段春艳,侯小改,张赞平,等.堇菜属 Viola 植物资源的园林开发前景探讨[J].中国农学通报,2004,20(5):185-186.
[17] 周劲松,龚琴,黎昌汉,等.中国堇菜属植物资源及园林应用评价[J].广东园林,2008(3):49-52.
[18] 程家玉,张晶.紫花地丁人工栽培丰产技术及推广应用[J].中国林副特产,2007,89(4):73,79.
[19] 鲍平秋.地被新秀斑叶堇菜[J].中国花卉盆景,2005(4):4.
[20] 刘会超,孙振元.三种野生堇菜属植物引种及园林应用[J].中国园林,2006(2):92-94.
[21] Culley T M, Shita S J, Wick A. Population Genetic Effects of Urban Habitat Fragmentation in the Perennial Herb Viola pubescens (Violaceae) using ISSR Markers [J]. Annals of Botany, 2007, 100:91-100.
[22] 代容春,朱锦懋,陈由强.改进CTAB法提取蔓茎堇菜基因组DNA[J].热带农业科学,2005,25(2):8-10,62.
[23] 代容春,朱锦懋,陈由强.蔓茎堇菜基因组DNA 3种提取方法的比较研究[J].生命科学研究,2005,9(3):254-257.
[24] 张楠楠,孙晓梅.秋水仙碱诱导紫花地丁多倍体[J].安徽农业科学,2007,35(7):2012-2013.
[25] 杨鹏鸣,刘会超,刘晓庆,等.堇菜属植物杂交研究[J].河南科技学院学报(自然科学版),2007,25(3):48-49.

Review in Research of Viola (Violaceae)

YANG Shan-shan, MING Xiao, ZHU Rui-ni, GAO Yi-ke
(Gardening College Beijing Forestry University, Beijing, 100083, China)

Abstract: This article summarized the study of Viola genus in history, flower physiology, molecular biology and landscape application; and concluded that study in Viola should focus on new forms of application in landscape and horticulture, and should focus on breeding new variety of Viola in China.

Key words: Viola; Flowering physiology; Breeding research; Landscape application