

仙茅属植物种质资源遗传多样性研究进展

朱丽芳, 何 钢

(中南林业科技大学 生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004)

摘 要:遗传多样性作为生物多样性的重要组成部分,是生态系统多样性和物种多样性的基础。随着仙茅属野生资源的减少及其药用价值和经济价值的体现,研究其遗传多样性具有重要的理论和实践意义。文章从形态学水平、细胞学水平、生化水平,尤其是分子水平对仙茅属种质资源遗传多样性的研究进行了综述,提出了仙茅属种质资源研究中存在的问题,以期为进一步研究仙茅属资源提供借鉴与参考。

关键词:仙茅属植物;种质资源;遗传多样性

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)23-0176-04

种质资源又称作遗传资源,是所有生物生命延续和种族繁衍的前提。在长期的进化过程中,由于基因突变、基因交流及遗传分化,在自然选择和人工选择作用的基础上,生物体便出现了丰富多样的遗传性状^[1]。种质资源是生物多样性的重要组成部分,遗传多样性又是生物多样性的核心。生物的遗传多样性不仅表征了种间和种内的差异,还体现了不同地域个体之间的差异,也是对物种种群和个体变异的综合反映。生物多样性的保护实质上是生物遗传多样性的保护,这不仅是因为保持物种稳定和进化潜力依赖其遗传多样性,而且其特有的基因组成使物种的经济价值和生态价值得到保证。在长期的选择过程中,物种优良的特性得到加强,使得其抗病虫害、适应环境变化等能力得到保存,为人类改良、创造新品种提供材料。在现代生物技术等科学发展的基础上,利用种质资源的遗传多样性筛选优良的栽培品种选育新品方面取得了较大的进展。遗传多样性的研究对指导作物种质资源的收集、保存、评价和利用都有实际意义,也为满足生命科学的发展和农林畜牧业的生产提供帮助。

仙茅属植物中的仙茅根茎是传统的中药材,已有的研究重点在于对其有效成分^[2-5]、药理作用^[6-7]、组织培养^[8-11]等进行探讨,对遗传多样性的考察只处在起步阶段。由于生态环境的破坏、野生资源的减少以及药用量的增加,仙茅属植物遗传多样性的研究及种质资源保存

等问题亟待解决。从植物的性状等宏观层面了解其遗传多样性已不能满足科学研究的需求,当今生物技术的发展,科研人员逐步从细胞水平、生化水平到分子水平来评价生物的遗传多样性。PCR 技术的诞生为遗传多样性的评价带来了新突破,开始着重于最本质的 DNA 分子水平方面的探索。不同的评价方法可从不同角度和层次揭示物种的变异,均有助于人们认识遗传多样性及其生物学意义。

1 形态学研究进展

仙茅属植物的形态学研究是通过观察记录其不同生长时期的外部特征、比较结构差异来探究其遗传变异情况的。形态学研究不仅要考察肉眼就能识别、观察到的性状,还要研究那些需借助一定的测量工具才能呈现的性状,如植物的生理、生殖、抗寒、抗旱等特性。常见的表型性状有 2 类,即单基因性状和多基因性状。单基因性状在自然界中很少存在,因此,种群或个体的遗传变异主要是对多基因性状的研究。

仙茅属植物的形态学方面研究较早,不同学者对仙茅属植物进行了花、根茎、种子等不同部位性状的研究,初步建立了仙茅属植物之间的遗传关系图谱。早期,张荣平等^[12]对拉枯族、傣族民间常用药大叶仙茅的植物形态特征、须根横切面、粉末的显微特征和理化性质进行研究,为进一步开发和利用大叶仙茅提供依据。董国明等^[13]利用计算机图像分析法对仙茅属植物花粉进行了定量分析,由分析所得的花粉三维形态数据,计算出仙茅属植物花粉粒的体积,体积由大到小依次为:疏花仙茅、短萼仙茅、大叶仙茅、光叶仙茅、中华仙茅、仙茅和绒叶仙茅,其中疏花仙茅、短萼仙茅和大叶仙茅的体积最大直径大于 20 μm ,而其它的最大直径小于 7 μm 。随后董国明等^[14]又对仙茅、光叶仙茅、疏花仙茅、中华仙茅和

第一作者简介:朱丽芳(1987-),女,硕士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:1053908219@qq.com.

责任作者:何钢(1965-),男,硕士,教授,现主要从事生物技术等教学与科研工作。E-mail:hegang262@163.com.

基金项目:国家林业公益性行业科技专项资助项目(201304807)。

收稿日期:2014-09-04

绒叶仙茅的种子进行扫描电镜观察,结果显示,仙茅组植物种子比较大(长 2.0~2.4 mm,直径 1.7~2.1 mm),大叶仙茅组植物种子相对较小(长 1.1~1.6 mm,直径 1.0~1.2 mm)。而在种子表面纵皱纹及种脐突起的电镜扫描结果中,除仙茅种子表面纵皱纹光滑,其它表面均不光滑;各植物种脐突出也略有不同,因此可以利用种脐突起的形态鉴别仙茅属植物。不久,李隆云^[15]选取 28 个形态学性状指标对我国仙茅属 7 个物种进行数值分类研究,运用聚类分析和主成分分析的方法研究仙茅属植物间的亲缘关系,聚类结果表明,疏花仙茅、短葶仙茅和大叶仙茅亲缘关系较近,绒叶仙茅和中华仙茅亲缘较近,仙茅与光叶仙茅亲缘较近,这与仙茅属植物的传统分类结果基本一致。在对仙茅与其它仙茅属植物进行根茎横切面、叶片横切面、叶片表面的显微组织特征观察中,指出了仙茅属植物间在根茎及叶片组织上的差异。仙茅属 7 种植物根茎中部的组织特征非常相似,主要区别是根茎的直径大小、皮层在横切面中所占的比例、淀粉粒的有无及多少、黏液细胞与分泌腔在皮层及中柱内的分布情况以及草酸钙晶体的类型、多少等特征;叶片方面主要是叶表皮细胞是否着生有腺毛,叶表皮内侧有无纤维,叶肉有无栅栏组织与海绵组织的分化,表皮及薄壁细胞有无小晶体等特征区别。利用仙茅属植物的形态组织学特征鉴别真伪,吴远文^[16]采用性状鉴别和显微鉴别分析仙茅与其伪品的组织特征,根据根茎断面形态与横切面的组织构造,轻松鉴别药材真伪。

形态学研究存在着一些弊端,许多表型性状鉴定周期长,而且鉴定易受到人为因素、检测工具和基因显隐性等因素的影响,使结果的准确性不强,因此在植物遗传多样性分析时需要借助其它的研究方法。虽然形态学性状易受环境和人为因素的影响,但对于同一生境下的不同种质材料或居群而言,在一定程度上可以快速地评价并准确地分析其遗传变异情况。鉴于表型性状检测遗传多样性是最直接最简便的方法,其仍是植物种间或种内分类的重要依据之一。

2 细胞学研究进展

细胞学水平研究主要是在染色体基础上进行染色体的核型、带型分析,研究染色体组和染色体的数目变异等问题。染色体是遗传物质的载体,一旦其发生变异就必然导致遗传变异的产生,因此研究物种的染色体变异就能了解物种的遗传多样性。染色体结构和数量上的特征是最能明确显示物种遗传多样性的细胞学特征,因而,仙茅属植物已有的细胞学研究也主要集中在染色体核型等问题上的分析。

在仙茅属植物的细胞学研究方面,最早报道是 1967

年台湾学者 Hsu^[17]进行的核型分析,主要进行了台湾产大叶仙茅染色体数目的分析,结果显示其核型公式为 $2n=2x=18$ 。1980 年, Lakshmi^[18] 分析了采自锡金 Chandra 绒叶仙茅(*C. crassifolia*)的核型结构,其核型公式为 $2n=2x=18=4m+10sm+4st$ 。在已有报道的基础上,杨永平等^[19]对我国仙茅属的 3 个种进行了较为系统的核型分析,结果表明绒叶仙茅、大叶仙茅和中华仙茅的染色体数目均为 $2n=2x=18$,3 个种的核型都属于“2B”型,但不同种在核型上又有明显的区别。云南绒叶仙茅的核型公式为 $2n=2x=18=10m(4SAT)+8sm$,云南大叶仙茅染色体数目和核型为 $2n=2x=18=10m(2SAT)+8sm$,中华仙茅核型为 $2n=2x=18=8m(2SAT)+10sm(3SAT)$,很显然中华仙茅的核型不对称性比绒叶仙茅和大叶仙茅都强。此外,云南绒叶仙茅与锡金绒叶仙茅核型上有明显的区别,锡金绒叶仙茅有 4 条 m 型和 4 条 st 染色体,而云南的则是 10 条 m 型而无 st 染色体。这也许是在漫长的历史过程中,为适应新的生态环境,绒叶仙茅的染色体形态发生了变化,出现了较为进化的细胞核型。在仙茅属植物的核型研究方面,尚未对我国 7 个种的仙茅属植物进行全面系统的研究,仙茅、光叶仙茅、短葶仙茅等的核型及带型尚不清楚。

细胞学标记也存在一些不足,不但在材料准备方面要花费较长的培育时间和较大的人力,同时对染色体制片技术和观察时机把握上要求极高。对同一种群的不同个体来说,因其形态相似、染色体数目相等,仅靠细胞学上的技术尚不能满足其遗传多样性的精确定位。

3 生化水平研究进展

生化水平标记主要是研究基因表达的产物-蛋白质,通过蛋白质的电泳谱带间接反映植物的遗传变异情况。常用于生化研究的蛋白质是同工酶(包含等位酶)和种子贮藏蛋白等,其遗传和表达遵循孟德尔遗传定律,便于进行遗传学分析。国外已经有很多学者对此研究, Huang 等^[20]运用十酶系统研究我国不同地区的板栗遗传多样性,通过 19 个位点的同工酶基因分布的不均匀性测试,分析 3 个种的遗传距离等问题; Geraci 等^[21]等对西西里地区甘蓝的 5 个品种 16 个种群进行的同工酶分析; Chung 等^[22]研究了韩国春兰种群的等位酶多样性,根据不同种群所测的杂合度值预测种群间基因流。另外,对紫丁香^[23]、矮沙冬青^[24]、光皮树^[25]等植物在生化水平上国内也有诸多的报道,但对仙茅属植物生化水平的研究尚鲜见报道。

生化研究的优势在于分析所需的样品量较少,部分组织、器官就能直接反映基因产物的差异,因此克服了形态学与细胞学研究易受环境影响以及整株植株为材料的难题。任何事物都是利弊共存的,生化研究也存在一些限制性问题,如样品中某些溶解度低的蛋白质无法

分离,一些分子量小的蛋白质无法检测,在电泳过程中还有一些极端蛋白质会丢失等问题,这些都限制了利用蛋白质来反映植物的遗传多样性。

4 分子水平研究进展

DNA 是遗传物质的载体,所有生物的遗传信息都是由 DNA 碱基序列呈现的,因此直接对 DNA 碱基序列的分析和比较是揭示遗传多样性最理想的方法。DNA 分子研究既不受环境因素的影响又能提高结果的准确度,是一种高效的遗传多样性评价方法。随着 DNA 分子技术的发展,已经延伸出多中分子标记技术如 RFLP、RAPD、SSR、ISSR 和 AFLP 等,这些标记在作物种质资源的分析利用中扮演着重要角色。

仙茅属植物种质资源分子水平上的研究比较少,主要集中在李隆云等^[26-28,30]进行的 RAPD、ISSR 和 SRAP 等的研究。李隆云等^[26]通过单因子试验就 RAPD 反应体系的主要参数对扩增结果的影响进行研究,建立了适合仙茅 RAPD 分析的反应体系,并通过试验验证了该体系的稳定性和可靠性。利用优化好的体系对 25 个不同地区的仙茅进行引物筛选,从 40 个随机引物中初选出的 21 个随机引物共扩增出 159 条带,其多态性达 68.6%。同时在对我国 7 个仙茅属 30 个单株进行的 RAPD 分析试验中,11 个 RAPD 引物共扩增出 157 条带,其中有 145 条呈多态性^[27],表明我国仙茅属植物的遗传多样性极为丰富,且种间的遗传差异大于种内的遗传差异。基于 RAPD 研究,李隆云等^[28]又对我国 25 个主产区的仙茅的遗传多样性进行了 ISSR 分析,从 18 条 ISSR 引物中筛选出 14 条引物,共得到 176 条清晰可辨的扩增条带;并通过 UPGMA 聚类法将 25 份样品分为两大类,聚类较为复杂,大多种质资源没有明显的地理相关性,仅一小部分种质分布呈现地域性;这便再次证明仙茅的遗传多样性丰富,为筛选优质种质资源提供遗传基础。陈大霞等^[29]通过单因子和双因子试验对仙茅属植物 SRAP 反应体系中主要因素进行优化,建立了适合仙茅属植物 SRAP 分析的反应体系。利用优化好的 SRAP 体系,研究了仙茅属植物 7 个国产种亲缘关系,通过 TREECONW 软件分析遗传距离,UPGMA 方法聚类,构建亲缘关系系统图。结果表明,25 对引物组合共得到 923 条扩增条带,其中有 910 条呈现多态性,占 98.6%,遗传距离 0.631~0.912。聚类结果显示我国 7 个仙茅属植物分类结果与传统形态分类结果基本一致^[30]。根据仙茅属植物的 SRAP 体系优化和遗传分析研究结果,对上述扩增产物进行了琼脂糖凝胶电泳与非变性 PAGE 电泳效果检测^[31],结果显示,我国 7 个仙茅属植物的多态性水平高,SRAP 用于其分类的可行性强;非变性 PAGE 电泳的分辨率远高于琼脂糖凝胶电泳。所有这些在 DNA 水平上对仙茅属植物遗传多样性进行

的分析都更准确地评定了各种质的遗传特征和相互关系,为进一步加速仙茅属植物种质的遗传育种的研究奠定了基础。

5 问题与展望

遗传多样性研究从最初单纯外观形态研究发展到分子水平的研究,各种方法都有优点,但也存在各自的局限性。整体来讲,仙茅属植物遗传多样性研究在形态学、细胞学、分子生物学均有涉及,但是仅有的研究还不够系统完善,不足以为仙茅属植物的种质资源遗传多样性分析评价以育种工作提供更多的帮助。在形态学水平上,分析环境土壤、温度等对仙茅属植物生长影响程度的报道尚鲜见,也未曾涉及到野生种群与栽培种群间形态上是否有差异。而细胞学水平的研究虽然起步早,但尚鲜见其最新报道,并且现有的研究多数针对部分仙茅属植物的染色体核型和数目的分析,没有染色体带型分析、染色体结构数目变异分析和染色体组分析等,亦未研究我国仙茅属植物 7 个种详细的核型分析以及不同地区染色体结构等的区别。在种内水平上,等位酶是一种稳定的遗传标记,可以测量种群的遗传变异性,但仙茅属植物生化水平上的研究却是空白的。分子水平上虽进行了 RAPD、ISSR 和 SRAP 分析,只是笼统区分了我国仙茅属植物 7 个种之间的亲缘关系,并未深入探讨种内差异、种间差异以及地域差异等问题。对仙茅属植物遗传多样性研究应该是建立在不同层次上的,须将形态学研究、细胞学研究、生化研究和分子水平研究结合起来,以提高研究的准确性和可靠性。

仙茅属植物研究最多的是有效成分提取及药用仙茅的药理作用,其人工育种、栽培方面鲜有报道。在仙茅分子育种过程中,需要对大量已知和未知基因、蛋白质进行更为详尽的分析和鉴定,同时,仙茅遗传多样性的研究也将为其育种工作提供帮助。另外,低成本组织培养体系的建立,大规模林下栽培技术等方面的研究也都需要进一步完善。目前,我国仙茅属植物的种质研究工作主要集中在形态学水平和分子水平,但高密度的遗传图谱构建工作进展缓慢,限制了分子标记辅助育种的进一步开展。随着分子手段的提高,对仙茅属植物的种质资源研究将会更深入。

参考文献

- [1] Nei M. Analysis of fene diversity in subdivided population[J]. Proceedings of National Academic Science, 1973, 70(2): 3321-3323.
- [2] Wu Q, Fu D X, Hou A J, et al. Antioxidative phenols and phenolic glycosides from *Curculigo orchoides* [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2005, 53(8): 1065-1067.
- [3] Kubo M, Namba K, Nagamoto N, et al. A new phenolic glucoside, curculigoside from rhizomes of *Curculigo orchoides* [J]. Planta Med, 1983, 47(1): 52-55.
- [4] Garg Shri N, Misra Laxmi N, Agarwal Santosh K. Corchioside A, an

- orcinol glycoside from *Curculigo orchioides* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(6): 1771-1772.
- [5] Dall'Acqua S, Shrestha B B, Comai S, et al. Two phenolic glycosides from *Curculigo orchioides* Gaertn [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(5): 279-282.
- [6] Pandit P, Singh A, Bafna A R, et al. Evaluation of Antiasthmatic Activity of *Curculigo orchioides* Gaertn. Rhizomes [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2008, 70(4): 440-444.
- [7] Augustine A C, Souza L D. Regeneration of an anticarcinogenic herb, *Curculigo orchioides* (Gaertn.) [J]. *In Vitro Cellular and Development Biology-plant*, 1997, 33(2): 111-113.
- [8] Bhavisha B W, Yogesh T J. Micropropagation of an Endangered Medicinal Plant; *Curculigo orchioides* Gaertn. [J]. *Plant Tissue Cult*, 2003, 13(1): 13-19.
- [9] Dennis Thomas T. Pretreatment in thidiazuron improves the *in vitro* shoot induction from leaves in *Curculigo orchioides* Gaertn., an endangered medicinal plant [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2007, 29(5): 455-461.
- [10] Sharma D, Kapoor R, Bhatnagar A K. Arbuscular mycorrhizal (AM) technology for the conservation of *Curculigo orchioides* Gaertn.: an endangered medicinal herb [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(3): 395-400.
- [11] Francis S V, Senapati S K, Rout G R. Rapid clonal propagation of *Curculigo orchioides* Gaertn., an endangered medicinal plant [J]. *In Vitro Cellular and Development Biology-plant*, 2007, 43(2): 140-143.
- [12] 张荣平, 唐金春, 赵爱华, 等. 民族药头花仙茅的生药学研究 [J]. *中国民族民间医药杂志*, 1998(1): 39-41.
- [13] 董国明, 张汉明, 张汉臣. 仙茅属植物花粉的计算机图像分析 [J]. *第二军医大学学报*, 1994, 15(3): 233-235.
- [14] 董国明, 张汉明. 5 种仙茅属植物种子表面显微特征观察 [J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(1): 6-8.
- [15] 李隆云. 仙茅种质资源与质量研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2005.
- [16] 吴远文. 仙茅与伪品的形态组织学及理化鉴别 [J]. *中药材*, 2006, 29(6): 553-554.
- [17] Hsu C C. Preliminary chromosome studies on the vascular plants of Taiwan (I) [J]. *Taiwania*, 1967, 13(1): 117-129.
- [18] Lakshmi N. Cytotaxonomical studies in eight genera of Amaryllidaceae [J]. *Cytologia*, 1980, 45: 663-673.
- [19] 杨永平, 顾志建, 李恒, 等. 仙茅属三个国产种的核型研究 [J]. *云南植物研究*, 1989, 11(3): 350-354.
- [20] Huang H, Dane F, Norton J D. Allozyme diversity in Chinese, Seguin and American chestnut (*Castanea* spp.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 88(8): 981-985.
- [21] Geraci A, Chevre A M, Divaret I, et al. Isozyme analysis of genetic diversity in wild Sicilian populations of *Brassica sect. Brassica* in view of genetic resources management [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2004, 51(2): 137-146.
- [22] Chung M Y, Chung M G. Allozyme diversity and population structure in Korean Populations of *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) [J]. *Journal of Plant Research*, 1999, 112(2): 139-144.
- [23] 廖卉荣, 顾万春, 明军. 紫丁香天然群体的等位酶遗传多样性分析 [J]. *北京林业大学学报*, 2009, 31(5): 84-89.
- [24] 陈国庆, 黄宏文, 葛学军. 濒危植物矮沙冬青的等位酶多样性及居群分化 [J]. *武汉植物学研究*, 2005, 23(2): 131-137.
- [25] 李昌珠, 秦利军, 李培旺, 等. 光皮树优株遗传多样性的等位酶研究 [J]. *中国园艺文摘*, 2010(5): 31-33.
- [26] 李隆云, 陈大霞, 李泉森. 仙茅随机扩增多态性 DNA 反应体系的优化 [J]. *中国药房*, 2011, 22(7): 654-657.
- [27] 李隆云, 陈大霞, 钟国跃, 等. 我国仙茅属植物遗传关系的 RAPD 分析 [J]. *中草药*, 2011, 42(5): 980-984.
- [28] 李隆云, 陈大霞, 钟国跃, 等. 不同产地仙茅遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *中草药*, 2012, 43(5): 967-971.
- [29] 陈大霞, 李隆云, 李泉森, 等. 仙茅属植物 SRAP-PCR 反应体系的优化 [J]. *分子植物育种*, 2007, 5(6): 191-195.
- [30] 李隆云, 陈大霞, 秦松云, 等. 仙茅属植物 7 个国产种的 SRAP 遗传关系研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(2): 117-120.
- [31] 陈大霞, 李隆云, 彭锐, 等. 仙茅属植物 SRAP 产物检测方法的比较 [J]. *重庆中草药研究*, 2007, 56(2): 6-9.

Advances on Genetic Diversity of *Curculigo* Gaertn Germplasm Resources

ZHU Li-fang, HE Gang

(College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004)

Abstract: As an important component of biodiversity, genetic diversity is the foundation of species diversity and ecosystem diversity. Along with the reduction of *Curculigo* Gaertn wild resource and its medicinal and economic value has become increasingly improved, it is necessary to understand its genetic diversity from the perspective of theoretical and practical perspective. This paper reviewed the existing literature on genetic diversity of *Curculigo* Gaertn, specifically, including the aspects of morphology, cytology, biochemistry, as well as molecule. Based on the previous conclusions, some problems need to be further studied were proposed, aiming to supply reference to the further research.

Keywords: *Curculigo* Gaertn; germplasm resources; genetic diversity