

扇脉杓兰和无距虾脊兰的核型分析

钱鑫¹, 连静静¹, 李全健², 刘芬³, 王彩霞¹, 田敏^{1*}

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 中国科学院上海辰山植物园, 上海 201602; 3. 中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 为了解扇脉杓兰(*Cypripedium japonicum* Thunb.)和无距虾脊兰(*Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang)的核型, 采用根尖压片法对扇脉杓兰和无距虾脊兰的染色体数目和核型进行了研究。结果表明, 扇脉杓兰体细胞的染色体数为 22, 核型公式为 $2n = 2x = 22 = 16m + 2sm + 2st + 2t$, 染色体相对长度组成为 $2n = 22 = 2L + 6M_2 + 12M_1 + 2S$, 核不对称系数为 60.01%, 核型分类为 2B 型; 而无距虾脊兰体细胞的染色体数为 40, 核型公式为 $2n = 2x = 40 = 28m + 10sm + 2st$, 染色体相对长度组成为 $2n = 40 = 8L + 10M_2 + 16M_1 + 6S$, 核不对称系数为 59.84%, 核型分类为 2B 型; 两者核型都较为对称。其中, 无距虾脊兰的核型为首次报道。这为扇脉杓兰和无距虾脊兰的进化地位和种质保护提供了细胞学证据。

关键词: 扇脉杓兰; 无距虾脊兰; 染色体; 核型

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.05.004

Karyotype Analysis of *Cypripedium japonicum* Thunb. and *Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang

QIAN Xin¹, LIAN Jing-jing¹, LI Quan-jian², LIU Fen³, WANG Cai-xia¹, TIAN Min^{1*}

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, China; 2. Chenshan Shanghai Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201602, China; 3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The aim was to understand the karyotype of *Cypripedium japonicum* Thunb. and *Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang. Their chromosome number and karyotype were studied by using fingertip squashing method. The results showed that the chromosome number of *Cypripedium japonicum* was $2n = 22$, karyotype formula was $2n = 2x = 22 = 16m + 2sm + 2st + 2t$, constitution of relative length was $2n = 22 = 2L + 6M_2 + 12M_1 + 2S$, asymmetry index was 60.01%, karyotype type was classified as 2B; while the chromosome number of *Calanthe tsoongiana* was $2n = 40$, karyotype formula was $2n = 2x = 40 = 28m + 10sm + 2st$, constitution of relative length was $2n = 40 = 8L + 10M_2 + 16M_1 + 6S$, asymmetry index was 59.84%, karyotype type also belonged to 2B. Both of them have relatively symmetric karyotype. The karyotype of *Calanthe tsoongiana* was reported for the first time. These provided some cytological evidences for evolutionary status and germplasm conservation of *Cypripedium japonicum* and *Calanthe tsoongiana*.

Key words: *Cypripedium japonicum*; *Calanthe tsoongiana*; Chromosome; Karyotype

兰科(Orchidaceae)是被子植物的第二大科, 约有 700 多属 20000 多种, 大多数分布于热带亚热带地区, 其中很多种类具有较高的观赏价值和

经济价值, 是一类重要的植物资源^[1]。扇脉杓兰(*Cypripedium japonicum* Thunb.)(图 1: A)隶属于杓兰亚科(subfam. Cypripedioideae Lindl.)杓兰属, 花

收稿日期: 2012-12-07 接受日期: 2013-04-15

基金项目: 浙江省省院合作林业项目(2012SY02-3)资助

作者简介: 钱鑫, 男, 硕士研究生, 主要从事兰科植物的保护生物学研究。E-mail: qianxin090@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: tmin115@163.com

型奇特,唇瓣艳丽,是一种珍稀的地生兰,主要生长于海拔 1000 ~ 2000 m 的林下、溪谷旁、隐蔽山坡等湿润和腐殖质丰富的土壤上,中国是其主要分布地^[2]。无距虾脊兰(*Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang)(图 1: B),隶属于兰亚科(subfam. Orchidoideae)虾脊兰属,花型似虾,色彩鲜艳,生长于海拔 450 ~ 1450 m 的山坡林下、路边和阴湿岩石上,是中国特有物种^[3]。

染色体的数目和形态是研究植物遗传进化与系统发育的基本信息,但是由于大多数兰科植物生境较为苛刻,难以驯化,兰花种子在自然状态下难以萌发,不易获得可用于核型分析的幼嫩材料;而且兰科植物种类繁多,染色体数目变化较大($2n = 10 \sim 240$),数目普遍偏多,目前已进行核型分析的兰科植物只有不到 10%^[4]。本文以分布于浙江天目山的扇脉杓兰和无距虾脊兰野生植株为研究对象,分析了这两种兰科植物的核型,进一步丰富了兰科植物的细胞学资料,同时也为今后对其系统演化、分类鉴定、资源评价与保护等方面的研究提供必要的参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

扇脉杓兰(*Cypripedium japonicum* Thunb.)与无距虾脊兰(*Calanthe tsoongiana* T. Tang et F. T. Wang)

的根尖材料均采自浙江省临安市境内的天目山国家级自然保护区内的野生植株,两者分布的地理坐标分别为 119° 25' E, 30° 21' N 和 119° 27' E, 30° 19' N, 取材时间为 2012 年 9 月上旬的上午 9 : 00 – 10 : 00 之间。凭证标本 CJ. Li120912 和 CT. Lian120906,存放于中国林业科学研究院亚热带林业研究所植物细胞实验室内。

1.2 染色体制片

剪取扇脉杓兰和无距虾脊兰成熟植株新长出的幼嫩根尖 2 ~ 5 mm,蒸馏水冲洗干净后用对二氯苯- α -溴萘混合液于 4℃ 冰箱中处理 24 h,然后用现配的卡诺固定液(95% 乙醇 : 冰醋酸 = 3 : 1)于 4℃ 冰箱中处理 10 h, 2.5% 的纤维素-果胶混合酶液于室温下处理 30 min,然后用 1 mol L⁻¹ 的盐酸在 60℃ 下解离 10 min,蒸馏水中室温低渗 30 min,用改良的卡宝品红染色压片,镜检并统计染色体的数目,最后选择染色体形态好又分散开的细胞在 Olympus CX41 显微镜下拍照。

1.3 核型分析方法

染色体数目的确定和核型分析按照第一届全国植物染色体学术讨论会上李懋学和陈瑞阳^[5]建议的标准,每个材料各选 5 ~ 10 株,每株选取 3 ~ 5 个染色体分散良好的细胞进行统计,其中 85% 以上的细胞具一致的染色体数即可视为该种植物的染



图 1 扇脉杓兰(A)和无距虾脊兰(B)植株

Fig. 1 *Cypripedium japonicum* (A) and *Calanthe tsoongiana* (B)

染色体数。核型不对称系数按照 Arano^[6]的方法,比值越小越对称。核型分类按照 Stebbins^[7]的标准划分,1A型最对称,4C型最不对称。

2 结果和分析

扇脉杓兰的体细胞染色体数为 $2n = 22$,二倍体,核型公式为 $2n = 2x = 22 = 16m + 2sm + 2st + 2t$,其中端部着丝粒染色体是第11对染色体,占

9.09%,近端部着丝粒染色体为第10对,占9.09%,近中部着丝粒染色体为第9对,占9.09%,其余的都为中部着丝粒染色体,占72.73%,未观察到随体。染色体相对长度系数组成为 $2n = 22 = 2L + 6M_2 + 12M_1 + 2S$ 。核不对称系数为60.01%,臂指数为40,最长染色体与最短染色体的比值为2.03,臂比大于2的染色体百分率为18%,所以核型分类属于对称的2B型。核型参数见表1;染色体核型图与核型模式图见图2。

表1 扇脉杓兰的核型参数

Table 1 Karyotype parameters of *Cypripedium japonicum*

序号 No.	相对长度 Relative length (%)	相对长度系数 Coefficient of relative length	臂比 Arm ratio	着丝点位置 Kinetochore position
1	6.46 + 6.09 = 12.55	1.38 (L)	1.06	m
2	6.29 + 4.99 = 11.28	1.24 (M ₂)	1.26	m
3	6.28 + 4.95 = 11.23	1.24 (M ₂)	1.28	m
4	5.23 + 4.38 = 9.61	1.06 (M ₂)	1.19	m
5	5.17 + 3.77 = 8.94	0.98 (M ₁)	1.37	m
6	4.69 + 3.67 = 8.36	0.92 (M ₁)	1.28	m
7	4.43 + 3.88 = 8.31	0.91 (M ₁)	1.14	m
8	4.88 + 3.32 = 8.20	0.90 (M ₁)	1.47	m
9	4.87 + 2.82 = 7.69	0.85 (M ₁)	1.73	sm
10	6.05 + 1.60 = 7.65	0.84 (M ₁)	3.78	st
11	5.66 + 0.52 = 6.18	0.68 (S)	10.88	t

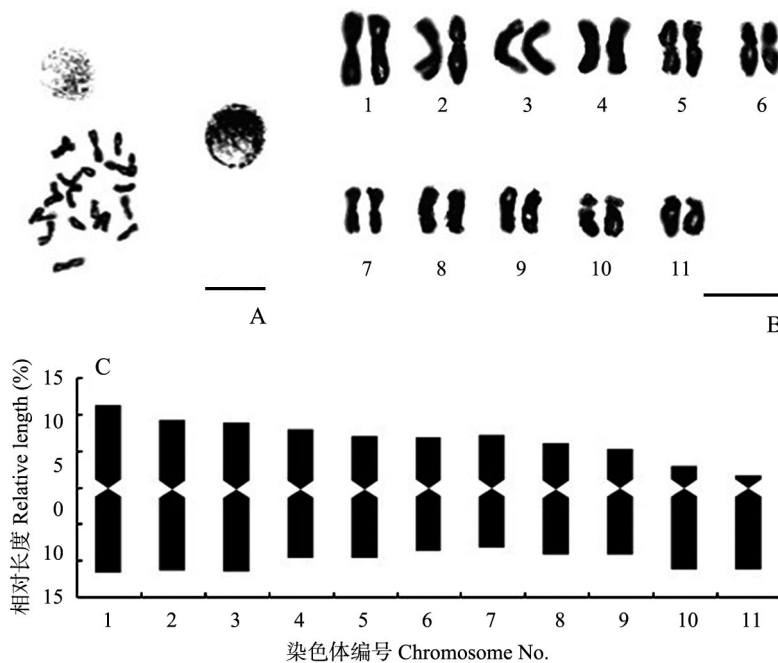


图2 扇脉杓兰的中期染色体(A)、核型图(B)和核型模式图(C)。标尺: A = 20 μ m; B = 10 μ m

Fig. 2 Metaphase chromosome (A), karyogram (B) and ideogram (C) of *Cypripedium japonicum*. Bars: A = 20 μ m; B = 10 μ m

无距虾脊兰的体细胞染色体数为 $2n = 40$ ，二倍体，核型公式为 $2n = 2x = 40 = 28m + 10sm + 2st$ ，主要由中部着丝粒染色体和近中部着丝粒染色体组成，其中近端部着丝粒染色体为第4对，占5%，第1、2、3、15、20对为近中部着丝粒染色体，占25%，其余的都为中心着丝粒染色体，占70%，缺乏端部着丝粒染色体类型，未观察到随体结构。染色体相对长度系数组成为 $2n = 40 = 8L + 10M_2 + 16M_1 + 6S$ ，核不对称系数为59.84%，臂指数为78，最长染色体与最短染色体的比值为2.08，臂比大于2的染色体百分率为15%，所以核型分类属于2B型，较为对称。核型参数见表2；染色体核型图与核型模式图见图3。

3 讨论

3.1 杓兰属种间的染色体数目变化

染色体作为遗传物质的载体，其数目在种内

是相对恒定的。Flelix^[8]通过计算生长于巴西的11属41种地生兰科植物的染色体数，并结合前人的研究结果，得出除了杓兰亚科(Cypripedioideae)和香荚兰亚科(Vanilloideae)之外，其余的多数地生兰的染色体基数是 $x = 7$ 或7的倍数或者在此基础上 ± 1 的结论。本研究结果表明，扇脉杓兰($2n = 22$)与无距虾脊兰($2n = 40$)的染色体数符合这个假说。国外报道的其它杓兰属植物染色体数目大多为 $2n = 20$ ，如紫点杓兰(*Cypripedium guttatum*)、高山杓兰(*C. himalaicum*)、宝岛杓兰(*C. segawai*)、大花杓兰(*C. macranthum*)、欧洲杓兰(*C. pubescens*)、*C. yatabeanum*、*C. fasciculatum*、雅致杓兰(*C. elegans*)和对叶杓兰(*C. debile*)等^[9-11]，其他数目在杓兰属中较为罕见。Hoffmann^[12]和Pace^[13]曾报道皇后杓兰(*C. spectabile*)、*C. candidum*与*C. parviflorum*的染色体数目为 $2n = 22$ ，说明杓兰属的染色体数目大体较为稳定($2n = 20, 22$)。杓兰种间水平的多样性主要是由染色体形态结构多样性引起的。

表2 无距虾脊兰的核型参数

Table 2 Karyotype parameters of *Calanthe tsoongiana*

序号 No.	相对长度 Relative length (%)	相对长度系数 Coefficient of relative length	臂比 Arm ratio	着丝点位置 Kinetochore position
1	4.34 + 2.43 = 6.77	1.35 (L)	1.79	sm
2	4.79 + 1.89 = 6.68	1.34 (L)	2.53	sm
3	4.62 + 1.86 = 6.48	1.30 (L)	2.48	sm
4	3.31 + 3.14 = 6.45	1.29 (L)	1.05	m
5	3.33 + 2.61 = 5.94	1.19 (M ₂)	1.28	m
6	2.82 + 2.50 = 5.32	1.06 (M ₂)	1.13	m
7	3.04 + 2.20 = 5.24	1.05 (M ₂)	1.38	m
8	2.96 + 2.26 = 5.22	1.04 (M ₂)	1.31	m
9	2.65 + 2.56 = 5.21	1.04 (M ₂)	1.04	m
10	2.50 + 2.37 = 4.87	0.97 (M ₁)	1.05	m
11	2.56 + 2.24 = 4.80	0.96 (M ₁)	1.11	m
12	2.49 + 2.21 = 4.70	0.94 (M ₁)	1.14	m
13	2.95 + 1.72 = 4.67	0.93 (M ₁)	1.72	m
14	3.77 + 0.89 = 4.66	0.93 (M ₁)	4.24	st
15	2.96 + 1.61 = 4.57	0.91 (M ₁)	1.84	sm
16	2.48 + 1.88 = 4.36	0.87 (M ₁)	1.32	m
17	2.16 + 1.62 = 3.78	0.76 (M ₁)	1.33	m
18	1.99 + 1.53 = 3.52	0.70 (S)	1.30	m
19	2.02 + 1.48 = 3.50	0.70 (S)	1.36	m
20	2.10 + 1.16 = 3.26	0.65 (S)	1.81	sm

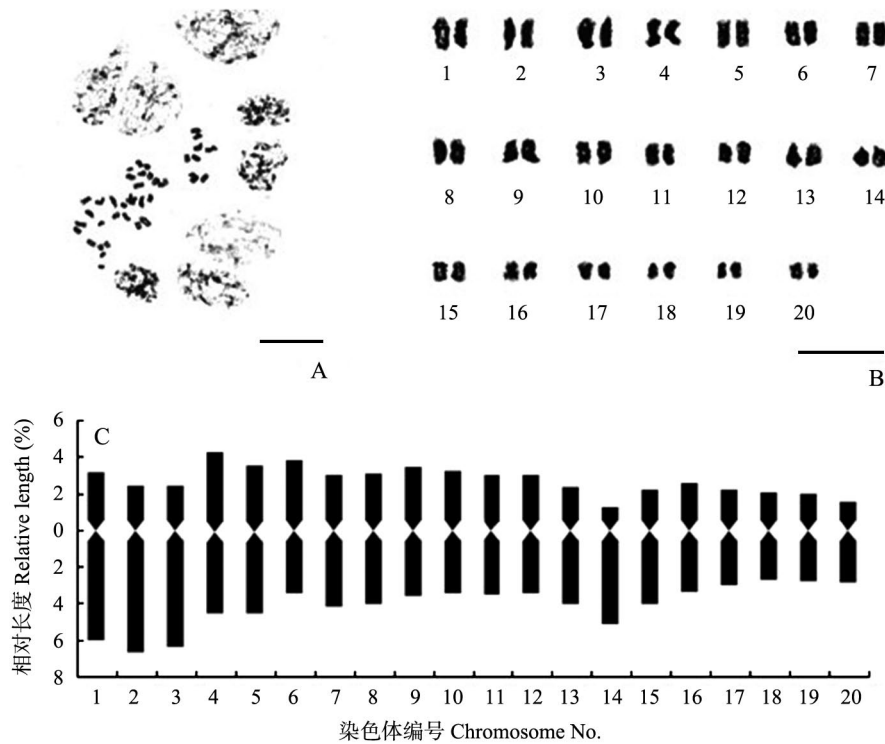


图3 无距虾脊兰的中期染色体(A)、核型图(B)和核型模式图(C)。标尺: A = 20 μm ; B = 10 μm

Fig. 3 Metaphase chromosome (A), karyogram (B) and ideogram (C) of *Calanthe tsoongiana*. Bars: A = 20 μm ; B = 10 μm

3.2 扇脉杓兰居群间染色体数目的变化

Karasawa 和 Hoshi 等^[14-15]曾报道分布于日本的扇脉杓兰染色体数为 $2n = 20$, 与本实验结果并不一致。这种分布于不同地域或不同居群的同一种物种染色体数目发生变化的现象同样存在于同属植物杓兰(*Cypripedium calceolus*)中($2n = 20, 22$)^[16], 另外, 在青甘韭(*Allium przewalskianum*)^[17]、雅江点地梅(*Androsace yargongensis*)^[18]、鱼腥草(*Houttuynia cordata*)^[19]和石蒜(*Lycoris radiata*)^[20]等植物中也有报道。薛春迎等^[17]认为生境的异质性可能是造成不同居群染色体数变异的原因之一, 但其具体机制还不十分明确。

3.3 无距虾脊兰属种间染色体数目变化

目前, 国内对虾脊兰属核型的报道有三褶虾脊兰(*Calanthe triplicata*)^[21] ($2n = 38$)和虾脊兰(*C. discolor*)^[22] ($2n = 40$), 国外对该属植物染色体数目的报道主要有泽泻虾脊兰(*C. alismaefolia*) ($2n = 44$)、二裂虾脊兰(*C. biloba*) ($2n = 38$)、肾唇虾脊兰(*C. brevicorum*) ($2n = 48$)、*C. chloroleuca* ($2n = 56$)、西南虾脊兰(*C. herbacea*) ($2n = 44$)、长距虾脊兰(*C. masuca*) ($2n = 52$)、镰萼虾脊兰(*C. puberula*) ($2n =$

42)、三棱虾脊兰(*C. tricarinata*) ($2n = 42$)、钩距虾脊兰(*C. striata*) ($2n = 40$)以及二列叶虾脊兰(*C. yushuni*) ($2n = 40$)等^[10, 23-24]。可见虾脊兰属种间染色体数目变异范围较大。Cox 等^[9]的研究表明兜兰属植物存在着同样的现象, 并指出这种属内的染色体数目的多样性现象可能是由于染色体在核型进化过程发生了罗伯逊变化(Robertsonian change), 从而导致新染色体的产生。染色体数目进化的趋势主要是由于中部着丝粒型染色体和端部着丝粒型染色体在异染色质集中的着丝粒或靠近着丝粒的不稳定部位发生了染色体断裂或融合, 从而使得染色体数目发生变化, 且一般来说属内染色体数目较多的属于更进化类型。造成染色体这种进化趋势的具体原因目前还不是很清楚, 环境的选择压力可能是重要的原因之一。Cozzolino 等^[25]通过对地中海的一些兰花染色体数目和不对称系数的研究表明, 染色体变化程度较大的种类往往是所处的生境较为恶劣且是孤立的小种群, 可能这种数目的变化造成的基因重组的多样化有利于增加其遗传多样性, 从而提高对生存环境的适应能力。所以推测无距虾脊兰在虾脊兰属中可能属较原始类型, 但还需要发育学和分子生物学等方面的证据进一步验证。

参考文献

- [1] Lang K Y, Chen X Q, Luo Y B, et al. Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 17 [M]. Beijing: Science Press, 1999: 1–8.
郎楷永, 陈心启, 罗毅波, 等. 中国植物志, 第17卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 1–8.
- [2] Ding B Y, Li G Y, Fu C X, et al. Flora of Tianmushan, Volume 4 [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2010: 226–227.
丁炳扬, 李根有, 傅承新, 等. 天目山植物志, 第4卷 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2010: 226–227.
- [3] Chen X Q, Ji Z H, Lang K Y, et al. Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 18 [M]. Beijing: Science Press, 1999: 279–281.
陈心启, 吉占和, 郎楷永, 等. 中国植物志, 第18卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 279–281.
- [4] Daviña J R, Grabile M, Cerutti J C, et al. Chromosome studies in Orchidaceae from Argentina [J]. Genet Mol Biol, 2009, 32(4): 811–821.
- [5] Li M X, Chen R Y. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants [J]. J Wuhan Bot Res, 1985, 3(4): 297–302.
李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题 [J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 297–302.
- [6] Arano H. Cytological studies in subfamily Carduoideae (Compositae) of Japan, IX [J]. Bot Mag Tokyo, 1963, 76: 32–39.
- [7] Stebbins G L. Chromosomal Evolution in Higher Plants [M]. London: Edward Arnold, 1971: 87–89.
- [8] Felix L P, Guerra M. Basic chromosome numbers of terrestrial orchids [J]. Plant Syst Evol, 2005, 254(3/4): 131–148.
- [9] Cox A V, Pridgeon A M, Albert V A, et al. Phylogenetics of the slipper orchids (Cypripedioideae: Orchidaceae): Nuclear rDNA ITS sequences [J]. Plant Syst Evol, 1997, 208(3/4): 197–223.
- [10] Roy S C, Sharma A K. Cytological study of Indian orchids [J]. Proc Natl Inst Sci, 1972, 38(1/2): 72–86.
- [11] Yamasaki N. Karyotypanalyse an Hand des Färbungsmusters der Metaphasechromosomen von *Cypripedium debile* und *Trillium kamschaticum* [J]. Chromosoma, 1971, 33(4): 372–381.
- [12] Hoffmann k. Beiträge zur cytologie der orchidaceen [J]. Planta, 1930, 10(3): 523–595.
- [13] Pace L. Fertilization in *Cypripedium* [J]. Bot Gaz, 1907, 44(5): 353–374.
- [14] Karasawa K, Aoyama M. Karyomorphological studies on *Cypripedium* in Japan and Formosa [J]. Bull Hiroshima Bot Gard, 1986, 31(1): 1–22.
- [15] Hoshi Y, Kondo K, Tanaka R, et al. A comparison of C-banding pattern in nine species of *Cypripedium* (Orchidaceae) [J]. La Kromosomo, 1995, 77(10): 2636–2645.
- [16] Kull T. *Cypripedium calceolus* L. [J]. J Ecol, 1999, 87(5): 913–924.
- [17] Xue C Y, Xu J M, Liu J Q. Karyotypes of nine populations of *Allium przewalskianum* from Qinghai [J]. Acta Bot Yunnan, 2000, 22(2): 148–154.
薛春迎, 许介眉, 刘建全. 青海青甘韭9个居群的核型 [J]. 云南植物研究, 2000, 22(2): 148–154.
- [18] Huang R F. Variation of karyotype and ploidy of *Androsace yargongensis* (Primulaceae) in three population in Q-Z Plateau [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin, 2001, 21(3): 526–531.
黄荣福. 雅江点地梅(报春花科)3个居群的核型和倍性变化 [J]. 西北植物学报, 2001, 21(3): 526–531.
- [19] Yuan Y, Wang L, Wang X J. Comparative analysis on karyotype of different populations of *Houttuynia cordata* Thunb. [J]. Acta Hort Sin, 2008, 35(9): 1377–1383.
袁艺, 王莲, 王小娟. 不同居群鱼腥草的核型比较 [J]. 园艺学报, 2008, 35(9): 1377–1383.
- [20] Zhou S B, Yu B Q, Luo Q, et al. Karyotypes of six populations of *Lycoris radiata* and discovery of the tetraploid [J]. Acta Phytotaxon Sin, 2007, 45(4): 513–522.
周守标, 余本祺, 罗琦, 等. 六个石蒜居群的核型及四倍体石蒜的发现 [J]. 植物分类学报, 2007, 45(4): 513–522.
- [21] Leng Q Y, Mo R. The karyotype analysis of *Calanthe triplicata* [J]. J Trop Subtrop Bot, 2008, 16(2): 165–168.
冷青云, 莫饶. 三褶虾脊兰的核型分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(2): 165–168.
- [22] Chen R Y, Song W Q, Zhang X L, et al. Chromosome Atlas of Major Economic Plants Genome in China, III [M]. Beijing: Science Press, 2003: 538–539.
陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰, 等. 中国主要经济植物基因组染色体图谱, 第3册 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 538–539.
- [23] Terasaka O, Tanaka R. Cytological studies on the nuclear differentiation in microspore division of some angiosperms [J]. Bot Mag Tokyo, 1974, 87(3): 209–217.
- [24] Hsu C C. Preliminary chromosome studies on the vascular plants of Taiwan: IV. Counts and systematic notes on some monocotyledons [J]. Taiwan, 1971, 16(1): 123–136.
- [25] Cozzolino S, D'Eméricoand S, Widmer A. Evidence for reproductive isolate selection in Mediterranean orchids: Karyotype differences compensate for the lack of pollinator specificity [J]. Proc R Soc Lond B, 2004, 271(S5): S259–S262.