

评述与展望

Review and Progress

兰属植物细胞学与分子细胞遗传学研究进展

徐子涵¹ 陈跃² 胡凤荣^{1*}

1 南京林业大学风景园林学院, 南京, 210037; 2 浙江省农业科学院园艺所, 杭州, 310021

* 通信作者, hufengrong2003@sina.com

摘要 兰属(*Cymbidium*)植物作为重要的观赏花卉, 是研究被子植物花器官分化的良好模式类群。目前, 兰属植物的染色体进化研究十分受限, 其物种形成和进化过程尚不清楚, 部分种或变种仍缺乏着丝粒、端粒、核仁组织区等细胞学标记。本研究从常规的细胞学和分子细胞遗传学两个角度对兰属植物染色体的倍数性、核型、染色体行为、荧光原位杂交、表观遗传标记及分子标记等方面进行了综述, 期望为兰属植物的系统研究和杂交育种提供理论参考, 并为细胞学及分类学相关工作的研究提供基础。

关键词 兰属, 细胞学, 染色体, 荧光原位杂交, 分子标记

Research Advances in Cytology and Molecular Cytogenetics of *Cymbidium*

Xu Zihan¹ Chen Yue² Hu Fengrong^{1*}

1 College of Landscape Architecture, Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037; 2 Institute of Horticulture, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, 310021

* Corresponding author, hufengrong2003@sina.com

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0026

Abstract As an important ornamental flower, *Cymbidium* is a good model group for studying the floral organ differentiation of angiosperms. At present, studies on chromosome evolution of *Cymbidium* are very limited, and the process of speciation and evolution is still unclear. Some species or varieties still lack cytological markers such as centromeres, telomeres and nucleolar tissue regions. In view of this, the review summarized the progress in chromosome ploidy, karyotype, chromosome behavior, FISH, epigenetic markers and molecular markers of *Cymbidium* based on the conventional cytology and molecular cytogenetics, hoping to provide theoretical reference for systematic study and cross breeding of *Cymbidium*, and provide basis for cytology and taxonomic research.

Keywords *Cymbidium*, Cytology, Chromosome, FISH, Molecular markers

兰属(*Cymbidium*)隶属兰科(Orchidaceae)树兰族(Trib. Epidendreae), 下设兰亚属(Subgen. *Cymbidium*)、大花亚属(Subgen. *Cyperorchis*)、建兰亚属(Subgen. *Jensoa*) 3 个亚属, 具有极高的观赏价值和深厚的兰花文化(中国科学院中国植物志编辑委员会, 1996)。但兰属植物由于存在自然杂交的缘故, 中间类型颇多, 变异较大, 种的界限不甚明确, 为属内种的分类

和整理带来了极大的困难。

吴应祥在 1991 年第一版的《中国兰花》中, 将中国兰属定为 29 种, 而在该书 1993 年的第二版中则修订为 31 种, 并将这 31 个种划分为 5 个组 2 个亚组(吴应祥, 1993); 陈心启等(1998)认为国内兰属有 29 种和一些变种, 其中 27 种与吴应祥 1993 年第二版的相同。Du 和 Cribb (1988)系统将全属全球共 48

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 7 月 23 日; 接受日期: 2020 年 7 月 27 日; 发表日期: 2020 年 8 月 3 日

引用格式: 徐子涵, 陈跃, 胡凤荣, 2020, 兰属植物细胞学与分子细胞遗传学研究进展, 分子植物育种(网络版), 18(26): 1-8 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0026) (Xu .H., Chen Y., and Hu F.R., 2020, Research advances in cytology and molecular cytogenetics of *Cymbidium*, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(26): 1-8 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0026))

种植物分为 3 个亚属和 14 个组, 后在 2007 年又增加到 52 种(Du et al., 2007), 陈心启在此基础上将国内的 29 种又分为 3 个亚属 11 个组; 1998 年, 黄家平、戴思兰(2003)又用 R 分析对兰属的 37 个种、变种及品种和 37 个形态特征性状进行了数量分类研究, 将其大致分为兜瓣型、竹叶瓣型、多花型、素心瓣型和奇瓣型 5 大类; 后杨冬之等(2007)采用“二元分类法”将叶艺和花艺性状初步确定为国兰品种分类的第一级标准, 花色、花部结构则分别作为第二、三级分类标准。另外, 该属中还有许多新种正在被挖掘, 如刘仲健等于 2000 年发表了一个兰属的新种——福兰(*Cymbidium devonianum*), 并发现该种在全属已知的种类中, 尚难找到其明显的近亲; 2006 年, Liu 等又发现了腋花组的一个新种——丽花兰(*C. concinnum*) (刘仲健等, 2006)。以上分类系统和新种鉴定均根据形态学指标进行判定, 目前为止, 兰属究竟有多少种和变种尚无定论, 在形态学分类上存在分歧, 缺乏一套基于细胞分类学的分类体系。

为阐明兰属种的形成、演化及种间亲缘关系, 不同研究者从各个角度展开了大量的细胞学与分子细胞遗传学研究。本研究从染色体倍性及核型分析、染色体分带、减数分裂行为、荧光原位杂交、表观遗传标记和分子标记等 6 个方面对兰属植物的相关研究进展进行了综述, 以期对兰属植物的系统分类研究及遗传改良提供一定的理论参考。

1 染色体倍性及核型分析

据收集整理的文献资料来看, 兰属植物约有 40~50 种, 其中中国约有 29 种(中国科学院中国植物志编辑委员会, 1996)。它们以染色体基数 10 形成一个二倍体到四倍体的多倍体系列, 其中杂交培育的大花蕙兰(*C. hybridum*)系列存在种内多倍体, 部分种的倍性尚无记载。兰属植物的核型以中部着丝粒染色体(m)最多, 其次分别为近中部(sm)染色体, 极少出现近端(st)和端着丝粒染色体(t), 核型类型以 2B 型居多, 对称性较高。目前国内对于兰属植物染色体核型的分类常采用 Levan 标准(Levan et al, 1964), 国外多采用 Battaglia 标准(Battaglia, 1955), 可看出兰属植物种或变种在分类系统中的位置、种源地分布及其染色体的倍数性、核型公式和核型类型(表 1)。

国内外对于兰属植物染色体倍数性的结果较为一致, 除独占春和杂交种大花蕙兰外均为二倍体; 但核型研究结果存在较大差异, 如 Ning 等(2018)对春兰(*C. goeringii*)种内 5 种不同品种的研究存在很大的

分歧, 1B、2B、2C 型染色体均有出现; 李玉阁等(2003)、冷青云等(2009)和 Sharma 等(2010)对独占春(*C. eburneum*)核型分析的结果也不一致, 推测可能是种源地不同导致类似结果的出现。另外, 通过核型结果及形态差异匹配来看, 兰属植物的细胞学与形态学之间并不存在重要关联, 不同亚属、不同组植物的聚类结果与形态学分类结果并不一致, 甚至与进化关系也相悖(李玉阁等, 2002a; 李玉阁等, 2002b; 王丰妍, 2010; 王丰妍等, 2010; Sharma et al, 2012b; Younis et al, 2013)。目前在其他植物中已有发现, 染色体数目和倍性可能与植物的花期、花径和花色等指标相关(Endo, 1969; 李懋学等, 1983), 本属植物中已开展探究大花蕙兰染色体倍性与花期的关系(Hwang et al, 2016), 后期对于兰属植物宏观形态学及微观细胞学的各类参数仍需继续探究。

近年来, 以兰属中大花的种类为父母亲本, 杂交培育出来的大花蕙兰系列, 具有很高的观赏性及经济价值, 是当今花卉销售平台上最受欢迎的品种之一。大花蕙兰品种大多为二倍体或四倍体, 多花兰(*C. floribundum*)、冬凤兰(*C. dayanum*)和硬叶兰(*C. bicolor*)等均为大花蕙兰的重要亲本。更有研究者将其进行进一步的杂交: 冷青云等(2009)对具有 50%建兰(*C. ensifolium*)、12.5%美花兰(*C. insigne*)和 6.25%独占兰血统的属内品种小金童 (*C. golden Elf* ‘Sundust’) 进行核型分析, 得出其核型公式为 $2n=2x=40=34m+6sm$, 属 2B 型, 且发现该品种在第 17 对染色体短臂有随体; 王丰妍等(2010)将 4 种从韩国引进的大花蕙兰品种与国内栽培的国兰优良品种杂交, 杂交后代中出现二倍体和三倍体, 而二倍体杂交后代虽与亲本的染色体倍性相同, 但在染色体相对长度、平均臂比及不对称系数等指标上都趋于父母本的中间值, 形态具有双亲特点, 因此这 4 个 F1 代杂交种均可鉴定为真杂种。随后又有更多的杂交新品种出现 (朱根发, 2005; Kim et al, 2006a; Kim et al, 2006b; Kim et al, 2007; Kyung et al, 2009; Lee et al, 2015; 李玉萍等, 2015; Hwang et al, 2016; Baek et al, 2019), 尽管关于它们的染色体研究较少, 但仍为兰花新资源的开发做出了一定的贡献。

2 染色体行为、分带及荧光原位杂交

2.1 染色体行为研究

染色体行为是指在细胞分裂时染色体的复制、分裂和移动, 以及在繁殖时同源染色体的交叉互换,

表 1 兰属植物的倍数性、核型及种源分布

Table 1 Ploidy, karyotypes and provenance distribution of *Cymbidium*

亚属	组	种或变种	倍性	核型公式	类型	种源地	参考文献
Subgenus	Section	Species or variety	Ploidy	Karyotypes formula	Type	Provenance	References
兰亚属	硬叶组	纹瓣兰	2x	6V+34L	2B	印度东北部	Sharma et al,
Subgen.	Sect. <i>Cymbidium</i>	<i>C. aloifolium</i>				Northeastern region of India	2012b
<i>Cymbidium</i>		硬叶兰	2x	34m+6sm	2B	海南省	冷青云等, 2009
		<i>C. bicolor</i>				Hainan province	
	多花组	多花兰	2x	36m+4sm	2B	海南省	冷青云等, 2009
	Sect. <i>Floribunda</i>	<i>C. floribundum</i>				Hainan province	
		果香兰	2x	30m+10sm	2B	云南省	李玉阁等, 2003
		<i>C. suavissimum</i>				Yunnan province	
	带叶组	冬凤兰	2x	36m+4sm	2B	海南省	冷青云等, 2009
	Sect. <i>Himantophyllum</i>	<i>C. dayanum</i>				Hainan province	
大花亚属	莎草兰组	莎草兰	2x	28m+8sm+4st	2B	海南省	冷青云等, 2009
Subgen.	Sect. <i>Cyperorchis</i>	<i>C. elegans</i>				Hainan province	
<i>Cyperorchis</i>				4V+36L	2B	印度东北部	Sharma et al,
						Northeastern region of India	2012b
	腋花组	独占春	2x	36m+4sm	2A	云南省	李玉阁等, 2003
	Sect. <i>Eburnea</i>	<i>C. eburneum</i>				Yunnan province	
				32m+8sm	2A	海南省	冷青云等, 2009
						Hainan province	
				4V+34L+2J	2B	印度东北部	Sharma et al, 2010
						Northeastern region of India	
			4x	-	-	韩国	Younis et al, 2013
						Korea	
		大雪兰	2x	4V+32L+4J	2B	印度东北部	Sharma et al, 2010
		<i>C. mastersii</i>				Northeastern region of India	
	大花组	虎头兰	2x	30m+8sm+2st	2A	云南省	李玉阁等, 2003
	Sect. <i>Iridorchis</i>	<i>C. hookerianum</i>				Yunnan province	
				2V+38L	2B	印度东北部	Sharma et al, 2010
						Northeastern region of India	
		美花兰	2x	2m+36m+2sm	1A	海南省	冷青云等, 2009
		<i>C. insigne</i>				Hainan province	
		黄蝉兰	2x	4V+36L	2B	印度东北部	Sharma et al,
		<i>C. iridioides</i>				Northeastern region of India	2012b
		碧玉兰	2x	26m+12sm+2st	2A	云南省	李玉阁等, 2003
		<i>C. lowianum</i>				Yunan province	
				6V+34L		印度东北部	Sharma et al,
						Northeastern region of India	2012b
		西藏虎头兰	2x	8V+30L+2J	2C	印度东北部	Sharma et al,
		<i>C. tracyanum</i>				Northeastern region of India	2012b
		文山红柱兰	2x	28m+10sm+2st	2A	云南省	李玉阁等, 2003
		<i>C. wenshanense</i>				Yunnan province	
	斑舌兰组	斑舌兰	2x	4V+36L	2B	印度东北部	Sharma et al,
	Sect. <i>Parishiella</i>	<i>C. tigrinum</i>				Northeastern region of India	2012b
建兰亚属	兔耳兰组	兔耳兰	2x	28m+8sm+2st	2A	云南省	李玉阁等, 2002a
Subgen. <i>Jensoa</i>	Sect. <i>Geocymbidium</i>	<i>C. lancifolium</i>				Yunnan province	

续表 1

Continuing table 1

亚属	组	种或变种	倍性	核型公式	类型	种源地	参考文献
Subgenus	Section	Species or variety	Ploidy	Karyotypes formula	Type	Provenance	References
建兰亚属	建兰组	莎叶兰	2x	24m+12sm+4st	2B	云南省	李玉阁等, 2002b
Subgen. <i>Jensoa</i>	Sect. <i>Jensoa</i>	<i>C. cyperifolium</i>				Yunnan province	
		建兰	2x	30m+10sm	2B	四川省	李玉阁等, 2002a
		<i>C. ensifolium</i>				Sichuan province	
				38m+2sm	2B	浙江省	Ning et al, 2018
						Zhejiang province	
				32m+8sm	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
		蕙兰	2x	30m+8sm+2st	2B	湖北省	李玉阁等, 2002b
		<i>C. faberi</i>				Hubei province	
				34m+6sm	1B	浙江省	Ning et al, 2018
						Zhejiang province	
				38m+2sm	1B	浙江省	
						Zhejiang province	
				40m	1B	浙江省	
						Zhejiang province	
		送春	2x	26m+10sm+4st	2A	四川省	李玉阁等, 2002b
		<i>C. faberi</i> var. <i>szechuanicum</i>				Sichuan province	
		春兰	2x	24m+10sm+4st+2t	2B	贵州省	李玉阁等, 2002b
		<i>C. goeringii</i>				Guizhou province	
				14m+26sm	2B	浙江省	Ning et al, 2018
						Zhejiang province	
				34m+6sm	2C	浙江省	
						Zhejiang province	
				40m	1B	浙江省	Ning et al, 2018
						Zhejiang province	
				26m+12sm+2st	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
				32m+8sm	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
		春剑	2x	24m+10sm+6st	2B	四川省	李玉阁等, 2002b
		<i>C. goeringii</i> var. <i>longibracteatum</i>				Sichuan province	
				16m+24sm	2B	浙江省	Ning et al, 2018
						Zhejiang province	
		线叶春兰	2x	28m+10sm+2st	2B	湖北省	李玉阁等, 2002b
		<i>C. goeringii</i> var. <i>serratum</i>				Hubei province	
		寒兰	2x	26m+12sm+2st	2B	福建省	李玉阁等, 2002b
		<i>C. kanran</i>				Fujian province	
				34m+6sm	2B	浙江省	Ning et al, 2018
						Zhejiang province	
				38m+2sm	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
				30m+10sm	2C	浙江省	
						Zhejiang province	

续表 1

Continuing table 1

亚属	组	种或变种	倍性	核型公式	类型	种源地	参考文献
Subgenus	Section	Species or variety	Ploidy	Karyotypes formula	Type	Provenance	References
建兰亚属	建兰组	珍珠矮	2x	26m+10sm+4st	2B	云南省	李玉阁等, 2002a
Subgen. <i>Jensoa</i>	Sect. <i>Jensoa</i>	<i>C. nanulum</i>				Yunnan province	
		邱北冬蕙兰	2x	24m+12sm+4st	2B	云南省	李玉阁等, 2002b
		<i>C. qiubeiense</i>				Yunnan province	
		墨兰	2x	28m+10sm+2st	2B	四川省	李玉阁等, 2002a
		<i>C. sinense</i>				Sichuan province	
				36m+4sm	1B	浙江省	Ning et al, 2018
						Zhejiang province	
				40m	1B	浙江省	
						Zhejiang province	
				38m+2sm	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
		莲瓣兰	2x	26m+14sm	2B	浙江省	Ning et al, 2018
		<i>C. tortisepalum</i>				Zhejiang province	
				36m+4sm	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
				32m+8sm	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
				24m+16sm	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
				34m+6sm	1B	浙江省	
						Zhejiang province	
				28m+12sm	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
				34m+6sm	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
未知	-	福兰	2x	2V+38L	2B	印度东北部	Sharma et al, 2012b
		<i>C. devonianum</i>				Northeastern region of India	
	-	马来兰	2x	-	-	韩国	Younis et al, 2013
		<i>C. finlaysonianum</i>				Korea	
其他	-	大花蕙兰	2x	32m+8sm	2B	浙江省	王丰妍, 2010
		<i>C. hybridum</i>				Zhejiang province	
				28m+10sm+2st	2C	韩国	
						Korea	
				30m+10sm	2B	山东省	王丰妍等, 2010
						Shandong province	
				34m+6sm	2B	山东省	
						Shandong province	
			3x	45m+15sm	2B	山东省	
						Shandong province	
				42m+18sm	2B	山东省	
						Shandong province	
			4x	68m+12sm	2B	浙江省	
						Zhejiang province	
				64m+16sm	2B	韩国	王丰妍, 2010
						Korea	

减数分裂等行为。染色体行为异常可能导致非整倍体的形成、染色体的结构变异、细胞病变和花粉育性等存在一定的相关性(Roxas et al., 1995)。目前关于兰属植物染色体行为的研究尚不完善,仅见于 Sharma 等(2012a)报道的 3 种兰属植物花药绒毡层的核内有丝分裂。实验结果表明,它们的有丝分裂受到抑制,核膜没有消失,但中期染色体比正常有丝分裂时更为浓缩,核仁在整个核内分裂周期中持续存在。同时,研究者还认为 45S rRNA 基因在核内有丝分裂过程中的物理定位可能会有助于确认其非典型活性,便于深入了解绒毡层的多倍体化过程和程度,同时,对 DNA 甲基化水平的分析也有助于理解在核内分裂过程中核仁在纺锤体形成中的作用 (Sharma et al., 2012a)。

2.2 染色体分带及其他细胞学标记

尽管目前已有众多关于兰属植物染色体核型的报道,但几乎相同的染色体数目($2n=40$)和极小的染色体形态差异阻碍了物种之间明确的区分。如今,新型的细胞和分子遗传学技术能够精确的对染色体进行定位和标记,以比较不同物种间的种系发育关系(Heslop-Harrison, 2000),利用这些技术进行染色体分析已成必然,基于荧光原位杂交技术的染色体进化研究是解析兰花亲缘关系建成的一项有力工具。

兰属植物的核 DNA 在单子叶植物中是独一无二的,在中性 CsCl 密度梯度中显示出一个富含 AT 的卫星,原位杂交和 AT 特异性荧光染料显示染色中心有许多不同类型的异染色质区域 (Nagl, 1977); 2012 年,Sharma 等(2012c)利用 FISH(fluorescence in situ hybridization)技术,以 pTa71 45S rRNA 作探针来自印度东北部的 8 个兰属不同物种中的 45S 位点进行了定位,除纹瓣兰(*C. aloifolium*)和斑舌兰(*C. tigrinum*)各有 4 对和 5 对 45S rDNA 信号以外,其他 6 种植物仅存在 1 对信号;且所分析植物中仅有 1 对染色体存在 NOR 位点,且可能具有转录活性。另外,Sharma 和 Mukai (2015)指出双修饰 anti-H3S10phK-14ac 组蛋白和 H3S10ph 标记了兰科植物染色体着丝粒周围的染色质,而组蛋白 H3T3ph 苏氨酸磷酸化在有丝分裂和减数分裂期间标记了整个染色体臂:在花粉有丝分裂 I 期发生动态“减数-有丝分裂转移”时,组蛋白修饰染色体的分布以及由此产生的营养细胞和生殖细胞也揭示了磷酸化在兰花小孢子发生过程中的作用。

关于染色体分带技术的研究仅见于 Schwarz-

acher 等(1980)对兰属两个品种进行的初步测试,结果表明 Giemsa C- 带适合兰花,能够观察到较清晰的带型。而以位于核仁组织区的 45D rDNA 为探针进行荧光原位杂交时,杂交信号数相当于基因组里附随体的染色体数,并且,每个染色体组平均杂交信号出现的频率越高表明该种越原始 (Abdel and Kondo, 2003),相比而言,染色体分带技术如 CMA 荧光分带虽也能展现核仁组织区的信息,但条带数常比 FISH 中 45S rDNA 的杂交信号数少,且准确性也较低,由此推测后续研究仍将以荧光原位杂交及其他分子细胞遗传标记技术作为重点。

3 基于分子标记的遗传多样性研究

植物的形态特征往往受到生长环境和发育阶段的限制,染色体等细胞学研究也会受测量误差等影响,而现如今出现的分子标记技术,是以遗传物质为依据,从物种基因组 DNA 水平直接反应种间和种内的差异,为分类鉴定提供了高效、准确且清晰的方法(朱根发和郭振飞, 2004; 黄龙花等, 2011; 蹇黎, 2011; 魏霜等, 2014)。兰属植物在育种中运用的简单重复序列间扩增技术(inter-simple sequence repeat, ISSR)、随机扩增多态性 DNA 技术(random amplified polymorphic DNA, RAPD) 和相关序列扩增多态性技术(sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 等,对研究兰属植物的遗传多样性和亲缘关系,及对合理保护其种质资源、探讨遗传关系和培育新品种具有重要意义。

多个研究者的分析结果均显示,兰属植物的种质资源多样性十分丰富。高丽和杨波(2006)对湖北省的 11 个春兰野生居群内的 325 个体用 ISSR 分子标记进行遗传多样性水平的研究,11 对引物共检测到 127 个位点,表明春兰的遗传变异程度远高于其他兰科植物;同时,春兰虽自交亲和,但异交仍是其自然界繁育系统中的主要遗传模式,为追求稳定遗传,该研究组又对来自叶艺春兰同一母株并经多次无性繁殖获得的组培苗,采用 ISSR 分子标记技术进行基因组 DNA 分析,结果表明,组培苗在多次继代培养的过程中,遗传物质稳定,顺利保留母株的特性(高丽和杨波, 2006)。Huang 等(2010)利用 13 对简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)引物对春兰、蕙兰和建兰等 6 个种 103 个品种的遗传多样性和亲缘关系作 EST-SSR 分析,13 对 SSR 引物共产生了 168 条多态性条带,平均每条引物 6-24 个条带不等,也清晰的显示兰属种内及种间品种的多样性。

大部分分子标记技术的使用是通过遗传多样性分析将兰属植物重新归类或进行分类鉴定,如王晓英和王长宪(2014)利用 AFLP 技术将同种的品种聚在一起;高岭等(2013)采用 SCoT 对兰属 14 个种的 24 个样品进行划分,最终根据遗传距离将春兰、建兰、蕙兰、莲瓣兰聚为 A 类,墨兰、寒兰聚为 B 类,春剑为 C 类,兔耳兰为 D 类,多花兰、文山红柱兰、虎头兰等为 E 类,其中 A、B、C 在在传统分类学中均属建兰组, D 类为兔耳兰组, E 类除多花兰外均属大花组;季祥彪等(2008)采用 272 个 RAPD 标记发现贵州的 12 种兰属植物中,莲瓣兰(*C. lianpan*)及春剑与菅草兰(*C. tortisepalum*)高度同源,认为二者应为菅草兰的变种,现今分类学系统已将菅草兰合并到莲瓣兰中;吴振兴等(2008)也对兰属植物进行 ISSR 分析,表明 16 种植物中春兰和春剑亲缘关系最近,而与兔耳兰等其他兰属植物的亲缘较远。由此可见,分子标记聚类结果与形态学分类结果基本一致,并可作为一种更为细致的分类手段,从基因的水平对经典分类学进行适当的斧正。

不同种源地物种的亲缘关系分析也是分子标记的研究目的之一,Wang 等(2009)通过 ISSR 遗传多样性研究将栽培春兰的 50 个品种分为两组——中国组和日本组,为春兰栽培品种种源分布及亲缘关系的确立提供了依据;白坚等(2012)采用 SRAP 技术对采自四川、台湾、广东的 47 个建兰品种进行分析,结果表明不同来源的建兰品种间遗传背景混乱,推测是因人工驯化导致这种现象的出现。分子标记技术还为兰属植物的分类及遗传多样性研究提供了一定的理论支撑。李丽辉等(2018)利用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术,对 7 种国兰的 21 个品种资源进行遗传多样性和亲缘关系分析,同样发现同种内亲缘关系更为相近;李璐滨等(2008)则从兰属植物菌根的多样性入手,利用 AFLP 技术分析、聚类显示,兰花的地理分布、所属种和生态类型是影响菌根真菌多样性与兰花专一性的关键因素。分子标记技术同时也可用于植物的后代鉴定,最近,袁媛等(2020)采用 SRAP 技术开辟了较可靠、联合鉴别建兰的 3 种引物——Me8-Em4、Me11-Em2 和 Me12-Em11,可用于建兰及其他兰属植物种质资源的鉴定。

此外,兰属植物基因组信息的缺乏会导致其分子标记的开发受限,为弥补这一缺陷,李小白等(2014)基于建兰的转录组测序数据进行 SSR 搜索,最终扩增出了 61 对引物,并在其中筛选出了 39 对有多态性的引物,这些引物还分别涉及 GO、KOG 和 KE-

GG 等途径的注释,并具有一定的通用性,为整个兰属的亲缘关系及群体结构分析提供了有力的支持。

4 展望

综合来看,从染色体的倍性、核型、荧光原位杂交与最初的形态学分类结果关系不明显,而基于分子标记的遗传多样性分析则与传统分类基本吻合,部分种内亲缘关系还受到不同种源地等地理区位等方面的影响。目前国内对于兰属植物细胞学及分子细胞遗传学的研究进展虽相对国外研究较多,但总体研究仍不够全面,关于染色体的带型、染色体行为和荧光原位杂交技术几无报道,部分种、变种及种内的经典观赏品种也尚未研究到细胞方面。

分类学研究普遍认为,高等植物核型进化的基本趋势是从对称向不对称的方向发展的,以上结果显示,兰属植物主要是由中部着丝粒染色体(m)构成,核型多为 2B 型,即染色体大多是较对称的,在植物的系统演化进程中应当是处于相对较原始的状态。但是,从形态学性状来看,兰属植物的唇瓣、合蕊柱等高度特化器官的存在,使之被认为是被子植物中高级进化的种类。综合上述两个方面来看,兰属植物的细胞学和形态学进化方式与其他高等植物进化的方向存在一定的相悖性,由此可见,兰属乃至兰科整体的遗传进化研究及物种形成方面仍旧面临着极大的挑战。

作者贡献

徐子涵是本综述初稿写作的执行人;陈跃和胡凤荣是本研究章的构思者及负责人。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金青年基金(31801891)和江苏高校品牌专业建设工程(PPZY2015A063)共同资助。

参考文献

- Abdel-Twab M.H., and Kondo K., 2003, Physical mapping of 45S rDNA loci by fluorescent in situ hybridization and evolution among polyploid *Dendranthema* species, *Chromosome Science*, 7(3): 71-76
- Baek Y.S., Ramya M, An H.R., Park P.M., Lee S.Y., Baek N.I., and Park P.H., 2019, Volatiles profile of the floral organs of a new hybrid *Cymbidium*, 'Sunny Bell' using headspace

- solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry analysis, *Plants*, 8(8): 251
- Bai J., Hu X., Zhou S.T., and Wang H.Z., 2012, Genetic diversity of 47 *Cymbidium ensifolium* varieties assessed by SRAP markers, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 13 (3): 376-380 (白坚, 胡旭, 周淑婷, 王慧中, 2012, 47 个建兰品种的 SRAP 遗传多样性分析, *植物遗传资源学报*, 13(3): 376-380)
- Battaglia E., 1955, Chromosome Morphology and Terminology: (with 12 figures), *Caryologia*, 8(1): 179-187
- Carpener M., 2001, *Cymbidium*, orchid plant named 'Everglades Gold', United States Patent, US12077P
- Chen X.Q., and Ji Z.H., eds., 1998, Chinese orchid book, China Forestry Press, Beijing, China, pp.72 (陈心启, 吉占和, 编著, 1998, 中国兰花全书, 中国林业出版社, 中国, 北京, pp.72)
- Du P.D., and Cribb P.J., eds., 1988, The Genus *Cymbidium*, Timber Press, Portland, pp.1-20
- Du P.D., Cribb P., and Tibbs M., 2007, The Genus *Cymbidium*, Royal Botanic Gardens, London, pp.1-13
- Editorial Committee of flora of China, Chinese Academy of Sciences, eds., 1996, Flora of China, Science Press, Beijing, China, pp.191 (中国科学院中国植物志编辑委员会, 编著, 1996, 中国植物志, 科学出版社, 中国, 北京, pp.191)
- Endo N., 1969, The chromosome survey on the cultivated chrysanthemums, *Chrysanthemum morifolium* Ram, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 38(3): 267-274
- Gao L., Feng S.G., He R.F., Zhao M.Y., and Wang H.Z., 2013, Application of SCoT molecular marker in genetic diversity of *Cymbidium*, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticultural Sinica)*, 40 (10): 2026-2032 (高岭, 冯尚国, 何仁锋, 赵妙玉, 王慧中, 2013, 兰属植物目标起始密码子(SCoT)遗传多样性分析, *园艺学报*, 40(10): 2026-2032)
- Gao L., and Yang B., 2006a, Establishment of ISSR-PCR reaction system in *Cymbidium goeringii*, *Huazhong Nongye Daxue Xuebao (Journal of Huazhong Agricultural University)*, 25(3): 305-309 (高丽, 杨波, 2006a, 春兰 ISSR-PCR 反应体系的优化, *华中农业大学学报*, 25(3): 305-309)
- Gao L., and Yang B., 2006b, Genetic diversity of wild *Cymbidium goeringii* (Orchidaceae) populations from Hubei based on ISSR analysis, *Shengwu Duoyangxing (Biodiversity Science)*, 14(3): 250-257 (高丽, 杨波, 2006b, 湖北野生春兰资源遗传多样性的 ISSR 分析, *生物多样性*, 14(3): 250-257)
- Heslop-Harrison J.S., 2000, Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes, *The Plant Cell*, 12(5): 617-635
- Huang L.H., Wu Q.P., Yang X.B., and Hu H.P., 2011, Research advance on DNA molecular markers based on specific primer PCR, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, (2): 61-65 (黄龙花, 吴清平, 杨小兵, 胡惠萍, 2011, 基于特定引物 PCR 的 DNA 分子标记技术研究进展, *生物技术通报*, (2): 61-65)
- Huang J.P., and Dai S.L., 1998, The numerical taxonomy of Chinese *Cymbidium*, *Beijing Linye Daxue Xuebao (Journal of Beijing Forestry University)*, 20(2): 42-47 (黄家平, 戴思兰, 2003, 中国兰花品种数量分类初探, *北京林业大学学报*, 20(2): 42-47)
- Hwang S.H., Kim M.S., Park P.H., and Park S.Y., 2016, Scent analysis using an electronic nose and flowering period of potted diploid and tetraploid *Cymbidium*, *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 34(1): 163-171
- Huang Y., Li F., and Chen K., 2010, Analysis of diversity and relationships among Chinese orchid cultivars using EST-SSR markers, *Biochemical Systematics & Ecology*, 38(1): 93-102
- Jian L., 2011, The application of ISSR and SRAP technique in *Cymbidium* plants resources research, *Beifang Yuanyi (Northern Horticulture)*, (23): 190-192 (蹇黎, 2011, ISSR 和 SRAP 标记技术在兰花植物种质资源研究中的应用, *北方园艺*, (23): 190-192)
- Ji X.B., Wang G.D., Kang J.C., Qiao G., and Wen X.P., 2008, Comparative study of RAPD and morphological approaches to characterize the genetic relationships of the twelve species of *Cymbidium* in Guizhou, *Zhongzi (Seed)*, 27(2): 56-60 (季祥彪, 王国鼎, 康继川, 乔光, 文晓鹏, 2008, 贵州 12 种兰属植物资源形态学和 RAPD 标记的比较分析, *种子*, 27(2): 56-60)
- Kang K.W., Park K.S., Mo S.Y., Kim D., and Kang S.Y., 2009, A New *Cymbidium* Orchid Variety "Daegook" bred by In Vitro Mutagenesis, *Korean Journal of Breeding Science*, 41 (4): 510-514
- Kim M.S., Lee D.W., Lee Y.R., Kim J.Y., and Jeong M.I., 2006a, A new *Cymbidium hybrid*, "Bright Lemon" with yellow petals and fragrance, *Korean Journal of Breeding Science*, 38(3): 207-208
- Kim M.S., Lee Y.R., Kim J.Y., Song J., and Jeong M.I., 2006b, A new *Cymbidium hybrid*, "Beauty Princess" with red purple petals and medium plant size, *Korean Journal of Breeding Science*, 38(3): 205-206
- Kim M.S., Lee Y.R., Jeong M.I., Kim J.Y., and Song J.S., 2007, A new *Cymbidium hybrid* "Bright Evening" with brownish yellow petals, *Korean Journal of Breeding Science*, 39(3): 389-390
- Lee J.H., Kwon S.W., Park S.Y., and Kim D.Y., 2015, Development of new variety with multiple fragrance flowers in a peduncle and marginal stripe patterns in *Cymbidium goeringii* 'Julie', *Korean Journal of Breeding Science*, 47 (4): 459-463
- Leng Q.Y., Mo R., Peng B., Huang M.Z., Luo Y.H., and Wang J.

- B., 2009, A karyological study of six species of *Cymbidium*, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 36(2): 291-296 (冷青云, 莫饶, 彭彬, 黄明忠, 罗远华, 王家保, 2009, 六种兰属植物的核型分析, *园艺学报*, 36(2): 291-296)
- Levan A., Fredga K., and Sandberg A.A., 1964, Nomenclature for centromeric position on chromosomes, *Hereditas*, 52(2): 201-220
- Li L.B., Hu T., Yang K., Tang Z., Zhuang C.Y., Liu Z.J., and Peng Z.H., 2008, AFLP diversity in the mycorrhizal fungi of *Cymbidium* plants, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 13(1): 81-86 (李瀚滨, 胡陶, 杨凯, 唐征, 庄彩云, 刘振静, 彭镇华, 2008, 中国兰属植物菌根真菌的 AFLP 多样性分析, *园艺学报*, 13(1): 81-86)
- Li L.H., Hu Y., Li H.G., Zhang Y.L., Zhang Y., and Wu H.Y., 2018, Study on genetic diversity of China orchid resources using RAPD and ISSR markers, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 34(29): 42-47 (李丽辉, 胡瑶, 李宏告, 张跃龙, 张勇, 吴宏燕, 2018, 基于 RAPD、ISSR 标记的国兰种质资源遗传多样性研究, *中国农学通报*, 34(29): 42-47)
- Li M.X., Zhang X.F., and Chen J.Y., 1983, Cytological studies on some wild dendranthema species and chrysanthemum cultivars, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 10(3): 199-205 (李懋学, 张敦方, 陈俊愉, 1983, 我国某些野生和栽培菊花的细胞学研究, *园艺学报*, 10(3): 199-205)
- Li X.B., Jin F., Jin L., and Ma G.Y., 2014, Exploring genic-SSR markers from transcriptomic database in *Cymbidium ensifolium*, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 22(8): 1046-1056 (李小白, 金凤, 金亮, 马广莹, 2014, 利用建兰转录数据开发 genic-SSR 标记, *农业生物技术学报*, 22(8): 1046-1056)
- Li Y.G., Guo W.H., and Wu B.J., 2002a, Studies on karyotypes of four species of *Cymbidium* in China, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 22 (6): 1438-1444 (李玉阁, 郭卫红, 吴伯骥, 2002a, 4 种国产兰属植物的核型比较研究, *西北植物学报*, 22(6): 1438-1444)
- Li Y.G., Guo W.H., and Wu B.J., 2002b, A karyological study of seven species and one variety of *Cymbidium* from China, *Zhiwu Fenlei Xuebao (Acta Phytotaxonomica Sinica)*, 40 (5): 406-413 (李玉阁, 郭卫红, 吴伯骥, 2002b, 国产七种和一变种兰属植物的核型研究, *植物分类学报*, 40(5): 406-413)
- Li Y.G., Guo W.H., and Wu B.J., 2003, A karyological study of six Chinese species of *Cymbidium*, *Yunnan Zhiwu Yanjiu (Acta Botanica Yunnanica)*, 25(1): 83-89 (李玉阁, 郭卫红, 吴伯骥, 2003, 六种国产兰属植物的核型研究, *云南植物研究*, 25(1): 83-89)
- Li Y.P., Luo F.X., Tang G.G., and Wang Y.Q., 2015, The cross incompatibilities in *Cymbidium* and the cultivation of hybrid embryo in vitro, *Linye Keji Kaifa (Journal of China Forestry Science and Technology)*, 29(5), 14-17 (李玉萍, 罗凤霞, 汤庚国, 王燕青, 2015, 兰属植物杂交亲和性及杂交胚培养研究, *林业科技开发*, 29(5), 14-17)
- Liu Z.J., and Chen X.Q., 2000, *Cymbidium rigidum* sp. nov., a new orchid from Yunnan, China, *Zhiwu Fenlei Xuebao (Acta Phytotaxonomica Sinica)*, 38(6): 570-572 (刘仲健, 陈心启, 2000, 福兰, 中国云南兰科一新种, *植物分类学报*, 38(6), 570-572)
- Liu Z.J., Chen X.Q., and Ru Z.Z., 2006, Notes on some taxa of *Cymbidium* sect. *Eburnea*, *Zhiwu Fenlei Xuebao (Acta Phytotaxonomica Sinica)*, 44(2): 178-183 (刘仲健, 陈心启, 茹正忠, 2006, 兰属腋花组若干种类的研究(英文), *植物分类学报*, 44(2): 178-183)
- Ning H.J., Ao S.Y., Fan Y.R., Fu J.X., and Xu C.M., 2018, Correlation analysis between the karyotypes and phenotypic traits of Chinese cymbidium cultivars, *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 59(1): 93-103
- Nagl W., 1977, Localization of amplified DNA in nuclei of the orchid *Cymbidium* by in situ hybridization, *Experientia*, 33 (8): 1040-1041
- Roxas N.J.L., Tashiro Y., and Miyazaki S., 1995, Meiosis and pollen fertility in Higo chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitam.), *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 64(1): 161-168
- Schwarzacher T., Ambros P., and Schweizer D., 1980, Application of Giemsa banding to orchid karyotype analysis, *Plant Systematics and Evolution*, 134(3): 293-297
- Sharma S.K., Kumaria S., Tandon P., and Rao S.R., 2012a, Endomitosis in tapetal cells of some *Cymbidiums* (Orchidaceae), *The Nucleus*, 55(1): 21-25
- Sharma S.K., Kumaria S., Tandon P., and Satyawada R.R., 2012b, Comparative karyomorphological study of some Indian *Cymbidium* Swartz, 1799 (Cymbideae, Orchidaceae), *Comparative Cytogenetics*, 6(4): 453
- Sharma S.K., Mehra P., Kumari J., Kumar S., Kumaria S., Tandon P.R., and Satyawada R., 2012c, Physical localization and probable transcriptional activity of 18S-5.8 S-26S rRNA gene loci in some Asiatic *Cymbidiums* (Orchidaceae) from north-east India, *Gene*, 499(2): 362-366
- Sharma S.K., and Mukai Y., 2015, Chromosome research in orchids: current status and future prospects with special emphasis from molecular and epigenetic perspective, *The Nucleus*, 58(3): 173-184
- Sharma S.K., Rajkumari K., Kumaria S., Tandon P., and Rao S.R., 2010, Karyo-morphological characterization of natural genetic variation in some threatened *Cymbidium* species of Northeast India, *Caryologia*, 63(1): 99-105
- Wang F.Y., 2010, Study on tissue culture and karyotype of sever-

- al orchid filial generation in *Cymbidium*, Thesis of M.S., Forestry College, Shandong Agricultural University, Supervisor: Wang C.X., pp.47-60 (王丰妍, 2010, 兰属中几种兰花杂交后代组培与核型研究, 硕士学位论文, 山东农业大学林学院, 导师: 王长宪, pp.47-60)
- Wang F.Y., Wang C.X., Li C.X., Zhang D.X., Pan Y.P., and Wang Z.H., 2010, Study on karyotype analysis of four species of hybrid F1 generation between *Cymbidium hybridum* and Chinese *Cymbidium*, *Zhongguo Nongxue Tongbao* (Chinese Agricultural Science Bulletin), 26 (19): 234-238 (王丰妍, 王长宪, 李承秀, 张东旭, 潘银萍, 王郑浩, 2010, 4 种大花蕙兰与国兰杂交 F1 代核型分析, 中国农学通报, 26(19): 234-238)
- Wang H.Z., Wu Z.X., Lu J.J., Shi N.N., Zhao Y., Zhang Z.T., and Liu J.J., 2009, Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, *Genetica*, 136(3): 391-399
- Wang X.Y., and Wang C.X., 2014, Genetic diversity analysis of *Cybidium* cultivars by AFLP molecular markers, *Nongxue Xuebao* (Journal of Agriculture), 4(10): 69-72 (王晓英, 王长宪, 2014, 兰属品种间遗传多样性的 AFLP 分析, 农学报, 4(10): 69-72)
- Wei S., Yuan J.J., Chen W.J., Lin L.P., Li X.J., Yin J.P., Huang J.Y., Liu B.L., and Liu X.Y., 2014, Research Advances in Molecular Markers of Orchids, *Jianyan Jianyi Xuekan* (Journal of Inspection and Quarantine), 24(2): 73-76 (魏霜, 袁俊杰, 程文杰, 林利平, 李小健, 鄞杰平, 黄锦炎, 刘碧琳, 刘晓莹, 2014, 兰花的分子标记研究进展, 检验检疫学刊, 24 (2): 73-76)
- Wu Y.X., eds., 1993, Chinese orchids, 2, China Forestry Press, Beijing, China, pp.5 (吴应祥, 编著, 1993, 中国兰花, 第二版, 中国林业出版社, 中国, 北京, pp.5)
- Wu Z.X., Wang H.Z., Shi N.N., and Zhao Y., 2008, The genetic diversity of *Cymbidium* by ISSR, *Yichuan* (Hereditas), 30 (5): 627-632 (吴振兴, 王慧中, 施农农, 赵艳, 2008, 兰属 *Cymbidium* 植物 ISSR 遗传多样性分析, 遗传, 30(5): 627-732)
- Yang D.Z., Liu H.J., Luo Y.B., Geng P.P., Guo C.R., and Zhou B., 2007, Study on cultivar classification of Chinese *Cymbidiums*, *Anhui Nongye Xuebao* (Journal of Anhui Agricultural Science), 35 (29): 9242-9245 (杨冬之, 刘海娟, 罗毅波, 耿盼盼, 郭彩茹, 周波, 2007, 国兰品种分类研究, 安徽农业科学, 35(29): 9242-9245)
- Younis A., Ryu K.B., Co V.T., Hwang Y.J., Jee S.O., Kim M.S., Kim C.K., and Lim K.B., 2013, Analysis of chromosomes and nuclear DNA content in nine genotypes of *Cymbidium*, *Flower Research Journal*, 21(4): 158-161
- Yuan Y., Cao B., Zhang Y.Q., Chen Q.X., and Chen N.C., 2020, Genetic diversity analysis of *Cymbidium* germplasms based on SRAP markers, *Redai Zuowu Xuebao* (Chinese Journal of Tropical Crops), 41(5): 929-938 (袁媛, 曹彬, 张咏琪, 陈清西, 陈南川, 2020, 基于 SRAP 标记的国兰种质资源遗传多样性分析, 热带作物学报, 41(5): 929-938)
- Zhu G.F., 2005, Progress on international cross breeding of *Cymbidium*, *Guangdong Nongye Kexue* (Guangdong Agricultural Sciences), (4): 25-27 (朱根发, 2005, 国际兰属植物杂交育种进展, 广东农业科学, (4): 25-27)
- Zhu G.F., and Guo Z.F., 2004, Progress on molecular biology of main ornamental Orchidaceae, *Zhiwuxue Tongbao* (Chinese Bulletin of Botany), 21(4): 471-477 (朱根发, 郭振飞, 2004, 重要观赏兰科植物的分子生物学研究进展, 植物学通报, 21(4): 471-477)