

极小种群植物距瓣尾囊草的核型 及 5S rDNA-FISH 分析

张 瑜¹, 刘华华¹, 郭燕玲¹, 何昌杰¹, 党江波³, 龙治坚¹, 陈 志²

(¹西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010; ²成都理工大学信息科学与技术学院, 成都 610059;

³西南大学园艺园林学院, 重庆 400715)

摘要: 采用改良的去壁低渗火焰干燥法制片, 对距瓣尾囊草 (*Urophysa rockii* Ulbr.) 的染色体数目和核型进行分析; 并以 5S rDNA 为探针, 利用荧光原位杂交技术对 5S rDNA 位点进行定位。结果表明, 距瓣尾囊草的染色体总数为 14 条, 染色体基数为 7, 倍性为二倍体; 该植物的染色体相对长度组成为 $2n=14=2L+2M2+10M1$; 染色体核型公式为 $2n=2x=14m$, 无随体, 着丝粒平均指数为 44.09, 核型不对称系数为 55.91, 染色体核型属于“1A”型, 在系统进化上处于比较原始的状态; 同时, 具有 2 个 5S rDNA 位点, 且位于一对同源染色体 (1 号染色体) 长臂的近着丝粒位置, 由此可见 5S rDNA 可以作为该植物染色体识别的有效标记。综上所述, 本研究解析了该植物的系统学和细胞学特征。

关键词: 距瓣尾囊草; 染色体; 核型; 5S rDNA-FISH; 系统进化

Karyotype and 5S rDNA-FISH Analysis of an Extremely Small Population *Urophysa rockii* Ulbr.

ZHANG Yu¹, LIU Hua-hua¹, GUO Yan-ling¹, HE Chang-jie¹, DANG Jiang-bo³, LONG Zhi-jian¹, CHEN Zhi²

(¹College of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang Sichuan 621010;

²College of Information Science & Technology, Chengdu University of Technology, Chengdu 610059;

³College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract: In this study the modified wall degradation hypotonic method was used for unlocking the chromosome number and the karyotype of *Urophysa rockii* Ulbr., a plant species of which is distributed in an extremely restricted area. The 5S rDNA sites on chromosomes were also analyzed of *Urophysa rockii* Ulbr. via fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The results indicated that *Urophysa rockii* Ulbr. is a diploid species with 14 chromosomes ($n=7$). The relative length of chromosomes was $2n=14=2L+2M2+10M1$, and no satellite chromosome was detected with the karyotype formula. The average centromere index and karyotype asymmetry coefficient were 44.09 and 55.91, respectively. The karyotype belonged to 1A type, suggesting that phylogenetic evolution is relatively primitive. Furthermore, two 5S rDNA sites were detected close to the centromere of the long arm of chromosome 1. Taken together, these results may provide shed-light on systematology and cytology of *Urophysa rockii* Ulbr.

Key words: *Urophysa rockii* Ulbr.; chromosome; karyotype; 5S rDNA-FISH; phylogenetic sequence

收稿日期: 2019-01-28 修回日期: 2019-03-15 网络出版日期: 2019-04-11

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190128004>

第一作者研究方向为园林植物与观赏园艺, E-mail: vividz2010@126.com

通信作者: 龙治坚, 研究方向为植物分子细胞遗传, E-mail: long20053182@126.com

陈志, 研究方向为果树资源与遗传育种, E-mail: 996194852@qq.com

基金项目: 四川省教育厅项目 (18ZB0081); 国家自然科学基金项目 (31500498); “三区”人才支持计划项目 (18zd315301); 四川省大学生创新创业训练计划资助项目 (S201910619107, S201910619022)

Foundation project: The Education Department Foundation of Sichuan Province (18ZB0081), The National Natural Science Foundation of China (31500498), The “Three Districts” Talent Support Program Project (18zd315301), Project Supported by Sichuan’s Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduate (S201910619107, S201910619022)

距瓣尾囊草 (*Urophyssa rockii* Ulbr.) 是毛茛科 (Ranunculaceae) 耧斗菜亚族 (Aquilegiinae) 尾囊草属 (*Urophyssa* Ulbr.) 植物, 全球仅在中国的四川省江油市涪江上游区段和湖南省的涟源市湄江镇有少量的自然分布^[1-3]。该种自然生存环境为贫瘠的石壁缝隙, 种实繁殖率极低, 自然更新缓慢, 种群生态脆弱, 居群数量和个体数量均较少, 属极小种群, 已成为分布区极狭的濒危植物^[4]。距瓣尾囊草具有一定的药用、观赏及食用价值^[4-7]。研究发现, 尾囊草属存在囊状和距状两种过渡现象——尾囊草 (*U. henryi* (Oliv.) Ulbr.) 的花瓣囊状有柄, 而距瓣尾囊草则花瓣距状无柄, 这在系统演化上处于较为独特的地位。李春雨^[6]据此认为天葵属的原始祖先起源于耧斗菜属和尾囊草属杂交所产生的后代。

染色体是植物个体遗传信息的载体; 它控制着植物体的遗传变异、生长与发育^[8]。其数目、基数、核型等数量和形态特征不仅可作为植物分类、起源、演化以及亲缘关系研究的依据, 还可应用于杂交育种选育和鉴定杂种后代的真伪性^[9-10]。rDNA 数目、分布位置不仅为核型分析提供了稳定识别个别染色体的有效标记, 而且 5S rDNA 的定位和位点数量与染色体的倍性相关, 对植物的染色体特别是微小染色体可进行有效的区分和鉴别^[11-12]。而荧光原位杂交 (FISH, fluorescence *in situ* hybridization) 是基因物理定位常用的技术手段, 已被广泛应用于细胞遗传学分析、基因图谱绘制等研究领域^[13-14], 其与 5S rDNA 探针的结合, 可提高植物倍性鉴定、同源染色体配对的准确性, 为进一步阐明植物的细胞生物学和遗传学等重要问题提供可能的理论依据。

目前, 距瓣尾囊草的细胞学研究尚属空白。因此, 本研究对距瓣尾囊草的染色体数目和核型进行分析, 并结合 5S rDNA-FISH, 分析其染色体的位点, 不仅为该植物的系统学和保护生物学提供细胞学资料, 也为探讨耧斗菜亚族属间, 即天葵属、耧斗菜属和尾囊草属之间的系统进化顺序和亲缘关系提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

试验以距瓣尾囊草新萌发的叶片, 即生长旺盛的幼叶边缘为材料。该叶片采自于四川省江油市永胜镇象家沟水库上方山崖的距瓣尾囊草自然群体。

1.2 方法

1.2.1 染色体标本制备 材料处理方法参考劳世辉等^[15]的方法, 并稍加改良。具体为: 选取生长迅

速、分裂旺盛的幼叶, 置于含有 0.002 mol/L 的 8- 羟基喹啉与 0.2% 秋水仙素 (1:1) 混合液中预处理 2~2.5 h; 去掉预处理液, 并用无菌水清洗材料 3~5 次; 加入适量新配制的甲醇:冰醋酸 (体积比为 3:1) 固定液, 固定 2 h; 无菌水清洗材料 3~5 次后, 将材料置于 3% 的混合酶液中解离 2.5~3 h, 而后在 ddH₂O 中低渗 8 min。此后, 利用改良去壁低渗火焰干燥法制片^[16-17], 用 5% 的 Giemsa 液染色 3~5 min, ddH₂O 冲洗晾干后, 在荧光倒置显微镜下进行观察。

选取 30 个染色体分散性好、清晰度高、背景色浅、染色效果极佳的中期分裂相细胞进行观察统计, 据此确定该物种的染色体基数和倍性。同时, 选取 5 个分散性极佳的中期分裂相, 利用 PhotoshopCS4 软件对染色体长度进行测量, 取其均值以为核型分析之依据。核型分析、着丝粒位置命名、不对称性等分析参照前人研究提出的有关标准^[18-20]。

1.2.2 探针标记 供试探针是从 5S rDNA 中挑选的一段长为 20 bp 的保守序列, 由上海生工生物工程公司合成, 并直接在 5' 端用四甲基罗丹明 (TAMRA) 标记成为探针。

1.2.3 原位杂交及检测 染色体原位杂交按照陈志^[21]的方法, 采取染色体与探针分别变性。探针于 PCR 仪中 97 °C 10 min 变性, 然后立即冰浴 10 min 以免复性。原位杂交仪中杂交 4 h, 杂交液含 50% 去离子甲酰胺, 2× 柠檬酸钠 (SSC), 0.1% 十二烷基磺酸钠 (SDS), 10% 硫酸葡聚糖, 5 ng/μL 探针 5S rDNA。漂洗完成后加 20 μL 含有 4, 6- 二氨基 -2- 苯基吡啶 (DAPI, 4 ng/μL) 的抗荧光衰减剂封片。Olympus BX53 荧光显微镜观察杂交信号, Olympus DP71 装置捕获图像, 利用 Cellsens Standard 和 Photoshop 软件进行图像处理。

2 结果与分析

2.1 距瓣尾囊草的染色体数目

通常情况下, 植物染色体数目的核定以体细胞为准, 而且统计的细胞数必须大于或等于 30 个, 其中有 85% 以上的细胞具有恒定、相同的染色体数目, 方可认定为该植物的染色体数目^[18]。据此, 选取 30 个染色体分散性好、清晰度高、背景色浅、染色效果极佳的距瓣尾囊草细胞中期分裂相, 对每个细胞的中期分裂相进行观察、统计。结果表明, 所有细胞中期分裂相的染色体数目均是 14 条 (图 1)。因此, 确定距瓣尾囊草体细胞的染色体数为 2n=14, 体细胞为二倍体, 染色体基数为 x=7。

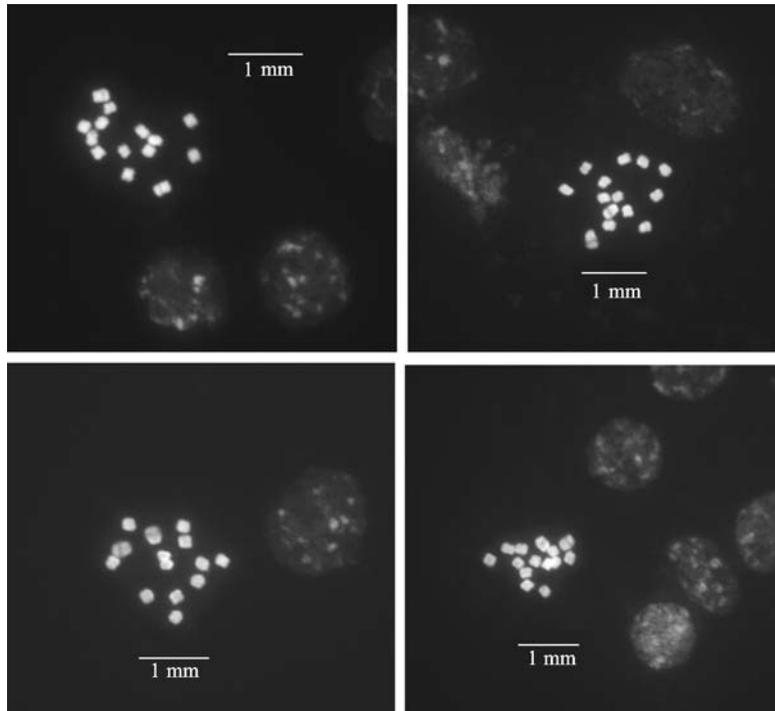


图 1 距瓣尾囊草的体细胞中期分裂相
(4 个不同的细胞视野)

Fig.1 The metaphase mitotic phase of somatic cells of *Urophysa rockii* Ulbr. (Four different views)

2.2 距瓣尾囊草的核型分析

距瓣尾囊草的染色体数为 14 条,核型公式为: $2n=2x=14=14m$, 14 条 7 对染色体全都为中部着丝点染色体 (m); 同时,在其染色体上,尚未发现有随体的存在(图 2、图 3)。染色体的参数详见表 1,其中染色体相对长度变幅在 6.50%~9.34% 之间,臂比幅度为 1.05~1.46,最长染色体与最短染色体的比值为 1.45,臂比值均小于 2;着丝粒平均指数为 44.09,核型不对称系数为 55.91,对称程度较高,属于较为对称类型;距瓣尾囊草染色体核型属于“1A”型;染色体的相对长度组成为 $2n=14=2L+2M_2+10M_1$,其中 1 号染色体是长染色体(L)、2 号染色体是中长染色体(M2),余下的染色体均为中短染色体(M1)。

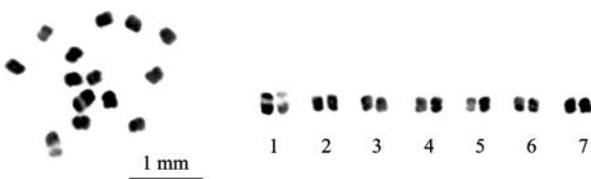


图 2 距瓣尾囊草的染色体制片(左)、染色体核型(右)
Fig.2 Chromosome preparation of *Urophysa rockii* Ulbr. (left), karyotype (right)

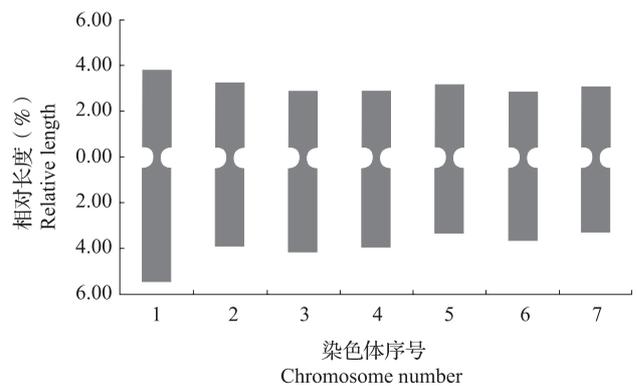


图 3 距瓣尾囊草的核型模式图
Fig.3 The idiogram of *Urophysa rockii* Ulbr.

2.3 5S rDNA 在有丝分裂中期染色体上的定位

5S rDNA 位点数与倍性具有相关性^[12]。距瓣尾囊草的 5S rDNA 的荧光原位杂交结果表明,在每一个细胞里,均有 2 个 5S rDNA 的荧光原位杂交位点(图 4)。进一步分析发现,2 个 5S rDNA 位点不存在同一条染色体上有 2 个位点的情况,不同细胞或者同一细胞不同染色体上的杂交信号强弱差别不明显,2 个信号分别位于 1 对同源染色体(1 号染色体)长臂的近着丝粒位置。这进一步表明该植物的倍性为二倍体。

表1 距瓣尾囊草的染色体参数

Table 1 The parameters of *Urophysa rockii* Ulbr. chromosomes

序号 No.	相对长度(%) Relative Length			着丝粒指数 (%) Centromere index	臂比值 Arm ratio (Long/Short)	类型 Type
	长臂 Long	短臂 Short	全长 Total			
1	5.52	3.82	9.34	40.90	1.45	m
2	3.91	3.27	7.18	45.54	1.19	m
3	4.20	2.89	7.09	40.76	1.46	m
4	3.96	2.88	6.84	42.11	1.37	m
5	3.37	3.23	6.60	48.94	1.05	m
6	3.67	2.83	6.50	43.54	1.29	m
7	3.32	3.13	6.45	48.53	1.06	m

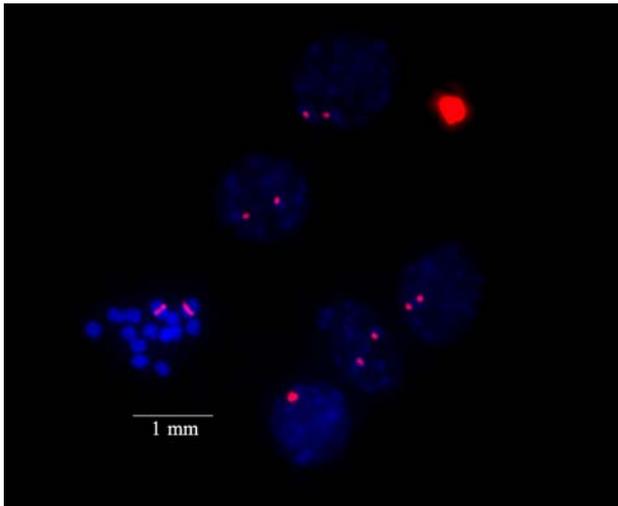


图4 距瓣尾囊草不同细胞的5S rDNA-FISH杂交结果

Fig.4 The 5S rDNA fluorescence *in situ* hybridization of different cells from *Urophysa rockii* Ulbr.

3 讨论

3.1 距瓣尾囊草的染色体基数和倍性

距瓣尾囊草(*Urophysa rockii* Ulbr.)是毛茛科(Ranunculaceae)耧斗菜亚族(Aquilegiinae)尾囊草属(*Urophysa* Ulbr.)植物。毛茛科不同亚族、不同属之间的染色体数目有较大的差异,同一属内的不同种之间也存在一定的差异。如乌头属的川乌(*Aconitum carmichaeli* Debeaux)倍性为 $2n=4x=32$,芍药属的牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andrews)为 $2n=2x=10$,驴蹄草属的膜叶驴蹄草(*Caltha palustris* L.var.*membranacea* Turcz.)则为 $2n=2x=18$ ^[22];而国产毛茛科银莲花族的西南银莲花(*Anemone davidii* Franch)为 $2n=4x=32$,大火草(*Anemone*

tomentosa (Maxim.) C.P'ei)为 $2n=2x=16$,展毛银莲花(*Anemone demissa* Hook. f. & Thomson)为 $2n=2x=14$ ^[23]。植物的科内不同亚族、属之间,甚至属内物种间的染色体数目差异对植物的系统演化有重要的意义^[24]。

耧斗菜亚族是扁果草族中,根据在雄蕊群和雌蕊群之间存在膜状的退化雄蕊所建立的一个新亚族。该亚族包括3个属:耧斗菜属(*Aquilegia* L.)、天葵属(*Semiaquilegia* Makino)和尾囊草属。亚族植物的主要特征有:染色体基数7,花瓣基部具囊或距,且具有退化雄蕊^[6]。前人研究表明,耧斗菜属的耧斗菜(*Aquilegia viridiflora* Pall.)染色体为 $2n=2x=14$ ^[22];而尾囊草(*Urophysa henryi* (Oliv.)Ulbr.)的染色体数目为 $2n=2x=14$ ^[25]。本试验结果表明,距瓣尾囊草的染色体总数为14条。由于距瓣尾囊草、尾囊草和耧斗菜同属于一个亚族,且前两者是同一属内的2个种。因此,认为距瓣尾囊草的染色体为 $2n=2x=14$,即倍性为二倍体,染色体基数为7。

3.2 距瓣尾囊草的进化地位

有关耧斗菜亚族的系统演化关系尚未形成一致的观点。加之,缺乏相应的研究材料,导致耧斗菜亚族内的尾囊草属的界定也存在诸多问题。对于亚族内属下的划分、亚族内的系统演化关系,除了形态学、分子系统以外,还需要更多的证据^[6]。植物核型的不对称性与物种进化的关系一直是学者关注的研究焦点之一^[26-27]。高等植物的核型进化规律通常是由对称向不对称发展,即核型的对称性越好,该物种在系统进化上则处于比较原始的地位;核型的不对称性越高,则物种的进化程度较高^[18-19]。

本试验得到的距瓣尾囊草染色体核型公式为 $2n=2x=14=14m$ 。14条7对染色体全都为中部着丝点染色体(m)。最长染色体与最短染色体的比值为1.45,小于2:1;而且所有染色体的臂比值均小于2:1,核型不对称系数为55.91。根据核型分类标准,距瓣尾囊草染色体核型属于“1A”型。而与距瓣尾囊草同属于一个亚族、不同属间的耧斗菜(*Aquilegia viridiflora* Pall.),其染色体核型公式为 $2n=2x=14=10m+2sm+2st$ (2SAT),其中1号为近端部丝点染色体(st),7号为近中部丝点染色体(sm),余下的5对染色体全均为中部着丝点染色体(m);最长染色体与最短染色体的比值为1.34,小于2:1;臂比值大于2:1的染色体比例为0.14%,核型不对称系数为59.66,核型属于“2A”型^[22]。核型分类表明距瓣尾囊草的核型与耧斗菜核型相比

较为对称,也就是说前者在物种进化上处于较原始的位置,而后进者的进化程度相对较高。

然而,根据形态学特征,有研究表明:在亚族内部,耧斗菜属和尾囊草属可能由天葵属分化而来,但并未指出耧斗菜属和尾囊草属的进化关系^[6]。同时,也有研究认为相对于尾囊草属和耧斗菜属,天葵属的进化程度较高;而耧斗菜属的花瓣样式进化程度又比尾囊草属的高^[25],侧面支持了距瓣尾囊草进化程度低于耧斗菜的推论。而从分子系统角度来分析,存在着两种推论,一则认为尾囊草属和天葵属拥有共同的原始祖先类型,另一种认为天葵属来自于尾囊草属和耧斗菜属杂交而产生的类群,母本来自于耧斗菜属^[6]。通过综合分析本试验和前人的研究报道,倾向于支持“天葵属来自于尾囊草属和耧斗菜属杂交而产生的类群”这一推论;同时,在系统演化上,初步认为尾囊草属最原始,耧斗菜属次之,而天葵属进化程度相对较高。

3.3 5S rDNA-FISH 技术在距瓣尾囊草上的应用初探

核糖体 DNA (rDNA) 是一类中等重复序列,由编码区和非编码区两部分组成,编码区较为保守。5S rDNA 是核糖体 DNA 的一种,在染色体上的位置是随物种的不同而不同。在植物进化过程中,rDNA 被认为是相对保守的,而对于亲缘关系接近的种,核糖体 DNA 在染色体上的分布位置也是相对保守的。但是保守的重复序列在进化历程中也发生着变异,同一物种不同染色体上各 rRNA 位点变异频率并非完全相同^[28],因此可根据重复序列位置、数量的不同来区分非同源染色体以及不同的染色体组^[29]。

通过 5S rDNA 杂交位点信号的数目以及在染色体上的数目、位置以及信号强度等信息对比,可以看出染色体结构等直观信息,进一步从分子细胞遗传学角度分析各植物类群之间的关系。在位点数目上,距瓣尾囊草具有 2 个 5S rDNA 杂交位点,且成对分布在一对同源染色体上,可以初步作为距瓣尾囊草染色体识别的有效标记。至于耧斗菜亚族属间、属内的物种进化顺序之确定,还应该结合亚族内所有种的核型分析、5S rDNA-FISH 定位、形态学、地理分布、分子标记等领域的研究才能给出科学的结论。

参考文献

[1] 别鹏飞,唐婷,胡进耀,蒋炜.珍稀濒危植物距瓣尾囊草(*Urophysa rockii*)的开花物候和繁育系统特性.生态学报,

2018, 38(11): 3899-3908

Bie P F, Tang T, Hu J Y, Jiang W. Flowering phenology and breeding system of an endangered and rare species *Urophysa rockii* (Ranunculaceae). *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(11): 3899-3908

[2] Du B G, Yang F L. *Urophysa rockii* Ulbr., a rare and endangered plant needs urgent conservation. *Current Science*, 2010, 99(4): 419-420

[3] 李锡泉. 湖南植物新记录——距瓣尾囊草. 湖南林业科技, 2015, 42(6): 145

Li X Q. New records of plants in Hunan province——*Urophysa rockii* (Ranunculaceae). *Hunan Forestry Science & Technology*, 2015, 42(6): 145

[4] 张云香,胡灏禹,何兴金.珍稀濒危植物距瓣尾囊草遗传多样性的 ISSR 分析. 西北植物学报, 2013, 33(6): 1098-1105

Zhang Y X, Hu J Y, He X J. Genetic diversity of *Urophysa rockii* Ulbrich, an endangered and rare species, detected by ISSR. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, 33(6): 1098-1105

[5] 龙治坚,范理璋,徐刚,余马,韩国辉.外源激素对珍稀濒危植物距瓣尾囊草种子萌发的影响. 种子, 2015, 34(3): 27-29, 35

Long Z J, Fan L Z, Xu G, Yu M, Han G H. Effect of exogenous hormone on seed germination characteristics of an endangered and rare species *Urophysa rockii* Ulbr. *Seed*, 2015, 34(3): 27-29, 35

[6] 李春雨.毛茛科耧斗菜亚族(*Aquilegiinae* Tamura)的系统学研究. 北京:中国科学院植物研究所, 2006

Li C Y. Classification and systematics of the *Aquilegiinae* Tamura. Beijing: Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, 2006

[7] 彭勇,陈四保,陈士林,肖培根.毛茛科植物药用亲缘学的初步探讨. 中国中药杂志, 2006, 31(16): 1124-1128

Peng Y, Chen S B, Chen S L, Xiao P G. Preliminary phylogenetic study on Ranunculaceae. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, 31(16): 1124-1128

[8] 杨汉波,饶龙兵,郭洪英,段红平,陈益泰.5 种桤木属植物的核型分析. 植物遗传资源学报, 2013, 14(6): 1203-1207

Yang H B, Rao L B, Guo H Y, Duan H P, Chen Y T. Karyotyping of five species of *Alnus* in East Asia region. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(6): 1203-1207

[9] Stebbins G L. Chromosome evolution in higher plants. London: Edward Arnold Ltd, 1971: 87-123

[10] 刘磊,王宗礼,李志勇,师文贵,李鸿雁,黄帆,李俊.苜蓿属 3 种不同花色基因型的染色体核型分析. 植物遗传资源学报, 2016, 17(2): 273-279

Liu L, Wang Z L, Li Z Y, Shi W G, Li H Y, Huang F, Li J. Karyotype analysis on 3 different flower color genotypes of *Medicago* L. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(2): 273-279

[11] 江蛟,张海英,郭绍贵,任毅,孙宏贺,宫国义,许勇,赵泓.普通西瓜 3 个变种 45S rDNA 和 5S rDNA 的染色体定位. 果树学报, 2012, 29(5): 764-769, 964

Jiang J, Zhang H Y, Guo S G, Ren Y, Sun H H, Gong G Y, Xu Y, Zhao H. Chromosomal polymorphism of ribosomal genes in the genus watermelon. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(5): 764-769, 964

[12] 李苏洁,王先宏,杨清辉.基于 5S rDNA-FISH 定位的缅甸割

- 手密倍性鉴定. 分子植物育种, 2018, 16(4): 1229-1235
- Li S J, Wang X H, Yang Q H. The ploidy identification of *Saccharum spontaneum* collected from Myanmar based on 5S rDNA-FISH localization. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(4): 1229-1235
- [13] 白玉娥, 彭鹏, 王菊, 伊如汗, 段国珍, 林涛. 基于荧光原位杂交技术分析沙地云杉及近缘种核型. 分子植物育种, 2016, 14(12): 3548-3553
- Bai Y E, Peng P, Wang J, Yi R H, Duan G Z, Lin T. Comparative FISH karyotype analysis of *Picea mongolica* and its closest relatives. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14(12): 3548-3553
- [14] 师明磊, 赖维莉, 易天红, 柯潇, 赵志虎. 应用荧光原位杂交技术检测康柏西普基因在 CHO 细胞染色体上的整合状态. 遗传, 2017, 39(4): 326-332
- Shi M L, Lai W L, Yi T H, Ke X, Zhao Z H. Characterization of the conbercept gene localization in DHFR-amplified CHO cells using fluorescence in situ hybridization. *Hereditas*, 2017, 39(4): 326-332
- [15] 劳世辉, 盛鸥, 魏岳荣, 易干军, 邓夫平. 香蕉 A 基因组 6 个品种的核型分析. 园艺学报, 2012, 39(3): 436-442
- Lao S H, Sheng O, Wei Y R, Yi G J, Deng F P. Karyotype analysis of six banana cultivars in relation to a genomes. *Acta Horticulturae Sinica*, 2012, 39(3): 436-442
- [16] 李桂芬, 梁国鲁, 林顺权. 枇杷属植物核型分析及其在系统分类中的应用. 园艺学报, 2013, 40(8): 1465-1474
- Li G F, Liang G L, Lin S Q. A study on karyotype analysis of genus *Eriobotrya* and its application to systematic taxonomy. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(8): 1465-1474
- [17] 梁国鲁, 陈全友. 柑橘属随体染色体系统演化研究. 西南农业大学学报, 1994, 16(2): 106-110
- Liang G L, Chen Q Y. Study on the system and evolution of satellite chromosomes in *Citrus*. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1994, 16(2): 106-110
- [18] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 297-302
- Li M X, Chen R Y. The standardization about the karyotype analysis. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1985, 3(4): 297-302
- [19] 刘冬云, 张晓曼, 李艳, 史宝胜. 不同居群山丹的核型分析. 植物遗传资源学报, 2015, 16(1): 199-204
- Liu D Y, Zhang X M, Li Y, Shi B S. Karyotype analysis of different populations of *Lilium pumilum* DC. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2015, 16(1): 199-204
- [20] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 1964, 52: 201-220
- [21] 陈志. 柑橘及其近缘属植物 5S rDNA 的 FISH 位点研究. 重庆: 西南大学, 2015
- Chen Z. FISH analysis of 5S rDNA in *Citrus* and close related genera. Chongqing: Southwest University, 2015
- [22] 陈瑞阳. 中国主要经济植物基因组染色体图谱: 第五册. 北京: 科学出版社, 2009: 580-597
- Chen R Y. Genome map of main economic plants in China: fifth volume. Beijing: Science Press, 2009: 580-597
- [23] Yang Q E. Cytology of ten species in *Anemone*, one in *Anemone* and six in *Clematis* (Trib. Anemoneae, Ranunculaceae) from China. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 2002, 40(5): 396-405
- [24] 鲁元学, 孙先凤, 周其兴, 顾志建. 云南十种苦苣苔科植物的染色体数目报道. 云南植物研究, 2002, 24(3): 377-382
- Lu Y X, Sun X F, Zhou Q X, Gu Z J. Chromosome number in ten species in the Gesneriaceae from Yunnan. *Acta Botanica Yunnanica*, 2002, 24(3): 377-382
- [25] Wang X Q, Li Z Y, Hong D Y. A karyomorphological study of nine species in four genera of Ranunculaceae. *Cathaya*, 1994, 6: 43-56
- [26] 史建强, 李艳琴, 张宗文, 吴斌, 王安虎. 荞麦野生种的核型及进化特征分析. 植物遗传资源学报, 2016, 17(3): 455-460
- Shi J Q, Li Y Q, Zhang Z W, Wu B, Wang A H. Analysis of karyotypes and evolutionary features of wild species of Buckwheat. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17(3): 455-460
- [27] 底远哲, 胡仲萌, 王海霞, 孙文光, 李志敏. 青藏高原三种蝇子草属植物的核型研究. 植物遗传资源学报, 2019, 20(4): 1074-1079
- Di Y Z, Hu S M, Wang H X, Sun W G, Li Z M. Karyotypes of three *Silene* L. (Caryophyllaceae) species from the Qinghai-Tibet Plateau. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(4): 1074-1079
- [28] Nguyen T X, Lee S I, Rai R, Kim N S. Ribosomal DNA locus variation and RMAP analysis of the diploid and triploid complexes of *Lilium lancifolium*. *Genome*, 2016, 59(8): 551-564
- [29] Li K P, Wu Y X, Zhao H, Wang Y, Lü X M, Wang J M, Xu Y, Li Z Y, Han Y H. Cytogenetic relationships among *Citrullus* species in comparison with some genera of the tribe benincaseae (Cucurbitaceae) as inferred from rDNA distribution patterns. *BMC Evolutionary Biology*, 2016, 16(1): 1-9