

植物染色体核型分析常用方法概述

刘永安^{1,2}, 冯海生¹, 陈志国^{1*}, 畅喜云^{1,2}, 刘瑞娟^{1,2}, 窦全文¹, 王海庆¹

(1. 中国科学院 西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

[摘要] 植物核型分析是指对植物细胞染色体的数目、形态、长度、带型和着丝粒位置等内容的分析研究,是植物分类和遗传研究的重要手段。对植物核型分析的基本方法,包括取材、预处理、固定、解离、染色、制片及结果分析进行了比较系统的介绍和评价。

[关键词] 植物; 核型分析; 染色体
[中图分类号] S501; Q946

[文献标识码] A

Common Methods of Karyotype Analysis in Plant

LIU Yong-an^{1,2}, FENG Hai-sheng¹, CHEN Zhi-guo^{1*}, CHANG Xi-yun^{1,2},
LIU Rui-juan^{1,2}, DOU Quan-wen¹, WANG Hai-qing¹

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, CAS, Xining 810001; 2. The Graduate School of CAS, Beijing 100049, China)

Abstract: Plant karyotype analysis, involving the number, shape, length and banding of chromosome, site of centromere and so on, is an important method for classification and genetic study of plant. The basic method for plant karyotype analysis including sampling, pretreatment, stationary, dissociation, dye, squash and result analysis is introduced and evaluated systematically.

Key words: plant; karyotype analysis; chromosome

地球上有多万种植物。在人们研究植物的早期,对植物的分类往往是根据植物的形态学、解剖学等资料来进行的,但由于每个人对植物形态认识的差异,经常会将同一植物划分为不同的类别,特别是在研究形态相近的植物时,常常会出现有的学者将某一植物划分为这个属或种,而别的学者将其划分为其他属或种^[1],造成植物分类上的混乱,给学术交流和对整个植物界的研究带来一些不便。核型分析是指对细胞染色体的数目、形态、长度、带型和着丝粒位置等内容的分析研究^[2,3]。一种生物的染色体核型是相当固定的,因此可用它作为植物学分类及遗传研究的一个重要手段,使学者们在研究分类有争议的植物时有更多的参考资料,以达到意见上的统一。

1 染色体核型分析的实验方法

1.1 取材

进行植物染色体的核型分析时,大多数研究是取种子的初生根根尖(萌发至1~2cm)^[4~16,18~26],也有少数实验取植物的花粉母细胞^[6,20]、愈伤组织^[27]、次生根^[20,28]或幼嫩的叶片^[80]。李懋学认为,凡能进行细胞分裂的植物组织或单个细胞(幼嫩的根尖、茎尖,花粉母细胞、愈伤组织及禾本科植物的居间分生组织等)都可以作为取材的对象^[29]。但不是随便取上述材料均可作为研究对象,只有在充分了解不同植物组织结构 and 生长发育规律的基础上,有针对性地取样才能获得合适的材料。

取种子初生根的根尖有很多优点,即不受时间、季节的限制,只要事先培养种子使其萌发生根,就可用于实验,比较方便。与之相对,取植物茎尖时,必须剥除幼叶和剥出生长锥,而取花粉母细胞时,则不易判断花粉发育状况、难以把握时期,这些都相当麻烦。因此,大多数研究者在进行植物染色体核型分析时,把植物初生根的根尖作为研究对象。但取花粉母细胞也有优点,即花粉母细胞只有一个染色体组,分析时不必进行同源染色体配对,容易分析,所以一些研究者在一个实验中同时分析根尖和花粉母细胞,使两者的优点相互补充^[81~83]。

1.2 材料的预处理

细胞处在分裂中期时染色体最容易观察,但分裂中期持续的时间很短,这就需要材料进行预处理,以便观察材料中的染色体。

实际操作中有很多对材料进行预处理的方法,主要有化学方法和物理方法,也有将化学方法和物理方法结合起来的复合方法,以及将不同的化学药剂按比例配成的混合液对材料进行预处理。

1.2.1 化学方法 化学方法可分为离体处理和非离体处理^[2,3]。离体处理是将从植物体上取下的材料浸泡于化学药剂中,对其进行处理。因为材料脱离母体,所以化学药剂很容易从破损处渗入,只需较短的时间即可,至于处理的时间,因不同植物或组织而异。非离体处理是指将植物的根等组织直接浸泡于化学药剂中,因为材料没有破损,所以化学药剂进入植物组织的

[收稿日期] 2005-08-25; 2005-11-07 修回

[基金项目] 青海省招标课题“分子育种”,中国科学院“西部之光”人才培养计划“青藏铁路高海拔地区植物繁育及其栽培技术研究”专题,中国科学院创新领域课题(CXL Y2002-6)

[作者简介] 刘永安(1980-),男,在读硕士,研究方向:植物栽培和生态学;E-mail:liuanliuan123010@sina.com

*通讯作者, E-mail:zgchen@nwipb.ac.cn

速度较慢,需处理较长的时间。进行预处理时所用的化学药剂及主要方法如下:

(1) 用低浓度的秋水仙素溶液对材料进行预处理^[4,16,20,26,30,31,84,82,85]。常用浓度为0.01%~0.2%。秋水仙素有很强的毒性,如果秋水仙素用量过大或处理时间过长,会引起染色体收缩过度或产生多倍体,而且秋水仙素的价格较贵。但由于用秋水仙素进行预处理的效果较好,因此,在染色体核型分析时仍较为常用^[32]。

(2) 用饱和的对二氯苯水溶液对材料进行预处理^[5,33,34,81]。对二氯苯也有毒性,其效果和秋水仙素相似,但价格较为便宜,使用也较为广泛。

(3) 用低浓度的8-羟基喹啉溶液^[9,11,12,14,27,28,35~39]对材料进行预处理。浓度范围在0.002~0.004 mol/L,该溶液适合处理具有较大染色体的植物。经过该溶液处理后,染色体的缢痕区比较清晰。

(4) 用-溴荼的饱和水溶液对材料进行预处理^[18]。该溶液适合对禾本科和水生植物的材料进行预处理,而且是非离体处理的效果较好^[3]。

1.2.2 物理方法 物理方法是用低温对植物材料进行预处理^[6,8,9,10,20,23,24]。处理温度一般在0~8℃,最常用的就是用冰水混合物对材料进行预处理。该方法比较经济、简单和安全,因而也比较常用。

为了使不同方法的优点结合起来,有些实验采用复合方法,如用0.1%的秋水仙素(0.002 mol/L)和8-羟基喹啉溶液(1:1)对材料进行预处理^[25,40,41],或用滴加了少量-溴荼的对二氯苯饱和液对根尖进行预处理^[42~44],以及先用0.05%的秋水仙素在0~4℃下处理18~24 h,再用0~4℃的冰水处理18~24 h^[45]等,但这些复合方法比较麻烦,在实际操作中不用秋水仙素溶液处理等方法常用。

1.3 材料的固定

固定的目的是用渗透力强的固定液将材料迅速杀死,使蛋白质沉淀,并尽量使其保持原有状态^[2,3]。通常用卡诺液(无水酒精:冰醋酸=3:1)对材料固定24 h左右。也有人用甲醇冰醋酸溶液(甲醇:冰醋酸=3:1)来固定材料^[46],但此方法极少使用。

在对材料固定后,应马上进行解离,因为经过保存过的材料其效果没有固定后立即解离的效果好^[3]。固定好的材料如不能及时解离,可将其保存在70%的酒精中^[4,81,83]。如果不需要保存很长时间,也可将其直接保存在固定液中。

1.4 材料的解离

植物的细胞有细胞壁,胞间层含有果胶,这将导致压出的片子达不到理想的效果。经过解离,细胞之间的果胶层被除去,细胞壁得到软化,使压片能够顺利进行^[3]。

对材料的解离方法有酶解法和酸解法。酶解法是用低浓度的果胶酶(1%~2%)和纤维素酶(1%~5%)的混合液对材料进行解离^[5,7,47~50],解离时间一般在室温下2~5 h;酸解法一般是将材料放入预热60℃的1 mol/L HCl中解离,解离时间一般为几分钟到十几

分钟或更长^[4,8,44,51~57]。

以上2种方法,酸解法比较经济,一般实验多采用此法。但是,无论是酶解还是酸解,都要把握好解离的时间,时间过长或过短都会产生不良的影响。另外,有的研究者在对材料进行解离前进行前低渗,解离后又进行后低渗^[5,13,16,27,35,40,58,50],其目的是使水分通过细胞膜向细胞内渗入,使细胞膨胀,进而使细胞中本来已经分散的染色体更加分散。低渗液一般使用蒸馏水或0.075 mol/L KCl溶液。其中0.075 mol/L KCl溶液对染色体的结构破坏较小,经它处理后,染色体较为明显清晰。

低渗处理的时间应适当。如果处理时间过长,则会使细胞胀破,多个细胞的染色体混合在一起,给观察和分析造成很多麻烦;反之,则达不到应有的处理效果。处理时间的长短因不同植物而定^[32]。

1.5 材料的染色

对材料的染色是指用染料对材料进行处理,仅使染色体染色,而染色质不染色或染色很淡,以便观察和分析。可分为常规染色法和分带染色法。

1.5.1 常规染色法 常规染色法是指用染料对材料进行处理,染色体被染成一致的颜色。主要方法如下:

(1) 醋酸洋红溶液染色^[2,3,32]:此法简单易行,较为常用。先将材料置于载玻片上,用不锈钢刀片切去根冠和伸长区,留下分生区,然后加一滴醋酸洋红,待根尖被染至暗红色时,进行常规压片。如果想使染色的效果更好,可以在压片后置于酒精灯上加热数秒,但不能使染液沸腾。如染色过深,可在盖玻片的一侧滴加适量45%的醋酸,另一侧用滤纸吸取染液,以达到褪色的目的。

(2) 改良石炭酸品红溶液染色^[2,3,9,25,32,59,60]:改良石炭酸品红克服了石炭酸中含有较多甲醛而使原生质硬化的缺点,并且该染液比较稳定,能存放很长时间,因此应用也很广泛。该染液染色的方法与醋酸洋红染色的方法相同,但不需加热。

(3) 铁矾-苏木精溶液染色^[2,3,14,32]:先用4%的铁矾溶液进行媒染,用蒸馏水将铁矾洗净,再用0.5%的苏木精染色,蒸馏水漂洗,然后用45%的醋酸分色、软化,常规压片。此方法能使染色体的轮廓保持清晰,即使用它处理染色体数目多而不易分散的材料,也能得到较好的效果。

(4) Schiff试剂染色^[2,3,16,24]:先将解离好的材料用蒸馏水漂洗几次,把材料放于染液中1~5 h或黑暗处过夜,然后将材料在漂洗液或直接将材料在蒸馏水中冲洗几次,每次数分钟,最后用45%的醋酸压片。该方法不仅能显示出染色体的形态结构,而且可用显微分光光度计对细胞核及染色体中的脱氧核糖核酸进行定量测定,因此该方法在细胞遗传学研究中较为常用^[32]。

除了以上主要方法,还有一些别的染色方法,如用品红溶液染色^[4,23]、用(改良)卡宝红溶液染色^[7,8,12,20,61]和用卡宝红-品红溶液染色^[28]等。

1.5.2 分带染色法 分带染色是指染色体经过染色

后,不同部位呈现出不同的条带。可根据条带的不同,对植物进行分类和遗传研究。常用分带染色法如下^[2,11,18,22,29]:

(1) C-带染色:先将压好的片子冷冻脱片,室温下防尘干燥。用酸或碱(通常用 5% 的 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 处理,使染色体变性,再用盐溶液(2 ×SSC 溶液)高温(60~65)下处理,使之复性,最后 Giemsa 染色,使染色体的不同部位呈现宽窄不同的条带。通常一种植物的 C-带是固定的,而且重复性很高,因此,在实际操作中 C-带染色法最常用。

(2) G-带染色:先将压好的片子冷冻脱片,室温下防尘干燥。用 2 ×SSC 溶液处理, Giemsa 染色,使染色体上出现宽窄、深浅不同的条带。但 G-带较为均一,缺乏特异性,因此没有 C-带常用。

(3) N-带染色:先将压好的片子冷冻脱片,室温下防尘干燥。用 1 mol/L NaH_2PO_4 高温(87~97)处理,水洗, Giemsa 染色,使染色体核仁组成区染色。但用该方法处理一些禾本科植物的染色体时,不仅核仁组成区着色,而且染色体的其它部位也染色成带。因此该法可用于植物染色体核仁组成区的数目和位置等方面的研究,同时也可用于一些禾本科植物染色体的带型研究。

(4) Ag-染色:该法是用 AgNO_3 等药品处理植物染色体,使染色体核仁组成区染色。如果用 HCl(或 NaOH)作前处理,再用 AgNO_3 染色,在一些禾本科植物染色体的着丝粒、端粒等部位也能染色。因此,该方法也能用于植物染色体核仁组成区的数目和位置等方面研究和一些禾本科植物染色体的带型研究。

1.6 制片

制片的质量直接影响实验的结果,可根据具体情况采用各自的制片方法。常用的制片方法分为压片和涂片两种。

常规的压片方法对工具没有统一要求。压片时使用不锈钢刀片、镊子和针尖稍钝的木柄解剖针,但也可以找其它替代工具来操作。压片的方法不固定,只要在制片的过程中不让盖玻片移动,使细胞和染色体分散开来即可^[32]。

涂片法是先使用镊子、解剖针等将材料(包括花药)弄碎,使细胞均匀分散于载玻片上,以便观察。

由于常规压片易于操作,因此该方法是实际操作中最普遍采用的方法。而涂片法能使细胞得到充分分散,便于观察,虽然复杂一点,在一些特殊要求的实验中还是采用此种方法。

1.7 镜检、封片和永久制片

镜检时应先在低倍镜下观察,找到分散良好、处于细胞分裂中期相的细胞后,再将要观察的细胞放到视野的中间,调到高倍镜下观察。如果不能及时对片子进行拍照,或者想短时间(一两周)保存合格的片子以便对其继续研究,可以用石蜡、凡士林、甘油(稀释后加一滴甲醛)或无色的指甲油把盖玻片的四周密封起来(一定要封严),最好将密封好后的片子置于冰箱的储

藏室里保存^[32]。

合格的片子如能制成永久玻片,就可长期保存,便于观察和研究。制作永久玻片的方法一般采用冷冻脱片法,即将制成的临时玻片放到液氮或冰箱的冷冻室内低温处理,然后用刀片将盖玻片轻轻撬开,接着将盖玻片和载玻片同时放入 37 的烘箱中烘干或防尘自然干燥,然后用二甲苯透明(即用二甲苯浸泡数分钟),中性树胶封片^[8-10,14,43,41,36,37,47,62-64]。也可采用梯度乙醇脱水(依次是 50% 酒精、95% 酒精、无水酒精,各处理数分钟),二甲苯透明,加拿大树胶封片^[65]。

在制作永久玻片前,用防水墨水在盖玻片和载玻片交界处画一横线,放盖玻片时将原来的横线复原,以使盖玻片仍盖到原来的位置。涂胶时应均匀地将树胶涂开,以避免气泡的产生^[3,29,32]。另外,用涂片法做成的片子制作永久玻片时,可以用中性树胶直接封片^[32,66,67]。以上各种方法中,冷冻脱片法较为简单易行,经济实用,因此该方法比较广泛使用。

2 核型分析

核型分析包括染色体数目的确定和染色体形态的分析。在进行核型分析时,通常按李懋学等的标准来确定染色的数目、分析染色体的形态^[68],按 Stebbins 的方法确定染色体核型的类别^[86]。

2.1 染色体数目的确定

要确定一种植物染色体的数目,必须对它的一些细胞中含有的染色体数目进行统计分析。在实际操作中,不同学者所统计细胞的数目有很大差别。有的学者统计 20 个细胞^[52,69,70],有的学者统计 25 个细胞^[71],有的学者统计 30 个细胞^[19,42,41,44],也有的学者统计 50 个细胞^[72],甚至有的学者统计 100 个细胞^[54,55,73,74]。到底统计多少个细胞来确定染色体数目呢?一般认为至少应该统计 30 个染色体分散良好的细胞(染色体大且数目少的材料,可以少统计一些细胞,而染色体小且数目多的材料,可多统计一些细胞),而且 85% 以上的细胞具有相同染色体数时,才能确定该植物染色体数目^[2,32]。

2.2 染色体形态分析

在进行染色体形态分析时,一般取 5 个以上染色体分散良好的中期细胞进行显微摄影^[2,32],将底片冲洗放大,用精确的尺子测量照片上染色体长、短臂的相对长度^[8,11,15,17,18],根据放大的倍数求出染色体绝对长度;也可以用测微尺测量染色体的绝对长度(随体一般不记长度)^[4,9,25,67],然后求出每条染色体绝对长度、相对长度和臂比的平均值。如果要对染色体的带型进行分析,还要观察染色体条带的数量、相对位置、宽度等特征。根据染色体的长度、臂比、着丝粒的位置、随体的有无和位置以及染色体的带型等进行同源染色体的配对。然后根据染色体的长度给染色体编号,长度最长的染色体编为 1 号染色体,依次排列,最短的染色体编为末号,等长的染色体把短臂长的染色体排在前面。接着将配好对同源染色体按编号由小号到大号排列在与照片底色一样的纸上,并且粘好,排列时把染色体

的着丝粒放在一条直线上(如果染色体数目较多,可把染色体排成两行或两行以上),染色体纵向与直线垂直,短臂放在上边。排好后进行翻拍,就得到染色体核型图,然后按此图绘制染色体核型模式图^[87]。也可将放大后的相片用扫描仪扫描,在计算机上用图片处理软件对相片进行处理,最后得到清晰的染色体照片,再对其染色体进行测量、同源染色体配对、分析^[24,75,76,77]。若用数字照相系统或数码相机进行显微照相,则更加方便。

随着计算机技术的发展,计算机也广泛地应用到核型分析领域中,各种进行核型分析的硬件、软件得到开发,从而实现核型分析的自动化或半自动化^[78,79]。

3 讨论及展望

关于核型分析的文献发表的很多,但大多数文献的实验方法和结果分析各不相同,甚至对同一种植物的实验方法及结果分析的差别也很大。主要原因是不同的研究者具有的理论知识和实验技巧不同,他们所用的药品和实验设备也有很大差别。如果对不同的取材方式、材料的预处理、材料的解离、染色方法、压片、永久制片等方法进行随机组合,则可有成千上百种不同的方法。

不同的处理方式对染色体的影响是不完全相同的,如不同的处理使染色体缩小的程度不同而造成染色体的绝对长度不同;由于染色体不同部位的物质组成不同,不同的处理会使染色体不同部位按不同的比例缩小而造成染色体的臂比不同^[45]。于是这些实验结果之间的可比性就减小了,给植物的分类及遗传研究造成诸多不便。因此,有必要在国内外实行统一的实验方法和结果分析方法(至少在植物的一个属内实行统一的实验方法和结果分析方法)以及使用统一标准的仪器设备,建立一些专门从事植物染色体研究的机构,并且对实验操作人员进行统一培训,从而有利于植物分类和遗传的研究。

在植物核型分析领域中,我国的陈瑞阳、李懋学等学者做出了很大的贡献,他们制定了中国植物核型分析标准。他们承担的“中国主要植物染色体研究”课题对我国95个科331个属2834种植物染色体数目进行了研究,完成了1045种植物核型分析。对植物染色体核型分析的方法进行了很多创新,出版了世界上第一部植物基因组染色体图谱。

随着人类基因组计划的完成以及我国对水稻、鸡、“非典”病毒等生物基因组测序的完成,人类已经进入了“后基因组时代”。但植物染色体核型分析不会因此而过时,它将同植物的外部形态鉴定、基因组序列测定等一起成为植物分类和遗传研究的重要手段。

[参 考 文 献]

[1] 英国芳,等.植物学[M].北京:高等教育出版社,1992,111-150.
[2] 李懋学,张赞平.作物染色体及其研究技术[M].北京:中国农业出版社,1996,1-60.
[3] 张贵友,等.普通遗传学实验指导[M].北京:清华大学出版社,

2003,1-8.
[4] 邱爱军,魏凌基,吴玲,等.粗柄独尾草染色体核型分析[J].石河子大学学报(自然科学版),2004,22(5):415-416.
[5] 黄东益,郑成木,庄南生,等.甘蔗染色体组构成系统演化的研究[J].热带作物学报,2000,20(1):43-51.
[6] 刘文献,陈佩度,刘大钧.将大赖草种质转移给普通小麦的研究Ⅴ三个普通小麦2大赖草二体异附加系的选育与鉴定[J].南京农业大学学报,1997,20(2):6-10.
[7] 王晶,向凤宁,夏光敏,等.普通小麦与高冰草体细胞杂种F₅代株系的核型分析[J].麦类作物学报,2003,23(1):12-16.
[8] 孙彦,周禾,史德宽.新麦草有丝分裂及核型分析[J].草地学报,2000,8(3):193-197.
[9] 张玉玲.薏苡和薏米的染色体倍数鉴定及核型分析[J].辽宁农业职业技术学院学报,2003,5(4):14-16.
[10] 葛荣朝,赵宝存,沈银柱,等.多枝赖草的C-分带与核型分析[J].中国草地,2004,26(3):72-74.
[11] 贾勇炯,曹有龙,林宏辉,等.高矮秆水稻品种的核型分析及Giemsa染色区的比较研究[J].四川大学学报(自然科学版),1998,35(5):759-763.
[12] 高卫华,支中生,张恩厚,等.蜀黍属两个杂交种与其亲本染色体核型分析[J].中国草地,2002,24(4):68-71.
[13] 陈穗云,罗振,向凤宁,等.小麦与高冰草不对称体细胞杂种F₅代部分株系的根尖染色体数目及核型分析[J].Advances in Chromosome Sciences,131-135.
[14] 于立华,王胜利.野大麦染色体的核型分析[J].内蒙古草业,2004,16(1):24-25.
[15] 戴秀梅,傅大雄,徐如宏,等.硬粒小麦-偏凸山羊草六倍体的核型分析[J].麦类作物学报,2000,20(2):8-12.
[16] 杨起简,周禾,孙彦,等.二倍体新麦草染色体核型分析[J].北京农学院学报,2001,16(2):1-4.
[17] 贺昌锐,宋运淳,刘立华.高粱不同品种的核型分析[J].武汉植物学研究所,1997,15(3):277-278.
[18] 谌志伟,张飞雄,胡东.六倍体莜麦染色体的核型分析[J].首都师范大学学报(自然科学版),1997,18(4):66-69.
[19] 吴先军,周开达.水稻染色体研究述评[J].西南农业学报,2002,13(2):115-121.
[20] 刘双俊.新疆大赖草DNA片段导入春小麦761转化后代的细胞核型分析[J].西北农业学报,1997,6(4):105.
[21] 金危危,覃瑞,余舜武,等.一种提高水稻FISH检出率的新方法——RFLP混合标记[J].遗传,2001,23(3):263-265.
[22] 戴艺民,卢川北,林江波,林彦铨.福建斑茅核型分析初报[J].福建农业学报,2002,17(3):148-150.
[23] 郭玉堂,魏凌基,阎平.芨芨草染色体的核型分析[J].石河子大学学报(自然科学版),2003,7(3):223-225.
[24] 蔡联炳,冯海生.披碱草属3个种的核型分析[J].西北植物学报,1997,17(2):238-241.
[25] 吴玲,张霞,马森,等.新疆独尾草属植物核型分析[A].全国第二届甘草学术讨论会第二届植物资源开发、利用与保护学术讨论会会议论文摘要集[C].北京:中国植物学会,2004,72-78.
[26] 孔照胜,李贵全,岳爱琴.兵豆的核型分析[J].山西农业大学学报,1999,19(1):63-64.
[27] 郑乐娅,黄忠祥,吴家道,等.玉米体细胞继代无性系核型分析[J].安徽农业科学,1997,25(2):109-111.
[28] 魏建华,周海鹰,孙传清,等.水稻三体核型分析[J].农业生物技术学报,1998(1):61-64.
[29] 朱徽.植物染色体及染色体技术[M].北京:科学出版社,1982,43.
[30] 陈爱葵,沈育君,廖红云.穿心莲的染色体核型分析初报[J].广东教育学院学报,2002,22(2):57-58.
[31] 雷耘,王燕,刘胜祥,等.大叶马蹄香的核型分析[J].华中师范大学学报(自然科学版),1997,31(4):468-469.
[32] 李国珍.染色体及其研究方法[M].北京:科学出版社,1985,109-

- 130.
- [33] 赵东利, 王仁军, 刘鸿宇, 等. 红三叶 (*Trifolium pratense*) 的染色体核型分析[J]. 大连大学学报, 2000, 21(3): 86-90.
- [34] 赵东利, 胡忠, 陈炜, 等. 迷果芹 (*Sphallerocarpus gracilis*) 和红三叶 (*Trifolium pratense*) 的核型分析[J]. 西北植物学报, 2001, 21(5): 1026-1027.
- [35] 梁国鲁, 杨美全, 阎勇, 川麦冬核型分析[J]. 西南农业大学学报, 1998, 20(4): 307-310.
- [36] 宋艳梅, 李六文, 杨德奎. 二色棘豆的染色体数目和核型分析[J]. 山东师大学报(自然科学版), 2002, 17(1): 77-78.
- [37] 杨德奎, 康照莉. 饭包草的染色体数目和核型分析[J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 2003, 18(3): 72-73.
- [38] 范淑英, 吴才君, 董得坤. 江西野葛的核型分析[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(2): 239-241.
- [39] 杨德奎. 林泽兰的核型分析[J]. 山东科学, 2002, 15(2): 32-34.
- [40] 隆有庆, 傅华龙, 苏静娟. 春兰的核型分析[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2000, 37(4): 578-581.
- [41] 岳爱琴, 李贵全, 杜维俊, 等. 豆类植物三种类型染色体(大、中、小)核型分析方法的研究[J]. 山西农业大学学报, 2001, 21(2): 118-120.
- [42] 赵东利, 胡学军, 徐红梅, 海绿豆 (*Phaseolus demissus*) 的染色体核型分析初报[J]. 北京农学院学报, 1999, 20(4): 1-4.
- [43] 赵东利, 李东霞, 王仁军. 豆茶决明 (*Cassia nomame*) 的核型分析[J]. 内蒙古师大学报(自然科学(汉文)版), 1998, 27(4): 310-312.
- [44] 陈晓静. 福建3个产地水仙的核型分析[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(4): 28-31.
- [45] 香香, 施季森, 刘晓健. 两种预处理方法对杉木核型的影响[J]. 南京农业大学学报, 2001, 25(1): 23-26.
- [46] 杨帆. 薄壳山核桃及云南山核桃染色体核型分析[J]. 江西农林科技, 2001(2): 6-7.
- [47] 梁国鲁, 向素琼, 汪卫星, 等. 甘薯近缘种 *Impomoea trifida* (2X, 6X) 的核型分析[J]. 染色体科学进展, 2001(1): 404-40.
- [48] 杨秀英, 王永嘉, 钱小兵. 香瓜属 (*Cucumis*) 植物染色体核型分析[J]. 天津师大学报(自然科学版), 2000, 20(4): 48-52.
- [49] 陈庆富. 五个中国荞麦 (*Fagopyrum*) 种的核型分析[J]. 广西植物, 2001, 21(2): 107-110.
- [50] 王跃华, 马丹炜, 汪苏, 等. 喜树染色体制作与核型分析[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2004, 23(3): 27-29.
- [51] 周自玮, 薛世明, 奎嘉祥, 等. 毛果扁蓊豆的核型分析[J]. 中国草地, 2000(5): 76-79.
- [52] 吴梅, 黄向旭. 葫芦芦铁的核型分析[J]. 热带亚热带植物学报, 1999, 7(3): 207-209.
- [53] 申书兴, 李振秋, 张成合, 等. 大白菜3号、6号染色体双三体及其初级三体的鉴定[J]. 园艺学报, 2002, 29(5): 438-442.
- [54] 刘兆明, 张敏琦. 短瓣金莲花的核型分析[J]. 高师理科学刊, 2000, 20(4): 51-52.
- [55] 殷秀杰, 王明玖, 石凤翎. 高加索染色体的核型分析[J]. 牧草种质、育种与生理, 2001(9): 465.
- [56] 李洁, 陆小毛. 两种中国水仙品种的染色体核型分析[J]. 上海农学院学报, 1997, 15(3): 243-247.
- [57] 孔红, 陈荃, 马骥. 麻黄属3种植物的核型研究[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2001, 37(3): 100-103.
- [58] 郭运玲, 熊和平, 唐守伟, 等. 大麻染色体核型分析[J]. 中国麻作, 1999, 21(2): 21-23.
- [59] 赵东利, 徐红梅, 胡忠, 等. 中宁枸杞的核型分析[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2000, 36(3): 97-100.
- [60] 周俊英. 中药月见草的染色体数目和核型分析[J]. 山东科学, 2004, 17(3): 30-31.
- [61] 曹明, 周浙昆. 中国栎属九种植物的核型分析[J]. 广西植物, 2000, 20(4): 341-345.
- [62] 李红, 燕玲, 李佳桃. 15种濒危植物染色体数目及其核型分析[J]. 内蒙古农业大学学报, 2003, 24(3): 14-22.
- [63] 王冰, 白云, 陈连庚, 等. 扁莖黄芪染色体的核型分析[J]. 中药材, 2002, 25(8): 541-543.
- [64] 张云霞, 张殿昌, 曲喜英, 刘晓莉. 曲柳和豌豆染色体核型分析及比较[J]. 华南热带农业大学学报, 2001, 7(1): 6-13.
- [65] 李春艳, 慈忠玲, 王林, 等. 臭柏的核型分析[J]. 内蒙古农业大学学报, 2000, 21(3): 106-108.
- [66] 熊大胜, 王文龙, 谷南平, 蔡枝香. 鱼腥草染色体核型分析[J]. 湖南文理学院学报(自然科学版), 2004, 16(3): 39-40.
- [67] 熊大胜, 郭春秋, 张伏安. 白花败酱染色体的核型分析[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(3): 39-40.
- [68] 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.
- [69] 王彦芹, 朱天生, 魏凌基, 等. 大蒜染色体的核型分析[J]. 塔里木农垦大学学报, 2003, 15(4): 29-31.
- [70] 韦松基, 温标才. 桂平魔芋染色体及核型分析[J]. 中药材, 2003, 26(11): 773-774.
- [71] 孔照胜, 李贵全, 岳爱琴. 兵豆的核型分析[J]. 山西农业大学学报, 1999, 19(1): 63-64.
- [72] 王冰, 杨怀林, 郑太坤, 等. 金挖耳的核型分析[J]. 中药材, 1999, 22(4): 163-165.
- [73] 黄邦全, 薛小桥, 居超民, 等. 桂竹香的核型分析[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 1999, 21(1): 79-80.
- [74] 游兰英, 刘广发, 林建明. 杜氏藻同步化生长及核型分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, 36(2): 276-281.
- [75] 郭运玲, 熊和平, 唐守伟, 等. 亚麻 (*Linum usitatissimum* L.) 染色体核型分析[J]. 中国麻业, 2001, 23(3): 9-11.
- [76] 邵剑文, 李晓红, 韩露, 等. 5种珍珠菜属植物的核型分析[J]. 云南植物研究, 2004, 26(4): 427-433.
- [77] 李国泰. 轮叶百合染色体核型分析[J]. 通化师范学院学报, 2004, 25(2): 74-75.
- [78] 蒋姗姗, 梁英民, 王作军. 利用个人电脑系统及 Photoshop 软件进行核型分析[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(7): 860.
- [79] 刘泉, 傅祖芸. 一种植物染色体图像核型分析系统[J]. 计算机工程与应用, 2000(3): 71-74.
- [80] CHEN Hong QN Rui-Zhen. A new method for the identifying primary trisomics of rice[J]. ACTA AGRONOMICA SINICA, 2001: 923-929.
- [81] Eliana Regina Forni-Martins, Karine Pablos Calligaris. Chromosomal studies on Neotropical *Limnocharitaceae* (Alismatales) [J]. Aquatic Botany, 2002(74): 33-41.
- [82] B. G. MURRAY and A. G. YOUNG. Widespread Chromosome Variation in the Endangered Grassland Forb *Rutidosia leptorrhynchoides* F. Muell. (Asteraceae: Gnaphalieae) [J]. Annals of Botany, 2001(87): 83-90.
- [83] J úlia Y. Costa, Eliana R. Forni-Martins. A triploid cytotype of *Echinodorus tennellus* [J]. Aquatic Botany, 2004(79): 325-332.
- [84] N. TORRES, L. SA EZ, J. A. ROSSELLO' AND C. BLANCHE'. A new *Delphinium* subsp. from Formentera (Balearic Islands) [J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2000(133): 371-377.
- [85] Yumi Obata, Yoshiji Niimi, Masaru Nakano, Keiichi Okazaki, Ichiro Miyajima. Interspecific hybrids between *Lilium nobilissimum* and *L. regale* produced via ovules with placental-tissue culture [J]. Scientia Horticulturae, 2000(84): 191-204.
- [86] Stebbins GL. Chromosomal evolution in higher plants [M]. London: Edward Arnold, 1971, 85-104.
- [87] Levan A, et al. Nomenclature for centromeric position on chromosome [J]. Hereditas, 1964(52): 201.

(责任编辑: 高红卫)