

赖草(*Leymus secalinus*(Georgi) Tzvel.) 中一个染色体标记的克隆与鉴定

李媛^{1,2}, 喻凤^{1,2}, 赵闫闫^{1,2}, 窦全文¹

(¹中国科学院西北高原生物研究所/高原生物适应与进化重点实验室, 西宁 810001; ²中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 通过构建 Cot-1 DNA 文库以及利用荧光原位杂交技术, 从赖草(*Leymus secalinus*(Georgi) Tzvel.) 中克隆获得一个在染色体多个部位具有点状杂交信号的重复序列。进一步对该序列在赖草基因组进行克隆和分析表明该序列为一个具有 90 bp 的重复单元(pLs-90), 并在基因组中呈串联状排列。利用 pLs-90 对赖草进行分子核型分析, 结果表明: pLs-90 在染色体的着丝粒、近着丝粒、臂间以及近端粒区均有分布, 而且在每对染色体上信号分布模式不尽相同, 结合染色体臂比可以清楚地对赖草的 14 对(28 条)染色体进行识别。pLs-90 不仅可作为赖草种质鉴定和利用中染色体识别的理想标记, 也可作为研究小麦族不同物种染色体组进化的有力工具。

关键词: 赖草; Cot-1 DNA; 荧光原位杂交; 重复序列; 染色体标记

Isolation and Characterization of a Chromosome Maker in *Leymus secalinus* (Georgi) Tzvel.

LI Yuan^{1,2}, YU Feng^{1,2}, ZHAO Yan-yan^{1,2}, DOU Quan-wen¹

(¹Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota/Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008; ²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract: A repeat sequence producing multiple hybridization signals on chromosomes was obtained by constructing a Cot-1 DNA library and screening with a technique of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in *Leymus secalinus*(Georgi) Tzvel. Further cloning and sequence analysis revealed that the sequence was tandem arranged in the genome with a repeated motif of 90 bp. The repetitive sequence was named as pLs-90. Karyotyping with pLs-90 revealed that each chromosome of *L. secalinus* could be well identified by the different FISH patterns with multiple hybridizations on centromeric, subcentromeric, interstitial, or subtelomeric regions. pLs-90 not only could be an ideal chromosome maker for *Leymus* germplasm identification and utilization but also a powerful tool for studying the genome evolution of different species in Triticeae.

Key words: *Leymus secalinus*; Cot-1 DNA; FISH(fluorescence *in situ* hybridization); repeat sequence; chromosome marker

赖草属(*Leymus* Hochst.) 是禾本科(Poaceae)小麦族(Triticeae)的一个重要多年生属; 全世界的赖草属约有 53 个种, 主要分布于欧亚大陆和北美地区; 赖草属植物的生存环境非常广泛, 并且具有极强的耐寒、耐旱、抗虫、抗病等适应性^[1-3]。赖草属植

物多数种类为草原优良牧草, 如羊草(*L. chinensis*(Trin.) Tzvel.) 作为畜牧业上的优良牧草, 在我国内蒙古和黑龙江作为奶牛场重要的粗饲料资源; 赖草属植物的一些物种根系较发达, 可作为保土固沙的备选植物^[4]; 同时赖草属物种为小麦近缘种, 是

收稿日期: 2014-08-11 修回日期: 2014-12-01 网络出版日期: 2015-06-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150611.0955.015.html>

基金项目: 青海省科技厅科技促进新农村建设项目(2013-N-515); 中科院“西部之光”联合学者人才培养计划项目

第一作者主要从事赖草属植物重复序列的研究及小麦族植物的远缘杂交育种的研究。E-mail: liyuan0601@126.com

通信作者: 窦全文, 主要从事植物遗传与育种研究。E-mail: douqw@nwipb.cas.cn

进行麦类改良的重要基因资源,如迄今研究者通过染色体工程手段,已经成功将大赖草(*L. racemosus* (Lam.) Tzvel.)、滨麦(*L. mollis* (Trin.) Hara)等赖草属物种的优良性状导入到小麦中^[5-6]。

对赖草属物种基因组组成及进化的深刻认识,对于有效发掘和利用赖草属物种基因资源具有重要意义。赖草属基因组的组成为NsXm,为异源多倍体。细胞遗传学研究资料表明其染色体倍性从四倍体($2n = 4x = 28$)到十二倍体($2n = 12x = 84$)变化不等,但以四倍体居多^[3,7]。已有大量细胞学和分子生物学数据表明Ns基因组来源于新麦草属(*Psathyrostachys Nevski*),但Xm基因组的来源依旧不清楚^[8-9]。

染色体标记是进行染色体识别的重要工具,在麦类与近缘物种杂交后代中,染色体的识别和跟踪是进行染色体工程育种的重要步骤。比较染色体标记在不同基因组间的分布,可以推断物种基因组来源以及不同物种间基因组分化关系^[10]。植物染色体标记通常由一些重复序列组成,而由串联重复序列组成、荧光原位杂交呈点状信号的染色体标记在染色体识别中具有较高价值。多个染色体标记已经在赖草属物种中得到克隆和鉴定,但是多数标记在染色体上杂交信号呈散布分布^[11],以及杂交信号集中分布在端部和近端部区^[12],在对单个染色体识别中利用价值不高。

植物Cot-1 DNA富集了基因组中度和高度重复序列^[13-14],利用染色体荧光原位杂交技术(FISH, fluorescence *in situ* hybridization)对Cot-1 DNA文库进行筛选和鉴定,被证明是一种开发染色体标记快速有效的手段^[15-16]。

本研究以赖草(*L. secalinus* (Georgi) Tzvel.)为材料,建立Cot-1 DNA文库,通过FISH技术从中筛选出了一个杂交信号在不同染色体间具有较高多态性的染色体标记pLs-90。该染色体标记可以作为赖草遗传资源鉴定和利用以及赖草属基因组研究的有效工具。

1 材料与方法

1.1 材料

赖草(*L. secalinus* (Georgi) Tzvel.) ($2n = 4x = 28$, NsNsXmXm)种子采集于青海西宁。

1.2 方法

1.2.1 Cot-1 DNA的制备 Cot-1 DNA的制备主要按照M. S. Zwick等^[14]的方法。先根据G. C. Allen等^[17]的CTAB法提取赖草的基因组DNA。用5 mol/L NaCl溶液和ddH₂O将基因组DNA稀释至

300 ng/ μ L, NaCl终浓度为0.3 mol/L。高压灭菌锅中将基因组DNA灭菌打断于100~1000 bp之间。DNA片断在沸水浴中变性10 min,立即置冰上2 min,65℃水浴复性,按照Cot-1 DNA动力公式计算时间复性。用S1核酸酶消化,条件为37℃下水浴8 min,即得Cot-1 DNA。

1.2.2 Cot-1 DNA文库构建 Cot-1 DNA末端加“A”,反应体系为10×Taq buffer 1 μ L、dNTP mix (2.5 mmol/L) 1 μ L、Taq聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L、50~300 ng纯化产物,最后加ddH₂O至10 μ L,PCR仪中72℃延伸30 min。用T4 DNA连接酶将末端加“A”后的Cot-1 DNA连接到T载体上,将连接产物转化入*Escherichia coli* DH5 α ,在添加X-gal、IPTG、Ampicillin的LB培养基上筛选阳性克隆。

1.2.3 探针制备所用DNA的扩增 利用通用引物M13以菌落DNA为模板,进行PCR扩增获得。

1.2.4 探针的制备 纯化PCR产物,通过随机引物法,用Tetramethyl-rhodamine-5-dUTP(Roche Diagnostics)进行标记。

1.2.5 染色体制片 将赖草的种子放在有湿润滤纸的培养皿中,常温下发芽。待根尖长至1.5~2 cm时,取出根,冰水处理24 h,用卡诺氏液固定30 min以上,取根尖分生区部分,45%醋酸火焰干燥压片,相差显微镜观察,选取中期分裂良好的制片,-80℃冰冻。

1.2.6 染色体荧光原位杂交 将冰冻的制片揭片,待脱水干燥后放入0.2 mol/L溶于70%酒精的NaOH溶液变性10 min,之后立即放入-20℃预冷的无水乙醇中,5 min后取出气干。将含有10 μ L杂交液和1 μ L探针溶液的混合液沸水浴5 min,杂交液中含有50%甲酰胺、50%硫酸葡聚糖、1 mg鲑鱼精DNA、1 μ L 20×SSC和10 ng探针DNA,取出后立即放入冰水中冷却。将上述混合液加在制片上,盖上盖玻片,放在垫有湿滤纸的密闭盒子中,37℃避光杂交过夜。次日取掉盖玻片,用蒸馏水冲洗片子上的杂交液。气干后在制片上滴加10 μ L DAPI抗荧光衰减封片剂,封片后荧光显微镜(Leica DMR)观察拍照。

1.2.7 染色体臂比分析方法 染色体的相对长度、臂比及类型参照A. Levan等^[18]的命名系统,核型类型参照G. L. Stebbins^[19]标准。相关公式为:臂比=长臂/短臂;相对长度(%)=单个染色体长度/单套染色体组全长×100。

2 结果与分析

2.1 利用 FISH 技术对 Cot-1 DNA 文库的快速筛选

随机挑选 40 个克隆,对每个克隆中插入片段进行探针标记,对赖草根尖有丝分裂细胞进行 FISH 筛选。结果表明,40 个克隆中 33 个没有杂交信号。7 个信号标记比较强的克隆中 2 个表现为端部信号,4 个表现为弥散状信号,1 个克隆(克隆 40)在多个染色体、且在染色体不同部位呈现杂交信号,表明克隆 40 可以作为一个细胞学标记在染色体鉴定中加以利用。

2.2 目标克隆的序列分析

进一步进行测序分析表明,克隆 40 含有 70 bp 长度的插入序列,将该序列与 NCBI 数据库中的核酸序列进行比对,表明该序列与 GenBank 中公布的小麦 pTa-885 基因序列(KC290902.1) 同源性达 97%;与小麦 pTa-779(KC290901.1)、pTa-713(KC290900.1)、pTa-551(KC290899.1) 基因序列同源性达 94%。

2.3 重复单元的获得

由于 Cot-1 DNA 文库中克隆所含的 DNA 片段为随机打断所得,利用克隆 DNA 进行染色体 FISH 分析时,当克隆所含某重复序列中的一段序列时,就有可能在染色体产生信号,克隆 40 仅含有 70 bp 的长度,序列分析没能寻找出重复单元,因此表明克隆 40 中仅含有一个重复序列中的部分序列。为进一步获得完整重复单元,利用克隆 40 序列设计 1 对引物 5'-CATCGCGGTAGCGACGGC-3' 和 5'-CGT-GCTCGTCTCGGCG TC-3',以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增结果为大小不等的弥散条带。对弥散条带回收,建立 DNA 文库。菌落 PCR 扩增筛选,选取长度约 1000 bp 的克隆进行测序,结果得到了长度为 690 bp 的 DNA 序列,利用 DNAMAN 软件对该序列进行重复单元寻找,发现该序列包含了 6 个完整的重复单元及 3 个含部分重复单元的片段,重复单元长度约为 90 bp,重复单元之间呈首尾相接状排列,表明该序列为一典型的串联重复序列(图 1)。由于该重复序列在赖草属物种中首次克隆获得,命名为 pLs-90。

2.4 基于 pLs-90 杂交的赖草分子核型分析

利用 ImageJ 1.48u 软件(imagej.nih.gov/ij/index.html) 测量赖草核型分析图中的染色体长臂、短臂的长度,并计算每条染色体的臂比值(长臂/短臂),确定着丝粒位置类型以及计算出染色体的相对长度(表 1),结合 pLs-90 在染色体上不同的信号

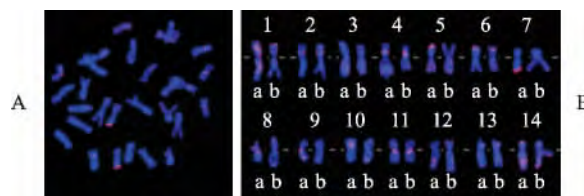
分布特征,得到赖草分子核型(图 2)。每对染色体具体特征如下。

Sec-aCGTCT	5
Sec-b	ggttggcagcagtgtcacatgctcatctcggtgtc--c-g	40
Sec-c	gggtggcagtggtgtcacgtgctcgtcccgcg.....	33
Sec-d	gggtggcaatggtgtcacgtgctcgtcttggtatc--c-g	40
Sec-e	gggtggcagtgagtgacgtgctcgtctcggcgctc--c-g	40
Sec-f	gggtggcagtggtgtcacgtgctcgtctcggcgctc--c-a	40
Sec-g	gggtggcagtggtgctcggcgctcgtctcggcgctc----	40
Sec-h	gggtggcagtggtgtcacgtgctcatctcggcgaa--c-g	40
Sec-i	gggtggcagtcgtgctatgtactcgtctcgggtgata-c-g	40
Sec-a	CGGCGTCCG...TTGTCGCTACCGTGACTCGGTACCCTA	42
Sec-b	tc--ta---cga-gacgtt-ga-tc-----a----a--ct	80
Sec-caacgt-cg--t-----t--a--atgct	60
Sec-d	tc--ta---cga-gacat-cg--t-----a--a-tct	80
Sec-e	tc--ta---cga-gacat-cg--tc--t-----a--a-gct	80
Sec-f	tct-ta---cgacgacgt-cg-ttct-----a--ct	80
Sec-g	--at-aa--...cc-----tc-----	77
Sec-h	tc--ta---caa-gac-ttcg--t-----a-	80
Sec-i	tc--ta---cga-g.....	54
Sec-a	AGACT.....	47
Sec-b	-agt-agaca	90
Sec-c	-agact....	66
Sec-d	-agt-agaca	90
Sec-e	-agaca....	86
Sec-f	-agt-agaca	90
Sec-g	-----	82
Sec-h	-----	85
Sec-i	-----	54

-代表核苷酸相同;·代表核苷酸不存在
- represents nucleotide consistent, · represents nucleotide absent

图 1 pLs-90 序列的重复单元(b d e f g h)和 3 个部分重复单元(a c i)之间的比对信息

Fig. 1 Alignment between the six complete repeating units(b d e f g h) and three partial repeating units(a c i) of pLs-90 sequence



A: 赖草荧光原位杂交图; B: 赖草核型分析图。

红色信号为 pLs-90,蓝色为 DAPI 染色的中期染色体

A: Fluorescent in situ hybridization(FISH) mapping of *L. secalinus*,

B: Karyotyping of *L. secalinus*.

The signals of pLs-90 are red and chromosomes are blue in FISH pictures

图 2 pLs-90 探针在赖草中期染色体上的 FISH 定位及基于 pLs-90 探针的赖草核型分析图

Fig. 2 Physical mapping and FISH-aimed karyotyping of pLs-90 on metaphase chromosomes of *L. secalinus*

表1 赖草染色体核型参数

Table 1 The chromosome karyotype parameters of *L. secalinus*

染色体编号 Chromosomes codes	相对长度(%) Relative length	臂比 Arm ratios	类型 Type	
1	a	9.17	1.55	m
	b		1.54	
2	a	8.57	1.40	m
	b		1.39	
3	a	8.29	1.37	m
	b		1.48	
4	a	7.66	1.30	m(sat)
	b		1.28	
5	a	7.26	1.17	m
	b		1.17	
6	a	6.7	1.36	m
	b		1.37	
7	a	6.35	1.59	m
	b		1.53	
8	a	6.32	1.20	m
9	a	6.08	1.27	m(sat)
	b		1.30	
10	a	6.02	1.22	m
	b		1.28	
11	a	5.61	1.31	m
	b		1.31	
12	a	7.39	2.64	sm
	b		2.54	
13	a	7.32	1.92	sm
	b		1.87	
14	a	7.27	2.19	sm
	b		2.05	

中部着丝粒染色体(1~11号):1号染色体在其短臂的间区、端部、近着丝粒区和长臂间区有点状信号分布从而与其他的染色体有明显的区别,b染色体信号比a弱;2号染色体在其短臂间区有2个强的点状信号与其他染色体具有明显的区分,此外b的整个染色体均有弱的点状信号分布;3号染色体在除了a长臂端部的其他部位外均有散布的点状信号分布;4号染色体在其短臂间区有强的点状信号分布从而与其他的染色体有明显的区分,在其长臂上也有散布的点状信号分布;5、6、7号染色体因分别在其短臂的端部、短臂的近端部和长臂的端部

有强的点状信号分布从而和其他染色体具有明显的区分;8号染色体因在其着丝粒、端部和近端部有强的信号从而与其他的染色体相区分,此外在其短臂间区有弱的信号分布;9号的a染色体在其近着丝粒区和长臂的次缢痕部位有强的点状信号,b染色体没有明显的信号分布;10号a染色体在其短臂间区有强的点状信号,b染色体在除了长臂间区外的其他部位有弱的点状信号分布;11号染色体因具有强的着丝粒信号很容易与该组其他的染色体区分开,另外在a的端部及a和b短臂的间区有弱的信号分布。

亚中着丝粒染色体(12~14号):12号染色体因在长臂间区有强的点状信号与其他的染色体明显的区分,在b的短臂端部有弱的点状信号分布;13号染色体因具有除了短臂和长臂端部外的其他部位有微弱的信号分布从而与其他的染色体相区分;14号染色体a的短臂端部和长臂间区有强的点状信号,此外a长臂的间区还有些弱的信号,b染色体和a有相同的信号分布,但信号都比a弱。

3 讨论

染色体荧光原位杂交技术(FISH)结合现代分子生物学和传统细胞学技术,是当前进行染色体识别和鉴定最为有效的手段^[20-21],而具有可供利用的染色体标记是染色体FISH鉴定的必备工具。染色体标记可以通过对重复序列的克隆和鉴定获得,多种方法可以获得染色体标记,如基因组DNA酶切条带的鉴定^[22]、基因组DNA文库的筛选鉴定等^[23]方法。本研究中利用赖草基因组Cot-1 DNA文库进行染色体标记的筛选,阳性率达18%。因此可见利用Cot-1 DNA文库是快速、经济获得染色体标记的一种有效手段。

对多个赖草属物种染色体进行C-带分析以及DAPI分带分析表明,在染色体近端部显现较强的C-带和DAPI带^[24-26],而在染色体着丝粒区和染色体臂中间区缺少明显的带纹,利用染色体分带技术很难将赖草属所有的染色体进行识别。植物染色体分带分析中,带纹分布区往往是DNA重复序列富集区,赖草染色体带纹多分布在近端部表明,通过重复序列克隆和鉴定获得近端粒区的染色体标记相对容易,前人从赖草属物种中获得多个串联重复序列,如350-bp家族和Tail家族重复序列^[22]以及Lt1重复序列^[26]等均位于染色体近端部。多个散布重复序列从赖草属物种中得到^[11],但是由于重复序列在染

染色体上散布分布,不具备作为染色体标记的价值。本研究从赖草中克隆和鉴定得到的串联序列 pLs-90 杂交信号位于染色体端部、近着丝粒区以及染色体臂的中间区域,而且在不同染色体上分布模式具有多态性,因此该重复序列可作为赖草染色体鉴定的一个理想标记。

通过 NCBI 数据库中的 DNA 序列比对,表明重复序列 pLs-90 与来自普通小麦 DNA 序列 pTa-885 (KC290902.1) 同源性达 97%,与 pTa-779 (KC290901.1)、pTa-713 (KC290900.1) 和 pTa-551 (KC290899.1) 同源性达 94%。FISH 结果表明上述 4 个普通小麦中的重复序列在普通小麦染色体上以点状形式分布于小麦 A、B 和 D 基因组的多个染色体上^[23]。小麦和赖草同属小麦族植物,小麦族包含有 Ns、H、P、St、Y、W、E 等 20 多个基本基因组,其中普通小麦中的 A、B 和 D 基因组,与赖草属物种中的 Ns 和 Xm 基因亲缘关系相对较远。pLs-90 与小麦中重复序列 94% 以上的同源性表明, pLs-90 是一个很保守的重复序列,推测在起源上可能为一个古老的序列,并且有可能存在于小麦族其他基因组中。pLs-90 有可能作为研究小麦族不同属间以及属内不同种间染色体组进化的有效工具。

赖草分子核型分析表明,部分同源染色体间 pLs-90 杂交信号分布具有多态性。自然界中赖草是以根茎繁殖为主的物种,有性生殖系统相对退化,天然结实率较低。部分同源染色体间多态性显示,赖草结实率低可能是由于这些同源染色体异质导致减数分裂不正常,从而导致花粉败育。因此,从后代种子中选择纯合的细胞型有可能提高赖草的结实率,从而解决赖草资源利用中种子产量低的问题。

参考文献

- [1] 王惠宁,董淑敏,赵茂林. 赖草属植物的优良特性及其研究与利用[J]. 北京农业科学, 1997, 15(5): 20-25
- [2] Dewey D R. The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with the perennial Triticeae [M]. New York: Plenum Press, 1984: 209
- [3] Löve Å. Conspectus of the Triticeae [J]. Feddes Rep, 1984, 95: 425-521
- [4] 蔡联炳,苏旭. 国产赖草属的分类修订[J]. 植物研究, 2007, 27(6): 651-660
- [5] Kishii M, Yamada T, Sasakuma T et al. Production of wheat-*Leymus racemosus* chromosome addition lines [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109(2): 255-260

- [6] 王献平,傅杰,张相岐,等. 八倍体小滨麦染色体组构成的分子细胞遗传学研究[J]. 植物学报, 2000, 42(6): 582-586
- [7] Barkworth M E, Atkins R J. *Leymus* Hochst. (Gramineae: Triticeae) in North America: taxonomy and distribution [J]. Am J Bot, 1984, 71(5): 609-625
- [8] Wang R R C, Jensen K B. Absence of the J genome in *Leymus* species (Poaceae: Triticeae): evidence from DNA hybridization and meiotic pairing [J]. Genome, 1994, 37(2): 231-235
- [9] Zhang H B, Dvořák J. The genome origin of tetraploid species of *Leymus* (Poaceae: Triticeae) inferred from variation in repeated nucleotide sequences [J]. Am J Bot, 1991, 78(7): 871-884
- [10] Wang R R C, Zhang J Y, Lee B S et al. Variations in abundance of 2 repetitive sequences in *Leymus* and *Psathyrostachys* species [J]. Genome, 2006, 49(5): 511-519
- [11] Bödvarsdóttir S K, Ananthawat-Jónsson K. Isolation, characterization and analysis of *Leymus*-specific DNA sequences [J]. Genome, 2003, 46(4): 673-682
- [12] Nagaki K, Kishii M, Tsujimoto H, et al. Tandem repetitive Afa-family sequences from *Leymus racemosus* and *Psathyrostachys juncea* (Poaceae) [J]. Genome, 1999, 42(6): 1258-1260
- [13] 龚全文,雷云霆,王海庆. 苜蓿种质间染色体多态性的荧光原位杂交检测[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(5): 782-788
- [14] Zwick M S, Hanson R E, Islam-Faridi M N et al. A rapid procedure for the isolation of Cot-1 DNA from plants [J]. Genome, 1997, 40(1): 138-142
- [15] Zhang L, Xu C, Yu W. Cloning and characterization of chromosomal markers from a Cot-1 library of peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Cytogenet Genome Res, 2012, 137(1): 31-41
- [16] Yu F, Lei Y T, Li Y et al. Cloning and characterization of chromosomal markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2013, 126(7): 1885-1896
- [17] Allen G C, Flores-Vergara M A, Krasynanski S et al. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide [J]. Nat Protoc, 2006, 1(5): 2320-2325
- [18] Levan A, Fredga K, Sandberg A. Nomenclature for centromeric position on chromosome [J]. Hereditas, 1964, 52: 197-201
- [19] Stebbins G L. Chromosome evolution in higher plants [M]. London: Edward Arnold, 1971: 88
- [20] Jiang J M, Gill B S. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research [J]. Genome, 2006, 49(9): 1057-1068
- [21] 盛茂银. 栽培荞麦 45S 和 5S rDNA 的染色体物理定位研究[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(2): 317-321
- [22] Kishii M, Nagaki K, Tsujimoto H, et al. Exclusive localization of tandem repetitive sequences in subtelomeric heterochromatin regions of *Leymus racemosus* (Poaceae, Triticeae) [J]. Chromosome Res, 1999, 7(7): 519-529
- [23] Komuro S, Endo R, Shikata K, et al. Genomic and chromosomal distribution patterns of various repeated DNA sequences in wheat revealed by a fluorescence *in situ* hybridization procedure [J]. Genome, 2013, 56(3): 131-137
- [24] 刘光欣,陈佩度,王苏玲,等. 8 个大赖草材料的 C-分带和 RAPD 分析[J]. 草业学报, 2006, 15(2): 107-112
- [25] 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): 73-75
- [26] Ananthawat-Jónsson K, Wenke T, Thörsson A T et al. Evolutionary diversification of satellite DNA sequences from *Leymus* (Poaceae: Triticeae) [J]. Genome, 2009, 52(4): 381-390