

构树染色体制片效果影响因素与核型分析

闫东方^{1,2,3,4}, 周玮^{1,2,3,4}, 王鑫^{1,2,3,4}, 任颖^{1,2,3,4}, 杨恩点^{1,2,3,4}, 陈晓阳^{1,2,3,4}

(1. 广东省木本饲料工程技术中心, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学 林学与风景园林学院, 广东 广州 510642; 3. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东 广州 510642; 4. 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:于2017年10月采集广东省广州市的构树 *Broussonetia papyrifera* 种子5000粒, 2018年2月进行种子萌发, 通过常规压片方法进行核型分析。结果表明, 在2018年3月2日至5月9日的10:00-10:30, 发育7d的材料有丝分裂指数最高, 相比于化学处理方法, 用冰水混合物预处理12h时染色体形态更清晰易辨; 解离10min时根尖细胞染色体分散较好。构树染色体数目为26条, 为二倍体, 核型公式为 $2n=2x=26m$, 核型属于2A型。

关键词: 构树; 染色体; 制片技术; 核型分析

中图分类号: Q943 文献标志码: A 文章编号: 1001-3776(2019)03-0037-08

Influencing Factors of Tabletting Chromosome of *Broussonetia papyrifera* and Karyotype Analysis

YAN Dong-fang^{1,2,3,4}, ZHOU Wei^{1,2,3,4}, WANG Xin^{1,2,3,4}, REN Ying^{1,2,3,4}, YANG En-dian^{1,2,3,4}, CHEN Xiao-yang^{1,2,3,4}

(1. Guangdong Woody Forage Engineering Center, Guangzhou 510642, China; 2. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangzhou 510642, China; 4. Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In October of 2017, 5000 seeds were collected from *Broussonetia papyrifera* in Guangzhou, Guangdong province, and in February of 2018, germination breaking was carried out. Caryotype analysis was implemented by pellet method. The result showed that the highest mitotic index was obtained from 7-day radicals at 10:00 and 10:30 during March 2 to May 9 of 2018. The morphology of chromosome was clearer when the radicals were treated with ice water for 12 hours. The dispersion of chromosomes was the best when 10 minutes was dissociated. The chromosome numbers of *B. papyrifera* were 26, diploid, and the karyotype formula was $2n=2x=26m$, and the karyotype belonged to 2A type.

Key words: *Broussonetia papyrifera*; chromosome; pellet method; karyotype analysis

构树 *Broussonetia papyrifera* 是桑科 Moraceae 构属 *Broussonetia* 的速生落叶乔木, 主要分布于亚洲东部及太平洋岛屿, 广泛分布于我国大部分地区^[1]。它是我国重要的经济林木, 其树皮纤维品质优良, 自古就是造纸的优良原料^[2]; 构树具有药用价值, 其乳液、根皮、树皮、树叶、果实及种子均可入药, 具有补肾、利尿、强筋骨等作用^[3]; 环境适应性强, 是迅速绿化荒山、盐碱地的理想树种。枝叶粗蛋白含量高, 并且富含氨基酸、维生素、碳水化合物以及微量元素, 是畜类饲料生产的优质原材料。目前构树饲料产业作为我国十大精准扶贫项

收稿日期: 2018-10-11; 修回日期: 2019-03-27

基金项目: 华南地区主要木本饲料植物种质资源创新利用关键技术研究与示范(2017KJCX029)

作者简介: 闫东方, 硕士研究生, 从事构树再生体系及多倍体育种研究; E-mail: 2316280160@qq.com. 通信作者: 陈晓阳, 教授, 博士, 从事林木遗传育种研究; E-mail: xychen@scau.edu.cn.

目之一,在贵州、广西、海南、湖南、四川等省区规模越来越大,被广泛种植^[4]。

植物染色体的数目、形态特征是最稳定的细胞学特征之一,染色体数目可以用来确定植物倍性。染色体核型参数、核型类型可作为物种的系统演化及其亲缘关系和分类鉴定的重要依据^[5]。1987年,蒋同庆等以西南农业大学校园内构树为材料通过涂片法得出染色体数目为24条,但未对染色体核型进行进一步分析^[6]。日本关博夫对构树不同品种进行细胞学研究后发现日本‘上田楮’ $2n = 2x = 26$ 的二倍体、 $2n = 4x = 52$ 的四倍体,‘佐贺楮’ $2n = 3x = 39$ 的三倍体,染色体基数为13。本研究通过常规压片法得出构树染色体最佳制片条件,并进行核型分析,以期能为构树细胞遗传学和倍性育种等研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2017年10月13日,在广州市天河区岑的同株生长状况良好的成年构树上取完整成熟红种约5000粒。采收后立即清洗,洗净后放置在阴凉通风处干燥后封装于4℃冰箱保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 种子处理 2018年2月25日至4月30日,采用98%浓硫酸处理干燥种子9 min,用自来水清洗15 min后放入30℃,12 h光照+12 h黑暗条件的恒温培养箱中进行催芽培养。

1.2.2 胚根长度对制片的影响试验 分别待根发育6,7,8和9 d时取生长状态良好的胚根,并记录取材时的根长。

1.2.3 取材时间对制片的影响试验 2018年3月2日至5月9日,每隔4 d分别于08:00,08:30,09:00,09:30,10:00,10:30,11:00,11:30,12:00取长度为1.0 cm的胚根,作为制片观察材料,每个时间点取20条以上根尖。

1.2.2 不同预处理试验 从取材时间和胚根长度试验所得结果为取材时间为10:30,胚根长度为1.0 cm的制片最佳,故核型试验选择10:30取1.0 cm的胚根,根据预备试验的初步结果进行不同预处理。试验采用冰水混合物、0.1%秋水仙素、 2 mmol L^{-1} 8-羟基喹啉3种预处理试剂,每种试剂分为3~4个时间梯度(冰水混合物处理6,12,24 h;秋水仙素4℃下处理1,2,3,4 h;8-羟基喹啉室温处理1,2,3,4 h),对照(CK)为无预处理。

1.2.3 固定 将预处理后的胚根用新鲜配制的卡诺氏固定液($V_{\text{无水乙醇}}:V_{\text{冰乙酸}}=3:1$)于4℃下固定24 h。经固定且清洗干净的材料置于70%乙醇中低温保存备用。

1.2.4 不同酸解时间对制片的影响试验 蒸馏水清洗胚根15~20 min以冲走固定液,用 1 mol L^{-1} 盐酸于60℃下解离由冰水混合物处理的根,设置6个时间梯度:0 min,6 min,8 min,10 min,12 min,14 min。采用卡宝品红染液对解离后的胚根染色5~7 min。

1.2.5 核型分析 选取能准确计数的30个以上分裂相较好的细胞进行染色体计数;选取5个染色体数目完整、轮廓清晰、着丝粒清晰、背景干净的细胞进行核型分析。

1.2.6 数据统计与分析 细胞中22条染色体都不与其他染色体重叠,或重叠但仍可以区分染色体的轮廓,则称该细胞为染色体分散良好的细胞。于40倍物镜下观察约1000个细胞,统计中期分裂细胞及染色体分散较好的细胞数目,计算中期分裂指数和染色体分散指数^[7],以确定最佳取材年龄及取材时间。

中期分裂指数 = (中期分裂相细胞/观察的细胞) × 100%;

染色体分散指数 = (适合做核型分析的中期细胞/中期分裂相细胞) × 100%。

在OLYMPUS显微镜下观察制片效果,对染色体形态结构、解离分散程度进行拍照记录,以确定最佳预处理方式及酸解时间。

利用Photoshop软件对染色体进行测量和配对,根据核型参数表得出核型公式。染色体长和臂比等参数参照Levan^[8]的方法归类,利用Excel及画图软件绘制核型模式图;依照李懋学等^[9]提出的标准进行核型命名,对其进行核型分析依据Stebbins^[10]的核型分类标准得出核型类型。

2 结果与分析

2.1 胚根年龄对制片的影响

经浓硫酸预处理 9 min 后, 构树种子能够快速萌发。胚根生长至 0.5 cm 时, 根尖较粗较短; 至 1.0 cm 时, 根尖粗细、长短均匀, 且易于切取; 至 1.5 cm 时, 根尖较细较长; 至 2.0 cm 时, 根尖过长过细, 切取部位难以掌握, 制片效果差。

由表 1 可知, 根长为 1.0 cm 时, 即种子萌发 7 d 时, 其中期分裂指数和染色体分散指数分别为 5.60%, 35.71%, 显著优于其他根长 ($P < 0.05$), 其他根长之间的指标并无显著差异, 其中根长为 0.5 cm 时, 染色体分散指数最低, 仅为 14.29%, 根长为 2.0 cm 时, 中期分裂指数最低, 分裂相最少。因此种子萌发 7 d、根长为 1.0 cm 时的胚根制片效果最佳。

表 1 不同根长对染色体分裂的影响

Table 1 Effect of different root length on chromosome division

根长/cm	发育年龄/d	中期分裂指数/%	染色体分散指数/%
0.5	6	1.40±0.012b	14.29±0.002b
1.0	7	5.60±0.056a	35.71±0.022a
1.5	8	4.00±0.014b	21.43±0.006b
2.0	9	1.20±0.028b	16.67±0.002b

注: 表中数据为均值±标准误差; 同列的不同小写字母表示在 0.05 水平存在显著差异。下同。

2.2 不同取材时间对制片的影响

由表 2 可见, 构树根尖细胞分裂旺盛期在 09:30–10:30, 在此区间进行取样, 中期分裂指数大, 分裂细胞数多, 染色体分散指数大, 易于观测分析。从 08:00 开始, 中期分裂指数、染色体中期分裂指数均呈先增大后减小的趋势, 10:00 取样时, 染色体分散指数达到最大, 为 46.13%, 10:30 取样时, 中期分裂指数达到最大, 为 5.60%。

多重比较结果显示, 09:30–10:30 的中期分裂指数显著优于 08:00, 08:30, 11:30, 12:00 的 ($P < 0.01$), 08:00–09:00 与 11:00–12:00 之间无显著性差异; 10:00 的染色体分散指数显著优于 08:00–09:00 及 11:00–12:00 的 ($P < 0.01$), 09:30, 10:00, 10:30 之间无显著差异, 09:00, 09:30, 10:30, 11:00 之间无显著差异但均显著优于 08:00, 08:30, 11:30, 12:00。

表 2 不同取样时间对染色体分裂的影响

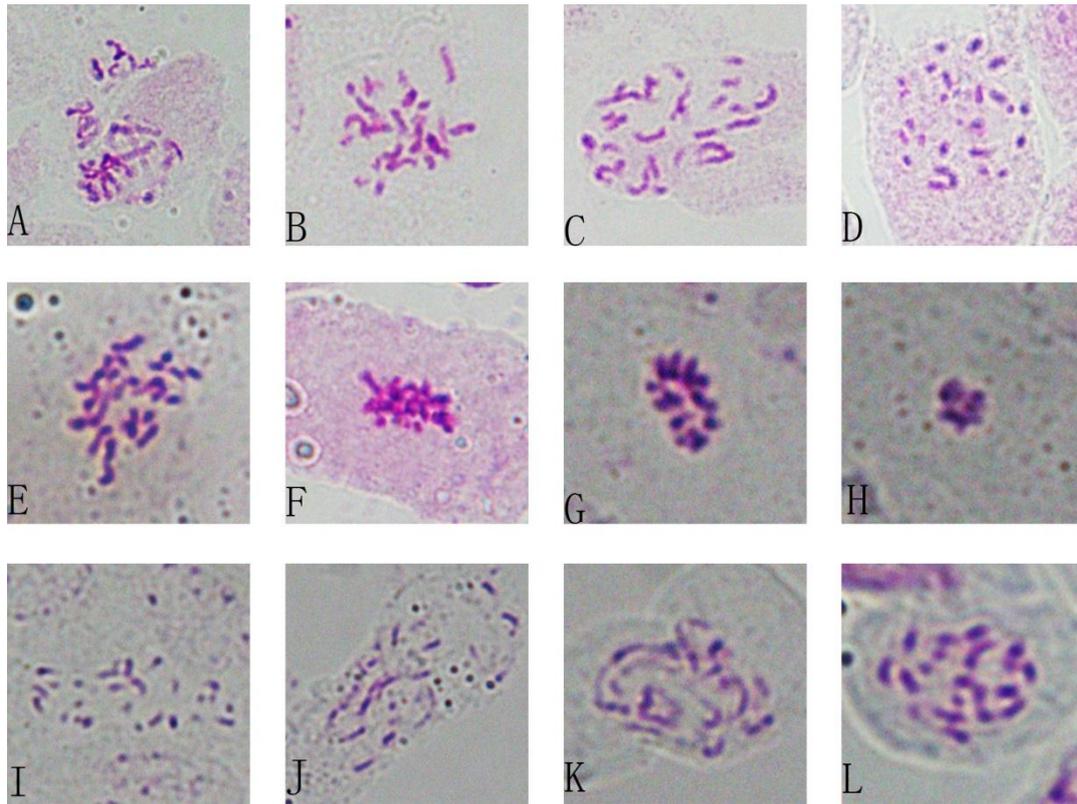
Table 2 Effect of different sampling time on chromosome division

取样时间	中期分裂指数/%	染色体分散指数/%	取样时间	中期分裂指数/%	染色体分散指数/%
08:00	1.60±0.016b	12.50±0.002c	10:30	5.60±0.056a	35.71±0.020ab
08:30	2.40±0.024b	16.67±0.004c	11:00	3.60±0.036ab	27.78±0.010b
09:00	4.00±0.040ab	25.00±0.010b	11:30	2.20±0.022b	18.18±0.004c
09:30	5.00±0.050a	28.00±0.014abc	12:00	1.80±0.018b	11.11±0.002c
10:00	5.20±0.052a	46.15±0.024a			

2.3 不同预处理对制片的影响

于 10:30 取材后未经预处理, 直接用卡诺氏固定液固定的材料, 解离困难, 染色体较长, 收缩程度不足, 难以抑制、破坏纺锤丝的形成, 中期分裂相较少, 很难获得分散良好的制片, 无法进行染色体计数及核型分析, 如图 1A 所示。

从构树根尖预处理结果 (图 1B, C, D) 可以看出, 不同预处理方法对染色体分散效果及清晰度有明显影响。其中, 冰水处理 12 h 效果最佳。如图 1B 所示, 细胞分裂相较多, 染色体浓缩程度适宜, 分散均匀, 形态清晰, 处理 24 h 时, 染色体过度固化皱缩呈点状, 已不适用于核型分析, 但可用于染色体计数。



A - 无预处理; B~D - 冰水混合物预处理 6, 12, 24 h; E~H - 秋水仙素预处理 1, 2, 3, 4 h; I~L - 8-羟基喹啉预处理 1, 2, 3, 4 h。

图 1 不同预处理方法下的染色体状态

Figure 1 Chromosomal status under different pretreatment methods

0.1%秋水仙素和 8-羟基喹啉预处理均以处理 1 h 效果较好, 前者处理染色体短粗, 分散较好但易粘连, 形态不宜观察; 后者处理染色体分散良好却皱缩成点状, 且相较于秋水仙素更短更小。而其余预处理效果不甚理想(表 3)。

表 3 不同预处理液对构树根尖染色体制片的影响

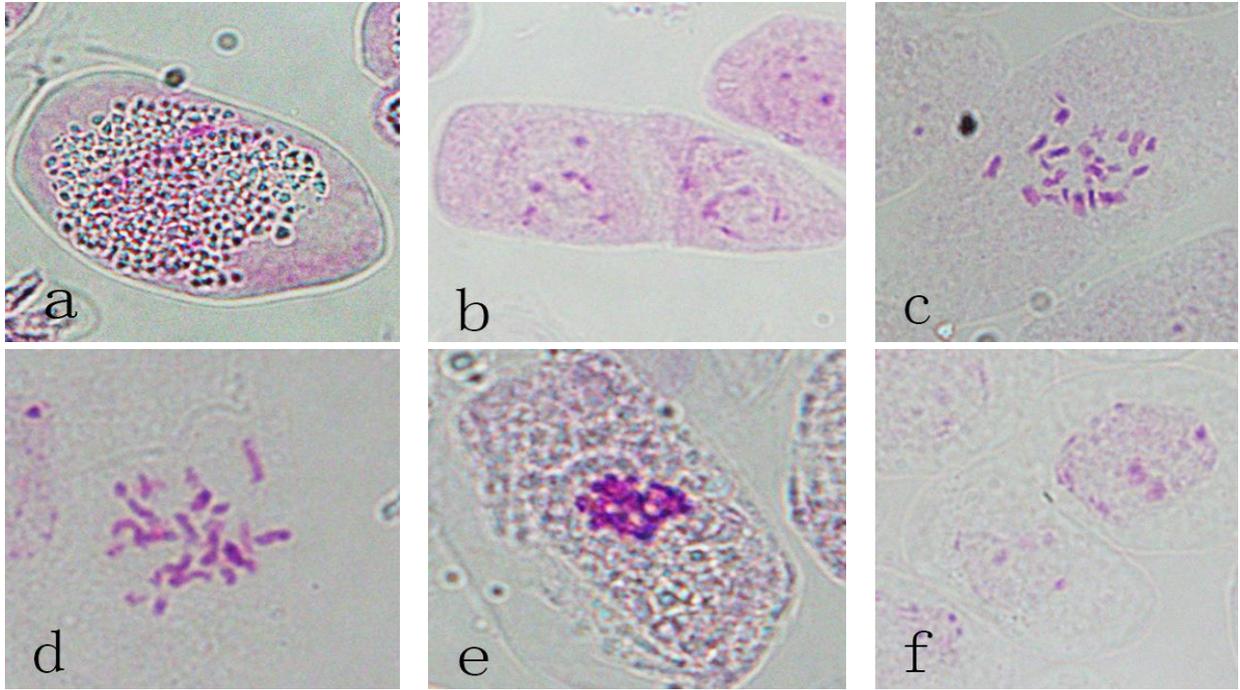
Table 3 Effect of different pretreatment solutions on the preparation of root tip chromosomes

预处理液	浓度	温度/°C	时间/h	效果
冰水混合物	-	0	6	形态清晰但不易分散
冰水混合物	-	0	12	形态清晰且分散良好、长度适中
冰水混合物	-	0	24	染色体皱缩变短、边界清晰
秋水仙素	0.1%	4	1	形态清晰但易粘连
秋水仙素	0.1%	4	2	染色体收缩、严重粘连、不分散
秋水仙素	0.1%	4	3	染色体进一步皱缩、不分散
秋水仙素	0.1%	4	4	染色体浓缩成团
8-羟基喹啉	2 mmol L ⁻¹	24~28	1	分散良好、染色体短
8-羟基喹啉	2 mmol L ⁻¹	24~28	2	分散较好、染色体较长
8-羟基喹啉	2 mmol L ⁻¹	24~28	3	染色体收缩、部分重叠、结构模糊
8-羟基喹啉	2 mmol L ⁻¹	24~28	4	染色体收缩变短

2.4 不同酸解时间对制片的影响

由图 2 可见, 酸解时间对构树染色体制片效果存在明显影响。当酸解时间为 0 min 时, 解离不充分, 细胞壁软化程度不足, 视野中未见中期分裂细胞, 无染色体分散(图 2a); 随解离时间的延长, 染色体离散程度逐渐增加, 酸解 6 min 时, 内部细胞开始接触染液, 细胞质着色较深, 与染色体对比度低(图 2b); 酸解 8 min 时, 细胞间较分散, 染色体着色良好(图 2c); 酸解 10 min 时, 细胞分散, 可用于核型分析的中期分裂相最多, 细胞质趋于透明, 染色体着色最佳, 对比度高, 更有利于观察分析(图 2d); 酸解 12 min 时, 酸解逐渐

过度, 染色体开始同细胞质呈相同着色状态, 不易观察 (图 2e); 酸解 14 min 时, 随细胞通透性的增加, 细胞开始破裂, 染色体难以留存在同一个细胞内且难以观察 (图 2f)。



A-0 min; b-6 min; c-8 min; d-10 min; e-12 min; f-14 min。

图 2 1 mol L⁻¹ 盐酸解离不同时间的染色体状态

Figure 2 Chromosome state after different times of 1 mol L⁻¹ hydrochloric acid treatment

2.5 染色体核型分析

对 30 个染色体分散良好的细胞进行染色体计数, 结果表明所有细胞的染色体均为 26 条, 占计数细胞的 100%, 确定二倍体构树染色体数目为 $2n=2x=26$ 。由图 1C 可见, 染色体形态清晰可见, 着丝点较清楚, 有 2 条染色体具有随体。构树染色体核型参数结果见表 4, 染色体相对长度变化范围为 4.05% ~ 11.53%, 臂比值集中在 1.03 ~ 1.28 之间, 全部为中部着丝粒染色体 (m), 第 4 对染色体具有随体。核型公式为 $2n=2x=26=26m$, 没有臂比值大于 2 的染色体, 属于 2A 型。核型模式图见图 3, 核型图见图 4。

表 4 构树核型分析参数

Table 4 The parameter of *B. papyrifera* karyotype analysis

染色体序号	相对长度	长臂相对长度	短臂相对长度	臂比	染色体类型
1	11.53	6.01	5.52	1.09	m
2	11.41	5.89	5.52	1.07	m
3	10.80	5.52	5.28	1.05	m
4	10.06	5.28	4.78	1.10	m
5	7.98	4.29	3.69	1.16	m
6	7.73	3.93	3.8	1.03	m
7	7.24	3.68	3.56	1.03	m
8	6.63	3.44	3.19	1.08	m
9	5.89	3.31	2.58	1.28	m
10	5.77	3.07	2.7	1.14	m
11	5.52	3.07	2.45	1.25	m
12	5.40	2.82	2.58	1.09	m
13	4.05	2.09	1.96	1.07	m

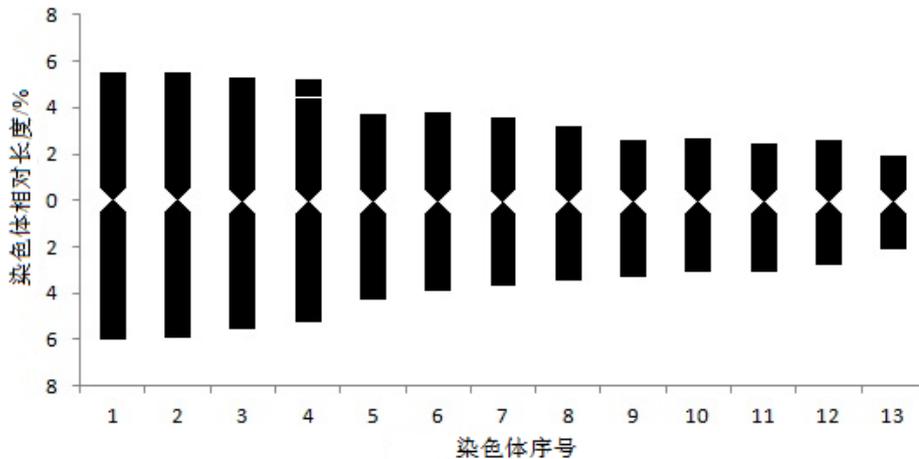


图3 核型模式图

Figure 3 Karyogram



图4 核型图

Figure 4 Karyotype

3 结论与讨论

在染色体制片过程中,材料的选取起着重要的作用,不同取材部位的中期分裂指数与染色体分散指数存在一定差异^[11]。由于高等植物有丝分裂主要发生在根尖、茎尖生长点和幼叶等的分生组织,因此取材时一般选取根尖、幼芽、茎尖、幼叶、诱导产生的愈伤组织等^[12],不同种植物适宜的取材部位不同。桑科植物常用嫩叶^[13-14],蒋同庆等^[6]在对构树染色体数目进行探究时选取幼嫩的茎尖为试验材料,最终得到分散较好的染色体制片,但未对分裂指数进行统计。目前,由于构树种子催芽萌发后根尖易得,操作、鉴定简便,且试验结果表明以根尖为构树染色体制片的材料时,分裂指数较好,能获得良好的制片效果,因此以根尖适宜作为构树染色体制片及核型分析的材料。

相同植物不同状态的根尖分裂情况不同,这不仅体现在获取根尖方式的区别,还表现在相同根尖的不同长度^[15]。根尖长度对细胞分裂指数有显著的影响($P < 0.05$),试验得出在根长至 1.0 cm 时,中期分裂指数及染色体分散指数最高,过长及过短分裂相均较少,这与其发育年龄有关,幼嫩的部位分裂比较旺盛,随着年龄的增长,根尖中淀粉积累增多,分裂相不容易看到。

分裂相的多少及分裂旺盛的程度是染色体制片的重要一步,一天中植物分裂旺盛期一般出现在 8:00 - 11:00,但不同物种的细胞分裂期长短及分裂旺盛的时间点存在一定差异^[11]。桑 *Morus alba* 在生长最旺盛的 8:00 - 9:00 取材所得试验结果最佳^[14]。红肉火龙果 *Hylocereus polyrhizus* 气生根染色体制片的最佳取材时间为 10:30^[16],药用植物刺五加 *Eleutherococcus senticosus* 根尖最佳取材时间为 09:30 - 10:30 及 13:30 - 14:30^[17],木薯 *Manihot esculenta* 根尖的最佳取材时间为 9:00 - 10:00^[18]。不同取材时间对构树中期分裂指数及染色体分散指数有显著影响($P < 0.01$),最佳取材时间段为 10:00 - 10:30。白刺花 *Sophora davidii*,向日葵 *Helianthus annuus*,欧李 *Cerasus humilis*,薯蓣 *Dioscorea opposita* 等植物^[19-22]在进行染色体制片时的最佳时间也与本文试验结果类似。

解离的主要目的是软化和分解部分细胞壁,同时清除部分细胞质,使细胞质背景透明化,便于染色体观

察^[23]。不同植物解离的方式不同, 由于构树根尖生长旺盛、生长势强、材料易得且酶解成本较高、处理时间长, 因此选择酸解的方式, 酶解的解离方式较温和, 适用于幼嫩、数量少的植物材料^[24]。解离时间随树种的先进程度逐渐增加, 裸子植物较被子植物在相同处理条件下解离时间较短即可获得清晰分裂中期物像。本试验得出 1 mol L⁻¹ 盐酸于 60℃ 下解离 10 min 为构树根尖最佳解离方式。其他相关研究表明芥蓝 *Brassica alboglabra*, 穿心莲 *Andrographis paniculata* 根尖以相同浓度相同温度条件下酸解 8 min 较好^[25-26], 过路黄 *Lysimachia christinae* 根尖酸解 10 min 最佳^[27], 橡胶草 *Taraxacum kok-saghyz* 根尖和嫩叶酸解 10 和 12 min 效果良好^[28], 小花吊兰 *Chlorophytum laxum* 酸解 15 min 效果较好^[29], 红肉火龙果气生根解离 20 min 较好^[16], 番木瓜 *Carica papaya* 根尖用 5 mol L⁻¹ 盐酸酸解 5 ~ 8 s 效果较好^[30], 紫叶小檗 *Berberis thunbergii* var. *atropurpurea* 茎尖 1 mol L⁻¹ 盐酸常温解离 20 min 后可获得中期分散良好细胞^[31]。而桑染色体制片采用酶解法效果较好, 解离采用 2.5% 纤维素酶: 2.5% 果胶酶 = 1:1 (V/V) 的混合酶液于室温下酶解 2 ~ 3 h, (不同桑品种稍有差异) 制片效果最佳^[14]。

压片作为使染色体分散的重要步骤, 有许多地方值得注意。在制片切取根尖时, 为能快速准确地切取 0.5 ~ 1.0 mm 的根尖, 可在载玻片下方放置不同颜色的滤纸以凸显根尖的具体位置, 提高切取的效率及准确率。染色完成后在进行压片时, 先用拇指压净玻片内的染液, 找到根尖的具体位置后用铅笔有规律地垂直用力敲打, 先四周后中间, 力度先轻后重, 直至能肉眼观察到根尖组织均匀散开成圆团状为止, 压片过程中切忌造成盖玻片的移动, 以防滑片影响材料的观察。

本研究得出构树染色体为 26 条, 染色体基数为 13, 为二倍体。这与蒋同庆^[6]所得不同 (为 24 条), 这可能是由于构树品种或种源的不同所导致的, 需在以后的研究中, 对构树其他品种或种源进行染色体计数, 以判断具体差异所在。日本关博夫对构树不同品种进行细胞学研究后发现了 2 n=2 x=26 的二倍体日本‘上田楮’、2 n=4 x=52 的四倍体, 2 n=3 x=39 的三倍体‘佐贺楮’, 染色体基数同样 13, 结果与本文一致。在植物长期的进化过程中, 受到外界环境和自身遗传因素的影响, 染色体数目、形态结构、大小方面会发生变化。植物核型的对称性趋势是由对称向不对称方向发展的^[32]。迄今为止, 构树的核型分析尚未见报道, 本试验通过 Photoshop 软件对染色体进行配对、排列、测量, 得出 26 条染色体全部为近中部染色体 (m), 由此可见构树在系统演化上相对较原始, 在相对稳定的自然环境中进化速度较缓慢, 且 1 对染色体具有随体, 随体位于第 4 对染色体上, 易于与其他染色体相区别, 臂比值为 1.10。本试验结果可为之后构树细胞遗传学、构树多倍体育种提供理论基础与依据。

参考文献:

- [1] 周敏. 构树遗传多样性的 AFLP 研究[D]. 昆明: 西南林学院, 2008.
- [2] 彭献军, 沈世华. 构树: 一种新型木本模式植物[J/OL]. 植物学报, 2018 (03): 372 - 381.
- [3] 成启明, 贾玉山, 李平, 等. 构树加工利用研究进展[J]. 草学, 2018 (01): 1 - 6.
- [4] 郭文, 熊康宁, 刘凯旋, 等. 我国石漠化地区乡土构树资源综合开发利用研究[J]. 世界林业研究, 2018, 31 (01): 23 - 28.
- [5] 刘敏, 王卉, 宁慧霞, 等. 树上干杏染色体制片优化及核型分析[J]. 西北农业学报, 2012, 21 (10): 79 - 83.
- [6] 蒋同庆, 朱勇, 郭明武. 构树 (*Broussonetia Papyrifera* (L) Vent) 染色体数目与构树分类形态学的初探 (第一报) [J]. 蚕学通讯, 1987 (04): 1 - 5.
- [7] 张桂芳, 任改婷, 周佐葡, 等. 白鹤芋染色体制片技术优化及核型分析[J]. 草业科学, 2017, 34 (03): 532 - 538.
- [8] Levan A. Nomenclature for centromeric position on chromosome[J]. Hereditas, 1964, 52 (2): 201 - 220.
- [9] 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 (04): 297 - 302.
- [10] STEBBINS G L. Chromosomal evolution in higher plants[M]. London: Edward Arnold, 1971: 87 - 89.
- [11] 刘丹, 夏雪, 吴益梅, 等. 植物染色体制片效果影响因素的解析[J]. 浙江农业科学, 2015, 56 (10): 1654 - 1657.
- [12] 肖春林. 植物染色体制片方法的改进[J]. 新疆农垦科技, 2016, 39 (03): 48 - 49.
- [13] 李杨, 轩亚辉, 王圣, 等. 滇桑 (*Morus yunnanensis*) 的染色体核型分析[J]. 蚕业科学, 2014, 40 (02): 187 - 190.
- [14] 李杨. 桑属植物染色体倍性研究及 FISH 分析[D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [15] 周翼虎. 山药的染色体制片技术优化与核型分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- [16] 刘顺枝, 周浩彬, 林润怡, 等. 红肉火龙果气生根染色体制片优化及核型分析[J]. 北方园艺, 2015 (12): 71 - 76.

- [17] 王明艳, 韩秀玲, 吴鹏, 等. 药用植物刺五加根尖压片技术研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(03): 1149-1150.
- [18] 冯斗, 王建岭, 席世丽, 等. 木薯根尖染色体的观察技术[J]. 安徽农业科学, 2008(09): 3711-3712.
- [19] 雷文英, 赵丽丽, 简忠领, 等. 白刺花染色体压片技术优化及核型分析[J]. 种子, 2017, 36(08): 5-9.
- [20] 闫素丽. 向日葵染色体核型分析及单染色体微切割、微分离和微克隆[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [21] 薛宇峰, 吴金玲, 胡新颖. 欧李染色体制片技术初探[J]. 数字技术与应用, 2010(05): 172-173.
- [22] 周翼虎, 霍秀文, 刘向宇, 等. 河南铁棍山药的染色体数目及核型分析[J]. 河南农业大学学报, 2015, 49(03): 305-310.
- [23] 张贵友. 普通遗传学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003: 1-11.
- [24] 徐洪国, 祁宏英, 顾灵杰. 黄果龙葵和龙葵染色体制片优化及核型分析[J]. 西北植物学报, 2017, 37(02): 387-393.
- [25] 夏雪, 辜金花, 刘丹, 等. 黄花芥蓝染色体制片优化及核型分析[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2016, 42(05): 527-534.
- [26] 马婷玉, 李明, 吴燕燕, 等. 穿心莲染色体制片优化及核型分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(07): 33-36.
- [27] 唐晓敏, 梅凌峰, 程轩轩, 等. 广金钱草根尖染色体制片技术及核型分析[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(03): 305-309.
- [28] 杨玉双, 甘霖, 覃碧, 等. 橡胶草染色体制片技术研究[J]. 热带农业科学, 2017, 37(02): 31-34.
- [29] 李磊, 沈吉焚, 何梦玲, 等. 小花吊兰染色体制片优化与核型分析[J]. 北方园艺, 2016(01): 76-79.
- [30] 任鹏荣, 冯瑞祥, 游恺哲, 等. 番木瓜根尖染色体压片技术的研究[J]. 中国热带农业, 2017(04): 59-62.
- [31] 潘妹慧. 紫叶小檗茎尖染色体制片技术初探[J]. 现代园艺, 2017(07): 9-10.
- [32] SCHUBERT I. Chromosome evolution[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10: 109-115.