

基于 3 个 DNA 序列的不同形态类型诸葛菜的遗传关系分析及后代性状观察

吴林园^{1,2}, 高兴², 彭斌², 郭建林², 王荣富^{1,①}, 杭悦宇^{2,①}

[1. 安徽农业大学生命科学院, 安徽 合肥 230036;

2. 江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园)江苏省植物迁地保护重点实验室, 江苏 南京 210014]

摘要: 选择 4 种形态类型(花紫色-果实光滑、花紫色-果实密生毛、花白色-果实光滑和花白色-果实密生毛)诸葛菜 [*Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz] 共 11 个单株为实验材料, 在进行 ITS、*trnL-F* 和 *psbA-trnH* 序列分析的基础上, 采用邻接法(NJ)构建系统发育树, 并对各形态类型的后代性状进行观察和分析。结果表明, 诸葛菜的 ITS、*trnL-F* 和 *psbA-trnH* 序列长度分别为 704、767 和 216 bp, 合并序列长度为 1 687 bp, G+C 含量为 43.5%; 共有 7 个变异位点和 7 个信息位点, 变异率 0.41%。4 个形态类型诸葛菜的 *trnL-F* 序列完全一致, ITS 和 *psbA-trnH* 序列略有差异。其中, 花紫色和花白色的果实密生毛类型中各有 1 个单株的 ITS 序列第 519 位碱基为 C, 其他单株为 T; 花紫色和花白色的果实光滑类型中各有 1 个单株的 *psbA-trnH* 序列第 68 位至第 73 位碱基依次为 CAAAAA, 其他单株均为 TTTTTC。NJ 系统发育树显示, 4 个类型诸葛菜之间没有完全清晰的界限, 亲缘关系很近。后代性状观察结果表明, 诸葛菜白色花为特化现象, 果实光滑和密生毛是不稳定的性状。研究结果支持将毛果诸葛菜 (*O. violaceus* var. *lasiocarpus* Migo) 并入诸葛菜的分类处理。

关键词: 诸葛菜; 形态特征; ITS 序列; *trnL-F* 序列; *psbA-trnH* 序列; 亲缘关系

中图分类号: Q946-33; S681.9 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2010)01-0075-05

Genetic relationship of different morphological types of *Orychophragmus violaceus* based on three DNA sequences and character observation of their progenies WU Lin-yuan^{1,2}, GAO Xing², PENG Bin², GUO Jian-lin², WANG Rong-fu^{1,①}, HANG Yue-yu^{2,①} (1. College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Jiangsu Province Key Laboratory for Plant *Ex-situ* Conservation, Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2010, 19(1): 75-79

Abstract: The eleven individuals belonging to four morphological types (purple petal and glabrous fruit, purple petal and hairy fruit, white petal and glabrous fruit, white petal and hairy fruit) of *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz were chosen as experimental materials, the NJ phylogenetic tree was constructed based on ITS, *trnL-F* and *psbA-trnH* sequence analysis, and the characters of their progenies were observed. The results show that the length of ITS, *trnL-F* and *psbA-trnH* sequences is 704, 767 and 216 bp, respectively, and the combined length of the three sequences is 1 687 bp with a G+C content of 43.5%. In which, there are seven variable sites and seven informative sites with a variation rate of 0.41%. The *trnL-F* sequences of the four morphological types are complete agreement, while ITS and *psbA-trnH* sequences have a little difference. The base of 519th site of ITS sequence of only one purple petal individual and one white petal individual in hairy fruit types is C, while the others are T. And the bases from 68th to 73th site of *psbA-trnH* sequence of only one purple petal individual and one white petal individual in glabrous fruit types are CAAAAA, while the others are TTTTTC. The NJ phylogenetic tree shows that there is not a clearly bound among the four morphological types of *O. violaceus*, so the four types have a close relationship. The observation results of progeny character show

收稿日期: 2009-06-29

作者简介: 吴林园(1985—), 女, 江苏常州人, 硕士研究生, 主要从事植物学研究。

①通信作者 E-mail: rfwang@ahau.edu.cn; hangyueyu@yahoo.com.cn

that the white petal of *O. violaceus* is a special phenomenon, and the character of glabrous or hairy fruit is unstable. The research results support the classification that *O. violaceus* var. *lasiocarpus* Migo can be incorporated into *O. violaceus*.

Key words: *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz; morphological character; ITS sequence; *trnL-F* sequence; *psbA-trnH* sequence; genetic relationship

诸葛菜 [*Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz] 为十字花科 (Brassicaceae) 芸苔族 (Trib. Brassiceae Hayek) 诸葛菜属 (*Orychophragmus* Bunge) 植物, 广泛分布于中国东北、华北、华东、华中及西北地区^[1]。诸葛菜属下分类问题一直存在争议。《中国植物志》记载^[1], 我国有诸葛菜属植物 1 种 3 变种, 即原变种诸葛菜, 变种湖北诸葛菜 [*O. violaceus* var. *hupehensis* (Pamp.) O. E. Schulz]、缺刻叶诸葛菜 [*O. violaceus* var. *intermedius* (Pamp.) O. E. Schulz] 和毛果诸葛菜 (*O. violaceus* var. *lasiocarpus* Migo)。1998 年, 谭仲明等^[2] 提出了分布于陕西的太白诸葛菜 (*O. taibaiensis* Z. M. Tan et B. X. Zhao) 和分布于浙江的铺散诸葛菜 (*O. diffusus* Z. M. Tan et J. M. Xu) 2 个新种, 并将《中国植物志》中的湖北诸葛菜由变种提升为种。《Flora of China》^[3] 将诸葛菜属修订为 2 个种, 即诸葛菜和产于安徽和浙江的心叶诸葛菜 [*O. limprichtianus* (Pax) Al-Shehbaz et G. Yang], 并将原来所有的诸葛菜变种都归并为诸葛菜, 而将碎米荠属 (*Cardamine* L.) 的心叶碎米荠 (*C. limprichtiana* Pax) 和葱芥属 (*Alliaria* Scop.) 的大叶葱芥 (*A. grandifolia* Z. X. An) 合并定为心叶诸葛菜。此后, 吴金清等^[4] 又提出了 1 个新种——秭归诸葛菜 (*O. ziguiensis* Z. E. Zhao et J. Q. Wu), 分布于长江三峡库区附近。

诸葛菜种内具有明显不同的形态类型, 如产于江苏的毛果诸葛菜具长角果且植株密生长柔毛^[1], 因此, 《江苏植物志》记载^[5], 诸葛菜属在江苏分布有 1 种 1 变种, 即原变种诸葛菜和变种毛果诸葛菜。然而, 作者在野外调查中发现, 诸葛菜果实有无毛及具毛 2 种情况, 并有 2 种花色 (白色和紫色), 共 4 种形态类型, 这些形态变异类型的亲缘关系模糊, 仅从形态学角度分析无法对它们进行分类界定。

随着分子生物学技术的发展, 在探讨植物类群系统演化的过程中, DNA 序列差异得到逐步应用, 其中, ITS, *trnL-F* 和 *psbA-trnH* 片段进化速率较快, 适于种下单位的分子系统演化关系研究和物种鉴

别^[6-7]。作者对诸葛菜的 4 个形态变异类型的 ITS、*trnL-F* 及 *psbA-trnH* 序列进行综合分析, 同时分别收集种子进行实生繁殖, 对后代的性状进行观察, 以探讨诸葛菜 4 个形态变异类型的遗传关系, 为诸葛菜属植物分类研究提供分子生物学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的诸葛菜 4 种形态变异类型采自南京, 均为野生植株。每一类型采集 2~3 个单株, 凭证标本存放在江苏省·中国科学院植物研究所标本馆 (NAS), 各单株的形态特征及凭证标本号见表 1。

表 1 供试 4 种类型诸葛菜的形态特征及凭证标本号
Table 1 Morphological characters and voucher specimen number of four types of *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz tested

单株号 No.	形态特征 Morphological character	凭证标本号 Voucher specimen number
021-1	花紫色, 果实光滑 Purple petal and glabrous fruit	0648499
021-2	花紫色, 果实光滑 Purple petal and glabrous fruit	0648498
021-3	花紫色, 果实光滑 Purple petal and glabrous fruit	0648497
004-1	花紫色, 果实密生毛 Purple petal and hairy fruit	0648466
004-2	花紫色, 果实密生毛 Purple petal and hairy fruit	0648467
004-3	花紫色, 果实密生毛 Purple petal and hairy fruit	0648468
001-1	花白色, 果实光滑 White petal and glabrous fruit	0648503
001-2	花白色, 果实光滑 White petal and glabrous fruit	0647627
001-3	花白色, 果实光滑 White petal and glabrous fruit	0647628
035-1	花白色, 果实密生毛 White petal and hairy fruit	0648502
035-2	花白色, 果实密生毛 White petal and hairy fruit	0648500

1.2 方法

1.2.1 DNA序列分析 选取生长状况良好的植株中部的健康嫩叶, 去掉主脉, 用体积分数70%的乙醇擦去叶片表面的灰尘, 采用改进的CTAB法^[8]提取总DNA。

利用ITS通用正向引物ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')和反向引物ITS5(5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3')进行ITS片段的扩增; 采用正向引物c(5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3')和反向引物f(5'-ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG-3')对*trnL*内含子和*trnL-F*基因间隔区进行扩增^[9]; 采用自行设计的正向引物F1(5'-AAT GCT CAC AAC TTY CCT CTA-3')和反向引物R1(5'-CCA CTG CCT TGA TCC ACT TG-3')对*psbA-trnH*片段进行扩增。

全部扩增反应在BioMetra T1型PCR仪上进行。反应体系总体积为50 μL , 包括: 30 ng模板DNA、2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂、0.12 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs、1 \times PCR buffer、0.3 $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$ 引物和1 U *Taq* DNA聚合酶。ITS片段及*trnL-F*片段扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1.5 min, 共35个循环; 最后于72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。*psbA-trnH*片段的扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 70 $^{\circ}\text{C}$ 延伸80 s, 共35个循环; 最后于72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。扩增产物经质量体积分数1.0%的琼脂糖凝胶电泳后, 使用Gel Doc凝胶成像系统观察电泳结果。

由上海英骏生物技术有限公司对PCR扩增产物进行纯化并测序, 采用双向测序法进行PCR产物的测序, 测序引物为扩增反应所用引物。

1.2.2 后代性状的观察 收集供试的4个形态类型的诸葛菜种子分别播种, 播种地间隔一定的距离, 每种形态类型条播200颗种子, 待出苗后统计每一形态类型的出苗率, 并于2009年3月中旬至4月底观察并统计每一形态类型后代的花色, 4月初至5月底观察并统计后代果实的被毛情况。

1.3 数据处理

将ITS、*trnL-F*和*psbA-trnH*片段序列分别通过Clustal X软件^[10]进行对位排列(alignment), 然后用BioEdit软件^[11]进行人工校正, 合并ITS、*trnL-F*和*psbA-trnH*序列, 用MEGA 3.1序列分析软件^[12]分析4个不同形态类型诸葛菜间DNA序列的差异; 同时,

采用MEGA 3.1序列分析软件中的邻接法^[13](neighbor-joining method, NJ)推测系统关系, 构建系统发育树; 在NJ法中, 取出成对插入缺失, 用Juke-Cantor模型推测距离; 使用自展检测法^[14](bootstrap test)估计所构建的系统发育树的可靠性, 重复次数为1 000次。

2 结果和分析

2.1 不同形态类型诸葛菜的DNA序列分析结果

2.1.1 DNA序列差异分析 通过测序, 分别获得4种形态类型诸葛菜的ITS、*trnL-F*和*psbA-trnH*片段序列, 并分别在GenBank中进行登录, 编号为001-1、001-2、001-3、004-1、004-2、004-3、021-1、021-2、021-3、035-1和035-2的单株ITS序列登录号依次为GQ261942至GQ261952, *trnL-F*序列登录号依次为GQ261977至GQ261987, *psbA-trnH*序列登录号依次为GQ261966至GQ261976。

4个形态类型诸葛菜的ITS、*trnL-F*和*psbA-trnH*片段序列对比结果见表2。由表2可见, ITS片段序列排序切平后长度为704 bp, 变异位点和信息位点均只有1个, 变异率为0.14%, 平均碱基组成为A 19.6%、G 30.0%、T 23.3%、C 27.2%, G+C含量为57.2%; *trnL-F*片段序列排序切平后长度为767 bp, 11个单株间的碱基组成完全一致, 未发现变异位点和信息位点, 平均碱基组成为A 32.3%、G 16.7%、T 32.5%、C 18.5%, G+C含量为35.2%; *psbA-trnH*片段序列排序切平后长度为216 bp, 变异位点和信息位点均为6个, 变异率2.8%, 平均碱基组成为A 33.8%、G 18.1%、T 37.3%、C 10.7%, G+C含量为28.8%。上述3个DNA片段合并序列长度1 687 bp; 碱基差异百分率为0.2%, 其中转换率0.1%、颠换率0.1%; 平均碱基组成为A 27.2%、G 22.4%、T 29.2%、C 21.1%, G+C含量平均为43.5%。

4种形态类型诸葛菜的*trnL-F*片段序列完全一致, 而ITS和*psbA-trnH*片段序列存在一定变异。在ITS片段序列中, 除编号为004-1(花紫色, 果实密生毛)和035-2(花白色, 果实密生毛)的2个单株的ITS序列第519位碱基为C外, 其他单株都为T; 在*psbA-trnH*片段序列中, 编号为021-2(花紫色, 果实光滑)和001-3(花白色, 果实光滑)的2个单株的*psbA-trnH*序列第68位至第73位的碱基依次为

CAAAAA,其他单株均为 TTTTGTG。同时可以看出,4种形态类型各自的单株间的序列均存在 2 个单倍型,花紫色、果实光滑和花白色、果实光滑类型的 *psbA-trnH* 序列各具有 2 个单倍型,花紫色、果实密生毛和花白色、果实密生毛类型的 ITS 序列也各具有 2 个单倍型。

表 2 4 种形态类型诸葛菜的 ITS、*trnL-F* 和 *psbA-trnH* 片段序列对比分析结果

Table 2 Comparative analysis results of ITS, *trnL-F* and *psbA-trnH* fragment sequences of four morphological types of *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz

片段 Fragment	长度/bp Length	变异位 点数 Variable site number	信息位 点数 Informative site number	G+C 含量/% G+C content
ITS	704	1	1	57.2
<i>trnL-F</i>	767	0	0	35.2
<i>psbA-trnH</i>	216	6	6	28.8
总计 Total	1 687	7	7	43.5

2.1.2 基于 DNA 序列差异的遗传关系分析 对 4 种形态类型诸葛菜的 ITS、*trnL-F* 和 *psbA-trnH* 片段序列的联合矩阵进行系统发育分析,利用 MEGA 3.1 序列分析软件中的 NJ 法构建系统发育树,并用 Bootstrap 法分析各分支的支持强度(1 000 次重复),结果见图 1。

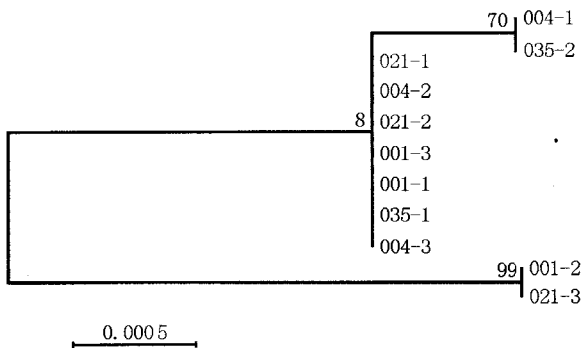


图 1 基于 ITS、*trnL-F* 和 *psbA-trnH* 片段序列数据合并后构建的 4 种形态类型诸葛菜的 NJ 系统树
Fig. 1 The NJ tree of four morphological types of *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz based on the combined datums of ITS, *trnL-F* and *psbA-trnH* fragment sequences

021: 花紫色,果实光滑 Purple petal and glabrous fruit; 004: 花紫色,果实密生毛 Purple petal and hairy fruit; 001: 花白色,果实光滑 White petal and glabrous fruit; 035: 花白色,果实密生毛 White petal and hairy fruit. 图中线段长度代表位点的碱基替代率 The length of line segment indicates the base substitution rate. 分支上的数据代表 1 000 次重复抽样检测的自展支持率 The datums on the branches indicate the bootstrap values of 1 000 replications.

合并序列的 NJ 系统树(图 1)显示:在 *psbA-trnH*

片段序列上有着 6 个变异位点的 021-3(花紫色,果实光滑)和 001-2(花白色,果实光滑)2 个单株以 99% 的自展支持率紧密地聚在一起;004-1(花紫色,果实密生毛)和 035-2(花白色,果实密生毛)2 个单株以 70% 的自展支持率聚在一起并独立于其他分支;其余各分支的自展支持率均很低,说明诸葛菜的 4 个具有不同形态特征的类型之间没有完全清晰的界限,遗传关系很近。

2.2 不同形态类型诸葛菜后代的性状分析结果

4 种形态类型诸葛菜的后代性状的统计结果见表 3。由表 3 可见,具紫色花的 2 种形态类型的诸葛菜(果实光滑和果实密生毛)的生长状况优于具白色花的 2 种形态类型(果实光滑和果实密生毛)的诸葛菜,前者的出苗率和存活植株数明显高于后者。其中,花紫色、果实光滑的诸葛菜后代存活植株数为 57 株,后代花色都为紫色,但有 6 株植株的果实密生毛,变异率 10.5%;花紫色、果实密生毛的诸葛菜后代存活植株数为 59 株,后代花色都为紫色,但有 31 株植株的果实光滑,变异率达 52.5%;花白色、果实光滑的诸葛菜后代存活植株数为 12 株,其中 10 株为紫色花,均为光滑果实,变异率高达 83.3%;花白色、果实密生毛的诸葛菜后代存活植株数为 11 株,由于人为因素没能对果实的变异状况进行统计。此外,由于种植时间较晚及一些天气原因,植株出苗率以及存活率较低,这可能也对实验结果造成了一定的影响。

表 3 4 种形态类型诸葛菜后代的性状分析¹⁾

Table 3 Character analysis of progenies of four morphological types of *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz¹⁾

亲代 类型 Parent type	出苗 率/% Emergence rate	存活 株数 Survival number	后代数量 Progeny number				变异率/% Variation rate
			PG	PH	WG	WH	
PG	39.0	57	51	6	0	0	10.5
PH	40.0	59	31	28	0	0	52.5
WG	15.0	12	10	0	2	0	83.3
WH	14.0	11	-	-	-	-	-

¹⁾ PG: 花紫色,果实光滑 Purple petal and glabrous fruit; PH: 花紫色,果实密生毛 Purple petal and hairy fruit; WG: 花白色,果实光滑 White petal and glabrous fruit; WH: 花白色,果实密生毛 White petal and hairy fruit.

3 讨 论

《中国植物志》中将诸葛菜分为 1 种 3 变种,主要依据为顶裂片、侧裂片、叶轴上小裂片的有无及果

实是否密生长柔毛等^[1],如秭归诸葛菜为柔弱草本^[4]、太白诸葛菜叶具微小外耳、铺散诸葛菜茎呈铺散状^[2],这些特点变化小且主要是极易变化的叶特征(毛果诸葛菜除外)。2000年,有研究者通过深入研究提出^[15],中国的诸葛菜有2种,即诸葛菜和心叶诸葛菜,并认为心叶碎米芥和大叶葱芥应归入心叶诸葛菜,铺散诸葛菜和太白诸葛菜应归入诸葛菜,同时也希望通过对中国诸葛菜更深入的探讨和研究使诸葛菜的分类不再混淆。

然而,诸葛菜丰富的变异类型还体现在花部性状上,如:花极端色为白色和紫色,但有不同深浅的粉色过渡,还有很多特殊变异特征(如花斑和洒金等);花形从细长形至倒卵形,花瓣边缘齿的数量和齿裂深浅等也有明显的变异;花朵大小变化也很大^[16]。除此之外,叶形和叶色也表现出很大的差异^[16]。因此,尽管本研究选择的诸葛菜是花色为紫色或白色,果实为光滑或密生毛等4个极端形态类型,且研究结果显示有些形态类型具有独特的单倍体类型,但将各形态类型作为变种处理的理由还不够充分。

另外,对4种形态类型诸葛菜后代的性状观察结果显示,花紫色的诸葛菜的后代花色均没有发生变化,但果实形态则出现了光滑和密生毛类型的相互转变;果实光滑而花白色的诸葛菜的后代果实形态没有变化,但大部分植株花色变为紫色。表明诸葛菜的白色花为特化现象,果实具毛现象是个不稳定的性状。吴沿友等^[17]曾对诸葛菜进行引种驯化研究,发现诸葛菜花瓣颜色等性状经连续自交多代后仍难以稳定,也证实了诸葛菜各形态类型具有十分相近的亲缘关系,难以准确定性为与之相应的变种。

综合DNA序列分析及后代植株性状的观察结果,作者支持《Flora of China》中将毛果诸葛菜归入诸葛菜的处理。

参考文献:

[1] 周太炎,陆莲立,关克俭,等. 中国植物志:第三十三卷[M]. 北京:科学出版社,1987:40-43.

- [2] 谭仲明,许介眉,赵炳祥,等. 中国诸葛菜属(十字花科)新分类群[J]. 植物分类学报,1998,36(6):544-548.
- [3] Wu Z Y, Raven P H. Flora of China: Vol. 8 [M]. Beijing: Science Press, 2001: 26-27.
- [4] 吴金清,赵子恩. 长江三峡库区诸葛菜属(十字花科)一新种[J]. 武汉植物学研究,2003,21(6):487-488.
- [5] 江苏省植物研究所. 江苏植物志:下册[M]. 南京:江苏科学技术出版社,1982:233.
- [6] 田欣,李德铎. DNA序列在植物系统学研究中的应用[J]. 云南植物研究,2002,24(2):170-184.
- [7] 葛燕芬,杭悦宇,夏冰,等. 5种苍术属药用植物的 *trnL-F* 序列测定及种间遗传关系分析[J]. 植物资源与环境学报,2007,16(2):12-16.
- [8] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11-15.
- [9] Taberlet P, Gielly L, Pautou G, et al. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA [J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(5): 1105-1109.
- [10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [11] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41: 95-98.
- [12] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [14] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [15] Al-Shehbaz I A, Yang G. A revision of the Chinese endemic *Orychophragmus* (Brassicaceae) [J]. Novon, 2000, 10(4): 349-353.
- [16] 张莉俊,秦红梅,王敏,等. 二月兰形态性状的变异分析[J]. 生物多样性,2005,13(6):535-545.
- [17] 吴沿友,蒋九余,帅世文,等. 诸葛菜的细胞遗传学研究[J]. 西南农业学报,1996,9(3):38-41.