



石刁柏雄性偏向核质体 DNA 的克隆与分析

李书粉, 李旭, 王冰肖, 袁金红, 邓传良, 高武军*

(河南师范大学 生命科学院, 河南新乡 453007)

摘要: 该研究以雌雄异株植物石刁柏为材料, 利用基因组消减杂交技术对石刁柏雌雄核基因组中的性别差异核质体 DNA(nuclear plastid DNA, NUPTs)进行了分离和分析。结果表明: (1) 通过构建消减杂交文库共获得了 52 个雄性偏向序列, 序列长度分布在 63~297 bp 之间, 其中有 19 个差异序列属于叶绿体来源序列(命名为 Ao1~Ao19), 且这些序列与石刁柏叶绿体基因组的相似性均大于 84%, Ao19 与石刁柏叶绿体基因组相似性为 100%。(2) 利用基因组半定量 PCR 对 19 个 NUPTs 序列的性别差异分析表明, 有 4 条序列为稳定的雄性偏向 NUPTs 序列, 分别为 Ao1、Ao3、Ao10 和 Ao18。(3) 序列比对表明, 转移到核基因组的 NUPTs 主要来源于叶绿体基因组的反向重复区(包含 IRa 和 IRb 区), 说明石刁柏叶绿体基因组重复区序列更容易向核基因组进行转移形成雄性偏向的 NUPTs 序列。

关键词: 石刁柏; 性别差异; 核质体 DNA; 雄性偏向

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

Cloning and Analysis of Male-biased Nuclear Integrants of Plastid DNA from *Asparagus officinalis*

LI Shufen, LI Xu, WANG Bingxiao, YUAN Jinhong, DENG Chuanliang, GAO Wujun*

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, He'nan 453007, China)

Abstract: In this study, male-biased NUPTs (nuclear integrants of plastid DNA) were isolated and analyzed in the genome of *Asparagus officinalis*, a dioecious plant, by using genome subtractive hybridization method. (1) 52 male-biased sequences with size ranged from 63 bp to 297 bp were obtained from the subtractive hybridization library. Among these sequences, 19 were originated from chloroplast genome, which were designated as Ao1—Ao19. These sequences all showed high similarity (>84%) with the corresponding sequences in asparagus chloroplast genome, while Ao19 showed 100% similarity with the corresponding sequence in the asparagus chloroplast genome. (2) Genome semi-quantitative PCR revealed that four (Ao1, Ao3, Ao10, and Ao18) out the 19 sequences were stable male-biased NUPTs. (3) Sequence alignment showed the NUPTs were mainly derived from the inverted repeat region (IR) (containing IRa and IRb) of the asparagus chloroplast genome, indicating that the sequences of IR region of chloroplast genome were more preferred to transfer to nuclear genome to form male-biased NUPTs sequences.

Key words: *Asparagus officinalis*; sex difference; NUPTs; male-biased

植物细胞中存在细胞器基因组和细胞核基因组, 细胞器 DNA 能够转移进入细胞核从而形成核

质体 DNA (nuclear integrants of plastid DNA, NUPTs) 和核线粒体 DNA (nuclear integrants of

收稿日期: 2016-10-12; 修改稿收到日期: 2016-12-02

基金项目: 国家自然科学基金(31470334); 河南省高校科技创新团队支持计划(17IRTSTHN017); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(13A180525)

作者简介: 李书粉(1983—), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物性别决定与分化机制研究。E-mail: lishufen83@163.com

* 通信作者: 高武军, 教授, 主要从事植物性别决定与分化机制研究。E-mail: gaowujun1@163.com

mitochondria DNA, NUMTs)^[1]。其中, NUPTs 主要是叶绿体起源的 DNA 转移到细胞核并整合到核基因组中形成的^[2]。目前, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[3]、水稻 (*Oryza sativa*)^[4]、烟草 (*Nicotiana tabacum*)^[5-6] 等多个植物基因组中均发现存在 NUPTs 序列。核质体 DNA 的插入是真核生物基因组进化的重要动力^[7]。一些研究表明, 叶绿体来源的大片段 DNA 序列的插入会通过逐步衰减^[8-9]或扩增来影响染色体的结构及演化过程^[10]。

被子植物性染色体相对于哺乳动物来说在进化上较为年轻, 因此是研究性染色体起源和演化的重要模式材料。研究表明, NUPTs 的插入也可能参与了植物性染色体的演化过程。对雌雄异株植物酸模 (*Rumex acetosa*) 和白麦瓶草 (*Silene latifolia*) 叶绿体基因组序列进行染色体定位发现, 在这 2 个物种中核基因组中的叶绿体 DNA 主要累积在 Y 染色体上, 甚至在酸模整条 Y 染色体上都散布有 NUPTs 序列^[11], 而白麦瓶草 Y 染色体上的 NUPTs 主要分布于着丝粒位置^[11]。这些有限的证据表明, NUPTs 在 Y 染色体上并非随机分布, 尤其是在白麦瓶草 Y 染色体上 NUPTs 分布于不易发生重复的着丝粒及其侧翼区域, 说明 NUPTs 可能参与了 XY 性染色体之间重组抑制的形成。但是, 目前由于该方面研究结果较少, 且仅限于少数模式材料, 因此 NUPTs 和植物性染色体之间的关系仍需要进一步研究。

石刁柏是一种重要的多年生雌雄异株草本植物, 具有 $2n=2x=20$ 条染色体, 其性染色体 X 和 Y 同型^[12], 表明其性染色体仍处于进化的早期阶段, 是研究性染色体起源较为理想的材料之一。但是, 石刁柏性染色体上是否存在 NUPTs 序列, 其分布特征如何等仍未见报道。因此, 本研究采用雌雄基因组消减杂交方法, 分离分析石刁柏核基因组中的性别差异 NUPTs 序列, 为进一步分析 NUPTs 与石刁柏性染色体起源和演化的关系提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

石刁柏 (*Asparagus officinalis*) 品种“UC309”种植于河南师范大学生命科学学院实验基地, 植株性别通过花器官鉴定。

1.2 方法

1.2.1 石刁柏 DNA 提取及检测 石刁柏 DNA 用 CTAB 法进行提取, 具体实验步骤参照文献^[10]。

1.2.2 石刁柏雌雄基因组消减杂交 基因组消减杂交是通过驱赶 DNA(driver)和检测 DNA(tester)基因组之间的差异来分离不同基因型间差异序列的方法。在此, 以过量的石刁柏雌性基因组 DNA 作为 driver, 适量的雄性基因组 DNA 作为 tester, 通过消减杂交以获得石刁柏雄性特异或偏向序列。具体步骤参照文献^[13]进行。取 25 μg 雄株基因组 DNA, 加入 *Mbo* I (10 U/ μL) 2.5 μL , 在金属浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 9 h 进行酶切, 酶切后用纯化试剂盒进行回收。将酶切产物和 125 μg 雌性 DNA (在沸水浴中放置 60 min 进行破碎) 混合煮沸 15 min 变性。反应物室温下混合振动 (100 r/min) 复性 72 h。将产物用氯仿抽提 2 次, 乙醇沉淀。

将 3×10^{-8} μmol 去磷酸化处理后的载体 PUC119 和 3×10^{-7} μmol 消减产物进行连接转化。转化操作根据文献^[14]进行。挑取阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定, 筛选插入片段为 120 bp 以上单克隆进行测序分析。

1.2.3 雌雄性别差异序列的斑点杂交 取 1.5 μL 菌落 PCR 扩增产物, 分别以雌雄基因组 DNA 为探针, 根据文献^[15]方法进行斑点杂交。探针的标记按照 Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2.0 (Takara, 大连, 中国) 和 DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit 试剂盒 (Roche, Switzerland) 说明书进行。根据斑点杂交结果, 筛选出雌雄信号差异显著的单克隆进行测序。

1.2.4 NUPTs 的鉴定及雌雄差异性验证 将测序得到的差异序列, 用 Blast 进行同源搜索, 筛选出与叶绿体基因组有关的序列。采用 Primer 6 设计引物 (表 1), 分别以石刁柏雌雄基因组为模板进行 PCR 扩增, 验证其性别差异性。

表 1 引物序列汇总表

Table 1 Summary of the primers used in this study		
引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$
Ao1	TCTCCCCGTTCCGTCA CGGGGGAAAAATAGAGA	55
Ao3	GCATATAGATACAAATGG CTACTTGAAAAAGGCTC	50
Ao10	GGCATGTACAGAATGAA TCAGAAGAAGAATTAGGC	52
Ao18	ACAACCTTCTTCTCTCGG AAGAACAAAGATGAAAAGG	52
18S	GGCAACGGATATCTCGGCTCTC TGACGCCCAGGCAGACGTGC	55

根据所得序列设计引物进行基因组半定量分析,每对引物用 3 个雌性 DNA 模板和 3 个雄性 DNA 模板,以 18S 为内参。扩增总体积 25 μ L,分别加入模板 DNA(质量浓度 30 ng/ μ L)1.0 μ L,10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L,dNTP Mixture 1.5 μ L,引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,*Taq* 酶 0.1 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,不同退火温度下 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 性别差异序列的基因组拷贝数分析 利用本实验室对石刁柏基因组测序数据^[16],运用 bowtie2 软件^[17]对所得雄性偏向 NUPTs 进行拷贝数估计。

1.2.6 性别差异 NUPTs 序列的叶绿体基因组定位 采用 DNAMAN 软件对性别差异 NUPTs 序列和石刁柏叶绿体基因组进行序列比对,以确定这些性别差异 NUPTs 序列在石刁柏叶绿体基因组的定位,也即来源于叶绿体基因组的具体区域。

2 结果与分析

2.1 石刁柏雌雄株基因组 DNA 酶切及破碎

石刁柏雄性基因组 DNA 在 100 μ L 体系下,经过 *Mbo* I 酶切 9 h,电泳结果表明,酶切产物呈现均匀弥散状(图 1,A)。说明酶切效果良好,可以用做 Tester DNA。雌性基因组 DNA 经沸水浴处理 60 min,电泳结果显示,DNA 破碎片段呈连续弥散,片段大小在 250~1 000 bp 之间,主亮带集中在 500

bp 左右(图 1,B),达到用做 driver DNA 的要求。

2.2 雌雄基因组 DNA 消减文库克隆及筛选

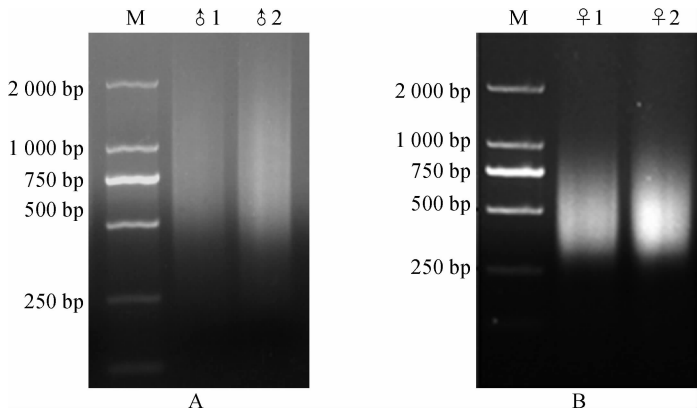
处理后的雄性 DNA 与雌性 DNA 消减杂交后,将消减杂交液与酶切纯化处理后的 pUC119 载体连接,转入大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,涂在含有氨苄青霉素的 LB 培养基平板上筛选后,共获得 6 600 个阳性克隆。用通用引物 M13 进行 PCR 扩增,获得 2 600 个片段长度在 120 bp 及以上的单一克隆,片段大小在 100~450 bp 之间(图 2)。

2.3 阳性克隆的斑点杂交

为了进一步验证所获得阳性克隆的性别特异性,将 452 个重组单克隆菌液 PCR 扩增产物点在尼龙膜上,分别用雌雄基因组 DNA 为探针进行斑点杂交。共获得 98 个雄性特异阳性克隆(部分结果见图 3)进行测序。测序结果利用 DNAMAN 软件去掉载体、引物序列、低质量序列和小于 60 bp 的序列后得到 52 条序列。其中,最长序列片段长度 297 bp,最短序列片段长度 63 bp。在 52 条差异序列中,33 条为非叶绿体来源序列,19 条序列是叶绿体来源序列,命名为 Ao1~Ao19。所有的 NUPTs 序列石刁柏叶绿体基因组序列相似性在 84% 以上。

2.4 NUPTs 的筛选与验证

为了进一步验证所获得的 NUPTs 是否是稳定的性别差异序列,利用基因组半定量 PCR 技术对 19 个 NUPTs 进行分析。结果发现,其中 4 个序列(Ao1、Ao3、Ao10、Ao18)是较为稳定的雄性偏向序列(图 4)。



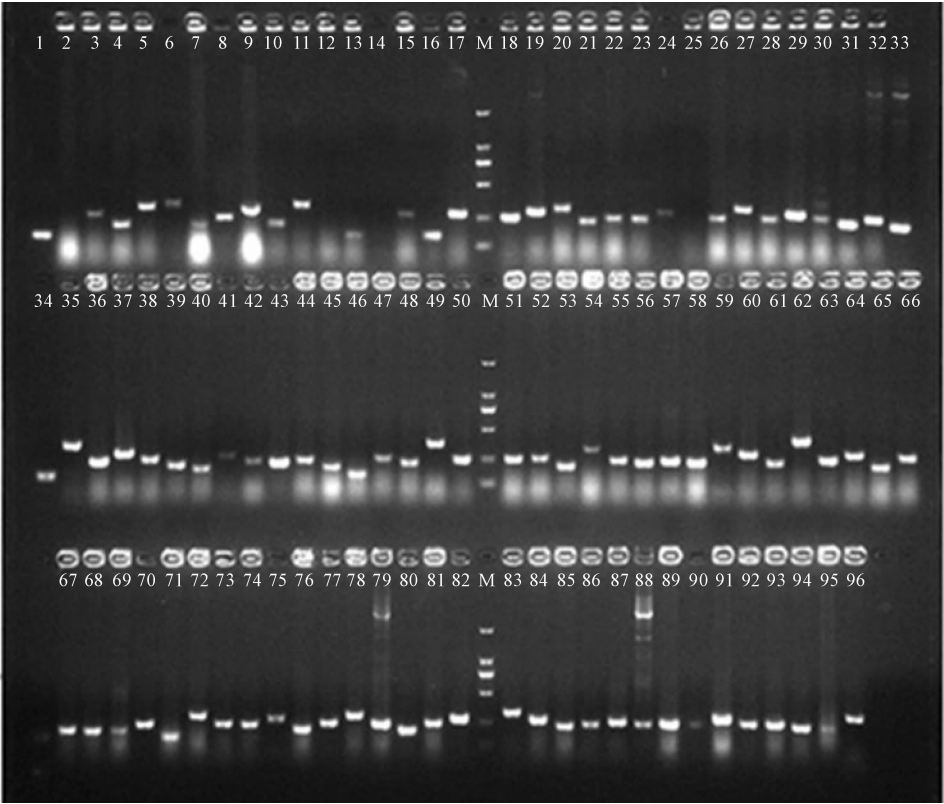
M. Trans2K marker; A. 1 和 2 为酶切后的石刁柏雄性基因组 DNA; B. 1 和 2 为高温破碎后的石刁柏雌性基因组 DNA

图 1 石刁柏雄性基因组 DNA 酶切(A)及雌性 DNA 破碎(B)电泳图

M. Trans2K marker; A. 1 and 2 represent the genomic DNA of male asparagus after enzyme digestion;

B. 1 and 2 represent the genomic DNA of female asparagus after high temperature boiling

Fig. 1 The electropherogram of enzyme digested male genomic DNA (A) and high temperature broken female genomic DNA (B) of asparagus

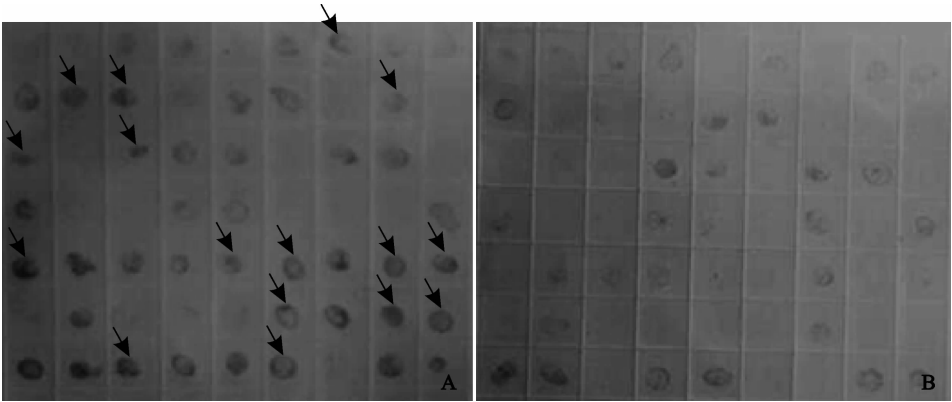


M 为 Trans 2K marker, 1~96 为随机挑取的菌落

图 2 部分重组质粒的 PCR 扩增结果(以 M13R 和 M13F 为引物)

M indicates Trans 2K marker;1—96 represent randomly selected colonies

Fig. 2 Partial results of PCR amplification for screening the positive recombinant clones (M13R and M13F as the primers)



A. 克隆与石刁柏雄性基因组 DNA 探针杂交;B. 克隆与石刁柏雌性基因组 DNA 探针杂交;箭头所示为雄性基因组中显著富集的克隆

图 3 部分消减杂交克隆产物的斑点杂交检测

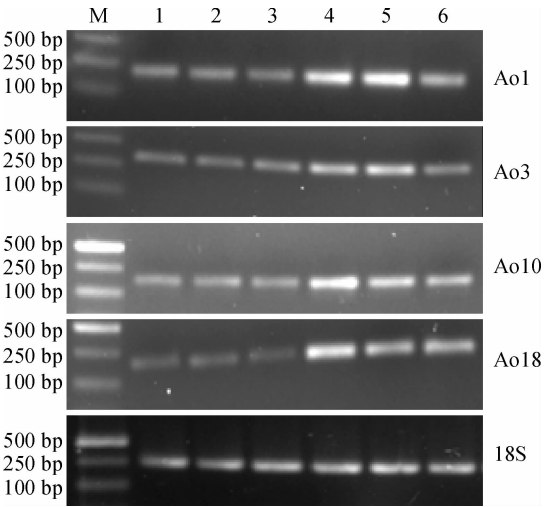
A. The results of clones hybridized with asparagus male genomic DNA probe; B. The results of clones hybridized with asparagus female genomic DNA probe; Arrows represent the clones with preference in male asparagus genome

Fig. 3 Dot blot hybridization of the clones screened by subtractive hybridization (only partial results were shown)

2.5 NUPTs 在基因组中的拷贝数估计

为了分析所获得的 4 个雌雄基因组差异序列是否属于重复序列,利用本实验室石刁柏基因组测序的数据进行拷贝数估计后发现,Ao1、Ao3、Ao10 和

Ao18 的每单倍基因组拷贝数分别为 2 514、1 505、1 477和 15(表 2),说明这些 NUPTs 属于高度重复序列,这也说明核基因组中性别差异的 NUPTs 在其插入基因组后发生了复制。



M. Trans2K marker;1~3 为石刁柏雌性单株基因组 DNA;
4~6 为石刁柏雄性单株基因组 DNA
图 4 基因组半定量 PCR 扩增结果
M. Trans2K marker;1-3 represent the genomic
DNA of female asparagus individuals;4-6 represent the
genomic DNA of male asparagus individuals
Fig. 4 Genomic semi-quantitative PCR
amplification results

表 2 基于高通量测序数据的 4 个雄性偏向 NUPTs
拷贝数估计

Table 2 Copy number estimation of the four male-biased
NUPTs based on high-throughput sequencing data

序列 Sequence	石刁柏基因组 Ao-genome	
	总拷贝数 Total copies	每单倍体基因组的拷贝数 Copies/1C
Ao1	16 258	2 514
Ao3	9 675	1 505
Ao10	9 572	1 477
Ao18	97	15

2.6 NUPTs 的叶绿体基因组定位分析

为了进一步分析所获得的 NUPTs 序列在石刁柏叶绿体基因组的位置特征,将所获得的 19 个 NUPTs 在叶绿体基因组进行定位,结果发现 19 个性别差异 NUPTs 在叶绿体基因组上的分布并不是随机的,其中 10 个 NUPTs 都分布在叶绿体基因组的反向重复区(IR)(包含 IRa 和 IRb 区),而在短单拷贝序列(SSC)及长单拷贝序列(LSC)区仅有 5 个 NUPTs,说明叶绿体反向重复区序列更容易向核基因组进行转移,可能和该区域序列高拷贝数有关。

3 讨 论

研究表明,叶绿体基因组向核基因组进行转移会引起染色体或染色质结构的变化,且这些 NUPTs 在染色体上的分布具有位置特异性。在水稻中发现大多数染色体上 NUPTs 多分布于着丝粒区域^[18-19],且多数长序列 NUPTs 会随着核基因组的膨胀和收缩而出现被复制或被淘汰现象^[19]。本研究从石刁柏核基因组中所发现的 19 个雌雄差异叶绿体序列中有 4 个为高拷贝的重复序列,说明叶绿体 DNA 序列在核基因组中的插入频率较高,且在 NUPTs 不断插入演化过程中形成多拷贝重复序列,但是基因组的膨胀是 NUPTs 拷贝数增加的结果还是原因仍不清楚。从进化上来说,石刁柏叶绿体许多基因也发生了向核基因组的迁移现象,而且这是一个伴随物种进化的持续过程。本研究通过 NUPTs 在叶绿体基因组上的位置分析发现,转移到核基因组上的 DNA 大部分来自于叶绿体反向重复区,表明石刁柏叶绿体基因组的重复区序列更容易发生细胞核细胞质之间的转移,这也可能是造成细胞核基因组中某些 NUPTs 高拷贝数的原因之一。

现代进化理论认为,原始性染色体的性别决定区的重组抑制是性染色体演化过程中最关键的一步^[20-21]。正是这种重组抑制现象的出现加快了植物性染色体的演化过程,导致了异型性染色体的出现^[22]。而一些反转座子和 NUPTs 等高拷贝重复序列的插入可以引起性染色体的异染色质化^[23]。现有研究证据表明,植物的性染色体上积累有大量的包括 NUPTs 在内的重复序列^[11, 24-25],这些序列能够导致 Y 染色体异染色质化及功能的丧失^[25-27],形成了两条组成型异染色质的 Y 染色体^[28]。目前,从技术上证明 NUPTs 等重复序列在染色体上插入所引起的异染色质化可以利用现代细胞学技术来实现。如利用高分辨率的 DNA Fiber 免疫荧光杂交技术来分析 NUPTs 邻近区域染色质的 DNA 甲基化及组蛋白修饰模式特征,并通过和同属雌雄同株近缘种的同源染色体进行比较能够获得更有价值的结果,为进一步分析 NUPTs 在植物性染色体演化中的作用提供重要的理论资料。

参考文献:

- [1] LEWIN R. No genome barriers to promiscuous DNA: the movement of DNA sequences between mitochondrial, chloroplast and nuclear genomes is even more prolific than had been expected[J]. *Science*, 1984, **224**(4 652): 970-971.
- [2] ROUSSEAU-GUEUTIN M, AYLIFFE M A, TIMMIS J N. Conservation of plastid sequences in the plant nuclear genome for millions of years facilitates endosymbiotic evolution[J]. *Plant Physiology*, 2011, **157**(4): 2 181-2 193.
- [3] MARTIN W, RUJAN T, RICHLI E, *et al.* Evolutionary analysis of *Arabidopsis*, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**(19): 12 246-12 251.
- [4] WANG D, TIMMIS J N. Cytoplasmic organelle DNA preferentially inserts into open chromatin[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2013, **5**(6): 1 060-1 064.
- [5] HUANG C Y, AYLIFFE M A, TIMMIS J N. Direct measurement of the transfer rate of chloroplast DNA into the nucleus[J]. *Nature*, 2003, **422**(6 927): 72-76.
- [6] SHEPPARD A E, AYLIFFE M A, BLATCH L, *et al.* Transfer of plastid DNA to the nucleus is elevated during male gametogenesis in tobacco[J]. *Plant Physiology*, 2008, **148**(1): 328-336.
- [7] DEUSCH O, LANDAN G, ROETTGER M, *et al.* Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2008, **25**(4): 748-761.
- [8] SHEPPARD A E, TIMMIS J N. Instability of plastid DNA in the nuclear genome[J]. *PLoS Genetics*, 2009, **5**(1): e1000323.
- [9] YUAN Q, HILL J, HSIAO K, *et al.* Genome sequencing of a 239kb region of rice chromosome 10L reveals a high frequency of gene duplication and a large chloroplast DNA insertion[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, **267**(6): 713-720.
- [10] HUANG C Y, GRUNHEIT N, AHMADINEJAD N, *et al.* Mutational decay and age of chloroplast and mitochondrial genomes transferred recently to angiosperm nuclear chromosomes[J]. *Plant Physiology*, 2005, **138**(3): 1 723-1 733.
- [11] STEFLOVA P, HOBZA R, VYSKOT B, *et al.* Strong accumulation of chloroplast DNA in the Y chromosomes of *Rumex acetosa* and *Silene latifolia*[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2014, **142**(1): 59-65.
- [12] ELLISON J H. Asparagus Breeding[M]//BASSETT M J. Breeding vegetable crops. Connecticut: AVI Publishing Company, 1986: 523-568.
- [13] TOMITA M, AKAI K, MORIMOTO T. Genomic subtraction recovers rye-specific DNA elements enriched in the rye genome[J]. *Molecular Biotechnology*, 2009, **42**(2): 160-167.
- [14] LI S F, SONG L Y, YIN W B, *et al.* Isolation and functional characterization of the genes encoding Δ^8 -sphingolipid desaturase from *Brassica rapa*[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2012, **39**(1): 47-59.
- [15] DENG C L, WANG N N, LI S F, *et al.* Isolation of differentially expressed sex genes in garden asparagus using suppression subtractive hybridization[J]. *Journal of Plant Research*, 2015, **128**(5): 829-838.
- [16] LI S F, GAO W J, ZHAO X P, *et al.* Analysis of transposable elements in the genome of *Asparagus officinalis* from high coverage sequence data[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(5): e97189.
- [17] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nature Methods*, 2012, **9**: 357-359.
- [18] NOUTSOS C, RICHLI E, LEISTER D. Generation and evolutionary fate of insertions of organelle DNA in the nuclear genomes of flowering plants[J]. *Genome Research*, 2005, **15**(5): 616-628.
- [19] MATSUO M, ITO Y, YAMAUCHI R, *et al.* The rice nuclear genome continuously integrates, shuffles, and eliminates the chloroplast genome to cause chloroplast-nuclear DNA flux[J]. *The Plant Cell*, 2005, **17**(3): 665-675.
- [20] PEICHEL C L, ROSS J A, MATSON C K, *et al.* The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome[J]. *Current Biology*, 2004, **14**(16): 1 416-1 424.
- [21] MING R, WANG J, MOORE P H, *et al.* Sex chromosomes in flowering plants[J]. *American Journal of Botany*, 2007, **94**(2): 141-150.
- [22] 李书粉, 李 莎, 邓传良, 等. 转座子在植物XY性染色体起源与演化过程中的作用[J]. *遗传*, 2015, **37**(2): 157-164.
- [22] LI S F, LI S, DENG C L, *et al.* Role of transposons in origin and evolution of plant XY sex chromosomes[J]. *Hereditas* (Beijing), 2015, **37**(2): 157-164.
- [23] STEINEMANN M, STEINEMANN S. Enigma of Y chromosome degeneration: neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution[J]. *Genetica*, 1998, **102-103**(1-6): 409-420.
- [24] VANBUREN R, MING R. Organelle DNA accumulation in the recently evolved papaya sex chromosomes[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2013, **288**(5/6): 277-284.
- [25] KEJNOVSKY E, KUBAT Z, HOBZA R, *et al.* Accumulation of chloroplast DNA sequences on the Y chromosome of *Silene latifolia*[J]. *Genetica*, 2006, **128**(1-3): 167-175.
- [26] NAVAJAS P R, HERRAN R, LOPEZ G G, *et al.* The evolution of reproductive systems and sex-determining mechanisms within *Rumex* (Polygonaceae) inferred from nuclear and chloroplastidial sequence data[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, **22**(9): 1 929-1 939.
- [27] CUNADO N, NAVAJAS P R, HERRAN R, *et al.* The evolution of sex chromosomes in the genus *Rumex* (Polygonaceae): Identification of a new species with heteromorphic sex chromosomes[J]. *Chromosome Research*, 2007, **15**(7): 825-833.
- [28] DIVASHUK M G, ALEXANDROY O S, RAZUMOVA O V, *et al.* Molecular cytogenetic characterization of the dioecious *Cannabis sativa* with an XY chromosome sex determination system[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(1): e85118.