



云实的 45S rDNA 检测和核型分析

余朝文^{1,2,3}, 罗 嫣³

(1 怀化学院 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南怀化 418000; 2 怀化学院 湘西药用植物与民族植物学湖南省高校重点实验室, 湖南怀化 418000; 3 怀化学院 生物与食品工程学院, 湖南怀化 418000)

摘 要: 该研究对药用植物云实的有丝分裂早中期、中期染色体进行了 CPD(PI 和 DAPI 组合)染色和相继的 45S rDNA 荧光原位杂交分析, 并结合染色体测量和 CPD 带、45S rDNA 杂交信号建立了其核型。结果显示: (1) 云实的单倍基因组总长度为 $(30.38 \pm 1.58) \mu\text{m}$; 云实的核型公式为 $2n=24=14m+10sm$ (2SAT), 染色体相对长度范围为 11.22~7.12; 核型不对称性参数 CI、A1、A2、As K(%)、TF%、AI 分别为 41.63 ± 6.70 、0.27、0.16、58.18、41.82、2.57, 核型属于 2A 类型。 (2) 云实的二倍体基因组具有 9 个 45S rDNA 位点, 其中第 3、8、9 和 12 号染色体的短臂末端的位点成对存在, 第 10 号染色体仅 1 个成员的短臂末端具有 45S 位点, 呈现杂合性。该研究首次建立了云实的分子细胞遗传学核型, 为该物种的基因组研究提供了基础资料。

关键词: 云实; 核型; 45S rDNA; 荧光原位杂交; CPD 染色

中图分类号: Q943

文献标志码: A

Detection of 45S rDNA and Karyotype Analysis of *Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston

SHE Chaowen^{1,2,3}, LUO Yan³

(1 Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418000, China; 2 Key Laboratory of Hunan Higher Education for Western Hunan Medicinal Plant and Ethnobotany, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418000, China; 3 College of Biological and Food Engineering, Huaihua University, Huaihua, Hunan 418000, China)

Abstract: In this study, CPD (combined PI and DAPI) staining and sequential fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with 45S rDNA probe were applied to analyze the prometaphase and metaphase chromosomes of *Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston, a medicinal plant, and the karyotype of this species was established by combining the chromosome measurements and the CPD bands and rDNA FISH signals. (1) The mean haploid karyotype length was $(30.38 \pm 1.58) \mu\text{m}$. The karyotype formula was $2n=24=14m+10sm$ (2SAT) with the range of chromosome relative length being 11.22–7.12. The karyotype asymmetry indice, CI, A1, A2, As K(%), TF% and AI were 41.63 ± 6.70 , 0.27, 0.16, 58.18, 41.82 and 2.57, respectively, and the asymmetric karyotype belonged to the 2A type of the Stebbins' category. (2) Four and a half pairs of 45S rDNA sites were identified in the diploid complement. Among these rDNA sites, four pairs were located at the terminals of the short arms of chromosome pairs 3, 8, 9 and 12, respectively; and one site was located at the terminal of the short arm of one homologue of chromosome pair 10, showing heterozygosity of rDNA site. The investigation established the molecular cytogenetic karyotype of

收稿日期: 2019-03-04; 修改稿收到日期: 2019-04-15

基金项目: 湖南省科技计划重点项目(2013FJ4324)

作者简介: 余朝文(1964–), 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事植物分子细胞遗传学研究。E-mail: shechaowen@aliyun.com

C. decapetala for the first time, providing basic data for the genome study of this species.

Key words: *Caesalpinia decapetala*; karyotype; 45S rDNA; fluorescence *in situ* hybridization; CPD staining

云实(*Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston) 是豆科(Leguminosae)云实亚科(Caesalpinioideae)云实族(Trib. Caesalpinieae)云实属(*Caesalpinia*)的藤本植物,分布于亚洲热带和温带地区,产中国华东、中南、西南及河北、陕西、甘肃等地区,其根、茎及果药用,性温、味苦、涩,有发表散寒、活血通经、解毒杀虫之效,治筋骨疼痛、跌打损伤;其果皮和树皮含单宁,种子含油 35%,可制肥皂及润滑油^[1]。

虽然云实具有重要药用价值,但对它的研究却很少,而且已有的少数报道主要集中在化学成分及其生理活性的研究^[2-3]。迄今,对云实的细胞遗传学研究仅有染色体数目的报道^[4-5]。在植物染色体分析中,采用改良的 PI(碘化丙啶)和 DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)组合染色(简称 CPD 染色)技术,能够同时显示染色体的 GC 丰富区和 AT 丰富区,揭示异染色质在染色体上的分布,并为染色体识别提供标记;而且,因为 45S rDNA(rRNA 基因)是 GC 丰富的,因此 CPD 染色能够识别和定位 45S rDNA 位点^[6]。在基因组中,45S rDNA 存在于染色体上的一到多个位点,每个位点有几百个单位串联重复排列。采用荧光原位杂交(FISH)技术在染色体上定位 rDNA 序列,既可以确定 rDNA 在染色体上的位置,也可以为染色体的识别提供有效标记^[7-9]。基于染色体测量、荧光带和 rDNA FISH 信号,可以构建展示染色体形态、异染色质分布和重复序列在染色体上位置的分子细胞遗传学核型^[8,10-11],藉此,阐明植物染色体水平的基因组结构,分析植物近缘种间的进化关系,整合植物的遗传与物理图谱^[10-11]。

本研究采用改良的酶解去壁火焰干燥法制备分散且形态良好的云实有丝分裂早中期、中期染色体,用 CPD 染色和 45S rDNA 荧光原位杂交进行荧光显带和 rDNA 物理定位分析,并综合染色体测量、CPD 带和 rDNA 杂交信号,准确识别染色体,建立云实的分子细胞遗传学核型,为云实基因组的进一步研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料和染色体制片

本实验所用云实(*Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston)种子采自种植在怀化学院生物园的

云实植株。

用根尖参照余朝文等^[8]描述的方法制备有丝分裂染色体。为促使云实种子发芽,根据杨宇华等^[12]的方法,用 98%浓硫酸处理种子 10 min,捞出后用自来水反复冲洗,去除种子表面的蜡质层,再用清水浸泡种子过夜使其吸胀,然后置于铺有 2 层滤纸的培养皿内,在 28 ℃下培养。剪取根尖,用饱和 α-溴萘在 28 ℃下处理 2 h,然后用甲醇:冰醋酸(3:1)固定过夜。将固定的根尖先用双蒸水洗涤 4 次,每次 5 min,再用 pH 值为 4.5 的柠檬酸缓冲液洗涤 2 次,每次 5 min,然后在 28 ℃下用 1%纤维素酶(Cellulase RS)、1%果胶酶(Pectolyase Y23)和 1%蜗牛酶(Cytohellicase)的混合液(用 pH 4.5 的柠檬酸缓冲液配制)酶解 2.0 h。用火灼干燥法制片。染色体装片置-20 ℃贮存备用。

1.2 CPD 染色

CPD 染色按 She 等^[6]的方法进行。染色体装片相继用 RNA 酶和胰蛋白酶处理,然后用 0.6 μg/mL PI 和 3 μg/mL DAPI (均来自 Sigma-Aldrich)的混合液(用 30%抗淬灭剂 Vectashield H-1000 水溶液配制)染色 30 min 以上。用装有 CCD 照相系统(Photometrics Cool SNAP EZ)的 Olympus BX60 荧光显微镜观察装片,用 MetMorph 图像软件控制 CCD 照相系统。观察 CPD 染色时,分别用绿色(WG)和紫外光(UV)激发滤色片观察 PI 染色和 DAPI 染色。通过合成 PI 和 DAPI 染色的灰度图获得 CPD 图像。图像用 Photoshop 软件(8.0.1 版)处理。

1.3 探针标记、原位杂交和检测

45S rDNA 来自番茄基因组,45S rDNA 质粒的插入片段长度为 9.1 kb,克隆载体为 pUC18^[13]。分离纯化的质粒用地高辛-11-UTP 缺口平移标记试剂盒标记。

45S rDNA 荧光原位杂交在先前被 CPD 染色的装片上进行。被 CPD 染过的制片用 2×SSC 浸洗 3 次,每次 5 min,然后用 70%、90%和 100%乙醇系列脱水,风干后直接用于荧光原位杂交。原位杂交按 She 等^[6]的流程进行。用抗地高辛罗丹明(Roche Diagnostics)检测杂交信号。用前述的荧光显微镜和 CCD 照相系统观察和拍照。染色体用 3 μg/mL DAPI 溶液复染染色体。图像用 Photoshop

软件(8. 0.1 版) 处理。

1.4 核型分析

按照李懋学和陈瑞阳^[14]的方法进行染色体计数和核型分析。通过统计 30 个分裂相的染色体数确定该物种的染色体数目。中期染色体因凝缩程度高,形态上的区分度降低,故采用早中期染色体进行核型分析。选取 5 个染色体形态良好且分散的早中期分裂相,用 Photoshop 软件(8. 0.1 版)测量染色体,计算各染色体的相对长度[(染色体长度÷单倍基因组总长度)×100%]、臂比(长臂÷短臂)和染色体长度比(最长染色体长度÷最短染色体长度),根据臂比确定各染色体的类型。随体不计算在所在臂的长度内。测量染色体凝缩程度最高的 5 个中期分裂相,计算单倍基因组绝对长度(即核型长度)^[10]。按照 Paszko^[15]综述的核型不对称性参数的计算方法,计算平均着丝粒指数(CI)、染色体内不对称指数(A1)、染色体间不对称指数(A2)、单倍染色体组中所有长臂占总长的比例[As K(%)]、单倍染色体组中所有短臂占总长的比例(TF%)、核型不对称指数(AI),确定 Stebbins 核型不对称类型^[16]。染色体按从长到短顺序排列。综合染色体测量和 CPD 带、rDNA 信号数据绘制核型模式图。

2 结果与分析

云实的 CPD 染色、荧光原位杂交和核型分析结

果见图 1。其中,图 1,a、b 分别是有丝分裂中期、早中期染色体的 CPD 显带图像,图 1,c 是早中期染色体的 45S rDNA 荧光原位杂交图像,图 1,d 是 CPD 显带核型,图 1,e 是核型模式图。云实的核型分析数据见表 1。

通过 30 个分裂相的染色体计数,确定云实的染色体数目为 2n=24。染色体凝缩最短的 5 个中期分裂相(包括图 1,a 所示的分裂相)测量得知单倍基因组总长度为 30.38±1.58 μm,染色体平均长度为 2.53 μm,最长染色体的长度为(3.22±0.20) μm,最短染色体的长度为(2.06±0.18) μm,可见云实的基因组相当小。图 1,a 所示的中期分裂相的单倍基因组总长度为 32.34 μm,最长染色体为 3.50 μm,最短染色体为 2.25 μm;图 1,b 所示的早中期分裂相,其染色体凝缩程度较低,单倍基因组总长度为 62.76 μm,最长染色体为 7.09 μm,最短染色体为 4.28 μm,相当于中期染色体的 2 倍。从表 1 可以看出,云实的核型公式为 2n=24=14m+10sm(2SAT),即第 1、2、4、5、6、7 和 11 号染色体为中部着丝粒染色体(m),第 3、8、9、10、12 号为近中部着丝粒染色体(sm),第 12 号染色体短臂末端在早中期可见形成随体结构(图 1,b)。染色体相对长度范围 11.22~7.12。核型不对称性参数 CI、A1、A2、As K(%),TF%、AI 分别为 41.63±6.70、0.27、0.16、58.18、41.82、2.57,基因组中臂比大于 2.0 的染色

表 1 云实的染色体测量数据

Table 1 Chromosome measurements of *Caesalpinia decapetala* (Roth) Alston

染色体编号 Chromosome No.	相对长度 Relative length/%			臂比 Arm ratio	染色体类型 Chromosome type
	短臂 Short arm	长臂 Long arm	总长度 Total length		
1	4.81±0.33	6.41±0.20	11.22±0.13	1.34±0.14	m
2	4.60±0.16	5.54±0.58	10.13±0.74	1.20±0.09	m
3	3.15±0.25	6.25±0.27	9.40±0.52	1.99±0.07	sm
4	4.07±0.10	4.42±0.23	8.49±0.21	1.09±0.07	m
5	4.02±0.06	4.26±0.12	8.28±0.13	1.06±0.04	m
6	3.79±0.11	4.18±0.06	7.97±0.05	1.10±0.05	m
7	3.74±0.27	4.07±0.28	7.81±0.53	1.09±0.05	m
8	2.83±0.08	4.82±0.36	7.64±0.34	1.71±0.15	sm
9	2.55±0.11	5.05±0.04	7.60±0.07	1.98±0.10	sm
10	2.67±0.34	4.76±0.32	7.43±0.55	1.79±0.22	sm
11	3.38±0.24	3.74±0.22	7.12±0.45	1.11±0.03	m
12	2.19±0.11	4.72±0.11	6.91±0.17	2.15±0.10	sm *

注:m. 中部着丝粒染色体;sm. 近中部着丝粒染色体;* 为随体染色体

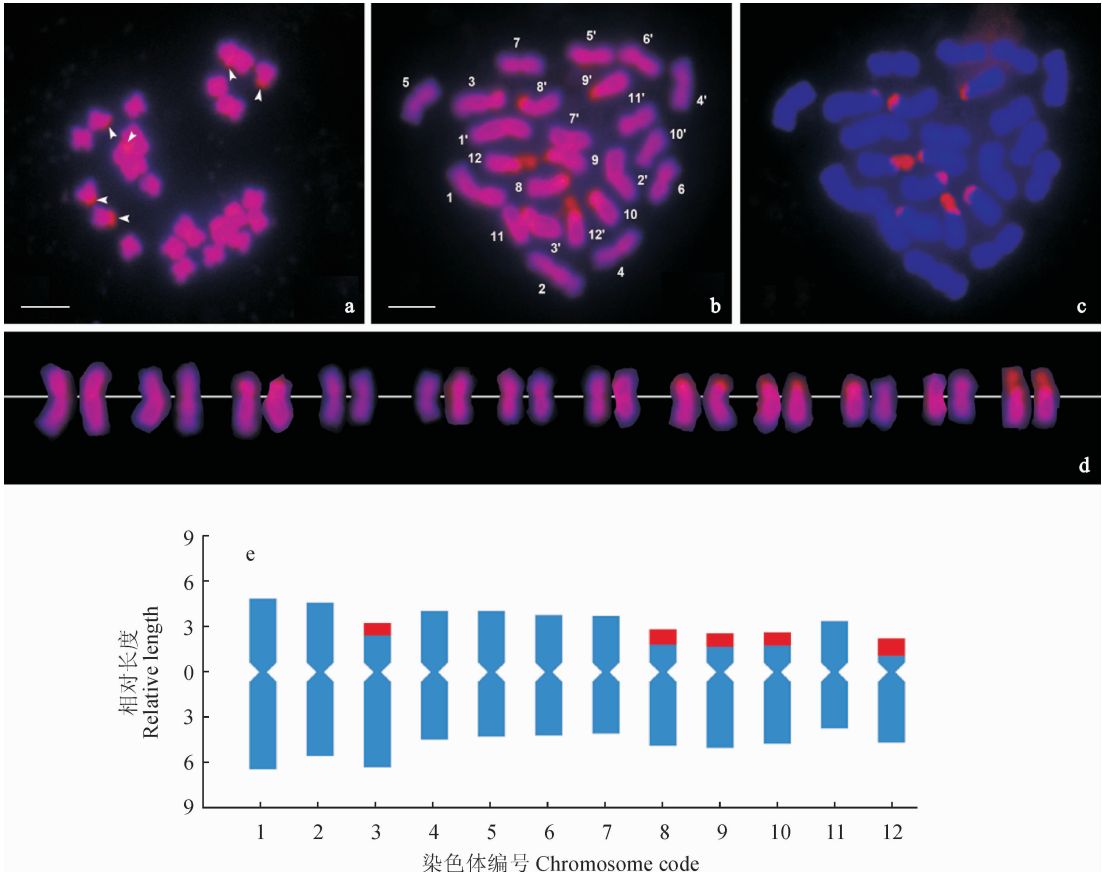
Notes: m. The middle centromere chromosome;sm. Near the middle of the centromere chromosome;* . Satellite chromosome

体所占比例为 8.33%，最长与最短染色体的比例为 1.62，因此云实的核型属于 Stebbins 类型中的 2A 型。从这些参数可以看出，云实的核型是一种相当对称的核型。

云实的早中期染色体经 CPD 染色后，在 9 条染色体短臂末端显示了红色的 CPD 带(图 1,b,d)，其中：第 3 号染色体短臂末端有 1 对较弱的 CPD 带，第 8、9 号染色体的短臂末端各有一对较强的 CPD 带，第 10 号染色体中仅 1 条染色体的短臂末端有较强的 CPD 带，第 12 号染色体的短臂末端有 1 对很强的 CPD 带，其远端在早中期形成随体结构。在

CPD 染色的中期染色体中(图 1,a)，因为染色体高度凝缩，弱的 CPD 带难以显现出来，只观察到 6~7 个 CPD 带，而且第 12 号染色体的随体也显现不出来。早中期和中期染色体经 CPD 染色后，都没有显示蓝色的 DAPI 带。

CPD 染色过的染色体装片经 45S rDNA 探针杂交后，显示了 9 个杂交信号(图 1,c)，这些杂交信号全部出现在相应染色体的 CPD 带区，而且杂交信号的强弱与相应染色体上的 CPD 带的强弱相对应。rDNA 荧光原位杂交表明，云实有 9 个 45S rDNA 位点，位于 5 对染色体的短臂末端，其中在第 3、8、9



a. CPD 染色的有丝分裂中期染色体，显示 6 个红色 CPD 带(箭头所示)；b. CPD 染色的有丝分裂早中期染色体，显示 9 个红色 CPD 带；c. 45S rDNA 荧光原位杂交，显示 9 个对应于 CPD 带区的 45S rDNA 位点(红色)；d. CPD 显带核型；e. 核型模式图，红色带代表 CPD 带和 rDNA 杂交信号。a 中的箭头示 CPD 带，b 中的数字为核型分析确定的染色体编号。标尺 = 5 μm

图 1 云实 CPD 染色和 45S rDNA 探针荧光原位杂交的有丝分裂染色体以及云实的 CPD 显带核型和核型模式图

a. Mitotic metaphase chromosome stained by CPD, showing six red CPD bands (indicated by arrowheads); b. Mitotic prometaphase chromosome stained by CPD, showing nine red CPD bands; c. FISH with 45S rDNA probe, showing nine 45S sites (red); d. CPD-banded karyotype; e. Idiograms of *C. decapetala*, the position of fluorochrome bands and 45S rDNA FISH signals. The ordinate scale on the left indicates the relative length of the chromosomes (i.e. % of haploid complement). The horizontal axis indicates the chromosome number designated. The red bands represent both CPD bands and rDNA FISH signals. Arrowheads in a indicate the CPD bands. The chromosome numbers in b are designated by means of karyotyping. Bars = 5 μm

Fig. 1 Mitotic chromosomes after CPD staining and FISH with 45S rDNA probe, and CPD banded karyotype and ideogram in *C. decapetala*

和 12 号染色体成对存在,在第 10 号染色体成单存在,表现出杂合性;在这些位点的杂交信号中,第 12 号染色体的最强,第 8、9、10 号染色体的次之,第 3 号染色体的最弱;第 12 号染色体短臂上的随体是 rDNA 位点的一部分,是 rDNA 位点的远端解凝缩伸展而成。

3 讨 论

云实属有大约 140 个形态特征相似的物种^[5]。迄今为止,关于云实属物种的细胞遗传学研究较少,仅确定了 22 个物种的染色体数目,仅对 15 个物种进行过核形态学研究^[17-18]。本研究首次对云实染色体进行了荧光显带和 rDNA 荧光原位杂交分析,建立其分子细胞遗传学核型,为云实属物种的细胞遗传学比较研究以及云实基因组的进一步分析提供了重要的基础性数据。

关于云实的染色体数,最早的报道了 2 个数目,即 $2n=22$ 和 $2n=24$ ^[4],但 Lewis^[5] 认为云实的染色体数为 $2n=24$,本研究进一步证实云实的染色体数是 $2n=24$ 而不是 $2n=22$ 。事实上,已研究的云实属物种的染色体数目都是 $2n=24$ ^[17-25],仅在很少情况下观察到染色体数目的整倍性变化^[22],表明云实属物种的染色体数目相当保守,其基数为 $x=12$ 。

本研究结果表明,云实的基因组和染色体小,其染色体平均长度 ($2.53\ \mu\text{m}$) 略高于 Kumari 和 Bir^[20] 报道的云实属的染色体长度 ($2.09\sim1.74\ \mu\text{m}$)、Cangiano 和 Bernardello^[22] 报道的 *C. gilliesii*、*C. mimosifolia* 和 *C. paraguariensis* 的染色体长度 (分别为 2.06 、 1.72 、 $1.90\ \mu\text{m}$),与 Rodrigues 等^[17,25] 报道的 *C. bracteosa*、*C. echinata*、*C. laxiflora*、*C. pyramidalis*、*C. calycina*、*C. microphylla*、*C. pluviosa* var. *peltophoroides*、*C. ferrea* var. *leiostachya* 和 *C. pulcherrima* 的染色体长度 (分别为 3.12 、 2.40 、 2.52 、 2.51 、 3.32 、 2.05 、 2.57 、 2.87 、 $2.58\ \mu\text{m}$) 很接近。这些事实表明,云实属物种的基因组都小,物种间的差异不太大,基因组

大小在物种间相当保守。

本研究结果还表明,云实的核型仅由 m 染色体和 sm 染色体组成,属 2A 不对称类型,并且其 AI 值低,因此是相当对称的核型。已报道的云实属物种的核型也几乎都是由 m 和 sm 染色体组成^[17-19,22,25]。而且,部分已测核型不对称性参数的物种,其不对称性参数如 A1、A2、TF%、AI 等与云实的相近^[17,22,25]。事实上,在云实亚科中也是 m 和 sm 染色体很常见,st 染色体(近端部着丝粒染色体)很少见^[20,26]。Stebbins^[16] 认为云实亚科趋向于拥有小的染色体和相对对称的核型,是豆科中的原始类群。已有的云实属物种的核形态学研究结果反映了这一趋向^[17,20,22-23,25],本研究关于云实的核型分析结果则为这一趋向提供了进一步的佐证。此外,本研究在云实染色体中检测到 1 对随体。前人的研究已在云实属 14 个已进行核形态学研究的物种中的 11 个物种检测到 1 对随体^[17,22,24-25],提示这对随体的存在也是相当保守的。

rDNA 原位杂交结果揭示云实具有 9 个 rDNA 位点,在第 10 号染色体表现出 rDNA 位点的杂合性。rDNA 位点杂合性可表现为同源染色体之间的两个位点的大小即 rDNA 重复单位的拷贝数差异,原位杂交时出现信号大小与强度差异;也可表现为其中的 1 条染色体的 rDNA 拷贝数很少甚至缺失,原位杂交时不产生信号。前一种情况在植物中相对较常见。后一种情况则多在杂种起源的物种及一些植物的变种中观察到^[27-28]。一般认为,rDNA 位点的杂合性来自同源染色体 rDNA 位点间的不等交换或 rDNA 序列的转座^[10]。云实第 10 号染色体上的 rDNA 位点杂合性,是来自原本都有 rDNA 位点的 2 个染色体的短臂末端的不等交换(导致其中 1 个成员丧失 rDNA 位点),还是原本都没有 rDNA 位点的两条染色体中的一条因转座而获得 rDNA 位点? 有待于今后通过比较云实属不同物种的 45S rDNA 位点的数目和位置来寻找线索^[10]。

参考文献:

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 39 卷 [M]. 北京:科学出版社,1988: 105.
[2] ZHANG Q, LIU X T, LIANG J Y, et al. Chemical constituents from the stems of *Caesalpinia decapetala* [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2008,6(3): 168-172.

[3] GALLEGO M G, GORDON M H, SEGOVIA, F J, et al. *Caesalpinia decapetala* extracts as inhibitors of lipid oxidation in beef patties[J]. *Molecules*, 2015,20(8), 13 913-13 926.
[4] GOLDBLATT P. Cytology and the phylogeny of Leguminosae [M]// Polhill R M, Raven P H, eds. *Advances in Legume Systematics, Part 2*. Royal Botanic Gardens, Kew, 1981:

427-465.

[5] LEWIS G P. *Caesalpinia*: A revision of the Poincianella-Erythrostemon Group [M]. Royal Botanic Gardens, Kew, 1998; 233.

[6] SHE C W, LIU J Y, SONG Y C. CPD staining: an effective technique for detection of NORs and other GC-rich chromosomal regions in plants[J]. *Biotechnic & Histochemistry*, 2006, **81**(1): 13-21.

[7] 余朝文, 宋运淳. 植物荧光原位杂交技术的发展及其在植物基因组分析中的应用[J]. *武汉植物学研究*, 2006, **24**(4): 365-376.

SHE C W, SONG Y C. Progress of plant FISH technique and its applications in the analysis of plant genome[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2006, **24**(4): 365-367.

[8] 余朝文, 张礼华, 蒋向辉. 花生的荧光显带和 rDNA 荧光原位杂交核型分析[J]. *作物学报*, 2012, **38**(4): 754-759.

SHE C W, ZHANG L H, JIANG X H. Karyotype analysis of *Arachis hypogaea* L. using fluorescence banding and fluorescence *in situ* hybridization with rDNA probes[J]. *Acta Agonomica Sinica*, 2012, **38**(4): 754-759.

[9] 余朝文, 蒋向辉. 慈姑 45S rDNA 和端粒序列检测及核型分析[J]. *植物科学学报*, 2015, **33**(4): 507-512.

SHE C W, JIANG X H. Detection of 45S rDNA and telomere sequences and karyotype analysis of *Sagittaria trifolia* L. [J]. *Plant Science Journal*, 2015, **33**(4): 507-512.

[10] SHE C W, JIANG X H, OU L J, *et al.* Molecular cytogenetic characterisation and phylogenetic analysis of the seven cultivated *Vigna* species (Fabaceae) [J]. *Plant Biology*, 2015, **17**(1): 268-280.

[11] SHE C W, WEI L, JIANG X H. Molecular cytogenetic characterization and comparison of the two cultivated *Canavalia* species (Fabaceae) [J]. *Comparative Cytogenetics*, 2017, **11**(4): 579-600.

[12] 杨宇华, 胡学明, 周庆宏. 用浓硫酸处理刺云实种子的发芽试验[J]. *云南林业科技*, 1996, (4): 67-69.

YANG Y H, HU X M, ZHOU Q H. Germination test on *Caesalpinia spinosa* seed treated with oil of vitriol[J]. *Yunnan Forestry Science and Technology*, 1996, (4): 67-69.

[13] PERRY K L, PALUKAITIS P. Transcription of tomato ribosomal DNA and the organization of the intergenic spacer. *Molecular & General Genetics*, 1990, **221**(1): 102-112.

[14] 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.

LI M X, CHEN R Y. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1985, **3**(4): 297-302.

[15] PASZKO B. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2006, **258**(1-2): 39-48.

[16] STEBBINS G L. Chromosomal evolution in higher plants [M]. London: Edward Arnold, 1971.

[17] RODRIGUES P S, SOUZA M M, CORRÊA R X. Karyomorphology and karyotype asymmetry in the South American *Caesalpinia* species (Leguminosae and Caesalpinioideae) [J]. *Genetics & Molecular Research*, 2014, **13**(4): 8 278-8 293.

[18] 包松莲, 李志国, 张建云, 等. 塔拉染色体核型分析[J]. *江苏农业科学*, 2012, **40**(7): 176-177.

BAO S L, LI Z G, ZHANG J Y, *et al.* Karyotype analysis of *Caesalpinia spinosa* [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, **40**(7): 176-177.

[19] GILL L S, HUSAINI S W H. Cytology of some arborescent Fabaceae of Nigeria [J]. *Silvae Genetica*, 1982, **31**(4): 117-122.

[20] KUMARI S, BIR S S. Karyomorphological evolution in Caesalpinaceae [J]. *Journal of Cytology and Genetics*, 1989, **24**: 149-163.

[21] BELTRÃO G T, GUERRA M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. III [J]. *Ciência e Cultura*, 1990, **42**: 839-845.

[22] CANGIANO M A, BERNARDELLO G. Karyotype analysis in Argentinean species of *Caesalpinia* (Leguminosae) [J]. *Caryologia*, 2005, **58**(3): 262-268.

[23] SOUZA M G C, BENKO-ISEPPON A M. Cytogenetics and chromosome banding patterns in Caesalpinioideae and Papilionioideae species of Pará, Amazonas, Brazil [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2004, **144**(2): 181-191.

[24] JENA S, SAHOO P, MOHANTY S, *et al.* Identification of RAPD markers, *in situ* DNA content and structural chromosomal diversity in some legumes of the mangrove flora of Orissa [J]. *Genetica*, 2004, **122**(3): 217-226.

[25] RODRIGUES P S, SOUZA M M, CORRÊA R X. Karyomorphology of *Caesalpinia* species (Caesalpinioideae; Fabaceae) from Caatinga and Mata Atlantica Biomes of Brazil [J]. *Journal of Plant Studies*, 2012, **1**(2): 82-91.

[26] BAIRIGANJAN G C, PATNAIK S N. Chromosomal evolution in Fabaceae [J]. *Cytologia*, 1989, **54**(1): 51-64.

[27] PEDROSA A, SCHWEIZER D, GUERRA M. Cytological heterozygosity and the hybrid origin of sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, **100**(3-4): 361-367.

[28] HASTEROK R, WOLNY E, HOSIAWA M, *et al.* Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae [J]. *Annals of Botany*, 2006, **97**(2): 205-216.

(编辑:潘新社)