

几种菊属植物及其种间杂种减数分裂行为观察

崔娜欣* 陈发棣** 赵宏波 房伟民 汪舟明

(南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095)

摘 要: 对菊花脑 [*D. nankingense* (2x)]、甘菊 [*D. lavandulifilium* (2x)]、四倍体菊花脑 [*D. nankingense* (4x)]、‘滁菊’ [*D. morifolium* ‘Chuju’ (6x)]、‘黄英’ [*D. morifolium* ‘Huangying’ (6x)] 及其部分种间杂种减数分裂过程染色体行为进行研究。结果表明: 二倍体的菊花脑和甘菊减数分裂中期 (M_I) 每个花粉母细胞 (PMC) 平均染色体配对构型分别为 0.83 + 8.58 和 1.50 + 8.25; 四倍体菊花脑 PMC 染色体配对构型为 2.64 + 13.35 + 1.03 + 0.93; 六倍体 ‘滁菊’ 和 ‘黄英’ PMC 染色体配对构型分别为 0.48 + 26.09 + 0.33 和 1.09 + 25.18 + 0.18 + 0.50, 是两个已经二倍体化的异源六倍体。菊花脑 × 甘菊的杂种 F₁ PMC 染色体配对构型为 1.61 + 8.19; 四倍体菊花脑 × 菊花脑、菊花脑 × 四倍体菊花脑杂种 F₁ PMC 染色体配对构型分别为 3.42 + 8.34 + 1.53 + 0.58 和 3.62 + 8.31 + 1.50 + 0.56; 菊花脑 × ‘黄英’、‘黄英’ × 菊花脑和甘菊 × ‘黄英’、‘黄英’ × 甘菊正反交杂种 F₁ PMC 染色体配对构型分别为 0.30 + 16.45 + 0.70 + 0.29 + 16.07 + 0.89、0.63 + 16.32 + 0.68 和 0.47 + 16.38 + 0.65 + 0.03; 四倍体菊花脑 × ‘滁菊’ 杂种 F₁ PMC 染色体配对构型为 3.59 + 18.03 + 0.98 + 0.52 + 0.07。由减数分裂行为可以看出菊花脑和甘菊亲缘关系较近, 菊花脑和甘菊及其近缘种可能是栽培菊花的 1 个染色体组供体; 菊属 3 个染色体组间分化程度较低, 彼此亲缘关系较近, 且部分染色体可能存在易位等结构变异, 或菊属内广泛存在促进配对的基因。

关键词: 菊属; 种间杂种; 减数分裂; 亲缘关系

中图分类号: S 682.1⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 05-1033-06

Research on Meiosis of Some *Dendranthem a* Species and Their Hybrids

Cui Naxin*, Chen Fadi**, Zhao Hongbo, Fang Weinan, and Wang Zhouming

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Meiosis behaviors of *D. nankingense* (2x), *D. lavandulifilium* (2x), *D. nankingense* (4x), *D. morifolium* ‘Chuju’ (6x), *D. morifolium* ‘Huangying’ (6x) and part of interspecific hybrids between them were studied. The results were concluded as following: The chromosome pairing configuration in meiosis M_I per PMC of diploid *D. nankingense* and *D. lavandulifilium* was 0.83 + 8.58 and 1.50 + 8.25, respectively. The chromosome pairing configuration in meiosis M_I per PMC of tetraploid *D. nankingense* (4x) was 2.64 + 13.35 + 1.03 + 0.93. The chromosome pairing configuration in meiosis M_I per PMC of hexaploid *D. morifolium* ‘Chuju’ and *D. morifolium* ‘Huangying’ were 0.48 + 26.09 + 0.33 and 1.09 + 25.18 + 0.18 + 0.50, respectively, which elucidated that they were two allohexaploids with diploidization meiotic behavior, as well, there were structural changes as translocation on some chromosomes. The chromosome pairing configuration in meiosis M_I per PMC of *D. nankingense* × *D. lavandulifilium* was 1.61 + 8.19. Chromosome configuration per PMC in M_I was 3.42 + 8.34 + 1.53 + 0.58 in F₁ hybrids of *D. nankingense* (4x) × *D. nankingense* (2x) and 3.62 + 8.31 + 1.50 + 0.56 in that of *D. nankingense* (2x) × *D. nankingense* (4x). Meiotic association per PMC in M_I of F₁

收稿日期: 2005-11-18; 修回日期: 2006-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400308); 江苏省科技厅高技术研究项目 (BG2003305、BG2004310); 江苏省农业三项工程项目 [SX (2003) 065]; 上海市委重点攻关项目 [(2004) D3-1]

*现工作单位: 上海鲜花港水生花卉有限公司

**通讯作者 Author for correspondence (E-mail: chenfd@njau.edu.cn)

hybrids of *D. nankingense* \times *D. morifolium* 'Huangying', *D. morifolium* 'Huangying' \times *D. nankingense*, *D. lavandulifilium* \times *D. morifolium* 'Huangying' and *D. morifolium* 'Huangying' \times *D. lavandulifilium* were 0.30 + 16.45 + 0.70, 0.29 + 16.07 + 0.89, 0.63 + 16.32 + 0.68 and 0.47 + 16.38 + 0.65 + 0.03, respectively. Chromosome configuration in meiosis M per PMC of F_1 hybrids of *D. nankingense* (4x) \times *D. morifolium* 'Chuju' was 3.59 + 18.03 + 0.98 + 0.52 + 0.07. The results indicated that the genetic relationship between *D. nankingense* and *D. lavandulifilium* was closely, and *D. nankingense*, *D. lavandulifilium* or some of their relatives were the pregenitor of one genome of cultivating chrysanthemum. The degree of differentiation of three genomes in genus *Dendranthema* was low and the homology of the three genomes was high. Meanwhile, Structural changes such as translocation were likely to happen in some chromosomes, and pairing-promotion genes existed in genus *Dendranthema* widely.

Key words: *Dendranthema*; Interspecific hybrids; Meiosis; Genetic relationship

不同倍性物种间杂种减数分裂中期的染色体配对构型能够很好地反映出染色体组的同源性,用于确定多倍体种染色体的二倍体供体,被广泛应用到多倍体物种系统发育研究。小麦^[1,2]、棉花^[3]、水稻^[4]等大田作物的染色体组构成分析已取得了长足的进展,但菊属系统发育的染色体组分析研究,国内外仅有零星报道^[5~7]。由于菊属植物种间远缘杂交在同倍数性物种间及四倍体与六倍体间较易成功,而二倍体物种与四倍体及六倍体杂交则很难获得杂种^[8~10]。因此,已有的研究多集中在高倍性物种间的杂种后代。对二倍体菊属物种参与的杂种后代减数分裂行为研究是阐明多倍体物种染色体组构成及来源的重要环节。本文重点对通过幼胚拯救^[11]或四倍体^[12]桥梁亲本获得的二倍体菊属物种远缘杂交后代减数分裂中期染色体配对构型进行探讨,为菊属物种间的亲缘关系、菊属植物的染色体组来源及菊属系统演化和栽培菊花起源研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为不同倍性菊属植物及其远缘杂种(经幼胚拯救或通过四倍体桥梁亲本获得,表1),种植在南京农业大学菊花种质资源保存中心。

表 1 试验材料

Table 1 Materials

编号 Code	材料 Material	染色体数 of chromosome	Number备注 Remark
1	菊花脑 <i>Dendranthema nankingense</i>	18	
2	甘菊 <i>D. lavandulifilium</i>	18	
3	四倍体菊花脑 <i>D. nankingense</i> (4x)	36	经秋水仙素诱变获得 ^[12] Acquired by colchicine induction
4	'黄英' <i>D. morifolium</i> 'Huangying'	54	栽培观赏小菊 <i>Chrysanthemum</i> cultivars with small inflorescences
5	'滁菊' <i>D. morifolium</i> 'Chuju'	54	栽培药用菊 Medicinal <i>chrysanthemum</i> cultivars
6	菊花脑 <i>D. nankingense</i> \times 甘菊 <i>D. lavandulifilium</i> F_1	18	
7	菊花脑 <i>D. nankingense</i> \times '黄英' <i>D. morifolium</i> 'Huangying' F_1	36	杂交后幼胚拯救获得 ^[11] Acquired by embryo rescue after hybridization
8	'黄英' <i>D. morifolium</i> 'Huangying' \times 菊花脑 <i>D. nankingense</i> F_1	36	杂交后幼胚拯救获得 ^[11] Acquired by embryo rescue after hybridization
9	甘菊 <i>D. lavandulifilium</i> \times '黄英' <i>D. morifolium</i> 'Huangying' F_1	36	杂交后幼胚拯救获得 ^[11] Acquired by embryo rescue after hybridization
10	'黄英' <i>D. morifolium</i> 'Huangying' \times 甘菊 <i>D. lavandulifilium</i> F_1	36	杂交后幼胚拯救获得 ^[11] Acquired by embryo rescue after hybridization
11	四倍体菊花脑 <i>D. nankingense</i> (4x) \times 菊花脑 <i>D. nankingense</i> (2x) F_1	27	杂交后幼胚拯救获得 ^[11] Acquired by embryo rescue after hybridization
12	菊花脑 <i>D. nankingense</i> (2x) \times 四倍体菊花脑 <i>D. nankingense</i> (4x) F_1	27	
13	四倍体菊花脑 <i>D. nankingense</i> (4x) \times '滁菊' <i>D. morifolium</i> 'Chuju' F_1	45	

1.2 方法

于晴天 9:00 ~ 11:00 取直径 2 ~ 6 mm 大小的花蕾直接用卡诺氏固定液（95%酒精和冰醋酸体积比为 3:1）固定，4℃冰箱中保存备用。将固定好的花蕾取出，去除头状花序的苞片，用镊子夹取管状花的花药，直接用 45% 的醋酸压片，在 Olympus BX41 相差显微镜下，用临时片统计 M 染色体配对构型，并拍照^[13,7]。在制片时，因为菊花头状花序从外轮向内轮逐渐成熟，因此先挑选最外轮和最内轮的管状花进行制片，然后根据分裂相情况挑选一定发育时期的管状花进行制片。

2 结果与分析

2.1 不同倍性菊属植物花粉母细胞减数分裂行为

由表 2 可以看出，菊花脑减数分裂中期（M）染色体平均构型为 0.83 ± 8.58 ，以 9 构型为主（图 1, A），占观察细胞总数的 68.3%；二价体结构松散，环状二价体与棒状二价体出现的频率接近 1:3，部分二价体在终变期提前解离为单价体，减数分裂过程基本正常，后期（A）、后期（A）正常分离（图 1, B）。甘菊在 M 染色体平均构型为 1.50 ± 8.25 ，主要构型为 2 + 8，占观察细胞总数的 43.8%；环状二价体与棒状二价体出现的频率亦接近 1:3，部分二价体在终变期解离为单价体（图 1, C）。四倍体菊花脑 M 染色体构型呈多样性变化，除二价体外，还有三价体、四价体和单价体出现（图 1, D），其中二价体频率最高，单价体和三价体次之，四价体频率最低，61.3% 的细胞出现四价体，为链状或环状结构，染色体平均构型为 $2.64 \pm 13.35 \pm 1.03 \pm 0.93$

（表 2），减数分裂后期（A）、后期（A）以及末期（T）、末期（T）出现高频率落后染色体、断片以及各种形式的桥、微核等异常现象。滁菊是六倍体栽培药用菊，花粉母细胞 M 以二价体构型为主（图 1, E），其中 66.7% 的观察细胞出现 27 构型，染色体配对平均构型为 $0.48 \pm 26.09 \pm 0.33$ ，减数分裂过程基本正常。‘黄英’为六倍体栽培小菊品种，减数分裂行为也表现为二倍体化的倾向，在观察的 22 个细胞中，7 个细胞为 27 构型，含单价体和四价体的细胞出现频率分别为 45.4% 和 40.9%，另外，在 2 个细胞内观察到三价体构型（图 1, F），每细胞的染色体平均构型为 $1.09 \pm 25.18 \pm 0.18 \pm 0.50$ ，减数分裂过程基本正常，A、A 正常分离。

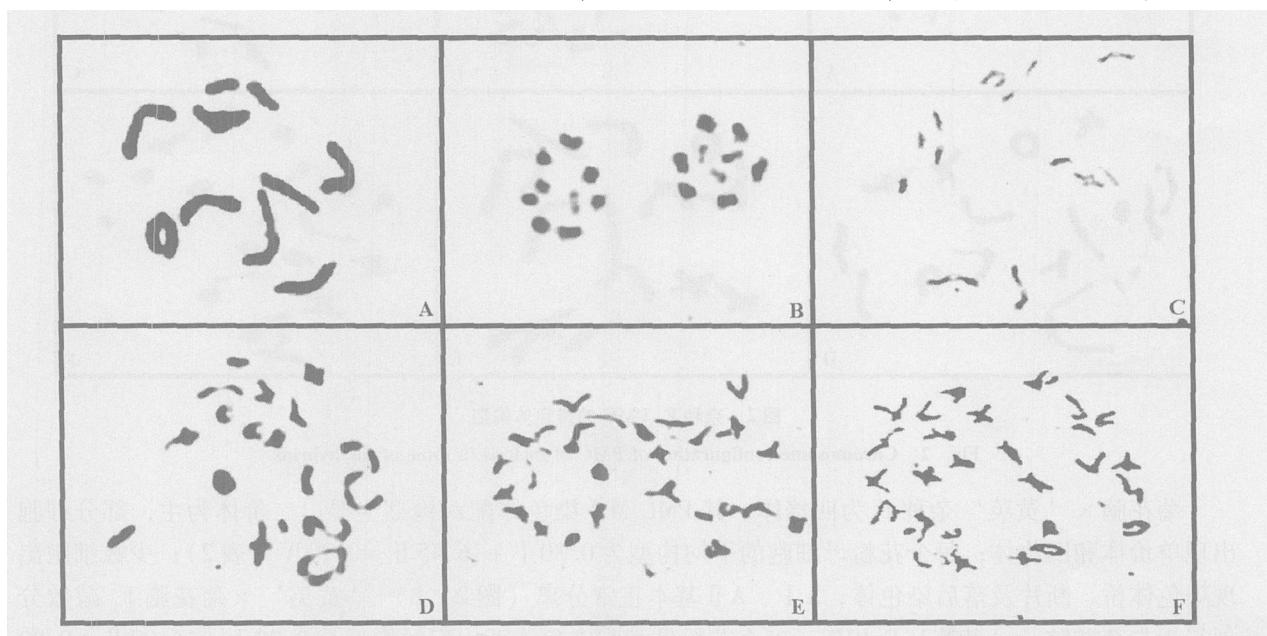


图 1 不同倍性菊属植物 PMC 的染色体构型

Fig 1 Chromosome configuration of PMC of meiosis in different ploidy materials

表 2 不同倍性菊属植物及杂种 F₁ 代 PMC M 染色体平均配对构型

Table 2 Chromosome configuration of PMC M of meiosis in different ploidy materials and hybrids

试材 编号 Code	染色体数 Number of chromosome	统计细胞数 Number of cells scored	每个细胞平均染色体配对构型 Mean chromosome configuration of per cell							每细胞交叉	
			单价体	二价体 () Bivalent			三价体	四价体	五价体	六价体	结数 Chiasmata per cell
			()	棒状	环状	合计	()	()	()	()	
			Monovalent	Rod	Ring	Total	Trivalent	Tetavalent	Pentavalen	Hexavalent	
1	18	41	0.83	6.36	2.22	8.58					10.78
2	18	32	1.50	6.22	2.03	8.25					10.53
3	36	31	2.64	9.96	3.39	13.35	1.03	0.93			22.35
4	54	22	1.09	20.14	5.04	25.18	0.18	0.50			32.63
5	54	33	0.48	20.82	5.27	26.09		0.33			33.13
6	18	31	1.61	5.03	3.16	8.19					11.35
7	36	33	0.30	14.15	2.30	16.45		0.70			21.32
8	36	28	0.29			16.07		0.89			
9	36	38	0.63	13.11	3.21	16.32		0.68			22.26
10	36	34	0.47	12.85	3.53	16.38		0.65		0.03	22.68
11	27	38	3.42	4.97	3.37	8.34	1.53	0.58			17.03
12	27	32	3.62			8.31	1.50	0.56			16.13
13	45	41	3.59			18.03	0.98	0.52	0.07		

2.2 杂种 F₁花粉母细胞减数分裂行为

菊花脑 × 甘菊杂种 F₁ 在 M 染色体配对构型上与亲本相似，平均构型为 1.61 + 8.19 (表 2)。A、A 均等分离 (图 2, A)，减数分裂过程基本正常，说明菊花脑和甘菊亲缘关系较近。

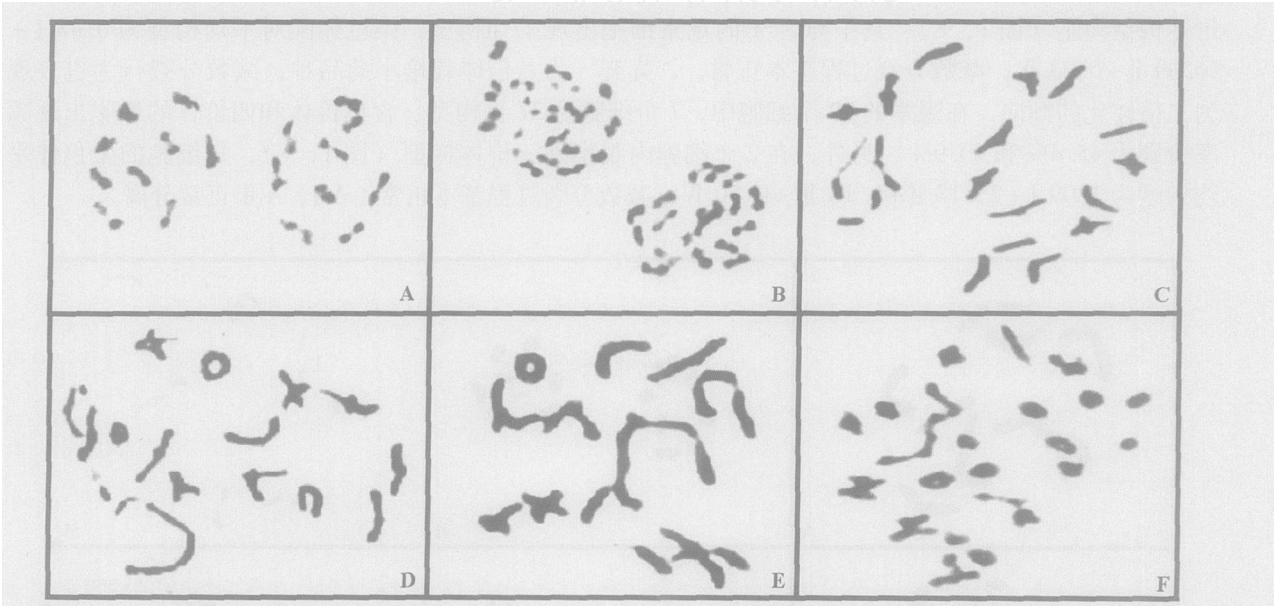


图 2 杂种 F₁ PMC 的染色体构型

Fig. 2 Chromosome configuration of PMC of meiosis in some of the hybrids

菊花脑 × ‘黄英’ 杂种 F₁ 为四倍体，其 PMC M 染色体配对构型主要以二价体为主，部分细胞出现单价体和四价体；每个花粉母细胞的平均构型为 0.30 + 16.45 + 0.70 (表 2)；少数细胞出现染色体桥、断片及落后染色体，A、A 基本正常分离 (图 2, B)。

‘黄英’ × 菊花脑 F₁ 减数分裂行为与菊花脑 × ‘黄英’ F₁ 相似，每个花粉母细胞染色体平均配对构型为 0.29 + 16.07 + 0.89 (表 3)；少数细胞观察到染色体桥，减数分裂过程基本正常。

甘菊 × ‘黄英’ 的 F₁ 亦为四倍体杂种 (2n = 4x = 36)，M 的染色体配对构型以二价体为主 (图

2, C); 其中含 $16 + 1$ 的细胞出现频率最高, 为 42.1%, 含四价体和单价体的细胞频率分别为 57.9%和 31.6%; 平均每个花粉母细胞配对构型为 $0.63 + 16.32 + 0.68$ (表 2)。 \times 甘菊的杂种 F_1 减数分裂行为与甘菊 \times ‘黄英’ F_1 相似, M 每细胞平均配对构型为 $0.47 + 16.38 + 0.65 + 0.03$; 18 构型出现频率最高, 为 38.2%, 在一个细胞内观察到一个链状六价体 (图 2, D), 推断可能有 2~3 对染色体发生了易位等结构变异。

四倍体菊花脑 \times 菊花脑杂种 F_1 减数分裂行为复杂, 出现单价体、二价体、三价体及四价体构型, 平均染色体配对构型为 $3.42 + 8.34 + 1.53 + 0.58$ (表 2)。其中含三价体的细胞占观察细胞总数的 81.6%, 数目变幅为 1~4; 含四价体的细胞占总数的 44.7%, 数目变幅为 1~3; 单价体的变幅为 1~7。A、A 出现高频率的染色体桥、断片及落后染色体, T 出现微核。菊花脑 \times 四倍体菊花脑杂种 F_1 减数分裂行为与四倍体菊花脑 \times 菊花脑杂种 F_1 相似, 在中期每个 PMC 染色体平均配对构型为 $3.62 + 8.31 + 1.50 + 0.56$, 含三价体和四价体的细胞分别占观察细胞总数的 81.2% 和 50.0%, 单价体变幅为 2~9 (图 2, E)。

诱导四倍体是克服二倍体和六倍体物种间障碍的一条途径。四倍体菊花脑 \times ‘滁菊’的杂种 F_1 花粉母细胞减数分裂 M 染色体配对构型二价体出现频率很高, 另外还观察到部分三价体、四价体以及五价体 (图 2, F)。几乎所有细胞都观察到单价体, 数目变幅为 0~9。在 4.9%的细胞内观察到 $9 + 18$ 构型。每个花粉母细胞 M 的染色体平均配对构型为 $3.59 + 18.03 + 0.98 + 0.52 + 0.07$ (表 2)。A、A 呈不均等分离, 出现高频率的染色体桥、断片及落后染色体, 并形成大小花粉粒。

3 讨论

菊花脑和甘菊减数分裂中期 染色体配对构型虽均以二价体为主, 但棒状二价体的比例较高, 且部分二价体在终变期解离为单价体。推断可能是 2 个杂合性质的二倍体, 或存在提前分离的控制机制, 或属染色体组已发生了一定程度分化的二倍体, 与陈发棣等的报道一致^[7]。四倍体菊花脑由二倍体菊花脑诱导而来, 菊花脑减数分裂中期 染色体配对构型以松散的二价体构型为主, 而四倍体菊花脑染色体配对较复杂, 出现了单价体、二价体、三价体和四价体等构型, 其中二价体数平均高达 13.35, 且三价体和单价体的频率高于四价体; 在菊花脑与四倍体菊花脑正反交杂种 F_1 PMC M 染色体配对构型中, 三价体的频率低于预期值, 而二价体频率高于预期值, 因此再次表明菊花脑有可能是一部分同源的种间杂种 (A_1A_2), 诱导的四倍体菊花脑为一部分同源四倍体 ($A_1A_1A_2A_2$), 即菊花脑为一杂合二倍体, 或存在促进配对基因^[5,6]。栽培观赏小菊 ‘黄英’ 与栽培药用菊 ‘滁菊’ 减数分裂行为相似, 减数分裂中期 染色体配对构型均以二价体为主, 其中二价体的频率分别为 96.9%和 94.1%, 是两个二倍体化的异源六倍体, 四价体和单价体的出现, 推断染色体间可能存在易位现象。

药用菊和栽培小菊在栽培菊起源演化过程中被认为是较原始的类型^[13]。菊花脑和 ‘黄英’、甘菊和 ‘黄英’ 正反交杂种 F_1 PMC M 染色体基本配成二价体, 说明菊花脑、甘菊或其近缘种可能是栽培菊花一个染色体组的供体。但由于菊花脑和甘菊可能是杂种性质的二倍体, 因此其原始二倍体染色体组供体可能是两个种的祖先种。杂种的另两个染色体组也能很好地配对, 推断栽培菊花染色体组间分化程度较低, 或存在促进配对基因。Kishimoto 等^[14]对菊属植物叶绿体基因组 RFLP 分析, 发现栽培菊花与甘菊 RFLP 带型一致, 亦认为甘菊与栽培菊花有较近的亲缘关系。赵惠恩^[15]将 ITS 序列分析技术应用于菊属物种亲缘关系分析, 也发现栽培菊花与甘菊的叶绿体基因 (*trnT-trnL*) 序列完全相同。王文奎等^[16]利用染色体原位杂交技术对菊属野生种和栽培品种进行基因组分析, 同样发现菊属植物各种间存在广泛的种质渗入现象, 不同基因组间的同源性很高。

四倍体菊花脑和 ‘滁菊’ 杂交获得了杂种, 克服了二倍体菊花脑和栽培菊花的杂交障碍, 说明

诱导多倍体作为桥梁是克服倍性差异较大物种间远缘杂交障碍的一条有效途径。

参考文献:

- 1 高 智, 韩方普, 何孟元. 应用荧光原位杂交和染色体配对研究八倍体小冰麦中 2 的染色体组构成及染色体特征. 植物学报, 1999, 41 (1): 25~28
Gao Z, Han F P, He M Y. Characterization of genome and chromosomes in octoploid wheat-wheatgrass amphiploid Zhong 2 using fluorescence in situ hybridization and chromosome pairing analysis. Acta Botanica Sinica, 1999, 41 (1): 25~28 (in Chinese)
- 2 Liu ZW, Wang R C. Genome analysis of *Elytrigia caespitosa*, *Lophopyrum nodosum*, *Pseudoroegneria geniculata* spp. *scythica* and *Thinopyrum intermedium*. (Triticeae Gramineae). Genome, 1993, 36: 102~111
- 3 王坤波, 李懋学, 张香娣. 陆地棉与 7 个野生棉杂种细胞学研究. 作物学报, 1996, 22 (1): 27~36
Wang K B, Li G X, Zhang X D. Cytological studies of hybrids between *G. hirsutum* and seven wild cotton species. Acta Agronomica Sinica, 1996, 22 (1): 27~36 (in Chinese)
- 4 王红星, 谭光轩. 水稻染色体组及其关系. 生物学通报, 2002, 37 (12): 22~23
Wang H X, Tan G X. Relationship of chromosome set in *Oryza sativa*. Chinese Bulletin of Biology, 2002, 37 (12): 22~23 (in Chinese)
- 5 Watanabe K. Studies on the control of diploid-like meiosis in polyploid taxa of *Chrysanthemum*. 1. Hexaploid *Chrysanthemum Japanese* Nakai. Cytologia, 1981, 46: 459~498
- 6 Nazeer M A, Khoshoo T N. Meiotic variations in *Chrysanthemum morifolium* complex. Nucleus (Calcutta), 1985, 28: 35~41
- 7 陈发棣, 陈佩度, 李鸿渐. 几种中国野生菊的染色体组分析及亲缘关系初步研究. 园艺学报, 1996, 23 (1): 67~72
Chen F D, Chen P D, Li H J. Genome analysis and their phylogenetic relationships of several wild species of *Dendranthema* in China. Acta Horticulturae Sinica, 1996, 23 (1): 67~72 (in Chinese)
- 8 戴思兰, 陈俊愉. 菊属 7 个种的人工种间杂交试验. 北京林业大学学报, 1996, 18 (4): 16~22
Dai S L, Chen J Y. Artificial interspecific cross among seven species of *Dendranthema* in China. Journal of Beijing Forestry University, 1996, 18 (4): 16~22 (in Chinese)
- 9 Nakata M, Hong D Y, Qiu J Z, Uchiyama H, Tanaka R, Chen S C. Cytogenetic studies on wild *Chrysanthemum sensulato* in China. A hybrid between *Dendranthema indicum* ($2n=36$) and *D. vestitum* ($2n=54$) from Hubei province. J. Jpn. Bot., 1992, 67: 92~100
- 10 Tanaka R, Watanabe K. Embryological studies in *Chrysanthemum makinoi* and its hybrid crossed with hexaploid Ch. Japanese. J. Sci. Hiroshima Univ., Series B, Div., 1972, 14 (2): 75~84
- 11 李辛雷, 陈发棣, 崔娜欣. 菊属种间杂种的鉴定. 南京农业大学学报, 2005, 28 (1): 24~28
Li X L, Chen F D, Cui N X. Identification of interspecific hybrids in *Dendranthema*. Journal of Nanjing Agricultural University, 2005, 28 (1): 24~28 (in Chinese)
- 12 陈发棣, 蒋甲福, 房伟民. 秋水仙素诱导菊花脑多倍体的研究. 上海农业学报, 2002, 18 (1): 46~50
Chen F D, Jiang J F, Fang W M. Study on induction of polyploid *Dendranthema nankingense* with colchicines. Acta Agriculturae Shanghai, 2002, 18 (1): 46~50 (in Chinese)
- 13 陈发棣, 陈佩度, 房伟民, 李鸿渐. 三个药用菊品种的细胞学研究. 南京农业大学学报, 1997, 20 (2): 28~31
Chen F D, Chen P D, Fang W M, Li H J. Cytological studies of three varieties of medicinal chrysanthemum. Journal of Nanjing Agricultural University, 1997, 20 (2): 28~31 (in Chinese)
- 14 Kishimoto S, Shibata M, Aida R. PCR-RFLP analysis of chloroplast DNA genes in *Dendranthema*: further investigation of polymorphisms in Chinese chrysanthemum and Shasta daisy cultivars. Japan Hort. Sci., 1999, 68: 365
- 15 赵惠恩. 菊属基因库的建立与菊花起源的研究及多功能地被菊育种. 博士论文 1 北京: 北京林业大学, 2000
Zhao H E. Establishment of *Dendranthema* germplasm bank, the origin of garden chrysanthemums and breeding of multi-functional ground cover chrysanthemum [Ph. D. Dissertation] Beijing: Beijing Forestry University, 2000. (in Chinese)
- 16 Wang W K, Dai S L, Li M X. Physical mapping of rDNA in *Dendranthema nankingense* and its closed species by fluorescence in situ hybridization. Cellular & Molecular Biology Letters, 2002, 7 (3): 911~917