

# 益母草基于 45S rDNA 染色体定位的核型分析及减数分裂观察

马玉涛, 惠荣奎\*, 崔颖, 张倩, 刘焰\*\*

(华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070)

**摘要:** 以番茄的 45S rDNA 为探针, 采用荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术与核型分析相结合的方法, 对益母草 (*Leonurus japonicus* Houtt) 的核型和 45S rDNA 在染色体上的定位进行了研究, 同时采用压片法观察了其花粉母细胞减数分裂中染色体的行为。结果表明, 益母草绝大多数花粉母细胞减数分裂中染色体的行为正常, 终变期形成 10 个二价体, 佐证了益母草的染色体数目为  $2n = 20$ , 且为二倍体, 其减数分裂为同时型, 花粉粒育性为 97.10%。益母草体细胞有丝分裂中期染色体上具有 2 对 45S rDNA 杂交信号, 分别位于第 2 号染色体短臂的末端和第 3 号染色体短臂近着丝粒处, 益母草的核型公式为  $2n = 2x = 20 = 2m + 16sm (2SAT) + 2st$ , 染色体相对长度组成为  $2n = 2L + 8M_2 + 10M_1$ , 最长染色体与最短染色体的比值为 1.58, 核型不对称系数为 69.39, 染色体相对长度变异范围为 8.05% ~ 12.73%, 其核型为“3A”型。基于上述结果绘制了益母草的核型模式图。

**关键词:** 益母草; 荧光原位杂交; 45S rDNA; 核型

**中图分类号:** S 567.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 01-0125-08

## Karyotype Analysis Based on Physical Mapping of the 45S rDNA and Meiotic Observations in *Leonurus japonicus* Houtt

MA Yu-tao, HUI Rong-kui\*, CUI Ying, ZHANG Qian, and LIU Yan\*\*

(College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Karyotype analysis was performed for *Leonurus japonicus* Houtt with the localization of 45S rDNA loci by using the rDNA from *Lycopersicon esculentum* as probe. The meiotic observations showed that the chromosomes were paired as 10 bivalents in its pollen mother cells at diakinesis, indicating that the plant has  $2n = 20$ . The meiotic divisions belong to the simultaneous type and the stainability of the pollen grains was 97.10%. The signals from 45S rDNA probe were detected at the terminal parts of the short arms of second pair of chromosomes and central parts of the third pair of chromosomes. The karyotype formula was  $2n = 2x = 20 = 2m + 16sm (2SAT) + 2st$ , with the constitution of relative length being  $2n = 2L + 8M_2 + 10M_1$ . The ratio of the longest / the shortest chromosomes (L/S) was 1.58, and the asymmetry index was 69.39. The chromosome relative length ranged from 8.05% to 12.73%, and karyotype type belonging to “3A”. The idiogram was established for the species.

**收稿日期:** 2010 - 10 - 08; **修回日期:** 2010 - 12 - 20

**基金项目:** 华中农业大学校基金项目

\* 共同第一作者; \*\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yanl@mail.hzau.edu.cn)

**Key words:** *Leonurus japonicus* Houtt; florescence in situ hybridization; 45S rDNA; karyotype

益母草 (*Leonurus japonicus* Houtt) 为唇形科益母草属一年生或二年生草本植物, 是常用中草药。目前, 益母草的研究主要集中在化学成分分析、药理机制及临床作用等方面。其味辛、微苦, 性微寒, 全草入药有去瘀生新、活血调经的功能, 其果实能清肝明目, 临床上常用于心脑血管疾病、血液病、产后瘀痛、痛经等疾病的治疗 (阮金兰 等, 2003; 陈书新和殷允诚, 2004; 郭鹏 等, 2008)。

荧光原位杂交 (FISH) 技术是一种简单而高效的在染色体上物理定位DNA序列的技术, 被广泛应用于探讨植物种属间的进化关系、染色体物理作图 (de Jong et al., 1999)、染色体结构变异及外源基因染色体整合分析等重要的遗传学问题 (Taketa et al., 1999; Thomas et al., 2004)。以45S rDNA为探针的植物染色体进行荧光原位杂交 (FISH) 可以测定植物基因组的45S rDNA位点数, 确定其在特定染色体上的位置, 为染色体的识别提供稳定有效的标记 (余朝文和宋运淳, 2008), 为研究植物基因组的进化关系提供重要信息。然而目前尚未见有关益母草45S rDNA在中期染色体定位和花粉母细胞减数分裂过程观察的报道。

作者拟研究益母草的花粉母细胞减数分裂、花粉粒育性以及基于45S rDNA在染色体上定位的核型分析, 旨在为益母草的种质资源分类、真伪品种的鉴别及遗传育种提供细胞遗传学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

益母草种子购于河北安国, 现种植在华中农业大学药用植物标本园。含有番茄45S rDNA序列的质粒由华中农业大学分子育种国家重点实验室油菜细胞遗传课题组保存及惠赠。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 体细胞、减数分裂观察和花粉粒育性鉴定

参照李润芳等 (2008) 和杜玉娟等 (2009) 的制片观察方法。

#### 1.2.2 原位杂交方法

益母草根尖用0.6%的纤维素酶 (YAKULT HONSHA Co., LTD, Japan) 和0.2%的果胶酶 (MERCK, Germany) 以及0.5%的蜗牛酶 (Beijing Baitai Biochem Co., China) 混合酶液, 在37℃水浴锅中酶解根尖70 min, 柠檬酸缓冲液漂洗20 min, 采用火焰干燥法制备染色体标本, 镜检后置-20℃保存备用。

含有45S rDNA的序列来源于番茄, 其片段长度为9.1 kb。采用碱裂解法提取含有45S rDNA序列的质粒DNA, 采用切口平移法以生物素-11-dUTP (bio-11-dUTP, MBI, Shenzhen, China) 标记探针。染色体原位杂交的程序主要参照Leitch等 (1994) 的方法略作修改。

所有结果在显微镜 (NIKON ECLIPSE 80i) 下观察摄影, 采用Adobe Photoshop 8.0软件进行图片处理。

#### 1.2.3 核型分析方法

取大量分散良好的中期分裂细胞进行染色体计数。从普通细胞学制片和原位杂交制片中选择染色体形态良好、数目完整或杂交信号清晰的细胞进行显微摄影, 核型分析时两种制片各取5个细胞的

平均值。

染色体相对长度、臂比及类型采用Levan等（1964）的命名系统，染色体相对长度系数按Kuo等（1972）方法划分，核型分类采用Stebbins（1971）的标准。

染色体玻片凭证标本保存于华中农业大学植物科学技术学院遗传学实验室。

## 2 结果与分析

### 2.1 花粉母细胞减数分裂过程观察

在前期 I 的终变期，同源染色体配对后形成了10个二价体，二价体高度浓缩、形态清晰、分散度好，为染色体计数的最佳时期（图 1，A），佐证了益母草的染色体数为 $2n = 2x = 20$ 。

中期 I，可以清晰的观察到10个二价体排列于赤道板上（图 1，B），此期观察到少数细胞（约 3.72%）中出现了落后染色体（图 1，C）。

后期 I，在纺锤丝的牵引下配对的同源染色体彼此分离向两极移动，此期在细胞两极可清晰的观察到各有10条染色体（图 1，D）。

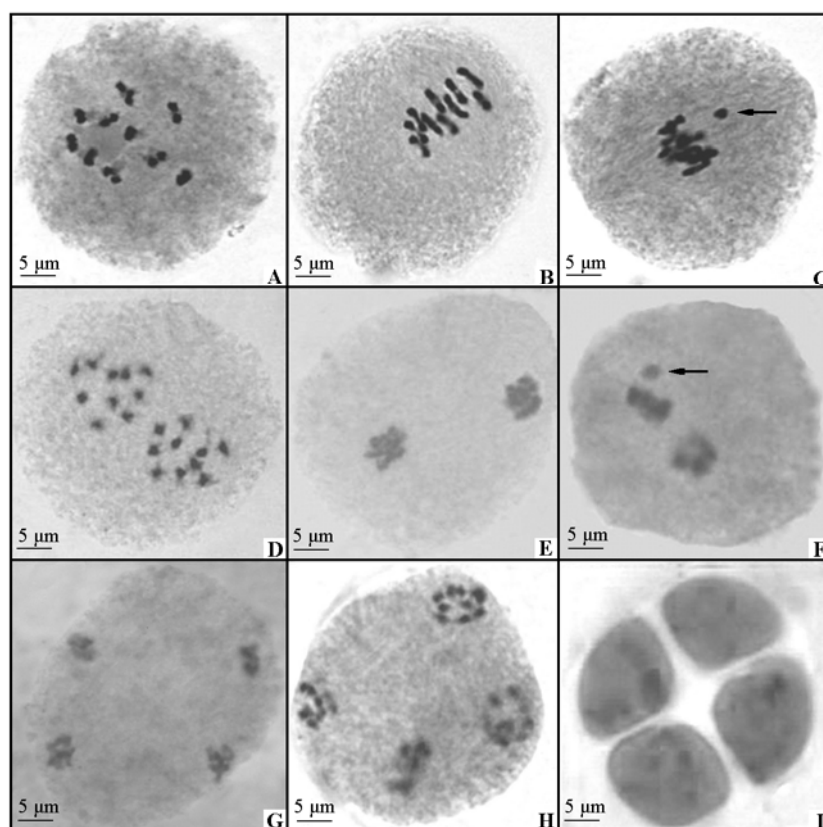


图 1 益母草花粉母细胞减数分裂

A. 终变期，示10个二价体；B. 中期 I，示10个二价体；C. 中期 I，箭头示单价体落后；D. 后期 I；E. 末期 I；F. 中期 II，箭头示落后染色体；G. 后期 II；H. 末期 II；I. 四分体。

Fig. 1 The pollen mother cell meiosis in *Leonurus japonicus*

A. Diakinesis, showing 10 bivalents; B. Metaphase I, showing 10 bivalents; C. Metaphase I, showing one lagged bivalent; D. Anaphase I; E. Telophase I; F. Metaphase II, showing lagged chromosomes; G. Anaphase II; H. Telophase II, showing lagged chromosomes; I. Tetrads.

在末期 I，染色体开始解螺旋，在细胞两极分别形成新的子核，但细胞质不分裂(图 1，E)。

中期 II，两个子细胞中的染色体都排列到细胞的赤道面上，分别形成两个相互垂直的赤道板，此期也观察到少数细胞(约1.13%)中出现落后染色体(图 1，F)。

后期 II，每条染色体上的两个姐妹染色单体分开，分别走向细胞一极，在细胞内可看到4组染色体(图 1，G)，姊妹染色单体发生分离，随机分配向两级移动。

末期 II，在细胞内形成了4个子核，染色体开始解螺旋(图 1，H)。

最后，细胞质分裂，同时形成4个子细胞，即四分体(图 1，I)。整个减数分裂过程表明，益母草花粉母细胞的减数分裂方式属于同时型。

## 2.2 花粉粒育性观察结果

随机取样，共观察统计了794个益母草成熟的花粉粒醋酸洋红染色反应结果，其中不被染色或浅染色的败育花粉粒有23个，可育花粉粒为97.10%，败育花粉粒仅占2.90%，与减数分裂的异常频率相近。

## 2.3 核型分析

从大量普通细胞学压片统计了83个染色体分散良好的细胞，其中有78个细胞的染色体数为20条，约占94%，因此，可以确定益母草的体细胞染色体数为 $2n = 20$ (图2，图3，a)。

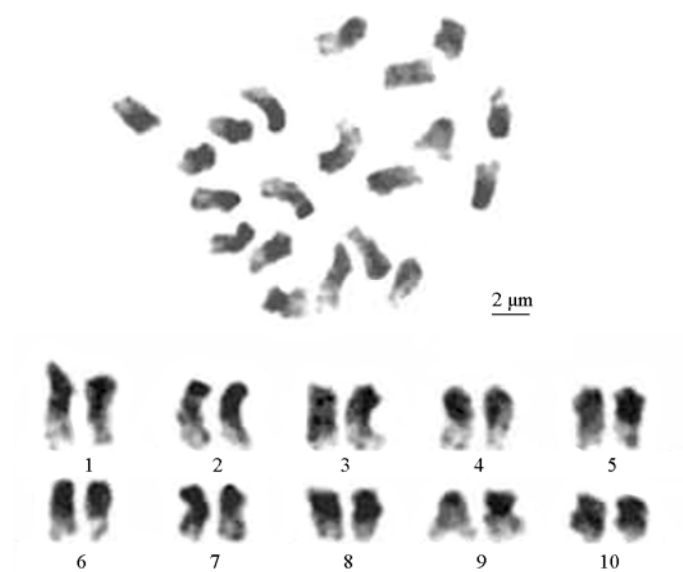


图 2 益母草中期染色体照片和核型图

Fig. 2 Photo of somatic cell in metaphase and karyotype of *Leonurus japonicus*

根据试验观察结果(表1)，确定益母草的核型公式为 $2n = 2x = 20 = 2m + 16sm(2SAT) + 2st$ ，其染色体相对长度组成为： $2n = 2L + 8M_2 + 10M_1$ 。

最长染色体与最短染色体的比值为1.58，核型类型为“3A”型，核型不对称系数为69.39，染色体相对长度变异范围为8.05% ~ 12.73%

表 1 益母草染色体相对长度、臂比和类型

Table 1 Relative length, arm ratio and type of the chromosome in *Leonurus japonicas* Houtt

| 染色体编号<br>Number | 相对长度 Relative length<br>(短臂 + 长臂 = 全长)<br>(S + L = T) | 相对长度系数<br>Index of relative<br>length | 着丝粒指数/%<br>Centromere index | 臂比 (长臂/短臂)<br>Arm ratio (Long/Short) | 类型<br>Type |
|-----------------|---|---------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|------------|
| 1               | 4.75 + 7.98 = 12.73                                   | 1.27                                  | 37.303                      | 1.68                                 | m          |
| 2               | 2.90 + 8.18 = 11.08                                   | 1.11                                  | 26.189                      | 2.82                                 | sm*        |
| 3               | 3.69 + 7.12 = 10.82                                   | 1.08                                  | 34.147                      | 1.93                                 | sm         |
| 4               | 3.36 + 7.06 = 10.42                                   | 1.04                                  | 32.278                      | 2.10                                 | sm         |
| 5               | 3.36 + 6.86 = 10.22                                   | 1.02                                  | 32.903                      | 2.04                                 | sm         |
| 6               | 1.72 + 8.25 = 9.96                                    | 1.00                                  | 17.219                      | 4.81                                 | st         |
| 7               | 2.90 + 6.46 = 9.37                                    | 0.94                                  | 30.984                      | 2.23                                 | sm         |
| 8               | 2.31 + 6.46 = 8.77                                    | 0.88                                  | 26.319                      | 2.80                                 | sm         |
| 9               | 2.77 + 5.81 = 8.58                                    | 0.86                                  | 32.303                      | 2.10                                 | sm         |
| 10              | 2.84 + 5.21 = 8.05                                    | 0.81                                  | 35.243                      | 1.84                                 | sm         |

注：\* 代表随体染色体，随体长度未计算在内。  
Note: \* Referred to chromosome with satellite, the length of satellite was not included.

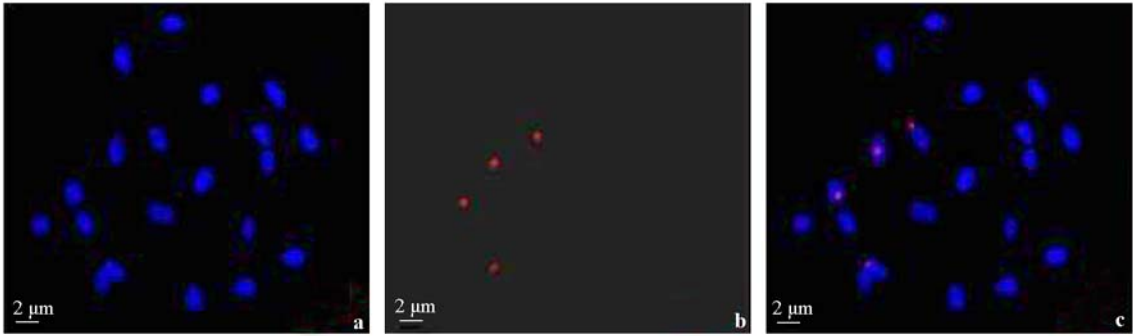


图 3 45S rDNA (红色) 在益母草体细胞有丝分裂中期染色体上定位

a. 有丝分裂中期染色体; b. 中期45S rDNA杂交信号; c. 中期45S rDNA (红色) 与 DAPI (蓝色) 复染的染色体的合成图。

Fig. 3 FISH localization of 45S rDNA on metaphase chromosomes in *Leonurus japonica*

a. Metaphase chromosomes of *Leonurus japonicu*; b. 45S rDNA FISH signals of the metaphase chromosomes; c. Amerged image of the metaphase chromosomes and FISH signals.

2.4 45S rDNA 在染色体上的定位

用生物素标记的45S rDNA探针与益母草染色体制片杂交，分别对50个有丝分裂中期分裂相进行检测，结果显示：90%以上的中期染色体中具有2对45S rDNA杂交信号（图3，b、c），一对杂交信号位于第2号染色体短臂的末端的随体上；另一对位于第3号染色体短臂近着丝粒处（图4），且杂交信号比位于第2号染色体上的信号强。

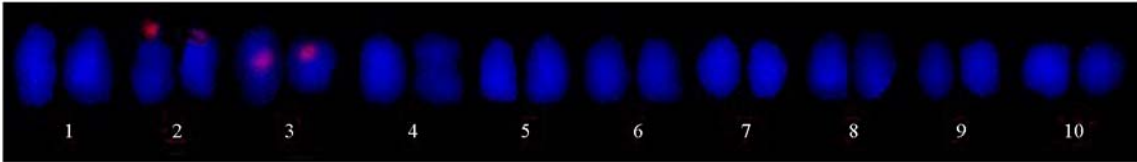


图 4 益母草的FISH核型图

Fig. 4 Karyotype of *Leonurus japonicu*

## 2.5 益母草带有 45S rDNA 位点的核型模式图

根据益母草核型分析数据并结合45S rDNA位点在其中期染色体上的相对位置, 绘制出益母草核型模式图(图5)。

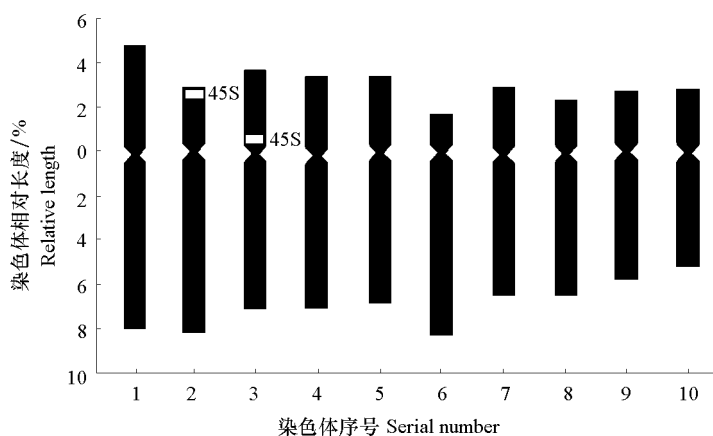


图 5 益母草核型模式图

Fig. 5 The ideogram of *Leonurus japonicus* Houtt

## 3 讨论

### 3.1 减数分裂和花粉粒育性

有关植物花粉母细胞减数分裂异常对花粉育性影响的报道很多(李雪 等, 2003; 刘晓瑞 等, 2008; 张守攻 等, 2009)。例如, 兰州百合小孢子母细胞减数分裂异常是导致其花粉败育的主要原因; 百合科山韭小孢子母细胞减数分裂中出现如落后染色体和后期桥等许多异常行为, 可能是导致其花粉败育的原因之一。本研究中发现, 益母草的绝大多数花粉母细胞减数分裂过程中染色体的行为正常, 能够形成染色体数平衡的可育的配子, 仅有少数花粉母细胞出现落后染色体等异常现象, 说明有个别同源染色体配对、分离行为异常, 这可能是导致约2.9%的花粉粒不育的重要原因之一。

### 3.2 45S rDNA 的定位及核型分析

在本研究的FISH核型图中, 由于第3对染色体的其中一条同源染色体的短臂向内弯曲, 在核型分析时仅凭其相对长度、臂比等很难进行同源染色体配对, 但通过45S rDNA在染色体上的定位, 可清晰的观察到在其短臂上有45S rDNA杂交信号, 因此, 很容易找到同源染色体; 另外, 第2对染色体中的一条同源染色体上的杂交信号相对较弱, 这可能是由于该染色体的短臂向内弯曲, 使得随体与染色体的其它部分不在同一平面上的缘故。

真核细胞的45S rDNA属于中度重复序列的DNA。植物中45S rDNA的重复单位长度为718 ~ 1 815 kb, 大多数分布在随体染色体上(Lima, 1976)。在植物中45S rDNA位点数目等于、大于或小于随体数目的情况均可能存在, 且在染色体上的位置也并不一定在短臂的近端部, 也可能存在于长臂的端部或染色体的中部(刘博 等, 2006)。本研究中发现益母草有2对45S rDNA杂交信号, 一对位于2号染色体的短臂随体上, 另一对位于3号染色体短臂近着丝粒处, 说明益母草45S rDNA位点数目多于随体数目, 且2对45S rDNA位点在染色体上的分布的位置不同, 由此可见, 采用FISH定位方法来确定随体的有无及位置比普通核型分析方法更加灵敏、精确和可靠。本研究还发现杂交信号在不同

染色体上强度明显不同, 位于3号染色体上的杂交信号比位于2号染色体的信号强。由于杂交信号的大小和强度可间接反映基因拷贝数的多少, 因此推断, 益母草45S rDNA在3号染色体上的拷贝数多于2号染色体上的拷贝数, 这种现象在其他作物中也有报道(龚志云等, 2002)。

本研究表明, 益母草的染色体核型为“3A”型, 这一结果与陈瑞阳(2009)报道的益母草核型类型相同, 但与徐炳声等(1987)、张义贤(1989)、金忠民和沙伟(2004)报道的益母草核型为“2A”型存在差异, 同时与上述报道的有关益母草的核型公式、随体的有无、随体的位置以及核型不对称系数等方面均存在一定差异, 这可能预示着不同地区不同种质的益母草, 其染色体数虽然相同, 但染色体核型存在差异, 说明不同种质的益母草在染色体水平上存在遗传多样性。另外, 由于本研究中45S rDNA杂交信号为益母草染色体提供了新的识别标记, 使得核型分析的结果更加准确、可靠。

本研究中首次对益母草的45S rDNA在染色体上的定位进行了研究, 确定了带有45S rDNA标记的FISH核型图, 奠定和丰富了益母草的分子细胞遗传学资料, 为益母草的品种选育、真伪鉴别及种质资源分类提供了分子细胞学依据。

## References

- Chen Rui-yang. 2009. Chromosome atlas of major economic plants genome in China V: Chromosome atlas of medicinal plants in China. Beijing: Science Press: 327. (in Chinese)
- 陈瑞阳. 2009. 中国主要经济植物基因组染色体图谱. 第5册: 中国药用植物染色体图谱. 北京: 科学出版社: 327.
- Chen Shu-xin, Yin Yun-cheng. 2004. The clinical investigation of *Leonurus japonicus* Houtt for the treatment of angina pectoris. Traditional Chinese Medicine of Jilin, 24 (5): 10. (in Chinese)
- 陈书新, 殷允诚. 2004. 益母草合剂治疗冠心病心绞痛临床研究. 吉林中药, 24 (5): 10.
- de Jong J H, Fransz P, Zable P. 1999. High resolution FISH in plants techniques and applications. Trends Plant Sci, 4 (7): 258 - 263.
- Du Yu-juan, Cheng Zhi-hao, Wang Mo, Cai Ming-li, Hao Da-cui, Liu Yan. 2009. Karyotype analysis and meiotic observations of pollen mother cells on *Scutellaria barbata* D. Don. Journal of Huazhong Agricultural University, 28 (1): 93 - 96. (in Chinese)
- 杜玉娟, 程志号, 王沫, 蔡明历, 郝大翠, 刘焰. 2009. 半枝莲花粉母细胞减数分裂观察及核型分析. 华中农业大学学报, 28 (1): 93 - 96.
- Gong Zhi-yun, Wu Jin-gan, Zhu Kuan, Gu Ming-hong. 2002. Physical mapping of the 45S rDNA and 5S rDNA to rice prometaphase chromosome. Acta Genetica Sinica, 29 (3): 241 - 244. (in Chinese)
- 龚志云, 吴金淦, 祝宽, 顾铭洪. 2002. 水稻45S rDNA和5S rDNA的染色体定位研究. 遗传学报, 29 (3): 241 - 244.
- Guo Peng, Gao Ying, Zhang Jing-ze. 2008. Progress in pharmacological research on *Leonurus japonicus* Houtt. Acta Academiae Medicinae Cpf, 17 (1): 83 - 84. (in Chinese)
- 郭鹏, 高颖, 张静泽. 2008. 益母草的药理学研究进展. 武警医学院学报, 17 (1): 83 - 84.
- Jin Zhong-min, Sha Wei. 2004. The karyotype study on *Isodon japonica* var. *glaucocalyx* and *Leonurus japonicas*. Guangxi Sciences, 11 (1): 78 - 80. (in Chinese)
- 金忠民, 沙伟. 2004. 蓝萼香茶菜和益母草的染色体核型研究. 广西科学, 11 (1): 78 - 80.
- Kuo S R, Wang T T, Huang T C. 1972. Karyotype analysis of some formosam gymnosperms. Tal Wante, 17 (1): 66 - 80.
- Levan A, Fredga K, Samdberg A A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52: 201 - 220.
- Leitch A R, Schwarzbacher T, Jackson D, Leitch I J. 1994. *In situ* hybridization: A practical guide. England: Bios Scientific Publishers Ltd.
- Li Run-fang, Lü Song, Deng Rui-ning, Cheng Zhi-hao, Li Zai-yun, Liu Yan. 2008. Karyotype analysis and meiotic observations of pollen mother cells in *Capsella bursa-pastoris* L. Medick. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 30 (4): 506 - 510. (in Chinese)
- 李润芳, 吕松, 邓瑞宁, 程志号, 李再云, 刘焰. 2008. 荠菜的花粉母细胞减数分裂及核型分析. 中国油料作物学报, 30 (4): 506 - 510.
- Li Xue, Chen Li-mei, Du Jie, Liang Wan-fu, Xing Heng-tai. 2003. Observations on abnormal meiosis of pollen mother cells in *Lilium davidii* var.

- nicolor*. *Acta Bot Borea Occident Sin*, 23 (10): 1796 – 1799. (in Chinese)
- 李 雪, 陈丽梅, 杜 捷, 梁万福, 幸亨泰. 2003. 兰州百合小孢子母细胞减数分裂异常现象的观察. *西北植物学报*, 23 (10): 1796 – 1799.
- Lima-De Faria A. 1976. The chromosome field i. prediction of the location of ribosomal cist rons. *Hereditas*, 83 (1): 1222.
- Liu Bo, Chen Cheng-bin, Li Xiu-lan, Chen Rui-yang, Song Wen-qin. 2006. Physical mapping of 45S rDNA on metaphase chromosomes in several plant species. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis: Science Edition*, 39 (4): 96 – 102. (in Chinese)
- 刘 博, 陈成彬, 李秀兰, 陈瑞阳, 宋文芹. 2006. 45S rDNA在多种植物中期染色体上的定位. *南开大学学报: 自然科学版*, 39 (4): 96 – 102.
- Liu Xiao-rui, Chen Zu-keng, Su Li-juan, Zhao Yun-yun, Liu Jia-xi. 2008. Microsporogenesis and development of male gametophyte in *Allium senescens* L. (Liliaceae). *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, (2): 153 – 159. (in Chinese)
- 刘晓瑞, 陈祖铿, 苏立娟, 赵云云, 刘家熙. 2008. 百合科山韭小孢子发生及雄配子体发育. *热带亚热带植物学报*, (2): 153 – 159.
- Ruan Jin-lan, Du Jun-rong, Zeng Qing-zhong, Qian Zhong-ming. 2003. Advance in studies on chemical components, pharmacological effect and clinical application of *Leonurus japonicus*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 34 (11): 15 – 19. (in Chinese)
- 阮金兰, 杜俊蓉, 曾庆忠, 钱忠明. 2003. 益母草的化学、药理和临床研究进展. *中草药*, 34 (11): 15 – 19.
- She Chao-wen, Song Yun-chun. 2008. Analysis of the chromosomal location of 45S rDNA in plants by CPD staining together with FISH. *Guangxi Plants*, 28 (4): 515 – 520. (in Chinese)
- 余朝文, 宋运淳. 2008. 植物45S rDNA的染色体位置的CPD染色和FISH分析. *广西植物*, 28 (4): 515 – 520.
- Stebbins G L. 1971. Chromosomal evolution in high plants. London: Edward Arnold Ltd: 87 – 90.
- Taketa S, Harrison G E, Heslop-Harrison J S. 1999. Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theor Appl Genet*, 98 (1): 1 – 9.
- Thomas H M, Harper J A, Morgan W G. 2004. Gross chromosome rearrangements are occurring in an accession of the grass *Lolium rigidum*. *Chromosome Res*, 9 (7): 585 – 590.
- Xu Bing-sheng, Ge Chuan-ji, Li Yan-kun, Ni Chen-kai. 1987. A study the karyotype of *Leonurus japonicus* Houtt. *Guihaia*, 7 (2): 97 – 99. (in Chinese)
- 徐炳声, 葛传吉, 李岩坤, 倪陈凯. 1987. 益母草的核型研究. *广西植物*, 7 (2): 97 – 99.
- Zhang Shou-gong, Han Su-ying, Yang Wen-hua, Li Mao-xue, Sun Xiao-mei, Qi Li-wang. 2009. Studies on the meiosis of pollen mother cell and pollen development of *Picea koraiensis* Nakai. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (7): 1023 – 1030. (in Chinese)
- 张守攻, 韩素英, 杨文华, 李懋学, 孙晓梅, 齐力旺. 2009. 红皮云杉花粉母细胞减数分裂和花粉发育的研究. *园艺学报*, 36 (7): 1023 – 1030.
- Zhang Yi-xian. 1989. Karyotype study of *leonurus japonicus* Houtt. *Journal of Shanxi University*, 12 (4): 460 – 464. (in Chinese)
- 张义贤. 1989. 益母草的染色体组型研究. *山西大学学报*, 12 (4): 460 – 464.