

# 棉属 D 基因组棉种着丝粒 FISH 标记的筛选初报

吴琼<sup>①②\*</sup>, 程华<sup>①③\*</sup>, 刘方<sup>①</sup>, 王省芬<sup>④</sup>, 王春英<sup>①</sup>, 宋国立<sup>①</sup>, 黎绍惠<sup>①</sup>, 张香娣<sup>①</sup>, 王玉红<sup>①</sup>, 马峙英<sup>④†</sup>, 王坤波<sup>①†</sup>

① 中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点实验室, 安阳 455000;

② 辽宁省农业科学院经济作物研究所, 辽阳 111000;

③ 安阳工学院生物与食品工程学院, 安阳 455000;

④ 河北农业大学河北省作物种质资源重点实验室, 保定 071001

\* 同等贡献

† 联系人, E-mail: wkbcri@cricaas.com.cn; mzhy@hebau.edu.cn

2010-03-23 收稿, 2010-05-21 接受

国家自然科学基金(30170501)和国家高技术研究发展计划(2003AA207051)资助项目

**摘要** 为了筛选着丝粒探针, 在棉花染色体荧光原位杂交中标记染色体着丝粒区域, 以便于构建棉花粗线期染色体细胞遗传学图谱. 在棉花遗传连锁图上选择尽可能接近着丝粒区的单拷贝的分子标记, 以海岛棉 pima 90-53 的 BAC 文库为素材, 采用两维筛库法从该文库中筛选 BAC 克隆, 然后用 BAC-FISH 技术进行染色体定位检测. 用 10 号染色体长臂末端的 SSR 引物 BNL3563 筛选到一个 BAC 克隆 150D24, 该克隆在四倍体陆地棉和海岛棉部分染色体着丝粒区有杂交信号, 但信号强度不高. 以二倍体 D 基因组为靶 DNA 进行 FISH 时, 染色体着丝粒区有明显信号, 但是以二倍体 A, C, E 等基因组棉种染色体为靶 DNA 进行 FISH 时, 染色体着丝粒区未发现杂交信号. BAC 克隆 150D24 可能含有 D 组特有卫星重复序列, 可用作棉属 D 基因组棉种(包括四倍体棉种 D 亚组)的着丝粒 FISH 探针.

## 关键词

棉花  
FISH  
着丝粒  
BAC

经典细胞遗传学识别染色体的方法主要是通过分析染色体的相对长度、臂比、随体以及与特定遗传材料杂交后代染色体的特征等来实现的, 这些方法广泛应用于各物种的核型研究中, 为棉花的细胞遗传学研究奠定了基础<sup>[1-7]</sup>. 这些方法首先需要掌握良好的制片技术, 其次由于制片过程中染色体凝聚程度不同造成形态差异, 使得分析结果很难达到一致, 研究者必须通过多次重复的数据来确保结果的准确性, 但仍然避免不了制片过程中产生的染色体变形对实验结果造成的影响, 实验重复性较差. 四倍体棉花染色体数量多、形态小, 而且染色体多是中部或亚中部着丝粒类型, 再加上在染色体制片过程中, 棉花细胞质浓厚, 细胞壁较坚硬, 处理细胞比较困难等, 这些都为核型分析带来很大的困难, 使得棉花核型

分析工作停滞不前, 其细胞遗传研究工作已远远落后于其他重要经济作物<sup>[8-17]</sup>. 减数分裂粗线期染色体比有丝分裂中期染色体长, 有更好的空间分辨率, 在粗线期染色体上进行荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH), 其分辨率能够达到低于 100 kb 的水平<sup>[18]</sup>. 对于染色体较小、形态相近的植物而言, 利用粗线期染色体结合着丝粒、染色体臂位与端粒标记, 不仅可以大大提高 FISH 的分辨率, 弥补中期染色体不能识别单条染色体的缺陷, 而且可较为精确地测量染色体的长度, 在基于 FISH 的核型分析中能够更准确地鉴别染色体及其大小, 这种方法已被应用于许多植物细胞学图的构建<sup>[19-21]</sup>. 利用粗线期染色体-FISH (pachytene-FISH)技术已成为构建分子细胞遗传学图的首选方法.

**英文引用格式:** Wu Q, Cheng H, Liu F, et al. Screen of FISH marker of chromosomes at *Gossypium* D genome species (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55: 2099—2105, doi: 10.1360/972010-157

着丝粒是指中期染色体上染色较浅且发生缢缩的部位,着丝粒的功能高度保守,但DNA组成成分差异较大.研究表明,着丝粒包含不同类型的重复序列组成的复杂的DNA结构,如高度重复的卫星序列(satellite DNA)、还原转座子(centromeric retrotransposon, CR)等,水稻、小麦、玉米中着丝粒DNA序列研究得较深入<sup>[22-24]</sup>.棉花粗线期染色体着丝粒区缢缩不明显,且没有合适的形态标志,水稻和拟南芥等植物中可以通过DAPI染色深浅来确定粗线期染色体着丝粒的位置,但是用这种方法很难确定棉花粗线期染色体着丝粒位置,所以筛选棉花着丝粒探针对构建棉花粗线期细胞学图有重要意义.因此本实验试图在海岛棉 pima90-53 BAC 文库中筛选出位于着丝粒区的BAC克隆作为着丝粒FISH探针,用于构建棉花的分子细胞遗传学图谱.

## 1 材料与方法

(i) 实验材料. 本实验中采用的材料包括陆地棉 *G. hirsutum* [(AD)<sub>1</sub>]、海岛棉 *G. barbadense* [(AD)<sub>2</sub>]、阿非利加棉 *G. herbaceum* var. *africanum* (A<sub>1-a</sub>)、亚洲棉 *G. arboretum* (A<sub>2</sub>)、瑟伯氏棉 *G. thurberi* (D<sub>1</sub>)、辣根棉 *G. armourianum* (D<sub>2-1</sub>)、戴维逊氏棉 *G. davidsonii* (D<sub>3-d</sub>)、克劳茨基棉 *G. klotzschianum* (D<sub>3-k</sub>)、旱地棉 *G. aridum* (D<sub>4</sub>)、雷蒙地棉 *G. raimondii* (D<sub>5</sub>)、拟似棉 *G. gossypoides* (D<sub>6</sub>)、三裂棉 *G. trilobum* (D<sub>8</sub>)、斯特提棉 *G. sturtianum* (C<sub>1</sub>)和索马里棉 *G. somalense* (E<sub>2</sub>),以上所有材料都种植于中国农业科学院棉花研究所海南野生棉种质圃,并在河南安阳温室中有备份.

实验中所用SSR标记来自遗传连锁图谱TM-1 × 3-79(<http://cottondb.org>),选择在遗传连锁图上可能接近着丝粒区的分子标记,或位于染色体长臂或短臂末端的分子标记用于筛选染色体特异BAC探针(表1).实验所用的海岛棉Pima 90-53 BAC文库由河北农业大学作物种质资源重点实验室马峙英教授惠赠.

(ii) 二维法筛选文库. 将每块384孔板的BAC克隆混合成一个混合池(Plate-pool)(一级池),提取BAC DNA. 分别以混合的BAC DNA为模板,以筛选的SSR引物进行PCR扩增;获得的阳性384孔板再分别进行二维筛选<sup>[28]</sup>,即以384孔板的行混和列混(二级池)为模板,经过菌液PCR扩增相应的SSR引物.菌液PCR反应体系:模板2.5 μL, *Taq* DNA聚合酶0.5 U,引物0.5 μmol/L, dNTP 200 μmol/L, 10 ×

表1 本实验筛选的染色体特异的SSR标记

编号	SSR 标记	染色体号或臂	引物扩增片段大小/bp
1	BNL3971	2Lo	122 <sup>[25]</sup>
2	BNL2572	4	236 <sup>[26]</sup>
3	BNL3995	5sh	190 <sup>[25]</sup>
4	BNL1597	7	207 <sup>[25]</sup>
5	BNL3563	10Lo	248 <sup>[25]</sup>
6	BNL4094	11sh	173 <sup>[27]</sup>
7	BNL1495	13L	189 <sup>[27]</sup>
8	BNL3888	14	182 <sup>[25]</sup>
9	BNL3065	16	190 <sup>[25]</sup>
10	BNL3479	18Lo	256 <sup>[25]</sup>
11	BNL0390	19	250 <sup>[27]</sup>
12	BNL2553	20	200 <sup>[25]</sup>
13	BNL3649	21	195 <sup>[25]</sup>
14	BNL3408	3sh/17Lo	136/174 <sup>[25]</sup>
15	BNL1440	25sh/6sh	245/270 <sup>[25]</sup>
16	BNL686	9sh,23	189/144 <sup>[25]</sup>
17	BNL1414	9Lo,23	128/165 <sup>[25]</sup>
18	BNL3599	12sh,26	212/179 <sup>[25]</sup>
19	BNL3627	8/24	184/176 <sup>[25]</sup>
20	BNL252	8/24	179/169 <sup>[25]</sup>
21	BNL1350	1/15	197/207 <sup>[25]</sup>
22	BNL1045	22/26	215 <sup>[26]</sup>

缓冲液2 μL,总反应体积20 μL.反应程序为:95℃预变性10 min;93℃,15 s,55℃,30 s,72℃,60 s,40个循环;72℃延伸6 min.扩增产物经8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染检测.

(iii) 染色体制备. 预处理及染色体制片按王春英等人<sup>[29]</sup>的方法稍加改进.种子温水中浸种过夜,播种于经煮沸消毒的潮湿的细沙中,置25~30℃萌发.待根长至3~5 cm时取根尖,25 mg/L放线菌酮20℃预处理2 h,蒸馏水洗10 min,卡诺(乙醇:冰乙酸 = 3:1)固定2~24 h.2%纤维素酶(Cellulase R-10, Sigma)和0.5%果胶酶(Pectinase, Sigma)混合液37℃处理30 min,60%乙酸压片,液氮揭盖片,4℃保存.

(iv) 探针的标记. 探针标记试剂盒为德国Roche公司的Bio-Nick Translation标记系统,按照其标准流程操作.

(v) 原位杂交流程. 制片在60℃烘烤过夜,100 μg/mL RNase A (2 × SSC 配制)37℃温育1 h,2 × SSC,3 × 5 min 洗涤,0.1% Pepsin (10 mmol/L HCl 配制)37℃温育30 min,4%的多聚甲醛37℃固定10 min,2 × SSC 洗3 × 5 min,70%去离子甲酰胺溶液80℃预变性2 min,玻片迅速浸入-20℃的70%,90%,100%酒精各3 min,风干备用.取20 μL杂交液滴于制片上,加盖片80℃共变性10 min,37℃杂交过夜.

(vi) 洗脱和信号检测.  $2 \times$  SSC 漂去盖片,  $2 \times$  SSC (含 0.1% SDS) 37°C 洗脱  $3 \times 5$  min,  $0.2 \times$  SSC (含 0.1% SDS) 37°C 洗脱  $3 \times 5$  min,  $2 \times$  SSC 室温下洗 2 次, 甩干制片, 加 5% BSA 于 37°C 封阻 30 min, 甩干封阻液(制片不能见干), 加 Avidin-FITC 抗体 37°C 温育 1 h,  $1 \times$  PBS (Teween 20) 37°C 洗脱  $3 \times 5$  min, DAPI 衬染 10 min,  $1 \times$  PBS 洗脱  $3 \times 3$  min, 晾干, 抗荧光衰减剂 (Vectashied) 封片.

(vii) 荧光观察. 在荧光显微镜 (Ziess Axioskop 2 plus) 下观察杂交信号, Isis 系统拍摄并调节对比度和亮度. 用于每个特定探针的信号统计的细胞数目为 10 个以上. 染色体形态描述、核型分析参照李懋学和陈瑞阳<sup>[30]</sup>的标准.

## 2 结果与分析

### 2.1 BAC 克隆筛选

本研究共用了 22 对引物对 7680 个 BAC 克隆进行筛选, 从中共筛选到 12 个阳性克隆(表 2), 以阳性克隆作探针, 以海岛棉 pima90-53 有丝分裂中期染色体为靶 DNA 进行原位杂交, 大多数 BAC 克隆的杂交信号是弥散在染色体或是不在着丝粒区域. 在实验中发现以 SSR 标记 BNL3563 筛选到 BAC 克隆 150D24 的 DNA 为探针, 以四倍体海岛棉 pima90-53 有丝分裂中期染色体为靶 DNA 进行原位杂交, 发现在许多较小的染色体着丝粒区位置有强弱不等的信

号(图 1(a)), 按其染色体大小来看这些大多都是 D 亚组染色体; 在以四倍体陆地棉为靶 DNA 的原位杂交中, 也发现了类似的现象(图 1(b)).

### 2.2 以 150D24 为探针的 FISH

以 BAC 克隆 150D24 为探针, 以 A 组二倍体棉种亚洲棉(A<sub>2</sub>)、阿非利加棉(A<sub>1-a</sub>)为靶 DNA 进行原位杂交实验, 与实验最初预期结果差距较大, 在 A 组棉种染色体着丝点处没有发现任何信号, 在染色体其他位置也没有信号, 我们将这一实验重复了多次, 但是一直都没有发现任何信号.

鉴于以 A 组棉种为靶 DNA 的实验中并没有信号, 经反复考虑, 增加了以 D 组棉种为靶 DNA 的实验. 以 BAC 克隆 150D24 为探针, 以二倍体 D 组棉种戴维逊氏棉(D<sub>3-d</sub>)有丝分裂前中期染色体作靶 DNA 进行原位杂交, 发现在戴维逊氏棉染色体着丝粒区有非常明显的信号(图 1(c)), 局部放大图中(图 1(d))染色体中部较暗的区域为着丝粒区, 可以很清楚地看到信号(白色箭头)位于染色体的着丝粒区. 在以二倍体 D 组棉种瑟伯氏棉(D<sub>1</sub>)、辣根棉(D<sub>2-1</sub>)、克劳茨基棉(D<sub>3-k</sub>)、旱地棉(D<sub>4</sub>)、雷蒙德氏棉(D<sub>5</sub>)、拟似棉(D<sub>6</sub>)、三裂棉(D<sub>7</sub>)有丝分裂中期染色体为靶 DNA 原位杂交, 在没有重复序列的封阻条件下, 在 D 组棉种几乎每条染色体上, 着丝粒处都发现了非常清晰的信号(图 1(e)~(k)), 而且在染色体其他位置几乎没有信号, 背

表 2 筛选获得的阳性克隆

编号	单克隆	SSR 标记	引物扩增片段大小/bp	染色体号或臂	SSR 标记在染色体上的位置	原位杂交信号
1	150D24	BNL3563	248	10Lo	150/260	着丝点区
2	150H22	BNL0390	231	19	234.2/322.3	弥散分布
3	149E1	BNL1440	245	6sh/25sh	121.7/167.8, 135.3/293.7	弥散分布
4	148C1	BNL2553	200	20	145.9/146	弥散分布 (含端粒区域信号)
5	160K12	BNL3592	195,188	11	29.5/161.9,	弥散分布
6	160C3	BNL3479	256	13/18Lo	61.8/211.9, 90.7/171.9	弥散分布
7	160I2	BNL0390	230	19	234.2/322.3	弥散分布
8	160H11	BNL0390	245	19	234.2/322.3	弥散分布
9	159N2	BNL3408	136	3/17	0/130.6, 55.3/84	弥散分布
10	158N13	BNL1597	207	7	169/230	弥散分布
11	157A16	BNL3649	193	11/21	77/271, 32.1/331.2	弥散分布
12	149P17	BNL3995	190	5sh	染色体端部	特异信号

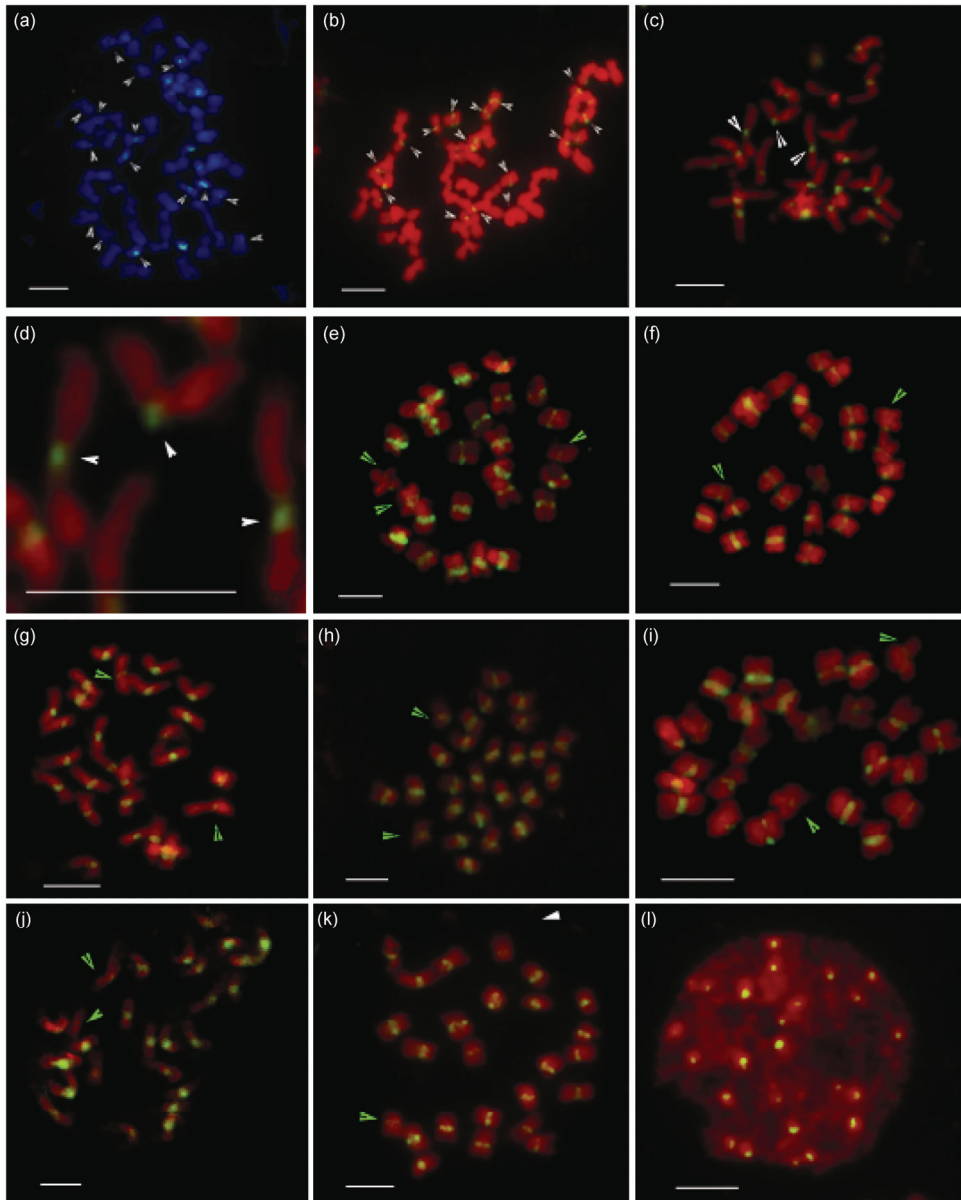


图1 以150D24为探针的原位杂交图

(a) 以海岛棉 pima90 有丝分裂中期染色体为靶 DNA 的原位杂交图; (b) 陆地棉 TM-1 有丝分裂中期染色体为靶 DNA 的原位杂交图; (c) 以戴维逊氏棉(D<sub>3-d</sub>)有丝分裂前中期染色体为靶 DNA 的原位杂交图; (d) 为(c)的局部放大图, 白色箭头示信号位于染色体着丝粒区侧翼区; (e)~(k) 以瑟伯氏棉(D<sub>1</sub>)(e)、辣根棉(D<sub>2-i</sub>) (f)、克劳茨基棉(D<sub>3-k</sub>) (g)、早地棉(D<sub>4</sub>) (h)、雷蒙地氏棉(D<sub>5</sub>) (i)、拟似棉(D<sub>6</sub>) (j)、三列棉(D<sub>8</sub>) (k)有丝分裂中期染色体为靶 DNA 的原位杂交图; (l) 以瑟伯氏棉(D<sub>1</sub>)有丝分裂间期染色体为靶 DNA 的原位杂交图. 标尺示 5 μm

景非常干净,但是在每个棉种的 FISH 图像中都有 1~2 对染色体上的信号相对较弱(绿色箭头). 在以瑟伯氏棉有丝分裂间期细胞为靶 DNA, 以 BAC 克隆 150D24 为探针的原位杂交实验中, 我们也发现了非常明显的信号散布在整个细胞中(图 1(l)), 如不计强弱, 信号总数为 26 个左右.

考虑到实验的异常现象, 又增加了以 C, E 组棉种为靶 DNA 的实验, 以 BAC 克隆 150D24 为探针, 以 C 组二倍体棉斯特提棉、E 组二倍体棉索马里棉为靶 DNA 的原位杂交实验结果与 A 组相同, 也没有任何信号, 重复多次结果依然如此. 本实验所用靶 DNA, 探针及信号具体情况详见表 3.



表 3 以 BAC 克隆 150D24 为探针所用制片、细胞数及信号

	AD <sub>2</sub>	AD <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2-1</sub>	D <sub>3-d</sub>	D <sub>3-k</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>	D <sub>8</sub>	A <sub>1-a</sub>	A <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>
制片数目	2	2	5	2	5	6	5	5	5	5	10	10	10	10
细胞数	12	18	22	31	24	30	21	22	15	20	67	53	47	41
信号	有	有	有	有	有	有	有	有	有	有	无	无	无	无

### 3 讨论

刘三宏等人<sup>[31]</sup>发现在以 A 组二倍体阿非利加棉作靶 DNA, 以二倍体 D 组雷蒙德氏棉基因组 DNA 作探针, 用鲑鱼精 DNA 作封阻的 GISH 实验中, 在阿非利加棉染色体着丝粒区处没有杂交信号出现, 并由此推测二倍体棉花 A 和 D 基因组经过漫长的分化, 其着丝粒区重复序列同源性很低. 在本实验中发现, BAC 克隆 150D24 只在二倍体 D 组棉种染色体着丝粒区域有信号, 在其他二倍体 A, C, E 组棉种染色体着丝粒区都没有信号, 这暗示着 150D24 中可能含有着丝点区域特有的重复序列, 且这些重复序列在二倍体 A, C, E 组棉种中并不存在, 也就是说 150D24 可能含有二倍体 D 组棉种的着丝粒区域特有的重复序列. 通过仔细观察图 1(c)~(k)发现, 在二倍体 D 组的着丝粒信号中, 不同染色体上的信号强度是不同的, 几乎在每张图片中都能找到 1~2 对信号较弱的染色体(绿色箭头), 这说明 BAC 克隆 150D24 虽然含有二倍体 D 组棉种着丝粒重复序列, 但是该重复序列在不同的染色体上的重复次数是不同的, 在部分一些染色体上重复次数很少, 这说明 BAC 克隆 150D24 中所含重复序列在不同染色体间差异还是很大的. 近年来的研究证明, 卫星 DNA(satellite DNA)和还原转座子是植物着丝粒区含量最多有 DNA 元件, 着丝粒特异的还原转座子(centromeric retrotransposons)序列在相近种间是保守的, 卫星 DNA 长度在种间的长度是保守的, 但其组成成分即使是在较近的种间也有很大不同<sup>[32-36]</sup>, 卫星 DNA 是真核生物中进化较快的部分, 在亲缘关系较近的种间也呈现非常明显的重排、序列及拷贝数的变异<sup>[32,37]</sup>. 因此, 我们认为, BAC 克隆 150D24 含有二倍体 D 组着丝粒区的特有卫星重复序列, 可以作为二倍体 D 组棉种着丝粒的特异 FISH 标记, 用于构建基于粗线期染色体的分子

细胞遗传学图谱.

本研究中的 BAC 克隆 150D24 是由 SSR 标记 BNL3563 筛选到的, BNL3563 位于四倍体棉花遗传连锁图中 10 号染色体长臂末端, 而且在二倍体 D 组遗传连锁图中并没有此分子标记, 以此 BAC 克隆为探针进行原位杂交时, 在四倍体棉种 D 亚组染色体着丝粒区产生微弱的信号. 最初我们推断 BAC 克隆 150D24 来自四倍体棉种的 A 亚组的一对染色体, 其中可能含有部分 D 亚组着丝粒的重复序列, 或是含有 A 和 D 组共有的着丝粒重复序列, 因此能在 D 亚组染色体着丝粒区产生信号. 因此, 最初预计以 BAC 克隆 150D24 为探针能在二倍体 A 组棉种着丝粒至少产生一对信号. 然而后来的研究发现, BAC 克隆 150D24 不能在 A 组二倍体染色体着丝粒处产生信号, 而是在 D 亚组全部染色体着丝粒处产生了清晰信号, 这说明来源于四倍体 A 亚组的 BAC 克隆 150D24 含有二倍体 D 组着丝粒重复序列而不是 A 组的着丝粒重复序列. 我们推测可能有两种原因造成了这种现象: 一是二倍体 D 组的着丝粒区重复序列“入侵”或是“转移”到了遗传连锁图中 10 号染色体着丝粒区, 并恰好处在分子标记 BNL3563 附近; 二是遗传连锁图的 10 号染色体可能是二倍体 D 组来源的, 或者至少说部分属于 D 亚组而不是 A 亚组染色体, 而标记 BNL3563 是在漫长的进化过程中复制或转移而来的, 四倍体棉种与二倍体 A, D 组棉种染色体的线性对应关系可能比我们预期的更复杂.

近 20 年来, 着丝粒结构和功能、物理图谱着丝粒区 Gap 填补等已成为当今分子细胞生物学与分子细胞遗传学的热点之一, 本研究仅就着丝粒探针进行初步筛选, 其功能和结构等还要需要更深入的研究来确定, 并将推动棉花分子细胞生物学、分子细胞遗传学及棉花基因组测序计划的发展.

### 参考文献

- 1 Nandi H K. The chromosome morphology, second association and origin of cultivated rice. *J Genet*, 1936, 33: 315—336
- 2 Okamoto M. Identification of the chromosomes of common wheat belonging to the A and B genome. *Can J Genet Cytol*, 1962, 4: 31—37

- 3 Rich C M, Barton D W. Cytological and genetical identification of primary trisomics of the tomato. *Genetics*, 1954, 39: 640—666
- 4 McClintock B. Chromosome morphology in *Zea mays*. *Science*, 1929, 69: 629
- 5 程祝宽, 杨学明, 于恒秀, 等. 水稻随体染色体的研究. *遗传学报*, 1998, 25: 225—231
- 6 Menzel M Y. A cytological method for genome analysis in *Gossypium*. *Genetics*, 1954, 40: 214—223
- 7 Brown M S. The identification of the chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. by means of translocations. *J Hered*, 1980, 71: 260—274
- 8 Edwards G A. The karyotype of *Gossypium herbaceum* L. *Caryologia*, 1977, 30: 369—374
- 9 聂汝芝, 李懋学. 三种野生和四个栽培棉种核型研究. *植物学报*, 1985, 27: 113—121
- 10 王坤波, 李懋学. 棉属 D 染色体组核型变异和进化. *作物学报*, 1990, 16: 200—207
- 11 宋平, 季道藩, 许复华. 二倍体栽培棉种草棉和亚洲棉的核型比较研究. *作物学报*, 1991, 17: 102—106
- 12 王坤波, 张香娣, 王春英, 等. 棉属 A 染色体组的核型研究. *遗传*, 1995, 17: 32—34
- 13 沈新莲, 周宝良, 吴敬音, 等. 棉属野生种稀毛棉、皱壳棉、杨叶棉的核型研究. *棉花学报*, 1997, 9: 217—221
- 14 聂汝芝, 李懋学, 主编. 棉属植物核型研究. 北京: 科学出版社, 1993
- 15 应苗成, 彭跃进, 陈松, 等. 松散棉(*Gossypium laxum*)核型的研究. *江苏农业学报*, 1989, 5: 20—25
- 16 王坤波, 胡绍安. 异常棉的核型研究. *中国棉花*, 1989, 16: 9—11
- 17 王坤波, 王文奎, 王春英, 等. 海岛棉原位杂交及核型比较. *遗传学报*, 2001, 28: 69—75
- 18 De Jong J H, Fransz P F, Zabel P. High resolution FISH in plants techniques and applications. *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 258—263
- 19 Jiang J M, Gill B S. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome*, 2006, 49: 1057—1068
- 20 Cheng Z K, Buell C R, Wing R A, et al. Toward a cytological characterization of the rice. *Genome Res*, 2001, 11: 2133—2141
- 21 Wang K, Song X L, Han Z G, et al. Complete assignment of the chromosomes of *Gossypium hirsutum* L. by translocation and fluorescence *in situ* hybridization mapping. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 73—80
- 22 Jiang J, Birchler J A, Parrott W A, et al. A molecular view of plant centromeres. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 570—575
- 23 Cheng Z, Dong F, Langdon T, et al. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromerespecific retrotransposon. *Plant Cell*, 2002, 14: 1691—1704
- 24 Jin W, Melo J R, Nagaki K, et al. Maize centromeres: Organization and functional adaptation in the genetic background of oat. *Plant Cell*, 2004, 16: 571—581
- 25 Liu S, Saha S, Stelly D, et al. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton. *Am Genet Assoc*, 2000, 91: 326—332
- 26 Rong J K, Abbey C, Bowers J E, et al. A 3347-Locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*). *Genetics*, 2004, 166: 389—417
- 27 Han Z G, Wang C B, Song X L, et al. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 430—439
- 28 Crooijmans R P M A, Vrebalov J. Two-dimensional screening of the Wageningen chicken BAC library. *Mamm Genome*, 2000, 11: 360—363
- 29 王春英, 王坤波, 宋国立, 等. 棉花体细胞染色体 rDNA-FISH 技术. *棉花学报*, 2001, 13: 75—77
- 30 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题. *武汉植物学研究*, 1985, 3: 297—302
- 31 刘三宏, 王坤波, 宋国立, 等. 棉花 GISH-NOR 的初步探讨. *科学通报*, 2005, 50: 443—447
- 32 Henikoff S, Dalal Y. Centromeric chromatin: What makes it unique? *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15: 177—184
- 33 Jiang J, Birchler J A, Parrott W A, et al. A molecular view of plant centromeres. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 570—575
- 34 Lamb J C, Theuri J, Birchler J A. What's in a centromere? *Genome Biol*, 2004, 5: 239
- 35 Malik H S, Henikoff S. Conflict begets complexity: The evolution of centromeres. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12: 711—718
- 36 Han Y H, Wang G X, Liu Z, et al. Divergence in centromere structure distinguishes related genomes in *Coix lacryajobi* and its wild relative. *Chromosoma*, 2010, 119: 89—98
- 37 Ugarkovic D L, Plohl M. Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. *EMBO J*, 2002, 21: 5955—5959

## Screen of FISH marker of chromosomes at *Gossypium* D genome species

WU Qiong<sup>1,2</sup>, CHENG Hua<sup>1,3</sup>, LIU Fang<sup>1</sup>, WANG ShengFeng<sup>4</sup>, SONG GuoLi<sup>1</sup>, LI ShaoHui<sup>1</sup>, ZHANG XiangDi<sup>1</sup>, WANG YuHong<sup>1</sup>, MA ZhiYing<sup>4</sup> & WANG KunBo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement of Ministry of Agriculture, Anyang 455112, China;

<sup>2</sup> Institute of Cash Crops, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Liaoyang 111000, China;

<sup>3</sup> AnYang Institute of Technology, Anyang 455112, China;

<sup>4</sup> Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China

Appropriate centromere probes for fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of cotton were screened and high density cytogenetic maps based on pachytene-FISH in D genome cotton were developed. A BAC library of *Gossypium barbadense* var. pima 90-53 was screened using two-dimensional PCR with molecular markers close to the centromere region and 12 BAC clones were identified by BAC-FISH. BAC clone 150D24 screened with SSR marker BNL3563, located at the end of long arm of Chromosome 10 was identified. Signals for BAC clone 150D24 were located in centromere regions of some shorter chromosomes in tetraploid cotton *G. hirsutum* (AD)1 and *G. barbadense* (AD)2. FISH conducted on diploid cotton demonstrated that there were clear signals in the centromere region of D genome diploid cotton species when BAC clone 150D24 was used as a probe. No signals were evident in A, C or E genome diploid cotton. This suggests that 150D24 contains repeat sequences, which are specific to D genome species centromere region; therefore, 150D24 can be used as a specific FISH marker for centromere regions in D genome diploid cotton, including the D sub-genome.

**cotton, FISH, centromere, BAC**

doi: 10.1360/972010-157