

染色体识别技术及其在园艺植物上的应用进展

舒巧利¹, 陈 志³, 党江波¹, 杨 星¹, 孙海艳¹, 梁国鲁¹, 洪棋斌^{2,*},
向素琼^{1,*}

(¹西南大学园艺园林学院, 重庆 400716; ²西南大学柑桔研究所, 重庆 400712; ³成都理工大学信息科学与技术学院, 成都 610059)

摘 要: 综述染色体制备和识别技术发展历程以及这些技术在园艺植物上的应用, 以期对园艺植物染色体结构与行为研究、系统演化分析、重要农艺性状相关基因定位、分子辅助新品种选育等提供参考。

关键词: 园艺植物; 染色体识别; 核型; 带型; 荧光原位杂交

中图分类号: S 6; Q 813.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2017) 09-1772-15

Progress of Chromosome Identification Technology and Application on Horticultural Plants

SHU Qiaoli¹, CHEN Zhi³, DANG Jiangbo¹, YANG Xing¹, SUN Haiyan¹, LIANG Guolu¹, HONG Qibin^{2,*}, and XIANG Suqiong^{1,*}

(¹College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China; ²Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China; ³College of Information Science and Technology, Chengdu University, Chengdu 610059, China)

Abstract: This paper mainly reviewed the advances of chromosome specimen preparation, identification technology and application on horticultural plants, which would provide some references for chromosome structure research, phylogenetic relationship analysis, gene locating of important agronomic traits and molecular assistant new varieties selection of horticultural plants.

Keywords: horticultural plant; chromosome identification; karyotype; banding; fluorescence *in situ* hybridization

染色体是细胞内遗传物质的载体。染色体是 Hofmeister 于 1848 年在研究紫鸭跖草的花粉母细胞中观察到核的消失和球状小体的出现时加以描绘的, 但当时并未被命名, 直到 1888 年由 Waldeyer 将其命名为染色体。Morgan 于 1906 年确定了基因在染色体上呈线性排列并通过细胞分裂遗传给后代, 由此关于染色体结构和行为与生物性状的关系以及基因在染色体上分布的研究逐步开展起来 (Gill et al., 2008; Scholes, 2012; Sharma & Lavania, 2016)。

染色体识别是指通过一定的标记将不同的染色体区分开来, 包括染色体组、单个染色体以及染色体片段, 这一直是细胞遗传学研究的重要内容 (Kato et al., 2005)。随着分子生物学、细胞学以

收稿日期: 2017-05-26; 修回日期: 2017-07-05

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272138); 国家科技支撑计划项目 (2013BAD02B02)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xiangsq@swu.edu.cn; Tel: 023-68250383)

及遗传学的交叉渗透, 染色体识别在物种起源与鉴定、系统分类与亲缘关系分析、基因定位与物理图谱构建、异源染色体与外源基因检测等方面具有重要意义和应用价值 (Sharma & Lavania, 2016)。在园艺植物的遗传研究及育种中, 对染色体识别相关内容常有涉及, 但并不深入。因此本文中简述染色体标本制备和识别技术发展历程, 并对园艺植物染色体识别方面的内容予以综述, 以期园艺植物染色体结构与行为研究、系统演化分析、重要农艺性状相关基因定位、分子辅助新品种选育等提供一定参考。

1 染色体制备技术的发展

染色体标本制备是染色体研究的基础。染色体制片技术主要包括压片法、涂片法和滴片法。由于细胞壁的影响, 植物染色体制片的发展相对滞后。1921 年 Belling 用酸去除花粉母细胞细胞壁开创了植物染色体的压片法 (Belling, 1921)。后来, 酶解离去除细胞壁的方法被应用到植物染色体制片中。随着低渗技术和干燥技术的发展, 陈瑞阳等将这些技术有机地结合起来 (简称: 去壁—低渗法), 获得了良好的染色体标本, 现被广泛使用 (陈瑞阳 等, 1979; 晁无疾和段丛, 1985; 陈春丽 等, 2003)。压片法对去壁要求较低且材料不易丢失, 经压片后染色体可能会出现粘连、变形甚至断裂的现象。该法适用于大量材料的倍性鉴定、染色体计数、初步的染色体形态观察 (Ostergren & Heneen, 1962; Ahloowalia, 1965)。经酶解去壁低渗后的材料多采用涂片法, 该法可能会使染色体丢失, 但减少了机械力对染色体的损伤, 维持了其原本的形态。涂片法适用于染色体的核型分析与倍性鉴定 (宋文琴 等, 1985; 张毓芳和袁妙葆, 1995; 梁国鲁 等, 2012)。酶解适度时可采用滴片法, 虽然操作较复杂, 对细胞解离要求较高, 但染色体标本背景较浅 (Ronildo & Roberto, 2006; Chirino et al., 2014)。Kirov 等 (2014b) 在滴片法的基础上运用蒸汽处理使染色体分散良好, 形态更加伸展, 并在 28 种植物上运用。由于个性差异, 不同植物材料染色体标本制作的各个环节均有所差异, 但总体都遵循去壁后分散细胞的方法。因此, 研究者主要通过各自材料特点优化制片条件来制备所需的染色体 (Dang et al., 2015; 涂红艳 等, 2016)。

2 染色体识别技术的发展

2.1 核型分析技术

染色体识别经历了从外部形态到内部结构的多种识别技术的发展。染色体的形态是生物进化的表现, 同时也是生物的固有特征, 对染色体形态的分析即为核型分析。1921 年 Belling 首创压片法开启了植物染色体核型研究的大门。传统的核型分析是指染色体组在有丝分裂中期的表型, 包括染色体数量、大小和外部形态特征。它在最初的染色体识别研究中扮演了重要的角色。人类的核型分析已可通过计算机自动进行, 并在遗传病诊断方面有着广泛的应用 (Schrock et al., 1996)。陈瑞阳等 (2009) 运用压片法和去壁低渗法结合半自动核型分析软件对中国的 140 科 656 属 1 563 种主要经济植物进行了核型分析, 编撰了染色体图谱, 为中国经济植物的基因组学的研究奠定了坚实的基础。但是, 某些形态极其相似或部分区段发生了变异的染色体, 核型分析技术难以准确识别, 这就促进了学者们对染色体内部性质和结构的探索, 于是出现了染色体显带技术。

2.2 染色体显带技术

1968 年 Caspersson 等 (1968) 首次建立了染色体显带技术, 通过各种染料的使用让染色体纵轴上的纹路得以显现, 这是染色体识别从外部形态研究向内部结构研究的一个转折点。此后, 美国细胞遗传学家 Yunis (1976) 又在原有技术的基础上建立了高分辨显带法, 这使得染色体带型更加清晰可靠。这种着色深浅相间的带纹对大多数染色体来说是独特的, 若染色体结构发生变异, 带纹也可能发生变化, 因此可用带型来区分各条染色体以及初步鉴定染色体的变异。常用的有 C 带、G 带显带技术。C 带主要显示异染色质所在区域, 如着丝粒、随体等, 带型稳定, 应用广泛, 已经在玉米 (Carvalho & Saraiva, 1997)、小麦 (钟少斌 等, 1989) 和高粱 (Yu et al, 1990) 等诸多作物上有所应用。G 带主要显示经 Giemsa 染料染色后富含 AT 碱基的区域。Yunis (1976) 先用氨甲喋呤等药物使细胞分裂同步化, 然后用秋水酰胺进行短时间处理, 使之出现大量的晚前期和早中期的分裂相, 显带后染色体分带细、带纹可多达 800 条甚至更多, 使染色体识别更为准确, 这就是高分辨显带技术。该技术在临床医学与植物染色体识别方面皆有所应用 (Zhang et al., 1981; 梁国鲁 等, 1990)。伴随着这几种主要的带型分析方法的应用, 银染法、N 带、R 带和 T 带等类似的带型分析方法也逐步发展起来。其实 Caspersson 等 (1968) 最先建立的染色体显带技术是荧光显带技术, 仅用荧光染料氮芥喹叶因处理染色体就可得到 Q 带。但由于这种荧光染料的各种缺点以及显带工具的局限性使得该技术未得到广泛应用。随着几种新荧光染料, 如 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、色霉素 A3 (chromomycin A3, CMA) 和碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 等的应用极大地促进了荧光显带技术的发展。Bickmore (2001) 发现经 DAPI 染色后染色体带型稳定且不易褪色, 在众多植物的带型分析中得到应用 (Kim et al., 2002; Karlov et al., 2003; Liu et al., 2004)。

2.3 染色体原位杂交技术

2.3.1 探针类型的发展

许多染色体较小、浓缩程度较高且形态相似的物种, 染色体经过各种显带处理后只产生较少甚至不产生清晰的带纹, 不能够区分所有染色体。而 Gall 和 Pardue (1969)、John 等 (1969)、Buongiorno-Nardelli 和 Amaldi (1970) 建立的染色体原位杂交技术弥补了这一缺点。将标记的核酸探针与细胞中的核酸进行杂交称为原位杂交。而该技术最早使用的探针是 DNA 重复序列。由于在不同染色体上组成、分布、位置和重复数的不同, 被广泛应用于染色体识别中, 主要包括 rDNA 基因、串联重复序列和转座子等 (Pardue & Gall, 1970; Gaginakaia & Gruzova, 1975; 向素琼 等, 2007)。此后, 低拷贝序列与全基因组序列也加入到探针的制备行列。以大片段克隆如细菌人工染色体 (BAC)、酵母人工染色体 (YAC) 和哺乳动物人工染色体 (MAC) 等为探针的荧光原位杂交技术可定位低拷贝序列并绘制遗传图谱 (Kempski & Cowell, 1993; Zhong et al., 1999; Kirov et al., 2014a)。利用一个物种的全基因组 DNA 为探针, 直接与其他物种的基因组杂交即基因组原位杂交 (Genomic *In Situ* Hybridization, GISH) 技术, 现多用于异源多倍体和种属间杂交渗入系的染色体识别 (Jellen et al., 1994; 李宗芸 等, 2013; Zheng et al., 2014)。另外, 寡核苷酸也可用作探针, 主要包括寡脱氧核糖核苷酸探针和寡核糖核苷酸探针 (Matera & Ward, 1992; Frischer et al., 1996)。只需已知待测对象的部分核酸序列就可轻易合成寡核苷酸探针。该类探针是单链, 相对分子质量小, 因此其杂合效率高。研究者们多采用双标记和多标记的寡核苷酸探针来提高信号的灵敏度 (Stoecker et al., 2010; Schimak et al., 2015)。

实际上, 从全基因组到单条染色体或染色体上某一区域的不同核酸片段, 以及发掘的分子标记、人工合成的核酸序列都可成为染色体原位杂交的探针, 只是单拷贝或低拷贝序列存在难以杂交和不易检测的困难。

2.3.2 探针标记方法与检测系统

最初的原位杂交是采用含有放射性同位素的核苷酸掺入探针来进行标记并采用放射自显影进行检测。1981 年 Langer 等 (1981) 首次采用生物素标记的核苷酸探针进行杂交试验并用荧光显微镜来检测, 避免了放射性同位素的不安全性, 开创了非放射性原位杂交。1985 年, Rayburn 和 Gill (1985) 首次将非放射原位杂交技术应用到植物染色体识别上。根据非放射性原位杂交中标记和检测特点的不同可分为直接标记法和间接标记法。直接标记是指掺入到探针中的标记物在杂交后可被直接检测到, 这种标记物多为可在激发光下发出荧光的物质, 常用的荧光素标记物有异硫氰酸荧光素 (FITC)、氨基苯基香豆素醋酸酯 (AMCA) 和罗达明衍生物 (TRITC) 等 (余朝文和宋运淳, 2006)。间接标记是指掺入到探针中的标记物不能被直接观察到, 必需通过偶联复合物专一地结合到杂交后的探针标记物上, 通过特殊的检测方法来显示杂交位点, 常用的标记物有生物素和地高辛。直接标记的探针杂交后经过简单冲洗就可镜检, 省去了间接标记的探针杂交后需要偶联抗体的检测步骤, 但却不能像间接标记的探针那样进行多步骤信号放大, 灵敏性不如间接标记, 但靶序列较大时还是比较可靠的。以荧光素直接或间接标记的探针在细胞制片上进行原位杂交的技术即荧光原位杂交 (FISH)。如今, 标记物除上述物质外, 还有近期发展起来的量子点 (Quantum dots, QD), 如发荧光的纳米金刚石和镧系元素等, 都是一种新型荧光纳米材料, 具有宽激发窄发射、荧光寿命长不易猝灭、表面可进行多种修饰等特点 (Chan et al., 2005; Loannou et al., 2009; Parker & Hutchinson, 2016)。

2.3.3 染色体标本的分辨率

现今, 在染色体识别研究中采用最多的就是荧光原位杂交技术, 衡量该技术的两个最重要的参数是分辨率和灵敏度, 目前主要是通过改变染色体靶标的浓缩程度和探针种类来提高其分辨率和灵敏度。多数研究最初都是采用有丝分裂中期的染色体作为靶标, 因为此时的染色体形态较好, 制片简单, 但其分辨率较低, 且对于较小的染色体也无法识别。为了精确识别染色体的细微变异, 发展了粗线期的 FISH 技术与 DNA 纤维原位杂交 (Fiber-FISH) 技术。粗线期染色体的荧光原位杂交技术的分辨率可达 100 kb, 但该时期染色体难以取材制备。Fiber-FISH 技术突破了分辨率的限制, 通过裂解间期细胞核释放出染色质纤维, 人工改变染色质原本的空间结构, 去除蛋白质的束缚使 DNA 得到伸展, 其分辨率可达 1 ~ 500 kb (Dechyeva & Schmidt, 2016)。染色质纤维虽然在一定程度上提高了 FISH 技术的分辨率, 但是与有丝分裂中期染色体相比, 它无法表现信号相对于端粒、着丝粒等染色体特殊部位的位置, 必需有其他特异标记辅助, 否则难以识别染色体 (Jong et al., 1999)。因此, 不同分辨率的靶标各有优势, 需要根据研究的实际情况来选择。

2.3.4 荧光原位杂交技术的发展

随着新荧光染料的发现, 探针标记、图像获取和显微分析技术的不断发展, FISH 则由单色向多色发展。1990 年出现了 mFISH (Multicolor-FISH) 技术, 即多色荧光原位杂交。以多种荧光素标记形成不同的探针同时对一张制片进行杂交, 不仅减轻了多次洗脱、多次杂交对试验的影响, 还使分辨率得到了提高 (Liu et al., 2007)。如用不同颜色的探针组合来识别人类的 24 条染色体 (Speicher et al., 1996), 二色探针组合来识别小麦的全部染色体组 (Pedersen & Langridge, 1997)。在 FISH 技术的基础上还衍生出了染色体涂染技术 (Chromosome painting, CP)、比较基因组杂交 (Comparative

genomic hybridization, CGH) 技术、三维荧光原位杂交 (Three dimensional FISH, 3D-FISH) 技术、免疫染色荧光原位杂交 (Immuno-FISH) 技术、量子点荧光原位杂交 (QD-FISH) 技术、非变性荧光原位杂交 (Non-denaturing fluorescence in situ hybridization, ND-FISH) 等。CP、CGH 都可直接检测整条染色体上的未知序列, 后者甚至可检测整个基因组序列 DNA 拷贝数变异, 尤其适用于近缘物种染色体的识别, 其缺点是不能检测平衡易位与染色体倍性, 依赖于中期染色体的制片质量, 因此对于高度螺旋的小染色体不太适用 (谢文美 等, 2015); 3D-FISH 能观察到小至 1 Mb 的染色质的空间结构 (Solovei et al., 2002); Immuno-FISH 与 QD-FISH 都可检测到单拷贝基因, 前者还可定位蛋白质的相对位置 (Boersma-Vreugdenhil et al., 2003; Namekawa & Lee, 2011), 后者适用于多色标记且在动物和植物上都有所应用 (Namekawa & Lee, 2011; 邹铅, 2013)。ND-FISH 技术现多采用 SSR 标记为探针, 所用的染色体也无需变性, 但对含高度螺旋的染色体不适用。该技术已在黑腹果蝇、黑麦、玉米、大麦、小麦、芝麻等上有所应用 (Cuadrado et al., 2009; 常晓媛 等, 2013; 刘艳阳 等, 2013; Fu et al., 2015)。

3 染色体识别在园艺植物上的应用进展

3.1 核型分析技术的应用

陈瑞阳等 (1993, 2003) 对 64 科 205 属 356 种园林花卉植物以及 29 科 52 属 261 种中国果树及其野生近缘植物进行了核型分析。此外, 该技术被用于园艺植物亲缘关系分析、进化研究、倍性鉴定、杂种真实性确认等方面 (Acosta et al., 2005; Marasek et al., 2006; Iovene et al., 2008; 刘慧民 等, 2010; Lao et al., 2012; She, 2016)。曾佳诗等 (2015) 对 4 个不同株型和花色的勋章菊进行了核型分析, 发现‘红纹’、‘星白’和‘日出’3 个外引的品种亲缘关系较近, 与‘中国勋章菊’亲缘关系较远。李桂芬等 (2013) 用去壁火焰低渗法对 21 个枇杷属和 1 个近缘属材料做了核型分析, 发现其核不对称性逐渐增强, 表明枇杷属植物正在不断进化。Fatima 等 (2015) 用核型分析方法鉴定了金诺橘的三倍体和甜橙的四倍体植株。Nathewet 等 (2009) 先后以 60% 乙酸和 1.5% 乳丙酸地衣红对八倍体草莓杂交后代, 以及智利草莓染色体染色得到了清晰的核型, 可清楚识别每一染色体。刘学生等 (2013) 通过对苹果枣进行核型分析以及其染色体减数分裂行为观察, 初步鉴定苹果枣为天然同源三倍体。王金耀等 (2014) 用常规压片方法首次得到当代月季 Kardinal、Solidor 和 Yuzen 的核型, 并通过杂种后代的染色体核型初步鉴定了 F_1 代杂种的真实性。Bhadra 和 Bandyopadhyay (2016) 用常规压片方法发现野山姜、舞花姜、艳山姜是对称型核型, 就染色体长度和着丝粒指数而言, 它们存在低水平的种间及种内变异。虽然核型分析技术在园艺植物上的应用正在不断推广, 但还是远低于大田农作物。

3.2 染色体显带技术的应用

显带技术在园艺植物的染色体识别上起到了一定作用。梁国鲁等 (1990) 用胰酶法首次在茶树伸长的染色体上成功诱导出高分辨 G 带, 使茶树的早前期、晚前期、前中期的每一染色体上都呈现清晰而丰富的 G 带带纹, 初步识别了该基因组中的各条染色体。Hu 等 (2011) 用 C 带技术研究 5 种不同颜色的风信子, 发现它们的 C 带基本都聚集在着丝粒和长臂上, 再结合染色体核型清楚区分了 5 种风信子的每条染色体。Yamamoto 等 (2005) 用 CMA 荧光显带技术研究了来自日本的中熟、晚熟柑橘和酸橙的染色体, 根据染色体上 CMA 带的位置与数量将其分成 5 类染色体组型, 区分出

了 7 类柑橘和酸橙并且发现它们的亲缘关系越近其带型就越相似。Yasuda 等 (2015) 依据 CMA 显带技术与已知数据认为椭圆金柑、圆形金柑、金弹是金柑属的 3 个基本种, 而其它 3 个种则是它们之间的天然杂交产物。但显带技术本身也有一定的局限, 胡凤荣等 (2009) 用改良的 Giemsa C 带法对细叶百合进行 C 带研究, 发现细叶百合有 6 条染色体没有带纹, 有带纹的染色体其带纹多集中出现在染色体长臂及着丝粒区域, 因此无法区分每一条染色体。

3.3 染色体原位杂交技术的应用

3.3.1 重复序列的荧光原位杂交识别染色体

高等植物核基因组最大的特征是含有大量保守的重复序列, 如 rDNA、卫星重复序列等。运用重复序列的荧光原位杂交技术对该类序列进行染色体定位构建了黄瓜、莴苣、芦笋、百合、绣球花、山茶花、杧果等园艺植物 rRNA 基因的物理图谱 (Hoshi et al., 1999; Miyamoto et al., 1999; Matoba et al., 2001; Gu & Xiao, 2003; Laere et al., 2008; Yonemori et al., 2010; Deng et al., 2012a)。Kumar 等 (2014) 定位了田菁的 rRNA 基因, 发现该基因间的间隔序列在长度上存在着变异。保守的重复序列在进化历程中发生着变异, 同一物种不同染色体上各 rRNA 位点变异频率并非完全相同 (Nguyen et al., 2016)。因此可根据重复序列位置、数量的不同来区分非同源染色体以及不同的染色体组 (Li et al., 2016)。Deng 等 (2012b) 通过对 45S rDNA 定位研究, 识别了菠菜的性染色体。He 等 (2015) 运用萝卜染色体上卫星重复序列 CL1、CL25 以及 5S rDNA、45S rDNA 为探针的 FISH 技术发现萝卜的全基因组中含有 31% 的重复序列且识别了萝卜的每条中期染色体。Moraes 等 (2007) 运用 CMA 带型技术和以 rDNA 为探针的 FISH 技术对葡萄柚的核型多样性进行了探究, 结果发现葡萄柚 ‘Duncan’、‘Foster’ 的 CMA 带型、rDNA 位点皆与葡萄柚 ‘Flame’、‘Henderson’、‘Marsh’、‘Rio Red’ 不同, 这表明栽培种葡萄柚存在着遗传变异。Rho 等 (2012) 用 rDNA 为探针的荧光原位杂交技术, 鉴别了 3 个不同种的草莓并获得了更为精确的核型。Lee 等 (1998) 运用该技术发现天蓝韭在经愈伤组织培养过程中存在高比例的倍性变异。周树军等 (2008) 利用 FISH 技术鉴别了麝香百合 (*Lilium longiflorum*)、柠檬色百合 (*Lilium leichtlinii*)、天香百合 (*Lilium auratum*) 和豹纹百合 (*Lilium pardalinum*)。

3.3.2 GISH 技术的应用

通过基因组原位杂交, 不仅可以鉴定属间的亲缘关系, 还可以检测外源染色体或片段。李宗芸等 (2013) 利用 GISH 技术, 研究了甘蓝基因组与芸薹属其他 5 个近缘物种基因组间的相互关系, 发现甘蓝与白菜型油菜、甘蓝型油菜基因组的分化程度较小, 与黑芥基因组的分化程度较前者高, 与芥菜型油菜和埃塞俄比亚芥间的亲缘关系介于二者之间。Kitajima 等 (2007) 以椪柑、柚子的基因组 DNA 为 GISH 的探针, 再结合 CMA、DAPI 染色技术发现温州蜜柑的 6 对染色体与椪柑染色体有较高同源性, 与柚子染色体的同源性次之, 而另外 6 条杂合的染色体与它们的亲缘关系不明。Zheng 等 (2014) 用 GISH 技术发现异源四倍体白菜的染色体上存在重复序列插入和删除现象。张云霞等 (2015) 利用栽培黄瓜基因组 DNA 与 45S rDNA 为探针的荧光原位杂交技术, 一次性快速显示基因组串联重复序列的分布, 同时发现染色体上该类序列的位点和拷贝数在黄瓜变种间表现出明显的分化。Tonosaki 等 (2014) 将该技术用于鉴别白菜与甘蓝单体附加系。此外, GISH 技术还在风信子、菊、草莓、葱属、忍冬 (Abd El-Twab & Kondo, 2004; Barba-Gonzalez et al., 2006; Budylin et al., 2014; Jang et al., 2015; Miyashita & Hoshino, 2015; Liu et al., 2016) 等园艺植物上有所应用。

3.3.3 BAC-FISH 与 TSA-FISH 技术的应用

番茄、洋葱、蔷薇属植物、柑橘类植物等，它们的染色体小，研究进程缓慢，其单拷贝序列则更是难以用于研究。BAC-FISH 和酪胺信号放大 FISH (TSA-FISH) 等技术为这类植物染色体的研究提供了新的细胞遗传学标记。Zhong 等 (1999) 以含抗根结线虫基因 *Mi-1* 的 BAC 克隆与含酸性磷酸酶基因 *Aps-1* 的 YAC 克隆为探针作用在番茄粗线期染色体上定位了这两种基因。Shearer 等 (2014) 运用 BAC-FISH 和光学标测技术纠正了番茄基因组支架重排问题。Lou 等 (2010) 根据马铃薯、番茄、茄子的荧光原位杂交图谱发现了它们的 6 号染色体存在臂内与臂间倒位现象。Silvokleio 等 (2014) 用该法与 CMA/DAPI 染色技术通过比较细胞遗传图谱发现柑橘属和枳属具有同源性。Kirov 等 (2014a) 将 TSA-FISH 技术与现代分子标记技术相结合定位光叶蔷薇的 3 个连锁群，并且成功将小至 1 kb 单拷贝基因定位在中期染色体上。次年 Kirov 等 (2015) 运用高分辨率的 TSA-FISH 和多色 TSA-FISH 技术成功将 7 个基因定位到光叶蔷薇粗线期染色体上，将蔷薇属单拷贝基因的物理作图分辨率提高了 20 倍。低拷贝序列的研究不仅有益于物理图谱的构建，还能用于近缘物种间亲缘关系的鉴定。Szinay 等 (2012) 用番茄和马铃薯 BAC 克隆为探针的 mFISH 技术，以跨种杂交后代中染色体发生了重排的植株为材料，研究茄科作物的进化历程，发现 *Solanum etuberosum* 与番茄的分类地位更近，而 *S. lycopersicoides* 与 *S. pennellii* 具有相同的分类地位。

3.3.4 Fiber-FISH 技术的应用

Fiber-FISH 技术在识别与定位染色体亚微结构以及构建精确物理图谱上作出了贡献。Jackson 等 (1998) 用 BAC 克隆为探针杂交，在拟南芥 2 号染色体纤维上发现两处间隙分别约为 31 和 500 kb，并且以此建立拟南芥更为精细的物理图谱。同年，Zhong 等 (1998) 用该项技术观察了番茄染色体纤维的端粒和亚端粒结构，发现它们具有染色体特异性且间隔区重复序列存在着变异。Hernandez-Castellano 等 (2017) 以寡核苷酸为探针杂交在拟南芥的染色质纤维上，有效定位了 miRNAs。Lavanian 等 (2004) 以 rDNA 为探针杂交，在吊兰 (*Chlorophytum*) 的染色质纤维上发现 *C. borivillianum* 与 *C. comosum* 的 rDNA 数与位置存在着变异，估测了 *C. comosum* 的 45S rDNA、5S rDNA 的长度。Knaap 等 (2005) 从潘那利番茄渗入系与具 *sun* 基因 (控制番茄果形的基因) 的番茄杂交后代中选取具 *sun* 基因植株，运用 Fiber-FISH 技术第 1 次构建了具 *sun* 基因位点的遗传图谱，且发现 *sun* 基因位点附近易发生等位基因变异。王三红等 (2014) 用以苹果自交不亲和基因座上的 4 种 BAC 为探针杂交在染色体纤维上，结果将两个未深入研究的 BAC 克隆定位到了 ‘Florina’ 染色体上且得出其大小。Mehrotra 等 (2015) 用高分辨率的 Fiber-FISH 技术揭示了菊花染色体上的卫星重复序列以及其基因组的进化历程。相信在不久该项技术将应用于更多的植物 (Dechyeva & Schmidt, 2016)。

3.3.5 mFISH 技术的应用

多色荧光原位杂交技术可快速定位核酸序列，建立更加精确的核型 (Baeza & Schrader, 2005; 徐延浩 等, 2007; Maghuly et al., 2010; Jiang, 2011; 张婷 等, 2014)。Fransz 等 (1996) 用双色荧光原位杂交技术定位了转基因矮牵牛的单拷贝基因，发现了基因重排现象。喻凤和窦全文 (2013) 采用苜蓿 E180 重复序列和 45S 核糖体基因为探针，以双色荧光原位杂交的方法对 2 种紫花苜蓿有丝分裂中期染色体进行定位分析，快而准地将两种紫花苜蓿区别开来，并建立了分子核型。吴春红等 (2014) 从早熟的白菜基因组中提取 Cot-1 DNA 用生物素标记作探针，25S rDNA 用地高辛标记为探针进行双色荧光原位杂交试验，再结合已公布的核型创建了 1 个更加精确的白菜核型。Nowicka 等 (2016) 以着丝点重复序列、胡萝卜特殊重复序列、微型反向重复转座子元件为探针用多色荧光

原位杂交技术识别了野生胡萝卜的染色体对, 使该野生胡萝卜的核型更加精确。

3.3.6 CP 与 ND-FISH 的应用

染色体涂染技术 (CP) 可一次性研究染色体片段或整条染色体变异, 有助于物理图谱的构建。Lysak 等 (2001) 以不同的 BAC 克隆为探针涂染在拟南芥处于不同分裂期的 4 号染色体上, 有助于识别同源染色体。Lou 等 (2014) 用基于单拷贝基因的染色体涂染技术构建了栽培黄瓜的精确核型, 识别了处于中期、粗线期的每条染色体。此外, 发现 4 号染色体上具有非线性区域, 由于该区域存在差异, 因此在栽培黄瓜、甜瓜和刺角瓜染色体上的相关研究需用不同的涂染方式, 且构建了栽培黄瓜、甜瓜在该区域的比较染色体图谱。

与传统 FISH 相比, ND-FISH 省时、省力, 最大限度地保持了染色体的形态特征。Cuadrado 等 (2009) 报道了以两个 21 nt 的人工寡核苷酸为探针作用在紫背万年青的未变性的染色体上, 无论该染色体处于有丝分裂期还是减数分裂期皆可于 1 h 内在紫背万年青的染色体端粒处观察到强信号; 此外, 还发现端粒序列还存在于紫背万年青的某些臂间区域。

4 问题与展望

植物染色体的识别较人类和动物染色体识别发展较晚, 虽然随着技术更新也经历了从外部形态到内部结构分子水平的研究过程, 但有待深入。随着显微技术、制片技术、染色技术和相应物理化学技术的发展, 由单条染色体到几条染色体识别再到全套染色体识别, 已成为植物遗传材料创建和种质资源利用的有力工具。

传统的染色体识别方法, 主要通过核型、带型来识别染色体, 这对一些拥有较大染色体且亲缘关系较远的物种来说是可行的。然而对于很多亲缘关系近和有着较小染色体的植物, 很难通过传统技术进行准确识别。显然, 基于不同探针的原位杂交技术对染色体的识别更为准确、有效, 然而小片段低拷贝 DNA 探针在染色体上较难检测, 需从 BAC 等文库中选出含特异序列的克隆作为探针, 但这些探针的准备和标记费时费力。而寡核苷酸探针用来 FISH 分析则相对简便, 同时寡核苷酸探针易通过商业途径购买, 价格也相对较低, 随着 FISH 相关技术的完善与发展, 利用寡核苷酸探针进行 FISH 分析一定会得到广泛应用。进行染色体识别研究时, 由于每种技术会有不同程度的自身局限性, 对不同物种的染色体识别有着明显的优势与劣势。这时就需要将不同技术有机结合, 弥补相互之间的技术局限, 从而准确识别每条染色体甚至染色体上的某一特异性位点, 如近年发展起来的 CGH、Immuno-FISH、QD-FISH 等多种新技术相结合共同实现染色体的识别。CGH 技术对近缘物种未知序列变异研究有巨大潜力, 将 CGH 技术中所用的中期染色体换为染色体纤维相信会在一定程度上提高染色体识别的分辨率。量子点荧光原位杂交技术是新兴技术, 优点颇多。

园艺植物染色体识别较人类、动物、粮食作物等发展起步更晚。高粱 (杨慧勇 等, 2015)、棉花 (Gan et al, 2011) 等农作物早已深入到功能基因的研究, 研究手段也较为成熟。园艺植物染色体识别虽已逐步跨入分子水平, 但仅仅停留在 DNA 片段的研究上, 单个基因的研究很少, 有用的功能基因的研究也不多, 且仅对模式植物研究得较为深入 (Sharma & Lavania, 2016)。因此园艺植物尤其是一些染色体小又高度杂合的类型以及染色体形态相似的材料, 其染色体研究进展缓慢、识别困难, 至今难以对所有染色体精确识别和核型分析。因此需要寻找更多的特异性分子探针, 再结合成像技术等的发展与应用才能取得令人满意的结果。相信未来会有更多更新的技术应用到园艺植物染色体识别的研究中, 也一定会在园艺植物遗传研究和辅助育种中起到重要作用。

References

- Abd El-Twab M H, Kondo K. 2004. GISH identification of meiotic chromosome organization and segregation in F_1 intergeneric hybrid between *Dendranthema horaimontana* and *Nipponanthemum nipponicum*. Chromosome Science, 8: 128 - 132.
- Acosta M C, Bernardello G, Guerra M, Moscone E A. 2005. Karyotype analysis in several south american species of *Solanum* and *Lycianthes rantonnei* (Solanaceae). Taxon, 54 (3): 713 - 723.
- Ahloowalia B S. 1965. A root tip squash technique for screening chromosome number in *Lolium*. Euphytica, 14 (2): 170 - 172.
- Baeza C, Schrader O. 2005. Comparative karyotype analysis in *Haplopappus* Cass. and *Grindelia* Willd. (Asteraceae) by double FISH with rRNA specific genes. Plant Systematics and Evolution, 251 (2): 161 - 172.
- Barba-Gonzalez R, Silfhout A A V, Visser R G F, Ramanna M S, Tuyl J M V. 2006. Progenies of allotriploids of oriental \times asiatic lilies (*Lilium*) examined by GISH analysis. Euphytica, 151 (2): 243 - 250.
- Belling J. 1921. On counting chromosomes in pollen-mother cells. The American Naturalist, 55 (641): 573 - 574.
- Bhadra S, Bandyopadhyay M. 2016. New chromosome number counts and karyotype analyses in three important genera of Zingiberaceae. Nucleus, 59 (1): 35 - 40.
- Bickmore A W. 2001. Karyotype analysis and chromosome banding // Encyclopedia of Life Sciences. Wiley J. & Sons Ltd. London: Nature Publishing Group: 1 - 7.
- Boersma-Vreugdenhil G R, Peeters T, Bast B J, Lokhorst H M. 2003. Translocation of the IgH locus is nearly ubiquitous in multiple myeloma as detected by immuno-FISH. Blood, 101 (4): 1653.
- Budylin M V, Kan L Y, Romanov V S, Khrustaleva L I. 2014. GISH study of advanced generation of the interspecific hybrids between *Allium cepa* L. and *Allium fistulosum* L. with relative resistance to downy mildew. Russian Journal of Genetics, 50 (4): 387 - 394.
- Buongiorno-Nardelli M, Amaldi F. 1970. Autoradiographic detection of molecular hybrids between rRNA and DNA in tissue sections. Nature, 225: 946 - 947.
- Carvalho C R, Saraiva L S. 1997. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosome. Plant Res, 110 (4): 417 - 420.
- Caspersson T, Farber S, Foley G E, Kudynowski J, Modest E J, Simonsson E, Wagh U, Zech L. 1968. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. Experimental Cell Research, 49 (1): 219 - 222.
- Chang Xiao-yuan, Xia Yun, Zeng Xiao-mao. 2013. Application of ND-FISH in amphibians. Zoolog Res, 34 (6): 610 - 616. (in Chinese)
- 常晓媛, 夏云, 曾晓茂. 2013. ND-FISH 技术在两栖类中的应用. 动物学研究, 34 (6): 610 - 616.
- Chan P M, Yuen T, Ruff F, Gonzalezmaeso J, Sealfon S C. 2005. Method for multiplex cellular detection of mRNAs using quantum dot fluorescent *in situ* hybridization. Nucleic Acids Research, 33 (18): 161 - 170.
- Chao Wu-ji, Duan Cong. 1985. Application of the method of removing wall and low permeability in grape chromosome. Sino-Overseas Grapevine & Wine, (3): 3 - 5. (in Chinese)
- 晁无疾, 段丛. 1985. 去壁、低渗法在葡萄染色体观察上的应用. 中外葡萄与葡萄酒, (3): 3 - 5.
- Chen Chun-li, Guo Wen-wu, Deng Xiu-xin. 2003. Establishment of *in situ* genomic hybridization (GISH) technique in *Citrus*. Journal of Plant Science, 21 (5): 439 - 443. (in Chinese)
- 陈春丽, 郭文武, 邓秀新. 2003. 柑橘基因组原位杂交 (GISH) 技术体系的建立. 植物科学学报, 21 (5): 439 - 443.
- Chen Rui-yang, Chen Cheng-bin, Song Wen-qin, Liang Guo-lu, Li Xiu-lan, Chen Li, Wang Chun-guo, Ma Xiao-jun, Wang Wei-xing. 2009. Chromosome atlas of major economic plants genome in China. Volume 5. Chromosome atlas of medicinal plants in China. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 陈瑞阳, 陈成彬, 宋文琴, 梁国鲁, 李秀兰, 陈力, 王春国, 马小军, 汪卫星. 2009. 中国主要经济植物基因组染色体图谱. 第五册. 中国药用植物染色体图谱. 北京: 科学出版社.
- Chen Rui-yang, Song Wen-qin, Liang Guo-lu, Lin Sheng-hua, Li Xiu-lan, An Zhu-ping. 1993. Chromosome atlas of Chinese principal economic plants. Volume 1. Chromosome atlas of Chinese fruit trees and their close wild relatives. Beijing: International Academic Publishers. (in Chinese)
- 陈瑞阳, 宋文琴, 梁国鲁, 林生华, 李秀兰, 安祝平. 1993. 中国主要经济植物基因组染色体图谱. 第一册. 中国果树及其野生近缘植

- 物染色体图谱. 北京: 万国学术出版社. (in Chinese)
- Chen Rui-yang, Song Wen-qin, Liang Guo-lu, Li Mao-xue, Li Xiu-lan, Chen Cheng-bin. 2003. Chromosome atlas of majior economic plants genome in China. Volume 3. Chromosome atlas of garden flower plants in china. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 陈瑞阳, 宋文琴, 梁国鲁, 李懋学, 李秀兰, 陈成彬. 2003. 中国主要经济植物基因组染色体图谱. 第三册. 中国园林花卉植物染色体图谱. 北京: 科学出版社.
- Chen Rui-yang, Song Wen-qin, Li Xiu-lan. 1979. A new method for preparing mitotic chromosomes from plants. Journal of Integrative Plant Biology, (3): 101 – 102. (in Chinese)
- 陈瑞阳, 宋文芹, 李秀兰. 1979. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法. 植物学报, (3): 101 – 102.
- Chirino M G, Rossi L F, Bressa M J, Luaces J P, Merani M S. 2014. Dipteran chromosomes: a simple method for obtaining high quality chromosomal preparations, 107 (11): 1792 – 1794.
- Cuadrado A, Golczyk H, Jouve N. 2009. A novel, simple and rapid nondenaturing FISH (ND-FISH) technique for the detection of plant telomeres. Potential used and possible target structures detected. Chromosome Research, 17 (6): 755 – 762.
- Dang J B, Zhao Q, Yang X, Chen Z, Xiang S Q, Liang G L. 2015. A modified method for preparing meiotic chromosomes based on digesting pollen mother cells in suspension. Molecular Cytogenetics, 8 (1): 80.
- Dechyeva D, Schmidt T. 2016. Fluorescent in situ hybridization on extended chromatin fibers for high-resolution analysis of plant chromosomes. Methods in Molecular Biology, 1429: 23 – 33.
- Deng C L, Qin R Y, Gao J, Cao Y, Li S F, Gao W J. 2012b. Identification of sex chromosome of spinach by physical mapping of 45S rDNAs by FISH. Caryologia Firenze, 65 (4): 322 – 327.
- Deng C L, Qin R Y, Wang N N, Cao Y, Gao J, Gao W J, Lu L D. 2012a. Karyotype of asparagus by physical mapping of 45S and 5S rDNA by FISH. Journal of Genetics, 91 (2): 209 – 212.
- Fatima B, Usman M, Khan M S. 2015. Identification of citrus polyploids using chromosome counts, morphological and SSR marker. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 52 (1): 107 – 114.
- Fransz P F, Stam M, Montijn B, Hoopen R T, Wiegant J, Kooter J M. 1996. Detection of single-copy genes and chromosome rearrangements in petunia hybrida by fluorescence in situ hybridization. Plant Journal, 9 (5): 767 – 774.
- Frischer M E, Floriani P J, Nierzwicki-Bauer S A. 1996. Differential sensitivity of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes used for fluorescence *in situ* hybridization is a result of ribosomal higher order structure. Canadian Journal of Microbiology, 42 (10): 1061 – 1071.
- Fu S, Chen L, Wang Y, Li M, Yang Z, Qiu L, Yan B J, Ren Z L, Tang Z X. 2015. Oligonucleotide probes for ND-FISH analysis to identify rye and wheat chromosomes. Scientific Reports, 5: 10552.
- Gaginskaia E R, Gruzova M N. 1975. Detection of the amplified rDNA in ovarial cells of some insects and birds by hybridization of nucleic acids in situ. Tsitologiia, 17 (10): 1132 – 1137.
- Gall L G, Pardue M L. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Genetics, 64 (2): 600 – 604.
- Gan Y M, Chen D, Liu F, Wang C, Li S, Zhang X, Wang Y, Peng R, Wang K. 2011. Individual chromosome assignment and chromosomal collinearity in *Gossypium thurberi*, *G. trilobum* and D subgenome of *G. barbadense* revealed by BAC-FISH. Genes Genet Syst, 86 (3): 165 – 174.
- Gill N, Hans C S, Jackson S. 2008. An overview of plant chromosome structure. Cytogenetic and Genome Research, 120 (3 – 4): 194 – 201.
- Gu Z, Xiao H. 2003. Physical mapping of the 18S-26S rDNA by fluorescent in situ hybridization (FISH) in *Camellia reticulata*, polyploid complex (Theaceae). Plant Science, 164 (2): 279 – 285.
- He Q Y, Cai Z X, Hu T H, Liu H J, Bao C L, Mao W H, Jin W W. 2015. Repetitive sequence analysis and karyotyping reveals centromere-associated DNA sequences in radish (*Raphanus sativus* L.). BMC Plant Biology, 15 (1): 105 – 117.
- Hernandez-Castellano S, Niccan G I, Delapena C. 2017. Localization of miRNAs by in situ hybridization in plants using conventional oligonucleotide probes. Methods in Molecular Biology, 1456: 51.
- Hoshi Y, Plader W, Malepszy S. 1999. Physical mapping of 45S rRNA gene loci in the cucumber (*Cucumis sativus* L.) using fluorescence in situ hybridization. Caryologia Firenze, 52 (1 – 2): 49 – 57.

- Hu F, Ren C, Bao R, Liu G. 2011. Chromosomes analysis of five diploid garden hyacinth species. *Scientia Horticulturae*, 131 (1): 82 – 87.
- Hu Feng-rong, Liu Guang-xin, Xi Meng-li, Wu Zhu-hua, Shi Ji-sen. 2009. Analysis of C-banding of root tip chromosome in *Lilium pumium*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 7 (3): 170 – 171. (in Chinese)
- 胡凤荣, 刘光欣, 席梦利, 吴祝华, 施季森. 2009. 细叶百合根尖染色体 C 带分析. *江苏农业科学*, 7 (3): 170 – 171.
- Iovene M G E, Carputo D, Jiang J, Simon P W. 2008. Major cytogenetic landmarks and karyotype analysis in *Daucus carota* and other apiaceae. *American Journal of Botany*, 95 (7): 793 – 804.
- Jackson S A, Wang M L, Goodman H M, Jiang J. 1998. Application of fiber-FISH in physical mapping of *Arabidopsis thaliana*. *Genome*, 41 (4): 566 – 572.
- Jang T, Parker J S, Weiss-Schneeweiss H. 2015. Structural polymorphisms and distinct genomic composition suggest recurrent origin and ongoing evolution of b chromosomes in the *Prospero autumnale* complex (hyacinthaceae). *New Phytologist*, 210 (2): 669 – 679.
- Jellen E N, Gill B S, Cox T S. 1994. Genomic in situ hybridization differentiates between A/D- and C-genome chromatin and detects intergenomic translocations in polyploid oat species (genus *Avena*). *Genome*, 37 (4): 613 – 618.
- John H, Birnstiel M, Jones K. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 223: 582 – 587.
- Jong J H D, Frans P, Zabel P. 1999. High resolution FISH in plants-techniques and applications. *Trends Plant Sci*, 4 (7): 258 – 263.
- Jiang X H. 2011. Karyotype analysis of three *Solanum* plants using combined PI-DAPI staining and double fluorescence in situ hybridization with 45S and 5S rDNA probes. *African Journal of Biotechnology*, 10 (82): 18948 – 18957.
- Karlov G I, Danilova T V, Horlemann C, Weber G. 2003. Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus* L.) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding. *Euphytica*, 132 (2): 185 – 190.
- Kato A, Vega J M, Han F, Joanthan C L, James A B. 2005. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (2): 148 – 154.
- Kempski H, Cowell J K. 1993. Detection of submicroscopic chromosomal deletions in aniridia patients using fluorescence in situ hybridization and a panel of cosmid covering the *WT1* gene. *Immunology*, 22 (2): 231 – 245.
- Kim E S, Punina E O, Rodionov A V. 2002. Chromosome CPD (PI/DAPI) and CMA/DAPI-banding patterns in *Allium cepa* L. *Russian Journal of Genetics*, 38 (4): 489 – 496.
- Kirov I V, Van L K, Khrustaleva L I. 2015. High resolution physical mapping of single gene fragments on pachytene chromosome 4 and 7 of *Rosa*. *BMC Genet*, 16 (1): 1 – 10.
- Kirov I V, Van L K, Riek J D, Keyser E D, Roy N V, Khrustaleva L. 2014a. Anchoring linkage groups of the *Rosa* genetic map to physical chromosomes with Tyramide-FISH and EST-SNP markers. *PLoS ONE*, 9 (4): 1 – 9.
- Kirov I, Divashuk M, Van L K, Soloviev A, Khrustaleva L. 2014b. An easy “steamdrop” method for high quality plant chromosome preparation. *Molecular Cytogenetics*, 7 (1): 1 – 10.
- Kitajima A, Yamasaki A, Habu T, Preedasuttijit B, Hasegawa K. 2007. Chromosome identification and karyotyping of Satsuma Mandarin by genomic in situ hybridization. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132 (6): 836 – 841.
- Knaap E V D, Sanyal A, Jackson S A, Tanksley S D. 2005. High-resolution fine mapping and fluorescence in situ hybridization analysis of sun, a locus controlling tomato fruit shape, reveals a region of the tomato genome prone to DNA rearrangements. *Genetics*, 168 (4): 2127 – 2140.
- Kumar S, Friebe B, Gill B S. 2014. Physical localization of rRNA genes by fluorescence in situ hybridization (FISH) and analysis of spacer length variants of 45S rRNA genes in some species of genus *Sesbania*. *Plant Systematics and Evolution*, 300 (8): 1793 – 1802.
- Laere K V, Huylenbroeck J V, Bockstaele E V. 2008. Karyotype analysis and physical mapping of 45S rRNA genes in *Hydrangea* species by fluorescence in situ hybridization. *Plant Breeding*, 127 (3): 301 – 307.
- Langer P R, Waldrop A A, Ward D C. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 78 (11): 6633 – 6637.
- Lavania U C, Basu S, Srivastava S, Mukai Y, Lavania S. 2004. In situ chromosomal localization of rDNA sites in “safed musli” *Chlorophytum ker-gawl* and their physical measurement by fiber FISH. *Journal of Heredity*, 96 (2): 155 – 160.
- Lee S H, Ryu J A, Do G S, Seo B B, Pak J H, Kim I S. 1998. Chromosome analysis by fluorescence in situ hybridization of callus-derived

- regenerants in *Allium cyaneum*. Plant Cell Reports, 18 (3): 209 – 213.
- Li Gui-fen, Liang Guo-lu, Liu Shun-quan. 2013. A study on karyotype analysis of genus *Eriobotrya* and it's application to systematic taxonomy. Acta Horticulturae Sinica, 40 (8): 1465 – 1474. (in Chinese)
- 李桂芬, 梁国鲁, 林顺全. 2013. 枇杷属植物核型分析及其在系统分类中的应用. 园艺学报, 40 (8): 1465 – 1474.
- Li K P, Wu Y X, Zhao H, Wang Y, Lu X M, Wang J M, Yong X, Zhong Y L, Yong H H. 2016. Cytogenetic relationships among *Citrullus* species in comparison with some genera of the tribe benincaseae (Cucurbitaceae) as inferred from rDNA distribution patterns. BMC Evolutionary Biology, 16 (1): 1 – 9.
- Li Zong-yun, Wu Xiao-ming, Wang Xiu-qin, Song Yun-chun. 2013. GISH analysis of *Brassica oleracea* and 5 related *Brassica* species. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 25 (4): 16 – 19. (in Chinese)
- 李宗芸, 伍晓明, 王秀琴, 宋运淳. 2013. 甘蓝与芸薹属 5 个近缘物种的基因组原位杂交分析. 中国油料作物学报, 25 (4): 16 – 19.
- Liang Guo-lu, Guo Qi-gao, Wang Wei-xing, Li Xiao-lin, Xiang Su-qiong, He Qiao, Li Yan-mei, Sun Hai-yan. 2012. A fast method to obtain triploid loquat. China Patent: CN102577940A. 2012-07-18. (in Chinese)
- 梁国鲁, 郭启高, 汪卫星, 李晓林, 向素琼, 何 桥, 李艳梅, 孙海燕. 2012. 一种快速获得三倍体枇杷的方法. 中国专利: CN102577940A. 2012-07-18.
- Liang Guo-lu, Li Xiao-lin, Kang Hou-sheng. 1990. High-resolution G-banding in tea chromosome. Acta Genetica Sinica, 17 (2): 94 – 97. (in Chinese)
- 梁国鲁, 李晓林, 康厚生. 1990. 茶树染色体高分辨 G 带带型研究. 遗传学报, 17 (2): 94 – 97.
- Liu B, Qi L W, Chen R Y, Song W Q. 2007. Multicolor fluorescence in situ hybridization with combinatorial labeling probes enables a detailed karyotype analysis of *larix principis-rupprechtii*. Biological Research, 40 (1): 23 – 28.
- Liu Hui-min, Chen Ya-jun, Lu Gui-e, Li Li, Wu Feng-zhi. 2010. Karyotype features of 17 species of *Spiraea* and karyotype parameters analysis. Acta Horticulturae Sinica, 37 (9): 1456 – 1462. (in Chinese)
- 刘慧民, 陈雅君, 吕贵娥, 李 丽, 吴凤芝. 2010. 17 种绣线菊核型特征及核型参数分析. 园艺学报, 37 (9): 1456 – 1462.
- Liu J Y, She C W, Hu Z L, Xiong Z Y, Liu L H, Song Y C. 2004. A new chromosome fluorescence banding technique combining DAPI staining with image analysis in plants. Chromosoma, 113 (1): 16 – 21.
- Liu W L, Shih H C, Weng I S, Ko Y Z, Tsai C C, Chou C H, Chiang Y A C. 2016. Characterization of genomic inheritance of intergeneric hybrids between *Asocenda* and *Phalaenopsis* cultivars by GISH, PCR-RFLP and RFLP. PLoS ONE, 11 (4): 1 – 14.
- Liu Xue-sheng, Chen Long, Wang Jin-xin, Li Li, Peng Jian-ying. 2013. Discovery and identification of natural triploid ploidy of Chinese jujube cultivar 'Pingguozao'. Acta Horticulturae Sinica, 40 (3): 426 – 432. (in Chinese)
- 刘学生, 陈 龙, 王金鑫, 李 莉, 彭建营. 2013. '苹果枣' 自然三倍体倍性的发现与鉴定. 园艺学报, 40 (3): 426 – 432.
- Liu Yan-yang, Cui Cheng-qi, Mei Hong-xian, Wu Ke, Zheng Yong-zhan. 2013. Exploration and application of non-denaturing FISH on chromosomes research in sesame (*Sesamum indicum* L.). Scientia Agricultura Sinica, 46 (17): 3729 – 3735. (in Chinese)
- 刘艳阳, 崔承齐, 梅鸿献, 武 轲, 郑永战. 2013. 非变性原位杂交技术在芝麻染色体识别上的初探与运用. 中国农业科学, 46 (17): 3729 – 3735.
- Loannou D, Tempest H G, Skinner B M, Thornhill A R, Ellis M, Griffin D K. 2009. Quantum dots as new-generation fluorochromes for FISH: an appraisal. Chromosome Research, 17 (4): 519 – 530.
- Lou Q F, Iovene M, Spooner D M, Buell C R, Jiang J J. 2010. Evolution of chromosome 6 of *Solanum* species revealed by comparative fluorescence in situ hybridization mapping. Chromosoma, 119 (4): 435 – 442.
- Lou Q F, Zhang Y X, He Y H, Li L, Jia L, Cheng C Y, Guan Y, Yang S Q, Chen J F. 2014. Single-copy gene-based chromosome painting in cucumber and its application for chromosome rearrangement analysis in *Cucumis*. Plant Journal, 78 (1): 169 – 179.
- Lysak M A, Fransz P F, Ali H B M, Ingo S. 2001. Chromosome painting in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 28 (6): 689 – 697.
- Maghuly F, Schmoellerl B, Temsch E M, Laimer M. 2010. Genome size, karyotyping and FISH physical mapping of 45S and 5S genes in two cherry rootstocks: *Prunus subhirtella* and *Prunus incise* × *serrula*. Journal of Biotechnology, 149 (1): 88 – 94.

- Marasek A, Mizuochi H, Okazaki K. 2006. The origin of Darwin hybrid *Tulips* analyzed by flow cytometry, karyotype analysis and genomic in situ hybridization. *Euphytica*, 151 (3): 279 - 290.
- Matera A G, Ward D C. 1992. Oligonucleotide probes for the analysis of specific repetitive DNA sequences by fluorescence *in situ* hybridization. *Human Molecular Genetics*, 1 (7): 535 - 539.
- Matoba H, Uchiyama H, Koyama T. 2001. Physical mapping of 5S and 18S rDNA in lettuce, *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). *Chromosome Science*, 5: 73 - 77.
- Mehrotra S, Goyal V, Gautam V K. 2015. Unraveling the chromosomal organization of satellite repeats using fluorescence in situ hybridization and high resolution fiber-FISH mapping provides insights into the genome evolution in Centaureinae (Asteraceae). *Chromosome Research*, 23 (2): 397 - 398.
- Miyamoto J, Ohmido N, Fukui K. 1999. Physical mapping of 18s rDNA by fluorescence in situ hybridization (FISH) in the three species of the genus *Paris* L., Liliaceae. *Cytologia*, 64 (2): 175 - 180.
- Miyashita T, Hoshino Y. 2015. Interploid and intraploid hybridizations to produce polyploid Haskap (*Lonicera caerulea* var. *emphyllocalyx*) plants. *Euphytica*, 201 (1): 15 - 27.
- Moraes A P D, Filho W D S S, Guerra M. 2007. Karyotype diversity and the origin of grape fruit. *Chromosome Research*, 15 (1): 115 - 121.
- Namekawa S H, Lee J T. 2011. Detection of nascent RNA, single-copy DNA and protein localization by immuno-FISH in mouse germ cells and preimplantation embryos. *Nature Protocol*, 6 (3): 270 - 284.
- Nathewet P, Yanagi T, Iwastubo Y, Sone K, Takamura T, Okuda N. 2009. Improvement of staining method for observation of mitotic chromosomes in octoploid strawberry plants. *Scientia Horticulturae*, 120 (3): 431 - 435.
- Nguyen T X, Lee S I, Rai R, Kim N S, Kim J H. 2016. Ribosomal DNA locus variation and RMAP analysis of the diploid and triploid complexes of *Lilium lancifolium*. *Genome*, 59 (8): 551 - 564.
- Nowicka A, Grzebelus E, Grzebelus D. 2016. Precise karyotyping of carrot mitotic chromosomes using multicolour-FISH with repetitive DNA. *Biologia Plantarum*, 60 (1): 25 - 36.
- Ostergren G, Heneen W K. 1962. A squash technique for chromosome morphological studies. *Hereditas*, 48 (1 - 2): 332 - 341.
- Pardue M L, Gall J G. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168 (3937): 1356 - 1358.
- Parker L M, Hutchinson M R. 2016. Fluorescent nanodiamond and lanthanide labelled in situ hybridization for the identification of RNA transcripts in fixed and clarity-cleared central nervous system tissues (Conference Presentation). *Spie Bios*, 9690: 969017.
- Pedersen C, Langridge P. 1997. Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH. *Genome*, 40 (5): 589 - 593.
- Rayburn A L, Gill B S. 1985. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes. *J Hered*, 76 (2): 78 - 81.
- Rho I R, Hwang Y J, Lee H I, Lee C H, Lim K B. 2012. Karyotype analysis using FISH (fluorescence in situ hybridization) in *Fragaria*. *Scientia Horticulturae*, 136 (2): 95 - 100.
- Ronildo C W, Roberto C C. 2006. A high quality chromosome preparation from cell suspension aggregates culture of *Coffea canephora*. *Cytologia*, 71 (3): 243 - 249.
- Schimak M P, Kleiner M, Wetzel S, Liebecke M, Dubilier N, Fuchs B M. 2015. MiL-FISH: multilabeled oligonucleotides for fluorescence in situ hybridization improve visualization of bacterial cells. *Applied & Environmental Microbiology*, 82 (1): 62 - 70.
- Scholes D. 2012. Book Review Plant cytogenetics: Genome structure and chromosome function. *Cytometry Part A*, 81A (9): 815 - 817.
- Schrock E, Du M S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith M A, Ning Y, Ledbetter D H, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Tied T. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273 (5274): 494 - 497.
- Sharma A K, Lavania U C. 2016. Chromosome identification-evolving technology from elucidating condensed chromatin to DNA molecules. *The Nucleus*, 58 (3): 159 - 163.
- She C W. 2016. Karyotype analysis of *Alocasia cucullata* (Lour.) schott using fluorochrome banding and fluorescence in situ hybridization with rDNA probes. *Caryologia-Firenze*, 69 (3): 1 - 5.
- She Chao-wen, Song Yun-chun. 2006. Progress of plant FISH technique and its application in the analysis of plant genome. *Journal of Plant*

- Science, 24 (4): 365 - 376. (in Chinese)
- 余朝文, 宋运淳. 2006. 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. 植物科学学报, 24 (4): 365 - 376.
- Shearer L A, Anderson L K, Jong H D, Smit S, Goicoechea J L, Roe B A, Hua A, Giovannoni J J, Stack S M. 2014. Fluorescence in situ hybridization and optical mapping to correct scaffold arrangement in the tomato genome. G3-Genes Genomes Genetics, 4 (8): 1395 - 1405.
- Solovei I, Cavallo A, Schermelleh L, Jaunin F, Scasselati C, Cmarko D, Cremer R, Fakan S, Cremer T. 2002. Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH). Experimental Cell Research, 276 (1): 10 - 23.
- Speicher M R, Ballard S G, Ward D C. 1996. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. Nature Genetics, 12 (4): 368 - 375.
- Stoecker K, Dorninger C, Daims H, Michael Wagner. 2010. Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization (dope-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. Applied and Environmental Microbiology, 76 (3): 922 - 926.
- Szinay D, Wijnker E, Berg R V D, Visser R G F, Jong H D, Bai Y. 2012. Chromosome evolution in *Solanum*, traced by cross-species BAC-FISH. New Phytologist, 195 (3): 688 - 698.
- Tonosaki K, Akaba M, Bang S W, Kitashiba H, Kaneko Y, Nishio T. 2014. The use of species-specific DNA markers for assessing alien chromosome transfer in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*-monosomic additions of *Raphanus sativus*. Molecular Breeding, 34 (3): 1301 - 1311.
- Tu Hong-yan, Zhang Ai-ling, Xiao Wang, Chen Dan, Zeng Hai-min. 2016. Optimization of chromosome preparation technology in Zingiberaceae plants. Chinese Journal of Tropical Crops, 37 (5): 1017 - 1021. (in Chinese)
- 涂红艳, 张爱玲, 肖 望, 陈 丹, 曾海敏. 2016. 姜科植物染色体制片方法的优化. 热带作物学报, 37 (5): 1017 - 1021.
- Wang Jin-yao, Yu Chao, Luo Le, Wang Yun-hong, Sui Yun-ji, Guo Run-hua, Pan Hui-tang, Zhang Qi-xiang. 2014. Karyotype analysis of *Rosa laxa*, modern Rose and their interspecific hybrids. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 34 (3): 488 - 494. (in Chinese)
- 王金耀, 于 超, 罗 乐, 王蕴红, 隋云吉, 郭润华, 潘会堂, 张启翔. 2014. 疏花蔷薇与当代月季品种及其杂交后代的核型分析. 西北植物学报, 34 (3): 488 - 494.
- Wang San-hong, Zhang Zhen, Cai Bin-hua, Qu Shen-chun. 2014. Establishment and application of double color DNA fiber fluorescence in situ hybridization using bacterium artificial chromosomes in apple. Scientia Agricultura Sinica, 47 (11): 2205 - 2213. (in Chinese)
- 王三红, 章 镇, 蔡斌华, 渠慎春. 2014. 苹果细菌人工染色体双色 DNA 纤维荧光原位杂交体系的建立及应用. 中国农业科学, 47 (11): 2205 - 2213.
- Wu Chun-hong, Fan Shuang-li, Wang Li-jun. 2014. Fluorescence in situ hybridization and karyotyping analysis of rDNA and Cot-1 DNA in *Brassica campestris*. Journal of Plant Physiology, 50 (8): 1216 - 1222. (in Chinese)
- 吴春红, 范双莉, 王力军. 2014. 白菜 rDNA 及 Cot-1 DNA 的荧光原位杂交及其核型分析. 植物生理学报, 50 (8): 1216 - 1222.
- Xiang Su-qiong, Wang Wei-xing, Liang Guo-lu. 2007. Chromosome localization of 45S rDNA in different ploidy citrus grandis by fluorescence in situ hybridization. Acta Horticulturae Sinica, 34 (1): 75 - 80. (in Chinese)
- 向素琼, 汪卫星, 梁国鲁. 2007. 45SrDNA 在不同倍性沙田柚染色体上的荧光原位杂交分析. 园艺学报, 34 (1): 75 - 80.
- Xie Wen-mei, Zhou Feng-juan, Wang Qiang, Zhao Xiao-rong. 2015. Research progress of the application of chromosomal abnormality detection in prenatal diagnosis. Journal of Clinical Laboratory Science, 33 (2): 134 - 136. (in Chinese)
- 谢文美, 周凤娟, 王 强, 赵小荣. 2015. 染色体异常检测技术在产前诊断应用中的研究进展. 临床检验杂志, 33 (2): 134 - 136.
- Xu Yan-hao, Yang Fei, Cheng You-lin, Ma Lu, Wang Jian-bo, Li Li-jia. 2007. Comparative analysis of rDNA distribution in metaphase chromosomes of Cucurbitaceae species. Hereditas, 29 (5): 614 - 620. (in Chinese)
- 徐延浩, 杨 飞, 程有林, 马 璐, 王建波, 李立家. 2007. 45S rDNA 和 5S rDNA 在南瓜、丝瓜和冬瓜在染色体上的比较定位. 遗传, 29 (5): 614 - 620.
- Yamamoto M, Kubo T, Tominaga S. 2005. CMA banding patterns of chromosome of mid-maturing and late-maturing citrus and acid citrus grown in Japan. Engei Gakkai Zasshi, 74 (6): 476 - 478.
- Yang Hui-yong, Zhao Wen-bo, Wang Hua-yun, Zhang Fu-yao. 2015. Genetic mapping of the resistance gene for the Race 4 of *Sphacelotheca reiliana* in *Sorghum*. Scientia Agricultura Sinica, 48 (8): 1484 - 1491. (in Chinese)
- 杨慧勇, 赵文博, 王花云, 张福耀. 2015. 高粱丝黑穗病菌 4 号生理小种抗性基因的定位. 中国农业科学, 48 (8): 1484 - 1491.

- Yasuda K, Yahata M, Kunitake H. 2015. Phylogeny and classification of kumquats (*Fortunella* spp.) inferred from CMA karyotype composition. Horticulture Journal, 85 (2): 115 - 121.
- Yonemori K, Nishiyama K, Choi Y.A, Souza M, Drew R. 2010. Physical mapping of 5S and 45S rDNAs by fluorescent in situ hybridization in mango (*Mangifera indica* L.). Acta Horticulturae, 864 (864): 133 - 140.
- Yu Feng, Dou Quan-wen. 2013. Physical localization of E180 repetitive sequence and 45S ribosomal gene by fluorescence in situ hybridization and fluorescence pattern analysis in *Medicago sativa* L. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 29 (5): 1114 - 1119. (in Chinese)
- 喻 风, 窦全文. 2013. 紫花苜蓿 E180 序列和 45S 核糖体基因的物理定位及染色体荧光分带. 江苏农业学报, 29 (5): 1114 - 1119.
- Yu H, Liang H, Kofo K D. 1990. Analysis of C-banding chromosome patterns of *Sorghum*. Crop Sci, 31 (6): 1524 - 1527.
- Yunis J J. 1976. High-resolution of human chromosomes. Science, 191 (4233): 1268 - 1270.
- Zeng Jia-shi, Wang Dong-xu, Wu Yang-qing, Guo Xiao-yu, Zhang Ya-zhou, Chen Xiao-Ping. 2015. The karyotype analysis of *Gazania rigens* varieties. Acta Horticulturae Sinica, 42 (12): 2512 - 2518. (in Chinese)
- 曾佳诗, 王东旭, 吴阳清, 郭小宇, 张亚洲, 陆小平. 2015. 勋章菊品种核型分析. 园艺学报, 42 (12): 2512 - 2518.
- Zhang S C, The-Hung B, Isabel C, Lennart I, Stellan H, Karl-Martin L. 1981. A girl with an interstitial deletion of the short arm of chromosome 3 studied with a high-resolution banding technique. Human Genetics, 59 (2): 178 - 181.
- Zhang Ting, Jian Hong-ying, Tian Min, Wang Qi-gang, Zhang Hao, Yan Hui-jun, Qiu Xian-qin, Tang Kai-xue. 2014. Physical location of 45S rDNA and 5S rDNA in the genomes of three wild rose species. Acta Horticulturae Sinica, 41 (5): 994 - 1000. (in Chinese)
- 张 婷, 蹇洪英, 田 敏, 王其刚, 张 颢, 晏慧君, 邱显钦, 唐开学. 2014. 蔷薇属 3 个野生种中 45S rDNA 和 5S rDNA 的物理定位. 园艺学报, 41 (5): 994 - 1000.
- Zhang Yu-fang, Yuan Miao-bao. 1995. A method for rapid preparation of plant chromosome by enzymatic hydrolysis and low permeability. Hereditas, (5): 48 - 48. (in Chinese)
- 张毓芳, 袁妙葆. 1995. 一种快速酶解去壁低渗制备植物染色体标本的方法. 遗传, (5): 48 - 48.
- Zhang Yun-xia, Lou Qun-feng, Li Zi-ang, Wang Jun-zhu, Zhang Zhen-tao, Li Ji, Chen Jin-feng. 2015. Rapid karyotype analysis of cucumber varieties based on genomic in situ hybridization. Scientia Agricultura Sinica, 48 (2): 398 - 406. (in Chinese)
- 张云霞, 娄群峰, 李子昂, 王筠竹, 张振涛, 李 季, 陈劲枫. 2015. 基于基因组原位杂交快速构建黄瓜变种间核型. 中国农业科学, 48 (2): 398 - 406.
- Zheng J S, Zhang S N, Sun C Z, Hou X L. 2014. Karyotype analysis of autotetraploidy in *Brassica rapa* ssp. *chinensis*. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 89 (1): 23 - 28.
- Zhong Shao-bin, Xu Jie, Jiang Jian-dong, Yao Jing-xia. 1989. Identification of 21 pairs of chromosomes and chromosome structure variation in wheat by C-banding technique. Acta Genetica Sinica, 16 (6): 415 - 419. (in Chinese)
- 钟少斌, 徐 杰, 蒋建东, 姚景侠. 1989. 用 C - 带技术识别小麦 21 对染色体及染色体结构变异. 遗传学报, 16 (6): 415 - 419.
- Zhong X B, Bodeau J, Fransz P F, Williamson V M, Kammen A V, Jong J H D, Zabel P. 1999. FISH to meiotic pachytene chromosomes of tomato locates the root-knot nematode resistance gene Mi-1 and the acid phosphatase gene Aps-1 near the junction of euchromatin and pericentromeric heterochromatin of chromosome arms 6S and 6L, respectively. Theoretical & Applied Genetics, 98 (34): 365 - 370.
- Zhong X B, Fransz P F, Wennekes-Eden J, Ramanna M S, Van Kammen A, Zabel P, Hans De Jong J. 1998. FISH studies reveal the molecular and chromosomal organization of individual telomere domains in tomato. Plant Journal, 13 (4): 507 - 517.
- Zhou Shu-jun, Jaap van Tuyl, Zang De-kui, Xia Yi-ping, Li Fang. 2008. Physical localization of 45S rDNA on the chromosomes of 4 species of the genus *Lilium*. Acta Horticulturae Sinica, 35 (6): 859 - 862. (in Chinese)
- 周树军, Jaap van Tuyl, 臧德奎, 夏宜平, 李 方. 2008. 45S rDNA 在 4 种百合属植物染色体上的物理定位. 园艺学报, 35 (6): 859 - 862.
- Zou Qian. 2013. The preparation of a new type of nucleic acid probe based on quantum dots and its use in in situ hybridization [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 邹 铅. 2013. 量子点标记的新型核酸探针的制备及其在原位杂交中的应用 [硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.