

欧洲山杨一号染色体显微分离、原位杂交分析及特异文库的构建

张守攻^{1*} 张勇^{1, 2*} 刘博² 李秀兰² 宋文芹² 韩素英¹ 齐力旺^{1**}

(¹ 中国林业科学院林业研究所细胞生物学实验室, 北京 100091; ² 南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要: 以欧洲山杨 (*Populus tremula*) 根尖细胞为材料, 采用玻璃针分离法, 通过显微操作器成功地分离出一号染色体。将分离到的单条染色体去蛋白、*Sau3A* 酶切, 并在染色体 DNA 片段两端加上 *Sau3A* 人工接头, 进行两轮 PCR 扩增, 得到了 200~3 000 bp 的 DNA 扩增片段。以 DIG-dUTP 标记的欧洲山杨基因组 DNA 为探针进行 Southern 杂交, 结果表明显微分离出的染色体扩增片段与欧洲山杨基因组 DNA 同源, 从而证明一号染色体 DNA 确实已被成功地扩增。以一号染色体第 2 轮 PCR 产物为探针进行荧光原位杂交, 发现荧光信号较密集的分布于一号染色体, 但同时荧光信号也出现在其它染色体的着丝粒及端粒区域。对第 2 轮 PCR 产物进行克隆, 构建单条染色体 DNA 文库, 经分析, 该微克隆文库包含约 3×10^5 个重组子。随机挑选 160 个重组子进行鉴定, 证明该文库的插入片段主要介于 230~2 200 bp 之间, 平均 800 bp。该文库的构建为欧洲山杨 1 号染色体特异探针的筛选、遗传图谱的构建、重要基因的克隆等研究奠定了基础。

关键词: 欧洲山杨; 染色体; 显微分离; 特异性文库; 荧光原位杂交

中图分类号: S 678.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 04-0794-07

Microdissection, in Situ Analysis and Microcloning of Poplar Chromosome 1

Zhang Shougong^{1*}, Zhang Yong^{1, 2*}, Liu Bo², Li Xiulan², Song Wenqin², Han Suying¹, and Qi Liwang^{1**}

(¹ Laboratory of Cell Biology, the Research Institute of Forestry, the Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China;

² College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: This study was performed to establish a method for single chromosome microdissection and microcloning in forest plants using poplar (*Populus tremula*) as a model. An individual chromosome 1 was microdissected from the metaphase spreads of poplar root-tip cells with the fine glass needle controlled by a micromanipulator. The dissected chromosome was amplified in vitro by the *Sau3A* linker adaptor mediated PCR technique, by which 200 bp to 3 000 bp smear DNA fragments were obtained. Southern hybridization result showed the PCR products from the single poplar chromosome were homogeneous with the poplar genomic DNA, indicating that DNA from the single chromosome has been successfully amplified. Then, the second round PCR products were used as a complex probe mixture for fluorescent in situ hybridization (FISH) on the metaphase spreads of poplar. Hybridization signals were observed, mainly, along the entire chromosome 1, at the same time, signals were also present on telomeric and centromeric regions of other chromosomes. The second round PCR products from the single chromosome 1 were cloned into T-easy vectors to generate a DNA library of the chromosome 1. Approximately 3×10^5 recombinant clones were obtained. Evaluation based on 160 randomly selected clones showed that the sizes of the cloned inserts varied from 230 bp to 2 200 bp with an average of 800 bp. This library will facilitate specific probe screening, molecular map construction, gene tagging and gene cloning on this chromosome.

Key words: *Populus tremula*; Chromosome; Microdissection; Chromosome specific DNA library; Fluorescent in situ hybridization

收稿日期: 2005-08-01; 修回日期: 2005-12-01

基金项目: 国家 '973' 资助项目 (G19990160); 国家自然科学基金资助项目 (3057157) 资助

*表示同等贡献

** 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: lwqi@caf.ac.cn)

杨树是重要的用材树种,并在城市道路绿化中具有防沙滞尘功能,因此也是园林绿化的首选树种。杨属 (*Populus*) 植物由于具有基因组构成精简 (单倍体 ($n=19$) 约含 500 ± 20 Mbp); 物种丰富,分布广泛;遗传转化容易,再生能力强,易于无性繁殖;已构建相对饱和的各种连锁图,获得大量与目标性状相关的分子标记等生物学特性,成为研究木本植物的首选模式物种^[1~3]。自2002年起,美国能源部 (US Department of Energy's Office, DOE) 下属的“基因组研究合作”项目组 (Joint Genome Institute, JGI) 与多家研究机构启动了杨属植物基因组计划。目前,已覆盖全基因组 7.5 倍,完成了 4.8 G 碱基的测序任务。

由于杨树染色体识别与分离的困难,杨树基因组计划采用以杨树基因组总 DNA 建立基因文库的方案,采用“全基因组鸟枪法”(A whole-genome shotgun approach) 进行测序,与人类基因组计划采取的分离纯化单条染色体建库的策略有相当大的差距。以总 DNA 建库的方法前期工作容易获得大量克隆片段,读出杨树基因组全部核苷酸顺序,但后期确定某一片段在染色体上的位置及克隆功能基因,会遇到很大困难。由于其文库容量多达数百万个重组子,加上不同克隆片段之间可能出现部分同源性,有不少筛选工作会没有结果。因此,构建杨树基因组单条染色体和特定区 DNA 文库,筛选每条染色体特异性分子标记,对推进杨树基因组计划的进程具有重要理论意义和应用价值。

作者在对欧洲山杨 (*Populus tremula*) 染色体识别的基础上,对欧洲山杨一号染色体进行了显微分离、Southern 杂交与染色体荧光原位杂交,结果表明,显微分离出的单条染色体扩增片段与欧洲山杨基因组 DNA 同源。以接头介导的 PCR (Linker adaptor mediated PCR, LA-PCR) 微克隆方法对其进行克隆,建立了一号染色体特异文库,并对该文库进行了分析。

1 材料与方法

取中国林业科学院杨树种质资源圃提供的欧洲山杨 (*Populus tremula*) 一年生枝条,70%乙醇消毒,25℃培养箱中水培养。采用宋文芹等^[4]和张守攻等^[5]的去壁低渗法制备欧洲山杨染色体标本。

1.1 一号染色体显微切割

确定分离的细胞后,首先进行核型分析,确定染色体序号。显微分离的仪器为经作者改装的安装在防震台上的液压传动式显微操作仪 (Narishige, Japan)。用硅化的直径 $0.5 \mu\text{m}$ 左右的微细玻璃针将分离的染色体直接放在微量离心管底部, -20°C 保存备用。具体操作方法参照文献 [6]。

1.2 单染色体 PCR 扩增

制备 *Sau3A* 接头所用的两个引物 (24 个碱基和 10 个碱基的寡核苷酸片段) 由上海 Sangon 公司合成,序列分别为: LA-PCR-24: 5'-CGGGAA TTCTGGCTCTGCGACATG-3'; LA-PCR-10: 5'-GATCCATGTC-3'。接头的制备参照文献 [7] 进行。

单染色体 DNA 的限制酶酶切、接头连接、PCR 扩增按文献 [6, 8] 的方法进行。为了避免外源 DNA 的污染,整个单染色体体外扩增操作过程均在无菌条件下进行,并设立严格的不含染色体 DNA 的阴性对照和以 $1 \mu\text{g}$ 基因组 DNA 为模板的阳性对照。

1.3 Southern 杂交分析

欧洲山杨基因组 DNA 的提取和纯化采用 CTAB 方法^[9]。DNA 的纯度和浓度用 0.8% 琼脂糖凝胶和 ND-1000 分光光度仪 (NanoDrop, America) 检测。取适量的基因组 DNA 用 *EcoR* I 于 37℃ 酶切过夜,与染色体 LA-PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, Southern 印迹过程参考文献 [10]。以 *EcoR* I 酶切并经 DIG-dUTP 随机引物标记法标记的欧洲山杨基因组 DNA 为探针进行 Southern 杂交,具体杂交、检测过程详见 Roche DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 说明。

1.4 荧光原位杂交分析

通过随机引物法用 DIG (Digoxigenin-dUTP, Roche) 标记的第 2 轮 PCR 产物作为探针,在欧洲山杨根尖有丝分裂中期染色体标本上进行原位杂交。杂交及杂交后的信号按 Zhang 等^[11]的方法检测。

1.5 染色体特异性文库的构建及分析

单染色体的第2轮 LA-PCR产物 (50 μ L) 采用 UN Q-10柱纯化 (Sangon, 上海), 溶于 50 μ L 无菌水。取 2 μ L 与 T-Vector (Sanong, 上海) 16 连接 16 h, 1/10连接产物转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞。100 μ L 涂布于含 IPTG X-gal和 Amp的 LB平板上, 37 培养过夜, 筛选重组克隆。随机挑选 160个白斑克隆, 碱裂解法制备质粒 DNA, 用载体上 M13正/反向通用引物进行 PCR扩增。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR产物, 与已知浓度和大小的 DNA标准比较, 估算插入片段的大小和浓度。

2 结果与分析

2.1 欧洲山杨染色体观察及目标染色体的确定

采用改进的去壁低渗法制片^[4,5], 获得了分散良好的中期染色体分裂相 (图1)。观察了 20个不同根尖的细胞染色体, 结果表明欧洲山杨基因组含 19对同源染色体, $2n = 2x = 38$ 。

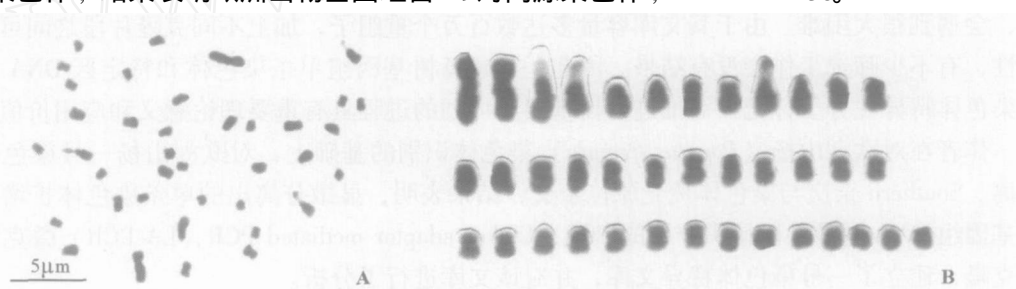


图1 欧洲山杨中期分裂相 (A) 及核型图 (B)

Fig. 1 Image of *Populus tremula* somatic metaphase chromosomes (A) and the karyotype (B)

2.2 欧洲山杨一号染色体的显微分离

杨树染色体较小, 前中期染色体长度 0.33 ~ 2.2 μ m, 大多数相邻染色体之间差异不显著, 因此染色体识别比较困难。欧洲山杨一号染色体为最大的 1对对着丝粒染色体, 在 100 \times 油镜下可清晰分辨。选择分散良好的中期染色体分裂相, 确定适于分离的目标染色体。

将制好的微细玻璃针固定于操作动力臂上, 用改装的显微镜镜台推进器 XY轴, 调节微切针至待分离染色体的大约位置, 操纵显微操作器的微调螺旋杆, 使玻璃针对准待分离的染色体, 换成 100 \times 油镜, 在目镜视野监视下进行染色染色体分离, 将黏附有目标染色体的玻璃针尖折断于 0.5 mL Eppendorf管底。图2显示从 1个分裂相中分离单条染色体的过程。

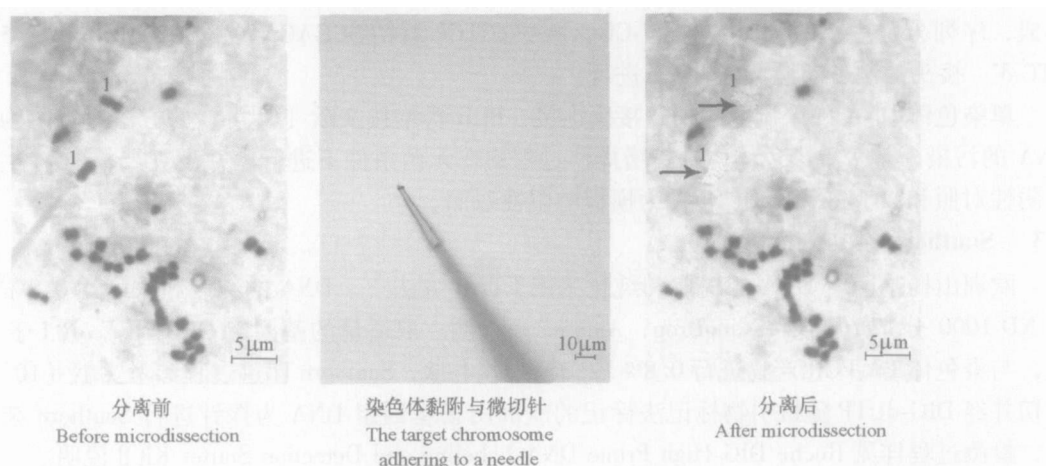


图2 欧洲山杨一号染色体显微分离
箭头示一号染色体

Fig. 2 Procedure of isolation of an individual chromosome 1 (indicated by arrow head) in poplar

2.3 欧洲山杨一号染色体的 LA-PCR扩增及 Southern杂交分析

将分离的一号染色体置于 0.5 mL Eppendorf管中, 每管 1 条, 经蛋白酶 K消化, *Sau*3A 酶切, *Sau*3A 接头连接, 并经两轮 PCR扩增, 结果如图 3, A 所示。首轮扩增后, 可见有微量的 DNA 散布在泳道中, 扩增产物大小从 200 ~ 1 500 bp 不等。第 2 次扩增后, 电泳信号明显增强, 弥散形的条带在泳道中清晰可见, DNA 片段长度大约在 200 ~ 3 000 bp 之间, 且在 300 ~ 1 200 bp 范围内信号相对集中。以基因组 DNA 为模板的阳性对照亦能扩增出类似的 DNA, 而在阴性对照中无扩增产物, 表明在整个微切和 PCR 扩增过程, 虽涉及到大量的酶切、连接反应, 但并未带来明显的外源 DNA 污染。

欧洲山杨一号染色体二轮扩增产物及阴性对照、阳性对照二轮扩增产物与经 *Eco*R 消化的杨树基因组 DNA 电泳。转膜后, 与 DIG-dUTP 标记的杨树基因组 DNA 探针进行杂交, 发现杨树基因组 DNA、阳性对照及一号染色体的扩增产物均出现了明显的杂交信号 (图 3, B)。与此同时, 阴性对照则无任何杂交信号, 说明单条染色体的扩增产物确实来自杨树基因组。

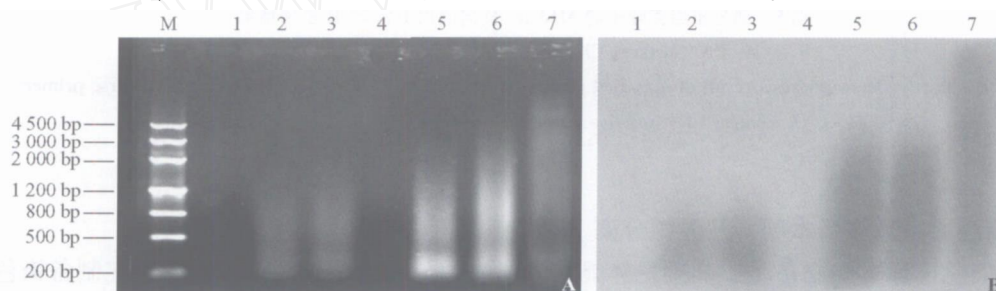


图 3 欧洲山杨一号染色体的 LA-PCR 扩增 (A) 及 Southern 杂交检测 (B)

M: DNA marker; 1 ~ 3: 一次扩增, 4 ~ 6: 二次扩增 (1, 4: 阴性对照; 2, 5: 一号染色体; 3, 6: 阳性对照); 7: 基因组酶切产物。

Fig 3 LA-PCR amplification with microdissected chromosomes 1 (A) and southern blot hybridization analysis (B)

M: DNA marker; 1 - 3: The first round PCR, 4 - 6: The second round PCR (1, 4: Negative control; 2, 5: The single chromosome 1 as DNA template; 3, 6: The positive control used 1 pg genomic DNA as template); 7: *Eco*R I digested genomic poplar DNA).

2.4 PCR产物的荧光原位杂交分析

由于 Southern 杂交的结果仅能证实扩增产物来自原基因组, 没有提供直接的证据证实扩增产物是来自原分离染色体。本研究用 DIG-dUTP 标记的第二轮 PCR 产物作为探针, 在欧洲山杨根尖细胞有丝分裂中期染色体标本上进行原位杂交。如图 4 所示, 分裂相中的两条一号染色体均出现明显的黄色杂交信号, 信号均匀分布于整条染色体上, 色彩均匀, 未见背景干扰。初步证实扩增产物来自被分离的染色体, 而不是来自基因组的其它染色体。同时, 在其它染色体着丝粒及端粒区域也可检测到一定强度的杂交信号, 说明这些部位存在一号染色体的同源重复序列。

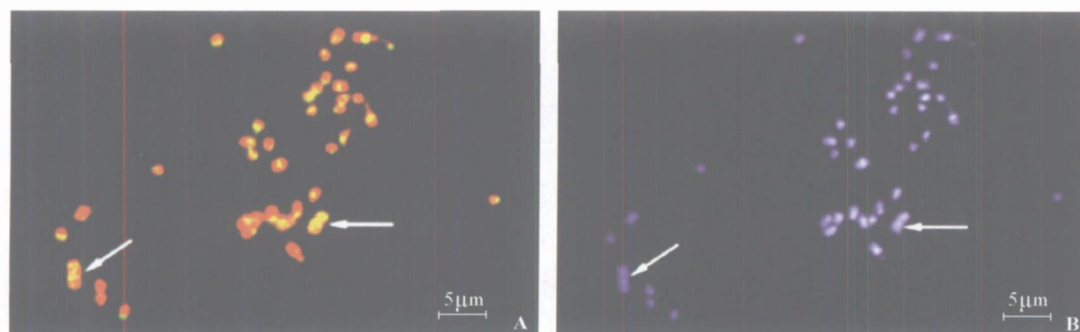


图 4 染色体荧光原位杂交结果

A: 一号染色体二轮 LA-PCR 产物为探针的 FISH 结果; B: 染色体 DAPI 复染结果。

Fig 4 Result of FISH using microdissection amplification products as probe

A: Metaphase spread hybridized with labeled LA-PCR products of chromosome 1; B: The chromosomes staining with DAPI

Arrows indicate the chromosome 1.

2.5 单染色体文库的特性分析

回收纯化并克隆目标染色体的第二轮 PCR 产物, 转化大肠杆菌, 得到 3×10^5 个重组克隆。随机挑选 160 个白斑克隆子, 碱裂解法小量制备质粒 DNA, 用载体上的 M13 正/反向通用引物进行常规 PCR 扩增。结果如图 5 所示, 插入片段大小为 220 ~ 2 300 bp, 平均长度 800 bp。

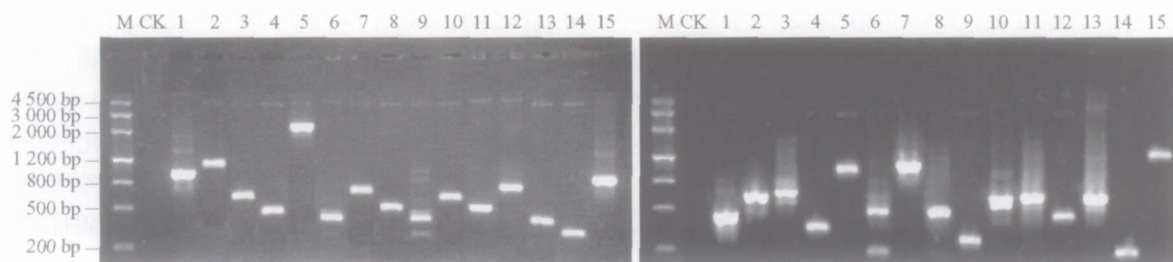


图 5 部分重组克隆子的 M13 正/反向通用引物 PCR 扩增结果

M: DNA marker; CK: 阴性对照; 1~15: 克隆样品。

Fig 5 Partly electrophoresis result of amplified cloning fragments by PCR using M13 forward/reverse primers

M: DNA marker; CK: Negative control; 1 - 15: PCR products of positive clone

3 讨论

3.1 杨树高质量染色体标本制备及显微分离

高质量染色体标本的制备是影响染色体显微分离成功与否的重要因素。因此, 在制备染色体标本时, 力求染色体分散好, 收缩程度适中, 染色清晰。杨树根尖细胞含较浓的细胞质, 在染色体制片过程中如果不能很好地去除细胞质的影响, 很容易在显微分离过程中把其它染色体 (来自细胞质 DNA 和其它非目标染色体) 甚至整个细胞一并挑起, 造成单条染色体 DNA 的内源污染。本试验采用改进的去壁低渗法制备欧洲山杨染色体标本^[4,5], 较好地解决了杨树单条染色体显微分离中细胞质干扰的问题 (图 1)。DNA 在酸性条件下容易脱嘌呤, 通常所用的固定液中含有醋酸, 对染色体 DNA 有降解作用^[12], 因此作者在制备染色体标本时进行了条件优化, 采用 70% 乙醇代替甲醇-冰醋酸 (3:1) 固定液, 避免了酸对 DNA 的破坏作用。

欧洲山杨染色体较小, 前中期染色体绝对长度分布在 $0.33 \sim 2.2 \mu\text{m}$, 根据染色体等级划分标准^[13], 属于小染色体, 因此分离技术上要求相当高, 这也是至今鲜见此类报道的主要原因。我们在已建立的玻璃针分离技术的基础上稍加改进, 在制作玻璃针时, 通过调整拉针仪的电流强度, 制作出适合分离染色体所需的细而短的针尖^[6]。本试验使用针尖直径为 $0.5 \mu\text{m}$ 左右的微细玻璃针, 用于杨树单条染色体的显微分离。用微细玻璃针挑取染色体方法的操作难度相对较大, 但可以挑取整条染色体, 还可以对染色体进行切割, 也不易被其它非目标物质污染^[14]。

3.2 PCR 技术在微克隆中的应用

近年来 PCR 技术在微克隆中的应用, 不仅提高了克隆效率, 而且突破了植物染色体分离、切割、酶切、酚抽提及连接反应等均需在纳升体积中进行的限制^[16]。但是, PCR 扩增极易出现假阳性, 因此保证无外源 DNA 污染是试验成功的关键^[14]。本研究表明, 以下措施可有效控制污染: (1) 所有试验操作严格控制无菌条件; (2) 玻璃器皿均在 180°C 下烘烤 5 h 以上, 塑料器皿高压灭菌 30 min 以上; (3) 各种试剂经过滤除菌, 独立分装为 1 次用量; (4) 制片时使染色体充分分散并尽量去除细胞质; (5) 选用高质量的试验试剂。

PCR 扩增片段的大小关系到染色体文库的完整性。本研究中, PCR 扩增及 Southern 杂交结果表明, 扩增片段较前人报道的稍大。Albani 等^[17]报道在小麦中, 单染色体的扩增片段为 100 ~ 2 000 bp, 多数集中在 200 ~ 800 bp。而 Chen 等^[8]在对燕麦的报道中, 扩增片段为 150 ~ 3 000 bp, 多数集中在 300 ~ 1 000 bp。扩增片段的大小可能与染色体的自身序列结构、*Sau3A* 的酶切程度、*Taq* 酶的活性及

植物材料在含冰醋酸的固定液中的处理时间长短有关^[18]。总之, 人们期望得到较大的扩增片段, 这样才有可能建立单染色体的完整文库。

杨树的基因组比较小, 单倍体基因组 DNA 含量约为 1.2 pg , $480 \pm 20 \text{ Mbp}$ ^[1~3], 平均 1 条染色体的 DNA 含量为 $0.02 \sim 0.06 \text{ pg}$ 。由于一号染色体相对长度大约为整个单倍体染色体长度的 5%, 因此, 推测杨树单条一号染色体 DNA 含量为 0.06 pg (23 Mbp)。按插入片段大小为 1 kb 计算, 每个 DNA 插入片段至少出现 1 次, 染色体文库约含 1.4×10^5 个重组克隆^[10]。本研究采用 *Sau*3A 接头介导的 PCR 方法构建的欧洲山杨一号染色体文库, 共获得了 3×10^5 个重组子, 插入片段主要分布于 $230 \sim 2\,200 \text{ bp}$, 平均为 800 bp , 基本可以覆盖杨树整条一号染色体。

3.3 染色体扩增产物来源的确定

目前已有较多关于植物染色体显微分离和扩增的报道, 但这些研究在扩增出分离染色体 DNA 片段后, 常用基因组 Southern 杂交方法证实扩增产物来自原基因组^[5, 7, 8, 17, 18], 却很少有直接证据能证实扩增产物仅来自目标染色体。程祝宽等^[19]用水稻染色体图谱上已定位的 STS 及微卫星标记等序列扩增法, 证实微分离染色体 DNA 扩增产物来自水稻第 5 染色体短臂, 而不是来自其它染色体。刘宝等^[20]以普通小麦“中国春”全套“缺体 2 四体”为材料, 进行 Southern 分析, 杂交结果表明所建立的 7B 染色体亚基因组 DNA 文库不仅没有外源 DNA 污染, 也没有小麦其它染色体的污染。

但要证实显微分离获得的染色体 DNA 扩增产物确实源于目标染色体, 最有效的方法仍然是通过染色体原位杂交技术, 将分离获得的染色体 DNA 扩增产物特异性定位于目标染色体上。关于人及动物染色体显微分离的报道中, 该策略被广泛应用^[12, 21]。在植物研究中, 很多研究者也进行了广泛的尝试, 但由于植物自身基因组结构的特点, 成功的报道并不多见^[12], 主要集中于植物 B 染色体及性染色体的研究。Zhou 等^[22]以黑麦 1R 染色体第二轮扩增产物为探针, 与其根尖细胞中期分裂相进行染色体原位杂交, 当以适量基因组 DNA 进行封阻时, 显微分离染色体 DNA 扩增产物成功地重新定位在一对 1R 染色体上。本文的染色体荧光原位杂交结果显示, 杨树染色体中期分裂相中两条一号染色体均出现明显的杂交信号, 信号均匀分布, 但同时与其它染色体着丝粒及端粒区域也可检测到一定强度的杂交信号, 以不同计量的杨树基因组 DNA 进行封阻时, 结果并未有显著改善 (结果未列出), 这和大多数前人的结果一致^[12, 23, 24]。

同时, 由于染色体片段特异性 DNA 文库的克隆效率高、针对性强, 辅助基因组的物理作图也极为有利。因此, 进行杨树单条染色体的分离和克隆将为杨树分子标记的染色体定位研究和木本植物基因组研究提供新的研究策略和技术手段。

参考文献:

- 1 Bradshaw H D, Ceulemans R, Davis J, Stettler R. Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. *J. Plant Growth Regul*, 2000, 19: 306~313
- 2 Taylor G. *Populus: Arabidopsis for forestry*. Do we need a model tree? *Ann. Bot.*, 2002, 90: 677~687
- 3 Brunner A M, Busov V B, Strauss S H. Poplar genome sequence: functional genomics in an ecologically dominant plant species. *Trends Plant Sci*, 2004, 9 (1): 49~56
- 4 宋文芹, 崔香芹, 许文胜, 李秀兰, 彭永康, 陈瑞阳. 蚕豆大 M 染色体长臂端部的显微切割与 PCR 扩增. *科学通报*, 1996, 41 (4): 361~363
Song W Q, Cui X Q, Xu W S, Li X L, Peng Y K, Chen R Y. Microdissection of chromosome 1M of *Vicia faba* and amplification of the chromosome DNA. *Chinese Science Bulletin*, 1996, 41 (4): 361~363 (in Chinese)
- 5 张守攻, 齐力旺, 韩素英, 陈成彬, 李秀兰, 宋文芹, 陈瑞阳. 杨属 (*Populus*) 黑杨组 (*Aigeiros*) 种 (品种) 间核型比较. *园艺学报*, 2005, 32 (1): 70~73
Zhang S G, Qi L W, Han S Y, Chen C B, Li X L, Song W Q, Chen R Y. Karyotype comparison of *Aigeiros* species in *Populus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32 (1): 70~73 (in Chinese)
- 6 Zhang Y, Zhang S G, Qi L W, Liu B, Gao J M, Chen C B, Li X L, Song W Q. Construction of poplar (*Populus tremula*) chromosome 1 specific DNA library by using a microdissection technique. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, 23 (3): 129~138
- 7 Deng H X, Yoshiura K, Dirks R W, Harada N, Hirota T, Tsukamoto K, Jinno Y, Niikawa N. Chromosome-band-specific painting: chromo-

- some in situ suppression hybridization using PCR products from a microdissected chromosome band as a probe pool. *Hum. Genet.*, 1992, 89 (1): 13 ~ 17
- 8 Chen Q, Armstrong K. Characterization of a library from a single microdissected oat (*Avena sativa* L.) chromosome. *Genome*, 1995, 38: 706 ~ 714
- 9 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, 1980, 8 (19): 4321 ~ 4325
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1 ~ 1060
- 11 Zhang Y, Zhang S G, Qi L W, Liu B, Gao J M, Chen C B, Li X L, Song W Q. Chromosome microdissection, cloning and painting of the chromosome 1 in poplar (*Populus tremula*). *Silvae Genetica*, 2005, 54 (4 - 5): 211 ~ 217
- 12 Houben A, Leach C R, Verlin D, Rofe R, Timmis J N. A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. *Chromosoma*, 1997, 106: 513 ~ 519
- 13 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 (4): 291 ~ 302
Li M X, Chen R Y. A suggestion on the standardization of karyotype analysis in plants. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 1985, 3 (4): 291 ~ 302 (in Chinese)
- 14 Fominaya A, Linares C, Loarce Y, Ferrer E. Microdissection and microcloning of plant chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 2005, 109: 1 ~ 3
- 15 Scalenghe F, Turco E, Edstrom J E, Pirrotta V, Mellini I. Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma*, 1981, 82: 205 ~ 216
- 16 Ponelies N, Stein N, Weber G. Microamplification of specific chromosome sequences: an improved method for genome analysis. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (17): 3555 ~ 3557
- 17 Albani D, Cote M J, Armstrong K C, Chen Q, Segal A, Robert L S. PCR amplification of microdissected wheat chromosome arms in a simple "single tube" reaction. *Plant J.*, 1993, 4: 899 ~ 903
- 18 周奕华, 党本元, 胡赞民, 崔丽华, 李良才, 陈正华. 大豆单染色体的显微分离及体外扩增. *植物学报*, 1998, 40: 144 ~ 150
Zhou Y H, Dang B Y, Hu Z M, Cui L H, Li L C, Chen Z H. Microdissection and PCR amplification of single soybean chromosome. *Acta Bot Sin.*, 1998, 40: 144 ~ 150 (in Chinese)
- 19 程祝宽, 颜辉煌, 党本元, 胡赞民, 顾铭洪, 朱立煌. 水稻第 5 染色体短臂端四体在染色体臂分离中的应用. *科学通报*, 1998, 43 (3): 272 ~ 276
Cheng Z K, Yan H H, Dang B Y, Hu Z M, Gu M H, Zhu L H. Application of terminal tetrasome of rice No. 5 chromosome in chromosome arm microdissection. *Chinese Science Bulletin*, 1998, 43 (3): 272 ~ 276 (in Chinese)
- 20 刘 宝, 戎均康, 董英山, 韩方普, 刘振兰, 何孟元, 黄百渠, 郝 水. 普通小麦 7B 染色体的显微分离和低拷贝专化 DNA 序列的克隆. *科学通报*, 1999, 44 (4): 389 ~ 393
Liu B, Rong J K, Dong Y S, Han F P, Liu Z L, He M L, Huang B Q, Hao S. Microdissection of 7B chromosome in wheat and cloning of its specific DNA sequences. *Chinese Science Bulletin*, 1999, 44 (4): 389 ~ 393 (in Chinese)
- 21 Antonacci R, Marzelli R, Finelli P, Lonoce A, Forabosco A, Archidiacono N, Rocchi M. A panel of subchromosomal painting libraries representing over regions of the human genome. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1995, 68: 25 ~ 32
- 22 Zhou Y H, Hu Z M, Dang B Y, Wang H, Deng X D, Wang L L, Chen Z H. Microdissection and microcloning of rye (*Secale cereale* L.) chromosome 1R. *Chromosoma*, 1999, 108: 250 ~ 255
- 23 Hibata F, Hizume M, Kuroki Y. Chromosome painting of Y chromosomes and isolation of Y-specific repetitive sequence in the dioecious plant *Rumex acetosa*. *Chromosoma*, 1999, 108: 266 ~ 270
- 24 Houben A, Leach C R, Verlin D, Rofe R, Timmis J N. A repetitive DNA sequence common to the different B chromosomes of the genus *Brachycome*. *Chromosoma*, 1997, 106: 513 ~ 519