

雷蒙德氏棉 3 条染色体特异 BAC 的筛选与定位

覃琴¹, 刘方¹, 甘仪梅², 王春英¹, 王玉红¹, 蔡小彦¹, 王坤波^{1*}

(1. 中国农业科学院棉花研究所 / 棉花生物学国家重点实验室, 河南 安阳 455000; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 / 农业部热带作物生物遗传资源重点实验室, 海南海口 571101)

摘要: 通过筛选海岛棉 BAC 文库并结合 BAC-FISH 技术成功获得雷蒙德氏棉 D₅01、D₅02 和 D₅10 染色体的特异 BAC 克隆, 可作为这 3 条染色体的细胞学标记。这 3 个克隆在雷蒙德氏棉和海岛棉中进行比较作图, 结果表明, 它们在海岛棉中均表现出了染色体特异性, 说明这 3 个 BAC 也可用于海岛棉 D₅01、D₅02 和 D₅10 染色体的识别。其中 BAC 克隆 280G06 在两棉种 10 号染色体上的位置为非线性关系, 可能在棉属的进化过程中发生了染色体结构的变异。

关键词: 雷蒙德氏棉; 单染色体; 细菌人工染色体; 荧光原位杂交

中图分类号: S562.035.3 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2013)04-0323-06

Screening and Positioning of Three Chromosome-specific BAC Clones in *Gossypium raimondii*

QIN Qin¹, LIU Fang¹, GAN Yi-mei², WANG Chun-ying¹, WANG Yu-hong¹, CAI Xiao-yan¹, WANG kun-bo^{1*}

(1. Institute of Cotton Research Chinese Academy of Agricultural Sciences / State Key Laboratory of Cotton Biology, Anyang, 455000, China; 2. The Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture (China), Haikou, Hainan, 571101, China)

Abstract: We screened a bacterial artificial chromosome(BAC) library of *Gossypium barbadense* acc. Pima 90-53 to identify chromosome-specific BAC clones. Using BAC-fluorescence *in situ* hybridization technology, we obtained three BAC clones specific to chromosome D₅01, D₅02, and D₅10 of *Gossypium raimondii*, which could be used as cytological markers for those three chromosomes. Comparative mapping of these three BACs between *G. barbadense* and in *G. raimondii* showed that these three BAC clones could also be used to identify chromosomes D₅01, D₅02, and D₅10 in *G. barbadense*. The position of the BAC clone 280G06 on chromosome 10 did not show colinearity between *G. barbadense* and *G. raimondii*, possibly because of chromosomal rearrangement.

Key words: *G. raimondii*; individual chromosome; bacterial artificial chromosome(BAC); Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

棉属有 52 个种, 其中包括 5 个四倍体种和 47 个二倍体种。根据不同棉种杂交 F₁ 减数分裂时染色体的配对关系, 二倍体种可分为 8 个基因组类型, 分别是 A-G 和 K 基因组^[1], 其单倍体基因组大小在 880 Mb (D 基因组雷蒙德氏棉 (*G. raimondii*, D₅)) ~ 2460 Mb (K 基因组小小棉 (*G. exiguum*, K₁)) 范围内^[2], 可见雷蒙德氏棉是棉属中基因组最小的棉种。多数观点支持雷蒙德氏棉与异源四倍体棉种 D 亚组的亲缘关系最近^[3], 对

雷蒙德氏棉的研究有助于深入了解异源四倍体棉种的进化及 AD 亚组的相互关系。

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、臂比和随体的特征等来实现的。就棉花而言, 其染色体小, 形态相似, 着丝点不易分辨; 同时在预处理过程中因所用试剂和处理时间的差异, 使得染色体的缩短程度不同, 因此依靠染色体形态来确定染色体编号, 不同学者之间仍存在分歧。荧光原位杂交

收稿日期: 2013-03-07 作者简介: 覃琴(1986-), 女, 硕士研究生, qinqin36@163.com; 通讯作者, wkbcri@163.com

基金项目: 国家 863 计划 (2012AA101108-02-05); 农业部保种项目 (NB2012-2130135-29B); 农业部 948 项目 (2011-G1-04)

(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)始于 20 世纪 60 年代末,最初使用的探针类型为 DNA 重复序列和多拷贝基因家族^[4]。随着 FISH 技术的发展,逐渐开始使用单低拷贝序列作为探针^[5],但此类序列片段短,存在不易与靶染色体结合且检出信号较困难等问题。BAC-FISH 是采用植物基因组大片段 BAC (Bacterial artificial chromosome)克隆作为探针的 FISH 技术,从根本上克服了这一难题,并在马铃薯^[6]、高粱^[7]和水稻^[8]等多种作物上用来鉴别单染色体。在棉属中,利用该技术已鉴定出陆地棉^[9]、亚洲棉^[10]、达尔文氏棉和 6 个 D 基因组棉种^[11-12]的全套染色体。

本实验室用 Wang 等^[9]筛选出的一套陆地棉 D 亚组特异 BAC 克隆,分别在雷蒙德氏棉有丝分裂中期染色体上进行荧光原位杂交,有 10 个 BAC 克隆产生了特异信号,但陆地棉 D_h01、D_h02 和 D_h10 染色体上的 3 个特异 BAC 分别在雷蒙德氏棉多对染色体上都可以观察到信号,无法鉴别这 3 条染色体^[13]。因此本实验选用四倍体遗传图谱上的特异 SSR (Simple sequence repeats) 标记,通过筛海岛棉 Pima 90-53 BAC 文库得到阳性克隆,在雷蒙德氏棉有丝分裂中期染色体上进行荧光原位杂交验证其特异性,期望能筛选出雷蒙德氏棉 D_s01、D_s02 和 D_s10 染色体特异 BAC 克隆,为雷蒙德氏棉细胞遗传学的研究提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 SSR 标记的选择

实验所用的棉种为雷蒙德氏棉和海岛棉 (*G. barbadense*, (AD)₂)。雷蒙德氏棉材料编号为 D_s-3, 长期活体种植于国家野生棉种质圃(位于海南三亚),并备份于中国农业科学院棉花研究所的温室中(河南安阳)。海岛棉材料为品种 Pima 90-53,引自美国,由本实验室保存。两棉种的基因组 DNA 用改良 CTAB 法^[14]提取。所用 SSR 标记选自 Yu 等^[15]和 Guo 等^[16]构建的陆海回交群体遗传图谱 D 亚组中的 1 号、2 号和 10 号染色体,所选标记必须满足的条件为:在图谱上只有唯一的位点,且为 2 个图谱所共有或来源于雷蒙德氏棉的 EST (Expressed sequence tag) 序列。选出的 SSR

标记需要在雷蒙德氏棉基因组 DNA 中进行扩增,其具体 PCR (Polymerase chain reaction) 反应体系、反应程序和电泳检测参见 Zhang 等^[17]进行。

1.2 BAC 文库的筛选

所用的 BAC 文库为海岛棉 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。采用三步 PCR 法进行 BAC 文库的筛选,在筛库之前需要构建板池,即用灭菌的 384 复制器在装有 BAC 克隆的 384 板上沾取菌液于含有 12.5 g·L⁻¹ 氯霉素的 LB 固体培养基上,37 °C 静止过夜培养,之后用液体培养基将各菌落混合收集于离心管中,构成 1 个板池。用选出的 SSR 标记依次对板池(1 个 384 板所有的单克隆混合)、行池(1 个 384 板中 1 行 24 个单克隆混合)和 1 行 24 个单克隆层层进行菌液 PCR 扩增,所有扩增产物经 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,最后得到阳性单克隆^[18]。为了避免单克隆菌液污染以及菌液 PCR 易出现假阳性现象,将来自原库的阳性单克隆菌液重新涂布于含 12.5 g·L⁻¹ 氯霉素的 LB 固体培养基上,挑取单克隆培养并用碱裂解法^[19]提取质粒 DNA,用相应的 SSR 引物扩增加以验证。

菌液 PCR 反应总体积为 20 μL,其中含有 DNA 模板 1 μL, dNTPs (0.01 mol·L⁻¹) 1.5 μL,上下游引物(1×10⁻⁵ mol·L⁻¹)各 1 μL, Taq DNA 聚合酶终浓度为 0.025 U·μL⁻¹, 10×Reaction buffer 2.0 μL。反应程序如下:先 95 °C 预变性 10 min,然后是 94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 1 min 经 30 个循环,最后 72 °C 延伸 6 min, 4 °C 保存。

1.3 DNA 探针的制备

实验所用探针分别为:45S rDNA, D 基因组着丝粒特异 BAC 克隆 150D24, 筛选出来的阳性 BAC 克隆,海岛棉 D 亚组 1 号、2 号和 10 号染色体特异 BAC 克隆 48F11、78G20 和 78O17^[11]。其中 45S rDNA 菌种来源于拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*),由武汉大学宋运淳教授惠赠。BAC 克隆 150D24 含有二倍体 D 组棉种着丝粒区域特有的重复序列,用作此棉种(包括四倍体棉种 D 亚组)着丝粒探针^[20]。海岛棉特异 BAC 克隆由南京农业大学张天真教授惠赠。除筛选出来的阳性 BAC DNA 用德国 Roche 公司的 BIO-Nick Trans-

lation Mix 标记系统进行标记外,其余 3 种 DNA 探针均采用德国 Roche 公司的 DIG-Nick Translation Mix 标记系统进行标记。

1.4 中期染色体制片和 FISH

材料根尖采用水培法获得,中期染色体制片和 FISH 流程按照王春英等^[21]的方法。生物素标记的探针和地高辛标记的探针分别能够通过 a-vidin-FITC 抗体和 anti-digoxigenin-rhodamine 抗体检测到,在荧光显微镜下观察分别显示绿色和红色。染色体用 DAPI 衬染在荧光显微镜下观察显示蓝色。采用高压下打断的雷蒙德氏棉基因组作为封阻 DNA 来封阻 BAC DNA 所含有的重复序列。杂交信号用荧光显微镜(Ziess Axioskop 2 plus)观察,Isis 软件对原位杂交图像进行拍照和加工,Photoshop 作图软件处理图片。

2 结果与分析

2.1 雷蒙德氏棉三条染色体特异 BAC 克隆的筛选和 FISH 验证

从陆海回交群体遗传图谱 D 亚组的 1 号、2 号和 10 号染色体上共选了 48 个 SSR 标记,并用于雷蒙德氏棉基因组 PCR 扩增鉴定,获得只扩增出 1 条主带的 19 个 SSR 标记用于海岛棉 BAC 文库的筛选,每个标记都筛出了至少 1 个阳性克隆。每 1 个 SSR 标记只选用 1 个阳性克隆作为探针,共 19 个阳性克隆进行 FISH 特异性验证。

以筛出的阳性克隆和 45S rDNA 为混合探针,雷蒙德氏棉有丝分裂中期染色体为靶 DNA 进行荧光原位杂交,选择只出现 1 对信号且清晰明显的 BAC 作为对应染色体的特异 BAC 克隆,最后成功筛选出雷蒙德氏棉 D₅01、D₅02 和 D₅10 染色体特异 BAC 克隆 389K13、384I04 和 280G06,其长度均在 100 kb 以上(表 1)。在图 1 中,白色箭头所指的绿色信号依次为 3 个 BAC 克隆在雷蒙德氏棉有丝分裂中期染色体上所产

生的 1 对特异信号。3 对红色信号为 45S rDNA 位点,其中有 2 对大信号,1 对小信号。

2.2 特异 BAC 克隆在海岛棉中的定位

筛选出的 3 个雷蒙德氏棉染色体特异 BAC 克隆均来自海岛棉 BAC 文库。为了探讨这 3 个 BAC 克隆与对应海岛棉 D 亚组染色体特异 BAC 克隆在海岛棉染色体上的位置关系,使用这两种探针为混合探针进行双 BAC 荧光原位杂交,结果如图 2 所示。雷蒙德氏棉染色体上的 3 个特异 BAC 克隆分别在海岛棉中均能产生特异的杂交信号(绿色杂交信号),并与海岛棉 D 亚组对应的染色体特异 BAC 克隆(红色杂交信号)在同 1 条染色体上,表明两者具有同线性关系,因此这 3 个特异 BAC 克隆也可分别作为海岛棉 D₅01、D₅02 和 D₅10 染色体的特异标记。从两者的相对位置来看,海岛棉 2 号染色体上的 2 个特异 BAC 之间的物理距离最近,而另外 2 条染色体上的 2 个特异 BAC 之间要相对远一些。此外还可看出这 3 个特异 BAC 克隆较海岛棉染色体特异 BAC 克隆更接近染色体的末端。

2.3 特异 BAC 克隆在海岛棉与雷蒙德氏棉中的比较分析

以 45S rDNA、D 基因组着丝粒特异 BAC 克隆 150D24 和染色体特异 BAC 克隆为混合探针进行荧光原位杂交,定位 3 个特异 BAC 克隆在雷蒙德氏棉染色体上的具体位置,结果如图 3-a。位于染色体内部的红色信号为 D 组着丝粒特异 BAC 克隆 150D24 的杂交信号,位于染色体端部的红色信号为 45S rDNA 位点,绿色信号为特异 BAC 克隆杂交信号,可见 3 个 BAC 克隆分别都位于对应染色体的长臂上,1 号和 10 号染色体特异 BAC 克隆 389K13 和 280G06 位于染色体的端部,2 号染色体特异 BAC 克隆 384I04 位于染色体的近着丝粒区域。此外 2 号染色体短臂的末端有 1 个 45S rDNA 位点。

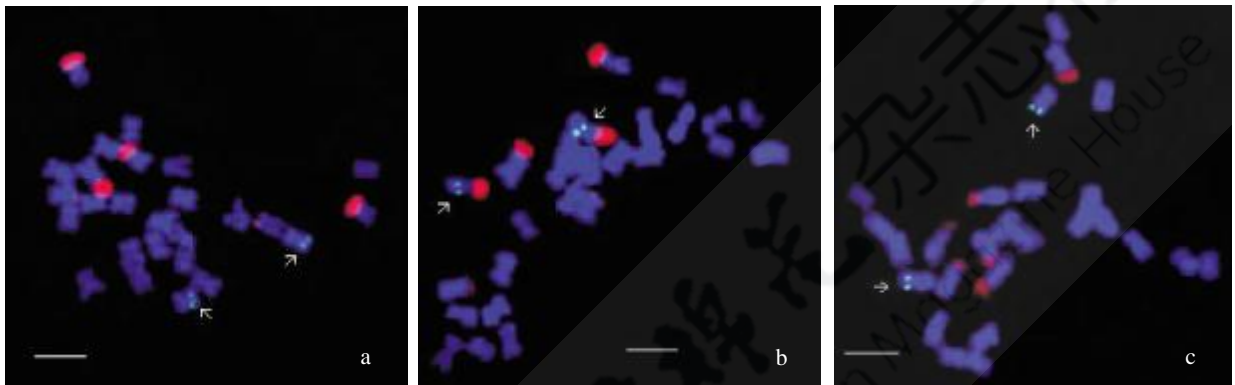
表 1 雷蒙德氏棉 D₅01、D₅02 和 D₅10 染色体特异 BAC 克隆

Table 1 Chromosome-specific BACs in chromosome D₅01, D₅02 and D₅10 of *G. raimondii*

染色体编号 Chromosomal number	SSR 标记 SSR marker	BAC 克隆 BAC clone	BAC 克隆长度 The length of BAC clone/ Kb
D501	HAU0737	389K13	145
D502	NAU6416	384I04	130
D510	HAU0590	280G06	120

为了探究 3 个 BAC 克隆分别在海岛棉和雷蒙德氏棉染色体上位置的异同,对其在两个棉种上的定位进行了比较分析。图 3-a 以雷蒙德氏棉染色体特异 BAC 克隆 (绿色信号)、D 组着丝粒特异 BAC 克隆 150D24 (染色体内部的红色信号)和 45S rDNA (染色体末端的红色信号)为混合探针在雷蒙德氏棉有丝分裂中期 D_501 、 D_502 和 D_510 染色体上杂交的信号图,图 3-b 以雷蒙德

氏棉染色体特异 BAC 克隆 (绿色信号)和海岛棉染色体特异 BAC 克隆 (红色信号)为混合探针在海岛棉有丝分裂中期 D_601 、 D_602 和 D_610 染色体上杂交的信号图。由于海岛棉 D_601 、 D_602 和 D_610 染色体特异 BAC 克隆分别位于海岛棉染色体的长臂、长臂和短臂上^[1],而雷蒙德氏棉染色体特异 BAC 较海岛棉染色体特异 BAC 更接近染色体的端部 (图 3-a),因此可得出雷蒙德氏棉染色体特



a-c: 分别为雷蒙德氏棉 D_501 、 D_502 和 D_510 染色体特异 BAC 克隆在雷蒙德氏棉有丝分裂中期染色体上杂交所显示的信号图片,标尺为 $5\ \mu\text{m}$ 。

a-c: the FISH images of 3 chromosome-specific BAC clones hybridized to mid-mitotic chromosomes in *G. raimondii*, Bar= $5\ \mu\text{m}$.

图 1 雷蒙德氏棉 3 条单染色体的鉴定

Fig. 1 Identification of 3 individual chromosomes in *G. raimondii*

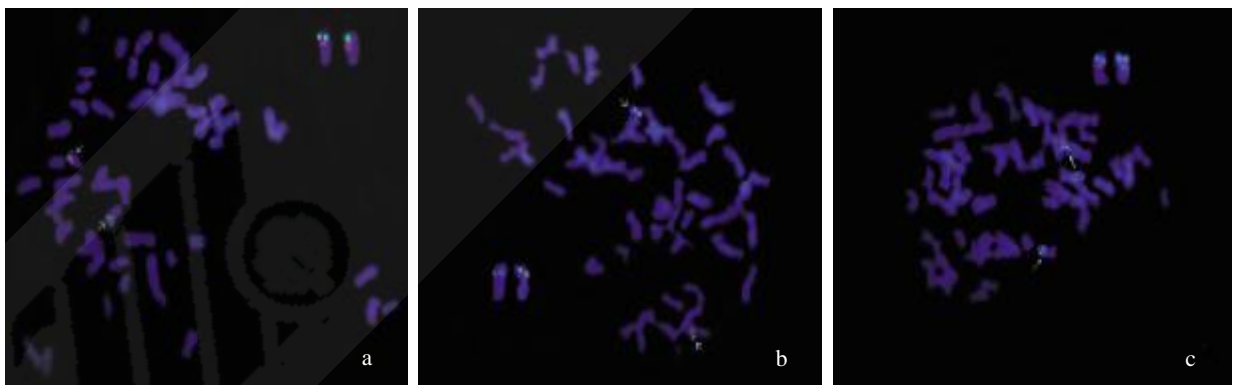


图 2 雷蒙德氏棉染色体上 3 个特异 BAC 克隆在海岛棉有丝分裂中期染色体上的定位

Fig. 2 The location of 3 chromosome-specific BAC clones of *G. raimondii* in the mid-mitotic chromosome of *G. barbadense*

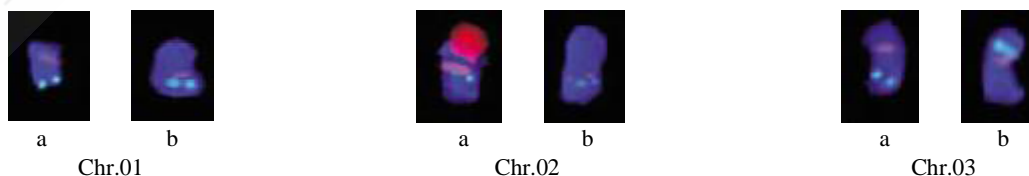


图 3 3 个特异 BAC 克隆分别在雷蒙德氏棉和海岛棉中的比较分析

Fig. 3 Comparative analysis of 3 chromosome-specific BAC clones location in *G. raimondii* and *G. barbadense*

异 BAC 分别位于海岛棉 D_b01、D_b02 和 D_b10 染色体的长臂、长臂和短臂上。比较雷蒙德氏棉染色体特异 BAC 在两个棉种对应染色体上的位置发现:在 1 号和 2 号染色体上,特异 BAC 克隆 389K13 和 384I04 均位于 2 个棉种染色体的长臂上,两者表现出共线性关系。在 10 号染色体上,特异 BAC 克隆 280G06 分别位于海岛棉染色体的短臂和雷蒙德氏棉染色体的长臂上,表现出非线性关系。在 2 个棉种的 2 号染色体上,雷蒙德氏棉此染色体的短臂末端带有一个 45S rDNA 位点,而海岛棉此染色体上则没有 45S rDNA 位点(图 3)。

3 讨论

染色体的准确识别是植物基因组研究的基础^[22]。对于染色体小且形态相似的植物物种棉属来说,单凭染色体的形态学特征难以识别全部的染色体。BAC-FISH 技术能为染色体提供有效的细胞遗传学标记。本实验使用四倍体海岛棉的 BAC 克隆和对应的 SSR 标记,鉴别出海岛棉和可能的供体种雷蒙德氏棉的 3 条单染色体。这种使用同一细胞学标记可同时鉴定 D 基因组和四倍体 D 亚组的方法不仅有利于两棉种的统一命名,同时在两者间架起了一座“桥梁”,便于两者之间信息的使用和比较,也方便了学者的交流。

以某个种的 DNA 克隆为探针,其它种的染色体为靶 DNA 运用 FISH 技术可探讨种之间的进化关系或线性关系。Findley 等^[23]使用大豆全套染色体特异 BAC 克隆对两种野生大豆进行 FISH 研究,发现了染色体相互异位现象。Ma 等^[24]以二穗短柄草 13 个染色体特异 BAC 克隆为探针在大麦染色体上进行 FISH,揭示出两者部分染色体具有同线性关系。鉴于雷蒙德氏棉与海岛棉的亲缘关系,本研究比较分析了雷蒙德氏棉 3 个染色体特异 BAC 克隆与海岛棉染色体特异 BAC 克隆在海岛棉中的位置关系,发现 2 个克隆之间具有同线性关系。这一结果说明两棉种之间存在同源片段,同时也从另一侧面证实了本实验所选标记确实分别位于遗传图谱 D 亚组的 1 号、2 号和 10 号染色体,而不是位于其他染色体上。比较不同种之间的线性关系将有助于探究种之间的

亲缘关系以及知之较少的种^[25]。本实验比较了 3 个 BAC 克隆分别在海岛棉与雷蒙德氏棉染色体上物理位置的异同,发现特异 BAC 克隆 280G06 分别位于两棉种 10 号染色体上的短臂和长臂上,表现为非线性关系。可见在进化过程中雷蒙德氏棉 D 基因组与海岛棉 D 亚组并不是简单的线性对应关系,可能发生了染色体结构的变异,这将有利于研究异源四倍体棉种多倍化的进化历程。

雷蒙德氏棉基因组测序已经完成,根据测序数据分析发现了古六倍化事件、基因组复制事件以及染色体重排,此外虽然雷蒙德氏棉所含的重复 DNA 片段在棉属 8 个基因组类型中是最少的,但它仍含有 57%~61%的转座子^[26-27]。本研究在利用 BAC-FISH 验证阳性 BAC 克隆特异性的过程中,发现有些阳性 BAC 克隆同时在雷蒙德氏棉多条染色体上都杂交出了信号,同时 Danilova^[28]和 Fonsêca 等^[29]分别在整合玉米 9 号染色体细胞遗传图和菜豆细胞遗传图的研究中也发现了此现象,这种重复区域的存在表明在棉属的进化过程中有可能涉及染色体重排、转座子及全基因组复制等事件。这一发现可作为研究 BAC 克隆中直向同源区域或共生同源区域的新途径。

参考文献:

- [1] WENDEL J F, Albert V A. Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium*): Character-state weighted parsimony analysis of chloroplast-DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications[J]. *Systematic Botany*, 1992, 17(1): 115-143.
- [2] HAWKINS J S, Kim H, Nason J D, et al. Differential lineage-specific amplification of transposable elements is responsible for genome size variation in *Gossypium*[J]. *Genome Research*, 2006, 16: 1252-1261.
- [3] WENDEL J F, Cronn R C. Polyploidy and the evolutionary history of cotton[J]. *Advances in Agronomy*, 2003, 78: 139-186.
- [4] PARDUE M L, Gall J G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1969, 64(2): 600-604.
- [5] HARPER M E, Ullrich A, Saunders G F. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*

- of the United States of America, 1981, 78 (7): 4458-4460.
- [6] DONG F, Song J, Naess S K, et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101: 1001-1007.
- [7] KIM J S, Klein P E, Klein R R, et al. Chromosome identification and nomenclature of sorghum bicolor[J]. *Genetics*, 2005, 169: 1169-1173.
- [8] CHENG Zhu-kuan, Buell C R, Wing R A, et al. Toward a cytological characterization of the rice genome[J]. *Genome Research*, 2001, 11: 2133-2141.
- [9] WANG Kai, Guo Wang-zhen, Zhang Tian-zhen. Development of one set of chromosome-specific microsatellite-containing BACs and their physical mapping in *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115: 675-682.
- [10] WANG Kai, Guan Bing, Guo Wang-zhen, et al. Completely distinguishing individual A-genome chromosomes and their karyotyping analysis by multiple bacterial artificial chromosome-fluorescence *in situ* hybridization [J]. *Genetics*, 2008, 178: 1117-1122.
- [11] GAN Yi-mei, Chen Dan, Liu Fang, et al. Individual chromosome assignment and chromosomal collinearity in *Gossypium thurberi*, *G. thilobum* and D subgenome of *G. barbadense* revealed by BAC-FISH [J]. *Genes Genetics System*, 2011, 86: 165-174.
- [12] GAN Yi-mei, Liu Fang, Peng Ren-hai, et al. Individual chromosome identification, chromosomal collinearity and genetic-physical intergrated map in *Gossypium darwinii* and four D genome cotton species revealed by BAC-FISH[J]. *Genes Genetics System*, 2012, 87: 233-241.
- [13] 甘仪梅. 棉属四倍体及其供体基因组单染色体鉴别和 rDNA 定位[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
GAN Yi-mei. The individual chromosome identification and rDNA location in tetraploids of *Gossypium* and their progenitor genomes[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011.
- [14] 宋国立, 崔荣霞, 王坤波, 等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA [J]. *棉花学报*, 1998, 10(5): 273-275.
SONG Guo-li, Cui Rong-xia, Wang Kun-bo. A rapid improved CTAB method for extraction of cotton genomic DNA [J]. *Acta Gossypii Sinica*, 1998, 10(5): 273-275.
- [15] YU Yu, Yuan Dao-jun, Liang Shao-gang, et al. Genome structure of cotton revealed by a genome-wide SSR genetic map constructed from a BC1 population between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*[J]. *BMC Genomics*, 2011, 12: 15.
- [16] GUO Wang-zhen, Cai Cai-ping, Wang Chang-biao, et al. A preliminary analysis of genome structure and composition in *Gossypium hirsutum*[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 314.
- [17] ZHANG J, Guo W, Zhang T. Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. × *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105: 1166-1174.
- [18] 石学萍, 冯大领, 王彦华, 等. 大白菜开花相关基因 FLC1 的 BAC 克隆筛选及分析[J]. *园艺学报*, 2010, 37(9): 1513-1516.
SHI Xue-ping, Feng Da-ling, Wang Yan-hua, et al. Screening and analysis of BAC clones containing flowering time gene FLC1 in *Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis* Olsson[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37(9): 1513-1516.
- [19] SAMBROOK J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [20] 吴琼, 程华, 刘方, 等. 棉属 D 基因组棉种着丝粒 FISH 标记的筛选初报[J]. *科学通报*, 2010, 55(21): 2099-2105.
WU Qiong, Cheng Hua, Liu Fang, et al. Screening of FISH marker of chromosomes at *Gossypium* D genome species [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2010, 55(21): 2099-2105.
- [21] 王春英, 王坤波, 宋国立, 等. 棉花体细胞染色 rDNA-FISH 技术[J]. *棉花学报*, 2001, 13(2): 75-77.
WANG Chun-ying, Wang Kun-bo, Song Guo-li, et al. Protocol of cotton FISH of somatic chromosomes with rDNA as probes[J]. *Acta Gossypii Sinica*, 2001, 13(2): 75-77.
- [22] GILL B S, Friebe B. Plant cytogenetics at the dawn of the 21st century[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 1998, 1(2): 109-115.
- [23] FINDLEY S D, Cannon S, Varalakshmi, et al. A fluorescence *in situ* hybridization system for karyotyping soybean [J]. *Genetics*, 2010, 185: 727-744.
- [24] MA Lu, Giang T H, Schubert V, et al. Synteny between *Brachypodium distachyon* and *Hordeum vulgare* as revealed by FISH[J]. *Chromosome Research*, 2010, 18: 841-850.
- [25] TANG Hai-bao, Bowers J E, Wang Xi-yin, et al. Synteny and collinearity in plant genomes[J]. *Science*, 2008, 320(5875): 486-488.
- [26] WANG Kun-bo, Wang Zhi-wen, Li Fu-guang, et al. The draft genome of a diploid cotton *Gossypium raimondii* [J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(10): 1098-1103.
- [27] PATERSON A H, Wendel J F, Gundlach H, et al. Repeated polyploidization of *Gossypium* genomes and the evolution of spinnable cotton fibers[J]. *Nature*, 2012, 492: 423-427.
- [28] DANILOVA T V, Birchler J A. Integrated cytogenetic map of mitotic metaphase chromosome 9 of maize: resolution, sensitivity, and banding paint development [J]. *Chromosoma*, 2008, 117: 345-356.
- [29] Fonseca A, Ferreira J, dos Santos TRB, et al. Cytogenetic map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. *Chromosome Research*, 2010, 18: 487-502. ●