

中间偃麦草 2Ai-2 染色体 DNA 文库构建及特异性序列的克隆

何聪芬^{1,2}, 马有志¹, 辛志勇¹, 徐琼芳¹, 李连城¹

(¹ 中国农业科学院作物育种栽培研究所 / 农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京 100081;
² 北京工商大学化学与环境工程学院 / 北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100037)

摘要: 以二体异附加系 Z_1 与其普通小麦亲本宛 7107 杂交 F_1 的花粉母细胞为材料, 用原位杂交方法确定其中的单价体为中间偃麦草 2Ai-2 染色体; 在此基础上, 以显微分离、回收、LA-PCR (Linker-adaptor PCR) 扩增了该条染色体, 扩增产物长度在 0.15-3 kb 之间, 主要分布在 0.2-2 kb。以 α -³²P-dCTP 标记的中间偃麦草的基因组 DNA 为探针, 对 LA-PCR 扩增产物进行杂交, 证实扩增产物来自中间偃麦草。将扩增片段纯化后连接到质粒载体 pUC18 上, 构建了 2Ai-2 染色体 DNA 文库。该文库包含约 5×10^5 个克隆。随机选取 500 个克隆进行分析, 发现插入片段长 200-1 500 bp, 平均 580 bp。点杂交结果表明, 56% 为低/单拷贝序列, 44% 为重复序列。从文库筛选到 4 个中间偃麦草克隆。RFLP 结果表明, 3 个为多态性低拷贝 (Mag065、Mag088、Mag139), 1 个为高度重复序列克隆 (Mag104)。GISH 结果表明, Mag104 为中间偃麦草染色体专化重复序列。

关键词: 中间偃麦草; 染色体显微分离及微克隆; LA-PCR; RFLP; 特异性 DNA 序列

Construction of *Agropyrum intermedium* 2Ai-2 Chromosome DNA Library and Cloning of Species-specific DNA Sequences

HE Cong-fen^{1,2}, MA You-zhi¹, XIN Zhi-yong¹, XU Qiong-fang¹, LI Lian-cheng¹

(¹ Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture / Institute of Crop Breeding and Culture, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ² Beijing Key laboratory of Plant Resources Research and Development / College of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100037)

Abstract: The univalent from the meiosis-metaphase spreads of F_1 ($Z_1 \times$ wheat variety Wan7107) was identified to be *Agropyrum intermedium* 2Ai-2 chromosome by GISH. The 2Ai-2 chromosomes were microisolated and collected. After two rounds of PCR amplification, the PCR products were ranged from 150-3 000 bp, with predominant fragments at about 200-2 000 bp. Using *Ag. intermedium* genomic DNA as probe, Southern blotting analysis confirmed the products originated from *Ag. intermedium* genome. The products were purified, ligated to pUC18 and then transformed into competence *Escherichia coli* DH5 α to produce a 2Ai-2 chromosome DNA library. The microcloning experiments produced approximately 5×10^5 clones, the size range of the cloned inserts was 200-1 500 bp, with an average of 580 bp. Using *Ag. intermedium* genomic DNA as probe, dot blotting results showed that 56% clones are unique/low copy sequences, 44% are repetitive sequences in the library. Four *Ag. intermedium* clones were screened from the library by RFLP, and three clones (Mag065, Mag088, Mag139) belong to low/single sequences, one clone (Mag104) was repetitive sequence. GISH results indicated that Mag104 was *Ag. intermedium* species-specific repetitive DNA sequence.

Key words: *Agropyrum intermedium*; Microisolation and microcloning of chromosome; LA-PCR; RFLP; Species-specific DNA Sequences

构建特定染色体或染色体区段的 DNA 文库, 对 建立高密度的分子标记及图位克隆特定基因均具有重

收稿日期: 2003-06-02

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (101-04-03-03-97)

作者简介: 何聪芬 (1966-), 女, 河北无极人, 副教授, 博士, 主要从事植物分子生物学研究, E-mail: hecf@th.btbu.edu.cn. 马有志为通讯作者, Tel: 010-68919765; Fax: 010-68975212, E-mail: mayzh@mail.caas.net.cn

要意义。日前,该技术已成功应用于甜菜^[1]、大麦^[2]、燕麦^[3]、小麦^[4]、玉米^[5]、黑麦^[6]、大豆^[7]等作物的染色体DNA文库构建、遗传图谱绘制、特异性探针筛选等方面。

小麦-中间偃麦草二体异附加系 Z_2 ($2n=44$)是通过部分双二倍体无芒中4 ($2n=56$)与普通小麦亲本宛7107杂交、回交选育而成的^[8],高抗由大麦黄矮病毒(barley yellow dwarf virus, BYDV)引起的小麦黄矮病。由于 Z_2 的小麦亲本不抗BYDV, Z_2 的BYDV抗性基因来自附加的中间偃麦草染色体。同工酶及RFLP分析证明,其附加的中间偃麦草染色体与小麦的第2同源群染色体部分同源,该染色体被命名为2Ai-2^[9]。利用微切割、微克隆技术构建2Ai-2染色体DNA文库,可为分子标记的富集及抗病基因的克隆提供一个良好的技术操作平台,本文报道中间偃麦草2Ai-2染色体DNA文库构建及特异性DNA序列的克隆。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料中间偃麦草、无芒中4 ($2n=56$)、二体异附加系 Z_1 、 Z_2 、普通小麦品种中国春、宛7107、黑麦等,均由中国农业科学院作物育种栽培研究所小麦生物技术课题组提供。

1.2 方 法

1.2.1 染色体原位杂交 采用马有志等^[10]的方法,以biotin-16-dUTP标记的中间偃麦草基因组DNA为探针,与 $Z_2 \times$ 宛7107杂种 F_1 的花粉母细胞中期I(PMC MI)染色体进行原位杂交,以确定2Ai-2中间偃麦草染色体。

1.2.2 单条染色体的分离及体外扩增 染色体标本的制作、染色体微操作及微分离、单条染色体的蛋白酶消化、染色体DNA的酶切、连接接头及2轮PCR反应过程参照何聪芬等^[11]的方法。以 α -³²P-dCTP标记的中间偃麦草基因组DNA为探针对LA-PCR扩增产物进行杂交,来确定扩增产物是否来自中间偃麦草。

1.2.3 2Ai-2染色体DNA文库的构建 用Pharmacia公司的Sureclone试剂盒,参照公司提供的说明书,将纯化后的PCR产物连接到pUC18质粒载体上,转化大肠杆菌DH5 α ,并涂布于LB/Amp/X-gal/IPTG平板上,培养过夜后挑选白色菌落,制备菌落原位杂交膜^[11]。

1.2.4 重组质粒分析 参照文献[11]进行菌落原位

杂交。利用载体上的M13正/反通用引物进行PCR扩增,电泳分析插入片段大小。

1.2.5 重组质粒的点杂交 根据重组质粒浓度不同,分别用1~5 μ l依次排列在硝酸纤维素膜上,经碱变性、中和处理及干燥,保鲜膜包好置4℃冰箱保存备用。以 α -³²P-dCTP标记的中间偃麦草基因组DNA为探针对重组质粒进行点杂交。

1.2.6 2Ai-2染色体特异性克隆的筛选 提取中间偃麦草、无芒中4、 Z_2 、 Z_1 、中国春、宛7107以及黑麦等基因组DNA。样品各取10 μ g经EcoRI, EcoRV, BamHI, DraI或HindIII酶切、电泳、转膜,分别用点杂交筛选的低拷贝和重复序列DNA克隆为探针,进行Southern杂交。用点杂交和Southern杂交筛选的重复序列DNA克隆为探针,与 $Z_2 \times$ 宛7107的 F_1 花粉母细胞中期染色体进行原位杂交,以确定重复序列DNA的特异性。

2 结果与分析

2.1 目标染色体的微分离和LA-PCR扩增

由于($Z_2 \times$ 宛7107) F_1 PMC MI的中间偃麦草2Ai-2染色体以单价体形式存在,不与小麦染色体配对,使得其很容易被区分(图1)。对($Z_2 \times$ 宛7107) F_1 花药进行不同的固定时间处理发现,固定10~15 min即可用酶解的方法制成适宜分离目标染色体的标本。对独立的2个离心管(各含1条2Ai-2染色体)及阳性对照(100 ng的中间偃麦草基因组DNA)经2次PCR扩增,得到0.15~3 kb的扩增产物,主要

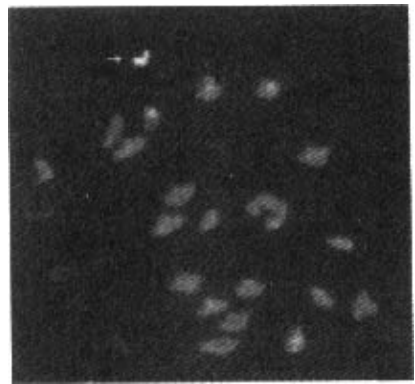
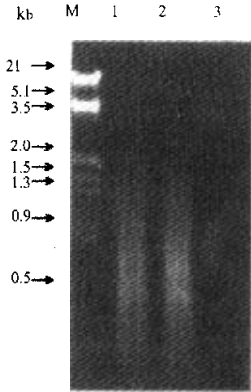


图1 $Z_2 \times$ 宛7107的 F_1 减数分裂中期I(箭头示中间偃麦草染色体)

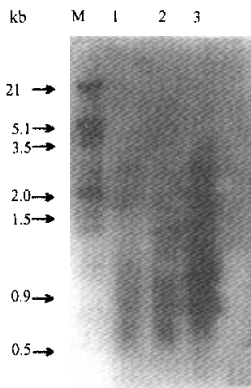
Fig.1 Meiotic metaphase I in F_1 hybrid of $Z_2 \times$ Wan7107 (Arrow indicating the 2Ai-2 chromosome)

分布在 0.2~2 kb。阴性对照无扩增产物（图 2）。为验证 PCR 扩增产物的可靠性，将染色体 DNA 第 2 轮 PCR 产物转至尼龙膜上，以 ³²P 标记的中间偃麦草基因组 DNA 为探针进行 Southern 杂交，结果表明，扩增产物与中间偃麦草产生较强的杂交信号，阴性对照无杂交信号（图 3），表明扩增产物来自中间偃麦草基因组。



1、2. 2Ai-2 染色体；3. 阴性(空白)对照
1 and 2. 2Ai-2 chromosome; 3. CK

图 2 以分离回收的单条 2Ai-2 染色体 DNA 为模板的 LA-PCR
Fig.2 The PCR products of second LA-PCR (M. λ DNA/
*Hind*III+*Eco*RI)



1、2. 2Ai-2 染色体；3. 中间偃麦草；4. 阴性(空白)对照
1 and 2. 2Ai-2 chromosome; 3. *Ag. intermedium*; 4. CK

图 3 α-³²P-dCTP 标记的中间偃麦草基因组 DNA 与单条 2Ai-2 染色体 DNA 第二轮扩增产物的 Southern 杂交结果 (M. λ DNA/*Hind*III+*Eco*RI)

Fig.3 Southern blot analysis of the second LA-PCR products, using a probe of total *Ag. intermedium* genomic DNA labeled by α-³²P-dCTP

2.2 2Ai-2 染色体 DNA 文库的构建

将第 2 轮 LA-PCR 产物纯化后，连接到 pUC18 质粒载体上，转化 *E. coli* DH5α，得到大约 5 × 10⁵ 个克隆（其中包括一定频率的重复克隆）。随机选取 1 000 个克隆，以中间偃麦草基因组 DNA 为探针进行菌落原位杂交，大约 628 个出现杂交信号（图 4 示其中 1 张杂交膜的杂交结果）。据此推算，该 DNA 文库中有 314 000 个与中间偃麦草有关的克隆。随即挑选 500 个克隆，用 M13 正/反通用引物进行 PCR 扩增发现插入片段大约在 150~1 500 bp，平均为 580 bp。50% 以上的插入片段在 377~695 bp，40% 在 150~377 bp，10% 在 695~1 543 bp 或大于 1 543 bp（图 5）。以 α-³²P-dCTP 标记的中间偃麦草基因组 DNA 为探针针对其中 100 个重组质粒进行点杂交，结果表明，有 56 个克隆（56%）出现微弱或无杂交信号，推测为低/单拷贝序列；44 个克隆（44%）出现较强/很强杂交信号，推测为中度/高度重复序列（图 6）。

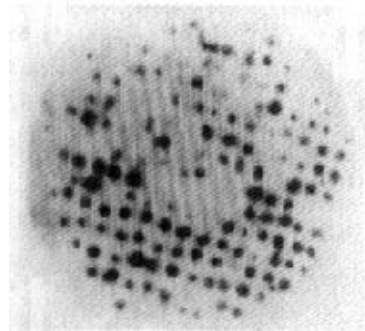


图 4 以 α-³²P-dCTP 标记的中间偃麦草基因组 DNA 为探针的菌落原位杂交

Fig.4 Clony hybridization using a probe of *Ag. intermedium* genomic DNA labeled by α-³²P-dCTP

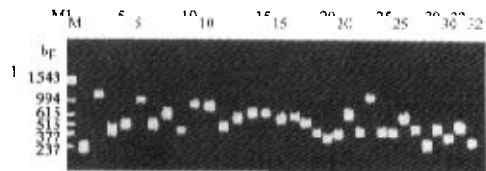


图 5 PCR 扩增分析文库中部分克隆插入片段

Fig.5 PCR amplification analysis the sizes of some insert fragments

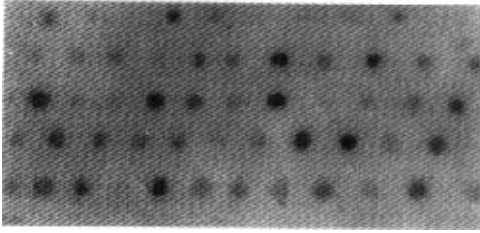


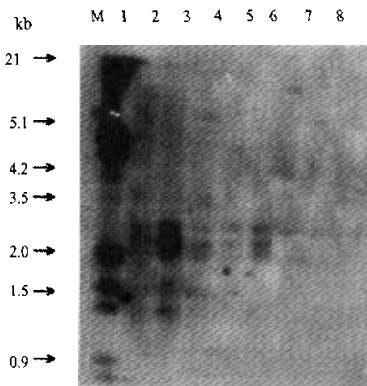
图 6 以 α -³²P-dCTP 标记的中间偃麦草基因组 DNA 为探针的点杂交部分结果

Fig.6 Dot hybridization of some plasmids cloned using a probe of *Ag. intermedium* genomic DNA labeled by α -³²P-dCTP

2.3 2Ai-2 染色体 DNA 文库中特异性探针的筛选

分别以 30 个低拷贝克隆和 5 个重复序列为探针, 与经内切酶消化的基因组 DNA 进行 RFLP 分析。筛选到 3 个多态性低拷贝探针 (Mag065、Mag088、Mag139) 和 1 个中间偃麦草专化高度重复序列 (Mag104)。

在 Mag065/*EcoRV* 组合中 (Mag065 为克隆编号), 中间偃麦草、无芒中 4、Z₁、Z₂、(Z₂ × 宛 7107) F₁ 均在 2.0~2.8 kb 处具有 3 条杂交带, 而中国春、宛 7107、黑麦等不含中间偃麦草染色体的材料缺失这些条带 (图 7)。表明 Mag065 为中间偃麦草特异



M. λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI

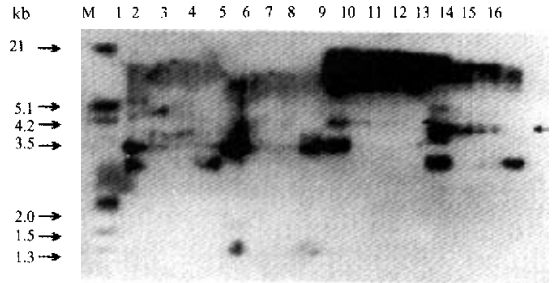
1. 中间偃麦草; 2. 无芒中 4; 3. Z₁; 4. Z₂; 5. (Z₂ × 宛 7107) F₁; 6. 中国春; 7. 宛 7107; 8. 黑麦

1. *Ag. intermedium*; 2. Awnless Zhong4; 3. Z₁; 4. Z₂; 5. (Z₂ × Wan7107) F₁; 6. (*T. aestivum*) Chinese Spring; 7. (*T. aestivum*) wan7107; 8. (*S. cereale*) rye.

图 7 Mag065 为探针与 *EcoRV* 酶切的基因组 DNA 杂交结果

Fig.7 Southern hybridization patterns of combination genomic DNAs/*EcoRV* using Mag065 as a probe

性寡拷贝序列。在 Mag088/*Hind*III 组合中, 中间偃麦草、无芒中 4、Z₂ 在 4.0 kb 处具有 1 条杂交带, 而宛 7107 缺失此带 (图 8)。在 Mag139/*Eco*RI 组合中, 中间偃麦草、无芒中 4、Z₂ 在 3.2 kb 处具有 1 条杂交带, 而宛 7107 缺失此带, 但宛 7107 在 2.9 kb 处有 1 条杂交带 (图 9)。表明 Mag088, Mag139 为中间偃麦草-小麦多态性寡拷贝序列。

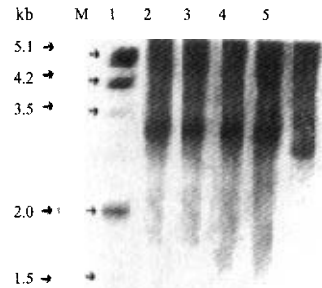


M. λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI; 1~4. *Eco*RI; 5~8. *Eco*RV; 9~12. *Dra*I; 13~16. *Hind*III; 1、5、9、13. 中间偃麦草; 2、6、10、14. 无芒中 4; 3、7、11、15. Z₂; 4、8、12、16. 宛 7107

1, 5, 9, 13. *Ag. intermedium*; 2, 6, 10, 14. Awnless Zhong4; 3, 7, 11, 15. Z₂; 4, 8, 12, 16. Wan7107

图 8 Mag088 为探针的基因组 DNA Southern 杂交结果

Fig.8 Southern hybridization patterns of combination of Mag088



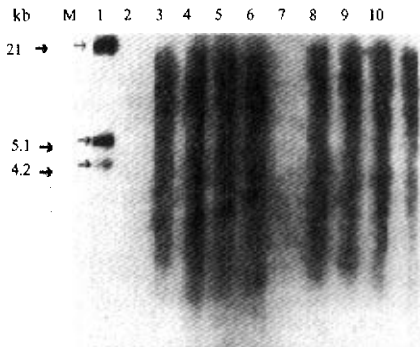
M. λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI; 1. 中间偃麦草; 2. 无芒中 4; 3. Z₂; 4. (Z₂ × 宛 7107) F₁; 5. 宛 7107

1. *Ag. intermedium*; 2. Awnless Zhong4; 3. Z₂; 4. (Z₂ × Wan7107) F₁; 5. Wan7107

图 9 Mag139 为探针与 *Eco*RI 酶切的基因组 DNA Southern 杂交结果

Fig.9 Southern hybridization patterns of combination of Mag139

在 Mag104/*Eco*RI 和 Mag104/*Hind*III 组合中, Mag104 与普通小麦宛 7107 几乎没有杂交信号, 而与中间偃麦草及其衍生物有较强的弥散杂交信号(图10), 说明 Mag104 为中间偃麦草特异性重复序列。以 Biotin-16-dUTP 标记的 Mag104 为探针, 中国春基因组 DNA 作封阻, 对 ($Z_2 \times$ 宛 7107) F_1 花粉母细胞染色体进行原位杂交, 在中间偃麦草染色体两端部出现较强的杂交信号, 臂间也出现了杂交信号, 但相对较弱(图11)。小麦染色体上未出现杂交信号。说明 Mag104 为中间偃麦草染色体专化重复序列。



M. λ DNA/*Hind*III+*Eco*RI:1~5. *Eco*RI: 6~10. *Hind*III
1, 6. 宛 7107; 2, 7. 中间偃麦草; 3, 8. 无芒中 4; 4, 9. Z_2 ; 5, 10. ($Z_2 \times$ 宛 7107) F_1
1, 6. Wan7107; 2, 7. *Ag. intermedium*; 3, 8. Awnless Zhong4;
4, 9. Z_2 ; 5, 10. ($Z_2 \times$ Wan7107) F_1

图10 Mag104 为探针的 Southern 杂交结果

Fig. 10 Southern hybridization patterns of combination of Mag104



图11 Biotin-16-dUTP 标记的 Mag104 为探针与 ($Z_2 \times$ 宛 7107) F_1 减数分裂中期 I 原位杂交(箭头示中间偃麦草染色体)

Fig. 11 GISH of meiotic metaphase I in F_1 hybrid of $Z_2 \times$ Wan7107 using Biotin-16-dUTP labeled Mag104 (Arrow showing the 2Ai-2 chromosome)

3 讨论

在 ($Z_2 \times$ 宛 7107) F_1 PMC MI 中, 可能出现 3 个单价体, 这是由于小麦染色体也可能以单价体的形式存在。试验中, 笔者选择在 ($Z_2 \times$ 宛 7107) F_1 PMC MI 中只有 1 个单价体的材料, 即只有中间偃麦草 2Ai-2 染色体以单价体形式存在的, 不与小麦染色体配对(图1), 以确保微分离的为 2Ai-2 染色体。

体外扩增片段及微克隆中插入片段的大小是染色体微克隆研究中的重要检测指标之一, 扩增片段越大越好。胡赞民等^[12]、党本元等^[13]分别用 LA-PCR 扩增了玉米和王百合的染色体 DNA, 扩增片段分别为 300~2 500 和 300~5 000 bp。本研究的扩增片段为 150~3 000 bp, 多数在 200~2 000 bp。扩增片段的大小不仅与所用方法和染色体自身结构有关。还可能:(1) 与染色体 DNA 酶解程度有关, 酶量少或酶解时间短时可使染色体 DNA 的部分酶切;(2) 与材料的固定方法有关。植物材料一般都采用卡诺固定液, 这种固定液中的醋酸对 DNA 具有脱嘌呤作用。Chen 等^[3]将卡诺固定时间降至 10 min, 胡赞民等^[12]用 95% 乙醇直接固定的方法以避免对 DNA 的损伤。本研究用卡诺固定液, 固定时间降至 15 min。总之, 缩短在卡诺固定液中的固定时间或者直接用乙醇固定, 可防止醋酸的脱嘌呤作用, 保持模板的完整性有助于大片段的扩增。

避免分离回收染色体被污染是关系到染色体显微操作技术成功与否的关键问题之一。本研究用 LA-PCR 从分离的单条染色体中得到 PCR 扩增产物, 经 Southern 杂交证实它们来自中间偃麦草 DNA。在笔者的前期试验中, 空白对照也有微弱的 PCR 扩增产物。但这些产物不能与中间偃麦草基因组 DNA 杂交。在 LA-PCR 扩增过程中, 经常会发生非特异性扩增产物。这种现象可能是由于:(1) 被细菌污染的各种酶所致, 这时需采用更换酶来解决。(2) 制片、分离单条染色体、去蛋白、酶解、连接接头、PCR 扩增等各步操作过程都易受到外来 DNA 的污染, 所以整个试验过程中所用的器皿均需经过严格的无菌处理。

体外 PCR 技术的发展促进了染色体微克隆的广泛应用。先后出现了载体介导(vector mediated-PCR)、简并寡聚核苷酸引物(DOP-PCR)、结合体一连接体(LA-PCR)等。目前主要采用后两者。

DOP-PCR方法只需要1个简并引物就可把大多数染色体片段扩增出来,是比较简单、快捷的方法。然而这种方法要求较高的无菌操作条件。因此,常在对照中有微弱的扩增带^[14]。而LA-PCR虽然也需要严格的无菌操作,但只要接头与染色体DNA连接之前没有污染,在以后步骤中即使有外源DNA的污染也不会对试验结果有较大的影响。并且DOP-PCR因使用随机引物和较低的退火温度,使得试验结果不稳定,随机性较大。比较而言,LA-PCR由于使用特异引物和较高的退火温度,因而比较稳定。DOP-PCR扩增到的片段比LA-PCR扩增的片段小^[4],而大片段的扩增产物更有利于构建覆盖率高的DNA文库及建库后的标记筛选和应用。因此,作者认为采用植物染色体显微切割技术时,选用LA-PCR较好。

理想的染色体DNA文库应富含单或低拷贝序列,而小麦等作物的核基因组中含大约80%的重复序列。由于高等植物核DNA中的未甲基化的胞嘧啶常位于富含单/低拷贝的区域成簇存在^[15]。*Sau3AI*对胞嘧啶甲基化敏感,只能酶切未甲基化区域的DNA序列。本试验所构建的2Ai-2染色体DNA文库中重复序列出现频率为44%、低/单拷贝出现频率为56%,说明使用*Sau3AI*可防止高频率重复DNA序列出现。在建立小麦染色体DNA文库时,使用同样对胞嘧啶甲基化敏感的*Hpa II*可以得到高频率的低/单拷贝克隆^[16]。但是,经*Hpa II*消化的微小片段通常只有200~300 bp。Chen^[3]等在用LA-PCR体外扩增分离的单条燕麦染色体DNA时,发现同样对胞嘧啶甲基化敏感的*MboI*(与*Sau3AI*为同工酶)酶切染色体DNA后的扩增结果比使用*Sau3AI*差。综上所述,笔者认为使用*Sau3AI*可以建立一个适合于选择RFLP标记的有功能的染色体DNA文库。

建立染色体DNA文库的最终目的,是从中筛选基因组和染色体特异性序列,提高筛选与目标基因紧密连锁的分子标记的效率。刘宝等^[16]从微分离的染色体中克隆出特异性序列证实扩增产物仅来自微分离的染色体;程祝宽等^[17]用STS、微卫星序列扩增的方法初步证实扩增产物的来源;周奕华等^[18]从黑麦1R染色体微克隆文库中筛选出1个与端粒相关的高度重复序列;孔凡晶等^[19]从簇毛麦端体6VS染色体文库中筛选出2个簇毛麦专化DNA序列,1个低拷贝序列克隆,1个为高度重复序列克隆。笔者利用显微激光切割法首次分离了小麦遗传背景下携带黄矮病抗性基因的中间偃麦草2Ai-2染色体,构建了

其DNA文库,并从中筛选到3个中间偃麦草多态性探针,1个中间偃麦草染色体专化重复序列,此专化重复序列将为鉴定中间偃麦草染色体提供有用的分子标记。

References

- [1] Jung C, Claussen U, Horsthemke B, et al. A DNA library from an individual *Beta patellaris* chromosome conferring nematode resistance obtained by microdissection of meiotic metaphase chromosomes. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20:503-522.
- [2] Schondelmaier R M, Jahoor A, Houben A, et al. Microdissection and microcloning of the barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 1HS. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 86:629-636.
- [3] Qian Chen, Ken Armstrong. Characterization of a library from a single microdissected oat (*Avena sativa* L.) chromosome. *Genome*, 1993; 485-488.
- [4] Baoliu, Gregorio Segal, Juan Manual Vega, et al. Isolation and characterization of chromosome-specific DNA sequence from a chromosome arm genomic library of common wheat. *The Plant Journal*, 1997, 11(5): 959-965.
- [5] Stein N, Pronelies N, Musket T, McMullen M, Weber G. Chromosome micro-dissection and region-specific libraries from pachytene chromosomes of maize (*Zea mays* L.). *Plant Journal*, 1998, 13:281-289.
- [6] Zhou Y, Hu Z, Chen Z. Microdissection and microcloning of rye (*Secale cereale* L.). *Chromosoma*, 1999, 108:250-255.
- [7] Zhou Y, Dang B, Wang H, Hu Z, Wang L, Chen Z. Microdissection of a single chromosome and construction of the microclone library from soybean. *Euphytica*, 2001, 121(2):129-135.
- [8] Xin Z Y, Chen X, Xu H J, et al. Characterization of potential source of barley yellow dwarf virus from wheat (*T. intermedium*). *Proc. 8th Int. Wheat Genetics Symposium*, 1993, 485-488.
- [9] Larkin P J, Bands P M, Lagudan E S, et al. Disomic *Thniopyrum intermedium* addition lines in wheat barley yellow dwarf virus resistance and with rust resistance. *Genome*, 1995, 38: 385-394.
- [10] 马有志, 富田因则, 中田升, 安室喜正, 近江户伸子, 福井希一. 应用分子原位杂交技术解析小麦-天兰冰草部分双二倍体——远中2号的染色体构成. *遗传学报*, 1997, 24: 344-349.
Ma Y Z, Tomita M, Nakata N, Yasumur Y, Ohmido N, Fukui K. Analysis of the chromosomes composition of common wheat (*Agroprion intermedium*) partial amphiploid, Yuan zhong 2 by *in situ* hybridization. *Acta Genetica Sinica*, 1997, 24: 344-349. (in Chinese)
- [11] 何聪芬, 马有志, 辛志勇, 徐琼芳, 钱红. 携带黄矮病抗性基因染色体的分离. *作物学报*, 1999, 25 (3): 273-278.
He C F, Ma Y Z, Xin Z Y, Xu Q F, Qian H. Isolation of the single chromosome with BYDV resistant gene. *Acta Agronomica Sinica*, 1999, 25(3): 273-278. (in Chinese)
- [12] 胡赞民, 党本元, 周奕华, 崔丽华, 王兰岚, 张铁汉, 李良材, 陈正华. 玉米单染色体的分离和体外扩增. *遗传学报*, 1998, 25 (6): 545-550.
Hu Z M, Dang B Y, Zhou Y H, Cui L H, Wang L L, Zhang T H, Li L C, Chen Z H. Isolation of single chromosome and DNA amplification *in vitro* in *Zea mays*. *Acta Genetica Sinica*,

- 1998, 25(6): 545-550. (in Chinese)
- [13] 党本元, 胡赞民, 周奕华, 崔丽华, 王兰岚, 李良材, 陈正华. 玉百合单条染色体 DNA 文库的构建. 科学通报, 1998, 43(2): 194-199.
Dang B Y, Hu Z M, Zhou Y H, Cui L H, Wang L L, Li L C, Chen Z H. Construction of single-chromosome DNA library from *Lilium regale wilson*. *China Science Bulletin*, 1998, 43(2):194-199. (in Chinese)
- [14] 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 and PCR amplification of large M-chromosome long arm in broadbean. *China Science Bulletin*, 1996, 41(4):361-363. (in Chinese)
- [15] Cheung W Y, Moore G, Money T A, et al. *Hap II* library indicates 'methylation-free island' in wheat and barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 84:739-746.
- [16] 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 Y, Huang B Q, Hao S. Isolation of common wheat chromosome 7B and clone of low copy species-specific DNA sequences. *China Science Bulletin*, 1999, 44(4):389-393. (in Chinese)
- [17] 程祝宽, 颜辉焯, 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微分离中的应用. 科学通报, 1998, 43(2): 194-199.
Cheng Z K, Yan H H, Dang B Y, Hu Z M, Gu M H, Zhu L H. Study on the microisolation of chromosome V short arm in rice tetrasome. *China Science Bulletin*, 1998, 43(2):194-199. (in Chinese)
- [18] 周奕华, 王槐, 党本元, 邓向东, 胡赞民, 陈正华. 利用微分离黑麦 1R 染色体的体外扩增产物进行染色体着染研究. 植物学报, 1999, 41(7): 715-721. (英文)
Zhou Y H, Wang H, Dang B Y, Deng X D, Hu Z M, Chen Z H. Chromosome painting in *Secale cereale* with PCR products from microdissected chromosome 1R. *Acta Botanica Sinica*, 1999, 41(7): 715-721.
- [19] 孔凡晶, 陈孝, 马有志, 辛志勇, 李连成, 张增艳, 林志娜. 簇毛麦端体 6VS 的显微切割及其专化 DNA 序列的克隆和分析. 植物学报, 2002, 44(3): 307-313. (英文)
Kong F J, Chen X, Ma Y Z, Xin Z Y, Li L C, Zhang Z Y, Lin Z S. Microdissection of *Haynaldia villosa* telosome 6VS and cloning of species-specific DNA sequences. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(3): 307-313.

(责任编辑 孙雷心)