

植物染色体分子核型技术研究进展

张 力 鹏, 刘 博, 陈 成 彬

(南开大学 生命科学学院, 天津 300071)

摘 要:近年来, 荧光原位杂交及荧光分带等细胞遗传学技术的发展, 提供了更多的染色体信息, 使科研工作者能从更精细水平上对植物进行核型分析, 更好地分辨基因组内各条非同源染色体, 以及进行分化程度小的基因组间的比较。这种核型分析技术为研究染色体行为和变异, 单个基因及转基因在基因组内的定位等开辟了新的途径。现在阐述以多色荧光原位杂交(mFISH)、基因组原位杂交(GISH)、染色体绘染(chromosome painting, CP)等荧光原位杂交为基础的染色体分子核型基础上, 分析了荧光分带技术(fluorochrome banding)在分子核型中的应用, 并对染色体分子核型技术在植物基因组功能研究领域的应用进行了展望。

关键词:分子核型; 染色体; 荧光原位杂交; 荧光分带; 重复序列

中图分类号:Q 343.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)08-0179-05

核型分析是细胞遗传学、染色体工程学、细胞分类学等学科的基本研究方法。细胞遗传学和分子细胞遗传学的建立和发展, 都是以染色体研究技术的创新和应用为其先导的。常规核型分析所用的数据均来源于体细胞染色体在普通光学显微镜下可测定的表型特征, 信息量极其有限。特别是对于基因组内染色体形态相近的物种以及基因组间分化程度较小的物种之间, 这种核型分析无法提供更多有效而可靠的信息。荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术和荧光分带(fluorochrome banding)技术可以使染色体呈现特定的杂交信号和带型, 为识别和分析染色体提供标记。由于这些标记都是基于染色体特定位点区域客观的 DNA 序列或结构组成特点, 使其比来源于染色体形态的测量数据更为准确而可靠。无疑, 这种加入了特定位点信息的染色体研究, 已经使广泛应用于细胞遗传学领域, 使核型分析技术进入了新的时代。1997 年, Brown 等^[1]在利用 FISH 技术对 2 种云杉(*Picea*)的基因组结构的研究中, 使用了“分子核型(molecular karyotype)”这一概念。刁英^[2]也在其综述中把这种将分子生物学技术与传统的细胞生物学技术相结合的新兴技术概括为“分子

核型”。由于同样是应用于染色体研究但是主要基于脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)技术的凝胶核型(gel karyotype)已经使用了“分子核型”这一概念, 为与其相区别, 将以荧光原位杂交技术及荧光分带技术为基础的核型分析方法全称为“染色体分子核型”。现对近年来各种染色体分子核型的研究进展及其在植物细胞遗传学领域的应用进行了综述。

1 以荧光原位杂交为基础的染色体分子核型

20 世纪 80 年代出现的以非放射性荧光物标记探针的原位杂交技术^[3], 以其简便快捷、灵敏度高、相比放射性标记探针具有良好的安全性, 并可通过多色标记探针进行多种序列同时定位的特点, 逾 30 年来取得了长足的进展和广泛的应用。在植物分子细胞遗传学研究领域, 以 FISH 技术为基础发展起来的多色荧光原位杂交(multicolor fluorescence *in situ* hybridization, mFISH)、基因组原位杂交(genomic *in situ* hybridization, GISH)和染色体绘染(chromosome painting, CP)技术都已成功应用于植物染色体分子核型研究。第 1 种方法主要用于分辨同一基因组内不同染色体, 后 2 种方法则多用于辨别不同基因组来源的染色体, 以下将结合应用实例对这 3 种方法分别加以介绍。

1.1 多色荧光原位杂交(mFISH)

许多植物种类的染色体或者很大, 或者很小, 且彼此间常具有非常相似的形态特征。这就必须通过若干染色体标记的辅助才能对染色体进行确定无误的辨认, 包括同源染色体的正确配对和区别同一基因组内各条非同源染色体。对基因组内各条染色体的正确识别是

第一作者简介:张力鹏(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向为分子细胞遗传学。E-mail: lipengzhang@mail.nankai.edu.cn.

责任作者:陈成彬(1972-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为遗传学。E-mail: chencb@nankai.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31371249); 天津市自然科学基金重点资助项目(13JCZDJC29000)。

收稿日期:2014-01-14

研究染色体进化和变异、染色体行为、基因组序列定位以及相近植物种属分类和系统进化的重要前提。利用多色荧光原位杂交技术在染色体上呈现的杂交信号,不仅可以辅助识别染色体,并且那些染色体或染色体区域特异性的位点还能够作为以上所提到的后续研究的重要参考标记。

应用多色荧光原位杂交技术构建的染色体分子核型也称为 FISH 核型(FISH karyotype),一般用多种不同的串联重复序列作为探针。探针的选择主要依据其在不同物种基因组内信号的数目和在染色体上的分布模式。在植物中应用最普遍的是在各植物种类间高度保守的基因家族:核糖体 RNA 基因(rDNA),包括 18S-5.8S-25S rDNA (简称 45S rDNA),或其转录单元内的一部分(如 25S rDNA),以及 5S rDNA,此外还有端粒序列,端粒相关序列(telomere-associated sequences, TAS)和着丝粒区域特异性重复序列。通过以上 2 种或多种探针的组合,使很多植物染色体的准确辨认成为可能。如棉花(*Gossypium mustelinum*)^[4]、牛尾菜(*Smilax rufescens*)^[5]、柳树(*Salix viminalis*)^[6]、百合(*Lilium*)^[7]等的部分植物。尽管在这些植物中有些并未能将所有染色体逐一区分,但已经大大提高了核型分析的精细程度,杂交信号作为染色体标记已经为研究这些植物的多倍体组成、系统发育等提供了重要信息。为了更好的区分各条染色体,许多研究者针对特定植物种类筛选出位于其它染色体区域的卫星 DNA 序列(satellite DNA),为分子核型提供更多的标记。Dou 等^[8]利用一个微卫星(micro-satellite)AAG 和 Afa-family 重复序列,结合基因组原位杂交技术(GISH),分析了披碱草属(*Elymus nutans*)3 个基因组 St、H、Y 的亲缘和进化关系。课题组曾利用 25S rDNA、5S rDNA LPD 序列、端粒序列克隆 LTA14 和弥散型重复序列克隆 LRA427 等 5 种探针分组混合后^[9-10],分 2 次与相同的细胞进行多色荧光原位杂交。各种探针在不同染色体上产生了不同排列组合的标记模式,使几乎全部的染色体可以被区分。首次将组合标记探针方法应用于落叶松属(*Larix*)的分子核型的构建(图 1)。

构建多色 FISH 核型,除选择串联重复序列作为探针,另一个策略则是以多个低拷贝序列为探针。低拷贝序列在基因组中一般只有 1 个或几个位点,更可能作为染色体特异性标记;此外,低拷贝序列也为探针的选择提供了丰富的资源^[11]。为了产生可辨认的 FISH 信号,这些低拷贝序列探针一般为带有较大插入片段的 DNA 克隆^[12]。Shibata 等^[13]从向日葵(*Helianthus annuus* L.)的栽培种 cv. HA89 等 2 个基因组文库中筛选出 44 个可

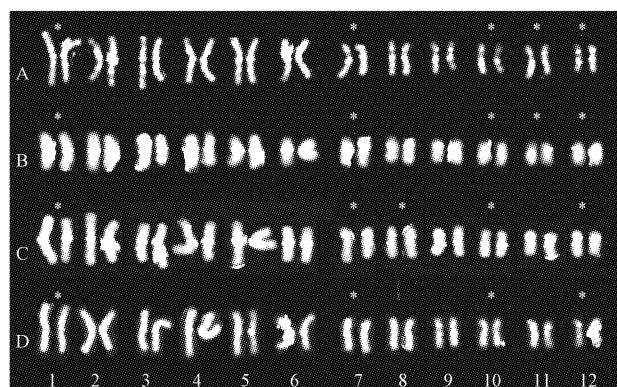


图 1 4 种落叶松属植物的分子核型

注:A:兴安落叶松;B:华北落叶松;C:日本落叶松;D:长白落叶松;星号示具有 LRA427 特异性位点的染色体对;比例尺:10 μm 。

Fig. 1 Four kinds of larix molecular karyotype

Note: A; *Larix gmelinii*; B; *Larix principis-rupprechtii*; C; *Larix kaempferi*; D; *Larix olgensis*; The asterisk has LRA427 specific site of a chromosome; measuring scale: 10 μm .

以产生特定杂交位点的克隆(24 BACs, 20BIBACs),并利用这些杂交信号位点将这些克隆划分为 18 个连锁群,构建了传统 RFLP 和 SSR 分子标记遗传图谱所无法区分的 4 个连锁群,成功整合了遗传连锁图谱和物理图谱。

对于多色 FISH 核型,除了探针的选择,另一个重要问题是如何在同一染色体标本上同时呈现多种不同颜色的标记。为了扩充探针标记容量,出现了组合标记(combinatorial labeling)探针和比例标记(ratio-labeling)探针。前者是将 1 种探针用 2 种或以上可产生不同颜色的标记物进行标记,原则上可标记最多达 $2n-1$ (n 为不同标记物的数目)种探针^[14]。后者是将不同标记物以一定比例标记同一种探针,标记容量进一步增加^[15]。但是,由于荧光染料本身和显微镜技术的限制,后 1 种标记技术尚存在分辨率低等缺点,因而未得到广泛的应用^[16]。在植物分子核型研究中,Haeterok 等^[17]将组合标记探针用于黑麦、小麦等多种植物染色体的识别,可一次性同时清楚地检测 3 种标记。课题组也将此方法用于构建落叶松属(*Larix*)、杨属(*Populus*)的分子核型^[9,18]。不过,在多数研究中,对 2 种以上序列位点的检测仍多是通过重复杂交^[19]、FISH 信号的直接检测和间接检测相结合^[20]等策略实现的。

1.2 基因组原位杂交(GISH)

尽管多色 FISH 核型已广泛应用于多种植物,而最早应用荧光标记辨别植物染色体的方法却是基因组原位杂交^[21]。这种方法可以直接分辨种间杂种(interspecific hybrids)、异源多倍体和种间渐渗系(interspecific

introgression lines)中来自不同亲本基因组的染色体,并对染色体的组成和变异进行分析^[22]。

婆罗门参(*Tragopogon miscellus*)是一个自然形成的异源四倍体,距今已传 40 余代,但是细胞生物学研究证明,在其进化过程中子代存在持久的染色体变异事件。Chester 等^[23]以二倍体亲本 *T. pratensis* 和 *T. dubius* 基因组为探针的 GISH,发现子代 76% 个体具有不同情况的染色体易位,69% 个体为非整倍体,并阐述了多倍体进化过程中出现的染色体重排现象。此外,芸薹属(*Brassica*)的 3 个异源四倍体:*B. carinata*、*B. juncea*、*B. napus*,和它们的 3 个二倍体祖先种(*B. nigra*、*B. oleracea*、*B. campestris*)组成了一个非常适用于研究多倍体的模式系统。Maluszynska 等^[24]通过以 *B. nigra* 和 *B. campestris* 的基因组 DNA 为探针的双色 GISH,结合 25S 和 5S rDNA 标记,成功区分了 *B. juncea* 中的 A、B 基因组,并分别标记出了 36 条染色体中的 28 条。小麦作为异源多倍体,也有许多研究者应用 GISH 技术对其和其它小麦族成员的基因组进行研究。Han 等^[25-26]应用改进的多色 GISH 技术,清楚地将组成六倍体小麦基因组的 A、B 和 D 基因组区分开。在该技术中,Han 等用荧光素标记 *Thinopyrum intermedium* 和 *Triticum urartu* 的基因组总 DNA,用生物素标记 *Aegilops tauschii* 的基因组总 DNA,*Aegilops speltoides* 的基因组 DNA 作为封阻。这种多色 GISH 技术为研究异源多倍体植物基因组结构与变异提供了重要的技术基础。

但是,尽管 Han 等在区分小麦不同基因组来源的染色体研究中取得了成功,更多像小麦一样,其亲本基因组的亲缘关系非常相近的多倍体,则很难通过 GISH 区分不同来源的染色体。因此,GISH 技术有其无法避免的局限性。

另一方面,Zoller 等^[27]在用亲缘关系较远的植物基因组 DNA 作为探针,进行基因组原位杂交试验中获得了另一种效果。针对小麦、黑麦、大麦、洋葱等单子叶植物和蚕豆、甜菜等双子叶植物,Zoller 等均采用拟南芥的基因组 DNA 作为 GISH 探针。杂交信号位于核仁组织区(nucleolus organizing regions,NORs)、含卫星 DNA 的 N 带区域,及其它含有与拟南芥同源的保守序列区域,如端粒。Zoller 等的试验为构建多种不同植物的分子核型提供了新的策略。其优点在于拟南芥基因组探针的通用性,使研究者无需再针对某一植物单独筛选探针,而且杂交信号的强度和可重复性良好,无需进行信号的放大,也无需进行封阻。

1.3 染色体绘染(chromosome painting,CP)

“染色体绘染”这一术语最早由 Pinkel 等^[28]提出,用

以概括利用 FISH 将一个染色体组中特定的染色体或染色体片段进行原位呈现的技术。虽然此后 CP 在动物和人类细胞遗传学研究中得到广泛应用,在植物中却很难获得成功。这很可能是由于植物基因组中含有大量弥散分布于各条染色体的重复序列的原因。尽管如此,一些研究者还是通过改进研究策略取得了一定的突破。

与哺乳动物中以单、低拷贝序列作为 CP 探针的策略相反,针对植物中富含重复序列这一特点,Houben 等^[29]富集了染色体特异的重复序列作为探针,较为成功的标记了黑麦(*Secale cereale*)、*Allium schoenoprasum*、*Brachycome dichromosomatica* 的 B 染色体。不过在 A 染色体上仍有较弱的弥散信号无法消除。Yu 等^[30]利用以来自 Cot-1 文库的 11 个串联重复序列为探针产生的多色荧光杂交信号,准确清晰的区分出四倍体苜蓿(*Medicago sativa* L.)的 2 个染色体组,并结合常规染色体测量数据,成功构建了分子核型。Lysak 等^[31]利用含染色体特异序列的 BAC 克隆,标记出了拟南芥的 1、2 和 4 号染色体,这种标记使这些染色体在减数分裂和有丝分裂各个时期都可以被分辨,从而可以进行不同细胞周期染色体行为的研究。Lysak 等的成功的一个重要原因是拟南芥的基因组较小,所含重复序列相对很少。此外,在菜豆^[32]、番茄^[33]、高粱^[34]和马铃薯^[35]中,也利用染色体特异的 BAC 克隆,使部分染色体得以分辨,但是仍需要加入少量的 Cot I DNA 以抑制重复序列的杂交背景。在含有大型基因组的植物中,因所含重复序列显著增加,则需要改变探针选择的策略。Zhang 等^[36]为区分六倍体小麦中 3 个不同来源的染色体组,分别从 A 组和 D 组供体种的 BAC 克隆文库中筛选出若干含有基因组特异重复序列的克隆,这些克隆所产生的 CP 信号弥散于其所特异的染色体组的所有染色体上,因此可用于检测形成异源多倍体后染色体的易位情况。但是也因其供体种的亲缘关系较近的原因使得 Zhang 等无法通过 GISH 进行异源多倍体和渐渗系的染色体分辨的研究。

2 荧光分带技术(fluorochrome banding)在分子核型中的应用

与开创荧光分带技术的 Q 带技术不同,现今的植物染色体分析更多的是采用色霉素 A₃(chromomycin A₃, CMA)、4',6-二脒-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,DAPI)、Hoechst33258 等荧光染料。尤其是 DAPI,由于作为 FISH 试验的复染剂被广泛使用,且能在很多植物染色体的特定区域呈现清晰的阳性或阴性带型^[37],DAPI 带型常常被作为分子核型的重要标记。尽管 Brown 和 Carlson、刁英等在对分子核型的概括中并未提到荧光分带技术,但因其作用机理与 DNA 分子

的碱基组成相关^[38],更重要的是其在许多植物染色体分析中,都能提供一定的染色体标记信息,所以,将该技术也列入到染色体分子核型技术中,以作为 FISH 技术的重要补充。

在一些基因组分化程度高、染色体变异较大的植物分类群中,甚至仅靠荧光分带就可以完成分子核型分析。Yurkevich 等^[39]利用 DAPI/C-banding 能够区分所有 *Adenolinum* 的全部染色体,证实了该物种染色体模式的相似性,并在此基础上结合 Ag-NOR、FISH 及 RAPD 分析发现 *Adenolinum* 与 *Linum* 其它种存在较远的进化关系;Urdamplilleta 等^[40]运用 CMA 和 DAPI 分带检测到地铃属(*Cardiospermum*)种间染色体的变异,并结合 FISH 定位技术进行了系统发育和进化分析;Karlov 等^[41]根据 DAPI 阳性带的有无识别了蛇麻草(*Humulus lupulus*)中的性染色体,结合 rDNA 定位分析,构建了该种的分子核型;Liu 等^[42]将 DAPI 染色与三维图像软件分析手段相结合,在大麦、水稻、小麦、*Lilium brownii* 和蚕豆中构建了稳定的 DAPI 带型,可用于识别特定的染色体和染色体区域。如果这一技术能够进一步应用于更多的植物种类,将以荧光分带技术为基础的染色体分析迈上一个新的台阶,在染色体的结构分析和基因的物理定位研究中将具有广泛的应用价值。

3 结论与展望

综上所述,根据作用机理、研究的广泛性与实用性,将 mFISH、GISH、CP 和荧光分带这些技术手段都包括进构建染色体分子核型的技术范畴。这些细胞遗传学技术的发展为植物基因组研究提供了新的工具,可以获得更精确的信息研究染色体结构和行为。越来越多植物基因组测序的完成及 BAC 克隆文库的构建,将为选择基因组特异探针、染色体或染色体片段特异的探针提供更为丰富的资源,从而使染色体分子核型技术在植物基因组功能的研究领域中发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Brown G R, Carlson J E. Molecular cytogenetics of the genes encoding 18S-5.8S-26S rRNA and 5S rRNA in two species of spruce (*Picea*) [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 1-9.
- [2] 刁英. 染色体核型研究的方法及应用 [J]. 渝西学院学报, 2004(3): 55-58.
- [3] Langer P R, Waldrop A A, Ward D C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides; novel nucleic acid affinity probes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78: 6633-6637.
- [4] Wu Q, Liu F, Li S H, et al. Uniqueness of the *Gossypium mustelinum* genome revealed by GISH and 45S rDNA FISH [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2013, 55(7): 654-662.
- [5] Pizzaiia D, Oliveira V M, Martins A R, et al. Karyotype characterization reveals active 45S rDNA sites located on chromosome termini in *Smilax rufescens* (Smilacaceae) [J]. Genet Mol Res, 2013, 12(2): 1303-1310.
- [6] Németh A V, Dudits D, Molnár-Láng M, et al. Molecular cytogenetic characterisation of *Salix viminalis* L. using repetitive DNA sequences [J]. J Appl Genetics, 2013, 54: 265-269.
- [7] Sultana S, Lee S H, Bang J W, et al. Physical mapping of rRNA gene loci and inter-specific relationships in wild *Lilium* distributed in Korea [J]. J Plant Biol, 2013, 53: 433-443.
- [8] Dou Q W, Chen Z G, Liu Y A, et al. High frequency of karyotype variation revealed by sequential FISH and GISH in plateau perennial grass forage *Elymus nutans* [J]. Breeding Science, 2009, 59: 651-656.
- [9] Liu B, Qi L, Chen R. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization with combinatorial labeling probes enables a detailed karyotype analysis of *Larix principis-rupprechtii* [J]. Biological Research, 2007, 40: 23-28.
- [10] Liu B, Zhang S, Zhang Y, et al. Molecular cytogenetic analysis of four *Larix* species by bicolor fluorescence *in situ* hybridization and DAPI banding [J]. International Journal of Plant Sciences, 2006, 167(2): 367-372.
- [11] Kim J, Childs K L, Islam-Faridi M N, et al. Integrated karyotyping of sorghum by *in situ* hybridization of landed BACs [J]. Genome, 2002, 45: 402-412.
- [12] Dong F, Song J, Naess S K, et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato [J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 1001-1007.
- [13] Shibata F, Nagaki K, Yokota E, et al. Tobacco karyotyping by accurate centromere identification and novel repetitive DNA localization [J]. Chromosome Res, 2013, 21: 375-381.
- [14] Ried T, Baldini A, Rand T C, et al. Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 1388-1392.
- [15] Nederlof P M, van der Flier S, Vrolijk J, et al. Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes for multiple *in situ* hybridization by digital imaging microscopy [J]. Cytometry, 1992, 13(8): 839-845.
- [16] Levsky J M, Singer R H. Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future [J]. Journal of Cell Science, 2003, 116: 2833-2838.
- [17] Hasterok R, Langdon T, Taylor S, et al. Combinatorial labeling of DNA probes enables multicolour fluorescence *in situ* hybridization in plants [J]. Folia Histochemica Et Cytobiologica, 2002, 40(3): 319-323.
- [18] 董凤平, 韩素英, 张守功, 等. 25S rDNA 在杨属植物染色体上的定位 [J]. 云南植物研究, 2007, 29(4): 423-428.
- [19] Lengerova M, Kejnovsky E, Hobza R, et al. Multicolor FISH mapping of the dioecious model plant, *Silene latifolia* [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 1193-1199.
- [20] Vischi M, Jurman I, Bianchi G, et al. Karyotype of Norway spruce by multicolor FISH [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 591-597.
- [21] Schwarzbacher T, Leitch A R, Bennett M K, et al. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid [J]. Ann Bot, 1989, 98: 315-324.
- [22] Neelam K, Rawat N, Tiwari V K, et al. Introgression of group 4 and 7 chromosomes of *Ae. peregrina* in wheat enhances grain iron and zinc density [J]. Mol Breeding, 2011, 28: 623-634.
- [23] Chester M, Gallagher J P, Symonds V V, et al. Extensive chromosomal variation in a recently formed natural allopolyploid species, *Tragopogon miscellus* (Asteraceae) [J]. PNAS, 2012, 109: 1176-1181.
- [24] Maluszynska J, Hasterok R. Identification of individual chromosomes

and parental genomes in *Brassica juncea* using GISH and FISH[J]. Cytogenetic and Genome Research, 2005, 109: 310-314.

[25] Han F, Fedak G, Benabdelmouna A, et al. Characterization of six wheat \times *Thinopyrum intermedium* derivatives by GISH, RFLP and multicolor GISH[J]. Genome, 2003, 46: 490-495.

[26] Han F, Liu B, Fedak G, et al. Genomic constitution and variation in five partial amphiploids of wheat-*Thinopyrum intermedium* as revealed by GISH, multicolor GISH and seed storage protein analysis[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 1070-1076.

[27] Zoller J F, Yang Y, Reinhold G, et al. Comparative genomic in situ hybridization (cGISH) analysis on plant chromosomes revealed by labeled *Arabidopsis* DNA[J]. Chromosome Res, 2001(9): 357-375.

[28] Pinkel D, Langejant J, Collins C, et al. Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 9138-9142.

[29] Houben A, Field B L, Saunders V A. Microdissection and chromosome painting of plant B chromosomes[J]. Methods in Cell Science, 2001, 23: 115-124.

[30] Yu F, Lei Y T, Li Y, et al. Cloning and characterization of chromosomal markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.)[J]. Theor Appl Genet, 2013, 126: 1885-1896.

[31] Lysak M A, Pecinka A, Schubert I. Recent progress in chromosome painting of *Arabidopsis* and related species[J]. Chromosome Res, 2003(11): 195-204.

[32] Almeida C, Pedrosa-Harand A. High macro-collinearity between lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) and the common bean (*P. vulgaris* L.) as revealed by comparative cytogenetic mapping[J]. Theor Appl Genet, 2013, 126: 1909-1916.

[33] Budiman M A, Chang S, Lee S, et al. Localization of *jointless-2* gene in the centromeric region of tomato chromosome 12 based on high resolution

genetic and physical mapping[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 190-196.

[34] Islam-Faridi M N, Childs K L, Klein P E, et al. A molecular cytogenetic map of sorghum chromosome 1: fluorescence *in situ* hybridization analysis with mapped bacterial artificial chromosomes[J]. Genetics, 2002, 161: 345-353.

[35] Dong F, Song J, Naess S K, et al. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 1001-1007.

[36] Zhang P, Li W, Friebe B, et al. Simultaneous painting of three genomes in hexaploid wheat by BAC-FISH[J]. Genome, 2004, 47: 979-987.

[37] Nakamura R, Kitamura S, Inoue M, et al. Karyotype analysis of *Nicotiana karwakkamii* Y. Ohashi using DAPI banding and rDNA FISH[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 810-814.

[38] Liu J Y, She C W, Hu Z L, et al. A new chromosome fluorescence banding technique combining DAPI staining with image analysis in plants[J]. Chromosoma, 2004, 113: 16-21.

[39] Yurkevich O Y, Naumenko-Svetlova A A, Bolsheva N L, et al. Investigation of genome polymorphism and seed coat anatomy of species of section *Adenolinum* from the genus *Linum*[J]. Genet Resour Crop Evol, 2013, 60: 661-676.

[40] Urdampilleta J D, Coulleri J P, Ferrucci M S, et al. Karyotype evolution and phylogenetic analyses in the genus *Cardiospermum* L. (Paullinieae, Sapindaceae)[J]. Plant Biology, 2013(15): 868-881.

[41] Karlov G I, Danilova T V, Horlemann C, et al. Molecular cytogenetics in hop (*Humulus lupulus* L.) and identification of sex chromosomes by DAPI-banding[J]. Euphytica, 2003, 132: 185-190.

[42] Liu J Y, She C W, Hu Z L, et al. A new chromosome fluorescence banding technique combining DAPI staining with image analysis in plants[J]. Chromosoma, 2004, 113: 16-21.

Research Advances in Plant Chromosomal Molecular Karyotyping

ZHANG Li-peng, LIU Bo, CHEN Cheng-bin

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: Recent developments on multiple cytogenetic techniques such as fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and fluorochrome banding, provide us more information on chromosomes, which enable detailed karyotype analysis of plants. As chromosome marks, signals showed by multicolor FISH using different repetitive sequences as probes and/or fluorochrome bands, improves our ability to distinguish each of the nonhomologous chromosomes within a genome, and to distinguish slightly diverged genomes from each other. Such karyotype analysis opens new avenues for the study of chromosomal variation and behavior, as well as for the localization of individual genes and transgenes to genomic position. In this paper, the multicolor fluorescence *in situ* hybridization (mFISH), genomic *in situ* hybridization (GISH), chromosome painting dye (chromosome painting, CP), such as fluorescence *in situ* hybridization-based molecular chromosome karyotype were described, based on the analysis of the fluorescence banding techniques (fluorochrome banding) applications in molecular karyotype and molecular karyotype and chromosome technology in the field of plant genomics functional studies were discussed.

Key words: molecular karyotype; chromosome; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); fluorochrome banding; repetitive sequences