

网络出版时间:2025-07-07

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20250704.1645.002

小伞山羊草特异寡核苷酸探针开发和 Oligo-FISH 核型构建

陈丽娟, 罗婧, 张旭, 肖进, 袁春霞, 王秀娥, 王海燕

(南京农业大学作物遗传与种质创新利用全国重点实验室/细胞遗传研究所/现代作物生产省部共建协同创新中心, 江苏南京 210095)

摘要: 小麦野生近缘物种小伞山羊草 (*Aegilops umbellulata*, $2n=2x=14$, UU) 是普通小麦的三级基因源。为准确鉴定小麦背景中的小伞山羊草染色体或染色体片段, 本研究在利用二代测序获得小伞山羊草 U 基因组序列信息的基础上, 根据其中鉴定出的 17 条可能的特异卫星重复序列设计了 13 个寡核苷酸探针。Oligo-FISH 结果表明, 其中 10 个探针可在小伞山羊草染色体上产生明显的杂交信号。对探针进行特异性分析发现, 5 个探针在小伞山羊草染色体上存在特异的杂交信号, 在小麦染色体上则无信号, 可作为识别小麦背景下 U 基因组染色体的特异性探针。本研究选择在小伞山羊草上能产生丰富信号的两个探针 Oligo-pAu153、Oligo-pAu263 与小伞山羊草特异探针 Oligo-pAu133 结合 Oligo-pSc119.2 构成探针套 ONPS# AU1, 用其构建了小伞山羊草染色体的 Oligo-FISH 核型。该 FISH 核型可以准确识别小伞山羊草各条染色体, 对加快挖掘、转移和利用小伞山羊草优异基因具有重要意义。

关键词: 小伞山羊草; 二代测序; 卫星重复序列; 寡聚核苷酸探针; 荧光原位杂交

中图分类号: S512.1; S336

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2025)09-1147-09

Development of Specific Oligonucleotide Probe Library of *Aegilops Umbellulata* and Construction of Oligo-FISH Karyotype

CHEN Lijuan, LUO Jing, ZHANG Xu, XIAO Jin, YUAN Chunxia, WANG Xiu'e, WANG Haiyan

(National Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement and Utilization/Cytogenetics Institute/Collaborative Innovation Center for Modern Crop Production Co-sponsored by Province and Ministry(CIC-MCP), Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: *Ae. umbellulata* (*Aegilops umbellulata*, $2n=2x=14$, UU) is a tertiary gene resource for wheat improvement. In order to accurately identify the chromosomes of *Ae. umbellulata* U genome or the chromosome segments transferred into wheat, based on the next-generation sequencing information of *Ae. umbellulata* U genome, 13 oligonucleotide probes were designed for Oligo-FISH analysis according to the 17 possible specific satellite repeats identified. The Oligo-FISH results showed that 10 of the probes exhibited obvious hybridization signals on the chromosomes of *Ae. umbellulata*. The probe specificity analysis revealed that the five probes generated hybridization signals on the chromosomes of *Ae. umbellulata*, but there was no obvious hybridization signal on the chromosomes in wheat, which can be used as the specific probes to identify the chromosomes of U genome in wheat background. Two probes Oligo-pAu153 and Oligo-pAu263, generating rich and strong signals on *Ae. umbellulata* chromosome, and one probe Oligo-pAu133 specific for *Ae. umbellulata* chromosome combining with Oligo-pSc119.2 were used as a probe multiplex ONPS# AU1. The Oligo-FISH karyotype of *Ae. umbellulata* was constructed, which can accurately identify each chromosome of the U

收稿日期: 2024-06-02 修回日期: 2024-07-17

基金项目: 江苏省重点研发计划项目 (BE2022346); 江苏省农业农村厅揭榜挂帅项目 (JBGS[2021]006); 江苏省现代农业产业技术体系项目 (JATS[2023]422)

第一作者 E-mail: 2021101121@njau.edu.cn (陈丽娟)

通讯作者 E-mail: hywang@njau.edu.cn (王海燕)

genome. It will accelerate the step for mining, transferring and utilizing the excellent genes of *Ae. umbellulata*.

Keywords: *Aegilops umbellulata*; Next-generation sequencing; Satellite repeats; Oligonucleotide probe; Fluorescence *in situ* hybridization

小伞山羊草(*Ae. umbellulata*, UU, $2x=14$)为禾本科山羊草属一年生物种,主要分布在土耳其、伊朗等地^[1],是山羊草属中唯一含有 U 基因组的二倍体物种,也是含有 U 基因组多倍体山羊草物种的 U 基因组二倍体供体种,例如四倍体物种卵穗山羊草(*Ae. geniculata*, U^sU^sM^sM^s)、粘果山羊草(*Ae. kotschyi*, U^vU^vS^vS^v)和六倍体牡山羊草(*Ae. juvenalis*, DDMMUU)等,属于普通小麦的三级基因源^[2]。

小伞山羊草具有抗小麦白粉病、条锈病、叶锈病、小麦瘦蚊病、小麦蚜虫以及耐盐、耐旱、耐锌毒害等优良性状^[3-4],是小麦遗传改良的重要基因资源。目前,通过远缘杂交和染色体工程手段已将小伞山羊草所携的抗白粉病基因 *PmY399*、抗叶锈病基因 *Lr9* 和 *Lr76*、抗条锈病基因 *Yr70* 转移到普通小麦中。Zhu 等^[5]在四倍体小麦-小伞山羊草双二倍体与普通小麦杂交、回交后代中筛选到携带抗白粉病基因 *PmY399* 的普通小麦-小伞山羊草 2B(2U)代换系。Sears^[6]通过远缘杂交和辐射诱变的方法,首次创制了携带 *Lr9* 的普通小麦-小伞山羊草 6U 易位系。Bansal 等^[7-8]研究发现,小麦-小伞山羊草渐渗系既抗小麦条锈病,又抗叶锈病,通过对小伞山羊草 5U 染色体进行分拣和测序,将 5U 染色体上完全连锁的抗叶锈病基因 *Lr76* 和抗条锈病基因 *Yr70* 定位到小麦 5DS 染色体末端 9.47 Mb 的遗传区间,该易位系所携的抗病基因已经被转移到印度小麦品种 PBW343 和 PBW550 中,这两个品种可用于普通小麦的抗叶锈病和条锈病的遗传改良。此外,小伞山羊草也是普通小麦品质改良的重要基因来源,具有丰富的高分子量谷蛋白亚基(high-molecular-weight-glutenin subunit, HMW-GS)等位变异,目前已经克隆和测序的小伞山羊草 HMW-GS 基因有 *1Uy1.9*、*1Ux3.5* 和 *1Ux3*^[9]。

在利用染色体工程手段转移野生近缘物种优异基因时,高效、精准地鉴定外源染色质是种质创新的关键环节。随着植物基因组学的快速发展,已经发展出基因组原位杂交(genomic *in situ* hybridization, GISH)、荧光原位杂交(fluorescence

in situ hybridization, FISH)等分子遗传学技术和基于简单重复序列、表达序列标签、单核苷酸多态性等相关分子标记的外源染色质鉴定技术。例如,彭泽等^[10]发现,寡核苷酸探针 Oligo-pSc119.2 与重复序列探针 (GAA)₇ 相结合可以准确地辨别小伞山羊草的每对染色体,建立了小伞山羊草的 FISH 核型,可为识别小麦-小伞山羊草新种质中外源染色体提供参考。宋中平^[11]利用 Oligo-pSc119.2、Oligo-pTa71、Oligo-pTa713、(AAC)₅、(ACT)₇、(CTT)₁₂ 等多种探针对多份小伞山羊草材料进行 FISH 核型和遗传多样性分析,发现每条染色体有 2~6 种变异;并在四倍体小麦-小伞山羊草杂种 F₁ 自交后代中鉴定出小麦与小伞山羊草间相互易位材料,这些材料可作为利用小伞山羊草优异性状的基因源。目前,在小伞山羊草染色体鉴定研究中,利用的重复序列探针,例如 Oligo-pSc119.2、Oligo-pTa71、Oligo-pTa713 都来源于其他物种,对小伞山羊草染色体无特异性,而且基于重复序列开发的 FISH 探针只在染色体的特定区域如长短臂的端部或着丝粒区域产生较为局限的点状信号,不能覆盖整条染色体,难以鉴定涉及染色体小片段结构易位或重排等。因此,迫切需要基于小伞山羊草基因组信息,开发小伞山羊草特异 oligo 探针,提高小伞山羊草染色质的鉴定精度、特异性和效率。

本研究利用 TAREAN 软件对小伞山羊草的二代测序数据进行分析,鉴定特异重复序列,根据重复序列基序开发寡核苷酸探针,通过 Oligo-FISH 筛选小伞山羊草特异 oligo 探针;利用筛选出的特异 oligo 探针结合前人开发的寡核苷酸探针 Oligo-pSc119.2 构建小伞山羊草 U 基因组染色体的 FISH 核型,以完善小伞山羊草染色体鉴定体系,为挖掘和利用小伞山羊草的优异基因提供有效的技术手段。

1 材料与方法

1.1 植物材料

4 份小伞山羊草(*Ae. umbellulata*, 基因组 UU, $2n=14$),引种号分别是 PI276994、PI487219、PI298906、2018In-647;顶芒山羊草(*Ae. comosa*, 基因组 MM, $2n=14$),引种号是 PI551063;尾状

山羊草(*Ae. markgrafii*, 基因组 CC, $2n=14$), 引种号为 PI551120; 单芒山羊草(*Ae. uniaristata*, 基因组 NN, $2n=14$), 引种号为 PI554418; 拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltoides*, 基因组 SS, $2n=14$), 引种号为 PI542272; 节节麦(*Ae. tauschii*, 基因组 DD, $2n=14$), 引种号为 PI486275; 黑麦(*Secale cereal*, 基因组 RR, $2n=14$), 引种号为 PI542176, 均引自美国国家植物种质资源库(NPGSUSA)。簇毛麦(*Haynaldia villosa*, 基因组 VV, $2n=14$), 引种号为 91C43, 引自英国剑桥植物园。普通小麦品种中国春(CS)和硬粒小麦品种中引 1286 由南京农业大学细胞遗传研究所(CINAU)保存。

1.2 小伞山羊草的基因组测序和 oligo 探针开发

采用 CTAB 法提取小伞山羊草 PI276994 三叶期叶片基因组 DNA。通过 DNA 片段化、末端修复、连接和 PCR 扩增构建 DNA 文库。利用 Agilent 2100 对 DNA 文库进行质量控制, 最终合格的文库由中国深圳 BGI 公司用双末端测序法进行 BGISEQ-500 测序。去除原始序列中低质量、低复杂度、短于 35 bp 的 Reads, 得到高质量测序数据用于进一步分析。

参考史培瑶等^[12]开发寡核苷酸探针的方法, 从小伞山羊草的测序数据中, 随机选择 800 000 条 Reads, 经质检和筛选获得 650 778 条 Reads, 利用 TAREAN^[13]进行聚类分析, 鉴定卫星重复序列。对鉴定出的卫星重复序列基序(包括高置信度重复序列和低置信度重复序列)在 NCBI 上进行比对后, 用 Primer 5.0 软件搜索长度为 50~59 bp 的特异重复序列基序作为 oligo 探针的候选序列, 对于非特异重复序列基序, 随机截取 50~59 bp 作为 oligo 探针的候选序列(保证合适的退火温度)。每个卫星重复序列开发 1 个 oligo 探针。

卫星重复序列和探针命名: 用 p 代表探针 probe, A 代表山羊草属 *Aegilops* L., u 代表小伞山羊草 *umbellulata*, 加序列聚类簇的编号, 例如来自于 U 基因组的 cluster67 被命名为 pAu67, 以其开发的 oligo 探针命名为 Oligo-pAu67。本研究所有的 oligo 探针由南京擎科生物有限公司合成, 探针的 5 端由 FAM(绿色荧光)或 TAMRA(红色荧光)修饰。

1.3 有丝分裂中期染色体制片

根尖细胞有丝分裂中期同步化及染色体制片

参照程梦豪等^[14]的方法。

1.4 寡核苷酸探针的荧光原位杂交(Oligo-FISH)

Oligo-FISH 技术在 Lei 等^[15]的基础上稍作修改。选取分裂相好的染色体制片放于含 0.15 mol·L⁻¹ NaOH 的 70% 酒精中, 变性 5 min, 随后依次放入 70%、90% 和 100% 的酒精中梯度脱水 5 min, 晾干备用。每张已变性的制片上加 15 μL 的杂交液, 杂交液组成(7.5 μL 甲酰胺, 1.5 μL 缓冲液(20×SSC), 0.5 μL 鲑鱼精 DNA, 10 pmol oligo 探针, ddH₂O 补足至 15 μL)。盖上盖玻片, 置于湿盒, 37 °C 杂交 6 h 以上; 取出制片, 轻轻敲除盖玻片, 放入装有 ddH₂O 的脱水缸中洗 10 min(42 °C 水浴), 每张制片在气干后滴加 7 μL 含 DAPI 的 H1200(VECTA)防荧光淬灭剂, 盖上盖玻片, 于 Olympus BX53 型荧光显微镜下镜检, 用 Olympics DP80 型 CCD 相机拍摄图像。使用 Adobe Photoshop 软件优化处理图像。

2 结果与分析

2.1 小伞山羊草特异重复序列筛选

利用 TAREAN 软件对小伞山羊草所有串联重复序列的 Reads 进行聚类分析和拼接, 共获得 17 条 U 基因组卫星重复序列(8 条高置信度, 9 条低置信度)。CL21 基序最长, 为 1 533 bp, 占 U 基因组 0.850%; CL172 基序最短, 为 44 bp, 占 U 基因组 0.016%; 其余 15 条序列的基序长度为 46~775 bp, 占 U 基因组 0.028%~0.240%。

在 NCBI 数据库 BLASTN(Percent Identity ≥80%, Query Coverage ≥80%)中对上述 17 条序列的基序进行比对, 4 条(CL52、CL131、CL141 和 CL157)与已知重复序列相同, 对其不再进一步分析; 剩余的 13 条序列的具体信息见表 1, 其中 10 条序列(CL21、CL114、CL136、CL197、CL263、CL132、CL146、CL153、CL133 和 CL172)存在同源序列; 其余 3 条序列(CL67、CL163、CL177)未比对到已知同源序列。

2.2 Oligo 探针开发和基因组特异性分析

基于上述 13 条卫星重复序列, 开发了 13 个 oligo 探针, 分别命名为 Oligo-pAu21、Oligo-pAu67、Oligo-pAu114、Oligo-pAc132、Oligo-pAu133、Oligo-pAu136、Oligo-pAu146、Oligo-pAu153、Oligo-pAu163、Oligo-pAu172、Oligo-pAu177、Oligo-pAu197 和 Oligo-pAu263, 探针长度介于 42~59 bp(表 1)。

表 1 开发的 13 个 oligo 探针的序列信息

Table 1 Sequence information of 13 oligonucleotide probes developed in this study

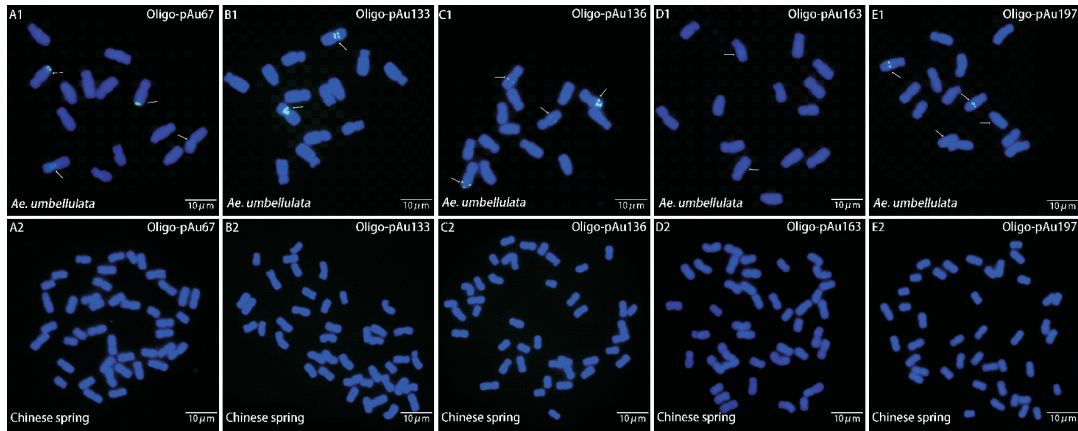
序列名称 Sequence name	基序长度 Sequence length/bp	比对信息 Sequence comparison	探针名称 Probe name	探针长度 Probe length/bp	探针序列(5'→3') Probe sequence(5'→3')
CL21	1 533	小麦醇溶蛋白相关、3B BAC 文库 <i>Triticum aestivum</i> prolamin and chromosome 3B-specific BAC library	Oligo-pAu21	59	TGTCGGGGACGAATCCACGAACAC-CTATGGGACCGGTGGATCGGCCCTTTTGGTTCCG
CL67	775	无 None	Oligo-pAu67	59	GACACCCGCCGTCGTGGT-CACTTTTTCGCCATTTTCGGCGG-GAAAACTCTCGCCGTCGTG
CL114	504	小麦 3B BAC 文库 <i>Triticum aestivum</i> chromosome 3B-specific BAC library	Oligo-pAu114	54	5' ACGAAAGTTTGGACACACACCCCTCAAACCGGAGCAACTACTAGAAGGCTC
CL132	118	大麦亚种 Morex Rfm1 基因 <i>Hordeum vulgare</i> subsp. vulgare cultivar Morex Rfm1 gene	Oligo-pAu132	56	ATGCTATTACCCACTAATTTTGGGTC-CCGGGGCGATCCGAACGTTTCGAGGAACCC
CL133	553	肥山羊草 CL261 卫星序列 <i>Aegilops crassa</i> clone CL261 satellite sequence	Oligo-pAu133	50	CCCCTAACCCACTCTCGGGCTTCGACAA-CATTTTCGGAGGCAAGATCCGGC
CL136	312	小麦醇溶蛋白相关 <i>Triticum aestivum</i> prolamin	Oligo-pAu136	58	TGGAGGTGGTTCGAAAAAATGAACGCAT-TCCGGAGGGACCATTTGGTCTAACTTAAGCC
CL146	46	小麦 <i>TaAP2-D</i> 基因 <i>Triticum aestivum TaAP2-D</i> gene	Oligo-pAu146	42	GACGCGGGGGCGGCCGAGTGGTGAT-GAGGTGACCAACCGAG
CL153	505	斯卑尔特小麦 18S 和 26S 核糖体 RNA 基因 <i>Triticum spelta</i> 26S ribosomal RNA and 18S ribosomal RNA genes	Oligo-pAu153	59	TCGTGGACGGAACGTGACGCGGCCATG-GAAAACTGGGCAAAACCAGTACGAGGCACA
CL163	210	无 None	Oligo-pAu163	58	TTCAACGTGAGGCTCCGGCCCATG-GAAAAACGCACACTACTTCAGTCGGT-GAGGTTGG
CL172	44	百萨偃麦草 CL199 卫星序列 <i>Thinopyrum bessarabicum</i> clone CL199 satellite sequence	Oligo-pAu172	43	AACTCTAGTGTAATAATTATTTGAAC-TAGCTTATAGAGCTAGTT
CL177	118	无 None	Oligo-pAu177	54	ACACTGTTTTGGGGTC-CGGGCACGATTTTCGATGGCCCGTGAC-CCCCGGTACACA
CL197	653	小麦醇溶蛋白相关 3B BAC 文库 <i>Triticum aestivum</i> prolamin and chromosome 3B-specific BAC library	Oligo-pAu197	58	AAAAGCATGCATTTCCGACCCTCGTAGC-TACTCCCGCAATTTCAGACCACCTTCG-GCC
CL263	118	小麦 BAC 1J9Tmemb-185A 结构域蛋白 <i>Triticum aestivum</i> clone BAC 1J9Tmemb-185A domain-containing protein	Oligo-pAu263	59	TAAGTTAGCATATTAGAGCCAACCTTAG-GTAAAATGAAGCTAACATATGT-CATTTTGGAA

利用 13 个探针对小伞山羊草根尖有丝分裂中期的染色体进行 Oligo-FISH, 发现探针 Oligo-pAu21、Oligo-pAu114 和 Oligo-pAu146 对小伞山羊草没有明显杂交信号, 其他 10 个探针均产生明显信号。Oligo-pAu177、Oligo-pAu263 和 Oligo-pAu153 分别在小伞山羊草的 12 条、10 条和 6 条染色体上产生信号, Oligo-pAu67、Oligo-pAu132、Oligo-pAu136、Oligo-pAu172 和 Oligo-pAu197 均在小伞山羊草的 4 条染色体上产生信号, Oligo-pAu133 和 Oligo-pAu163 均在小伞山羊草的 2 条染色体上有信号。

利用上述可产生明显信号的 10 个探针对中国春根尖有丝分裂中期的染色体进行 Oligo-FISH 分析, 发现 Oligo-pAu67、Oligo-pAu133、

Oligo-pAu136、Oligo-pAu163 和 Oligo-pAu197 只在小伞山羊草染色体上产生明显信号, 在中国春染色体上没有信号, 推测这 5 个探针可用于识别小麦背景下的 U 基因组染色体(图 1)。

探针 Oligo-pAu132、Oligo-pAu172、Oligo-pAu177、Oligo-pAu153 和 Oligo-pAu263 在小伞山羊草和中国春根尖有丝分裂中期的染色体上均产生信号(图 2)。利用能特异识别小麦染色体的寡核苷酸探针 Oligo-pSc119.2 和 Oligo-pTa535 对产生信号的中国春染色体进行识别, 发现探针 Oligo-pAu132 只在 4B 染色体上产生信号; Oligo-pAu263 只在 4A 染色体上有信号; Oligo-pAu172 在 3A、5A、7A 和 5D 染色体上产生信号; Oligo-pAu153 在 1A、4A、1B、6B 和 7B 染色体上有信号; Oligo-pAu177 在 4A、5A、7A、2D、3D 和所有

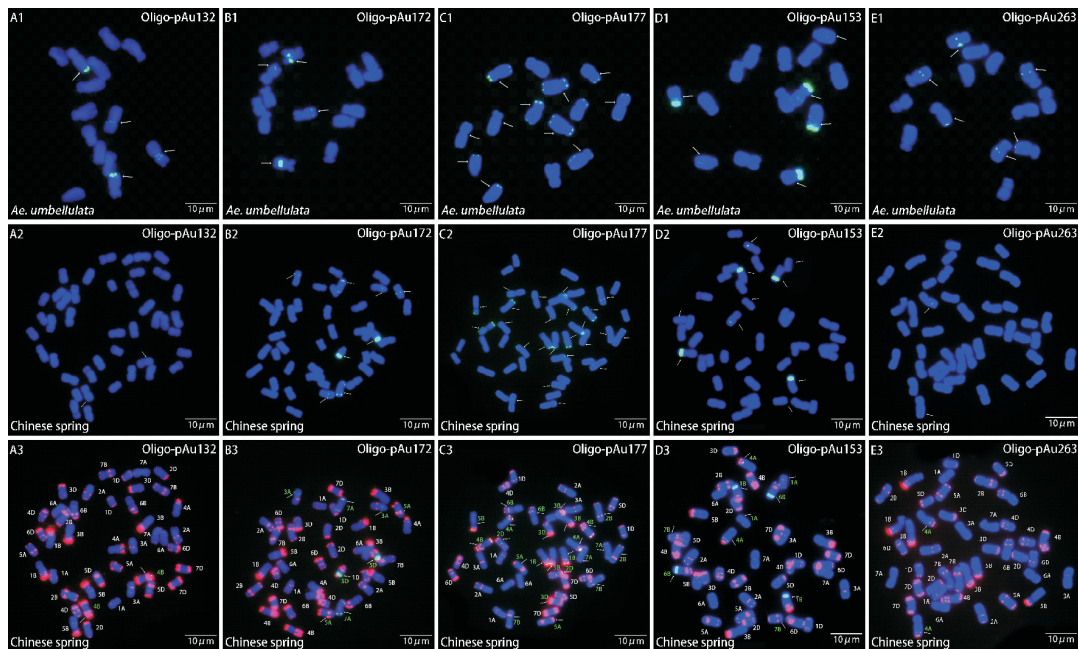


A1 和 A2:探针 Oligo-pAu67;B1 和 B2:探针 Oligo-pAu133;C1 和 C2:探针 Oligo-pAu136;D1 和 D2:探针 Oligo-pAu163;E1 和 E2:探针 Oligo-pAu197。所有探针 5'端为 FAM 修饰(绿色);染色体用 DAPI 套染(蓝色);标尺=10 μm。

A1 and A2: Probe Oligo-pAu67; B1 and B2: Probe Oligo-pAu133; C1 and C2: Probe Oligo-pAu136; D1 and D2: Probe oligo-pAu163; E1 and E2: Probe Oligo-pAu197. All probes were modified with 5' FAM(green); Chromosomes were counterstained with DAPI(blue); Bars=10 μm.

图 1 5 个可鉴定 U 基因组的 Oligo 探针对小伞山羊草和中国春的 Oligo-FISH 图

Fig. 1 Pictures of Oligo-FISH of five Oligo probes identifying U genome on *Ae. umbellulata* and Chinese Spring



A1~A3:探针 Oligo-pAu132;B1~B3:探针 Oligo-pAu172;C1~C3:探针 Oligo-pAu177;D1~D3:探针 Oligo-pAu153;E1~E3:探针 Oligo-pAu263;A3~E3 探针 Oligo-pSc119.2 和 Oligo-pTa535。Oligo-pAu67、Oligo-pAu133、Oligo-pAu136、Oligo-pAu163 和 Oligo-pAu197 探针用 5' FAM 修饰(绿色),Oligo-pSc119.2 和 Oligo-pTa535 探针用 5' TAMRA 修饰(红色);染色体用 DAPI 套染(蓝色);标尺=10 μm。

A1-A3: Probe Oligo-pAu132; B1-B3: Probe Oligo-pAu172; C1-C3: Probe Oligo-pAu177; D1-D3: Probe Oligo-pAu153; E1-E3: Probe Oligo-pAu263; A3-E3: Probe Oligo-pSc119.2 and Oligo-pTa535. Probes Oligo-pAu132, Oligo-pAu172, Oligo-pAu177, Oligo-pAu153, and oligo-pAu263 were modified with 5' FAM(green); Oligo-pSc119.2 and Oligo-pTa535 were modified with 5' TAMRA (red). Chromosomes were counterstained with DAPI(blue). Bars=10 μm.

图 2 在小伞山羊草和中国春中均有信号的 5 个 oligo 探针 Oligo-FISH 鉴定图

Fig. 2 Pictures of Oligo-FISH of five oligo probes producing signals on *Ae. umbellulata* and Chinese Spring

B 基因组染色体上有明显信号。说明这 5 个探针可以作为配套探针鉴别部分小麦染色体。

利用探针 Oligo-pAu67、Oligo-pAu133、Oligo-pAu136、Oligo-pAu163 和 Oligo-pAu197 分别

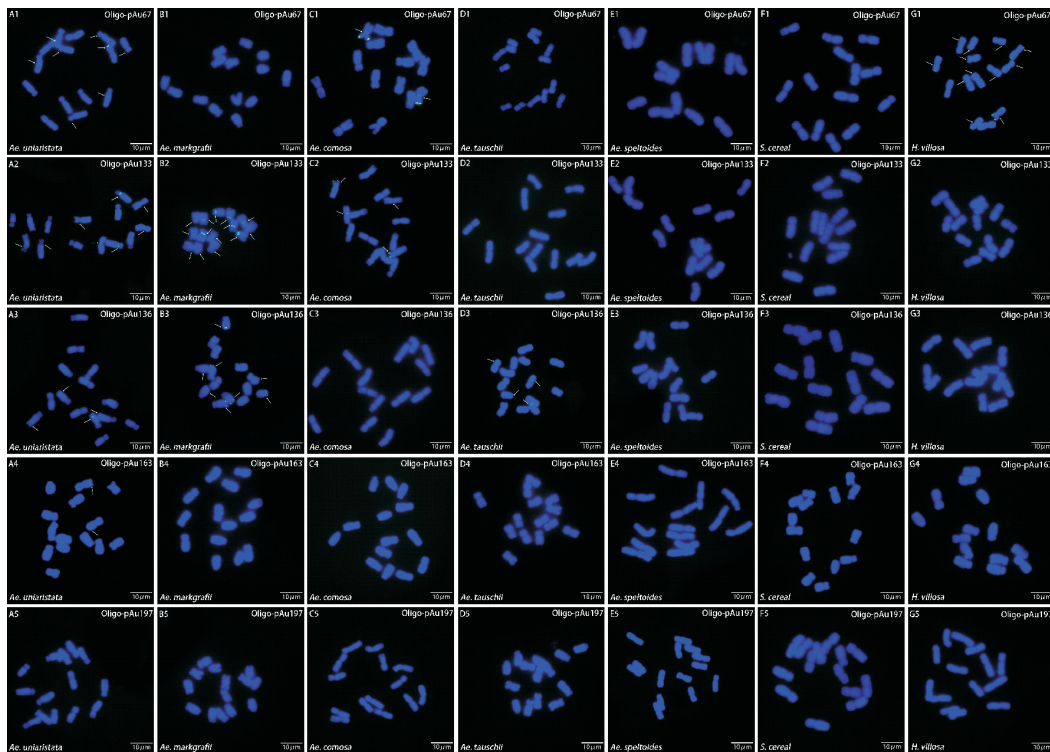
对其他 7 个二倍体小麦近缘物种进行 Oligo-FISH(图 3),结果发现,Oligo-pAu197 可用于 U 基因组鉴定,在其他 7 个二倍体近缘物种上均未产生信号;Oligo-pAu163 只在单芒山羊草 N 基因

组有信号,在其他基因组上没有信号;Oligo-pAu67 在单芒山羊草 N 基因组的 8 条染色体、顶芒山羊草 M 基因组的 2 条染色体和簇毛麦 V 基因组的 12 条染色体上产生信号;Oligo-pAu133 在单芒山羊草 N 基因组的 8 条染色体、尾状山羊草 C 基因组的 14 条染色体和顶芒山羊草 M 基因组的 4 条染色体上产生信号;Oligo-pAu136 在单芒山羊草 N 基因组的 4 条染色体、尾状山羊草 C 基因组的 8 条染色体和节节麦 D 基因组的 4 条染色体上有信号(图 3)。Oligo-pAu163 + Oligo-pAu197 可用于单芒山羊草 N 基因鉴定;其余 3 个 oligo 探针需与能识别单芒山羊草、尾状山羊草、顶芒山羊草、节节麦和簇毛麦染色体的探针结合使用,明确这些 oligo 探针能够特异识别哪些染色体。

2.3 小伞山羊草的 Oligo-FISH 核型构建及应用

寡核苷酸探针 Oligo-pSc119.2 信号主要分布于染色体两端,信号相似度高,不能精准识别 U 基因组的各条染色体。本研究选取了在小伞山羊草上能产生丰富信号的两个探针 Oligo-pAu153 和 Oligo-pAu263 与探针 Oligo-pAu133 结合 Oli-

go-pSc119.2 构成探针套 ONPS# AU1 进行 Oligo-FISH,构建了小伞山羊草染色体的 Oligo-FISH 核型。结果(图 4)表明,该探针套可以在 U 基因组的各条染色体上产生清晰可辨的 FISH 信号特征,可用于区分 U 基因组的各条染色体。1U 染色体短臂末端随体区域有非常强的 FISH 信号,长臂末端有一对点状的 FISH 信号;2U 染色体长臂末端和短臂末端分别有一对点状 FISH 信号;3U 染色体短臂末端、长臂末端以及长臂近着丝粒区域各有一对点状 FISH 信号,其中长臂近着丝粒区域 FISH 信号更强;4U 染色体短臂末端和长臂末端各有一对较弱的点状 FISH 信号,着丝粒区域和短臂近着丝粒区域各有一对较强的点状 FISH 信号;5U 染色体短臂末端随体区域有非常强的 FISH 信号,在短臂末端和长臂末端各有一对较弱的点状 FISH 信号;6U 染色体的长臂顶端有一对较强的 FISH 信号,着丝粒区域和长臂近着丝粒区域各有一对较弱的 FISH 信号;7U 染色体的短臂末端有一对点状的 FISH 信号,长臂末端有两对并排的点状 FISH 信号。

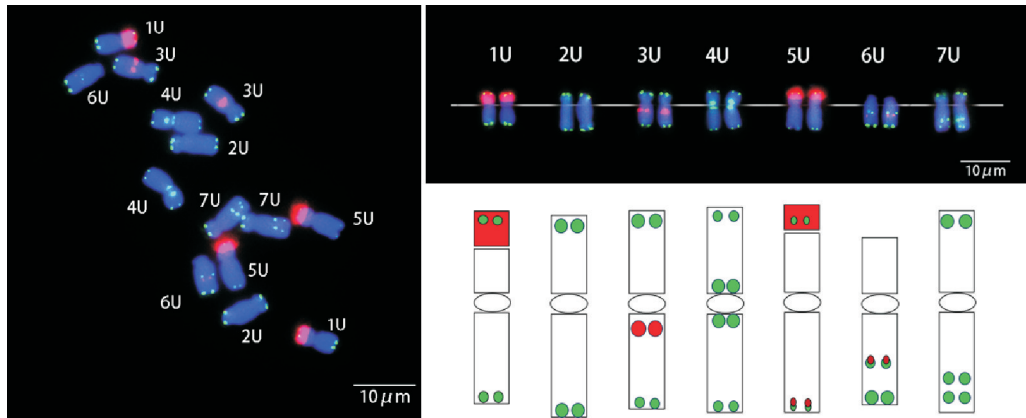


A1~G1: 探针 Oligo-pAu67; A2~G2: 探针 Oligo-pAu133; A3~G3: 探针 Oligo-pAu136; A4~G4: 探针 Oligo-pAu163; A5~G5: 探针 Oligo-pAu197。染色体用 DAPI 套染(蓝色);5 个 oligo 探针用 5' FAM 修饰(绿色);标尺=10 μm。

A1-G1: Probe Oligo-pAu67; A2-G2: Probe Oligo-pAu133; A3-G3: Probe Oligo-pAu136; A4-G4: Probe Oligo-pAu163; A5-G5: Probe Oligo-pAu197. Chromosomes were counterstained with DAPI(blue); Five oligo probes were modified with 5' FAM (green). Bars=10 μm.

图 3 5 个可鉴定 U 基因组的 Oligo 探针在 7 个二倍体的小麦近缘物种中的 Oligo-FISH 分析

Fig. 3 Oligo-FISH of five Oligo probes identifying U genome in seven diploid wheat relative species



FISH 探针: Oligo-pAu133 和 Oligo-pSc119.2 用 5' FAM 修饰(绿色);Oligo-pAu153 和 Oligo-pAu263 用 5' TAMRA 修饰(红色);染色体用 DAPI 套染(蓝色);标尺=10 μ m。

FISH probes Oligo-pAu133 and Oligo-pSc119.2 were modified with 5' FAM(green); Oligo-pAu153 and Oligo-pAu263 were modified with 5' TAMRA(red). Chromosomes were counterstained with DAPI(blue). Bars=10 μ m.

图 4 小伞山羊草的 Oligo-FISH 核型

Fig. 4 Karyotype of *Ae. umbellulata* based on Oligo-FISH

2.4 小伞山羊草探针套 ONPS#AU1 的适用潜力

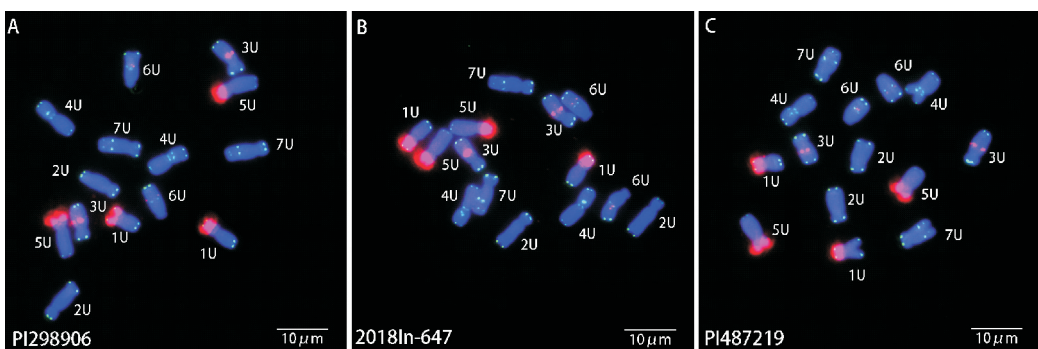
利用探针套 ONPS#AU1 对 3 份不同小伞山羊草品系进行了 Oligo-FISH 分析,结果(图 5)发现,这 3 份材料的 FISH 核型与上述构建核型的小伞山羊草 PI276994 的核型高度一致,表明该探针套可用于鉴别 U 基因组各条染色体。

oligo 探针 Oligo-pAu67、Oligo-pAu133、Oligo-pAu136、Oligo-pAu163 和 Oligo-pAu197 能特异识别小麦背景中的小伞山羊草染色体。为了明确这 5 个探针与小伞山羊草染色体的对应关系,将探针套 ONPS#AU1 分别与上述 5 个 oligo 探针组合,进行 Oligo-FISH。结果(图 6)发现,探针 Oligo-pAu67 在 4U 染色体着丝粒区域有较弱信号,在 5U 染色体长臂顶端有较强信号;Oligo-pAu133 在 4U 染色体着丝粒区域有两对较强的

信号,可特异识别 4U 染色体;Oligo-pAu136 在 3U 短臂顶端和 5U 长臂中部均产生较弱信号,在 4U 染色体长臂顶端产生的信号较强;Oligo-pAu163 仅在 7U 染色体长臂区域产生较弱信号,可用于特异识别 7U 染色体;Oligo-pAu197 在 6U 染色体长臂区域产生较弱信号,在 7U 染色体长臂区域产生较强信号。

3 讨论

近年来,基于基因组序列信息开发物种专业化寡核苷酸探针的 FISH(Oligo-FISH) 技术已经成为研究染色体的重要手段^[16]。Oligo-FISH 技术不仅在探针开发和制备方面减少了繁琐的步骤,降低了成本,同时简化了原位杂交的程序。目前,小麦中已开发许多串联序列重复(SSR)寡核苷酸

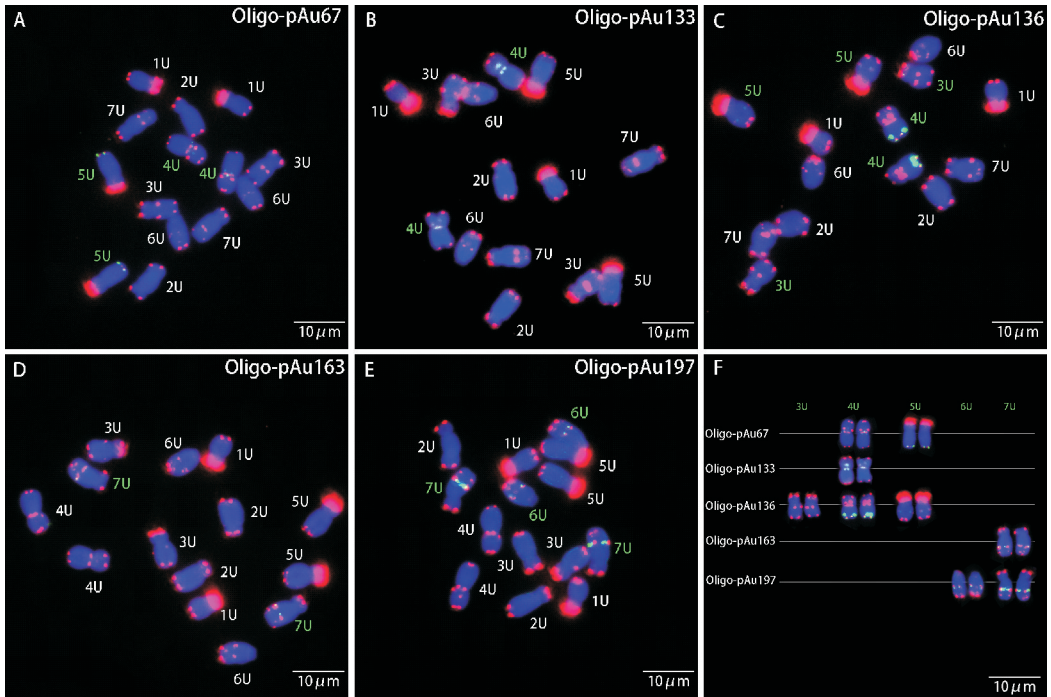


A: 小伞山羊草 PI298906;B: 小伞山羊草 2018In-647;C: 小伞山羊草 PI487219;标尺=10 μ m。

A: *Ae. umbellulata* PI298906; B: *Ae. umbellulata* 2018In-647; C: *Ae. umbellulata* PI487219; Bars=10 μ m.

图 5 不同小伞山羊草品系的 Oligo-FISH 核型

Fig. 5 Karyotype of three different accessions of *Ae. umbellulata* based on Oligo-FISH



A: 探针 Oligo-pAu67; B: 探针 Oligo-pAu133; C: 探针 Oligo-pAu136; D: 探针 Oligo-pAu163; E: 探针 Oligo-pAu197; F: 5 个 oligo 探针对应的小伞山羊草染色体; 5 个 oligo 探针用 5' FAM 修饰 (绿色); 染色体用 DAPI 套染 (蓝色); 标尺 = 10 μm。

A: Probe Oligo-pAu67; B: Probe Oligo-pAu133; C: Probe Oligo-pAu136; D: Probe Oligo-pAu163; E: Probe Oligo-pAu197; F: Five oligo probes were used to identify the chromosome of *Ae. umbellulata*; five oligo probes were modified with 5' FAM (green). Chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Bars = 10 μm.

图 6 5 个可鉴定 U 基因组的 Oligo 探针与探针套 ONPS # AU1 结合对小伞山羊草 (PI276994) 的 Oligo-FISH

Fig. 6 Oligo-FISH on *Ae. umbellulata* (PI276994) using combining probes identifying

U genome including five Oligo probes and ONPS # AU1

探针, 例如 Oligo-pSc119. 2、Oligo-pAs1、Oligo-pTa535、Oligo-713 和 (GAA)_n 等常用探针, 用于 FISH 核型构建和识别小麦染色体^[17-20]。在小麦中常用的重复序列探针, 如 Oligo-pSc119. 2、(AAC)₅、(CTT)₁₂、(GAA)_n、Oligo-pTa713 和 Oligo-pTa71 等, 虽已被用于二倍体小伞山羊草物种以及小麦-小伞山羊草双二倍体的 FISH 核型分析^[10, 21], 但这些探针在小伞山羊草中的信号丰富度多变, 其中 (AAC)₅、Oligo-pTa713 和 Oligo-pTa71 均只在小伞山羊草的某些染色体上产生信号, 不能明确区分不同小伞山羊草染色体。随着基因组测序技术快速发展, 许多近缘物种的全基因组序列被发布^[22-25], 使得通过生物信息学方法筛选物种特异重复序列、开发物种或基因组特异 FISH 探针成为可能。本研究利用 TARE-AN 从小伞山羊草的测序数据中鉴定出卫星重复序列并开发成 oligo 探针, 通过与小麦参考基因组的序列比对结合 Oligo-FISH, 成功开发了小伞山羊草特异探针; 利用开发的特异 oligo 探针结合前人开发的寡核苷酸探针 Oligo-pSc119. 2 组

成 ONPS # AU1 探针套对小伞山羊草进行 FISH 分析, 构建其 Oligo-FISH 核型, 有效地提高了小伞山羊草染色体识别的精度和效率。

特异重复序列探针除了可鉴别小麦染色体中外源染色体的归属外, 也用来研究小麦野生近缘物种间亲缘关系的重要工具。Badaeva 等^[26]利用重复序列探针 pSc119. 2 和 pAs1 对包括顶芒山羊草、单芒山羊草和西尔斯山羊草等在内的 12 个二倍体山羊草属物种进行 FISH 分析, 结果发现, D 基因组与 M 基因组的关系较为密切。Shi 等^[27]利用小麦 D 亚基因组各染色体的特异寡核苷酸探针部分山羊草属物种进行分析, 发现节节麦 D 基因组与普通小麦 D 亚基因的亲缘关系最近; 其次为小伞山羊草 U 基因组和尾状山羊草 C 基因组, 单芒山羊草 N 基因组与普通小麦 D 亚基因组的亲缘较远。本研究利用开发的 5 个小伞山羊草特异重复序列探针对 7 个二倍体小麦近缘物种进行 Oligo-FISH 分析, 发现 4 个探针 (Oligo-pAu67、Oligo-pAu133、Oligo-pAu163 和 Oligo-pAu136) 在单芒山羊草 N 基因组有信号, 2 个

探针在尾状山羊草 C 基因组和顶芒山羊草 M 基因组有信号,1 个探针在节节麦 D 基因组有信号,据此我们推测小伞山羊草 U 基因组与单芒山羊草 N 基因组亲缘关系较近。以上结果为后续研究不同小麦近缘种属基因组间的亲缘关系提供了新思路。

参考文献:

- [1] WILLIAMS W M, WILLIAMSON M L, REAL D. Wild crop relatives: Genomic and breeding resources [M]. Springer Berlin Heidelberg, 2011: 197.
- [2] KUMAR A, KAPOOR P, CHUNDURI V, et al. Potential of *Aegilops* sp. for improvement of grain processing and nutritional quality in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 308.
- [3] CAKMAK I, TOLAY I, ÖZKAN H, et al. Variation in zinc efficiency among and within *Aegilops* species [J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 1999, 162(3): 257.
- [4] SONG Z P, ZUO Y Y, XIANG Q, et al. Investigation of *Aegilops umbellulata* for stripe rust resistance, heading date, and the contents of iron, zinc, and gluten protein [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2023, 22(4): 1258.
- [5] ZHU Z, ZHOU R, KONG X, et al. Microsatellite marker identification of a *Triticum aestivum*-*Aegilops umbellulata* substitution line with powdery mildew resistance [J]. *Euphytica*, 2006, 150(1): 149.
- [6] SEARS E R. The transfer of leaf-rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat [J]. *Brookhaven Symposia in Biology*, 1956, 9: 1.
- [7] BANSAL M, KAUR S, DHALIWAL H S, et al. Mapping of *Aegilops umbellulata*-derived leaf rust and stripe rust resistance loci in wheat [J]. *Plant Pathology*, 2017, 66(1): 38.
- [8] BANSAL M, ADAMSKI N M, TOOR P I, et al. *Aegilops umbellulata* introgression carrying leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr76* and *Yr70* located to 9.47-Mb region on 5DS telomeric end through a combination of chromosome sorting and sequencing [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2020, 133(3): 903.
- [9] 包婷玉. 小麦-小伞山羊草 1U 衍生系的创制与鉴定 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.
- BAO T Y. Development and identification of wheat-*Aegilops umbellulata* 1U introgression lines [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2020.
- [10] 彭泽, 杨春苗, 耿广东, 等. 小伞山羊草染色体的 FISH 核型分析 [J]. *种子*, 2019, 38(8): 7.
- PENG Z, YANG C M, GENG G D, et al. FISH karyotype analysis of chromosomes in *Aegilops umbellulata* [J]. *Seed*, 2019, 38(8): 7.
- [11] 宋中平. 小伞山羊草及衍生种质资源评价 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2022.
- SONG Z P. Evaluation of *Aegilops umbellulata* and its derived germplasm [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2022.
- [12] 史培瑶, 陈丽娟, 孙昊杰, 等. 顶芒山羊草特异寡核苷酸探针开发和 Oligo-FISH 核型构建 [J]. *作物学报*, 2023, 49(6): 1455.
- SHI P Y, CHEN L J, SUN H J, et al. Development of specific oligonucleotide probe library of *Aegilops comosa* and construction of Oligo-FISH karyotype [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(6): 1455.
- [13] NOVÁK P, ROBLÉDILLO L Á, KOBLÍŽKOVÁ A, et al. TAREAN: A computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(12): e111.
- [14] 程梦豪, Miroslava Karafiátová, 孙昊杰, 等. 基于纤毛鹅观草特异的卫星重复序列开发寡核苷酸探针 [J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45(3): 442.
- CHENG M H, KARAFIÁTOVÁ M, SUN H J, et al. Development of oligonucleotide probes specific to *Roegneria ciliaris* chromosomes based on satellite repeats [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(3): 442.
- [15] LEI J, ZHOU J, SUN H, et al. Development of oligonucleotide probes for FISH karyotyping in *Haynaldia villosa*, a wild relative of common wheat [J]. *The Crop Journal*, 2020, 8(4): 676.
- [16] HARUN A, LIU H, SONG S, et al. Oligonucleotide fluorescence *in situ* hybridization: An efficient chromosome painting method in plants [J]. *Plants*, 2023, 12(15): 2816.
- [17] FU S, CHEN L, WANG Y, et al. Oligonucleotide probes for ND-FISH analysis to identify rye and wheat chromosomes [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10552.
- [18] JIANG J. Fluorescence *in situ* hybridization in plants: Recent developments and future applications [J]. *Chromosome Research*, 2019, 27(3): 153.
- [19] DU P, ZHUANG L, WANG Y, et al. Development of oligonucleotides and multiplex probes for quick and accurate identification of wheat and *Thinopyrum bessarabicum* chromosomes [J]. *Genome*, 2017, 60(2): 93.
- [20] TANG Z, YANG Z, FU S. Oligonucleotides replacing the roles of repetitive sequences pAs1, pSc119. 2, pTa-535, pTa71, CCS1, and pAWRC. 1 for FISH analysis [J]. *Journal of Applied Genetics*, 2014, 55(3): 313.
- [21] SONG Z, DAI S, BAO T, et al. Analysis of structural genomic diversity in *Aegilops umbellulata*, *Ae. markgrafii*, *Ae. comosa*, and *Ae. uniaristata* by fluorescence *in situ* hybridization karyotyping [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 710.
- [22] JIA J, ZHAO S, KONG X, et al. *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation [J]. *Nature*, 2013, 496(7443): 91.
- [23] YU G, MATNY O, CHAMPOURET N, et al. *Aegilops sharonensis* genome-assisted identification of stem rust resistance gene *Sr₆₂* [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1607.
- [24] ABROUK M, WANG Y, CAVALET-GIORSO E, et al. Chromosome-scale assembly of the wild wheat relative *Aegilops umbellulata* [J]. *Scientific Data*, 2023, 10(1): 739.
- [25] ZHANG X, WANG H, SUN H, et al. A chromosome-scale genome assembly of *Dasyphyrum villosum* provides insights into its application as a broad-spectrum disease resistance resource for wheat improvement [J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(2): 432.
- [26] BADAÉVA E D, FRIEBE B, GILL B S. Genome differentiation in *Aegilops*. 1. Distribution of highly repetitive DNA sequences on chromosomes of diploid species [J]. *Genome*, 1996, 39(2): 293.
- [27] SHI P, SUN H, LIU G, et al. Chromosome painting reveals inter-chromosomal rearrangements and evolution of subgenome D of wheat [J]. *The Plant Journal*, 2022, 112(1): 55.