

以色列野生二粒小麦染色体的 FISH 核型分析

杨春苗¹, 彭泽¹, 耿广东¹, 杨婷¹, 杨锐¹, 程剑平^{1,2}, 张庆勤^{1,2},
张素勤^{1,2*}

(1. 贵州大学农学院, 贵阳 550025; 2. 国家小麦改良中心贵州分中心, 贵阳 550025)

摘要:以色列野生二粒小麦具有抗白粉病、条锈病和叶锈病, 富含蛋白质和硒等元素, 耐旱、耐盐和矿质养分利用率高等诸多优点。本试验采用荧光原位杂交(FISH)技术, 分析以色列野生二粒小麦染色体的核型特点, 为该种质在小麦遗传及新品种培育上的应用提供参考。结果表明, 以 Oligo-pAs1-1 (红色) 和 Oligo-pSc119.2-1 (绿色) 重复序列为探针进行 FISH 分析发现, 以色列野生二粒小麦共有 14 对染色体, 它的 A 组染色体上主要分布着 Oligo-pAs1-1 红色信号, 而 B 组染色体上主要分布着明亮且丰富的 Oligo-pSc119.2-1 绿色信号; 通过这些信号在染色体上的分布特点, 能够对每对染色体进行准确地鉴别。以色列野生二粒小麦的 FISH 核型与中国春等普通小麦存在差异, 可以用于创造小麦新种质。

关键词:野生二粒小麦; 染色体; FISH; 核型

中图分类号: S512.1

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2020)04-0045-04

FISH Karyotype Analysis of Wild Emmer from Israel

YANG Chunmiao¹, PENG Ze¹, GENG Guangdong¹, YANG Ting¹, YANG Rui¹, CHENG Jianping^{1,2},
ZHANG Qingqin^{1,2}, ZHANG Suqin^{1,2*}

(1. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025; 2. Guizhou Sub-Center of National Wheat Improvement Center, Guiyang 550025, China)

Abstract: Wild emmer in Israel has many advantages, such as resistance to powdery mildew, stripe rust and leaf rust, rich in protein and selenium, drought tolerance, salt tolerance and high utilization rate of mineral nutrients. In this study FISH technique was applied to analyze karyotype characteristics of wild emmer from Israel, so as to provide reference for its application of this germplasm in wheat genetics and new variety cultivation. The results are as follow: using the Oligo-pAs1-1 (red) and Oligo-pSc119.2-1 (green) repeats as probes, the FISH analysis showed that there were 14 pairs of chromosomes in Israel wild emmer wheat. In Israel wild emmer wheat, the oligo-pas1-1 red signal was mainly distributed on the A chromosome, while the bright and rich oligo-psc119.2-1 green signal was mainly distributed on the B chromosome. Through the distribution characteristics of these signals on chromosomes, each pair of chromosome can be accurately identified. The FISH karyotype of wild emmer wheat in Israel is different from that of common wheat such as Chinese Spring, which can be used to create new wheat germplasm.

Key words: Wild emmer; Chromosome; FISH; Karyotype

野生二粒小麦 (*Triticum turgidum* Var. *dicoccoides*, AABB) 的 A 基因组和 B 基因组分别是由乌拉

尔图小麦 (*T. urartu*) 和拟斯卑尔脱山羊草 (*Aegilops speltoides*) 单独或其近亲共同提供^[1-2]。在约 25 万 ~ 130 万年前, 乌拉尔图小麦与拟斯卑尔脱山羊草通过天然杂交并经过染色体自然加倍形成了野生二粒小麦^[3-4]。之后大约在 8 000 年前, 异源多倍化再次在小麦中发生, 栽培四倍体小麦与二倍体山羊草进行了天然杂交并通过染色体自然加倍形成了新的异源六倍体, 即普通小麦 (*T. aestivum*; $2n=6x=42$, AABBDD)^[5]。因此, 野生二粒小麦是现代栽培小麦 (硬粒小麦和普通小麦) 的祖先, 含有大量的优异基因^[6], 特别在抗病性^[7-8]、抗逆

收稿日期: 2019-03-20

基金项目:国家自然科学基金 (31860380、31660390); 贵州省科技计划项目 (黔科合平台人才[2018]5781 号); 贵州省科学技术基金 (黔科合基础[2019]1110); 贵州省农业成果转化计划 (黔科合成果(2016)4022 号); 国家“七大农作物育种”重点专项 (2017YFD0100900); 贵州大学自然科学基金 (贵大专基合字(2013)01 号)

作者简介:杨春苗 (1994-), 男, 在读硕士, 主要从事小麦遗传育种研究。

通讯作者:张素勤, 女, 博士, 教授, E-mail: zsqin2002@163.com

性^[9-10]及品质^[11]方面潜力巨大;同时也是普通小麦的二级基因源,在小麦遗传改良中有重要的应用潜力^[12-14]。以色列野生二粒小麦对白粉病、条锈病、叶锈病等病害都有良好的抗性,并且具有抗旱、耐盐和对矿质养分利用率高等特性^[15-16],因此以色列野生二粒小麦在小麦种质资源的开发利用以及现代小麦品种的遗传改良中扮演着重要角色。

荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization, FISH)技术诞生于二十世纪八九十年代,由于它具有灵敏度高、安全、快速、探针能长期保存和高效等优点,一诞生就被人们广泛应用。染色体核型分析对研究生物的遗传变异、生物的系统演化、物种之间的亲缘关系、某些生物的起源、远缘杂交及染色体工程、基因定位等都具有重要的意义^[17]。Yuan等^[18]通过将C-带与FISH技术结合把簇毛麦的7对染色体一一准确识别开来。重复序列pAs1和pSc119.2在小麦染色体中分布广泛,由此开发的探针能够对小麦中的染色体进行一一鉴定。Liu W H等^[19]将pAs1、pSc119.2和pHvG39等重复序列作为探针用于检测小麦的易位染色体,发现在小麦-圆柱山羊草异源易位系中存在6种易位类型。宫文萍等^[20]通过将寡聚核苷酸Oligo-pSc119.2-1、Oligo-pTa-535-1和(GAA)₈作为探针分别对小麦-单芒山羊草双二倍体和中国春-单芒山羊草附加系进行FISH核型分析,成功对小麦和单芒山羊草全部染色体进行了鉴定。本试验拟对以色列野生二粒小麦染色体进行FISH分析,探索该染色体的FISH特点,建立其FISH核型,为其在小麦遗传育种中的应用提供参考,加速优良小麦新品种的选育进程。

1 材料和方法

1.1 材料

以色列野生二粒小麦是贵州大学农学院国家小麦改良中心程剑平教授从以色列引进,具有抗白粉病、条锈病和叶锈病,富含蛋白质和硒等元素,耐旱、耐盐和矿质养分利用率高等诸多优点。

1.2 染色体制片

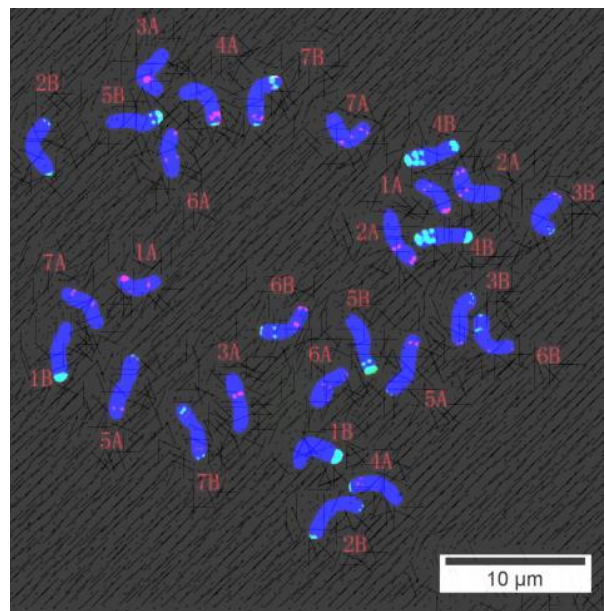
将已充分吸水的以色列野生二粒小麦种子置于铺有两层湿润滤纸的培养皿中于常温下发芽,待根长至2 cm左右时,剪取根尖用N₂O处理2 h,在90%冰醋酸中固定10 min左右,用蒸馏水冲洗三遍后切取根尖分生区,酶解滴片,在OLMPUS BX60显微镜下镜检,选取分裂相好的片子保存于-20℃冰箱备用。

1.3 荧光原位杂交分析

本试验采用的FISH技术参见Han等^[21]方法。寡核苷酸Oligo-pAs1-1(红色)和Oligo-pSc119.2-1(绿色)探针^[22]由Thermo Fisher Scientific(上海)公司合成。用OLYMPUS BX60显微镜观察荧光原位杂交信号^[23],选择FISH效果好的细胞用Q-Capture pro摄像系统照相,选取5个分裂相好且染色清晰的细胞用于FISH核型分析,以得到准确可靠的数据。

2 结果与分析

本试验以Oligo-pAs1-1(红色)和Oligo-pSc119.2-1(绿色)重复序列为探针对以色列野生二粒小麦根尖细胞染色体进行双色FISH分析,根据探针信号在染色体上的分布特点与Tang Z等^[22]试验结果比对,对该染色体进行一一识别(图1)。结果发现,以色列野生二粒小麦包括14对染色体,其A组染色体上分布的Oligo-pAs1-1红色信号较多,而B组染色体上分布着较强且丰富的Oligo-119.2-1绿色信号。



注: Oligo-pAs1-1 探针为红色, Oligo-119.2-1 探针为绿色, 背景染色体由DAPI复染为蓝色;下同。比例尺为10μm

图1 以色列野生二粒小麦根尖细胞染色体的FISH核型

在以色列野生二粒小麦的A基因组中,1A染色体的长臂中间和短臂端部分布有Oligo-pAs1-1红色信号(图2)。2A染色体的近着丝点处及短臂端部分布有明亮的Oligo-pAs1-1红色信号。3A染色体的近着丝点处分布有明亮的Oligo-pAs1-1红色信号。4A染色体的长臂端部及近端部分布有Oligo-pAs1-1红色信号,其端部分布有Oligo-

pSc119.2-1 绿色信号。5A 染色体的长臂近端部及短臂端部分别分布有 Oligo-pAs1-1 红色信号和 Oligo-pSc119.2-1 绿色信号。6A 染色体的近着丝点处和短臂端部分布有微弱的 Oligo-pAs1-1 红色信号。7A 染色体的着丝点处及长臂近端部均分布有 Oligo-pAs1-1 红色信号。

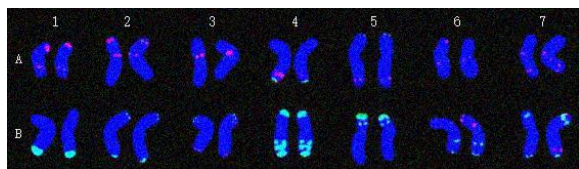


图2 以色列野生二粒小麦的A和B基因组的FISH核型

在以色列野生二粒小麦的B基因组中,1B染色体的长臂端部分布有强的 Oligo-pSc119.9-1 绿色信号。2B 染色体的长短臂端部分布有 Oligo-pSc119.2-1 绿色信号。3B 染色体的长臂和短臂端部分别分布有 Oligo-pAs1-1 红色信号和 Oligo-pSc119.2-1 绿色信号。在4B染色体上分布有最丰富的 Oligo-pSc119.2-1 绿色信号,即4B染色体的长臂中间与端部、短臂端部分别分布有强的 Oligo-pSc119.2-1 绿色信号。5B 染色体的短臂端部及中间分别分布着较强的 Oligo-pSc119.2-1 绿色信号。6B 染色体的长臂端部及中间分布有 Oligo-pSc119.2-1 绿色信号,而在近着丝点处及短臂端部分布有 Oligo-pAs1-1 红色信号。7B 染色体的长臂端部和短臂近端部分布有 Oligo-pSc119.2-1 绿色信号,而在长臂近端部分布有 Oligo-pAs1-1 红色信号。

3 讨论

植物 FISH 核型图的建立,一方面可以为植物的分类及进化研究提供指导,另一方面也可以为植物育种特别是远缘杂交育种提供参考^[24-25]。Tang Z 等^[22]以 Oligo-pAs1-2、Oligo-pSc119.2-2 和 Oligo-pTa535-1 等为探针对小麦和黑麦等材料的染色体进行分析,建立了它们的 FISH 核型。Delgado 等^[26]利用寡核苷酸 Oligo-pTa535 和 Oligo-pAs1 为探针对野生大麦染色体进行 FISH 分析,根据探针信号在染色体上的分布特点可以将 7 对大麦染色体与小麦染色体区分开来。董磊等^[27]利用 Oligo-pTa535 和 Oligo-pSc119.2 对拟斯卑尔脱山羊草和小麦进行 FISH 分析,把拟斯卑尔脱山羊草的不同染色体进行了准确区分,并将拟斯卑尔脱山羊草与小麦的染色体成功区分开来。Linc G 等^[28]为了区分二倍体长穗偃麦草的 7 对染

色体,以重复序列 pSc119.2 和 Afa family 为探针进行 FISH 分析,最终获得成功并建立了该偃麦草的 FISH 核型。陈星灼等^[29]用 Oligo-pTa535-2 和 Oligo-pSc119.2-1 探针对硬粒小麦染色体进行了 FISH 核型分析,发现 Oligo-pTa535-2 信号主要分布在 A 组染色体上,而 B 组染色体上主要分布着明亮而丰富的 Oligo-pSc119.2-1 信号。本试验以 Oligo-pAs1-1 和 Oligo-pSc119.2-1 重复序列为探针对以色列野生二粒小麦染色体进行 FISH 分析,发现该小麦 A 组染色体上的 Oligo-pAs1-1 信号相对较多且丰富,而 B 组染色体上分布着较强且丰富的 Oligo-119.2-1 信号,获得了与陈星灼等^[29]相似的结果。本试验利用 Oligo-pAs1-1 和 Oligo-pSc119.2-1 探针能够对以色列野生二粒小麦的 14 对染色体进行清晰地一一鉴别,建立了该二粒小麦的 FISH 核型。

以色列野生二粒小麦染色体的 FISH 核型与 Tang Z 等^[22]研究报道的中国春小麦 A 和 B 基因组的 FISH 核型基本一致,有些染色体(尤其 B 组染色体)的 FISH 信号存在一些差别。以色列野生二粒小麦 1B 染色体的长臂中间比中国春少一对 Oligo-pSc119.2-1 信号;2B 染色体长臂上 Oligo-pSc119.2-1 信号位点位于端部,而中国春小麦在长臂中间;7B 染色体长臂端部有 Oligo-pSc119.2-1 信号,而中国春小麦则在 7B 染色体长臂中间存在 Oligo-pSc119.2-1 信号。以色列野生二粒小麦的 FISH 核型与中国春等小麦的遗传背景存在差异,可以把野生二粒小麦的抗病、耐逆和优质等重要基因通过染色体工程导入普通小麦,拓宽栽培小麦的遗传基础,创造小麦新资源。

参考文献:

- [1] Dvorák J, Terlizzi P, Zhang H B, et al. The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species [J]. *Genome*, 1993, 36(1): 21-31.
- [2] Dvorák J, Zhang H B. Variation in repeated nucleotide sequences shed slight on the phylogeny of the wheat B and G genomes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87 (24): 9640-9644.
- [3] Dvorák J, Akhunov E D. Tempos of gene locus deletions and duplications and their relationship to recombination rate during diploid and polyploid evolution in the Aegilops-Triticum alliance [J]. *Genetics*, 2005, 171(1): 323-332.
- [4] Huang S X, Sirikhachornkit A, Su X J, et al. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat [J]. *Proceedings of the National Academy of Sci-*

- ences of the United States of America, 2002, 99(12): 8133–8138.
- [5] Matsuoka Y, Nasuda S. Durum wheat as a candidate for the unknown female progenitor of bread wheat: an empirical study with a highly fertile F_1 hybrid with *Aegilops tauschii* Coss [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2004, 109(8): 1710–1717.
- [6] Xie W L, Nevo E. Wild emmer: genetic resources, gene mapping and potential for wheat improvement [J]. Euphytica, 2008, 164(3): 603–614.
- [7] Hua W, Liu Z, Zhu J, et al. Identification and genetic mapping of pm42, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2009, 119(2): 223–230.
- [8] Li G, Fang T, Zhang H, et al. Molecular identification of a new powdery mildew resistance gene Pm41 on chromosome 3BL derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2009, 119(3): 531–539.
- [9] Peleg Z, Fahima T, Abbo S, et al. Genetic diversity for drought resistance in wild emmer wheat and its ecogeographical associations [J]. Plant Cell & Environment, 2010, 28(2): 176–191.
- [10] Peleg Z, Saranga Y, Krugman T, et al. Allelic diversity associated with aridity gradient in wild emmer wheat populations [J]. Plant Cell & Environment, 2010, 31(1): 39–49.
- [11] Nevo E, Korol A B, Beiles A, et al. Evolution of wild emmer and wheat improvement: Population genetics, genetic resources, and genome organization of wheat's progenitor, *Triticum dicoccoides* [M]. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2002.
- [12] Nevo E. Evolution of genome–phenome diversity under environmental stress [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(11): 6233–6240.
- [13] Peng J, Ronin Y, Fahima T, et al. Domestication quantitative trait loci in *Triticum dicoccoides*, the progenitor of wheat [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(5): 2489–2494.
- [14] Peng J H, Sun D, Nevo E. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat [J]. Molecular Breeding, 2011, 28(3): 281–301.
- [15] Joppa L R, Cantrell R G. Chromosome allocation of genes for grain protein content of wild tetraploid wheat [J]. Crop Science, 1990, 30: 1059–1064.
- [16] Cantrell R G, Joppa L R. Genetic analysis of quantitative traits in wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) [J]. Crop Science, 1991, 31: 645–649.
- [17] 徐振东, 兰秀红, 杨 曼, 等. Co^{60} - γ 辐射对2种高羊茅染色体核型的影响[J]. 东北农业科学, 2016, 41(3): 18–24.
- [18] Yuan W Y, Tomita M. Centromeric distribution of 350–family in *Dasypyrum villosum* and its application to identifying *Dasypyrum* chromatin in the wheat genome [J]. Hereditas, 2009, 146(2): 58–66.
- [19] Liu W H, Luan Y, Wang J C, et al. Production and identification of wheat–*Agropyron cristatum* (1.4P) alien translocation lines [J]. Genome, 2010, 53(6): 472–481.
- [20] 宫文萍, 李建波, 李豪圣, 等. 寡聚核苷酸 FISH 在鉴定小麦–单芒山羊草种质中的应用[J]. 山东农业科学, 2017, 49(8): 12–18.
- [21] Han F, Lamb J C, Birchler J A. High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(9): 3238–3243.
- [22] 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): 313–318.
- [23] 徐延浩, 高 伟, 张文英. 不同作物染色 DAPI 荧光显带的研究[J]. 吉林农业科学, 2013, 38(2): 27–28, 51.
- [24] Badaeva E D, Amosova A V, Muravenko O V, et al. Genome differentiation in *Aegilops*. 3. Evolution of the D–genome cluster [J]. Plant Systematics & Evolution, 2002, 231(1): 163–190.
- [25] Badaeva E D, Amosova A V, Samatadze T E, et al. Genome differentiation in *Aegilops*. 4. Evolution of the U–genome cluster [J]. Plant Systematics & Evolution, 2004, 246(1): 45–76.
- [26] Delgado A, Carvalho A, Martín A C, et al. Use of the synthetic Oligo–pTa535 and Oligo–pAs1 probes for identification of *Hordeum chilense*–*origin* chromosomes in hexaploid tritordeum [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2016, 63(6): 945–951.
- [27] 董 磊, 董 晴, 张文利, 等. 拟斯卑尔脱山羊草的 FISH 核型分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(8): 1378–1387.
- [28] Linc G, Sepsi A, M Molnár–Láng. A FISH karyotype to study chromosome polymorphisms for the *Elytrigia elongata* E genome [J]. Cytogenetic and Genome Research, 2012, 136(2): 138–144.
- [29] 陈星灼, 彭 红, 王 亚, 等. 硬粒小麦染色体的 FISH 核型分析[J]. 种子, 2018, 37(3): 12–14, 18.

(责任编辑: 刘洪霞)