

基因组原位杂交鉴定牛筋草 AA 基因组在穆子染色体上的分布及探针长度优化方法

姜斌^{1,2}, 刘利勤³, 胡晓颖¹, 刘青^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 云南瑞升烟草技术(集团)有限公司, 昆明 650106)

摘要: 采用基因组原位杂交(Genomic *in situ* hybridization, GISH)方法研究了牛筋草(*Eleusine indica*)AA 基因组在穆子(*E. coracana*)染色体上的分布, 并探讨了 AA、BB 基因组的同源关系。用超声波破碎法进行预剪切, 以缺口平移法标记的牛筋草总 DNA 为探针, BB 基因组的 *E. floccifolia* (Forssk.) Spreng. 总 DNA 为封阻, 与 AABB 基因组穆子的中期染色体进行杂交。结果表明, 牛筋草 AA 基因组分布在穆子的 18 条染色体上。不加封阻或加过量封阻均不能鉴别 AA 基因组, 说明 AA 和 BB 基因组间的分化程度不大, 双方共享的重复序列较多。牛筋草与 *E. floccifolia* 总 DNA 分别用超声波破碎 2 min 和 3 min 后, 可得到峰值为 300 ~ 750 bp 的 DNA 片段, 这说明不同物种的超声波破碎时间需要调整, 以获得合适长度的探针。

关键词: AA 基因组; 穆子; 基因组原位杂交; 剪切方法

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2012.01.008

Distribution of *Eleusine indica* AA Genome on *E. coracana* (Poaceae) Chromosomes Identified by Genomic *in situ* Hybridization and Optimization Method of Probe Length

JIANG Bin^{1,2}, LIU Li-qin³, HU Xiao-ying¹, LIU Qing^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Yunnan Reascend Tobacco Technology (Group) Co. Ltd., Kunming 650106, China)

Abstract: Genomic *in situ* hybridization (GISH) was used to detect the AA genome distribution of *Eleusine indica* (L.) Gaertn. on chromosomes of *E. coracana* (L.) Gaertn. (AABB), and the homoeologous relationship between AA and BB genomes was studied. The ultrasonic processor pre-sheared total DNA of *E. indica* further labeled by nick translation mix as probe and the sheared total DNA of *E. floccifolia* (Forssk.) Spreng. (BB) as blocking DNA, and then they were hybridized to the metaphase chromosomes of *E. coracana*. The results showed that the AA genome of *E. indica* was distributed in 18 chromosomes of *E. coracana*. When not adding or adding excess blocking DNA, the AA genome was not detected on the chromosomes of *E. coracana*, suggesting that the AA and BB genomes may have not yet been well differentiated from each other, and that *E. indica* and *E. floccifolia* may share abundant repeated sequences. The 300 - 750 bp fragment peaks were presented on the 1% agar gel after shearing total DNA of *E. indica* and *E. floccifolia* 2 min and 3 min, respectively. The difference in the time of DNA shearing of the two species suggests that the ultrasonic processor method should be adjusted

收稿日期: 2011-07-12 接受日期: 2011-08-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700043); 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室基金项目(200922); 教育部留学回国人员科研启动基金项目(2011-1139); 中国科学院生命科学领域基础前沿研究专项(KSCX2-EW-J-28)资助

作者简介: 姜斌, 男, 硕士研究生, 研究方向为禾本科重要类群的系统与演化, email: jiangbin@scbg.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author, email: liuqing@scib.ac.cn

depending on species in order to obtain DNA probes with appropriate lengths.

Key words: AA genome; *Eleusine*; Genomic *in situ* hybridization; Shearing method

禾本科(Poaceae)穆属异源四倍体作物穆子(*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.)[AABB, $2n=36$]^[1], 是干旱区三大禾谷类作物之一^[2-3], 其营养价值和药用价值很高, 穆子全球年产量超过 4.5×10^6 t, 蛋白质含量达 11.7%, 高于大米(8.5%)和小米(9.7%)^[3-4]; 穆子全草可用于治疗伤寒(瑶医偏方)、肝炎、肺炎、胸膜炎等^[5]。对其基因组起源进行研究对提高穆子(耐旱性、耐储藏)品质具有重要意义。Neves 等^[6]通过对穆子 nrDNA ITS 核苷酸序列进行研究, 认为其核糖体 ITS 序列致同进化(concerted evolution)倾向于 AA 基因组谱系(牛筋草 *E. indica* (L.) Gaertn.)。相对于核苷酸的序列变异, 基因组原位杂交(Genomic *in situ* hybridization, GISH)方法能够直观地定位异源基因组(或共有序列)在染色体上的分布^[7-8]。Bisht 和 Mukai 用标记的牛筋草(AA)和 *E. floccifolia* (BB)总 DNA 为探针, 与穆子减数分裂中期 I 的染色体进行双探针原位杂交, 结果表明在穆子 9 条染色体上有强度不同的重叠信号^[9], 暗示牛筋草、*E. floccifolia* 和穆子之间存在共有序列。而在核基因系统树中, 牛筋草和 *E. floccifolia* 位于两个二倍体谱系^[10], 暗示两物种的核苷酸序列存在差异。目前牛筋草(AA)基因组在穆子染色体上的分布缺乏单探针 GISH 的研究报道, 且 AA、BB 基因组间的同源关系也缺乏细胞遗传学的证据^[6,10]。因此, 探讨加入适量封阻 DNA 能否明显提高单探针杂交的特异性, 不加或者加入过量封阻 DNA 对杂交的影响, 以及 AA、BB 基因组的同源关系等问题均有重要意义。

基因组原位杂交实验中, 标记出长度适宜的高效探针是 GISH 成功的关键因素之一^[11-14]。若预剪切的 DNA 片段大于 3000 bp, 将降低探针标记的产率^[15]; 若小于 1000 bp, 用缺口平移法标记会使探针更短, 从而影响杂交分子的稳定性^[16]。如果预剪切的 DNA 片段长度为 1000~3000 bp, 经缺口平移法标记出的探针为 300~750 bp, 可与靶 DNA 的特异性结合牢固^[17]。植物总 DNA 的物理剪切方法包括快速通过针头法、超声波水浴法、超声波破碎仪法等^[15,17]。本文通过筛选预剪切方法, 以标记出适宜长度的探针, 采用 GISH 方法研究封阻 DNA 的用量与单探针杂交特异性的关系, 为研究

AA、BB 基因组的同源关系提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料与染色体制片

实验材料为穆属牛筋草(*E. indica* (L.) Gaertn., Qing Liu 056, IBSC)和 *E. floccifolia* (Qing Liu 099, IBSC); 颖果来源于 International Livestock Centre for Africa at Addis Ababa, ILCA 15383, 栽培于中国科学院华南植物园温室, 用于提取基因组 DNA。穆子(*E. coracana* (L.) Gaertn.)颖果(来源于 ILCA 13733)用于萌发实验。

染色体制片参照李常宝^[18]的方法略做修改。当穆子根尖长至 1 cm 左右时, 切取生长旺盛的根尖约 1 mm 用 0.004 mol/L 8-羟基喹啉中预处理 2 h, 蒸馏水充分洗净后用 4℃ 的新鲜卡诺固定液(福尔马林:冰醋酸:70%酒精=1:1:18)固定 24 h, 柠檬酸缓冲液(10 mmol/L 柠檬酸:10 mmol/L 柠檬酸钠=2:3)清洗后置于 2% 酶混合液(纤维素酶:果胶酶=1:1)中, 在 37℃ 下酶解约 80 min, 用 45% 醋酸压片, -80℃ 超低温冰箱保存。

1.2 基因组 DNA 的提取、预剪切及探针标记

采用 CTAB 方法^[19]提取并纯化牛筋草和 *E. floccifolia* 植物总 DNA。

用快速通过针头法、超声波水浴法、超声波破碎仪法对两种植物总 DNA 进行预剪切筛选:(1)快速通过针头法, 选用医用 16 号针头对两种植物总 DNA 分别抽打 20 次、40 次、60 次、80 次;(2)超声波水浴法, 采用超声波清洗器(KJ1003B, Guangzhou)剪切两种植物总 DNA, 共 3 个循环, 每个循环 10 s、20 s、30 s、40 s、50 s、60 s, 立即放冰上冷却 1 min;(3)超声波破碎仪法, 用超声波破碎仪(Scientz-III, Ningbo)在冰上剪切两种植物总 DNA, 超声 10 s 间歇 10 s 分别处理 3、6、9 个循环, 总计 1 min、2 min、3 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段长度。

用缺口平移法标记探针。用试剂盒 Nick Translation Mix (Roche, Cat. No. 11745824910)标记预剪切的牛筋草总 DNA (Biotin-16-dUTP), 标记方法遵照使用说明 (<https://www.roche-applied-science.com>)。超微量紫外分光光度计(Nano Drop ND2000, Wilmington, USA)检测纯化探针的浓度。

1.3 基因组原位杂交

参照 Liu 和 Gu^[20] 的方法略做修改。穆子染色体制片前处理:液氮揭片,载玻片在 60℃烘箱内过夜。每张制片新配置 40 μL 杂交混合液,含 50% 去离子甲酰胺,10% 硫酸葡聚糖(DS),2 倍柠檬酸钠氯化钠缓冲液(2 × SSC),0.5% 十二烷基环酸钠(SDS),100 bp 鲑鱼精 DNA 0.25 μg,以 Biotin-16-dUTP 标记预剪切 1 min 的牛筋草总 DNA 40 ng 为探针,预剪切 5 min 的 *E. floccifolia* 总 DNA 250 ng 为封阻。对照实验用 DNase-free 水代替封阻 DNA 为不加封阻;加 2 μg 预剪切的 *E. floccifolia* 总 DNA 为过量封阻。制片于 37℃ 下用 100 μg mL⁻¹ DNase-free RNaseA (2 × SSC 配制)处理 1 h,2 × SSC 洗涤 5 min,共 3 次,用 70%-95%-100% 酒精系列脱水各 5 min,37℃ 下用 0.01% 胃蛋白酶 Pepsin(10 mmol/L HCl, Sangon)温育 40 min,再用磷酸盐缓冲液(1 × PBS)洗涤 2 次各 5 min,37℃ 下用 4% (W/V)多聚甲醛固定 10 min,2 × SSC 洗涤 3 次各 5 min,70%-80%-100% 酒精系列脱水各 2 min。

探针和染色体变性和杂交:加 40 μL 杂交混合液于载玻片上,90℃ 下封口膜覆盖共变性 10 min 后,转入 37℃ 湿盒中杂交 16 ~ 21 h。

1.4 原位杂交信号的荧光检测及图象分析

杂交后洗脱 用 2 × SSC 漂去封口膜,于 37℃ 下依次用 0.1% SDS (2 × SSC 配制)和 0.1% SDS (0.2 × SSC 配制)洗涤 3 次各 5 min。

信号检测 在 37℃ 下用 5% 牛血清白蛋白 BSA (Promega)温育 30 min,加入荧光素异硫氰酸盐卵白素(avidin FITC)抗体(Santa cruz) 30 μL 于 37℃ 下暗室温 1 h,用磷酸盐缓冲液 (PBS/Tween20) 于 37℃ 下漂洗 3 次各 5 min。

衬染、封片和观察 制片用 2 μg mL⁻¹ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Roche)衬染 10 min,用 PBS 室温下冲洗 3 次各 3 min,抗衰剂 Vectashield (VCH-1000, Vector)封片。Zeiss Axioplan 2 Imaging 数字视频显微镜下观察,AxioCam CCD (charge coupled device)照相装置俘获图像,用 Axiovision Imaging System 分别在 360 nm 和 480 nm 波长下观察衬染信号和杂交信号,用 Photoshop CS2 ver. 9.0 软件处理图像。

2 结果

2.1 预剪切方法的筛选

用快速通过针头法进行剪切没有出现梯度亮带,对牛筋草(图 1a)和 *E. floccifolia*(图 1b)总 DNA 抽打 0 ~ 80 次的梯度剪切结果接近,片段长 > 5000 bp,峰值大于 5000 bp,因此用快速通过针头法预剪切的效果不理想。

用超声波水浴法进行剪切也没有出现梯度亮带,牛筋草(图 2a)和 *E. floccifolia*(图 2b)总 DNA 剪切 0 ~ 60 s 的结果接近,片段长 > 5000 bp,峰值大于 5000 bp,因此用超声波水浴法预剪切的效果不理想。

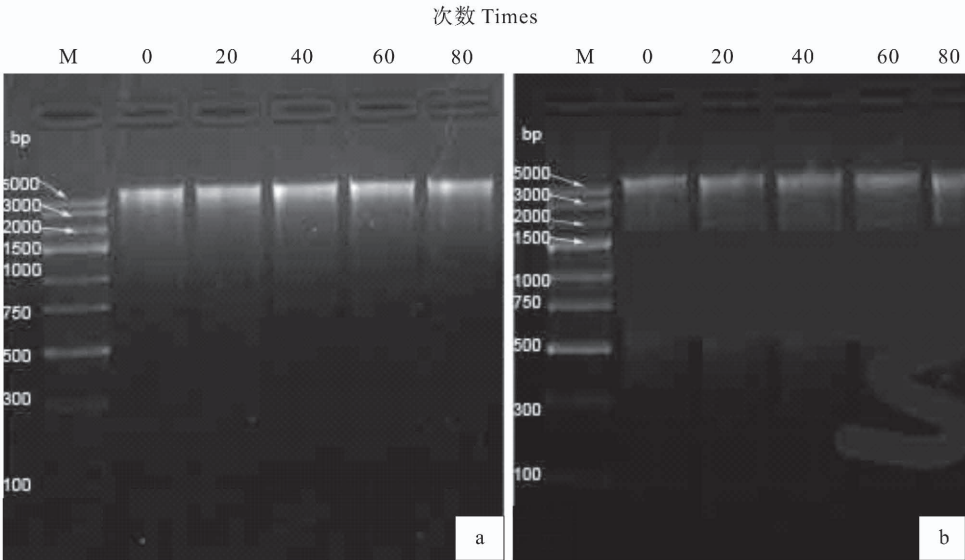


图 1 快速通过针头法剪切牛筋草和 *E. floccifolia* 的总 DNA。a. 牛筋草; b. *E. floccifolia*。
Fig. 1 Total DNA of *E. indica* and *E. floccifolia* sheared with needle-passing method. a. *E. indica*; b. *E. floccifolia*.

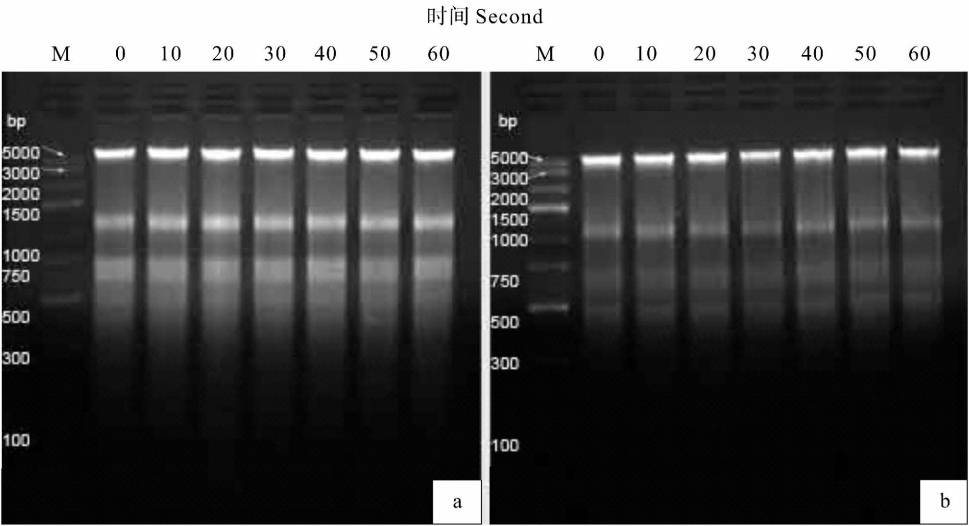


图 2 超声波水浴法剪切的牛筋草 *Eleusine indica* 和 *E. floccifolia* 总 DNA。a. 牛筋草; b. *E. floccifolia*。
Fig. 2 Total DNA of *E. indica* and *E. floccifolia* sheared with ultrasonic bath method. a. *E. indica*; b. *E. floccifolia*.

用超声波破碎仪法进行剪切出现了梯度亮带,牛筋草总 DNA 剪切 1 min 后的片段长为 1000 ~ 3000 bp,峰值 1500 bp,剪切 2 min 后的片段长为 300 ~ 750 bp,峰值 500 bp,剪切 3 min 后的片段长为 200 ~ 500 bp,峰值 300 bp(图 3a);*E. floccifolia* 总

DNA 剪切 1 min 后的片段长为 750 ~ 5000 bp,峰值 1000 bp,剪切 2 min 后的片段长为 500 ~ 3000 bp,峰值 750 bp,剪切 3 min 后的片段长为 300 ~ 750 bp,峰值 500 bp 左右,最短的有 100 bp (图 3b)。因此,预剪切选择超声波破碎仪法。

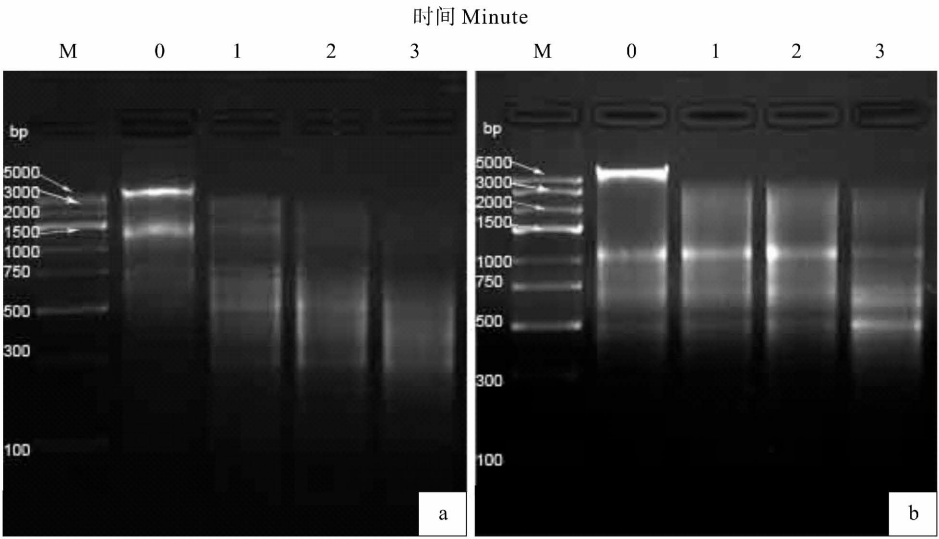


图 3 超声波破碎仪法剪切的牛筋草和 *E. floccifolia* 总 DNA。a. 牛筋草; b. *E. floccifolia*。
Fig. 3 Total DNA of *E. indica* and *E. floccifolia* sheared with the ultrasonic processor method. a. *E. indica*; b. *E. floccifolia*.

2.2 基因组原位杂交

用缺口平移法标记预剪切 1 min 的牛筋草总 DNA 为探针(40 ng, 500 ~ 750 bp),预剪切 3 min 的 *Eleusine floccifolia* 总 DNA 为封阻(250 ng, 100 ~ 500 bp),与穆子中期染色体杂交,结果 36 条染色体(人为编号,图 4a)中的 18 条有清晰可辨的杂交信

号(200 ~ 300 pixel,图 4b),在合成效果图上,亮绿色杂交信号与其余染色体衬染的蓝色信号反差明显(图 4c)。说明适量封阻 DNA 可以鉴别穆子基因组中的 AA 基因组。

不加封阻实验以预剪切牛筋草总 DNA 为探针(40 ng, 500 ~ 750 bp),以 DNase-free 水代替封阻

DNA,与穆子中期染色体(图 4d)杂交,结果所有染色体上都有杂交信号,信号的强弱差异不大(160 ~ 240 pixel,图 4e),在合成效果图上,亮绿色杂交信号过强(图 4f)。说明不加封阻不能鉴别穆子基因组中的 AA 基因组。

过量封阻实验以预剪切的牛筋草总 DNA 为探针(40 ng, 500 ~ 750 bp),预剪切的 *E. floccifolia* 总

DNA 为封阻(2 μ g, 100 ~ 500 bp),与穆子中期染色体(图 4g)杂交,结果染色体上的杂交信号较弱,仅有个别染色体上有信号点(200 ~ 300 pixel,图 4h),其余染色体几乎没有杂交信号,在合成效果图上,染色体被衬染的蓝色信号较强(图 4i),少量亮绿色杂交信号集中在染色体的着丝粒部位。说明过量封阻不能鉴别穆子基因组中的 AA 基因组。

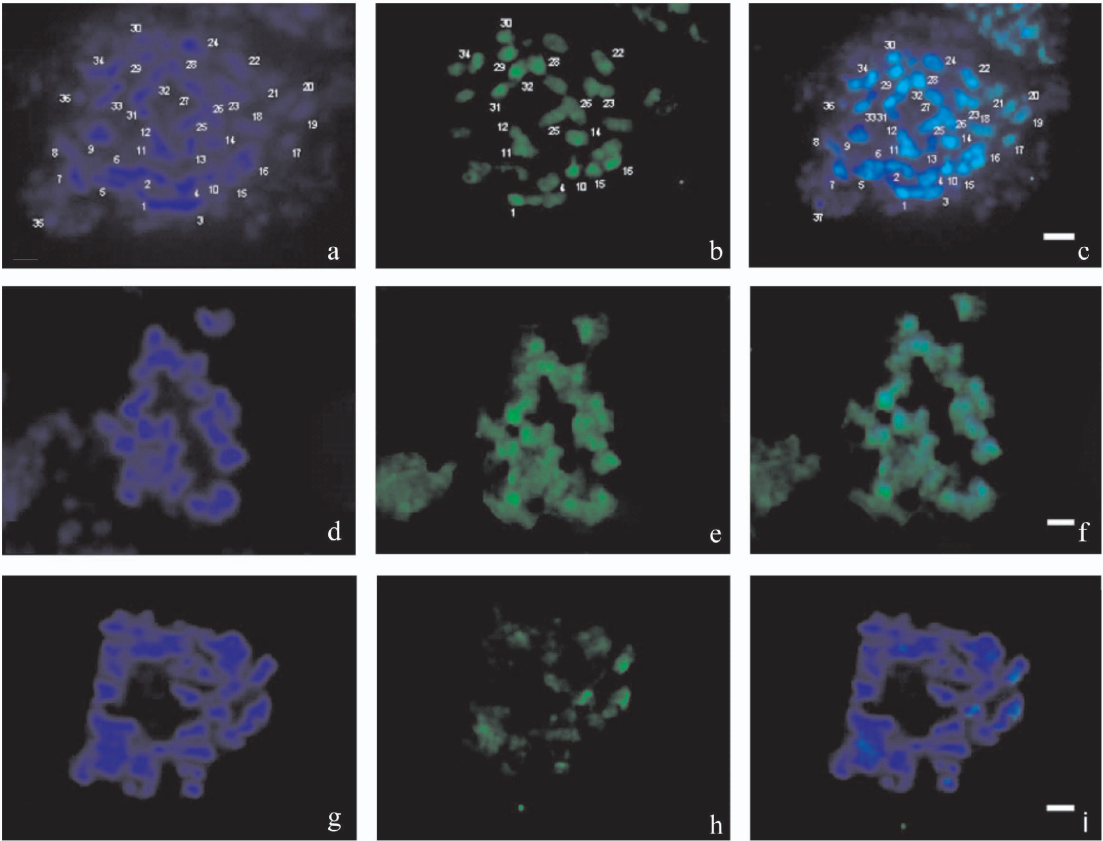


图 4 基因组原位杂交鉴定牛筋草 AA 基因组(绿色信号)在穆子染色体上的分布。a, d, g. 穆子减数分裂中期染色体; b. 探针(牛筋草)及适量封阻(*E. floccifolia*)的杂交信号; c. a 和 b 的合成图像; e. 探针(牛筋草)及不加封阻的杂交信号; f. d 和 e 的合成图像; h. 探针(牛筋草)及过量封阻(*E. floccifolia*)的杂交信号; i. g 和 h 的合成图像。数字“1 ~ 36”示穆子的 36 条染色体。标尺 = 1.5 μ m

Fig. 4 AA genome of *Eleusine indica* (green signals) on the *E. coracana* chromosomes identified by GISH. a, d, and g. Meiotic metaphase chromosomes of *E. coracana*; b. Hybridization signals on 18 chromosomes using *E. indica* DNA as probe and *E. floccifolia* as blocking DNA; c. Merged image of a and b; e. Hybridization signals using *E. indica* DNA as probe and not adding blocking DNA; f. Merged image of d and e; h. Hybridization signals using *E. indica* DNA as probe and adding excess blocking DNA from *E. floccifolia*; i. Merged image of g and h. The chromosomes of *E. coracana* are arbitrarily numbered as “1–36”. Bars = 1.5 μ m

3 结论和讨论

3.1 超声波破碎仪法是理想的预剪切方法

探针长度优化是 GISH 实验的重要步骤^[17,21]。快速通过针头法剪切的强度不易量化,难以得到梯度亮带。超声波水浴法由于有介质存在而削弱空化效应,不容易控制剪切强度,也难以得到梯度亮带^[22]。超声波破碎仪法产生的空化效应直接作用

于总 DNA,可以精确控制剪切强度,得到梯度亮带,剪切效果较好。该方法已经被运用到高密度芯片(ChIP-Chip)和高通量测序(ChIP-Seq)实验中^[21,23]。

植物总 DNA 的 GC 碱基对之间有 3 个氢键,GC 含量(GC%)越多,DNA 的双螺旋结构越稳定,相同剪切强度下,得到目标长度的 DNA 片段所需的剪切时间越长^[24]。我们的试验结果表明,牛筋

草和 *E. floccifolia* 总 DNA 分别用超声波破碎仪处理 2 min 和 3 min, 可得到峰值为 300 ~ 750 bp 的 DNA 片段, 暗示超声波破碎仪法具有物种特异性。

3.2 基因组原位杂交

缺口平移法标记的探针长度取决于 Dnase I 在 DNA 链上打开缺口的数量。在 Dnase I 用量确定的情况下, 在一定的范围内探针的长度同 DNA 底物的量成正比, 与反应时间成反比。在反应时间相同的情况下, DNA 量少, 不仅所标记的探针量少, 而且探针也太短 (< 100 bp), 不适宜用于 GISH; 若 DNA 量太大, 超过体系中 Dnase I 的有效作用范围, 不仅所标记的探针很长, 而且有大量的非标记 DNA 存在, 在杂交时会和探针竞争靶序列, 降低杂交灵敏度^[18,25-26]。实验证明, 牛筋草总 DNA 进行预剪切 1 min 可获得 1000 ~ 3000 bp 的片段, 缺口平移法标记 1 μg 预剪切的牛筋草总 DNA 90 min, 可获得片段长度 300 ~ 750 bp, 浓度为 20 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ 的探针, 用于 GISH 实验的杂交效果理想。

本实验表明, 加入封阻 DNA 能明显地提高探针的特异性。封阻 DNA 能封闭染色体上和探针共有的序列, 显示未被封闭的基因组特有序列, 从而显示目标基因组。本研究以 40 ng 牛筋草总 DNA 为探针, 以 6 倍的 *E. floccifolia* 总 DNA 为封阻, 与穆子减数分裂中期染色体杂交, 结果牛筋草基因组特异性重复序列分布在穆子的 18 条染色体上。若基因组之间分化较大时, 不加封阻 DNA, 单个探针也能够有效鉴别 AA 基因组, 然而在不加封阻的对照实验中, 牛筋草基因组在穆子所有的染色体均有杂交信号, 不能鉴别出 AA 基因组的分布, 暗示 AA 基因组(牛筋草)与 BB 基因组(*E. floccifolia*)重复序列的同源性高; 而在封阻 DNA(BB 基因组)过量的对照实验中, 杂交信号集中在染色体着丝粒区域, 暗示 AA 和 BB 基因组间的分化程度不大, 双方共享的重复序列较多, 在穆子染色体着丝粒区域可能分布着 AA 基因组(牛筋草)特异性重复序列。值得注意的是, 探针和靶序列之间的相同序列能够杂交, 具有一定相似性的序列也能够杂交, 如何控制洗脱严谨度来区分不同相似性程度的基因组, 是未来 GISH 实验关注的方向。

致谢 感谢 ILCA 种质储存中心(Addis Ababa)提供颖果材料, 感谢中国科学院华南植物园标本馆馆长张奠湘研究员提供仪器支持, 杨亲二研究员修改英文摘要, 美国威斯康辛大学(University of Wisconsin, Madison)蒋继明教授和张文

利博士提供技术帮助。

参考文献

- [1] Liu Q (刘青), Peterson P M. Advances in systematics of adaptively radiated *Eleusine* Gaertn. (Poaceae) [J]. J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报), 2010, 18(3): 335-342.(in Chinese)
- [2] Phillips S M. *Eleusine* Gaertn. [C]// Hedberg I, Edwards S. Flora of Ethiopia and Eritrea. Vol. 7. Addis: Addis Ababa University and Sweden: Uppsala University, 1995: 138-142.
- [3] Barbeau W E, Hilu K W. Protein, calcium, iron, and amino acid content of selected wild and domesticated cultivars of finger millet [J]. Plant Foods Hum Nutr, 1993, 43(2): 97-104.
- [4] National Research Council. Lost Crops of Africa. Vol. 1. Grains [M]. Washington DC: National Academy Press, 1996: 1-383.
- [5] Duke J A, Wain K K. Medicinal Plants of the World: Computer Index with More Than 85000 Entries [M]. London: Longman Group Limited, 1981: 1-35.
- [6] Neves S S, Swire-Clark G, Hilu K W, et al. Phylogeny of *Eleusine* (Poaceae: Chloridoideae) based on nuclear ITS and plastid *trnT-trnF* sequences [J]. Mol Phylogen Evol, 2005, 35(2): 395-419.
- [7] Zhang S Z(张寿洲), Lu B R(卢宝荣), Hong D Y(洪德元). *In situ* hybridization and its application in studies on *Oryza* [J]. Acta Phytotax Sin(植物分类学报), 1998, 36(1): 87-96.(in Chinese)
- [8] Zhang H Q, Yang R W, Dou Q W, et al. Genome constitution of *Hystrix patula*, *H. duthiei* ssp. *duthiei* and *H. duthiei* ssp. *longearistata* (Poaceae: Triticeae) revealed by meiotic pairing behaviour and genomic *in-situ* hybridization [J]. Chromosome Res, 2006, 14(6): 595-604.
- [9] Bisht M S, Mukai Y. Genome organization and polyploid evolution in the genus *Eleusine* (Poaceae) [J]. Plant Syst Evol, 2002, 233(3/4): 243-258.
- [10] Liu Q, Triplett J K, Wen J, et al. Allotetraploid origin and divergence in *Eleusine* (Chloridoideae, Poaceae): Evidence from low-copy nuclear gene phylogenies and a plastid gene chronogram [J]. Ann Bot, 2011, 108(7): 1287-1298.
- [11] Yu S W(余舜武), Zhang D P(张端品), Song Y C(宋运淳). The uptodate advance and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) in plant [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 2001, 19(3): 248-254.(in Chinese)
- [12] Xu J(徐静), Zhang X Y(张新友), Li C X(李春喜). Genomic *in situ* hybridization (GISH) technology and its application in plant [J]. J Henan Agri Sci(河南农业科学), 2006(4): 5-8.(in Chinese)
- [13] Guan H(关鹤), Zhao H(赵泓), Yun X F(云兴福), et al. Application of GISH in plants genomic research [J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2006(S1): 99-105.(in Chinese)
- [14] Le H T, Armstrong K C, Miki B. Detection of rye DNA in wheat-rye hybrids and wheat translocation stocks using total

- genomic DNA as a probe [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1989, 7(2): 150–158.
- [15] Fan Y S (范耀山). *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications* [M]. Beijing: Science Press, 2007: 21–41. (in Chinese)
- [16] Li M X (李懋学), Zhang Z P (张赞平). *The Chromosomes of Crops and Their Research Technology* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 70–76. (in Chinese)
- [17] Li X (李璇), Hu W J (忽伟军), Li C B (李常宝). Optimization of probe length in genomic *in situ* hybridization [J]. *J Centr Univ Nation (Nat Sci)* (中央民族大学学报: 自然科学版), 2002, 11 (1): 63–66. (in Chinese)
- [18] Li C B (李常宝). Genome constitution and relationships in *Oryza officinalis* complex by genomic *in situ* hybridization (GISH) [D]. Beijing: Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 2000: 10–27. (in Chinese)
- [19] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucl Acids Res*, 1980, 8 (19): 4321–4325.
- [20] Liu L Q, Gu Z J. Genomic *in situ* hybridization identifies genome donors of *Camellia reticulata* (Theaceae) [J]. *Plant Sci*, 2011, 180(3): 554–559.
- [21] Li M L (李敏俐), Guan S H (关善辉), Lu Z H (陆祖宏). Optimal ultrasonic conditions for shearing the genomic DNA in the chromatin immunoprecipitation experiment [J]. *Biotechn Bull (生物技术通报)*, 2010(5): 121–125. (in Chinese)
- [22] Qiu S Y (邱树毅), Yao R H (姚汝华), Zong M H (宗敏华). Application of ultrasound to biotechnology [J]. *Prog Biotechn (生物技术进展)*, 1999, 19(3): 45–48. (in Chinese)
- [23] Bottomly D, Kyler S L, McWeeney S K, Yochum G S. Identification of β -catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq [J]. *Nucl Acids Res*, 2010, 38(17): 5735–5745.
- [24] Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature [J]. *J Mol Biol*, 1982, 5(1): 109–118.
- [25] Heslop-Harrison J S, Schwarzhacher T. Genomic southern and *in situ* hybridization for plant genome analysis [C]// Jauhar P P. *Methods of Genome Analysis in Plants*. Boca Raton: CRC Press, 1996: 163–179.
- [26] Yang Q E, Hanson L, Bennett M D, et al. Genome structure and evolution in the allohexaploid weed *Avena fatua* L. (Poaceae) [J]. *Genome*, 1999, 42(3): 512–518.