



染色体分选技术在植物学研究中的应用

钱旺, 王秋松, 杨善, 徐良年, 邓祖湖

引用本文:

钱旺, 王秋松, 杨善, 等. 染色体分选技术在植物学研究中的应用[J]. 热带亚热带植物学报, 2021, 29(2): 221–228.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4262>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

燕麦属细胞遗传学研究进展

Research Advances on Cytogenetics of *Avena* (Pooideae, Poaceae)

热带亚热带植物学报. 2017, 25(4): 409–418 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3669>

黄藤染色体核型及基因组大小分析

Karyotype and Genome Size Analyses of *Daemonorops jenkinsiana*

热带亚热带植物学报. 2019, 27(3): 315–322 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3982>

新分类系统下长蒴苣苔亚科(苦苣苔科)细胞学研究概述

Synopsis of Cytological Studies on *Didymocarpoideae* (Gesneriaceae) under New Classification System

热带亚热带植物学报. 2019, 27(5): 548–557 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4082>

我国入侵植物薇甘菊(菊科)的细胞学研究

Cytology of *Mikania micrantha* (Asteraceae), An Invasive Plant in China

热带亚热带植物学报. 2016, 24(5): 508–514 <https://doi.org/10.11926/j.issn.1005-3395.2016.05.006>

巴西橡胶树栽培种质基因组C值测定和变异分析

Genome C Value and Variation Analysis of Cultivated Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) Germplasms by Flow Cytometry

热带亚热带植物学报. 2018, 26(5): 523–528 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3857>

染色体分选技术在植物学研究中的应用

钱旺¹, 王秋松¹, 杨善^{1,2}, 徐良年^{1,3,4*}, 邓祖湖^{1,2,4*}

(1. 福建农林大学国家甘蔗工程技术研究中心, 福州 350002; 2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004; 3. 广西甘蔗生物学重点实验室, 南宁 530004; 4. 农业农村部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室, 福州 350002)

摘要: 介绍了染色体分选技术的基本原理和样品处理的基本流程, 对根尖分生区采用同步化处理, 制备染色体悬浮液, 最后通过流式细胞仪的分析与收集获得纯度高、数量多的目标染色体。综述了染色体分选技术在植物学研究中的主要应用, 包括物理图谱的构建、DNA 分子标记的开发、以及复杂多倍体植物的基因组测序等。通过染色体分选技术的不断完善与发展, 应用于染色体分选的探针标记不断开发, 以及分选后的染色体 DNA 纯化和扩增技术的优化, 将为多倍体植物如甘蔗等基因组学研究提供更有力的帮助。

关键词: 染色体分选; 流式细胞术; 基因组; 多倍体植物

doi: 10.11926/jtsb.4262

Applications of Chromosome Sorted in Botany Research

QIAN Wang¹, WANG Qiu-song¹, YANG Shan^{1,2}, XU Liang-nian^{1,3,4*}, DENG Zu-hu^{1,2,4*}

(1. *National Engineering Research Center of Sugarcane, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China*; 2. *State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Nanning 530004, China*; 3. *Guangxi Key Laboratory for Sugarcane Biology, Nanning 530004, China*; 4. *Key Lab of Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Fuzhou 350002, China*)

Abstract: The basic principle of chromosome sorting technology and the basic process of sample treatment were introduced. The chromosome suspension was prepared by synchronizing the apical meristem. And then the target chromosomes with high purity and high quantity were obtained by flow cytometry. The main applications of chromosome sorting technology in plants were reviewed, including the construction of physical maps, the development of DNA molecular markers, and genome sequence of the complex polyploid plant. With the continuous improvement and development of chromosome sorting technology, the development of probe markers for chromosome sorting and the optimization of chromosome DNA purification and amplification technology after sorted, it will provide more effective help for the genomics research of polyploid plants such as sugarcane.

Key words: Chromosome sorted; Flow cytometry; Genome; Polyploid plant

染色体分选技术是一种基于流式细胞仪在经细胞周期同步化富集中期染色体的悬浮液中快速分析、分选染色体的有效手段^[1]。起初, 在人类基

因组计划方面研究比较多^[2], 在植物方面研究很少。随着高质量的植物染色体悬浮液的成功制备, 植物染色体分选技术的研究获得了快速发展^[3]。国外在

收稿日期: 2020-06-08 接受日期: 2020-08-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771863); 中国现代农业技术专项基金项目(CARS-170106); 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室项目(SKLCUSA-a201912, SKLCUSA-b201806); 福建农林大学科技创新专项基金(KFA17168A, KFA17525A, KFA17169A, 2018N1002)资助

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31771863), the Special Project for Modern Agriculture Technology of China (Grant No. CARS-170106), the Project of State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources (Grant No. SKLCUSA-a201912, SKLCUSA-b201806), and the Special Project for Science and Technology Innovation of Fujian Agriculture and Forestry University (Grant No. KFA17168A, KFA17525A, KFA17169A, 2018N1002).

作者简介: 钱旺(1995~), 男, 在读硕士研究生, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: 719482561@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: dengzuhu@163.com; xuliangnian@163.com

染色体分选方面的研究报道较多,特别是捷克、美国、澳大利亚等国家,而国内鲜有报道。国际小麦基因组测序联盟(International Wheat Genome Sequencing Consortium, IWGSC)提出将小麦基因组分离为染色体或染色体臂组成,并构建相应的 BAC 文库^[4]。后续 BAC 测序和物理图谱的构建由 IWGSC 成员国分担,我国主要是负责 7DL 物理图谱构建。通过这种“化整为零”的方法, IWGSC 完成了小麦染色体的物理作图,并使基因组测序得以完成^[5]。受此鼓舞,染色体分选技术在复杂基因组植物中的应用越来越广泛。通过对基因组中各条染色体的分选来完成全基因组的测序,不仅解决了组装困难的问题,而且可以进一步研究基因组的结构和进化,并且可以分离出感兴趣的一条或多条染色体进行精细研究。染色体的分离使得我们可以用感兴趣的基因分析染色体,例如,由于小麦基因组的高度复杂性和多倍体性阻碍了基因定位的克隆和靶标记的开发。通过对分选得到的小麦 7A、7B 和 7D 染色体的精细研究,最终从小麦染色体臂 7DS 上成功克隆了俄罗斯小麦抗蚜虫基因 Dn2401 并开发出 11 个新的与基因相关的标记^[6]。自然界中高等植物的多倍化现象较为普遍,对其全基因组测序和组装还存在困难,因此采用染色体分选技术是一种不错的选择。

流式细胞术(flow cytometry, FCM)作为分子生物学应用最广、最普遍的细胞定量分析技术,具有精确、高效的优点,是根据液体悬浮液细胞或其他生物大分子的理化性质与光学参数进行功能水平上的精确收集与分析,从而实现了对目标颗粒群体进行快速、准确的分析和分选^[7]。早期流式细胞术在植物染色体分选中采用的是单色标记,即只用一种荧光标记物标记悬浮液中的染色体,这样染色体的大小可用荧光信号值的强弱来表示,这种荧光信号最终在计算机上表现为数值的大小,形态大小相近的染色体聚集在一起就形成峰或点,不同的染色体因自身的长短、形态而聚集成不同的峰或点,从而达到分选染色体的目的。但是这种分选方式要求被分选的植物染色体形态必须差异大,然而,大多数植物的染色体间形态往往差异没那么大,因此采用单色标记法常常难以分选到感兴趣的染色体。使染色体分选技术得到迅速发展的原因是悬浮液荧光原位杂交技术与染色体分选的结合。研究人员通过设计探针,

给目标染色体标记荧光信号,从而能够分选感兴趣的染色体进行研究。这种利用双色标记进行流式核型分析的方法在植物染色体分析中发挥了强大的优势,对完成小麦基因组测序工作发挥重要作用^[5]。目前,流式细胞术在植物染色体上的应用不仅体现在流式核型分析方面,也表现在目标染色体物理图谱的构建、遗传学标记的开发以及染色体测序等相关研究。

1 流式细胞术染色体分选的基本原理

流式细胞术是根据细胞理化性质,对悬浮液中的细胞群体进行快速、准确地分析与分选。早期其主要应用于动物细胞研究,而在植物细胞学研究的应用较晚,原因是植物细胞结构与动物细胞不同,具有细胞壁和特殊的细胞器,制备单细胞悬浮液比较困难。流式细胞术广泛应用于 DNA 含量、检测细胞凋亡、植物细胞周期、染色体核型和流式分子表型分析等方面研究分析^[8-9]。流式细胞术分选染色体的基本原理是把经细胞周期同步化后的根尖组织进行酶解或进行机械匀浆,制成染色体悬浮液,在其中加入荧光标记探针与靶染色体进行杂交,制成荧光染色体悬浮液。然后,将其加入到流式细胞仪中,在鞘液带动下高速通过光学检测系统,流式细胞仪中荧光信号的相对强度表现为染色体的含量。通过流式细胞仪可以将荧光标记的染色体信息可视化地表现在电脑上,结果可以用染色体分布的一维直方图或二维散点图表示(分别是柱状图或散点图)。在一维直方图中,不同的染色体在分布范围内形成不一样的峰值,每种峰值都代表一种染色体大小的差异;而在二维散点图中,不同的染色体形成不同的簇。通过染色体 DNA 含量和碱基对特异性荧光色素检测到的 A-T/G-C 含量差异将其分开。然后,通过调节分选参数,流式细胞仪可以自动对不同染色体峰或形成的簇进行分类,收集分选出的单一类型染色体。

2 染色体分选样品的处理

染色体分选技术包括细胞同步化处理,染色体悬浮液制备以及利用流式细胞仪对分选染色体的流式核型分析、分选和收集,最后得到分选出的染色体。

2.1 制备植物染色体的材料选取

植物细胞周期同步化的材料主要来源于叶肉原生质体或根尖分生组织的悬浮培养细胞。细胞悬浮培养具有生长迅速、便于处理等优点,已在胡萝卜(*Daucus carota*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、小麦(*Triticum aestivum*)等植物的悬浮细胞培养中成功进行同步化诱导。1984年 De Laat 等^[10]以同步化诱导后的纤细单冠菊(*Haplopappus gracilis*)的悬浮培养细胞为材料,完成了植物染色体的首次流式核型分析。但是悬浮液培养细胞存在缺点,即建立一个悬浮培养体系耗时多,需要数月甚至数年时间,并且核型的稳定性差,不利于遗传研究与利用。因此研究人员尝试通过培养植物叶肉原生质体来获得染色体,1987年 Conia 等^[11]以矮牵牛(*Petunia hybrid*)的叶肉原生质体进行同步化诱导,但是这种方法富集的中期指数只有 10%。并且由于植物叶肉原生质体难获得,培养体系难构建,叶肉原生质体方法并没有得到广泛的运用。1992年 Dolezel 等^[13]成功利用蚕豆(*Vicia faba*)的根尖分生组织制备了高质量的染色体悬浮液。Halfmann 等的研究表明,生长活跃的植物根尖分生组织中细胞群体分裂旺盛,并保持恒定的循环周期,易于进行人为同步化调控处理^[12]。由于植物根尖具有来源广、易处理、可重复以及稳定性高等优点,通过使用植物根尖材料实现了多种植物的中期染色体富集的研究,如小麦^[13]、豌豆(*Pisum sativum*)^[14]、棉花(*Gossypium hirsutum*)^[12]和甘蔗(*Saccharum officinarum*)^[15]等。

2.2 细胞周期同步化富集中期染色体

根尖是制备染色体悬浮液,实现染色体分选的理想材料。然而,未经处理的植物根尖材料用于制备染色体悬浮液的效果并不理想。在自然条件下生长的根尖分生组织细胞中,处于分裂期的细胞仅占整个分生区细胞的 5%~8%^[16],用其制备的染色体悬浮液中包含大量细胞核以及细胞杂质。在进行染色体分选时,过多的核以及杂质会干扰染色体的识别,导致分选效率低下、误差大。因此,在进行染色体悬浮液的制备前,首先进行细胞周期同步化处理,即通过低温、DNA 合成抑制剂和微管抑制剂等理化措施对根尖分生组织细胞进行处理,使其大部分细胞处于有丝分裂的中期,从而获得以中期染色体为主的流式核型^[17]。

植物组织中细胞周期同步化诱导主要有两种

策略:即物理法与化学法诱导。物理法是根据细胞的物理特征将细胞同步化,常用的有离心淘析法(*centrifugal elutriation*),即利用细胞在不同时期的大小不相同的特点,通过离心方式对目标阶段的细胞进行分离与收集,以获得同步化的群体^[18]。虽然这种方法操作简单,但是需要的实验设备特殊且昂贵,因此应用并不广泛。化学法则在细胞的不同阶段采用不同类型的化学抑制剂处理,以达到对特定细胞周期的关键响应因子进行功能抑制,使细胞分裂过程受阻停滞在某一阶段,从而达到富集某一目标时期的细胞群体的目的。在去除抑制后,细胞会继续向下一个阶段前进。通常采用不同类型的化学抑制剂对细胞生长周期进行人为调控,主要分为两种,一种是 DNA 合成抑制剂,通过抑制周期蛋白(*cyclins*)和细胞周期蛋白依赖性激酶(*cyclins dependent kinases, CDKs*)的有效表达,使细胞暂时抑制 DNA 的复制,停留在 G1/S 阶段,如羟基脲(HU)、脱氧腺苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷等均可以抑制 DNA 的合成,去除 DNA 合成抑制剂后细胞可恢复正常进程。第二种是微管抑制剂,通过破坏有丝分裂中微管的形成,消除纺锤体的牵引力从而将细胞阻断在中期,达到富集中期染色体的目的,如甲基胺草磷(*amiprofos-methyl, APM*)、氟乐灵(*trifluralin*)以及秋水仙碱(*colchicine*)等。由于不同植物的生长周期不同,为达到理想效果,对细胞的同步化处理也应调整优化。而为了提高细胞周期同步化效率,通常会将两种类型的抑制剂组合使用。早在 1999 年, Dolezel 等^[13]就通过对 HU 和 APM 进行组合,对蚕豆根尖进行同步化处理,获得的中期指数最高可达 70%。在大麦(*Hordeum vulgare*)根尖细胞周期同步化中, Lee 等^[16]通过组合使用 HU 与氟乐灵,获得的染色体中期指数高达 76.5%。

2.3 染色体悬浮液的制备

受染色体悬浮液制备质量的限制,植物染色体分选研究进展缓慢。高等植物细胞具有细胞壁,细胞壁对染色体的分离造成了一定的困难。要获得完整的染色体,必须先去除细胞壁的束缚。有两种方法从植物体细胞中释放染色体:一种是酶解法,通过混合酶液(纤维素酶与果胶酶等)的酶解处理,可以去除细胞壁,但这种方法操作过程繁琐,而且酶解后产生的大量细胞碎片不利于直接进行流式分析^[10];第二种是机械破碎法,也是现在主流的制备

染色体悬浮液的方法。将同步化处理后的根尖细胞用甲醛溶液固定,用超高速破碎细胞壁使染色体释放出来,然后用 50 μm 孔径滤膜过滤细胞碎片。机械破碎法对染色体损伤小,且悬浮液中细胞碎片含量减少,可提高分选染色体的纯度^[3]。进一步的研究表明,对经机械破碎后的染色体悬浮液采用蔗糖梯度的方法进行纯化,可以使染色体悬浮液中的细胞碎片及杂质含量更低,染色体形态结构更完整,背景更加清晰^[19]。

多种因素都会影响到制备的染色体悬浮液质量。其中,固定液种类和固定时间对染色体形态的影响都很大。因而有不少关于对甲醛固定液浓度和固定时间进行优化的研究,以期获得高质量的染色体悬浮液。如 Lee 等^[20]对大麦根尖细胞同步化,在获得 76.5% 的中期染色体指数基础上,采用 2% 的甲醛固定 20 min,机械匀浆后获得了高质量的细胞悬浮液;同样地,对所获得的 70% 的中期染色体指数的玉米根尖用 3% 的甲醛固定 25 min 后机械匀浆,也获得高质量的悬浮液^[21],为后续研究奠定了基础。染色体悬浮液的裂解缓冲液的选择也很重要,裂解缓冲液影响染色体的形态稳定性,用裂解缓冲液可以使悬浮液中的染色体处于独立稳定的形态而不聚集和沉淀,利于分选染色体。常用的裂解液有 LB01、 MgSO_4 、WPB、Otto's 等^[22],不同植物适用的裂解液也可能不同。因为染色体悬浮液的质量对染色体分选至关重要,因此在对一种植物进行染色体分选前,对甲醛固定液的浓度、固定时间和裂解缓冲液进行优化筛选很有必要。

3 染色体分选技术在植物学研究中的应用

双色荧光信号标记的应用使染色体分选技术得到进一步发展,分子标记与目标染色体结合可以帮助研究者实现分选目标染色体的愿望。由于它能够按照研究人员意愿分离到数量较多的纯度极高的特定染色体而得到广泛应用。所分选的高纯度染色体或片段极大地简化了植物复杂基因组的分析,并为物理图谱构建、遗传学标记开发以及基因定位等方面的研究提供帮助。而基于染色体技术进行基因组学的研究分析被称为染色体基因组学。流式分选染色体的主要用途随着细胞学、分子生物学和基因组学方法的发展而不断扩大。

3.1 构建物理图谱

基于流式细胞仪的染色体分选技术可以分选出目标的染色体,用来构建染色体的 BAC 文库^[23]。被流式细胞术分选出来的染色体本身就包含基因组的部分独立的 DNA 序列,因此研究者可以将分选出的染色体作为模板来定位基因或遗传标记在染色体中的位置,从而构建分选染色体的物理图谱和遗传图谱。通过这种方法研究者已将球蛋白基因绘制到豌豆的基因图谱上^[24]。之前,由于等位基因的缺失变异,这些基因难以绘制到基因图谱中。利用分选出的在蚕豆和豌豆中相互易位的染色体,Macas^[24]和 Neumann^[25]将大量 DNA 序列定位到它们的亚染色体区域。Simkova^[26]用分选出的面包小麦的 7D 染色体分别构建了 7DL 和 7DS 染色体的 BAC 文库。对于 7DS 文库,利用俄罗斯小麦蚜虫抗性基因 DnCI2401 相关的标记物筛选,获得包含抗性基因 DnCI2401 的克隆片段;而 7DL 文库采用与绿盲蝽抗性基因 *Gb3* 相关的探针杂交筛选,获得包含 *Gb3* 的克隆片段。由于分选得到的面包小麦 7D 染色体的克隆相对于基因组的克隆数目少,所以筛选效率高,成本低。Zatloukalová 等^[27]对流式细胞术分选出的鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)染色体进行染色体核型研究,最终将物理图谱与遗传图谱整合,并开发出一套有效的细胞遗传标记物,其中 2 个分子标记可以鉴别染色体 E 和 H。Roberto 等^[28]利用染色体形态差异并结合 5s 与 45s 在染色体中的定位对芦笋进行染色体分选,发现有 4 种染色体(IV、V、VI 和 VIII)可以被区分和分选;然后,利用 72 个 SSR 标记对流式核型上单个峰的染色体含量进行了鉴定,其中 27 个被纳入遗传连锁图谱,并将遗传连锁群联系到染色体上,同时发现性别决定位点位于 LG5 上,其与 V 峰相关,V 峰代表了一个带有 5S rDNA 位点的染色体。

3.2 DNA 标记的开发

通过分选出单个染色体可以降低模板的复杂性,有利于遗传标记的开发。标记是构建遗传连锁图谱、基因定位、组装物理图谱以及图位克隆的重要资源。在植物遗传学中应用最广泛的标记是 SSRs、DArTs (多样性微阵列技术)、ISBPs (基于插入位点的多态性)和 SNPs (单核苷酸多态性)。通过分选染色体构建染色体的特异文库,开发 DNA 分子标记是一种有效的途径。DNA 标记既可从短插入

染色体特异文库中获得^[29], 也可以从长插入染色体特异文库中获得^[30]。DARts 标记的开发不需要构建染色体特异文库, 可直接从分选染色体纯化后的 DNA 中开发得到。Wenzl 等^[31]从分选的小麦 3B 染色体和 1B 染色体短臂分别获得了 510 和 59 个 DARts 标记, 而该方法的效率明显大幅提高, 只筛选了 2 688 个小麦 3B 染色体的克隆就获得了 510 个标记, 然而筛选整个基因组大约 70 000 个克隆才获得了 269 个标记。利用染色体分选技术与测序技术结合可以开发大量的染色体特异性标记, Shatalina 等^[32]利用分选出的 2 个六倍体冬小麦 Arina 和 Forno 的 3B 染色体测序开发出 70 多个 SNPs 标记。

3.3 基因组测序

随着测序技术的不断发展, 越来越多植物的基因组序列及组成被人们破解, 为基因组学研究提供了基础。然而对于一些基因组信息庞大、富含高度冗余序列的多倍体植物来说仍然存在测序和组装困难以及测序成本高的问题。但是染色体分选技术的出现使得研究人员可以将植物体复杂的基因组拆分为染色体组, 通过分选单条染色体或染色体臂进行深入研究, 解决了多倍体植物测序和组装困难的问题。国际小麦基因组测序联盟为了测定小麦的全基因组序列, 提出了染色体逐条测序的方法, 利用流式分选技术对中国春小麦的 21 条染色体进行分离, 并构建了相应的 BAC 文库为基因组测序提供帮助。Jin 等^[33]利用流式细胞术对簇毛麦染色体 4VS 进行了分选, 并利用 Illumina 平台进行测序获得大约 170.6 Mb 的组装序列; 该序列为小麦黄花叶病毒抗性基因 Wss1 的定位和图位克隆提供了有价值的信息。Akpınar 等^[34]报道了利用流式分选染色体技术分选出野生二粒小麦的 5B 染色体, 然后进行测序, 通过研究蛋白编码基因、重复元件和假定的 microRNA 和 tRNA 编码序列, 揭示其基因组的结构、组织和功能, 助力小麦的遗传改良。Miao 等^[35]对六倍体小麦‘CRNIL1A’的 3B 染色体进行分选并测序, 报道中国春小麦 3B 染色体上缺失的 CRNIL1A 序列约为 8.3 Mb, 与中国春小麦基因组序列进行对比, 大约有 159.3 Mb 的序列不存在于‘中国春’的基因组中。把来自不同地理起源的 226 份普通小麦的序列与‘CRNIL1A’特异序列进行比较, 结果表明部分序列只存在于特定区域的小麦基因型中, 表明具有这些序列的品种分布存在地域差异性, 可能与

小麦的适应性选择有一定关系。

现代甘蔗栽培品种主要由热带种 *Saccharum officinarum* 和细茎野生种 *S. spontaneum* 杂交而来, 为异源多倍体, 染色体倍性变化大(可多达 16 倍以上), 基因组组成复杂^[36]; 目前对甘蔗栽培种基因组的研究较少, 2018 年 Garsmeur 等^[37]用 PacBio RS II 测序平台对甘蔗 R570 构建的 BAC 文库进行一一测序, 由此构建了只有基因富集区域序列的 1 个仅为 370 Mb 的简单甘蔗基因组。2018 年 Zhang 等^[38]完成了对单倍体细茎野生种 AP85-441 ($4x=32$) 的全基因组测序, 但更高倍性的原种和甘蔗杂交品种等染色体水平基因组序列尚难以完成。染色体分选技术可为甘蔗基因组研究提供一种有效手段, 通过对甘蔗栽培种染色体逐条分选完成全基因组的测序, 为甘蔗栽培种遗传和物理图谱的构建, 遗传育种的分子标记开发提供基础。目前, 有研究首次报道了利用流式细胞技术制备甘蔗完整染色体悬浮液的方法^[39]; 并且通过对甘蔗的 2 热带种和 3 个杂交种材料进行流式核型分析, 发现甘蔗热带种的峰图比杂交种峰图更突出, 且具有更多分离的峰。研究结果表明这种差异可能与杂交种具有双基因组结构有关。这种通过流式细胞术分选甘蔗染色体的方法将使我们能够分离和分析目标染色体并对其进行测序, 从而进一步研究甘蔗基因组的结构和进化。我们相信染色体分选作为一种不断完善的技术在植物基因组学研究中将有更加广阔的应用前景。

4 展望

4.1 染色体分选技术的开发与利用

染色体分选技术在高等植物中主要是通过利用染色体之间的较大差异来分选染色体, 即通过单色荧光直接标记染色体, 根据荧光信号强度, 对染色体形态差异明显的峰值图或聚集成簇的散点图进行分选^[40]。这种方法只能分选 1 条或几条形态差异大的染色体, 并不能按照研究人员的意图分选染色体, 并且分选出来的染色体会含有少量非目标染色体, 影响研究结果。

随着染色体分选技术的发展, 通过开发特异的分子标记结合悬浮液荧光原位杂交技术可以实现按照人们意图选择想要分选的染色体^[41]; 这种双色荧光采用两种核酸染料分别对整条染色体和杂交探针位点进行标记, 通过两种不同荧光信号

强度可以分选出任意带有分子标记的染色体,且这种方法分选出来的染色体纯度更高。然而,有效分子标记探针的缺乏阻碍了其进一步发展,目前常用的标记探针只有 45S 和 5S^[28],因此开发更多新的染色体特异的分子标记是提高染色体分选效率的关键。

染色体分选技术虽然可以一次性收集几万到几十万条单一类型的染色体,但所含的 DNA 含量还是太少了,还达不到三代测序所需的 5~10 μg 的数值含量, Capal 等提供了一种可将分选出的染色体 DNA 经纯化后扩增的方案,该方案拓展了染色体基因组学的潜力,并为染色体结构杂合性和植物单倍型定相研究开辟了新的途径^[42],但该方案仍存在扩增后的组装序列片段小的问题。

4.2 染色体分选技术在基因组学研究中的作用

基因组测序技术的应用为评估植物基因组组成提供帮助,并有助于将基因组学方法引入到植物改良项目中。基因组测序技术在小基因组物种和有参考基因组序列的植物中应用较为简单。然而,对于一些没有参考序列,基因组庞大、复杂的物种,整个基因组的测序数据很难处理和使用。例如,普通小麦包含 3 个基因组(AA、BB、DD),基因组序列数据约为 17 GB,其中重复序列高达 85%^[43]。对于这样复杂基因组物种来说,全基因组测序是难以完成的。因此,运用流式细胞术分选单条染色体或染色体臂以降低基因组的复杂性提供了一种有吸引力的方法。自然界中有很多植物和小麦一样拥有复杂的基因组,对他们进行基因组学研究还存在困难,而染色体分选是通过分选出单条染色体逐条完成基因组测序,简化了测序和组装的过程。将染色体分选技术应用于同样复杂的甘蔗基因组研究中也是一种可行的方案,可为甘蔗基因组测序和组装提供新的技术支持。我们相信,随着染色体悬浮液制备方法的优化,流式细胞术多参数分析和分选技术的开发,染色体分选技术在高等植物中的应用越来越广,为高等植物的复杂基因组研究提供了另一种视野。

参考文献

- [1] JIAO X W, ZHAO S J. Applications of flow cytometry in higher plant research [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2006, 14(4): 354–358. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2006.04.016.
- [2] SHIMIZU N, MINOSHIMA S, KUDO H J, et al. Human genome analysis using chromosome sorting [J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 1993, 38(3): 268–277.
- [3] DOLEŽEL J, ČÍHALÍKOVÁ J, LUCRETTI S. A high-yield procedure for isolation of metaphase chromosomes from root tips of *Vicia faba* L. [J]. *Planta*, 1992, 188(1): 93–98. doi: 10.1007/BF00198944.
- [4] GILL B S, APPELS R, BOTHA-OBERHOLSTER A M, et al. A workshop report on wheat genome sequencing: International genome research on wheat consortium [J]. *Genetics*, 2004, 168(2): 1087–1096. doi: 10.1534/genetics.104.034769.
- [5] Consortium International Wheat Genome Sequencing. A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1251788. doi: 10.1126/science.1251788.
- [6] STAŇKOVÁ H, VALÁRIK M, LAPITAN N L V, et al. Chromosomal genomics facilitates fine mapping of a Russian wheat aphid resistance gene [J]. *Theor Appl Genet*, 2015, 128(7): 1373–1383. doi: 10.1007/s00122-015-2512-2.
- [7] DING M, KASPERSSON K, MURRAY D, et al. High-throughput flow cytometry for drug discovery: Principles, applications, and case studies [J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(12): 1844–1850. doi: 10.1016/j.drudis.2017.09.005.
- [8] LI Q, HE Z F, LIU J M, et al. Paris *polyphylla* 26 triggers G2/M phase arrest and induces apoptosis in HepG2 cells via inhibition of the Akt signaling pathway [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(4): 1685–1695. doi: 10.1177/0300060519826823.
- [9] ZHANG C Q, BARTHELSON R A, LAMBERT G M, et al. Global characterization of cell-specific gene expression through fluorescence-activated sorting of nuclei [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(1): 30–40. doi: 10.1104/pp.107.115246.
- [10] DE LAAT A M M, BLAAS J. Flow-cytometric characterization and sorting of plant chromosomes [J]. *Theor Appl Genet*, 1984, 67(5): 463–467. doi: 10.1007/BF00263414.
- [11] CONIA J, BERGOUNIOUX C, PERENNES C, et al. Flow cytometric analysis and sorting of plant chromosomes from *Petunia hybrida* protoplasts [J]. *Cytometry*, 1987, 8(5): 500–508. doi: 10.1002/cyto.990080511.
- [12] HALFMANN R A, STELLY D M, YOUNG D H. Towards improved cell cycle synchronization and chromosome preparation methods in

- cotton [J]. *J Cotton Sci*, 2007, 11(1): 60–67.
- [13] DOLEŽEL J, ČÍHALÍKOVÁ J, WEISEROVÁ J, et al. Cell cycle synchronization in plant root meristems [J]. *Methods Cell Sci*, 1999, 21(2/3): 95–107. doi: 10.1023/A:1009876621187.
- [14] GUALBERTI G, DOLEŽEL J, MACAS J, et al. Preparation of pea (*Pisum sativum* L.) chromosome and nucleus suspensions from single root tips [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92(6): 744–751. doi: 10.1007/BF00226097.
- [15] YANG S, ZENG K, LUO L, et al. A flow cytometry-based analysis to establish a cell cycle synchronization protocol for *Saccharum* spp. [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5016. doi: 10.1038/s41598-020-62086-9.
- [16] LEE J H, ARUMUGANATHAN K, YEN Y, et al. Root tip cell cycle synchronization and metaphase-chromosome isolation suitable for flow sorting in common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Genome*, 1997, 40(5): 633–638. doi: 10.1139/g97-083.
- [17] DOLEŽEL J, KUBALÁKOVÁ M, PAUX E, et al. Chromosome-based genomics in the cereals [J]. *Chromosome Res*, 2007, 15(1): 51–66. doi: 10.1007/s10577-006-1106-x.
- [18] WALKER G M. Synchronization of yeast cell populations [J]. *Methods Cell Sci*, 1999, 21(2/3): 87–93. doi: 10.1023/A:1009824520278.
- [19] ŠIMKOVÁ H, ČÍHALÍKOVÁ J, VRÁNA J, et al. Preparation of HMW DNA from plant nuclei and chromosomes isolated from root tips [J]. *Biol Plant*, 2003, 46(3): 369–373. doi: 10.1023/A:1024322001786.
- [20] LEE J H, ARUMUGANATHAN K, CHUNG Y S, et al. Flow cytometric analysis and chromosome sorting of barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Mol Cell*, 2000, 10(6): 619–625. doi: 10.1007/s10059-000-0619-y.
- [21] LEE J H, ARUMUGANATHAN K, KAEPLER S M, et al. Cell synchronization and isolation of metaphase chromosomes from maize (*Zea mays* L.) root tips for flow cytometric analysis and sorting [J]. *Genome*, 1996, 39(4): 697–703. doi: 10.1139/g96-088.
- [22] LOUREIRO J, RODRIGUEZ E, DOLEŽEL J, et al. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species [J]. *Ann Bot*, 2007, 100(4): 875–888. doi: 10.1093/aob/mcm152.
- [23] BIRADAR S S, NIE X J, FENG K W, et al. Preparation of high molecular weight gDNA and bacterial artificial chromosome (BAC) libraries in plants [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1099(1): 41–63. doi: 10.1007/978-1-62703-715-0_6.
- [24] MACAS J, DOLEŽEL J, LUCRETTI S, et al. Localization of seed protein genes on flow-sorted field bean chromosomes [J]. *Chromosome Res*, 1993, 1(2): 107–115. doi: 10.1007/BF00710033.
- [25] NEUMANN P, POZÁRKOVÁ D, VRÁNA J, et al. Chromosome sorting and PCR-based physical mapping in pea (*Pisum sativum* L.) [J]. *Chromosome Res*, 2002, 10(1): 63–71. doi: 10.1023/A:1014274328269.
- [26] ŠIMKOVÁ H, ŠAFÁŘ J, KUBALÁKOVÁ M, et al. BAC libraries from wheat chromosome 7D: Efficient tool for positional cloning of aphid resistance genes [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 302543. doi: 10.1155/2011/302543.
- [27] ZATLOUKALOVÁ P, HŘIBOVÁ E, KUBALÁKOVÁ M, et al. Integration of genetic and physical maps of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome using flow-sorted chromosomes [J]. *Chromosome Res*, 2011, 19(6): 729–739. doi: 10.1007/s10577-011-9235-2.
- [28] MORENO R, CASTRO P, VRÁNA J, et al. Integration of genetic and cytogenetic maps and identification of sex chromosome in garden asparagus (*Asparagus officinalis* L.) [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1068. doi: 10.3389/fpls.2018.01068.
- [29] LAN H, SHEPEL L A, HAAG J D, et al. Linkage mapping of rat chromosome 5 markers generated from chromosome-specific libraries [J]. *Mamm Genome*, 1999, 10(7): 687–691. doi: 10.1007/s003359901071.
- [30] PAUX E, ROGER D, BADAIEVA E, et al. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B [J]. *Plant J*, 2006, 48(3): 463–474. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2006.02891.x.
- [31] WENZL P, SUCHÁNKOVÁ P, CARLING J, et al. Isolated chromosomes as a new and efficient source of DArT markers for the saturation of genetic maps [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, 121(3): 465–674. doi: 10.1007/s00122-010-1323-8.
- [32] SHATALINA M, WICKER T, BUCHMANN J P, et al. Genotype-specific SNP map based on whole chromosome 3B sequence information from wheat cultivars Arina and Forno [J]. *Plant Biotechnol J*, 2013, 11(1): 23–32. doi: 10.1111/pbi.12003.
- [33] XIAO J, DAI K L, FU L, et al. Sequencing flow-sorted short arm of *Haynaldia villosa* chromosome 4V provides insights into its molecular structure and virtual gene order [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 791. doi: 10.1186/s12864-017-4211-7.
- [34] AKPINAR B A, YUCE M, LUCAS S, et al. Molecular organization and comparative analysis of chromosome 5B of the wild wheat ancestor *Triticum dicoccoides* [J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 10763. doi: 10.1038/srep10763.
- [35] LIU M, STILLER J, HOLUŠOVÁ K, et al. Chromosome-specific sequencing reveals an extensive dispensable genome component in wheat [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 36398. doi: 10.1038/srep36398.
- [36] WANG P. Chromosome genetic analysis of mobilization of *Saccharum*

- spontaneum* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2016: 1–53.
- 王平. 甘蔗属割手密高贵化染色体遗传研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2016: 1–53.
- [37] GARSMEUR O, DROC G, ANTONISE R, et al. A mosaic monoploid reference sequence for the highly complex genome of sugarcane [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2638. doi: 10.1038/s41467-018-05051-5.
- [38] ZHANG J S, ZHANG X T, TANG H B, et al. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. [J]. *Nat Genet*, 2018, 50(11): 1565–1573. doi: 10.1038/s41588-018-0237-2.
- [39] METCALFE C J, LI J C, GIORGI D, et al. Flow cytometric characterisation of the complex polyploid genome of *Saccharum officinarum* and modern sugarcane cultivars [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19362. doi: 10.1038/s41598-019-55652-3.
- [40] MOLNÁR I, KUBALÁKOVÁ M, ŠIMKOVÁ H, et al. Flow cytometric chromosome sorting from diploid progenitors of bread wheat, *T. urartu*, *Ae. speltooides* and *Ae. Tauschii* [J]. *Theor Appl Genet*, 2014, 127(5): 1091–1104. doi: 10.1007/s00122-014-2282-2.
- [41] CÁPÁL P, VRÁNA J, KUBALÁKOVÁ M, et al. Chromosomal allocation of DNA sequences in wheat using flow-sorted chromosomes [J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1469: 157–170. doi: 10.1007/978-1-4939-4931-1_12.
- [42] CÁPÁL P, BLAVET N, VRÁNA J, et al. Multiple displacement amplification of the DNA from single flow-sorted plant chromosome [J]. *Plant J*, 2015, 84(4): 838–844. doi: 10.1111/tpj.13035.
- [43] CHOULET F, ALBERTI A, THEIL S, et al. Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B [J]. *Science*, 2014, 345(6194): 1249721. doi: 10.1126/science.1249721.