

# 新型寡聚核苷酸荧光原位杂交: 发展与应用

姜春秀<sup>1</sup>, 姚 伟<sup>1</sup>, 张木清<sup>1</sup>, 邓祖湖<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>广西大学广西甘蔗生物学重点实验室, 南宁 530004; <sup>2</sup>福建农林大学国家甘蔗工程技术研究中心, 福州 350002)

**摘要:** 荧光原位杂交技术(FISH, fluorescence *in situ* hybridization)是分子细胞遗传学中最重要的手段之一,可以实现DNA或RNA序列在染色体上精确的可视化的直观定位。随着基因组测序技术的发展和测序成本的降低,大量物种的基因组信息被不断公布,基于高通量测序和参考基因组衍生的寡聚核苷酸序列(Oligo, oligonucleotide)探针在FISH中表现出独特的优势。和传统FISH探针相比,Oligo-FISH能更加精确、深入地揭示植物在进化过程中染色体的进化、遗传与变异。本研究对荧光标记的靶标DNA与荧光探针的种类与应用,寡聚核苷酸探针的种类及制备技术进行了综述,重点聚焦于Oligo-FISH的起源发展及其在鉴定植物染色体、识别植物同源染色体方面所发挥的重要作用。Oligo-FISH技术可用于构建物种属内的染色体核型,利用Oligo-FISH结果可为该属没有全基因组的作物的基因组组装提供指导,Oligo涂染还可以很好地解决异源多倍体物种中非同源染色体间的融合与交换问题,能够准确地检测染色体间是否存在易位等行为及异源重组。因此,Oligo-FISH技术的发展为基因组染色体水平的组装提供了强有力的支撑。未来Oligo-FISH技术与信号放大技术结合能够克服重复序列高度富集区域Oligo探针密度低的困难,可对非常短的基因区域进行可视化,如对启动子、增强子的检测,在转基因中对基因片段定位等,这些研究将有助于更加深入地了解物种遗传和进化,进一步推动作物遗传育种的改良与发展。

**关键词:** 荧光原位杂交技术;寡聚核苷酸;物种进化;染色体识别

## New Oligo Fluorescence *in situ* Hybridization: Development and Application

JIANG Chun-xiu<sup>1</sup>, YAO Wei<sup>1</sup>, ZHANG Mu-qing<sup>1</sup>, DENG Zu-hu<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Biology, Guangxi University, Nanning 530004;

<sup>2</sup>National Engineering Research Center for Sugarcane, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

**Abstract:** Fluorescence *in situ* hybridization (FISH, fluorescence *in situ* hybridization) is a powerful tool for molecular cytogenetics studies and is able to authentically allocate particular DNA or RNA sequences on chromosomes. With the development of the genome sequencing technology, the reduction of sequencing cost and the publishment of a large number of species genome information, Oligonucleotide (Oligo) probes based on high-throughput sequencing and reference genome were developed showing the advantages in FISH. In comparison with the traditional probes, Oligo-FISH can further reveal the evolution, inheritance and variation of chromosomes more precisely and deeply in plant evolution. This paper reviews the types and applications of target DNA and fluorescent probes in the development of fluorescence labeling, as well as the types and preparation techniques of oligonucleotide probes, mainly focusing on the origin and development of Oligo-FISH and its application in plants, which plays an important role in the identification of plant chromosomes and plant homologous chromosomes. Since the karyotype of species and genera can be constructed by Oligo-FISH technology, the results of Oligo-FISH can provide guidance for genome assembly of crops in this genus which have no complete genomes. Oligo painting can also solve the problem of fusion and exchange between chromosomes

收稿日期: 2022-08-01 修回日期: 2022-08-26 网络出版日期: 2022-09-23

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220801001>

第一作者研究方向为甘蔗遗传育种, E-mail: jchunxiu99@163.com

通信作者: 邓祖湖, 研究方向为甘蔗遗传育种, E-mail: dengzuhu@163.com

基金项目: 广西甘蔗生物学重点实验室重大创新基地项目(AE3310019005)

Foundation project: Major Innovation Base Project of Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Biology(AE3310019005)

of heteropolyploid species and accurately detect whether there is translocation and heterologous recombination between chromosomes. Therefore, the development of Oligo-FISH technology provides strong support for the assembly of the genome at chromosome level. In the future, Oligo-FISH technology combined with signal amplification technology can overcome the challenge of low Oligo probes with high concentration of repeat sequences in regions, and visualize limited gene regions, such as the detection of promoters or enhancers or the localization of gene segments in transgenes. These studies will make better use of the research results of species genetics and evolution to further ensure, assist and innovate the improvement and development of crop genetics and breeding.

**Key words:** fluorescence *in situ* hybridization; oligonucleotide; species evolution; chromosome recognition

荧光原位杂交 (FISH, fluorescence *in situ* hybridization) 是分子细胞遗传学中最重要技术, 1982 年该技术的出现标志着研究模式由表型遗传学向分子遗传学的转变。30 多年来 FISH 在植物研究中的发展与应用, 揭示了物种间亲缘关系、血缘构成、基因渗入、染色体重排与结构变异等遗传问题, 成果显著。然而可用探针的贫乏是 FISH 发展过程中面临的极大挑战。早期的基因组探针、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) 文库克隆、以卫星序列或串联重复为代表的高拷贝重复序列探针并未给具有复杂遗传背景的染色体提供可靠的识别手段, 尤其是在非模式作物与多倍体植物的研究中仍存在较大的困难。而寡核苷酸荧光原位杂交技术 (Oligo-FISH, Oligo-fluorescence *in situ* hybridization) 作为现代分子细胞遗传学新兴起的技术之一, 能够更有效地揭示非模式作物或多倍体植物染色体的核型、遗传与演化及近源物种间的亲缘关系。Oligo-FISH 的出现拓宽了荧光原位杂交技术的应用范围并促进了分子生物遗传学的发展。

## 1 荧光标记的发展

原位杂交是指通过标记的已知特定核苷酸作为探针, 与测定目标或组织中的靶核苷酸杂交, 从而对该核苷酸进行物理定量与定位<sup>[1]</sup>。研究者通过放射性同位素对探针进行标记与信号检测, 但放射性同位素存在分辨率有限、信号延迟、制作成本高、对安全措施要求严格等局限性<sup>[2]</sup>, 这在一定程度上限制了其广泛应用<sup>[3]</sup>。荧光原位杂交技术始于 19 世纪 80 年代末, Bauman 等<sup>[4]</sup>首次使用荧光素标记的探针进行原位杂交, 实现了非放射性技术的创新。荧光原位杂交的原理是利用已设计好的带有荧光标记的目的 DNA 探针, 与中期染色体或间期细胞核的靶 DNA 通过变性-退火-复性, 以碱基互补配对的方式形成特定的杂交体, 通过电荷耦合探测元件或

激光共聚焦成像系统, 借助不同荧光颜色将探针可视化于中期染色体或间期细胞核上。FISH 杂交的步骤 (图 1) 可分为 4 步: (1) 中期染色体或间期细胞核标本的制备; (2) 目的探针的标记和制备; (3) 探针与待检测目标杂交; (4) 探针信号的捕获与图片处理。和传统 ISH (*In situ* hybridization) 技术相比, FISH 可以更便捷、更准确地检测杂交后的特定 DNA 序列。目前, 已设计出多种发光波长的荧光基团, 如异硫氰酸荧光素 (FITC, fluorescein isothiocyanate)、羧基荧光素 (FAM, carboxyfluorescein)、吖啶二羧酸 (Cy3, carboxyfluorescein) 等<sup>[5]</sup>。荧光基团的出现极大提高了 FISH 技术的分辨率、灵敏度及安全性, 并降低了成本。

## 2 探针的种类与制备

### 2.1 靶标 DNA 与荧光探针的种类与应用

FISH 技术发展至今已 40 多年, 一直是细胞学研究的重要手段。FISH 技术的关键优势在于靶标的多样性及其探针设计的多样性。FISH 靶标分为多种, 如中期染色体、减数分裂粗线期染色体、间期细胞核和 DNA 纤维等<sup>[6]</sup>。不同时期的靶 DNA, 因其浓缩程度不同, 分辨率水平差异也较大。在染色体中期, 染色体浓缩程度高, 形态分散, 杂交信号分辨率较低, 杂交序列必须在 1 Mb 以上; 而在有丝分裂染色体间期, 杂交序列仅需 50 kb, 并且可以观测探针信号间的物理距离与互作关系; 处于减数分裂粗线期的染色体虽然浓缩程度降低, 但其分辨率较高, 可以更精确地观察信号在染色体上的分布以及染色体潜在的配对行为; DNA 纤维 FISH 又称 DNA 拉丝技术, 该技术突破了蛋白质的束缚, 分辨率可以达到 1~2 kb<sup>[3]</sup>。根据实验目的不同, 利用 DNA 序列设计的探针类型也不同, 主要可分为重复序列探针、基因组探针、单拷贝序列探针、寡核苷酸文库探针以及 RNA 探针。其中重复序列探针, 因其拷贝数

多、信号强且重复性好,在植物杂交利用中最广泛。探针的制备可以通过PCR扩增、酶切扩增和化学方

法进行。常规的BAC文库探针、DNA重复序列探针、基因组探针等都可通过上述方法制备<sup>[7]</sup>。

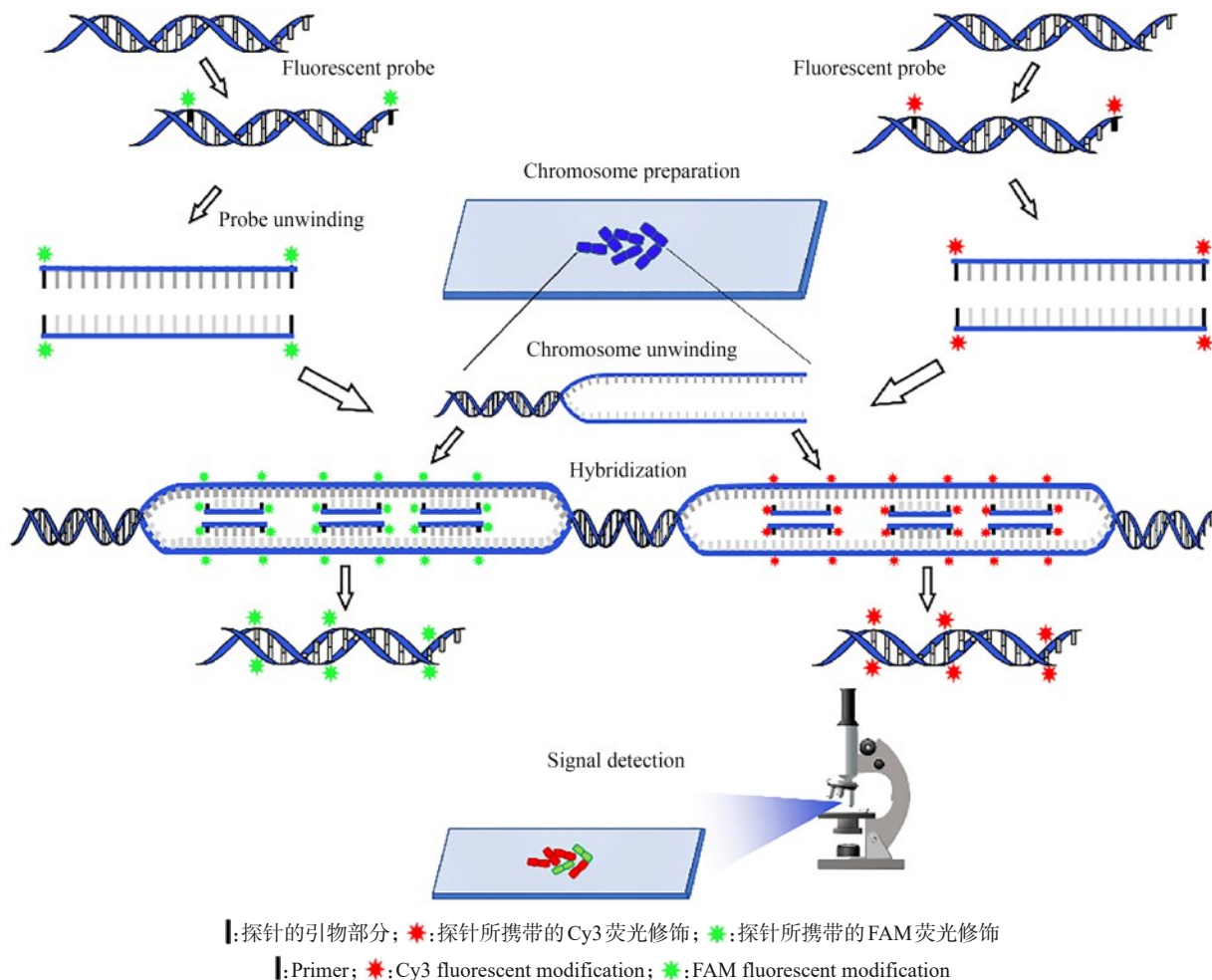


图1 FISH杂交的模式图  
Fig.1 The model of fluorescence *in situ* hybridization

对于多种靶细胞染色体片段的鉴定,分别设计不同的目的探针与不同的荧光信号进行配对结合,便可方便快捷地检测出染色体在进化过程中发生的遗传、重组和变异<sup>[8]</sup>。Albini等<sup>[9]</sup>通过对黑麦花粉母细胞减数分裂粗线期染色体重复序列定位,构建了高分辨率DNA序列图。王坤波等<sup>[10]</sup>以A染色体组为探针进行荧光原位杂交,验证了海岛棉海7124是A与D染色体组双二倍体起源,同时发现部分染色体存在结构变异现象。此外FISH技术也可以应用于染色体流式分选,将设计的目的探针与细胞根尖悬浮液杂交,然后利用流式分选仪进行分选。根据杂交染色体探针的荧光信号强度与未杂交上的染色体自身所带电荷,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,收集所需的中期染色体<sup>[11]</sup>。郭东伟等<sup>[12]</sup>利用FISH技术对中国春等小麦品种进行流式分选染色体鉴定,解决了PCR

鉴定结果不可视、分选纯度不可鉴定等难题,且具有良好的重复性。Yang等<sup>[13]</sup>利用流式细胞仪对斑茅与甘蔗杂交世代中的斑茅单条染色体分选,采用悬浮液基因组原位杂交的新方法,成功对仅含一条斑茅染色体的材料中的斑茅染色体分选并测序分析。

## 2.2 寡聚核苷酸探针的种类及制备

寡核苷酸序列探针(Oligo, oligo nucleotide)是利用已知基因组人工合成的DNA探针,借助生物信息学手段,利用k-mer(k-monomeric unit)方法将基因组序列打断,得到的k-mer序列通过比对方式筛选出备选Oligo文库,再利用近源物种的二代数据库进行打分,从而剔除潜在的重复序列,最终筛选出富集特异寡核苷酸序列的Oligo文库<sup>[14]</sup>。通过对两端载有特定荧光基团的引物进行扩增,进而标记为不同荧光的探针,因此可以通过不同的基因组或

者不同的基因位点设计寡核苷酸探针。单条 Oligo 长度通常在 20 nt~50 nt, 分子量小, 序列复杂程度低, 但通过人工合成标记后的寡核苷酸探针需要 3 个以上 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 位点。从设计区域上区分, Oligo 探针分为单拷贝序列 Oligo 探针与重复序列 Oligo 探针<sup>[15]</sup>。基于单拷贝序列的特异性, 可用于核型的分型与构建。而重复序列 Oligo 探针, 则能够大大缩短杂交时间, 可用于快速检测物种的倍性以及重复序列在染色体中的分布<sup>[15]</sup>。从探针设计思路区分, Oligo-FISH 技术可分为条形码 Oligo-FISH 和涂染 Oligo-FISH 两种<sup>[16]</sup>。条形码 Oligo-FISH 主要通过标记不同的颜色探针, 对染色体杂交, 从而在染色体上显示出特异的信号组合。条形码 Oligo-FISH 探针的主要优势其一在于可以通过不同的荧光信号位点与不同的荧光标记显色组合方式来达到一次性区分染色体核型的目的, 从而节省了 Oligo 设计建库的价格; 其二是能够高效地区分出目标材料的染色体核型, 降低了因重复原位杂交所带来的技术困扰与时间的耗费。但其缺点在于无法有效且直接地观察非同源染色体间发生的交换与重组情况, 容易对结果分析出现干扰。而涂染 Oligo-FISH 技术根据涂染的染色体片段大小不同, 又分为全涂染 Oligo-FISH 和分段涂染 Oligo-FISH<sup>[17]</sup>, 全涂染 Oligo-FISH 的优势在于能够清晰地观察到异源染色体多次交换, 准确性高; 而分段涂染 Oligo-FISH 则能够更直接地看到其同源染色体中染色体的异位、倒位、缺失和重复, 如需同时观察多片段在染色体上的分布, 则需要为 Oligo 探针附带多种荧光染料。此外, Oligo-FISH 还可分为单链探针与双链探针<sup>[18]</sup>。单链探针的制备是将目标文库翻译为 RNA 后反转录为 cDNA, 再标记上荧光分子基团直接杂交, 其特点是制备杂交液时无需进行探针变性。相对于双链探针而言, 单链探针的优势在于探针与目标 DNA 结合效率高, 且探针间不会自身结合, 在文库扩增时不会出现非特异性扩增, 而缺点在于制备步骤繁琐<sup>[18]</sup>。双链探针的制备仅需利用携带荧光标记引物通过 PCR 扩增即可, 其缺点在于 PCR 扩增时易出现非特异性扩增, 导致杂交背景较重, 且探针结合率相对较低, 优点在于探针易于制备<sup>[19]</sup>。

### 3 寡核苷酸探针在植物中的应用

#### 3.1 鉴定植物染色体

植物在进化与衍化过程中, 均经历过不同程度

的染色体融合事件或全基因组加倍事件, 为深入了解植物在这一进程中的衍化过程, 对染色体倍性与染色体基数进行鉴定是必不可少的。寡核苷酸的大规模合成首先在哺乳动物及果蝇中得到实现, 到 2015 年, Han 等<sup>[20]</sup>首先在黄瓜上成功开发基于寡核苷酸的染色体绘制技术, 此后, Oligo-FISH 技术在小麦<sup>[21]</sup>、水稻<sup>[14]</sup>、棉花<sup>[22]</sup>、玉米<sup>[23]</sup>、甘蔗<sup>[24]</sup>等植物上得到广泛应用。刘洪坤等<sup>[21]</sup>通过开发 Oligo-FISH 探针达到高效快速鉴别小麦背景中黑麦染色体的目的。Hou 等<sup>[14]</sup>筛选出日本晴 9 号染色体上的 Oligo 文库并标记为探针, 通过 FISH 技术验证了水稻染色体存在易位行为。刘玉玲<sup>[22]</sup>参考棉花基因组设计 Oligo 库, 将标记的探针杂交到棉花的中期染色体上, 成功建立棉花 Oligo-FISH 技术体系。Oligo-FISH 技术与较为广泛应用的基因组原位杂交 (GISH, genome *in situ* hybridization) 及细菌人工染色体-荧光原位杂交 (BAC-FISH, bacterial artificial chromosome- fluorescence *in situ* hybridization) 相比较, 其优势在于对染色体的覆盖性、精确性及特异性更高, 可以实现单条染色体的识别<sup>[25]</sup>, 可以通过染色体涂染技术 (Painting) 更清晰准确地判断染色体的异位、倒位等现象, 系统性地揭示物种进化与衍化过程以及物种间的亲缘关系等<sup>[26]</sup>。

#### 3.2 寡聚核苷酸探针识别植物同源染色体

同源染色体间的差异及其在减数分裂时期的分离配对与重组行为是植物在遗传稳定与变异中的重要因素<sup>[20]</sup>。在过去的几年里, Oligo-FISH 已经成功应用于部分作物研究, 许多研究者开始利用该技术在各种植物领域研究同源染色体配对的机制。基于染色体的异态性, 对同源染色体间存在的 SNP 位点设计特异探针能够较为精确地发现同源染色体的差异。Braz 等<sup>[27]</sup>基于 Oligo-FISH 技术对玉米近交系 B73 和 M17 的 10 号同源染色体进行识别, 发现后代群体中存在同源染色体间的重组和交换现象。这一研究构建了以 Oligo-FISH 为基础的细胞学在植物染色体同源配对和遗传交换的遗传模型。然而, 相对于拷贝数较高, 基因组相对复杂的多倍体作物与非模式作物中, 同源间的配对机制仍然尚未揭示。尽管 Chai 等<sup>[28]</sup>利用 Cot (Cotangent) 重复序列文库, 通过重复序列的不同分布揭示斑茅同源染色体的差异, 但是这种差异并不能完整诠释其同源间差异, 以及较高倍性的多倍体作物减数分裂时染色体配对的相关机制。割手密、芒草等多倍体基因组的破译为识别多倍体间的同源差异提供了基

础<sup>[29-30]</sup>。在未来的研究,可以通过对同源染色体间的 SNP 位点设计特异 Oligo 文库,以实现对于同源染色体的识别,揭示在物种的遗传过程中同源染色体的衍化及其减数分裂时期同源染色体的配对行为,了解物种的多倍体事件进而能够更加有效地指导多倍体育种。

## 4 展望

### 4.1 Oligo-FISH 结果辅助基因组组装

染色体遗传图谱作为经典的遗传学研究方法之一,依据染色体的交换和重组,对不同标记之间的排列顺序进行线性连锁<sup>[16]</sup>。通过遗传图谱可以进行 QTL (Quantitative trait locus) 定位,辅助育种标记的开发和物种基因组的组装,同时也可以进行不同物种间的染色体多态性研究及基因水平差异分析等。Oligo-FISH 技术已应用于构建物种的染色体物理图谱和遗传图谱,如在玉米<sup>[23]</sup>、黄瓜<sup>[31]</sup>、土豆<sup>[32]</sup>等中已有相关报道。另外绘制基因图谱过程中,将 Oligo-FISH 和连锁图谱结合起来可以更准确地确定具有高多态性的基因位点<sup>[33]</sup>,如王丹蕊等<sup>[34]</sup>在小麦品种中国春中,通过 15 万个单核苷酸多态性构建的标记遗传图谱揭示了物种在染色体衍化过程中的差异。

细胞学可以辅助基因组组装并为组装结果提供可视化验证<sup>[35-38]</sup>。染色体核型作为基因组组装的模板,能够有效地证明该物种的染色体基数与倍性。基于 Oligo-FISH 技术可构建该属物种的染色体核型,为没有全基因组的作物提供指导<sup>[34]</sup>。尽管部分植物的全基因组测序已经变得越来越容易,重测序能够更准确地鉴定目标区段,但异源多倍体植物如小麦、甘蓝、甘蔗等非模式作物在作物改良进程中聚合了多种血缘染色体,且存在大量的异源染色体之间的重组交换,利用重测序,传统 FISH 实验或者是高通量染色体构象捕获技术无法解决这一问题,这使得高倍性的异源多倍体在全基因组染色体水平的组装一直未有较大的突破<sup>[39-40]</sup>。Oligo 涂染可以很好地解释异源多倍体物种中非同源染色体间的融合与交换问题,通过各个探针涂染信号与信号间的共定位,以全基因组水平的层面去准确地检测染色体间是否存在易位等行为及异源重组<sup>[41]</sup>。另外,2005 年 Tettelin 等<sup>[42]</sup>首次提出泛基因组概念,基因组研究进入了一个全新的领域,染色体遗传相关研究也进入了泛核型时代<sup>[43]</sup>。Oligo-FISH 技术的发展为基因组染色体水平的组装提供

了强有力的支撑,为较复杂的基因组组装提供了新的思路,对挖掘、利用优良基因,推动基因组学的发展与分子育种进程具有重要意义。

### 4.2 Oligo 探针在未来植物研究中的发展与应用

在过去的几十年间,尽管基于荧光原位杂交的成像技术能够观察到基因组的精细结构,然而光学显微镜的分辨成像效果以及物种所携带的遗传特征限制了荧光信号的观察以及对于目标区域的检测。重复序列作为基因的冗余,在植物的遗传信息中,其含量平均占比在 63.3%。寡核苷酸探针密度理论上不少于 0.4 (100 条/M),但重复序列在物种中的高度富集为部分物种 Oligo 探针的开发带来了挑战<sup>[28, 44]</sup>。探针密度较低会导致其在信号检测上出现一定干扰,这种干扰对同源染色体间与 SNP 位点的识别方面带来的影响更加明显<sup>[45-46]</sup>。信号放大技术,是通过携带多级寡核苷酸荧光基因结合位点,将荧光基团与基因组之间的距离最小化,从而提高靶细胞的结构分辨率,这种多级放大方法能够尽可能弥补光学显微镜分辨成像的不足<sup>[47-48]</sup>。该技术在扩增中的可编程性使之具备了高度的靶向结合,能够对较厚组织及三维结构进行精准检测<sup>[48]</sup>,并且通过多级放大技术,能够将非常短的基因区域进行可视化,可应用于启动子或增强子的检测,或是在转基因中对基因片段的定位等<sup>[48]</sup>。目前该技术在人类和动物上的应用已经取得突破<sup>[48-49]</sup>。在未来的发展与应用中,寡核苷酸技术为等位基因间特异研究提供可能,包括单分子的定位、染色体间的互作以及更加精密的片段重组检测。同时,在物种的亲缘鉴定中寡核苷酸的可检测年限通常在 1200 万年,基于信号放大的基础能够大大拓宽可检测物种的范围<sup>[20]</sup>。寡核苷酸技术是细胞遗传学上具有里程碑式意义的突破,信号放大技术与之结合有望解决植物细胞学中如多倍体作物高度同源序列的识别、探针密度过低和探针序列受光学显微镜成像分辨率限制等问题,有助于更加深入地了解植物多倍化现象、物种遗传和进化与分子机制,进一步推动作物遗传育种的改良与发展。

## 参考文献

- [1] 王宏晋. 小麦-多年生簇毛麦染色体重组系准确鉴定与重要农艺性状基因的区段定位. 成都: 电子科技大学, 2022  
Wang H J. Characterization of wheat-*Dasyphyrum brevistaratum* introgression lines and physical localization of the genes encoding important agronomic traits. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2022

- [2] 董玉玮. 荧光原位杂交技术研究现状. 科技资讯, 2008(32): 6-8  
Dong Y W. Research status of fluorescence in situ hybridization. Science & Technology Information, 2008(32): 6-8
- [3] Gall J G, Pardue M L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1969, 63(2): 378-383
- [4] Bauman J G, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. Experimental Cell Research, 1980, 128(2): 485-490
- [5] Singh R S, Jiang J, Gill B S. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. Genome, 2006, 49(9): 1057-1068
- [6] De Jong J H, Fransz P, Zabel P. High resolution FISH in plants-techniques and applications. Trends in Plant Science, 1999, 4(7): 258-263
- [7] 汪慧, 郭长虹, 郭东林. 小麦、黑麦 FISH 技术特异序列探针的研究进展. 生物技术通报, 2011, 27(8): 75-81  
Wang H, Guo C H, Guo D L. Development of FISH specific sequence probe in wheat and rye. Biotechnology Bulletin, 2011, 27(8): 75-81
- [8] Jiang J. Fluorescence *in situ* hybridization in plants: Recent developments and future applications. Chromosome Research, 2019, 27(3): 153-165
- [9] Albin S, Schwarzbacher T. *In situ* localization of two repetitive DNA sequences to surface-spread pachytene chromosomes of rye. Genome, 2011, 35: 551-559
- [10] 王坤波, 王文奎, 王春英, 宋国立, 崔荣霞, 黎绍惠, 张香娣. 海岛棉原位杂交及核型比较. 遗传学报, 2001, 28(1): 69-98  
Wang K B, Wang W K, Wang C Y, Song G L, Cui R X, Li S H, Zhang X D. *In situ* hybridization and karyotype comparison of sea island cotton. Acta Genetica Sinica, 2001, 28(1): 69-98
- [11] Metcalfe C J, Li J, Giorgi D, Doležel J, Piperidis N, Aitken K S. Flow cytometric characterisation of the complex polyploid genome of *Saccharum officinarum* and modern sugarcane cultivars. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-12
- [12] 郭东伟, 胡甘, 余茂云, 李连城, 陈明, 徐兆师, 马有志. 小麦流式分选染色体的鉴定. 作物学报, 2008, 34(1): 89-94  
Guo D W, Hu G, She M Y, Li L C, Chen M, Xu Z S, Ma Y Z. Identification of wheat chromosomes sorted by flow cytometry. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(1): 89-94
- [13] Yang S, Cápál P, Doležel J, Li X, Qian W, Wang Z, Zeng K, Li P, Zhou H, Xia R, Zhang M, Deng Z. Sequence analysis of *Erianthus arundinaceus* chromosome 1 isolated by flow sorting after genomic *in situ* hybridization in suspension. The Crop Journal, 2022, 10(5): 1221-1516
- [14] Hou L, Xu M, Zhang T, Xu Z, Wang W, Zhang J, Yu M, Ji W, Zhu C, Gong Z, Gu M, Jiang J, Yu H. Chromosome painting and its applications in cultivated and wild rice. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 110
- [15] Waminal N E, Pellerin R J, Kim N S, Jayakodi M, Park J Y, Yang T J, Kim H H. Rapid and efficient FISH using Pre-Labeled oligomer probes. Scientific Reports, 2018, 8(1): 8224
- [16] Yu F, Chai J, Li X, Yu Z, Yang R, Ding X, Wang Q, Wu J, Yang X, Deng Z. Chromosomal characterization of *Tripidium arundinaceum* revealed by Oligo-FISH. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8539
- [17] 毕云飞. 基于寡核苷酸探针的染色体涂染技术及其在甜瓜属染色体研究中的应用. 南京: 南京农业大学, 2019  
Bi Y F. Oligonucleotide probe-based chromosome painting technique and its application in chromosome research of *Cucumis*. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019
- [18] 杜培. 小麦、百慕大草和花生染色体荧光原位杂交寡核苷酸探针(套)开发与应用. 南京: 南京农业大学, 2017  
Du P. Development and application of wheat, *Thinopyrum Bessarabicum* and peanut oligonucleotide and multiplex probes for fluorescence *in situ* hybridization. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017
- [19] Bi Y, Zhao Q, Yan W, Li M, Liu Y, Cheng C, Zhang L, Yu X, Li J, Qian C, Wu Y, Chen J, Lou Q. Flexible chromosome painting based on multiplex PCR of oligonucleotides and its application for comparative chromosome analyses in *Cucumis*. The Plant Journal, 2020, 102(1): 178-186
- [20] Han Y H, Zhang T, Thammaphichai P, Weng Y, Jiang J. Chromosome-Specific painting in *Cucumis* species using bulked Oligonucleotides. Genetics, 2015, 200(3): 771-779
- [21] 刘洪坤, 唐宗祥. 利用 SLAF-seq 技术开发新寡核苷酸探针鉴定小麦背景中的黑麦染色体. 四川农业大学学报, 2016, 34(4): 402-405  
Liu H K, Tang Z X. Development of novel Oligonucleotide probes for identifying rye chromosomes in wheat background. Journal of Sichuan Agricultural University, 2016, 34(4): 402-405
- [22] 刘玉玲. 棉花基于 FISH 的单染色体图谱及亚基因组和 Oligo 序列鉴定. 武汉: 华中农业大学, 2016  
Liu Y L. Individual chromosome cytogenetic maps and identification of the subgenomes and Oligo sequences in cotton based on FISH. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016
- [23] Figueroa D M, Bass H W. Development of pachytene FISH maps for six maize chromosomes and their integration with other maize maps for insights into genome structure variation. Chromosome Research, 2012, 20(4): 363-380
- [24] De Oliveira Bustamante F, Do Nascimento T H, Montenegro C, Dias S, do Vale Martins L, Braz G T, Benko-Iseppon A M, Jiang J, Pedrosa-Harand A, Brasileiro-Vidal A C. Oligo-FISH barcode in beans: A new chromosome identification system. Theoretical and Applied Genetics, 2021, 134(11): 3675-3686
- [25] 刘玉玲, 刘震, 李兆国, 王玉红, 周忠丽, 蔡小彦, 王星星, 王小艳, 张树林, 赵海燕, 张振梅, 王坤波, 刘方, 彭仁海. 棉花 Oligo-FISH 技术建立及其初步应用. 棉花学报, 2017, 29(3): 213-221  
Liu Y L, Liu Z, Li Z G, Wang Y H, Zhou Z L, Cai X Y,

- Wang X X, Wang X Y, Zhang S L, Zhao H Y, Zhang Z M, Wang K B, Liu F, Peng R H. Construction and primary application of Oligos Fluorescence *in situ* hybridization technology in cotton. *Cotton Science*, 2017, 29(3): 213-221
- [26] Lou Q F, Zhang Y X, He Y H, Li J, Jia L, Cheng C, Guan W, Yang S, Chen J. Single-copy gene-based chromosome painting in cucumber and its application for chromosome rearrangement analysis in *Cucumis*. *The Plant Journal*, 2014, 78(1):169-179
- [27] Braz G T, Yu F, Zhao H, Deng Z, Birchler J A, Jiang J. Preferential meiotic chromosome pairing among homologous chromosomes with cryptic sequence variation in tetraploid maize. *New Phytologist*, 2021, 229(6):3294-3302
- [28] Chai J, Luo L, Yu Z, Lei J, Zhang M, Deng Z. Repetitive sequence barcode probe for karyotype analysis in *Tripidium arundinaceum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(12):6726
- [29] Zhang G, Ge C, Xu P, Wang S, Cheng S, Han Y, Wang Y, Zhuang Y, Hou X, Yu T, Xu X, Deng S, Li Q, Yang Y, Yin X, Wang W, Liu W, Zheng C, Sun X, Wang Z, Ming R, Dong S, Ma J, Zhang X, Chen C. The reference genome of *Miscanthus floridulus* illuminates the evolution of Saccharinae. *Nature Plants*, 2021, 7(5):608-618
- [30] Zhang J, Zhang X, Tang H, Zhang Q, Hua X, Ma X, Zhu F, Jones T, Zhu X, Bowers J, Wai C M, Zheng C, Shi Y, Chen S, Xu X, Yue J, Nelson D R, Huang L, Li Z, Xu H, Zhou D, Wang Y, Hu W, Lin J, Deng Y, Pandey N, Mancini M, Zerpa D, Nguyen J K, Wang L, Yu L, Xin Y, Ge L, Arro J, Han J O, Chakrabarty S, Pushko M, Zhang W, Ma Y, Ma P, Lv M, Chen F, Zheng G, Xu J, Yang Z, Deng F, Chen X, Liao Z, Zhang X, Lin Z, Lin H, Yan H, Kuang Z, Zhong W, Liang P, Wang G, Yuan Y, Shi J, Hou J, Lin J, Jin J, Cao P, Shen Q, Jiang Q, Zhou P, Ma Y, Zhang X, Xu R, Liu J, Zhou Y, Jia H, Ma Q, Qi R, Zhang Z, Fang J, Fang H, Song J, Wang M, Dong G, Wang G, Chen Z, Ma T, Liu H, Dhungana S R, Huss S E, Yang X, Sharma A, Trujillo J H, Martinez M C, Hudson M, Riascos J J, Schuler M, Chen L-Q, Braun D M, Li L, Yu Q, Wang J, Wang K, Schatz M C, Heckerman D, Van Sluys M-A, Souza G M, Moore P H, Sankoff D, VanBuren R, Paterson A H, Nagai C, Ming R. Allele-defined genome of the autopolyploid sugarcane *Saccharum spontaneum* L. *Nature Genetics*, 2018, 50(11):1565-1573
- [31] Lou Q F, He Y H, Cheng C Y, Zhang Z, Li J, Huang S, Chen J. Integration of high-resolution physical and genetic map reveals differential recombination frequency between chromosomes and the genome assembling quality in cucumber. *The Public Library of Science*, 2013, 8(5):e62676
- [32] Koo D H, Jo S H, Bang J W, Park H M, Lee S, Choi D. Integration of cytogenetic and genetic linkage maps unveils the physical architecture of tomato chromosome 2. *Genetics*, 2008, 179(3):1211-1220
- [33] 钱文丹, 陈波利. 荧光原位杂交技术及其应用. 乡村科技, 2018(25): 51-52
- Qian W D, Chen B L. Fluorescence *in situ* hybridization and its application. *Xiang Cun Ke Ji*, 2018 (25): 51-52
- [34] 王丹蕊, 杜培, 裴自友, 庄丽芳, 亓增军. 基于寡核苷酸探针套 painting 的小麦“中国春”非整倍体高清图型及应用. 作物学报, 2017, 43(11): 1575-1587
- Wang D R, Du P, Pei Z Y, Zhuang L F, Qi Z J. Development and application of high resolution karyotypes of wheat “Chinese Spring” aneuploids. *Acta Agronomica Sinica*, 2017, 43(11): 1575-1587
- [35] Gelali E, Girelli G, Matsumoto M, Wernersson E, Custodio J, Mota A, Schweitzer M, Ferenc K, Li X, Mirzazadeh R, Agostini F, Schell J P, Lanner F, Crosetto N, Bienko M. iFISH is a publically available resource enabling versatile DNA FISH to study genome architecture. *Nature Communications*, 2019, 10(1):1-15
- [36] Xin H, Zhang T, Wu Y, Zhang W, Zhang P, Xi M, Jiang J. An extraordinarily stable karyotype of the woody *Populus* species revealed by chromosome painting. *The Plant Journal*, 2020, 101(2):253-264
- [37] Xuan Y, Ma B, Li D, Tian Y, Zeng Q, He N. Chromosome restructuring and number change during the evolution of *Morus notabilis* and *Morus alba*. *Horticulture Research*, 2022, 9: 401-412
- [38] 郝兆东. 鹅掌楸属基因组演化及其花色变异遗传基础研究. 南京: 南京林业大学, 2020
- Hao Z D. *Liriodendron* genome evolution and the genetic basis of flower color variation. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2020
- [39] Garsmeur O, Droc G, Antonise R, Grimwood J, Potier B, Aitken K, Jenkins J, Martin G, Charron C, Hervouet C, Costet L, Yahiaoui N, Healey A, Sims D, Cherukuri Y, Sreedasyam A, Kilian A, Chan A, Van Sluys M A, Swaminathan K, Town C, Berges H, Simmons B, Glaszmann J C, van der Vossen E, Henry R, Schmutz J, D'Hont A. A mosaic monoplod reference sequence for the highly complex genome of sugarcane. *Nature Communications*, 2018, 9(1):1-10
- [40] 孙思龙. 玉米 Mo17 基因组组装及与其它玉米基因组的比较. 北京: 中国农业大学, 2018
- Sun S L. *De Novo* assembly of maize Mo17 genome and its comparison with other maize genomes. Beijing: China Agricultural University, 2018
- [41] 郎涛. 小麦及其近缘物种串联重复序列的全基因组发掘与染色体区段鉴定. 成都: 电子科技大学, 2019
- Lang T. Distribution of tandem repeats in genomes of wheat and related species and its application for chromosome identification. Chengdu: University of Electronic Science and Technology of China, 2019
- [42] Tettelin H, Riley D, Cattuto C, Medini D. Comparative genomics: The bacterial pan-genome. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(5):472-477
- [43] Cheng M, Li X, Cui H, Sun H, Deng T, Song X, Song R,

- Wang T, Wang Z, Wang H. FISH-based “pan” and “core” karyotypes reveal genetic diversification of *Roegneria ciliaris*. *Journal of Genetics and Genomics*, 2022, 49(9):833-912
- [44] Yu Z, Huang Y, Wu J, Zhang M, Deng Z. Diversity chromosome evolution of *Tyl-copia* retrotransposons in *Pennisetum purpureum* revealed by FISH. *Agronomy Journal*, 2022, 12(6):1312
- [45] Ren R, Ray R, Li P, Xu J, Zhang M, Liu G, Yao X, Kilian A, Yang X. Construction of a high-density DArTseq SNP-based genetic map and identification of genomic regions with segregation distortion in a genetic population derived from a cross between feral and cultivated-type watermelon. *Molecular Genetics and Genomics*, 2015, 290(4):1457-1470
- [46] 罗江陶, 郑建敏, 蒲宗君, 范超兰, 刘登才, 郝明. 四倍体小麦与六倍体小麦杂种的染色体遗传特性. *作物学报*, 2021, 47(8): 1427-1436
- Luo J T, Zheng J M, Pu Z J, Fan C L, Liu D C, Hao M. Chromosome transmission in hybrids between tetraploid and hexaploid wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47(8): 1427-1436
- [47] Beliveau B J, Boettiger A N, Avendano M S, Jungmann R, McCole R B, Joyce E F, Kim-Kiselak C, Bantignies F, Fonseka C Y, Erceg J, Hannan M A, Hoang H G, Colognori D, Lee J T, Shih W M, Yin P, Zhuang X, Wu C T. Single-molecule super-resolution imaging of chromosomes and *in situ* haplotype visualization using Oligopaint FISH probes. *Nature Communications*, 2015, 6(1):1-13
- [48] Kishi J Y, Lapan S W, Beliveau B J, West E R, Zhu A, Sasaki H M, Saka S K, Wang Y, Cepko C L, Yin P. SABER amplifies FISH: Enhanced multiplexed imaging of RNA and DNA in cells and tissues. *Nature Methods*, 2019, 16(6):533-544
- [49] Levesque M J, Raj A. Single-chromosome transcriptional profiling reveals chromosomal gene expression regulation. *Nature Methods*, 2013, 10(3):246-248