

荧光原位杂交技术在植物多倍体起源与进化研究中的应用

付文炎^{1,2}, 刘义飞¹, 黄宏文^{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. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 多倍化是植物物种形成与多样化的重要原动力。研究植物特别是一些重要经济作物和园艺植物多倍体的起源与进化, 不仅对于揭示多倍体形成过程中性状变异的分子机制具有重要意义, 而且可为植物遗传资源的保护与利用提供理论和技术支持。作为连接基因组序列片段到染色体组的桥梁, 荧光原位杂交技术长期被广泛用来研究多倍体形成与进化过程中相关特异基因或序列的表达定位、外源染色体检测和鉴定、基因组结构变异等科学问题。因此, 在简单介绍荧光原位杂交技术发展历史和植物多倍体主要类型的基础上, 主要总结了荧光原位杂交技术在植物多倍体起源与进化相关研究上的应用。

关键词: 荧光原位杂交; 基因组原位杂交; 多倍化; 染色体变异

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.03.014

Applications of Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH/GISH) to Study the Origin and Evolution of Plant Polyploids

FU Wen-yan^{1,2}, LIU Yi-fei¹, HUANG Hong-wen^{1*}

(1. Key Laboratory of Plant Resources Conservation and Sustainable Utilization, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Polyploidization is a driving force to the plant speciation and diversification. The researches about the origin and evolution of plant polyploids, in particular crop or horticultural plant polyploids can not only give insights of the molecular mechanism underlying trait variations, but also improve the conservation and utilization of valuable polyploid germplasm resources. The developing of fluorescence *in situ* hybridization (FISH/GISH) technique recently provides a bridge between the sequences of a genome and the corresponding chromosomes. The uses of FISH and GISH can help to understand the processes of gene expressions, exotic chromosomal invasions and genomic structural variations related to polyploidy. Thus, the history of the developments of fluorescence *in situ* hybridization technique and the main types of plant polyploids were briefly introduced. Furthermore, the recent progresses of the applications of FISH and GISH on the researches of the origin and evolution of plant polyploids were reviewed.

Key words: FISH; GISH; Polyploidy; Chromosomal variation

植物多倍化是一种普遍存在的生物学现象, 自然界中约 95% 的蕨类植物^[1]和 70% ~ 80% 的双子叶植物均为多倍体^[2], 同时约 50% ~ 70% 的被子植

物在其进化史中至少经历过一次多倍化进程^[3]。多倍化是植物进化和多样化的重要原动力^[4-5], 一些重要的经济作物, 如小麦(*Triticum aestivum*)、燕麦

收稿日期: 2013-08-28

接受日期: 2013-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900119); 中国科学院植物资源保护与可持续利用重点实验室青年基金项目(211006)资助

作者简介: 付文炎(1988 ~), 女, 硕士研究生, 从事植物细胞遗传学与基因组学研究工作。E-mail: fuwenyan11@mailsucas.ac.cn

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: huanghw@mail.scbg.ac.cn

(*Avena sativa*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、棉花(*Gossypium hirsutum*)等均为多倍体。其他一些作物,如甘蓝(*Brassica oleracea*)、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、向日葵(*Helianthus annuus*)等虽为二倍体,但其祖先在进化中也经历了多倍化过程,即古多倍化^[6]。通过全基因组测序,在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的进化过程中发生过多倍化现象^[7]。最近的研究表明,水稻(*Oryza sativa*)基因组在禾谷类作物分化之前也发生了全基因组加倍事件^[8]。就多倍体作物而言,多倍化除对其本身具有重要的进化和生物学意义外,还对其形态的多样化和抗逆抗病性等均具有重要的影响。相比二倍体物种,四倍体野生马铃薯(*S. stoloniferum*)具有许多优良的抗病毒病性状,其 Ry_{sto} 和 Na_{sto} 基因能抵抗土豆 Y 与 A 病毒病^[9]。研究多倍体植物,特别是一些重要的多倍体经济农作物和园艺作物的多倍体形成机制、基因组组成和进化规律,不仅对揭示多倍体形成过程中性状变异的分子机制具有重要的科学意义,而且可为新种质资源的驯化以及新品种品系的培育提供理论和技术基础。

随着现代分子遗传和分子生物学技术的发展,各种研究多倍体基因组组成和结构变异的方法不断出现,这为研究、评价和发掘利用多倍体植物或者多倍体作物种质资源本身提供了便利条件。特别的,随着新一代测序技术(Next-generation sequencing, NGS)的广泛使用,结合荧光标记技术发展的原位杂交技术(*in situ* hybridization, ISH),即荧光原位杂交技术(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH),作为连接基因组序列片段到染色体组的桥梁,使得基因组分析不再停留在草图阶段,而是可以实现更精细化的分子细胞遗传学操作,极大地促进了从分子基因组模式研究到辅助作物遗传育种,从基础研究到应用研究的转变。本文将综述荧光原位杂交技术的相关发展历史背景,并结合多倍体植物类型的背景介绍总结荧光原位杂交技术对于研究多倍体植物基因组组成和结构变异方面的相关研究进展,以期为今后类似的研究提供思路借鉴和指导。

1 荧光原位杂交技术的发展

1969年, Pardue 和 John 等^[10]利用放射性同位素 ^3H 标记的 rDNA 探针与非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)

细胞核杂交首次获得成功。其原理是通过设计一种带标记的外核苷酸片断探针,利用碱基配对原则与经变性成单链的染色体 DNA 杂交,最后经过专门的检测方法将目标 DNA 在染色体上的具体位置显示出来,他们将该技术命名为原位杂交。在该项技术发展之初所用的探针多为放射性标记探针,但是放射性标记有许多缺陷,如杂交信号检测比较困难、分辨率低、定位不准确等。1977年, Rudkin 等^[11]发明了用间接免疫荧光法检测目的 DNA 的非同位素原位杂交技术(Nonisotopic *in situ* hybridization, NISH)。1981年, Bauman^[12]通过制备抗 DNA:RNA 复合物的抗体来检测杂交后的 RNA 探针,然后通过免疫荧光法结合抗体、显示 RNA 的杂交位点。1982年, Langer 等^[13]将偶联有生物素的核苷酸(Biotin-11-dUTP)通过缺口转移法掺入 DNA 探针进行染色体原位杂交,从而开创了非放射性原位杂交时期。但是,自 1969年 Pardue^[10]、Gall 以及 John 等创建这项技术后,植物染色体原位杂交的研究由于受到植物细胞的细胞壁以及细胞质覆盖等因素的制约,远远落后于在人类及哺乳动物中的研究。随着植物染色体制片技术的改进及相应应用于植物染色体原位杂交的检测系统的发展,该技术在植物上的运用瓶颈逐渐消除。1985年, Rayburn 等^[14]以黑麦(*Secale cereale*)的 DNA 探针(120 bp)与中国春小麦的染色体进行原位杂交,在小麦 21 对染色体中的 11 条染色体上观察到了 24 个杂交位点,该实验的成功使得该项技术在植物研究中逐渐地推广和应用。随着该项技术的发展与成熟, Stelly^[15]于 20 世纪 80 年代末进一步开发了棉花花粉母细胞(PMC)染色体的原位杂交技术(Chromosome *in situ* hybridization, CISH)。

Pinkel 等^[16]于 1986 年首次报道了荧光原位杂交技术,即用荧光素标记探针检测杂交信号,即荧光原位杂交技术(FISH)。与传统的放射性同位素标记相比,荧光素标记的优点是不具有放射性,同时实验周期短、非特异杂交信号污染少,标记的探针稳定、检测简便快速、灵敏度高和安全等。目前主要使用的荧光染料包括异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)、若丹明(Rhodamine)、德克萨斯红(Texas red)、 ^3H -吡啶菁类染料(Cy3)、4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)、碘化丙啶(Propidium iodide, PI)等。利用荧光染料标记的探针可以直接原位杂交到染色体或 DNA 纤维切片上,并通过洗脱、

杂交信号放大等处理后在荧光显微镜下观察探针序列在染色体或 DNA 纤维上的位置和分布方式^[17]。Schwarzacher 等^[18]在 1989 年发表了用基因组总 DNA 为探针进行原位杂交的研究结果,后来把这种方法称为基因组原位杂交(Genome *in situ* hybridization, GISH),主要原理是标记一种植物的总基因组 DNA 作探针,另一种植物的基因组总 DNA 不加标记用作封阻 DNA,利用基因组专化重复 DNA 序列优先杂交,使探针 DNA 与染色体 DNA 结合,从而区分来自不同基因组的染色体。目前, FISH 和 GISH 被广泛的用来进行细胞核型分析、特异基因或序列的表达定位、外源染色体检测和鉴定、染色体物理作图和基因组结构变异分析^[19-20]。

2 植物多倍体的分类

Grant^[1]把多倍体定义为含有更多染色体的个体,含有附加的 1 个或多个祖先的全部染色体组。简单地来说多倍体是含有 3 套及 3 套以上的染色体组^[21]。最开始植物多倍体分为同源多倍体与异源多倍体两种,但是这两种分类方式无法概括所有多倍体物种的类型,尤其是对于一些起源比较复杂,基因组组成牵涉到多个物种的多倍体。Stebbins^[22-23]根据染色体减数分裂时形成多价体和二价体的情况把多倍体分为 4 类:同源多倍体(只形成多价体)、部分异源多倍体(多价体多于或者少于同源多倍体)、严格异源多倍体(只有二价体)和同源异源多倍体(多价体二价体都存在)。Grant^[1]提出通过染色体减数分裂行为、隔离系数、可育性和形态特征等法则来综合判断多倍体类型,并且认为同源多倍体和异源多倍体是多倍体分类的两个极端,中间有许多过渡的类型,他将多倍体分为 2 大类和 5 小类:第一大类为同源多倍体(Autopolyploids),包括严格同源多倍体(Strict autopolyploid, AAAA)和小种间同源多倍体(Interracial autopolyploid, AAAA);第二大类为双倍体(Amphiploids),包括部分异源多倍体(Segmental allopolyploid, A_sA_sA_tA_t)、基因组异源多倍体(Genomic allopolyploid, AABB)和同源异源多倍体(Autoallopolyploid, AAAABB)。关于多倍体的分类到目前还没有一个最终的定论^[21],目前广泛接受的说法是:同源多倍体是指在同一物种种内交配产生的多倍体物种,也包括有遗

传差异的不同居群之间杂交产生的多倍体后代,异源多倍体是指不同物种之间杂交产生的多倍体后代^[24]。

3 植物多倍体基因组起源和组成

对于植物多倍体基因组起源和组成的研究,最开始主要用到的方法是核型分析,通过核型和分带特征确定物种间的亲缘关系,辅助植物分类学工作,但这些数据并不可靠,因为同属植物的核型是很相似的,不能明显区分物种中来源不同的基因组,并且植物染色体分带技术目前也无法得到非常稳定清晰的条带,因而通常很难准确地了解物种间遗传物质的差异性。但是这些问题通过原位杂交可以得到很好的解决。对于植物多倍体, GISH 与 FISH 是探测祖先基因组来源、理清种间进化关系、构建遗传图谱、分析基因组杂交渐渗和促进遗传育种的重要手段^[25]。普通小麦 A、B 和 D 基因组染色体第 1 到第 7 号同源群模式图就是结合核型分析和原位杂交技术构建起来的^[26]。

3.1 单个多倍体物种起源问题研究

传统区分同源与异源多倍体的方法是通过观察其减数分裂过程中染色体的配对行为,若形成多价体则可能是同源多倍体,若为二价体则可能是异源多倍体^[27]。然而传统的方法只能大致判断出多倍体类型,并不能准确识别基因组组成与来源。而通过 GISH 与 FISH 则可以较为清晰的识别多倍体基因组的同源或者异源组成。

单色 GISH 方法是利用一个潜在亲本的基因组作为标记 DNA,利用另一个亲本作为封阻 DNA 与待测样本的染色体进行杂交,若发现有杂交信号就说明其与潜在亲本的亲缘关系很近。通过单色 GISH 可以追溯多倍体起源问题,例如在对云南山茶(*Camellia reticulata*)多倍体复合体基因组起源的探究中,用近缘种西南山茶(*C. pitardii*)和怒江红山茶(*C. saluenensis*)作为标记 DNA,用二倍体云南山茶的基因组作为封阻 DNA 进行 GISH,结果表明,西南山茶与四倍体和六倍体均有杂交信号,而怒江红山茶只与六倍体有杂交信号,从而推断异源四倍体是由二倍体云南山茶和西南山茶杂交产生的,异源六倍体是由异源四倍体与怒江红山茶杂交得到的^[28]。以甘薯近缘野生种 *Ipomoea trifida* (2x)的全

基因组为探针,与 *I. trifida* (4x)的 2 个株系 695104 和 697288 的体细胞染色体进行 GISH,结果表明,695104 几乎所有染色体整条都有均匀明亮的信号,有可能是由二倍体 *I. trifida* 基因组直接加倍而来;697288 虽然各条染色体也均有杂交信号,但信号的区域与亮度有差异,有可能是由于染色体加倍的同时或之后发生了基因组重组与部分变异^[29]。

单色 GISH 一次只能检测一种杂交信号,对于起源牵涉到两物种及以上的异源多倍体基因组组成的检测效率不高,所以后来又出现了双色 GISH,即用两个潜在亲本的全基因组序列为标记 DNA,不用封阻 DNA,一起与待测样本的染色体进行杂交,这样可以同时检测待测样本与两个潜在亲本的亲缘关系。在对多倍体变色鸢尾(*Iris virginica*)起源的研究中,通过 GISH 将两个潜在祖先 *I. virginica* 与 *I. setosa* 的全基因组标记后与变色鸢尾染色体进行杂交,结果表明有 38 条染色体被 *I. setosa* 的 DNA 标记,70 条染色体被 *I. virginica* 的 DNA 标记,据此证明变色鸢尾为异源多倍体^[30]。

通过开发基因组特异的探针序列,即发掘基因组或者染色体特异的 FISH 信号(探针的分布方式与数量),也可以准确的区分多倍体染色体和基因组的组成。在小麦、水稻等重要经济作物中都已开发出许多基因组特异的标记探针。用从黑麦中开发的 R 染色体组特异性序列 pSC119 作为探针,与小麦染色体进行 FISH 杂交,结果表明与小麦的 A、B、D 染色体组都有杂交信号,但与 B 染色体杂交信号最多,所以黑麦的 R 染色体组与小麦的 B 染色体同源性高一些^[14]。此外,通过 FISH 结合核型分析以及染色体减数分类时的配对行为,也可以用来判断多倍体类型。Lavia 等^[31]通过 FISH 证实了多年生花生(*Arachis pintoi*)二倍体和三倍体中 rDNA 位点分布都是一样的,核型组成也是一样的,并且三倍体中同源染色体联会时基本都以三价体的形式,从而表明多年生花生为一个同源三倍体。以 45s rDNA 为探针,对柑橘属品种‘红江橙’(*Citrus sinensis* Osbeck. ‘Hongjiangcheng’)不同倍性的植株进行 FISH 研究,结果表明,‘红江橙’二倍体有 3 个位点,三倍体有 4 个位点,其中有 3 个与二倍体相同,另 1 个分布在不同染色体上;四倍体中有 6 个位点,与二倍体在染色体上的分布和信号强弱都基本相同,以此推断三倍体的形成与 $2n$ 雌配子的形成有关,伴随有外源基因组的重组;四倍体可能产

生于珠心系细胞的直接加倍^[32]。

许多植物物种的种内与种间存在连续倍性变异(如从二倍体到更高的八倍体、十倍体等的连续倍性变异),而正确区分这些多倍体系列的同源或者异源十分困难。在这种情况下需结合 FISH 和 GISH 数据对多倍体基因组进行综合分析。Hasterock 等^[33]最近基于原位杂交对二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)的整倍体系列($2n = 10, 20, 30$)进行分析,认为其染色体 $2n = 30$ 的个体并不是想象中的同源多倍体,而是经 $2n = 10$ 和 20 的物种杂交形成的异源多倍体。以长的 BAC 序列为探针进行 BAC-FISH 分析还可以有效的探测同源多倍体中的亚基因组结构变异,可用以解释一些同源多倍体具有类似异源多倍体染色体分离的现象^[34]。此外利用双色 GISH 将信号叠加可以解决同源性高的问题:香蕉栽培种分别由 A、B、S 和 T 等 4 个染色体组构成,对应的物种分别是 *Musa acuminata*, *M. balbisiana*, *M. schizocarpa* 和 *Australimusa* 属的物种,其中 A 基因组和 B 基因组同源性很高(通过单色 GISH 无法将 A、B 基因组区分开来),A 基因组和 T 基因组间的同源性很低。在检测有可能包含了 A、B 和 T 基因组的三倍体栽培种‘Yawa 2’的基因组组成时,用了两种探针:*M. acuminata* (AA)和 *M. balbisiana* (BB),通过这两种基因组探针的杂交信号叠加观察到有 22 条染色体为 A 基因组,有 11 条染色体为 B 基因组,剩下 10 条没有杂交信号有可能是来源于 T 基因组,从而成功鉴定出三倍体栽培种的基因组组成^[35]。

3.2 物种间网状进化关系探讨

由于多倍化和自然杂交导致的网状进化(Reticulate evolution)在植物中广泛存在^[36-37],从而进一步加剧了我们对多倍体形成机制理解的困难。在没有足够的完整基因组遗传差异的情况下,GISH 是理清网状进化关系最有效的工具。在利用 GISH 对南芥属植物 *Boechera holboellii* 复合体的研究中,观察到大量与倍性水平相关的网状进化和种间杂交渐渗^[38-39]。但对一些物种复合体,多倍体的祖先基因组遗传差异却较小,GISH 往往不能形成具有分辨性的荧光信号,此时若利用基因组上一些快速进化区域,如 DNA 重复序列(Repetitive sequence)作为标记探针进行 FISH 检测,就可以产生物种基因组或者染色体特异的原位杂交信号,进

而区分基因组或者染色体类型,并检测出可能的基因组杂交渐渗以及进行系统进化重建^[17]。在烟草(*Nicotiana tabacum*)中,几个与病毒相关的DNA呈现出串联重复的形式,以它们作为FISH探针,对整个sect. *Tomentosae*的系统进化关系进行了重构,同时报道了普通烟草进化过程中经历的基因组重组事件^[19,40]。

4 多倍体基因组结构变异分析

物种多倍体形成以后其基因组往往会发生大量的结构变异,如重复序列位点与数量、基因的增加与删除、染色体数量、染色体结构(包括染色体组内与组间的易位、倒位、互换)等的变异^[41-45]。通过荧光原位杂交技术可以准确地识别这些结构变异,促进我们对多倍体早期进化的理解。

4.1 重复序列变化

4.1.1 转座子序列

基因组DNA重复序列主要包括串联重复序列(Tandem repeat)和转座子(Transposable element, TEs)。相比串联重复序列,基因组转座子多呈现分散式分布。根据最近Wicker等^[46]的分类系统,基因组转座子主要包括反转座子(Retrotransposon)和DNA转座子(DNA transposon)两大类,其主要区别在于前者的转位依赖反转录酶的存在,而后者不依赖于反转录酶即可实现在基因组上的移动。反转录转座子也分为两大类:具有长末端重复(Long terminal repeat, LTR)的反转录转座子和无长末端重复LINE (Long interspersed nuclear element)类的反转录转座子,前者又可分为Ty1-copia类和Ty3-gypsy类。反转录转座子以高拷贝的形式在植物界中广泛分布,它可以通过纵向和横向方式分别在世代之间和不同种之间进行传递,同一家族的反转录转座子具有很高的异质性。当处在一些生物的和非生物的逆境条件下时,反转录转座子的转录便可以被激活^[47]。

转座子最早是McClintock^[48]在玉米中发现的,它是真核生物基因组的重要组成部分,玉米约85%的基因组为重复序列^[49]、香蕉的约55%为重复序列^[50],其中有许多都属于转座子序列。这些快速进化的基因组重复序列多具有物种或者染色体特异性,从而导致了广泛的基因组大小变化和遗传多样

性^[51]。在模式植物拟南芥中,180 bp的微卫星串联重复序列是其着丝粒区域的主要成分^[52],而在油菜中则主要为176 bp的串联重复序列^[53],其他植物,如水稻为155 bp^[54],玉米为156 bp和一个第四染色体特异的740 bp^[55],普通小麦则为570 bp^[56]。之前的研究还报道了大量基因组或者物种特异转座子元素,如水稻着丝粒区域特异的反转座子CRR家族^[57],棉花AD基因组特异的反转座子Gorge3家族^[58]等。对于缺乏完整基因组信息的物种,利用低深度(< 1%的基因组覆盖)NGS测序分析可有效地发掘出物种主要的重复序列家族。最近,利用罗氏454测序仪对豌豆(*Pisum sativum*)进行仅0.77%的测序覆盖便获得了占完整基因组约35%~48%的重复序列的主要家族类别^[59]。利用生物信息学分析选择一定的重复序列制成FISH探针便可用来进行基因组组成和网状进化相关的分析。通过FISH用Matita(一种LTR反转座子)作为标记探测异源四倍体花生基因组,结果表明其在A、B染色体组上的分布都是相似的,这种染色体特异性结合的模式可以用于花生染色体的鉴定,并且这类转座子并不是随机分布在基因组上而是倾向于分布在类似抗性基因的周围^[60]。目前虽然找到了许多物种的转座子序列用以研究物种的进化,但是专门用来分析多倍体基因组进化的转座子序列还相对较少,有待进一步加强。

4.1.2 rDNA 序列

rDNA,即核糖体DNA,可以转录形成rRNA,然后结合成核糖体的大小两个亚基并在细胞质中与mRNA结合形成核糖体。由于rDNA有一定的保守性,所以常被用于鉴定物种的同源性。通过PCR技术和荧光染色技术相结合能准确定位rDNA在染色体上的位置,通过杂交信号能得知rDNA的位点数与染色上的位置,作为判定物种同源性的证据。

这种方法也被用于鉴定多倍体基因组的进化,将多倍体与潜在二倍体亲本的rDNA位点与数目进行对比可以清楚显示出由多倍体化导致的基因组组成上的变化,如用rDNA序列作为标记,对异源多倍体变色鸢尾(*Iris versicolor*)基因组进行FISH研究,结果表明其所有的18S-26S rDNA单元都来自于同一个祖先*I. virginica*,而5S rDNA位点的单元却来自于两个祖先,有两个应该来自于*I. setosa*祖先的5S rDNA位点缺失了,因此推断,18S-26S

rDNA 位点与其中一个祖先相似暗示了染色体二倍化的第一个阶段^[29]。通过 FISH, 以 45S rDNA 为标记, 分别与四倍体细弱剪股颖(*Agrostis capillaris*) ($A_1A_1A_2A_2$)和四倍体匍茎剪股颖(*A. stolonifera*) ($A_2A_2A_3A_3$)的染色体进行杂交, 结果表明, 与二倍体相比, 该位点在这两种多倍体中的分布都有变异, 说明该属在进化的过程中基因组发生了改变^[61]。人参属包含 3 种植物: 人参(*Panax ginseng*)、西洋参(*P. quinquefolius*)和三七(*P. notoginseng*), 以 45S rDNA 和 5S rDNA 为探针进行 FISH 研究, 结果二倍体三七和四倍体人参的杂交信号都聚集于 1 个位点, 但是位于不同染色上, 而西洋参有 2 个 5S rDNA 位点和 1 个 45S rDNA 位点。用其他物种的 DNA 作为标记进行 GISH 研究, 结果表明, 染色体上的杂交信号很少。这些可以推断人参和西洋参的同源性最高, 并且这些种是近几年才开始分化^[62]。以 45S rDNA 为探针, 分别与现代月季(*Rosa chinensis*)的 5 个四倍体品种(‘和平’、‘粉和平’、‘奇异玫瑰’、‘红双喜’和‘蜜糖’)进行荧光原位杂交研究, 结果表明杂交位点数量均为 3 个, 与 Ma^[63]报道的 4 个不同, 其原因有可能是在人工选择的多倍体进化过程中染色体发生了不等交换和转座, 或者是倾向于向某一亲本的 45S rDNA 进化, 源于另一方亲本的 45S rDNA 基因表达受到了抑制^[64]。

4.2 染色体数量变异

多倍体形成后其染色体数目并不完全是两个亲本 $2n$ 型配子染色体数目的总和, 在一些多倍体后代中往往会存在非整倍体, 即比预期的染色体数量少几条或多出几条, 如通过 FISH 研究, 异源多倍体假韭(*Nothoscordum gracile*)的核型有两种: $2n = 18$ ($14M + 4A$)和 $2n = 19$ ($13M + 6A$), 而其二倍体的核型为: $2n = 10$ ($6M + 4A$), 正常的四倍体应该为 $2n = 20$ ($12M + 8A$), 结合一些 FISH 标记的 rDNA 位点信息和染色体配对情况, 推断 $2n = 19$ ($13M + 6A$)这种情况是两条 A 染色体通过着丝粒融合形成的, 并且这种非整倍性会在多倍体后代中稳定的延续下去^[65]。Grant^[1]认为植物细胞的兼容性是很大的, 所以才有稳定的非整倍体出现, 如有报道吉尼亚春美草(*Claytonia virginica*)非整倍体的染色体数目从 12 ~ 191 条不等^[66]。有人认为非整倍体的植物能存活主要是受到了基因组加倍的保护, 所以由非整倍性在二倍体中所造成的危害在多

倍体中被减轻了。最近的一项研究也同样表明多倍体后代会产生一系列的非整倍体植株, 利用基因组特异性标记序列对人工合成的异源多倍体拟南芥后 8 代进行 FISH 研究, 若后代中染色体数目正常则应该含有来自亲本 *A. suecica* 和 *A. thaliana* 的 20 个绿色标记, 16 个红色标记, 结果后代含有的绿色标记为 17 ~ 22 不等, 红色标记为 15 ~ 17 不等, 这说明染色体数目在多倍体后代的变异很大。学者们认为这种改变也许与新表型的产生有关, 从而能在自然选择中占有优势, 不仅促进了单一物种的形成, 还促进了一系列新物种的形成^[67]。

4.3 染色体结构变异

由于新形成的多倍体会受到“杂合性”和“多倍性”所带来的基因组冲击(Genomic shock), 为了抵抗这种冲击而得以繁衍, 其基因组会作出一系列的适应性反应, 这些变化直接关系到新形成的异源多倍体物种基因组的稳定和进化。在多倍性形成的早期会发生广泛的基因组构成和基因表达水平的变化, 对内让异源的基因组能相互容纳, 对外产生适应环境的表型变异。在基因组构成上的变化主要是染色体组重排, 而在表达上的变化主要有基因沉默和表达量上的变化。通过 GISH 与 FISH 能有效探测到多倍体基因组的互换与染色体易位等结构变异。

在鉴别染色体的结构变异中, 最开始采用的是银染联会复合体(Ag-SC)的电镜观察法, 这种方法可准确定位易位的断点, 但识别易位染色体十分困难。分带技术在一些植物中可准确识别易位染色体, 但难确定易位的断点。运用原位杂交技术可以很好地克服上述方法的不足, 可以通过杂交信号在染色体上的分布来识别染色结构的改变。通过 GISH, 以四倍体细弱剪股颖($A_1A_1A_2A_2$)和匍茎剪股颖($A_2A_2A_3A_3$)为实验对象, 用假定的一个二倍体祖先种普通剪股颖(A_1A_1)的基因组为标记, 结果在一些染色体只有部分有杂交信号, 这可能是由于异源染色体之间的互换导致的^[60]。Barba-Gonzalez^[68]通过 GISH 研究表明, 百合属(*Lilium*)人工合成的 F_1 代多倍体中存在 A 与 O 基因组重组的现象, 并且验证了这种重组对回交一代遗传多样性的影响。通过 FISH 实验, 利用分布在小麦 4A 染色体上的 Acc-2 标记与小麦染色体进行杂交探测出了在 5A 染色体上也有杂交信号, 说明了 4A 与 5A 染色体

的易位,并且在一些近源的二倍体和多倍体物种中也都有类似易位现象的存在,说明它们起源于同一个 A 基因组祖先种^[69]。通过 GISH 对异源四倍体烟草(*Nicotiana tabacum*)的后代进行研究,结果在三代以前的个体中基本都能观察到明显的染色体易位位点,三代以后则很少出现染色体易位现象,在其他近缘的异源多倍体上没有明显的易位位点,这说明染色体易位在烟草属多倍体中并不是一个广泛存在的现象,并且染色体易位出现在多倍体形成的初期,以后趋于稳定,因此推断这种现象有可能是由核质互作(Nucleocytoplasmic interaction)引起的,以提高细胞对异源染色体的耐受性^[70]。

目前有关核质互作导致的染色体易位现象的研究已有不少,但很少涉及到环境对多倍体产生与进化的影响。在最近的一项研究中,以不同生境中的梭罗草(*Kengyilia thoroldiana*)为实验对象,通过 GISH 观察其染色体重组情况,结果表明在寒冷的草原和高原上生长的居群比湖盆山谷生长的居群的染色体重组率更高一些,其遗传多样性也更高一些,这说明在恶劣的气候条件下更容易促使多倍体染色体的重组,以产生适应环境的新表型,从而促进多倍体的进化和新物种的形成^[71]。

5 展望

荧光原位杂交技术已被广泛用于多倍体基因组起源与进化的研究中,与传统方法相比,其优势在于能更精确更高效地探测基因组的组成,指示特异性序列在染色体上的分布位置和数量,但其劣势在于不能定量去研究基因组变异的程度,只能通过杂交信号的强弱对比在不同物种中目的片段拷贝数的多少,这一点可以通过与 PCR 技术相结合而得以实现。目前 GISH 与 FISH 主要运用在多倍体基因组识别、杂交种亲本鉴定、多倍体复合群体起源、物种形成以及多倍体形成后基因组改变的研究上,如染色体重组、重复序列变异等。该项技术不仅可以对多倍体基因组进行一些描述性分析,还可以用于研究多倍体形成的机制,例如与环境互动、适应性进化等。同时 FISH 探针的选择大多用的是 rDNA,而利用转座子这一广泛散布在植物基因组的序列来研究多倍体基因组组成与进化的报道相对较少,所以在以后的研究中可以进一步利用基因组串联重复序列和转座子开发更多新类型的探针

去描述与鉴别多倍体基因组,并且运用到多倍体形成与适应性进化相关机制的研究当中,使该项技术得到更加广泛和深入的运用。

参考文献

- [1] Grant V. Plant Speciation [M]. New York: Columbia University Press, 1981: 10–11.
- [2] Lewis W H. Polyploidy in Angiosperms: Dicotyledons [M]// Polyploidy. New York, USA: Plenum Press, 1980: 241–268.
- [3] Masterson J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of Angiosperms [J]. Science, 1994, 264(5157): 421–424.
- [4] Soltis D E, Soltis P S, Tate J A. Advances in the study of polyploidy since *Plant Speciation* [J]. New Phytol, 2003, 161(1): 173–191.
- [5] Otto S P. The evolutionary consequences of polyploidy [J]. Cell, 2007, 131(3): 452–62.
- [6] Leitch I J, Bennett M D. Polyploidy in Angiosperms [J]. Trends Plant Sci, 1997, 2(12): 470–476.
- [7] Blanc G, Barakat A, Guyot R, et al. Extensive duplication and reshuffling in the *Arabidopsis* genome [J]. Plant Cell, 2000, 12(7): 1093–1101.
- [8] Tian C G, Xiong Y Q, Liu T Y, et al. Evidence for an ancient whole-genome duplication event in rice and other cereals [J]. Acta Genet Sin, 2005, 32(5): 519–527.
- [9] Pendinen G, Gavrilenko T, Jiang J M, et al. Allopolyploid speciation of the Mexican tetraploid potato species *Solanum stoloniferum* and *S. hjertingii* revealed by genomic *in situ* hybridization [J]. Genome, 2008, 51(9): 714–720.
- [10] Pardue M L, Gall J G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations [J]. Genetics, 1969, 64(2): 600–604.
- [11] Rudkin G T, Stollar B D. High resolution detection of DNA-RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence [J]. Nature, 1977, 265(5593): 472–473.
- [12] Bauman J G J, Wiegant J, van Duijn P, et al. Rapid and high resolution detection of *in situ* hybridisation to polytene chromosomes using fluorochrome-labeled RNA [J]. Chromosoma, 1981, 84(1): 1–18.
- [13] Langer P R, Waldrop A A, Ward D C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes [J]. Biochemistry, 1981, 78(11): 6633–6637.
- [14] Rayburn A L, Gill B S. Use of biotin-labeled probes to map specific DNA sequences on wheat chromosomes [J]. J Hered, 1985, 76(2): 78–81.
- [15] Stelly D M, Crane C F, Price H J, et al. Status of *in situ* DNA hybridization in cotton [C]// Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences. Nashville: National Cotton Council, 1992: 6–10.
- [16] Pinkel D, Straume T, Gray J W. Cytogenetic analysis using

- quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(9): 2934–2938.
- [17] Schwarzhacher T, Heslop-Harrison P. Practical *in situ* Hybridization [M]. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000: 134–135.
- [18] Schwarzhacher T, Leitch A R, Bennett M D, et al. *In situ* localization of parental genomes in a wide hybrid [J]. Ann Bot, 1989, 64(3): 315–324.
- [19] Murad L, Bielawski J P, Matyasek R, et al. The origin and evolution of geminivirus-related DNA sequences in Nicotiana [J]. Heredity, 2004, 92(4): 352–358.
- [20] Bancroft I, Morgan C, Fraser F, et al. Dissecting the genome of the polyploid crop oilseed rape by transcriptome sequencing [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 762–766.
- [21] Soltis D E, Rieseberg L H. Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (Saxifragaceae): Genetic insights from enzyme electrophoresis [J]. Amer J Bot, 1986, 73(2): 310–318.
- [22] Stebbins G L Jr. Types of polyploids: Their classification and significance [J]. Adv Genet, 1947, 1(4): 403–429.
- [23] Stebbins G L. Variation and Evolution in Plants [M]. New York, USA: Columbia University Press, 1950: 1–643.
- [24] Soltis P S, Soltis D E. The role of hybridization in plant speciation [J]. Ann Rev Plant Biol, 2009, 60(1): 561–88.
- [25] Chester M, Leitch A R, Soltis P S, et al. Review of the application of modern cytogenetic methods (FISH/GISH) to the study of reticulation (Polyploidy/Hybridisation) [J]. Genes, 2010, 1(2): 166–192.
- [26] Pedersen C, Langridge P. Identification of the entire chromosome complement of bread wheat by two-colour FISH [J]. Genome, 1997, 40(5): 589–593.
- [27] Jauhar P P, Joppa L R. Chromosome pairing as a tool in genome analysis: Merits and limitations [C]// Jauhar P P. Methods of Genome Analysis in Plants. Boca Raton: CRC Press, 1996: 9–37.
- [28] 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.
- [29] Xiang S Q, Wang W X, Li X L, et al. GISH analysis of sweet potato wild relative *Ipomoea trifida* (4x) [J]. Acta Agron Sin, 2008, 34(2): 341–343.
向素琼, 汪卫星, 李晓林, 等. 甘薯近缘野生种 *Ipomoea trifida* (4x) GISH分析 [J]. 作物学报, 2008, 34(2): 341–343.
- [30] Lim K Y, Matyasek R, Kovarik A, et al. Parental origin and genome evolution in the allopolyploid *Iris versicolor* [J]. Ann Bot, 2007, 100(2): 219–224.
- [31] Lavia G I, Ortiz A M, Robledo G, et al. Origin of triploid *Arachis pintoi* (Leguminosae) by autopolyploidy evidenced by FISH and meiotic behaviour [J]. Ann Bot, 2011, 108(1): 103–111.
- [32] Wang W X, Xiang S Q, Zhao Y, et al. Studies on 45s rDNA-FISH of natural polyploids in *Citrus sinensis* Osbeck. ‘Hongjiangcheng’ [J]. Acta Hort Sin, 2008, 35(1): 103–106.
汪卫星, 向素琼, 陈瑶, 等. ‘红江橙’天然多倍体的45s rDNA荧光原位杂交分析 [J]. 园艺学报, 2008, 35(1): 103–106.
- [33] Hasterock R, Draper J, Jenkins G. Laying the cytotoxic foundations of a new model grass, *Brachypodium distachyon* (L.) Beauv [J]. Chrom Res, 2004, 12(4): 397–403.
- [34] Mandakova T, Lysak M A. Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in $x = 7$ crucifer species (Brassicaceae) [J]. Plant Cell, 2008, 20(10): 2559–2570.
- [35] D’Hont A, Paget-Goy A, Escoute J, et al. The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA *in situ* hybridization [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100(2): 177–183.
- [36] Linder C R, Rieseberg L H. Reconstructing patterns of reticulate evolution in plants [J]. Amer J Bot, 2004, 91(10): 1700–1708.
- [37] Vriesendorp B, Bakker F T. Reconstructing patterns of reticulate evolution in angiosperms: What can we do? [J] Taxon, 2005, 54(3): 593–604.
- [38] Kantama L, Sharbel T F, Schranz M E, et al. Diploid apomicts of the *Boechera holboellii* complex display large-scale chromosome substitutions and aberrant chromosomes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(35): 14026–14031.
- [39] Köhler C, Scheid O M, Erilova A. The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants [J]. Trends Genet, 2010, 26(3): 142–148.
- [40] Lim K Y, Matyasek R, Lichtenstein C P, et al. Molecular cytogenetic analyses and phylogenetic studies in the *Nicotiana* section *Tomentosae* [J]. Chromosoma, 2000, 109(4): 245–258.
- [41] Madlung A, Masuelli R W, Watson B, et al. Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic *Arabidopsis* allotetraploids [J]. Plant Physiol, 2002, 129(2): 733–746.
- [42] Huettel B, Kreil D P, Matzke M, et al. Effects of aneuploidy on genome structure, expression, and interphase organization in *Arabidopsis thaliana* [J]. PLoS Genet, 2008, 4(10): e1000226.
- [43] Lim K Y, Soltis D E, Soltis P S, et al. Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in *Tragopogon* (Asteraceae) [J]. PLoS One, 2008, 3(10): e3353.
- [44] Salmon A, Ainouche M L. Polyploidy and DNA methylation: New tools available [J]. Mol Ecol, 2010, 19(2): 213–215.
- [45] Jackson S, Chen Z J. Genomic and expression plasticity of polyploidy [J]. Curr Opin Plant Biol, 2010, 13(2): 153–159.
- [46] Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, et al. A unified classification system for eukaryotic transposable elements [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(12): 973–82.
- [47] Shi F M, Yun J F, Zhao Y, et al. Isolation and sequence analysis of a retrotransposon-like sequence derived from *Agropyron mongolicum* Keng [J]. Acta Agri Bor-Sin, 2010, 25(6): 52–56.

- 石凤敏, 云锦凤, 赵彦, 等. 蒙古冰草基因组类反转座子基因同源序列的克隆与序列分析 [J]. 华北农学报, 2010, 25(6): 52–56.
- [48] McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1950, 36(6): 344–355.
- [49] Huang X H, Han B. A crop of maize variants [J]. Nat Genet, 2012, 44(7): 734–735.
- [50] D'Hont A, Denoeud F, Aury J M, et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants [J]. Nature, 2012, 488(7410): 213–217.
- [51] Kazazian H H Jr. Mobile elements: Drivers of genome evolution [J]. Science, 2004, 303(5664): 1626–1632.
- [52] Heslop-Harrison J S, Brandes A, Schwarzacher T. Tandemly repeated DNA sequences and centromeric chromosomal regions of *Arabidopsis* species [J]. Chrom Res, 2003, 11(3): 241–253.
- [53] Xia X J, Selvaraj G, Bertrand H. Structure and evolution of a highly repetitive DNA sequence from *Brassica napus* [J]. Plant Mol Biol, 1993, 21(2): 213–224.
- [54] Cheng Z K, Dong F G, Langdon T, et al. Functional rice centromeres are marked by a satellite repeat and a centromere-specific retrotransposon [J]. Plant Cell, 2002, 14(8): 1691–1704.
- [55] Nagaki K, Song J, Stupar R M, et al. Molecular and cytological analyses of large tracks of centromeric DNA reveal the structure and evolutionary dynamics of maize centromeres [J]. Genetics, 2003, 163(2): 759–770.
- [56] Kishii M, Nagaki K, Tsujimoto H. A tandem repetitive sequence located in the centromeric region of common wheat (*Triticum aestivum*) chromosomes [J]. Chromo Res, 2001, 9(5): 417–428.
- [57] Gao D Y, Gill N, Kim H R, et al. A lineage-specific centromere retrotransposon in *Oryza brachyantha* [J]. Plant J, 2009, 60(5): 820–831.
- [58] Hu G, Hawkins J S, Grover C E, et al. The history and disposition of transposable elements in polyploid *Gossypium* [J]. Genome, 2010, 53(8): 599–607.
- [59] Macas J, Neumann P, Navrátilová A. Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: Comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula* [J]. BMC Genom, 2007, 8(1): 427–442.
- [60] Nielen S, Vidigal B S, Leal-Bertioli S C M, et al. A new retroelement from peanut: Characterization and evolutionary context in the light of the *Arachis* A-B genome divergence [J]. Mol Genet Genom, 2012, 287(1): 21–38.
- [61] He S B, Huang M, Huang J, et al. Dynamics of the evolution of the genus of *Agrostis* revealed by GISH/FISH [J]. Crop Sci, 2009, 49(6): 2285–2290.
- [62] Choi H W, Koo D H, Paek K H, et al. FISH and GISH analysis of the genomic relationships among *Panax* species [J]. Genes Genom, 2009, 31(1): 99–105.
- [63] Ma Y, Islam-Faridi M N, Crane C F, et al. *In situ* hybridization of ribosomal DNA to rose chromosomes [J]. Chromosome Res, 1999, 7(8): 641–647.
- [64] Tian M, Jian H Y, Jia Y X, et al. FISH analysis of 45S rDNA on modern rose [J]. SW Chin J Agri Sci, 2012, 25(6): 2263–2266. 田敏, 蹇洪英, 贾艳霞, 等. 现代月季45S rDNA的荧光原位杂交分析 [J]. 西南农业学报, 2012, 25(6): 2263–2266.
- [65] Souza L G R, Crosa O, Speranza P, et al. Cytogenetic and molecular evidence suggest multiple origins and geographical parthenogenesis in *Nothoscordum gracile* (Alliaceae) [J]. Ann Bot, 2012, 109(5): 987–999.
- [66] Lewis W H, Oliver R L, Suda Y. Cytogeography of *Claytonia virginica* and its allies [J]. Ann Missouri Bot Gard, 1967, 54(2): 153–171.
- [67] Matsushita S C, Gerad A P T, Thornton M, et al. Allopolyploidization lays the foundation for evolution of distinct populations: evidence from analysis of synthetic *Arabidopsis* allohexaploids [J]. Genetics, 2012, 191(2): 535–547.
- [68] Barba-Gonzalez R, Ramanna M S, Visser R G F, et al. Inter-genomic recombination in F_1 lily hybrids (*Lilium*) and its significance for genetic variation in the BC1 progenies as revealed by GISH and FISH [J]. Genome, 2005, 48(5): 884–894.
- [69] Danilova T V, Friebe B, Gill B S. Single-copy gene fluorescence *in situ* hybridization and genome analysis: Acc-2 loci mark evolutionary chromosomal rearrangements in wheat [J]. Chromosoma, 2012, 121(6): 597–611.
- [70] Leitch A R, Lim K Y, Skalicka K, et al. Nuclear cytoplasmic interaction hypothesis and the role of translocations in *Nicotiana* allopolyploids [C]// Radiation Risk Estimates in Normal and Emergency Situations. Netherlands: Springer, 2006: 319–326.
- [71] Wang Q X, Liu H T, Gao A N, et al. Intergenomic rearrangements after polyploidization of *Kengyilia thoroldiana* (Poaceae: Triticeae) affected by environmental factors [J]. PloS One, 2012, 7(2): e31033.