

荧光原位杂交检测野生六出花 (*Alstroemeria aurea*) 染色体命运^{*}

周树军

(山东农业大学林学院, 泰安 271018)

摘 要: 利用从野生六出花 (*Alstroemeria aurea*) 中分离的一个种特异性串联重复序列 (A001-I) 作荧光原位杂交的探针, 检测野生六出花染色体在其一系列杂交后代中的命运。试验结果表明, 除最长的一对染色体外, 该方法能够检测到在其一系列杂种后代中其余 7 对染色体是否存在。

关键词: 六出花; 特异性重复序列; 荧光原位杂交

中图分类号: S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 03-0255-03

将有价值的外源基因或染色体导入栽培植物, 对改良作物栽培品种起到了很大的作用, 如燕麦染色体的片段导入小麦中大大提高了小麦的抗病性^[1]。尽管利用现在基因工程的方法已克隆了一定数量的基因并获得了转基因植物, 但它不能取代传统的杂交育种方法, 因为能够克隆的基因必须是单拷贝的且基因产物是明确的, 而很多农艺性状往往由多基因控制, 且基因产物不清楚。传统育种方法需要连续几代的回交, 费力费时, 存在着盲目性, 因为在连续回交过程中会发生所需染色体丢失的现象。近年来分子细胞遗传学利用分子探针能够检测外源染色体渗入栽培植物的过程, 克服传统育种的盲目性, 提高育种的效率, 加速育种的进程。

六出花 (*Alstroemeria*), 又名百合水仙, 在荷兰是重要的切花。其野生种 (如 *A. aurea* 和 *A. psittacina*) 存在许多栽培品种中不具备的园艺学性状 (如抗病毒, 瓶插寿命长, 耐寒等特点)。De Jeu 等从野生六出花 *A. aurea* 中分离了一组重复序列, 其中 A001-I 含有 217 bp, 且为该种的特异性高度重复序列^[2], Kamstra 等用荧光原位杂交鉴别了其每一对染色体^[3]; Kuipers 等研究了 *A. psittacina* 高度重复序列的特征和物理定位^[4]。De Jeu 等用 Southern 杂交表明四倍体栽培品种 Jubilae 不含 *A. aurea* 的 A001-I 这一重复序列^[2]。本研究利用 De Jeu 等从 *A. aurea* 分离的 A001-I 作为荧光原位杂交的探针, 旨在检测 *A. aurea* 的染色体在其一系列杂交后代中的命运, 希望为六出花的育种选材提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所需原始植物材料的来源和编号列于表 1, 其一系列杂种的关系和编号见图 1, 这些杂种是 Wageningen 农业大学育种实验室采用 De Jeu 等^[5]描述的胚培养技术获得的, 并由 De Jeu 提供, 所有植物材料均保存于该实验室。

1.2 荧光原位杂交 (FISH)

染色体制片基本根据周树军等的方法^[6]。待试管苗根长约 2 cm, 小心取出, 用凉水洗掉凝胶, 放入 200 μ L/L cyclohexamide 中, 在室温条件下处理 8 h, 然后切下根尖放入 4 的乙醇和乙酸 (3 : 1)

收稿日期: 2001 - 11 - 26; 修回日期: 2002 - 03 - 18

基金项目: 荷兰 Wageningen 大学育种实验室项目

^{*} 本文为作者 1998 年 1 月 ~ 1999 年 10 月在荷兰 Wageningen 大学育种实验室作访问学者期间的部分工作, 期间得到 Kuipers A G J、De Jeu M J 和 Visser R G F 博士的悉心指导和实验室其他同仁的热情帮助, 在此一并致谢。

固定液中, 12 h 后用常规压片法进行染色体制片。

探针标记用 Boehrings Mannheim 公司生产的生物素 (biotin-16-dUTP), 采用 PCR 法进行标记。50 μL 的反应混合物中含有插入的 A001-I 的 pUC19 质粒 200 ng、M13 上游和下游引物各 50 pmol、Perkin Elmer 生产的 Taq 酶 1u、dNTP 各 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、biotin-16-dUTP 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、1 倍的 Perkin Elmer PCR 缓冲液。PCR 的反应程序为: 第 1 个循环 95 $^{\circ}\text{C}$ 7 min、50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 接着进行 29 个 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 重复循环, 然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长 10 min, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

用 RNase A (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 和 Pepsin (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) 对染色体分别预处理 60 min 和 10 min, 用 4 % paraformaldehyde 固定 10 min, 用 70 %、90 %、100 % 的乙醇各脱水 3 min 后在空气中干燥。杂交液中含有 50 % deionized formamide、10 % dextran sulphate、2 \times SSC (即 0.30 mol L^{-1} NaCl 和 0.030 mol L^{-1} sodium citrate, pH 7.0)、0.25 % SDS、1.25 ~ 2.5 ng μL^{-1} A001-I、0.06 ~ 0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sonicated herring sperm DNA。杂交液在 70 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下变性 10 min 后迅速埋入冰中至少 5 min, 将每张经预处理的染色体片滴加 40 μL 变性杂交液, 然后将其在 80 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下变性 5 min, 杂交反应在一个保湿盒中于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱中进行 12 h。杂交松紧度约 80 %, 即: 反应后的载玻片用 2 \times SSC 洗 15 min, 用 42 $^{\circ}\text{C}$ 的 0.1 \times SSC 洗 30 min, 再用 2 \times SSC 洗 15 min, 然后在 buffer 1 (0.1 mol L^{-1} Tris-HCl 和 0.15 mol L^{-1} NaCl, pH 7.5) 中洗 5 min。

Biotin-16-dUTP 分别用 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptavidin-Cy3 (Jackson Immuno Research Laboratories)、10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ biotinylated-antistreptavidin (Vector Laboratories)、再用 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptavidin-Cy3 进行 3 次检测。每次每张载玻片先用 200 μL blocking buffer (buffer 1 中含有 1 % Boehringer Mannheim 生产的封阻剂) 保温 5 min, 再用 100 μL 含以上相应抗体的 blocking buffer 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下保温 1 h, 最后用在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中用 buffer 1 洗 3 次, 每次 5 min。用 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) 复染, 用 5 μL Vector Laboratories 生产的 Vectashied 封片, 用 Zeiss Axiophot 荧光显微镜检测, 用 400 ASA 彩卷照相, 将负片扫入计算机, 用 CorelDraw 软件获得最佳对比度的照片。

2 结果与分析

结果见插页 4 图版和图 1。野生种 *A. aurea* 和栽培品种 Jubilee 杂交产生的杂种 92JA010 为三倍体, 且 7 条染色体有较强的簇状 A001-I 的 FISH 信号 (见插页 4 图版, A)。这一结果同前人报道的结果一致, 表明了 8 对染色体中有 7 对存在 A001-I 的 FISH 信号, 同时也表明四倍体的六出花品种 Jubilee 不含 A001-I 重复序列^[2,4]。*A. psittacina* 与 92JA010 的杂交种 BCJA1 为四倍体 (2n = 4x = 32) (见插页 4 图版, B)。结果表明 92JA010 产生了不减数的雄配子 (n = 3x = 24), 因此 BCJA1 的基因组中亦含有 7 条显示 A001-I 信号的染色体 (见插页 4 图版, B 和 C; B 中的红色箭头与 C 中的红色信号相对应)。

表 1 本研究所用的两个六出花野生种和一个栽培品种

Table 1 Two species and a cultivar of *Alstroemeria* used in the present study

种和品种 Species and Cultivar	来源 Origin	染色体数目 Chromosome numbers	编号 Code
<i>A. aurea</i>	智利 Chile	2n = 2x = 16	A001
<i>A. psittacina</i>	巴西 Brazil	2n = 2x = 16	93Z390.4
Jubilee	栽培种 Cultivar	2n = 4x = 32	CV118

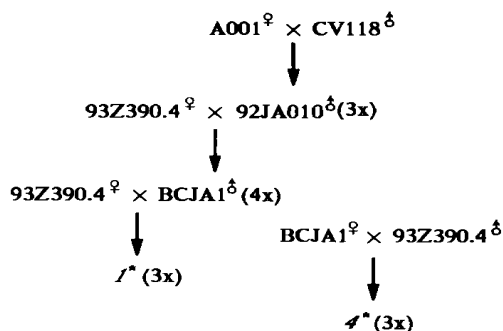


图 1 与野生六出花相关的杂种来源示意图

带星号的斜体数字表明有 A001-I 荧光原位杂交信号的 *A. aurea* 染色体数。

Fig. 1 A series of hybrids related with *A. aurea*

3x or 4x in the brackets show the results of the polyploidy of the hybrids and the italic numbers marked with asterisks represent the number of *A. aurea* chromosome (s) which had FISH signal (s) of A001-I.

A. psittacina 和 BCJA1 的回交后代为三倍体 ($2n = 3x = 24$), 其基因组中只有一条染色体 A001-I 的信号 (见插页 4 图版, D); BCJA1 和 *A. psittacina* 的杂交后代虽然亦为三倍体, 但有四条染色体上具有 A001-I 的信号。一般情况下, 三倍体极少产生可育的配子, 如果产生可育配子, 它们一般为二倍体。试验结果表明三倍体的 BCJA1 无论是作父本还是母本产生的可育的配子都是二倍体, 但它们的染色体组成是不同的, 雄配子中只有 1 条染色体 A001-I 的信号, 雌配子有 4 条染色体上具有 A001-I 的信号, 它们都清楚地反映在其后代的个体中 (图 1 和插页 4 图版 D、E 和 F)。因此 A001-I 能够作为 *A. aurea* 的一个分子标记用于检测其染色体在一系列杂交后代中的命运。当然仅用 A001-I 作分子标记存在一定的局限性, 因为 *A. aurea* 的一号染色体上没有 A001-I 的信号^[4]。我们试图用基因组原位杂交 (GISH) 的方法来检测 *A. aurea* 一号染色体在其一系列杂种中的命运, 但 GISH 的结果与 FISH 的结果几乎相同, 因此难以将 *A. aurea* 一号染色体与最长的 Jubilae 和 *A. psittacina* 的染色体区分开来。Kuipers 等利用 GISH 区分了 *A. aurea* 和 *A. inodora* 的基因组^[7], 本试验仍未得到理想 GISH 结果的原因有待进一步探讨。

根据试验结果和以上分析, 我们认为 A001-I 可以作为 *A. aurea* 的分子标记用于六出花的杂交育种中检测 *A. aurea* 染色体的命运。这既有助于克服该杂交育种工作的盲目性, 又将会有助于判断一些性状和其相关的基因连锁群。当然由于只用 A001-I 作分子标记不能一一区分 *A. aurea* 的每一条染色体, 因此如同其他探针结合使用会得到更好的结果。

参考文献:

- 1 Jiang J, Friebe B, Gill B S. Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica*, 1994, 73: 199 ~ 212
- 2 De Jeu MJ, Lasschuit J, Kuipers A GJ, et al. Characterisation and localisation of repetitive DNA sequences in the ornamental *Alstroemeria aurea* Graham. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 94: 982 ~ 990
- 3 Kuipers A GJ, Kamstra S A, De Jeu MJ, et al. Molecular characterisation and physical localisation of highly repetitive DNA sequences from Brazilian *Alstroemeria* species. 1999, Submitted.
- 4 Kamstra S A, Kuipers A GJ, De Jeu MJ, et al. Physical localisation of repetitive DNA sequences in *Alstroemeria*: karyotyping of two species with species-specific and ribosomal DNA. *Genome*, 1997, 40: 652 ~ 658
- 5 De Jeu MJ, Jacobsen E. Early postfertilization ovule culture in *Alstroemeria* L. and barriers to interspecific hybridization. *Euphytica*, 1995, 86: 15 ~ 23
- 6 周树军, 汪劲武. 10 种菊属植物的细胞学研究. *武汉植物学研究*, 1997, 15 (4): 289 ~ 292
- 7 Kuipers GJ, van Os D P M, de Jong J H, et al. Molecular cytogenetics of *Alstroemeria*: identification of parental genomes in interspecific hybrids and characterization of repetitive DNA families in constitutive heterochromatin. *Chromosome Res.*, 1997, 5: 31 ~ 39

Detection of *Alstroemeria aurea* Chromosomes in a Series of Its Hybrids

Zhou Shujun

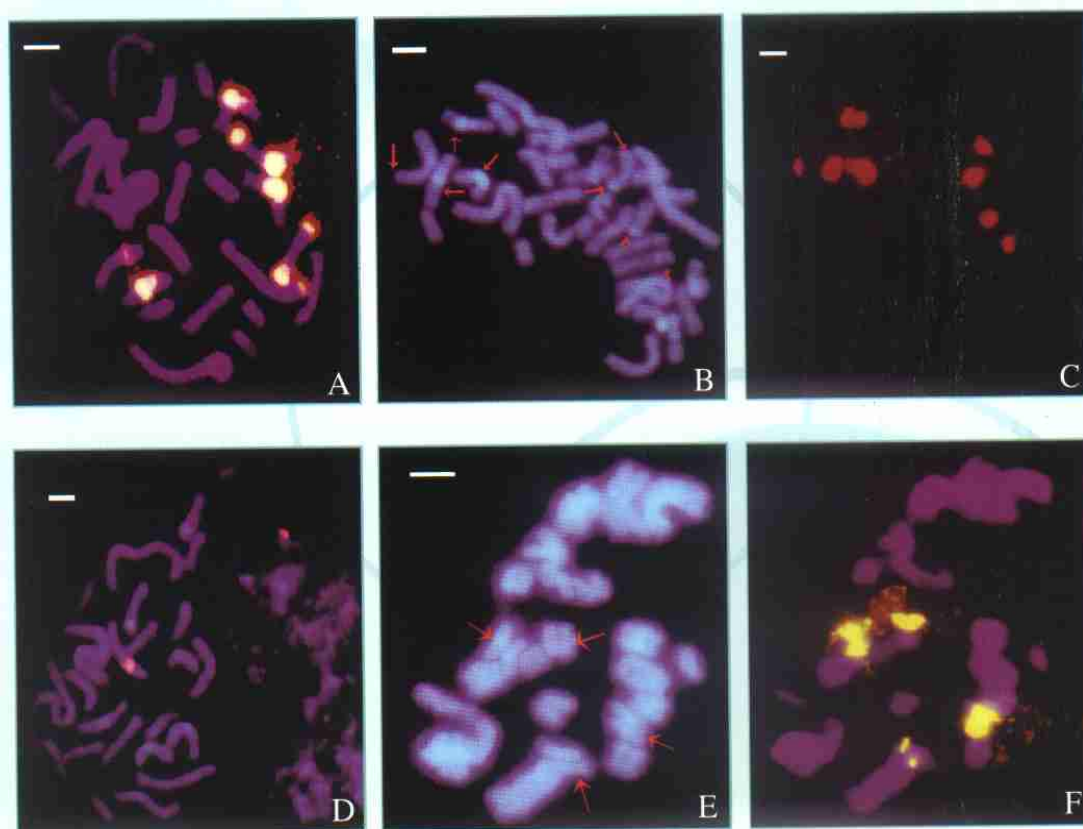
(College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: A001-I, a species-specific repetitive sequences isolated from *Alstroemeria aurea*, was used in fluorescence in situ hybridization to detect the fate of *A. aurea* chromosomes in a series of its hybrids in this study. We could clearly detect the change of the number of *A. aurea* chromosomes in its related hybrids except for Chromosome 1, the longest chromosome of *A. aurea*. This could be helpful to select materials in further *Alstroemeria* breeding.

Key words: *Alstroemeria aurea*; Species-specific sequence; Fluorescence in situ hybridization

周树军：荧光原位杂交检测野生六出花 (*Alstroemeria aurea*) 染色体命运

Zhou Shujun: Detection of *Alstroemeria aurea* Chromosomes in a Series of Its Hybrids



图版说明：有丝分裂中期染色体荧光原位杂交结果。A. 杂种 92JA010，示该杂种中 7 条染色体上有 A001-I 的 FISH 簇状信号；B, C. 93Z.390.4 × 92JA010，示该杂种中 7 条染色体上有 A001-I 的 FISH 簇状信号，B 中的红箭头与 C 中的簇状信号相对应；D. 93Z.390.4 × BCJA1，示该杂种中 1 条染色体上有 A001-I 的 FISH 簇状信号；E, F. BCJA1 × 93Z.390.4，示该杂种中 4 条染色体上有 A001-I 的 FISH 簇状信号，E 中的红箭头与 F 中的簇状信号相对应。标尺=20 μm。

Explanation of Plates: Fluorescence in situ hybridization of mitotic metaphase of chromosomes. A. FISH result of 92JA010, indicating that 7 chromosomes had clustered signals of A001-I; B, C. FISH result of 93Z.390.4 × 92JA010, they were the same metaphase, indicating that 7 chromosomes had clustered signals of A001-I. Red arrows in B were correspondent to red clustered signals in C; D. FISH result of 93Z.390.4 × BCJA1, indicating one chromosome had clustered signals of A001-I; E, F. FISH result of BCJA1 × 93Z.390.4, they were the same metaphase, indicating that 4 chromosomes had clustered signals of A001-I. Red arrows in E were correspondent to clustered signals in F. Bar=20 μm.