



基因组原位杂交技术及其在园艺植物基因组研究中的应用

王 燕^{1,2}, 陈 清¹, 陈 涛¹, 张 静¹, 汤浩茹^{1,2}, 王小蓉^{1,2}

(1 四川农业大学 园艺学院, 成都 611130; 2 四川农业大学 果蔬研究所, 成都 611130)

摘 要: 基因组原位杂交(GISH)技术可以鉴定植物多倍体物种起源、杂种亲本染色体来源和组成, 分析栽培种与其近缘野生种的亲缘关系, 研究减数分裂染色体行为等。基因组原位杂交包括多色基因组原位杂交、比较基因组原位杂交和自身基因组原位杂交等。基因组原位杂交技术的关键步骤是染色体制片、探针制备及长度优化、探针与封阻的浓度比例和杂交后洗脱强度。该文对近年来国内外有关基因组原位杂交技术的发展及其在园艺植物基因组研究中的应用现状进行了综述, 并指出随着多种园艺植物全基因组的测定, 未来应从基因组信息中寻找更多的染色体特异性标记, 结合荧光显带及荧光原位杂交技术, 为深入研究园艺植物的起源以及遗传关系鉴定等提供技术支持。

关键词: 基因组原位杂交; 园艺植物; 多倍体或杂种鉴定; 物种起源; 染色体行为

中图分类号: Q789 **文献标志码:** A

Research Progress of Genomic *in situ* Hybridization and the Application in Horticultural Plants

WANG Yan^{1,2}, CHEN Qing¹, CHEN Tao¹, ZHANG Jing¹,
TANG Haoru^{1,2}, WANG Xiaorong^{1,2*}

(1 College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2 Institute of Pomology and Olericulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: Genomic *in situ* hybridization (GISH) has been used to discriminate the different ancestral genome donors in polyploids or hybrids, analyze the phylogenetic relationships between cultivar and wild relatives, and study chromosome behavior of meiosis in plants. GISH technology includes multi-color genomic *in situ* hybridization (mc-GISH), comparative genomic *in situ* hybridization (cGISH), and self-genomic *in situ* hybridization (self-GISH). Its key procedures contain chromosome preparation, probe preparation and length optimization, the concentration ratio of probe to blocking DNA, and stringency of post-hybridization washes. This paper reviewed the research progress on the development of GISH and its utilization in horticultural plants, and summarized their promising application prospects. During the past several years, the complete genome sequences are available for horticultural plants such as grape, banana, pear, sweet orange, and cucumber. It is necessary for researchers to select more chromosomal specific markers from the whole genomic sequence. Combining with fluorescence banding and fluorescence *in situ* hybridization

收稿日期: 2017-06-30; 修改稿收到日期: 2017-10-09

基金项目: 国家自然科学基金(31272134, 31672114)

作者简介: 王 燕(1987—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事果树种质资源与遗传育种研究。E-mail: wangyanwxy@163.com

* 通信作者: 王小蓉, 教授, 博士生导师, 主要从事果树种质资源与遗传育种研究。E-mail: wangxr@sicau.edu.cn

(FISH) technologies, GISH will become a powerful tool to further illustrate the origin and identify genetic relationship of horticultural plants.

Key words: genomic *in situ* hybridization (GISH); horticultural plants; polyploid or hybrid identification; species origin; chromosome behavior

基因组原位杂交 (genomic *in situ* hybridization, GISH) 由荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 技术改进发展而来^[1], 主要原理是标记一个亲本/物种的基因组 DNA 作为探针, 另一个亲本/物种的未标记基因组 DNA 作为封阻, 然后与靶染色体进行原位杂交; 或者 2 个亲本基因组同时被分别标记, 不加封阻, 然后杂交, 从而区分来自不同基因组的染色体。GISH 技术已广泛用于多倍体基因组识别、杂种亲本鉴定、物种间亲缘关系、基因组结构与进化等研究, 并且日益显示出在分子细胞遗传学中的重要地位^[2-3]。本文综述了 GISH 技术的关键步骤、分类以及在园艺植物基因组研究中的应用进展, 以期为园艺植物的分子育种提供遗传学依据。

1 基因组原位杂交技术关键步骤

基因组原位杂交技术分为 5 个主要步骤: 探针的制备和标记、染色体标本的制备、杂交、显色及荧光检测、图像分析。其中, 染色体制片、探针标记、杂交和杂交后洗脱等步骤最为关键。

1.1 染色体制片

GISH 杂交前, 植物染色体制片需要排除细胞壁和细胞质的覆盖, 使染色体完全裸露, 提高探针与靶 DNA 的可及性。采用去壁低渗法进行染色体制片可有效解决这一问题, 但这一方法较为繁琐, 同时适合的酶解去壁时间难以把握^[4]。对于蔷薇科悬钩子属 (*Rubus*) 植物而言, 可采用根尖压片法^[5] 制备染色体, 杂交前使用 2% 纤维素酶和果胶酶混合液于 37 °C 处理 1.5 h, 可有效除去细胞壁^[6]。杂交过程中, 染色体需要牢固地覆盖在盖片或载片上, 以避免高温变性和反复洗涤过程中染色体丢失。Heslop-Harrison^[7] 指出, 染色体制片变性和杂交前, 用 4% (w/v) 多聚甲醛 (paraformaldehyde) 固定 10 min, 然后用乙醇脱水干燥, 能有效地防止染色体脱落, 并可改善杂交结果的质量。

1.2 探针制备及其长度优化

基因组原位杂交中, 提取的 DNA 越纯净, 则经标记形成的探针质量越好, 因此对基因组 DNA 纯度要求很高。经核酸蛋白仪检测, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为

1.8~1.9 的基因组 DNA 才符合标准。此外, GISH 对 DNA 探针长度也有一定的要求, 最佳长度为 300~500 bp^[8]。探针太短会使杂交稳定性下降, 太长 (>1 kb) 则不利于穿透染色体立体结构, 影响杂交效果^[9]。

1.3 探针与封阻 DNA 的浓度比例

GISH 试验中, 封阻 DNA 优先与一般序列杂交, 而标记 DNA 探针则与特异性序列杂交。因此, 探针与封阻 DNA 的浓度比例非常重要。探针与封阻的比例根据不同供试材料之间基因组亲缘关系远近而差异较大, 物种之间亲缘关系越近, 需要的封阻量越大; 亲缘关系越远, 需要的封阻量越小, 甚至可以不加封阻^[10]。如枳属 (*Poncirus*) 与柑橘属 (*Citrus*) 的亲缘关系较远, 探针与封阻 DNA 的浓度比例为 1:4 时即能有效分开双方染色体组^[11]。悬钩子属杂种鉴定中, 当探针与封阻比例为 1:50 时, 才能区分开其亲本茅莓 (*R. parvifolius*) 和插田泡 (*R. coreanus*) 的基因组^[6]。

1.4 杂交后洗脱强度及严谨度

杂交后洗脱强度和严谨度也是决定 GISH 信号特异性的关键步骤。合适的洗脱强度可以使正确配对的杂交分子保持稳定而使错配的杂交分子解体, 主要由洗脱温度、离子浓度及洗脱时间来决定。严谨度是指杂交体在所在的条件下, 杂交 DNA 双链之间的核苷酸能够正确配对的下限的百分数。严谨度的计算可以用公式表示: 严谨度 (%) = 100 (%) - $F_m(T_m - T_h)$ ^[12], T_m 表示正确配对的杂种分子的熔解温度; T_h 表示杂种分子所处的环境温度; F_m 表示错配因子, 与探针长度相关 (探针 >150 bp, $F_m = 1$; 探针 <50 bp, $F_m = 5$)。研究表明, 杂交严谨度可通过调节盐和甲酰胺浓度以及杂交后洗脱温度来改变, 当使用含 20% 甲酰胺的 2×SSC 在 42 °C 下洗涤 10 min, GISH 杂交严谨度可达到 80% 以上^[10]。

2 GISH 技术的分类

2.1 多色基因组原位杂交

使用生物素 (biotin) 和地高辛 (digoxigenin) 这两种不同的半抗原标记不同来源的基因组总 DNA, 对异源多倍体和近缘物种的种间杂种或它的衍生系

进行多色基因组原位杂交(multi-color genomic *in situ* hybridization, mc-GISH),以应用于多倍体物种基因组的同时鉴定^[2]。mc-GISH 在确定源自属间杂交的易位染色体基因组来源方面比一般 GISH 的分辨能力要高得多。该技术已成功应用于香蕉(*Musa*)^[13-15]、柿(*Diospyros*)^[16]和土豆(*Solanum*)^[17]等园艺植物的基因组来源和组成研究。

2.2 比较基因组原位杂交

以一个物种的总基因组 DNA 为探针,与其它植物染色体进行杂交,能够检测该物种与其它植物之间重复序列的同源性,揭示在进化上保守的重复序列在不同植物染色体上的分布特征,探讨不同物种间的亲缘关系,即为比较基因组原位杂交(comparative genomic *in situ* hybridization, cGISH)。cGISH 技术已广泛应用于多种园艺植物及其近缘种的亲缘关系研究中,为物种起源及进化提供了分子证据^[18-25]。

2.3 自身基因组原位杂交

以物种总基因组 DNA 为标记探针,与自身染色体进行杂交,即为自身基因组原位杂交(self-genomic *in situ* hybridization, self-GISH)。self-GISH 信号实际上反映了基因组重复 DNA 序列对染色体的杂交,能够有效地揭示串联重复序列和基因在染色体水平上的分布模式和组织情况。研究表明,self-GISH 信号图型在不同物种间有明显的差异,并与基因组大小密切相关^[6, 26-27]。因此,根据物种的 self-GISH 荧光带型差异可以构建种或变种的快速核型^[28-30]。

3 GISH 在园艺植物基因组研究中的应用

目前,GISH 技术在芭蕉科(Musaceae)、蔷薇科(Rosaceae)、芸香科(Rutaceae)、十字花科(Cruciferae)、茄科(Solanaceae)和百合科(Liliaceae)等园艺植物中有研究应用,主要用于多倍体物种起源、杂种的亲本染色体来源、栽培种与野生祖先种的亲缘关系、减数分裂时染色体行为等研究中。

3.1 多倍体物种起源

传统研究中,通过观察减数分裂过程中染色体的配对行为来区分同源与异源多倍体。这种方法只能大致判断多倍体的类型,并不能准确识别基因组组成与来源,而通过 GISH 则可以准确追溯多倍体的起源问题(表 1)。如向素琼等^[31]对沙田柚(*Citrus grandis* cv. ‘Shatianyou’)天然四倍体和人工

四倍体进行 GISH 分析,表明天然四倍体既有异源也有同源四倍体,经秋水仙素诱导所得的四倍体均为同源四倍体;而异源四倍体是通过有性杂交获得,从而证明了柚雌性未减数配子的自然存在。以甘薯近缘野生种 *Ipomoea trifida* (2*x*)基因组为探针,与 *I. trifida* (4*x*)2 个株系的体细胞染色体进行 GISH 研究,结果表明,株系 695104 几乎所有染色体整条都有均匀明亮的信号,可能由二倍体 *I. trifida* 基因组直接加倍而来;株系 697288 虽然各条染色体也均有杂交信号,但信号的区域与亮度存在差异,可能是由于染色体加倍的同时或之后发生了基因组重组和部分变异^[32]。在对云南山茶(*Camellia reticulata*)多倍体复合体基因组起源的研究中,Liu 等^[33]以近缘种西南山茶(*C. pitardii*)和怒江红山茶(*C. saluenensis*)作为标记探针,以二倍体云南山茶的基因组作为封阻,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由二倍体云南山茶和西南山茶杂交产生,而异源六倍体则由异源四倍体与怒江红山茶杂交而来。

对于起源涉及到 2 个及以上物种的异源多倍体而言,双色或多色 GISH 的应用大大提高了其基因组组成检测效率。Lim 等^[34]以 *Iris setosa* (2*n*=38)和 *I. virginica* (2*n*=70)同时为探针,与变色鸢尾(*I. versicolor*, 2*n*=108)染色体杂交,结果分别表明有 38 条和 70 条染色体被标记,据此证明变色鸢尾为异源多倍体。分别以 *Solanum verrucosum* (AA)、*S. jamesii* (BB)和 *S. andreanum* (PP)为探针,与墨西哥野生土豆(*S. hougasii*, 2*n*=6*x*=72)和 *S. demissum* (2*n*=6*x*=72)染色体杂交,结果表明 *S. hougasii* 为异源六倍体,A、B 和 P 基因组同时参与了其形成;而 *S. demissum* 则为 A 基因组加倍形成的同源六倍体^[17]。

3.2 杂种亲本鉴定及外源染色体检测

园艺植物野生种中存在着许多对栽培种有利的基因,育种学家们为了能够利用这部分基因,通常采用杂交或体细胞融合等方法创造杂种并不断回交,以期能将野生种的遗传物质转入栽培种中。基因组原位杂交技术是一种探索植物亲本染色体在杂交后代中的传递及重组方式的有效工具^[2]。因此,对园艺植物杂种进行 GISH 分析,能有效区分亲本染色体来源,为育种工作提供分子细胞遗传学证据。

GISH 在园艺植物杂种亲本染色体来源和组成鉴定中的应用见表 1。Landi 等^[35]利用 FISH 和 GISH

表 1 GISH 在园艺植物多倍体和杂种染色体组成鉴定中的应用

物种 Plant species	染色体数目 Chromosome number	染色体组成 Chromosome composition	GISH 结果 GISH result	参考文献 Reference
蔷薇科 Rosaceae				
枇杷 Natural triploid	$2n=3x=51$	—	天然三倍体包括同源和异源三倍体 Natural triploids contained both autotriploids and allotriploids.	[37]
枇杷(四倍体×二倍体) <i>Eriobotrya japonica</i> (tetraploid × diploid)	$2n=3x=51$	—	34 条染色体来自四倍体, 17 条来自二倍体 34 chromosomes were from tetraploid and 17 from diploid.	[38]
黄毛草莓×凤梨草莓 <i>Fragaria nilgerrensis</i> × <i>F. ananassa</i>	$2n=5x=35$	F ^a F ^a F ^a F ^a F ^a	7F ^a +28F ^a	[39]
<i>F.</i> × <i>ananassa</i> (<i>F. vesca</i> × <i>F. iinumae</i>)	$2n=8x=56$	F ^a F ^a F ^b F ^b F ^b F ^b F ^b F ^b	14F ^a +42F ^b	[40]
欧洲酸樱桃 <i>Prunus cerasus</i> Schattenmorelle	$2n=4x=32$	—	16 条染色体来自欧洲甜樱桃, 16 条来自草原樱桃 16 chromosomes were from <i>P. avium</i> and 16 from <i>P. fruticosa</i> .	[41]
悬钩子属 <i>Rubus</i> L.				
—	$2n=4x=28$	R'R'BB	14R'+14B	[36]
—	$2n=5x=35$	R'R'R'BB	22R'+13B	
‘Aurora’	$2n=8x=58$	R'BBBBBB	9R'+49B	
疑似杂种 Putative hybrid	$2n=3x=21$	—	14 条染色体来自草莓, 7 条来自田泡 14 chromosomes were from <i>R. parvifolius</i> and 7 from <i>R. coreanus</i> .	[6]
芸香科 Rutaceae				
枳橙 <i>Poncirus trifoliata</i> × <i>Citrus aurantium</i>	$2n=4x=36$	P ^a P ^a C ^a C ^a	18P ^a +18C ^a	[42]
枳橙 <i>P. trifoliata</i> × <i>C. sinensis</i>	$2n=2x=18$	P ^a C ^a	9P ^a +9C ^a	[11]
枳柚 <i>P. trifoliata</i> × <i>C. paradisis</i>	$2n=2x=18$	P ^a C ^b	9P ^a +9C ^b	
沙田柚 <i>C. grandis</i> cv. Shatianyou	$2n=4x=36$	—	天然四倍体多为异源四倍体, 人工四倍体均为同源四倍体 Natural tetraploids were mainly allotetraploid, while artificial tetraploids were all autotetraploid.	[31]
沙田柚×宜昌橙 <i>C. grandis</i> cv. Shatianyou × <i>C. ichangensis</i>	$2n=2x=18$	C ^a C ⁱ	9C ^a +9C ⁱ	[43]
	$2n=4x=36$	C ^a C ^a C ⁱ C ⁱ	18C ^a +18C ⁱ	
<i>Citropsis schweinfurthii</i> ×Nanpu tangor (<i>Citrus</i> spp.)	$2n=2x=18$	C ^a C ⁿ	9C ^a +9C ⁿ	[44]
<i>C. sinensis</i> cv. Hongjiangcheng	$2n=4x=36$	—	天然同源四倍体 Natural autotetraploid	[45]
芭蕉属 <i>Musa</i> L.				
Calcutta 4, TMP2x 2829-62	$2n=2x=22$	AA	22A	[13-15, 46-47]
Butohan 2	$2n=2x=22$	BB	22B	
Kunnan, Safet Vecchi	$2n=2x=22$	AB	11A+11B	
Wompa	$2n=2x=22$	AS	11A+11S	
Bluggoe, Fougamou, Praha	$2n=3x=33$	ABB	11A+22B	
Pelipita	$2n=3x=33$	ABB	8A+25B	
Kunnan 4x ×Cameroun	$2n=3x=33$	ABB	11/10A+22/23B	
Agbagba, Figue Pomme, Laknao, Malaccensis × Kunnan 4x, Mbi, Obino l'Ewai, P. raja bulu	$2n=3x=33$	AAB	22A+11B	
Luba	$2n=3x=33$	AAB	22/23A+11/10B	
M. bouroukou, Nyombe	$2n=3x=33$	AAB	21/22A+12/11B	
Kunnan 4x × IDN110	$2n=3x=33$	AAB	23/22/21/20A+10/11/12/13B	
Karoina	$2n=3x=33$	AAT/ATT	22A+10T	
Kunnan 4x	$2n=4x=44$	AABB	22A+22B	
TMPx 4698-1	$2n=4x=44$	AAAB	33A+11B	
Yawa 2	$2n=4x=44$	ABBT	11A+22B+10T	
西番莲属 <i>Passiflora</i>				
HD15-101 (<i>P. gardineri</i> × <i>P. gibertii</i>)	$2n=2x=18$	—	9 条染色体来自 <i>P. gardineri</i> , 9 条来自 <i>P. gibertii</i> 9 chromosomes were from <i>P. gardineri</i> and 9 from <i>P. gibertii</i> .	[48]
HD13-133 (<i>P. subanceolata</i> × <i>P. foetida</i>)	$2n=2x=22$	P ^a P ^f	10P ^a +12P ^f	
HD18-106 (<i>P. subanceolata</i> × HD13-133)	$2n=2x=22$	P ^a H	8P ^a +14H	
HD18-113 (<i>P. subanceolata</i> × HD13-133)	$2n=2x=22$	P ^a H	9P ^a +13H	
<i>P. subanceolata</i> × <i>P. foetida</i>	$2n=2x=20-22$	P ^a P ^f	9-16P ^a +6-11P ^f	[49]

续表 1 Continued Table 1				
物种 Plant species	染色体数目 Chromosome number	染色体组成 Chromosome composition	GISH 结果 GISH results	参考文献 References
	$2n=3x=30$	P^aP^f	$21P^a+9P^f$	
柿属 <i>Diospyros</i>				
柿×莲柿 <i>D. kaki</i> × <i>D. glandulosa</i>	$2n=8x=120$	$D^kD^kD^kD^kD^kD^kD^e$	$90D^k+30D^e$	[16]
枣属 <i>Ziziphus</i>				
赞皇大枣 <i>Z. jujuba</i> ‘Zanhuangdazao’	$2n=3x=36$	—	同源三倍体 Autotriploid	[50]
十字花科 <i>Cruciferae</i>				
<i>Brassica napus</i> (AACC) × <i>Raphanus raphanistrum</i> (RR)	$2n=2x=28$	—	19AC+9R	[51]
<i>B. napus</i> (AACC) × <i>B. oleracea</i> (CC)	$2n=3x=27$	ACC	9A+18C	[52]
<i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (AA) × <i>B. oleracea</i> var. <i>capitata</i> (CC)	$2n=17-20, 26$	AC	7A+10C, 9A+9C, 10A+9C, 12A+8C, 14A+12C	[53]
茄科 <i>Solanaceae</i>				
土豆 <i>Solanum hougasii</i>	$2n=6x=72$	AABBPP	异源六倍体 Allohexaploid; 24A+24B+24P	[17]
<i>S. demissum</i>	$2n=6x=72$	AAAAAA	同源六倍体 Autohexaploid; 72A	
番茄×土豆 <i>L. esculentum</i> × <i>S. lycopersicoides</i>	$2n=3x+2=38$	$L^*L^*S^*+2$	24 条染色体来自 <i>L. esculentum</i> , 12 条来自 <i>S. sitiens</i> , 2 条来自 <i>S. lycopersicoides</i> 24 chromosomes were from <i>L. esculentum</i> and 12 from <i>S. sitiens</i> and 2 from <i>S. lycopersicoides</i> .	[54]
番茄×土豆 <i>L. esculentum</i> × <i>S. sitiens</i>	$2n=2x+1=25$	L^*S^*+1	12 条染色体来自 <i>L. esculentum</i> , 12 条来自 <i>S. sitiens</i> , 1 条来自 <i>S. lycopersicoides</i> 12 chromosomes were from <i>L. esculentum</i> and 12 from <i>S. sitiens</i> and 1 from <i>S. lycopersicoides</i> .	
葱属 <i>Allium</i>				
<i>A. cepa</i> × <i>A. roylei</i>	$2n=40$	—	20 条染色体来自 <i>A. cepa</i> , 20 条来自 <i>A. roylei</i> 20 chromosomes were from <i>A. cepa</i> and 20 from <i>A. roylei</i> .	[55]
<i>A. fisutulosum</i> × <i>A. tuberosum</i>	$2n=3x=24$	—	8 条染色体来自 <i>A. fisutulosum</i> , 16 条来自 <i>A. tuberosum</i> . 8 chromosomes were from <i>A. fisutulosum</i> and 16 from <i>A. tuberosum</i> .	[56]
<i>A. wakegi</i>	$2n=2x=16$	—	8 条染色体来自 <i>A. fisutulosum</i> , 8 条来自 <i>A. cepa</i> . 8 chromosomes were from <i>A. fisutulosum</i> and 8 from <i>A. cepa</i> .	
菊科 <i>Compositae</i>				
大岛野路菊 × 芙蓉菊 <i>Dendranthema crassum</i> × <i>Crossostephium chinense</i>	$2n=6x=54$	$D^fD^fD^fD^fD^fC^e$	$45D^f+9C^e$	[57]
南京野菊 × 芙蓉菊 <i>D. indicum</i> × <i>C. chinense</i>	$2n=3x=27$	$D^fD^fC^e$	$18D^f+9C^e$	[58]
Line T3	$2n=6x=54$	—	属间杂种, 9 条染色体来自芙蓉菊, 9 条来自北艾, 36 条来自 <i>C. grandiflorum</i> 和 <i>C. crassum</i> . A true tri-genic hybrid containing 9 chromosomes from <i>C. chinense</i> , 9 from <i>Artemisia vulgaris</i> , and 36 from <i>C. grandiflorum</i> and <i>C. crassum</i> .	[59]
秋海棠属 <i>Begonia</i>				
<i>B. socotrana</i>	$2n=2x=28$	SS	28S	[60]
Tuberous begonia	$2n=4x=56$	TTTT	56T	
Elatior-begonias hybrids	$2n=2x=28$	TT × SS	14T+14S	
	$2n=3x=42$	TTTT × SS	28T+14S	
	$2n=3x=41$	TTTT × SS	27T+14S	
	$2n=4x=56$	TTS × SSS	28T+28S	
百合属 <i>Lilium</i>				
Marco Polo × <i>L. henryi</i> , Expression × <i>L. henryi</i>	$2n=2x=24$	—	12 条染色体来自 Marco Polo (Expression), 12 条来自湖北百合 12 chromosomes were from Marco Polo (Epression) and 12 from <i>L. henryi</i> .	[61]
<i>L. longiflorum</i> × Asiatic hybrid (LA hybrid)	$2n=2x=24$	LA	12L+12A	[62]
郁金香属 <i>Tulipa</i>				
F ₁ (<i>T. gesneriana</i> × <i>T. fosteriana</i>)	$2n=2x=24$	T ^a T ^a × T ^f T ^f	12T ^a +12T ^f	[63]
BC ₁ (<i>T. gesneriana</i> × F ₁)	$2n=2x=24$	—	18—20T ^a +6—4T ^f	
	$2n=4x=48$	—	42T ^a +6T ^f	
BC ₂ (<i>T. gesneriana</i> × BC ₁)	$2n=2x=24$	—	21—24T ^a +3—0T ^f	
	$2n=2x+1=25$	—	25T ^a	

续表 1 Continued Table 1

物种 Plant species	染色体数目 Chromosome number	染色体组成 Chromosome composition	GISH 结果 GISH results	参考文献 References
芦荟属 <i>Aloe</i>				
<i>A. arborescens</i> × <i>A. vera</i>	$2n=2x=14$	—	双二倍体, 7 条染色体来自大芦荟, 7 条来自芦荟 Allo-diploid; 7 chromosomes were derived from <i>A. arborescens</i> and the remaining 7 originated from <i>A. vera</i> .	[64]
<i>Ascoendena</i> × <i>Phalaenopsis</i>	$2n=3x+5-10=62-67$	—	28A+34 P, 31A+36P	[65]
水仙属 <i>Narcissus</i>				
两色花水仙 <i>N. tazetta</i> var. <i>chinensis</i> ‘two-color flower’	$2n=3x=32$	—	白水仙和黄花仙的天然三倍体杂种 Natural triploid hybrid between white flower narcissus ($2n$) and yellow flower narcissus (n).	[66]
鸢尾属 <i>Iris</i> L.				
变色鸢尾 <i>I. versicolor</i>	$2n=108$	—	异源多倍体, 38 条染色体来自山鸢尾, 70 条染色体来自 <i>I. virginica</i> Allopolyploid; 38 chromosomes were from <i>I. setosa</i> and 70 from <i>I. virginica</i> .	[34]

注: 杂交组合为“母本×父本”
Note: The hybridization crosses are all “maternal parent × paternal parent”

对 1 个二倍体树莓品种和 1 个四倍体黑莓品种的愈伤组织进行研究, 在 GISH 下显示有异核体产生; FISH 核糖体探针显示多样和多个位点。此结果显示有大量染色体组重排发生, 推测这与发生基因组重组以及经长期培养的愈伤组织不稳定性有关。Lim 等^[36]对树莓栽培类群($2x$)、黑莓栽培类群($2x \sim 12x$)以及它们之间的异源多倍体进行 GISH 分析, 结果显示在异源五倍体中有 3 个染色体组来自树莓(raspberry), 2 个来自黑莓(blackberry); 而在一些黑莓异源多倍体如八倍体黑莓栽培品种‘Aurora’的染色体组中发现既有完整的树莓染色体, 也有异位了的树莓染色体, 并认为这是由于各种形式的二轮杂交和种质渗入引起的。香蕉(*Musa* L.)栽培种分别由 A、B、S 和 T 等 4 个染色体组构成, 对应的物种分别为 *M. acuminata*、*M. balbisiana*、*M. schizocarpa* 和 *Australimusa* 属的物种。多位学者利用 GISH 准确鉴定了多个香蕉栽培种的基因组来源和组成^[13-15, 46-47], 并校正了种间杂种‘Pelipita’($2n=3x=33$, ABB)的染色体组成为 8A+25B 而不是预期的 11A+22B。Karlova 等^[67]利用 GISH 技术将百合的 3 种基因型 O(东方百合)、A(亚洲百合)、L(麝香百合)区分开来。Nathewet 等^[68]基于 GISH 推测饭沼草莓(*F. iimurae*)和森林草莓(*F. vesca*)可能都参与了栽培草莓(*F. × ananassa* ‘Hokowase’, $2n=8x=56$)的形成。

GISH 也在园艺植物远缘杂种的培育鉴定中发挥了重要作用, 既鉴定了杂种的真实性, 又能够探讨属间的亲缘关系。以十字花科为例, Singh 等^[51]将油菜(*Brassica napus*, $2n=38$, AACC)与野萝卜(*Raphanus raphanistrum*, $2n=18$, RR)杂交, GISH 检测表明其减数分裂染色体行为达到稳定,

可以用作向油菜转移萝卜基因的桥梁物种。GISH 也被广泛应用于海甘蓝、大白菜、诸葛菜等的属间杂交和异附加系检测^[52, 69]。Tang 等^[57]通过 GISH 不仅对大岛野路菊(*Dendranthema crassum*, $2n=10x=90$)和芙蓉菊(*Crossostephium chinense*, $2n=2x=18$)的杂交后代($2n=6x=54$)真实性进行了鉴定, 同时也探讨了父母本的亲缘关系。因此, GISH 技术已经成为园艺植物种质创新和新品种培育鉴定的重要工具。

3.3 物种间亲缘关系

物种间亲缘关系的研究是杂交育种的理论基础。园艺植物栽培种通常由多个野生祖先种杂交经不断筛选获得, 其遗传背景非常复杂, 采用 GISH 方法, 可准确评价各基因组的亲缘关系, 快速可靠地研究各基因组的起源与进化, 从而为园艺植物的种质资源改良提供理论依据。Choi 等^[19]以二倍体种莲柿(*D. glandulosai*)基因组 DNA 为探针, 在栽培柿(*D. kaki*, $2n=6x=90$)染色体的端粒和着丝粒处都显示了较强的信号, 据此认为该二倍体种与栽培柿有较近的亲缘关系, 并推测其可能是栽培柿的祖先。GISH 表明栽培杧果(*M. indica*)与林生杧果(*M. sylvatica*)具有较近的亲缘关系^[20]。Preeda-suttijit 等^[70]利用 GISH 分析表明无核蜜桔(*C. unshiu*)与枳(*P. trifoliata*)有较近的亲缘关系; Kitajima 等^[71]证明无核蜜桔与柑橘(*C. reticulata*)关系也较近, 同时柚(*C. maxima*)可能参与了其起源。刘京京等^[50]研究表明枣(*Z. jujuba*)和酸枣(*Z. jujuba* subsp. *spinosa*)基因组之间具有高度同源性, 为证实枣起源于酸枣、两者同属一个种提供了分子细胞遗传学依据。Lee 等^[72]通过对兜兰属(*Paphiopedilum*)种间杂交后代减数分裂染色体配

对行为的 GISH 分析,评价了不同种的亲缘关系。以上研究表明,GISH 技术能够为园艺植物的起源进化和分类研究提供重要的依据。

3.4 染色体行为研究

染色体行为与 DNA 复制、基因表达、基因组的进化、甚至物种的形成都密切相关。对一些杂种细胞的 GISH 研究表明,在细胞周期的各个阶段,来自双亲的基因组在杂种后代中是在基因组水平进行空间组织的,各自占据一定的空间区域,而不是随机组合的^[1],且杂种细胞核中双亲间的染色质并不相混合或仅有极有限的混合^[73]。如在香蕉栽培种‘Figue pomme’(AAB)和‘Praha’(ABB)中,B 基因组主要存在于染色体着丝粒处,而 A 基因组在染色体上的位置则呈现出动态变化,这可能是亲本染色体发生了交换重组导致基因组的不平均分配^[47],也可能与 B 基因组小于 A 基因组有关^[74]。而甘蔗(*Saccharum* spp.)与蔗茅(*Erianthus fulvus*)的杂交后代中,由于母本遗传物质对父本遗传物质的排斥作用引起的染色体消减及片段化导致父本染色体在子代中有断裂现象,且在间期核中,亲本染色质以分散的方式单独分布^[75]。Deng 等^[76]应用 GISH 技术检测栽培菊花(*D. morifolium*)与黄金艾蒿(*A. vulgaris*)的属间杂种发现,来源于不同亲本的染色体在杂种细胞内具有相对独立分布的特点,表明菊属和蒿属的亲缘关系较远。

通过基因组原位杂交,不仅能观察到配对同源染色体的来源,而且能鉴定染色体的重组和易位现象^[2]。在百合属(*Lilium*)人工合成的 F₁ 代多倍体中存在 A 与 O 基因组重组的现象,GISH 表明这种重组对回交一代遗传多样性产生了影响^[77]。Natenapit 等^[78]对百合 LLO 杂种和二倍体亚洲百合进行杂交,结果表明异源三倍体在减数分裂过程中发

生了重组。减数分裂异常现象在合成白菜异源三倍体(ACC)中十分明显,如中期 I 染色体排列紊乱,后期 I 到末期 II 过程中出现染色体桥和落后染色体,这些现象可能与减数分裂相关基因骤然下调有关^[52]。Jeridi 等^[46]则通过研究秋水仙碱诱导的四倍体栽培香蕉(AABB)发现,小果野蕉(*M. acuminata*, AA)和野蕉(*M. balaisiana*, BB)之间基因交换为节段异源遗传模式。

4 展 望

相较于蔬菜和花卉等园艺植物,果树大多为多年生木本植物,木质化程度高,细胞质浓,染色体形态很小且数目多^[79],通过传统的核型或带型分析鉴别远缘杂种中携带的外源染色体或其片段很难。因此,利用总基因组 DNA 为探针,与多倍体或杂种的染色体进行基因组原位杂交,能快速鉴定多倍体染色体组同源性、分析杂种亲本染色体来源。同时,果树较为容易积累各种突变,且无性繁殖在果树中较为常见,因此其染色体层面的变异较易保存。对这些变异进行 GISH 研究,能够直观地反映不同种、品种之间的亲缘关系,结果明确可靠。

值得注意的是,GISH 也有其限制,如常常不能区分各染色体。有研究将荧光显带(CMA⁺/DA-PI⁻)和特异性重复序列探针(如 rDNA、端粒以及物种特异序列等)及其他分子生物学技术相结合起来,使用多种标记识别染色体。如 CMA⁺/DAPI⁻ 荧光带型已将芸香科植物染色体划分为 A~G 等 8 种类型,再与 rDNA 等重复序列定位相结合,可识别全部染色体^[80]。随着多种园艺植物全基因组的测定,未来应从基因组信息中寻找更多的染色体特异性标记,结合荧光原位杂交分析,GISH 也将在园艺植物基因组研究中得到更为广泛和深入的应用。

参考文献:

[1] SCHWARZACHER T, LEITCH A R, BENNETT M D, *et al.* In situ localization of parental genomes in a wide hybrid [J]. *Annals of Botany*, 1989, **64**(3): 315-324.

[2] 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.

[3] RAINA S N, RANI V. GISH technology in plant genome research[M]//K S A, A S (eds.) *Chromosome Painting*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001: 83-104.

[4] 陈瑞阳,宋文芹,李秀兰. 植物有丝分裂染色体标本制作的新方法[J]. *植物学报*, 1979, **21**(3): 297-298.

CHEN R Y, SONG W Q, LI X L. A new method of preparing chromosome from plant[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1979, **21**(3): 297-298.

[5] 王小蓉,汤浩茹,李 玲,等. 根尖压片法制备树莓染色体标本的研究[J]. *四川农业大学学报*, 2007, **25**(3): 277-281.

WANG X R, TANG H R, LI L, *et al.* Studies on root-tip squashing method for chromosome preparation of *Rubus* L. [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2007, **25**(3): 277-281.

[6] WANG Y, WANG X R, CHEN Q, *et al.* Phylogenetic insight into subgenera *Idaeobatus* and *Malachobatus* (*Rubus*,

Rosaceae) inferring from ISH analysis[J]. *Molecular Cytogenetics*, 2015, **8**(1): 11.

[7] HESLOP-HARRISON J S, SCHWARZACHER T, LEITCH A R. *In situ* hybridization[M]. Karyobiology Group, John Innes Institute, Norwich, UK. 1991.

[8] 李 璇, 忽伟军, 李常宝. 基因组原位杂交中探针长度的优化[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2002, **11**(1): 63-66.

LI X, HU W J, LI C B. Optimization of probe length in genomic *in situ* hybridization[J]. *Journal of the CUN* (Natural Sciences Edition), 2002, **11**(1): 63-66.

[9] 于 卓, 云锦凤. 基因组原位杂交技术及其在植物远缘杂种染色体分析中的应用[J]. 内蒙古林学院学报, 1998, **20**(2): 32-37.

YU Z, YUN J F. Genomic *in situ* hybridization (GISH) technique and its application to chromosome analysis of plant wide hybrid[J]. *Journal of Inner Mongolia Forestry College*, 1998, **20**(2): 32-37.

[10] 张延明, 徐香玲, 李集临. 麦类作物基因组原位杂交技术要点分析[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2004, **20**(5): 74-76.

ZHANG Y M, XU X L, LI J L. The analysis of technical point in wheat genomic *in situ* hybridization[J]. *Natural Sciences Journal of Harbin Normal University*, 2004, **20**(5): 74-76.

[11] 陈春丽, 郭文武, 邓秀新. 柑橘基因组原位杂交(GISH)技术体系的建立[J]. 武汉植物学研究, 2003, **21**(5): 439-443.

CHEN C L, GUO W W, DENG X X. Establishment of GISH technique in *Citrus*[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*, 2003, **21**(5): 439-443.

[12] ZHANG P, KYNAST R, FRIEBE B. Protocol for GISH genomic *in situ* hybridization. Wheat Genetics Resource Center, Plant Pathology Department, Kansas State University, Manhattan KS. www.ksu.edu/wgrc.

[13] OSUJI J O, HARRISON G, CROUCH J, *et al.* Identification of the genomic constitution of *Musa* L. Lines (bananas, plantains and hybrids) using molecular cytogenetics[J]. *Annals of Botany*, 1997, **80**(6): 787-793.

[14] 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]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, **100**(2): 177-183.

[15] D'HONT A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2005, **109**(1-3): 27-33.

[16] CHOI Y A, TAO R, YONEMORI K, *et al.* Multi-color genomic *in situ* hybridization identifies parental chromosomes in somatic hybrids of *Diospyros kaki* and *D. glandulosa*[J]. *HortScience*, 2002, **37**(1): 184-186.

[17] PENDINEN G, SPOONER D M, JIANG J, *et al.* Genomic *in situ* hybridization reveals both auto-and allopolyploid origins of different North and Central American hexaploid potato (*Solanum* sect. *Petota*) species[J]. *Genome*, 2012, **55**(6): 407-415.

[18] 王 燕, 王小蓉, 陈 清, 等. 椭圆悬钩子, 红毛悬钩子和栽秧泡的原位杂交及系统分类研究[J]. 园艺学报, 2014, **41**(5): 841-850.

WANG Y, WANG X R, CHEN Q, *et al.* *In situ* hybridization analysis and taxonomic treatments of *Rubus ellipticus*, *R. pinfaensis* and *R. ellipticus* var. *obcordatus*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, **41**(5): 841-850.

[19] CHOI Y A, TAO R, YONEMORI K, *et al.* Genomic *in situ* hybridization between persimmon (*Diospyros kaki*) and several wild species of *Diospyros*[J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2003, **72**(5): 385-388.

[20] NISHIYAMA K, CHOI Y A, HONSHO C, *et al.* Application of genomic *in situ* hybridization for phylogenetic study between *Mangifera indica* L. and eight wild species of *Mangifera*[J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, **110**(1): 114-117.

[21] TEL-ZUR N, ABBO S, BAR-ZVI D, *et al.* Genetic relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus vine* cacti (Cactaceae): evidence from hybridization and cytological studies[J]. *Annals of Botany*, 2004, **94**(4): 527-534.

[22] HAIDER ALI S, RAMANNA M, JACOBSEN E, *et al.* Genome differentiation between *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* as revealed by genomic *in situ* hybridization[J]. *Euphytica*, 2002, **127**(2): 227-234.

[23] 常珂玮, 沈君君, 李宗芸, 等. 西瓜与近缘种亲缘关系的比较基因组原位杂交分析[J]. 植物科学学报, 2012, **30**(4): 402-406.

CHANG K W, SHEN J J, LI Z Y, *et al.* Genomic homology between *Citrullus lanatus* and its close relatives revealed by comparative genomic *in situ* hybridization[J]. *Plant Science Journal*, 2012, **30**(4): 402-406.

[24] SHE C W, JIANG X H, OU L J, *et al.* Molecular cytogenetic characterisation and phylogenetic analysis of the seven cultivated *Vigna* species (Fabaceae) [J]. *Plant Biology*, 2015, **17**(1): 268-280.

[25] CUYACOT A R, WON S Y, PARK S K, *et al.* The chromosomal distribution of repetitive DNA sequences in *Chrysanthemum boreale* revealed a characterization in its genome [J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, **198**: 438-444.

[26] SHE C W, LIU J Y, DIAO Y, *et al.* The distribution of repetitive DNAs along chromosomes in plants revealed by self-genomic *in situ* hybridization[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, **34**(5): 437-448.

[27] 汤佳立, 戚大石, 张 俞, 等. 荧光原位杂交技术分析栽培种甘薯(*Ipomoea batatas* cv. Xushu No. 18)染色体[J]. 遗传, 2010, **32**(2): 177-182.

TANG J L, QI D S, ZHANG Y, *et al.* FISH analysis of chromosomes of sweet potato (*Ipomoea batatas* cv. Xushu No. 18)[J]. *Hereditas*, 2010, **32**(2): 177-182.

[28] 鄢丽娟, 申书兴, 轩淑欣, 等. 大白菜和结球甘蓝基因组原位杂交及核型分析[J]. 园艺学报, 2007, **34**(6): 1 459-1 464.

QIE L J, SHEN S X, XUAN S X, *et al.* Karyotype analysis of Chinese cabbage and cabbage by genomic *in situ* hybridization[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2007, **34**(6): 1 459-1 464.

[29] 张云霞, 娄群峰, 李子昂, 等. 基于基因组原位杂交快速构建黄瓜变种间核型[J]. 中国农业科学, 2015, **48**(2): 398-406.

ZHANG Y X, LOU Q F, LI Z A, *et al.* 2015. Rapid karyotype analysis of cucumber varieties based on genomic *in situ* hybridization[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, **48**(2): 398-406.

[30] ZHANG Y X, CHENG C Y, LI J, *et al.* Chromosomal structures and repetitive sequences divergence in *Cucumis* species revealed by comparative cytogenetic mapping [J]. *BMC Genomics*, 2015, **16**: 730.

[31] 向素琼, 梁国鲁, 李晓林, 等. 沙田柚多倍体的获得与基因组原位杂交(GISH)分析[J]. 中国农业科学, 2008b, **41**(6):

- 1 749-1 754.
- XIANG S Q, LIANG G L, LI X L, *et al.* Obtaining polyploids and genome analysis of tetraploids by GISH in *Citrus grandis* cv. Shatianyou [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008b, **41**(6): 1 749-1 754.
- [32] 向素琼, 汪卫星, 李晓林. 甘薯近缘野生种 *Ipomoea trifida* (4x) GISH 分析[J]. 作物学报, 2008a, **34**(2): 341-343.
- XIANG S Q, WANG W X, LI X L. GISH analysis of sweet potato wild relative *Ipomoea trifida* (4x) [J]. *Acta Agonomica Sinica*, 2008a, **34**(2): 341-343.
- [33] LIU L Q, GU Z J. Genomic *in situ* hybridization identifies genome donors of *Camellia reticulata* (Theaceae) [J]. *Plant Science*, 2011, **180**(3): 554-559.
- [34] LIM K Y, MATYASEK R, KOVARIK A, *et al.* Parental origin and genome evolution in the allopolyploid *Iris versicolor* [J]. *Annals of Botany*, 2007, **100**(2): 219-224.
- [35] LANDI L, PHAN B H, TARUSCHIO L, *et al.* Peg-mediated fusion of *Rubus idaeus* (raspberry) and *R. fruticosus* (blackberry) protoplasts, selection and characterisation of callus lines [J]. *Plant Biosystems*, 2001, **135**(1): 63-69.
- [36] LIM K Y, LEITCH I J, LEITCH A R. Genomic characterisation and the detection of raspberry chromatin in polyploid *Rubus* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, **97**(7): 1 027-1 033.
- [37] LIANG G, WANG W, XIANG S, *et al.* Genomic *in situ* hybridization (GISH) of natural triploid loquat seedlings [C]. *II International Symposium on Loquat*, 2007, **750**: 97-99.
- [38] WANG W X, XIANG S Q, GUO Q G, *et al.* Genome identification of triploid loquats by genome *in situ* hybridization technique [C]. *III International Symposium on Loquat*, 2011, **887**: 49-53.
- [39] 马鸿翔, 陈佩度, 余桂红, 等. 利用 GISH 和 RAPD 检测黄毛草莓×凤梨草莓种间杂种 [J]. 植物遗传资源学报, 2005, **6**(3): 256-261.
- MA H X, CHEN P D, YU G H, *et al.* GISH and RAPD detecting the interspecific hybrids from the cross of *Fragaria nilgerrensis* Schlecht. × *F. ananassa* Duch. [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005, **6**(3): 256-261.
- [40] LIU B, POULSEN E G, DAVIS T M. Insight into octoploid strawberry (*Fragaria*) subgenome composition revealed by GISH analysis of pentaploid hybrids [J]. *Genome*, 2016, **59**(2): 79-86.
- [41] SCHUSTER M, SCHREIBNER H. Genome investigation in sour cherry, *P. cerasus* L. [C]. *Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*, 2000, **538**: 375-379.
- [42] FU C H, CHEN C L, GUO W W, *et al.* GISH, AFLP and PCR-RFLP analysis of an intergeneric somatic hybrid combining Goutou sour orange and *Poncirus trifoliata* [J]. *Plant Cell Reports*, 2004, **23**(6): 391-396.
- [43] 杨 星, 王 莹, 赵 倩, 等. 沙田柚宜昌橙杂种核型及基因组原位杂交分析 [J]. 园艺学报, 2016, **43**(3): 441-450.
- YANG X, WANG Y, ZHAO Q, *et al.* Analysis of karyotype and GISH of the hybrid from *Citrus grandis* 'Shatianyou' and *C. ichangensis* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2016, **43**(3): 441-450.
- [44] YASUDA K, YAHATA M, SHIGYO M, *et al.* Identification of parental chromosomes in sexual intergeneric hybrid progenies between *Citrus* cultivar 'Nanpu' tangor and *Citropsis schweinfurthii* in the subfamily Aurantioideae [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2010, **79**(2): 129-134.
- [45] 王 莹, 李晓林, 梁国鲁, 等. 天然四倍体红江橙与其二倍体的植株形态学和遗传组成比较 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2015, **37**(9): 1-5.
- WANG Y, LI X L, LIANG G L, *et al.* Morphological comparison and genetic difference between a natural tetraploid and the diploid of *Citrus sinensis* cv. Hongjiangcheng [J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2015, **37**(9): 1-5.
- [46] JERIDI M, PERRIER X, RODIER-GOUD M, *et al.* Cytogenetic evidence of mixed disomic and polysomic inheritance in an allotetraploid (AABB) *Musa* genotype [J]. *Annals of Botany*, 2012, **110**(8): 1 593-1 606.
- [47] JERIDI M, BAKRY F, ESCOUTE J, *et al.* Homoeologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. revealed by genomic *in situ* hybridization [J]. *Annals of Botany*, 2011, **108**(5): 975-981.
- [48] MELO C A F, SILVA G S, SOUZA M M. Establishment of the genomic *in situ* hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora* [J]. *Genetic and Molecular Research*, 2015, **14**(1): 2 176-2 188.
- [49] DE MELO C A F, SOUZA M M, SILVA G S. Karyotype analysis by FISH and GISH techniques on artificial backcrossed interspecific hybrids involving *Passiflora subanceolata* (Killip) MacDougal (*Passifloraceae*) [J]. *Euphytica*, 2017, **213**(8): 161.
- [50] 刘京京, 裴艳梅, 王金鑫, 等. 枣和酸枣基因组原位杂交技术体系的建立及其基因组同源性比较 [J]. 河北农业大学学报, 2014, **37**(5): 50-54.
- LIU J J, PEI Y M, WANG J X, *et al.* Establishment of GISH technique in *Ziziphus* Mill. and comparison of genomic homology between Chinese jujube and wild jujube [J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2014, **37**(5): 50-54.
- [51] SINGH S, KAUR G, GUPTA M, *et al.* Genomic affinities between *Brassica napus* and *Raphanus raphanistrum* as revealed by meiotic GISH [J]. *Plant Breeding*, 2016, **135**(4): 459-465.
- [52] YANG Y, WEI X C, SHI G Y, *et al.* Molecular and cytological analyses of A and C genomes at meiosis in synthetic allotriploid *Brassica* hybrids (ACC) between *B. napus* (AACC) and *B. oleracea* (CC) [J]. *Journal of Plant Biology*, 2017, **60**(2): 181-188.
- [53] XUAN S X, SHEN S X, WANG Y H, *et al.* Genomic composition of microspore-derived plants from a Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) × heading cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*) allotriploid (ACC) hybrid based on genomic *in situ* hybridization [J]. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 2015, **90**(4): 379-387.
- [54] JI Y F, PERTUZÉ R, CHETELAT R T. Genome differentiation by GISH in interspecific and intergeneric hybrids of tomato and related nightshades [J]. *Chromosome Research*, 2004, **12**(2): 107-116.
- [55] CHUDA A, ADAMUS A. Hybridization and molecular characterization of F₁ *Allium cepa* × *Allium roylei* plants [J]. *Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica*, 2012, **54**(2):

- 25-31.
- [56] YAMAMOTO M. Molecular cytogenetic and epigenetic components of crossing barriers and peculiar reproduction ability in *Allium* hybrids[J]. *The Nucleus*, 2015, **58**(3): 165-172.
- [57] TANG F P, CHEN F D, CHEN S M, *et al.* Intergeneric hybridization and relationship of genera within the tribe Anthemideae Cass. (I. *Dendranthema crassum* (Kitam.) Kitam. $\times$ *Crossostephium chinense* (L.) Makino)[J]. *Euphytica*, 2009, **169**(1): 133-140.
- [58] TANG F P, CHEN F D, CHEN S M, *et al.* Molecular cytogenetic identification and relationship of the artificial intergeneric hybrid between *Dendranthema indica* and *Crossostephium chinense* by GISH[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2010, **289**(1-2): 91-99.
- [59] DENG Y M, JIANG J F, CHEN S M, *et al.* Combination of multiple resistance traits from wild relative species in *Chrysanthemum* via trigenic hybridization[J]. *PloS One*, 2012, **7**(8): e44337.
- [60] MARASEK-CIOLAKOWSKA A, RAMANNA M S, TER LAAK W A, *et al.* Genome composition of 'Elatior'-begonias hybrids analyzed by genomic *in situ* hybridisation[J]. *Euphytica*, 2010, **171**(2): 273-282.
- [61] MARASEK A, HASTEROK R, WIEJACHA K, *et al.* Determination by GISH and FISH of hybrid status in *Lilium* [J]. *Hereditas*, 2004, **140**(1): 1-7.
- [62] KHAN N, ZHOU S, RAMANNA M, *et al.* Potential for analytic breeding in allopolyploids: an illustration from *Longiflorum* $\times$ Asiatic hybrid lilies (*Lilium*) [J]. *Euphytica*, 2009, **166**(3): 399-409.
- [63] MARASEK-CIOLAKOWSKA A, HE H, BIJMAN P, *et al.* Assessment of intergenomic recombination through GISH analysis of F₁, BC₁ and BC₂ progenies of *Tulipa gesneriana* and *T. fosteriana* [J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2012, **298**(5): 887-899.
- [64] LEE Y S, PARK H M, KIM N H, *et al.* Phylogenetic relationship of 40 species of genus *Aloe* L. and the origin of an allotriploid species revealed by nucleotide sequence variation in chloroplast intergenic space and cytogenetic *in situ* hybridization[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2016, **63**(2): 235-242.
- [65] LIU W L, SHIH H C, WENG I S, *et al.* Characterization of genomic inheritance of intergeneric hybrids between *Ascoenda* and *Phalaenopsis* cultivars by GISH, PCR-RFLP and RFLP[J]. *PloS One*, 2016, **11**(4): e0153512.
- [66] 吴菁华, 张志忠, 吕柳新. 中国水仙 3 个特异种质的分子细胞遗传学分析[J]. 园艺学报, 2011, **38**(4): 740-746.
- WU J H, ZHANG Z Z, LV L X. Molecular cytogenetic analysis of special germplasm of *Narcissus tazetta* var. *chinensis* [J]. *Acta Horticultureae*, 2011, **38**(4): 740-746.
- [67] KARLOV G I, KHRUSTALEVA L I, LIM K B, *et al.* Homoeologous recombination in 2n-gametes producing interspecific hybrids of *Lilium* (Liliaceae) studied by genomic *in situ* hybridization (GISH)[J]. *Genome*, 1999, **42**(4): 681-686.
- [68] NATHEWET P, SONE K, YANAGI T. Genomic *in situ* hybridization identifies genome donor of octoploid cultivated strawberry plants (*Fragaria* $\times$ *ananassa* Duch.) [C]. *The 7th International Strawberry Symposium*, 2012, Beijing.
- [69] LIM S J, LEE S S, BANG J W. Karyotype and genomic *in situ* hybridization pattern in $\times$ *Brassicoraphanus*, an intergeneric hybrid between *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* and *Raphanus sativus* [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2012, **6**(2): 107-112.
- [70] PREEDASUTTIJIT B, KITAJIMA A, YAMASAKI A, *et al.* Chromosome identification and characterization in trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) by CMA and PI/DAPI staining and GISH[J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2007, **76**(3): 197-204.
- [71] KITAJIMA A, YAMASAKI A, HABU T, *et al.* Chromosome identification and karyotyping of Satsuma mandarin by genomic *in situ* hybridization[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2007, **132**(6): 836-841.
- [72] LEE Y I, CHANG F C, CHUNG M C. Chromosome pairing affinities in interspecific hybrids reflect phylogenetic distances among lady's slipper orchids (*Paphiopedilum*) [J]. *Annals of Botany*, 2011, **108**(1): 113-121.
- [73] LIMA-BRITO J, GUEDES-PINTO H, HARRISON G, *et al.* Molecular cytogenetic analysis of durum wheat $\times$ tritordeum hybrids[J]. *Genome*, 1997, **40**(3): 362-369.
- [74] BARTOŠ J, ALKHIMOVA O, DOLEŽELOVÁ M, *et al.* Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (Musaceae): taxonomic implications[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2005, **109**(1-3): 50-57.
- [75] 王先宏, 杨清辉, 李富生, 等. 基于 GISH 的甘蔗与蔗茅属间杂交 F₁ 后代染色体组成及核型分析[J]. 中国农业科学, 2011, **44**(6): 1 085-1 091.
- WANG X H, YANG Q H, LI F S, *et al.* Chromosomal constitution and karyotype of intergeneric F₁ hybrids between *Saccharum* spp. and *Erianthus fulvus* based on GISH[J]. *Acta Agriculturae Sinica*, 2011, **44**(6): 1 085-1 091.
- [76] DENG Y M, CHEN S M, LU A M, *et al.* Production and characterisation of the intergeneric hybrids between *Dendranthema morifolium* and *Artemisia vulgaris* exhibiting enhanced resistance to chrysanthemum aphid (*Macrosiphoniella sanbourni*) [J]. *Planta*, 2010, **231**(3): 693-703.
- [77] BARBA-GONZALEZ R, RAMANNA M S, VISSER R G F, *et al.* Intergenic recombination in F₁ 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.
- [78] NATENAPIT J, TAKETA S, NARUMI T, *et al.* Crossing of allotriploid LLO hybrid and Asiatic lilies (*Lilium*) [J]. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 2010, **51**(5): 426-430.
- [79] 陈瑞阳, 林盛华, 宋文芹, 等. 中国主要经济植物染色体图谱 (第一卷) [M]. 中国果树及其野生近缘植物染色体图谱. 北京: 万国学术出版社, 1993.
- [80] E SILVA A E B, MARQUES A, DOS SANTOS K G, *et al.* The evolution of CMA bands in *Citrus* and related genera[J]. *Chromosome Research*, 2010, **18**(4): 503-514.

(编辑: 宋亚珍)