

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00802

## 甘蓝自交不亲和基因 *MLPK* 与 *SSP* 的 FISH 定位

荣小莹<sup>1</sup> 朱利泉<sup>1,\*</sup> 王永<sup>1</sup> 高启国<sup>2</sup> 陈晓丹<sup>1</sup> 杨洋<sup>2</sup> 王小佳<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 西南大学植物生理生物化学实验室, 重庆 400716; <sup>2</sup> 西南大学重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400716

**摘要:** 利用 FISH 技术, 对自交不亲和基因 *MLPK* 与 *SSP* 在甘蓝有丝分裂前中期染色体、减数分裂早粗线期染色体以及伸长 DNA 纤维等 3 种分辨率水平的靶 DNA 载体上进行物理定位。结果表明, 在有丝分裂前中期, *MLPK* 探针信号位于一对近中着丝粒同源染色体的短臂中部, 距着丝粒的百分距离约为 53.41±3.16; *SSP* 探针信号位于一对具有随体的近端着丝粒同源染色体的长臂端部, 距着丝粒的百分距离约为 78.36±4.26。综合 3 种载体上的 FISH 结果表明, *MLPK* 与 *SSP* 在甘蓝染色体组中可能都只有一个同源序列座位, 具有在单倍体基因组中的单拷贝性。重复 FISH 杂交表明, *MLPK* 与 5S rDNA 位于同一对染色体。依据 Armstrong 的核型分析标准, 初步判断 *MLPK* 与 *SSP* 可能分别位于甘蓝的 2 号和 7 号染色体, 与 *S* 位点不存在连锁关系。另从比较基因组学角度对定位结果进行了讨论。

**关键词:** 甘蓝; *MLPK* 基因; *SSP* 基因; 荧光原位杂交; 自交不亲和性

## Localization of *MLPK* and *SSP* Genes for Self-Incompatibility of *Brassica oleracea* by Fluorescence in situ Hybridization

RONG Xiao-Ying<sup>1</sup>, ZHU Li-Quan<sup>1,\*</sup>, WANG Yong<sup>1</sup>, GAO Qi-Guo<sup>2</sup>, CHEN Xiao-Dan<sup>1</sup>, YANG Yang<sup>2</sup>, and WANG Xiao-Jia<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Plant Physiology and Biochemistry Laboratory of Southwest University, Chongqing 400716, China; <sup>2</sup> Key Laboratory in Olericulture of Chongqing, Southwest University, Chongqing 400716, China

**Abstract:** In *Brassica*, self-incompatibility recognition is controlled by the multiallelic gene complex (*S*-haplotypes) at the *S*-locus, which encodes both the male determinant *S*-locus pollen coat protein (SCR/SP11) and the female determinant *S*-locus receptor kinase (SRK). Studies of *MLPK* and *SSP* genes for self-incompatibility of *Brassica* have been gradually widespread since they were identified. However, the position and copy number of *MLPK* and *SSP* genes in *Brassica oleracea* genome are still unclear. In this paper, the localization of *MLPK* and *SSP* genes for self-incompatibility of *Brassica oleracea* on prometaphase chromosomes, early pachytene chromosomes and extended DNA fibers was conducted successfully by fluorescence in situ hybridization. The results indicated that *MLPK* probe was hybridized onto the short arm of a pair of homologous prometaphase chromosomes, and the percent distance from centromere to the signal point was about 53.41±3.16; *SSP* probe was hybridized onto the long arm of a pair of homologous prometaphase chromosomes with the satellite, and the percent distance from centromere to the signal point was about 78.36±4.26. Hybridization signals from three kinds of cytological targets with different FISH resolutions showed that both *MLPK* gene and *SSP* gene might be located at a single-copy locus in *Brassica oleracea* genome. Repeated FISH indicated that both *MLPK* and 5S rDNA probes were hybridized onto the same chromosomes. According to karyotype standard of Armstrong, it was primarily inferred that *MLPK* gene was located on the chromosome 2, and *SSP* gene on the chromosome 7. The results presumably revealed that neither *MLPK* nor *SSP* is linked to *S*-locus. And they locate respectively on the different chromosomes in *Brassica oleracea*. In addition, the collinearity relationship of *MLPK* as well as *SSP* between *Brassica* and *Arabidopsis thaliana* was also discussed on the basis of comparative genomics.

**Keywords:** *Brassica oleracea*; *MLPK* gene; *SSP* gene; Fluorescence in situ hybridization; Self-incompatibility

芸薹属植物中普遍存在一个以 *S* 位点基因控制的自交不亲和(self-incompatibility, SI)信号传导途径。至今, 已鉴定出 *S* 位点糖蛋白(*S*-locus glycoprotein

gene, SLG)<sup>[1]</sup>、雌性决定因子 *S* 位点受体激酶(*S*-locus receptor kinase, SRK)<sup>[2-3]</sup>、雄性决定因子 *S* 位点花粉胞被蛋白(*S*-locus pollen coat protein, SCR/SP11)、臂

本研究由国家自然科学基金项目(30671429)和重庆市自然基金项目(9266)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 朱利泉, E-mail: zhuliquan@swu.edu.cn; Tel: 023-68250794

第一作者联系方式: E-mail: rongxy666@126.com

Received(收稿日期): 2008-10-15; Accepted(接受日期): 2009-01-20.

重复蛋白(arm repeat containing, ARC1)、硫氧还蛋白家族中的 THL1/THL2、水孔蛋白等传导元件<sup>[4-6]</sup>。但目前这一信号传导途径仍不够完整<sup>[7]</sup>, 许多学者从多方面进行了补充。Murase 等<sup>[8]</sup>首先从芸薹属自交不亲和和传导途径中发现了一种由 *M* 位点编码的蛋白激酶 (*M*-locus protein kinase, *MLPK*), *MLPK* 的隐性突变体植株完全丧失 SI, 表明 *MLPK* 与芸薹属 SI 信号传导途径密切相关。最近, Kakita 等<sup>[9]</sup>证实了 *MLPK* 直接与 *SRK* 相互作用, 参与了 SI 信号传导过程。2003 年, 吴能表用 <sup>32</sup>P 标记自交不亲和甘蓝受粉后的花粉提取液中的蛋白质, 经检测发现自花受粉后出现了一条相对分子量约为 22.2 kD 的特异标记带, 并能受到槲皮素的抑制, 说明该蛋白的磷酸化与 SI 信号传导密切相关, 是 *SRK* 的一种可能的磷酸化底物蛋白 (*SRK* substrate protein, *SSP*)<sup>[10-11]</sup>。

目前, *MLPK*、*SSP* 等 SI 信号传导元件编码基因在甘蓝染色体上的物理定位以及与 *S* 位点的连锁关系还不明确, 在甘蓝基因组中是否具有同源序列也没有定论。这些问题的解决对于明确甘蓝 SI 信号传导元件编码基因之间的连锁关系以及阐明孢子体自交不亲和性的机理具有十分重要的意义。本研究以 *MLPK* 和 *SSP* 基因序列为探针, 分别在甘蓝有丝分裂前中期染色体、减数分裂早粗线期染色体以及伸长 DNA 纤维(extended DNA fibers, EDFs)等 3 种靶 DNA 载体上进行荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH), 旨在明确 *MLPK* 和 *SSP* 在甘蓝染色体组中的物理定位, 为孢子体自交不亲和性的深入研究提供新的内容。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

甘蓝(*Brassica oleracea*)自交不亲和品种 Ky57 和 Ay287 来自西南大学重庆市油菜工程中心。

### 1.2 靶 DNA 载体制备

参考 Hasterok 等<sup>[12]</sup>和陈瑞阳等<sup>[13]</sup>方法稍加改进, 采用酶解去壁低渗法制备有丝分裂前中期染色体。参考钟筱波等<sup>[14]</sup>方法稍加改进制备减数分裂早粗线期染色体。参考钟筱波等<sup>[14]</sup>和 Yang 等<sup>[15]</sup>方法制备伸长 DNA 纤维(EDFs)。制片经 DAPI 复染镜检, 可在 -20℃ 下干燥保存数月。

### 1.3 探针标记

插入甘蓝 *SSP* 基因片段的 pMD18-T 质粒由西南大学杨洋博士惠赠。采用赵永斌等<sup>[16]</sup>报道的引物 (P1: 5'-GCATGAGTGTTCAGGTTAAAGC-3', P2:

5'-TGCTCTCTCGGTGGACGATTAT-3'), 克隆扩增得到 *MLPK* 基因片段, 并经测序证实后作为探针。采用随机引物法标记 *MLPK* 与 *SSP* 探针(DIG High Prime, Roche)。甘蓝 5S rDNA 探针由西南大学王永博士提供, 采用 PCR 法标记(DIG probe synthesis kit, Roche)。

## 1.4 荧光原位杂交程序

1.4.1 杂交前处理 将染色体制片于 60 烘箱中干燥 3 h。依次用 100 μg mL<sup>-1</sup> RNase A 在 37℃ 酶解 1 h、1 μg mL<sup>-1</sup> Pepsin 37 处理 30 min、2% (W/V) Cellulase 和 2% (W/V) Pectase 混合液 37 解离 30 min、1% (W/V) TritonX100 在 25 处理 10 min, 每次处理后均用 2×SSC 漂洗 3×5 min。然后用 1% (V/V) 甲醛(50 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1×PBS 配制)于室温下固定 10 min, 2×SSC 漂洗 3×5 min。然后经 70%、90%、100%乙醇依次脱水, 烘干备用。

1.4.2 预变性 染色体制片(EDFs 除外)在 70% (V/V)去离子甲酰胺(2×SSC 稀释)中 70 变性 2 min, 立即通过预冷的梯度(70%、90%和 100%)乙醇脱水备用。杂交液(20 μL 体系)含 50% (V/V)去离子甲酰胺、7.5% (V/V)硫酸葡聚糖、2×SSC、1.5 ng μL<sup>-1</sup> 探针(EDFs-FISH 0.5 ng μL<sup>-1</sup>)、2% (W/V) SDS、0.5 μg μL<sup>-1</sup> ssDNA(鲑鱼精 DNA)。85 变性 10 min, 立即冰浴 10 min 以上。

1.4.3 原位杂交 将杂交液加于制片上, 加盖玻片, 密封, 85 共变性 10 min, 然后于 37 湿盒中杂交 18~24 h。

1.4.4 杂交后洗脱及信号检测 室温 2×SSC 中漂洗 5 min, 然后在 37 条件下(EDFs-FISH 为 40 ), 以 4×SSCT (0.2% Tween 20)、2×SSC 和 1×PBS 各洗脱 5 min。每片加羊抗地高辛荧光素偶联物(Sheep anti-Digoxigenin-Fluorescein, Roche) 20 μL, 37 温育 30 min 后漂洗, 步骤同前, 时间改为每次 8 min。然后加入兔抗羊荧光素偶联物(Rabbit anti-Sheep-Fluorescein, Roche) 20 μL, 温育和洗脱同前。用 5 μg mL<sup>-1</sup> 的 DAPI 复染, 加抗淬灭剂, Nikon Eclipse E600W 荧光显微镜观察, Digital Sight DS-U2 CCD 捕捉收集图像, 使用 NIS-Elements BR 2.20 和 Photoshop 软件对图像进行叠加和处理。

## 2 结果与分析

2.1 适合于 3 种伸长度的染色体 FISH 体系的建立 在前中期和早粗线期染色体上采用的 FISH 程序基本一致(方法 1.4)。而 EDFs-FISH 中, 制片无需

进行前处理和预变性, 杂交液中探针浓度以及杂交后洗脱温度略有不同, 其余程序在3种载体上可保持一致, 杂交效果均较好, 证明该方法的可行性。实验中对 FISH 体系作了如下几方面的条件优化。

*MLPK* 和 *SSP* 探针序列经 PCR 扩增后, 产物转化大肠杆菌, 菌液 PCR 检测后由上海英骏生物公司测序。*MLPK* 和 *SSP* 探针序列分别为 1 721 bp (图 1) 和 1 251 bp (图 2)。在 20  $\mu\text{L}$  杂交液体系中, 最低探针浓度以达到靶核苷酸的最大饱和结合度为宜。在 0.1~1.5  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  (EDFs-FISH 0.5  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) 范围内, 杂交效率随着浓度的增加不断提高。

针对甘蓝前中期及早粗线期染色体较高的包裹程度, 杂交前处理时采用不同的方法处理制片(表 1) 发现, 杂交前处理是否充分直接影响 FISH 信号的检出率和信噪比。另外, 染色体制片预变性不彻底或变性过度都会直接影响 FISH 的效果。对前中期及早粗线期染色体在 70% 去离子甲酰胺中的变性条件进行探索(表 2) 表明, 70 $^{\circ}\text{C}$  变性 2 min 取得较好的杂交效果; 若变性时间稍长, 对前中期染色体的影响更为明显。

杂交后洗脱先后尝试了 42 $^{\circ}\text{C}$ ~37 $^{\circ}\text{C}$  等 6 种不同温度条件。结果表明, 针对单、低拷贝探针的 3 级洗脱, 37 获得的杂交信号比较稳定, 背景影响较小, 信噪比较高。对于 EDFs-FISH, 将温度提高到 40, 能更好地减少非特异信号, 提高信噪比。利用抗体偶联物进行信号的级联放大, 对于杂交信号检出率的提高至关重要。

## 2.2 *MLPK* 和 *SSP* 在甘蓝前中期染色体上的 FISH

*MLPK* 和 *SSP2* 种探针都只在 1 对同源染色体上检测到绿色杂交信号(图 3)。*MLPK* 探针信号位于 1

对近中着丝粒染色体的短臂中部(图 3-A, B); *SSP* 探针信号位于 1 对具有随体的近端着丝粒染色体的长臂端部(图 3-C, D)。没有观察到同时出现在姊妹染色单体上的双点信号现象。*MLPK* 探针信号检出率为 11.8%, *SSP* 探针信号检出率为 9.1%。在图 3-A 中观

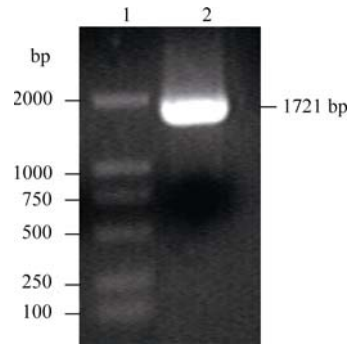


图 1 *MLPK* 基因片段 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 PCR products of *MLPK* fragment

1: DL2000 DNA marker; 2: *MLPK* 基因片段 PCR 产物。  
1: DL2000 DNA marker; 2: PCR products of *MLPK* fragment.

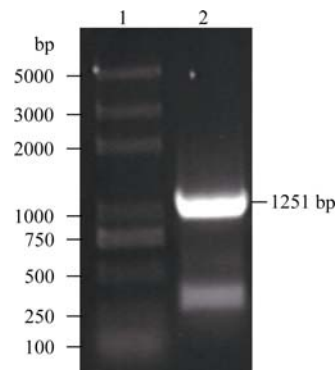


图 2 *SSP* 基因片段 PCR 扩增电泳图

Fig. 2 PCR products of *SSP* fragment

1: DL2000 plus DNA marker; 2: *SSP* 基因片段 PCR 产物。  
1: DL2000 plus DNA marker; 2: PCR products of *SSP* fragment.

表 1 杂交前不同处理对对丝分裂前中期染色体 FISH 信号检出率与信噪比的影响(*MLPK* 探针)

Table 1 Effects of pretreatments on rate of detected signal and ratio of signal-to-noise in prometaphase FISH(*MLPK* probe)

处理 Treatment	RNA 酶 A <sup>a</sup> RNase A	胃蛋白酶 <sup>b</sup> Pepsin	纤维素酶和果胶酶 2%(W/V) cellulase & 2% (W/V) pectase	1%(W/V) TritonX100	信号检出率 <sup>c</sup> Rate of detected signal (%)	信噪比 Ratio of signal-to-noise
	37 $^{\circ}\text{C}$ /1 h	37 $^{\circ}\text{C}$ /30 min	37 $^{\circ}\text{C}$ /30 min	25 /10 min		
1	+	-	-	-	3.7	B
2	+	+	-	-	8.9	C
3	+	+	+	-	10.9	D
4	+	+	-	+	10.3	E
5	+	+	+	+	11.8	F
6	-	-	-	-	1.1	A

<sup>a</sup>: RNA 酶 A 浓度为 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; <sup>b</sup>: 胃蛋白酶浓度为 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; <sup>c</sup>: 信号检出率(%)=检测到杂交信号的细胞数/观察细胞总数 $\times$ 100%; +: 进行处理; -: 不处理; A~F: 信噪比逐步提高。

<sup>a</sup>: the working concentration for RNase A is 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; <sup>b</sup>: the working concentration for pepsin is 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; <sup>c</sup>: rate of detected signal (%)=cell number of detected hybridization signal/observed cell total number $\times$ 100%; +: treatment; -: without treatment; A~F: enhanced ratio of signal-to- noise gradually.

表 2 不同染色体变性条件对 FISH 结果的影响(*MLPK* 探针)  
Table 2 Effects of chromosome denaturation conditions on FISH (*MLPK* Probe)

处理 Treatment	变性条件 Denaturation condition ( /min)	信号检出率 Rate of detected signal(%)	
		前中期染色体 Prometaphase chromosomes	早粗线期染色体 Early pachytene chromosomes
1	65/2.0	0(++)	0(++)
2	65/3.0	2.1(+)	6.7(+)
3	70/2.0	11.8(+)	31.4(+)
4	70/2.5	3.5(-)	30.8(+)
5	70/3.0	0.2(--)	30.3(+)

+ : 染色体形态良好; - : 染色体膨胀变形。

+: good chromosome configuration; -: chromosome distortion or dilating.

察到 2 个 *MLPK* 探针信号; 而在图 3-B 中染色体基本成同源配对, 杂交信号所在染色体部分重叠导致只观察到 1 个信号。在图 3-C 和图 3-D 中 *SSP* 探针也有类似情况出现。由此表明, 靶 DNA 载体的质量对于杂交效果有直接的影响。在图 3 中, 各信号点的强度、大小等有一定的差异, 推测可能与染色体自身的空间状态有关。当靶染色体以一定的解螺旋方式出现时, 探针可以更容易进入, 提高了探针与靶 DNA 的结合率, 信号强度和检测灵敏度会相应提高。

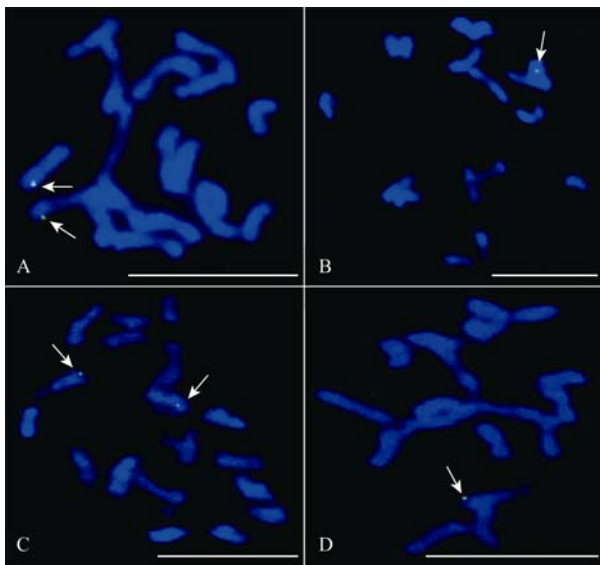


图 3 *MLPK* 与 *SSP* 在甘蓝有丝分裂前中期染色体上的荧光原位杂交

Fig. 3 FISH of *MLPK* and *SSP* genes on prometaphase chromosomes of *Brassica oleracea*

A~B: *MLPK* 杂交信号; C~D: *SSP* 杂交信号; 标尺为 10  $\mu\text{m}$ 。

A~B: FISH signals of *MLPK*; C~D: FISH signals of *SSP*.

Scale bars=10  $\mu\text{m}$ .

### 2.3 *MLPK* 和 *SSP* 在甘蓝减数分裂早粗线期染色体上的 FISH

*MLPK* 和 *SSP* 探针在甘蓝减数分裂早粗线期染色体上(图 4-A, B), 1 个分裂相内最多只观察到 2 个同

源杂交信号。而 2 个杂交信号相距较远, 由此说明, 该时期同源染色体尚未完全联会, 介于偶线期和粗线期之间, 即为早粗线期染色体。但据形态来看应该更靠近偶线期, 其 FISH 的检测灵敏度和分辨率较之粗线期会更高<sup>[17]</sup>。*MLPK* 探针信号检出率为 31.4%, 多数分裂相可观察到 2 个同源杂交信号, 如图 4-A 两个分裂相中观察到 4 个信号点; *SSP* 探针信号检出率为 20.4%, 多数分裂相中观察到的是单个信号点(图 4-B)。2 种探针之间, 信号检出率、强度、大小都表现出一定的差异。

### 2.4 *MLPK* 和 *SSP* 在甘蓝伸长 DNA 纤维上的 FISH

在 EDFs 上(图 4-C, D), *MLPK* 和 *SSP* 探针都呈现单个的绿色杂交信号点。根据我们课题组 5S rDNA 的 EDFs-FISH 的拷贝数及杂交信号的分布(另文发表), 可以推算出制备的 EDFs 的伸展度约为 7 kb  $\mu\text{m}^{-1}$ , 按照显微镜分辨率 0.2  $\mu\text{m}$  计算, EDFs 的 FISH 分辨率水平可以达到 1.5 kb 左右。本研究中所用的探针大小分别为 1 721 bp 和 1 251 bp, 因此, 推测两种探针信号在 EDFs 上呈现的单个点即代表该探针序列的 1 个拷贝。由于制备 EDFs 所用的细胞核密度较大以及 DNA 纤维拉伸时多成束存在, 因而在同一视野下观察到的 EDFs 应出自多个不同的细胞核。因此, 在 EDFs 制片上尽管观察到多个杂交信号点, 但它们应位于多个细胞核拉伸出的 EDFs 上即属于不同的染色体组。另外, 前中期和早粗线期染色体 FISH 表明, *MLPK* 和 *SSP* 2 种探针都只在 1 对同源染色体上检测到杂交信号。而 EDFs-FISH 结果显示在每一条(或束)DNA 纤维上只有 1 个信号点, 1 条 DNA 纤维对应于 1 条染色体, 由此推断, *MLPK* 与 *SSP* 在 1 条染色体上可能只有 1 个拷贝。*MLPK* 和 *SSP* 探针信号的强度、大小皆表现出一定的个体差异性。

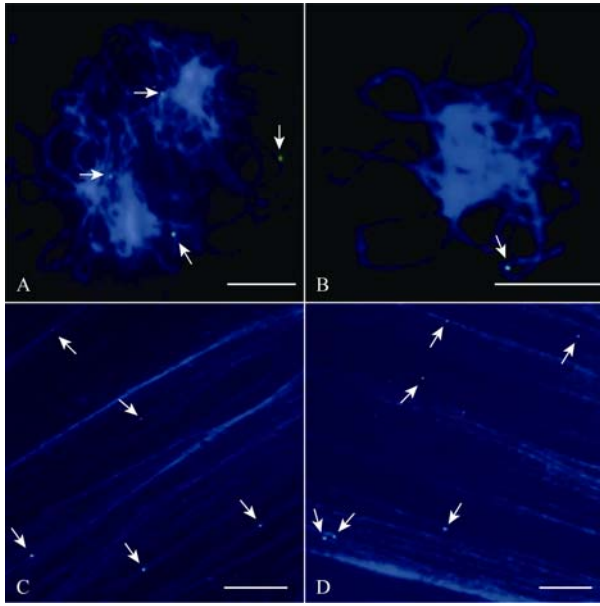


图 4 *MLPK* 与 *SSP* 在甘蓝减数分裂早粗线期染色体和伸长 DNA 纤维上的荧光原位杂交

Fig. 4 FISH of *MLPK* and *SSP* probes on early pachytene chromosomes and extended DNA fibers in *Brassica oleracea*

A: *MLPK* 在早粗线期染色体上的杂交信号; B: *SSP* 在早粗线期染色体上的杂交信号; C: *MLPK* 在伸长 DNA 纤维上的杂交信号; D: *SSP* 在伸长 DNA 纤维上的杂交信号; 标尺为 10  $\mu\text{m}$ 。

A: FISH signals of *MLPK* on early pachytene chromosomes; B: FISH signals of *SSP* on early pachytene chromosomes; C: FISH signals of *MLPK* on extended DNA fibers; D: FISH signals of *SSP* on extended DNA fibers. Scale bars=10  $\mu\text{m}$ .

## 2.5 *MLPK* 和 *SSP* 在甘蓝染色体组内的物理定位

本研究采用的 3 种靶 DNA 载体的 FISH 空间分辨率逐步提高, 从 Mb 数量级到 kb 数量级不等, 其中, EDFs 的分辨率最高可以达到 1.5 kb 左右。综合分析 *MLPK* 和 *SSP* 在 3 种分辨率水平的靶 DNA 载体上的 FISH 结果表明, *MLPK* 与 *SSP* 在甘蓝染色体组中可能都只有 1 个同源序列座位, 二者在甘蓝单倍体基因组中为单拷贝基因。采用重复 FISH, 将 *MLPK*、*SSP* 及甘蓝 5S rDNA 探针先后在同一张前中期染色体制片上进行杂交, 其同一分裂相的结果表明, 在甘蓝染色体组内, *MLPK* 和 5S rDNA 探针信号位于同一对染色体上(图 5-A, B), *SSP* 探针信号位于另一对同源染色体上(图 5-C)。依据 Armstrong 等<sup>[18]</sup>

的核型分析标准, 5S rDNA 位于 2 号染色体, 4 号和 7 号染色体具有随体。再参考染色体的平均相对长度、着丝粒指数等参数(表 3), 初步判断, 在甘蓝染色体组中, *MLPK* 位于 2 号染色体的短臂中部(图 5-A, D), 信号距着丝粒的百分距离约为  $53.41 \pm 3.16$ ; *SSP* 位于具有随体的 7 号染色体的长臂端部(图 5-C, D), 信号距着丝粒的百分距离约为  $78.36 \pm 4.26$ 。

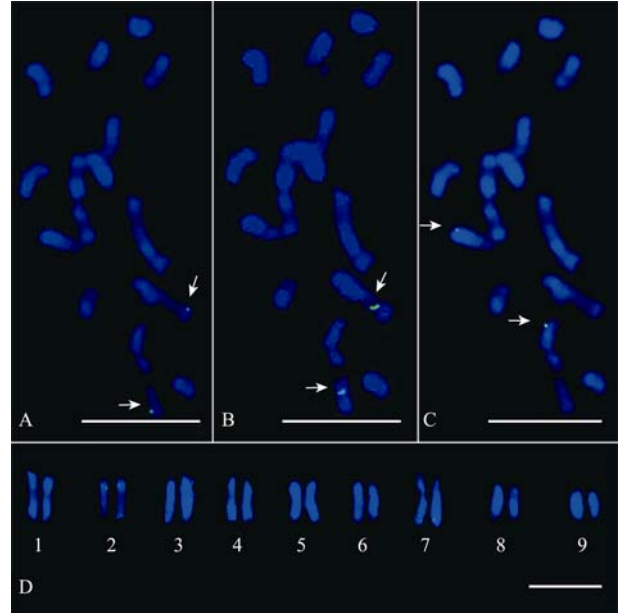


图 5 *MLPK* 与 *SSP* 在甘蓝染色体组中的物理定位

Fig. 5 Physical localization of *MLPK* and *SSP* genes by FISH on chromosomes of *Brassica oleracea*

A: *MLPK* 杂交信号; B: 5S rDNA 杂交信号; C: *SSP* 杂交信号; D: 甘蓝中期染色体核型图; 标尺为 10  $\mu\text{m}$ 。

A: FISH signals of *MLPK*; B: FISH signals of 5S rDNA C: FISH signals of *SSP*; D: The karyotype of metaphase in *Brassica oleracea*; Scale bars=10  $\mu\text{m}$ .

## 3 讨论

随着国际芸薹属基因组计划(MBGP)深入开展, 在 A、B、C 基因组测序等方面已取得了不同程度的进展, 为本研究利用 NCBI 和 MBGP(<http://www.brassica.info/resource/>)数据库, 深入分析讨论 *MLPK* 和 *SSP* 在甘蓝染色体组内的定位提供了可能。对 *MLPK* 和 *SSP* 探针序列在 GenBank、Brassica DB、

表 3 *MLPK* 与 *SSP* 在甘蓝染色体上的定位

Table 3 Localization of *MLPK* and *SSP* genes on *Brassica oleracea* Chromosomes

基因 Gene	染色体 Chromosome	相对长度 Relative length (%)	着丝粒指数 Centromere index	信号距着丝粒百分距离 Percentage distance from the centromere to the signal site(%)	臂比 Ratio of arm
<i>MLPK</i>	2S	$11.89 \pm 0.59$	$36.22 \pm 2.68$	$53.41 \pm 3.16$	$1.44 \pm 0.19$
<i>SSP</i>	7L	$10.28 \pm 1.17$	$25.6 \pm 1.07$	$78.36 \pm 4.26$	$1.96 \pm 0.86$

S: 短臂; L: 长臂。S: short arm; L: long arm.



BrGP-BAC 中的 Blastn 同源性比对发现, 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中与 *MLPK* 序列同源性最高的是位于拟南芥 2 号染色体上的 BAC 克隆 F8N16 (GenBank 登录号为 AC005727.3)。进一步通过拟南芥数据库 TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) 比对发现, F8N16 位于拟南芥 2 号染色体的 12.4 Mb 处。芸薹属与拟南芥之间的比较基因组研究表明, 甘蓝、白菜与拟南芥之间存在广泛的共线性关系<sup>[19-20]</sup>。拟南芥 2 号染色体在甘蓝第 2、3、4、9 连锁群上存在共线性区域, 其中拟南芥 2 号染色体上的 12.2 Mb 到 13.8 Mb 区域与甘蓝的第 4 连锁群同源<sup>[20-21]</sup>, *MLPK* 的同源序列就位于此共线性范围内。在白菜 (*Brassica rapa*) 中与 *MLPK* 序列同源性最高的是 BAC 克隆 KbrB068E07 (GenBank 登录号为 AC189432.2), 相似性达 97% 以上, KbrB068E07 克隆中应含有 *MLPK* 在白菜基因组中的同源序列。利用 NIAB-KOREA (<http://www.brassica-rapa.org/KBGP/>) 提供的白菜与拟南芥之间的基因组比较图谱比对发现, KbrB068E07 与拟南芥 2 号染色体上 12.2~12.5 Mb 这一区域同源, 由上述推断, *MLPK* 位于甘蓝的第 4 连锁群即第 2 号染色体<sup>[22]</sup>, 这与我们的 FISH 定位结果一致。*SSP* 序列经同源比对发现, 拟南芥中同源性最高的是 T13C7 克隆 (GenBank 登录号为 AC007109.7), 通过 TAIR 比对, T13C7 位于拟南芥 2 号染色体 8.8 Mb 处, 与甘蓝第 7 连锁群具有共线性关系<sup>[21]</sup>, 据此 *SSP* 应位于甘蓝第 4 号染色体<sup>[22]</sup>, 与我们的 FISH 定位结果稍有出入。研究表明, 芸薹属与拟南芥之间的共线性关系较为复杂, 不排除该区域在进化过程中发生大量易位、断裂现象的可能; 另外, 甘蓝的第 4、7 号染色体上都有随体, 其中 4 号较小, 观察困难, 而 7 号相对较大, 比较容易观测<sup>[18]</sup>, 因此, *SSP* 应位于 4 号或 7 号染色体, 杂交结果显示 *SSP* 探针信号所在染色体的随体较为明显, 因而倾向 *SSP* 位于 7 号染色体, 但还有待进一步确认。

本研究中所用的早粗线期染色体与晚粗线期相比更加细长, FISH 的检测灵敏度和分辨率更高。而且杂交信号正好位于常染色质所占比例较高的区域, 这更有利于信号的检出。但研究发现, 早粗线期染色体上杂交信号检出率与前中期染色体相比提高幅度并不明显。Wang 等<sup>[23]</sup> 研究表明, 采用 Cy3 直接标记单拷贝序列作探针在玉米粗线期染色体上杂交, 3.4 kb 序列检出率为 70%, 3.1 kb 序列检出率为 63%, 而 4.1 kb 序列因 5' 端存在同源性不高的反向重复转

座子序列而使其检出率仅为 40%。在油菜染色体上定位 *SLG* 和 *SLRI* 时也发现, *SLG* 探针因与靶染色体同源性较低而只在 1 条同源染色体上检测到信号<sup>[24]</sup>。本研究所用探针与早粗线期染色体来自不同的甘蓝品种。因此, 推测 *MLPK* 和 *SSP* 的非编码区序列在甘蓝品种间可能存在一定程度的进化趋异性, 杂交中探针与靶 DNA 载体同源性不高, 导致杂交信号检出率相对较低, 但还有待进一步的研究。前中期和早粗线期染色体 FISH 表明, 检测中进行信号的级联放大与否, 对杂交效果影响显著。Howell 等<sup>[22]</sup> 用插入片段为 1 880 bp 的质粒作探针时, 直接用 Cy3 检测不到, 但用 3 级链亲和素-Cy3 则可以检测到, 而插入序列为 3.3 kb 的质粒探针则可以用 Cy3 直接检测到。这些都表明, 信号级联放大可以有效提高 FISH 灵敏度和信号检出率, 尤其是对于单、低拷贝探针效果更为明显。研究发现, *MLPK* 和 *SSP* 在 3 种载体上 FISH 信号的强弱、大小都表现出一定的个体差异。其原因是 DNA 变性过程中, 靶 DNA 有可能部分丢失; 且在杂交过程中探针与靶 DNA 随机相遇而结合, 靶 DNA 有些区域得到充分结合, 有些区域则很少或没有结合<sup>[25]</sup>。另外, 检测中荧光的反复被激发, 也可能导致某些信号变弱甚至淬灭。

目前, 已证实 *MLPK* 与 *SRK* 之间存在直接的相互作用, *MLPK* 作为 *SRK* 受体复合物的核心因子作用将会是以后芸薹属自交不亲和性研究中的热点<sup>[9]</sup>。在 SI 信号传导途径中, *SSP* 可能作为 *ARC1* 发挥泛素连接酶作用的调节因子而起作用<sup>[11,26]</sup>。已有研究表明, *S* 位点位于甘蓝第 6 连锁群即第 9 号染色体<sup>[22,24]</sup>。因此, 在甘蓝染色体组中 *MLPK*、*SSP* 与 *S* 位点之间不存在连锁关系, 分别位于不同的染色体, 并且在单倍体基因组中都是单拷贝的。*MLPK* 和 *SSP* 在甘蓝染色体组中的定位可以为 *SSP* 等自交不亲和基因结构和功能的研究打下良好的基础, 有助于明确 *SSP* 是否作为 SI 信号传导途径的下游元件。*MLPK*、*SSP* 以及 *S* 位点在甘蓝染色体组中的分布特点对于 SI 基因表达调控时空特性的研究具有重要意义, 这对于阐明 SI 信号传导途径中 *MLPK* 与 *SRK* 以及其他元件之间的相互关系具有积极的促进作用。

## 4 结论

在甘蓝染色体组中, *MLPK* 与 *SSP* 可能都只有一个同源序列座位, 初步证明二者在单倍体基因组中的单拷贝性, 与 *S* 位点基因之间不存在连锁关系,

且分别位于不同的染色体上。*MLPK* 和 *SSP* 可能分别位于甘蓝的 2 号和 7 号染色体。本研究建立的 FISH 杂交体系, 经实践证明适用于 3 种伸长度染色体的荧光原位杂交。

## References

- [1] Stein J C, Howlett B, Boyes D C, Nasrallah M E, Nasrallah J B. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 8816–8820
- [2] Goring D R, Rothstein S J. The *S*-locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell*, 1992, 4: 1273–1281
- [3] Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che F S, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K, Isogai A. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 1920–1925
- [4] Boyes D C, Nasrallah M E, Vrebalov J, Nasrallah J B. The self-incompatibility (*S*) haplotypes of *Brassica* contain highly divergent and rearranged sequences of ancient origin. *Plant Cell*, 1997, 9: 237–247
- [5] Gu T S, Mazzurco M, Sulaman W, Matias D D, Goring D R. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 382–387
- [6] Cabrillac D, Cock J M, Dumas C, Gaude T. The *S*-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature*, 2001, 410: 220–223
- [7] Goring D R, Walker J C. Self-rejection: A new kinase connection. *Science*, 2004, 303: 1474–1475
- [8] Murase K, Shiba H, Iwano M, Che F S, Watanabe M, Isogai A, Takayama S. A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science*, 2004, 303: 1516–1519
- [9] Kakita M, Murase K, Iwano M, Matsumoto T, Watanabe M, Shiba H, Isogai A, Takayama S. Two distinct forms of *M*-locus protein kinase localize to the plasma membrane and interact directly with *S*-locus receptor kinase to transduce self-incompatibility signaling in *Brassica rapa*. *Plant Cell*, 2007, 19: 3961–3973
- [10] Wu N-B(吴能表). Study on Evocable Protein Phosphorylation and Correlative Characters in the Self-Incompatible of *Brassica oleracea* L. PhD Dissertation of Southwest Agricultural University, 2003. pp 51–52(in Chinese with English abstract)
- [11] Zhao Y-B(赵永斌), Zhu L-Q(朱利泉). Cloning and sequences analysis of SRK substrate protein gene from *Brassica oleracea*. *Acta Agric Boreali-occident Sin* (西北农业学报), 2007, 16(6): 102–106(in Chinese with English abstract)
- [12] Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, Kowalczyk M, Kulak-Ksiazczyk S, Ksiazczyk T, Heneen W K, Maluszynska J. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. *Ann Bot*, 2006, 97: 205–216
- [13] Chen R-Y(陈瑞阳), Song W-Q(宋文芹), Li X-L(李秀兰). Wall degradation hypotonic method of preparing chromosome sample in plant and its significance in the cytogenetics. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1982, 9(2): 151–159(in Chinese with English abstract)
- [14] Zhong X-B(钟筱波), Franz P F, Wennekes J, Kammen A, De Jong J H, Zabel P. Fluorescence in situ hybridization to pachytene chromosomes and extended DNA fibres in plants. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1998, 25(2): 142–149(in Chinese with English abstract)
- [15] Yang K, Qi H Y, Zhu L Q, Wang X J. Localization of *S* genes on extended DNA fibers (EDFs) in *Brassica oleracea* by high-resolution FISH. *Acta Genet Sin*, 2006, 33(3): 277–284
- [16] Zhao Y-B(赵永斌), Zhu L-Q(朱利泉), Wang X-J(王小佳). Cloning and sequences analysis of *M*-locus protein kinase gene from *Brassica oleracea*. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2006, 32(1): 46–50(in Chinese with English abstract)
- [17] Cheng Z K, Buell C R, Wing R A, Jiang J M. Resolution of fluorescence in situ hybridization mapping on rice mitotic prometaphase chromosomes, meiotic pachytene chromosomes and extended DNA fibers. *Chrom Res*, 2002, 10: 379–387
- [18] Armstrong S J, Franz P, Marshall D F, Jones G H. Physical mapping of DNA repetitive sequences to mitotic and meiotic chromosomes of *Brassica oleracea* var. *alboaglabra* by fluorescence in situ hybridization. *Heredity*, 1998, 81: 666–673
- [19] Li G, Gao M, Yang B, Quiros C F. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 168–180
- [20] Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Kondo M, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka H, Hirai M, Matsumoto S. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: The genetic origin of clubroot resistance. *Genetics*, 2006, 173: 309–319
- [21] Lukens L, Zou F, Lydiat D, Parkin I, Osborn T. Comparison of a *Brassica oleracea* genetic map with the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2003, 164: 359–372
- [22] Howell E C, Barker G C, Jones G H, Kearsley M J, King G J, Kop E P, Ryder C D, Teakle G R, Vicente J G, Armstrong S J. Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. *Genetics*, 2002, 161: 1225–1234
- [23] Wang C J R, Harper L, Cande W Z. High-resolution single-copy gene fluorescence in situ hybridization and its use in the construction of a cytogenetic map of maize chromosome 9. *Plant Cell*, 2006, 18: 529–544
- [24] Kamisugi Y, Nakayama S, O'Neil C M, Mathias R J, Trick M, Fukui K. Visualization of the *Brassica* self-incompatibility *S*-locus on identified oilseed rape chromosomes. *Plant Mol Biol*, 1998, 38: 1081–1087
- [25] Van De Rijke F M, Florijn R J, Tanke H J, Raap A K. DNA fiber-FISH staining mechanism. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48: 743–745
- [26] Stone S L, Anderson E M, Mullen R T, Goring D R. ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell*, 2003, 15: 885–898