

FISH 技术在芸薹属作物基因组研究中的应用进展

轩淑欣¹, 冯大领², 李岩宾¹, 赵玉靖¹, 张成合¹, 申书兴^{1,*}

(¹河北农业大学园艺学院, 河北保定 071000; ²河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071000)

摘要: FISH 技术是进行基因和重复 DNA 序列在染色体上可视化作图的精确有效方法, 已广泛应用于特异核苷酸序列的物理作图、基因组或染色体的识别、DNA 序列的定量分析以及着丝粒、染色质空间结构分析等方面。综述了 FISH 技术在芸薹属作物基因组研究中的重要进展, 并讨论了其应用前景。

关键词: 芸薹属作物; 荧光原位杂交; 细胞遗传学; 染色体涂染; 伸展 DNA 纤维

中图分类号: S 63

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 09-1710-09

Recent Advances in *Brassica* Genome Research by Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

XUAN Shu-xin¹, FENG Da-ling², LI Yan-bin¹, ZHAO Yu-jing¹, ZHANG Cheng-he¹, and SHEN Shu-xing^{1,*}

(¹College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; ²College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is an effective and accurate method to visualize the localization of genes and repetitive DNA sequences on chromosomes. This technique has been widely used for physical mapping of unique nucleotide sequences on specific chromosome regions, for identifying the specific genomes and chromosomes, for measuring the size of various DNA molecules, and for revealing the spatial organization of the centromere and heterochromatin or euchromatin of different chromosomes. The present review mainly described the recent advances in *Brassica* genome research by fluorescence *in situ* hybridization and discussed its future applications in *Brassica* crops.

Key words: *Brassica* crops; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); cytogenetics; genome; chromosome painting (CCP); extend DNA fibers (EDFs)

芸薹属 (*Brassica*) 包括白菜 (*B. rapa*, $2n = 2x = 20$, AA)、甘蓝 (*B. oleracea*, $2n = 2x = 18$, CC)、黑芥 (*B. nigra*, $2n = 2x = 16$, BB) 3 个二倍体种和甘蓝型油菜 (*B. napus*, $2n = 4x = 38$, AACC)、芥菜 (*B. juncea*, $2n = 4x = 36$, AABB)、埃塞俄比亚芥 (*B. carinata*, $2n = 4x = 34$, BBCC) 3 个复合二倍体种, 其中许多是重要的蔬菜、油料和饲料作物, 或为某些调味品及抗癌化合物的重要来源

收稿日期: 2013-06-17; 修回日期: 2013-08-05

基金项目: 国家‘863’课题(2012AA100202); 国家自然科学基金项目(31171964); 国家教育部高校博士点基金项目(20101302110001); 河北省青年科学基金项目(C2010000738)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: shensx@hebau.edu.cn; Tel: 0312-7521286)

(Labana & Gupta, 1993; Fahey & Talalay, 1995; Razis & Noor, 2013)。关于芸薹属作物的细胞遗传学研究开始于 20 世纪初 (Takamine, 1916; Karpechenko, 1922), 至今已有近 100 年的历史, 然而该领域在新技术以及基因组资源 (如 BAC 文库、遗传图谱、测序数据等) 出现之前曾一度停滞不前。荧光原位杂交技术 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 的建立和发展促使芸薹属植物细胞遗传学研究进入一个新阶段。

荧光原位杂交技术是在染色体或细胞核上可视化定位核苷酸序列的一种非常有效的方法。其原理是将标记的核苷酸序列作为信号分子与载玻片上互补的 DNA 或 RNA 序列直接杂交和检测。由于 FISH 技术程序简单, 灵敏度高, 对比明显, 可同时检测多个探针, 具有立体分析的多功能性, 其迅速成为原位杂交的主流技术, 已被广泛应用在许多植物的重要性状和基因组研究中 (de Jong, 2003; Jiang & Gill, 2006; Lysak et al., 2007; Xiong et al., 2010; Iovene et al., 2011; Figueroa & Bass, 2012; Szinay et al., 2012)。FISH 作为一项可视化方法, 其发展在分子细胞遗传学研究中具有重要的里程碑意义。本文综述并讨论了该方法在芸薹属作物研究上的应用和前景。

1 芸薹属作物核糖体 RNA 基因的荧光原位杂交检测

核糖体 RNA 基因 (rDNA) 在基因组中具有高拷贝数和串联重复的特性, 是迄今在植物中应用最广泛的 FISH 标记探针。rDNA-FISH 技术使得芸薹属作物等具有小染色体物种的分子细胞遗传学研究有了显著进展。

1993 年, Maluszynska 和 Heslop-Harrison (1993) 第一次将 45S rDNA 作为 FISH 标记成功应用到芸薹属植物染色体, 分析了 45S rDNA 在芸薹属 6 个种基因组中的位点数和分布。随后, 许多研究者使用 FISH 技术进行了 45S rDNA 和 5S rDNA 的染色体定位, 如甘蓝 9 对染色体中的 3 对、白菜 10 对染色体中的 6 对、黑芥 8 对染色体中的 4 对、甘蓝型油菜 19 对染色体中的 9 对、芥菜 18 对染色体中的 10 对, 被精确识别 (Fukui et al., 1998; Hasterok et al., 2001, 2006; Kulak et al., 2002; Snowdon et al., 2002; Ziolkowski & Sadowski, 2002; Koo et al., 2004; Ali et al., 2005; 轩淑欣 等, 2007), 并建立了携带 rDNA 位点的染色体核型模式图 (Hasterok et al., 2001), 显示出了比传统显带技术高得多的分辨能力 (Hasterok et al., 2006)。

通过 FISH 技术对 rDNA 在芸薹属物种进行染色体作图, 不仅对芸薹属物种染色体结构有了更深入的认识, 而且也认识到 rDNA 位点在不同物种中的数量具有可变性 (Hasterok et al., 2006), 初步推测其可能是因为物种在进化过程中染色体或核糖体 RNA 基因交换或易位所致。随着流式细胞仪在整套染色体悬浮液中进行染色体分拣的应用, rDNA 和着丝粒 DNA 也被用作 FISH 探针标记大麦和黑麦染色体悬浮液中的特异染色体 (Ma et al., 2005), 这表明 rDNA-FISH 方法在染色体的筛选和分拣上有很大的应用前景。

2 通过重复序列 FISH 揭示芸薹属基因组结构特异性

串联 (卫星) 重复序列和转座子构成了植物基因组 DNA 的大部分, 对维持染色体结构十分重要。在芸薹属基因组中, 串联重复主要分布于染色体的异染色质区, 包括着丝点、近着丝点以及端粒区, 而转座子片段也主要集中在这些区域, 少量分布在大块常染色质的染色体臂。FISH 技术是鉴定芸薹属各类重复序列在基因组广泛分布模式的有用工具。

植物着丝点包含多种反转录转座子和 100 ~ 200 bp 短基元卫星重复。着丝点卫星序列在基因组中进化快速。除核糖体 RNA 基因外, CentBr1 和 CentBr2 是两个在白菜上较早被鉴定的串联重复,

包含着 176 bp 的卫星重复基元 (Lim et al., 2005, 2007), FISH 分析表明二者分别位于白菜的 8 对和 2 对染色体的近着丝点处 (Lim et al., 2005)。CentBr1 和 CentBr2 在甘蓝上也被发现, 前者位于所有的染色体, 后者至少位于 5 对染色体, 但在黑芥的基因组中均未被检测到; 在埃塞俄比亚芥、芥菜和甘蓝型油菜 3 个复合二倍体中也仅在其供体 A 和 C 基因组的染色体上被检测到 (Lim et al., 2007)。在黑芥上, Schelfhout 等 (2004) 发现 1 个 329 bp 的串联重复特异定位在 B 基因组染色体着丝粒区, 并进一步证实该串联重复在芥菜上也只位于 16 条 B 染色体。着丝点卫星序列的基因组特异性进一步揭示了 A 和 C 基因组相对于 B 基因组有更近的亲缘关系。

FISH 研究也揭示了不同种类的反转录转座子对染色体组织有重要作用。Ty1-copia-type 和 Ty3-gypsy-type 是广泛存在于植物基因组中的反转录转座子元件, 其存在有助于产生物种基因组大小的极大变异。芸薹属着丝粒反转录转座子 (centromere retrotransposon of *Brassica*, CRBs) 是该属 6 个种所有染色体着丝粒的主要组成之一。Alix 等 (2005) 分析了 2 个 Ty1-copia-type 和 1 个 Ty3-gypsy-type 反转录转座子在甘蓝基因组中的分布, 其中 1 个 Ty1-copia 探针沿着染色体全长有一些间质性聚集杂交, 而另一个 Ty1-copia 片段和 Ty3-gypsy 探针及 1 个 Athila-like gypsy 片段沿着整个染色体杂交, 并在近着丝点区域产生强烈的杂交信号。白菜近着丝粒反转录转座子 (peri-centromere retrotransposon of *Brassica rapa*, PCRBr) 的 Ty3-gypsy-type 片段定位在白菜 3 对染色体上, 是 A 基因组特有的, 在 B 和 C 基因组中缺失; 但在 3 个异源四倍体中, PCRBr 探针被杂交到 B 和 C 基因组染色体上 (Lim et al., 2007)。Bot1 是在甘蓝基因组内特异扩增的转座子, 在白菜基因组中没有扩增; 在甘蓝型油菜基因组中, Bot1 作为 FISH 探针标记了 C 基因组的 18 条染色体, 但与白菜来源的染色体亦有较弱的杂交信号 (Alix et al., 2008)。目前甘蓝 1 个包含 Bot1 的 BAC 克隆被标记为 FISH 探针广泛应用于 A、C 基因组的区分研究中 (Leflon et al., 2006; Nicolas et al., 2009; Szadkowski et al., 2011)。

相对于近着丝粒区域, 芸薹属作物染色体末端端粒部分的研究较少。除了拟南芥类型的端粒序列, 只有 dos Santos 等 (2007) 从甘蓝基因组中分离了 1 个端粒类似重复 (克隆 pBo1.6), FISH 结果表明该重复定位在甘蓝所有染色体端粒和/或亚端粒的间隙区域, 是 C 基因组特有的, 在白菜染色体上没有检测到杂交信号; 但在甘蓝型油菜中克隆 pBo1.6 标记了 C 基因组的所有染色体和 A 基因组的 6 条染色体。

3 利用 GISH 分析芸薹属杂交种和多倍体的基因组组成

基因组特异的重复片段被广泛用于植物细胞遗传和系统发育分析。基因组原位杂交 (genome *in situ* hybridization, GISH), 是 FISH 的一种衍生技术, 在植物细胞学和细胞遗传学研究中也是一个通用的工具。在 GISH 试验中, 一个亲本/物种的基因组 DNA (genome DNA, gDNA) 被标记做探针, 另一个亲本/物种的过量 gDNA 或丰富的重复 DNA 片段 (*Cot-1* DNA) 做封阻, 然后与靶染色体进行原位杂交; 或是两个亲本 gDNA 同时被分别标记, 然后杂交, 不进行额外的封阻。GISH 能够直观显示和比较不同材料的染色体或基因组差异, 能够分析异源 (部分异源) 多倍体、种间杂交种、单倍体、渐渗系以及重组染色体的特征。

芸薹属 3 个重要的物种埃塞俄比亚芥、芥菜和甘蓝型油菜均为异源四倍体, GISH 已被较多地用于区分这 3 个种和它们衍生物的亲本基因组或单个染色体。3 个亲本基因组 A、B、C 在埃塞俄比亚芥和芥菜基因组中被鉴定 (Snowdon et al., 1997; Hasterok et al., 2005; Maluszynska & Hasterok, 2005; Hong & Li, 2007; 杨续蕊 等, 2013), 由于甘蓝 (CC) 和白菜 (AA) 较近的亲缘关系, 甘蓝型油菜的供体基因组先前并未被清楚地区分。近来, Howell 等 (2008)、Howell 和 Armstrong (2013)

使用标记的甘蓝 gDNA 做探针和未标记的过量白菜 gDNA 进行封阻,对甘蓝型油菜的 C 基因组进行了精确鉴定。许多研究者曾揭示了白菜 gDNA 探针标签具有空间局限性,在白菜和甘蓝染色均只标记近着丝点区域;与此相反,甘蓝 gDNA 标记则较均匀地分布在 C 基因组染色体(鄯丽娟 等, 2007; 顾爱侠 等, 2008; Howell et al., 2008)。两个基因组探针不同的标记效率表明甘蓝染色体比白菜染色体包含有较多的、均等分布的基因组特异重复序列。根据甘蓝 gDNA 探针标记的特点, Howell 等(2008)利用甘蓝特异的 BAC 克隆探针进行 FISH, 然后顺次进行甘蓝 gDNA 的原位杂交, 检测出了甘蓝型油菜 A7 和 C6 染色体间的 1 个相互易位。

除了芸薹属种内的研究, GISH 也被广泛用于鉴定芸薹属物种与其他十字花科物种的种间杂种和异附加系, 如海甘蓝、白芥、萝卜、诸葛菜等(Wang et al., 2006; Wei et al., 2006; Akaba et al., 2009; Lim et al., 2012)。但由于包括芸薹属在内的十字花科物种均具有较小的基因组和相对低含量的基因组特异重复片段(Lysak et al., 2009), GISH 在芸薹属作物细胞遗传学中的应用非常有限。

4 BAC-FISH 在芸薹属作物图谱整合和基因定位中的应用

由于受 FISH 分辨率和灵敏度的限制, 单/低拷贝的功能基因序列做探针直接原位杂交进行定位是很困难甚至是不可行的。随着植物基因组学研究的不断发展, 尤其是大片段基因组文库(如 BAC 文库)的构建, 根据目的基因或片段已知序列设计特异引物, 用以筛选 BAC 文库获得阳性 BAC 克隆, 将小的目的片段转换成 BAC 克隆, 以此做探针, 极大地提高了 FISH 信号的检出率。目前 BAC-FISH 技术被广泛应用于动植物基因组学研究中, 为现代遗传学研究提供了新的方法。

在芸薹属中, 甘蓝、白菜和甘蓝型油菜这 3 个物种的 BAC 文库被构建和利用, 这些物种染色体结构的特异性(重复序列主要分布在异染色质区)促进了 BAC-FISH 技术的建立。2 个二倍体物种的 BAC 克隆已被用于细胞遗传学标记, 促进了甘蓝和白菜染色体的鉴定。Howell 等(2002)首先使用 BAC-FISH 技术, 以代表甘蓝 9 条染色体 19 个位点的 22 个探针整合了 C 基因组遗传连锁图谱和细胞遗传图谱; 并使用甘蓝染色体特异的 BAC 克隆进行 FISH, 然后顺次进行 GISH 试验, 鉴定了 A7 和 C6 染色体间的相互易位(Howell et al., 2008)。

在白菜基因组计划中, 利用 FISH 作图技术, 一些特异的 BACs 已定位在相应的染色体上(Yang et al., 2005, 2006b; Lim et al., 2006; Park et al., 2009)。Kim 等(2009)建立了锚定于国际白菜遗传参考图谱上 SSR 标记的 BACs-FISH 核型。Xiong 等(2010)在白菜上首次使用多色 FISH cocktail 技术, 利用 16 个 BAC 克隆的混合探针(cocktail probes)整合了白菜 A7 染色体的遗传图谱、物理图谱和细胞遗传图谱, 并将白菜的 16 个 BAC 探针应用于甘蓝和甘蓝型油菜。Xiong 和 Pires(2011)利用来自白菜的 BAC 探针构建了白菜和甘蓝的分子细胞遗传核型, 鉴别了甘蓝型油菜 A 和 C 基因组的具体染色体和基因组间染色体的部分同源性。Heneen 等(2012)利用 rDNA、着丝粒重复、白菜 BAC 克隆、甘蓝染色体特异 BAC 克隆等系列探针, 鉴定了白菜—芥蓝单体异附加系的 C 基因组染色体, 并揭示了 C 基因组染色体和连锁群的对应关系以及与 A 基因组染色体的部分同源性。

此外, 利用 BAC-FISH 技术也可以进行染色体常染色质和异染色质边界的识别, 估测常、异染色质基因组的大小。Mun 等(2009)通过对 100 多个 BAC 克隆的 FISH 定位分析, 揭示了所有富含基因的 BAC 克隆均位于基因组的常染色质区域, 其基因组的大小约为 $400 \sim 500 \text{ kb} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ 。

5 利用比较染色体涂染(CCP)揭示芸薹属物种的进化

BAC-FISH 通常是指单个或几个 BAC 克隆的原位杂交, 而染色体涂染(chromosome painting,

CP) 常被应用于大染色体区段的可视化作图, 如使用重叠的连续序列或非重叠的 BACs 或 BAC contigs 组成 pools 探针在染色体臂或整个染色体进行 FISH。比较染色体涂染 (comparative chromosome painting, CCP) 可以进行相关物种的基因组比较, 鉴定组间染色体的部分同源性、染色体重排以及基因含量和基因排序上的相似性 (Ziolkowski et al., 2006; Lysak et al., 2010)。

在芸薹属细胞遗传研究中, 拟南芥的 BACs 和 BAC contigs 被广泛用于芸薹属物种染色体 FISH, 通过大范围的 CCP 揭示了拟南芥与芸薹属基因组部分同源的染色体区域, 促进了芸薹属物种 BACs 的染色体登陆 (chromosome landing) 和细胞遗传图谱的构建, 并从结果分析中获得大量关于核型和整个基因组进化历程有价值的信息。如, Jackson 等 (2000) 将拟南芥 2 号染色体上 1 个包含 6 个 BACs 长 431 kb 的 contig 定位在白菜 DNA 纤维 (DNA fibers) 和 4~6 条中期染色体上。Ziolkowski 和 Sadowski (2002)、Howell 等 (2005) 在甘蓝上也观察到拟南芥 BAC 克隆与多条染色体有杂交信号。Lysak 等 (2005) 发现芸薹属大部分物种拥有 3 个或 6 个拟南芥 contig 部分的同源拷贝。以上研究表明芸薹属物种在与拟南芥分化后的进化过程中整个基因组发生了三倍化。与进化分析相一致, 拟南芥 BACs 跨物种 FISH 揭示的染色体部分同源, 也支持整个十字花科起源于一个共同的六倍体祖先的观点 (Lysak et al., 2005, 2007; Ziolkowski et al., 2006)。

6 使用 DNA combing 和 EDFs-FISH 进行定量分析和高分辨率作图

在植物中, FISH 的分辨率在细胞分裂中期染色体仅为 5~10 Mb, 在粗线期染色体为 1.2 Mb, 在间期核为 100 kb (de Jong et al., 1999)。分辨率的大小与染色质浓缩程度、基因组大小、细胞分裂时期、细胞类型、异染色质化程度有关。两个紧密相连的靶位点序列将在染色体或细胞核中显示重叠的 FISH 信号。利用高分辨率的 FISH 直观地进行基因作图在基因研究中是一种重要的技术。

DNA combing 在植物中是一个用于高分辨率测量的有用技术。使用一个已知长度的 BAC 克隆和一个标准的长度可以将数字化测量的距离转化为 DNA 千碱基对的长度。使用这种方法, 在环形 BAC 分子上可以直接测量小到 2 kb 长度的植物 DNA 片段。在芸薹属物种中, 自交不亲和性受 1 个具有多重等位基因的 *S* 位点调控, 该 *S* 位点长几百 kb, 包含几种基因, 如 *SLG* 和 *SRK*。1 个包含 *SLG* 和 *SRK* 基因的 76 kb 的 PAC 克隆片段被用来直接观察 *S* 位点的基因序列。Suzuki 等 (1999) 使用 DNA combing 和 FISH 证明 *SLG* 和 *SRK* 荧光信号在克隆上的位置与限制性酶切图谱的位置一至。

伸展的 DNA 纤维 FISH (FISH on extend DNA fibers, EDFs-FISH) 提供了一个比其他 FISH 具有更高空间分辨能力的方法。该技术几乎是在裸露的 DNA 双链上进行的, 分辨率大大提高, 可以达到 2~3.29 kb, 检测的灵敏度提高到可以检测小于 1 kb 的探针。因此可以用来进行定量分析, 精确估计重复序列的拷贝数和靶核苷酸序列的物理长度 (Fransz et al., 1996; Jiang & Gill, 2006)。如, 利用 EDFs-FISH 技术, 王永等 (2009) 和 Li 等 (2012) 分别估测了 5S rDNA 在甘蓝基因组和 25S rDNA 在大白菜基因组中的物理长度和拷贝数。Yang 等 (2006a) 测量了 *S* 位点相关基因 *SRK* 和 *SPII* 相距约为 1 μm , 获得了局部最高为 4 kb 的空间分辨率。

EDFs-FISH 技术还可以用于 DNA 序列在染色体上的组装排序。如 Park 等 (2005) 利用有丝分裂和减数分裂染色体以及 DNA 纤维通过 FISH 组装了大白菜 BAC contigs, 分析了大白菜对应于拟南芥 4 号染色体 1 个富含基因的 222 kb 片段区域的保守性和微观共线性, 揭示了大白菜基因组的三倍化和染色体重排。

7 结论

FISH 技术的灵敏度和分辨率自 20 年前被建立以来已经有了很大改善,是当前植物细胞学和生物学研究的主要技术之一。FISH 技术为芸薹属遗传学和染色体的研究提供了一个强有力的工具,使其进入了一个新阶段。随着国际芸薹属基因组测序计划的进展,累积的序列数据和功能基因数据分析逐渐在包括芸薹属物种在内的十字花科植物起源进化以及亲缘关系研究中占据优势 (Franzke et al., 2011; Cheng et al., 2013)。然而, FISH 作为一项直观的可视化作图技术,将依然在芸薹属物种染色体配对、部分同源重组研究以及依赖于染色体鉴定的育种技术方面有着重要的应用前景。

此外, FISH 灵敏度的改善也正在引领 FISH 技术进入新的阶段,利用 FISH 结合染色质免疫沉淀和免疫染色检测 DNA - 蛋白质互作 (Wang et al., 2011; Amoah et al., 2012; Qiu et al., 2012), 利用 3D (three-dimensional) - FISH 技术揭示植物间期核的典型形态、结构和空间组织 (Gué et al., 2006), 使用绿色或红色荧光蛋白的荧光技术 (如 GFP 和 DsRed) 研究植物活体细胞动力学 (Ohmido et al., 2008; Tirichine et al., 2009)。这些技术将对芸薹属植物的遗传学研究和表观遗传学研究提供巨大帮助。

References

- Akaba M, Kaneko Y, Ito Y, Nakata Y, Bang S W, Matsuzawa Y. 2009. Production and characterization of *Brassica napus* - *Raphanus sativus* monosomic addition lines mediated by the synthetic amphidiploid "*Raphanobrassica*". *Breeding Science*, 59: 109 - 118.
- Ali H B, Lysak M A, Schubert I. 2005. Chromosomal localization of rDNA in the Brassicaceae. *Genome*, 48: 341 - 346.
- Alix K, Joets J, Ryder C D, Moore J, Barker G C, Bailey J P, King G J, Heslop-Harrison J S. 2008. CACTA transposon *Bot1* played a major role in *Brassica* genome divergence and gene proliferation. *Plant J*, 56: 1030 - 1044.
- Alix K, Ryder C, Moore J, King G J, Heslop-Harrison J S. 2005. The genomic organization of retrotransposons in *Brassica oleracea*. *Plant Mol Biol*, 59: 839 - 851.
- Amoah S, Kurup S, Lopez C M R L, Welham S J, Powers S J, Hopkins C J, Wilkinson M J, King G J. 2012. A hypomethylated population of *Brassica rapa* for forward and reverse Epi-genetics. *MC Plant Biology*, 12: 193.
- Cheng F, Mandáková T, Wu J, Xie Q, Lysak M A, Wang X W. 2013. Deciphering the diploid ancestral genome of the mesohexaploid *Brassica rapa*. *The Plant Cell*, 25 (5): 1541 - 1554.
- de Jong H. 2003. Visualizing DNA domains and sequences by microscopy: A fifty-year history of molecular cytogenetics. *Genome*, 46: 943 - 946.
- de Jong H, Fransz P, Zabel P. 1999. High resolution FISH in plants-techniques and applications. *Trends Plant Sci*, 4: 258 - 263.
- dos Santos K G B, Becker H C, Ecke W, Bellin U. 2007. Molecular characterisation and chromosomal localisation of a telomere-like repetitive DNA sequence highly enriched in the C genome of *Brassica*. *Cytogenet Genome Res*, 119: 147 - 153.
- Fahey J, Talalay P. 1995. The role of crucifers in cancer chemoprotection. In: *Phytochemicals and Health* (Eds. Gustine D L, Florens H E). American Society of Plant Physiologists, Rockvill, Md, USA, 87 - 93.
- Figueroa D, Bass H W. 2012. Development of pachytene FISH maps for six maize chromosomes and their integration with other maize maps for insights into genome structure variation. *Chromosome Res*, 20: 363 - 380.
- Fransz P, Alonso-Blanco C, Liharska T, Peeters A J M, Zabel P, de Jong H. 1996. High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibers. *Plant J*, 9: 421 - 430.
- Franzke A, Lysak M A, Al-Shehbaz I A, Koch M A, Mummenhoff K. 2011. Cabbage family affairs: The evolutionary history of Brassicaceae. *Trends Plant Sci*, 16: 108 - 116.
- Fukui K, Nakayama S, Ohmido N, Yoshiaki H, Yamabe M. 1998. Quantitative karyotyping of three diploid *Brassica* species by imaging methods and localization of 45S rDNA loci on the identified chromosomes. *Theor Appl Genet*, 96: 325 - 330.
- Gu Ai-xia, Zhao Yu-jing, Qie Li-juan, Xuan Shu-xin, Wang Yan-hua, Shen Shu-xing. 2008. Production and SSR identification and GISH analysis of interspecific hybrids between diploid Chinese cabbage and tetraploid cabbage. *Journal of Plant Genetic Resources*, 9 (2): 144 - 150. (in

Chinese)

顾爱侠, 赵玉靖, 鄱丽娟, 轩淑欣, 王彦华, 申书兴. 2008. 二倍体大白菜与四倍体结球甘蓝杂种的获得及其 SSR 鉴定与 GISH 分析. 植物遗传资源学报, 9 (2): 144 - 150.

- Gué M, Sun J S, Boudier T. 2006. Simultaneous localization of MLL, AF4 and ENL genes in interphase nuclei by 3D-FISH: MLL translocation revisited. BMC Cancer, 6: 20.
- Hasterok R, Jenkins G, Langdon T, Jones R N, Maluszynska J. 2001. Ribosomal DNA is an effective marker of *Brassica* chromosomes. Theor Appl Genet, 103: 486 - 490.
- Hasterok R, Ksiaczek T, Wolny E, Maluszynska J. 2005. FISH and GISH analysis of *Brassica* genomes. Acta Biol Cracov Bot, 47: 185 - 192.
- Hasterok R, Wolny E, Hosiawa M, Kowalczyk M, Kulak-Ksiaczek S, Ksiaczek T, Heneen W K, Maluszynska J. 2006. Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. Annals of Botany, 97: 205 - 216.
- Heneen W K, Geleta M, Brismar K, Xiong Z Y, Pires J C, Hasterok R, Stoute A I, Scott R J, King G J, Kurup S. 2012. Seed colour loci, homoeology and linkage groups of the C genome chromosomes revealed in *Brassica rapa* - *B. oleracea* monosomic alien addition lines. Annals of Botany, 109: 1227 - 1242.
- Hong X, Li Z Y. 2007. Intra- and intergenomic homology of B-genome chromosomes in trigonemic combinations of the cultivated *Brassica* species revealed by GISH analysis. Chromosome Research, 15: 849 - 861.
- Howell E C, Armstrong S. 2013. Using sequential fluorescence and genomic in situ hybridization (FISH and GISH) to distinguish the A and C genomes in *Brassica napus*. Methods Mol Biol, 990: 25 - 34.
- Howell E C, Armstrong S, Barker G C, Jones G H, King G J, Ryder C D, Kearsey M J. 2005. Physical organization of the major duplication on *Brassica oleracea* chromosome O6 revealed through fluorescence *in situ* hybridization with *Arabidopsis* and *Brassica* BAC probes. Genome, 48: 1093 - 1103.
- Howell E C, Barker G C, Jones G H, Kearsey M J, King G J, Kop E P, Ryder C D, Teakle G R, Vicente J G, Armstrong S J. 2002. Integration of the cytogenetic and genetic linkage maps of *Brassica oleracea*. Genetics, 161: 1225 - 1234.
- Howell E C, Kearsey M J, Jones G H, King G J, Armstrong S J. 2008. A and C genome distinction and chromosome identification in *Brassica napus* by sequential FISH and GISH. Genetics, 180: 1849 - 1857.
- Iovene M, Cavagnaro P F, Senalik D, Buell C R, Jiang J M, Simon P W. 2011. Comparative FISH mapping of *Daucus* species (Apiaceae family). Chromosome Res, 19: 493 - 506.
- Jackson S A, Cheng Z K, Wang M L, Goodman H M, Jiang J M. 2000. Comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping of a 431 kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplications in the expansion of the *Brassica rapa* genome. Genetics, 156: 833 - 838.
- Jiang J, Gill B S. 2006. Current status and the future of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in plant genome research. Genome, 49: 1057 - 1068.
- Karpechenko G D. 1922. The number of chromosomes and the genetic correlation of cultivated Cruciferae. Bull Appl Bot Genet Plant Breed, 13: 3 - 14.
- Kim H, Choi S R, Bae J, Hong C P, Lee S Y, Hossain M J, Van Nguyen D, Jin M, Park B S, Bang J W, Bancroft I, Lim Y P. 2009. Sequenced BAC anchored reference genetic map that reconciles the ten individual chromosomes of *Brassica rapa*. BMC Genomics, 10: 432.
- Koo D H, Plaha P, Lim Y P, Hur Y K, Bang J W. 2004. A high-resolution karyotype of *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* revealed by pachytene analysis and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. Theor Appl Genet, 109: 1346 - 1352.
- Kulak S, Hasterok R, Maluszynska J. 2002. Karyotyping of *Brassica* amphidiploids using 5S and 25S rDNA as chromosome markers. Hereditas, 136: 144 - 150.
- Labana K S, Gupta M L. 1993. Importance and origin// Labana K S, Banga S S, Banga S K. Breeding Oilseed Brassicas. Berlin: Springer-Verlag: 1 - 20.
- Leflon M, Eber F, Letanneur J C, Chelysheva L, Coriton O, Huteau V, Ryder C D, Barker G, Jenczewski E, Chèvre A M. 2006. Pairing and recombination at meiosis of *Brassica rapa* (AA) × *Brassica napus* (AACC) hybrids. Theor Appl Genet, 113: 1467 - 1480.
- Li J H, Wang Y H, Li X F, Shen S X, Xuan S X. 2012. Study on preparation and detection of Chinese cabbage extended DNA fibers. Agricultural Science & Technology, 13 (3): 517 - 519.
- Lim K B, de Jong H, Yang T J, Park J Y, Kwon S J, Kim J S, Lim M H, Kim J A, Jin M, Jin Y M, Kim S H, Lim Y P, Bang J W, Kim H

- I, Park B S. 2005. Characterization of rDNAs and tandem repeats in the heterochromatin of *Brassica rapa*. *Molecules and Cells*, 19 (3): 436 - 444.
- Lim K B, Yang T J, Hwang Y J, Park J Y, Kwon S J, Kim J, Choi B S, Lim M H, Jin M, Kim H I, de Jong H, Bancroft I, Lim Y, Park B S. 2007. Characterization of the centromere and peri-centromere retrotransposons in *Brassica rapa* and their distribution in related *Brassica* species. *The Plant Journal*, 49 (2): 173 - 183.
- Lim S J, Lee S S, Bang J W. 2012. Karyotype and genomic *in situ* hybridization pattern in \times *Brassicoraphanus*, an intergeneric hybrid between *Brassica campestris* ssp. *pekinensis* and *Raphanus sativus*. *Plant Biotechnol Rep*, 6: 107 - 112.
- Lim Y P, Plaha P, Choi S R, Uhm T, Hong C P, Bang J W, Hur Y K. 2006. Toward unraveling the structure of *Brassica rapa* genome. *Physiol Plant*, 126: 585 - 591.
- Lysak M A, Cheung K, Kitschke M, Bureš P. 2007. Ancestral chromosomal blocks are triplicated in Brassicaceae species with varying chromosome number and genome size. *Plant Physiol*, 145: 402 - 410.
- Lysak M A, Koch M A, Beaulieu J M, Meister A, Leitch I J. 2009. The dynamic ups and downs of genome size evolution in Brassicaceae. *Mol Biol Evol*, 26: 85 - 98.
- Lysak M A, Koch M A, Pecinka A, Schubert I. 2005. Chromosome triplication found across the tribe Brassicaceae. *Genome Res*, 15: 516 - 525.
- Lysak M A, Mandáková T, Lacombe E. 2010. Reciprocal and multi-species chromosome BAC painting in crucifers (Brassicaceae). *Cytogenet Genome Res*, 129: 184 - 189.
- Ma Y, Lee J H, Li L C, Uchiyama S, Ohmido N, Fukui K. 2005. Fluorescent labeling of plant chromosomes in suspension by FISH. *Genes Genet Syst*, 80: 35 - 39.
- Maluszynska J, Hasterok R. 2005. Identification of individual chromosomes and parental genomes in *Brassica juncea* using GISH and FISH. *Cytogenet Genome Res*, 109: 310 - 314.
- Maluszynska J, Heslop-Harrison J S. 1993. Physical mapping of rDNA loci in *Brassica* species. *Genome*, 36: 774 - 781.
- Mun J H, Kwon S J, Yang T J, Seol Y J, Jin M, Kim J A, Lim M H, Kim J S, Baek S, Choi B S, Yu H J, Kim D S, Kim N, Lim K B, Lee S I, Hahn J H, Lim Y P, Bancroft I, Park B S. 2009. Genome-wide comparative analysis of the *Brassica rapa* gene space reveals genome shrinkage and differential loss of duplication events after whole genome triplication. *Genome Biol*, 10: doi: 10.1186/gb-2009-10-10-r111.
- Nicolas S D, Leflon M, Monod H, Eber F, Coriton O, Huteau V, Chevre A M, Jenczewski E. 2009. Genetic regulation of meiotic cross-overs between related genomes in *Brassica napus* haploids and hybrids. *Plant Cell*, 21: 373 - 385.
- Ohmido N, Wako T, Fukui K. 2008. Nuclear organization analyzed by visualization. *The Nucleus*, 50: 473 - 489.
- Park J Y, Koo D H, Hong C P, Lee S J, Jeon J W, Lee S H, Yun P Y, Park B S, Kim H R, Bang J W, Plaha P, Bancroft I, Lim Y P. 2005. Physical mapping and microsynteny of *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* genome corresponding to a 222 kbp gene-rich region of *Arabidopsis* chromosome 4 and partially duplicated on chromosome 5. *Mol Genet Genomics*, 274: 579 - 588.
- Park J Y, Kwon S J, Choi B S, Lim K B, Hwang Y J, Kim J A, Lim Y P, Park B S, Yang T J. 2009. In silico-selection of *Brassica rapa* organelle genome-derived BACs using their end sequences and sequence level comparative analysis of the 124 kb mitochondrial genome sequences in the family Brassicaceae. *J Crop Sci Biotech*, 12 (4) : 207 - 215.
- Qie Li-juan, Shen Shu-xing, Xuan Shu-xin, Wang Yan-hua, Chen Xue-ping, Zhang Cheng-he, Li Xiao-feng, Luo Shuang-xia. 2007. Karyotype analysis of Chinese cabbage and cabbage by genome *in situ* hybridization. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (6): 1459 - 1464. (in Chinese)
- 郗丽娟, 申书兴, 轩淑欣, 王彦华, 陈雪平, 张成合, 李晓峰, 罗双霞. 2007. 大白菜和结球甘蓝基因组原位杂交及核型分析. *园艺学报*, 34 (6): 1459 - 1464
- Qiu Z M, Zhang L, Hu Y, He S B, Li L J. 2012. The acetylation level of rDNA in *Brassica campestris*. *J Plant Biol*, 55: 298 - 302.
- Razis A F A, Noor N M. 2013. Cruciferous vegetables: Dietary phytochemicals for cancer prevention. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 14 (3): 1565 - 1570.
- Schelfhout C I, Snowdon R, Cowling W A, Wroth I M. 2004. A PCR based B-genome-specific marker in *Brassica* species. *Theor Appl Genet*, 109 (5): 917 - 921.
- Snowdon R J, Friedrich T, Friedt W, Köhler W. 2002. Identifying the chromosomes of the A- and C-genome diploid *Brassica* species *B. rapa* (syn. *Campestris*) and *B. oleracea* in their amphidiploid *B. napus*. *Theor Appl Genet*, 104: 533 - 538.
- Snowdon R J, Köhler W, Friedt W, Köhler A. 1997. Genomic *in situ* hybridization in *Brassica* amphidiploids and interspecific hybrids. *Theor Appl*

- Genet, 95: 1320 - 1324.
- Suzuki G, Kai N, Hirose T, Fukui K, Nishio T, Takayama S, Isogai A, Watanabe M, Hinata K. 1999. Genomic organization of the *S* locus: Identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of *S*⁹ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *Rapa*). *Genetics*, 153: 391 - 400.
- Szadkowski E, Eber F, Huteau V, Lode M, Coriton O, Jenczewski E, Chevre A M. 2011. Polyploid formation pathways have an impact on genetic rearrangements in resynthesized *Brassica napus*. *New Phytol*, 191: 884 - 894.
- Szinay D, Wijinker E, van den Berg R, Visser R G F, de Jong H, Bai Y L. 2012. Chromosome evolution in *Solanum* traced by cross-species BAC-FISH. *New Phytologist*, 195 (3): 688 - 698.
- Takamine N. 1916. Über die ruhenden und die präsynaptischen Phasen der Reduktionsteilung. *Bot Mag*, 30: 293 - 303.
- Tirichine L, Andrey P, Biot E, Maurin Y, Gaudin V. 2009. 3D fluorescent *in situ* hybridization using *Arabidopsis* leaf cryosections and isolated nuclei. *Plant Methods*, 5: 11.
- Wang G X, He Q Y, Liu F, Cheng Z K, Talbert P B, Jin W W. 2011. Characterization of *CENH3* proteins and centromere-associated DNA sequences in diploid and allotetraploid *Brassica* species. *Chromosoma*, 120: 353 - 365.
- Wang Y P, Sonntag K, Rudloff E, Wehling P, Snowdon R J. 2006. GISH analysis of disomic *Brassica napus* - *Crambe abyssinica* chromosome addition lines produced by microspore culture from monosomic addition lines. *Plant Cell Rep*, 25: 35 - 40.
- Wang Yong, Zhu Li-quan, Rong Xiao-ying, Chen Xiao-dan, Tang Zhang-lin, Wang Xiao-jia. 2009. Study on high-resolution 5S rDNA-FISH of *Brassica oleracea* chromosome 2. *Scientia Agricultura Sinica*, 42 (12): 4294 - 4300. (in Chinese)
- 王 永, 朱利泉, 荣小营, 陈晓丹, 唐章林, 王小佳. 2009. 甘蓝 2 号染色体的高分辨率 5S rDNA 荧光原位杂交. *中国农业科学*, 42 (12): 4294 - 4300.
- Wei W H, Zhang S F, Li J, Wang L J, Chen B, Fang X P, Wang Z, Luo L X. 2006. Analysis of F₁ hybrid and BC₁ monosomic alien addition line plants from *Brassica oleracea* × *Sinapis alba* by GISH. *Chinese Science Bulletin*, 51 (23): 2872 - 2877.
- Xiong Z, Kim J S, Pires J C. 2010. Integration of genetic, physical, and cytogenetic maps for *Brassica rapa* chromosomes A7. *Cytogenet Genome Res*, 129: 190 - 198.
- Xiong Z, Pires J C. 2011. Karyotype and identification of all homoeologous chromosomes of allopolyploid *Brassica napus* and its diploid progenitors. *Genetics*, 187: 37 - 49
- Xuan Shu-xin, Shen Shu-xing, Zhao Jian-jun, Zhang Cheng-he, Chen Xue-ping, Qie Li-juan. 2007. Location of 25S rDNA and 5S rDNA in Chinese cabbage-pe-tsai metaphase chromosome. *Scientia Agricultura Sinica*, 40 (4): 782 - 787. (in Chinese)
- 轩淑欣, 申书兴, 赵建军, 张成合, 陈雪平, 鄯丽娟. 2007. 25S rDNA 和 5S rDNA 在大白菜中期染色体上的 FISH 定位. *中国农业科学*, 40 (4): 782 - 787.
- Yang K, Qi H Y, Zhu L Q, Wang X J. 2006a. Localization of *S* genes on extended DNA fibers (EDFs) in *Brassica oleracea* by high-resolution FISH. *Acta Genetica Sinica*, 33 (3): 277 - 284.
- Yang T J, Kim J S, Kwon S J, Lim K B, Choi B S, Kim J A, Jin M, Park J Y, Lim M H, Kim H I, Lim Y P, Kang J J, Hong J H, Kim C B, Bhak J, Bancroft I, Park B S. 2006b. Sequence-level analysis of the diploidization process in the triplicated *FLOWERING LOCUS C* region of *Brassica rapa*. *Plant Cell*, 18: 1339 - 1347.
- Yang T J, Kim J S, Lim K B, Kwon S J, Kim J A, Jin M, Young J P, Lim M H, Kim H I, Kim S H, Lim Y P, Park B S. 2005. The Korea *Brassica* genome project: A glimpse of the *Brassica* genome based on comparative genome analysis with *Arabidopsis*. *Compar Funct Genom*, 6: 138 - 146.
- Yang Xu-rui, Li Qin-fei, Ge Xian-hong, Li Zai-yun, Qian Wei. 2013. GISH analysis of interspecific hybrid between *Brassica juncea* and *B. carinata*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 14 (2): 329 - 333. (in Chinese)
- 杨续蕊, 李勤菲, 葛贤宏, 李再云, 钱 伟. 2013. 芥菜型油菜与埃塞俄比亚芥杂种基因组原位杂交分析. *植物遗传资源学报*, 14 (2): 329 - 333.
- Ziolkowski P A, Kaczmarek M, Babula D, Sadowski J. 2006. Genome evolution in *Arabidopsis/Brassica*: conservation and divergence of ancient rearranged segments and their breakpoints. *Plant J*, 63 - 74.
- Ziolkowski P A, Sadowski J. 2002. FISH-mapping of rDNAs and *Arabidopsis* BACs on pachytene complements of selected *Brassicacae*. *Genome*, 45: 189 - 197.