

# 向日葵染色体 Giemsa C-分带研究

高 猛<sup>1,2</sup>, 安玉麟<sup>2</sup>, 孙瑞芬<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019; <sup>2</sup> 内蒙古农牧业科学院生物技术中心, 呼和浩特 010031)

**摘要:** 采用 HKG (HCl-KOH-Giemsa) 法对内蒙杂 3 号三交种染色体进行了 C-分带研究和分析。结果表明: 每条染色体至少都有一条 C-分带, 染色体组共有 62 条 C-分带, 以中间带和着丝点带为主, 中间带主要分布在染色体短臂上; C-分带强弱差异明显, 其中 46 条强带, 16 条弱带。Giemsa C-分带带型公式为:  $2n = 2x = 34 = 8I_+ + 3T_+ + 5I + I^+T_+ + 4C + 2CI + 4CI^+ + 3CI_+ + I^+T^+ + CT^+ + 2CT_+$ 。每条染色体都显示出显著的带纹特征, 因此, 利用 Giemsa C-分带方法可以将向日葵的每条染色体区分开。

**关键词:** 向日葵 (*Helianthus annuus* L.); 染色体; Giemsa C-分带

## Giemsa C-banding Patterns Analysis of Sunflower Chromosomes

GAO Meng<sup>1,2</sup>, AN Yu-lin<sup>2</sup>, SUN Rui-fen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Agronomy, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010019;

<sup>2</sup> Biotechnology Research Center, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031)

**Abstract:** In this paper, the HKG (HCl-KOH-Giemsa) method studied and analysed the C-banding of chromosomes in triple cross of Inner Mongolia Hybrid oil sunflower 3. The results showed that every chromosome had at least one C-band and there were 62 C-bands on the chromosome pairs, most of them were centromeric and inter-bands, and the interbands were mainly distributed on the short arms; C-band intensity were different, 46 were strong and 16 were weak. The C-bands formula was  $2n = 2x = 34 = 8I_+ + 3T_+ + 5I + I^+T_+ + 4C + 2CI + 4CI^+ + 3CI_+ + I^+T^+ + CT^+ + 2CT_+$ . Each chromosome had its own unique band pattern distinguishable from all the others, so each chromosome of sunflower can be distinguished by Giemsa C-banding.

**Key words:** Sunflower (*Helianthus annuus* L.); Chromosome; Giemsa C-band

染色体分带 (chromosome banding) 技术是 20 世纪 60 年代末发展起来的染色体研究领域的细胞学新技术, 它是通过一系列处理使染色体显示出特定的带纹, 以此作为鉴别染色体组和单个染色体以及深入认识染色体的结构、成分与功能的一种新手段<sup>[1]</sup>。

染色体分带技术中, C-分带技术应用最广, 它是显示染色体上组成型异染色质的一种方法, 已被应用在麦类<sup>[2-5]</sup>、玉米<sup>[6-7]</sup>、高粱<sup>[8]</sup>、黄瓜<sup>[9-11]</sup>、水仙<sup>[12-13]</sup>、百合<sup>[14-15]</sup>等多种植物研究上, 而在向日葵研究上的应用国外开展的工作不多, 报道很少, 国内至今尚未见到报道。本文以内蒙杂 3 号三交种为研究材料, 在闫素丽等<sup>[16]</sup>已进行的常规核型分析的基础上, 进一步进行

了染色体 Giemsa C-分带分析, 为向日葵品种鉴定、杂交育种、亲缘关系及遗传研究等提供细胞学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料内蒙杂 3 号三交种, 由内蒙古农牧业科学院向日葵课题组提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 染色体制片** 取材及材料处理按照闫素丽等<sup>[16]</sup>的方法进行。选饱满种子于温水中浸泡 2h 后均匀放于铺有湿润滤纸的培养皿中, 在 25℃ 培养室中萌发。当根长到 1.5cm 左右时, 于上午 9:30 -

收稿日期: 2011-11-23 修回日期: 2012-01-15

基金项目: 国家现代向日葵产业技术体系项目 (nycytx-1)

作者简介: 高猛, 硕士研究生, 主要研究方向为作物遗传育种。E-mail: gaozeshi2008@163.com

通信作者: 安玉麟, 研究员, 硕士生导师, 国家现代向日葵产业技术体系首席科学家。E-mail: nkanyulin@163.com

10:00 切取根尖,将根尖用 0.002mol/L 8-羟基喹啉处理 4.5h,在 Carnoy 固定液中固定 24h 后转入 70% 乙醇,4℃ 保存备用。

将处理的根尖用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗 2~3 次后吸干水分,1mol/L HCl 室温解离 10min,用 45% 醋酸压片后在相差显微镜下观察。选中期染色体分散好的制片,于 -80℃ 超低温冰箱中冷冻 12h 后揭片,并迅速进行酒精梯度脱水(70% 乙醇→95% 乙醇→100% 乙醇各 5min),脱水的制片用于分带处理。

**1.2.2 染色体 C-分带** 染色体 C-分带参考 Schrader 等<sup>[17]</sup>的 HKG(HCl-KOH-Giemsa)法。制片脱水气干后于 60℃ 1mol/L HCl 中处理 5~7min,每隔 10s 设一个梯度,蒸馏水冲洗 4 次,每次 2.5min,然后干燥过夜。再在 0.07mol/L KOH 中处理 20~120s,每 5s 为一个梯度,转入磷酸缓冲液处理 5~30s,每 5s 为一个梯度,其间不断振荡(以上操作在室温下进行)。在 2%~5% (V/V) Gimesa 染液中染色,每 0.5% 为一个梯度,染色时间 10~60min,每 5min 设一个梯度,染色后制片经蒸馏水冲洗气干,滴加二甲苯后观察,以上步骤中每个处理每次至少 15 张片子。选染色体分散好且带型清晰的中期分裂相细胞在油镜(100×)下观察并照相。

**1.2.3 染色体 C-分带分析** C-分带分析参照李懋学等<sup>[18]</sup>的方法进行,并按此法将染色体带纹的类型和分布表示出来,建立染色体 C-分带带型公式。将选好的图片用 Photoshop 软件进行处理,用闫素丽等<sup>[16]</sup>的核型分析方法对染色体配对,照片放大后进行带纹位置测量,利用所测得的结果将分带模式图在画图系统中画出。

## 2 结果与分析

### 2.1 影响染色体 C-分带的因素

**2.1.1 酸、碱变性处理时间对 C-分带的影响** 酸、碱变性时间长短是影响染色体 C-分带的关键因素之一,不同的植物材料在分带过程中对酸、碱处理的时间要求不同。本实验对分带过程中的酸、碱分别进行不同时间梯度处理,结果发现 HCl 的处理时间在 6~7min 效果最好,KOH 的处理时间在 20~60s 效果较好,超过 60s 分带效果不明显。

### 2.1.2 磷酸缓冲液复性处理时间对 C-分带的影响

染色体经酸、碱变性处理后,在磷酸缓冲液中进行复性处理。由于染色体上不同区域复性速度不同所以显示出带纹,因此制片在缓冲液中的处理时间长短也是影响分带效果的因素之一。本实验经不同时

间梯度处理后发现,缓冲液的处理时间控制在 5~15s 时分带效果最佳,过长或过短都会出现带纹不明显的现象。

**2.1.3 Giemsa 染液浓度和处理时间对 C-分带的影响** 在分带过程中,Giemsa 的浓度和处理时间也会对分带效果产生影响,本实验采用不同浓度和不同时间染液处理的对比发现,Giemsa 染液浓度在 3%~4%,染色时间在 10~15min 效果最佳,染液浓度过低和染色时间过短分带不明显,浓度过高和处理时间过长,使得染色体着色部位过多、颜色过深,不容易区分带纹。

### 2.2 Giemsa C-分带结果

分带中染色体经酸、碱、酶或高温处理后,DNA 变性双链打开,由于异染色质区的复性速度快,易与染料结合染色较深,而常染色质复性慢,结构松散染色较浅,从而在染色体上出现深浅不一的带纹(图 1),因此 C-分带揭示了染色体上的异染色质区域。镜检发现内葵杂 3 号三交种染色体数为  $2n = 2x = 34$ ,第 2 对染色体具有随体,与闫素丽等<sup>[16]</sup>的结果完全一致。利用 Photoshop 软件将 34 条染色体进行同源染色体配对,并由长到短依次排列(图 2)。从图 2 看出,每条染色体至少都有一条 C-分带;染色体组共有 62 条 C-分带,以中间带和着丝点带为主,中间带主要分布在染色体短臂上;C-分带强弱差异明显,其中 46 条强带,16 条弱带。由于 C-分带带纹的数量、强弱和在染色体上的位置差异,使每对染色体都表现出明显的带纹特征,因此 C-分带可以作为识别染色体的细胞学标记。根据内葵杂 3 号三交种的染色体 C-分带主要特征得出带型公式为:  $2n = 2x = 34 = 8I_+ + 3T_+ + 5I + I^+ T_+ + 4C + 2CI + 4CI^+ + 3CI_+ + I^+ T^+ + CT^+ + 2CT_+$ 。

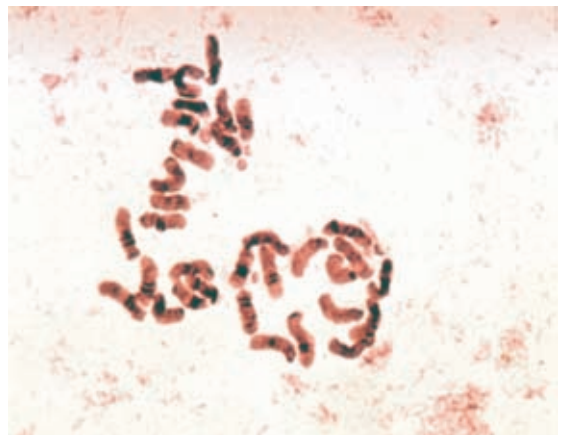


图 1 向日葵染色体 Giemsa C-分带图

Fig. 1 Chromosome C-banding of sunflower

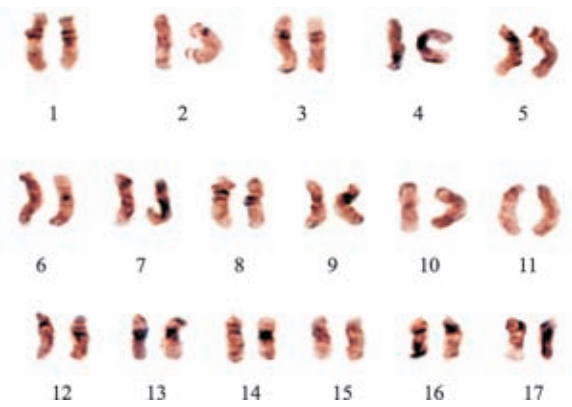


图2 向日葵染色体 C-分带带型分析

Fig. 2 Chromosome C-banding analysis of sunflower

根据染色体带型特征,将分带后的染色体进行

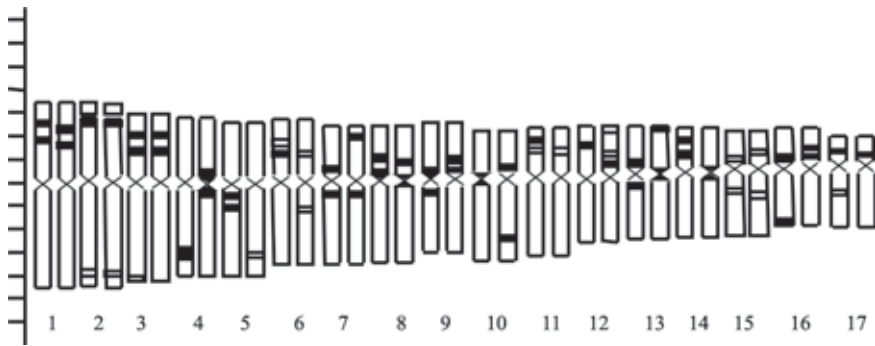


图3 向日葵染色体 C-分带带型模式图

Fig. 3 Chromosome C-banding pattern of sunflower

### 3 讨论

C-分带主要揭示染色体上的组成型异染色质区域,根据 C-分带带型特征可以区分不同对的染色体。C-分带的方法有很多种,如 HBSG (HCl-Ba(OH)<sub>2</sub>-SSC-Giemsa)、BSG (Ba(OH)<sub>2</sub>-SSC-Giemsa) 及 HKG 等。多数研究表明,采用 HBSG 和 BSG 的 Giemsa C-分带方法可以将多种植物分裂中期细胞的不同对染色体区分开,而 Schrader 等<sup>[17]</sup> 利用 BSG 法对向日葵自交系 HA89 进行 C-分带研究,结果表明 C-分带只出现在着丝粒的位置,即只显示着丝粒异染色质,因而不能明确区分不同对的染色体,与 Cuellar 等<sup>[19]</sup> 的研究结果一致,而用 HKG Giemsa C-分带法除了显示着丝粒 C-分带外还可显示染色体其他位置的带,因此可将 4 对近着丝粒染色体和 2 组偏-亚中着丝粒染色体区别开,两种分带技术表明在染色体上有不同类型的异染色质存在,类似的结果在玉米中也有<sup>[6]</sup>。本实验利用 HKG 分带法可将内葵杂 3 号三交种的多数染色体对彼此区分开,与 Schrader 等<sup>[17]</sup> 的研究结果一致。同时还发现

剪切、测量、配对及排列,建立了内葵杂 3 号三交种染色体 C-分带带型模式图(图 3)。从图 3 看出,17 对染色体之间带纹数量和位置差异十分明显,可以非常明确地将其彼此区分开来。结果进一步表明多数同源染色体之间的 C-分带也存在很大的差别,如第 4 对染色体中,其中一条染色体的长臂近末端有 1 个强带,另一条染色体上有 1 个着丝粒带;第 5 对染色体中,其中一条染色体近着丝点有 2 个强带,另一条长臂近末端有 1 个弱带;第 10 对染色体中,其中一条染色体上有 1 个强带为着丝点带,另一条染色体短臂近着丝点处和长臂中下部各有 1 个强带,以及第 6 对、第 16 对和第 17 对染色体的同源染色体之间的带纹数量和位置也有差别。

多数同源染色体之间的 C-分带也有差别,表现在 C-分带显示的数量、位置及带纹的宽窄和深浅上,与前人<sup>[17,19]</sup> 研究结果有所不同。关于同源染色体之间 C-分带的差别,最早是 Merker<sup>[20]</sup> 在小黑麦的 C-分带研究中观察到,并将这种现象叫 C-分带的杂合性,后来相继在多种植物中也观察到<sup>[12,21-22]</sup>。这种杂合性或表现为带型的大小不同,或表现为位置的不同,或表现为数量的不同,产生这种杂合性的原因,一种可能是染色体易位的结果,一种可能是显带区的结构异染色体重复程度的差别<sup>[12]</sup>。本实验供试材料内葵杂 3 号三交种为通过三系配套选育的杂交种,又将该杂交种与另一自交系杂交获得的三交种,因此上述 C-分带的杂合现象,可能是由于同源染色体之间仍各自继承着亲本的特征和染色体的易位这两种因素共同作用的结果。这种同源染色体之间的差别,也为供试材料为杂交种提供了一个细胞学证据,同时也说明了 C-分带的优越性。C-分带对于大多数物种而言较为稳定,不同物种的染色体 C-分带带型具有明显的特征,因而本实验建立的内葵杂 3 号三交种的 C-分带带型,为该物种的鉴定提供了

依据。

有关向日葵随体染色体的数量,因所研究的材料不同而不同,但所有研究者有关异染色质与随体染色体的次缢痕有关的结论是一致的。Schrader 等<sup>[17]</sup>研究了向日葵自交系 HA89 的 C-分带结果表明,17 对染色体中有 3 对随体染色体,而且异染色质与这 3 对随体染色体的次缢痕有关。Cuéllar 等<sup>[23]</sup>对向日葵不同品系的染色体 C-分带进行研究也得到相同的结果。Vanzela 等<sup>[24]</sup>对二倍体、四倍体和六倍体向日葵的 10 个品系或杂交种的研究结果也表明,异染色质与随体染色体的次缢痕有关。本实验对内葵杂 3 号三交种的 C-分带的研究结果表明,第 2 对随体染色体的次缢痕处有 C-分带,与以上研究结果一致,不同的是随体染色体的数目,这是由于研究材料不同所致。

#### 参考文献

- [1] 杨弘远. 植物染色体显带技术及其在遗传学与细胞学中的应用[J]. 武汉大学学报:自然科学版,1978(3):110-118
- [2] 窦全文,沈裕璇,王海庆. 栽培燕麦和野燕麦 C-带核型比较[J]. 草业学报,2004,13(4):76-79
- [3] 陈全战,杨平. 4 种栽培大麦染色体组型和 C-带带型的比较分析[J]. 南京晓庄学院学报,2007(3):57-67
- [4] 孔芳,王海燕,赵彦,等. 加州野大麦染色体 C-分带、荧光原位杂交及其核型分析[J]. 草地学报,2007,15(2):301-301
- [5] 李淑梅,徐川梅,周波,等. 普通小麦-簇毛麦 2V 染色体端体异附加系的选育与鉴定[J]. 南京农业大学学报,2009,32(1):1-5
- [6] Decarvalho C R, Saraiva L S. A new heterochromatin banding pattern revealed by modified HKG-banding technique in maize chromosomes[J]. Heredity, 1993, 70:515-519
- [7] Carvalho C R, Saraiva L S. High-resolution HKG-banding in maize mitotic chromosomes [J]. J Plant Res, 1997, 110(4):417-420
- [8] Yu H, Liang H, Kofo K D. Analysis of C-banding chromosome patterns of Sorghum[J]. Crop Sci, 1990, 31(6):1524-1527
- [9] Hoshi Y, Plader W, Malepszy S. New C-banding pattern for chromosome identification in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Plant Breeding, 1998, 117(1):77-82
- [10] Koo D H, Hur Y, Jin D C, et al. Karyotype analysis of a Korean cucumber cultivar (*Cucumis sativus* L. cv. Winter Long) using C-banding and bicolor fluorescence *in situ* hybridization [J]. Mol and Cells, 2002, 13(3):413-418
- [11] Koo D H, Choi H W, Cho J, et al. A high-resolution karyotype of cucumber (*Cucumis sativus* L. 'Winter Long') revealed by C-banding, pachytene analysis, and RAPD-aided fluorescence *in situ* hybridization [J]. Genome, 2005, 48(3):534-540
- [12] 李懋学, 陈定慧, 王莲英. 中国水仙的染色体组型和 Giemsa C-带带型研究[J]. 园艺学报, 1980, 7(2):29-39
- [13] 庄伟建, 林治良, 苏金为. 中国水仙两个地方品种的核型和 Giemsa C-带的研究[J]. 福建农业学报, 1999, 14(1):51-57
- [14] 刘光欣, 胡凤荣, 席梦利, 等. 卷丹与宜兴百合的 C-带比较[J]. 南京晓庄学院学报, 2009, 11(6):63-65
- [15] 胡凤荣, 刘光欣, 席梦利, 等. 毛百合根尖染色体 Giemsa C-带分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(1):87-90
- [16] 闫素丽, 安玉麟, 孙瑞芬. 内葵杂 3 号染色体核型分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6):784-788
- [17] Schrader O, Ahne R, Fuchs J, et al. Karyotype analysis of *Helianthus annuus* using Giemsa banding and fluorescence *in situ* hybridization [J]. Chromosome Res, 1997, 5:451-456
- [18] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题[J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4):297-302
- [19] Cuellar T, Belhassen E, Fernandez-Calvin B, et al. Chromosomal differentiation in *Helianthus annuus* var. *macrocarpus*: heterochromatin characterization and rDNA location [J]. Heredity, 1996, 76:586-591
- [20] Merker A. A Giemsa technique for rapid identification of chromosomes in *Triticum* [J]. Hereditas, 1973, 75(2):280-282
- [21] 李懋学, 陈定慧. 栽培芍药染色体的 Giemsa C-带及体细胞染色体联合的观察[J]. 遗传学报, 1980, 7(3):271-277
- [22] 云岚. 新麦草多倍体诱导及细胞学研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2009
- [23] Cuéllar T, Orellana J, Belhassen E, et al. Chromosomal characterization and physical mapping of the 5S and the 18S-5.8S-25S ribosomal DNA in *Helianthus argophyllus*, with new data from *Helianthus annuus* [J]. Genome, 1999, 42:110-115
- [24] Vanzela A L, Ruas I C F, Marcelo F O, et al. Characterization of diploid, tetraploid and hexaploid *Helianthus* species by chromosome banding and FISH with 45S rDNA probe [J]. Genetica, 2002, 114:105-111