果 树 学 报 2019,36(7):939-946
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20190015

流式细胞仪测定荔枝倍性和基因组大小的细胞核提取液筛选与应用

赖 彪[1],吴传龙[2],秦永华[2],刘成明[2],冯奇瑞[2],叶自行[2,3],胡桂兵[2],王惠聪[1,2*]

([1]长江师范学院现代农业与生物工程学院,重庆涪陵 408100;[2]华南农业大学园艺学院,广州 510642)

摘 要:【目的】流式细胞术是目前测定植物倍性和基因组大小差异的最快、最有效的方法。建立适合荔枝的流式细胞术的方法,对荔枝倍性育种以及基因组大小的确定是必不可少的。**【方法】**笔者以荔枝的幼嫩叶片为材料,筛选适合荔枝的细胞核提取液配方,建立利用流式细胞仪测定荔枝倍性和基因组大小的方法。用改进的标准两步法,比较了6种常用细胞核提取液提取细胞核的效果。**【结果】**利用WPB(Woody Plant Buffer)提取的大部分荔枝品种(品系)叶片细胞核稳定、分辨率高、细胞碎片少且细胞G_0/G_1峰的变异系数(*CV*)较低,平均*CV*值为5.12%,说明该配方适用于酚类物质丰富的荔枝细胞核的提取。同时以已知染色体数量的'无核荔'(2*n*=30)为外标,检测了18个品种(品系)的倍性,发现参测样品的G_0/G_1峰与'无核荔'G_0/G_1峰的荧光均值的比值为0.78~1.24,说明所测荔枝品种(品系)均为二倍体。以已知基因组大小的'Stupické polní rané'番茄为内标测定了14个品种(品系)的基因组大小,结果表明荔枝基因大小约为550~620 Mb,平均602 Mb,不同荔枝品种(品系)间基因组大小存在一定差异。**【结论】**WPB细胞核提取液提取的荔枝幼嫩的叶片的细胞核质量好,可用于流式细胞术荔枝倍性和基因组大小的测定,测定的结果显示参测荔枝品种(品系)均为二倍体,无单倍或多倍的情况,不同荔枝品种基因组大小有一定的差异。

关键词:荔枝;流式细胞术;细胞核提取液;倍性;基因组大小

中图分类号:S667.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2019)07-0939-08

Nuclear isolation buffer optimization and the determination of ploidy level and genome size of litchi using flow cytometry

LAI Biao[1], WU Chuanlong[2], QIN Yonghua[2], LIU Chengming[2], FENG Qirui[2], YE Zixing[2,3], HU Guibing[2], WANG Huicong[1,2*]

([1]School of Advanced Agriculture and Bioengineering, Yangtze Normal University, Chongqing 408100, China; [2]College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

Abstract:【Objective】Flow cytometry is particularly applicable in the determination of ploidy and genome size of diverse plant samples because it is convenient, fast and reliable. The sample preparation in flow-cytometry determination is relatively simple and less costly. The nuclei can be counted in a short time using a sample volume of only a few milligrams of plant tissues. Although chromosome counting has been used in ploidy determination in plants, in many cases representative picture of a cell population is difficult to obtain and the determination is inefficient. DNA flow cytometry requires preparation of the suspensions of intact nuclei, and suitable nuclei isolation buffer is a bottleneck for litchi ploidy and genome size estimation. The main problem is that it is not easy to prepare suspensions of intact nuclei from the leaves of woody plants, which contain cells with a rigid cell wall and secondary metabolites. This study aimed to choose the best nuclei isolation buffer and establish an appropriate flow cytometry method for litchi ploidy and genome size estimation.【Methods】In this study, young litchi

收稿日期:2019-01-28 接受日期:2019-04-07

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目"国家荔枝龙眼产业技术体系"(CARS-33);长江师范学院校级科研项目(2016KYQD20和2016XJQN06)

作者简介:赖彪,男,讲师,博士,主要从事果树分子生物学研究。Tel:15826215416,E-mail:laibiaoscau@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:15322030626,E-mail:wanghc1972@263.net

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

leaves were selected as material to compare the nuclei isolation efficiency and extraction quality among six frequently-used buffers, including Otto's, $MgSO_4$, Tris-$MgCl_2$, Galbraith's, WPB and GPB buffer, using modified two step procedures. First, place a small amount of young litchi leaf (typically 50-100 mg) in the center of a glass petri dish, which was placed on ice to keep the sample cold. Then add 2 mL ice-cold nuclei isolation buffer to the petri dish and chop the tissue immediately in the buffer with a razor blade (use new one for each sample). Filter the chopped solution through a 53 mm nylon mesh into a new a 2 mL Eppendorf tube, which was centrifuged (1 000 $r \cdot min^{-1}$) for 5 minutes at 4 ℃ and the supernatant was carefully remove. The nuclei in the sediment was re-suspended by gentle shaking in 400 μL new nuclei isolation buffer supplemented with 50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ PI (Propidium iodide) and 50 $\mu g \cdot mL^{-1}$ RNase, and filtered through a 42 mm nylon mesh. Incubate the sample for a few minutes, with occasional shaking before testing. The isolated nuclei were analyzed by Beckman Cell Lab Quanta SC FL3 fluorescence channel. The G_0/G_1 fluorescence value and *CV* (Coefficient of variation) were analyzed by Cell Lab Quanta SC software. *CV* of DNA peaks, presence of debris background and the number of nuclei released from sample tissue were the key parameters to evaluate those buffers.【Results】Clear differences among buffers were observed. After chopping the young leaf tissue in Tris-$MgCl_2$, Galbraith's or GPB isolation buffer, the isolated nuclei solution turned brown quickly, indicating that they are not suitable for litchi leaf nuclei isolation. In contrast, Otto's Buffer, $MgSO_4$ and WPB could isolate the nuclei and the nuclei solution stayed green. The *CV* of G_0/G_1 fluorescence peak obtained using $MgSO_4$ buffer and Otto's was 8.35% and 5.64%, respectively. A much better nuclei stability, higher integrity and resolution ratio, but lower amount of cell debris and *CV* of G_0/G_1 peak (3.25%) were obtained in most of samples tested using Woody Plant Buffer (WPB). These results indicated that WPB buffer was the most suitable nuclei isolation buffer for young litchi leaf and can be used for further study like ploidy and genome size estimation. Subsequently ploidy level of 18 tested cultivars/lines were determined by flow cytometry using known chromosome number cultivar 'Wuheli' (2*n*=30) as an external standard. The results showed that the fluorescence ratio of the G_0/G_1 peak among tested 18 samples compare to 'Wuheli' range from 0.78 to 1.24, which suggested that the tested cultivars/lines should belong to diploid. Genome size of 14 cultivars/lines was also determined by flow cytometry using 'Stupické polní rané', a known genome size (958 Mb) tomato, as an internal standard control. The genome size of litchi ranged from 550 to 620 Mb with an average size of 602 Mb. Flow cytometry revealed the great variation in genome sizes among different litchi cultivars/lines.【Conclusion】Among the six frequently-used buffers, WPB nuclei isolation buffer was found to be the most effective for litchi young leaf nuclei isolation. The isolated nuclei can be used for litchi ploidy level, genome size determination and maybe other studies. The results also indicated that all the tested cultivars/lines are diploid. The genome size of litchi varies among different cultivars/lines. Hopefully, these results will provide useful information in the further studies of litchi ploidy and genome size and also new clue for other woody plant crops.

Key words: *Litchi chinensis* Sonn.; Flow cytometry; Nuclei isolation buffer; Ploidy; Genome size

流式细胞术是应用流式细胞仪进行分析、分选的技术，对处于液流中各种荧光标记的微粒进行多参数快速准确的定性和定量测定。20世纪80年代以来，随着流式细胞仪和荧光探针标记技术的不断发展，流式细胞术在生物科学与医学的研究及临床实践中的作用越来越重要。流式细胞术主要用于检测植物细胞核DNA含量及其倍性水平[1-5]。其中G_0/G_1期的DNA含量可间接反映该细胞的倍性水平，因此测定植物细胞核DNA含量的同时可以获取倍性水平相关数据。对植物DNA的测定首先要求能够

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

分离到单细胞核的悬浮液，不同的细胞核提取液对不同植物的细胞核提取效果相差很大，因而，利用流式细胞术测定某个物种的DNA时应该首先对细胞核提取液进行筛选和优化，以得到更加准确的测定结果[6-7]。自1983年Galbraith报道细胞核提取液配方至今，不同研究组配制了适合不同物种的细胞核提取液，比如：Otto’s Buffer、$MgSO_4$、Tris-$MgCl_2$、Galbraith’s、WPB和GPB等[6,8-13]。一般而言草本植物叶片的细胞核较容易提取，而木本植物因为叶片中含有多酚、单宁、花色素苷和粘性物质而使其提取效果相对较差[14-15]。评判细胞核提取效果一般用变异系数（Coefficient of Variation，CV）值为参照，草本植物DNA直方图的CV值一般会小于3%，木本植物一般情况下小于5%被认为合格，而对于富含酚类、基因组小或标本等特殊的样本DNA直方图的CV小于8%可以接受，但是必须明确指出提取效果难以达到要求的原因[7]。

染色体压片观察作为一种传统的倍性观测方法具有准确直观的优点，但其过程较为复杂，操作难度较大，而且样品测定数量大时，工作量大，并且当植物的细胞核小或者染色体较多时很难得到准确的结果[16]。利用流式细胞术分析植物的倍性和基因组大小已在国内外广泛应用，1983年Galbraith等[8]首次利用流式细胞仪对多种植物的基因组大小进行了测定，随后20年中，大量物种的基因组大小和倍性陆续被测定[17-21]。在荔枝中仅有两篇利用染色体压片方法观察少数几个品种染色体数目的报道[22-23]。2011年李彩琴等[24]首次利用流式细胞仪使用改良后的Otto’s buffer对荔枝果皮和果肉的细胞周期进行了测定，对实验步骤进行改良后得到的最好的峰值的*CV*值仅为7.58%，没有达到小于5%的要求。同年Vanburen等[25]利用$MgSO_4$细胞核提取液提取测定了几个品种荔枝、龙眼和龙荔的基因组大小，但文中没有提到关于流式直方图的一些重要信息。为筛选适合荔枝叶片的细胞核提取液，笔者比较了6种常用的细胞核提取液提取细胞核的质量和效率，获得了最佳的细胞核提取液配方，并运用该配方以‘无核荔’为外标、番茄为内标测定了十余个荔枝品种（品系）的倍性和基因组大小，旨在为流式细胞术在荔枝倍性鉴定和基因组测定奠定基础，也为流式细胞术在其他木本植物上的应用提供参考。

1　材料和方法

1.1　供试材料

进行倍性分析的荔枝品种（品系）有：‘怀枝’‘及弟’‘Kom’‘晚埔’‘桂林’‘魁星2号’‘尚书怀’‘水蜜’‘小金钟’‘白驳早红’‘皇帝舅’‘玉荷苞’‘六月雪’‘兰竹’‘贡仔’‘大红袍’‘灵山香荔’、‘三月红’18个品种（品系）；基因组大小测定材料为‘妃子笑’‘桂味’‘无核荔’‘荷花大红荔’‘马贵荔’‘陈紫’‘软枝早红’‘乌叶舅’‘早埔’‘9911-1’‘9911-2’‘9919’‘D11’‘D13’等14个品种（品系）。所有品种（品系）均种植于华南农业大学园艺分场荔枝品种资源圃。

倍性分析以确定为二倍体的‘无核荔’荔枝（2n=30）为参照样品[23]。基因组大小测定内标番茄（*Solanum lycopersicum* L. ‘Stupické polní rané’）由捷克共和国植物研究所流式与细胞遗传实验室Jaroslav Doležel教授赠送[26]。

样品的预处理：用剪刀剪取新梢上的幼嫩叶片，放入冰盒中带回实验室。用预冷的清水洗去叶片表面的灰尘，然后用吸水纸吸干净备用。

1.2　细胞核悬浮液的制备

参照Dolezel等[7]的标准2步法并有所改进。具体步骤为：在直径为6 cm的玻璃培养皿中加入2 mL细胞核提取液，放入50~100 mg叶片用锋利的刀片将材料切碎，在冰上放置10分钟充分提取，400目（38 μm）的尼龙网过滤到2 mL离心管中，4 ℃ 1 000 r·m^{-1}离心5 min，小心弃去上清，加入400 μL的细胞核提取液重新悬浮细胞核，用300目（50 μm）的尼龙网过滤后加入RNase A和碘化丙啶（PI）终质量浓度均为50 μg·mL^{-1}，室温染色10 min后上机测定。

对荔枝不同品种（品系）进行倍性分析时，参照品种和目标品种（品系）同时进行样品制备细胞核悬浮液，每次实验最多测定3个样品，设3次重复，每测定三个样品测定参照品种一次。测定基因组大小时，以番茄为内标，同时制备内标和目标样品的细胞核悬浮液。先取50 μL上机对内标和目标样品进行浓度测定，然后根据获得的浓度稀释至2×10^5个•mL^{-1}，等体积混合后上机测定。

1.3　流式细胞仪测定

PI染色的样品在488 nm激光的激发下发出橘红色荧光，利用美国Beckman公司的Cell Lab Quanta SC的FL3荧光通道的检测其荧光强度。上机后

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

调整FL3荧光通道电压使荔枝的G_0/G_1峰的荧光均值在200左右，稳定后电压不变。每个样品至少收集5 000个细胞，G_0/G_1峰的荧光均值和变异系数*CV*由Cell Lab Quanta SC分析软件计算得到。试验设置3个重复。

1.4 细胞核分离缓冲液的初步筛选

目前在植物流式细胞分析上常用的有6种细胞核提取液及配方，分别是Galbraith's等[8] [45 mmol·L^{-1} $MgCl_2$，20 m mol·L^{-1} MOPS，30 mmol·L^{-1} 柠檬酸钠，0.1%（φ）曲拉通 X-100，pH 7.0]；Otto's[9][Otto I 溶液: 0.1 mol·L^{-1}柠檬酸，0.5%（φ）Tween 20，pH 2.3；Otto II溶液: 0.4 mol·L^{-1} $Na_2HPO_4·12H_2O$，pH 8.9]；$MgSO_4$ [10 mmol·L^{-1} $MgSO_4·7H_2O$，50 mmol·L^{-1} KCl，5 m mol·L^{-1} Hepes，pH 8.0，3 mmol·L^{-1}二硫代苏糖醇，0.25%曲拉通X-100，pH 8.0][10]；Tris·$MgCl_2$ [200 mmol·L^{-1} Tris，4 mmol·L^{-1} $MgCl_2$，0.5%（φ）曲拉通X-100，pH 7.5][12]；WPB[0.2 mol·L^{-1} Tris·HCl，4 mmol·L^{-1} $MgCl_2·6H_2O$，2 mmol·L^{-1}Na_2EDTA，86 mmol·L^{-1}氯化钠，10 mmol·L^{-1}焦亚硫酸钠，1% PVP-10，1%(φ)曲拉通X-100，pH 7.5][13]；GPB[0.5 mmol·L^{-1} 精胺 4HCl，30 mmol·L^{-1}柠檬酸钠，20 mmol·L^{-1} MOPS，80 mmol·L^{-1} KCl，20 mmol·L^{-1} NaCl，0.5 %（φ）曲拉通X-100，pH 7.0][13]。所有提取液均通过0.22 μm滤膜过滤，除Otto II溶液存放于常温外，其他均4 ℃保存。以'无核荔'叶片为材料，对比6种细胞核提取液的提取效果，主要判断依据为样品的褐变程度、细胞碎片（背景噪音）、细胞数量和G_0/G_1峰的*CV*值。

1.5 结果计算及数据处理

基因组大小通常又称为'C'值，指一个物种单倍体核的DNA含量。

*CV*值、倍性和基因组大小计算方法：*CV*%=（G_0/G_1峰的宽度/峰的位置）×100%；目标样品的倍性=参照样品的倍性×（目标样品G_0/G_1峰的荧光均值/参照样品G_0/G_1峰的荧光均值）；目标样品的2C基因组大小（pg或者Mbp）=参照样品的的基因组大小×（目标样品2C峰荧光均值/参照样品2C峰荧光均值）[6-7]。相对的基因组大小为3次重复的平均值。将pg转换为碱基数通常通过1 pg=978 Mb来换算[27]。

所有试验均设3次生物重复，使用SPSS数据处理软件进行数据统计处理，样品基因大小采用LSD法多重比较法（$p < 0.01$，n=3）。

2 结果与分析

2.1 不同核分离缓冲液的提取效果比较

以'无核荔'幼嫩的叶片为材料，在Tris-$MgCl_2$、Galbraith's和GPB细胞核提取液中切碎叶片后，由于这些细胞核提取液中缺少抗氧化剂导致样品很快发生褐变。在这些提取液中加入1%的PVP-10后，褐变现象仍然发生，说明这3种细胞核提取液不适合荔枝叶片细胞核的提取；而在Otto's、$MgSO_4$和WPB细胞核提取液中提取细胞核样品未见明显褐变发生，但是可以明显观察到使用$MgSO_4$细胞核提取液时样品中会出现乳白色的物质（图1）。经过流式细胞仪分析后发现使用Otto's细胞核提取液提取的细胞核悬浮液有较好的G_0/G_1峰值，*CV*值为5.64%；$MgSO_4$细胞核提取液处理样品也能得到明显的G_0/G_1峰，但*CV*值为8.35%，细胞碎片较多；而WPB处理后细胞核分辨率高、细胞碎片少且细胞G_0/G_1峰的变异系数较低，为3.25%，效果最好（图2）。

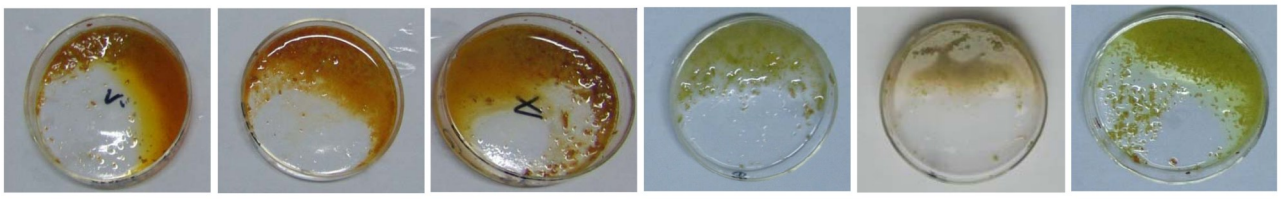

图 1 六种细胞核提取液提取'无核荔'叶片后褐变情况

Fig. 1 Browning status of 'Wuheli' leaf extract using six different isolation buffers

2.2 倍性测定

利用筛选好的WPB细胞核提取液以二倍体'无核荔'为外标测定了华南农业大学园艺分场荔枝品种资源圃18个品种（品系）的倍性。图3展示了部分样品倍性测定的直方图结果，在同一测定条件下3个样品的G_0/G_1峰值的荧光均值为200左右，表明3

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

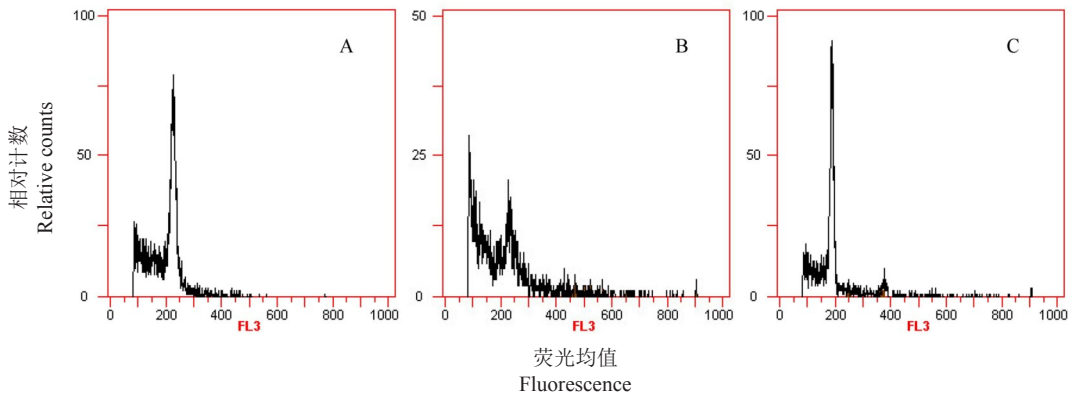

图 2　Otto’s（A）、$MgSO_4$（B）和 WPB（C）细胞核提取液提取‘无核荔’叶片的细胞核 DNA 直方图

Fig. 2 Histograms of ‘Wuheli’ leaf nuclei extract using Otto’s (A), $MgSO_4$ (B) and WPB (C)

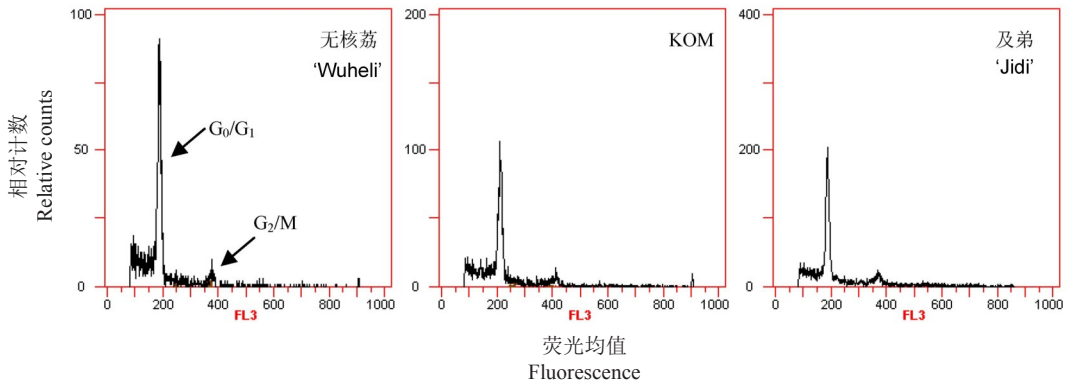

图 3　以‘无核荔’为外标测定‘KOM’和‘及弟’的倍性的直方图

Fig. 3 Ploidy level histograms of ‘KOM’ and ‘Jidi’ using ‘Wuheli’ as external standard

个样品的倍性一致，即为二倍体。

通过同时测定‘无核荔’和样品的G_0/G_1荧光均值，计算样品与外标之间的比值可以初步判定未知样品的倍性。由表 1 可以看出 18 个品种（品系）的G_0/G_1荧光均值与‘无核荔’的G_0/G_1荧光均值的比值在 0.78~1.24。大部分的样品的G_0/G_1荧光均值与‘无核荔’的G_0/G_1荧光均值相近，说明它们的倍性均为二倍体。

2.3　基因组大小测定结果

以番茄为内标测定了‘妃子笑’等 14 个品种（品系）的基因组大小（图 4 和表 2），结果表明荔枝各个品种/品系之间的基因组大小存在着一定的差异，检测的样品中‘无核荔’的基因组最大，为 630.55 Mb；‘9911-2’的基因组最小，为 543.27 Mb。

3　讨　论

流式细胞分析的第一步就是要获取足够量完整的细胞核，然而不同植物种类含有的干扰物质及

表 1　18 个荔枝品种/品系的倍性分析

Table 1 Ploidy analysis of 18 litchi cultivars/lines

品种/品系 Cultivars/Lines	样品G_0/G_1荧光均值/外标G_0/G_1荧光均值 G_0/G_1 fluorescence value of samples compare to internal standard	样品G_0/G_1的 *CV* 值 *CV* value of G_0/G_1 peak /%
怀枝 Huaizi	0.98±0.001	5.06±0.37
及弟 Jidi	0.98±0.003	4.86±0.07
Kom	1.11±0.005	6.94±0.27
晚埔 Wanpu	1.09±0.008	7.14±1.20
桂林 Guilin	0.84±0.015	6.42±0.93
魁星 2 号 Xinkui 2	0.88±0.004	5.37±0.24
尚书怀 Shangshuhuai	0.78±0.002	4.36±0.31
水蜜 Shuimi	0.84±0.002	4.40±0.03
小金钟 Xiaojinzhong	0.84±0.003	4.71±0.06
白驳早红 Baibozaohong	0.90±0.009	6.27±0.37
皇帝舅 Huangdijiu	0.94±0.004	7.58±0.61
玉荷苞 Yuhebao	0.99±0.005	4.31±0.18
六月雪 Liuyuexue	0.89±0.005	4.25±0.07
兰竹 Lanzu	1.14±0.005	4.08±0.28
贡仔 Gongzai	1.00±0.002	3.69±0.02
大红袍 Dahongpao	1.06±0.020	4.92±0.30
灵山香荔 Lingshanxiangli	1.12±0.003	3.52±0.18
三月红 Sanyuehong	1.24±0.004	3.51±0.11

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

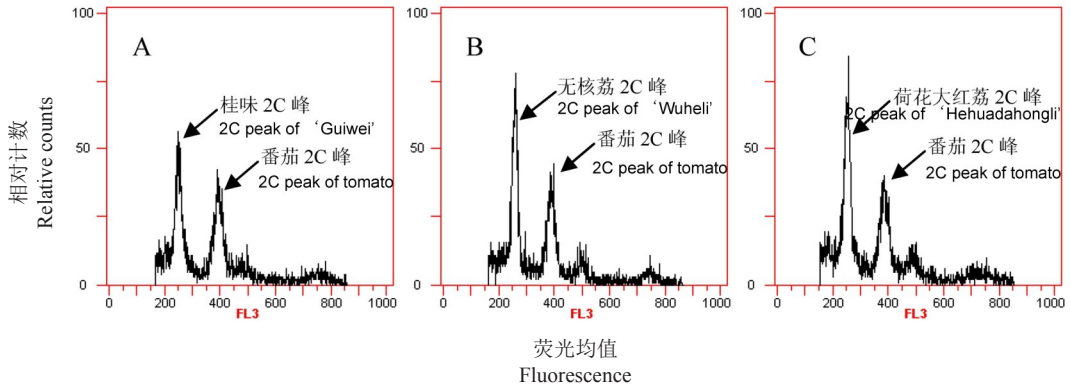

图 4 以番茄为内标测定‘桂味’（A）、‘无核荔’（B）和‘荷花大红荔’（C）基因组大小的直方图

Fig. 4 Genome size histograms of ‘Guiwei’ (A), ‘Wuheli’ (B) and ‘Hehuadahongli’ (C) using tomato as internal standard

表 2 14 个品种（品系）的 G_0+G_1 荧光均值、*CV* 值及基因组大小

Table 2 Fluorescence value (G_0+G_1), *CV* value and genome size of 14 cultivars (or lines)

品种/品系名称 Cultivars/Lines	样品 G_0/G_1 的 *CV* G_0/G_1 Fluorescence value of samples/%	内标 G_0/G_1 的 *CV* G_0/G_1 Fluorescence value of internal standard /%	基因组大小 2C（pg） Genome size（2C, pg）	基因组大小 1C（Mb） Genome size（1C, Mb）
妃子笑 Feizixiao	5.05±0.32	4.10±0.49	1.196±0.018	584.72±8.71 CD
桂味 Guiwei	4.57±0.49	3.62±0.19	1.231±0.012	602.00±5.90 BC
无核荔 Wuheli	3.48±0.25	3.56±0.31	1.289±0.007	630.55±3.30 A
荷花大红荔 Hehuadahongli	4.19±0.32	3.14±0.25	1.266±0.014	618.86±7.00 AB
马贵荔 Maguili	5.44±0.40	3.19±0.23	1.227±0.012	599.93±5.92 BCD
陈紫 Chenzi	5.12±0.24	4.05±0.38	1.240±0.025	606.44±12.20 ABC
软枝早红 Ruanzhizaohong	4.46±0.29	3.78±0.22	1.233±0.005	603.10±2.65 BC
乌叶舅 Wuyejiu	5.91±0.13	3.97±0.33	1.173±0.021	573.48±10.32 D
早蒲 Zaopu	4.81±0.33	3.29±0.17	1.234±0.010	603.22±5.01 BC
9911-1	4.86±0.13	3.98±0.08	1.280±0.004	625.78±1.76 AB
9911-2	7.76±1.01	4.02±0.56	1.110±0.018	543.27±8.70 E
9919	4.92±0.32	3.93±0.51	1.229±0.012	600.97±5.66 BC
D11	4.59±0.11	4.13±0.13	1.269±0.005	620.71±2.51 AB
D13	5.01±0.12	3.91±0.33	1.271±0.017	621.30±8.45 AB

注：差异显著性采用 LSD 法多重比较，$p < 0.01$，n=3；同一列数据后的字母不同表示差异显著。

Note: Different letters after the values of genome size indicate significant difference at $p < 0.01$ according to LSD Test (n=3).

结构不一样，这就要求研究人员在测定不同样品时对不同的细胞核提取液进行比较和改进。2006 年 Loureiro 等[6]比较了 Galbraith’s、LB01、Otto’s 和 Tris·$MgCl_2$ 4 种细胞核提取液对酢浆草、番茄、厚叶景天、南极光、豌豆、羊茅草和蚕豆等 7 个物种叶片的细胞核提取效果。由于酢浆草细胞质中 pH<3.0，只有 Galbraith’s 和 Otto’s 提取细胞核能得到满意的结果，木本植物南极光含有黏性物质，在细胞核悬浮液制备过程中细胞核容易聚集不利于流式分析，在 4 个细胞核提取液中只有 Tris·$MgCl_2$ 适合[28]。此后，Loureiro 等[13]设计了适合更广泛的草本植物 GPB 和木本植物 WPB 的细胞核提取液，方便研究者选择。荔枝叶片中含有大量的酚类物质，所以选择和改良细胞核提取液时防止褐变应该作为重点考虑的因素，2011 年李彩琴等[24]以荔枝果肉为材料，通过对 Otto’s 的细胞核提取液和对实验方法的改良，取得了较好的实验结果，但是 *CV* 值还是偏高。Tris-Mg-Cl_2 裂解液对枣幼嫩叶片裂解效果最好，而 WPB 反而更差，LB 01 提取液更适合蔷薇叶片细胞裂解，Otto’s 提取液适合海棠叶片细胞裂解，由此可见不同的木本植物适合裂解细胞的裂解液不尽相同，需要根据不同的样品选择不同的提取液[29-31]。本文筛选的 WPB 提取液提取荔枝叶片的细胞核后进行流式分析，获得了更好的直方图和更小的 *CV* 值，适合用于荔枝叶片倍性和基因组大小流式细胞分析。

流式细胞术作为一种快速、简单、准确和经济检

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

测植物倍性的方法已广泛应用。荔枝起源于中国，是中国南方的特色水果。据不完全统计，荔枝有不少于200个品种或品系，而目前只有少数几个荔枝品种的倍性利用染色体计数法被揭示[22-23]。笔者结合倍性和基因组大小测定的结果，确定了测定的32个荔枝品种（品系）未发现无单倍体和多倍体情况，为荔枝种质资源评价添加了新的倍性数据。

利用流式细胞仪测定基因组大小要求内标样品基因组大小和目标样品基因组大小的2倍以内或一半以内，否则容易造成较大误差[7]。以鸡血红细胞为内标长时间被应用于植物基因组大小的测定，而Johnston等[32]研究发现来源不同的鸡红血细胞的DNA含量在2.94到3.01 pg/2C，而不同研究者用它作为内标必定会得到不同的结果。因此，已知DNA含量稳定的特定植物被推荐作为内标测定植物的基因组大小[7,32]。本文选用的Jaroslav Doležel教授提供的番茄‘Stupické polní rané’为内标，基因组大小适合荔枝基因组大小的测定，更有利于获得准确的数据。

植物细胞核DNA包含了植物的大部分遗传信息，不同植物的基因组大小存在着巨大的差异，植物基因组的大小和植物的特性相联系，因此基因组大小的信息对分类学和遗传进化分析有着重要的参考价值[33]。同一个物种不同的品种的基因组大小同样存在一定的差异，比如葡萄各个品种/栽培品种之间的基因组大小有一定的差异，但是差异达不到显著水平[34-35]。本研究测定的14个荔枝栽培品种（品系）基因组大小之间存在显著差异，是否存在非整倍体或染色体数目缺失或增加的现象还需要用染色体计数法确认。流式细胞术测定的基因组大小与基因组测序的结果相比往往偏大，主要因为基因组中存在大量的重复序列和一些不能组装的序列[20]。拟南芥全基因组测序组装的结果为1C=115.4 Mb，而利用流式测定的结果为1C=157 Mb，主要原因是着丝粒区域和核糖体结合体的DNA没有被测到[20,33]。近年来随着大规模测序技术的飞速发展，大量的植物基因组序列被解读，测定目标样品的基因组大小成为了基因组测序之前一个非常重要的工作[36]。

参考文献 References:

[1] ROBERTS A V，GLADIS T，BRUMME H. DNA amounts of roses (*Rosa* L.) and their use in attributing ploidy levels[J]. Plant Cell Reports，2009，28(1): 61-71.

[2] OZKAN，H，TUNA，M，KILIAN，B，MORI，N，OHTA，S. (2010). Genome size variation in diploid and tetraploid wild wheats[J]. AoB Plants，2010: plqo15.

[3] MIYASHITA T，ARAKI H，HOSHINO Y. Ploidy distribution and DNA content variations of *Lonicera caerulea* (caprifoliaceae) in Japan[J]. Journal of Plant Research，2011，124(1): 1-9.

[4] PHILLIPS N，KAPRAUN D F，GOMEZ GARRETA A，RIBERA SIGUAN M A，RULL J L，SALVADOR SOLER N，LEWIS R，KAWAI H. Estimates of nuclei DNA content in 98 species of brown algae (Phaeophyta)[J]. AoB Plants，2011: r001.

[5] SEDZIELEWSKA K A，FUCHS J，TEMSCH E M，BARONIAN K，WATZKE R，KUNZE G. Estimation of the *Glomus intraradices* nuclei DNA content[J]. New Phytologist，2011，192(4): 794-797.

[6] LOUREIRO J，RODRIGUEZ E，DOLEZEL J，SANTOS C. Comparison of four nuclei isolation buffers for plant DNA flow cytometry[J]. Annals of Botany，2006，98(3): 679-689.

[7] DOLEZEL J，GREILHUBER J，SUDA J. Estimation of nuclei DNA content in plants using flow cytometry[J]. Nature Protocols，2007，2(9): 2233-2244.

[8] GALBRAITH D W，HARKINS K R.，MADDOX J M，AYRES N M，SHARMA D P，FIROOZABADY E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues[J]. Science，1983，220(4601): 1049-1051.

[9] OTTO F. 11 DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclei DNA[J]. Methods in Cell Biology，1990，33: 105-110.

[10] ARUMUGANATHAN K，EARLE E. Nuclei DNA content of some important plant species[J]. Plant Molecular Biology Reporter，1991，9(3): 208-218.

[11] DOLEZEL J，GOHDE W. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry[J]. Cytometry，1995，19(2): 103-106.

[12] PFOSSER M，AMON A，LELLEY T，HEBERLE-BORS E. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines[J]. Cytometry，1995，21(4): 387-393.

[13] LOUREIRO J，RODRIGUEZ E，DOLEZEL J，SANTOS C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species[J]. Annals of Botany，2007，100(4): 875-888.

[14] DOLEZEL J，GREILHUBER J，SUDA J. Flow cytometry with plant cells: analysis of genes，chromosomes and genomes[M]. Weinheim: Wiley-VCH，2007: 67-95.

[15] 田新民，周香艳，弓娜 . 流式细胞术在植物学研究中的应用-检测植物核 DNA 含量和倍性水平[J]. 中国农学通报, 2011，27(9): 21-27.
TIAN Xinmin，ZHOU Xiangyan，GONG Na. Applications of flow cytometry in plant research: analysis of Nuclei DNA content and ploidy level in plant cells[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin，2011，27(9): 21-27.

[16] 陶抵辉，李小红，王利群，周杰良，陈涌，霍稳根 . 植物染色体倍

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

性鉴定方法研究进展[J]. 生命科学研究，2009，13(5): 453-458.
TAO Dihui，LI Xiaohong，WANG Liqun，ZHOU Jieliang，CHEN Yong，HUO Wengen. Progresses on determination of cell chromesome ploidy level of plants[J]. Life Science Research，2009，13(5): 453-458

[17] MENG R，FINN C. Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science，2002，127(5): 767-775.

[18] OBIDIEGWU J，LOUREIRO J，ENEOBONG E，RODRIGUEZ E，KOLESNIKOVAALLEN M，SANTOS C，MUONEKE C，ASIEDU R. Ploidy level studies on the *Dioscorea cayenensis*/*Dioscorea rotundata* complex core set[J]. Euphytica，2009，169 (3): 319-326.

[19] OBIDIEGWU J，RODRIGUEZ E，ENEOBONG E，LOUREIRO J，MUONEKE C，SANTOS C，KOLESNIKOVA，A M，ASIEDU R. Ploidy levels of *Dioscorea alata* L. germplasm determined by flow cytometry[J]. Genetic resources and crop evolution，2010，57(3): 351-356.

[20] BENNETT M D，LEITCH I J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets，trends and tomorrow[J]. Annals of Botany，2011，107(3): 467-590.

[21] OUMAR D，SAMA A E，ADIOBO A，ZOK S. Determination of ploidy level by flow cytometry and autopolyploid induction in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*)[J]. African Journal of Biotechnology，2011，10(73): 16491-16494.

[22] 吕柳新，陈景禄，陈晓静 . 荔枝(*Litchi chinensis* Soon.)染色体数目与花粉母细胞减数分裂的研究[J]. 福建农学院学报，1987，3(16): 224-228.
LU Liuxin，CHEN Jinglu，CHEN Xiaojing. An approach to the chromosome unmber and meisoes of pollen mother cells in litchi (*Litchi chinensis* soon.) [J]. Journal of Fujian Agricultural University，1987，3(16):224-228

[23] 张永福，卢博彬，王英，潘丽佳，胡又厘，周佳，赵海燕，刘成明 . 荔枝和龙眼部分珍稀种质的染色体观察[J]. 园艺学报，2010，37(12): 1991-1994.
ZHANG Yongfu，LU Bobin，WANG Ying，PAN Lijia，HU Youli，ZHOU Jia，ZHAO Haiyan，LIU Chengming. The chromosomes observation of several rare germplasm in litchi and longan[J]. Acta Horticulturae Sinica，2010，37(12): 1991-1994

[24] 李彩琴，王泽槐，徐咏珊，张劲霭，李建国 . 流式细胞术细胞核分离缓冲液的改良及大、小果型荔枝幼果和果皮细胞分裂活性比较[J]. 园艺学报，2011，38(9): 1781-1790.
LI Caiqin，WANG Zehuai，XU Yongshan，ZHANG Jinguo，LI Jianguo. Improvement of the cell nuclei suspensions for flow cytometry and comparison on the cell division activity of litchi fruitlet and pericarp which having different final fruit size[J] Acta Horticulturae Sinica，2011，38(9): 1781-1790.

[25] VANBUREN R，LI J，ZEE F，ZHU J，LIU C，ARUMUGANATHAN A K，MING R. Longli is not a hybrid of longan and lychee as revealed by genome size analysis and trichome morphology[J]. Tropical Plant Biology，2011(4): 228-236.

[26] DOLEŽEL J，SGORBATI S，LUCRETTI S. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants[J]. Physiologia Plantarum，1992，85 (4): 625-631.

[27] DOLEŽEL J，BARTOS J，VOGLMAYR H，GREILHUBER J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human[J]. Cytometry A，2003，51(2): 127-129.

[28] EMSHWILLER E. Ploidy levels among species in the ‘Oxalis tuberosa Alliance’ as inferred by flow cytometry[J]. Annals of Botany, 2002, 89(6): 741-753.

[29] 王利虎, 吕晔, 罗智, 刘平, 刘孟军 . 流式细胞术估测枣染色体倍性和基因组大小方法的建立及应用[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(3): 511-520.
WANG Lihu, LÜ Hua, LUO Zhi, LIU Ping, LIU Mengjun. Establishment and Application of a Method for Chromosome Ploidy Identification and Genome Size Estimation Using Flow Cytometry in Ziziphus jujube [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(3): 511-520.

[30] 李诗琦, 张程, 高信芬 . 应用流式细胞术测定 17 种中国野生蔷薇核 DNA 含量[J]. 植物科学学报, 2017, 35(4): 558-565.
LI Shiqi, ZHANG Chen, GAO Xinfen. Estimation of nuclei DNA content of 17 Chinese wild rose species by flow cytometry [J]. Plant Science Journal, 2017, 35(4): 558-565.

[31] 杜文文, 王祥宁, 段青, 贾文杰, 马璐琳, 崔光芬, 王继华 . 34 种秋海棠基因组大小比较与分析[J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 370-376.
DU Wenwen, WANG Xiangning, DUAN Qing, JIA Wenjie, CUI Guangfen, WANG Jihua. Genome size comparison in 34 Begonia L. species[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19 (2): 370-376.

[32] JOHNSTON J S，BENNETT M D，RAYBURN A L，GALBRAITH D W，PRICE H J. Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei[J]. American Journal of Botany，1999，86(5): 609-613.

[33] LEAL F，LOUREIRO J，RODRIGUEZ E，PAIS M S，SANTOS C，PINTO C O. Nuclei DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo derived plants obtained from anther culture[J]. Plant Cell Reports，2006，25(9): 978-985.

[34] KRON P，SUDA J，HUSBAND B C. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology[J]. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics，2007，38: 847-876.

[35] LODHI M A，REISCH B I. Nuclei DNA content of *Vitis* species，cultivars，and other genera of the Vitaceae[J]. Theoretical and Applied Genetics，1995，90(1): 11-16.

[36] The Arabidopsis Genome. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*[J]. Nature，2000，408: 796-815.

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net