



利用流式细胞术鉴定桦木染色体倍性和DNA含量

黄茂根 沈凝 刘雪羽 吴兴盛 陈爱平 孟岩 胡现铭 童再康 黄华宏 楼雄珍

Identification of Chromosomal Ploidy and DNA Content in *Betula* by Flow Cytometry

Huang Maogen, Shen Ning, Liu Xueyu, Wu Xingsheng, Chen Aiping, Meng Yan, Hu Xiang, Tong Zaikang, Huang Huahong, Lou Xiongzheng

引用本文:

黄茂根, 沈凝, 刘雪羽, 吴兴盛, 陈爱平, 孟岩, 胡现铭, 童再康, 黄华宏, 楼雄珍. 利用流式细胞术鉴定桦木染色体倍性和DNA含量[J]. 西南林业大学学报, 2023, 43(1):49–57. doi: 10.11929/j.swfu.202105029

Huang Maogen, Shen Ning, Liu Xueyu, Wu Xingsheng, Chen Aiping, Meng Yan, Hu Xiang, Tong Zaikang, Huang Huahong, Lou Xiongzheng. Identification of Chromosomal Ploidy and DNA Content in *Betula* by Flow Cytometry[J]. Journal of Southwest Forestry University(Natural Science), 2023, 43(1):49–57. doi: 10.11929/j.swfu.202105029

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11929/j.swfu.202105029>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于流式细胞术的15个油茶品种基因组测定研究

Estimation of Genome Sizes of 15 *Camellia oleifera* Varieties Using Flow Cytometry Analysis

西南林业大学学报. 2018, 38(5): 46–51 <https://doi.org/10.11929/j.issn.2095–1914.2018.05.008>

云南蝗不同地理种群染色体研究

Chromosome Study on Different Geographical Populations of *Yunnanites coriacea*

西南林业大学学报. 2018, 38(2): 185–189 <https://doi.org/10.11929/j.issn.2095–1914.2018.02.029>

5种楠木木材DNA的提取与条形码鉴定

DNA Extraction and DNA Barcoding Identification of 5 Wood Species of *Phoebe* spp. and *Machilus* spp.

西南林业大学学报. 2019, 39(3): 141–148 <https://doi.org/10.11929/j.swfu.201808003>

15个北方杨树栽培品种倍性检测与SSR遗传分析

Ploidy Detection and Genetic Analysis of SSR Markers of 15 *Populus* Cultivars in North China

西南林业大学学报. 2018, 38(5): 27–33 <https://doi.org/10.11929/j.issn.2095–1914.2018.05.005>

古银杏半同胞家系染色体核型分析及进化趋势研究

Chromosome Karyotype Analysis and Evolutional Trend of Ancient *Ginkgo biloba* Half-sib Families

西南林业大学学报. 2017, 37(5): 15–21 <https://doi.org/10.11929/j.issn.2095–1914.2017.05.003>

紫雨桦花色苷含量的时空变化及相关基因的表达特性分析

Spatial and Temporal Content Levels of Anthocyanin and the Expression Characters of Some Related Genes in *Betula pendula*

西南林业大学学报. 2017, 37(2): 53–59 <https://doi.org/10.11929/j.issn.2095–1914.2017.02.009>

DOI: 10.11929/j.swfu.202105029

引文格式: 黄茂根, 沈凝, 刘雪羽, 等. 利用流式细胞术鉴定桦木染色体倍性和 DNA 含量 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学), 2023, 43(1): 49–57.

利用流式细胞术鉴定桦木染色体倍性和 DNA 含量

黄茂根¹ 沈凝² 刘雪羽² 吴兴盛¹ 陈爱平³ 孟岩⁴
胡现铭² 童再康² 黄华宏² 楼雄珍²

(1. 罗卜岩自然保护区管理站, 福建 三明 365050; 2. 浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 临安 311300;

3. 官庄国有林场, 福建 三明 365050; 4. 信阳市林业科学研究所, 河南 信阳 464000)

摘要: 基于流式细胞术 (FCM) 研究体系, 构建能快速、准确鉴定桦木属植物倍性和测定 DNA 含量的研究体系, 是测定不同桦木属植物倍性与基因组大小的有效方法。使用流式细胞术检测 7 种桦树属类物种, 以物种不同生长状态 (嫩叶、幼叶、成熟叶) 为实验材料, 不同存储方式 (常温、冷藏和聚乙烯吡咯烷酮保存 PVP) 进行实验处理, 对 9 种常用的裂解液进行筛选与优化。结果表明: 桦木属植物 DNA 含量测定中, 新鲜幼叶以 1% PVP 浸泡常温保存, 并使用 MgSO_4 裂解液制备细胞核悬浮液上机效果最佳; 桦木属植物中, 基因组倍性依次为黑桦 ($(2.09 \pm 0.04) \text{Gb}$, 8 倍体) > 坚桦 ($(1.53 \pm 0.08) \text{Gb}$, 6 倍体) > 光皮桦 ($(0.87 \pm 0.05) \text{Gb}$, 4 倍体) = 岳桦 ($(0.80 \pm 0.07) \text{Gb}$, 4 倍体) > 垂枝桦 ($(0.46 \pm 0.03) \text{Gb}$, 2 倍体) = 河桦 ($(0.51 \pm 0.01) \text{Gb}$, 2 倍体)。因此, 桦木属植物 DNA 倍性和 DNA 含量可以通过 FCM 研究体系进行测定, 且 3 倍体 ($(0.66 \pm 0.02) \text{Gb}$) 子代的鉴定结果表明光皮桦与河桦之间不存在生殖隔离。

关键词: 流式细胞术; 桦木; 染色体倍性; DNA 含量

中图分类号: S792

文献标志码: A

文章编号: 2095-1914(2023)01-0049-09

Identification of Chromosomal Ploidy and DNA Content in *Betula* by Flow Cytometry

Huang Maogen¹, Shen Ning², Liu Xueyu², Wu Xingsheng¹, Chen Aiping³, Meng Yan⁴,
Hu Xiange², Tong Zaikang², Huang Huahong², Lou Xiongzen²

(1. Nature Reserve Management Station of Luoboyan, Sanming Fujian 365050, China; 2. The State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Linan Zhejiang 311300, China; 3. Guanzhuang State-owned Forest Farm, Sanming Fujian 365050, China;
4. Xinyang Forestry Science Institute, Xinyang Henan 464000, China)

Abstract: This study aims to conduct flow cytometry (FCM) research that can accurately determine the ploidy level, DNA content, and genome size of different *Betula* species. Experimental materials with different growth stages (tender leaves, young leaves, mature leaves) were treated with varying methods of storage (room temperature, cold storage and polyvinylpyrrolidone, commonly referred to as PVP). Then, FCM was used to screen and optimize 9 kinds of commonly used dissociation fluids, and the cell ploidy and DNA content of the experimental materials were detected. The results showed that fresh young leaves, soaked in 1% PVP at room temperature and the

收稿日期: 2021-05-19; 修回日期: 2021-08-29

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (32001327) 资助; 浙江省自然科学基金项目 (LQ21C160002) 资助。

第 1 作者: 黄茂根 (1972—), 男, 高级工程师。研究方向: 苗木培育、森林经营、森林资源保护。

Email: jxk8850361@163.com。

通信作者: 楼雄珍 (1980—), 女, 高级实验室。研究方向: 林木遗传育种。Email: 13666630907@163.com。

nuclear suspension prepared by MgSO_4 dissociation solution, is the best dissociation fluid. Of all 7 tested *Betula* spp., the sequence of genomic ploidy was *Betula dahurica*(2.09 ± 0.04 Gb, octaploid) > *Betula chinensis*(1.53 ± 0.08 Gb, hexaploid) > *Betula luminifera*(0.87 ± 0.05 Gb, tetraploid) = *Betula ermanii*(0.80 ± 0.07 Gb, tetraploid) > *Betula pendula*(0.46 ± 0.03 Gb, diploid) = *Betula nigra*(0.51 ± 0.01 Gb, diploid). The ploidy level of *Betula luminifera* × *Betula nigra* hybrid progeny was found to be triploid(0.66 ± 0.02 Gb), which indicated that there was no reproductive isolation between the 2 species.

Key words: flow cytometry; *Betula*; chromosomal ploidy; DNA content

如何有效评估植物基因组大小是开展植物遗传改良和分子遗传学研究的关键问题之一。目前, 鉴定植物基因组大小的主要方法有流式细胞术 (FCM)、Feulgen 光密度测定法 (FDM) 和全基因组测序法 (WGS) [1], 其中 FCM 操作简单、检测结果准确、检测成本低, 是最常用的测定方法。例如, 通过对山茶属和山茶亚属株的 DNA 含量进行测定, 识别出普洱茶 (*Camellia sinensis* var. *assamica*) 的基因组大小 [2]; 通过对蓝莓 (*Vaccinium* spp.) 个体的测定, 发现其倍性丰富, 包含从 2 倍体到 6 倍体等不同的种 [3]; 通过对香蕉 (*Musa nana*) 的倍性检测, 发现其至少含 2 倍体、3 倍体和 4 倍体 [4]。物种基因组大小的预估, 可以提前预测解析其基因组所需要的成本, 为后续的测序组装等分析提供重要的理论参考, 同时也为遗传学和基因组学研究奠定基础。

桦木属 (*Betula*) 的适宜生态位主要分布于北半球亚热带、温带以及寒温带地区, 约有 100 个种 [5], 我国自然分布约 31 个种和 6 个变种 [6], 分布于我国的横断山区、四川盆地、滇南和新疆等地 [7]。桦木属植物包含很多重要的用材树种, 例如光皮桦 (*Betula luminifera*) 木材被我国列为一类木材, 生长快、抗性强, 具有很高的经济价值和广阔的开发前景。桦木属植物倍性丰富, 从 2 倍体到 12 倍体不等, 1C 值在 0.44 pg (430 Mb) 到 2.67 pg (2611 Mb) 之间, 2Cx 值在 371 Mb 到 616 Mb 之间 [8]。当前, 桦木属植物的基因组信息还不丰富 [9-10], 且缺乏针对桦木属植物的基因组评估测定方法。因此, 建立有效的评估体系对桦木属植物的倍性进行鉴定, 可快速鉴定桦木种间杂交后代的倍性, 可为未来选育出适应性强, 生长速度快, 材质优良的桦木新品种提供重要的技术支撑。然而, 目前国内对桦木属植物的研究大部分集中在其基因功能解析, 而对于桦木属植物倍性与 DNA 含量的研究相对较少, 这也

限制了我国桦木属植物的研究和快速发展。本研究利用 FCM 检测不同种类桦木属植物的细胞染色体的倍性, 并针对不同材料、试剂先进行优选, 筛选适合桦木属植物的 FCM 检测体系, 为未来的桦木属植物的倍性育种和全基因组测序分析以及多倍体植物的形成机制探索提供研究基础和参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料

7 种桦树: 河桦 (*Betula nigra*)、光皮桦、光皮桦 × 河桦 (*Betula luminifera* × *Betula nigra*)、垂枝桦 (*Betula pendula*)、黑桦 (*Betula dahurica*)、岳桦 (*Betula ermanii*)、坚桦 (*Betula chinensis*) 均为浙江农林大学苗圃地所栽培。毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 组培苗和光皮桦组培苗均为浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室组培室培养, 其中毛果杨与垂枝桦为本实验的对照。

1.1.2 仪器与试剂

流式细胞仪型号为 CytoFLEX9 (美国贝克曼库尔特有限公司); 荧光染料为碘化丙啶 (PI, SIGMA, 美国); RNaseA 购于天根生化科技 (北京) 有限公司; 滤膜、鞘液等试剂均购于美国贝克曼库尔特有限公司; 0.22 μm 微孔滤膜购于密理博 (中国) 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 裂解液与染料配制

实验所需细胞核裂解液的配方见表 1, 除 Otto II 常温下保存, 其余裂解液均使用 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤后冷藏保存。为去除双链 RNA 可能带来的干扰, PI 染液中可以加入适量 RNA 酶。由于见光易分解, PI 染液配制和保存方法参照弓娜等 [11] 制定的 FCM 在植物学研究中的应用方法, 终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 细胞核裂解液配方

Table 1 Formula of nuclear dissociation fluid

裂解液	配方
Galbraith's	30 mmol/L Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O, 45 mmol/L MgCl ₂ , 20 mmol/L MOPS, 0.1% (V/V) TritonX-100 (pH=7.0)
GPB	0.5 mmol/L C ₁₀ H ₂₆ N _{4.4} ClH, 30 mmol/L Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O, 20 mmol/L MOPS, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 0.5% (V/V) TritonX-100 (pH=7.0)
HEPES	10 mmol/L MgSO ₄ · 7H ₂ O, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L HEPES, 0.25% (V/V) TritonX-100 (pH=8.0)
LB01	15 mmol/L Tris, 2 mmol/L EDTA-Na ₂ · 2H ₂ O, 0.5 mmol/L C ₁₀ H ₂₆ N _{4.4} ClH, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 15 mmol/L C ₂ H ₆ OS, 0.1% (V/V) TritonX-100
Marie's	50 mmol/ L C ₆ H ₁₂ O ₆ , 15 mmol/ L NaCl, 15 mmol/ L KCl, 5 mmol/ L EDTA-Na ₂ , 50 mmol/ LNa ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O, 0.5% (V/V) Tween-20, 0.5% (V/V) C ₂ H ₆ OS, 50 mmol/L HEPES (pH=7.2)
MgSO ₄	10 mmol/L MgSO ₄ · 7H ₂ O, 50 mmol/L KCl, 5 mmol/L HEPES, 0.25% (V/V) TritonX-100, 3 mmol/L C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂ (pH=8.0)
mGb	45 mmol/L MgCl ₂ , 20 mmol/L MOPS, 30 mmol/L Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O, 1% (V/V) PVP-40, 0.2% (V/V) TritonX-100, 10 mmol/L EDTA-Na ₂ · 2H ₂ O, 20 mmol/L C ₂ H ₆ OS (pH=8.0)
OTTO	Otto I: 100 mmol/L C ₅ H ₆ O ₇ , 0.5% (V/V) Tween-20 (pH=2.0 ~ 3.0); Otto II: 400 mmol/L Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O (pH=8.0 ~ 9.0) (细胞核在Otto I buffer中提取, DNA染色在Otto I和Otto II的混合液(1 : 4)中进行。)
Tris-MgCl ₂	200 mmol/L Tris, 4 mmol/L MgCl ₂ · 6H ₂ O, 0.5% (V/V) TritonX-100 (pH=7.0 ~ 8.0)

1.2.2 细胞核悬浮液制备

选取 60 mg 植物新鲜叶片放入 9 cm 的一次性培养皿中，加入 1 mL 预冷的细胞裂解液与 500 μL 浓度为 1% PVP 溶液，用锋利的双面刀片快速切碎。利用 3 mL 塑料吸管将悬浮液吸取并通过 500 目的滤膜将悬浮液过滤，滤液收集至 2 mL 离心管中，冰上静置 5 min。1000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 100 μL 预冷的裂解液重悬，再加入 150 μL 预冷的含 RNase 的 PI 染液对细胞核进行荧光染色，4 ℃ 避光孵育 5 min。用 500 目的滤膜再过滤，移至上样管，上机检测，低速收集记录 10000 个颗粒。

1.3 叶片状态与保存方式处理

叶片状态分为 3 种：嫩叶为 2 个月的组培苗从上往下数第 1 或 2 片叶片，幼叶为野外 1 a 生枝条从上往下数的第 1 至 2 片叶，成熟叶为野外 1 a 生枝条上第 5 片叶片。

当天采集幼叶的保存方式分为 4 种：保存方式 1，将其放入保鲜袋中常温保存；保存方式 2，将其放入保鲜袋中冷藏保存；保存方式 3，放入含有 1% PVP 的 PE 管中常温保存（3 h）；保存方式 4，放入含有 1% PVP 的 PE 管中常温保存 24 h。

1.4 数据分析

1.4.1 倍性及 DNA 含量计算

对已知 DNA 含量的对照样本进行测定，根据通过 PI 染色的细胞核的相对荧光强度比值来计

算出待测样本的 DNA 含量^[12]，再通过已知倍性为 2 倍体的垂枝桦的荧光强度来计算出未知桦木属植物的 DNA 倍性。

1.4.2 数据收集及分析

PI 荧光激发波长为 488 nm，上机后收集通道 585/42BP 的荧光，检测 PI 发射的荧光强度。变异系数（CV）值控制在 5% 以内。使用 CyExpert 软件进行数据收集与分析。参照 Huang 等^[2]提供的计算公式计算样本的 1C 值。每个样本检测 3 次，利用 SPSS 22 软件进行数据的显著性分析。

2 结果与分析

2.1 裂解液种类对检测效果的比较

由于目前植物还没有通用的细胞核裂解液，因此筛选出对该物种细胞核提取效果最佳的裂解液对于流式细胞检测而言至关重要。本实验利用光皮桦组培苗嫩叶为材料进行实验，结果如图 1 所示，Galbraith's、GPB、LB01、Marie's 裂解液杂质多，均出现明显杂质峰，其中 Marie's 裂解液收集的有效细胞核数最少（不足 160），通过散点图发现颗粒分布并不集中，大部分为细胞杂质碎片，表明这些裂解液不能较好的提取细胞核。图 1c、i 中发现 HEPES 与 Tris-MgCl₂ 裂解液所得直方图虽看起来杂质干扰较少，但 HEPES 裂解液的 CV 值大于 5%，结果不可信，Tris-MgCl₂ 裂解液所得直方图出现 G₁ + G₂ 期峰，说明出现了

细胞核黏连的情况。图 1h 发现 OTTO 裂解液显示 G_1 期峰左右不对称, 对光皮桦而言不是最佳裂解液。图 1f、g 中 mGb 裂解液与 $MgSO_4$ 裂解液所得 G_1 期峰左右对称, G_2 期峰明显, 无杂峰干扰, mGb 裂解液提取速率为 311 个/秒, $MgSO_4$

裂解液提取速率为 485 个/秒, 提取速率高, 均可作为制备光皮桦组培苗单细胞悬浮液的裂解液。但 $MgSO_4$ 裂解液提取效果略高, 因此, 选择 $MgSO_4$ 裂解液进行进一步实验。

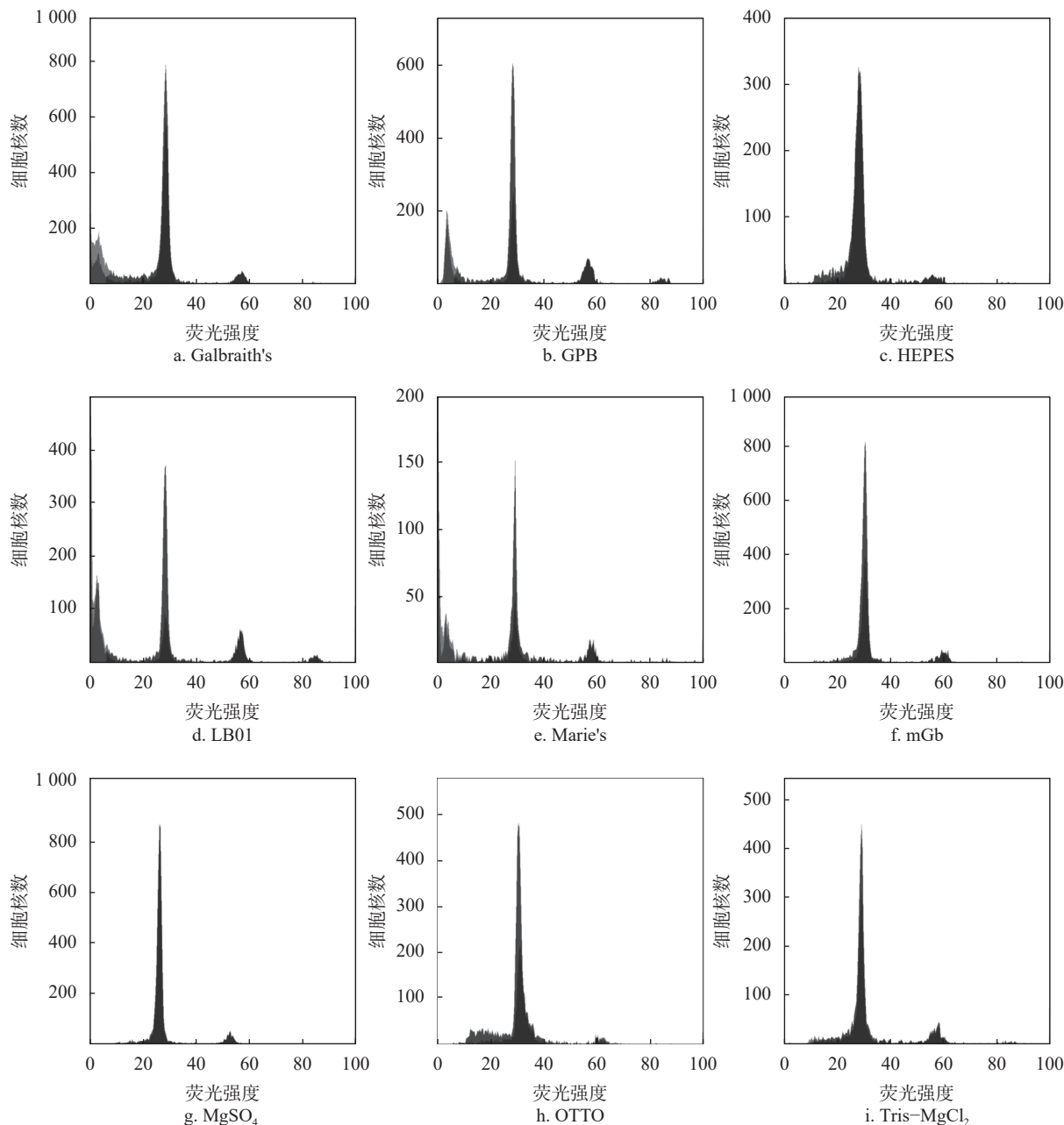


图 1 光皮桦样品不同裂解液流式细胞分析直方图

Fig. 1 Histograms of *Betula* prepared from different nuclear dissociation solutions

2.2 叶片成熟度对检测效果的影响

由图 2c 可知, 由于成熟叶次生代谢旺盛, 产生大量多糖多酚物质易被氧化, 使提取液变得浓稠, 无法通过 500 目的滤膜, 从而干扰 $MgSO_4$ 裂解液的提取效率, 使得收集有效颗粒数极少, 不到 20 个, G_1 期峰出峰困难, 杂峰明显。图 2b 中

幼叶 G_1 期出峰明显, G_2 期清晰, 收集有效细胞核数比嫩叶稍低, 结果清晰可靠。虽然嫩叶的直方图最好, 但由于外植体杀菌进行组培培养时间长, 培养程序复杂, 而幼叶来源简单, 采摘方便, 更适合野外样品的快速检测, 可替代嫩叶制备细胞核悬浮液进行流式检测。

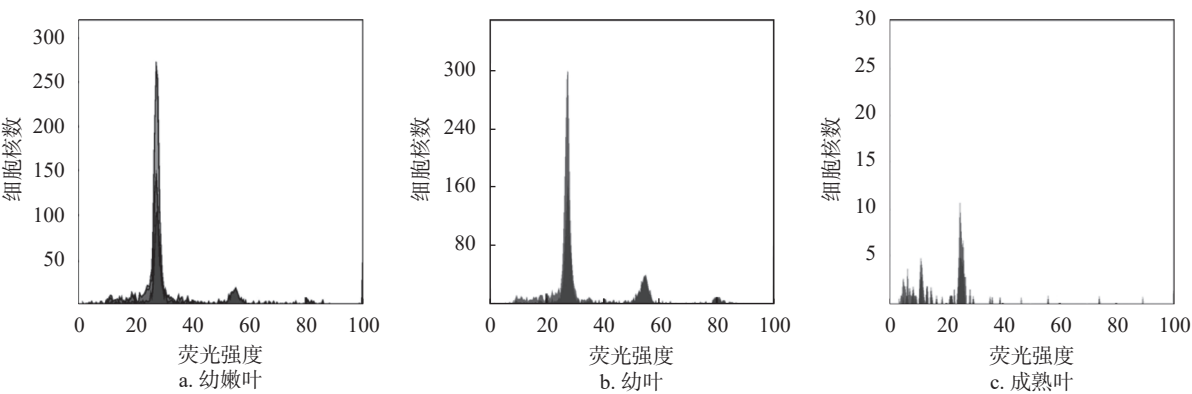


图 2 MgSO_4 裂解液制备嫩叶、幼叶与成熟叶

Fig. 2 The preparation of tender, young and old leaves with MgSO_4 buffer

2.3 叶片保存方式对检测效果的影响

由图 3a 可知，常温保存的 G_1 期峰明显，杂峰干扰较大。由于常温保存会使叶片中多糖多酚类物质氧化干扰裂解液提取细胞核而产生较大的杂质峰，CV 值为 5.00%。图 3b 为冷藏保存， G_1 和 G_2 期峰明显，杂峰较少，CV 值小于 5.00%，这种保存方式较好，但野外采样携带冰盒不便。由图 3c 可知，叶片放入 1%PVP 液体中也可以减少叶片中多糖多酚物质氧化，从而使细胞核悬浮

液检测所得直方图杂质峰较小， G_1 期峰左右对称， G_2 期峰明显，能得到冷藏保存的检测效果，且细胞核提取量较高。由图 3d 可知，保存时间对提取效果影响巨大， G_1 期峰左边出现明显杂质峰，CV 值为 6.84%，大于 5%，一般情况下 CV 值在 5% 以下为可信，所以结果不可靠。野外采样为了减少负重，增加样品量将待测幼叶放入 1%PVP 中浸泡常温保存并及时上机检测比较好。

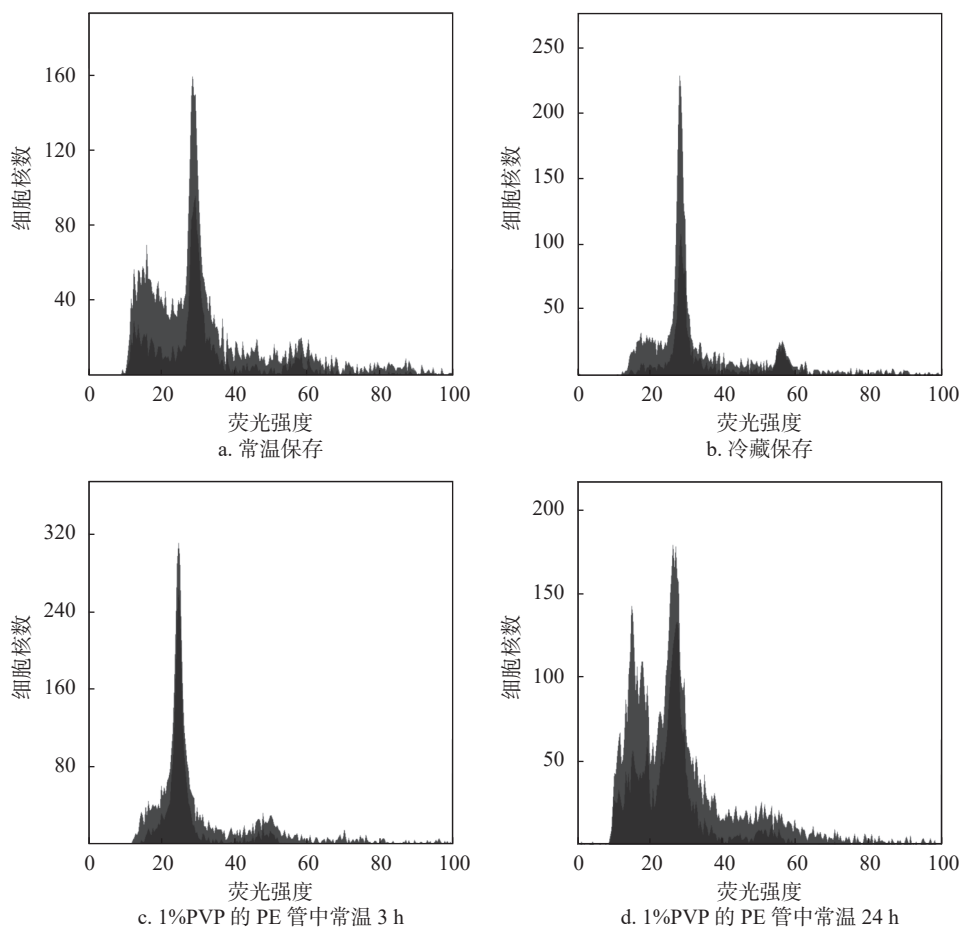


图 3 不同保存方式对检测效果的影响

Fig. 3 The effect of different preservation methods on detection effect

2.4 桦木属植物不同倍性间荧光强度比较

利用光皮桦筛选所得的流式细胞术体系检测其余桦木属植物的适用性。由于对照样本杨树 (*Populus sp.*) 与垂枝桦的基因组大小相近, 所以采用外标法进行检测。用已知基因组大小的毛果杨作为对照, 检测已知倍性和基因组大小的 2 倍体桦木垂枝桦, 初步确定对照与待测样本的荧光强度范围, 设定检测模板, 在同一个模板下对其余 6 个桦木属植物进行倍性鉴定。PI 染液可以非特异性结合碱基, 适用于基因组大小测定与倍性鉴定, 为防止 RNA 干扰加入 RNaseA, 此时的荧光强度可以代表 DNA 相对含量^[13]。因此, 根据 DNA 含量计算公式^[1] 可算出待测样品 DNA 含

量。以毛果杨为参照估测其余桦木属植物 DNA 含量, 并以垂枝桦为对照估测其余桦木属植物 DNA 倍性。结合图 4 与表 2 发现河桦与垂枝桦的 DNA 倍性均为 2 倍体, 光皮桦 × 河桦 DNA 倍性为 3 倍体, 光皮桦与岳桦的 DNA 倍性为 4 倍体, 坚桦 DNA 倍性为 6 倍体, 黑桦 DNA 倍性为 8 倍体。光皮桦基因组为 (889.29 ± 48.94) Mb, 河桦基因组大小为 (519.78 ± 12.18) Mb, 光皮桦 × 河桦的 DNA 含量在河桦与光皮桦之间, 为 (670.66 ± 21.81) Mb, 估计为 3 倍体, 由此可证明光皮桦与河桦之间无生殖隔离, 这可为未来的倍性育种提供新的依据。

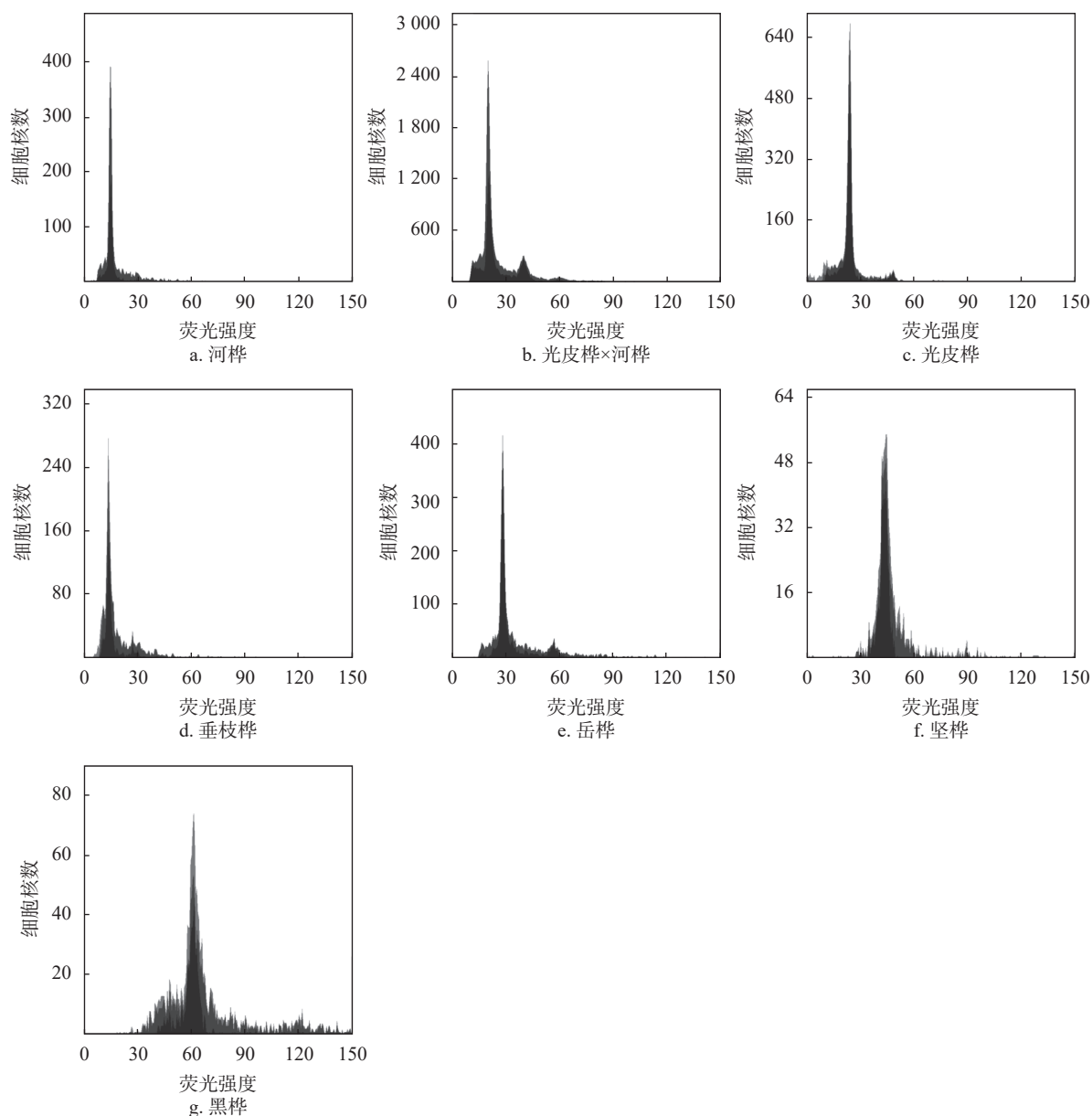


图 4 桦木属植物 DNA 峰值图

Fig. 4 Flow histogram of *Betula*

表 2 桦木属 DNA 含量及倍性估计
Table 2 Ploidy and DNA content in *Betula*

样本	峰值	DNA 含量/(Mb·C ⁻¹)	DNA 倍性	1Cx 值/pg
垂枝桦	165 895.40 ± 12 191.11	471.94 ± 34.68 ^a	2×	0.48 ± 0.01 ^a
河桦	182 713.80 ± 4 281.82	519.78 ± 12.18 ^a	2×	0.53 ± 0.02 ^b
光皮桦 × 河桦	235 750.63 ± 7 668.16	670.66 ± 21.81 ^b	3×	0.46 ± 0.04 ^a
岳桦	289 028.37 ± 24 180.25	822.22 ± 68.79 ^c	4×	0.42 ± 0.03 ^a
光皮桦	312 605.46 ± 17 203.91	889.29 ± 48.94 ^c	4×	0.45 ± 0.03 ^a
坚桦	549 673.80 ± 30 055.00	1 563.70 ± 85.50 ^d	6×	0.53 ± 0.05 ^{ac}
黑桦	752 243.27 ± 14 608.20	2 139.96 ± 41.56 ^e	8×	0.55 ± 0.06 ^{bc}

注：1 pg=978 Mb；不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。

分析结果显示，垂枝桦基因组大小为 (471.94 ± 34.68) Mb，这与 Saloj 等^[4]发表的垂枝桦基因组大小（440 Mb）非常相近。此外，岳桦、坚桦、黑桦的基因组大小分别为 (822.22 ± 68.79) Mb、 (1563.70 ± 85.50) Mb、 $(2\,139.96 \pm 41.56)$ Mb。同时，不同倍性桦木的 DNA 含量差异显著（ $P<0.05$ ），相同倍性桦木的 DNA 含量差异不显著（表 2），由此可以推测桦木属植物多倍体可能是由染色体加倍导致，基因组缩小现象也不明显。为进一步研究桦木基因组大小演变，本研究还计算了 1Cx 值，其中方差分析发现 1Cx 为 0.42 ~ 0.55 pg，基本分为垂枝桦与河桦两大类，黑桦单独为一类，垂枝桦与光皮桦 × 河桦、岳桦、光皮桦、坚桦的 1Cx 值差异均不显著，与河桦、黑桦间 1Cx 值差异显著（ $P<0.05$ ）；河桦与黑桦之间 1Cx 值差异不显著；坚桦与黑桦之间 1Cx 值差异不显著，黑桦与其余桦木 1Cx 值差异均显著（ $P<0.05$ ）。

3 结论与讨论

FCM 检测具有速度快、重复性好、检测准确等优点，但准确度受植物组织、裂解液、叶片的成熟度和保存方式的影响较大。其中裂解液是 FCM 检测倍性实验成功的关键，它决定了细胞核能否完整的被分离出来，细胞核能否被 PI 染料染色。目前，还未发现植物的通用裂解液，因此需要筛选甚至优化裂解液来获得最佳的细胞核悬浮液进行上机检测。判断本实验结果可靠性的标准是 CV 值^[12]，CV 值越小，所得峰值结果越可靠，一般来说 CV 值小于 5% 可视为可信。本实验对 9 种裂解液进行筛选，最终得出 MgSO₄ 裂解液提取效果最佳，CV 值控制在 3% 以内。FCM 方法鉴定倍性的实验中，不同物种对应的最优裂解液

也不同，如对槭属植物解离效果均较好的是 LB01 解离液^[15]；Galbraith's 解离液对莲瓣兰（*Cymbidium tortisepalum*）和墨兰（*Cymbidium sinense*）样品解离效果最好^[16]；同时，研究发现使用 Galbraith's 解离液对金线莲（*Anoectochilus roxburghii*）样品的解离效果也较好^[17]。桦木属植物叶片含有丰富的多糖与多酚物质，易被氧化，提取时加入 500 μL 体积浓度为 1%PVP 和裂解液中的 TritonX-100 可消除糖类、酚类杂质带来的影响^[18]，MgSO₄ 裂解液含有稳定核染色体的 Mg²⁺，KCl 可以维持植物细胞渗透压，使细胞不易破碎，减少胞质中的多糖与多酚物质游离出来影响细胞核悬浮液的质量，DTT 的加入使染色质得到保护，进一步消除酚类物质对 DNA 染色的影响^[11]。选择合适的材料与保存方式可提高 FCM 的可行性，通常新鲜幼叶更加容易被检测。叶片的生长状态直接影响到制备的细胞核悬浮液能否用于检测，一般情况下，老叶中的酚类次生代谢产物较多，易被氧化从而破坏细胞核的结构^[19]，例如栎属植物老叶的细胞核提取产率就远低于幼叶^[20]。本研究得出桦木属植物新鲜幼叶在 1% PVP 溶液中浸泡常温保存，用 MgSO₄ 裂解液制备细胞悬浮液进行检测效果较好。

桦木属植物的材质优良，经济价值高^[7]，部分种可作为观赏树种，且种间与种内变异丰富，是优良的林木遗传研究材料。然而，桦木属植物的基因组信息还不丰富^[9-10]，目前在植物 DNA C 值数据库中仅包含 5 个桦木树种^[16]。“1C 值”的概念由 Greilhuber 等^[21]于 2005 年提出，代表一半体细胞 DNA 的含量（2C），是统计植物基因组大小的有效指标。本研究发现不同倍性桦木 DNA 含量存在显著差异，1C 值在 0.42 ~ 0.55 pg 之间，与 Wang 等^[8]发现桦木属植物从 2 倍体到

12 倍体的 1C 值在 0.42 ~ 0.57 pg 之间结果相似。此外, 本研究结果中发现垂枝桦与光皮桦倍性不同, 但它们之间 1Cx 值差异不显著, 且坚桦与黑桦也属于类似情况, 这可能是由于植物体内多倍化水平由组织器官和发育阶段差异造成。植物不同器官的多倍化水平不一致现象已经在芸薹属^[22]、紫薇 (*Lagerstroemia indica*)^[23]、大麦 (*Hordeum vulgare*) 和小麦 (*Triticum aestivum*)^[24] 等植物中被发现, 但桦木属植物中还缺乏类似的研究, 未来需要更深入的研究。此外, 基因组重复或加倍、DNA 丢失等均是造成基因组 C 值差异的重要因素^[19], 目前国内关于桦木属植物 C 值的测定还未展开, 还需要更多的研究来分析桦木属植物的基因组变化规律和主要影响因素。

对桦木植物倍性的鉴定中, 本实验所测得河桦为 2 倍体, 但河桦种内变异相对较大, 种内存在 2 倍体、3 倍体和 4 倍体等不同倍性变种^[25]。本实验中垂枝桦基因组大小被鉴定为 0.48 pg, 这与 Saloj 等^[18] 所测基因组 0.45 pg 大小相近。光皮桦 × 河桦杂种的倍性为 3 倍体, 由此可知 2 倍体河桦与 4 倍体光皮桦间不存在生殖隔离, 能通过杂交产生新的桦木种质。大部分情况下, 3 倍体植物一般不育, 生殖生长所需营养可供营养生长, 使木材的材性更加优良, 因此, 3 倍体林木的繁育更有利于材质的改良。FCM 鉴定出光皮桦 × 河桦子代倍性为 3 倍体, 可以为种间杂种鉴定提供一条新的研究道路。此外, FCM 在其他桦木树种上也有成功的应用, 如冰岛的沼桦 (*Betula nana*) 被鉴定为 2 倍体, 西伯利亚银色桦 (*B. pubescens*) 为 4 倍体, 沼桦 × 西伯利亚银色桦 (*B. nana* × *B. pubescens*) 为 3 倍体, 平均 1C 值分别为 448、666、882 Mb^[26], 与本研究中的河桦、光皮桦、光皮桦 × 河桦所测结果相似, 说明 FCM 是鉴定桦木倍性的有效手段, 且自然界广泛存在着不同倍性桦木杂交以适应新的环境。相对于传统的染色体计数法来确定植物的倍性, FCM 的研究方法相对简单, 工作量较小, 对实验室的条件要求也不高, 但显微镜以及更先进的扫描电镜对植物染色体进行观察仍然是确定植物倍性最基本的方法, 往往多种方法的结合运用才能更精确的鉴定植物倍性。

本研究发现, MgSO₄ 裂解液是提取光皮桦细胞核的最佳裂解液, 桦木属植物幼叶次生代谢产物少, 适合作为 FCM 的检测材料。研究结果分别揭示了垂枝桦、河桦、光皮桦 × 河桦、岳桦、光

皮桦、坚桦、黑桦的 DNA 倍性和含量, 为桦木属植物的基因组学研究、细胞生物学和种质资源研究提供了基础数据。同时, 有效的 FCM 评估体系的建立, 可快速鉴定桦木种间杂交后代的倍性, 可为未来选育出适应性强, 生长速度快, 材质优良的桦木新品种提供重要的技术支撑。

[参 考 文 献]

- [1] Leutwiler L S, Hough-Evans B R, Meyerowitz E M. The DNA of *Arabidopsis thaliana* [J]. Molecular & General Genetics, 1984, 194(1): 15-23.
- [2] Huang H, Tong Y, Zhang Q J, et al. Genome size variation among and within *Camellia* species by using flow cytometric analysis [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64981.
- [3] Sakhanokho H F, Rinehart T A, Stringer S J, et al. Variation in Nuclear DNA Content and Chromosome Numbers in *Blueberry* [J]. Scientia Horticulturae, 2018, 233: 108-113.
- [4] 吕顺, 任毅, 王芳, 等. 利用流式细胞术快速鉴定 169 份香蕉种质资源的染色体倍性 [J]. 果树学报, 2018, 35(6): 668-684.
- [5] Furlow J J. The Genera of *Betulaceae* in the Southeastern United States [J]. Journal of the Arnold Arboretum, 1990, 71(1): 1-67.
- [6] 姜景民. 中国桦木属植物地理分布的研究 [J]. 林业科学研究, 1990, 3(1): 57-64.
- [7] 郑万钧. 中国树木志 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1983.
- [8] Wang N, McAllister H A, Bartlett P R, et al. Molecular phylogeny and genome size evolution of the genus *Betula* (Betulaceae) [J]. Annals of Botany, 2016, 117(6): 1023-1035.
- [9] Ivan K, Rostislav L, Tomáš F, et al. Is *Betula carpatICA* genetically distinctive? A morphometric, cytometric and molecular study of *Birches* in the Bohemian Massif with a focus on *Carpathian birch* [J]. PLoS One, 2019, 14(10): e0224387.
- [10] Yang X Y, Wang Z F, Zhang L, et al. A chromosome-level reference genome of the hornbeam, *Carpinus fangiana* [J]. Scientific Data, 2020, 7(1): 24.
- [11] 弓娜, 田新民, 周香艳, 等. 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.
- [12] 李彩琴, 王泽槐, 徐咏珊, 等. 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.
- [13] Doležel J, Greilhuber J, Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry [J]. Nature Protocols, 2007, 2(9): 2233–2244.
- [14] Saloj R J, Smolander O P, Nieminen K, et al. Genome sequencing and population genomic analyses provide insights into the adaptive landscape of *Silver birch* [J]. Nature Genetics, 2017, 49(6): 904.
- [15] 马秋月, 李淑顺, 马骧, 等. 基于流式细胞技术的两种械属植物基因组大小测定 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2018, 42(5): 205–209.
- [16] 林瀚, 韩晓文, 兰思仁, 等. 基于流式细胞技术两种兰属植物基因组大小的测定 [J]. 福建林学院学报, 2019, 39(6): 616–620.
- [17] 林瀚, 王晶晶, 黄华星, 等. 利用流式细胞技术测定和评估金线莲基因组大小 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2020, 49(6): 48–53.
- [18] 汪艳, 肖媛, 刘伟, 等. 流式细胞仪检测高等植物细胞核DNA含量的方法 [J]. 植物科学学报, 2015, 33(1): 126–131.
- [19] 魏高明, 方炎明. 栎属植物流式细胞术实验体系的建立与优化 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2015, 39(1): 167–167.
- [20] Pellicer J, Leitch I J. The application of flow cytometry for estimating genome size and ploidy level in plants [J]. Molecular Plant Taxonomy, 2014, 1115: 279–307.
- [21] Greilhuber J, Doležel J, Lysák M A, et al. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents [J]. Annals of Botany, 2005, 95(1): 255–260.
- [22] Kudo N, Kimura Y. Flow cytometric evidence for endopolyploidy in seedlings of some *Brassica* species [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 102(1): 104–110.
- [23] 宋新红. 紫薇多倍体的诱导, 鉴定及内多倍性 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [24] 曾章慧. 大、小麦根系内多倍性差异对盐和磷胁迫的反应 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [25] Eaker T A, Ranney T G, Vilorio Z J, et al. Variation in ploidy level among *Birch* Taxa [C] // Plant Breeding & Evaluation Section. SNA Research Conference 2004, 49: 548–551.
- [26] Anamthawat-Jonsson K, Temsch E, Greilhuber J. Icelandic *Birch* polyploids—the case of a perfect fit in genome size [J]. Journal of Botany, 2010: 347254.

(责任编辑 张 坤)

