

流式细胞仪检测香花油茶、越南油茶基因组大小方法的建立及应用

吴方圆¹, 蔡 娅¹, 郝丙青¹, 贾艳霞², 叶 航¹, 张照远^{1*}, 马锦林^{1*}

1. 广西壮族自治区林业科学研究院/广西经济林培育与利用重点实验室/广西油茶良种与栽培技术创新中心, 广西南宁 530002; 2. 中国科学院昆明植物研究所/中国西南生物种质资源库分子生物学实验中心, 云南昆明 650000

摘 要: 为香花油茶 (*Camellia osmantha*)、越南油茶 (*C. vietnamensis*) 优良品系基因组大小遗传多样性分析及特异种质筛选、倍性差异分析提供参考, 针对解离液种类、内参植物、试验材料组织器官等关键环节, 以细胞核解离情况、次生代谢物质降解情况、细胞峰出峰稳定情况、主峰清晰程度、主杂峰分离程度、取材容易程度、内参与待测样品基因组大小差异情况、基因组大小测定准确性及变异系数等方面为评价指标, 构建基于香花油茶良种义禄 (*Camellia osmantha* var. Yilu)、越南油茶优良品系鸿鹄 23 (*C. vietnamensis* var. Hongu 23) 为试材的流式细胞术基因组大小检测技术体系, 并用于香花油茶、越南油茶优良品系的测定。结果表明: 研究发现 4 种常见的解离液 WPB、Tris-MgCl₂、OTTO、mG^b 中 WPB、mG^b 解离效果较好, 内参植物以豌豆、玉米为优先, 试验材料组织器官以嫩叶或根尖为宜; 香花油茶优良品系基因组大小在 5.12~9.31 Gb 之间变化, 均值为 7.60 Gb, 1 号、37 号、45 号种质在基因组大小分布上存在极端性, 推测其存在倍性差异或其亲本间存在种间杂交; 越南油茶优良品系基因组大小在 9.17~9.85 Gb 之间变化, 均值为 9.47 Gb。香花油茶与越南油茶优良品系群体间在基因组大小上存在明显差异。

关键词: 油茶; 基因组大小; 流式细胞仪

中图分类号: S794.4 文献标识码: A

Establishment of a Flow Cytometry Method for Genome Size Determination of *Camellia osmantha* and *Camellia vietnamensis* and Its Application

WU Fangyuan¹, CAI Ya¹, HAO Bingqing¹, JIA Yanxia², YE Hang¹, ZHANG Zhaoyuan^{1*}, MA Jinlin^{1*}

1. Guangxi Forestry Research Institute / Guangxi Key Laboratory of Special Non-wood Forest Cultivation and Utilization / Improved Variety and Cultivation Engineering Research Center of Oil-tea *Camellia* in Guangxi, Nanning, Guangxi 530002, China; 2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences / Molecular Biology Experiment Center, Germplasm Bank of Wild Species in Southwest China, Kunming, Yunnan 650000, China

Abstract: A technique system for detecting the genome size of *Camellia oleifera* by flow cytometry was established to analyze the genome size genetic diversity between the superior lines of *C. osmantha* var. Yilu and *C. vietnamensis* var. Hongu 23, and to provide reference for selection of special germplasm and analysis of ploidy difference, based on the key links such as the type of dissociated liquid, the plant of internal reference, the tissue organ of the test material, evaluation indexes such as the nuclear dissociation, the degradation of secondary metabolites, the stability of the cell peak, the clear degree of the main peak, the separation degree of the main and miscellaneous peak, the easy degree of

收稿日期 2022-09-22; 修回日期 2022-10-10

基金项目 广西林科院基本科研业务费专项 (林科 202109 号); 广西特色经济林培育与利用重点实验室自主课题资助项目 (No. 19-A-01-01); 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科 AB21076012)。

作者简介 吴方圆 (1992—), 男, 博士研究生, 研究方向: 油茶育种栽培。*通信作者 (Corresponding author): 张照远 (ZHANG Zhaoyuan), E-mail: zzy3564@163.com; 马锦林 (MA Jinlin), E-mail: majinlin009@163.com。

sampling, the difference of the genome size of the internal participating samples, the accuracy of genome size determination and the coefficient of variation. The method was used to determine the genome size of the superior lines of *C. osmantha* and *C. vietnamensis*. The disintegrating effect of WPB and mG^b was better among common dissociative fluids WPB, Tris-MgCl₂, OTTO, mG^b. Pean and corn were the favorable internal plants, and young leaf or root tip were the favorable experimental materials. The genome size of the superior lines of *C. osmantha* was from 5.12 to 9.31 Gb, with an average value of 7.60 Gb, the genome size distribution of the superior lines No. 1, No. 37 and No. 45 was extreme, and it was speculated that there were ploidy differences or interspecific hybridization between the parents. The genome size of superior lines of *C. vietnamensis* varied from 9.17 to 9.85 Gb, the mean value was 9.47 Gb. There was significant difference in genome size between the superior lines of *C. osmantha* and *C. vietnamensis*.

Keywords: *Camellia oleifera*; genome size; flow cytometry

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.08.003

油茶 (*Camellia oleifera*) 是世界四大木本食用油料植物、我国四大木本油料植物、我国最重要的食用油料树种。经济价值高、用途广、综合开发范围广、利用潜力大, 被农户称为“铁杆庄稼”“绿色油库”。发展油茶产业, 对于缓解我国耕地资源刚性不足, 保障食用植物油供给安全, 优化食用植物油结构, 促进国民健康和推进丘陵区农民精准扶贫等都具有非常重要的意义。油茶产业受到国家和各级政府的高度重视, 正处于快速发展期。2022 年中央一号文件中明确提出“支持扩大油茶种植面积, 改造提升低产林”。作为我国油茶三大主产区的广西, 油茶是广西九大农业产业和五大林业优势产业之一, 是长期巩固精准脱贫成效的压舱石。广西实施千万亩油茶、千亿元产业的“双千计划”, 根据广西壮族自治区林业局统计资料, 截至 2021 年底, 全区油茶种植面积达 57.07 万 hm²。

广西长期以来以普通油茶岑软 2 号、岑软 3 号等品种为主, 种植品种较为单一。广西拥有丰富的油茶特色种质资源^[1], 其中香花油茶和越南油茶是广西地区今后大力发展的油茶物种。广西壮族自治区林业科学研究院自 2005 年开始香花油茶选育的研究, 获得 160 多份优良种质。近年来香花油茶生长快、适应性抗逆性强、结果多等优良特性得到广大种植户、企事业单位的认可, 正在大力推广中。越南油茶是南亚热带分布的重要物种, 研究相对薄弱, 经过十多年的研究获得 30 多份优良种质, 其大果特性适合应对今后劳动力短缺价格昂贵、摘果费时费力等生产实际问题。目前这些优良品系均保存在广西国家油茶种质资源库中, 围绕这些种质已开展新品种良种审(认)定工作, 截至 2022 年 9 月, 获得香花油茶新品种 10 个、良种 6 个, 越南油茶新品种 3

个; 已开展杂交育种、家系繁育工作, 已开展植物学性状、经济性状及少量分子标记等方面多样性研究, 但关于基因组大小遗传多样性方面的研究尚未开展。检测其基因组大小, 为今后基因组测序模式种质筛选提供方便, 为今后分子研究提供铺垫, 有助于初步推测其倍性及物种间自然杂交可能性, 为今后多倍体授粉可配性研究、多倍体种质创制提供基础, 以减少育种的工作量及盲目性。开展基因组大小多样性方面的研究, 有助于克服环境带来的表型差异影响, 从遗传物质的角度更深一步筛选特异种质。

应用流式细胞术测定蔷薇、茉莉花、山竹、甘蔗、火龙果、葡萄、枣、萝芙木、橡胶、柳树、桑树、茶树等植物构建的流式细胞术基因组大小检测技术体系均不尽相同^[2-5]。龚倩颖^[6]针对海南油茶分别以根、叶片、花瓣 3 个部位的材料进行流式细胞术试验, 结果发现, 以花瓣为材料获得的效果最好, 嫩叶次之, 以扦插苗的根为材料很难得到理想的结果, 以成熟叶片为材料在加入染色剂后出现严重褐化现象, 容易堵塞仪器, 致使试验无法进行; 杨晓兰等^[7]针对江西 15 个油茶品种用水稻 (389 Mb) 为内标, 从常规 Gal、WPB、Tris-MgCl₂、OTTO 等 4 种解离液中筛选出适合油茶的流式细胞术的解离液为改良的 OTTO。由于试材种类状态、试验平台条件、试验人员技术水平与测定结果准确性要求程度等方面的不同, 各地科技人员都在因地制宜构建适合的流式细胞术基因组大小检测技术体系。

基因组大小是指生物体的单倍体基因组所含的 DNA 含量^[8]。流式细胞术可以用来测定植物 DNA 的绝对含量, 是近年发展起来的测定方法, 通过比较荧光强度, 从而计算出待测样品 DNA 含量。该方法不受植物体取材部位和细胞所处时

期限限制,取材部位可以是叶片、茎、根、花、果皮、种子等。特别是在离体培养过程中,植株或芽很小和很嫩时,此方法仅用 1 cm^2 的样品就很容易决定其材料倍性。该方法简便快速易行,检测结果较为准确稳定可靠^[9]。流式细胞术也存在一定的缺陷,流式细胞仪设备较昂贵,并且维护人员需较高的专业水平进行复杂的仪器操作和样品前处理,限制了其在植物领域中的应用。其原理为:有丝分裂中期细胞去细胞壁后制成特异性荧光染色的核悬浮液,作为样品加入到流式细胞仪并形成狭窄的液流高速通过光学检测系统的高强度光束,已染色的染色体产生的荧光被量化,进而根据相对荧光强度经仪器附设计算机自动统计,根据统计结果计算 DNA 含量^[10]。碘化丙啶是一种荧光染料,能均匀嵌入到双链核酸碱基对中,因此可以对 DNA 进行特异性染色^[11]。在 488 nm 激发光下,碘化丙啶发出的荧光可被流式细胞仪检测。并且碘化丙啶在着色过程中的嵌入量与 DNA 量呈正比关系,故荧光强度可以表示出基因组 DNA 的相对含量^[12]。观察待测样品和内参碘化丙啶-DNA 复合体的荧光峰值,即可得

出 2 种植物 DNA 含量的比值,再乘以内参植物的基因组大小,即可计算出待测植物的基因组大小。即计算公式:待测样品 DNA 含量=内参 DNA 含量 \times 待测样品的荧光强度/内参样品的荧光强度^[13]。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料选用香花油茶良种义禄及越南油茶优良品系鸿鹄 23,组织部位选择嫩叶、成叶、根尖组织进行试验。内参植物为番茄 (0.92 Gb)、玉米 (2.30 Gb)、豌豆 (4.45 Gb),以种子萌发后 1 个月的嫩叶为试验材料,其种子取自中国科学院昆明植物研究所。

1.2 方法

1.2.1 基于香花油茶、越南油茶为试材的流式细胞术基因组大小检测技术体系构建 针对检测中的关键环节,分别研究解离液种类、内参植物、试验材料组织部位对检测效果的影响,每个处理重复 3 次。选取 4 种常见的解离液 WPB、Tris-MgCl₂、OTTO、mG^b,具体配方见表 1。

表 1 解离液种类

Tab. 1 Types of dissociating liquids

种类 Type	配方 Formula
WPB	0.2 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O, 2 mmol/L EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O, 1% (V/V) Triton X-100, 86 mmol/L NaCl, 1% (W/V) PVP-10, 10 mmol/L Na ₂ S ₂ O ₅ (pH 7.5)
Tris-MgCl ₂	200 mmol/L Tris, 4 mmol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0.5% (V/V) Triton X-100 (pH 7.0)
OTTO	OTTO I: 100 mmol/L Citric acid, 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) (先用 OTTO I 处理材料,上样前用 OTTO II 稀释悬浮液,VI:VII=1:4)
mG ^b	45 mmol/L MgCl ₂ ·6H ₂ O, 20 mmol/L MOPS, 30 mmol/L Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 1% (W/V) PVP-40, 0.2% (V/V) Triton X-100, 10 mmol/L EDTA-Na ₂ ·2H ₂ O, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ β -mercaptoethanol (pH 7.0)

1.2.2 香花油茶、越南油茶优良品系基因组大小检测 基于香花油茶、越南油茶为试材构建的流式细胞术基因组大小检测技术体系:解离液为改良后的 mG^b 解离液;内参植物豌豆为优先,若出现重峰时,以玉米为内参;试验材料组织部位为嫩叶。采用以上技术体系,以香花油茶、越南油茶优良品系为试材,检测其基因组大小。

(1) 细胞悬浮液制备。将样品置于 0.8 mL 预冷的 mG^b 解离液中,用锋利的刀片将组织迅速垂直切碎,使其在解离液中冰上静置 10 min ,将制备好的细胞核悬液用 300 目尼龙网过滤至 5 mL 聚苯乙烯无帽圆底未灭菌流式管,即得到细胞核

悬浮液。

(2) DNA 特异性染色。在细胞核悬液加入预冷的碘化丙啶和 RNAase 溶液,置于冰上避光染色 $0.5\sim 1.0\text{ h}$ 。碘化丙啶染液和 RNAase 溶液的工作浓度均为 $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(3) 流式细胞仪检测。以豌豆为内参(当出现重峰时,内参替换为玉米),将待测样品的悬液和内参样品的悬液混合。利用美国 Becton Dickinson 公司生产的 FAC Scalibur 流式细胞仪对染色后的细胞核悬浮液样品上机检测,设置参数碘化丙啶激发波长为 488 nm 蓝光,上机后收集通道 FL2 的荧光、检测碘化丙啶发射的荧光强度,

每次检测收集 10 000 个颗粒。收集数据使用 Modifit 3.0 分析软件作图分析，变异系数控制在 5% 以内。

(4) 基因组大小计算。根据公式：待测样品 DNA 含量 = 内参 DNA 含量 × 待测样品的荧光强度 / 内参样品的荧光强度，计算待测样品的基因组大小值。

2 结果与分析

2.1 基于香花油茶、越南油茶为试材的流式细胞术基因组大小检测技术体系构建

2.1.1 不同解离液对出峰的影响 流式细胞仪之所以可以准确检测植株倍性的关键是用适宜的细胞核解离液制备拥有单个的、完整的细胞核悬浮液^[14]。目前虽然有多种提取细胞核的解离液，但不同植株因遗传基础不同，导致在组织和结构成分、含量等方面均有差异，因此降解各种成分所

需的化学物质含量也不同，至今还未发现适合于所有物种的通用提取液^[15]。

为筛选适用于香花油茶、越南油茶基因组大小测定的最佳解离液，选取香花油茶和越南油茶的幼嫩叶片为试材，应用 6 种常用解离液来解离细胞核。如图 1 所示，WPB 和 mG^b 这 2 种解离液主峰清晰、主杂峰分离程度高且 mG^b 解离液的效果最佳。但是，由于标准的 mG^b 解离液中加入高浓度的 β-巯基乙醇，而 β-巯基乙醇对人体的呼吸系统有强烈刺激并有接触性毒性，二硫苏糖醇和巯基乙醇相比，作用相似，但二硫苏糖醇的刺激性气味要小很多，毒性也比巯基乙醇低很多。β-巯基乙醇作为还原剂的主要作用是保护染色质蛋白，消除酚类化合物对 DNA 染色的影响。发现去掉二硫苏糖醇替代标准 mG^b 中的 β-巯基乙醇并不影响细胞核解离效果，因此在后期实验中均选择改良后的 mG^b 解离液。

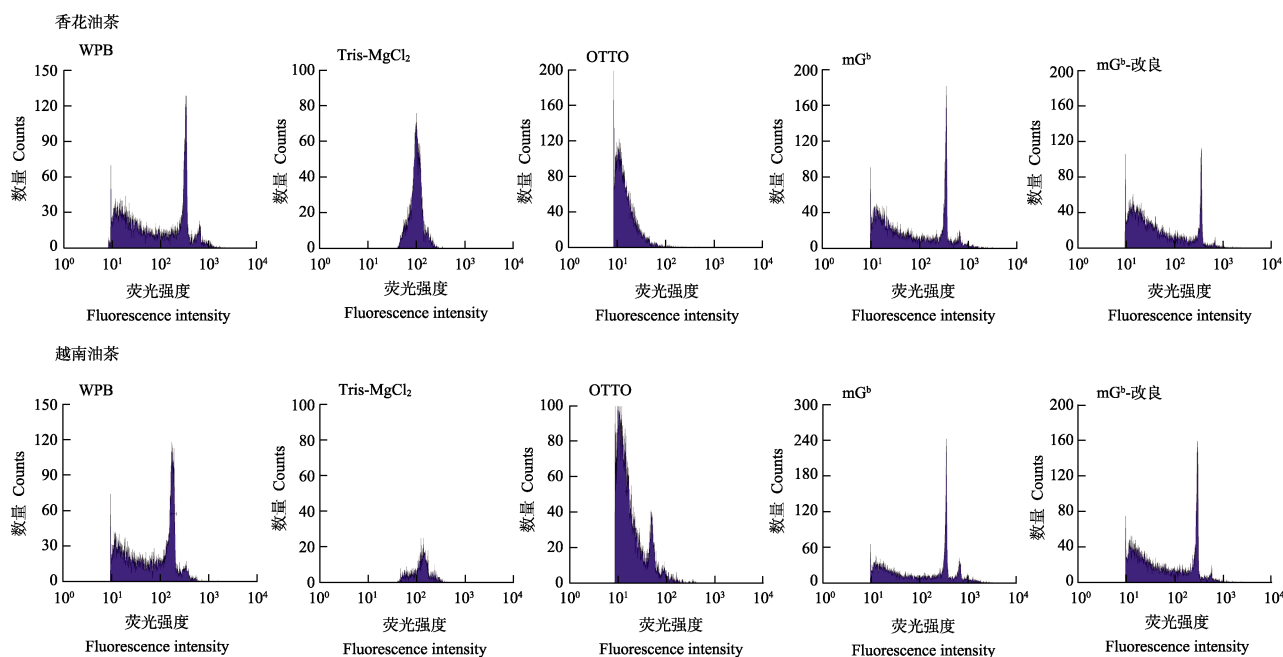


图 1 不同解离液对出峰的影响

Fig. 1 Influence of different dissociation solutions on peak output

2.1.2 不同内参对待测植物基因组大小的影响

目前虽然有研究证明许多组织可用于流式细胞仪检测，但是相比其他材料，叶片组织不仅可以产生较好的试验效果，而且取材容易、成本较低、耗时短，因此在流式细胞仪选材中，叶片被广泛使用。本研究选用成叶为材料，以番茄、玉米、豌豆 3 种植物作为内参。

内参应满足以下 3 个条件：(1) 内参 DNA 含量同待测样品 DNA 含量相近，从而降低仪器非线性引起的误差风险，减少零位偏移；(2) 参照样本峰不能与目标样本峰重叠，最好也不能与目标样本的 G₂ 或 M 期峰值重叠^[15]；(3) 内参植物的 DNA 含量均已知且稳定。从图 2 可以看出，以此 3 种植物为内参也均未出现重峰现象，获得

较好的细胞峰出峰效果,但是相较而言豌豆同目标样本的 DNA 含量最为相近。

由表 2 可知,以玉米和豌豆为内参计算的样品基因组大小接近,在误差范围内,说明这 2 种内参均比较合适。但是以番茄为内参的测定结果显著小于其他 2 种内参的测定结果,可能是因为番茄的基因组与待测样品的基因组大小相差较

远,所以造成的误差更大。因此在后续试验中选择以豌豆为内参来计算其他待测植物的基因组大小。

2.1.3 不同组织部位对待测植物基因组大小的影响
流式细胞仪对植物材料也有严格要求,选取的材料太老或者太嫩时,会影响峰值的形成。材料的选择是用流式细胞仪测定基因组大小成功的首要

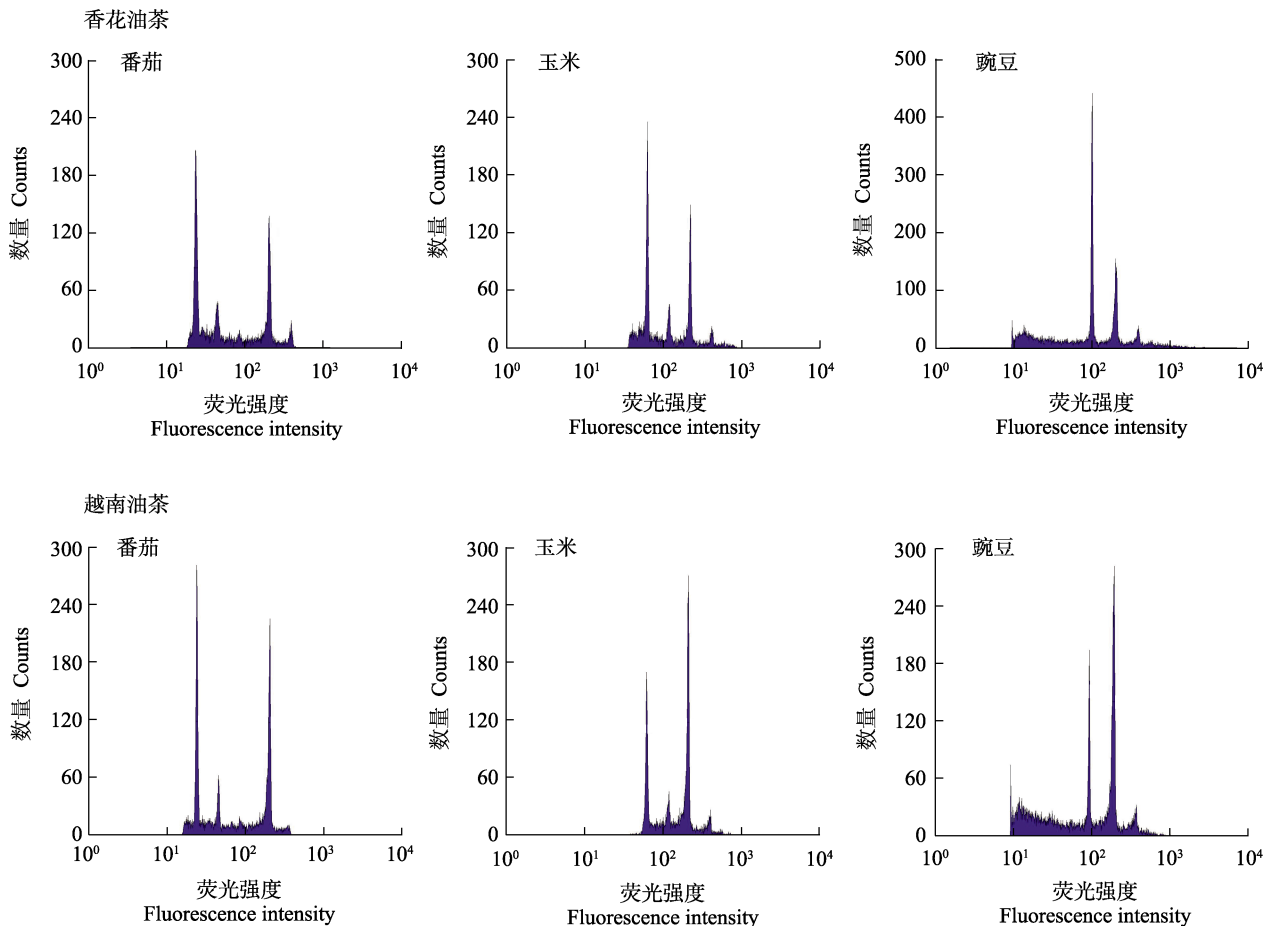


图 2 不同内参对出峰的影响

Fig. 2 Influence of different internal reference on peak output

表 2 不同内参对基因组大小测定准确性的影响

Tab. 2 Effects of different internal controls on the accuracy of genome size determination

样品-内参 Sample-Internal reference sample	待测样品荧光强度 Fluorescence intensity of test sample	内参荧光强度 Fluorescence intensity of internal reference sample	待测样品荧光强度/内参荧光强度 Fluorescence intensity of test sample/ Fluorescence intensity of internal reference sample	基因组大小 Genome size/Gb
香花油茶-番茄	175.23	23.09	7.59	6.67
香花油茶-玉米	190.50	58.11	3.28	7.54
香花油茶-豌豆	176.42	99.88	1.77	7.86
越南油茶-番茄	202.69	23.44	8.65	7.61
越南油茶-玉米	215.88	56.38	3.83	8.81
越南油茶-豌豆	192.47	93.90	2.05	9.12

因素。在本研究中分别使用植株的嫩叶、成叶和根尖来验证不同组织器官对基因组大小检测结果准确性的影响。从图 3 可以看出，以主峰清晰程度、主杂峰分离程度、细胞碎片多少等方面综合考虑，无论是香花油茶还是越南油茶，细胞峰出峰效果：嫩叶优于根尖优于成叶。

由表 3 可知，所选用的 3 种植物材料中嫩叶的变异系数均小于 5，而成叶和根尖的变异系数大于 5，说明嫩叶效果最佳；另外，发现成叶中的基因组大小显著小于嫩叶和根；香花油茶嫩叶和根尖的检测结果接近，而越南油茶根尖测定结果显著大于叶片。在后续试验中选择以嫩叶为材

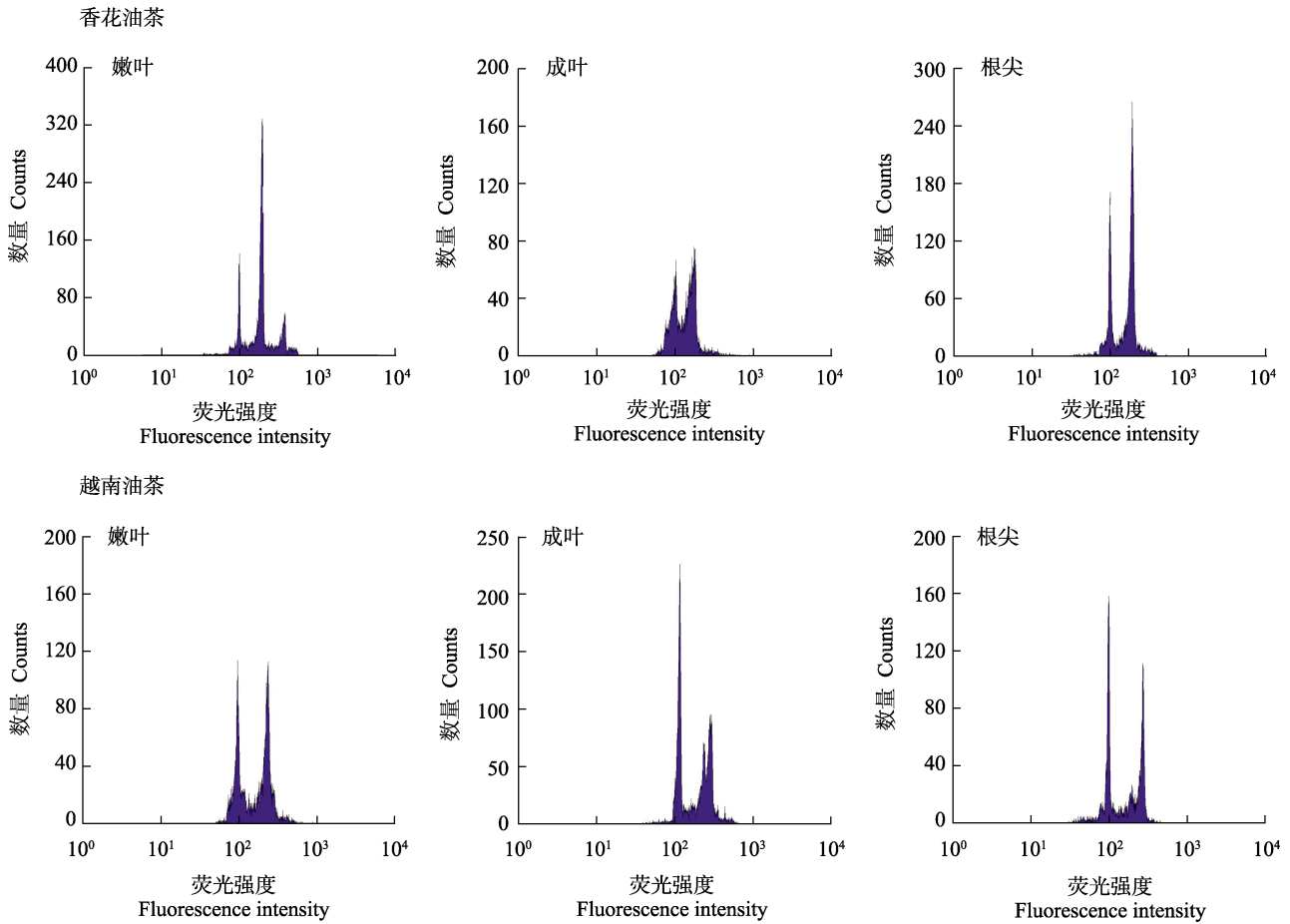


图 3 不同组织部位对出峰的影响

Fig. 3 Influence of different tissue parts on peak output

表 3 不同组织部位对基因组大小测定准确性的影响

Tab. 3 Effects of different tissue sites on the accuracy of genome size determination

样品-组织部位 Sample-tissue	待测样品荧光强度 Fluorescence intensity of test sample	内参荧光强度 Fluorescence intensity of internal reference sample	待测样品荧光强度/ 内参荧光强度 Fluorescence intensity of test sample/ Fluorescence intensity of internal reference sample	基因组大小 Genome size/Gb	变异系数 CV
香花油茶-嫩叶	187.35	99.33	1.89	8.39	3.03
香花油茶-成叶	174.49	100.23	1.74	7.75	5.74
香花油茶-根尖	188.21	99.75	1.89	8.40	5.56
越南油茶-嫩叶	316.04	129.99	2.43	10.82	4.78
越南油茶-成叶	241.17	108.68	2.22	9.87	5.64
越南油茶-根尖	267.01	96.88	2.76	12.26	5.90

料来开展流式细胞术试验。

2.2 香花油茶、越南油茶优良品系基因组大小检测

采用基于香花油茶良种义禄、越南油茶优良品系鸿鹄 23 为试材构建的流式细胞术基因组大小检测技术体系测定香花油茶、越南油茶优良品系山茶属植物基因组大小时,其细胞峰出峰稳定情况、峰形、CV 值等均较好,但在测定表 4 中香花油茶 1 号、45 号优良品系,由于待测样品与内参基因组大小接近出现重峰的情况,因此将内参替换为玉米。

由表 4 可知,1~45 号来自于香花油茶优良品系,基因组大小在 5.12~9.31 Gb 之间变化,均值为 7.60 Gb。1~38 号来自于香花油茶优树选育,其中 1~36 号及 38 号基因组大小在 7.07~8.56 Gb 之间变化,均值为 7.72 Gb,1 号基因组大小为 5.12 Gb,明显低于其他品系基因组大小;37 号基因组大小为 9.31 Gb,明显高于其他品系基因组大小。39~45 号均来自于香花油茶优树家系,其中 39~44 号基因组大小在 6.32~8.94 Gb 之间变化,均值为 7.66 Gb,45 号基因组大小为 5.14 Gb,明显低于其他品系基因组大小。46~51 号来自于越南油茶优树选育,其基因组大小在 9.17~9.85 Gb 之间变化,均值为 9.47 Gb,与绝大多数的香花油茶优良品系相比,在基因组大小上存在数量级的明显差异。1 号、37 号、45 号种质在基因组大小分布上存在极端性,日常观察中发现 1 号、37 号、45 号

品系在种质长势形态上存在明显的特异性,由此可推断其长势形态上的差异并非是环境的影响而是遗传基础不同造成的,推测其存在倍性差异或其亲本间存在种间杂交。

3 结论与讨论

以香花油茶、越南油茶为研究对象,针对检测中的关键环节,分别研究解离液种类、内参植物、试验材料组织部位对检测效果的影响,以细胞核解离情况、次生代谢物质降解情况、细胞峰出峰稳定情况、主峰清晰程度、主杂峰分离程度、取材容易程度、内参与待测样品基因组大小差异情况、基因组大小测定准确性及变异系数等方面为评价指标,研究发现 4 种常见的解离液 WPB、Tris-MgCl₂、OTTO、mG^b 中 WPB、mG^b 解离效果较好,内参植物以豌豆或玉米为佳,试验材料组织部位以嫩叶或者根尖为宜。综合各方面情况,最佳体系参数设置为:解离液为改良后的 mG^b 解离液;内参植物豌豆为优先,若出现重峰时,以玉米为内参;试验材料组织部位为嫩叶。香花油茶优良品系基因组大小在 5.12~9.31 Gb 之间变化,均值为 7.60 Gb,1 号、37 号、45 号种质在基因组大小分布上存在极端性,推测其存在倍性差异或其亲本间存在种间杂交;越南油茶优良品系基因组大小在 9.17~9.85 Gb 之间变化,均值为 9.47 Gb。香花油茶与越南油茶优良品系群体间在基因组大小上存在明显差异,推测其物种间存在

表 4 香花油茶、越南油茶优良品系基因组大小

Tab. 4 Genome size of superior lines of *C. osmantha* and *C. vietnamensis*

序号 No.	基因组大小 Genome size/Gb	序号 No.	基因组大小 Genome size/Gb	序号 No.	基因组大小 Genome size/Gb	序号 No.	基因组大小 Genome size/Gb
1	5.12	14	7.50	27	7.47	40	8.94
2	7.57	15	7.38	28	7.66	41	7.82
3	7.09	16	7.07	29	7.53	42	7.84
4	7.16	17	7.22	30	7.20	43	6.34
5	7.31	18	7.32	31	8.56	44	6.32
6	7.33	19	8.02	32	7.76	45	5.14
7	8.00	20	8.17	33	7.75	46	9.18
8	8.41	21	7.10	34	7.90	47	9.85
9	8.16	22	8.47	35	8.48	48	9.67
10	8.34	23	8.19	36	7.77	49	9.17
11	7.19	24	8.05	37	9.31	50	9.41
12	7.34	25	8.31	38	8.18	51	9.53
13	7.48	26	7.60	39	8.68		

倍性差异。

在基因组大小体系构建摸索过程中发现, 任何一个关键环节的改变, 都可能会造成流式细胞术测定基因组大小的改变, 比如无论是香花油茶义禄还是越南油茶鸿鹄 23, 均以成叶为试材, 以改良后的 mG^b 溶液为解离液, 选用不同内参得到的基因组大小存在差异。任何一个小环节的改变, 都可能会造成基因组大小的轻微改变。比如在内参也相同的情况下, 选择不同成熟度的成叶也会造成基因组大小检测结果的不同。在取材时选择相同成熟度的成叶, 但材料来源于母树还是后期繁育的无性系幼苗, 也会造成差异。离体保存不同时间下的测定结果也不尽相同。其造成差异的原因来自于多方面, 有可能是因为自身携带次生代谢物质差异造成, 也有可能是自身材料状态差异造成, 也有可能是细胞群人为选取范围主观性差异。因此种质间基因组大小未产生明显差异时, 二者应尽可能置于同等的流式细胞术基因组大小检测技术体系下方可比较基因组大小。由此可说明, 本研究中优良品系间基因组大小具有可比性。

但值得庆幸的是, 在关键环节等同的条件下大多数测定基因组大小变化不大, 而流式细胞术只是用于估测基因组大小的大概值, 微小的差异对测定结果的应用意义影响较小。要想准确得知一份种质的基因组大小, 还是需要测序技术才得以实现。然而基因组测序费用昂贵, 在油茶方面应用技术并不成熟, 不适宜针对每一份种质开展。

参考文献

- [1] 郝丙青, 张乃燕, 夏莹莹, 陈国臣, 叶航, 刘凯. 广西油茶扶贫产业模式的探索[J]. 广西林业科学, 2018, 47(2): 237-241.
HAO B Q, ZHANG N Y, XIA Y Y, CHEN G C, YE H, LIU K. Exploration on the poverty-alleviation modes of *Camellia oleifera* industry in Guangxi[J]. Guangxi Forestry Science, 2018, 47(2): 237-241. (in Chinese)
- [2] METCALFE C J, LI J, GIORGI D, DOLEZEL J, PIPERIDIS N, AITKEN K S. Flow cytometric characterisation of the complex polyploid genome of *Saccharum officinarum* and modern sugarcane cultivars[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 1-12.
- [3] ZAFAR N, MUJIB A, ALI M, TONK D, GULZAR B, MALIK M, SAYEED R, NANGAIN J. Genome size analysis of field grown and tissue culture regenerated *Rauvolfia serpentina* (L.) by flow cytometry: histology and scanning electron microscopic study for *in vitro* morphogenesis[J]. Industrial Crops and Products, 2019, 128: 545-555.
- [4] MADIN M R, NORDIN M S, MADON M, SLAEH M N, GOH H H, NOOR N M. Determination of the chromosome number and genome size of *Garcinia mangostana* L. via cytogenetics, flow cytometry and k-mer analyses[J]. Caryologia, 2018, 71(1): 35-44.
- [5] CARVALHO G M A, CARVALHO C R, SOARES F A F. Flow cytometry and cytogenetic tools in eucalypts: genome size variation × karyotype stability[J]. Tree Genetics & Genomes, 2017, 13(5): 1-11.
- [6] 龚倩颖. 海南油茶资源特性及亲缘关系比较研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2018.
GONG Q Y. A comparative study on resource characteristics and affiliation of Hainan oil-tea[D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2018. (in Chinese)
- [7] 杨晓兰, 佟岩, 雷小林, 徐林初, 高立志. 基于流式细胞术的 15 个油茶品种基因组测定研究[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2018, 38(5): 46-51.
YANG X L, TONG Y, LEI X L, XU L C, GAO L Z. Estimation of genome sizes of 15 *Camellia oleifera* varieties using flow cytometry analysis[J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Science), 2018, 38(5): 46-51. (in Chinese)
- [8] 李春楠, 傅巧娟, 沈国正, 赵福康, 张晓莹, 阮若昕. 流式细胞术在兰科植物中的应用[J]. 核农学报, 2020, 34(5): 973-981.
LI C N, FU Q J, SHEN G Z, ZHAO F K, ZHANG X Y, RUAN R X. Applications of flow cytometry in Orchidaceae[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(5): 973-981. (in Chinese)
- [9] 王云鹏, 肖博允, 熊文波, 吴世丹, 季爱加, 段礼新. 流式细胞术测定巴戟天基因组大小[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5): 657-660.
WANG Y P, XIAO B Y, XIONG W B, WU S D, JI A J, DUAN L X. Genome size analysis for *Morinda officinalis* how using flow cytometry[J]. Traditional Chinese Drug Research & Clinical Pharmacology, 2018, 29(5): 657-660. (in Chinese)
- [10] 丁鸿, 邱东萍, 陈少雄. 植物染色体标本的制备和染色体核型分析研究进展[J]. 南方农业学报, 2012, 43(12): 1958-1962.
DING H, QIU D P, CHEN S X. Research progress in plant chromosome samples preparation and karyotype analysis[J]. Journal of Southern Agriculture, 2012, 43(12): 1958-1962. (in Chinese)
- [11] 曹敏. 坛紫菜基因组结构特征及红毛菜功能基因组特性分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
CAO M. Analysis of genome structure features of *Pyropia*

- haitanensis* and functional genomias of *Bangia fuscopurea*[D]. Qingdao: Ocen University of China, 2015. (in Chinese)
- [12] 李潞滨, 武静宇, 胡陶, 杨学文, 彭镇华. 毛竹基因组大小测定[J]. 植物学通报, 2008, 25(5): 574-578.
LI L B, WU J Y, HU T, YANG X W, PENG Z H. Estimation of genome size of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*)[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2008, 25(5): 574-578. (in Chinese)
- [13] 李春牛, 李先民, 黄展文, 卢家仕, 李琴, 黄昌艳, 卜朝阳. 利用流式细胞术鉴定茉莉花基因组大小和染色体倍性[J]. 热带作物学报, 2021, 42(5): 1231-1236.
LI C N, LI X M, HUANG Z W, LU J S, LI Q, HUANG C Y, BU Z Y. Genome size estimation and ploidy identification of *Jasminum sambac* by flow cytometry[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(5): 1231-1236. (in Chinese)
- [14] 刘凤霞, 李京一, 王志刚, 徐凌飞. 适合流式细胞仪分析的梨叶片细胞核提取缓冲液筛选[J]. 农业生物技术学报, 2018, 26(6): 1034-1042.
LIU F X, LI J Y, WANG Z G, XU L F. The screening of the optimum buffer to produce pear (*Pyrus*) leaf nuclear suspensions for flow cytometry analysis[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2018, 26(6): 1034-1042. (in Chinese)
- [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 X M, ZHOU X Y, GONG N. Applications of flow cytometry in plant research—analysis of nuclear DNA content and ploidy level in plant cells[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27(9): 21-27. (in Chinese)