

## 流式细胞术估测胡椒属植物基因组大小方法的建立及应用

伍宝朵<sup>1,3,4</sup>, 胡丽松<sup>1,3,4</sup>, 冯捷雄<sup>2</sup>, 范睿<sup>1,3,4</sup>, 郭芬<sup>2</sup>, 吉训志<sup>1,3,4</sup>, 郝朝运<sup>1,3,4</sup>, 闫林<sup>1,4\*</sup>

1. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533; 2. 云南农业大学热带作物学院, 云南普洱 665000; 3. 海南省 Sim Soonliang 院士工作站, 海南万宁 571533; 4. 农业农村部香辛饮料作物遗传资源利用重点实验室, 海南万宁 571533

**摘要:** 为建立胡椒属资源基因组大小流式细胞术测定方法, 本研究筛选了 6 种细胞核提取液和 3 种不同部位叶片, 以已知基因组大小的黄瓜为标样, 运用流式细胞术对胡椒属资源基因组大小进行了测定。结果表明: 改良细胞核提取液和倒一叶是适合胡椒流式细胞术的提取液和取样部位; 栽培胡椒品种古晋、Aman 和 EMAS 胡椒的基因组大小为 667.94~719.32 Mb, 而热引 1 号、柬埔寨小叶种、班尼约尔 1 号和 73F5 的基因组大小为 759.69~785.38 Mb, 因此不同栽培品种之间基因组大小存在差异; 推算基因组大于 900 Mb 的石楠藤和山蒟的染色体条数应该是大于 52 且为 13 的倍数, 基因组大小在 600~800 Mb 范围内种质的染色体数可能是 52 条。杂交种不但具有与栽培胡椒和黄花胡椒相近的表型, 其基因组大小也几乎等于栽培胡椒和黄花胡椒的平均值, 推测杂交种可能是栽培胡椒和黄花胡椒的杂交后代。本研究可为胡椒属资源基因组大小测定提供方法, 也将为胡椒属种质资源评价及远源杂交等研究提供技术基础。

**关键词:** 胡椒属; 流式细胞术; 细胞核提取液; 基因组大小

中图分类号: S573.9 文献标识码: A

## Establishment and Application of a Method for Genome Size Estimation of *Piper L.* Using Flow Cytometry

WU Baoduo<sup>1,3,4</sup>, HU Lisong<sup>1,3,4</sup>, FENG Jianxiong<sup>2</sup>, FAN Rui<sup>1,3,4</sup>, GUO Fen<sup>2</sup>, JI Xunzhi<sup>1,3,4</sup>, HAO Chaoyun<sup>1,3,4</sup>, YAN Lin<sup>1,4\*</sup>

1. Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wanning, Hainan 571533, China; 2. College of Tropical Crop Science, Yunnan Agricultural University, Pu'er, Yunnan 665000, China; 3. Hainan Sim Soonliang Academician Workstation, Wanning, Hainan 571533, China; 4. Key Laboratory of Genetic Resources Utilization of Spiced Beverage Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wanning, Hainan 571533, China

**Abstract:** Six nuclear extracts and three leaves of different development stage were screened to establish the flow cytometry (FCM) method for determining the genomic size of *Piper L.* and *Cucumis sativus L.* was used as the DNA reference standard. Result showed that the modified nuclear extract and inverted leaf were suitable for the flow cytometry of *Piper L.* The genome size of cultivated varieties, including Kuching, Aman and EMAS, ranged from 667.94 to 719.32 Mb, and Reyin1, microphylla variety from Cambodia, Panniyur-1 and 73F5 ranged from 759.69 to 785.38 Mb. Therefore, the genome size was significantly different among cultivated varieties. Furthermore, it is speculated that the chromosome numbers of *P. wallichii* and *P. hancei*, with genome size larger than 900 Mb, should be larger than 52 with a multiple of 13, and the number of chromosomes of germplasm, with genome size ranged from 600 to 800 Mb, may be 52. The hybrid not only had similar phenotypes to cultivated varieties and *P. flaviflorum*, but also had an average genome size of cultivated varieties and *P. flaviflorum*. Therefore, it is speculated that the hybrid may be the hybrid offspring of cultivated varieties and *P. flaviflorum*. This study would provide a method for the determination of the genome size of *Piper L.* germplasm, and provide a technical basis for the study of *Piper L.* germplasm evaluation and distant

收稿日期 2022-10-10; 修回日期 2022-11-16

基金项目 国家现代农业产业技术体系项目 (No. CARS-11); 海南省院士创新平台科研专项 (No. SQ2021PT0035)。

作者简介 伍宝朵 (1984—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 胡椒种质资源与遗传育种。\*通信作者 (Corresponding author): 闫林 (YAN Lin), E-mail: yanlin2575@163.com。

hybridization.

**Keywords:** *Piper* L.; flow cytometry; modified nuclear extract; genomic size

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.11.015

基因组大小是指某种生物中单倍体细胞核或配子体中的 DNA 含量,是物种特有的,称为 C 值 (C-value),常用重量皮克 ( $10^{-12}$  g) 或核苷酸碱基对数量 (base pair) 来表示。基因组大小与物种的进化有较强的相关性,同时与生物学性状也有一定的关系<sup>[1]</sup>。基因组大小测定的方法有多种,如 Feulgen 染色法、化学分析法及流式细胞术等。Feulgen 染色法结果相对准确,但是操作过程繁琐;化学分析法易受细胞周期影响,致使测定结果存在偏差<sup>[2]</sup>;而新技术流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 具有瞬间准确分析大量细胞的特点,是一种测定基因组大小快速且有效的方法<sup>[3]</sup>。流式细胞术在人和动物的临床和基础研究中被广泛应用,植物体内由于含有大量的多糖、多酚等次生代谢物质,严重影响了 PI 染料的荧光染色强度,降低了测定基因组大小的准确性<sup>[4]</sup>。因此明确适合测定物种流式细胞术的测定方法对该物种基因组大小研究至关重要。近年来,流式细胞术在植物中被广泛应用。杨转英等<sup>[5]</sup>采用流式细胞术测定不同菠萝蜜株系基因组大小,发现不同菠萝蜜株系之间基因组大小存在显著差异,且湿苞株系大于干苞株系。柳颀等<sup>[6]</sup>利用改良 OTTO 细胞核提取液检测出澳洲坚果基因组大小为  $1.872\ 758 \times 10^9$  bp,该研究发现运用流式细胞术进行澳洲坚果基因组 C 值测定准确可靠。

胡椒属植物是胡椒科 (Piperaceae) 重要的泛热带组成成分,是基部被子植物中最大的属之一<sup>[7]</sup>。约有 1000 多个种,主要分布于南亚、南美洲、中美洲等热带和亚热带地区。胡椒属内有许多具有经济价值和开发潜力的资源,例如胡椒 (*P. nigrum*)、卡瓦胡椒 (*P. methysticum*) 和石楠藤 (*P. wallichii*) 等被用来入药<sup>[8]</sup>,在亚洲东南部,人们常将萎叶 (*P. betle*) 和槟榔果连同石灰一起咀嚼帮助消化。胡椒野生近缘种众多,部分资源具有优良性状,例如黄花胡椒 (*P. flaviflorum*) 具有较强的抗瘟病性<sup>[9]</sup>。大叶蒟 (*P. laetispicum*) 具有较长的花穗,石楠藤具有较强的抗寒性等<sup>[10]</sup>。胡椒是人们喜爱的调味品,素有“香料之王”的美誉。原产于印度,胡椒自 1947 年引入中国,目前种植

面积达 3 万  $\text{hm}^2$ ,年总产量超过 3 万 t,位居世界第 5 位。我国胡椒栽培品种以热引 1 号 (*P. nigrum* cv. Reyin1) 为主,存在栽培品种单一和抗逆性弱的问题,严重限制了我国胡椒产业的良性发展<sup>[11-12]</sup>。因此亟待开展胡椒资源挖掘和创新利用工作。胡椒是四倍体植物,染色体数为  $2n=4x=52$ <sup>[13]</sup>。JOSE 等<sup>[14]</sup>报道胡椒属不同资源具有不同染色体数,且胡椒属植物具有较小的染色体长度 ( $0.56\sim 2.41\ \mu\text{m}$ ),而染色体倍性分析需要较强的实验技术,利用流式细胞术可快速测定胡椒属资源基因组大小,为染色体倍性估测和分析提供基础。

本研究以 4 份不同来源地胡椒属种质为材料,通过筛选 6 种细胞核提取液和不同部位叶片,明确适合胡椒属基因组大小的流式细胞术测定方法。利用筛选出的适合胡椒流式细胞术测定的方法,以黄瓜为标样,测定 22 份胡椒属资源的基因组大小。本研究可为胡椒属资源基因组大小测定提供方法,也将为胡椒属资源变异、种质资源评价及远源杂交等研究提供技术基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试材料为胡椒属种质,胡椒属种质叶片取材于中国热带农业科学院香料饮料研究所的农业农村部万宁胡椒种质资源圃。分别取 4 份来源地不同的胡椒属种质嫩叶用于细胞核提取液筛选 (表 1);取 4 份种质的下位叶、中位叶、倒一叶用于叶片部位筛选;22 份胡椒属资源用于测定基因组大小。以黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 为标样<sup>[15]</sup>,将黄瓜种子播种于  $15\ \text{cm} \times 20\ \text{cm}$  培养盆中,并在人工气候室培育,待长出真叶后取嫩叶用于试验。

表 1 供试材料  
Tab. 1 Test materials

材料名称 Materials name	种名 Genus name	来源地 Origin place	植株形态 Plant morphology
热引 1 号胡椒	<i>P. nigrum</i> cv. Reyin1	中国海南	木质藤本
黄花胡椒	<i>P. flaviflorum</i>	中国云南	木质藤本
墨西哥胡椒	<i>P. auritum</i>	墨西哥	直立灌木
卡瓦胡椒	<i>P. methysticum</i>	南美洲	直立灌木

## 1.2 方法

1.2.1 细胞核提取液及 DNA 荧光染料的配制  
选取 4 种已报道的细胞核提取液 (Otto 提取液<sup>[5]</sup>、Tris 提取液<sup>[16]</sup>、LB01 提取液<sup>[4]</sup>和 WPB 提取液<sup>[17]</sup>)、1 种改良提取液<sup>[18]</sup>和 1 种 PI 试剂盒 (广州吉源生物科技有限公司), 细胞核提取液具体配方见表 2。提取液配制完成后过滤、灭菌, 并置于 4 °C 冰箱内保存。荧光探针是碘化丙啶 (PI), PI 工作液中碘化丙啶的浓度为 1 mg/mL。

1.2.2 细胞核悬浮液的制备和染色  
剪取约 20~40 mg 胡椒叶片放入 60 mm 培养皿中, 加入预冷的细胞核提取液 500  $\mu$ L, 让提取液充分浸没叶片, 用厚度为 0.08 mm 锋利的双面刀片迅速切成碎片, 倾斜放置 5 min, 再用 400~600 目滤膜过滤至流式细胞仪专用上样管中, 在滤液中加入 2 mL 细胞核提取液或缓冲液、6  $\mu$ L RNaseA (终浓度为 40  $\mu$ g/mL) 和 20  $\mu$ L PI 染液, 避光静置 30 min。

表 2 细胞核解离液及提取液成分  
Tab. 2 Nuclear buffer and its components

提取液 Buffer	组分 Component
Otto 提取液	Otto I: 100 mmol/L citric acid, 0.5% Tween 20, 20 mmol/L $\beta$ -mercaptoethanol, pH 2.3 Otto II: 400 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 20 mmol/L $\beta$ -mercaptoethanol, pH 8.9
Tris 提取液	200 mmol/L Tris, 4 mmol/L $\text{MgCl}_2$ , 0.5% (V/V) Tritonx-100 pH 7.5
LB01 提取液	15 mmol/L Tris, 2 mmol/L $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0.5 mmol/L spermine $\cdot$ 4HCl, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 15 mmol/L $\beta$ -mercaptoethanol, 0.1% (V/V) Triton X-100, pH 7.5
WPB 提取液	200 mmol/L Tris-HCl, 4 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 2 mmol/L $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 86 mmol/L NaCl, 10 mmol/L $\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2$ , 1% PVP-10, 1% (V/V) Triton X-100, pH 7.0
改良提取液	1.0% (V/V) Tritonx-100, 140 mmol/L PVP, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0), 50 mmol/L $\text{NaHSO}_3$ , pH 7.5

1.2.3 流式细胞术检测  
将制备好的细胞核悬浮液采用德国 Partec 公司 CyFlow<sup>®</sup> Cube6 流式细胞仪检测。流式细胞仪的氩离子激光发射器的激发光波长为 488 nm, 检测通道为 FL2 通道 590/50[488], 利用流式细胞仪随机自带软件 CyFlow Cube 15-CFG 收集至少 5000 个细胞, 变异系数 (coefficient of variation, CV) 控制在 6% 以内; 每个样本重复测定 5 次。

## 1.3 数据处理

利用 FlowJo-V10 软件分析数据, 以标样基因组大小和出峰位置为对照, 依据测定样品出峰位置计算出其基因组大小 (基因组 C 值), 计算公式为: 待测样本基因组大小=参考样本基因组大小 $\times$  (待测样本荧光均值/参考样本荧光均值); 使用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞核提取液的筛选

比较 6 种细胞核提取液流式细胞术测定结果可知 (图 1), 以 Otto 提取液为细胞核提取液时, 只有墨西哥胡椒能检测出信号峰, 热引 1 号胡椒、黄花胡椒和卡瓦胡椒 3 份种质不能检测出信号峰。以 Tris 提取液为细胞核提取液时, 热引 1 号胡椒和墨西哥胡椒能检测出信号峰, 但是信号峰

碎片较多, CV 值均大于 6, 黄花胡椒和卡瓦胡椒不能检测出信号峰。以 LB01 提取液为细胞核提取液时, 热引 1 号胡椒、墨西哥胡椒和卡瓦胡椒均能检测出信号峰, 其中热引 1 号胡椒和卡瓦胡椒的信号峰都是碎片较多, CV 值大于 6, 墨西哥胡椒信号峰碎片相对少一些, 黄花胡椒不能检测出信号峰。以 WPB 提取液为细胞核提取液时, 热引 1 号胡椒和墨西哥胡椒均能检测出信号峰, 但是检测出的信号峰都是碎片较多, CV 值大于 6, 黄花胡椒和卡瓦胡椒不能检测出信号峰。以 PI 试剂盒为细胞核提取液时, 墨西哥胡椒和卡瓦胡椒能检测出信号峰, 但是卡瓦胡椒信号峰碎片稍多, 热引 1 号胡椒和黄花胡椒不能检测出信号峰。以改良提取液为细胞核提取液时, 4 份种质均能检测出完整信号峰, CV 值小于 6。可见, 改良提取液是适合胡椒属种质流式细胞术的细胞核提取液。

### 2.2 叶片取样部位的筛选

为选择适合胡椒属种质资源流式细胞检测的最佳部位叶片, 利用筛选出的改良提取液分别对黄花胡椒、热引 1 号胡椒、卡瓦胡椒和墨西哥胡椒的下位叶 (superior leaf)、中上位叶 (inferior leaf) 和倒一叶 (inverted one leaf) 进行流式细胞术检测 (图 2), 结果表明 4 份胡椒种质使用下位叶和上位叶检测时, 少数不能形成完整的信号峰,

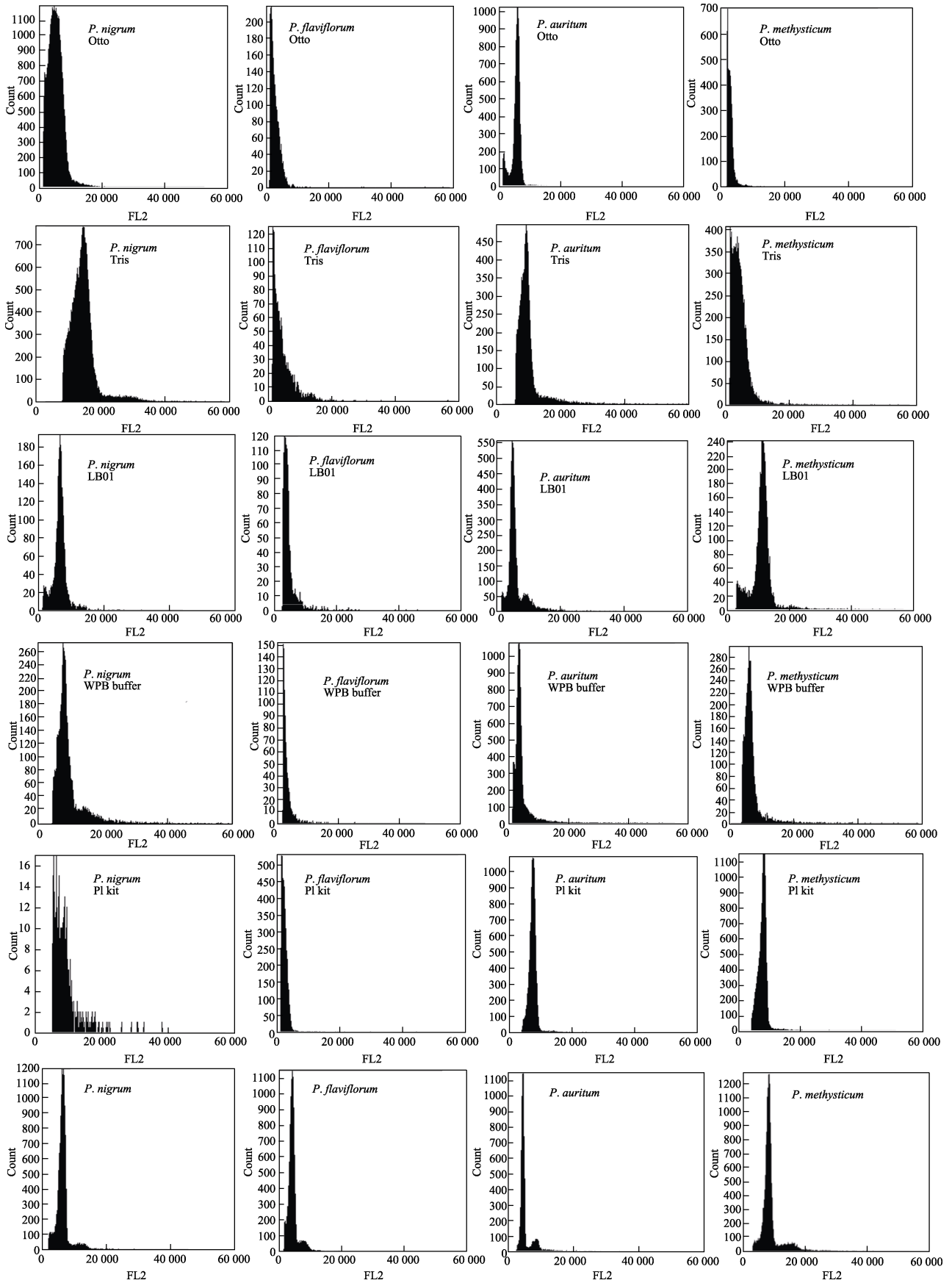


图 1 6 种细胞核提取液筛选 4 份胡椒种质流式图

Fig. 1 Flow cytometry results analyzed by six nuclear extract buffer for four *Piper L.* germplasm

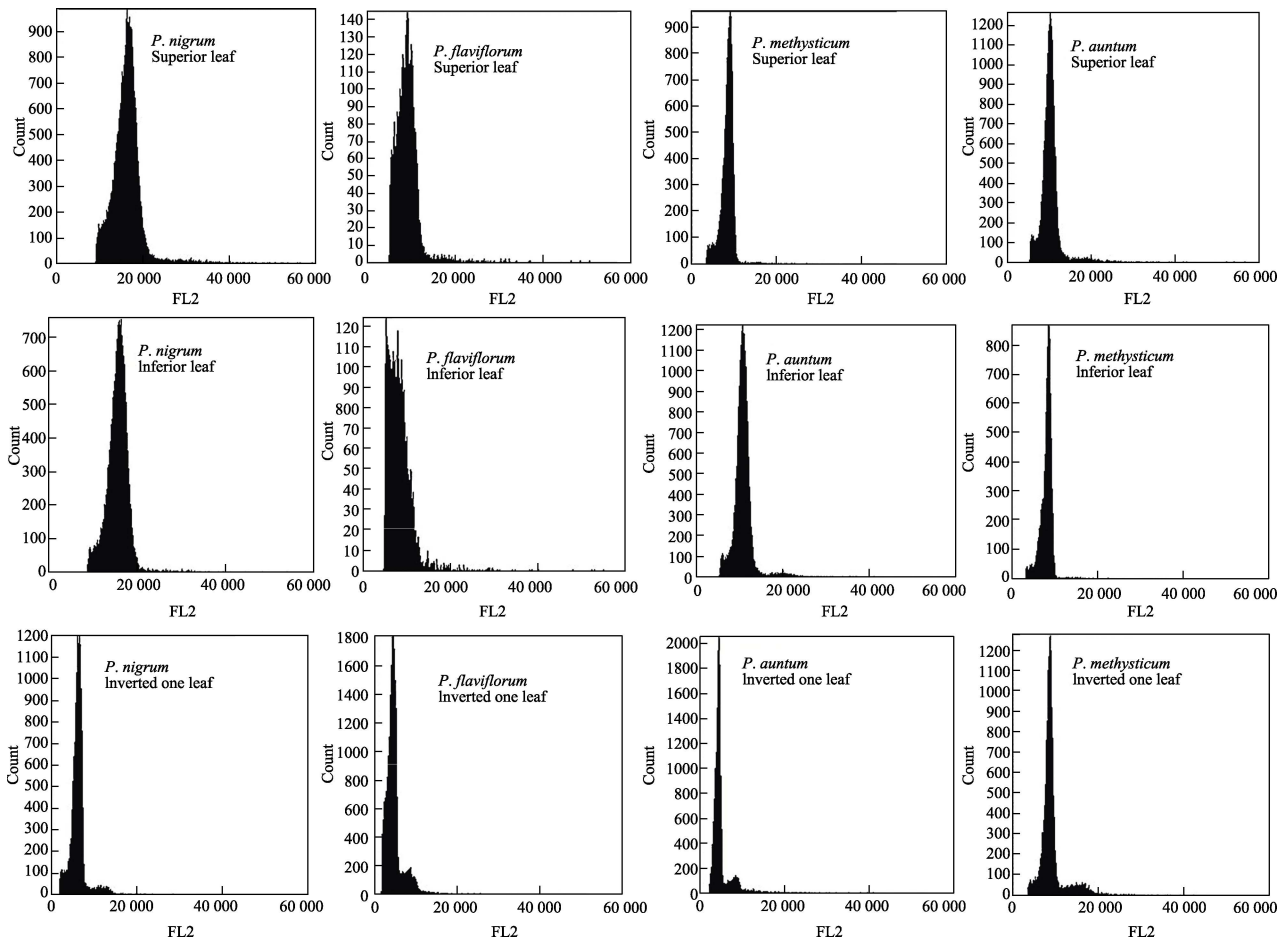


图 2 改良提取液检测 4 份胡椒种质不同部位叶片流式结果

Fig. 2 Flow cytometry result of four *Piper* L. germplasm different sites of leaf samples screened with modified buffer

多数形成了完整的信号峰，但是与倒一叶相比，下位叶和上位叶形成的信号峰碎片较多，细胞核收集偏少。可见，倒一叶是适宜胡椒属流式细胞术的叶片采样部位。

### 2.3 胡椒属资源 C 值测定

通过比较待测胡椒资源样品与黄瓜样品峰值的倍数关系 (图 3)，计算出胡椒资源的基因组大小 (表 3)。以热引 1 号胡椒为例，其荧光强度是 6596，标样黄瓜的荧光强度为 3184，ARUMUGANATHAN 等<sup>[15]</sup>报道利用流式细胞术测定的黄瓜基因组大小为 367 Mb，依据基因组大小计算公式，计算出热引 1 号胡椒基因组大小为 759.69 Mb，HU 等<sup>[19]</sup>通过全基因组测序估测的热引 1 号胡椒基因组大小为 761.2 Mb，二者误差较小，说明该方法准确可靠。利用同样的方法，估测了 22 份胡椒资源基因组大小，检测的胡椒种质基因组大于 900 Mb 的种质有石楠藤、卡瓦胡椒和山蒟；基因组在 600~800 Mb 的种质有热引 1

号、柬埔寨小叶种、班尼约尔 1 号、古晋、Aman 胡椒、EMAS 胡椒、73F5、杂交种、复毛胡椒、华山蒟、萎叶和箬菝；基因组小于 600 Mb 的种

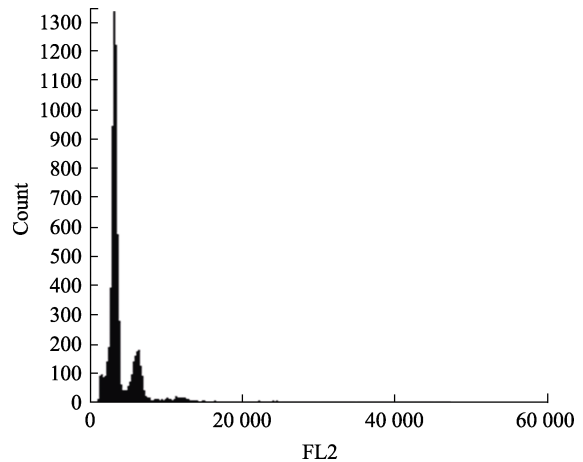


图 3 标样黄瓜的流式细胞术测定结果

Fig. 3 Flow cytometry determination result of *Cucumis sativus* L.

表 3 不同胡椒资源细胞核 DNA 相对含量  
Tab. 3 Relative nuclear DNA content in different *Piper* L. germplasm

种质名称 Germplasm name	种名 Species name	荧光强度 Fluorescence intensity		比值 Ratio	基因组大小 Genome size/Mb
		胡椒 <i>Piper</i>	黄瓜 <i>C. sativus</i>		
热引 1 号	<i>Piper nigrum</i>	6596.0	3184	2.07	759.69
柬埔寨小叶种	<i>Piper nigrum</i>	7048.2	3407	2.07	759.69
班尼约尔 1 号	<i>Piper nigrum</i>	6771.6	3219	2.10	770.70
古晋	<i>Piper nigrum</i>	6747.0	3491	1.93	708.31
Aman 胡椒	<i>Piper nigrum</i>	6081.2	3348	1.82	667.94
EMAS 胡椒	<i>Piper nigrum</i>	6943.4	3548	1.96	719.32
73F5	<i>Piper nigrum</i>	6688.0	3124	2.14	785.38
杂交种	未知	5166.4	3124	1.65	605.55
海南蒟	<i>Piper hainanense</i>	5772.0	3592	1.62	594.54
萎叶	<i>Piper betle</i>	7479.0	3539	2.11	774.37
假蒟	<i>Piper samentosum</i>	5569.2	3716	1.50	550.50
大叶蒟	<i>Piper laetispicum</i>	5111.0	3472	1.47	539.49
石楠藤	<i>Piper wallichii</i>	9847.0	3116	3.16	1159.72
复毛胡椒	<i>Piper bonii</i>	5852.8	3316	1.77	649.59
尖峰岭胡椒	<i>Piper jianfenglingense</i>	5235.8	3371	1.55	568.85
荜拔	<i>Piper longum</i>	6766.8	3316	2.04	748.68
黄花胡椒	<i>Piper flaviflorum</i>	4140.6	3219	1.29	473.43
卡瓦胡椒	<i>Piper methysticum</i>	8026.0	3184	2.52	924.84
墨西哥胡椒	<i>Piper auritum</i>	4208.0	3124	1.35	495.45
斜叶蒟	<i>Piper senporeiense</i>	5225.8	3539	1.48	543.16
华山蒟	<i>Piper cathayanum</i>	6378.4	3361	1.90	679.30
山蒟	<i>Piper hancei</i>	9254.6	3510	2.64	968.88

质有海南蒟、假蒟、大叶蒟、尖峰岭胡椒、斜叶蒟、黄花胡椒和墨西哥胡椒。综上可见，胡椒属不同种质间基因组大小差异较大。

### 3 讨论

植物体内含有大量的多糖、多酚等次生代谢物质，严重影响了 PI 染料的荧光染色强度，降低了测定基因组大小的准确性。胡椒属植物是遍布于热带地区的重要作物，胡椒叶片具有较厚的蜡质层，叶片硬度较高，细胞中具有较复杂的次生代谢物质，研究表明胡椒叶中 DPPH 清除能力、多酚含量及氧自由基清除能力均高于胡椒果实，可能含有高抗氧化因子<sup>[20]</sup>。本研究尝试采用已报道植物流式细胞术测定细胞核提取液 (Otto、Tris、LB01、WPB 提取液和 PI 试剂盒) 测试胡椒属植物，均不能得到满意效果，因此，明确适合胡椒属植物流式细胞术的细胞核提取液及测定方法对胡椒属植物基因组大小研究至关重要。

本研究发现，与 Otto、Tris、LB01、WPB 提

取液和 PI 试剂盒相比较，以改良提取液为细胞核提取液检测胡椒属植物时，噪音峰能够与信号峰较好分离，碎片相对较少，CV 值也符合流式细胞术分析要求，是适合胡椒属植物基因组大小测定的细胞核提取液。本研究选用的 6 种提取液配方差异较大，以改良提取液检测胡椒属植物效果最好，LB01 提取液效果次之。比较改良提取液和 LB01 提取液配方发现，二者共有的成分有 Tritonx-100、Cl<sup>-</sup>和 Tris，改良提取液特有的成分是 NaHSO<sub>3</sub>，而 LB01 提取液特有的成分是 spermine·4HCl。分析另外 3 种已知配方提取液发现，Tritonx-100、Cl<sup>-</sup>和 Tris 这 3 种成分在 Tris 和 WPB 提取液中也同时存在。说明 NaHSO<sub>3</sub> 和 spermine·4HCl 可能适用于作为胡椒属植物流式细胞术检测的提取液配方，尤其是 NaHSO<sub>3</sub> 更适合，当然，它们需与其他成分相互作用才能更好地发挥作用。本研究只测试了改良提取液在胡椒属植物中的应用，还适用于哪些植物需要进一步试验证明。

分析不同种质信号峰检测结果发现, 不同种质检测出信号峰的难易程度差异较大。如: 热引 1 号胡椒在 2 种提取液中能检测出完整信号峰, 3 种提取液中能检测的信号峰不能与噪音峰分离; 黄花胡椒除在改良提取液中能检测出完整信号峰, 其他的均不能; 而墨西哥胡椒在 4 种提取液中均能检测出完整信号峰, 另外 2 种的信号峰不能与噪音峰分离。说明利用流式细胞术检测胡椒属内不同种资源时也具有特异性, 这可能与不同种质细胞内次生代谢物质不同有关。

本研究选用的栽培种胡椒有 7 份。古晋、Aman 和 EMAS 胡椒都是马来西亚育成品种, 其中 EMAS 胡椒是由 Balancotta (印度品种) 和古晋杂交并回交选育而成, Aman 胡椒是由从哥斯达黎加引种的品种 CATIE Row1-1 的无性系选育而来<sup>[21]</sup>。经测试发现, 古晋、Aman 和 EMAS 胡椒的基因组大小分别为 708.31、667.94、719.32 Mb; 热引 1 号是由从印度尼西亚引种的品种南榜的无性系经长期选育而来, 班尼约尔 1 号是从印度引进的品种, 73F5 是热引 1 号和班尼约尔 1 号的杂交后代, 柬埔寨小叶种是从柬埔寨引进的小叶种胡椒品种。热引 1 号、柬埔寨小叶种、班尼约尔 1 号和 73F5 的基因组大小分别为 759.69、759.69、770.70、785.38 Mb。综上可见, 本研究中测定的 7 份栽培种胡椒的基因组大小存在差异。JOSE 等<sup>[14]</sup>报道栽培种班尼约尔 1 号、Cheriakaniakadan 和 Karimunda 的总染色体长度分别为 67.04、51.48、56.66  $\mu\text{m}$ , 因此不同栽培种之间基因组大小也会存在差异。本研究中, 来源于马来西亚的品种与来源于印度尼西亚、印度、柬埔寨的品种基因组大小也具有差异。

JOSE 等<sup>[14]</sup>认为胡椒属资源的染色体基数是  $n=13$  (*P. cubeba* 除外), 研究发现, 栽培胡椒、萎叶、荜菴和卡瓦胡椒的染色体数分别为  $2n=4x=52$ 、 $2n=2x=52$ 、 $2n=2x=52$  和  $2n=10x=130$ <sup>[14, 22-23]</sup>。本研究测定卡瓦胡椒基因组大小大于 900 Mb, 明显大于另外 3 种染色体数为 52 的种质, 此外, 石楠藤和山蒟的基因组也大于 900 Mb, 依据前面结论推测石楠藤和山蒟的染色体条数应该是大于 52 且为 13 的倍数<sup>[14]</sup>。本研究中 7 份栽培胡椒染色体数都是 52, 基因组大小范围为 667.94~785.38 Mb, SAMUEL 等<sup>[22]</sup>研究中报道, 3 份染色体数为 52 的种质 (*P. nigrum*、*P. ornatum* 和 *P. porphyrophyllum*) 染色体长度为 52.32~72.18  $\mu\text{m}$ , 其中 *P.*

*nigrum* 的染色体长度最长, 推断基因组大小在 600~800 Mb 范围内的种质染色体数可能也是 52 条。杂交种是一个未知种, 从表型和进化上来看, 该种具有与栽培胡椒和黄花胡椒相近的表型, 本研究发现, 其基因组大小几乎等于栽培胡椒和黄花胡椒的平均值, 因此推测杂交种可能是栽培胡椒和黄花胡椒的杂交后代。

## 参考文献

- [1] GREILHUBER J, DOLEZEL J, LYSÁK M A, BENNETT M D. The origin, evolution and proposed stabilization of the term 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA content[J]. *Annals of Botany*, 2005, 95(1): 255-260.
- [2] 弓娜, 田新民, 周香艳, 刘建全. 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.  
GONG N, TIAN X M, ZHOU X Y, LIU J Q. 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)
- [3] 焦旭雯, 赵树进. 流式细胞术在高等植物研究中的应用[J]. *热带亚热带植物学报*, 2006, 14(4): 354-358.  
JIAO X W, ZHAO S J. Applications of flow cytometry in higher plant research[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2006, 14(4): 354-358. (in Chinese)
- [4] 中国科学院华南植物园. 一种适用于苦苣苔科植物基因组大小的测定方法: ZL201410250566.X[P]. 2014-06-06. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences. A method for determining genome size of Gesneriaceae plants: ZL201410250566.X[P]. 2014-06-06. (in Chinese)
- [5] 杨转英, 吴传龙, 丰锋, 吕庆芳, 王俊宁, 叶春海. 不同株系菠萝蜜染色体倍性及基因组大小分析[J]. *果树学报*, 2015, 32: 567-571.  
YANG Z Y, WU C L, FENG F, LYU Q F, WANG J N, YE C H. Determination and analysis of ploidy and genome size of different jackfruit lines[J]. *Journal of Fruit Science*, 2015, 32: 567-571. (in Chinese)
- [6] 柳颀, 孔广红, 倪书邦, 贺熙勇, 陶丽, 陶亮, 宫丽丹. 基于流式细胞术的澳洲坚果基因组 C 值测定[J]. *中国农学通报*, 2013, 29: 96-101.  
LIU J, KONG G H, NI S B, HE X Y, TAO L, TAO L, GONG L D. Estimation of genomic C value of *Macadamia integrifolia* spp. by flow cytometry[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29: 96-101. (in Chinese)
- [7] FRODIN D G. History and concepts of big plant genera[J]. *Taxon*, 2004, 53: 753-776.

- [8] KHARE C P. Indian medicinal plants[M]. New Delhi: Springer New York, 2007: 492-493.
- [9] HAO C Y, XIA Z Q, FAN R, TAN L H, HU L S, WU B D, WU H S. *De novo* transcriptome sequencing of black pepper (*Piper nigrum* L.) and an analysis of genes involved in phenylpropanoid metabolism in response to *Phytophthora capsici*[J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 822.
- [10] 伍宝朵, 范睿, 胡丽松, 杨建峰, 郝朝运. 低温胁迫对胡椒叶片生理生化及显微结构的影响[J]. 热带作物学报, 2018, 39(8): 1519-1525.  
WU B D, FAN R, HU L S, YANG J F, HAO C Y. Effect of cold stress on the leaf physiological, biochemical variation and anatomical structure in *Piper* L.[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(8): 1519-1525. (in Chinese)
- [11] RAVINDRAN P N. Black pepper[M]. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2000: 1.
- [12] 刘进平, 邹华松, 杨建峰. 国内外胡椒品种评述[J]. 中国热带农业, 2009(1): 49-52.  
LIU J P, WU H S, YANG J F. Review of domestic and foreign black pepper varieties[J]. China Tropical Agriculture, 2009(1): 49-52. (in Chinese)
- [13] SAMUEL M R A, BAVAPPA K V A. Chromosome numbers in the genus *Piper*[J]. Current Science, 1981, 50(4): 197-198.
- [14] JOSE J, SHARMA K. Structure and behavior of chromosomes in *Piper* and *Peperomia* (Family Piperaceae)[J]. Cytologia, 1985, 50: 301-310.
- [15] ARUMUGANATHAN K, EARLE E D. Nuclear DNA content of some important plant species[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1991, 9(3): 208-218.
- [16] 周香艳, 张宁, 王旺田, 王翠玲, 吴兵. 流式细胞术检测4种提取沙棘核DNA方法的比较[J]. 甘肃农业大学学报, 2012, 47(4): 155-160.  
ZHOU X Y, ZHANG N, WANG W T, WANG C L, WU B. Comparison of different nuclear isolation buffers for species of *Hippophae* DNA flow cytometry[J]. Journal of Gansu Agriculture University, 2012, 47(4): 155-160. (in Chinese)
- [17] 中国科学院昆明植物研究所. 一种测定睡莲科植物基因组大小的方法: CN201710644954.X[P]. 2017-08-01.  
Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. A method for determining the genome size of Nymphaeaceae: CN201710644954.X[P]. 2017-08-01.
- [18] 中国热带农业科学院香料饮料研究所. 细胞核提取缓冲液及胡椒属植物基因组大小的测定方法: ZL201910815313.5[P]. 2019-08-30.  
Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences. Nuclear extraction buffer and a method of determining genome size of *Piper* L.: ZL201910815313.5[P]. 2019-08-30. (in Chinese)
- [19] HU L S, XU Z P, WANG M J, FAN R, YUAN D J, WU B D, WU S H, QIN X W, YAN L, TAN L H, SIM S, LI W, SASKI C A, DANIELL H, WENDEL J F, LINDSEY K, ZHANG X L, HAO C Y, JIN S X. The chromosome-scale reference genome of black pepper provides insight into piperine biosynthesis[J]. Nature Communications, 2019, 10: 4702.
- [20] 张水平, 谷凤林, 吴桂苹, 房一明, 贺书珍, 王庆煌. 胡椒果与胡椒叶抗氧化能力的比较[J]. 食品工业科技, 2013, 34(20): 130-134.  
ZHANG S P, GU F L, WU G P, FANG Y M, HE S Z, WANG Q H. Comparative analysis of antioxidant activity between the fruits and leaves of *Piper nigrum* L.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(20): 130-134. (in Chinese)
- [21] LAI K F, SIM S L. Pepper production technology in Malaysia[M]. Kuching: Malaysia Pepper Board, 2011: 62-64.
- [22] SAMUEL R, MORAWETZ W. Chromosomal evolution within Piperaceae[J]. Plant Systematics and Evolution, 1989, 166: 105-117.
- [23] LEBOT V, ARADHYA M K, MANSARDT R M. Geographic survey of genetic variation in Kava (*Piper methysticum* Forst. f. and *P. wichmannii* C. DC.)[J]. Pacific Science, 1991, 45(2): 169-185.