

青钱柳流式细胞术预测倍性方法的初步建立

宋子琪 卞国良 胡清华 尚旭岚

南京林业大学林学院 南京林业大学南方现代林业协同创新中心

摘要:【目的】本试验以不同保存状态下的青钱柳叶片为材料,探究样品与解离液的差异对流式细胞分析结果的影响,达到对青钱柳流式细胞分析方法的初步建立。试验以不同贮存方式下四倍体青钱柳幼嫩叶片为材料,探究 LB01、GPB、mGb、WPB 和 Tris-MgCl₂ 解离液对鲜样(4℃)、冻样(-20、-40 和-80℃)和硅胶干燥样进行流式细胞分析的适用性和贮存方式和时间的差异。【结果】对于 4℃ 保鲜和硅胶干燥 7d 的叶片,使用 mGb 解离液所出峰图效果最佳,对于-80℃ 冷冻叶片,WPB 解离液所处峰图效果最佳,但 mGb 解离液所得结果也能对样品倍性进行准确判断。对不同贮存方式和时间的样品使用 mGb 解离液进行流式细胞分析,表明 4℃ 保鲜叶片 7d 的峰图 CV 值和质量最佳,但保存 7d 以上会出现叶片褐化的情况。而-40℃ 和-80℃ 冷冻叶片保持至少 360 d 时仍能通过流式细胞分析得到倍性结果,而硅胶干燥保存 220 d 的叶片无法检测出倍性结果。对青钱柳叶片进行流式细胞分析方法的验证时,会出现判断不准确的情况,此时应加入与疑似倍性相同的标准样品进行检测,即双标法,经过双标法的鉴定结果与染色体计数结果比对后能够达到 100% 的准确率。【结论】对青钱柳染色体进行流式细胞分析鉴定倍性时,尽量选择 4℃ 保存的新鲜幼嫩叶片。若条件不允许,且无法保证低温条件,可使用硅胶干燥的方法进行样品保存,但保存时间不宜过长。使用-40℃ 和-80℃ 进行冷冻保存可以保存至少 360d。同时, mGb 解离液可以作为 3 种样品的通用解离液,但若进一步对配方进行优化,能够得到更优质的结果。

关键词: 青钱柳; 细胞核裂解液; 多倍体; 内标法

Preliminary establishment of the method for predicting ploidy of *Cyclocarya paliurus*

Song Ziqi Bian Guoliang Tang Xiaowei Shang Xulan

.College of Forestry Nanjing Forestry University Co-Innovation center for Sustainable Forestry in Southern China

Abstract:【Objective】In this experiment, *C. paliurus* leaves under different storage conditions were used as materials to explore the impact of the difference between the sample and the dissociation solution on the results of flow cytometry, and to achieve the preliminary establishment of a flow cytometric analysis method for *C. paliurus*. The experiment used the young leaves of tetraploid *C. paliurus* under different storage methods as materials, and explored the effect of LB01, GPB, mGb, WPB and Tris-MgCl₂ dissociation solution on fresh samples (4 °C) and frozen samples (-20, -40 and -80 °C) and silica gel dry sample for flow cytometry analysis and the difference in storage method and time. 【Result】For the leaves kept fresh at 4 °C and dried on silica gel for 7 d, the peak pattern produced by mGb dissociation solution is the best. For frozen samples at -80 °C, the peak pattern of WPB dissociation solution is the best, but mGb. The results obtained from the dissociation solution can also accurately judge the ploidy of the sample. Flow cytometric analysis of samples with different storage methods and time using mGb dissociation solution showed that the peak CV value and quality of the leaves were kept fresh for 7 d at 4 °C, but the leaves browned after storage for more than 7 d. However, when leaves frozen at -40 °C and -80 °C for at least 360 d, the ploidy results can still be obtained by flow cytometry, while the ploidy results cannot be detected by the leaves stored in silica gel for 220 d. When performing flow cytometric analysis on *C. paliurus* leaves, the judgment will be inaccurate. At this time, standard samples with the same ploidy as the suspected ploidy should be added for testing, that is the double-labeling method. The identification results of the double-labeling method. The accuracy of 100% can be achieved after comparing with the chromosome count results. 【Conclusion】When performing flow cytometric analysis on the chromosome of *C. paliurus* to identify ploidy, try to choose fresh young leaves stored at 4°C. If the conditions are not allowed and the low temperature conditions cannot be guaranteed, the sample can be stored using silica gel drying, but the storage time should not be too long. Use -40 °C and -80 °C for cryopreservation can be stored for at least 360 d. At the same time, the mGb dissociation solution can be used as a general dissociation solution for the three samples, but if the formula is further optimized, better results can be obtained.

Key words: *Cyclocarya paliurus*; nucleus-isolation buffer; Polyploid; Internal standard method

青钱柳 (*Cyclocarya paliurus*) 是胡桃科青钱柳属植物, 作为我国特有的单属单种乔木, 主要分布在江西、浙江、安徽、福建、台湾、湖北、四川、贵州、广西等亚热带地区海拔 420~2500 m 的山地上 (方升佐和杨万霞, 2003; 方升佐和泮香香, 2007)。自然界中存在二倍体和四倍体两种倍性的青钱柳天然群体, 这种多倍化的现象在植物中广泛存在, 且长期被认为是植物进化和物种形成的主要驱动力 (Soltis and Soltis, 2009)。植物在染色体加倍的过程中为了适应环境和稳定基因组的形成, 其基因表达水平会发生变化 (Pikaard, 2001), 最终体现在植物表型和生理生化等方面的差异上 (Hegarty et al, 2006)。如多倍体苦荞麦 (*Fagopyrum tataricum*) 表现为植株叶片畸形严重, 叶片变厚, 花瓣长度增加 (杨敬东等, 2007)。甜菊 (*Stevia rebaudiana*) 多倍体叶片糖苷含量比二倍体增高 4.9% (漆慧娟, 2014)。

作为药用树种, 青钱柳叶片中含有丰富的次生代谢产物, 不仅具有抗氧化、增强免疫力以及抗衰老等保健价值, 还具有较为显著的降血糖、降血压、降血脂的药用功能 (李磊等, 2003; 舒任庚等, 2005)。基于此, 研究者们探究了青钱柳在不同地理位置, 不同种源、家系和个体间的差异和特征。研究表明, 青钱柳不同种源间和种内均具有较大的遗传差异, 纬度显著影响了青钱柳叶片中黄酮类单体山奈酚的含量且高海拔地区青钱柳叶片黄酮和三萜含量较高, 可溶性多糖含量较低 (Wu et al, 2020; 周一昶等, 2011; 余斌斌, 2021)。此外, 通过青钱柳的表型和次生代谢产物含量选择优良单株, 也能证明青钱柳个体间具有显著差异 (田力等, 2021)。然而, 由于预测青钱柳倍性方法的缺失, 倍性数据的获得具有一定的难度, 导致青钱柳叶用价值的差异性还未从倍性角度开展分析。

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 通过对样品 (多为叶片) 解离释放细胞核, 并对其进行染色处理, 获得单细胞核悬浮液后使用流式细胞分析仪进行光电信号的转换, 最后计算细胞核内相对 DNA 含量进行倍性预测 (田新民等, 2011)。相比于染色体计数法, 流式细胞术对样品取样时间和取样技术要求较低, 过程简单, 是目前效率较高的倍性预测方法 (金亮等, 2016)。待测材料的质量和解离液的选择是通过流式细胞术对植物进行倍性鉴定的关键, 使用 WPB 解离液对玉兰科植物进行流式细胞分析时被证明其峰值直方图出图时间快, 碎片少且 CV 值较低 (邹璇等, 2020)。Juan 的研究表明, 除新鲜叶片外, 使用硅胶干燥和植物标本保存的叶片也能够通过流式细胞术鉴定出植物倍性 (Juan et al, 2019)。

因此, 本研究以不同保存状态下的青钱柳叶片为材料, 探究样品与解离液的差异对流式细胞分析结果的影响, 以达到对青钱柳倍性鉴定方法初步建立的目的, 为今后获得青钱柳倍性数据提高效率。

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 选取青钱柳初选优良单株清凉峰 2 号 (二倍体) 和青钱柳 4 号 (四倍体) 幼嫩叶片, 冰盒带回实验室后分别放于 4℃、-20℃、-40℃和-80℃冰箱中以及常温硅胶干燥贮存 7 d, 叶片于 2021 年 4 月采自南京林业大学白马基地。

(2) 选取青钱柳初选优良单株清凉峰 4 号的嫁接苗于-40℃和-80℃冷冻贮存约 360 d, 叶片于 2020 年 4 月采自南京林业大学白马基地。

(3) 选取一株青钱柳野生大树幼嫩叶片, 冰盒带回实验室后使用硅胶干燥 7 d 和 200 d, 叶片分别于 2020 年 9 月和 2021 年 4 月 (贮存 7 d) 采自安徽清凉峰国家级自然保护区。

(4) 选取三个种源的野生大树幼嫩叶片冰盒带回实验室后 4℃保鲜保存, 用于优化体系验证, 叶片于 2021 年 4 月采自安徽黄山、安徽清凉峰国家级自然保护区和湖北鹤峰。

1.2 试验设计

1.2.1 解离液的筛选

选取 1.1 中 (1) 的材料, 采用单因素重复试验设计, 使用 LB01、GPB、mGb、WPB 和 Tris-MgCl₂ 细胞核裂解液分别对 4 °C 保鲜叶片、硅胶干燥叶片和 -80 °C 冷冻叶片进行流式细胞分析的测定, 每个处理重复 3 次, 探究不同样品间解离液对流式细胞分析的影响, 表 1 显示了 5 种解离液成分的差异 (田新民等, 2011)。

表 1 不同细胞核裂解液内成分的差异

Table1 The difference of component with nucleus-isolation buffers

成分 Component	mGb	GPB	LB01	WPB	Tris-MgCl ₂
Mg ²⁺	45 mmol/L			4 mmol/L	4 mmol/L
四盐酸精胺		0.5 mmol/L	0.5 mmol/L		
KCl		80 mmol/L	80 mmol/L		
NaCl		20 mmol/L	20 mmol/L	86 mmol/L	
TritonX-100	0.2% (v/v)	0.5% (v/v)	0.1% (v/v)		
Na ₂ EDTA	10 mmol/L		2 mmol/L		
EDTA · Na ₂ · 2H ₂ O				2 mmol/L	2 mmol/L
柠檬酸钠	30 mmol/L	30 mmol/L			
Tris			15 mmol/L		
Tris-HCl				200 mmol/L	200 mmol/L
MOPS	20 mmol/L	20 mmol/L			
PVP-10				1%	
PVP-40	1%(w/v)				
β-巯基乙醇	20 mmol/L		15 mmol/L		
焦亚硫酸钠				10 mmol/L	

1.2.2 贮存方式的比较

选取 1.1 中 (1) 的材料, 使用 mGb 解离液对 4 °C 保鲜叶片、-20 °C、-40 °C 和 -80 °C 冷冻叶片以及常温硅胶干燥叶片进行流式细胞分析的测定, 每个处理重复 3 次, 探究样品贮存方式对流式细胞分析的影响。

1.2.3 贮存时间的比较

选取 1.1 中 (1) 和 (2) 的材料, 使用 mGb 解离液对贮存 7 d 和 360 d 的 -40 °C 与 -80 °C 冷冻叶片进行流式细胞分析, 选取 1.1 中 (3) 的材料, 使用 mGb 解离液对贮存 7 d 和 220 d 的硅胶干燥叶片进行流式细胞分析, 每个处理重复 3 次, 探究贮存时间对冷冻叶片和硅胶干燥叶片进行流式细胞分析的影响。

1.2.4 青钱柳叶片流式细胞分析体系的验证

选取 1.1 中 (4) 的材料, 使用 mGb 解离液对 4 °C 保鲜叶片进行流式细胞分析, 测定各单株倍性后通过染色体计数法对结果进行验证, 确定最终流式细胞分析的准确性。

1.3 试验方法

本试验参考 Galbraith (2010) 的测定方法并加以改进。选取解离液 700 μL 加入培养皿中, 将培养皿置于冰上, 选取 1 cm² 的待测样品和标准样品叶片置于培养皿中, 在解离液中快速切碎, 切样时间为 20 s, 随后将混合液经过 400 目的滤网过滤, 转移至 1.5 ml 的 EP 管内, 得到细胞核悬浮液, 最后加入 20 μL 的碘化丙啶 (PI) 染料至细胞核悬浮液内混合均匀, 4 °C 避光染色 1 min 后使用 InfluxTM 流式细胞仪 (美国 BD) 上机测定。由于荧光染料能够定量嵌合在细胞核内 DNA 双链分子上, 当染色细胞进入流式细胞分析仪后能够检测到单个细胞相应的荧光强度, 最后根据相对荧光强度大小, 判断样品的倍性情况。 (Paul and Husband, 2012)

1.4 数据统计

使用 Flow Jo V10 软件对流式细胞分析数据进行作图，并得到峰图 CV 值和相对荧光强度均值；使用 EXCEL 2010 计算四倍体和二倍体样品的相对荧光强度比值，并使用 DPS 数据处理系统对 CV 值和比值进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 解离液的筛选

流式细胞峰图效果的评判标准关键为峰图 CV 值和峰图质量。峰图 CV 值是判断流式细胞仪测量精度的指标，CV 值越低，说明仪器因素、样本制备和染色过程对结果准确性的影响越低。同时，信号峰与噪音峰的分離程度及噪音峰的数量，峰图边缘线平滑程度，峰的宽度和高度均能够影响峰图的质量，峰值高说明解离液对细胞核的释放能力强，峰的宽度小说明荧光信号更为集中，两峰的分離程度清晰，峰图效果好（王利虎，2021）。

使用 GPB、LB01、mGb、Tris-MgCl₂ 和 WPB 解离液对新鲜叶片、硅胶干燥叶片和 -80 °C 冷冻叶片进行流式细胞分析，方差分析结果表明，解离液间的差异对 3 种样品所出峰图 CV 值均具有显著影响 ($P < 0.05$)，但二倍体和四倍体青钱柳叶片对不同解离液的适用性有所区别（表 1）。同时，根据 t 检验结果，在同一解离液下，虽然四倍体叶片所出峰图 CV 值在数值上均低于二倍体，但倍性的差异对流式细胞分析所出峰图 CV 值并无显著影响。

2.1.1 不同解离液对新鲜叶片的影响

对于二倍体，使用 GPB 解离液所出峰图的 CV 值最低，为 6.08%，但与 mGb、LB01 和 WPB 解离液所出峰图的 CV 值无显著差异。对于四倍体，使用 LB01 解离液所出峰图的 CV 值最低，为 5.00%，GPB 和 WPB 解离液与 LB01 所出峰图 CV 值无显著差异，mGb 解离液所出峰图 CV 值显著高于以上 3 种解离液 ($P < 0.05$)，但 Tris-MgCl₂ 解离液所出峰图 CV 值在两种倍性青钱柳叶片中均最高，且显著高于其他解离液 ($P < 0.05$)。

根据流式细胞分析峰图结果（图 1-A），5 种解离液均能够准确预测青钱柳叶片倍性。其中，GPB 解离液所出峰图边缘线平滑，二倍体和四倍体峰图的噪音峰最少，两峰的峰型整体表现为细长型，峰图质量最佳，出图稳定但出图效率较低，平均出图时间为 5 min。mGb 解离液峰图的峰值略低，峰型与 GPB 解离液所出峰图的峰型相似，峰图质量较好且出图稳定，平均出图时间为 1 min。但 Tris-MgCl₂、LB01 和 WPB 解离液所出峰图的峰值较低，峰的宽度较大，且边缘线曲折，噪音峰较多，会影响四倍体与二倍体相对荧光强度的比值，进而影响倍性的判断。

2.1.2 不同解离液对硅胶干燥叶片的影响

从表 2 可以看出，二倍体 GPB 解离液所出峰图 CV 值最低，为 6.07%，WPB、Tris-MgCl₂ 和 mGb 解离液与 GPB 解离液所出峰图 CV 值无显著差异，而 LB01 解离液所出峰图 CV 值显著高于其他 4 种解离液，为 9.46%。对于四倍体，WPB 解离液所出峰图 CV 值最低，为 5.59%，GPB 解离液所出峰图 CV 值略高于 WPB 解离液，但与其无显著差异，而 Tris-MgCl₂、LB01 和 mGb 解离液均显著高于 WPB 和 GPB 解离液所出峰图 CV 值。

根据流式细胞分析峰图结果（图 1-B），相比于二倍体，5 种解离液均能够对四倍体叶片解离出更多的细胞核。从峰图效果来看，虽然 GPB 解离液对四倍体样品测定时所出峰图的峰值略低于 mGb、Tris-MgCl₂ 和 WPB 解离液，但两峰的边缘线较为平滑，峰的宽度最小，峰图质量最佳。WPB 解离液所出峰图的四倍体峰有少量噪音峰，出图稳定性偏差，但峰图质量与 GPB 解离液所出峰图差异不大。mGb 解离液所出峰图的宽度较大，有少量噪音峰，两峰的峰值相差较多，但峰值较高，也能够从该图准确判断出倍性情况。而 Tris-MgCl₂ 和 LB01 解离液所出峰图的噪音峰最多，整理的峰值较低，峰的宽度较大，Tris-MgCl₂ 解离液表现为二倍体峰值低，四倍体峰值高，大约为是二倍体峰值的 1.88 倍，而 LB01 解离液与其

情况相反, 峰值过低可能会造成噪音峰和信号峰的混淆, 使用以上两种解离液多次测定时可能会出现倍性无法准确判断倍性的峰图。

表 2 不同细胞核裂解液峰图 CV 值与相对荧光强度比值

Tab.2 The CV value and Relative fluorescence intensity of different nucleus-isolation buffers

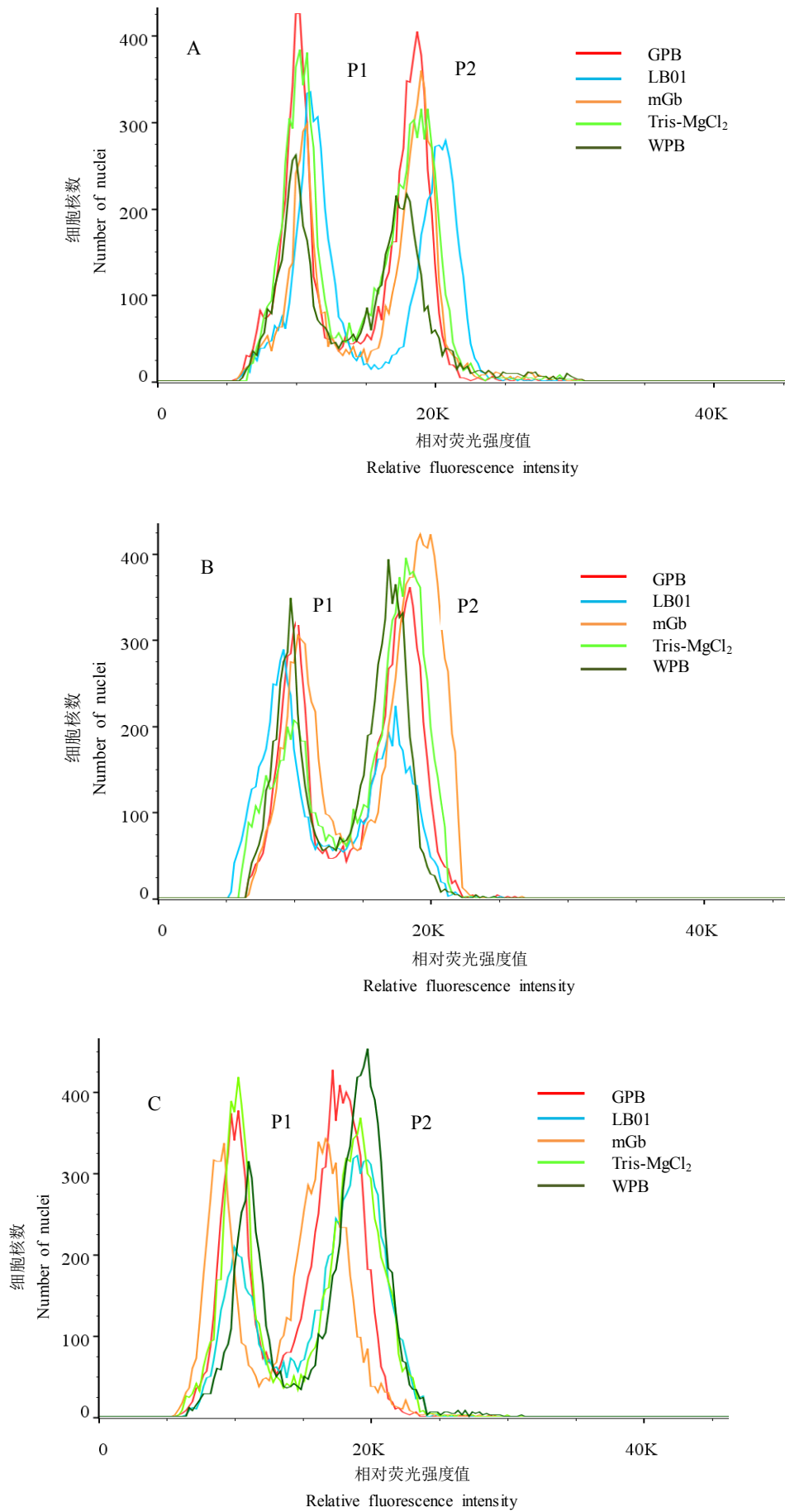
样品 Sample	细胞核裂解液 Nucleus-isolation buffer	CV-2	CV-4	比值 Ratio
4℃保鲜样	GPB	6.08±0.32b	5.59±0.50bc	1.88±0.03a
	LB01	6.83±0.84b	5.00±0.45c	1.81±0.01b
	mGb	6.83±0.77b	6.54±0.31ab	1.79±0.01b
	Tris-MgCl ₂	8.99±0.81a	7.21±0.25a	1.83±0.01ab
	WPB	7.17±0.32ab	5.81±0.30bc	1.82±0.02b
硅胶干燥样	GPB	6.70±0.30b	6.02±0.02bc	1.84±0.02b
	LB01	9.46±1.36a	6.83±0.56ab	1.98±0.03a
	mGb	8.02±0.41ab	7.70±0.27a	1.84±0.01b
	Tris-MgCl ₂	7.72±0.08ab	6.73±0.03b	1.81±0.03bc
	WPB	7.44±0.04ab	5.59±0.07c	1.77±0.01c
-80℃冷冻样	GPB	8.39±0.13a	7.64±0.19bc	1.91±0.02a
	LB01	8.44±0.12a	7.94±0.05abc	1.76±0.03b
	mGb	8.46±0.22a	8.10±0.11ab	1.87±0.01a
	Tris-MgCl ₂	9.61±0.76a	8.84±0.68a	1.84±0.03ab
	WPB	6.19±0.66b	7.06±0.09c	1.77±0.03b

不同小写字母间代表解离液间 CV 值和四倍体与二倍体相对荧光强度比值具有显著差异 ($P < 0.05$), CV-2 和 CV-4 分别代表二倍体和四倍体所出峰图 CV 值, 比值代表四倍体和二倍体相对荧光强度比值, 下同。Different lowercase indicates significant difference at 0.05 level with the CV values among different nucleus-isolation and the ratio of relative fluorescence intensity between tetraploid and diploid, the same below.

2.1.3 不同解离液对-80℃冷冻叶片的影响

使用 WPB 解离液对二倍体和四倍体进行流式细胞分析, 所出峰图 CV 值均最低, 分别为 6.19% 和 7.06%。对于二倍体, WPB 解离液所出峰图 CV 值显著低于其他 4 种解离液, 但这 4 种解离液所出峰图 CV 值之间无显著差异, 其中 Tris-MgCl₂ 解离液峰图 CV 值最高, 为 9.61%。对于四倍体, GPB、LB01 和 mGb 解离液所出峰图 CV 值显著高于 WPB 解离液, 但 3 种解离液之间无显著差异, 而 Tris-MgCl₂ 解离液所出峰图 CV 值显著高于 GPB 和 WPB 解离液。

根据流式细胞分析峰图结果 (图 1-C), 使用 5 种解离液对-80℃冷冻叶片进行流式细胞分析时所出峰图效果整体质量较低, 表现在噪音峰较多和相对荧光强度的偏移。其中, WPB 解离液所出峰图边缘线相对平滑, 具有少量的噪音峰, 四倍体峰值较高, 但二倍体峰值较低, 与其他解离液相比, 峰的宽度较小。Tris-MgCl₂ 解离液所出峰图有少量噪音峰, WPB 解离液所出峰图边缘线平滑程度相似, 两峰的峰值差距较小。相对于 WPB 和 Tris-MgCl₂ 解离液, GPB 解离液所出峰图的噪音峰稍多, 但峰图边缘线平滑程度与其无明显区别, 且峰值较高, 峰图质量处于中等水平。mGb 解离液所出峰图噪音峰较多, 峰值较低, 峰的宽度较小, 所测结果的相对荧光强度值大小偏低, 而 LB01 解离液所出峰图噪音峰最多, 二倍体峰值过低, 易出现噪音峰和信号峰难以区分的现象。



A、B 和 C 分别代表 4 °C 保鲜、硅胶干燥和-80 °C 冷冻叶片不同解离液的峰图，P1 和 P2 分别代表二倍体和四倍体峰，下同。A,B and C indicate the histogram of peak values of 4°C fresh sample, silica gel-dried sample and -80°C frozen sample among different nucleus-isolation buffer.

图 1 不同解离液进行流式细胞分析对青钱柳叶片的峰图

Fig.1 The histogram of peak values of *C. paliurus* leave with different nucleus-isolation buffers through flow cytometric analysis

2.2 贮存方式对流式细胞分析的影响

采用低温（4 °C、-20 °C、-40 °C、-80 °C）和常温（25 °C）硅胶干燥的方式贮存青钱柳叶片共 7 d 后，使用 mGb 解离液进行流式细胞分析，方差分析结果表明（表 3），贮存方式的差异对所出峰图 CV 值具有显著影响（ $P < 0.05$ ）。对于二倍体，使用 4 种低温和常温硅胶干燥保存叶片进行测定后，所出峰图 CV 值从小到大顺序为 4°C < -40°C < 硅胶干燥 < -20 °C < -80 °C，但 5 种贮存方式间无显著差异。对于四倍体，4°C 保鲜叶片所出峰图 CV 值显著低于-20 °C、-80 °C 冷冻和硅胶干燥保存叶片，但与-40°C 冷冻叶片所出峰图 CV 值无显著差异。

流式细胞分析峰图结果表明（图 2），4 °C 保鲜叶片峰值最高，峰的宽度最小，峰图边缘线平滑，峰图质量最佳。-20 °C 冷冻叶片所出峰图峰值略低于 4 °C 保鲜和硅胶干燥叶片，但峰图边缘线光滑，峰图质量较好。硅胶干燥叶片所出峰图有少量噪音峰，峰的宽度略大于 4 °C 保鲜和-20 °C 冷冻叶片。-40 °C 和-80 °C 冷冻叶片所出峰图效果最差，噪音峰较多，峰图边缘线平滑程度较差，峰值较低。

表 3 不同贮存方式下峰图 CV 值和荧光强度比值

Tab.3 The CV value and Relative fluorescence intensity in different storage methods

贮存方式 Storage method	CV-2	CV-4	比值 Ratio
4°C	5.78±0.49a	3.98±0.29b	1.78±0.01b
-20°C	6.99±0.19a	7.22±0.48a	1.76±0.02b
-40°C	6.47±0.94a	6.46±0.81ab	1.87±0.02a
-80°C	7.42±0.23a	7.34±0.30a	1.85±0.02a
硅胶干燥	6.57±0.81a	7.49±0.41a	1.85±0.00a

不同小写字母间代表贮存方式间 CV 值和四倍体与二倍体相对荧光强度比值具有显著差异（ $P < 0.05$ ） Different lowercase indicates significant difference at 0.05 level with the CV values among different storage method and the ratio of relative fluorescence intensity between tetraploid and diploid.

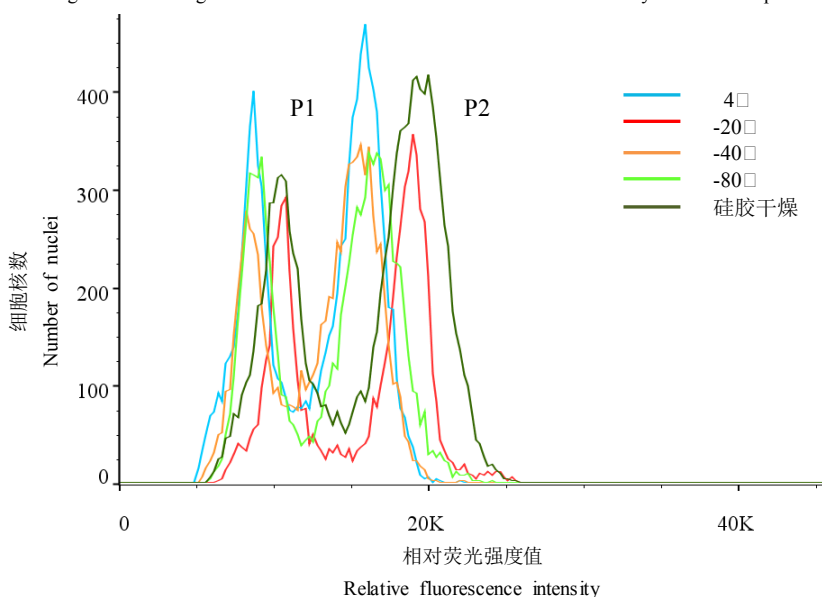


图 2 不同贮存方式下青钱柳叶片流式细胞分析所出峰图

Fig.2 The histogram of peak values of *C. paliurus* leave with different storage methods through flow cytometric analysis

2.3 贮存时间对流式细胞分析的影响

不同保存时间下青钱柳叶片流式细胞分析结果表明（表 4），-40 °C 和-80 °C 冷冻二倍体叶片保存 7 d 和 365 d 后，流式细胞分析所出峰图 CV 值无显著差异，但均为保存 7 d 的样品峰图 CV 值较小。四倍体叶片在-40 °C 下保存条件下，两种贮存时间也无显著差异，但在-80 °C 保存条件下，贮存 365 d 的叶片所出峰图 CV 值显著低于贮存 7 d 的叶片（ $P < 0.05$ ）。同时发现，硅胶干燥 220 d 的叶片无法通过解离液释放出足够的细胞核进行流式细胞分析鉴定倍性。

流式细胞分析峰图结果表明（图 3），-40 °C 和-80 °C 冷冻叶片所出峰图细胞核数分别高于保存 365 d 叶片的 1.75 倍和 1.44 倍，且冷冻保存 7 d 的叶片所出峰图均峰值较高，峰的宽度较小，边缘线相对平滑，峰图质量显著高于保存 365 d 所出峰图，而硅胶干燥 7 d 的叶片所出峰图峰值和噪音峰数量均处于中等水平。

表 4 不同贮存时间下峰图 CV 值和荧光强度比值

Tab.4 The CV value and Relative fluorescence intensity in different storage time

贮存时间 Storage time	CV-2	CV-4	比值 Ratio
-40°C-7d	7.47±0.69c	6.65±0.64bc	1.86±0.04a
-40°C-365d	8.02±0.20abc	7.15±0.11abc	1.82±0.07a
-80°C-7d	7.88±0.35bc	7.64±0.34ab	1.86±0.01a
-80°C-365d	9.28±0.54ab	6.05±0.55c	1.80±0.03a
硅胶干燥-7d	9.62±0.72a	8.32±0.41a	1.79±0.01a
硅胶干燥-200d	/	/	/

不同小写字母间代表贮存时间 CV 值和四倍体与二倍体相对荧光强度比值具有显著差异（ $P < 0.05$ ），“/”代表流式细胞分析未检测出峰图。Different lowercase indicates significant difference at 0.05 level with the CV values among different storage time and the ratio of relative fluorescence intensity between tetraploid and diploid, “/” indicates the failure of flow cytometry test.

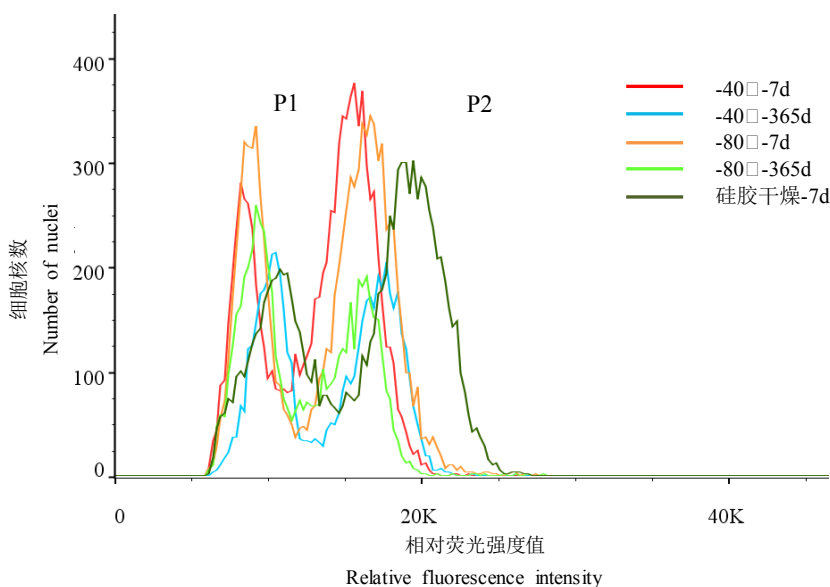


图 3 不同贮存时间下青钱柳叶片流式细胞分析所出峰图

Fig.2 The histogram of peak values of *C. paliurus* leave with different storage time through flow cytometric analysis

2.4 流式细胞术体系的验证和优化

一般认为，通过内标法将待测样品和标准样品混合液进行上机测定后，所出峰图相对荧光强度的比值为 2 时，可以准确判断待测样品倍性，但根据物种的区别会出现比值偏大或偏小的可能。根据表 2、表

3 和表 4, 发现经过染色体计数的四倍体和二倍体青钱柳样品相对荧光强度比值范围在 1.76~1.98 之间, 因此本研究以比值高于 1.75 为标准, 确定青钱柳的倍性。

使用 mGb 解离液和 PI 荧光染色剂, 对安徽黄山、清凉峰和湖北鹤峰共 50 株青钱柳野生大树的叶片 4 °C 保鲜 2 d 后进行流式细胞分析鉴定倍性, 结果表明, 经过第一轮鉴定, 出图稳定性达 96.00%, 重新测定未出图样品后共鉴定出 9 株二倍体和 35 株四倍体。而鉴定过程中, 发现 5 份样品出现如图 4-A 的情况, 即两峰间距离过小, P1 的相对荧光强度值较高, P2 与 P1 的相对荧光强度值之间的比值为 1.52。1 份样品 P2 表现出相对荧光强度值过小 (图 4-C), P2 与 P1 的相对荧光强度值之间的比值为 1.60。以上两种情况均可能导致待测样品倍性判断为三倍体, 因此在发生以上两种情况时只通过一种标准样品进行标定具有不确定性。需要采用双标法, 即当出现不确定倍性时, 采用两种倍性的标准样品进行标定, 最终确定倍性。在图 4-A 中的样品通过加入二倍体标准样品后, 两种样品仍然处于同一相对荧光强度范围内, 最终确定为二倍体样品 (图 4-B)。图 4-A 中的样品加入四倍体标准样品后, 两种样品也处于同一相对荧光强度范围中, 最终确定为四倍体样品 (图 4-D)。同时, 通过染色体计数验证发现图 6 中的样品为二倍体 ($2n = 32$), 图 7 中的样品为四倍体 ($2n = 64$), 因此可以确定为该样品为二倍体。

通过染色体计数法进行倍性结果的验证, 发现流式细胞分析结果和染色体计数结果完全一致, 使用 mGb 解离液和 PI 荧光染色剂对 4 °C 保鲜样品在 7 d 进行流式细胞分析的体系能够得到 100% 的正确率。

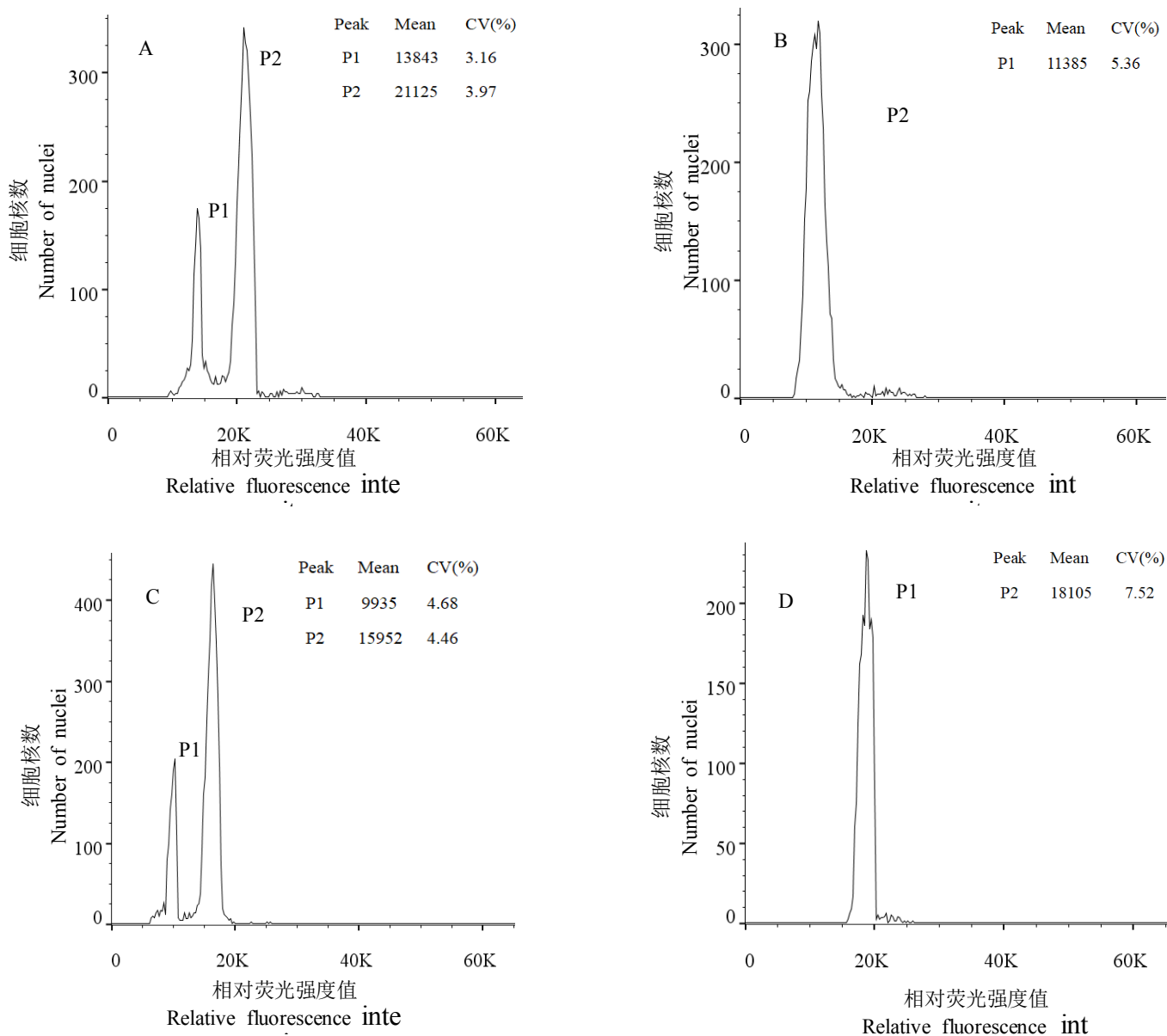


图 4 特殊情况下青钱柳叶片流式细胞分析峰图

Fig.4 The histogram of peak values of *C. paliurus* leaf through flow cytometric analysis in exceptional cases

A 和 C 分别代表二倍体和四倍体青钱柳待测样品加入不同倍性青钱柳标准样品的峰图；B 和 D 分别代表二倍体和四倍体青钱柳待测样品加入相同倍性青钱柳标准样品的峰图；P1 和 P2 分别代表二倍体和四倍体峰；Mean 代表相对荧光强度平均值。A and C indicate the histogram of peak values with diploid and tetraploid sample adding different ploidy standard sample, respectively；B and D indicate the histogram of peak values with diploid and tetraploid sample adding different ploidy standard sample, respectively；P1 and P2 indicate the peak of diploid and tetraploid, respectively；Mean indicates the mean relative fluorescence intensity.

3. 讨论

3.1 解离液的筛选

目前的研究还未发现有一种解离液能够适用于所有植物，因此对细胞解离液种类的选择是流式细胞分析成功的关键之一。张虹等人（2020）发现，使用 Nuclei Extraction Buffer 解离液对黑果枸杞和甜叶菊试管苗叶片进行流式细胞分析所得峰图成峰集中，噪音峰较少，效果最佳。Thiem 等人（2003）的研究表明，使用与 Tris-MgCl₂ 成分相似的解离液能够检测出云莓的倍性和基因组大小。

本研究中, GPB 解离液对 4 °C 保鲜、硅胶干燥的青钱柳叶片进行流式细胞分析测定后的峰图质量均较优, 峰图边缘线平滑程度较高, 说明使用该解离液制备的细胞核悬浮液染色较为均匀, 相对荧光强度值波动范围较小, 但 GPB 解离液对细胞核的释放能力较弱, 导致出图效率较低, 而 mGb 解离液所出峰图质量仅次于 GPB, 且出图效率高, 因此, 对青钱柳 4 °C 保鲜和硅胶干燥叶片进行流式细胞分析时, 使用 mGb 解离液是最佳选择。而使用-80 °C 冷冻叶片进行分析时, 发现 WPB 解离液效果最佳, 其次为 Tris-MgCl₂。通过对 5 种解离液成分的比较 (田新民等, 2011), 可以发现, GPB 和 mGb 解离液均使用了柠檬酸钠作为消除 RNA 影响的成分, 而 LB01、WPB 和 Tris-MgCl₂ 解离液未使用此成分。此外, 这 3 种解离液均使用了 Tris 作为维持核完整性, 防止核黏连的成分, 而 GPB 和 mGb 解离液未使用此成分。因此, 笔者认为 4 °C 和硅胶干燥叶片可能受到了柠檬酸钠或 Tris 的影响, 且 Tris 更适用于冻样, 而 LB01 解离液对冷冻叶片解离效果不好的原因可能是 Tris 的浓度较低, 为 15 mmol/L, 而 LB01 和 WPB 解离液中 tris 的浓度均为 200 mmol/L。

TritonX-100 能够提取细胞膜蛋白, 起到释放细胞核的作用 (Dolezel et al, 1989), 在本研究使用的 5 种解离液中均以不同浓度存在, 它的效果间接表现为峰图中细胞核的数量。本研究中 mGb 解离所出峰图峰值高于 GPB 解离液, 但 TritonX-100 的浓度在 GPB 解离液中更高。这可能是由于青钱柳叶片中含有黄酮、多糖和酚类等多种次生代谢产物, 而 mGb 解离液中加入了 PVP 和 β -巯基乙醇, 能够消除酚类物质和对其染色的影响, 但 GPB 解离液中未使用这两种成分, 造成 TritonX-100 对细胞核的释放能力受到酚类物质的抑制。因此, 后期需对解离液进行进一步优化, 得到细胞核释放能力强, 杂质少的解离液, 如李雯雯 (2019) 使用 MgSO₄-LB01 的混合解离液对新疆野杏的叶片进行流式细胞分析, 能够得到 CV 值低, 上样速率快的优质峰图。

3.2 贮存方法和时间的比较

对待测样品的良好贮存是进行流式细胞分析的前提, 贮存样品的目的是保护细胞核内 DNA 的完整性。由于青钱柳叶片中酚类物质含量较多, 4 °C 保鲜样品的贮存期限仅为 7 d, 随后逐渐褐化。因此, 对长时间贮存方式和时间的探讨具有一定必要性。从结果来看, 以 7 d 为期限, 4 °C 保鲜叶片的效果最好, 能够释放出更多的细胞核, 其次为-20 °C 保存和硅胶干燥保存, 而-40 °C 和-80 °C 冷冻叶片所出峰图质量最差, 这是由于低温对细胞造成的机械损伤以及细胞溶质化合物造成的干扰 (李雯雯等, 2019), 但 5 种贮存方式均能够准确判断出青钱柳叶片的倍性。此外, 贮存方式的不同影响了出图稳定程度。随着贮存温度的降低, 进行测定时叶片的褐化程度越快, 操作难度加大, 可能导致无法出图。

本研究认为, 低温冷冻 360 d 仍能够对叶片进行流式细胞分析的测定, 但硅胶干燥 220 d 的叶片已经无法解离出能够检测出的细胞核, 说明冷冻的方式能够降低叶片内 DNA 的降解速率。从峰图效果来看, 长时间冷冻贮存对叶片内 DNA 质量均造成一定的影响, 所解离出的细胞核数较少, 这是由于长时间低温冷冻造成了更大的伤害和叶片内 DNA 本身的降解造成的双重影响。同时, 贮存时间的增加也影响了出图稳定性。

3.3 流式细胞体系的验证与优化

通过对不同叶片解离液的筛选以及贮存方式和时间的比较, 认为使用 mGb 解离液和 PI 染色剂对 4 °C 保鲜样品进行流式细胞分析的效果最优。使用安徽黄山、清凉峰和湖北鹤峰种源野生大树 4 °C 保鲜的幼嫩叶片进行了流式细胞分析准确性的验证, 出现部分二倍体样品相对荧光强度值偏高, 而四倍体样品相对

荧光强度值偏低。这是由于本研究使用的 PI 染色剂能够与碱基对 G-C 结合，进而估测基因组的大小，而青钱柳单株之间的基因组大小有所差异，因此导致在倍性判断时出现相对荧光强度值偏大或偏小的现象。而在加入相同倍性标准样品后，由于两峰相对荧光强度值相差过小，且部分荧光强度有所重叠，导致两个样品处于同一个峰中，CV 值的升高也说明了峰图中荧光轻度集中程度较差。但通过双标法后，能够准确鉴定出青钱柳倍性，达到 100% 的准确性。