

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2020.30369

邹璇, 孙李勇, 万小霞, 陈瑶, 林峰, 尹增芳. 玉兰亚属多倍体植物 DNA C-值流式细胞术测定体系的建立[J]. 植物科学学报, 2020, 38(3): 369-377

Zou X, Sun LY, Wan XX, Chen Y, Lin F, Yin ZF. Establishment of flow cytometry system for DNA C-value determination of polyploid species in subgenus *Yulania*[J]. *Plant Science Journal*, 2020, 38(3): 369-377

玉兰亚属多倍体植物 DNA C-值流式细胞术测定体系的建立

邹璇¹, 孙李勇¹, 万小霞¹, 陈瑶¹, 林峰², 尹增芳^{1*}

(1. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 生物与环境学院, 南京 210037;

2. 南京林业大学现代分析测试中心, 南京 210037)

摘要:通过对不同解离液和内标组合的筛选, 采用流式细胞仪对木兰科玉兰亚属(subgen. *Yulania*)6种多倍体植物的DNA C-值进行测定与分析。结果显示:在解离液和标样的筛选中,WPB解离液为玉兰亚属植物的最佳选择;以星花玉兰(*Magnolia stellata*(Siebold & Zucc.)Maxim.)为内标时,混合样品的峰图效果最好,DNA峰的变异系数(CV)均小于5.0%。紫玉兰(*M. liliiflora* Desr.)、多瓣紫玉兰(*M. polytepala* Law, R. Z. Zhou & R. J. Zhang)、黄山玉兰(*M. cylindrica* E. H. Wilson)、白玉兰(*M. denudata* Desr.)、二乔玉兰(*M. × soulangeana* Soul.-Bod.)和渐尖玉兰(*M. acuminata* (L.)L.)的C-值大小范围在(3.92 ± 0.02)pg到(5.85 ± 0.03)pg之间,基因组大小从(3832.13 ± 24.67)Mbp到(5964.17 ± 56.06)Mbp。研究结果表明该优化的流式细胞术测定体系可以精确测定玉兰亚属多倍体植物的DNA C-值。

关键词:流式细胞术; DNA C-值; 基因组大小; 玉兰亚属

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2020)03-0369-09

Establishment of flow cytometry system for DNA C-value determination of polyploid species in subgenus *Yulania*

Zou Xuan¹, Sun Li-Yong¹, Wan Xiao-Xia¹, Chen Yao¹, Lin Feng², Yin Zeng-Fang^{1*}

(1. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 2. Advanced Analysis and Testing Center, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: By screening different combinations of dissociation solutions and internal standards, the DNA C-values of six polyploid plants of subgen. *Yulania* (Magnoliaceae) were determined and analyzed by flow cytometry. Results showed that, in the screening of solution buffers and standard samples, woody plant buffer (WPB) was the best choice for subgen. *Yulania*. Furthermore, the peak pattern of mixed samples worked best when *Magnolia stellata* (Siebold & Zucc.) Maxim. was the internal standard and the coefficient of variation (CV) of the DNA peak was less than 5.0%. The C-values of *M. liliiflora* Desr., *M. polytepala* Law, R. Z. Zhou & R. J. Zhang, *M. cylindrica* E. H. Wilson, *M. denudata* Desr., *M. × soulangeana* Soul.-Bod., and *M. acuminata* (L.) L ranged from (3.92 ± 0.02) pg to (5.85 ± 0.03) pg and the genome size ranged from (3832.13 ± 24.67) Mbp to (5964.17 ± 56.06) Mbp. Thus, our results showed that the optimized flow cytometry system accurately determined the DNA C-value of

收稿日期: 2019-09-25, 退修日期: 2019-11-14。

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20171451); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)。

This work was supported by grants from the Natural and Science Foundation of Jiangsu Province (BK20171451) and Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

作者简介: 邹璇(1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向为资源植物学(E-mail: 1308175391@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: zfyin@njfu.edu.cn)。

polyploid species in the subgen. *Yulania*.

Key words: Flow cytometry; DNA C-value; Genome size; subgenus *Yulania*

木兰科 (Magnoliaceae) 是现存被子植物中最原始的类群之一, 对研究有花植物的起源、系统发育和分类有着重要价值^[1]。木兰科植物分布范围广及美洲、亚洲的温带、亚热带和热带地区, 木兰科植物之间在内部结构和外部形态上较为相似, 长期以来在科内的分类上存在很大争议。迄今为止, 产生较大影响的木兰科分类系统有 Dandy 系统、刘玉壶系统和 Nooteboom 系统^[2, 3], 他们在属的界定上有一定分歧, 虽然都在木兰属 (*Magnolia*) 下设立玉兰亚属 (subgen. *Yulania*), 但各自的划分标准和范围不同。

玉兰亚属现存 20 多个种及变种, 其中大部分为中国特有分布, 该类群分布范围广, 容易发生属间 (内) 自然杂交, 形态性状交叉情况普遍, 变异类型丰富, 仅凭形态特征难以准确界定分类群, 在玉兰亚属下级分类群的划分上仍未统一观点^[4-6]。目前, 国内外学者采用形态解剖学、细胞学、孢粉学、分支系统学、分子生物学等诸多方法, 在玉兰类植物的系统发育与分类学研究方面取得了一些进展^[7], 但还需要更多的证据支持。因此, 加强玉兰亚属的细胞学研究, 积累更多基因组信息, 对解决木兰科的系统分类问题有一定指导价值。

基因组大小指的是一个物种配子所含的 DNA 含量 (染色体数目为 n), 反映其特定的遗传信息, 其大小多用 C-值 (C-value) 表示^[8]。在多倍体植物中, DNA 2C-值 (物种含有的 DNA 总量) 除以其倍性得到 Cx 值 (Cx-value), 表示物种单倍体染色体的 DNA 含量^[9]。对于真核生物来说, C-值在一定程度上是一个固有的特性参数, 他与细胞大小、气孔密度和物种进化及濒危程度等性状都有一定相关性^[10], 故 C-值的研究对进一步了解生物体的特性具有重要价值。此外, 种级水平的 C-值测定, 对于研究种群进化和物种分类具有重要意义^[11]。通过 C-值获取的基因组大小可用于构建物种系统进化树, 分析物种间的亲缘关系^[12], 并且也可结合倍性水平来鉴定种间杂交物种^[13]。目前已建立的植物 DNA C-值数据库涵盖了约 12 273 种植物 (<https://cvalues.science.kew.org/>), 而其中仅收录了紫玉兰 (*M. liliiflora* Desr.) 和二乔玉兰 (*M. ×*

soulangeana Soul.-Bod.) 两种玉兰亚属植物的 C-值信息。显然, 更多玉兰亚属植物 DNA C-值的确定, 对于其基因组信息的解析、木兰科植物分类系统学研究及种质资源鉴定 (如杂种鉴定) 十分必要。

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 因其操作简单、低成本、高效率, 近年来被众多学者用于 C-值的测定, 在系统分类学、生态学、植物遗传及育种等方面均有广泛的应用^[14]。FCM 已被证实是有效估算木兰科植物 C-值的方法。Parris 等^[15]利用 FCM 测定了木兰属 175 个种或品种的相对基因组大小, 研究其与倍性水平的关系, 建立了丰富的倍性水平数据库供木兰科育种研究者使用, 但未对解离液和内标进行筛选。国内近几年才开展关于 FCM 在木兰科植物上的研究, 如叶林江等^[16]选取木兰科中 10 个属级分类单元, 通过 FCM 分别检测了 23 个不同种的核 DNA 含量 (2C-值), 但其研究对象主要针对木兰科二倍体物种。赵青等^[17]使用外标法测定了 3 种木兰科植物的 DNA-C 值及倍性, 但该方法与内标法相比准确性略低。因此, 本研究通过对最适解离液和内标的筛选, 采用流式细胞仪对玉兰亚属 6 种多倍体植株进行 DNA C-值的测定与分析, 以建立起高效、准确、适宜的玉兰亚属植物流式细胞术测定体系, 旨在为该属植物种质鉴定与基因组学研究提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 植物材料

1.1.1 待测样品

选取木兰属玉兰亚属中的 6 个种作为待测样品, 紫玉兰 (*M. liliiflora* Desr.)、二乔玉兰 (*M. × soulangeana* Soul.-Bod.)、渐尖玉兰 (*M. acuminata* (L.) L.) 采自南京林业大学校园; 黄山玉兰 (*M. cylindrica* E. H. Wilson)、白玉兰 (*M. denudata* Desr.) 采自南京中山植物园; 多瓣紫玉兰 (*M. polytepala* Law, R. Z. Zhou & R. J. Zhang) 由西安植物园提供。以 8 ~ 10 年生的成年植株为采样株, 于 2019 年 4 月 15 号至 18 号采集样株上刚抽出的幼嫩叶片作为实验材料, 立即用冰盒保存带回实验室, 置于 4℃ 冰箱内, 于 2 d 内完成流式细胞

术检测。凭证标本 (Zou01ML、Zou02M × S、Zou03MA、Zou04MC、Zou05MD、Zou06MP) 均保存于南京林业大学植物标本馆(NF)。

1.1.2 标准样品

本实验分别选取玉米 (*Zea mays* L. CE-777, $2n = 2x = 20$)、星花玉兰 (*M. stellata* (Siebold & Zucc.) Maxim., $2n = 2x = 38$) 和鹅掌楸 (*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg., $2n = 2x = 38$) 为标准样本。研究表明玉米的 DNA-2C 值为 $5.43 \text{ pg}^{[9]}$; 星花玉兰的 DNA-2C 值为 $4.25 \text{ pg}^{[15]}$; 鹅掌楸已完成全基因组测序, 其 DNA-2C 值为 $3.6 \text{ pg}^{[18]}$ 。其中玉米由南京林业大学现代分析测试中心提供; 星花玉兰和鹅掌楸均采自南京林业大学校园。标样的凭证标本 (Zou07ZM、Zou08MS、Zou09LC) 保存于南京林业大学植物标本馆(NF)。

1.2 实验方法

1.2.1 解离液的选择与配制

选取 4 种细胞核解离液, 分别为 woody plant buffer (WPB)、Tris · MgCl_2 buffer、Galbraith's buffer 和 LB01 buffer, 配方参考汪艳等^[19]的方法。配好后的裂解液均于 4°C 冰箱保存、备用。

1.2.2 细胞核悬液的制备与 DNA 特异性染色

实验操作参照 Galbraith^[20]的方法并进行了部分改进。撕下大约 1.5 cm^2 的嫩叶样品置于冰上的培养皿中, 各加入 4 种解离液 1 mL, 用锋利的双面刀片快速垂直切碎叶片, 此过程尽量将材料浸没于解离液中。吸取培养皿中的解离液于 400 目滤网过滤至 1.5 mL 的 EP 管中, 弃去滤网内碎材料, 获得细胞核悬液, 置于冰上孵育 5 min。往制备好的细胞核悬液中加入 $50 \mu\text{L}$ 碘化丙啶(propidium iodide, PI) 染液 (1 mg/mL) 及 $1 \mu\text{L}$ RNase (10 mg/mL), 混匀后置于 4°C 冰箱避光染色 20 min, 随后上机检测。

1.2.3 流式细胞仪检测

检测过程全程在南京林业大学现代分析测试中心进行。首先将 Influx™ 流式细胞仪 (美国 BD) 预热 30 min, 用荧光微球校准各荧光通道, 之后对染色后的细胞核悬液样品进行上机检测。采用 488 nm 蓝光激发, 收集 FL2 通道的荧光, 并检测 PI 发射的荧光强度。PI 为嵌入式染色, 能与细胞内 DNA 碱基均匀结合, 由于 PI 的嵌入量与细胞核 DNA 含量是正相关的线性关系, 故流式细胞仪可

以通过测定样品的荧光强度推算出其 DNA 相对含量^[21]。每个样品 1 d 内做 3 次平行实验, 检测时各收集 8000~10 000 个细胞核。

1.2.4 数据分析

使用 FACSTM 1.0.0.650 软件对流式细胞仪测定结果作图分析, 得出各样品的峰值直方图, 并计算待测样品的核 DNA 含量 (2C-值), 单位为 pg 或 Mbp ($1 \text{ pg DNA} = 978 \text{ Mbp}$)^[22]。以 CV 值 (DNA 峰的变异系数) 的大小作为评价流式测定结果好坏的参数, 一般来说 CV 值小于 5.0%, 实验结果才具可信度^[23]。采用 SPSS 20.0 软件对测定结果进行统计分析。核 DNA 含量计算公式为: 待测样本核 DNA 含量 (2C-值) = 内标样本细胞核 DNA 含量 (2C-值) × (待测样本峰荧光强度/内标样本峰荧光强度)。

2 结果与分析

2.1 解离液的筛选

为获得标准样品与待测样品的最适解离液, 本研究分别以玉米、鹅掌楸、星花玉兰和待测样品紫玉兰嫩叶为材料, 比较 4 种解离液的裂解效果。实验结果表明, LB01 对玉米的裂解效果最好, 出峰稳定、无杂峰, 且 CV 值低于 3.0% (表 1, 图 1: A)。Tris 对于鹅掌楸、星花玉兰和紫玉兰来说均不适宜, 细胞核悬浮液褐化比较严重, 裂解效果特别差, 没有得到相应的流式结果。而在 LB01、Gal 和 WPB 解离液下, 3 种木兰科植物样品的裂解效果存在差异 (表 1, 图 1: B ~ D), 其中 LB01 和 Gal 产生的碎片峰较明显, CV 值较高, 为 8.0% 左右, 对实验结果准确性有一定的影响; 而 WPB 制备的样品流式峰图清晰稳定, CV 值控制在 5.0% 左右, 特别是对于待测样品紫玉兰来说, WPB 的出峰快, CV 值低于 3.5%。综上所述, WPB 最适合作为木兰科植物流式分析的解离液, 可用于后续对玉兰亚属多倍体植物基因组大小的测定。

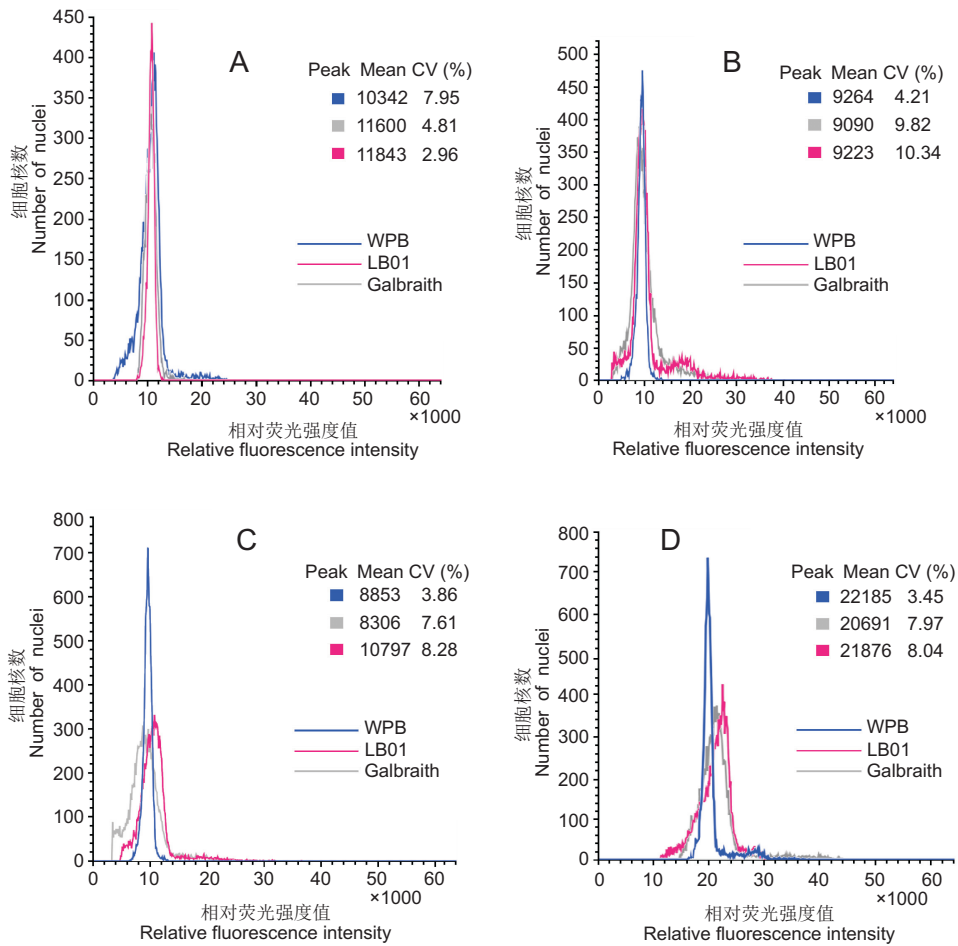
2.2 内标的筛选及适用性

FCM 分析中待测样品与标准样品同时检测被称为内标法, 此时的标准样品即内标 (internal standard), 使用内标法能够降低样品制备以及仪器自身引起的误差, 测定结果更加准确^[21]。为筛选出最适合玉兰亚属植物的内标, 本研究分

表 1 不同解离液处理下样品测定结果变异系数的比较

Table 1 Comparison of coefficient of variation (CV) of samples treated with different dissociation solutions

物种 Species	WPB 解离液 WPB buffer	Tris-MgCl ₂ 解离液 Tris-MgCl ₂ buffer	LB01 解离液 LB01 buffer	Gal 解离液 Gal buffer
玉米 <i>Zea mays</i> L.	< 8.0%	< 5.0%	< 3.0%	< 5.0%
鹅掌楸 <i>Liriodendron chinense</i> (Hemsl.) Sarg.	< 5.0%	不适宜	< 10.0%	< 10.0%
星花玉兰 <i>Magnolia stellata</i> (Siebold & Zucc.) Maxim.	< 5.0%	不适宜	< 8.0%	< 8.0%
紫玉兰 <i>Magnolia liliiflora</i> Desr.	< 3.5%	不适宜	< 8.0%	< 8.0%



A. 玉米 (*Z. mays*); B. 鹅掌楸 (*L. chinense*); C. 星花玉兰 (*M. stellata*); D. 紫玉兰 (*M. liliiflora*); Mean: 相对荧光强度的均值 (Relative fluorescence intensity); CV: 变异系数 (Coefficient of variation)。

图 1 3 种解离液条件下 4 种样品的峰值直方图

Fig. 1 Histogram of peak values of four samples under three kinds of dissociation solution

别以玉米、鹅掌楸、星花玉兰为待选内标，选用 2.1 中对木兰科植物裂解效果最好的 WPB 解离液，与紫玉兰样品一同上机检测。结果表明，玉米和鹅掌楸分别作内标时，峰图的 CV 值较大 (> 8%)，杂峰多、峰图效果较差，故玉米和鹅掌楸不适宜作为内部标准。而星花玉兰与紫玉兰一起检测时峰图区分明显，出峰较快且稳定，CV 均值为 3.8% 左右，说明星花玉兰更适合作为紫玉兰的内部标准。

2.3 玉兰亚属 6 种植物核 DNA 含量与基因组大小的测定

本研究以二倍体植物星花玉兰为实验内标，选用 WPB 解离液，利用流式细胞仪对玉兰亚属 6 种多倍体植物的 DNA 2C-值大小进行测定，所得的流式峰图如图 2 所示。内标星花玉兰的峰图与待测样品的峰图无重叠，且 CV 值都在 5.0% 以下，证实星花玉兰做内标测定多倍体玉兰植物 DNA 2C-值的合理性和准确性。

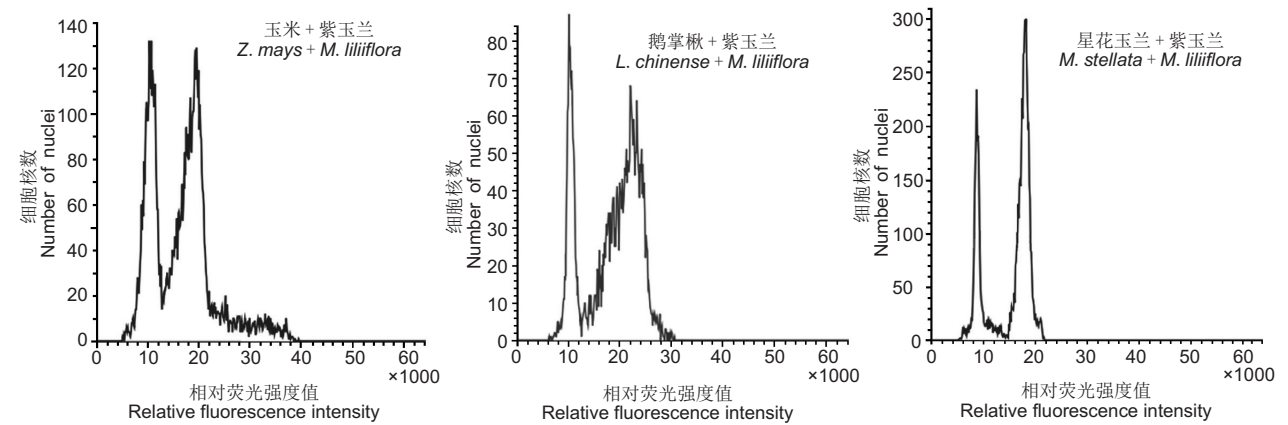
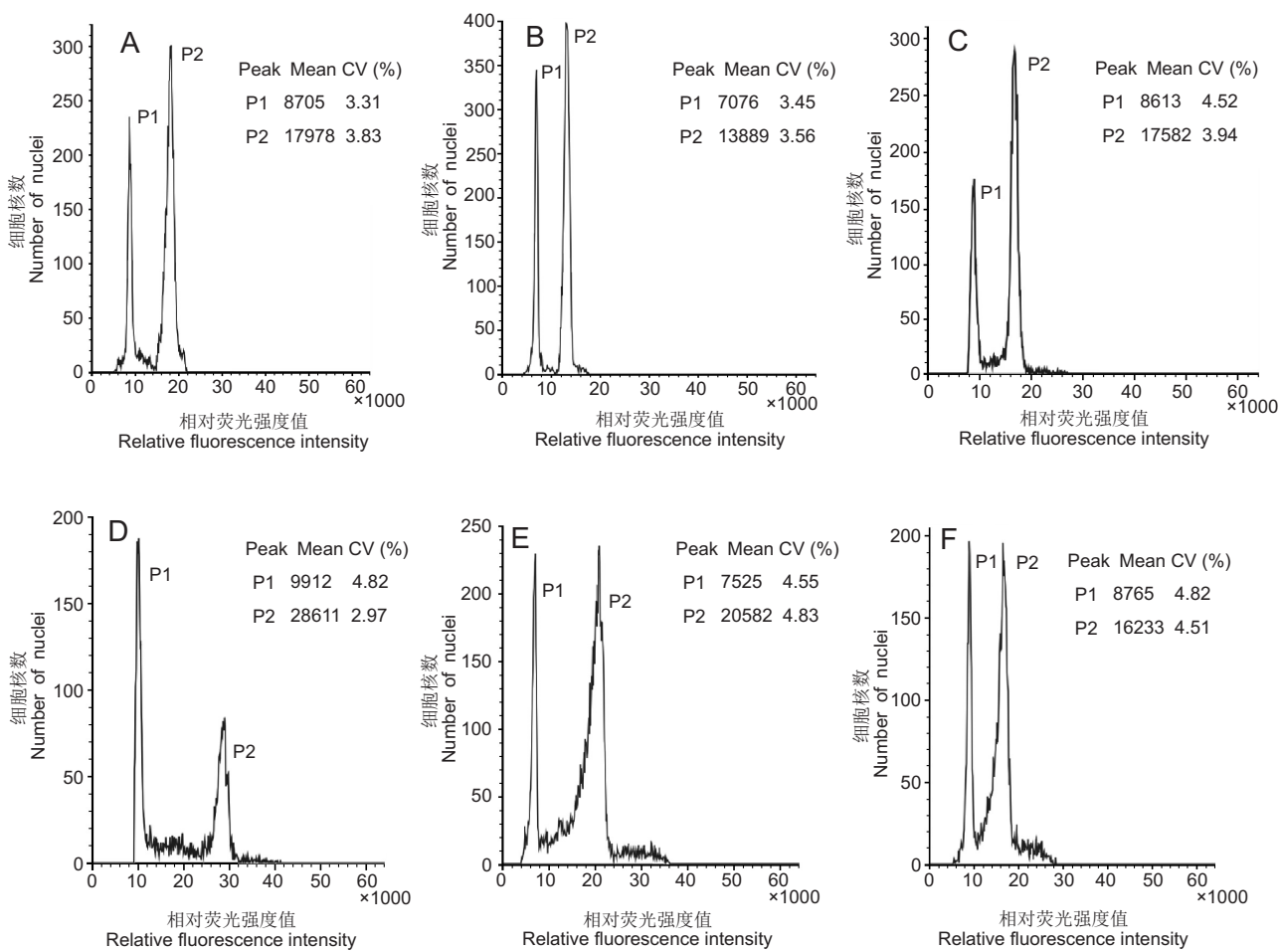


图2 不同内标与紫玉兰的流式直方图

Fig. 2 Flow histogram of different internal standards and *Magnolia liliiflora*



P1 为对照星花玉兰；P2 分别为紫玉兰、多瓣紫玉兰、黄山玉兰、白玉兰、二乔玉兰和渐尖玉兰。Mean：相对荧光强度值；CV：变异系数。
P1 represents standard sample, *M. stellata*; P2 represents *M. liliiflora*, *M. polytepala*, *M. cylindrica*, *M. denudata*, *M. × soulangeana*, and *M. acuminata*, respectively; Mean: Relative fluorescence intensity; CV: Coefficient of variation.

图3 星花玉兰与玉兰亚属6种多倍体植物的流式直方图

Fig. 3 Flow histogram of *Magnolia stellata* and six polyploid species of subgen. *Yulania*

星花玉兰与待测样品的混合样品的测定结果显示(图 3), P1 峰为星花玉兰 2C DNA 含量峰, P2 为各种待测样品 2C DNA 含量峰, 通过比较两者的倍数关系进而计算得到玉兰亚属各种样品的细胞核 DNA 含量(DNA 2C-值), 同时倍性可由测得的 DNA-2C 值与已有报道中的 Cx 值的比

值进行估测。玉兰亚属 6 种多倍体植物中 DNA 2C-值最大的是白玉兰, 其次是二乔玉兰、紫玉兰、黄山玉兰和多瓣紫玉兰, 最小的是渐尖玉兰。6 个物种 Cx 值的范围为 1.96 ~ 2.92 pg。在倍性水平上, 白玉兰为六倍体, 其余 5 种植物均为四倍体(表 2)。

表 2 玉兰亚属 6 种植物的流式细胞仪测定结果
Table 2 Measurement results of six species of subgen. *Yulania* using flow cytometry

种名 Species	样品与内标峰值比 Peak value ratio of sample to internal standard	2C-值 2C-value (pg)	Cx 参考值 Cx-value of reference (pg)	倍性 Ploidy level	Cx 值 Cx value (pg)	基因组大小 Genome size (Mbp)
紫玉兰 <i>M. liliiflora</i>	2.07 ± 0.01	8.80 ± 0.04	2.23 ^[15] , 2.48*, 2.55 ^[16]	2n = 4x	2.20	4301.57 ± 24.01
多瓣紫玉兰 <i>M. polytepala</i>	1.95 ± 0.01	8.30 ± 0.05	N	2n = 4x	2.08	4058.70 ± 25.09
黄山玉兰 <i>M. cylindrica</i>	2.04 ± 0.02	8.67 ± 0.10	2.23 ^[15]	2n = 4x	2.17	4244.52 ± 24.73
白玉兰 <i>M. denudata</i>	2.89 ± 0.03	12.28 ± 0.06	2.21 ^[15]	2n = 6x	2.05	5964.17 ± 56.06
二乔玉兰 <i>M. × soulangeana</i>	2.75 ± 0.01	11.69 ± 0.06	2.3 ^[17] , 2.75 ^[16] , 2.99*	2n = 4x	2.92	5716.41 ± 32.56
渐尖玉兰 <i>M. acuminata</i>	1.84 ± 0.01	7.84 ± 0.05	2.06 ^[15]	2n = 4x	1.96	3832.13 ± 24.67

注: 每个样品设 3 次重复; 表中数据为平均值 ± 标准误; * 代表 C 值数据库 (<https://cvalues.science.kew.org/>); N 表示尚未报道。
Notes: Three replicates for each sample; data in table are average values ± SD; * database of C-value (<https://cvalues.science.kew.org/>); N. Has not been reported.

3 讨论

3.1 解离液与内标的优化

在细胞核悬液制备过程中, 解离液的选择至关重要^[24]。根据植物细胞核的复杂性, 解离液应有利于分离出完整的细胞核, 保持细胞核在悬浮液中的稳定性, 尽量减少某些细胞内含物对 DNA 染色的负面影响。由于植物组织在结构和化学成分上的多样性, 没有一种解离液能通用于所有物种^[9]。本研究选取了 4 种解离液(LB01、Galbraith、Tris 和 WPB), 检测目标样品的流式峰图, 根据出峰效果及 CV 值大小来评价各种解离液对目标样品细胞的裂解效果, 以筛选出最适解离液。结果表明, 以 Galbraith 和 LB01 为解离液时, CV 值均较大(> 8%), 与赵青等^[17]的实验结果一致; 而 WPB 对 3 种木兰科植物的裂解效果最好, 上机检测后获得了清晰的主峰, 且 CV 值均在 5.0% 以下。以上

差异可能源于木兰科植物叶片富含多酚类物质的特性。研究发现, WPB 解离液已在酚类物质丰富的枣属(*Ziziphus*)^[25]、栎属(*Quercus*)^[26]等木本植物组织中获得良好的裂解效果。因此, WPB 是用于富含多酚类物质的木兰科植物流式检测最适解离液。

Bennett 等^[27]的研究强调内标的选择对 FCM 测定结果有着同样重要的影响。Doležel 等^[9]构建了适用于植物 DNA 流式细胞术检测的 8 种标准样品, 其中玉米的 Cx 值为 2.7 pg; 本研究中 6 种待测玉兰亚属植物均为多倍体, 已报道的 Cx 值多为 2.0 ~ 3.0 pg。根据内标选用的原则, 标样和待测样 Cx 值接近而倍性水平不同时, 可用于流式细胞术检测^[28]。此外, 玉米为标样检测木兰科植物 DNA C-值已有报道^[16]。因此, 本研究中将玉米作为首选标样。前人的研究表明, 一般理想的参考标准及目标样品的染色体结构应该相似, 在一些已测

序的模式植物也不适合用于参考标准时,应在与待测样品近缘的植物中选择内标^[21],如 Parris 等^[15]在流式测定木兰科植物 DNA 含量时,主要以豌豆 (*Pisum sativum* 'Ctirad', 2C = 8.76 pg) 为内标,但由于多倍体木兰科类群 DNA 含量与豌豆相近,故选择采取弗吉尼亚木兰 (*M. virginiana* 'Jim Wilson', 2C = 3.92 pg) 为二级标准进行测定。星花玉兰和鹅掌楸与待测样品同属木兰科,染色体结构相似,且 DNA 含量与弗吉尼亚木兰相近,满足作为玉兰亚属多倍体植物内标的条件。因此,本研究选取了玉米、鹅掌楸、星花玉兰 3 种参考标准进行筛选,结果显示星花玉兰为内标时,峰图区分明显,出峰较快且稳定, CV 值最小。后续的流式检测结果也表明星花玉兰能与玉兰亚属多倍体植物获得清晰稳定的峰图。在测定过程中,3 次重复实验测得 DNA 峰的 CV 值始终在 5.0% 以下,保证了本实验 FCM 测定结果的精确性。综上所述,对于玉兰亚属多倍体植物而言,选用 WPB 解离液 (1 mL)、PI 为染料 (50 μ L),以 1 cm² 大小的星花玉兰嫩叶为内部标准,选择刚展开的 1.5 cm² 大小的待测样,与内标在解离液中同时切碎制备细胞核悬浮液,用于 FCM 测定其 DNA C-值,不失为简单可行的操作方法。

3.2 玉兰亚属 6 种植物 C-值测定结果评估

国内外对木兰科植物的细胞学研究主要集中在核型分析上,其倍性水平大多已知。玉兰属类群中种间存在丰富的染色体倍性差异,包括二倍体 ($2n = 2x = 38$)、四倍体 ($2n = 4x = 76$)、六倍体 ($2n = 6x = 114$) 等,大多数种类为多倍体^[29]。已有研究发现,玉兰属中的白玉兰 ($2n = 76$, 114)、紫玉兰 ($2n = 76$, 95)、二乔玉兰 ($2n = 76$, 114)、黄山玉兰 ($2n = 76$)、多瓣紫玉兰 ($2n = 76$) 和渐尖玉兰 ($2n = 76$) 均为多倍体^[30]。本研究中,6 种玉兰测得倍性水平与前期研究结果相符,除白玉兰为六倍体外,其余 5 种均为四倍体。

本研究测定的 Cx 值与已有文献报道的数据相比具有一定的差异。Parris 等^[15]的研究发现,黄山玉兰的 Cx 值为 2.23 pg;白玉兰的 Cx 值为 2.21 pg;渐尖玉兰的 Cx 值为 2.06 pg;而本研究的测定结果偏小,分别为 2.17、2.05 和 1.96 pg。紫玉兰和二乔玉兰的 Cx 值与已有文献或英国皇家

植物园邱园 C-值库的结果接近,这也验证了优化后的流式体系的准确性。研究表明,在一些物种内不同种群或个体 DNA 的 C-值也会存在一定差异,原因可能是受外界环境因素(如土壤营养状况、海拔因素)的影响,如 Hidalgo 等^[10]采用流式细胞术对不同生长条件下的 19 个类群进行基因组大小评估,结果显示与野生个体相比,盆栽植物的 Cx 值降低了 8.48%。Bancheva 等^[31]发现广义矢车菊属 (*Centaurea* s. l.) 植物的 Cx 值与海拔高度存在正相关关系。此外,也可能是由于不同个体内部的基因组重复或加倍、DNA 丢失、转座子扩张的影响导致^[11]。目前,关于玉兰亚属植物 C-值的研究还很少,有关该属 C-值变异的规律和影响因素还需要进一步探究。

致谢:感谢西安植物园王亚玲研究员和南京中山植物园王淑安博士在样品采集中给予的帮助。

参考文献:

- [1] 刘玉壶,周仁章,曾庆文. 木兰科植物及其珍稀濒危种类的迁地保护[J]. 热带亚热带植物学报, 1997, 5(2): 1-12.
Liu YH, Zhou RZ, Zeng QW. *Ex situ* conservation of Magnoliaceae including its rare and endangered species[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 1997, 5(2): 1-12.
- [2] 司马永康,陆树刚,韩明跃,马惠芬,徐涛,等. 木兰科系统分类学研究动态[J]. 西部林业科学, 2012, 41(1): 116-127.
Sima YK, Lu SG, Han MY, Ma HF, Xu T, et al. Advances in Magnoliaceae systematic research[J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2012, 41(1): 116-127.
- [3] Figlar RB, Nooteboom HP. Notes on Magnoliaceae IV[J]. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 2004, 49(1): 87-100.
- [4] 刘玉壶. 中国植物志: 第 30 卷: 第 1 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1996.
- [5] 傅大立,赵天榜,孙卫邦,陈志秀,闫双喜. 关于木兰属玉兰亚属分组问题的研究[J]. 中南林学院学报, 1999, 19(2): 23-28.
Fu DL, Zhao TB, Sun WB, Chen ZX, Yan SX. A study of the question of section division of subgenus *Yulania* of *Magnolia*[J]. *Journal of central south forestry college*, 1999, 19(2): 23-28.
- [6] 王亚玲,张寿洲,崔铁成. RAPD 技术在玉兰亚属植物分类研究中的应用[J]. 西北植物学报, 2002, 22(8): 79-86.
Wang YL, Zhang SZ, Cui TC. Studies on classification of

- subgenus *Yulania* by RAPD analysis [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2002, 22(8): 79–86.
- [7] 刘秀丽. 中国玉兰种质资源调查及亲缘关系的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2012.
- [8] 陈丙义, 李金凤, 霍恒志, 万春雁, 章镇, 等. 6 种野生草莓基因组大小估算[J]. 果树学报, 2015, 32(1): 51–56.
Chen BY, Li JF, Huo ZH, Wan CY, Zhang Z, *et al.* Estimation of genome size in six wild strawberry species[J]. *Journal of Fruit Science*, 2015, 32(1): 51–56.
- [9] Doležel J, Greilhuber J, Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(9): 2233–2244.
- [10] Hidalgo O, Vallès J, Romob A, Canelac MÁ, Garnatjeb T. Genome size variation in gymnosperms under different growth conditions[J]. *Caryologia*, 2015, 68(2): 92–96.
- [11] 郭水良, 周平, 印丽萍, 娄玉霞. 植物 DNA C-值在种间和种内的变异及其生物学意义[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2011, 40(1): 102–110.
Guo SL, Zhou P, Yin LP, Lou YX. Interspecific and intraspecific variations of plant DNA C-values and its biological significance[J]. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences)*, 2011, 40(1): 102–110.
- [12] Yulianna GZ, Elena VA, Karakulov AV, Novikova TI. Flow cytometric determination of genome size and ploidy level of some frost-resistant cultivars and species of *Rhododendron* L. native to Asian Russia [J]. *Botanica Pacifica*, 2018, 7(1): 97–100.
- [13] 何敬峰, 李春峰, 丁美娟, 刘筱玮, 张睿. 四倍体野菊与露地菊‘紫秋裳’种间杂交 F_1 代 3 个株系倍性鉴定[J]. 东北林业大学学报, 2019, 47(5): 1–3.
He JF, Li CF, Ding MJ, Liu XW, Zhang R. Ploidy identification of three lines of F_1 generation between *Dendrathe-ma indicum* and *Dendrathe-ma* \times *gandiflorum* ‘ziquishang’ species [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2019, 47(5): 1–3.
- [14] 金亮, 徐伟伟, 李小白, 刘建新, 田丹青, 等. DNA 流式细胞术在植物遗传及育种中的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2016, 38(2): 225–234.
Jin L, Xu WW, Li XB, Liu JX, Tian DQ, *et al.* Application of DNA flow cytometry to plant genetics and breeding[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2016, 38(2): 225–234.
- [15] Parris JK, Ranney TG, Knap HT, Baird WV. Ploidy levels, relative genome sizes, and base pair composition in *Magnolia*[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2010, 135(6): 533–547.
- [16] 叶林江, 张志荣, 孙志霞, 田双, 张志勇. 木兰科主要属种核 DNA 含量 (2C-值) 的检测 [J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(5): 605–610.
- Ye LJ, Zhang ZR, Sun ZX, Tian S, Zhang ZY. The determination of nuclear DNA content (2C-value) on some representative genus and species of Magnoliaceae [J]. *Plant Diversity and Resources*, 2015, 37(5): 605–610.
- [17] 赵青, 张强, 周鹏, 林峰, 方炎明. 5 种木兰科植物的 DNA-C 值及倍性分析 [J]. 植物研究, 2016, 36(6): 853–859.
Zhao Q, Zhang Q, Zhou P, Lin F, Fang YM. Analysis of DNA C-value and ploidy of five species in Magnoliaceae [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2016, 36(6): 853–859.
- [18] Chen JH, Hao ZD, Guang XM, Zhao CX, Wang PK, *et al.* *Liriodendron* genome sheds light on angiosperm phylogeny and species-pair differentiation [J]. *Nature Plants*, 2019, 5(1): 18–25.
- [19] 汪艳, 肖媛, 刘伟, 李婷婷, 胡锐, 乔志仙. 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.
Wang Y, Xiao Y, Liu W, Li TT, Hu R, Qiao ZX. Operation skills of flow cytometer for detecting nuclear DNA contents in higher plant cells [J]. *Plant Science Journal*, 2015, 33(1): 126–131.
- [20] Galbraith DW. Simultaneous flow cytometric quantification of plant nuclear DNA contents over the full range of described angiosperm 2C values [J]. *Cytometry Part A*, 2009, 75A(8): 692–698.
- [21] 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 XM, Zhou XY, 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.
- [22] Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human [J]. *Cytometry Part A*, 2003, 51A(2): 127–128.
- [23] 林峰, 周翔宇, 徐莉, 孙海军, 宣艳. 几种鼠尾草属植物基因组 C 值测定 [J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(10): 1622–1628.
Lin F, Zhou XY, Xu L, Sun HJ, Xuan Y. Estimation of genomic C value in several species of *Salvia* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25(10): 1622–1628.
- [24] 赖彪, 吴传龙, 秦永华, 刘成明, 冯奇瑞, 等. 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 [J]. 果树学报, 2019, 36(7): 939–946.
Lai B, Wu CL, Qin YH, Liu CM, Feng QR, *et al.* Nuclear isolation buffer optimization and the determination of ploidy level and genome size of litchi using flow cytometry [J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(7): 939–946.

- [25] 吴丽萍, 唐岩, 李颖岳, 尹丹妮, 庞晓明. 枣和酸枣基因组大小测定[J]. 北京林业大学学报, 2013, 35(3): 77-83.
Wu LP, Tang Y, Li YY, Yin DN, Pang XM. Estimation of genome size of *Ziziphus jujuba* and *Z. acidojujuba*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2013, 35(3): 77-83.
- [26] Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 Species[J]. *Ann Bot-London*, 2007, 100(4): 875-888.
- [27] Bennett MD, Leitch IJ. Nuclear DNA amounts in angiosperms: Progress, problems and prospects[J]. *Ann Bot-London*, 2005, 95(1): 45-90.
- [28] Suda J, Leitch IJ. The quest for suitable reference standards in genome size research[J]. *Cytometry Part A*, 2010, 77A(8): 717-720.
- [29] 孟爱平, 王恒昌, 李建强, 司马永康. 中国木兰科 11 属 40 种植物的核形态研究[J]. 植物分类学报, 2006, 44(1): 47-63.
Meng AP, Wang HC, Li JQ, Sima YK. A karyomorphological study of 40 species in 11 genera of the Magnoliaceae from China[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 2006, 44(1): 47-63.
- [30] Wang YL, He ZC, Ejder E, Yang JF, Zhang SZ. Cytological study of tetraploid species of *Magnolia* subgenus *Yulania* (Magnoliaceae)[J]. *Cytologia*, 2016, 81(2): 195-205.
- [31] Bancheva S, Greilhuber J. Genome size in Bulgarian *Centaurea* s. l. (Asteraceae)[J]. *Plant Syst Evol*, 2006, 257: 95-117.

(责任编辑: 周媛)

《植物科学学报》订阅方式

订阅方式一: 全国各地邮局均可订阅(邮发代号: 38-103);

订阅方式二: 科学出版社期刊发行部: 联系电话 010-64017032, 64017539;

订阅方式三: 网上购买。搜淘宝店、微店店铺名称: 中科期刊(订阅及销售过刊)。

淘宝购买链接:

<https://item.taobao.com/item.htm?spm=a1z38n.10677092.0.0.11891debphcQKC&id=563435510476>

微店购买链接:

<https://weidian.com/item.html?itemID=2566716607>

或扫描下方二维码:



订阅方式四: 直接与本刊编辑部联系订阅(免收邮挂费)。

编辑部通讯地址: 武汉市东湖高新区九峰一路 201 号(九峰一路与光谷七路路口以北)中科院武汉植物园内《植物科学学报》编辑部

邮编: 430074, 电话: 027-87700820

E-mail: editor@wbpcas.cn; zwkxbjb@wbpcas.cn