

6 种核桃基因组大小测定*

黄 星¹, 李唯奇², 贾艳霞², 李成云^{1**}, 张旭东^{2**}

(1. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 中国科学院 昆明植物研究所, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】建立应用流式细胞术测定胡桃属植物基因组大小的方法, 测定 6 种核桃种质资源的 C 值(即 DNA 含量), 分析比较基因组大小, 为胡桃属植物的遗传学、基因组学和进化学等研究提供参考依据。

【方法】以深纹核桃野生种、漾濞泡核桃、三台核桃、云新云林核桃、普通核桃野生种和强特勒核桃的新鲜嫩叶为待检材料, 以水稻日本晴新鲜嫩叶为标样, 应用流式细胞术分别测定并计算 6 种核桃的基因组大小。

【结果】测得 6 种核桃基因组大小分别为深纹核桃野生种 (543.2±35.7) Mb、漾濞泡核桃 (548.8±43.1) Mb、三台核桃 (554.4±14.5) Mb、云新云林核桃 (548.8±14.7) Mb、普通核桃野生种 (551.6±39.0) Mb 和强特勒核桃 (520.8±38.5) Mb, 6 种核桃基因组大小无显著差异 ($P>0.05$)。【结论】胡桃属核桃组植物无论物种分化、种内驯化和种间杂交都未引起基因组大小的变异。深纹核桃野生种、漾濞泡核桃、三台核桃和云新云林核桃都是首次报道其基因组大小, 为中国特有种深纹核桃的深入研究提供了参考数据。同时丰富了胡桃属植物的 C 值库, 并为胡桃属其他物种基因组大小测定提供了可以借鉴的方法。

关键词: 核桃; 基因组大小; 流式细胞术

中图分类号: S 664.1

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 04-0688-05

Estimation of the Genome Sizes of Six Walnut Varieties by Flow Cytometry

HUANG Xing¹, LI Weiqi², JIA Yanxia², LI Chengyun¹, ZHANG Xudong²

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To estimate and compare the genome sizes of six walnut varieties by flow cytometry and provide a reference for the study on the genetics, genomics and chemistry of *Juglans* L. plants. [Method] Fresh leaves of six walnut varieties including *Juglans sigillata* Dode, *J. sigillata* cv. Yangbi, *J. sigillata* cv. Santai, *J. sigillata* cv. Yunxinyunlin, *J. regia* Linn and *J. regia* cv. Chandler were taken as samples, and *Oryza sativa* ssp. *japonica* with known genome was set as the standard. The C values content of DNA of all the six walnut varieties were detected by flow cytometry (FCM) and the genome sizes were calculated according to the the genome size of *O. sativa* L. ssp. *japonica*. [Result] The genome sizes of *J. sigillata*, *J. sigillata* cv. Yangbi, *J. sigillata* cv. Santai, *J. sigillata* cv. Yunxinyunlin, *J. regia* and *J. regia* cv. Chandler were (543.2±35.7) Mb, (548.8±43.1) Mb, (554.4±14.5) Mb, (548.8±14.7) Mb, (551.6±39.0) Mb and (520.8±38.5) Mb, re-

收稿日期: 2018-05-02

修回日期: 2020-04-15

网络首发时间: 2020-07-15 13:30:26

*基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31300251); 云南省自然科学基金面上项目 (2017FB057)。

作者简介: 黄星 (1993—), 男, 云南曲靖人, 硕士研究生, 主要从事植物生理和分子生物学研究。

E-mail: 1915663379@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 李成云 (1964—), 男, 云南大理人, 博士, 研究员, 主要从事植物病理学研究。E-mail: licheng_yun@163.com; 张旭东 (1983—), 女, 湖北宜昌人, 博士, 助理研究员, 主要从事分子生物学和功能基因组学研究。E-mail: zhangxudong@mail.kib.ac.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200714.0949.001.html>



spectively. And there was no significant difference between the genome size of these six walnut varieties ($P>0.05$). [**Conclusion**] The species differentiation, domestication and interspecific hybridization of Sect. 1. *Juglans* plants didn't induce variation of genome size. What's more, the first report of the genome sizes of *J. sigillata*, *J. sigillata* cv. Yangbi, *J. sigillata* cv. Santai and *J. sigillata* cv. Yunxinyunlin would provide useful data for the further research on the endemic species of China *J. sigillata*, and enrich the C value database of *Juglans* L. plants.

Keywords: walnut; genome size; flow cytometry

核桃是被子植物门双子叶植物纲胡桃目 (Juglandales) 胡桃科 (Juglandaceae) 胡桃属 (*Juglans*) 植物。胡桃属植物为落叶乔木, 分为 3 个组: 核桃组 (Sect. 1. *Juglans*)、核桃楸组 (Sect. 2. *Cardiocaryon*) 和黑核桃组 (Sect. 3. *Nigra*), 约 20 种, 分布于南北半球温、热带区域, 其中, 核桃组和核桃楸组在中国都有分布^[1]。

核桃是一种综合利用经济价值极高的木本油料树种。首先, 核桃果富含油脂、蛋白、维生素和矿质元素等重要的营养因子^[2-3], 具有神经保护^[4]、抗氧化^[5]、促进学习和记忆^[6]等功效; 其次, 核桃木具有质地坚硬、纹理细致、伸缩性小、抗力强、不受虫蛀和光滑美观等优点, 是军工航空器材、高级家具、高级胶合板和雕刻工艺的优良用材。此外, 核桃叶片、核桃青皮和核桃分心木中也能提取出多种具有抗炎、抗菌和抗癌等功效的活性物质^[7-9]。核桃是世界上消费最多的木本坚果之一, 美国农业部统计的数据显示: 2016 年全世界核桃消费达 190 万 t, 中国是产量最大的国家^[10]。世界上种植最多的核桃主要是普通核桃 (*Juglans regia* L.) 和深纹核桃 (*J. sigillata* Dode)。其中, 普通核桃分布非常广泛, 在中亚、欧洲、美国以及中国都有分布; 而深纹核桃是中国特有种, 只分布在中国西南地区包括云南、贵州、四川西部和西藏雅鲁藏布江中下游^[1], 但其总产量在中国并不逊色于普通核桃。

基因组大小是生物体一套完整单倍体所含 DNA 碱基对的总数, 也可以用 C 值即 DNA 含量表示, DNA 含量和碱基数的换算关系为 $1 \text{ pg} = 978 \text{ Mb}$ ^[11]。物种基因组大小是生物多样性的主要指标之一, 是种群进化、物种分类、生态学和遗传学等研究中最基本的数据^[12]。基因组大小测定最早在 20 世纪 50 年代应用非常烦琐的化学方法进行提取^[13], 到目前已经发展起来 3 种主要的方法: 孚尔根微显影法 (Feulgen microdensito-

metry)、基因组测序法 (Genomic sequencing) 和流式细胞术 (Flowcytometry, FCM)^[14-15]。其中, 流式细胞术具有制样简单、操作快捷、结果准确和成本低的特点, 成为近年来测定基因组大小最常用的方法。迄今为止, 世界范围内关于胡桃科基因组大小的报道只有普通核桃 (606 Mb/635 Mb)、核桃楸 (558 Mb) 和黑核桃 (682 Mb)^[16-17] 3 个种以及 1 个美国栽培种强特勒核桃 (667 Mb)^[18], 而对中国特有种深纹核桃尚无报道。因而, 本研究以日本晴水稻为内标, 应用流式细胞术首次测定了深纹核桃野生种、漾濞泡核桃、三台核桃、云新云林核桃、普通核桃野生种以及强特勒核桃的基因组大小, 并进行了基因组大小种间变异的分析。

1 材料与方法

1.1 材料

以水稻日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*) 为标样, 以深纹核桃野生种、漾濞泡核桃 (*J. sigillata* cv. Yangbi)、三台核桃 (*J. sigillata* cv. Santai)、云新云林核桃 (*J. sigillata* cv. Yunxinyunlin)、普通核桃野生种和强特勒核桃 (*J. regia* cv. Chandler) 为研究对象。其中, 深纹核桃野生种采自云南大理无量山自然保护区, 漾濞泡核桃、三台核桃和云新云林核桃采自云南昆明双龙乡核桃栽培示范基地, 普通核桃野生种采自新疆伊犁巩留野核桃沟, 强特勒核桃采自云南曲靖沾益林业局九龙山核桃基地。6 种核桃种质资源均采用无性繁殖方式保存于中国科学院昆明植物研究所苗圃。采用植株顶部的幼叶为供试材料, 采样后立即制备样品进行流式细胞仪测定。

1.2 方法

1.2.1 细胞核悬浮液制备

将样品置于 2 mL 预冷的 WPB 解离液 (0.2 mol/L Tris-HCl, 4 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mmol/L $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 86 mmol/L NaCl, 10 mmol/L

焦亚硫酸钠, 1% PVP-10, 1% Triton X-100, pH 7.5) 中, 用锋利的刀片将组织切碎, 使其在解离液中冰上静置 10 min, 然后用 400 目滤网过滤, 即得到细胞核悬浮液。

1.2.2 DNA 染色

将得到的细胞核悬浮液于 4 ℃、1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。在沉淀中加入 500 μL 冰上预冷的 WPB、25 μL PI 染液 (Propidium Iodide, 购自 sigma) 和 25 μL RNAase 溶液 (购自 MDBio Inc.公司)(表 1), 置于冰上避光染色 0.5~1 h。

表 1 RNAase 酶溶液和 PI 染液制备方法		
Tab. 1 Preparation of RNAase solution and PI dye		
试剂名称 reagent	质量浓度/(mg·mL ⁻¹) mass concentration	备注 note
RNA 酶溶液 RNAase solution	1	1 mg RNAase 加入 1 mL 去离子水中溶解, 90 ℃ 沸水煮 15 min, 冷却后用锡纸包裹避光, -20 ℃ 下保存, 用时解冻, 解冻后 4 ℃ 下保存
PI 染液 PI dye	1	1 mL 去离子水中加入 1 mg PI, 液体剧毒, 用锡纸包裹避光 4 ℃ 下保存

1.2.3 流式细胞仪检测

利用 BD FACScalibur 流式细胞仪对染色后的细胞核悬浮液样品进行检测, 采用 488 nm 蓝光激发, 每个样品重复测 3 次, 每次检测收集 20 000 个颗粒, 变异系数控制在 5% 以内。使用 Modifit 3.0 分析软件作图分析。待测样品的基因组大小按照以下公式计算:

$$X=F_1/F_H\times H,$$

式中, X 为待测样品的基因组大小, F_1 为待测样品的 DNA 荧光强度, F_H 为水稻样品的 DNA 荧光强度, H 为标样物种的已知基因组大小^[19], 本试验水稻日本晴的基因组大小为 420 Mb^[20]。

本研究在应用流式细胞仪检测核桃基因组大小的过程中同时采用了内标法和外标法。内标法是指将标样物种和待测样品物种染色后的细胞核悬浮液混合后同时上样检测, 外标法是指将标样物种和待测样品物种染色后的细胞核悬浮液分开上样检测。

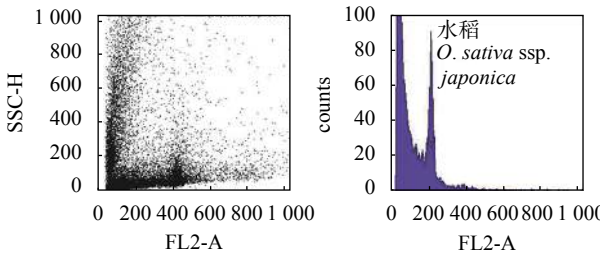
1.2.4 数据统计分析

用 SPSS 19.0 单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计。

2 结果与分析

如图 1~7 所示: 碎片峰和样品峰有效分离,

样品峰线性好, 说明细胞核解离液合适, 测得数据可靠。同时以水稻日本晴为内标, 将云新云林核桃和水稻日本晴的细胞核悬浮液混合后测定其 DNA 含量, 结果如图 8 所示。图 8 显示: 内标



注: SSC. 侧向散射光, 代表颗粒度; FL2. 荧光通道 2, 代表荧光强度; counts. 细胞核数量; 下同。
Note: SSC. side scatter, represents particle size; FL2. fluorescence line, represents fluorescence intensity; counts. the number of nucleus; the same as below.

图 1 水稻日本晴的流式细胞仪检测分析结果

Fig. 1 FCM detection analysis for *O. sativa ssp. japonica*

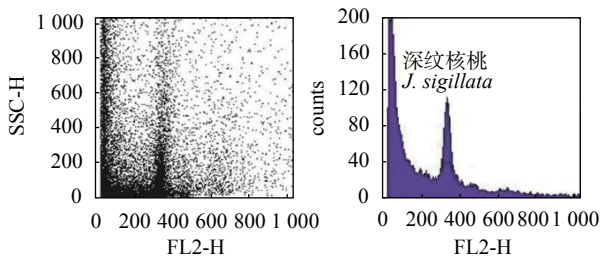


图 2 深纹核桃的流式细胞仪检测分析结果

Fig. 2 FCM detection analysis for *J. sigillata*

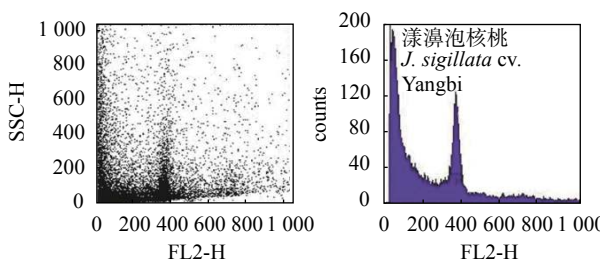


图 3 漾濞泡核桃的流式细胞仪检测分析结果

Fig. 3 FCM detection analysis for *J. sigillata* cv. Yangbi

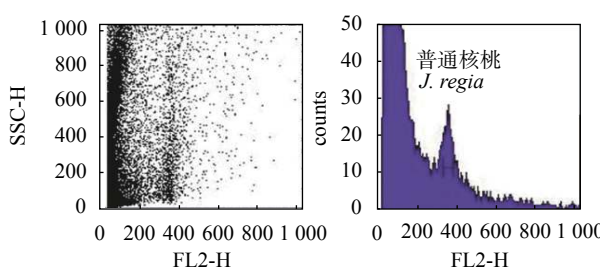


图 4 普通核桃的流式细胞仪检测分析结果

Fig. 4 FCM detection analysis for *J. regia*

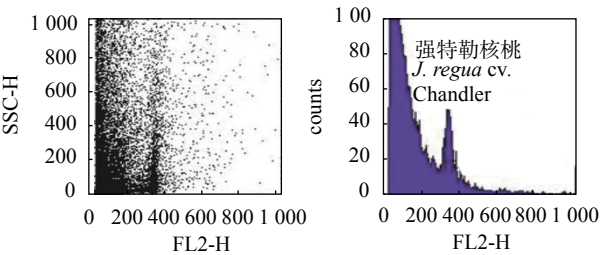


图 5 强特勒核桃的流式细胞仪检测分析结果

Fig. 5 FCM detection analysis for *J. regia* cv. Chandler

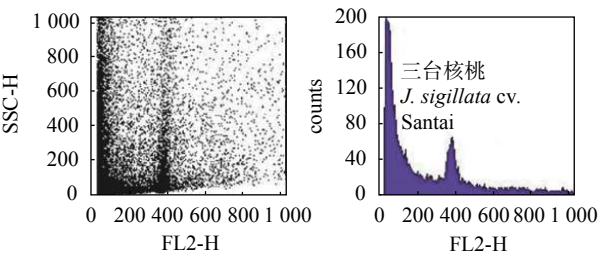


图 6 三台核桃的流式细胞仪检测分析结果

Fig. 6 FCM detection analysis for *J. sigillata* cv. Santai

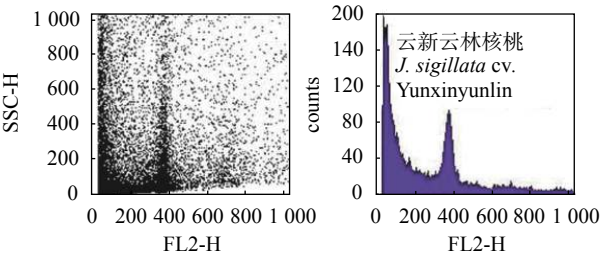


图 7 云新云林核桃的流式细胞仪检测分析结果

Fig. 7 FCM detection analysis for *J. sigillata* cv. Yunxinyunlin

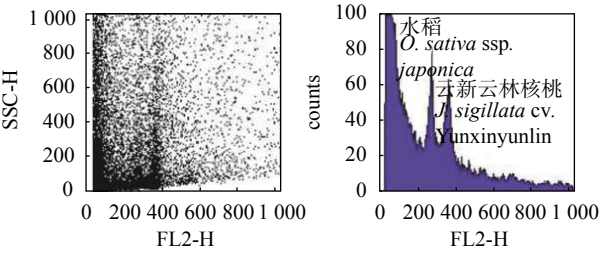


图 8 水稻与云新云林核桃样品混合的流式细胞仪检测分析结果

Fig. 8 FCM detection analysis for mixture of *O. sativa* ssp. *japonica* with *J. sigillata* cv. Yunxinyunlin

峰和样品峰无重叠且区分度良好, 说明所选标准基因组合适。

经流式细胞仪测得结果及计算所得基因组大小如表 2 所示: 每个样品 DNA 含量测定的 CV

值都小于 5%, 说明所测数据稳定、可靠。6 种核桃基因组大小都在 520~560 Mb 范围内, 经统计分析无显著差异 ($P>0.05$), 而且除了强特勒核桃基因组约为 520 Mb, 其他 5 种核桃基因组大小都约为 550 Mb, 说明胡桃属核桃组植物的基因组大小很稳定, 而且不同种核桃在从野生种到栽培种的人工驯化过程中基因组大小基本都未发生变异。

表 2 核桃基因组大小的测定结果	
Tab. 2 The determination of genome size of walnut	
物种 species	基因组大小/Mb genome size
深纹核桃 (<i>J. sigillata</i>)	543.2±35.7
漾濞泡核桃 (<i>J. sigillata</i> cv. Yangbi)	548.8±43.1
三台核桃 (<i>J. sigillata</i> cv. Santai)	554.4±14.5
云新云林核桃 (<i>J. sigillata</i> cv. Yunxinyunlin)	548.8±14.7
普通核桃 (<i>J. regia</i>)	551.6±39.0
强特勒核桃 (<i>J. regia</i> cv. Chandler)	520.8±38.5

3 讨论

中国对核桃资源的利用源远流长。中国科学院古生物研究所对漾濞县境内出土的核桃化石鉴定表明: 早在公元前 16 世纪漾濞江流域就有大量核桃生长^[21]。近年来, 中国已跃居为世界上最大的核桃生产国, 但对于中国主要的且特有的核桃种深纹核桃, 无论国外或国内都研究较少且不够深入, 限制了深纹核桃价值的开发。因而, 本研究以已知基因组大小的水稻日本晴作为标样, 应用流式细胞术测定并比较了 6 种核桃的基因组大小。其中, 深纹核桃野生种、漾濞泡核桃、三台核桃 3 种同属于深纹核桃, 后两种是深纹核桃中选育出的优良品种^[22]; 普通核桃野生种和强特勒核桃同属于普通核桃, 后者是普通核桃中选育出的优良品种; 云新云林为漾濞泡核桃作为母本、云林 A7 (普通核桃优良单株) 作为父本进行种间杂交筛选获得的优良品种^[23]。结果显示: 这 6 种核桃基因组大小无显著差异, 说明核桃基因组大小很稳定, 无论物种分化、种内驯化、种间杂交都未引起基因组大小的变异。而强特勒核桃与其他 5 种核桃基因组大小略微有差异。

本研究在应用流式细胞术检测核桃基因组大小过程中同时采用了外标法和内标法, 结果显示: 两种方法中待测样品云新云林核桃和日本晴

水稻的比值都约为 1.3, 说明在我们选择的条件下(解离液、材料类型和材料用量等)以水稻日本晴为标样测定核桃基因组大小, 外标法和内标法一样准确可靠。此外, 在内标法中标样和待测样品荧光密度峰值并不重叠且差距适中, 说明水稻日本晴是采用流式细胞术测定核桃基因组大小的合适标样。

本研究测定的 6 种核桃中有 2 种已报道过基因组大小, 分别是普通核桃野生种和强特勒核桃, 普通核桃野生种应用流式细胞术和基因组测序测得基因组大小分别为 606 Mb^[17]和 635 Mb^[16], 强特勒核桃应用基因组测序方法测得基因组大小为 667 Mb^[18], 而本研究中测得普通核桃野生种和强特勒核桃基因组大小分别为 552 Mb 和 520 Mb, 与文献报道有差异。一方面是因为这 2 种核桃的基因组测序都是组装到基因组草图水平, 所以由此估计的基因组大小往往会有误差, 正如普通核桃野生种基因组测序测得基因组大小与此前报道的流式细胞术测得基因组大小也有偏差; 另一方面, 此前应用流式细胞术测定的普通核桃野生种基因组大小是在 20 世纪初报道的, 由于当时基因组研究刚刚兴起, 已知基因组大小的物种并不多, 所以并不是每个物种都能找到合适的标样用于测定基因组大小, 而普通核桃野生种基因组大小测定采用的标样是矮牵牛 [*Petunia hybrida* (Hort.) PxPc6] 和大豆 (*Pisum sativum* L. cv. Express Long), 2 个标样基因组^[24-25]都比核桃大很多, 所以测得结果会有误差。

4 结论

本研究应用流式细胞术比较分析了普通核桃和深纹核桃这两种世界上种植最多的核桃基因组大小, 结果显示不同核桃品种基因组大小稳定, 说明在普通核桃和深纹核桃分化之后, 2 个物种无论种内的品种驯化还是种间杂交, 都未发生基因组水平的大规模进化事件。此外, 深纹核桃野生种、漾濞泡核桃、三台核桃和云新云林 4 种核桃都是首次报道基因组大小, 这为深纹核桃遗传学和育种学等的深入研究提供了参考数据, 同时也丰富了胡桃属植物的 C 值数据库, 为胡桃属其他植物提供了可供参考的流式细胞术测定基因组大小方法。

[参考文献]

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] KARAMAC M. Chelation of Cu(II), Zn(II), and Fe(II) by tannin constituents of selected edible nuts[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2009, 10(12): 5485. DOI: 10.3390/ijms10125485.
- [3] VENKATACHALAM M, SATHE S K. Chemical composition of selected edible nut seeds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(13): 4705. DOI: 10.1021/jf0606959.
- [4] ZOU J, CAI P S, XIONG C M, et al. Neuroprotective effect of peptides extracted from walnut (*Juglans sigilata* Dode) proteins on A β -25-35-induced memory impairment in mice[J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences), 2016, 36(1): 21. DOI: 10.1007/s11596-016-1536-4.
- [5] LIU M C, YANG S J, HONG D, et al. A simple and convenient method for the preparation of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates[J]. Chemistry Central Journal, 2016, 10(1): 39. DOI: 10.1186/s13065-016-0184-x.
- [6] CHEN H P, ZHAO M M, LIN L Z, et al. Identification of antioxidative peptides from defatted walnut meal hydrolysate with potential for improving learning and memory[J]. Food Research International, 2015, 78(1): 216. DOI: 10.1016/j.foodres.2015.10.008.
- [7] AVANZATO D. Traditional and modern uses of walnut[C]// Vi International Walnut Symposium, 2010.
- [8] 张旭, 曹丽娟, 陈朝银, 等. 核桃隔开发利用的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(23): 5793. DOI: 10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2015.23.001.
- [9] HU W C, WANG X F, WU L, et al. Apigenin-7-O- β -D-glucuronide inhibits LPS-induced inflammation through the inactivation of AP-1 and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages and protects mice against endotoxin shock[J]. Food & Function, 2016, 7(2): 1002. DOI: 10.1039/c5fo01212k.
- [10] United States Department of Agriculture. Tree nuts: world markets and trade[R/OL]. Foreign Agricultural Service/USDA Office of Global Analysis, 2017, October. [2017-10-27] (2018-05-02): <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/tm70mv16z/s4655h00b/v118rd95z/treenutwm-10-27-2017.pdf>.
- [11] DOLEŽEL J, BARTOS J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size[J]. Annals of Botany, 2005, 95(1): 99. DOI: 10.1093/aob/mci005.
- [12] BENNETT M D, BHANDOI P, LEITCH I J. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses-807 new estimates[J]. Annals of Botany, 2000, 86(4): 859. DOI: 10.1093/aob/mci005.
- [13] SWIFT H. The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1950, 36(11): 643. DOI: 10.1073/pnas.36.11.643.

(下转第 707 页)