



郭艳超, 侯宇航, 陈菊, 徐彦杰, 孟静柔, 郑伶杰, 姚玉涛, 张国君. 菊花倍性流式细胞术快速检测方法的优化[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(07): 119-130.
GUO Yanchao, HOU Yuhang, CHEN Ju, XU Yanjie, MENG Jingrou, ZHENG Lingjie, YAO Yutao, ZHANG Guojun. Optimization of rapid chrysanthemum ploidy detection method by flow cytometry[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(07): 119-130.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.07.10

菊花倍性流式细胞术快速检测方法的优化

郭艳超¹ 侯宇航^{1,2} 陈菊³ 徐彦杰^{4*} 孟静柔¹ 郑伶杰¹ 姚玉涛¹ 张国君²

(1. 河北省农林科学院 滨海农业研究所/河北省盐碱地绿化技术创新中心, 河北 唐山 063299;

2. 河北科技师范学院 园艺科技学院, 河北 秦皇岛 066600;

3. 北京市花木公司, 北京 100044;

4. 中国农业大学 园艺学院, 北京 100193)

摘要 为建立大批量快速鉴定菊花倍性的流式细胞术,以二倍体菊花野菊和六倍体菊花‘秋艳’为材料,采用3种方法制备细胞核悬浮液,通过比较3种方法测定倍性的优劣,确定了研磨器研磨法为最优方法,并对研磨器研磨法中的裂解液、研磨器转速、裂解时间、过滤尼龙网目数、染色时间5个因素进行了探究。结果表明:1)3种样品制备方法均可准确判断倍性,刀片切碎法制备的样品流式细胞检测图峰型较好,耗时间最长;研钵研磨法峰型中等,耗时间适中;研磨器研磨法峰型中等,耗时间最短。2)在研磨器研磨法中采用Otto裂解液、1 200~1 400 r/min研磨转速、裂解时间0 min、200~500目尼龙网、染色时间5 min处理样品速度较快,检测效果较好。综上,基于流式细胞仪的研磨器研磨法,其检测结果同研钵研磨法、刀片切碎法制备样品一样准确,还可实现批量快速鉴定菊花的染色体倍性,为菊花的倍性鉴定提供了快捷可靠的技术方法。

关键词 菊花; 倍性检测; 流式细胞仪; 方法优化; 快速鉴定

中图分类号 S682.1+1

文章编号 1007-4333(2025)07-0119-12

文献标志码 A

Optimization of rapid chrysanthemum ploidy detection method by flow cytometry

GUO Yanchao¹, HOU Yuhang^{1,2}, CHEN Ju³, XU Yanjie^{4*}, MENG Jingrou¹, ZHENG Lingjie¹,
YAO Yutao¹, ZHANG Guojun²

(1. Institute of Coastal Agriculture/Saline-alkali Land Greening Technology Innovation Center of Hebei Province,
Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Tangshan 063299, China;

2. College of Horticultural Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology,
Qinhuangdao 066600, China;

3. Beijing Huamu Company, Beijing 100044, China;

4. College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract To establish a flow cytometry method for large-scale rapid identification of chrysanthemum ploidy, the diploid chrysanthemum indicum and the hexaploid chrysanthemum ‘Qiuyan’ were used as study materials. Three methods were adopted to prepare nuclear suspension. By comparing the advantages and disadvantages of the three methods in determining the ploidy, the grinder grinding method was selected as the optimal method. A total of five factors in the grinder grinding method were explored,

收稿日期: 2024-10-03

基金项目: 河北省农林科学院科技创新专项(2022KJCXZX-BHS-5, 2023KJCXZX-BHS-8); 河北省现代农业产业技术体系建设专项(HBCT2024200409)

第一作者: 郭艳超(ORCID:0000-0002-8310-9495), 研究员, 主要从事耐盐观赏植物遗传育种与抗逆机制研究, E-mail: bhsygyh@163.com

通讯作者: 徐彦杰(ORCID:0000-0002-4397-7191), 副教授, 主要从事观赏植物响应非生物胁迫的分子调控机理研究, E-mail: xuyanjie@cau.edu.cn

including lysis buffer, the rotation speed of the grinder, lysis time, the mesh number of the filtering nylon mesh and staining time. The results showed that: 1) All three sample preparation methods could accurately determine the ploidy. The sample prepared by the blade chopping method displayed a better peak shape, but it took the longest time. The sample prepared by the mortar grinding method had a medium peak shape and a moderate time consumption. The sample prepared by the grinder grinding method had a medium peak shape and the shortest time consumption. 2) The grinder grinding method, using Otto lysis buffer with the rotation speed of 1 200 to 1 400 r/min, the lysis time of 0 min, 200 to 500 mesh nylon mesh and the staining time of 5 min, could process the samples more quickly and achieve a better detection effect. In conclusion, the grinder grinding method based on flow cytometry achieved the same accurate detection results as the mortar grinding method and the blade chopping method for sample preparation. It realized the rapid batch identification of chrysanthemums' chromosome ploidy, providing a quick and reliable technical method for the ploidy identification of chrysanthemums.

Keywords chrysanthemum; ploidy identification; flow cytometry; method optimization; rapid identification

菊花 (*Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat.) 是菊科菊属多年生草本植物^[1], 观赏价值较高^[2], 分布较为广泛, 是世界第二大产值花卉。目前有二倍体、四倍体、六倍体、八倍体等, 这些倍性的菊花具有鲜重大、花瓣多、抗性强等优良性状, 是菊花育种中的重要种质资源。

菊花染色体倍性的鉴定对于品种的鉴定、杂交组合的选配、杂交后代材料的提前筛选、亲缘关系的鉴定等均具有十分重要的意义^[3]。前人通常采用根尖染色体计数法检测植物倍性^[4-6], 但该方法过程较为复杂、耗时较长, 而且难以处理染色体较小且倍性水平较高的物种^[7]。流式细胞仪是一种用于单个细胞多参数快速分析的先进仪器, 能对处在快速直线流动状态中的单细胞或生物颗粒进行多参数、快速的定量分析和分选^[8]。在细胞检测过程中, 将待检测细胞悬浮液通过细管注入流式细胞仪中, 形成单个细胞在流动液体中通过的状态。细胞通过时, 激光束照射到细胞上, 激发细胞内的荧光染料或细胞本身的固有荧光发射。通过检测激光散射信号, 可以获取细胞大小、形状和表面特性等信息^[9]。这些光信号转化成电信号, 被传送到计算机, 经转换器传输到微机处理器形成数据文件^[10]。随着不断发展, 流式细胞术逐渐广泛应用于植物育种、细胞核基因组大小的检测以及染色体倍性的鉴定中, 如青钱柳^[11]、旱柳^[12]、茶树^[13]、棱叶韭^[14]、茉莉^[15]、灯盏花^[16]、草莓^[17]等植物的染色体倍性鉴定。在利用流式细胞术进行植物染色体倍性鉴定时, 样品的处理是最为重要的一步, 关乎着鉴定结果是否准确。目前, 菊花染色体倍性鉴定时多采用刀片切碎法进行样

品制备^[3], 但是这种方法制备样品效率较低, 不适于数量较多的菊花染色体倍性鉴定工作。因此, 本研究拟以二倍体菊花野菊和六倍体菊花‘秋艳’的嫩叶为试验材料, 采用刀片切碎法、研钵研磨法、研磨器研磨法制备菊花叶片细胞核悬浮液, 通过比较这3种样品制备方法的优缺点, 找出适合批量鉴定、效率较高、倍性结果准确的制样方法, 并对方法中的裂解液、研磨器转速、裂解时间、过滤尼龙网目数、染色时间5个因素进行探究, 旨在建立一种快速、高通量、简便, 同时能够准确鉴定出菊花染色体倍性水平的方法, 以期为菊花新品种的鉴定、杂交后代的筛选等减少工作量和盲目性, 降低成本, 加速育种进程。

1 材料与方法

1.1 材料

以中国农业大学园艺学院花卉发育与品质调控北京市重点实验室提供的二倍体菊花野菊和六倍体菊花‘秋艳’为试验材料, 选取植株茎尖往下第3—4片的嫩叶片为检测材料。

1.2 仪器设备及试剂

试验使用的仪器是贝克曼公司的CytoFLEX流式细胞仪, 新芝公司的SCIENTZ-48高通量组织研磨器。裂解液使用北京源叶公司的WPB裂解液、Galbrath裂解液和采购自麦克林公司的药剂自配的Otto裂解液, 裂解液配方^[18]详见表1。

1.3 细胞核悬浮液的制备

1.3.1 刀片切碎法

参考李春牛等^[15]和万红等^[17]的方法, 将叶片用去离子水冲洗并擦干, 放入在4℃冰箱预冷的玻璃

表 1 3 种裂解液的配方

Table 1 Formulas of three lysis solutions

裂解液名称 Name of the dissociation solution	配方 Formulation
Otto	Otto I液: 100 mmol/L 柠檬酸, 0.5% Tween 20 Otto II液: 400 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ Otto: $V(\text{Otto I液}): V(\text{Otto II液}) = 2:1$
Galbraith	45 mmol/L MgCl_2 , 30 mmol/L 柠檬酸钠, 20 mmol/L MOPS, 0.1% Triton X-100
WPB	0.2 mol/L Tris-HCl, 4 mmol/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mmol/L $\text{EDTA Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 86 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 焦亚硫酸钠, 1% PVP-10, 1% Triton X-100

培养皿,加入 1 mL 裂解液,用刀片快速垂直切碎,然后在冰上静置裂解 10 min。用移液枪吸取培养皿中的裂解液,用尼龙网过滤到 2 mL 离心管中,加入 200 μL PI 染色液和 1 μL RNA 酶 A,然后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光染色,进行 3 次重复。

1.3.2 研钵研磨法

参考郑英转等^[19]的方法,将叶片用去离子水冲洗并擦干,放入在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冷的研钵,加入 5~10 mL 液氮快速研磨成粉末,然后在研钵加入 1 mL 裂解液在冰上裂解 10 min。用移液枪吸取研钵中的裂解液,用尼龙网过滤到 2 mL 离心管中,加入 200 μL PI 染色液和 1 μL RNA 酶 A,然后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光染色,进行 3 次重复。

1.3.3 研磨器研磨法

参考王梦钦等^[16]的方法,将叶片用去离子水冲洗并擦干,放入在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱预冷的 2 mL 离心管中,加入 1 mL 裂解液并放入一颗预冷的 5 mm 小钢珠,把 2 mL 离心管放入研磨器中研磨 1 min。然后放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱裂解 10 min。吸取 2 mL 离心管中的裂解液,再用尼龙网过滤到新的 2 mL 离心管中,加入 200 μL PI 染色液和 1 μL RNA 酶 A 后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光染色,进行 3 次重复。

1.3.4 裂解液设置

为了验证研磨器研磨法制备的细胞核悬浮液在不同裂解液下的测定结果是否有差异,选用的裂解液为 Otto、Galbraith 和 WPB,每种裂解液进行 3 次重复。

1.3.5 研磨器转速设置

为了验证研磨器研磨法制备的细胞核悬浮液在不同研磨器转速梯度下的测定结果是否有差异,设置的转速分别为 1 000、1 200、1 400 和 1 800 r/min,

每种转速进行 3 次重复。

1.3.6 裂解时间设置

为了验证研磨器研磨法制备的细胞核悬浮液在不同裂解时间梯度下的测定结果是否有差异,设置的裂解时间分别 0、2、10、20 和 30 min,每个裂解时间进行 3 次重复。

1.3.7 过滤尼龙网目数设置

为了验证研磨器研磨法制备的细胞核悬浮液在不同目数尼龙网过滤下的测定结果是否有差异,设置的目数分别为 200、300、400 和 500 目,每种目数进行 3 次重复。

1.3.8 染色时间设置

为了验证研磨器研磨法制备的细胞核悬浮液在不同染色时间下的测定结果是否有差异,设置的染色时间分别为 5、10、20 和 30 min,每种染色时间进行 3 次重复。

1.4 流式细胞仪测定及数据分析

使用贝克曼公司的 CytoFLEX 流式细胞仪,按照仪器操作说明对染色后的细胞核悬浮液样品上机检测,每次检测至少收集 10 000 个细胞颗粒。最终得到的流式峰值图中,横坐标为细胞核 DNA 相对含量的荧光强度,纵坐标为细胞核数量。数据的统计分析用 GraphPad Prism 9 软件完成, $P < 0.05$ 时认为存在统计学意义上的显著性差异。

2 结果与分析

2.1 不同方法制备的细胞核悬浮液效果比较

分别采用刀片切碎法、研钵研磨法和研磨器研磨法 3 种方法制备野菊叶片样品,使用流式细胞仪对细胞核悬浮液进行检测,结果见图 1。研钵研磨法中细胞核没有显著聚集在一起,而刀片切碎法聚

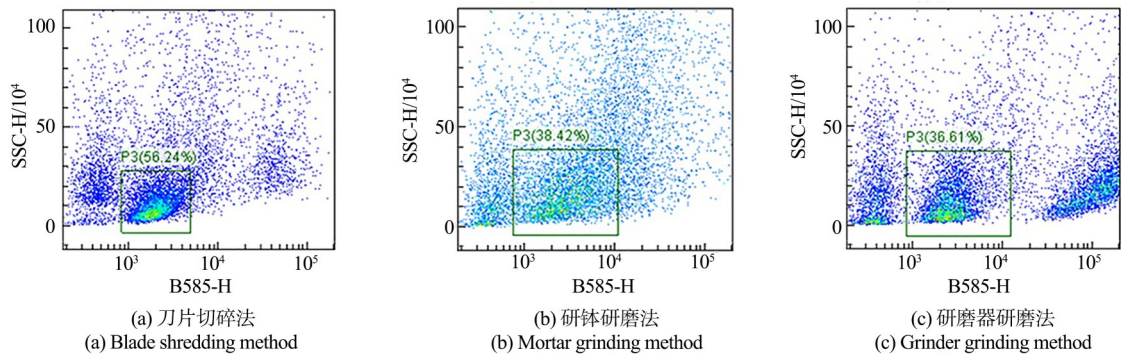
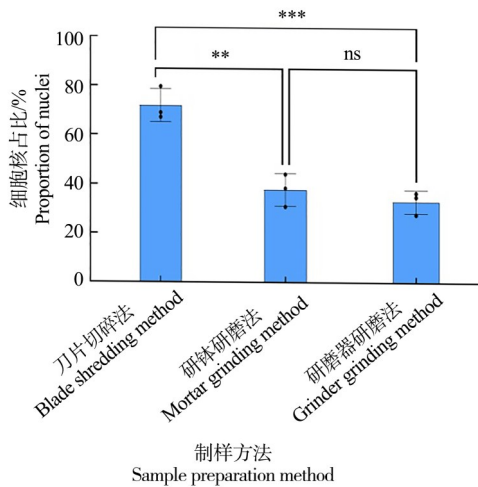


图1 3种方法制备的细胞核悬浮液中细胞核占比

Fig. 1 The proportion of cell nuclei in the cell nucleus suspension prepared by three methods

集明显,研磨器研磨法的聚集程度介于两者之间。刀片切碎法的细胞核占比最高,研钵研磨法和研磨器研磨法的细胞核占比在统计学上无显著差异($P>0.05$)(图2)。刀片切碎法的峰图中显示的峰型较好,碎片峰较少;研钵研磨法和研磨器研磨法的峰图中峰型较差,碎片峰较多(图3)。3种方法的制备的样品峰对应的相对荧光强度均在 20×10^2 附近,且在统计学上无显著性差异($P>0.05$)(图4),证明

3种方法均可准确检测出菊花的倍性。样品制备时间表明,刀片切碎法制备1个样品耗时5~7 min,研钵研磨法耗时4~5 min,研磨器研磨法耗时1 min;3种方法制备49个样品需要的时间分别为245~343、196~245和1 min(表2)。由此可知,研磨器研磨法制备样品速度最快,检测大批量植物材料时宜采取此种方法。基于此次试验结果,以下试验条件的筛选选择能快速检测大批量样品的研磨器研磨法。



采用 t 检验进行差异显著性分析;***表示 $P<0.001$,**表示 $P<0.01$,ns表示统计学上无显著性差异($P>0.05$)。 $n=3$ 。下同。
The t -test is used for difference significance analysis. *** means $P<0.001$, ** indicates $P<0.01$, and ns means no statistically significant difference ($P>0.05$). $n=3$. The same below.

图2 3种方法制备的细胞核悬浮液中细胞核占比比较

Fig. 2 Comparison of the proportion of cell nuclei in the cell nucleus suspensions prepared by three methods

2.2 研磨器研磨法中不同细胞裂解液裂解的效果比较

以二倍体野菊为材料,对研磨器研磨法中所用的3种细胞裂解液进行筛选。由图5可知,采用裂

解液Otto处理野菊叶片细胞的流式直方图峰型清晰且集中,荧光强度为 $2\,394.4\pm380.5$;裂解液Galbrath处理的样品,直方图峰型较粗,荧光强度为 $2\,819.7\pm259.9$,峰对应的荧光强度误差较大;裂解

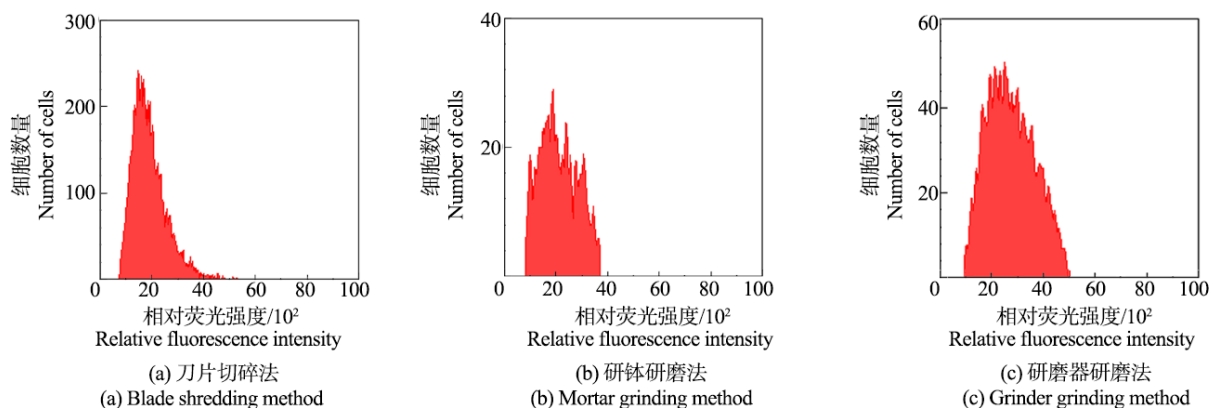


图 3 3 种方法制备的细胞核悬浮液流式细胞检验

Fig. 3 Flow cytometry examination of the cell nucleus suspensions prepared by three methods

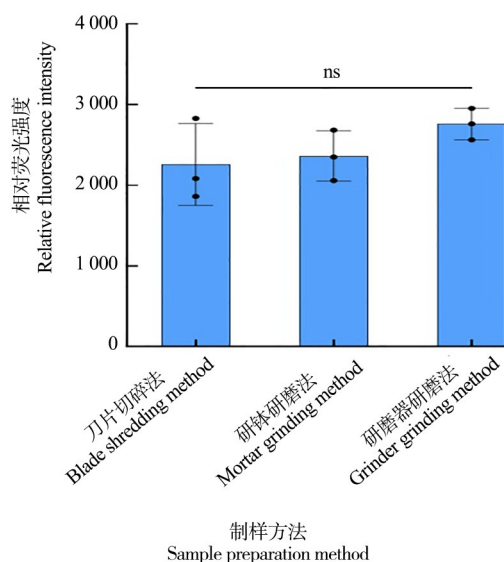


图 4 3 种方法处理二倍体菊花叶片的相对荧光强度比较

Fig. 4 Comparison of the relative fluorescence intensities of diploid chrysanthemum leaves treated by three methods

表 2 3 种制样方法耗时比较

Table 2 Comparison of the time spent by the three sample preparation methods

处理样品数 No. of processed samples	刀片切碎法耗时/min The time consumed by the blade shredding method	研钵研磨法耗时/min The time consumed by the mortar grinding method	研磨器研磨法耗时/min The time consumed by the grinder grinding method
1	5~7	4~5	1
49	245~343	196~245	1

液 WPB 处理的样品, 荧光强度为 281.3 ± 137.8 , 在 20×10^2 附近无峰型。采用裂解液 Otto 和 Galbrath 处理的样品的相对荧光强度无显著差异 ($P > 0.05$), 但二者处理的样品的相对荧光强度均极显

著高于裂解液 WPB 处理的样品 ($P < 0.001$) (图 6), 证明 WPB 裂解液不适用于菊花的倍性检测。由此可知, 采用裂解液 Otto 对流式细胞仪检测菊花倍性效果更好。

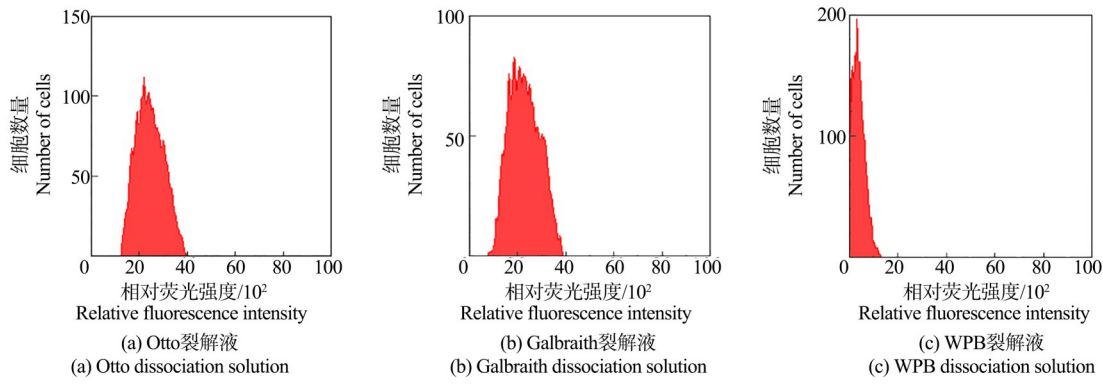


图5 研磨器研磨法中不同裂解液处理二倍体菊花叶片的流式细胞检验

Fig. 5 Flow cytometry of diploid chrysanthemum leaves treated with different dissociation solutions in grinder grinding method

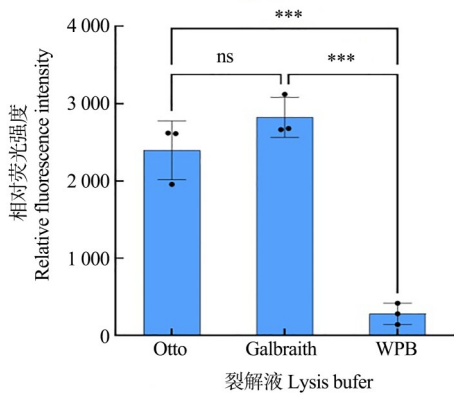


图6 研磨器研磨法中不同裂解液处理二倍体菊花叶片的相对荧光强度比较

Fig. 6 Comparison of the relative fluorescence intensities of diploid chrysanthemum leaves treated with different dissociation solutions in grinder grinding method

2.3 研磨器研磨法中不同转速的效果比较

分别用4种研磨转速对野菊叶片进行处理,得到的样品状态如图7所示。可见,1 000 r/min处理样品时留有大块叶片,可能会导致释放出的细胞核较少;1 200、1 400和1 800 r/min处理样品时植物材料研磨较为充分。流式细胞仪检验结果表明,4种转速下的峰型均较为明显,但1 800 r/min明显偏离 20×10^2 (图8)。1 000~1 400 r/min的相对荧光强度在统计学上无显著性差异($P>0.05$),而1 800 r/min的相对荧光强度极显著高于其他3个转速($P<0.01$)(图9)。综合叶片的研磨程度、峰型和相对荧光强度3个因素考虑,转速为1 200~1 400 r/min时样品的处理效果较好。

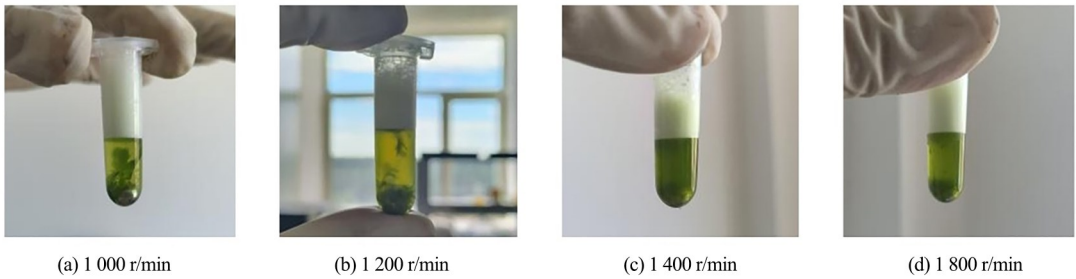


图7 研磨器研磨法中不同转速处理二倍体菊花叶片后叶片状态

Fig. 7 Leaf state of diploid chrysanthemum after treated with different rotational speeds in grinder grinding method

2.4 研磨器研磨法中不同裂解时间的效果比较

用研磨器研磨法制备细胞核悬浮液的裂解时间分别设置为0、2、10、20和30 min。每一时间点裂解结束后立即进行20 min的染色处理,最终将所有

结果汇总分析。结果表明,5个裂解时间的相对荧光强度均在 25×10^2 附近(图10),且无显著性差异($P>0.05$)(图11)。因此,使用研磨器研磨法制备的样品裂解时间在30 min内其倍性鉴定结果是一

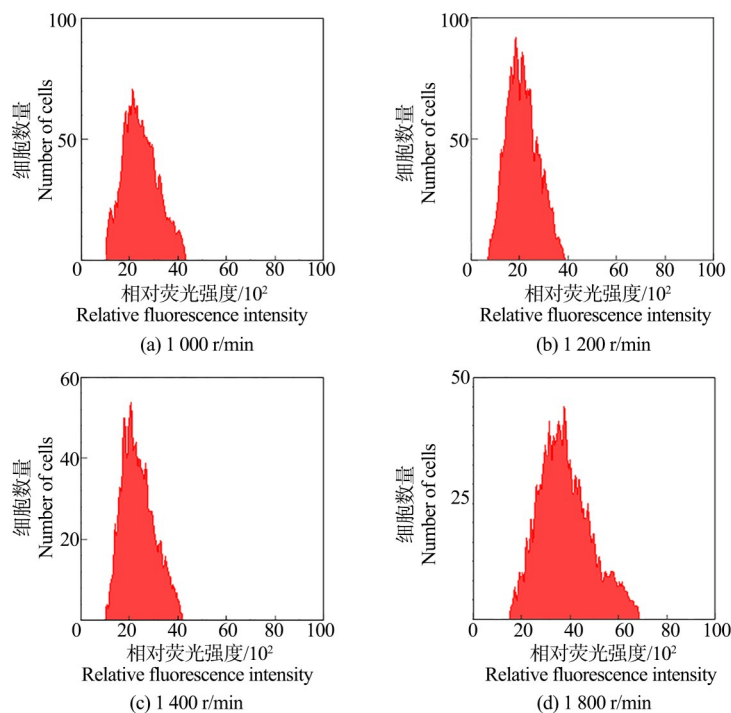


图 8 研磨器研磨法中不同转速处理二倍体菊花叶片的流式细胞检验

Fig. 8 Flow cytometry of diploid chrysanthemum leaves treated at different speeds in grinder grinding method

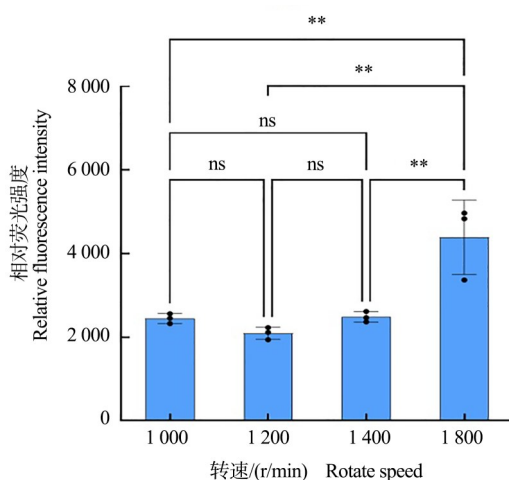


图 9 研磨器研磨法中不同转速处理二倍体菊花叶片的相对荧光强度比较

Fig. 9 Comparison of the relative fluorescence intensity of diploid chrysanthemum leaves treated at different rotation speeds in grinder grinding method

致的。为了节省时间提高效率,建议在研磨完成后逐一对所有样品立即进行染色。

2.5 研磨器研磨法中不同过滤尼龙布目数的效果比较

使用研磨器研磨法制备细胞核悬浮液,在研磨完成后分别使用 200、300、400 和 500 目 4 种目数的尼龙布过滤,其他步骤一致,将样品进行流式细胞

仪测定,最终将所有结果汇总分析。结果表明,4 种目数的尼龙布过滤得到的样品流式细胞检测峰对应的位置均在 30×10^2 附近(图 12),且 4 种目数尼龙布过滤的样品的相对荧光强度在统计学上无显著性差异($P > 0.05$)(图 13)。因此,使用研磨器研磨法制备的样品在 200~500 目过滤时其倍性鉴定结果是一致的,尼龙布目数越多成本越高,基于试验

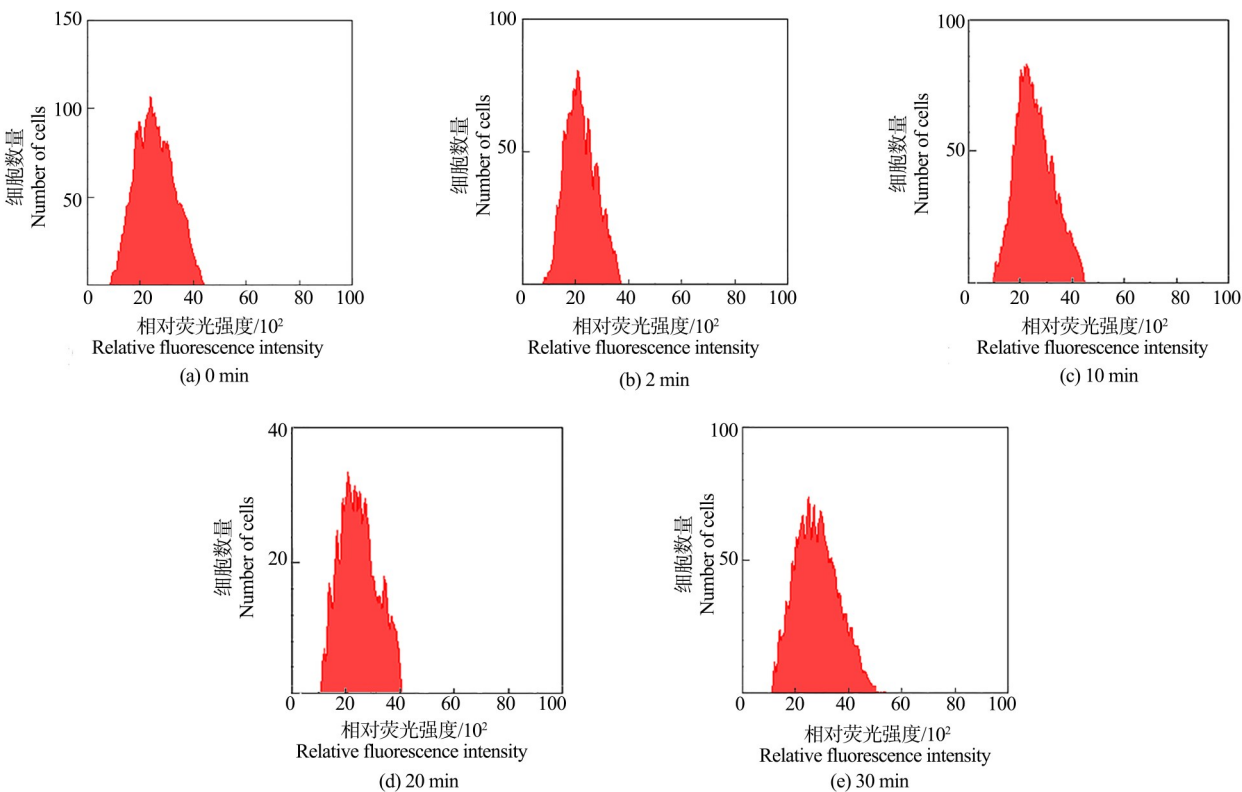


图 10 研磨器研磨法中不同裂解时间对二倍体菊花叶片的流式细胞检验

Fig. 10 Flow cytometric examination of diploid chrysanthemum leaves at different lysis times in grinder grinding method

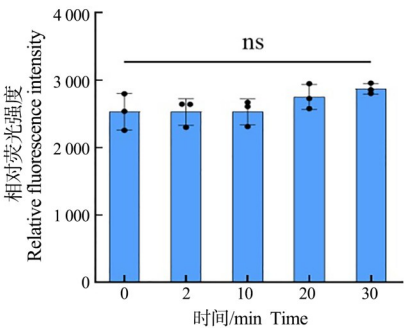


图 11 研磨器研磨法中不同裂解时间处理二倍体菊花叶片的相对荧光强度比较

Fig. 11 Comparison of the relative fluorescence intensity of diploid chrysanthemum leaves treated with different lysis times in grinder grinding method

成本考虑,建议选择200~400目的尼龙布较为合适。

2.6 研磨器研磨法中不同染色时间的效果比较

使用研磨器研磨法制备细胞核悬浮液,在加入PI染色液后分别设置5、10、20和30 min的时间梯度,每一时间点染色结束后立即进行流式细胞仪测定,最终将所有结果汇总分析。结果表明,4个染色时间得到的峰图对应的位置均在 30×10^2 附近

(图14),且4个染色时间的相对荧光强度在统计学上无显著性差异($P>0.05$)(图15),这与郑英转等^[19]的研究结果一致。因此,染色时间在5~30 min,样品的倍性鉴定结果是一致的,为快速制备细胞核悬浮液,建议选择染色时间为5 min。

2.7 利用已知倍性菊花材料检验研磨器研磨法的可靠性

为进一步确定研磨器研磨法制备的细胞核悬浮

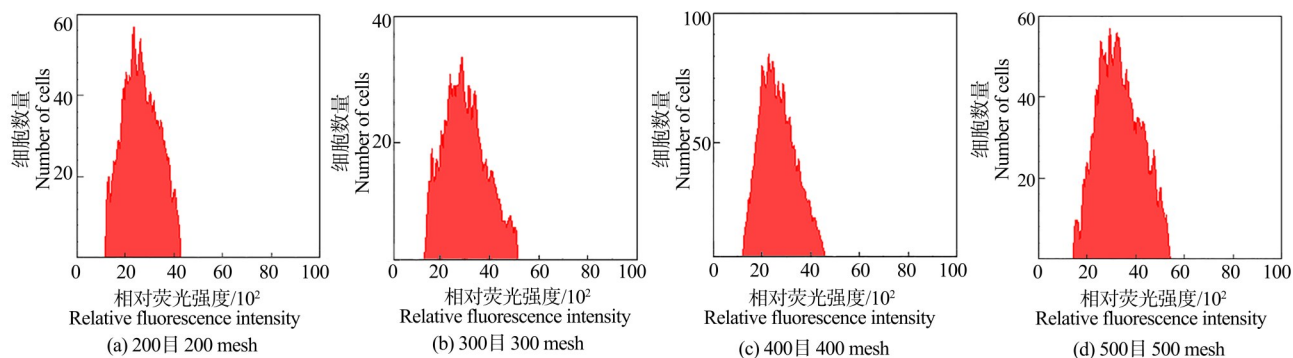


图 12 研磨器研磨法中不同目数尼龙布过滤对二倍体菊花叶片的流式细胞检验

Fig. 12 Flow cytometric test of diploid chrysanthemum leaves with different mesh nylon cloth filtration in grinder grinding method

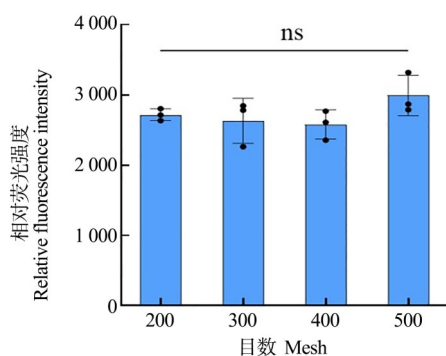


图 13 研磨器研磨法中不同目数尼龙网过滤的二倍体菊花叶片的相对荧光强度比较

Fig. 13 Comparison of the relative fluorescence intensity of diploid chrysanthemum leaves filtered by nylon meshes with different mesh sizes in grinder grinding method

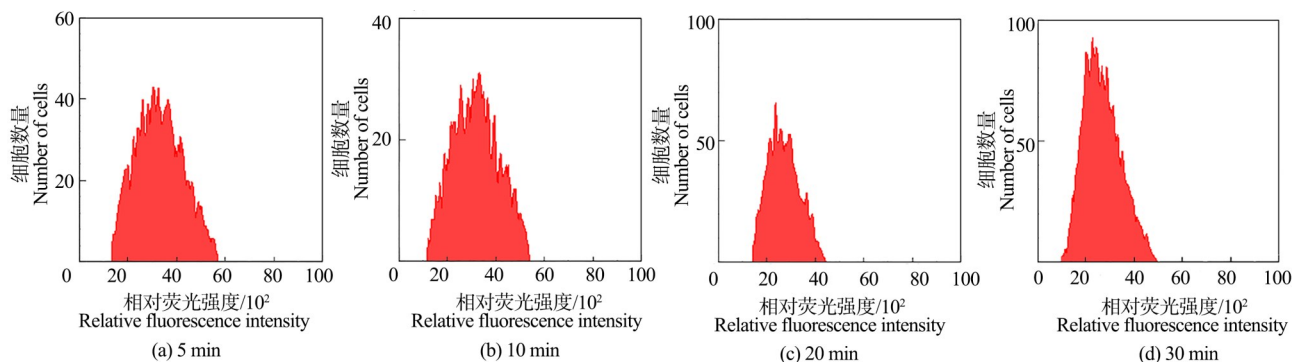


图 14 研磨器研磨法中不同染色时间对二倍体菊花叶片的流式细胞检验

Fig. 14 Flow cytometric examination of diploid chrysanthemum leaves at different staining times in grinder grinding method

液在测定菊花倍性应用中的可靠性,选取已知六倍体菊花“秋艳”和二倍体菊花野菊为材料,试验过程中其他步骤保持一致。在相对荧光强度的直方图中(图 16),二倍体野菊的峰图显示的相对荧光强度为 $2\,565.7 \pm 367.4$,六倍体“秋艳”的峰图显示的相对荧光强度为 $7\,289.4 \pm 683.2$,二者的数量关系接近 3 倍,符合二倍体和六倍体的理论比值。该结果

进一步证实了基于研磨器研磨法的流式细胞仪测定菊花染色体倍性的可靠性。

3 讨论

目前植物染色体倍性鉴定的方法较多,而流式细胞术具有操作简单快捷、试剂成本低廉、检测结果准确可靠等优点,在检测大批量的植物材料时可

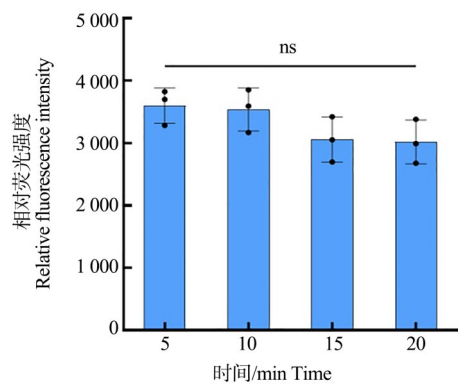


图 15 研磨器研磨法中不同染色时间处理二倍体菊花叶片的相对荧光强度比较

Fig. 15 Comparison of the relative fluorescence intensity of diploid chrysanthemum leaves treated with different staining times in grinder grinding method

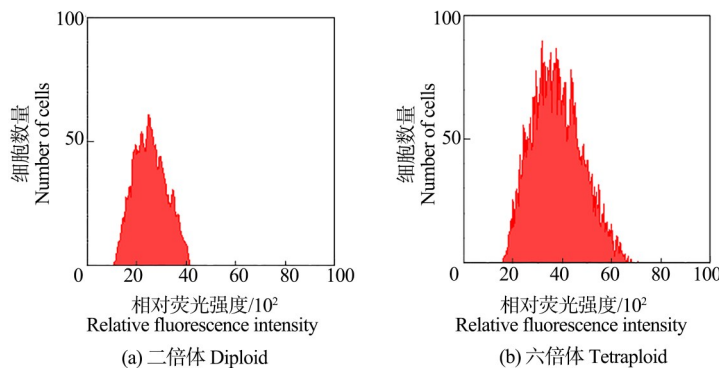


图 16 研磨器研磨法中不同倍性菊花叶片的流式细胞检验

Fig. 16 Flow cytometric examination of leaves of chrysanthemums with different ploidy levels in grinder grinding method

以显著提高工作效率,已成为近年来植物染色体倍性鉴定最常用的方法之一^[20]。在利用流式细胞仪鉴定菊花染色体倍性的试验中,刀片切碎法是较主流的样品制备方法,1个样品的细胞核悬浮液制备时间在7 min左右,需要的时间较长。而研磨器研磨法尽管比刀片切碎法在制备1个样品所用的时间短2~3 min,但在大批量的制样中,仍需要较长的时间,且此种方法制备的细胞核无显著聚集现象。在此基础上,本研究探究出了一种简便、高通量且同时能够准确鉴定出菊花染色体倍性水平的方法,即采用研磨器研磨法进行了菊花染色体倍性检测样品制备,缩短了制样时间。在制备方法中,袁兰等^[20]的研究中机器打样法制备的样品细胞核占比最高,研钵研磨法次之,刀片切碎法最低,这与本研究的结果不一致。但在郑英转等^[19]的研究中刀片切碎法制备的样品细胞核占比高于研钵研磨法。而王梦钦等^[16]在灯盏花的样品制备方法中得出刀

片切碎法制备的样品效果最好,研钵研磨法和机器研磨法的点图中细胞核无显著聚集,这与本研究的结果是一致的。在染色时间的探究上,本研究与郑英转等^[19]的研究结果一致。

4 结 论

在使用流式细胞仪测定菊花染色体倍性时,研磨器研磨法制备的样品,细胞裂解充分,流式细胞检测图峰型明显,检测倍性结果与刀片切碎法、研钵研磨法一样准确,可从制样方法、裂解细胞、染色三方面缩短时间,大大提高了菊花染色体倍性鉴定效率。本研究得出制备菊花叶片细胞核悬浮液的步骤为:预冷的2 mL离心管中加入1颗5 mm小钢珠、1 cm²左右的菊花嫩叶和1 mL Otto裂解液,在研磨器研磨1 min后立即使用200~400目尼龙网过滤到另一个新的2 mL离心管中,再将第2个离心管中加入PI染色液,放入4℃冰箱避光染色5 min,即可得到样品的

细胞核悬浮液。本研究的研磨器研磨法制备菊花叶片细胞核悬浮液对于大批量菊花染色体倍性鉴定具有重要意义。

参考文献 References

- [1] 唐桂梅,李卫东,黄国林,张力,符红艳,肖晓玲,杨吉龙,刘洋. 功能性菊花资源分类及产品开发研究进展[J]. 中国果菜, 2024, 44(4): 54-57
Tang G M, Li W D, Huang G Zhang L, Fu H Y, Xiao X L, Yang J L, Liu Y. Research on resource classification and product development of functional chrysanthemum morifolium [J]. *China Fruit & Vegetable*, 2024, 44(4):54-57 (in Chinese)
- [2] 戴思兰,温小蕙. 菊花的药食同源功效[J]. 生命科学, 2015, 27(8):1083-1090
Dai S L, Wen X H. Efficacy of the medicinal and food chrysanthemum [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2015, 27(8): 1083-1090 (in Chinese)
- [3] 王荣邦,张秀海,吴忠义,黄丛林. 菊花染色体倍性鉴定研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(23): 12778-12780, 12789
Wang R B, Zhang X H, WU Z Y, Huang C L. Common methods of cell chromosome ploidy identification for chrysanthemum and its application in breeding [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(23): 12778-12780, 12789 (in Chinese)
- [4] 薛皓,陈宗礼,王迪,刘盼盼,刘春玲. 菊花染色体数目及核型分析[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(6): 280-281
Xue H, Chen Z L, Wang D, Liu P P, Liu C L. The number of chromosomes and karyotype analysis of chrysanthemums [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2011, 39(6): 280-281 (in Chinese)
- [5] 叶雨晴,孙丽萍,张一驰,李毅,徐俊,马琛悦,牛雅静,张蒙蒙,戴思兰,黄河. 不同倍性菊花远缘杂交亲和性及子代倍性研究[J]. 园艺学报, 2024, 51(10): 2329-2342
Ye Y Q, Sun L P, Zhang Y C, Li Y, Xu J, Ma T Y, Niu Y J, Zhang M M, Dai S L, Huang H. Studies on distant crossing compatibility and hybrid ploidy in different ploidy chrysanthemums [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2024, 51(10): 2329-2342 (in Chinese)
- [6] 荆禹铭,嵇乐乐,肖栋,胡春梅,侯喜林,李英,胡君,刘同坤. 同源四倍体菜薹新材料的创制与品质分析[J]. 南京农业大学学报, 2024, 47(4): 643-652
Jing Y M, Ji L L, Xiao D, Hu C M, Hou X L, Li Y, Hu J, Liu T K. Creation and quality analysis of new autotetraploid materials in flowering Chinese cabbage [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2024, 47(4): 643-652 (in Chinese)
- [7] 陈瑞阳,宋文芹,李秀兰. 植物染色体标本制备的去壁、低渗法及其在细胞遗传学中的意义[J]. 遗传学报, 1982, 9(2): 151-159, 173-174
Chen R Y, Song W Q, Li X L. Wall degradation hypotonic method of preparing chromosome samples in plant and its significance in the cytogenetics [J]. *Acta Genetica Sinica*, 1982, 9(2): 151-159, 173-174 (in Chinese)
- [8] 栾永胜,刘佳琳,刘萍,吴学丽,周娜,栾传磊. 流式细胞仪样品预处理系统的设计与实现[J]. 分析测试技术与仪器, 2024, 30(1): 23-27
Luan Y S, Liu J L, Liu P, Wu X L, Zhou N, Luan C L. Design and application of sample pre-processing system for flow cytometer [J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2024, 30(1): 23-27 (in Chinese)
- [9] 方平龙. 流式细胞仪及光学系统设计[J]. 中国新技术新产品, 2024(14): 31-33.
Fang P L. Design of flow cytometer and optical system [J]. *New Technology & New Products of China*, 2024(14): 31-33 (in Chinese)
- [10] 赵书涛,武晓东,王策,陈永勤,唐玉国. 流式细胞仪的原理、应用及最新进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(22): 4378-4381
Zhao S T, Wu X D, Wang C, Chen Y Q, Tang Y G. Principles, applications and latest developments of flow cytometer [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2011, 11(22): 4378-4381 (in Chinese)
- [11] 宋子琪,卞国良,林峰,胡凤荣,尚旭岚. 流式细胞仪鉴定青钱柳倍性方法的建立及其应用[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2024, 48(2): 61-68
Song Z Q, Bian G L, Lin F, Hu F R, Shang X L. Establishment and application of a flow cytometry method for chromosome ploidy identification of *Cyclocarya paliurus* [J]. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 2024, 48(2): 61-68 (in Chinese)
- [12] 张健,王莹,马祥建,谈峰,李敏,李玉娟. 基于流式细胞术的旱柳染色体倍性与基因组大小测定[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(22): 40-43.
Zhang J, Wang Y, Ma X J, Tan F, Li M, Li Y J. Determination of chromosome ploidy and genome size of *Salix matsudana* based on flow cytometry [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(22): 40-43 (in Chinese)
- [13] 李瑞琳. 茶树倍性鉴定体系的建立[D]. 合肥:安徽农业大学, 2015
Li R L. The establishment of a tea tree polyploidy identification system [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [14] 吕雅雅,白事麟,韩宜洁,邱娟,师小军. 基于流式细胞术对棱叶韭染色体的倍性鉴定和基因组大小分析[J/OL]. 分子植物育种, (2024-03-19). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240318.1332.006.html>
Lv Y Y, Bai S L, Han Y J, Qiu J, Shi X J. Flow cytometry-based ploidy identification and genome size analysis of leeks in prismatic leeks [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, (2024-03-19). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240318.1332.006.html>
- [15] 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. 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)
- [16] 王梦钦,董云龙,徐达,陈晓波,张云峰. 灯盏花倍性的流式细胞术检测优化[J]. 中南农业科技, 2023, 44(11): 53-56, 68
Wang M Q, Dong Y L, Xu D, Chen X B, Zhang Y F. Optimization of flow cytometry detection of *erigeron breviscapus* ploidy [J] *South-Central Agricultural Science and Technology*, 2023, 44(11): 53-56, 68 (in Chinese)
- [17] 万红,桂大萍,汪蓁,袁艺,杨建华,阮继伟,陶磅. 基于流式细胞术对不同倍性草莓基因组大小的测定[J]. 中国南方果树, 2024, 53(4): 164-169
Wan H, Gui D P, Wang Q, Yuan Y, Yang J H, Ruan J W, Tao B. Determination of genome size of strawberry with different ploidy based on flow cytometry [J]. *South China Fruits*, 2024, 53(4): 164-169 (in Chinese)
- [18] 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)
- [19] 郑英转,吕燕,杨东旭,李国威,王洪洋,李灿辉. 基于液氮研磨法的流式细

胞术检测马铃薯倍性的研究[J]. 生物技术通报, 2021, 37(1): 282-288

Zheng Y Z, Lv Y, Yang D X, Li G W, Wang H Y, Li C H. Study on the identification of potato ploidy using flow cytometry based on liquid nitrogen grinding method[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(1): 282-288 (in Chinese)

高通量样品制备方法[J]. 生物技术通报, 2024, 40(9): 141-147

Yuan L, Huang Y N, Zhang B N, Xiong Y M, Wang H Y. High-throughput sample preparation method for the identification of potato ploidy using flow cytometry[J] *Biotechnology Bulletin*, 2024, 40(9): 141-147 (in Chinese)

[20] 袁兰, 黄娅楠, 张贝妮, 熊雨萌, 王洪洋. 基于流式细胞仪鉴定马铃薯倍性的

责任编辑: 申青苗



第一作者简介: 郭艳超, 博士, 研究员。河北省农业产业体系花卉岗位专家, 河北省林木品种审定专家, 《华北农学报》编委。主要从事耐盐观赏植物遗传育种及抗逆机制研究。先后主持国家自然科学基金、河北省自然科学基金及河北省科技厅重点研发项目等课题10余项; 获河北省科技进步三等奖1项, 唐山市科技进步三等奖1项。审定河北省林木良种7个, 获得植物新品种权9个, 出版著作4部, 标准4项, 在《园艺学报》《植物生理学报》等期刊发表论文50多篇。



通讯作者简介: 徐彦杰, 中国农业大学园艺学院副教授。主要从事观赏植物响应非生物胁迫的分子调控机理研究。近年来, 主持国家自然科学基金2项, 重点研发子课题2项; 以第一作者或通讯作者发表论文6篇; 授权发明专利5项, 植物新品种权9个; 参与制修订国家、行业及地方标准3项。