



主持人:朱国鹏

火龙果42份种质资源的倍性鉴定及基因组大小分析

丁一¹, 王周雯¹, 康绍玲¹, 姜森荣¹, 王猛¹, 黄家权^{1,2},
李洪立³, 胡文斌³, 汤华^{1,2}

(1. 海南大学 热带农林学院,海口 570228; 2. 海南大学 三亚南繁研究院,海南 三亚 572025;
3. 中国热带农业科学院 热带作物资源研究所,海口 571700)

摘要: 为了满足火龙果的产业发展需求,必须开展火龙果高产优质新品种的选育工作。收集和评价火龙果种质资源,并开展火龙果的杂交育种,是火龙果育种的主要路径。火龙果种质资源多样,遗传倍性情况不明,对种质资源的倍性进行鉴定是育种创新不可缺少的环节。本研究建立了火龙果茎尖染色体制片体系,并采用茎尖染色体制片技术以及流式细胞技术对42份火龙果种质资源进行倍性鉴定。结果表明:1) 火龙果茎尖染色体制片在前低渗时间为2 h、解离时间为1.5 h、酶解时间为1 h、后低渗时间为30 min时,染色体分散程度较好,背景清晰,没有出现重叠的现象,具有完整的细胞。2) 火龙果茎尖倍性稳定,是最可靠的检测材料,老熟的茎条含有大量的四倍体和八倍体细胞,不宜做倍性鉴定材料。3) 42份火龙果种质资源中有二倍体材料41份,四倍体材料1份,无三倍体材料。4) 以‘金都一号’为参照,进行基因组大小的预估,发现有15份火龙果种质资源的1C-value (1C) ≤ 1.34 Gb,为极小型基因组,27份火龙果种质资源的1C值在1.35~3.34 Gb之间,为小型基因组。

关键词: 火龙果; 种质资源; 染色体制片技术; 流式细胞技术; 遗传倍性; 基因组大小

中图分类号: S667.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054 (2024) 03-0306-09

丁一,王周雯,康绍玲,等. 火龙果42份种质资源的倍性鉴定及基因组大小分析[J]. 热带生物学报, 2024, 15(3): 306-314. doi:10.15886/j.cnki.rdswwb.20230118

火龙果是仙人掌科(Cactaceae)量天尺属(*Hylocereus*)或蛇鞭柱属(*Selenicereus*)的植物,原产于中美洲热带地区,是热带地区重要的经济作物^[1-3]。随着消费升级,人们对火龙果的品质要求越来越高,火龙果新品种的研发也日益重要。火龙果育种中,不同种属、不同倍性材料的杂交是常用方法,对火龙果种质资源及杂交后代进行倍性鉴定是火龙果新品种选育的重要环节。黄黎芳等^[4]对18份火龙果种质资源及8份杂交后代的倍性进行鉴定,发现自然界种主要存在二倍体和四倍体,杂交后代中存在三倍体。刘顺枝等^[5-6]利用火龙果根尖和气生根对红肉火龙果和白肉火龙果进行核型分析,发现2种火龙果都是二倍体,染色体数目均

为 $2n=2x=22$ 。常规的植物倍性鉴定是采用染色体制片技术和染色体核型分析,火龙果的染色体制片多选择根尖和气生根为材料,但火龙果根多为须根,操作困难;气生根难以催生,获取不易。Soltis等^[7]将未复制的配子核基因组中的DNA含量称为1C-value(1C),并根据1C值大小将基因组分成5大类,分别是极小型基因组($1C \leq 1.34$ Gb)、小型基因组(1.35 Gb $\leq 1C \leq 3.34$ Gb)、中型基因组(3.35 Gb $\leq 1C \leq 13.36$ Gb)、大型基因组(13.37 Gb $\leq 1C \leq 33.42$ Gb)、特大型基因组($1C \geq 33.43$ Gb)。流式细胞技术可以快速鉴定植物种质资源的倍性,预估基因组大小^[8]。科学家使用流式细胞技术对草莓(*Fragaria ananassa*)^[9]、油茶(*Camellia oleifera*)^[10]、石斛(*Den-*

收稿日期: 2023-10-18

修回日期: 2023-12-20

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目(320RC487); 海南省重大科技计划项目(ZDKJ2021014)

第一作者: 丁一(1997-), 男, 海南大学热带农林学院2021级硕士研究生。E-mail: crystaldylj@163.com

通信作者: 汤华(1974-), 男, 教授, 博士研究生导师。研究方向: 火龙果遗传育种与分子生物学。E-mail: thtiger@163.com

drobium nobile)^[11]、猕猴桃(*Actinidia chinensis*)^[12]等植物进行倍性鉴定,证明流式细胞技术在植物倍性鉴定中的可行性。但流式细胞技术在火龙果方面的研究少有报道。本研究利用茎尖染色体制片技术与流式细胞技术对42份火龙果种质资源进行倍性鉴定以及基因组大小的估测,旨在为火龙果

杂交育种亲本材料的选择提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试种质资源 供试的42份种质资源材料取自海南恩红农业科技有限公司的种质资源圃(表1)。对照材料‘金都一号’的基因组大小为1.4 Gb。

表1 火龙果种质资源名称及编号

Tab. 1 The name and number of pitaya germplasm resources

| 编号 Number | 品种名称 Name | 编号 Number | 品种名称 Name | 编号 Number | 品种名称 Name |
|--------------|-----------------------|--------------|--------------------|--------------|-------------------------|
| 1 | 澳洲黄龙 Aozhouhuanglong | 15 | 红水晶 Hongshuijing | 29 | 偷心6号 Touxin No.6 |
| 2 | 白肉 Bairou | 16 | 黄皮 Huangpi | 30 | 陀2Tuo No.2 |
| 3 | 白水晶 Baishuijing | 17 | 金都一号 Jindu No.1 | 31 | 陀红肉小果 Tuohongrouxiaoguo |
| 4 | 粗砂 Cusha | 18 | 玫瑰1号 Meigui No.1 | 32 | 无刺红龙 Wucihonglong |
| 5 | 大红 Dahong | 19 | 玫红4号 Meihong No.4 | 33 | 无刺黄龙 Wucihuanglong |
| 6 | 帝龙 Dilong | 20 | 美龙 Meilong | 34 | 细致 Xizhi |
| 7 | 富贵红450 Fuguihong450 | 21 | 美龙3号 Meilong No.3 | 35 | 香蜜龙 Xiangmilong |
| 8 | 光明白肉 Guangmingbairou | 22 | 蜜宝 Mibao | 36 | 小圆果 Xiaoyuanguo |
| 9 | 光明红肉 Guangminghongrou | 23 | 蜜玄龙 Mixuanlong | 37 | 燕窝果 Yanwoguo |
| 10 | 广西450Guangxi 450 | 24 | 蔷薇3号 Qiangwei No.3 | 38 | 越南白肉 Yuenanbairou |
| 11 | 桂红龙 Guihonglong | 25 | 软枝大红 Ruanzhidahong | 39 | 紫蜜龙 Zimilong |
| 12 | 红宝龙 Hongbaolong | 26 | 石火泉 Shihuoquan | 40 | 紫肉 Zirou |
| 13 | 红皮 Hongpi | 27 | 双色 Shuangse | 41 | 紫肉1号 Zirou No.1 |
| 14 | 红肉 Hongrou | 28 | 台湾红肉 Taiwanhongrou | 42 | 紫肉2号 Zirou No.2 |

1.2 试剂和仪器 用 Tris-MgCl₂ 解离缓冲液作为处理流式细胞样品的处理液,解离缓冲液所需试剂的配制方法如下。1) 1 mol·L⁻¹ Tris-HCl 的制备:称取 120.11 g Tris,加浓盐酸充分搅拌调节 pH 至 8.0,双蒸水定容至 1 000 mL,灭菌,温室保存。2) 1 mol·L⁻¹ MgCl₂ 的制备:称取 1.9 g MgCl₂,溶于 20 mL 双蒸水中,充分搅拌,室温下保存。

将 1 mol·L⁻¹ Tris-HCl(200 mmol·L⁻¹), 1 mol·L⁻¹ MgCl₂(4 mmol·L⁻¹), TritonX-100(0.5%)按含量混合,使用 1 mol·L⁻¹ 的 HCl 将解离缓冲液调节 pH 至 7.5,用 0.22 μm 的滤膜进行过滤去除杂菌,放置冰箱 4 °C 保存备用。

采用 Sysmex 公司的 CyFlow Ploidy Analyser 流式细胞仪进行细胞倍性检测。然后用 CyFlow Cube (Sysmex 公司) 软件获取数据,用 FlowJo-V10.6.2 软件进行结果分析。

1.3 茎尖染色体制片方法 (1)取材、预处理:选取健康、幼嫩的火龙果植株茎尖,并利用锋利的刀片去除外围的肉质幼叶,得到火龙果植株的中心茎尖;将解剖得到的火龙果植株茎尖放入 0.2% 的秋水仙素与 0.002 mol·L⁻¹ 的 8-羟基喹啉混合液中,常温下静置 2 h。

(2)前低渗:用蒸馏水清洗 2~3 次后转入 0.075 mol·L⁻¹ 的 KCl 在常温下分别浸泡 1.5、2、2.5 h,以确定适宜的前低渗时间。

(3)前固定:将低渗后的茎尖放入卡诺氏固定液($V_{\text{无水乙醇}}:V_{\text{冰醋酸}}=3:1$)中,置于 4 °C 条件下冷藏固定 12 h 以上。

(4)解离:用蒸馏水清洗 2~3 次,将清洗去除卡诺氏固定液后的茎尖放入 1 mol·L⁻¹ 的 HCl 中,在常温下分别解离 1、1.5、2 h,确定解离时间。

(5)酶解:将解离后的茎尖用蒸馏水清洗 2~

3次,并放入2.5%的纤维素酶和果胶酶混合液($m_{\text{纤维素酶}}:m_{\text{果胶酶}}=1:1$)中,在常温下分别处理0.5、1、1.5 h,确定酶解的时间;

(6)后低渗:用蒸馏水清洗2~3次后,放入蒸馏水中分别低渗20、30、40 min,以确定后低渗时间。

(7)后固定:将后低渗的茎尖放入卡诺氏固定液中,在4℃下冷藏固定30 min,固定结束后如不能及时进行制片使用,则将茎尖漂洗之后放入75%的酒精中保存(4℃);

(8)染色、制片、观察:将茎尖置于载玻片上,轻轻切取尖端部位2~3 mm,并用锋利的刀将其尽可能的切碎,之后滴加10%改良苯酚品红颜色液,盖上盖玻片,染色20~40 min。染色结束后,用蒸馏水洗去多余染料,并用滤纸吸去多余液体。压片过程中使用带有橡皮的铅笔轻轻敲击盖玻片,使得茎尖组织和细胞可以均匀的分散在载玻片上,最后使用显微镜进行观察拍照。

1.4 流式细胞检测的方法 (1)以已知二倍体材料‘金都一号’为内参,称取约100 mg的火龙果茎组织,去除表面蜡质层,放入预冷的培养皿中,加入预冷的解离缓冲液2 mL,用锋利的刀片竖直快速一次性切碎,整个过程中待测材料需要完全浸没于解离缓冲液中。(2)吸取培养皿中的解离缓冲液,用300目的过滤网过滤到流式细胞仪上机用的试管中。(3)将流式细胞仪的光源波长调节为532 nm,加入100 μL DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)染液对细胞核DNA进行荧光标记,立即使用流式细胞仪进行样品检测,每个样品检测3次重复。(4)利用FlowJo-V10.6.2软件进行结果分析,以已知基因组大小的火龙果‘金都一号’为参照样本,计算待测样品的基因组大小(待测样品基因组大小等于参照样本基因组大小乘以待测样品平均荧光强度除以参照样本平均荧光强度)。

2 结果与分析

2.1 火龙果茎尖染色体制片技术的建立

2.1.1 不同前低渗时间对制片效果的影响 研究发现,染色体周围往往附着比较多的细胞质,妨碍染色体的充分铺展,因此为了促使染色体可以更好的分散,笔者采用前将材料经过 $0.075 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的KCl的处理,来利用细胞内外渗透压的不同,使细胞经过吸收充分膨胀,从而获得染色体分散更加

良好的细胞。从图1可以看出,茎尖经过前低渗1.5 h后染色体聚集,不易分散;前低渗2 h后,染色体可以很好的分散;经过前低渗2.5 h的处理后,发现低渗时间过长会导致染色体出现损伤。

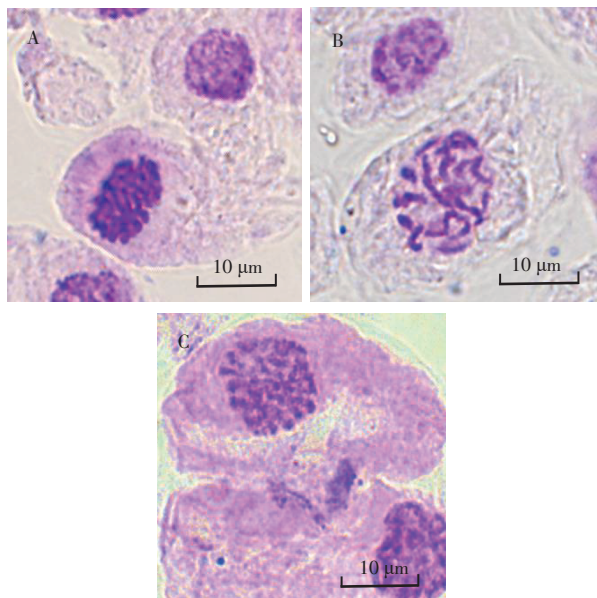


图1 不同前低渗时间对制片效果的影响

Fig. 1 The effects of microscopical preparation by different pre-hypotonic treatment times

A: 1.5 h; B: 2 h; C: 2.5 h.

2.1.2 不同解离时间对制片效果的影响 解离的目的是为了更好的使细胞分离,材料软化易于制片以及单细胞的观察。从图2可知,当解离时间为1 h时,火龙果茎尖细胞解离不充分,在进行制片时细胞难以压散,且容易造成气泡残留,难以进行观察。当解离时间为2 h时,细胞易于分散,但由于解离时间过长,造成细胞破裂或者染色体出现断裂的现象。当解离时间为1.5 h时,细胞易于分散,没有出现重叠的现象,且染色体完好,背景清晰,易于观察和计数,适合用于核型分析。

2.1.3 不同酶解时间对制片效果的影响 观察中发现,火龙果茎尖存在大量果胶,并且火龙果茎尖中心部位属于木质部,细胞壁较厚不易于破除,因此在试验过程中使用纤维素酶和果胶酶混合液对火龙果茎尖进行处理。如图3所示,在酶解时间为0.5 h时,材料趋于硬化,并且存在果胶的残留,对制片过程造成了一定阻碍,且镜检后发现细胞存在重叠,不易于染色体的观察与计数。当酶解1.5 h时,在材料处理过程中容易在成断裂,从而遗失制片所需要的尖端部位,同时经过制片后观察发现,虽

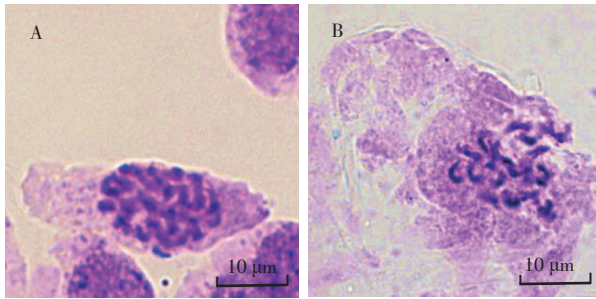


图2 不同解离时间对制片效果的影响

Fig. 2 The effect of microscopical preparation by different dissociation times

A: 1.5 h; B: 2.0 h.

然可以得到单个细胞而且方便观察染色体,但是由于酶解时间过长造成细胞壁溶解消失,无法观测到细胞边界。当酶解时间为1 h时,材料的制备过程中硬度适中不容易断裂,制片时也可以获得分散的细胞,且细胞壁没有破裂的现象,可以更容易分辨出单细胞,适合用于核型分析。

2.1.4 不同后低渗时间对制片效果的影响 后低渗的目的是为了使细胞吸水膨胀,从而使染色体更加的分散,但是为了防止细胞过度吸水,导致细胞涨破,所以仍需要确定后低渗的合适时间。从图4中可以发现,火龙果茎尖经过后低渗20 min,染色体依然存在较为集中,出现缠绕、重叠等现

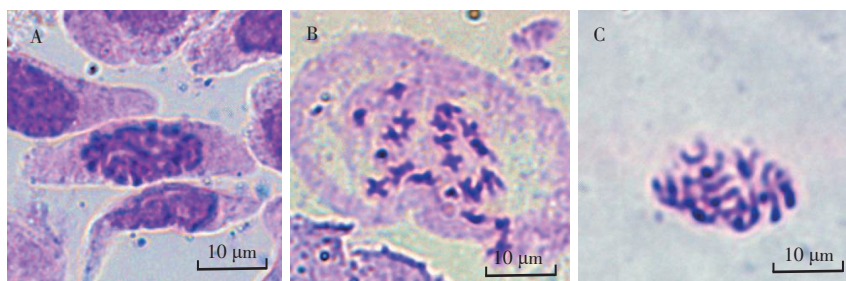


图4 不同后低渗时间对制片效果的影响

Fig. 4 The effect of microscopical preparation by different post-hypotonic treatment times

A: 20 min; B: 30 min; C: 40 min.

2.2 流式细胞检测的取材部位筛选 本实验以已经确定的火龙果二倍体材料‘金都一号’为参照品种材料,对其茎尖、幼嫩茎条、老熟茎条进行检测,选取优质的实验材料。从图5可知,茎尖的流式细胞检测有良好的二倍体单峰。而幼嫩茎条与老熟茎条则有3个峰值,且相对于幼嫩茎条,老熟茎条则有更多的八倍体细胞。同时,在检测过程中发现幼嫩茎条和老熟茎条的杂质较多,导致获得有效的细胞核数降低。

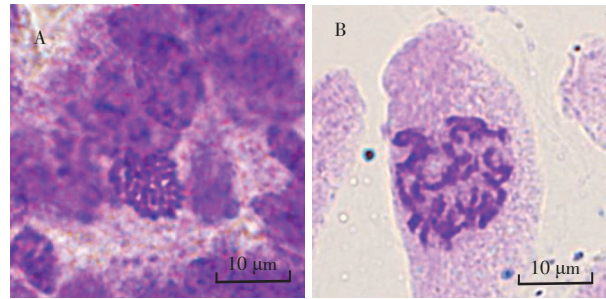


图3 不同酶解时间对制片效果的影响

Fig. 3 The effect of microscopical preparation by different enzymatic hydrolysis times

A: 0.5 h; B: 1.0 h; C: 1.5 h.

象,对后续的核型分析造成影响。当后低渗时间为40 min时,细胞吸水涨破,容易造成染色体缺失。当后低渗时间为30 min时,染色体分散程度较好,且细胞完整,易于后续的计数与计算,适用于核型分析。

幼嫩茎条和老熟茎条相比,老熟茎条的八倍体细胞对应峰值比四倍体细胞对应峰值高,因此在进行倍性鉴定时,老熟茎条容易造成判断错误。幼嫩茎条的四倍体细胞对应的峰值比二倍体细胞对应的峰值高。在火龙果流式细胞技术的检测上,茎尖最适宜作为试验材料,其次是幼嫩茎条,老熟茎条不适合作为火龙果流式细胞检测材料。

2.3 火龙果倍性的流式细胞检测 以已知的二倍体‘金都一号’($2n=2x=22$)为对照材料,对42份火

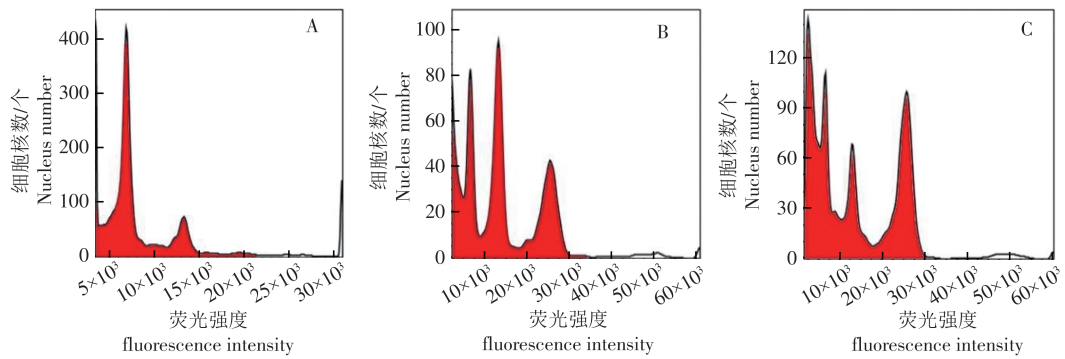


图5 火龙果不同组织部位的流式细胞检测

Fig. 5 Flow cytometry assays for different tissues of pitaya

A: 茎尖; B: 幼嫩茎条; C: 老熟茎条; 横轴是DNA染料DAPI收到波长为532 nm的激光激发所放出的荧光强度。纵轴是细胞核数。

Note: A: young bud tip; B: young stems; C: Old ripe stems; The horizontal axis is the fluorescence intensity emitted by the laser excitation of the DNA dye DAPI with a wavelength of 532 nm. The vertical axis is the number of nuclei.

龙果种质资源进行流式细胞倍性鉴定,测得‘金都一号’染色体的峰值荧光强度为5 121,其具有良好的二倍体单峰;四倍体品种染色体的峰值荧光

强度在2倍的二倍体荧光强度处有较好的单峰,且四倍体品种的DNA相对含量也是二倍体含量的2倍(图6)。

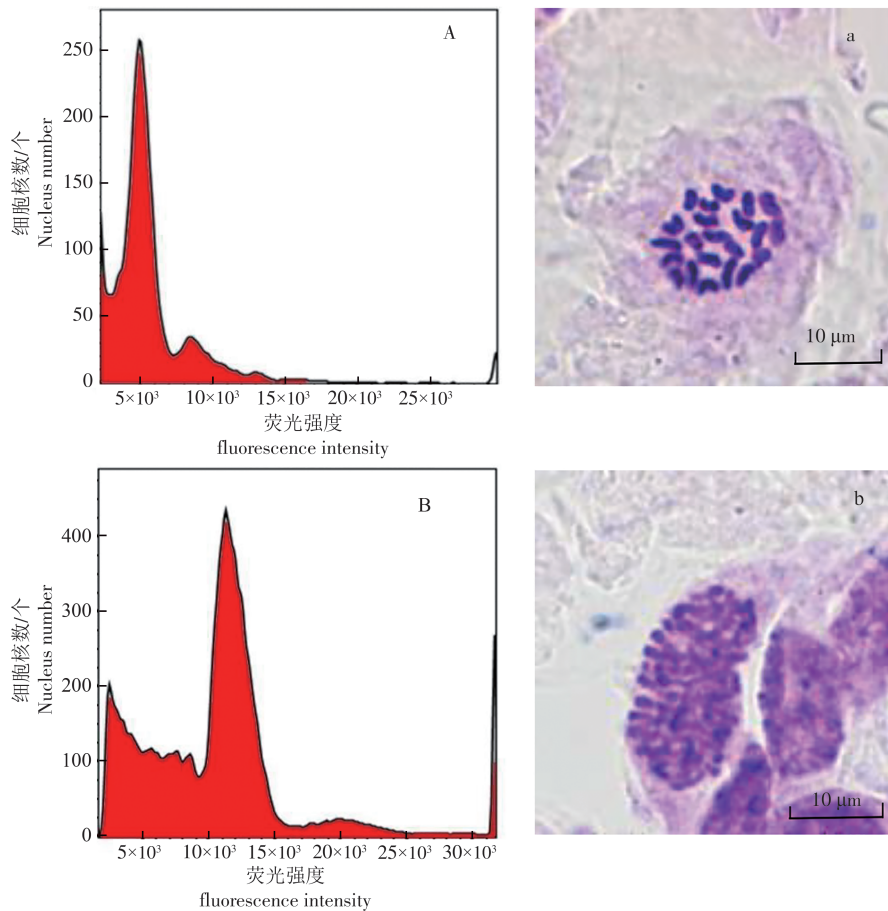


图6 火龙果二倍体与四倍体细胞的对比

Fig. 6 the comparison between diploid and tetraploid cells of pitaya

A、a: 二倍体; B、b: 四倍体。

Note: A, a: Diploid; B, b: Tetraploid

经流式细胞检测收集的42份火龙果种质资源的染色体倍性见表2。其中,有41份荧光强度值在4 219~6 612之间,呈二倍体荧光强度(0.82~1.29),为二倍体材料;1份荧光强度值为10 939,是2.14倍的二倍体的荧光强度值,为四倍体材料。四倍体材料为‘燕窝果’。在42份火龙果种质资源材料中并未发现三倍体材料。

2.4 火龙果材料的基因组大小预估与倍性确定 根据植物基因组的1C值大小,将基因组分成5类。以‘金都一号’为对照,对其余41种火龙果基因组大小

进行预估,发现预估基因组大小在1.15~2.99 Gb之间(表2),预估基因组的平均大小为1.45 Gb,其中有15份火龙果种质资源的1C \leq 1.34 Gb,属于极小型基因组;其余27份火龙果种质资源的1C值在1.35 Gb~3.34 Gb之间,属于小型基因组。42份火龙果种质资源的预估基因组大小主要集中在1.35~3.34 Gb之间,其次在1.15~1.34 Gb之间,并未发现其他种类的基因组,其中‘蜜宝’的基因组最小,仅有1.15 Gb;‘燕窝果’的基因组最大,达到了2.99 Gb。两者的预估基因组大小相差2.6倍。

表2 不同火龙果种质资源的基因组大小、倍性及染色体数目

Tab. 2 The genome size, ploidy and chromosome number of different pitaya germplasm resources

| 品种 Variety name | 染色体数目/条 Chromosome number | 峰值荧光强度 Peak fluorescence intensity | DNA 含量/% DNA content/% | 预估基因组大小(1C)/Gb Genome size/Gb | 倍性 Ploidy |
|--------------------------|------------------------------|--|---------------------------|----------------------------------|--------------|
| 金都一号 Jindu No.1 | 2n=2x=22 | 5 121 | 100.00 | 1.40 | 二倍体 2X |
| 澳洲黄龙 Aozhouhuanglong | 2n=2x=22 | 5 097 | 99.53 | 1.39 | 二倍体 2X |
| 白肉 Bairou | 2n=2x=22 | 5 313 | 103.75 | 1.45 | 二倍体 2X |
| 白水晶 Baishuijing | 2n=2x=22 | 6 035 | 117.85 | 1.65 | 二倍体 2X |
| 粗砂 Cusha | 2n=2x=22 | 5 121 | 100.00 | 1.40 | 二倍体 2X |
| 大红 Dahong | 2n=2x=22 | 5 205 | 101.64 | 1.42 | 二倍体 2X |
| 帝龙 Dilong | 2n=2x=22 | 4 712 | 92.01 | 1.29 | 二倍体 2X |
| 富贵红 450 Fuguihong450 | 2n=2x=22 | 5 109 | 99.77 | 1.40 | 二倍体 2X |
| 光明白肉 Guangmingbairou | 2n=2x=22 | 4 941 | 96.49 | 1.35 | 二倍体 2X |
| 光明红肉 Guangminghongrou | 2n=2x=22 | 4 496 | 87.80 | 1.23 | 二倍体 2X |
| 广西 450 Guangxi 450 | 2n=2x=22 | 4 784 | 93.42 | 1.31 | 二倍体 2X |
| 桂红龙 Guihonglong | 2n=2x=22 | 4 340 | 84.75 | 1.19 | 二倍体 2X |
| 红宝龙 Hongbaolong | 2n=2x=22 | 5 409 | 105.62 | 1.48 | 二倍体 2X |
| 红皮 Hongpi | 2n=2x=22 | 6 311 | 123.24 | 1.73 | 二倍体 2X |
| 红肉 Hongrou | 2n=2x=22 | 5 025 | 98.13 | 1.37 | 二倍体 2X |
| 红水晶 Hongshuijing | 2n=2x=22 | 4 592 | 89.67 | 1.26 | 二倍体 2X |

续表2 Tab. 2 Continued

| 品种 Variety name | 染色体数目/条 Chromosome number | 峰值荧光强度 Peak fluorescence intensity | DNA 含量/% DNA content/% | 预估基因组大小(1C)/Gb Genome size/Gb | 倍性 Ploidy |
|----------------------------|------------------------------|--|---------------------------|----------------------------------|--------------|
| 黄皮 Huangpi | $2n=2x=22$ | 4 484 | 87.56 | 1.23 | 二倍体 2X |
| 玫瑰 1 号 Meigui No.1 | $2n=2x=22$ | 5 349 | 104.45 | 1.46 | 二倍体 2X |
| 玫红 4 号 Meihong No.4 | $2n=2x=22$ | 4 520 | 88.26 | 1.24 | 二倍体 2X |
| 美龙 Meilong | $2n=2x=22$ | 5 506 | 107.52 | 1.51 | 二倍体 2X |
| 美龙 3 号 Meilong No.3 | $2n=2x=22$ | 6 107 | 119.25 | 1.67 | 二倍体 2X |
| 蜜宝 Mibao | $2n=2x=22$ | 4 219 | 82.39 | 1.15 | 二倍体 2X |
| 蜜玄龙 Mixuanlong | $2n=2x=22$ | 5 602 | 109.39 | 1.53 | 二倍体 2X |
| 蔷薇 3 号 Qiangwei No.3 | $2n=2x=22$ | 4 496 | 87.80 | 1.23 | 二倍体 2X |
| 软枝大红 Ruanzhidahong | $2n=2x=22$ | 4 941 | 96.49 | 1.35 | 二倍体 2X |
| 石火泉 Shihuoquan | $2n=2x=22$ | 4 748 | 92.72 | 1.30 | 二倍体 2X |
| 双色 Shuangse | $2n=2x=22$ | 5 397 | 105.39 | 1.48 | 二倍体 2X |
| 台湾红肉 Taiwanhongrou | $2n=2x=22$ | 4 832 | 94.36 | 1.32 | 二倍体 2X |
| 偷心 6 号 Touxin No.6 | $2n=2x=22$ | 5 277 | 103.05 | 1.44 | 二倍体 2X |
| 陀 2 Tuo No.2 | $2n=2x=22$ | 4 905 | 95.78 | 1.34 | 二倍体 2X |
| 陀红肉小果 Tuohongrouxiaoguo | $2n=2x=22$ | 6 503 | 126.99 | 1.78 | 二倍体 2X |
| 无刺红龙 Wucihonglong | $2n=2x=22$ | 5 854 | 114.31 | 1.60 | 二倍体 2X |
| 无刺黄龙 Wucihuanglong | $2n=2x=22$ | 5 446 | 106.35 | 1.49 | 二倍体 2X |
| 细致 Xizhi | $2n=2x=22$ | 6 612 | 129.12 | 1.81 | 二倍体 2X |
| 香蜜龙 Xiangmilong | $2n=2x=22$ | 5 446 | 106.35 | 1.49 | 二倍体 2X |
| 小圆果 Xiaoyuanguo | $2n=2x=22$ | 4 484 | 87.56 | 1.23 | 二倍体 2X |
| 燕窝果 Yanwoguo | $2n=4x=44$ | 10 939 | 213.61 | 2.99 | 四倍体 4X |
| 越南白肉 Yuenanbairou | $2n=2x=22$ | 4 496 | 87.80 | 1.23 | 二倍体 2X |
| 紫蜜龙 Zimilong | $2n=2x=22$ | 6 503 | 126.99 | 1.78 | 二倍体 2X |
| 紫肉 Zirou | $2n=2x=22$ | 5 217 | 101.87 | 1.43 | 二倍体 2X |

续表2 Tab. 2 Continued

| 品种 Variety name | 染色体数目/条 Chromosome number | 峰值荧光强度 Peak fluorescence intensity | DNA 含量/% DNA content/% | 预估基因组大小(1C)/Gb Genome size/Gb | 倍性 Ploidy |
|--------------------|------------------------------|--|---------------------------|----------------------------------|--------------|
| 紫肉2号 Zirou No.1 | $2n=2x=22$ | 5 049 | 105.62 | 1.48 | 二倍体2X |
| 紫色1号 Zirou No.2 | $2n=2x=22$ | 4 340 | 84.75 | 1.19 | 二倍体2X |

注:‘金都一号’为对照。

Note: ‘Jindu-1’ was selected as control.

3 讨论

在对火龙果染色体制片材料的选择中发现火龙果根系多为须根系,根系较细且木质化严重,不易切割制片;火龙果枝条的气生根相对较粗且质地柔软,方便制片,但火龙果气生根并没有稳定的催生技术,获取不易。本研究为建立方便、快捷、稳定的火龙果制片技术体系,以火龙果茎尖为材料进行火龙果染色体制片。本研究发现,火龙果茎尖染色体制片在前低渗时间为2 h;解离时间为1.5 h;酶解时间为1 h;后低渗时间为30 min时,染色体分散程度较好,背景清晰,没有出现重叠的现象,具有完整的细胞。

流式细胞技术在植物倍性鉴定方面具有操作简单、效率高、结果准确的特点^[13]。为了获得准确的倍性鉴定结果,样品的选择是其中的关键。本试验对火龙果流式细胞检测的材料进行筛选比较,发现幼芽茎尖具有较好的二倍体荧光图像。幼嫩茎条与老熟茎条都存有较多的杂峰,且细胞核数显著降低,存在较多的四倍体细胞和八倍体细胞,影响流式细胞检测的准确性。

在种质资源评价中,染色体的倍性鉴定是其中重要的环节,染色体的倍性鉴定对新品种选育及品种资源的科学利用具有重要意义^[14]。本研究利用染色体制片技术和流式细胞技术,同时对42份火龙果种质资源进行倍性鉴定,取得一致性的研究结果,其中41份种质资源为二倍体($2n=2x=22$)材料,1份四倍体($2n=4x=44$)材料,未发现三倍体种质资源。42份火龙果种质资源中仅有1份四倍体材料,预估基因组大小为‘燕窝果’(2.99 Gb)。所有二倍体材料中‘细致’的预估基因组最大,

大小为1.81 Gb;‘蜜宝’的预估基因组最小,为1.15 Gb。

随着火龙果产业的发展,火龙果优质新品种的选育显得尤为重要。本研究利用茎尖染色体制片技术和流式细胞技术,对42份火龙果种质资源进行倍性鉴定以及基因组大小研究,既能为培育优质火龙果品种和开展人工授粉杂交、转基因等工作提供参考,也能为火龙果的全基因组测序以及细胞遗传学研究提供依据。

参考文献:

- [1] 吴征镒. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社, 1999.
- [2] MIZRAHI Y, NERD A, NOBE P S. Cacti as crops[J]. Horticultural reviews, 1997, 18: 291-391.
- [3] HERBACH K M, ROHE M, STINTZING F C, et al. Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*[Weber]Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives[J]. Food Research International, 2006, 39(6): 667-677.
- [4] 黄黎芳, 武志江, 梁桂东, 等. 利用流式细胞术对29份火龙果种质染色体的倍性鉴定[J]. 热带作物学报, 2021, 42(4): 966-970.
- [5] 刘顺枝, 刘政浩, 林润怡, 等. 白肉火龙果染色体制片技术及核型分析[J]. 广东农业科学, 2015, 42(3): 115-118.
- [6] 刘顺枝, 周浩彬, 林润怡, 等. 红肉火龙果气生根染色体制片优化及核型分析[J]. 北方园艺, 2015(12): 71-76.
- [7] SOLTIS D E, SOLTIS P S, BENNETT M D, et al. Evolution of genome size in the angiosperms[J]. American Journal of Botany, 2003, 90(11): 1596-1603.
- [8] 宋云连, 张惠云, 王跃全, 等. 流式细胞术应用及植物种质资源倍性研究进展[J]. 陕西农业科学, 2020, 66(8): 76-80.
- [9] 周历萍, 王淑珍, 阮松林, 等. 草莓流式细胞检测提取方法的优化[J]. 浙江农业学报, 2015, 27(11): 2024-2028.
- [10] 叶天文, 袁德义, 李艳民, 等. 海南油茶的倍性鉴定[J]. 林业科学, 2021, 57(7): 61-69.
- [11] 熊文艳, 普冉, 刘云礼, 等. 基于流式细胞术对27种石

- 解的倍性鉴定和基因组大小分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(11): 2249–2257.
- [12] 刘振盼. 利用流式细胞术鉴定软枣猕猴桃倍性的方法[J]. 辽宁林业科技, 2021(2): 23–25.
- [13] 杨丽, 孙浩元, 张俊环, 等. 利用流式细胞术鉴定杏及其部分近缘植物的倍性[J]. 西北农业学报, 2021, 30(10): 1504–1513.
- [14] 裴丹, 葛孟清, 董天宇, 等. 208 个葡萄品种染色体倍性的流式细胞分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2019(5): 21–28.

Ploidy identification and genome size analysis of 42 Pitaya germplasm resources

DING Yi¹, WANG Zhouwen¹, KANG Shaoling¹, JIANG Senrong¹, WANG Meng¹,
HUANG Jiaquan^{1,2}, LI Hongli³, HU Wenbin³, TANG Hua^{1,2}

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228; 2. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya, Hainan 572025; 3. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571700, China)

Abstract: In order to meet the needs of development of pitaya industry, it is necessary to develop numerous commercial varieties of pitaya with high yield and high quality through breeding and selection. The main way for pitaya breeding is to collect and evaluate pitaya germplasm resources for cross-breeding. Pitaya germplasm is diverse, and its genetic ploidy is unknown. The ploidy identification is indispensable to breeding innovation. Forty two accessions of pitaya germplasm were collected and their ploidy was identified by stem tip chromosome preparation technique and flow cytometry. When the current hypotonic time is 2 h, the dissociation time is 1.5 h, the enzymatic hydrolysis time is 1 h, and the post-hypotonic time is 30 min, the cells prepared are intact with good chromosome dispersion and clear background and without overlapping. The ploidy of the pitaya stem tip is stable, and the stem tip is the most reliable material for chromosome determination. The mature stems contain a large number of tetraploid and octaploid cells, and are hence not suitable for ploidy identification. Among the 42 accessions of pitaya germplasm there are 41 accessions diploid, 1 tetraploid and no triploid. The genome size was estimated with accession ‘Jindu No.1’ as a reference. It was found that 15 accessions of pitaya germplasm were very small in genome size with the 1C-value (1C) being ≤ 1.34 Gb while 27 accessions of pitaya germplasm were small in genome size with the 1C being in the range of 1.35 Gb–3.34 Gb. The identification of the ploidy of 42 accessions of pitaya germplasm might provide some reference for parent selection in pitaya cross breeding.

Keywords: pitaya; germplasm resources; chromosome preparation technique; flow cytometry; genetic ploidy; genome size

(责任编辑:潘学峰)