

基于流式细胞术和 K-mer 分析的银缕梅属 (*Parrotia* C. A. Mey.) 植物基因组大小测定

张云燕¹, 安宇¹, 林峰², 马秋月³, 周翔宇⁴, 金亮⁵, 李朋富¹, 王中生¹

(¹南京大学生命科学学院, 南京 210023; ²南京林业大学现代分析测试中心, 南京 210037; ³江苏省农业科学院休闲农业研究所, 南京 210014;
⁴上海辰山植物园, 上海 201602; ⁵浙江省园林植物与花卉研究所, 杭州 311251)

摘要: 金缕梅科 (Hamamelidaceae) 银缕梅属 (*Parrotia* C. A. Mey.) 仅包含银缕梅 (*Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei) 和波斯铁木 (*Parrotia persica* (DC.) C. A. Mey.) 两种落叶阔叶乔木, 其中银缕梅是我国华东地区特有的 I 级濒危珍稀保护植物, 属东亚第三纪孑遗成分; 其姊妹种波斯铁木则间断分布于伊朗北部, 属北极第三纪孑遗植物类群。本研究首次利用流式细胞术和 K-mer 分析方法对银缕梅属两姊妹种的基因组大小进行了测定, 建立和优化了以萝卜 (*Raphanus sativus* L. 'Saxa') 为内标、WPB (Woody plant buffer) 为细胞核解离液的两种植物单倍体基因组的 DNA 含量 (DNA C 值) 流式测定的适宜体系, 旨在为金缕梅科银缕梅属植物的全基因组测序、基因组学研究、种质资源开发和利用以及物种保育等提供前期基础数据参考; 同时也可作为金缕梅科其他属、种的基因组大小测定提供借鉴。主要研究结果如下: (1) 通过流式测定银缕梅基因组大小约为 971.45 ± 13.91 Mb, 波斯铁木基因组大小约为 890.52 ± 24.69 Mb; (2) K-mer 分析估测银缕梅基因组大小为 951.70 Mb, 杂合率为 1.740%, 重复序列比例为 77.50%; 波斯铁木基因组大小为 858.50 Mb, 杂合率为 0.695%, 重复序列占 74.30%; (3) 银缕梅属于高杂合和高重复基因组, 波斯铁木则属于低杂合和高重复基因组。本研究的结果为银缕梅属植物后续基于 DNA 三代高通量测序技术的全基因组测序、组装及去冗余处理等工作提供了重要的数据参考。

关键词: 银缕梅; 波斯铁木; 基因组大小; 流式细胞术; K-mer 分析; 基因组去冗余

Estimation of Genome Size of *Parrotia* C. A. Mey. by Flow Cytometry and K-mer Analysis

ZHANG Yun-yan¹, AN Yu¹, LIN Feng², MA Qiu-yue³, ZHOU Xiang-yu⁴,
JIN Liang⁵, LI Peng-fu¹, WANG Zhong-sheng¹

(¹College of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210023; ²Advanced Analysis and Testing Center, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037; ³Institute of Leisure Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014;
⁴Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602; ⁵Zhejiang Institute of Landscape Plants and Flowers, Hangzhou 311251)

Abstract: The genus *Parrotia* C. A. Meyer (Hamamelidaceae) contains just two extant deciduous broad-leaved trees, *Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei and *P. persica* (DC.) C. A. Mey. *P. subaequalis*, classified as 'Grade I Key Protected Wild Plant', is native to eastern China and belongs to East Asian Tertiary relics. Its sibling species, *P. persica*, is a member of Arctic tertiary relict plant group and disjunct distributed in northern Iran. In this study, we firstly estimated the genome size of two sister species of *Parrotia* using flow cytometry and K-mer analysis, as well as established and optimized a suitable system for flow cytometric determination of DNA C value of these two plants selecting *Raphanus sativus* L. 'Saxa' as internal standard and WPB (Woody plant buffer) as nuclear dissociation solution. Our present research aims to provide

收稿日期: 2020-07-05 修回日期: 2020-08-18 网络出版日期: 2020-09-02

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20200705002>

第一作者研究方向为濒危孑遗植物的进化生态学与保护基因组学, E-mail: zyyju@smail.nju.edu.cn

通信作者: 李朋富, 研究方向为植物生理生态和保护生物学, E-mail: pengfuli@nju.edu.cn

王中生, 研究方向为植物分子生态与景观基因组学, E-mail: wangzs@nju.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFA0605104)

Foundation project: The State Key Basic Research and Development Plan of China (2017YFA0605104)

a fundamental guidance for whole genome sequencing, genomics research, germplasm resource development and utilization, and species conservation of *Parrotia* in Witch Hazel family and set an important example for the estimation of the genome size of other genera and species of Hamamelidaceae. The main findings are as follows: (1) measurement results of the flow cytometry showed that the estimated genome size of *P. subaequalis* and *P. persica* was 971.45 ± 13.91 Mb and 890.52 ± 24.69 Mb, respectively. (2) K-mer analysis estimated that the genome size of *P. subaequalis* was about 951.70 Mb, the hybridity rate was about 1.740%, and the proportion of repeated sequences was about 77.50%, while for *P. persica*, the genome size, hybridity rate and the percentage of repeated sequences was 858.50 Mb, 0.695% and 74.30%, respectively. (3) The genome of *P. subaequalis* is classified as a highly heterozygous and highly repeated genome, while *P. persica* genome is a slightly heterozygous and highly repeated genome. Accordingly, the results of this study provide an important database reference for the follow-up work of whole-genome sequencing, assembly and de-redundancy processing of *Parrotia* based on DNA third-generation high-throughput sequencing technology.

Key words: *Parrotia subaequalis*; *Parrotia persica*; genome size; flow cytometry; K-mer analysis; genome de-redundancy

银缕梅属 (*Parrotia* C. A. Meyer) 是隶属于虎耳草目 (Saxifragales) 金缕梅科 (Hamamelidaceae) 的落叶阔叶乔木, 该属仅包含银缕梅 (*Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei) 和波斯铁木 (*Parrotia persica* (DC.) C. A. Mey.) 2 个姊妹种。其中银缕梅是我国特有的第三纪孑遗植物, 被列为我国 I 级濒危珍稀重点保护野生植物, 并被国际自然保护联盟 (IUCN, international union for conservation of nature) 列为“极危” (CR, critically endangered) 物种^[1]; 近年来又被收录在我国极小种群 (狭域分布) 保护物种数据库中 (ISCREP, information system of Chinese rare and endangered plants)。目前银缕梅野生种群零星分布于我国安徽、江苏、浙江和河南等省份; 而波斯铁木则分布于伊朗北部及里海南岸的赫卡尼亚 (Hyrcanian) 森林, 该森林包含了许多北极第三纪 (Arcto-Tertiary) 古地质时期的孑遗植物类群, 被认为是最接近上新世到更新世期间欧洲古森林生境的遗存地^[2-4]。银缕梅属植物典型的间断分布格局对于研究欧亚地区古气候、古地理的变化, 以及古植物区系的变迁等均具有重要的科研价值。此外, 作为金缕梅科无花瓣类群的代表属之一, 也是该科系统发育及花性状演化研究的重要材料^[5]。银缕梅和波斯铁木是著名的彩叶树种, 且树形独特, 树皮具斑块状花纹, 盛花后花丝下垂如“银丝缕缕”, 极具观赏价值, 常作为园林景观树种, 亦是优良的盆景树种; 波斯铁木已广泛栽培于北美、欧洲和东亚等地^[2-3]。银缕梅和波斯铁木心材纹理致密, 坚硬异常, 均是上等家具及工艺品用材; 其中银缕梅茎皮中还含有红景

天、甾元等药用化学成分, 具有潜在的药用价值^[6]。同时银缕梅和波斯铁木根系发达, 多生长于石质瘠薄斜坡及山地沟谷溪流边, 逆境耐受性较强, 是研究植物生理生态及抗逆性的目标物种^[3, 7]。目前对银缕梅属 2 个孑遗种的研究多集中在种质资源调查、光合生理生态、繁育生物学及种群遗传学等方面^[2-3, 7-10], 但对于银缕梅属植物基因组大小的相关研究还未见报道。

基因组大小 (又称 DNA C 值) 是指一个物种单倍体核的 DNA 含量, 一般用质量 (pg, pictogram) 或碱基对数目 (Mb, million base pair) 来表示, 1 pg 相当于 978 Mb^[11-13]。基因组大小是物种最基础的基因多样性特征参数, 对于物种全基因组测序、遗传资源发掘利用以及系统进化、生态适应性等方面的研究具有重要参考价值^[11-13]。目前基因组大小测定方法主要包括基因组调查测序法 (GSS, genomic survey sequencing)、孚耳根微显影 (Feulgen microdensitometry) 以及流式细胞术 (FCM, flow cytometry)^[12, 14]。

近年来 DNA 高通量测序 (High-throughput sequencing) 技术的快速发展使得大量非模式木本植物, 如无油樟 (*Amborella trichopoda* Baill.)^[15]、簸箕柳 (*Salix suchowensis* Cheng)^[16]、银杏 (*Ginkgo biloba* L.)^[17] 和鹅掌楸 (*Liriodendron chinensis* (Hemsl.) Sarg.)^[18] 等的全基因组测序工作得以开展, 其中基于 k-mer 分析的基因组调查测序法已成为在开展全基因组测序工作之前, 对目标物种基因组大小、杂合度、重复序列等特征信息进行预测和评估, 进而为后续测序策略选择提供基础数

据参考的重要方法^[19-20]。同时流式细胞术由于具有操作简单快捷、分辨率和准确率高等优点也被广泛运用于不同生物基因组大小的测定^[11-12], 如五节芒 (*Miscanthus floridulus* (Lab.) Warb. ex Schum. et Laut.)^[21]、新疆沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex Kom.) Cheng f.)^[22]、秋海棠 (*Begonia grandis* Dryand.)^[14]、翅果油树 (*Elaeagnus mollis* Diels.)^[23]、鸢尾属 (*Iris* L.)^[24]及槭属 (*Acer* Linn.)^[25]等。

植物 DNA C 值数据库 (<https://cvalues.science.kew.org/>) 中至今只收录有 3 属共 5 种金缕梅科植物的基因组大小数据, 它们 DNA 1C 值的大小依次为: 中华蚊母树 (*Distylium chinense* (Franch. ex Hemsl.) Diels.) 0.57 pg^[26]、北美金缕梅 (*Hamamelis virginiana* L.) 0.59 pg^[27]、杨梅叶蚊母树 (*Distylium myricoides* Hemsl.) 1.06 pg、*Corylopsis gotoana* Makino 1.97 pg 和蜡瓣花 (*Corylopsis sinensis* Hemsl.) 2.31 pg^[28]。本研究首次利用流式细胞术和 K-mer 分析方法对银缕梅和波斯铁木的基因组大小进行测定, 拟为后续基于 DNA 三代高通量测序技术的银缕梅属植物全基因组测序、组装及去冗余处理等工作提供数据参考; 同时也为金缕梅科其他属、种的基因组大小测定提供数据比较。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用于基因组大小流式测定和 K-mer 分析的银缕梅个体 (YLM) 采自江苏省宜兴市善卷洞风景区 (31°18.0581' N, 119°40.0364' E); 波斯铁木的受试个体 (BSTM) 采自上海市辰山植物园 (31°05.0334' N, 121°10.3072' E)。二者凭证标本均存放在南京大学植物标本室, 凭证号分别为: YLMZYY20190408、BSTMZYY20190410。用作流式测定内标植物的萝卜种子由捷克共和国科学院植物研究所的 Jaroslav Doležal 教授惠赠, 并于上海市辰山植物园科研苗圃播种并采样。上述植株均为二倍体 (银缕梅属: $2n = 2x = 24$; 萝卜: $2n = 2x = 18$)^[29-31], 且后续实验材料均选取其新鲜幼嫩叶片。

1.2 流式细胞术试验方法

1.2.1 筛选最佳细胞核解离液与配制荧光染料 为获得适合银缕梅和波斯铁木流式测定的最佳细胞核解离液, 分别逐一尝试 Galbraith's buffer^[32]、GPB^[33] (General purpose buffer)、LB01 buffer^[34]、MgSO₄ buffer^[35]、Otto's buffers^[36]、Tris-MgCl₂

buffer^[37]、WPB^[33] (Woody plant buffer) 等多种解离液。实验过程中所用的荧光染料是经稀释后浓度为 250 μg/mL 的碘化丙啶 (PI, propidium iodide) 溶液, 配制好后避光保存于 4 °C 冰箱中。

1.2.2 制备细胞核悬液与 DNA 特异性染色 对上述受试的银缕梅和波斯铁木植株体, 分别称取 3 份新鲜幼嫩叶片, 每份约 1 g, 放置于加有 1.5 mL 预冷解离液的培养皿中, 并用锋利的刀片迅速将叶片切碎。吸取培养皿中的解离液经孔径为 37 μm 的滤膜进行过滤后置于 1 mL EP 管中, 并将其放置在冰上孵育 5 min。离心 5 min (1000 r/min) 后弃掉上清液, 收集沉淀的细胞, 再加入 150 μL 预冷的解离液, 振荡混匀后制成细胞核悬液, 置于冰上备用。吸取 150 μL 上述细胞核和解离液的混合液至新的 1 mL EP 管中, 再加入 100 μL (250 μg/mL) PI 荧光染料, 使其在细胞核混合待测液 (总体积为 250 μL) 中的终浓度达到 100 μg/mL; 最后加入 1 μL (10 μg/mL) 60 °C 预热的核糖核酸酶 (RNase); 混匀后置于 4 °C 冰箱避光染色 15 min 后上机进行检测^[21, 23-25]。对照样品萝卜的处理方法同上, 且用于流式测定的细胞核悬液是待测样品和对照样品的等比例混合液。

1.2.3 基因组大小的流式测定与计算 本试验采用内标法进行待测样品基因组大小的流式测定。测定前, 先提前 30 min 预热 BD InfluxTM (Becton Dickinson & Company, New Jersey, USA) 流式细胞仪。测定时, 先分别单独上机检测萝卜、银缕梅和波斯铁木的细胞核悬液, 初步确定它们各自的荧光强度范围; 采用 488 nm 的蓝光激发, 收集 FL2 通道 (670/30) 的荧光, 检测 PI 发射的荧光强度。由于 PI 荧光染料能够均匀插入到 DNA 双链中, 其嵌入量与细胞核 DNA 含量成正比, 因此可通过所测得的荧光强度来表示 DNA 的相对含量。检测过程中, 对每个测试样品低速收集至少 10000 个颗粒。

使用 BD InfluxTM 流式细胞仪自带的软件 FACSTM Software 1.0.0.650 对测定结果进行分析、统计和制图, 每个样品平行测定 3 次, 变异系数 (CV, coefficient of variation) 控制在 5% 以内^[11, 38]。本试验所有的内标峰均为 P1 峰, 待测物种峰为 P2 峰。待测物种 1C 基因组大小 (Mb) = 内标物种 1C 基因组大小 × (待测物种 G₀/G₁ 期峰荧光强度 / 内标物种 G₀/G₁ 期峰荧光强度)^[24, 39]。其中, 已知内标物种萝卜 1C 基因组大小为 543 Mb^[31]。

1.3 K-mer 分析试验方法

1.3.1 基因组 DNA 提取与建库测序 采用改良的 CTAB 法^[40]分别提取银缕梅和波斯铁木新鲜幼嫩叶片的基因组 DNA。对提取出的 DNA 样本进行琼脂糖凝胶电泳来检测其完整性;使用 Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Incorporation, Waltham, USA) 检测其浓度和纯度。对检测合格的 DNA 样品进行插入片段长度分别为 270 bp 和 500 bp 的文库构建,利用 Illumina HiSeq™ Xten 平台对上述文库进行高通量双末端 (PE, paired-end) 测序,测序读长 (reads) 为 150 bp。使用 SOAPnuke v1.6.5 软件^[41]对测序下机的原始数据 (Raw data) 进行质控过滤,即去除序列中的接头 (Adapter) 污染和低质量 reads。最后得到的高质量数据 (clean data) 用于后续的 K-mer 分析。

1.3.2 基因组大小和杂合度评估 基于上述高质量的二代测序数据,利用 K-mer 分析方法来估计银缕梅和波斯铁木的基因组大小、杂合度和重复比例,其中 K-mer 是指从所有测序序列中迭代选取的长度为 k 个碱基的序列。对于一个理想基因组测序数据,即基因组无杂合与重复且测序没有错误与偏差,该数据的 K-mer 频数分布图服从泊松分布。因此统计 K-mer 频数分布,计算获得 K-mer 深度估计值,利用公式:基因组大小 = K-mer 总数 / K-mer 期望深度来估计待测物种的基因组大小。同时计算杂

合峰值与纯合峰值的比值得到基因组的杂合率;计算标准泊松分布和实际数据曲线峰值后的面积差值得到基因组的重复序列比例。这里选取 K 值为 17 来进行预测分析,使用 jellyfish v2.1.4 软件^[42]对 17-mer 数目进行快速统计,17-mer 的频数分布图则使用 GenomeScope 软件^[43]进行拟合。

2 结果与分析

2.1 细胞解离液的筛选结果

在流式细胞术估测基因组大小实验的细胞核悬液制备过程中,特定的解离液能促使植物细胞破碎,细胞器分散,进而解离出细胞核。然而不同解离液对不同植物或同一植物不同部位的解离效果存在较大差异^[11-12, 38]。本研究以萝卜、银缕梅和波斯铁木的新鲜嫩叶为试验材料,基于流式细胞仪的检测结果对 Galbraith's buffer、GPB、LB01 buffer、MgSO₄ buffer、Otto's buffers、Tris-MgCl₂ buffer 和 WPB 共 7 种解离液的解离效果进行逐一评估和比较。结果表明,WPB 对萝卜和银缕梅、萝卜和波斯铁木的混合液解离效果最好。具体表现在二者的细胞核混合悬液经流式细胞仪检测时,从流式散点图来看,待测样品与内标样品的粒子数目最多,且清晰集中 (图 1A、B);此外,WPB 和其他解离液相比,测定结果表现为基本无杂峰和重叠峰,待测植物和内参植物的主峰明显,能够被高度地区分开。同时,在衡

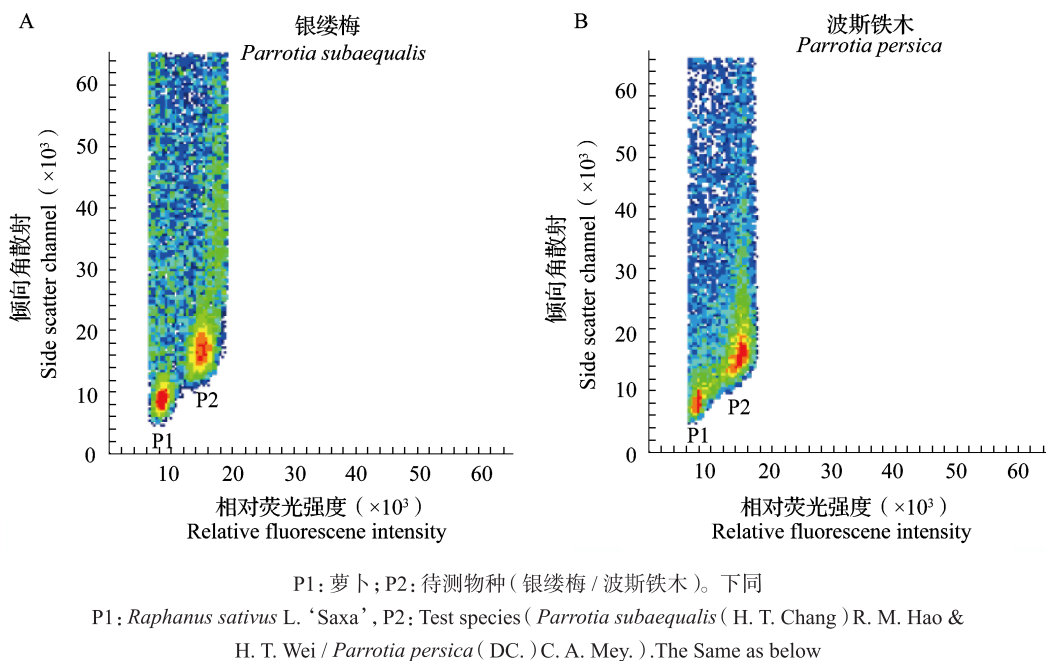


图 1 银缕梅、波斯铁木与萝卜细胞核混合悬液的 G₀/G₁ 期流式散点图

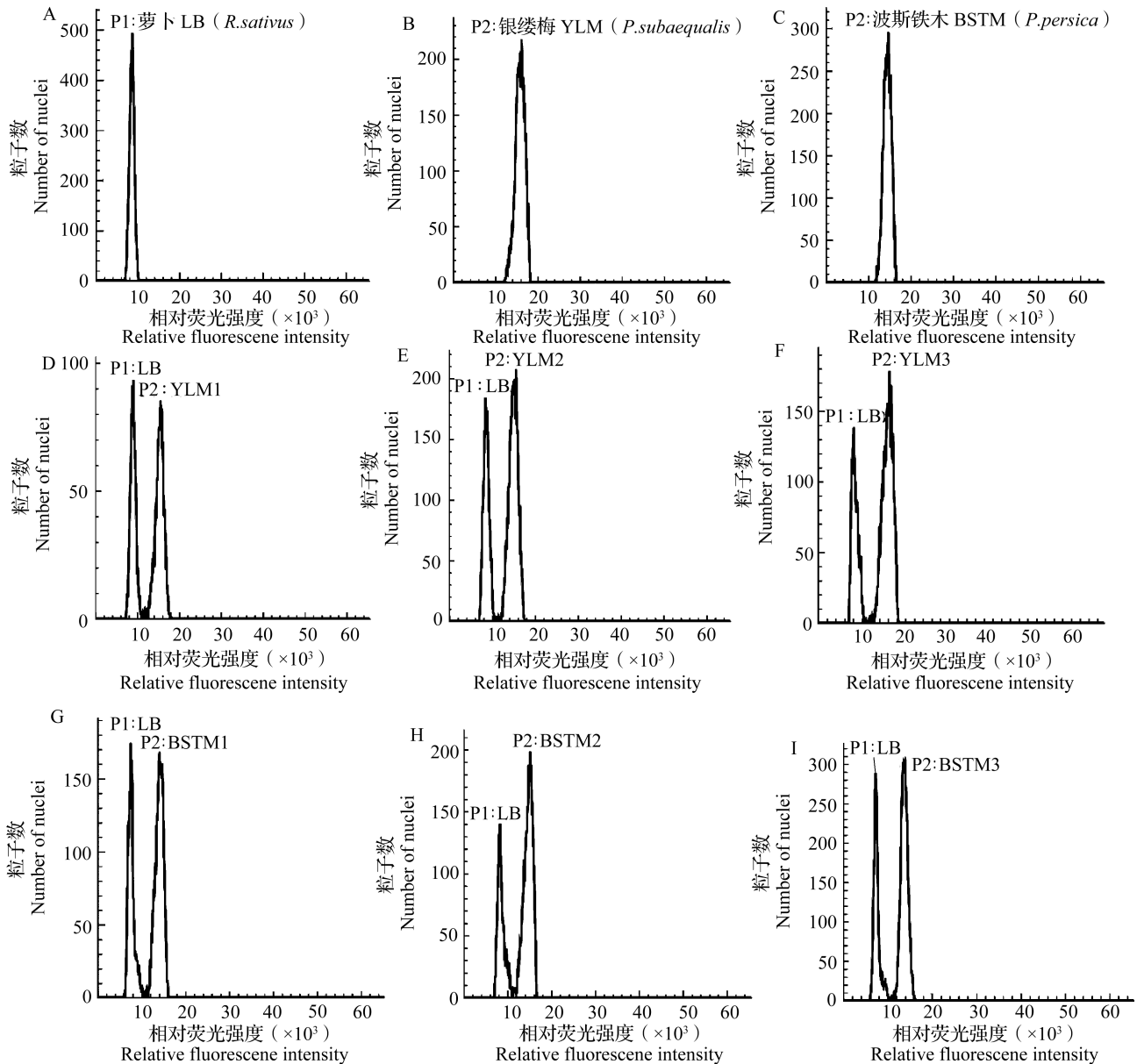
Fig.1 The FCM scatter plots of the mixed cell nucleus suspensions of *Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei, *Parrotia persica* (DC.) C. A. Mey. and *Raphanus sativus* L. 'Saxa' in G₀/G₁ phase

量试验数据的精确度方面,经 WPB 解离后的测定结果比其他解离液的测定结果更加精确,即流式图谱的峰图 *CV* 值均低于 5%。因此,WPB 是本研究中流式测定体系的最佳解离液。

2.2 基因组大小的流式测定结果

对萝卜、银缕梅和波斯铁木的新鲜嫩叶分别进行单独上机检测来确定它们各自的荧光强度范围,如图 2A 所示,萝卜 G_0/G_1 期细胞的荧光强度

在 8500 附近;在机器设置条件一致,即同一检测模板下,银缕梅 G_0/G_1 期细胞的荧光强度在 15000 附近(图 2B),波斯铁木 G_0/G_1 期细胞的荧光强度在 14000 附近(图 2C)。峰图结果显示上述三者的测定峰接近但并无重叠,区分度良好。表明选用基因组大小已知的萝卜作为内标用于计算本研究待测物种基因组大小具有合理性和可行性。



A: 萝卜; B: 银缕梅; C: 波斯铁木; D~F: 萝卜和银缕梅的 3 次重复测定; G~I: 萝卜和波斯铁木的 3 次重复测定

A: *Raphanus sativus* L. 'Saxa', B: *Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei, C: *Parrotia persica* (DC.) C. A. Mey, D~F: 3 repeated estimations of *Raphanus sativus* L. 'Saxa' and *Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei, G~I: 3 repeated estimations of *Raphanus sativus* 'Saxa' and *Parrotia persica* (DC.) C. A. Mey

图 2 萝卜、银缕梅与波斯铁木单独和混合样品的 G_0/G_1 期流式细胞分析结果

Fig.2 C-value measurements of the simple samples and mixed samples of *Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei, *Parrotia persica* (DC.) C. A. Mey. and *Raphanus sativus* L. 'Saxa' in G_0/G_1 phase

根据萝卜 DNA 1C 基因组大小为 543 Mb,采用内标法对萝卜和银缕梅的混合细胞核悬液的 PI 发射荧光强度进行流式测定分析可知:3 次平行测定得到的银缕梅基因组大小分别为:YLM1 为 971.97 Mb, YLM2 为 954.16 Mb, YLM3 为 988.21 Mb; 1C DNA 含量分别为:0.99 pg、0.98 pg 和 1.01 pg(表 1); 流式测定的峰图分别如图 2D、E、F 所示。萝卜和波斯铁木的混合细胞核悬液经流式细胞仪测

定后得到的波斯铁木 3 次平行测定的基因组大小分别为:BSTM1 为 895.95 Mb, BSTM2 为 917.67 Mb, BSTM3 为 857.94 Mb; 1C DNA 含量分别为:0.92 pg、0.94 pg 和 0.88 pg(表 1); 流式测定的峰图分别如图 2G、H、I 所示。综上,基于流式细胞术估测的银缕梅基因组大小为 971.45 ± 13.91 Mb, 波斯铁木基因组大小为 890.52 ± 24.69 Mb(表 1)。

表 1 银缕梅和波斯铁木的基因组大小流式测定结果
Table 1 Estimation results of genome size of *Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei and *P. persica* (DC.) C. A. Mey. by flow cytometry

待测物种编号 Sample codes of test species	样品峰值 Peak value of samples	萝卜峰值 Peak value of <i>Raphanus</i> <i>sativus</i> L. 'Saxa'	比值 Ratio	基因组大小 (Mb) Genome size	1C DNA 含量 (pg) 1C DNA content	基因组大小均值 ± 标准差 (Mb) Mean value ± SD of genome size
YLM1	15444	8651	1.79	971.97	0.99	971.45 ± 13.91
YLM2	14641	8332	1.76	954.16	0.98	
YLM3	15371	8446	1.82	988.21	1.01	
BSTM1	14618	8859	1.65	895.95	0.92	890.52 ± 24.69
BSTM2	15203	8996	1.69	917.67	0.94	
BSTM3	14119	8936	1.58	857.94	0.88	

YLM1~YLM3 分别为银缕梅 3 次重复测定的样品编号; BSTM1~BSTM3 分别为波斯铁木 3 次重复测定的样品编号
YLM1-YLM3 represent the sample codes for 3 repeated estimations of genome size of *Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei respectively, BSTM1-BSTM3 represent the sample codes for 3 repeated estimations of genome size of *P. persica* (DC.) C. A. Mey. respectively

2.3 K-mer 分析预测基因组大小和杂合率

基于 DNA 二代高通量测序平台 Illumina HiSeq™ Xten 分别对银缕梅和波斯铁木测序,银缕梅和波斯铁木的原始下机数据总量分别约为 176.43 Gb 和 142.37 Gb,经质控过滤后的总数据量分别为 148.38 Gb 和 119.93 Gb(表 2)。利用 jellyfish v2.1.4 和 GenomeScope 软件分别对上述 2 个物种的高质量测序数据进行 K-mer 分析(K 值取 17)。通过 2 个物种的 17-mer 频率分布图(图 3)的黑色曲线可以观察到:银缕梅和波斯铁木的 17-mer 期望

深度(图中主峰)分别在 139 和 125 附近。统计二者的 17-mer 总数(表 3),依据公式:基因组大小=K-mer 总数 / K-mer 期望深度,本研究估测出银缕梅和波斯铁木的基因组大小分别约为 951.70 Mb; 和 858.50 Mb。但 2 个物种频谱图的主峰前面 1/2 处均有小峰,说明二者基因组均存在杂合情况;主峰后面均存在拖尾现象说明二者基因组均存在较复杂的基因组重复序列。通过预估,银缕梅的杂合率约为 1.740%,重复序列约占 77.50%;波斯铁木的杂合率约为 0.695%,重复序列约占 74.30%(表 3)。

表 2 银缕梅和波斯铁木基因组的二代测序数据统计
Table 2 Next-generation sequencing data statistics of *Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei and *P. persica* (DC.) C. A. Mey. genome

待测物种 Test species	插入片段长度 (bp) Insert size	测序读长 (bp) Read length	原始数据量 (Gb) Raw data	过滤后数据量 (Gb) Clean data	总原始数据量 (Gb) Total raw data	总过滤后数据量 (Gb) Total clean data
银缕梅 <i>P. subaequalis</i>	270	150	76.41	64.80	176.43	148.38
	500	150	100.02	83.58		
波斯铁木 <i>P. persica</i>	270	150	57.58	48.62	142.37	119.93
	500	150	84.79	71.31		

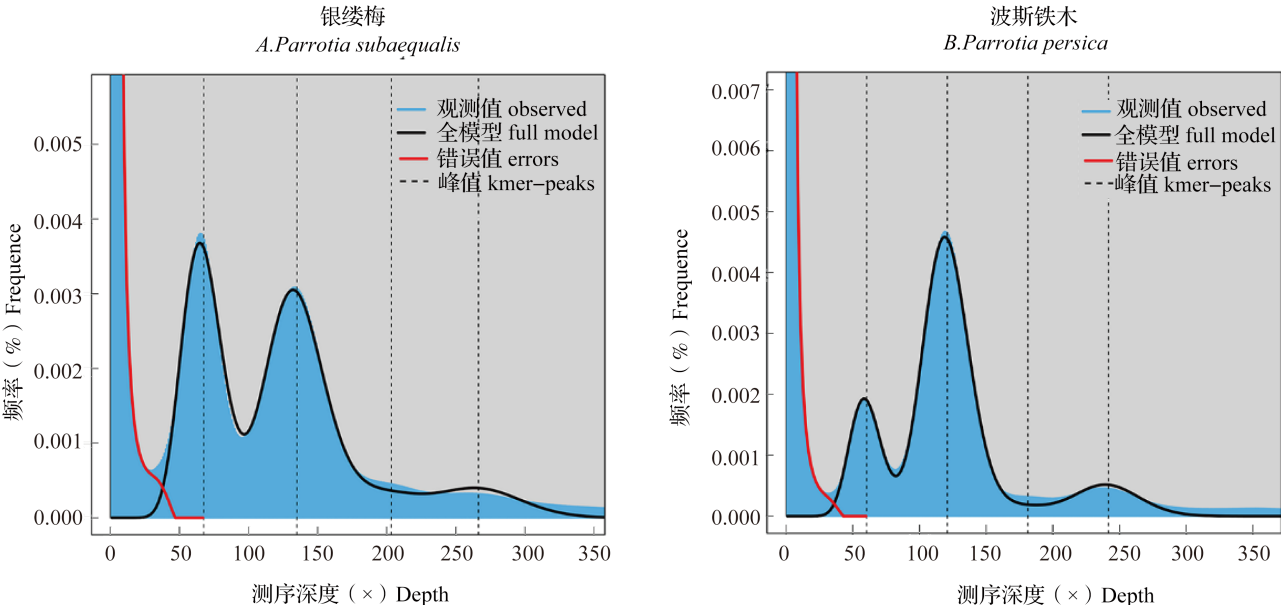


图 3 银缕梅和波斯铁木基因组 17-mer 深度分布曲线
Fig.3 Distribution of 17-mer depth in the genome of *Parrotia subaequalis* (H. T. Chang)
R. M. Hao & H. T. Wei and *P. persica* (DC.) C. A. Mey.

表 3 银缕梅和波斯铁木基因组的 17-mer 分析数据统计
Table 3 The 17-mer analysis statistics of *Parrotia subaequalis* (H. T. Chang) R. M. Hao & H. T. Wei and *P. persica* (DC.)
C. A. Mey. genome

待测物种 Test species	K-mer 数量 (Mb) K-mer number	基因组大小 (Mb) Genome size	重复序列比例 (%) Repeat ratio	杂合率 (%) Heterozygous ratio	所用碱基 (bp) Used bases	测序深度 (×) Sequence depth
银缕梅 <i>P. subaequalis</i>	132, 503, 956, 699	951.70	77.50	1.740	148, 380, 484, 500	155.91
波斯铁木 <i>P. persica</i>	107, 097, 578, 336	858.50	74.30	0.695	119929, 086, 300	139.70

3 讨论

3.1 基因组大小的测定方法比较

基于细胞学研究手段的基因组大小检测方法主要包括孚尔根光密度测量法、实时荧光定量 PCR 技术与流式细胞术等^[22, 25]。本研究首次建立和优化了银缕梅属两姊妹种基因组大小流式测定方法,选择与待测植物组织特异性相匹配的细胞核解离液来制备高质量的细胞核悬浮液是实验成功的关键。本研究通过对 7 种常用解离液的筛选和比较,发现以 WPB 为细胞核解离液时,背景碎片最少,噪音峰与信号峰分离良好, CV 值均在 5% 以内,是适合银缕梅和波斯铁木进行流式测定的最佳细胞核解离液。已报道的中华蚊母树^[26]和北美金缕梅^[27]的 DNA C 值流式测定实验选用 Otto's buffers 作为细胞核解离液效果较好,而杨梅叶蚊母树和 2 种蜡瓣花属^[28]植物则选用 Galbraith's buffer 更适合。说明受不同

解离液各自化学成分差异、植物组织细胞特异性等的影响,不同解离液对不同植物材料的解离效果存在很大差异。因此对于特定的待测植物,应首先通过预实验筛选适合该植物流式测定体系的最佳解离液。

目前利用 Illumina、Solexa、ABI SOLiD 以及 454 等高通量测序平台结合 K-mer 分析的生物信息学方法,已成熟应用于模式或非模式植物的基因组大小估测^[19-20],如新疆沙冬青^[22]、铁皮石斛^[44]、黄瓜^[45]和人参^[46]等。本研究基于 Illumina HiSeq™ Xten 平台,分别对银缕梅和波斯铁木的基因组大小进行了 K-mer 分析,结果显示银缕梅基因组大小约 951.70 Mb,波斯铁木基因组大小约 858.50 Mb。流式测定结果为:银缕梅基因组大小为 971.45 ± 13.91 Mb,波斯铁木基因组大小为 890.52 ± 24.69 Mb。两种方法预测的基因组大小基本一致,但基于流式细胞术的预测结果略大于 K-mer 分析的结果,这一现象与黄瓜^[45]和人参^[46]等植物的基因组大小研究

结果相似。但在新疆沙冬青^[22]和铁皮石斛^[44]等的研究中,流式测定的基因组大小却略小于 K-mer 分析的结果。研究表明流式测定基因组大小的结果会受到植物细胞结构及其次生代谢物的影响^[11,44,46],而基于 K-mer 分析的估测结果在克服了植物内源性物质干扰的同时却受到分析软件本身系统误差等的影响^[45-46]。因此,综合比较和分析 2 种方法的结果是开展植物基因组大小测定工作的合理策略。

3.2 与金缕梅科已测植物基因组大小的比较

植物基因组大小作为生物多样性的特征参数之一,对进化生物学、比较基因组学、生理生态学等各方面的研究都具有重要意义^[11-13,23]。根据 Soltis 等^[47]对被子植物基因组大小的范围界定,物种 DNA 1C 值 ≤ 1.4 pg 为极小基因组,1C 值在 1.4 ~ 3.50 pg 范围内为小基因组。金缕梅科银缕梅属两姊妹种的基因组属于极小基因组,已报道的金缕梅科 3 属 5 种植物的基因组^[26-28]也属于极小或小基因组,与 Soltis 等^[47]发现的核心双子叶植物的主要进化枝(如石竹目、虎耳草目和蔷薇目)及其祖先类群的基因组 1C 值大小均相对较小的研究结果相符。银缕梅属两姊妹种的基因组约是金缕梅属的北美金缕梅基因组大小的 1 倍;2 种蜡瓣花属植物 DNA 1C 值比银缕梅属两姊妹种的基因组大约 1 倍;蚊母树属中的中华蚊母树 1C 值约为银缕梅属的 1/2,而杨梅叶蚊母树的 1C 值大小相近于银缕梅属。大量研究表明不同植物基因组大小差异产生的主要原因是基因组内的非编码 DNA (Non-coding DNA) 序列;基因组多倍化和转座子积累是导致基因组增大的主要动力,而驱动基因组 DNA 丢失的潜在动力则是同源不平等重组和非正规重组^[13,48-51]。但目前关于植物基因组大小与物种进化的关系仍然存在争议,Leitch 等^[51-52]研究表明陆生植物 C 值进化的基本趋势是增大,即越古老的谱系,其基因组可能越小;但 Oliver 等^[53]认为较年轻的谱系其基因组普遍偏小。Soltis 等^[47]的研究指出被子植物及广义的有胚植物的基因组大小演变趋势是动态的,同时具有增大和减小的趋势。陈建军等^[49]则进一步指出植物基因组大小进化方向的总体趋势是增大,而某些基因组本身的“删除机制”,如插入/缺失 (Indel) 偏爱、假基因 (Pseudogenes) 清除等只能削弱这种增大作用但不能逆转。

3.3 银缕梅属全基因组测序的展望

在开展全基因组测序工作之前有必要对目标

物种的基因组大小、杂合度、重复序列等特征信息进行预测和评估,进而为物种后续的全基因组测序工作制定合适的测序策略和方案。本研究联合采用流式细胞术和 K-mer 分析方法,测定了银缕梅属两姊妹种的基因组大小,补充和丰富了金缕梅科植物的 DNA C 值数据库。依据 K-mer 分析预测的杂合度大小通常将基因组划分为微杂合 ($0.5\% \leq$ 杂合率 $< 0.8\%$) 和高杂合 (杂合率 $\geq 0.8\%$) 2 类^[54];且基因组重复序列比例 $\geq 50\%$ 则为高重复基因组^[44,54]。基于本研究中 K-mer 分析的结果:银缕梅属于高杂合和高重复基因组,波斯铁木则属于微杂合和高重复基因组。与其他已测序的木本植物相比较^[15-18],银缕梅属两姊妹种的基因组杂合度和重复序列比例均偏高,因此在后续的基于 DNA 三代测序技术开展的全基因组测序工作中要重视基因组杂合区域的去冗余处理。在全基因组测序的基础上,将进一步解析银缕梅属两姊妹种的起源分化以及基因组进化,并有助于深入探究金缕梅科的系统发育关系。

参考文献

- [1] 张志耘,张宏达,Endress P K. 中国植物志:第九卷.北京:科学出版社,2003:18-42
Zhang Z Y, Zhang H D, Endress P K. Flora of China: Vol 9. Beijing: Science Press, 2003: 18-42
- [2] Adroit B, Malekhosseini M, Girard V, Abedi M, Rajaei H, Terral J F, Wappler T. Changes in pattern of plant-insect interactions on the Persian ironwood (*Parrotia persica*, Hamamelidaceae) over the last 3 million years. Review of Palaeobotany and Palynology, 2018, 258: 22-35
- [3] Sefidi K, Marvie Mohadjer M R, Etemad V, Copenheaver C A. Stand characteristics and distribution of a relict population of Persian ironwood (*Parrotia persica* C.A. Meyer) in northern Iran. Flora, 2011, 206 (5): 418-422
- [4] Talebi K S, Sajedi T, Pourhashemi M. Forests of Iran: a treasure from the past, a hope for the future. Plant & Vegetation, 2014, 10: 17-53
- [5] Li J H, Tredici P D. The Chinese *Parrotia*: A sibling species of the Persian *Parrotia*. Arnoldia, 2008, 66 (1): 2-9
- [6] 吴献礼,周荣汉,段金廉.银缕梅茎皮的化学成分.植物资源与环境,1998,7(4):59-60
Wu X L, Zhou R H, Duan J A. Preliminary studies on the chemical constituents in the stem bark of *Shaniodendron subaequale* (H.T. Chang) M.B. Deng, H.T. Wei et X.Q. Wang. Journal of Plant Resources & Environment, 1998, 7(4): 59-60
- [7] Zhang Y Y, Shi E, Yang Z P, Geng Q F, Qiu Y X, Wang Z S. Development and application of genomic resources in an endangered Palaeoendemic tree, *Parrotia subaequalis* (Hamamelidaceae) from eastern China. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 246-259
- [8] 龚滨,夏洋洁,张光富,陆芸,孙国.中国特有珍稀濒危树种银

- 缕梅种群结构和空间格局. 生态与农村环境学报, 2012, 28 (6): 638-646
- Gong B, Xia Y J, Zhang G F, Lu Y, Sun G. Population structure and spatial pattern of *Parrotia subaequalis*, a rare and endangered species endemic to China. Journal of Ecology and Rural Environment, 2012, 28 (6): 638-646
- [9] 颜超, 王中生, 安树青, 陈姝凝, 魏娜, 陆霞梅. 濒危植物银缕梅不同径级个体的光合能力差异与更新限制. 生态学报, 2008, 28 (9): 4153-4161
- Yan C, Wang Z S, An S Q, Chen S N, Wei N, Lu X M. Differences in photosynthetic capacity among different diameter classes of *Parrotia subaequalis* populations and their implications to regeneration limitation. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28 (9): 4153-4161
- [10] Geng Q F, Yao Z G, Yang J, He J, Wang D B, Wang Z S, Liu H. Effect of Yangtze River on population genetic structure of the relict plant *Parrotia subaequalis* in eastern China. Ecology and Evolution, 2015, 5 (20): 4617-4627
- [11] 金亮, 徐伟伟, 李小白, 刘建新, 田丹青, 葛亚英, 潘晓韵, 王炜勇. DNA 流式细胞术在植物遗传及育种中的应用. 中国细胞生物学学报, 2016, 38 (2): 225-234
- Jin L, Xu W W, Li X B, Liu J X, Tian D Q, Ge Y Y, Pan X Y, Wang W Y. Application of DNA flow cytometry to plant genetics and breeding. Chinese Journal of Cell Biology, 2016, 38 (2): 225-234
- [12] 弓娜, 田新民, 周香艳, 刘建全. 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. 中国农学通报, 2011, 27 (9): 21-27
- Gong N, Tian X M, Zhou X Y, Liu J Q. Applications of flow cytometry in plant research-Analysis of nuclear DNA content and ploidy level in plant cells. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27 (9): 21-27
- [13] Pellicer J, Hidalgo O, Dodsworth S, Leitch I J. Genome size diversity and its impact on the evolution of land plants. Genes, 2018, 9 (2): 88
- [14] 杜文文, 王祥宁, 段青, 贾文杰, 马璐琳, 崔光芬, 王继华. 34 种秋海棠基因组大小比较与分析. 植物遗传资源学报, 2018, 19 (2): 370-376
- Du W W, Wang X N, Duan Q, Jia W J, Ma L L, Cui G F, Wang J H. Genome size comparison in 34 *Begonia* L. species. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19 (2): 370-376
- [15] Amborella Genome Project. The Amborella genome and the evolution of flowering plants. Science, 2013, 342 (6165): 1241089
- [16] Dai X G, Hu Q J, Cai Q, Feng K, Ye N, Tuskan G A, Milne R, Chen Y N, Wan Z B, Wang Z F, Luo W C, Wang K, Wan D S, Wang M X, Wang J, Liu J Q, Yin T M. The willow genome and divergent evolution from poplar after the common genome duplication. Cell Research, 2014, 24: 1274-1277
- [17] Guan R, Zhao Y P, Zhang H, Fan G Y, Liu X, Zhou W B, Shi C C, Wang J H, Liu W Q, Liang X M, Fu Y Y, Ma K L, Zhao L J, Zhang F M, Lu Z H, Lee S M, Xu X, Wang J, Yang H M, Fu C X, Ge S, Chen W B. Draft genome of the living fossil *Ginkgo biloba*. GigaScience, 2016, 5: 49
- [18] Chen J H, Hao Z D, Guang X M, Zhao C X, Wang P K, Xue L J, Zhu Q H, Yang L F, Sheng Y, Zhou Y W, Xu H B, Xie H Q, Long X F, Zhang J, Wang Z R, Shi M M, Lu Y, Liu S Q, Guan L H, Zhu Q H, Yang L M, Ge S, Cheng T L, Laux T, Gao Q, Peng Y, Liu N, Yang S H, Shi J S. *Liriodendron* genome sheds light on angiosperm phylogeny and species-pair differentiation. Nature Plants, 2019, 5: 18-25
- [19] 施季森, 王占军, 陈金慧. 木本植物全基因组测序研究进展. 遗传, 2012, 34 (2): 145-156
- Shi J S, Wang Z J, Chen J H. Progress on whole genome sequencing in woody plants. Hereditas (Beijing), 2012, 34 (2): 145-156
- [20] 刘海琳, 尹佟明. 全基因组测序技术研究及其在木本植物中的应用. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2018, 42 (5): 172-178
- Liu H L, Yin T M. Progress on the whole genome sequencing and the application in woody plants. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2018, 42 (5): 172-178
- [21] 邓果特, 刘清波, 蒋建雄, 陈智勇, 艾辛, 肖亮, 易自力. 五节芒基因组大小测定. 植物遗传资源学报, 2013, 14 (2): 339-341
- Deng G T, Liu Q B, Jiang J X, Chen Z Y, Ai X, Xiao L, Yi Z L. Estimation of genome size of *Miscanthus floridulus*. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14 (2): 339-341
- [22] 王雪, 周佳熠, 孙会改, 禹瑞敏, 高飞, 周宜君. 新疆沙冬青基因组调查测序与基因组大小预测. 植物遗传资源学报, 2018, 19 (1): 143-149
- Wang X, Zhou J Y, Sun H G, Yu R M, Gao F, Zhou Y J. Genomic survey sequencing and estimation of genome size of *Ammopiptanthus mongolicus*. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19 (1): 143-149
- [23] 王霞, 李霞, 李婷婷, 任婷, 韩榕, 陈惠. 珍稀濒危植物翅果油树基因组大小的测定. 植物学研究, 2018, 7 (2): 216-225
- Wang X, Li X, Li T T, Ren T, Han R, Chen H. Determination of genome size of a rare and endangered plant *Elaeagnus mollis* Diels. Botanical Research, 2018, 7 (2): 216-225
- [24] 林峰, 肖月娥, 周翔宇, 唐颖, 高步红. 25 份鸢尾属植物基因组 DNA C 值的流式测定. 草地学报, 2018, 26 (4): 985-990
- Li F, Xiao Y E, Zhou X Y, Tang Y, Gao B H. Estimation of genome C value of 25 samples of Iris plants by flow cytometry. Acta Agrestia Sinica, 2018, 26 (4): 985-990
- [25] 马秋月, 李淑顺, 马骧, 闻婧, 朱璐, 唐玲, 黎瑞, 郭伟, 李倩中. 基于流式细胞技术的两种槭属植物基因组大小测定. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2018, 42 (5): 201-205
- Ma Q Y, Li S S, Ma X, Wen J, Zhu L, Tang L, Li R, Guo W, Li Q Z. Estimation of genome size of two *Acer* Linn. by flow cytometry. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2018, 42 (5): 201-205
- [26] Zhang L L, Cao B, Bai C K. New reports of nuclear DNA content for 66 traditional Chinese medicinal plant taxa in China. Caryologia, 2013, 66 (4): 375-383
- [27] Hanson L, Boyd A, Johnson M A T, Bennett M D. First nuclear DNA C-values for 18 eudicot families. Annals of Botany, 2005, 96: 1315-1320
- [28] Garcia S, Garnatje T, Hidalgo O, Mas G, Pellicer J, Sánchez I, Viales D, Vallès J. First genome size estimations for some eudicot families and genera. Collectanea Botanica (Barcelona), 2010, 29: 7-16
- [29] 杨光, 邓懋彬. 银缕梅属染色体数报告. 植物资源与环境学报, 1996, 5 (2): 49
- Yang G, Deng M B. Chromosome number report on

- Shaniodendron subaequale* (Chang) Deng, Wei et Wang. Journal of Plant Resources & Environment, 1996, 5 (2): 49
- [30] Oginuma K, Tobe H. Karyomorphology and evolution in some Hamamelidaceae and Platanaceae (Hamamelididae; Hamamelidales). The Botanical Magazine, 1991, 104: 115-135
- [31] Kitashiba H, Li F, Hirakawa H, Kawanabe T, Zou Z W, Hasegawa Y, Tonosaki K, Shirasawa S, Fukushima A, Yokoi S J, Takahata Y, Kakizaki T, Ishida M, Okamoto S, Sakamoto K, Shirasawa K, Tabata S, Nishio T. Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome. DNA Research, 2014, 21: 481-490
- [32] Galbraith D, Harkins K, Maddox J, Ayres N, Sharma D, Firoozabady E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. Science, 1983, 220 (4601): 1049-1051
- [33] Loureiro J, Rodriguez E, Doležel J, Santos C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: a test with 37 species. Annals of Botany, 2007, 100 (4): 875-888
- [34] Doležel J, Binarová P, Lucretti S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biologia Plantarum, 1989, 31: 113-120
- [35] Arumuganathan K, Earle E D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. Plant Molecular Biology Reporter, 1991, 9 (3): 208-218
- [36] Otto F J, Oldiges H, Göhde W, Jain V K. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content variations as a potential *in vivo* mutagenicity test. Cytometry, 1981, 2 (3): 189-191
- [37] Pfosser M, Heberle-Bors E, Amon A, Lelley T. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. Cytometry, 1995, 21 (4): 387-393
- [38] Doležel J, Bartoš J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Annals of Botany, 2005, 95: 99-110
- [39] Ruben M, Juan R, Maria L. *In vitro* propagation of the endangered plant *Centaurea ultriae*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2010, 101 (1): 31-39
- [40] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15
- [41] Chen Y X, Chen Y S, Shi C M, Huang Z B, Zhang Y, Li S K, Li Y, Ye J, Yu C, Li Z, Zhang X Q, Wang J, Yang H M, Fang L, Chen Q. SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data. GigaScience, 2018, 7: 1-6
- [42] Marçais G, Kingsford C. A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of K-mers. Bioinformatics, 2011, 27 (6): 764-770
- [43] Vurtture G W, Sedlazeck F J, Nattestad M, Underwood C J, Fang H, Gurtowski J, Schatz M C. GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads. Bioinformatics, 2017, 33 (14): 2202-2204
- [44] Yan L, Wang X, Liu H, Tian Y, Lian J M, Yang R J, Hao S M, Wang X J, Yang S C, Li Q Y, Qi S, Kui L, Okpekum M, Ma X, Zhang J J, Ding Z L, Zhang G J, Wang W, Dong Y, Sheng J. The genome of *Dendrobium officinale* illuminates the biology of the important traditional Chinese orchid herb. Molecular Plant, 2015, 8 (6): 922
- [45] Huang S, Li R, Zhang Z, Li L, Gu X F, Fan W, Lucas W J, Wang X W, Xie B Y, Ni P X, Ren Y Y, Zhu H M, Li J, Lin K, Jin W W, Fei Z J, Li G C, Staub J, Kilian A, Vossen E A, Wu Y, Guo J, He J, Jia Z Q, Ren Y, Tian G, Lu Y, Ruan J, Qian W B, Wang M W, Huang Q F, Li B, Xuan Z L, Cao J J, Asan, Wu Z G, Zhang J B, Cai Q L, Bai S Q, Zhao B W, Han Y H, Li Y, Li X F, Wang S H, Shi Q X, Liu S Q, Cho W K, Kim J, Xu Y, Heller-Urszyska K, Miao H, Cheng Z C, Zhang S P, Wu J, Yang Y H, Kang H X, Li M, Liang H Q, Ren X L, Shi Z B, Wen M, Jian M, Yang H L, Zhang G J, Yang Z T, Chen R, Liu S F, Li J W, Ma L J, Liu H, Zhou Y, Zhao J, Fang X D, Li G Q, Fang L, Li Y R, Liu D Y, Zheng H K, Zhang Y, Qin N, Li Z, Yang S, Bolund L, Kristiansen K, Zheng H C, Li S C, Zhang X Q, Yang H M, Wang J, Sun R F, Zhang B X, Wang J, Du Y C, Li S G. The genome of cucumber, *Cucumis sativus* L. Nature Genetics, 2009, 41 (12): 1275-1281
- [46] 张小燕, 刘志香, 廖保生, 肖水明, 徐江, 盛玮. 基于本草基因组学应用流式量测序技术检测人参基因组大小. 世界科学技术, 2017, 19 (10): 1724-1728
- Zhang X Y, Liu Z X, Liao B S, Xiao S M, Xu J, Sheng W. Estimation of genome size of Ginseng based on herb genomics by flow cytometric analysis and high-throughput sequence. World Science and Technology, 2017, 19 (10): 1724-1728
- [47] Soltis D E, Soltis P S, Bennett M D, Leitch I J. Evolution of genome size in the angiosperms. American Journal of Botany, 2003, 90: 1596-1603
- [48] Lynch M, Conery J S. The origins of genome complexity. Science, 2003, 302 (5649): 1401-1404
- [49] 陈建军, 王瑛. 植物基因组大小进化的研究进展. 遗传, 2009, 31 (5): 464-470
- Chen J J, Wang Y. Recent progress in plant genome size evolution. Hereditas (Beijing), 2009, 31 (5): 464-470
- [50] Wendel J F, Jackson S A, Soltis P S, Meyers B C, Wing R A. Evolution of plant genome architecture. Genome Biology, 2016, 17: 37
- [51] Leitch I J, Greilhuber J, Doležel J, Wendel J F. Plant genome diversity: Vol 2. Berlin: Springer-Verlag Wien, 2013: 307-321
- [52] Leitch I J, Soltis D E, Soltis P S, Bennett M D. Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). Annals of Botany, 2005, 95 (1): 207-217
- [53] Oliver M J, Petrov D, Ackerly D, Falkowski P, Schofield O M. The mode and tempo of genome size evolution in eukaryotes. Genome Resources, 2007, 17 (5): 594-601
- [54] 伍艳芳, 肖复明, 徐海宁, 章挺, 江香梅. 樟树全基因组调查. 植物遗传资源学报, 2014, 15 (1): 149-152
- Wu Y F, Xiao F M, Xu H N, Zhang T, Jiang X M. Genome survey in *Cinnamomum camphora* L. Presl. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15 (1): 149-152