

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201903065

黄婧, 张敏, 林峰, 等. 基于流式细胞术的乌饭树核 DNA 含量(2C-值)测定 [J]. 广西植物, 2020, 40(5): 680–686.

HUANG J, ZHANG M, LIN F, et al. Determination of nuclear DNA content (2C-value) of *Vaccinium bracteatum* by flow cytometry [J]. *Guihaia*, 2020, 40(5): 680–686.

基于流式细胞术的乌饭树核 DNA 含量(2C-值)测定

黄婧¹, 张敏^{1*}, 林峰², 周鹏¹, 周洁¹

(1. 江苏省林业科学研究院, 南京 211153; 2. 南京林业大学, 南京 210037)

摘要:核 DNA 含量(2C-值)是描述植物生物多样性的一个重要特征参数。该研究利用流式细胞仪检测越橘属植物乌饭树核 DNA 含量,建立了适合乌饭树的流式细胞术测定方法:以野生乌饭树的嫩叶为材料,以已知核 DNA 含量的水稻品种‘日本晴’为内标,采用 GPB 解离液,细胞核悬液加入 50 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 碘化丙啶染色 5 min 即可上机检测。结果表明:(1)9 个乌饭树单株的核 DNA 含量平均值为 (1.22 ± 0.03) pg,最小值为 1.18 pg,最大值为 1.27 pg。(2)检测结果与已知的越橘属二倍体植株的 2C-值含量相似,且不同地理来源的单株 DNA 含量没有显著差异($P > 0.05$),推测这 9 个单株为二倍体植株。(3)测定的乌饭树核 DNA 含量(2C-值)可丰富越橘属植物的 C-值库;基于流式细胞术建立的乌饭树核 DNA 含量测定方法可为该属其他植物的相关研究提供借鉴。

关键词: 乌饭树, 核 DNA 含量, 2C-值, 流式细胞术

中图分类号: Q946 文献标识码: A

文章编号: 1000-3142(2020)05-0680-07

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Determination of nuclear DNA content (2C-value) of *Vaccinium bracteatum* by flow cytometry

HUANG Jing¹, ZHANG Min^{1*}, LIN Feng², ZHOU Peng¹, ZHOU Jie¹

(1. *Jiangsu Academy of Forestry*, Nanjing 211153, China; 2. *Nanjing Forestry University*, Nanjing 210037, China)

Abstract: The plant nuclear DNA content (2C-value) is a principal characteristic parameter to describe biodiversity of plant species. For better understanding the nuclear DNA information of this plant, the nuclear DNA content of *Vaccinium bracteatum* wild plants were estimated by flow cytometry (FCM). In order to establish the optimal FCM method, young fresh leaves were taken as samples, and *Oryza sativa* subsp. *japonica* ‘Nipponbare’ with known nuclear DNA content was set as internal standard. The nucleus of the mixed leaf cells was isolated by GPB dissociation solution and stained with 50 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ propidium iodide (PI) with 5 min, then the PI emission fluorescence intensity was measured by flow cytometry.

收稿日期: 2019-07-05

基金项目: 江苏省林业科学研究院青年科技基金(JAF-2016-07); 中央财政林业科技推广示范资金项目(苏[2019]TG02)[Supported by Youth Science and Technology Foundation of Jiangsu Academy of Forestry(JAF-2016-07); Science and Technology Promotion Demonstration Foundation of Central Finance Forestry(Su[2019]TG02)]。

作者简介: 黄婧(1987-),女,江苏镇江人,博士,助理研究员,主要从事植物遗传学研究,(E-mail)694286338@qq.com。

*通信作者: 张敏,博士,研究员,主要从事林木花卉生理生化和组织培养研究,(E-mail)29157510@qq.com。

try. The results were as follows: (1) The average nuclear DNA content of nine *Vaccinium bracteatum* plants was (1.22±0.03) pg, the minimum value was 1.18 pg and the maximum was 1.27 pg. (2) The results were similar to the nuclear DNA content of the known diploid plants of *Vaccinium*, and there was no significant differences in DNA content of plants from different geographical origins ($P > 0.05$). It is speculated that these nine *V. bracteatum* plants are diploid plants. (3) The detected nuclear DNA contents (2C-value) of *V. bracteatum* can enrich the C-value database of *Vaccinium*. The nuclear DNA content detection method established based on FCM for *V. bracteatum* can provide reference for related research of other *Vaccinium* species.

Key words: *Vaccinium bracteatum*, nuclear DNA content, 2C-value, flow cytometry (FCM)

真核生物体细胞核中,染色体组数和 DNA 含量保持一定的数值,为了将 DNA 含量与染色体数目相区分,Swift et al. (1950)提出了 C-值(C-value)的概念,C-值是指真核生物细胞中,没有复制的单倍体细胞核(无论倍性水平)所含的 DNA 总量。C-值的单位可以用皮克(pg, $1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$)表示,1 pg DNA 代表 0.978×10^9 碱基对(base pairs, bp) (Dolezel et al., 2003)。C-值是植物的一项重要特征参数,与生物体的细胞大小、寿命、光合速率等生理参数有一定的相关性(Beaulieu et al., 2007),同时 C-值具有种的特征,也与植物的种群进化、遗传信息总量等有密切关系,因此对植物的 C-值进行研究有重要意义。目前,植物 C-值数据库(<http://data.Kew.org/cvalues/>)包含超过 8 500 个种的数据,包括被子植物、裸子植物、蕨类、苔藓、藻类的 C-值数据,方便科研工作者查询与分析。

核 DNA 含量一般被称为含有 2C 的 DNA 含量(Dolezel & Bartos, 2005),这是由于在有丝分裂间期,细胞核含有两份未复制的基因组拷贝。核 DNA 含量的测定方法主要有化学分析法、复性动力学法、孚尔根染色法(feulgen microdensitometry)、流式细胞术(flow cytometry, FCM)等方法。化学分析法和复性动力学法现在已经很少被使用了;孚尔根染色法操作复杂且结果不够稳定(Moscone, 2003)。Galbraith et al. (1983)报道了应用流式细胞术测定植物细胞周期检测和细胞核 DNA 含量的研究,开辟了流式细胞术应用于植物研究的先河。流式细胞仪(flow cytometer)操作方便迅速,结果准确可靠,目前被广泛应用于植物 C-值的测定中(金亮等,2016),其工作原理是利用特殊的荧光染料与 DNA 碱基结合,激光照射被荧光染料染色

的细胞会发射出荧光,由于荧光强度与 DNA 含量成正比的原理,通过测定细胞的荧光强度即可推算出样本细胞的 DNA 含量。由于不同植物、组织中的细胞内含物和次生代谢物质不同,针对不同研究对象,采用适合的细胞核提取液配方、提取和染色方法是流式细胞术的应用难点。

目前,利用流式细胞术已经测定了越橘属 7 个种的核 DNA 含量(Costich et al., 1993),分别是旱地蓝莓(*Vaccinium pallidum*) 1.21 pg,北方越橘(*V. boreale*) 1.18 pg,蓝莓‘埃利奥特’(*V. elliotii*) 1.26 pg,加拿大蓝莓(*V. myrtilloides*) 1.26 pg,南方蓝莓(*V. tenellum*) 1.30 pg,蓝莓‘达柔’(*V. darrowi*) 1.31 pg,北高丛蓝莓(*V. corymbosum*) 1.33 pg。然而尚无关于越橘属植物乌饭树核 DNA 含量的研究报道。乌饭树(*V. bracteatum*)又名南烛,古称染菽,是属于越橘属的常绿灌木。在我国主要分布在浙江、福建、江西、湖南、江苏和台湾等地的丘陵地带。乌饭树具有很高的营养价值和保健功能(Lee et al., 2014),亦是不可多得的盆景及园林绿化树种。乌饭树作为一种特色保健乡土树种,具有极高的开发利用价值,但是其基因与基因组层面的研究甚少,严重限制了种质资源的利用和育种进程。本试验摸索乌饭树的流式细胞术测定方法,检测乌饭树野生单株的核 DNA 含量,并分析基因组倍性情况以及核 DNA 含量变化与种质地理来源之间的关系,以期为乌饭树的种质资源研究、基因组学和倍性育种提供参考。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

以来自 3 个省份的 9 个野生乌饭树单株为研究

对象,其来源省份见表1。以植物鲜嫩叶片为材料,标准植物水稻‘日本晴’(*Oryza sativa* subsp. *japonica* ‘Nipponbare’, 2C=0.795)(Sasaki & Burr, 2000)为内部标样。

表1 乌饭树单株的地理来源

Table 1 Geographical sources of *Vaccinium bracteatum* plants

省份 Province	城市 City	编号 Sample Number
江苏 Jiangsu	宜兴 Yixing	1
	溧阳 Liyang	4,5
	无锡 Wuxi	6
湖南 Hunan	常德 Changde	2
	白云山 Baiyunshan	3
江西 Jiangxi	赣州 Ganzhou	7,8,9

1.2 标本制作

1.2.1 解离液选择与荧光染料配制 采用 LB01、Galbraith's、WPB、GPB 和 Tris-MgCl₂ 5 种配方进行试验,找出测定乌饭树基因组的最佳解离液配方。配制碘化丙啶 PI 染色液(50 μL · mL⁻¹,含 RNA 酶),4℃保存。

1.2.2 细胞核悬液制备与 DNA 特异性染色 制备待测样、标样、待测样+标样混合的细胞核悬液。取待测样品和标样嫩叶各 50 mg,一起放入置于冰上的塑料平皿中,加入 1 mL 预冷的解离液,用锋利刀片迅速切碎叶片。使用移液枪吸取塑料平皿中的解离液(弃去碎材料),置于 1.5 mL EP 管,用孔径为 40 μm 无菌注射式过滤器过滤,得滤液至新管内,置于冰上孵育 5 min。4℃,800 r · min⁻¹ 离心 5 min,小心吸取上清置于新管中。再加入 500 μL 配置好的 PI-Rnase 染液,避光染色 5~10 min。另取待测样品、标样的嫩叶各 50 mg,按照同样的方法分别备至细胞核悬液作为空白对照,空白对照以同样的方法进行染色。将染色的细胞核悬液转入标准上样管中,上机测定。

1.3 流式细胞仪检测及分析

利用 BD Influx™ 流式细胞仪对染色后的细胞

核悬液样品上机检测,采用 488 nm 的激光激发,收集 670/30 通道的荧光,检测荧光强度。每个待测样品收集约 10 000 个细胞,每管样品测试 3 次,并在不同日期进行 2 次重复,取平均值计算。

使用仪器自带软件进行作图分析。已知核 DNA 含量的水稻‘日本晴’的实生幼苗为参照样本,按照以下公式计算得到待测样品的核 DNA 含量,其中 G₀/G₁ 峰的变异系数(coefficient of variation, CV=标准差/平均值×100%) CV 值大于 5% 的结果予以舍弃(Arumuganathan & Earle, 1991a)。并根据 1 pg DNA = 978 Mp,计算乌饭树的基因组大小。

2 结果与分析

2.1 解离液的选择

由于不同解离液对不同植物的解离效果存在明显差异,在乌饭树核 DNA 含量检测前,比较 5 种植物常用的解离液(LB01、Galbraith's、WPB、GPB 和 Tris-MgCl₂)对乌饭树叶片的解离效果。发现 GPB 解离液对乌饭树和水稻叶片细胞核的解离效果最佳,其细胞核悬液的浓度较高,上机检测能得到较好的荧光信号:噪音少、峰形佳、面积相对较大,变异系数控制在 5% 以内。因此,本研究采用 GPB 解离液制样进行测试。

2.2 待测样品的荧光强度范围确定

为了控制试验误差,试验采用内标法进行测定,经查询、比较常用的植物标样和部分越橘属植物的 2C-值后,选择水稻‘日本晴’作为标准样品。以水稻‘日本晴’、乌饭树样本单独上机检测,通过观察流式细胞术检测图中峰的位置,初步确定标样与待测样本的荧光强度范围。在同一检测模板下,水稻‘日本晴’的荧光强度峰值在 10 000 附近(图 1),乌饭树的荧光强度峰值在 17 000 附近(图 2)。由于细胞核的荧光强度与核 DNA 含量成正比,说明水稻‘日本晴’的核 DNA 含量小于乌饭树;同时可以推测,在下一步混合样本的流式细胞术检测图中,代表水稻的峰应位于流式细胞术检测图的左侧,而代表乌饭树样品的峰应位于图的右侧。

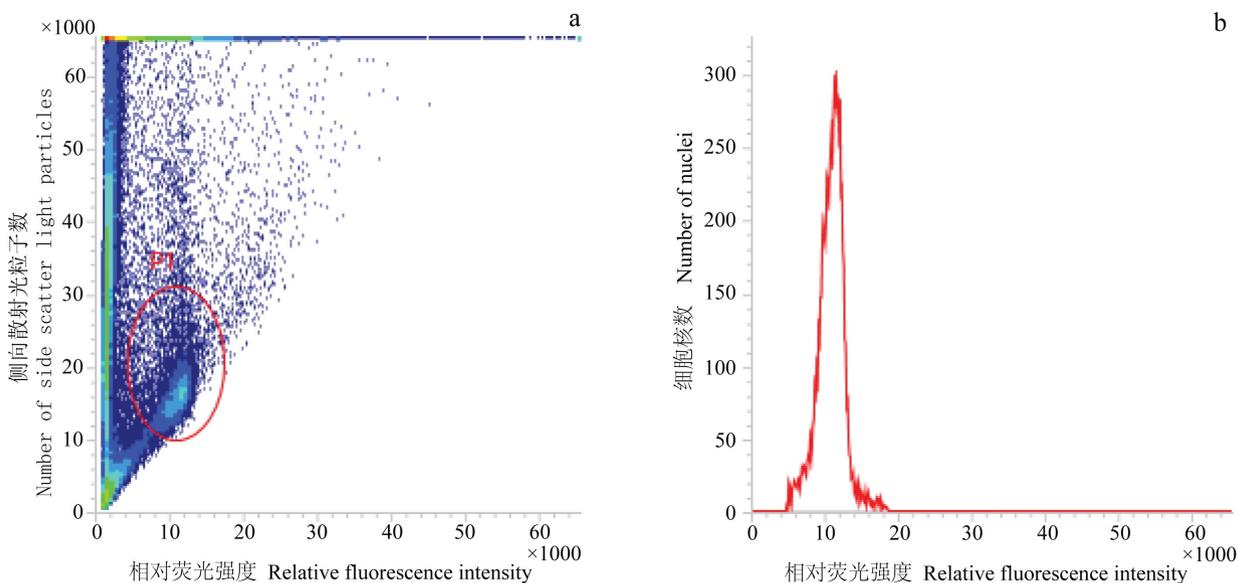


图 1 水稻‘日本晴’的流式细胞术检测分析结果
 Fig. 1 FCM detection analysis result for *Oryza sativa* subsp. *japonica* ‘Nipponbare’

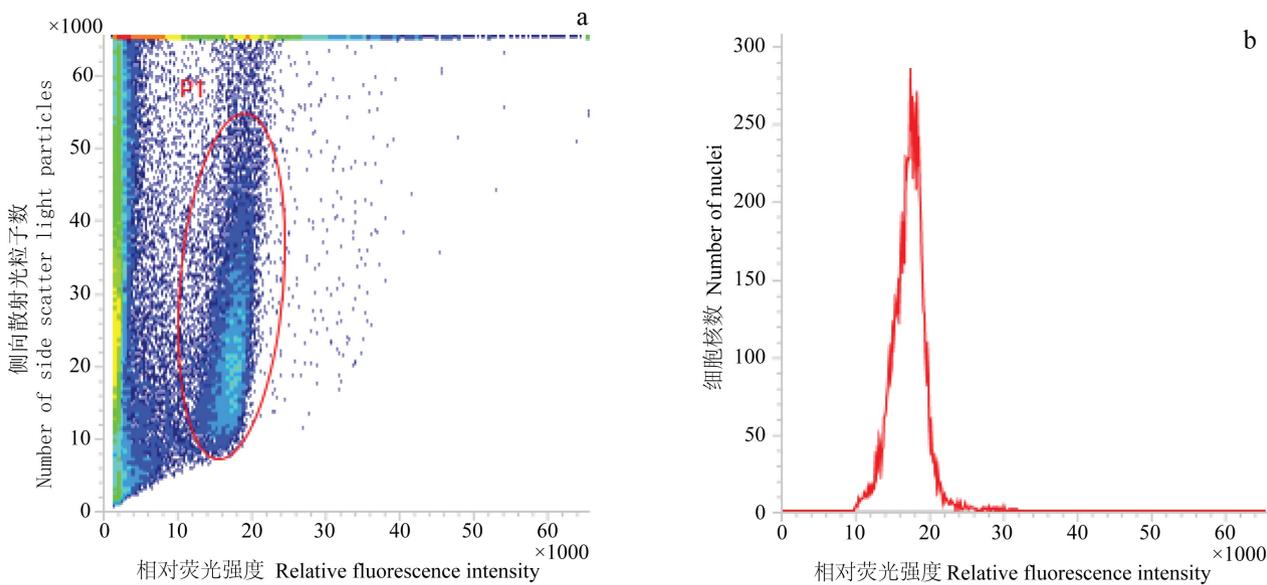


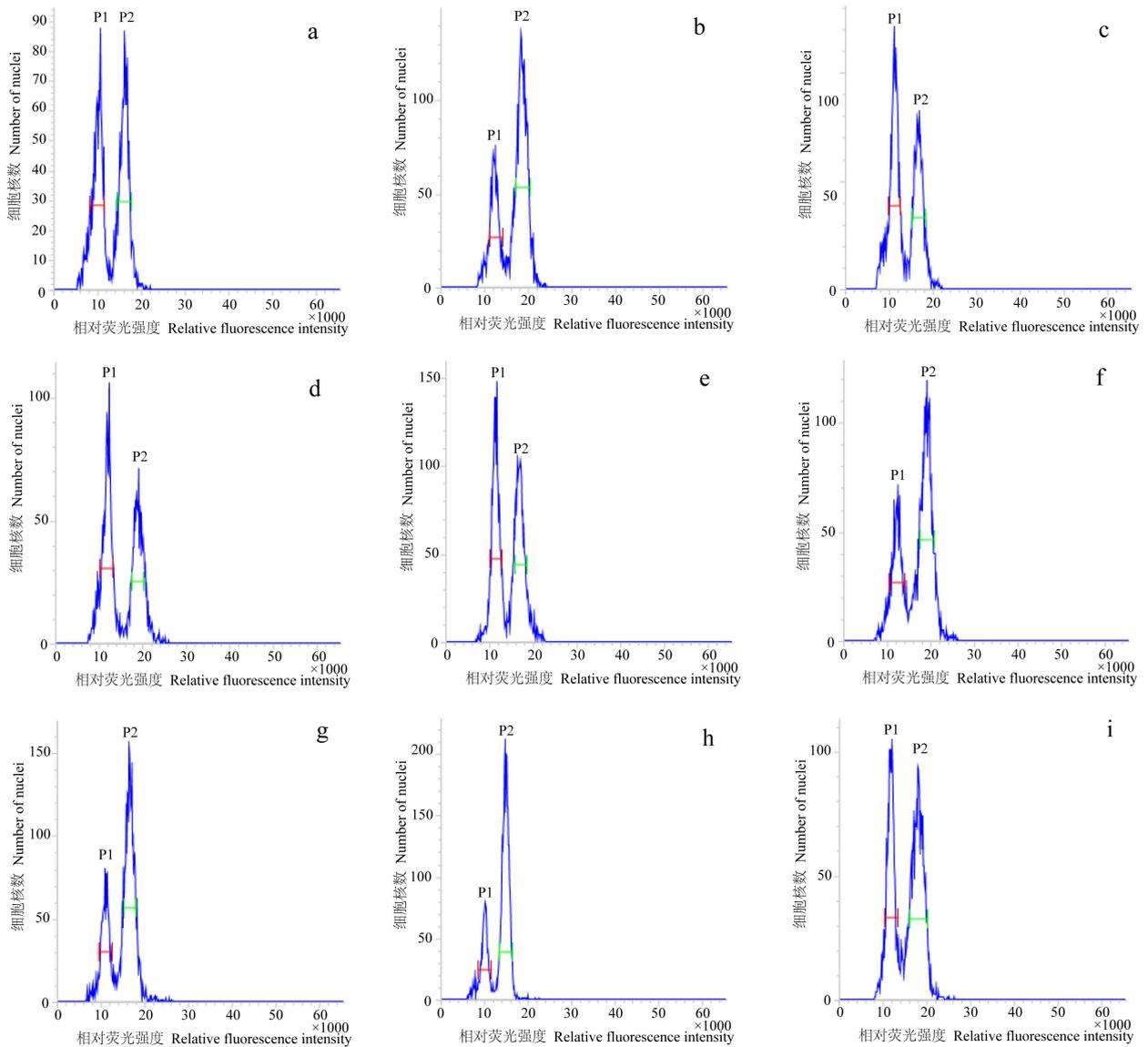
图 2 乌饭树的流式细胞术检测分析结果
 Fig. 2 FCM detection analysis result for *Vaccinium bracteatum*

2.3 乌饭树核 DNA 含量(2C-值)的测定结果

分别将 9 份乌饭树测试样本与水稻标样的混合样本上机测试,测试结果如图 3 所示,水稻与乌饭树混样的主峰区分度良好,均清晰且无重叠,说明本试验方法准确可行。分别比较各乌饭树测试

样本与水稻标样的 G_0/G_1 期峰值相对位置,图中左侧的 P1 峰代表标样水稻‘日本晴’的荧光强度,右侧的 P2 峰代表乌饭树测试样本的荧光强度。

乌饭树测试样品的核 DNA 含量(2C-值)见表 2。9 个样本的平均核 DNA 含量(2C-值)为 1.22



a-i 代表乌饭树样本 1-9; a-i 中 P1 代表水稻的 G0/G1 期峰, a-i 中 P2 代表乌饭树的 G0/G1 期峰。

a-i represent the nine samples of *Vaccinium bracteatum*; P1 of a-i represent the G0/G1 phase peak of *Oryza sativa* subsp. *japonica* 'Nipponbare', and P2 of a-i represent the G0/G1 phase peak of *Vaccinium bracteatum*.

图 3 水稻‘日本晴’与 9 个乌饭树单株混合样本的流式细胞仪测定结果
Fig. 3 FCM detection analysis result for mixed samples of *Oryza sativa* subsp. *japonica* 'Nipponbare' and nine *Vaccinium bracteatum* samples

pg, 标准差为 0.03。最大的是样本 6 号, 为 1.27 pg, 最小的是样本 5 号, 为 1.18 pg。经单因素方差分析(表 3), 不同省份的野生单株之间核 DNA 含量无显著差异($P>0.05$), 说明乌饭树核 DNA 含量没有因地理分布不同而产生进化差异。检测结果与已知的二倍体越橘品种的核 DNA 含量(1.18~1.31 pg)相似, 且前人的研究表示三、四倍体越橘

品种的核 DNA 含量显著大于二倍体($P<0.05$) (Costich et al., 1993), 因此, 推测本试验鉴定的 9 个单株均为二倍体植株。

一般认为植物 DNA 1 pg 相当于 978 Mb。本试验测得乌饭树核 DNA 含量(2C-值)为 (1.22 ± 0.03) pg, 推测乌饭树基因组大小约为 $(1\ 194.39 \pm 29.07)$ Mb。

表 2 乌饭树单株的核 DNA 含量(2C-值)

Table 2 Nuclear DNA contents (2C-value) of nine *Vaccinium bracteatum* samples

项目 Item	样本 1 Sample 1	样本 2 Sample 2	样本 3 Sample 3	样本 4 Sample 4	样本 5 Sample 5	样本 6 Sample 6	样本 7 Sample 7	样本 8 Sample 8	样本 9 Sample 9	平均值 Mean
核 DNA 含量 Nuclear DNA content (pg)	1.25	1.21	1.20	1.25	1.18	1.27	1.22	1.19	1.23	1.22±0.03
基因组大小 Genome size (Mb)	1 218.65	1 184.74	1 174.65	1 221.33	1 150.49	1 238.40	1 192.91	1 163.08	1 205.29	1 194.39± 29.07

表 3 不同地理来源的植物单株的核

DNA 含量间的方差分析

Table 3 ANOVA testing for the differences in nuclear DNA contents of samples from different provinces

种源省份 Province	数量 n	平均值±标准差 $\bar{x} \pm s$	F 值 F value	P 值 P value
江苏 Jiangsu	4	1.237 5± 0.039 48		
湖南 Hunan	2	1.205 0± 0.007 07	0.946	0.439
江西 Jiangxi	3	1.213 3± 0.020 82		

3 讨论

本研究首次利用流式细胞术检测乌饭树核 DNA 含量(2C-值)。测试得到乌饭树野生单株核 DNA 含量(2C-值)平均值为(1.22±0.03) pg, 基因组大小约为(1 194.39±29.07) Mb。检测单株与越橘二倍体品种的核 DNA 含量近似, 且不同省份来源的野生单株的核 DNA 含量无显著差异($P > 0.05$), 推测供试单株均为二倍体植株。本研究旨在为乌饭树基因组学研究、遗传多样性研究和育种工作奠定基础。

流式细胞术根据样本的相对荧光强度来分析其 DNA 含量, 是一种快速准确鉴定植物基因组大小及倍性的方法。前人利用流式细胞术检测越橘属植物 2C-值时使用的解离液(Arumuganathan & Earle, 1991a) 和外标样品(Costich et al., 1993) (虹鳟鱼红细胞), 目前已不常在植物研究中使用, 因此本研究自行摸索了乌饭树的流式细胞术试验方法。最终采用水稻‘日本晴’作为内标, 选择

GPB 解离液, 使用红色或鲜绿色的乌饭树鲜叶制备细胞悬浮液, 经 50 $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI 溶液染色 5 min 即可上机检测。该方法相比于前人对越橘属植物的测定方法简化了许多, 结果重复性较好, CV 值控制在 5%, 可为本属其他植物的流式细胞术研究提供参考。

本研究随机挑选了分布在江苏、湖南、江西的 9 个单株, 检测结果均为二倍体植株。这与越橘属其他植物的基因组特性(孙海悦和张亚东, 2014) 有类似之处, 生长在美国东南部温暖湿润地区的常绿越橘(*Vaccinium darrowi*)、兔眼越橘(*V. virgatum*)、小穗越橘(*V. tenellum*) 都是二倍体植株($2n=2x=24$); 生长在严寒地区的北高丛蓝莓、矮丛越橘(狭叶越橘为主) 品种多是四倍体植株($2n=4x=48$)。乌饭树与其他越橘属植物的分布范围不同, 目前只发现生长在温暖湿润的地区, 尤其是丘陵地带或海拔 400~1 400 m 的山地(郝娟娟, 2010), 结合本试验的结果, 推测乌饭树可能是二倍体植物。但由于试验检测的乌饭树单株数量较少, 尚不能确定乌饭树是否存在三、四、六倍体, 还需要检测更多植株, 尤其是生长量大、株高较高, 以及生长在低温地区的植株。同时, 在今后的育种工作中, 可以利用乌饭树的耐热和低温需要量基因, 对耐冷的北方越橘品种进行改良, 扩大其种植适应范围。

越橘属植物种类繁多, 并且经过长期的自然选择, 遗传变异丰富, 前人研究发现, 越橘属不同倍性植株的核 DNA 含量大小存在显著差异($P < 0.05$), 甚至在二倍体品种之间也存在一定差异(Costich et al., 1993), 这种现象在其他植物中也被证实存在(吴丽萍等, 2013; 陈丙以等, 2015; 林

峰等,2017)。本研究中不同省份的乌饭树二倍体单株核 DNA 含量没有显著差异($P>0.05$),暗示这些乌饭树的核 DNA 含量可能没有受到地理环境影响而发生遗传进化。但对于不同地理环境是否造成种群遗传进化差异,仅根据本次试验结果,尚无法得出确定的结论,可以利用分子标记开展不同种源种质的遗传多样性的研究,进一步了解乌饭树种质的遗传进化进程。

根据植物 C-值大小的 5 个等级(Leitch et al., 1998; Soltis et al., 2003)划分,乌饭树属于“很小($1C\text{-值}\leq 1.4\text{ pg}$)”的植物;利用测得的二倍体单株的核 DNA 含量预测,乌饭树基因组大小约为($1\ 194.39 \pm 29.07$) Mb。对照前人的研究结果(Arumuganathan & Earle, 1991b),估计乌饭树基因组大小是拟南芥的 4 倍,玉米的 1/5,番茄的 1/2,远大于木瓜、芒果、杏、樱桃、橙和覆盆子等水果植物。该结果能够为乌饭树基因组的研究提供一些依据。

目前,国内尚无关于乌饭树核 DNA 含量的研究报道,本研究结果可以丰富越橘属植物的 C-值库,基于流式细胞术建立的乌饭树核 DNA 含量测定方法可为加快越橘属植物的相关研究提供借鉴。

参考文献:

ARUMUGANATHAN K, EARLE ED, 1991a. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 9(3):229-241.

ARUMUGANATHAN K, EARLE ED, 1991b. Nuclear DNA content of some important plant species [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 9(3):208-218.

BEAULIEU JM, LEITCH IJ, KNIGHT CA, 2007. Genome size evolution in relation to leaf strategy and metabolic rates revisited [J]. *Ann Bot*, 99(3):495-505.

CHEN BY, LI JF, HUO HZ, et al., 2015. Estimation of genome size in six wild strawberry species [J]. *J Fruit Sci*, (1):51-56. [陈丙义, 李金凤, 霍恒志, 等, 2015. 6 种野生草莓基因组大小估算 [J]. *果树学报*, (1):51-56.]

COSTICH DE, ORTIZ R, MEAGHER TR, et al., 1993. Determination of ploidy level and nuclear DNA content in blueberry by flow cytometry [J]. *TAG*, 86(8):1001-1006.

DOLEZEL J, BARTOS J, VOGLMAYR H, et al., 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human

[J]. *Cytom Parta*, 51(2):127-128.

DOLEZEL J, BARTOS J, 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size [J]. *Ann Bot*, 95(1):99-110.

GALBRAITH DW, HARKINS KR, MADDOX JM, et al., 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues [J]. *Science*, 220(4601):1049-51.

HAO JJ, 2010. A preliminary study on *Vaccinium bracteatum* Thunb. germplasm collection and utilization technology [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University. [郝娟娟, 2010. 乌饭树种质资源收集与利用的初步研究 [D]. 南京:南京林业大学.]

JIN L, XU WW, LI XB, et al., 2016. Application of DNA flow cytometry to plant genetics and breeding [J]. *Chin J Cell Biol*, (2):225-234. [金亮, 徐伟伟, 李小白, 等, 2016. 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*, (2):225-234.]

LEE S, JUNG ES, DO SG, et al., 2014. Correlation between species-specific metabolite profiles and bioactivities of blueberries (*Vaccinium* spp.) [J]. *J Agric Food Chem*, 62(9):2126-2133.

LEITCH IJ, CHASE MW, BENNETT MD, 1998. Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants [J]. *Ann Bot*, 82:85-94.

LIN F, ZHOU XY, XU L, et al., 2017. Estimation of genomic C value in several species of *Salvia* [J]. *Chin J Agric Biotechnol*, 25(10):1622-1628. [林峰, 周翔宇, 徐莉, 等, 2017. 几种鼠尾草属植物基因组 C 值测定 [J]. *农业生物技术学报*, 25(10):1622-1628.]

MOSCONI EA, 2003. Analysis of nuclear DNA content in *Cap-sicum* (Solanaceae) by flow cytometry and feulgen densitometry [J]. *Ann Bot*, 92(1):21-29.

SASAKI T, BURR B, 2000. International rice genome sequencing project: The effort to completely sequence the rice genome [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 3(2):138-141.

SOLTIS DE, SOLTIS PS, BENNETT MD, et al., 2003. Evolution of genome size in the angiosperms [J]. *Am J Bot*, 90(11):1596-1603.

SUN HY, LI YD, 2014. Overview of blueberry breeding in the world [J]. *J NE Agric Univ*, (9):116-122. [孙海悦, 李亚东, 2014. 世界蓝莓育种概述 [J]. *东北农业大学学报*, (9):116-122.]

SWIFT H, 1950. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei [J]. *PNAS*, 36(11):643-654.

WU LP, TANG Y, LI YY, et al., 2013. Estimation of genome size of *Ziziphus jujube* and *Z. acidojujuba* [J]. *J Beijing For Univ*, 35(3):77-83. [吴丽萍, 唐岩, 李颖岳, 等, 2013. 枣和酸枣基因组大小测定 [J]. *北京林业大学学报*, 35(3):77-83.]