

巴西橡胶树栽培种质基因组 C 值测定和变异分析

柳颢, 牛迎凤, 吴裕, 毛常丽, 张凤良, 刘紫艳, 郑诚, 龙青姨, 李国华*

(云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100)

摘要: 为了解巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)栽培种质的变异情况, 以 53 份在云南植胶区综合性状表现较好的巴西橡胶树栽培种质为材料, 采用流式细胞术测定了基因组 C 值, 并进行了变异分析。结果表明, 浅绿色嫩叶是巴西橡胶树流式细胞术测定的最适样品。53 份巴西橡胶树栽培种质的细胞核 DNA 含量和基因组 C 值存在一定差异, 基因组的平均 C 值是 $1.531\ 696 \times 10^9$ bp, 最小的是 CRTG-272 种质($1.465\ 908 \times 10^9$ bp), 最大的是 CRTG-83 种质($1.600\ 381 \times 10^9$ bp), 变异系数较小(CV=0.035 5)。53 份巴西橡胶树栽培种质中有 47 份为二倍体, 6 份为三倍体。在已测定基因组大小的 40 种大戟科(Euphorbiaceae)植物中, 基因组大小变异较大(CV=1.248 6), 与“C 值悖论”观点相一致。因此, 应用流式细胞术能快速、准确地测定巴西橡胶树细胞核 DNA 含量、基因组 C 值和染色体倍性。

关键词: 巴西橡胶树; 栽培种质; C 值; 变异

doi: 10.11926/jtsb.3857

Genome C Value and Variation Analysis of Cultivated Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*) Germplasms by Flow Cytometry

LIU Jin, NIU Ying-feng, WU Yu, MAO Chang-li, ZHANG Feng-liang, LIU Zi-yan, ZHENG Cheng, LONG Qing-yi, LI Guo-hua*

(Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong 666100, Yunnan, China)

Abstract: In order to understand the variation of cultivated germplasm of *Hevea brasiliensis*, the genomic C value of 53 cultivated germplasms with high quality characters in Yunnan rubber planting areas were measured by flow cytometry, and their variations were analyzed. The results showed that light green young leaves of *H. brasiliensis* were suitable samples for flow cytometry. There were differences in nuclear DNA content and genomic C value among 53 cultivated germplasms. The average genomic C value was $1.531\ 696 \times 10^9$ bp, the smallest was CRTG-272 ($1.465\ 908 \times 10^9$ bp), the largest was CRTG-83 ($1.600\ 381 \times 10^9$ bp), and the variation coefficient (CV) was small (0.035 5). Among 53 cultivated germplasms of *H. brasiliensis*, forty-seven were diploid and 6 were triploid. The genome sizes had big CV up to 1.248 6 among 40 species of Euphorbiaceae, which is consistent with the view of the C value paradox. Therefore, flow cytometry can achieve rapid and accurate determination of the nuclear DNA content, genomic C value, and chromosome ploidy of *H. brasiliensis*.

Key words: *Hevea brasiliensis*; Cultivated germplasm; C value; Variation

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)原产于亚马逊流域^[1], 是大戟科(Euphorbiaceae)重要的热带经济作

物之一, 也是目前唯一大规模产业化的天然橡胶来源^[2]。因天然橡胶具有合成橡胶无法替代的独特物

收稿日期: 2017-12-07

接受日期: 2018-03-02

基金项目: 云南省现代农业天然橡胶产业技术体系建设项目; 云南省技术创新人才培养对象项目; 云南省热带作物科技创新体系建设项目(RF2018/RF2017)资助

This work was supported by the Project for Technical System Construction of Natural Rubber in Modern Agriculture of Yunnan, the Project for Technology Innovation Talents in Yunnan, and the Project for Science and Technology Innovation System Construction for Tropical Crops in Yunnan Province (Grant No. RF2018/RF2017).

作者简介: 柳颢(1983~), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为植物遗传及分子育种。E-mail: liujin06@126.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: 13708818917@139.com

理性能^[3], 使其在工业和国防等领域有广泛需求, 以天然橡胶为原料的产品超过 4 000 余种^[4]。我国天然橡胶自给率较低, 绝大多数天然橡胶原料依然需要进口。

由于巴西橡胶树属于典型的热带植物, 国内宜植地区极其有限, 只能通过选育优良高产品种来实现增产。但巴西橡胶树传统育种周期较长, 基于基因测序的分子筛选和定向改良则为提高其育种效率提供了一条新的思路。近年来对巴西橡胶树的核基因组进行了测序和组装^[5-8], 重要细胞器叶绿体^[9]和线粒体^[10]的基因组也陆续发表, 数万个与关键性状相关联的基因得以发掘和定位。随着生物技术手段的进步和测序成本的持续降低, 针对大多数栽培品种和特异种质资源的重测序也即将开展, 而基因组 *C* 值则是开展基因组测序的重要参考。

基因组 *C* 值(*C*-value)是指特定物种单倍体细胞核或配子中 DNA 的含量^[11], 也称之为基因组大小, 通常以质量皮克(pg)或核苷酸碱基对数量(Gb)来表述, 二者之间的换算关系为 $1 \text{ pg}=0.978 \text{ Gb}=0.978 \times 10^9 \text{ bp}$ 。对于同一植物而言, 基因组 *C* 值不仅与物种的进化位置有关^[12-13], 而且在一定程度上与其种质资源的遗传多样性紧密相关, 因此, 基因组 *C* 值变异也是评价种质资源遗传基础宽窄的一种手段^[14-15]。此外, 对于同一种植物而言, 细胞核中 DNA 含量与细胞核大小和染色体倍性呈线性相关, 也可通过测定细胞核大小来进行倍性鉴定^[16-17]。流式细胞术作为一种基于核酸荧光染色原理的基因组 *C* 值测定技术, 因其操作简单, 效率较高, 目前已有许多作物种质资源的基因组 *C* 值被测定和分析^[18-19], 但对巴西橡胶树的流式细胞术基因组 *C* 值测定和变异分析的研究尚未见报道。

本研究以 53 份在云南植胶区综合性状表现较好的巴西橡胶树栽培种质为材料, 采用流式细胞术对其细胞核 DNA 含量进行了测定, 并对其基因组 *C* 值变异和染色体倍性进行了分析, 提出了一种简洁有效的巴西橡胶树基因组 *C* 值测定方法, 报道了一批巴西橡胶树栽培种质的基因组 *C* 值和染色体倍性, 为巴西橡胶树基因组重测序和优良品种选育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

53 份巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)栽培种质是

从云南省热带作物科学研究所农业部景洪巴西橡胶树种质资源圃中保存的 600 余份栽培种质中筛选出来的, 这些种质的综合性状表现较好。内标材料玉米(*Zea mays* 'CE-777')和豌豆(*Pisum sativum*)的种子由捷克共和国实验植物学研究所(奥洛摩茨)Jaroslav Dolezel 惠赠, 繁殖出苗后采集嫩叶。

1.2 方法

根据巴西橡胶树叶片组织特征和老嫩程度, 在柳甄等^[20-21]的基础上对流式细胞术测定方法进行了改进。首先选择 CRTG-9、CRTG-191 和 CRTG-314 等 3 份种质的古铜色嫩叶、浅绿色嫩叶和深绿色成熟叶(图 1)分别制样并测试(图 2)。然后选择供试种质的浅绿色嫩叶, 以基因组大小已知的玉米或豌豆嫩叶作为内标进行混合制样并测试, 每份种质重复测定 3 组, 每组测定 6~10 个样品, 细胞核荧光强度取平均值。运用 CFlow Plus 1.0.264.15 软件和 Microsoft Office Excel 2016 软件进行数据收集、作图和分析。内标玉米和豌豆的 $2n$ 细胞核 DNA 含量分别为 5.43 和 9.09 pg^[22], 待测样品基因组 *C* 值 = 内标样品基因组 *C* 值 \times (待测样品荧光强度 / 内标样品荧光强度)。

2 结果和分析

2.1 不同幼嫩程度叶片的比较

从图 2 可以看出, 古铜色嫩叶和深绿色成熟叶的流式细胞术样本峰(M1)较宽, 表示样本中各个细胞核荧光强度值变异较大, 说明测定精确度较差; 浅绿色嫩叶的流式细胞术样本峰窄, 荧光强度值变异小, 说明测定精确度更高。因此, 在巴西橡胶树

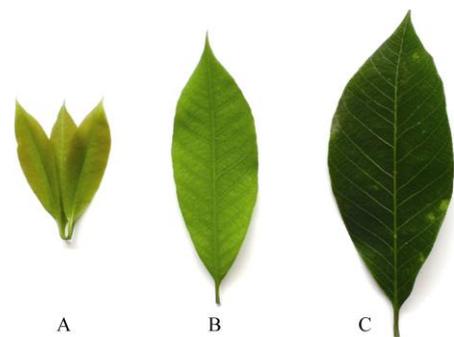


图 1 巴西橡胶树叶片。A: 古铜色嫩叶; B: 浅绿色嫩叶; C: 深绿色成熟叶。图 2 同。

Fig. 1 Leaves of rubber tree. A: Bronze young leaves; B: Light green young leaf; C: Dark green mature leaf. The same is Figure 2.

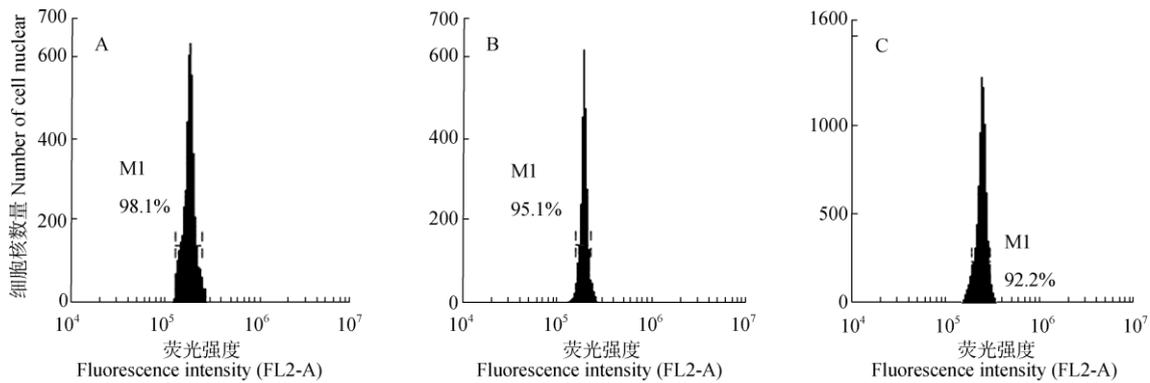


图 2 不同叶龄巴西橡胶树叶片的流式细胞术

Fig. 2 Flow cytometry diagram of rubber tree leaf at different age

栽培种质的基因组大小测定中, 均选择浅绿色嫩叶进行制样和测定。

2.2 基因组 C 值与变异分析

对巴西橡胶树、玉米和豌豆的嫩叶进行了单独制样和流式细胞术检测, 预估了基因组 C 值, 表明基因组 C 值为巴西橡胶树 < 玉米 < 豌豆。因流式细胞术检测图中样本峰的横轴代表样本细胞核的荧光强度, 而细胞核荧光强度直接反映样本的基因组 C 值大小, 因此, 在后续的检测中(图 3), 无论是以玉米还是以豌豆作为内标, 流式细胞术检测图中峰由左向右分别是巴西橡胶树体细胞细胞核的峰、内标材料体细胞细胞核的峰、内标材料体细胞有丝分裂前期染色质复制加倍后细胞核的峰(内标材料有丝分裂旺盛时有此峰, 内标材料有丝分裂不旺盛时无此峰)。

相比而言, 玉米的基因组 C 值与巴西橡胶树更为接近。为减少误差, 首先采用玉米作为内标, 结

果表明, 其中 47 份种质的细胞核 DNA 含量可被准确测定(图 3: A), 说明其基因组 C 值也可被准确测定和换算(表 1)。而 CRTG-186、CRTG-187、CRTG-188、CRTG-255、CRTG-272 和 CRTG-314 等 6 份种质的流式细胞术检测图中仅有玉米的峰, 缺少巴西橡胶树的峰(图 3: B), 但将二者单独制样检测时却都可以得到很好的检测峰图, 因此推测这 6 份种质的细胞核 DNA 含量与其他 47 份种质差异较大, 但与内标玉米的接近, 故在流式细胞术检测图中二者的峰是重叠的。因此, 再次采用豌豆作为内标进行测定(图 3: C), 结果这 6 份种质的细胞核 DNA 含量也可被准确测定(表 1)。对 53 份种质的细胞核 DNA 含量比较发现, 这 6 份种质的细胞核 DNA 含量为其他 47 份种质的 1.5 倍左右, 因普通巴西橡胶树种质为二倍体^[5-8], 因此判定这 6 份种质为三倍体。

从表 1 可见, 53 份巴西橡胶树栽培种质的细胞核 DNA 含量和基因组 C 值存在一定差异, 细胞核 DNA 含量最小的是 CRTG-172 种质(3.007 966 pg),

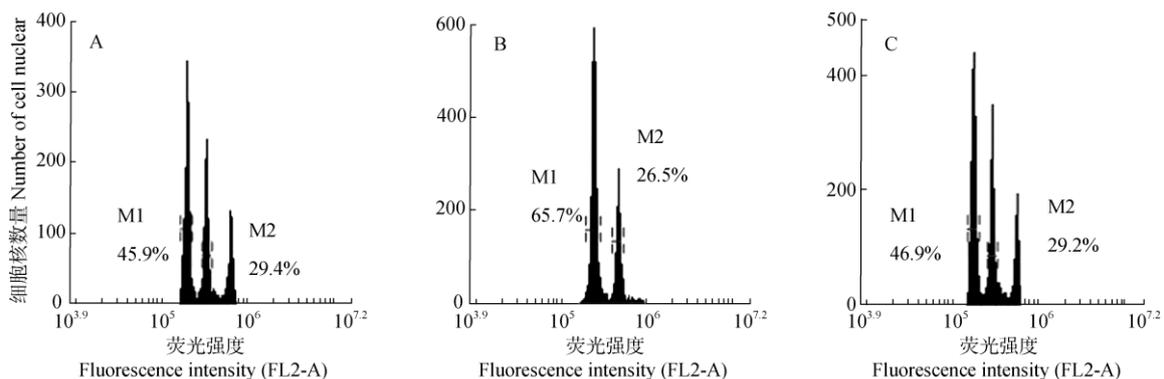


图 3 巴西橡胶树的流式细胞术测定图。A: CRTG-9 种质, 玉米为内标; B: CRTG-186 种质, 玉米为内标; C: CRTG-186 种质, 豌豆为内标。

Fig. 3 Flow cytometry diagram of rubber trees. A: CRTG-9 germplasm with *Zea mays* as interior label; B: CRTG-186 germplasm with *Z. mays* as interior label; C: CRTG-186 germplasm with *Pisum sativum* as interior label.

表 1 53 份巴西橡胶树栽培种质的细胞核 DNA 含量和基因组 C 值

Table 1 Nuclear DNA content and Genome C value of 53 cultivation rubber tree germplasms

序号 No.	种质 Germplasm	细胞核 DNA 含量 Nuclear DNA content (pg)	C ($\times 10^9$ bp)	染色体倍性 Chromosome ploidy (n)
1	CRTG-9	3.137 780	1.534 374	2
2	CRTG-53	3.137 782	1.534 376	2
3	CRTG-81	3.137 776	1.534 372	2
4	CRTG-83	3.272 763	1.600 381	2
5	CRTG-85	3.272 746	1.600 373	2
6	CRTG-87	3.007 985	1.470 904	2
7	CRTG-89	3.272 747	1.600 373	2
8	CRTG-93	3.137 769	1.534 369	2
9	CRTG-94	3.137 783	1.534 376	2
10	CRTG-106	3.007 985	1.470 904	2
11	CRTG-113	3.007 975	1.470 900	2
12	CRTG-120	3.272 753	1.600 376	2
13	CRTG-131	3.272 753	1.600 376	2
14	CRTG-169	3.007 971	1.470 898	2
15	CRTG-170	3.137 785	1.534 377	2
16	CRTG-171	3.272 759	1.600 379	2
17	CRTG-172	3.007 966	1.470 895	2
18	CRTG-173	3.007 982	1.470 903	2
19	CRTG-177	3.137 783	1.534 376	2
20	CRTG-178	3.007 985	1.470 904	2
21	CRTG-180	3.007 985	1.470 904	2
22	CRTG-182	3.272 759	1.600 379	2
23	CRTG-190	3.137 782	1.534 376	2
24	CRTG-191	3.007 989	1.470 907	2
25	CRTG-218	3.007 986	1.470 905	2
26	CRTG-222	3.272 752	1.600 376	2
27	CRTG-223	3.137 773	1.534 371	2
28	CRTG-228	3.137 783	1.534 376	2
29	CRTG-229	3.272 753	1.600 376	2
30	CRTG-230	3.272 750	1.600 375	2
31	CRTG-232	3.007 978	1.470 901	2
32	CRTG-235	3.272 750	1.600 375	2
33	CRTG-249	3.007 975	1.470 900	2
34	CRTG-257	3.272 752	1.600 376	2
35	CRTG-261	3.137 782	1.534 376	2
36	CRTG-262	3.007 984	1.470 904	2
37	CRTG-263	3.137 782	1.534 376	2
38	CRTG-271	3.272 753	1.600 376	2
39	CRTG-274	3.137 759	1.534 364	2
40	CRTG-276	3.137 788	1.534 378	2
41	CRTG-281	3.007 980	1.470 902	2
42	CRTG-292	3.272 753	1.600 376	2
43	CRTG-297	3.272 745	1.600 372	2
44	CRTG-322	3.272 750	1.600 375	2
45	CRTG-335	3.137 774	1.534 371	2
46	CRTG-551	3.137 773	1.534 371	2
47	CRTG-553	3.272 752	1.600 376	2
48	CRTG-186	4.504 428	1.468 443	3
49	CRTG-187	4.533 920	1.478 058	3
50	CRTG-188	4.522 910	1.474 469	3
51	CRTG-255	4.505 916	1.468 929	3
52	CRTG-272	4.496 651	1.465 908	3
53	CRTG-314	4.518 754	1.473 114	3

最大的是 CRTG-187 种质(4.533 920 pg); 基因组 C 值最小的是 CRTG-272 种质($1.465\ 908 \times 10^9$ bp), 最大的是 CRTG-83 种质($1.600\ 381 \times 10^9$ bp)。53 份巴西橡胶树栽培种质的基因组 C 值平均值为 $1.531\ 696 \times 10^9$ bp, 与前人的研究结果^[6-8]一致。变异分析表明, 53 份巴西橡胶树栽培种质的基因组 C 值变异系数较小(CV=0.035 5), 说明其遗传基础相对狭窄。

2.3 巴西橡胶树和大戟科物种的基因组 C 值对比

通常认为, 物种的基因组 C 值是代表某个物种

特征的常数, 与其遗传和进化位置相关^[12-13]。在植物基因组 C 值数据库^[23]中检索到 40 种大戟科植物, 隶属于 14 属(表 2)。基因组 C 值最小的是佛肚树(*Jatropha podagrica*), 为 $0.293\ 4 \times 10^9$ bp, 最大的是宝轮玉(*Euphorbia polygona*), 为 $14.034\ 3 \times 10^9$ bp, 基因组 C 值变异系数(CV)高达 1.248 6。不仅大戟科不同物种间的基因组 C 值变异较大, 且隶属于同一属的不同物种的基因组 C 值变异也较大, 大戟属 19 种植物中, 基因组 C 值最小仅为 $0.337\ 41 \times 10^9$ bp, 最大的为 $14.034\ 3 \times 10^9$ bp, 变异系数(CV)也高达 0.934 5。

表 2 大戟科植物的基因组 C 值

Table 2 Genome C value of Euphorbiaceae species

属 Genus	种数 Species number	C ($\times 10^9$ bp)	属 Genus	种数 Species number	C ($\times 10^9$ bp)
石栗属 <i>Aleurites</i>	1	2.347 20	麻疯树属 <i>Jatropha</i>	2	0.293 40~0.415 65
秋枫属 <i>Bischofia</i>	1	1.809 30	油大戟属 <i>Joannesia</i>	1	0.782 40
土蜜树属 <i>Bridelia</i>	1	1.222 50	木薯属 <i>Manihot</i>	1	0.806 85
大戟属 <i>Euphorbia</i>	19	0.337 41~14.034 3	山靛属 <i>Mercurialis</i>	6	0.650 37~2.298 30
白树属 <i>Gelonium</i>	1	1.149 15	叶下珠属 <i>Phyllanthus</i>	2	0.978 00~1.442 55
巴西橡胶树属 <i>Hevea</i>	2	2.102 70~2.029 35	蓖麻属 <i>Ricinus</i>	1	0.508 56
沙箱树属 <i>Hura</i>	1	4.914 45	滑桃树属 <i>Trewia</i>	1	1.907 10

3 讨论

样品选择是流式细胞术制样和检测的关键, 过于幼嫩的叶片样品在采集后容易萎蔫, 造成部分细胞核结构破坏; 而过于成熟的叶片含有较多的次生代谢物, 检测中易出现较多的杂质峰。本研究比较了不同幼嫩程度巴西橡胶树叶片的流式细胞术检测效果, 首次建立了一套快速、准确测定巴西橡胶树细胞核 DNA 含量和基因组 C 值的方法, 并对云南植胶区综合性状表现较好的主要栽培种质的基因组 C 值进行了测定和变异分析, 为巴西橡胶树种质资源鉴定评价、基因组重测序和良种选育提供了重要理论依据。

在植物基因组 C 值数据库中, Bennett 等^[23]测定巴西橡胶树的基因组 C 值为 $2.102\ 7 \times 10^9$ bp, 而本研究测定的巴西橡胶树基因组 C 值为 $1.531\ 696 \times 10^9$ bp。通过比较^[6-8], 我们认为本研究的测定值更为准确, 推测可能是 Bennett 等的测定时间为 1997 年, 受研究技术、标准品选择等条件限制, 导致估值出现了偏差。

本研究结果表明, 53 份云南植胶区综合性状表现较好的巴西橡胶树栽培种质中有 11.32% (6 份)为三倍体, 远高于自然状态下植物多倍化的几率。这说明巴西橡胶树三倍体种质在云南高海拔植胶区

本身就具有较好的综合性状表现优势, 才使得其在多年的观测评价中被筛选出来。当前云南植胶区主推品种‘云研 77-2’和‘云研 77-4’等均为三倍体, 在高海拔植胶区抗寒性强、产量表现好, 提示我们可以在巴西橡胶树品种选育中重点关注三倍体种质, 以便提高云南植胶区高产抗寒品种的选育效率。

大戟科是被子植物中的大科, 不仅是一个具有重要经济价值的植物学类群, 也是热带植物区系中的重要成分^[24]。本研究结果表明, 大戟科不同物种的基因组 C 值大小与其种属分类没有必然联系, 意味着其基因组 C 值与进化位置间不存在严格的对应关系, 这与前人“C 值悖论”的观点较为一致^[11], 原因尚需进一步研究。

参考文献

- [1] ZOU Z, LIU J T, YANG L F, et al. Survey of the rubber tree genome reveals a high number of cysteine protease-encoding genes homologous to *Arabidopsis* SAG12 [J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0171725. doi: 10.1371/journal.pone.0171725.
- [2] ZOU Z, GONG J, AN F, et al. Genome-wide identification of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) aquaporin genes and their response to ethphon stimulation in the laticifer, a rubber-producing tissue [J/OL]. BMC Genom, 2015, 16: 1001. doi: 10.1186/s12864-015-2152-6.

- [3] LERTPANYASAMPATHA M, GAO L, KONGSAWADWORAKUL P, et al. Genome-wide analysis of microRNAs in rubber tree (*Hevea brasiliensis* L.) using high-throughput sequencing [J]. *Planta*, 2012, 236(2): 437–445. doi: 10.1007/s00425-012-1622-1.
- [4] LIU J P, XIA Z Q, TIAN X Y, et al. Transcriptome sequencing and analysis of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.) to discover putative genes associated with tapping panel dryness (TPD) [J/OL]. *BMC Genom*, 2015, 16: 398. doi: 10.1186/s12864-015-1562-9.
- [5] RAHMAN A Y A, USHARRAJ A O, MISRA B B, et al. Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis* [J/OL]. *BMC Genom*, 2013, 14: 75. doi: 10.1186/1471-2164-14-75.
- [6] TANG C R, YANG M, FANG Y J, et al. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation [J/OL]. *Nat Plant*, 2016, 2: 16073. doi: 10.1038/nplants.2016.73.
- [7] LAU N S, MAKITA Y, KAWASHIMA M, et al. The rubber tree genome shows expansion of gene family associated with rubber biosynthesis [J/OL]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28594. doi: 10.1038/srep28594.
- [8] POOTAKHAM W, SONTHIROD C, NAKTANG C, et al. *De novo* hybrid assembly of the rubber tree genome reveals evidence of paleotetraploidy in *Hevea* species [J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41457. doi: 10.1038/srep41457.
- [9] TANGPHATSORNRUANG S, UTHAIPAISANWONG P, SANGSRAKRU D, et al. Characterization of the complete chloroplast genome of *Hevea brasiliensis* reveals genome rearrangement, RNA editing sites and phylogenetic relationships [J]. *Gene*, 2011, 475(2): 104–112. doi: 10.1016/j.gene.2011.01.002. Epub 2011 Jan 15.
- [10] SHEARMAN J R, SANGSRAKRU D, RUANG-AREERATE P, et al. Assembly and analysis of a male sterile rubber tree mitochondrial genome reveals DNA rearrangement events and a novel transcript [J/OL]. *BMC Plant Biol*, 2014, 14: 45. doi: 10.1186/1471-2229-14-45.
- [11] GREILHUBER J, DOLEŽEL J, LYSÁK MA, et al. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms ‘genome size’ and ‘C-value’ to describe nuclear DNA contents [J]. *Ann Bot*, 2005, 95(1): 255–260. doi: 10.1093/aob/mci019.
- [12] BIÉMONT C. Genome size evolution: Within-species variation in genome size [J]. *Heredity*, 2008, 101(4): 297–298. doi: 10.1038/hdy.2008.80.
- [13] PETROV D A. Evolution of genome size: New approaches to an old problem [J]. *Trends Genet*, 2001, 17(1): 23–28. doi: 10.1016/S0168-9525(00)02157-0.
- [14] KORBAN S S, WANNARAT W, RAYBURN C M, et al. Genome size and nucleotypic variation in *Malus* germplasm [J]. *Genome*, 2009, 52(2): 148–155. doi: 10.1139/G08-109.
- [15] YAN H H, MARTIN S L, BEKELE W A, et al. Genome size variation in the genus *Avena* [J]. *Genome*, 2016, 59(3): 209–220. doi: 10.1139/gen-2015-0132.
- [16] SAMOLUK S S, CHALUP L, ROBLEDO G, et al. Genome sizes in diploid and allopolyploid *Arachis* L. species (Section *Arachis*) [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2015, 62(5): 747–763. doi: 10.1007/s10722-014-0193-3.
- [17] CASTRO S, LOUREIRO J, RODRIGUEZ E, et al. Evaluation of polysomaty and estimation of genome size in *Polygala vayredae* and *P. calcarea* using flow cytometry [J]. *Plant Sci*, 2007, 172(6): 1131–1137. doi: 10.1016/j.plantsci.2007.03.002.
- [18] LIU J, KONG G H, NI S B, et al. Estimation of genomic C value of *Macadamia integrifolia* spp. by flow cytometry [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2013, 29(34): 96–101. doi: 10.11924/j.issn.1000-6850.2013-1305. 柳颀, 孔广红, 倪书邦, 等. 基于流式细胞术的澳洲坚果基因组 C 值测定 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(34): 96–101. doi: 10.11924/j.issn.1000-6850.2013-1305.
- [19] LIU J, LI K X, KONG G H, et al. Genome size and variation analysis of mango (*Mangifera indica* L.) germplasm in Yunnan by flow cytometry [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2015, 23(4): 386–390. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.04.004. 柳颀, 李开雄, 孔广红, 等. 云南芒果种质基因组大小测定与变异分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2015, 23(4): 386–390. doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.04.004.
- [20] LIU J, KONG G H, LI K X, et al. Estimation of genomic C value of *Mangifera indica* L. by flow cytometry [J]. *Chin J Trop Crop*, 2015, 36(9): 1626–1630. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2015.09.013. 柳颀, 孔广红, 李开雄, 等. 基于流式细胞术的芒果基因组 C 值测定 [J]. *热带作物学报*, 2015, 36(9): 1626–1630. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2015.09.013.
- [21] OTTO F. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA [J]. *Methods Cell Biol*, 1990, 33: 105–110. doi: 10.1016/S0091-679X(08)60516-6.
- [22] DOLEZEL J, GREILHUBER J, SUDA J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(9): 2233–2244. doi: 10.1038/nprot.2007.310.
- [23] Royal Botanic Gardens, Kew. Plant DNA C-values database [EB/OL]. (2012–12–01) [2017–07–20]. <http://data.kew.org/cvalues>.
- [24] XU Z L, YU B Y, XU L S. Numerical analysis of the euphorbiaceae [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2004, 12(5): 399–404. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2004.05.002. 徐增莱, 余伯阳, 徐珞珊. 大戟科植物分类的数值分析 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2004, 12(5): 399–404. doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2004.05.002.