

甘薯属耐盐植物马鞍藤基因组大小及特征分析

霍恺森^{1,2}, 赵冬兰¹, 陈艳丽², 周志林¹, 王 珧², 唐 君¹, 朱国鹏², 曹清河¹

(¹江苏徐淮地区徐州农业科学研究所, 徐州 221131; ²海南大学热带农林学院, 海口 570228)

摘要: 马鞍藤 (*Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.) 是甘薯的近缘野生种之一, 为热带、亚热带海滩生长的多年生藤蔓植物, 作为沿海地区的园林绿化植物之一, 具有较强的耐盐性。马鞍藤基因组学的研究可为耐盐甘薯种质创制提供信息参考。本试验调查了马鞍藤基因组大小和特征概况, 为后续全基因组精细图谱绘制打下基础。研究以已知基因组大小的三裂叶薯 (*Ipomoea triloba* L.) 为对照, 运用流式细胞术对马鞍藤基因组大小进行初步预估; 使用二代高通量测序技术 (Illumina Hiseq 2500) 对马鞍藤基因组进行 survey 评估, 测序深度 30 ×, 利用生物信息学方法估算马鞍藤 GC 含量 (即鸟嘌呤和胞嘧啶所占比例)、杂合率、重复序列等基因组概况。结果表明: 流式细胞术估算马鞍藤基因组大小为 1012.704 ± 17.37 Mb; 经全基因组 Survey 测定获得马鞍藤有效数据为 21.71 Gb, 基因组大小经修正后估算为 1041.65 Mbp; 通过 K-mer 分布曲线估算马鞍藤基因组中重复序列所占比例为 74.52%, 杂合率为 0.99%; 经初步组装后, GC 平均深度及含量分布存在异常, 出现分层的现象, 这可能与马鞍藤基因组杂合率较高有关。本试验首次报导甘薯属耐盐植物马鞍藤基因组大小及特征信息, 为马鞍藤进一步的全基因组深度测序和甘薯耐盐基因挖掘打下基础。

关键词: 马鞍藤; 流式细胞术; 基因组测序; GC 含量; 杂合度; 重复序列

Analysis of Genome Size and Characteristics of Salt-tolerant Plant *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.

HUO Kai-sen^{1,2}, ZHAO Dong-lan¹, CHEN Yan-li², ZHOU Zhi-lin¹, WANG Yao², TANG Jun¹, ZHU Guo-peng²,
CAO Qing-he¹

(¹Jiangsu Xuhuai Regional Xuzhou Institute of Agricultural Sciences, Xuzhou 221131;

²Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. is one of the perennial wild species of sweetpotato, a perennial vine plant which grows on tropical and subtropical beaches. It is one of the landscaping plants in coastal areas with strong salt tolerance. The study of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. genome-wide can provide reference for the improvement of salt-tolerant varieties of Sweetpotato and the innovation of salt-tolerant sweet potato germplasm resources. In order to reduce the blindness of whole-genome deep sequencing, this experiment aims to understand the genome overview and provide insight for the following mapping of the whole genome. We performed the experiments in preliminary estimation of the genome size of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. by flow cytometry, generation of high-throughput sequencing datasets, and the bioinformatics analysis of genomic profiles such as *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. GC content, heterozygosity, and repeat sequences. The results showed that the genomic size by using the flow cytometry was 1012.99 Mb, and the clean data of *Ipomoea pes-caprae* was (L.) R.Br. 21.71 Gb by genome-

收稿日期: 2018-08-16 修回日期: 2018-09-04 网络出版日期: 2018-10-19

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20181017.1657.009.html>

第一作者研究方向为作物种质资源与生物技术, E-mail: 673621488@qq.com

通信作者: 曹清河, 研究方向为甘薯基因组学与种质创新, E-mail: caoqinghe@jaas.ac.cn

基金项目: 国家甘薯产业技术体系资源评价岗 (CARS-10-B1-2017); 国家自然科学基金 (31461143017); 国家农作物种质资源平台徐州甘薯平台 (NICGR-062); 江苏省重点研发项目 (BE2016394)

Foundation project: The Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-10-B1-2017), National Natural Science Foundation of China (31461143017), National Crop Germplasm Resources Platform Xuzhou Sweet Potato Platform (NICGR-062), Jiangsu Provincial Key Research and Development Project (BE2016394)

wide Survey. By integrated analysis with 30 × genomic dataset, its genome size was re-estimated to be 1041.65 Mb. K-mer analysis suggested 74.52% of repeated sequences of the *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. genome. The heterozygosity rate was 0.99%. The initial depth of GC and the content distribution were abnormal after initial assembly. The stratification phenomenon may be related to the high heterozygous rate of the *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. genome. Thus, this work reported the preliminary information of the *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. genome, which lays a foundation for further genome-wide deep sequencing and salt tolerance gene mining.

Key words: *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br.; flow cytometry; genome sequencing; GC content; heterozygosity; repetitive sequences

基因组大小(C值)是指生物体的单倍体基因组所含有的DNA总量^[1]。物种C值的测定可为基因组学和进化生物学研究提供理论参考^[2],也可为细胞生物学和转录组学提供一定的理论基础。目前,测定基因组大小的方法众多,其中流式细胞仪(FCM, flow cytometer)测定法因具有速度快、效率高、准确性好等优点^[3],目前已在毛竹^[4]、五节芒^[5]等植物和药用真菌如茯苓^[6]、灵芝^[7]中都有广泛的应用。在流式细胞仪基因组大小的测定中,裂解液的成分含量以及处理时间尤为重要,获得杂质较少的细胞核悬液可增加试验的准确性^[8-9]。随着基因组测序工作的推进,诸多植物基因组测序成为可能,目前已公布三裂叶薯(*Ipomoea triloba* L.)和三浅裂野牵牛(*Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don)基因组序列,甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)第一个基因组草图也已经发表,为优质基因挖掘提供重要参考。除流式细胞仪外,通过高通量测序对基因组Survey分析也是测定基因组大小以及其他基因组特征的有效手段之一。基因组Survey测序是在大规模深度测序之前进行的低覆盖度测序,从而判断基因组的大小以及复杂程度,并以此作为选取适合的测序策略和序列拼接软件的依据^[10],由此提前了解基因组的概况,减少测序的盲目性。目前,通过测序进行基因组Survey分析的方法应用较为广泛,唐其等^[11]利用二代测序技术对罗汉果基因组进行了Survey分析,张伟等^[12]通过二代高通量测序对捕食性真菌 *Duddingtonia flagrans* 全基因组大小进行了测定和评估。

马鞍藤(*Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.)是旋花科(Convolvulaceae)甘薯属(*Ipomoea* L.)植物,又名厚藤、马六藤、沙藤、海滩牵牛等^[13],是生长在热带、亚热带海滩的沙滩植物,属于沿海固沙绿化植物^[14],也是重要的药用植物之一。研究发现甘薯为盐敏感型植物,而作为甘薯的近缘野生种之一,马鞍藤具有较强的耐盐性^[15],但对于马鞍藤的耐盐分子机理方面尚未见详细报道。马鞍藤作为甘薯的

近缘野生种之一,可能携带了包括耐盐基因等大量的优异基因,可为甘薯的种质创新提供基因源。随着全基因组测序成本不断降低,基因组技术将进一步推动未知基因组物种的研究。然而马鞍藤的全基因组大小以及基因组特征评估等信息匮乏,不利于基因组测序工作的开展。本试验通过流式细胞仪对马鞍藤基因组大小进行预估,结合高通量测序技术(Illumina HiSeq 2500),对马鞍藤全基因组的大小进行测定和评估,为后续全基因组测序策略提供依据,为挖掘其耐盐基因以及利用其潜在的基因资源提供参考,以期达到利用分子生物学手段提高甘薯耐盐性的目的。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料马鞍藤(*Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.) (2n=2x=30)、三裂叶薯(*I. triloba* L.) (2n=2x=30)均来自于国家种质徐州甘薯试管苗库。其中,三裂叶薯基因组大小为462 Mb (<http://sweetpotato.plantbiology.msu.edu/>. Accessed 2018.), 以其为流式细胞术测定的参考基因组。

1.2 流式细胞术检测法

1.2.1 待测样品细胞核悬液的制备 参照Dolezel等^[16]和Arumuganathan等^[17]的方法,分别取等量马鞍藤(*Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br.)、三裂叶薯(*Ipomoea triloba* L.)新鲜叶片各0.1 g,蒸馏水洗净表面后使用滤纸吸干,分别置于2个预冷的培养皿中,加入预冷的裂解液5 mL。用锋利的刀片进行切碎,破坏其细胞壁;吸取液体用300目滤膜过滤2次;800 r/min离心5 min。

1.2.2 细胞核悬液DNA特异性染色 制备的核悬液离心后,弃去上清液,加入200 mL碘化丙锭(PI,浓度为5 μg/mL),静置在4℃下避光保存20 min。300目尼龙网过滤,滤液用标准试管收集,随即上机测定。

1.2.3 流式细胞光度术测定 使用美国 B-C (Beckman-Coulter) 公司生产的 BD Accuri C6 (2L4C) Personalized Cytometer 流式细胞仪进行检测。荧光信号的强度代表了其核内物质的浓度,利用荧光强度与细胞核的 DNA 含量成正比例的关系^[18]。荧光信号经光电倍增管接受后可转化为电信号,再通过模/数转换器,将连续的电信号转换为可被计算机识别的数字信号^[19-20]。采用 488 nm 的蓝光激发,检测 PI 的发射荧光强度。每个样品至少收集 1 万个细胞,每个样品重复测定 3 次,变异系数 (CV, coefficient of variation) 控制在 5% 以内。测定所得图像和数据由流式细胞仪自带软件 (BD Accuri C6) 进行处理分析。

1.3 基因组 Survey 分析

1.3.1 样品提取及检测 参照苏一钧等^[21]的方法,采用改良 CTAB 法提取马鞍藤叶片基因组 DNA,用 NanoDrop 分光光度计测量 DNA 的纯度和浓度,琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性。

1.3.2 测序 将马鞍藤的样品委托诺禾致源公司进行测序。通过 Covaris 超声波破碎仪随机打断,构建 250 bp 小片段测序文库,然后通过 Illumina Hiseq2500 平台进行双末端 (Pair-End) 测序。将得到的数据进行过滤,去除低质量的序列片段,得到有效数据 (Clean date) 用于后续基因组大小、杂合度和 GC 含量等信息分析。

1.3.3 K-mer 统计分析及基因组特征预估 在基因组组装前,可以通过测序得到的序列估计基因组特征。采用基于 K-mer 的分析方法来估计基因组大小和杂合率等,即从一段连续序列中迭代地选取长度为 K 个碱基的序列,若每条序列的长度为 L,则 K-mer 长度 K,那么可以得 L-K+1 个 K-mer,本试验中我们取 K=17 来进行分析^[22]。假设从每条序列中逐碱基取出的所有 K-mer 能够遍历整个基因组,根据 Lander_watermand 等算法和 K-mer 深度频率分布服从泊松分布,即可从所有测序序列中逐碱基取 K-mer,统计 K-mer 频数分布,计算获得 K-mer 深度分布曲线和深度乘积曲线。根据曲线获得 K-mer 深度估计值,用于估计基因组大小。基于贝叶斯模型 K-mer 所有的频率数和深度属性,可以得到并且通过迭代来修正由此反映基因组的杂合率和重复序列的情况。对于杂合基因组来说,假设每一个杂合位点有 K×2 个杂合 K-mer 覆盖,所以相比于纯合 K-mer 的期望深度,杂合 K-mer 的期望深度为 2C。由此,可通过其中杂合 K-mer 种类数

的百分比、纯合 K-mer 种类数的百分比、所有 K-mer 的种类数计算出杂合率。

$$\phi = \frac{a_{1/2} \times n_{Kspecies} / (2 \times K)}{n_{Kspecies} - a_{1/2} \times n_{Kspecies} / 2} = \frac{a_{1/2}}{K(2 - a_{1/2})}$$

其中 $a_{1/2}$ 为杂合 K-mer 种类数的百分比, $n_{Kspecies}$ 为所有 K-mer 的种类数,通常选取 Kmer=17 进行分析。通过计算标准泊松分布和实际数据曲线峰值后的面积差值,可得到重复序列百分比。

1.3.4 基因组数据组装分析 对有效序列进行初步的拼接和组装,用 K=41 组装到 Contig (基于 reads 和 overlap 区,拼接获得的序列) 和 Scaffold (由顺序已知的 Contigs 组成),得到原始基因组序列。将组装好的基因组序列与原始 reads 进行对比,分析组装序列的 GC 含量、Contig 覆盖深度、长度及数量分布情况。

2 结果与分析

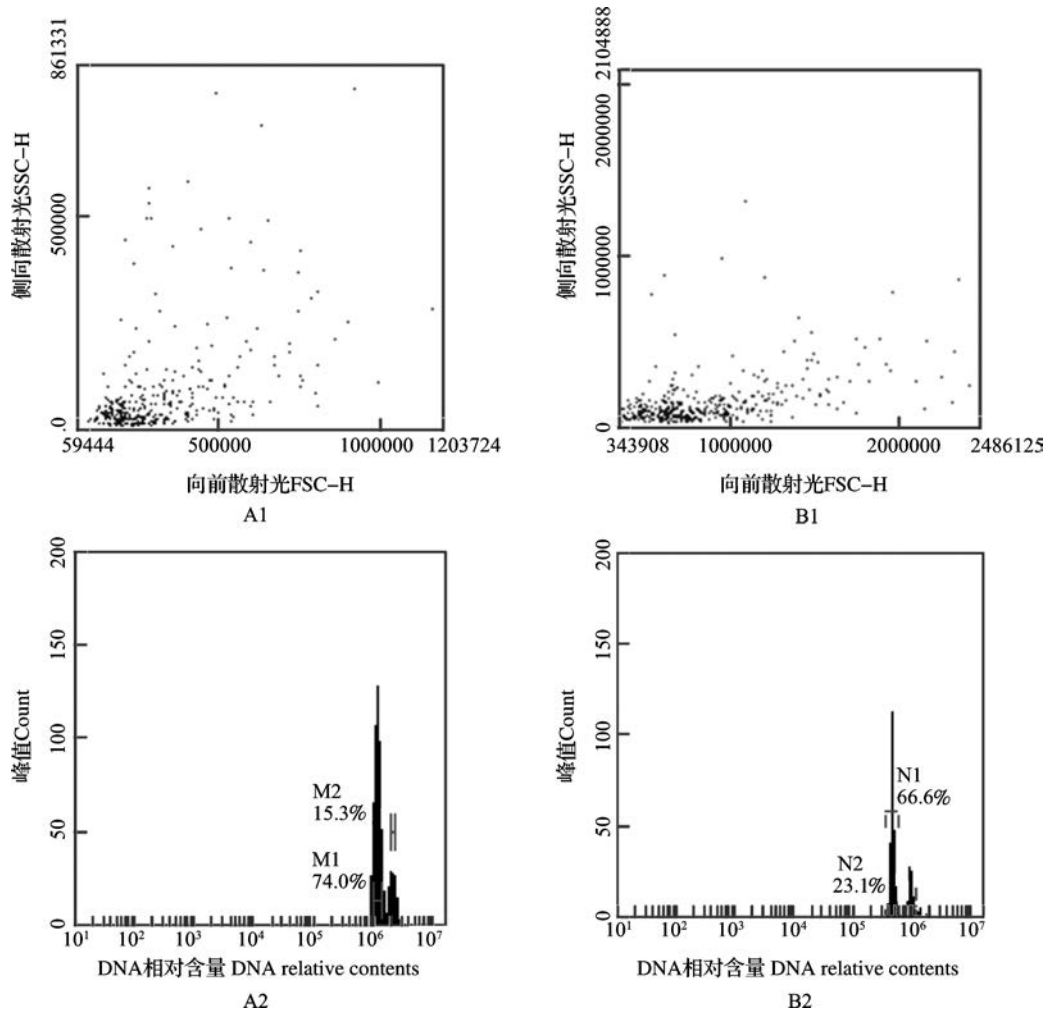
2.1 马鞍藤基因组大小流式细胞术分析

PI 是一种荧光染料,能够均匀嵌入双链 DNA 的碱基对中,嵌入量与 DNA 含量成正比关系,故可用荧光强度表示 DNA 相对含量。在本试验条件下,由三裂叶薯样品与马鞍藤样品可知 (图 1A1, B1),制备质量散点图中粒子团清晰且集中,表明试验样品区分良好。分别对三裂叶薯和马鞍藤样品的 PI 发射荧光强度表明 (图 1),N1 为三裂叶薯 2C DNA 含量峰,DNA 相对含量均值为 559010.03;M1 为马鞍藤 2C DNA 含量峰,DNA 相对含量均值为 1225702.34。本试验以三裂叶薯基因组大小作为参考,比较三裂叶薯与马鞍藤峰值的倍数关系,计算马鞍藤基因组大小。马鞍藤基因组大小为三裂叶薯基因组大小平均值的 2.192 ± 0.0376 倍,由此计算出马鞍藤大小 1012.704 ± 17.37 Mb,即 2C DNA 含量为 2.07 pg (以 1 pg DNA=978 Mb 计算)。

2.2 马鞍藤基因组大小测序 Survey 分析

2.2.1 测序数据量统计 通过高通量测序技术对 DNA 进行测序后得到原始数据 30.69 Gb,预估马鞍藤基因组测序深度为 30×,将低质量的序列片段过滤后,得到 21.71 Gb 有效数据 (Clean date) 用于后续分析。

2.2.2 K-mer 分析及基因组特征预估 将马鞍藤 21.71 Gb 的数据用于 17-mer 分析频率分布。由图 2 可知,只有一个主峰值的出现,K-mer 期望深度出现在 21 附近。由表 1 显示,K-mer 总数为 22081066699,



A1: 三裂叶薯样品制备质量散点图; A2: 三裂叶薯基因组的测定峰; B1: 马鞍藤样品制备质量散点图; B2: 马鞍藤基因组的测定峰;
 SSC: 侧向光散射; FSC: 前向散射光; N1: 三裂叶薯 2C DNA 含量峰, DNA 相对含量均值为 559010.03; N2: 三裂叶薯 1C DNA 含量峰;
 M1: 马鞍藤 2C DNA 含量峰, DNA 相对含量均值为 1225702.34; M2: 马鞍藤 1C DNA 含量峰
 A1: *Ipomoea triloba* L. sample preparation mass scatter plot, A2: *Ipomoea triloba* L. genome peak, B1: quality scatter plot of the sample of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br., B2: peak of the genome of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br., SSC: lateral light scattering, FSC: forward scattered light,
 N1: *Ipomoea triloba* L. 2C DNA content peak, mean relative content of DNA is 559010.03, N2: *Ipomoea triloba* L. 1C DNA content peak,
 M1: 2C DNA content peak of *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br., mean relative content of DNA is 1225702.34, M2: *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br. 1C DNA content peak

图 1 三裂叶薯与马鞍藤流式细胞术的测定

Fig.1 Flow cytometry of *Ipomoea triloba* L. and *Ipomoea pes-caprae* (L.) R.Br.

通过公式(基因组大小 = K-mer 的总数 / K-mer 期望深度)计算出基因组的大小为 1051.48 Mbp, 排除错误 K-mer 带来的误差影响经修正后为 1041.65 Mbp。根据图 2, K-mer 曲线拖尾现象较为明显, 可能是马鞍藤基因组重复序列含量较高所导致。由 1.3.3 公式计算可得出, 杂合率为 0.99%。通过计算标准泊松分布和实际数据曲线峰值后的面积差值, 可得到重复序列百分比。本研究中根据纯合峰深度后 1.8 倍的 K-mer 总数占有所有 K-mer 数的百分比计算可得重复率为 74.52%。

2.2.3 基因组数据初步组装结果分析 使用 SOAP-denovo 对 21.71 Gb 有效数据进行组装, 采

用 K=41 构建 Contig 和 Scaffold, 得到原始基因组序列, 组装结果如表 2 所示 Contig N50 为 552 bp, Contig 最大长度达 20689 bp, 总长度为 505182803 bp; 然后利用 reads 之间的连接关系和插入片段大小信息, 将 Contigs 组装成 Scaffolds, Scaffold N50 长度为 789 bp, 最大长度达到 30044 bp, 总长度为 544460844 bp。其中, Contig N50 和 Scaffold N50 的长度较短可能是由于马鞍藤基因组杂合率达到 0.99% 所导致。如图 3, Contig 分布的结果显示马鞍藤有 1 个明显的峰, 结合 17-mer 的 Survey 分析得到的基因组大小, 认为此峰值是 14 左右的纯合峰。

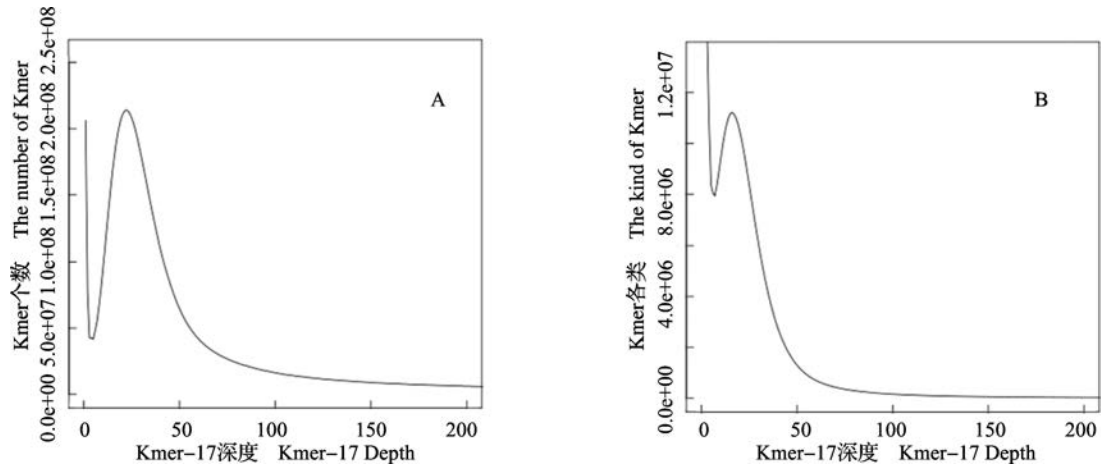


图2 17-mer 分布曲线

Fig.2 The distribution curve of 17-mer

表1 17-mer 分析数据统计

Table 1 Statistics of 17-mer analysis data

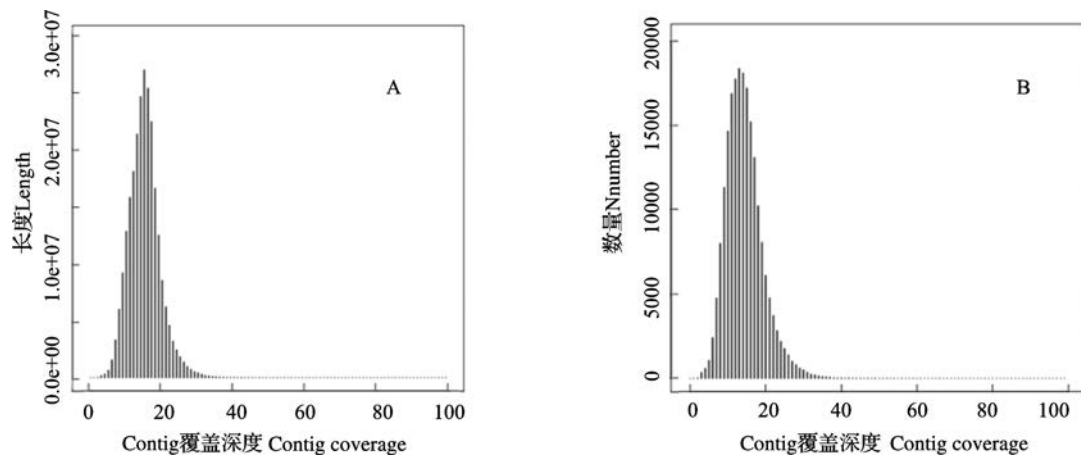
K-mer 总数量 K-mer total number	K-mer 深度 K-mer depth	基因组大小 (Mbp) Genome size	修正后基因组大小 (Mbp) Revised genome size	杂合率 (%) Heterozygous ratio	重复序列 比例 (%) Repeat sequence ratio
22081066699	21	1051.48	1041.65	0.99	74.52

表2 基因组组装结果统计

Table 2 Statistics of the outcome of genome assembly

项目 Item	Contig	Scaffold
总长度 (bp) Total length	505182803	544460844
总数量 Total number	1575598	1341909
最大长度 (bp) Max length	20689	30044
N50 长度 (bp) N50 length	552	789
N90 长度 (bp) N90 length	124	139

在上述统计结果中,只对大于 100 bp 的 scaffold 进行统计; contig 统计是针对组装好的长度大于等于 100 bp 的 scaffold 内部的 contig 进行的统计
In the above statistical results, only the scaffold larger than 100 bp is counted, the contig statistic is the statistics of the contig inside the scaffold assembled with a length of 100 bp



A: Contig 覆盖深度和长度分布图; B: Contig 覆盖深度和数量分布图

A: Contig coverage depth and length profile figure, B: Contig coverage depth and quantity distribution

图3 Contig 分布

Fig.3 Contig distribution

对组装的 Contig 进行 GC 含量的统计,统计结果显示(图 4),测序不具有明显的 GC 偏向,GC 含量分布在 20%~60%,主要集中在 40% 左右。由图 4 可知,马鞍藤基因组的 GC 含量分布存在异常,GC 深度分布呈现 3 层,分为高、中、低深度 3 个区域。低深度区域,GC 含量达到 50%,细菌序列一般 GC 含量较高,由此推测这可能是由于细菌污染所造成。中深度区域深度约为高深度区域的 50% 左右,结合马鞍藤基因组杂合率高达 0.99% 推测可能与马鞍藤高度杂合有关。因为在组装的过程中,杂合可能导致同源染色体杂合部位单条组装,导致 GC 含量出现分层的现象,这可能与马鞍藤自身的 GC 含量较高有关,进一步验证马鞍藤杂合率较高的特性。

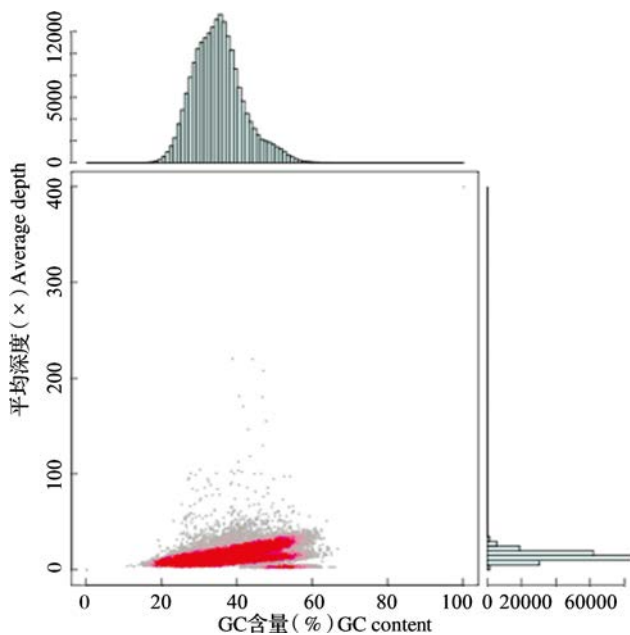


图 4 Contig GC 含量和覆盖深度
Fig.4 Contig GC content and depth of coverage

3 讨论

基因组大小是指一个基因组中所拥有的 DNA 含量。基因组大小是基因组学的基础^[23]。人们发现基因组的大小和物种的进化复杂度之间没有严格的对应关系^[24],而绝大多数植物的基因组都经历了多倍化过程。此外,也有资料明确表示在相近物种中,进化的物种基因组出现压缩是自然界常观察到的现象^[25]。本研究对马鞍藤基因组大小进行分析,为探究甘薯及其近缘野生种基因组大小变化规律提供参考。甘薯基因组大小约为 4.4 Gb^[26];三裂野牵牛(*Ipomoea trifida* (Kunth) G. Don) 基因

组大小约为 462 Mb,三裂叶薯(*Ipomoea triloba* L.) 基因组大小约为 458 Mb^[27]。本研究通过流式细胞术预估马鞍藤基因组大小为 1012.99 Mb,经高通量测序 K-mer 估计法测定马鞍藤基因组大小修正后为 1041.65 Mb,两种方法测定结果基本一致,但仍存在一定误差。马鞍藤基因组大小约为三裂野牵牛基因组、三裂叶薯基因组的 2 倍左右,而马鞍藤基因组大小明显小于甘薯,这可能是由于普通栽培种甘薯为六倍体,基因组倍性高,遗传背景复杂。

在对基因组大小的检测技术从复性动力学估算法^[28],到脉冲凝胶电泳法^[29],到流式细胞法^[30],再到现在的高通量测序 K-mer 估计法^[31]。其中流式细胞术的应用较为广泛,具有所需材料少、时间短、准确性较高等优点;而高通量测序 K-mer 估计法,在测定基因组大小的同时,还可获得基因组 GC 含量、杂合率、重复序列等遗传背景信息。本试验通过全基因组 Survey 分析和流式细胞术相结合,通过两种方法测定基因组大小,提高结果的可靠性,并对其他遗传背景信息进行评估。马鞍藤基因组在经过初步组装后,Contig N50 和 Scaffold N50 长度并不理想,同时 GC 含量分布存在异常;而针对马鞍藤杂合度和重复序列较高的特点,可考虑使用 WGS + BAC-to-BAC 或 Fosmid-to-Fosmid 对拼接策略进行补充,但常规解决策略具有成本高昂、周期较长的特点,因此也可考虑采用 NOVOheter 策略应对高杂合度的组装。本试验为马鞍藤基因组进一步深度测序策略的选取和利用甘薯近缘野生种资源方面提供了参考。

参考文献

- [1] Greilhuber J, Dolezel J, Lysák M A, Bennett M D. The origin, evolution and proposed stabilization of the terms 'genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*, 2005, 95 (1): 255-260
- [2] 张靖靖. 紫草基因组大小的测定研究. 南京: 南京大学生命科学学院, 2013
Zhang J J. Study on the measurement of genome size of *Lithospermum erythrorhizon*. Nanjing: School of Life Sciences, Nanjing University, 2013
- [3] Dolezel J, Greilhuber J, Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2007, 2 (9): 2233-2244
- [4] 李潞滨, 武静宇, 胡陶, 杨学文, 彭镇华. 毛竹基因组大小测定. *植物学通报*, 2008, 25 (5): 574-578
Li L B, Wu J Y, Hu T, Yang X W, Peng Z H. Estimation of genome size of Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Chinese*

- Bulletin of Botany, 2008, 25 (5): 574-578
- [5] 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
- [6] 李秋实, 徐江, 朱英杰, 孙超, 宋经元, 陈士林. 基于流式细胞技术的灵芝基因组大小估测. 菌物学报, 2013, 32 (5): 899-906
Li Q S, Xu J, Zhu Y J, Sun C, Song J Y, Chen S L. Estimation of the genome size of *Ganoderma lucidum* based on a flow cytometric analysis. Mycosystema, 2013, 32 (5): 899-906
- [7] 王亚之, 李秋实, 陈士林, 孙超, 宋经元. 基于流式细胞分析技术的茯苓基因组大小测定. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2010, 12 (3): 452-456
Wang Y Z, Li Q S, Chen S L, Sun C, Song J Y. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Poriacocos*. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2010, 12 (3): 452-456
- [8] 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. 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. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27 (9): 21-27
- [9] 李彩琴, 王泽槐, 徐咏珊, 张劲霁, 李建国. 流式细胞术细胞核分离缓冲液的改良及大、小果型荔枝幼果和果皮细胞分裂活性比较. 园艺学报, 2011, 38 (9): 1781-1790
Li C Q, Wang Z H, Xu Y S, Zhang J A, Li J G. Improvement of the cell nuclei suspensions for flow cytometry and comparison on the cell division activity of litchi fruitlet and pericarp which having different final fruit size. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38 (9): 1781-1790
- [10] 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 (2): 145-156
Shi J S, Wang Z J, Chen J H. Progress on whole genome sequencing in woody plants. Hereditas, 2012 (2): 145-156
- [11] 唐其, 马小军, 莫长明, 潘丽梅, 韦荣昌, 赵欢. 罗汉果全基因组 Survey 分析. 广西植物, 2015, 35 (6): 786-791
Tang Q, Ma X J, Mo C M, Pan L M, Wei R C, Zhao H. Genome survey analysis in *Siraitia grosvenorii*. Guihaia, 2015, 35 (6): 786-791
- [12] 张伟, 王瑞, 杨晓野, 祝晓蕊, 王新芳, 梁萌, 杨莲茹, 李军燕, 罗晓平. 捕食性真菌 *Duddingtonia flagrans* 基因组 DNA 的提取及基因组 survey 分析. 中国兽医学报, 2017, 37 (11): 2090-2094
Zhang W, Wang R, Yang X Y, Zhu X R, Wang X F, Liang M, Yang L R, Li J Y, Luo X P. Genomic DNA extraction and genome survey of the predatory fungus *Duddingtonia flagrans*. Chinese Journal of Veterinary Science, 2017, 37 (11): 2090-2094
- [13] 孔令培. 优良海滩植被——厚藤. 中国花卉盆景, 2001 (9): 9
Kong L P. Excellent beach vegetation--- *Ipomoea pes-caprae*. Chinese Flower Bonsai, 2001 (9): 9
- [14] Kamakura M, Furukawa A. Compensatory function for water transport by adventitious roots of *Ipomoea pes-caprae*. Journal of Plant Research, 2009 (122): 327-333
- [15] 王正加, 黄有军, 龚宁, 夏国华, 吕联江, 程柯. 厚藤耐盐生理指标研究. 江西农业大学学报, 2006, 28 (2): 264-267
Wang Z J, Huang Y J, Gong N, Xia G H, Lv L J, Cheng K. A study on physiological indices of *Ipomoea pes-caprae* under salt stress. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2006, 28 (2): 264-267
- [16] Dolezel J, Binarova P, Lucretti S. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biologia Plantarum, 1989, 31: 113-120
- [17] Arumuganathan K, Earle E D. Estimation of nuclear DNA contents of plants by flow cytometry. Plant Molecular Biology Reporter, 1991, 9 (3): 229-241
- [18] 刘祎, 刘争辉, 何旭, Dragovich A Yu, 杨起简. 利用流式细胞术鉴定黑麦草倍性方法的研究. 中国农学通报, 2011, 27 (9): 212-215
Liu W, Liu Z H, He X, Dragovich A Yu, Yang Q J. DNA content and ploidy determination of ryegrass (*Lolium perenne*) by flow cytometry. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2011, 27 (9): 212-215
- [19] 严苏丽, 何丽容, 陈巧伦. 流式细胞仪的应用体会. 现代医学仪器与应用, 2003, 15 (1): 23-24
Yan S L, He L R, Chen Q L. Application experience of flow cytometry. Journal of Molecular Diagnostics and Therapy, 2003, 15 (1): 23-24
- [20] 赵泓, 刘凡. 流式细胞仪. 安徽农学通报, 2006, 12 (12): 39-41
Zhao H, Liu F. Flow cytometry. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2006, 12 (12): 39-41
- [21] 苏一钧, 王娇, 戴习彬, 唐君, 赵冬兰, 张安, 周志林, 曹清河. 303 份甘薯地方种 SSR 遗传多样性与群体结构分析. 植物资源遗传学报, 2018, 19 (2): 243-251
Su Y J, Wang J, Dai X B, Tang J, Zhao D L, Zhang A, Zhou Z L, Cao Q H. Genetic diversity and population structure analysis of 303 Sweetpotato landraces using SSR markers. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19 (2): 243-251
- [22] Huang S S, Li R Q, Zhang Z H, 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, van der Vossen EA, 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 Y 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 Y, Xu Y, Heller-Uszynska 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 G H, Yang S, Bolund L, Kristiansen K, Zheng H C, Li S F, Zhang X Q, Yang H M, Wang J, Sun R F, Zhang B, Jiang S Z, Wang J, Du Y C, Li S G. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. Nature Genetics, 2009, 41 (12): 1275-1038

- [23] 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
- [24] Callan H G. The organization of genetic units in chromosomes. Journal of Molecular Cell Biology, 1967, 2: 1-7
- [25] 李蔚,刘莉莎,李仁,郭仰东. 十字花科蔬菜基因组含量的测定与分析. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 103-106
Li W, Liu L S, Li R, Guo Y D. Analysis of genome contents in some cruciferous vegetables. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(1): 103-106
- [26] *Ipomoea* Genome Hub. The haplotype-resolved genome sequence of hexaploid *Ipomoea batatas*. (2014-05-15) [2018-08-09]. <https://ipomoea-genome.org/>
- [27] Sweetpotato Genomics Resource. The Sweetpotato Genomics Resource was released. (2016-06-13) [2018-09-22]. <http://sweetpotato.plantbiology.msu.edu/>
- [28] Frenkel N, Roizman B. Herpes vimplex virus: genome size and redundancy studied by renaturation kinetics. Journal of Virology, 1971, 8: 591-593
- [29] Chen H, Keseler I M, Shimkets L J. Genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Bacteriology, 1990, 172: 4206-4213
- [30] De Vita R, Cavallo D, Eleuteri P, Odierna G, Balletto E. Flow cytometric approach to study genome size variation in eurasiatic green toads of the *Bufo viridis* complex. European Journal of Histochemistry, 1997, 41(2): 175-176
- [31] Chen W, Hasegawa D, Arumuganathan K, Simmons A M, Wintermantel W M, Fei Z J, Ling K S. Estimation of the whitefly *bemisia tabaci* genome size based on k-mer and flow cytometric analyses. Insects, 2015, 6: 704-715