

Determination of Genome Size of a Rare and Endangered Plant *Elaeagnus mollis* Diels

Xia Wang, Xia Li, Tingting Li, Ting Ren, Rong Han, Hui Chen*

College of Life Science, Shanxi Normal University, Linfen Shanxi
Email: 472617651@qq.com, *chenhui@sxnu.edu.cn

Received: Mar. 4th, 2018; accepted: Mar. 18th, 2018; published: Mar. 29th, 2018

Abstract

The study aims to determine the genome size of a rare and endangered plant *Elaeagnus mollis* by using flow cytometry method. *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis* that the genome size was known was selected as an internal reference plant. First, the conditions of seed germination of plants were optimized by soaking seeds in different temperatures water and the seeds were cultured in soil. Then the study compared the cracking effects of OttoI lysate on plant leaves of *Elaeagnus mollis* and *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*. Meanwhile, we observed the cell size by freehand sectioning. Finally, we extracted nuclei with OttoI and OttoII lysates and nuclei were stained with propidium iodide. Based on the observation both of cell size, we made sure the same leaves weight and sample loading. Then, these samples were detected by flow cytometry and their DNA contents were calculated as the ratio of mean fluorescence of the G₀/G₁ peak between *Elaeagnus mollis* and *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*. The results show that the determined genome size of *Elaeagnus mollis* is 1662.6 ± 78.24 Mbp, or relative DNA content is 1.70 ± 0.08 pg. The results provide a data reference for future research of genome sequencing of *Elaeagnus mollis*.

Keywords

Elaeagnus mollis Diels, *Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*, Flow Cytometry, Genome Size

珍稀濒危植物翅果油树基因组大小的测定

王霞, 李霞, 李婷婷, 任婷, 韩榕, 陈惠*

山西师范大学, 生命科学学院, 山西 临汾
Email: 472617651@qq.com, *chenhui@sxnu.edu.cn

收稿日期: 2018年3月4日; 录用日期: 2018年3月18日; 发布日期: 2018年3月29日

*通讯作者。

摘要

本文的研究目的是通过流式细胞法来测定珍稀濒危植物翅果油树基因组的大小。研究采用基因组大小已知的中国沙棘作为参考植物。首先,通过两种温度浸种优化了两种植物种子萌发的条件,培养出幼苗。其次,比较了OttoI裂解液对翅果油树和中国沙棘幼苗叶片的细胞裂解效果,并通过徒手切片法观察了二者叶片的细胞大小。最终确定选用OttoI和OttoII细胞裂解液提取两种植物叶片的细胞核悬浮液并根据细胞大小确定了相同的细胞悬浮液上样量,同时用碘化丙啶进行细胞核染色,将处理好的样品上流式细胞仪进行细胞核DNA含量的测定。通过比较内参样品中国沙棘与待测样品翅果油树二者细胞核的 G_0/G_1 期峰值,计算出翅果油树的基因组大小。结果以中国沙棘为内参测定的翅果油树的基因组大小为 1652.82 ± 78.24 Mbp,或相对DNA含量为 1.69 ± 0.08 pg。研究结果为翅果油树基因组的测序等研究提供了数据参考。

关键词

翅果油树, 中国沙棘, 流式细胞仪, 基因组大小

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

翅果油树(*Elaeagnus mollis* Diels)为胡颓子科(Elaeagnaceae)胡颓子属(*Elaeagnus*)的多年生落叶灌木或乔木[1],叶片表面含有大量浓密的白色表皮毛,且种子含油率高,是第四纪冰川后保存下来的古生植物,于20世纪80年代被列为国家二级重点保护植物[2],为中国特有树种和中国特有的野生木本油料植物[3]。翅果油树多生长在海拔800~1300 m左右的山地及坡上,野生物种主要分布在中国的山西省乡宁县、翼城县、平陆县等地。山西琪尔康生物有限公司和陈惠等人成功进行了翅果油树的人工栽培[4]和组织培养快速繁殖[5]。宫慧芳和陈惠[6]还进行了不同种质翅果油树幼苗表型和抗旱性比较研究。中国沙棘(*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi)与翅果油树近缘,属胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属(*Hippophae* L.)中沙棘的一个亚种,是沙棘属中最原始的类群[7]。乔木或灌木,叶片密被白色星状鳞毛,是中国特有的物种且广泛分布于中国的北部地区。

物种基因组的大小(或称C-value)指的是单倍体细胞中全套染色体的DNA总量[8],单位一般表示为pg (pictogram)或Mb (million base pair),1 pg相当于978 Mb [9]。基因组的大小是物种的重要特征之一,而且真核生物体细胞的染色体数目和DNA含量一般是恒定不变的,这对物种生理、生态分布、进化等都有不同的影响[10]。

流式细胞仪测定样品的DNA含量可通过仪器的上样区进行自动测定分析,其原理是经荧光染色的单细胞在激光照射下所产生的荧光信号被检测器捕捉,经过光电信号及数字信号转换,通过计算机软件设计的直方图进行量化分析,经比较待测样品和内参样品的相对荧光强度,即 G_0/G_1 期峰值比,计算出待测样品的DNA含量[11]。流式细胞法可以直接测定样品细胞核的DNA含量[12][13],快速鉴定物种的染色体倍性水平,已成功用于苹果[14]、草莓[15]、李属[16]和猕猴桃[17]的倍性鉴定中。流式细胞法检测样品速度快,样品制备方法简便,可检测包括各种细胞,微生物,细胞裂解液,血清等多种类型的样品,还能检测细胞的结构与功能等。实验测定结果稳定可靠,已广泛应用于临床、生物医学、制药工业、环

境及食品等领域，但在植物上的应用仍有许多问题需要不断探索。比如选择不同的内参植物对待测植物所测基因组大小的数值也是不同的，国际上并没有规定标准的内标植物。同时不同的细胞裂解液对植物细胞的裂解效果也有影响，不同植物有最适的细胞裂解液，选择何种裂解液也是基因组大小测定的关键。

有关翅果油树，前人研究过它的表皮毛微形态及其发育[4] [18]、种子萌发与幼苗的生长[19] [20]、组织培养快速繁殖[21]及种群生态等方面[22] [23]。目前，还未见有其基因组大小的报道。本研究以8叶期的翅果油树幼嫩叶片为材料，选择胡颓子科沙棘属的中国沙棘为内参植物，以 OttoI 为裂解液对叶片进行细胞裂解，确定了最佳的样品制备条件，优化了测定翅果油树基因组大小的流式操作流程，方便对翅果油树进行后续的深入研究。此外，测定的结果可以为翅果油树的进一步测序及相关分子生物学研究提供参考。

2. 材料与amp;方法

2.1. 植物材料

中国沙棘种子从中国山东省临沂蓝天种业专业种子amp;公司购得；翅果油树种子由山西省琪尔康生物有限公司种植基地之一的临汾市乡宁县云丘山种植园内采集，所有材料均保存于山西师范大学生命科学学院植物组织培养实验室。

2.2. 种子萌发与幼苗栽培

取饱满的中国沙棘种子分别用 50℃ 和 21℃ 水浸泡 24 h，果实膨胀后剥掉果皮，播种在蛭石：营养土 =1:1 的营养钵中。培养条件：25℃，光照 16 h；21℃，黑暗 8 h。翅果油树种子同样也用 50℃ 和 21℃ 水浸泡 24 h，果实膨胀后剥掉中果皮，剪开种皮，露出胚部，直接种植在蛭石：营养土=1:1 的 7 cm × 7 cm 营养钵中。培养温度为 25℃，光周期为 12 h 光照/12 h 小时黑暗。

2.3. 方法

2.3.1. 裂解前的叶片处理

由于两种材料表面有丰富的表皮毛会影响测定结果，需在裂解前对叶片进行特殊处理。将叶片在蒸馏水中浸湿，置于培养皿盖上无菌滤纸吸干表面水分，用牙签粗头端轻轻刮去表皮毛，并用蒸馏水冲洗 5~6 次，吸水纸吸干备用。

2.3.2. OttoI 细胞裂解液对两种植物叶片的裂解效果

本研究配制了 OttoI (100 mmol·L⁻¹ citric acid, 0.5%(V/V) Tween-20, pH = 3.0, 0.22 μm 微孔滤膜过滤，4℃ 保存)和 OttoII (400 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄·12H₂O, pH = 8.0, 0.22 μm 微孔滤膜过滤，常温避光保存)裂解液 [24]对二者叶片细胞进行裂解，裂解后的样品经荧光染料 PI (Propidium Iodide)染色 10 min，并在荧光显微镜(Olympus BX51)下观察裂解的细胞。

2.3.3. 翅果油树叶片最佳取材量及荧光染料用量的研究

分别对 50 mg、100 mg、150 mg、200 mg 的翅果油树叶片用量和不同荧光染料碘化丙啶 PI(酷尔化学科技有限公司，北京)用量即 10 μg、12.5 μg、20 μg、25 μg 进行优化，统计相同时间内不同取材量及对应的 PI 用量下流式细胞仪(BD, USA)图像获取的细胞数目。

2.3.4. 翅果油树与中国沙棘叶片细胞大小的观察

取中国沙棘和翅果油树的新鲜嫩叶片进行徒手切片，用单面刀片切取厚为 0.1 mm 的薄片，置于干净载玻片上，滴加一滴 1% 番红染液，盖上盖玻片，在荧光显微镜(Olympus BX51)下观察二者的细胞大小，

并拍摄。同时用 ImageJ 软件测量二者植物叶片中叶肉细胞的短径和长径大小。

2.3.5. 单细胞悬浮液的制备及检测

1) 细胞悬浮液制备: 称取翅果油树新鲜嫩叶 200 mg, 剪去叶脉, 去掉表皮毛后用无菌蒸馏水清洗 5~6 次, 并用滤纸吸干表面水分。在加有 1 mL 预冷的 OttoI 溶液的干净培养皿中, 用单面刀片将叶片快速切成 0.5 cm² 大小的碎片, 冰浴器上孵育 5 min 后 400 目尼龙网(预先用 OttoI 溶液浸泡)过滤, 取滤液于 1.5 mL 离心管中, 离心。翅果油树 2,000 g, 4℃离心 5 min, 弃上清液, 沉淀加 100 μL OttoI 溶液, 4℃保存备用, 待测样品的细胞悬浮液制备三份。采用同样的方法分别获取中国沙棘及二者混合样的细胞悬浮液样品各三份, 其中混合样品 1,000 g, 4℃离心 5 min, 离心一次, 中国沙棘样品 5,000 g, 4℃离心 5 min, 离心两次。

2) 染色: 将上述备好的细胞悬浮液样品各加 378 μL OttoII 溶液, 1 mg·mL⁻¹ RNase 10 μL(预先煮沸, 使 DNase 失活)和 1 mg·mL⁻¹ 荧光染料 PI 12.5 μL(RNase 和 PI 均预先经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, -20℃保存), 混匀, 4℃避光染色 10 min。

3) 流式细胞仪检测: 开机预热 30 min, 流式细胞仪采用 488 nm 氩离子激发光检测, 流式参数设为 FL2-A, 低速上样。每份样品上样量 0.5 mL, 获取至少 10,000 个细胞, 同一样品处理重复测定 3 次。鉴于荧光强度与 DNA 含量之间存在正相关关系, 依据内参植物样品的荧光强度与待测样品的荧光强度之间的成像及比较, 通过公式换算得到翅果油树基因组大小值, 公式如下:

$P = F_1/F_2 \cdot H$ (P 为待测样品的 DNA 含量; F_1 为待测样品的荧光强度; F_2 为内参样品的荧光强度; H 为内参样品的 DNA 含量) [11]。

2.4. 数据分析

实验采用 CellQuest(Pro)软件采集流式细胞仪图像数据, Modfit LT(Mac V 3.0)软件进行数据处理和分析, Excel 软件计算萌发率, 并制图。

3. 结果与分析

3.1. 沙棘、翅果油树种子的萌发及幼苗的生长

为了对翅果油树基因组大小的测定提供较好研究材料, 首先对翅果油树和中国沙棘进行了两种温度预处理后的种子萌发研究。由图 1 可知, 翅果油树种子在种植 7 天后开始萌发, 萌发率呈现先快速增加后趋于平缓的趋势, 同等种子基数下, 50℃水处理过的种子萌发率始终高于常温水 21℃处理过的种子萌发率, 而 50℃水处理过的沙棘种子会比常温水 21℃处理过的沙棘种子提前萌发, 且萌发过程中萌发率高于常温水处理过的种子, 两者都说明在一定范围内温度的提升有利于促进种子的萌发。

研究发现翅果油树种子经 50℃水处理后的种子萌发率为 17.39%, 成苗率为 8.70%; 在 21℃水处理后种子的萌发率为 12.56%, 成苗率是 6.67%。50℃水处理过的中国沙棘种子萌发率为 47.22%, 成苗率为 22.22%; 在 21℃水处理过的种子萌发率为 46.67%, 成苗率为 44.44%。中国沙棘幼苗成活率低主要是在发育过程中植株的茎部会从下部逐渐出现干化现象, 并向上部延伸, 最终植株死亡。植物幼苗生长如图 2 所示。

3.2. 细胞裂解液裂解效果观察

为了观察 OttoI 和 OttoII 对两种材料叶片的裂解效果, 在 500 μL 体系裂解液中附加荧光染料 PI 12.5 μL, 各吸取 10 μL 细胞核悬液滴于载玻片上, 盖上盖玻片, 在荧光(蓝色)显微镜(Olympus BX51)倍下观察, 发

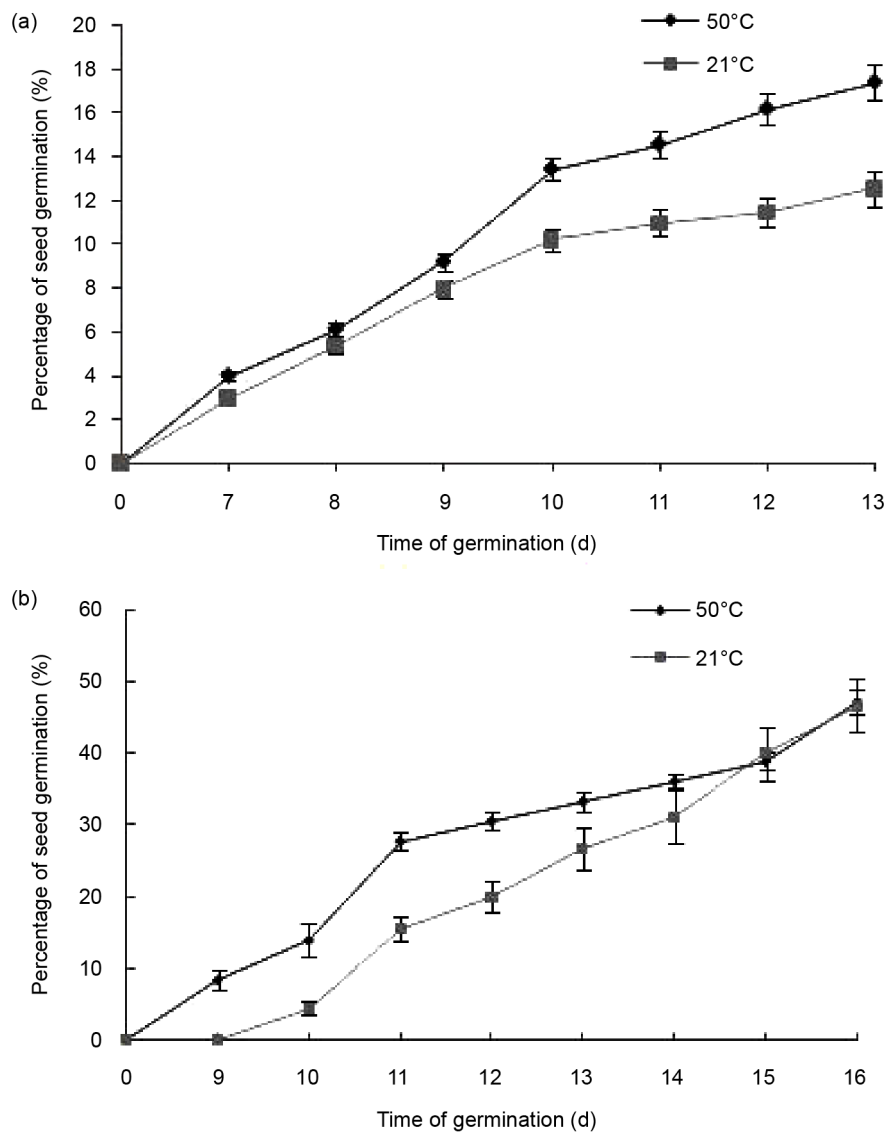


Figure 1. Effect of two temperature pretreatment on seed germination rate of *Elaeagnus mollis* Diels (a) and *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi (b) with different conditions

图 1. 两种温度预处理对翅果油树(a)和沙棘(b)种子的萌发率的影响

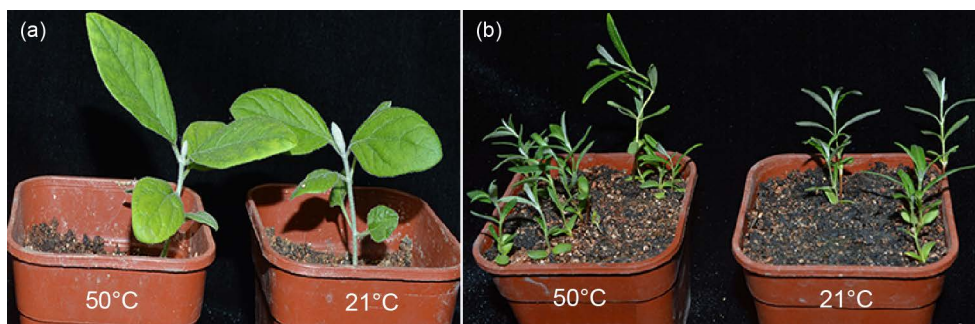


Figure 2. Plants of (a) *Elaeagnus mollis* Diels and (b) *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi germinated for one month

图 2. 生长 1 个月的翅果油树和中国沙棘幼苗(a)翅果油树, (b)中国沙棘

现 OttoI、OttoII 裂解液对本研究材料的细胞裂解效果较好，悬浮细胞核完整且杂质相对较少，结果如图 3 所示。

3.3. 翅果油树叶片用量与荧光染料用量的确定

分别称取 50、100、150、200 mg 的翅果油树叶片，置于 1 mL OttoI 裂解液中裂解 5 min，过滤后将细胞核分别重悬在附加 20 μL PI 的 500 μL 体系的 OttoII 中，结果如表 1 所示，200 mg 的取材量在流式细胞仪上测得的细胞数目最多，为 13,575 个。

在确定 200 mg 的取材量基础上，又对 PI 用量进行了优化，结果如表 1 所示，12.5 μg 的 PI 用量为最佳，所测得的细胞数目为 22,710 个，多于 20 μL PI 用量所测得的细胞核数目。故确定 200 mg 取材量附加 12.5 μL PI 染液为最佳组合，在此条件下，测定时观察到流式图像清晰、稳定，而且所用时间短。如果取材量太少，荧光染料 PI 浓度太稀或太浓，测得的细胞核数量显著减少，且会导致荧光信号检测受阻，峰图形成过程缓慢，导致无法及时调整图像，影响检测结果等。

3.4. 翅果油树与中国沙棘植物叶片的细胞大小观察

由徒手切片制片观察如图 4 所示，二者叶片细胞的大小差异不大，且经显微测量，翅果油树叶肉细胞大小约为 $11.11 \pm 1.85 \times 16.20 \pm 1.33 \mu\text{m}$ ；中国沙棘叶肉细胞大小约为 $9.19 \pm 0.78 \times 10.29 \pm 0.94 \mu\text{m}$ 。因此，研究过程中两种材料的叶片均称取相同重量，来获得样品的细胞核悬浮液，同时在流式细胞仪上也保持翅果油树与中国沙棘的细胞核悬液上样量一致。

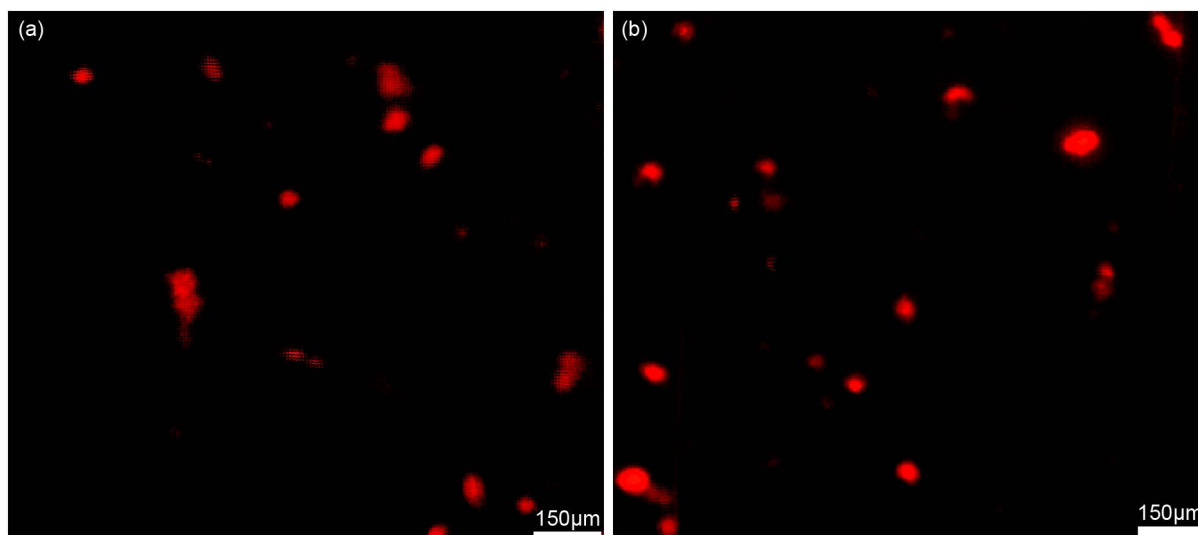


Figure 3. The observation of fluorescent nuclei under Otto lysates (a) *Elaeagnus mollis* Diels, (b) *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi; bar = 150 μm , $\times 40$

图 3. Otto 液裂解后翅果油树和中国沙棘的细胞核荧光观察(a)翅果油树，(b)中国沙棘；bar = 150 μm ， $\times 40$

Table 1. The number of acquired cells in different use level of materials and PI at the same time

表 1. 相同时间内材料和 PI 不同的用量所获得的细胞数目

	Material (mg)				PI (μg)				
	weight	50	100	150	200	10	12.5	20	25
The number of acquired cells		1035	2145	10000	13575	2145	22710	13575	12465

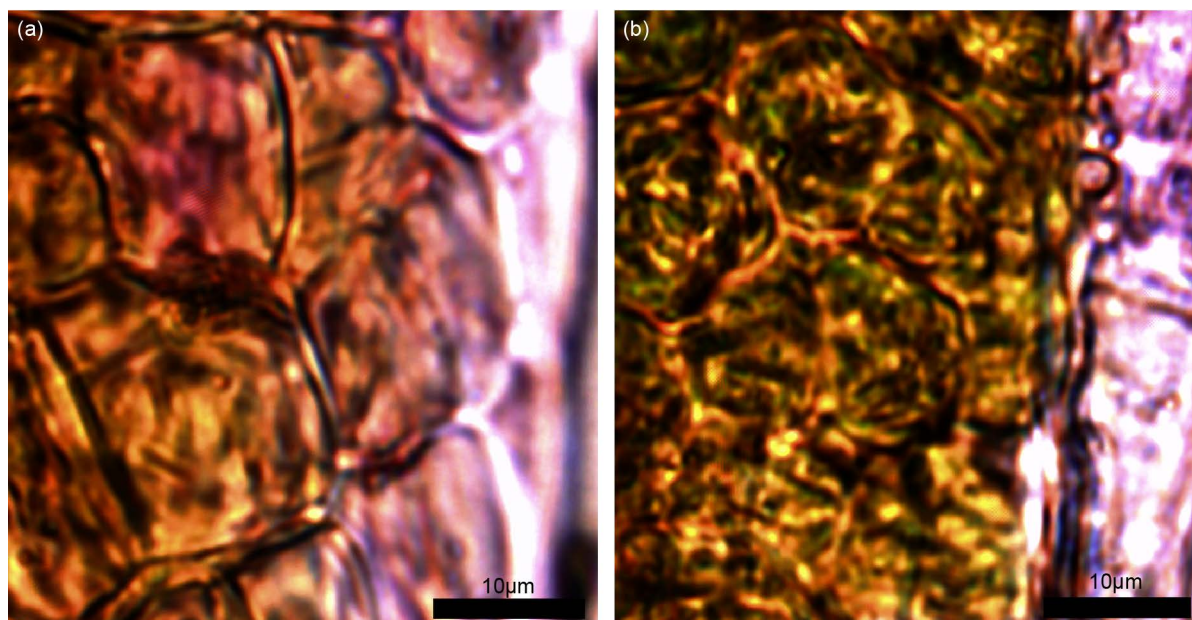


Figure 4. The observation of the cell size of *Elaeagnus mollis* Diels and *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi (a) *Elaeagnus mollis* Diels; (b) *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi; bar = 10 μm , $\times 100$

图 4. 翅果油树与沙棘细胞大小观察(a)翅果油树, (b)中国沙棘; bar = 10 μm , $\times 100$

3.5. 翅果油树基因组大小的测定

考虑到地理位置因素对细胞核 DNA 含量的影响[25] [26], 本研究内参植物选择了与乡宁(E110.90°, N34.95°)地理位置相近的甘肃迭部(E103°13', N34°3')的中国沙棘, 其基因组测定的大小为 2601.48 ± 117.36 Mbp, 即 2.66 ± 0.12 pg [24]。流式细胞仪分析参数设定为 FL2-A, 荧光信号在 200 道峰值左右, 为 G_0/G_1 期细胞所在位置。试验获取的散点图和直方图如图 5 所示。二者测定的变异系数均控制在 5% 以下, 通过比较中国沙棘和翅果油树二者 G_0/G_1 期的峰值, 发现中国沙棘的峰值是翅果油树峰值的 1.57 倍。根据中国沙棘基因组大小可估算出翅果油树的基因组大小为 1652.82 ± 78.24 Mbp, 即 1.69 ± 0.08 pg。

4. 讨论

本研究为了获得材料, 首先进行了两种温度 50°C 、 21°C 预处理后的翅果油树种子在蛭石: 营养土=1:1 的栽培基质上的萌发率与成苗率的比较, 结果表明, 50°C 均好于 21°C , 萌发率为 17.39%, 成苗率为 8.70%, 比前人[19]报道的萌发率 5.0%、成苗率 3.3% 要高。中国沙棘种子的萌发处理温度参考前人的研究[27] [28], 两种温度预处理后, 结果发现萌发率与成苗率跟翅果油树的比较, 具有类似的结果。总之, 该研究为翅果油树基因组大小的测定提供了材料。

本研究利用流式细胞仪首次测定了翅果油树的基因组大小为 1652.82 ± 78.24 Mbp, 即 1.69 ± 0.08 pg, 这为进行后续的基因组测序研究奠定了基础。用于基因组大小测定的方法多样, 常用的几种主要有显微镜分光光度法、孚尔根光密度测量法和流式细胞法三种[29]。因流式细胞法具有样品制备过程简便, 测定结果准确, 可依据实验要求自主设置软件参数[11]等优点, 故得到普遍应用, 因此本研究也采用流式细胞法测定基因组大小。在选定内参样品时, 早期研究多用动物鸡血红细胞作为内参, 但后来发现动物细胞和植物细胞存在差异, 因此在进行植物基因组大小测定时, 研究者建议应选用植物作为内参[14] [15]。中国沙棘和翅果油树两者同属于胡颓子科, 且中国沙棘基因组大小已测定, 实验材料容易获得, 二者的测定峰图无明显重叠, 能区分开来, 所以本研究选用中国沙棘作为内参植物可以保证结果的准确性。

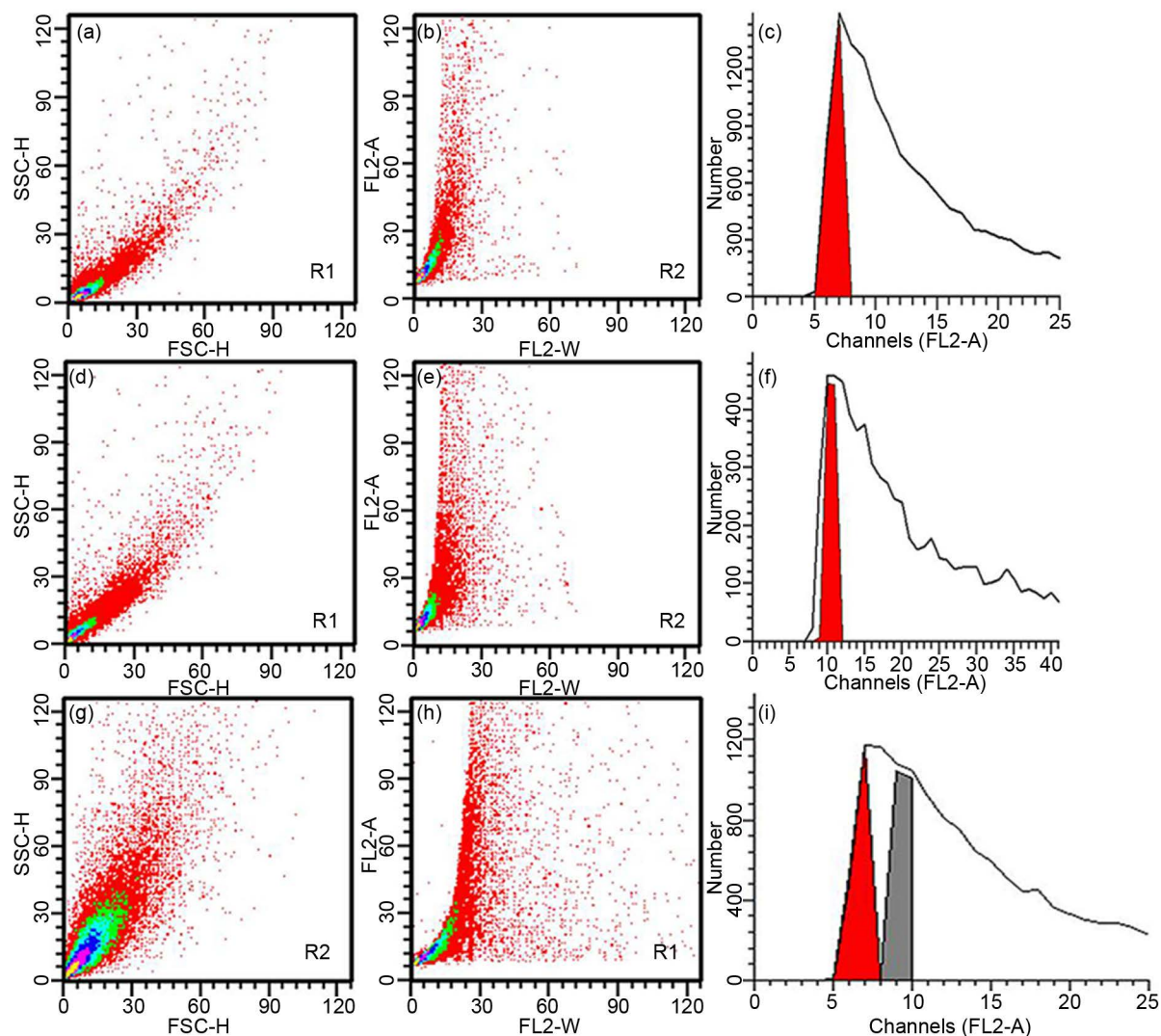


Figure 5. Subcellular scatter plots and Histograms of samples by FCM. ((a), (b), (d), (e), (g), (h)) The subcellular scatter plots; ((c), (f), (i)) the histograms; ((a), (b), (c)) *Elaeagnus mollis* Diels; ((d), (e), (f)) *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi; ((g), (h), (i)) the photos of mixed samples

图 5. 流式细胞散点图和直方图 ((a), (b), (d), (e), (g), (h)) 散点图, ((c), (f), (i)) 直方图, ((a), (b), (c)) 翅果油树, ((d), (e), (f)) 中国沙棘, ((g), (h), (i)) 混合样品图

目前,对于基因组大小测定中内参的选择还没有固定的标准,同一物种基因组大小的测定值只是相对值。本研究对实验材料用量进行了优化对比,并比较了内参和待测植物两者叶片细胞大小,最终确定二者取材量均为 200 mg。对于荧光染料的用量,荧光染料浓度太稀或者太浓,都会影响到实验峰图及检测结果,研究 PI 为 12.5 μg 为最适合的用量。实验的 CV 值(即变异系数)能反映试验的精确度, Dolezel J. 和 Bartos J. [30] 等提出 CV 值应降低到 3%, 但 Pinto 等[31] 发现, 由于多数木本植物成分的复杂性, 很难达到 CV 值低于 5%, 甚至有些不可能。本研究中我们从制样量, 制样时间和环境控制等因素方面进行严格把控, 选取植物的相同部位, 同一时期叶片材料, 随后立即制备样品、染色、上样测定, 获取了较理想的峰图。每种样品重复测定 3 次, 将变异系数 CV 控制在 5% 以下, 确保了结果的可靠性。

此次研究初次探究了翅果油树基因组大小, 为后续翅果油树基因组的测序研究提供了数据参考。翅果油树种子有不同的生态类型(大宫灯、小宫灯、长果型)和种质[6], 但是本次研究只选择了由山西乡宁

县山西琪尔康公司提供的大宫灯型的种子获得的幼苗为材料, 并未对其它来源地和生态类型的翅果油树种子做研究, 以后将进一步系统完善, 探讨不同来源地的翅果油树和不同生态型或种质之间的基因组大小值, 以求获得更加全面的数据。

致 谢

作者感谢山西省基础研究项目(No.2012011032)和山西师范大学生命学院项目(SMYKZ-28; SMYKZ-37)的资助。

参考文献

- [1] 吴征镒. 中国植被[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 1-1375.
- [2] 狄维忠. 陕西省第一批国家珍稀濒危保护植物[M]. 西安: 西北大学出版社, 1987.
- [3] 谢树莲, 凌元洁. 珍稀濒危植物翅果油树的生物学特性及其保护[J]. 植物研究, 1997, 17(2): 153-157.
- [4] 陈惠, 遆清平, 杨瑞林, 等. 珍稀濒危植物翅果油树表皮毛的微形态观察研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(8): 1390-1396.
- [5] 刘庚伟, 陈惠. 濒危植物翅果油树组织培养研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(1): 78-80, 99.
- [6] 宫慧芳, 陈惠. 不同种质翅果油树表型及抗旱性比较研究[J]. 浙江农业科学, 2012(3): 304-308.
- [7] 廉永善, 陈学林. 沙棘属植物的系统分类[J]. 沙棘, 1996, 9(1): 15-24.
- [8] 陈建军, 王瑛. 植物基因组大小进化的研究进展[J]. 遗传学报, 2009, 31(5): 464-470.
- [9] Dolezel, J., Bartos, J., Voglmayr, H., et al. (2003) Nuclear DNA Content and Genome Size of Trout and Human. *Cytometry*, **51**, 127-128.
- [10] Heslop-Harrison, J.S. (1995) Flow Cytometry and Genome Analysis. *Probe*, **5**, 14-17.
- [11] 吴丽萍, 唐岩, 李颖岳, 等. 枣和酸枣基因组大小测定[J]. 北京林业大学学报, 2013, 35(3): 77-83.
- [12] Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., et al. (1983) Rapid Flow Cytometric Analysis of the Cell Cycle in Intact Plant Tissues. *Science*, **220**, 1049-1051. <https://doi.org/10.1126/science.220.4601.1049>
- [13] Arumuganathan, K. and Earle, E.D. (1991) Estimation of Nuclear DNA Contents of Plants by Flow Cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, **9**, 229-241. <https://doi.org/10.1007/BF02672073>
- [14] 李赞, 石荫坪, 束怀瑞, 等. 利用流式细胞光度术鉴定苹果倍性的研究[J]. 西北植物学报, 1998, 18(4): 499-504.
- [15] 李赞, 束怀瑞, 石荫坪, 等. 流式细胞光度术用于草莓倍性鉴定的研究[J]. 西北大学学报, 1998, 26(4): 45-48.
- [16] Vance, B.W. and Birch, H.G. (1994) Estimating Nuclear DNA Content in Peach and Related Diploid Species Using Laser Flow Cytometry and DNA Hybridization. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **119**, 1312-1316.
- [17] Frederique, O.S. and Stiger, H.C.M. (1994) Use of Flow Cytometry for Rapid Determination of Ploidy Level in the Genus *Actinidia*. *Scientia Horti Culturae*, **57**, 303-313. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(94\)90113-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(94)90113-9)
- [18] 曹志勇, 魏学智, 杨瑞林, 等. 翅果油树叶表皮毛发育的研究[J]. 植物研究, 2008, 28(6): 663-667.
- [19] 陈惠, 卢英梅, 申峻沛. 不同栽培基质对翅果油树种子萌发的影响及不同种质幼苗生长发育的表型研究[J]. 山西师范大学学报(自然科学版), 2010, 24(3): 63-66.
- [20] 许淑青, 郭春秀, 金红喜, 等. 不同处理对翅果油树种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 甘肃科技, 2007, 33(13): 144-146.
- [21] 陈惠, 白新生. 翅果油树茎段愈伤组织和芽发生的组织学研究[J]. 广西植物, 1998, 18(2): 157-159.
- [22] 张峰, 上官铁梁. 山西翅果油树群落优势种群分布格局研究[J]. 植物生态学报, 2000, 24(5): 590-594.
- [23] 秦永燕, 张钦弟, 闫桂琴. 濒危植物翅果油树种群遗传多样性的 RAPD 分析[R]. 分子植物育种, 2006, 4(6(S)): 31-36.
- [24] 周香艳. 沙棘核 DNA 含量与杂交种起源的相关性研究[D]: [硕士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学, 2009.
- [25] 陈章和. 植物细胞 DNA 量研究[J]. 生态科学, 1998, 17(1): 76-83.
- [26] Rayburn, A.L. and Auger, J.A. (1990) Genome Size Variation in *Zea mays* spp. Mays Adapted to Different Altitudes.

Theoretical and Applied Genetics, **79**, 470-474. <https://doi.org/10.1007/BF00226155>

- [27] 张鹏, 何梦雅, 张宇, 等. 温度与浸种处理对沙棘种子萌发的影响[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(6): 130-133.
- [28] 马瑞君, 陈学林, 廉永善. 不同温度下四种沙棘种子萌发试验[J]. 沙棘, 1998, 11(3): 17-19.
- [29] Birstein, V.J., Poletaev, A.I. and Goncharov, B.F. (1993) DNA Content in Eurasian Sturgeon Species Determined by Flow Cytometry. *Cytometry*, **14**, 377-383. <https://doi.org/10.1002/cyto.990140406>
- [30] Dolezel, J. and Bartos, J. (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, **95**, 99-110. <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- [31] Pinto, G., Loureiro, J., Lopes, T., *et al.* (2004) Analysis of the Genetic Stability of *Eucalyptus globulus* Labill Somatic Embryos by Flow Cytometry. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**, 580-587. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1655-3>

Hans 汉斯

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2168-5665, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: br@hanspub.org