

陈双双, 齐香玉, 冯 景, 等. 基于流式细胞术和基因组 Survey 的绣球基因组大小及特征分析[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(12): 39-44.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.12.005

基于流式细胞术和基因组 Survey 的绣球基因组大小及特征分析

陈双双¹, 齐香玉¹, 冯 景¹, 王华娣², 邓衍明^{1,2}

(1. 江苏省农业科学院休闲农业研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏南京 210014;

2. 江苏大学生命科学学院, 江苏镇江 212013)

摘要:绣球花序饱满、花型多样、花色丰富, 是重要的观赏植物。很多绣球品种种植在酸性含铝的土壤中时, 花序可由红色变为蓝色、紫色或蓝紫色, 使其更受消费者喜爱。但绣球基因组信息缺乏, 基因资源开发和分子机制研究相对滞后。利用流式细胞术和基于 K-mer 分析的基因组 Survey 技术估测绣球主栽品种“Bailer”(商品名: Endless Summer™, 中文名译为无尽夏)的基因组大小。流式细胞术分析结果表明, 以豌豆(*Pisum sativum* L.)为对照的流式细胞术估测“Bailer”基因组大小为 2.17 pg(约 2.12 Gb); Illumina HiSeq PE 测序产生 212.41 Gb 的有效数据, K-mer 分析结果显示, 修正后的基因组大小为 1.96 Gb; 根据 K-mer 分析, 该基因组具有明显的杂合峰, 杂合度和重复率分别为 1.97%、72.80%。此外, 经组装, 该基因 Contigs 总数为 7 418 139(N50 为 249 bp), 总读长为 1.49 Gb, Scaffolds 总数为 7 071 975(N50 为 289 bp), 总读长为 1.52 Gb, GC 含量为 38.75%。综上所述, 推测绣球“Bailer”基因组大小约为 1.96~2.12 Gb, 属杂合度较高的复杂基因组。结果可为绣球全基因组测序及相关研究提供了理论依据。

关键词:绣球; 基因组大小; 流式细胞术; K-mer 分析; Survey 技术

中图分类号:S685.990.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)12-0039-06

绣球(*Hydrangea macrophylla*)别称八仙花, 属于虎耳草科绣球属, 因其花序色彩艳丽、开花期长、适应性广和抗逆性强而被广泛种植^[1]。绣球是观赏植物中的强耐铝(Al)植物, 其成熟叶片和萼片可以积累高于 3 000 μg/g Al 而不呈现任何毒性症状^[2]。部分绣球品种花色易变, 调节栽培土壤 pH 值及 Al³⁺含量能使其呈现红色、紫色或蓝色等不同颜色^[3]。大量研究表明, 萼片中飞燕草素-3-O-葡萄糖苷与 Al³⁺的络合物调控萼片颜色, 而颜色的变化取决于萼片中 Al³⁺含量^[3-4]。因此, 绣球不仅是非常值得开发的观赏植物资源, 而且是研究观赏植物蓝色花形成机制的特色材料, 在花卉育种领域具有较大的应用价值。

长期以来, 对绣球的研究多集中在栽培和育种领域^[5-6]; 近年来, 人们开展了绣球分子生物学特性相关研究, 如分子标记的开发^[7]、花色变化的分子机制^[8-10]、铝转运相关基因克隆与功能研究^[11-13]等。基因组特征研究是植物基因资源开发和分子机制研究的前提, 然而, 关于绣球不同品种基因组大小及特征研究的报道尚少, 无法为分子生物学研究提供足够的理论基础。早在 1957 年, 绣球体细胞染色体数首次被鉴定为 $2n = 2x = 36$ ^[14], 并在 Funamoto 等的研究中得到证实^[15]; 此后, Cerbah 等也发现, 多数绣球种和亚种的染色体数为 36, 为二倍体($2n = 2x = 36$)^[16]。绣球不同品种具有不同大小的基因组, 大花绣球 [*H. macrophylla* ssp. *macrophylla* (Thunb.) Ser.] 和粗齿绣球 (*H. macrophylla* ssp. *serrata* Ser.) 的 1C 值分别为 2.15、1.92 pg, 相应地 GC 含量分别高达 41.0%、40.6%^[16]; 进一步研究发现, 大花绣球二倍体品种的 1C 值在 1.98~2.49 pg 之间, 但也有研究表明, 大花绣球 Taube 1C 值为 (3.75 ± 0.05) pg, 而 Veitchii 为 (2.35 ± 0.05) pg^[17-19]。这些结果均是基于流式细胞术估测的结果。

流式细胞术和基于 K-mer 分析的基因组 Survey

收稿日期: 2020-10-10

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31901359); 江苏省农业科学院探索性颠覆性创新计划[编号: ZX(17)2004]; 江苏省昆山市科技项目(编号: KN1809)。

作者简介: 陈双双(1986—), 女, 河南安阳人, 博士, 助理研究员, 主要从事观赏植物遗传育种与分子生物学研究。E-mail: chenshuang7876@sina.com。

通信作者: 邓衍明, 博士, 研究员, 主要从事花卉遗传育种与分子生物学研究。E-mail: nkdsym@163.com。

测序是估测基因组大小的常用方法,前者用于评估基因组大小和倍性水平,操作简单,分辨率高,准确性高,后者具有高通量测序、速度快和数据量大等优点^[20-21]。本研究采用流式细胞术和基于 K-mer 分析的基因组 Survey 测序对大花绣球主栽品种“Bailer”基因组大小进行估测和相互验证,并对测序质量、杂合度、序列重复率等进行评估测定,旨在为绣球全基因组测序提供重要依据,为绣球进化分析、基因挖掘、遗传改良以及结构基因组研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料大花绣球“Bailer”(商品名:Endless SummerTM,中文名译为无尽夏)种植于江苏省农业科学院绣球种质资源圃内,该品种具有新老枝都能开花和花色极易改变等优点,是绣球的主栽品种。豌豆(*Pisum sativum* L., 2C=9.09 pg)作为对照^[22],种子由江苏省农业科学院江苏省农业种质资源保护与利用平台提供。试验于 2019 年 1 月至 3 月在江苏省农业科学院院内进行。

1.2 试验方法

1.2.1 流式细胞分析 采集“Bailer”和豌豆幼嫩新鲜叶片,分别称取 3 份,每份约 1 g,置于盛有细胞裂解液 LB01[15 mmol/L Tris, 2 mmol/L Na₂ 乙二胺四乙酸(EDTA), 0.5 mmol/L 四盐酸精胺, 80 mmol/L KCl, 20 mmol/L NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 值为 7.0~8.0]的培养皿中,并迅速用锋利的刀片将其切碎。将培养皿中的解离液过滤至 1.5 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,收集细胞沉淀,加入 100 μL 解离液悬浮。将待测样品“Bailer”与对照样品豌豆细胞悬液等比例混合,加入荧光染料 PI(碘化丙啶),于 4 ℃ 冰箱放置 15 min 后进行上机检测^[20]。

使用美国 BD 公司的流式细胞仪对“Bailer”基因组大小进行评估,变异系数控制在 5% 以内。每个样品进行 3 次重复试验。测试数据利用仪器自带软件 FACSTM Software 1.0.0.650 进行分析,数据统计分析利用 SPSS 17.0 完成。绣球基因组(核 DNA 含量)估算方法如下:待测样品核 DNA 含量 = 对照样本核 DNA 含量 × [(待测样品 G0/G1 峰荧光强度)/(对照样品 G0/G1 峰荧光强度)]^[23]。

1.2.2 样品 DNA 制备与基因组测序 采集“Bailer”幼嫩叶片,立即用液氮速冻后保存于 -80 ℃。使用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒进

行 DNA 提取, Nanodrop 2000 分光光度计(德国, eppendorf)和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度及质量。检测合格的 DNA 样品通过 Covaris 超声波破碎仪随机打断成长度为 350 bp 的片段,经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成整个文库制备,构建好的文库通过 Illumina Hiseq PE 进行测序。获得的原始数据经过滤后利用 Vsearch 软件(<https://github.com/torognes/vsearch>)进行评估,包括数据产量、测序错误率、Q20 含量、Q30 含量、GC 含量等。同时,利用 Blast 工具将部分有效测序数据(clean data)与 NCBI 核苷酸数据库(NT)进行比对,选取比对结果中的前 3 个,分析样本是否存在外源污染。

1.2.3 K-mer 分析估算基因组大小、杂合度及重复率 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,取 K=17 进行分析。假设 K-mer 的深度频率服从泊松分布,并且从碱基读数中获取的所有 K-mer 都可以遍历整个基因组,则可以计算 K-mer 频数分布和 K-mer 深度分布曲线。根据曲线获得 K-mer 深度估计值,用于估计基因组大小。通过 K-mer 曲线的分布情况,估计基因组特征,计算杂合峰值与纯合峰值的比值,从而得到杂合率;利用纯合峰 1.8 倍后的 K-mer 个数所占的比例来估计重复序列比例^[24]。

1.2.4 基因组组装 利用 SOAPdenovo(<https://github.com/aquaskyline/SOAPdenovo2>)对测序数据进行拼接组装,选择 K-mer=41 组装 Contigs 和 Scaffolds。将读取长度小于 100 bp 的低质量序列删除,并将过滤后的有效数据组装为 Contigs,最后利用 reads 之间的连接关系和插入片段大小信息,将 Contigs 组装成 Scaffolds^[24]。

2 结果与分析

2.1 基于流式细胞术绣球基因组大小分析

当变异系数控制在 5% 以内时,待测样品与对照样品的离子清晰集中,并且可以同时检测到混合样品的颗粒簇(图 1),因此,解离液 LB01 和对照样品豌豆对于估算绣球基因组比较适宜,保证了利用豌豆作为对照估算绣球基因组大小的准确性。利用豌豆(2C=9.09 pg)作为对照样品,根据混合样品 PI 荧光强度以及待测样品与对照样品峰值的倍数关系,计算绣球基因组 1C 值为 2.17 pg(图 2、表 1)。

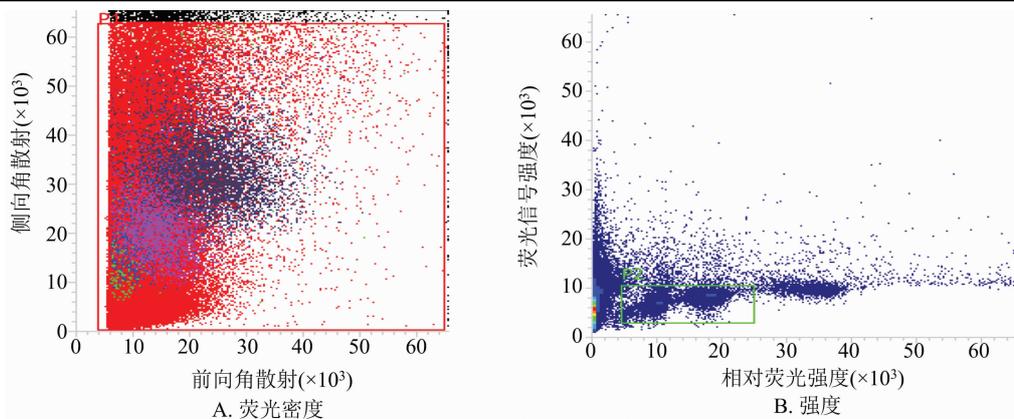


图1 流式细胞术测定豌豆和绣球混合样品的荧光密度、强度
P1 和 P2 代表荧光面积

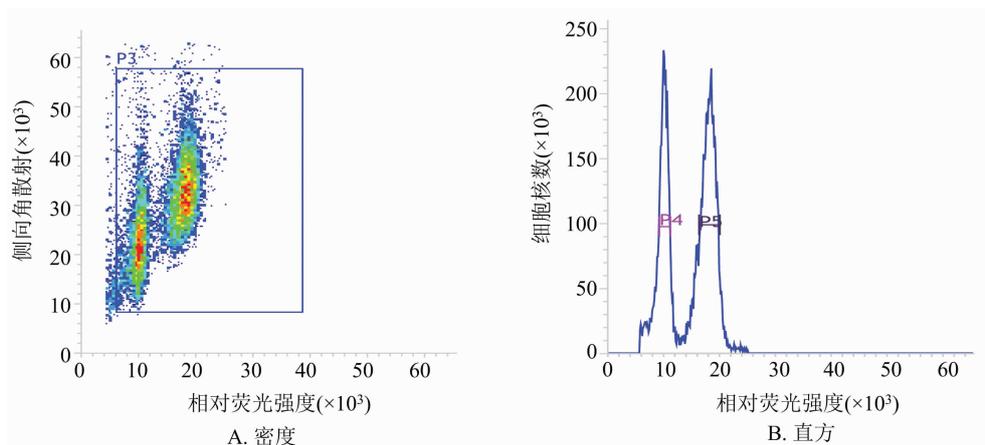


图2 豌豆和绣球混合样品流式细胞仪分析结果
P3 代表豌豆和绣球混合物的荧光强度区域; P4 和 P5 分别代表豌豆和绣球

表 1 流式细胞术测定绣球基因组大小相关结果

编号	待测样品 峰值	对照样品 峰值	比值	1C 值 (pg)	平均值 (pg)
1	9 985	20 869	0.48	2.17	
2	9 967	20 804	0.48	2.18	2.17
3	8 568	18 046	0.47	2.16	

2.2 基因组 Survey 与质量评估

利用 Illumina Hiseq PE 测序平台对构建的 3 个插入片段为 350 bp 的 DNA 文库 (DES01984、DES02239 和 DES02238) 进行双末端测序, 经过滤和修正后, 获得 212.41 Gb 的测序数据。测序质量评估显示, 这 3 个文库 Q20 值分别为 96.04%、96.64%、96.99%, Q30 值分别为 90.8%、92.12%、92.83% (表 2), 测序错误率均小于 0.03%, 表明测序质量较好。此外, 取每个文库的部分有效测序数据比对到 NCBI 核苷酸数据库 (NT) 进行比对, 在 DES01984、DES02239 和 DES02238 文库中, 排名前 3 的物种分别为粗齿绣球/珙桐 (*Davidia involucrata*

Baill.) / 大花绣球、大花绣球/粗齿绣球/山茱萸 (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.)、大花绣球/粗齿绣球/葡萄 (*Vitis vinifera* L.)。根据这些结果, 认为序列比对结果为同源比对, 样本不存在污染现象 (表 3)。

2.3 K-mer 分析

将获得的有效数据 (212.41 Gb) 用于“Bailer”K-mer 分析, 并估测基因组大小、杂合度及序列重复率。从图 3 可以看出, 横坐标表示 K-mer 出现的次数, 纵坐标表示出现的频率; K-mer 分布曲线成峰情况较好, 呈双峰分布, 在 50 和 85 附近各有 1 个峰值。根据 survey 分析, 推测 depth = 85 附近为主峰值, 即 K-mer 的期望深度, K-mer 总数为 168、564、374、328 (图 3、表 4)。结合公式 (基因组大小 = K-mer - number / depth) 估算得出“Bailer”基因组为 1 983.11 Mb, 修正后的基因组大小为 1 964.82 Mb (约 1.96 Gb, 表 4)。从图 3 还可以看出, 在主峰的 1/2 位置处有明显的杂合峰, 而且 K-mer 分布曲线

表2 测序数据统计及质量评估

文库	原始数据量 (bp)	数据有效率 (%)	有效数据量 (bp)	错误率 (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
DES01984	65 860 599 000	99.82	65 742 763 800	0.03	96.0	90.8
DES02239	68 816 821 200	99.79	68 672 205 600	0.03	96.6	92.1
DES02238	77 736 417 600	99.78	77 567 097 300	0.03	97.0	92.8

表3 NCBI 核苷酸数据库(NT) 比对结果统计

文库	物种	fq1		fq2		平均比例 (%)
		数目	比例(%)	数目	比例(%)	
DES01984	粗齿绣球	14	0.28	10	0.20	0.24
	珙桐	9	0.18	9	0.18	0.18
	大花绣球	9	0.18	9	0.18	0.18
DES02239	大花绣球	15	0.30	10	0.20	0.25
	山茱萸	12	0.24	6	0.12	0.18
	粗齿绣球	11	0.22	7	0.14	0.18
DES02238	大花绣球	15	0.30	7	0.14	0.22
	粗齿绣球	10	0.20	11	0.22	0.21
	葡萄	8	0.16	12	0.24	0.20

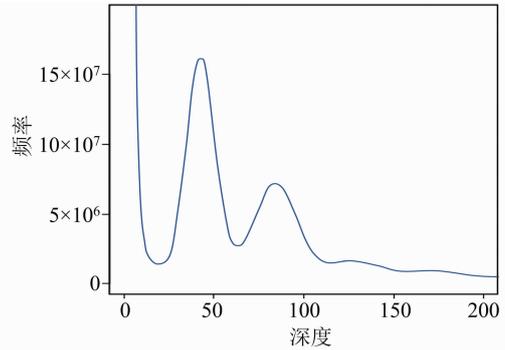
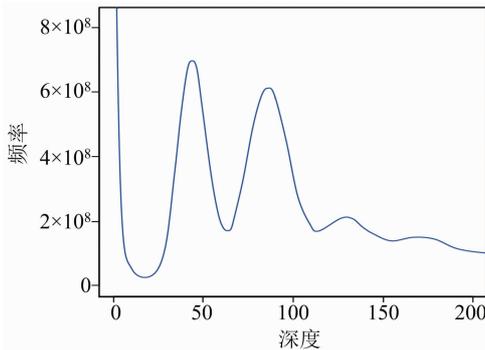
A. K-mer 的分布=17 期望与 K-mer 频率的关系; B. K-mer 的分布=17 期望深度与 K-mer 物种频率的关系。
第 2 个峰是期望值

图3 绣球 Bailer 基因组 K-mer(K=17)曲线分布

表4 绣球“Bailer”基因组 K-mer(K=17) 分析统计

项目	数值
K-mer 总数	168,564,374,328
K-mer 深度	85
基因组大小(Mb)	1 983.11
修正后基因组大小(Mb)	1 964.82
杂合度(%)	1.97
重复率(%)	72.8

表5 Contig 和 Scaffold 组装结果数据统计

指标	Contig	Scaffold
N50 长度(bp)	249	289
N50 长度(bp)	111	113
总长度(Gb)	1.49	1.52
序列条数(条)	74 181 339	7 071 975
最长的序列长度(bp)	16 545	17 657

此可以排除此区域受细菌污染的可能性。

2.5 GC 含量分布

根据 GC 含量与测序深度相关性分析, Bailer 的 GC 含量为 38.75% (图 4)。GC - depth 分析显示, 测序无明显偏向趋势; GC 深度分布被分为 2 层, 这可能与基因组杂合度高有关。此外, 取低深度区域的序列与 NT 数据库比对, 未对上细菌序列, 因

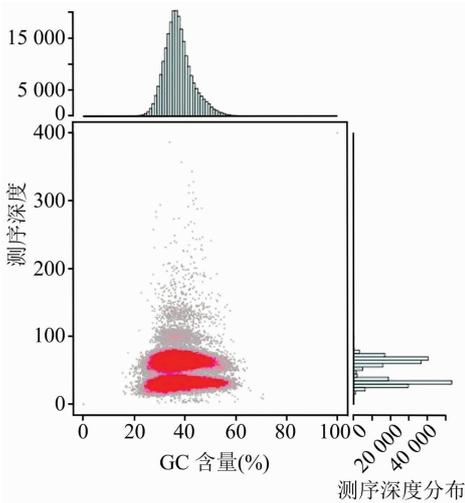
有严重的拖尾, 这可能是“Bailer”基因组杂合度和重复序列含量均较高所致。根据公式计算, Bailer 基因组杂合度和重复率分别高达 1.97%、72.8%。

2.4 基因组组装

利用 Soap denovo 软件对所获得的有效数据(clean data)进行 denovo 拼接组装, 选择 K-mer = 41 得到最优的拼接效果。组装结果显示, Contigs 总数为 7 418 139, N50 长度为 249 bp, 总读长为 1.49 Gb; 进一步组装后, Scaffolds 总数为 7 071 975, N50 和 N90 长度分别为 289 bp 和 113 bp, 总读长为 1.52 Gb (表 5)。

3 讨论与结论

植物基因组大小估测不仅对于物种本身基因组测序具有重要意义, 而且可为相关蛋白组、转录组以及代谢产物研究提供不可或缺的基础资料^[25-26]。本研究采用流式细胞术和基于 K-mer



x轴(横坐标)和y轴(纵坐标)分别表示GC含量与测序深度,右方是测序深度分布,上方是GC含量分布,其中红色的部分代表该散点图中点的密度比较大的部分

图4 Contig GC含量和覆盖深度

分析的基因组 Survey 测序估测绣球主栽品种 Bailer 的基因组大小,为进一步进行基因组测序和相关基因功能研究提供了更准确的信息。

自 1983 年以来,流式细胞术已成为分析植物基因组大小的标准方法,应用于多种植物基因组大小(C 值)的预测^[16,24,27-29]。本研究中预测 Bailer 的 1C 值为 2.17 pg,这与已有报道大花绣球 1C 值(2.15 pg)接近^[16]。但与 Jones 等所报道的结果不同,该研究中大花绣球二倍体品种的 1C 值在 2.23 ~ 2.49 pg 之间,其中 Bailer (即 Bailer) 1C 值为 2.37 pg^[17]。流式细胞术中采用材料类型、荧光染料、裂解液的化学成分、内标的选择、处理环境等均有可能影响同一物种基因组大小的测定结果^[13]。结合已有报道,造成绣球基因组大小差异的原因可能是材料类型和荧光染料不同造成的。本研究利用 PI 作为荧光染料估测 Bailer 基因组大小,PI 可通过简单的化学计量插入到双链核酸中,无碱基偏好。Cerbah 等研究中对绣球 1C 值估测采用的是溴化乙锭(与 PI 类似,对细胞计数具有相同特异性)、AT 碱基特异性染料 Hoechst 和 GC 碱基特异性染料 mithramycin 作为细胞核荧光染料,但是该研究中没有明确所测品种^[16];而 Jones 等研究采用的是具有 AT 碱基高度亲和力的染料 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DPAI)^[17]。

本研究还利用了基于 Illumina Hiseq 测序平台的 K-mer 分析技术进一步验证并估测绣球基因组大小。根据 3 个不同文库的测序数据,使用 K-mer

分析,修正后的 Bailer 的基因组大小约为 1 964.82 Mb(1.96 Gb)。根据细胞核 DNA 含量与基因组大小的关系(1 pg = 978 Mb),流式细胞术估测绣球基因组大小为 2.17 pg,换算为 2 122.26 Mb,即 2.12 Gb。显然,以上 2 种方法估测的绣球基因组大小不一致,流式细胞术比 K-mer 分析估测结果大约 157.44 Mb。流式细胞术估测基因组较大可能是由于估测结果是参考已知基因组大小的对照样品,而基于 K-mer 分析的基因组信息是基于数学计算,可能更加全面、准确^[20,24,27]。

据报道,兰科蝴蝶兰 (*Phalaenopsis equestris*) 基因组杂合度为 1.2%^[28],康乃馨 (*Dianthus caryophyllus* L.) 基因组杂合度为 0.2%^[30],铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 基因组杂合度为 0.48%^[31],而本研究基因组杂合度评估显示“Bailer”基因组杂合度则高达 1.97%;Bailer 基因组序列重复率估测为 72.8%,与黄石斛 (*Dendrobium catenatum* Lindl.) 接近(78.1%)^[32],然而,蝴蝶兰、铁皮石斛和牵牛 (*Ipomoea nil*) 基因组仅含有 62.00%、63.30% 和 59.74% 的重复序列,康乃馨基因组序列仅有 33% 的重复率。这些结果可能与基因组大小相关,如黄石斛基因组大小为 1.1 Gb^[33],蝴蝶兰基因组大小为 1.2 Gb^[32],铁皮石斛基因组大小为 1.3 Gb^[31],而康乃馨基因组大小只有 Bailer 的 2/3,为 622 Mb。因此,可以推测基因组大小与基因组杂合度和重复率相关。此外,与其他观赏植物如木槿 (*Hibiscus syriacus*, 34.04%)^[34]、蝴蝶兰 (*Phalaenopsis cultivar* ‘KHM190’, 30.7%)^[28]、康乃馨(36%)^[30] 相比,Bailer 基因组还有较高的 GC 含量(38.75%)且 GC 深度分布被分为 2 层,可能是由基因组的高杂合率引起。根据测序数据组装得到的基因组中,Contigs、Scaffolds 总长度分别为 1.49、1.52 Gb,其中 N50 长度分别为 249、289 bp,基因组杂合度高可能导致 N50 值较低^[22,31]。显然,绣球基因组是杂合度较高的复杂基因组。

本研究首次利用流式细胞术和 K-mer 分析的方法测定了绣球基因组大小,并对相应的参数进行了初步评估,主要结论如下:(1)大花绣球 Bailer 基因组大小估测为 1.96 ~ 2.12 Gb;(2)绣球基因组具有较高的杂合度(1.97%)和重复率(72.8%),属于复杂基因组范畴;(3)由于绣球基因组杂合率较高,导致有较高的 GC 含量(38.75%)。本研究结果可为绣球全基因组测序及相关研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] 邓衍明, 韩勇, 齐香玉, 等. 绣球属植物种质资源分析及其花色可调和叶斑病抗性比较[J]. 植物资源与环境学报, 2018, 27(4): 90-100.
- [2] Ma J F, Ryan P R, Delhaize E. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids[J]. Trends in Plant Science, 2001, 6(6): 273-278.
- [3] Schreiber H D, Jones A H, Lariviere C M, et al. Role of aluminum in red-to-blue color changes in *Hydrangea macrophylla* sepals[J]. Biometals, 2011, 24(6): 1005-1015.
- [4] Schreiber H D, Swink A M, Godsey T D. The chemical mechanism for Al^{3+} complexing with delphinidin: a model for the bluing of hydrangea sepals[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2010, 104(7): 732-739.
- [5] 孙晓波, 苏家乐, 陈双双, 等. 大花绣球‘无尽夏’组培苗叶片再生植株的研究[J]. 中国农学通报, 2020, 36(16): 67-72.
- [6] 吴可鹏, 徐炜杰, 谢丽丽, 等. 绣球属植物引种及适应性试验[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(3): 549-551.
- [7] 贾新平, 孙晓波, 梁丽建, 等. 绣球 SSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. 华北农学报, 2016, 31(4): 68-73.
- [8] Negishi T, Oshima K, Hattori M, et al. Tonoplast- and plasma membrane-localized aquaporin-family transporters in blue *Hydrangea sepals* of aluminum hyperaccumulating plant[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43189.
- [9] Negishi T, Oshima K, Hattori M, et al. Plasma membrane-localized Al-transporter from blue *Hydrangea sepals* is a member of the anion permease family[J]. Genes to Cells, 2013, 18(5): 341-352.
- [10] 龚仲幸, 何勇, 杨静, 等. 外源硫酸铝调节八仙花花青苷组成和含量变化的分子生物学机制[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(3): 821-826.
- [11] Chen H X, Lu C P, Jiang H, et al. Global transcriptome analysis reveals distinct aluminum-tolerance pathways in the Al-accumulating species *Hydrangea macrophylla* and marker identification[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144927.
- [12] 陈海霞, 范适, 胡春梅. 铝胁迫下八仙花 *HmVALT* 基因表达的差异[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(5): 147-152.
- [13] 李志奇, 陈海霞. 八仙花 *NRATI* 基因的克隆及表达分析[J]. 福建农业学报, 2019, 34(6): 646-651.
- [14] Ishih A, Miyase T, Suzuki T, et al. Seasonal variation in the content of a febrifugine and isofebrifugine alkaloid mixture in aerial parts of *Hydrangea macrophylla* var. Otaksa, with special reference to its antimalarial activity[J]. Journal of Natural Medicines, 2006, 61(2): 213-216.
- [15] Funamoto T, Tanaka R. Karyomorphological studies in some taxa of *Hydrangea* from Japan[J]. Kromosomo, 1988(2): 1583-1594.
- [16] Cerbah M, Mortreau E, Brown S, et al. Genome size variation and species relationships in the genus *Hydrangea*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(1): 45-51.
- [17] Jones K D, Reed S M. Analysis of ploidy level and its effects on guard cell length, pollen diameter, and fertility in *Hydrangea macrophylla*[J]. HortScience, 2007, 42(3): 483-488.
- [18] Rinehart T A, Scheffler B E, Reed S M. Ploidy variation and genetic diversity in *Dichroa*[J]. HortScience, 2010, 45(2): 208-213.
- [19] Peter H, Annette H, Conny T. Molecular reconstruction of an old pedigree of diploid and triploid *Hydrangea macrophylla* genotypes[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 429-442.
- [20] Doležel J, Greilhuber J, Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry[J]. Nature Protocols, 2007, 2(9): 2233-2244.
- [21] Yagi M. Recent progress in whole genome sequencing, high-density linkage maps, and genomic databases of ornamental plants[J]. Breeding Science, 2018, 68(1): 62-70.
- [22] Doležel J, Bartoš J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size[J]. Annals of Botany, 2005, 95(1): 99-110.
- [23] 弓娜, 田新民, 周香艳, 等. 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[J]. 中国农学通报, 2011, 27(9): 21-27.
- [24] Wang C R, Yan H D, Li J, et al. Genome survey sequencing of purple elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum ‘Zise’) and identification of its SSR markers[J]. Molecular Breeding, 2018, 38(7): 94-104.
- [25] Bennett M D, Leitch I J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow[J]. Annals of Botany, 2011, 107(3): 467-590.
- [26] Bourge M, Brown S C, Siljak-yakovlev S. Flow cytometry as tool in plant sciences, with emphasis on genome size and ploidy level assessment[J]. Genetics and Applications, 2018, 2(2): 1-12.
- [27] 霍恺森, 赵冬兰, 陈艳丽, 等. 甘薯属耐盐植物马鞍藤基因组大小及特征分析[J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(3): 728-735.
- [28] Cai J, Liu X, Vanneste K, et al. The genome sequence of the orchid *Phalaenopsis equestris*[J]. Nature Genetics, 2014, 47(1): 65-72.
- [29] 齐香玉, 陈双双, 冯景, 等. 3种瓣型茉莉基因组大小测定与比较[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(19): 40-44.
- [30] Yagi M, Kosugi S, Hirakawa H, et al. Sequence analysis of the genome of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. DNA Research, 2014, 21(3): 231-241.
- [31] Yan L, Wang X, Liu H, et al. The genome of *Dendrobium officinale* illuminates the biology of the important traditional chinese orchid herb[J]. Molecular Plant, 2015, 8(6): 922-934.
- [32] Zhang G Q, Xu Q, Bian C, et al. The *Dendrobium catenatum* Lindl. genome sequence provides insights into polysaccharide synthase, floral development and adaptive evolution[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 1-10.
- [33] Huang J Z, Lin C P, Cheng T C, et al. The genome and transcriptome of *Phalaenopsis* yield insights into floral organ development and flowering regulation[J]. PeerJ, 2016, 4: e2017.
- [34] Kim Y M, Kim S, Koo N, et al. Genome analysis of *Hibiscus syriacus* provides insights of polyploidization and indeterminate flowering in woody plants[J]. DNA Research, 2017, 24(1): 71-80.