

# 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

李彩琴, 王泽槐, 徐咏珊, 张劲靛, 李建国\*

(华南农业大学中国荔枝研究中心, 广州 510642)

**摘要:** 以荔枝幼果为材料, 比较 5 种常用细胞核分离缓冲液对制备样品 DNA 分辨率效果的影响, 发现在 Otto 缓冲液基础上进行适当改进 (增加还原剂种类和含量, 把 RNaseA 直接加入缓冲液, 降低离心力), 可获得最佳的提取效果, 分辨率高, 细胞 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 峰产生的变异系数低。通过比较具有相似遗传背景的‘妃子笑’早花大果和晚花小果以及具有不同遗传背景的大果 (‘四两果’) 和小果 (‘陈紫’) 型荔枝品种之间果实发育前期的幼果和果皮的细胞分裂活性发现, 大果的细胞分裂活性高于小果, 且持续时间长, 说明果实大小差异与果实发育前期细胞分裂活性有关。

**关键词:** 荔枝; 细胞分裂活性; 流式细胞术; 果实大小; 核悬液

**中图分类号:** S 667.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 09-1781-10

## 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

LI Cai-qin, WANG Ze-huai, XU Yong-shan, ZHANG Jin-ai, and LI Jian-guo\*

(China Litchi Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The effects of the five commonly used buffers on DNA nuclei isolation from fruitlet of litchi were evaluated. The results showed that improved method on Otto buffers (adding the content and type of reducing agent into Otto buffers, putting RNase A directly into the buffer and reducing the centrifugal force) could get the highest resolution and the lowest coefficient of variation G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> peak of DNA nucleus, which was suitable for detecting the cell division activity of litchi fruitlet and pericarp. By comparing with cell division activities of fruitlet and pericarp in the first stage of fruit development between larged-fruit and smalled-fruit from the early and late flowering flowers of ‘Feizixiao’ litchi with the similar genetic background, and from ‘Siliangguo’ and ‘Chenzi’ litchi with the different genetic background respectively, it was found that the cell division activity of larged-fruit was higher and lasted longer compared with the smalled fruit, indicating that their differences in terms of the final fruit size was related to the cell division activity in early fruit development.

**收稿日期:** 2011-01-10; **修回日期:** 2011-08-12

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (30871694); 国家现代荔枝产业技术体系栽培生理岗位项目 (nycytx-32-03); 教育部博士点基金项目 (200805640003)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jianli@scau.edu.cn)

**Key words:** litchi; cell division activity; flow cytometry; fruit size; nuclei suspension

流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 是一种快速、准确、高效测定和分析细胞 DNA 含量的方法, 近年来已广泛应用于植物研究中 (Bennett & Leitch, 2005), 如细胞周期分析 (Sgorbati et al., 1991; 闫国华 等, 2000; 张俊娥和邓秀新, 2005)、植物倍性鉴定 (Souza et al., 2004)、染色体分选 (Li et al., 2004)、细胞核 DNA 含量测定 (Dolezel & Bartos, 2005)、生殖途径鉴定 (Matzk et al., 2000)、DNA 变异分析 (Murray et al., 1992)、遗传稳定性分析 (Pinto et al., 2004)、体胚发生分析 (Perry et al., 2002) 等。

流式细胞术测定的生物细胞必须处于单细胞悬浮液状态, 制备优质的细胞核悬液 (细胞碎片少、杂质少、便于检测) 的关键在于选择适合的细胞核分离缓冲液。不同植物的组织结构和化学成分存在较大差异, 使用细胞核分离缓冲液的效果不同, 而且目前还没有一种普遍适用的细胞核分离缓冲液, 因此需要尝试不同的细胞核分离缓冲液, 甚至要改进缓冲液的成分, 以获得最佳的细胞核分离效果。

细胞周期可通过直接影响单个细胞的分裂能力和细胞周期的期限来决定细胞数量 (Winklemann et al., 1998; Yanpaisan et al., 1999)。细胞数量被许多研究认为是决定果实最终大小的最重要的细胞学基础, 如苹果不同品种之间果实大小的差异主要决定于授粉后细胞分裂的数量 (Goffinet et al., 1995); 桃 (Scorza, 1991)、草莓 (Cheng & Breen, 1992) 和甜瓜 (Higashi et al., 1999) 则主要取决于开花前和授粉后细胞分裂的数量。此外, 对具有相同或相似遗传背景的同品种之间果实大小差异的细胞研究表明, 同一番茄品种的两个果实大小不同的突变体 (Bohner & Bangerth, 1988), 以及同一株油梨树上不同大小果之间 (Cowan et al., 1997), 果实大小的差异主要是由细胞数量不同所造成的, 受细胞大小的影响较小。通过比较荔枝大果型和小果型品种果实发育过程中单位面积果皮细胞数量和大小发现成熟果实大小也是由细胞数量决定, 与细胞大小无关 (李建国 等, 2002)。应用流式细胞仪计算测量细胞核内 DNA 含量实际上是细胞周期的测量 (Dolezel et al., 1989), 对细胞周期分析也可以用来估测细胞周期分裂活性。

本试验中比较具有相似遗传背景的‘妃子笑’早花大果和晚花小果以及不同遗传背景的大果和小果品种的幼果和果皮细胞分裂活性的差异, 以期为进一步揭示荔枝果实大小的细胞学机制提供新的证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

全部试材于 2009 年 3—6 月取自华南农业大学园艺学院正常管理的荔科技园, 树龄均为 8 年生。其中用于建立细胞分裂活性流式细胞仪检测方法的材料为‘大金钟’荔枝花后 7 d 幼果; 具有不同遗传背景材料为大果型品种‘四两果’和小果型品种‘陈紫’, 各 3 株; 具相似遗传背景的‘妃子笑’荔枝早花 (雌花盛开日期为 3 月 20 日) 和晚花 (雌花盛开期为 4 月 10 日) 树, 各 3 株。单株为 1 个重复。

在雌花盛开期 (花后 0 d), 每株选花穗 5~10 条挂牌, 用于定期采样。取样后用冰盒迅速带回实验室, 在冰上用镊子和带手柄的 10 号手术刀片小心切取样品, 其中花后 0~25 d 样品取幼果, 花后 32~49 d 样品取果皮。

1.2 细胞核分离缓冲液的初步筛选

选用 5 种常用的细胞核分离缓冲液, 其中缓冲液 IV 由 IV-1 和 IV-2 两部分组成, 成分见表 1。

表 1 5 种常用细胞核分离缓冲液  
Table 1 Main components of five nuclei buffer solutions

核分离缓冲液 Nuclei buffer solution	组分 Component	参考文献 Reference
I	15 mmol · L <sup>-1</sup> Tris; 2 mmol · L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> EDTA; 80 mmol · L <sup>-1</sup> KCl; 0.5 mmol · L <sup>-1</sup> Spermine · 4HCl; 20 mmol · L <sup>-1</sup> NaCl; 0.1% Triton X-100; 20 mmol · L <sup>-1</sup> β-mercaptoethanol; pH 7.5	Dolezel et al., 1989
II	40 mmol · L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> ; 30 mmol · L <sup>-1</sup> sodium citrate; 20 mmol · L <sup>-1</sup> MOPS; 0.1% (v/v) Triton X-100; 20 mmol · L <sup>-1</sup> β-mercaptoethanol; pH 7.0	Galbraith et al., 1983
III	100 mmol · L <sup>-1</sup> citric acid; 0.5% Triton X-100; pH 2.0 - 3.0	李铁军 等, 2009
IV	IV-1: 100 mmol · L <sup>-1</sup> citric acid; 0.5% Tween 20; 20 mmol · L <sup>-1</sup> β-mercaptoethanol; pH 2.3 IV-2: 400 mmol · L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O; 20 mmol · L <sup>-1</sup> β-mercaptoethanol; pH 8.9	Otto, 1990; Dolezel & Gohde, 1995
V	200 mmol · L <sup>-1</sup> Tris; 4 mmol · L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O; 0.5% Triton X-100; 20 mmol · L <sup>-1</sup> β-mercaptoethanol; pH 7.5	Pfossner et al., 1995

注: 除缓冲液 IV-2 室温保存外, 其余均需置 4 ℃ 保存备用。  
Note: Five nuclei buffer solutions should be stored in 4 ℃, except for buffer IV-2 which was kept in room temperature.

1.3 核分离缓冲液的改良

向核分离提取液中添加 30 mmol · L<sup>-1</sup> DTT、10% (质量体积比) PVP、2% (体积比) Triton X-100 和 50 mmol · L<sup>-1</sup> β - 巯基乙醇等成分; 缓冲液配置好后直接加入 100 μg · mL<sup>-1</sup> RNase A; 离心时把离心力从 800 × g 降低到 400 × g。

1.4 核悬液 DNA 特异染色

染色主要参考金亮等(2007)的方法: 制备好的核悬液加入 DNA 荧光染料碘化丙啶(PI, propidium iodide, 终浓度为 50 μg · mL<sup>-1</sup>) 及 RNase A (终浓度为 50 μg · mL<sup>-1</sup>), 暗处低温下染色 30 min。用缓冲液 V 制备时, 核染色缓冲液需在上机前 10 min 加入。将制备好的细胞核悬液经 400 目尼龙网过滤后转入标准的上样管中, 上机测定, 3 个重复。

1.5 流式细胞仪测定

经 PI 染色的样品通过 FACSCalibur 流式细胞仪 (美国 Becton-Dickinson 公司), 在 488 nm 激光的激发下发出橘红色荧光, 由 FL2 通道检测出荧光强度。使用随机软件 CellQuest Pro<sup>TM</sup> 获取数据, 每个样品测定 10 000 个细胞核 (颗粒)。数据采用 ModFitLT (美国 verity Software House 公司) 软件进行分析, 显示直方图 (其横坐标为 DNA 相对含量, 反映荧光曲线的面积, 纵坐标为细胞核出现频率, 即相对细胞核数), 并计算出 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 峰的变异系数 (CV/% = 标准差/平均峰值 × 100) (金亮 等, 2007)。

1.6 细胞分裂活性的计算

细胞分裂活性用处于 G<sub>2</sub>/M 期和 S 期的细胞数与总细胞数的比值来表示, 计算公式参考张玉静 (2000)。即细胞分裂活性 (CDA) /% = (N<sub>G<sub>2</sub>/M</sub> + N<sub>S</sub>) / (N<sub>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></sub> + N<sub>G<sub>2</sub>/M</sub> + N<sub>S</sub>) × 100, 其中 N<sub>G<sub>2</sub>/M</sub> 表示处于 G<sub>2</sub> 期 (DNA 合成后期) 和 M 期 (有丝分裂期) 的细胞数量; N<sub>S</sub> 表示处于 S 期 (DNA 合成期) 的细胞数量; N<sub>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></sub> 表示处于 G<sub>1</sub> 期 (DNA 合成前期) 和 G<sub>0</sub> 期 (静止期) 的细胞数量。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同核分离缓冲液的提取效果比较

图 1 表示应用不同核分离缓冲液所获得的荔枝细胞周期时相分布图, 从中可看出  $G_1/G_0$  期、S 期和  $G_2/M$  期各时相的分布情况。第 1 个“峰”代表了  $G_1/G_0$  期, 第 2 个“峰”是  $G_2/M$  期,  $G_1/G_0$  期和  $G_2/M$  期之间的部分是 S 期。从图 1 可以看出, 使用这 5 种缓冲液制备的荔枝幼果细胞核悬液, 经流式细胞仪分析测定, 缓冲液 III 获得的直方图只有背景碎片的杂峰带, 没有出现明显的主峰, 因此认为缓冲液 III 不适合荔枝幼果细胞核悬液的制备。而使用缓冲液 I、II、IV、V 制备的样品在直方图中均可产生非常明显的二倍体“峰”, 但在主峰的左侧出现许多背景碎片, 形成明显的干扰峰带, 推测这可能是研磨时对细胞损伤太大, 样品中含有较多的细胞碎片和坏死细胞, 致使峰变宽, 产生较多杂峰所造成。

分析的准确性即直方图的分辨率一般以变异系数 (CV) 来表示 (Dolezel & Bartos, 2005)。CV 越小, DNA 含量分析就越准确, 对于植物组织而言, 最好要小于 8% 才能取得较好的试验结果。使用缓冲液 I、II、IV、V 这 4 种核分离缓冲液制备的荔枝细胞核悬液, 它们的 CV 值均达不到 < 8% 的标准。由于 CV 值差异较大, 因此, 相同的样品在不同的提取缓冲液中获得的细胞分裂活性 (CDA) 的差异也较大 (最高 43.28%, 最低 27.69%)。

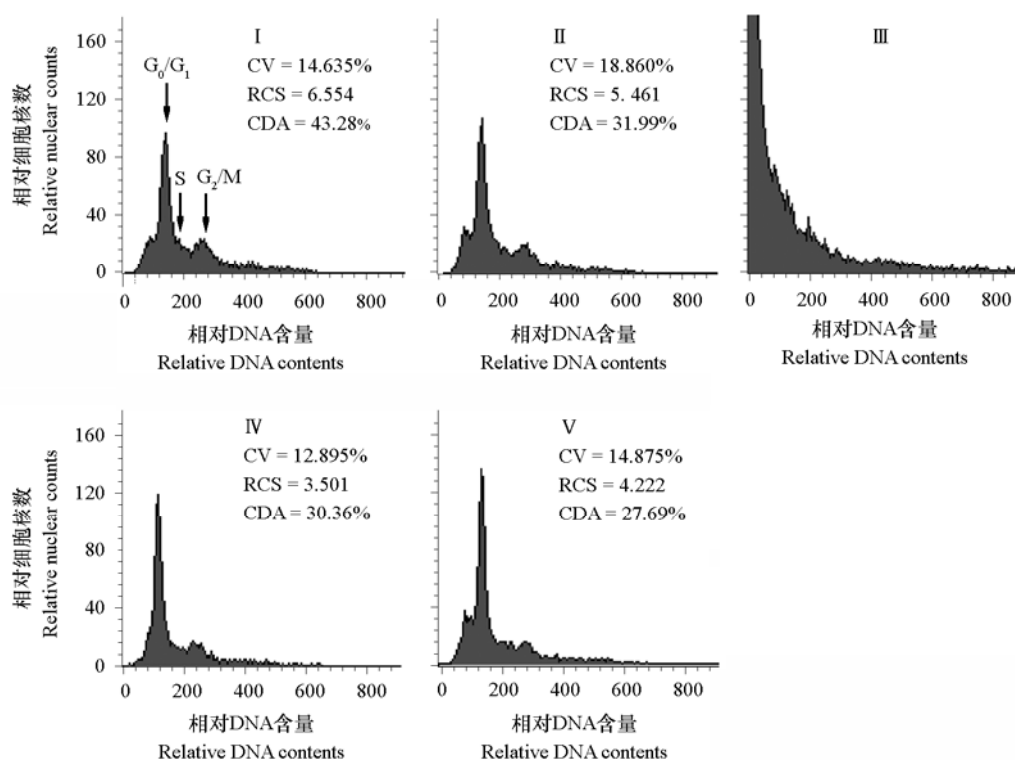


图 1 不同核分离缓冲液获得的荔枝幼果相对 DNA 含量直方图

CV: 变异系数; RCS: 拟合程度; CDA: 细胞分裂活性。

Fig. 1 Histogram for the relative DNA contents of cell number isolated from litchi by different buffer solutions

CV: Coefficient of variation; RCS: Routine checking standard;

CDA: Cell division activity.

*RCS* 是统计学上的指标, 用来反映所选择的模式与所选标本的拟合程度, 0.9 ~ 3.0 为较好的一个范围, 而 3.0 ~ 5.0 为可以接受, 小于 0.8 或是大于 5.0 都被视为不接受。从图 1 中可以看出 4 种缓冲液的 *RCS* 也存在差异, 其中只有缓冲液Ⅳ和缓冲液Ⅴ的 *RCS* 值在可接受范围内, 符合试验的要求, 但由于其 *CV* 值较大, 均未达到最低的试验要求标准, 因此需要进行改良。

## 2.2 改良后核分离缓冲液的提取效果比较

从图 2 中可以看出, 使用改良后核分离缓冲液制备的荔枝细胞核悬液, 在直方图中可产生明显的二倍体和四倍体的“峰”, 峰宽变窄, 主峰变高。虽然主峰底部仍然存在较多的背景碎片, 但是相对于改良前的直方图(图 1)来说, 干扰峰带有了一定的减少, *CV* 值也得到了一定程度的改善, 但是只有改良后的缓冲液Ⅳ的 *CV* 值和 *RCS* 值均达到了试验标准要求, 因此, 选择其作为制备荔枝细胞核悬液的最佳分离缓冲液。

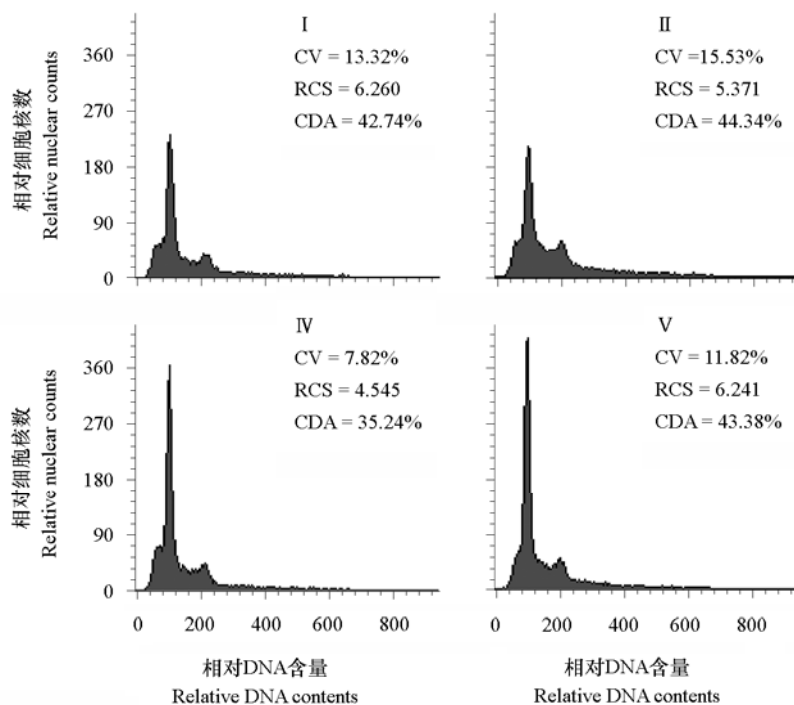


图 2 改良后不同核分离缓冲液获得的荔枝幼果相对 DNA 含量直方图

*CV*: 变异系数; *RCS*: 拟合程度; *CDA*: 细胞分裂活性。

Fig. 2 Histogram for the relative DNA contents of cell nuclei isolated from litchi by optimized different buffer solutions

*CV*: Coefficient of variation; *RCS*: Routine checking standard;  
*CDA*: Cell division activity.

试验中比较了  $400 \times g$  和  $800 \times g$  离心力对核分离效果的影响, 从结果(图 3)看, 采用  $400 \times g$  和  $800 \times g$  离心力得到的 *CV* 值均  $< 8\%$ , *RCS* 值也在可接受范围内, 差异不大, 但有报道指出低离心力有利于降低细胞碎片及杂质的沉积(夏玉玲等, 2002), 由此, 使用改良后的缓冲液Ⅳ作为核分离缓冲液, 采用  $400 \times g$  离心力的处理方法最适合制备荔枝幼果细胞核悬液, 并可用于流式细胞术分析细胞分裂活性。

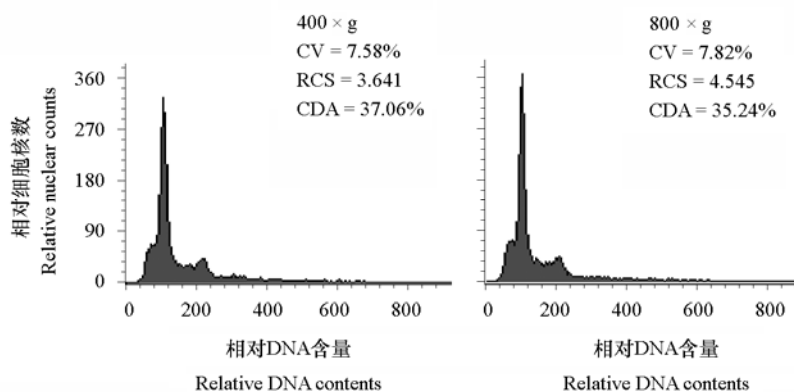


图 3 不同离心力下缓冲液 IV 获得的荔枝幼果相对 DNA 含量直方图

CV: 变异系数; RCS: 拟合程度; CDA: 细胞分裂活性。

Fig. 3 Histogram for the relative DNA contents of cell nuclei isolated from litchi by optimized buffer IV under different centrifugal force

CV: Coefficient of variation; RCS: Routine checking standard; CDA: Cell division activity.

### 2.3 ‘妃子笑’荔枝早花大果和晚花小果果实发育早期细胞分裂活性的比较

由图 4 可见, 在盛花期 (0 d), 早花和晚花果的子房细胞分裂活性相差不大, 随着果实的发育, 在花后 14 d 时, 早花果出现了一个分裂活性的高峰, S + G<sub>2</sub>/M 期细胞数占 27.5%, 此后逐渐减弱, 花后 39 d 时, S + G<sub>2</sub>/M 期细胞数下降至 15.5%。而晚花果的 S + G<sub>2</sub>/M 期细胞数在花后 14 d 时已急剧下降至 16.6%, 虽然在花后 25 d 时有所回升, 但是在花后 32 d 时, 细胞分裂活性已处于较低水平。因此, 从 ‘妃子笑’ 果实的整个发育早期来看, 早花果的细胞分裂活性始终高于晚花果, 而且细胞分裂的持续时间比晚花果长 7 d 左右。

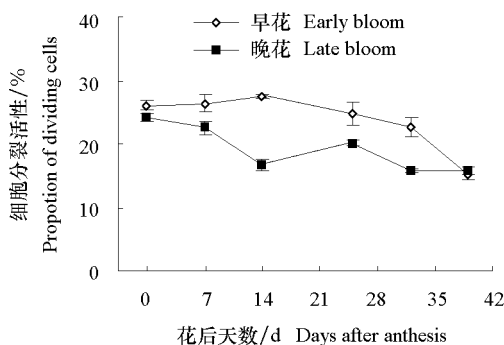


图 4 ‘妃子笑’荔枝早花果和晚花果果实发育早期细胞分裂活性的比较

Fig. 4 The proportion of dividing cells in fruitlet and pericarp from early bloom and late bloom of ‘Feizixiao’ during fruit early development

### 2.4 不同果实大小荔枝品种果实发育早期细胞分裂活性的比较

由图 5 可见, 大果品种 ‘四两果’ 在盛花期的细胞分裂活性虽处于较低水平 (只有 20.57%), 但随后快速上升, 并在花后 7 d 达到一个小高峰 (30.97%), 之后两周略有下降, 但均高于 27%, 花后 28 d 到达分裂高峰 (36.66%) 后, 便开始急速降低, 至花后 49 d 跌至最低水平 (16.28%)。小果品种 ‘陈紫’ 则在花后的 0~21 d 内, 其果实细胞分裂活性维持在一个较高水平 (22.63%~25.30%),

花后 21 d 起, 开始较快速的下降, 至花后 42 d 达到最低点 13.12%。对比两个品种果实发育早期的细胞分裂活性, 除花后 0 d 外, ‘四两果’ 始终高于 ‘陈紫’, 而且细胞分裂的持续时间比 ‘陈紫’ 长 7 d 左右。

大果 (‘妃子笑’ 早花果与 ‘四两果’) 的细胞分裂活性均高于小果, 而且具有较长的分裂持续时间, 这意味着果实发育早期的细胞分裂活性与成熟果实的最终大小是密切相关的。

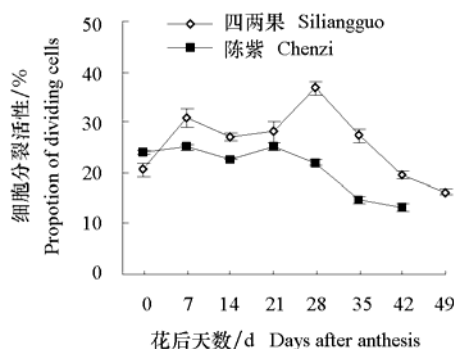


图 5 ‘四两果’ 与 ‘陈紫’ 荔枝果实发育早期细胞分裂活性的比较  
Fig. 5 The proportion of dividing cells in fruitlet and pericarp from ‘Siliangguo’ and ‘Chenzi’ during fruit early development

### 3 讨论

#### 3.1 荔枝幼果细胞分裂活性的流式细胞术检测方法的建立

由于流式细胞术不适用于粘度过高的植物材料, 因此材料状态、取材部位也是需要考虑的重要问题 (Hopping, 1993)。含有较多酚类物质和糖类的植物, 其粘性较大, 这些粘性物质分布在细胞质中, 细胞质紧密地和细胞核粘在一起, 分离的细胞核纯度会受到影响, 还会加速细胞核老化, 增加样品粘度, 阻碍流式细胞仪中鞘液流动, 以致不能准确地检测出待测样品的倍性 (Noirot et al., 2003; Suda et al., 2004; Loureiro et al., 2006)。Favre & Brown (1996) 和 Zoldo 等 (1998) 在测定的橡树 DNA 含量时, 发现结果不一致, 究其原因是因为酚类物质的存在。Loureiro 等 (2006) 在研究栓皮栎树组培苗和离体叶片 DNA 含量时, 发现酚类物质是造成两者差异较大的原因。荔枝果实中含有较多的酚类物质和糖类, 若要选择粘度高的荔枝样品进行检测, 必须选择新鲜、幼嫩的材料并通过提取方法的改进来消除材料本身的粘性。

本试验中首先对 5 种常用细胞核分离缓冲液进行了初步筛选, 发现李铁军等 (2009) 提出的适合长春花叶片细胞核悬液的缓冲液 III 不适用于荔枝幼果, 然后通过对其其他 4 种缓冲液进行增加还原剂的量 ( $\beta$ -巯基乙醇的量提高到  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和种类 (添加  $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT) 的改良, 目的是抵消酚类物质对 DNA 染色的干扰, 保护染色质蛋白, 降低细胞核和细胞质碎片的聚集, 促进细胞核释放, 分散叶绿体, 消除叶绿体的干扰。DNA 荧光染料 PI 可定量结合在 DNA 双螺旋的碳架结构上, 不受 DNA 分子碱基对差异的影响, 细胞核内 DNA 分子数目越多, DNA 分子链越长, PI 嵌入碳架结构中的量就越多, 经激光照射, 这些 DNA 促发荧光的强度就越强。若细胞中含有双链的 RNA, PI 也能嵌入到 RNA 的碳架结构中, 对测定的结果造成影响, 因而, 用 PI 染色时须加入 RNase A 以消解 RNA 分子 (李赞 等, 1998)。本试验中采用 RNase A 直接加入缓冲液中而不是只在染色过程中加入到染色液中 (Otto, 1990; Dolezel & Ghode, 1995), 从而使 RNase A 在整个细胞核的提取过

程中都发挥作用,更加充分地分解样品中的 RNA,以降低 RNA 的干扰。

### 3.2 荔枝果实发育早期细胞分裂活性与果实大小的关系

‘妃子笑’在生产中容易形成两批花,早花在珠江三角洲地区一般在 3 月下旬开放,晚花一般在 4 月中下旬开放,早花果(> 30 g)一般比晚花果(< 22 g)要大 50%以上(李建国 等, 2004)。本试验中,早花和晚花雌花盛开的日期分别为 2009 年 3 月 20 日和 4 月 10 日,至采收时,早花果实最终鲜质量平均达 34.58 g,远大于晚花果实的 20.58 g。此外,据《中国果树志·荔枝卷》(吴淑娴, 1998)记载,‘四两果’和‘陈紫’的平均单果质量分别为 34.6 g 和 14.8 g,前者属于大果品种,而后者属于小果品种,本试验中观测的‘四两果’和‘陈紫’的平均单果质量分别为 30.47 g 和 14.61 g。通过比较具有相似遗传背景的‘妃子笑’早花大果和晚花小果以及具有不同遗传背景的大果和小果型品种之间果实发育前期的幼果和果皮细胞分裂活性发现,与小果相比,大果的细胞分裂活性要高,且持续时间要长,说明果实大小方面的差异与其果实发育前期细胞分裂活性有关。本结果进一步证实了李建国等(2002)认为荔枝果实大小属于细胞数量决定型的观点。本结果与日本 Ezura 课题组在甜瓜上的研究结果非常相似,他们通过用组织解剖学的方法比较了具有相似遗传背景的大果型品种‘Fuyu A’和小果型品种‘Natsu 4’果实发育早期细胞学差异,认为甜瓜果实大小是由细胞数量决定的而与细胞大小无关(Higashi et al., 1999),后来又通过流式细胞仪的检测结果所证实(Kobayashi et al., 2002)。细胞周期可通过直接影响单个细胞的分裂能力和细胞周期的期限来决定细胞数量(Winkleman et al., 1998; Yanpaisan et al., 1999),因此,细胞周期对最终细胞数量和器官大小起决定性的作用(Inze & Veylder, 2006)。在栽培实践中通过喷施细胞分裂类的植物生长调节剂也许可以达到提高果实发育前期细胞分裂活性或延长其分裂时间,从而增加大果比例的目的。

### References

- Bennett M D, Leitch I J. 2005. Plant genome size research: A field in focus. *Annals of Botany*, 95: 1 – 6.
- Bohner J, Bangerth F. 1988. Cell number, cell size and hormone levels in semi-isogenic mutants of *Lycopersicon pimpinellifolium* differing in fruit size. *Physiologia Plantarum*, 72: 316 – 320.
- Cheng G W, Breen P J. 1992. Cell count and size in relation to fruit size among strawberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117 (6): 946 – 950.
- Cowan A K, Moore-Gordon C S, Bertling I, Wolstenholme B N. 1997. Metabolic control of avocado fruit growth: Isoprenoid growth regulators and the reaction catalyzed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Plant Physiology*, 114: 511 – 518.
- Dolezel J, Bartos J. 2005. Plant DNA flow cytometry made estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95: 99 – 110.
- Dolezel J, Binarova P, Lcretti S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31: 113 – 120.
- Dolezel J, Gohde W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry*, 19: 103 – 106.
- Favre J, Brown S. 1996. A flow cytometric evaluation of the nuclear DNA content and GC percent in genomes of European oak species. *Annales des Sciences Forestieres*, 53: 915 – 917.
- Galbraith D W, Harkins K R, Maddox J M, Ayres N M, Sharma D P, Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049 – 1051.
- Goffinet M C, Robinson T L, Lakso A N. 1995. A comparison of ‘Empire’ apple fruit size and anatomy in unthinned and hand-thinning trees. *Journal of Horticultural Science*, 70: 375 – 387.
- Higashi K, Hosaya K, Ezura H. 1999. Histological analysis of fruit development between two melon (*Cucumis melo* L. *reticulatus*) genotypes setting a different size of fruit. *Journal of Experimental Botany*, 50: 1593 – 1597.



- Hopping M E. 1993. Preparation and preservation of nuclei from plant tissues for quantitative DNA analysis by flow cytometry. *New Zealand Journal of Botany*, 31: 391 – 401.
- Inze D, Veylder L D. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, 40: 77 – 105.
- Jin Liang, Zhang Xian-yin, Xue Qing-zhong. 2007. Comparison on the effects of different isolation buffer on the DNA resolution of the cell nucleus suspensions from rice. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 19: 93 – 96. (in Chinese)
- 金 亮, 张宪银, 薛庆中. 2007. 分离缓冲液对水稻细胞核悬液 DNA 分辨率效应的比较. *浙江农业学报*, 19: 93 – 96.
- Kobayashi T, Kato-Emori S, Tomita K, Ezura H. 2002. Detection of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase protein Cm-HMGR during fruit development in melon (*Cucumis melo* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 779 – 785.
- Li J, Arumuganathan K, Gill K S, Song Y C. 2004. Flow sorting and microcloning of maize chromosome 1. *Hereditas*, 141: 55 – 60.
- Li Jian-guo, Huang Xu-ming, Huang Hui-bai, Zhou Bi-yan. 2002. A cytological and physiological study of large- and small-sized litchi cultivars fruit. *Journal of Fruit Science*, 21: 37 – 41. (in Chinese)
- 李建国, 黄旭明, 黄辉白, 周碧燕. 2002. 大果型和小果型荔枝品种果实发育的细胞学和生理学比较. *果树学报*, 19: 158 – 162.
- Li Jian-guo, Huang Hui-bai, Huang Xu-ming. 2004. Differential fruit sizing of 'Feizixiao' litchi fruit from early and late bloom as affected by temperature regimes. *Journal of Fruit Science*, 19 (3): 158 – 162. (in Chinese)
- 李建国, 黄辉白, 黄旭明. 2004. 妃子笑荔枝早花果和晚花果大小不同与温度的关系. *果树学报*, 19 (3): 158 – 162.
- Li Tie-jun, Shi Jun-ying, Zhang Xiao-wei. 2009. Simple preparation of nucleus suspension from leaf of madagascar periwinkle. *Research and Practice of Chinese Medicines*, 23: 31 – 32. (in Chinese)
- 李铁军, 石俊英, 张孝卫. 2009. 长春花叶片细胞核悬液的简便制备方法. *现代中药研究与实践*, 23: 31 – 32.
- Li Yun, Shi Yinping, Shu Huai-rui, Wang Qiang-sheng. 1998. Use of flow cytometry for identification of ploidy in apple. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 18 (4): 499 – 504. (in Chinese)
- 李 贇, 石荫坪, 束怀瑞, 王强生. 1998. 利用流式细胞光度术鉴定苹果倍性的研究. *西北植物学报*, 18 (4): 499 – 504.
- Loureiro J, Rodriguez E, Dolezel J, Santos C. 2006. Flow cytometric and microscopic analysis of the effect of tannic acid on plant nuclei and estimation of DNA content. *Annals of Botany*, 98: 515 – 527.
- Matzk F, Meister A, Schubert I. 2000. An efficient screen of reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *Plant Journal*, 21: 97 – 108.
- Murray B G, Hammett K R W, Standring L S. 1992. Genomic constancy during the development of *Lathyrus odoratus* cultivars. *Heredity*, 68: 321 – 327.
- Noirot M, Barre P, Duperray C, Louarn J, Hamon S. 2003. Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide accessibility to DNA: Consequences on genome size evaluation in coffee tree. *Annals of Botany*, 92: 259 – 264.
- Otto F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in Cell Biology*: 105 – 110.
- Perry R N, Beane J, Marett C C, Tylka G L. 2002. Comparison of the rate of embryogenic development of *Globodera rostochiensis* and *G-pallida* using flow cytometric analysis. *Nematology*, 4: 553 – 555.
- Pfossen M, Amon A, Lelley T, Heberle-Bors E. 1995. Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat-rye addition lines. *Cytometry*, 21: 387 – 393.
- Pinto G, Loureiro J, Lopes T, Santos C. 2004. Analysis of genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 580 – 587.
- Scorza R. 1991. Differences in number and area of mesocarp cell between small- and large-fruited peach cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116 (5): 861 – 864.
- Sgorbati S, Sparvoli E, Levi M, Maria G G, Sandra C, Donato C. 1991. Cell cycle kinetic analysis with flow cytometry in pea root meristem synchronized with aphidicolin. *Physiologia Plantarum*, 81: 507 – 512.
- Souza M M, Palomino G, Pereira T N S, Pereira M G, Viana A P. 2004. Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. *Hereditas*, 141: 31 – 38.
- Suda J, Malcova R, Abazid D, Banas M, Prochazka F, Sida O, Stech M. 2004. Cytotype distribution in *Empetrum* (Ericaceae) at various spatial scales in the Czech Republic. *Folia Geobotanica*, 39: 161 – 171.

- Winklemann T, Sangwan R S, Schwenkel H G. 1998. Flow cytometric analyses in embryogenic and non-embryogenic callus lines of *Cyclamen persicum* Mill.: Relation between ploidy level and competence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 17: 400 - 404.
- Wu Shu-xian. 1998. *Encyclopaedia of China fruits: Litchi*. Beijing: China Forestry Press: 131, 151. (in Chinese)
- 吴淑娴. 1998. 中国果树志 · 荔枝卷. 北京: 中国林业出版社: 131, 151.
- Xia Yu-ling, Liu Yan-qun, Lu Cheng. 2002. Principles and methods for the extraction of mitochondrion DNA of animals. *Newsletter of Sericultural Science*, 22 (3): 24 - 29. (in Chinese)
- 夏玉玲, 刘彦群, 鲁 成. 2002. 动物线粒体 DNA 提取的原理和方法. *蚕学通讯*, 22 (3): 24 - 29.
- Yan Guo-hua, Gan Li-jun, Sun Rui-hong, Zhang Li-hua, Zhou Xie. 2000. A study on the mechanisms of exo-gibberlins and cytokinins in the growth regulation of young apple fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 27: 11 - 16. (in Chinese)
- 闫国华, 甘立军, 孙瑞红, 张利华, 周 燮. 2000. 赤霉素和细胞分裂素调控苹果果实早期生长发育机理的研究. *园艺学报*, 27: 11 - 16.
- Yanpaisan W, King N J C, Doran P M. 1999. Flow cytometry of plant cells with applications in large-scale bioprocessin. *Biotechnology Advances*, 17: 3 - 27.
- Zhang Jun-e, Deng Xiu-xin. 2005. Cell cycle of citrus calli revealed by flow cytometry. *Journal of Fruit Science*, 22 (6): 741 - 743. (in Chinese)
- 张俊娥, 邓秀新. 2005. 采用流式细胞仪分析柑橘愈伤组织的细胞周期. *果树学报*, 22 (6): 741 - 743.
- Zhang Yu-jing. 2000. *Molecular Genetics*. Beijing: Science Press: 27. (in Chinese)
- 张玉静. 2000. 分子遗传学. 北京: 科学出版社: 27.
- Zoldo V, Pape D, Brown S C, Panaud O, Siljak-Yakovlev S. 1998. Genome size and base composition of seven *Quercus* species: inter-and intra-population variation. *Genome*, 41: 162 - 168.

## 征 订

## 欢迎订阅 2012 年《中国农业科学》中、英文版

《中国农业科学》中、英文版由农业部主管、中国农业科学院主办。主要刊登农牧业基础科学和应用基础科学研究论文、综述、简报等。设有作物遗传育种; 耕作栽培·生理生化; 植物保护; 土壤肥料·节水灌溉·农业生态环境; 园艺; 园林; 贮藏·保鲜·加工; 畜牧·兽医等栏目。读者对象是国内外农业科研院(所)、农业大专院校的科研、教学人员。

《中国农业科学》中文版影响因子、总被引频次连续多年居全国农业科技期刊最前列或前列位次。1999 年起连续 10 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”资助; 2001 年入选中国期刊方阵双高期刊; 1999 年获“首届国家期刊奖”, 2003、2005 年获“第二、三届国家期刊奖提名奖”; 2004—2006 年连续荣获第四、五届全国农业优秀期刊特等奖; 2002 年起 7 次被中信所授予“百种中国杰出学术期刊”称号; 2008 年获中国科技信息研究所“精品科技期刊”称号, 及武汉大学中国科学评价中心“权威期刊”称号; 2010 年荣获“第二届中国出版政府奖期刊提名奖”。在北京大学《中文核心期刊要目总览(2008 年版)》中位居“农业综合类核心期刊表”首位。2010 年 1 月起中文版改为半月刊, 将有更多最新农业科研成果通过《中国农业科学》及时报道。

《中国农业科学》英文版(*Agricultural Sciences in China*)2002 年创刊, 2006 年 1 月起正式与国际出版集团 Elsevier 合作, 海外发行由 Elsevier 全面代理, 全文数据在 ScienceDirect 平台面向世界发行。2010 年 1 月起英文版页码增至 160 页。2010 年 *Agricultural Sciences in China* 被 SCIE 收录, 拟于 2012 年 1 月更名为 *Journal of Integrative Agriculture*。

《中国农业科学》中文版大 16 开, 每月 1、16 日出版, 国内外公开发行。每期 224 页, 定价 49.50 元, 全年定价 1188.00 元, 国内统一刊号: CN11-1328/S, 国际标准刊号: ISSN0578-1752, 邮发代号: 2-138, 国外代号: BM43。

《中国农业科学》英文版大 16 开, 每月 20 日出版, 国内外公开发行。每期 160 页, 国内订价 36.00 元, 全年 432.00 元, 国内统一刊号: CN11-4720/S, 国际标准刊号: ISSN1671-2927, 邮发代号: 2-851, 国外代号: 1591M。

邮编: 100081; 地址: 北京 中关村南大街 12 号《中国农业科学》编辑部; 电话: 010-82109808, 82106280, 82106281, 82106282; 传真: 010-82106247; 网址: [www.ChinaAgriSci.com](http://www.ChinaAgriSci.com); E-mail: [zgnykx@mail.caas.net.cn](mailto:zgnykx@mail.caas.net.cn)。