

基于流式细胞术和 K-mer 分析的苦豆子基因组大小估测

黄阿晶, 周佳熠, 李天泽, 邢怡德, 高 飞*, 周宜君*

中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

摘要: **目的** 采用流式细胞术与 K-mer 分析方法对苦豆子基因组大小及杂合率进行估测, 为其全基因组测序提供参考。**方法** 以大豆为内标, 通过流式细胞仪检测大豆与苦豆子细胞 DNA 含量的倍数关系, 计算苦豆子的基因组大小。采用二代测序技术进行苦豆子基因组调查测序, 使用 K-mer 分析估测苦豆子基因组大小与杂合率。**结果** 采用流式细胞术测得苦豆子基因组大小约为 1 749 Mb。K-mer 分析结果表明, 苦豆子基因组大小约为 1 648 Mb, 基因组杂合率为 1.12%, 杂合率较高。**结论** 苦豆子基因组大小约为 1.7 Gb, 杂合率较高, 后续研究可采用三代 PacBio 进行 80~100 X 深度的测序开展全基因组测序研究。

关键词: 苦豆子; 流式细胞术; K-mer 分析; 基因组大小; 杂合率

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)24 - 6098 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.026

Flow cytometry and K-mer analysis estimates of genome size of *Sophora alopecuroides*

HUANG A-jing, ZHOU Jia-yi, LI Tian-ze, XING Yi-de, GAO Fei, ZHOU Yi-jun

College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract: Objective In this study, flow cytometry and K-mer analysis were used to estimate genome size and hybridity percentage of *Sophora alopecuroides*, so as to provide reference for its genome sequencing. **Methods** *Glycine max* served as an internal reference, the multiple relationship between DNA content in *Glycine max* and *S. alopecuroides* cells was detected by flow cytometry, and the genome size of *S. alopecuroides* was calculated. Genome sequencing of *S. alopecuroides* was carried out using NGS technology, genome size and hybridity percentage of *S. alopecuroides* were estimated by K-mer analysis. **Results** The genome size of *S. alopecuroides* was about 1 749 Mb measured by flow cytometry. K-mer analysis showed that the genome size of *S. alopecuroides* was about 1 648 Mb, the hybridity percentage was 1.12%, and the percentage of repetitive sequence was high. **Conclusion** The genome size of *S. alopecuroides* was about 1.7 Gb with high hybridity percentage. The technology of combining Illumina and PacBio is recommended for future genome sequencing.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.; flow cytometry; K-mer analysis; genome size; hybridity percentage

苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 为豆科 (Leguminosae) 槐属 *Sophora* L. 多年生草本根茎植物, 别名香豆、苦甘草、苦豆草、欧苦参等^[1]。在我国, 苦豆子广泛分布于宁夏、新疆、内蒙古、甘肃等西北部干旱荒漠地区, 抗旱、抗盐性较强^[2], 具有防风固沙和改良盐碱地等重要生态功能^[3]。

作为一种药用植物, 苦豆子全株味苦, 具有平喘止咳、抗菌消炎、止痛杀虫等作用^[4], 现收载于《中国药典》《全国中草药汇编》《维吾尔药志》等^[5]。苦豆子的主要化学成分为生物碱和黄酮类, 此外还含有氨基酸、蛋白质、多糖、有机酸等^[6], 其生物碱具有抗肿瘤^[7]、杀菌^[8]、抗炎^[9]、镇痛^[10]等功能, 其

收稿日期: 2019-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31370356); 国家自然科学基金资助项目 (31670335); 中央民族大学学术团队建设项目 (2015C8); 国家大学生创新训练计划 (SHSY2016120010)

作者简介: 黄阿晶 (1996—), 女, 本科在读, 研究方向为生物科学。Tel: (010)68932633 E-mail: 1255607105@qq.com

*通信作者 高 飞, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物化学与分子生物学研究。Tel: (010)68932633 E-mail: gaofei@muc.edu.cn

周宜君, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物化学与分子生物学研究。Tel: (010)68932922 E-mail: zhouyijun@muc.edu.cn

种子中所含的苦豆子凝集素具有抗真菌、抗癌等能力^[11]。目前针对苦豆子的研究主要集中在对其有效化学成分的提取与鉴定^[12-14]以及功能的研究^[15-16]方面,少有对其基因组的研究,因而限制了其分子生物学研究的进展。苦豆子全基因组测序的完成,将为研究苦豆子在豆科植物进化中的地位、掌握和利用苦豆子潜在的基因资源奠定基础,从而开展功能基因的克隆和分子遗传育种,以更好地利用其生物碱资源及生态保护功能。

在进行全基因组测序前,通常需对基因组大小进行较为精确的估测。基因组大小(C值)是指生物单倍体配子基因组中所有DNA的总量^[17],估测基因组大小,可以保证足够的测序覆盖度,并为基因组的组装提供参考依据^[18]。此外,基因组大小还与生物进化有关^[19],对植物系统发育^[20]、属间分类^[21]、杂交种鉴定^[22]等研究具有重要参考价值。目前测定基因组大小的方法主要有流式细胞仪测定法和孚尔根染色法等,其中流式细胞术通常被认为是测定多细胞生物基因组大小的标准方法^[23],而随着二代测序的快速发展,K-mer分析也逐渐被运用于基因组大小的测定,并具有一定的准确度与可靠性^[24]。

本研究采用流式细胞仪对苦豆子基因组大小进行了估测,使用K-mer分析方法,对Illumina二代测序得到的苦豆子基因组数据进行分析,以对基因组大小测定结果进行验证,此外分析了基因组杂合度等指标。研究结果可为苦豆子基因组的相关研究提供参考。

1 材料

苦豆子种子来自于宁夏盐池县,其植株经中央民族大学生命与环境科学学院刘博博士鉴定为苦豆子 *Sophora alopecuroides* L.。使用65%的浓硫酸浸泡20 min以破除硬实^[25],种子萌发后在25℃下培养30 d,采取新鲜叶片用于DNA提取,选取幼嫩叶片用于流式细胞分析。大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr. William832 由中国农业科学院作物研究所提供,选取45 d左右的幼嫩叶片用于流式细胞分析。

2 方法

2.1 流式细胞分析

2.1.1 细胞核悬液制备 取植株新鲜幼嫩叶片1 g,加入2 mL细胞裂解液,用锋利刀片切碎、滤过、收集滤液,1 000 r/min离心5 min,弃上清,收集

沉积细胞。

2.1.2 DNA 特异性染色 加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液至制备好的细胞核悬液中,避光染色20 min。

2.1.3 流式细胞仪检测 使用美国BD公司的FACSCalibur流式细胞仪进行检测,使用BD公司CellQuest软件获取数据,并用Yerity Software House公司的ModFit软件分析结果。

PI可无序列选择性地插入DNA的大沟中,从而改变其荧光性,并能够被流式细胞仪检测。同时,PI染色的嵌入量与DNA含量呈正比,故检测待测样品与对照样品的荧光峰值,即可得知两者DNA含量的比值,已知对照样品的基因组大小按照公式即可算出待测样品的基因组大小^[26]。

待测样品DNA含量=对照样品DNA含量×待测样品
荧光强度/对照样品荧光强度

2.2 K-mer 分析

使用全式金PlantZol试剂盒提取苦豆子叶片基因组DNA,Nano Drop 2000测得 $A_{260}/A_{280} \geq 1.8$,琼脂糖凝胶电泳检测单一条带完整。将提取的DNA样品送至安诺优达基因技术公司进行测序分析。首先将DNA样品进行随机打断,构建550 bp的小片段DNA文库,再用Illumina HiSeq 2500进行双末端(Paired-End)测序,过滤掉低质量数据,得到高质量数据用于分析。

采用基于K-mer的分析方法进行基因组大小和杂合率的估测。取K为17进行分析,即从reads中逐碱基取出长度为17个碱基的核苷酸序列,假设所有K-mer能遍历整个基因组,且其深度频率服从泊松分布,即可从所有测序reads中统计K-mer的频数分布,做图获得K-mer的分布曲线,根据曲线可获得K-mer深度估计值^[27],并可根据其拖尾现象估计重复序列。根据公式估测基因组的大小:

基因组大小=K-mer总数/K-mer期望深度

采用Trinity以及Jellyfish 2种软件进行数据分析,并使用Genomescope分析计算杂合率。

3 结果与分析

3.1 流式细胞分析估测苦豆子基因组大小

流式细胞仪可以检测植物的倍性、各细胞周期(G₀、G₁、S、G₂、M)及基因组的大小,检测分辨率或精确度可由G₀/G₁峰的变异系数(CV)^[28]来反映。本研究中CV值均低于4.83%。

利用流式细胞仪测定大豆、苦豆子基因组大小

的结果如图 1~3 所示。对比大豆与苦豆子单独测定的结果可以发现,大豆基因组的测定峰(图 1)与苦豆子基因组的测定峰(图 2)无重叠,可以保证以大豆作为内标计算苦豆子基因组大小结果的准确性。比较 G_0/G_1 期的峰值(图 3),可以得出苦豆子基因组的大小是大豆的 1.59 倍。已知大豆的基因组大小为 1 100 Mb^[29],因而苦豆子的基因组大小为 1 749 Mb、1.79 pg (1 pg=978 Mb^[30])。在流式细胞仪分析中,大豆的流式细胞仪检测结果出现了双峰现象(图 1),第 2 个峰的出峰位置为第 1 个峰的 2 倍,第 1 个峰为 G_0/G_1 期 2C 的 DNA 含量,第 2 个峰为 G_2/M 期 4C 的 DNA 含量,检测选取的大豆材料可能恰好处于细胞分裂旺盛期,因此出现双峰现象。

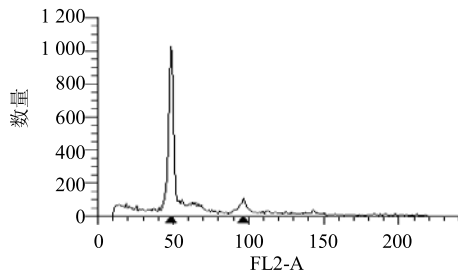


图 1 流式细胞仪估测大豆基因组大小结果

Fig. 1 Flow cytometry estimation of genome size for *G max*

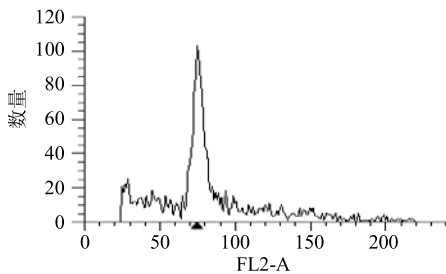


图 2 流式细胞仪估测苦豆子基因组大小结果

Fig. 2 Flow cytometry estimation of genome size for *S. alopecuroides*

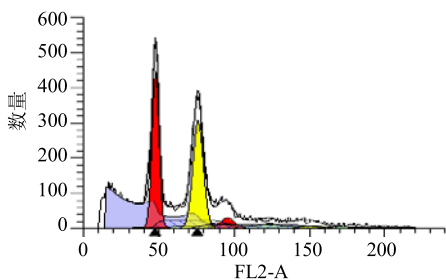


图 3 流式细胞仪估测大豆和苦豆子基因组大小结果

Fig. 3 Flow cytometry estimation of genome size for *G max* and *S. alopecuroides*

3.2 17-mer 分析测定苦豆子基因组大小

利用第二代高通量测序方法获得 131 Gb 原始数据,过滤掉低质量数据后,得到 98 Gb 高质量数据,使用 jellyfish 软件进行 17-mer 分析,其频率分布如图 4 所示。横坐标表示 17-mer 出现的次数,纵坐标表示出现的频率。图中显示,在 48 附近有一明显峰值,即 K-mer 的期望深度。根据公式(基因组大小=K-mer 的总数/K-mer 的期望深度)估算基因组大小约为 1 648 Mb。从图 4 还可观察到,在期望深度的 1/2 处有一个明显的凸峰,初步判断苦豆子基因组具有较高的杂合率。使用 Genomescope 进行杂合度分析,计算得出杂合度为 1.12%,杂合度较高。

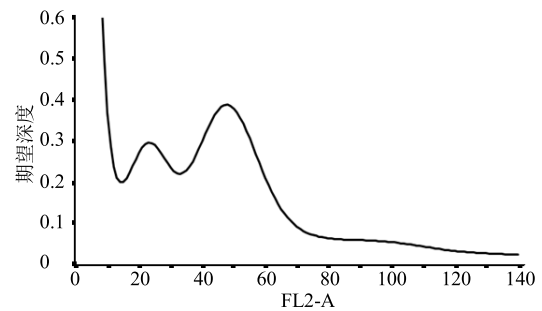


图 4 17-mer 分布曲线

Fig. 4 Distribution curve of 17-mer

4 讨论

流式细胞术目前已被广泛应用于测定植物基因组大小及倍性水平^[31],具有操作简单快速、灵敏度高、准确性好等优点^[32]。然而,在实际检测过程中,使用的细胞裂解液、材料类型、测定方法、实验环境和标准选取等因素都可能导致同一物种测定结果的不同^[33]。在标准物的选取上,早期研究多选用鸡血红细胞作为参照标准,但由于鸡的 2C DNA 含量有一定变异,且鸡与植物细胞核的水解率不同等原因^[34-35],检测植物 DNA 含量时最好以植物细胞作为参照。一个理想的内标植物应满足:细胞核易提取、细胞中不含有影响细胞核提取以及影响 PI 染色的物质^[36]、具有遗传稳定性、样品容易大量获取、其基因组大小与待测物种接近(相差 2 倍以内)但容易区分^[33]等。本研究选取大豆作为标准植物,大豆于 2008 年完成全基因组测序^[29],基因组大小为 1 100 Mb,具有遗传稳定性,且样本容易获取。大豆与苦豆子的基因组大小较为接近,其出峰位置与苦豆子可明确区分,并与杂质峰距离远,是苦豆子基因组大小估测的理想参照。

CV 值是检验实验精确度的重要指标, 通常认为 CV 值在 5% 以下的实验结果较为可靠。此次研究中几次检测的 CV 值均位于 3.02%~4.83%, 表明实验结果较为可靠。因此, 本研究采用大豆作为内标估测苦豆子基因组大小, 测定结果为 1 749 Mb, 具有一定的准确性。

基于全基因组测序和统计学原理发展而来的 K-mer 分析, 可以通过对测序片段的 K-mer 分布进行统计分析来估算基因组大小, 获得测序数据后无需进行生物学实验, 因此避免了由实验过程造成的误差, 具有一定的可靠性, 目前已被成功地运用于一些没有相关基因组信息的物种(如大熊猫^[37]、黄瓜^[38]、长牡蛎^[39]等)的基因组大小估测, 并为其全基因组测序方案及序列拼接提供了参考。由于 K-mer 分析完全基于二代测序得到的数据, 因此只要在整个流程, 包括 DNA 的提取、NGS 文库构建、高通量测序的步骤中没有偏差, 测序片段能很好代表整个基因组, K-mer 分析就能较为准确地对基因组大小进行估计^[18]。

本研究采用 K-mer 分析得出苦豆子的基因组大小约为 1 648 Mb, 这一结果与流式细胞仪的检测结果 1 749 Mb 较为接近, 但小了 101 Mb, 可能是由于二代测序过程中遗漏了部分基因组, 如异染色质区和高度重复序列^[18]等。此外, 由于苦豆子杂合度较高, 其 17-mer 曲线呈现为双峰, 较为偏离泊松分布, 也可能影响对其基因组的精确估计^[40]。

综合流式细胞仪与 K-mer 分析的结果, 可得出苦豆子基因组大小约为 1.7 Gb, 相比于其他豆科植物的基因组大小, 如大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 为 1 100 Mb^[29], 绿豆 *Vigna radiata* (L.) Wilczek 为 579 Mb^[41], 豌豆 *Pisum sativum* L. 约为 4 300 Mb^[42], 百脉根 *Lotus japonicus* L. 为 472 Mb^[43], 蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn. 约为 500 Mb^[44], 苦豆子基因组大小在豆科植物中相对较大, 介于大豆与豌豆之间。

此外, K-mer 分析结果显示苦豆子杂合度较高(1.12%), 序列拼接难度较大。目前对于高重复高杂合度基因组的组装多使用全基因组鸟枪法结合 BAC to BAC 或 fosmid 文库的策略, 但文库构建工作较大, 实验周期长, 人力成本较高^[44]。随着三代测序技术的发展, 使用三代 PacBio 测序可成功地分析高杂合基因组^[45], 并可降低时间和成本。因此, 苦豆子的全基因组测序可采用三代 PacBio 进行

80~100 X 深度的测序。

本研究使用流式细胞术和 K-mer 分析对苦豆子基因组大小进行了估测, 流式细胞仪测定结果为 1 749 Mb, K-mer 分析结果为 1 648 Mb, 杂合度为 1.12%, 杂合度较高, 建议后续研究可采用三代 PacBio 进行 80~100 X 深度的测序。

参考文献

- [1] 杨毅. 苦豆子赖氨酸脱羧酶基因克隆及表达分析 [D]. 银川: 宁夏大学, 2015.
- [2] 郭文云. 苦豆子抗盐相关基因的筛选及功能分析 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [3] 纪瑛, 藺海明, 陈垣, 等. 施氮对苦豆子生物量及生物碱积累的影响 [J]. 草业学报, 2008, 17(3): 40-46.
- [4] 单晓菊, 邸明磊, 陶遵威. 苦豆子化学成分及药理研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(3): 105-107.
- [5] 杨巧丽, 顾政一, 黄华. 中药苦豆子的研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2011, 26(3): 232-236.
- [6] 周福生, 穆青. 野生植物苦豆子的化学成分和主要药理作用 [J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(4): 1-3.
- [7] Wang H, Yang S, Zhou H, et al. Aloperine executes antitumor effects against multiple myeloma through dual apoptotic mechanisms [J]. *J Hematol Oncol*, 2015, 8(1): 26.
- [8] Tian A, Xu T, Liu K, et al. Anti-helicobacter pylori effect of total alkaloids of *Sophora alopecuroides* in vivo [J]. *Chin Med J*, 2014, 127(13): 2484-2491.
- [9] Gao Y, Jiang W, Dong C, et al. Anti-inflammatory effects of sophocarpine in LPS-induced RAW 264. 7 cells via NF- κ B and MAPKs signaling pathways [J]. *Toxicol In Vitro*, 2012, 26(1): 1-6.
- [10] Hai Y W, Yu X L, Ling L D, et al. Antinociceptive effects of matrine on neuropathic pain induced by chronic constriction injury [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(7): 844-850.
- [11] Li T, Yin X, Liu D, et al. Isolation and characterization of a novel lectin with antifungal and antiproliferative activities from *Sophora alopecuroides* seeds [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2012, 44(7): 606-613.
- [12] Yang W, Ye G, Meng A, et al. Rapid characterisation of flavonoids from *Sophora alopecuroides* L. by HPLC/DAD/ESI-MSⁿ [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(4/5): 323-330.
- [13] Yang J, Zhang L, Zhu G, et al. Separation and enrichment of major quinolizidine type alkaloids from *Sophora alopecuroides* using macroporous resins [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 945: 17-22.
- [14] Wang H, Duan J, Guo S, et al. Development and validation of a hydrophilic interaction ultra-high-performance liquid chromatography with triple quadrupole MS/MS for the absolute and relative quantification of amino acids in *Sophora alopecuroides*

- L. [J]. *J Separ Sci*, 2013, 36(14): 2244-2252.
- [15] Lu X, Lin B, Tang J, *et al.* Study on the inhibitory effect of total alkaloids of *Sophora Alopecuroides* on osteosarcoma cell growth [J]. *Afric J Tradit Compl Altern Med*, 2014, 11(1): 172-175.
- [16] Chang A, Cai Z, Wang Z, *et al.* Extraction and isolation of alkaloids of *Sophora alopecuroides* and their anti-tumor effects in H22 tumor-bearing mice [J]. *African J Trad Compl Altern Med*, 2014, 11(2): 245-248.
- [17] Soltis D, Soltis P, Bennett M, *et al.* Evolution of genome size in the angiosperms [J]. *Ame J Bot*, 2003, 90(11): 1596-1603.
- [18] Kim J, Roh J, Kwon D, *et al.* Estimation of the genome sizes of the chigger mites *Leptotrombidium pallidum* and *Leptotrombidium scutellare* based on quantitative PCR and k-mer analysis [J]. *Parasites Vectors*, 2014, 7(1): 279-283.
- [19] Bennett M, Leitch I. Plant genome size research: A field in focus [J]. *Annals Bot*, 2005, 95(1): 1-6.
- [20] Zonneveld B. Nuclear DNA contents of all species of *Helleborus* (Ranunculaceae) discriminate between species and sectional divisions [J]. *Plant System Evol*, 2001, 229(1): 125-130.
- [21] Bureš P, Wang Y F, Horova L, *et al.* Genome size variation in central European species of *Cirsium* (Compositae) and their natural hybrids [J]. *Annals Bot*, 2004, 94(3): 353-363.
- [22] Morgan-Richards M, Trewick S, Chapman H, *et al.* Interspecific hybridization among *Hieracium* species in New Zealand: Evidence from flow cytometry [J]. *Heredity*, 2004, 93(1): 34.
- [23] Marescalchi O, Scali V, Zuccotti M. Genome size in parental and hybrid species of *Bacillus* (Insecta, Phasmatodea) from Southeastern Sicily: A flow cytometric analysis [J]. *Genome*, 1990, 33(6): 789-793.
- [24] Chen W, Hasegawa D, Arumuganathan K, *et al.* Estimation of the whitefly *Bemisia tabaci* genome size based on k-mer and flow cytometric analyses [J]. *Insects*, 2015, 6(3): 704-715.
- [25] 王进, 张勇, 陈叶, 等. 苦豆子种子形态特性及发芽条件研究 [J]. *草地学报*, 2007, 15(5): 486-490.
- [26] Hare E, Johnston J. Genome size determination using flow cytometry of propidium iodide-stained nuclei [J]. *Mol Methods Evol Genet*, 2011, 16: 3-12.
- [27] 伍艳芳, 肖复明, 徐海宁, 等. 樟树全基因组调查 [J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(1): 149-152.
- [28] 王亚之, 李秋实, 陈士林, 等. 基于流式细胞分析技术的茯苓基因组大小测定 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2010, 12(3): 452-456.
- [29] Schmutz J, Cannon S, Schlueter J, *et al.* Genome sequence of the palaeopolyploid soybean [J]. *Nature*, 2009, 463(7278): 178-183.
- [30] He K, Lin K, Wang G, *et al.* Genome sizes of nine insect species determined by flow cytometry and k-mer analysis [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 569.
- [31] Miyashita T, Araki H, Hoshino Y. Ploidy distribution and DNA content variations of *Lonicera caerulea* (Caprifoliaceae) in Japan [J]. *J Plant Res*, 2011, 124(1): 1-9.
- [32] Hawley T, Hawley R. *Flow Cytometry Protocols* [M]. New Jersey: Humana Press, 2011.
- [33] Doležel J, Bartoš J. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size [J]. *Annals Bot*, 2005, 95(1): 99-110.
- [34] Tiersch T, Chandler R, Wachtel S, *et al.* Reference standards for flow cytometry and application in comparative studies of nuclear DNA content [J]. *Cytometry Part A*, 1989, 10(6): 706-710.
- [35] Johnston J, Bennett M, Rayburn A, *et al.* Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei [J]. *Am J Bot*, 1999, 86(5): 609-613.
- [36] Bai C, Alverson W, Follansbee A, *et al.* New reports of nuclear DNA content for 407 vascular plant taxa from the United States [J]. *Ann Bot*, 2012, 110(8): 1623-1629.
- [37] Li R, Fan W, Tian G, *et al.* The sequence and de novo assembly of the giant panda genome [J]. *Nature*, 2010, 463(7279): 311-317.
- [38] Huang S, Li R, Zhang Z, *et al.* The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. [J]. *Nature Genet*, 2009, 41(12): 1275-1281.
- [39] Zhang G, Fang X, Guo X, *et al.* The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation [J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 49-54.
- [40] 赵柏淞. 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) BAC 文库的构建及其基因组特征分析 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [41] Arumuganathan K, Earle E. Nuclear DNA content of some important plant species [J]. *Plant Mol Biol Reporter*, 1991, 9(3): 208-218.
- [42] Franssen S, Shrestha R, Bräutigam A, *et al.* Comprehensive transcriptome analysis of the highly complex *Pisum sativum* genome using next generation sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 227-229.
- [43] Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, *et al.* Genome structure of the legume, *Lotus japonicus* [J]. *DNA Res*, 2008, 15(4): 227-239.
- [44] 钟永达, 张新, 李彦强, 等. 鹅掌楸全基因组调查 [J]. *分子植物育种*, 2017, 15(2): 507-512.
- [45] 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]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19029.