

保存方法和保存时间对竹子核 DNA 含量 (2C-值) 检测的影响*

张亦弛^{1,2}, 李霞^{1,2}, 郭振华^{1**}

(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650201; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 竹子核 DNA 含量 (2C-值) 的检测对竹资源的科学研究具有重要意义, 而大部分野外采集的样本, 通过不同方法保存后, 均使用流式细胞仪技术进行核 DNA 含量检测。本文选取麻竹 (*Dendrocalamus latiflorus*)、箬竹 (*Chimonobambusa tumidissinoda*) 和毛花酸竹 (*Acidosasa purpurea*) 三种竹子样本, 使用硅胶保存法和 Sample protector 试剂保存法分别保存 4 d、8 d、12 d、16 d 后, 采用流式细胞术检测样品 2C-值。CV 值可以用来反映数据检测结果质量, 是对检测结果准确性以及精确性的评价标准, 我们通过样品 CV 值的大小和 2C-值的变异率来评价保存方法和保存时间对竹子 2C-值检测的影响。方差分析显示, 保存时间对 CV 值具有显著性影响 ($P < 0.001$), 随着保存时间增大, CV 值增大; 保存方法对 2C-值变异率有显著性影响 ($P < 0.001$)。硅胶保存法保存后的样品, 测量值比新鲜材料大; Sample protector 试剂保存法保存后, 测量值比新鲜材料小。因此, 随着保存时间的增加, 样品 CV 值增大, 引起检测结果质量降低。研究发现, 硅胶保存法和 Sample protector 试剂保存法会影响竹子样本 2C-值大小, 但 2C-值大小的变化小于 10%。

关键词: 竹子; 核 DNA 含量; 保存

中图分类号: Q 78

文献标识码: A

文章编号: 2095-0845(2014)02-227-06

The Effects of Preservation Methods and Storage Time on Estimating the Nuclear DNA Content (2C-value) of Bamboos

ZHANG Yi-Chi^{1,2}, LI Xia^{1,2}, GUO Zhen-Hua^{1**}

(1 Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China;

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Measurement of nuclear DNA content of bamboos (2C-value) is important for scientific research. Sample preservations were required for nuclear DNA content estimate using flow cytometry method, when plants tissues were collected from remote areas. Three bamboo species (*Dendrocalamus latiflorus*, *Chimonobambusa tumidissinoda* and *Acidosasa purpurea*) were selected in this study. Samples were treated with two preservation methods and nuclear DNA contents were estimated by flow cytometry after four days, eight days, twelve days and sixteen days, respectively. Coefficient of variation (CV) was an indicator of sample quality which affects the accuracy and precision of DNA content estimates. Differences in nuclear DNA content (2C-value) and variations in CVs were analyzed to evaluating the effects of two preservation methods and storage time. Univariate ANOVA analysis revealed that CVs were influenced by storage time significantly ($P < 0.001$). Besides, differences of 2C-values between preserved tissues and fresh tissues were influenced by preservation methods significantly ($P < 0.001$). CVs were increasing when time

* 基金项目: 中国科学院知识创新工程项目 (KSCX2-YW-N-067); 国家自然科学基金项目 (30990244); 云南省联合基金项目 (U1136603); 教育部留学回国人员科研启动基金和云南省中青年学术和技术带头人基金 (2008PY065)

** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: guozhenhua@mail.kib.ac.cn

收稿日期: 2013-04-14, 2013-07-29 接受发表

作者简介: 张亦弛 (1987-) 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物比较功能基因组学。E-mail: yiyi758657@gmail.com

elapsed. After short time preservation, nuclear DNA contents generated from dried tissues were higher than those from fresh tissues, while nuclear DNA contents generated from fixed tissues were lower than those from fresh tissues. We concluded that data quality decreases along with the preservation time increases, expressed as higher CVs. Silica gel desiccant treatment and sample protector treatment could contribute to variations in 2C-values of bamboos and the changes of 2C-values were lower than 10%.

Key words: Bamboos; Nuclear DNA content; Preserve

C-值是指一个物种单倍体基因组所含的 DNA 总量 (Swift, 1950)。在细胞分裂的 G1 期, 核内含有未复制的基因组的两个拷贝, 称含有 2C DNA 含量 (DOLEŽEL 和 Bartoš, 2005)。C-值是植物体一个重要的特征, 通常与植物生理、生态和系统与进化有着密切的关系 (Loureiro 等, 2010)。植物 C-值主要通过流式细胞术 (Flow Cytometry, FCM) 进行测定 (Galbraith, 2009; Bennett 和 Leitch, 2011)。流式细胞术是一种快速、准确、客观地同时检测直线流动状态中单个细胞多项物理及生物学特征并加以分析定量的技术 (弓娜等, 2011)。

竹子属于禾本科竹亚科 (Bambusoideae, Poaceae), 全球约有 88 属 1 400 多种, 我国有 34 属 534 种, 分布在长江流域及其以南各省, 是重要的森林资源植物并且具有极其重要的经济价值 (Li 等, 2006)。目前, 国内外学者对竹子 2C-值相关报道较少。Gui 等 (2007) 曾以玉米为内参检测到毛竹新鲜材料的 2C-值为 4.22 pg。李潞滨等 (2008) 以水稻为内参, 测得毛竹新鲜材料的 2C-值为 4.24 pg。国外的 Kumar 等 (2011) 测定了取自新加坡, 马来西亚和泰国的 37 种竹子新鲜材料的 2C-值。研究植物 2C-值是了解植物基因组结构和复杂度、基因组进化历史的重要步骤, 因此获得竹子 2C-值数据对于竹资源的科学研究具有重要意义。

然而, 使用流式细胞技术检测竹子 2C-值的主要限制是: 一方面, 这项技术需要新鲜材料才能进行可靠的 2C-值检测 (Galbraith 等, 1983; Arumuganathan 和 Earle, 1991; Greilhuber 等, 2007); 另外一方面, 流式细胞仪属于贵重仪器, 不易随意搬动, 搬动后会造成检测结果不准确。因此对于野外采集的植物样本, 通常需要通过不同的方法保存一段时间后, 才能进行 2C-值测量。目前, 在野外采集的大量植物样本都可以使用硅胶

快速干燥保存法进行材料保存, 而且在野外操作极其简单、方便。此外, Sample protector (Takara) 试剂保存法同样在野外也操作简单、切实可行。Sample protector 试剂是一种组织材料稳定剂, 它能够迅速渗入新鲜组织细胞的胞浆中, 快速灭活生物样品中的 RNA 酶和 DNA 酶; 在 4 °C 条件下, 一个月内保护 DNA 不被降解。这两种样品保存的方法, 均可在野外快速方便地进行。但是, 使用这两种方法保存后的材料所测量的 2C-值与新鲜材料的 2C-值有没有差异? 保存时间对 2C-值测量的影响有多大? Bainard 等 (2011) 曾考察了硅胶快速干燥的保存方法对于检测 6 个来自不同科的物种基因组大小的影响, 结果发现硅胶快速干燥保存引起的基因组大小改变小于 10%, 这种差异类似于其它方法因素例如缓冲液或是材料收集的季节引起的差异; 没有研究者评价过 Sample protector 试剂保存方法对于检测植物 2C-值的影响。目前, 国内尚未有对这两种保存方法和保存时间对竹子 2C-值测量大小的影响的研究。

本研究通过选取麻竹 (*Dendrocalamus latiflorus* Munro), 箬竹 (*Chimonobambusa tumidissinoda* (Hsueh & T. P. Yi ex Ohrnberger) Hsueh & T. P. Yi.), 毛花酸竹 (*Acidosasa purpurea* (Hsueh & T. P. Yi) P. C. Keng) 3 种竹子作为样本材料, 采用硅胶快速脱水法 (硅胶保存法) 和 Sample protector 试剂法 (试剂保存法) 保存样本, 使用流式细胞术分别测量样本在保存第 4 d、8 d、12 d、16 d 等 4 个时间点以及新鲜材料的 2C-值。通过 CV 和 2C-值变异率两种标准来评价保存方法和保存时间两种因素对竹子 2C-值测量的影响。CV (coefficient of variation) 是用来描述 FCM 直方图数据质量的参数, 代表了流式细胞术检测结果的质量好坏。2C-值变异率主要用来评价保存后, 样本 2C-值大小与新鲜材料相比差异的程度。

1 材料与方法

1.1 实验材料

内参水稻选取栽培稻日本晴 (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*), 基因组大小为 0.86 pg (Goff 等, 2002)。待检测样本选取来自牡竹属 (*Dendrocalamus*) 的麻竹、酸竹属 (*Acidosasa*) 的毛花酸竹和方竹属 (*Chimonobambusa*) 的箬竹 3 种竹子样本。内参样本采取种子萌发 2 月左右的幼嫩叶片。待检测的 3 种竹子样本采取健康植株上同一小枝的新鲜、幼嫩叶片。采样地点位于中国科学院昆明植物研究所植物园。

1.2 实验方法

1.2.1 保存方法 采集的 3 种竹子的样本分别使用硅胶保存法和试剂保存法两种方法进行保存。(1) 硅胶保存法: 新鲜健康的叶片使用硅胶快速脱水干燥, 常温保存。(2) 试剂保存法: 新鲜健康的叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 左右放入 5 倍体积的 Sample protector 试剂 (购自 Takara 公司, Takara Code: D311A) 4 °C 保存。

1.2.2 2C-值检测方法 细胞核悬液制备: 整个实验流程主要按照 Galbraith 等 (2009) 的方法进行。取 1 cm×1 cm 左右新鲜待测叶片组织和 0.5 cm×0.5 cm 左右新鲜水稻叶片组织置于培养皿中, 加入 1 mL 改良的 Galbraith buffer (45 mmol·L⁻¹ MgCl₂、30 mmol·L⁻¹ 柠檬酸钠、20 mmol·L⁻¹ MOPS、体积分数 0.1% TritonX-100 和 0.1% PVP, pH 7.0), 用锋利刀片将组织切碎, 切割力度适中, 以防细胞核破碎, 之后用 300 目尼龙网过滤, 获得细胞核悬液。硅胶干燥的组织在加入 1 mL 缓冲液后浸泡 10 min, 其他步骤同新鲜组织。Sample protector 试剂保存的组织用 ddH₂O 洗净后置于培养皿中, 其他步骤同新鲜组织。所有过程均在冰上完成。

DNA 特异性染色: 向制备的细胞核悬液中加入 1.5 μL DNase-free RNase A (10 mg·mL⁻¹), 置于冰上孵育 5 min, 随后加入碘化丙啶 (Propidium Iodide, PI) 至终浓度为 50 μg·mL⁻¹, 混匀, 于冰上避光染色 20 min, 随后上机检测。

流式细胞仪检测: 流式细胞系统为美国 BD 公司的 Accuri C6 流式细胞仪, 采用 488 nm 蓝光激发。每个样品以栽培稻日本晴为内参, 每个样品重复测 2 次。每次检测至少收集 10 000 个细胞。使用软件 CFlow Plus 分析数据。对于所有的数据, 我们均采用直方图设门 (Gated histograms) 来进行数据采集。

1.2.3 统计方法 CV (coefficient of variation): CV 可以用来反映数据检测结果质量, 是对 2C-值检测准确性以及精确性的评价标准。CV 值越小, 表明数据质量越好。一般认为在 3% 以下是较好的, 3%~5% 是可接受的, 5% 以上较差 (Dolezel 等, 2007)。我们通过 3 个竹种样本的平均 CV 值的大小来考察保存方法和保存时间

对 2C-值检测结果质量的影响。

2C-值变异率: 我们通过 2C-值变异率来考察保存方法和保存时间对 2C-值检测结果大小的影响。

2C-值变异率的计算公式是:

$$2C \text{ 值变异率} = \frac{\text{保存材料 } 2C \text{ 值} - \text{新鲜材料 } 2C \text{ 值}}{\text{新鲜材料 } 2C \text{ 值}} \times 100\%$$

2C-值变异率大于零, 说明 2C-值变大; 2C-值变异率小于零, 说明 2C-值变小。

统计学分析: 所有的分析都使用 SPSS 18.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) 统计学软件进行分析。所有的结果均以均数±标准差表示。我们使用 *t* 检验来考察两组数据之间的均值差异是否显著, 使用 T-SNK 检验来考察多组样本相互之间的均值差异是否显著, 使用单因素方差分析来考察保存方法和保存时间对 CV 和 2C-值变异率的影响是否显著。

2 结果

经预实验检测, 3 种竹子的 2C-值分别是 3.2 pg、6.0 pg 和 5.4 pg。针对每种样品, 分别使用硅胶保存方法和 Sample protector 试剂保存法进行保存, 每种竹子样本分别进行 3 次重复保存处理, 重复处理的材料均在一次实验内测定完成, 共测定第 4 d、第 8 d、第 12 d 和第 16 d, 共 4 个时间点的样品 2C-值, 并且同时测定新鲜材料作为对照, 总共获得五组 2C-值数据。

2.1 保存时间对 CV 的影响

图 1 显示了采用两种保存方法保存后, 3 种竹种在 5 个时间点的平均 CV 值大小, 随着保存时间的增加, 测量的 CV 值呈增大的趋势。对试剂保存的样品, 经 T-SNK 检验, 5 个时间点两两

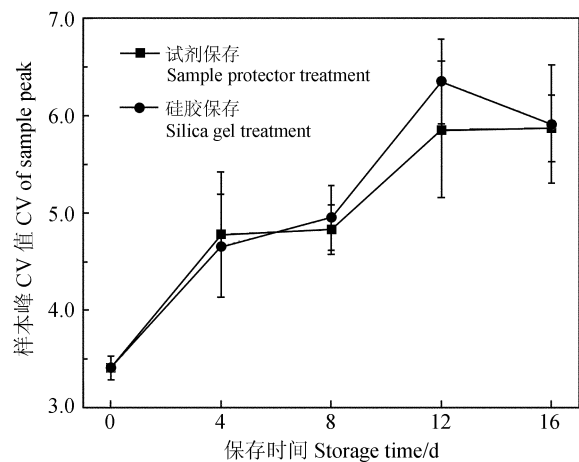


图 1 保存时间对 CV 的影响

Fig. 1 Effects of storage time on coefficient of variation

之间 CV 均具有显著性差异 ($P < 0.05$), 其中在保存 16 天产生了最高的 CV 值 (5.88%)。对于硅胶保存的样品, 经 T-SNK 检验, 5 个时间点之间的 CV 均具有显著性差异 ($P < 0.05$), 在保存 12 天产生了最高的 CV 值 (6.35%), 而在保存 16 天时, 产生的 CV 值为 5.92%。

2.2 保存方法对 2C-值变异率的影响

表 1 反映了保存方法对 2C-值变异率的影响结果。对于硅胶保存的材料, 2C-值变异率为正, 表明保存后样品对于内参相对荧光强度的增强, 2C-值增大。麻竹、箬竹和毛花酸竹在 16 天的保存时间内, 2C-值变异率均小于 5%。对于试剂保存的材料, 2C-值差异为负, 表示保存后样品对于内参相对荧光强度的减弱, 2C-值减小。麻竹、箬竹和毛花酸竹在 16 天的保存时间内, 2C-

值变异率的绝对值小于 5% (除麻竹在保存后第 4 天和第 8 天检测中)。同时, 我们发现每种竹子, 通过两种方法保存后测量的 2C-值和新鲜材料 2C-值之间无显著性差异 (t 检验, $P > 0.05$)。

2.3 保存方法和保存时间对测量结果的交互影响

采用方差分析, 以保存方法和保存时间为两种因素, 分别探索这两种因素对 CV 和 2C-值变异率的影响, 如表 2 所示。保存时间对 CV 具有显著性影响 ($F = 101.19, P < 0.001$), 保存方法对 CV 无显著性影响 ($F = 1.27, P = 0.264$)。保存时间对 2C-值变异率无显著性影响 ($F = 1.27, P = 0.288$), 但是保存方法对 2C-值变异率有显著性影响 ($F = 188.29, P < 0.001$)。同时, 保存时间和保存方法的交互作用对 2C-值变异率有显著性影响 ($F = 12.34, P < 0.001$)。

表 1 保存方法对样品 2C-值变异率的影响

Table 1 Effects of preservation methods on difference of 2C-values

物种 Species	保存时间 Storage time /d	试剂保存 Sample protector treatment		硅胶保存 Silica gel treatment	
		平均 2C DNA 含量/pg (Mean 2C DNA content \pm SD)	2C-值变异率/% (Difference of 2C- values)	平均 2C DNA 含量/pg (Mean 2C DNA content \pm SD)	2C-值变异率/% (Difference of 2C- values)
麻竹 <i>Dendrocalamus latiflorus</i>	0	3.191 \pm 0.037	—	3.191 \pm 0.037	—
	4	2.985 \pm 0.011	-6.45	3.221 \pm 0.053	0.93
	8	2.981 \pm 0.051	-6.58	3.207 \pm 0.056	0.51
	12	3.079 \pm 0.021	-3.49	3.244 \pm 0.017	1.66
	16	3.087 \pm 0.061	-3.24	3.265 \pm 0.029	2.32
箬竹 <i>Chimonobambusa tumidissinoda</i>	0	6.038 \pm 0.026	—	6.038 \pm 0.026	—
	4	5.856 \pm 0.082	-3.02	6.326 \pm 0.098	4.76
	8	5.851 \pm 0.008	-3.10	6.284 \pm 0.026	4.06
	12	5.853 \pm 0.036	-3.07	6.300 \pm 0.054	4.34
	16	5.822 \pm 0.053	-3.59	6.335 \pm 0.059	4.91
毛花酸竹 <i>Acidosasa purpurea</i>	0	5.419 \pm 0.039	—	5.419 \pm 0.039	—
	4	5.182 \pm 0.019	-4.37	5.647 \pm 0.038	4.21
	8	5.287 \pm 0.030	-2.43	5.688 \pm 0.254	4.96
	12	5.334 \pm 0.071	-1.56	5.650 \pm 0.071	4.27
	16	5.352 \pm 0.044	-1.25	5.649 \pm 0.116	4.23

表 2 保存方法和保存时间两种因素对 2C-值检测结果的影响

Table 2 Effects of preservation methods and storage time on 2C-value estimate

因素 Factors	CV (Coefficient of variation)			2C-值变异率 Difference of 2C-values		
	df	F	P	df	F	P
保存方法 Preservation method	1	1.27	0.264	1	188.29	<0.001
保存时间 Storage time	4	101.19	<0.001	4	1.27	0.288
保存方法 * 保存时间 Preservation method * storage time	4	1.17	0.330	4	12.34	<0.001

3 讨论

竹子是重要的资源植物, 而且也是一类有特殊生物学现象的植物, 其笋期生长快速, 秆高度木质化, 一次开花, 开花周期可长达 120 年 (Janzen 等, 1976)。检测竹子的 2C-值对竹资源的科学研究和开发利用具有重要的意义。大量野外采集的竹种样本需经不同方法保存后, 长途运回实验室进行 2C-值的测定。目前, 已发现有多种保存方法适合对待检测的样本进行保存, 脱水干燥法和试剂固定后保存的方法是两种主流的保存方法 (Suda 和 Trávníček, 2006)。本文主要评价硅胶快速脱水干燥保存和 Sample protector 试剂保存这两种保存方法及 16 天的保存时间对竹子 2C-值检测的影响, 对竹子及其他野生植物资源的 2C-值测定具有一定的参考价值。

3.1 保存时间对 CV 的影响

对于两种保存方法保存后的样本, 随着保存时间增加, 三种竹种的平均 CV 值呈增大的趋势 (图 1)。参数 CV 用来反映样本数据质量, 是对核 DNA 含量检测准确性以及精确性的评价标准, CV 值越小, 表明数据的质量越好。通常认为, CV 值小于 5%, 表明获得的数据质量是可以接受的, 而大于 5% 后, 获得的数据质量就较差 (Dolezel 等, 2007)。本研究结果显示, 随着保存时间的增加, CV 值逐渐变大, 数据质量下降。在保存 12 天以后, 两种保存方法产生的 CV 值均超过了 5%, 获得的数据质量较差, 数据的准确性降低。

3.2 保存方法对 2C-值大小的影响

保存方法对 2C-值变异率的影响有显著性 ($P < 0.001$)。对于硅胶保存法保存后的样本, 测量的 2C-值相对于新鲜材料较大。麻竹在使用硅胶保存 16 天后, 2C-值相对于新鲜材料增大了 2.32%, 箬竹在使用硅胶保存 16 天后, 2C-值相对于新鲜材料增大了 4.91%, 毛花酸竹在使用硅胶保存 16 天后, 2C-值相对于新鲜材料增大了 4.23%。我们的结果和国外对其他植物的研究结果基本相一致。Bainard 等 (2011) 在对硅胶干燥的 6 个物种基因组大小检测的研究中发现, 样品在保存一周至两月后, 检测的 5 个物种的 2C-值要高于新鲜的组织。对于竹子样本, 使用硅胶短时间的干燥保存后, 会造成所测样品的相对荧光强度的增强, 使检测的 2C-值变大。对于 Sam-

ple protector 试剂保存的材料, 保存一段时间后, 2C-值相对于新鲜材料变小。对于 Sample protector 试剂保存法引起 2C-值大小变化, 目前没有相关的报道。可能的原因是由于试剂处理改变染色体的结构引起的 (Esteban 等, 1991)。

虽然两种保存方法都会引起竹子测量 2C-值变化, 但是, 这种绝对值的改变均小于 10%。部分研究者认为, 在使用流式细胞术检测植物 2C-值的实验中, 因组织处理引起的误差在 10% 以内, 均认为是可以接受的 (Bainard 等, 2011)。本研究中, 使用硅胶保存的样品与 Sample protector 试剂处理后的样品, 2C-值最大变异率为 6.58% (表 1, 麻竹, Sample protector 试剂保存 8 天后检测)。根据 Bennett 和 Leitch (2005) 对于同一物种基因组大小的估计 (由不同实验室采用流式细胞技术获得的结果), 差异在 10% 以内, 检测结果就可以采用并进行可靠的大规模分析。硅胶保存法和 Sample protector 试剂保存法, 会引起竹子样本 2C-值的变化, 但是这种绝对差异小于 10%。因此在野外收集竹子材料较困难的情况下, 可以考虑采用这两种保存方法进行材料保存以检测核 DNA 含量, 但是在保存 12 天以后, 获得的检测数据的可信度较差。

最后, 我们通过方差分析, 评价保存方法和保存时间两种因素对竹子 2C-值检测结果 (CV 和 2C-值变异率) 的影响 (表 2)。结果表明, 对于 CV, 保存时间具有显著性影响 ($P < 0.001$), 保存方法对 CV 无显著性影响 ($P > 0.05$); 同时, 对于 2C-值变异率, 保存时间无显著性影响 ($P > 0.05$), 保存方法有显著性影响 ($P < 0.001$)。

[参 考 文 献]

- Arumuganathan K, Earle E, 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, **9**: 229—241
- Bainard JD, Husband BC, Baldwin SJ *et al.*, 2011. The effects of rapid desiccation on estimates of plant genome size [J]. *Chromosome Research*, **19**: 825—842
- Bennett M, Leitch I, 2005. Plant genome size research: a field in focus [J]. *Annals of Botany*, **95**: 1—6
- Bennett M, Leitch I, 2011. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow [J]. *Annals of Botany*, **107**: 467—590

- DOLEŽEL J, Bartoš J, 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size [J]. *Annals of Botany*, **95**: 99—110
- Dolezel J, Greilhuber J, Suda J, 2007. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry [J]. *Nature Protocols*, **2**: 2233—2244
- Esteban J, Sheibani K, Owens M *et al.*, 1991. Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis. A need for strict internal DNA standards [J]. *American Journal of Clinical Pathology*, **95** (4): 460
- Galbraith DW, 2009. Simultaneous flow cytometric quantification of plant nuclear DNA contents over the full range of described angiosperm 2C values [J]. *Cytometry Part A*, **75**: 692—698
- Galbraith DW, Harkins KR, Maddox JM *et al.*, 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues [J]. *Science (New York, NY)*, **220**: 1049
- Goff SA, Ricke D, Lan TH *et al.*, 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) [J]. *Science*, **296**: 92—100
- Gong N (弓娜), Tian XM (田新民), Zhou XY (周香艳), 2011. Applications of flow cytometry in plant research analysis of nuclear DNA content and ploidy level in plant cells [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin (中国农学通报)*, **27**: 21—27
- Greilhuber J, Tensch EM, Loureiro J, 2007. Nuclear DNA content measurement [J]. *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*, **4**: 67—101
- Gui YJ, Wang S, Quan LY *et al.*, 2007. Genome size and sequence composition of moso bamboo: a comparative study [J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, **50**: 700—705
- Janzen DH, 1976. Why bamboos wait so long to flower [J]. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **7**: 347—391
- Kumar PP, Turner IM, Nagaraja Rao A *et al.*, 2011. Estimation of nuclear DNA content of various bamboo and rattan species [J]. *Plant Biotechnology Reports*, **5**: 317—322
- Li DZ, Wang ZP, Stapleton CMA *et al.*, 2006. Poaceae [A]. In: Wu ZY, Raven PH (eds.), *Flora of China*, Vol 22 [M]. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 103—105
- Li LB (李潞滨), Wu JY (武静宇), Hu T (胡陶) *et al.*, 2008. Estimation of genome size of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Chinese Bulletin of Botany (植物学通报)*, **25**: 574—578
- Loureiro J, Trávníček P, Raichová J *et al.*, 2010. The use of flow cytometry in the biosystematics, ecology and population biology of homoploid plants [J]. *Preslia*, **82**: 3—21
- Suda J, Trávníček P, 2006. Reliable DNA ploidy determination in dehydrated tissues of vascular plants by DAPI flow cytometry—new prospects for plant research [J]. *Cytometry Part A*, **69**: 273—280
- Swift H, 1950. The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **36**: 643