

流式细胞术在测定竹类植物基因组大小中的应用

陈蓉芬, 黄坚钦, 陈 荣, 徐川梅

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】分析竹类植物不同组织部位及不同处理方法对其基因组大小的影响, 可提高植物基因组大小测定精度。【方法】以竹类植物叶片和笋为材料, 以水稻 *Oryza sativa* 为参照, 设置细胞核染色时间为 1、3、5、7、9、12、18、24 和 30 min 共 9 个梯度, 利用流式细胞仪对不同组织部位及处理的基因组大小进行分析。【结果】①对同一竹种而言, 其叶片和笋流式峰形图相似, 基因组大小仅存在微小差异, 差值为 0.04~0.20 pg。②不同竹种对染色时间要求不同, 其中, 唐竹 *Sinobambusa tootsik*、花叶唐竹 *Sinobambusa tootsik* f. *albo-striata*、平安竹 *Pseudosasa japonica* var. *tsutsumiana*、曙筋矢竹 *Pseudosasa japonica* f. *akebono*、美丽箬竹 *Indocalamus decorus*、花叶赤竹 *Sasaella glabra* f. *albo-striata* 及红秆寒竹 *Chimonobambusa mamorea* f. *variegata* 染色 1 min 即达到最大荧光峰值, 孝顺竹 *Bambusa multiplex* 和黄皮绿筋竹 *Phyllostachys sulphurea* 染色 3 min 达到最大峰值, 茶竿竹 *Pseudosasa amabilis* var. *amabilis* 和柳叶细竹 *Thyrsochloa ssiemensis* 染色 5 min 达到最大峰值, 仅黄皮刚竹 *Phyllostachys sulphurea*(叶片)7 min 达到最大峰值。③12 个竹种的荧光强度在 1~30 min 内存在较大变化, 除茶竿竹、柳叶细竹、孝顺竹叶片及唐竹笋外, 其他竹种的荧光强度变化值均在 5% 以上, 特别是平安竹和花叶赤竹变化更大, 分别为 12.93% 和 12.88%。④热带木本竹种孝顺竹和柳叶细竹基因组大小为 (1.64±0.54)~(2.69±1.01) pg, 其他 10 个温带竹种基因组大小为 (3.76±1.51)~(5.73±1.85) pg。10 个温带竹种中, 刚竹属 *Phyllostachys* 竹种基因组较小, 大小为 (3.76±1.51)~(3.91±0.95) pg, 其他竹属的一些竹种基因组较大, 大小为 (4.82±0.54)~(5.73±1.85) pg。【结论】①竹类植物叶片和笋均可作为基因组大小分析材料, 细胞核染色时间对基因组大小测定结果存在一定影响, 染色时间以 3~5 min 最佳。②热带木本竹种基因组大小明显小于温带木本竹种, 温带木本竹种中, 刚竹属竹种的基因组大小明显小于其他竹种。图 1 表 5 参 29

关键词: 分子生物学; 竹类植物; 基因组大小; 流式细胞仪; 荧光峰值

中图分类号: S718.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2021)01-0103-09

On the application of flow cytometry in the genomic size determination of bamboo plants

CHEN Rongfen, HUANG Jianqin, CHEN Rong, XU Chuanmei

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This research is aimed to study the effects of material tissue and the treatment method on the genome size of bamboo plants with the ultimate purpose to improve the genome size determination accuracy of bamboo plants. [Method] With the leaves and shoots of different bamboo species selected as materials, and the rice used as the reference standard while the nuclear staining time set for 9 different gradients, that is 1, 3, 5, 7, 9, 12, 18, 24 and 30 minutes, an investigation was carried out of the tissue sites and staining materials of different bamboo plants with the employment of flow cytometry. [Result] (1) With the same bamboo species, the leaves and shoots were similar in the fluorescence peak and genome size with the genome size difference range as narrow as 0.04~0.20 pg. (2) The 12 bamboo species are different in their nuclear

收稿日期: 2020-03-18; 修回日期: 2020-09-28

基金项目: 浙江农林大学校课堂教学改革项目(KGZD18001); 浙江省自然科学基金资助项目(LY13C160011)

作者简介: 陈蓉芬, 从事林木植物分子细胞遗传学研究。E-mail: 2937364056@qq.com。通信作者: 徐川梅, 高级实验师, 博士, 从事林木植物分子细胞遗传学研究。E-mail: xuchuanmei1979@126.com

staining time, with the fluorescence intensity of *Sinobambusa tootsik*, *Sinobambusa tootsik* f. *albo-striata*, *Pseudosasa japonica* var. *tsutsumiana*, *Pseudosasa japonica* f. *akebono*, *Indocalamus decorus*, *Sasaella glabra* f. *albo-striata* and *Chimonobambusa mamorea* f. *variegata* reaching the maximum within 1 minute, that of *Bambusa multiplex* and *Phyllostachys sulphurea* reaching the maximum within 3 minutes, that of *Pseudosasa amabilis* var. *amabilis* and *Thyrsostachy ssiamensis* reaching the maximum within 5 minutes, while that of *Phyllostachys sulphurea* (leaf) reaching the maximum within 7 minutes. (3) The fluorescence intensity of the 12 bamboos varies greatly from 1 to 30 minutes, all exceeding 5% except for the leaf of *P. amabilis* var. *amabilis*, *T. ssiamensis*, *B. multiplex* and the shoot of *S. tootsik*. In fact, the fluorescence intensity of *P. japonica* var. *tsutsumiana* and *S. glabra* f. *albo-striata* have reached 12.93% and 12.88% respectively. (4) As for the genome size of 12 bamboo species, 2 tropical woody bamboo species of *B. multiplex* and *T. ssiamensis* changed from (2.64±0.54) pg to (2.69±1.01) pg, however, that of the 10 temperate woody bamboo species changed from (3.76±1.51) pg to (5.73±1.85) pg; of the 10 temperate bamboo species, the genome size of *Phyllostachys* changed from (3.76±1.51) pg to (3.91±0.95) pg, yet that of the other bamboo genus changed from (4.82±0.54) pg to (5.73±1.85) pg, which is obviously larger than *Phyllostachys*. [Conclusion] (1) Both leaves and shoots of bamboo can be used as experimental materials to determine their genome sizes by flow cytometry. The nuclear staining time has a certain effect on the determination of the bamboo genome size with 3 to 5 minutes as the optimal staining time. (2) The genome size of tropical woody bamboo species is obviously smaller than that of temperate woody bamboo species while among the temperate woody bamboo species, the genome size of *Phyllostachys* is obviously smaller than that of the other genus bamboo species. [Ch, 1 fig. 5 tab. 29 ref.]

Key words: molecular biology; bamboo plants; genome size; flow cytometry; peak fluorescence

流式细胞术是指利用流式细胞仪对悬浮细胞或微粒等进行分析的现代分析技术,该技术可对一些特异的细胞和染色体等进行分析和分选,还可对动植物基因组大小及倍性水平等进行测定和分析^[1-3]。在分析植物基因组大小过程中,与传统的福尔根染色技术相比,流式细胞术具有速度快、准确性高等优点。因此,目前流式细胞术在植物基因组大小研究中发挥了重要的作用,约265种菊科 Asteraceae 植物、157种莎草科 Cyperaceae 植物及191种毛茛属 *Ranunculus* 植物的基因组大小已通过流式细胞仪被测定^[2,4-7],大量植物的C值(指单倍体细胞核的DNA含量)数据库已建立^[8]。基因组大小信息可为植物系统分类、基因组测序及重测序等研究提供参考,因此,提高植物基因组大小测量精度至关重要^[9-10]。竹类植物是重要的森林资源,全世界约119属1482种,在中国分布的约37属500余种,变种变型100余种^[11-13]。在竹类植物基因组学研究中,目前仅有毛竹 *Phyllostachys edulis*、莪莉竹 *Olyra latifolia*、芸香竹 *Raddia guianensis* 及瓜多竹 *Guadua angustifolia* 等竹种完成了全基因组测序工作,在整个竹类植物中所占比例还不足0.2%^[10,14-15]。另外,在竹类植物基因组大小研究中,目前约200个竹种的基因组大小通过流式细胞仪被测定,但由于不同研究者所用实验内参、仪器类型及实验方法不同,部分竹种在测量结果间存在一定差异^[16-19]。流式样品制作主要分为细胞核提取和染色2个步骤,因不同植物细胞内含物及代谢物成分不同,所用细胞核提取液在组成上存在较大差异。研究者们往往会重点关注细胞核提取液,而忽略染色时间对实验结果的影响。因此,为了进一步提高竹类植物基因组大小测定结果的精度,本研究分析了样品采集部位及染色时间对竹类植物基因组大小测定结果的影响,并在此基础上揭示了12个竹种的基因组大小,以为竹类植物系统分类及基因组测序等提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

以已测序的水稻 *Oryza sativa* 为参照。12个竹种清单及采样信息见表1。流式细胞仪分析的植物材料要求是新鲜幼嫩的组织部位,不能进行冷冻和干燥等处理。竹类植物叶片和笋均可满足实验要求,而

且方便采集，特别是竹笋更适合长时间保存。唐竹 *Sinobambusa tootsik*、茶竿竹 *Pseudosasa amabilis* var. *amabilis*、孝顺竹 *Bambusa multiplex* 及黄皮刚竹 *Phyllostachys sulphurea* 等 4 个竹种同时以叶片和笋为材料，花叶唐竹 *Sinobambusa tootsik* f. *albo-striata*、黄皮绿筋竹 *Phyllostachys sulphurea*、平安竹 *Pseudosasa japonica* var. *tsutsumiana*、柳叶细竹 *Thyrsostachy ssiamensis*、花叶赤竹 *Sasaella glabra* f. *albo-striata*、美丽箬竹 *Indocalamus decorus*、曙筋矢竹 *Pseudosasa japonica* f. *akebono* 及红秆寒竹 *Chimonobambusa mamorea* f. *variegata* 等 8 个竹种主要是从国内外一些竹种园收集而来。这些竹种数量有限，目前尚无笋，因此，这 8 个竹种均以叶片为材料。

表 1 12 个竹种的采样信息

Table 1 Description of the geographical distribution of 12 bamboo species

竹种	材料来源	经纬度	竹种	材料来源	经纬度
孝顺竹	浙江农林大学翠竹园	30°09'14"N, 119°26'00"E	茶竿竹	浙江农林大学翠竹园	30°09'14"N, 119°26'00"E
柳叶细竹	浙江农林大学智能温室	30°09'14"N, 119°26'00"E	平安竹	浙江农林大学翠竹园	30°09'14"N, 119°26'00"E
黄皮刚竹	浙江农林大学翠竹园	30°09'14"N, 119°26'00"E	曙筋矢竹	浙江农林大学智能温室	30°09'14"N, 119°26'00"E
黄皮绿筋竹	浙江农林大学翠竹园	30°09'14"N, 119°26'00"E	花叶赤竹	浙江农林大学智能温室	30°09'14"N, 119°26'00"E
唐竹	浙江农林大学翠竹园	30°09'14"N, 119°26'00"E	美丽箬竹	浙江农林大学智能温室	30°09'14"N, 119°26'00"E
花叶唐竹	浙江农林大学翠竹园	30°09'14"N, 119°26'00"E	红秆寒竹	浙江农林大学智能温室	30°09'14"N, 119°26'00"E

1.2 方法

1.2.1 流式细胞仪样品制备 对于竹类植物叶片样品，选取顶端尚未展开的心叶或紧邻心叶已完全展开的嫩叶；对于竹笋样品，选择新鲜无病虫害的嫩笋，实验过程中剥去笋壳。用双面刀片切取一段面积约 1 cm² 或厚度约 1.0 mm 的叶片，面积约 0.25 cm² 的嫩笋置于干净的培养皿中，然后向培养皿中加入 500 μL 细胞核提取液 (cystain UV precise P Nuclei Extraction Buffer, PARTEC, 编号 5003) 润湿样品，用锋利的双面刀片迅速将样品剁碎，将培养皿倾斜静置 1~2 min，使细胞核提取充分，之后向培养皿中加入 2 mL DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 染色液 (cystain UV precise P stain Buffer, PARTEC, 编号 5003) 对细胞核进行染色，然后用 30 目的滤头将样品过滤到进样管中，准备上机测样。

1.2.2 流式细胞仪样品测定 根据前期多次预实验结果，设置样品染色时间为 1、3、5、7、9、12、18、24 和 30 min 共 9 个梯度，利用流式细胞仪 (Partec CyFlow ploidy Analyser) 对样品进行测定。为了确保测量结果的准确性，每次实验先以水稻为参照，分析已测序毛竹的基因组大小，在此基础上再对其他竹种基因组大小进行测量和分析。为了减少误差，每个竹种设置 3 个不同重复，变异系数控制在 5% 以内。

1.2.3 不同竹种的 DNA 含量分析 登录 C 值数据库网站 (<http://www.rbgekew.org.uk/cval/homepage.html>)，查出水稻二倍体基因组对应的 DNA 含量 2C 为 1.0 pg，并推算待测竹种的 2C 值：待测竹种 2C 值 (pg) = (待测竹种峰值/水稻峰值) × 水稻 2C 值 (1.0 pg)，水稻单倍体基因组大小为 466 Mb^[20]。据此可以推算出相应竹种基因组对应的碱基数。

2 结果与分析

2.1 竹类植物叶片和笋基因组大小测量结果分析

利用流式细胞仪测定植物基因组大小过程中，样品峰形状是判断实验结果是否可靠的重要依据。样品处理过程中细胞核提取质量越好，相应的细胞碎片及杂质越少，杂峰就会越少，样品峰往往表现得尖而细，测量误差也较小，实验结果较为可靠；反之，样品处理过程中产生的细胞碎片越多，对应的杂峰也会随之增多，进而影响甚至改变样品峰形状，实验结果往往不可靠。从图 1 可以看出：孝顺竹、唐竹、茶竿竹及黄皮刚竹等 4 个竹种叶片和笋所呈现的峰在形状上均尖而细，碎片背景也非常少。另外，同一竹种的叶片和笋对应的峰形和峰值也十分相似，如孝顺竹的叶片和笋均表现出双峰，其中左侧较高的峰为 2C 细胞所对应的峰，右侧较低的峰为 4C 细胞所对应的峰，且相同类型细胞对应的荧光强度值也几乎一致 (图 1A₁~A₂)。除此之外，唐竹、茶竿竹和黄皮刚竹等 3 个竹种与孝顺竹情况相似，叶片和笋的测量结果也十分接近 (图 1B₁~B₂，图 1C₁~C₂，图 1D₁~D₂)。

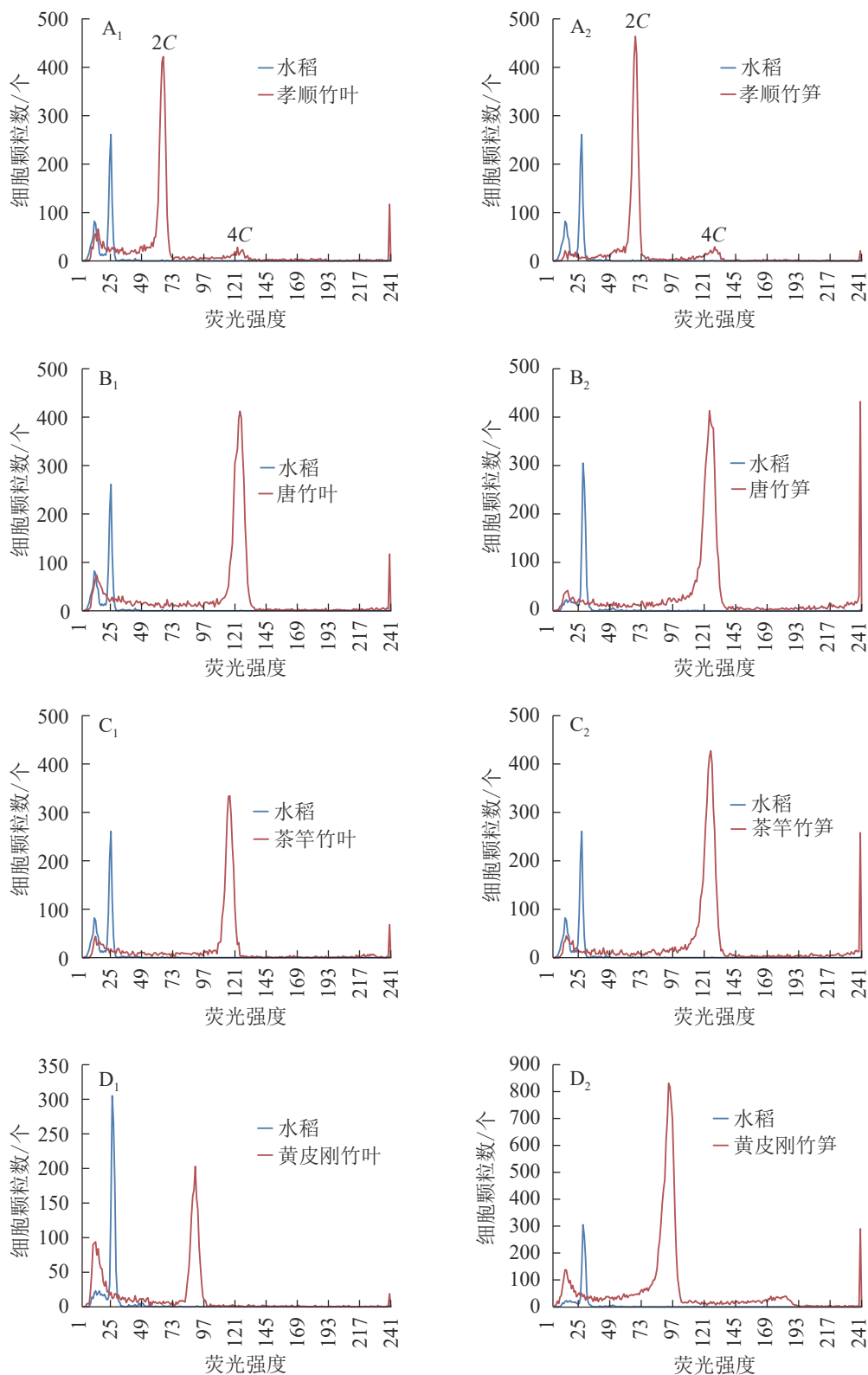


图1 部分竹种叶片和笋的流式峰形图

Figure 1 Flow cytometer peak value of some bamboo leaves and shoots

理论上, 荧光强度值达到最大, 说明此时细胞核染色最充分, 获得的基因组大小与其真实值也最接近。为了更科学地对竹类植物叶片和笋对应的基因组大小进行比较分析, 分别以黄皮刚竹、茶竿竹、孝顺竹及唐竹4个竹种叶片和笋的最大荧光强度值为依据, 计算出4个竹种叶片和笋对应的基因组大小。结果表明: 4个竹种叶片和笋对应的基因组大小并非完全吻合, 唐竹、茶竿竹、孝顺竹及黄皮刚竹叶片对应的2C值分别为 (5.03 ± 2.33) 、 (4.82 ± 0.54) 、 (2.64 ± 0.50) 和 (3.76 ± 1.51) pg, 而笋对应的2C值分别为

(4.99±1.56)、(5.02±1.99)、(2.72±0.59) 和 (3.86±2.31) pg, 其中茶竿竹、孝顺竹及黄皮刚竹叶片 2C 值略小于笋对应的 2C 值, 差值分别为 0.20、0.10 和 0.08 pg, 而唐竹叶片 2C 值比其笋略大 0.04 pg (表 2)。虽然 4 个竹种叶片和笋所获基因组大小并不完全吻合, 但是差值非常小, 在误差允许范围内。因此, 对竹类植物而言其叶片和笋均可作为其基因组大小研究的材料。

2.2 染色时间对竹类植物基因组大小测定结果的影响

表 3 表明: 12 个竹种在一定时间内达到最大荧光强度值后, 随着染色时间延长, 荧光强度值均有不同程度的减少, 当染色时间延长到 30 min 时, 大部分竹种的荧光强度值基本减少到最小。首先, 同一竹种的叶片和笋的染色时长及荧光强度变化也不完全相同。以唐竹为例, 叶片染色 1 min 荧光强度即达到最大, 之后随着染色时间延长, 荧光强度值不断减少, 当染色时间延长到 30 min 时, 荧光强度值减少到最小, 约减少 6.23%, 而唐竹笋最大荧光强度则出现在 3 min, 之后随着染色时间延长, 荧光强度不断减少, 染色 30 min 时, 其荧光强度减少到 119.75±1.40, 约减少 2.67%(表 3 和表 4)。其次, 12 个竹种荧光强度在 0~30 min 也存在较大变化, 变异范围为 2.67%~12.93%, 除唐竹笋、茶竿竹叶和笋、孝顺竹叶及柳叶细竹叶等荧光强度变化小于 5% 外, 其余竹种荧光强度变化值均大于 5%, 有些竹种荧光强度变化值甚至超过 10%, 如孝顺竹笋、平安竹叶、花叶赤竹叶及美丽箬竹叶等, 荧光强度变化值分别为 11.02%、12.93%、12.88% 及 12.33% 等 (表 4)。表明细胞核染色时间对竹类植物基因组大小测定结果存在一定影响。

另外, 不同竹种甚至同一竹种不同组织部位对染色时间反应也不完全相同。以叶片材料为例, 唐竹、花叶唐竹、平安竹、曙筋矢竹、美丽箬竹、花叶赤竹及红秆寒竹染色 1 min 即达到最大荧光强度,

表 2 4 个不同竹种叶片和笋的基因组大小

物种	材料部位	2C值±标准差/pg	基因组大小±标准差/Mb
水稻	叶片	1.00±0.00	860.00±0.00
	叶片	5.03±2.33	4 325.80±2.33
唐竹	笋	4.99±1.56	4 291.40±1.56
	叶片	4.82±0.54	4 145.20±0.54
茶竿竹	笋	5.02±1.99	4 317.20±1.99
	叶片	2.64±0.54	2 270.40±0.54
孝顺竹	笋	2.72±0.59	2 339.20±0.59
	叶片	3.76±1.51	3 233.60±1.51
黄皮刚竹	笋	3.86±2.31	3 319.60±2.31

表 3 12 个竹种不同染色时间下对应的荧光峰值

Table 3 Mean value under different dyeing time of 12 bamboo species

物种	部位	不同染色时间对应的荧光强度峰值								
		1	3	5	7	9	12	18	24	30 min
水稻	叶	24.67±0.38	24.42±0.48	24.2±0.52	24.16±0.42	24.07±0.36	23.94±0.38	23.8±0.34	23.47±0.27	23.15±0.24
	叶	123.98±2.33	123.32±2.68	122.24±3.14	121.48±3.27	120.81±2.72	119.83±2.84	118.59±3.08	117.32±2.55	116.25±2.19
唐竹	笋	121.85±1.51	123.04±1.56	122.77±1.23	122.11±1.51	121.86±0.78	120.82±0.35	120.67±0.09	119.75±1.40	119.87±0.60
	叶	118.13±1.24	118.81±0.59	118.97±0.54	118.52±1.03	117.99±0.92	116.27±1.73	115.82±2.62	115.75±2.24	115.31±2.43
茶竿竹	笋	123.39±1.90	123.67±2.00	123.75±2.00	123.18±2.09	122.57±1.57	121.37±1.87	119.56±2.31	118.80±1.68	118.85±1.24
	叶	64.07±0.44	65.20±0.54	64.92±0.59	64.63±0.22	64.88±0.44	64.54±0.83	63.85±0.83	63.70±0.86	63.35±0.74
孝顺竹	笋	67.22±0.59	66.90±1.15	65.60±1.97	64.72±2.07	63.71±2.90	62.85±3.17	64.79±1.64	60.61±5.90	59.81±6.10
	叶	91.20±1.83	92.27±1.60	92.50±1.52	92.70±1.36	92.54±1.36	91.98±1.91	90.64±2.27	90.11±1.93	87.70±1.09
黄皮刚竹	笋	95.21±1.83	95.35±2.31	94.46±3.32	92.72±3.22	92.09±2.81	91.10±2.28	89.01±2.74	88.30±2.03	87.66±1.87
	叶	95.84±1.19	96.37±0.95	95.66±1.22	95.74±1.23	95.10±1.53	94.68±1.85	93.47±1.81	92.32±2.25	91.27±3.96
平安竹	叶	134.17±0.93	133.44±0.57	132.43±1.18	131.34±1.49	130.17±1.63	129.10±1.93	125.12±4.50	122.36±6.36	116.82±8.22
花叶唐竹	叶	126.61±1.96	125.97±1.71	125.58±2.88	124.25±2.10	123.76±1.86	122.98±2.18	120.92±2.30	118.80±3.17	117.99±2.33
花叶赤竹	叶	132.17±1.58	131.67±1.67	131.36±1.46	129.64±2.47	127.77±3.32	124.73±3.37	122.08±3.05	118.56±3.82	115.14±3.52
曙筋矢竹	叶	141.29±1.85	141.20±1.47	140.06±2.06	139.30±2.20	138.50±1.63	137.64±1.84	135.40±2.90	133.01±2.20	129.62±3.47
美丽箬竹	叶	133.08±1.14	132.59±2.03	130.98±3.10	130.03±2.85	127.63±2.80	125.61±3.61	121.71±4.26	119.82±5.21	116.67±6.85
柳叶细竹	叶	65.67±1.47	65.88±0.83	66.25±1.01	66.23±0.68	66.09±0.40	66.14±0.42	66.39±0.83	65.12±1.47	63.30±0.96
红秆寒竹	叶	132.82±0.97	132.29±1.73	131.62±1.88	131.36±2.02	130.12±2.22	130.10±2.21	127.39±3.91	126.18±3.35	123.87±3.58

表4 12个竹种荧光强度变化

Table 4 Fluorescence intensity change of 12 bamboos

竹种	材料部位	最大荧光强度	最小荧光强度	荧光强度减少值	变化比例/%
唐竹	叶	123.98±2.33	116.25±2.19	7.73	6.23
	笋	123.04±1.56	119.75±1.40	3.29	2.67
茶竿竹	叶	118.97±0.54	115.31±2.43	3.65	3.07
	笋	123.75±2.00	118.80±1.68	4.95	4.00
孝顺竹	叶	65.20±0.54	63.35±0.74	1.85	2.84
	笋	67.22±0.59	59.81±6.10	7.41	11.02
黄皮刚竹	叶	92.70±1.36	87.70±1.09	5.00	5.39
	笋	95.35±2.31	87.66±1.87	7.69	8.07
黄皮绿筋竹	叶	96.37±0.95	91.27±3.96	5.10	5.30
平安竹	叶	134.17±0.93	116.82±8.22	17.35	12.93
花叶唐竹	叶	126.61±1.96	117.99±2.33	8.62	6.81
花叶赤竹	叶	132.17±1.58	115.14±3.52	17.03	12.88
曙筋矢竹	叶	141.29±1.85	129.62±3.47	11.67	8.26
美丽箬竹	叶	133.08±1.14	116.67±6.85	16.41	12.33
柳叶细竹	叶	66.39±0.83	63.30±0.96	2.95	4.45
红秆寒竹	叶	132.82±0.97	123.87±3.58	8.95	6.74

染色时间延长到 3 min 时, 荧光强度略有衰减, 但减少不明显 (表 3); 孝顺竹和黄皮绿筋竹最大荧光强度出现在 3 min, 但与 1、5 min 对应的荧光强度相差明显 (表 3); 茶竿竹和柳叶细竹最大荧光强度出现在 5 min, 其中茶竿竹最大荧光强度与其 3 min 时的荧光强度最接近, 而柳叶细竹最大荧光强度与其 7 min 时的荧光强度最接近, 只有黄皮刚竹最大荧光强度出现在 7 min, 但与 5、9 min 对应的峰值十分接近 (表 3)。以笋为材料时, 荧光强度随染色体时间变化情况与叶片相似, 其中孝顺竹的笋最大荧光强度出现在 1 min, 唐竹和黄皮刚竹 2 个竹种笋的最大荧光强度出现在 3 min, 茶竿竹最大荧光强度出现在 5 min (表 3)。唐竹、茶竿竹、孝顺竹和黄皮刚竹 4 个竹种同时以叶片和笋为材料, 但是叶片和笋对应的荧光曲线图也不完全相同, 例如黄皮刚竹笋的最大荧光强度出现在 3 min, 叶片最大荧光强度却出现在 7 min (表 3)。综上所述, 无论是叶片还是竹笋, 当染色时间延长到 3 min 时, 75% 的竹种已达到最大荧光强度值, 延长到 5 min 时, 已有 91.67% 的竹种达到最大荧光强度值。因此, 为确保竹类植物基因组大小测定结果的准确性, 竹类植物染色时间最好控制在 7 min 以内, 以 3~5 min 最佳。

2.3 12 个不同属种竹种的基因组大小分析

表 5 表明: 孝顺竹和柳叶细竹对应的基因组大小分别为 (2.64±0.54) 和 (2.69±1.01) pg, 明显小于其他 10 个竹种; 其次为刚竹属 *Phyllostachys* 的黄皮刚竹和黄皮绿筋竹, 对应的 2C 值分别为 (3.76±1.51) 和 (3.91±0.95) pg, 明显小于其他一些竹属的竹种; 再次为唐竹属 *Sinobambusa* 的唐竹和花叶唐竹, 对应

表5 12个不同竹种的基因组大小

Table 5 Genome size of 12 different bamboo species

物种	2C值±标准差/pg	基因组大小±标准差/Mb	物种	2C值±标准差/pg	基因组大小±标准差/Mb
水稻	1.00±0.00	860.00±0.00	茶竿竹	4.82±0.54	4 145.20±0.54
孝顺竹	2.64±0.54	2 270.40±0.54	平安竹	5.44±0.93	4 678.40±0.93
柳叶细竹	2.69±1.01	2 313.40±1.01	曙筋矢竹	5.73±1.85	4 927.80±1.85
黄皮刚竹	3.76±1.51	3 233.60±1.51	花叶赤竹	5.36±1.58	4 609.60±1.58
黄皮绿筋竹	3.91±0.95	3 362.60±0.95	美丽箬竹	5.39±1.14	4 635.40±1.14
唐竹	5.03±2.33	4 325.80±2.33	红秆寒竹	5.38±0.97	4 626.80±0.97
花叶唐竹	5.13±1.96	4 411.80±1.96			

说明: 以12个竹种叶片对应的最大荧光强度值为依据, 对其基因组大小进行了计算

的基因组大小分别为 (5.03 ± 2.33) 和 (5.13 ± 1.96) pg。赤竹属 *Sasaella* 的花叶赤竹、箬竹属 *Indocalamus* 的美丽箬竹及寒竹属 *Chimonobambusa* 的红秆寒竹 3 个竹种基因组大小比较相近，对应的基因组大小分别为 (5.36 ± 1.58) 、 (5.39 ± 1.14) 和 (5.38 ± 0.97) pg。茶竿竹、平安竹和曙筋矢竹在分类上虽然为同一属，但彼此间差异较大，这 3 个竹种的基因组大小分别为 (4.82 ± 0.54) 、 (5.44 ± 0.93) 和 (5.73 ± 1.85) pg。

3 讨论

KUMAR 等^[18]研究表明：分布在新加坡的孝顺竹基因组大小为 (3.11 ± 0.02) pg，而 ZHOU 等^[19]研究表明：分布在中国的孝顺竹基因组大小为 (2.78 ± 0.02) pg。本研究中孝顺竹叶片和笋对应的基因组大小分别为 (2.64 ± 0.54) 和 (2.72 ± 0.59) pg，与 ZHOU 等^[19]研究结果较为接近，与 KUMAR 等^[18]研究结果存在一定差异。流式细胞仪测定植物基因组大小过程中，细胞核提取液种类、染色液浓度、染色液类型及染色时间等均会对基因组大小测定结果产生一定影响^[21-23]。KUMAR 等^[18]以烟草 *Nicotiana tabacum* 为对照，采用碘化丙啶 (PI) 荧光染料对细胞核进行染色，为了去除烟草等植物细胞中一些特殊的内含物，细胞核提取液中加入了一定量的聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。如果 PVP 浓度过大，在一定程度上会影响细胞核与荧光染料的结合，进而影响细胞核染色效果^[24]。本研究与 ZHOU 等^[19]的实验方法相似，均以水稻为对照，用 DAPI 对细胞核进行染色，这可能是本研究结果与 ZHOU 等^[19]较为接近而与 KUMAR 等^[18]有差异的主要原因。另外，本研究中红秆寒竹和茶竿竹对应的基因组大小分别为 (5.38 ± 0.97) 和 (4.82 ± 0.54) pg，比 ZHOU 等^[19]研究的 2 个竹种的基因组略大。这种差异可能是由于染色时间不同而造成的。本研究表明：染色时间对竹类植物基因组大小测定结果存在一定影响，且不同竹种对染色时间要求并不完全相同，大部分竹种的细胞核可以被快速染色，如红秆寒竹、美丽箬竹及曙筋矢竹等 1 min 即可达到最大荧光值；还有少量竹种染色较慢，如茶竿竹和黄皮刚竹等需 5~7 min 才可达到最大荧光值。ZHOU 等^[19]对竹类植物基因组大小进行分析过程中，所有竹种均采用相同的染色时间，这可能是造成这种差异的主要原因。

利用流式细胞仪分析植物基因组大小过程时，一般需要选择基因组大小已知的物种做对照，然后根据流式细胞仪测量结果对待测物种基因组大小进行估算^[24-25]。对照物种选择一般需遵循以下几个原则：①对照物种已测序，且基因组大小与待测物种基因组大小间存在显著差异，以便区分对照峰和样品峰；②对照样品与待测样具有一定的生物学相似性；③对照材料方便采集且易大量获取。目前，虽然毛竹、菝葜竹、芸香竹及瓜多竹等已完成测序^[10, 14-15]，但其中大部分竹种主要分布在南方热带地区，这些竹种在经过长时间、长距离运输后，部分材料萎蔫或者细胞核结构改变已达不到实验要求。为了检测不同对照对竹类植物基因组大小测定结果是否存在影响，本研究尝试同时利用水稻和毛竹为参照，对孝顺竹、柳叶竹、黄皮刚竹、黄皮绿筋竹、唐竹及曙筋矢竹等竹种基因组大小进行比较分析，表明 2 种参照所获基因组大小十分接近，但由于毛竹基因组大小与待测竹种黄皮刚竹、黄皮绿筋竹、茶竿竹及唐竹等竹种的基因组相差较小，因此测量过程中对照毛竹的峰和待测竹种的峰间存在较大区域的重叠和干扰。水稻与竹类植物同属禾本科 *Poaceae*，其种子通过催芽 2~3 周即可获得大量嫩苗，另外水稻与竹类植物基因组大小相差约 3~6 倍，测量过程中对照峰和样品峰区分非常明显，彼此间干扰较少。因此，对竹类植物而言水稻是非常理想的参照物。

竹类植物主要分为草本竹种和木本竹种 2 个基本类型。根据分布区域，木本竹种又分为温带木本竹种和热带木本竹种 2 个类型^[11, 26]。温带木本竹种染色体数目比较稳定，基本上为 $2n=48$ ($2n$ 代表体细胞染色体数，即是单倍体的 2 倍)，热带木本竹种染色体数目表现比较复杂，主要有 $2n=64$ ， $2n=70 \pm 2$ ， $2n=96$ ， $2n=104$ 等多种类型^[19, 27-29]。本研究所分析的 12 个木本竹种中，孝顺竹和柳叶细竹为热带木本竹种，黄皮刚竹、黄皮绿筋竹、唐竹、花叶唐竹、茶竿竹、平安竹、曙筋矢竹、花叶赤竹、美丽箬竹及红秆寒竹均为温带木本竹种。本研究表明：12 个木本竹种基因组大小与染色体数目并不呈正相关，虽然孝顺竹和柳叶细竹 2 个竹种染色体数目多于另外 10 个温带木本竹种，但基因组大小却明显小于温带木本竹种，这与一些温带竹种和热带竹种研究的情况类似^[16, 18-19, 25]。部分竹种测序结果表明：竹类植物是异源多倍体植物，基因组主要分为 A、B、C 和 D 等 4 个不同的亚基因组，长期进化过程中 C 基因组竹种分别与 B 和 D 基因组竹种杂交形成染色体组类型分别为 BBCC 和 CCDD 的异源四倍体竹种 ($2n=48$)，之

后 A 基因组竹种又与基因组类型为 BBCC 的异源四倍体竹种杂交形成染色体组类型为 AABBCC 的异源六倍体竹种 ($2n=72$)^[14]。本研究中: 黄皮刚竹、黄皮绿筋竹、唐竹、花叶唐竹、茶竿竹、平安竹、曙筋矢竹、花叶赤竹、美丽箬竹及红秆寒竹等温带竹种虽然染色体数目相同, 但基因组大小却存在较大差异, $2C$ 值为 3.76~5.73 pg, 相差近 1.52 倍。这些竹种中, 刚竹属的黄皮刚竹和黄皮绿筋竹对应的基因组大小分别为 (3.76 ± 1.51) 和 (3.91 ± 0.95) pg, 明显小于其他竹属中的一些竹种。另外, 唐竹属、矢竹属、赤竹属、箬竹属及寒竹属中的一些竹种在基因组大小上差异不大, 特别是花叶刺竹、美丽箬竹及红秆寒竹 3 个竹种基因组大小十分接近。因此, 根据 12 个不同竹种的基因组大小测定结果推测, 赤竹属、箬竹属及寒竹属等属竹种在染色体组组成类型上可能相同或相近, 与刚竹属竹种在染色体组类型上存在较大差异。

4 参考文献

- [1] TAVARES M G, CARVALHO C R, SOARES F. Genome size variation in *Melipona* species (Hymenoptera: Apidae) and sub-grouping by their DNA content [J]. *Apidologie*, 2010, **41**(6): 636 – 642.
- [2] SKOKANOVÁ K, PERNÝ M, ŠPANIEL S, *et al.* Nuclear DNA content variation among perennial taxa of the genus *Cyanus* (Asteraceae) in Central Europe and adjacent areas [J]. *Plant Syst Evol*, 2012, **298**(8): 1463 – 1482.
- [3] ZONNEVELD B J M, IREN F V. Flow cytometric analysis of DNA content in *Hosta* reveals ploidy chimeras [J]. *Euphytica*, 2000, **111**(2): 105 – 110.
- [4] LIPNEROVA I, BURES P, HOROVA L, *et al.* Evolution of genome size in *Carex* (Cyperaceae) in relation to chromosome number and genomic base composition [J]. *Ann Bot*, 2013, **111**(1): 79 – 94.
- [5] PAULE J, DUNKEL F G, SCHMIDT M, *et al.* Climatic differentiation in polyploid apomictic *Ranunculus auricomus* complex in Europe [J]. *BMC Ecol*, 2018, **18**(1): 16.
- [6] WANG Guangyan, ZHANG Xiaoming, QIAN Min, *et al.* Chromosome number and genome size variation in *Colocasia* (Araceae) from China [J]. *J Plant Res*, 2017, **130**(6): 989 – 997.
- [7] 火艳, 招雪晴, 黄厚毅, 等. 观赏石榴表型遗传多样性分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2020, **37**(5): 939 – 949.
HUO Yan, ZHAO Xueqing, HUANG Houyi, *et al.* Phenotypic genetic diversity of ornamental pomegranate cultivars [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2020, **37**(5): 939 – 949.
- [8] BENNETT M D, LEITCH I J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects [J]. *Ann Bot*, 2005, **95**(1): 45 – 90.
- [9] 洪森荣, 曾清华, 谭鑫, 等. 上饶早梨‘六月雪’和‘黄皮消’全基因组重测序分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2019, **36**(2): 227 – 235.
HONG Senrong, ZENG Qinghua, TAN Xin, *et al.* Whole genome re-sequencing analysis of two cultivars (‘Liuyuexue’ and ‘Huangpixiao’) of *Pyrus pyrifolia* in Shangrao [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2019, **36**(2): 227 – 235.
- [10] PENG Zhenhua, LU Ying, LI Lubin, *et al.* The draft genome of the fast-growing non-timber forest species moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) [J]. *Nat Genet*, 2013, **45**(4): 456 – 461.
- [11] Bamboo Phylogeny Group. An updated tribal and subtribal classification of the Bamboos (Bambusoideae: Poaceae) [J]. *Bamboo Sci Cult*, 2012, **25**(1): 3 – 27.
- [12] INOUE A, TOCHIHARA S, SATO M, *et al.* Universal node distribution in three bamboo species (*Phyllostachys* spp.) [J]. *Trees*, 2017, **31**: 1271 – 1278.
- [13] LI Dezhu, XIA Nianhe, STAPLETON C, *et al.* *Flora of China*, “*Bambuseae*” [M]. Beijing: Science Press, 2006: 7 – 180.
- [14] GUO Zhenhua, MA Pengfei, YANG Guoqian, *et al.* Genome sequences provide insights into the reticulate origin and unique traits of woody bamboos [J]. *Mol Plant*, 2019, **12**(10): 1353 – 1365.
- [15] ZHAO Hansheng, GAO Zhimin, WANG Le, *et al.* Chromosome-level reference genome and alternative splicing atlas of moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. *Gigascience*, 2018, **7**(10). doi: 10.1093/gigascience/gy1115.
- [16] GIELIS J, VALENTE P, BRIDTS C, *et al.* *Estimation of DNA Content of Bamboos Using Flow Cytometry and Confocal Laser Scanning Microscopy* [M]. San Diego: Academic Press, 1997: 215 – 223.

- [17] GUI Yijie, WANG Sheng, QUAN Liyan, *et al.* Genome size and sequence composition of moso bamboo: a comparative study [J]. *Sci China Life Sci*, 2007, **50**(5): 1 – 6.
- [18] KUMAR P P, TURNER I M, RAO A N, *et al.* Estimation of nuclear DNA content of various bamboo and rattan species [J]. *Plant Biotechnol Rep*, 2011, **5**(4): 317 – 322.
- [19] ZHOU Mingbing, XU Chuangmei, SHEN Lifan, *et al.* Evolution of genome sizes in Chinese Bambusoideae (Poaceae) in relation to karyotype [J]. *Trees*, 2017, **31**: 41 – 48.
- [20] YU Jun, HU Songnian, WANG Jun, *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) [J]. *Science*, 2002, **296**(5565): 79 – 92.
- [21] LOUREIRO J, CAPELO A, BRITO G, *et al.* Micropropagation of *Juniperus phoenicea* from adult plant explants and analysis of ploidy stability using flow cytometry [J]. *Biol Plant*, 2007, **51**: 7 – 14.
- [22] DOLEŽEL J, GREILHUBER J, SUDA J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry [J]. *Nat Protoc*, 2007, **2**(9): 2233 – 2244.
- [23] CHOUDHURY R R, BASAK S, RAMESH A M, *et al.* Nuclear DNA content of *Pongamia pinnata* L. and genome size stability of in vitro-regenerated plantlets [J]. *Protoplasma*, 2014, **251**(3): 703 – 709.
- [24] 陈丙义, 黄金凤, 高志红, 等. 6 种野生草莓的核型分析 [J]. *西北植物学报*, 2012, **32**(8): 1567 – 1572.
CHEN Bingyi, HUANG Jinfeng, GAO Zhihong, *et al.* Karyotype analysis of six wild strawberry species [J]. *Acta Bot Borealli-Occident Sin*, 2012, **32**(8): 1567 – 1572.
- [25] 贾芳信, 周明兵, 陈荣, 等. 4 种竹子的核型及其基因组大小 [J]. *林业科学*, 2016, **52**(9): 57 – 66.
JIA Fangxin, ZHOU Mingbing, CHEN Rong, *et al.* Karyotype and genome size in four bamboo species [J]. *Sci Silv Sin*, 2016, **52**(9): 57 – 66.
- [26] YANG Hanqi, YANG Junbo, PENG Zhenhua, *et al.* A molecular phylogenetic and fruit evolutionary analysis of the major groups of the paleotropical woody bamboos (Gramineae: Bambusoideae) based on nuclear ITS, GBSSI gene and plastid trnL-F DNA sequences [J]. *Mol Phylogenetics Evol*, 2008, **48**(3): 809 – 824.
- [27] 陈瑞阳, 李秀兰, 宋文芹, 等. 中国主要经济植物基因组染色体图谱 IV [M]. 北京: 科学出版社, 2002, 625 – 628.
- [28] 李秀兰, 林汝顺, 冯学琳, 等. 中国部分丛生竹类染色体数目报道 [J]. *植物分类学报*, 2001, **39**(5): 433 – 442.
LI Xiulan, LIN Rushun, FENG Xuelin, *et al.* Chromosome numbers of some caespitose bamboos native in or introduced to China [J]. *Acta Phytotaxon Sin*, 2001, **39**(5): 433 – 442.
- [29] 李秀兰, 刘松, 宋文芹, 等. 40 种散生竹的染色体数目 [J]. *植物分类学报*, 1999, **37**(6): 541 – 544.
LI Xiulan, LIU Song, SONG Wenqin, *et al.* Chromosome number of forty species of scattered bamboos [J]. *Acta Phytotaxon Sin*, 1999, **37**(6): 541 – 544.