

竹子叶绿体基因组SSR分子标记的开发及其应用

杨丽¹, 赵韩生¹, 彭镇华², 董丽莉¹, 高志民^{1*}

(1. 国际竹藤中心, 竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: 为探讨观赏竹叶片异质性的机理, 根据麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)和绿竹(*Bambusa oldhamii*)叶绿体基因组序列开发 SSR 分子标记。结果表明, 在麻竹和绿竹叶绿体基因组中分别存在 87 和 86 个 SSR 位点, 其中三核苷酸重复类型最多, 其次为单核苷酸重复类型。根据 SSR 位点设计 21 对引物, 其中 11 对引物对 6 竹种能够扩增出稳定、清晰的条带, 且具有多态性, 引物有效率达到 52.4%。聚类分析表明, 6 竹种可分为两大类群, 与形态学分类结果基本一致。有 4 对引物在非白竹(*Pleioblastus fortunei*)和白纹椎谷篔(*Sasaella glabra* f. *albo-striata*)的花叶中具有多态性, 可作为区分观赏竹叶片异质性的分子标记。

关键词: 竹子; 叶绿体 SSR; 异质性

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.03.008

Development and Application of SSR Molecular Markers from the Chloroplast Genome of Bamboo

YANG Li¹, ZHAO Han-sheng¹, PENG Zhen-hua², DONG Li-li¹, GAO Zhi-min^{1*}

(1. International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory on the Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: In order to reveal the heterogeneity mechanism of ornamental bamboo leaves, the SSR molecular markers were developed from chloroplast genome of *Dendrocalamus latiflorus* and *Bambusa oldhamii*. The results showed that there were 87 and 86 SSR loci in chloroplast genome of *D. latiflorus* and *B. oldhamii*, respectively, in which the trinucleotide type was the most, followed by mononucleotide type. Based on the sequences of SSR loci in chloroplast genome, 21 pairs of SSR primers were designed. Six bamboo species could be amplified stable and clear bands with polymorphism by 11 pairs of primers, accounting for 52.4%. The cluster analysis indicated that 6 bamboo species could be divided into two groups, which was consisted with morphological classification. Meanwhile, polymorphism bands could be amplified in different parts of colorful leaves from *Pleioblastus fortunei* and *Sasaella glabra* f. *albo-striata* by 4 pairs of primers. So, it was suggested that these SSR markers could be used to distinguish the leaf heterogeneity of ornamental bamboo.

Key words: Bamboo; Chloroplast SSR; Heterogeneity

植物叶绿体富含色素, 是重要的光合作用细胞器, 其 DNA 以半保留方式进行自我复制, 与核基因组相比, 叶绿体基因组为单亲遗传, 保守程度高, 因此叶绿体 DNA 的简单重复序列(SSR)分子标记已

成为群体遗传结构、亲缘关系评价、细胞质遗传特性、叶绿体单倍型划分等的强有力工具。自 Powell 等^[1]首次开发了大豆(*Glycine max*)、水稻(*Oryza sativa*)等 6 种植物的叶绿体 SSR 以来, 叶绿体 SSR 分子

收稿日期: 2013-08-19 接受日期: 2013-12-11

基金项目: 国际竹藤中心基本科研业务费项目(1632013009), “十二五”农村领域国家科技支撑计划项目(2012BAD23B05)资助

作者简介: 杨丽, 女, 博士研究生, 研究方向为竹藤的品种改良。E-mail: yangli0817@yeah.net

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gaozhimin@icbr.ac.cn

标记在农作物的研究中得到了广泛应用,如应用叶绿体 SSR 分子标记证明了单倍体型栽培大豆是独立起源的^[2];红花菜豆(*Phaseolus coccineus*)的细胞质遗传具有多样性^[3]等等。同时,叶绿体 SSR 分子标记也逐渐在林业资源研究中得到应用,如利用叶绿体 SSR 分子标记对日本落叶松(*Larix kaempferi*)的研究表明,其遗传变异主要来自于群体内个体间,群体间的变异较小^[4];对香蕉(*Musa paradisiaca*)种群的分析表明,野生蕉材料表现出明显的差异^[5]。

竹子属于禾本科(Poaceae)竹亚科(Bambusoideae)植物,有 1250 余种,是森林资源中重要的类群,具有极高的生态、经济价值,尤其是在生态文明建设中,观赏竹种在园林绿化中的作用日趋受到重视。目前,分子标记已在竹类植物的遗传多样性、种质资源收集与保护、良种选育等方面得到广泛应用,包括 SSR^[6-7]、RFLP^[8-9]、AFLP^[10-12]、RAPD^[13-14]、ISSR^[15-17]等,其中 SSR 分子标记是基于 EST、核基因组等开发的。目前,有关竹子叶绿体基因组的 SSR 分子标记的开发和应用研究尚未见报道。因此,本研究根据已有的麻竹和绿竹叶绿体基因组序列^[18],开发 SSR 分子标记,以探讨竹叶叶绿体基因组 SSR 分子标记的可行性,为获得区分观赏竹花叶条纹的分子标记和揭示花叶的异质性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

所选用的 6 竹种均为实验室盆栽培养,包括刚竹属的毛竹(*Phyllostachys edulis*)、牡竹属的麻竹(*Dendrocalamus latiflorus*)、簕竹属的绿竹(*Bambusa oldhamii*)、苦竹属的菲白竹(*Pleioblastus fortunei*)和铺地竹(*P. argenteostriatus*)、以及东芭竹属的白纹椎谷篁(*Sasaella glabra* f. *albo-striata*)。其中,毛竹、麻竹和绿竹的叶片绿色,均为笋材两用竹种;菲白竹的叶片具白色或淡黄色条纹;铺地竹的叶片翠绿,新叶具白色条纹;白纹椎谷篁的叶片彩色,新叶黄白色具绿条纹。菲白竹、铺地竹和白纹椎谷篁均为观赏竹种。培养温度为 25℃,光照强度为 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光周期为光/暗 = 16 h/8 h。

1.2 麻竹和绿竹叶绿体 SSR 的开发及引物设计

从 GenBank 公共数据库中下载麻竹和绿竹的叶绿体基因组序列,利用 SSR Hunter 软件搜索序

列中的 SSR 位点,参数设置:核苷酸重复数位为 2、3、4,对应重复次数为 5、3、3;利用 TRF 在线软件搜索单核苷酸重复序列,设置重复次数 ≥ 10 。应用软件 Vector NTI 9.0 设计引物,预扩增片段在 200 ~ 300 bp 之间,引物由华大基因公司合成(表 1)。

1.3 DNA 提取及检测

采用改良的 CTAB 方法^[19]提取 6 竹种叶片的基因组 DNA,同时对菲白竹、铺地竹和白纹椎谷篁花叶叶片的绿色部分和白色部分分别提取 DNA,在紫外分光光度计下测量 A_{260} 和 A_{280} ,检测 DNA 的质量。提取的 DNA 于 -20℃ 保存。

1.4 PCR 扩增及数据统计

PCR 扩增体系共 20 μL : 包含 10 \times LA Buffer (MgCl₂) 2.0 μL , dNTPs (2.5 mmol L⁻¹) 3.2 μL , 正、反向 SSR 引物(10 mmol L⁻¹)各 1.0 μL , 模板 DNA (100 ng μL^{-1}) 2.0 μL , LA *Taq* DNA 聚合酶 1.0 U, 超纯水 9.8 μL 。扩增反应程序为:95℃ 预变性 5 min; 然后 95℃ 30 s, 52℃ ~ 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 28 个循环;最后 72℃ 延伸 7 min。经预实验,确定退火温度后,用每对引物分别对 12 个样品进行扩增,扩增产物采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,电压为 200 V, 60 min 后银染显色。拍照采集电泳图像,统计扩增条带,有共迁移条带记为 1,无带记为 0,形成[0, 1]的原始数据矩阵,用 DPS 软件中的 UPGMA 法进行数据系统聚类获得遗传距离矩阵,利用 MEGA4 软件进行系统进化树分析^[20]。

2 结果和分析

2.1 麻竹和绿竹叶绿体基因组 SSR 分析

在麻竹 139350 bp 的叶绿体基因组序列中搜索到 87 个 SSR 位点,平均每 1602 bp 出现 1 个 SSR 位点;在绿竹 139365 bp 叶绿体基因组序列中搜索到 86 个 SSR 位点,平均每 1621 bp 出现 1 个 SSR 位点。在麻竹的 87 个 SSR 位点中,有单核苷酸重复 28 条,二核苷酸重复 5 条,三核苷酸重复 36 条,四核苷酸重复 18 条,出现的频率分别为 32.2%、5.7%、41.4%、20.7%;在绿竹的 86 个 SSR 位点中,有单核苷酸重复 29 条,二核苷酸重复 4 条,三核苷酸重复 38 条,四核苷酸重复 15 条,出现的频率分别为 33.7%、4.7%、44.2%、17.4% (表 2)。可见,

表 1 麻竹和绿竹叶绿体 SSR 的引物

Table 1 Chloroplast SSR primers of *Dendrocalamus latiflorus* and *Bambusa oldhamii*

| 位点 Locus | 重复基序 Repeat motif | 引物 Primer (5'~3') | 退火温度 Annealing temperature (°C) |
|----------|---------------------|---|---------------------------------|
| DI-190 | (T) ₁₅ | F: AAAGCAATTGATCATGATCA R: GGATCATTAAAGTCAGGTTTC | 52 |
| DI-191 | (T) ₁₁ | F: CCTTTGGGGGATGGATCCTA R: CGGAAAGAAGTACCACTCG | 57 |
| DI-210 | (TCT) ₄ | F: CAGTTTCTTCGTAGTAACGC R: TCTCGTCGTTAACTGAATTC | 52 |
| DI-211 | (TTC) ₃ | F: TTGTGAATCCACCATGCGCG R: TGGCTAGGTAAACGCCCGT | 59 |
| DI-221 | (T) ₁₁ | F: ATAGTTCATGGCCTATTAGAAGTAG R: CCCTGCAATCAAATAGATTG | 54 |
| DI-287 | (A) ₁₂ | F: AAGTTGTTGATATTCAACAAC R: AATATTCAAATACCCCAAAG | 49 |
| DI-325 | (A) ₁₃ | F: ACCCTGCAATCAAATAGATTG R: TAGTTCATGGCCTATTAGAAG | 52 |
| DI-326 | (A) ₁₃ | F: CAAAACATTTCTAACGGATTCC R: AACTTGGAACGAGCATGAAG | 52 |
| DI-42 | (GAGG) ₃ | F: CGAACTAGGGTTCAATGAAT R: TCGAATAGGAAGTTAAGATG | 52 |
| DI-74 | (TTTA) ₃ | F: TTCTTCTGATTCTGACGTAAC R: ACGGAATTTATTTCTTTTTG | 52 |
| Bo-204 | (TTCT) ₃ | F: CTGTGTTCAAGTTACGATTTTCG R: ATCATATAGTTGTAGCAACTGC | 52 |
| Bo-253 | (T) ₁₁ | F: ATCTTCATTGTTCAACTCTTTGAT R: TATCATTCTGGCATCGAGCTAT | 54 |
| Bo-284 | (TTA) ₃ | F: ATGAAACTTTGACCAATGTACC R: AAGATGGACTTTACCCAGGATG | 54 |
| Bo-294 | (A) ₁₇ | F: GCTACAGGCCACCCCGTCTC R: GGGGAGGTCCTGCGGCAAAAT | 65 |
| Bo-295 | (A) ₁₀ | F: TATCATTCTGGCATCGAGCTAT R: TTCATTGTTCAACTCTTTGATG | 54 |
| Bo-33 | (AT) ₅ | F: CCCTTTGGCCTTTTCTTTATAT R: TCACTGCACAAAGTAGAGGTTT | 54 |
| Bo-34 | (T) ₁₁₃ | F: ATTGAATCATATTTGTTTCCCTCC R: TTATTCATGGCAAGGTTCAAAT | 54 |
| Bo-56 | (T) ₁₀ | F: GCCTCAGATAGCGAGCGAATC R: GTTCCATCTTGCAAATAGGGC | 59 |
| Bo-8 | (TTC) ₃ | F: TTCCTTACTAACAAAGGATTTATTG R: ACGAATCCACTTTTCTAGGAAG | 54 |
| Bo-210 | (TTC) ₄ | F: ACAGTTTCTTCGTAGTAACGC R: ATCTCGTCGTTAACTGAATTC | 54 |
| Bo-211 | (TTTG) ₃ | F: TTGTGCTTTGAAAACCCGTTTC R: TATGGTAGGTCGCAAAATGGG | 56 |

表 2 麻竹和绿竹叶叶绿体 SSR 类型及频率

Table 2 Type and frequency of chloroplast SSR in *Dendrocalamus latiflorus* and *Bambusa oldhamii*

| 麻竹 <i>Dendrocalamus latiflorus</i> | | | | 绿竹 <i>Bambusa oldhamii</i> | | | | |
|------------------------------------|-------------------|-----------|------|------------------------------------|-------------------|-----------|------|--|
| 类型 Type | 重复单元 Repeat motif | 数目 Number | % | 类型 Type | 重复单元 Repeat motif | 数目 Number | % | |
| 单核苷酸 Mononucleotide (32.2%) | A | 13 | 46.4 | 单核苷酸 Mononucleotide (33.7%) | A | 14 | 48.3 | |
| | T | 15 | 53.6 | | T | 15 | 51.7 | |
| 二核苷酸 Dinucleotide (5.7%) | AG/TC | 1 | 20.0 | 二核苷酸 Dinucleotide (4.7%) | AG/TC | 1 | 25.0 | |
| | AT/TA | 4 | 80.0 | | AT/TA | 3 | 75.0 | |
| 三核苷酸 Trinucleotide (41.4%) | AAG/TTC | 9 | 25.0 | 三核苷酸 Trinucleotide (44.2%) | AAG/TTC | 12 | 31.6 | |
| | AGA/TCT | 6 | 16.7 | | AGA/TCT | 5 | 13.2 | |
| | AAC/TTG | 9 | 25.0 | | AAC/TTG | 8 | 21.1 | |
| | AAT/TTA | 2 | 5.5 | | AAT/TTA | 3 | 7.9 | |
| | ATA/TAT | 3 | 8.3 | | ATA/TAT | 3 | 7.9 | |
| | ACG/TGC | 3 | 8.3 | | ACG/TGC | 3 | 7.9 | |
| | AGT/TCA | 1 | 2.8 | | AGT/TCA | 1 | 2.6 | |
| | AGG/TCC | 1 | 2.8 | | AGG/TCC | 1 | 2.6 | |
| | CGG/GCC | 1 | 2.8 | | AGC/TCG | 1 | 2.6 | |
| | CTA/GAT | 1 | 2.8 | | CAG/GTC | 1 | 2.6 | |
| | AGC/TCG | 1 | 2.8 | | | | | |
| | CAG/GTC | 1 | 2.8 | | | | | |
| 四核苷酸 Tetranucleotide (20.7%) | ATAC | 1 | 5.5 | 四核苷酸 Tetranucleotide (17.4%) | ATAC | 1 | 6.7 | |
| | AAAG | 1 | 5.5 | | AAAG | 2 | 13.3 | |
| | TCCT | 1 | 5.5 | | TCCT | 1 | 6.7 | |
| | AATA | 4 | 22.3 | | AATA | 4 | 26.7 | |
| | GTAG | 1 | 5.5 | | GTAG | 1 | 6.7 | |
| | TCGT | 1 | 5.5 | | TCGT | 1 | 6.7 | |
| | TTTA | 4 | 22.3 | | AGAA | 2 | 13.3 | |
| | AAAC | 1 | 5.5 | | TTTA | 1 | 6.7 | |
| | AACG | 1 | 5.5 | | AAAC | 1 | 6.7 | |
| | GAGG | 1 | 5.5 | | AACG | 1 | 6.7 | |
| GAAA | 1 | 5.5 | | | | | | |
| AGAA | 1 | 5.5 | | | | | | |

麻竹和绿竹叶叶绿体基因组中 SSR 的核苷酸重复数量及出现频率基本一致,单核苷酸重复以基序 A 和 T 出现的次数最多,没有 G 或 C 的单核苷酸重复;二核苷酸重复基序以 AT/TA 出现的次数最多,分别占二核苷酸重复总数的 80.0% 和 75.0%;三核苷酸重复基序中出现最多的是 AAG/TTC,分别占三核苷酸重复总数的 25.0% 和 31.6%,其次为 AAC/TTG、AGA/TCT;四核苷酸重复基序中出现较多的是 AATA,分别占四核苷酸重复总数的 22.3% 和 26.7%。

2.2 麻竹和绿竹叶叶绿体 SSR 的多态性分析

根据麻竹和绿竹叶叶绿体基因组序列信息,针对不同的 SSR 类型设计了 21 对引物,以 6 竹种的 DNA 样品为模板进行 PCR 扩增,扩增产物的电泳分析结果表明,有 19 对引物能扩增出清晰的条带,其中 11 对引物的条带具有多态性(图略),多态性引物占 SSR 引物总数的 52.4%。

2.3 基于叶绿体 SSR 分子标记的聚类分析

采用 11 对叶绿体 SSR 引物对 6 竹种进行

PCR 扩增,将扩增产物的电泳结果数字化,并计算竹种间的遗传相似性系数,并进行聚类分析。结果表明,供试 6 竹种分别聚为两个大类,其中铺地竹和菲白竹聚在一起,在竹子形态学分类上,这两竹种均为苦竹属,白纹椎谷篁与铺地竹、菲白竹聚为一个大的分支上,说明这 3 竹种的亲缘关系较近,

且都为温带竹种;麻竹和绿竹在一个小分支上,其都为丛生竹,与散生竹——毛竹的亲缘关系相对较远(图 1)。整体而言,对 6 竹种的聚类结果与竹子的形态学分类基本一致,说明从麻竹和绿竹叶绿体序列中挖掘出的 SSR 引物具有较好的通用性,可用作竹子种间的 SSR 分子标记分析。

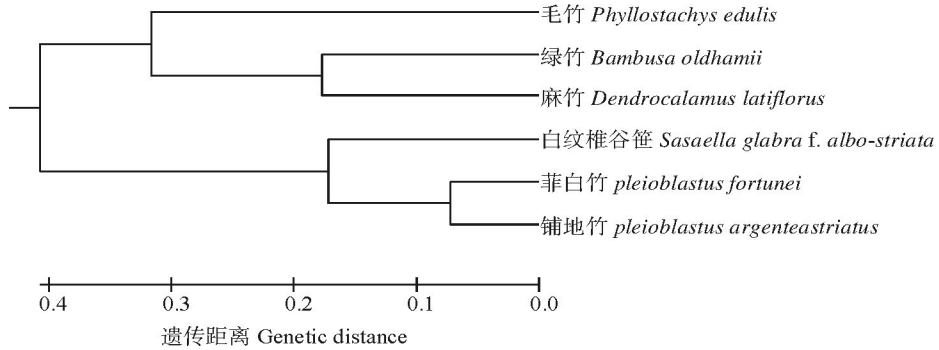


图 1 6 种竹类植物基于叶绿体 SSR 标记的聚类图

Fig.1 6 Cluster analysis of 6 bamboo species based on SSR markers from chloroplast

2.4 基于叶绿体SSR分子标记的观赏竹叶片的异质性分析

电泳分析结果表明,具有多态性的 11 对引物中,有 4 对引物在菲白竹和白纹椎谷篁叶片的不同条纹中具有多态性,而在铺地竹中没有特异扩增条带。引物对 Bo-211 在白纹椎谷篁的绿色叶片样品中无扩增条带,而在其叶片的 DNA 混合样品及在白色条纹样品中均有大小一致的条带;引物对

Bo-56 在菲白竹的绿色叶片样品中无扩增条带,在其叶片的 DNA 混合样品及在白色条纹样品中条带大小一致;引物对 DI-74 和 Bo-284 在菲白竹白色条纹样品中无扩增条带,在菲白竹叶片 DNA 混合样品及在绿色叶片部分中有大小一致的条带。说明这 4 个 SSR 位点可作为区分菲白竹和白纹椎谷篁叶片条状斑纹及叶片绿色部分的分子标记(图 2)。

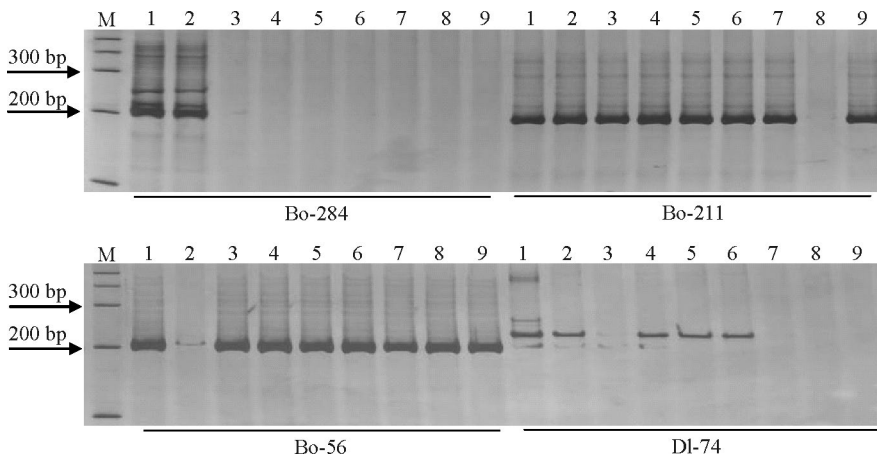


图 2 4 对引物对 3 竹种的扩增结果。M: 2 kb DNA marker; 1: 菲白竹; 2: 菲白竹绿色部分; 3: 菲白竹白色部分; 4: 铺地竹; 5: 铺地竹绿色部分; 6: 铺地竹白色部分; 7: 白纹椎谷篁; 8: 白纹椎谷篁绿色部分; 9: 白纹椎谷篁白色部分。

Fig. 2 PCR results of 3 bamboo species by 4 pairs of primers. M: 2 kb DNA marker; 1: *Pleioblastus fortunei*; 2: Green part of *P. fortunei*; 3: White part of *P. fortunei*; 4: *P. argenteastriatus*; 5: Green part of *P. argenteastriatus*; 6: White part of *P. argenteastriatus*; 7: *Sasaella glabra* f. *albo-striata*; 8: Green part of *S. glabra* f. *albo-striata*; 9: White part of *S. glabra* f. *albo-striata*.

3 讨论

随着高通量测序技术的快速发展,有效促进了对叶绿体基因组的研究。到目前为止,已有接近 200 种植物的叶绿体全基因组在 NCBI 上发布,其中已对 8 种竹类植物的叶绿体基因组进行了测序^[18,21]。本研究通过对麻竹和绿竹叶绿体基因组序列进行分析,分别挖掘出 87 和 86 个 SSR 位点,具有存在大量的 A 或 T 单核苷酸重复,并且二核苷酸重复较少的特点,这与前期开发的大豆、水稻、黑松(*Pinus thunbergii*)等叶绿体 SSR 标记的结果一致^[1,22]。但是麻竹和绿竹的叶绿体 SSR 中不存在 G 或 C 单核苷酸重复的微卫星标记,且三核苷酸的重复类型较多,这与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[23]、大豆^[2]等叶绿体 SSR 重复类型不一致,这可能是物种原因造成的。

叶绿体基因组的保守性强,含有特征性重复顺序,它的遗传形式多样,且以母系遗传为主。对主要以无性繁殖为主的竹类植物来说,叶绿体 SSR 分子标记在竹类植物研究中具有重要价值。已有用叶绿体基因 *ndhF*^[24]、*rps4*^[25]以及 *rpl16* 的内含子^[26]进行竹类植物系统进化研究的报道。本研究首次利用叶绿体基因组 SSR 分子标记分析了其在不同竹种间的通用性,并获得较好的多态性。因此,本研究开发的叶绿体基因组 SSR 分子标记对于研究竹类植物的系统分类有重要参考意义。毛竹属于温带竹种,本研究中却与热带竹种麻竹和绿竹聚在一起,没有与温带竹种菲白竹、铺地竹和白纹椎谷篁聚在一起。究其原因,本研究的聚类分析结果是基于 11 对叶绿体 SSR 标记对 6 竹种之间的遗传相似性数据得到的,并非严格的系统发育方法,可能是研究中 SSR 数据较少,有一定的偏向性,因此还需要做进一步的分析核实。

花叶条纹是观赏竹的重要观赏性状,应用石蜡切片及超薄切片对观赏竹花叶结构进行观察,在菲白竹、白纹阴阳竹(*Hibanobambusa tranquillans* f. *shiroshima*)和白纹椎谷篁 3 种竹子的条状斑纹内的叶绿体结构均发生了变异,这意味着叶绿体结构变异可能是花叶形成的重要因素^[27-28]。为从分子水平来探讨观赏竹花叶的异质性,本研究借助从麻竹和绿竹叶绿体基因组中开发的 11 对 SSR 分子标记,对铺地竹叶片不同条纹样品进行扩增,均未获得特异性条带,这意味着铺地竹花叶条纹性状与现

有的 SSR 分子标记并不关联,其形成是由于叶绿体结构变异还是功能基因突变引起的,还有待于进一步研究;而对于菲白竹和白纹椎谷篁不同条纹的样品,4 对叶绿体 SSR 引物有特异扩增,且具有多态性,能够有效地区分不同颜色条纹的异质性,这为有效开展观赏竹的分子标记辅助育种和新品种的 DUS 测试奠定了基础。

参考文献

- [1] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome [J]. *Curr Biol*, 1995, 5(9): 1023-1029.
- [2] Xu H, Abe J, Gai Y, et al. Diversity of chloroplast DNA SSRs in wild and cultivated soybeans: Evidence for multiple origins of cultivated soybean [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(5): 645-653.
- [3] Rodriguez M, Rau D, Angioi S A, et al. European *Phaseolus coccineus* L. landraces: Population structure and adaptation, as revealed by cpSSRs and phenotypic analyses [J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57337. doi: 10.1371/journal.pone.0057337.
- [4] Zhang X Y, Bai S J, Huang M R. Analysis of genetic structure in population of *Larix kaempferi* by chloroplast SSR markers [J]. *Hereditas* (Beijing), 2004, 26(4): 486-490.
张新叶, 百石进, 黄敏仁. 日本落叶松群体的叶绿体 SSR 分析 [J]. *遗传*, 2004, 26(4): 486-490.
- [5] Li B. Phylogenetic analysis of *Musa* using cpSSR marker [D]. Haikou: Hainan University, 2011: 38-40.
李博. 香蕉种间叶绿体 SSR 位点变异的遗传分析 [D]. 海口: 海南大学, 2011: 38-40.
- [6] Tang D Q, Lu J J, Fang W, et al. Development, characterization and utilization of GenBank microsatellite markers in *Phyllostachys pubescens* and related species [J]. *Mol Breed*, 2010, 25(2): 299-311.
- [7] Gao Z M, Yang L, Li C L, et al. EST-SSR molecular marker development from *Dendrocalamus latiflorus* and its application on genetic diversity analysis of variation types from *Bambusa emeiensis* [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2012, 20(5): 462-468.
高志民, 杨丽, 李彩丽, 等. 麻竹 EST-SSR 标记开发及对慈竹变异类型的分析研究 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(5): 462-468.
- [8] Friar E, Kochert G. A study of genetic variation and evolution in *Phyllostachys* (Bambusoideae, Poaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 89(2/3): 265-207.
- [9] Watanabe M, Ito M, Kurita S. Chloroplast DNA phylogeny of Asian bamboos (Bambusoideae, Poaceae) and its systematic implication [J]. *J Plant Res*, 1994, 107(3): 253-261.
- [10] Loh J P, Ruth K, Set O, et al. A study of genetic variation and

- relationships with the bamboo subtribe Bambusinae using amplified fragment length polymorphism [J]. *Ann Bot*, 2000, 85(5): 607–612.
- [11] Suyama Y, Obayashiand K, Hayashi I. Clonal structure in a dwarf bamboo (*Sasa senanensis*) population inferred from amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprints [J]. *Mol Ecol*, 2000, 9(7): 901–906.
- [12] Lou Y F, Lin X C, He Q J, et al. Analysis on genetic relationship of Puji-bamboo species by using AFLP and SRAP [J]. *Mol Plant Breed*, 2010, 8(1): 83–88.
娄永峰, 林新春, 何奇江, 等. 哺鸡竹亲缘关系的AFLP和SRAP分析 [J]. *分子植物育种*, 2010, 8(1): 83–88.
- [13] Lai C C, Hsiao J Y. Genetic variation of *Phyllostachys pubescens* (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan based on DNA polymorphisms [J]. *Bot Bull Acad Sin*, 1997, 38(3): 145–152.
- [14] Shi L H, Yang G Y, Lin X C, et al. RAPD studies on the grade of infra-species of *Phyllostachys edulis* [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci)*, 2002, 26(3): 65–68.
师丽华, 杨光耀, 林新春, 等. 毛竹种下等级的RAPD研究 [J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2002, 26(3): 65–68.
- [15] Ruan X S, Lin X C, Lou Y F, et al. Genetic diversity of *Phyllostachys hererocyca* var. *pubescens* provenances by AFLP and ISSR [J]. *J Zhejiang For Techn*, 2008, 28(2): 29–33.
阮晓赛, 林新春, 娄永峰, 等. 毛竹种源遗传多样性的AFLP和ISSR分析 [J]. *浙江林业科技*, 2008, 28(2): 29–33.
- [16] Lin X C, Ruan X S, Lou Y F, et al. Genetic similarity among cultivars of *Phyllostachys pubescens* [J]. *Plant Syst Evol*, 2009, 277(1/2): 67–73.
- [17] Yang H Q, Ruan Z Y, Tian B, et al. Genetic differentiation of four straight-culmed provenances of *Dendrocalamus sinicus* based on ISSRs [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2010, 27(1): 81–86.
杨汉奇, 阮桢媛, 田波, 等. 通直型巨龙竹不同地理种源遗传分化的ISSR分析 [J]. *浙江林学院学报*, 2010, 27(1): 81–86.
- [18] Wu F H, Kan D P, Lee S B, et al. Complete nucleotide sequence of *Dendrocalamus latiflorus* and *Bambusa oldhamii* chloroplast genomes [J]. *Tree Physiol*, 2009, 29(6): 847–856.
- [19] Gao Z M, Fan S H, Gao J, et al. Extract genomic DNA from *Phyllostachys edulis* by CTAB-based method [J]. *For Res*, 2006, 19(6): 725–728
高志民, 范少辉, 高健, 等. 基于CTAB法提取毛竹基因组DNA的探讨 [J]. *林业科学研究*, 2006, 19(6): 725–728
- [20] Li Y L, Han G M, He S E, et al. A new strategy for construction of phylogenetic tree based on DNA molecular mark data [J]. *China J Bioinform*, 2008, 4(6): 168–170.
李亚玲, 韩国民, 何沙娥, 等. 基于DNA分子标记数据构建系统进化树的新策略 [J]. *生物信息学*, 2008, 4(6): 168–170.
- [21] Zhang Y J, Ma P F, Li D Z. High-throughput sequencing of six bamboo chloroplast genomes: Phylogenetic implications for temperate woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae) [J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e20596. doi: 10.1371/journal.pone.0020596.
- [22] Powell W, Morgante M, McDevitt R, et al. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 7759–7763.
- [23] Zhang Y Y, Fang Z Y, Wang Q B, et al. Utility of *Arabidopsis* chloroplast simple sequence repeat (cpSSR) primers in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) [J]. *Acta Hort Sin*, 2011, 38(3): 549–555.
张扬勇, 方智远, 王庆彪, 等. 拟南芥叶绿体SSR引物在甘蓝上的应用 [J]. *园艺学报*, 2011, 38(3): 549–555.
- [24] Clark L G, Zhang W, Wendel J F. A phylogeny of the grass family (Poaceae) based on *ndhF* sequence data [J]. *Syst Bot*, 1995, 20(4): 436–460.
- [25] Nadot S, Bittar G, Carter L, et al. A phylogenetic analysis of monocotyledons based on the chloroplast gene *rps4*, using parsimony and a new numerical phenetics method [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1995, 4(3): 257–282.
- [26] Kelchner S A, Clark L G. Molecular evolution and phylogenetic utility of the chloroplast *rpL16* intron in *Chusquea* and the Bambusoideae (Poaceae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1997, 8(3): 385–397.
- [27] Wang X C, Yue X H, Wu J, et al. Appearance and structure analysis of chimeric leaves from two ornamental bamboos [J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2012, 28(16): 233–238.
王啸晨, 岳祥华, 吴杰, 等. 2种观赏彩叶竹形态结构的观察与分析 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28(16): 233–238.
- [28] Yuan L C, Li X P, Peng Z H, et al. Ultrastructure of the albino and green mutants of *Pleioblastus fortunei* and expression of 15 chloroplast genes [J]. *Chin Bull Bot*, 2010, 45(4): 451–459.
袁丽钗, 李雪平, 彭镇华, 等. 菲白竹组培苗白化、绿化突变体的超微结构及15个叶绿体编码基因的表达 [J]. *植物学报*, 2010, 45(4): 451–459.