

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.07.007

基于 ITS 序列的竹亚科植物分子鉴定研究^①

王苗苗¹, 王孝仕², 左龙亚¹, 于杰^{1,3}

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715; 2. 重庆市梁平县农业委员会, 重庆 405200;

3. 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要: 利用 ITS 序列对竹亚科 13 个属 76 个竹种进行 DNA 条形码分子鉴定. 该研究提取慈竹属、刚竹属、箬竹属、唐竹属、矢竹属、大明竹属、赤竹属、巴山木竹属、倭竹属、短穗竹属、籼竹属、酸竹属及少穗竹属共 13 个属 62 个竹种 DNA, 对其内转录间隔区 ITS 序列进行 PCR 扩增和双向测序, 所得序列与 GenBank 数据库下载的 14 条 ITS 序列共 76 个竹种序列用 Clustal X 软件比对, 再利用 MEGA6.06 软件构建 K2P 距离法的 NJ 系统发育树. 结果显示, 种内遗传距离为 0~3.907, 平均遗传距离为 0.370; 种间遗传距离为 0~4.394, 平均遗传距离为 2.287, 种内遗传距离远小于种间遗传距离. ITS 序列可用于竹类资源的物种鉴定研究.

关键词: DNA 条形码; ITS; 竹亚科; 分子鉴定

中图分类号: Q949.71⁺4.2

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)07-0044-07

竹亚科(Bambusoideae)为禾本科(Poaceae) 12 个亚科中最大的亚科之一, 因竹秆具有木纤维而不同于其他禾本类植物. 全世界的竹亚科植物约有 119 属, 已被描述的 1 500 个种是森林植被极为重要的组成部分^[1]. 竹子以根状茎繁殖为主, 且很少开花结实, 利用花和果实等生殖性状对竹子进行分类受到极大限制. 现阶段系统划分主要依据竹子的营养器官如地下茎、秆箨、分枝方式, 但这些形态性状极为相似, 难以观察和判定, 且容易受到生境、生长阶段、生长部位乃至个体大小等因素的影响, 加上在后期栽植中出现不同程度的无性系变异特征被放大, 造成分类界定上的混乱. 事实上, 一些形态上有显著差异的竹子, 可能有更大程度的遗传相似性^[2], 因而为解决由形态性征不同而造成的分类问题, 直接从分子角度进行研究尤为重要.

核苷酸序列作为最直接、最稳定的标记性状, 现已成功应用于植物各分类阶元的系统发育构建, 其最大优势在于能提供相对客观的分子证据, 可以直接反映物种的遗传变异, 是近年来竹子系统鉴定的主要手段之一. 竹亚科各类分类研究涵盖的范围较广, 不同学者先后以族或属(群)为主题作了相应的研究和探讨. 研究主要涉及倭竹族^[3]、刚竹属 *Phyllostachys*^[4]、空竹属 *Cephalostachyum*^[5] 等. DNA 条形码(DNA barcoding)技术是近年来在物种鉴定领域发展的一种新方法^[6]. 一段好的 DNA 条形码必须具有较高的种间变异性, 以区别不同的物种, 同时保持较低的种内变异性^[7], 核基因组的 ITS 是较为热门的一个 DNA 条形

① 收稿日期: 2017-05-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171930); 中央高校基本科研业务费双创资金项目(XDJK2016E143).

作者简介: 王苗苗(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物分类学研究.

通信作者: 于杰, 博士, 副教授.

码^[8-9]. 在第三届 DNA 条形码国际学术大会上, 与会者一致建议选择进化速率较快的 ITS 探讨它们在陆生植物中的通用性、分辨率和适合程度, ITS 适合于属种间较低等级的系统发育研究^[10]. ITS 是指 18S rDNA 和 28S rDNA 基因的间隔序列, 由 ITS1 区、5.8S 基因、ITS2 区组成. 内转录区 ITS1 和 ITS2 区作为非编码区, 承受的选择压力小, 变化相对较大, 而核糖体 DNA 中的 5.8S 基因在大多数生物中趋于保守, 物种间变化小, 被广泛应用于系统分类鉴定的研究. 虽然人们越来越多地应用 ITS 序列鉴定物种, 但仍没有运用 ITS 序列鉴定竹亚科不同物种的研究. 本研究利用 GenBank 公布的 ITS 序列及本试验测得的 ITS 序列进行比较分析, 实现准确而快速的鉴定.

1 材 料

本文所用的 ITS 序列共 76 条, 其中包括 GenBank 序列 14 条, 试验所得的序列共 62 条. 材料采摘于重庆市梁平县竹博园和重庆茶山竹海景区. 材料为竹类植物的叶片, 叶片采下后用硅胶保存(慈竹属: 1 种; 刚竹属: 37 种; 箬竹属: 2 种; 唐竹属: 2 种; 矢竹属: 3 种; 大明竹属: 1 种; 赤竹属: 5 种; 巴山木竹属: 1 种; 倭竹属: 3 种; 短穗竹属: 2 种; 簕竹属: 2 种; 酸竹属: 2 种; 少穗竹属: 1 种). 拉丁名、属名依据中国植物志.

2 方 法

2.1 DNA 的提取

本次试验的具体步骤参照张汉尧等^[10]的改良 CTAB 方法. 取样品叶片 0.05 g, 加入 2% PVP 和 2% 巯基乙醇在研钵中用液氮磨碎, 转入 1.5 mL 离心管中; 加入 900 μ L 2 $\times$ CTAB 提取缓冲液, 混匀后置于 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中保温 1 h, 其间轻轻摇动几次; 冷却至室温, 加入 600 μ L 24:1 的氯仿-异戊醇, 颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 10 min; 取上清液, 加入 2/3 体积冰冷的异丙醇, 轻微摇匀, -20 $^{\circ}$ C 放置 30 min 以上; 12 000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清液; 用 70% 乙醇洗沉淀 2 次, 100% 乙醇洗 1 次; 室温下晾干 DNA, 20 min 左右, 加灭菌蒸馏水溶解, -4 $^{\circ}$ C 低温保存备用.

2.2 PCR 扩增及测序

PCR 扩增选用 ITS 引物, ITS 上游引物 ITS2 的序列为 5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCG-TAGG-3', 下游引物 ITS4 的序列为 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5'^[11]. 反应体系 25 μ L 包括: PCRMix 12.5 μ L; 正反引物(10 mmol/L)各 1.0 μ L; 模板 DNA 2 μ L; 用 ddH₂O 补充至 25 μ L. 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 5 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; -4 $^{\circ}$ C 低温保存. 用 1% 琼脂糖电泳检测 PCR 扩增情况, 得到的产物送上海华大科技有限责任公司进行序列纯化及正反双向测序.

2.3 数据处理

试验所得的 DNA 序列与 GenBank 数据库中下载的序列利用 Clustal X 进行对比, 并辅以人工校正, 去除引物序列及测序质量较差的序列, 得到可供分析的 450 bp 长度的 ITS 序列; 然后利用 MEGA6.06 分析不同竹种序列间的变异频率, 计算各样品的种内、种间距离; 最后采用 K2P 模型进行遗传距离分析并构建 NJ(Neighbor-Joining)距离树^[12], 利用 Bootstrap(1 000 次重复)检验各分支的支持率.

3 结 果

3.1 序列分析

竹亚科各竹种序列经 Clustal X 比对后长度为 450 bp, 分析其各样品 ITS 序列长度、GC 含量(表 1).

表 1 供试竹类植物样品信息

来源	编号	种	拉丁名	属	分组	长度/bp	G+C 含量/%
GenBankDQ270121.1/梁平县竹博园	1,2	慈竹	<i>Neosinocalamus affinis</i>	慈竹属	Gp1	395.0	67.6
GenBankEU847118.1/梁平县竹博园	3,4	水竹	<i>Phyllostachys heteroclada</i>	刚竹属	Gp2	406.0	69.0
GenBankDQ131503.1/梁平县竹博园	5,6	篌竹	<i>Phyllostachys nidularia</i>	刚竹属	Gp3	406.0	69.0
GenBankJN247376.1/梁平县竹博园	7,8	巴山箬竹	<i>Indocalamus bashanensis</i>	箬竹属	Gp4	403.0	61.0
GenBankKC004045.1/梁平县竹博园	9,10	阔叶箬竹	<i>Indocalamus latifolius</i>	箬竹属	Gp5	403.0	53.1
GenBankEU847119.1/梁平县竹博园	11,12	晾衫竹	<i>Sinobambusa intermedia</i>	唐竹属	Gp6	403.0	59.5
GenBankEU847121.1/梁平县竹博园	13,14	红舌唐竹	<i>Sinobambusa rubroligula</i>	唐竹属	Gp7	413.0	62.2
GenBankEU847136.1/梁平县竹博园	15,16	曙筋矢竹	<i>Pseudosasa japonica</i>	矢竹属	Gp8	404.0	69.3
GenBankEU847134.1/梁平县竹博园	17,18	秋竹	<i>Pleioblastus oleosus</i>	大明竹属	Gp9	405.0	69.1
GenBankHQ600538.1/梁平县竹博园	19,20	毛金竹	<i>Phyllostachys nigra</i>	刚竹属	Gp10	406.0	69.2
GenBankGQ464839.1/梁平县竹博园	21,22	菲白竹	<i>Sasa fortunei</i>	赤竹属	Gp11	395.0	52.2
GenBankGQ464808.1/梁平县竹博园	23,24	巴山木竹	<i>Bashania fargesii</i>	巴山木竹属	Gp12	417.0	43.9
GenBankGQ464844.1/梁平县竹博园	25,26	鹅毛竹	<i>Shibataea chinensis</i>	倭竹属	Gp13	393.0	51.1
GenBankGQ464809.1/梁平县竹博园	27,28	短穗竹	<i>Brachystachyum densiflorum</i>	短穗竹属	Gp14	384.0	54.3
梁平县竹博园/茶山竹海景区	29,30	红后竹	<i>Phyllostachys rubicunda</i>	刚竹属	Gp15	414.0	52.4
梁平县竹博园/茶山竹海景区	31,32	高节竹	<i>Phyllostachys prominens</i>	刚竹属	Gp16	408.0	56.1
梁平县竹博园/茶山竹海景区	33,34	早竹	<i>Phyllostachys praecox</i>	刚竹属	Gp17	402.0	66.2
梁平县竹博园/茶山竹海景区	35,36	安吉水胖竹	<i>Phyllostachys canvava</i>	刚竹属	Gp18	403.0	60.8
梁平县竹博园/茶山竹海景区	37,38	罗汉竹	<i>Bambusa ventricosa</i>	箬竹属	Gp19	396.0	45.2
梁平县竹博园/茶山竹海景区	39,40	红壳雷竹	<i>Phyllostachys incarnata</i>	刚竹属	Gp20	402.0	56.0
梁平县竹博园/茶山竹海景区	41,42	黄槽斑竹	<i>Phyllostachys bambusoides</i>	刚竹属	Gp21	402.0	43.3
梁平县竹博园/茶山竹海景区	43,44	实肚竹	<i>Phyllostachys nidularia</i>	刚竹属	Gp22	408.0	55.9
梁平县竹博园/茶山竹海景区	45,46	黎竹	<i>Acidosasa venusta</i>	酸竹属	Gp23	418.0	51.9
梁平县竹博园/茶山竹海景区	47,48	金丝毛竹	<i>Phyllostachys heterocycla</i>	刚竹属	G24	404.0	57.4
梁平县竹博园/茶山竹海景区	49,50	斗竹	<i>Oligostachyum spongiosum</i>	少穗竹属	Gp25	408.0	52.5
梁平县竹博园/茶山竹海景区	51,52	黄古竹	<i>Phyllostachys angusta</i>	刚竹属	Gp26	405.0	51.6
梁平县竹博园/茶山竹海景区	53,54	黄竿乌哺鸡竹	<i>Phyllostachys vivax</i>	刚竹属	Gp27	442.0	49.3
梁平县竹博园/茶山竹海景区	55,56	斑苦竹	<i>Phyllostachys maculates</i>	刚竹属	Gp28	442.0	51.8
梁平县竹博园/茶山竹海景区	57,58	金竹	<i>Phyllostachys sulphurea</i>	刚竹属	Gp29	405.0	53.6
梁平县竹博园/茶山竹海景区	59,60	寿竹	<i>Phyllostachys bambusoides</i>	刚竹属	Gp30	407.0	49.6
梁平县竹博园/茶山竹海景区	61,62	淡竹	<i>Phyllostachys glauca</i>	刚竹属	Gp31	407.0	53.6
梁平县竹博园/茶山竹海景区	63,64	红哺鸡竹	<i>Phyllostachys iridescens</i>	刚竹属	Gp32	403.0	56.1
梁平县竹博园/茶山竹海景区	65,66	狭叶倭竹	<i>Shibataea lanceifolia</i>	倭竹属	Gp33	407.0	51.4
梁平县竹博园/茶山竹海景区	67,68	紫竹	<i>Phyllostachys nigra</i>	刚竹属	Gp34	406.0	53.2
梁平县竹博园/茶山竹海景区	69,70	无毛翠竹	<i>Sasa pygmaea</i>	赤竹属	Gp35	405.0	52.3
梁平县竹博园/茶山竹海景区	71,72	铺地竹	<i>Sasa argenteistriatus</i>	赤竹属	Gp36	405.0	53.8
梁平县竹博园/茶山竹海景区	73,74	黄槽石绿竹	<i>Phyllostachys arcane</i>	刚竹属	Gp37	400.0	50.3
梁平县竹博园/茶山竹海景区	75,76	托竹	<i>Pseudosasa cantori</i>	矢竹属	Gp38	403.0	51.9

3.2 种内、种间变异分析

基于 K2P 模型计算遗传距离，对 1—76 号样品进行分组，见表 1. 结果显示，种内遗传距离为 0～3.907，平均遗传距离为 0.370；种间遗传距离为 0～4.394，平均遗传距离为 2.287. 种间变异明显大于种内变异，符合条形码种间变异大、种内变异小的要求，证明 ITS 序列能够准确区分竹亚科的不同竹种(图 1).

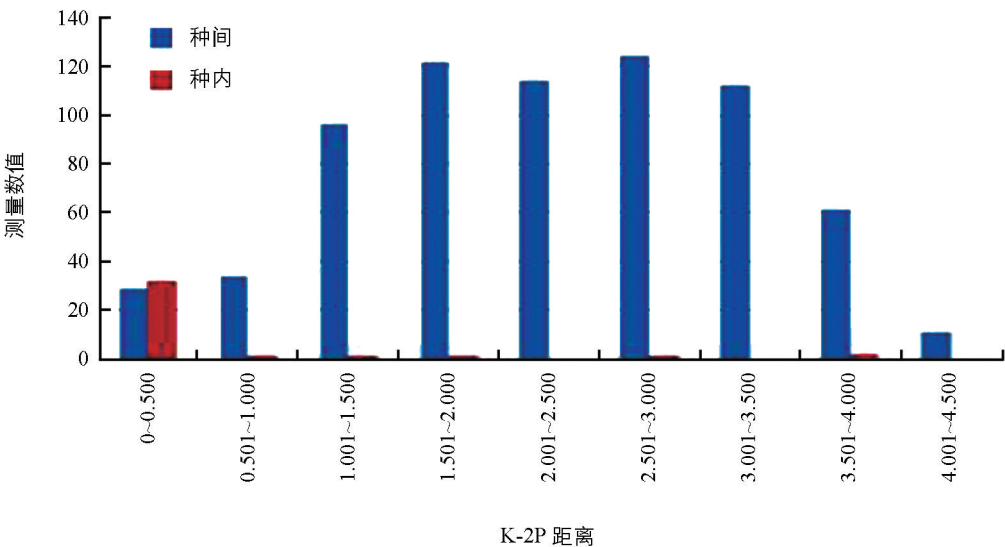


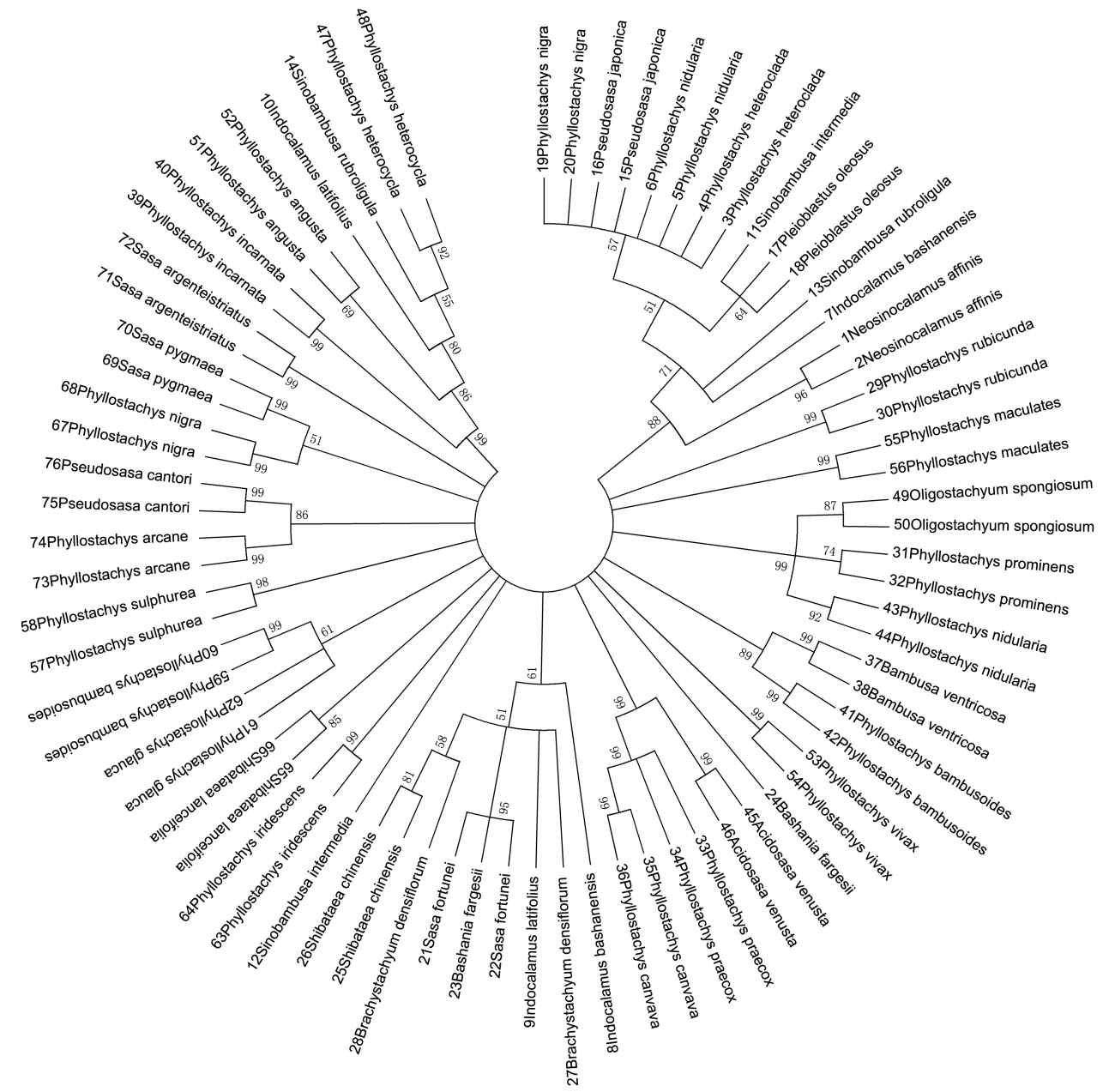
图 1 ITS 序列的种内变异和种间变异分布

3.3 聚类分析

利用 MEGA6.06 分析软件的 K-2P 距离构建 NJ(Neighbor-Joining)距离树(图 2)，拓扑结构的可靠性用 1 000 次重复的自展检验(Bootstrap analysis)来评估，分支支持率低于 50%的略去.

从 NJ 树可看出，慈竹 *Neosinocalamus affinis* 的序列(1,2)聚为一支，支持率为 96%；鹅毛竹 *Shibataea chinensis* 的序列(25,26)聚为一支，支持率为 81%；红后竹 *Phyllostachys rubicunda* 的序列(29,30)聚为一支，支持率为 99%；高节竹 *Phyllostachys prominens* 的序列(31,32)聚为一支，支持率为 74%；安吉水胖竹 *Phyllostachys canvaava* 的序列(35,36)聚为一支，支持率为 99%；罗汉竹 *Bambusa ventricosa* 的序列(37,38)聚为一支，支持率为 99%；红壳雷竹 *Phyllostachys incarnata* 的序列(39,40)聚为一支，支持率为 99%；黄槽斑竹 *Phyllostachys bambusoides* 的序列(41,42)聚为一支，支持率为 99%；实肚竹 *Phyllostachys nidularia* 的序列(43,44)聚为一支，支持率为 92%；黎竹 *Acidosasa venusta* 的序列(45,46)聚为一支，支持率为 99%；金丝毛竹 *Phyllostachys heterocycla* 的序列(47,48)聚为一支，支持率为 92%；斗竹 *Oligostachyum spongiosum* 的序列(49,50)聚为一支，支持率为 87%；黄古竹 *Phyllostachys angusta* 的序列(51,52)聚为一支，支持率为 69%；黄竿乌哺鸡竹 *Phyllostachys vivax* 的序列(53,54)聚为一支，支持率为 99%；斑苦竹 *Phyllostachys maculates* 的序列(55,56)聚为一支，支持率为 99%；金竹 *Phyllostachys sulphurea* 的序列(57,58)聚为一支，支持率为 98%；寿竹 *Phyllostachys bambusoides* 的序列(59,60)聚为一支，支持率为 99%；淡竹红哺鸡竹 *Phyllostachys iridescens* 的序列(63,64)聚为一支，支持率为 99%；狭叶倭竹 *Shibataea lanceifolia* 的序列(65,66)聚为一支，支持率为 85%；紫竹 *Phyllostachys nigra* 的序列(67,68)聚为一支，支持率为 99%；无毛翠竹 *Sasa pygmaea* 的序列(69,70)聚为一支，支持率为 99%；铺地竹 *Sasa argenteistriatus* 的序列(71,72)聚为一支，支持率为 99%；黄槽石绿竹 *Phyllostachys arcana* 的序列(73,74)聚为一支，支持率为 99%；托竹 *Pseudosasa cantori* 的序列(75,76)聚为一支，支持率为 99%. 水竹 *Phyllostachys heteroclada* 的序列(3,4)、篌竹 *Phyllostachys nidularia* 的序列(5,6)、曙筋矢竹 *Pseudosasa japonica* 的序列(15,16)与毛金竹 *Phyllostachys nigra* 的序列(19,

20)聚为一支,支持率为 57%;菲白竹 *Sasa fortunei* 的序列(21,22)与巴山木竹 *Bashania fargesii*(23)聚为一支,支持率为 64%。早竹 *Phyllostachys praecox* 的序列(33,34)与安吉水胖竹(35,36)聚为一支,支持率为 99%。但巴山箬竹 *Indocalamus bashanensis*(7,8)、阔叶箬竹 *Indocalamus latifolius* (9,10)、晾衫竹 *Sinobambusa intermedia*(11,12)、红舌唐竹 *Sinobambusa rubroligula* (13,14)、秋竹 *Pleioblastus oleosus*(17,18)、巴山木竹 *Bashania fargesii*(23,24)、短穗竹 *Brachystachyum densiflorum*(27,28)没有聚为一支,种内遗传距离较远。



Bootstrap 1 000 次重复, 仅显示自展支持率大于 50% 的分支, 采用 K-2P 距离法。

图 2 基于 ITS 序列构建的竹亚科样品的邻接(NJ)树

4 讨 论

DNA 条形码技术从分子水平对物种进行鉴定, 具有准确性高、高通量、操作简便等特点, 避免了形态学上的误差, 是现代生物分类的发展方向之一。理想的 DNA 条形码应该具备明显的种间差异, 同时种

内差异要足够小,并且能够使用单引物对其进行扩增,通过双向测序得到高质量的序列^[11].在竹亚科的研究中常见的核 DNA 片段主要是 ITS,ITS 以点突变为主,变异位点相互独立,适合于种或种下水平的分析,更重要的是通过两旁 rDNA 保守序列上的通用引物,可对很广范围的种类进行 PCR 扩增和测序,作为物种分类的通用标记^[12],该核片段的应化适度提高了一些竹种间系统发育关系的分辨力.本研究结果表明,核基因 ITS 序列具有较好的 PCR 扩增效率和测序成功率,同时具有较大的种间变异和较小的种内变异,在样本量较大的情况下,其物种鉴定成功率达到 81.6%,故 ITS 序列可用于竹类资源的物种鉴定研究.但研究表明这些核基因在竹子中均不是单拷贝^[13].Song 等^[14]经过分析发现,一些竹种的 ITS 序列出现假基因化,致使拷贝间的序列差异明显,影响了系统发育关系的正确构建.另外,杂种存在也是分类混乱不可忽视的一个原因,因为竹类植物具有其特殊的生理与生态特性^[12],在已探讨的竹类杂交亲和力和试验中,同属不同种的竹子间杂交亲和力较强,部分不同属但生态特性相似的竹子间杂交亲和力也较强^[15].竹类植物很少开花,由于其特殊的分布方式和繁殖方法,这些杂交竹种在外观上很难分辨,仅靠营养器官不足以对其进行准确地分辨,对于竹亚科这样一类经历了快速分化、序列分化水平程度低的类群,可能仍然需要结合大量核基因序列进行佐证^[16].研究证明,通过增加 DNA 序列的取样量可提高对类群关系的分辨力^[17].

基于 DNA 序列差异的分析被认为是最直接的阐明类群间系统关系的方法.但由于竹子过长的世代周期和快速的物种分化导致一些种属内序列分化程度不高,试验难以得到竹类植物族间、属间一致的演化关系和良好的拓扑支持率,值得进一步研究.

参考文献:

- [1] CLARK L G, LONDOÑO X, RUIZ-SANCHEZ E. Bamboo Taxonomy and Habitat [J]. Bamboo, 2015, 10(2): 1—30.
- [2] ZHOU M B, LU J J, HAO Z, et al. Distribution and Diversity of PIF-Like Transposable Elements in the Bambusoideae Subfamily [J]. Plant Science, 2010, 179(3): 257—266.
- [3] 胡成华, 汤敬杉. 倭竹族花序演化的探讨 [J]. 广西植物, 1991, 11(2): 141—145.
- [4] 丁雨龙. 刚竹属(*Phyllostachys*)系统分类的研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 1998.
- [5] 杨汉奇, 李德铎. 中国竹亚科空竹属的整理 [J]. 植物分类与资源学报, 2015, 37(5): 546—550.
- [6] 师玉华, 孙 伟, 方广宏, 等. 凉茶药材鸡蛋花及其混伪品的 DNA 条形码鉴定 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2199—2203.
- [7] LAHAYE R, BANK M V D, BOGARIN D, et al. From the Cover: DNA Barcoding the Floras of Biodiversity Hotspots [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(8): 2923—2928.
- [8] 任保青, 陈之瑞. 植物 DNA 条形码技术 [J]. 植物学报, 2010, 45 (1): 1—12.
- [9] 宁淑萍, 颜海飞, 郝 刚, 等. 植物 DNA 条形码研究进展 [J]. 生物多样性, 2008, 16(5): 417—425.
- [10] 张汉尧, 刘小珍, 龚秀会, 等. 竹子 DNA 提取方法的改良及 ITS-RFLP 分析的初步研究 [J]. 江西林业科技, 2006(3): 3—5.
- [11] YAO H, SONG J Y, MA X Y, et al. Identification of Dendrobium Species by a Candidate DNA Barcode Sequence: the Chloroplast psbA-trnH Intergenic Region [J]. Planta Medica, 2009, 75(6): 667—669.
- [12] 朱芳明, 杜建伟, 周国贤, 等. 基于 DNA 序列分析的刚竹属系统树构建 [J]. 西部林业科学, 2015(2): 63—68.
- [13] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods [J]. Molecular Biology & Evolution, 2011, 28(10): 2731—2739.
- [14] SONG H X, GAO S P, JIANG M Y, et al. The Evolution and Ribosomal ITS Sequences in Bambusinae and Related Species: Divergence, Pseudogenes, and Implications for Phylogeny [J]. Journal of Genetics, 2012, 91(2): 129—139.

- [15] 张光楚, 陈富枢. 竹类杂交育种的研究 [J]. 林业与环境科学, 1986(3): 1—5.
- [16] ZHANG Li-na, ZHANG Xian-zhi, ZHANG Yu-xiao, et al. Identification of Putative Orthologous Genes for the Phylogenetic Reconstruction of Temperate Woody Bamboos (Poaceae: Bambusoideae) [J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(5): 988—99.
- [17] MA P F, ZHANG Y X, ZENG C X, et al. Chloroplas Phylogenomic Analyses Resolve Deep-Level Relationships of an Intractable Bamboo Tribe Arundinarieae (Poaceae) [J]. Systematic Biology, 2014, 63(6): 933—950.

Molecular Identification of Bambusoideae Plants Based on ITS Sequences

WANG Miao-miao¹, WANG Xiao-shi², ZUO Long-ya¹, YU Jie^{1,3}

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Agricultural Commission of Liangping County, Chongqing 405200, China;

3. Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, Chongqing 400715, China

Abstract: Molecular identification was conducted of 76 species of 13 genera in Bambusoideae by nuclear internal transcribed spacer (ITS) sequence fragments. DNA was extracted from 62 bamboo species of 13 genera (*Neosinocalamus*, *Phyllostachys*, *Indocalamus*, *Sinobambusa*, *Pseudosasa*, *Pleioblastu*, *Sas*, *Bashani*, *Shibataea*, *Brachystachyum*, *Bambusa*, *Acidosasa* and *Oligostachyum*), and PCR amplification and bidirectional sequencing of the 62 ITS sequences were carried out. Then the 62 ITS sequences obtained were aligned with 14 ITS sequences from GenBank database by Clustal X, and MEGA program (version 6.06) was employed to estimate the intraspecific and interspecific genetic distances. NJ(Neighbor-Joining) trees were constructed based on K2P (Kimura-2-parameter) distance of the ITS sequences in order to evaluate the results. Results showed that the intraspecific genetic distance was much smaller than the interspecific genetic distance: the intraspecific genetic distance was 0—3.907, averaging 0.370; and the interspecific genetic distance was 0—4.394, averaging 2.287. In conclusion, ITS barcodes can be used to distinguish different species of Bambusoideae.

Key words: DNA barcoding; ITS; Bambusoideae; molecular identification

责任编辑 夏 娟

