

• 药材与资源 •

豆蔻属药用植物叶绿体基因组密码子偏性分析

马孟莉^{1,2}, 张 薇^{1,2}, 孟衡玲^{1,2}, 王田涛^{1,2}, 李春燕^{1,2}, 卢丙越^{1,2*}

1. 云南省高校滇南特色生物资源研究与利用重点实验室, 云南 蒙自 661199

2. 红河学院 生物科学与农学院, 云南 蒙自 661199

摘要: 目的 明确豆蔻属药用植物叶绿体基因组蛋白编码基因密码子使用模式及影响因素。方法 以草果 *Amomum tsao-ko*、阳春砂 *Amomum villosum*、白豆蔻 *Amomum kravanh* 和爪哇白豆蔻 *Amomum compactum* 叶绿体基因组 50 个共有蛋白编码基因为材料, 利用 CodonW 1.4.2 软件、CUSP 在线程序和 Excel 软件等分析基因密码子使用偏性参数和核苷酸组成。结果 4 个豆蔻属物种叶绿体基因组具有相似的密码子使用模式, 密码子第 3 位碱基 GC 含量为 37.22%~37.31%, 偏向使用 NNA 和 NNT 型密码子; 4 个物种的有效密码子数值 (ENC) 均在 35 以上, 表明豆蔻属叶绿体基因组密码子偏性较弱。综合中性分析、有效密码子数 (ENC-plot) 分析、奇偶偏好性 (PR2-plot) 分析和对应性分析的结果显示豆蔻属叶绿体基因组密码子偏性主要受选择影响, 同时突变等其它因素也对密码子的偏性产生一定的作用。在草果、阳春砂、白豆蔻和爪哇白豆蔻中分别确定了 18、16、16、18 个最优密码子, 其中共有最优密码子 13 个。结论 豆蔻属植物叶绿体基因组密码子第 3 位碱基偏向使用 A/T 结尾, 密码子偏性受选择影响最大, 同时还受到诸如突变等其它因素的影响。

关键词: 草果; 阳春砂; 白豆蔻; 爪哇白豆蔻; 叶绿体基因组; 密码子偏性; 最优密码子

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)12-3661-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.024

Codon bias analysis of chloroplast genome in medicinal plants of *Amomum* Roxb.MA Meng-li^{1,2}, ZHANG Wei^{1,2}, MENG Heng-ling^{1,2}, WANG Tian-tao^{1,2}, LI Chun-yan^{1,2}, LU Bing-yue^{1,2}

1. Key Laboratory of Biological Resources Research and Utilization in Southern Yunnan, Mengzi 661199, China

2. College of Biological and Agricultural Sciences, Honghe University, Mengzi 661199, China

Abstract: Objective To determine the codon usage patterns and influencing factors of chloroplast genomic protein coding genes in medicinal plants of *Amomum* Roxb. **Methods** A total of 50 common protein coding genes of chloroplast genomes of *Amomum tsao-ko*, *Amomum villosum*, *Amomum kravanh* and *Amomum compactum* were used as materials, and the codon usage bias parameters and nucleotide composition were analyzed by CodonW 1.4.2 software, CUSP online program and Excel software. **Results** The chloroplast genomes of four *Amomum* species had similar codon usage patterns, and the GC content of third codon positions was 37.22-37.31%, which preferred to use NNA and NNT codons. The ENC values of the four species were all above 35, indicating that the codon bias of the chloroplast genome of *Amomum* is weak. The results of neutrality plot, ENC-plot, PR2-bias plot and correspondence analysis showed that the codon bias of *Amomum* chloroplast genome was mainly affected by selection, while other factors such as mutation also had a certain effect on codon bias. 18, 16, 16 and 18 optimal codons were identified in *A. tsao-ko*, *A. villosum*, *A. kravanh* and *A. compactum*, respectively, of which 13 were common optimal codons. **Conclusion** The third base of chloroplast genome of *Amomum* tends to use A/T ending, and the codon bias is mostly affected by selection, as well as by other factors such as mutation.

Key words: *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire; *Amomum villosum* Lour.; *Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep.; *Amomum compactum* Soland ex Matan; chloroplast genome; codon usage bias; optimal codons

豆蔻属 *Amomum* Roxb. 是姜科第 2 大属, 全球 我国有 26 种, 其中包括 2 个变种, 主要分布在西藏、150 余种, 主要分布在亚洲和大洋洲的热带地区, 云南、贵州、广西、广东、福建等省区, 本属植物

收稿日期: 2020-09-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460380); 云南省地方本科高校基础研究联合专项资金面上项目 (202001BA070001-181); 红河学院中青年学术骨干培养项目 (2014GG0101); 红河学院重点学科开放基金项目 (2018ZDXK02)

作者简介: 马孟莉 (1985—), 女, 讲师, 主要从事药用植物资源研究。E-mail: mamlsky@126.com

*通信作者: 卢丙越 (1981—), 男, 副教授, 主要从事特色植物种质资源挖掘与利用方面研究。E-mail: lby202@126.com

大多可作药用或香料,有祛风止痛、健胃消食之功效^[1]。《中国药典》2015 年版收录的豆蔻属物种有草果 *Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire、阳春砂 *Amomum villosum* Lour.、绿壳砂 *Amomum villosum* Lour. var. *xanthioides* T.L.Wu et Senjen、海南砂仁 *Amomum longiligulare* T.L.Wu、白豆蔻 *Amomum kravanh* Pierre ex Gagnep.和爪哇白豆蔻 *Amomum compactum* Soland ex Maton, 其中阳春砂、绿壳砂和海南砂的干燥成熟果实做砂仁用,白豆蔻和爪哇白豆蔻干燥成熟果实做豆蔻使用^[2]。2020 年 2 月 4 日印发的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)》中,草果被用于新冠肺炎临床治疗初期和中期推荐的中药处方,而恢复期推荐中药处方中含有砂仁,说明豆蔻属药用植物在抗病毒治疗中也发挥着重要作用。

叶绿体是调节植物光合作用的主要细胞器,具有感知外界环境胁迫信号的能力^[3]。此外像氨基酸、蛋白质、脂类、萜类、酚类等多种物质与植物生命活动相关的代谢过程均需叶绿体的参与^[4],挥发油是豆蔻属植物重要的化学成分,其挥发油主要由单萜、倍半萜和二萜等萜类物质构成^[5]。随着高通量 DNA 测序技术的发展及叶绿体测序技术成熟,越来越多的药用植物已完成叶绿体基因组的组装,包括姜科的姜、蜂窝姜、艳山姜、益智、观音姜、黄花姜黄、山柰、紫花山柰等,其中姜科豆蔻属的爪哇白豆蔻、白豆蔻、草果、阳春砂、绿壳砂和海南砂也已完成测序(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>)。

DNA 携带的遗传信息在从 RNA 转移到蛋白质的过程中以三联子密码的形式传递,每种氨基酸至少对应 1 个密码子,最多对应 6 个密码子。编码相同氨基酸的密码子称为同义密码子,在蛋白质合成过程中,使用同义密码子的频率是不同的,把一个物种或一个基因倾向于使用一个或多个特定的同义密码子的现象称为密码子使用偏性(Codon usage bias, CUB)^[6],这一现象被认为是生物为适应环境而表现出的一种进化行为^[7]。已有研究表明,选择、突变和漂变是导致密码子偏性的主要原因^[8],而对于哪种因素起主导作用仍是研究的热点和争论的焦点。对生物密码子使用偏性的分析,有助于理解物种的分子进化和环境适应性,研究物种间的进化关系^[9],而且对研究基因表达也具有重要意义^[10],最近王茹茹等^[11]利用 α -法尼烯合酶基因在叶绿体中过表达的拟南芥转基因株系实现了萜类代谢挥发

物含量的增加,认为叶绿体是萜类代谢工程一个理想的亚细胞空间,这为通过基因工程手段提高豆蔻属药用植物精油含量、改良精油品质提供了一个新的思路。而目前未见关于豆蔻属叶绿体基因组密码子偏性研究的详细报道,本研究系统分析了豆蔻属 4 个药用植物草果、阳春砂、白豆蔻和爪哇白豆蔻的叶绿体基因组密码子使用模式和变异来源,结果可为豆蔻属药用植物叶绿体的深入研究和应用奠定基础。

1 材料

草果和阳春砂植株采自云南省红河哈尼族彝族自治州金平苗族瑶族傣族自治县金河镇大老塘村(22°73'99.86"N, 103°21'43.19"E),经云南省高校滇南特色生物资源研究与利用重点实验室张薇教授鉴定为姜科豆蔻属植物草果 *A. tsao-ko* Crevost et Lemaire 和阳春砂 *A. villosum* Lour.。草果和阳春砂叶绿体全基因组序列已上传至 GenBank, GenBank 收录号分别为 MK926774 和 MN931250,此外从 GenBank 数据库下载白豆蔻(收录号 NC_036935)和爪哇白豆蔻(MG000589)叶绿体基因组序列。草果、阳春砂、白豆蔻和爪哇白豆蔻叶绿体基因组大小分别为 163 648、164 069、162 766、163 553 bp,分别包括无重复蛋白质编码基因序列 79、79、80、80 条。为保证结果的准确性和可比性,筛选的各基因需满足以 ATG 为起始密码子,以 TAA、TAG、TGA 为终止密码子,并且编码区序列长度超过 300 bp 的条件,最终确定 50 条基因序列用于 CUB 分析。

2 方法

2.1 密码子偏好性分析

利用 CUSP 在线程序(<http://www.Bioinformatics.nl/emboss-explorer/>)计算各基因编码区总 GC 含量(GCall)以及密码子第 1 位(GC1)、第 2 位(GC2)、第 3 位(GC3)的 GC 含量。利用 CodonW1.4.2 软件计算有效密码子数(ENC)和同义密码子的相对使用频率(relative synonymous codon usage, RSCU),并进行对应性分析(correspondence analysis, COA)。通过 Microsoft Excel 和 IBM SPSS19.0 软件对分析数据进行整理和作图。

2.2 中性绘图分析

中性绘图分析是衡量密码子偏性影响因素的方法之一,同义密码子的突变通常发生在第 3 碱基,而第 1 或第 2 碱基的突变是非同义密码子的突变,

非同义密码子的突变率较低。在中性图中,以每个基因的 GC12(GC1 和 GC2 的平均值)为纵坐标(Y),GC3 为横坐标(X),每个点都被认为是一个独立的基因,如果所有的点都沿对角线分布,说明密码子 3 个位置的碱基没有明显差异,只受突变压力的影响;如果 GC12 和 GC3 变异的相关性很低,则表明自然选择是密码子使用模式的主要决定因素^[12]。

2.3 ENC-plot 分析

有效密码子数(ENC)反映的是密码子偏离随机选择的程度^[13],被广泛用于衡量密码子偏好性水平,ENC 值从 20(极偏好,每个氨基酸只使用一个密码子)到 61(无偏好,每个氨基酸均匀使用所有同义密码子),当 ENC 值 ≤ 35 时,认为密码子使用有非常显著的偏差。通过给定的 GC3 含量,可以计算出理论 ENC 值。

$$ENC = 2 + GC3 + 29 / [GC3^2 + (1 - GC3)^2]$$

以 GC3 为横坐标,ENC 为纵坐标,用 Microsoft Excel 绘制 ENC-plot 图。如果密码子使用偏性受到突变压力的很大影响,基因将位于标准曲线上或略低于标准曲线,相反,如果基因低于标准曲线,则受到选择和其他因素的影响较大。

2.4 PR2-plot 分析

PR2 偏倚分析(PR2-bias plot analysis)是为了避免由密码子第 3 位碱基 A/T 和 C/G 之间突变不平衡,仅对 4 种密码子编码的氨基酸进行密码子第 3 位上 4 种碱基组成情况的分析^[14]。本研究选择了包括编码亮氨酸(Leu)的 CTT、CTC、CTA、CTG,编码缬氨酸(Val)的 GTT、GTC、GTA、GTG,编码苏氨酸(Thr)的 TCT、TCC、TCA、TCG,编码脯氨酸(Pro)的 CCT、CCC、CCA、CCG,编码丝氨酸(Ser)的 ACT、ACC、ACA、ACG,编码丙氨酸(Ala)的 GCT、GCC、GCA、GCG,编码精氨酸(Arg)的 CGT、CGC、CGA、CGG 和编码甘氨酸(Gly)的 GGT、GGC、GGA、GGG 的 8 个氨基酸密码子用于 PR2 偏倚分析。分别以 A3/(A3+T3)为纵坐标,G3/(G3+C3)为横坐标制作散点图,通过各点偏离中心点(A=T, C=G)判断碱基偏移的程度和方向。

2.5 对应性分析

对应性分析(COA)从多维空间中提取最具影响的轴和方向,通过分析 COA 轴分离出的基因能识别影响密码子使用偏性的主要原因^[15]。利用 CodonW1.4.2 软件进行 COA 分析,根据相对同义密码子使用度(RSCU)值将所有基因绘制在 59 维的向

量空间中,产生了一系列可以用来表示豆蔻属植物叶绿体基因组密码子使用变异的正交轴,根据基因在多维空间中的同义密码子使用情况,来分析密码子使用变化的主要来源。

2.6 最优密码子分析

参照刘庆坡等^[16]的方法确定最优密码子。根据 ENC 值大小,将 4 个豆蔻属物种 50 个候选基因中 ENC 值最高(10%)和最低(10%)的作为高表达组(5 个)和低表达组(5 个),分别计算高表达组和低表达组的 RSCU,并计算高低组的 RSCU 差值($\Delta RSCU$),以 $\Delta RSCU$ 大于 0.08 的密码子作为高表达密码子;将高表达密码子与高频密码子($RSCU > 1$)取交集,所有的密码子作为最优密码子。

3 结果与分析

3.1 叶绿体基因的密码子偏好性分析

豆蔻属 4 个物种叶绿体基因组的 GC 含量见表 1。50 个基因整个编码区的 GC 含量(GCall)在 37.22%~37.31%,叶绿体基因组 3 个位点的 GC1、GC2 和 GC3 含量分别为 45.68%~45.93%、38.08%~38.24%和 27.72%~28.03%,其中 GC1>GC2>GC3,平均 GC 含量均小于 50%,表明 4 个物种叶绿体基因组倾向于使用 A/T 碱基和 A/T 结尾密码子。草果、阳春砂、白豆蔻和爪哇白豆蔻叶绿体基因组编码区的 ENC 值分别在 35.28(*rps18*)~55.08(*ndhC*)、35.27(*rps18*)~56.00(*ndhC*)、38.94(*rps18*)~56.08(*ndhC*)和 35.27(*rps18*)~56.08(*ndhC*),4 个物种 50 个基因 ENC 值均在 35 以上,表明豆蔻属物种叶绿体基因密码子偏性较弱。

4 个豆蔻属物种各基因的 GC1、GC2、GC3、GCall、ENC 和密码子数(codon counts, CC)相关性分析见表 2。GCall 与 GC1、GC2 和 GC3 呈极显著相关($P < 0.01$),GC1 和 GC2 之间也呈极显著相关,表明密码子第 1 位碱基和第 2 位碱基组成相似,但与第 3 位碱基组成存在显著差别;ENC 值与 GC3 相关性呈极显著水平,而与 GC1 和 GC2 相关性不显著,表明密码子第 3 位碱基的组成对密码子使用偏性有重要影响;4 个物种的 ENC 值与基因密码子数 CC 之间的相关系数为 0.199(草果)~0.211(爪哇白豆蔻),物种间差异较小,且相关性均未达到显著水平,表明 CC 对 ENC 的影响较弱,豆蔻属物种叶绿体基因长度对密码子使用偏性无干扰。

为了进一步分析密码子使用模式,利用 CodonW1.4.2 软件计算 4 个物种的 RSCU 值,结果

表明 4 个物种的 RSCU 值相近, RSCU>1 的密码子共有 30 个, 其中只有 1 个密码子 (TTG) 以 G 结尾, 其余 29 个密码子都以 A、T 结尾, 说明豆蔻属叶绿体基因组中 A 或 T 出现频率较高, 是该属叶绿

体基因组偏好的密码子。RSCU<1 的密码子中除 CTA 和 ATA 以 A 结尾外, 其余均以 C 或 G 结尾, 说明以 C、G 结尾的密码子出现频率比较低, 是非偏好密码子 (表 3)。

表 1 豆蔻属叶绿体基因组密码子不同位置的 GC 含量

Table 1 GC content of different positions of codon in chloroplast genome of *Amomum Roxb.*

基因	GC1/%				GC2/%				GC3/%				GC4/%				ENC/%			
	草果	阳春砂	白豆蔻	爪哇白豆蔻	草果	阳春砂	白豆蔻	爪哇白豆蔻	草果	阳春砂	白豆蔻	爪哇白豆蔻	草果	砂仁	白豆蔻	爪哇白豆蔻	草果	砂仁	白豆蔻	爪哇白豆蔻
<i>rps12</i>	52.42	52.42	52.42	52.42	46.77	46.77	46.77	46.77	22.58	22.58	22.58	22.58	40.59	40.59	40.59	40.59	41.91	41.91	41.91	41.91
<i>psbA</i>	49.15	49.15	48.87	48.87	43.50	43.50	43.50	43.50	32.20	31.92	31.92	31.92	41.62	41.53	41.43	41.43	44.70	44.62	44.71	44.71
<i>matK</i>	37.21	36.82	36.82	36.82	29.07	29.07	29.07	29.07	22.29	22.87	22.29	22.29	29.52	29.59	29.39	29.39	45.71	47.64	46.54	46.54
<i>atpA</i>	56.10	55.71	55.91	55.91	39.37	39.57	39.57	39.57	27.17	27.36	27.17	27.17	40.88	40.88	40.88	40.88	46.35	46.87	46.89	46.89
<i>atpF</i>	48.39	48.93	48.93	48.93	32.26	32.26	32.26	32.26	29.03	29.57	29.03	29.03	36.56	36.92	36.74	36.74	40.09	40.39	40.25	40.25
<i>atpI</i>	48.39	48.39	48.39	48.37	36.29	35.89	35.89	36.18	25.00	25.00	25.00	24.80	36.56	36.42	36.42	36.45	44.86	45.13	45.13	44.85
<i>rps2</i>	42.19	42.26	42.26	42.26	42.19	42.68	42.68	42.68	31.65	30.96	30.54	30.13	38.68	38.63	38.49	38.35	46.80	47.48	46.48	45.90
<i>rpoC2</i>	44.09	44.09	44.09	44.09	36.11	36.19	36.11	36.04	24.66	24.80	24.87	24.87	34.95	35.03	35.03	35.00	46.23	46.54	46.69	46.67
<i>rpoC1</i>	48.55	48.70	48.84	48.84	38.41	38.55	38.55	38.55	25.22	25.07	25.07	25.07	37.39	37.44	37.49	37.49	46.73	47.34	47.23	47.23
<i>rpoB</i>	48.79	48.88	48.88	48.88	38.27	38.45	38.27	38.27	26.63	26.72	26.91	26.91	37.90	38.02	38.02	38.02	46.31	46.65	46.67	46.67
<i>psbD</i>	52.83	52.26	52.26	52.26	43.22	43.22	43.22	43.22	28.53	28.25	28.25	28.25	41.53	41.24	41.24	41.24	42.97	41.52	41.52	41.52
<i>psbC</i>	53.59	53.38	53.38	53.38	46.20	46.41	46.41	46.41	32.91	32.70	31.86	31.86	44.23	44.16	43.88	43.88	45.47	45.03	44.76	44.76
<i>rps14</i>	39.60	40.59	40.59	40.59	45.55	45.55	45.55	45.55	29.70	30.69	30.69	30.69	38.28	38.94	38.94	38.94	43.66	44.72	44.72	44.72
<i>psaB</i>	48.44	48.44	48.57	48.57	43.13	43.13	42.99	42.99	29.12	29.80	29.80	29.80	40.23	40.45	40.45	40.45	45.65	46.64	46.49	46.49
<i>psaA</i>	52.06	52.06	52.33	52.33	43.01	43.01	43.01	43.01	31.03	31.96	31.96	31.96	42.03	42.34	42.43	42.43	47.98	48.70	48.85	48.85
<i>ycf3</i>	47.65	47.65	47.65	47.65	40.00	40.00	40.00	40.00	31.18	31.18	31.18	31.18	39.61	39.61	39.61	39.61	53.15	53.89	53.89	53.89
<i>rps4</i>	46.54	46.54	46.54	46.54	39.11	38.12	38.12	38.12	25.25	24.26	23.27	23.27	36.96	36.30	35.97	35.97	48.30	45.95	46.06	46.06
<i>ndhJ</i>	48.13	48.13	48.13	48.13	35.00	35.00	34.38	35.00	28.75	28.75	28.75	28.75	37.29	37.29	37.08	37.29	50.18	50.09	50.97	50.09
<i>ndhK</i>	41.83	41.83	41.83	41.83	40.64	40.64	40.64	40.64	26.30	26.30	26.69	26.30	36.25	36.25	36.39	36.25	48.85	48.04	48.41	48.08
<i>ndhC</i>	49.59	48.76	49.59	49.59	33.88	34.71	34.71	34.71	30.58	30.58	31.41	31.41	38.02	38.02	38.57	38.57	55.08	56.00	56.08	56.08
<i>atpE</i>	52.94	52.94	52.94	52.94	40.44	40.44	40.44	40.44	28.68	29.41	29.41	29.41	40.69	40.93	40.93	40.93	47.38	47.60	47.60	47.60
<i>atpB</i>	55.85	55.65	55.65	55.65	42.14	41.94	42.14	42.14	28.83	28.63	28.23	28.23	42.27	42.07	42.00	42.00	47.93	47.36	47.00	47.00
<i>rbcL</i>	56.35	56.56	56.56	56.56	43.03	42.62	42.62	42.62	29.30	29.10	28.89	28.89	42.90	42.76	42.69	42.69	48.27	47.38	47.79	47.38
<i>accD</i>	41.68	41.49	41.68	41.49	35.23	35.03	35.23	35.42	22.31	22.31	21.72	21.72	33.07	32.94	32.88	32.88	42.79	42.77	42.18	41.94
<i>ycf4</i>	44.87	44.87	44.87	44.87	41.62	41.62	41.62	41.62	33.51	34.05	34.05	34.05	40.00	40.18	40.18	40.18	48.43	50.50	50.50	50.50
<i>petA</i>	54.83	54.21	54.21	54.21	35.51	35.51	35.51	35.51	28.66	28.66	28.66	28.66	39.67	39.46	39.46	39.46	51.94	52.72	51.34	51.34
<i>rps18</i>	33.04	32.14	31.65	32.14	41.96	42.86	44.94	42.86	27.68	27.68	25.95	27.68	34.23	34.23	34.18	34.23	35.28	35.27	40.94	35.27
<i>rpl20</i>	34.97	35.66	35.66	35.66	41.96	41.26	41.26	41.26	28.67	30.77	30.07	30.07	35.20	35.90	35.66	35.66	52.02	49.24	54.00	54.00
<i>clpP</i>	54.37	52.91	53.88	53.88	37.86	37.86	37.86	37.86	32.52	33.01	33.01	32.52	41.59	41.26	41.59	41.42	54.18	54.69	54.12	53.51
<i>psbB</i>	53.83	54.03	54.03	54.03	46.37	46.37	46.37	46.37	29.86	29.27	29.67	29.47	43.35	43.22	43.35	43.29	45.76	45.18	45.39	45.38
<i>petB</i>	48.17	48.17	48.15	48.17	41.74	41.74	42.13	41.74	27.52	27.52	27.32	27.52	39.14	39.14	39.20	39.14	42.81	43.66	41.47	43.33
<i>petD</i>	50.31	50.31	48.57	48.57	38.51	38.51	39.43	39.43	26.71	28.57	29.14	29.14	38.51	39.13	39.05	39.05	48.69	49.32	45.26	45.26
<i>rpoA</i>	44.90	44.61	44.32	44.32	33.82	34.11	34.11	34.11	22.74	22.45	22.74	22.74	33.82	33.72	33.72	33.72	48.68	50.49	50.14	50.14
<i>rps11</i>	54.68	55.40	55.40	55.40	57.55	57.55	56.12	56.12	17.27	16.55	16.55	16.55	43.17	43.17	42.69	42.69	42.12	41.12	40.89	40.89
<i>rps8</i>	39.10	39.10	39.85	39.10	38.35	39.10	39.10	39.10	21.81	22.56	22.56	22.56	33.08	33.58	33.83	33.58	38.56	38.41	38.94	37.43
<i>rpl14</i>	53.66	53.66	53.66	53.66	36.59	36.59	36.59	36.59	26.02	26.83	26.02	26.02	38.75	39.02	38.75	38.75	40.70	40.93	40.70	40.70
<i>rpl16</i>	51.10	51.10	51.10	51.10	54.02	54.75	54.75	54.02	29.93	31.39	30.66	30.66	45.01	45.74	45.50	45.26	44.65	46.47	46.02	45.68
<i>rps3</i>	42.92	43.84	43.84	43.84	31.96	31.96	31.96	31.96	25.57	25.57	24.66	25.11	33.49	33.79	33.49	33.64	41.79	44.87	43.46	44.32
<i>rpl22</i>	34.62	34.62	34.62	34.62	34.62	33.85	33.08	33.85	19.23	17.69	18.46	18.46	29.49	28.72	28.72	28.97	45.02	36.55	43.35	42.93
<i>ndhB</i>	41.68	41.68	41.68	41.68	38.94	39.34	39.34	39.34	31.51	31.70	31.90	31.90	37.38	37.57	37.64	37.64	46.24	46.43	46.59	46.59
<i>rps7</i>	51.28	51.28	51.28	51.28	45.51	45.51	45.51	45.51	22.44	22.44	22.44	22.44	39.74	39.74	39.74	39.74	46.04	46.04	46.04	46.04
<i>ycf1</i>	38.37	37.95	37.81	37.52	27.94	27.97	28.83	28.77	24.40	24.95	26.84	26.79	30.24	30.29	31.16	31.02	46.22	46.60	47.86	47.63
<i>ndhF</i>	35.82	35.69	35.41	35.55	36.77	37.31	37.18	37.18	20.49	21.44	21.03	21.03	31.03	31.48	31.21	31.25	42.76	42.01	41.59	41.62
<i>ccsA</i>	29.27	30.37	30.68	30.68	38.11	39.26	38.65	38.65	26.52	26.38	26.07	26.07	31.30	32.00	31.80	31.80	46.78	45.46	44.19	44.19
<i>ndhE</i>	40.20	39.22	39.22	39.22	32.35	32.35	32.35	32.35	24.51	27.45	27.45	27.45	32.35	33.01	33.01	33.01	39.82	40.27	40.27	40.27
<i>ndhG</i>	40.68	40.68	40.68	40.68	35.59	35.59	35.59	35.59	22.03	22.03	22.60	22.03	32.77	32.77	32.96	32.77	45.40	45.40	45.75	45.40
<i>ndhI</i>	39.78	39.78	39.78	39.78	35.91	35.91	36.46	35.91	23.76	23.76	23.76	23.76	33.15	33.15	33.33	33.15	49.59	49.44	49.03	47.66
<i>ndhA</i>	44.41	44.11	43.84	43.84	39.51	40.00	40.00	40.00	22.62	22.19	22.19	22.19	35.51	35.43	35.34	35.34	42.68	42.30	42.28	42.28
<i>ndhH</i>	49.24	49.24	49.24	49.24	34.77	34.77	34.77	34.77	28.17	27.41	27.16	26.90	37.39	37.14	37.06	36.97	52.18	51.74	51.62	51.22
<i>ycf2</i>	41.54	42.01	41.86	41.89	34.28	34.08	34.36	34.12	36.82	36.32	36.77	36.19	37.55	37.47	37.66	37.66	52.63	53.18	52.85	53.20
合计	45.83	45.93	45.68	45.80	38.08	38.24	38.09	38.14	27.90	27.75	28.03	27.72	37.27	37.31	37.27	37.22	47.92	47.91	48.02	47.84

表2 各基因相关参数的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of each gene's related parameters

相关参数	物种	GC1	GC2	GC3	GCall	ENC
GC2	草果	0.403**				
	阳春砂	0.406**				
	白豆蔻	0.390**				
	爪哇白豆蔻	0.413**				
GC3	草果	0.271	0.117			
	阳春砂	0.240	0.107			
	白豆蔻	0.244	0.095			
	爪哇白豆蔻	0.232	0.098			
GCall	草果	0.844**	0.732**	0.542**		
	阳春砂	0.836**	0.736**	0.532**		
	白豆蔻	0.837**	0.723**	0.532**		
	爪哇白豆蔻	0.841**	0.730**	0.527**		
ENC	草果	0.207	-0.149	0.439**	0.194	
	阳春砂	0.268	-0.163	0.502**	0.248	
	白豆蔻	0.137	-0.184	0.517**	0.172	
	爪哇白豆蔻	0.202	-0.182	0.486**	0.202	
CC	草果	-0.056	-0.224	0.231	-0.059	0.199
	阳春砂	-0.040	-0.229	0.155	-0.076	0.204
	白豆蔻	-0.073	-0.240	0.228	-0.075	0.203
	爪哇白豆蔻	-0.059	-0.250	0.172	-0.084	0.211

** $P < 0.01$, 表示极显著相关** $P < 0.01$, indicates highly significant correlation

表3 豆蔻属叶绿体同义密码子的使用频率

Table 3 RSCU analysis of protein coding region in the chloroplast of *Amomum Roxb.*

氨基酸	密码子	草果	阳春砂	白豆蔻	爪哇白豆蔻	氨基酸	密码子	草果	阳春砂	白豆蔻	爪哇白豆蔻
Phe	TTT	1.34	1.34	1.33	1.34	Tyr	TAT	1.59	1.60	1.60	1.60
	TTC	0.66	0.66	0.67	0.66		TAC	0.41	0.40	0.40	0.40
Leu	TTA	2.01	2.06	2.02	2.07	TER	TAA	1.80	1.86	1.86	1.86
	TTG	1.26	1.26	1.26	1.25		TAG	0.60	0.54	0.54	0.60
	CTT	1.26	1.25	1.25	1.24	His	CAT	1.60	1.59	1.59	1.59
	CTC	0.35	0.36	0.37	0.35		CAC	0.40	0.41	0.41	0.41
	CTA	0.79	0.79	0.78	0.79	Gln	CAA	1.53	1.53	1.53	1.53
	CTG	0.31	0.30	0.32	0.31		CAG	0.47	0.47	0.47	0.47
Ile	ATT	1.52	1.52	1.52	1.52	Asn	AAT	1.57	1.57	1.57	1.57
	ATC	0.53	0.53	0.54	0.53		AAC	0.43	0.43	0.43	0.43
	ATA	0.96	0.95	0.95	0.95	Lys	AAA	1.49	1.50	1.50	1.52
Met	ATG	1.00	1.00	1.00	1.00		AAG	0.51	0.50	0.50	0.48
Val	GTT	1.47	1.47	1.47	1.47	Asp	GAT	1.62	1.64	1.64	1.63
	GTC	0.39	0.40	0.41	0.40		GAC	0.38	0.36	0.36	0.37
	GTA	1.58	1.58	1.57	1.58	Glu	GAA	1.52	1.52	1.52	1.53
	GTG	0.56	0.56	0.55	0.54		GAG	0.48	0.48	0.48	0.47
Ser	TCT	1.71	1.71	1.70	1.70	Cys	TGT	1.60	1.58	1.58	1.57
	TCC	0.96	0.97	0.98	0.98		TGC	0.40	0.42	0.42	0.43
	TCA	1.22	1.18	1.19	1.18	TER	TGA	0.60	0.60	0.60	0.54
	TCG	0.52	0.51	0.53	0.52		TGG	1.00	1.00	1.00	1.00
Pro	CCT	1.66	1.65	1.66	1.65	Arg	CGT	1.41	1.40	1.40	1.44
	CCC	0.77	0.76	0.75	0.76		CGC	0.33	0.34	0.34	0.33
	CCA	1.16	1.19	1.17	1.19		CGA	1.31	1.30	1.30	1.32
	CCG	0.41	0.41	0.42	0.41		CGG	0.38	0.40	0.40	0.38
Thr	ACT	1.64	1.64	1.64	1.65	Ser	AGT	1.30	1.30	1.30	1.34
	ACC	0.66	0.69	0.67	0.68		AGC	0.29	0.29	0.29	0.28
	ACA	1.27	1.24	1.25	1.24	Arg	AGA	1.96	1.94	1.94	1.92
	ACG	0.43	0.44	0.44	0.43		AGG	0.61	0.63	0.63	0.61
Ala	GCT	1.88	1.87	1.88	1.88	Gly	GGT	1.43	1.42	1.42	1.43
	GCC	0.58	0.57	0.56	0.57		GGC	0.33	0.34	0.34	0.34
	GCA	1.21	1.22	1.22	1.22		GGA	1.61	1.62	1.62	1.62
	GCG	0.33	0.33	0.34	0.33		GGG	0.63	0.62	0.62	0.61

3.2 中性绘图分析

豆蔻属叶绿体基因中性绘图见图 1。草果、阳春砂、白豆蔻和爪哇白豆蔻叶绿体基因组各基因的 GC3 分别为 17.27%~36.82%、16.55%~36.32%、16.55%~36.77%和 16.55%~36.19%，GC3 含量最低的基因为 *rps11* 基因，最高的为 *ycf2* 基因；GC12 的取值范围分别为草果（33.14%~56.12%）、阳春砂（32.95%~56.48%）、白豆蔻（32.95%~55.76%）和爪哇白豆蔻（32.95%~55.76%）。4 个物种的 GC12 与 GC3 的相关系数分别为 0.240（草果）、0.213（阳春砂）、0.211（白豆蔻）和 0.204（爪哇白豆蔻），相关性均未达到显著水平（ $P=0.05$ ），说明突变压

力对密码子使用偏倚的影响较小。此外，中性图斜率显示，4 个叶绿体基因组密码子使用模式的突变压力仅占 25.61%~31.04%，而自然选择占 68.96%~74.39%。这些结果表明自然选择在密码子使用模式中起着重要作用。

3.3 ENC-plot 绘图分析

4 个豆蔻属植物叶绿体基因组的 ENC 和 GC3 分布相似（图 2）。只有少数几个点位于曲线附近，偏性较弱，而大多数 ENC 值低于预期值的基因位于曲线下方，偏性较强，表明突变压力对叶绿体基因组密码子使用偏好性影响不大，更多地受到选择效应的影响，这也与中性分析的结果一致。

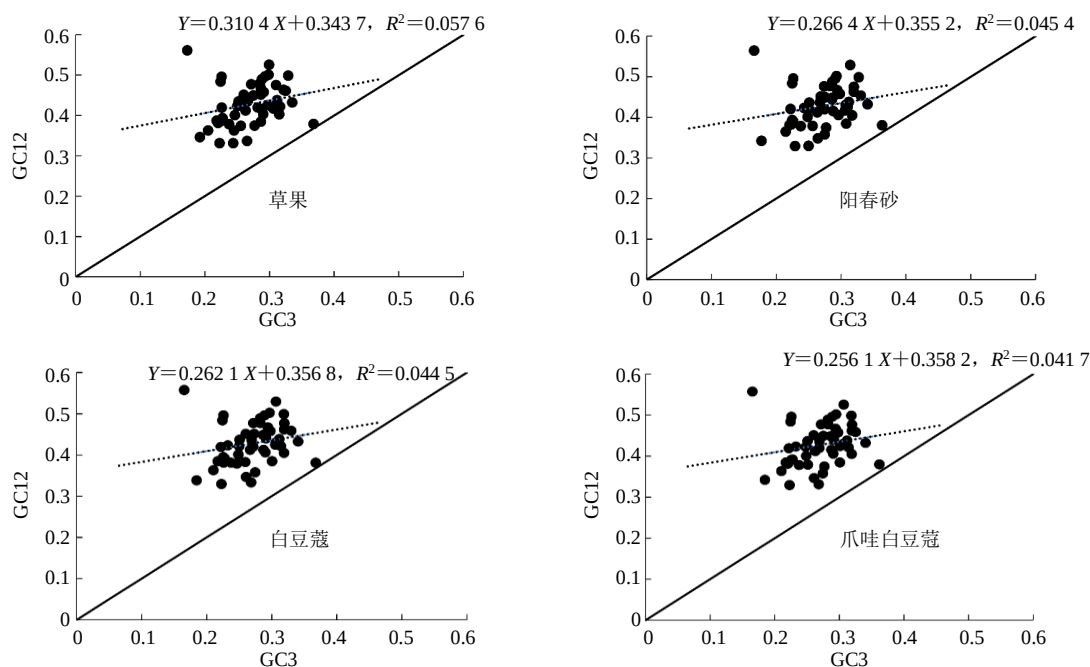


图 1 中性绘图分析

Fig. 1 Analysis of neutrality plot

3.4 PR2-plot 绘图分析

PR2-plot 分析表明，草果、阳春砂、白豆蔻和爪哇白豆蔻的 AT 偏向分别为 0.451、0.448、0.448 和 0.449，GC 偏向分别为 0.455、0.450、0.450 和 0.450。各编码基因不均匀地分布于平面图的 4 个区域内，平面图左下方基因分布较多（图 3），说明豆蔻属叶绿体基因密码子的第 3 位密码子存在 T/C 偏向，豆蔻属叶绿体基因组密码子使用模式不仅受到突变影响，同时还受到如选择压力等其他因素的影响。

3.5 对应性分析

基于 4 个物种的 50 个叶绿体基因的 RSCU 值

进行对应性分析（COA）（图 4），前 4 个轴累计解释的变异分别占总变异的 37.27%、36.46%、34.91% 和 36.40%，第 1 轴可解释的变异分别占总变异的 11.27%、11.07%、10.43% 和 10.80%；4 个物种第 2~4 轴可解释的变异分别为草果（10.54%、7.96% 和 6.09%）、阳春砂（9.58%、8.17% 和 7.64%）、白豆蔻（8.73%、8.28% 和 7.48%）和爪哇白豆蔻（9.84%、8.13% 和 7.63%），由于第 1 轴仅解释了豆蔻属植物 cp 基因组中密码子使用的部分变异，表明豆蔻属植物叶绿体的密码子使用变异来源并不单一，可能与几个主要因素有关。

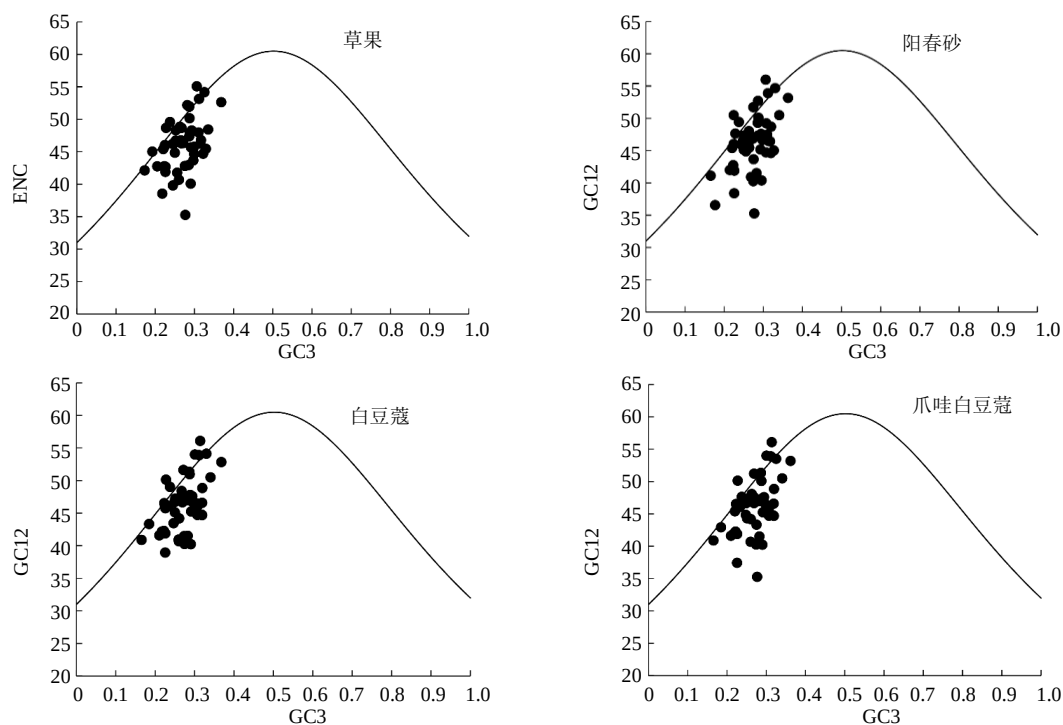


图 2 ENC-plot 分析
Fig. 2 Analysis of ENC-plot

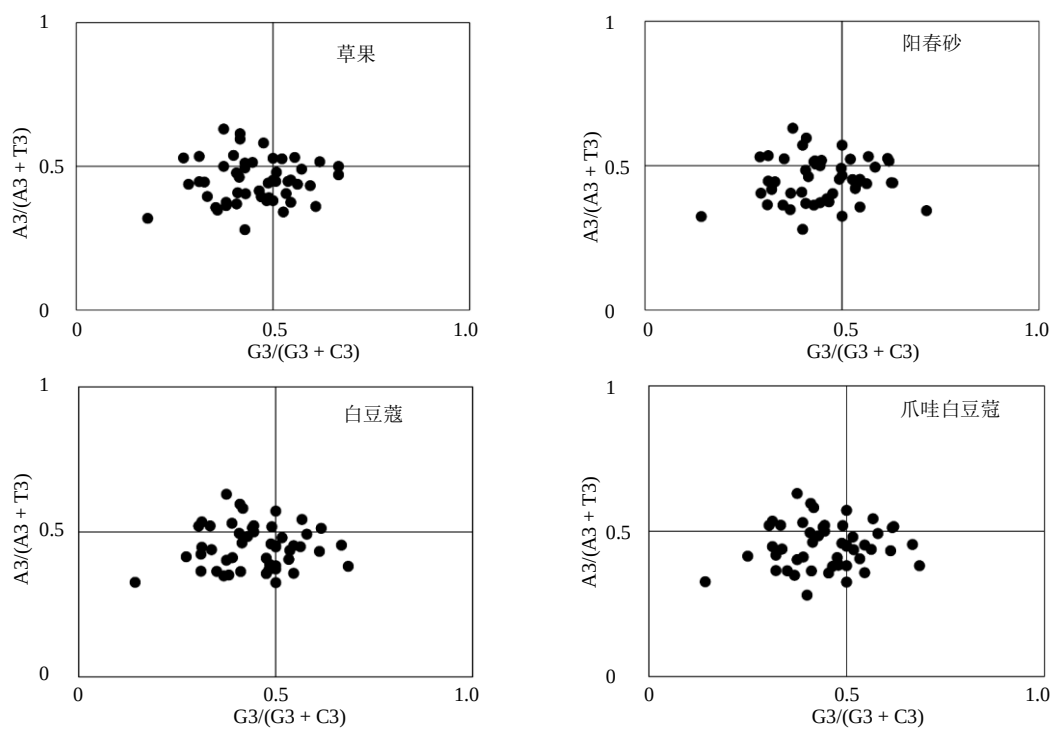


图 3 PR2-plot 分析
Fig. 3 Analysis of PR2-blot

3.6 最优密码子分析

根据高低库中密码子的 RSCU 值和 Δ RSCU 值来确定豆蔻属叶绿体的最优密码子 (表 4), 草果、

阳春砂、白豆蔻和爪哇白豆蔻分别确定了 18、16、16、18 个最优密码子。4 个物种共有的高频密码子有 13 个 (TTT、TTA、ATT、GTA、ACT、CAA、

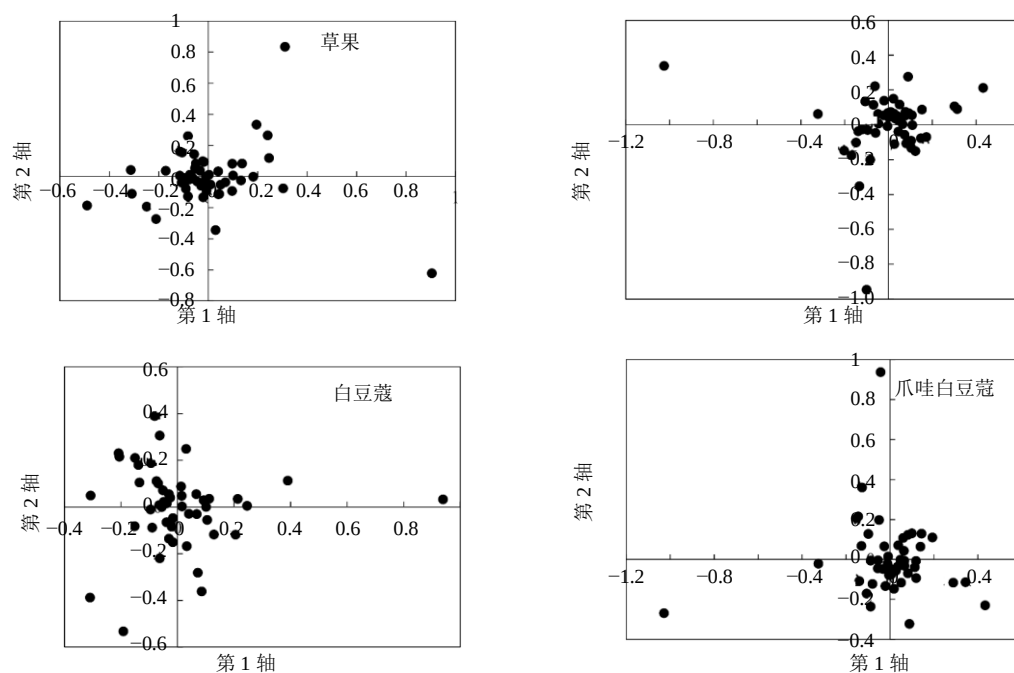


图4 基于RSCU的对应性分析

Fig. 4 Corresponding analysis based on RSCU

表4 豆蔻属叶绿体基因组最优密码子分析

Table 4 Putative optimal codons in the chloroplast genome of *Amomum* Roxb.

氨基酸	密码子	草果	阳春砂	白豆蔻	爪哇白豆蔻	氨基酸	密码子	草果	阳春砂	白豆蔻	爪哇白豆蔻
Phe	TTT	***	**	*	**	Tyr	TAT				
	TTC						TAC				
Leu	TTA	***	***	***	***	TER	TAA				
	TTG	**		*	*		TAG				
	CTT					His	CAT	*			
Ile	CTC						CAC				
	CTA					Gln	CAA	*	**	*	**
	CTG						CAG				
	ATT	**	**	**	**	Asn	AAT		*		*
	ATC						AAC				
Met	ATA					Lys	AAA	**	**	**	*
	ATG						AAG				
Val	GTT					Asp	GAT		*		
	GTC						GAC				
	GTA	*	*	***	**	Glu	GAA	*	**	**	*
Ser	GTG						GAG				
	TCT		*		*	Cys	TGT	*	***	***	***
	TCC						TGC				
	TCA					TER	TGA				
Pro	TCG						TGG				
	CCT					Arg	CGT	**	**	***	**
	CCC						CGC				
	CCA	**		***	*	Ser	CGA	***	***	***	***
Thr	CCG						CGG				
	ACT	***	***	***	***	Arg	AGT	***	***	***	***
	ACC						AGC				
	ACA					Gly	AGA				
Ala	ACG						AGG				
	GCT	*			*	Gly	GGT	**	**	***	***
	GCC						GGC				
	GCA						GGA	*		*	
	GCG						GGG				

*: $\Delta\text{RSCU} > 0.08$; **: $\Delta\text{RSCU} > 0.3$; ***: $\Delta\text{RSCU} > 0.5$

AAA、GAA、TGT、CGT、CGA、AGT、GGT), 在 13 个共有密码子中 Δ RSCU 均大于 0.5 的有 4 个, 分别为编码亮氨酸的 TTA、编码苏氨酸的 ACT、编码精氨酸的 CGA 和编码丝氨酸的 AGT。除 TTG 外, 所有的最优密码子均以 A/T 结尾。

4 讨论

密码子使用偏性是生物基因组进化的一个重要特征, 对研究分子进化和外源蛋白表达有重要意义^[17-18]。前人对真核生物和原核生物的密码子使用偏向进行了大量的研究, 发现密码子使用偏向与 GC 组成、tRNA 丰度、基因表达水平、基因长度等有关^[6]。密码子的使用模式与 GC 含量密切相关, 本研究中 4 个豆蔻属植物叶绿体基因组 3 个位点的 GC1 (45.68%~45.93%)、GC2 (38.08%~38.24%)、GC3 (27.72%~28.03%) 含量和总 GC (37.22%~37.31%) 含量均小于 50%, 说明 4 个叶绿体基因组倾向于使用 A/T 碱基和 A/T 结尾的密码子, 这与已报道的籽粒苋^[19]、糜子^[20]、刺榆^[21]、大戟科^[22]、茶树^[23]、茄科^[24]等植物叶绿体基因组研究结果一致, 也说明高等植物在叶绿体基因 GC 含量及密码子使用上具有相似性。

4 个豆蔻属物种的叶绿体基因组中均有 30 个密码子的 RSCU>1, 其中 29 个密码子以 A/T 结尾, 而 RSCU<1 的 32 个密码子中有 29 个密码子以 C/G 结尾, 这也与前人对叶绿体基因密码子偏性分析的结果相似^[25-26]。相比较而言, 核基因组中高频密码子的数量和密码子第 3 位碱基变化很大, 像双子叶植物大豆、拟南芥和番茄分别有 29、26 和 25 个高频密码子, 且绝大多数高频密码子以 A 或 T 结尾, 而像单子叶植物玉米、水稻和小麦分别有 28、27 和 25 个高频密码子, 大多以 G 或 C 结尾^[27]。本研究中 4 个豆蔻属植物叶绿体基因组 RSCU 值的变异范围相似, 分别为 0.29~2.01、0.29~2.06、0.29~2.02 和 0.28~2.07, 均以 TTA(编码亮氨酸)的 RSCU 值最高和 AGC(编码丝氨酸)最低, 表明在豆蔻属物种中 TTA 使用频率最高, 而 AGC 使用频率最低, 相似的密码子使用情况在菊科植物^[18]、陆地棉^[28]、沙枣^[29]、刺五加^[30]等物种中也存在, 而柿属植物编码 Arg 的 AGA 和 CGC 的 RSCU 值最高和最低^[31], 蒺藜苜蓿也以编码 Arg 的 AGA 的 RSCU 最高, 但 RSCU 最低的是编码 Arg 的 CGG^[32], 表明不同物种在氨基酸和密码子使用上存在差异。

中性绘图分析是通过密码子 3 个位点碱基组成

的相关性来判断影响密码子偏性原因的常用方法, 在随机突变或一定方向突变压力的情况下, 密码子 3 个位点的碱基含量应该相似, 当存在选择压力的情况下密码子 3 个位点的碱基组成会出现差异。本研究中 4 个豆蔻属物种 GC3 和 GC12 之间没有显著的相关性, 密码子第 3 位受到随机突变的影响较弱, 表明选择压力可能是影响豆蔻属叶绿体基因核苷酸组成的重要因素, ENC-plot 分析也证实了这一点, 4 个物种都只有少部分基因位于标准曲线上或附近, 更多的基因则落于标准曲线下方, 说明在豆蔻属叶绿体基因组中只有少部分基因的密码子偏性是由突变主导, 而更多的基因密码使用受选择作用主要影响。进一步的 PR2-plot 分析也证实了密码子第 3 位碱基的组成并非随机突变形, 大部分基因位于平面图的左下方(图 3), 而没有集中在中心点位置(随机突变情况下 A/T 和 G/C 所占比例相当), 其中个别基因偏离中心点很远, 表明除突变外, 其它因素(如选择)对豆蔻属叶绿体密码子使用模式影响较大, 此外对应性分析前 4 轴可解释总变异的 37.27%、36.46%、34.91%和 36.40%, 第 1 轴是主要的变异来源, 约占总变异量的 11%, 这也表明密码子的使用除受自然选择外, 还受到其它因素的影响。综合分析表明豆蔻属物种密码偏性受多种因素影响, 其中以选择压力为主。本研究在草果和爪哇白豆蔻中提取到 18 个最优密码子, 而阳春砂和白豆蔻都为 16 个, 其中共有最优密码子有 13 个。鉴于最优密码子与基因的表达水平有关, 在后续的豆蔻属物种基因工程研究, 可有针对性的改造外源基因密码子, 以提高基因的表达量, 来实现改良物种重要性状的目的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 110-135.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 167.
- [3] Lv R, Li Z H, Li M P, *et al.* Uncoupled expression of nuclear and plastid photosynthesis-associated genes contributes to cell death in a lesion mimic mutant [J]. *Plant Cell*, 2019, 31(1): 210-230.
- [4] 熊延, 刘翠敏, 王淑芳, 等. 叶绿体基因组与叶绿体基因表达的调节 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(3): 264-269.
- [5] 咸魁峰, 尹虹. 豆蔻属植物化学成分和药理作用研究

- 进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(10): 1831-1836.
- [6] 吴宪明, 吴松峰, 任大明, 等. 密码子偏性的分析方法及相关研究进展 [J]. 遗传, 2007, 29(4): 420-426.
- [7] Botzman M, Margalit H. Variation in global *Codon* usage bias among prokaryotic organisms is associated with their lifestyles [J]. *Genome Biol*, 2011, 12(10): R109.
- [8] 唐晓芬, 陈莉, 马玉韬. 密码子使用偏性量化方法研究综述 [J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(5): 660-666.
- [9] 武志娟, 钟金城. 密码子偏性及其应用 [J]. 生物学通报, 2012, 47(4): 9-11.
- [10] Quax T E, Claassens N J, Söll D, *et al.* *Codon* bias as a means to fine-tune gene expression [J]. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 149-161.
- [11] 王茹茹, 张婷婷, 刘宇, 等. 苹果 MdAFS 叶绿体定位表达对拟南芥萜类挥发物的影响 [J]. 园艺学报, 2018, 45(2): 217-228.
- [12] Sueoka N. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution [J]. *PNAS*, 1988, 85(8): 2653-2657.
- [13] Wright F. The 'effective number of codons' used in a gene [J]. *Gene*, 1990, 87(1): 23-29.
- [14] Sueoka N. Translation-coupled violation of Parity Rule 2 in human genes is not the cause of heterogeneity of the DNA G+C content of third *Codon* position [J]. *Gene*, 1999, 238(1): 53-58.
- [15] Grantham R, Gautier C, Gouy M, *et al.* *Codon* catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity [J]. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9(1): r43-r74.
- [16] 刘庆坡, 薛庆中. 粳稻叶绿体基因组的密码子用法 [J]. 作物学报, 2004, 30(12): 1220-1224.
- [17] Sharp P M, Matassi G. *Codon* usage and genome evolution [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1994, 4(6): 851-860.
- [18] Nie X J, Deng P C, Feng K W, *et al.* Comparative analysis of *Codon* usage patterns in chloroplast genomes of the Asteraceae family [J]. *Plant Mol Biol Report*, 2014, 32(4): 828-840.
- [19] 冯瑞云, 梅超, 王慧杰, 等. 籽粒苋叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. 中国草地学报, 2019, 41(4): 8-15.
- [20] 刘慧, 王梦醒, 岳文杰, 等. 糜子叶绿体基因组密码子使用偏性的分析 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(3): 362-371.
- [21] Liu H B, Lu Y Z, Lan B L, *et al.* *Codon* usage by chloroplast gene is bias in *Hemiptelea davidii* [J]. *J Genet*, 2020, 99: 8.
- [22] Wang Z J, Xu B B, Li B, *et al.* Comparative analysis of *Codon* usage patterns in chloroplast genomes of six *Euphorbiaceae* species [J]. *Peer J*, 2020, 8: e8251.
- [23] Yengkhom S, Uddin A, Chakraborty S. Deciphering *Codon* usage patterns and evolutionary forces in chloroplast genes of *Camellia sinensis* var. *assamica* and *Camellia sinensis* var. *sinensis* in comparison to *Camellia pubicosta* [J]. *J Integr Agric*, 2019, 18(12): 2771-2785.
- [24] Zhang R Z, Zhang L, Wang W, *et al.* Differences in *Codon* usage bias between photosynthesis-related genes and genetic system-related genes of chloroplast genomes in cultivated and wild *Solanum* species [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): E3142.
- [25] Zhou M, Long W, Li X. Patterns of synonymous *Codon* usage bias in chloroplast genomes of seed plants [J]. *For Stud China*, 2008, 10(4): 235-242.
- [26] Li G, Pan Z, Gao S, *et al.* Analysis of synonymous *Codon* usage of chloroplast genome in *Porphyra umbilicalis* [J]. *Genes Genomics*, 2019, 41(10): 1173-1181.
- [27] Wang L J, Roossinck M J. Comparative analysis of expressed sequences reveals a conserved pattern of optimal *Codon* usage in plants [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 61(4/5): 699-710.
- [28] 尚明照, 刘方, 华金平, 等. 陆地棉叶绿体基因组密码子使用偏性的分析 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(2): 245-253.
- [29] 王婧, 王天翼, 王罗云, 等. 沙枣叶绿体全基因组序列及其使用密码子偏性分析 [J]. 西北植物学报, 2019, 39(9): 1559-1572.
- [30] 邢朝斌, 曹蕾, 周秘, 等. 刺五加叶绿体基因组密码子的用法分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(5): 661-665.
- [31] 傅建敏, 索玉静, 刘慧敏, 等. 柿属植物叶绿体蛋白质编码基因密码子用法 [J]. 经济林研究, 2017, 35(2): 38-44.
- [32] 杨国锋, 苏昆龙, 赵怡然, 等. 蒺藜苜蓿叶绿体密码子偏好性分析 [J]. 草业学报, 2015, 24(12): 171-179.

[责任编辑 时圣明]