

刺柏属 4 种药用植物叶绿体基因组密码子偏好性分析

舒军霞¹, 杨 林¹, 周 涛¹, 沈莲文², 王大玮^{1*}

1. 西南林业大学 云南省高校林木遗传改良与繁育重点实验室, 云南 昆明 650224

2. 西南林业大学 西南山地森林资源保育与利用教育部重点实验室, 云南 昆明 650224

摘要: 目的 明确刺柏属圆柏 *Juniperus chinensis*、垂枝香柏 *J. pingii*、昆明柏 *J. gaussenii* 和铺地柏 *J. procumbens* 4 种药用植物叶绿体基因组密码子的使用偏好性及影响其密码子偏好性的因素。方法 利用 CodonW、CUSP、SPSS 等软件对 4 种刺柏属药用植物叶绿体基因组密码子偏好性进行分析。结果 4 种刺柏属药用植物叶绿体基因组密码子的 GC 含量在 35.8%~37.3%, 有效密码子数 (effective number of codon, ENC) 值在 47.10~47.79, 表明其密码子偏好性较弱。中性绘图、ENC-plot、PR2-plot 分析表明影响 4 种刺柏属药用植物叶绿体基因组密码子使用偏性的因素有选择和突变。同时利用相对同义密码子使用度 (relative synonymous codon usage, RSCU) 值和 ENC 值筛选出共 65 个最优密码子, 其中有 9 个密码子为 4 种刺柏属植物共有的最优密码子。结论 4 种刺柏属药用植物密码子偏好使用 A/T 结尾, 其密码子使用偏性主要受到自然选择的影响。通过对 4 种刺柏属植物叶绿体基因组密码子的使用偏性进行分析及外类群聚类分析验证, 揭示影响其密码子使用偏性的主要因素, 为后续刺柏属叶绿体基因组外源蛋白表达载体的构建及优化提供理论依据。

关键词: 刺柏属; 圆柏; 垂枝香柏; 昆明柏; 铺地柏; 密码子偏好性; 最优密码子; 自然选择

中图分类号: R286.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)23-7507-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.23.022

Analysis of codon bias in the chloroplast genome of four medicinal plants of *Juniperus*

SHU Jun-xia¹, YANG Lin¹, ZHOU Tao¹, SHEN Lian-wen², WANG Da-wei¹

1. Key Laboratory for Forest Genetic and Tree Improvement & Propagation in Universities of Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

2. Key Lab of Ministry of Education for Conservation and Utilization of Mountain Forest Resources in Southwest China, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: Objective To determine the codon usage preference of the chloroplast genome of four medicinal plants of *Juniperus* genus (*J. chinensis*, *J. pingii*, *J. gaussenii*, and *J. procumbens*) and the factors that affecting its codon preference. **Methods** CodonW, CUSP, SPSS and other software was used to analyze the codon preference of the chloroplast genome of four medicinal plants of *Juniperus*. **Results** The GC content of the chloroplast genome codons of the four medicinal plants of *Juniperus* was from 35.8% to 37.3%, and the effective number of codon (ENC) value was from 47.10 to 47.79, indicating that their codon preference was weak. Neutral plotting, ENC-plot, PR2-plot analysis showed that the factors affecting the codon usage bias of the chloroplast genome of the four medicinal plants of *Juniperus* species were selection and mutation. At the same time, the relative synonymous codon usage (RSCU) value and ENC value were used to filter out a total of 65 optimal codons, of which nine codons are the optimal codons shared by four species of *Juniperus*. **Conclusion** The codon preference of four species of *Juniperus* species uses A/T ending, and its codon usage bias is mainly affected by natural selection. This study analyzes the codon usage bias of the chloroplast genome of four species of *Juniperus* plants and verified it by cluster analysis of the outer group cluster analysis, revealing the main factors affecting the codon usage bias of *Juniperus* genus, and it is the foreign protein of the subsequent *Juniperus* chloroplast genome. The construction and optimization of expression vectors provide a theoretical basis.

Key words: *Juniperus* L.; *Juniperus chinensis* L.; *Juniperus pingii* W. C. Cheng ex Ferré; *Juniperus gaussenii* W. C. Cheng; *Juniperus procumbens* (Endlicher) Siebold ex Miquel; codon preference; optimal codon; natural selection

收稿日期: 2022-03-01

基金项目: 云南森林资源培育与利用协同创新中心开放基金项目 (201903611)

作者简介: 舒军霞 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为林木遗传育种。Tel: 18008713477 E-mail: shujunxia@swfu.edu.cn

*通信作者: 王大玮, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为林木遗传育种。Tel: 13888915161 E-mail: wangdawei@swfu.edu.cn

叶绿体基因组是高等植物细胞质基因组的组成成分之一,携带大量自我调节的编码基因。与核基因组相比具有序列长度适中、基因直系同源、进化速率适中等优势^[1-2]。这些优势可以用于揭示物种起源、进化、演变及比较基因组学等研究方向^[3-5]。随着高通量测序技术的发展,越来越多的植物叶绿体基因组得到了测序和组装。因此,叶绿体基因组已经广泛应用于植物系统发育研究、物种鉴定、叶绿体基因工程和遗传结构分析等方面的研究,为植株的多抗性转化、农作物代谢途径改造等方面奠定理论依据^[6-7]。

密码子是生物体内 mRNA (或 DNA) 上的 3 联体核苷酸残基序列,是遗传信息的序列单位,参与 mRNA 翻译成蛋白质的过程^[8]。密码子的使用偏好性是指某一物种或某一基因在蛋白质翻译过程中倾向于使用一种或几种特定的同义密码子的现象^[9]。目前对密码子偏好性的研究主要集中在分子进化、翻译调控等方面^[10-11]。研究表明,密码子偏好性可以通过改变蛋白质结构、核苷酸序列等方式影响外源基因的表达^[12-13]。因此,对密码子偏好性的分析可提供密码子偏好性优化策略,进而为利用基因工程技术改良植物重要性等研究奠定理论基础。

圆柏 *Juniperus chinensis* L.、垂枝香柏 *J. pingii* W. C. Cheng ex Ferré、昆明柏 *J. gaussonii* W. C. Cheng 和铺地柏 *J. procumbens* (Endlicher) Siebold ex Miquel 均属于柏科刺柏属植物,主要分布于热带及亚热带地区。刺柏属植物是具有药用、景观、生态价值的经济树种。刺柏属植物的枝叶中含有具抗炎、抑菌效果的总酚、总黄酮等化合物,是中医常用来止血、散肿毒的传统药物^[14-15];同时研究发现圆柏叶提取物制备的生物功能银纳米颗粒对肺癌细胞有抗转移和抗增殖的作用^[16]。此外,刺柏属植物还具有耐寒耐旱及改善土壤环境等特点,是我国西北干旱以及被重金属污染地区的主要栽培树种^[17-18]。刺柏属植物在多个领域都有开发利用价值,因此加强刺柏属叶绿体基因组的基础研究对其高效利用具有重要意义。本研究分析了 4 种刺柏属叶绿体基因组密码子使用模式并通过外类群聚类分析验证,确定了影响其密码子使用偏好性的因素以及最优密码子,为 4 种刺柏属植物叶绿体基因组后续进行异源基因表达载体设计和基因工程应用和研究提供理论依据。

1 材料

所用的植物样本采于云南省昆明市(102°10'E, 24°23'N, 平均海拔 1891 m)西南林业大学(圆柏、昆明柏、铺地柏,2020 年 7 月 3 日)和中国科学院昆明植物研究所(垂枝香柏,2020 年 7 月 11 日),所有样本均由西南林业大学刘江华副教授分别鉴定柏科刺柏属植物圆柏 *J. chinensis* L.、垂枝香柏 *J. pingii* W. C. Cheng ex Ferré、昆明柏 *J. gaussonii* W. C. Cheng 和铺地柏 *J. procumbens* (Endlicher) Siebold ex Miquel。样本送至安诺优达基因科技(北京)有限公司进行叶绿体基因组测序并将测序结果上传至 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),圆柏、昆明柏、垂枝香柏、铺地柏登录号分别为 MZ151419、MZ151420、MZ151421、MZ151422。

2 方法

2.1 数据处理方法

剔除 CDS 中基因长度小于 300 bp、重复和不完整的序列,选择起始密码子为 ATG、终止密码子为 TAA、TAG、TGA 的序列,对符合条件的 CDS 进行下一步的分析。以 4 种刺柏属植物筛选得到的 CDS 序列进行分析,使用 CodonW1.4.2、CUSP、SPSS26.0、Excel、CUSP (<http://imed.med.ucm.es/EMBOSS/>) 等软件进行数据分析以及图表绘制。

2.1.1 ENC-plot 绘图分析 以 GC₃ 为横坐标(X),有效密码子数(effective number of codon, ENC)值为纵坐标(Y),绘制散点图和 ENC 值的标准曲线图($ENC = 2 + GC_3 + 29/[GC_3^2 + (1 - GC_3)^2]$)。若基因落点位于标准曲线上或附近表明密码子偏好主要受突变影响,反之则主要受到选择影响。同时为了更准确地评估观察值(ENC_{obs})与期待值(ENC_{exp})之间的差异,根据公式 $(ENC_{exp} - ENC_{obs}) / ENC_{exp}$ 计算 ENC 的比值频数,并结合比值频数对差异进行量化分析。

2.1.2 PR₂-plot 分析 以 G₃/(G₃+C₃)为横坐标(X),以 A₃/(A₃+T₃)为纵坐标(Y),绘制散点图,图中心点位置表明碱基含量 A=T、G=C,即密码子不具有偏好性,其余点与中心点的矢量距离则代表其偏倚程度和方向。

2.1.3 中性绘图分析 以 GC₃ 为横坐标(X),GC₁₂(GC₁、GC₂的平均值)为纵坐标(Y),绘制散点图并做直线拟合分析。若直线斜率接近 1,表明密码子在碱基组成上无差异,则密码子偏好性主要决定因素为突变;若直线斜率接近 0,则更多地受到选择的影响。

基因	圆柏				ENC	基因	昆明柏				ENC	基因	垂枝香柏				ENC	基因	铺地柏				ENC
	GC ₁ %	GC ₂ %	GC ₃ %	GC _{all} %			GC ₁ %	GC ₂ %	GC ₃ %	GC _{all} %			GC ₁ %	GC ₂ %	GC ₃ %	GC _{all} %			GC ₁ %	GC ₂ %	GC ₃ %	GC _{all} %	
<i>ndhE</i>	45.54	33.66	21.78	33.66	52.41	<i>ndhE</i>	45.54	33.66	24.75	34.65	59.39	<i>ndhE</i>	45.54	33.66	24.75	34.65	59.39	<i>ndhE</i>	45.54	33.66	24.75	34.65	59.39
<i>rps14</i>	40.59	42.57	30.69	37.95	44.64	<i>rps14</i>	40.59	42.57	32.67	38.61	49.24	<i>rps14</i>	40.59	42.57	32.67	38.61	49.24	<i>rps14</i>	40.59	42.57	32.67	38.61	49.24
<i>rps114</i>	51.22	39.02	24.20	38.48	47.26	<i>rpl14</i>	52.03	39.02	25.20	38.75	47.63	<i>rpl14</i>	51.22	39.02	25.20	38.48	47.77	<i>rpl14</i>	52.03	39.02	25.20	38.57	47.63
<i>rpl22</i>	44.62	40.00	20.77	35.13	37.98	<i>rpl20</i>	41.03	41.88	26.50	36.47	49.95	<i>rps8</i>	39.85	40.60	23.31	34.59	41.48	<i>rps8</i>	39.85	40.60	23.31	34.59	41.48
<i>rps8</i>	39.85	40.60	23.31	34.59	41.69	<i>rps8</i>	39.85	40.60	23.31	34.59	41.48	<i>rps18</i>	26.43	42.86	16.43	28.57	32.89	<i>atpE</i>	55.88	38.97	25.00	39.95	42.26
<i>atpE</i>	55.15	38.24	25.74	39.71	42.50	<i>atpE</i>	55.88	38.97	25.00	39.95	42.26	<i>prl16</i>	47.52	51.06	25.53	41.37	44.55	<i>rpl16</i>	47.52	51.06	25.53	41.37	44.55
<i>rps18</i>	28.06	45.32	17.27	30.22	31.65	<i>rps18</i>	26.43	42.86	15.71	28.33	32.31	<i>rpl22</i>	42.96	42.25	21.13	35.45	40.92	<i>rpl22</i>	42.96	42.25	20.42	35.21	39.92
<i>rpl16</i>	47.52	51.06	25.53	41.37	44.55	<i>rpl16</i>	47.52	51.06	25.53	41.37	44.55	<i>rps7</i>	43.59	30.77	25.00	33.12	46.92	<i>rps18</i>	25.17	42.18	15.65	27.66	32.00
<i>ndhI</i>	44.72	36.02	27.33	36.02	50.28	<i>rpl22</i>	42.25	42.25	20.42	34.98	39.92	<i>ndhI</i>	44.72	36.02	28.57	36.44	50.99	<i>ndhI</i>	44.72	36.02	27.95	36.23	50.00
<i>ycf3</i>	50.00	38.24	31.76	40.00	54.38	<i>ndhI</i>	51.57	38.99	25.79	38.78	47.33	<i>ycf3</i>	50.00	38.82	30.59	39.80	55.36	<i>ycf3</i>	50.00	38.82	30.59	39.80	55.36
<i>ndhG</i>	42.86	35.71	20.88	33.15	39.73	<i>ndhI</i>	44.72	36.02	27.95	36.23	50.90	<i>ndhG</i>	42.86	35.16	21.98	33.33	40.09	<i>ndhG</i>	42.86	35.16	21.98	33.33	40.09
<i>atpF</i>	49.19	29.19	28.65	35.68	48.08	<i>ycf3</i>	50.00	38.82	30.59	39.80	55.36	<i>ycf4</i>	45.41	37.30	32.97	38.56	51.91	<i>ycf4</i>	44.86	37.30	32.97	38.38	51.91
<i>ycf4</i>	45.41	37.30	32.43	38.38	51.95	<i>ndhG</i>	42.86	35.16	21.43	33.15	40.05	<i>atpF</i>	48.39	30.11	29.57	36.02	51.22	<i>rps4</i>	45.67	37.21	25.48	34.46	48.53
<i>rps4</i>	45.19	31.21	23.56	33.63	46.48	<i>ycf4</i>	45.41	37.30	32.97	38.56	51.91	<i>rps4</i>	45.19	32.69	25.48	34.46	47.56	<i>rps3</i>	44.44	28.44	23.11	32.00	45.67
<i>rps3</i>	45.78	28.44	23.11	32.44	45.66	<i>rps4</i>	45.67	31.73	25.96	34.46	48.82	<i>rps3</i>	43.56	28.00	23.11	31.56	46.38	<i>atpI</i>	53.01	36.14	23.69	37.62	49.07
<i>rps2</i>	43.53	35.78	23.48	34.20	45.23	<i>petB</i>	46.79	39.45	34.40	40.21	44.52	<i>rps2</i>	42.67	35.78	24.57	34.34	46.42	<i>rps2</i>	42.02	35.41	24.51	33.98	43.73
<i>atpI</i>	53.01	36.14	22.89	37.35	47.97	<i>rps3</i>	44.44	28.44	23.56	32.15	45.79	<i>atpI</i>	53.04	36.44	23.48	37.65	48.41	<i>cemA</i>	39.69	30.92	30.15	33.59	43.59
<i>chlL</i>	50.17	37.11	25.09	37.46	52.27	<i>atpI</i>	53.01	36.14	23.29	37.48	48.41	<i>cemA</i>	39.69	31.30	30.15	33.72	44.56	<i>rpl2</i>	48.39	49.10	28.00	41.76	51.04
<i>clpP</i>	55.05	34.53	29.97	39.85	50.23	<i>rps2</i>	41.63	35.80	24.51	33.98	43.88	<i>rpl2</i>	33.54	41.87	38.62	38.01	59.01	<i>chlL</i>	50.17	37.11	24.85	37.11	51.32
<i>ccsA</i>	37.78	40.00	28.57	35.45	47.68	<i>cemA</i>	39.69	30.92	30.15	33.59	43.59	<i>chlL</i>	50.17	37.11	25.09	37.46	52.31	<i>clpP</i>	55.24	33.97	31.11	40.11	51.56
<i>petA</i>	52.17	34.16	23.29	36.54	46.09	<i>rpl2</i>	48.18	49.27	28.10	41.85	52.30	<i>ccsA</i>	38.34	40.89	29.07	36.10	47.31	<i>ccsA</i>	37.74	40.25	28.93	35.64	47.25
<i>rpoA</i>	42.39	33.43	24.78	33.53	51.01	<i>chlP</i>	50.17	37.11	23.71	37.00	51.15	<i>clpP</i>	55.24	33.97	30.16	39.79	51.77	<i>petA</i>	51.86	34.16	23.60	36.54	47.25
<i>psbA</i>	51.13	42.94	33.90	42.66	38.77	<i>clpP</i>	54.92	33.97	30.48	39.79	50.60	<i>petA</i>	52.48	34.16	23.29	36.65	45.32	<i>rpoA</i>	42.69	33.13	25.07	33.63	51.54
<i>rpoC1</i>	49.29	34.42	23.80	35.84	45.86	<i>ccsA</i>	37.74	40.25	29.25	35.74	47.62	<i>rpoA</i>	42.99	33.43	24.48	33.63	51.48	<i>psbA</i>	51.13	42.94	34.46	42.84	39.60
<i>psaB</i>	49.80	41.90	29.52	40.41	45.79	<i>petA</i>	51.86	34.16	23.60	36.54	45.62	<i>psbA</i>	43.16	42.94	34.18	42.75	39.56	<i>ndhA</i>	43.09	36.86	24.66	34.87	47.57
<i>psaA</i>	51.33	42.27	30.40	41.33	47.68	<i>rpoA</i>	42.69	33.13	25.07	33.63	51.54	<i>ndhA</i>	43.36	36.86	24.93	35.05	47.76	<i>ndhH</i>	48.22	35.53	28.17	37.31	46.70
<i>accD</i>	43.79	25.10	23.33	30.77	47.46	<i>psbA</i>	51.13	42.94	34.46	42.84	39.60	<i>ndhH</i>	48.22	35.53	27.66	37.14	46.55	<i>chlN</i>	51.09	39.52	24.67	38.43	47.55
<i>rpoB</i>	48.27	34.12	22.45	34.91	45.21	<i>ndhA</i>	43.36	36.86	24.93	35.05	47.76	<i>chlN</i>	50.07	39.30	24.89	38.36	47.39	<i>rbcl</i>	58.61	44.33	28.36	43.77	48.73
<i>rpoC2</i>	42.69	31.21	24.49	32.79	47.66	<i>ndhH</i>	48.22	35.53	28.17	37.31	46.70	<i>rbcl</i>	58.40	44.33	27.94	43.56	48.12	<i>atpB</i>	53.86	40.85	27.24	40.65	45.14
						<i>chlN</i>	44.09	34.28	35.70	38.02	47.87	<i>atpB</i>	53.86	40.85	27.03	40.58	45.00	<i>ndhD</i>	39.13	36.96	28.26	34.78	48.27
						<i>rbcl</i>	58.61	44.33	28.36	43.77	48.73	<i>matK</i>	38.25	33.47	27.69	33.13	48.02	<i>atpA</i>	55.12	37.80	23.03	38.65	44.21
						<i>atpB</i>	53.86	40.85	27.44	40.72	45.13	<i>ndhD</i>	38.86	36.69	28.60	34.71	48.88	<i>chlB</i>	51.38	36.81	21.65	36.61	43.46
						<i>ndhD</i>	39.13	36.96	28.66	34.91	48.46	<i>atpA</i>	55.51	37.80	23.23	38.85	44.43	<i>rpoC1</i>	48.73	34.70	24.50	35.98	46.02
						<i>atpA</i>	54.92	37.80	23.03	38.58	44.35	<i>chlB</i>	51.57	36.81	21.65	36.68	43.37	<i>psaB</i>	49.80	42.04	29.80	40.54	46.03
						<i>chlB</i>	51.18	36.81	21.46	36.48	43.36	<i>rpoC1</i>	48.73	34.56	24.36	35.88	45.80	<i>psaA</i>	51.60	42.13	29.87	41.20	47.57
						<i>rpoC1</i>	48.87	34.56	24.65	36.02	45.77	<i>psaB</i>	49.80	42.04	29.93	40.59	46.08	<i>rpoB</i>	48.50	34.24	22.25	35.00	44.59
						<i>pasB</i>	49.80	42.04	29.80	40.54	46.03	<i>psaA</i>	51.60	42.13	30.00	41.24	47.61	<i>ycf1</i>	43.00	32.28	33.07	36.12	51.62
						<i>ndhF</i>	38.29	38.29	28.82	35.14	48.57	<i>rpoB</i>	48.04	34.37	22.52	34.97	44.48						
						<i>psaA</i>	51.60	42.13	29.87	41.20	47.57												
						<i>accD</i>	44.90	26.30	26.08	32.43	49.77												
						<i>rpoB</i>	48.59	34.33	22.07	35.00	44.43												
						<i>rpoC2</i>	42.81	32.13	25.24	33.39	47.57												

表 3 4 种刺柏属叶绿体基因组密码子参数的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of codon parameters in chloroplast genome of four *Juniperus* species

物种	项目	GC ₁	GC ₂	GC ₃	GC _{all}	ENC
圆柏	GC ₂	-0.132				
	GC ₃	0.392*	0.201			
	GC _{all}	0.671**	0.556**	0.743**		
	ENC	0.423*	-0.396*	0.419*	0.198	
	密码子数 N	0.109	-0.281	0.016	-0.090	0.093
昆明柏	GC ₂	0.074				
	GC ₃	0.169	0.103			
	GC _{all}	0.735**	0.592**	0.577**		
	ENC	0.243	-0.186	0.391*	0.223	
	密码子数 N	0.117	-0.275	0.022	-0.056	0.002
垂枝香柏	GC ₂	0.025				
	GC ₃	0.037	0.163			
	GC _{all}	0.709**	0.574**	0.543**		
	ENC	0.140	-0.224	0.552**	0.230	
	密码子数 N	0.271	0.029	0.074	0.231	-0.053
铺地柏	GC ₂	0.092				
	GC ₃	0.221	0.087			
	GC _{all}	0.774**	0.568**	0.584**		
	ENC	0.302	-0.208	0.482**	0.288	
	密码子数 N	0.079	-0.200	0.256	0.059	0.110

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

GC₂、GC₃ 的相关性均达到极显著水平 (0.543~0.774); GC₃ 与 GC₁、GC₂ 的相关性不显著, 但与 GC_{all} (0.543~0.743) 和 ENC (0.391~0.552) 呈显著相关性, 说明密码子的第 3 位与第 1、2 位的碱基组成不同。

3.2 密码子偏好性影响因素分析

3.2.1 ENC-plot 分析 通过对叶绿体基因组中各基因的 ENC 值和 GC₃ 的关联分析, 然后根据各基因与标准曲线的距离来衡量影响密码子偏好性的主要因素。落点位于标准曲线上或附近表明密码子偏好性主要受突变影响, 反之则主要受到选择影响。

根据 ENC-plot 分析图 (图 1), 大部分落点位于标准曲线下方, 极少部分位于标准曲线下方较远位置。ENC 值在 31.65~59.39, 且绝大部分 ENC

值大于 45, 说明这 4 种刺柏属植物叶绿体基因组密码子偏好性均较弱。结合 ENC 比值频数分布表 (表 4) 发现, 4 种刺柏属叶绿体基因组分别有 14、16、17、14 个基因位于标准曲线附近, 分别有 15、22、25、23 个基因距标准曲线较远, 表明突变影响了密码子的使用模式。

3.2.2 PR2-plot 分析 以 $G_3/(G_3+C_3)$ 为横坐标, $A_3/(A_3+T_3)$ 为纵坐标进行 PR₂-plot 分析来研究叶绿体基因组密码子的第 3 位上 (A/T) 与 (C/G) 之间的关系。结果表明在 4 个区域内的点分布并不均匀 (图 2)。4 种刺柏属植物的点都集中在右半部分, 这说明碱基使用情况 $T>A$, $G>C$ 。结果表明 4 个刺柏属叶绿体基因组密码子在第 3 位上 A/T 的使用频率较高, 且密码子使用模式受到多种因素的影响。

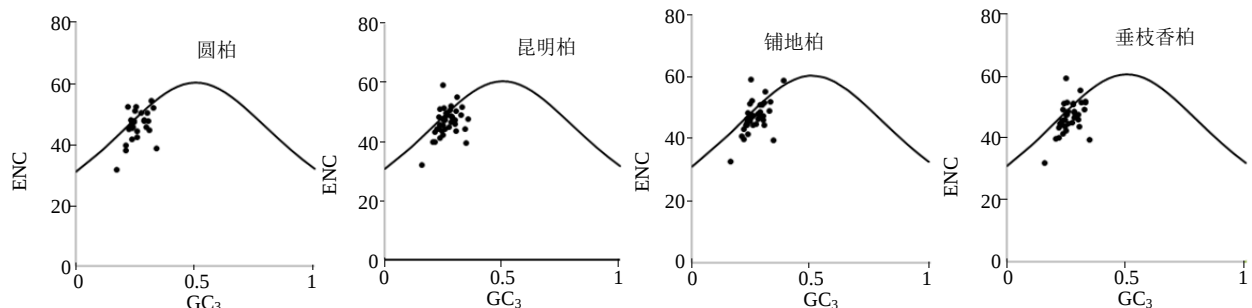


图 1 ENC-plot 分析图

Fig. 1 Analysis of ENC-plot

表 4 ENC 比值频率分布
Table 4 Frequency distribution of ENC ratio

组段	圆柏		昆明柏		垂枝香柏		铺地柏	
	频数	频率/%	频数	频率/%	频数	频率/%	频数	频率/%
(-0.25, -0.15)	0	0.00	1	0.02	1	0.03	1	0.03
(-0.15, -0.05)	3	0.10	3	0.07	3	0.08	3	0.08
(-0.05, 0.05)	14	0.48	16	0.38	17	0.45	14	0.38
(0.05, 0.15)	8	0.28	18	0.43	15	0.39	16	0.43
(0.15, 0.25)	2	0.07	3	0.07	1	0.03	2	0.05
(0.25, 0.35)	2	0.07	1	0.02	1	0.03	1	0.03
合计	29		38		42		37	

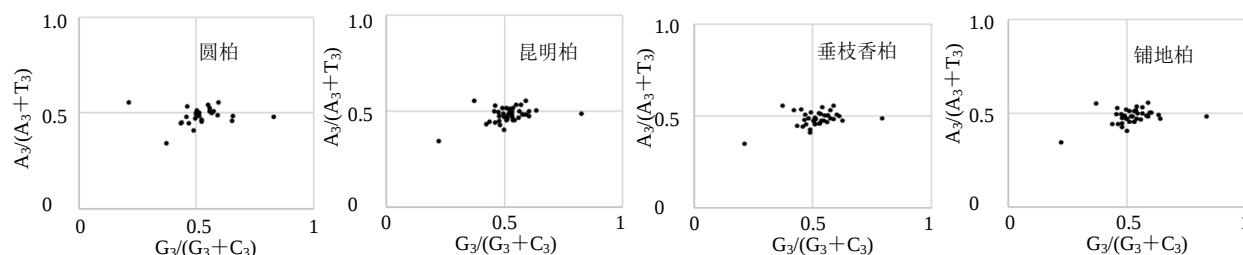


图 2 PR2-plot 分析
Fig. 2 Analysis of PR2-plot

3.2.3 中性绘图分析 本研究对 4 种刺柏属植物叶绿体基因组做中性绘图分析以进一步确定影响其密码子偏好性的因素。以 GC_3 为横坐标 (X), GC_{12} 为纵坐标 (Y) 绘制散点图。若基因落点沿对角线分布, 斜率接近 1, 则 3 个位置上的密码子碱基组成无明显差异, 密码子偏好性主要受突变影响, 反之

则为自然选择影响。

如图 3 所示, 4 个叶绿体基因组密码子的 GC_{12} 值在 0.33~0.52, GC_3 值在 0.15~0.39, 斜率在 0.010~0.049, 相关性不显著, 说明密码子 1、2 位碱基和第 3 位碱基的组成存在明显差异, 密码子的偏好性受自然选择影响较大, 这与 ENC-plot 分析结

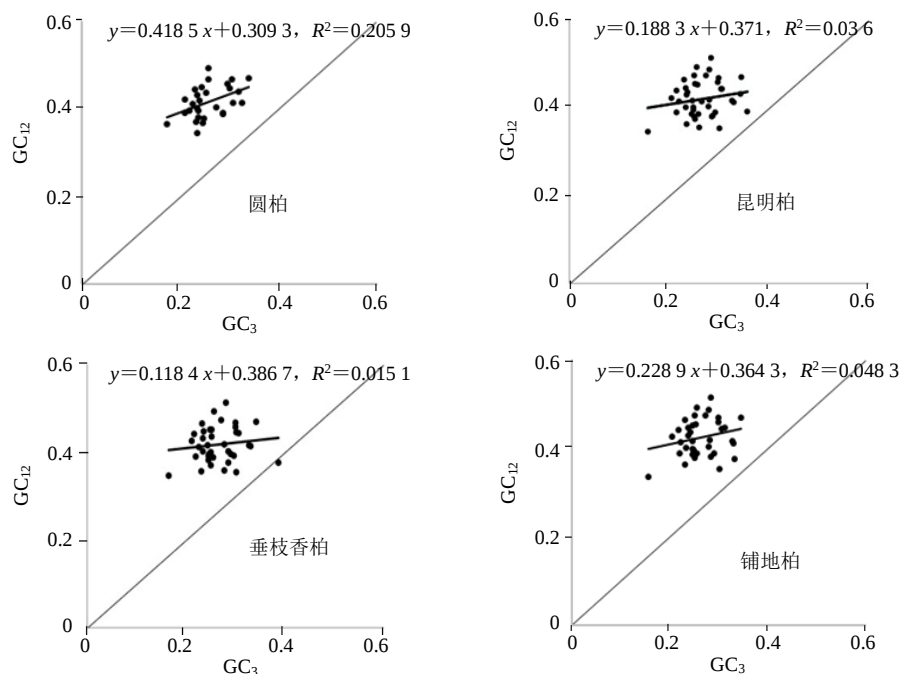


图 3 中性绘图分析
Fig. 3 Analysis of neutrality plot

果一致。

3.3 最优密码子确定

通过构建高表达、低表达基因库，分别计算 4

种刺柏属植物在这 2 个基因库中的 RSCU 和 Δ RSCU，见表 5。选取 RSCU>1 的密码子为高频密码子， Δ RSCU $\geq$ 0.08 的密码子为高表达密码子。

表 5 4 种刺柏属植物叶绿体基因组密码子 RSCU 值

Table 5 RSCU value of codons in chloroplast genome of four species of *Juniperus*

氨基酸密码子	圆柏			昆明柏			垂枝香柏			铺地柏			
	高表达 RSCU	低表达 RSCU	Δ RSCU	高表达 RSCU	低表达 RSCU	Δ RSCU	高表达 RSCU	低表达 RSCU	Δ RSCU	高表达 RSCU	低表达 RSCU	Δ RSCU	
Phe	UUU	1.23	1.52	-0.29	1.35	1.71	-0.37	1.13	1.61	-0.49	1.36	1.55	-0.20
	UUC	0.77	0.48	0.29	0.66	0.29	0.37	0.88	0.39	0.49	0.65	0.45	0.19
Leu	UUA	1.72	2.27	-0.55	1.65	1.85	-0.20	1.74	1.91	-0.17	1.81	1.75	0.05
	UUG	1.71	1.10	0.61	1.48	1.38	0.10	1.33	1.37	-0.04	1.51	1.31	0.20
	CUU	1.19	1.43	-0.25	0.99	1.33	-0.34	1.36	1.28	0.08	1.21	1.47	-0.26
	CUC	0.06	0.53	-0.47	0.11	0.41	-0.30	0	0.61	-0.61	0.22	0.51	-0.30
	CUA	1.04	0.67	0.38	1.53	0.51	1.02	1.23	0.61	0.62	0.90	0.57	0.33
	CUG	0.27	0	0.27	0.24	0.52	-0.29	0.35	0.35	0	0.36	0.39	-0.04
Ile	AUU	1.51	1.29	0.22	1.50	1.32	0.18	1.34	1.36	-0.02	1.35	1.22	0.14
	AUC	0.32	0.77	-0.45	0.59	0.67	-0.08	0.44	0.76	-0.32	0.42	0.79	-0.36
	AUA	1.16	0.94	0.22	0.92	1.01	-0.09	1.22	0.88	0.34	1.23	1.00	0.23
	AUG	1.00	1.00	0	1.00	1.00	0	1.00	1.00	0	1.00	1.00	0
Met	GUU	0.69	1.11	-0.42	1.27	1.26	0.01	1.09	1.03	0.06	0.94	1.34	-0.40
	GUC	0.27	0.07	0.20	0.25	0.32	-0.07	0.17	0.39	-0.22	0.27	0.38	-0.11
Val	GUA	2.74	1.66	1.08	2.28	1.49	0.79	2.50	1.63	0.88	2.37	1.30	1.08
	GUG	0.30	1.16	-0.86	0.21	0.94	-0.73	0.24	0.95	-0.72	0.43	0.99	-0.57
Ser	UCU	3.28	1.40	1.88	2.97	1.32	1.65	2.61	1.27	1.35	2.59	1.45	1.13
	UCC	0.55	0.87	-0.32	0.58	0.54	0.04	0.59	0.83	-0.24	0.62	0.65	-0.02
	UCA	0.50	1.66	-1.17	0.74	1.59	-0.85	1.34	1.28	0.06	1.17	1.21	-0.04
	UCG	0.16	0.44	-0.28	0.13	0.55	-0.42	0.13	0.76	-0.63	0.13	0.55	-0.42
Pro	CCU	2.41	0.71	1.70	1.48	0.84	0.64	1.93	0.82	1.11	1.76	0.90	0.86
	CCC	0.32	0.36	-0.04	0.81	0.96	-0.16	0.61	0.41	0.20	0.94	0.92	0.02
	CCA	1.27	0.90	0.37	1.62	0.79	0.83	1.47	1.09	0.38	1.30	0.74	0.56
	CCG	0	0.69	-0.69	0.10	0.42	-0.32	0	0.68	-0.68	0	0.44	-0.44
Thr	ACU	1.32	1.45	-0.13	1.20	1.68	-0.48	1.76	1.25	0.51	1.87	1.83	0.04
	ACC	0.77	0.28	0.49	0.44	0.71	-0.27	0.55	0.51	0.04	0.8	0.52	0.28
	ACA	1.24	1.90	-0.67	1.35	1.41	-0.06	1.02	1.81	-0.80	0.83	1.33	-0.50
	ACG	0.67	0.37	0.30	1.02	0.21	0.81	0.68	0.43	0.25	0.50	0.31	0.19
Ala	GCU	2.48	2.04	0.44	2.71	1.75	0.97	2.53	1.71	0.82	2.17	1.75	0.42
	GCC	0.28	0.35	-0.07	0.39	0.62	-0.22	0.35	0.53	-0.18	0.53	0.68	-0.15
	GCA	1.14	1.15	-0.01	0.82	1.17	-0.35	0.91	1.20	-0.29	1.00	1.01	-0.02
	GCG	0.10	0.46	-0.35	0.08	0.47	-0.39	0.22	0.56	-0.34	0.31	0.56	-0.25
Tyr	UAU	1.61	1.80	-0.19	2.10	1.75	0.35	1.53	1.69	-0.17	1.53	1.68	-0.16
	UAC	0.39	0.20	0.19	0.40	0.25	0.15	0.48	0.31	0.17	0.48	0.32	0.16
TER	UAA	3.00	2.00	1.00	1.50	0.75	0.75	1.50	1.89	-0.39	1.50	1.50	0
	UAG	0	0	0	0	0.75	-0.75	0	0.61	-0.61	0	0	0
His	CAU	1.57	1.78	-0.21	1.70	1.22	0.48	1.60	1.62	-0.02	1.20	1.26	-0.06
	CAC	0.40	0.22	0.18	0.30	0.28	0.02	0.40	0.38	0.02	0.30	0.24	0.06
Gln	CAA	1.37	1.46	-0.09	1.74	1.69	0.04	1.49	1.48	0	1.36	1.56	-0.20
	CAG	0.63	0.54	0.09	0.27	1.06	-0.79	0.52	0.52	-0.01	1.54	0.44	1.10
Asn	AAU	1.68	1.50	0.18	1.49	1.48	0.01	1.61	1.29	0.33	1.69	1.43	0.26
	AAC	0.32	0.50	-0.18	0.52	0.52	-0.01	0.24	0.72	-0.48	0.31	0.57	-0.26
Lys	AAA	1.71	1.16	0.55	1.71	1.29	0.42	1.73	1.18	0.55	1.55	1.15	0.40
	AAG	0.29	0.84	-0.55	0.29	0.71	-0.42	0.27	0.82	-0.55	0.45	0.85	-0.40
Asp	GAU	1.92	1.60	0.32	1.89	1.33	0.56	1.94	1.50	0.44	1.77	1.42	0.35
	GAC	0.08	0.40	-0.32	0.11	0.67	-0.56	0.06	0.51	-0.44	0.23	0.58	-0.35
Glu	GAA	1.03	1.56	-0.53	1.37	1.68	-0.31	1.24	1.56	-0.32	1.20	1.61	-0.41
	GAG	0.97	0.44	0.53	0.63	3.54	-2.91	0.76	0.44	0.32	0.80	0.39	0.41
Cys	UGU	0.44	1.92	-1.47	0.83	1.53	-0.70	0.90	1.65	-0.75	0.60	1.46	-0.86
	UGC	0.89	0.08	0.81	0.67	0.47	0.20	0.60	0.35	0.25	0.90	0.54	0.36
TER	UGA	0	1.00	-1.00	1.50	1.50	0	1.50	1.00	0.50	1.50	1.50	0
Trp	UGG	0.33	1.00	-0.67	0.75	1.00	-0.25	0.50	1.00	-0.50	0.50	1.00	-0.50
Arg	CGU	2.29	1.57	0.72	2.13	2.00	0.13	2.26	1.46	0.80	2.35	1.66	0.69
	CGC	0.22	0.18	0.04	0.38	0.30	0.08	0.22	0.21	0.01	0.52	0.45	0.07
	CGA	0.93	1.87	-0.94	1.35	1.37	-0.02	1.70	1.40	0.30	0.99	1.49	-0.51
	CGC	0.23	0.58	-0.35	0.45	0.41	0.04	0.23	0.55	-0.32	0.23	0.37	-0.15
Ser	AGU	0.98	1.34	-0.36	1.07	1.48	-0.41	0.81	1.46	-0.65	0.84	1.36	-0.52
	AGC	0.53	0.25	0.28	0.52	0.58	-0.06	0.52	0.40	0.11	0.66	0.54	0.12
Arg	AGA	1.95	1.30	0.66	1.30	1.47	-0.17	1.26	1.47	-0.21	1.49	1.47	0.03
	AGG	0.38	0.90	-0.52	0.39	0.45	-0.06	0.34	0.92	-0.59	0.43	0.59	-0.15
Gly	GCU	1.94	1.38	0.56	1.29	1.27	0.02	1.74	1.18	0.56	2.00	1.27	0.74
	GGC	0.25	0.10	0.15	0.33	0.37	-0.04	0.22	0.16	0.07	0.35	0.28	0.07
	GGA	1.54	1.02	0.52	2.02	1.41	0.61	1.83	1.46	0.37	1.56	1.46	0.10
	GGG	0.27	1.17	-0.90	0.37	0.96	-0.59	0.22	1.21	-0.99	0.10	1.00	-0.91

同时满足高频、高表达的密码子选为最优密码子。结果表明(表 6),这 4 个刺柏属叶绿体基因组中以 G 结尾的最优密码子只占极小部分,以 A 和 U 结尾的密码子占绝大部分,其中又以 U 结尾的密码子数最多。

3.4 外类群聚类分析

为验证本研究所得出的 4 种刺柏属叶绿体基因组密码子的使用偏性能否用于后续对密码子的研究,使用拟南芥(NC-000932.1)、香子含笑(MW470947)、杉木(KC427270.1)公开发表的叶绿体基因组数据筛选相同基因,计算密码子的 RSCU 值(表 7),根据 RSCU 值做聚类分析。结果表明(图 4),7 个物种可以分为 3 大类:拟南芥、香子含笑和针叶树种。其中铺地柏单独聚为 1 支,表明铺地柏与其他 3 种刺柏属植物密码子使用模式具有明显的差异。

4 讨论

通常密码子第 3 位碱基受到的自然选择压力较小,不会影响与氨基酸的对应关系,因此对研究密码子偏好性具有重要意义^[19]。对 4 种刺柏属植物叶绿体基因组进行相关性分析、中性绘图分析,结果

表 6 4 种刺柏属植物叶绿体基因组最优密码子
Table 6 Optimal codons in chloroplast genomes of four *Juniperus* species

氨基酸	密码子			
	圆柏	昆明柏	垂枝香柏	铺地柏
Leu	UUG*** CUA**	UUG* CUA***	CUU* CUA***	UUG*
Ile	AUU* AUA*	AUU*		AUU* AUA*
Val	GUA***	GUA***	AUA** GUA***	GUA***
Ser	UCU***	UCU***	UCU***	UCU***
Pro	CCU*** CCA**	CCU*** CCA***	CCU*** CCA**	CCU*** CCA**
Thr			ACU**	
Ala	GCU**	ACG*** GCU***	GCU***	GCU**
Tyr		UAU**		
TER	UAA***	UAA***		
His		CAU**		
Gln				CAG***
Asn	AAU*		AAU**	AAU*
Lys	AAA**	AAA**	AAA**	AAA**
Asp	GAU**	GAU**	GAU**	GAU**
TER			UGA**	
Arg	CGU***	CGU*	CGU*** CGA**	CGU***
Arg	AGA***			
Gly	GCU** GGA**	GGA***	GCU** GGA**	GCU*** GGA*
合计	17	16	17	15

*P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001

表 7 7 个物种叶绿体基因组密码子 RSCU 值

Table 7 RSCU values of codons in chloroplast genomes of seven species

氨基酸 密码子		RSCU 值						
		圆柏	昆明柏	垂枝香柏	铺地柏	拟南芥	香子含笑	杉木
Phe	UUU	1.542	1.520	1.522	1.515	1.823	1.263	1.524
	UUC	0.457	0.480	0.479	0.486	0.177	0.737	0.476
Leu	UUA	1.873	1.864	1.863	1.865	3.097	1.753	1.939
	UUG	1.190	1.162	1.181	1.163	0.697	1.377	1.128
	CUU	1.419	1.411	1.407	1.412	1.577	1.482	1.579
	CUC	0.315	0.330	0.335	0.330	0.190	0.418	0.326
	CUA	0.892	0.823	0.887	0.908	0.303	0.636	0.684
	CUG	0.311	0.321	0.327	0.322	0.137	0.333	0.344
Ile	AUU	1.448	1.387	1.383	1.390	1.583	1.414	1.400
	AUC	0.443	0.510	0.548	0.510	0.380	0.652	0.455
	AUA	1.064	1.100	1.033	1.099	1.043	0.934	1.144
Met	AUG	1.000	1.000	0.991	1.000	1.000	1.000	1.000
Val	GUU	1.361	1.331	1.340	1.332	1.133	1.680	1.112
	GUC	0.450	0.434	0.461	0.453	0.520	0.388	0.593
	GUA	1.653	1.713	1.720	1.694	0.507	1.324	1.581
	GUG	0.536	0.521	0.497	0.520	1.840	0.610	0.526
Ser	UCU	1.888	1.887	1.791	1.892	1.370	1.531	1.864
	UCC	0.773	0.826	0.748	0.826	0.717	1.007	0.631
	UCA	1.323	1.276	1.369	1.274	1.260	1.204	1.208
	UCG	0.343	0.388	0.461	0.388	0.737	0.669	0.530
Pro	CCU	1.739	1.756	1.866	1.743	1.717	1.391	1.826
	CCC	0.637	0.603	0.600	0.616	0.637	0.948	0.644
	CCA	1.002	1.049	1.017	1.049	1.193	1.250	1.192
	CCG	0.449	0.417	0.343	0.373	0.453	0.377	0.338
Thr	ACU	1.728	1.755	1.662	1.760	2.427	1.405	1.754
	ACC	0.568	0.567	0.576	0.569	0.570	0.895	0.594
	ACA	1.252	1.145	1.218	1.139	0.623	1.320	1.149
	ACG	0.495	0.530	0.543	0.532	0.380	0.380	0.503
Ala	GCU	1.892	1.909	1.913	1.897	2.673	1.850	1.888
	GCC	0.444	0.438	0.440	0.448	0.223	0.541	0.541
	GCA	1.258	1.258	1.195	1.269	0.853	1.268	1.289
	GCG	0.405	0.395	0.495	0.385	0.250	0.342	0.283
Tyr	UAU	1.628	1.610	1.607	1.607	1.843	1.786	1.569
	UAC	0.372	0.390	0.393	0.393	0.157	0.240	0.431

续表 7

氨基酸	密码子	RSCU 值						
		圆柏	昆明柏	垂枝香柏	铺地柏	拟南芥	香子含笑	杉木
TER	UAA	2.087	1.826	1.826	1.957	1.000	1.714	1.688
	UAG	0.522	0.652	0.522	0.522	2.000	0.429	0.750
His	CAU	1.522	1.552	1.525	1.549	0.903	1.515	1.505
	CAC	0.391	0.361	0.388	0.364	0.430	0.390	0.370
Gln	CAA	1.544	1.552	1.546	1.553	1.410	1.444	1.462
	CAG	0.456	0.448	0.455	0.448	0.590	0.556	0.538
Asn	AAU	1.503	1.515	1.512	1.523	1.673	1.413	1.569
	AAC	0.540	0.485	0.488	0.477	0.327	0.587	0.431
Lys	AAA	1.523	1.510	1.524	1.466	1.597	1.431	1.519
	AAG	0.433	0.494	0.476	0.490	0.403	0.473	0.481
Asp	GAU	1.522	1.517	1.522	1.520	1.833	2.346	1.423
	GAC	0.526	0.483	0.478	0.480	0.167	0.607	0.578
Glu	GAA	1.588	1.517	1.527	1.517	1.353	1.445	1.523
	GAG	0.499	0.483	0.473	0.483	0.647	0.608	0.477
Cys	UGU	1.269	1.265	1.270	1.265	0.333	1.421	1.748
	UGC	0.574	0.561	0.557	0.561	1.000	0.484	0.564
TER	UGA	0.417	0.522	0.522	0.522	0.000	0.857	0.563
Trp	UGG	0.783	0.826	0.826	0.826	0.667	0.857	0.867
Arg	CGU	1.693	1.630	1.659	2.527	1.470	1.384	1.553
	CGC	0.343	0.355	0.353	0.352	0.557	0.233	0.319
	CGA	1.313	1.257	1.272	1.262	1.047	1.560	1.260
	CGC	0.259	0.318	0.320	0.316	0.117	0.503	0.453
Ser	AGU	1.302	1.193	1.245	1.191	1.810	1.067	1.281
	AGC	0.370	0.430	0.369	0.430	0.107	0.529	0.488
Arg	AGA	1.783	1.862	1.867	1.886	1.477	1.734	1.995
	AGG	0.541	0.533	0.530	0.528	1.327	0.589	0.420
Gly	GCU	1.333	1.352	1.353	1.352	1.020	1.245	1.373
	GGC	0.277	0.278	0.280	0.278	0.357	0.374	0.269
	GGA	1.817	1.826	1.828	1.823	1.697	1.716	1.929
	GGG	0.573	0.543	0.537	0.545	0.923	0.709	0.429

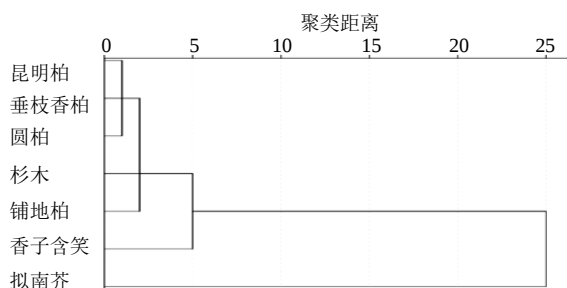


图 4 外类群聚类分析图

Fig. 4 Outer group cluster analysis graph

显示 GC_3 和 GC_1 、 GC_2 相关性不显著, 且 $GC_3 < GC_1$ 、 GC_2 , 表明密码子 GC_3 与 GC_1 、 GC_2 有差异, 且密码子偏向以 A/G 碱基结尾, 这与巴山松^[20]、臭柏^[21]等大部分裸子植物叶绿体基因组密码子偏好性的研究结论相似, 表明亲缘关系近的高等植物密码子偏好使用模式具有一定的相似性。

影响密码子偏好性形成的因素有很多, 这其中最主要的因素是自然选择和突变^[22]。根据 ENC-plot 分析、PR₂-plot 分析的结果显示 4 种刺柏属植物叶绿体基因组密码子的使用频率 $T > A$ 、 $G > C$, 说明影响密码子偏好性形成的主要因素是自然选择, 这与

马尾松^[23]、思茅松^[24]等针叶树种的结论一致; 但与杜梨^[25]、银白杨^[26]等主要受到突变影响以及巨桉^[27]、芒果^[28]等受突变和自然选择的影响相对均衡的结论不一致, 推测可能存在多种因素影响植物密码子偏好性, 不同物种间影响密码子偏好性的主要因素也有所不同^[29]。

利用与外类群叶绿体基因组密码子的 RSCU 值进行聚类分析来对 4 种刺柏属植物叶绿体基因组密码子的使用偏性结果进行群体验证。结果显示, 4 种刺柏属植物中铺地柏单独聚为 1 支; 昆明柏、圆柏、垂枝香柏聚为另外 1 支。铺地柏原产于日本, 为匍匐灌木; 垂枝香柏和昆明柏是中国特有种, 为乔木或小乔木; 圆柏虽分布广泛, 但属于乔木^[30]。研究结果与 4 种刺柏属植物的地理分布及形态学特征一致, 证明本研究中 4 种刺柏属植物的密码子偏好性分析的结果可用于后续对异源基因表达载体的设计和基因工程的应用和研究中。

本研究在 4 种刺柏属植物叶绿体基因组密码子中筛选出共 65 个最优密码子, 确定了 GUA、UCU、CCU、CCA、GCU、AAA、GAU、CGU、GGA 等 9 个密码子为 4 种刺柏属叶绿体基因组共有最优密

码子,大部分最优密码子以 A 或 U 结尾,尤其以 U 结尾,这与杉木^[31]、云南蓝果树^[32]、梧桐^[33]等高等植物研究结果类似,说明高等植物叶绿体基因组的进化相对保守。

本研究对 4 个刺柏属叶绿体基因组密码子的特征及偏性进行了分析和验证,找出最优密码子,对制定密码子优化策略来提高异源蛋白在刺柏属植物中的表达量从而改良刺柏属植物重要性状奠定坚实基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张悦. 红豆杉科叶绿体基因组结构多样化研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- [2] 任婷. 十种报春花属植物的叶绿体基因组研究 [D]. 西安: 西北大学, 2018.
- [3] Li S F, Su T, Cheng G Q, et al. Chromosome evolution in connection with repetitive sequences and epigenetics in plants [J]. *Genes (Basel)*, 2017, 8(10): E290.
- [4] 姜汶君, 郭梦月, 庞晓慧. 叶绿体基因组在药用植物鉴定及系统进化研究中的应用 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(5): 702-708.
- [5] 丁彦强, 方扬, 靳艳玲, 等. 基于叶绿体基因组的浮萍亚科系统进化 [J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(2): 215-219.
- [6] 李泳潭, 张军, 黄亚丽, 等. 杜梨叶绿体基因组分析 [J]. *园艺学报*, 2020, 47(6): 1021-1032.
- [7] 母连胜, 何勇, 田志宏. 植物叶绿体遗传转化技术及应用研究进展 [J]. *长江大学学报: 自科版*, 2017, 14(14): 52-57.
- [8] 周承哲, 朱晨, 李小桢, 等. 茶树密码子使用偏性分析方法及其研究进展 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(5): 1480-1488.
- [9] 马孟莉, 张薇, 孟衡玲, 等. 豆蔻属药用植物叶绿体基因组密码子偏性分析 [J]. *中草药*, 2021, 52(12): 3661-3670.
- [10] Yu C H, Dang Y K, Zhou Z P, et al. Codon usage influences the local rate of translation elongation to regulate co-translational protein folding [J]. *Mol Cell*, 2015, 59(5): 744-754.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 杨云彭, 马晓焉, 霍毅欣. 密码子优化策略在异源蛋白表达中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2019, 35(12): 2227-2237.
- [14] 符文豪. 刺柏木材中抗炎活性成分的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2019.
- [15] 赵俊淇. 柏木、圆柏的精油提取及其抑菌性研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.
- [16] Noorbazargan H, Amintehrani S, Dolatabadi A, et al. Anti-cancer & anti-metastasis properties of bioorganic-capped silver nanoparticles fabricated from *Juniperus chinensis* extract against lung cancer cells [J]. *AMB Express*, 2021, 11(1): 61.
- [17] 张翼, 来静. 内蒙古中西部地区圆柏移植季节分析与选择 [J]. *农业与技术*, 2021, 41(5): 109-111.
- [18] 施辰阳, 沙旭明, 马丹丹, 等. 基于外源硅处理下刺柏对重金属镉污染土壤的修复治理研究 [J]. *杭州师范大学学报: 自然科学版*, 2019, 18(1): 46-52.
- [19] 王晓双, 杨芳, 罗茜, 等. 石斛属叶绿体基因组密码子使用偏性及系统发育分析[J/OL]. *分子植物育种*, 2022, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210303.1340.012.html>.
- [20] 徐贝. 巴山松及其近缘种的叶绿体基因组比较分析 [D]. 西安: 西北大学, 2021.
- [21] 路东晔, 张磊, 郝蕾, 等. 臭柏叶绿体基因组结构与系统进化分析 [J]. *西北植物学报*, 2018, 38(8): 1464-1475.
- [22] Rao Y S, Wu G Z, Wang Z F, et al. Mutation bias is the driving force of Codon usage in the *Gallus gallus* genome [J]. *DNA Res*, 2011, 18(6): 499-512.
- [23] 叶友菊, 倪州献, 白天道, 等. 马尾松叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(10): 4464-4471.
- [24] 原晓龙, 陈伟, 王毅, 等. 思茅松叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2021, 40(3): 1278-1283.
- [25] 辛雅萱, 董章宏, 瞿绍宏, 等. 杜梨叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. *河北农业大学学报*, 2020, 43(6): 51-59.
- [26] Zhou M, Long W, Li X. Analysis of synonymous Codon usage in chloroplast genome of *Populus alba* [J]. *J For Res*, 2008, 19(4): 293-297.
- [27] 王鹏良, 吴双成, 杨利平, 等. 巨桉叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. *广西植物*, 2019, 39(12): 1583-1592.
- [28] 唐玉娟, 赵英, 黄国弟, 等. 芒果叶绿体基因组密码子使用偏好性分析 [J]. *热带作物学报*, 2021, 42(8): 2143-2150.
- [29] 秦政, 郑永杰, 桂丽静, 等. 樟叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. *广西植物*, 2018, 38(10): 1346-1355.
- [30] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第 7 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1978: 362-363.
- [31] 郑薇玮, 陈金慧, 郝兆东, 等. 杉木等 5 种针叶树叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. *分子植物育种*, 2016, 14(5): 1091-1097.
- [32] 原晓龙, 康洪梅, 王毅. 云南蓝果树叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. *西北林学院学报*, 2020, 35(4): 26-31.
- [33] 陆奇丰, 骆文华, 黄至欢. 两种梧桐叶绿体基因组密码子使用偏性分析 [J]. *广西植物*, 2020, 40(2): 173-183.

[责任编辑 时圣明]