

广丰千金薯叶绿体基因组序列特征及密码子使用偏好性分析

尹明华^{1,2,3,4}, 范馨月¹, 付悦欣¹, 胡慧玲¹

1. 上饶师范学院生命科学学院, 江西 上饶 334001

2. 上饶农业技术创新研究院, 江西 上饶 334001

3. 上饶市药食同源植物资源保护与利用重点实验室, 江西 上饶 334001

4. 上饶市薯芋类作物种质保存与利用重点实验室, 江西 上饶 334001

摘要: **目的** 解析广丰千金薯 *Dioscorea opposita* 叶绿体基因组信息序列特征和确定其在薯蓣属的系统位置。**方法** 利用高通量测序技术对广丰千金薯叶片进行核基因组重测序, 并利用生物信息学相关工具对组装得到的叶绿体基因组进行注释、序列特征和系统发育分析。**结果** 广丰千金薯叶绿体基因组长度为 153 293 bp, 注释到 84 个 CDS 基因、31 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。广丰千金薯叶绿体基因组中共检测到 45 个 SSR 位点, 多为单碱基 (A/T) 重复类型。广丰千金薯叶绿体基因组共鉴定到 61 个长重复序列, 包括 16 个正向重复、21 个回文重复、14 个反向重复、10 个互补重复。广丰千金薯叶绿体基因组高变区主要分布在 LSC 和 SSC 区域, 基因间隔区 *matK-tnaQ-UUG*、*atpl-rps2*、*psbl-trnS*、*rpl32-ndhF*、*ndhD-ccsA*、*trnE-UUC-trnT-GGU*、*trnS-GCU-trnG-UCC*、*rps2-rpoC2* 以及基因 *ycf1* 变异率最高。广丰千金薯叶绿体基因组的密码子偏好性较弱。广丰千金薯叶绿体基因组密码子偏好以 A、U 结尾。广丰千金薯叶绿体基因组密码子使用偏好性很大程度上受自然选择的影响, 而受突变压力的影响小。广丰千金薯叶绿体基因组的最优密码子共 16 个, 即 UUA、UCU、GAU、GGA、AAU、CAU、GUA、CAA、GAA、CCU、GUU、AUU、CGA、CUU、UUU、AGU。广丰千金薯与野脚板薯 *Dioscorea polystachya* NC_037716 聚为一小支。**结论** 广丰千金薯与野脚板薯 NC_037716 亲缘关系较近。首次采用生物信息学分析方法对广丰千金薯叶绿体基因组的序列特征及密码子使用偏好性进行了分析, 结果可为薯蓣属植物的遗传多样性分析提供理论依据。

关键词: 广丰千金薯; 叶绿体基因组; 序列特征; 系统发育分析; 野脚板薯

中图分类号: R286.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)21-7444-18

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.023

Analysis of chloroplast genome sequence characteristics and codon usage bias in *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu

YIN Minghua^{1,2,3,4}, FAN Xinyue¹, FU Yuexin¹, HU Huiling¹

1. College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, China

2. Shangrao Agricultural Technology Innovation Research Institute, Shangrao 334001, China

3. Key Laboratory of Protection and Utilization of Medicinal and Edible Plant Resources in Shangrao City, Shangrao 334001, China

4. Key Laboratory of Germplasm Conservation and Utilization of Potato and Taro Crops in Shangrao City, Shangrao 334001, China

Abstract: Objective To analyze the chloroplast genome sequence characteristics of *Dioscorea opposita* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu and determine its systematic position in the *Dioscorea* genus. **Methods** The nuclear genome of the leaves of *D. opposita* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu was re-sequenced by high-throughput sequencing technology, the assembled chloroplast genome and its sequence characteristics and phylogeny were annotated and analyzed using bioinformatics related tools. **Results** The chloroplast genome length of *D. opposita* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu was 153 293 bp, and 84 CDS genes, 31 tRNA genes and eight rRNA genes were annotated. A total of 45 SSR loci were detected in the chloroplast genome of *D. opposita* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu, most of which were single base (A/T) repeats. A total of 61 long repeat sequences were identified from

收稿日期: 2024-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31960079); 江西省科技厅重点研发计划一般项目 (20202BBG73010); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ201704); 江西省现代农业产业技术体系建设专项 (JXARS-13-赣东站); 上饶市科技局平台载体建设项目 (2020J001)

作者简介: 尹明华 (1973—), 女, 江西永新人, 硕士, 教授, 主要从事植物生物技术研究工作。E-mail: yinminghua04@163.com

the chloroplast genome of *D. opposite* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu, including 16 forward repeats, 21 palindrome repeats, 14 reverse repeats, and ten complementary repeats. The hypervariable regions of chloroplast genome of *D. opposite* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu were mainly distributed in LSC and SSC regions, and the gene spacer *matK* - *tnaQ*-UUG, *atp1* - *rps2*, *psbI* - *trnS*, *rpl32* - *ndhF*, *ndhD* - *ccsA*, *trnE*-UUC - *trnT*-GGU, *trnS*-GCU - *trnG* UCC, *rps2* - *rpoC2* and gene *ycf1* had the highest mutation rates. The codon bias of chloroplast genome of *D. opposite* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu was weak, whose codon preference of chloroplast genome ended with A and U. Codon usage bias of chloroplast genome of *D. opposite* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu was largely affected by natural selection, but was less affected by mutation pressure. There were 16 optimal codons in the chloroplast genome of Guangfeng Qianjinshu, namely UUA, UCU, GAU, GGA, AAU, CAU, GUA, CAA, GAA, CCU, GUU, AUU, CGA, CUU, UUU, AGU. *D. opposite* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu and *D. polystachya* NC_037716 was gathered into a small branch. **Conclusion** The genetic relationship between *D. opposite* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu and *D. polystachya* NC_037716 was relatively close. For the first time, bioinformatics analysis methods were used to analyze the sequence characteristics and codon usage bias of the chloroplast genome of *D. opposite* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu. The results can provide a theoretical basis for the genetic diversity analysis of *Dioscorea* plants.

Keywords: *Dioscorea opposite* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu; chloroplast genome; sequence characteristics; phylogenetic analysis; *Dioscorea polystachya* Thunb.

广丰千金薯 *Dioscorea opposite* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu, 薯蓣科薯蓣属多年生草本植物, 为江西省上饶市广丰区传统名优地方山药品种^[1]。广丰千金薯的地下块茎可食用, 肉质粉嫩, 软糯爽口, 实属美味佳肴; 也可药用, 健脾养胃、滋肾益精、增强免疫、延缓衰老, 誉为“广丰人参”^[2]。薯蓣属植物主要基于传统的形态学进行鉴定, 如从叶表皮微形态^[3]以及化学成分和药效作用^[4]出发进行分类, 但是部分品种只从形态学鉴定很难区分, 导致其传统分类发展缓慢, 因此需要寻找新的方法来对其鉴定手段进行补充。随着 DNA 分子标记技术的相继出现, 国内外利用分子标记技术, 如随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR)、限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)、扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)、相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP)、单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 等研究薯蓣属植物的研究逐渐增多^[5-7]。叶绿体 (chloroplast) 是植物细胞内一种半自主性细胞器, 主要起到光合作用和能量转换的作用, 还兼具复制、转录、翻译等生命活动功能^[8]。随着系统发育学和基因组学的交叉融合, 在植物系统发育研究中, 基于叶绿体基因组的系统发育基因组学研究优势渐显端倪, 为一些分类类群的系统学问

题提供了新的解决方案^[9]。叶绿体基因组保守性高、进化速度慢、拷贝数多、规模小、基因组数多^[10], 目前被广泛应用于植物进化^[11]和物种鉴定^[12]等方面的研究。目前关于广丰千金薯的研究多集中于高产栽培^[2]、脱毒快繁^[13]等方面, 对其遗传信息方面的研究很有限, 仅有部分研究集中于遗传多样性分析^[14]和转录组分析^[15]等, 这些研究均丰富了薯蓣属的遗传信息, 证实了广丰千金薯与来源于河南焦作市温县的铁棍山药亲缘关系较近, 推测出广丰千金薯微型块茎肉质绵密粉嫩、软糯爽口、胁迫防御、食后易胀的内在原因可能是其淀粉合成酶 3、 α -淀粉酶 3、 β -淀粉酶、类黄酮 3'-单加氧酶、类黄酮 3'-羟化酶、花青素合酶等基因上调, 而颗粒结合淀粉合酶 2、蔗糖合酶 1、扩展蛋白 2 和苯丙氨酸解氨酶等基因下调。但关于广丰千金薯进化分类的相关研究结论的可靠性有限, 影响了广丰千金薯优良资源的进一步开发和利用。现有的研究表明, 在纠正物种错误鉴定、发现隐存种与新物种方面, 叶绿体基因组的优势明显^[16]。在目前核基因组、线粒体基因组测序、组装技术尚无普及的前提下, 利用叶绿体基因组构建系统发育树仍然是当前的有效手段之一^[17-19]。本研究拟使用 Illumina 测序平台对广丰千金薯的叶绿体全基因组进行测序、组装和注释, 从叶绿体基因组结构、SSR 位点、密码子使用偏性、IR 区的扩张与收缩以及系统发育等方面开展研究, 以期为广丰千金薯资源的开发和利用、近缘种间的系统发育关系及薯蓣属植物的进化和分类研究提供理论依据和参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

广丰千金薯试管苗(由上饶市薯芋类作物种质保存与利用重点实验室提供)。试管苗由上饶师范学院王艾平教授鉴定为千金薯 *D. opposita* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu。DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。TAE 缓冲液、琼脂糖、DNA 酶抑制剂(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 仪器

BGISEQ-500 型测序平台(华大基因); NanoDrop 2000 型分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)。ATC 96-Well System 型自动化 PCR 仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

2 方法

2.1 DNA 提取和测序

选取广丰千金薯试管苗叶片组织,利用植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取广丰千金薯试管苗 DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性,NanoDrop 2000 分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)检测 DNA 浓度和纯度,用机械打断的方法(超声波)将 DNA 片段化,然后对片段化的 DNA 进行片段(片段大小 250 bp)纯化、末端修复、3'端加 A、连接测序接头,再用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择,进行 PCR 扩增形成测序文库,建好的文库先进行文库质检,质检合格的文库用 BGISEQ-500 平台(BGISEQ-500, 华大基因)进行读长 150 bp 双端测序。

2.2 叶绿体全基因组的组装与注释

通过 SOAPnuke (version: 1.3.0) 软件对 Raw Data 进行数据过滤,去除其中的接头序列及低质量 Reads 获得高质量的 Clean Data。采用 Noveplastys 软件组装叶绿体基因组核心模块,以起始组装序列为起点开始组装叶绿体 contigs,如果 contigs 未环化,则利用 CAP3 软件连接多个 contigs 为完整叶绿体基因组,并手动调整环状叶绿体基因组起始位置。为了降低接下来序列组装的复杂度,使用 bowtie 2 比对叶绿体基因组数据库,将比对上的 reads 数量最多的 3 个 CDS 序列当做广丰千金薯叶绿体基因组起始组装序列。使用 GeSeq、tRNAscan-SE 对叶绿体基因组进行注释,再经过手工校正后得到最终的叶绿体基因组基因注释结果。将注释完成的广丰千金薯叶绿体基因组序列提交至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),获得登录号(OP589404)。使

用 OGDRAW 绘制叶绿体基因组图谱。

2.3 叶绿体基因组特征分析

通过 JSHYCloud 在线工具集 (<http://cloud.genepioneer.com:9929>) 分析并统计叶绿体基因组、大单拷贝区 (large single copy region, LSC)、小单拷贝区 (small single copy region, SSC) 和反向重复区 (inverted repeat, IR) 的 GC 含量;使用 MISA (MicroSatellite identification tool) 软件进行简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 分析,单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸的最小重复值分别设置为 10、6、5、5、5、5;利用 REPuter 软件进行 Longrepeat (长重复序列) 分析,查找正向重复 F (forward)、反向重复 R (reverse)、互补重复 C (complement)、回文重复 P (palindromic) 4 种重复类型;通过 Pasteur Galaxy 在线工具集中的 CodonW 模块分析密码子使用情况,设置输出结果为有效密码子数 (ENC) 和相对同义密码子使用度 (RSCU),其他参数设为默认值。将广丰千金薯叶绿体基因组序列上传至 NCBI 进行 BLASTn 比对,选择 highly similar sequence (megablast) 来比较相似性在 95% 以上的序列,检索获得广丰千金薯的近缘种。利用 Gview、VISTA tools、IRscope 和 DNADnaSP6.0 软件绘制广丰千金薯及其 10 个近缘种 (*D. cayenensis* NC_039836、*D. pyrifolia* NC_062814、野脚板薯 *D. polystachya* NC_037716、穿龙薯蓣 *D. nipponica* NC_057065、日本薯蓣 *D. japonica* MW413805、薯蓣 *D. cirrhosa* NC_065059、*D. brevipetiolata* NC_062811、甘薯 *D. esculenta* NC_052854、黄独 *D. bulbifera* NC_039708、长柔毛薯蓣 *D. villosa* NC_034686) 的变异圈图、mVIST 结构变异图、IR 结构变异图,计算广丰千金薯及其 10 个近缘种的基因组多样性指数 (P_i),参数设置 100 bp 滑窗,25 bp 的步长;并对上述广丰千金薯及其 10 个近缘种进行 GC3~GC12 分析 (Neutrality-plot 分析)、ENC-plot 分析和 PR2-bias-plot 分析和最优密码子分析;对广丰千金薯叶绿体基因的 ENC 值进行排序,分别选取两端基因各 5 个,构建高表达基因库 (ENC 值小) 和低表达基因库 (ENC 值大),并计算二者的 RSCU 差值 ($\Delta RSCU$)。筛选 $\Delta RSCU \geq 0.08$ 的高表达密码子,且 $RSCU > 1$ 的高频率密码子定义为广丰千金薯叶绿体基因组的最优密码子;利用 mafft 7.0 软件对广丰千金薯及其 34 个近缘种 (*D. cayenensis* NC_039836、*D. cayenensis* subsp. Rotundata

MZ848368、*D. abyssinica* NC_039834、*D. sagittifolia* NC_039854、*D. baya* NC_039850、*D. burkilliana* NC_039835、*D. togoensis* NC_039836、丽叶薯蓣 *D. aspersa* NC_039807、*D. pyrifolia* NC_062814、褐苞薯蓣 *D. persimilis* MN585218、野脚板薯 NC_037716、穿龙薯蓣 NC_057065、日本薯蓣 MW413805、薯蓣 NC_065059、*D. depauperata* NC_062812、光叶薯蓣 *D. glabra* NC_062813、*D. brevipetiolata* NC_062811、脚板薯 *D. alata* NC_039707、*D. hirtiflora* NC_039851、*D. schimperiana* NC_039855、*D. preussii* NC_039852、甘薯 NC_052854、非洲薯蓣 *D. sansibarensis* NC_039838、*D. dumetorum* MZ848369、白薯蓣 *D. hispida* OP018507、*D. quartiniana* NC_039853、黄独 NC_039708、南非龟甲龙 *D. elephantipes* NC_009601、长柔毛薯蓣 NC_034686、叉蕊薯蓣 *D. collettii* NC_037717、福州薯蓣 *D. futschauensis* NC_039808、昆氏薯蓣 *D. quinquelobata* NC_057067、盾叶薯蓣 *D. zingiberensis* NC_027090、*Trichopus zeylanicus* subsp. Travancoricus NC_044084) 进行序列比对, 利用 fasttree 2.1.10 软件构建广丰千金薯及其 34 个近缘种的进化树。最后比对广丰千金薯及其 34 个近缘种叶

绿体基因组序列, 总结出广丰千金薯的标志性鉴定序列, 并以广丰千金薯叶绿体基因组为参考序列, 利用 Geneious prime 软件查找长度超过 100 bp 的 InDel。位点 1 是 177 bp 的 insert, 其他序列相对于广丰千金薯叶绿体基因组具有 177 bp 的插入 (含多序列比对 gap), NC_037716.1/NC_057066.1 相对于广丰千金薯叶绿体基因组在该位点没有变化, 位点 2 为 214 bp 的缺失 (NC_037716.1 相对于广丰千金薯), 位点 3 为 109 bp 缺失 (NC_037716.1 相对于广丰千金薯)。以上述 3 个位点为目标位点, 利用 Geneious prime 软件在其两侧设计广丰千金薯鉴定区别的扩增引物, 扩增产物长度设计为 200~400 bp。

3 结果与分析

3.1 广丰千金薯叶绿体基因组序列特征分析

经过测序组装的完整的广丰千金薯叶绿体基因组长度为 153 293 bp, 基因组图谱 (图 1) 显示, 广丰千金薯叶绿体基因组呈典型的四分体结构, 由 1 个 LSC、1 个 SSC 和 2 个 IR 共 4 部分组成, 其中, LSC、SSC 和 IR 区的长度分别为 83 487、18 822 和 25 492 bp。基因组的总 GC 含量为 37.01%, 其中, LSC、SSC 和 IR 区的 GC 含量分别为 34.78%、30.96%和 42.90%。

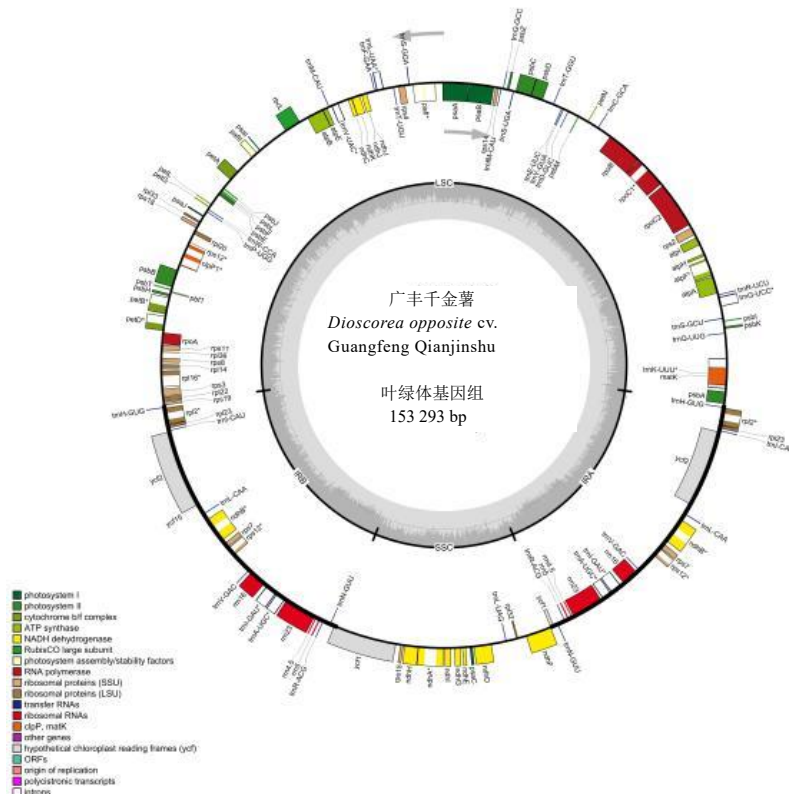


图 1 广丰千金薯叶绿体基因组图谱

Fig. 1 Chloroplast genome map of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu

3.2 广丰千金薯叶绿体基因类型分析

广丰千金薯叶绿体基因组的注释结果见表 1。由表 1 可知,共注释到光合作用基因、自我复制基因、其他基因和未知功能基因 4 类,包括 84 个 CDS 基因、31 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因,假基因为 0,共 123 个基因。对有多个外显子的叶绿体基因进行结构分析,由 2 个外显子构成的基因有 18 个,包括 10 个 CDS 基因和 8 个 tRNA 基因,其中有 2 个基因在 IR 区重复;由 3 个外显子构成的基

因有 3 个,均为 3 个 CDS 基因;完全在 LSC 区的基因有 80 个;完全在 SSC 区的基因有 11 个;完全在 IRb 和 IRa 区的基因有 18 个;在 SSC-IRb junction 的基因有 1 个;在 LSC-IRb junction 的基因有 1 个;在 SSC-IRa junction 的基因有 1 个;在 LSC-IRa junction 无基因;rps12 有 2 个拷贝,每个拷贝具有 3 个外显子,且 2 个拷贝共享第 1 个外显子,第 1 个外显子位于 LSC 区域,另外 2 个外显子位于 IR 区域。

表 1 广丰千金薯叶绿体基因功能分类

Fig. 1 Chloroplast gene functional classification of *D. opposite* cv. Guangfeng Qianjinshu

基因功能	基因类型	基因名	基因数量
光合作用	光系统I	<i>psaA</i> 、 <i>psaB</i> 、 <i>psaC</i> 、 <i>psaI</i> 、 <i>psaJ</i>	5
	光系统II	<i>psaJ</i> 、 <i>psbA</i> 、 <i>psbB</i> 、 <i>psbC</i> 、 <i>psbD</i> 、 <i>psbE</i> 、 <i>psbF</i> 、 <i>psbH</i> 、 <i>psbI</i> 、 <i>psbK</i> 、 <i>psbL</i> 、 <i>psbM</i> 、 <i>psbT</i> 、 <i>psbZ</i>	14
	NADH 脱氢酶	<i>ndhA</i> 、 <i>ndhB</i> [*] 、 <i>ndhC</i> 、 <i>ndhD</i> 、 <i>ndhE</i> 、 <i>ndhF</i> 、 <i>ndhG</i> 、 <i>ndhH</i> 、 <i>ndhI</i> 、 <i>ndhJ</i> [*] 、 <i>ndhK</i>	13
	细胞色素 b/f 复合体	<i>petA</i> 、 <i>petB</i> 、 <i>petD</i> 、 <i>petG</i> 、 <i>petL</i> 、 <i>petN</i>	6
自我复制	ATP 合成酶	<i>atpA</i> 、 <i>atpB</i> 、 <i>atpE</i> 、 <i>atpF</i> 、 <i>atpH</i> 、 <i>atpI</i>	6
	核糖体大亚基蛋白质	<i>rpl14</i> 、 <i>rpl16</i> 、 <i>rpl2</i> [*] 、 <i>rpl20</i> 、 <i>rpl22</i> 、 <i>rpl23</i> [*] 、 <i>rpl32</i> 、 <i>rpl33</i> 、 <i>rpl36</i>	11
	核糖体小亚基蛋白质	<i>rps11</i> 、 <i>rps12</i> [*] 、 <i>rps14</i> 、 <i>rps15</i> 、 <i>rps18</i> 、 <i>rps19</i> 、 <i>rps2</i> 、 <i>rps3</i> 、 <i>rps4</i> 、 <i>rps7</i> [*] 、 <i>rps8</i>	13
	核糖体大亚基	<i>rbcL</i>	1
	RNA 聚合酶	<i>rpoA</i> 、 <i>rpoB</i> 、 <i>rpoC1</i> 、 <i>rpoC2</i>	4
	核糖体 RNA	<i>rrn16</i> 、 <i>rrn16</i> 、 <i>rrn23</i> 、 <i>rrn23</i> 、 <i>rrn4.5</i> 、 <i>rrn4.5</i> 、 <i>rrn5</i> 、 <i>rrn5</i>	8
	转运 RNA	<i>trnC-GCA</i> 、 <i>trnD-GUC</i> 、 <i>trnF-GAA</i> 、 <i>trnG-GCC</i> 、 <i>trnH-GUG</i> [*] 、 <i>trnI-CAU</i> [*] 、 <i>trnK-UUU</i> 、 <i>trnL-CAA</i> [*] 、 <i>trnL-UAA</i> 、 <i>trnS-UGA</i> 、 <i>trnL-UAG</i> 、 <i>trnM-CAU</i> 、 <i>trnN-GUU</i> [*] 、 <i>trnP-UGG</i> 、 <i>trnQ-UUG</i> 、 <i>trnR-ACG</i> [*] 、 <i>trnR-UCU</i> 、 <i>trnS-GCU</i> 、 <i>trnS-GGA</i> 、 <i>trnS-UGA</i> 、 <i>trnT-UGU</i> 、 <i>trnV-GAC</i> [*] 、 <i>trnV-UAC</i> 、 <i>trnC-ACA</i> 、 <i>trnW-CCA</i> 、 <i>trnY-GUA</i> 、 <i>trnM-CAU</i>	31
	成熟酶	<i>matK</i>	1
其他基因	蛋白酶	<i>clpP1</i>	1
	囊膜蛋白	<i>cemA</i>	1
	乙酰辅酶 A 羧化酶	<i>accD</i>	1
	c-型细胞色素合成基因	<i>ccsA</i>	1
	翻译起始因子	<i>infA</i>	1
	保守假设叶绿体阅读框架	<i>ycf1</i> [*] 、 <i>ycf15</i> 、 <i>ycf2</i> [*]	5
未知功能基因			

*表示该基因的数量有 2 个。
* indicates that there are 2 genes.

3.3 广丰千金薯叶绿体基因组重复序列分析

广丰千金薯叶绿体基因组重复序列分析结果见表 2。由表 2 可知,在广丰千金薯叶绿体基因组中共检测到 45 个 SSR 位点,其中,单碱基重复有 37 个,双碱基重复有 4 个,三碱基重复有 4 个。其中,重复单元为 A、重复频率为 10 的 SSR 位点数量最多(10),重复单元为 T、重复频率为 10 的 SSR 位点数量最多(8);重复单元为 A/T、重复频率为 10 的

SSR 位点数量为 18,重复单元为 AT/AT、重复频率为 6 的 SSR 位点数量为 3,重复单元为 AAT/ATT、重复频率为 5 或 6 的 SSR 位点数量均为 2。

3.4 广丰千金薯叶绿体基因组 Longrepeat 分析

广丰千金薯叶绿体基因组 Longrepeat 分析见表 3。由表 3 可知,广丰千金薯叶绿体基因组共鉴定到 61 个长重复序列,包括 16 个正向重复 F(14 个 30~39 bp, 2 个 40~49 bp)、21 个回文重复 P(18 个

表 2 广丰千金薯叶绿体基因组中 SSR 的类型及分布

Table 2 Type and distribution of SSR in chloroplast genome of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu

重复单元碱基类型	重复单元重复次数												总数
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
A	—	—	—	—	—	10	5	1	1	1	—	1	19
T	—	—	—	—	—	8	6	1	2	—	1	—	18
TA	—	3	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
ATA	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
TAA	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
TAT	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2
A/T	—	—	—	—	—	18	11	2	3	1	1	1	37
AT/AT	—	3	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4
AAT/ATT	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4

表 3 广丰千金薯叶绿体基因组 Longrepeat 分析

Table 3 Longrepeat analysis in chloroplast genome of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu

第一部分的重复长度/bp	第一部分的起始位置/bp	第二部分的重复长度/bp	第二部分的起始位置/bp	该重复的距离	该重复计算的 e 值
48	77 070	48	77 070	0	8.34×10^{-20}
49	88 384	49	88 405	-1	3.07×10^{-18}
49	88 384	49	148 326	-1	3.07×10^{-18}
49	88 405	49	148 347	-1	3.07×10^{-18}
49	148 326	49	148 347	-1	3.07×10^{-18}
39	29 439	39	29 439	-1	2.56×10^{-12}
30	29 103	30	29 398	0	5.73×10^{-9}
36	99 651	36	99 651	-2	7.94×10^{-9}
36	99 651	36	137 093	-2	7.94×10^{-9}
36	137 093	36	137 093	-2	7.94×10^{-9}
36	99 651	36	99 657	-3	2.70×10^{-7}
36	99 651	36	137 087	-3	2.70×10^{-7}
36	99 657	36	137 093	-3	2.70×10^{-7}
36	99 657	36	137 093	-3	2.70×10^{-7}
36	137 087	36	137 093	-3	2.70×10^{-7}
33	99 651	33	99 651	-2	4.26×10^{-7}
33	99 651	33	99 654	-2	4.26×10^{-7}
33	99 651	33	137 093	-2	4.26×10^{-7}
33	99 651	33	137 096	-2	4.26×10^{-7}
33	99 654	33	99 654	-2	4.26×10^{-7}
33	99 654	33	137 093	-2	4.26×10^{-7}
33	99 654	33	137 096	-2	4.26×10^{-7}
33	137 093	33	137 093	-2	4.26×10^{-7}
33	137 093	33	137 096	-2	4.26×10^{-7}
33	137 096	33	137 096	-2	4.26×10^{-7}
35	99 651	35	99 660	-3	9.89×10^{-7}
35	99 651	35	137 085	-3	9.89×10^{-7}
35	99 652	35	99 660	-3	9.89×10^{-7}
35	99 652	35	137 085	-3	9.89×10^{-7}
35	99 660	35	137 093	-3	9.89×10^{-7}
35	99 660	35	137 094	-3	9.89×10^{-7}
35	123 855	35	123 855	-3	9.89×10^{-7}
35	137 085	35	137 093	-3	9.89×10^{-7}
35	137 085	35	137 094	-3	9.89×10^{-7}
30	88 406	30	88 427	-2	2.24×10^{-5}
30	88 406	30	148 323	-2	2.24×10^{-5}
30	88 427	30	148 344	-2	2.24×10^{-5}
30	99 651	30	99 651	-2	2.24×10^{-5}

表 3 (续)

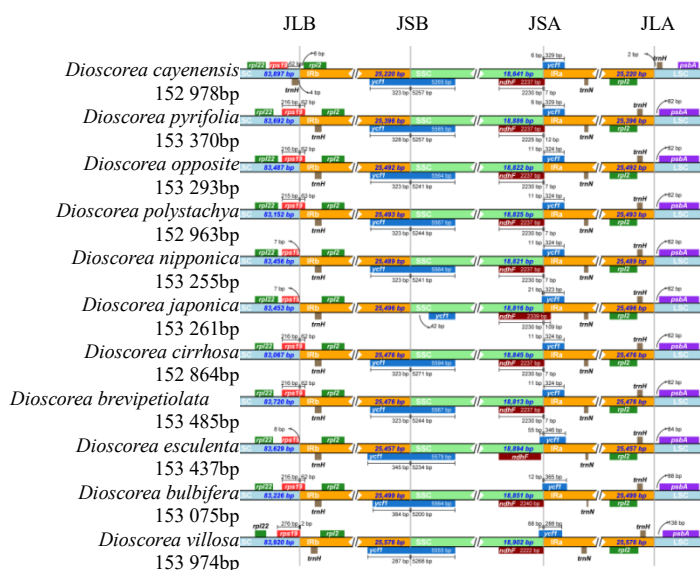
第一部分的重复长度/bp	第一部分的起始位置/bp	第二部分的重复长度/bp	第二部分的起始位置/bp	该重复的距离	该重复计算的 e 值
30	99 651	30	137 099	-2	2.24×10^{-5}
30	99 666	30	99 666	-2	2.24×10^{-5}
30	99 666	30	137 084	-2	2.24×10^{-5}
30	117 394	30	117 394	-2	2.24×10^{-5}
30	123 059	30	123 059	-2	2.24×10^{-5}
30	137 084	30	137 084	-2	2.24×10^{-5}
30	137 099	30	137 099	-2	2.24×10^{-5}
32	35 643	32	44 786	-3	4.80×10^{-5}
32	99 651	32	99 663	-3	4.80×10^{-5}
32	99 651	32	137 085	-3	4.80×10^{-5}
32	99 655	32	99 663	-3	4.80×10^{-5}
32	99 655	32	137 085	-3	4.80×10^{-5}
32	99 663	32	137 093	-3	4.80×10^{-5}
32	99 663	32	137 097	-3	4.80×10^{-5}
32	137 085	32	137 093	-3	4.80×10^{-5}
32	137 085	32	137 097	-3	4.80×10^{-5}
30	4 648	30	30 947	-3	6.28×10^{-4}
30	60 367	30	60 390	-3	6.28×10^{-4}
30	88 385	30	88 427	-3	6.28×10^{-4}
30	88 385	30	148 323	-3	6.28×10^{-4}
30	88 427	30	148 365	-3	6.28×10^{-4}
30	108 686	30	128 068	-3	6.28×10^{-4}
30	148 326	30	148 368	-3	6.28×10^{-4}

30~39 bp, 3 个 40~49 bp)、14 个反向重复 R (30~39 bp)、10 个互补重复 C (30~39 bp)。

3.5 广丰千金薯叶绿体基因组 IR 区边界结构差异分析

广丰千金薯 IR 区边界结构差异分析见图 2。由

图 2 可知, 在 LSC 左边区域, 广丰千金薯及其 10 个近缘种 *rpl22* 基因的长度和位置基本一致。在 IRb 区、IRa 和 SSC 区的边界(JSA)、IRa 区和 LSC 区, 广丰千金薯及其 10 个近缘种 *trnH*、*ndhF*、*trnN*、*rpl2*、*trnH*、*psbA* 基因的长度和位置基本一致。广



JLB-LSC 和 IRb 区的边界; JSB-IRb 和 SSC 区的边界; JSA-SSC 和 IRa 区的边界; JLA-IRa 和 LSC 区的边界。
Boundary of LSC and IRb regions; Boundary of IRb and SSC regions; Boundary of SSC and IRa regions; Boundary of IRa and LSC regions.

图 2 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组 LSC、SSC 和 IR 边界位置的比较

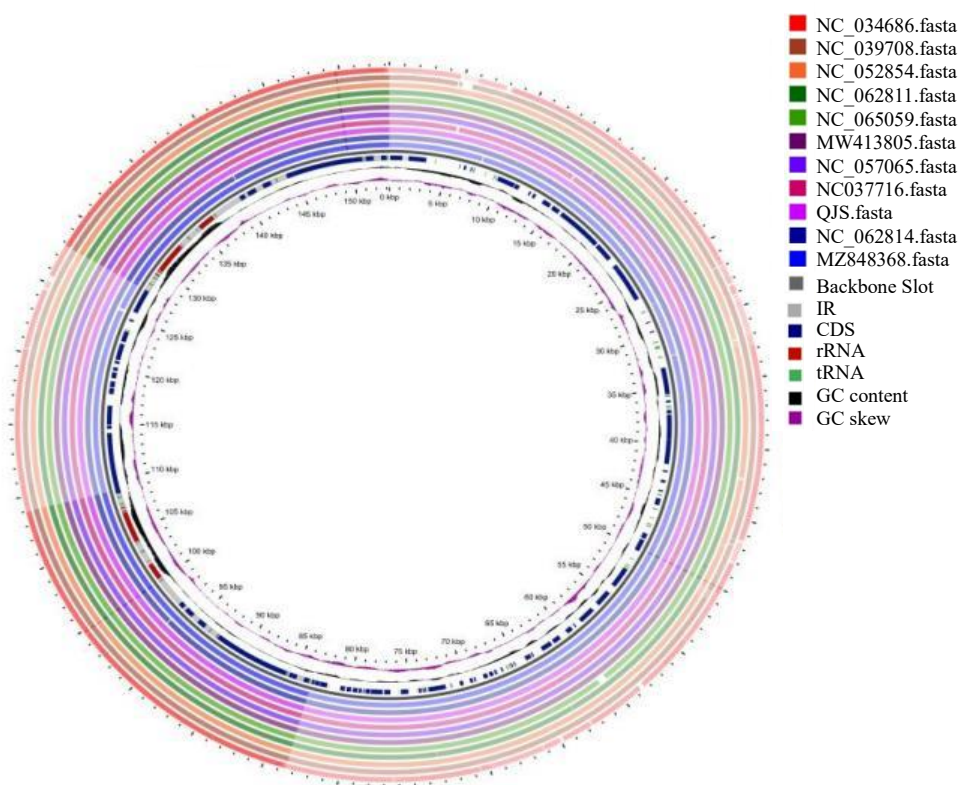
Fig. 2 Comparison on boundary locations of LSC, SSC and IR in chloroplast genomes of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu and its ten related species

丰千金薯及其 10 个近缘种主要的差异在在 LSC 和 IRb 区的边界(JLB)和 IRb 和 SSC 区的边界(JSB), 广丰千金薯 (*D. opposita* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu)、*D. pyrifolia*、野脚板薯、薯蓣 *D. cirrhosa*、*D. brevipetiolata*、黄独 *D. bulbifera* 的 *rps19* 基因横跨 JLB 边界; 穿龙薯蓣 *D. nipponica*、日本薯蓣 *D. japonica*、甘薯 *D. esculenta*、长柔毛薯蓣 *D. villosa* 的 *rps19* 基因左移, 紧贴 JLB 边界左边; *D. cayenensis* 的 *rps19* 基因继续左移, 已经完全位于 LSC 区内; 广丰千金薯、*D. cayenensis*、*D. pyrifolia*、野脚板薯、穿龙薯蓣、薯蓣、*D. brevipetiolata*、甘薯、黄独、长柔毛薯蓣的 *ycf1* 基因横跨 JSB 边界; 广丰千金薯、*D. cayenensis*、野脚板薯、穿龙薯蓣、薯蓣、*D. brevipetiolata* 的 *ycf1* 基因在 JSB 边界左边部分长度均为 323 bp, 差异主要体现在 *ycf1* 基因在 JSB 边界右边部分长度; 甘薯、黄独、长柔毛薯蓣的 *ycf1* 基因在 JSB 边界左边部分长度分别为 345、364、287 bp; 日本薯蓣 *D. japonica* 的 *ycf1* 基因缩短且右移,

距 JSB 边界 42 bp。

3.6 广丰千金薯叶绿体基因组比对分析

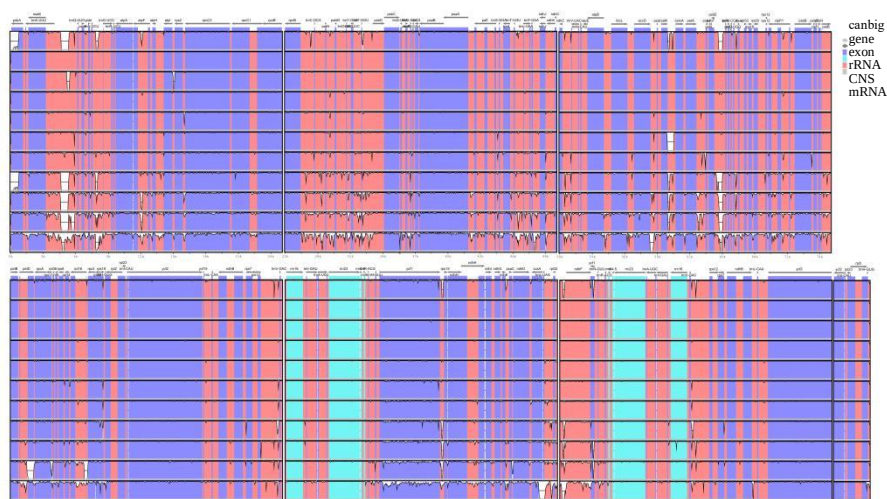
以广丰千金薯为参考, 利用 Gview、VISTA tools 和 DNADnaSP 6.0 软件计算和绘制广丰千金薯 10 个近缘种叶绿体基因组的变异圈图(图 3)、mVISTA 结构变异图(图 4)和多样性指数 (P_i) 分析图(图 5)。由图 3、4 可知, 广丰千金薯及其 10 个近缘种的叶绿体基因组变化较大, 但 *D. pyrifolia* NC_062814、广丰千金薯、野脚板薯 NC_037716、穿龙薯蓣 *D. nipponica* NC_057065 的叶绿体基因组较为保守, 叶绿体基因组较为稳定。由图 5 可知, 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组核苷酸多样性的变化范围为 0~0.097 09, 高变区主要分布在 LSC 和 SSC 区域, 基因间隔区 *matK-tnaQ-UUG*、*atpl-rps2*、*psbl-trnS*、*rpl32-ndhF*、*ndhD-ccsA*、*trnE-UUC-trnT-GGU*、*trnS-GCU-trnG-UCC*、*rps2-rpoC2* 以及基因 *ycf1* 变异率最高(图 4), 以上结果与 Gview 和 mVISTA 分析结果一致。



右上角标记的序列是由最外圈开始, GC content 和 GC skew 是最内两圈, IR 是由内往外第 3 圈, CDS、rRNA、tRNA 是由内往外第 3 圈的标记。
The sequence marked in the upper right corner starts from the outermost circle, GC content and GC sketch are the innermost two circles, IR is the third circle from inside to outside, and CDS, rRNA and tRNA are the markers from inside to outside.

图 3 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组 Gview 变异圈

Fig. 3 Gview variation circle of chloroplast genomes of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu and its ten related species



从上到下依次为 *D. cayenensis* NC_039836、*D. pyrifolia* NC_062814、广丰千金薯、野脚板薯 NC_037716、穿龙薯蓣 NC_057065、日本薯蓣 MW413805、薯蓣 NC_065059、*D. brevipetiolata* NC_062811、甘薯 NC_052854、黄独 NC_039708、长柔毛薯蓣 NC_034686；每个基因上的灰色箭头表示该基因的方向；不同颜色的波形图表示叶绿体基因组不同区域。

From top to bottom: *D. cayenensis* NC_039836, *D. pyrifolia* NC_062814, *D. opposita* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu, *D. polystachya* NC_037716, *D. nipponica* NC_057065, *D. japonica* MW413805, *D. cirrhosa* NC_065059, *D. brevipetiolata* NC_062811, *D. esculenta* NC_052854, *D. bulbifera* NC_039708, *D. villosa* NC_034686; The gray arrow on each gene indicates the direction of the gene; Waveforms with different colors represent different regions of chloroplast genome.

图 4 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组 mVISTA 分析

Fig. 4 mVISTA Analysis of chloroplast genomes of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu and its ten related species

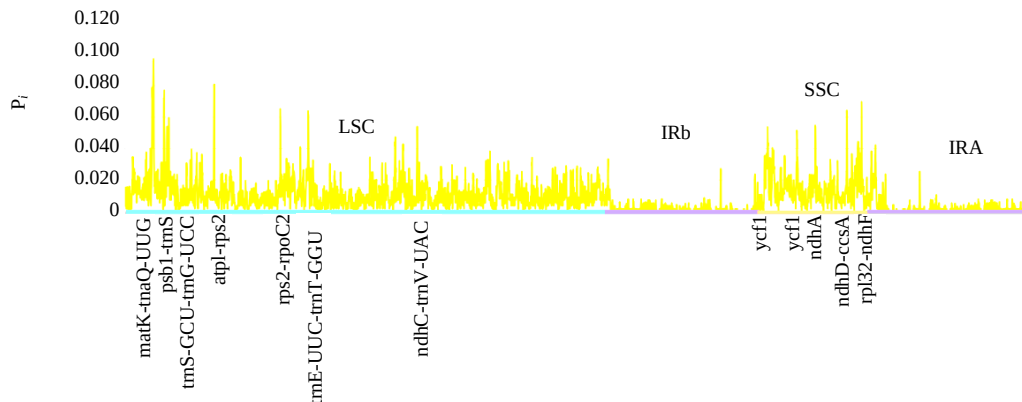


图 5 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组 P_i 分析

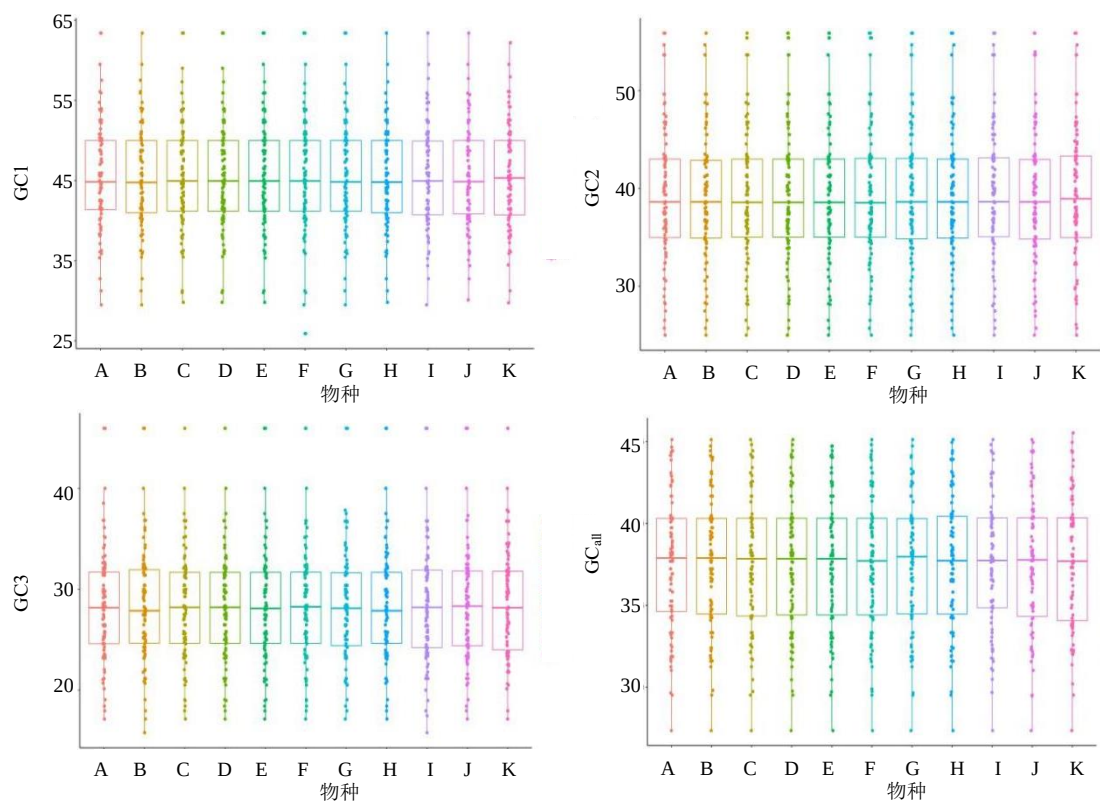
Fig. 5 P_i Diversity index analysis of chloroplast genomes of *D. opposita* and its ten related species

3.7 广丰千金薯叶绿体基因组密码子使用偏性分析

3.7.1 同义密码子的偏性分析 通过对广丰千金薯叶绿体基因组 84 个 CDS 基因序列进行分析，密码子各位点上的 GC 含量见图 6。由图 6 可知，3 个位置 GC 含量的平均值为 37.52%，GC1、GC2、GC3 分别为 45.39%、39.00%、28.18%。这说明 GC 在密码子 3 个位点上的分布存在显著差异，呈 $GC3 <$

$GC2 < GC1$ 的趋势，只有 GC2 与平均 GC 大致接近，且偏爱以 A、T 结尾的密码子。ENC 是密码子偏性分析的重要指标，通常将 35 作为区分值来评估密码子偏倚的强度。广丰千金薯叶绿体基因组 84 个 CDS 基因的平均 ENC 值为 45.89，ENC 值 > 35 的基因有 78 个，有 9 个基因的 ENC 值 < 35 ，这表明广丰千金薯叶绿体基因组的密码子偏性较弱。

通过 SPSS 20.0 进行相关性分析，结果表明(表 4)，



GC1、GC2、GC3 分别表示密码子第 1、2、3 位的 GC 含量；GC_{all} 表示密码子总 GC 含量；字母 A~K 分别代表 *D. cayenensis* NC_039836、*D. pyrifolia* NC_062814、广丰千金薯、野脚板薯 NC_037716、穿龙薯蓣 NC_057065、日本薯蓣 MW413805、薯蓣 NC_065059、*D. brevipetiolata* NC_062811、甘薯 NC_052854、黄独 NC_039708、长柔毛薯蓣 NC_034686，下同。

GC1, GC2 and GC3 represent the GC content of codon 1, 2 and 3 respectively; GC_{all} represents the total GC content of the codons; Letters A—K represent *D. cayenensis* NC_039836, *D. pyrifolia* NC_062814, *D. opposita* Thunb. cv. Guangfeng Qianjinshu, *D. polystachya* NC_037716, *D. nipponica* NC_057065, *D. japonica* MW413805, *D. cirrhosa* NC_065059, *D. brevipetiolata* NC_062811, *D. esculenta* NC_052854, *D. bulbifera* NC_039708, *D. villosa* NC_034686 respectively, same as below.

图 6 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组密码子组成成分分析

Fig. 6 Composition analysis of chloroplast genome codons of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu and its ten related species

表 4 广丰千金薯叶绿体基因组中各基因参数的相关性

Table 4 Correlation analysis on gene parameters of chloroplast genome of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu

指标	相关系数				
	GC _{all}	GC1	GC2	GC3	ENC
GC _{all}	1.000 000 000				
GC1	0.746 602 426**	1.000 000 000			
GC2	0.729 802 422**	0.332 811 736*	1.000 000 000		
GC3	0.469 188 538*	0.079 240 105	−0.001 562 462	1.000 000 000	
ENC	0.141 425 539	0.162 569 362	−0.036 020 571	0.175 986 284	1.000 000 000

*表示相关性达到 0.05 水平上的显著性；**表示相关性达到 0.01 水平上的极显著性；GC1、GC2、GC3 分别表示密码子第 1、2、3 位的 GC 含量；GC_{all} 表示密码子总 GC 含量；ENC 表示有效密码子数。

“*” indicates that the correlation reaches 0.05 level of significance; “**” refers to the extremely significant correlation at 0.01 level; GC1, GC2 and GC3 represent the GC content of codon 1, 2 and 3 respectively; GC_{all} represents the total GC content of the codon; ENC indicates the number of valid codons.

GCall 与 GC1、GC2 在 0.01 水平上均存在极强的正相关，GCall 与 GC3 在 0.05 水平上显著相关；GC1 与 GC2 关系在 0.01 水平上存在强正相关，但两者均与 GC3 不相关，这表明广丰千金薯叶绿体基因组密码子前 2 位的碱基组成相似，而与第 3 位不相似。ENC 与 GC1、GC2、GC3 均不相关，这说明密码子上的碱基组成对 ENC 值没有影响，即对密码子偏性没有明显的影响。

广丰千金薯叶绿体基因组 87 个 CDS 基因序列的 RSCU 见表 5。由表 5 可知，共有 31 个 RSCU>1 的密码子，在这 31 个密码子中，除 AUG、UUG 外，其余都以 A、U 结尾，这表明 A、U 碱基在密码子最后位点上出现的频率最高，广丰千金薯叶绿

体基因组密码子偏好以 A、U 结尾。

3.7.2 中性绘图分析 (GC3~GC12 分析) 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组密码子的 GC3~GC12 分析见图 7。由图 7 可知，GC3~GC12 分析发现广丰千金薯及其 10 个近缘种植物叶绿体基因的 GC3 含量分布在 0.157 9~0.459 5，GC12 含量分布在 0.259 2~0.634 1，二者沿对角线上方集中分布。两者的相关系数 $r=0.050\ 99$ ($R^2=0.002\ 6$)，相关不显著，回归斜率为 0.051 8，说明 GC12 与 GC3 不相关。密码子上的碱基组成中最后 1 个位点不同于其他 2 个位点，表明广丰千金薯叶绿体基因组密码子使用偏性很大程度上受自然选择的影响，而受突变压力的影响小。

表 5 广丰千金薯叶绿体基因组同义密码子的使用频率 (RSCU)

Table 5 Relative synonymous codon usage (RSCU) of chloroplast genome of <i>D. opposita</i> cv. Guangfeng Qianjinshu							
密码子	氨基酸	相对同义密码子使用度	数量	密码子	氨基酸	相对同义密码子使用度	数量
GCA	Ala	1.219 990	409	AAA	Lys	1.493 200 00	1 043
GCC	Ala	0.614 467	206	AAG	Lys	0.506 800 00	354
GCG	Ala	0.360 925	121	AUG	Met	1.990 650 00	639
GCU	Ala	1.804 620	605	GUG	Met	0.009 345 79	3
AGA	Arg	1.951 400	522	UUC	Phe	0.768 087 00	568
AGG	Arg	0.616 822	165	UUU	Phe	1.231 910 00	911
CGA	Arg	1.297 200	347	CCA	Pro	1.123 210 00	294
CGC	Arg	0.317 757	85	CCC	Pro	0.897 803 00	235
CGG	Arg	0.388 785	104	CCG	Pro	0.485 196 00	127
CGU	Arg	1.428 040	382	CCU	Pro	1.493 790 00	391
AAC	Asn	0.427 215	270	AGC	Ser	0.276 163 00	95
AAU	Asn	1.572 780	994	AGU	Ser	1.200 580 00	413
GAC	Asp	0.366 541	195	UCA	Ser	1.328 490 00	457
GAU	Asp	1.633 460	869	UCC	Ser	0.985 465 00	339
UGC	Cys	0.472 492	73	UCG	Ser	0.523 256 00	180
UGU	Cys	1.527 510	236	UCU	Ser	1.686 050 00	580
CAA	Gln	1.516 880	719	UAA	Ter	1.275 860 00	37
CAG	Gln	0.483 122	229	UAG	Ter	0.896 552 00	26
GAA	Glu	1.502 500	1 051	UGA	Ter	0.827 586 00	24
GAG	Glu	0.497 498	348	ACA	Thr	1.244 640 00	421
GGA	Gly	1.631 310	719	ACC	Thr	0.721 360 00	244
GGC	Gly	0.347 136	153	ACG	Thr	0.437 546 00	148
GGG	Gly	0.657 969	290	ACU	Thr	1.596 450 00	540
GGU	Gly	1.363 580	601	UGG	Trp	1.000 000 00	454
CAC	His	0.431 310	135	UAC	Tyr	0.401 598 00	201
CAU	His	1.568 690	491	UAU	Tyr	1.598 400 00	800
AUA	Ile	0.965 071	746	GUA	Val	1.522 870 00	541
AUC	Ile	0.588 616	455	GUC	Val	0.444 757 00	158
AUU	Ile	1.446 310	1 118	GUG	Val	0.582 688 00	207
CUA	Leu	0.819 971	375	GUU	Val	1.449 6800 0	515
CUC	Leu	0.441 691	202				
CUG	Leu	0.384 840	176				
CUU	Leu	1.241 980	568				
UUA	Leu	1.830 170	837				
UUG	Leu	1.281 340	586				

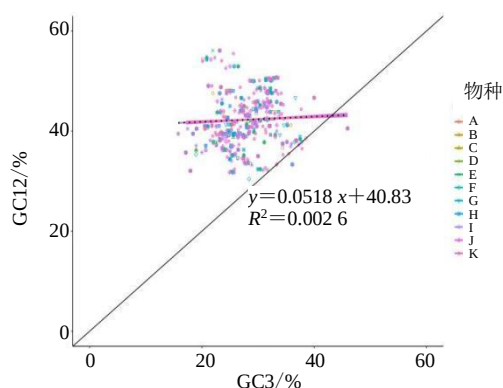


图 7 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组密码子 GC3~GC12 分析

Fig. 7 GC3—GC12 analysis of chloroplast genome codons of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu and its ten related species

3.7.3 ENC-plot 分析 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组密码子的 ENC-plot 分析见图 8。由图 8 可知,分布在期望曲线上或曲线附近的基因较少,分布在期望曲线下方且远离曲线的基因较多,说明大部分基因的实际 ENC 值与理论 ENC 值存在差异。为了解实际 ENC 值 (ENCobs) 和理论 ENC 值 (ENCexp) 的差异度,计算了广丰千金薯 ENC 比值频数即 (ENCexp-ENCobs)/ENCexp,结果见表 6。由表 6 可知,广丰千金薯叶绿体基因组基因中,有 16.25% (13 个) 的基因分布在 0~0.1,表明这部分基因分布于期望曲线上或曲线附近,即

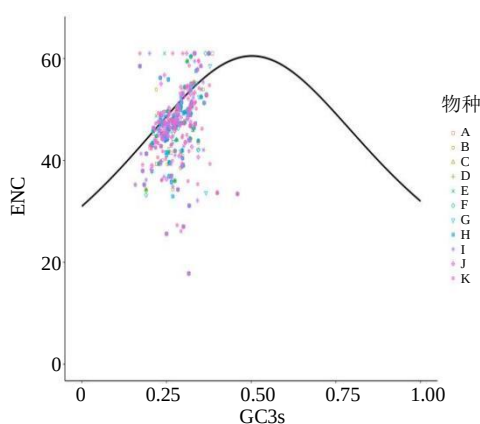


图 8 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组密码子 ENC-plot 分析

Fig. 8 ENC-plot analysis of chloroplast genome codons of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu and its ten related species

表 6 广丰千金薯叶绿体基因组密码子 ENC 比值频数分布

Table 6 Codon ENC ratio frequency distribution of chloroplast genome of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu

区间	组限	频数/个	频率
(-0.1, 0]	-0.1	5	0.062 5
(0, 0.1]	0	13	0.162 5
(0.1, 0.2]	0.1	43	0.537 5
(0.2, 0.3]	0.2	12	0.150 0
(0.3, 0.4]	0.3	6	0.075 0
>0.4	0.4	1	0.012 5
合计		80	1.000 0

ENCobs 值接近于 ENCexp 值,有 83.75% 的基因分布在 0~0.1 外,远离期望曲线分布,即 ENCexp 和 ENCobs 相差较大,这表明自然选择是影响广丰千金薯叶绿体基因组密码子使用偏性的主要因素,而突变压力的作用较小。

3.7.4 PR2-plot 分析 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组密码子的 PR2-plot 分析见图 9。X、Y 坐标轴均以 0.5 为界限,发现 4 个平面内基因分布不均衡。从 G3/GC3 轴看,多数基因位于上方 (>0.5),少数基因位于下方 (<0.5);从 A3/AU3 轴看,多数基因位于左侧 (<0.5),少数基因位于右侧 (>0.5),这表明 4 种碱基在同义密码子第 3 位上存在 C>G、T>A 现象。由于当密码子使用存在偏性完全受突变压力影响时,C 和 G 以及 A 和 T 同义密码子在第 3 位上的分布应相等。因此,广丰千金薯叶绿体基因组密码子使用偏性除受到突变影响外,还受自然选择等因素影响。

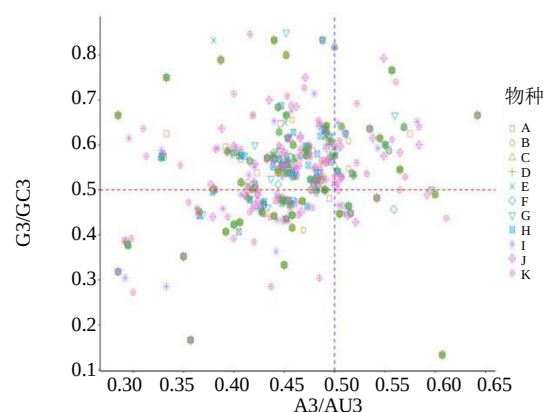


图 9 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组密码子 PR2-plot 分析

Fig. 9 PR2-plot analysis of chloroplast genome codons of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu and its ten related species

3.7.5 最优密码子确定 广丰千金薯叶绿体基因的高表达基因库 (ENC 值小) 和低表达基因库 (ENC 值大) 及二者的 RSCU 差值 (Δ RSCU) 见表 7。由表 7 可知, 同时满足条件 $RSCU > 1$ 和 $\Delta RSCU \geq 0.08$ 的密

码子共 16 个, 即 UUA、UCU、GAU、GGA、AAU、CAU、GUA、CAA、GAA、CCU、GUU、AUU、CGA、CUU、UUU、AGU, 这些密码子都以 A、U 结尾, 被确定为广丰千金薯叶绿体基因组的最优密码子。

表 7 广丰千金薯叶绿体基因最优密码子筛选

Table 7 Optimal codon screening of chloroplast genome of <i>D. opposita</i> cv. Guangfeng Qianjinshu								
密码子	氨基酸	相对同义密码子使用度	数量	RSCU 高表达	数量	RSCU 低表达	数量	RSCU 差值
AUG	Met	1.990 65	639	1.000 00	19	1.000 00	9	0.000 00
AGA	Arg	1.951 40	522	1.142 86	4	1.142 86	4	0.000 00
UUA*	Leu	1.830 17	837	1.406 25	15	1.153 85	5	0.252 40
GCU	Ala	1.804 62	605	1.575 76	13	1.600 00	4	-0.024 24
UCU*	Ser	1.686 05	580	1.621 62	10	1.363 64	3	0.257 98
GAU*	Asp	1.633 46	869	1.666 67	15	1.000 00	4	0.666 67
GGA*	Gly	1.631 31	719	1.875 00	15	1.777 78	8	0.097 22
UAU	Tyr	1.598 40	800	1.600 00	16	1.666 67	5	-0.066 67
ACU	Thr	1.596 45	540	1.290 32	10	1.666 67	10	-0.376 35
AAU*	Asn	1.572 78	994	1.444 44	13	1.000 00	3	0.444 44
CAU*	His	1.568 69	491	1.500 00	6	1.000 00	3	0.500 00
GUA*	Val	1.522 87	541	1.268 29	13	0.375 00	1	0.893 29
CAA*	Gln	1.516 88	719	1.692 31	11	1.600 00	4	0.092 31
GAA*	Glu	1.502 50	1 051	1.517 24	22	1.200 00	3	0.317 24
CCU*	Pro	1.493 79	391	1.777 78	12	1.000 00	3	0.777 78
AAA	Lys	1.493 20	1043	1.428 57	10	1.750 00	7	-0.321 43
GUU*	Val	1.449 68	515	1.365 85	14	1.125 00	3	0.240 85
AUU*	Ile	1.446 31	1 118	1.650 00	22	1.500 00	11	0.150 00
CGU	Arg	1.428 04	382	1.142 86	4	1.428 57	5	-0.285 71
GGU	Gly	1.363 58	601	1.000 00	8	1.333 33	6	-0.333 33
UCA	Ser	1.328 49	457	0.972 97	6	1.363 64	3	-0.390 67
CGA*	Arg	1.297 20	347	1.714 29	6	0.571 43	2	1.142 86
UUG	Leu	1.281 34	586	0.750 00	8	0.692 31	3	0.057 69
UAA	Ter	1.275 86	37	0.500 00	1	0.500 00	1	0
CUU*	Leu	1.241 98	568	1.125 00	12	0.923 08	4	0.201 92
UUU*	Phe	1.231 91	911	1.315 79	25	0.800 00	4	0.515 79
AGU*	Ser	1.200 58	413	1.297 30	8	0.909 09	2	0.388 21

*密码子为最优密码子。
*The codons are the optimal ones.

3.8 薯蓣属植物系统发育分析

基于广丰千金薯及其 34 个近缘种叶绿体基因组构建的系统发育树见图 10。由图 10 可知, *D. cayenensis* NC_039836、*D. cayenensis* subsp. *Rotundata* MZ848368、*D. abyssinica* NC_039834、*D. sagittifolia* NC_039854、*D. baya* NC_039850、*D. burkilliana* NC_039835 和 *D. togoensis* NC_039836 聚为一支; 丽叶薯蓣 NC_039807、*D. pyrifolia* NC_062814 和褐苞薯蓣 MN585218 聚为一支; 广

丰千金薯、野脚板薯 NC_037716、穿龙薯蓣 NC_057065、日本薯蓣 MW413805 和薯蓣 NC_065059 聚为一支; *D. depauperata* NC_062812、光叶薯蓣 NC_062813、*D. brevipetiolata* NC_062811 和脚板薯 NC_039707 聚为一支; *D. hirtiflora* NC_039851 和 *D. schimperiana* NC_039855 聚为一支。因此, 广丰千金薯与野脚板薯 NC_037716、穿龙薯蓣 NC_057065、日本薯蓣 MW413805 和薯蓣 NC_065059 的亲缘关系较近。由于广丰千金薯与野

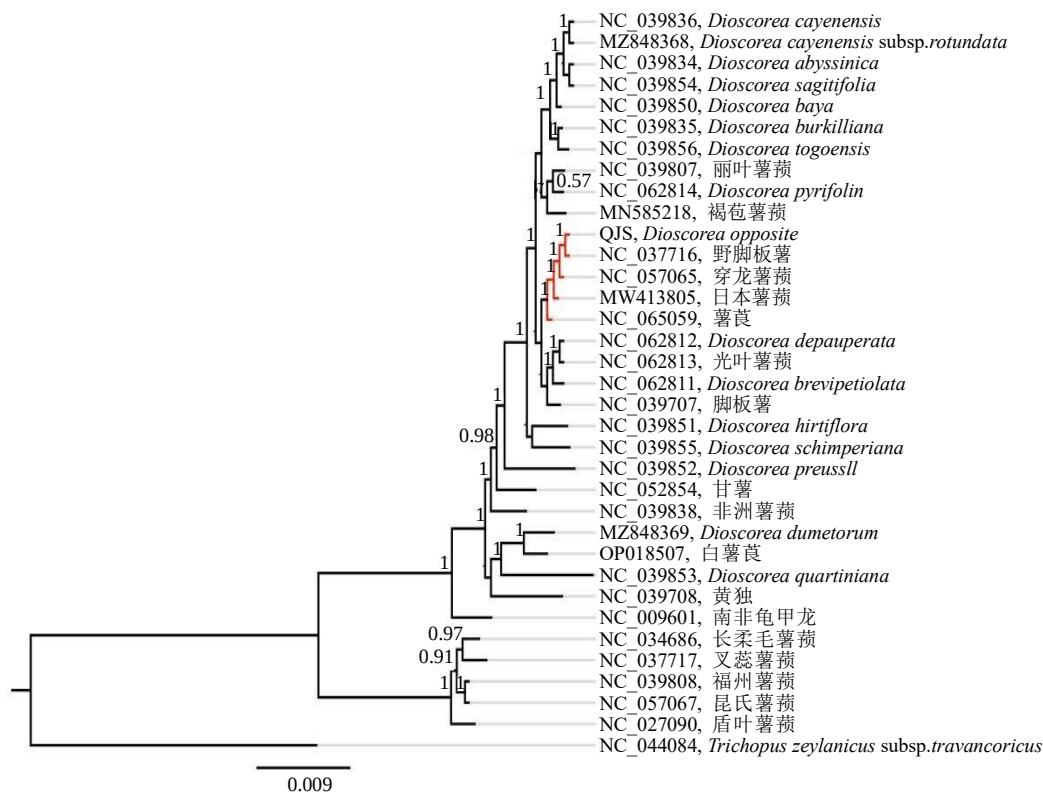


图 10 基于叶绿体基因组的广丰千金薯及其 34 个近缘种的系统发育树

Fig. 10 Phylogenetic tree of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu and its 34 related species based on chloroplast genome

脚板薯 NC_037716 还聚为一小支, 说明广丰千金薯与野脚板薯 NC_037716 亲缘关系较近, 广丰千金薯与野脚板薯 NC_037716 来源于同一个最近共同祖先。

3.9 广丰千金薯的标志性鉴定序列及其鉴定 InDel 引物设计

广丰千金薯的标志性鉴定序列及其鉴定 InDel 引物设计见图 11、表 8 和表 9。由图 11 可知, 广丰

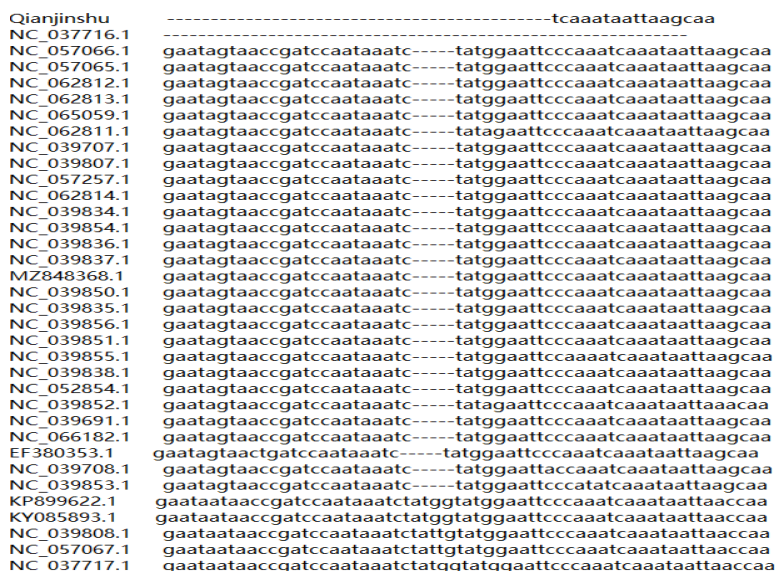


图 11 广丰千金薯的标志性鉴定序列

Fig. 11 Signature identification sequence of *D. opposita* cv. Guangfeng Qianjinshu

表 8 广丰千金薯鉴定的 InDel 引物组 1

Table 8 InDel primer group 1 for identification of *D. opposite* cv. Guangfeng Qianjinshu

名称	序列 (5'-3')	最小值/bp	最大值/bp	T _m /°C	长度/bp	大小/bp
6793 F	AGACGCAAAC TTTACCATATCCA	6 793	6 815	58.2	23	330
7160 R	AAGGCCTGTGATGCTATGCA	7 133	7 160	59.7	28	330
6793 F	AGACGCAAAC TTTACCATATCCAA	6 793	6 816	58.8	24	331
6794 F	GACGCAAAC TTTACCATATCCAA	6 794	6 816	57.4	23	331
7161 R	CAAGGCCTGTGATGCTATGC	7 134	7 161	59.3	28	331
7162 R	ACAAGGCCTGTGATGCTATGC	7 134	7 162	61.0	29	331
6727 F	TGGACACAATCACAATGAGTAGA	6 727	6 758	57.5	32	388
7161 R	CAAGGCCTGTGATGCTATGCA	7 133	7 161	61.0	29	388
6722 F	ACAAATGGACACAATCACAATGAGT	6 722	6 755	59.7	34	391
7159 R	AGGCCTGTGATGCTATGCA	7 133	7 159	59.1	27	391

表 9 广丰千金薯鉴定的 InDel 引物组 2

Table 9 InDel primer group 2 for identification of *D. opposite* cv. Guangfeng Qianjinshu

名称	序列 (5'-3')	最小值/bp	最大值/bp	T _m /°C	长度/bp	大小/bp
5130 F	TCATAAATGGTCATTGGCTCAAC	5 130	5 152	57.4	23	306
5435 R	GGGTCCTTTTGTTTGTGTTGAGGT	5 412	5 435	60.3	24	306
5129 F	ATCATAAATGGTCATTGGCTCAAC	5 129	5 152	57.8	24	306
5434 R	GGTCCTTTTGTTTGTGTTGAGGT	5 412	5 434	58.2	23	306
5130 F	TCATAAATGGTCATTGGCTCAACC	5 130	5 153	59.6	24	307
5436 R	AGGGTCCTTTTGTTTGTGTTGAGG	5 413	5 436	60.1	24	307
5129 F	ATCATAAATGGTCATTGGCTCAACC	5 129	5 153	59.9	25	307
5435 R	GGGTCCTTTTGTTTGTGTTGAGG	5 413	5 435	58.8	23	307
14811 F	TTGGCCTACTTCTACACCCCG	14 811	14 830	59.1	20	359
15169 R	TTGCGAGGGTCGTTATAGCT	15 150	15 169	58.9	20	359
14810 F	GTGGCCTACTTCTACACCCCG	14 810	14 830	60.4	21	361
15170 R	TTTGCAGGGTCGTTATAGCT	15 150	15 170	59.5	21	361
14813 F	GGCCTACTTCTACACCCGAT	14 813	14 832	58.6	20	362
15174 R	GCAATTTGCGAGGGTCGTT	15 156	15 174	59.4	19	362
14812 F	TGGCCTACTTCTACACCCGA	14 812	14 831	60.0	20	363
15174 R	GCAATTTGCGAGGGTCGTTA	15 155	15 174	59.2	20	363
14812 F	TGGCCTACTTCTACACCCGAT	14 812	14 832	60.3	21	363
15174 R	GCAATTTGCGAGGGTCGTTAT	15 154	15 174	59.6	21	363
5131 F	CATAAATGGTCATTGGCTCAACC	5 131	5 153	58.3	23	400
5530 R	TCGGGTTATTGGAGTCATTGT	5 510	5 530	57.0	21	400

千金薯的标志性鉴定序列为 TCAAATAATT AAGCAA。由表 8 可知,广丰千金薯鉴定的 InDel 引物组 1 有 4 对引物(针对同一个 indel 位点,InDel 比较长),可以鉴定区分广丰千金薯/NC_037716.1/NC_057066.1 与其他近缘种的差异,但无法区分广丰千金薯、NC_037716.1 和 NC_057066.1。由表 9 可知,广丰千金薯鉴定的 InDel 引物组 2 有 8 对引物(针对 2 个位点,InDel 比较长),可以区分广丰千金薯/NC_037716.1 与

其他近缘种的差异。但无法区分广丰千金薯和 NC_057066.1。

4 讨论

叶绿体被普遍认为起源于内共生的蓝藻,是细胞内半自主细胞器以及光合作用和生物合成的关键场所^[20]。近年来叶绿体基因组已发展成为近缘物种分子标记、揭示植物进化和系统发育关系的有力工具^[21]。马双姣等^[22]的研究表明,薯蓣(河南焦作)和叉蕊薯蓣(四川峨眉山)叶绿体基因组全长和 GC

量分别为 152 963 bp 和 153 870 bp、37.04%和 37.17%。Zhao 等^[23]的研究表明, 丽叶薯蓣、脚板薯、黄独、福州薯蓣、野脚板薯、南非龟甲龙、长柔毛薯蓣、盾叶薯蓣、白山药叶绿体基因组全长分别为 153 337、153 161、153 075、153 946、153 243、152 609、153 919、153 970、155 418 bp, 其 GC 含量分别为 37.0%、37.0%、37.0%、37.2%、37%、37.2%、37.2%、37.2%、37.2%。张玉君^[24]的研究表明, 河北封龙山、山东泰山、河南云台山、北京香山、江苏南京、福建闽侯区 6 个野生薯蓣叶绿体基因组全长分别为 153 255、153 255、153 292、153 257、153 281、153 243 bp。在本实验中, 广丰千金薯叶绿体基因组长度为 153 293 bp, 基因组的总 GC 含量为 37.01%。表明薯蓣属植物叶绿体基因组大小、基因组成等高度保守。

重复序列在叶绿体基因组中发挥着重要的进化作用, 能促进叶绿体基因组重排, 影响基因组结构的变化, 并且可以增加种群遗传多样性^[22]。简单重复序列是叶绿体基因组中一段长度为 1~6 bp 的重复序列, 具有共显性、多等位基因、高度可变、多态性等特点, 是研究遗传变异性的最佳标记^[23]。马双姣等^[22]的研究表明, 薯蓣(河南焦作)叶绿体全基因组共有 215 个 SSR 位点。其中单碱基重复有 140 个, 二碱基重复有 56 个, 三碱基重复有 10 个, 四碱基重复有 4 个, 五碱基重复有 5 个, 重复最多的序列是单碱基重复, 主要是 A/T 的重复; 叉蕊薯蓣(四川峨眉山)叶绿体全基因组共有 236 个 SSR 位点, 其中单碱基重复有 148 个, 二碱基重复有 63 个, 三碱基重复有 6 个, 四碱基重复有 12 个, 五碱基重复有 4 个, 六碱基重复有 3 个, 重复最多的序列是单碱基重复, 主要是 A/T 的重复。Zhao 等^[23]的研究表明, 丽叶薯蓣、脚板薯、黄独、福州薯蓣、野脚板薯、*D. elephantipes*、*D. villosa*、盾叶薯蓣、*D. rotundata* 叶绿体全基因组中, *D. elephantipes* 的 SSRs 最多(95 个), 而 *D. rotundata* 的 SSRs 最少(66 个), 复最多的序列是单碱基重复, 主要是 A/T 的重复。张玉君^[24]的研究表明, 河北封龙山、山东泰山、河南云台山、北京香山、江苏南京、福建闽侯区 6 个野生薯蓣叶绿体基因组共检测到 66 个 SSR 位点, 含有 37 个单核苷酸序列、11 个二核苷酸 SSR 序列、7 个三核苷酸 SSR 序列、4 个四核苷酸 SSR 序列、7 个五核苷酸 SSR 序列。在本实验中, 广丰千金薯叶绿体基因组共有 45 个 SSR 位点, 其中单

碱基重复有 37 个, 双碱基重复有 4 个, 三碱基重复有 4 个, 重复最多的序列是单碱基重复, 主要是 A/T 的重复。广丰千金薯叶绿体全基因组中碱基重复序列比薯蓣(河南焦作)和叉蕊薯蓣(四川峨眉山)显著减少, 且广丰千金薯中未发现四碱基重复、五碱基重复和六碱基重复。广丰千金薯叶绿体全基因组重复序列的获取, 为悬钩子属植物的进一步的演化研究提供参考。

叶绿体基因作为 DNA 条形码鉴定序列已得到公认, 其中 *psbA-trnH*、*matK*、*rbcL* 等已普遍作为药用植物的 DNA 分子鉴定条形码^[25]。在本实验中, 除了甘薯和黄独的 *trnN* 基因内缩、*D. cayenensis* 的 *trnH* 基因右移外, 广丰千金薯及其 10 个近缘种 *trnH* 基因的长度和位置基本一致; 除了甘薯的 *psbA* 基因右移外, 广丰千金薯及其 10 个近缘种 *psbA* 基因的长度和位置也基本一致。因此, 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组结构较为保守。曾晓璇^[26]的研究表明, 来自全国范围内 14 个省份的 69 份山药样叶绿体基因组核苷酸多样性的高变区主要分布在 LSC 和 SSC 区域。 $P_i > 0.008$ 的热点区域分别为 *trnK-psbK*、*rps2-rpoC2*、*trnL-trnF*、*rps15-ndhH*、*psaI*、*ycfI* 和 *rpl32*, 其中, *rps2-rpoC2* 区域的 P_i 值最高为 0.030 67。在本实验中, 广丰千金薯及其 10 个近缘种叶绿体基因组核苷酸多样性的变化范围为 0~0.097 09, 高变区主要分布在 LSC 和 SSC 区域, 基因间隔区 *matK-tnaQ-UUG*、*atpI-rps2*、*psbI-trnS*、*rpl32-ndhF*、*ndhD-ccsA*、*trnE-UUC-trnT-GGU*、*trnS-GCU-trnG-UCC*、*rps2-rpoC2* 以及基因 *ycfI* 变异率最高。这些变异位点百分率较高的叶绿体基因间隔区, 能提供足够多的信息位点, 为广丰千金薯分子鉴定提供较高的分辨率。其中, 通过自然选择, 例如阴暗潮湿等环境因子, 会使 *ycfI* 等调节光合作用的基因面临的选择压力不同, 进而使得基因的进化速率不同^[27-28], 这类进化速率不同的基因可以组合起来作为 DNA 条形码^[19], 为广丰千金薯特异分子标记的开发提供有价值的信息。还有研究表明, 薯蓣的叶绿体基因组中 *ycfI* 基因是第 2 长的基因, 对植物的生长发育和编码 Tic214 至关重要, 也是拟南芥叶绿体内膜蛋白转运子(TIC)的一个重要组成部分^[29]。*ycfI* 的 2 个部分(*ycfIa* 和 *ycfIb*) 在开花植物 SSC 区具有高度的变异^[30-31], 可以作为广丰千金薯系统发育和物种鉴定的标记物。

叶绿体基因组仅次于核基因组,遗传信息丰富,并且编码区进化速度较慢,适用于系统进化研究^[32]。有 RAPD 分子标记分析表明,广丰千金薯与来源于河南焦作市温县的铁棍山药亲缘关系较近^[14]。Zhao 等^[23]的研究表明,九种薯蓣属植物分为 2 支,一支包括长柔毛薯蓣、盾叶薯蓣和福州薯蓣,另一支包括南非龟甲龙、黄独、丽叶薯蓣、白山药、脚板薯和野脚板薯。张玉君^[24]的研究表明,河北封龙山、山东泰山、河南云台山、北京香山、江苏南京、福建闽侯区 6 个野生薯蓣均属于野脚板薯,与白山药、南非龟甲龙。本实验结果与此一致。马双姣等^[22]的研究表明,薯蓣(河南焦作)、白山药、南非龟甲龙聚为一支;叉蕊薯蓣、长柔毛薯蓣、穿龙薯蓣、盾叶薯蓣聚为一支。在本实验中,南非龟甲龙单独成一支,而广丰千金薯与野脚板薯 NC_037716、穿龙薯蓣 NC_057065、日本薯蓣 MW413805 和薯蓣 NC_065059 聚为一支。表明广丰千金薯与薯蓣(河南焦作)亲缘关系较远。这与尹明华等^[14]的结论不一致,说明叶绿体基因组用于系统发育进化,较 RAPD 分子标记分析分析更为精确。在本实验中,广丰千金薯与野脚板薯 NC_037716 聚为一小支,说明广丰千金薯与野脚板薯 NC_037716 亲缘关系较近,这从一定程度上解决了广丰千金薯的种源来源问题。

对薯蓣属植物叶绿体全基因组进行比对能够更加全面地反映薯蓣属物种的序列变异情况,为从广丰千金薯叶绿体基因组序列中筛选特异性 DNA 条形码鉴定序列提供了参考。本实验通过比对,找出了广丰千金薯的标志性鉴定序列为 TCAAAT-AATTAAGCAA。InDel (Insertion/Deletion) 为插入缺失标记,指的是不同样本在全基因组中有一定数量的核苷酸插入或缺失。本实验根据基因组中插入缺失位点,设计 12 对扩增这些插入缺失位点的 InDel 标记 PCR 引物,可以鉴定区分广丰千金薯/NC_037716.1/NC_057066.1 与其他近缘种的差异。本研究通过广丰千金薯叶绿体基因组筛选的标志性鉴定序列和 InDel 标记 PCR 引物在广丰千金薯中的鉴定效率有待于收集更多的该属物种通过常规 DNA 条形码方法进一步验证,最终确定广丰千金薯鉴定的特异性 DNA 条形码。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 柯维忠,王丽,杨星鹏,等.广丰千金薯驯化移栽苗对 PEG 干旱胁迫的光合生理响应[J].浙江农业学报,

2016, 28(9): 1462-1475.

- [2] 方利平,尤玉英,邱翠金,等.广丰千金薯高产栽培技术[J].安徽农学通报,2009,15(6): 147-148.
- [3] 徐梅,魏怡冰,杜富强,等.10 种黔产薯蓣属植物叶表皮微形态特征及分类学意义[J].江苏农业科学,2019,47(24): 82-87.
- [4] 黄含含,李霞,高文远,等.薯蓣属药用植物的亲缘关系研究[J].中国中药杂志,2015,40(17): 3470-3479.
- [5] Terauchi R, Konuma A. Microsatellite polymorphism in *Dioscorea tokoro*, a wild yam species [J]. *Genome*, 1994, 37(5): 794-801.
- [6] Mignouna H, Mank R, Ellis T, et al. A genetic linkage map of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) based on AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(5): 716-725.
- [7] Mignouna D, Mank A, Ellis N, et al. A genetic linkage map of water yam (*Dioscorea alata* L.) based on AFLP markers and QTL analysis for anthracnose resistance [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105(5): 726-735.
- [8] 赵月梅,杨贵清,徐其碧,等.建始槭叶绿体基因组密码子使用偏性分析[J].福建农林大学学报(自然科学版),2022,51(6): 792-799.
- [9] 李佳璇,梁丹,张鹏.系统发育基因组学方法研究进展[J].中国科学:生命科学,2019,49(4): 456-471.
- [10] 崔柳青,李一帆,潘卫东.叶绿体基因工程研究进展[J].生物技术通报,2012(6): 1-6.
- [11] 李汐,祝铭,孙延霞,等.基于叶绿体 rps16 基因和核基因 ITS 片段研究肉苁蓉属系统位置[J].植物科学学报,2012,30(5): 431-436.
- [12] 李丹丹,郭水良,于晶,等.基于 4 个叶绿体基因识别蕨藓属(*Macromitrium*)植物的可行性研究[J].植物科学学报,2013,31(1): 23-33.
- [13] 尹明华,徐志坚,章省琴,等.广丰千金薯离体快繁及其气孔观察、染色体倍数 FCM 分析和 DNA 变异 ISSR 检测[J].中药材,2016,39(7): 1446-1451.
- [14] 尹明华,徐志坚,黄玮,等.江西山药种质资源遗传多样性及其组培苗遗传稳定性的 RAPD 检测[J].中草药,2016,47(19): 3486-3493.
- [15] 尹明华,白丽,陈舒敏,等.广丰千金薯和铁棍山药脱毒微型块茎的转录组分析[J].浙江农业学报,2022,34(10): 2209-2219.
- [16] Liu Z F, Ma H, Ci X Q, et al. Can plastid genome sequencing be used for species identification in Lauraceae? [J]. *Bot J Linn Soc*, 2021, 197(1): 1-14.
- [17] 刘潮,唐利洲,韩利红.四川山胡椒叶绿体基因组特征及山胡椒属系统发育[J].林业科学,2021,57(12): 167-174.
- [18] Song Y, Yu W B, Tan Y H, et al. Plastid phylogenomics improve phylogenetic resolution in the Lauraceae [J]. *J*

- Syst Evol*, 2020, 58(4): 423-439.
- [19] 童一涵, 郑倩, 杜新明, 等. 多齿红山茶叶绿体基因组序列特征分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(5): 27-36.
- [20] Dyall S D, Brown M T, Johnson P J. Ancient invasions: From endosymbionts to organelles [J]. *Science*, 2004, 304(5668): 253-257.
- [21] 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.
- [22] 马双姣, 周建国, 李滢, 等. 薯蓣和叉蕊薯蓣叶绿体基因组及特异性 DNA 条形码鉴定序列筛选研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(5): 571-582.
- [23] Zhao Z Y, Wang X, Yu Y, *et al.* Complete chloroplast genome sequences of *Dioscorea*: Characterization, genomic resources, and phylogenetic analyses [J]. *Peer J*, 2018, 6: e6032.
- [24] 张玉君. 基于叶绿体分子谱系地理学的山药的系统进化和品种鉴定研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [25] Li X W, Yang Y, Henry R J, *et al.* Plant DNA barcoding: From gene to genome [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2015, 90(1): 157-166.
- [26] 曾晓璇. 山药种质资源整理研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [27] Yang X F, Wang Y T, Chen S T, *et al.* PBR1 selectively controls biogenesis of photosynthetic complexes by modulating translation of the large chloroplast gene *Ycf1* in *Arabidopsis* [J]. *Cell Discov*, 2016, 2: 16003.
- [28] Vitti J J, Grossman S R, Sabeti P C. Detecting natural selection in genomic data [J]. *Annu Rev Genet*, 2013, 47: 97-120.
- [29] Kikuchi S, Bédard J, Hirano M, *et al.* Uncovering the protein translocon at the chloroplast inner envelope membrane [J]. *Science*, 2013, 339(6119): 571-574.
- [30] Dong W P, Xu C, Li C H, *et al.* *ycf1*, the most promising plastid DNA barcode of land plants [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8348.
- [31] Dong W P, Liu J, Yu J, *et al.* Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35071.
- [32] 倪梁红, 赵志礼, 米玛. 药用植物叶绿体基因组研究进展 [J]. 中药材, 2015, 38(9): 1990-1994.

[责任编辑 时圣明]