

朱蕉叶绿体基因组特征与系统发育分析

李卫英^{1,2}, 辛 静^{1,2}, 赵文植^{1,2}, 董章宏^{1,2}, 马路遥^{1,2}, 夏茂甜^{1,2}, 高 洁^{3*},
辛培尧^{1,2*}

1. 西南林业大学国家林业和草原局西南风景园林工程技术研究中心, 云南昆明 650224; 2. 西南林业大学西南地区生物多样性保育国家林业和草原局重点实验室, 云南昆明 650224; 3. 中国科学院西双版纳热带植物园综合保护中心, 云南勐腊 666303

摘 要: 朱蕉 (*Cordyline fruticosa*) 是一种常见的园艺植物, 广泛分布于亚洲、大洋洲、南美洲等热带地区。为了明确朱蕉叶绿体基因组特征, 了解其系统发育地位, 利用 Illumina 测序技术对其叶绿体基因组测序后, 进行中线性绘图、ENC-plot、PR2-plot 和 SSR 位点等相关数据的挖掘和分析。结果表明: 朱蕉叶绿体基因组全长 154 488 bp, GC 含量为 38%, 其中大单拷贝区区长 85 279 bp, GC 含量为 36.1%, 小单拷贝区长 20 325 bp, GC 含量为 32.6%; 双向重复区分别长 24 442 bp, GC 含量分别为 43.4%。注释得到 131 种基因, 其中 unigenes 的有 111 种, 包括了 78 种蛋白编码基因, rRNA 基因 4 种和 tRNA 基因 29 种。以朱蕉与龙舌兰科中 19 种植物的叶绿体基因组构建系统发育树, 结果显示朱蕉与蓝朱蕉 (*Cordyline indivisa*) 的亲缘关系最近。朱蕉叶绿体基因组 GC₃、GC₁ 与 GC₂ 的碱基含量分别为 29.47%、46.45% 和 39.14%, GC₃ 的碱基含量低于 GC₁ 和 GC₂, 说明密码子末尾偏好以 A、U 结尾; ENC 的取值范围为 35.48~59.44, 表明朱蕉密码子偏好性较弱; ENC-plot 分析可知 ENC 频数比值在 -0.05~0.05 之间的有 20 个, 表明密码子偏好性主要受自然选择压力的影响; PR2-plot 分析中, T > A, G > C, 说明朱蕉叶绿体基因组受多种因素的影响; 以 RSCU 值和 ENC 值作为参考, 确定 17 个密码子为最优密码子。在检测到的 91 个 SSR 位点中五核苷酸最少 (3 个), 单核苷酸最多 (55 个), SSR 位点中以 A、T (A/T、AT/AT 和 AAAT/ATTT) 为重复单元的占 76.92%。说明朱蕉叶绿体基因组 SSR 位点多以 A、T 重复单元为主。研究结果可为朱蕉乃至朱蕉属植物分类及系统进化提供理论依据。

关键词: 朱蕉; 叶绿体基因组; 系统发育; 密码子

中图分类号: S687.9 文献标识码: A

Genomic Characteristics and Phylogenetic Analysis of Chloroplast of *Cordyline fruticosa*

LI Weiying^{1,2}, XIN Jing^{1,2}, ZHAO Wenzhi^{1,2}, DONG Zhanghong^{1,2}, MA Luyao^{1,2}, XIA Maotian^{1,2}, GAO Jie^{3*},
XIN Peiyao^{1,2*}

1. Southwest Research Center for Engineering Technology of Landscape Architecture (National Forestry and Grassland Administration), Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China; 2. Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Biodiversity Conservation in Southwest China, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China; 3. Center for Integrative Conservation, Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303, China

Abstract: *Cordyline fruticosa* is an common horticultural plant, widely distributed in tropical Asia, Oceania and South America. In order to clarify the characteristics of the chloroplast genome of *C. fruticosa* and understand its phylogenetic status, the chloroplast genome was sequenced by Illumina sequencing technology, and the relevant data of middle linear plot, ENC-plot, PR2-plot and SSR loci were mined and analyzed. The total length of the complete chloroplast genome

收稿日期 2021-10-25; 修回日期 2021-12-01

基金项目 西南林业大学科技创新基金项目 (No. KY21035); 云南省科技人才与平台计划项目 (No. 202205AF15002)。

作者简介 李卫英 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 林木分子生物学与遗传改良。*通信作者 (Corresponding author): 高 洁 (GAO Jie), E-mail: gaojie@xtbg.org.cn; 辛培尧 (XIN Peiyao), E-mail: xpytyx@163.com。

was 154 488 bp, and the GC content was 38%. The length of large single copy area was 85 279 bp and the GC content was 36.1%. The small single copy area was 20 325 bp, and the GC content was 32.6%. And bidirectional repetition zones were 24 442 bp, respectively, and the GC content was 43.4%. 131 genes were annotated, including 111 unigenes genes, including 78 protein-coding genes, 4 rRNA genes and 29 tRNA genes. Phylogenetic tree was constructed using the chloroplast genomes of 19 plant species in *C. fruticosa* and Agavaceae family. *C. fruticosa* was most closely related to *C. indivisa*. The content of GC₃ in the chloroplast genome of *C. fruticosa* was 29.47%, GC₁ and GC₂ were 46.45%, 39.14%, respectively. The base content of GC₃ was lower than that of GC₁ and GC₂, indicating that codon ends preferred to end with A and U. The ENC values ranged from 35.48 to 59.44, indicating that the codon bias was weak. ENC-plot analysis showed that there were 20 ENC frequency ratios between -0.05 to 0.05, indicating that codon preference was mainly affected by natural selection pressure. PR2-plot analysis revealed T>A, G>C, indicating that the chloroplast genome of *C. fruticosa* was affected by many factors. Codon preference is mainly influenced by selection. Using RSCU and ENC values as references, 17 codons were determined as optimal codons in the chloroplast genome of *C. fruticosa*. Among the 91 SSR loci detected, there were 3 pentanucleotides and 55 single nucleotides. 76.92% of the SSR loci took A, T (A / T, AT / AT and AAAT / ATTT) as repeat units. It showed that the A and T repeat units were the main SSR sites in the chloroplast genome of *C. fruticosa*. The results of this study could provide a theoretical basis for the taxonomy and phyletic evolution of *C. fruticosa* and *Cordyline*.

Keywords: *Cordyline fruticosa*; chloroplast genome; phylogeny; codon

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2022.04.001

朱蕉 (*Cordyline fruticosa*) 为龙舌兰科 (Agavaceae) 朱蕉属 (*Cordyline*) 植物。朱蕉喜高温多湿气候, 主要分布于亚洲、大洋洲和南美洲的热带地区^[1]。其株形优美, 色彩华丽高雅, 具有较高的观赏性, 同时还可用于服饰、食品包装^[2]等方面, 因此在中国南部和台湾等地区广泛种植^[3]。此外, 朱蕉也是一种药用植物^[4], 叶片中含有次生代谢物甾体皂苷, 可用于抗菌、抑制肿瘤细胞、治疗腹泻等^[5-6]。目前, 关于朱蕉的相关研究仅见于组织培养^[7-9]、病虫害治理^[4, 10-11]、扦插繁殖^[2-3, 11]、盐胁迫^[12-14]和 RAPD、SSR 分子标记^[15-17]等方面。

植物叶绿体是一些高等植物和藻类所特有的细胞器^[18-19], 是进行光合作用的重要场所^[20]。叶绿体基因组具有保守的四分体结构, 由大单拷贝区 (large single copy, LSC)、2 个双向重复区 (inverted repeat, IR) 和小单拷贝区 (small single copy, SSC) 组成^[21]。叶绿体基因组具有相对独立的遗传系统、进化速率快、分子量相对保守、序列获得容易等特点, 被广泛地应用于分子进化、DNA 条形码开发、物种鉴定、物种演化和系统发育分析等方面^[22-23]。其中系统发育分析在物种进化研究、植物分类和亲缘关系鉴定等方面备受科研工作者的关注, 如在花园君子兰 (*Clivia gardenii*)^[21]、香花枇杷 (*Eriobotrya fragrans*)^[24]、羽叶丁香 (*Syringa pinnatifolia*)^[25]、毛重楼 (*Paris mairei*)^[26]和杜梨 (*Pyrus betulifolia*)^[27]等植物中的应用。此外, 在细胞质中, 通过 mRNA 翻译

成蛋白质时, 遗传密码子担当着重要的角色。编码同一种氨基酸的不同密码子, 在遗传学中称之为同义密码子, 不同的蛋白质编码在同义密码子的使用上是有所不同的, 但同一物种或亲缘关系相近的物种间却有着相似的使用偏好性^[28-29]。密码子偏性在植物类群相关研究方面备受关注, 其在遗传改良和系统发育等方面具有重要的意义。目前关于叶绿体基因组特征分析已应用于多种植物, 如金刚等^[30]以剑麻 *H.11648* (*Agave sisalana*) 栽培种进行叶绿体基因组相关研究, 结果表明其密码子偏好性是受自然选择压力和突变压力的共同影响。在香花枇杷 (*E. fragrans*)^[31]、蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite*)^[32]和蒜头果 (*Malania oleifera*)^[33]等叶绿体基因组分析中也表明密码子使用偏好性的因素是多种因素共同决定的。

目前, 龙舌兰科植物的叶绿体全基因组已在香龙血树 (*Dracaena fragrans*)^[34]、柬埔寨龙血树 (*Dracaena cambodiana*)^[35]、丝兰 (*Yucca flaccida*)^[36]和剑麻 (*A. sisalana*)^[30]等多种植物中展开研究, 但朱蕉在该方面的相关研究还未见报道。对朱蕉叶绿体基因组特征、系统发育等信息进行分析, 可为朱蕉乃至朱蕉属植物叶绿体基因组的研究与应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

研究材料来自于中国科学院西双版纳热带植

物园。采摘朱蕉新鲜嫩叶,裹上锡箔纸放入液氮中,备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组的测序和注释 采用宋国立等^[37]的方法对朱蕉叶片的 DNA 进行提取和检测,从而形成测序文库,质检合格后采用 Illumina Novaseq 平台进行测序。由北京诺禾致源科技股份有限公司完成相关建库测序。

以蓝朱蕉 (*C. indivisa*) 叶绿体基因组 (登录号: KX822776) 为参照,由 Getorganelle 软件组装成完整的 CP (叶绿体) 基因组^[38],使用在线软件 GeSeq (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html>) 对朱蕉叶绿体基因组进行注释,使用 Geneious 8.1 软件对注释结果手动校正^[39]。其结果已提交至樟科植物叶绿体基因组数据库 (<https://lcgdb.wordpress.com/>) (登录号: LAU10100)。最后,利用 OGDRAW (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>) 软件在线进行朱蕉叶绿体基因组的物理图谱的绘制。

1.2.2 系统发育分析 为研究朱蕉在龙舌兰科中的系统发育关系,以龙舌兰科中 7 个属植物作为主群体,分别为龙舌兰属 (*Agave*)、朱蕉属 (*Cordyline*)、晚芦荟属 (*Hesperaloe*)、龙血树属 (*Dracaena*)、虎尾兰属 (*Sansevieria*)、丝兰属 (*Yucca*) 和 *Hesperocallis* 属。共有 19 个种,分别是美洲龙舌兰 (*A. americana* KX519714)、剑麻 H.11648 (*A. hybrid cultivar* H.11648 MG642741)、灰叶剑麻 (*A. fourcroydes* MW540496)、狭叶龙舌兰 (*A. angustifolia* MW540498)、剑麻 (*A. sisalana* MW540497)、*Polianthes* sp. (KX931464)、蓝朱蕉 (*C. indivisa* KX822776)、柬埔寨龙血树 (*D. cambodiana* MH 293451)、*D. coohinchinensis* (MN200195)、龙血树 (*D. draco* MN990038)、香龙血树 (*D. fragrans* MW123093)、金边虎尾兰 (*S. trifasciata* var. *laurentii* MT922036)、短叶丝兰 (*Y. brevifolia* MW281818, MW 281832)、*H. parviflora* (NC032703)、*H. campanulate* (NC032702)、*H. undulata* (NC032704)、*Y. brevifolia* × *Y. jaegeriana* (MW281839)、*Y. jaegeriana* (MW281848)。在百合科 (Liliaceae) 百合属 (*Lilium*) 中选择野百合 (*L. brownii*) (登录号: KX822776) 作为外类群进行系统发育分析。首先利用 MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) 软件进行在线序列比对,再使用 BioEdit 软件对矩阵进行手

动校正,然后用 CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>) 在线软件构建具有 1000 个 Bootstrap 的最大似然法 (maximum likelihood, ML) 系统发育树。最后使用 FigTree 软件对结果进行美化。

1.2.3 密码子相关参数计算 运用软件 CodonW 1.4.2 分析大于 300 bp 的 47 条 CDS (蛋白质编码区),分析朱蕉叶绿体基因组各 CDS 的同义密码子相对使用度 (relative synonymous codon usage, RSCU) 和有效密码子数 (Effective number of codon, ENC)。使用 EMBOSS explorer 中的 CUSP (<https://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>) 在线软件分析获得朱蕉叶绿体基因组不同基因中 GC₁、GC₂、GC₃ 和 GC_{all} 的碱基含量,并利用 SPSS 25.0 软件对其进行相关性分析。

1.2.4 朱蕉密码子使用偏好性影响因素相关分析 参考 WRIGHT^[40]提出的方法来判断朱蕉叶绿体基因组密码子使用的偏好性。在中性绘图分析中以 GC₃ 为横坐标、GC₁₂ (GC₁ 与 GC₂ 的平均值) 为纵坐标作散点图,对二者进行相关性分析,图中 1 个散点代表 1 个基因,分析 GC₁、GC₂ 和 GC₃ 相关性。ENC-plot 是以 ENC 值为纵坐标,GC₃ 值为横坐标进行二维散点图的绘制,标准曲线公式为: $ENC = 2 + GC_3 + 29 / (GC_3^2 + (1 - GC_3)^2)$ 。PR2-plot 分析 (Parity rule 2) 是以 $G_3 / (G_3 + C_3)$ 值为横坐标,以 $A_3 / (A_3 + T_3)$ 值为纵坐标进行 PR2-plot 绘图分析。通过以上相关分析来揭示朱蕉叶绿体基因组密码子的使用偏好性,由此区分基因组密码子使用偏好性的情况和检测碱基组成对密码子偏好性之间的关系^[41]。

1.2.5 最优密码子分析 参考 WRIGHT^[40]提出的方法从两端各选取 10% 的基因 (前后各 5 条),建立高低基因表达库。若同一密码子既符合高表达密码子,又符合高频密码子,则将该密码子确定为叶绿体基因组的最优密码子。

1.2.6 朱蕉叶绿体基因组特征分析 利用 MISA (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>) 在线软件进行朱蕉叶绿体基因组 SSR (简单重复序列) 序列的相关分析,参数设置为四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸至少重复 3 次,三核苷酸至少重复 4 次,二核苷酸至少重复 5 次,单核苷酸至少 10 次。设置 2 个 SSR 位点之间的距离为 100 bp,若 2 个位点间的距离小于 100 bp,则 2 个序列组成 1 个复合微卫星。

2 结果与分析

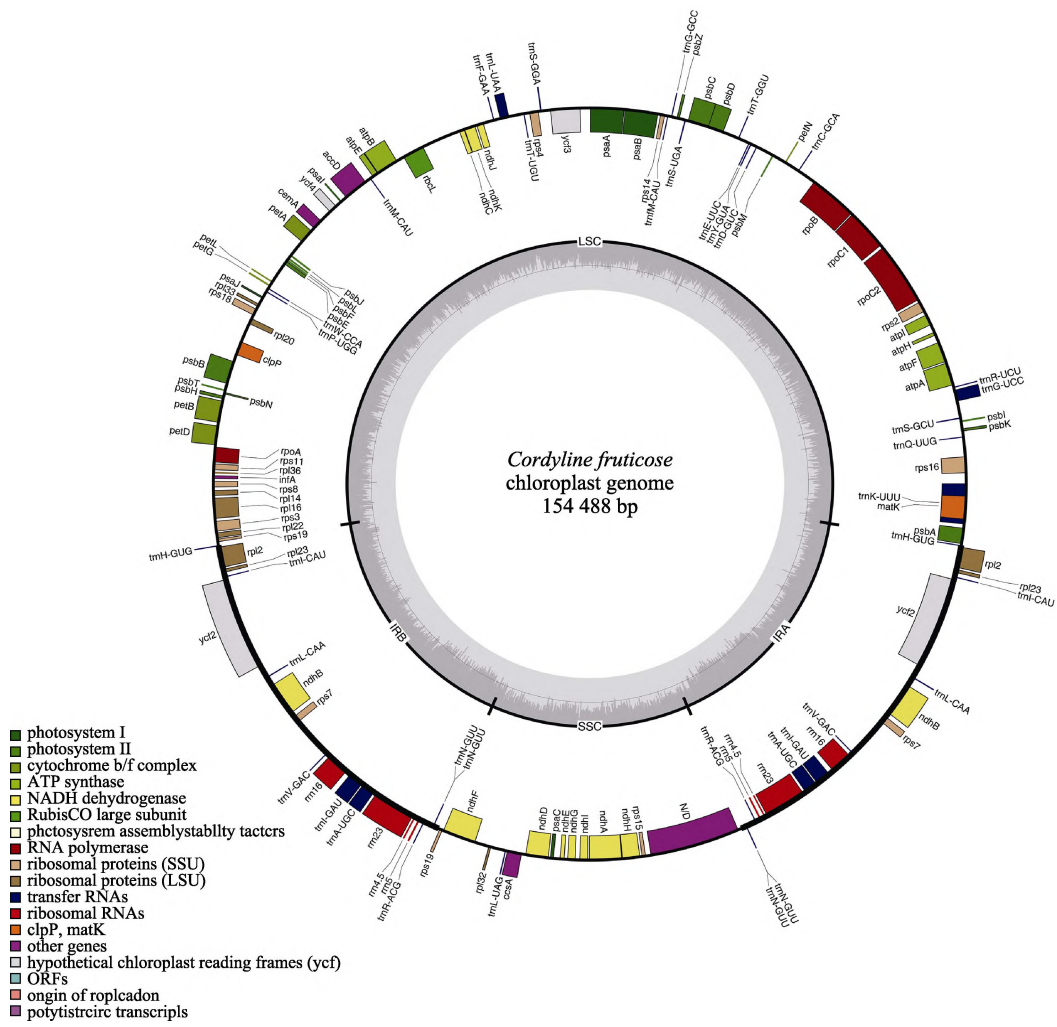
2.1 朱蕉叶绿体基因组结构与特征

朱蕉叶绿体基因组全长为 154 488 bp, GC 含量为 38.0%, 是高度保守的典型四分体结构 (图 1), 其中包括了大单拷贝区 85 279 bp, GC 含量为 36.1%; 小单拷贝区 20 325 bp, GC 含量为 32.6%; 双向重复区分别长 24 442 bp, GC 含量分别为 43.4%。朱蕉叶绿体基因组共注释出 131 种基因, 其中 unigenes 的有 111 种, 分别为 rRNA 基因 4 种、编码蛋白质基因 78 种和 tRNA 基因 29 种 (表 1)。

2.2 系统发育分析

利用最大似然法 (ML) 对龙舌兰科中 19 种植物进行系统发育分析 (图 2), 图中 19 种植物

分为 4 个组: Group I (ML-100%) 包括朱蕉属、龙血树属和虎尾兰属的 7 个种, 分别是朱蕉 (*C. fruticosa*)、蓝朱蕉 (*C. indivisa*)、金边虎尾兰 (*S. trifasciata*)、柬埔寨龙血树 (*D. cambodiana*)、龙血树 (*D. draco*)、香龙血树 (*D. fragrans*) 和 *D. coohinchinensis*; Group II (ML-100%) 包括晚芦荃属和 *Hesperocallis* 属共 3 个种, 分别是 *H. parviflora*、*H. campanulate* 和 *H. undulata*; Group III (ML-100%) 包括丝兰属的 3 个种, 分别是短叶丝兰 (*Y. brevifolia*)、*Y. brevifolia* × *Y. jaegeriana* 和 *Y. jaegeriana*; Group IV (ML-100%) 包括龙舌兰属和晚香玉属中的 6 个种, 分别是美洲龙舌兰 (*A. americana*)、*Polianthes* sp.、剑麻 H.11648 (*A. hybrid cultivar* H.11648)、灰叶剑麻 (*A. four-*



不同的颜色代表不同基因的类型, 大环内的基因按顺时针方向转录, 大环外的基因按逆时针方向转录, GC 含量为环内灰色区域。 Different colors represent different gene types, and the genes within the macroloop are transcribed clockwise, while genes outside the macroloop are transcribed counterclockwise, GC content is the gray area within the loop.

图 1 朱蕉叶绿体基因组图谱
Fig. 1 Gene map of *C. fruticosa* chloroplast genome

表 1 朱蕉叶绿体基因组基因功能分类
Tab. 1 Functional classification of *C. fruticosa* chloroplast genome

基因分类 Gene type	基因分组 Group of gene	基因名称 Gene name
其他基因	乙酰辅酶 A 羧化酶基因	<i>accD</i>
	蛋白酶基因	<i>clpP^c</i>
	细胞色素合成基因	<i>ccsA</i>
	膜蛋白基因	<i>cemA</i>
	成熟酶 K 基因	<i>matK</i>
	翻译起始密码子基因	<i>infA</i>
	假定叶绿体阅读框	<i>ycf1, ycf2⁽²⁾, ycf3, ycf4</i>
光合系统基因	NADH 氧化还原酶基因	<i>ndhA, ndhB⁽²⁾, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
	ATP 酶基因	<i>atpA, atpB, atpF, atpH, atpE, atpI</i>
	细胞色素 b/f 复合体基因	<i>petA, petB, petD, petG, petL, petN</i>
	光系统 I 基因	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>
	光系统 II 基因	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>
	二磷酸核酮糖羧化酶大亚基基因	<i>rbcL</i>
遗传系统基因	RNA 聚合酶亚基基因	<i>rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2</i>
	核糖体蛋白大亚基基因	<i>rpl14, rpl20, rpl16, rpl2⁽²⁾, rpl22, rpl23⁽²⁾, rpl32, rpl33, rpl36</i>
	rRNA 基因	<i>rrn16⁽²⁾, rrn23⁽²⁾, rrn5⁽²⁾, rrn4.5⁽²⁾</i>
	核糖体蛋白小亚基基因	<i>rps11, rps14, rps15, rps16, rps2, rps3, rps4, rps7⁽²⁾, rps8, rps18, rps19⁽²⁾</i>
	tRNA 基因	<i>trnM-CAU, trnN-GUU⁽²⁾, trnP-UGG, trnA-UGC⁽²⁾, trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-GAA, trnG-GCC, trnG-UCC, trnH-GUG⁽²⁾, trnI-CAU⁽²⁾, trnI-GAU⁽²⁾, trnT-GGU, trnT-UGU, trnL-CAA⁽²⁾, trnL-UAG, trnL-UAA, trnQ-UUG, trnR-ACG⁽²⁾, trnR-UCU, trnS-GCU, trnS-GGA, trnS-UGA, trnV-GAC⁽²⁾, trnW-CCA, trnY-GUA</i>

注：标有上标（2）表示基因重复个数。
Note: The superscript (2) indicates the number of gene duplication.

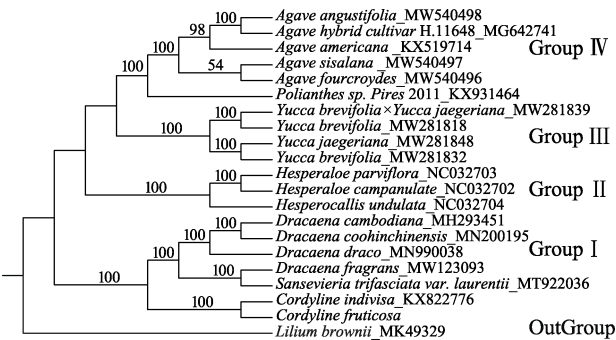


图 2 19 个物种的叶绿体基因组系统进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree constructed using chloroplast genome of 19 species

croydes)、狭叶龙舌兰 (*A. angustifolia*) 和剑麻 (*A. sisalana*)。分析结果表明朱蕉与蓝朱蕉形成一个单系群，且亲缘关系最近，Group I、Group II、Group III 和 Group IV 4 个属植物以 100% 的支持率相互形成一个单系群，而这些单系群共同组成了龙舌兰科。

2.3 密码子相关性分析

利用 CUSP 在线程序和 CodonW 1.4.2 软件对经过筛选过的朱蕉叶绿体基因组的 47 条蛋白质

编码序列 (CDS) 进行分析，结果如表 2 所示：所有 CDS 的平均 GC_{all} 含量为 38.29%，GC₁ 为 46.45%，GC₂ 为 39.14%，GC₃ 为 29.47%，表明朱蕉叶绿体基因组密码子在不同位置的 GC 含量分布不均匀，其 GC 碱基含量存在差异。GC₁、GC₂ 的 GC 碱基含量要高于 GC₃ 的 GC 碱基含量，说明朱蕉叶绿体基因组密码子碱基偏好以 A/U (T) 结尾。在 47 条 CDS 朱蕉叶绿体基因组密码子中其 ENC 值介于 35.48~59.44 之间，平均值为 48.4，结果表明朱蕉叶绿体基因组密码子的使用偏性为中等偏下。

由表 3 可知，GC_{all} 和 GC₁、GC₂ 碱基含量呈极显著相关 ($P<0.01$)，与 GC₃ 碱基含量呈显著相关 ($P<0.05$)，GC₁ 和 GC₂ 碱基含量呈极显著相关，GC₁、GC₂ 碱基含量和 GC₃ 碱基含量不显著相关，说明朱蕉叶绿体基因组第 3 位碱基与第 1 位、第 2 位碱基间有较大差异，第 1 位和第 2 位之间的相似度很高。ENC 和 GC₃ 碱基含量呈极显著相关，与 GC₁、GC₂ 碱基含量不显著相关。上述结果说明影响密码子使用偏好性的是第 3 位碱基的构

表 2 朱蕉叶绿体基因密码子的不同位置 GC 含量及 ENC 值
Tab. 2 GC content and ENC value of different positions of chloroplast genomic codon in *C. fruticosa*

基因 Gene	GC ₁ /%	GC ₂ /%	GC ₃ /%	GC _{all} /%	ENC	基因 Gene	GC ₁ /%	GC ₂ /%	GC ₃ /%	GC _{all} /%	ENC
<i>ycf4</i>	44.32	42.16	31.89	39.46	49.70	<i>psaB</i>	48.44	42.86	32.52	41.27	48.80
<i>ycf3</i>	46.75	40.83	40.83	39.64	59.44	<i>psaA</i>	52.06	43.41	34.49	43.32	51.97
<i>ycf2</i>	42.65	33.94	37.19	37.92	52.88	<i>petA</i>	53.29	35.74	28.21	39.08	49.31
<i>ycf1</i>	38.05	31.12	28.26	32.48	49.16	<i>ndhK</i>	42.17	42.57	27.71	37.48	50.17
<i>rps18</i>	34.67	30.67	28.67	31.33	35.48	<i>ndhJ</i>	48.43	39.62	33.33	40.46	57.11
<i>rps14</i>	47.52	46.53	31.68	41.91	40.66	<i>ndhI</i>	40.88	36.46	22.10	33.15	45.15
<i>rps11</i>	55.32	58.16	21.28	44.92	48.49	<i>ndhH</i>	50.76	36.80	26.40	37.99	47.21
<i>rps8</i>	40.00	41.48	26.67	36.05	42.11	<i>ndhG</i>	42.94	35.59	23.73	34.09	46.45
<i>rps7</i>	50.00	45.51	24.36	39.96	48.58	<i>ndhF</i>	37.43	37.03	25.00	33.15	44.22
<i>rps4</i>	48.51	40.10	28.22	38.94	49.91	<i>ndhE</i>	38.24	32.35	31.37	33.99	55.15
<i>rps3</i>	44.10	34.93	27.07	35.37	48.17	<i>ndhD</i>	40.84	36.85	31.27	36.32	50.16
<i>rps2</i>	42.62	42.62	30.80	38.68	49.42	<i>ndhC</i>	50.41	35.54	28.10	38.02	47.20
<i>rpoC2</i>	46.43	37.11	28.38	37.30	49.19	<i>ndhB</i>	42.86	40.12	31.51	38.16	47.34
<i>rpoC1</i>	51.46	37.32	31.20	39.99	52.38	<i>ndhA</i>	44.23	39.29	25.27	36.26	44.54
<i>rpoB</i>	50.14	38.38	29.04	39.18	48.64	<i>matK</i>	39.88	30.06	23.51	31.15	47.54
<i>rpoA</i>	47.35	35.88	28.53	37.25	51.27	<i>cemA</i>	40.43	28.26	31.30	33.33	52.57
<i>rpl22</i>	42.15	39.67	28.10	36.64	47.87	<i>ccsA</i>	30.56	39.51	30.25	33.44	51.18
<i>rpl20</i>	40.46	45.04	30.53	38.68	51.43	<i>atpI</i>	49.19	36.29	26.21	37.23	45.62
<i>rpl14</i>	54.47	36.59	24.39	38.48	46.11	<i>atpF</i>	49.19	34.05	32.43	38.56	43.47
<i>rbcL</i>	57.97	43.89	27.74	43.20	47.26	<i>atpE</i>	51.49	41.04	32.84	41.79	51.91
<i>psbD</i>	52.82	43.22	33.05	43.03	45.79	<i>atpB</i>	56.65	41.33	31.45	43.15	49.56
<i>psbC</i>	54.01	46.41	32.28	44.23	44.87	<i>atpA</i>	55.51	39.76	29.13	41.47	47.62
<i>psbB</i>	55.01	46.56	32.42	44.66	51.21	<i>accD</i>	41.09	33.09	29.82	34.67	48.53
<i>psbA</i>	49.44	43.79	34.75	42.66	41.81	Average	46.45	39.14	29.47	38.29	48.40

注: GC_{all}表示各密码子位置的平均 GC 含量。
Note: GC_{all} represents the average GC content at each codon position.

表 3 朱蕉叶绿体基因密码子参数的相关性分析
Tab. 3 Correlation analysis of parameters of chloroplast genomic codon in *C. fruticosa*

参数 Parameter	GC ₁	GC ₂	GC ₃	GC _{all}	ENC
GC ₂	0.483**				
GC ₃	0.084	0.051			
GC _{all}	0.845**	0.785**	0.371*		
ENC	0.061	0.001	0.420**	0.134	
密码子数 N	-0.073	-0.236	0.190	-0.081	0.140

注: *表示显著相关 ($P<0.05$); **表示极显著相关 ($P<0.01$)。
Note: * indicates significant correlation ($P<0.05$); ** indicates extremely significant correlation ($P<0.01$).

成。但由于密码子数 N 和 ENC 的相关系数是 0.140, 并未达到显著水平, 则表明该基因序列长度对密码子偏好性影响较弱。

朱蕉叶绿体基因组相关 RSCU 分析如表 4 所示, 共有 34 个密码子的 RSCU 值>1, 且以 U 结尾的密码子有 16 个, 以 A 结尾的密码子有 14 个, 以 G 结尾的密码子有 3 个, 以 C 结尾的密码子有 1 个, A、U 结尾较多。说明朱蕉叶绿体基因组以 G、C 结尾的密码子偏好较弱, 多偏好于 A、U 结尾。

2.4 密码子使用偏好性影响因素

从图 3 可知, 朱蕉叶绿体基因组密码子 GC₁₂ 的取值范围在 0.427~1.288 之间, GC₃ 的取值范围在 0.213~0.408 之间, GC₁₂ 和 GC₃ 的趋势线率(即回归系数)为 0.2687, 其相关系数 $R=0.0592$, 说明朱蕉密码子 GC₁₂ 和 GC₃ 的相关系数较低, GC₃ 的碱基组成与 GC₁、GC₂ 有差异, 且 GC 的含碱

基量在基因组中高度保守，结果表明自然选择压力对朱蕉叶绿体基因组密码子的影响较强。

ENC-plot 图中，朱蕉中大部分基因分布在曲线下方（图 4），说明朱蕉叶绿体基因组密码子的偏好性受自然选择压力的影响较大。从表 5 ENC 比值频数分布表可知：ENC 比值分布在-0.05~0.05 区间的有 20 个，与预期值 ENC 值较近，其余的基因则与预期 ENC 值较远，即离标准曲线较远，说明朱蕉叶绿体基因组密码子偏好性主要受自然选择压力的影响。

表 4 朱蕉叶绿体基因组最优密码子的确定

Tab. 4 Determination of optimal codons in the chloroplast genome of *C. fruticosa*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	高表达基因 High expression gene		低表达基因 Low expression gene		Δ RSCU	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	高表达基因 High expression gene		低表达基因 Low expression gene		Δ RSCU
		RSCU	No.	RSCU	No.				RSCU	No.	RSCU	No.	
Phe	UUU	25	1.00	88	0.98	0.02	Ile	AUU**	40	1.58	91	1.21	0.37
	UUC	25	1.00	91	1.02	-0.02		AUC	17	0.67	63	0.84	-0.17
Ser	UCU*	18	1.69	64	1.49	0.20	Thr	AUA	19	0.75	72	0.96	-0.21
	UCC	13	1.22	52	1.21	0.01		ACU***	25	2.27	41	1.52	0.75
	UCA	2	0.19	58	1.35	-1.16		ACC***	13	1.18	17	0.63	0.55
	UCG	3	0.28	30	0.70	-0.42		<u>ACA</u>	5	0.45	30	1.11	-0.66
Tyr	AGU***	22	2.06	43	1.00	1.06	Lys	ACG	1	0.09	20	0.74	-0.65
	AGC**	6	0.56	11	0.26	0.30		AAA*	36	1.50	114	1.33	0.17
	<u>UAU</u>	17	1.21	81	1.64	-0.43		AAG	12	0.50	58	0.67	-0.17
	UAC**	11	0.79	18	0.36	0.43	Met	AUG	23	1.00	63	1.00	0.00
Cys	UGU*	5	1.43	18	1.33	0.10		GUU**	20	1.86	39	1.51	0.35
	UGC	2	0.57	9	0.67	-0.10	Val	GUC	2	0.19	16	0.62	-0.43
TER	UAA***	3	1.80	1	0.60	1.20		GUA**	17	1.58	33	1.28	0.30
	<u>UGA</u>	1	0.60	2	1.20	-0.60		GUG	4	0.37	15	0.58	-0.21
	UAG	1	0.60	2	1.20	-0.60	Ala	GCU***	36	2.44	41	1.89	0.55
Trp	UGG	13	1.00	53	1.00	0.00		GCC	7	0.47	15	0.69	-0.22
Pro	CCU***	19	2.53	33	1.17	1.36		<u>GCA</u>	13	0.88	21	0.97	-0.09
	CCC	0	0.00	22	0.78	-0.78		GCG	3	0.20	10	0.46	-0.26
	<u>CCA</u>	8	1.07	32	1.13	-0.06	Asp	<u>GAU</u>	16	1.14	132	1.67	-0.53
	CCG	3	0.40	26	0.92	-0.52		GAC***	12	0.86	26	0.33	0.53
His	<u>CAU</u>	16	1.45	54	1.59	-0.14	Gly	GGU**	25	1.56	33	1.25	0.31
	CAC*	6	0.55	14	0.41	0.14		GGC**	10	0.63	8	0.30	0.33
Arg	CGU***	21	1.48	26	0.94	0.54		<u>GGA</u>	23	1.44	43	1.62	-0.18
	CGC	4	0.28	13	0.47	-0.19		GGG	6	0.38	22	0.83	-0.45
	CGA**	22	1.55	32	1.16	0.39	Glu	GAA*	40	1.43	107	1.22	0.21
	CGG	5	0.35	22	0.80	-0.45		GAG	16	0.57	69	0.78	-0.21
Gln	<u>AGA</u>	26	1.84	50	1.81	0.03	Leu	UUA***	29	2.05	51	1.06	0.99
	AGG	7	0.49	23	0.83	-0.34		UUG*	25	1.76	73	1.52	0.24
	<u>CAA</u>	19	1.09	56	1.30	-0.21		<u>CUU</u>	12	0.85	74	1.54	-0.69
	CAG*	16	0.91	30	0.70	0.21		CUC	4	0.28	22	0.46	-0.18
Asn	<u>AAU</u>	39	1.30	118	1.56	-0.26		CUA	12	0.85	49	1.02	-0.17
	AAC*	21	0.70	33	0.44	0.26		CUG	3	0.21	20	0.42	-0.21

注：*表示 Δ RSCU ≥ 0.08 ，**表示 Δ RSCU ≥ 0.3 ，***表示 Δ RSCU ≥ 0.5 ；带下划线的密码子表示 RSCU>1，加粗的密码子为最优密码子。

Note: * indicates Δ RSCU ≥ 0.08 , ** indicates Δ RSCU ≥ 0.3 , *** indicates Δ RSCU ≥ 0.5 ; The codon with underline indicates RSCU>1 and the bold codon indicates the optimal codon.

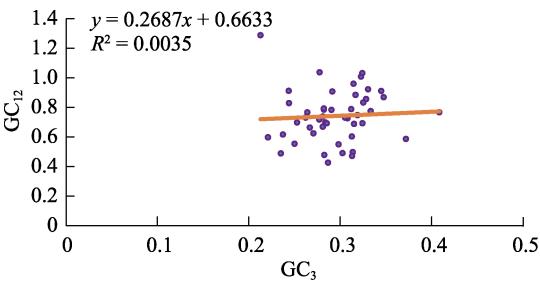


图 3 中性绘图分析
Fig. 3 Neutrality plot analysis

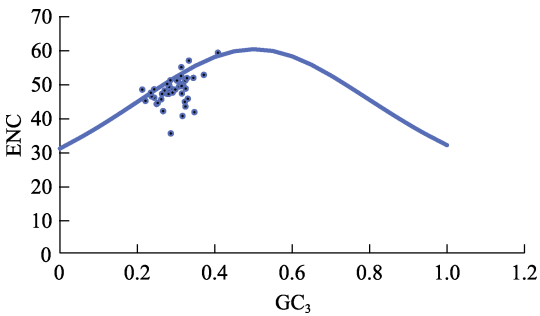


图 4 ENC-plot 绘图分析
Fig. 4 Analysis of ENC-plot

表 5 朱蕉叶绿体基因的 ENC 分布频率
Tab. 5 Frequency of ENC distribution in chloroplast genes of *C. fruticosa*

组段 Class range	组中值 Class mid value	频数 Frequency number	频率 Frequency
-0.15~-0.05	-0.10	1	0.021
-0.05~-0.05	0.00	20	0.426
0.05~0.15	0.10	19	0.404
0.15~0.25	0.20	6	0.128
0.25~0.35	0.30	1	0.021
合计		47	1.000

PR2-plot 绘图分析 (图 5) 的 4 个平面区域内的基因并未均匀分布,朱蕉叶绿体基因组中大多基因分布在下半部分,说明在碱基使用上 T>A,G>C;即自然选择压力不是影响朱蕉叶绿体基因组的唯一因素,也会受自然选择压力之外的因素的影响。

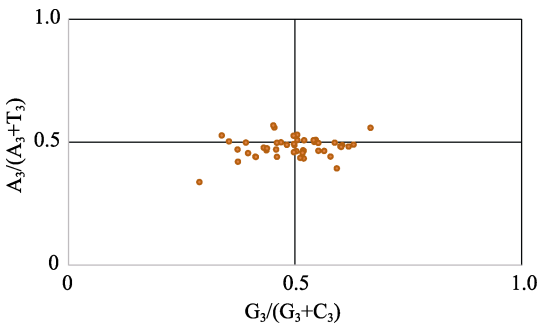


图 5 PR2-plot 绘图分析
Fig. 5 Analysis of PR2 bias plot

2.5 最优密码子的确定

从表 4 可知朱蕉叶绿体基因组的高频密码子 (RSCU>1) 有 34 个, $\Delta RSCU \geq 0.08$ 的高表达密码子有 25 个, 将同时满足 $\Delta RSCU \geq 0.08$ 和 $RSCU > 1$ 的密码子确认为朱蕉叶绿体基因组最优密码子,共筛选出 17 个最优密码子 (UCU、UGU、UUA、UAA、UUG、CCU、CGU、CGA、AUU、ACU、AGU、AAA、GUU、GCU、GGU、GUA、GAA)。其中有 6 个以 A 结尾, 10 个以 U 结尾, 1 个以 G 结尾。

2.6 朱蕉叶绿体基因组 SSR 分析

使用 MISA 分析朱蕉叶绿体基因组的 SSR 碱基组成,共检测到 91 个 SSR 位点,其中五核苷酸最少仅有 3 个,四核苷酸有 9 个,三核苷酸有 11 个,二核苷酸有 13 个,而单核苷酸最多有 55 个。在所检测到的朱蕉叶绿体基因组 SSR 中以 A/T、AT/AT 和 AAAT/ATTT 为重复单元的占 76.92%,说明朱蕉叶绿体基因组 SSR 位点多以 A、T 重复单元为主。

3 讨论

系统发育树显示,龙舌兰属与丝兰属、晚芦荟属和 *Hesperocallis* 属互为姐妹类群,且各属间、种间分支明确,这与 KATE 等^[42]、MCKAIN 等^[36]的研究结果一致,本研究构建的系统发育树各分支节点以较高的支持率阐明了龙舌兰科各属间、种间的亲缘关系。ZHU 等^[35]通过叶绿体基因组序列建立了柬埔寨龙血树 ML 系统发育树,树图显示蓝朱蕉与柬埔寨龙血树同为龙舌兰科。黄威廉^[43]、VERLOOVE 等^[44]在龙舌兰科族的分类及地理分布的相关研究中,证明朱蕉属与龙血树属、虎尾兰属同属于龙血树族 (*Dracaeneae*),这些结果与本研究结果一致,有力地证明了本研究结果的可靠性。龙舌兰科系统发育 ML 树的 4 组分支都能以极高的支持率聚集且互为姐妹类群,证明了植物叶绿体基因组系统发育树的构建在物种鉴定方面的准确性。

同义密码子在蛋白质与基因组的联系中发挥着重要的作用^[45],密码子偏好性受多种因素影响,自然选择压力和突变压力是主要的影响因素^[46]。基因的使用频率会受突变压力或自然选择压力的影响,通常 GC 含量的变化被认为是基因突变的趋势^[30]。通常氨基酸不受密码子第 3 位碱基的改变而改变,而且突变时所受的自然选择压力也较

弱, 因此, 可将 GC₃ 当作分子密码子使用模式的重要依据之一^[47]。通过对朱蕉叶绿体基因组密码子偏好性的相关分析发现, GC₁ 与 GC₂ 呈极显著相关, GC₃ 与 GC₁、GC₂ 不具有相关性, 表明 GC 含量在密码子的各个位置上呈不均匀分布, RSCU 的结果分析也证明了这一观点。在对米楮 (*Castanopsis carlesii*)^[48]、羽叶丁香 (*S. pinnatifolia*)^[25]、阳春砂 (*Amomum villosum*)^[49]、矮扁桃 (*Prunus tenella*)^[50]、柿 (*Diospyros kaki*)^[51]、永椿香槐 (*Cladrastis yunchunii*)^[52]、灯盏花 (*Erigeron breviscapus*)^[53] 和杜梨 (*P. betulifolia*)^[19] 等植物的相关研究中, 也得到了一致的观点。

通过中线性、PR2-plot 和 ENC-plot 绘图分析发现, 朱蕉叶绿体基因组密码子偏好性主要受自然选择压力的影响, 这在紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)^[54]、秋茄 (*Kandelia obovata*)^[55]、杜梨 (*P. betulifolia*)^[19]、降香黄檀 (*Dalbergia odorifera*)^[56] 和永椿香槐 (*C. yunchunii*)^[52] 等植物的相关研究中也得出一致的结论。而在阔叶猕猴桃 (*Actinidia latifolia*)^[57]、蝴蝶兰 (*P. aphrodite*)^[32]、油茶 (*Camellia oleifera*)^[58]、甜荞 (*Fagopyrum esculentum*)^[59]、香花枇杷 (*E. fragrans*)^[31] 和圆锥南芥 (*Arabis paniculate*)^[60] 等植物的研究中则发现, 这些植物的叶绿体基因组密码子偏好性不仅受到自然选择压力的影响, 而且还会受到突变压力的影响。可见, 在不同的植物物种之间其叶绿体基因组密码子偏好性的主要使用模式之间存在着差异性, 并且这些影响因素的作用也不尽相同。本研究筛选出朱蕉叶绿体基因组 17 个最优密码子, 多数以 A、U 结尾, 这与剑麻 (*A. sisalana*)^[30]、乳油木 (*Vitellaria paradoxa*)^[61]、杧果 (*Mangifera indica*)^[62] 和香花枇杷 (*E. fragrans*)^[31] 等植物的相关研究中最优密码子多以 A、U 结尾的结果相同, 这可能是由于叶绿体基因组富含 A、U (T) 碱基, 且植物叶绿体基因组密码子的进化相对保守所造成。

通过 MISA 在线软件对朱蕉叶绿体基因组核苷酸进行位点标记, 研究发现朱蕉叶绿体 SSR 基因组碱基偏好多以 A/T 碱基为主。这与云南火焰兰 (*Renanthera imschootiana*)^[63]、草果 (*Amomum tsaoko*)^[64]、狗枣猕猴桃 (*Actinidia kolomikta*)^[65]、沙枣 (*Elaeagnus angustifolia*)^[66]、裂叶榆 (*Ulmus laciniata*)^[67]、金花茶 (*Camellia petelotii*)^[68] 和薏苡 (*Coix lacryma-jobi*)^[69] 等研究结果一致。叶

绿体基因组在进化过程中具有保守性和单亲遗传等特点, 且叶绿体 SSR 技术在系统发育、物种分类和遗传多样性等方面有明显的优势^[70]。朱蕉叶绿体 SSR 位点的获得对于后期进行龙舌兰科相关物种鉴定、遗传图谱的构建和系统发育等方面具有重要意义。

4 结论

朱蕉叶绿体基因组是典型的四分结构, 全长 154 488 bp, GC 含量为 38%, 系统发育分析显示朱蕉与蓝朱蕉为姐妹种关系, 对朱蕉密码子使用偏好性进行分析得出其更多受自然选择压力的影响, 通过对朱蕉叶绿体基因组的密码子分析得出最优密码子有 17 个, 其中 16 个是以 A、U 结尾的, 朱蕉叶绿体基因组的 SSR 相关分析表明朱蕉叶绿体基因组 SSR 位点多以 A、T 重复单元为主。分析结果可为后续开展朱蕉属植物系统发育研究、物种鉴定、基因工程等的相关研究提供理论参考。

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](第十四卷). 北京: 科学出版社, 1980: 273.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China (Vol.14)[M]. Beijing: Science Press, 1980: 273. (in Chinese)
- [2] 王金全. 细叶朱蕉扦插繁殖技术研究[J]. 福建林业科技, 2012, 39(1): 89-91.
WANG J Q. Study on cutting propagation technology of *Cordyline fruticosa* 'Bella'[J]. Fujian Forestry Science and Technology, 2012, 39(1): 89-91. (in Chinese)
- [3] 陈少萍. 朱蕉栽培管理[J]. 中国花卉园艺, 2015(6): 27-29.
CHEN S P. *Cordyline fruticosa* cultivation management[J]. China Flowers & Horticulture, 2015(6): 27-29. (in Chinese)
- [4] 童依婷, 晏冬华, 彭文煊, 黄静华, 黄洪滨, 易润华. 朱蕉叶枯病菌的鉴定及生物学特性[J]. 广东海洋大学学报, 2016, 36(4): 89-95.
TONG Y T, YAN D H, PENG W X, HUANG J H, HUANG H B, YI R H. Identification and biological characteristics of *Fusarium verticillioides* (Saccardo) nirenberg causing leaf blight on Ti plant (*Cordyline fruticosa* Chevalier)[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2016, 36(4): 89-95. (in Chinese)
- [5] ROMUALD T, FOUEDJOU, REMY B, TEPONNO, LUANA Q, MASSIMO B, DEZEMONA P, LUCA A. VITALI, DENNIS F L A. TAPONDJOU, LUCIANO B.

- Steroidal saponins from the leaves of *Cordyline fruticosa* (L.) A. Chev. and their cytotoxic and antimicrobial activity[J]. *Phytochemistry Letters*, 2014(7): 62-68.
- [6] DASH S K, PADHY S. Review on ethnomedicines for diarrhoea diseases from orissa: prevalence versus culture[J]. *Journal of Human Ecology*, 2006, 20(1): 59-64.
- [7] 高建莉. 组织培养快速繁殖朱蕉[J]. *云南农业科技*, 2000(4): 29.
GAO J L. Rapid propagation of *Cordyline* by tissue culture[J]. *Yunnan Agricultural Science and Technology*, 2000(4): 29. (in Chinese)
- [8] 潘学峰, 王毅, 王安石. 密叶朱蕉组培快繁技术研究[J]. *热带林业*, 2009, 37(1): 22-24.
PAN X F, WANG Y, WANG A S. Study on tissue culture and rapid propagation technology of *Dracaena deremensis* cv. *Compacta*[J]. *Tropical Forestry*, 2009, 37(1): 22-24. (in Chinese)
- [9] 王丽萍, 邓泽周, 吴勇谋, 田丽华, 谢健, 谢晓辉, 张和顺, 梁番土. 皇帝蕉组织培养与快速繁殖技术研究[J]. *中国南方果树*, 2014, 43(2): 71-73.
WANG L P, DENG Z Z, WU Y M, TIAN L H, XIE J, XIE X H, ZHANG H S, LIANG F T. Study on tissue culture and rapid propagation technology of *Musa paradisiaca*[J]. *South China Fruits*, 2014, 43(2): 71-73. (in Chinese)
- [10] 张炜. 高温引发朱蕉褐斑病[J]. *花木盆景(花卉园艺)*, 2004(9): 24.
ZHANG W. High temperature causes brown spot of *Cordyline*[J]. *Flower Plant & Penjing*, 2004(9): 24. (in Chinese)
- [11] 陈宣, 云勇, 姜殿强, 张浪, 李海文. 海南 6 种切叶花卉植物橡胶林下套种的适应性研究[J]. *西部林业科学*, 2015, 44(1): 103-108.
CHEN X, YUN Y, JIANG D Q, ZHANG L, LI H W. Adaptability of six leaf cutting flower plants interplanted in Hainan rubber plantation[J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2015, 44(1): 103-108. (in Chinese)
- [12] 蔡金桓, 都成林, 薛立, 叶自慧, 余汉基, 李子华. 盐胁迫对 4 种园林植物光合特性的影响[J]. *西南林业大学学报(自然科学)*, 2017, 37(2): 30-34.
CAI J H, DOU C L, XUE L, YE Z H, SHE H J, LI Z H. Effects of NaCl stress on photosynthetic characteristic of garden seedlings of 4 species[J]. *Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences)*, 2017, 37(2): 30-34. (in Chinese)
- [13] 郑欣颖, 李鹏飞, 薛立, 麦凝珺, 蔡金桓, 李秋静. 3 种园林植物的抗盐生理研究[J]. *中南林业科技大学学报*, 2017, 37(9): 62-67.
ZHENG X Y, LI P F, XUE L, MAI N J, CAI J H, LI Q J. Study on salt resistance physiology of three garden plants[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2017, 37(9): 62-67. (in Chinese)
- [14] 邹晓君, 列志咏, 薛立. 盐分胁迫对 7 种园林植物生物量的影响[J]. *中南林业科技大学学报*, 2018, 38(3): 97-101, 128.
ZOU X J, LIE Z Y, XUE L. Effects of salt stress on biomass of seven garden plants[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2018, 38(3): 97-101, 128. (in Chinese)
- [15] 王健, 宋希强, 张鑫, 唐虹霞. 基于 RAPD 与形态数据的朱蕉品种亲缘关系分析[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(24): 322-325.
WANG J, SONG X Q, ZHANG X, TANG H X. Analysis of genetic relationships on Ti plant (*cordyline fruticosa*) cultivars based on the RAPD markers and morphological traits[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(24): 322-325. (in Chinese)
- [16] 龙兴, 秦献泉, 方仁, 邓彪, 安振宇, 黄伟雄, 尧金燕. 广西野生蕉种质资源调查与鉴定[J]. *西南农业学报*, 2017, 30(6): 1284-1293.
LONG X, QIN X Q, FANG R, DENG B, AN Z Y, HUANG W X, YAO J Y. Investigation and identification of wild *Musa* germplasm resources in Guangxi province[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 30(6): 1284-1293. (in Chinese)
- [17] 冯慧敏, 陈友, 李博, 邓长娟, 武耀廷. 中国芭蕉属野生种表型性状和 SSR 多样性分析[J]. *热带作物学报*, 2011, 32(4): 708-714.
FENG H M, CHEN Y, LI B, DENG C J, WU Y T. The diversity study of wild *Musa* species in China by phenotypic characteristics and SSR molecular markers[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, 32(4): 708-714. (in Chinese)
- [18] SHINOZAKI K, OHME M, TANAKA M, WAKASUGI T, SUGIURA M. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1986, 5(9): 2043-2049.
- [19] 辛雅莹, 董章宏, 瞿绍宏, 刘成, 叶鹏, 辛培尧. 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.
XIN Y X, DONG Z H, QU S H, LIU C, YE P, XIN P Y. Analysis on codon usage bias of chloroplast genome in *Pyrus betulifolia* Bge.[J]. *Journal of Hebei Agricultural University*, 2020, 43(6): 51-59. (in Chinese)
- [20] KRZYSZTOF B, BURCH-SMITH T M. Chloroplast signaling within, between and beyond cells[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6(781): 78.
- [21] 吴海红, 李丹, 冯秀丽, 岳玲, 赵兴华. 花园君子兰叶绿体基因组序列[J]. *分子植物育种*, 2021, 3(9): 1-8.
WU H H, LI D, FENG X L, YUE L, ZHAO X H. The complete chloroplast genome sequence of *Clivia gardenii*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 3(9): 1-8. (in Chinese)
- [22] 尹为治, 方正, 黄良鸿, 龙文兴, 李佳灵. 海南 2 种龙脑香科植物叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. *林业调查*

- 规划, 2020, 45(6): 19-26.
- YIN W Z, FANG Z, HUANG L H, LONG W X, LI J L. Codon usage bias in chloroplast genomes of two species of Dipterocarpaceae in Hainan[J]. Forest Inventory and Planning, 2020, 45(6): 19-26. (in Chinese)
- [23] 段义忠, 张 凯. 沙冬青属植物叶绿体基因组对比和系统发育分析[J]. 西北植物学报, 2020, 40(8): 1323-1332.
- DUAN Y Z, ZHANG K. Comparative analysis and phylogenetic evolution of the complete chloroplast genome of *Ammopiptanthus*[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2020, 40(8): 1323-1332. (in Chinese)
- [24] DONG Z H, QU S H, LIU C, YE P, XIN P Y. The complete chloroplast genome sequence of *Eriobotrya fragrans*[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2019, 4(2): 3549-3550.
- [25] 张靖雯. 濒危植物羽叶丁香叶绿体全基因组及系统发育研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- ZHANG J W. The complete chloroplast genome and phylogenetic analysis of the endangered species *Syringa pinnatifolia*(Oleaceae)[D]. Yangling: Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2019. (in Chinese)
- [26] 江 媛, 杨青淑, 王 婧, 杨成金, 黄林芳, 杨 燕, 段宝忠. 毛重楼叶绿体基因组序列特征及其系统发育分析[J]. 中草药, 2021, 52(13): 4014-4022.
- JIANG Y, YANG Q S, WANG J, YANG C J, HUANG L F, YANG Y, DUAN B Z. Complete chloroplast genome of *Paris mairei*: characterization and phylogeny[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(13): 4014-4022. (in Chinese)
- [27] DONG Z H, QU S H, LI X H, YE P, LIU C, XIN Y X, XIN P Y. The complete plastome sequence of a subtropical tree *Pyrus betulaefolia* (Rosaceae)[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2020, 5(1): 826-827.
- [28] SUEOKA N. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988, 85(8): 2653-2657.
- [29] 高家翔, 胖铁良, 唐 征, 张 兰, 何承忠, 杨 凯. 早园竹叶绿体 *atpA* 基因序列及系统进化分析[J]. 西南林学院学报, 2009, 29(2): 31-36.
- GAO J X, PANG T L, TANG Z, ZHANG L, HE C Z, YANG K. Sequence and phylogenetic analysis of *atpA* gene in chloroplast of early garden bamboo[J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences), 2009, 29(2): 31-36. (in Chinese)
- [30] 金 刚, 覃 旭, 龙凌云, 王丽萍, 覃剑峰, 危丹妮, 陈涛, 蔡中全. 剑麻叶绿体基因组编码序列密码子的使用特征[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2018, 47(6): 705-710.
- JIN G, QIN X, LONG L Y, WANG L P, QIN J F, WEI D N, CHEN T, CAI Z Q. Characteristics of codon usage in the chloroplast protein-coding genes of *Agave hybrid* No.11648[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2018, 47(6): 705-710. (in Chinese)
- [31] 屈亚亚, 辛 静, 冯发玉, 董章宏, 瞿绍宏, 王海洋, 李斌, 辛培尧. 香花枇杷质体基因组序列密码子偏性分析[J]. 西北林学院学报, 2021, 36(4): 138-144, 158.
- QU Y Y, XIN J, FENG F Y, DONG Z H, QU S H, WANG H Y, LI B, XIN P Y. Codon usage bias in chloroplast genome of *Eriobotrya fragrans* Champ. ex Benth[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2021, 36(4): 138-144, 158. (in Chinese)
- [32] 续 晨, 贲爱玲, 蔡晓宁. 蝴蝶兰叶绿体基因组密码子使用的相关分析[J]. 分子植物育种, 2010, 8(5): 945-950.
- XU C, BEN A L, CAI X N. Analysis of synonymous codon usage in chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*[J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(5): 945-950. (in Chinese)
- [33] 原晓龙, 刘 音, 康洪梅, 陈中华, 李云琴, 王 毅. 蒜头果叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2021, 41(3): 15-22.
- YUAN X L, LIU Y, KANG H M, CHEN Z H, LI Y Q, WANG Y. Analysis of codon usage bias in chloroplast genome of *Malania oleifera*[J]. Journal of Southwest Forestry University (Natural Sciences), 2021, 41(3): 15-22. (in Chinese)
- [34] JIANG H, KANG Y, CHEN X, YANG X L, YANG X Q. The complete plastid genome sequence of *Dracaena fragrans* (L.) Ker Gawl. (Asparagaceae)[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2021, 6(2): 653-655.
- [35] ZHU Z X, MU W X, WANG J H, ZHANG J R, ZHAO K K, FRIEDMAN C R, WANG H F. Complete plastome sequence of *Dracaena cambodiana* (Asparagaceae): a species considered "Vulnerable" in Southeast Asia[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2018, 3(2): 620-621.
- [36] MCKAIN M R, MCNEAL J R, KELLAR P R, EGUIARTE L E, PIRES J C, LEEBENS M J. Timing of rapid diversification and convergent origins of active pollination within Agavoideae (Asparagaceae) [J]. American Journal of Botany, 2016, 103(10): 1717-1729.
- [37] 宋国立, 崔荣霞, 王坤波, 郭立平, 黎绍惠, 王春英, 张香娣. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. 棉花学报, 1998, 33(5): 50-52.
- SONG G L, CUI R X, WANG K B, GUO L P, LI S H, WANG C Y, ZHANG X D. A rapid improved CTAB method for extraction of cotton genomic DNA[J]. Cotton Science, 1998, 33(5): 50-52. (in Chinese)
- [38] JIN J J, YU W B, YANG J B, SONG Y, DEPAMPHILIS C W, YI T S, LI D Z. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes[J]. Genome biology, 2020, 21(1): 241.
- [39] KEARSE M, MOIR R, WILSON A, STONES H S,

- CHEUNG M, STURROCK S, BUXTON S, COOPER A, MARKOWITZ S, DURAN C, THIERER T, ASHTON B, MEINTJES P, DRUMMOND A. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the rganization and analysis of sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(12): 1647-1649.
- [40] WRIGHT F. The 'effective number of codons' used in a gene[J]. *Genome biology*, 1990, 87(1): 23-29.
- [41] DURET L, MOUCHIROUD D. Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila* and *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96(8): 4482-4487.
- [42] KATE H, MARK F. A chloroplast phylogeny of Agavaceae subfamily Chlorogaloideae: Implications for the tempo of evolution on serpentine soils[J]. *Systematic Botany*, 2013, 38(4): 674.
- [43] 黄威廉. 世界龙舌兰科族属分类及地理分布[J]. *贵州科学*, 2016, 34(1): 1-4.
- HUANG W L. Classification and geographical distribution of Agave families and genera in the world[J]. *Guizhou Science*, 2016, 34(1): 1-4. (in Chinese)
- [44] VERLOOVE F, PASCUAL M S. Notes on genuine *Agave vivipara* (Agavaceae), a poorly known Caribbean species, recently introduced in the Canary Islands (Spain)[J]. *British Cactus and Succulent Society*, 2021, 2021(39): 259-264.
- [45] 张家榕, 雷万钧. 18 种苔藓植物 *rbcL* 基因的密码子偏性及聚类分析[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(6): 1-12.
- ZHANG J R, LEI W J. Codon bias and cluster analysis of *rbcL* genes in 18 bryophytes[J]. *Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition)*, 2020, 40(6): 1-12. (in Chinese)
- [46] ROMERO H, ZAVALA A, MUSTO H. Codon usage in *Chlamydia trachomatis* is the result of strand-specific mutational biases and a complex pattern of selective forces[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(10): 2084-2090.
- [47] 吴妙丽, 陈世品, 陈 辉. 竹亚科叶绿体基因组的密码子使用偏性分析[J]. *森林与环境学报*, 2019, 39(1): 9-14.
- WU M L, CHEN S P, CHEN H. Codon usage bias analysis of chloroplast genome of Bambusaceae[J]. *Journal of Forest and Environment*, 2019, 39(1): 9-14. (in Chinese)
- [48] 江淑珍, 连 辉, 熊远芳, 张 赛, 陈世品. 米楮叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. *分子植物育种*, 2021, 26(7): 1-12.
- JIANG S Z, LIAN H, XIONG Y F, ZHANG S, CHEN S P. Analysis of codon bias in chloroplast genome of *Castanopsis carlesii*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 26(7): 1-12. (in Chinese)
- [49] 马茉莉, 孟衡玲, 张 薇, 雷 恩, 卢丙越. 阳春砂叶绿体全基因组解析及系统发育研究[J]. *西北植物学报*, 2020, 40(6): 978-986.
- MA M L, MENG H L, ZHANG W, LEI E, LU B Y. Whole genome analysis and phylogeny of chloroplasts in *Amomum villosum*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 40(6): 978-986. (in Chinese)
- [50] 杨 斌, 孟庆瑶, 张 凯, 段义忠. 孑遗濒危植物矮扁桃叶绿体全基因组特征分析及亲缘关系鉴定[J]. *植物研究*, 2020, 40(5): 686-695.
- YANG B, MENG Q Y, ZHANG K, DUAN Y Z. Analysis of chloroplast genome characteristics and phylogenetic identification of endangered plant *Amygdalus nana*[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2020, 40(5): 686-695. (in Chinese)
- [51] 傅建敏, 索玉静, 刘慧敏, 谭晓风. 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.
- FU J M, SUO Y J, LIU H M, TAN X F. Analysis on codon usage in the chloroplast protein-coding genes of *Diospyros* spp[J]. *Non-wood Forest Research*, 2017, 35(2): 38-44. (in Chinese)
- [52] 李江飞, 原晓龙, 李熙颜, 王 瑜, 蔡年辉, 陈 诗, 许玉兰. 永椿香槐叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. *分子植物育种*, 2021, 10(7): 1-13.
- LI J F, YUAN X L, LI X Y, WANG Y, CAI N H, CHEN S, XU Y L. Analysis on codon usage bias of chloroplast genome in *Cladrastis yungchunii* X. W. Li & G. S. Fan[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 10(7): 1-13. (in Chinese)
- [53] 李显煌, 杨生超, 辛雅萱, 屈亚亚, 杨琳懿, 冯发玉, 范伟, 辛培尧. 灯盏花叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2021, 36(3): 384-392.
- LI X H, YANG S C, XIN Y X, QU Y Y, YANG L Y, FENG F Y, FAN W, XIN P Y. Analysis of the codon usage bias of chloroplast genome in *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2021, 36(3): 384-392. (in Chinese)
- [54] 喻 凤, 韩 明. 紫花苜蓿叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. *广西植物*, 2021, 18(8): 1-13.
- YU F, HAN M. Analysis of codon usage bias in the chloroplast genome of alfalfa (*Medicago sativa*)[J]. *Guihaia*, 2021, 18(8): 1-13. (in Chinese)
- [55] 赵 森, 邓力华, 陈 芬. 秋茄叶绿体基因组密码子使用偏好性分析[J]. *森林与环境学报*, 2020, 40(5): 534-541.
- ZHAO S, DENG L H, CHEN F. Codon usage bias of chloroplast genome in *Kandelia obovata*[J]. *Journal of Forest and Environment*, 2020, 40(5): 534-541. (in Chinese)
- [56] 原晓龙, 李云琴, 张劲峰, 王 毅. 降香黄檀叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. *广西植物*, 2021, 41(4): 622-630.
- YUAN X L, LI Y Q, ZHANG J F, WANG Y. Analysis of codon usage bias in the chloroplast genome of *Dalbergia odorifera*[J]. *Guihaia*, 2021, 41(4): 622-630. (in Chinese)
- [57] 王 宇, 周俊良, 唐冬梅, 仲伟敏, 马玉华, 张 敏. 阔叶猕猴桃叶绿体基因组特征及密码子偏好性分析[J]. *种子*, 2020, 39(5): 13-19.

- WANG Y, ZHOU J L, TANG D M, ZHONG W M, MA Y H, ZHANG M. Analysis of chloroplast genome characteristics and codon preference in *Broad-leaf Kiwifruit*[J]. Seed, 2020, 39(5): 13-19. (in Chinese)
- [58] 王鹏良, 杨利平, 吴红英, 农有良, 吴双成, 肖玉菲, 覃子海, 王华宇, 刘海龙. 普通油茶叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. 广西植物, 2018, 38(2): 135-144.
- WANG P L, YANG L P, WU H Y, NONG Y L, WU S C, XIAO Y F, QIN Z H, WANG H Y, LIU H L. Codon preference of chloroplast genome in *Camellia oleifera*[J]. Guihaia, 2018, 38(2): 135-144. (in Chinese)
- [59] 罗洪, 胡莎莎, 吴琦, 姚慧鹏. 甜芥叶绿体基因组密码子偏爱性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(11): 2457-2464.
- LUO H, HU S S, WU Q, YAO H P. Analysis of *Buckwheat* chloroplast gene codon bias[J]. Genomics and Applied Biology, 2015, 34(11): 2457-2464. (in Chinese)
- [60] 罗茜, 方正, 余婕, 翁庆北, 朱斌. 圆锥南芥叶绿体基因组特征及密码子偏好性分析[J]. 分子植物育种, 2021, 26 (07): 1-27.
- LUO X, FANG Z, YU J, WENG Q B, ZHU B. Analysis of chloroplast genome characteristics and codon usage bias of *Arabis paniculata* franch[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 26 (7): 1-27. (in Chinese)
- [61] 原晓龙, 李云琴, 张劲峰, 王毅. 乳油木叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. 分子植物育种, 2020, 18(17): 5658-5664.
- YUAN X L, LI Y Q, ZHANG J F, WANG Y. Codon usage bias analysis of chloroplast genome in *Vitellaria paradoxa*[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(17): 5658-5664. (in Chinese)
- [62] 辛雅萱, 黎若竹, 李鑫, 陈丽琼, 唐军荣, 屈亚亚, 杨琳懿, 辛培尧, 李云芳. 杠果叶绿体基因组密码子使用偏好性分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, 41(9): 148-156, 165.
- XIN Y X, LI R Z, LI X, CHEN L Q, TANG J R, QU Y Y, YANG L Y, XIN P Y, LI Y F. Analysis on codon usage bias of chloroplast genome in *Mangifera indica*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2021, 41(9): 148-156, 165. (in Chinese)
- [63] 辛静, 辛雅萱, 董章宏, 瞿绍宏, 姚国琼, 李凤, 屈亚亚, 唐军荣. 云南火焰兰转录组 SSR 分布及其序列特征分析[J]. 南方农业学报, 2020, 51(7): 1634-1641.
- XIN J, XIN Y X, DONG Z H, QU S H, YAO G Q, LI F, QU Y Y, TANG J R. Distribution and sequence characteristics of SSR in transcriptome of *Renanthera imschootiana* Rolfe[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(7): 1634-1641. (in Chinese)
- [64] 马茉莉, 张薇, 孟衡玲, 卢丙越. 草果叶绿体基因组特征及系统发育分析[J]. 中草药, 2021, 23(9): 1-9.
- MA M L, ZHANG W, MENG H L, LU B Y. Characterization and phylogenetic analysis of the complete chloroplast genome of *Amomum tsao-ko*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 23(9): 1-9. (in Chinese)
- [65] 吴东洋, 业宁, 徐逸卿, 张礼, 周小亮. 狗枣猕猴桃叶绿体基因组微卫星特征分析[J]. 北方园艺, 2018(9): 30-35.
- WU D Y, YE N, XU Y Q, ZHANG L, ZHOU X L. Microsatellite analysis of chloroplast genome of *Actinidia kolomikta*[J]. Northern Horticulture, 2018(9): 30-35. (in Chinese)
- [66] 王婧, 王天翼, 王罗云, 张建国, 曾艳飞. 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.
- WANG J, WANG T Y, WANG L Y, ZHANG J G, ZENG Y F. Assembling and analysis of the whole chloroplast genome sequence of *Elaeagnus angustifolia* and its codon usage bias[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2019, 39(9): 1559-1572. (in Chinese)
- [67] 杜久军, 左力辉, 刘易超, 于晓跃, 董研, 王进茂, 杨敏生. 裂叶榆叶绿体基因组及 CP-SSR 位点分析[J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(6): 1187-1196.
- DU J J, ZUO L H, LIU Y C, YU X Y, DONG Y, WANG J M, YANG M S. Chloroplast genome and CP-SSR site analyses of *Ulmus laciniata*[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(6): 1187-1196. (in Chinese)
- [68] 叶鹏, 李显煌, 唐军荣, 李斌, 张贵良, 刘成, 雷瀚, 辛培尧. 云南金花茶转录组 SSR 的分布及其序列特征[J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39(9): 86-91.
- YE P, LI X H, TANG J R, LI B, ZHANG G L, LIU C, LEI H, XIN P Y. Distribution and characteristics of SSR in transcriptome of *Camellia fascicularis*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2019, 39(9): 86-91. (in Chinese)
- [69] 李祥栋, 潘虹, 陆秀娟, 魏心元, 陆平, 石明, 秦礼康. 薏苡叶绿体基因组的 SSR 位点分析及种质亲缘关系鉴定[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(8): 1-5.
- LI X D, PAN H, LU X J, WEI X Y, LU P, SHI M, QIN L K. SSR locus analysis of chloroplast genome and identification of genetic relationship in 14 semen adlay germplasm resources[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2018, 46(8): 1-5. (in Chinese)
- [70] PROVAN J, POWELL W, HOLLINGSWORTH P M. Chloroplast microsatellites: New tools for studies in plant ecology and evolution[J]. Trends in Ecology and Evolution, 2001, 16(3): 142-147.