

# 湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬叶绿体基因组分析

王梦涵<sup>1</sup>, 胡帅军<sup>1</sup>, 杨楚虹<sup>1</sup>, 刘霞<sup>1\*</sup>, 徐江<sup>2\*</sup>

(1. 武汉理工大学 化学化工与生命科学学院, 武汉 430070;  
2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:** 测定湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬叶绿体基因组, 分析其序列特征并完成特异性 DNA 条形码筛选。**方法:** 通过高通量测序技术对湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬叶绿体基因组进行测序、拼接及注释, 利用生物信息学方法对叶绿体基因组结构特征及系统发育进行分析。**结果:** 湖北麦冬的叶绿体基因组全长 155 998 bp, 鸟嘌呤与胞嘧啶(GC)总量 37.7%, 成功注释出 85 个蛋白编码基因, 37 个转运 RNA(tRNA) 基因和 8 个核糖体 RNA(rRNA) 基因, 检测到 274 个简单重复序列(SSR), 编码亮氨酸的密码子数量最多, 编码色氨酸的密码子数量最少; 川麦冬叶绿体基因组全长 156 078 bp, GC 总量 37.8%, 成功注释出 85 个蛋白编码基因, 37 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因, 检测到 265 个 SSR, 编码亮氨酸的密码子数量最多, 编码色氨酸的密码子数量最少; 杭麦冬叶绿体基因组全长 156 207 bp, GC 总量 37.7%, 成功注释出 85 个蛋白编码基因, 37 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因, 检测到 274 个 SSR, 编码亮氨酸的密码子数量最多, 编码色氨酸的密码子数量最少。**结论:** 系统发育树显示, 与川麦冬相比, 湖北麦冬与杭麦冬的亲缘关系更近。湖北麦冬、杭麦冬及川麦冬非编码区变异程度均大于编码区, 叶绿体基因组可作为山麦冬属及沿阶草属植物物种鉴定的超级条形码。

**[关键词]** 叶绿体; 湖北麦冬; 杭麦冬; 川麦冬; 叶绿体基因组; 分子鉴定; 叶绿体转化

**[中图分类号]** R22;R931;R28;Q34;Q732 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0182-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200947

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200114.0929.001.html>

**[网络出版时间]** 2020-01-14 09:50

## Chloroplast Genome Analysis of *Liriope spicata* var. *prolifera*, *Ophiopogon japonicus* in Sichuan and Zhejiang

WANG Meng-han<sup>1</sup>, HU Shuai-jun<sup>1</sup>, YANG Chu-hong<sup>1</sup>, LIU Xia<sup>1\*</sup>, XU Jiang<sup>2\*</sup>

(1. School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of  
Technology, Wuhan 430070, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To determine the chloroplast genomes of *Liriope spicata* var. *prolifera*, *Ophiopogon japonicus* in Sichuan and Zhejiang, analyze their sequence characteristics and complete the screening of specific DNA barcodes. **Method:** The chloroplast genomes of *L. spicata* var. *prolifera*, *O. japonicus* in Sichuan and Zhejiang were sequenced, spliced and annotated through high-throughput sequencing technology, and the structural characteristics and phylogenetic relationships of chloroplast genomes were analyzed by bioinformatics. **Result:** The total length of chloroplast genome of *L. spicata* var. *prolifera* was 155 998 bp, the total content of guanine and cytosine (GC) was 37.7%, and 85 protein-coding genes, 37 transfer RNA (tRNA) genes and 8 ribosomal RNA (rRNA) genes were successfully annotated, a total of 274 simple sequence repeats (SSRs) were

**[收稿日期]** 20191204(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81891013); 武汉理工大学专业学位研究生团队指导项目(201701)

**[第一作者]** 王梦涵, 在读硕士, 从事中药资源研究, E-mail: wmh1628@163.com

**[通信作者]** \* 刘霞, 博士, 副教授, 从事中药资源研究, E-mail: lrx1125@126.com;

\* 徐江, 博士, 副研究员, 从事中药基因组学及分子生物学研究, E-mail: jxu@icmm.ac.cn

detected, the number of codons encoding leucine was the most, while the number of codons encoding tryptophan was the least. The total length of chloroplast genome of *O. japonicus* in Sichuan province was 156 078 bp, the total content of GC was 37.8%, and 85 protein-coding genes, 37 tRNA genes and 8 rRNA genes were successfully annotated, a total of 265 SSRs were detected, the number of codons encoding leucine was the most, while the number of codons encoding tryptophan was the least. The total length of chloroplast genome of *O. japonicus* in Zhejiang province was 156 207 bp, the total content of GC was 37.7%, and 85 protein-coding genes, 37 tRNA genes and 8 rRNA genes were successfully annotated, a total of 274 SSRs were detected with the highest number of codons encoding leucine and the lowest number of codons encoding tryptophan. **Conclusion:** The phylogenetic trees show that compared with *O. japonicus* in Sichuan province, *L. spicata* var. *prolifera* is more closely related to *O. japonicus* in Zhejiang province. The variation of non-coding regions of *L. spicata* var. *prolifera*, *O. japonicus* in Zhejiang and Sichuan is greater than that in the coding region. The entire chloroplast genome can be used as a super barcode for identifying species of *Ophiopogon* and *Liriope*.

**[Key words]** chloroplast; *Liriope spicata* var. *prolifera*; *Ophiopogon japonicus* in Zhejiang province; *O. japonicus* in Sichuan province; chloroplast genome; molecular identification; chloroplast transformation

近年来,叶绿体基因组已被越来越多地应用于条形码鉴定、分子标记和系统发育等方面的研究,在揭示物种进化及其种间亲缘关系等方面具有重要价值<sup>[1-4]</sup>。高亚芳等<sup>[5]</sup>对金铁锁叶绿体基因组进行全局分析,确定了其在石竹科的系统位置,为金铁锁物种鉴定及遗传进化等研究提供了依据。左文明等<sup>[6]</sup>通过比较 7 个蓼科物种及 4 个其他科物种后发现,高变异基因 *rpl32* 可以有效区分近缘物种。DONG 等<sup>[7]</sup>通过对 12 个属 29 个物种的部分特异性片段研究发现其对近缘物种的鉴定效果良好。LI 等<sup>[8]</sup>提出叶绿体基因组可以作为物种鉴定的超级条形码,特别是近缘物种及其亚种鉴定。

麦冬 *Ophiopogon japonicus* 是百合科沿阶草属植物麦冬的干燥块根<sup>[9]</sup>,市场上根据其产地不同分为杭麦冬(又称浙麦冬)<sup>[10]</sup>和川麦冬<sup>[11]</sup>。麦冬含有甾体皂苷、高异黄酮、多糖等化学成分,具有保护心血管系统<sup>[12-14]</sup>、抗炎<sup>[15-16]</sup>、抗肿瘤<sup>[17]</sup>、抗氧化<sup>[18]</sup>、降血糖血脂<sup>[19-20]</sup>及免疫调节等活性。湖北麦冬 *Liriope spicata* var. *prolifera* 是于 1995 年起收录入《中国药典》“山麦冬”项下的基原植物之一<sup>[21]</sup>,是湖北省特有的药用植物,2008 年获国家地理标志产品保护<sup>[22]</sup>。刘霞等<sup>[23]</sup>研究发现 49 位点处的稳定碱基变异可作为杭麦冬和川麦冬种内鉴别的单核苷酸多态性(SNP)位点。胡仲义等<sup>[24]</sup>研究发现杭麦冬与川麦冬遗传相似系数较小,与湖北麦冬的亲缘性更近,推断两者可能是同一品种由于长期生殖隔离而产生的不同亚种。许金榜等<sup>[25]</sup>通过分析山麦冬及其近缘种叶绿体 DNA(cpDNA) *trnL-F*, *psbA-trnH* 间隔序列的特点发现, *trnL-F* 和 *psbA-trnH* 序列进化速

率低、保守性强,仅适合麦冬类植物属间鉴别的 DNA 条形码,而在属下水平的应用有一定局限性。在此基础上,本研究利用高通量测序技术对湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬叶绿体基因组进行测序分析,旨在从系统发育学角度为三者的系统进化及特异性 DNA 条形码筛选提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 1-14 型高速离心机(德国 Sigma 公司),Nanodrop 2000 型超微量分光光度计(美国赛默飞世尔科技公司),DYY-6C 型琼脂糖凝胶电泳仪(北京六一仪器厂),Universal Hood II 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司),PL203 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)和乙二胺四乙酸(EDTA)(美国 Amresco 公司,批号分别为 BS0330, MC0649),聚乙烯吡咯烷酮 40 [PVP40,生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 E906BA0029],十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, Biosharp 公司,批号 201510), $2 \times Taq$  聚合酶链式反应(PCR) Master Mix(北京艾德莱生物科技有限公司,批号 301447AX),溴化乙锭(EB)溶液(北京博迈德基因技术有限公司,批号 18Ga2102),DNA Marker 和  $6 \times$  Loading Buffer(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 AI52305A, KA701A), $\beta$ -巯基乙醇(北京博奥拓达科技有限公司,批号 MC0674),琼脂糖(西班牙 Biowest 公司,批号 111860),水为无菌去离子水,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。湖北麦冬、川麦冬和杭麦冬分别采自湖北襄阳(32°02'N, 112°15'E),四川绵阳(31°47'N,

104°73'E)和浙江宁波(29°87'N,121°55'E),均为人工栽培,经武汉理工大学楼一层教授鉴定,凭证标本保存于武汉理工大学中药资源与分子鉴定实验室。

**1.2 DNA 提取、叶绿体基因组序列的测序、拼接及验证** 取新鲜的叶片,采用 CTAB 法<sup>[26]</sup>提取总 DNA。用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量,将检验合格的样品 DNA 用超声波片段化,然后对片段化的 DNA 进行片段纯化,末端修复,3 端加腺嘌呤(A)碱基以及连接测序接头,用琼脂糖凝胶电泳进行片段

大小选择。通过 PCR 扩增形成测序文库,对其进行质检,质检合格的文库用 Illumina HiSeq 2000 进行双端测序(paired-end),插入片段大小 300 bp。利用生信分析方法对测序数据进行拼接和组装,拼接、组装方法及应用软件同文献[27]。

为了验证拼接结果的准确性,从拼接好的叶绿体基因组选取 4 个连接区段[大单拷贝区-反向重复区 a(LSC-IRa),IRa-小单拷贝区(SSC),SSC-IRb,IRb-LSC],分别设计引物进行 PCR 验证,将获得的序列与基因组组装结果比对,见表 1。

表 1 湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬叶绿体基因组 SC 与 IR 边界引物验证序列

Table 1 Primer verification sequences for SC and IR frontiers of chloroplast genomes of *L. spicata* var. *prolifera*, *O. japonicus* in Sichuan and Zhejiang provinces

物种	区域	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
湖北麦冬	LSC-IRa	GGTTGTACCAAGTCTGAAACC	GCTACATCCGCCCTTATCC
	IRa-SSC	ACCAAGTTCAACGTTAGCCA	TTGTAAAGAGGGGCCCAAG
	SSC-IRb	TCGTGGGATAGTTTTCTGTCGT	ACCAAGTTCAACGTTAGCCAGA
	IRb-LSC	GGCTACATCCGCCCTTATC	ACCAAGTTCAACGTTAGCCAGA
川麦冬	LSC-IRa	GGTTGTACCAAGTCTGAAACC	GCTACATCCGCCCTTATCC
	IRa-SSC	ACCAAGTTCAACGTTAGCCAGA	TGAATGGTCCCCAGATTGGT
	SSC-IRb	TGATAAAACCAGGTGGGCGA	ACCAAGTTCAACGTTAGCCAGA
	IRb-LSC	ATCCACTTGGCTACATCCGC	CTGCTTGGCCTGTAGTAGGT
杭麦冬	LSC-IRa	GGTTGTACCAAGTCTGAAACC	GCTACATCCGCCCTTATCC
	IRa-SSC	ACCAAGTTCAACGTTAGCCA	TTGTAAAGAGGGGCCCAAG
	SSC-IRb	TCGTGGGATAGTTTTCTGTCGT	ACCAAGTTCAACGTTAGCCAGA
	IRb-LSC	GGCTACATCCGCCCTTATC	ACCAAGTTCAACGTTAGCCAGA

注:引物长度均为 1 000 bp。

**1.3 叶绿体基因组注释** 利用 Skewer 去掉原始序列中的低质量片段<sup>[28]</sup>。以美国国家生物技术信息中心(NCBI)发表的山麦冬(GenBank 登录号 NC\_042227)为参照序列,经 MUMmer 4 软件进行比对和校正<sup>[29]</sup>。用 Plann 对基因进行注释<sup>[30]</sup>,用 Geneious R11 检查注释结果<sup>[31]</sup>。将湖北麦冬、川麦冬和杭麦冬的 GenBank 格式文件在线提交至 OGDRAW 绘图工具(<http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de/index.shtml>)绘制叶绿体基因组物理图谱。使用 MEGA X<sup>[32]</sup>分析密码子使用情况和鸟嘌呤与胞嘧啶(GC)含量。利用 MISA 软件<sup>[33]</sup>(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)对湖北麦冬、川麦冬和杭麦冬叶绿体基因组进行简单重复序列(SSR)位点搜索,其参数设置为单核苷酸单元的重复数≥8 次,二核苷酸单元的重复数≥4 次,三核苷酸单元的重复数≥3 次,四核苷酸单元和五核苷酸单元的重复数≥

3 次,六核苷酸单元的重复数≥3 次。

**1.4 序列变异及系统发育关系分析** 应用在线基因比对工具 mVISTA<sup>[34]</sup>(<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>)对山麦冬、湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬共 4 条叶绿体基因组进行全基因组比对。选择湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬在内的 22 条叶绿体基因组序列数据,使用 MAFFT 7 软件<sup>[35]</sup>通过最大似然法(ML)构建 ML 树,设置自展值(bootstrap)=1 000 次重复,系统进化树仅显示支持率≥50%的支。

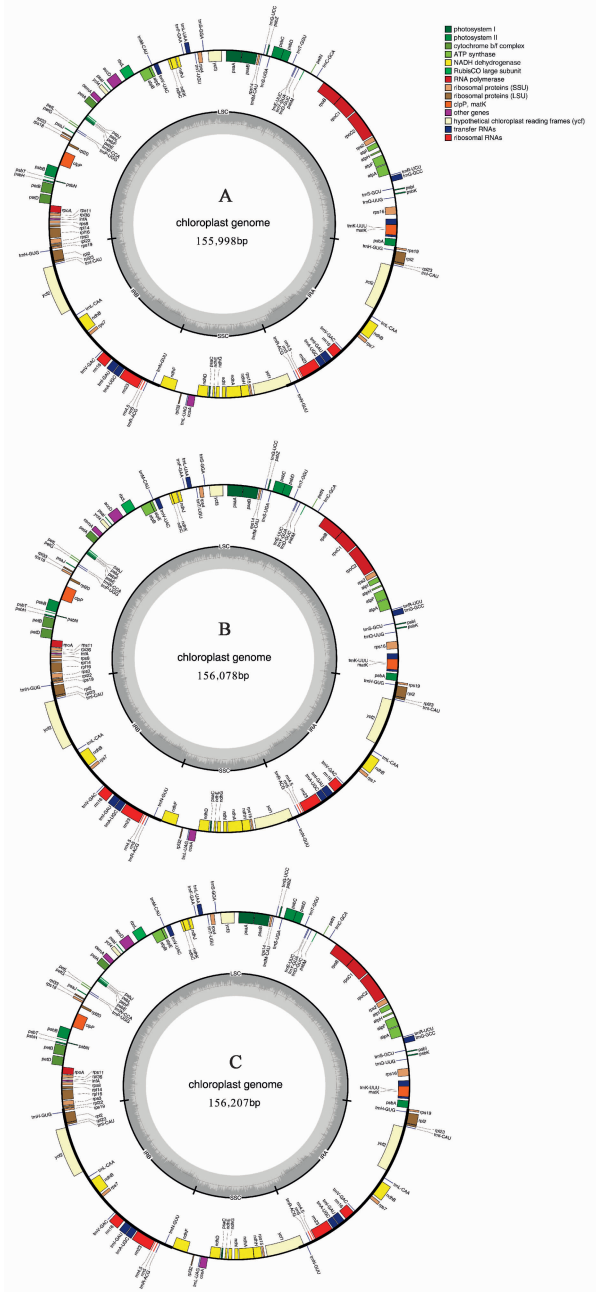
## 2 结果及分析

**2.1 叶绿体基因组基本特征、基因组成及分类** 湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬的叶绿体基因组均为常见的四分体结构,即 1 个 LSC,1 个 SSC 及 2 个 IR,见图 1。经拼接后湖北麦冬、川麦冬、杭麦冬的叶绿体基因组(GenBank 登录号分别为 MN811645,

MN811646, MN811647) 各区段长度及 GC 含量见表 2, 其中 IR 的 GC 含量均高于各自 LSC 和 SSC。通过比较湖北麦冬、川麦冬和杭麦冬的叶绿体基因组发现其大小、数目及 GC 含量非常相似, 这体现了山麦冬与沿阶草属间亲缘关系较近。3 条叶绿体基因组均成功注释出 85 个蛋白编码基因, 37 个转运 RNA (tRNA) 基因和 8 个核糖体 RNA (rRNA) 基因。其中 6 个蛋白编码基因 (*rps19*, *rpl2*, *rpl23*, *ycf2*, *ndhB*, *rps7*), 8 个 tRNA (*trnN-GUU*, *trnR-ACG*, *trnA-UGC*, *trnI-GAU*, *trnV-GAC*, *trnL-CAA*, *trnI-CAU*, *trnH-GUG*) 及 8 个 rRNA 位于 IR。湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬均有 18 个含有内含子的基因, 其中 *rps12*, *ycf3* 和 *clpP* 各含有 2 个内含子, 其他基因各含有 1 个内含子, 见表 3。

**2.2 叶绿体基因组密码子使用分析** 相对同义密码子使用度 (RSCU) 是指对于某一特定的密码子在编码对应氨基酸的同义密码子间的相对概率<sup>[36]</sup>。通过 MEGA X 计算湖北麦冬叶绿体基因组的密码子使用情况。结果显示湖北麦冬共有 51 999 个密码子, 在所有密码子中, 编码亮氨酸 (Leu) 的密码子最多, 有 5 115 个; 而编码色氨酸 (Trp) 的密码子最少, 只有 719 个; UAA 是最常用的终止密码子, 其数量为 1 179 个, 高于 UGA (1 037 个) 和 UAG (818 个) 的数量。川麦冬共有 52 026 个密码子, 在所有密码子中, 编码 Leu 的密码子最多, 有 4 978 个; 而编码 Trp 的密码子最少, 只有 705 个; UAA 数量高于 UGA 和 UAG 的数量。杭麦冬共有 52 069 个密码子, 在所有密码子中, 编码 Leu 的密码子最多, 有 5 043 个; 而 Trp 的密码子最少, 只有 700 个; UAA 数量高于 UGA 和 UAG 的数量。见表 4。

**2.3 SSR 分析**<sup>[37-38]</sup> 在湖北麦冬叶绿体基因组中共搜索到 274 个 SSR 位点, 其中单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸重复分别有 139, 45, 80, 8, 2 个。重复最多的是单核苷酸重复, 且主要是 A/T 的重复, 共有 51 处连续 A 和 80 处连续 T 的单核苷酸重复, 占有单核苷酸重复 (139 个) 的 94.2%; 之后依次为 AAT/ATT (28 次), AT/AT (27 次), AAG/CTT (21 次), AG/CT (17 次) 和 AAC/GTT (12 次), 这些重复序列占总数的 86.1%。在川麦冬叶绿体基因组中共发现 265 个符合条件的 SSR 位点, 重复最多的是单核苷酸重复, 且主要是 A/T 的重复, 共有 46 处连续 A 和 72 处连续 T 的单核苷酸重复, 占有单核苷酸重复 (123 个) 的 95.9%。在杭麦冬叶绿体基因组中共发现 274 个符合条件的



A. 湖北麦冬; B. 川麦冬; C. 杭麦冬; 内圈较深的灰色区域对应 GC 含量, 较浅的灰色区域对应 AT (腺嘌呤和胸腺嘧啶) 含量; 内侧基因顺时针转录, 外侧基因逆时针转录

图 1 湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬叶绿体基因组环形分析  
Fig.1 Ring analysis of complete chloroplast genomes of *L. spicata* var. *prolifera*, *O. japonicus* in Sichuan and Zhejiang provinces

SSR 位点, 重复最多的也是单核苷酸重复, 且主要是 A/T 的重复, 共有 51 处连续 A 和 80 处连续 T 的单核苷酸重复, 占有单核苷酸重复 (139 个) 的 94.2%。另外, 3 条序列的单核苷酸至三核苷酸重复序列的碱基组成均存在一定的碱基偏好性, 以富含 AT 的重复序列为主。这与湖北麦冬、川麦冬及

表 2 各区域湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬叶绿体基因组长度及 GC 含量

Table 2 Length and GC content of chloroplast genomes of *L. spicata* var. *prolifera*, *O. japonicus* in Sichuan and Zhejiang provinces

区域	湖北麦冬		川麦冬		杭麦冬	
	长度 /bp	GC 质量分数/%	长度 /bp	GC 质量分数/%	长度 /bp	GC 质量分数/%
全长	155 998	37.7	156 078	37.8	156 207	37.7
LSC	84 555	35.8	84 677	35.8	84 649	35.8
SSC	18 489	31.5	18 457	31.6	18 604	31.4
IRa	26 477	43.0	26 472	43.0	26 477	43.0
IRb	26 477	43.0	26 472	43.0	26 477	43.0

表 3 湖北麦冬叶绿体基因组包含内含子和外显子的基因位置及长度

Table 3 Gene locations and lengths of introns and exons in chloroplast genome of *L. spicata* var. *prolifera* bp

基因	位置	I		II		III
		外显子 I	内含子 I	外显子 II	内含子 II	外显子 III
<i>atpF</i>	LSC	145	820	410		
<i>clpP</i>	LSC	71	809	292	654	255
<i>ndhA</i>	SSC	559	1 060	539		
<i>ndhB</i>	IR	777	696	756		
<i>petB</i>	LSC	6	755	642		
<i>petD</i>	LSC	8	734	505		
<i>rps12</i>	IR	114	-	232	544	26
<i>rps16</i>	LSC	40	866	215		
<i>rpoC1</i>	LSC	453	741	1 617		
<i>rpl16</i>	LSC	9	1 032	399		
<i>rpl2</i>	IR	391	666	431		
<i>trnA-UGC</i>	IR	38	826	35		
<i>trnG-GCC</i>	LSC	23	708	58		
<i>trnI-GAU</i>	IR	37	947	35		
<i>trnK-UUU</i>	LSC	37	2 587	36		
<i>trnL-UAA</i>	LSC	37	616	50		
<i>trnV-UAC</i>	LSC	39	634	37		
<i>ycf3</i>	LSC	126	748	228	739	153

杭麦冬叶绿体基因组富含 AT(AT 质量分数分别为 62.3%、61.9% 及 62.3%) 一致。这种偏好性可能与 AT 比 GC 更容易突变有关。见表 5。

### 2.4 叶绿体基因组比对及特异性 DNA 条形码筛选

以山麦冬为参照基因,利用 mVISTA 对 4 条叶绿体基因组进行全局比对,见图 2。结果显示,山麦冬

属与沿阶草属叶绿体基因组变异很少,其中非编码区(红色)变异较大,蛋白编码区域(蓝色)高度保守,LSC 和 SSC 变异大于 IR,rRNA 基因高度保守,几乎没有变异。除了川麦冬的 *ycf1* 基因变异较大,其他基因都十分保守。基因区的差异小于基因间隔区,如 *trnF-ndhJ*,*ndhF-rpl32* 和 *rpl32-trnL*,差异大的区域可作为潜在鉴别川麦冬的特异性 DNA 条形码序列,但湖北麦冬与杭麦冬难以鉴别,叶绿体基因组可作为超级条形码,为鉴别湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬提供依据。

2.5 系统进化分析 从 NCBI 下载的 19 条叶绿体基因组序列包括百合科贝母属暗紫贝母 [*Fritillaria unibracteata* (KF769142)], 贝母属川贝母 [*F. cirrhosa* (NC\_024728)], 贝母属甘肃贝母 [*F. przewalskii* (NC\_044636)], 贝母属大金贝母 [*F. dajinensis* (NC\_044632)], 贝母属中华贝母 [*F. sinica* (NC\_044631)], 贝母属华西贝母 [*F. sichuanica* (NC\_044628)], 贝母属浙贝母 [*F. thunbergii* (MH244914)], 贝母属太白贝母 [*F. taipaiensis* (MH244910)], 贝母属砂贝母 [*F. karelinii* (KX354691)], 郁金香属阿尔泰郁金香 [*Tulipa altaica* (NC\_044780)], 百合属 [*Lilium pardanthinum* (MG704135)], 百合属绿花百合 [*L. fargesii* (NC\_033908)], 百合属青岛百合 [*L. tsingtauense* (KU230438)], 百合属野百合 [*L. brownii* (KX347245)], 百合属欧洲百合 [*L. martagon* (NC\_039162)], 百合属华盛顿百合 [*L. washingtonianum* (NC\_037699)], 百合属毛百合 [*L. pensylvanicum* (NC\_043876)], 山麦冬属山麦冬 [*Liriope spicata* (NC\_042227)], 石杉科石杉属蛇足石杉 [*Huperzia serrata* (KY609860)], 以蛇足石杉为外类群,通过 IQ-TREE 构建 ML 树,见图 3。

在构建的系统进化树中,每个节点均具有 100% 支持率。系统进化树显示,百合科植物聚为一支,外类群蛇足石杉为一支,说明其亲缘关系较远。百合科不同属的物种各聚为一支且彼此分开,支持率 100%,说明同属植物亲缘关系更近。山麦冬、湖北麦冬、川麦冬与杭麦冬聚为一支且彼此分开,支持率 100%,说明山麦冬、湖北麦冬、川麦冬与杭麦冬的亲缘关系较近。湖北麦冬、山麦冬与杭麦冬又聚为一小支,且山麦冬和杭麦冬构成姐妹群,表明与川麦冬相比,湖北麦冬与杭麦冬亲缘关系更近。

### 3 讨论

植物细胞有 3 个基因组,即核基因组、质体基因

表 4 湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬叶绿体基因组的密码子使用情况

Table 4 Application of codons in chloroplast genomes of *L. spicata* var. *prolifera*, *O. japonicus* in Sichuan and Zhejiang provinces

密码子	氨基酸	数量/个			RSCU			密码子	氨基酸	数量/个			RSCU		
		湖北 麦冬	川 麦冬	杭 麦冬	湖北 麦冬	川 麦冬	杭 麦冬			湖北 麦冬	川 麦冬	杭 麦冬	湖北 麦冬	川 麦冬	杭 麦冬
UUU	苯丙氨酸 (Phe)	2 133	2 130	2 159	1.16	1.17	1.20	AUU	异亮氨酸 (Ile)	1 763	1 793	1 756	1.21	1.23	1.22
UUC	Phe	1 541	1 515	1 449	0.84	0.83	0.80	AUC	Ile	1 171	1 105	1 066	0.80	0.75	0.74
UUA	Leu	998	1 004	1 072	1.17	1.21	1.28	AUA	Ile	1 436	1 493	1 510	0.99	1.02	1.05
UUG	Leu	1 089	1 072	1 057	1.28	1.29	1.26	AUG	蛋氨酸 (Met)	928	918	894	1.00	1.00	1.00
CUU	Leu	1 043	1 032	1 009	1.22	1.24	1.20	CGU	精氨酸 (Arg)	380	394	402	0.70	0.70	0.72
CUC	Leu	702	652	627	0.82	0.79	0.75	CGC	Arg	253	259	256	0.46	0.46	0.46
CUA	Leu	797	780	792	0.93	0.94	0.94	CGA	Arg	575	584	609	1.05	1.04	1.09
CUG	Leu	486	438	486	0.57	0.53	0.58	CGG	Arg	380	431	398	0.70	0.77	0.71
UCU	丝氨酸 (Ser)	1 122	1 163	1 214	1.41	1.43	1.47	AGA	Arg	1 045	1 095	1 054	1.92	1.95	1.89
UCC	Ser	919	932	916	1.15	1.14	1.11	AGG	Arg	639	609	623	1.17	1.08	1.12
UCA	Ser	969	984	1 019	1.22	1.21	1.23	ACU	苏氨酸 (Thr)	645	647	721	1.14	1.13	1.17
UCG	Ser	635	640	626	0.80	0.79	0.76	ACC	Thr	547	611	624	0.97	1.06	1.01
AGU	Ser	659	690	722	0.83	0.85	0.87	ACA	Thr	700	660	722	1.24	1.15	1.17
AGC	Ser	473	478	462	0.59	0.59	0.56	ACG	Thr	372	379	395	0.66	0.66	0.64
UAU	酪氨酸 (Tyr)	1 445	1 464	1 476	1.30	1.35	1.36	AAU	天冬酰胺 (Asn)	1 732	1 811	1 818	1.35	1.38	1.40
UAC	Tyr	770	701	687	0.70	0.65	0.64	AAC	Asn	836	814	773	0.65	0.62	0.60
UAA	终止 (Stop)	1 179	1 143	1 058	1.17	1.17	1.16	AAA	赖氨酸 (Lys)	2 071	2 021	2 027	1.35	1.36	1.33
UAG	Stop	818	779	701	0.81	0.80	0.77	AAG	Lys	991	952	1031	0.65	0.64	0.67
UGA	Stop	1 037	1 006	981	1.03	1.03	1.07	GUU	缬氨酸 (Val)	792	738	784	1.37	1.27	1.35
UGU	半胱氨酸 (Cys)	728	757	713	1.20	1.24	1.23	GUC	Val	413	442	419	0.71	0.76	0.72
UGC	Cys	488	466	448	0.80	0.76	0.77	GUA	Val	702	732	710	1.21	1.26	1.22
UGG	Trp	719	705	700	1.00	1.00	1.00	GUG	Val	410	414	408	0.71	0.71	0.70
CCU	脯氨酸 (Pro)	637	650	668	1.04	1.06	1.09	GCU	丙氨酸 (Ala)	457	501	530	1.23	1.34	1.34
CCC	Pro	613	629	602	1.00	1.03	0.98	GCC	Ala	339	335	373	0.92	0.89	0.94
CCA	Pro	765	774	774	1.25	1.27	1.27	GCA	Ala	432	407	446	1.17	1.08	1.12
CCG	Pro	428	389	403	0.70	0.64	0.66	GCG	Ala	253	258	239	0.68	0.69	0.60
CAU	组氨酸 (His)	951	961	967	1.39	1.39	1.44	GAU	天冬氨酸 (Asp)	1 022	1 113	1 218	1.41	1.42	1.47
CAC	His	414	418	373	0.61	0.61	0.56	GAC	Asp	430	452	437	0.59	0.58	0.53
CAA	谷氨酰胺 (Gln)	1 056	1 016	1 056	1.38	1.34	1.38	GGU	甘氨酸 (Gly)	568	537	546	1.01	0.97	0.97
CAG	Gln	472	503	474	0.62	0.66	0.62	GGC	Gly	323	346	366	0.58	0.63	0.65
GAA	谷氨酸 (Glu)	1 319	1 367	1 301	1.35	1.38	1.38	GGA	Gly	808	797	789	1.44	1.44	1.41
GAG	Glu	637	609	589	0.65	0.62	0.62	GGG	Gly	544	531	544	0.97	0.96	0.97

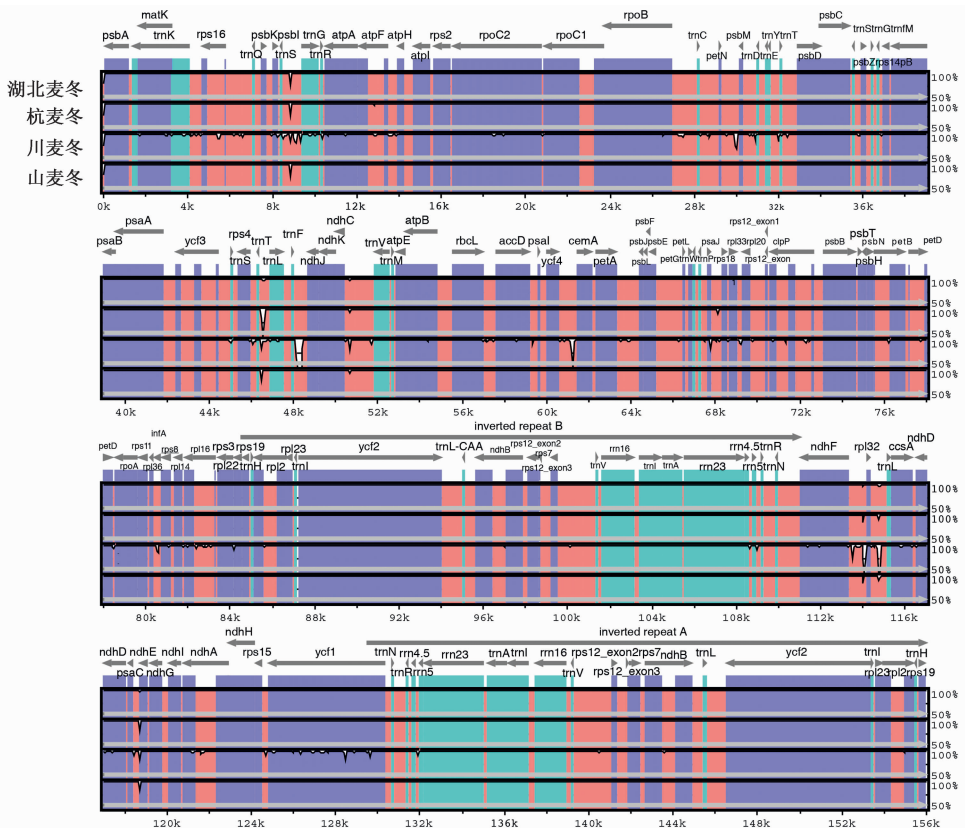
组和线粒体基因组。叶绿体是质体的一种,因内含叶绿素而得名,具有独立的基因组,被普遍认为是蓝细菌内共生起源的基因组<sup>[39]</sup>。叶绿体是绿色植物和藻类进行光合作用必不可少的细胞器,在裸子植物中以父系遗传为主<sup>[40]</sup>,而在被子植物中以母系遗传为主,少数为双亲遗传和父系遗传<sup>[41-43]</sup>。叶绿体

基因组序列高度保守,大部分均是长度 120 ~ 220 kb 的闭合环状双链 DNA,编码 120 ~ 130 个基因<sup>[44]</sup>。麦冬是百合科沿阶草属植物麦冬的干燥块根,根据产地不同分为杭麦冬和川麦冬;山麦冬为百合科山麦冬属植物湖北麦冬或短葶山麦冬的干燥块根,根据基原不同分为湖北麦冬和短葶山麦冬。本研究

表 5 湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬叶绿体基因组的 SSR 类型、数量及比例

Table 5 Types, amounts and ratios of SSR in chloroplast genomes of *L. spicata* var. *prolifera*, *O. japonicus* in Sichuan and Zhejiang provinces

核苷酸类型	SSR 重复序列	SSR 数量/次			重复序列的比例/%			核苷酸类型	SSR 重复序列	SSR 数量/次			重复序列的比例/%		
		湖北麦冬	川麦冬	杭麦冬	湖北麦冬	川麦冬	杭麦冬			湖北麦冬	川麦冬	杭麦冬	湖北麦冬	川麦冬	杭麦冬
单核苷酸	A/T	131	118	131	94.24	95.93	94.24	四核苷酸	AGC/CGT	5	5	5	6.25	6.17	6.25
	G/C	8	5	8	5.76	4.07	5.76		AGG/CCT	2	2	2	2.50	2.47	2.50
二核苷酸	AC/GT	1	1	1	2.22	2.00	2.22	ATC/ATG	6	6	6	7.50	7.41	7.50	
	AG/CT	17	19	17	37.78	38.00	37.78	CCG/CGG	1	1	1	1.25	1.23	1.25	
三核苷酸	AT/AT	27	30	27	60.00	60.00	60.00	AAAT/ATTT	3	3	3	37.50	33.33	37.50	
	AAC/GTT	12	11	12	15.00	13.58	15.00	AATG/ATTG	2	2	2	25.00	22.22	25.00	
	AAG/CTT	21	21	21	26.25	25.93	26.25	AATG/ATTC	3	3	3	37.50	33.33	37.50	
	AAT/ATT	28	30	28	35.00	37.04	35.00	AAAG/CTTT	-	1	-	-	11.11	-	
	ACC/GGT	3	3	3	3.75	3.70	3.75	五核苷酸	AAACG/CGTTT	2	2	2	100	100.00	100.00
	ACT/AGT	2	2	2	2.50	2.47	2.50								



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;Y轴表示 50% ~ 100% 的相似性;X轴表示叶绿体基因组序列长度,单位为 bp(碱基对)

图 2 湖北麦冬、川麦冬及杭麦冬叶绿体基因组全局比对

Fig. 2 Global comparison of chloroplast genomes of *L. spicata* var. *prolifera*, *O. japonicus* in Sichuan and Zhejiang provinces

结果湖北麦冬、川麦冬与杭麦冬的序列长度基本一致,总长度分别为 155 998, 156 078, 156 207 bp, 与已经发表的山麦冬序列长度相差不大。川麦冬在

*ycf1* 基因及 *trnF-ndhJ*, *ndhF-rpl32*, *rpl32-trnL* 基因间隔区与湖北麦冬、杭麦冬存在明显差异,这些区域可以为川麦冬物种鉴定特异性 DNA 条形码的筛选



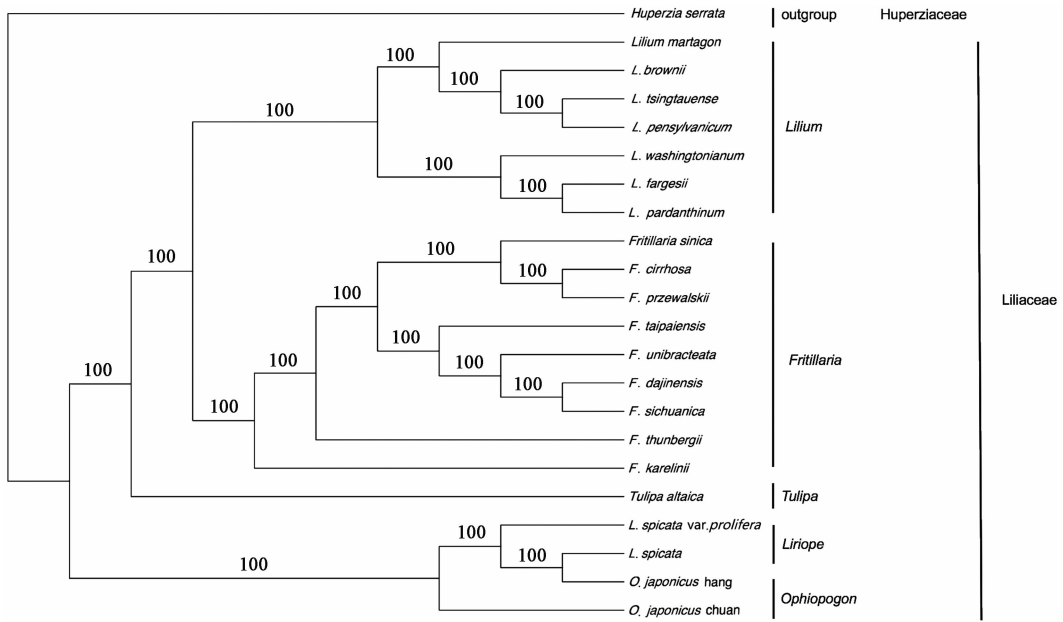


图 3 基于叶绿体基因组构建百合科和其他植物的 ML 树

Fig. 3 Maximum likelihood (ML) tree of Liliaceae and other species based on complete chloroplast genomes

提供参考,而叶绿体基因组可作为超级条形码用于山麦冬属与沿阶草属植物的鉴定。系统发育树显示,湖北麦冬、杭麦冬与参考序列山麦冬聚为一支,且杭麦冬与山麦冬互为姐妹群,与传统分类不一致。已有学者研究表明,由于生长环境和栽培技术等条件的不同,会形成不同地区的栽培品种,其化学成分也会因此发生显著变化<sup>[45-46]</sup>,本研究从系统发育学角度为上述研究提供了证据。

叶绿体转化技术是植物基因工程中的新热点。叶绿体转化与细胞核转化相比具有多重优势,包括基因拷贝数高让外源基因大量表达<sup>[47-48]</sup>、可以实现外源基因的定点整合、可实现多基因的同时转化<sup>[49]</sup>、保证环境安全<sup>[50-51]</sup>以及在子代中稳定的遗传表达等。叶绿体转化技术在作物遗传改良和植物生物反应器中有重要应用。自莱茵衣藻<sup>[52]</sup>和烟草<sup>[53]</sup>叶绿体的遗传转化以来,叶绿体转化技术已成功应用于甜菜<sup>[54]</sup>、莴苣<sup>[55]</sup>、胡萝卜及棉花<sup>[56-57]</sup>等多种植物中,获得了高产、抗虫、抗除草剂及抗盐的植株;此外叶绿体转化技术还可用于非绿色组织中的基因表达<sup>[58-59]</sup>。随着对叶绿体转化技术的不断深入研究,该技术在植物次生代谢、光合作用及进化等基础研究方面也有重要应用<sup>[60-62]</sup>。

本研究通过对沿阶草属及山麦冬属的叶绿体基因组序列进行比较和分析,进一步丰富了这两属植物的叶绿体基因组资料,揭示了属间的亲缘关系及系统进化位置,可为二者的分子鉴定提供数据支撑。

为了进一步推进沿阶草属及山麦冬属药用植物的研究进程,还需对这两属植物叶绿体基因组展开更深入的研究,为这两属药用植物在培育改良、遗传转化及次生代谢途径等方面探索奠定理论基础。

[参考文献]

[ 1 ] WU F H, CHAN M T, LIAO D C, et al. Complete chloroplast genome of *Oncidium* Gower Ramsey and evaluation of molecular markers for identification and breeding in *Oncidiinae* [ J ]. BMC Plant Biol, 2010, 10 ( 1 ): 68.

[ 2 ] KUANG D Y, WU H, WANG Y L, et al. Complete chloroplast genome sequence of *Magnolia kwangsiensis* ( Magnoliaceae ): implication for DNA barcoding and population genetics [ J ]. Genome, 2011, 54 ( 8 ): 663-673.

[ 3 ] NOCK C J, WATERS D L, EDWARDS M A, et al. Chloroplast genome sequences from total DNA for plant identification [ J ]. Plant Biotechnol J, 2011, 9 ( 3 ): 328-333.

[ 4 ] TAKANO A, OKADA H. Phylogenetic relationships among subgenera, species, and varieties of Japanese *Salvia* L. ( Lamiaceae ) [ J ]. J Plant Res, 2011, 124 ( 2 ): 245-252.

[ 5 ] 高亚芳,刘莹莹,杨从卫,等. 金铁锁叶绿体基因组序列及其系统发育分析 [ J ]. 中草药, 2019, 50 ( 22 ): 5532-5536.

[ 6 ] 左文明,曾阳,杨春芳,等. 基于高通量技术的唐古特大黄叶绿体全基因组测序及应用研究 [ J ]. 中草药,



- 2019,50(22):5545-5553.
- [ 7 ] DONG W, 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.
- [ 8 ] LI X, 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.
- [ 9 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部 [ M ]. 北京:中国医药科技出版社, 2015:155-156.
- [ 10 ] 余伯阳, 徐国钧. 中药麦冬的资源利用研究 [ J ]. 中草药, 1995, 26(4):205-210, 225.
- [ 11 ] 简美玲, 李荷, 毛润乾. 麦冬种质资源的研究进展 [ J ]. 广东药科大学学报, 2011, 27(5):549-551.
- [ 12 ] LI L C, WANG Z W, HU X P, et al. MDG-1 inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis and inflammation in human umbilical vein endothelial cells [ J ]. Mol Med Rep, 2017, 16(3):3673-3679.
- [ 13 ] 袁春丽, 孙立, 袁胜涛, 等. 麦冬有效成分的药理活性及作用机制研究进展 [ J ]. 中国新药杂志, 2013, 22 ( 21 ): 2496-2502.
- [ 14 ] 李霞. 麦冬多糖-1 对心肌缺血再灌注大鼠内皮祖细胞与缺血修饰白蛋白变化的影响 [ J ]. 中国老年学杂志, 2015, 35(19):5449-5450.
- [ 15 ] ZHAO J W, CHEN D S, DENG C S, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of compounds isolated from the rhizome of *Ophiopogon japonicus* [ J ]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1):7.
- [ 16 ] BI L Q, ZHU R, KONG H, et al. Ruscogenin attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats [ J ]. Int Immunopharmacol, 2013, 16(1):7-16.
- [ 17 ] CHEN M, DU Y H, QUI M, et al. Ophiopogonin B-induced autophagy in non-small cell lung cancer cells via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway [ J ]. Oncol Rep, 2013, 29(2):430-436.
- [ 18 ] LIN M, SUN W, GONG W, et al. Methylophiopogonanone A protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and attenuates blood-brain barrier disruption *in vitro* [ J ]. PLoS One, 2015, 10(4):e0124558.
- [ 19 ] ZHU Y, CONG W, SHEN L, et al. Fecal metabonomic study of a polysaccharide, MDG-1 from *Ophiopogon japonicus* on diabetic mice based on gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry ( GC TOF/MS ) [ J ]. Mol Biosyst, 2014, 10(2):304-312.
- [ 20 ] WANG X, SHI L, JOYCE S, et al. MDG-1, a potential regulator of PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ , ameliorates dyslipidemia in mice [ J ]. Int J Mol Sci, 2017, 18 ( 9 ): E1930.
- [ 21 ] 陈心启, 马元俊. 百合科药用新植物 [ J ]. 植物科学学报, 1985, 3(1):25-27.
- [ 22 ] 国家质量监督检验检疫总局科技司. 关于批准对藜麦冬实施地理标志产品保护的公告 ( 2008 年第 53 号 ) [ EB/OL ]. [http://kjs.aqsiq.gov.cn/dlbzcpbhwx/ggex/200805/t20080509\\_72032.html](http://kjs.aqsiq.gov.cn/dlbzcpbhwx/ggex/200805/t20080509_72032.html), 2008-05-07/2019-12-04.
- [ 23 ] 刘霞, 林韵涵, 陈士林, 等. 道地药材川麦冬和浙麦冬的生态遗传分化 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 ( 17 ): 27-33.
- [ 24 ] 胡仲义, 吴帆, 徐兵兵, 等. 不同地区麦冬遗传多样性的 ISSR 分析 [ J ]. 中国野生植物资源, 2015, 34(3):23-26, 33.
- [ 25 ] 许金榜, 张君毅. 山麦冬及其近缘种 DNA 条形码研究 [ J ]. 植物研究, 2012, 32(4):452-457.
- [ 26 ] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [ J ]. Phytochem Bull, 1987, 19(1):11-15.
- [ 27 ] ZHOU J, CHEN X, CUI Y, et al. Molecular structure and phylogenetic analyses of complete chloroplast genomes of two *Aristolochia* medicinal species [ J ]. Int J Mol Sci, 2017, 18(9):E1839.
- [ 28 ] JIANG H, LEI R, DING S W, et al. Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads [ J ]. BMC Bioinformatics, 2014, 15:182.
- [ 29 ] MARÇAIS G, DELCHER A L, PHILLIPPY A M, et al. MUMmer4: a fast and versatile genome alignment system [ J ]. PLoS Comput Biol, 2018, 14(1):e1005944.
- [ 30 ] HUANG D I, CRONK Q C B. Plann: a command-line application for annotating plastome sequences [ J ]. Appl Plant Sci, 2015, 3(8):1500026.
- [ 31 ] KEARSE M, MOIR R, WILSON A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data [ J ]. Bioinformatics, 2012, 28(12):1647-1649.
- [ 32 ] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [ J ]. Mol Biol Evol, 2018, 35(6):1547-1549.
- [ 33 ] BEIBER S, THIEL T, MÜNCH T, et al. MISA-web: a web server for microsatellite prediction [ J ]. Bioinformatics, 2017, 33(16):2583-2585.
- [ 34 ] FRAZER K A, PACHTER L, POLIAKOV A, et al. VISTA: computational tools for comparative genomics [ J ]. Nucleic Acids Res, 2004, 32:W273-W279.
- [ 35 ] KATO H, KUMA K, TOH H, et al. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment [ J ]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(2):511-518.
- [ 36 ] ZHOU J G, CUI Y X, CHEN X L, et al. Complete chloroplast genomes of *Papaver rhoas* and *Papaver orientale*: molecular structures, comparative analysis, and

- phylogenetic analysis [ J ]. *Molecules*, 2018, 23 (2) :E437.
- [37] 杨丽,赵韩生,彭镇华,等. 竹子叶绿体基因组 SSR 分子标记的开发及应用 [ J ]. *热带亚热带植物学报*, 2014, 22 (3) :263-269.
- [38] TANG D Q, LU J J, FANG W, et al. Development, characterization and utilization of GenBank microsatellite markers in *Phyllostachys pubescens* and related species [ J ]. *Mol Breeding*, 2010, 25 (2) :299-311.
- [39] MCFADDEN G I. Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids [ J ]. *J Phycol*, 2001, 37 (6) : 951-959.
- [40] JR BIRKY C W. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92 (25) : 11331-11338.
- [41] JANSEN R K, RUHLMAN T A. *Plastid Genomes of Seed Plants: Genomics of Chloroplasts and Mitochondria* [ M ]. Dordrecht: Springer, 2012, 35: 103-126.
- [42] HU Y C, ZHANG Q, RAO G Y, et al. Occurrence of plastids in the sperm cells of Caprifoliaceae: biparental plastid inheritance in angiosperms is unilaterally derived from maternal inheritance [ J ]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49 (6) :958-968.
- [43] TESTOLIN R, CIPRIANI G. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in the genus *Actinidia* [ J ]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94 (6/7) :897-903.
- [44] 张韵洁,李德铎. 叶绿体系统发育基因组学的研究进展 [ J ]. *植物分类与资源学报*, 2011, 33 (4) : 365-375.
- [45] 车晓彦,伍丕娥,周娟,等. 麦冬药材 TLC 及 HPLC 特征图谱研究 [ J ]. *药物分析杂志*, 2012, 32 (12) : 2262-2266.
- [46] 中国药材公司. 中国常用中药材 [ M ]. 北京: 科学出版社, 1995: 286.
- [47] OEY M, LOHSE M, KREIKEMEYER B, et al. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic [ J ]. *Plant J*, 2009, 57 (3) :436-445.
- [48] HIBBERD M J, LINLEY J P, KHAN M S, et al. Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojection bombardment [ J ]. *Plant J*, 1998, 16 (5) :627-732.
- [49] MCBRIDE K E, SVAB Z, SCHAAF D J, et al. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplast leads to an extraordinary level of an insecticidal protein tobacco [ J ]. *Nat Biotechnol*, 1995, 13 (4) :362-365.
- [50] BOCK R. Genetic engineering of the chloroplast: novel tools and new application [ J ]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 26: 7-13.
- [51] BOCK R. Engineering plastid genomes: methods, tools, and application in basic research and biotechnology [ J ]. *Annu Rev Plant Biol*, 2015, 66 (1) :211-241.
- [52] BOYNTON J E, GILLHAM N W, HARRIS E H, et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles [ J ]. *Science*, 1988, 240 (4858) :1534-1538.
- [53] SVAB Z, HAJDUKIEWICZ P, MALIGA P. Stable transformation of plastids in higher plants [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87 (21) :8526-8530.
- [54] 赵雅坤,史贤明,张忠明. 人白细胞介素 4 在衣藻叶绿体中的高效转化及表达 [ J ]. *华中农业大学学报*, 2006, 25 (2) :110-116.
- [55] 林春晶,韦正乙,王云鹏,等. 莴苣叶绿体转化体系的初步建立 [ J ]. *农业生物与技术学报*, 2014, 22 (4) : 520-528.
- [56] KUMAR S, DHINGRA A, DANIELL H. Plastid expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance [ J ]. *Plant Physiol*, 2004, 136 (1) :2843-2854.
- [57] KUMAR S, DHINGRA A, DANIELL H. Manipulation of gene expression facilitates cotton plastid transformation of cotton by somatic embryogenesis & maternal inheritance of transgenes [ J ]. *Plant Mol Biol*, 2004, 56 (2) :203-216.
- [58] SIDOROV V A, KASTEN D, PANG S Z, et al. Technical advance: stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker [ J ]. *Plant J*, 1999, 19 (2) :209-216.
- [59] RUF S, HERMANN M, BERGER I, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit [ J ]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19 (9) :870-875.
- [60] WHITNEY S M, ANDREWS T J. Plastome-encoded bacterial ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) supports photosynthesis and growth in tobacco [ J ]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (25) :14738-14743.
- [61] 王永飞,马三梅,王莹. 高等植物叶绿体基因组转化的应用 [ J ]. *遗传*, 2004, 26 (6) :977-983.
- [62] DING S H, ZHANG Y, HU Z, et al. mTERF5 acts as a transcriptional pausing factor to positively regulate transcription of chloroplast psbEFLJ [ J ]. *Mol Plant*, 2019, 12 (9) :1259-1277.

[责任编辑 刘德文]