

## 红芽芋及荔浦芋叶绿体基因组测序及比较分析

贾芯碧, 潘 饶, 肖 遥, 罗 莎, 单 楠, 孙静宇, 汪生林, 周庆红,  
黄英金, 朱强龙\*

江西省薯芋生物学重点实验室/江西农业大学, 江西南昌 330045

**摘 要:** 为明确红芽芋、荔浦芋叶绿体基因组的基本特征及其差异, 本研究以江西铅山红芽芋和广西荔浦芋为研究对象, 采用改良 CTAB 法提取 2 种芋新鲜叶片基因组 DNA, 利用高通量测序技术获得 2 种芋全长叶绿体基因组序列, 并进行 SSR 检测、序列比对、遗传多样性滑窗分析和系统发育树构建分析。结果表明, 红芽芋和荔浦芋的叶绿体基因组全长分别为 162 478 bp 和 162 453 bp, 均呈现典型的环状双链四分体结构, 二者均注释到 131 个基因, 包括蛋白编码基因 86 个, tRNA 基因 37 个, rRNA 基因 8 个, 其中具有 2 个拷贝的基因 18 个, 具有内含子的基因 23 个。简单重复序列 (SSR) 位点分析发现, 红芽芋和荔浦芋基因组序列分别含有 130 和 124 个 SSR, 二者 SSR 序列中 A/T 碱基含量分别占 63.08% 和 61.29%, 基于其 SSR 位点分析开发出 15 条具有多态性的 SSR 引物。红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组共检测到 236 个 SNP 位点, 26.7% 的 SNP 位点发生在编码区, 其中有 25 个基因发生错位突变, 这些基因的变异可能促进了 2 种芋之间的性状变异。与天南星亚科已公布的 13 个属代表植物叶绿体基因组进行比较, 其基因结构、种类和数量都比较保守, trnS-trnG 和 ndhF-rpl32 分别是 SSC 区和 LSC 区的最高变异位点。最大似然法构建的系统发育树显示芋属与皂七属亲缘关系最为相近, 与斑龙芋属亲缘关系较远。本研究结果将为我国特色芋种质资源开发利用、遗传多样性评价和系统发育分析奠定理论基础。

**关键词:** 红芽芋; 荔浦芋; 叶绿体基因组; SSR; SNP; 系统发育分析

中图分类号: S632.3 文献标识码: A

## Comparative Analysis and Sequencing of Chloroplast Genome of *Colocasia esculenta* var. *Redbud* and *Colocasia esculenta* var. *Lipu*

JIA Xinbi, PAN Rao, XIAO Yao, LUO Sha, SHAN Nan, SUN Jingyu, WANG Shenglin, ZHOU Qinghong,  
HUANG Yingjin, ZHU Qianglong\*

Jiangxi Province Key Laboratory of Root and Tuber Crops Biology / Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China

**Abstract:** To confirm the characteristics and difference of the chloroplast (cp) genome of *Colocasia esculenta* var. *Redbud* and *Colocasia esculenta* var. *Lipu*, the two taros were taken as experimental materials in the study, their genomic DNA were first extracted from fresh leaves using an improved CTAB method and the two complete cp genomes were obtained using high-throughput sequencing technology and bioinformatics analysis, simple sequence repeat (SSR) identification, multiple sequence alignment, sliding window analysis on DNA polymorphism and phylogenetic tree analysis were then conducted on two complete cp genomes. The results showed that the length of the complete cp genomes of Redbud and Lipu was 162 478 bp and 162 453 bp, respectively, exhibiting the typical cyclic quadripartite structure. A total of 131 genes were annotated both in the two, including 86 protein-coding genes, 37 tRNA genes and 8 rRNA genes, of which 18 genes had two copies and 23 genes had introns. A total of 130 and 124 SSR sites were identified in Redbud

收稿日期 2022-06-07; 修回日期 2022-07-24

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 32060683); 江西省自然科学基金项目 (No. 20202ACBL215006); 江西重点研发计划项目 (No. 20212BBF61001)。

作者简介 贾芯碧(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物技术。\*通信作者 (Corresponding author): 朱强龙 (ZHU Qianglong), E-mail: longzhu2011@126.com。

and Lipu respectively, the content of A/T in the SSR repeats was 63.08% and 61.29% respectively. 15 SSR polymorphic primers were identified. A total of 236 cp single nucleotide polymorphism (SNP) sites were detected between Redbud and Lipu, of which 26.7% were in the gene coding region, which leading to 25 missense variant genes, the variation of the genes may promote the difference between the two varieties. Compared with the representative species from 13 genus of Aroideae showed that the structure, types, and numbers of gene were relatively conservative. The trnS-trnG and ndhF-rpl32 were the highest variation sites in SSC and LSC region, respectively. The phylogenetics analysis using maximum likelihood method (ML) showed that the genus *Colocasia* had the closest relationship with the genus *Stuednera*, but the farthest relationship with the genus *Sauromatum* in the Ariodeae. The results would provide a theoretical basis for the germplasm resource exploitation, genetic diversity evaluation and phylogenetic analysis of *C. esculenta*.

**Keywords:** *Colocasia esculenta* var. *Redbud*; *Colocasia esculenta* var. *Lipu*; chloroplast genome; SSR; SNP; phylogenetic analysis

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.05.002

芋 [*Colocasia esculenta* (L.) Schoott] 为天南星科芋属多年生草本植物, 是我国传统的蔬菜兼粮食作物。芋地下球茎具有很高的营养和药用价值, 富含淀粉、蛋白质、多糖、维生素和膳食纤维<sup>[1]</sup>, 球茎中含有的丰富的粘液物质具有抑制癌细胞转移, 增强人体免疫力, 降血糖、抗病毒等功效, 其花、叶、茎均可入药, 可治口渴便秘、消癆散结等症<sup>[2]</sup>, 是食药兼优的上乘佳品。芋在我国有悠久的栽培历史, 品种类型丰富多样, 其中以多子芋和魁芋最为常见。多子芋主要分布在长江流域, 多为三倍体种 ( $2n=3x=42$ ), 以子、孙芋为主要食用部分; 魁芋主要分布于岭南地区, 为二倍体种 ( $2n=2x=28$ ), 以食用硕大的母芋为主。江西铅山红芽芋为典型的多子芋类型, 红芽白肉, 母芋近圆形, 芋皮黄褐色, 有少量须毛, 子芋肥大, 多而群生。铅山红芽芋因其肉质细腻, 口感松滑, 营养丰富而备受大众喜爱, 成为江西省名优农产品, 2013 年获批国家地理标志农产品<sup>[3-4]</sup>。广西荔浦芋又名魁芋, 白芽白肉, 母芋个头硕大, 呈椭圆形, 芋皮棕色, 芋肉具有美丽的紫色槟榔花纹<sup>[5]</sup>。荔浦芋肉质绵甜, 酥黏可口, 味道芬芳, 被誉为“芋中极品”, 被列为广西壮族自治区的地理标志保护产品<sup>[6]</sup>。红芽芋喜湿怕涝, 喜凉怕热<sup>[7]</sup>, 一般选用土层深厚肥沃, pH 在 5.5~7.5 之间的沙质土壤, 进行旱地栽培<sup>[8]</sup>; 而荔浦芋喜高温多湿的环境<sup>[9]</sup>, 更适合水田种植, 栽培时选用石灰性的黏质壤土较为适宜<sup>[10]</sup>, 由于它们长期生长环境和栽培条件不同, 可能导致 2 种芋的遗传和性状具有显著的差异。

叶绿体是绿色植物细胞中参与光合作用和能量代谢最重要的细胞器之一, 内含特定的遗传物质。叶绿体基因组编码了约 110~134 个基因, 这

些基因与光合作用、叶绿体转录翻译表达及能量代谢相关。相较于核基因组, 叶绿体基因组多为母系遗传, 其进化路线独立、进化速率适中、核苷酸替换率较低、基因结构稳定, 在系统研究方面易于提供物种进化信息<sup>[11]</sup>。因此, 叶绿体基因组广泛应用于植物物种鉴定及分类、系统进化、遗传差异和多样性分析等研究中<sup>[12]</sup>。目前, 国内外鲜有关于我国特色芋种质资源叶绿体基因组测序和比较分析的研究。此外, 荔浦芋和红芽芋虽均为芋属芋种作物, 但由于倍性不同, 其生物学特性存在显著差异, 二者在叶绿体基因组方面的差异并不明确。本研究以江西铅山红芽芋和广西荔浦芋为实验材料, 对其叶绿体基因组进行测序、组装、注释和绘制物理图谱, 分析其简单重复序列并开发多态性 SSR 引物, 将红芽芋、荔浦芋与 NCBI 数据库中已公布的 13 种植物的叶绿体基因组序列信息进行序列比对, 对其进行叶绿体基因组基本特征的比较分析, 通过遗传多样性滑窗分析鉴别 15 种天南星亚科植物叶绿体基因序列的遗传差异, 并构建进化树揭示芋在系统发育中的地位及其群体进化关系, 为阐明我国特色多子芋和魁芋遗传差异, 芋种质资源鉴定、开发、利用以及遗传育种奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究为比较红芽芋 (多子芋, 三倍体) 和荔浦芋 (魁芋, 二倍体) 的叶绿体基因的差异, 所用红芽芋品种为赣芋 1 号, 是江西上饶铅山县的地理标志农产品; 荔浦芋采自广西壮族自治区桂林市荔浦市。同时利用 30 份从全国搜集的芋核心种质资源品种 (表 1) 对红芽芋和荔浦芋叶

表 1 32 份芋种质资源信息  
Tab. 1 Information of 32 germplasm resources of taro

编号 No.	样品名称 Sample name	采集地 Origin	分类 Species	编号 No.	样品名称 Sample name	采集地 Origin	分类 Species
1	赣芋 1 号	江西赣州	多子芋	17	炮弹芋	四川乐山	魁芋
2	青岛芋	山东青岛	多子芋	18	黎族多子芋	海南白沙黎族自治县	多子芋
3	江芋 3 号	江西上饶	多子芋	19	扁母芋	河南商丘	多子芋
4	江芋 4 号	江西上饶	多子芋	20	多子芋	天津西青	多子芋
5	瑞金芋	江西赣州	多子芋	21	泉州魁芋	福建泉州	魁芋
6	于都芋 1 号	江西赣州	多子芋	22	水毛芋	重庆	多子芋
7	粉红佳人	江西赣州	多子芋	23	紫红嘴芋	江西新余	多子芋
8	粉红芋 2 号	江西赣州	多子芋	24	登龙粉芋	江西吉安	多子芋
9	于都大野芋	江西赣州	多子芋	25	野生紫柄小水芋	江西抚州南城县	多子芋
10	紫柄芋	江苏宿迁	多子芋	26	花柄食用芋	云南丽江	多子芋
11	钦州芋	广西钦州	多子芋	27	大麻芋 2 号	云南西双版纳勐腊河边	多子芋
12	紫芽芋	江西南昌	多子芋	28	大香芋	云南西双版纳勐醒	魁芋
13	狗爪芋	云南曲靖	多子芋	29	常德芋	湖南常德	多子芋
14	白肉毛芋	贵州六盘水	多子芋	30	小香芋	云南西双版纳勐醒	魁芋
15	赣州多子芋	江西赣州	多子芋	31	鹰潭红芽芋	江西鹰潭	多子芋
16	红嘴芋	广西南宁	多子芋	32	荔浦芋	广西桂林	魁芋

绿体基因组中开发的 SSR 标记进行多态性检验。于 2021 年 7 月在田间收集新鲜的叶片,立即冻存于液氮中,然后运至实验室保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中直至使用。利用 CTAB 改良法提取叶片高纯度基因组 DNA<sup>[13]</sup>,并用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop-2000 核酸测定仪检测 DNA 的质量和浓度,符合要求的 DNA 样品将用于后续实验。

## 1.2 方法

1.2.1 基因组测序、组装与注释 将红芽芋和荔浦芋的 DNA 送至深圳华大基因科技有限公司进行高通量测序,其余稀释到  $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ ,分装冻存待用。利用华大基因自主开发的过滤软件 SOAPnuke 对原始数据进行过滤,过滤参数为“-n 0.01 -I 20 -q 0.3 -A 0.25 -f <adapter1> -r <adapter2> -l <fq1> -2 <fq2> -C <cleanFq1> -D <cleanFq2> -o <outDir>”。删除匹配上 adapter 序列的 25%或者以上、质量值低于 20 的碱基占整条 read 的 30%或者以上、碱基 N 含量占整条 read 的 1%或者以上的整条 read,得到无杂质的高质量数据。利用 Seqtk 软件随机抽取获得 1 Gb 的高质量测序数据,采用 SPAdes 软件<sup>[14]</sup>中的 Plasmids-pades.py 脚本程序将得到的 clean reads 组装到 contig 序列,用 BlastN 软件<sup>[15]</sup>将其比对到国外发表的芋的叶绿体参考基因组 (NC\_016753.1),构建出芋叶绿体基因组骨架。使用 GapCloser 软件对框架序列上的 gap 进行填补。通过 CPGAVAS2<sup>[16]</sup>和 GeSeq<sup>[17]</sup>对 2 种芋叶绿体基因组

序列进行注释,利用 IGV 和 Sequin 软件检查和修正注释结果,将最终注释的红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组数据提交到 NCBI 的 GenBank 基因组数据库,获得基因编号分别为 MT447084 和 MT447085。最后,使用在线程序 OGDRAW<sup>[18]</sup> (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>) 绘制完整的环状叶绿体基因组图谱。

1.2.2 简单重复序列鉴定及标记开发 利用 MISA 软件<sup>[19]</sup>对红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组中简单重复序列 (SSR) 进行鉴定,再利用 Primer3 软件进行批量化 SSR 引物设计,引物挑选标准:引物序列长度为 16~24 bp,预计扩增产物片段长度为 100~300 bp, TM 值为  $50\sim 60^{\circ}\text{C}$ ,最适为  $55^{\circ}\text{C}$ ,上下游引物的 TM 值相差不大于  $3^{\circ}\text{C}$ ,GC% 为 40%~60%; SSR 多态性引物的筛选的条件为:SSR 重复单元包含 2~6 个碱基重复,SSR 长度不少于 18 bp,富含 AT 碱基,且 SSR 序列在 2 种芋叶绿体基因组上存在差异,它们的侧翼引物将用于后续的多态性验证实验。然后,利用本实验室保存的 32 份芋核心种质资源的 DNA 样品(表 1)对符合筛选条件的 SSR 引物进行多态性验证。PCR 扩增反应体系为  $10\ \mu\text{L}$ ,含  $5\ \mu\text{L}\ 2\times\text{TSINGKE}$  Master Mix (Green);前引物  $0.25\ \mu\text{L}$  ( $10\ \mu\text{mol}/\text{L}$ );后引物  $0.25\ \mu\text{L}$  ( $10\ \mu\text{mol}/\text{L}$ );  $0.5\ \mu\text{L}$  模板 DNA;  $4\ \mu\text{L}\ \text{ddH}_2\text{O}$ 。扩增反应采用以下循环参数:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 2~5 min,  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $50\sim 68^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 30~35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1~2 min,  $72^{\circ}\text{C}$  终

延伸 5~10 min。扩增的 PCR 产物在 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶上检测。使用 AgNO<sub>3</sub> 染色 12 min 后用适量蒸馏水浸洗胶面 2 次，每次 20~30 s，将胶片浸于 NaOH 显影液中不断摇匀，直至显出条带，并拍照记录进行分析。

1.2.3 叶绿体基因组比较分析 为了解芋种内叶绿体基因组的遗传多样性，本研究利用 BWA<sup>[20]</sup>、SAMtools<sup>[21]</sup>、VarsScan 等软件挖掘红芽芋和荔浦芋 2 种类型芋叶绿体基因组中的单核苷酸多态性位点 (SNP)，并用 SNPeff 软件分析 SNP 对基因的影响，以解析红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组的遗传差异。天南星亚科植物是天南星科植物中数量最多且遗传多样性最高的一类植物，其中多数植物具有很高的经济价值、观赏价值和药用价值。目前，NCBI 数据库中现已收录 17 种天南星亚科植物，共 13 个属，本研究分别从以上 13 个属中随机挑选一种代表植物参与比较分析。基于本研究中注释的红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组信息和数据库中 13 个属叶绿体基因组信息，对该 15 个叶绿体基因组的基因含量和基因结构信息进行统计分析，并以红芽芋为参照，利用 DNASP6 软

件进行遗传多样性滑窗分析，鉴别 15 种天南星科植物叶绿体基因序列的遗传差异。

1.2.4 系统进化分析 为揭示芋属植物在天南星亚科植物中的进化地位，本研究利用 MAFFT 软件<sup>[22]</sup>对红芽芋、荔浦芋和 13 个天南星亚科代表植物的叶绿体基因组进行完全比对，以泽泻属泽泻 (NC\_044108.1) 和浮萍属浮萍 (NC\_010109.1) 叶绿体基因组作为外群 (outgroup)，基于极大似然法 (ML)，自举值 (bootstrap) 为 1000，利用 MEGA 软件构建进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 红芽芋及荔浦芋叶绿体基因组基本特征

红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组均为典型的环状双链四分体结构，全长分别为 162 478 bp 和 162 453 bp (图 1)，2 种芋叶绿体基因组全长仅相差 25 bp。红芽芋和荔浦芋均包括 1 个小的单拷贝片段 (SSC)，长度分别为 22 072 bp 和 22 187 bp，1 个大的单拷贝片段 (LSC, 89 808 bp 和 89 718 bp) 和 1 对反向重复序列 (IRa 和 IRb, 25 299 bp 和 25 274 bp) (图 1)。由此可见，其中 SSC 片段

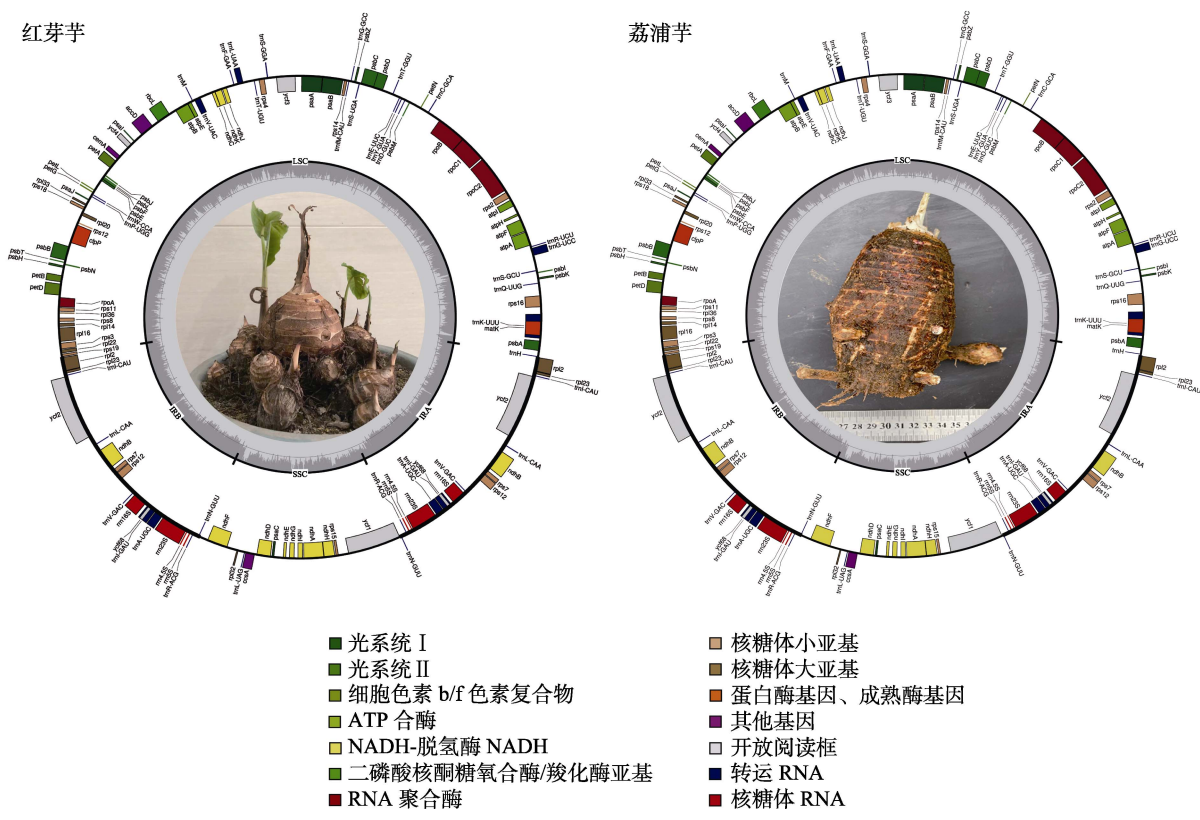


图 1 红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组图谱  
Fig. 1 Chloroplast genome map of Redbud and Lipu

长度在 2 种芋中差异最大, IR 片段的差异最小。

2 种芋叶绿体基因组均注释到 131 个基因(表 2), 包括 86 个蛋白编码基因, 37 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。其中 86 个蛋白编码基因可分为 3 个大类, 第一类包含 29 个与自我复制相关的基因, 包括编码 RNA 聚合酶的 3 个亚基(大亚基、

小亚基和 DNA 依赖性 RNA 聚合酶); 第二类包含 45 个与光合作用相关的基因(ATP 合酶亚基、光系统 I 的亚基、光系统 II 的亚基、NADH-脱氢酶的亚基、细胞色素 b/f 复合物的亚基、二磷酸核酮糖羧合酶/羧化酶亚基); 第三类包括 5 个其他编码蛋白质的基因和 6 个功能未知的基因。

表 2 芋叶绿体基因组注释基因列表  
Tab. 2 Genes found in taro chloroplast genome

功能 Function	家族名称 Family name	基因代码 Gene code	基因 Gene
自我复制	核糖体小亚基	<i>rps</i>	<i>rps2, rps3, rps4, rps7<sup>a</sup>, rps8, rps11, rps12<sup>a</sup>, rps14, rps15, rps16<sup>b</sup>, rps18, rps19</i>
	核糖体大亚基		
	DNA 依赖性 RNA 聚合酶	<i>rpl</i>	<i>rpl2<sup>ab</sup>, rpl14, rpl16<sup>b</sup>, rpl20, rpl22, rpl23<sup>a</sup>, rpl32, rpl33, rpl36</i>
		<i>rpo</i>	<i>rpoA, rpoB, rpoC1<sup>b</sup>, rpoC2</i>
	rRNA	<i>rrn</i>	<i>rrn4.5S<sup>a</sup>, rrn5S<sup>a</sup>, rrn16S<sup>a</sup>, rrn23S<sup>a</sup></i>
	tRNA	<i>trn</i>	<i>trnA-UGC<sup>ab</sup>, trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-M-CAU, trnF-GAA, trnG-UCC<sup>b</sup>, trnG-GCC, trnH, trnI-CAU<sup>a</sup>, trnI-GAU<sup>ab</sup>, trnK-UUU<sup>b</sup>, trnL-UAA<sup>b</sup>, trnL-CAA<sup>a</sup>, trnL-UAG, trnM, trnN-GUU<sup>a</sup>, trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-UCU, trnR-ACG<sup>a</sup>, trnS-GCU, trnS-UGA, trnS-GGA, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-UAC<sup>b</sup>, trnV-GAC<sup>a</sup>, trnW-CCA, trnY-GUA</i>
光合作用	ATP 合酶亚基	<i>atp</i>	<i>atpA, atpB, atpE, atpF<sup>b</sup>, atpH, atpI</i>
	光系统 I 的亚基	<i>psa</i>	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>
	光系统 II 的亚基	<i>psb</i>	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ, ycf3<sup>c</sup></i>
	NADH-脱氢酶的亚基	<i>ndh</i>	<i>ndhA<sup>b</sup>, ndhB<sup>ab</sup>, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
	细胞色素 b/f 复合物的亚基	<i>pet</i>	<i>petA, petB<sup>b</sup>, petD<sup>b</sup>, petG, petL, petN</i>
	二磷酸核酮糖羧合酶/羧化酶亚基	<i>rbc</i>	<i>rbcL</i>
	其他	乙酰-CoA-羧化酶的亚基	<i>acc</i>
	c 型细胞色素合成基因	<i>ccs</i>	<i>ccsA</i>
	包膜蛋白基因	<i>cem</i>	<i>cemA</i>
	蛋白酶基因	<i>clp</i>	<i>clpP<sup>c</sup></i>
	成熟酶基因	<i>mat</i>	<i>matK</i>
未知功能	保守开放阅读框	<i>yef</i>	<i>yef1, yef2<sup>a</sup>, yef4, yef68<sup>ab</sup></i>

注: <sup>a</sup>表示 IRs 中有 2 个基因拷贝; <sup>b</sup>表示包含 1 个内含子的基因; <sup>c</sup>表示包含 2 个内含子的基因。

Note: <sup>a</sup> means duplicated gene in IRs; <sup>b</sup> means gene containing one intron; <sup>c</sup> means gene containing two introns.

红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组中共有 23 个基因含有内含子, 其中只有 *yef3* 和 *clpP* 含有 2 个内含子(表 3)。对二者叶绿体基因组中所有翻译蛋白表达的密码子进行统计发现, 亮氨酸 Leu 是其中编码率最高的氨基酸, 分别有 5056 个

和 5050 个(表 4); 半胱氨酸 Cys 是编码率最低的氨基酸, 均只含 606 个; 二者叶绿体基因组中的密码子用法有所不同, 使用同种密码子数量差异范围为 0~12 个。红芽芋和荔浦芋的第三密码子 A/T 含量分别为 68.09%和 68.12%。

表 3 芋叶绿体基因组中含有内含子的基因  
Tab. 3 Genes with introns in taro chloroplast genome

基因 Gene	外显子 I Exon I/bp	内含子 I Intron I/bp	外显子 II Exon II/bp	内含子 II Intron II/bp	内含子 III Exon III/bp
<i>trnA-UGC</i>	38	799	35		
<i>trnA-UGC</i>	38	799	35		
<i>trnG-UCC</i>	24	725	48		
<i>trnK-UUU</i>	37	2541	42		
<i>trnL-UAA</i>	37	515	50		
<i>trnI-GAU</i>	42	942	35		
<i>trnI-GAU</i>	42	942	35		
<i>trnV-UAC</i>	38	590	37		
<i>rps16</i>	40	988	197		
<i>atpF</i>	145	813	401		
<i>rpoC1</i>	453	750	1620		
<i>ycf3</i>	124	738	230	794	153
<i>ycf68</i>	24	31	321		
<i>ycf68</i>	24	31	321		
<i>clpP</i>	71	801	294	640	244
<i>petB</i>	6	57	642		
<i>petD</i>	8	735	475		
<i>rpl2</i>	388	663	431		
<i>rpl2</i>	388	663	431		
<i>rpl16</i>	9	1082	399		
<i>ndhA</i>	553	1094	539		
<i>ndhB</i>	775	677	758		
<i>ndhB</i>	775	677	758		

表 4 红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组中的密码子使用情况  
Tab. 4 Codon usage in chloroplast genome of Redbud and Lipu

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	数量 Number		氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	数量 Number	
		红芽芋 Redbud	荔浦芋 Lipu			红芽芋 Redbud	荔浦芋 Lipu
丙氨酸 Ala (A)	GCA	745	743	脯氨酸 Pro (P)	CCA	604	608
	GCC	366	366		CCC	375	377
	GCG	267	269		CCG	251	249
	GCT	1141	1139		CCT	765	770
半胱氨酸 Cys (C)	TGC	178	176	谷氨酰胺 Gln (Q)	CAA	1309	1309
	TGT	428	430		CAG	485	484
天冬氨酸 Asp (D)	GAC	409	407	精氨酸 Arg (R)	AGA	960	964
	GAT	1632	1636		AGG	370	364
谷氨酸 Glu (E)	GAA	1946	1948		CGA	659	657
	GAG	706	704	CGC	182	182	
苯丙氨酸 Phe (F)	TTC	1058	1053	CGG	246	251	
	TTT	1853	1865	CGT	655	655	
	甘氨酸 Gly (G)	GGA	1241	1245	丝氨酸 Ser (S)	AGC	244
GGC		314	318	AGT		855	857
GGG		571	569	TCA		846	844
GGT		1037	1034	TCC		667	669

续表 4 红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组中的密码子使用情况  
Tab. 4 Codon usage in chloroplast genome of Redbud and Lipu (continued)

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	数量 Number		氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	数量 Number	
		红芽芋 Redbud	荔浦芋 Lipu			红芽芋 Redbud	荔浦芋 Lipu
组氨酸 His (H)	CAT	326	326	苏氨酸 Thr (T)	TCG	374	376
	CAC	928	928		TCT	1117	1109
异亮氨酸 Ile (I)	ATA	1302	1300	ACA	801	803	
	ATC	780	776	ACC	452	448	
	ATT	2005	2009	ACG	283	283	
赖氨酸 Lys (K)	AAA	1980	1984	ACT	977	979	
	AAG	717	715	缬氨酸 Val (V)	GTA	956	960
亮氨酸 Leu (L)	CTA	648	648	GTC	346	344	
	CTC	371	372	GTG	373	373	
	CTG	321	323	GTT	955	953	
	CTT	1070	1065	色氨酸 Trp (W)	TGG	881	881
	TTA	1507	1503	酪氨酸 Tyr (Y)	TAC	394	394
	TTG	1139	1139	TAT	1435	1433	
	终止子 Terminator	TAA	130	130			
甲硫氨酸 Met (M)	ATG	1099	1101	TAG	126	124	
天冬酰胺 Asn (N)	AAC	572	574	TGA	114	114	
	AAT	1805	1800				

2.2 SSR 鉴定及其分子标记开发

鉴定到红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组中 SSR 数量分别为 130 和 124 (表 5)。红芽芋 SSR 序列绝大部分是单核苷酸重复序列 (p1), 占 65.38%, 二核苷酸重复序列 (p2) 共 35 个 (26.92%), 三核苷酸重复序列 (p3) 共 8 个 (6.15%), 四核苷酸重复序列 (p4) 仅 2 个 (1.54%); 位于编码区仅 14.62%, 而大部分 (85.38%) 位于非编码区 (图 2)。荔浦芋 SSR 序列中 p1 占 62.9%, p2 共 35 个 (28.23%), p3 共 10 个 (8.06%), p4 仅 1 个 (0.81%), 其中 19.35% 位于编码区, 80.65% 位于非编码区 (图 2)。红芽芋叶绿体基因组中 63.08% 的 SSR 由 A/T 碱基组成, 而荔浦芋重复碱基中 A/T 碱基占

61.29% (表 6)。

根据红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组中 SSR 序列差异信息, 鉴别到 38 个 SSR 序列在 2 个材料的基因组序列之间具有多态性, 在多态性 SSR 序列两端共设计出 191 对 SSR 引物, 其中 31 对符合多态性引物的筛选条件, 以 32 种芋试验材料的 DNA 样品为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物的电泳分析结果表明, 其中 12 对引物能扩增出稳定、清晰的条带, 并具有多态性 (表 7), 每个引物在一份材料中产生 0~10 个条带 (图 3), 12 对引物在 32 份材料中共扩增出 1226 个清晰条带,

表 5 红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组 SSR 序列类型

Tab. 5 SSR type in chloroplast genome of Redbud and Lipu

SSR 类型 SSR type	红芽芋 Redbud		荔浦芋 Lipu	
	数量 Number	比例 Ratio/%	数量 Number	比例 Ratio/%
	p1	85	65.38	78
p2	35	26.92	35	28.23
p3	8	6.15	10	8.06
p4	2	1.54	1	0.81
总计	130	100.00	124	100.00

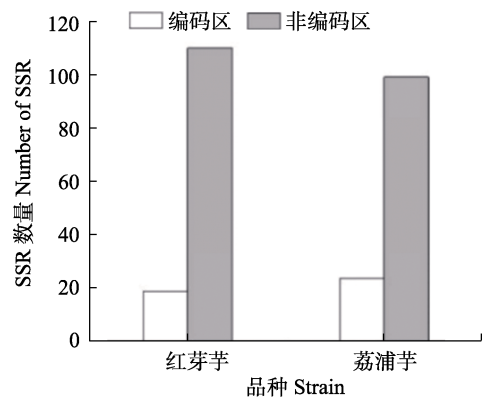


图 2 红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组 SSR 分布情况  
Fig. 2 The distribution of SSR in the chloroplast genome of Redbud and Lipu

表 6 红芽芋和荔浦芋 SSR 中的重复碱基类型  
Tab. 6 Base pairs repeats in SSR of Redbud and Lipu

重复碱基 Base repeats	红芽芋 Redbud		荔浦芋 Lipu	
	数量 Number	比例 Ratio/%	数量 Number	比例 Ratio/%
A/T	82	63.08	76	61.29
C/G	3	2.31	2	1.61
TC/AG	1	0.77	1	0.81
AT/TA	34	26.15	34	27.41
AAT/TTA	5	3.85	6	4.83
TAA/ATT	1	0.77	1	0.81
ATA/TAT	1	0.77	1	0.81
TTC/AAG	1	0.77	1	0.81
CAG/GTC	0	0	1	0.81
TATG/ATAC	1	0.77	1	0.81
TATT/ATAA	1	0.77	0	0
总计	130	100.00	124	100.00

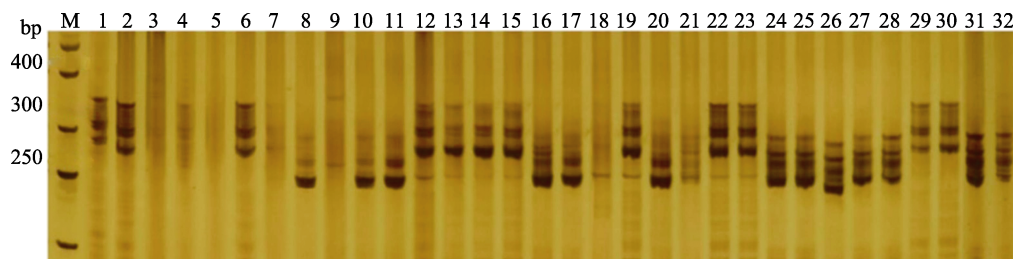
其中 827 条为多态性条带,多态性比率为 67.45%。

本研究所搜集的 32 份试验材料在芋种群中具有一定代表性,利用其叶绿体基因组 SSR 开发标记有助于深入研究我国芋种质资源,因此,本研究基于上述 12 对引物对试验材料的遗传分型条带对 32 份芋核心种质资源进行了遗传多样性分析(图 4),结果表明遗传距离最远的是青岛芋头和于都大野芋,最近的是白肉毛头芋和赣州多子芋,品种间相似性系数在 0~0.971 之间,平均值为 0.515。在相似性系数为 0.480 处可以将供试材料分成 3 组。

第 I 组包括 18 个品种,92.3%为多子芋品种,其中赣州 1 号红芽芋(1)、紫柄芋(10)、紫芽芋(12)、狗爪芋(13)、白肉毛芋(14)、扁母芋(19)等为多子芋类型的典型品种,子芋多、芽色艳丽、芋肉粉质,除粉红佳人(7)、粉红芋 2 号(8)和于都大野芋(9)外,其他 10 个来源于江西的品种均聚集在该组。

表 7 12 对芋叶绿体 SSR 的引物信息  
Tab. 7 Information of 12 chloroplast SSR primers of taro

序号 No.	SSR	引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
1	(TA) <sup>5</sup> -(A) <sup>11</sup>	T14-Ce-1	F: TTCAAGACTCCCAAGCAC R: ATCCGACTAGTCCGGGTTTC
2	(TA) <sup>9</sup>	T14-Ce-5	F: GAATTTACAGTCCGTCCCA R: CCCTATCGTCTAGCGGTTCA
3	(A) <sup>11</sup> -(AAT) <sup>4</sup> -(AAT) <sup>4</sup>	T14-Ce-6	F: GACCTTCCCACTTTACAG R: TCCTTTTCTGTAGACCAATCA
4	(AT) <sup>5</sup> -(TA) <sup>6</sup>	T14-Ce-7	F: CGCATAAACAAAGCAAAGAAAA R: CAGAACAAATCATAAACGTAGCC
5	(AT) <sup>7</sup> -(AT) <sup>8</sup>	T14-Ce-10	F: TCGAGATATTTTATTGGGCGA R: CAATTCATTGCGCAACTTGT
6	(TA) <sup>5</sup> -(TA) <sup>5</sup> -(TA) <sup>6</sup> -(TA) <sup>6</sup> -(AT) <sup>6</sup>	T14-Ce-13	F: ATCCGGAGCATACTTCCTT R: TGGCTTCTATTGAATCGAGAAA
7	(TA) <sup>6</sup> -(TA) <sup>6</sup> -(TA) <sup>6</sup> -(TA) <sup>5</sup> -(AT) <sup>5</sup>	T14-Ce-15	F: TGGCTTCTATTGAATCGAGAAA R: ATCCGGAGCATACTTCCTT
8	(AT) <sup>5</sup> -(A) <sup>12</sup>	T22-Ce-1	F: TTGATTGGATGGATATGGGTC R: ACCTATTTCCGCATATCCCC
9	(A) <sup>11</sup> -(A) <sup>11</sup>	T22-Ce-3	F: TCGAGATATTTTATTGGGCGA R: CAATTCATTGCGCAACTTGT
10	(AT) <sup>5</sup> -(TA) <sup>14</sup>	T22-Ce-7	F: CCTAATAAACACATGAGAAAAAGGC R: GGTGCAATTACTATGGCTCG
11	(C) <sup>10</sup> -(T) <sup>10</sup>	T22-Ce-10	F: TGGTTTGGGTCCTTAGCAGG R: TATTAGACCCACCCATCCCA
12	(TA) <sup>6</sup> -(TA) <sup>5</sup> -(AT) <sup>5</sup>	T22-Ce-16	F: TGGCTTCTATTGAATCGAGAAA R: ATCCGGAGCATACTTCCTT



M: DL 500 bp DNA marker.

图 3 引物 T14-Ce-5 对 32 个芋头样本的扩增结果

Fig. 3 Amplification of 32 taro samples by primer T14-Ce-5

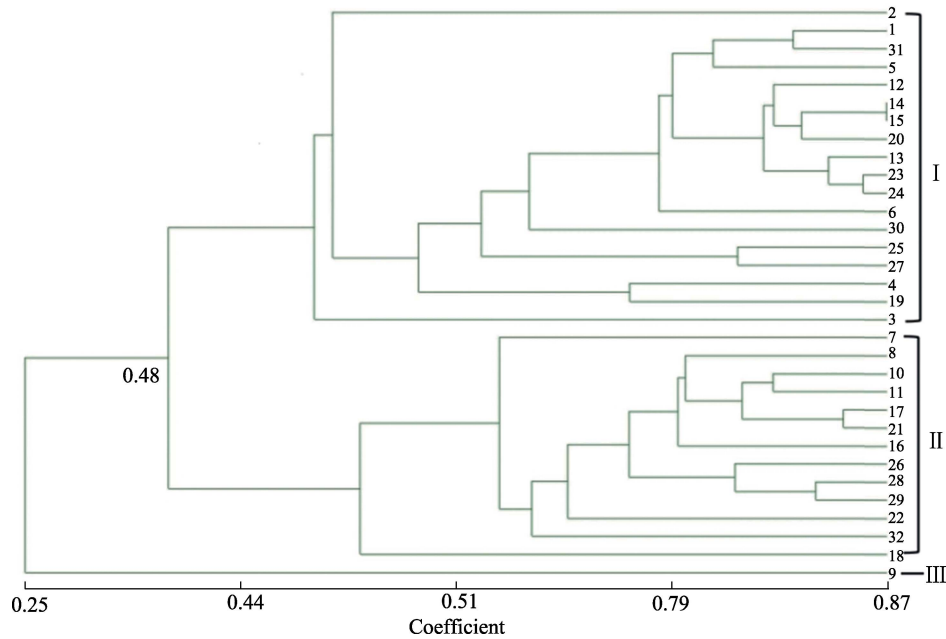


图 4 芋试验材料 UPGMA 法聚类分析树状图

Fig. 4 Dendrogram of taro based on UPGMA cluster analysis

第 II 组包括 13 个品种,集中了炮弹芋(17)、泉州魁芋(21)、大香芋(28)和荔浦芋(32)四种魁芋,其中炮弹芋和泉州魁芋相似性最高,相似系数为 0.936,来自广西的钦州芋(11)、红嘴芋(16)和荔浦芋(32)3 个品种均聚集在第 II 组。

第 III 组只含于都大野芋(9)一个品种,大野芋 [*Colocasia gigantea* (Blume) Hook. f.] 属天南星科、芋属、大野芋种,根茎倒圆锥形,直立,叶丛生,叶片卵状心形,与本研究其他 31 份芋材料有较大差异,此外,12 对 SSR 引物在于都大野芋(9)上扩增出的多态性条带位点也与其他试验材料的较为不同。

### 2.3 红芽芋与荔浦芋叶绿体基因组中单核苷酸多态性分析

为了比较红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组的差异,进一步了解红芽芋和荔浦芋的遗传多样性,本研究对二者的叶绿体基因组进行了单核苷酸多态性分析(SNP)。共鉴别到 236 个 SNP 位点(图 5),其中 173 个位点发生在基因间区(intergenic region),63 个位点发生在基因编码区,致使 36 个基因发生同义突变(synonymous variant),25 个基因发生错位突变(missense variant)(表 8),其中, *ycf2* 是发生错义突变频率最高的基因。此外, *rpl16* 发生终止密码子提前(stop gained), *atpF* 发生剪接区突变(splice region variant)。

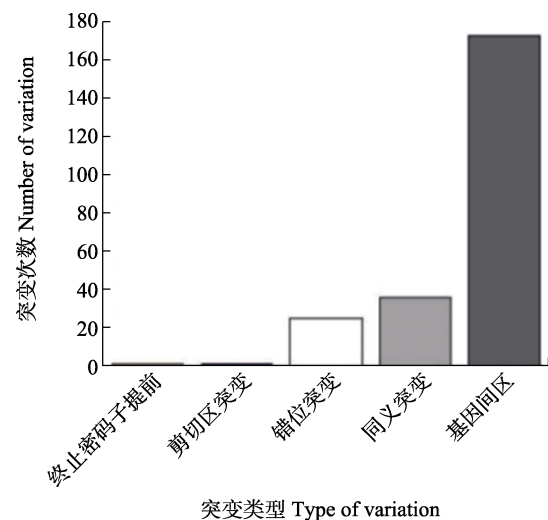


图 5 红芽芋与荔浦芋间叶绿体基因组 SNP 突变对编码基因的影响

Fig. 5 Effect of SNP mutation of Redbud and Lipu chloroplast genome on coding gene

### 2.4 芋与天南星亚科植物叶绿体基因组的分析比较

比较红芽芋、荔浦芋及其他 13 种天南星科植物叶绿体基因组发现,其叶绿体基因的结构大小及基因种类差异不大(表 9)。犁头尖的叶绿体基因组最大,为 169 977 bp,普陀南星叶绿体基因组最小,为 160 792 bp。红芽芋 GC 含量最高,为 38.15%,独角莲 GC 含量最低,为 35.59%。一共注释到 128~132 个基因,其中最多的为独角莲

表 8 红芽芋与荔浦芋间叶绿体基因组错义 SNP 突变对编码基因的影响  
Tab. 8 Effect of SNP missense mutation of Redbud and Lipu chloroplast genome on coding gene

基因 Gene	错义突变数 Missense variant	突变密码子 Variant code	基因 Gene	错义突变数 Missense variant	突变密码子 Variant code
<i>matK</i>	1	A→G			T→C
<i>rpoC<sub>2</sub></i>	2	G→A			A→G
		T→G			T→C
<i>rpoC<sub>1</sub></i>	1	T→C	<i>ndhF</i>	2	C→T
<i>rbcL</i>	3	A→T			C→A
		C→G	<i>ndhD</i>	1	T→A
		G→C	<i>ndhA</i>	1	T→C
<i>accD</i>	1	C→A	<i>ycf1</i>	3	G→C
<i>rp120</i>	1	G→A			A→G
<i>rps8</i>	1	C→T			C→T
<i>rp12</i>	2	T→G	<i>psaB</i>	1	T→C
		A→C	<i>rp116</i>	1	A→C
<i>ycf2</i>	4	A→G			

表 9 15 种天南星亚科植物叶绿体基因组基本特征比较  
Tab. 9 Comparison of general features of chloroplast genome in fifteen Aroideae species

天南星亚科植物 Aroideae specie	拉丁名 Latin name	编号 Code	全长 Total length/bp	GC 含量 GC content/%	编码蛋白质基因 Protein-coding gene number	基因总数 Total gene	rRNA	tRNA
红芽芋	<i>Colocasia esculenta</i>	MT447084	162 478	38.15	86	131	8	37
荔浦芋	<i>Colocasia esculenta</i>	MT447085	162 453	37.99	86	131	8	37
新西兰芋	<i>Colocasia esculenta</i>	NC016753.1	162 424	36.16	86	131	8	37
花魔芋	<i>Amorphophallus konjac</i>	MK611803.1	161 647	36.40	86	131	8	37
普陀南星	<i>Arisaema ringens</i>	NC044118.1	160 792	36.53	85	131	8	37
短序弯棒芋	<i>Arisarum simorrhinum</i>	NC056328.1	164 961	36.51	85	131	8	37
灰岩芋	<i>Carlephyton glaucophyllum</i>	NC051871.1	168 218	35.86	85	130	8	36
掌叶半夏	<i>Pinellia pedatisecta</i>	NC058756.1	164 682	35.71	83	128	8	36
大藻	<i>Pistia stratiotes</i>	NC048522.1	164 551	36.00	84	129	8	37
独角莲	<i>Sauromatum giganteum</i>	MN626718.1	165 289	35.59	86	132	8	38
皂七	<i>Stuednera colocasiifolia</i>	MT161479.1	162 500	36.14	84	130	8	37
犁头尖	<i>Typhonium blumei</i>	MT161480.1	169 977	35.63	85	131	8	37
黄肉芋	<i>Xanthosoma helleborifolium</i>	MT161482.1	164 418	35.84	84	131	8	37
雪铁芋	<i>Zamioculcas zamiifolia</i>	MT226775.1	167 405	35.70	84	131	8	37
亚马逊蓴芋	<i>Zomicarpella amazonica</i>	NC051874.1	162 729	35.82	84	131	8	37

(132 个)，最少的为掌叶半夏 (128 个)。编码蛋白基因数在 83~86 之间，掌叶半夏只注释到 83 个编码基因。13 种天南星亚科植物 rRNA 数均为 8 个。tRNA 个数在 36~38 之间，大多数植物有 37 个 tRNA，最多的为独角莲 (38 个)。

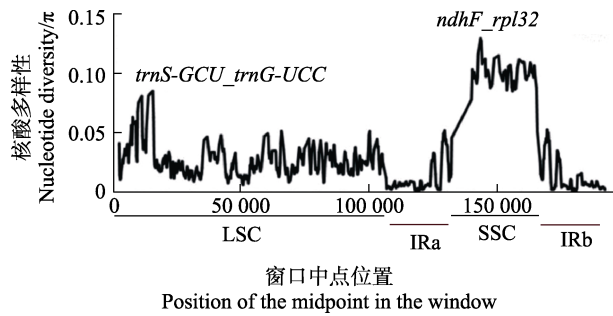
### 2.5 遗传多样性滑窗分析

为了明确红芽芋、荔浦芋及其他 13 种天南星科植物序列的差异程度，本研究利用 DnaSP 6.0 软件计算了表 9 中 15 个植物叶绿体基因组的核苷

酸序列遗传多样性  $P_i$  值。结果表明在 SSC 区基因变异程度最大，LSC 区次之，IRa 和 IRb 区的基因变异程度最低 (图 6)，并发现 trnS-trnG 和 *ndhF*-*rp132* ( $\pi > 0.5$ ) 分别为 SSC 区和 LSC 区中最高的变异位点，这 2 个区域均位于基因间区。

### 2.6 系统进化分析

叶绿体基因组是研究物种起源、进化演变及不同物种之间的亲缘关系等方面的重要分子依据之一。本研究利用 MAFFT 软件比对分析表 9 中



窗口中点位置  
Position of the midpoint in the window  
窗长: 600 bp; 步距: 200 bp。  
Window length: 600 bp; Step size: 200 bp。  
图 6 15 种天南星亚科全叶绿体基因组的  
核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 滑动窗图

Fig. 6 Position of the midpoint in window sliding window plots of nucleotide diversity ( $\pi$ ) across complete chloroplast genome of fifteen Aroideae species

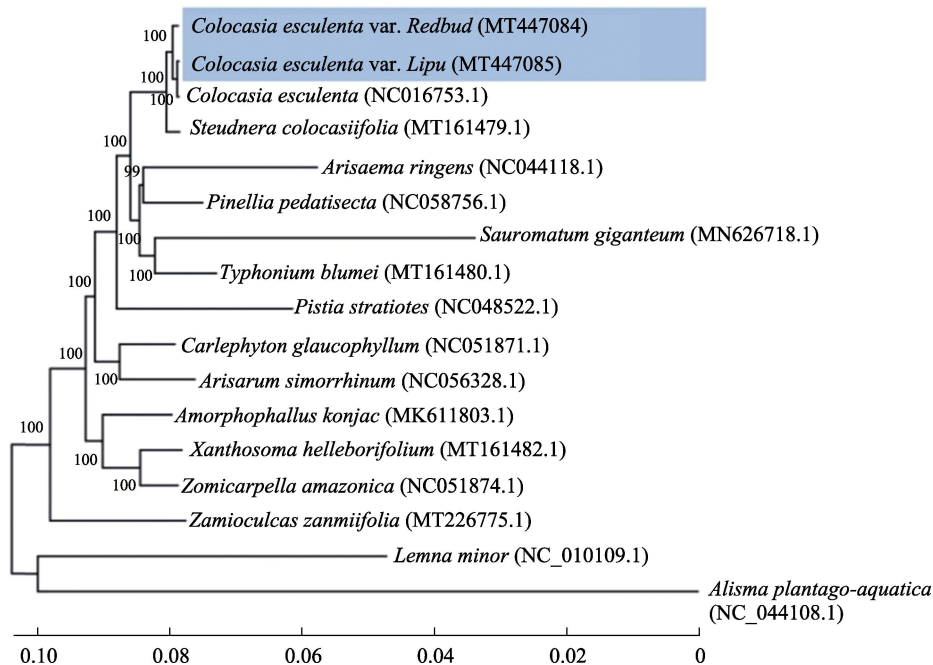


图 7 系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree for fourteen Aroideae species

### 3 讨论

高等植物叶绿体基因组通常为典型的四分结构, 序列长度在 120~160 kb 范围内<sup>[23]</sup>。红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组结构与之相似, 全长分别为 162 478 bp 和 162 453 bp, 呈典型的环状双链四分体结构, 均由 1 个 SSC 区, 1 个 LSC 区和 1 对反向重复序列 (IRa 和 IRb) 组成。在二者叶绿体基因组所有翻译蛋白表达的密码子中, 亮氨酸 Leu 是编码率最高的氨基酸, 表明芋可能富含亮氨酸重复序列结构的蛋白质, 从而提高芋的天然免疫

防御能力<sup>[24-25]</sup>。二者叶绿体基因组蛋白编码基因第三密码子均具有明显的 A/T 偏好性, 进一步证明了 A/T 密码子偏好性普遍存在于高等植物的叶绿体基因组中<sup>[26]</sup>。

SSR 是以 PCR 技术为核心的 DNA 分子标记技术, SSR 标记能在遗传水平上直接识别特定的基因型, 在芋种质资源鉴定与分类、遗传多样性分析和新品种开发中具有重要作用。近年来, 随着芋的食药同源价值被大众认可和芋产业的发展, 芋特异性 SSR 分子标记开发逐渐受到重视。

YOU 等<sup>[27]</sup>根据芋头转录组序列, 开发了 2858 对 SSR 引物, 随机合成 100 对, 其中 72 对可以扩增出条带, 62 对在芋头的品种中存在多态性; CHAR 等<sup>[28]</sup>使用 11 对 SSR 标记成功地来自 19 个国家的芋头品种进行分类。本研究利用 MISA 和 Primer3 软件对红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组进行 SSR 鉴定及引物开发, 鉴定到红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组分别有 130 和 124 个 SSR, 以多聚 A 和多聚 T 单核苷酸重复序列为主, 分别为 65.38% 和 62.9%, 二者的 SSR 序列主要分布在非编码区。通过对红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组 SSR 位点的比较分析, 开发出 15 对能扩增出条带清晰、多态性丰富的 SSR 引物, 将为深入研究芋种质资源鉴别、遗传多样性分析及分子标记辅助选择育种等提供理论依据。

叶绿体基因组是植物细胞中重要的遗传物质之一, 红芽芋、荔浦芋的表型性状, 生长习性等方面有较大差别。为了明确 2 种芋叶绿体基因组之间遗传差异, 通过对红芽芋、荔浦芋叶绿体基因组的比较分析, 发现尽管二者基因组结构相近, 总基因数、编码蛋白基因数、rRNA 数和 tRNA 数均一致, 但它们在系统发育进化树上遗传距离约为 0.001 486, 表明存在遗传差异。对红芽芋和荔浦芋叶绿体基因组中 SNP 位点进行分析, 共鉴别到 SNP 位点 236 个, 63 个位点发生在基因编码区, 致使 *accD*、*matK*、*ndhA*、*ndhD*、*ndhF*、*rbcL*、*rpoC*<sub>1</sub>、*rpoC*<sub>2</sub> 等 25 个基因发生错义突变。*accD* 基因编码乙酰辅酶 A 羧化酶的  $\beta$ -羧基转移酶亚基<sup>[29]</sup>, 是参与脂肪酸合成的重要调节酶之一, 研究发现 *accD* 也是调节叶片生长发育的重要基因<sup>[30-31]</sup>, 荔浦芋的叶片一般比红芽芋的叶片大, *accD* 的变异可能促进了它们之间的叶片产生形态差异。*matK* 基因编码内含子成熟酶 K, 主要参与 RNA 转录内含子的剪接<sup>[32]</sup>。*rpoC*<sub>1</sub> 和 *rpoC*<sub>2</sub> 基因编码  $\beta$ -RNA 聚合酶, 在植物授粉和性别分化的调控中发挥重要作用<sup>[33]</sup>。*ndhA*、*ndhD*、*ndhF* 和 *rbcL* 是光系统中重要的调控基因, 对 2 种芋的光合作用具有重要作用。这些叶绿体功能基因对芋适应生态环境与生长发育过程发挥重要作用, 它们的变异可能促使 2 种芋的农艺性状与生长习性存在较大差异。

通过 2 种芋与 13 个天南星亚科代表属植物叶绿体基因组的比较分析, 发现 *trnS-trnG* 和 *ndhF-rpl32* 分别是 SSC 区和 LSC 区的最高变异位

点, 这 2 个区域已经作为 DNA 条形码 (DNA barcode) 被广泛地用于禾本科<sup>[34]</sup>、葫芦科<sup>[35]</sup>、豆科<sup>[36]</sup>植物系统进化研究中, 表明这 2 个高变异区域可开发为 DNA barcode 用于芋植物及其近缘物种的种质资源鉴定评价、遗传多样性分析及群体进化关系等研究。在本研究的系统进化分析中, 与其他天南星亚科代表属相比, 芋属与皂七属 (*Stuednera*) 亲缘关系最近, 该结果与 CABRERA 等<sup>[37]</sup>、CUSIMANO 等<sup>[38]</sup>、NAUHEIMER 等<sup>[39]</sup>对天南星科植物系统进化关系的研究结果相似, 表明本研究准确分析了芋属的系统分类位置。芋属中红芽芋、荔浦芋与新西兰芋 (NC016753.1) 聚在同一分支上, 但 3 种芋之间存在一定的遗传距离, 表明我国红芽芋、荔浦芋与新西兰芋存在遗传差异, 体现出我国特色芋种质资源在芋属中的独特性与重要性, 为深入研究我国芋特色种质资源群体遗传提供了参考。

## 参考文献

- [1] 姜绍通, 程元珍, 郑志, 潘丽军. 红芽芋营养成分分析及评价[J]. 食品科学, 2012, 33(11): 269-272.  
JIANG S T, CHENG Y Z, ZHENG Z, PAN L J. Analysis and evaluation of nutritional components of red bud taro (*Colocasia esulenta* L. Schott)[J]. Food Science, 2012, 33(11): 269-272. (in Chinese)
- [2] 段文倩, 孙河龙, 金书情, 耿雯雯, 路海涛, 楚子琰, 郭宵飞. 中医绿色药膳房——芋头的药食功效研究[J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2018, 6(21): 26.  
DUAN W Q, SUN H L, JIN S Q, GENG W W, LU H T, CHU Z Y, GUO X F. Study on the medicinal and dietary efficacy of taro, a green medicinal diet room of traditional Chinese medicine[J]. Electronic Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Cardiovascular Disease, 2018, 6(21): 26. (in Chinese)
- [3] 余志平, 林海红, 余俊红, 曾广恒, 洪岳善, 黄新芳. 铅山红芽芋产业发展概况[J]. 长江蔬菜, 2016(20): 34-36.  
YU Z P, LIN H H, YU J H, ZENG G H, HONG Y S, HUANG X F. Development of red bud taro industry in Qianshan[J]. Changjiang Vegetable, 2016(20): 34-36. (in Chinese)
- [4] 柯维忠, 徐文慧, 谢妮妮, 吴夏俊鹏, 占学林. 红芽芋低温疗法脱毒苗遗传变异的 AFLP 检测[J]. 分子植物育种, 2018, 16(14): 4685-4695.  
KE W Z, XU W H, XIE N N, WU-XIA J P, ZHAN X L. AFLP detection of genetic variation of virus-free seedlings of red bud taro treated with hypothermia[J]. Molecular Plant

- Breeding, 2018, 16(14): 4685-4695. (in Chinese)
- [5] 章恒毅. 荔浦芋的引种及其丰产栽培[J]. 中国蔬菜, 2010(15): 45-46.  
ZHANG H Y. Introduction and high yield cultivation of Lipu Taro[J]. Chinese Vegetable, 2010(15): 45-46. (in Chinese)
- [6] 张德纯. 中国地理标志产品荔浦芋[J]. 中国蔬菜, 2019(6): 97.  
ZHANG D C. Chinese geographical indication product Lipu Taro[J]. Chinese Vegetable, 2019(6): 97. (in Chinese)
- [7] 肖月土. 红芽芋无公害高产栽培技术[J]. 作物杂志, 2006(2): 55-56.  
XIAO Y T. Pollution free and high yield cultivation techniques of red bud taro[J]. Journal of Crops, 2006(2): 55-56. (in Chinese)
- [8] 郑建平. 红芽芋的高产栽培技术[J]. 现代园艺, 2010(7): 29-30.  
ZHENG J P. High yield cultivation techniques of red bud taro[J]. Modern Horticulture, 2010(7): 29-30. (in Chinese)
- [9] 彭碧云, 张瑀琳. 荔浦县芋头种植的气候条件分析[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(12): 178-201.  
PENG B Y, ZHANG Y L. Analysis on climatic conditions of taro planting in Lipu county[J]. Anhui Agronomy Bulletin, 2012, 18(12): 178-201. (in Chinese)
- [10] 杨声激, 宾丽慧, 廖莉莉, 古彪. 桂东南地区荔浦芋高产栽培技术[J]. 长江蔬菜, 2021(20): 29-30.  
YANG S G, BIN L H, LIAO L L, GU B. High yield cultivation techniques of Lipu Taro in Southeast Guangxi[J]. Changjiang Vegetable, 2021(20): 29-30. (in Chinese)
- [11] KAUNDUN S S, MATSUMOTO S. Molecular evidence for maternal inheritance of the chloroplast genome in tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(14): 2660-2663.
- [12] 张俊焱, 曾阳, 李锦萍, 王虹雨, 张瑞峰, 刘力宽. 2种药用獐牙菜叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(1): 96-102.  
ZHANG J Y, ZENG Y, LI J P, WANG H Y, ZHANG R F, LIU L K. Analysis of codon usage bias in chloroplast genome of two *Medicinal swertia* L.[J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine Information, 2022, 29(1): 96-102. (in Chinese)
- [13] 李金璐, 王硕, 于婧, 王玲, 周世良. 一种改良的植物DNA提取方法[J]. 植物学报, 2013, 48(1): 72-78.  
LI J L, WANG S, YU J, WANG L, ZHOU S L. An improved plant DNA extraction method[J]. Acta Botany Sinica, 2013, 48(1): 72-78. (in Chinese)
- [14] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, GUREVICH A A, DVORKIN M, KULIKOV A S, LESIN V M, NIKOLENKO S I, PHAM S, PRJIBELSKI A D, PYSHKIN A V, SIROTKIN A V, VYAHHI N, YESLER G, ALEKSEYEV M A, PENZNER P A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. Journal of Computational Biology, 2012, 19(5): 455-477.
- [15] TALAMANTES-BECERRA B, CARLING J, GEORGES A. OmicR: a tool to facilitate BLASTn alignments for sequence data[J]. SoftwareX, 2021, 14: 100702.
- [16] SHI L C, CHEN H M, JIANG M, WANG L Q, WU X, HUANG L F, LIU C. CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(W1): W65-W73.
- [17] TILLICH M, LEHWARK P, PELLIZZER T, UIBRICH-JONES E S, FISCHER A, BOCK R, GREINER S. GeSeq-versatile and accurate annotation of organelle genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W6-W11.
- [18] LOHSE M, DRECHSEL O, BOCK R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW): a tool for the easy generation of high-quality custom graphical maps of plastid and mitochondrial genomes[J]. Current Genetics, 2007, 52(5/6): 267-274.
- [19] SAHU J, SARMAH R, DEHURY B. Mining for SSRs and FDMs from expressed sequence tags of *Camellia sinensis*[J]. Bioinformatics, 2012, 8(6): 260-266.
- [20] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [21] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, SIVACHENKO A, CIBULSKIS K, KERNYTSKY A, GARIMELLA K, ALTSHULER D, GABRIEL S, DALY M, DEPRISTO M A. The genome analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. Genome Research, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [22] KATO H, ROZEWICKI J, YAMADA K D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization[J]. Briefings in Bioinformatics, 2019, 20(4): 1160-1166.
- [23] WICKE S, SCHNEEWEISS G M, DEPAMPHILIS C W, MULLER K F, QUAND D. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 76(3/5): 273-297.
- [24] 张肖晗, 赵芊, 谢晨星, 靳晓扬, 宋水山. 参与植物天然免疫的LRR型蛋白[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(9): 2513-2518.  
ZHANG X H, ZHAO Q, XIE C X, JIN X Y, SONG S S. Involvement of LRR proteins in plant innate immunity[J]. Genomics and Applied Biology, 2016, 35(9): 2513-2518. (in Chinese)

- [25] 杨银, 高志勇. 植物抗病机制的研究进展[J]. 科教导刊, 2016(26): 138-139, 186.  
YANG Y, GAO Z Y. Research progress on the mechanism of plant disease resistance[J]. The Guide of Science & Education, 2016(26): 138-139, 186. (in Chinese)
- [26] KAWABE A, MIYASHITA N T. Patterns of codon usage bias in three dicot and four monocot plant species[J]. Genes & Genetic Systems, 2003, 78(5): 343-352.
- [27] YOU Y N, LIU D C, LIU H B, ZHENG X F, DIAO Y, HUANG X F, HU Z L. Development and characterisation of EST-SSR markers by transcriptome sequencing in taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott][J]. Molecular Breeding, 2015, 35(6): 134-145.
- [28] CHAR H, TRAORE R E, DUVAL M F, RIVALLAN R, MUKHERJEE A, ABOAGYE L M, VAN RENSBURG W J, ANDRIANAVALONA V, PINHEIRO DE CARVALHO M A A, SABORIO F, SRI PRANA M, KOMOLONG B, LAWAC F, LEBOT V. Genetic diversification and dispersal of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott][J]. PLoS One, 2016, 11(6): 1-19.
- [29] ROUSSEAU-GUEUTIN M, HUANG X, HIGGINSON E, AYLIFFE M, DAY A, TIMMIS J N. Potential functional replacement of the plastidic acetyl-CoA carboxylase subunit (*accD*) gene by recent transfers to the nucleus in some angiosperm lineages[J]. Plant Physiology, 2013, 161(4): 1918-1929.
- [30] KODE V, MUDD E A, IAMTHAM S, DAY A. The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development[J]. Plant Journal, 2005, 44(2): 237-244.
- [31] MADOKA Y, TOMIZAWA K, MIZOI J, NISHIDA I, NAGANO Y, SASAKI Y. Chloroplast transformation with modified *accD* operon increases acetyl-CoA carboxylase and causes extension of leaf longevity and increase in seed yield in tobacco[J]. Plant & Cell Physiology, 2002, 43(12): 1518-1525.
- [32] HERTEL S, ZOSCHKE R, NEUMANN L, QUY, AXMANN I M, SCHMIT-LINNEWEBER C. Multiple checkpoints for the expression of the chloroplast-encoded splicing factor MatK[J]. Plant Physiology, 2013, 163(4): 1686-1698.
- [33] SHI H, YANG M, MO C, XIE W, LIU C, WU B, MA X. Complete chloroplast genomes of two *Siraitia* Merrill species: comparative analysis, positive selection and novel molecular marker development[J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0226865.
- [34] SILVA C, SNAK C, SCHNADEIBACH A S, VAN DEN BERG C, OLIVEIRA R P. Phylogenetic relationships of *Echinolaena* and *Ichnanthus* within Panicoideae (Poaceae) reveal two new genera of tropical grasses[J]. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2015, 12(93): 212-233.
- [35] SEBASTIAN P, SCHAEFER H, TELFORD I R H, RENNER S S. Cucumber (*Cucumis sativus*) and melon (*C. melo*) have numerous wild relatives in Asia and Australia, and the sister species of melon is from Australia[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010, 107(32): 14269-14273.
- [36] ZHANG M L, WEN Z B, FRITSCH P W, SANDERSON S C. Spatiotemporal evolution of *Calophaca* (Fabaceae) reveals multiple dispersals in central Asian mountains[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0123228.
- [37] CABRERA L I, SALAZAR G A, CHASE M W, MAYO S J, BOGNER J, DVILA P. Phylogenetic relationships of aroids and duckweeds (Araceae) inferred from coding and noncoding plastid DNA[J]. American Journal of Botany, 2008, 95(9): 1153-1165.
- [38] CUSIMANO N, BOGNER J, MAYO S J, BOYCE P C, WONG S Y, HESSE M, HETTERSCHIED W A, KEATING R C, FRENCH J C. Relationships within the Araceae: comparison of morphological patterns with molecular phylogenies[J]. American Journal of Botany, 2011, 98(4): 654-668.
- [39] NAUHEIMER L, METZLER D, RENNER S S. Global history of the ancient monocot family Araceae inferred with models accounting for past continental positions and previous ranges based on fossils[J]. The New Phytologist, 2012, 195(4): 938-950.