网络出版时间:2025-09-10 DOI:10.13207/j.jnwafu.2026.03.005

马家柚线粒体基因组序列特征、密码子偏好性及系统发育分析

尹明华,柯子妍,余璐,邱梦婷,周佳慧,徐文萱
(上饶师范学院 生命科学学院,江西 上饶 334001)

[摘 要] 【目的】探明马家柚[*Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou']线粒体基因组结构特征及系统发育关系。【方法】利用高通量测序技术对马家柚线粒体基因组进行测序,并利用生物信息学相关软件对该线粒体基因组进行组装、注释、图谱绘制以及序列特征分析,并基于线粒体基因组构建柑橘属 5 个物种的系统发育树。【结果】马家柚线粒体基因组大小为 516 383 bp,呈完整单环状结构,GC 含量为 45.15%;注释到 65 个基因,其中包括 35 个编码蛋白基因、27 个 tRNA 基因和 3 个 rRNA 基因。马家柚线粒体基因组共鉴定出 64 个 SSR(A/T 单核苷酸重复占主导地位)和 100 个 Longrepeat 序列(51 个正向重复和 49 个回文重复)。马家柚线粒体基因组的密码子偏性较弱,偏好以 A、U 结尾。马家柚线粒体基因组密码子使用偏好性受内部突变和自然选择的双重影响,其中自然选择对密码子使用偏好性的影响更大。马家柚线粒体基因组的最优密码子为 22 个(AAU、GAU、UGU、CAA、AAA、UUU、UAU、AUU、AUG、UAA、GGA、GGU、CCA、CCU、ACU、GUA、GUU、CGA、CGU、UUA、UCA 和 UCU),多以 A、U 结尾。马家柚线粒体基因组与甜橙线粒体基因组的共线性较高,两者的亲缘关系较近。马家柚有 21 个叶绿体基因片段转移到线粒体基因组,转移片段的总长度为 12 195 bp。【结论】探明了马家柚线粒体基因组序列特征和密码子偏好性;马家柚与甜橙的遗传关系最近。

[关键词] 马家柚;柑橘属植物;线粒体基因组;密码子偏好性;系统发育分析
[中图分类号] S666.3 [文献标志码] A [文章编号] 1671-9387(2026)03-0046-10

Sequence characteristics, codon usage bias, and phylogenetic analysis of mitochondrial genome of *Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou'

YIN Minghua, KE Ziyan, YU Lu, QIU Mengting, ZHOU Jiahui, XU Wenxuan
(*College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao, Jiangxi* 334001, *China*)

Abstract:【Objective】 The study aims to investigate the structural characteristics and phylogenetic relationships of the mitochondrial genome in *Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou'.【Method】 The mitochondrial genome of *C. maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou' was sequenced using high-throughput sequencing. Bioinformatics software was employed to assemble, annotate, map, and analyze sequence characteristics of the mitochondrial genome. A phylogenetic tree of five *Citrus* species was constructed based on this mitochondrial genome sequence.【Result】 The mitochondrial genome size of *C. maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou' was 516 383 bp, with a complete monocyclic structure and a GC content of 45.15%. Annotation identified 65 genes, including 35 protein coding genes, 27 tRNA genes, and 3 rRNA genes. A total of 64 SSRs (A/T single nucleotide repeats dominant) and 100 Longrepeat sequences (51 direct repeats

[收稿日期] 2024-11-01 [修回日期] 2024-12-25
[基金项目] 国家自然科学基金项目(31860084,31960079,32060092);江西省现代农业产业技术体系建设专项(JXARS-13-赣东站)
[作者简介] 尹明华(1973—),女,江西吉安人,教授,硕士,主要从事植物资源利用与保护研究。E-mail:yinminghua04@163.com

and 49 palindromic repeats) were identified in the mitochondrial genome of *C. maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou'. This mitogenome exhibited weak codon usage bias with a preference for A and U endings. The codon usage preference of *C. maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou' mitochondrial genome was influenced by both internal mutations and natural selection, with the latter being dominant. Twenty-two optimal codons were determined (AAU, GAU, UGU, CAA, AAA, UUU, UAU, AUU, AUG, UAA, GGA, GGU, CCA, CCU, ACU, GUA, GUU, CGA, CGU, UUA, UCA, and UCU), all ending in A and U. The mitochondrial genome of *C. maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou' showed high collinearity with the mitochondrial genome of *Citrus* sinensis, indicating a close genetic relationship between the two. There were 21 chloroplast gene fragments of *C. maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou' transferred to its mitochondrial genome, with a total length of 12 195 bp.【Conclusion】Sequence characteristics and codon usage bias of mitochondrial genome of *Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou' were elucidated, with the closest genetic relationship to *Citrus* sinensis among the studied *Citrus* species being demonstrated.

Key words: *Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou'; *Citrus* plants; mitochondrial genome; codon bias; phylogenetic analysis

马家柚[*Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou']为芸香科(Rutaceae)柑橘亚科柑橘属(*Citrus*)的一个地方红心柚优良品种，是上饶市广丰区地方特色农产品和国家地理标志保护农产品[1]，2009 年 12 月被江西省农作物品种审定委员会认定为中国八大柚类之一，享有"江西省酸柚类第一名""华东十大精品水果""中华名果"等美誉[2]。马家柚食用与药用历史悠久，食用方面，马家柚果实瓤满肉嫩，汁浓色红，风味酸甜，清香爽口，营养丰富[3]；药用方面，马家柚果实富含番茄红素、维生素 C、类胡萝卜素、游离单糖、氨基酸以及铁、铜、锌等微量元素，具有清爽润喉、清热去火、理气化痰、滋阴养肺等功效[4]。

柑橘属植物喜光耐阴，花期在每年 4～5 月，果期在 10～12 月，分布范围非常广泛，隶属于芸香科柑橘族(Citreae)，包括柑橘、柚、柠檬等[5]。研究人员从形态学、细胞学、孢粉学、分子生物学等方面对柑橘属植物的分类作了一系列工作，取得了一定的成果。SWINGLE[6]根据雄蕊数目及汁胞构造将芸香科柑橘族的枳属(*Poncirus* Raf.)、金柑属(*Fortunella* Swingle)、柑橘属(*Citrus* s. s.)等关系密切的 6 个属归为"真柑橘类"。有学者将 DNA 分子标记用于柑橘属植物的分类、资源鉴定以及遗传多样性研究，获得了较多柑橘属植物分类相关的结论[7-11]。杨程等[12]基于柑橘属叶绿体基因组和二代基因组测序数据，获得了可以有效鉴别柑橘属及近缘属类群的叶绿体插入缺失(insertion-deletion，InDel)和简单重复序列(simple sequence repeat，SSR)标记。但柑橘属植物容易发生属间种间有性杂交、无融合生殖和无性变异[13-14]，且柑橘属植物栽培历史悠久，这些因素使得柑橘属植物的分类变得十分复杂，目前尚无可以让人普遍接受的分类结论[15]。

线粒体基因组是一个独立于核基因的完整遗传体系，相对于细胞核基因组而言其分子质量较小，序列结构较简单，母系遗传较严格，进化速率较快，旁系同源基因较少，基因组结构较保守[16]，因此将单个线粒体基因用作分子遗传标记已广泛应用于植物物种鉴定、群体分类、分子诊断和系统发育等研究领域[17]。但由于线粒体的基因组结构、核苷酸替代速率、重复序列随植物种类而异，线粒体基因组的结构具有多样性(包括环状、分支状和网状等类型)，基因组的长度也呈现差异化(22～11 700 kb)，导致植物线粒体基因组的组装和注释存在较大的挑战性[18]。目前植物系统学的研究多集中于核基因组和叶绿体基因组上，而对植物线粒体基因组的完整组装和注释仍然是植物系统学研究中的一个瓶颈[19]。近年来，随着高通量测序技术的不断发展，适用于线粒体基因组测序和组装的软件程序(GetOrganelle、Mitofiner、GSAT 和 PMAT 等)已经得到全面开发[20]，线粒体基因组的测序和组装更加精确和高效，为深入了解植物物种的遗传特征及其系统发育提供了技术支撑。

目前关于马家柚的研究主要集中于光合特性[1]、菌液促生[3]、鲜食品质[4]、果实贮藏[21]、遗传来源鉴定[22]、叶绿体基因组[23]等方面，而关于其线粒体基因组序列特征、密码子偏好性及其系统发育分析的研究报道很少，目前只有 ZHANG 等[24]对温州蜜柑国庆 1 号、华柚 2 号和华柚 1 号的线粒体基

因组进行了测序,并将其组装成521.6,538.4和518.3 kb的环状分子,发现柑橘属植物线粒体基因组包括35～36种蛋白质编码基因、3种核糖体RNA(ribosomal RNA,rRNA)和21种转运RNA(transfer RNA,tRNA)。本研究以马家柚为研究对象,利用高通量测序技术获得其叶片的线粒体全基因组序列,并对其基因组序列特征、密码子偏好性及系统发育进行分析,以期为进一步从分子水平研究马家柚的遗传特点、起源演化和分类地位提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

广丰马家柚(代号:MJY)盆栽苗,由上饶师范学院马家柚产业研究院提供。

1.2 方 法

1.2.1 DNA提取 利用改良的CTAB法提取广丰马家柚叶片组织总DNA。

1.2.2 二代测序和三代测序 二代测序试验流程按照BGISEQ-500的标准protocol执行,包括样品质量检测、文库构建、文库质量检测和文库测序等流程,质检合格的文库用BGISEQ-500平台进行测序。三代测序试验流程采用Oxford Nanopore Technologies公司提供的建库文档执行,包括BluePippin全自动核酸回收系统筛选大片段DNA、利用SQK-LSK109连接试剂盒构建文库和文库上机测序等流程。

1.2.3 线粒体序列组装 将三代测序的读段(reads)使用minimap2软件与NCBI中的所有柑橘属线粒体基因组数据进行比对,提取比对长度大于5 000 bp的读段用于马家柚线粒体基因组组装。二代测序的读段使用bowtie2软件在广州佰数生物科技有限公司自建的线粒体基因组数据库进行比对,被比对上的读段用于马家柚线粒体基因组组装。将提取到的三代和二代测序读段使用Unicycler version:v0.4.8软件进行线粒体基因组组装。将组装所获的马家柚线粒体基因组序列提交至NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov),获得的登录号为PP770439。

1.2.4 线粒体基因注释和基因组图谱制作 线粒体基因使用GeSeq软件进行注释,注释结果利用geneious prime软件进行手动校正。线粒体基因组图谱使用OGDRAW软件进行制作。

1.2.5 SSR分析和Longrepeat分析 SSR和长重复序列(long repetitive sequence,Longrepeat)分别利用MISA软件和REPuter软件进行分析。

1.2.6 密码子偏好性分析 采用condonW1.4.2软件分析马家柚及其4个近缘种温州蜜柑国庆1号、华柚2号、华柚1号和甜橙线粒体基因(登录号分别为MN946543、MN946544、MN946545、NC_037463)的有效密码子数(effective number of codons,ENC),GC含量,同义密码子第1、2、3位GC含量(GC1、GC2、GC3),同义密码子第1和2位平均GC含量(GC12)和同义密码子相对使用频次(relative synonymous codon usage,RSCU)。RSCU可以反映密码子使用模式的差异,RSCU等于1,表明密码子使用率无偏性;RSCU大于1,表明密码子使用频率较高;RSCU小于1,表明密码子使用频率较低。

1.2.7 基因组共线性和变异分析 利用LASTZ version 1.02.00软件分析马家柚及其4个柑橘属近缘种和槟榔青属1个外群种黄槟榔青(MN057920)的全基因共线性,以马家柚线粒体基因组为参考,其他基因组与之相比,检测其共线性区段。利用Mauve软件分析马家柚及其4个近缘种线粒体基因组的结构变异。

1.2.8 细胞器基因组基因水平转移(horizontal gene transfer,HGT)分析 为了从线粒体和叶绿体基因组中获得具有高度同源性片段,利用blast软件检测马家柚线粒体基因组和叶绿体基因组之间的全基因同源性。

1.2.9 系统发育分析 采用mafft软件比对马家柚及其4个近缘种(温州蜜柑国庆1号、华柚2号、华柚1号和甜橙)和槟榔青属1个外群种(黄槟榔青MN057920)的线粒体基因组序列,利用fasttree软件构建马家柚近缘种及外群样品线粒体基因组的ML进化树。

2 结果与分析

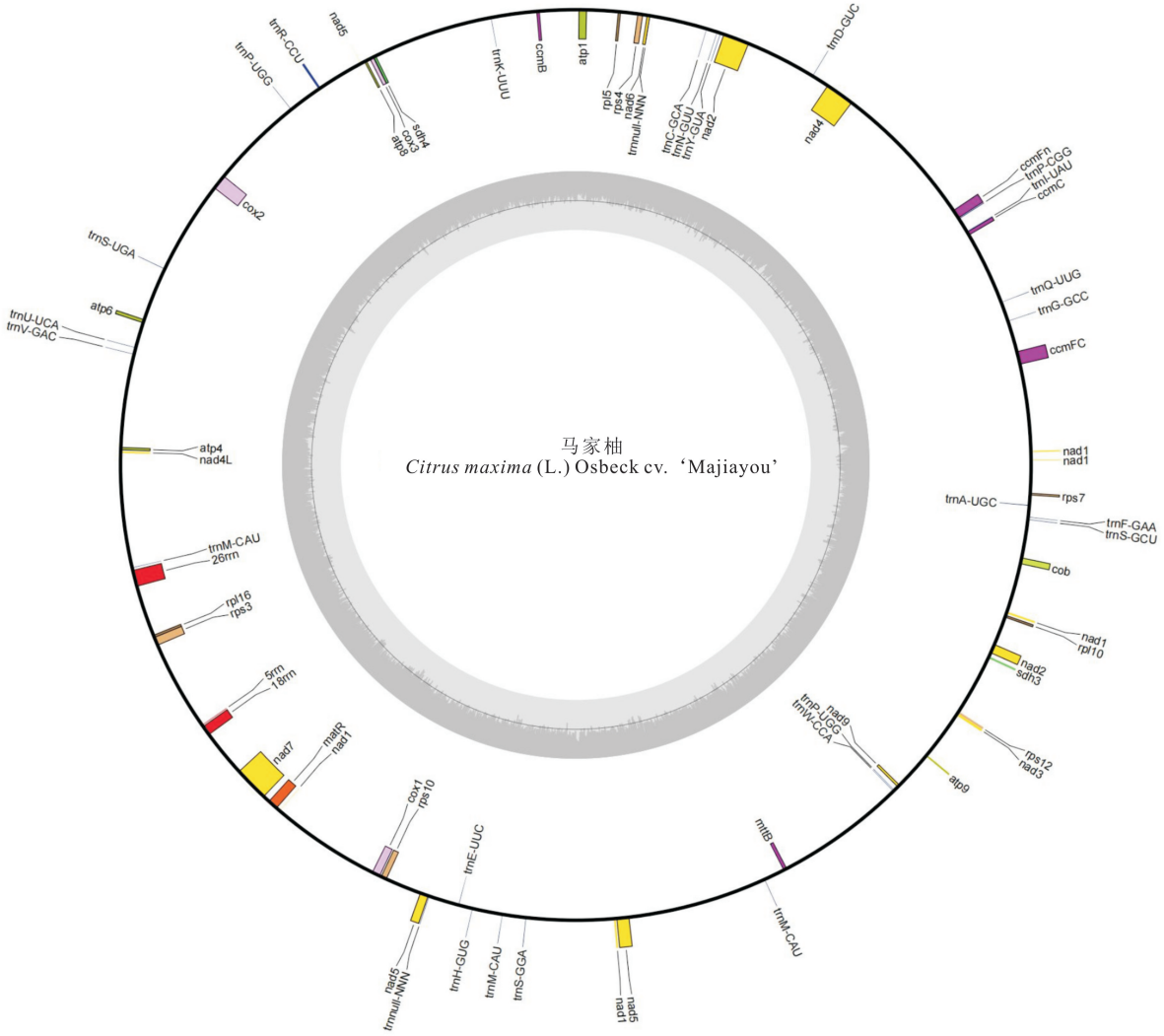
2.1 马家柚线粒体基因组测序数据统计

马家柚线粒体基因组测序共获得40 942 696条读段;测得的全部碱基为6 141 404 400 bp;Q20碱基数5 979 064 044个,占比97.357%;Q30碱基数5 641 899 855个,占比91.867%;GC含量37.727%。结果表明,马家柚线粒体基因组的测序质量较高,可用于进一步分析试验。

2.2 马家柚线粒体基因组组装与注释

马家柚线粒体基因组大小为516 383 bp,组装

结果已上传至 NCBI 数据库，呈完整单环状结构（图 1），其中 A、T、C、G 含量分别为 27.19%，27.66%，22.57%和 22.59%，GC 含量为 45.15%。线粒体基因组共注释到 65 个基因，其中包括 35 个编码蛋白（coding sequence，CDS）基因、27 个 tRNA 基因和 3 个 rRNA 基因，无假基因（表 1）。在马家柚线粒体基因组中，35 个 CDS 基因总长 32 088 bp，其中 *nad5* 基因最长（2 016 bp），*nad4L* 基因最短（273 bp）；*psaB* 为叶绿体转移过来的基因，长为 1 935 bp，而在马家柚叶绿体基因组中 *psaB* 基因长为 2 205 bp，说明 *psaB* 基因在由叶绿体向线粒体转移过程中丢失了 270 bp 序列。*ccmFC*、*cox*2、*nad*2、*rps*10、*trnR-CCU* 基因有 2 个外显子；*nad*4、*nad*5 基因有 3 个外显子。



□复合物Ⅰ(NADH脱氢酶) Complex Ⅰ (NADH dehydrogenase); □复合物Ⅱ(琥珀酸脱氢酶) Complex Ⅱ (succinate dehydrogenase); □复合物Ⅲ(泛素细胞色素c还原酶) Complex Ⅲ (ubichinol cytochrome c reductase); □ATP合酶 ATP synthase; □成熟酶 Maturases; □复合物Ⅳ(细胞色素c氧化酶) Complex Ⅳ (cytochrome c oxidase); □核糖体小亚基蛋白(SSU) Ribosomal small subunit proteins (SSU); □核糖体大亚基蛋白(LSU) Ribosomal large proteins (LSU); □其他基因 Other genes; □转运RNA tRNA; □核糖体RNA rRNA.

图 1　马家柚线粒体基因组结构

Fig. 1　Structure of *Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou' mitochondrial genome

表 1　马家柚线粒体基因组的基因组成

Table 1　Gene composition of *Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou' mitochondrial genome

	基因类型 Gene type	基因名 Gene name	基因数量 Number of genes
CDS 基因 CDS gene	ATP 合成酶 ATP synthase	*atp*1、*atp*4、*atp*6、*atp*8、*atp*9	5
	细胞色素 c 生物发生 Cytohrome c biogenesis	*ccmB*、*ccmC*、*ccmFc*、*ccmFn*	4
	乌比基醇细胞色素 c 还原酶 Ubichinolcytochrome c reductase	*cob*	1

表 1(续) Table 1(continued)

	基因类型 Gene type	基因名 Gene name	基因数量 Number of genes
CDS 基因 CDS gene	细胞色素 c 氧化酶 Cytochrome c oxidase	*cox*1、*cox*2、*cox*3	3
	成熟酶 Maturase	*matR*	1
	转运膜蛋白 Transport membrance protein	*mttB*	1
	NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase	*nad*1、*nad*2、*nad*3、*nad*4、*nad*4L、*nad*5、*nad*6、*nad*7、*nad*9	9
	核糖体大亚基蛋白 Ribosomal subunit protein	*rpl*10、*rpl*16、*rpl*5	3
	核糖体小亚基蛋白 Ribosomal small subunit protein	*rps*10、*rps*12、*rps*3、*rps*4、*rps*7	5
	叶绿体转移过来的基因 Genes transferred from chloroplasts	*psaB*	1
	琥珀酸脱氢酶 Succinate dehydrogenase	*sdh*3、*sdh*4	2
	转运 RNA tRNA	*trnA-UGC*、*trnC-GCA*、*trnD-GUC*、*trnE-UUC*、*trnF-GAA*、*trnG-GCC*、*trnH-GUG*、*trnI-UAU*、*trnK-UUU*、*trnM-CAU***、*trnN-GUU*、*trnnull-NNN**、*trnP-CGG*、*trnP-UGG**、*trnQ-UUG*、*trnR-CCU*、*trnS-GCU*、*trnS-GGA*、*trnS-UGA*、*trnU-UCA*、*trnV-GAC*、*trnW-CCA*、*trnY-GUA*	27
	核糖体 RNA rRNA	*rrn*18、*rrn*26、*rrn*5	3

注:* 表示有 2 个拷贝,* * 表示有 3 个拷贝。

Note: * denotes 2 copies; * * denotes 3 copies.

2.3 **马家柚线粒体基因组 SSR 与 Longrepeat 分析** 马家柚线粒体基因组共鉴定出 64 个 SSR,其中单核苷酸重复最多(52 个,占总数的 81.25%),其次是 2 核苷酸重复(7 个)、3 核苷酸重复(3 个)、4 核苷酸重复(1 个)和 5 核苷酸重复(1 个)。在单核苷酸 SSR 中,A/T 碱基重复数量最多(48 个),占比最高(75%);在 2 核苷酸重复中,AT/AT 碱基重复数量最多(5 个),占比最高(7.8%)。马家柚线粒体基因组共鉴定到 100 个 Longrepeat 序列,其中包括 51 个正向重复(forward repeats,F)和 49 个回文重复(palindromic repeats,P)。分散重复一般包括正向重复、反向重复和互补重复 3 种类型。马家柚线粒体基因组分散重复只有正向重复一种类型。在马家柚线粒体基因组 Longrepeat 序列中,40～49 bp 的序列数量最多(26 个),50～70 bp 序列数量次之(25 个),30～39 bp 序列数量排名第 3(12 个),而 70～79 bp(9 个)、80～89 bp(8 个)、90～99 bp(4 个)、100～200 bp(8 个)和＞200 bp(8 个)序列数量较少。

2.4 **马家柚线粒体基因组密码子偏好性分析**

2.4.1 *同义密码子的偏性分析* 马家柚及其 4 个近缘种线粒体基因组 CDS 基因密码子 GC1、GC2、GC3 的总平均值为 41.26%,GC1、GC2、GC3 的平均值分别为 46.72%,40.81%和 36.24%,表现为 GC3＜GC2＜GC1;马家柚线粒体基因组 35 个 CDS 基因密码子的 ENC 值介于 43.178～61.000,均大于 35,平均值为 52.51,说明马家柚线粒体基因组的密码子偏好性较弱;马家柚 4 个近缘种线粒体基因组 137 个 CDS 基因密码子的 ENC 值也介于 43.178～61.000,均大于 35,平均值为 52.66,说明马家柚 4 个近缘种线粒体基因组的密码子偏好性同样较弱。马家柚线粒体基因组 65 个基因序列共有 31 个 RSCU＞1 的密码子,其中编码蛋氨酸(Met)的 AUG 密码子出现频率最高,RSCU 值为 2.958 04;除 ACC、UGG、AUG 外,其余 28 个密码子均以 A、U 结尾。马家柚 4 个近缘种线粒体基因组 259 个 CDS 基因序列中共有 124 个 RSCU＞1 的密码子,均具有马家柚的 31 个 RSCU＞1 的密码子;在这 124 个密码子中,除 ACC、UUG、AUG 外,其余 121 个密码子同样偏好以 A、U 结尾。

2.4.2 *中性分析(GC3-GC12 分析)* 马家柚线粒体基因组密码子的 GC12、GC3 含量分别为 31.67%～58.27%和 25.17%～57.77%,马家柚 4 个近缘种线粒体基因组密码子的 GC12、GC3 含量分别为 31.67%～58.27%和 23.72%～57.77%,可见马家柚与 4 个近缘种之间的 GC12、GC3 含量总体范围较为一致,说明马家柚及其 4 个近缘种线粒体编码基因的碱基 GC 含量十分保守。马家柚及其

4 个近缘种的 GC12 与 GC3 的相关系数介于 0.083 6～0.234 5，均不显著，可见 GC12 与 GC3 相关性不大，说明马家柚及其 4 个近缘种的密码子偏好性主要受第 3 位碱基的影响。马家柚及其 4 个近缘种密码子的回归曲线斜率为－0.062～－0.207，内部突变贡献率为 6.2%～20.7%，自然选择贡献率为 79.3%～93.8%，说明自然选择是马家柚及其 4 个近缘种线粒体基因密码子使用偏好性的主要影响因素。需要注意的是，在马家柚线粒体基因组中，*mttB*、*rps*3 和 *ccmFC* 基因的密码子使用偏好性主要受内部突变的影响。

2.4.3　ENC-plot 分析　马家柚及其 4 个近缘种线粒体基因组的大部分基因偏离 ENC 期望值，说明马家柚及其 4 个近缘种线粒体基因组的密码子偏好性主要受到自然选择的影响，其次受到内部突变的影响。ENC 与期望值偏离较大的基因有 *ccmFC*、*matR* 和 *sdh*3，这 3 个基因是马家柚与温州蜜柑国庆 1 号、华柚 2 号、华柚 1 号共有的基因。

2.4.4　PR2-plot 分析　在马家柚及其 4 个近缘种线粒体基因组中，A 的使用频率高于 T，G 的使用频率高于 C。因此，马家柚及其 4 个近缘种线粒体基因组密码子使用偏好性受内部突变和自然选择的双重影响，其中自然选择对密码子使用偏好性的影响更大。

2.4.5　最优密码子确定　将马家柚 ENC 值最大和最小的 10%基因作为标准，筛选马家柚的高、低表达基因库，然后分别计算高、低表达基因库的 RSCU。马家柚及其 4 个近缘种线粒体基因组的高表达基因均为 *rps*3、*ccmFC*、*nad*9 和 *atp*4，低表达基因均为 *nad*4*L*、*rps*7 和 *cox*2。计算马家柚高、低表达基因库的 ΔRSCU 值，最优密码子为 ΔRSCU≥0.08 且 RSCU＞1 的密码子。马家柚线粒体基因组的最优密码子为 22 个且多以 A、U 结尾，即 AAU、GAU、UGU、CAA、AAA、UUU、UAU、AUU、AUG、UAA、GGA、GGU、CCA、CCU、ACU、GUA、GUU、CGA、CGU、UUA、UCA 和 UCU。

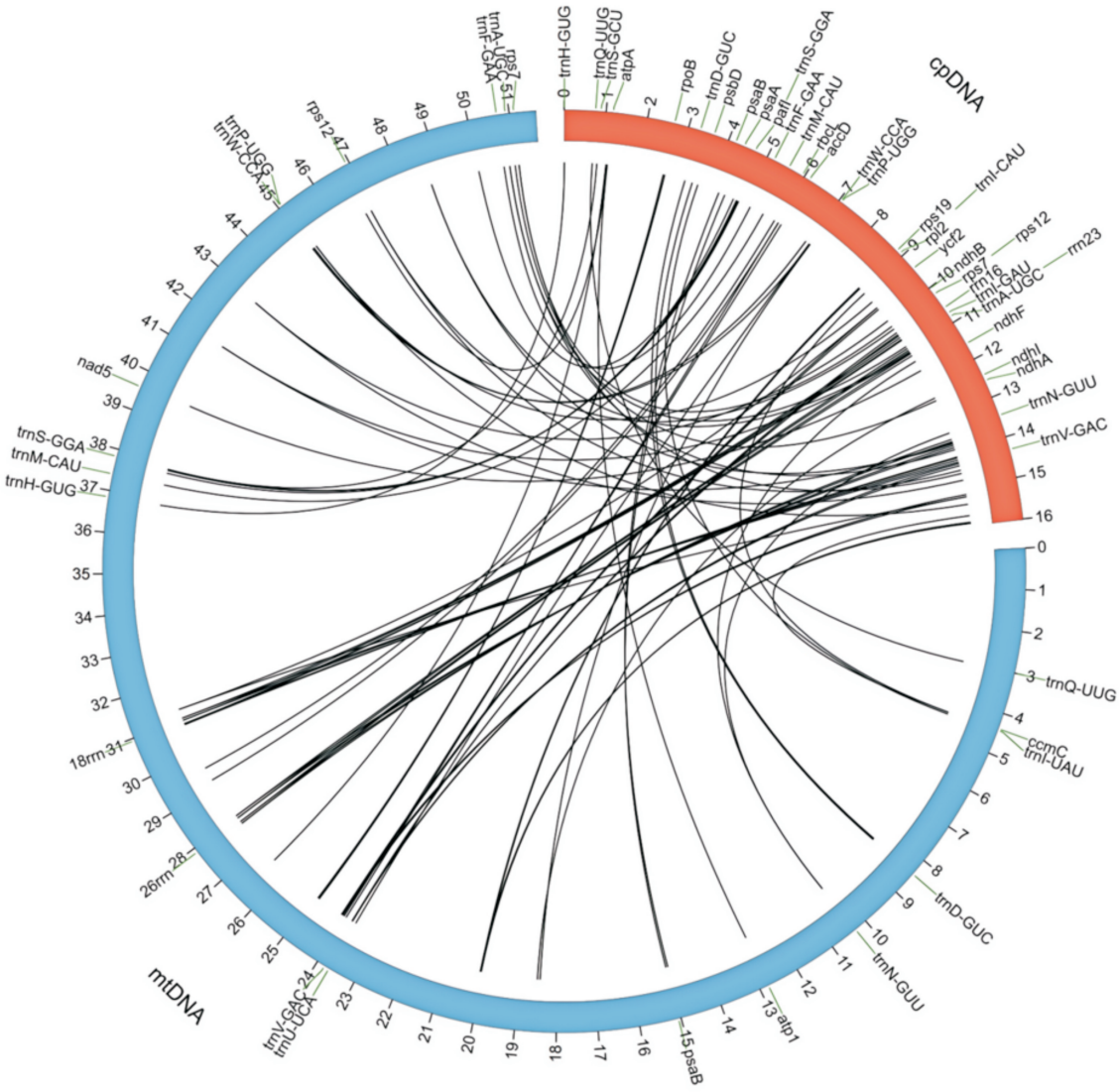
2.5　全基因组共线性和变异分析

将马家柚的线粒体基因组作为参照，与其他 4 种柑橘属植物和槟榔青属黄槟榔青进行共线性比对。结果显示，马家柚线粒体基因组与甜橙线粒体基因组的相似度最高，与黄槟榔青线粒体基因组的相似度最低，表明马家柚与甜橙的亲缘关系较近，这对柑橘属植物间的进化关系及其系统发育树的构建具有一定的参考价值。总体来看，马家柚及其 4 种柑橘属植物线粒体基因组间的相似度较高，表明柑橘属的线粒体基因组较为保守。

对马家柚及其 4 个近缘种的线粒体全基因组进行共线性和变异分析，结果表明马家柚与温州蜜柑国庆 1 号、华柚 2 号和华柚 1 号在 20 000～40 000，80 000～100 000 和 180 000～200 000 bp 共线性较好；在其他区间发生了较大的变异，可观察到大片段的倒位。马家柚与甜橙的线粒体全基因组发生了较大的变异，但马家柚的 20 000～140 000，16 000～200 000 和 320 000～500 000 bp 区段与甜橙的 100 000～220 000，340 000～380 000 和 440 000～620 000 bp 区段具有较好的共线性，且基因的排列顺序一致。

2.6　细胞器基因组基因 HGT 分析

马家柚的线粒体基因组大小（516 383 bp）约为其叶绿体基因组（160 186 bp）的 3.22 倍。与叶绿体基因组相比，马家柚线粒体基因的分布相对稀疏（图 2）。基于叶绿体和线粒体基因组之间的序列相似性，鉴定到 21 个叶绿体基因片段转移到线粒体基因组中，这些转移的片段总长度为 12 195 bp，占整个线粒体基因组的 2.36%，其中包括 6 个 CDS 基因（*psaB*、*rps*7、*atp*1、*rps*12、*ccmC*、*nad*5）、2 个 rRNA 基因（*rrn*18、*rrn*26）和 13 个 tRNA（*trnA-UGC*、*trnD-GUC*、*trnF-GAA*、*trnH-GUG*、*trnI-UAU*、*trnM-CAU*、*trnN-GUU*、*trnP-UGG*、*trnQ-UUG*、*trnS-GGA*、*trnU-UCA*、*trnV-GAC*、*trnW-CCA*）（表 2，线粒体中的名称）。在这些转移的片段中，*psaB* 基因最长（3 243 bp），从叶绿体基因组转移到了线粒体基因组 *atp*6 和 *trnU-UCA* 的基因间区；其次是 *rps*7 基因（2 699 bp），从叶绿体基因组转移到了线粒体基因组 *trnA-UGC* 基因片段的左边；再次是 *trnA-UGC* 基因（2 344 bp），从叶绿体基因组转移到了线粒体基因组 *trnW-CCA* 基因片段的左边。大多数 tRNA 基因的序列信息在迁移过程中并没有发生较大的变化，仅由叶绿体中的 *trnI-CAU* 迁移转变而来的线粒体 *ccmC* 基因，序列信息发生了较大变化。rRNA 基因在马家柚的迁移中均发生了改变，叶绿体 *rrn*16、*rrn*23 基因分别转变为线粒体 *rrn*18 和 *trnA-UGC* 基因，表明在迁移过程中 tRNA 基因比 rRNA 基因和 CDS 基因更为保守，tRNA 基因在线粒体中具有不可或缺的作用。



mtDNA 为线粒体基因组;cpDNA 为叶绿体基因组。

mtDNA refers to the mitochondrial genome;cpDNA refers to the chloroplast genome.

图 2 马家柚的细胞器基因组基因水平转移分析

Fig. 2 Horizontal gene transfer analysis of organelle genomes in *Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou'

表 2 马家柚的细胞器基因组基因水平转移情况

Table 2 Horizontal gene transfer of organelle genomes in *Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou'

叶绿体基因组 cpDNA			线粒体基因组 mtDNA		
基因名称 Gene name	位置/bp Position	长度/bp Length	基因名称 Gene name	位置/bp Position	长度/bp Length
psaB	40 914—44 192	3 279	*psaB*	151 615—148 373	3 243
rps7	100 643—103 335	2 693	*rps7*	512 351—509 653	2 699
rrn23	107 464—109 799	2 336	*trnA-UGC*	509 667—507 324	2 344
rrn16	105 323—106 176	854	*rrn18*	310 092—309 244	849
trnV-GAC	143 122—143 317	196	*trnV-GAC*	238 044—237 849	196
rrn26	111 270—111 796	527	*rrn26*	277 953—277 428	526
trnW-CCA	70 474—70 860	387	*trnW-CCA*	450 696—451 059	364
trnP-UGG	70 474—70 860	387	*trnP-UGG*	450 696—451 059	364
atp1	11 289—11 747	459	*atp1*	127 349—127 807	459
trnS-GGA	48 259—48 442	184	*trnS-GGA*	378 180—378 370	191
trnN-GUU	134 605—13 4687	83	*trnN-GUU*	103 195—103 113	83

表 2（续）　Table 2（continued）

叶绿体基因组 cpDNA			线粒体基因组 mtDNA		
基因名称 Gene name	位置/bp Position	长度/bp Length	基因名称 Gene name	位置/bp Position	长度/bp Length
trnD-GUC	32 844－32 922	79	*trnD-GUC*	84 182－84 104	79
trnH-GUG	1－76	76	*trnH-GUG*	368 500－368 425	76
trnM-CAU	55 708－55 785	78	*trnM-CAU*	373 937－374 014	78
trnU-UCA	70 474－70 548	75	*trnU-UCA*	236 838－236 764	75
*rps*12	102 792－102 982	191	*rps*12	469 305－469 115	191
trnI-CAU	90 424－90 498	75	*ccmC*	44 260－44 174	87
trnI-UAU	90 424－90 498	75	*trnI-UAU*	44 260－44 174	87
*nad*5	116 169－116 248	80	*nad*5	396 298－396 219	80
trnQ-UUG	7 489－7 542	54	*trnQ-UUG*	30 035－29 982	54
trnF-GAA	51 758－51 825	68	*trnF-GAA*	506 919－506 988	70

2.7　系统发育分析

由于柑橘属线粒体基因组的测序数据较为匮乏，因此基于马家柚及其 4 个柑橘属近缘种和槟榔青属 1 个外群种黄槟榔青的线粒体基因组测序数据进行系统发育分析。结果（图 3）表明，马家柚与甜橙的遗传关系最近。

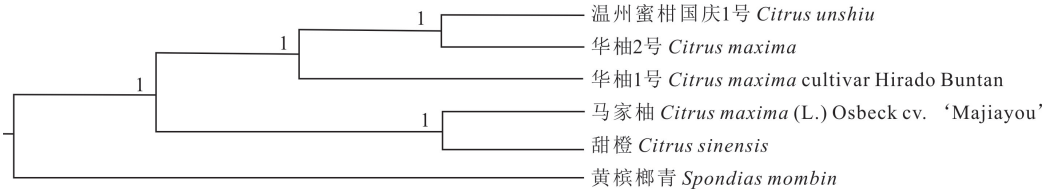


图 3　基于线粒体基因组的马家柚及其 4 个柑橘属近缘种和槟榔青属 1 个外群种的系统发育树

Fig. 3　Phylogenetic tree of *Citrus maxima* (L.) Osbeck cv. 'Majiayou' with 4 closely related species (*Citrus*), and 1 outgroup species (*Spondias*) based on mitochondrial genome

3　讨　论

柑橘属为芸香科柑橘亚科下的一属，种类繁多，目前人们对其线粒体基因组的研究较少。迄今为止，柑橘属只公开了 4 个品种的线粒体基因组数据，分别为温州蜜柑国庆 1 号、华柚 2 号、华柚 1 号和甜橙。马家柚线粒体全基因组总长度为 516 383 bp，为单一环状结构，其 GC 含量为 45.15%，共注释到 65 个基因（35 个 CDS 基因、27 个 tRNA 基因和 3 个 rRNA 基因）。温州蜜柑国庆 1 号、华柚 1 号和华柚 2 号的线粒体基因组的结构均为单一环状，其大小分别为 521 559，518 274 和 538 434 bp，其 GC 含量分别为 45.06%，45.14%和 45.02%，分别注释到 60 个基因（36 个 CDS 基因、21 个 tRNA 基因和 3 个 rRNA 基因）、59 个基因（35 个 CDS 基因、21 个 tRNA 基因和 3 个 rRNA 基因）和 60 个基因（36 个 CDS 基因、21 个 tRNA 基因和 3 个 rRNA 基因）[24]。马家柚线粒体全基因组的大小与华柚 1 号接近，其 GC 含量与华柚 1 号基本一致，稍高于温州蜜柑国庆 1 号和华柚 2 号线粒体基因组的 GC 含量，表明在柑橘属植物的进化过程中，线粒体基因组的大小和 GC 含量相对保守。马家柚线粒体基因组的 tRNA 基因最多（27 个），温州蜜柑国庆 1 号、华柚 1 号和华柚 2 号线粒体基因组的 tRNA 基因较少（均为 21 个），表明在柑橘属植物的进化过程中，tRNA 基因和多拷贝基因数量存在较大差异。马家柚线粒体基因组超过 80%是非编码区，编码区仅占其总长度的 18.95%，这与 ZHANG 等[24]的研究结果一致，原因可能是柑橘属线粒体基因组中重复序列逐渐增加所致。

现有研究表明，重复序列容易引起高等植物线粒体基因组的高频重组，从而导致其线粒体基因组结构呈现复杂性和多样性[16]。马家柚线粒体基因组共鉴定出 64 个 SSR 和 100 个 Longrepeat 序列，这些 SSR 和 Longrepeat 的大量存在说明其线粒体基因组发生了频繁的分子重组，这种频繁的分子重组可以改变其线粒体基因组的结构和构象，从而可以促进马家柚的遗传进化。

线粒体基因组和叶绿体基因组的重排、复制和 HGT 会导致基因组发生多重结构变化。从叶绿体向线粒体基因组之间的 HGT，不仅具有基因和插入位点的选择性，而且还具有一定的偏好性[25]。马家柚叶绿体基因组向线粒体基因组迁移片段长 12 195 bp，迁移片段包括 6 个 CDS 基因、2 个 rRNA 基因

和 13 个 tRNA 基因。tRNA 在高等植物叶绿体基因组和线粒体基因组间普遍存在迁移现象,且可随机插入基因组中[26]。在马家柚线粒体基因组中,存在着由其叶绿体基因组迁移而来的基因,这些基因大多为 tRNA,且其序列无较大变化,仅由叶绿体中的 trnI-CAU 迁移转变至线粒体中的 *ccmC* 基因序列发生了较大变化,但马家柚叶绿体向线粒体迁移的 rRNA 基因发生了一些序列上的变化,表明 tRNA 基因在线粒体中具有不可或缺的作用,这可能与 tRNA、rRNA 在马家柚生命活动中执行的功能不同相关,即对 tRNA 功能的保守性要求更高。

一般情况下,DNA 双链的自然变异和物种进化过程中的不同压力会导致基因突变、随机遗传漂变和 HGT,而这些因素均会对植物线粒体基因碱基使用的偏好性产生一定的影响[27]。柑橘属植物(马家柚及其 18 个同属种)的叶绿体基因组具有以 A/U 结尾的密码子偏好性[23]。马家柚及其 4 个近缘种线粒体基因组 CDS 基因的密码子同样偏好以 A/U 结尾。由于密码子使用的偏好性,导致马家柚线粒体基因组的 GC 含量稍高于温州蜜柑国庆 1 号和华柚 2 号线粒体基因组的 GC 含量,这可能有助于减轻强紫外线辐射对马家柚线粒体基因组 DNA 造成的损伤[28],从而导致马家柚能够更好地适应江西较为炎热的环境。植物线粒体基因组密码子偏好性的主要驱动力为内部突变和自然选择[29]。马家柚及其 4 个近缘种线粒体基因组的密码子使用偏好性主要受自然选择的影响,内部突变率的影响次之,这样可以确保其优势基因始终保持一定的遗传稳定性。

本研究发现,马家柚与甜橙的亲缘关系最近,这与杨莉等[30]基于 FIE(fertilization independent endosperm)基因编码的氨基酸序列的分析结果一致。

[参考文献]

[1] 毛小涛,陈凯,孙志锋,等. 马家柚光合特性研究[J]. 上饶师范学院学报,2023,43(3):73-78.
MAO X T,CHEN K,SUN Z F,et al. Study on photosynthetic characteristics of *Citrus grandis* (L.) Osbeck[J]. Journal of Shangrao Normal University,2023,43(3):73-78.

[2] 林国卫,曾芷仪,袁昕,等. 马家柚的研究进展[J]. 上饶师范学院学报,2024,44(3):67-75.
LIN G W,ZENG Z Y,YUAN X,et al. Research progress of *Citrus grandis* (L.) Osbeck 'Majiayou'[J]. Journal of Shangrao Normal University,2024,44(3):67-75.

[3] 于文清,廖雅莉雯,张译心,等. 多粘类芽胞杆菌 X-11 培养条件优化及其对马家柚的促生效果[J]. 上饶师范学院学报,2024,44(3):44-57.
YU W Q,LIAO Y L W,ZHANG Y X,et al. Optimization of culture conditions of *Paenibacillus polymyxa* X-11 and its growth-promotion effects on *Citrus grandis* (L.) Osbeck 'Majiayou'[J]. Journal of Shangrao Normal University,2024,44(3):44-57.

[4] 王瑞庆,付震,王弋,等. 延迟采收对马家柚鲜食品质的影响[J]. 上饶师范学院学报,2024,44(3):58-66.
WANG R Q,FU Z,WANG Y,et al. Effects of late harvesting on the fresh eating quality of *Citrus grandis* (L.) Osbeck 'Majiayou'[J]. Journal of Shangrao Normal University,2024,44(3):58-66.

[5] BAYER R J,MABBERLEY D J,MORTON C,et al. A molecular phylogeny of the orange subfamily (*Rutaceae*: Aurantioideae) using nine cpDNA sequences[J]. American Journal of Botany,2009,96(3):668-685.

[6] SWINGLE W T. The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily (Family Rutaceae, subfamily Aurantioideae)[C]//WEBBER H J,BATCHELOR L D. The *Citrus* Industry:Vol 1. History,botang and breeding. Berkeley:University of California Press.

[7] PANG X M,HU C G,DENG X X. Phylogenetic relationships within *Citrus* and its related genera as inferred from AFLP markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution,2007,54(2):429-436.

[8] BARKLEY N A,ROOSE M L,KRUEGER R R,et al. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs)[J]. Theoretical and Applied Genetics,2006,112(8):1519-1531.

[9] SHARAFI A A,ABKENAR A A,SHARAFI A,et al. Genetic variation assessment of acid lime accessions collected from south of Iran using SSR and ISSR molecular markers[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants,2016,22(1):87-95.

[10] UZUN A,YESILOGLU T,POLAT I,et al. Evaluation of genetic diversity in lemons and some of their relatives based on SRAP and SSR markers[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2011,29(3):693-701.

[11] 王炯,龚桂芝,彭祝春,等. 基于 COS marker 分析柑橘属及其近缘、远缘属植物的遗传与进化[J]. 中国农业科学,2017,50(2):320-331.
WANG J,GONG G Z,PENG Z C,et al. Genetic and phylogenetic relationships among *Citrus* and its close and distant relatives based on COS marker[J]. Scientia Agricultura Sinica,2017,50(2):320-331.

[12] 杨程,龚桂芝,彭祝春,等. 基于 cpInDel 标记和 cpSSR 标记的柑橘属及近缘属植物亲缘关系[J]. 中国农业科学,2022,55(16):3210-3223.
YANG C,GONG G Z,PENG Z C,et al. Genetic relationship among *Citrus* and its relatives as revealed by cpInDel and cpSSR marker[J]. Scientia Agricultura Sinica,2022,55(16):3210-3223.

[13] SWINGLE W T,REECE P C. The botany of citrus and its

wild relatives of the orange subfamily[M]. Berkeley, California, USA: University of California, 1967.

[14] WU G A, TEROL J, IBANEZ V, et al. Genomics of the origin and evolution of *Citrus*[J]. Nature, 2018, 554(7692): 311-316.

[15] RAMADUGU C, PFEIL B E, KEREMANE M L, et al. A six nuclear gene phylogeny of *Citrus* (*Rutaceae*) taking into account hybridization and lineage sorting[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68410.

[16] PARK H S, LEE W K, LEE S C, et al. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in cucumber revealed by four reciprocal F1 hybrid combinations[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 2506.

[17] TAKATSUKA A, KAZAMA T, ARIMURA S, et al. TALEN-mediated depletion of the mitochondrial gene *orf312* proves that it is a Tadukan-type cytoplasmic male sterility-causative gene in rice[J]. The Plant Journal, 2022, 110(4): 994-1004.

[18] CHEN J H, MA H P, FAN H L, et al. De novo assembly and comparative analysis of the mitochondrial genome of *Reynoutria japonica*[J]. Frontiers in Genetics, 2023, 14: 1289811.

[19] WEI L Z, ZHENG T, XIANG J, et al. Assembly and analysis of the first complete mitochondrial genome of *Ficus carica* Linn.[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2023, 148(6): 283-291.

[20] YANG M, ZHANG S, LI B, et al. Comprehensive analysis of the mitochondrial genome of *Ziziphus mauritiana* Lam.: investigating sequence structure, repeat-mediated recombination, chloroplast-derived transfer, RNA editing, and evolution[J]. Scientia Horticulturae, 2024, 324: 112637.

[21] 樊友富，胡威，杨莉，等. 马家柚果实常温贮藏期间柠檬酸含量变化及相关基因的表达分析[J]. 果树学报，2024，41(3)：448-458.
FAN Y F, HU W, YANG L, et al. Changes of citrate acid contents and expression of related genes in Majiayou pomelo fruit during room temperature storage[J]. Journal of Fruit Science, 2024, 41(3): 448-458.

[22] 徐宸宇，曹立新，唐启正，等. 马家柚遗传来源鉴定与适宜授粉品种筛选[J]. 华中农业大学学报，2022，41(2)：124-135.
XU C Y, CAO L X, TANG Q Z, et al. Identification of Majia pomelo germplasm and screening of varieties with suitable pollination[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2022, 41(2): 124-135.

[23] 尹明华，余璐，周佳慧，等. 马家柚叶绿体基因组特征及其密码子偏好性分析[J]. 果树学报，2024，41(5)：824-846.
YIN M H, YU L, ZHOU J H, et al. Analysis of the chloroplast genome sequence characteristics and its code usage bias of *Citrus maxima* (L.) Osbeck 'Majiayou'[J]. Journal of Fruit Science, 2024, 41(5): 824-846.

[24] ZHANG S, YIN Z P, WU X M, et al. Assembly of *Satsuma mandarin* mitochondrial genome and identification of cytoplasmic male sterility-specific ORFs in a somatic cybrid of pummelo[J]. Tree Genetics & Genomes, 2020, 16: 84.

[25] ZHENG X M, GE S. Ecological divergence in the presence of gene flow in two closely related *Oryza species* (*Oryza rufipogon* and *O. nivara*)[J]. Molecular Ecology, 2010, 19: 2439-2454.

[26] 田相军. 水稻线粒体基因组：序列多态性和基因组进化，以及线粒体、叶绿体和细胞核基因组间的基因迁移[D]. 杭州：浙江大学，2006.
TIAN X J. Rice mitochondrial genome: sequence polymorphism and genome evolution, as well as gene transfer between mitochondrial, chloroplast, and nuclear genomes[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006.

[27] SHEN B M, SHEN A R, LIU L N, et al. Assembly and comparative analysis of the complete multichromosomal mitochondrial genome of *Cymbidium ensifolium*, an orchid of high economic and ornamental value[J]. BMC Plant Biology, 2024, 24(1): 255.

[28] WANG B, YUAN J, LIU J, et al. Codon usage bias and determining forces in green plant mitochondrial genomes[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(4): 324-334.

[29] SALIM H M W, CAVALCANTI A R O. Factors influencing codon usage bias in genomes[J]. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2008, 19(2): 257-262.

[30] 杨莉，春永强，邱丽，等. 柚 FIE 同源基因的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种，2020，18(13)：4222-4228.
YANG L, CHUN Y Q, QIU L, et al. Cloning and expression analyzing of FIE homologous gene in *Citrus maxima* (Burm.) Merr.[J]. Molecular Plant Breeding, 2020, 18(13): 4222-4228.

（责任编辑：马秋明）