

大叶百两金和细柄百两金叶绿体全基因组解析及系统发育分析

曾宪法, 刘畅, 杨小英, 余庆, 扶世伦, 鄢藤云, 蒲翔*

(贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 百两金 *Ardisia crispa* (Thunb.) A. DC. 为传统苗药药材, 在治疗咽喉痛、扁桃腺炎、肾炎水肿及跌打风湿等方面具有显著疗效。大叶百两金 *Ardisia crispa* var. *amplifolia* 和细柄百两金 *Ardisia crispa* var. *dielsii* 是百两金的变种, 两者在物种进化关系及分类鉴定方面存在争议。本研究利用 Illumina 平台测序获取两者叶绿体全基因组序列, 对其进行组装、注释和特征分析, 采用生物信息学方法比较叶绿体基因组间的结构特征与变异程度, 同时下载报春花科 Primulaceae 和紫金牛科 Myrsinaceae 植物叶绿体全基因组序列信息构建系统发育树解析其系统发育关系。结果表明大叶百两金和细柄百两金完整叶绿体基因组序列全长 156 749 bp、156 748 bp, 均注释到基因 132 个, 其中蛋白质编码基因 87 个; 密码子偏好性 A/U 大于 G/C; 基因组比较分析中两者在 *rps15* 和 *rpoB* 基因编码区存在差异, 为两者分子鉴定提供新的位点; 与同属物种相比较叶绿体基因组中 *ycf1*、*ycf2*、*rpoC1*、*ycf3*、*petD* 及 *rpl16* 等基因编码区存在差异, 可作该属植物的鉴别位点; 系统发育结果中, 大叶百两金和细柄百两金聚为一束, 支持率为 100%, 表明两者亲缘关系较近。本研究对大叶百两金与细柄百两金叶绿体基因组结构和系统发育关系进行解析, 为两者分子鉴别、遗传变异、育种以及系统发育分析等提供重要的理论依据。

关键词: 紫金牛属; 大叶百两金; 细柄百两金; 叶绿体基因组; 系统发育

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)01-0217-12

Chloroplast genome resolution and phylogenetic analysis of *Ardisia crispa* var. *amplifolia* and *Ardisia crispa* var. *dielsii*

ZENG Xian-fa, LIU Chang, YANG Xiao-ying, YU Qing, FU Shi-lun, YAN Teng-yun, PU Xiang*

(Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

Abstract: *Ardisia crispa* (Thunb.) A. DC. is a traditional Miao medicinal herb with significant therapeutic effects in the treatment of sore throat, tonsillitis, edema of nephritis and bruising and rheumatism, etc. *Ardisia crispa* var. *amplifolia* and *Ardisia crispa* var. *dielsii* are varieties of *A. crispa*. *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii* are controversial in terms of species evolutionary relationships and taxonomic identification. In this study, we sequenced the whole genome sequences of *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii* chloroplasts using Illumina platform, assembled, annotated and characterized them, compared the structural features and degree of variation among chloroplast genomes using bioinformatics methods, and also downloaded constructing phylogenetic trees to analyze the phylogenetic relationships of chloroplasts in Primulaceae and Myrsinaceae using whole genome sequence information. The results showed that the complete chloroplast genome sequences of *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii* were 156 749 bp and 156 748 bp in length, with 132 genes annotated, including 87 protein-coding genes; the codon preference of A/U was greater than that of G/C; The differences in the coding regions of *rps15* and *rpoB* genes in the comparative genome analysis can be used as loci for molecular identifica-

收稿日期: 2022-07-18; 修回日期: 2022-08-17.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1708100); 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题 (QZYY-2021-098); 贵州中医药大学 2021 年度科研创新和探索专项 (2018YFC170810101); 贵州省“十四五”中医药、民族医药重点学科 [QZYZZDXK(JS)-2021-03].

*通讯作者 E-mail: 314745595@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0874

tion of the two species; the differences in the coding regions of *ycf1*, *ycf2*, *rpoC1*, *ycf3*, *petD* and *rpl16* genes in the chloroplast genome compared with those of the same genus can be used as loci for identification of the genus. In the phylogenetic results, *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii* were clustered together with 100% support, indicating that they are closely related. In this research, we analyzed the chloroplast genome structure and phylogenetic relationships of *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii*, providing an important theoretical basis for their molecular identification, genetic variation, breeding and phylogenetic analysis.

Key words: *Ardisia*; *A. crispa* var. *amplifolia*; *A. crispa* var. *dielsii*; chloroplast genome; phylogeny

紫金牛属 *Ardisia* 植物是紫金牛科最大的属, 该属物种较多, 全世界分布广泛, 在我国主要集中分布于长江流域以南各地^[1], 该属植物常用于治疗风湿、跌打、癆咳及各种炎症等; 该属植物形态或功效的相似以及种间变异错综复杂导致本草记载中常出现同名异物或同物异名的情况, 各物种之间亲缘关系有待进一步明晰。百两金为紫金牛科紫金牛属百两金的干燥根或根茎, 具有清咽利喉、散淤消肿和舒筋活血等功效, 可治疗咽喉痛、扁桃体炎、肾炎水肿、跌打损伤、风湿疼痛、白浊、骨结核、劳伤咳血、痢疔和毒蛇咬伤等^[2]。大叶百两金和细柄百两金为百两金变种, 两变种植株外形差别较小, 仅叶、植株大小有所不同 (图1), 仅仅从形态学方面区分大叶百两金和细柄百两金缺乏科学依据。

叶绿体是植物细胞特有的一种半自主性细胞器, 拥有独立的基因组^[3], 存在于所有绿色植物和某些自养生物细胞中, 是它们进行光合作用和能量转换的重要场所, 是植物生命活动代谢中心^[4]; 在裸子植物中多为父系遗传, 而在被子植物中则以母系遗传为主^[5]。叶绿体基因组是叶绿体内带有遗传信息的一套DNA序列, 一般介于120~180 kb, 通常为典型的环状四分体结构, 包括1个大单拷贝区 (large single copy region, LSC)、1个小单拷贝区 (small single copy region, SSC) 和2个反向重复区 (inverted repeats region, IRa/IRb)^[6], 因其具有分子质量小、结构稳定、高度保守等特点, 目前已经被广泛应用于植物鉴定、系统进化分析、遗传多样性、种群动态历史及叶绿体基因工程等研究^[7,8]; 随着测序技术的快速发展, 诸多药用植物的叶绿体基因

组已被完成测序和数据分析, 取得了较好的研究成效, 如白头翁 *Pulsatilla chinensis*、牛蒡 *Arctium lappa*、罂粟 *Papaver somniferum*^[9-11]等已经完成了叶绿体基因组分析, 确定了各自的系统位置及其与近缘物种的亲缘关系。目前紫金牛属部分物种已经完成叶绿体基因组测序, 如朱砂根 *Ardisia crenata*、紫金牛 *Ardisia japonica*、纽子果 *Ardisia polysticta* 等少数物种, 但变种之间及同种不同个体间叶绿体比较基因组学和系统发育研究鲜有报道。

因此, 本研究对大叶百两金和细柄百两金两个紫金牛属物种进行叶绿体基因组测序, 解析两者叶绿体基因组序列与结构特征, 筛选种间高变异序列, 以期在两变种的分子鉴别提供科学依据; 同时下载报春花科报春花属丽花报春 *Primula pulchella*、宝兴报春 *Primula moupinensis*、陕西报春 *Primula handeliana* 以及紫金牛科紫金牛属、杜茎山属 *Maesa*、蜡烛果属 *Aegiceras*、酸藤子属 *Embelia* 和铁仔属 *Myrsine* 已上传至NCBI植物叶绿体全基因组序列信息构建系统进化树, 旨在解析紫金牛科与报春花科以及紫金牛属种间亲缘关系, 为大叶百两金和细柄百两金物种鉴定、药材特异DNA指纹开发、分子植物育种等研究奠定基础。

材料与方法

材料 样品的新鲜叶片采自贵州省贵州中医药大学药质资源圃, 经魏升华教授鉴定为大叶百两金与细柄百两金, 取健康叶片用无菌水冲洗数次, 晾干后置于-80 °C冰箱保存备用。通过NCBI数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索紫金牛科紫金牛属物种的

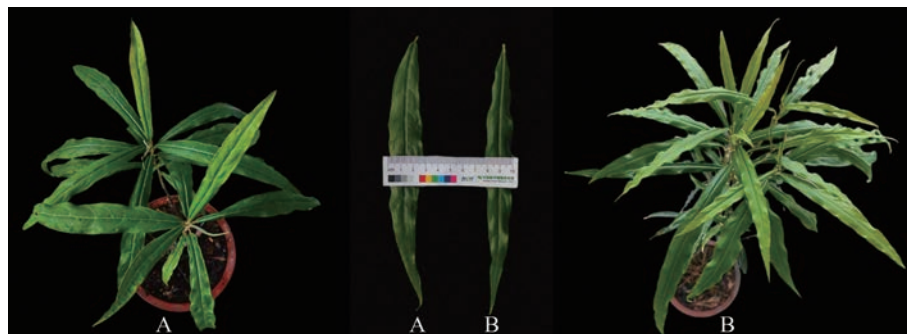


Figure 1 A: *A. crispa* var. *amplifolia*; B: *A. crispa* var. *dielsii*

叶绿体全基因组序列信息。检索到紫金牛科紫金牛属 18 个物种以及杜茎山属 2 个、蜡烛果属 1 个、酸藤子属 2 个和铁仔属 2 个物种叶绿体全基因组序列信息, 然后选取与紫金牛科亲缘关系较近的报春花科报春花属常见的 3 个观赏植物丽花报春、宝兴报春、陕西报春完整叶绿体全基因组序列信息构建系统发育树 (表 1)。

Table 1 The GenBank accession numbers of chloroplast in Myrsinaceae and Primulaceae

Species	Family	Genus	GenBank accession number
<i>Ardisia gigantifolia</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	MN548760.1
<i>Ardisia mamillata</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	MN136062.1
<i>Ardisia polysticta</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	KC465962.1
<i>Ardisia fordii</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK514746.1
<i>Ardisia quinquegona</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK514745.1
<i>Ardisia villosa</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK509170.1
<i>Ardisia faberi</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK509169.1
<i>Ardisia japonica</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK148445.1
<i>Ardisia solanacea</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	MN094783.1
<i>Ardisia argenticaulis</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK509165.1
<i>Ardisia merrillii</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK054493.1
<i>Ardisia crenata</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	MW929178.1
<i>Ardisia omissa</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK054494.1
<i>Ardisia carnosicaulis</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK054492.1
<i>Ardisia replicate</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK514747.1
<i>Ardisia balansana</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK509167.1
<i>Ardisia sieboldii</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK509163.1
<i>Ardisia obtusa</i>	Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	OK509166.1
<i>Maesa montana</i>	Myrsinaceae	<i>Maesa</i>	KU569490.1
<i>Maesa hupehensis</i>	Myrsinaceae	<i>Maesa</i>	MZ846203.1
<i>Myrsine stolonifera</i>	Myrsinaceae	<i>Myrsine</i>	MN167883.1
<i>Aegiceras corniculatum</i>	Myrsinaceae	<i>Aegiceras</i>	MN167882.1
<i>Embelia scandens</i>	Myrsinaceae	<i>Embelia</i>	MW246148.1
<i>Embelia vestita</i>	Myrsinaceae	<i>Embelia</i>	MN167884.1
<i>Myrsine africana</i>	Myrsinaceae	<i>Myrsine</i>	MN165129.1
<i>Primula handeliana</i>	Primulaceae	<i>Primula</i>	MG181221.1
<i>Primula pulchella</i>	Primulaceae	<i>Primula</i>	KX668179.1
<i>Primula moupinensis</i>	Primulaceae	<i>Primula</i>	KX668175.1

基因组 DNA 提取与测序 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司, 北京] 提取总 DNA, 0.8% 琼脂糖电泳检测 DNA 样品是否有降解及杂质, Nanodrop 分光光度计检测样品浓度及纯度, 检测合格的 DNA 样品根据 Illumina DNA 文库构建流程, 构建插入片段大小为 350 bp 的双末端测序文库。对质检合格的高通量测序文库, 采用 Illumina Novaseq6000 高通量测序平台进行测序。Illumina 高通量测序结果经 CASAVA 软件进行碱基识别 (base calling) 后转化为原始测序序列 (raw reads), 利用 NGS QC ToolKit 软件对 raw reads 进行质控, 过滤去除接头和低质量序列, 得到高质量序列 (clean reads)。

叶绿体基因组组装、注释及图谱绘制 利用 FastQC 对测序所得原始序列进行质量检测, 采用 Trimmomatic 软件^[12]过滤去除接头序列和低质量区。使用 NOVOPlasty^[13]将原始读长组装成完整的叶绿体基因组。采用 BWA 将高质量读长比对回叶绿体基因组序列, 并在 IGV 中进行人工检查以确保组装无误; 利用 CPGAVAS 软件^[14]和 GeSeq 软件^[15]对完整叶绿体基因组序列进行注释, tRNA 基因用 tRNAscan-SE 软件^[16]进行鉴定及人工校正; 利用 Organellar Genome DRAW (<http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de/cgi-bin/ogdraw.pl>) 在线绘制叶绿体基因组图谱。

边界序列的 PCR 扩增 将叶绿体基因组 4 个边界区域序列 IRa-SSC、IRa-LSC、IRb-LSC、IRb-SSC 采用 PCR 方法进行鉴别, 用在线软件 Primer 3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 设计 4 对 PCR 扩增所用引物 (表 2)。Eppendorf 管中, 依次加入 8.2 μL dd H_2O 、10.0 μL 2 \times Taq PCR MasterMix II、0.4 μL 的上游引物 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、0.4 μL 下游引物 (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1.0 μL DNA 模板 (50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)。PCR 反应在伯乐 T100 型 PCR 仪上进行, 程序为: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min、90 $^\circ\text{C}$ 变性 3 s; 退火 60 $^\circ\text{C}$ 30 s、延伸 72 $^\circ\text{C}$ 45 s、30 个循环。

Table 2 PCR amplification primers of four border region sequences

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Size/bp
IRa-SSC-F	CCCTTCCATGCCTCATTTCA	1 284
IRa-SSC-R	GGCGGACGCATCTCATCTTA	
IRa-LSC-F	TATCGGTATACGCCATCCA	1 250
IRa-LSC-R	AGGCACGGCCATACATAACA	
IRb-SSC-F	TGTGCTCGCATAGACCCTTT	1 418
IRb-SSC-R	GGCAGAATACCGTCACCCAT	
IRb-LSC-F	TCTGGGGAGGTCCGTTTGAT	1 306
IRb-LSC-R	TCGGCGGTTCCCTATTTCAGT	

重复序列和密码子偏向性分析 使用在线软件 MISA^[17] (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/index.php>) 分析简单重复序列 (SSRs), 参数阈值设置为 1、2、3、4、5、6, 核苷酸参数为 9、4、3、3、3、3, 且两个 SSRs 之间的距离不小于 100 bp, 并对 SSRs 的类型、数量等进行比较分析。利用在线软件 REPuter^[18] (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/reputer>) 对长重复序列 (long repeat) 进行分析, 海明距离 (Hamming distance)、最大计算重复次数 (maximum computed repeats)、最小重复片段大小 (minimal repeat size) 参数设置为 3、5 000、30。采用软件 CodonW^[19] (<http://codonw.sourceforge.net>) 分析密码子使用情况。

叶绿体基因组比较分析 利用在线软件 IRSCOPE^[20] (<https://irscope.shinyapps.io/irapp/>) 对百两金与其同属

6个物种叶绿体基因组4个区域的边界信息进行分析,并观察收缩与扩张在IRs区域的现象;采用mVISTA^[21]对全基因组进行比对分析;使用Geneious10.2.2软件中Mauve多重基因组比对法进行共线性比较。

系统发育分析 本研究选择已发表的紫金牛科和报春花科共30个物种进行系统发育树构建,利用在线软件MAFFT 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>)将30个物种叶绿体基因组序列进行比对,结果采用MEGAX软件^[22]中邻接法(neighbor-joining, NJ)法构建系统进化树,bootstrap重复值设置为1 000。同时,采用IQ-TREE 2.0.5 (<http://www.iqtree.org/>)软件,最大似然法(ML法: maximum likelihood method)构建系统发育树,构树参数设置为: -m MFP -B 1 000 -alrt 1 000, 优构树模型为: TVM+F+I+G4。

结果与分析

1 叶绿体基因的边界验证

通过PCR手段对大叶百两金(1~4)和细柄百两金(5~8)4个边界进行验证(图2)。电泳结果表明,4对引物均能扩增出单一条带,大小与预期一致。

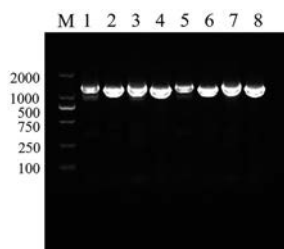


Figure 2 Gel electrophoresis of PCR products. M: Marker; 1-4/5-8: Boundary sequences of IRb/LSC, IRa/LSC, IRb/SSC and IRa/SSC

2 叶绿体基因组结构

大叶百两金与细柄百两金叶绿体基因组大小为156 749 bp、156 748 bp,呈双链环状四分区域结构,包括1个大单拷贝区(large single-copy, LSC)、1对反向互补重复区(inverted repeats, IR)和1个小单拷贝区(small single-copy region, SSC),其大小分别为86 303 bp、26 014 bp、18 418 bp, G/C与A/T含量均为37.05%、62.95%,有明显的AT偏向性(图3)。此外, LSC、IR和SSC区域的GC值存在一定的差异(表3), IR区的G/C含量最高(42.97%),其次是SSC区(30.14%)及LSC区(34.95%)。

3 叶绿体基因组功能及分类

大叶百两金与细柄百两金叶绿体基因组共包含132个基因,其中编码蛋白基因87个、rRNA基因8个

Table 3 The basic information of chloroplast genomes between *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii*

Genomic region	<i>A. crispa</i> var. <i>amplifolia</i>		<i>A. crispa</i> var. <i>dielsii</i>	
	Length/bp	GC content/%	Length/bp	GC content/%
Total	156 749	37.05	156 748	37.05
LSC	86 303	34.95	86 303	34.95
IR	26 014	42.97	26 014	42.97
SSC	18 418	30.14	18 417	30.14

与tRNA基因37个。根据其功能分为3大类:自我复制有关的基因、光合作用有关的基因和其他基因;在这些基因中,蛋白质编码基因10个: *ycf2*、*ycf1*、*rpl2*、*rps12*、*ndhB*、*rps19*、*rps7*、*rpl23*、*ycf15*、*ndhF*; tRNA编码基因7个: *tRNA-Met*、*tRNA-Val*、*tRNA-Arg*、*tRNA-Leu*、*tRNA-Ile*、*tRNA-Asn*、*tRNA-Ala*; rRNA编码基因4个: *rrn5S*、*rrn4.5S*、*rrn16S*、*rrn23S*位于IR区(表4)。

4 重复序列分析

长重复序列进行分析表明,大叶百两金和细柄百两金长重复序列皆为54个,包括正向重复(forward repeats, F)、回文重复(palindrome repeats, P)、反向重复(reverse repeats, R)和互补重复(complement repeats, C)。其中有24个正向重复F(10个30~39 bp, 7个40~49 bp, 2个50~59 bp, 2个60~69 bp, 3个70~79 bp)、29个回文重复P(12个30~39 bp, 10个40~49 bp, 2个50~59 bp, 1个60~69 bp, 4个70~79 bp)、1个反向重复R(30~39 bp)和0个互补重复C,两者叶绿体基因组中大多数重复序列长度都在30~39 bp之间,均未鉴定到互补重复序列(表5)。简单重复序列(simple sequence repeat, SSRs)分析表明,两者均有217个SSRs位点,均未发现六核苷酸重复基序(表6)。

5 叶绿体基因组密码子使用分析

根据RSCU值计算大叶百两金和细柄百两金叶绿体基因组蛋白编码基因的密码子使用模式(表7)。结果表明两个百两金叶绿体基因组均包含64种密码子,其中61种密码子编码21种氨基酸,其余3个为终止密码子;在所有氨基酸密码子中,编码亮氨酸(Leu, L)的密码子数最多。根据RSCU值对其密码子进行统计分析,大叶百两金RSCU为>1的密码子共30个,其中4个密码子以G/C结尾,26个密码子以A/U结尾;细柄百两金RSCU为>1的密码子共33个,其中5个密码子以G/C结尾,28个密码子以A/U结尾。上述结果表明两物种叶绿体基因组对A/U结尾密码子的偏好性高于G/C结尾密码子。

6 叶绿体基因组内含子分析

内含子长度或编码序列长度等因素均会直接影响到整个基因长度的变化,大叶百两金和细柄百两金的

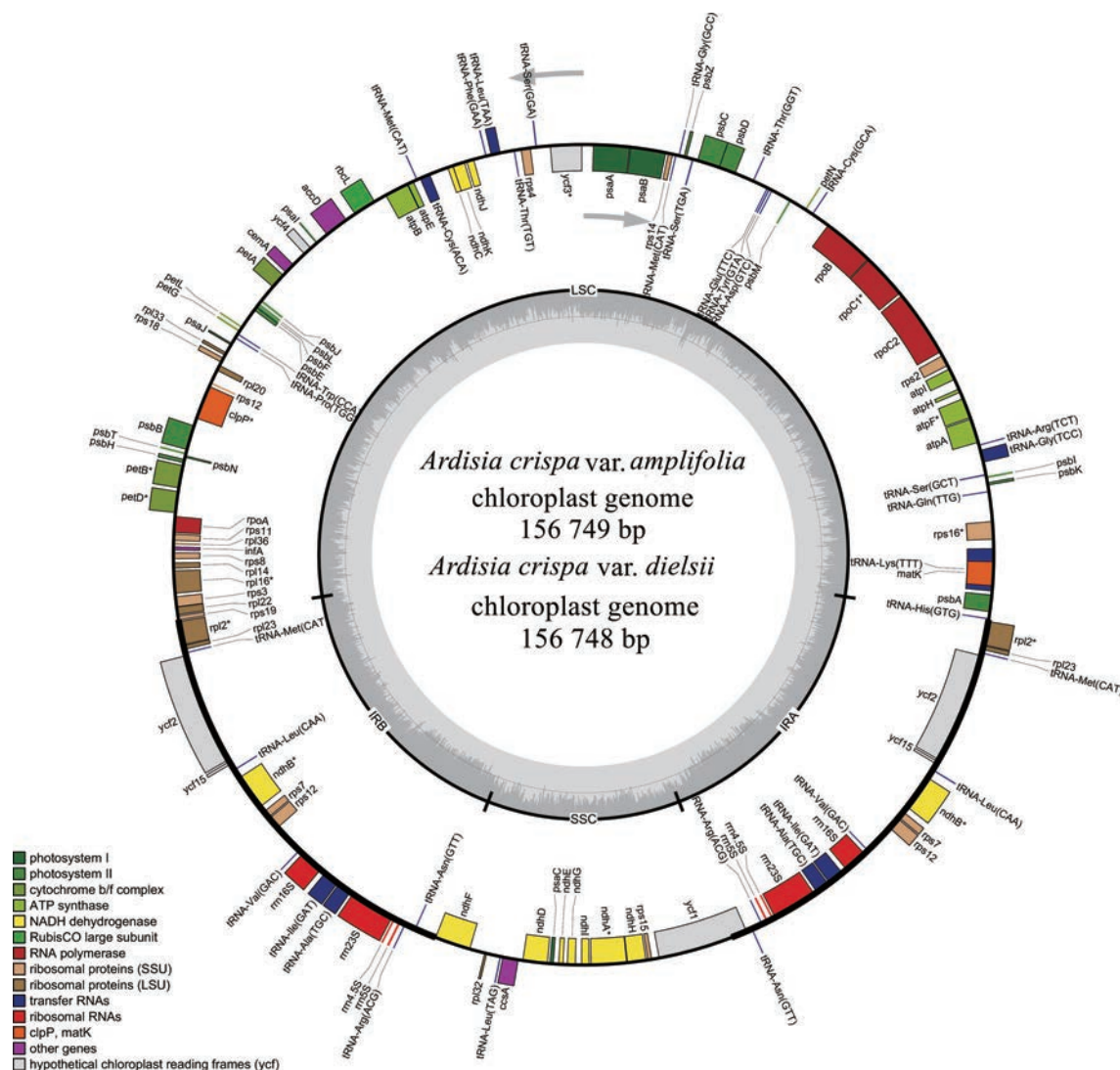


Figure 3 Chloroplast genome map between *A. crisa* var. *amplifolia* and *A. crisa* var. *dielsii*. The length of the chloroplast genome was shown in the circle. The different colors on the circle represented different types of genes. Represented with arrows, the transcription directions for the inner and outer genes were listed clockwise and anticlockwise, respectively

叶绿体基因组中内含子编码序列 (coding sequences, CDS) 长度和基因全长 (gene length) 如下 (表 8), 两物种的叶绿体基因组中均检测到 11 个含内含子的蛋白编码基因: *petB*、*petD*、*rps16*、*ycf3*、*ndhA*、*clpP*、*rpoC1*、*rpl2*、*atpF*、*ndhB* 和 *rpl16*。结果表明在这 11 个含内含子的蛋白编码基因中, 两物种内含子蛋白编码基因在内含子长度和编码序列长度上均一致。

7 叶绿体基因组边界分析

紫金牛属叶绿体基因组虽然在序列长度、基因组组成及 GC 含量等方面相对稳定保守, 但 4 个边界区的过渡区域却存在有多样性 (图 4)。紫金牛 8 个物种的 IRb-LSC 边界均位于 *rps19* 基因的编码区; 对于 IRb-SSC 边界, 大叶百两金和细柄百两金边界均位于 *ndhF* 基因的编码区, 月月红 *Ardisia faberi* Hemsl. 的 *ndhF* 基因仅存在于 SSC,

灰色紫金牛 *Ardisia fordii* Hemsl. 则存在于 *ycf1* 基因的编码区, 其余 4 个物种 IRb-SSC 边界均在 *ndhF* 基因的编码区; 紫金牛 8 个物种的 IRa-SSC 边界, 除了灰色紫金牛位于 *ndhF* 基因的编码区外, 其他物种均位于 *ycf1* 基因编码区; 对于紫金牛属 8 个物种的 IRa-LSC 边界, *rpl2* 基因均位于 IRa 区域, 月月红、酸苔菜 *Ardisia solanacea* Roxb.、纽子果和走马胎 *Ardisia gigantifolia* Stapf 位于 *trnH* 基因内, 酸苔菜 *rps19* 基因存在向 LSC 区扩张趋势, 纽子果与走马胎 *rps1* 基因位于边界处, 大叶百两金与细柄百两金位于 tRNA 基因编码区。

8 基因组序列变异分析

为了评估紫金牛属叶绿体基因组序列的差异程度, 本研究采用 mVISTA 软件, 并选用检测基因重排和倒位的全局比对模式 (shuffle-LAGAN), 以大叶百两金作

Table 4 Gene composition in chloroplast genomes between *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii*. *One intron; **Two introns

Gene group	Gene function	Gene name
Self-replication	Large subunit of ribosome	<i>rpl23(x2), rpl2^{**}(x2), rpl36, rpl33, rpl32, rpl20, rpl16^{**}, rpl22, rpl14</i>
	Small subunit of ribosome	<i>rps8, rps12(x2), rps11, rps3, rps2, rps18, rps7(x2), rps4, rps19, rps16[*], rps15, rps14</i>
	RNA polymerase	<i>rpoB, rpoC2, rpoC1[*], rpoA</i>
	rRNA	<i>rrn16S(x2), rrn4.5S(x2), rrn5S(x2), rrn23S(x2)</i>
	tRNA	<i>tRNA-Val(x2), tRNA-Gly(x2), tRNA-Tyr, tRNA-Lys, tRNA-Trp, tRNA-Thr(x2), tRNA-Ser(x3), tRNA-Phe, tRNA-Met(x4), tRNA-His, tRNA-Glu, tRNA-Arg(x3), tRNA-Gln, tRNA-Pro, tRNA-Cys(x2), tRNA-Asp, tRNA-Asn(x2), tRNA-Ala(x2), tRNA-Leu(x4), tRNA-Ile(x2)</i>
Photosynthesis	Photosystem I	<i>psaI, psaB, psaJ, psaC, psaA</i>
	Photosystem II	<i>psbA, psbD, psbC, psbK, psbI, psbM, psbL, psbF, psbZ, psbJ, psbE, psbB, psbT, psbN, psbH</i>
	NADH dehydrogenase	<i>ndhJ, ndhF, ndhD, ndhK, ndhC, ndhG, ndhI, ndhA^{**}, ndhH, ndhB^{**}(x2), ndhE</i>
	Cytochrome b/f complex	<i>petB[*], petD[*], petN, petL, petG, petA</i>
	ATP synthase	<i>atpA, atpE, atpF[*], atpI, atpB, atpH</i>
	Large subunit of rubisco	<i>rbcL</i>
	Other genes	Translational initiation factor
Maturase	<i>matK</i>	
Protease	<i>clpP[*]</i>	
Envelope membrane protein	<i>cemA</i>	
Subunit of acetyl-carboxylase	<i>accD</i>	
C-type cytochrome synthesis	<i>ccsA</i>	
Open reading frames	<i>ycf15(x2), ycf4, ycf2(x2), ycf3[*], ycf1</i>	

Table 5 Repeat sequences in the chloroplast genomes between *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii*

Species	P	F	R	C	Total
<i>A. crispa</i> var. <i>amplifolia</i>	29	24	1	0	54
<i>A. crispa</i> var. <i>dielsii</i>	29	24	1	0	54

Table 6 Types and amounts of SSRs in the chloroplast genomes between *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii*

SSR type	<i>A. crispa</i> var. <i>amplifolia</i>	<i>A. crispa</i> var. <i>dielsii</i>
Mono	94	94
Di	41	41
Tri	71	71
Tetra	8	8
Penta	2	2
Hexa	0	0
Total	217	217

为参考基因组,对细柄百两金、灰色紫金牛、走马胎、罗伞树 *Ardisia quinquegona* Blume、纽子果、酸苔菜、月月红叶绿体全基因组序列同源性进行比较(图5)和基因序列比对研究(图6)。结果表明,紫金牛属物种叶绿体基因组 LSC、IRa、SSC、IRb 四个区域排列顺序较为一致、保守性较高,在非基因编码区存在有较明显的差异,变异程度较高,其中 SSC 区的变异程度最高,而在基因编码区差异不明显,在 IRa 区的变异程度最低,具有较高的保守性;紫金牛属叶绿体基因组中 *ycf1*、*clpP*、*rpoC1*、*ycf3*、*petD*、*ycf2*、*ndhA*、*rpl16* 等基因的编码区存在显著差异,此外,大叶百两金和细柄百两金两物种高度相似,仅 *rps15* 和 *rpoB* 基因的编码区存在差异,两位点可为大叶百两金和细柄百两金的分子鉴定

Table 7 Chloroplast genome RSCU > 1 codon between *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii*

Amino acid	<i>A. crispa</i> var. <i>amplifolia</i>		<i>A. crispa</i> var. <i>dielsii</i>	
	Codon	RSCU	Codon	RSCU
Phe	<i>UUU</i>	1.20	<i>UUU</i>	1.20
	<i>UUA</i>	1.28	<i>UUA</i>	1.40
	<i>UUG</i>	1.29	<i>UUG</i>	1.25
	<i>CUU</i>	1.25	<i>CUU</i>	1.23
Ile	<i>AUU</i>	1.24	<i>AUU</i>	1.23
			<i>AUA</i>	1.04
Val	<i>GUU</i>	1.37	<i>GUU</i>	1.35
	<i>GUA</i>	1.12	<i>GUA</i>	1.17
Ser	<i>UCU</i>	1.48	<i>UCU</i>	1.50
	<i>UCC</i>	1.11	<i>UCC</i>	1.12
Pro	<i>UCA</i>	1.11	<i>UCA</i>	1.25
	<i>CCU</i>	1.10	<i>CCU</i>	1.10
	<i>CCA</i>	1.28	<i>CCA</i>	1.21
			CCC	1.05
Thr	<i>ACU</i>	1.21	<i>ACU</i>	1.16
	<i>ACC</i>	1.06	<i>ACC</i>	1.04
	<i>ACA</i>	1.07	<i>ACA</i>	1.12
Ala	<i>GCU</i>	1.35	<i>GCU</i>	1.36
	<i>GCA</i>	1.10	<i>GCA</i>	1.11
Tyr	<i>UAU</i>	1.34	<i>UAU</i>	1.33
His	<i>CAU</i>	1.43	<i>CAU</i>	1.44
Gln	<i>CAA</i>	1.39	<i>CAA</i>	1.38
Asn	<i>AAU</i>	1.39	<i>AAU</i>	1.38
Lys	<i>AAA</i>	1.36	<i>AAA</i>	1.37
Asp	<i>GAU</i>	1.40	<i>GAU</i>	1.40
Glu	<i>GAA</i>	1.39	<i>GAA</i>	1.39
Cys	<i>UGU</i>	1.24	<i>UGU</i>	1.23
Arg	<i>CGA</i>	1.07	<i>CGA</i>	1.11
	<i>AGA</i>	2.02	<i>AGA</i>	2.04
	<i>AGG</i>	1.06	<i>AGG</i>	1.05
Gly	<i>GGA</i>	1.44	<i>GGA</i>	1.36
			<i>GGU</i>	1.02
TER	<i>UAA</i>	1.29	<i>UAA</i>	1.27

Table 8 CDS length and gene length of intron in the chloroplast genomes between *A. crispa* var. *amplifolia* and *A. crispa* var. *dielsii*

Intron gene		<i>A. crispa</i> var. <i>amplifolia</i>	<i>A. crispa</i> var. <i>dielsii</i>
<i>rps16</i>	CDS length	267	267
	Gene length	1 116	1 116
<i>atpF</i>	CDS length	630	630
	Gene length	1 265	1 265
<i>rpoC1</i>	CDS length	2 061	2 061
	Gene length	2 812	2 812
<i>ycf3</i>	CDS length	510	510
	Gene length	1 952	1 952
<i>clpP</i>	CDS length	588	588
	Gene length	2 122	2 122
<i>petB</i>	CDS length	648	648
	Gene length	1 408	1 408
<i>petD</i>	CDS length	483	483
	Gene length	1 316	1 316
<i>rpl16</i>	CDS length	408	408
	Gene length	1 405	1 405
<i>rpl2</i>	CDS length	825/825	825/825
	Gene length	1 480/1 480	1 480/1 480
<i>ndhB</i>	CDS length	1 533/1 533	1 533/1 533
	Gene length	2 212/2 212	2 212/2 212
<i>ndhA</i>	CDS length	1 092	1 092
	Gene length	2 210	2 210

提供新的位点资源。基因序列比对研究(图6)中大叶百两金与细柄百两金仅存在1个碱基的差异,该变异发生在125 730 bp处,大叶百两金在该位点有1个碱基C的插入,两者与同属物种叶绿体基因比对中部分碱基存在差异,如*ycf1*基因131 688 bp处大叶百两金与细柄百两金在该位点为碱基A,同属其他物种该位点为碱基G。

9 叶绿体基因组共线性分析

为了评估大叶百两金与细柄百两金和同属物种在进化上的差异程度,利用Mauve软件对大叶百两金、细

柄百两金和同属的灰色紫金牛、走马胎、罗伞树、扭子果、酸苔菜、月月红的叶绿体基因进行对照分析,通过多重基因组比对法检测出8个物种的叶绿体基因组之间有3个局部共线块(locally collinear block, LCB)(图7)。该属8个物种叶绿体全基因组序列的比对显示其物种之间的基因组具有高度的相似性,叶绿体基因组之间没有重排或倒置,但在区域(83 000~110 000; 130 000~156 000)中观察到高频的变异,其特征是在对齐的叶绿体基因组中基因序列的高度变异。

10 系统发育分析

根据本研究中大叶百两金和细柄百两金的叶绿体基因组,并选择已发表的紫金牛科紫金牛属、杜茎山属、蜡烛果属、酸藤子属、铁仔属叶绿体基因组和亲缘关系相近的报春花科报春花属丽花报春、宝兴报春、陕西报春构建NJ与ML系统发育树。邻接法结果显示(图8),紫金牛科5个属与报春花科报春花属共30个物种之间存在明确的系统进化关系,可确定为2个主要类群,紫金牛属、杜茎山属、报春花属、酸藤子属、蜡烛果属和铁仔属为一个类群,紫金牛属为一个类群;杜茎山属、报春花属聚为一个支,支持率100%,表明2个属之间亲缘关系密切;大叶百两金和细柄百两金在第二类群中以100%支持率和虎红舌、白花紫金牛两者聚为一束,亲缘关系相对属间其他物种更近,该束中大叶百两金和细柄百两金也以100%支持率聚为一小支,表明两者亲缘关系最近。以报春花属为外类群的最大似然法(ML法)发育树中(图9),紫金牛属为一个大类群,杜茎山属、蜡烛果属、酸藤子属、铁仔属聚在一起,各属植物都聚为一支,杜茎山属和报春花属相隔最近且大叶百两金和细柄百两金依然100%支持率和虎红

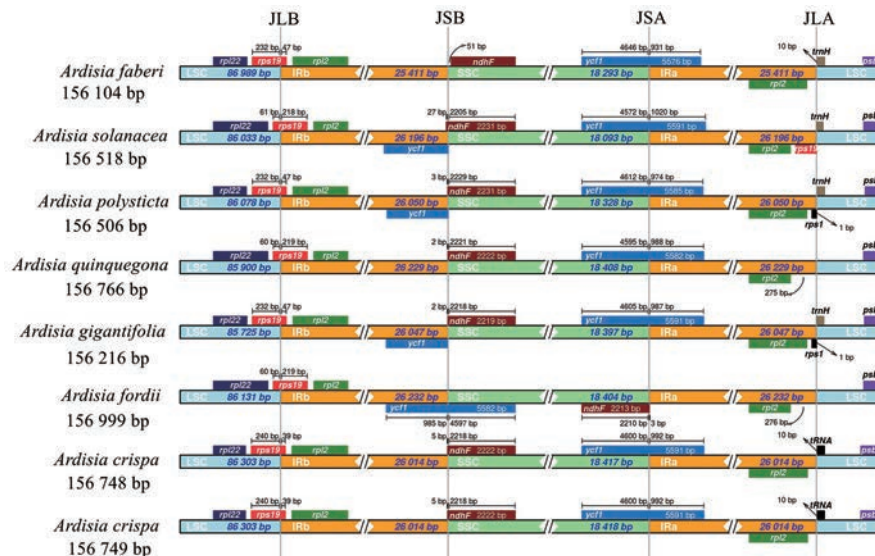


Figure 4 The chloroplast genome boundary analysis of eight plants from *Ardisia*

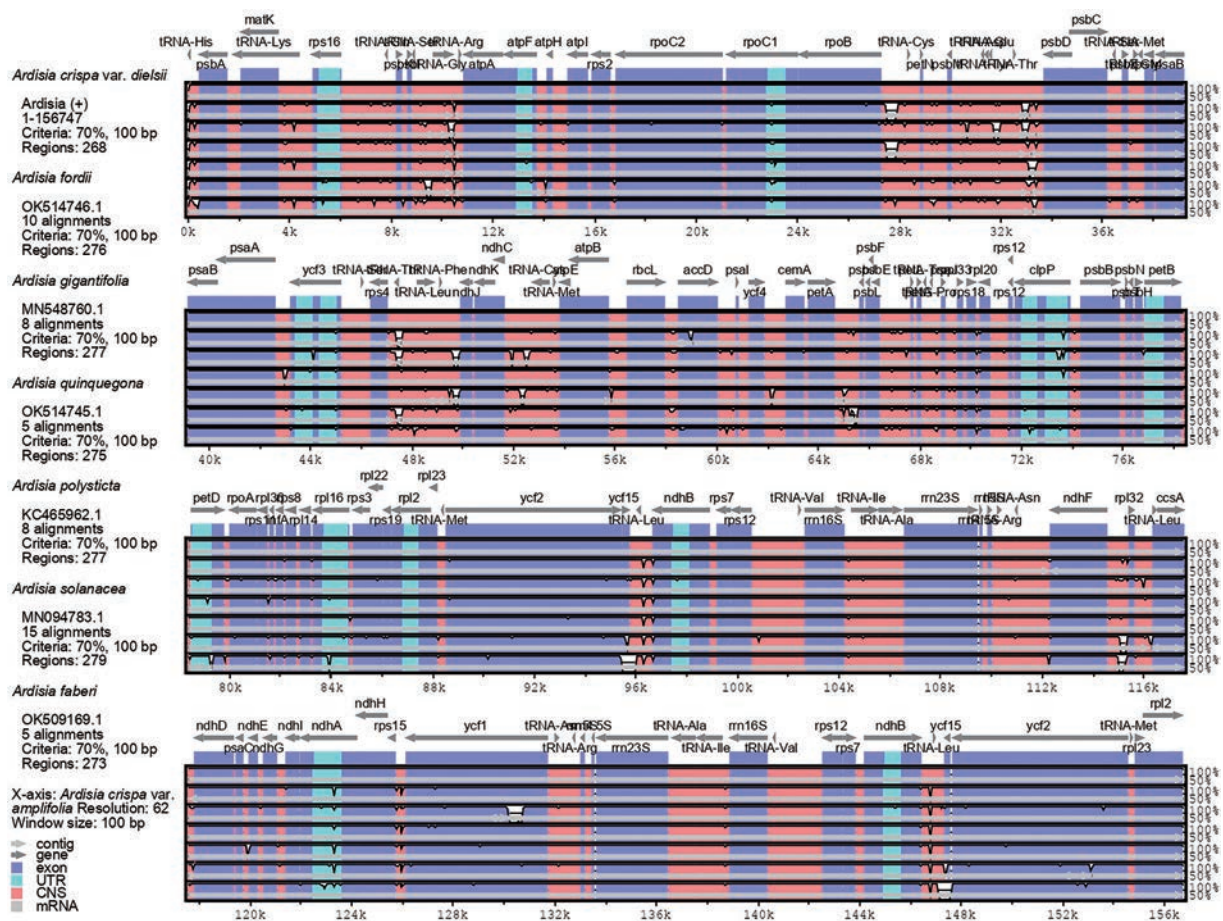


Figure 5 Global alignment in the chloroplast genomes of the eight *Ardisia* species

舌、白花紫金牛两者聚为一束。系统进化树结果表明叶绿体基因组构建的系统发育树可用于紫金牛物种植物的鉴定。

讨论

本研究完成了大叶百两金和细柄百两金叶绿体基因组的测序、组装和注释,并对其结构、GC含量等进行了分析,研究表明两者叶绿体基因组呈典型的环状四分体结构,序列总长度、GC含量、基因数量基本一致。其中,IRs区序列GC含量最高,各区域序列中GC含量从高到低依次为IRs > LSC > SSC;进一步分析发现,其原因可能是IR区含有高GC含量的rRNA基因。此外,包括本研究新测序的大叶百两金和细柄百两金在内的紫金牛属8个不同个体叶绿体全基因组、LSC、SSC和IRs区长度的种间差异范围分别为1~895 bp、0~1 264 bp、1~325 bp和0~821 bp,即总长度的差异主要来自于LSC区,而SSC和IRs区长度相对保守,这一发现与张明英等^[18]在对北柴胡、紫花阔叶柴胡叶绿体全基因组解析及柴胡属药用植物叶绿体基因组比较与系统发育分析研究中一致。

叶绿体简单序列重复(SSRs)拷贝数变异是一种重要的分子标记,已经被用于基因流、种群分化和遗传多样性研究^[23],此外,分布于植物叶绿体基因组中的SSRs还同时兼具单亲遗传模式,被作为分子标记广泛用于群体遗传学、谱系地理学等相关研究^[24,25]。本研究中大叶百两金和细柄百两金叶绿体基因组共检测到217个SSR位点,均未发现六核苷酸重复基序,SSR均以单核苷酸重复(占总数的43.32%)为主要类型,且随着拷贝数目增加,SSRs数量明显减少。单核苷酸和二核苷酸SSRs的重复序列类型分别以A/T和AT/TA为主,其余核苷酸SSRs的重复单元亦主要由A、T碱基组合构成,这也进一步验证了叶绿体基因组序列中的SSRs主要由polyA或polyT所构成,这些SSRs可以为紫金牛属药用植物分子遗传学相关研究提供候选分子标记^[18,26]。

叶绿体基因组IR、LSC和SSC区域扩张和收缩是植物进化中的常见现象,也是造成叶绿体基因组长度差异与结构变异的主要原因^[27,28],通过分析IR-LSC/SSC区域的边界信息,对研究叶绿体基因组结构的差异、物种进化等具有重要意义^[29,30],本文对紫金牛科8个物种

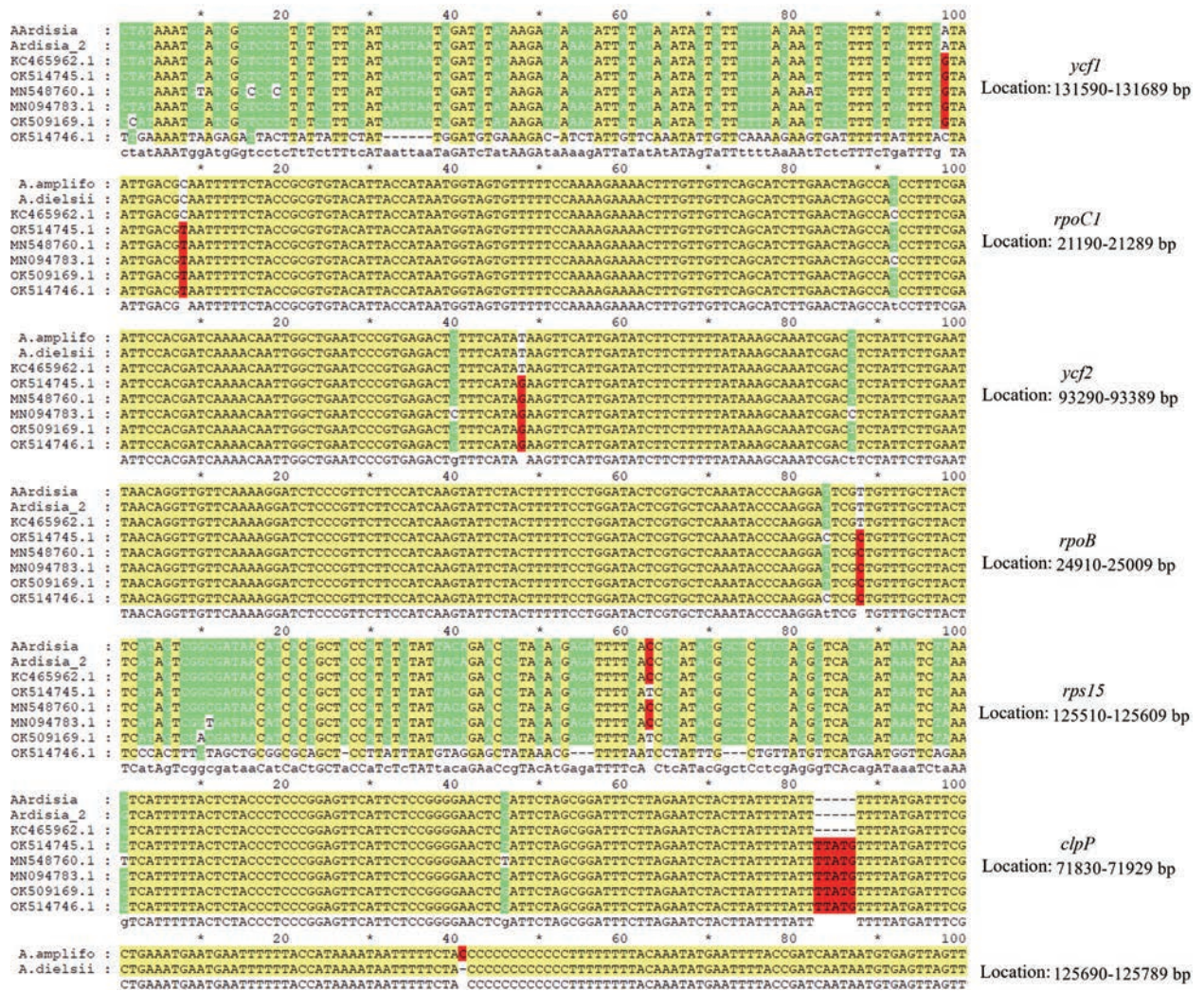


Figure 6 Partial gene sequence comparison fragment map

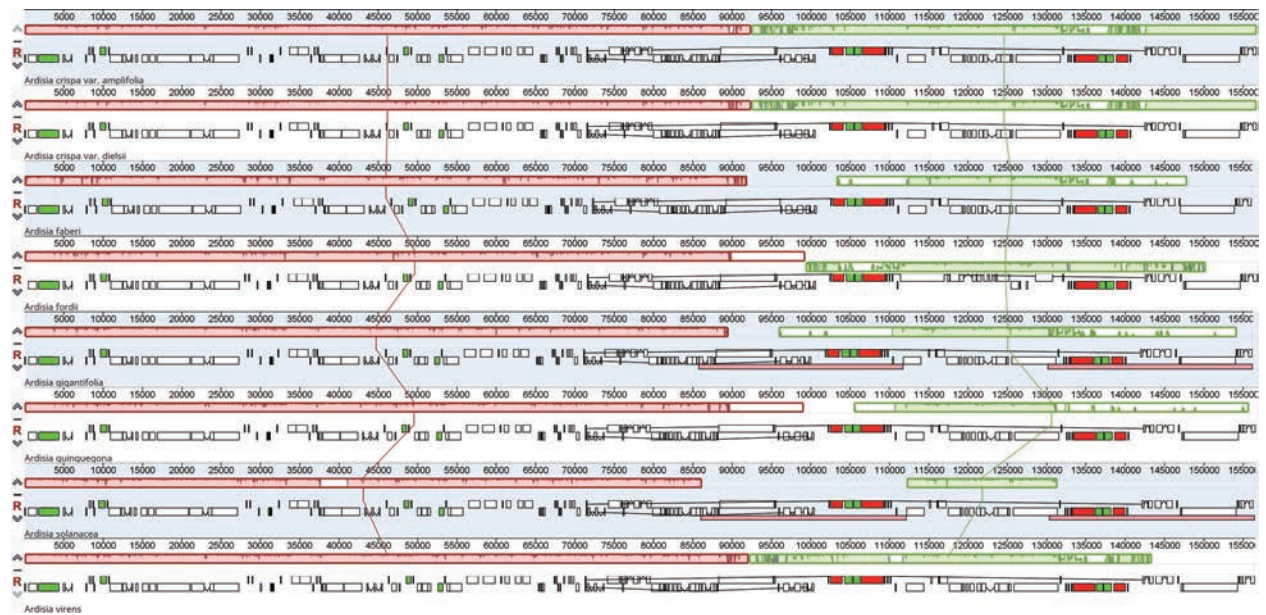


Figure 7 Collinearity analysis of chloroplast genomes from eight *Ardisia* species

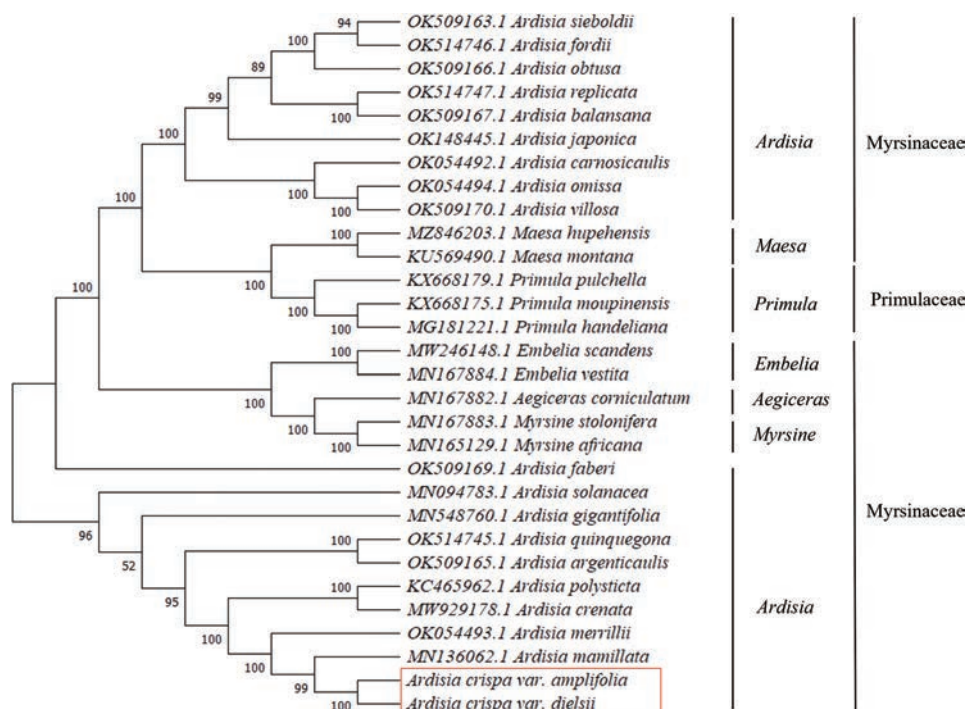


Figure 8 Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree was constructed based on the whole chloroplast genome sequence

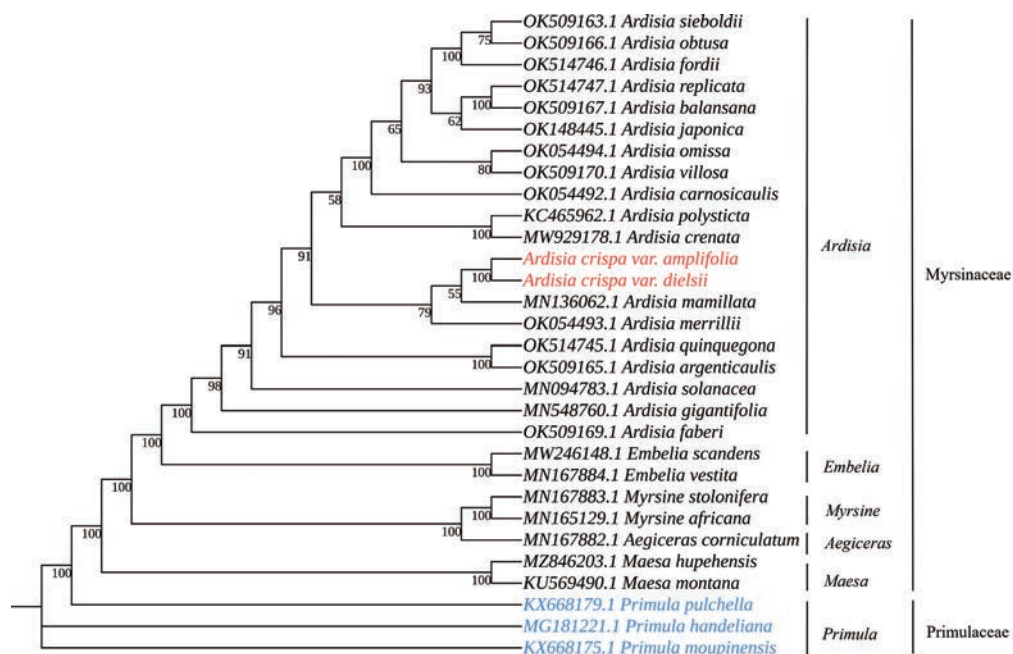


Figure 9 Maximum likelihood method (ML) phylogenetic tree was constructed based on the whole chloroplast genome sequence

植物叶绿体基因组边界分析发现LSC/IR和SSC/IR边界基因排列和类型有差异,如月月红的 $ndhF$ 基因仅存在于SSC区,灰色紫金牛则存在于 $ycf1$ 基因的编码区;同时,酸苔菜、罗伞树、灰色紫金牛的 $rps19$ 基因向IRb区扩张现象明显,与已有研究中马兜铃科^[31]、菊科^[32]、禾本科^[33]物种叶绿体基因组边界分析发现叶绿体基因组边界变化不呈现规律性相一致。

叶绿体基因组包括蛋白编码区和非编码区,编码

区具有多种不同的基因,具有光合、复制等作用^[34],大叶百两金和细柄百两金叶绿体全基因组序列在非基因编码区存在有较明显的差异,变异程度较高,其中SSC区的变异程度最高,通过基因组比较分析,得出两物种在 $rps15$ 和 $rpoB$ 基因的编码区存在差异,可作为两者分子鉴定的位点资源;Bretones等^[35]发现 $rps15$ 基因主要影响mRNA转录和细胞代谢,叶绿体基因组的特点是具相同或相关功能的基因组成复合操纵子结构,例

如 *rpoB-rpoC-rpoC2* 操纵子是由编码 RNA 聚合酶各个亚基的基因聚合在一起而形成的, 利于叶绿体基因的表达与调控^[36], 大叶百两金和细柄百两金之间存在的差异或是由此产生。基因组序列变异分析亦发现该属 8 个物种叶绿体基因组中 *ycf1*、*clpP*、*rpoC1*、*ycf3*、*petD*、*ycf2*、*ndhA*、*rpl16* 等基因的编码区存在显著差异, 可作为该属植物的鉴别位点。

紫金牛属植物是传统苗药药材, 属内物种丰富, 种间变异错综复杂, 导致物种鉴定及系统发育存在较多争议。已有研究表明, 叶绿体基因组常作为 DNA 条形码应用于物种鉴定和系统发育关系研究^[37]。为进一步界定大叶百两金和细柄百两金在紫金牛科紫金牛属中的系统位置, 基于紫金牛科和报春花科 30 个物种叶绿体基因组全长构建的系统发育树结果表明, 大叶百两金和细柄百两金亲缘关系密切, 此外两者与同属植物中虎红舌、白花紫金牛亲缘关系最为相近, 植物志中形态特征描述也支持两者亲缘关系相近, 如叶片均顶端渐尖、基部楔形、具有边缘腺点、花瓣白色、卵形等特征^[38]。报春花科报春花属 3 个物种与杜茎山属的亲缘关系比紫金牛科紫金牛属、酸藤子属、蜡烛果属和铁仔属更为密切, 这与 Xie 等^[39]认为紫金牛属为报春花科、植物化学方面研究中紫金牛科与报春花科在亲缘关系上相近以及目前紫金牛属已合并到报春花科 (<http://www.iplant.cn/info/Primulaceae>) 说法一致, 但亦有说法紫金牛属为紫金牛科, 紫金牛属是否可以划分为报春花科需要进一步结合贝叶斯树及溯祖理论进行分析。

作者贡献: 曾宪法负责实验工作、数据分析、论文撰写与修改; 刘畅参与实验及数据分析; 杨小英、余庆参与稿件修改; 扶世伦参与数据分析; 鄢藤云参与样品采集; 蒲翔负责实验设计、论文指导和稿件修改。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Li M, Li H, Chen R, et al. Investigation and application evaluation of *Ardisia* resources in Guizhou [J]. *Guizhou Agric Sci* (贵州农业科学), 2019, 47: 140-144.
- [2] Ye LS, Du M, Li R, et al. Overview of pharmacological research on *Ardisia crispa* (Thunb.) DC.A. [J]. *Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2013, 41: 7754-7755, 7758.
- [3] Zheng CY, Su X, Liu YP, et al. Characteristics of complete chloroplast genome and phylogenetic analysis of *Cirsium souliei* (Asteraceae) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 2022, 57: 2224-2233.
- [4] Zhang Y, Su X, Liu YP, et al. Characteristics of complete chloroplast genome and phylogenetic analysis of *Rhodiola himalensis* (Crassulaceae) [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 2022, 42: 602-612.
- [5] Zhang YJ, Li DZ. Advances in phylogenomics based on complete chloroplast genomes [J]. *Plant Diver Resour* (植物分类与资源学报), 2011, 33: 365-375.
- [6] Hu SW, Ding YN, Bi GY, et al. Characterization and phylogenetic analysis of complete chloroplast genome of medicinal plant *Polygonum aviculare* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, 53: 2776-2785.
- [7] Du X, Zeng T, Feng Q, et al. The complete chloroplast genome sequence of yellow mustard (*Sinapis alba* L.) and its phylogenetic relationship to other *Brassicaceae* species [J]. *Gene*, 2020, 731: 144340.
- [8] Liu YP, Lv T, Zhu D, et al. Sequencing and alignment analysis of the complete chloroplast genome of *Littledalea tibetica*, an endemic species from the Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 2018, 38: 518-525.
- [9] Zhang T, Xing Y, Xu L, et al. Comparative analysis of the complete chloroplast genome sequences of six species of *Pulsatilla* Miller, Ranunculaceae [J]. *Chin Med*, 2019, 14: 53.
- [10] Nie L, Cui Y, Chen X, et al. Complete chloroplast genome sequence of the medicinal plant *Arctium lappa* [J]. *Genome*, 2020, 63: 53-60.
- [11] Zhou J, Cui Y, Chen X, et al. Complete chloroplast genomes of *Papaver rhoeas* and *Papaver orientale*: molecular structures, comparative analysis, and phylogenetic analysis [J]. *Molecules*, 2018, 23: 437.
- [12] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30: 2114-2120.
- [13] Dierckxsens N, Mardulyn P, Smits G. Unraveling heteroplasmy patterns with NOVOPlasty [J]. *NAR Genom Bioinform*, 2019, 2: lqz011.
- [14] Liu C, Shi L, Zhu Y, et al. CpGAVAS, an integrated web server for the annotation, visualization, analysis, and GenBank submission of completely sequenced chloroplast genome sequences [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 715.
- [15] Tillich M, Lehwark P, Pellizzer T, et al. GeSeq-versatile and accurate annotation of organelle genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: W6-W11.
- [16] Schattner P, Brooks AN, Lowe TM. The tRNAscan-SE, snoScan, snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: W686-W689.
- [17] Du Q, Wang LQ, Chen ZE, et al. Characterization and phylogenetic analysis of the complete chloroplast genome of *Lycopus europaeus* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2022, 57: 2206-2215.
- [18] Zhang MY, Zhang YQ, Li YM, et al. Complete plastid genomes of *Bupleurum chinense* DC. and *B. boissieuianum* H. Wolff, with comparative and phylogenetic analyses of medicinal *Bupleurum* species [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2021, 56: 618-629.
- [19] Li RJ, Wu LW, Xin TY, et al. Analysis of chloroplast genomes

- and development of specific DNA barcodes for identifying the original species of *Rhei Radix et Rhizoma* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 1495-1505.
- [20] Tian X, Liu YY, Zhang YM, et al. Comparative and phylogeny analysis of four *Veratrum* medicinal plants complete chloroplast genomes [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2022, 53: 1127-1137.
- [21] Yang JP, Zhu ZL, Fan YJ, et al. Comparative plastomic analysis of three *Bulbophyllum* medicinal plants and its significance in species identification [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 2736-2745.
- [22] Song Y, Jia MJ, Cao YP, et al. Analysis on chloroplast genomic characteristics of *Forsythia Suspensa* [J]. Acta Hort Sin (园艺学报), 2022, 49: 187-199.
- [23] Yuan QJ, Zhang ZY, Hu J, et al. Impacts of recent cultivation on genetic diversity pattern of a medicinal plant, *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) [J]. BMC Genet, 2010, 11: 1-13.
- [24] Du Q, Wang B, Wei Z, et al. Genetic diversity and population structure of Chinese white poplar (*Populus tomentosa*) revealed by SSR markers [J]. J Hered, 2012, 103: 853-862.
- [25] Chmielewski M, Meyza K, Chybicki IJ, et al. Chloroplast microsatellites as a tool for phylogeographic studies: the case of white oaks in Poland [J]. iForest, 2015, 8: 765-771.
- [26] Kuang DY, Wu H, Wang YL, et al. Complete chloroplast genome sequence of *Magnolia kwangsiensis* (Magnoliaceae): implication for DNA barcoding and population genetic [J]. Genome, 2011, 54: 663-673.
- [27] Kim KJ, Lee HL. Complete chloroplast genome sequences from Korean ginseng (*Panax schinseng* Nees) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants [J]. DNA Res, 2004, 11: 247-261.
- [28] Xue S, Shi T, Luo W, et al. Comparative analysis of the complete chloroplast genome among *Prunus mume*, *P. armeniaca*, and *P. salicina* [J]. Hort Res, 2019, 6: 89.
- [29] Liang FP, Wen XN, Gao HY, et al. Analysis of chloroplast genomes features of Asteraceae species [J]. Genomics Appl Biol (基因组学与应用生物学), 2018, 37: 5437-5447.
- [30] Ravi V, Khurana JP, Tyagi AK, et al. An update on chloroplast genomes [J]. Plant Syst Evol, 2008, 271: 101-122.
- [31] Zhao R, Yin SY, Jiang CH, et al. Comparative analysis of chloroplast genomes of medicinal plants of Aristolochiaceae [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 2932-2937.
- [32] Su Y, Liu JJ, Wan B, et al. Chloroplast genome structure characteristic and phylogenetic analysis of *Mulgedium tataricum* [J]. J Agri Sci Tech (中国农业科技导报), 2021, 23: 33-42.
- [33] LI YH. Bioinformatics Analysis of *Triticum* Species Chloroplast Genomes (小麦属叶绿体基因组生物信息学分析) [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021.
- [34] Zhang T, Fang Y, Wang X, et al. The complete chloroplast and mitochondrial genome sequences of *Boea hygrometrica*: insights into the evolution of plant organellar genomes [J]. PLoS One, 2012, 7: e30531.
- [35] Bretones G, Álvarez MG, Arango JR, et al. Altered patterns of global protein synthesis and translational fidelity in RPS15-mutated chronic lymphocytic leukemia [J]. Blood, 2018, 132: 2375-2388.
- [36] Su N, Meng K, Shen GF. The regulation of chloroplast gene expression [J]. Biotech Bull (生物技术通报), 1999, (01): 16-19.
- [37] Kane NC, Cronk Q. Botany without borders: barcoding in focus [J]. Mol Ecol, 2008, 17: 5175-5176.
- [38] Editorial Board of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. FRPS (Vol. 58) (中国植物志) [M]. Beijing: Science Press, 2004: 27070-27092.
- [39] Xie CZ, An WL, Liu SS, et al. Comparative genomic study on the complete plastomes of four officinal *Ardisia* species in China [J]. Sci Rep, 2021, 11: 22239.