

林锦杭, 耿晓珊, 郭艺鹏, 等. 基于全基因组的假蒟叶绿体进化: 特征及系统发育分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(10): 1907-1919.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.10.004

基于全基因组的假蒟叶绿体进化: 特征及系统发育分析

林锦杭¹, 耿晓珊², 郭艺鹏¹, 刘 秦²

(1. 玉林师范学院/广西壮族自治区设施农业工程中心, 广西 玉林 537000; 2. 广西农业职业技术大学农业工程学院, 广西 南宁 530000)

摘要: 为了明确假蒟的基因组学信息, 本研究对假蒟叶绿体基因组进行 de novo 测序、组装和注释, 并对其基因组结构、基因组成、重复序列特征、简单重复序列(SSR)位点以及系统发育关系进行全面分析。结果显示, 假蒟叶绿体基因组碱基序列总长度为161 389 bp, 具有典型的四分体结构, 即大单拷贝区(LSC)、小单拷贝区(SSC)和2个反向重复区(IRa和IRb), 总G+C含量为38.30%, 包含82个蛋白质编码基因。在对其散在重复序列鉴定中共检测到16个正向重复序列、24个回文重复序列、2个反向重复序列和2个互补重复序列, 而在SSR检测中, 共发现51个SSR位点, 其核苷酸重复类型主要为A/T。密码子偏好性分析结果表明, 编码亮氨酸(Leu)的密码子使用频率最高, 而编码半胱氨酸(Cys)的密码子使用频率最低, 在高频密码子中多使用A或U结尾。通过属内叶绿体基因组IR边界比较分析, 结果发现胡椒属IR边界区域相对保守, 仅存在微小的变异。核苷酸多态性分析共检测出胡椒属存在6个高变异区: *rps16(exon1)-trnQ-psbZ-trnG*、*rps4-trnT*、*petA-psbJ*、*psbJ-psbL* 以及 *ndhF-rpl32*, 这些高变异区可用于开发胡椒属物种系统发育和DNA条形码研究的分子标记。基于胡椒目植物叶绿体基因组的系统发育分析确定假蒟与萎叶、海南蒟、变叶胡椒的亲缘关系较近。本研究结果为这种重要药食同源植物的系统发育和叶绿体基因工程研究提供了宝贵信息。

关键词: 假蒟; 胡椒属; 叶绿体基因组; 密码子偏好性; 系统发育分析

中图分类号: Q949.732.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)10-1907-13

Evolutionary characteristics and phylogenetic analysis of chloroplasts in *Piper sarmentosum* based on whole genome sequencing

LIN Jinhang¹, GENG Xiaoshan², GUO Yipeng¹, LIU Qin²

(1. Yulin Normal University/Guangxi Zhuang Autonomous Region Engineering Research Center of Facility Agriculture, Yulin 537000, China; 2. College of Agricultural Engineering, Guangxi Vocational University of Agriculture, Nanning 530000, China)

Abstract: To elucidate the genomic information of *Piper sarmentosum*, this study conducted de novo sequencing, assembly, and annotation of its chloroplast genome, followed by a comprehensive analysis of its genomic structure, gene composition, repetitive sequence characteristics, simple sequence repeat (SSR) loci, and phylogenetic relationships. The results showed that the total length of the chloroplast genome sequence of *Piper sarmentosum* was 161 389 bp, exhibiting a

typical quadripartite structure consisting of a large single-copy (LSC) region, a small single-copy (SSC) region, and two inverted repeat (IRa and IRb) regions. The overall G+C content was 38.30%, and the genome contained 82 protein-coding genes. A total of 16 forward repeats, 24 palindromic repeats, two reverse repeats, and two complementary repeats were identified during the analysis of its dispersed repetitive sequences. Meanwhile, 51 SSR loci

收稿日期: 2025-04-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(32101691); 广西自然科学基金项目(2025GXNSFAA069625); 2023年度广西高校中青年教师基础能力提升项目(2023KY05604)

作者简介: 林锦杭(2002-), 男, 广东潮州人, 本科, 主要从事植物基因组学研究。(E-mail) 15919529485@163.com

通讯作者: 刘 秦, (E-mail) liuqin@ylyu.edu.cn; 郭艺鹏, (E-mail) 514508412@qq.com

were detected, with A/T nucleotides being the predominant repeat type. The results of codon usage bias analysis revealed that codons encoding leucine (Leu) were the most frequently used, while those encoding cysteine (Cys) were the least frequent. Among the high-frequency codons, most ended with A or U. Through comparative analysis of chloroplast genome IR boundaries within the genus, it was found that the IR boundary regions of *Piper* were relatively conserved, with only minor variations. Six highly variable regions were detected in the *Piper* genus through nucleotide polymorphism analysis: *rps16(exon1)-trnQ*, *psbZ-trnG*, *rps4-trnT*, *petA-psbJ*, *psbJ-psbL*, and *ndhF-rpl32*. These regions can be utilized to develop molecular markers for phylogenetic and DNA barcoding research in *Piper*. Phylogenetic analysis based on chloroplast genomes of Piperales plants confirmed that *Piper sarmentosum* was closely related to *Piper betle*, *Piper hainanense*, and *Piper mutabile*. The results of this study provide valuable information for the phylogeny and chloroplast genetic engineering of this important plant with both medicinal and edible values.

Key words: *Piper sarmentosum*; *Piper* L.; chloroplast genome; codon usage bias; phylogenetic analysis

叶绿体是植物细胞中一种具有独立遗传体系的双层膜细胞器,是植物进行光合作用以及碳水化合物、氨基酸、脂肪酸等重要代谢活动的主要场所^[1-2]。内共生理论认为,叶绿体起源于远古时期被真核细胞吞噬的蓝藻^[3]。在长期共生进化过程中,蓝藻的大部分基因转移至宿主细胞核基因组,仅有少量基因保留在叶绿体基因组中^[4]。在高等植物中,叶绿体基因组通常高度保守,呈现出典型的四分体结构,即由一个大单拷贝区(LSC)、一个小单拷贝区(SSC)和两个反向重复区(IRa和IRb)组成,基因组碱基序列长度在107 kb至218 kb,包含120~130个基因^[5]。这些基因可编码两类核心产物,一是光合作用关键酶(如Rubisco大亚基),二是叶绿体基因表达调控相关组分(如RNA聚合酶、核糖体蛋白),对植物的光合效率、生长发育和环境适应性至关重要^[1,6-8]。

随着高通量基因组测序技术的快速发展和生物信息学分析方法的日益完善,植物叶绿体基因组学研究取得了很大进展^[2]。截至目前,已有大量叶绿体基因组被解析和研究,为深入理解其结构、功能及进化特性提供了丰富的数据基础^[9-12]。叶绿体基因工程作为一种重要的植物遗传改良手段,通过将外源基因精确插入到叶绿体基因组的特定位点(通常为非编码区),已在部分作物中实现了抗逆性增强、产量提升及营养品质改良。例如,前人研究结果表明,在棉花叶绿体中表达苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)蛋白,可显著提高其对棉铃虫的抗性,降低化学农药的使用量^[5]。在生物医药领域,烟草叶绿体中表达的Gal/GalNAc糖蛋白已成功应用于疫苗开发,为新型疫苗的生产提供了新策略^[13]。在营养品质改良

方面,番茄叶绿体工程显著提高了果实中类胡萝卜素(其中 β -胡萝卜素含量增加超过50%),从而有效增强维生素A前体的营养价值^[14]。此外,叶绿体基因工程还具有独特的生物安全优势,如通过母系遗传有效降低转基因扩散的风险,减少对环境的潜在影响,并有助于实现环境友好型农业生产^[15]。综上所述,叶绿体工程已在作物抗病虫、生物材料合成以及可持续农业等领域展现出巨大的应用潜力,并为解决全球粮食安全和环境问题提供了新思路。

假蒟(*Piper sarmentosum* Roxb.),又名假蒟,是胡椒科胡椒属多年生草本植物,原产于东南亚,现广泛分布于中国南方沿海地区^[16]。假蒟具有独特的风味和药用价值,是一种重要的药食同源植物。传统医学认为,假蒟的根、茎、叶及果实均可入药,具有祛风除湿、消肿止痛等功效^[17]。现代植物化学研究结果表明,假蒟富含生物碱(如胡椒碱)、酚类、黄酮类等多种活性成分,具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗氧化等多种药理活性^[18-20]。近年来,对假蒟的植物化学成分和药理活性研究日益深入,然而,针对其基因组学的研究相对滞后,已有的研究多集中在成分分析和药理活性评价方面,缺乏基因组层面的深入探讨,尤其缺乏对叶绿体基因组的全面解析。这种现状严重制约了假蒟的遗传改良和药用价值开发,同时也限制了对其系统进化地位的准确评估^[21]。

本研究对假蒟的叶绿体基因组进行de novo测序、组装和注释,并对其基因组结构、基因组成、重复序列特征、简单重复序列(SSR)位点以及系统发育关系进行了全面分析,旨在为假蒟的遗传资源保护、品种鉴定、遗传改良、分子标记开发以及药用成分合成途径解析提供重要的基因组学信息,并为进一步

开发假蒟的药用和食用价值奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜的假蒟叶片采自玉林师范学院园艺种质资源中心(110.185°E, 22.669°N)。相应的凭证标本(编号:JL-YNU-001)已存放于玉林师范学院标本馆。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 提取和测序 采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)方法^[22]提取假蒟(*Piper sarmentosum*)叶片总基因组 DNA。提取后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的降解程度及片段大小,确保 DNA 片段完整且无明显降解。使用 NanoDrop 2000 分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司产品)在 260 nm 和 280 nm 波长下测量吸光度值,评估 DNA 的纯度, A_{260}/A_{280} 比值应为 1.8~2.0。采用 Qubit 4.0 荧光计(美国 Life Technologies 公司产品)和相应的 dsDNA Assay 试剂盒进行精确定量,以确保 DNA 浓度符合后续文库构建的需求。文库构建及测序工作由上海凌恩生物科技有限公司完成。具体而言,使用 Illumina HiSeq 4000 测序平台进行 150 bp 双端(Paired-end, PE)测序。

1.2.2 叶绿体基因组组装、注释 为确保数据质量,使用 Trimmomatic(v0.39)软件^[23]对 Illumina 测序平台产生的原始 reads 进行严格的质量控制,去除接头序列及低质量碱基。具体参数设置:LEADING 为 2, TRAILING 为 3, SLIDINGWINDOW 为 4:15, MINLEN 为 100。高质量 reads 用于后续的叶绿体基因组组装。叶绿体基因组的 de novo 组装采用 GetOrganelle(v1.7.5)工具包^[24],以提升组装效率和准确性。组装完成后,使用 CPGAVAS2 在线平台^[25]对叶绿体基因组进行注释,包括基因定位、功能预测等。为便于同行参考,本研究组装完成的假蒟叶绿体基因组已提交至 GenBank 数据库,登录号为 MZ958833。

1.2.3 简单重复序列(SSR)和散在重复序列(DR)的鉴定 为鉴定假蒟叶绿体基因组中的 SSR,本研究采用 MISA 在线工具^[26](<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>)进行分析。SSR 的鉴定标准为:单核苷酸重复 10 次,二核苷酸重复 5 次,三核苷酸重复 4 次,四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸分别重复 3 次。为进一步研究胡椒属植物叶

绿体基因组的重复序列特征,使用 REPuter 在线工具^[27](<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/reputer>)分析胡椒属 6 个代表性物种的叶绿体基因组,鉴定 4 种类型的散在重复序列:正向重复、反向重复、回文重复和互补重复。REPuter 分析参数设置为:最小重复长度为 30 bp,海明距离(Hamming distance)为 3,最大计算重复次数为 5 000。该参数组合是叶绿体基因组分析的常用设置,旨在识别长度较长且包含少量突变的重要重复序列^[9,28]。

1.2.4 密码子使用分析 本研究使用 CodonW(v1.4.2)软件(可在 <http://codonw.sourceforge.net> 获取)分析假蒟叶绿体基因组中编码序列(CDS)的相对同义密码子使用度(RSCU)^[29]。为保证统计稳健性并避免计算偏差,本研究遵循该领域的经典标准^[28],剔除了重复的以及长度小于 300 bp(100 个密码子)的 CDS 序列。筛选后仅保留以起始密码子 ATG 开头,且以终止密码子 UAA、UGA 或 UAG 结尾的完整 CDS 序列用于后续分析。最终,使用 RStudio(v9.4.191338)软件对 RSCU 分析结果进行可视化。为检验密码子使用的偏好性是否具有统计学意义,进一步对各氨基酸的同义密码子使用频数进行卡方检验(Chi-square test),判断不同同义密码子的使用频率是否显著偏离随机分布。

1.2.5 胡椒属植物叶绿体基因组的边界收缩与扩张 叶绿体基因组中 IR 区边界的收缩与扩张是常见的进化事件,可导致基因组碱基序列长度的变异^[30]。为明确胡椒属植物叶绿体基因组的结构变异特征,本研究使用 CPJSDraw(v0.0.1)软件^[31]对 6 个胡椒属物种的植物叶绿体基因组 IR 区边界信息进行对比分析与可视化,涉及物种包括:假蒟(本研究组装,GenBank 登录号: MZ958833)、变叶胡椒(*Piper mutabile*, GenBank 登录号: NC_066433)、复毛胡椒(*Piper bonii*, GenBank 登录号: NC_066434)、海南蒟(*Piper hainanense*, GenBank 登录号: OM717262)、萎叶(*Piper betle*, GenBank 登录号: NC_066435)及芒叶蒟(*Piper boehmeriifolium*, GenBank 登录号: NC_066431)。

1.2.6 胡椒属植物叶绿体基因组多态性位点分析 单核苷酸多态性(SNP)是辅助植物分子育种、遗传关联分析的理想分子标记^[32]。本研究利用生信云平台(<http://112.86.217.82:9929/#/>),以窗口大

小 600 bp、步长 200 bp 为参数,对上述 6 个胡椒属物种的植物叶绿体基因组同源序列进行核苷酸多样性(P_i)计算,基于计算结果绘制核苷酸多态性曲线图,以直观呈现胡椒属植物叶绿体基因组不同区域的遗传变异差异。

1.2.7 系统发育分析 为构建假蒟的系统发育关系,本研究共纳入胡椒目 17 个物种的植物叶绿体基因组,包括从 NCBI 数据库下载的假蒟近缘类群 5 个物种(变叶胡椒、海南蒟、萎叶、复毛胡椒、苾叶蒟)、外类群相关物种 11 个(马兜铃科的马蹄香、细辛、西藏马兜铃、大别山马兜铃、巨花马兜铃、美丽马兜铃,三白草科的裸蒟、三白草、鱼腥草,林仙科的格林纳达林仙,白樟科的椒叶樟)的植物叶绿体基因组。利用 PhyloSuite_v1.2.3^[33] 软件构建系统发育树,将所有物种的植物叶绿体基因组序列导入该软件,利用其内置的 MAFFT 工具进行序列比对,对齐后的 CDS 序列进一步使用 MACSE 工具优化处理,合并所有优化后的序列,通过 ModelFinder 筛选得到最优进化模型,将序列与最优模型导入 IQ-TREE,采用最大似然法建树,Bootstrap 分析选择 Ultrafast 模式,设置重复次数为 5 000 次,系统发育树构建完成后,通过 ChiPlot 在线可视化平台(<https://www.chiplot.online>)进行图表美化。

2 结果与分析

2.1 假蒟及胡椒属植物叶绿体基因组结构与特征

从图 1 可见,假蒟叶绿体基因组是典型的双链环状,具有四分体结构,包含一个大单拷贝区(LSC 碱基序列长度为 88 979 bp)、一个小单拷贝区(SSC 碱基序列长度为 18 274 bp)和两个反向重复区(IRa 和 IRb 碱基序列长度均为 27 068 bp),叶绿体基因组碱基序列总长为 161 389 bp,总 G+C 含量为 38.30%。

与其他 5 种胡椒属植物相比(表 1),6 种植物的叶绿体基因组碱基序列长度在 161 291 bp(海南蒟)至 161 426 bp(苾叶蒟)之间,变异幅度较小,基因组总 G+C 含量在 38.30%~38.36%,表明胡椒属植物叶绿体基因组碱基序列长度和碱基组成均具有一定的保守性。LSC 区碱基序列长度范围为 88 915 bp(海南蒟)到 89 028 bp(苾叶蒟),G+C 含量范围为 36.77%(假蒟)到 36.85%(复毛胡椒);SSC 区碱基序列长度范围为 18 206 bp(萎叶)到

18 274 bp(假蒟、苾叶蒟),G+C 含量范围为 32.06%(假蒟)到 32.26%(萎叶);IR 区碱基序列长度范围为 27 062 bp(苾叶蒟)到 27 088 bp(变叶胡椒),G+C 含量范围为 42.90%(海南蒟)到 42.93%(假蒟)。

通过基因功能注释与分类(表 2),共鉴定出 82 个蛋白质编码基因,按基因功能可分为 4 类,包括光合作用基因、自我复制基因、其他基因、未知基因。其中参与光合作用的基因有 42 个,参与自我复制的基因 29 个,其他基因 5 个,功能未知的基因 6 个。在假蒟叶绿体基因组中,9 个基因含有一个内含子(*ndhA*、*ndhB*、*petB*、*petD*、*atpF*、*rpl16*、*rpl2*、*rpoC1*、*rps16*),2 个基因含有 2 个内含子(*paq I*、*rps12*)。

2.2 假蒟叶绿体基因组的简单重复序列与散在重复序列

对假蒟叶绿体基因组的简单重复序列进行分析,共检测到 51 个简单重复序列(SSR)位点(表 3)。其中,单核苷酸重复序列为最主要的类型,共 29 个,占总数的 56.86%,且均为 A/T 重复;二核苷酸重复序列共 11 个,占总数的 21.57%,主要为 AT/AT 重复,另有少量 AC/GT 重复;三核苷酸重复序列和四核苷酸重复序列数量相对较少,分别为 5 个和 6 个。

对 6 种胡椒属植物叶绿体基因组的散在重复序列进行分析(图 2)发现,各物种在重复序列的数量和类型上存在一定差异。复毛胡椒的散在重复序列数量最多(47 个),提示其叶绿体基因组在进化过程中可能较为活跃,变异速率相对较高;变叶胡椒的散在重复序列数量最少(31 个),提示其叶绿体基因组可能相对保守。在重复序列类型方面,正向重复和回文重复是各物种中最常见的类型,互补重复仅存在于假蒟、海南蒟和复毛胡椒中。

2.3 假蒟叶绿体基因组的密码子使用偏好性

对假蒟叶绿体基因组的密码子使用情况进行分析发现,基因组中共包含 24 028 个密码子,可编码 20 种氨基酸。不同密码子的使用频率存在显著差异。编码亮氨酸(Leu)的密码子使用频率最高,其同义密码子包括 UUA、UUG、CUU、CUC、CUA 和 CUG,总数为 2 437 个,占总密码子数量的 10.14%;而编码半胱氨酸(Cys)的密码子使用频率最低,其同义密码子为 UGU 和 UGC,总数为 278 个,仅占总密码子数量的 1.16%。

表 2 假蒟叶绿体基因组基因功能注释与分类表

Table 2 Gene function annotation and classification of *Piper sarmentosum* chloroplast genome

基因功能分类	基因种类	基因名称	基因数 (个)
光合作用基因	光系统 I 亚基基因	<i>psaA</i> 、 <i>psaB</i> 、 <i>psaC</i> 、 <i>psaI</i> 、 <i>psaJ</i>	5
	光系统 II 亚基基因	<i>psbA</i> 、 <i>psbB</i> 、 <i>psbC</i> 、 <i>psbD</i> 、 <i>psbE</i> 、 <i>psbF</i> 、 <i>psbI</i> 、 <i>psbJ</i> 、 <i>psbK</i> 、 <i>psbM</i> 、 <i>psbT</i> 、 <i>psbZ</i>	12
	NADH 脱氢酶基因	<i>ndhA</i> ¹⁾ 、 <i>ndhB</i> (×2) ¹⁾ 、 <i>ndhC</i> 、 <i>ndhD</i> 、 <i>ndhE</i> 、 <i>ndhF</i> 、 <i>ndhG</i> 、 <i>ndhH</i> 、 <i>ndhI</i> 、 <i>ndhJ</i> 、 <i>ndhK</i>	12
	细胞色素亚基基因	<i>petA</i> 、 <i>petB</i> ¹⁾ 、 <i>petD</i> ¹⁾ 、 <i>petG</i> 、 <i>petL</i> 、 <i>petN</i>	6
	ATP 合成酶亚基基因	<i>atpA</i> 、 <i>atpB</i> 、 <i>atpE</i> 、 <i>atpF</i> ¹⁾ 、 <i>atpH</i> 、 <i>atpI</i>	6
	Rubisco 大亚基基因	<i>rbcL</i>	1
	自我复制基因	核糖体大亚基基因	<i>rpl14</i> 、 <i>rpl16</i> ¹⁾ 、 <i>rpl2</i> (×2) ¹⁾ 、 <i>rpl20</i> 、 <i>rpl22</i> 、 <i>rpl23</i> (×2)、 <i>rpl32</i> 、 <i>rpl33</i> 、 <i>rpl36</i>
RNA 聚合酶亚基基因		<i>rpoA</i> 、 <i>rpoB</i> 、 <i>rpoC1</i> ¹⁾ 、 <i>rpoC2</i>	4
核糖体小亚基基因		<i>rps11</i> 、 <i>rps12</i> (×2) ²⁾ 、 <i>rps14</i> 、 <i>rps15</i> 、 <i>rps16</i> ¹⁾ 、 <i>rps18</i> 、 <i>rps19</i> 、 <i>rps2</i> 、 <i>rps3</i> 、 <i>rps4</i> 、 <i>rps7</i> (×2)、 <i>rps8</i>	14
其他基因	乙酰辅酶 A 羧化酶亚基基因	<i>accD</i>	1
	C 型细胞色素合成基因	<i>ccsA</i>	1
	包膜蛋白基因	<i>cemA</i>	1
	翻译起始因子基因	<i>infA</i>	1
	成熟酶基因	<i>matK</i>	1
未知基因	保守的开放阅读框	<i>yefI</i> (×2)、 <i>yef2</i> (×2)、 <i>pafI</i> ²⁾ 、 <i>pafII</i>	6

×2:拷贝数为 2;¹⁾:1 个内含子;²⁾:2 个内含子。

表 3 假蒟叶绿体基因组 SSR 位点类型及数量

Table 3 Types and quantity of SSR loci in the chloroplast genome of *Piper sarmentosum*

核苷酸类型	重复序列	重复位点数量 (个)	比例 (%)
单核苷酸	A/T	29	56.86
	AC/GT	1	1.96
二核苷酸	AT/AT	10	19.61
	AAT/ATT	4	7.85
	AGC/CTG	1	1.96
三核苷酸	AAAT/ATTT	3	5.88
	AACT/AGTT	1	1.96
	AATG/ATTC	2	3.92

相对同义密码子使用度 (RSCU) 分析结果 (图 3) 显示, RSCU>1 的密码子共有 31 个, 表明这些密码子具有较强的使用偏好性; RSCU<1 的密码子同样有 31 个, 表明这些密码子在使用上偏好性较低; 起始密码子 AUG 以及编码色氨酸 (Trp) 的密码子 UGG 的 RSCU 值均为 1, 表明这些密码子在使用上无明显偏好性。在 RSCU>1 的密码子中, 有 29 个以 A 或 U 结尾, 1 个以 C 结尾, 1 个以 G 结尾, 表明假

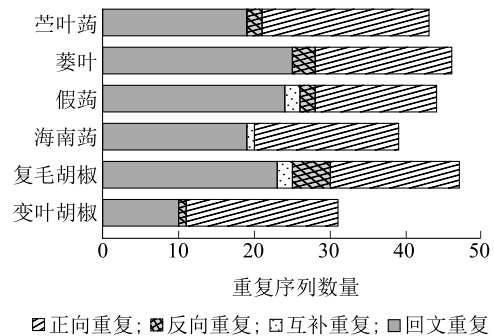


图 2 6 种胡椒属植物叶绿体基因组的重复序列

Fig.2 Repeat sequences in chloroplast genomes of six *Piper* species

蒟叶绿体基因组高频使用的密码子倾向于以 A 或 U 结尾, 占比高达 93.55%。

为了从统计学上验证所观察到的密码子使用偏好, 本研究进行了卡方检验。检验结果如表 4 所示, 终止密码子 (TER) 的 P 值约为 0.06, 表明其使用无显著偏好; 其余 18 种具有同义密码子的氨基酸, 卡方检验的 P 值均小于 0.01, 说明这些氨基酸的密码子使用频率极显著偏离了均等使用的期望。这一结果为本研究观察到的强烈密码子使用偏好现象提供了坚实的统计学支持。

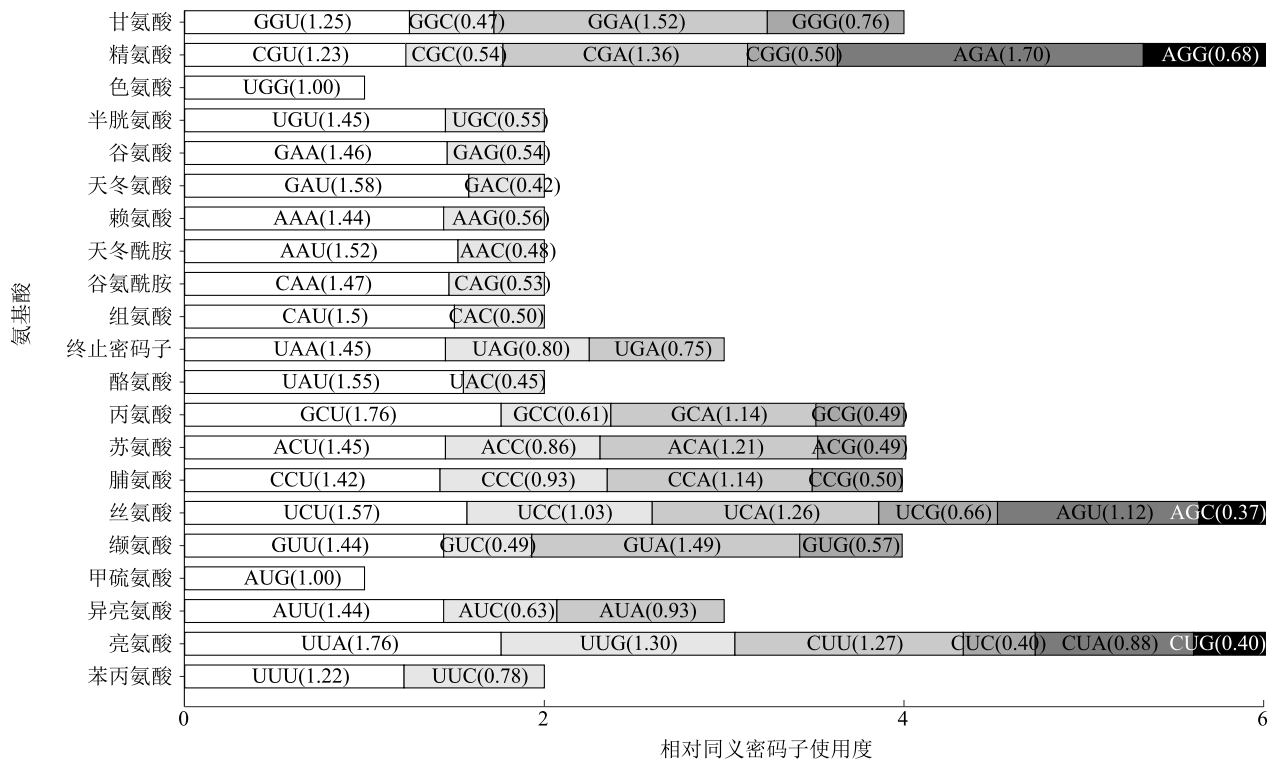


图3 假蒟叶绿体基因组相对同义密码子使用度

Fig.3 Relative synonymous codon usage of *Piper sarmentosum* chloroplast genome

表4 假蒟叶绿体基因组同义密码子使用的卡方检验结果

Table 4 Chi-square test results for synonymous codon usage in the *Piper sarmentosum* chloroplast genome

氨基酸及终止密码子	卡方值	自由度	P 值
Ala	319.09	3	7.34×10 ⁻⁶⁹
Arg	307.48	5	2.46×10 ⁻⁶⁴
Asn	312.05	1	7.83×10 ⁻⁷⁰
Asp	347.44	1	1.53×10 ⁻⁷⁷
Cys	57.11	1	4.13×10 ⁻¹⁴
Gln	192.94	1	7.25×10 ⁻⁴⁴
Glu	266.16	1	7.79×10 ⁻⁶⁰
Gly	276.69	3	1.10×10 ⁻⁵⁹
His	151.76	1	7.15×10 ⁻³⁵
Ile	222.56	2	4.68×10 ⁻⁴⁹
Leu	601.56	5	9.29×10 ⁻¹²⁸
Lys	244.92	1	3.33×10 ⁻⁵⁵
Phe	65.98	1	4.56×10 ⁻¹⁶
Pro	112.43	3	3.30×10 ⁻²⁴
Ser	295.83	5	7.89×10 ⁻⁶²
TER	5.61	2	0.06
Thr	159.65	3	2.18×10 ⁻³⁴
Tyr	269.58	1	1.40×10 ⁻⁶⁰
Val	284.15	3	2.67×10 ⁻⁶¹

Ala: 丙氨酸; Arg: 精氨酸; Asn: 天冬酰胺; Asp: 天冬氨酸; Cys: 半胱氨酸; Gln: 谷氨酰胺; Glu: 谷氨酸; Gly: 甘氨酸; His: 组氨酸; Ile: 异亮氨酸; Leu: 亮氨酸; Lys: 赖氨酸; Phe: 苯丙氨酸; Pro: 脯氨酸; Ser: 丝氨酸; TER: 终止密码子; Thr: 苏氨酸; Tyr: 酪氨酸; Val: 缬氨酸。

2.4 胡椒属植物叶绿体基因组边界区域比较

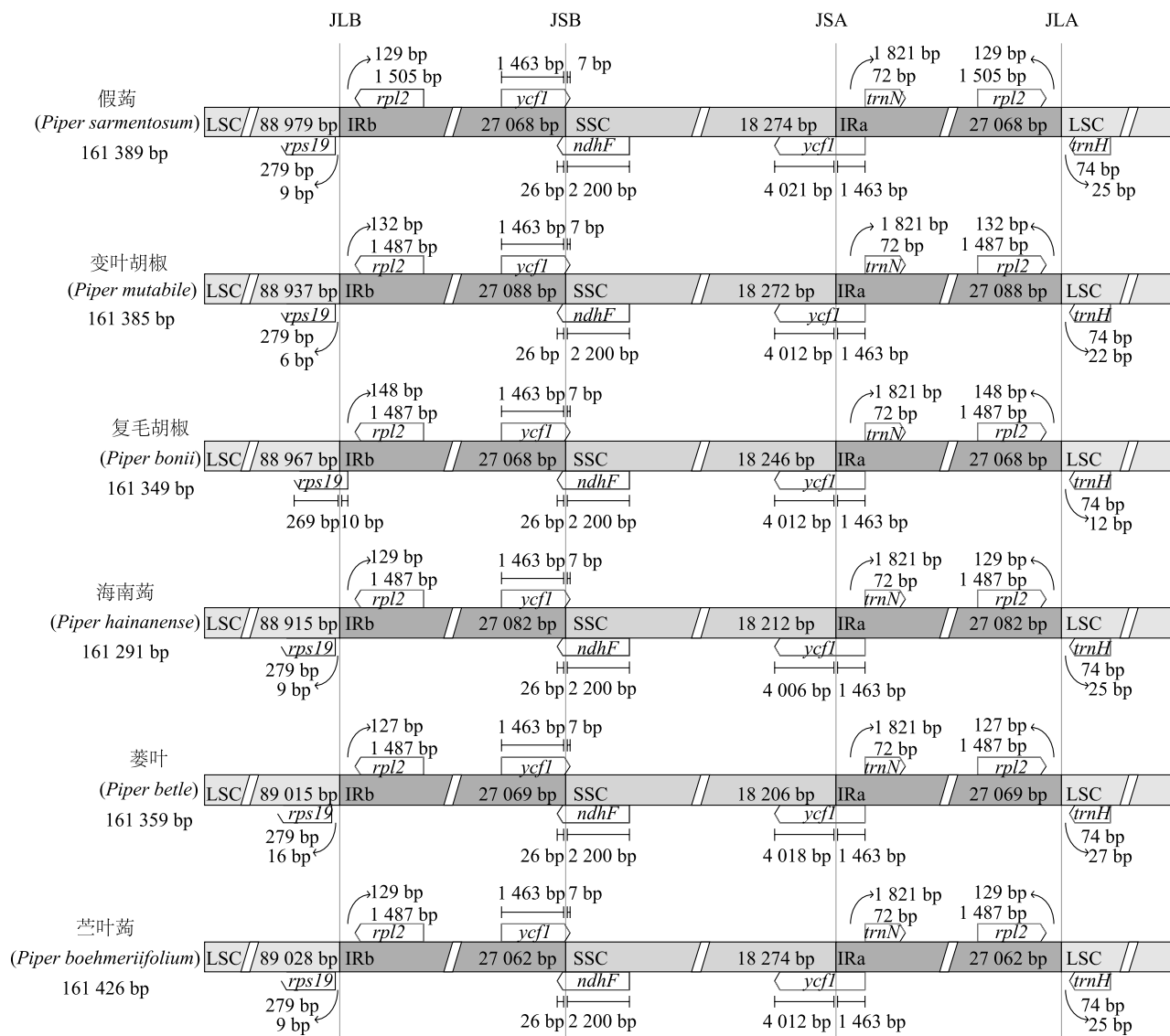
为了解胡椒属植物叶绿体基因组的结构变异特征,本研究对6个物种(假蒟、变叶胡椒、复毛胡椒、海南蒟、萎叶和芘叶蒟)的LSC/IRb(JLB)、SSC/IRb(JSB)、SSC/IRa(JSA)和LSC/IRa(JLA)边界区域进行比较分析(图4)。总体而言,胡椒属植物叶绿体基因组的IR区边界较为保守,各物种在IR区边界位置的差异较小,且JLB、JSB、JSA和JLA边界附近分布的基因种类一致。JLB边界位于*rps19*和*rpl2*基因之间,*rps19*基因碱基序列长度均为279 bp,但复毛胡椒的*rps19*基因出现跨界现象,有10 bp延伸至IRb区,其余物种的*rps19*基因均完全位于LSC区;*rpl2*基因在假蒟中碱基序列长度为1505 bp,在其余物种中则为1487 bp。JSB边界位于假基因 $\psi ycf1$ 与 $\psi ndhF$ 基因的重叠区域,边界信息完全相同。JSA边界位于 $\psi ycf1$ 基因的编码区内,有1463 bp的 $\psi ycf1$ 基因片段延伸至IRa区,且相同长度的 $\psi ycf1$ 片段被复制到IRb区中,形成假基因 $\psi ycf1$ 。JLA边界位于 $\psi rpl2$ 基因与 $\psi trnH$ 基因之间。

2.5 胡椒属植物叶绿体基因组核苷酸多态性

对6种胡椒属植物叶绿体基因组进行核苷酸多态

性(P_i)分析,旨在鉴定高变异区域,为分子标记开发提供依据。结果如图 5 所示,胡椒属植物叶绿体基因组的 P_i 值范围为 0~0.024 78,平均 P_i 值为 0.004 50,表明胡椒属叶绿体基因组核苷酸多态性水平整体较低。然而,在 LSC 区和 SSC 区检测到多个高变异区域。其中, *petA-psbJ* 区段的 P_i 值最高,为 0.024 78。此外, *rps16(ex-*

on1)-trnQ ($P_i = 0.019 78$)、*psbZ-trnG* ($P_i = 0.017 89$)、*rps4-trnT* ($P_i = 0.017 22$)、*psbJ-psbL* ($P_i = 0.018 56$) 和 *ndhF-rpl32* ($P_i = 0.017 22$) 等区段的 P_i 值也相对较高,提示这些区域可能具有较高的进化速率。相比之下,IR 区的变异程度较低,最高 P_i 值仅为 0.007 22,表明 IR 区在叶绿体基因组中相对保守。



JLB、JSB、JSA 和 JLA 分别代表 LSC/IRb、SSC/IRb、SSC/IRa 和 LSC/IRa 边界。

图 4 胡椒属 6 个物种植物叶绿体基因组 IR 边界比较分析结果

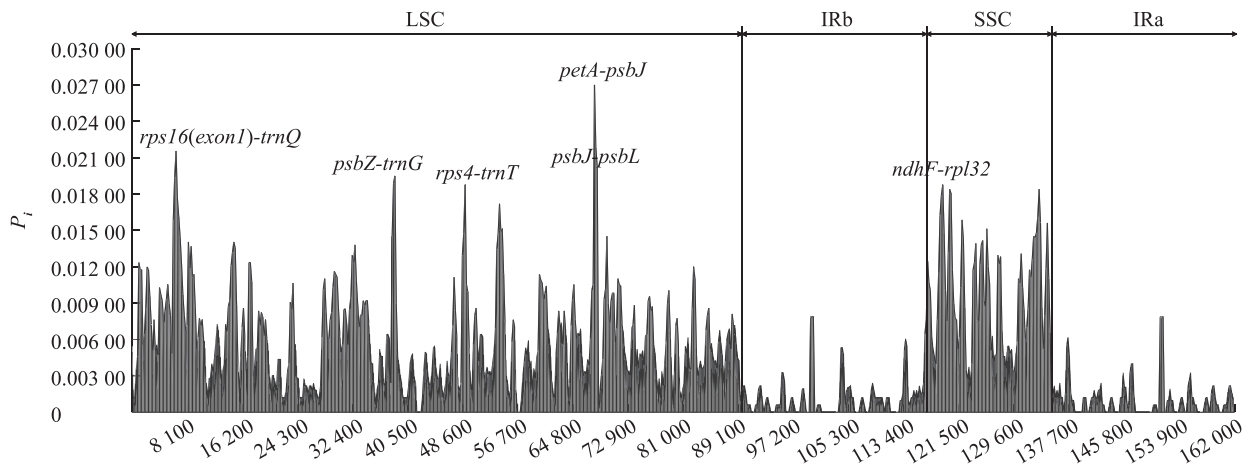
Fig. 4 Comparative analysis of chloroplast genome IR boundaries of six species of *Piper* L.

2.6 胡椒目 17 个物种的系统发育

为了解胡椒目植物的系统发育关系,本研究基于 17 个物种的叶绿体全基因组数据,构建了最大似然法系统发育树(图 6)。从图 6 可知,该系统发育树具有较高的整体支持率,其中 11 个节点的自展值

支持率达到 100%。

系统发育树的拓扑结构表明,格林纳达林仙(*Drimys granadensis*)与椒叶樟(*Warburgia ugandensis*)作为外类群位于分支的基部,三白草科(*Saururaceae*)物种与胡椒科(*Piperaceae*)物种聚为一个大的

图5 胡椒属植物叶绿体基因组核苷酸多态性(P_i)分析结果Fig.5 Analysis of chloroplast genome nucleotide polymorphism (P_i) in *Piper* L.

分支,马兜铃科(Aristolochiaceae)物种单独聚为一支,并具有100%的支持率,表明三白草科物种与胡椒科物种的亲缘关系较近。在胡椒科内部,假蒟(*Piper sarmentosum*)与变叶胡椒(*Piper mutabile*)、海南蒟(*Piper hainanense*)和萎叶(*Piper betle*)聚为一支,互为姐妹群,其中变叶胡椒与海南蒟的亲缘关系最为密切。

3 讨论

假蒟(*Piper sarmentosum*)作为一种重要的药食同源植物,具有广泛的药用和食用价值。然而,目前对其遗传背景和进化机制的研究相对匮乏。叶绿体基因组作为植物细胞中重要的遗传物质,蕴含着丰富的进化和适应信息。本研究旨在通过全面解析假蒟叶绿体基因组特征,为揭示其遗传多样性、进化地位以及指导其资源开发利用提供科学依据。

本研究发现,假蒟叶绿体基因组具有典型的四分体结构,基因组碱基序列长度为161 389 bp,包含大单拷贝区、小单拷贝区和两个反向重复区。其碱基序列长度、基因排布和G+C含量(38.30%)等特征与大多数被子植物高度相似^[34-37],体现了叶绿体基因组的保守性。这种保守性可能源于叶绿体基因组所编码的蛋白质大多参与光合作用等核心生命过程,这些基因受到强烈的纯化选择,突变率较低^[38]。然而,与其他胡椒属物种相比,假蒟叶绿体基因组在碱基序列上存在微小差异,表明在保守的框架下,叶绿体基因组仍存在一定的可塑性,可能与植物对特定环境的适应有关。与假蒟叶绿体基因组LSC区

G+C含量(36.77%)和SSC区G+C含量(32.06%)相比,假蒟叶绿体基因组IR区(42.93%)G+C含量显著升高,这主要是由于IR区富含rRNA基因。此外,G+C含量可能影响基因的表达水平和tRNA的丰度^[39]。高G+C含量通常与基因组的稳定性相关,可能有助于维持IR区结构的稳定^[40]。

重复序列是基因组进化的重要驱动力,在基因组重排、基因复制和基因表达调控等方面发挥关键作用^[41]。本研究在假蒟叶绿体基因组中鉴定出51个SSR位点,其中A/T重复序列为最主要的类型。SSR的高突变率使其成为研究种群遗传结构和物种间亲缘关系的理想分子标记^[42]。散在重复序列分析结果表明,复毛胡椒、萎叶和假蒟的散在重复序列数量较多,而变叶胡椒的数量较少,这可能与物种的进化速率和环境适应能力有关。大量研究表明,散在重复序列可以通过介导基因组重排,导致基因组结构变异^[43-45]。因此,本研究所得结果可为胡椒属植物系统发育和遗传变异研究提供有效的分子标记。

密码子使用偏好性是生物界普遍存在的现象,反映了基因组进化过程中的选择压力^[46-47]。本研究发现,假蒟叶绿体基因组高频使用的密码子倾向于以A或U结尾,这一结果与双子叶植物密码子偏好性的研究结果^[48-49]一致。密码子使用偏好性对基因表达效率和翻译准确性具有重要影响^[50]。因此,通过分析假蒟的叶绿体基因组密码子偏好性,有望优化外源基因在叶绿体中的表达,提高转基因植物的产量和品质,为假蒟的遗传改良提供新思路。

IR区边界的收缩与扩张是叶绿体基因组进化的

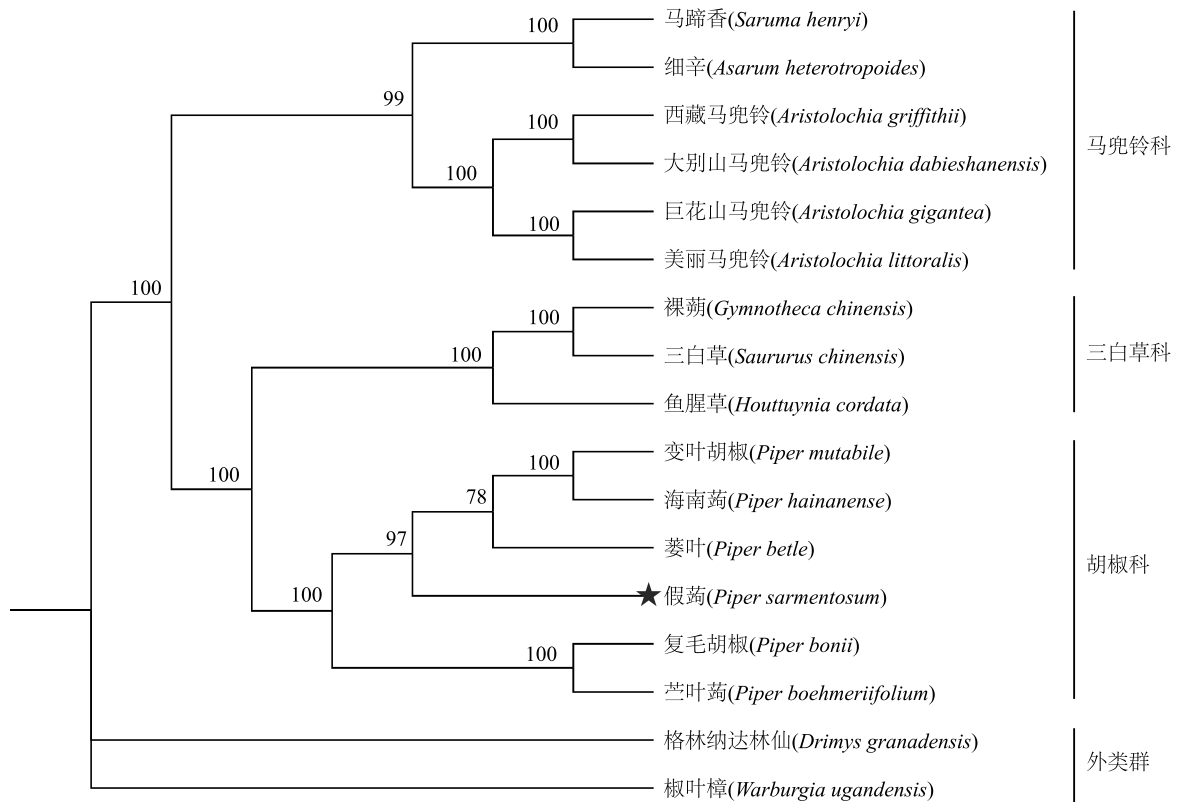


图 6 基于叶绿体基因组构建的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree based on chloroplast genome

常见现象,可能导致基因组大小和基因排列的变化^[51]。胡椒属植物的 IR 区边界相对保守,但仍存在一些细微的变异。本研究观察到复毛胡椒的 *rps19* 基因部分片段因 IRb 区扩张而纳入 IRb 区,这种 IR 区和 LSC 区边界的微小变动并非孤例,而是高等植物叶绿体中一种常见的进化事件。大量研究结果表明, *rps19*、*ycf1* 等基因在 IR 边界的位置变动是造成不同物种间叶绿体基因组碱基序列长度差异的主要原因之一;此外,这种结构变异在多个被子植物谱系中已被证实可作为有价值的系统发育标记^[52-54]。从进化意义上讲,IR 区的轻微扩张,将如 *rps19* 这样的单拷贝基因的一部分纳入其中,可能会通过基因重复和后续的纯化选择,对维持基因组结构的稳定性具有一定作用^[55-56]。尽管这类微小变异对基因功能的直接影响尚不明确,但其如“分子化石”般记录了物种进化中的重组事件。因此,胡椒属物种叶绿体基因组这些细微的 IR 区边界差异,为从结构层面解析其属内物种精细分化及亲缘关系提供了新视角。

本研究通过核苷酸多态性分析,鉴定了胡椒属植物叶绿体基因组中的 6 个高变异区段 [*petA-psbJ*、

rps16(exon1)-trnQ、*psbZ-trnG*、*rps4-trnT*、*psbJ-psbL* 和 *ndhF-rpl32*], 主要分布在 LSC 区和 SSC 区。这些高变异区域通常位于非编码区或编码区中的同义突变位点,可能受到较弱的选择压力^[57-58]。基于这些高变异区段,未来可通过在其两侧的保守区域设计通用引物,经 PCR 扩增与 Sanger 测序,即可开发出用于胡椒属植物物种鉴定和系统发育研究的、信息更丰富的分子标记。

本研究基于叶绿体全基因组数据构建的系统发育树清晰展现了主要类群间的亲缘关系,也明确了假蒟在胡椒科内的系统发育位置。需要说明的是,叶绿体基因组具有结构保守、母系遗传的特性,是构建稳定系统发育框架的理想工具,不过它仅能反映母本的进化路径,在揭示由杂交等事件引发的双亲遗传效应时,核基因组数据更为全面^[59-61]。即便如此,本研究的系统发育分析结果仍与前人基于形态学和分子数据的研究结果高度契合^[62-63],其得出的假蒟与蒟蒻、海南蒟及变叶胡椒形成单系群等结论,为推测该分支植物的生物地理起源^[64-65]提供了可靠的母系进化依据,而未来结合核基因组开展综合

分析将是进一步深入研究的方向。

同时,本研究解析的叶绿体基因组也为假蒟的定向遗传改良开拓了新思路。比如在抗病领域,可借助叶绿体高效表达抗菌肽或靶向病原体的 dsRNA,来增强假蒟的抗性;在活性成分增产方面,由于其合成前体(生物碱、酚类等)大多源于叶绿体内的莽草酸途径,所以能够通过对该途径进行工程化改造,过表达关键限速酶,进而提高药用物质的最终产量。这些设想为提升假蒟的经济价值和抗逆性提供了清晰的技术途径。

4 结论

本研究对假蒟的叶绿体基因组展开全面解析,系统揭示了其基因组结构、密码子偏好性、重复序列特征、IR 区边界动态、核酸多态性及系统发育位置,并将其与其他 5 种胡椒属植物的叶绿体基因组进行对比分析。研究结果显示,胡椒属植物叶绿体基因组整体呈现出一定的保守性,但不同物种间仍存在特定变异区域,这些变异区域可为后续胡椒属植物的分子标记开发与系统发育研究提供关键参考。综上,本研究结果不仅为深入阐释胡椒属植物叶绿体基因组的进化规律及其物种间进化关系奠定了基础,还为假蒟的资源保护、合理开发及高效利用提供了新的分子数据支撑与研究思路。

参考文献:

- [1] ZHANG Y, TIAN L, LU C M. Chloroplast gene expression: recent advances and perspectives [J]. *Plant Communications*, 2023, 4(5):100611.
- [2] ARMBRUSTER U, PESARESI P, PRIBIL M, et al. Update on chloroplast research: new tools, new topics, and new trends [J]. *Molecular Plant*, 2011, 4(1):1-16.
- [3] ARCHIBALD J M. Genomic perspectives on the birth and spread of plastids [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(33):10147-10153.
- [4] TIMMIS J N, AYLIFFE M A, HUANG C Y, et al. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5(2):123-135.
- [5] DANIELL H, LIN C S, YU M, et al. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering [J]. *Genome Biology*, 2016, 17(1):134.
- [6] WHITNEY S M, HOUTZ R L, ALONSO H. Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco [J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(1):27-35.
- [7] PARRY M A J, JOHN ANDRALOJC P, SCALES J C, et al. Rubisco activity and regulation as targets for crop improvement [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(3):717-730.
- [8] NOURI M Z, MOUMENI A, KOMATSU S. Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(9):20392-20416.
- [9] 龚秋怡,董姝洁,许琴,等.牛茄子叶绿体全基因组特征及系统发育分析[J].*中草药*,2024,55(12):4150-4158.
- [10] 梁莹莹,吴文如,彭晓祺,等.苜蓿叶绿体全基因组序列特征及苜蓿属系统发育分析[J].*中草药*,2024,55(19):6721-6729.
- [11] 任玉玲,李幸儿,梁佳林,等.鲜黄小檗叶绿体基因组特征及系统发育分析[J].*西北植物学报*,2024,44(10):1616-1625.
- [12] 黄祥,何梦瑶,王子焯,等.紫叶风箱果叶绿体基因组特征及绣线菊亚科系统发育分析[J].*草业学报*,2024,33(3):161-173.
- [13] VERMA D, DANIELL H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications [J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(4):1129-1143.
- [14] CLARKE J L, DANIELL H. Plastid biotechnology for crop production: present status and future perspectives [J]. *Plant Molecular Biology*, 2011, 76(3/4/5):211-220.
- [15] AN Y Q, WANG Y, WANG X W, et al. Development of chloroplast transformation and gene expression regulation technology in land plants [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:1037038.
- [16] SUN X L, CHEN W H, DAI W, et al. *Piper sarmentosum* Roxb.: a review on its botany, traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 263:112897.
- [17] HUSSAIN K, HASHMI F K, LATIF A, et al. A review of the literature and latest advances in research of *Piper sarmentosum* [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2012, 50(8):1045-1052.
- [18] NURUL, SANUSI N A, UMAR R, et al. Chemical compositions and antimicrobial properties of *Piper sarmentosum*-a review [J]. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 2017, 16:62-65.
- [19] ZAINAL ARIFFIN S H, WAN OMAR W H, ZAINAL ARIFFIN Z, et al. Intrinsic anticarcinogenic effects of *Piper sarmentosum* ethanolic extract on a human hepatoma cell line [J]. *Cancer Cell International*, 2009, 9:6.
- [20] UGUSMAN A, ZAKARIA Z, HUI C K, et al. Flavonoids of *Piper sarmentosum* and its cytoprotective effects against oxidative stress [J]. *EXCLI Journal*, 2012, 11:705-714.
- [21] HAMIL M S R, MEMON A H, MAJID A M S A, et al. Simultaneous determination of two isomers of asarone in *Piper sarmentosum* Roxburgh (Piperaceae) extracts using different chromatographic columns [J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2016, 15(1):157.
- [22] POREBSKI S, BAILEY L G, BAUM B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1997, 15(1):8-15.

- [23] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30 (15): 2114-2120.
- [24] JIN J J, YU W B, YANG J B, et al. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes [J]. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 241.
- [25] LIU C, SHI L C, ZHU Y J, 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.
- [26] BEIER S, THIEL T, MÜNCH T, et al. MISA-web: a web server for microsatellite prediction [J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(16): 2583-2585.
- [27] KURTZ S, CHOUDHURI J V, OHLEBUSCH E, et al. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(22): 4633-4642.
- [28] YAO J C, ZHENG Z H, XU T, et al. Chloroplast genome sequencing and comparative analysis of six medicinal plants of *Polygonatum* [J]. *Ecology and Evolution*, 2025, 15(1): 70831.
- [29] SHARP P M, LI W H. The *Codon* adaptation index: a measure of directional synonymous *Codon* usage bias, and its potential applications [J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(3): 1281-1295.
- [30] WU J, ZHANG J, GUO X H, et al. Comprehensive analysis of complete chloroplast genome sequence of *Plantago asiatica* L. (Plantaginaceae) [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2023, 18(1): 2163345.
- [31] LI H E, GUO Q Q, XU L, et al. CPJSDraw: analysis and visualization of junction sites of chloroplast genomes [J]. *Peer J*, 2023, 11: 15326.
- [32] FUSARI C M, LIA V V, ESTEBAN HOPP H, et al. Identification of single nucleotide polymorphisms and analysis of linkage disequilibrium in sunflower elite inbred lines using the candidate gene approach [J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8: 7.
- [33] ZHANG D, GAO F L, JAKOVLIĆ I, et al. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, 20(1): 348-355.
- [34] GAIKWAD A B, KAILA T, MAURYA A, et al. The chloroplast genome of black pepper (*Piper nigrum* L.) and its comparative analysis with related *Piper* species [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 13: 1095781.
- [35] WEI F, TANG D F, WEI K H, et al. The complete chloroplast genome sequence of the medicinal plant *Sophora tonkinensis* [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 12473.
- [36] NGUYEN H Q, NGUYEN T N L, DOAN T N, et al. Complete chloroplast genome of novel *Adrinandra megaphylla* Hu species: molecular structure, comparative and phylogenetic analysis [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 11731.
- [37] 张健, 张宏祥. 新疆野苹果叶绿体基因组特征及其进化历史 [J]. *干旱区研究*, 2024, 41(12): 2110-2119.
- [38] HUANG R, XIE X N, CHEN A M, et al. The chloroplast genomes of four *Bupleurum* (Apiaceae) species endemic to Southwestern China, a diversity center of the genus, as well as their evolutionary implications and phylogenetic inferences [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 714.
- [39] SERRES-GIARDI L, BELKHIR K, DAVID J, et al. Patterns and evolution of nucleotide landscapes in seed plants [J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(4): 1379-1397.
- [40] TANG J M, ZOU R, HUANG K, et al. Comparative and phylogenetic analyses of the complete chloroplast genomes of four *Ottelia* species [J]. *Horticulturae*, 2024, 10(6): 603.
- [41] WENG M L, BLAZIER J C, GOVINDU M, et al. Reconstruction of the ancestral plastid genome in Geraniaceae reveals a correlation between genome rearrangements, repeats, and nucleotide substitution rates [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2014, 31(3): 645-659.
- [42] ELLEGREN H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2004, 5(6): 435-445.
- [43] POMBERT J F, OTIS C, LEMIEUX C, et al. The chloroplast genome sequence of the green *Alga pseudonodolium* akinetum (Ulvothyceae) reveals unusual structural features and new insights into the branching order of chlorophyte lineages [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 22(9): 1903-1918.
- [44] YUE F, CUI L Y, DEPAMPHILIS C W, et al. Gene rearrangement analysis and ancestral order inference from chloroplast genomes with inverted repeat [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 25.
- [45] HABERLE R C, MATTHEW FOURCADE H, BOORE J L, et al. Extensive rearrangements in the chloroplast genome of *Trachelium caeruleum* are associated with repeats and *tRNA* genes [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2008, 66(4): 350-361.
- [46] SHABALINA S A, SPIRIDONOV N A, KASHINA A. Sounds of silence: synonymous nucleotides as a key to biological regulation and complexity [J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(4): 2073-2094.
- [47] LABELLA A L, OPULENTE D A, STEENWYK J L, et al. Variation and selection on *Codon* usage bias across an entire subphylum [J]. *PLoS Genetics*, 2019, 15(7): 1008304.
- [48] WANG L J, ROOSSINCK M J. Comparative analysis of expressed sequences reveals a conserved pattern of optimal *Codon* usage in plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(4/5): 699-710.
- [49] 朱艳, 韩长志. 普通核桃与深纹核桃中叶绿体基因组密码子使用特征对比 [J]. *江苏农业学报*, 2024, 40(8): 1507-1520.
- [50] PARVATHY S T, UDAYASURIYAN V, BHADANA V. *Codon* usage bias [J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(1): 539-565.
- [51] KRÄMER C, BOEHM C R, LIU J H, et al. Removal of the large inverted repeat from the plastid genome reveals gene dosage effects and leads to increased genome copy number [J]. *Nature Plants*, 2024, 10(6): 923-935.
- [52] XUE S, SHI T, LUO W J, et al. Comparative analysis of the complete chloroplast genome among *Prunus mume*, *P. armeniaca*, and

- P. salicina*[J]. Horticulture Research,2019,6:89.
- [53] DOWNIE S R, JANSEN R K. A comparative analysis of whole plastid genomes from the Apiales; expansion and contraction of the inverted repeat, mitochondrial to plastid transfer of DNA, and identification of highly divergent noncoding regions [J]. Systematic Botany,2015,40(1):336-351.
- [54] LIU L K, DU J X, LIU Z H, et al. Comparative and phylogenetic analyses of nine complete chloroplast genomes of Orchidaceae[J]. Scientific Reports,2023,13:21403.
- [55] ZHANG L, MENG Y, WANG D, et al. Plastid genome data provide new insights into the dynamic evolution of the tribe Ampelopsideae (Vitaceae)[J]. BMC Genomics,2024,25(1):247.
- [56] ZHAO X Q, YAN M, DING Y, et al. Characterization and comparative analysis of the complete chloroplast genome sequence from *Prunus avium* 'Summit' [J]. Peer J,2019,7:8210.
- [57] VOETS A M, VAN DEN BOSCH B J C, Stassen A P, et al. Large scale mtDNA sequencing reveals sequence and functional conservation as major determinants of homoplasmic mtDNA variant distribution[J]. Mitochondrion,2011,11(6):964-972.
- [58] YANG Z, NIELSEN R. Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models [J]. Molecular Biology and Evolution,2000,17(1):32-43.
- [59] WITHARANA E P, IWASAKI T, SAN M H, et al. Subfamily evolution analysis using nuclear and chloroplast data from the same reads[J]. Scientific Reports,2025,15(1):687.
- [60] QIN H T, MÖLLER M, MILNE R, et al. Multiple paternally inherited chloroplast capture events associated with *Taxus* speciation in the Hengduan Mountains[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2023,189:107915.
- [61] KUROIWA T. Mechanisms of maternal inheritance of chloroplast DNA; an active digestion hypothesis[J]. Microbiological Sciences,1985,2(9):267-270.
- [62] TUCKER S C, DOUGLAS A W, LIANG H X. Utility of ontogenetic and conventional characters in determining phylogenetic relationships of Saururaceae and Piperaceae (Piperales) [J]. Systematic Botany,1993,18(4):614.
- [63] HILLIS D M. Phylogenetic analysis[J]. Current Biology,1997,7(3):129-131.
- [64] SMITH J F, STEVENS A C, TEPE E J, et al. Placing the origin of two species-rich genera in the Late Cretaceous with later species divergence in the tertiary: a phylogenetic, biogeographic and molecular dating analysis of *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae) [J]. Plant Systematics and Evolution,2008,275(1):9-30.
- [65] SIMMONDS S E, SMITH J F, DAVIDSON C, et al. Phylogenetics and comparative plastome genomics of two of the largest genera of angiosperms, *Piper* and *Peperomia* (Piperaceae) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,2021,163:107229.

(责任编辑:黄克玲)