



## 金花菜叶绿体基因组特征及密码子偏好性分析

尹明华 胡佳欣 李瑶瑶 刘曼情 欧阳克蕙

### Sequence characteristic analyses of the *Medicago polymorpha* complete chloroplast genome and its codon usage bias

YIN Minghua, HU Jiaxin, LI Yaoyao, LIU Manqing, OUYANG Kehui

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0992>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 玉米B3基因家族全基因组鉴定及表达模式

Genome wide identification and expression pattern analysis of *B3* gene family in maize

草业科学. 2023, 40(10): 2556 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0814>

#### 紫花苜蓿ADK基因家族成员鉴定与分析

Identification and analysis of *ADK* gene family members in alfalfa (*Medicago sativa*)

草业科学. 2022, 39(9): 1803 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0774>

#### 柳枝稷Hsp70家族基因鉴定与生物信息学分析

Genome-wide identification and bioinformatics analysis of *Hsp70* family genes in switchgrass

草业科学. 2022, 39(10): 2112 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0742>

#### 甘草AQP<sub>s</sub>基因家族的鉴定及表达分析

Identification and expression analysis of *AQP<sub>s</sub>* family genes in *Glycyrrhiza uralensis*

草业科学. 2022, 39(10): 2127 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0108>

#### 育肥湖羊对不同非常规原料采食偏好性

The feeding preference of fattening Hu sheep to different unconventional feed ingredients

草业科学. 2022, 39(9): 1904 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2021-0551>

#### 空心莲子草ApCAT基因家族鉴定和表达模式

Genome-wide identification and expression analysis of *ApCAT* gene family in *Alternanthera philoxeroides*

草业科学. 2023, 40(11): 2889 <https://doi.org/10.11829/j.issn.1001-0629.2023-0142>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2022-0992

尹明华, 胡佳欣, 李瑶瑶, 刘曼情, 欧阳克蕙. 金花菜叶绿体基因组特征及密码子偏好性分析. 草业科学, 2024, 41(4): 884-898.

YIN M H, HU J X, LI Y Y, LIU M Q, OUYANG K H. Sequence characteristic analyses of the *Medicago polymorpha* complete chloroplast genome and its codon usage bias. Pratacultural Science, 2024, 41(4): 884-898.

# 金花菜叶绿体基因组特征及密码子偏好性分析

尹明华<sup>1,2,3,4</sup>, 胡佳欣<sup>1</sup>, 李瑶瑶<sup>1</sup>, 刘曼情<sup>1</sup>, 欧阳克蕙<sup>5</sup>

(1. 上饶师范学院生命科学学院, 江西 上饶 334001; 2. 上饶农业技术创新研究院, 江西 上饶 334001; 3. 上饶市药食同源植物资源保护与利用重点实验室, 江西 上饶 334001; 4. 上饶市薯芋类作物种质保存与利用重点实验室, 江西 上饶 334001; 5. 江西农业大学动物科学技术学院, 江西 南昌 330045)

**摘要:** 本研究对金花菜 (*Medicago polymorpha*, JHC, 江苏) 叶绿体基因组进行 BGISEQ-500 平台测序, 对其基因进行 Noveplastys 组装和 GeSeq 注释, 最后通过 MISA、REPuter、Gview、VISTA tools、IRscope 和 DNADnaSP6.0 等软件对其序列特征、基因种类、密码子偏好性以及系统发育进行分析。结果表明, JHC 叶绿体基因组大小为 124 163 bp, 无四分体结构, 基因组总 GC 含量为 34.09%, 共注释出 111 个基因 (76 个 CDS 基因、30 个 tRNA 基因、4 个 rRNA 基因、1 个假基因)、91 个 SSR 位点和 148 个长重复序列; JHC 叶绿体基因组的第三位密码子偏好以 A 和 U 作为末尾碱基, UUA、GCU、UAA、ACU、CCU、GAA、GUA、AUU、UGU、GGU、UUU、CUU 为 JHC 叶绿体基因组的最优密码子; JHC 与 MZ772862 (云南) 亲缘关系较近, 与 MW971560 (美国)、NC\_042848 (美国) 关系较远, 表明中国金花菜与美国金花菜的起源存在差异。

**关键词:** 金花菜; 叶绿体基因组; 中性绘图分析; ENC-plot 分析; PR2-plot 分析; 最优密码子; 系统发育分析

文献标识码: A 文章编号: 1001-0629(2024)04-0884-15

## Sequence characteristic analyses of the *Medicago polymorpha* complete chloroplast genome and its codon usage bias

YIN Minghua<sup>1,2,3,4</sup>, HU Jiabin<sup>1</sup>, LI Yaoyao<sup>1</sup>, LIU Manqing<sup>1</sup>, OUYANG Kehui<sup>5</sup>

(1. College of Life Sciences, Shangrao Normal University, Shangrao 334001, Jiangxi, China;

2. Shangrao Agricultural Technology Innovation Research Institute, Shangrao 334001, Jiangxi, China;

3. Key Laboratory of protection and utilization of medicinal and edible plant resources in Shangrao City, Shangrao 334001, Jiangxi, China;

4. Key Laboratory of germplasm conservation and utilization of potato and taro crops in Shangrao City, Shangrao 334001, Jiangxi, China;;

5. College of animal science and technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China)

**Abstract:** We performed BGISEQ-500 platform sequencing of the chloroplast genome of *Medicago polymorpha* (JHC, Jiangsu) and assembled its genes using Noveplastys assembly and GeSeq annotation. we then analyzed its sequence characteristics, gene types, codon preferences, and phylogeny using MISA, REPuter, Gview, VISTA tools, IRscope, and DNADnaSP6.0. The JHC chloroplast genome size was 124 163 bp. No tetrad structure was observed, and total genomic GC content was 34.09%. A total of 111 genes, including 76 CDS genes, 30 tRNA genes, 4 rRNA genes, and 1 pseudogene, were

收稿日期: 2022-12-25 接受日期: 2023-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31860084、31960079、32060092); 江西省科技厅重点研发计划一般项目 (20202BBG73010); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ201704、GJJ211729); 江西省现代农业产业技术体系建设专项 (JXARS-13-赣东站); 上饶市科技局平台载体建设项目 (2020J001)

第一作者: 尹明华 (1973-), 女, 江西永新人, 教授, 硕士, 主要从事草学生物技术研究。E-mail: 864035356@qq.com

通信作者: 欧阳克蕙 (1974-), 女, 江西万年人, 教授, 博士, 主要从事牧草资源开发与利用和南方草地生态的研究。E-mail: ouyangkehui@sina.com

annotated from the chloroplast genome of JHC. A total of 91 SSR loci and a total of 148 long repeat sequences were also detected. The third position in JHC chloroplast genome codons preferentially used A and U, and UUA, GCU, UAA, ACU, CCU, GAA, GUA, AUU, UGU, GGU, UUU, CUU were the optimal codons of the chloroplast genome of JHC. JHC was closely related to MZ772862 (Yunnan), and was more distantly related to MW971560 (the United States) and NC\_042848 (the United States), indicating that the origins of American and Chinese *Medicago polymorpha* strains are different.

**Keywords:** *Medicago polymorpha*; chloroplast genome; neutral drawing analysis; ENC-plot analysis; PR2-plot analysis; optimal codons; phylogenetic analysis

**Corresponding author:** OUYANG Kehui E-mail: [ouyangkehui@sina.com](mailto:ouyangkehui@sina.com)

金花菜 (*Medicago polymorpha*) 又称草头<sup>[1]</sup>、南苜蓿<sup>[2]</sup>、肥田草等, 为一年或二年生豆科苜蓿属牧草, 原产于地中海地区, 广泛分布于欧洲、亚洲和非洲北部, 在我国主要栽培或野生于长江流域以南, 适应性较强<sup>[3]</sup>。金花菜纤维量低、高蛋白质、适口性好<sup>[4]</sup>, 是一种兼具菜用、饲用、药用、绿肥、边坡绿化等用途的多功能牧草<sup>[5]</sup>。金花菜品种在国外主要有 ‘Santiago’ ‘Serena’ ‘Scimitar’ ‘Cavalier’ ‘Armadillo’ ‘Anglona’ 等<sup>[6]</sup>; 我国尚未引入上述品种, 国内现有的金花菜品种均为菜用和饲用品种, 主要有 ‘淮扬’ 金花菜<sup>[7]</sup>、‘楚雄’ 南苜蓿<sup>[8]</sup>、‘川南’ 金花菜<sup>[6]</sup> 3 个品种。

叶绿体是细胞内一种半自主的特殊细胞器, 其功能是完成光合作用, 并进行代谢反应为植物提供碳水化合物。叶绿体基因组的基本结构一般包括 1 个 LSC 区、1 个 SSC 区和 2 个 IR 区, 一般呈现典型的四分体结构。叶绿体基因组结构简单、遗传保守、自我复制、独立进化、突变较低、母体遗传, 常作为系统发育进化分析、DNA 条形码的主要工具。核酸与蛋白质之间的遗传信息传递一般通过密码子来传递<sup>[9]</sup>, 而密码子可以通过 tRNA 的转运完成 mRNA 遗传信息的翻译和相应氨基酸的合成<sup>[10]</sup>, 这些可以翻译 mRNA 遗传信息并指导相应氨基酸合成的密码子称为同义密码子<sup>[11-14]</sup>。苜蓿属有些物种的叶绿体基因组序列特征和密码子偏好性分析目前已有研究。Fitter 等<sup>[15]</sup> 通过序列分析证实了紫花苜蓿 (*M. sativa* ‘Regen S’) 叶绿体基因组的异质性; 杨国锋等<sup>[16]</sup> 对蒺藜苜蓿 (*M. truncatula*) 叶绿体基因组全序列密码子进行了分析, 发现内部突变是影响蒺藜苜蓿叶绿体基因组密码子偏好性的主要因素, 并确定了 UUA、UUG、CCU 等 23 个密码子为最优密码子。喻风和韩明<sup>[17]</sup> 研究了紫花苜蓿叶绿体基因组的密码子偏好性, 指出自然选择可以显著影响

紫花苜蓿叶绿体基因组的密码子偏好性, 并发现紫花苜蓿叶绿体基因组有 17 个最优密码子; 孙志轩等<sup>[18]</sup> 对 ‘德钦’ 紫花苜蓿叶绿体基因组进行测序和分析, 最后 115 个 SSRs 位点被鉴定出来, 同时指出 *clpP* 基因与其他紫花苜蓿存在差异, 具有不同的 SSRs 位点; 田春育等<sup>[19]</sup> 分析了苜蓿属 24 个种 1 个亚种叶绿体基因组结构比较及亲缘关系, 发现苜蓿属物种叶绿体基因组的反向重复序列没有注释到, 推测反向重复序列的没有注释到可能是由于某些基因在进化过程中发生了丢失, 或者是由于某些基因转移到了核基因组。

目前针对金花菜的研究大多集中在逆境胁迫<sup>[4]</sup>、种子萌发<sup>[20]</sup>、栽培种植<sup>[21]</sup>、农艺性状<sup>[22]</sup> 等方面, 而金花菜叶绿体基因组方面的研究尚无专家学者涉及, 本文采用 BGISEQ-500 平台对金花菜 (江苏) 的叶绿体全基因组进行第二代高通量测序, 采用相关软件对其叶绿体基因进行组装、注释, 采用相关软件分析其叶绿体基因的密码子偏性特征, 并对最优密码子的偏性特点进行深入分析, 为金花菜的遗传育种和物种鉴定提供理论基础和分子生物学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

金花菜 (JHC) 试管苗 (种子购买于江苏沭阳县, 无菌苗由上饶师范学院植物组织培养室提供)。

### 1.2 方法

DNA 的提取和测序。植物基因组 DNA 提取试剂盒法用于金花菜试管苗叶片组织的 DNA 提取; 琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 的完整性; 用分光光度计法检测提取的 DNA 浓度和纯度; 机械打断 (超声波) 法将 DNA 片段化; BGISEQ-500 平台质检合

格文库的测序。

叶绿体全基因组的组装与注释。SOAPnuke (version: 1.3.0) 软件用于金花菜叶绿体基因组 Raw Data 的数据过滤; Noveplastys 软件用于叶绿体基因组核心模块的组装; CAP3 软件用于叶绿体 contigs 的环化、连接和调整; GeSeq、tRNAscan-SE 等软件用于叶绿体基因组的注释; OGDRAW 软件用于叶绿体基因组的图谱绘制; 金花菜叶绿体基因组序列注释完成后提交到 NCBI; 金花菜叶绿体基因组的登录号为 OP589400。

叶绿体基因组的序列分析。JSHYCloud 在线工具集用于金花菜叶绿体基因组、大单拷贝区、小单拷贝区和反向重复区 GC 含量的分析和统计; MISA (MicroSatellite identification tool) 软件用于叶绿体基因组 SSR (简单重复序列) 的分析和鉴定; REPuter 软件用于叶绿体基因组 Longrepeat (长重复序列) 分析; CodonW 软件用于叶绿体基因组密码子使用情况的分析。 $\Delta$ RSCU 大于等于 0.08 且 RSCU 大于 1 的高表达高频率密码子作为金花菜叶绿体基因组最优密码子的筛选原则; Gview、VISTA tools、IRscope 和 DNADnaSP6.0 软件用于金花菜及其 9 个近缘种 [*M. radiata* NC\_042854、花苜蓿 (*M. ruthenica* MW703984)、刺果苜蓿 (*M. intertextata* NC\_042851)、南苜蓿 (*M. polymorpha* MW971560)、蒺藜苜蓿 (*M. truncatula* JX512022)、木本苜蓿 (*M. arborea* NC\_042856)、*M. marina* NC\_042845、野苜蓿 (*M. falcata* MW271003)、紫花苜蓿 (*M. sativa* MN218692)] 的相关图形 (变异圈图、mVIST 结构变异图) 的绘制、基因组  $P_i$  的计算、Neutrality-plot analysis、ENC-plot analysis、PR2-bias-plot analysis 和 optimal codons analysis; mafft 7.0 软件用于金花菜及其 45 个近缘种和 2 个外类群物种 (表 1) 的序列比对; fasttree 2.1.10 软件用于金花菜及其 45 个近缘种和 2 个外类群物种进化树的构建。

## 2 结果与分析

### 2.1 金花菜叶绿体基因组的序列分析

金花菜叶绿体基因组的完整长度为 124 163 bp, 其结构为环状 (图 1), 没有 IR 区域 (丢失一个 IR 拷贝), 不存在 LSC、SSC、IR 区域区分, 无四分体结构。基因组的总 GC 含量为 34.09%, A 含量为 32.94%, T 含量为 32.96%, C 含量为 16.49%, G 含量为 17.6%。

### 2.2 金花菜叶绿体基因的类型分析

经过注释 (表 2), 金花菜叶绿体基因组有 111 个基因 (76 个 CDS 基因、30 个 tRNA 基因、4 个 rRNA 基因和 1 个假基因)。10 个 CDS 基因和 6 个 tRNA 基因含有 2 个外显子, *pafl* 基因含有 3 个外显子。

### 2.3 金花菜叶绿体基因组重复序列分析

通过检测, 共有 91 个 SSR 位点 (36 个单碱基重复、13 个双碱基重复、2 个三碱基重复) 在金花菜叶绿体基因组中得到鉴定 (表 3)。当重复单元为 A/T 且重复频率为 10 时, 金花菜叶绿体基因组有 33 个 SSR 位点, 数量最多; 当重复单元为 C/G 且重复频率为 12 时, 金花菜叶绿体基因组有 1 个 SSR 位点; 当重复单元为 AT/AT 且重复频率为 6 时, 金花菜叶绿体基因组有 11 个 SSR 位点, 数量最多; 当重复单元为 AAT/ATT 或 ATC/ATG 且重复频率为 5 时, 金花菜叶绿体基因组有 1 个 SSR 位点。

### 2.4 金花菜叶绿体基因组长重复序列分析

金花菜叶绿体基因组长重复序列 (Longrepeat) 分析如附表 1 所列。共有 61 个 Longrepeat (117 个正向重复、20 个回文重复、1 个反向重复和 10 个互补重复) 在金花菜叶绿体基因组中得到鉴定, 其中, 30~39 bp 正向重复 61 个, 40~49 bp 正向重复 32 个, 50~59 bp 正向重复 8 个, 60~69 bp 正向重复 9 个, 70~79 bp 正向重复 4 个, 80~89 bp 正向重复 2 个, 90~99 bp 正向重复 1 个, 30~39 bp 回文重复 16 个, 40~49 bp 回文重复 4 个, 30~39 bp 反向重复 1 个、30~39 bp 互补重复 10 个。

### 2.5 金花菜叶绿体基因组比对分析

以金花菜 (JHC) 为参考, 利用 Gview、VISTA tools 和 DNADnaSP6.0 软件计算和绘制金花菜 10 个近缘种叶绿体基因组的变异圈图 (图 2) 和  $P_i$  多样性指数分析图 (图 3)。如图 2 所示, JHC 及其 9 个近缘种的叶绿体基因组变化较大, 但 JHC 和南苜蓿 MW971560 叶绿体基因组的序列没有明显的变化, 比较保守, 叶绿体基因组的结构也没有明显的变化, 比较稳定。如图 3 所示, 在核苷酸多样性方面, JHC 及其 9 个近缘种叶绿体基因组的  $P_i$  变化范围为 0~0.3100, 变异率最高的基因有 *accD*、*trnP-UGG-psaJ*、*rps12-exon1-clpP1*、*psaJ-trnI-CAU*、*ycf2*。

表 1 金花菜 45 个近缘种和 2 个外类群物种的产地或来源  
 Table 1 Origin or source of 45 closely related species and 2 species level taxa of *Medicago polymorpha*

序号 Number	近缘种或外 类群物种 Related species or outgroup species	产地或来源 Origin or source	序号 Number	近缘种或外 类群物种 Related species or outgroup species	产地或来源 Origin or source	序号 Number	近缘种或外 类群物种 Related species or outgroup species	产地或来源 Origin or source
1	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i> KU321683	中国 China	17	蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> JX512023	美国 USA	33	<i>Medicago intertexta</i> NC_042851	美国 USA
2	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i> MN218692	云南省德钦县 Deqin County, Yunnan Province	18	蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> JX512024	美国 USA	34	<i>Medicago orbicularis</i> NC_042850	美国 USA
3	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i> NC_042841	美国 USA	19	蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> JX512022	美国 USA	35	天蓝苜蓿 <i>Medicago lupulina</i> NC_042847	美国 USA
4	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i> MZ983396	中国 China	20	蒺藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i> f. <i>tricycla</i> KF241982	美国 USA	36	<i>Medicago tenoreana</i> NC_057658	美国 USA
5	野苜蓿 <i>Medicago falcata</i> MW271002	中国 China	21	<i>Medicago scutellata</i> MZ895077	中国 China	37	<i>Medicago disciformis</i> NC_057655	美国 USA
6	野苜蓿 <i>Medicago falcata</i> NC_032066	中国 China	22	早花苜蓿 <i>Medicago praecox</i> NC_057657	美国 USA	38	小苜蓿 <i>Medicago minima</i> NC_042849	美国 USA
7	野苜蓿 <i>Medicago falcata</i> MK460490	美国 USA	23	金花菜 <i>Medicago polymorpha</i> MZ772862	中国 China	39	<i>Medicago coronata</i> NC_057660	美国 USA
8	野苜蓿 <i>Medicago falcata</i> MW271003	中国 China	24	金花菜 <i>Medicago polymorpha</i> MW971560	美国 USA	40	<i>Medicago suffruticosa</i> NC_042843	美国 USA
9	<i>Medicago tetraprostra</i> NC_042844	美国 USA	25	金花菜 <i>Medicago polymorpha</i> NC_042848	美国 USA	41	<i>Medicago biflora</i> NC_042415	美国 USA
10	紫花苜蓿 <i>Medicago sativa</i> subsp. <i>Glomerata</i> MK460494	美国 USA	26	褐斑苜蓿 <i>Medicago arabica</i> MT584354	美国 USA	42	毛茛苜蓿 <i>Medicago edgeworthii</i> NC_042415	中国 China
11	<i>Medicago hybrida</i> NC_027153	加拿大 Canada	27	褐斑苜蓿 <i>Medicago arabica</i> NC_057661	美国 USA	43	花苜蓿 <i>Medicago ruthenica</i> NC_053371	中国 China
12	<i>Medicago papillosa</i> NC_027154	加拿大 Canada	28	褐斑苜蓿 <i>Medicago arabica</i> MZ905469	中国 China	44	<i>Medicago radiata</i> NC_042854	美国 USA
13	<i>Medicago cretacea</i> NC_042842	美国 USA	29	<i>Medicago secundiflora</i> NC_057656	美国 USA	45	<i>Medicago monspeliaca</i> NC_042855	美国 USA
14	<i>Medicago marina</i> NC_042845	美国 USA	30	<i>Medicago blanchiana</i> NC_042852	美国 USA	46	白花草木樨 <i>Melilotus albus</i> NC_041419	中国 China
15	木本苜蓿 <i>Medicago arborea</i> NC_042856	美国 USA	31	<i>Medicago laciniata</i> NC_042853	美国 USA	47	胡卢巴 <i>Trigonella foenum- graecum</i> NC_042857	美国 USA
16	<i>Medicago pironae</i> NC_042846	美国 USA	32	<i>Medicago sauvagei</i> NC_057659	美国 USA			

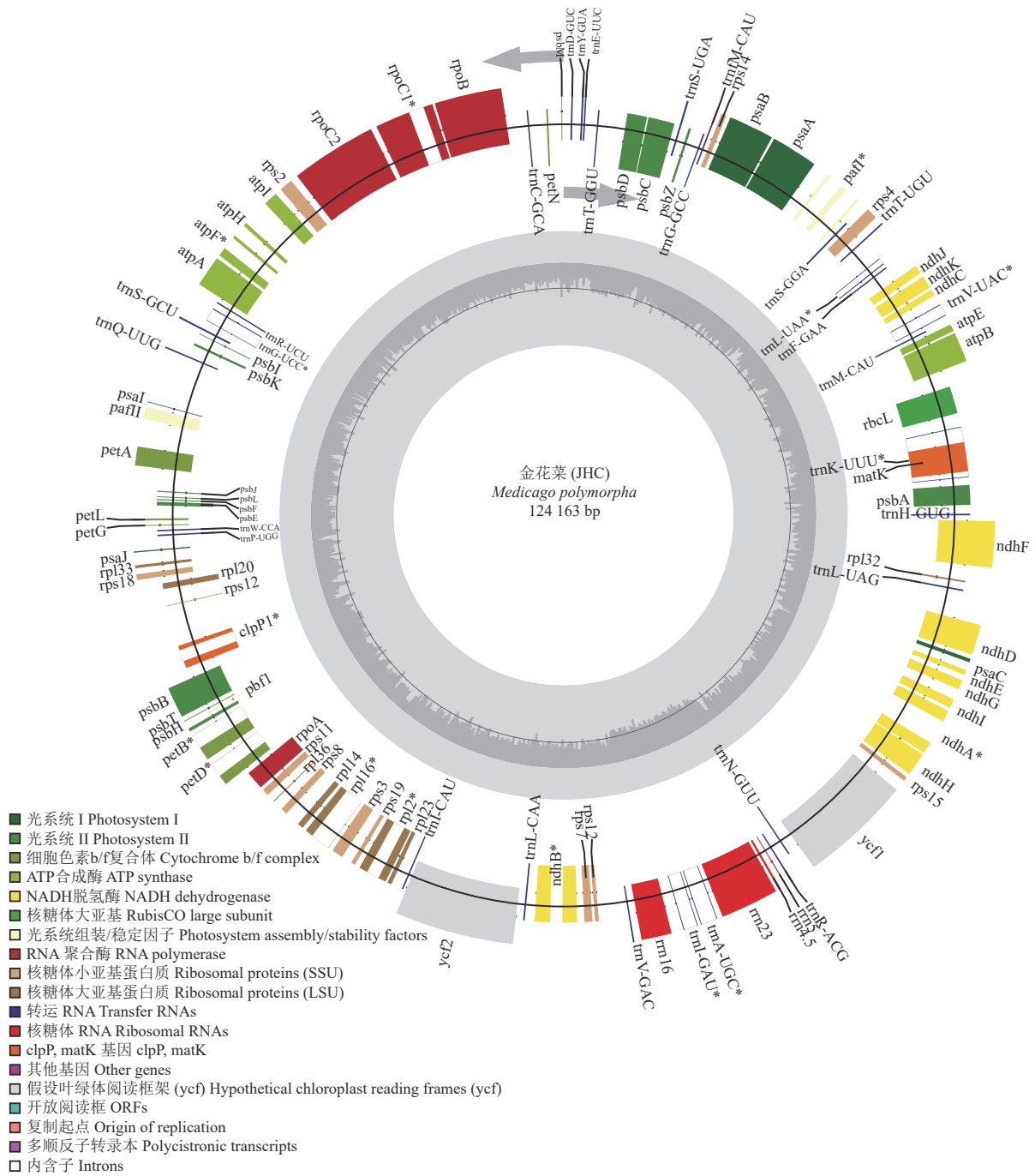


图1 金花菜叶绿体基因组图谱

Figure 1 *Medicago polymorpha* chloroplast genome map

### 2.6 金花菜叶绿体基因组密码子使用偏性分析

#### 2.6.1 同义密码子的偏性分析

金花菜叶绿体基因组密码子各位点上的GC含量(图4)表明,3个位置GC含量的平均值为36.81%,GC<sub>1</sub>、GC<sub>2</sub>、GC<sub>3</sub>分别为45.21%、38.75%、26.46%,呈GC<sub>3</sub> < GC<sub>2</sub> < GC<sub>1</sub>的趋势;金花菜叶绿体基因组76个CDS基因的平均ENC值为45.11,ENC值 > 35

的基因有71个,ENC值 < 35的基因有5个,因此,在密码子偏性方面,金花菜叶绿体基因组表现为较弱。在相关性方面(表4),GC<sub>all</sub>与GC<sub>1</sub>、GC<sub>2</sub>极显著正相关(P < 0.01);GC<sub>1</sub>与GC<sub>2</sub>显著正相关(P < 0.05);ENC与GC<sub>1</sub>、GC<sub>2</sub>均不相关(P > 0.05),但与GC<sub>3</sub>显著相关(P < 0.05)。金花菜叶绿体基因组共有32个RSCU > 1的密码子,除AUG、UUG和UGG外,其余密码子均以A、U结尾(表5)。

表 2 金花菜叶绿体基因的类型分析  
Table 2 Type analysis of chloroplast genes in *Medicago polymorpha*

基因功能 Gene function	基因类型 Gene type	基因名 Gene name	基因数量 Number of genes
光合作用 Photosynthesis	光系统 I photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC, psal, psaj</i>	5
	光系统 II photosystem II	<i>psaj, psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbK, psbL, psbM, psbT, psbZ, psbN</i>	15
	NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase	<i>ndhA, ndhB, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>	11
	细胞色素 b /f 复合体 cytochrome b/f complex	<i>petA, petB, petD, petG, petL, petN</i>	6
	ATP 合成酶 ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI</i>	6
自我复制 Self-replication	核糖体大亚基蛋白质 Proteins of large ribosomal subunit	<i>rpl14, rpl16, rpl2, rpl20, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36</i>	8
	核糖体小亚基蛋白质 Proteins of small ribosomal subunit	<i>rps11, rps12, rps14, rps15, rps18, rps19, rps2, rps3, rps4, rps7, rps8</i>	11
	核糖体大亚基 Large subunit of rubisco	<i>rbcL</i>	1
	RNA 聚合酶 RNA polymerase	<i>rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2</i>	4
	核糖体 RNA Ribosomal RNAs	<i>rrn16, rrn23, rrn4.5, rrn5</i>	4
	转运 RNA Transfer RNAs	<i>trnA-UGC, trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-GAA, trnG-GCC, trnG-UCC, trnH-GUG, trnI-CAU, trnI-GAU, trnK-UUU, trnL-CAA, trnL-UAA, trnL-UAG, trnM-CAU, trnN-GUU, trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG, trnR-UCU, trnS-GCU, trnS-GGA, trnS-UGA, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-GAC, trnV-UAC, trnW-CCA, trnY-GUA, trnYm-CAU</i>	30
	其他基因 Other genes	成熟酶 Maturase <i>matK</i>	1
	蛋白酶 Protease <i>clpP1</i>	1	
	囊膜蛋白 Envelope membrane protein <i>cemA</i>	1	
	乙酰辅酶A 羧化酶 Acetyl-CoA carboxylase <i>accD</i>	1	
	c-型细胞色素合成基因 c-type cytochrome synthesis gene <i>ccsA</i>	1	
	翻译起始因子 Translation initiation factor <i>infA</i>	1	
未知功能基因 Unknown function gene	保守假设叶绿体阅读框架 Conserved hypothetical chloroplast Reading Frames <i>ycf1, ycf2, ycf3, ycf4</i>	4	

表 3 金花菜叶绿体基因组中简单重复序列的类型及分布  
Table 3 Type and distribution of simple repeat sequences within the *Medicago polymorpha* chloroplast genome

重复单元碱基类型 Repetitive unit base type	重复单元重复次数 Repeat number of repeat units															总数 Total
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
A/T	-	-	-	-	-	33	15	10	8	5	-	2	-	1	1	75
C/G	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
AT/AT	-	11	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
AAT/ATT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
ATC/ATG	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

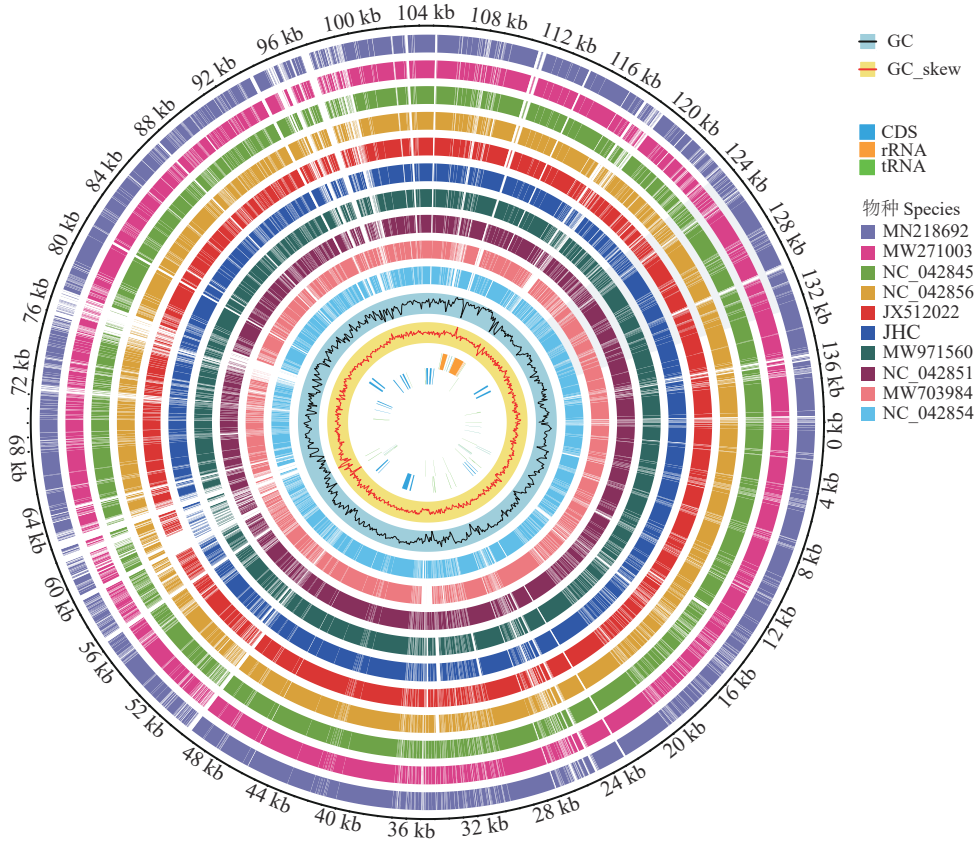


图 2 金花菜及其 9 个近缘种叶绿体基因组变异圈图

Figure 2 Chloroplast genome variation circle diagram for *Medicago polymorpha* and nine closely related species

物种从内向外第 3 圈开始依次为: *Medicago radiata* NC\_042854、花苜蓿 MW703984、刺果苜蓿 NC\_042851、南苜蓿 MW971560、金花菜 JHC、蒺藜苜蓿 JX512022、木本苜蓿 NC\_042856、*Medicago marina* NC\_042845、野苜蓿 MW271003、紫花苜蓿 MN218692。右上角 GC 和 GC skew 是最内两圈, CDS、rRNA、tRNA 圆圈中心位置。

Species start from inner to outer ring: *Medicago radiata* NC\_042854, *M. ruthenica* MW703984, *M. intertexta* NC\_042851, *M. polymorpha* MW971560, *M. polymorpha* (JHC), *M. truncatula* JX512022, *M. arborea* NC\_042856, *M. marina* NC\_042845, *M. falcata* MW271003, *M. sativa* MN218692. GC and GC skew are the two innermost circles in the upper right corner; CDS, rRNA, and tRNA circles are in the center.

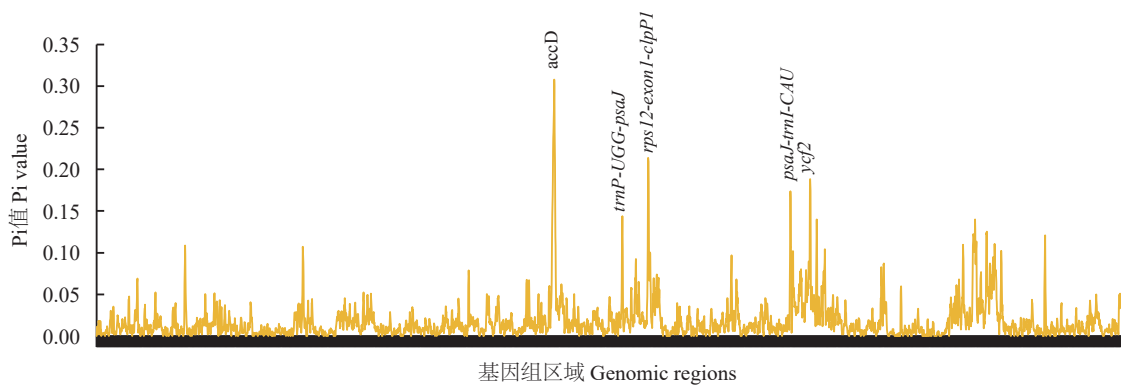


图 3 金花菜及其 9 个近缘种叶绿体基因组 Pi 多样性指数分析

Figure 3 Pi diversity index analysis of the chloroplast genomes of *Medicago polymorpha* and nine related species

2.6.2 Neutrality-plot 和 ENC-plot 以及 PR2-bias-plot 分析中性绘图分析 ( $GC_3 \sim GC_{12}$ ) 表明, 对于金花菜及其 9 个近缘种植物来说, 其叶绿体基因的  $GC_3$  含

量和  $GC_{12}$  含量分别为 0.127 0~0.425 0 以及 0.215 7~0.646 3,  $GC_3$  含量和  $GC_{12}$  含量均分布在对角线上方。 $GC_3$  含量和  $GC_{12}$  含量的相关系数 ( $r$ ) 为 0.131 07,



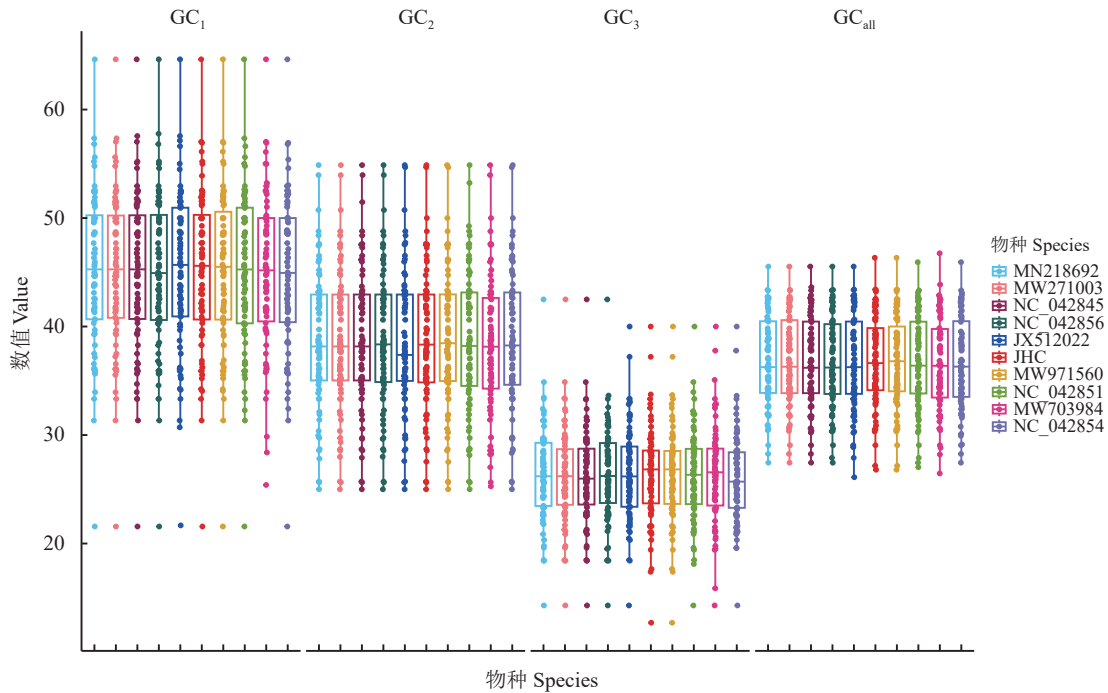


图 4 金花菜及其 9 个近缘种叶绿体基因组密码子的偏性分析

Figure 4 Partial chloroplast genome codon analysis for *Medicago polymorpha* and nine closely related species

物种同图 2。密码子第 1、2、3 位的 GC 含量分别用 GC<sub>1</sub>、GC<sub>2</sub>、GC<sub>3</sub> 表示；密码子总 GC 含量用 GC<sub>all</sub> 表示。表 4 同。

The species are the same as Figure 2. GC content at first, second, and third codon positions are represented as GC<sub>1</sub>, GC<sub>2</sub>, and GC<sub>3</sub>, respectively; Total codon GC content is represented by GC<sub>all</sub>. This is applicable for Table 4 as well.

表 4 金花菜叶绿体基因组 GC<sub>all</sub>、GC<sub>1</sub>、GC<sub>2</sub>、GC<sub>3</sub> 和 ENC 的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of the chloroplast genome GC<sub>all</sub>, GC<sub>1</sub>, GC<sub>2</sub>, GC<sub>3</sub>, and ENC in *Medicago polymorpha*

指标 Parameter	GC <sub>all</sub>	GC <sub>1</sub>	GC <sub>2</sub>	GC <sub>3</sub>	ENC
GC <sub>all</sub>	1				
GC <sub>1</sub>	0.807 080 845**	1			
GC <sub>2</sub>	0.751 657 748**	0.379 814 149*	1		
GC <sub>3</sub>	0.453 207 251*	0.124 498 687	0.072 925 809	1	
ENC	0.002 157 050	-0.074 635 309	-0.074 619 818	0.239 857 869*	1

\*和\*\*分别表示相关性在 0.05 和 0.01 水平上显著相关；ENC 表示有效密码子数。

\* and \*\* indicate significant correlation at the 0.05 and 0.01 levels, respectively; ENC indicates the number of valid codons.

其中  $R^2$  等于 0.017 18, 具有显著的相关性 ( $P < 0.05$ ), 回归斜率等于 0.177 677 7。ENC-plot analysis 表明, 分布在 ENC-plot 期望曲线上方的基因比较少, 分布在 ENC-plot 曲线附近的基因也比较少, 分布在 ENC-plot 期望曲线下方基因比较多, 远离 ENC-plot 曲线基因也比较多, 因此, 与理论 ENC 值相比, 金花菜叶绿体基因组大多数基因的实际 ENC 值具有显著差异。ENC 比值频数即  $(ENC_{exp} - ENC_{obs}) / ENC_{exp}$  (表 6) 分析表明, 在金花菜叶绿体基因组基因中, 8% (6 个) 基因的 ENC 比值频数为

0~0.1, 表明这 6 个基因分布在 ENC-plot 期望曲线上或者分布在 ENC-plot 曲线附近, ENC<sub>obs</sub> 值与 ENC<sub>exp</sub> 值比较一致; 92% 基因的 ENC 比值频数在 0~0.1 这个区间之外, 均离 ENC-plot 期望曲线比较远, ENC<sub>obs</sub> 值与 ENC<sub>exp</sub> 值具有较大差异。PR2-bias-plot analysis 表明, 金花菜叶绿体基因组的基因坐标在 G<sub>3</sub>/GC<sub>3</sub> 轴和 A<sub>3</sub>/AU<sub>3</sub> 轴隔成的 4 个区域内的分布量出现明显的不均衡。大部分基因分布在 G<sub>3</sub>/GC<sub>3</sub> 轴的上面, 少部分基因分布在 G<sub>3</sub>/GC<sub>3</sub> 轴的下面; 大部分基因分布在 A<sub>3</sub>/AU<sub>3</sub> 轴的左边部分,

表 5 金花菜叶绿体基因组密码子的相对同义密码子使用度  
 Table 5 Relative synonymous codon usage (RSCU) of chloroplast genome codons in *Medicago polymorpha*

密码子 Codon	氨基酸 Amino acid	相对同义密码子使用度 Relative synonymous codon usage (RSCU)		密码子 Codon	氨基酸 Amino acid	相对同义密码子使用度 Relative synonymous codon usage (RSCU)	
		频度 Frequency	数量 Number			频度 Frequency	数量 Number
GCA	Ala	1.143 330	349	AAA	Lys	1.556 100	957
GCC	Ala	0.573 301	175	AAG	Lys	0.443 902	273
GCG	Ala	0.412 776	126	AUG	Met	1.992 030	500
GCU	Ala	1.870 600	571	GUG	Met	0.007 968	2
AGA	Arg	1.768 370	369	UUC	Phe	0.588 417	381
AGG	Arg	0.666 134	139	UUU	Phe	1.411 580	914
CGA	Arg	1.389 780	290	CCA	Pro	1.280 700	292
CGC	Arg	0.383 387	80	CCC	Pro	0.671 053	153
CGG	Arg	0.388 179	81	CCG	Pro	0.447 368	102
CGU	Arg	1.404 150	293	CCU	Pro	1.600 880	365
AAC	Asn	0.445 076	235	AGC	Ser	0.314 803	84
AAU	Asn	1.554 920	821	AGU	Ser	1.315 430	351
GAC	Asp	0.388 708	179	UCA	Ser	1.195 500	319
GAU	Asp	1.611 290	742	UCC	Ser	0.824 485	220
UGC	Cys	0.489 627	59	UCG	Ser	0.520 924	139
UGU	Cys	1.510 370	182	UCU	Ser	1.828 860	488
CAA	Gln	1.613 070	617	UAA	Ter	1.815 790	46
CAG	Gln	0.386 928	148	UAG	Ter	0.434 211	11
GAA	Glu	1.560 400	930	UGA	Ter	0.750 000	19
GAG	Glu	0.439 597	262	ACA	Thr	1.231 600	343
GGA	Gly	1.645 470	608	ACC	Thr	0.667 864	186
GGC	Gly	0.341 001	126	ACG	Thr	0.445 242	124
GGG	Gly	0.581 867	215	ACU	Thr	1.655 300	461
GGU	Gly	1.431 660	529	UGG	Trp	1.000 000	383
CAC	His	0.453 441	112	UAC	Tyr	0.335 749	139
CAU	His	1.546 560	382	UAU	Tyr	1.664 250	689
AUA	Ile	0.952 549	629	GUA	Val	1.530 180	469
AUC	Ile	0.519 435	343	GUC	Val	0.440 457	135
AUU	Ile	1.528 020	1 009	GUG	Val	0.486 134	149
CUA	Leu	0.834 693	324	GUU	Val	1.543 230	473
CUC	Leu	0.314 298	122				
CUG	Leu	0.350 365	136				
CUU	Leu	1.231 430	478				
UUA	Leu	2.060 970	800				
UUG	Leu	1.208 240	469				

表6 金花菜叶绿体基因组密码子 ENC 比值频数分布  
Table 6 Codon ENC ratio frequency distribution in the *Medicago polymorpha* chloroplast genome

区间 Section	组限 Group limit	频数 Number	频率 Frequency
-0.1~0.0	-0.1	4	0.533 3
0.0~0.1	0	6	0.080 0
0.1~0.2	0.1	38	0.506 7
0.2~0.3	0.2	20	0.266 7
0.3~0.4	0.3	3	0.040 0
> 0.4	0.4	4	0.053 3
合计 Total		75	1.000 0

少部分基因分布在 A3/AU3 轴的右边部分。因此, 金花菜叶绿体基因组的同义密码子第 3 位上碱基 (A、T、G、C) 具有 C 大于 G、T 大于 A 的现象。因此, 与突变压力相比, 自然选择显著影响了金花菜叶绿体基因组同义密码子的使用偏好性。

### 2.6.3 最优密码子确定

如表 7 可知, 金花菜叶绿体基因组的最优密码子 (满足条件  $RSCU > 1$  和  $\Delta RSCU \geq 0.08$  的密码子) 有 12 个 (UUA、GCU、UAA、ACU、CCU、GAA、GUA、AUU、UGU、GGU、UUU、CUU), 12 个最优密码子均以 A、U 结尾。

## 2.7 苜蓿属植物的系统发育分析

苜蓿属在聚类图中聚成一个大类 (图 5); 草木樨属和胡卢巴属聚为另一大类。在苜蓿属中, 金花菜 (*M. polymorpha*, JHC, 产地: 江苏) 与 *M. polymorpha* MZ772862 (产地: 云南)、*M. polymorpha* MW971560 (产地: 美国)、*M. polymorpha* NC\_042848 (产地: 美国) 单独聚为一分支。在这个分支中, 金花菜 (JHC) 与 *M. polymorpha* MZ772862 聚为一小分支。说明金花菜 (JHC, 产地: 江苏) 与 *M. polymorpha* MZ772862 (产地: 云南) 亲缘关系较近, 与 *M. polymorpha* MW971560 (产地: 美国)、*M. polymorpha* NC\_042848 (产地: 美国) 关系较远, 表明中国金花菜与美国金花菜的起源存在差异。

## 3 讨论

分子测序技术的发展快速推动了叶绿体基因组学的发展。研究表明, IR 区域基因高度保守, 碱基

突变频率低于 LSC 和 SSC, IR 的保守性可以稳定叶绿体基因组结构<sup>[23]</sup>。IR 区域的扩张或缩减, 可显著影响叶绿体基因组的大小<sup>[24]</sup>。随着叶绿体基因组数据的不断积累, 豆科植物的叶绿体基因组发生 IR 区丢失, 已成为豆科蝶形花亚科植物的指示特征<sup>[25-27]</sup>。本研究结果也证实了这一观点。王晓娟等<sup>[28]</sup>测定云南金花菜 (南苜蓿) 叶绿体基因组为 124 349 bp, 总 GC 含量为 34.1%。在本研究中, 江苏金花菜叶绿体基因组长度为 124 163 bp, 基因组的总 GC 含量为 34.09%, 与云南金花菜 (南苜蓿) 一样, 江苏金花菜缺失了反向重复序列区, 研究表明, 这种反向重复序列区缺失属于反向重复序列缺失支 (inverted repeat-lacking clade, IRLC) (豆科蝶形花亚科车轴草族)<sup>[29]</sup>。云南金花菜 (南苜蓿) 的叶绿体基因组主要有蛋白编码基因 (77 个)、tRNA 基因 (30 个) 和 rRNA 基因 (4 个) 3 类基因<sup>[28]</sup>。本研究结果与此结果基本一致。假基因是 *infA*, 一般在 *rpl36* 和 *rps8* 基因之间, 有研究表明基因丢失或转移后留下的一些残余碱基可能是形成假基因 *infA* 的主要原因<sup>[30]</sup>。

叶绿体基因组的简单重复序列 (SSR) 用途广泛, 在种群多样性、遗传稳定性、物种道地性鉴定和系统进化分析方面具有重要作用<sup>[31]</sup>。云南金花菜 (南苜蓿) 叶绿体基因组的简单重复序列 (SSR) 位点超过 100<sup>[28]</sup>。田春育等<sup>[19]</sup>的研究表明, *Medicago polymorpha* NC\_042848 (MK460498) (产地: 美国) 含有 7 种简单重复序列 (SSR) 类型。在本研究中, 江苏金花菜叶绿体基因组只检测到 91 个 SSR 位点, 与云南金花菜 (南苜蓿)<sup>[28]</sup> 相同, 江苏金花菜叶绿体基因组的单碱基简单重复序列数量最多, 二碱基简单重复序列数量排在其次, 单碱基简单重复序列大多为 A/T, 二碱基简单重复序列大多为 AT/TA。江苏金花菜叶绿体基因组含有 3 种碱基重复类型, 即从单碱基重复到三碱基重复 3 种重复类型, 与 *Medicago polymorpha* NC\_042848 (MK460498) (产地: 美国) 不一致。

片段重复、缺失和重排一般是由叶绿体基因组的重复序列导致的<sup>[32]</sup>。物种的突变频率和进化速率之间的差异也可通过重复序列类型和数目的差异来反映<sup>[33-35]</sup>。田春育等<sup>[19]</sup>表明, 苜蓿属植物叶绿体基因组的长重复序列主要为正向重复 (forward repeats, F) 和回文重复 (palindromic repeats, P), F 和

表 7 金花菜叶绿体基因的最优密码子  
 Table 7 Optimal codons in the *Medicago polymorpha* chloroplast genome

密码子 Codon	氨基酸 Amino acid	相对同义密码子使用度 Relative synonymous codon usage (RSCU)		RSCU高表达 RSCU high expression		RSCU低表达 RSCU low expression		RSCU差值 $\Delta$ RSCU
		频度 Frequency	数量 Number	频度 Frequency	数量 Number	频度 Frequency	数量 Number	
UUA*	Leu	2.060 970	800	1.370 080	58	1.615 380	7	0.245 300
AUG	Met	1.992 030	500	1.000 000	45	1.000 000	6	0.000 000
GCU*	Ala	1.870 600	571	1.600 000	26	1.875 000	5	0.275 000
UCU	Ser	1.828 860	488	1.631 070	56	1.166 670	7	-0.464 400
UAA*	Ter	1.815 790	46	1.200 000	3	1.800 000	3	0.600 000
AGA	Arg	1.768 370	369	1.808 820	41	1.200 000	3	-0.608 820
UAU	Tyr	1.664 250	689	1.674 420	72	1.500 000	3	-0.174 420
ACU*	Thr	1.655 300	461	1.234 040	29	1.714 290	8	0.480 250
GGA	Gly	1.645 470	608	1.706 670	32	0.857 143	9	-0.849 527
CAA	Gln	1.613 070	617	1.371 430	48	1.000 000	2	-0.371 430
GAU	Asp	1.611 290	742	1.639 340	100	1.000 000	6	-0.639 340
CCU*	Pro	1.600 880	365	1.292 930	32	2.142 860	5	0.849 930
GAA*	Glu	1.560 400	930	1.292 310	84	1.666 670	5	0.374 360
AAA	Lys	1.556 100	957	1.364 160	118	1.166 670	7	-0.197 490
AAU	Asn	1.554 920	821	1.594 200	110	1.000 000	8	-0.594 200
CAU	His	1.546 560	382	1.489 360	35	0.666 667	1	-0.822 693
GUU	Val	1.543 230	473	1.733 330	39	1.666 670	10	-0.066 660
GUA*	Val	1.530 180	469	0.933 333	21	1.666 670	10	0.733 337
AUU*	Ile	1.528 020	1 009	1.411 760	80	1.560 000	13	0.148 240
UGU*	Cys	1.510 370	182	1.153 850	15	1.600 000	4	0.446 150
GGU*	Gly	1.431 660	529	1.013 330	19	1.142 860	12	0.129 530
UUU*	Phe	1.411 580	914	1.182 390	94	1.294 120	11	0.111 730
CGU	Arg	1.404 150	293	0.750 000	17	0.800 000	2	0.050 000
CGA	Arg	1.389 780	290	1.235 290	28	1.200 000	3	-0.035 290
AGU	Ser	1.315 430	351	1.135 920	39			-1.135 920
CCA	Pro	1.280 700	292	1.535 350	38	0.428 571	1	-1.106 779
ACA	Thr	1.231 600	343	1.361 700	32	0.857 143	4	-0.504 557
CUU*	Leu	1.231 430	478	1.417 320	60	1.615 380	7	0.198 060
UUG	Leu	1.208 240	469	1.322 830	56	1.153 850	5	-0.168 980
UCA	Ser	1.195 500	319	1.368 930	47	1.000 000	6	-0.368 930
GCA	Ala	1.143 330	349	1.230 770	20	0.375 000	1	-0.855 770

\*表示最优密码子。

\* represents the optimal codon.

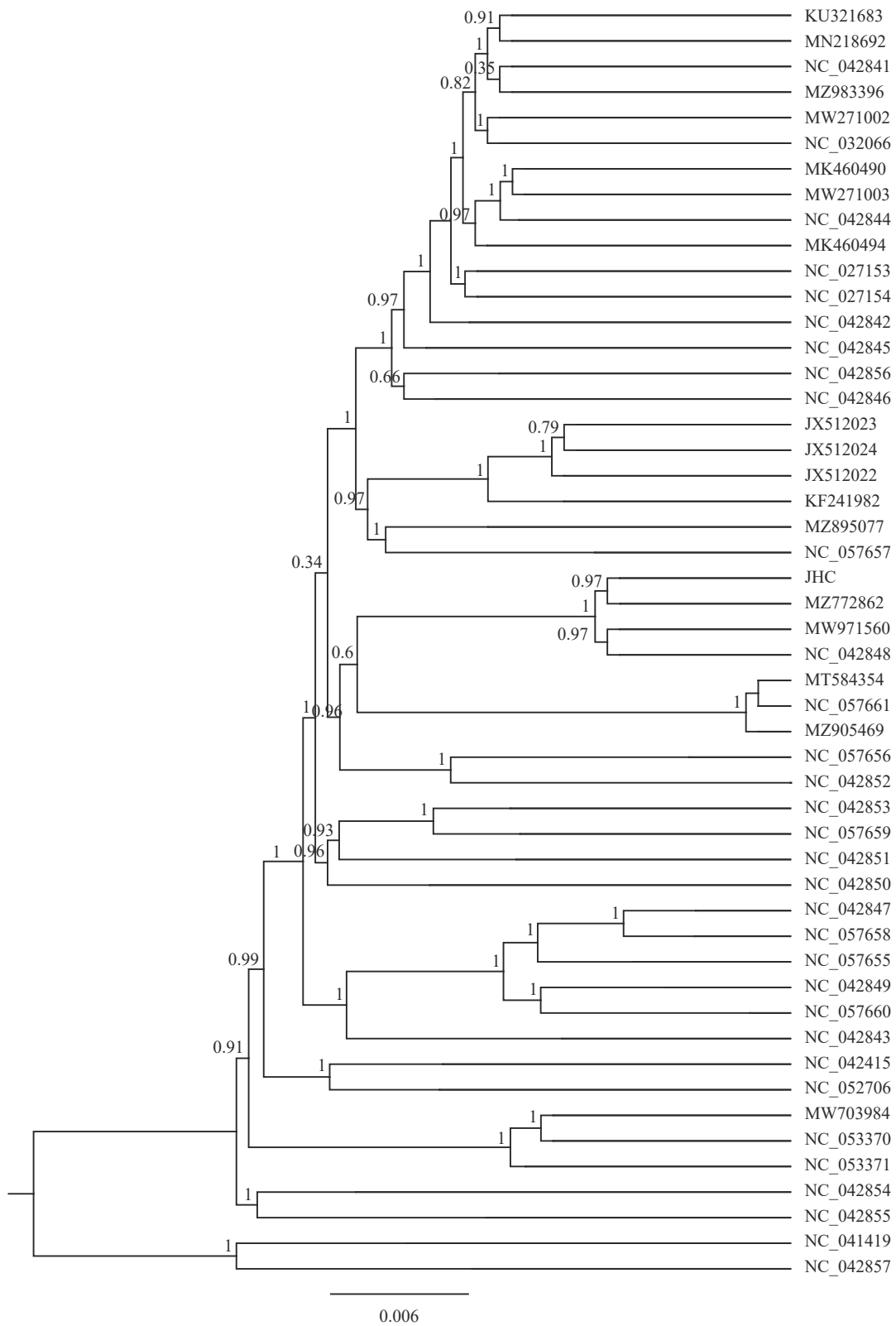


图 5 基于叶绿体基因组的金花菜 (JHC) 及其 45 个近缘种和 2 个外类群物种的系统发育树  
Figure 5 Phylogenetic tree of *Medicago polymorpha* (JHC) and its 45 closely related species and 2 species level taxa based on their chloroplast genomes

P 极少出现,表明在突变频率及进化速率方面,苜蓿属物种存在种间差异,推测亲缘关系可能与长重复序列类型和数量相关。本研究结果证实了该结论。

目前叶绿体基因组的密码子偏好性也引起了专家的较多关注<sup>[36]</sup>。外源基因的表达水平一般由物种的密码子偏好性来决定<sup>[37]</sup>,以 A/T 结尾属于双子叶植物密码子偏好性的显著特征,以 G/C 结尾属于单子叶植物密码子偏好性的显著特征<sup>[38]</sup>。本研究结果表明,江苏金花菜叶绿体基因组 32 个 RSCU > 1 的密码子除 AUG、UUG、UGG 外,其余都以 A、U 结尾,江苏金花菜叶绿体基因组密码子偏好以 A、U 结尾。杨国锋等<sup>[16]</sup>通过 Neutrality-plot analysis、ENC-plot analysis,发现内部突变可以显著影响蒺藜苜蓿叶绿体基因组的密码子偏好性。本研究结果与此不一致。本研究表明,自然选择可以显著影响江苏金花菜叶绿体基因组的密码子使用偏好性,这与紫花苜蓿叶绿体基因组密码子偏好性分析的研究结果<sup>[17]</sup>一致。

研究表明,布朗其苜蓿 *M. blanchena* NC\_042852 与 *M. polymorpha* NC\_042848 (MK460498)(美国)聚为一类<sup>[19]</sup>。*M. polymorpha* MZ772862 (云南)与 *M. polymorpha* NC\_042848 (MK460498) (美国)聚为一类<sup>[18]</sup>。本研究中,金花菜(JHC,江苏)与 *M. polymorpha* MZ772862 (云南)、*M. polymorpha* MW971560 (美国)、*M. polymorpha* NC\_042848 (美国)单独聚为一分支。

在这个分支中, JHC 与 *M. MZ772862* 聚为一小分支。说明 JHC 与 MZ772862 (云南)亲缘关系较近,与 MW971560 (美国)、NC\_042848 (美国)关系较远,表明中国金花菜与美国金花菜的起源存在差异。

#### 4 结论

金花菜叶绿体基因组大小为 124 163 bp,无四分体结构,基因组总 GC 含量为 34.09%;金花菜叶绿体基因组共注释出 111 个基因(76 个 CDS 基因、30 个 tRNA 基因、4 个 rRNA 基因、1 个假基因)、91 个 SSR 位点(单碱基重复 36 个,双碱基重复 13 个,三碱基重复 2 个)、148 个长重复序列,(117 个正向重复、20 个回文重复、1 个反向重复、10 个互补重复);金花菜叶绿体基因组核苷酸多样性的变化范围为 0~0.310 0,基因 *accD*、*trnP-UGG-psaJ*、*rps12-exon1-clpP1*、*psaJ-trnI-CAU*、*ycf2* 变异率最高;与突变压力相比,自然选择显著影响金花菜叶绿体基因组密码子的使用偏性;金花菜叶绿体基因组第三位密码子偏好以 A 和 U 作为末尾碱基,UUA、GCU、UAA、ACU、CCU、GAA、GUA、AUU、UGU、GGU、UUU、CUU 为金花菜叶绿体基因组的最优密码子;金花菜(JHC,江苏)与 *Medicago polymorpha* MZ772862 (云南)亲缘关系较近,与 *Medicago polymorpha* MW971560 (美国)、*Medicago polymorpha* NC\_042848 (美国)关系较远。

#### 参考文献 References:

- [1] 陈莉敏,李达旭,白史且,张玉,毛德才,廖兴勇,杨晓玲. <sup>60</sup>Co-γ 射线辐射对金花菜种子生物学效应的影响. 核农学报, 2022, 36(9): 1701-1706.  
CHEN L M, LI D X, BAI S Q, ZHANG Y, MAO D C, LIAO X Y, YANG X L. The biological effect of <sup>60</sup>Co-γ ray radiation on *Medicago polymorpha* L. seeds. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(9): 1701-1706.
- [2] 刘晓云,郭振国,李乔仙,刘桂霞,薛世明,王易鹏. 南苜蓿高效共生根瘤菌土壤的筛选. 生态学报, 2011, 31(14): 4034-4041.  
LIU X Y, GUO Z G, LI Q X, LIU G X, XUE S M, WANG Y P. Screening of highly effective rhizobial strains on *Alfalfa* (*Medicago polymorpha*) in soil. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(14): 4034-4041.
- [3] 中国科学院植物研究所. 中国植物志. 北京: 科学出版社, 1998.  
Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. Flora of China. Beijing: Science Press, 1998.
- [4] 董磊,王栋麟,王琳,刘大林. 外源水杨酸缓解金花菜高温胁迫的生理响应. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2022, 43(4): 129-136.  
DONG L, WANG D L, WANG L, LIU D L. Physiological effects of exogenous salicylic acid on relatively high-temperature stress in Jinhua. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2022, 43(4): 129-136.
- [5] DENTON M D, HILL C R, BELLOTTI W D, COVENTRY D R. Nodulation of *Medicago truncatula* and *Medicago polymorpha* in

- two pastures of contrasting soil pH and rhizobial populations. *Applied Soil Ecology*, 2007, 35(2): 441-448.
- [6] 贾雪杰,游明鸿,李达旭,雷雄,任小英,熊晓兰,杜静,陈丽敏,董志晓,张建波,马啸. 减量施肥对金花菜—水稻轮作系统中产量和土壤养分的影响. *草地学报*, 2023, 31(3): 876-883.  
JIA X J, YOU M H, LI D X, LEI X, REN X Y, XIONG X L, DU J, CHEN L M, DONG Z X, ZHANG J B, MA X. Effects of nutrient coordination on yield and soil nutrients in a burclover—rice rotation system. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(3): 876-883.
- [7] 魏臻武,任海龙,武自念,刘国志,陈祥,乔志宏. 金花菜新品种“淮扬金花菜”. *园艺学报*, 2015, 42(11): 2335-2336.  
WEI Z W, REN H L, WU Z N, LIU G Z, CHEN X, QIAO Z H. New *Medicago polymorpha* cultivar, Huaiyang Jinhua cai. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(11): 2335-2336.
- [8] 洪森荣,朱盈盈,李紫莹,胡明艳,欧阳克蕙. 盐胁迫下金花菜和紫花苜蓿试管苗的转录组分析及其耐盐基因筛选. *中国农学通报*, 2023, 39(3): 111-118.  
HONG S R, ZHU Y Y, LI Z Y, HU M Y, OUYANG K H. Plantlets of *Medicago polymorpha* and *Medicago sativa* under salt stress: transcriptome analysis and salt tolerance gene screening. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2023, 39(3): 111-118.
- [9] TANG D F, WEI F, KASHIF M H, KHAN A, LI Z Q, SHI Q Q, JIA R X, XIE H Y, ZHANG L, LI B, CHEN P, ZHOU R Y. Analysis of chloroplast differences in the leaves of rice isonuclear alloplasmic lines. *Protoplasma*, 2018, 255(3): 863-871.
- [10] LI G L, PAN Z L, GAO S C, HE Y Y, XIA Q Y, JIN Y, YAO H P. Analysis of synonymous codon usage of chloroplast genome in *Porphyra umbilicalis*. *Genes & Genomics*, 2019, 41(10): 1173-1181.
- [11] DURET L. Evolution of synonymous codon usage in metazoans. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002, 12(6): 640-649.
- [12] HERSHBERG R, PETROV D. Selection of codon bias. *Annual Review of Genetics*, 2008, 42: 287-299.
- [13] WANG H J, MENG T, WEI W Q. Analysis of synonymous codon usage bias in helicase gene from *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus. *Genes & Genomics*, 2018, 40(7): 767-780.
- [14] LONG S Y, YAO H P, WU Q, LI G L. Analysis of compositional bias and codon usage pattern of the coding sequence in the Banna virus genome. *Virus Research*, 2018, 258: 68-72.
- [15] FITTER J T, THOMAS M R, ROSE R J, SCOTT N S. Heteroplasmy of the chloroplast genome of *Medicago sativa* L. ‘Regen S’ was confirmed by sequence analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93(5-6): 685-690.
- [16] 杨国锋,苏昆龙,赵怡然,宋智斌,孙娟. 蒺藜苜蓿叶绿体密码子偏好性分析. *草业学报*, 2015, 24(12): 171-179.  
YANG G F, SU K L, ZHAO Y R, SONG Z B, SUN J. Analysis of codon usage in the chloroplast genome of *Medicago truncatula*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015, 24(12): 171-179.
- [17] 喻凤,韩明. 紫花苜蓿叶绿体基因组密码子偏好性分析. *广西植物*, 2021, 41(12): 2069-2076.  
YU F, HAN M. Analysis of codon usage bias in alfalfa chloroplast genome of alfalfa (*Medicago sativa*). *Guihaia*, 2021, 41(12): 2069-2076.
- [18] 孙志轩,敖平星,毕玉芬,赵雁. ‘德钦’紫花苜蓿叶绿体基因组序列及特征分析. *草地学报*, 2022, 30(2): 320-328.  
SUN Z X, AO P X, BI Y F, ZHAO Y. Complete chloroplast genome sequence and characteristics analysis of *Medicago sativa* ‘Deqin’. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(2): 320-328.
- [19] 田春育,李志勇,刘倩,于林清,武自念. 苜蓿属不同物种叶绿体基因组结构比较及亲缘关系分析. *中国草地学报*, 2021, 43(10): 1-8.  
TIAN C Y, LI Z Y, LIU Q, YU L Q, WU Z N. Comparison of chloroplast genome structure and phylogenetic analysis of different species of *Medicago*. *Chinese Journal of Grassland*, 2021, 43(10): 1-8.
- [20] 赵嫚,陈仕勇,李亚萍,周青平,陈有军,常馨丹. 外源 GABA 对盐胁迫下金花菜种子萌发及幼苗抗氧化能力的影响. *江苏农业学报*, 2021, 37(2): 310-316.  
ZHAO M, CHEN S Y, LI Y P, ZHOU Q P, CHEN Y J, CHANG X D. Influence of exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) on seed germination and antioxidant protection of *Medicago polymorpha* under salt stress. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 37(2): 310-316.
- [21] 江舟,陈丰,王东军,魏臻武,唐晨阳. 金花菜与燕麦间作对牧草产量与品质的影响. *中国草地学报*, 2020, 42(5): 127-135.  
JIANG Z, CHEN F, WANG D J, WEI Z W, TANG C Y. Effects of intercropping burr medics with oats on foyield and quality. *Chinese Journal of Grassland*, 2020, 42(5): 127-135.
- [22] 周克友,李争艳,陈祥,任海龙,江舟,魏臻武. 不同光周期条件下金花菜 F2 代农艺性状的变异特征. *草地学报*, 2017, 25(6):

- 1300-1307.
- ZHOU K Y, LI Z Y, CHEN X, REN H L, JIANG Z, WEI Z W. Study on variation characteristics of *Medicago polymorpha* F2 generation under different photoperiods. *Acta Agrestia Sinica*, 2017, 25(6): 1300-1307.
- [23] JANSEN R K, RUHLMAN T A. Plastid genomes of seed plants. //BOCK R, KOOP V. *Genomics of Chloroplasts and Mitochondria*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012: 103-126.
- [24] MOWER J P, VICKREY T L. Structural Diversity Amongplastid Genomes of Land Plants. //CHAW S M, JANSEN R K. *Advances in Botanical Research*. London: Academic Press, 2018: 263-292.
- [25] BRUNEAU A, DOYLE J J PALMER J. Chloroplast DNA inversion is a subtribal characteristic in *Phaseoleae* (*Leguminosae*). *Systematic Botany*, 1990, 15(3): 378-386.
- [26] KOLODNER R, TEWARI K K. Inverted repeats in chloroplast DNA from higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(1): 41-45.
- [27] SCHWARZ E N, RUHLMAN T A, WENG M L, KHIYAMI M A, SABIR J S M, HAJARAH N H, ALHARBI N S, RABAH S O, JANSEN R K. Plastome-wide nucleotide substitution rates reveal accelerated rates in Papilionoideae and correlations with genome features across legume subfamilies. *Journal of Molecular Evolution*, 2017, 84(4): 187-203.
- [28] 王晓娟, 董文攀, 周世良. 基于叶绿体基因组分析我国苜蓿属植物演化路径. *生态学报*, 2022, 42(15): 6125-6136.
- WANG X J, DONG W P, ZHOU S L. The evolutionary path of *Medicago* in China was based on chloroplast genome analysis. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, 42(15): 6125-6136.
- [29] HONG C P, PARK J, LEE Y, LEE M, PARK S G, UHM Y, LEE J, KIM C. *accD* nuclear transfer of *Platycodon grandiflorum* and the plastid of early *Campanulaceae*. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 1-13.
- [30] MILLEN R S, OLMSTEAD R G, ADAMS K L, PALMER J D, LAO N T, HEGGIE L, KAVANAGH T A, HIBBERD J M, GRAY J C, MORDEN C W, CALIE P J, JERMIIN L S, WOLFE K H. Many parallel losses of *infA* from chloroplast DNA occur during angiosperm evolution, with multiple independent transfers to the nucleus. *Plant Cell*, 2001, 13(3): 645-658.
- [31] SASKI C, LEE S B, DANIELL H, WOOD T C, TOMKINS J, KIM H G, JANSEN R K. Complete chloroplast genome sequence of *Gycine max* and comparative analyses with other legume genomes. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59(2): 309-322.
- [32] LI B, ZHENG Y. Dynamic evolution and phylogenomic analysis of the chloroplast genome in *Schisandraceae*. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 9285.
- [33] SALTONSTALL K, LAMBERTINI C. Value of repetitive sequences in chloroplast DNA for phylogeographic inference: A comment on Vachon and Freeland (2011). *Molecular Ecology Resources*, 2012, 12(4): 581-589.
- [34] 曾令霜, 张晨晨, 张敬, 徐彬. 多年生黑麦草种质 SSR 分子标记遗传多样性分析. *草业科学*, 2022, 39(1): 75-84.
- ZENG L S, ZHANG C C, ZHANG J, XU B. Genetic diversity analysis of perennial ryegrass germplasm using SSR molecular markers. *Pratacultural Science*, 2022, 39(1): 75-84.
- [35] 张婷婷, 张鹤山, 宋康杰, 赵泽宇, 许本波, 刘洋. 白三叶转录组 SSR 位点特征分析及引物开发. *草业科学*, 2023, 40(9): 2266-2275.
- ZHANG T T, ZHANG H S, SONG K J, ZHAO Z Y, XU B B, LIU Y. Analysis of SSR site characteristics of *Trifolium repens* transcriptome and primer development. *Pratacultural Science*, 2023, 40(9): 2266-2275.
- [36] JIANG Y, DENG F, WANG H L. Extensive analysis of global codon usage patterns in baculoviruses. *Archives of Virology*, 2008, 153(12): 2273-2282.
- [37] QUAX T F, CLAASSENS N, SÖLL D, OOST J. Codon bias as a means to fine-tune gene expression. *Molecular Cell*, 2015, 59(2): 149-161.
- [38] WANG L, ROOSSINCK M J. Comparative analysis of expressed sequences reveals a conserved pattern of optimal codon usage in plants. *Plant Molecular Biology*, 2006, 61(4-5): 699-710.

(责任编辑 张瑾)