

花生区组叶绿体高突变区验证及遗传关系分析

王娟¹, 李春娟^{1§}, 石大川², 刘宇¹, 唐荣华³, 贺梁琮³, 赵小波¹, 苑翠玲¹, 孙全喜¹, 闫彩霞^{1*}, 单世华^{1*}

(1. 山东省花生研究所, 山东 青岛, 266101;

2. 青岛市农业科学研究院, 山东 青岛, 266101;

3. 广西农业科学院经济作物研究所, 广西 南宁, 530000)

摘要:栽培种花生是重要的油料作物和经济作物。由于长期的人工选择压力和驯化作用,造成栽培种花生种质遗传背景渐趋狭窄,严重限制了利用现有品种进行遗传改良的效果。准确揭示栽培种花生与本区组内其它物种之间的遗传关系是野生遗传资源保护和有效利用的首要前提。叶绿体基因组具有母系遗传、能够解决低阶分类单元问题等特点,但利用叶绿体基因组全序列解析花生区组种间系统进化关系,具有步骤复杂、耗时长、成本高等缺点。本研究基于花生属花生区组14个叶绿体全序列及直立区组1个叶绿体全序列,初步筛选得到7个候选高突变区,通过引物设计和扩增测序,根据遗传变异数目及遗传多样性锚定到花生区组的高突变区,即*psbE-petL*的基因间区。经系统发生树拓扑分支结构对比,该区域能够较好地揭示花生区组种间遗传关系,可实现对花生区组尚不明确系统位置的其它物种进行快速鉴定,为准确揭示花生区组种间遗传关系提供重要参考。

关键词:花生属;叶绿体基因组;候选高突变区;遗传关系

中图分类号: S565.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2021)03-0495-07

Verifying high variation regions based on sect. *Arachis* chloroplast genome and revealing the interspecies genetic relationship

WANG Juan¹, LI Chun-juan^{1§}, SHI Da-chuan², LIU Yu¹, TANG Rong-hua³, HE Liang-qiong³, ZHAO Xiao-bo¹, YUAN Cui-ling¹, SUN Quan-xi¹, YAN Cai-xia^{1*}, SHAN Shi-hua^{1*}

(1. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266101, China; 2. Qingdao Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China; 3. Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530000, China)

Abstract: Cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) is one of the most important oilseed crops and cash crops worldwide. However, the genetic improvement of peanut cultivar is restricted by its narrow genetic base. The highly variable wild peanut species may serve as a rich genetic source of disease and insect resistant genetic resources. In order to take advantage of these wild peanut resources, the phylogenetic relationship of the *Arachis* species need firstly to be understood. The whole chloroplast (cp) genomes with uniparental inheritance and low order classification will help to reveal the sect. *Arachis* genetic relationship, but more time and procedures would be required. Here, the total of 9 candidate high variation regions was targeted based on the available 15 sect. *Arachis* cp complete genomes and 1 sect. *Erectoides* cp complete genome. By PCR verification, the region *psbE-petL* was found to be the highest variation region, which was used to detect the genetic relationship rapidly for the unknown sect. *Arachis* species. By comparing the topological structure of the phylogenetic tree, our study provided important reference for new species delimitation and interspecies exploration.

Key words: sect. *Arachis*; chloroplast genomes; candidate high variation regions; genetic relationship

收稿日期: 2020-05-07

基金项目: 泰山学者特聘专家(ts201712080); 国家自然科学基金(31800164, 31901506); 山东省农业科学院农业科技创新工程(CXGC2018E21)

作者简介: 王娟(1984-), 女, 助理研究员, 研究方向: 花生遗传育种, E-mail: wangjuan_1984@163.com; § 李春娟(1973-), 女, 助理研究员, 研究方向: 花生遗传育种研究, E-mail: peanutlab@163.com

* 通讯作者: 闫彩霞(1976-), 女, 副研究员, 研究方向: 花生抗病耐逆种质鉴定与新品种选育, E-mail: cxyan335@sina.com;

单世华(1971-), 男, 研究员, 研究方向: 花生种质资源与育种研究, E-mail: shansh1971@163.com

栽培种花生(*Arachis hypogaea* L.)是世界上重要的经济作物和油料作物,主要分布于亚洲、非洲和美洲,种植面积占全世界种植面积的99.7%。其中,中国是世界上花生种植和出口大国^[1,2]。尽管栽培种花生种植范围广,表型多样化,但是由于:1)严格的自花授粉方式;2)长期的人工驯化选择历史;3)近亲起源且属于单起源等方面的原因导致栽培种花生的遗传基础相对狭窄^[3,4]。此外,我国的栽培花生品种大多含有狮头企和伏花生的血缘,这也在很大程度上限制了利用现有栽培品种进行遗传改良的效果。因此,通过种间杂交引入外源有利等位基因资源来拓宽栽培种花生遗传基础,显得尤为迫切。

野生花生种类丰富,在热带、亚热带气候环境下有着广泛的适应性。野生花生具有抗病虫害、抗旱、多实、多花、高油分和高蛋白含量等多个优良的性状^[1,4,5]。因此,有些野生花生种质资源虽无栽培价值,但可通过杂交选育来利用野生种花生中的有利基因,达到培育新品种或改良现有品种的目的。综上所述,合理地利用栽培种花生和野生种的杂交选育能够有效地拓宽栽培种遗传基础,改良现有栽培品种。研究指出,区组间种间杂交常出现杂交不亲和或杂种完全不育的情况,而区组内种间杂交更具亲和性,因此准确揭示花生区组的各物种间遗传变异程度和系统发育关系,是野生花生遗传资源保护和栽培种遗传改良的重要前提和参考依据。

形态学特征发现,具有高原适应性的直立、围脉、根茎区组的二倍体种是最古老的花生类群,而花生、异形花、大根、匍匐、三籽粒以及根茎区组的四倍体则属于相对进化的类群^[1,6]。在分子水平上也有许多关于花生属各物种遗传关系的研究报道,使用的分子标记涉及了核基因片段(Stearoyl-ACP去饱和酶基因序列, Oleoyl-PC去饱和酶基因序列, ITS 1/2 & 5.8s rDNA等)、核基因组分子标记(微卫星,限制性片段多态性等)以及部分或者全部叶绿体基因序列(*trnT-F*)^[7-16]。归纳起来,花生属系统分支特征与物种的基因组类型、生活周期等生物学特征相关。但由于遗传标记数目的限制,导致利用不同遗传标记时分支内各物种间的聚类关系差异较大。可见,选择合适的遗传标记是准确揭示系统发育关系的重要因素。

近年来,高通量测序技术促进了基因组学的发展,相对于其他遗传标记,叶绿体基因组具备单倍性、母系遗传、重组率低、结构和功能保守等特点。

利用叶绿体基因组的全序列能够较为准确地揭示花生区组各物种间的系统发生过程。例如, Schwarz等^[17]和 Prabhudas等^[18]分别发表了一个栽培种花生的叶绿体全基因组,提供了叶绿体基因组大小和基因注释种类,为花生区组叶绿体基因组比较分析提供重要参考。Wang等^[19]选取花生栽培种4个代表生物学类型(*A. hypogaea* var. *hypogaea*, var. *hirsuta*, var. *fastigiata* 和 var. *vulgaris*)种质,经过高通量测序,精细尺度上比较了不同类型花生的叶绿体全基因组序列差异。另外,对于花生野生种的叶绿体全基因组资源已有相关报道, Yin等^[4]和 Wang等^[20]分别通过拼装获得了花生属的6个和12个野生种花生的叶绿体基因组序列。但是,利用叶绿体全基因组序列解析花生属种间系统进化关系需要经过建库、测序、原始数据过滤、组装和全序列比对分析等多个步骤,最终才能完成基于叶绿体全序列的系统进化树的构建,涉及的生物信息学分析较为复杂。本研究在花生区组已有物种叶绿体全基因组全序列基础上,对花生区组的高突变区进行筛选与验证,旨在保证系统发生树的各分支间拓扑结构不变的情况下,通过简单的扩增测序快速有效地解析花生区组种间遗传关系。

1 材料与方法

1.1 花生叶绿体全基因组数据下载及比对分析

通过NCBI数据库选择“SRA”后,以“chloroplast genome of *Arachis hypogaea*”为关键词或者根据文献中提供的基因库编号下载花生属叶绿体相关高通量测序数据,得到花生属花生区组四个典型植物学类型的栽培种花生的叶绿体基因组全序列:*Arachis hypogaea* var. *fastigiata*, var. *hirsuta*, var. *hypogaea* 和 var. *vulgaris*, 10个花生区组野生种花生的叶绿体基因组全序列:*A. monticola*, *A. duranensis*, *A. stenosperma*, *A. batizocoi*, *A. cardenasii*, *A. helodes*, *A. correntina*, *A. hoehnei*, *A. chacoensis* 和 *A. villosa* 以及1个直立区组的叶绿体基因组全序列:*A. paraguayensis*^[19,20]。种质信息见表1。利用软件MEGA v7.0 (<http://www.megasoftware.net>)将所有序列对齐后构建叶绿体全序列的系统发生关系树。同时,使用VISTA软件通过窗口为500 bp大小的滑动框来统计不同窗口内SNP和In-Del变异的数目,优先选择二者均丰富的区域,经过扩增、测序和分析最终锚定叶绿体全基因组上的高突变区域。

表1 栽培种和野生种样品的信息表
Table 1 The details of the cultivated and wild *Arachis*

物种名 Species	染色体倍性 Ploidy	基因组类型 Genome type	基因号 GenBank accession No.	种质资源编号 GRIN accession No.	材料来源 Collection site
Sect. <i>Arachis</i>					
Cultivated peanut accessions					
<i>A. hypogaea</i> var. <i>hypogaea</i>	4×	AABB	MG814008	Zh.h2410	山东省花生研究所
<i>A. hypogaea</i> var. <i>hirsuta</i>	4×	AABB	MG814007	Zh.h2376	山东省花生研究所
<i>A. hypogaea</i> var. <i>fastigiata</i>	4×	AABB	MG814006	Zh.h1602	山东省花生研究所
<i>A. hypogaea</i> var. <i>vulgaris</i>	4×	AABB	MG814009	Zh.h2105	山东省花生研究所
Wild allotetraploid species					
<i>A. monticola</i>	4×	AABB	MK144818	PI219824	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃
Wild diploid species					
<i>A. batizocoi</i>	2×	KK	MK144820	PI298639	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃
<i>A. cardenasii</i>	2×	AA	MK144824	PI262141	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃
<i>A. chacoensis</i>	2×	AA	MK144821	PI276235	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃
<i>A. correntina</i>	2×	AA	MK144828	PI331192	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃
<i>A. duranensis</i>	2× _x	AA	MK144822	PI263133	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃
<i>A. helodes</i>	2×	AA	MK144826	Manso588	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃
<i>A. hoehnei</i>	2×	AA	MK144827	KG30006	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃
<i>A. stenosperma</i>	2×	AA	MK144819	PI338280	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃
<i>A. villosa</i>	2×	AA	MK144825	PI210555	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃
Sect. <i>Erectoides</i>					
<i>A. paraguayensis</i>	2×	EE	MK144823	PI331187	国家种质武昌野生花生圃南宁分圃

1.2 DNA提取、高突变候选区域引物设计及Sanger测序验证

每份种质材料随机选取2、3粒完整种子,培养皿中浸种3~4 d,待种子萌发出芽后置入培养盒,28℃下培养10~12 d。使用植物基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN, Beijing, China)提取花生叶片DNA。利用Super GelRed(S-2001)进行凝胶电泳检测(US Everbright Inc, Suzhou, China)后,使用NanodropTM2000(Thermo Scientific, USA)分光光度计检测DNA完整性和纯度。所获得的4份栽培种DNA样品和11份野生种DNA样品,每份DNA样品保证单位浓度不少于50 ng/μL,总质量大于2 μg,放于冰箱(-80℃)保存备用。

引物设计利用软件primer premier v6. 25(<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/index.html>),根据锚定区域上游设计范围1~100 bp,下游设计范围600~700 bp,产物大小在500~700 bp之间。引物扩增基因组DNA样品,反应体系总体积为25 μL,含Master Mix 12.5 μL, DNA模板0.5 μL, ddH₂O 10 μL,上游引物1 μL,下游引物1 μL。反应条件为:95℃预变性5 min, 94℃变性50 s, 50~58℃退火1 min, 72℃延伸50 s, 33个循环, 72℃再延伸7 min, 4℃

保存。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳,电压120 V,电泳40 min,经凝胶成像分析系统(Tannon, Shanghai, China)检测后,将条带清晰的扩增产物进行Sanger测序

1.3 利用高突变区构建系统发生树

PCR测序结果经MEGA v7.0 (<http://www.megasoftware.net>)进行对齐后,利用DNAsp v6软件^[21]统计序列的插入和缺失数据以及遗传多样性参数 π 值(核苷酸多样性,基于任意两条不同序列的碱基差异数取平均值)和 θ 值(核苷酸多态性,基于全部序列内分离位点个数)。利用软件MEGA v7.0构建系统发育树,分析物种间的分支拓扑结构关系。

2 结果与分析

2.1 全基因组序列比对及高突变候选区的锚定

花生属花生区组的11个物种和直立区组的1个物种的叶绿体基因组全序列对齐后,以500 bp大小为滑动窗口进行SNP和InDel检测。获得SNP数目大于15且InDel数目大于5的窗口13个,SNP数目大于15窗口10个。初步筛选到遗传变异丰富的区间23个。

SNP数目最多的窗口于66 000 bp至66 500 bp

的区间,属于 *psbE-petL* 的基因间区(表2)。有两个叶绿体基因区域(57 000 bp-57 500 bp; 115 500 bp-116 000 bp)的 InDel 数目多达 11 个(表2),分别位于 *trnQ-accD* 基因间区和 *rpl32-trnL-ccsA*, *trnL* 基因区域^[20]。

在两种遗传变异类型均丰富的条件下,进一步

锚定到 7 个遗传变异(SNP & InDel)的窗口。在各个候选区域的上下游 100~200 bp 分别设计扩增引物序列(表3)。

2.2 Sanger 测序验证、遗传多样性分析及高突变区筛选

经过 PCR 验证,分别获取了花生属花生区组 11

表2 花生属叶绿体全基因组 SNPs 和 InDel 变异丰富区域统计表
Table 2 Regions with abundant SNPs and InDels based on the whole chloroplast genome of *Arachis*

序号 NO.	窗口 Windows	区间 Region	名称 Position	位置 Location	变异数目 Count
1	57 000-57 500	LSC	<i>trnQ-UUG-accD</i>	spacer	11 InDels, 17 SNPs
2	115 500-116 000	SSC	<i>rpl32-trnL-UAG;trnL-UAG;trnL-UAG-ccsA</i>	spacer; coding; spacer	11 InDels, 21 SNPs
3	66 000-66 500	LSC	<i>psbE-petL</i>	spacer	10 InDels, 27 SNPs
4	123 000-123 500	SSC	<i>ndhA</i>	coding	8 InDels, 13 SNPs
5	112 000-112 500	IRa;SSC	<i>trnN-GUU-ndhF; ndhF</i>	spacer; coding	7 InDels, 26 SNPs
6	53 000-53 500	LSC	<i>trnR-UCU; trnR-UCU-trnS-GCU</i>	coding; spacer	6 InDels, 20 SNPs
7	53 500-54 000	LSC	<i>trnR-UCU-trnS-GCU</i>	coding	6 InDels, 14 SNPs
8	56 000-56 500	LSC	<i>psbK; psbK-trnQ-UUG</i>	coding; spacer	6 InDels, 20 SNPs
9	10 000-10 500	LSC	<i>trnV-UAC; trnV-UAC-ndhC</i>	coding; spacer	5 InDels, 17 SNPs
10	29 500-30 000	LSC	<i>psbD-trnF-GGU</i>	spacer	5 InDels, 13 SNPs
12	115 000-115 500	SSC	<i>rpl32;rpl32-trnL-UAG</i>	coding; spacer	5 InDels, 25 SNPs
13	119 500-120 000	SSC	<i>psaC-ndhE; ndhE-ndhG</i>	spacer; spacer	5 InDels, 22 SNPs
14	44 500-45 000	LSC	<i>rpoC2</i>	coding	26 SNPs
15	15 000-15 500	LSC	<i>trnL-UAA-trnL-UGU;trnT-UGU;trnT-UGU-rps4</i>	spacer; coding; spacer	23 SNPs
16	56 500-57 000	LSC	<i>psbK-trnQ-UUG; trnQ-UUG; trnQ-UUG-accD</i>	spacer; coding; spacer	20 SNPs
17	81 000-81 500	LSC	<i>rps11-rpl36; rpl36; rpl36-rps8</i>	spacer; coding; spacer	20 SNPs
18	114 500-115 000	SSC	<i>ndhF-rpl32; rpl32</i>	spacer; coding	20 SNPs
19	86 000-86 500	LSC;IRA	<i>rps19; rps19-rpl2; rpl2</i>	coding; spacer; coding	18 SNPs
20	14 500-15 000	LSC	<i>trnL-UAA-trnL-UGU</i>	spacer	17 SNPs
21	57 000-57 500	LSC	<i>trnQ-UUG-accD</i>	spacer	17 SNPs
22	130 500-130 894	SSC	<i>ycf1</i>	coding	17 SNPs
23	130 000-130 500	SSC	<i>ycf2</i>	coding	16 SNPs

表3 引物合成信息
Table 3 Primer synthesis information

序号 NO.	位置 Position	窗口 Slide-window	地点 Location	区域 region	上游引物 F-Primer	下游引物 R-Primer	长度 Length
1	<i>trnQ-UUG-accD</i>	57 000-57 500	spacer	LSC	CCGTCCCAGAGCATATCCAT	GCCAAGAGCACTCCCATTTC	575
2	<i>rpl32-trnL-UAG;trnL-UAG;trnL-UAG-ccsA</i>	115 500-116 000	spacer; coding; spacer	SSC	TGTTCCATTTCCGACGAGATAA	AATGGTAAATGGCCCCACAAA	685
3	<i>psbE-petL</i>	66 000-66 500	spacer	LSC	GGGCATTCTAAGGTAACCTCGTT	AAGCACTTCCTAAGTTTCCAA	593
4	<i>trnR-UCU;trnR-UCU-trnS-GCU</i>	53 000-53 500	coding; spacer	LSC	AAGGAGGCTATTGAGGAACAAA	ATTCCCCTACCCGCTTT	785
5	<i>trnN-GUU-ndhF;ndhF</i>	112 000-112 500	spacer; coding	IRa; SSC	CCCTTGCTTACCAAGTTCCAT	TCTATAAGCCCGTTTATTCGGT	403
6	<i>rpl32;rpl32-trnL-UAG</i>	115 000-115 500	coding; spacer	SSC	GTCTTTCACATGACTTGTAGCA	TTATCTCGTCGGAATGGAACA	625
7	<i>psaC-ndhE; ndhE-ndhG</i>	119 500-120 000	spacer; spacer	SSC	CGTGCGAGTTTGTTGAATTAC	TCTCTTAGCTGCTTTGATAGGT	697

个物种及直立区组1个物种的叶绿体基因组上7个候选高突变区域相应的叶绿体DNA序列,长度范围在403~785 bp之间。每个区域相应的序列分别对齐后,通过软件Dnasp v6计算遗传多样性参数 π 值和 θ 值,这些候选区域的 π 值范围在0.0000~0.00912之间, θ 值范围在0.0000~0.01091之间。由表5可知,*psbE-petL*基因间区的遗传变异程度高于其它候选基因区域。因此,该间区是代表花生属叶绿体基因组上遗传变异程度最高的区域。*trnR-S*区域的遗传变异程度次之(表4)。

2.3 高突变区的系统发生树构建及对比分析

本研究分别用*psbE-petL*和*trnR-S*两个候选序列及其连接序列构建系统发育树,建树结果如图1B、C、D所示。与图1A分支结构相比,发现三种序列均将花生属种间遗传关系成功地分为两大支,但从小的分支聚类来看,*psbE-petL*构树结果与叶绿体全序列的构树结果最为相似,图1D可见,首先分支出来*A. stenosperma*和*A. villosa*,接着是*A. chacoensis*,接还有一长支(*A. duranensis*, *A. batizocoi*, *A. hoehnei*和*A. paraguariensis*)和短支(*A. hypogaea*

表4 序列的插入和缺失数据统计

Table 4 Statistics of insert and deletion regions

序号 NO.	引物名称 Primer names	位置 Position	区域 regions	核苷酸多样性 π	核苷酸多态性 θ
1	<i>trnQ-UUG-accD</i>	57 000-57 500	LSC	0.001 21	0.001 77
2	<i>rpl32-trnL-UAG; trnL-UAG; trnL-UAG-ccsA</i>	115 500-116 000	SSC	0.001 27	0.001 58
3	<i>psbE-petL</i>	66 000-66 500	LSC	0.009 12	0.010 91
4	<i>trnR-UCU; trnR-UCU-trnS-GCU</i>	53 000-53 500	LSC	0.003 66	0.004 51
5	<i>trnN-GUU-ndhF; ndhF</i>	112 000-112 500	IRa; SSC	0.000 66	0.001 19
6	<i>rpl32; rpl32-trnL-UAG</i>	115 000-115 500	SSC	0.001 16	0.001 39
7	<i>psaC-ndhE; ndhE-ndhG</i>	11 950-120 000	SSC	0.000 00	0.000 00

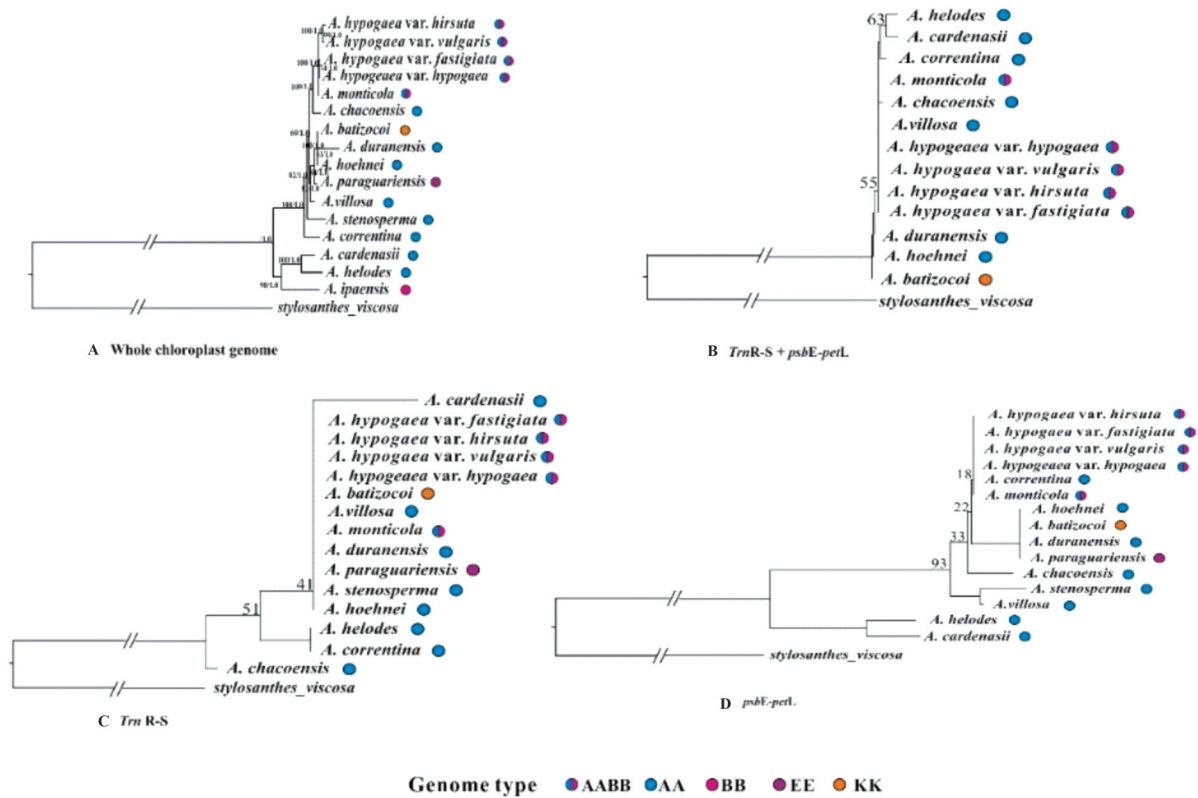


图1 四个最大似然法(ML)树拓扑分支结构对比 A)叶绿体基因组全序列^[20], B)*psbE-petL*及*TrnR-S*基因间区, C)*TrnR-S*基因间区, D)*psbE-petL*基因间区

Fig. 1 ML tree based on A) whole chloroplast genome^[20], B) *psbE-petL* and *TrnR-S* intergenic region, C) *TrnR-S* intergenic region, D) *psbE-petL* intergenic region

var. *fastigiata*, var. *hirsuta*, var. *hypogaea*, var. *vulgaris*, *A. monticola* 和 *A. correntina*)。同时, *TrnR-S* 构树的平行支较多(图 1C), 而且二者合并建树的效果不如 *psbE-petL* 单独构树效果好(图 1B)。因此, 筛选出 *psbE-petL* 这一段高突变区。

3 讨论

从筛选到的高突变区基因注释来看, 高遗传变异的基因组区域多位于基因间区, 这可能是由于基因间区所受的选择压力较小, 发生变异机率大的缘故。相对于叶绿体基因组全序列系统发生树, 本研究使用单个高突变区(*psbE-petL*)构建的系统发育树能够较好地分为两大支, 即野生种 *A. helodes* 和 *A. cardenasii* 聚为一支, 其它野生种和含四个主要生物学类型的栽培种花生(*A. hypogaea* var. *hypogaea*, var. *hirsuta*, var. *vulgaris* 和 var. *fastigiata*) 聚为一支, 该支含不同基因组类型及不同生长周期的野生种(图 1D)。由上可见, 仅使用 593 bp 大小的 *psbE-petL* 基因间区构建的系统发育树与 Wang 等^[20]利用叶绿体全基因组序列所构建的系统发生树的分支拓扑结构相似, 进一步验证了使用该高突变区解析花生区组的物种间分支关系的有效性。同时, 说明高突变 DNA 区域的选用与区域长度和片段数目关系不大, 因为上述结果表明 *psbE-petL* 和 *trnR-S* 联合建树结果不如 *psbE-petL* 单独使用的结果好。

此外, 聚类分析指出, 与栽培种花生亲缘关系最近的野生花生是 *A. monticola*, 它是花生区组中唯一的四倍体野生种^[24]。基于全基因组重测序和比较基因组学的分析支持 *A. monticola* 是栽培种花生未驯化物种^[25, 26]。本研究结果也指出栽培种花生与野生种 *A. villosa* 和 *A. cardenasii* 亲缘关系相对较远。

4 结论

花生区组间亲缘关系的揭示对利用野生种优良基因花生具有重要意义。由于种间形态差异的复杂性, 通过分子水平揭示它们之间的亲缘关系更为准确。与核基因组相比, 叶绿体基因组具备母系遗传特点, 存在一些高突变区, 在漫长的演化中会产生种间差异, 能够解决低阶分类单元问题。尽管叶绿体全基因组序列能够有效揭示种间亲缘关系, 但是对于一些系统位置尚不明确的花生属物种, 仍然缺乏揭示其系统发育关系的有效鉴定途径。本研究利用已发表的花生属叶绿体基因组全序列, 层层筛选出高突变区(*psbE-petL*), 并成功设计出了该高突变区域的特异引物。利用该叶绿体基因组高

突变区, 仅采用简单扩增即可快速鉴定花生属, 特别是花生区组未知物种的系统发生位置。

参考文献:

- [1] 禹山林. 中国花生品种及其系谱[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008.
- [2] 万书波. 花生产业形势与对策[J]. 山东农业科学, 2014, 46(10): 128-132. DOI: 10.3969/j.issn.1001-4942.2014.10.036.
- [3] Milla S R, Isleib T G, Stalker H T. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers[J]. Genome, 2005, 48(1): 1-11. DOI: 10.1139/g04-089.
- [4] Yin D M, Wang Y, Zhang X G, et al. Development of chloroplast genome resources for peanut (*Arachis hypogaea* L.) and other species of *Arachis* [J]. Sci Rep, 2017, 7: 11649. DOI: 10.1038/s41598-017-12026-x.
- [5] 姜慧芳, 任小平, 王圣玉, 等. 野生花生高油基因资源的发掘与鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(1): 30-34.
- [6] Krapovickas A, Gregory W C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae)[J]. Bonplandia, 2007, 16: 1. DOI: 10.30972/bon.160158.
- [7] Gimenes M A, Lopes C R, Valls J F M. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP [J]. Genet Mol Biol, 2002, 25(3): 349-353. DOI: 10.1590/s1415-47572002000300017.
- [8] Moretzsohn M D C, Hopkins M S, Mitchell S E, et al. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome [J]. BMC Plant Biol, 2004, 4: 11. DOI: 10.1186/1471-2229-4-11.
- [9] Tallury S P, Hilu K W, Milla S R, et al. Genomic affinities in *Arachis* section *Arachis* (Fabaceae): molecular and cytogenetic evidence [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111(7): 1229-1237. DOI: 10.1007/s00122-005-0017-0.
- [10] Barkley N A, Dean R E, Pittman R N, et al. Genetic diversity of cultivated and wild-type peanuts evaluated with M13-tailed SSR markers and sequencing [J]. Genet Res, 2007, 89(2): 93-106. DOI: 10.1017/s0016672307008695.
- [11] Bechara M D, Moretzsohn M C, Palmieri D A, et al. Phylogenetic relationships in genus *Arachis* based on ITS and 5.8S rDNA sequences [J]. BMC Plant Biol, 2010, 10: 255. DOI: 10.1186/1471-2229-10-255.
- [12] Friend S A, Quandt D, Tallury S P, et al. Species, genomes, and section relationships in the genus *Arachis* (Fabaceae): a molecular phylogeny [J]. Plant Syst

- Evol, 2010, 290 (1/2/3/4) : 185–199. DOI: 10.1007/s00606-010-0360-8.
- [13] Wang C T, Wang X Z, Tang Y Y, et al. Phylogeny of *Arachis* based on internal transcribed spacer sequences [J]. Genet Resour Crop Evol, 2011, 58(2) : 311–319. DOI: 10.1007/s10722-010-9576-2.
- [14] Moretzsohn M C, Gouvea E G, Inglis P W, et al. A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers [J]. Ann Bot, 2013, 111 (1) : 113–126. DOI: 10.1093/aob/mcs237.
- [15] Huang L, Jiang H, Ren X, et al. Abundant microsatellite diversity and oil content in wild *Arachis* species [J]. PLoS One, 2012, 7(11) : e50002. DOI: 10.1371/journal.pone.0050002.
- [16] Vishwakarma M K, Kale S M, Sriswathi M, et al. Genome-wide discovery and deployment of insertions and deletions markers provided greater insights on species, genomes, and sections relationships in the genus *Arachis* [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 2064. DOI: 10.3389/fpls.2017.02064.
- [17] Schwarz E N, Ruhlman T A, Sabir J S M, et al. Plastid genome sequences of legumes reveal parallel inversions and multiple losses of rps16 in papilionoids [J]. Jnl Systematics Evolution, 2015, 53 (5) : 458–468. DOI: 10.1111/jse.12179.
- [18] Prabhudas S K, Prayaga S, Madasamy P, et al. Shallow whole genome sequencing for the assembly of complete chloroplast genome sequence of *Arachis hypogaea* L. [J]. Front Plant Sci, 2016, 7: 1106. DOI: 10.3389/fpls.2016.01106.
- [19] Wang J, Li C, Yan C, et al. A comparative analysis of the complete chloroplast genome sequences of four peanut botanical varieties [J]. PeerJ, 2018, 6: e5349. DOI: 10.7717/peerj.5349.
- [20] Wang J, Li Y, Li C J, et al. Twelve complete chloroplast genomes of wild peanuts: great genetic resources and a better understanding of *Arachis* phylogeny [J]. BMC Plant Biol, 2019, 19: 504. DOI: 10.1186/s12870-019-2121-3.
- [21] Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-Delbarrio J C, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets [J]. Mol Biol Evol, 2017, 34 (12) : 3299–3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248.
- [22] Stalker H T. Utilizing wild species for peanut improvement [J]. Crop Sci, 2017, 57 (3) : 1102–1120. DOI: 10.2135/cropsci2016.09.0824.
- [23] Leal-Bertioli S C M, Santos S P, Dantas K M, et al. *Arachis batizocoi*: a study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids [J]. Ann Bot, 2015, 115 (2) : 237–249. DOI: 10.1093/aob/mcu237.
- [24] Yin D M, Zhang X G, Ma X L, et al. Genome of an allotetraploid wild peanut *Arachis monticola* : a de novo assembly [C]//中国作物学会学术年会, 2019:295.
- [25] Zhuang W, Chen H, Yang M, et al. The genome of cultivated peanut provides insight into legume karyotypes, polyploid evolution and crop domestication [J]. Nat Genet, 2019, 51(5) : 865–876. DOI: 10.1038/s41588-019-0402-2.
- [26] Yin D M, Ji C M, Song Q X, et al. Comparison of *Arachis monticola* with diploid and cultivated tetraploid genomes reveals asymmetric subgenome evolution and improvement of peanut [J]. Adv Sci, 2020, 7 (4) : 1901672. DOI: 10.1002/advs.201901672.

(责任编辑:王丽芳)