

赵秋燕, 曹孟会, 李新艺, 等. 濒危植物峨眉凤仙花叶绿体基因组分析 [J]. 福建农业学报, 2023, 38 (2): 174-182.
ZHAO Q Y, CAO M H, LI X Y, et al. Complete Chloroplast Genome of Endangered *Impatiens omeiana* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 38 (2): 174-182.

濒危植物峨眉凤仙花叶绿体基因组分析

赵秋燕¹, 曹孟会¹, 李新艺¹, 周 敏¹, 魏春梅¹,
张 茜¹, 瞿素萍², 黄海泉¹, 黄美娟^{1*}

(1. 西南林业大学园林园艺学院/西南林业大学园林园艺花卉研发中心, 云南 昆明 650224;
2. 云南省农业科学院花卉研究所, 云南 昆明 650205)

摘 要:【目的】对峨眉凤仙花 (*Impatiens omeiana* Hook.f.) 叶绿体基因组的结构特征及系统发育进行研究, 为其资源保护及开发利用提供理论依据。【方法】基于峨眉凤仙花叶绿体基因组序列, 利用生物信息学软件, 对叶绿体基因组进行组装、注释、基因特征、序列重复和系统发育分析。【结果】峨眉凤仙花完整的叶绿体基因组长度为 152 527 bp, 共有 130 个基因, 包括 86 个蛋白质编码基因、8 个 rRNA 基因和 36 个 tRNA 基因, GC 含量为 37%, 且具有保守的四分体结构, 包括大单拷贝区、小单拷贝区各 1 个和 2 个相同的反向重复区域, 其长度分别为 83 150、17 903、25 737 bp, 其中 13 个基因有 1 个内含子, 2 个基因有 2 个内含子。特征分析表明: 峨眉凤仙花叶绿体全基因组中共检测到 76 个 SSR 序列, 且多以 A/T 单核苷酸序列为主, 其长度为 10~91 bp; 检测到 50 842 个密码子, 其中以亮氨酸 (Leu) 最多, 色氨酸 (Tyr) 最少; 密码子偏好性分析显示 33 个 RSCU≥1 的密码子多数以 A/U 结尾。通过邻接法 (NJ) 构建系统发育树发现, 峨眉凤仙花与贵州凤仙花亲缘关系最近, 均属于棒凤仙花亚属植物。【结论】峨眉凤仙花叶绿体基因组呈典型的四分体结构, SSR 序列以 A/T 单碱基为主; 系统发育分析结果将其归为棒凤仙花亚属, 上述结果为峨眉凤仙花系统发育学地位及物种鉴定工作提供了重要的分子信息。
关键词: 峨眉凤仙花; 叶绿体基因组; 序列结构与特征分析; 系统发育
中图分类号: S685.99; Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1008-0384 (2023) 02-0174-09

Complete Chloroplast Genome of Endangered *Impatiens omeiana*

ZHAO Qiuyan¹, CAO Menghui¹, LI Xinyi¹, ZHOU Min¹, WEI Chunmei¹, ZHANG Xi¹, QU Suping²,
HUANG Haiquan¹, HUANG Meijuan^{1*}

(1. College of Landscape and Horticulture, Southwest Forestry University/Landscape, Horticulture and Flower R & D Center, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650224, China; 2. Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205, China)

Abstract: 【Objective】Chloroplast genome structure and phylogeny of the endangered *Impatiens omeiana* Hook.f. endemic species in China were studied. 【Method】Gene assembly, annotation, characteristics, sequence duplication, and phylogenetics of *I. omeiana* were analyzed based on the chloroplast genome sequence using bioinformatic software. 【Results】The genome was 152 527 bp consisting of 130 gene, including 86 protein-coding, 8 rRNA, and 36 tRNA genes. It had a GC content of 37% and a conservative tetrad structure with regions of a large single-copy of 83 150 bp, a small single-copy of 17 903 bp, and two identical reverse repeats of 25 737 bp. Thirteen of the genes had one intron, and two had two. There were 76 SSR sequences detected in the genome mainly of A/T single nucleotides with a length ranging from 10 bp to 91 bp. A total of 50 842 codons were found in the entire genome. Among the amino acids, leucine (Leu) was the most numerous and tryptophan (Tyr) the least. A codon bias analysis showed those of 33 RSCU>1 had A/U on their ends. Using the Neighbor

收稿日期: 2022-07-04 初稿; 2022-10-21 修改稿
作者简介: 赵秋燕 (1995-), 女, 硕士, 研究方向: 园林植物资源调查及分析 (E-mail: 1378219465@qq.com)
* 通信作者: 黄美娟 (1972-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 园林植物研究 (E-mail: xmhhq2001@163.com)
基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060364、32060366、31860230); 云南省重大科技专项 (202102AE090052); 云南省园林植物遗传改良与高效繁育博士生导师团队和云南省中青年学术和技术带头人培养项目 (503210103、2015HB046、2018HB024)

Joining method (NJ), a phylogenetic tree was constructed based on the chloroplast genomes from different plants to show a close relationship of *I. omeiana* with *I. guizhouensis* belonging to the subgenus *Clavicarpa*. 【Conclusion】 The chloroplast genome of *I. omeiana* had a typical tetrad structure of many SSR repeated sequences with A/T single base. Phylogenetically, *I. omeiana* was a *Clavicarpa* subgenus. These results provide important molecular information for the phylogenetic status and species identification of *I. omeiana*.

Key words: *Impatiens omeiana*; chloroplast genome; sequence structure and characteristic analysis; phylogeny

0 引言

【研究意义】峨眉凤仙花 (*Impatiens omeiana*) 为凤仙花科 (Balsaminaceae) 凤仙花属 (*Impatiens*) 多年生植物, 具总状花序、侧生萼片 4 枚和果实棒状等特征, 是古特有种的典型代表, 并被世界自然保护联盟列为濒危物种, 分布于峨眉山、洪雅和天全等地, 生长在海拔 1000 m 左右的灌木林下或路旁沟渠^[1]。峨眉凤仙花可用于花境营造、花坛装饰或植物专类园等, 同时其全株均可入药, 具有很好的开发和利用价值^[2]。植物分子系统学研究的基本方法是对植物特定的 DNA 序列进行同源性比较及构建系统发育树, 以此来探讨物种间的系统演化关系。叶绿体基因组研究可为植物物种鉴定、起源、进化、遗传多样性分析和资源保护与利用提供基础^[3,4]。【前人研究进展】凤仙花科有 2 个属: 水角属 *Hydrocera* (单种属) 和凤仙花属; 其中凤仙花属植物约有 1000 种, 而我国已知的约有 256 种^[5]。有关叶绿体的起源, 普遍接受的是“内共生”学说 (Endosymbiotic theory), 祖先为蓝藻 (*Cyanobacterium*) 这一古细菌^[6], 其原因在于叶绿体基因组为母系遗传, 比线粒体基因组及核基因组具有更为保守的结构特征^[7]。叶绿体基因组呈现出不同的构型, 以闭合环状 DNA 分子为典型, 其结构非常保守, 通常表现为一个四分体结构^[8], 由两个相同的反向重复序列 (IRs) 将大、小单拷贝区 (LSC、SSC) 分开, 整个叶绿体基因组大小在 72~217 kb, 大多数完整的叶绿体基因组包含 110~130 个不同的基因。自 1986 年, 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 和苔藓植物地钱 (*Marchantia polymorpha*) 的叶绿体基因组被报道, 标志着人们首次成功获得了叶绿体完整基因组^[9]。目前凤仙花属植物在国内主要参考 YU 等^[10]的分类依据, 将其分为两个亚属: 凤仙花亚属 (subg. *Impatiens*) 和棒凤仙花亚属 (subg. *Clavicarpa*)^[11]。多数研究学者以形态特征和基因片段进行分类^[12-15], 其中形态学易受环境影响, 基因片段仅能反映部分遗传信息, 其结果可靠性存在一定的片面性, 难以真正解决物种之间的分类学等相

关问题; 而叶绿体全基因组由于其数据量大且遗传信息更丰富, 可为植物分类及系统发育等提供更加丰富可靠的数据与理论依据。【本研究切入点】目前, 作为濒危植物的峨眉凤仙花叶绿体基因组信息缺乏, 有关其分类地位及系统发育学研究尚缺乏科学依据, 影响其进一步保护及开发利用。【拟解决的关键问题】本研究利用高通量测序技术获得峨眉凤仙花叶绿体基因组序列, 并对其结构特征以及系统发育进行分析, 为峨眉凤仙花资源保护、物种鉴定、系统发育及开发利用等提供一定的基础数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

峨眉凤仙花 (*I. omeiana*) 叶片采集于四川峨眉山 (29°59'21" N, 103°36'46" E), 放于硅胶中保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取、建库与测序 采用百泰克生物技术有限公司试剂盒提取植物叶片总 DNA, 将总 DNA 随机打断、末端修复和接头连接构建 500 bp 的测序文库, 交由安诺优达基因科技有限公司进行测序, 并对原始数据进行加工处理, 最终获得 Clean data。

1.2.2 叶绿体基因组组装、注释和物理图谱绘制 利用 GetOrganelle1.7.5.0^[16] 进行峨眉凤仙花叶绿体基因组的组装; 使用在线软件 Cpgavas2 (<https://www.herbalgenomics.org/cpgavas2>)^[17] 和 Chloroplast (<https://irscope.shinyapps.io/Chloroplast/>)^[18] 对其进行注释和物理图谱绘制; 峨眉凤仙花叶绿体基因组序列上传至 NCBI (GenBank 登录号 OP676074)。

1.2.3 叶绿体基因组数据分析 使用在线软件 MISA (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/index.php>)^[19] 对峨眉凤仙花叶绿体基因组简单重复序列 (Simple sequence repeats, SSRs) 进行分析; 通过 CodonW1.4.2^[20] 计算同义密码子使用频率 RSCU (Relative synonymous codon usage), 参数为默认值。

1.2.4 系统发育分析 利用 13 种杜鹃花目植物的叶绿体基因组序列，以 2 种山茱萸目植物作为外类群，使用在线网站 MAFFT (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>)^[21] 进行叶绿体基因组序列比对；基于邻接法 (Neighbour-Joining, NJ) 在 MEGA X 软件^[22] 构建系统发育树，参数自展值为 1000。

2 结果与分析

2.1 峨眉凤仙花叶绿体基因组结构与特征

峨眉凤仙花叶绿体基因组总长度 152 527 bp，GC 含量为 37%；呈典型的四分体结构 (图 1)，包含 1 对 IR 区、1 个 LSC 区和 1 个 SSC 区，其长度分别为 25 737、83 150、17 903 bp，GC 含量分别为 43.1%、34.9% 和 29.8%。

研究发现峨眉凤仙花共编码 130 个基因 (表 1)，包括蛋白质编码基因 86 个、转运 RNA (tRNA) 编

码基因 36 个和核糖体 RNA (rRNA) 编码基因 8 个。共注释到了 4 类基因：第一类自我复制基因 73 个，包括 tRNA 编码基因 36 个、rRNA 编码基因 8 个、核糖体小亚基蛋白编码基因 15 个、核糖体大亚基蛋白编码基因 10 个、RNA 聚合酶亚基编码基因 4 个；第二类光合作用基因 46 个，包括光系统 I 基因 5 个、光系统 II 基因 16 个、ATP 合成酶基因 6 个、NADH 脱氢酶基因 12 个、细胞色素 b/f 复合体基因 6 个、二磷酸核酮糖羧化酶基因 1 个；第三类生物合成相关基因 7 个，包括成熟酶基因、囊膜蛋白基因、ATP 依赖性蛋白酶等；第四类未知功能基因 4 个，包含假定叶绿体阅读框 4 个。

此外，发现峨眉凤仙花叶绿体基因组共有 15 个基因含有内含子 (表 2)，其中 8 个蛋白质编码基因和 5 个 tRNA 编码基因均含有 1 个内含子，*ycf3* 和 *clpP* 蛋白质编码基因含有 2 个内含子；*ycf1* 基因的内

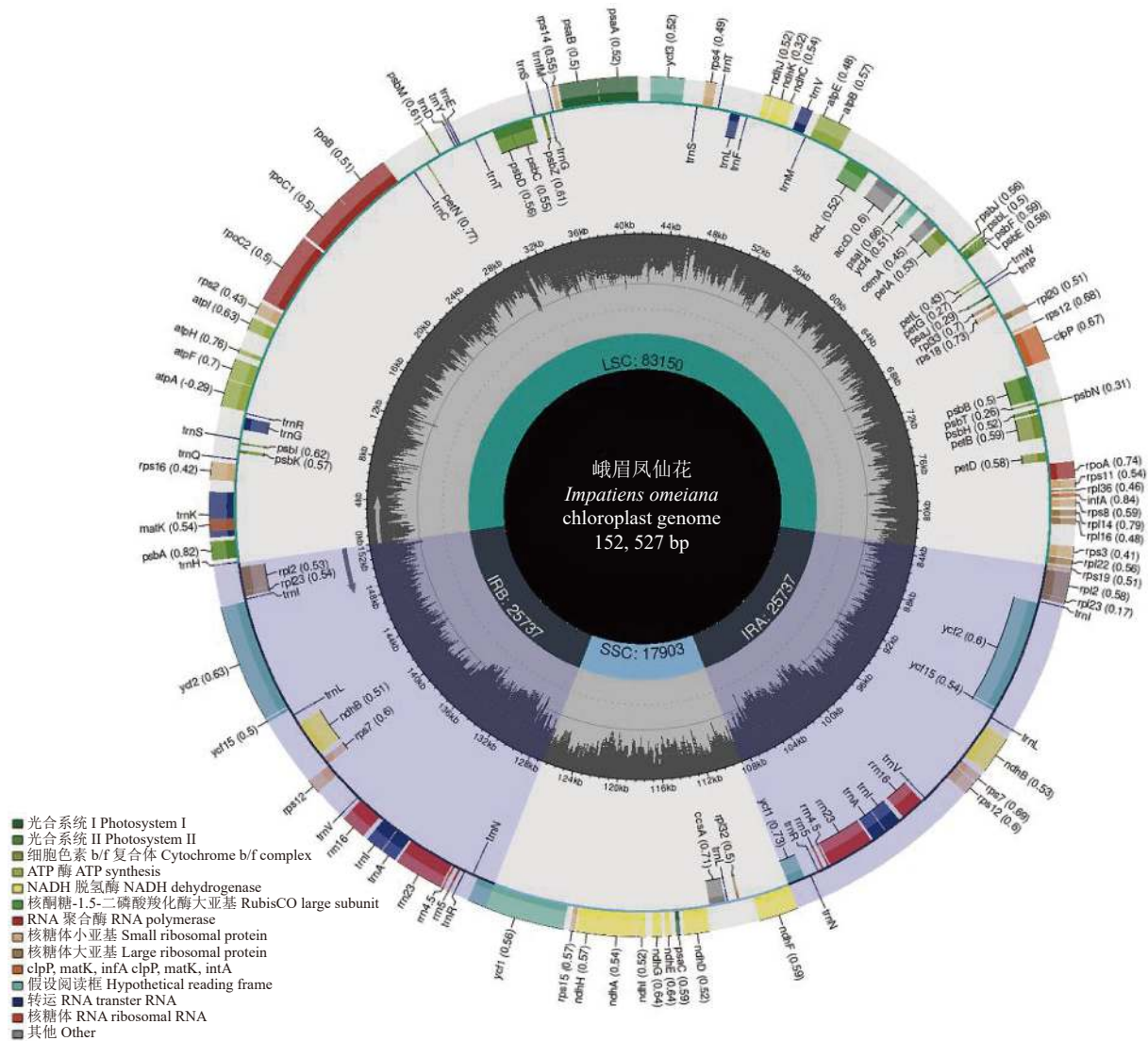


图 1 峨眉凤仙花叶绿体基因组图谱
Fig. 1 Chloroplast genome map of *I. omeiana*

表 1 峨眉凤仙花叶绿体基因组基因信息
Table 1 Information on chloroplast genome of *I. omeiana*

基因类别 Category of genes	基因分类 Group of genes	基因名称 Name of gene
自我复制 Self-replication	核糖体的小亚基 Small subunit of ribosome	<i>rps11</i> 、 <i>rps14</i> 、 <i>rps15</i> 、 <i>rps16</i> 、 <i>rps18</i> 、 <i>rps2</i> 、 <i>rps3</i> 、 <i>rps4</i> 、 <i>rps8</i> 、 <i>rps7</i> (×2)、 <i>rps12</i> (×2)、 <i>rps19</i> (×2)
	核糖体的大亚基 Large subunit of ribosome	<i>rpl14</i> 、 <i>rpl16</i> 、 <i>rpl20</i> 、 <i>rpl22</i> 、 <i>rpl33</i> 、 <i>rpl36</i> 、 <i>rpl2</i> (×2)、 <i>rpl23</i> (×2)
	依赖于DNA的RNA聚合酶 DNA dependent RNA polymerase	<i>rpoA</i> 、 <i>rpoB</i> 、 <i>rpoC1</i> 、 <i>rpoC2</i>
光合作用 Photosynthesis	光系统I亚基 Subunits of photosystem I	<i>psaA</i> 、 <i>psaB</i> 、 <i>psaC</i> 、 <i>psaI</i> 、 <i>psaJ</i>
	光系统II亚基 Subunits of photosystem II	<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>psbL</i> 、 <i>psbM</i> 、 <i>psbN</i> 、 <i>psbT</i> 、 <i>psbZ</i> 、 <i>ycf3</i>
	NADH脱氢酶亚基 Subunits of NADH-dehydrogenase	<i>ndhA</i> 、 <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> 、 <i>ndhB</i> (×2)
	细胞色素b/f复合体 Subunits of cytochrome b/f complex	<i>petA</i> 、 <i>petB</i> 、 <i>petD</i> 、 <i>petG</i> 、 <i>petL</i> 、 <i>petN</i>
	ATP合酶亚基 Subunits of ATP synthase	<i>atpA</i> 、 <i>atpB</i> 、 <i>atpE</i> 、 <i>atpF</i> 、 <i>atpH</i> 、 <i>atpI</i>
	二磷酸核酮糖羧化酶 Subunit of rubisco	<i>rbcl</i>
rRNA	rRNA 基因 rRNA genes	<i>rrn5S</i> (×2)、 <i>rrn16S</i> (×2)、 <i>rrn4.5S</i> (×2)、 <i>rrn23S</i> (×2)
tRNA	tRNA基因 tRNA genes	36 <i>trn</i> 基因 (5 个内含子)
其他 Others	乙酰辅酶A羧化酶亚基 Subunit of Acetyl-CoA-carboxylase	<i>accD</i>
	C型细胞色素合成酶 c-type cytochrom synthesis gene	<i>ccsA</i>
	外膜蛋白 Envelop membrane protein	<i>cemA</i>
	蛋白酶 Protease	<i>clpP</i>
	翻译起始因子 Translational initiation factor	<i>infA</i>
	成熟酶 Maturase	<i>matK</i>
未知功能 Unknown	保守的开放阅读框 Conserved open reading frames	<i>ycf1</i> 、 <i>ycf4</i> 、 <i>ycf2</i> (×2)

含子最长，为 1642 bp，而 *trnE-UUC* 基因最短，为 32 bp。

2.2 峨眉凤仙花简单重复序列分析

峨眉凤仙花叶绿体基因组中共检测到 76 个 SSR 位点，主要包含 4 种类型 (表 3)，其中以单核苷酸序列出现的次数最多，共有 67 个 (含 2 个复合型)，占比 88.16%，均为 A/T 类型；二核苷酸序列

有 4 个，占比 5.26%；三核苷酸序列 2 个，占比为 2.63%；四核苷酸序列有 3 个，占比 3.95%。序列长度在 10~ 12 bp，其中最短序列为 10 bp，最长序列为 91 bp，平均长度为 12.51 bp，其中单核苷酸序列的平均长度为 11.14 bp；复合型核苷酸序列的平均长度为 56.50 bp；二核苷酸序列的平均长度为 13.00 bp；三核苷酸序列和四核苷酸序列的平均长度均为 12.00 bp。

表 2 峨眉凤仙花叶绿体基因组中内含子和外显子位置及长度
Table 2 Positions and lengths of introns and exons in chloroplast genome of *I. omeiana*

基因名称 Gene name	起始位置 Start/bp	终点位置 End/bp	序列长度 Length of sequence/bp				
			第一外显子 Exon I	第一内含子 Intron I	第二外显子 Exon II	第二内含子 Intron II	第三外显子 Exon III
<i>trnK-UUU</i>	1 642	4 242	37	2 528	36		
<i>rps16</i>	4 905	5 950	40	809	197		
<i>atpF</i>	10 711	11 913	145	648	410		
<i>rpoC1</i>	19 925	22 723	432	750	1 617		
<i>ycf3</i>	41 988	43 909	124	711	230	704	153
<i>trnL-UAA</i>	46 816	47 428	35	528	50		
<i>trnV-UAC</i>	50 658	51 332	38	602	35		
<i>accD</i>	56 549	58 045	648	33	816		
<i>clpP</i>	69 103	71 130	71	795	294	645	223
<i>rpl2</i>	83 406	84 895	391	665	434		
<i>ndhB</i>	93 523	95 728	775	673	758		
<i>trnE-UUC</i>	101 206	102 209	32	932	40		
<i>trnA-UGC</i>	102 273	103 146	37	801	36		
<i>ndhA</i>	118 162	120 335	547	1 088	539		
<i>ycf1</i>	122 240	127 192	1 642	30	3 281		
<i>trnA-UGC</i>	132 532	133 405	37	801	36		
<i>trnE-UUC</i>	133 469	134 472	32	932	40		
<i>ndhB</i>	139 950	142 155	775	673	758		
<i>rpl2</i>	150 783	152 272	391	665	434		

表 3 峨眉凤仙花叶绿体基因组 SSR 类型及分布
Table 3 SSR types and distribution of chloroplast genome of *I. omeiana*

重复类型 Repeat type	重复单元 Repeat unit	重复频率 Repetition frequency	数量 Number	不同类型SSR的分布起始位点 Distribution initiation loci of different SSR types/bp
单核苷酸 Mononucleotides	A	10	15	5 313,6 149,7 515,7 680,7 924,31 792,44 011,46 201,50 989, 55 996,70 336,80 231,108 748,133 991,137 883
	A	11	3	7 807,44 377,69 853
	A	12	5	1803,11 479,29 832,108 859,111 109
	A	13	1	111 913
	A	14	1	60 218
	T	10	14	7 133,25 317,26 410,30 416,31 579,47 674,48 233,49 787, 97 786,101 678,113 939, 126 921,69 853,126 569
	T	11	14	7 300,10 671,13 405,17 614,34 889,45 803,75 910,81 044, 113 373,116 058,118 964,124 837,124 972,125 993
	T	12	8	11 343,26 853,29 527,53 623,59 969,81 205, 124 351,126 808
	T	13	3	77 265,79 172,109 650
	T	14	2	2 906,77 053
	T	17	1	64 052

续上表

重复类型 Repeat type	重复单元 Repeat unit	重复频率 Repetition frequency	数量 Number	不同类型SSR的分布起始位点 Distribution initiation loci of different SSR types/bp
二核苷酸 Dinucleotides	AT	6	2	46 389,53 926
	TA	7	2	96 020,139 645
三核苷酸 Trinucleotides	ATT	4	2	65 188,119 570
四核苷酸 Tetranucleotides	AATA	3	1	114 206
	AATT	3	1	62 783
	TTCT	3	1	56 243

2.3 峨眉凤仙花密码子使用偏好性分析

峨眉凤仙花叶绿体基因组的蛋白质编码基因共编码 50842 个密码子（含终止密码子），20 种氨基酸，其中最多的是亮氨酸（Leu），有 5234 个（占 10.29%）；其次是丝氨酸（Ser）及异亮氨酸（Ile），分别有 4626 个（占 9.10%）和 4310 个（占 8.48%）；最少的是色氨酸（Trp），有 709 个（占 1.40%）；其中仅 2 个氨基酸只有 1 个密码子，其余的为 2~6 个密码子。

峨眉凤仙花叶绿体基因的 64 种密码子中，发现 RSCU 值≥1.00 的密码子有 33 个，其中出现频率高

且以 A/U 结尾的密码子有 28 个，以 C/G 结尾的有 5 个；RSCU 值最高的密码子出现在编码精氨酸（Arg）的 AGA（2.03）中。此外，峨眉凤仙花叶绿体基因组偏好性密码子多以 A/U 结尾，与具有较低 GC 含量基因组一致（表 4）。

2.4 峨眉凤仙花系统发育分析

基于叶绿体全基因组序列采用邻接（NJ）法构建系统发育树，发现峨眉凤仙花与贵州凤仙花 *I. guizhouensis* 聚为一支，即棒凤仙花亚属，支持率为 96%，表明两者的亲缘关系最近（图 2）。

表 4 峨眉凤仙花叶绿体基因组密码子 RSCU 分布情况
Table 4 RSCU distribution of chloroplast genome codons of *I. omeiana*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	数量 Number	密码子偏好性值 RSCU	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	数量 Number	密码子偏好性值 RSCU
苯丙氨酸 Phe	UUU	2298	1.24	脯氨酸 Pro	CCU	649	1.10
	UUC	1397	0.76		CCC	571	0.97
亮氨酸 Leu	UUA	1197	1.37		CCA	743	1.26
	UUG	1013	1.16		CCG	388	0.66
	CUU	1058	1.21	苏氨酸 Thr	ACU	645	1.22
	CUC	659	0.76		ACC	512	0.97
	CUA	838	0.96		ACA	649	1.22
异亮氨酸 Ile	CUG	469	0.54		ACG	316	0.60
	AUU	1770	1.23	丙氨酸 Ala	GCU	522	1.32
	AUC	1033	0.72		GCC	349	0.88
蛋氨酸 Met	AUA	1507	1.05		GCA	474	1.20
	AUG	812	1.00		GCG	241	0.61
缬氨酸 Val	GUU	786	1.36	甘氨酸 Gly	GGU	538	0.95
	GUC	409	0.71		GGC	344	0.61
	GUA	709	1.22		GGA	866	1.53
	GUG	413	0.71		GGG	513	0.91

续上表

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	数量 Number	密码子偏好性值 RSCU	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	数量 Number	密码子偏好性值 RSCU
丝氨酸 Ser	UCU	1 130	1.47	组氨酸 His	CAU	836	1.39
	UCC	854	1.11		CAC	365	0.61
	UCA	1 050	1.36	谷氨酰胺 Gln	CAA	1 011	1.36
	UCG	559	0.73		CAG	474	0.64
	AGU	612	0.79	天冬酰胺 Asn	AAU	1 657	1.40
	AGC	421	0.55		AAC	705	0.60
酪氨酸 Tyr	UAU	1 346	1.37	赖氨酸 Lys	AAA	2 241	1.38
	UAC	618	0.63		AAG	1 005	0.62
半胱氨酸 Cys	UGU	649	1.21	天冬氨酸 Asp	GAU	1 070	1.46
	UGC	425	0.79		GAC	397	0.54
末端 TER	UAA	1 135	1.13	精氨酸 Arg	CGU	332	0.64
	UAG	806	0.80		CGC	244	0.47
	UGA	1 072	1.07		CGA	603	1.17
谷氨酸 Glu	GAA	1 323	1.39		CGG	340	0.66
	GAG	585	0.61		AGA	1 046	2.03
色氨酸 Trp	UGG	709	1.00		AGG	534	1.03

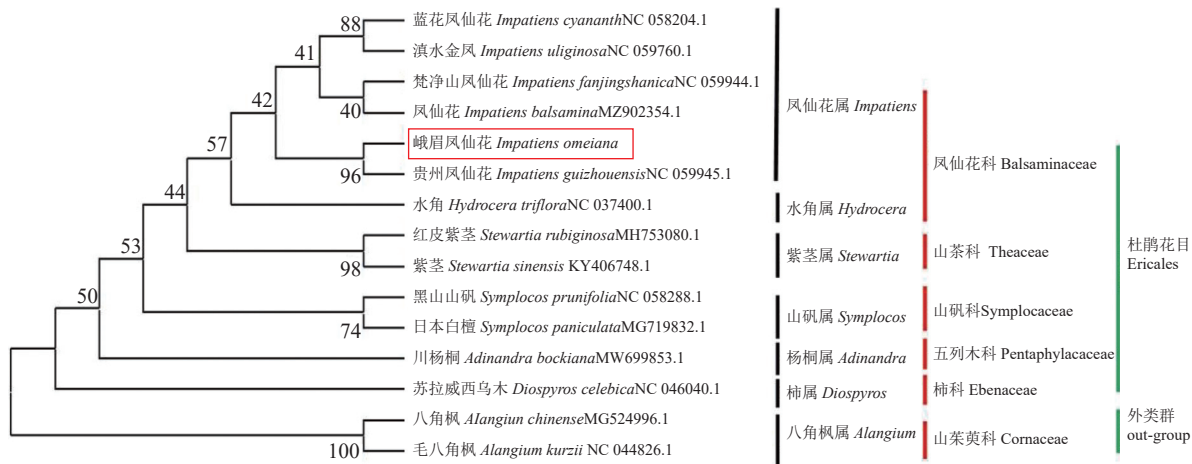


图 2 基于 15 个物种叶绿体基因组序列构建的邻接法系统发育树

Fig. 2 Neighbor Joining phylogenetic tree constructed from chloroplast genome sequences of 15 species

3 讨论

随着高通量测序技术的快速发展，植物叶绿体基因组序列为物种鉴定及系统发育提供了强有力的遗传信息，并被广泛用于评估物种亲缘关系和遗传多样性等方面^[23,24]。本研究发现峨眉凤仙花叶绿体基因组的环状结构分别由 2 个 IR 区、1 个 LSC 区和 1 个 SSC 区组成，与多数被子植物研究结果一致^[24-31]；

共注释到 130 个基因，含有 86 个蛋白编码、8 个 rRNA 和 36 个 tRNA 基因，与前人对凤仙花属植物贵州凤仙花 *I. guizhouensis* 和线萼凤仙花 *I. linearisepala* 的研究结果相一致^[32]，表明凤仙花属植物叶绿体基因组具有较高的保守性。

在叶绿体基因组中 SSR 也被称之为微卫星序列，是由 1~6 个核苷酸组成的短串联重复序列，存在于整个真核生物的基因组中，被广泛用于评价遗

传多样性、系统发育和物种鉴定等^[28]。本研究表明峨眉凤仙花叶绿体基因组中的76个SSR序列中,以单核苷酸重复为主,与多数植物的研究结果一致^[29,30],其中A/T碱基重复占多数,与其他物种相似^[25-28,31]。叶绿体SSR既有核基因组的多等位性、高多态性和共显性等特点,也有单亲遗传模式的结构简单和相对保守等特点^[33],SSR分子标记开发为进一步揭示凤仙花属植物系统发育与进化关系提供有用的分子手段。峨眉凤仙花RSCU值 ≥ 1.00 的密码子共有33个,其中有28个以A/U结尾,只有5个以C/G结尾,该现象与大多数被子植物类似,密码子多以AU(T)结尾;同时发现峨眉凤仙花与其他高等植物叶绿体基因组相对同义密码子使用度分析结果一致^[34]。

叶绿体基因组的遗传方式是母系遗传,其碱基替代率和基因组结构重排事件相对较低,因此常被用于探究物种系统发育关系^[35,36]。凤仙花属植物种类繁多,外观形态复杂多样,为该属植物鉴定和系统发育研究带来极大困难。本研究以叶绿体全基因组构建的系统发育树表明峨眉凤仙花与贵州凤仙花聚为一支,同属于凤仙花属中的棒凤仙花亚属,与LUO等^[32]构建的系统发育树相吻合,并与YU等^[10]基于2个质体 $atpB$ $rbcL$ 和 $trnL-F$ 及夏常英^[11]基于4个叶绿体片段得到的凤仙花属系统发育树的结果一致。上述结果进一步确定了棒凤仙花亚属在凤仙花属的系统发育位置,也印证了叶绿体基因组系统发育分析方法能很好地适用于凤仙花属植物系统发育分析。

参考文献:

- [1] 曾小华. 遮荫对野生峨眉凤仙花的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2016.
ZENG X H. Effects of shading on wild *Impatiens omeiana* hook. f. [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [2] 袁桃花, 李美君, 任柳伊, 等. 中国野生凤仙花属物种多样性和地理分布数据集[J]. 生物多样性, 2022, 30 (5): 118-122.
YUAN T H, LI M J, REN L Y, et al. A dataset on the diversity and geographical distributions of wild *Impatiens* in China [J]. *Biodiversity Science*, 2022, 30 (5): 118-122. (in Chinese)
- [3] CHOI K S, CHUNG M G, PARK S. The complete chloroplast genome sequences of three veroniceae species (Plantaginaceae): Comparative analysis and highly divergent regions [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 355.
- [4] 苏丹丹, 刘玉萍, 刘涛, 等. 苦马豆叶绿体基因组结构及其特征分析[J]. 植物研究, 2022, 42 (3): 446-454.
SU D D, LIU Y P, LIU T, et al. Structure of chloroplast genome and its characteristics of *Sphaerophysa salsula* [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2022, 42 (3): 446-454. (in Chinese)
- [5] 相银龙. 川西南凤仙花属*Impatiens* L. 植物区系及亲缘关系研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2011.
XIANG Y L. Study on the flora and phylogeny of *Impatiens* L. in Southwest Sichuan [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2011. (in Chinese)
- [6] WERNEGREEN J J. Endosymbiont evolution: Predictions from theory and surprises from genomes [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2015, 1360 (1): 16-35.
- [7] 陈新露, 赵祥云, WHITE B N, 等. 应用RAPD技术评价丁香品种间遗传关系[J]. 园艺学报, 1995, 22 (2): 171-175.
CHEN X L, ZHAO X Y, WHITE B N, et al. Analysis of genetic relationship among lilacs(*Syringa*) by RAPD [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1995, 22 (2): 171-175. (in Chinese)
- [8] LI Z Z, SAINA J K, GICHIRA A W, et al. Comparative genomics of the Balsaminaceae sister Genera *Hydrocera triflora* and *Impatiens pinfanensis* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (1): 319.
- [9] SHINOZAKI K, OHME M, TANAKA M, et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1986, 4 (3): 111-148.
- [10] YU S X, JANSSENS S B, ZHU X Y, et al. Phylogeny of *Impatiens* (Balsaminaceae): Integrating molecular and morphological evidence into a new classification [J]. *Cladistics: the International Journal of the Willi Hennig Society*, 2016, 32 (2): 179-197.
- [11] 夏常英. 凤仙花属(*Impatiens*)棒凤仙花亚属(subg. *Clavicarpa*)的系统学研究及分类修订[D]. 重庆: 西南大学, 2020.
XIA C Y. Phylogeny study and taxonomic revision of *Impatiens* subg. *clavicarpa* [D]. Chongqing: Southwest University, 2020. (in Chinese)
- [12] JANSSENS S B, KNOX E B, DESSEIN S, et al. *Impatiens msimwanensis* (Balsaminaceae): Description, pollen morphology and phylogenetic position of a new East African species [J]. *South African Journal of Botany*, 2009, 75 (1): 104-109.
- [13] 李祥军, 唐文秀, 黄仕训. 桂林大旗瓣凤仙花遗传多样性的ISSR分析[J]. 广东农业科学, 2013, 40 (13): 142-144.
LI X J, TANG W X, HUANG S X. ISSR analysis for genetic diversity of *Impatiens macrovexilla* in Guilin [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, 40 (13): 142-144. (in Chinese)
- [14] YUAN Y M, YI S, GE X. *Impatiens qingchengshanica* (Balsaminaceae), a unique new species from China and its phylogenetic position [J]. *Botanical Studies*, 2011, 52: 225-230.
- [15] 蔡秀珍. 中国凤仙花属*Impatiens* L. 一些系统学问题的研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2008.
CAI X Z. Study on some phylogenetic problems in *Impatiens* L. of China [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2008. (in Chinese)
- [16] 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.
- [17] SHI L C, CHEN H M, JIANG M, et al. CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer [J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47 (W1): W65-W73.

- [18] ZHENG S Y, POCZAI P, HYVÖNEN J, et al. Chloroplast: An online program for the versatile plotting of organelle genomes [J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 576124.
- [19] THIEL T, MICHAŁEK W, VARSHNEY R, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106 (3): 411–422.
- [20] LANGMEAD B, TRAPNELL C, POP M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome [J]. *Genome Biology*, 2009, 10 (3): R25.
- [21] KATO H, STANDLEY D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30 (4): 772–780.
- [22] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35 (6): 1547–1549.
- [23] WEN F, WU X Z, LI T J, et al. The complete chloroplast genome of *Stauntonia chinensis* and compared analysis revealed adaptive evolution of subfamily Lardizabaloideae species in China [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22 (1): 161.
- [24] 富贵, 刘晶, 李军乔. 密花香薷叶绿体基因组结构及系统进化分析 [J]. *中草药*, 2022, 53 (6): 1844–1853.
- FU G, LIU J, LI J Q. Characterization of chloroplast genome structure and phyletic evolution of *Elsholtzia densa* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2022, 53 (6): 1844–1853. (in Chinese)
- [25] WANG Q, LI W Q, DING B, et al. Characterization of the complete chloroplast genome sequence of *Impatiens pritzelii* (Balsaminaceae): An endemic species from China [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2019, 4 (2): 4073–4074.
- [26] LI B Z, LI Y, LI Z F, et al. The complete chloroplast genome of *Impatiens mengtszeana* (Balsaminaceae), an endemic species in China [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2022, 7 (2): 367–369.
- [27] LUO C, HUANG W L, ZHU J P, et al. The complete chloroplast genome of *Impatiens uliginosa* Franch., an endemic species in Southwest China [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2019, 4 (2): 3846–3847.
- [28] 赵容, 尹舒悦, 姜诚漠, 等. 马兜铃科药用植物叶绿体基因组比较分析 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47 (11): 2932–2937.
- ZHAO R, YIN S Y, JIANG C H, et al. Comparison of chloroplast genomes of medicinal plants in Aristolochiaceae [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2022, 47 (11): 2932–2937. (in Chinese)
- [29] LUO C, LI Y, BUDHATHOKI R, et al. Complete chloroplast genomes of *Impatiens cyanantha* and *Impatiens monticola*: Insights into genome structures, mutational hotspots, comparative and phylogenetic analysis with its congeneric species [J]. *PLoS One*, 2021, 16 (4): e0248182.
- [30] 王仕奇, 王倩倩, 许晓晨, 等. 龙船花叶绿体基因组结构与特征分析 [J/OL]. *分子植物育种*, 2022: 1–14. (2022-02-25). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220223.1836.019.html>.
- WANG S Q, WANG Q Q, XU X C, et al. Chloroplast genome structure and characterization of *Ixora chinensis* [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2022: 1–14. (2022-02-25). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220223.1836.019.html>. (in Chinese)
- [31] 钱方, 高作敏, 胡利娟, 等. 海甘蓝 (*Crambe abyssinica*) 叶绿体基因组特征及其系统发育研究 [J]. *生物技术通报*, 2022, 38 (6): 174–186.
- QIAN F, GAO Z M, HU L J, et al. Characteristics of *Crambe abyssinica* chloroplast genome and its phylogenetic relationship in Brassicaceae [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38 (6): 174–186. (in Chinese)
- [32] LUO C, HUANG W L, SUN H Y, et al. Comparative chloroplast genome analysis of *Impatiens* species (Balsaminaceae) in the Karst area of China: Insights into genome evolution and phylogenomic implications [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22 (1): 571.
- [33] 吴林世, 廖菊阳, 刘艳, 等. 基于高通量测序的羊蹄躑叶绿体基因组及SSR序列分析 [J]. *经济林研究*, 2022, 40 (1): 123–131.
- WU L S, LIAO J Y, LIU Y, et al. Chloroplast genome and SSR sequence analysis of *Rhododendron molle* based on high throughput sequencing [J]. *Non-Wood Forest Research*, 2022, 40 (1): 123–131. (in Chinese)
- [34] 杨祥燕, 蔡元保, 谭秦亮, 等. 菠萝叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. *热带作物学报*, 2022, 43 (3): 439–446.
- YANG X Y, CAI Y B, TAN Q L, et al. Analysis of Codon usage bias in the chloroplast genome of *Ananas comosus* [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2022, 43 (3): 439–446. (in Chinese)
- [35] 汤晨茜, 仇志欣, 檀超, 等. 陕甘花椒叶绿体基因组及其与爪瓣花椒的系统关系 [J]. *园艺学报*, 2022, 49 (3): 641–654.
- TANG C Q, QIU Z X, TAN C, et al. *Sorbus koehneana* (Rosaceae): Its complete chloroplast genome and phylogenetic relationship with *S. unguiculata* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, 49 (3): 641–654. (in Chinese)
- [36] 方琰, 胡莎莎, 张冬群, 等. 球状轮藻叶绿体全基因组的组装与特征分析 [J]. *四川大学学报 (自然科学版)*, 2021, 58 (4): 181–190.
- FANG Y, HU S S, ZHANG D Q, et al. Assembly and characteristic analysis of *Chara globularis* chloroplast whole genome [J]. *Journal of Sichuan University (Natural Science Edition)*, 2021, 58 (4): 181–190. (in Chinese)

(责任编辑: 张梅)