

6种君子兰叶绿体基因组比较分析

赵兴华 岳玲 吴海红 李丹 冯秀丽 任溪

(辽宁省农业科学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 为理解君子兰叶绿体全基因组的基本特征, 开发种质资源利用分析的分子标记, 选取了6种君子兰属植物为研究对象, 进行了叶绿体基因组的精细拼接和高效组装, 以及全面的基因注释。结果表明: 花园、黄花、彩叶、沼泽、有茎和大花君子兰的叶绿体基因组长度分别为158 156、158 112、157 689、157 130、157 130、158 149 bp和158 114 bp, 分别注释了130、130、133、128、128、133个基因。在花园、黄花、彩叶、沼泽、有茎和大花君子兰的叶绿体基因组中分别鉴定出54、60、61、63、71个和61个简单重复序列(SSRs)。在编码区中, *ycf4-cemA*基因的核苷酸多样性值最高($P_i=0.0152$), 以及*rrn23*基因的核苷酸多样性值大于0.0100, 可视为多样性较高的基因。*Rpl22*基因在LSC(大单拷贝区)与IRb(反向重复区b)的交界处, 6个种间仅存在1 bp的差异。*ndhF*基因跨越了IRb与SSC的边界区域, 它们的序列差异仅有6 bp。其中花园君子兰、沼泽君子兰和有茎君子兰相同, 而另外3种大花君子兰、黄花君子兰和彩叶君子兰相同, 观察到2个差异性较大的基因(*rpoC2*和*ycf2*)和8个高变区(*rps19-psbA*、*rps16-trnS-GCU*、*atpF-atpH*、*trnT-UGU-trnF-GAA*、*rps2-rpoC2*、*petA-psbL*、*trnI-CAU-ycf2*、*rps12-rrn16*)。通过君子兰叶绿体基因组比较, 可以利用差异性较大的基因和高变区域, 以开发出具有高度特异性的分子标记。

关键词: 君子兰; 叶绿体; 基因组; 序列分析; 分子标记

中图分类号:

文献标志码: A

文章编号: 2095-1914(2025)05-0001-09

引文格式: 赵兴华, 岳玲, 吴海红, 等. 6种君子兰叶绿体基因组比较分析[J]. 西南林业大学学报(自然科学), 2025, 45(5): 1-9. Zhao X H, Yue L, Wu H H, et al. Comparative analysis of chloroplast genomes of six species of *Clivia*[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2025, 45(5): 1-9. DOI: 10.11929/j.swfu.202410043



Comparative analysis of chloroplast genomes of six species of *Clivia*

Zhao Xinghua, Yue Ling, Wu Haihong, Li Dan, Feng Xiuli, Ren Xi

(Institute of Floriculture, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, 110161)

Abstract: In order to understand the basic features of the whole chloroplast genome of *Clivia* and to develop molecular markers for germplasm utilization analysis, the data obtained were finely spliced and efficiently assembled. The acquired data were subjected to fine splicing and efficient assembly of the chloroplast genome and comprehensive gene annotation. The results were as follows: (1) The chloroplast genome lengths of *C. gardenii*, *C. miniata* var. *citrina*, *C. miniata* var. *Variegata*, *C. robusta*, *C. caulescens* and *C. miniata* were 158 156, 158 112, 157 689, 157 130, 157 130, 158 149, and 158 114 bp, respectively. 130, 130, 133, 128, 128, and 133 genes were annotated, respectively. (2) 54, 60, 61, 63, 71, and 61 SSRs were identified in the chloroplast genomes of *C. gardenii*, *C. miniata* var. *citrina*, *C. miniata* var. *Variegata*, *C. robusta*, *C. caulescens* and *C. miniata*, respectively. (3) Among the coding regions, the *ycf4-cemA* gene had the highest nucleotide diversity value ($P_i=0.0152$), as well as the *rrn23* gene, which had a nucleotide diversity value greater than 0.0100 and can be considered as genes with higher diversity. (4) The *Rpl22* gene is located at the junction between the LSC (Large Single Copy re-

收稿日期: 2024-10-21; 修回日期: 2025-01-02

基金项目: 辽宁省设施花卉新品种创制及关键生产技术与示范项目(2023JCX0404)资助。

第1作者: 赵兴华(1973—), 男, 研究员。研究方向: 花卉遗传育种与栽培技术。Email: 739476236@qq.com。

通信作者: 岳玲(1980—), 女, 副研究员。研究方向: 花卉遗传育种与栽培技术。Email: 798008449@qq.com。

gion) and IRb(Inverted Repeat region b), with a difference of only 1 bp among 6 species. Specifically, the *ndhF* gene spans the border region between the IRb and the SSC and is only 6 bp different in sequence among these species. Among them, *C. gardenii*, *C. robusta*, *C. caulescens* are the same, while the other three species of *C. miniata*, *C. miniata* var. *citrina*, and *C. miniata* var. *variegata* are the same.(5) Two highly differentiated genes(*rpoC2* and *ycf2*) and eight highly variable regions(*rps19-psbA*, *rps16-trnS-GCU*, *atpF-atpH*, *trnT-UGU-trnF-GAA*, *rps2-rpoC2*, *petA-psbL*, *trnI-CAU- ycf2*, *rps12-rrn16*). Comparative analysis of the monarch chloroplast genome allows for the utilization of highly divergent genes and highly variable regions in order to develop highly specific molecular markers that can be implemented for precise species identification and in-depth phylogenetic exploration.

Key words: *Clivia*; chloroplast genome; sequence analysis; 1111; 11111

君子兰属 (*Clivia*) 隶属于石蒜科, 多年生常绿草本观赏植物, 原产非洲^[1]。君子兰以其终年常青的叶片与绚烂多彩的花朵著称, 展现出“春季赏花、夏秋冬三季观果、全年赏叶”的独特魅力^[2], 是全球范围内备受推崇的重要花卉种类之一^[3]。然而, 我国君子兰的遗传资源相对匮乏, 研究基础尚显薄弱, 尤其是在繁殖方式上过度依赖种子繁殖, 导致了品种与类型的混杂现象。此外, 君子兰的育种周期长, 在离体条件下的再生能力有限, 增殖效率低下, 且分子层面的研究步伐迟缓^[4]。尽管君子兰自南非被发现以来, 已被世界各地的爱好者引种栽培超过两百年之久^[5], 但关于其基因序列的深入探究报道在近年来才逐渐增多。随着分子生物学技术的快速发展, 科研人员对来自不同地域的君子兰进行基因关系分析, 评估其遗传多样性及变异规律, 有助于精准筛选携带目标性状基因的亲本材料, 从而实现特色君子兰新品种的高效选育^[6]。

利用高通量的基因组测序技术容易获得叶绿体全基因组数据^[7-8], 对基因组进行基因分析注释, 是探讨植物能量代谢、光合作用机制、次生代谢及抗氧化的基础^[9]。叶绿体基因组作为遗传信息的载体, 能够反映跨地理分布的植物种群间进化关系。通过精细提取的高多态性 DNA 片段, 能够量化分析母系遗传模式在植物种群分化过程中所扮演的角色及其程度^[10-11]。叶绿体的全基因组序列分析揭示了多种基因结构上的变异类型, 这些变异涵盖了简单序列重复 (SSRs)、单核苷酸差异 (SNPs) 以及插入与缺失 (InDels) 等多种形式。

在物种鉴别领域, 叶绿体全基因组序列广泛作为 DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术的关键分子标识, 包括 *rbcL*、*matK*、*psbA-trnH* 和 *atpF-atpH* 基因片段等^[12-13]。姚辉及其研究团队提出,

石斛属植物中的 *psbK-psbI* 基因片段, 具备作为该属特异性分子标记的潜力, 且他们已成功运用此片段作为识别工具, 对 6 份样本进行了精准鉴定^[14]。李冉郡等人针对大黄 (*Rheum* spp.) 药材的基原物种, 深入探索了其叶绿体基因组中的高变异区域, 成功开发出特异性 DNA 条形码技术。该技术能够有效区分并精准鉴别出 3 种不同大黄种类, 为药材鉴定领域提供了有力支持^[15]。通过生物信息学软件进行组装、注释、简单序列分析, 详细比较了 6 种君子兰叶绿体基因组的结构差异, 探讨 6 种君子兰叶的叶绿体基因组中有哪些位点可以作为特征性分子标记, 对 6 种君子兰的叶绿体基因组结构进行了深入的对比分析, 旨在探究这些物种叶绿体基因组中潜在的、具有特征性的分子标记位点, 为未来的君子兰属植物遗传特性解析及基因编辑辅助育种等相关研究构建坚实的基础, 从而推动该领域的发展。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集 4 种无病害且幼嫩的君子兰鲜叶, 包括黄花君子兰 (*C. miniata* var. *citrina*)、花园君子兰 (*C. gardenii*)、有茎君子兰 (*C. caulescens*) 及沼泽君子兰 (*C. robusta*), 随后以纱网裹覆, 置于流动水下冲洗 20min, 随后用蒸馏水漂洗多次, 最终将其存放于 -80 ℃ 的超低温冰箱中, 以备后续使用。辽宁省农业科学院花卉研究所温室 (N41°48'33", E123°34'53") 提供了用于研究的君子兰新鲜叶片样本, 相关的试验操作则是在辽宁省农业科学院花卉研究所的分子生物学实验室中开展的。

1.2 试验仪器

刀片服务器集群 IBM X36 50M4; 核酸超声破碎仪 Covaris S2; 颗粒计数仪 Beckman Z1; Illu-

mina Hiseq 2500 测序平台; 高速冷冻离心机 Sigma 3K30; ABI 9700 PCR 仪; 组织破碎仪 Retsch MM400 等。

1.3 试验方法

1.3.1 DNA 提取

采用 CTAB 法提取样品总的 DNA^[6]。

1.3.2 DNA 测序

依据测序文库构建的标准流程, 构建了测序文库, 插入长度为 400 bp 的 DNA 片段。随后, 这些片段通过添加接头序列并测序, 为后续聚合酶链反应 (PCR) 操作奠定了基础。PCR 过程具体为: 在 96 °C 下预热 2 min 以激活聚合酶; 96 °C 下维持 30 s, 使 DNA 双链解离成单链。随后, 温度降至 60 °C 持续 30 s, 接着, 温度迅速升至 72 °C 并保持 60 s, 以完成引物的延伸。上述 PCR 循环被重复执行 10 次。完成扩增后, 对 DNA 文库进行了纯化, 并通过琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行了质量检测。采用了 Pair-End 测序策略, 测序读长为 125 bp, 并利用 Illumina Hiseq 2500 测序平台进行高通量测序。每个样本最终获得了大约 3.3 G 的原始数据, 包含测序片段 1 000 Mb。

1.3.3 组装与注释

在 4 种君子兰叶绿体基因组 Clean Data 中选取 Reads, 用 Get Organelle v1.6.2e 软件进行组装。用 OGAP 流程 (<https://github.com/zhangrengang/OGAP>) 对组装好的序列进行注释, 并通过 Blast (V2.8.1+) 软件检验注释的正确性。利用在线工具 OGDRAW (Organellar Genome DRAW, <http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de>) 绘制 4 种君子兰叶绿体基因组图谱。在 NCBI (The National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库中检索已发表且注释的彩叶君子兰 *C. miniata* var. *variegata* (MW017632) 和大花君子兰 *C. miniata* (NC048961) 作为参考序列, 将注释后获得的两组数据使用 Geneious prime 2022.0.2 进行人工校正比对。利用 Organellar Genome DRAW (Greiner et al., 2019) 绘制彩叶君子兰和大花君子兰的叶绿体全基因组图谱。

1.3.4 简单重复序列分析

采用 MISA 软件, 对 6 种君子兰物种执行了简单序列重复 (SSR) 的预测分析。在预测过程中, 确定了单核苷酸重复单元的最小阈值为 15 次, 二核苷酸重复单元的最小阈值为 10 次, 三核苷酸重复单元的最小阈值设定为 6 次。对于

四核苷酸、五核苷酸及六核苷酸重复单元, 则统一采用了最小重复次数为 5 次的标准。

1.3.5 序列差异分析

运用 Geneious Prime 2022.0.2 内置的 MAFFT Alignment 插件, 对 6 种君子兰的叶绿体全基因组序列进行了比对。随后, 利用 BioEdit 软件进行了序列的编辑与整理。利用 DnaSP 软件版本 6.12.03, 计算单核苷酸多态性 (SNPs) 与插入/缺失变异 (InDel) 的数量, 统计了每 100 个碱基对 (bp) 区间内的突变发生频率, 并进一步估算了这 6 种君子兰叶绿体基因组所展现的核苷酸多样性水平, 即 P_i 。若 P_i 值超过 0.0300, 则定义为高变区。

1.3.6 比较基因组分析

用 mVISTA 程序, 对 6 种君子兰的叶绿体全基因组序列进行对比分析。借助 Rv4.1.3 软件运行了 IRscope 脚本, 对 6 种君子兰叶绿体中的大单拷贝区域 (LSC 区)、小单拷贝区域 (SSC 区) 以及反向重复序列 (IR 区) 的边界基因特性进行了详尽的对比分析。

2 结果与分析

2.1 6种君子兰属花卉叶绿体全基因组基本特征

6 种君子兰叶绿体基因组的基本特征见表 1, 君子兰 cp DNA 注释信息见表 2, 分析如下。

1) 花园君子兰 (*C. gardenii*) 由本实验团队之前测定^[6], 其叶绿体基因组序列 (Gen Bank 登录号: MW561117) 长度为 158 156 bp, 该序列由以下几部分组成: 1 个由 86 307 bp 构成的大单拷贝区域 (LSC), 1 个 18 231 bp 的小型单一拷贝区域 (SSC) 以及 1 个为 26,809 bp 的反向重复序列 (IRs)。该基因组的 GC 含量总计为 37.96%。在进行了深入的注释分析后, 总共鉴别出 130 个基因, 这些基因中, 包含 86 个具有编码功能的基因, 36 个转运核糖核酸 (tRNA) 基因, 以及 8 个核糖体核糖核酸 (rRNA) 基因。

2) 大花君子兰 (*C. miniata*) 的叶绿体基因组 (Gen Bank 登录号: NC_048961) 长度为 158 114 bp^[16], 包括 86 204 bp 的 LSC, 18 334 bp 的 SSC, 26 788 bp 的 IRs。该样本的总体 GC 比例达到 38%。共注释了 133 个基因, 其中编码基因的数量为 87 个, 38 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。

3) 黄花君子兰叶绿体基因组 (Gen Bank 登录号: MW561118) 的全长为 158 112 bp, 由一个

大的单拷贝区（LSC，86 202 bp）、小的单拷贝区（SSC，18 334 bp）和两个反向重复区域（IRs，26 788 bp）组成。叶绿体的基因组构成中，总计涵盖了 130 个完整基因，包括 86 个负责蛋白质合成的编码基因、36 个 tRNA 基因以及 8 个 rRNA 基因。

4）彩叶君子兰的叶绿体基因组（Gen Bank 登录号: MW017632）长度为 157 689 bp，包括 85 779 bp 的 LSC，18 334 bp 的 SSC，26 788 bp 的 IRs。总的 GC 含量为 38%，注释了 133 个基因，包括 88 个编码基因，37 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。

5）沼泽君子兰的叶绿体基因组（Gen Bank 登录号: MW660367）长度为 157 130 bp，包括 85 430 bp 的 LSC，18 278 bp 的 SSC，26 711 bp 的 IRs。总的 GC 含量为 38%，注释了 128 个基因，包括 86 个编码基因，34 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。

6）有茎君子兰的叶绿体基因组（Gen Bank 登录号: MW660366）长度为 158 149 bp，包括 86 250 bp 的 LSC，18 343 bp 的 SSC，26 778 bp 的 IRs。总的 GC 含量为 38%。注释了 128 个基因，包括 86 个编码基因，34 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。

表 1 6 种君子兰叶绿体基因组的基本特征
Table 1 Chloroplast genome characteristics in six species of C.

植物种类	GenBank accession No.	基因长度/ bp	LSC 区 长度/ /bp	SSC 区 长度/ bp	IR 区 长度/ bp	基因 数量/ 个	蛋白质编码 基因数量/ 个	tRNA 数量 No.	rRNA 数量 No.	总GC 含量 (%)	LSC区 GC含量 (%)	SSC区 GC含量 (%)	IR区 GC含量 (%)
花园君子兰	MW561117	158 156	86 307	18 231	26 809	130	86	36	8	38	36.06	32.27	42.94
大花君子兰	NC_048961	158 114	86 204	18 334	26 788	133	87	38	8	38	36.1	32.21	42.94
黄花君子兰	MW561118	158 112	86 202	18 334	26 788	130	86	36	8	38	36.1	32.21	42.94
彩叶君子兰	MW017632	157 689	85 779	18 334	26 788	133	88	37	8	38	36.08	32.21	42.94
沼泽君子兰	MW660367	157 130	85 430	18 278	26 711	128	86	34	8	38	36.15	32.2	42.96
有茎君子兰	MW660366	158 149	86 250	18 343	26 778	128	86	34	8	37.9	36.01	32.2	42.94

表 2 君子兰 cp DNA 注释信息
Table 2 C. cp DNA annotation information

基因分组	基因名称
ATP酶基因	<i>atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI</i>
乙酰辅酶A羧化酶基因ne	<i>accD</i>
细胞色素合成基因	<i>ccsA</i>
膜蛋白基因	<i>cemA</i>
蛋白酶基因	<i>clpP</i>
翻译起始密码子基因	<i>infA</i>
成熟酶K基因	<i>matK</i>
NADH氧化还原酶基因	<i>ndhA, ndhB, ndhI, ndhD, ndhE, ndhF, ndhC, ndhG, ndhH, ndhK, ndhJ</i>
细胞色素b/f复合体基因	<i>petB, petD, petA, petL, petG, petN</i>
光系统I基因	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>
光系统II基因	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>
二磷酸核酮糖羧化酶大亚基基因	<i>rbcL</i>
核糖体蛋白大亚基基因	<i>rpl14, rpl16, rpl2, rpl20, rpl22, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36</i>
RNA聚合酶亚基基因	<i>rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2</i>
核糖体蛋白小亚基基因	<i>rps11, rps12, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19, rps2, rps3, rps4, rps7, rps8</i>
假定叶绿体阅读框	<i>ycf1, ycf2, ycf3, ycf4</i>
转移RNA基因	<i>trnA-UGC, trnD-GUC, trnH-GUG, trnE-UUC, trnI-CAU, trnI-GAU, trnC-GCA, trnL-CAA, trnM-CAU, trnG-GCC, trnN-GUU, trnP-UGG, trnQ-UUG, trnL-UAG, trnR-ACG, trnF-GAA, trnR-UCU, trnM-CAU, trnS-GCU, trnS-UGA, trnS-GGA, trnT-GGU, trnV-GAC, trnT-UGU, trnV-UAC, trnW-CCA, trnY-GUA, trnM-CAU</i>
核糖体核糖核酸基因	<i>rrn16, rrn23, rrn4.5, rrn5</i>

2.2 6种君子兰叶绿体全基因组中的简单重复序列特征

在分析花园君子兰叶绿体的完整基因组序列时,共确定了54个简单序列重复(SSRs),这些SSRs包括6种不同类别的重复序列:分别是单核苷酸型、二核苷酸型、三核苷酸型、四核苷酸型、五核苷酸型以及六核苷酸型,具体数量分别为30、10、2、8、3个及1个。空间分布上,这些SSRs中,有33个定位于基因间隔区(即Intergenic spacer,简称IGS),14个位于蛋白质编码序列(CDS)内,另有7个则坐落于内含子区域。

在大花君子兰的叶绿体完整基因组序列分析中,共鉴别出61个简单序列重复(SSRs),涵盖6种不同类型的SSRs。具体而言,单核苷酸型、二核苷酸型、三核苷酸型、四核苷酸型、五核苷酸型以及六核苷酸型重复序列的数量分别为38、9、2、8、3个及1个。这些SSRs中,有35个定位于IGS,15个位于CDS内,而剩余的11个则分布在内含子区域。

对黄花君子兰的叶绿体全基因组进行深入分析后,共鉴别出60个简单序列重复(SSRs),这些SSRs可细分为6种类型。具体来说,单核苷酸型、二核苷酸型、三核苷酸型、四核苷酸型、五核苷酸型以及六核苷酸型重复序列的数量分别为37个、9个、2个、8个、3个和1个。在位置分布上,发现有38个SSRs定位于IGS,15个位于CDS区域,而剩余的7个则位于内含子区域内。

在沼泽君子兰的叶绿体基因组全面测序中,共计识别出63个简单序列重复(SSRs),这些SSRs被归类为5种不同的类型。具体而言,单核苷酸重复、二核苷酸重复、三核苷酸重复、四核苷酸重复及五核苷酸重复的数量依次为41、9、2、7个和4个。在位置特征上,观察到37个SSRs定位于基因间隔区域,16个则处于CDS之中,而剩余的10个SSRs则分布在内含子区域。

在有茎君子兰叶绿体的完整基因组序列中,鉴定出了总计71个简单重复序列(SSRs),这些SSRs涵盖6种不同的类型。具体而言,单核苷酸重复序列有47个,二核苷酸重复10个,三核苷酸重复2个,四核苷酸重复8个,五核苷酸重复3个,以及六核苷酸重复1个。在分布位置

上,43个SSRs定位于基因间隔区,另有18个位于蛋白质编码序列内,而剩余的10个则分布在内含子区域。

在彩叶君子兰的叶绿体完整基因组序列分析中,共鉴别出61个简单重复序列(SSRs),涵盖了六大类别,具体为:单核苷酸重复、二核苷酸重复、三核苷酸重复、四核苷酸重复及五核苷酸重复的数量依次为38个、9个、2个、8个、3个和1个。这些SSRs中,35个定位于基因间隔区(即IGS区域)、15个位于蛋白质编码序列内,还有11个则分布于内含子之中。进一步观察君子兰属植物叶绿体全基因组中的单核苷酸SSR类型,发现全部为A/T型,而未见C/G型。至于二核苷酸SSR,大多数则属于AT/TA型。

2.3 叶绿体基因组序列的核苷酸多样性

通过计算分析6种君子兰叶绿体基因组间的核苷酸多样性值(P_i),得出编码区域的 P_i 值范围介于0至0.0152之间(见图1),结果表明了编码区序列的相对保守性。高变异位点主要集中于大型单拷贝区(LSC),其次则为小型单拷贝区(SSC),而反向重复区(IR)的 P_i 值相对较低。在编码区内,ycf4-cemA基因展现出了最高的核苷酸多态性指数($\pi=0.0152$),同时,rrn23基因的 P_i 值也超过了0.0100,表明它们属于具有较高多样性的基因类别。鉴于这些基因所表现出的高核苷酸多样性水平,它们有潜力被开发为用于物种鉴定的高效特异性分子标记。

2.4 6种君子兰的叶绿体基因组比较

对6种君子兰的叶绿体基因组边界基因展开了详尽的比较分析。通过深入分析叶绿体全基因组边界所发生的收缩与扩展的动态模式(见图2),发现这6种君子兰在LSC/IRb、IRb/SSC、SSC/IRa以及IRa/LSC这4个边界区域均共享有相同的基因集合,具体包括rpl22、ndhF、ycf1、rps19以及psbA,且它们在边界上的收缩与扩张程度表现出高度的一致性。具体而言,Rpl22基因跨越LSC/IRb边界,6种君子兰之间在此基因的序列长度上仅存在1 bp的差异。ndhF基因则跨越IRb/SSC边界,6个种仅有6 bp之差,其中花园君子兰、沼泽君子兰和有茎君子兰的ndhF基因序列相同,而大花君子兰、黄花君子兰和彩叶君子兰的序列则保持一致。此外,ycf1基因跨越SSC/IRa边界,在花园君子兰、沼泽君子兰和有

茎君子兰中, 该基因向 IR 区延伸了 931 个碱基对, 而在大花君子兰、黄花君子兰和彩叶君子兰中则延伸了 963 bp (见图 3)。从边界分析结果

来看, 6 种君子兰之间并未展现出明显差异, 这一发现表明, 叶绿体基因组的结构特征并不支持在属内进一步划分君子兰的观点。

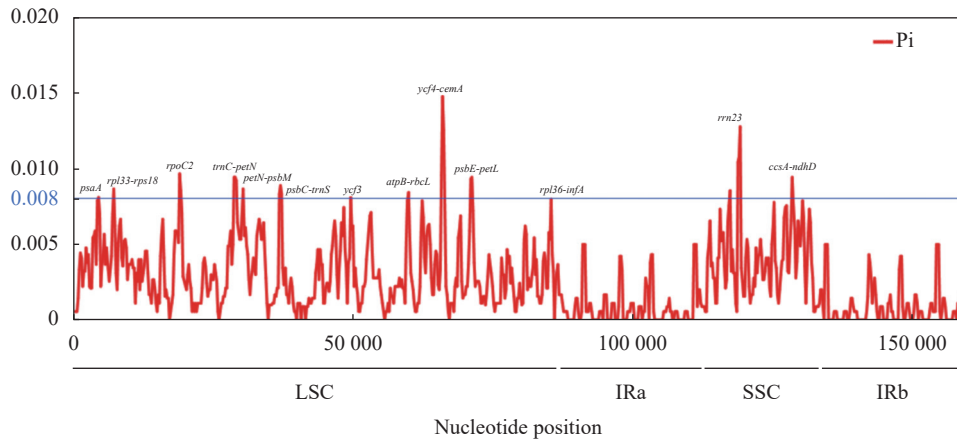
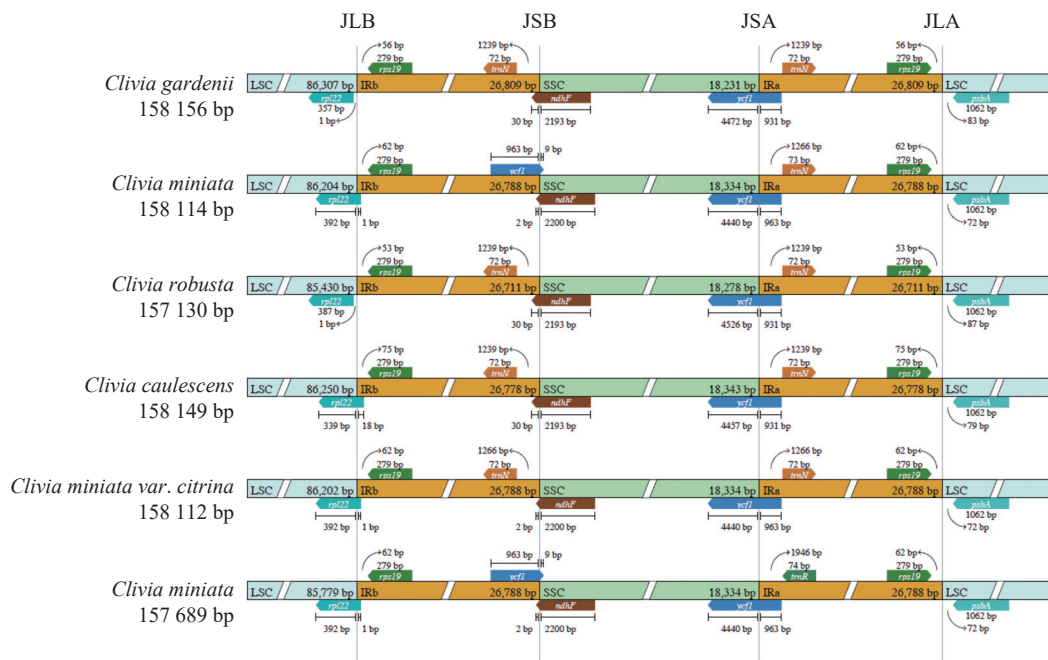


图 1 叶绿体基因组间的核苷酸多样性值 (Pi)

Fig. 1 Nucleotide diversity value (Pi) between chloroplast genomes



主线上方或下方的方框表示与边界相邻的基因。

图 2 六种君子兰叶绿体基因组中 LSC、SSC 和 IR 区相邻边界的比较

Fig. 2 Comparison of LSC, SSC and IR region boundaries in chloroplast genomes of six species of *C.*

以花园君子兰的注释序列作为参考序列, 运用在线工具 m VISTA 对 6 种君子兰的叶绿体全基因组序列进行了差异分析 (图 3)。分析结果显示, 相较于 IR 区, 6 种君子兰在 LSC 区和 SSC 区表现出更高的序列差异性; 同时, 非编码区域的差异性也显著高于编码区域。具体而言, 差异性较为突出的区域包括 rps19-psbA、rps16-trnS

(GCU)、atpF-atpH、trnT (UGU)-trnF (GAA)、rps2-rpoC2、petA-psbL、trnI (CAU)-ycf2 以及 rps12-rn16 等。在这些区域中, rpoC2 和 ycf2 两个基因的序列差异性尤为显著。基于这些高差异性的区域和基因, 我们有望开发出具有特异性的分子标记, 进而为物种鉴别及进化关系分析领域提供强有力的技术支撑与实用工具。

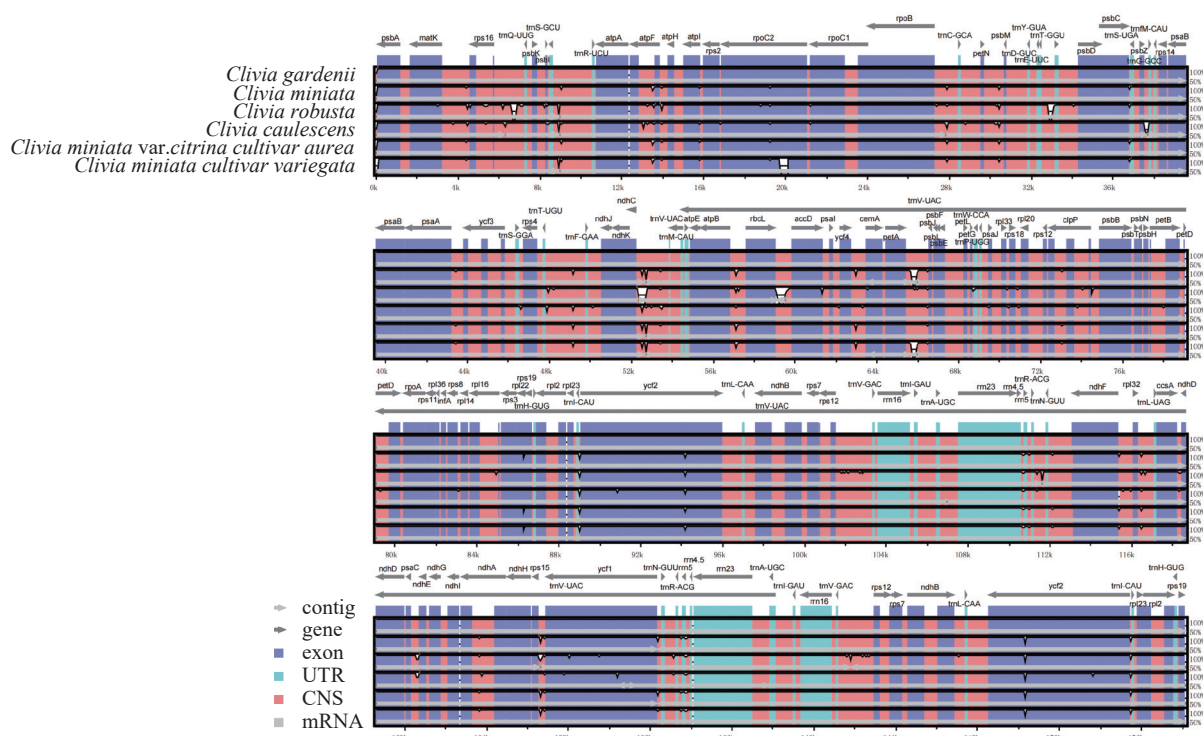


图3 6种君子兰叶绿体基因组序列的比对

Fig. 3 Comparison of chloroplast genome sequences of six *C. orchid* species

3 结论与讨论

南非是君子兰属植物原生种的原产地,其分布范围相对局限。我国早期的君子兰种质资源主要来自日本及欧洲地区,而近年来,从南非直接引进的种质资源亦显著增加。值得注意的是,我国科研单位和民间保存的君子兰原生种数量极为有限,多数种质是通过自交、种子繁殖或杂交手段获得,这导致了种质资源比较混乱以及纯度较差^[17]。

目前,随着基因组测序技术的广泛应用和叶绿体基因组研究的逐步深入,使其数据库迅速扩大,为探索研究分子层面进化的过程提供了基础^[18]。根据植物不同,叶绿体的基因数目差异也比较大,如山楂^[19] (*Crataegus pinnatifida*) 叶绿体基因组中注释了112个完整基因,其中蛋白质编码基因78个、tRNA基因30个和rRNA基因4个;砂仁^[19] (*Amomum villosum*) 注释了113个完整基因,其中蛋白质编码基因79个,tRNA基因30个和rRNA基因4个。本试验中大花君子兰注释了133个完整基因,包括蛋白质编码基因87个、tRNA基因38个和rRNA基因8个;有茎君子兰注释了128个基因,包括编码基因86个,tRNA基因34个和rRNA基因8个。本试验中这6种君子兰叶绿体基因组的组成和特征相比较发

现,花园、大花、黄花、彩叶和沼泽君子兰叶绿体基因组总GC含量均为38.0%;而有茎君子兰叶绿体基因组GC含量为37.9%,GC的含量能够反应出叶绿体基因组的基本特征,说明君子兰属内叶绿体基因组的进化速度较慢,表现出高度的保守性。

SSR序列在生物界中普遍存在,由于DNA复制时,很容易引起碱基错位的发生,因此使得SSR序列的多态性非常丰富,为生物的系统进化研究提供可靠的依据^[20]。在花园、大花、黄花、有茎和彩叶君子兰的叶绿体全基因组中分别检测到SSRs数量(54、61、60、71、61个),都包含单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸6种类型的SSRs;而在沼泽君子兰的叶绿体全基因组中检测到63个SSRs,只包含单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸5种类型的SSRs,没有检测到六核苷酸序列。君子兰的SSRs中大多数为单核苷酸,且主要由多聚胸腺嘧啶(polyT)和多聚腺苷酸(polyA)重复序列组成^[21],其余二核苷酸SSRs为AT/TA型。

群体基因组遗传多样性水平可以用核苷酸多样性值(Pi)来评价,本研究得出在君子兰叶绿体基因组中,IR区序列的Pi值较低,表现出较高的保守性,而高变位点位于LSC区,其次是

SSC区,其中*ycf4-cemA*基因的Pi值最高,以及核苷酸多样性值大于0.0100的基因,如*rrn23*基因等可视为多样性较高的基因,利用此突变位点,可以开展君子兰属内鉴定、系统进化水平分析,这和南洋杉叶绿体基因组高度保守的特征相同^[22]。

Spies等对君子兰进行鉴定研究,揭示了垂笑君子兰、具茎君子兰以及奇异君子兰各自拥有独特的DNA条形码,这一发现为准确区分这三种君子兰提供了可靠依据^[23]。Viljoen等研究表明在大花君子兰中,二氢黄酮醇-4-还原酶(DFR)基因与查尔酮合成酶(CHS)基因的表达模式与花青素的合成呈现出密切的关联性,并共同参与了对花青素生物合成的协同调控过程^[24]。Liu等人成功在大花君子兰中克隆得到了三个查尔酮异构酶基因,分别为CmCHI1、CmCHI2及CmCHI3,这些基因的发现揭示了它们与花青素生物合成之间存在着紧密的关联性^[25]。Wang等分析了君子兰叶片形成黄色条纹的机理,认为叶绿体基因组大单拷贝区(LSC, large single copy regions)产生突变,可能是引发叶片黄色条纹形成的原因^[26]。

本研究的结果表明,在6个君子兰品种中,相较于IR区,LSC区和SSC区表现出更高的差异性,非编码区的差异性高于编码区。其中差异性较高的区域有*rps19-psbA*、*rps16-trnS-GCU*、*atpF-atpH*、*trnT-UGU-trnF-GAA*、*rps2-rpoC2*、*petA-psbL*、*trnI-CAU-ycf2*、*rps12-rrn16*等区域,差异性较大的基因为*rpoC2*和*ycf2*。可以利用这些区域,开发特异性标记,进行物种鉴定研究。

[参 考 文 献]

- [1] Koopowitz H. *Clivias*[M]. Portland: Timber Press, 2002
- [2] Ran Y D, Simpson S. *In vitro* propagation of the genus *Clivia* [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, 81(2): 239–242.
- [3] Duncan G. *Grow Clivias*. 2nd edition[M]. South Africa: SANBI, 2008
- [4] Ran Y D, Hammett K R W, Murray B G. Phylogenetic analysis and karyotype evolution in the genus *Clivia*(Amaryllidaceae) [J]. *Annals of Botany*, 2001, 87(6): 823–830.
- [5] 中国君子兰协会. 中国君子兰 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
- [6] 吴海红, 李丹, 冯秀丽, 等. 花园君子兰叶绿体基因组序列 [J]. *分子植物育种*, 2023, 21(20): 6659–6665.
- [7] 黎若竹, 蔡杰, 杨俊波, 等. 利用叶绿体基因组数据解析锦葵科梧桐亚科的系统位置和属间关系 [J]. *广西植物*, 2022, 42(1): 25–38.
- [8] Fu C N, Mo Z Q, Yang J B, et al. Testing genome skimming for species discrimination in the large and taxonomically difficult genus *Rhododendron* [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(1): 404–414.
- [9] 段乃彬, 王俊峰, 白静, 等. 萝卜叶绿体及线粒体基因组测序与组装 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(11): 2429–2436.
- [10] Liang C L, Wang L, Lei J, et al. A comparative analysis of the chloroplast genomes of four *Salvia* medicinal plants [J]. *Engineering*, 2019, 5(5): 907–915.
- [11] Niu E L, Jiang C Y, Wang W, et al. Chloroplast genome variation and evolutionary analysis of *Olea europaea* L [J]. *Genes*, 2020, 11(8): 879.
- [12] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): e508.
- [13] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, et al. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(8): 2923–2928.
- [14] 姚辉, 杨培, 周红, 马双姣, 宋经元, 陈示林. 基于叶绿体 *psb K-psb I* 序列的石斛属药用植物鉴定 [J]. *药学报*, 2015, 50(6): 783–787
- [15] 李冉郡, 武立伟, 辛天怡, 等. 大黄药材基原物种叶绿体基因组分析与特异DNA条形码开发 [J]. *药学报*, 2022, 57(5): 1495–1505.
- [16] 郑祎, 张卉, 王钦美, 等. 大花君子兰叶绿体基因组及其特征 [J]. *园艺学报*, 2020, 47(12): 2439–2450.
- [17] 王冲, 纪艺, 王鸣谦, 等. 君子兰属植物种及品种分类研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(3): 692–700.
- [18] 柳迪, 杜雨, 李效雄, 等. 黑果枸杞叶绿体基因组特征分析 [J]. *西北农业学报*, 2024, 33(10): 1907–1918.
- [19] 刘晶星. 宁夏枸杞和黑果枸杞叶绿体全基因组测序及基因注释分析 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2013.
- [20] Jansen R K, Saski C, Lee S B, et al. Complete plastid genome sequences of three rosids (*Castanea*, *Prunus*, *Theobroma*): evidence for At least two independent transfers of *rpl22* to the nucleus [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(1): 835–847.
- [21] Zhang Y J, Du L W, Liu A, et al. The complete chloroplast genome sequences of five *Epimedium* species: lights into phylogenetic and taxonomic analyses [J].

- Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 306.
- [22] Nguyen V B, Linh Giang V N, Waminal N E, et al. Comprehensive comparative analysis of chloroplast genomes from seven *Panax* species and development of an authentication system based on species-unique single nucleotide polymorphism markers [J]. [Journal of Ginseng Research](#), 2020, 44(1): 135–144.
- [23] Spies P, Spies J J. *Clivia* taxonomy revisited, using DNA barcode regions [J]. *Acta Horticulturae*, 2018(1201): 503–514.
- [24] Viljoen C D, Snyman M C, Spies J J. Identification and expression analysis of *Chalcone* synthase and dihydroflavonol 4-reductase in *Clivia miniata* [J]. [South African Journal of Botany](#), 2013, 87: 18–21.
- [25] Liu Y, Xue X X, Zhao C L, et al. Cloning and functional characterization of *Chalcone* isomerase genes involved in anthocyanin biosynthesis in *Clivia miniata* [J]. *Ornamental Plant Research*, 2021, 1(1): 1–10.
- [26] Wang Q M, Cui J G, Dai H Y, et al. Comparative transcriptome profiling of genes and pathways involved in leaf-patterning of *Clivia miniata* var. *variegata* [J]. [Gene](#), 2018, 677: 280–288.

(责任编辑 张 坤)