

doi: 10.11733/j.issn.1007-0435.2026.04.004

引用格式: 欧阳天雨, 郭李智, 樊露泽, 等. 药用植物白蓝翠雀花的叶绿体基因组特征及系统发育分析[J]. 草地学报, 2026, 34(4): 1168–1180

OUYANG Tian-yu, GUO Li-zhi, FAN Lu-ze, et al. Characterization of the Chloroplast Genome and Phylogenetic Analysis of the Medicinal Plant *Delphinium albocoeruleum*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(4): 1168–1180

药用植物白蓝翠雀花的叶绿体基因组特征 及系统发育分析

欧阳天雨¹, 郭李智², 樊露泽¹, 黄荣鑫¹, 吕婷^{1*}

(1. 青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016; 2. 青海省药品检验检测院, 青海 西宁 810016)

摘要: 药用植物白蓝翠雀花(*Delphinium albocoeruleum*)富含二萜类生物碱, 兼具重要药用与生态价值, 但其叶绿体基因组特征与系统位置尚不明确。本研究首次测定并解析其完整叶绿体基因组, 同时开展了翠雀属及近缘物种的比较分析。结果显示: 基因组全长154 258 bp, 具典型四分体结构, 包括大单拷贝区(Large single copy region, LSC)84 847 bp、小单拷贝区(Small single copy region, SSC)16 301 bp及反向重复区(Inverted repeat region, IR)26 555 bp, 总GC含量38.25%; 共注释131个基因, 含1个特殊*ycf1*假基因, 其呈现IRb/SSC边界截断和SSC/IRa边界完整的分化模式。检测到243个简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR), 其中LSC区占67.1%, 且以A/T为主, 鉴定出*matK*, *ndhD*等7个正向选择基因及15个高变异区间($P_i > 0.020$), 表明基因组整体保守但存在局部变异。系统发育分析表明白蓝翠雀花与单花翠雀花亲缘关系最近。本研究为翠雀族系统发育、遗传演化及地理起源研究提供了重要依据。

关键词: 白蓝翠雀花; 叶绿体基因组; 系统发育分析; 翠雀族

中图分类号: Q949.95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-0435(2026)04-1168-13

Characterization of the Chloroplast Genome and Phylogenetic Analysis of the Medicinal Plant *Delphinium albocoeruleum*

OUYANG Tian-yu¹, GUO Li-zhi², FAN Lu-ze¹, HUANG Rong-xin¹, LÜ Ting^{1*}

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai Province 810016, China;

2. Qinghai Institute for Drug Control, Xining, Qinghai Province 810016, China)

Abstract: The medicinal plant *Delphinium albocoeruleum* is rich in diterpenoid alkaloids, and possesses significant medicinal and ecological values. However, studies on the characteristics of its chloroplast genome and systematic taxonomic status still remain scarce. In this study, the complete chloroplast genome of this species was sequenced and characterized for the first time, and comparative analyses within *Delphinium* and related taxa were also conducted. The results indicated that the chloroplast genome of *D. albocoeruleum* had a total length of 154 258 bp, and exhibited a typical quadripartite structure, including a large single copy (LSC) region of 84 847 bp, a small single copy (SSC) region of 16 301 bp, and an inverted repeat (IR) region of 26 555 bp. The total GC content was 38.25%. A total of 131 genes were annotated, including a unique *ycf1* pseudogene, which presented a boundary differentiation pattern characterized by truncation at the IRb/SSC boundary and intact function at the SSC/IRa boundary. We identified 243 simple sequence repeats (SSR) loci, with 67.1% of these SSR loci concentrated in the LSC region and A/T mononucleotide repeats being the dominant type. Furthermore, seven positive selection genes (e. g., *matK*, *ndhD*) and 15 highly divergent regions ($P_i > 0.020$) were detected, indicating that the genome was overall conserved but local variations. Phylogenetic analysis demonstrated that *D. albocoe-*

收稿日期: 2025-04-24; 修回日期: 2025-08-11

基金项目: 青海省自然科学基金(2024-ZJ-993); 青海大学青年科研基金(2023-QNY-10)资助

作者简介: 欧阳天雨(2004-), 女, 汉族, 云南版纳人, 本科生, 主要从事药用植物分子遗传的研究, E-mail: 2135553414@qq.com; *通信作者
Author for correspondence, E-mail: lvtingiu@163.com

ruleum had the closest genetic relationship with *D. candelabrum*. These results provide an important basis for research on the phylogeny, genetic evolution, and geographical origin of the tribe *Delphineae*.

Key words: *Delphinium albocoeruleum*; Chloroplast genome; Phylogenetic analysis; The tribe *Delphineae*

药用植物是我国重要的生物资源之一,在缓解人类健康问题方面发挥不可替代的作用^[1]。其中,青藏高原作为全球生物多样性热点区域,凭借其独特的高原生态系统,已成为我国道地中药材的核心产地。据调查,该地区已发现药用植物2000多种^[2],因长期适应极端环境,其活性成分含量普遍高于低海拔地区的同类植物。这是由于药用植物为适应青藏高原的极端环境,通过诱导植物次生代谢途径,从而促使二萜生物碱等活性成分的超量合成^[3]。该类化合物已被证实具有多靶点药理活性,早期研究主要聚焦于其抗炎、抗癌、镇痛及镇静作用^[4];近年研究则进一步揭示其在神经退行性疾病治疗领域的潜力,包括对阿尔茨海默病的干预、对癫痫发作的抑制,并在心律调节方面表现出积极作用,因而成为发掘创新药物先导体的重要宝库^[5]。翠雀属(*Delphinium*)隶属于毛茛科(Ranunculaceae),为多年生或一年生草本植物,全球约有350种,其中我国有165种,除台湾、海南外,广布于其他各省区,是民间及中国藏医药中常用药材。据藏药典籍《晶珠本草》记载,该属植物具有消炎、镇静、镇痛、祛风湿、活血调经、止咳平喘、治疗跌打损伤和牙痛等功效^[6]。而翠雀属植物之所以具有上述功效,主要是由于该属植物中含有二萜生物碱类化合物^[6]。

翠雀属包括翠雀亚属(Subgen. *Delphinium*)、三出翠雀亚属(Subgen. *Oligophyllum*)和还亮草亚属(Subgen. *Consolida*),其中以翠雀亚属物种最为丰富。本研究以该亚属的代表性物种白蓝翠雀花(*Delphinium albocoeruleum*)为研究对象。该物种主要分布于中国四川西北部、西藏东北部、青海东部和甘肃,典型生境为海拔3600~4700 m的山地草坡或柏树林下,其模式标本采自青海大通河流域^[7]。据《藏药志》记载,白蓝翠雀花是重要的藏药材“速木萨”的基源植物之一,全草可供药用,其提取物作为抗炎、解热、镇痛药在我国民间医药中已有较长的应用历史^[8]。该物种偏好凉爽湿润的气候环境,对土质要求不高,不过更适宜生长在肥沃、疏松的微酸性或中性土壤中。此外,白蓝翠雀花在一定范围内能够调节气候,兼具良好的药用价值和生态价值。目前,针对白蓝翠雀花的研究主要集中在其化学成分和药理作用方面,而关于其叶绿体基因组的研究尚未见报道。叶绿体是植物和藻类光合

细胞中重要且独特的组成部分,是进行光合作用和能量转换的重要半自主细胞器^[9]。与核基因组相比,叶绿体基因组具有结构稳定、保守性高、进化速率慢以及分子量较小等特点。基于这些特性,叶绿体基因组在物种鉴定和系统发育分析中具有独特优势,已成功应用于唐古特忍冬(*Lonicera tangutica*)^[10]、桔梗(*Platycodon grandiflorus*)^[11]和川贝母(*Fritillaria cirrhosa*)^[12]等药用植物的系统学研究。迄今为止,尽管NCBI数据库中已收录翠雀(*D. grandiflorum*)、云南翠雀花(*D. yunnanense*)、角萼翠雀花(*D. ceratophorum*)和还亮草(*D. anthriscifolium*)等多个翠雀属物种的叶绿体基因组数据,但相关研究多局限于基因组测序,缺乏深入的比较基因组学和系统发育分析。

基于此,本研究拟达成的具体研究目标如下:(1)首次测定并解析白蓝翠雀花的完整叶绿体基因组序列;(2)对翠雀属植物叶绿体基因组进行比较分析;(3)通过构建系统发育树,明确白蓝翠雀花在翠雀属中的系统分类地位。这些研究将为翠雀属植物的系统分类和进化研究提供新的分子证据。

1 材料与方法

1.1 样本采集、DNA提取与测序

白蓝翠雀花新鲜叶片采自青海省玉树地区(38°11'44.8"N,97°36'1.33"E),于野外迅速用硅胶干燥后密封保存,运输至实验室并置于-20℃冰箱保存。采用改良的CTAB法^[13]提取总DNA,并通过1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和纯度。随后,将基因组DNA超声波破碎至平均片段长度350 bp,并按照VAHTS Universal DNA Library Prep Kit(Vazyme)标准流程完成DNA末端修复、加“A”尾处理以及接头连接。最后,通过PCR扩增富集文库,确保其浓度满足高通量测序需求,并采用Illumina NovaSeq 6000平台进行双端测序,获得长度为150 bp的测序读长。

1.2 叶绿体基因组的组装与注释

利用GetOrganelle 1.7.5.0软件^[14]对过滤后的高质量测序数据进行组装,分别设置k-mer参数为55,87和121。随后,运用Bandage v. 0.8.1软件^[15]对组装结

果的完整性和准确性进行验证。叶绿体基因组注释采用双重验证策略:(1)运用Prodigal v2.6.3软件^[16]、Hmmer v3.1b2(网址:<http://www.hmmerr.org/>)和Aragorn v1.2.38(网址:<http://www.ansikte.se/ARAGORN/>)分别预测编码序列(Coding sequence, CDS)、核糖体核糖核酸(rRNA)和转运核糖核酸(tRNA);(2)以囊距翠雀花(*Delphinium brunonianum*, NC_051554.1)叶绿体基因组作为参考序列,通过Blast v2.6软件(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)完成读段比对和人工检查,修正基因差异和错误注释。最后,使用OGDRAW软件(<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>)绘制白蓝翠雀花的叶绿体基因组图谱。

1.3 叶绿体基因组特征分析

运用Codon W 1.4.2软件^[17]计算相对同义密码子的使用度(Relative synonymous codon usage, RSCU),该参数通过计算密码子的观察频率与预期频率的比值来确定。同时,利用REPuter软件^[18]对白蓝翠雀花叶绿体基因组中的散在重复序列进行鉴定,包括回文重复序列(P)、互补重复序列(C)、正向重复序列(F)和反向重复序列(R),具体参数设置为:最小重复序列长度30 bp,汉明距离3。此外,使用MISA软件^[19]对白蓝翠雀花叶绿体基因组中的简单序列重复进行分析,不同重复类型所需的最小重复次数设置如下:单碱基重复8次,二碱基重复5次,三碱基、四碱基、五碱基和六碱基重复均为3次。

1.4 叶绿体基因组的比较分析

为了深入探究翠雀属及相关属植物叶绿体基因组的结构特征与演化关系,本研究从NCBI中获取了单花翠雀花(*D. candelabrum*)、翠雀、露蕊乌头(*Gymnandrum gymnantrum*)、飞燕草(*Consolida ajacis*)、铁棒锤(*Aconitum pendulum*)和唐古特乌头(*A. tanguticum*)六个物种的叶绿体基因组序列,并结合新测序的密花翠雀花(*D. densiflorum*)和毛翠雀花(*D. trichophorum*)基因组数据进行比较分析。首先,利用CGVIEW软件(<https://github.com/paulstothard/cgview>)对上述9个物种的叶绿体基因组进行结构可视化,系统评估近缘物种间的基因组结构变异。随后,运用Mauve软件^[20]进行全基因组共线性分析(默认参数设置),以检测近缘物种叶绿

体基因组内的重排和倒位现象。此外,在基因组的进化过程中,反向重复序列(IR)边界易发生扩张或收缩,这种变化可能使特定基因在IR区域与单拷贝区域之间发生转移。为明确这四个基因组区域的边界大小是否存在变化,本研究使用IRscope软件^[21]分别对9个物种的叶绿体基因组进行边界分析,系统比较LSC/IRb, IRb/SSC, SSC/IRa和IRa/LSC四个边界区域的结构变异特征。

1.5 多态性分析和KaKs分析

核苷酸多样性(π)是评估物种间遗传变异的重要指标,其高变异区域可作为群体遗传学研究中的潜在分子标记。本研究利用MAFFT软件^[22]对不同物种的同源基因序列进行全局比对,并运用DnaSP v.5.1软件计算每个基因的核苷酸多样性。此外,在分子进化研究中,碱基突变对蛋白质编码功能的影响可分为两类:非同义突变(Ka)和同义突变(Ks)。非同义突变指导致氨基酸序列改变的核苷酸替换,这类突变通常处于自然选择的调控作用之下;而同义突变虽改变密码子组成,却不影响氨基酸序列,其演化过程主要受中性进化驱动。通过计算非同义替换率(Ka)与同义替换率(Ks)的比值,可有效评估基因位点所承受的选择压力类型。本研究使用KaKs_Calculator v2.0软件^[23]计算各基因的 $\frac{Ka}{Ks}$ 值。根据分子进化理论,当 $\frac{Ka}{Ks} > 1$ 时,表明基因位点存在正向选择压力;当 $\frac{Ka}{Ks} < 1$ 时,则反映纯化选择作用;当 $\frac{Ka}{Ks} = 1$ 时,则意味着中性进化。

1.6 系统发育分析

本研究基于17条叶绿体基因组序列构建系统发育树,其中3条序列由本研究提供,其余14条参考序列来源于NCBI。首先,使用MAFFT v7.4软件^[22]对环状叶绿体序列进行比对,并借助TrimAl v1.4软件去除比对结果中的低质量区域,以提高序列比对的可靠性。随后,基于jModelTest v2.1.10软件^[24]确定GTR+G+I为最优核苷酸替换模型。最后,使用RAxML v8.2.10软件^[25]以最大似然法(Maximum likelihood method, ML)构建系统发育树,自展重复次数设置为1000。

2 结果与分析

2.1 白蓝翠雀花叶绿体基因组结构和基本特征

白蓝翠雀花的叶绿体基因组呈现典型的四分体结构,全长 154 258 bp,GC 含量为 38.25%(表 1)。其结构与大多数陆生植物相似,由一个长 84 847 bp 的大单拷贝区(Large single copy region, LSC)、一个长 16 301 bp 的小单拷贝区(Small single copy region, SSC)和两个长 26 555 bp 的反向重复区(Inverted repeat region, IR)组成(表 1)。各区域的 GC 含量存在差异,其中 IR 区最高,达到 42.99%, LSC 区为 36.35%,而 SSC 区最低,为 32.76%(表 1)。此外,该基因组共注释 131 个基因,包括 85 个

蛋白编码基因、37 个 tRNA 基因、8 个 rRNA 基因和 1 个假基因(*ycf1*)(表 2)。其中 *ycf1* 基因存在特殊进化现象,其两个拷贝分别定位于 IRb/SSC 和 SSC/IRa 边界,前者发生截断并退化为假基因,后者保持完整编码功能。根据基因功能可划分为四类:参与光合作用的基因 45 个,与自我复制相关的基因 72 个,其他功能基因 6 个,以及功能未知基因 8 个(表 2)。IR 区共检测到 19 个重复基因,具体包括 8 个蛋白编码基因(*ndhB*, *rpl2*, *rpl23*, *rps12*, *rps7*, *ycf1*, *ycf2* 和 *ycf15*)、7 个 tRNA 基因(*trnA-UGC*, *trnI-CAU*, *trnI-GAU*, *trnL-CAA*, *trnN-GUU*, *trnR-ACG* 和 *trnV-GAC*)和 4 个 rRNA 基因(*rrn16*, *rrn23*, *rrn4*.5 和 *rrn5*)(表 2 和图 1)。

表 1 白蓝翠雀花完整叶绿体基因组信息

Table 1 Information of the complete chloroplast genomes of *D. albocoeruleum*

类别 Item	类型 Type	参数值 Parameter value
叶绿体基因组结构 Construction of the chloroplast genome	总体 Total	153 956 bp
	大单拷贝区 LSC	84 847 bp
	小单拷贝区 SSC	16 301 bp
	反向重复区 IR	26 555 bp
GC 含量 GC content/%	总体 Total	38.25
	大单拷贝区 LSC	36.35
	小单拷贝区 SSC	32.76
	反向重复区 IR	42.99
	总体 Total	131
基因数量 Gene number	蛋白编码基因 PCG	85
	转运 RNA tRNA	37
	核糖体 RNA rRNA	8
	假基因 Pseudo gene	1

表 2 白蓝翠雀花叶绿体基因组信息

Table 2 Information of the chloroplast genome of *D. albocoeruleum*

基因类别 Category of genes	基因分组 Group of genes	基因名称 Name of genes
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>psbH</i> , <i>psbI</i> , <i>psbK</i> , <i>psbL</i> , <i>psbM</i> , <i>psbN</i> , <i>psbT</i> , <i>psbZ</i>
	NADH 脱氢酶亚基 Subunits of NADH dehydrogenase	<i>ndhA</i> *, <i>ndhB</i> *(2), <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>
	细胞色素 b ₆ /f 复合体亚基 Subunits of cytochrome b ₆ /f complex	<i>petA</i> , <i>petB</i> *, <i>petD</i> *, <i>petG</i> , <i>petL</i> , <i>petN</i>
	ATP 合成酶亚基 Subunits of ATP synthase	<i>atpA</i> , <i>atpB</i> , <i>atpE</i> , <i>atpF</i> *, <i>atpH</i> , <i>atpI</i>
自我复制 Self-replication	核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基 Large subunit of rubisco	<i>rbcL</i>
	核糖体大亚基蛋白 Proteins of large ribosomal subunit	<i>rpl14</i> , <i>rpl16</i> *, <i>rpl2</i> *(2), <i>rpl20</i> , <i>rpl22</i> , <i>rpl23</i> (2), <i>rpl33</i> , <i>rpl36</i>
	核糖体小亚基蛋白 Proteins of small ribosomal subunit	<i>rps11</i> , <i>rps12</i> ** (2), <i>rps14</i> , <i>rps15</i> , <i>rps18</i> , <i>rps19</i> , <i>rps2</i> , <i>rps3</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7</i> (2), <i>rps8</i>
	RNA 聚合酶亚基 Subunits of RNA polymerase	<i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> *, <i>rpoC2</i>
	核糖体 RNA RNA Ribosomal RNAs	<i>rrn16</i> (2), <i>rrn23</i> (2), <i>rrn4.5</i> (2), <i>rrn5</i> (2)
其他基因 Other genes	转运 RNA RNA Transfer RNAs	<i>tmA-UGC</i> *(2), <i>tmC-GCA</i> , <i>tmD-GUC</i> , <i>tmE-UUC</i> , <i>tmF-GAA</i> , <i>tmG-GCC</i> , <i>tmG-UCC</i> *, <i>tmH-GUG</i> , <i>tmI-CAU</i> (2), <i>tmI-GAU</i> *(2), <i>tmK-UUU</i> *, <i>tmL-CAA</i> (2), <i>tmL-UAA</i> *, <i>tmL-UAG</i> , <i>tmM-CAU</i> , <i>tmN-GUU</i> (2), <i>tmP-UGG</i> , <i>tmQ-UUG</i> , <i>tmR-ACG</i> (2), <i>tmR-UCU</i> , <i>tmS-GCU</i> , <i>tmS-GGA</i> , <i>tmS-UGA</i> , <i>tmT-GGU</i> , <i>tmT-UGU</i> , <i>tmV-GAC</i> (2), <i>tmV-UAC</i> *, <i>tmW-CCA</i> , <i>tmY-GUA</i> , <i>tmM-CAU</i>
	成熟酶 Maturase	<i>matK</i>
	蛋白酶 Protease	<i>clpP</i> **
	包膜蛋白 Envelope membrane protein	<i>cemA</i>
	乙酰辅酶 A 羧化酶 Acetyl-CoA carboxylase	<i>accD</i>
功能未知基因 Genes of unknown function	c 型细胞色素合成基因 c-type cytochrome synthesis gene	<i>ccsA</i>
	翻译起始因子 Translation initiation factor	<i>infA</i>
	保守的假定叶绿体开放阅读框 Conserved hypothetical chloroplast ORF	# <i>ycf1</i> , <i>ycf1</i> , <i>ycf15</i> (2), <i>ycf2</i> (2), <i>ycf3</i> **, <i>ycf4</i>

注: *和**表示具有一个内含子和两个内含子; #表示假基因; 基因(2)表示拷贝数为 2 的基因

Note: * and ** stands for one intron and two introns in protein-coding genes, respectively; # stands for pseudogene; gene (2) stands for gene with more than one copy, with the copy number indicated in parentheses

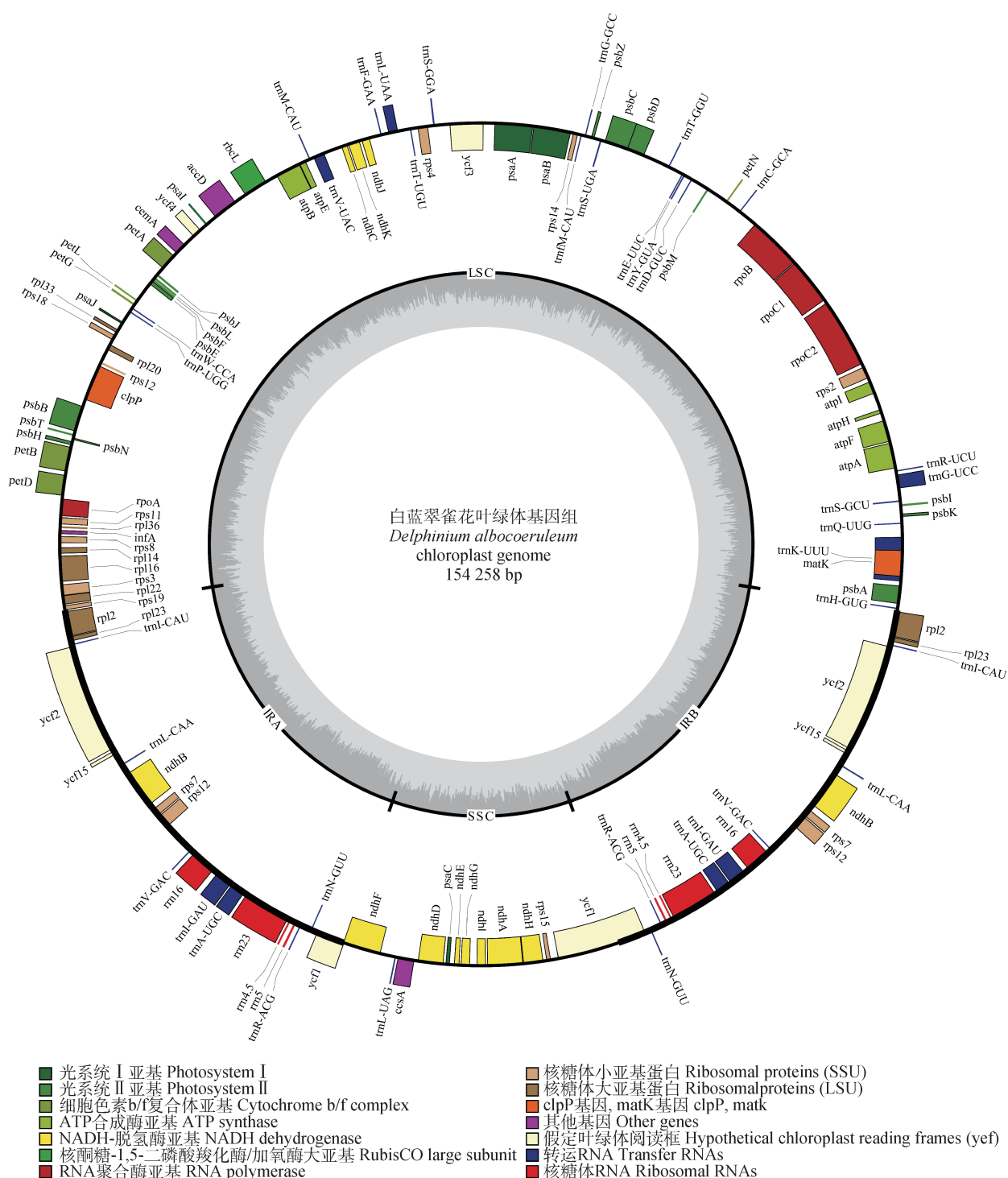


Fig. 1 Chloroplast genome map of *D. albocoeruleum*

注:基因组图谱外圈的基因按顺时针和逆时针方向转录。内圈灰色部分表示每个基因组位置的 GC 水平。不同功能类别的基因用不同颜色表示

Note: Genes in the outer circle of the genome map are transcribed in clockwise and counterclockwise directions. The gray inner circle indicates the GC level at each genomic position. Different functional categories of genes are represented by different colors

2.2 密码子偏好性分析

本研究对白蓝翠雀花叶绿体基因组的相对同义密码子使用度(RSCU)进行了系统分析,经排除 3

个终止密码子(UAA, UAG 和 UGA)和 2 个非同义密码子(AUG 和 UGG),共分析了 65 个同义密码子的使用特征。结果显示:白蓝翠雀花的叶绿体基因

2.4 叶绿体基因组的比较分析

通过对白蓝翠雀花与其他8个近缘物种的叶绿体基因组序列共线性分析,发现其具有高度保守性和显著同源性(图3-4)。其中,多态性位点分析表明, *matK*, *accD*, *PetA*, *rpl20*, *clpP*, *PsbT*, *PetD*, *rpoA*, *rps11*, *rpl36*, *ndhF*, *ccsA*, *ndhD*, *ndhE*, *ycf1* 基因序列变异水平较高 ($P_i > 0.020$), 被确定为突变热点, 其主要分布于 LSC 区, 仅 5 个位于 SSC 区(图5)。随后, 九个翠雀族物种的 IR 边界分析显示, JLB(LSC/IRb)位于 *rps19-rpl2* 基因间区, JSB(SSC/IRb)位于 *ycf1-ndhF* 基因间区, JSA(SSC/IRa)位于 *ycf1-trnN* 基因间区, JLA(IRa/LSC)位于 *rpl2-trnH* 基因间区。白蓝翠雀花与其他物种在长

度上无显著差异, 但边界基因位置存在差异, 尤其在 JSB 和 JLB 区域。而这种边界区域的保守性与变异性的结合, 为翠雀族的系统发育研究提供了分子标记候选区。此外, 本研究对 9 个物种的叶绿体基因组中 77 个蛋白质编码基因进行选择压力分析, 经排除 $\frac{K_a}{K_s}$ 值为 0 或无可用数据(NA)的基因

后, 最终对 58 个蛋白质编码基因的 $\frac{K_a}{K_s}$ 值进行了评估。结果显示, *matK*, *ndhD*, *ndhE*, *psaI*, *rpoA*, *ycf1*, *ycf2* 等 7 个基因的 $\frac{K_a}{K_s}$ 大于 1, 表明这些基因

受到正选择作用, 而大多数基因的 $\frac{K_a}{K_s}$ 小于 1, 表明

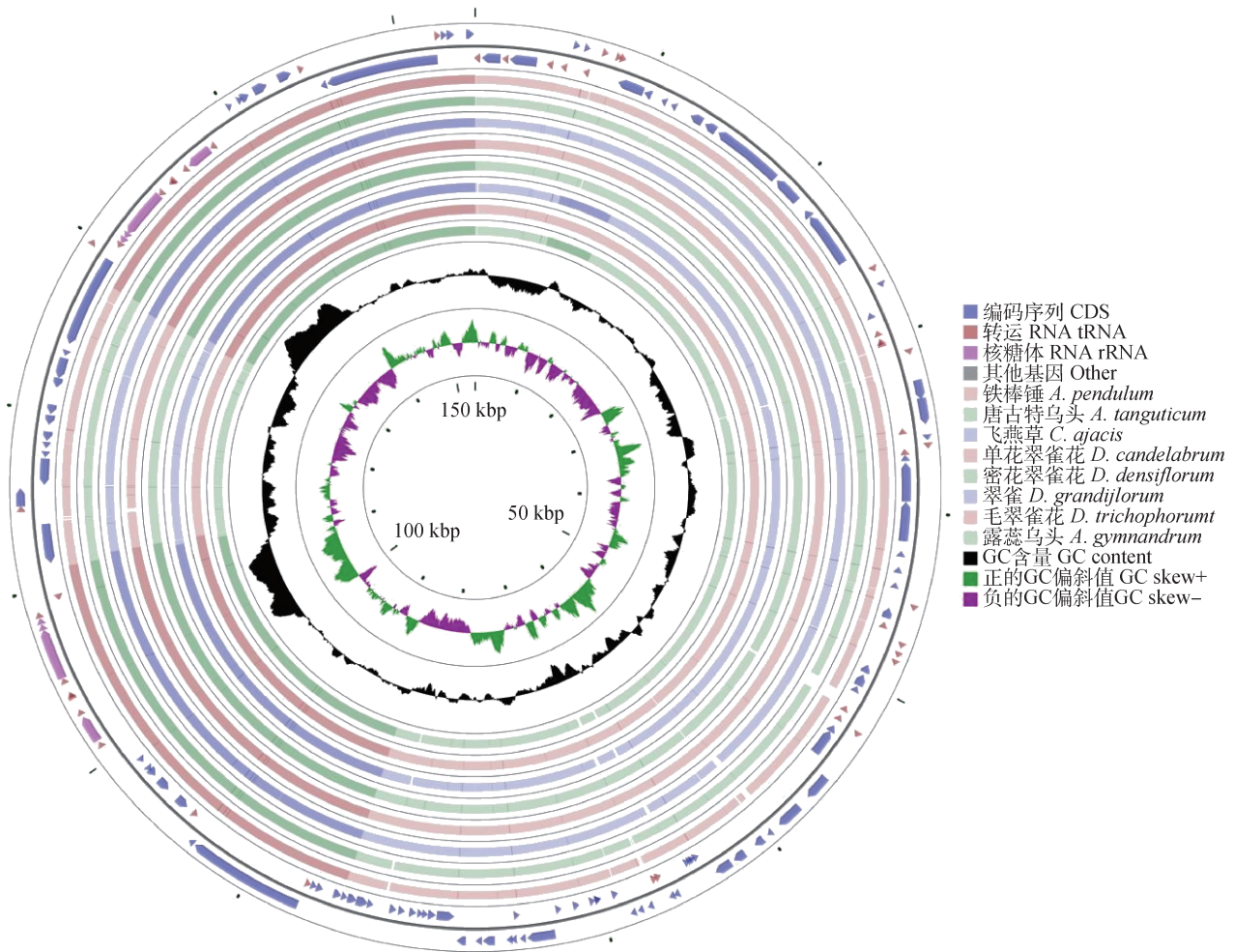


图3 白蓝翠雀花及其他八个物种的叶绿体基因组序列比较

Fig. 3 Sequence comparison of chloroplast genomes of nine species of *D. albocoeruleum*

注:图中最外层的两个圆圈展示了基因组内基因的长度和方向,而内层的圆圈则代表了与其他参考基因组的相似性比较结果。黑色圆圈表示GC含量,绿色和紫色的颜色梯度分别表示正的GC偏斜值(GC skew+)和负的GC偏斜值(GC skew-)

Note: The outermost two circles in the figure depict the gene length and orientation within the genome, while the inner circles represent the results of similarity comparisons with other reference genomes. The black circle indicates the GC content, whereas the green and purple color gradients denote GC skew+ and GC skew-, respectively

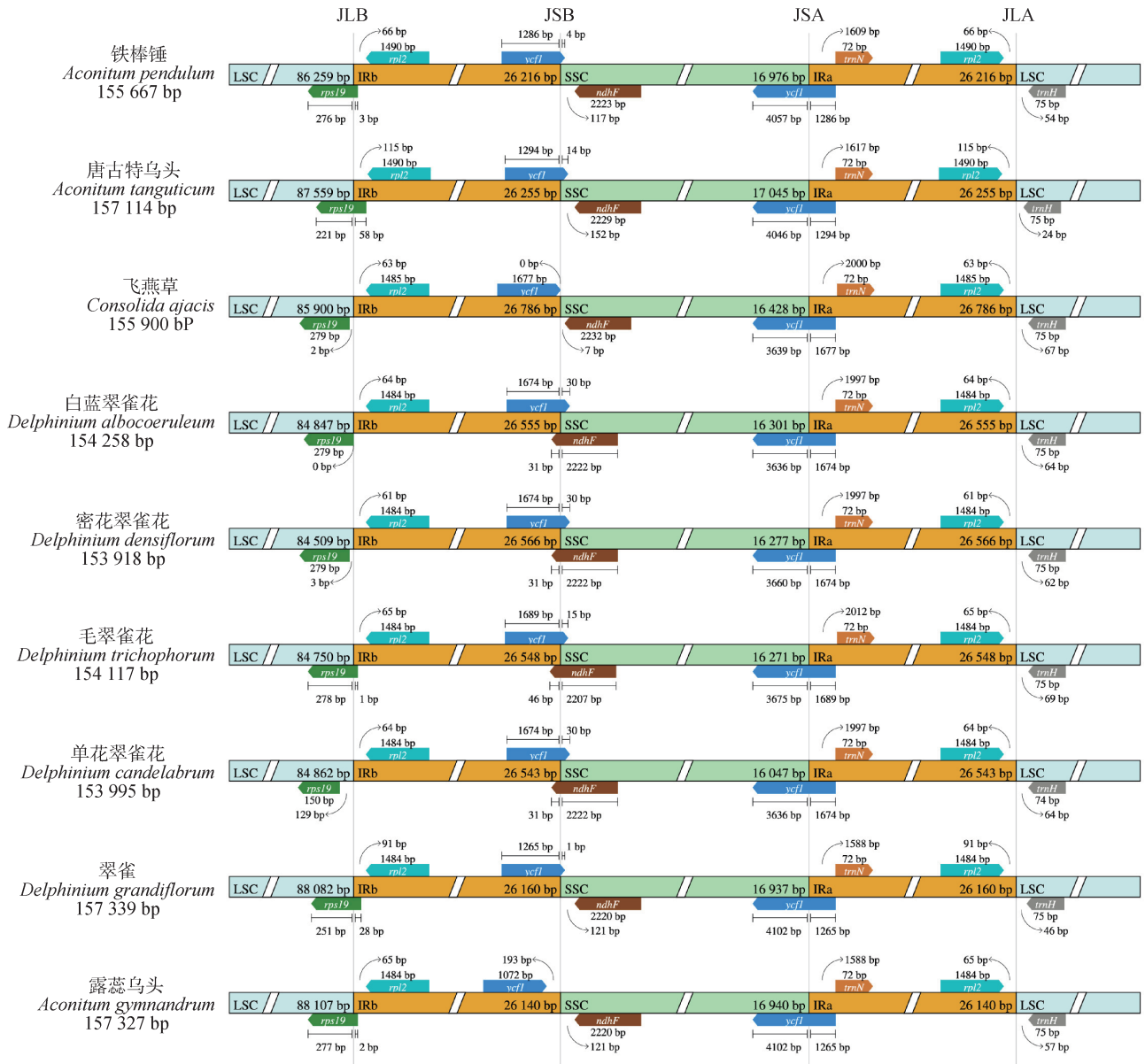


图 6 九个物种叶绿体基因组边界区域示意图

Fig. 6 Schematic diagram of chloroplast genome boundary regions of nine species

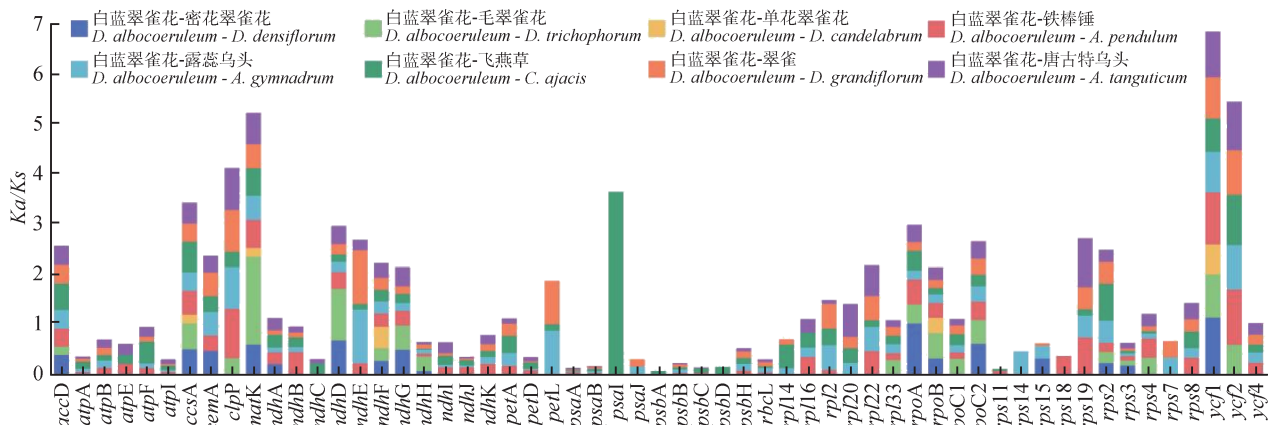


图 7 八种比较组合的蛋白质编码基因的 Ka/Ks 值

Fig. 7 Ka/Ks values of protein-coding genes of the eight comparative combinations

2.5 系统发育分析

本研究选取飞燕草(*Consolida ajacis*)为外类群,并以GTR+G模型为最优模型。基于已获得的叶绿体基因组序列以及先前发表的翠雀族15个物种的叶绿体基因组序列,构建最大似然树。结果表明,翠雀族18个物种可划分为4个分支(图8)。其中,分支I包含8个

多年生翠雀属植物,并被进一步划分为A和B两个分支。分支A包括角萼翠雀花、毛翠雀花、密花翠雀花和囊距翠雀花;分支B包括宽苞翠雀花(*D. maackianum*)、云南翠雀花、单花翠雀花和白蓝翠雀花。分支II仅包含还亮草;分支III包含了翠雀和露蕊乌头,而乌头属(*Aconitum*)的其余六个物种被归为分支IV。

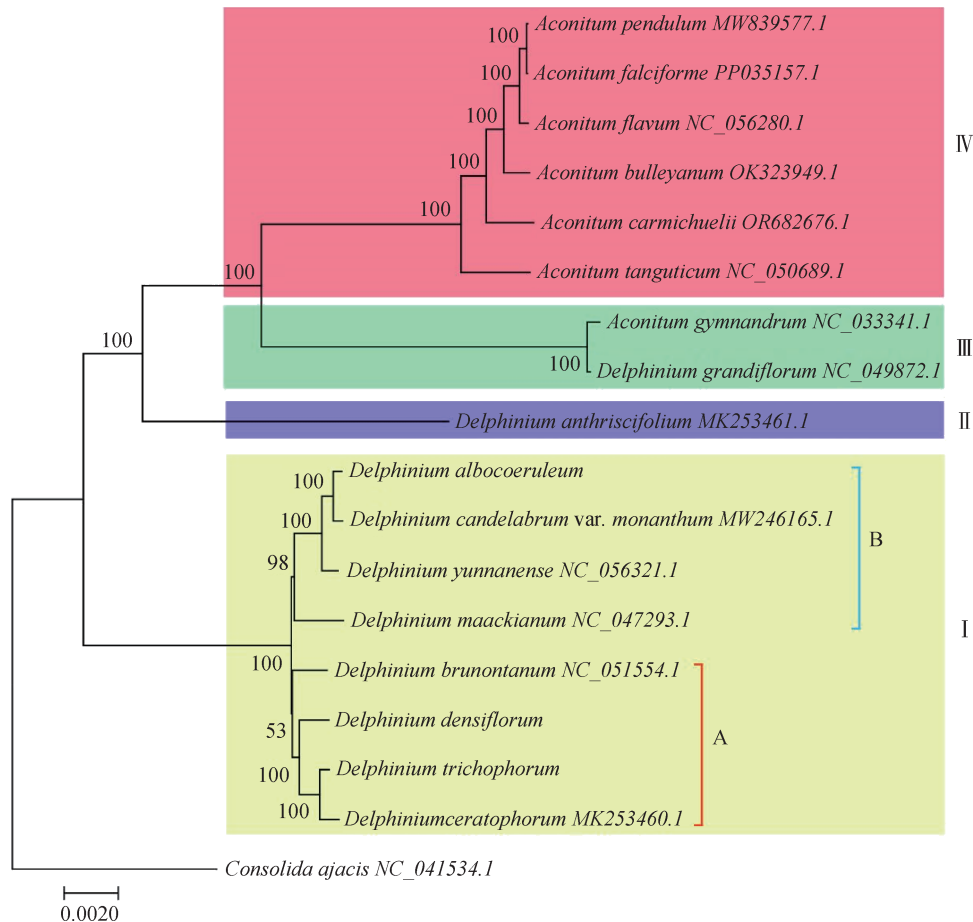


图8 基于18个物种叶绿体基因组构建的系统发育树

Fig. 8 Phylogenetic tree based on the chloroplast genomes of 18 species

3 讨论

3.1 叶绿体基因组结构特征

白蓝翠雀花的叶绿体基因组在大小、结构、基因数量和GC含量等方面与已报道的毛茛科其他物种(如翠雀和飞燕草)的特征基本一致^[14,26-27],具有较高的保守性和同源性。该基因组全长154 258 bp,由LSC,SSC及两个IR区构成典型的环状四分体结构。碱基组成分析显示,其总GC含量为38.25%,低于AT含量,且IR区的GC含量显著高于LSC区和SSC区。这种AT含量偏高的现象可能与同义密码子多以A/U结尾有关,反映了进化过程中自然选择与突变的共同作用^[28]。此外,由于rRNA基因主

要分布于IR区,且自身的GC含量较高,形成了IR区的GC含量较高的特征,这一分布模式与多数高等植物叶绿体基因组的保守特征一致^[29]。该物种叶绿体基因组共编码131个基因,包括85个蛋白编码基因、37个tRNA基因、8个rRNA基因及1个假基因(*ycf1*)。叶绿体基因组假基因化现象较为普遍,其主要原因是编码区因碱基突变、插入或缺失而提前出现终止密码子,这一现象在鸭跖草科钩毛子草(*Rhopalephora scaberrima*)和杜若(*Polia japonica*)等物种中已有相关报道^[30]。而白蓝翠雀花中*ycf1*基因的两个拷贝分别位于IRb/SSC和SSC/IRa边界,前者因截断而退化为假基因,但后者则保持完整的编码功能。这种假基因与功能基

因共存的现象,可能是IR区边界扩张或收缩过程中基因序列发生断裂所致,与乌头属植物中“边界区域基因截断形成假基因”的模式一致^[31]。

3.2 叶绿体基因组进化特点

密码子使用偏好性是物种在进化过程中的一个重要特征。本研究发现白蓝翠雀花叶绿体基因组中亮氨酸(Leu)密码子使用频率最高,30个同义密码子的RSCU值大于1,表明其密码子使用模式受自然选择的影响。该结论与翠雀属近缘物种研究一致,如Song等^[32]对新疆8种翠雀属植物的叶绿体基因组分析发现,其32个RSCU ≥ 1 的密码子中29个以A/U结尾,且自然选择是主要驱动因素,共同印证了选择压力对毛茛科植物叶绿体密码子模式的普遍影响。此外,质粒内的重复基序可引发基因组重排和重组,包括串联重复序列和分散重复序列^[33]。先前研究表明,叶绿体基因组中SSR的数量和类型均具有物种特异性,且已被广泛应用于植物遗传多样性、群体遗传结构、适应性进化以及种质资源评估等方面的研究^[34-35]。本研究在白蓝翠雀花叶绿体基因组中共鉴定出24个分散重复序列,表明其基因组重排可能由重复基序驱动。同时,检测到243个SSR位点,其中单核苷酸以A/T碱基为主,二核苷酸则以AT/TA为主导,与陆生植物叶绿体基因组A/T富集的普遍规律一致,这种碱基偏好性可能与DNA双螺旋结构的热力学稳定性相关^[36]。同时,LSC区较高的SSR分布密度可能与其包含多数光合作用基因的进化可塑性相关,而IR区的高度保守性则有利于维持核糖体RNA基因的功能稳定性。这些结果不仅揭示了白蓝翠雀花叶绿体基因组的重复序列多样性,也为开发高变异分子标记及解析其适应性进化机制提供了关键靶点。

共线性分析表明白蓝翠雀花叶绿体基因组结构较保守,而IR区边界分析揭示了白蓝翠雀花与近缘物种在*rps19*和*ycf1*等边界基因位置存在差异。这种结构变异可能反映了物种在适应高海拔环境过程中的基因组可塑性^[37],特别是*ycf1*基因在IRb/SSC边界的截断现象,表明该区域可能是基因组重排的热点。*Ka/Ks*进一步分析表明,该物种叶绿体基因组绝大多数基因处于纯化选择,仅*matK*,*ndhD*,*ndhE*,*psaI*,*rpoA*,*ycf1*,*ycf2*等7个基因受正选择。其中,*matK*优化极端胁迫下的光合基因表达;*ndhD*和*ndhE*增强NADH脱氢酶低温稳定性以维持能量

代谢;*psaI*提升光系统I弱光利用效率;*rpoA*强化环境波动响应的转录调控;*ycf1*和*ycf2*通过结构变异增强抗逆性。这些关键基因的定向进化既维持光合核心功能,又实现生态位的适应策略。此外,叶绿体基因组因其结构稳定、序列变异适中和易于测序等特点,已成为植物系统发育研究的重要分子标记^[38]。

3.3 叶绿体基因组系统发育关系

本研究基于翠雀族15个物种的叶绿体基因组数据,采用最大似然法(ML)构建了系统发育树。结果表明,翠雀族18个物种可划分为4个显著分支,其中分支I包含8个多年生翠雀属分类单元,并进一步分化为两个亚分支——分支A和分支B。本研究揭示的翠雀属内属间关系与先前学者基于质体基因组和nrITS数据集联合分析的研究结果基本一致^[32]。其中,分支A中角萼翠雀花和毛翠雀花以四面体翅状种子为共同特征,与密花翠雀花的三角形翅状种子形成显著差异;而囊距翠雀花虽具有四面体翅状种子,但其退化雄蕊颜色存在变异,使其与上述3个物种共同构成一个分支。分支B中宽苞翠雀花、云南翠雀花、单花翠雀花以及退化雄蕊上具有黄色髯毛的白蓝翠雀花聚为一支。值得注意的是,白蓝翠雀花与宽苞翠雀花虽均具有黑色退化雄蕊和具翅状种子,但二者在分支内并未紧密聚类,而是与单花翠雀花的亲缘关系更近。此外,先前细胞学研究表明,还亮草为四倍体($2n=32$),而其他分类单元均为二倍体($2n=16$),其独特的染色体组成凸显了分支内的遗传多样性^[38]。分支III由翠雀和露蕊乌头组成,二者以蓝紫色萼片及沿角翅状种子为共同特征而紧密聚类;乌头属其余6个物种则聚为分支IV。另外,传统分类学通常依据花瓣上是否有爪及上萼片有无距来区分乌头属和翠雀属^[39],且露蕊乌头作为一年生草本,具有6~8枚心皮,这使其有别于其他多年生且心皮数为3枚或5枚的乌头属物种。总之,本研究基于叶绿体基因组数据构建的翠雀族系统发育树,与Song等学者^[32]的研究结果整体吻合,仅存在细微差异,而这种差异可能源于两项研究在物种选择上的不同。因此,为更全面地揭示翠雀族各属间的亲缘关系,亟需扩大样本数量,构建多证据系统发育树,从而深入揭示翠雀族植物的进化历史与分化机制。

4 结论

白蓝翠雀花叶绿体基因组呈典型四分体结构,全长154 258 bp,GC含量38.25%,共注释131个基因,其 $ycf1$ 基因存在功能完整与截断为假基因的两个拷贝,是该基因组的显著特征。大部分密码子的RSCU值大于1,且以A/U结尾。SSR位点分布不均衡,共检测到243个SSR位点,主要分布于LSC区,其中以单核苷酸重复序列为主,且A/T碱基的出现频率最高。该物种大多数基因受纯化选择作用,并鉴定出15个高变异位点。从系统发育角度来看,翠雀族18个物种可划分为4个显著分支,其中白蓝翠雀花和单花翠雀花的亲缘关系最近。上述研究揭示了白蓝翠雀花叶绿体基因组的结构特点与进化保守性,为翠雀族植物的系统分类、进化机制及地理起源研究提供了关键分子依据。

参考文献

- [1] NALAWADE S M, SAGARE A P, LEE C Y, et al. Studies on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and their sustainable utilization [J]. Botanical Bulletin-Academia Sinica Taipei, 2003, 44(2): 79-98
- [2] YU X Q, GAO L M, SOLTIS D E, et al. Insights into the historical assembly of East Asian subtropical evergreen broadleaved forests revealed by the temporal history of the tea family [J]. New Phytologist, 2017, 215(3): 1235-1248
- [3] HE Y Q, MA Z Y, YANG Q, et al. Diterpenoid alkaloids and flavonoids from *Delphinium albocoeeruleum* Maxim [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(4): 554-556
- [4] CSUPOR D, FORGÓ P, CSEDO K, et al. Investigation of the diterpene alkaloids of *Aconitum* species native to the Carpathian Basin [J]. Acta Pharmaceutica Hungarica, 2006, 76(4): 181-190
- [5] MOGG A J, WHITEAKER P, MCINTOSH J M, et al. Methyllycaconitine is a potent antagonist of alpha-conotoxin-MII-sensitive presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in rat striatum [J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002, 302(1): 197-204
- [6] LI G Q, LI Y Y, ZHAO Y T, et al. Isolation and crystal structure of 4-((2-(methoxycarbonyl)phenyl)amino)-2-methyl-4-oxobutanoic acid from *Delphinium Grandiflorum*, C₁₃H₁₅N₁O₅ [J]. Zeitschrift Für Kristallographie - New Crystal Structures, 2019, 234(3): 521-522
- [7] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第27卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 380
Editorial Board of Flora of China. Flora of China (Vol. 27) [M]. Beijing: Science Press, 1979: 380
- [8] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991: 102
- Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Tibetan materia medica [M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991: 102
- [9] LI C H, ZHENG Y Q, HUANG P. Molecular markers from the chloroplast genome of rose provide a complementary tool for variety discrimination and profiling [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 12188-12203
- [10] 熊瑶, 童凌斐, 曹岚, 等. 四种忍冬属植物叶绿体基因组结构特征及系统发育分析 [J]. 药学报, 2024, 59(11): 3164-3171
XIONG Y, TONG L F, CAO L, et al. Structural characteristics and phylogenetic analysis of chloroplast genomes of four species of *Lonicera* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2024, 59(11): 3164-3171
- [11] HONG C P, PARK J, LEE Y, et al. *accD* nuclear transfer of *Platycodon grandiflorum* and the plastid of early Campanulaceae [J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 607-620
- [12] HUANG J, HU X, ZHOU Y, et al. Phylogeny, genetic diversity and population structure of *Fritillaria cirrhosa* and its relatives based on chloroplast genome data [J]. Genes, 2024, 15(6): 730
- [13] GAWEL N J, JARRET R L. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea* [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1991, 9(3): 262-266
- [14] LIU X L, ZHU J Y, JIANG M G, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Aconitum tschangbaishanense* (Ranunculaceae) [J]. Mitochondrial DNA Part B, Resources, 2023, 8(6): 658-662
- [15] 吴宪明, 吴松峰, 任大明, 等. 密码子偏性的分析方法及相关研究进展 [J]. 遗传, 2007, 29(4): 420-426
WU X M, WU S F, REN D M, et al. The analysis method and progress in the study of codon bias [J]. Hereditas, 2007, 29(4): 420-426
- [16] HYATT D, CHEN G L, LOCASCIO P F, et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(1): 119
- [17] KIM G B, LIM C E, KIM J S, et al. Comparative chloroplast genome analysis of *Artemisia* (Asteraceae) in east Asia: insights into evolutionary divergence and phylogenomic implications [J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 415
- [18] KURTZ S, CHOUDHURI J V, OHLEBUSCH E, et al. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(22): 4633-4642
- [19] ANDROSIUK P, JASTRZEBSKI J P, PAUKSZTO Ł, et al. The complete chloroplast genome of *Colobanthus apetalus* (Labill.) Druce: Genome organization and comparison with related species [J]. PeerJ, 2018, 6(2): e4723
- [20] DARLING A C E, MAU B, BLATTNER F R, et al. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements [J]. Genome Research, 2004, 14(7): 1394-1403
- [21] AMIRYOUSEFI A, HYVÖNEN J, POCZAI P. IRscope: an online program to visualize the junction sites of chloroplast genomes [J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): 3030-3031

- [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] ZHANG Z. KaKs_Calculator 3.0: calculating selective pressure on coding and non-coding sequences[J]. Genomics Proteomics & Bioinformatics, 2022, 20(3):536-540
- [24] POSADA D. jModelTest: phylogenetic model averaging[J]. Molecular Biology and Evolution, 2008, 25(7):1253-1256
- [25] STAMATAKIS A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. Bioinformatics, 2014, 30(9):1312-1313
- [26] SALVADO P, LLAURO C, CARPENTIER M C, et al. Characterization of the complete plastome of *Delphinium montanum*, a polyploid, endemic and endangered Pyrenean Larkspur[J]. Mitochondrial DNA Part B, Resources, 2022, 7(4):590-592
- [27] DUAN H, LU Y, DUAN X, et al. Characterization of the complete chloroplast genome of *Delphinium grandiflorum* L. [J]. Mitochondrial DNA Part B, 2019, 5(1):35-36
- [28] 熊霜, 周富琴, 王仕东, 等. 三脉水丝梨叶绿体基因组特征及系统发育分析[J]. 广西植物, 2025, 45(5):855-871
- XIONG S, ZHOU F Q, WANG S D, et al. Chloroplast genomic characteristics and phylogenetic analysis of *Sycopsis triplinervia*[J]. Guihaia, 2025, 45(5):855-871
- [29] WANG N J, CHEN S F, XIE L, et al. The complete chloroplast genomes of three Hamamelidaceae species: comparative and phylogenetic analyses[J]. Ecology and Evolution, 2022, 12(2): e8637
- [30] THIEL T, MICHALEK 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
- [31] MILLEN R S, OLMSTEAD R G, ADAMS K L, et al. Many parallel losses of *infA* from chloroplast DNA during angiosperm evolution with multiple independent transfers to the nucleus[J]. The Plant Cell, 2001, 13(3):645-658
- [32] SONG C F, ZHU J W, LI H M. Complete chloroplast genomes of eight *Delphinium taxa* (Ranunculaceae) endemic to Xinjiang, China: insights into genome structure, comparative analysis, and phylogenetic relationships[J]. BMC Plant Biology, 2024, 24(1):600
- [33] CAVALIER-SMITH T. Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses[J]. Current Biology, 2002, 12(2):R62-R64
- [34] 王化坤, 娄晓鸣, 章镇. 叶绿体微卫星在植物种质资源研究中的应用[J]. 分子植物育种, 2006, 4(S1):92-98
- WANG H K, LOU X M, ZHANG Z. Application in germplasm resource research using chloroplast simple sequence repeat[J]. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(S1):92-98
- [35] POWELL W, MORGANTE M, MCDEVITT R, et al. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(17):7759-7763
- [36] HENRY R J. Plant diversity and evolution genotypic and phenotypic variation in higher plants[M]. Wallingford: CABI Publishing, 2005:45-68
- [37] CHUMLEY T W, PALMER J D, MOWER J P, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Pelargonium hortorum*: organization and evolution of the largest and most highly rearranged chloroplast genome of land plants[J]. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23:2175-2190
- [38] LUO X Y, NIE T J, LIU H, et al. Karyotype and genome size variation in *Delphinium* subg. *Anthriscifolium* (Ranunculaceae) [J]. PhytoKeys, 2023, 234:145-165
- [39] 任路明. 甘肃毛茛科翠雀族分类学研究[D]. 兰州:西北师范大学, 2019:12-16
- REN L M. Taxonomic study on Ranunculaceae *Delphinium* in Gansu Province[D]. Lanzhou: Northwest Normal University, 2019:12-16

(责任编辑 闵芝智)