

美花卷瓣兰与长花石豆兰的叶绿体基因组比较和系统发育分析

邹婉霞, 欧阳勤森, 田海娟, 郝静静, 卓书斌*

东莞植物园, 广东东莞 523128

摘要: 为明确石豆兰属植物叶绿体基因组的结构特征与系统发育关系, 本研究对美花卷瓣兰 (*Bulbophyllum rothschildianum*) 和长花石豆兰 (*Bulbophyllum longissimum*) 的叶绿体基因组进行测序、组装与注释, 并与已发表的 4 种石豆兰属植物叶绿体基因组数据开展密码子偏好、重复序列及序列变异比较分析。结果显示: 美花卷瓣兰和长花石豆兰的叶绿体基因组分别为 148 447、151 095 bp, 均呈典型环状四分体结构, 分别包含 126、129 个功能基因; 亮氨酸密码子偏好性最强, 以 A/U 结尾密码子占比较高; SSR 以单核苷酸重复 (A/T 类型) 为主, 长重复序列多为回文重复; 变异区域集中于非编码区和部分编码基因 (如 *matK*、*ycf1* 等), IR/SC 边界存在扩张收缩差异; 系统发育分析表明, 32 个石豆兰属物种在系统树上形成高支持率的进化分支, 并呈现出亚洲类群与中南美洲类群 2 个地理分支的明显分化, 其中美花卷瓣兰与长花石豆兰在亚洲类群内聚为一支, 亲缘关系较近。本研究为石豆兰属植物的资源开发、遗传保护和系统发育研究提供分子依据。

关键词: 美花卷瓣兰; 长花石豆兰; 叶绿体基因组; 比较基因组学; 系统发育分析

中图分类号: S567.239

文献标志码: A

Comparative Analysis and Phylogenetic Study of the Chloroplast Genomes of *Bulbophyllum rothschildianum* and *Bulbophyllum longissimum*

ZOU Wanxia, OUYANG Qinsen, TIAN Haijuan, HAO Jingjing, ZHUO Shubin*

Dongguan Botanical Garden, Dongguan, Guangdong 523128, China

Abstract: The aim of the study was to characterize the chloroplast genome structure and phylogenetic relationships within the genus *Bulbophyllum*. We sequenced, assembled, and annotated the chloroplast genomes of *B. rothschildianum* and *B. longissimum* for the first time. Comparative analyses of codon usage bias, repeat sequences, and sequence variation were then conducted with the available chloroplast genomes from four previously published *Bulbophyllum* species. The chloroplast genome of *B. rothschildianum* and *B. longissimum* was 148 447 bp and 151 095 bp, respectively, both showing a typical circular quadripartite structure containing 126 and 129 functional genes. Codons encoding leucine exhibited the strongest usage bias, with codons ending in A/U being particularly abundant. SSR analysis revealed mononucleotide repeats (predominantly A/T type) were most abundant, and palindromic repeats dominated among long repeats. Highly variable regions were mainly located in non-coding regions and selected coding genes (e.g., *matK* and *ycf1*), with evident expansion and contraction at IR/SC boundaries. Phylogenetic analysis showed that the 32 *Bulbophyllum* species formed a strongly supported clade and exhibited clear geographic differentiation into Asian and Central and South American lineages, with *B. rothschildianum* and *B. longissimum* clustering together within the Asian lineage and being closely related. The study would provide molecular insights into resource development, genetic conservation,

收稿日期 2025-11-05; 接受日期 2025-11-25

基金项目 东莞市社会发展科技项目 (No. 20231800940762)。

作者简介 邹婉霞 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物资源调查、引种保育、驯化及应用。*通信作者 (Corresponding author): 卓书斌 (ZHUO Shubin), E-mail: 352168936@qq.com。

and systematic research in the genus *Bulbophyllum*.

Keywords: *Bulbophyllum rothschildianum*; *Bulbophyllum longissimum*; chloroplast genome; comparative genomics; phylogenetic analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2026.02.006

石豆兰属 (*Bulbophyllum*) 隶属于兰科 (Orchidaceae), 是该科物种数量最多、形态最丰富的属之一, 全球现有约 2200 种, 其中亚洲地区约占 1700 种^[1-3]。该属植物不仅具有重要的观赏价值和食用价值, 在传统医学领域也具有悠久的历史, 其全草与假鳞茎被广泛用于治疗滋阴降火、清热化痰、生津养胃及跌打损伤等病症, 且现代药理研究进一步证实, 其具有抗癌、抗炎、镇痛、抗氧化和抗菌等多种药理活性^[1,4-5]。因此, 深入开展石豆兰属的系统发育和基因组研究, 对其资源保护与可持续开发利用具有重要科学意义。近年来, 研究者利用核基因及叶绿体基因片段 (如 *matK*、*psbA-trnH*) 初步开展了石豆兰属的系统发育研究, 证实了亚洲类群的系统发育独立性, 并推测其祖先性状可能包括单叶、多花序和明显的假鳞茎^[2]。然而, 现有研究主要集中于马来半岛及 *Cirrhopetalum* 类群, 地理覆盖范围及物种采样仍不充分^[6-7]。同时, 传统的形态学分类体系与分子系统发育结果存在明显冲突, 多个传统节 (如 *Brachyantha*、*Cirrhopetalum* 和 *Cirrhopetaloides*) 已被证实为多系或并系类群^[8-10]。叶绿体基因组因其结构相对保守、重组频率低、单一母系遗传等特点, 相较于核基因更适合用于植物系统发育与进化关系分析^[11-12]。目前, 亚洲石豆兰属特别是中国南部地区代表性物种的叶绿体全基因组数据十分缺乏。此外, 现有系统发育研究多侧重于花部性状, 缺乏对营养器官 (如叶片) 的深入分析, 且分子系统发育成果尚未有效应用于传统分类体系的修订, 亟需基于高质量分子证据的分类研究^[1, 7-8]。本研究选取亚洲石豆兰属代表性物种美花卷瓣兰 (*B. rothschildianum*) 与长花石豆兰 (*B. longissimum*) 作为研究对象, 其中美花卷瓣兰已被列为中国国家二级重点保护植物, 具有重要的生态与保育价值。本研究拟通过对美花卷瓣兰与长花石豆兰的叶绿体基因组进行测序、注释和比较分析, 明确其基因组结构特征、重复序列分布及高变异区域, 且进一步构建系统发育树, 为该属植物的分类修订、资源保护与药用开发提供坚实的分子依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用的美花卷瓣兰 (*B. rothschildianum*) 和长花石豆兰 (*B. longissimum*) 均种植于东莞植物园苗圃 (113.75°N, 22.97°E), 供试材料生长健壮、长势良好。

1.2 方法

1.2.1 叶绿体基因组的提取与测序 经液氮冷冻保存的新鲜叶片送至上海凌恩生物科技有限公司进行 DNA 的提取, 并利用 Illumina PE 测序平台进行 2×150 bp 测序, 获得高质量测序数据。

1.2.2 叶绿体基因组的组装和注释 使用 GetOrganelle v 1.7.7.0^[13] 软件进行叶绿体基因组组装; 使用 GeSeq^[14] 软件对叶绿体基因组进行蛋白编码基因、tRNA 基因和 rRNA 基因的初步注释; 利用软件 OGDRAW^[15] 软件对样品叶绿体基因组进行可视化分析, 绘制其圈图结构。

1.2.3 密码子偏好性分析 采用 CodonW 1.4.2^[16] 软件计算石豆兰属植物叶绿体基因组密码子的频数和相对密码子使用度 (RSCU)。

1.2.4 长重复序列和简单重复序列分析 使用 MISA^[17] 软件分析简单重复序列 (SSR)。使用 REPuter^[18] 软件进行长重复序列分析, 查找正向重复 (forward)、反向重复 (reverse)、互补重复 (complement)、回文重复 (palindromic) 4 种重复类型。

1.2.5 基因组比较与边界分析 使用 mVISTA^[19] 在线工具分析美花卷瓣兰、长花石豆兰和 4 个近缘物种的序列差异。通过 IRscope^[20] 在线工具分析 6 个石豆兰属植物 IR 区的收缩与扩张情况, 并绘制对比图。

1.2.6 系统进化分析 从 NCBI 数据库中下载 32 个石豆兰属植物的叶绿体基因组序列。鉴于石斛属与石豆兰属在兰科中亲缘关系较近但系统位置相对独立, 在分子系统学研究中常被用作石豆兰属及相关类群的外群物种^[3, 9, 21], 本研究选取铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 和霍山石斛 (*Dendrobium huoshanense*) 作为外群, 对系统发育树进行定根,

并采用 PhyML v 3.0^[22] (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml>) 在线软件使用最大似然法 (ML) 构建系统发育树。

2 材料与方法

2.1 石豆兰叶绿体基因组结构基本特征

经基因组测序和组装,本研究获得美花卷瓣兰和长花石豆兰的完整叶绿体 (cp) 基因组,

大小分别为 148 447、151 095 bp,二者均表现为典型的环状双链结构,包括 1 个大单拷贝区 (LSC)、1 个小单拷贝区 (SSC) 和 2 个反向重复区域 (IRa 和 IRb)。其中, LSC 区长度分别为 85 173、83 160 bp,SSC 区长度分别为 9492、13 077 bp,而反向重复区域 (IR) 长度分别为 53 782、54 858 bp (图 1 和表 1)。2 个物种叶绿体基因组的总 GC 含量分别为 37.3%、

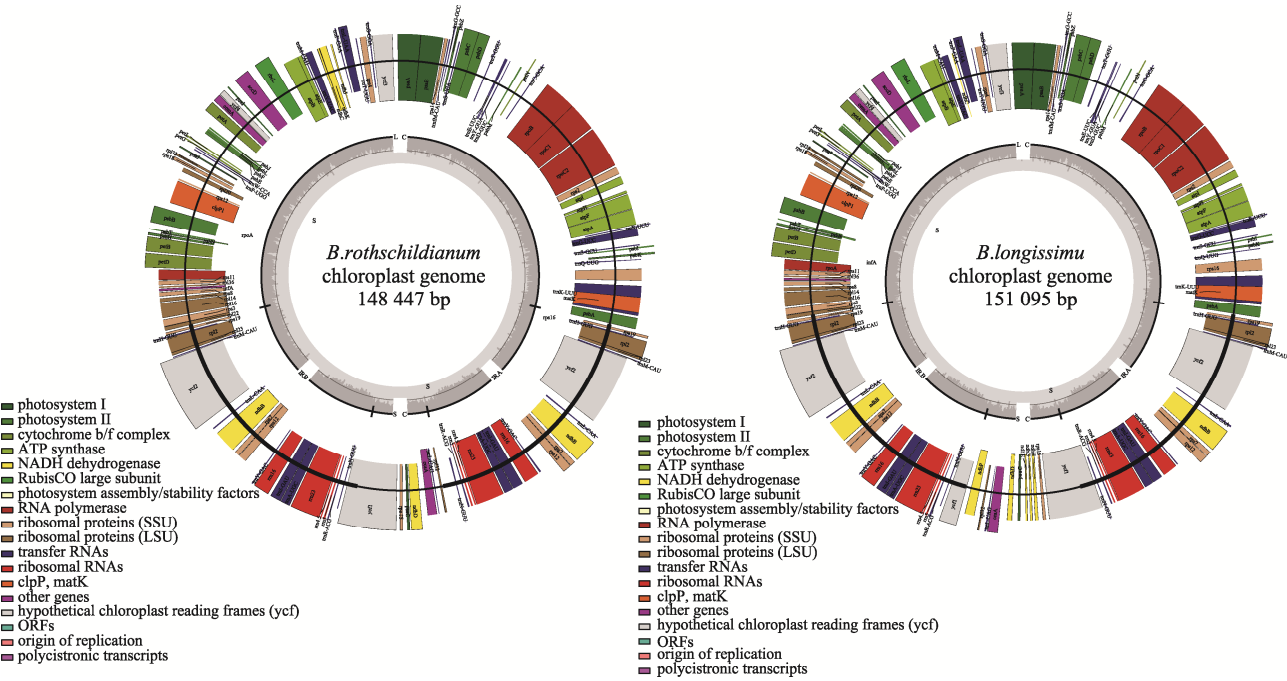


图 1 2 种石豆兰的基因组图谱
Fig. 1 Chloroplast genome map of two *Bulbophyllum* species

表 1 石豆兰属植物叶绿体基因组的基本特征
Tab. 1 Basic characteristics of chloroplast genomes of *Bulbophyllum* species

序号 No.		<i>B. rothschildianum</i>	<i>B. longissimu</i>	<i>B. steyermarkii</i>	<i>B. albociliatum</i>	<i>B. weddellii</i>	<i>B. granulorum</i>
1	基因组大小/bp	148 447	151 095	146 720	151 046	151 355	151 112
2	大单拷贝区/bp	85 173	83 160	83 488	85 956	83 450	84 492
3	IRa/bp	26 891	27 429	25 955	25 853	25 928	25 465
4	SSC/bp	9492	13 077	1812	13 384	16 049	15 690
5	IRb/bp	26 891	27 429	35 465	25 853	25 928	25 465
6	IR/bp	53 782	54 858	61 420	51 706	51 856	50 930
7	基因总数	126	129	122	127	120	120
8	蛋白质编码基因	80	83	76	81	74	74
9	tRNA 基因	38	38	38	38	38	38
10	rRNA 基因	8	8	8	8	8	8
11	GC 总含量%	37.30	37.06	36.74	36.99	36.64	36.72
12	LSC 区域 GC 含量/%	34.63	34.48	34.20	34.46	34.09	34.26
13	IRb 区域 GC 含量/%	42.99	42.77	42.80	43.20	43.16	43.13
14	SSC 区域 GC 含量/%	28.98	29.52	27.43	29.23	28.90	29.13
15	IRa 区域 GC 含量/%	42.99	42.77	38.77	43.21	43.16	43.13

37.06%，表现为 IR 区的 GC 含量最高，其次是 LSC 区，SSC 区最低（表 1）。与此同时，基因注释显示，美花卷瓣兰和长花石豆兰分别包含 126、129 个功能基因，其中蛋白质编码基因分别为 80、83 个，tRNA 基因均为 38 个，rRNA 基因均为 8 个。蛋白编码基因按照功能可分为 4 类：参与光合作用、自我复制、其他功能和功能未知基因（表 2）。

表 2 美花卷瓣兰与长花石豆兰叶绿体基因组的基因组成
Tab. 2 Gene composition of chloroplast genomes of *B. rothschildianum* and *B. longissimum*

基因功能分类 Gene function category	基因种类 Gene category	基因名称 Gene name
光合作用	光系统 I 亚基	<i>psaA</i> , <i>psaB</i> , <i>psaC</i> , <i>psaI</i> , <i>psaJ</i>
	光系统 II 亚基	<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>psbJ</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	<i>ndhB</i> (×2), <i>ndhC</i> , <i>ndhD</i>
	细胞色素 b/f 复合体亚基	<i>petA</i> , <i>petB</i> , <i>petD</i> , <i>petG</i> , <i>petL</i> , <i>petN</i>
	ATP 合酶亚基	<i>atpA</i> , <i>atpB</i> , <i>atpE</i> , <i>atpF</i> , <i>atpH</i> , <i>atp</i> , <i>I</i>
	二磷酸核酮糖羧化酶	<i>rbcL</i>
	核糖体大亚基	<i>rpl14</i> , <i>rpl16</i> , <i>rpl2</i> (×2), <i>rpl20</i> , <i>rpl22</i> , <i>rpl23</i> (×2), <i>rpl32</i> , <i>rpl33</i> , <i>rpl36</i>
	核糖体小亚基	<i>rps11</i> , <i>rps12</i> (×2), <i>rps14</i> , <i>rps15</i> , <i>rps16</i> , <i>rps18</i> , <i>rps19</i> (×2), <i>rps2</i> , <i>rps3</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7</i> (×2), <i>rps8</i>
自我复制	依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶	<i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> , <i>rpoC2</i>
	核糖体 RNA	<i>rrn16</i> , <i>rrn23</i> , <i>rrn4.5</i> , <i>rrn5</i>
	转运 RNA	<i>trnA</i> -UGC(×2), <i>trnC</i> -GCA, <i>trnD</i> -GUC, <i>trnE</i> -UUC, <i>trnF</i> -GAA, <i>trnG</i> -GCC, <i>trnG</i> -UCC, <i>trnH</i> -GUG(×2), <i>trnI</i> -GAU(×2), <i>trnK</i> -UUU, <i>trnL</i> -CAA(×2), <i>trnL</i> -UAA, <i>trnL</i> -UAG, <i>trnM</i> -CAU(×2), <i>trnN</i> -GUU(×2), <i>trnP</i> -UGG, <i>trnQ</i> -UUG, <i>trnR</i> -ACG(×2), <i>trnR</i> -UCU, <i>trnS</i> -GCU, <i>trnS</i> -GGA, <i>trnS</i> -UGA, <i>trnT</i> -GGU, <i>trnT</i> -UGU, <i>trnV</i> -GAC(×2), <i>trnV</i> -UAC, <i>trnW</i> -CCA, <i>trnY</i> -GUA, <i>trnY</i> -CAU
	成熟酶	<i>matK</i>
其他基因	蛋白酶	<i>clpP1</i>
	外膜蛋白	<i>cemA</i>
	乙酰辅酶 A 羧化酶	<i>accD</i>
	C 型细胞色素合成基因	<i>ccsA</i>
	翻译起始因子	<i>infA</i>
未知功能基因	功能未知蛋白	<i>ycf1</i> , <i>ycf2</i> (×2), <i>ycf3</i> , <i>ycf4</i>

此外，综合比较 4 个已发表石豆兰属物种的叶绿体基因组信息发现，这 6 个物种基因组大小在 146 720 (*B. steyermarkii*) ~151 355 bp (*B. weddellii*) 之间，GC 含量范围为 36.64%~37.30%，其中美花卷瓣兰最高（37.3%），*B. weddellii* 最低（36.64%）（表 1），表明石豆兰属植物在基因组组成和结构上存在一定的遗传变异。

2.2 密码子偏好性分析

本研究分别对美花卷瓣兰和长花石豆兰叶绿体基因组中的 80、83 个蛋白质编码基因的密码子使用情况进行系统分析（表 3）。结果显示，二者的叶绿体基因组中分别含有 23 974 个和 24 695 个密码子，包括所有类型的蛋白质编码密码子和终止密码子。在编码氨基酸的密码子中，亮氨酸

（Leu）使用频率最高，分别占美花卷瓣兰和长花石豆兰总密码子的 10.28%（2465 个）和 10.23%（2527 个）；谷氨酰胺（Gln）占比分别为 9.09%（2180 个）和 9.14%（2256 个）；天冬氨酸（Asn）占比分别为 9.04%（2167 个）和 9.12%（2251 个）；编码半胱氨酸（Cys）的密码子数量最少，分别仅占 1.19%（285 个）和 1.18%（292 个），反映出不同氨基酸在叶绿体基因组编码中的偏好差异。

相对同义密码子使用度 RSCU 分析（表 3）表明，两物种中分别有 29 个和 30 个密码子的 RSCU 值大于 1，表明这些密码子在编码中具有明显的使用偏好。其中，精氨酸（Arg）对应的 AGA 密码子偏好性最强，RSCU 值分别为 1.89 和 1.93；而丝氨酸（Ser）对应的 AGC 密码子使用最少，

表 3 美花卷瓣兰和长花石豆兰氨基酸密码子的使用频率与 RSCU 值
Tab. 3 Codon usage frequencies and RSCU values of amino acids in *B. rothschildianum* and *B. longissimum*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	<i>B. rothschildianum</i>					<i>B. longissimum</i>				
		数量 Number	出现频数 Frequency	总数 Total	占比 Percentage/%	相对同义密 码子使用度 RSCU	数量 Number	出现频数 Frequency	总数 Total	占比 Percentage/%	相对同义密 码子使用度 RSCU
Ala	GCA	376	1.5631	1238	5.16	1.2148	388	1.5659	1271	5.15	1.2210
	GCC	174	0.7234			0.5621	175	0.7063			0.5507
	GCG	118	0.4906			0.3812	118	0.4762			0.3713
	GCT	570	2.3697			1.8416	590	2.3811			1.8568
Arg	AGA	474	1.9706	1498	6.25	1.8985	495	1.9977	1538	6.23	1.9310
	AGG	164	0.6818			0.6568	165	0.6659			0.6436
	CGA	337	1.4010			1.3497	342	1.3803			1.3342
	CGC	86	0.3575			0.3444	86	0.3471			0.3355
Asn	CGG	102	0.4240			0.4085	109	0.4399			0.4252
	CGT	335	1.3927			1.3417	341	1.3762			1.3303
	AAC	252	1.0476	2167	9.04	0.4326	264	1.0655	2251	9.12	0.4327
	AAT	913	3.7956			1.5673	956	3.8583			1.5672
Cys	GAC	188	0.7816			0.3752	189	0.7628			0.3666
	GAT	814	3.3841			1.6247	842	3.3982			1.6333
	TGC	67	0.2785	285	1.19	0.4701	74	0.2987	292	1.18	0.5068
	TGT	218	0.9063			1.5298	218	0.8798			1.4931
Gln	CAA	657	2.7314	2180	9.09	1.5138	669	2.7000	2256	9.14	1.5118
	CAG	211	0.8772			0.4861	216	0.8717			0.4881
	GAA	974	4.0492			1.4847	1017	4.1044			1.4835
	GAG	338	1.4052			0.5152	354	1.4287			0.5164
Gly	GGA	648	2.6939	1600	6.67	1.6200	658	2.6556	1629	6.60	1.6157
	GGC	164	0.6818			0.4100	167	0.6740			0.4100
	GGG	279	1.1599			0.6975	284	1.1462			0.6973
	GGT	509	2.1161			1.2725	520	2.0986			1.2768
His	CAC	132	0.5488	611	2.55	0.4320	134	0.5408	626	2.53	0.4281
	CAT	479	1.9914			1.5679	492	1.9856			1.5718
Ile	ATA	615	2.5567	2017	8.41	0.9147	649	2.6193	2102	8.51	0.9262
	ATC	435	1.8084			0.647	451	1.8202			0.6436
	ATT	967	4.0201			1.4382	1002	4.0439			1.4300
Leu	CTA	356	1.4800	2465	10.28	0.8665	372	1.5013	2527	10.23	0.8832
	CTC	169	0.7026			0.4113	172	0.6942			0.4083
	CTG	170	0.7067			0.4137	179	0.7224			0.4250
	CTT	514	2.1369			1.2511	511	2.0623			1.2132
	TTA	738	3.0681			1.7963	770	3.1076			1.8282
	TTG	518	2.1535			1.2608	523	2.1107			1.2417
Lys	AAA	992	4.1241	1364	5.69	1.4545	1033	4.1690	1414	5.73	1.4611
	AAG	372	1.5465			0.5454	381	1.5377			0.5388
Met	ATG	554	2.3032	554	2.31	1.0000	578	2.3327	578	2.34	1.0000
Phe	TTC	519	2.1576	1352	5.64	0.7677	537	2.1672	1410	5.71	0.7617
	TTT	833	3.4630			1.2322	873	3.5233			1.2382
Pro	CCA	284	1.1807	984	4.10	1.1544	279	1.1260	993	4.02	1.1238
	CCC	220	0.9146			0.8943	223	0.9			0.8982

续表 3 美花卷瓣兰和长花石豆兰氨基酸密码子的使用频率与 RSCU 值
Tab. 3 Codon usage frequencies and RSCU values of amino acids in *B. rothschildianum* and *B. longissimum* (Continued)

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	<i>B. rothschildianum</i>					<i>B. longissimum</i>				
		数量 Number	出现频数 Frequency	总数 Total	占比 Percentage/%	相对同义密 码子使用度 RSCU	数量 Number	出现频数 Frequency	总数 Total	占比 Percentage/%	相对同义密 码子使用度 RSCU
Pro	CCG	113	0.4698	984	4.10	0.4593	115	0.4641	993	4.02	0.4632
	CCT	367	1.5257			1.4918	376	1.5175			1.5146
Ser	AGC	108	0.4490	1889	7.88	0.3430	107	0.4318	1937	7.84	0.3314
	AGT	364	1.5133			1.1561	378	1.5255			1.1708
	TCA	372	1.5465			1.1815	374	1.5094			1.1584
	TCC	313	1.3012			0.9941	326	1.3157			1.0098
	TCG	157	0.6527			0.4986	169	0.6821			0.5234
	TCT	575	2.3905			1.8263	583	2.3529			1.8058
Thr	ACA	366	1.5216	1223	5.10	1.1970	383	1.5457	1261	5.11	1.2149
	ACC	220	0.9146			0.7195	230	0.9282			0.7295
	ACG	143	0.5945			0.4677	141	0.5691			0.4472
	ACT	494	2.0537			1.6156	507	2.0462			1.6082
Trp	TGG	422	1.7544	422	1.76	1.0000	430	1.7354	430	1.74	1.0000
Tyr	TAC	172	0.7151	852	3.55	0.4037	173	0.6982	873	3.54	0.3963
	TAT	680	2.8270			1.5962	700	2.8251			1.6036
Val	GTA	453	1.8833	1273	5.31	1.4234	463	1.8686	1307	5.29	1.4169
	GTC	170	0.7067			0.5341	178	0.7184			0.5447
	GTG	208	0.8647			0.6535	213	0.8596			0.6518
	GTT	442	1.8375			1.3888	453	1.8282			1.3863
总计		23 974					24 695				

RSCU 值最低，分别为 0.34 和 0.33。此外，色氨酸（Trp，UGG）和蛋氨酸（Met，AUG）的 RSCU 值均为 1.00，说明其在两物种中无明显使用偏好，属于功能上高度保守的密码子。

在所有密码子中，以 A 或 U 结尾的密码子占据主导，在两物种中占比近 70%，这类密码子也大多具有较高的 RSCU 值，推测两物种叶绿体基因组整体存在较强的 A/U 偏好倾向，可能与叶绿体基因组中普遍存在的 A/T 碱基偏丰特征有关。

2.3 长重复序列和简单重复序列分析

本研究利用 REPuter 软件对 6 个石豆兰属植物叶绿体基因组中的长重复序列进行分析，共鉴定出 247 个长重复序列（图 2）。各物种重复序列数目介于 34~48 个之间，其中 *B. rothschildianum*、*B. steyermarkii* 和 *B. albociliatum* 的重复序列数目相同，均为 41 个。重复序列类型包括正向重复（forward）、反向重复（reverse）、回文重复（palindrome）和互补重复（complement）4 种类型。其中，除 *B. rothschildianum* 和 *B. weddellii*

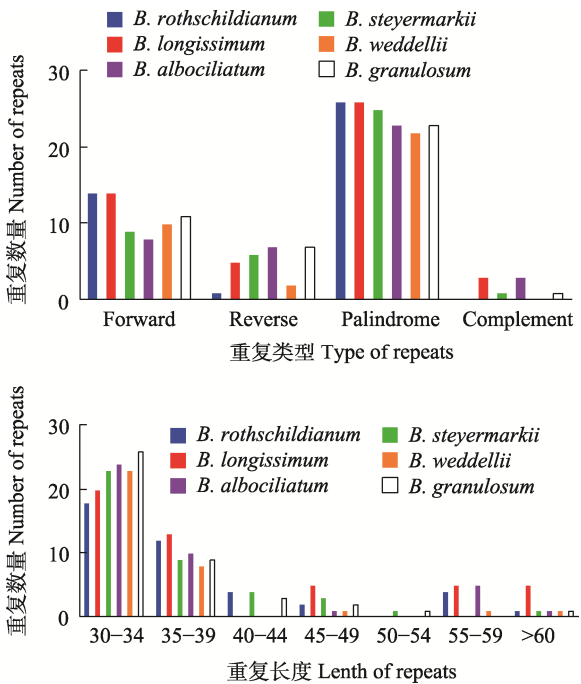


图 2 6 种石豆兰属植物的长重复序列类型与长度
Fig. 2 Types and lengths of long repeat sequences in six *Bulbophyllum* species

仅含 3 种类型（缺少互补重复）外，其余 4 个物种均检测到全部 4 种重复类型。在所有物种中，回文重复的数量最多(22~26 个,占比 55%~65%)，其次为正向重复(8~14 个)和反向重复(1~7 个)，互补重复最少（0~3 个）。从重复序列长度分布来看，大多数重复序列长度集中在 30~34 bp 和 35~39 bp 两个区间，仅 *B. longissimum* 检测到 5 个长度超过 60 bp 的重复序列，而在其他物种中此类较长重复序列均为 1 个。

此外,本研究利用 MISA 软件进一步分析上述 6 种石豆兰属植物叶绿体基因组的简单重复序列（SSR）类型、数量及分布特征，共鉴定出 379 个 SSR 位点（表 4）。各物种 SSR 数量差异明显，介于 55（*B. rothschildianum*）~80 个（*B. albociliatum*）之间，其中 *B. longissimum* 与 *B. weddellii* 的 SSR 数量相同，均为 61 个。从 SSR 类型组成来看，单核苷酸重复序列最为丰富

（37~47 个），且以 A/T 类型为主；而 C/G 类型则极为罕见，仅在 *B. steyermarkii* 中被检出；二核苷酸重复次之，其中 AT/AT 重复数量最多，AG/CT 类型在全部 6 种物种中均稳定存在（每个物种各检出 2 个）；三核苷酸重复序列（如 AAT/ATT、ACT/AGT 和 AAG/CTT）在除 *B. weddellii* 外的其他 5 个物种中均有分布；四核苷酸重复序列共检测到 7 种类型，包括 AATT/AATT、ACAG/CTGT、AGAT/ATCT、AAAT/ATTT、AAGT/ACTT、AGCG/CGCT 和 AAAG/CTTT；五核苷酸重复序列仅在 *B. longissimum* 和 *B. steyermarkii* 中出现；六核苷酸重复序列在 *B. rothschildianum*、*B. steyermarkii* 和 *B. albociliatum* 中被检出，其中以 *B. albociliatum* 的类型最丰富，除 AAATTG/AATTTC 外，其余 5 种类型（AAATAG/ATTTCT、AATATG/ATATTC、ACATAT/ATATGT、ATATCC/ATATGG）均被成功鉴定。

表 4 6 种石豆兰属植物的简单重复序列数量及类型
Tab. 4 SSR types and counts in six *Bulbophyllum* species

重复单元 Repeat unit	数量 Number					
	<i>B. rothschildianum</i>	<i>B. longissimum</i>	<i>B. steyermarkii</i>	<i>B. albociliatum</i>	<i>B. weddellii</i>	<i>B. granuloseum</i>
A/T	42	47	41	53	48	37
C/G	0	0	1	0	0	0
AG/CT	2	2	2	2	2	2
AT/AT	4	5	9	12	6	11
AAT/ATT	2	1	1	3	0	0
ACT/AGT	1	1	0	0	0	0
AAG/CTT	0	0	0	0	0	2
AATT/AATT	1	1	1	1	2	1
ACAG/CTGT	1	1	1	1	1	1
AGAT/ATCT	1	1	0	1	0	0
AAAT/ATTT	0	0	1	2	1	2
AAGT/ACTT	0	0	1	1	1	1
AGCG/CGCT	0	0	2	0	0	0
AAAG/CTTT	0	0	0	0	0	1
AATAC/ATTGT	0	1	0	0	0	0
AATAT/ATATT	0	1	1	0	0	0
ATATC/ATATG	0	0	1	0	0	0
AAATG/ATTTTC	0	0	0	0	0	1
AAATAG/ATTTCT	0	0	1	1	0	0
AATATG/ATATTC	0	0	0	1	0	0
ACATAT/ATATGT	0	0	0	1	0	0
ATATCC/ATATGG	0	0	0	1	0	0
AAATTG/AATTTC	1	0	0	0	0	0
合计	55	61	63	80	61	59

2.4 基因组结构比较分析

以美花卷瓣兰叶绿体基因组序列为参照,通过 m VISTA 在线软件对 6 种石豆兰属叶绿体基因组全长序列差异进行可视化分析。如图 3 所示,6 种石豆兰属物种的 CP 基因组序列显示出较高的序列相似性,高变异区域主要集中在非编码序列中(CNS),而编码区(exon)和 UTR 区具有较高的保守性。在非编码区,变化较大

的区域为 *trnQ-rps16*、*trnG-trnS*、*trnD-psbM*、*trnC-rpoB*、*trnE-trnT*、*trnT-trnL*、*trnF-ndhJ*、*atpB-rbcL*、*ndhD-ccsA* 和 *trnV-rps12* 等, 编码区变异较大的区域为 *matK*、*rpoC2*、*ycf2*、*ycf1* 和 *ndhD* 等。此外, 石豆兰属物种的 *cp* 基因组的序列比对结果显示, 基因组中最易变的区域位于 LSC 和 SSC 区域, IR 区域在全属中相对保守。

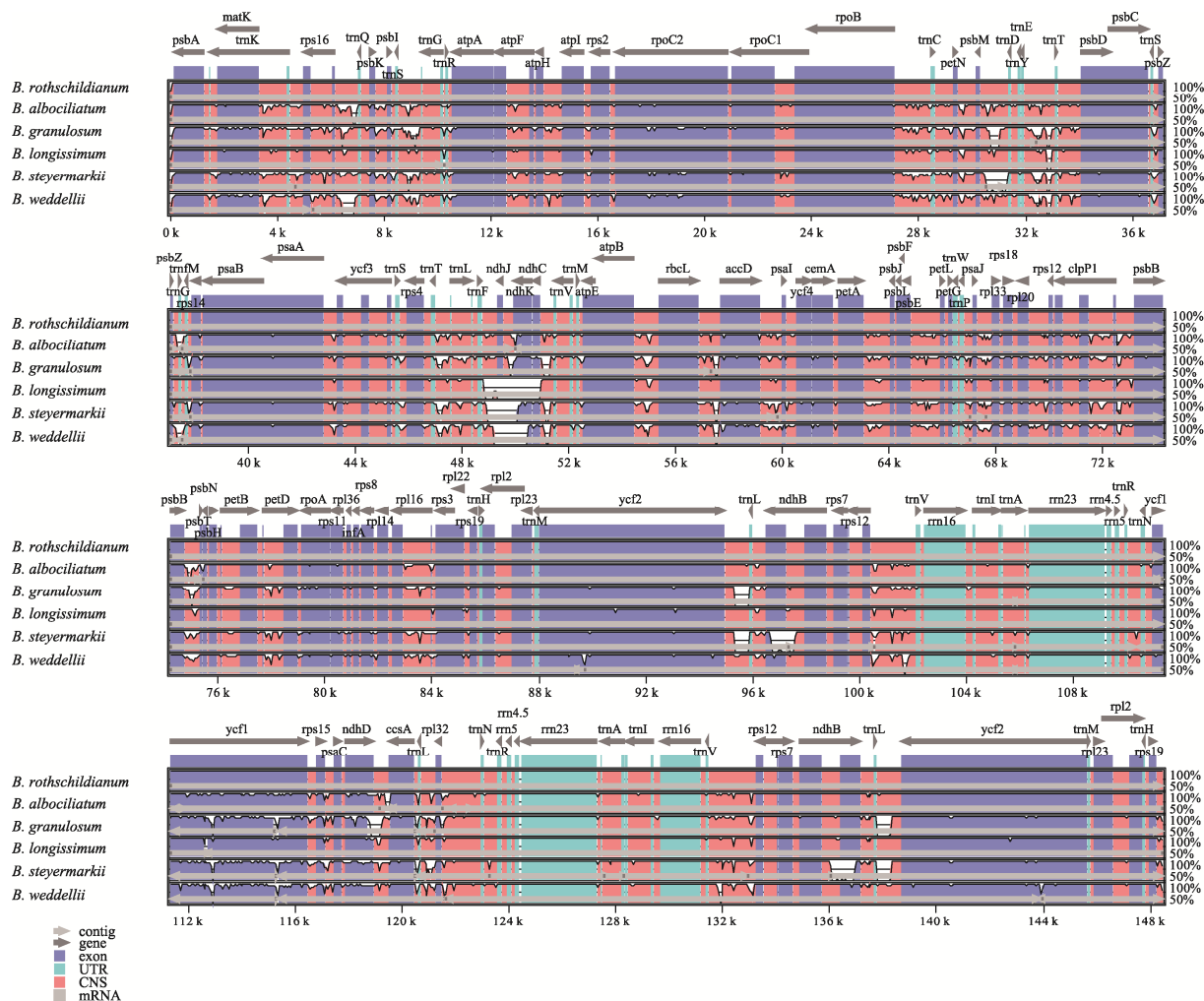


图3 石豆兰属植物叶绿体基因组序列比对

Fig. 3 Sequence alignment of chloroplast genome in six *Bulbophyllum* species

2.5 边界分析

叶绿体基因组中的 LSC、SSC 和 IR 区的边界区域 (JLB、JSB、JSA、JLA) 对于基因组的结构稳定性和大小变化起着关键作用。本研究对 6 种石豆兰属植物叶绿体基因组的 IR/SC 边界区域进行比较分析 (图 4) 发现, 6 个物种的基因组大小存在 4635 bp 的差异, 其中 *B. steyermarkii* 的基因组最短 (146 720 bp), *B. weddellii* 的基因组最长

(151 355 bp)。在 LSC/IRb (JLB) 边界, 6 个物种的 *rpl22* 基因均跨越边界, 其在 LSC 区的长度在 322~329 bp 之间, 说明该区域在石豆兰属内较为保守。在 IRb/SSC (JSB) 边界, 大多数物种的基因分布保持一致, 其中 *trnN* 和 *rpl32* 基因分列于 JSB 两侧, 分别为 72、174 bp。然而, 在 *B. rothschildianum* 和 *B. longissimum* 中, *ycf1* 基因扩展至 SSC 区, 尤其是 *B. rothschildianum*, *ycf1* 在 SSC 区的长度达

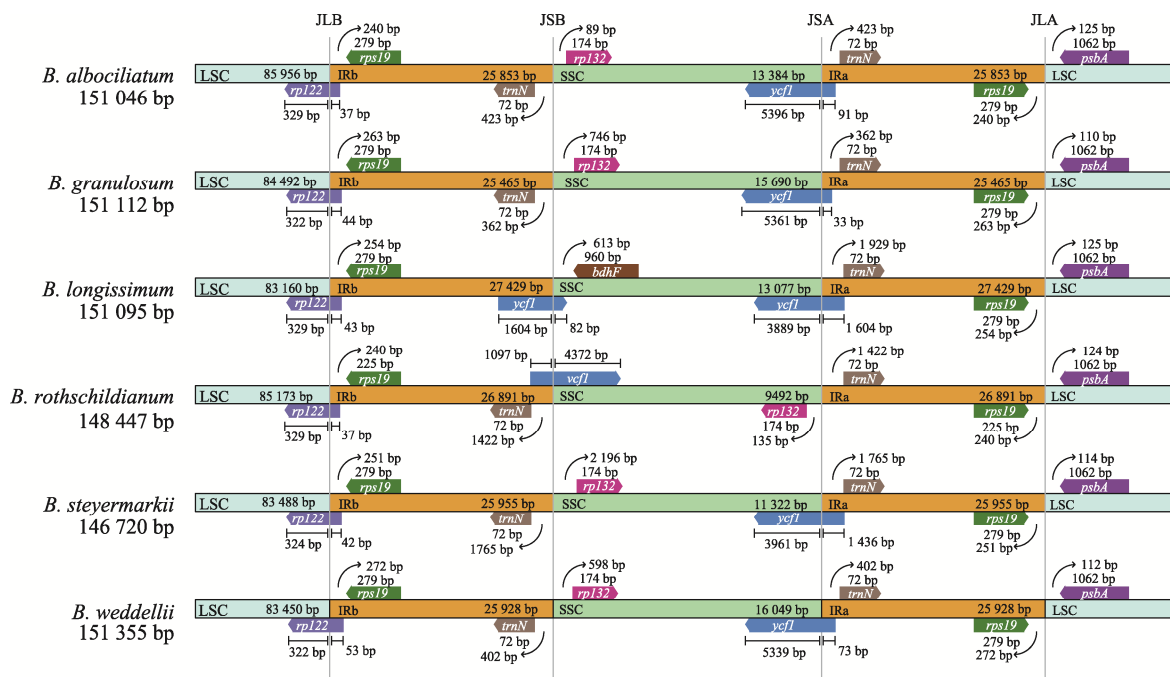


图 4 石豆兰属植物叶绿体基因组边界分析

Fig. 4 Boundary analysis of chloroplast genomes in six *Bulbophyllum* species

4372 bp, 相较于其他物种有显著偏移。在 SSC/IRa (JSA) 边界, 大多数物种的 *ycf1* 基因跨越边界, 其中 *B. albociliatum* 的 *ycf1* 向 SSC 方向扩展最显著 (5396 bp)。值得注意的是, 在 *B. rothschildianum* 的 JSA 边界未检测到 *ycf1* 基因, 而是由 *trnN* 和 *rpl32* 分列两侧。IRa/LSC (JLA) 边界 相对保守, *rps19* 和 *psbA* 在所有物种中均位于边界两侧, *psbA* 在 LSC 区的长度均为 1062 bp, 而 *rps19* 在 IRa 区的长度大部分为 279 bp (除 *B. rothschildianum* 外)。

2.6 系统发育树分析

本研究基于 32 个石豆兰属物种及 2 个石斛属外群物种 (*D. huoshanense* 与 *D. officinale*) 的叶绿体基因组序列, 采用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建系统发育树 (图 5)。结果显示, 2 个外群物种形成一个独立分支 (Out-group), 位于整棵系统树的基础; 其余 32 个石豆兰属物种聚为一个支持率为 100% 的单系类群。

石豆兰属内部可进一步划分为 2 个主要进化分支。进化支 1 (Clade 1) 包括 *B. kwangtungense*、*B. andersonii*、*B. rothschildianum*、*B. longissimum*、*B. ambrosia*、*B. pingnanense*、*B. ningboense* 和 *B. inconspicuum* 等物种, 整体组成一个节点支持率较高的亚洲类群 (Asian tropical clade), 其中多数分支的支持率达到 100%。在该类群中, *B.*

rothschildianum 与 *B. longissimum* 聚为一支, 且支持率为 100%, 显示出二者具有极近的系统发育关系。进化支 2 (Clade 2) 包含 *B. mentosum*、*B. exaltatum*、*B. weddellii*、*B. granulosum*、*B. regnellii* 等物种, 形成一个支持率为 100% 的进化分支, 代表新热带类群 (Neotropical clade), 即分布于中南美洲的类群。此外, *B. epiphytum*、*B. plumosum* 和 *B. steyermarkii* 亦归属于该进化枝, 并与上述物种共同组成亲缘关系较近的演化单元。

综上, 本研究构建的系统发育框架揭示了石豆兰属在亚洲与中南美洲之间存在显著的地理分化, 并形成 2 个支持率较高的谱系分支。然而, 受限于当前叶绿体基因组数据类型及物种采样范围, 尚不足以充分证明各地理类群的单系性, 未来仍需结合更广泛的物种采样及核基因组证据对这一分化格局进行进一步验证。

3 讨论

3.1 石豆兰叶绿体基因组结构基本特征

本研究首次获得美花卷瓣兰和长花石豆兰的叶绿体基因组结构, 均为典型的环状四分体结构, 与陆生植物叶绿体基因组的保守特征一致^[23]。两物种基因组大小存在显著差异, 可能主要由 IR 区的扩张或收缩引起^[9, 24]。此外, 叶绿体基因组各区域 GC 含量表现为 IR 区最高、SSC 区最低,

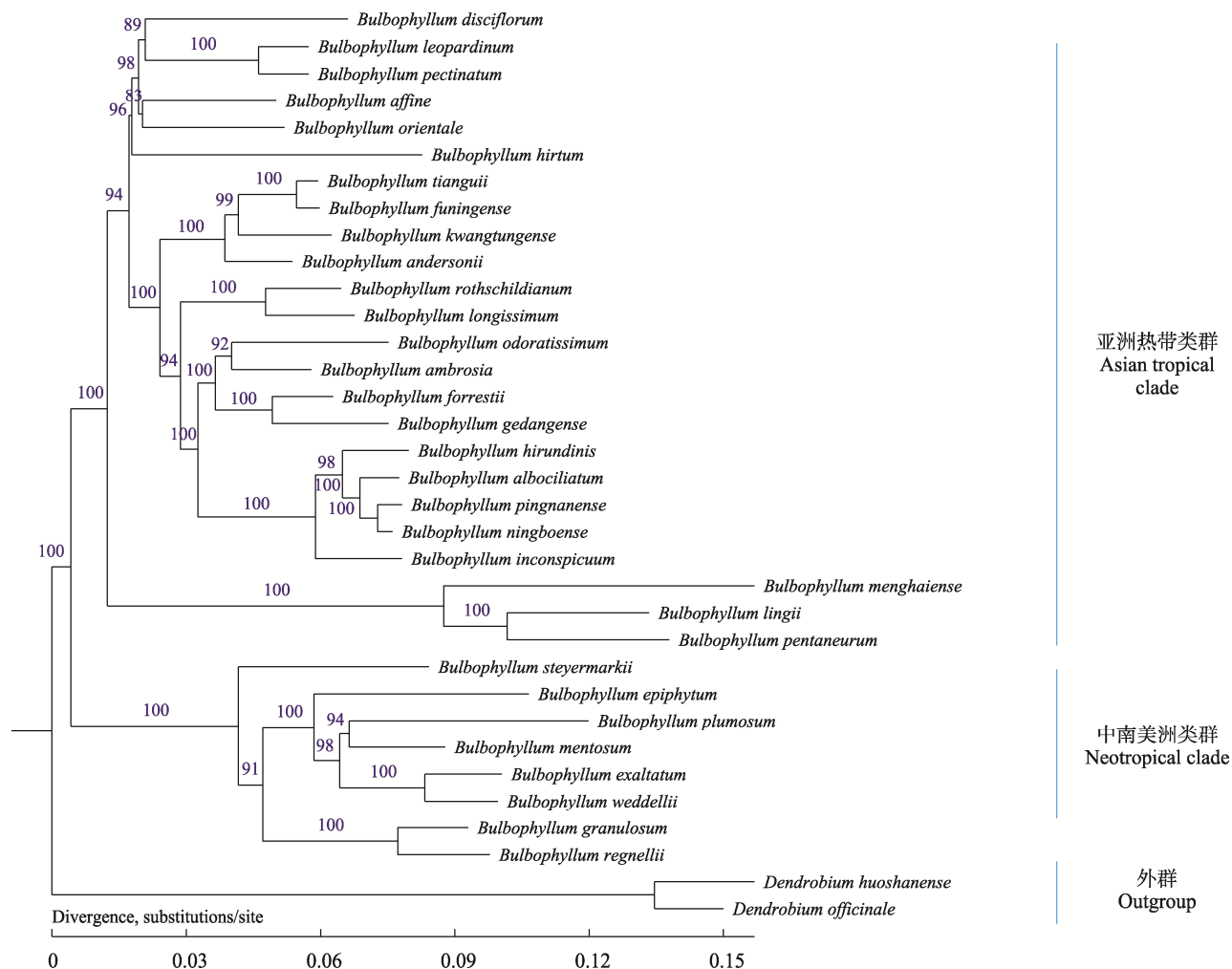


图 5 基于叶绿体基因组构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree constructed based on chloroplast genome

这一现象可能与 IR 区域富含 rRNA 和 tRNA 基因有关^[9, 25]。

3.2 密码子偏好性分析

密码子使用偏好性 (CUB) 广泛存在于生物基因组中, 在基因表达调控、蛋白质翻译效率及物种适应进化中具有重要意义^[26-27]。本研究发现, 美花卷瓣兰与长花石豆兰叶绿体基因组中, 编码亮氨酸 (Leu) 的密码子使用频率最高, 半胱氨酸 (Cys) 最低, 符合兰科及其他被子植物的通性^[9, 28-29]; 此外, 2 种基因组中以 A 或 U 结尾的密码子占优势, 多数具较高的相对同义密码子使用度 (RSCU), 呈现明显 AT 碱基富集特征。这种偏好可能源于自然选择与突变压力共同作用下的 GC→AT 突变倾向^[30]。已有研究表明, A/U 结尾密码子有助于提升蛋白翻译效率和准确性, 降低能耗, 可能在叶绿体基因组进化中具有适应性

优势^[27]。

3.3 长重复序列和简单重复序列分析

叶绿体基因组中的重复序列在维持基因组结构稳定性、促进重排与突变、以及推动物种间遗传变异等方面发挥着重要作用^[31]。本研究系统分析了 6 种石豆兰属植物的长重复序列与简单重复序列 (SSR), 结果显示, 回文重复为主要类型, 这一趋势与多种被子植物中观察到的模式相一致^[15, 32]。大多数重复序列的长度集中在 30~39 bp 之间, 提示该属植物在进化过程中可能倾向于保守维持较短的重复单元。

SSR 分析共鉴定出 379 个位点, 其中单核苷酸重复最为丰富, 且几乎全部为 A/T 类型, 这与叶绿体基因组普遍呈 AT 富集特性的现象相符, 可能是由于 AT 碱基相较于 GC 更易发生突变^[33-35]。相反, C/G 型重复极为罕见, 仅在 *B. steyermarkii* 中检测

到,可能反映其独特的进化轨迹。在二核苷酸重复中,AT/AT 类型最常见,而 AG/CT 类型在 6 个物种中均有分布,表现出较高的保守性,可能适合作为群体遗传研究中的通用 SSR 标记。

3.4 基因组结构比较分析

本研究利用 mVISTA 软件对 6 种石豆兰属植物的叶绿体基因组序列进行比较,结果显示非编码区(CNS)的变异显著高于编码区和 UTR 区,符合叶绿体基因组的普遍进化规律^[31-32, 36]。单拷贝区的变异性也高于反向重复区,这一结果与紫檀属、黄花蒿和三七^[36]的研究一致。部分编码区如 *matK*、*rpoC2*、*ycf2*、*ycf1* 和 *ndhD* 存在明显变异,尤其是 *matK* 和 *ycf1*,因其广泛用于被子植物 DNA 条形码研究^[37-38],亦具石豆兰属系统发育和种间鉴定潜力。因此,这些变异显著的非编码和编码区域可作为候选 DNA 条形码,为石豆兰属系统发育研究提供可靠的分子标记基础。

3.5 边界分析

反向重复区(IR)是叶绿体基因组中高度保守的区域,对其结构稳定性具有重要作用,IR 区的扩张与收缩是基因组演化中的常见现象,常导致基因组长度差异^[36]。本研究发现,6 种石豆兰属植物叶绿体基因组的总体结构高度保守,但在 IR/SC 边界区域仍存在一定的扩张与收缩现象,导致最大基因组长度差异达 4635 bp,表明该属植物在保守结构基础上仍存在局部动态演化。尤其是在 *ycf1* 基因的分布上,不同物种间差异显著,部分物种中 *ycf1* 显著扩展至 SSC 区域,而在美花卷瓣兰中甚至未检测到该基因跨越 JSA 边界的现象,这一现象表明 *ycf1* 基因边界区域可能经历了物种特异性漂移,而 *ycf1* 作为叶绿体中最大、变异性显著的编码基因,其在系统发育与种间分化中的潜在价值已被多项研究所证实^[37, 39]。

3.6 系统发育分析

本研究基于 32 个石豆兰属物种的叶绿体全基因组序列,结合 2 个石斛属外群物种,采用最大似然法(ML)构建了系统发育树。结果显示,石豆兰属物种在系统发育上呈现出可划分为亚洲类群(AT)和中南美洲类群(NT)2 个主要进化分支的格局,这一模式与前人的研究高度一致^[9-10]。尽管本研究未直接开展谱系分化时间的定量分析,但 AT 与 NT 类群之间的清晰分化现象

与前人研究推测的约 2500 万年前地理隔离事件相符合^[21]。在亚洲类群内部 *B. pentaneurum*、*B. lingii* 与 *B. menghaiense* 聚为支持率为 100% 的独立支系,进一步支持 *Macrocaulia* 组为单系类群的观点,同时 *B. inconspicuum* 未与该组聚集,而是独立成为一支,这与前人相关研究结果相吻合^[3, 10]。此外,前人基于 ITS、*matK* 与 *psbA-trnH* 联合数据进行的祖先性状重建表明,石豆兰属亚洲类群的多个关键花部性状(如侧萼片合生程度、萼片比例、花数)存在多次独立演化现象,说明传统的形态分类特征可能存在一定不稳定性^[2]。本研究系统树也显示,部分物种的系统发育关系与传统节级分类体系不符。例如,传统划入 *Ephippium* 组的 *B. andersonii* 与 *Desmosanthes* 组的 *B. kwangtungense* 聚为高支持率的姐妹群;而 *Cirrhopetalum* 组的 *B. inconspicuum* 与 *B. pingnanense* 却与 *Trais* 组的 *B. ningboense* 构成独立分支^[40]。

亚洲类群主要分布于中国南方、印度东北部、缅甸、越南以及朝鲜半岛等地区,生长于海拔 250~2000 m 的湿润山地林或常绿阔叶林边缘,以附生或半附生的方式附着于树干、树根或岩石表面,体现出湿润、阴蔽、气候相对稳定的生态特征。其中,大多数物种具假鳞茎和单叶,叶片质地坚硬,常为革质,有利于在湿润但光照有限的林下环境中保水^[41-44];且花序类型多样,如 *B. rothschildianum* 和 *B. longissimum* 具有大型花序及长侧萼片,形成独特的唇瓣结构^[45],而 *B. andersonii* 与 *B. pingnanense* 等物种的花部结构高度特化,普遍具有延长的萼片、独特的唇瓣形态与毛被结构,可能是对特定传粉昆虫协同演化的适应结果^[41, 44]。相对而言,中南美洲类群(如 *B. exaltatum*、*B. mentosum*、*B. plumosum*)主要栖息于山地雨林和稀树草原,采取附生或岩生方式生长,形态特征包括革质狭长叶片、复杂唇瓣结构及特殊突起,这些特征可能是其适应季节性干湿交替环境的生态适应结果^[46-48]。上述研究从生态和地理分布方面进一步支持了系统发育结果。

综上,本研究利用叶绿体基因组数据所构建的系统发育框架,揭示了石豆兰属复杂的系统关系与生态适应特征,验证了传统分类系统存在的局限性,为该属的分类修订、生态研究和物种

保护提供可靠的分子依据。

4 结论

本研究对美花卷瓣兰 (*B. rothschildianum*) 与长花石豆兰 (*B. longissimum*) 的叶绿体基因组进行测序与注释, 获得的基因组长度分别为 148 447、151 095 bp, 均呈典型的四分体结构, 分别包含 126、129 个功能基因。通过与 4 个已报道石豆兰属物种的比较分析发现, 该属植物的叶绿体基因组整体保守, 但在 IR 区边界位置、部分蛋白编码基因长度 (如 *ycf1*) 及重复序列分布方面存在差异, 提示其在进化过程中存在一定的结构变异。密码子使用偏好分析显示, 编码亮氨酸 (Leu) 的密码子使用频率最高, 以 A/U 结尾的同义密码子占据显著优势, 表明该属叶绿体基因组具有明显的碱基偏好性。SSR 分析揭示, 两物种中均以 A/T 型单核苷酸重复为主, 且长重复序列主要以回文型分布。系统发育结果显示, 美花卷瓣兰与长花石豆兰聚类于同一支系, 具有较高的支持率, 进一步验证了它们在亚洲类群中的亲缘关系。本研究不仅为石豆兰属的分类修订与系统结构解析提供新的分子证据, 也为相关物种的资源保护与分子育种提供参考依据。

参考文献

- [1] SHARIFI-RAD J, QUISPE C, BOUYAHYA A, EL MENYIY N, EL OMARI N, SHAHINOZZAMAN M, ARA HAQUE OVEY M, KOIRALA N, PANTHI M, ERTANI A, NICOLA S, LAPAVA N, HERRERA-BRAVO J, SALAZAR L A, CHANGAN S, KUMAR M, CALINA D. Ethnobotany, phytochemistry, biological activities, and health-promoting effects of the genus *Bulbophyllum*[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 2022: 6727609.
- [2] THAWARA N, KONGSAWADWORAKUL P, SUKSA-THAN P, WATTANA S, PINGYOT T, MERCKX V S F T, RUCHISANSKUN S. An overview of floral and vegetative evolution in the Asian clade of *Bulbophyllum* (Orchidaceae)[J]. Plant Ecology and Evolution, 2024, 157(3): 313-326.
- [3] TANG H, TANG L, SHAO S, PENG Y, LI L, LUO Y. Chloroplast genomic diversity in *Bulbophyllum* section Macrocaulia (Orchidaceae, Epidendroideae, Malaxideae): insights into species divergence and adaptive evolution[J]. Plant Diversity, 2021, 43(5): 350-361.
- [4] 赵会然, 顾玲丽, 赵春婷, 晏和贵, 陆安梅, 杨明惠. 石豆兰属(*Bulbophyllum*)植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(22): 2579-2583.
- [5] ZHAO H R, GU L L, ZHAO C T, YAN H G, LU A M, YANG M H. Advances in studies of chemical constituents from plants of *Bulbophyllum* genus and their bioactivities[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2015, 24(22): 2579-2583. (in Chinese)
- [5] 邹婉霞, 欧阳勤森, 卓书斌, 郝静静, 田海娟, 李欣. 石豆兰属 (*Bulbophyllum*) 植物国内外研究进展[J]. 热带农业科学, 2024, 44(7): 137-146.
- [6] ZOU W X, OUYANG Q S, ZHUO S B, HAO J J, TIAN H J, LI X. Research progress on *Bulbophyllum* plants at home and abroad[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2024, 44(7): 137-146. (in Chinese)
- [6] HOSSEINI S, DADKHAH K, GO R. Molecular systematics of genus *Bulbophyllum* (Orchidaceae) in Peninsular Malaysia based on combined nuclear and plastid DNA sequences[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2016, 65: 40-48.
- [7] HU A Q, GALE S W, LIU Z J, SUDDEE S, HSU T C, FISCHER G A, SAUNDERS R M K. Molecular phylogenetics and floral evolution of the *Cirrhopetalum* alliance (*Bulbophyllum*, Orchidaceae): evolutionary transitions and phylogenetic signal variation[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2020, 143: 106689.
- [8] WANG J Y, LIU Z J, WU X Y, HUANG J X. *Bulbophyllum lipingtaoi*, a new orchid species from China: evidence from morphological and DNA analyses[J]. Phytotaxa, 2017, 295(3): 218.
- [9] WU Y, ZENG M Y, WANG H X, LAN S, LIU Z J, ZHANG S, LI M H, GUAN Y. The complete chloroplast genomes of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species: insight into genome structure divergence and phylogenetic analysis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(5): 2665.
- [10] LI M, TANG L, DENG J, TANG H, SHAO S, XING Z, LUO Y. Comparative chloroplast genomics of three species of *Bulbophyllum* section *Cirrhopetalum* (Orchidaceae), with an emphasis on the description of a new species from Eastern Himalaya[J]. PeerJ, 2023, 11: e14721.
- [11] JIANG D, CAI X, GONG M, XIA M, XING H, DONG S, TIAN S, LI J, LIN J, LIU Y, LI H L. Complete chloroplast genomes provide insights into evolution and phylogeny of *Zingiber* (Zingiberaceae)[J]. BMC Genomics, 2023, 24(1): 30.
- [12] WU L, NIE L, WANG Q, XU Z, WANG Y, HE C, SONG J, YAO H. Comparative and phylogenetic analyses of the chloroplast genomes of species of Paeoniaceae[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 14643.
- [13] JIN J J, YU W B, YANG J B, SONG Y, DEPAMPHILIS C W, YI T S, LI D Z. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate de novo assembly of organelle genomes[J]. Genome Biology, 2020, 21(1): 241.

- [14] GUYEUX C, CHARR J C, TRAN H T M, FURTADO A, HENRY R J, CROUZILLAT D, GUYOT R, HAMON P. Evaluation of chloroplast genome annotation tools and application to analysis of the evolution of coffee species[J]. PLoS One, 2019, 14(6): e0216347.
- [15] LUO C, HUANG W, YER H, KAMUDA T, LI X, LI Y, RONG Y, YAN B, WEN Y, WANG Q, HUANG M, HUANG H. Complete chloroplast genomes and comparative analyses of three ornamental *Impatiens* species[J]. Frontiers in Genetics, 2022, 13: 816123.
- [16] 付文婷, 吴迪, 王楠艺, 涂祥敏, 黄冬福, 杨万荣, 何建文. 黄灯笼辣椒 (*Capsicum chinense* Jacq.) 叶绿体基因组特征分析[J]. 西南农业学报, 2025, 38(3): 498-506.
- FU W T, WU D, WANG N Y, TU X M, HUANG D F, YANG W R, HE J W. Characteristics of chloroplast genome of *Capsicum chinense* Jacq.[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2025, 38(3): 498-506. (in Chinese)
- [17] BEIER S, THIEL T, MUNCH T, SCHOLZ U, MASCHER M. MISA-web: a web server for microsatellite prediction[J]. Bioinformatics, 2017, 33(16): 2583-2585.
- [18] KURTZ S, CHOUDHURI J V, OHLEBUSCH E, SCHLEIERMACHER C, STOYE J, GIEGERICH R. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(22): 4633-4642.
- [19] 梁莹莹, 吴文如, 彭晓祺, 张雨薇, 陆亚茹, 邹何元. 苹婆(*Sterculia monosperma*)叶绿体全基因组序列特征及苹婆属(*Sterculia*)系统发育分析[J]. 中草药, 2024, 55(19): 6721-6729.
- LIANG Y Y, WU W R, PENG X Q, ZHANG Y W, LU Y R, ZOU H Y. Characteristics of chloroplast whole genome sequence of *Sterculia monosperma* and phylogenetic analysis of genus *Sterculia*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2024, 55(19): 6721-6729. (in Chinese)
- [20] AMIRYOUSEFI A, HYVONEN J, POCZAI P. IRscope: an online program to visualize the junction sites of chloroplast genomes[J]. Bioinformatics, 2018, 34(17): 3030-3031.
- [21] YANG J, ZHANG F, GE Y, YU W, XUE Q, WANG M, WANG H, XUE Q, LIU W, NIU Z, DING X. Effects of geographic isolation on the *Bulbophyllum* chloroplast genomes[J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1): 201.
- [22] SHENG W. The complete chloroplast genome of two traditional medical plants: *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. and *Asparagus dauricus* Fisch. ex Link[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2022, 7(5): 725-726.
- [23] DANIELL H, LIN C S, YU M, CHANG W J. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering[J]. Genome Biology, 2016, 17(1): 134.
- [24] JANSEN R K, RUHLMAN T A. Plastid genomes of seed plants[M]//BOCK R, KNOOP V. Genomics of chloroplasts and mitochondria. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012: 103-126.
- [25] 褚振州, 古丽巴哈尔·依斯拉木, 屈泽众, 田新民. 同域分布的 3 种木蓼属(*Atraphaxis*)植物叶绿体基因组比较[J]. 植物学报, 2023, 58(3): 417-432.
- CHU Z Z, YISILAM G, QU Z Z, TIAN X M. Comparative analyses on the chloroplast genome of three sympatric *Atraphaxis* species[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2023, 58(3): 417-432. (in Chinese)
- [26] PLOTKIN J B, KUDLA G. Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias[J]. Nature Reviews Genetics, 2011, 12(1): 32-42.
- [27] QUAX T E, CLAASSENS N J, SOLL D, VAN DER OOST J. Codon bias as a means to fine-tune gene expression[J]. Molecular Cell, 2015, 59(2): 149-161.
- [28] NIE X, DENG P, FENG K, LIU P, DU X, YOU F M, WEINING S. Comparative analysis of codon usage patterns in chloroplast genomes of the Asteraceae family[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 32(4): 828-840.
- [29] 刘丽娥, 李鸿燕, 李嘉欣, 周武. 树锦鸡儿 (*Caragana arborescens*) 和鬼箭锦鸡儿 (*Caragana jubata*) 叶绿体基因组结构比较及亲缘关系分析[J]. 分子植物育种, 2023: 1-17.
- LIU L E, LI H Y, LI J X, ZHOU W. Complete chloroplast genome of *Caragana arborescens* and *Caragana jubata*: comparative of genome structures and phylogenetic analysis[J]. Molecular Plant Breeding, 2023: 1-17. (in Chinese)
- [30] NIU Z, XUE Q, WANG H, XIE X, ZHU S, LIU W, DING X. Mutational biases and GC-biased gene conversion affect GC content in the plastomes of *Dendrobium* genus[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(11): 2307.
- [31] WANG H, GAN C, LUO X, DONG C, ZHOU S, XIONG Q, WENG Q, HU X, DU X, ZHU B. Complete chloroplast genome features of the model heavy metal hyperaccumulator *Arabidopsis paniculata* Franch and its phylogenetic relationships with other *Brassicaceae* species[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2022, 28(4): 775-789.
- [32] ZHANG Y, SONG M F, LI Y, SUN H F, TANG D Y, XU A S, YIN C Y, ZHANG Z L, ZHANG L X. Complete chloroplast genome analysis of two important medicinal *Alpinia* species: *Alpinia galanga* and *Alpinia kwangsiensis*[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 705892.
- [33] VIZOSO P, UNDURRAGA S F, VELOZO J. Chloroplast genome of the soap bark tree *Quillaja saponaria*[J]. Frontiers in Ecology and Evolution, 2019, 7: 104.

- [34] YANG Y, DANG Y, LI Q, LU J, LI X, WANG Y. Complete chloroplast genome sequence of poisonous and medicinal plant *Datura stramonium*: organizations and implications for genetic engineering[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e110656.
- [35] LI X, GAO H, WANG Y, SONG J, HENRY R, WU H, HU Z, YAO H, LUO H, LUO K, PAN H, CHEN S. Complete chloroplast genome sequence of *Magnolia grandiflora* and comparative analysis with related species[J]. Science China Life Sciences, 2013, 56(2): 189-198.
- [36] HONG Z, WU Z, ZHAO K, YANG Z, ZHANG N, GUO J, TEMBROCK L R, XU D. Comparative analyses of five complete chloroplast genomes from the genus *Pterocarpus* (Fabaceae)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(11): 3758.
- [37] DONG W, XU C, LI C, SUN J, ZUO Y, SHI S, CHENG T, GUO J, ZHOU S. ycf1, the most promising plastid DNA barcode of land plants[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 8348.
- [38] 周世良, 徐超, 董文攀, 程涛. DNA 条形码技术在珍稀濒危物种保护中的应用[J]. 生物多样性, 2015, 23(3): 288-290.
- ZHOU S L, XU C, DONG W P, CHENG T. Application of DNA barcoding to conservation of highly valued, rare and endangered species[J]. Biodiversity Science, 2015, 23(3): 288-290. (in Chinese)
- [39] DONG W, LIU J, YU J, WANG L, ZHOU S. Highly variable chloroplast markers for evaluating plant phylogeny at low taxonomic levels and for DNA barcoding[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35071.
- [40] SEIDENFADEN G, WOOD J J. The orchids of peninsular Malaysia and Singapore[M]. Singapore: Olsen & Olsen, 1992.
- [41] LIU J F, LAN S R, HE B Z, LIANG Y C. *Bulbophyllum pingnanense* (Orchidaceae, Epidendroideae, Dendrobinae), a new species from Fujian, China[J]. PhytoKeys, 2016, 65: 107-112.
- [42] YOON Y J, JANG R H, THO J H. A short record for the distribution of *Bulbophyllum inconspicuum* in Hongdo[J]. Proceedings of the National Institute of Ecology of the Republic of Korea, 2021, 2(3): 166-169.
- [43] ZHU J, XU Z, GAO P, LIU X. Chemical composition, antioxidant activity, enzyme inhibitory effects, and network pharmacology analysis of essential oil from *Bulbophyllum kwangtungense* Schltr[J]. South African Journal of Botany, 2024, 172: 701-709.
- [44] 何锦睿, 张雄, 罗银玲, 罗艳, 李青青. 梳帽卷瓣兰 (*Bulbophyllum andersonii*) 花部特征对蝇类传粉者的适应性[J]. 植物研究, 2024, 44(5): 681-691.
- HE J R, ZHANG X, LUO Y L, LUO Y, LI Q Q. Adaptability of floral characteristics to a fly pollinator in *Bulbophyllum andersonii* (Orchidaceae)[J]. Bulletin of Botanical Research, 2024, 44(5): 681-691. (in Chinese)
- [45] TEOH E S. Orchid species from Himalaya and Southeast Asia Vol. 2 (G-P)[M]. Cham: Springer Cham, 2021.
- [46] SMIDT E, BORBA E. Two new species of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) from Brazil[J]. Novon: A Journal for Botanical Nomenclature, 2009, 19(1): 122-126.
- [47] SANTOS I S D, SILVA M J D. O gênero *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae, Epidendroideae) no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros, Goiás, Brasil[J]. Hoehnea, 2019, 46(4): e872018.
- [48] NUNES E, MALDONADO P, SMIDT E, STÜZEL T, COAN A. Floral micromorphology and anatomy and its systematic application to Neotropical *Bulbophyllum* section *Micranthae* (Orchidaceae)[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2017, 183(2): 294-315.