

• 农业生物技术 •

藏波罗花叶绿体基因组分析

张亚颖, 焦琬尧, 焦文睿, 乔天乐, 苏志扬, 益西卓玛, 封烁*

青海大学 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016

张亚颖, 焦琬尧, 焦文睿, 乔天乐, 苏志扬, 益西卓玛, 封烁. 藏波罗花叶绿体基因组分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2954-2964.

ZHANG Yaying, JIAO Wanyao, JIAO Wenrui, QIAO Tianle, SU Zhiyang, Yixizhuoma, FENG Shuo. Analysis of the chloroplast genome of *Incarvillea younghusbandii* Sprague[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2954-2964.

摘 要: 藏波罗花(*Incarvillea younghusbandii* Sprague)是一种传统的补益类中药。其根作草药使用, 用于滋补强壮, 治产后少乳、久病虚弱、头晕、贫血等症。但目前关于藏波罗花分子遗传信息的研究很少。本研究基于高通量测序技术对藏波罗花叶绿体基因组进行测序、组装和注释, 并对其序列特征、密码子偏好性、重复序列、系统发育和分化时间进行分析。结果表明, 藏波罗花叶绿体基因组全长为 159 323 bp, 包含 1 个大单拷贝区(80 197 bp)、1 个小单拷贝区(9 030 bp)和 2 个反向重复区(35 048 bp); 共注释出 120 个基因, 包括 77 个蛋白编码基因、8 个 rRNA 基因和 35 个 tRNA 基因; 密码子偏好性分析显示, AAA 是藏波罗花叶绿体基因组中使用最频繁的密码子; 从藏波罗花叶绿体基因组中共检测到 42 个简单重复序列(simple sequence repeats, SSR); 系统发育分析表明, 藏波罗花与密生波罗花(*Incarvillea compacta*)的亲缘关系最近, 且在大概 466 万年前产生分化。本研究对藏波罗花相关资源的科学保护和开发具有重要的现实意义, 也可以为后续角蒿属(*Incarvillea*)的物种鉴定、紫葳科(Bignoniaceae)的种群遗传多样性研究提供基本的遗传资源。

关键词: 藏波罗花; 叶绿体基因组; 密码子偏好性; 简单重复序列; 系统发育分析; 分化时间估计

资助项目: 青海大学农牧学院大学生科研训练项目(NKX202205)

This work was supported by the Scientific Research Training Project for University Student of the College of Agriculture and Animal Husbandry of Qinghai University (NKX202205).

*Corresponding author. E-mail: fengshuo8894@126.com

Received: 2022-11-20; Accepted: 2023-01-16; Published online: 2023-01-19

Analysis of the chloroplast genome of *Incarvillea younghusbandii* Sprague

ZHANG Yaying, JIAO Wanyao, JIAO Wenrui, QIAO Tianle, SU Zhiyang, Yixizhuoma, FENG Shuo*

State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: *Incarvillea younghusbandii* Sprague is a traditional tonic herb. The roots are used as herbal medicine for nourishing and strengthening, as well as treating postpartum milk deficiency and weakness. In this study, the chloroplast genome of *I. younghusbandii* was sequenced and assembled by the high-throughput sequencing technology. The sequence characteristics, sequence repeats, codon usage bias, phylogenetic relationships and estimated divergence time of *I. younghusbandii* were analyzed. The 159 323 bp sequence contained a large single copy (80 197 bp), a small single copy (9 030 bp) and two inverted repeat sequences (35 048 bp). It contained 120 genes, including 77 protein coding genes, 8 ribosomal RNA genes and 35 transfer RNA genes. AAA was the most frequent codon in the chloroplast coding sequence of *I. younghusbandii*. A total of 42 simple sequence repeats were identified in the chloroplast genome. Phylogenetic analysis revealed *I. younghusbandii* was mostly like its taxonomically close relative *Incarvillea compacta*. The divergence between *I. younghusbandii* and *I. compacta* was dated to 4.66 million years ago. This study was significant for the scientific conservation and development of resources related to *I. compacta*. It also provides a basic genetic resource for the subsequent species identification of the genus *Incarvillea*, and the population genetic diversity study of Bignoniaceae.

Keywords: *Incarvillea younghusbandii*; complete chloroplast genome; codon usage bias; simple sequence repeats (SSR); phylogenetic; estimated divergence time

藏波罗花是紫葳科(Bignoniaceae)角蒿属(*Incarvillea*)矮小宿根草本植物, 主要分布于西藏自治区和青海省海拔 3 600–5 500 m 的高山沙质草甸及山坡砾石垫状灌丛中^[1]。藏波罗花为高山花卉, 花朵大且颜色鲜艳, 因此具有较好的观赏价值^[2]。其与同属的两头毛[*Incarvillea arguta* (Royle) Royle]、密生波罗花(*Incarvillea compacta* Maxim.)、黄波罗花(*Incarvillea lutea* Bureau et Franch.)、鸡肉参[*Incarvillea mairei* (Lévl.) Grierson]、大花鸡肉参[*Incarvillea mairei* (Levl.) Grierson var. *grandiflora* (Wehrhahn) Grier.]等 5 种植物一并作为传统药材。该药性平

味苦, 对于治疗胃病、黄疸、消化不良、耳病、月经不调、高血压、肺结核、肺炎、肺出血等都有效。目前关于藏波罗花的研究主要集中于其化学成分与药理作用。例如, 沈岚等^[3]首次从藏波罗花 95%的乙醇提取物中分离得到异角蒿素等 11 种化合物; 傅予等^[4]首次从藏波罗花中分离得到欧前胡素等 15 种呋喃香豆素类化合物; 高鹏等^[5]在藏波罗花的补血药效研究实验中发现, 藏波罗花的乙醇提取物能够通过增强髓外造血功能, 改善外周血象水平, 达到补血功效; 陈志娟等^[6]的研究证明在脑局部缺血引起的缺氧条件下, 藏波罗花提取物各剂量组

可提高机体对缺氧的耐受能力,降低机体耗氧,从而改善机体的缺氧状态。但关于藏波罗花叶绿体基因组遗传信息的研究很少。且同为药用植物,藏波罗花和密生波罗花在形态及药理方面非常相似。所以,通过分子生物学手段鉴别它们之间的亲缘关系,对于指导临床用药具有十分重要的意义。

叶绿体作为负责光合作用和合成氨基酸、核苷酸、脂肪酸、植物激素、维生素以及其他代谢产物的细胞器,在陆地植物和藻类的生理、发育中发挥着重要作用^[7]。叶绿体基因组在大多数植物中具有母系遗传性,大多数被子植物的叶绿体基因组都具有基因拷贝数高和序列高度保守的特点^[8]。完整的叶绿体基因组由 1 对反向重复区(inverted repeat, IRA 和 IRB)、1 个大单拷贝区(large single-copy, LSC)和 1 个小单拷贝区(small single-copy, SSC)组成,并形成了叶绿体基因组的保守结构,且由高度保守的蛋白质编码基因(protein-coding genes, PCGs)、转移 RNA (transfer RNA, tRNA)基因和核糖体 RNA (ribosomal, rRNA)基因组成^[9]。随着高通量测序技术通量高、成本低的优势日益明显,越来越多的植物叶绿体基因组被测序和组装,更多的遗传资源通过不同的生物信息学方法被分析出来^[10]。

本研究以藏波罗花为材料,通过二代测序,取得其叶绿体基因序列。从叶绿体基因序列结构特征、密码子偏好性分析和重复序列分析等方面对藏波罗花的叶绿体基因组进行对比分析,基于完整的叶绿体基因组数据构建进化树并推测分化时间。本研究对藏波罗花与其近缘物种之间的系统发育关系具有重要意义,可以进一步为后续角蒿属药用植物的遗传多样性和系统发育研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集和 DNA 测序

本研究中使用的藏波罗花样品采集于青海省玉树藏族自治州。采集的样品被立即冷冻在液氮中随后保存在 -80°C 。本研究中的所有植物样本均保存在三江源生态与农牧业国家重点实验室。用改良的十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法从新鲜叶片中分离出总 DNA^[11]。使用 NEB Next[®] Ultra[™] DNA 文库制备试剂盒生成测序文库^[12]。文库质量合格后,在 Illumina 平台对 DNA 文库进行测序,生成 $2\times 150\text{ bp}$ 的数据^[13]。获得的 raw reads 经过质量修剪得到 clean reads 用于后续组装和注释。

1.2 基因组组装、注释及物理图谱绘制

使用 GetOrganelle1.7.5 软件对获得的 clean reads 进行组装^[14],其参数设置如下: $-F\text{ embplant_pt}$, $-R\ 15$ 。使用在线工具 CPGAVAS2 (<http://47.96.249.172:16019/analyzer/home>)对藏波罗花叶绿体基因组进行注释^[15],并提交到美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库。利用在线工具 Chloroplot (<https://irscope.shinyapps.io/Chloroplot/>)绘制藏波罗花叶绿体基因组圈图^[16]。

1.3 密码子使用与重复序列分析

采用 CodonW1.4.2 软件对藏波罗花叶绿体基因组同义密码子相对使用频次(relative synonymous codon usage, RSCU)进行计算和比较^[17]。使用 MISA 在线软件(<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>)对藏波罗花叶绿体基因组进行简单重复序列(simple sequence repeats, SSRs)分析^[18],其参数设置如下:单核苷酸序列为 10 个重复单位,双核苷酸序列为 5 个重复单位,三核苷酸序列为 4 个重复单位,四、五、

六核苷酸序列为 3 个重复单位。

1.4 基于叶绿体基因组序列的系统进化分析

基于本研究组装获得的藏波罗花叶绿体基因组, 再加上从 NCBI 数据库中下载的 10 个紫葳科物种和一个外群物种(蓝花楹, *Jacaranda mimosifolia*)完整的叶绿体基因组序列, 进行系统发育树的构建。使用 MAFFT7.388^[19]对这些叶绿体基因组序列进行比对矫正。利用 IQtree 的默认参数使用 ModelFinder 自动筛选最优模型(bootstrap 为 1 000)构建最大似然(maximum likelihood, ML)树^[20]。ML 树的可视化使用 Figtree1.4.4 软件^[21]。

1.5 基于叶绿体基因组序列的分化时间估计

使用 paml4.9j 软件包中的 mcmctree 程序估计分化时间^[22]。3 个化石校准点是来自 TimeTree (<http://www.timetree.org/>) 的楸(*Catalpa bungei*, 置信区间: 0.5–55.4 MYA)、两头毛(*I. arguta*, 置信区间: 0.7–47.2 MYA)和蓝花楹(*J. mimosifolia*, 置信区间: 0.7–47.2 MYA)^[23]。其参数设置如下: 使用 JC69 替换模型(model=0)和独立的速率时钟模型(clock=2), 总体替代率和速率漂移参数设定为 G (2, 2)和 G (1, 10)。每次运行时, 丢弃前 2 000 次迭代, 然后每 10 次迭代采样一次, 直到收集到 20 000 个样本。

2 结果与分析

2.1 藏波罗花叶绿体基因组结构基本特征

藏波罗花的叶绿体基因组具有典型的环状四分体结构(图 1), 序列总长度为 159 323 bp, 包含 1 个大单拷贝区(80 197 bp)、1 个小单拷贝区(9 030 bp)和 2 个反向重复区(35 048 bp)。该基因组的总 GC 含量为 40.34% (表 1), 其中 LSC 区的 GC 含量为 39.23%, SSC 区的 GC 含量为 34.70%, IR 区的 GC 含量为 42.34%, IR 区的 GC 含量明显高于两个单拷贝区。

对藏波罗花叶绿体基因组注释得到了 120 个

基因(表 2), 包括 77 个蛋白质编码基因(PCG), 35 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。其中 77 个 PCGs 可以根据不同的功能分为 4 类: 40 个与光合作用有关的基因(photosynthesis related genes), 27 个与自我复制有关的基因(self replication related genes), 5 个未知功能基因(unknown function genes)和 5 个其他基因(other genes)。

藏波罗花叶绿体基因组中, 含有内含子的基因总数为 17 个(表 3)。其中 16 个基因有一个内含子, 1 个(*ycf3*)基因有两个内含子。根据基因的位置和分布可知, 17 个基因中有 9 个位于藏波罗花叶绿体基因组的 LSC 区, 所占比例最大; 8 个基因(*rpl2*×2, *ndhA*×2, *trnI-GAU*×2, *trnA-UGC*×2)位于 IRA 区和 IRB 区。

2.2 叶绿体基因组密码子偏好性与 SSR 分析

叶绿体基因组的同义密码子相对使用频次(RSCU)值大于 1 (RSCU>1)的密码子被认为是首选密码子, 因为其实际的使用频率高于预期^[24]。本研究中, 藏波罗花叶绿体基因组密码子使用总频次为 53 261 次。AAA 是藏波罗花叶绿体基因组中使用频率最多的密码子(RSCU=1.32), 使用频率最少的密码子是 GCG (RSCU=0.63), 它们分别编码赖氨酸(lysine, Lys)和丙氨酸(alanine, Ala) (图 2A)。此外, 有 27 个密码子使用频繁即 RSCU>1, 3 个密码子(AUG、CCC 和 UGG)的使用没有偏差(RSCU=1) (图 2B)。

藏波罗花叶绿体基因组中共鉴定出了 42 个 SSRs。在这些 SSRs 中, 单核苷酸重复序列是最多的重复序列(57.14%), 这其中 A 或 T 占大多数。而在藏波罗花叶绿体基因组中没有检测到二核苷酸重复序列(图 3A)。这些 SSRs 的长度大约为 10 bp。检测到位于 LSC 中的 3 个四核苷酸重复序列, 即 AGAC (12 bp)、AATG (12 bp)和 TCTT (12 bp)。这些 SSRs 在 LSC 区出现的频率高于在 SSC 区和 IR 区出现的频率(图 3B)。

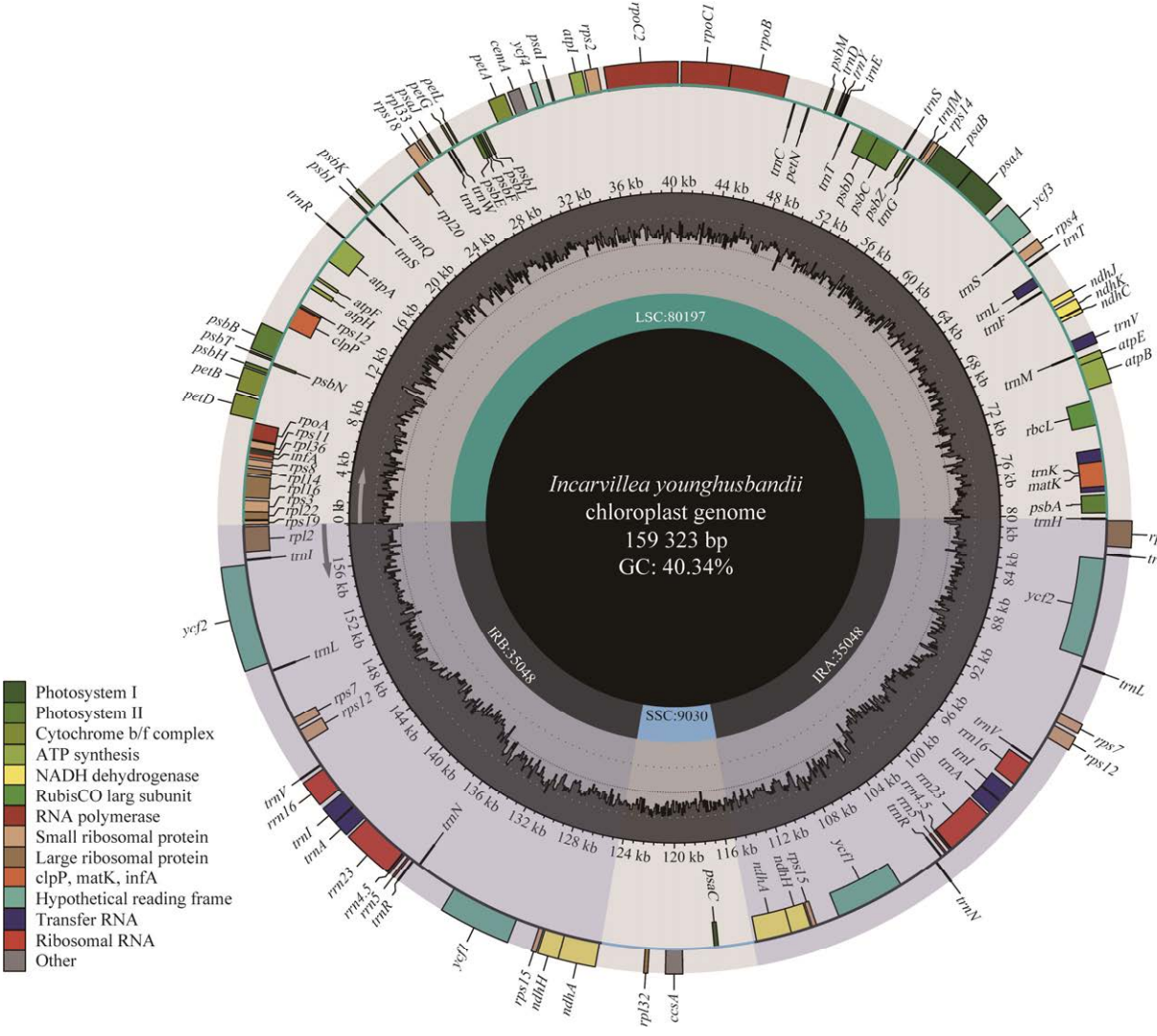


图 1 藏波罗花叶绿体基因组图谱
Figure 1 Gene map of the *Incarvillea younghusbandii* chloroplast genome.

表 1 藏波罗花叶绿体基因组结构组成
Table 1 Structure and composition of *Incarvillea younghusbandii* chloroplast genome

Location	Length (bp)	GC (%)
LSC	80 197	39.23
IRB	35 048	42.34
SSC	9 030	34.70
IRA	35 048	42.34
Total	159 323	40.34

2.3 基于叶绿体基因组的藏波罗花系统发育分析

全叶绿体基因组序列已被广泛地用于重建

植物系统发育关系^[25]。本研究利用共享的叶绿体基因组数据集进行了系统发育分析。ML 树的自举值(bootstrap)非常高: 其中 7 个节点的自举值为 100, 1 个节点的自举值为 98, 1 个节点的自举值为 95 (图 4)。以蓝花楹为外群, 将这 11 个物种分为两支。第一支由密生波罗花、藏波罗花、角蒿、两头毛、羽叶照夜白(*Nyctocalos pinnatum*)和凌霄(*Campsis grandiflora*)组成; 第二支由猫尾木(*Markhamia cauda-felina*)、海滨猫尾木 (*Dolichandrone spathacea*)、火焰树

(*Spathodea campanulat*)、楸和黄金树(*Catalpa speciosa*)组成。系统发育分析表明,藏波罗花和密生波罗花关系最密切。此外,凌霄属(*Campsis*)和照夜白属(*Nyctocalos*)亲缘关系最近,角蒿属与凌霄属和照夜白属具有较近的亲缘关系。

表 2 藏波罗花叶绿体基因组中发现的基因列表
Table 2 List of genes of the *Incarvillea younghusbandii* chloroplast genome

Category of genes	Group of genes	Gene name	Number
Photosynthesis related	Subunits of ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI</i>	40
	Subunits of photosystem II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ, ycf3**</i>	
	Subunits of NADH-dehydrogenase	<i>ndhA</i> ×2*, <i>ndhC, ndhH</i> ×2, <i>ndhJ, ndhK</i>	
	Subunits of cytochrome b/f complex	<i>petA, petB</i> *, <i>petD</i> *, <i>petG, petL, petN</i>	
	Subunits of photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>	
	Subunit of rubisco	<i>rbcL</i>	
	Large subunit of ribosome	<i>rpl14, rpl16, rpl2</i> ×2*, <i>rpl20, rpl22, rpl32, rpl33, rpl36</i>	27
Self replication	DNA dependent RNA polymerase	<i>rpoA, rpoB, rpoC1</i> *, <i>rpoC2</i>	
	Small subunit of ribosome	<i>rps11, rps12</i> ×2, <i>rps14, rps15</i> ×2, <i>rps18, rps19, rps2, rps3, rps4, rps7</i> ×2, <i>rps8</i>	
Other	c-type cytochrome synthesis gene	<i>ccsA</i>	5
	Envelop membrane protein	<i>cemA</i>	
	Translational initiation factor	<i>infA</i>	
	Protease	<i>clpP</i> *	
	Maturase	<i>matK</i>	
Unknown	Conserved open reading frames	<i>ycf1</i> ×2, <i>ycf2</i> ×2, <i>ycf4</i>	5
Total			77

* means one intron; ** means two introns; ×2 indicates genes with two copies.

表 3 藏波罗花叶绿体基因组中带有内含子的基因以及外显子和内含子的长度
Table 3 The genes with introns of the *Incarvillea younghusbandii* chloroplast genome and the length of the exons and introns

No.	Genes	Location	ExonI (bp)	IntronI (bp)	ExonII (bp)	IntronII (bp)	ExonIII (bp)
1	<i>rpl16</i>	LSC	9	872	399		
2	<i>petD</i>	LSC	9	721	474		
3	<i>petB</i>	LSC	6	680	642		
4	<i>clpP</i>	LSC	59	681	613		
5	<i>rpoC1</i>	LSC	435	769	1 608		
6	<i>ycf3</i>	LSC	126	701	228	725	159
7	<i>trnL-UAA</i>	LSC	43	485	50		
8	<i>trnV-UAC</i>	LSC	38	583	37		
9	<i>trnK-UUU</i>	LSC	37	2 473	35		
10	<i>rpl2</i>	IRB	391	657	434		
11	<i>trnI-GAU</i>	IRB	42	915	35		
12	<i>trnA-UGC</i>	IRB	38	806	35		
13	<i>ndhA</i>	IRB	553	1 013	539		
14	<i>ndhA</i>	IRA	553	1 013	539		
15	<i>trnA-UGC</i>	IRA	38	806	35		
16	<i>trnI-GAU</i>	IRA	42	915	35		
17	<i>rpl2</i>	IRA	391	657	434		

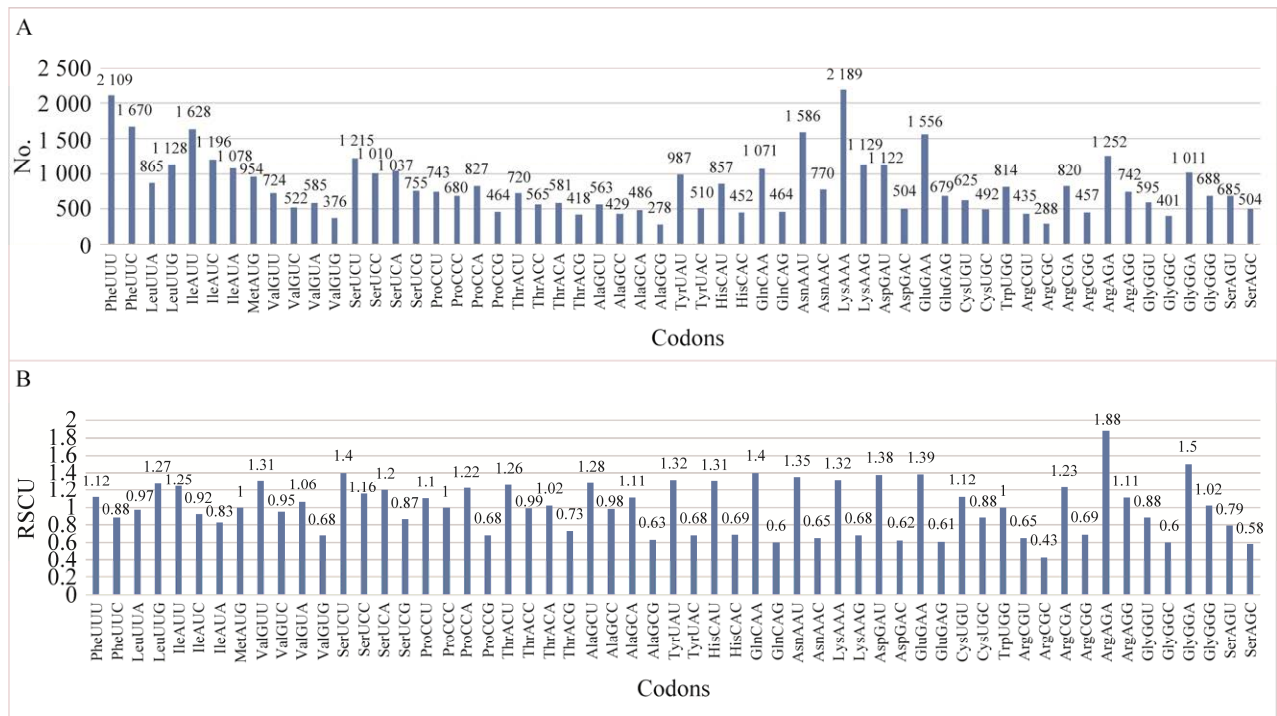


图 2 藏波罗花叶绿体基因组相对同义密码子的使用频率 A: 藏波罗花叶绿体基因组的密码子使用次数; B: 藏波罗花叶绿体基因组的同义密码子相对使用频次

Figure 2 Relative synonymous codon usage of *Incarvillea younghusbandii* chloroplast genome. A: Number of codon usage of the *I. younghusbandii* chloroplast genome. B: Relative synonymous codon usage (RSCU) value of the *I. younghusbandii* chloroplast genome.

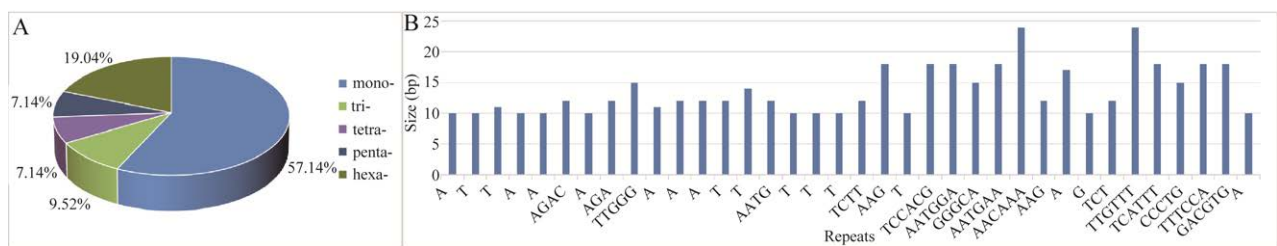


图 3 藏波罗花叶绿体基因组的 SSRs 分布 A: 单核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复序列所占的比例. B: 藏波罗花叶绿体基因组中检测到的不同类型 SSR 的大小和位置

Figure 3 Distribution of simple sequence repeats (SSRs) of the *Incarvillea younghusbandii* chloroplast genome. A: The proportion of mononucleotide, trinucleotide, tetranucleotide, pentanucleotide and hexanucleotide SSRs. B: Size and location of different SSR types detected in the *I. younghusbandii* chloroplast genome.

2.4 基于叶绿体基因组的藏波罗花分化时间估计

基于叶绿体基因组序列的 12 个物种的分化时间结果显示(图 5), 藏波罗花和密生波罗花

之间的分化时间可以追溯到 466 万年前, 凌霄属和照夜白属的分化时间大概在 675 万年前, 而角蒿属与凌霄属和照夜白属的分化时间大概在 1052 万年前。

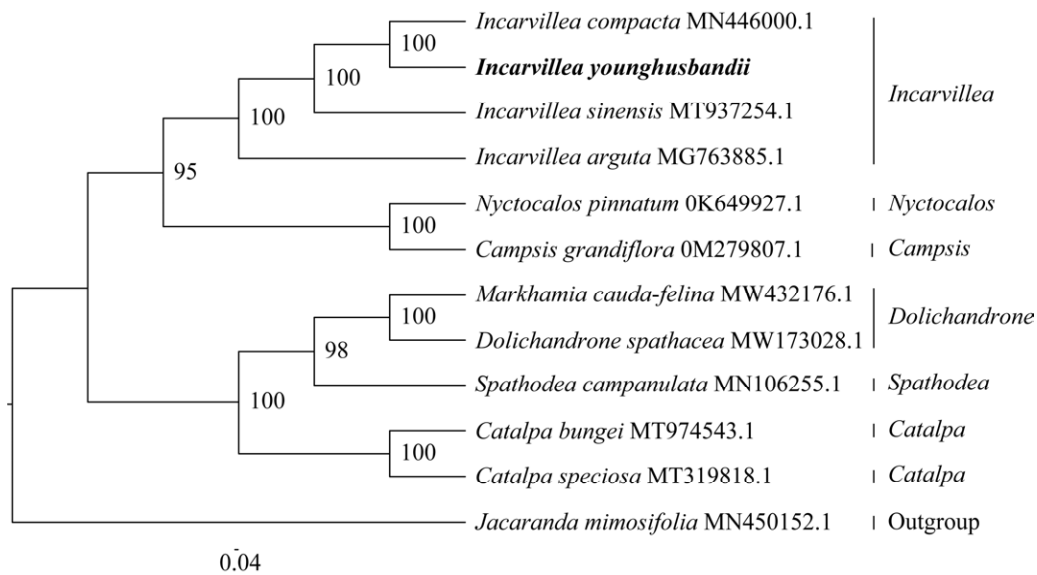


图 4 使用 12 个物种的叶绿体基因组构建的系统发育树 每个节点附近都显示了自举值，加粗的物种表示藏波罗花

Figure 4 Phylogenetic tree constructed using chloroplast genome of 12 species. Bootstrap values are shown near each node. The bold species indicated the *Incarvillea younghusbandii*.

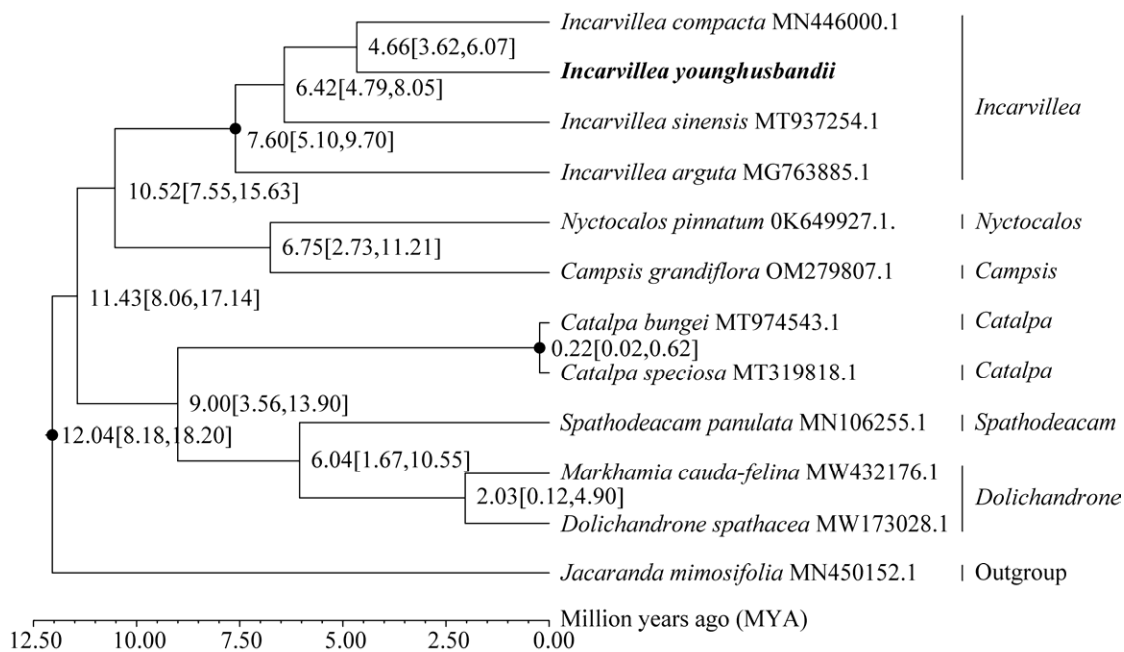


图 5 使用 12 个物种的叶绿体基因组构建的分化时间树 分化时间及 95%置信区间显示在每个节点附近，实心圆表示 3 个化石校准点，加粗的物种表示藏波罗花

Figure 5 Divergence time tree constructed using chloroplast genome of 12 species. Divergence times and 95% confidence intervals were shown near each node. Solid circle indicated the three calibration points. The bold species indicated the *Incarvillea younghusbandii*.

3 讨论

本研究基于高通量测序技术和生物信息学分析方法首次对藏波罗花叶绿体基因组进行测序研究。藏波罗花的叶绿体基因组总长度为 159 323 bp, 总 GC 含量为 40.34%, 共编码 120 个基因。GC 含量是确定不同物种之间亲缘关系的一个重要指标。许多被子植物的叶绿体基因组具有 GC 含量低的特点。这可能是由于大量的 rRNA 基因、tRNA 基因聚集在这些区域造成的。本研究发现 *ycf3* 基因有 2 个内含子, 而在其他植物叶绿体基因组的研究中也发现 *ycf3* 基因含有多个内含子, 可能是因为 *ycf3* 基因需要在光系统II复合体中积累, 而额外的内含子可能有利于光合作用的进行^[26]。

由于使用频率的变化, 叶绿体基因组的同义密码子相对使用频次(RSCU)是一种宝贵的进化形式, 由突变和选择产生, 对研究生物体的进化至关重要^[27]。本研究中, 赖氨酸是藏波罗花叶绿体基因组中占比最高的氨基酸, 终止密码子(UGG)没有显示出偏差, 这与之前发表的研究结果相似^[28]。

植物叶绿体基因组的 SSRs 由于在物种水平上具有较高的多态性, 已被广泛用于研究物种遗传变异的分子标记^[29]。在本研究中, 单核苷酸重复序列中 A 或 T 重复占大多数。表明叶绿体基因组中的 SSRs 通常由短的腺嘌呤(A)或胸腺嘌呤(T)重复组成, 很少包含鸟嘌呤(G)或胞嘧啶(C)重复。LSC 区中 SSRs 数量最多的原因可能是 LSC 区比 SSC 区和 IRs 区长。由于叶绿体在被子植物中高度保守, 叶绿体 SSRs 可以在种和属之间转移^[30]。因此, 在未来的研究中, 藏波罗花叶绿体基因组中鉴定出的这些 SSRs 可以作为分子标记, 对角蒿属植物的分子标记开发、系统进化、种质资源保护和合理开发利

用具有重要意义。

叶绿体基因组具有较强的稳定性和保守性, 能解决很多形态学分类上的问题, 目前已被广泛应用于探究物种的系统发育关系^[31]。在角蒿属植物的形态学研究中, 藏波罗花与密生波罗花同为角蒿属波罗花亚属的草本植物, 且具有相似的形态学特征。例如, 藏波罗花高 10–20 cm, 花紫红色, 花期为 5–8 月; 密生波罗花高 20 cm 左右, 花淡红色, 微紫, 花期为 5–7 月。此前, 陈绍田等^[32]对角蒿属植物花粉形态的研究中指出, 密生波罗花的花粉形态为扁球形至球形, 而藏波罗花的则为球形, 且藏波罗花花粉大小稍大于密生波罗花花粉。这些相似的形态学特征导致二者之间的分类界限不清晰。本研究基于叶绿体全基因组构建系统发育关系, 其中藏波罗花和密生波罗花互为姊妹支且自举值为 100, 两者大约在 466 万年前分化。此外, 藏波罗花主要分布于我国西藏自治区和青海省海拔 3 600–5 500 m 的地区, 是分布海拔最高的角蒿属植物; 密生波罗花则主要分布于我国云南西北部、西藏、青海、四川西部以及甘肃南部等海拔 2 600–4 100 m 的地区。与密生波罗花的分布位置相比, 藏波罗花分布于更干、更冷的高海拔地区, 更能适应极端的生态环境。赵清盛^[33]的研究表明, 角蒿属植物在距今 200–300 万年前从欧洲向东迁移, 经喜马拉雅地区进入我国, 现分布在横断山区的角蒿属植物可能是由古角蒿属植物分化出来的新成员。Rana 等^[34]的研究表明, 分布于喜马拉雅山西部的两头毛起源于约 792 万年前, 表明该物种的分化与喜马拉雅、横断山脉的隆起有关。本研究基于藏波罗花叶绿体全基因组重建系统发育关系和分化时间的估计, 不仅为该物种的鉴定提供分子依据, 也为角蒿属植物的分化时间提供一定的参考。然而, 由于紫葳科内已发

表的叶绿体基因组数量有限, 该类群的系统发育研究仍有许多困难。在未来, 需要更多的数据去重建紫葳科的系统发育关系。

4 结论

对叶绿体基因组的分析有助于了解叶绿体基因组的结构、物种的鉴定和确定系统发育关系。本研究对藏波罗花的完整叶绿体基因组进行了测序和组装。结果显示, 藏波罗花叶绿体基因组表现出典型的环状四分体结构, 总长度为 159 323 bp, 总 GC 含量为 40.34%。注释得到了 120 个基因。对藏波罗花叶绿体基因组进行组装注释、系统发育分析及分化时间估计等分析, 为紫葳科的系统发育研究和保护策略的制定提供了宝贵的遗传信息。

REFERENCES

- [1] ZHU Y, GENG YP, TERSING T, LIU N, WANG QB, ZHONG Y. High genetic differentiation and low genetic diversity in *Incarvillea younghusbandii*, an endemic plant of Qinghai-Tibetan Plateau, revealed by AFLP markers[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, 37(5): 589-596.
- [2] 李清明, 沈岚, 陈凌云, 朱华结. 藏波罗花中一个新的单萜环烯醚[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(6): 715-717.
LI QM, SHEN L, CHEN LY, ZHU HJ. One new terpene derivative from traditional Tibetan medicine *Incarvillea younghusbandii* sprague[J]. *Natural Product Research and Development*, 2012, 24(6): 715-717 (in Chinese).
- [3] 沈岚, 蒋思萍, 朱华结. 藏波罗花化学成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(9): 1210-1213.
SHEN L, JIANG SP, ZHU HJ. Chemical constituents in herb of *Incarvillea younghusbandii* sprague[J]. *Natural Product Research and Development*, 2012, 24(9): 1210-1213 (in Chinese).
- [4] 傅予, 白央, 达娃卓玛, 白冰如, 丁立生. 藏波罗花的化学成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(1): 58-62.
FU Y, BAI Y, DAWAZHUOMA, BAI BR, DING LS. Chemical constituents of *Incarvillea younghusbandii*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2010, 35(1): 58-62 (in Chinese).
- [5] 高鹏, 蒋思萍, 王敬文, 韩峰, 王婧, 高平. 藏波罗花补血效果的实验研究[J]. *四川动物*, 2006, 25(1): 182-184.
GAO P, JIANG SP, WANG JW, HAN F, WANG J, GAO P. Initial research on effect of enrich the blood of *Incarvillea younghusbandii*[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2006, 25(1): 182-184 (in Chinese).
- [6] 陈志鹏, 蒋思萍, 张闻杰, 刘浩, 包善飞, 杨玲玲, 陈彬, 高平. 藏波罗花提取物对小鼠耐缺氧作用的研究[J]. *四川动物*, 2012, 31(1): 125-128.
CHEN ZJ, JIANG SP, ZHANG WJ, LIU H, BAO SF, YANG LL, CHEN B, GAO P. Study of *Incarvillea younghusbandii* sprague on anti-hypoxia activity in mice[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2012, 31(1): 125-128 (in Chinese).
- [7] DU ZY, LU K, ZHANG K, HE YM, WANG HT, CHAI GQ, SHI JG, DUAN YZ. The chloroplast genome of *Amygdalus* L. (Rosaceae) reveals the phylogenetic relationship and divergence time[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 645.
- [8] YI SY, LU HB, WANG W, WANG GL, XU T, LI MZ, GU FL, CHEN CW, HAN BX, LIU D. The chloroplast genome of wild *Saposhnikovia divaricata*: genomic features, comparative analysis, and phylogenetic relationships[J]. *Genes*, 2022, 13(5): 931.
- [9] KHAN AL, ASAF S, LUBNA, AL-RAWAHI A, AL-HARRASI A. Decoding first complete chloroplast genome of toothbrush tree (*Salvadora persica* L.): insight into genome evolution, sequence divergence and phylogenetic relationship within Brassicales[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 312.
- [10] XIE DF, YU Y, DENG YQ, LI J, LIU HY, ZHOU SD, HE XJ. Comparative analysis of the chloroplast genomes of the Chinese endemic genus *Urophyssa* and their contribution to chloroplast phylogeny and adaptive evolution[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7): 1847.
- [11] 闫苗苗, 魏光成, 潘效红, 马怀雷, 李伟振. 一种适用于动物与植物总 DNA 提取的方法: 改良 CTAB 法[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(20): 8488, 8558.
YAN MM, WEI GC, PAN XH, MA HL, LI WZ. A method suitable for extracting genomic DNA from animal and plant-modified CTAB method[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(20): 8488, 8558 (in Chinese).
- [12] TVEDTE ES, MICHALSKI J, CHENG SJ, PATKUS RS, TALLON LJ, SADZEWICZ L, BRUNO VM, SILVA JC, RASKO DA, DUNNING HOTOPP JC. Evaluation of a high-throughput, cost-effective Illumina library preparation kit[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 15925.
- [13] JEON SA, PARK JL, PARK SJ, KIM JH, GOH SH,

- HAN JY, KIM SY. Comparison between MGI and Illumina sequencing platforms for whole genome sequencing[J]. *Genes & Genomics*, 2021, 43(7): 713-724.
- [14] JIN JJ, YU WB, YANG JB, SONG Y, DEPAMPHILIS CW, YI TS, LI DZ. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes[J]. *Genome Biology*, 2020, 21(1): 241.
- [15] SHI LC, CHEN HM, JIANG M, WANG LQ, WU X, HUANG LF, LIU C. CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W65-W73.
- [16] ZHENG SY, POCZAI P, HYVÖNEN J, TANG J, AMIRYOUSEFI A. Chloroplot: an online program for the versatile plotting of organelle genomes[J]. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 576124.
- [17] SHARP PM, LI WH. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(3): 1281-1295.
- [18] BEIER S, THIEL T, MÜNCH T, SCHOLZ U, MASCHER M. MISA-web: a web server for microsatellite prediction[J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(16): 2583-2585.
- [19] KATO H, STANDLEY DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(4): 772-780.
- [20] NGUYEN LT, SCHMIDT HA, von HAESLER A, MINH BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(1): 268-274.
- [21] FRECCERO J. The fig tree and the laurel: Petrarch's poetics[J]. *Diacritics*, 1975, 5(1): 34.
- [22] YANG ZH. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1586-1591.
- [23] KUMAR S, STECHER G, SULESKI M, HEDGES SB. TimeTree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, 34(7): 1812-1819.
- [24] ZHANG RZ, ZHANG L, WANG W, ZHANG Z, DU HH, QU Z, LI XQ, XIANG H. Differences in codon usage bias between photosynthesis-related genes and genetic system-related genes of chloroplast genomes in cultivated and wild *Solanum* species[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3142.
- [25] HAO J, LIANG YY, SU YJ, WANG T. The complete mitochondrial genome of *Ophioglossum vulgatum* L. is with highly repetitive sequences: intergenomic fragment transfer and phylogenetic analysis[J]. *Genes*, 2022, 13(7): 1287.
- [26] ZAREI A, EBRAHIMI A, MATHUR S, LAWSON S. The first complete chloroplast genome sequence and phylogenetic analysis of pistachio (*Pistacia vera*)[J]. *Diversity*, 2022, 14(7): 577.
- [27] MORTON BR. The role of context-dependent mutations in generating compositional and codon usage bias in grass chloroplast DNA[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2003, 56(5): 616-629.
- [28] WEN F, WU XZ, LI TJ, JIA ML, LIU XS, LIAO L. 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.
- [29] PANDEY S, YADAV PS, ANSARI WA, PANDEY M, YANG LM, SINGH B, DUBEY RK, SINGH PM, SINGH J. Development of high conserved cross-species microsatellite markers from cucumber genome and their applicability in genetic diversity and comparative mapping[J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 288: 110408.
- [30] TRIPATHY K, MISRA G, SINGH B, SINGH NK. Identification, distribution and comparative analysis of microsatellites in the chloroplast genome of *Oryza* species[J]. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 2019, 79(3): 536-544.
- [31] 马录花, 宁佳奇, 王永杰, 赵敏, 李以康, 周华坤. 桃儿七叶绿体比较基因组学分析[J]. *生物工程学报*, 2022, 38(10): 3695-3712.
- MA LH, NING JQ, WANG YJ, ZHAO M, LI YK, ZHOU HK. Comparative genomics on chloroplasts of *Sinopodophyllum hexandrum*[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2022, 38(10): 3695-3712 (in Chinese).
- [32] 陈绍田, 管开云, 周浙昆, Toshiyuki Fujiki. 角蒿属(紫葳科)的花粉形态[J]. *云南植物研究*, 2003, 25(4): 457-464.
- CHEN ST, GUAN KY, ZHOU ZK, FUJIKI T. Pollen morphology of the genus *Incarvillea* (Bignoniaceae)[J]. *Acta Botanica Yunnanica*, 2003, 25(4): 457-464 (in Chinese).
- [33] 赵清盛. 角蒿属植物趣谈[J]. *植物杂志*, 1985(2): 36-37.
- ZHAO QS. An interesting talk on *Artemisia* plants[J]. *Life World*, 1985(2): 36-37 (in Chinese).
- [34] RANA SK, LUO D, RANA HK, O'NEILL AR, SUN H. Geoclimatic factors influence the population genetic connectivity of *Incarvillea arguta* (Bignoniaceae) in the Himalaya-Hengduan Mountains biodiversity hotspot[J]. *Journal of Systematics and Evolution*, 2021, 59(1): 151-168.

(本文责编 陈宏宇)