



菱叶绣线菊彩叶园艺品种‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶绿体基因组研究

张巧玲, 陈琳, 张淑燕, 颜海飞

引用本文:

张巧玲,陈琳,张淑燕,颜海飞. 菱叶绣线菊彩叶园艺品种‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶绿体基因组研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2023, 31(4): 510–520.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4769>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

三裂叶薯 *NBS-LRR* 类抗病基因的筛选鉴定与结构分析

Screening and Identification and Structural Analysis of *NBS-LRR* Family Genes in *Ipomoea triloba*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(5): 495–504 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4184>

燕麦属细胞遗传学研究进展

Research Advances on Cytogenetics of *Avena* (Pooideae, Poaceae)

热带亚热带植物学报. 2017, 25(4): 409–418 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3669>

铁皮石斛 *WOX* 转录因子的鉴定和分析

Identification and Analysis of *WOX* Transcription Factor in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(3): 301–310 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4294>

马尾松 *PmPGK1* 和 *PmGPIC* 基因的克隆和表达分析

Cloning and Expression Analysis on *PmPGK1* and *PmGPIC* Genes in *Pinus massoniana*

热带亚热带植物学报. 2021, 29(4): 339–348 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4315>

铁皮石斛 *DoSMT2* 基因的克隆与表达分析

Cloning and Expression Analysis of *DoSMT2* Gene in *Dendrobium officinale*

热带亚热带植物学报. 2020, 28(6): 591–598 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

向下翻页，浏览PDF全文

菱叶绣线菊彩叶园艺品种‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶绿体基因组研究

张巧玲¹, 陈琳¹, 张淑燕², 颜海飞^{3*}

(1. 杭州西溪国家湿地公园生态文化研究中心, 杭州 310013; 2. 华南农业大学生命科学学院, 广州 510642; 3. 中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 基于菱叶绣线菊(*Spiraea × vanhouttei*)培育出了很多的彩叶园艺品种, 其中‘粉霜’彩叶绣线菊(‘Pink Ice’)和‘黄金喷泉’菱叶绣线菊(‘Gold Fountain’)是两个性状优良的品种, 这两个彩叶品种的形成机制尚缺乏深入研究。该研究基于二代测序的浅层测序技术, 对‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶绿体基因组进行组装、注释、绘制其叶绿体基因组图谱; 结合网上已有的绣线菊属植物的叶绿体全基因组开展比较基因组学研究。结果表明, 两个品种的叶绿体基因组均为典型的四分体结构, 即含有 1 个 LSC、1 个 SSC 及 2 个 IR; ‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶绿体基因组大小分别为 155 953 和 155 941 bp, 各含有 130 个基因, 包括 85 个蛋白编码基因, 37 个转运 RNA 基因和 8 个核糖体 RNA 基因; 分别含有 67、69 个简单重复序列, 其中, 单核苷酸重复序列最多。筛选出这两个叶绿体基因组内 7 个高变异区域, 分别为 *trnH_GUG-psbA*、*trnK_UUU*、*trnR_UCU-atpA*、*trnT_GCU-psbD*、*ndhC*、*rpl32*、*ycf1*。菱叶绣线菊、‘粉霜’和‘黄金喷泉’虽有非常近缘的关系, 但并未聚成单系。该研究首次获得了两种绣线菊属彩叶品种的叶绿体基因组, 为进一步理解绣线菊属及其彩叶园艺品种的亲缘关系提供了大量有用信息, 并为今后该属更多园艺资源的发掘奠定了基础。

关键词: 绣线菊属; 园艺品种; 叶绿体基因组; 系统发育分析

doi: 10.11926/jtsb.4769

Chloroplast Genome Analyses of *Spiraea × vanhouttei* ‘Pink Ice’ and ‘Gold Fountain’

ZHANG Qiaoling¹, CHEN Lin¹, ZHANG Shuyan², YAN Haifei^{3*}

(1. Hangzhou Xixi National Wetland Park Ecology & Culture Research Center, Hangzhou 310013, China; 2. College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642 China; 3. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Several foliage horticultural varieties have been bred based on *Spiraea × vanhouttei*, including ‘Pink Ice’ and ‘Gold Fountain’, which exhibit excellent horticultural traits. However, the underlying mechanism of these two colorful leaf varieties remain poorly understood. To address this knowledge gap, the complete chloroplast genomes of ‘Pink Ice’ and ‘Gold Fountain’ were assembled by using genome skimming sequencing. Comparative genomic analysis of all available chloroplast genomes of the genus *Spiraea* to date was studied, including variation hotspot analysis, simple repetitive sequence analysis, and phylogenetic analysis. The results showed that both varieties had a typical quadripartite structure, consisting of one LSC, one SSC, and two IRs. The chloroplast genomes of ‘Pink Ice’ and ‘Gold Fountain’ were 155 953 and 155 941 bp in size, respectively, and each contains 130 genes, including 85 protein-coding genes, 37 transfer RNA genes and 8 ribosomal RNA genes. The two chloroplast genomes also contained 67 and 69 simple repetitive sequences, respectively, with single nucleotide

收稿日期: 2023-01-04 接受日期: 2023-02-10

基金项目: 杭州西湖风景名胜区(市园文局、市运保委)科技发展计划项目(2018-006)资助

This work was supported by the Project for Science and Technology Development of the West Lake of Hangzhou (Grant No. 2018-006).

作者简介: 张巧玲(1982年生), 女, 硕士研究生, 从事植物应用及湿地生物多样性保护研究。E-mail: 3905397@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yanhaifei@srbg.ac.cn

repeat sequences being the most abundant. There were seven highly variable regions within these two chloroplast genomes, including *trnH_GUG-psbA*, *trnK_UUU*, *trnR_UCU-atpA*, *trnT_GCU-psbD*, *ndhC*, *rpl32*, and *ycf1*. Finally, phylogenetic analysis revealed that ‘Pink Ice’ and ‘Gold Fountain’ could not be considered a monophyletic group, despite their close relationship. Overall, these would provide valuable insights into the chloroplast genomes of two foliage varieties of *Spiraea*, which would aid in the development of more horticultural resources for this genus in the future.

Key words: *Spiraea*; Horticultural variety; Chloroplast genome; Phylogenetic analysis

叶绿体是植物细胞中一种半自主复制的细胞器,是植物进行光合作用的场所,能将光能转化为化学能进行储存,因此,叶绿体对植物乃至人类的生存至关重要。目前,多数观点认为叶绿体的起源来源于真核细胞早期捕获蓝藻或光合细菌共生形成(内共生假说^[1])。叶绿体基因组是叶绿体具有的独立遗传物质,最早完成叶绿体基因组测序的物种为烟草(*Nicotiana tabacum*)^[2]与地钱(*Marchantia polymorpha*)^[3]。在早期,叶绿体基因组序列需首先提取叶绿体DNA,并随机打断或酶切后才能通过克隆和桑格测序技术获得,获取过程费时费力^[4],随后,通过设计大量保守引物及长PCR方法^[5]使叶绿体基因组学研究进入了快车道。

随着高通量测序技术的快速发展,其测序数据通量和准确率都得到了极大提升,而且测序费用较为低廉,使该技术已普遍应用于当前的生物学研究中。基因组浅层测序是一种二代全基因组测序方法,可高效便捷地获取基因组中高重复的基因或区域(如重复元件、核DNA的核糖体内转录间隔区等)^[5]。叶绿体基因组在光合组织中的含量较高,约为细胞内总DNA含量的10%~20%^[6],因而基因组浅层测序技术可获得高丰度的叶绿体基因组信息。此外,不断发展的组装及注释技术^[7-9]也使近年来叶绿体基因组数据呈爆发式增长。

植物叶绿体基因组在园艺植物研究方面具有重要价值^[6],叶绿体基因组可用于园艺植物的起源、演化历史及遗传多样性方面的研究。叶绿体基因组通常为单亲遗传(且绝大多数为母系遗传),其序列结构及组成相对保守,核苷酸变异虽低于核基因但高于植物线粒体基因。叶绿体基因组的有效群体大小是雌雄异株植物的1/4或雌雄同株植物的1/2,因此叶绿体单倍型的固定时间及溯祖时间都较短,有利于我们发现其遗传变异并追溯其演化历史^[6]。因此,叶绿体基因组在植物起源、演化历史、遗传多样性、杂交方向等领域具有重要研究价值。叶绿体

基因组有利于园艺植物的分子定向育种和杂交选育研究。叶绿素含量是植物叶片的重要生理指标,但杂交育种或基因工程会导致核质不亲和或叶绿素合成不正常而形成花叶或白化,增加园艺植物的观赏价值^[6,10-11]。叶绿体的合成或质体形成过程中的自发突变是导致一些园艺嵌合体植物[如天竺葵(*Pelargonium × hybridum*)、牵牛花(*Ipomoea nil*)、紫茉莉(*Mirabilis jalapa*)、大丽菊(*Dahlia pinnata*)等]花斑现象形成的原因^[12]。最近,有研究比较了20种嵌合体植物的叶组织(绿叶组织和白化组织)的叶绿体基因组,发现了8个叶绿体编码的RNA聚合酶或光系统有关的基因中存在14个与白化现象产生相关的点突变^[11]。

蔷薇科(Rosaceae)绣线菊属(*Spiraea*)是一类具有重要园艺观赏价值的植物类群。根据最新的蔷薇科分类系统,绣线菊属归属于桃亚科(Amygda-loideae)绣线菊族(Spiraeaceae)^[13-14],为北温带分布的大属,全球包含约90种(<http://www.plantsoftheworldonline.org>),间断分布于欧、亚和北美洲地区。我国是绣线菊属的现代分布和分化中心,多达70种(其中47种为我国特有^[15])。因此,我国拥有丰富的绣线菊属的种质资源。绣线菊属植物多为伞形、伞形总状、复伞房或圆锥花序,多数种类具有美丽的花朵、细致的叶片,生性强健,具有耐寒、耐旱、繁殖简便等优点,可应用于花篱、花径、花坛的栽植及园林主景的构造^[16],是具有重要经济价值的观赏类园艺植物。然而,我国绣线菊属植物的园林应用仅限于几种常见种类,与我国丰富的种质资源十分不符。基于菱叶绣线菊(*S. × vanhouttei*)培育出了多种彩叶园艺品种,其中‘粉霜’彩叶绣线菊(‘Pink Ice’)和‘黄金喷泉’菱叶绣线菊(‘Gold Fountain’)是两个性状优良的菱叶绣线菊品种,表现出较好的园艺价值。

近年来,绣线菊属植物的叶绿体基因组研究得到了一些发展。目前,已公开8种绣线菊属植物的叶绿

体基因组数据^[14,17-23], 绣线菊属叶绿体基因组具有典型的四分体结构, 长度为 156 226~155 981 kb, 编码基因的数量变化较大, 菱叶绣线菊有 129 个编码基因^[23], 而渐尖叶粉花绣线菊(*S. japonica* var. *acuminata*)有 125 个编码基因^[22], 这可能是注释不完整导致的, 因此需进行更详尽的注释及比较基因组学研究。此外, ‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶色形成机制及与绣线菊属其他植物的演化关系尚未开展研究。鉴于叶绿体基因组在叶片色素形成及植物亲缘关系及进化方面的重要价值, 本研究基于二代测序的浅层测序技术, 对‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶绿体基因组进行组装、注释、绘制其叶绿体基因组图谱; 结合网上已有的绣线菊属植物的叶绿体全基因组开展比较基因组学研究, 探讨‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶绿体基因组的组成及高变异位点; 以及这两个品种与绣线菊属植物的亲缘关系, 为深入解析菱叶绣线菊及栽培品种的遗传基础和开发绣线菊属的园艺资源奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料和 DNA 测序

‘粉霜’彩叶绣线菊(凭证标本号: Yan Hai-Fei Y1940)和‘黄金喷泉’菱叶绣线菊(凭证标本号: Yan Hai-Fei Y1948)植株购自浙江桐乡四季花园家庭农场, 并栽种于杭州植物园。凭证标本保存在中国科学院华南植物园标本馆。采集新鲜健康叶片保存在透气的纸袋中, 并放入带有变色硅胶的封口袋中干燥保藏。在实验室采用 CTAB 法^[24]从干燥叶片中提取总 DNA, 并在深圳华大基因股份有限公司(武汉)的 MGISEQ-2000 基因组测序平台上开展基因组浅层测序, 获得原始读长数据(约 2 Gbp)。

1.2 叶绿体基因组组装及注释

原始读长数据在去除接头和低质量数据后, 使用软件 GetOrganelle v1.7.3.5^[8]进行叶绿体基因组的从头组装。将组装好的序列使用在线注释网站 Geseq (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html>^[25])进行基因注释, 并在 Geneious Prime 2019 软件^[26]中进行适当的手工调整。通过线上工具 OGDRAW v1.3.1 (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>)绘制叶绿体基因组序列物理图谱^[27]。

1.3 叶绿体基因组的比较分析

将叶绿体基因组导入 Geneious Prime 2019 软件,

比较叶绿体基因组总长度及大单拷贝区(LSC)、小单拷贝区(SSC)和反向重复区(IR)的长度、基因组成、GC 含量等叶绿体基因组的基本信息。利用 mVISTA 在线软件(<https://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>)的 Shuffle-LAGAN 模型检测叶绿体基因组的序列异质性。利用在线软件 Reputer (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/repuer>)鉴定叶绿体基因组的重复序列类型(如正向重复、倒置重复、互补重复、回文重复)^[28]; 其参数设置为: 最小重复长度设置为 8, 最小排列值为 50。

1.4 叶绿体简单重复序列及核苷酸多态性分析

使用简单重复序列(SSR)识别软件 MISA^[29]鉴定叶绿体基因组的单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸 SSR; 每种类型最小重复参数设置依次为 10、5、4、3、3、3; 两个 SSR 之间的最小距离设置为 100 bp; 当两个 SSR 之间的距离小于 100 bp 时识别为复合微卫星(compound SSR)。核苷酸多态性分析采用 DnaSP 6.0 软件^[30], 窗口大小设置为 500 bp, 步移大小设置为 200 bp。

1.5 系统发育分析

从 NCBI 的 GenBank 中下载所有绣线菊属物种的叶绿体基因组序列数据, 以中华绣线梅(*Neillia sinensis*) (MT683856)和华北珍珠梅(*Sorbaria kirilowii*) (NC_062461)为外类群(表 1)。本研究提取出所有叶绿体基因组中共有的蛋白质编码区(Protein-coding genes, PCGs), 并采用 MAFFT v7.308 软件^[31]比对后形成串联序列矩阵。利用 RAxML v8.2.10 软件^[32]序列矩阵进行最大似然树的构建, 核苷酸替代模型设置为 GTRGAMMA, 执行 1 000 次重复自举抽样以获得系统树上每个分支的支持率。

2 结果和分析

2.1 叶绿体基因组的结构

‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶绿体基因组长度分别为 155 953 和 155 941 bp, 均稍小于菱叶绣线菊(155 957 bp), 也小于绝大多数已知绣线菊属植物, 除毛枝绣线菊(*Spiraea martini*)和蒙古绣线菊(*S. mongolica*)外(表 1), ‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶绿体基因组与其他绣线菊属物种的一致, 均为典型的四分体结构, 即含有 1 个 LSC、1 个 SSC 和 2 个 IR(图 1)。^{‘粉霜’}叶绿体基因组的 LSC、SSC 和 IR 的长度分别为 84 384、18 883 和 26 342 bp, ‘黄金喷泉’分

别为 84 395、18 860 和 26 343 bp。‘粉霜’与菱叶绣线菊叶绿体基因组的 GC 含量均为 36.8%，而‘黄金喷泉’为 36.7%，说明绣线菊属植物叶绿体基因组的

GC 含量相近。通过重新注释并仔细检查，除渐尖叶粉花绣线菊缺失 *psaA* 基因外，该属叶绿体基因组的基因组组成高度保守。

表 1 绣线菊属叶绿体基因组的基本特征

Table 1 Chloroplast genome feature of genus *Spiraea*

序号 No.	物种 Species	总长 Total length (bp)	大拷贝区 Large single-copy region (bp)	重复区 Inverted repeat region (bp)	小拷贝区 Small single-copy region (bp)	GC %	总基因数 Total gene number	蛋白质编码基因 Protein-coding gene	rRNA 基因 rRNA gene	tRNA 基因 tRNA gene
1	绣球绣线菊 <i>S. blumei</i>	155 957	84 384	26 343	18 887	36.8	130	85	8	37
2	三裂绣线菊 <i>S. trilobata</i>	155 981	84 417	26 343	18 878	36.8	130	85	8	37
3	渐尖叶粉花绣线菊 <i>S. japonica</i> var. <i>acuminata</i>	153 822	82 226	26 344	18 908	36.6	129	84	8	37
4	<i>S. insularis</i>	158 637	86 997	26 365	18 910	36.9	130	85	8	37
5	蒙古绣线菊 <i>S. mongolica</i>	155 949	84 375	26 340	18 894	36.7	130	85	8	37
6	毛枝绣线菊 <i>S. martini</i>	156 226	84 378	26 492	18 864	36.8	130	85	8	37
7	珍珠绣线菊 <i>S. thunbergii</i>	155 922	84 360	26 342	18 879	36.8	130	85	8	37
8	菱叶绣线菊 <i>S. × vanhouttei</i>	155 957	84 384	26 340	18 893	36.8	130	85	8	37
9	‘粉霜’ ‘Pink Ice’	155 953	84 384	26 343	18 883	36.8	130	85	8	37
10	‘黄金喷泉’ ‘Gold Fountain’	155 941	84 395	26 343	18 860	36.7	130	85	8	37

2.2 叶绿体基因组的基因组组成

基因注释结果表明，‘粉霜’与‘黄金喷泉’叶绿体基因组各含有 130 个基因，包括 85 个蛋白质编码基因，37 个转运 RNA 基因(tRNA gene)和 8 个核糖

体 RNA 基因(rRNA gene)。这些基因可划分成光合作用相关基因、自身表达相关基因和其他基因 3 类(表 2)。“粉霜”与“黄金喷泉”叶绿体基因组中这 3 类基因的种类和数量均完全一致。光合作用相关的基

表 2 ‘粉霜’和‘黄金喷泉’叶绿体基因组的注释基因及其归类

Table 2 Annotated genes and their classification in the chloroplast genomes of ‘Pink Ice’ and ‘Gold Fountain’

类别 Category	基因功能 Gene function	基因 Gene
光合作用相关 Photosynthesis	二磷酸核酮糖羧化酶大亚基 Large subunit of Rubisco	<i>rbcl</i>
	光系统 I Subunit of photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC, psal, psaJ</i>
	光系统 II Subunit of photosystem II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>
	ATP 合酶 Subunit of ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF*, atpH, atpI</i>
	细胞色素 b/f 复合体 Subunit of Cytochrome	<i>petA, petB*, petD*, petG, petL, petN</i>
	NADPH 脱氢酶 Subunit of NADH	<i>ndhA*, ndhB*(2), ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
	细胞色素 c C-type cytochrome synthesis	<i>ccsA</i>
自身复制相关 Self-replication	RNA 聚合酶 RNA polymerase	<i>rpoA, rpoB, rpoCI*, rpoC2</i>
	核糖体蛋白 Large subunit of ribosome	<i>rpl2*(2), rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23(2), rpl32, rpl33, rpl36, rps2, rps3, rps4, rps7(2), rps8, rps11, rps12*(2), rps14, rps15, rps16*, rps18, rps19</i>
	核糖体 RNAs Ribosomal RNA	<i>rrn4.5(2), rrn5(2), rrn16(2), rrn23(2)</i>
	转运 RNAs Transefer RNA	<i>trnA-UGC*(2), trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-GAA, trnFM-CAU, trnG-GCC, trnG-UCC*, trnH-GUG, trnI-CAU (2), trnI-GAU*(2), trnK-UUU*, trnL-CAA(2), trnL-UAA*, trnL-UAG, trnM-CAU, trnN-GUU(2), trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG (2), trnR-UCU, trnS-CGA, trnS-GCU, trnS-GGA, trnS-UGA, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-GAC(2), trnV-UAC*, trnW-CCA, trnY-GUA</i>
ATP 蛋白酶 ATP dependent protease	<i>clpP**</i>	
其他 Other	核糖体 Maturase	<i>matK</i>
	乙酰辅酶 A 羧化酶亚基 Subunit of Acetyl-CoACarboxyase	<i>accD</i>
	囊膜蛋白基因 Envelop membrane protein	<i>cemA</i>
	保守的开放阅读框 Conserved open reading frames	<i>ycf1(2), ycf2(2), ycf3**, ycf4</i>

(2): 含有 2 个重复单元; *: 含有 1 个内含子; **: 含有 2 个内含子。

(2): Two repeat units; *: With one intron; **: With two introns.

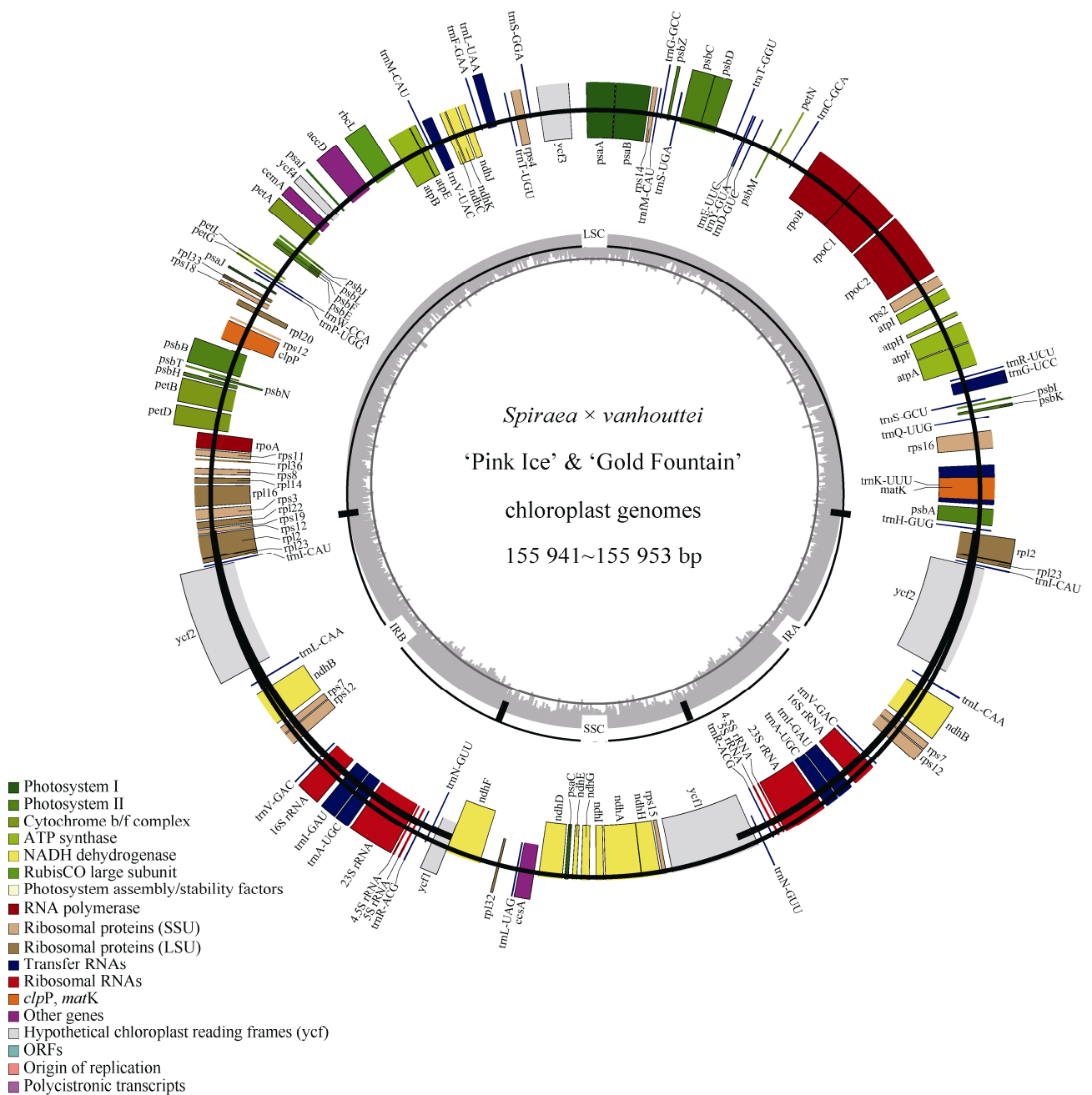


图 1 ‘粉霜’和‘黄金喷泉’叶绿体基因组

Fig. 1 Chloroplast genomes of ‘Pink Ice’ and ‘Gold Fountain’

因均有 45 个，其中 5 个基因(*atpF*、*petB*、*petD*、*ndhA* 和 *ndhB*)含 1 个内含子，*ndhB* 分布在 IR 上，因此具有 2 个拷贝。自身表达相关基因有 61 个基因，其中 *rpoC1*、*rpl2*、*rps12*、*rps16*、*trnA-UGC*、*trnG-UCC*、*trnI-GAU*、*trnK-UUU*、*trnL-UAA*、*trnV-UAC* 均有 1 个内含子，而 *clpP* 含有 2 个内含子，其中，有 15 个基因分布于 IR 上(*rpl2*、*rpl23*、*rps7*、*rps12*、*rrn4.5*、*rrn5*、*rrn16*、*rrn23*、*trnA-UGC*、*trnI-CAU*、*trnI-GAU*、*trnL-CAA*、*trnN-GUU*、*trnR-ACG*、*trnV-*

GAC)，因此均有 2 个拷贝。其他基因中的 *ycf1* 和 *ycf2* 分布于 IR 上，均有 2 个拷贝，*ycf3* 含有 2 个内含子。

2.3 重复序列及简单重复序列(SSR)分析

在‘粉霜’叶绿体基因组中共鉴定出 49 个重复序列，其中正向重复和回文重复各 19 个，反向重复 9 个，互补重复 2 个；在‘黄金喷泉’中鉴定出 49 个重复序列，其中正向重复和反向重复均与‘粉霜’一致，但回文重复和互补重复分别为 20 个和 1 个；在菱叶

绣线菊中鉴定到 49 个重复序列, 其中 2 个互补重复、21 个回文重复、19 个正向重复、7 个反向重复(表 3)。

‘粉霜’、‘黄金喷泉’和菱叶绣线菊的叶绿体基因组分别含有 67、69 和 65 个简单重复序列(表 4)。其中, 单核苷酸重复序列最多, 4 碱基重复序列次之, 2 碱基重复序列均为 6 个。‘粉霜’叶绿体基因组有 1 个 5 碱基重复序列, 而其余 2 种菱叶绣线菊均不存在这类重复。本研究的 3 种菱叶绣线菊均不存在 3 碱基重复和 6 碱基重复, 其叶绿体基因组的简单重复特征也基本反映了绣线菊属的情况。

2.4 叶绿体基因组变异分析

以三裂绣线菊(*S. trilobata*)的叶绿体全基因组为参考序列, 利用 mVISTA 在线软件基于 Shuffle-LAGAN 模型检测绣线菊属叶绿体基因组的序列异质性(图 2)。结果表明, 绣线菊属叶绿体基因组较为保守, 特别是 IR 区的变异程度整体较低。变异多发生在大小拷贝区(LSC 和 SSC 区), 特别是基因间隔区(Intergenic spacers: IGSs)的变异信号更多。

使用 DnaSP6 软件的滑动窗口方法筛选‘粉霜’和‘黄金喷泉’叶绿体高变区域(图 3), 结果存在 7 个高变异区域, 分别为 *trnH_GUG-psbA*、*trnK_UUU*、*trnR_UCU-atpA*、*trnT_GCU-psbD*、*ndhC*、*rpl32* 和 *yef1*。

2.5 系统发育分析

对 10 个有叶绿体基因组数据的绣线菊属物种进行了系统发育分析(图 4)。结果表明, 除 1 个节点外, 其余分支节点均有很高的支持率(>95%); 菱叶绣线菊、‘粉霜’和‘黄金喷泉’虽有非常近缘的关系, 但并未聚成单系; 菱叶绣线菊与绣球绣线菊(*S. blumei*)形成姐妹群, 该分支再与‘黄金喷泉’组成姐妹关系, 但其支持率非常低(37%), 其关系并未解决。

3 结论和讨论

当前, 欧美国家已在原产于亚洲的绣线菊属物种中进行了大量的新品种培育, 基于粉花绣线菊(*S. japonica*)培育出‘金焰’绣线菊(‘Gold Flame’)、‘金山’绣线菊(‘Gold Mound’)、‘魔毡’绣线菊(‘Walbuma’^{PBR})

表 3 绣线菊属植物叶绿体基因组的重复序列

Table 3 Repetitive sequence in chloroplast genomes of *Spiraea*

物种 Species	互补 Complement	回文 Palindromic	正向 Forward	反向 Reverse
毛枝绣线菊 <i>S. martini</i>	1	21	21	6
绣球绣线菊 <i>S. blumei</i>	2	21	19	7
三裂绣线菊 <i>S. trilobata</i>	2	21	18	8
渐尖叶粉花绣线菊 <i>S. japonica</i> var. <i>acuminata</i>	0	21	15	14
<i>S. insularis</i>	1	17	27	4
蒙古绣线菊 <i>S. mongolica</i>	0	21	18	10
珍珠绣线菊 <i>S. thunbergii</i>	0	21	18	10
菱叶绣线菊 <i>S. × vanhouttei</i>	2	21	19	7
‘粉霜’ ‘Pink Ice’	2	19	19	9
‘黄金喷泉’ ‘Gold Fountain’	1	20	19	9

表 4 绣线菊属叶绿体基因组的简单重复序列 SSR 类型

Table 4 SSR type in chloroplast genomes of *Spiraea*

物种 Species	单碱基重复 Mononucleotide	2 碱基重复 Dinucleotide	3 碱基重复 Trinucleotide	4 碱基重复 Tetranucleotide	5 碱基重复 Pentanucleotide	6 碱基重复 Hexanucleotide	总计 Total
毛枝绣线菊 <i>S. martini</i>	55	7	1	10	0	0	73
绣球绣线菊 <i>S. blumei</i>	49	6	0	10	0	0	65
三裂绣线菊 <i>S. trilobata</i>	51	6	0	10	0	0	67
渐尖叶粉花绣线菊 <i>S. japonica</i> var. <i>acuminata</i>	51	8	0	9	1	0	69
<i>S. insularis</i>	55	7	1	9	1	1	74
蒙古绣线菊 <i>S. mongolica</i>	50	6	0	9	0	0	65
珍珠绣线菊 <i>S. thunbergii</i>	51	5	0	8	0	0	64
菱叶绣线菊 <i>S. × vanhouttei</i>	49	6	0	10	0	0	65
‘粉霜’ ‘Pink Ice’	50	6	0	10	1	0	67
‘黄金喷泉’ ‘Gold Fountain’	52	6	0	11	0	0	69

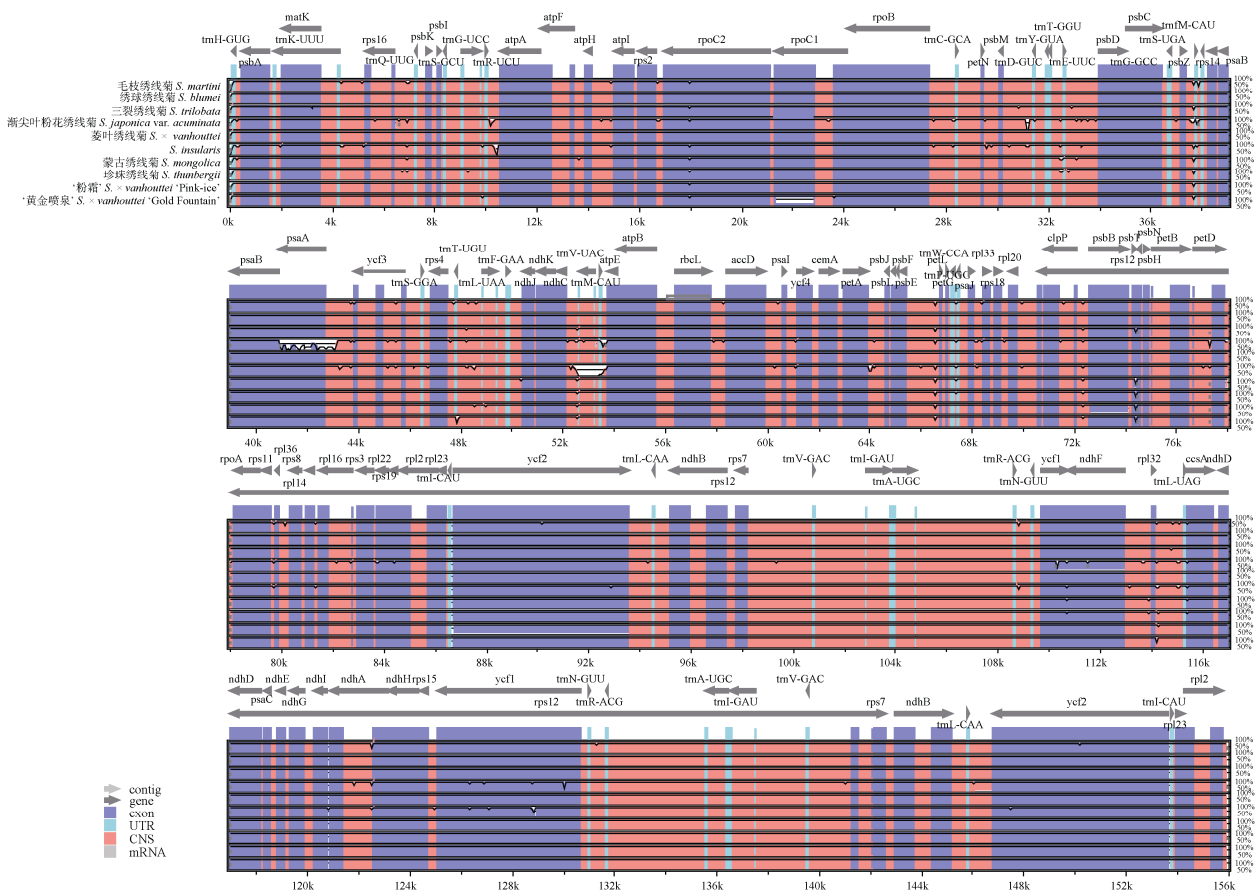


图 2 绣线菊属植物叶绿体基因组的比对分析

Fig. 2 Alignment of chloroplast genomes of *Spiraea*

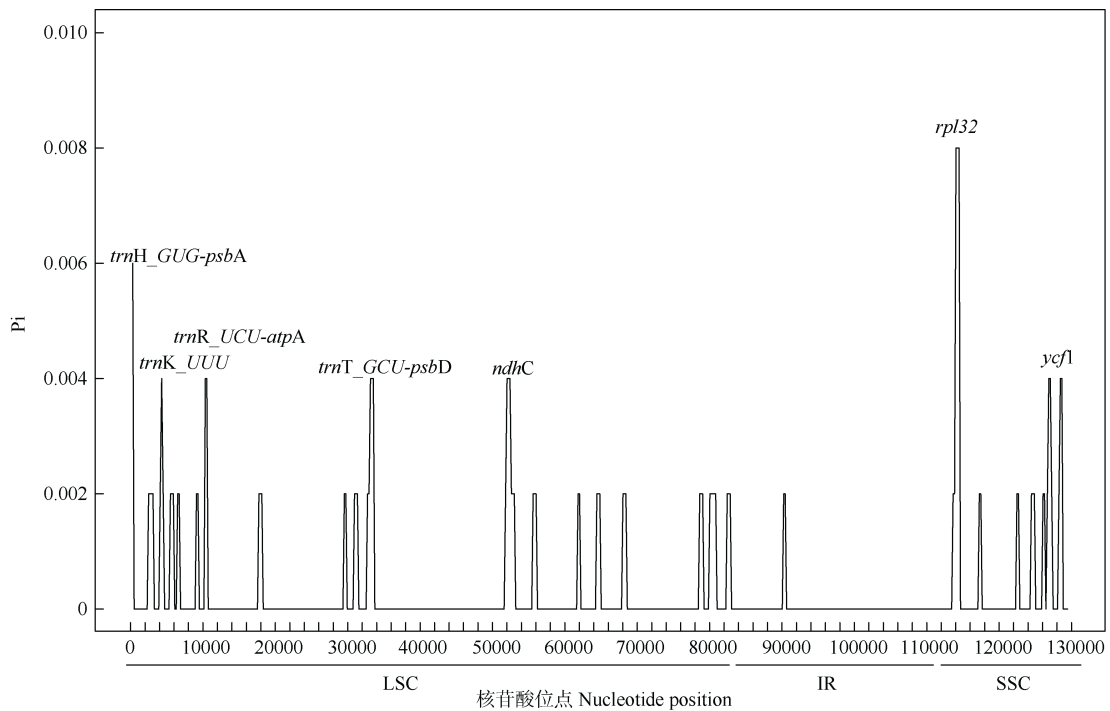


图 3 ‘粉霜’和‘黄金喷泉’叶绿体基因组核苷酸多态性(Pi)的滑动窗口分析

Fig. 3 Sliding window analysis of nucleotide diversity (Pi) in chloroplast genomes of ‘Pink Ice’ and ‘Gold Fountain’

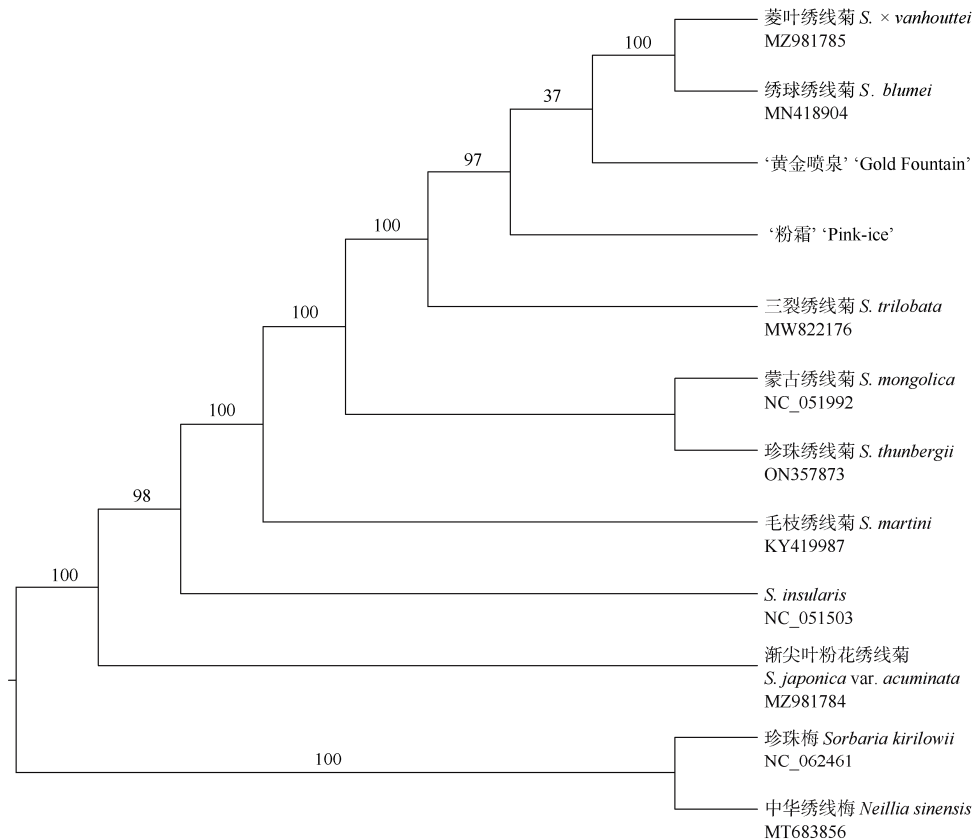


图 4 基于叶绿体基因组中编码基因构建的绣线菊属植物最大似然树。分支上的数字为支持率

Fig. 4 ML tree of *Spiraea* based on coding genes of chloroplast genomes. Bootstrap values on each branch

等大量园艺品种。菱叶绣线菊是麻叶绣线菊(*S. cantoniensis*)和三裂绣线菊的人工杂交种,广泛栽培于我国的山东、江苏、广东、广西、四川^[33]。基于菱叶绣线菊培育出了很多的彩叶园艺品种,其中‘粉霜’彩叶绣线菊和‘黄金喷泉’菱叶绣线菊是两个性状优良的菱叶绣线菊品种,具有极高的园艺价值。我国是绣线菊属的现代分布和分化中心,种类多达 70 种(其中 47 种为我国特有种^[15]),拥有丰富的绣线菊植物资源,但其园艺资源亟待开发。绣线菊属叶绿体基因组的研究还未深入开展,据统计,仅有 8 个绣线菊属物种具有叶绿体基因组数据^[14,17-23]。通过绣线菊属叶绿体基因组学研究将有助于厘清该属植物的遗传资源及亲缘关系,有利于进一步发掘其园艺资源。

本研究首次测序组装并分析了绣线菊属中两种重要彩叶绣线菊‘粉霜’和‘黄金喷泉’的叶绿体基因组,发现这两种彩叶绣线菊的叶绿体基因组均为典型的四分体结构,即含有 1 个 LSC、1 个 SSC 和 2 个 IR,并与其他绣线菊属物种的叶绿体基因组结构一致,是植物叶绿体基因组中最常见的结构

类型^[34]。‘粉霜’和‘黄金喷泉’叶绿体基因组分别为 155 953 和 155 941 bp,是绣线菊属叶绿体基因组中较小的。此外,本研究通过比较绣线菊属叶绿体基因组,发现除渐尖叶粉花绣线菊缺失 *psaA* 基因外,该属的叶绿体基因组在基因组成和 GC 含量均较稳定。一般而言,光合作用相关的 *psa* 基因以往在寄生植物中大量缺失,可能与寄生植物无需进行光合作用有关^[35-37],而这类基因的丢失现象近年来也在其他植物中发现,可能是由于其他基因(如核基因)发挥了其功能有关^[38]。渐尖叶粉花绣线菊叶绿体基因组丢失 *psa* 基因的原因值得后续深入研究。

叶绿体基因组的编码区序列进化速率慢,因而相对保守,而基因内含子及基因间隔区,以及简单重复序列均有较高的变异速率,叶绿体基因组内不同的区域具有不同变异速率的特点非常适用于不同分类阶元的系统发育研究。例如,保守的编码基因适用于科、目及以上分类阶元的系统发育分析^[39],而其非编码区可用于近缘物种或种下的进化研究^[40]。叶绿体简单重复序列(SSR)是研究植物系统与进化的重要遗传标记,主要为单核苷酸重复序列^[41-42]。在本研究

中,‘粉霜’、‘黄金喷泉’及菱叶绣线菊的叶绿体基因组均含有最多的单核苷酸重复序列,与以往的研究结果一致^[41]。此外,本研究还发现 4 碱基重复序列也较多,为后续开展相关研究奠定了基础。除叶绿体简单重复序列外,本研究使用滑动窗口方法筛选出‘粉霜’和‘黄金喷泉’的 7 个高变异区域,这些高变位点有 4 个处于编码区,其余位于基因间隔区。在这些高变位点中,*trnH_GUG-psbA* 和 *ycf1* 在其他植物中也具有很高的变异,因此曾被推荐为 DNA 条形码候选位点^[43-44]。此外,其他片段也具有很高的变异率(特别是 *rpl32*),说明这些位点在绣线菊属中具有作为 DNA 条形码位点的潜力,为后续开展相关研究提供了重要研究方向。

本研究对 10 个有叶绿体基因组数据的绣线菊属物种进行了系统发育分析,结果表明几乎所有的分支节点均有很高的支持率(>95%)。在以往的研究中,菱叶绣线菊与绣球绣线菊、三裂绣线菊等具有非常近缘的亲缘关系,但彼此的关系并未解决^[45]。本研究支持以上结论,并进一步厘清了这些种的关系,说明绣线菊属叶绿体基因组的蛋白质编码区已积累了较大变异,有充足的系统发育信号,为今后大规模开展相关研究奠定了基础。菱叶绣线菊是麻叶绣球和三裂绣线菊的人工杂交种,本研究由于缺少麻叶绣线菊的样品,并不能使用叶绿体基因组进行杂交方向的判定,后续通过引入麻叶绣线菊的样品将有助于解决上述问题。本研究还发现,菱叶绣线菊、‘粉霜’和‘黄金喷泉’虽有近缘关系,但并未聚成单系,这说明两个菱叶绣线菊园艺品种可能分别通过杂交培育的,也可能是由于菱叶绣线菊(尤其是叶的颜色)经历了强烈的人工选择,从而导致其叶绿体基因突变很快积累,并通过无性繁殖的方式保持了这种变异。叶绿体基因组研究可为我们进一步理解绣线菊属及其彩叶园艺品种的亲缘关系提供大量有用信息,为今后发掘该属更多有价值的园艺资源奠定了基础。

参考文献

- [1] RAVEN J A, ALLEN J F. Genomics and chloroplast evolution: What did cyanobacteria do for plants? [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(3): 209. doi: 10.1186/gb-2003-4-3-209.
- [2] SHINOZAKI K, OHME M, TANAKA M, et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression [J]. *EMBO J*, 1986, 5(9): 2043-2049. doi: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04464.x.
- [3] OHYAMA K, FUKUZAWA H, KOHCHI T, et al. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA [J]. *Nature*, 1986, 322(6079): 572-574. doi: 10.1038/322572a0.
- [4] FAN L J. *Plant Genomics* [M]. Beijing: Science Press, 2020: 181-183. [樊龙江. 植物基因组学 [M]. 北京: 科学出版社, 2020: 181-183.]
- [5] STRAUB S C K, PARKS M, WEITEMIER K, et al. Navigating the tip of the genomic iceberg: Next-generation sequencing for plant systematics [J]. *Am J Bot*, 2012, 99(2): 349-364. doi: 10.3732/ajb.1100335.
- [6] RAUWOLF U, GOLCZYK H, GREINER S, et al. Variable amounts of DNA related to the size of chloroplasts: III. Biochemical determinations of DNA amounts per organelle [J]. *Mol Genet Genom*, 2010, 283(1): 35-47. doi: 10.1007/s00438-009-0491-1.
- [7] DIERCKXSENS N, MARDULYN P, SMITS G. NOVOPlasty: *De novo* assembly of organelle genomes from whole genome data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(4): e18. doi: 10.1093/nar/gkw955.
- [8] JIN J J, YU W B, YANG J B, et al. GetOrganelle: A fast and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes [J]. *Genome Biol*, 2020, 21(1): 241. doi: 10.1186/s13059-020-02154-5.
- [9] SHI L C, CHEN H M, JIANG M, et al. CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer [J]. *Nucl Acids Res*, 2019, 47(W1): W65-W73. doi: 10.1093/nar/gkz345.
- [10] GREINER S, RAUWOLF U, MEURER J, et al. The role of plastids in plant speciation [J]. *Mol Ecol*, 2011, 20(4): 671-691. doi: 10.1111/j.1365-294X.2010.04984.x.
- [11] PARK H S, JEON J H, CHO W, et al. High-throughput discovery of plastid genes causing albino phenotypes in ornamental chimeric plants [J]. *Hort Res*, 2022, 10(1): uhac246. doi: 10.1093/hr/uhac246.
- [12] ZHOU Y, ZHOU H G, ZHANG X L. The study on variegation and chimerism in ornamental plants [J]. *J Guangxi Agric Biol Sci*, 1999, 18(4): 304-309. [周焱, 周厚高, 张西丽. 观赏植物花叶现象研究现状 [J]. *广西农业生物科学*, 1999, 18(4): 304-309.]
- [13] POTTER D, ERIKSSON T, EVANS R C, et al. Phylogeny and classification of Rosaceae [J]. *Plant Syst Evol*, 2007, 266(1): 5-43. doi: 10.1007/s00606-007-0539-9.
- [14] ZHANG S D, JIN J J, CHEN S Y, et al. Diversification of Rosaceae since the late Cretaceous based on plastid phylogenomics [J]. *New Phytol*, 2017, 214(3): 1355-1367. doi: 10.1111/nph.14461.
- [15] WU Z Y, Peter H R. *Flora of China*, Vol. 9 [M]. Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2003: 47-73.
- [16] CHENG Y H, WU R H. Plant resource and application in garden of *Spiraea* in Heilongjiang Province [J]. *For Invest Des*, 2008(2): 62-63.

- [程银虎, 武荣贵. 黑龙江省绣线菊属植物资源及在园林中的应用 [J]. 林业勘查设计, 2008(2): 62–63.]
- [17] QIN H, ZHU X X, ZHANG X, et al. Characterization of the complete plastome of *Spiraea trilobata* (Rosaceae), a perennial shrub [J]. Mitochondrial DNA B, 2022, 7(1): 249–250. doi: 10.1080/23802359.2021.2018948.
- [18] YANG J Y, KANG G H, PAK J H, et al. Characterization and comparison of two complete plastomes of Rosaceae species (*Potentilla dickinsii* var. *glabrata* and *Spiraea insularis*) endemic to Ulleung Island, Korea [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4933. doi: 10.3390/ijms21144933.
- [19] SHEN W Y, LIN J, LIN H F. The chloroplast genome of *Spiraea thunbergii* (Rosaceae) [J]. Mitochondrial DNA B, 2022, 7(10): 1879–1881. doi: 10.1080/23802359.2022.2135406.
- [20] MA Y J, GUO Y P, ZHU Y, et al. The complete chloroplast genome of *Spiraea mongolica* maxim [J]. Mitochondrial DNA B, 2021, 6(5): 1614–1616. doi: 10.1080/23802359.2021.1926351.
- [21] HUO Y, YAN M, ZHAO X Q, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Spiraea blumei* G. Don (Rosaceae) [J]. Mitochondrial DNA B, 2019, 4(2): 3671–3672. doi: 10.1080/23802359.2019.1678434.
- [22] WANG Q, CHEN M M, HU X F, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Spiraea japonica* var. *acuminata* Franch. (Rosaceae) [J]. Mitochondrial DNA B, 2022, 7(1): 275–276. doi: 10.1080/23802359.2022.2028590.
- [23] CHEN M M, WANG R H, SHA H K, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Spiraea × vanhouttei* (Briot) Zabel (Rosaceae) [J]. Mitochondrial DNA B, 2022, 7(3): 505–506. doi: 10.1080/23802359.2022.2052369.
- [24] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11–15.
- [25] TILLICH M, LEHWARK P, PELLIZZER T, et al. GeSeq: Versatile and accurate annotation of organelle genomes [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W6–W11. doi: 10.1093/nar/gkx391.
- [26] KEARSE M, MOIR R, WILSON A, et al. Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data [J]. Bioinformatics, 2012, 28(12): 1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199.
- [27] GREINER S, LEHWARK P, BOCK R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes [J]. Nucl Acids Res, 2019, 47(W1): W59–W64. doi: 10.1093/nar/gkz238.
- [28] KURTZ S, CHOUDHURI J V, OHLEBUSCH E, et al. REPuter: The manifold applications of repeat analysis on a genomic scale [J]. Nucl Acids Res, 2001, 29(22): 4633–4642. doi: 10.1093/nar/29.22.4633.
- [29] BEIER S, THIEL T, MÜNCH T, et al. MISA-web: A web server for microsatellite prediction [J]. Bioinformatics, 2017, 33(16): 2583–2585. doi: 10.1093/bioinformatics/btx198.
- [30] ROZAS J, FERRER-MATA A, SÁNCHEZ-DELBARRIO J C, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets [J]. Mol Biol Evol, 2017, 34(12): 3299–3302. doi: 10.1093/molbev/msx248.
- [31] KATO H, STANDLEY D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability [J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(4): 772–780. doi: 10.1093/molbev/mst010.
- [32] STAMATAKIS A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies [J]. Bioinformatics, 2014, 30(9): 1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
- [33] LU L T. The evolution and distribution of subfam. Spiraeoideae (Rosaceae) of China, with special reference to distribution of the subfamily in the world [J]. Acta Phytotaxon Sin, 1996, 34(4): 361–375. [陆玲娣. 中国蔷薇科绣线菊亚科的演化、分布——兼述世界绣线菊亚科植物的分布 [J]. 植物分类学报, 1996, 34(4): 361–375.]
- [34] WICKE S, SCHNEEWEISS G M, DEPAMPHILIS C W, et al. The evolution of the plastid chromosome in land plants: Gene content, gene order, gene function [J]. Plant Mol Biol, 2011, 76(3): 273–297. doi: 10.1007/s11103-011-9762-4.
- [35] BRAUKMANN T, KUZMINA M, STEFANOVIĆ S. Plastid genome evolution across the genus *Cuscuta* (Convolvulaceae): Two clades within subgenus *Grammica* exhibit extensive gene loss [J]. J Exp Bot, 2013, 64(4): 977–989. doi: 10.1093/jxb/ers391.
- [36] DONAHER N, TANIFUJI G, ONODERA N T, et al. The complete plastid genome sequence of the secondarily nonphotosynthetic alga cryptomonas paramecium: Reduction, compaction, and accelerated evolutionary rate [J]. Genome Biol Evol, 2009, 1: 439–448. doi: 10.1093/gbe/evp047.
- [37] GRAHAM S W, LAM V K Y, MERCKX V S F T. Plastomes on the edge: The evolutionary breakdown of mycoheterotroph plastid genomes [J]. New Phytol, 2017, 214(1): 48–55. doi: 10.1111/nph.14398.
- [38] MOHANTA T K, MISHRA A K, KHAN A, et al. Gene loss and evolution of the plastome [J]. Genes, 2020, 11(10): 1133. doi: 10.3390/genes11101133.
- [39] SOLTIS D E, SMITH S A, CELLINESE N, et al. Angiosperm phylogeny: 17 genes, 640 taxa [J]. Am J Bot, 2011, 98(4): 704–730. doi: 10.3732/ajb.1000404.
- [40] YAN H F, ZHANG C Y, WANG F Y, et al. Population expanding with

- the phalanx model and lineages split by environmental heterogeneity: A case study of *Primula obconica* in subtropical China [J]. PLoS ONE, 2012, 7(9): e41315. doi: 10.1371/journal.pone.0041315.
- [41] EBERT D, PEAKALL R. Chloroplast simple sequence repeats (cpSSRs): Technical resources and recommendations for expanding cpssr discovery and applications to a wide array of plant species [J]. Mol Ecol Resour, 2009, 9(3): 673–690. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02319.x.
- [42] YAN H F, PENG C I, HU C M, et al. Phylogeographic structure of *Primula obconica* (Primulaceae) inferred from chloroplast micro-satellites (cpSSRs) markers [J]. Acta Phytotaxon Sin, 2007, 45(4): 488–496. doi: 10.1360/aps06214.
- [43] DONG W P, XU C, LI C H, et al. *YcfI*, the most promising plastid DNA barcode of land plants [J]. Sci Rep, 2015, 5: 8348. doi: 10.1038/srep08348.
- [44] 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. doi: 10.1371/journal.pone.0000508.
- [45] YU S X, GADAGKAR S R, POTTER D, et al. Phylogeny of *Spiraea* (Rosaceae) based on plastid and nuclear molecular data: Implications for morphological character evolution and systematics [J]. Perspect Plant Ecol Evol Syst, 2018, 34: 109–119. doi: 10.1016/j.ppees.2018.08.003.