

• 农业生物技术 •

越南金花茶叶绿体基因组分析

张进, 邓永彪, 赵博*

桂林医学院药学院生药学教研室, 广西 桂林 541199

张进, 邓永彪, 赵博. 越南金花茶叶绿体基因组分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 280-291.

ZHANG Jin, DENG Yongbiao, ZHAO Bo. Characteristics of the chloroplast genome of *Camellia insularis*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1): 280-291.

摘要: 本研究通过高通量测序技术对越南金花茶(*Camellia insularis* Orel & Curry)的叶绿体(chloroplast, cp)基因组进行了测序。结果显示, 越南金花茶叶绿体基因组长度为 156 882 bp, 包含 132 个基因, 其中, 88 个编码蛋白质, 36 个编码 tRNA, 8 个编码 rRNA。密码子偏好性分析显示, 编码亮氨酸的密码子数量最多, 且第三位密码子显示出了较高的 A/U 偏好。此外, 共鉴定出了 67 个简单重复序列(simple sequence repeats, SSR), 发现越南金花茶 SSR 偏好使用 A 和 T 碱基。除了少数可变区域之外, 越南金花茶与其近缘物种的叶绿体基因组反向重复(inverted repeat, IR)边界区域相当保守。系统发育分析表明, 越南金花茶与云南金花茶(*Camellia fascicularis*)亲缘关系最近。金花茶是基因工程培育黄色山茶花的重要材料, 本研究为叶绿体工程提供了基本的遗传信息, 为深入研究金花茶组植物的进化、物种鉴定和基因组育种研究提供了宝贵的资源。

关键词: 越南金花茶; 叶绿体基因组; 结构特征; 系统发育分析

Characteristics of the chloroplast genome of *Camellia insularis*

ZHANG Jin, DENG Yongbiao, ZHAO Bo*

Department of Pharmacognosy, Pharmacy School, Guilin Medical University, Guilin 541199, Guangxi, China

Abstract: In this study, the chloroplast genome of *Camellia insularis* Orel & Curry was sequenced using high-throughput sequencing technology. The results showed that the chloroplast genome of *C. insularis* was 156 882 bp in length with a typical tetrad structure, encoding 132 genes, including 88 protein-coding genes, 36 tRNA genes, and 8 rRNA genes. Codon preference

资助项目: 国家自然科学基金(32060090); 广西壮族自治区自然科学基金(2021JJA130119); 广西研究生教育创新计划(YCSW2023414)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060090), the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2021JJA130119), and the Innovation Project of Guangxi Graduate Education (YCSW2023414).

*Corresponding author. E-mail: 122017017@glmc.edu.cn

Received: 2023-03-03; Accepted: 2023-04-24; Published online: 2023-05-08

analysis revealed that the highest number of codons coded for leucine, with a high A/U preference in the third codon position. Additionally, 67 simple sequence repeats (SSR) loci were identified, with a preference for A and T bases. The inverted repeat (IR) boundary regions of the chloroplast genome of *C. insularis* were relatively conserved, except for a few variable regions. Phylogenetic analysis indicated that *C. insularis* was most closely related to *C. fascicularis*. Yellow *camellia* is a valuable material for genetic engineering breeding. This study provides fundamental genetic information on chloroplast engineering and offers valuable resources for conducting in-depth research on the evolution, species identification, and genomic breeding of yellow *Camellia*.

Keywords: *Camellia insularis* Orel & Curry; chloroplast genome; structural characteristic; phylogenetic analysis

金花茶组(Sect. *Chrysantha* Chang)是山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia*)的一个组,包括50余个物种,因其金黄色花朵而被称为“茶中皇后”^[1]。金花茶组植物有着极高的观赏价值和药用价值,花瓣含有大量黄酮和营养元素,长期饮用可以有效调节人体血脂、血糖、胆固醇,其叶子和花已被用于食品和药用^[2]。金花茶组植物分布范围较窄,主要集中在我国的广西地区和越南北部,大部分物种为我国特有。目前人为过度采集造成了该物种野生种群的破坏,金花茶组的所有物种都已被列为国家二级重点保护野生植物^[3]。越南金花茶(*Camellia insularis* Orel & Curry)原产地为越南,与我国广西本地金花茶相比,越南金花茶叶片的药用价值更高,且单株花朵产量高,具有较好的耐晒性,是优质的金花茶种质资源,有着较高的利用价值^[4]。越南金花茶于2014年引种至我国,目前,国内对越南金花茶进行了扩繁技术研究、化学成分及表型性状分析,为越南金花茶种质分类和良种选育提供了依据^[5-6]。

叶绿体是细胞内非常重要的细胞器,其具有独立的基因组。在大多数被子植物中,叶绿体基因组呈现出典型的双链环状四分体结构,包括一个大单拷贝(large single copy, LSC)区、一个小单拷贝(small single copy, SSC)区和2个反向重复(inverted repeat, IR)区域^[7]。叶绿体基因组的编码序列和非编码序列进化速率差异大,且测序成本低,拼接误差小,对于探究植物物种的系统进

化、分类和鉴定具有方便、准确等优点^[8]。因此,近30年来,研究者越来越倾向于利用叶绿体基因组的比较对植物物种进行鉴定、分类和进化关系判定^[9]。山茶属植物容易杂交和异花授粉,也可能存在种内多倍体,使得在物种水平上鉴定困难^[10]。因此,鉴定研究需要从多角度开展,其中叶绿体基因组的分析对于研究物种鉴定和进化关系具有重要意义。目前,金花茶组植物中已经发表的叶绿体基因组包括金花茶、平果金花茶和毛瓣金花茶等^[11-13],更多金花茶组物种叶绿体基因组的发表将有助于通过序列比较鉴定遗传变异,为该组物种的进化历史和种间关系提供新的见解。

鉴于此,本研究对越南金花茶的叶绿体基因组进行了测序和注释,分析了密码子偏好性、简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)以及IR扩张和收缩。此外,利用大头茶(NC_035645)和30个金花茶植物的全叶绿体基因组构建了系统发育树。本研究从分子水平上探讨了越南金花茶的结构特征及其发育关系,为深入了解金花茶组植物的分子生物学特性及资源保护和开发利用提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

越南金花茶的鲜叶采集自广西壮族自治区南宁市金花茶公园,凭证标本 *C. insularis*

(csf001)被存放在广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所标本馆(Herbarium of Guangxi Institute of Botany, IBK)内。

1.2 基因组 DNA 提取及测序

采用十六烷基三甲基溴化铵法(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)^[14]提取总 DNA, 然后使用 NanoDrop 2000 分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和质量。使用 NEBNext[®] Ultra[™]II DNA Library Prep Kit 制备 350 bp 的双端文库, 获得 150 bp 的双端 reads。二代测序(NGS)在 Illumina HiSeq 4000 平台上进行, 按照制造商的说明进行测序。DNA 提取和测序均由武汉迈特维尔生物科技有限公司完成。

1.3 叶绿体基因组组装和注释

叶绿体基因组序列用 GetOrganelle v1.7.5.0 进行组装, 设置为默认参数。然后用 CPGAVAS2 和 GeSeq 对叶绿体基因组进行注释, tRNA 用 tRNAscan-SE 软件进行注释^[15-18]。将基因、内含子和编码区边界与参考序列 *C. minima* (NC_069310)进行了比较。最后, 利用在线工具 Chloroplast (<https://irscope.shinyapps.io/Chloroplast/>)绘制越南金花茶叶绿体基因组圈图^[19]。完整的越南金花茶叶绿体基因组序列已提交至 GenBank, 登录号为 OP271825。

1.4 密码子偏好性分析

从越南金花茶叶绿体基因组中提取所有的编码序列(coding sequence, CDS), 使用 CodonW v1.4.4 计算相对同义密码子使用率(relative synonymous codon usage, RSCU)^[20]。RSCU 值是特定密码子实际使用频率与无偏好性时理论使用频率之间的比值, 它表示了密码子在基因组中的相对使用偏好程度。当 RSCU 值大于 1.0 时, 说明该密码子的使用频率高于其他同义密码子; 而当 RSCU 值小于 1.0 时, 表示该密码子的使用频率低于其他同义密码子^[21]。

1.5 简单重复序列(SSR)分析

使用 MISA 在线软件(<https://webblast.ipkgatersleben.de/misa/>)预测越南金花茶叶绿体基因组中的 SSR 标记, 参数如下: 单核苷酸的重复单位>10, 二核苷酸的重复单位>5, 三核苷酸的重复单位>4, 四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸的重复单位>3, 2 个 SSR 之间的最小距离设置为 100 bp^[22]。

1.6 叶绿体基因组比较分析

基于系统发育分析的结果, 使用 IRscope (<https://irscope.shinyapps.io/irapp/>)可视化越南金花茶与其 4 个近缘种云南金花茶(*C. fascicularis*)、贵州金花茶(*C. huana*)、富宁金花茶(*C. mingii*)和小瓣金花茶(*C. parvipetala*)叶绿体基因组的 LSC/IR/SSC 的边界变化^[23]。

1.7 系统发育分析

从 NCBI 数据库中检索了大头茶(NC_035645)和包括越南金花茶在内的 30 个金花茶物种的完整叶绿体基因组(以大头茶为外群)用于构建系统发育树。然后应用 MAFFT v7 对所有物种的完整叶绿体基因组进行人工校正^[24], 用 IQ-tree 中内置的 ModelFinder 测试最佳核苷酸替换模型。然后用 IQ-tree 构建最大似然(maximum likelihood, ML)树, 自展值设置为 1 000^[25]。

2 结果与分析

2.1 越南金花茶叶绿体基因组结构组成和基本特征

越南金花茶的完整叶绿体基因组序列长度分别为 156 882 bp, 具有典型的环状四分体结构(图 1)。整个叶绿体基因组由一对长度相近的反向重复序列(IRs) (26 040 bp)和大单拷贝(LSC) (86 557 bp)以及小单拷贝(SSC) (18 245 bp)组成。越南金花茶的总 GC 含量为 37.31%, 其中 IR 区的 GC 含量(42.96%)高于 LSC 区(35.33%)和 SSC 区(30.61%) (表 1)。

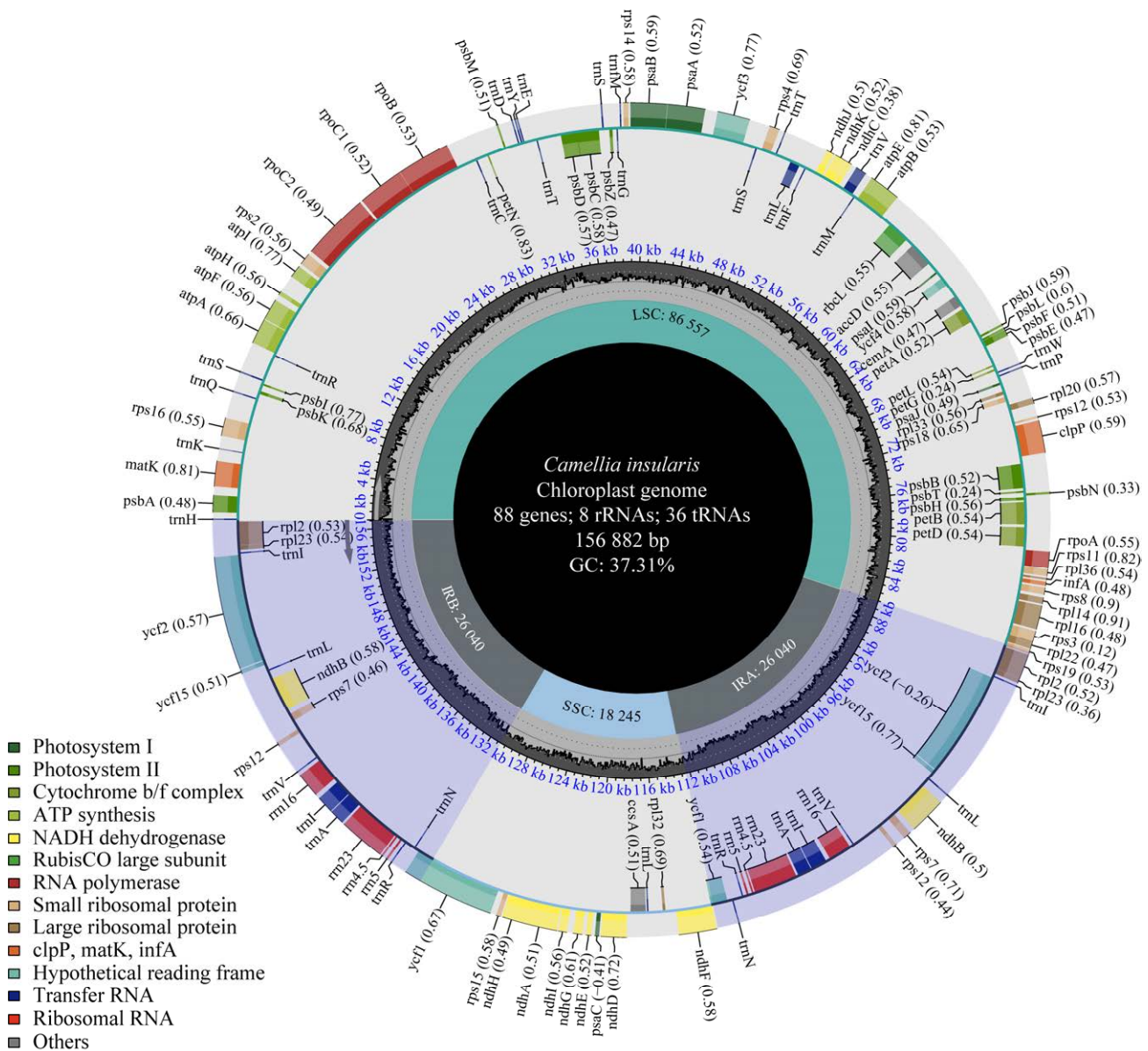


图 1 越南金花茶叶绿体基因组图谱 物种名称和有关基因组的特定信息(长度、GC 含量和基因数量)显示在图的中心. 不同功能的基因用不同的颜色表示. 内部的深灰色对应于 GC 含量, 浅灰色对应于 AT 含量

Figure 1 Circular gene map of *Camellia insularis*. The species name and specific information regarding the genome (length, GC content, and the number of genes) are depicted in the center of the plot. Genes with different functions are represented by different colors. The inner dark gray corresponds to the GC content and the light gray corresponds to the AT content.

经基因注释分析, 越南金花茶包含 132 个编码基因(其中 113 个为独特基因), 包括 36 个 tRNA 基因、8 个 rRNA 基因和 88 个蛋白质编码基因。内含子在基因表达调控中发挥着重要作用, 其中, 越南金花茶中具有内含子的基因数

量为 16 个, 基因 *rps12*、*rps16*、*atpF*、*rpoC1*、*petB*、*petD*、*rpl2*、*rpl16*、*trnI-GAU*、*trnA-UGC*、*trnV-UAC*、*trnL-UAA*、*ndhB* 和 *ndhA* 各含有 1 个内含子, 而 *clpP* 和 *ycf3* 含有 2 个内含子(表 2)。

表 1 叶绿体基因注释信息统计

Table 1 Statistics of chloroplast gene annotation information

Genomic characteristics	<i>Camellia insularis</i>
Total CP genome size (bp)	156 882
LSC region (bp)	86 557
IR region (bp)	26 040
SSC region (bp)	18 245
Total GC content (%)	37.31
LSC GC content (%)	35.33
IR GC content (%)	42.96
SSC GC content (%)	30.61
Number of genes	132
Protein-coding genes	88
rRNAs	8
tRNAs	36

表 2 叶绿体基因功能分类统计

Table 2 Classification and statistics of chloroplast gene function

Category	Gene group	Gene name
Photosynthesis	Subunits of photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>
	Subunits of photosystem II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>
	Subunits of NADH dehydrogenase	<i>ndhA*, ndhB*(2), ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
	Subunits of cytochrome b/f complex	<i>petA, petB*, petD*, petG, petL, petN</i>
	Subunits of ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF*, atpH, atpI</i>
	Large subunit of rubisco	<i>rbcL</i>
	Subunits photochlorophyllide reductase	–
Self-replication	Proteins of large ribosomal subunit	<i>rpl14, rpl16*, rpl2*(2), rpl20, rpl22, rpl23(2), rpl32, rpl33, rpl36</i>
	Proteins of small ribosomal subunit	<i>rps11, rps12*(2), rps14, rps15, rps16*, rps18, rps19, rps2, rps3, rps4, rps7(2), rps8</i>
	Subunits of RNA polymerase	<i>rpoA, rpoB, rpoC1*, rpoC2</i>
	Ribosomal RNAs	<i>rrn16S(2), rrn23S(2), rrn4.5S(2), rrn5S(2)</i>
	Transfer RNAs	<i>trnA-UGC*(2), trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-GAA, 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-GCU, trnS-GGA, trnS-UGA, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-GAC(2), trnV-UAC*, trnW-CCA, trnY-GUA, trnM-CAU</i>
Other genes	Maturase	<i>matK</i>
	Protease	<i>clpP**</i>
	Envelope membrane protein	<i>cemA</i>
	Acetyl-CoA carboxylase	<i>accD</i>
	C-type cytochrome synthesis gene	<i>ccsA</i>
	Translation initiation factor	<i>infA</i>
	Conserved hypothetical chloroplast ORF	<i>ycf1(2), ycf2(2), ycf3**, ycf4, ycf15(2)</i>

Gene*: Gene with one intron; Gene**: Gene with two introns; Gene(2): Number of copies of multi-copy genes.

2.2 越南金花茶叶绿体基因组密码子偏好性分析

在本研究中, 利用叶绿体基因组中的蛋白质编码序列计算了越南金花茶的同义密码子相对使用度(RSCU)。蛋白质序列包含了 26 312 个密码子, 包括终止密码子。如图 2 所示, 在越南金花茶中编码亮氨酸的密码子数量最多, 而编码半胱氨酸的密码子数量最少。此外, 除了蛋氨酸(AUG)和色氨酸(UGG) (RSCU=1.00)没有密码子偏好外, 大多数氨基酸显示出密码子偏向。越南金花茶中几乎所有 RSCU 值较高(RSCU>1.30)的密码子在第三密码子中显示出较高的 A/U 偏好, 这种密码子的使用模式可能是由高比例的 A/T 组成偏向所导致。

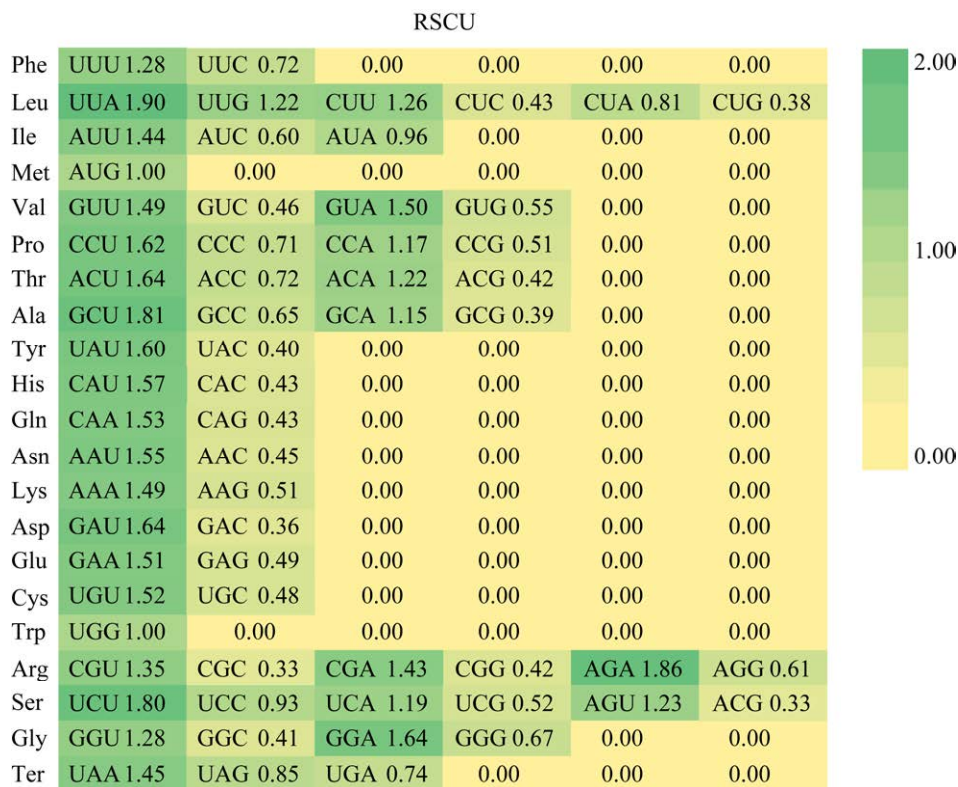


图 2 越南金花茶叶体基因组密码子使用率 图中颜色表示 RSCU 值, 随着颜色由浅黄色变为深绿色, 密码子使用率增加

Figure 2 RSCU values of chloroplast genomes in *Camellia insularis*. The colors here represent RSCU values, and codon usage increases as the color changes from light yellow to dark green.

2.3 越南金花茶叶体基因组 SSR 分析

简单重复序列(SSR)由几个(通常为 1 到 6 个)碱基组成的基序(motif)串联而成, 通常重复出现 5–50 次。本研究利用 MISA 软件在越南金花茶叶体基因组中鉴定到了 67 个 SSR 位点(图 3), 其中 A/T 单核苷酸重复最多, 为 48 个。此外, A/T、AT/AT 和 AAAT/ATTT 重复基序占 82.09%, 表明越南金花茶 SSR 偏好使用 A 和 T 碱基(图 3)。

2.4 越南金花茶叶体基因组 IR/SC 边界收缩扩张分析

为了观察 IR 区的收缩和扩张, 对越南金花茶与其 4 个近缘种云南金花茶(*C. fascicularis*)、贵州金花茶(*C. huana*)、富宁金花茶(*C. mingii*)和小瓣金花茶(*C. parvipetala*)叶绿体基因组进行了边界比较分析, 发现叶绿体基因组的结构十

分保守, 但也存在一些差异(图 4)。 *rpl22*、*rps19*、*rpl2*、*ycf1*、*ndhF*、*trnH-GUG* 和 *psbA* 等基因存在于 LSC/IRb(JLB)、IRb/SSC(JSB)、SSC/IRa(JSA)和 IRa/LSC(JLA)边界的交界处。

在 LSC/IRb 边界, 4 种金花茶叶体基因组都分布在 *rps19* 基因内, 其中 233 bp 的 *rps19* 基因位于 LSC 区, 46 bp 延伸至 IRb, 然而, 由于 LSC 区域边界的扩张, 小瓣金花茶的 *rps19* 基因完全位于 LSC 区域, 距离 LSC/IRb 边界 90 bp。IRb/SSC 边界有很大差异, 越南金花茶和贵州金花茶的 *ndhF* 跨越了边界, 分别有 39、28 bp 进入了 IRb 区域, 其余 3 种金花茶叶体基因组的 *ndhF* 基因都位于 SSC 区。此外, 越南金花茶、云南金花茶和贵州金花茶的这些边界位于 *ycf1* 假基因内, 由于 IRa 区域边界的收缩, 在富

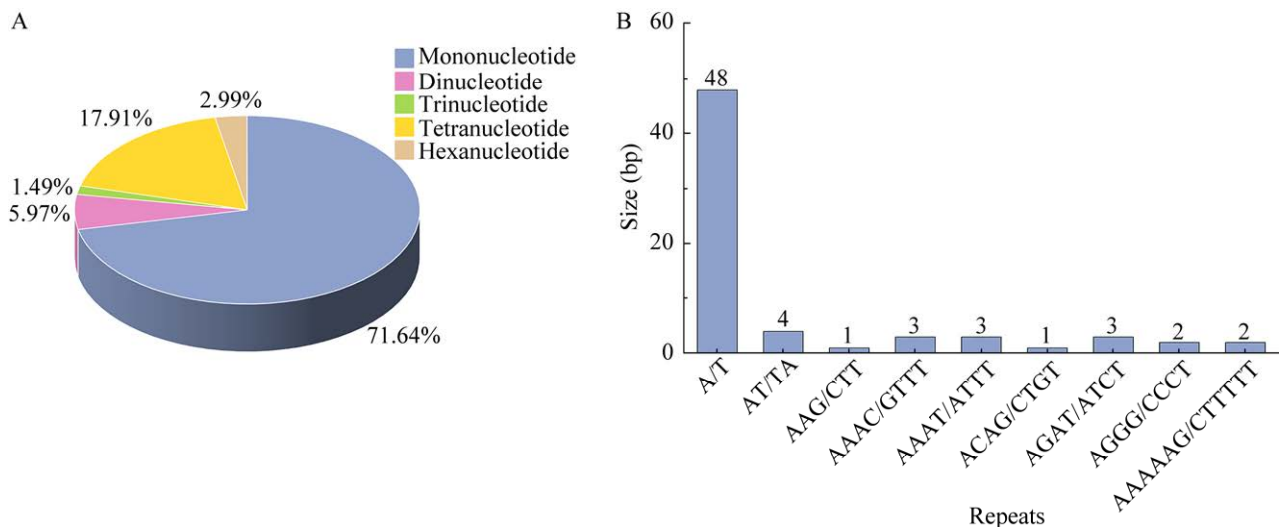


图 3 越南金花茶叶绿体基因组的 SSRs 分布 A: 单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸和六核苷酸重复序列所占的比例. B: 越南金花茶叶绿体基因组中检测到的不同类型 SSR 的大小

Figure 3 Distribution of simple sequence repeats (SSRs) of the *Camellia insularis* chloroplast genome. A: The proportion of mononucleotide, dinucleotide, trinucleotide, tetranucleotide and hexanucleotide SSRs. B: Size of different SSR types detected in the *C. insularis* chloroplast genome.

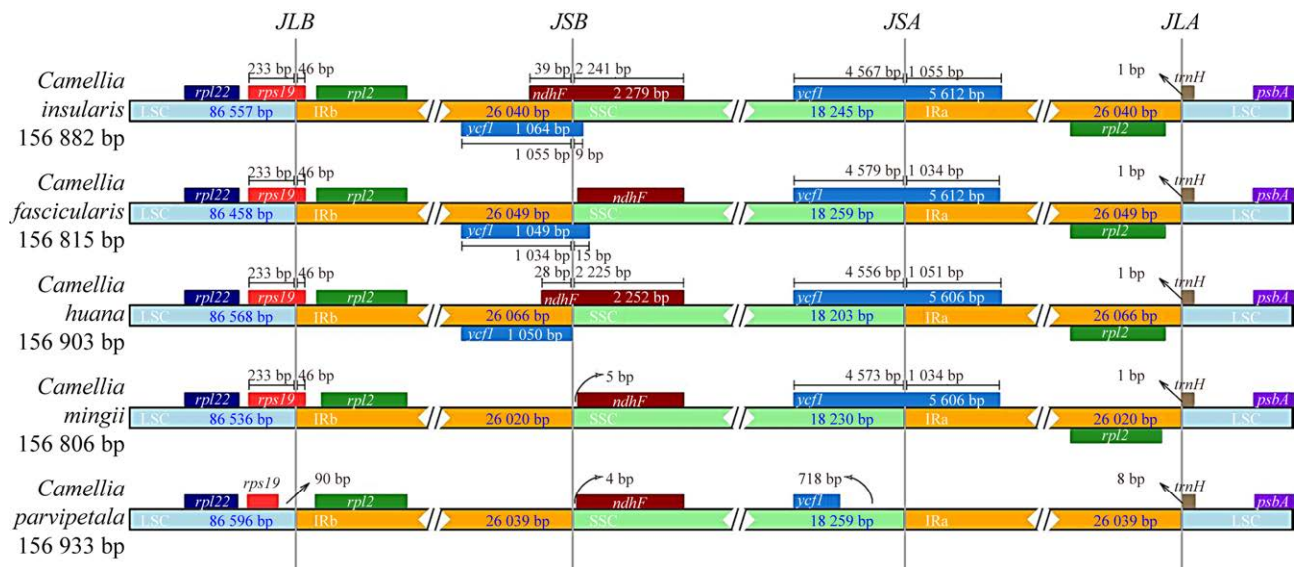


图 4 叶绿体基因组 IR/SC 边界分析 图中不同颜色表示叶绿体基因组的 4 个区域以及基因类型

Figure 4 IR/SC boundary analysis of chloroplast genomes. The colors here represent four regions and type of genes of chloroplast genomes.

宁金花茶和小瓣金花茶中未观察到 IRb/SSC 区域的 *ycf1* 假基因。*ycf1* 基因也位于 SSC/IRa 边界，这些 *ycf1* 基因有 1 034–1 055 bp 包含在 IRa 区，只有小瓣金花茶除外，该物种中的 *ycf1* 基因完全位于 SSC 区，距离 IRa/SSC 边界 718 bp。在 IRa/LSC 边界处，*trnH* 完全位于 LSC 区域，然

而，除小瓣金花茶之外，*rpl2* 的拷贝基因被完整保留在 IRa 区域中。

2.5 越南金花茶叶绿体基因组系统进化分析

使用最适模型 TVM+F+I+R4 对 30 种金花茶物种的全叶绿体基因组构建系统发育树。结果表明(图 5)，以大头茶为外群，将这 30 个金花

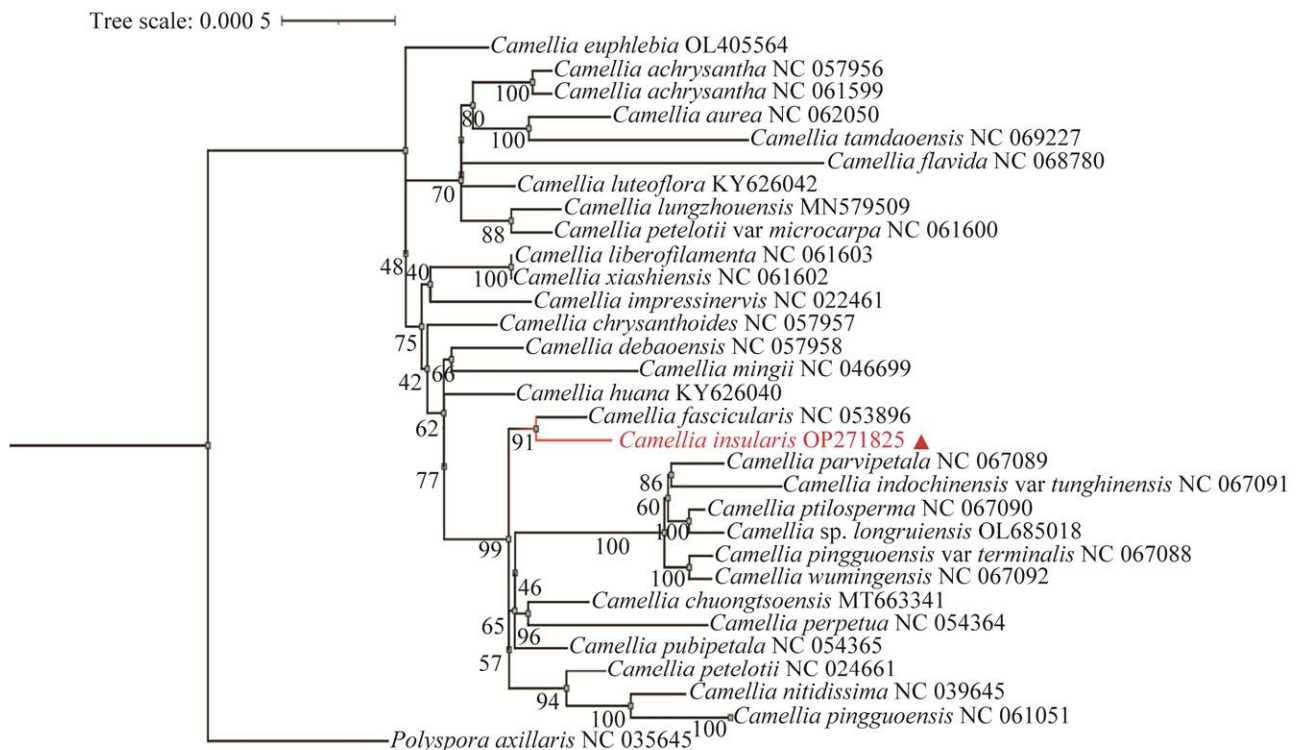


图5 越南金花茶等30个金花茶植物的叶绿体全基因组系统发育树构建

Figure 5 Construction of a genome-wide phylogenetic tree of chloroplasts from 30 yellow *Camellia* species including *Camellia insularis*.

茶物种分为了三支。第一支为显脉金花茶；第二支为中东金花茶、柠檬金花茶、五室金花茶、三岛金花茶、淡黄金花茶、小黄花茶、龙州金花茶和小果金花茶；第三支包含了21个金花茶物种，其中越南金花茶与云南金花茶有较近的亲缘关系，且自展支持率为91%。

3 讨论

金花茶组植物拥有美丽的花朵和广泛的生物活性，在育种以及传统中药和商业茶叶生产中具有极大的经济价值^[26]。近年来，越南北部和中国南部相继报道了许多金花茶组植物的新种^[27-30]，目前已经发现的新种数量超过50种^[31]。然而，只有少数金花茶组植物的叶绿体基因组数据被报道，这阻碍了对其进

化和分类学的理解。本研究对越南金花茶的叶绿体基因组进行了测序和分析，越南金花茶完整的叶绿体基因组长度为156 882 bp，具有典型的四方结构，包括一个大的单拷贝(86 557 bp)和一个小的单拷贝(18 245 bp)区域，由一对长度为26 040 bp的反向重复区分隔开(图1)。据统计，越南金花茶叶体基因组有132个基因，其中包括88个蛋白编码基因、36个tRNA基因和8个rRNA基因(表1，表2)。总的GC含量为37.31%，这与其他金花茶组物种的GC含量(37.32%–37.33%)存在细微的差异^[32-33]。

密码子的使用在塑造叶绿体基因组的进化中起着至关重要的作用^[34]，一个氨基酸通常由多个密码子(同义密码子)编码，在植物进化中，同义密码子在选择压力下通常表现出不同

的使用偏好性^[35-36]。本研究对越南金花茶叶绿体基因组的相对同义密码子使用度(RSCU)进行了统计,蛋白编码基因总共由 26 312 个密码子编码,与大多数被子植物相同,亮氨酸和异亮氨酸密码子是越南金花茶叶绿体中最常见的密码子,而半胱氨酸密码子是最罕见的^[37-38]。此外,在越南金花茶中,RSCU 值大于 1.00 的密码子大部分以 A/U 碱基结尾(图 2),这与其他金花茶组植物叶绿体基因组中以 A/U 结尾的密码子使用偏好性相似^[39],反映了密码子的偏向性使用,而这些受到偏好的密码子会被更准确和有效地翻译^[40]。因此,通过对越南金花茶密码子使用情况的研究,将为今后采用叶绿体基因工程改良金花茶性状的技术研究提供参考。简单重复序列(SSR)也称微卫星,是一种广泛存在于基因组中的 DNA 序列^[41]。SSR 是常见的遗传分子标记,在群体遗传学和系统发育分析研究中有着广泛的应用^[42-44]。利用 MISA 对越南金花茶叶绿体基因组中的 SSR 进行鉴定,共鉴定出 67 个 SSR,其中单核苷酸 SSR 最丰富,A/T 单核苷酸重复和 AT/TA 二核苷酸重复是最常见的(图 3)。具有 AT 丰富度的 SSR 在其他植物中已有报道^[45-47]。本研究中涉及 SSR 的信息将为遗传多样性研究提供分子标记,为今后金花茶组物种的种质资源保护和合理开发提供依据。

IR 区边界的收缩和扩张是叶绿体基因组常见的进化事件,可能会导致叶绿体基因组的大小变化^[48]。将越南金花茶的叶绿体基因组与 4 个近缘物种进行了比较,发现越南金花茶、云南金花茶和贵州金花茶的叶绿体基因组在 5 个金花茶组植物的 IR 区中差异最小,三者 IR 区的收缩和扩张方面无明显差异(图 4)。因此,IR 区边界分析在很大程度上表明越南金花茶、云南金花茶和贵州金花茶的亲缘关系非常近,而

与富宁金花茶和小瓣金花茶的亲缘关系相对较远。基于越南金花茶叶绿体基因的系统进化分析显示,越南金花茶与云南金花茶聚为一支(91%),两者亲缘关系最为紧密(图 5)。本文的拓扑结构与丁祥青等^[32-33]利用叶绿体片段序列进行的 4 种金花茶及抱茎金花茶系统发育研究结果较为相似,这说明金花茶组物种的种间关系是高度稳定的,未来可以利用叶绿体基因组和核基因组,结合更多的金花茶组物种和栽培品种,更加系统、全面地探索金花茶组植物的进化和发展。

4 结论

金花茶组的所有物种都是国家二级重点保护野生植物,具有很高的观赏价值和较好的药用开发前景。叶绿体基因组包含大量可利用的遗传信息。目前,国内外对金花茶组植物叶绿体基因组的研究较少。因此,通过研究越南金花茶叶绿体基因组的遗传信息来探讨其遗传进化和系统发育具有极其重要的意义。本研究对越南金花茶的完整叶绿体基因组进行了测序和组装,结果表明,越南金花茶叶绿体基因组具有高度保守的结构,与其他被子植物相似。在叶绿体基因组注释的基础上,分析了基因组的结构特征、边界特征和进化关系,SSR 位点的分析提供了潜在的遗传标记,系统发育分析表明越南金花茶与云南金花茶亲缘关系较近。这些结果丰富了金花茶组植物的叶绿体基因组数据,并为金花茶组植物的进化和发展提供了重要的遗传资源。

REFERENCES

- [1] 韦霄,蒋运生,韦记青,陈宗游,王满连,赵瑞锋. 珍稀濒危植物金花茶地理分布与生境调查研究[J]. 生态环境, 2007, 16(3): 895-899.
WEI X, JIANG YS, WEI JQ, CHEN ZY, WANG ML, ZHAO SF. Investigation on the geographical

- distribution and habitat of *Camellia nitidissima*[J]. Ecology and Environment, 2007, 16(3): 895-899 (in Chinese).
- [2] 陈永欣, 吕淑娟, 韦锦斌. 金花茶化学成分和药理作用研究进展[J]. 广西中医药, 2013, 36(1): 4-6.
CHEN YX, LV SJ, WEI JB. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Camellia chrysantha*[J]. Guangxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 36(1): 4-6 (in Chinese).
- [3] 国家林业和草原局. 国家林业和草原局 农业农村部公告 2021 年第 15 号《国家重点保护野生植物名录》[EB/OL]. (2021-09-08) [2023-03-03].
National Forestry and Grassland Administration. Announcement of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the National Forestry and Grassland Administration No.15 of 2021 “National Key Protected Wild Plants List”[EB/OL]. (2021-09-08) [2023-03-03] (in Chinese).
- [4] 陈雪梅, 林玮, 玄祖迎, 熊秉红, 涂智金, 薛克娜. 7 种金花茶组植物叶片营养成分分析[J]. 亚热带植物科学, 2021, 50(3): 170-174.
CHEN XM, LIN W, XUAN ZY, XIONG BH, TU ZJ, XUE KN. Comparison of main active ingredient contents in leaves of 7 species of *Camellia* sect. *chrysantha*[J]. Subtropical Plant Science, 2021, 50(3): 170-174 (in Chinese).
- [5] 李志辉, 蒋昌杰, 漆娅, 罗燕英, 李桂娥, 黄晓娜. 红顶金花茶在广西南宁的扩繁技术研究[J]. 农业研究与应用, 2019, 32(2): 1-4.
LI ZH, JIANG CJ, QI Y, LUO YY, LI GE, HUANG XN. The multiplication technology of *Camellia insularis* in Nanning[J]. Agricultural Research and Application, 2019, 32(2): 1-4 (in Chinese).
- [6] 何秋梅, 高慧, 白燕远, 何志鹏, 吴梦丽, 侯小涛, 邓家刚, 谢阳姣. 越南金花茶化学成分差异及基于表型性状的亲缘关系分析[J]. 中草药, 2022, 53(2): 557-568.
HE QM, GAO H, BAI YY, HE ZP, WU ML, HOU XT, DENG JG, XIE YJ. Analysis of difference in chemical composition and phenotypic characteristics related genetic relationships of *Camellia insularis* samples[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2022, 53(2): 557-568 (in Chinese).
- [7] DANIELL H, LIN CS, YU M, CHANG WJ. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering[J]. Genome Biology, 2016, 17(1): 1-29.
- [8] WANG YF, WEN F, HONG X, LI ZL, MI YL, ZHAO B. Comparative chloroplast genome analyses of *Paraboea* (Gesneriaceae): insights into adaptive evolution and phylogenetic analysis[J]. Frontiers in plant science, 2022, 13: 1019831.
- [9] DONG WL, WANG RN, ZHANG NY, FAN WB, FANG MF, LI ZH. Molecular evolution of chloroplast genomes of orchid species: insights into phylogenetic relationship and adaptive evolution[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(3): 716.
- [10] WU Q, TONG W, ZHAO HJ, GE RH, LI RP, HUANG J, LI FD, WANG YL, MALLANO AI, DENG WW, WANG WJ, WAN XC, ZHANG ZZ, XIA EH. Comparative transcriptomic analysis unveils the deep phylogeny and secondary metabolite evolution of 116 *Camellia* plants[J]. The Plant Journal, 2022, 111(2): 406-421.
- [11] LIU SL, PEI SY, HUANG L, TANG SQ. The complete chloroplast genome of *Camellia nitidissima* (Theaceae)[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2020, 5(3): 2228-2230.
- [12] WU X, HE FL, PAN HF, NING ZL. Characterization of the plastome of *Camellia pingguoensis* (Theaceae), an endangered and endemic yellow *Camellia* species in China[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2020, 5(3): 3527-3528.
- [13] FAN YY, YE XX, WEI M, LI B, ZHU YL, ZHOU XW. The complete chloroplast genome sequence of rare and endangered *Camellia pubipetala* Y. Wan & S. Z. Huang (Theaceae) of south China[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2021, 6(10): 2893-2895.
- [14] ALLEN GC, FLORES-VERGARA MA, KRASYNANSKI S, KUMAR S, THOMPSON WF. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide[J]. Nature Protocols, 2006, 1(5): 2320-2325.
- [15] 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): 1-31.
- [16] 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.
- [17] TILLICH M, LEHWARK P, PELLIZZER T, ULBRICHT-JONES ES, FISCHER A, BOCK R, GREINER S. GeSeq-versatile and accurate annotation of organelle genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2017,

- 45(W1): W6-W11.
- [18] CHAN PP, LIN BY, MAK AJ, LOWE TM. tRNAscan-SE 2.0: improved detection and functional classification of transfer RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(16): 9077-9096.
- [19] 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.
- [20] GUPTA SK, BHATTACHARYYA TK, GHOSH TC. Synonymous codon usage in *Lactococcus lactis*: mutational bias versus translational selection[J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2004, 21(4): 527-535.
- [21] 王婧, 王天翼, 王罗云, 张建国, 曾艳飞. 沙枣叶绿体全基因组序列及其使用密码子偏性分析[J]. *西北植物学报*, 2019, 39(9): 1559-1572.
- WANG J, WANG TY, WANG LY, ZHANG JG, ZENG YF. Assembling and analysis of the whole chloroplast genome sequence of *Elaeagnus angustifolia* and its codon usage bias[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, 39(9): 1559-1572 (in Chinese).
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] KATO H, STANDLEY D. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30: 772-780.
- [25] MINH B, SCHMIDT H, CHERNOMOR O, SCHREMPF D, WOODHAMS M, von HAESLER A, LANFEAR R. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2019, 37: 1530-1534.
- [26] 贺栋业, 李晓宇, 王丽丽, 张萍, 李淑英, 徐永平. 金花茶化学成分及药理作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(3): 231-234.
- HE DY, LI XY, WANG LL, ZHANG P, LI SY, XU YP. Chemical constituents and pharmacological effects of *Camellia nitidissima*[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2016, 22(3): 231-234 (in Chinese).
- [27] OREL G, CURRY AS. In Pursuit of Hidden *Camellias*: 32 new *Camellia* Species from Vietnam and China[M]. 2nd ed. Sydney: Theaceae Exploration Associates, 2015: 339.
- [28] LUONG VD, LE NHN. 陈氏金花茶 (*Camellia nihil*): 越南金花茶一新种[C]// 国际茶花协会: 2016 大理国际茶花大会论文集, 2016:70-72.
- LUONG VD, LE NHN. *Camellia nihil*, a new species of *Camellia* in Vietnam[C]// International *Camellia* Association: 2016 Dali International *Camellia* Conference Collection, 2016: 70-72 (in Chinese).
- [29] LE N, UEMATSU C, KATAYAMA H, NGUYEN L, TRAN N, LUONG DV, HOANG ST. *Camellia tuyenquangensis* (Theaceae), a new species from Vietnam[J]. *PhytoKeys*, 2020, 153: 1-11.
- [30] NGUYEN LT, TRAN N, CHIYOMI U, HIRONORI K, van LUONG D, HOANG ST, DANH NGUYEN K, NGUYEN HV, THAI TC. Two new species of *Camellia* (Theaceae) from Vietnam[J]. *Korean Journal of Plant Taxonomy*, 2018, 48(2): 115-122.
- [31] 唐绍清, 施苏华, 钟杨, 王燕. 基于 ITS 序列探讨山茶属金花茶组的系统发育关系[J]. *广西植物*, 2004, 24(6): 488-492, 487.
- TANG SQ, SHI SH, ZHONG Y, WANG Y. Phylogenetic relationships of golden camelias (sect. *Chrysantha*, *Camellia*) in China: evidence from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA[J]. *Guihaia*, 2004, 24(6): 488-492, 487 (in Chinese).
- [32] 丁祥青, 李文芳, 吴丽君, 陈义堂, 王子墨, 郑宏, 郑航, 邹双全. 4 种金花茶叶绿体基因组的比较分析[J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1255.s.20221130.0944.001.html>.
- DING XQ, LI WF, WU LJ, CHEN YT, WANG ZM, ZHENG H, ZHENG H, ZOU SQ. Chloroplast genome characteristics and genetic relationship of yellow *Camellia*[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1255.s.20221130.0944.001.html> (in Chinese).
- [33] 丁祥青, 毕远洋, 陈佳婷, 向双, 练芳松, 李文芳, 吴丽君, 邹双全. 抱茎金花茶 (*Camellia tienii*) 的叶绿体基因组特征分析[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(23): 33-40.
- DING XQ, BI YY, CHEN JT, XIANG S, LIAN FS, LI WF, WU LJ, ZOU SQ. Analysis of chloroplast genome characteristics of *Camellia tienii*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2022, 50(23): 33-40 (in Chinese).

- [34] LI B, LIN FR, HUANG P, GUO WY, ZHENG YQ. Complete chloroplast genome sequence of *Decaisnea insignis*: genome organization, genomic resources and comparative analysis[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 10073.
- [35] MA LN, CUI P, ZHU J, ZHANG ZH, ZHANG Z. Translational selection in human: more pronounced in housekeeping genes[J]. Biology Direct, 2014, 9(1): 1-11.
- [36] LIU K, WANG R, GUO XX, ZHANG XJ, QU XJ, FAN SJ. Comparative and phylogenetic analysis of complete chloroplast genomes in eragrostideae (Chloridoideae, Poaceae)[J]. Plants, 2021, 10(1): 109.
- [37] SONG WC, JI CX, CHEN ZM, CAI HH, WU XM, SHI C, WANG S. Comparative analysis the complete chloroplast genomes of nine *Musa* species: genomic features, comparative analysis, and phylogenetic implications[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 832884.
- [38] SHAHZADI I, Abdullah, MEHMOOD F, ALI Z, AHMED I, MIRZA B. Chloroplast genome sequences of *Artemisia maritima* and *Artemisia absinthium*: comparative analyses, mutational hotspots in genus *Artemisia* and phylogeny in family Asteraceae[J]. Genomics, 2020, 112(2): 1454-1463.
- [39] 丁祥青, 陈丝雨, 陈佳婷, 毕远洋, 曾姣艳, 邹双全. 11 种金花茶叶绿体基因组密码子偏好性分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1255.S.20230227.0939.002.html>.
DING XQ, CHEN SY, CHEN JT, BI YY, ZENG JY, ZOU SQ. Codon bias analysis of 11 yellow *Camellia* chloroplast genome[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1255.S.20230227.0939.002.html> (in Chinese).
- [40] HERSHBERG R, PETROV DA. Selection on codon bias[J]. Annual Review of Genetics, 2008, 42: 287-299.
- [41] 杨维泽, 金航, 崔秀明, 沈涛, 杨美权, 张金渝. 三种人参属植物的 EST-SSR 信息分析及其在三七中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 62-71.
YANG WZ, JIN H, CUI XM, SHEN T, YANG MQ, ZHANG JY. Analysis on EST-SSR of three species in genus *Panax* and the application in *Panax notoginseng*[J]. Genomics and Applied Biology, 2011, 30(1): 62-71 (in Chinese).
- [42] 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]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(3): 673-690.
- [43] KERSTIN D, HODKINSON TREVOR R, SUSANNE B. New chloroplast microsatellite markers suitable for assessing genetic diversity of *Lolium perenne* and other related grass species[J]. Annals of Botany, 2012, 110(6): 1327-39.
- [44] HUANG J, YANG XT, ZHANG CM, YIN X, LIU SP, LI XG. Development of chloroplast microsatellite markers and analysis of chloroplast diversity in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* mill.) and wild jujube (*Ziziphus acidojujuba* mill.)[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0134519.
- [45] XIONG Y, XIONG YL, SHU X, YU QQ, LEI X, LI DX, YAN JJ, BAI SQ, MA X. Molecular phylogeography and intraspecific divergences in Siberian wildrye (*Elymus sibiricus* L.) wild populations in China, inferred from chloroplast DNA sequence and cpSSR markers[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 862759.
- [46] DENG Q, ZANG H, HE Y, WANG T, SU Y. Chloroplast microsatellite markers for *Pseudotaxus chienii* developed from the whole chloroplast genome of *Taxus chinensis* var. *mairei* (Taxaceae)[J]. Applications in plant sciences, 2017, 5(3): apps. 1600153.
- [47] ASAF S, LATIF KHAN A, KHAN MA, SHAHZAD R, LUBNA, KANG SM, AL-HARRASI A, AL-RAWAHI A, LEE IJ. Complete chloroplast genome sequence and comparative analysis of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) with related species[J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0192966.
- [48] LI YG, XU WQ, ZOU WT, JIANG DY, LIU XH. Complete chloroplast genome sequences of two endangered *Phoebe* (Lauraceae) species[J]. Botanical Studies, 2017, 58(1): 1-10.

(本文责编 郝丽芳)