

基于叶绿体基因组的中国水麦冬科系统发育研究

王璐瑶 周全 樊国有 袁庆 张晶晶 刘海瑞

PHYLOGENY OF JUNCAGINACEAE IN CHINA BASED ON COMPLETE CHLOROPLAST GENOME

WANG Lu-Yao, ZHOU Quan, FAN Guo-You, YUAN Qing, ZHANG Jing-Jing, LIU Hai-Rui

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2025.2024.0349>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

异尾次目寄居蟹总科线粒体基因组比较分析及系统发育研究

COMPARATIVE ANALYSIS ON COMPLETE MITOGENOME OF PAGUROIDEA (ANOMURA) AND ITS PHYLOGENETIC IMPLICATIONS

水生生物学报. 2024, 48(2): 324–333 <https://doi.org/10.7541/2023.2023.0160>

陆川小笠贝线粒体全基因组测序及笠贝科系统发育分析

COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME SEQUENCING OF *LOTTIA LUCHUANA* AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE FAMILY LOTTIIDAE

水生生物学报. 2023, 47(8): 1248–1260 <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0316>

白纹方蟹线粒体基因组全序列测定及方蟹总科比较分析

THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF *GRAPSUS ALBOLINEATUS* LATREILLE AND COMPARATIVE ANALYSIS OF GRAPSOIDEA

水生生物学报. 2023, 47(8): 1237–1247 <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0259>

基于线粒体基因组全序列的鲟形目鱼类(Pisces: Acipenseriformes)的分子系统发育重建

MOLECULAR PHYLOGENY OF ACIPENSERIFORMES BASED ON COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME SEQUENCE

水生生物学报. 2021, 45(3): 487–494 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.050>

基于转录组的池蝶蚌系统发育及其遗传分析

THE PHYLOGENY AND GENETIC ANALYSIS OF THE *HYRIOPSIS SCHLEGELII* BASED ON TRANSCRIPTOME

水生生物学报. 2021, 45(3): 514–522 <https://doi.org/10.7541/2021.2019.208>

鲤sPLA₂-III基因结构、系统发育和表达特征

STRUCTURE, PHYLOGENY AND TISSUE DISTRIBUTION OF SPLA₂-III IN *CYPRINUS CARPIO*

水生生物学报. 2019, 43(6): 1172–1181 <https://doi.org/10.7541/2019.138>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2025.2024.0349

CSTR: 32229.14.SSSWXB.2024.0349

基于叶绿体基因组的中国水麦冬科系统发育研究

王璐瑶^{1*} 周全^{1,2,3*} 樊国有⁴ 袁庆¹ 张晶晶⁵ 刘海瑞¹

(1. 青海大学生态环境工程学院, 西宁 810016; 2. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 青海省海南藏族自治州麦秀林场, 黄南 811399; 5. 石家庄医学高等专科学校, 石家庄 050599)

摘要: 为探究水麦冬科(Juncaginaceae)系统发育上存在的争议, 并丰富水麦冬科物种的遗传信息资源, 研究对海韭菜(*Triglochin maritima*)和水麦冬(*Triglochin palustris*)叶绿体基因组进行测序、组装、注释和特征分析, 并重建其与相关类群的系统发育关系。海韭菜和水麦冬叶绿体基因组呈环状四分体结构, 全长分别为155881和155803 bp, 分别鉴定出了57和60个SSRs及49个长重复序列。海韭菜和水麦冬叶绿体基因组偏好使用以A/U结尾的密码子。系统发育分析表明水麦冬科两个物种聚为一支, 与其近缘类群遗传距离较远, 于78.67 MYA与眼子菜属(*Potamogeton*)、虾海藻属(*Phyllospadix*)、大叶藻属(*Zostera*)、二药藻属(*Halodule*)、针叶藻属(*Syringodium*)、川蔓藻属(*Ruppia*)构成的分支产生分化。结合物种生境与形态特征支持将水麦冬属上升为水麦冬科。研究将不仅为探究水麦冬科叶绿体基因组结构进化奠定理论基础, 也能为水麦冬科及相关类群物种保护和科学利用提供理论依据。

关键词: 水麦冬科; 叶绿体基因组特征; 系统发育; 分歧时间

中图分类号: S567.23⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2025)04-042516-13



水麦冬科(Juncaginaceae)隶属于泽泻目(Alismatales), 为一年生或多年生湿生草本, 多分布于湿地或碱滩, 在《中国维管植物生命之树》中仅记载水麦冬属(*Triglochin*)一属^[1]。水麦冬属植物全球约13种, 我国仅海韭菜(*Triglochin maritima*)和水麦冬(*Triglochin palustris*) 2种, 主要分布于我国东北及西南等湿地或碱滩^[2]。水麦冬与海韭菜作为我国重要的中药材与生态作物, 具有较高的生态价值与药用价值^[3]。目前针对水麦冬科物种的相关研究大多集中于生态价值挖掘^[4]和形态学研究等方面^[5], 而针对系统发育进行的研究较少, 因此仍然存在一定争议。自1753年林奈建立水麦冬属后, 该类群的分类学地位经过了数次修订, 在早期林奈分类系统与克朗奎斯特分类系统中^[6]根据水麦冬科的形态特征与其所处的生态位将其归于茨藻目(Najadales)。后有分子生物学研究表明水麦冬属与茨藻目其他物

种亲缘关系较远, 而与泽泻目眼子菜科物种有较近的亲缘关系, 因此将水麦冬属从茨藻目中分离出来, 归入泽泻目, 成为独立的水麦冬科^[7]。《中国植物志》^[2]与《中国高等植物图鉴》^[8]认为水麦冬属与眼子菜科(Potamogetonaceae)中许多类群存在相似的生态位且部分形态特征具有相似性, 因此将水麦冬属划分入眼子菜科, 但许多国内外学者依旧沿用水麦冬科这一名称^[9, 10]。《中国维管植物生命之树》^[1]和Mering等^[11]研究表明水麦冬属可能具有独特的进化历史和遗传背景, 且考虑到其具有眼子菜科其他物种所不具备的独特形态特征, 如叶基生等, 因此又将水麦冬属上升成科。另外, 在这一阶段^[1]大叶藻属(*Zostera*)、虾海藻属(*Phyllospadix*)、川蔓藻属(*Ruppia*)、二药藻属(*Halodule*)、针叶藻属(*Syringodium*)从眼子菜科中分离。大叶藻属和虾海藻属构成大叶藻科(Zosteraceae), 川蔓藻属上升

收稿日期: 2024-09-09; 修订日期: 2024-11-18

基金项目: 西宁市重大科技专项(2023-Z-13); 中国科学院西部之光青年学者项目(xbzglzb2022043)资助 [Supported by the Xining Science and Technology Major Project (2023-Z-13); CAS Light of West China Program (xbzglzb2022043)]

作者简介: 王璐瑶(2002—), 女, 学士; 主要研究方向为基因组学与生物信息学。E-mail: lywang1017@outlook.com 周全(2002—), 男, 硕士研究生; 主要研究方向为进化基因组学。E-mail: zhouquan0414@sina.com *共同第一作者

通信作者: 刘海瑞; 男; 副教授; 主要研究方向为植物分子系统学与物种分化。E-mail: lhrbotany@163.com

为川蔓藻科(Ruppiaceae), 二药藻属和针叶藻属归入丝粉藻科(Cymodoceaceae)。目前, 就水麦冬属是否能从眼子菜科中独立出来上升成科而言, 无论是从形态学上还是分子生物学上都能找出相应的证据, 因此迫切需要使用蕴含遗传信息更为丰富的分子证据并结合形态特征来解释系统发育上存在的争议。

叶绿体基因组相对分子量较小、拷贝数高, 易获得, 其大小大多位于107—218 kb, 已发表的被子植物完整叶绿体基因组大多为环状结构^[12]。另外, 由于其进化速率适中, 约为线粒体基因组进化速率的3倍, 是核基因组进化速率的1/3左右, 因此被广泛应用于植物系统发育研究, 较好解释了许多类群不同阶元水平上的系统发育争议^[12]。但目前针对水麦冬科及其相关类群(《中国植物志》^[2]中的眼子菜科)的完整叶绿体基因组相关研究相对薄弱, 自Luo等^[13]发表的穿叶眼子菜(*Potamogeton perfoliatus*)叶绿体基因组以来, 二药藻属、虾海藻属、眼子菜属(*Potamogeton*)、川蔓藻属、针叶藻属、大叶藻属均有完整叶绿体基因组报道(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 但水麦冬属和波喜荡属(*Posidonia*)尚未见完整叶绿体基因组。目前该类群已报道的叶绿体基因组均为环状四分体结构。

本研究的主要研究内容: (1)报道中国水麦冬科2个物种完整叶绿体基因组, 并从基因组成、密码子偏好性和重复序列等方面对其进行解析, 进一步丰富该类群的遗传信息资源。(2)比较水麦冬科物种及其近缘类群叶绿体基因组存在的序列结构差异, 为该类群叶绿体基因组结构进化提供参考资料。(3)利用叶绿体基因组中蕴含的遗传信息重建水麦冬科及近缘类群的系统发育关系, 并进行分歧时间的估算, 为该类群的多样性研究和分类学地位确定提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 物种采集与测序

海韭菜和水麦冬均于2021年7月16日采自青海省海西州都兰县河滩湿地(36°13'N, 98°09'E)。基于天根DP305试剂盒使用改良的CTAB法^[14]提取海韭菜和水麦冬的总DNA。然后, 使用VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3试剂盒构建测序文库。最后, 使用Illumina Novaseq 6000平台进行PE 150测序。使用Trimmomatic^[15]对获取到的raw data进行质控, 移除接头序列后, 以4 bp为窗口, 剔除碱基质量Q15以下的序列, 在此基础上, 剔除长度小于75 bp的序列。

1.2 叶绿体基因组组装、注释与可视化

以同物种叶绿体基因组片段为参考(水麦冬: OZ078213; 海韭菜: OY821795)运用Getorganelle v1.7.7.0^[16]组装海韭菜和水麦冬完整的叶绿体基因组, k-mer参数设置为21、45、65、85和105。将双末端reads映射到叶绿体基因组, 根据覆盖度进行组装质量的评估。以水麦冬科近缘类群眼子菜科物种菹草(*Potamogeton crispus*; NC_069582)、微齿眼子菜(*Potamogeton maackianus*; NC_077521)和*Zostera muelleri* (NC_068805)叶绿体基因组作为参考, 基于Geseq^[17] (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html>)对海韭菜和水麦冬的叶绿体基因组进行基因注释, 在此过程中使用HMMER对CDS和rRNA进行预测, tRNAscan-SE v2.0.7对tRNA进行预测, BLAT对蛋白编码序列(Coding sequences; CDS)、核糖体RNA (ribosomal RNA; rRNA)和转运RNA (Transfer RNA; tRNA)进行预测。最后, 使用Sequin v15.50识别注释错误并进行调整。组装注释完成的完整叶绿体基因组上传至NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 海韭菜登录号为PQ451111, 水麦冬登录号为PQ451110。基于在线网站Chloroplast^[18] (<https://irscope.shinyapps.io/Chloroplast/>)进行海韭菜和水麦冬叶绿体基因组图谱的绘制。

1.3 密码子偏好性分析

研究表明基因长度小于300 bp的CDS会对最优密码子的筛选造成偏差^[19], 因此运用PhyloSuite v1.2.2^[20]提取海韭菜和水麦冬的叶绿体基因组蛋白质编码序列, 去除重复基因序列以及基因长度不足300 bp的蛋白编码序列, 最终分别选取54条海韭菜CDS序列和53条水麦冬CDS序列用于后续密码子偏好性研究。该部分参照NCBI数据库中公布的第11套密码子表“The Bacterial, Archaeal and Plant Plastid Code”进行。

运用CodonW v1.4.2 (<http://codonw.sourceforge.net/>)^[21]分别计算海韭菜和水麦冬叶绿体基因组蛋白编码序列及其串联序列的有效密码子数(Effective Number of Codon; ENC)、密码子适应指数(Codon Adaptation Index; CAI)及同义密码子相对使用频率(Relative Synonymous Codon Usage; RSCU), 计算公式如公式1—3所示^[21]。

$$RSCU_j = \frac{x_{ij}}{\sum x_i} \quad (1)$$

式中, x_{ij} 是编码第*i*个氨基酸的第*j*个密码子的出现次数, $\sum x_i$ 是编码第*i*个氨基酸的所有密码子的总出现次数。

$$ENC = \frac{n}{A+T+G+C} \times \left(\frac{9}{\sum \left(\frac{1}{pi} \right)} - 1 \right) + 1 \quad (2)$$

式中, n 表示基因中所使用的密码子总数, A、T、G、C分别代表各碱基的数量, pi 表示每个密码子的使用频率。

$$CAI = \left(\frac{L}{L_0} \right)^{1/3} \quad (3)$$

式中, L 表示基因中实际使用的密码子数量, L_0 表示基因中所有密码子的数量。

基于筛选后的海韭菜和水麦冬叶绿体基因组蛋白编码基因, 依据周全等^[22]的研究方法使用 Matlab R2021b分别进行奇偶偏性分析(PR2-plot)、有效密码子数分析(ENC-plot)及中性绘图分析(Neutrality plot)。在ENC-Plot分析中ENC标准曲线公式如公式4所示:

$$ENC = 2 + GC3 + \frac{29}{[GC3^2 + (1 - GC3)^2]} \quad (4)$$

式中, GC3表示蛋白编码基因密码子第三位为G/C碱基的比例。

另外, 利用 R包 ggplot、aplot和 ggprism在 R v4.3.2中对海韭菜和水麦冬叶绿体基因组蛋白质编码基因串联序列的RSCU进行可视化。鉴于终止密码子(UAA、UAG、UGA)不参与编码任何氨基酸, AUG和UGG分别为甲硫氨酸和色氨酸唯一的密码子, 因此在进行最优密码子筛选时排除这5个密码子, 以确保筛选结果的准确性和科学性^[22]。此外, 分别选取海韭菜和水麦冬叶绿体基因组蛋白编码基因串联序列中RSCU>1的密码子作为高频密码子^[23]。将海韭菜和水麦冬的叶绿体基因组蛋白编码基因按照有效密码子数从高到低进行排列, 分别筛选出6个高表达和6个低表达的基因, 以构建海韭菜和水麦冬的高、低表达基因库^[24]。计算高低表达库间RSCU差值($\Delta RSCU$), 计算公式如公式5所示:

$$\Delta RSCU_j = RSCU_{high-j} - RSCU_{low-j} \quad (5)$$

式中, $RSCU_{high-j}$ 表示 j 密码子在高表达库中的相对使用频率, $RSCU_{low-j}$ 表示 j 密码子在低表达库中的相对使用频率。

将 $\Delta RSCU \geq 0.08$ 的密码子定义为高表达优越密码子, 这些密码子在基因表达过程中具有显著的使用偏好性, 将既属于高表达优越密码子, 同时也属于高频密码子的密码子定义为最优密码子^[24]。

运用CodonW v1.4.2 (<http://codonw.sourceforge.net>)中的Correspondence Analysis of Codon Usage模

块进行对应性分析(Correspondence Analysis, COA)^[25]。基于RSCU值将所有筛选出的蛋白编码基因映射在59维的向量空间中, 每个维度对应该密码子的RSCU值, 从多维空间中提取最具影响力的轴, 将密码子偏好性形成因素映射到低纬度空间中^[26], 用以揭示影响密码子偏好性的重要因素。一般认为第1轴(Axis1)和第2轴(Axis2)上的分散程度揭示了密码子使用模式的主要演变趋势^[27]。

1.4 重复序列鉴定

基于在线网站REPuter^[28] (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/reputer>)鉴定海韭菜和水麦冬长重复序列, 参数: 最大重复次数设为50, 最小重复单元为8 bp, 查找正向重复(Forward; F)、反向重复(Reverse; R)、互补重复(Complement; C)和回文重复(Palindromic; P) 4种重复类型。另外, 使用MISA (<https://webblast.ipk-gatersleben.de/misa/>)^[29]在默认参数下检索海韭菜和水麦冬叶绿体基因组中的简单重复序列(Simple Sequence Repeat; SSRs)。

1.5 进化选择压力分析

基于海韭菜和水麦冬叶绿体基因组中共有的蛋白编码序列, 使用DnaSP v6^[30]软件对其进行选择压力分析, 通过计算非同义突变和同义突变之比(K_a/K_s)探究物种分化过程中叶绿体基因组蛋白编码基因受到正选择更强烈还是受到纯化选择作用更强烈。

1.6 共线性分析

使用Geneious v9.0.2^[31]内置的Mauve对水麦冬科及其近缘类群物种叶绿体基因组进行比较分析, 检测各物种间存在的倒位与重排现象。

1.7 遗传距离估算

在MEGA v7^[32]中使用p-distance模型在pairs模式下计算水麦冬科及其近缘类群物种间遗传距离(Genetic distance)。

1.8 系统发育分析

选取泽泻科(Alismataceae)的野慈姑(*Sagittaria trifolia*)、泽苔草(*Caldesia parnassifolia*)和天南星科(Araceae)盾叶半夏(*Pinellia peltata*)作为外类群, 结合从NCBI数据库中下载的相关类群的完整叶绿体基因组序列数据, 基于最大似然法构建我国水麦冬科及其近缘类群系统发育关系。

基于PhyloSuite v1.2.3^[20]进行最大似然树的构建, 首先采用MAFFT^[33]工具对水麦冬科及其近缘类群叶绿体基因组序列进行多序列比对, 以获得完整的叶绿体基因组比对矩阵; 其次使用Gblocks (<https://www.biologiaevolutiva.org/jcastresana/Gblocks.html>)进行保守区的筛选, 剔除高可变区在推断物种

亲缘关系中的影响; 然后使用ModelFinder^[34]依据贝叶斯信息准则(Bayesian Information Criterion, BIC)确定最佳核苷酸替换模型为GTR+R3+F; 进而使用IQ-tree^[35]进行系统发育关系构建, 其中Number of bootstrap设置为100000。

1.9 分歧时间估算

基于系统发育树的拓扑结构, 运用MCMCtree^[36]估算物种分歧时间。由于水麦冬科及其近缘类群无化石报道^[11], 因此本研究使用TimeTree^[37]中记载的二药藻属和针叶藻属分歧时间段31.1—47.6 MYA、二药藻属和大叶藻属分歧时间段46.4—83.4 MYA、水麦冬属和川蔓藻属分歧时间段38.1—83.0 MYA作为时间度量树的校正点。具体参数: 分子钟算法选择independent rates, 分子钟模型选择HKY85模型; 迭代次数设为200000次, 舍弃前10%的迭代估算结果。

2 结果

2.1 叶绿体基因组图谱与基因统计

组装得到的海韭菜和水麦冬完整叶绿体基因组平均碱基深度分别为1053.6×和1699.3×, 表明本研究组装得到的海韭菜和水麦冬叶绿体基因组较为准确。海韭菜和水麦冬二者叶绿体基因组图谱均呈现双链环状结构(图1)。海韭菜和水麦冬叶绿体基因组全长分别为155881和155803 bp, GC含量均为36.5%, 反向重复区域(Inverted Repeat Region; IR)长度分别为25437和25590 bp, 大的单拷贝区

(Large Single copy Region, LSC)长度分别为85405和85142 bp, 小的单拷贝区(Small Single copy Region; SSC)长度分别为19602和19481 bp。

海韭菜和水麦冬叶绿体基因组所编码的基因依据其各自的功能可分为四大类: 光合作用相关基因、自我复制相关基因、其他基因与未知功能基因^[38]。海韭菜叶绿体基因组中共注释出131个基因, 包括86个蛋白编码基因、8个rRNA基因和37个tRNA基因(表1); 水麦冬叶绿体基因组中共注释出132个基因, 包括86个蛋白编码基因、8个rRNA基因和38个tRNA基因, 仅比海韭菜叶绿体基因组多1个 *trnH-GUG* 基因拷贝。

2.2 密码子偏好性

海韭菜和水麦冬蛋白编码基因平均GC含量分别为37.76%和37.75%; ENC平均值分别为46.51%和46.52%; CAI平均值分别为0.166和0.165。海韭菜和水麦冬叶绿体基因组蛋白编码基因串联序列的GC1分别为45.31%和45.38%, GC2分别为37.66%和37.59%, GC3分别为28.30%和28.53%, ENC分别为48.36和48.49。

在奇偶偏性分析中, 海韭菜和水麦冬叶绿体基因组蛋白编码基因大多远离中心点, $A_3/(A_3+T_3)=0.5$ 与 $G_3/(G_3+C_3)=0.5$ 分割成的4个象限中位于第4象限的基因数量最多, 第1象限的基因数量最少(图2A); 在有效密码子数分析中, 海韭菜和水麦冬叶绿体基因组蛋白编码基因除个别基因外大多远

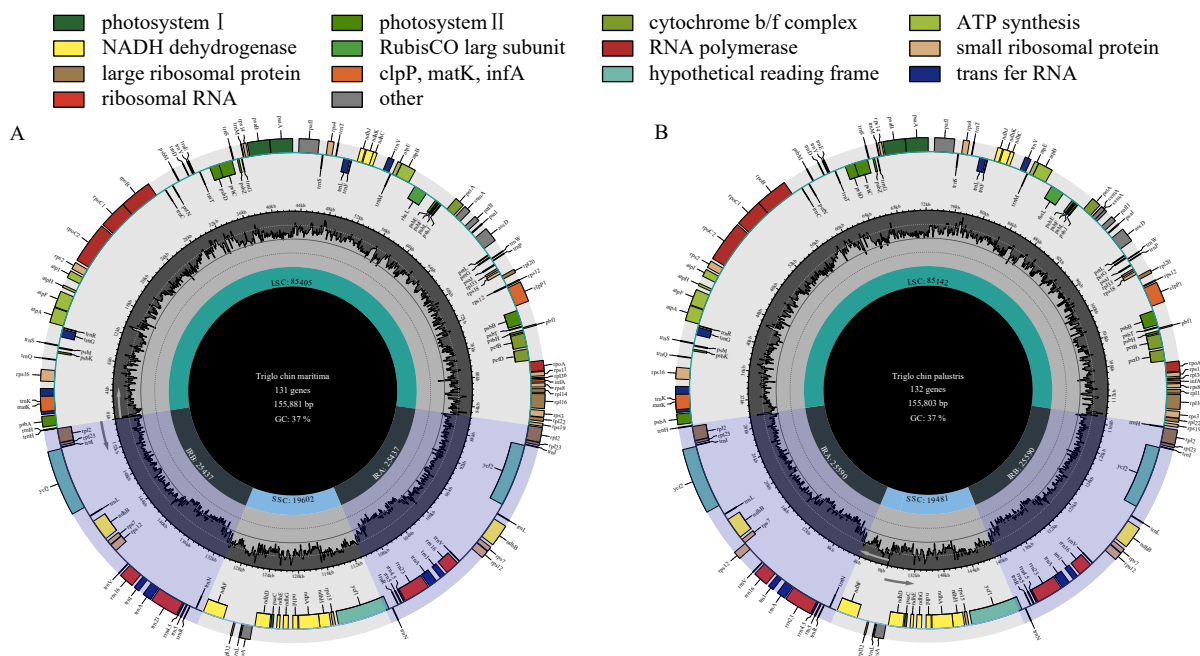


图1 水麦冬科叶绿体基因组图谱

Fig. 1 Chloroplast genomes map of Juncaginaceae

A. 海韭菜 *Triglochin maritima*; B. 水麦冬 *Triglochin palustris*

离ENC标准曲线(图 2B); 在中性绘图分析中, 海韭菜和水麦冬叶绿体基因组蛋白编码基因的GC12和GC3相关系数分别为0.369和0.366 (图 2C), 表明两个物种密码子偏好性形成过程中分别受到36.91%

和36.59%的突变影响, 受到63.09%和63.41%的自然选择影响。以上分析结果均表明自然选择在海韭菜和水麦冬叶绿体基因组密码子偏好性形成过程中具有重要影响。

表 1 海韭菜叶绿体基因组注释基因

Tab. 1 Genes contained of *Triglochin maritima* chloroplast genome

基因功能Gene function	基因类型Gene type	基因名称Gene name
光合作用相关基因 Genes for photosynthesis	光系统 I Photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>
	光系统 II Photosystem II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN(pbf1), psbT, psbZ</i>
	细胞色素b/f 复合物Cytochrome b/f complex	<i>petA, petB*, petD*, petG, petL, petN</i>
	ATP 合成酶ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF*, atpH, atpI</i>
	NADH 脱氢酶NADH dehydrogenase	<i>ndhA*, ndhB*(2), ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
	二磷酸核酮糖羧化酶大亚基Rubisco large subunit	<i>rbcL</i>
自我复制Self-replication	核糖体RNA Ribosomal RNAs	<i>rrn16(2), rrn23(2), rrn4.5(2), rrn5(2)</i>
	RNA 聚合酶亚基Subunits of RNA polymerase	<i>rpoA, rpoB, rpoC1*, rpoC2</i>
	核糖体小亚基(SSU)Small subunit of rubisco	<i>rps11, rps12**(2), rps14, rps15, rps16*, rps18, rps19, rps2, rps3, rps4, rps7(2), rps8</i>
	核糖体大亚基(LSU)Large subunit of rubisco	<i>rpl14, rpl16*, rpl2*(2), rpl20, rpl22, rpl23(2), rpl32, rpl33, rpl36</i>
	转运RNA Transfer RNAs	<i>trnA-UGC*(2), trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-GAA, trnG-GCC, trnG-UCC*, trnH-GUG, trnI-CAU(2), trnI-GAU*(2), trnK-UUU*, trnL-CAA(2), trnL-UAA*, trnL-UAG, trnM-AUG, trnN-GUU(2), trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG(2), trnR-UCU, trnS-GCU, trnS-UCC, trnS-UGA, trnT-ACA, trnT-GGU, trnV-GAC(2), trnV-UAC*, trnW-CCA, trnY-GUA, trnYM-CAU</i>
	成熟酶Maturase	<i>matK</i>
其他基因Other genes	被膜蛋白Envelop membrane protein	<i>cemA(2)</i>
	乙酰辅酶A羧化酶Acetyl-CoA carboxylase	<i>accD</i>
	c-型细胞色素合成基因 c-type cytochrome synthesis gene	<i>ccsA</i>
	蛋白酶Protease	<i>clpP1**</i>
	转录启动因子Transcription promoter	<i>infA</i>
	假定的保守叶绿体开放阅读框 Conserved hypothetical chloroplast Reading Frames	<i>ycf1, ycf2(2), ycf3(pafI)**, ycf4(pafII)</i>
未知功能基因 Unknown function genes		

注: Gene*. 此基因含有一个内含子; Gene**. 此基因含有两个内含子; Gene(2). 基因多拷贝数
Note: Gene*. Gene with one intron; Gene**. Gene with two introns; Gene(2). Number of copies of multi-copy genes

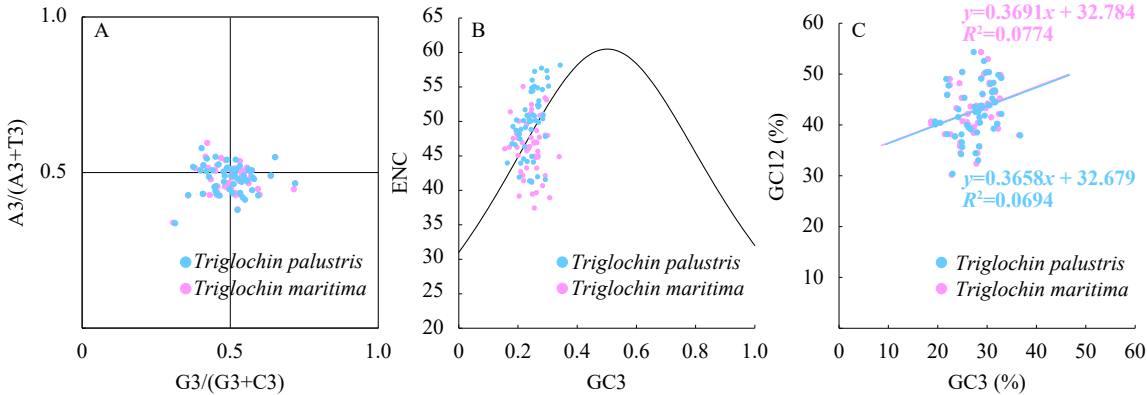


图 2 水麦冬科叶绿体基因组PR2-Plot、ENC-Plot和中性绘图分析

Fig. 2 Analysis of PR2-plot, ENC-plot, and neutrality plot of chloroplast genomes of Juncaginaceae

A. PR2-Plot; B. ENC-Plot; C. 中性绘图分析
A. PR2-Plot; B. ENC-Plot; C. neutrality-plot

海韭菜和水麦冬叶绿体基因组高频密码子均为30个(图3), 且均为28个以A/U碱基结尾, 2个以G/C碱基结尾。海韭菜和水麦冬叶绿体基因组高表达优越密码子均为18个, 且均为17个以A/U碱基结尾, 1个以G结尾。最终筛选得到UUU、UUG、AUU、GUU、GUA、UCU、CCU、GCU、GCA、CAU、CGU、AGU和AGA共计13个密码子作为水麦冬科的最优密码子, 其中有12个以A/U结尾, 仅有1个以G结尾。这表明在水麦冬科植物的叶绿体基因组中, 蛋白编码基因的密码子使用偏好趋向于使用以A或U结尾的密码子。

海韭菜和水麦冬前4个轴累计解释的变异分别占总变异的33.91%和35.11%(图4)。海韭菜和水麦冬第1轴可解释的变异分别占总变异11.31%和

11.42%; 第2轴可解释的变异分别占总变异7.97%和8.73%。海韭菜和水麦冬其他基因分布位置相对集中, 表明这类基因具有较为相似的密码子使用模式。由于前2轴仅解释了海韭菜和水麦冬叶绿体基因组密码子使用不到50%的变异, 因此海韭菜和水麦冬叶绿体基因组密码子使用偏性并非单一因素所导致的, 其影响因素较为复杂, 可能是突变压力、自然选择、基因长度、基因表达水平等影响因素共同作用的结果^[39]。

2.3 重复序列

海韭菜和水麦冬叶绿体基因组简单重复序列筛选结果表明, 海韭菜和水麦冬分别鉴定出57和60个简单重复序列, 二者仅存在单核苷酸重复和二核苷酸重复, 且单核苷酸重复数量明显高于二核苷

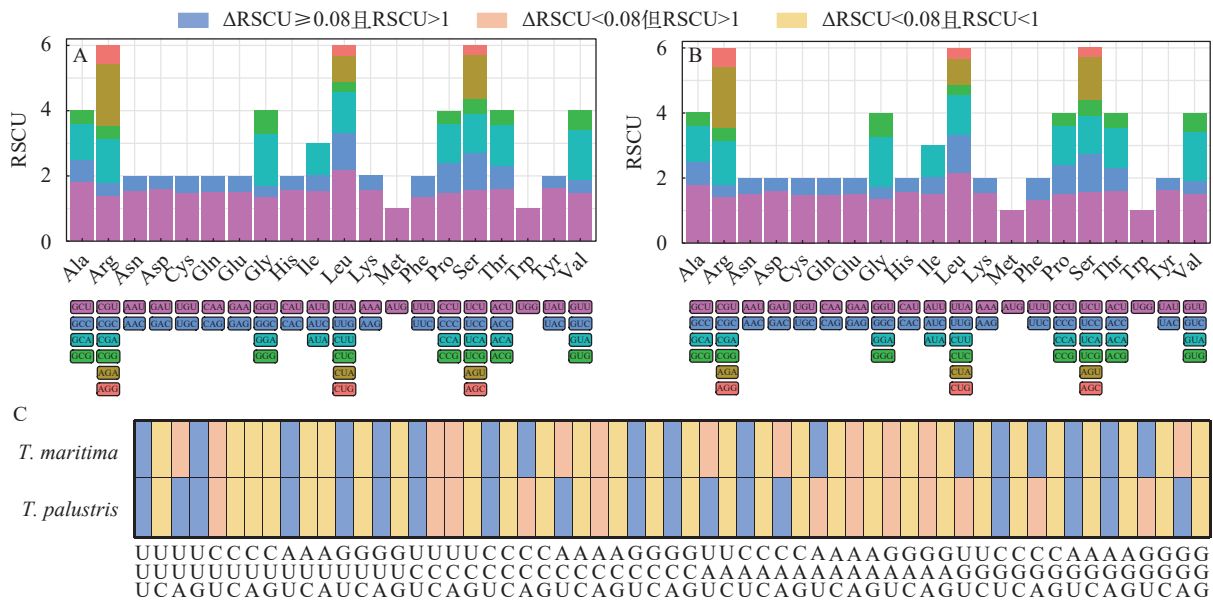


图3 水麦冬科叶绿体基因组RSCU分析与最优密码子

Fig. 3 Optimal codons analysis and RSCU analysis of chloroplast genomes of Juncaginaceae

A. 海韭菜RSCU分析; B. 水麦冬RSCU分析; C. 最优密码子

A. RSCU analysis of *Triglochin maritima*; B. RSCU analysis of *Triglochin palustris*; C. Optimal codons

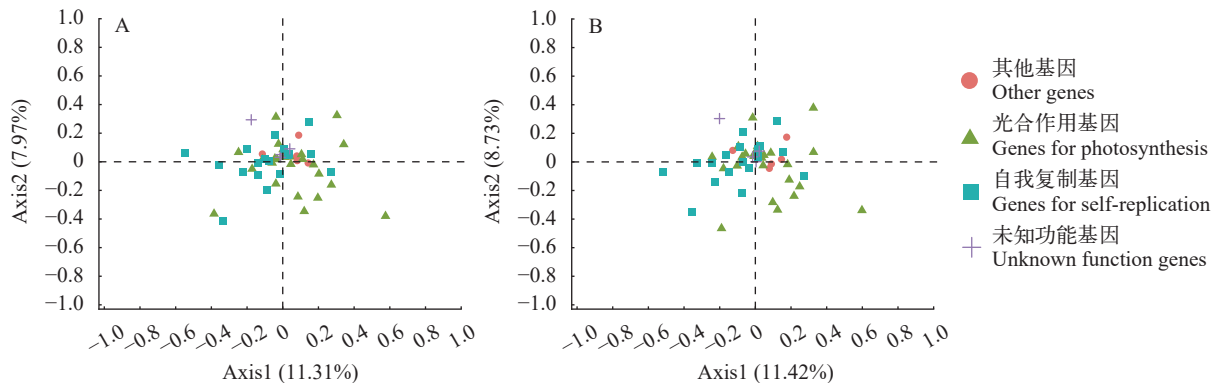


图4 水麦冬科植物基于RSCU的对应性分析

Fig. 4 Corresponding analysis based on RSCU of Juncaginaceae

A. 海韭菜 *Triglochin maritima*; B. 水麦冬 *Triglochin palustris*

酸重复(表 2)。其中海韭菜和水麦冬在单核苷酸重复中以A/T作为优势基序, 数量分别为50和55个, 分别占单核苷酸重复数目的98.2%和96.2%; 二核苷酸重复均为AT/TA重复。因此, 对于水麦冬科物种而言, 由A/T及其组合基序形成的SSRs居多, 与其他被子植物SSR组成类似。

表 2 水麦冬科叶绿体基因组简单重复序列

Tab. 2 Simple repeat sequences of chloroplast genomes of Juncaginaceae

重复类型 Repetitive type	重复碱基 Repetitive bases	数量 Repeat	最大重复单元 Maximum repeat size
单核苷酸重复 Single-nucleotide repeat	A	24/30	16/15
	C	1/1	10/10
	G	1/0	11/0
	T	26/25	15/18
二核苷酸重复 Dinucleotide repeat	AT	3/1	7/7
	TA	2/3	8/6

注: “/”前为海韭菜核苷酸重复数量或最大重复单元, 后为水麦冬核苷酸重复数量或最大重复单元

Note: “/” is preceded by the repeats or maximum repeat size of nucleotide repeats in *Triglochin maritima*, followed by the repeats or maximum repeat size of nucleotide repeats in *Triglochin palustris*

海韭菜和水麦冬叶绿体基因组中均检测到49个长重复序列(图 5)。其中, 海韭菜叶绿体基因组中存在19个回文重复、16个正向重复、12个反向重复和2个互补重复; 水麦冬叶绿体基因组中存在16个回文重复、15个正向重复、15个反向重复和3个互补重复。鉴定到的长重复序列在两个物种中主要分布在单拷贝区, 而反向重复区域分布较少, 表明海韭菜和水麦冬叶绿体基因组单拷贝区可能存在更多的重排现象。此外, 正向重复和反向重复在海韭菜和水麦冬叶绿体基因组4个区域中均存在。

2.4 进化选择压力

海韭菜和水麦冬的叶绿体基因组选择压力分析结果表明, 仅 *rpoA*、*ccsA* 和 *ycf2* 基因的 $K_a/K_s > 1$, 说明这些基因在进化过程中受到了较明显的正选择效应(图 6)。光合作用相关基因的 $K_a/K_s < 1$, 且大量蛋白编码基因存在 K_a 等于 0 的情况, 表明这类基因对于氨基酸的使用高度保守, 推测在水麦冬属两个物种分化后的光合作用环境差异不明显, 该类基因主要受纯化选择的影响。自我复制相关基因中除 *rpoA* 基因外的其他基因 K_a/K_s 也均小于 1, 表明自我复制相关基因在进化过程中也主要受到了纯化选择作用, 编码产物较为保守。综合来看, 海韭菜和水麦冬叶绿体基因组蛋白编码基因的表达产物在物种形成与进化过程中较为保守, 主要受纯化选

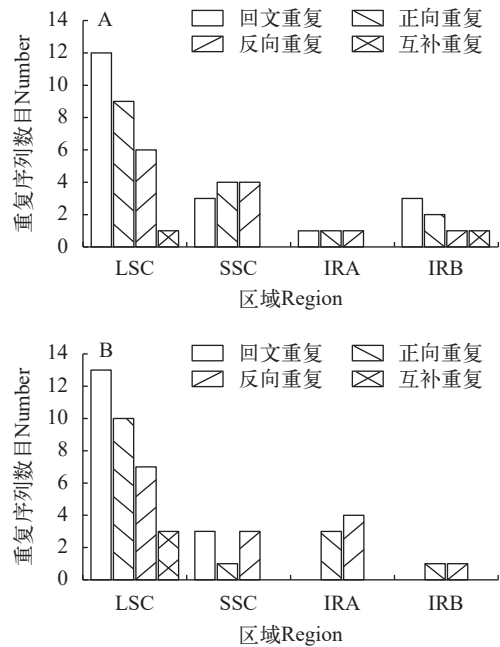


图 5 水麦冬科叶绿体基因组长重复序列

Fig. 5 Long repeat sequences of chloroplast genomes of Juncaginaceae

A. 海韭菜 *Triglochin maritima*; B. 水麦冬 *Triglochin palustris*

择的影响。

2.5 共线性

水麦冬科及近缘类群叶绿体基因组共线性分析结果表明, 在水麦冬科及其近缘类群叶绿体基因组中出现了序列倒位现象, 具体机制还需进一步探究(图 7)。

2.6 系统发育与分歧时间

基于最大似然法构建的系统发育树所有分支的 Bootstrap 值均为 100, 表明本研究基于叶绿体基因组重建的水麦冬科及其近缘类群的系统发育关系较为可靠, 叶绿体基因组能作为种水平上的分类依据。结果显示, 同属物种聚为一支, 水麦冬属位于系统发育树的基部位置, 与丝粉藻科、川蔓藻科、眼子菜科和大叶藻科构成的分支为姐妹类群。川蔓藻科与丝粉藻科聚为一支, 眼子菜科与大叶藻科聚为一支。大叶藻属和虾海藻属构成的分支与眼子菜属为姐妹类群(图 8)。

水麦冬科、大叶藻科、川蔓藻科、丝粉藻科和眼子菜科的最近共同祖先位于 78.67 MYA 左右, 随后分化成两支, 其中一支于 4.40 MYA 分化成海韭菜与水麦冬; 另外一支于 56.51 MYA 分化出了川蔓藻科、丝粉藻科的共同祖先和大叶藻科和眼子菜科的共同祖先。后于 44.49 MYA 大叶藻科与眼子菜科出现分化, 20.49 MYA 川蔓藻科和丝粉藻科产生分化。

Fig. 7 Collinearity analysis of chloroplast genomes of Juncaginaceae and closely related tax

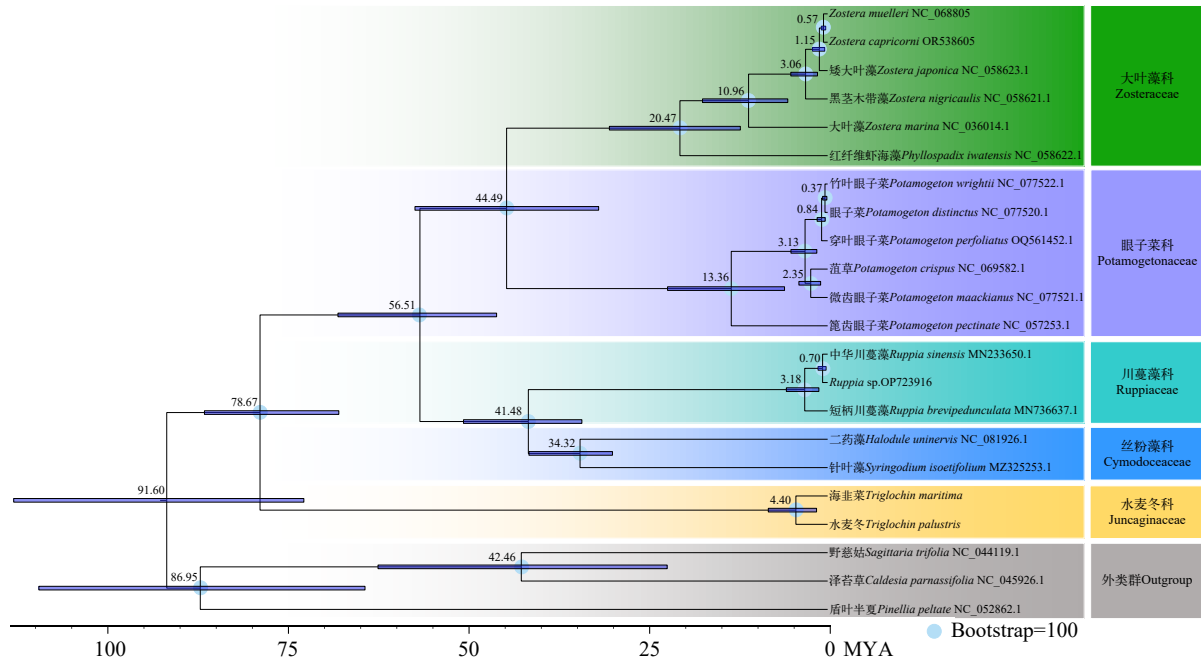


图 8 水麦冬科及近缘类群时间度量树

Fig. 8 Time metric tree of Juncaginaceae and closely related taxa

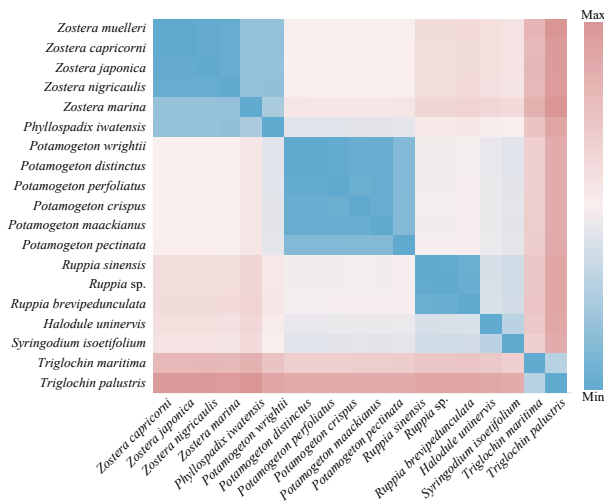


图 9 水麦冬科及近缘类群叶绿体基因组遗传距离

Fig. 9 Genetic distance of Juncaginaceae and closely related taxa based on chloroplast genomes

个物种与其他物种遗传距离均大于0.1, 远大于水麦冬科内的遗传距离。

3 讨论

3.1 叶绿体基因组特征与环境适应

叶绿体基因组是植物细胞中重要的遗传物质, 它包含了与光合作用、能量转化和调节等相关的一系列基因^[12]。叶绿体基因组的特征与物种的适应性之间存在着密切的关系, 这些特征通过影响植物的生理功能和代谢途径, 进而影响物种的生态分

布, 例如生存在严寒和干旱环境的植物往往GC含量高的密码子使用频率增加^[40]。

水麦冬和海韭菜叶绿体基因组均呈现典型的环状四分体结构, 未出现各分区的明显收缩与扩张现象^[41, 42], 且二者在基因组长度和GC含量方面展现出较高的相似性。水麦冬相较于海韭菜多了一个 *trnH-GUG* 基因拷贝, 但GUG密码子RSCU在海韭菜中比水麦冬高($RSCU_{\text{海韭菜-GUG}}=0.59$; $RSCU_{\text{水麦冬-GUG}}=0.57$)。若不考虑细胞质中转移而来的tRNA, 这一现象与tRNA基因的拷贝数越多, tRNA丰度越高, 其利用率越高, 对应的密码子相对使用频率也越高相悖^[43]。因此, 可能对于该类群而言, 叶绿体基因组密码子使用频率受自身基因表达影响较小, 从细胞质中转移而来的tRNA稀释了叶绿体基因组所编码的tRNA在翻译中的作用。水麦冬科高频密码子、高表达的优越密码子和最优密码子均偏好以A/U结尾, 说明水麦冬科植物叶绿体基因组蛋白编码基因序列更倾向于使用以A/U结尾的密码子。这种密码子偏好性现象的形成过程中相较于突变, 自然选择的影响更强, 与大多数被子植物相似^[44—47]。

叶绿体基因组的同源关系以及基因排列顺序, 能够突显出物种特有的遗传变化。本研究中共线性分析结果表明在所研究类群叶绿体基因组中的SSC区中出现了基因倒位现象, 其可能在物种进化过程中可能发挥着重要作用, 有助于该类群适应环境变化和生物多样性的形成, 然而该类群出现基因倒位机理还有待进一步探究。

非同义突变率与同义突变率的比值能够有效反映物种之间的差别及是否受自然选择的作用,与非同义替换相比,生物体中的大部分基因出现同义核苷酸替换现象更为频繁,因此 K_a/K_s 值通常小于1^[48]。在本研究中,共筛选出了3个正选择基因,分别为 $rpoA$ 、 $ccsA$ 和 $ycf2$,这3个基因在水麦冬与海韭菜分化过程中受到了比较强烈的正向选择压力,能够较好的反映出物种演化过程中叶绿体基因组对环境的适应性。在全球范围内获得海韭菜和水麦冬这3个基因或许对推断该类群的演化历史有重要意义。 $rpoA$ 是编码RNA聚合酶亚基的基因, $ccsA$ 是c-型细胞色素合成基因,但 $ycf2$ 基因功能未知,若探究出 $ycf2$ 基因功能或许可对该类群物种适应环境相关机制做出更进一步解释。另外,选择压力分析结果表明光合作用相关基因的 K_a/K_s 均小于1,且大量蛋白编码基因不存在非同义替换的情况,表明这类基因十分保守,推测其在水麦冬属开始分化后环境因素没有明显的对光合作用相关基因的编码产物功能活性产生新的选择方向。

3.2 系统发育与分歧时间

本研究通过叶绿体基因组对水麦冬属及其近缘类群系统发育关系进行重建,表明水麦冬属两个物种聚为一支,水麦冬属在78.67 MYA时与眼子菜属、虾海藻属、大叶藻属、二药藻属、针叶藻属、川蔓藻属构成的分支产生分化。水麦冬科位于系统发育树的基部位置。遗传距离计算结果也表明水麦冬属与其他物种遗传距离相对较远。在生活习性方面,水麦冬属为多年生沼生草本,眼子菜属为沉水或浮水植物,虾海藻属、大叶藻属、二药藻属、针叶藻属及川蔓藻属均为沉水草本,生活习性有较大差异^[1]。同时,水麦冬属具有其他类群所不具有的叶基生等特征。综合以上讨论,本研究支持将水麦冬属上升为水麦冬科。水麦冬属在78.67 MYA时与其他沉水或浮水植物发生分化,此时地球正处于白垩纪(135—65 MYA)中晚期,在这一时期,全球平均气温升高,导致大面积的陆地被海水淹没^[50, 51]。因此推测水麦冬属与眼子菜属、虾海藻属等沉水或浮水植物产生分化可能受到这一时期海平面上升的影响。

大叶藻科与眼子菜科构成的分支于44.49 MYA时与丝粉藻科所在的分支产生分化,支持Kubitzki等^[49]提出的大叶藻科较丝粉藻科更近于眼子菜科的观点。虾海藻属和大叶藻属虽然与眼子菜属亲缘关系较近,但考虑到遗传距离较大,因此支持虾海藻属与大叶藻属从眼子菜科中分离成为大叶藻科。川蔓藻属在56.51 MYA与眼子菜科产生分化。

与此同时,二者遗传距离相对较远。另外,考虑到川蔓藻属与眼子菜属在核型、胚乳发育及雄蕊数目等方面均存在明显差异^[3]。因此,本研究支持川蔓藻属独立为川蔓藻科。

前人研究认为虽然大叶藻科与丝粉藻科具有丝状花粉的特征,但相较于丝粉藻科,大叶藻科与眼子菜科亲缘关系相较于大叶藻科与丝粉藻科更近^[3, 49]。而川蔓藻科和丝粉藻科有较近的亲缘关系^[3]。本研究构建的系统发育关系与以上前人研究中的各科属之间亲缘关系相符。此外,在叶的形态上,川蔓藻科与丝粉藻科相较于川蔓藻科与眼子菜科更为相近^[49],这也进一步证明川蔓藻科与丝粉藻科的亲缘关系更近。

本研究基于叶绿体基因组重建了水麦冬科及其近缘类群的系统发育关系,得到了较为准确的属级与科级系统发育框架,但受到材料的限制未能获取到波喜荡属物种和其他科属更多物种的完整叶绿体基因组序列,后续还需进一步补充数据构建更为全面、包含物种更多的系统发育关系。其次,虽然叶绿体基因组提供了关于植物进化的有力证据,但依赖于单一类型的分子标记可能会影响分析的准确性。未来的研究可以使用其他类型的分子标记,如核基因组或线粒体DNA,以验证本研究的结果。另外,想要建立进一步的水麦冬科植物分类体系,还需对该类群进行详尽的资源分布调查,并综合运用解剖学、孢粉学、遗传学及分子生物学的技术方法,对其进行进一步的研究。

4 结论

本研究对海韭菜和水麦冬的总DNA进行了建库、测序,随后进行叶绿体基因组的组装和注释,最终获得了高质量的海韭菜和水麦冬完整叶绿体基因组序列。通过对水麦冬科叶绿体基因组特征比较分析及系统发育分析等研究方法来探究海韭菜和水麦冬叶绿体基因组中所蕴含的遗传信息,主要结论:(1)海韭菜和水麦冬的叶绿体基因组在结构和大小上相对保守。密码子偏好性分析结果表明自然选择在海韭菜和水麦冬叶绿体基因组密码子偏好性形成过程中具有重要作用。选择压力分析结果表明海韭菜和水麦冬叶绿体基因组蛋白编码基因中除 $rpoA$ 、 $ccsA$ 和 $ycf2$ 这3个基因受到正选择作用外,其余基因均受到纯化选择的作用。(2)共线性分析结果表明水麦冬科及其近缘类群叶绿体基因组出现了较明显的倒位现象,表明该类群叶绿体基因组存在一定的结构变异。(3)本研究通过叶绿体基因组重建了水麦冬属及其近缘类群的系统发

育关系, 结合形态学特征与分子遗传距离, 支持将水麦冬属上升为水麦冬科。(4)水麦冬属在78.67 MYA时与其他沉水或浮水近缘植物产生分化, 这一现象可能与白垩纪中晚期显著的海平面波动和温暖的气候条件有关。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Chen Z D, Lu A M, Liu B, *et al.* Tree of Life for Chinese Vascular Plants [M]. Beijing: Science Press, 2020: 179-182. [陈之端, 路安民, 刘冰, 等. 中国维管植物生命之树 [M]. 北京: 科学出版社, 2020: 179-182.]
- [2] Zeng G F. Flora of China Vol. 8 [M]. Beijing: Science Press, 1992: 40-62. [曾桂芳. 中国植物志 第八卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 40-62.]
- [3] Wu Z Y. The Families and Genera of Angiosperms in China a Comprehensive Analysis [M]. Beijing: Science Press, 2003: 185-197. [吴征镒. 中国被子植物科属综论 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 185-197.]
- [4] Li Y Z, Fu J T, Yu D M, *et al.* Mechanical effects of halophytes roots and optimal root content for slope protection in cold and arid environment [J]. *Chinese Journal of Rock Mechanics and Engineering*, 2015, **34**(7): 1370-1383. [栗岳洲, 付江涛, 余冬梅, 等. 寒旱环境盐生植物根系固土护坡力学效应及其最优含根量探讨 [J]. 岩石力学与工程学报, 2015, **34**(7): 1370-1383.]
- [5] Buzgo M, Soltis D, Soltis P, *et al.* Perianth development in the basal monocot *Triglochin maritima* (Juncaginaceae) [J]. *Aliso*, 2006, **22**(1): 107-125.
- [6] Cronquist A J. The Evolution and Classification of Flowering Plants [M]. Columbia: Columbia University Press, 1868: 329-337.
- [7] Group T A P. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2003, **141**(4): 399-436.
- [8] Institute of Botany. Iconographia Gormophytorum Sinicorum Tomus V [M]. Beijing: Science Press, 1976: 6-17. [中国科学院北京植物研究所. 中国高等植物图鉴-第五册 [M]. 北京: 科学出版社, 1976: 6-17.]
- [9] Glawe D A, Dugan F M, Liu Y, *et al.* First record and characterization of a powdery mildew on a member of the Juncaginaceae: *Leveillula taurica* on *Triglochin maritima* [J]. *Mycological Progress*, 2005, **4**(4): 291-298.
- [10] James E A, Brown G K, Citroen R, *et al.* Development of microsatellite loci in *Triglochin procera* (Juncaginaceae), a polyploid wetland plant [J]. *Conservation Genetics Resources*, 2011, **3**(1): 103-105.
- [11] Mering S V, Kadereit J W. Phylogeny, biogeography and evolution of *Triglochin* L. (Juncaginaceae)-morphological diversification is linked to habitat shifts rather than to genetic diversification [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2015(83): 200-212.
- [12] Fan S J, Guo X X. Advances in research and application of plant chloroplast genome [J]. *Journal of Shandong Normal University (Natural Science)*, 2022, **37**(1): 22-31. [樊守金, 郭秀秀. 植物叶绿体基因组研究及应用进展 [J]. 山东师范大学学报(自然科学版), 2022, **37**(1): 22-31.]
- [13] Luo Y, Ma P F, Li H T, *et al.* Plastid phylogenomic analyses resolve Tofieldiaceae as the root of the early diverging monocot order alismatales [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2016, **8**(3): 932-945.
- [14] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical bulletin*, 1987, **19**(1): 11-15.
- [15] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, **30**(15): 2114-2120.
- [16] 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 Biology*, 2020, **21**(1): 241.
- [17] Tillich M, Lehwark P, Pellizzer T, *et al.* GeSeq-versatile and accurate annotation of organelle genomes [J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, **45**(W1): W6-W11.
- [18] Zheng S, Pocai P, Hyvönen J, *et al.* Chloroplast: an online program for the versatile plotting of organelle genomes [J]. *Frontiers in Genetics*, 2020(11): 576124.
- [19] Ding R, Hu B, Zong X Y, *et al.* Analysis of Codon usage in the chloroplast genome of *Cypripedium calceolus* [J]. *Forest Research*, 2021, **34**(5): 177-185. [丁锐, 胡兵, 宗小雁, 等. 杓兰叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. 林业科学研究, 2021, **34**(5): 177-185.]
- [20] Zhang D, Gao F, Jakovlić I, *et al.* PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(1): 348-355.
- [21] Peden J. CodonW version 1.4. 2 [CP]. Nottingham, University of Nottingham, 2005.
- [22] Zhou Q, Wang L Y, Yuan Q, *et al.* Chloroplast genomic characteristics of *Hibiscus schizopetalus* and phylogenetic relationships of *Hibiscus* [J]. *Acta Agrestia Sinica*. <https://link.cnki.net/urlid/11.3362.S.20241011.1249.006>. [周全, 王璐瑶, 袁庆, 等. 吊灯扶桑叶绿体基因组特征与木槿属系统发育研究 [J]. 草地学报. <https://link.cnki.net/urlid/11.3362.S.20241011.1249.006>.]
- [23] Yang N, Wang A, Zhang Z C, *et al.* Characteristics of chloroplast genome and phylogenetic analysis of *Diospyros sutchuensis* with extremely small populations [J]. *Guihaia*, 2024, **44**(1): 15-29. [杨楠, 王奥, 张子晨, 等. 极小种群植物川柿叶绿体基因组特征与系统发育分析 [J]. 广西植物, 2024, **44**(1): 15-29.]
- [24] Xiu Z Y, Zhao Y L, Cheng Y Q, *et al.* Comparative analysis of chloroplast genomes and phylogenetic analysis of

- Vitex* [J]. *Guihaia*, 2024, **44**(9): 1755-1771. [修志莹, 赵艳玲, 程永琴, 等. 牡荆属叶绿体基因组比较分析及系统发育分析 [J]. *广西植物*, 2024, **44**(9): 1755-1771.]
- [25] Grantham R, Gautier C, Gouy M, *et al.* Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity [J]. *Nucleic Acids Research*, 1981, **9**(1): r43-r74.
- [26] Ma M L, Zhang W, Meng H L, *et al.* Codon bias analysis of chloroplast genome in medicinal plants of *Amomum* Roxb [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2021, **52**(12): 3661-3670. [马孟莉, 张薇, 孟衡玲, 等. 豆蔻属药用植物叶绿体基因组密码子偏性分析 [J]. *中草药*, 2021, **52**(12): 3661-3670.]
- [27] Niu Y, Xu Q, Wang Y D, *et al.* An analysis on Codon usage bias of chloroplast genome of *Rosa odorata* var. *gigantea* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2018, **33**(3): 123-130. [牛元, 徐琼, 王崙德, 等. 大花香水月季叶绿体基因组密码子使用偏性分析 [J]. *西北林学院学报*, 2018, **33**(3): 123-130.]
- [28] Kurtz S, Choudhuri J V, Ohlebusch E, *et al.* REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**(22): 4633-4642.
- [29] Beier S, Thiel T, Münch T, *et al.* MISA-web: a web server for microsatellite prediction [J]. *Bioinformatics*, 2017, **33**(16): 2583-2585.
- [30] Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio J C, *et al.* DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, **34**(12): 3299-3302.
- [31] Ma C, Gunther S, Cooke B, *et al.* Geneious plugins for the access of PlasmoDB and PiroplasmaDB databases [J]. *Parasitology International*, 2013, **62**(2): 134-136.
- [32] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, **33**(7): 1870-1874.
- [33] Nakamura T, Yamada K D, Tomii K, *et al.* Parallelization of MAFFT for large-scale multiple sequence alignments [J]. *Bioinformatics*, 2018, **34**(14): 2490-2492.
- [34] Kalyanamoorthy S, Minh B Q, Wong T K F, *et al.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates [J]. *Nature Methods*, 2017, **14**(6): 587-589.
- [35] Minh B Q, Schmidt H A, Chernomor O, *et al.* IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2020, **37**(5): 1530-1534.
- [36] Rannala B, Yang Z. Inferring speciation times under an episodic molecular clock [J]. *Systematic Biology*, 2007, **56**(3): 453-466.
- [37] Sagulenko P, Puller V, Neher R A. TreeTime: Maximum-likelihood phylodynamic analysis [J]. *Virus Evolution*, 2018, **4**(1): vex042.
- [38] Yin M H, Yu L, Zhou J H, *et al.* Analysis of the chloroplast genome sequence characteristics and its code usage bias of *Citrus maxima* (L.) Osbeck 'Majiaoyou' [J]. *Journal of Fruit Science*, 2024, **41**(5): 824-846. [尹明华, 余璐, 周佳慧, 等. 马家柚叶绿体基因组特征及其密码子偏好性分析 [J]. *果树学报*, 2024, **41**(5): 824-846.]
- [39] Lai R L, Chen J, Feng X, *et al.* Codon usage preference of chloroplast genome of *Canarium album* [J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* (Natural Science Edition), 2022, **51**(4): 502-509. [赖瑞联, 陈瑾, 冯新, 等. 橄榄叶绿体基因组密码子偏好性特征 [J]. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 2022, **51**(4): 502-509.]
- [40] Zhang J J, Yuan Q, Wei Y, *et al.* Evolutionary analysis of chloroplast genomes of Sect. Isika (*Lonicera*) species [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2024, **55**(9): 3085-3097. [张晶晶, 袁庆, 魏瑶, 等. 忍冬属囊管组植物叶绿体基因组进化分析 [J]. *中草药*, 2024, **55**(9): 3085-3097.]
- [41] Liu L, Li H, Li J, *et al.* Chloroplast genome analyses of *Caragana arborescens* and *Caragana opulens* [J]. *BMC Genomic Data*, 2024, **25**(1): 16.
- [42] Zhang Y, Ma J, Yang B, *et al.* The complete chloroplast genome sequence of *Taxus chinensis* var. *mairei* (Taxaceae): loss of an inverted repeat region and comparative analysis with related species [J]. *Gene*, 2014, **540**(2): 201-209.
- [43] Liu Q P, Tan J, Xue Q Z. Synonymous Codon usage bias in the rice cultivar 93-11 (*Oryza sativa* l. ssp. *indica*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, **30**(4): 335-340. [刘庆坡, 谭军, 薛庆中. 籼稻品种93-11同义密码子的使用偏性 [J]. *遗传学报*, 2003, **30**(4): 335-340.]
- [44] Xiao M, Hu X, Li Y, *et al.* Comparative analysis of Codon usage patterns in the chloroplast genomes of nine forage legumes [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2024, **30**(2): 153-166.
- [45] Li T, Ma Z, Ding T, *et al.* Codon usage bias and phylogenetic analysis of chloroplast genome in 36 Gracilariaceae species [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2024, **24**(2): 45.
- [46] Rao A, Chen Z, Wu D, *et al.* Codon usage bias in the chloroplast genomes of *Cymbidium* species in Guizhou, China [J]. *South African Journal of Botany*, 2024(164): 429-437.
- [47] Li C, Zhou L, Nie J, *et al.* Codon usage bias and genetic diversity in chloroplast genomes of *Elaeagnus* species (Myrtiflorae: Elaeagnaceae) [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2023, **29**(2): 239-251.
- [48] Yang Q Q, Jiang M, Wang L Q, *et al.* Complete chloroplast genome of *Allium chinense*: comparative genomic and phylogenetic analysis [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2019, **54**(1): 173-181. [杨俏俏, 姜梅, 王立强, 等. 药食两用蒜头叶绿体基因组解析、比较基因组学及系统发育研究 [J]. *药学报*, 2019, **54**(1): 173-181.]

- [49] Schmid R, Kubitzki K K, Kubitzki K K, *et al.* The families and Genera of vascular plants [J]. *Taxon*, 2005, **54**(2): 574.
- [50] Chen X, Wang C S, Huang Y J. Progress in the study of Cretaceous rapid climate change-evidence of glaciation in a greenhouse world [J]. *Geoscience*, 2011, **25**(3): 409-418. [陈曦, 王成善, 黄永建. 白垩纪快速气候变化研究新进展——温室世界中的冰川证据 [J]. *现代地质*, 2011, **25**(3): 409-418.]
- [51] Li X H, Hu X M, Huang Y J, *et al.* Cretaceous paleo-marine climate change and its main problems [J]. *Advances in Earth Science*, 2004, **19**(S1): 83-92. [李祥辉, 胡修棉, 黄永建, 等. 白垩纪古海洋气候变化及主要问题 [J]. *地球科学进展*, 2004, **19**(S1): 83-92.]

PHYLOGENY OF JUNCAGINACEAE IN CHINA BASED ON COMPLETE CHLOROPLAST GENOME

WANG Lu-Yao¹, ZHOU Quan^{1,2,3}, FAN Guo-You⁴, YUAN Qing¹, ZHANG Jing-Jing⁵ and LIU Hai-Rui¹

(1. College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Maixiu Forest Farm in Huangnan Tibetan Autonomous Prefecture in Qinghai Province, Huangnan 811399, China; 5. Shijiazhuang Medical College, Shijiazhuang 050599, China)

Abstract: To investigate the phylogeny of Juncaginaceae and enrich its genetic resources, the complete chloroplast genomes of *Triglochin maritima* and *Triglochin palustris* were sequenced, assembled, annotated, and characterized. In addition, the phylogenetic relationships of Juncaginaceae and closely related taxa were reconstructed. The results indicate that the chloroplast genomes of *Triglochin maritima* and *Triglochin palustris* exhibit circular structure with lengths of 155881 and 155803 bp, respectively, containing 57 and 60 SSRs and all 49 long repetitive sequences. In addition, Both genomes also show a preference for codons ending in A/U. Phylogenetic analysis shows that these two Juncaginaceae species form a single branch with a significant genetic distance from closely related taxa, diverging from *Potamogeton*, *Phyllospadix*, *Zostera*, *Halodule*, *Syringodium*, and *Ruppia* approximately 78.67 million years ago. In conjunction with the distributional habitat differences, this study supports the elevation of *Triglochin* to family status within Juncaginaceae. This study provides a theoretical foundation for investigating chloroplast genome structure evolution of Juncaginaceae and offers valuable insights for species conservation and scientific utilization of Juncaginaceae and its related taxa.

Key words: Juncaginaceae; Chloroplast genomes characteristics; Phylogeny; Divergence time