• 药材与资源 •

多叶勾儿茶叶绿体基因组比较分析及系统发育研究

刘　畅[1]，曾宪法[1]，杨小英[1]，赵　宇[2]，张　涛[2]，周思旋[2*]

1. 贵州中医药大学药学院 药食两用资源应用与开发研究中心，贵州 贵阳　550025
2. 贵州省农业科学院 畜牧兽医研究所，贵州 贵阳　550005

摘　要：目的　研究勾儿茶属药用植物多叶勾儿茶 *Berchemia polyphylla* 及变种光枝勾儿茶 *B. polyphylla* var. *leioclada* 叶绿体基因组成及结构特征，同时为勾儿茶属系统发育及进化研究提供参考。**方法**　基于 Illumina 平台对勾儿茶属药用植物多叶勾儿茶及变种光枝勾儿茶进行叶绿体基因组测序，利用生物信息学对其序列进行组装、注释和特征分析，与同科小勾儿茶属、枣属、枳椇属、鼠李属、翼核果属等的叶绿体全基因组进行比较分析，确定其在鼠李科植物中系统发育位置。**结果**　多叶勾儿茶和光枝勾儿茶叶绿体基因组具有典型环状四分体结构，全长分别为 161 185、161 210 bp，注释得到 131 个基因，其中蛋白质编码基因 86 个，37 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。勾儿茶属与鼠李科其它药用植物比较基因组学分析表明，勾儿茶属叶绿体基因组具有较高的保守性，叶绿体基因组之间没有重排或倒置，IR 区序列变异最低，LSC 区的变异程度最高，其中 *ndhA*、*ycf1*、*ycf3*、*rpl16*、*clpP* 以及 *atpF* 等基因的编码区存在差异，这些位点为勾儿茶分子鉴定提供新位点。系统发育树表明勾儿茶属与鼠李属及翼核果属有较近的亲缘关系，且多叶勾儿茶和光枝勾儿茶互为姊妹类群。**结论**　解析了勾儿茶属多叶勾儿茶和光枝勾儿茶叶绿体基因组结构，探讨了勾儿茶属系统发育关系，为勾儿茶属药用植物分类鉴定、系统进化及资源开发利用等研究奠定基础。

关键词：勾儿茶属；多叶勾儿茶；光枝勾儿茶；叶绿体基因组；系统发育

中图分类号：R286.12　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2023)08 - 2558 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.08.023

Comparative analysis and phylogeny of chloroplast genomes in *Berchemia polyphylla*

LIU Chang[1], ZENG Xian-fa[1], YANG Xiao-ying[1], ZHAO Yu[2], ZHANG Tao[2], ZHOU Si-xuan[2]

1. Research Center for Application and Development of Medicine and Food Dual-use Resources, School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China
2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550005, China

Abstract: Objective　To investigate the chloroplast structural characteristics of *Berchemia polyphylla* and *B. polyphylla* var. *leioclada*, so as to provide reference for the phylogeny and evolutionary study of *Berchemia*. **Methods**　Ilumina sequencing platform was used to obtain the whole chloroplast genome sequences of *B. polyphylla* and *B. polyphylla* var. *leioclada*. The sequences were assembled, annotated and characterized by bioinformatics. The chloroplast genomes were compared and phylogenetic analysis was performed with the chloroplast genomes of *Berchemiella*, *Ziziphus*, *Hovenia*, *Rhamnus* and *Ventilago* of the same family to determine its phylogenetic position in Rhamnaceae. **Results**　The chloroplast genomes of *B. polyphylla* and *B. polyphylla* var. *leioclada* had a typical circular tetrad structure, with the total length of 161 185 bp and 161 210 bp, respectively. A total of 131 genes were annotated, including 86 protein-coding genes, 37 tRNA genes and eight rRNA genes. The chloroplast genome of *Berchemia* was highly conserved by comparative genomic analysis with other genera in Rhamnaceae, without rearrangement or inversion between chloroplast genomes. The variation of IR region sequence was the lowest, and the variation degree of LSC region was the highest. The results of comparative genomics showed that the coding regions of *ndhA*, *ycf1*, *ycf3*, *rpl16*, *clpP* and *atpF* genes were different, which provided new loci for molecular identification of *Berchemia*. In the

收稿日期：2022-12-06

基金项目：国家自然科学基金资助项目（31960716）；贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题（QZYY-2021-098）；贵州中医药大学 2021 年度科研创新和探索专项（2018YFC170810201）；黔农科院国基后补助（2021）49 号

作者简介：刘　畅（1988—），女，副教授，从事分子生药学及系统药理学研究。E-mail: 19liuchang@163.com

***通信作者：**周思旋（1984—），女，副研究员，从事药用植物微生物资源分类及代谢产物研究。E-mail: kerrybaiye@163.com

phylogenetic tree, *B. polyphylla* and *B. polyphylla* var. *leioclada* were sister groups, which can clearly reflect the genetic relationship. Furthermore, *Berchemia* was closely related to *Rhamnus* and *Ventilago*. **Conclusion** In this study, the chloroplast genome structure of *Berchemia* was analyzed, and the phylogenetic relationship among the genera of *Berchemia* was discussed, which laid a foundation for the study of taxonomic identification, phylogenetic evolution, resource exploitation and utilization of medicinal plants of *Berchemia*.

Key words: *Berchemia* L.; *Berchemia polyphylla* Wall. ex Laws.; *Berchemia polyphylla* Wall. ex Laws. var. *Leioclada* Hand.-Mazz; chloroplast genome; phylogeny

勾儿茶属 *Berchemia* L.是鼠李科（Rhamnaceae）具有重要药用和经济价值的类群，勾儿茶属植物在中国分布有 18 种 6 变种[1]，主要集中于西南、华南、中南及华东地区。勾儿茶属药用植物化学成分主要包括黄酮类、萜类、木脂素类、醌类等，多以根、茎、叶入药，有祛风利湿、活血止痛、止咳祛痰之功效，主治风湿性关节炎、急慢性气管炎、跌打损伤、痈肿疮毒等症[2]，在临床上应用广泛。在民间医药中勾儿茶属植物也常被使用，西南地区往往将细叶勾儿茶、多叶勾儿茶、光枝勾儿茶、多花勾儿茶等的茎藤或根作为铁包金药材在使用[3]。但该属物种在形态学特征识别较为困难，尚缺乏从分子水平对勾儿茶属植物的分类鉴定与系统学进行研究，其不同物种间的系统发育关系及亲缘关系尚不清楚。

目前，叶绿体全基因组序列在解析植物类群系统发育关系研究中得到广泛应用，已有 1000 多种植物完成叶绿体基因组的测序，可作为物种分类、系统发育、起源进化以及避难所等研究的依据[4-6]。但有关勾儿茶属叶绿体基因组研究还较少，仅有铁包金 *B. lineata* (L.) DC、黄背勾儿茶 *B. flavescens* (Wall.) Brongn.完成了测序，且不同种间及同种不同个体间叶绿体比较基因组学和系统发育相关研究还鲜有报道。因此，本研究对多叶勾儿茶 *B. polyphylla* Wall. ex Laws.及变种光枝勾儿茶 *B. polyphylla* Wall. ex Laws. var. *leioclada* Hand.-Mazz.进行叶绿体测序，解析其叶绿体基因组结构特征和系统进化，比较多叶勾儿茶和光枝勾儿茶的叶绿体基因特征差异，筛选种间高变异序列。进一步基于叶绿体系统发育基因组学解析勾儿茶属与其他鼠李科药用植物种间系统发育关系，为勾儿茶属物种的鉴定、系统进化发育等研究奠定科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

多叶勾儿茶和光枝勾儿茶新鲜叶片采自贵州省贵阳市龙洞堡老里坡（经纬度 N 26 31′49″，E 106 47′26″，海拔 1100 m），经中山大学廖文波教授鉴定为鼠李科植物多叶勾儿茶 *B. polyphylla* Wall. ex Laws. 和光枝勾儿茶 *B. polyphylla* Wall. ex Laws. var. *leioclada* Hand. -Mazz.。取新鲜健康叶片，用无菌水冲洗干净，晾干后置于−80 ℃冰箱保存。通过 NCBI 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）检索鼠李目鼠李科和葡萄科 22 个叶绿体全基因组序列信息，包括鼠李科勾儿茶属、小勾儿茶属、枣属、枳椇属、鼠李属、翼核果属及葡萄科蛇葡萄属和葡萄属（表 1）。

表 1 鼠李科和葡萄科物种的叶绿体基因组 Genbank 登记号

Table 1 GenBank accession numbers of the Chloroplast in *Rhamnaceae* and *Vitaceae*

物种	科属	GenBank 登记号
铁包金	鼠李科勾儿茶属	MT621210.1
黄背勾儿茶	鼠李科勾儿茶属	MK460212.1
日本小勾儿茶 *B. berchemiifolia* (Makino) Nakai	鼠李科小勾儿茶属	MG739656.1
小勾儿茶	鼠李科小勾儿茶	MH938366.1
枣栽培种 *Z.s jujuba* cultivar Bokjo	鼠李科枣属	MT919946.1
枣 *Z. jujuba* Mill.	鼠李科枣属	KU351660.1
酸枣 *Z. jujuba* var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H.F.Chow.	鼠李科枣属	MW160433.1
印度枣 *Z. incurva* Roxb.	鼠李科枣属	MN017132.1
枳椇 *Hovenia acerba* Lindl.	鼠李科枳椇属	MN782301.1
毛果枳椇 *H. trichocarpa* Chun et Tsiang	鼠李科枳椇属	MT225404.1
北枳椇 *H. dulcis* Thunb.	鼠李科枳椇属	MT225403.1
枳椇 *H. acerba* Lindl.	鼠李科枳椇属	MN794429.1
北枳椇 *H. dulcis* Thunb.	鼠李科枳椇属	MT916772.1
异叶鼠李 *Rhamnus heterophylla* Oliv.	鼠李科鼠李属	MT211599.1
R. taquetii (H.Lév. & Vaniot) H.Lév.	鼠李科鼠李属	MN901522.1
长叶冻绿 *R. crenata* (Siebold et Zucc.) Miq.	鼠李科鼠李属	LC635131.1
翼核果 *Ventilago leiocarpa* Benth.	鼠李科翼核果属	MT974496.1
葎叶蛇葡萄 *Ampelopsis humulifolia* Bge.	葡萄科蛇葡萄属	MK547542.1
白蔹 *A. japonica* (Thunb.) Makino	葡萄科蛇葡萄属	MK547541.1
掌裂草葡萄 *A.aconitifolia* var. *palmiloba* (Carr.) Rehd.	葡萄科蛇葡萄属	MW246142.1
刺葡萄 *Vitis davidii* (Roman. Du Caill.) Foex.	葡萄科葡萄属	MG564632.1
深裂山葡萄 *V. amurensis* var. *dissecta* Skvorts.	葡萄科葡萄属	MG564630.1

1.2 基因组 DNA 提取与测序

取多叶勾儿茶和光枝勾儿茶新鲜叶片，利用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA，通过 0.8% 琼脂糖电泳和 Nanodrop 分光光度计检测样品的完整性、样品浓度及纯度。根据 Illumian DNA 文库构建流程，将合格的 DNA 样品构建插入片段 350 bp 的双末端测序文库，利用 Illumina Novaseq6000 高

通量测序平台进行叶绿体基因组测序。利用 NGS QC ToolKit 软件对原始测序序列（raw Reads）进行质控，过滤去除接头和低质量序列，获得高质量序列（clean reads）。

1.3　叶绿体全基因组序列组装、拼接与注释

采用 SPAdes v.3.15.2、CpGAVAS 和 ORF Finder 对叶绿体基因组序列进行拼接组装及注释[7]，并利用 Blastn 和 Blastp 与数据库收载的近缘物种叶绿体基因组编码蛋白和 rRNA 进行比对，验证结果的准确性并进行修正。利用 ARWEN 软件[8]对 tRNA 进行注释，生成 tRNA 二级结构图，采用 OGDRAW 软件[9]绘制叶绿体基因组环状结构图。

1.4　重复序列和 SSR 分析

利用 REPuter 在线工具（https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/reputer）对长重复序列进行分析[10]，包括正向重复、回文重复、反向重复和互补重复。利用 MISA 在线软件分析微卫星序列（SSR）[11]（https://webblast.ipk-gatersleben.de/ misa/index. php），单核苷酸、双核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸及六核苷酸的参数设置为 8、4、4、3、3、3，2 个 SSRs 之间的距离不小于 100 bp，对 SSRs 的类型、数量等进行统计分析。

1.5　叶绿体全基因组比较及共线性分析

采用 mVISTA 软件（https://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml），选用检测基因重排和倒位的全局比对模式（Shuffle-LAGAN）[12]，以光枝勾儿茶作为参考基因组，对多叶勾儿茶、枣、酸枣、枳椇、毛果枳椇、北枳椇和翼核果叶绿体全基因组序列同源性进行比较分析。采用 Geneious10.2.2 软件中 Mauve 多重基因组比对法[13]，检测多叶勾儿茶、光枝勾儿茶、枣、酸枣、枳椇、毛果枳椇、北枳椇和翼核果 8 个物种的叶绿体基因组的重排和共线性。

1.6　系统进化分析

下载鼠李科叶绿体基因组序列及鼠李科亲缘关系较近的葡萄科叶绿体基因组序列，构建最大似然（maximum likelihood，ML）系统发育树。利用 MAFFT 7 在线软件（https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/）对鼠李科和葡萄科叶绿体基因组进行全基因组比对[14-15]，采用 IQ-TREE 2.0.5 软件（http://www. iqtree.org/）[16]利用最大似然法（maximum likelihood method，ML）构建系统发育树，构树参数设置为：-m MFP -B 1000 -alrt 1000，优构树模型为：GTR＋F＋R2。

2　结果与分析

2.1　叶绿体全基因组测序、序列组装拼接与注释

多叶勾儿茶和光枝勾儿茶序列总长度分别为 161 185 bp 和 161 210 bp，由大单拷贝区（LSC，89 389 bp、89 390 bp），小单拷贝区（SSC，18 216、18 244 bp）和一对反向重复区（IRa/IRb，26 790、26 788 bp）（图 1）。相比于 LSC 和 SSC 区，IR 区的 GC 含量最高（42.55%），可能是由于 IR 区含有高 GC 含量的 RNA 基因造成。

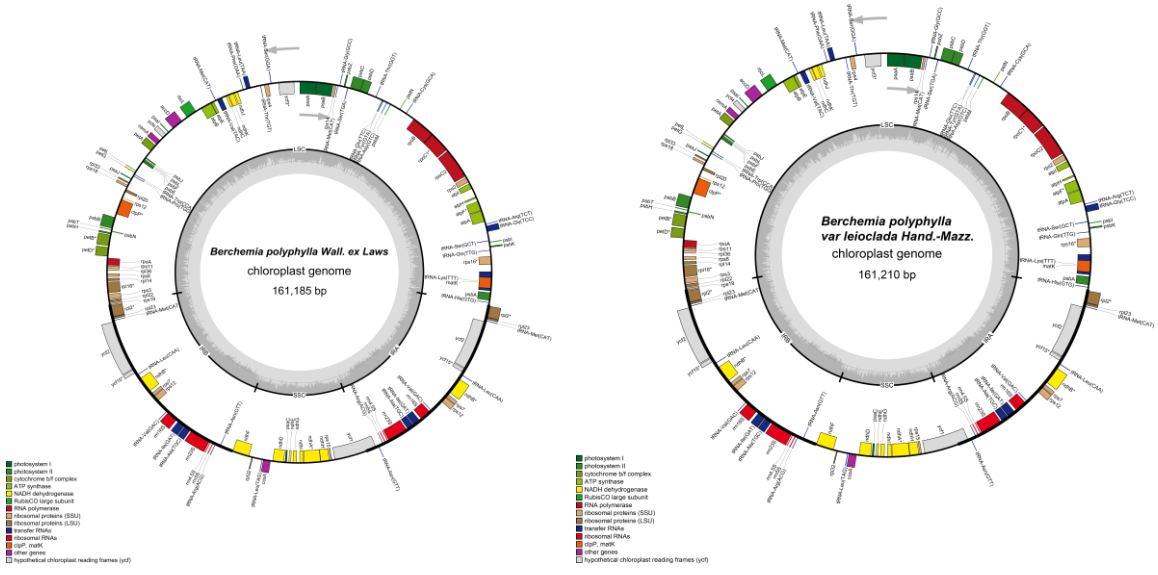

图 1　多叶勾儿茶及光枝勾儿茶叶绿体基因组图谱

Fig. 1　Chloroplast genome map between *B. polyphylla* and *B. polyphylla* var. *leioclada*

2.2 叶绿体基因组长重复序列及简单重复序列分析

利用 REPuter 在线工具对的长重复序列进行分析，多叶勾儿茶和光枝勾儿茶均包括正向重复、回文重复、反向重复和互补重复，但在数量和类型上存在差异。多叶勾儿茶叶绿体基因组中有 19 个回文重复、19 个正向重复、10 个反向重复和 1 个互补重复，光枝勾儿茶叶绿体基因组中有 21 个回文重复、20 个正向重复、8 个反向重复和 1 个互补重复。简单重复序列（simple sequence repeat，SSRs）分析表明（表 2），多叶勾儿茶有 263 个 SSRs 位点，光枝勾儿茶有 260 个 SSRs 位点，均为未发现六核苷酸重复。多叶勾儿茶和光枝勾儿茶叶绿体基因组序列中单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸 SSR 类型分别以 A/T（93%）、AT/TA（69%）、AAT/ATT（100%）为主，表明其叶绿体基因组序列中 SSRs 主要由 polyA 或 polyT 所构成。

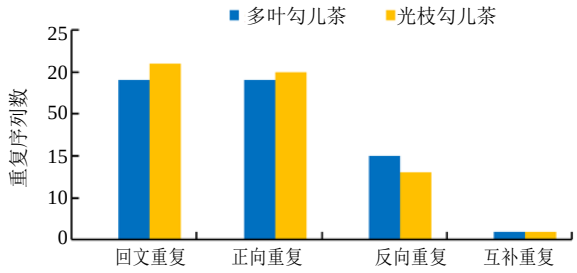

图 2 多叶勾儿茶及光枝勾儿茶叶绿体基因组长重复序列分析

Fig. 2 Analysis of long repeats of chloroplast genome between *B. polyphylla* and *B. polyphylla* var. *leioclada*

表 2 多叶勾儿茶及光枝勾儿茶叶绿体基因组 SSR 分析

Table 2 Analysis of SSR of chloroplast genome between *B. polyphylla* and *B. polyphylla* var. *leioclada*

SSR 类型	位点数	
	多叶勾儿茶	光枝勾儿茶
A/T	171	169
C/G	13	13
AG/CT	20	20
AT/AT	45	44
AAT/ATT	2	2
AAAG/CTTT	2	2
AAAT/ATTT	4	4
AATC/ATTG	1	1
AATG/ATTC	1	1
AATT/AATT	2	2
AGAT/ATCT	1	1
AATCG/ATTCG	1	1

2.3 叶绿体基因组功能及分类

多叶勾儿茶和光枝勾儿茶叶绿体全基因组中注释得到 131 个基因（表 3），包括 86 个蛋白编码基因、37 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因，主要分为光合作用基因、复制基因、未知功能基因以及乙酰辅酶 A 羧化酶亚基（accD）、成熟酶基因（matK）等其他基因，但未见转录起始因子 infA。对叶绿体基因内含子进行分析，其中有 15 个基因含有内含子，且 ycf3 和 clpP 蛋白编码基因含有 2 个内含子。

2.4 IR-LSC/SSC 区的收缩和扩张分析

叶绿体基因组由 SSC、LSC、IRa、IRb 4 个区间构成环状结构。其中 IR 区域相对保守，其收缩与扩张的现象代表着植物的进化，同时也会引起叶绿体基因 GC 含量变化，与植物的叶绿体基因组大小有关。通过分析 IR-LSC/SSC 区域的边界信息，对研究叶绿体基因组结构的差异、物种进化等具有重要意义。边界分析图（图 3）中自下往上分别为多叶勾儿茶、光枝勾儿茶、北枳椇、毛果枳椇、酸枣、翼核果、枣和枳椇。鼠李科叶绿体基因组虽然在序列长度、基因组成以及 GC 含量等方面相对稳定保守，但 4 个边界区的过渡区域却存在有多样性。对于 IRb-LSC 边界，多叶勾儿茶、光枝勾儿茶、酸枣、枣和枳椇位于 rps19 的编码区，北枳椇、毛果枳椇和翼核果均位于 *rpl2* 和 *rpl22* 基因间区内。对于 IRb-SSC 边界，北枳椇、毛果枳椇和枳椇边界均位于 ndhF 的编码区，北枳椇、酸枣、翼核果边界均位于 ycf1 的编码区，多叶勾儿茶、光枝勾儿茶的 JSA 下游存在 ndhF 编码区，枣位于 *ycf1* 和 *ndhF* 基因间区内。对于 IRa-SSC 边界，除了翼核果 JLA 下游存在 trnN 编码区外，其它种均位于 *ycf1* 基因内。对于 IRa-LSC 边界，多叶勾儿茶、光枝勾儿茶边界均位于 rpl2 和 tRNA 基因间区内，北枳椇、毛果枳椇、酸枣和枳椇则位于 rpl2 和 trnH 间区内，翼核果位于 *rps19* 基因编码区，枣位于 *rps19* 和 *trnH* 基因编码区。

2.5 勾儿茶的叶绿体基因组共线性分析

采用 Mauve 多重基因组比对法检测多叶勾儿茶、光枝勾儿茶、枣、酸枣、枳椇、毛果枳椇、北枳椇和翼核果 8 个物种的叶绿体基因组的重排和共线性。通过多重基因组比对法检测出 8 个物种的叶绿体基因组之间有 2 个局部共线块（locallycollinear block，LCB）（图 4），表明 8 个物种之间基因组具

表 3　多叶勾儿茶及光枝勾儿茶叶绿体基因组分类

Table 3　Chloroplast genome classification between *B. polyphylla* and *B. polyphylla* var. *leioclada*

基因类别	基因功能	基因名称
光合作用基因	ATP 合酶亚基	*atpA*、*atpB*、*atpE*、*atpF*、*atpH*、*atpI*
	亚光系统 I	*psaA*、*psaB*、*psaC*、*psaI*、*psaJ*
	亚光系统 II	*psbA*、*psbB*、*psbC*、*psbD*、*psbE*、*psbF*、*psbH*、*psbI*、*psbJ*、*psbK*、*psbL*、*psbM*、*psbN*、*psbT*、*psbZ*、*ycf3*
	NADH-脱氢酶亚基	*ndhA*、*ndhB* (×2)、*ndhC*、*ndhD*、*ndhE*、*ndhF*、*ndhG*、*ndhH*、*ndhI*、*ndhJ*、*ndhK*
	细胞色素复合物 b/f 亚基	*petA*、*petB*、*petD*、*petG*、*petL*、*petN*
	Rubisco 酶亚基	*rbcL*
复制基因	核糖体 RNA 基因	*rrn16S* (×2)、*rrn23S* (×2)、*rrn4.5S* (×2)、*rrn5S* (×2)
	转运 RNA 基因	*tRNA-Ala*(×2)、*tRNA-Arg*(×3)、*tRNA-Asn*(×2)、*tRNA-Asp*、*tRNA-Cys*(×2)、*tRNA-Gln*、*tRNA-Glu*、*tRNA-Gly*(×2)、*tRNA-His*、*tRNA-Ile*(×2)、*tRNA-Leu*(×4)、*tRNA-Lys*、*tRNA-Met*(×4)、*tRNA-Phe*、*tRNA-Pro*、*tRNA-Ser*(×3)、*tRNA-Thr*(×2)、*tRNA-Trp*、*tRNA-Tyr*、*tRNA-Val*(×2)
	核糖体大亚基	*rpl14*、*rpl16*、*rpl2* (×2)、*rpl20*、*rpl22* 、*rpl23* (×2)、*rpl32*、*rpl33*、*rpl36*
	核糖体小亚基	*rps2*、*rps3*、*rps4*、*rps7* (×2)、*rps8*、*rps11*、*rps12* (×2)、*rps14*、*rps15*、*rps16*、*rps18*、*rps19*
	DNA 依赖核酸聚合酶	*rpoA*、*rpoB*、*rpoC1*、*rpoC2*
其他基因	乙酰辅酶 A 羧化酶亚基	*accD*
	c 型细胞色素合成基因	*ccsA*
	包裹膜蛋白	*cemA*
	蛋白酶	*clpP*
	成熟酶	*matK*
未知基因	保守开放性阅读框	*ycf1*、*ycf2* (×2)、*ycf4*、*yfc15*(×2)

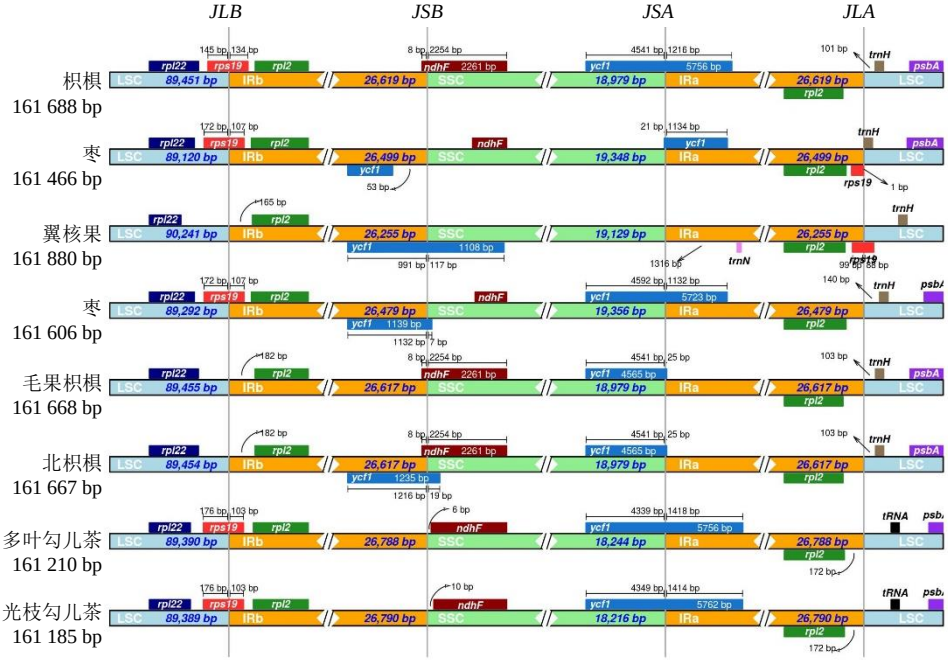

图 3　鼠李科植物叶绿体基因组边界分析

Fig. 3　Chloroplast genome boundary analysis of eight plants from *Rhamnaceae*

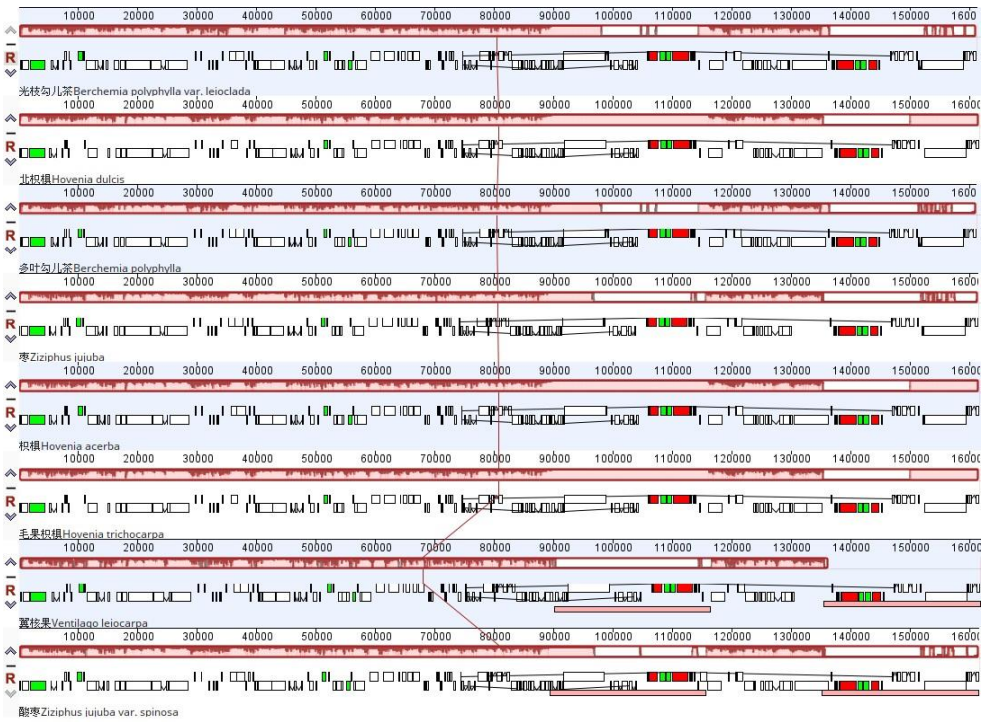

图 4　叶绿体基因组的共线性分析

Fig. 4　Covariance analysis of chloroplast genomes

有高度的相似性。叶绿体全基因组序列的比对显示，叶绿体基因组之间没有重排或倒置，从叶绿体基因组 4 个组分上看，IR 区序列变异最低，LSC 区的变异程度最高。

2.6　勾儿茶叶绿体基因组序列变异分析

为了评估勾儿茶属叶绿体基因组序列的差异程度，本研究采用 mVISTA 软件，并选用检测基因重排和倒位的全局比对模式（Shuffle-LAGAN），以光枝勾儿茶作为参考基因组，对多叶勾儿茶、枣、酸枣、枳椇、毛果枳椇、北枳椇和翼核果叶绿体全基因组序列同源性进行了比较研究。结果表明（图 5），叶绿体基因组 4 个部分排列顺序较为一致、保守性较高，在非基因编码区存在有较明显的差异，变异程度较高，其中 LSC 区的变异程度最高；而在基因编码区差异不明显，在 IRa 区的变异程度最低，具有较高的保守性。叶绿体基因组中在 *ndhA*、*ycf1*、*ycf3*、*rpl16*、*clpP* 以及 *atpF* 等基因的编码区存在显著差异。

2.7　系统发育分析

为确定多叶勾儿茶的系统位置，基于鼠李科和葡萄科叶绿体序列构建系统进化树（图 6）。葡萄科葡萄属和蛇葡萄属物种独立为一支，鼠李科枳椇属和枣属聚为一支，鼠李科勾儿茶属、鼠李属及翼核果属聚为一支，表明勾儿茶属、鼠李属及翼核果属有较近的亲缘关系。多叶勾儿茶和光枝勾儿茶聚为一起，支持率为 100%，亲缘关系最密切。但也发现勾儿茶属铁包金与勾儿茶属其它物种亲缘关系较远，值得进一步深入研究。

3　讨论

多叶勾儿茶为贵州苗族常用药材，多以根、茎、叶入药，有清热利湿，化痰止咳等功效[17]。光枝勾儿茶为勾儿茶属多叶勾儿茶的变种，又名铁包金[18]，与多叶勾儿茶的区别在于小枝及花序轴、果梗均无毛，叶柄仅上面有疏短柔毛，二者从形态上区别不大。据中国植物志记载，多叶勾儿茶和光枝勾儿茶的用药部位和药理作用并不完全相同，但两者均作为药材铁包金的基原在使用。因此有必要开发多叶勾儿茶和光枝勾儿茶分子标记，为其鉴定提供理论依据。

本研究对多叶勾儿茶和光枝勾儿茶叶绿体基因组序列进行分析，两者叶绿体序列总长度相差 25 bp，均为典型的环状四分体结构，所编码的基因类别、数量及排列顺序完全相同，具有高度相似的 GC 含量。多叶勾儿茶基因组中注释得到 131 个基因，与其他药用植物相比[19-22]，不含有转录起始因子 infA。在进化过程中，IRs 区发生的收缩或扩张现象

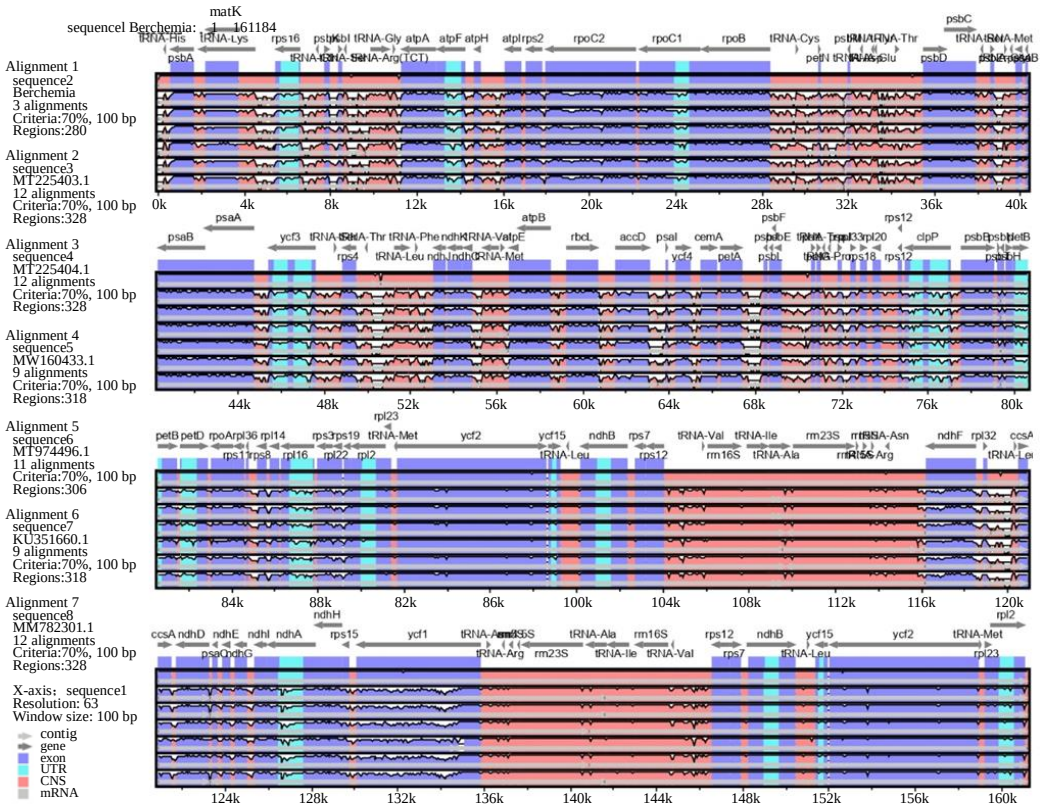

图 5　叶绿体基因组全局比对图

Fig. 5　Chloroplast genome global comparison map

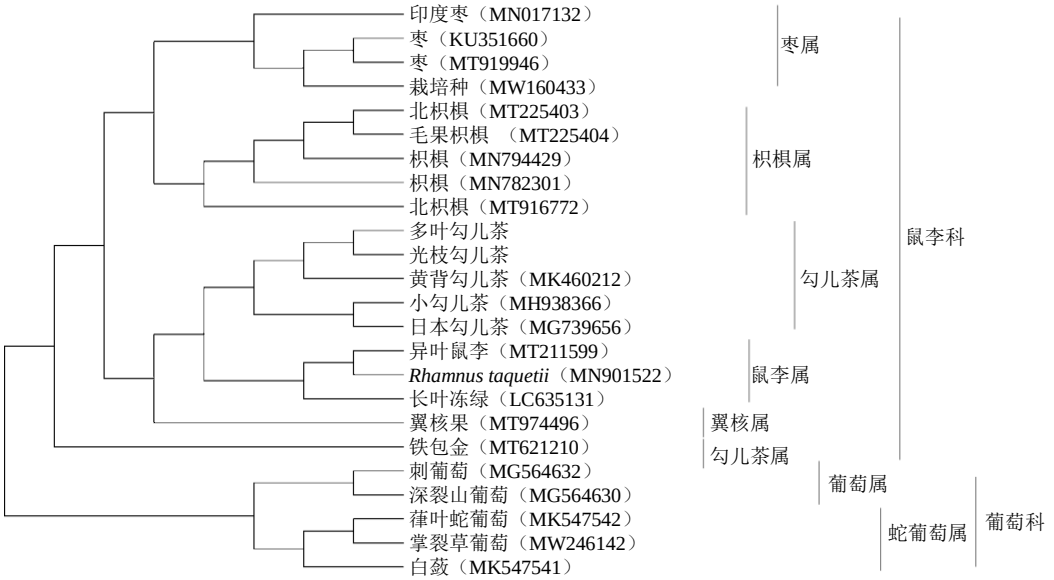

图 6　基于叶绿体基因组序列构建的系统发育树

Fig. 6　Phylogenetic tree based on chloroplast genome sequences

也是导致不同类群叶绿体基因组长度差异的原因[23]。对鼠李科勾儿茶属、枣属、枳椇属、翼核果属的叶绿体序列比对分析，虽然在基因组成、GC 含量等方面相对稳定保守，但 4 个边界区的过渡区域存在多样性。基于 mVISTA 叶绿体全基因组序列分析结果表明，鼠李科勾儿茶属、枣属、枳椇属、翼核果属叶绿体基因组具有高度相似性，没有发生重排或者倒置，且 IR 区序列变异最低，LSC 区的

变异程度最高。

叶绿体基因标记物，如简单重复序列（simple sequence repeats，SSRs）已经被用于基因流、种群分化和遗传多样性研究，叶绿体基因标记物也可用于药用植物驯化过程研究[24]。本研究从多叶勾儿茶鉴定 263 个 SSRs 位点，光枝勾儿茶有 260 个 SSRs 位点，且 SSRs 主要由 polyA 或 polyT 所构成。这些重复序列可为勾儿茶属物种分子标记开发，物种或产品鉴定提供理论依据。鼠李科分为咀签族、鼠李族、翼核果族和枣族，勾儿茶属、小勾儿茶属、枣属同为枣族，但是基于叶绿体基因组的系统进化树显示，勾儿茶属与鼠李属有较近的亲缘关系，建议将勾儿茶属归属为鼠李族。本研究表明叶绿体基因组可在物种水平上有效解决勾儿茶属的系统进化问题，为后续勾儿茶属群体遗传学和遗传多样性研究奠定理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] She M L, Watson M F. *Apiaceae (Umbelliferae) in Flora of China* [M]. Beijing: Science Press, 2005, 14: 60-74.

[2] 陈立, 董俊兴. 勾儿茶属植物化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37(4): 627-630.

[3] 滕红丽, 陈科力, 陈士林. 壮药铁包金及其药材商品的物种基础 [J]. 中药材, 2010, 33(5): 674-677.

[4] Xiong A S, Peng R H, Zhuang J, *et al*. Gene duplication, transfer, and evolution in the chloroplast genome [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(4): 340-347.

[5] Daniell H, Lin C S, Yu M, *et al*. Chloroplast genomes: Diversity, evolution, and applications in genetic engineering [J]. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 134.

[6] Twyford A D, Ness R W. Strategies for complete plastid genome sequencing [J]. *Mol Ecol Resour*, 2017, 17(5): 858-868.

[7] Liu C, Shi L C, Zhu Y J, *et al*. CpGAVAS, an integrated web server for the annotation, visualization, analysis, and GenBank submission of completely sequenced chloroplast genome sequences [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 715.

[8] Laslett D, Canbäck B. ARWEN: A program to detect tRNA genes in metazoan mitochondrial nucleotide sequences [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(2): 172-175.

[9] Greiner S, Lehwark P, Bock R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W59-W64.

[10] Kurtz S, Choudhuri J V, Ohlebusch E, *et al*. REPuter: The manifold applications of repeat analysis on a genomic scale [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(22): 4633-4642.

[11] Beier S, Thiel T, Münch T, *et al*. MISA-web: A web server for microsatellite prediction [J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(16): 2583-2585.

[12] Frazer K A, Pachter L, Poliakov A, *et al*. VISTA: Computational tools for comparative genomics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(Web Server issue): W273-W279.

[13] 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.

[14] Katoh K, Rozewicki J, Yamada K D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(4): 1160-1166.

[15] Kuraku S, Zmasek C M, Nishimura O, *et al*. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Web Server issue): W22-W28.

[16] Nguyen L T, Schmidt H A, von Haeseler A, *et al*. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies [J]. *Mol Biol Evol*, 2015, 32(1): 268-274.

[17] 唐远江, 尚以顺, 周思旋, 等. 多叶勾儿茶主要成分提取及抗氧化活性初探 [J]. 贵州农业科学, 2017, 45(11): 121-125.

[18] 景永帅, 吴兰芳, 张振东, 等. 光枝勾儿茶提取物的抗氧化活性 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(7): 1179-1180.

[19] 李述成, 郭生虎, 贝盏临. 小檗属植物叶绿体基因组序列结构及系统发育分析 [J]. 中草药, 2022, 53(3): 818-826.

[20] 张明英, 张雨曲, 李依民, 等. 北柴胡、紫花阔叶柴胡叶绿体全基因组解析及柴胡属药用植物叶绿体基因组比较与系统发育分析 [J]. 药学学报, 2021, 56(2): 618-629.

[21] 蒋明, 王军峰, 朱晏, 等. 射干叶绿体基因组结构、序列特征与系统发育分析 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 4039-4046.

[22] 江媛, 杨青淑, 王婧, 等. 毛重楼叶绿体基因组序列特征及其系统发育分析 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 4014-4022.

[23] Kim K J, Lee H L. Complete chloroplast genome sequences from Korean ginseng (*Panax schinseng* Nees) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants [J]. *DNA Res*, 2004, 11(4): 247-261.

[24] Yuan Q J, Zhang Z Y, Hu J, *et al*. Impacts of recent cultivation on genetic diversity pattern of a medicinal plant, *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) [J]. *BMC Genet*, 2010, 11: 29.

[责任编辑 时圣明]