

• 药材与资源 •

濒危紫皮石斛叶绿体基因组结构及系统发育分析

尚明越¹, 王嘉乐¹, 周莹², 张满常³, 刘颖琳^{1*}, 段宝忠^{1*}

1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000

2. 龙陵县石斛研究所, 云南 保山 678300

3. 保山市食品药品检验检测中心, 云南 保山 678000

摘要: 目的 解析紫皮石斛 *Dendrobium devonianum* 叶绿体基因组特征, 并探讨石斛属系统发育关系。方法 采用 Illumina 技术对紫皮石斛进行测序, 对其叶绿体基因组进行组装、注释和分析, 并基于共有编码基因序列构建系统发育树。结果 紫皮石斛叶绿体基因组大小为 146 493 bp, 总 GC 含量为 37.4%; 其大单拷贝区、小单拷贝区长度分别为 84 932、13 036 bp, 反向互补重复区为 24 263 bp; 共编码 118 个基因, 包括 72 个蛋白质编码基因, 38 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。密码子偏好分析表明, 亮氨酸是紫皮石斛叶绿体基因组中使用频次最高的氨基酸。系统发育分析表明, 紫皮石斛未形成单系, 与兜唇石斛 *D. aphyllum* 构成姊妹关系; 瘦轴组的重唇石斛 *D. hercoglossum* 和钩状石斛 *D. aduncum* 与石斛组其他物种聚为一支。结论 紫皮石斛叶绿体基因组呈典型四分体结构, 其与兜唇石斛亲缘关系最近; 瘦轴组的重唇石斛和钩状石斛与石斛组亲缘关系更近, 并入石斛组更合理。

关键词: 紫皮石斛; 叶绿体基因组; 石斛属; 兜唇石斛; 系统发育

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)19-6424-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.19.023

Analysis of chloroplast genome structure and phylogeny of endangered *Dendrobium devonianum*

SHANG Ming-yue¹, WANG Jia-le¹, ZHOU Ying², ZHANG Man-chang³, LIU Ying-lin¹, DUAN Bao-zhong¹

1. College of Pharmacy, Dali University, Dali 671000, China

2. Institute of Caulis Dendrobii Longling County, Baoshan 678300, China

3. Baoshan Food and Drug Inspection and Testing Center, Baoshan 678000, China

Abstract: Objective To obtain comprehensive information on the chloroplast (cp) genome of *Dendrobium devonianum* and estimate the phylogenetic relationships within the genus *Dendrobium*. **Methods** The cp genome of *D. devonianum* was sequenced using the Illumina platform. Bioinformatics software was employed to assemble, annotate, and characterize the cp genome. A phylogenetic tree was reconstructed based on the coding sequence. **Results** The complete cp genome of *D. devonianum* spanned 146 493 bp and consists of a large single-copy region (84 932 bp), a small single-copy region (13 036 bp), and reverse complementary repeat region (24 263 bp), and the total GC content was 37.4%. A total of 118 genes were identified, comprising 72 protein-coding genes, 38 tRNAs and 8 rRNAs. Analysis of codon usage bias revealed that leucine was the most frequently utilized amino acid in the cp genome. Phylogenetic analysis demonstrated that *D. devonianum* did not form a monophyletic clade instead of sharing a sister relationship with *D. aphyllum*. Additionally, *D. hercoglossum* and *D. aduncum* from Sect. *Breviflores* were grouped with other species from Sect. *Dendrobium*. **Conclusion** The cp genome of *D. devonianum* exhibits a typical circular tetrameric structure and displays the closest similarity to *D. aphyllum*. The *D. hercoglossum* and *D. aduncum* from Sect. *Breviflores* have a closer genetic relationship with the Sect. *Dendrobium* and it is more appropriate to incorporate them into the Sect. *Dendrobium*.

Key words: *Dendrobium devonianum* Paxt.; chloroplast genome; *Dendrobium* Sw.; *Dendrobium hercoglossum* Paxt.; phylogeny

收稿日期: 2023-03-10

基金项目: 云南省生物医药重大专项 (202302AA310029); 云南省生物医药重大专项 (202002AA100007); 云南省院士专家工作站 (202205AF150026); 云南省院士专家工作站 (202105AF150053); 云南省兴滇英才支持计划 (YNWR-QNBJ-2020251)

作者简介: 尚明越 (1999—), 硕士研究生, 研究方向为中药资源与鉴定。E-mail: smyueue@163.com

*通信作者: 刘颖琳, 讲师, 研究方向为中药资源及品质评价。Tel: (0872)2257401 E-mail: lyldaliedu@163.com

段宝忠, 教授, 研究方向为中药资源与鉴定。Tel: (0872)2257411 E-mail: bzduan@126.com

物种的准确分类和鉴定是许多生物学领域研究的先决条件^[1]。石斛属 *Dendrobium* Sw. 全球共有 1500 余种, 主要分布于我国西南及华南地区^[2], 有药用记载的有 40 余种, 作为传统滋补名贵中药, 已有上千年的历史^[3]。由于长期的掠夺式采挖, 石斛属植物资源遭到了毁灭性的破坏, 多个物种被列入 IUCN 中国物种红色名录^[4], 加强该属植物种质资源的保护和相关基础研究迫在眉睫。

紫皮石斛 *D. devonianum* Paxt. 为石斛属植物, 主要分布在云南、广西、贵州等地, 以茎入药, 具益胃生津、滋阴清热功效, 用于热病津伤、口干烦渴、胃阴不足、食少干呕等症^[5]。现代研究表明, 其含有多糖、酚类、萜类、生物碱等多种化合物^[6-7], 具有免疫调节、降血糖、护肝、抗氧化、抗疲劳等多种药理作用^[8-11]。目前, 有关紫皮石斛的研究主要集中在栽培、化学成分、药效学研究等方面^[12-14]。Li 等^[15]虽报道了紫皮石斛的叶绿体全基因组信息, 但其基因序列特征、功能分类、密码子组成、物种进化及其种间亲缘关系等尚未见报道, 限制了其遗传背景、种质资源保护及系统发育进化等方面的认识。此外, 由于石斛属植物丰富的遗传多样性和地理分布的重叠性, 使得该属植物的种间差异趋于复杂, 种间划分较为困难, 属内分组及不同物种间的系统发育关系长期存在争议^[16-17]。叶绿体基因组因其丰富的遗传变异和保守的基因信息, 已广泛用于重楼属 *Paris* L.、石斛属 *Dendrobium* Sw.、黄精属 *Polygonatum* Mill. 等物种的系统进化研究^[18-20]。然而有学者认为, 由于测序和组装等所导致的叶绿体基因组长度的变异, 以及所存在的 gaps/indels 可能导致系统发育分析偏差^[21]。编码基因序列 (coding sequence, CDS) 则相对稳定, 在系统发育研究中可提供更准确、可靠的系统发育结果^[22-23]。目前虽已有学者采用 CDS 对石斛属植物的系统发育进行了探讨^[24], 但由于所纳入样本有限, 部分石斛属植物的系统位置尚存在争议。鉴于此, 本研究对紫皮石斛 *D. devonianum* Paxt.、曲茎石斛 *D. flexicaule* Z. H. Tsi 和翅萼石斛 *D. cariniferum* Rchb. F. 的叶绿体基因组进行了测序、组装和注释, 详细解析了紫皮石斛叶绿体基因组结构特征, 并对 3 种石斛的序列差异及 IR 区的伸缩扩张情况进行了比较分析, 并基于 CDS 序列探讨了石斛属植物的系统发育关系, 期为该属植物的种质资源保护、遗传多样性和系统

发育研究提供科学参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

石斛样本采自于云南省龙陵县石斛研究所 (98°67' E, 24°66' N), 经大理大学段宝忠教授鉴定为兰科紫皮石斛 *D. devonianum* Paxt. (标本号 YN2022SH106)、曲茎石斛 *D. flexicaule* Z. H. Tsi (标本号 YN2022SH378) 和翅萼石斛 *D. cariniferum* Rchb. F. (标本号 YN2022SH386)。选取长势良好、无病虫害的新鲜幼嫩叶片, 用无菌水冲洗数次, 擦干叶片表面的水分后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 仪器

海尔超低温冰箱 (青岛海尔公司); 梅特勒 ME204 电子分析天平 (Mettler toledo 公司, 美国); 5430/R 小型台式高速冷冻离心机 (艾本德公司, 德国); 微量加样器 (艾本德公司, 德国); Nanodrop 2000 分光光度计 (Nanodrop Technologies, Thermo Science, 美国); HiSeq 4000 PE150 高通量测序仪 (Illumina 公司, 美国)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取与测序

取叶片, 采用植物 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN 公司, 北京) 提取总 DNA。使用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 核酸测定仪 (Nanodrop Technologies, 美国) 检测 DNA 质量, 检测合格后的总 DNA 利用 Illumina Nova Seq 平台进行建库测序。原始序列采用 NGS QC ToolKit 进行质控, 获得 clean reads 用于后续拼接和注释。

2.2 叶绿体全基因组序列组装、注释及图谱绘制

利用 GetOrganelle v.1.6.4 程序包依次调用 Bowtie2 v.2.4.4、SPAdes v.3.13.0、Blast v.2.5.0 软件, 对获得的 clean reads 进行组装, 得到高质量的 contigs, 并使用 Circlator v.2.0.1 软件检测 reads 映射的覆盖度和 contigs 各连接处, 以检测组装的正确性^[25]。采用 CPGAVAS2 对叶绿体基因组进行注释^[26], 基因组圈图采用 Chloroplot (<https://irscope.shinyapps.io/Chloroplot/>) 在线工具绘制^[27]。紫皮石斛、曲茎石斛和翅萼石斛的叶绿体基因组序列和基因注释信息已上传至 NCBI 数据库, 登录号分别为 OR_231924、OR_231925 和 OR_231926。

2.3 重复序列分析

采用 REPuter (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/reputer>) 对叶绿体基因组中的长重复序列进行分析, 汉明距离、最大计算重复次数、最小重复片段大小参数设置为 3、5000、30^[28]。利用 MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>) 对简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 进行检测, 参数阈值设置如下, 对应的各个重复单元的最少重复次数分别为 1-10、2-5、3-4、4-3、5-3、6-3^[24]。

2.4 密码子使用分析

采用 CodonW (<http://codonw.sourceforge.net>) 软件对紫皮石斛有效密码子数 (effective number of codons, ENc)、GC 含量、同义密码子第 3 位 GC 含量 (GC content of synonymous third codon positions, GC3s) 和同义密码子相对使用频次 (relative synonymous codon usage, RSCU) 进行分析和统计^[29]。

2.5 叶绿体基因组序列比较分析

采用 IRSCOPE (<https://irscope.shinyapps.io/irapp/>) 在线工具^[27]对紫皮石斛、曲茎石斛和翅萼石斛叶绿体基因组 4 个区域的边界信息进行分析; 并采用 mVISTA^[30]对全基因组进行比对分析。

2.6 系统发育分析

为探讨紫皮石斛的系统位置, 本研究按照《中国

植物志》兰科分类系统, 从 NCBI 下载了 26 条叶绿体基因组序列, 包括石斛属石斛组植物 13 条, 黑毛组植物 3 条, 顶叶组和瘦轴组植物各 2 条, 剑叶组、基肿组、草叶组和心叶组各 1 条。莎草兰 *Cymbidium elegans* Lindl. 和多花兰 *C. floribundum* Lindl. 作为外类群, 采用 MAFFT (V.7.0) (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) 对齐共有 CDS 序列, IQ-TREE 2.0.5 (<http://www.iqtree.org/>) 构建最大似然 (maximum likelihood, ML) 系统发育树^[31], 参数设置为 -m MFP -bb 1000 -alrt 1000 -nt AUTO。

3 结果与分析

3.1 叶绿体基因组结构特征

紫皮石斛叶绿体基因组测序结果见图 1, 其结构与大多数被子植物相同, 为环状双链分子, 总长度为 146 493 bp, 具有典型的四分体结构, 包括 1 个大单拷贝区 (large single copy region, LSC)、1 个小单拷贝区 (small single copy region, SSC) 和 1 对反向重复区 (inverted repeat, IR), 其大小分别为 84 932、13 035、24 263 bp。紫皮石斛 GC 含量为 37.4%, A/T 含量为 62.6%, 具有明显的 AT 偏向性。此外, LSC、IR 和 SSC 区域的 GC 值存在一定的差异, 碱基组成见表 1。IR 区的 GC 含量最高 (43.5%), 其次是 LSC 区 (35.1%) 及 SSC 区 (29.8%)。

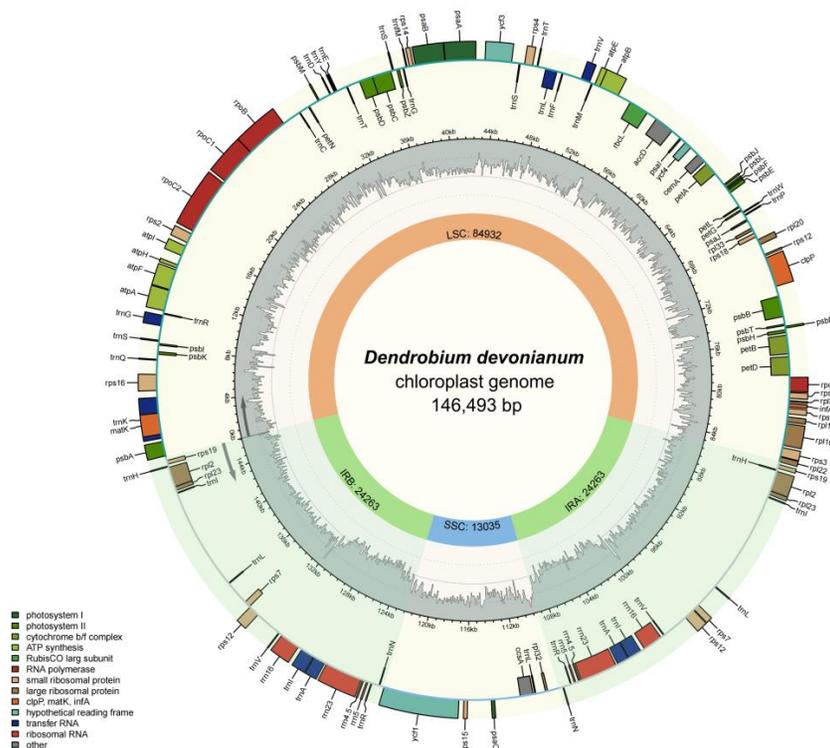


图 1 紫皮石斛叶绿体基因组图谱

Fig. 1 Gene map of the chloroplast (cp) genome in *D. devonianum*

表1 紫皮石斛叶绿体基因组结构组成

Table 1 Structure and composition of cp genome in *D. devonianum*

区域	A/%	C/%	G/%	T/%	GC/%	碱基长度/bp
总数	30.7	19.0	18.4	31.9	37.4	146 493
IRa	28.2	21.0	22.5	28.4	43.5	24 263
IRb	29.5	20.4	18.2	31.8	38.6	24 263
LSC	31.7	18.0	17.1	33.2	35.1	84 932
SSC	31.2	19.1	19.7	30.0	29.8	13 036

3.2 叶绿体基因组功能及分类

紫皮石斛叶绿体基因组共注释到 118 个基因，其中蛋白编码基因、tRNA 基因与 rRNA 基因分别为 72、38 和 8 个。根据其功能可以把它们分为 4 大类：分别是自我复制相关基因、光合作用相关基因、其他基因和未知功能基因。在这些基因中，有 6 个蛋白质编码基因 (*rpl22*、*rps19*、*rpl2*、*rpl23*、*rps7*、*rps12*)、8 个 tRNA 编码基因 (*trnH-GUG*、*trnI-CAU*、*trnL-CAA*、*trnV-GAC*、*trnI-GAU*、*trnA-UGC*、*trnR-ACG*、*trnN-GUU*) 和 4 个 rRNA 编码基因 (*rrn16S*、*rrn23S*、*rrn4.5S*、*rrn5S*) 位于 IR 区。叶绿体基因组内含子统

计表明，紫皮石斛中 19 个基因具有内含子，其中有 2 个基因 (*clpP*、*ycf3*) 含有 2 个内含子，其余 17 个基因均仅包含 1 个内含子 (表 2)。

3.3 重复序列分析

长重复序列是指长度 ≥ 30 bp 的重复序列，其有利于叶绿体基因组重排和种群遗传多样性增加。在紫皮石斛中共检测到 26 个长重复序列，包括 6 个正向重复、18 个回文重复和 2 个反向重复，未检测到互补重复序列。

SSR 是一段短而串联的 DNA 序列，大小为 1~6 bp，广泛分布于叶绿体基因组的不同位置。紫皮

表2 紫皮石斛叶绿体基因组注释信息

Table 2 Annotation information of cp genome in *D. devonianum*

基因类别	基因分组	基因名称
自我复制相关基因	核糖体 RNA 基因	<i>rrn16S</i> (×2), <i>rrn23S</i> (×2), <i>rrn4.5S</i> (×2), <i>rrn5S</i> (×2)
	转运 RNA 基因	<i>trnA-UGC</i> (×2)*, <i>trnC-GCA</i> , <i>trnD-GUC</i> , <i>trnE-UUC</i> , <i>trnF-GAA</i> , <i>trnG-UCC</i> * (×2), <i>trnH-GUG</i> (×2), <i>trnI-GAU</i> * (×2), <i>trnI-CAU</i> * (×2), <i>trnK-UUU</i> *, <i>trnL-UAG</i> , <i>trnL-UAA</i> *, <i>trnL-CAA</i> (×2), <i>trnM-CAU</i> , <i>trnN-GUU</i> (×2), <i>trnP-UGG</i> , <i>trnQ-UUG</i> , <i>trnR-UCU</i> , <i>trnR-ACG</i> (×2), <i>trnS-GGA</i> (×2), <i>trnS-UGA</i> , <i>trnT-GGU</i> , <i>trnT-UGU</i> , <i>trnV-UAC</i> *, <i>trnV-GAC</i> (×2), <i>trnW-CCA</i> , <i>trnY-GUA</i> , <i>trnM-CAU</i>
	核糖体蛋白小亚基	<i>rps11</i> , <i>rps12</i> (×2), <i>rps14</i> , <i>rps15</i> , <i>rps16</i> *, <i>rps18</i> , <i>rps19</i> (×2), <i>rps2</i> , <i>rps3</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7</i> (×2), <i>rps8</i>
	核糖体蛋白大亚基	<i>rpl14</i> , <i>rpl16</i> *, <i>rpl2</i> (×2)*, <i>rpl20</i> , <i>rpl22</i> , <i>rpl23</i> (×2), <i>rpl32</i> , <i>rpl33</i> , <i>rpl36</i>
光合作用相关基因	DNA 依赖核酸聚合酶	<i>rpoA</i> , <i>rpoB</i> , <i>rpoCI</i> *, <i>rpoC2</i>
	亚光系统 I	<i>psaA</i> , <i>psaB</i> , <i>psaC</i> , <i>psaI</i> , <i>psaJ</i>
	亚光系统 II	<i>psbA</i> , <i>psbB</i> , <i>psbC</i> , <i>psbD</i> , <i>psbE</i> , <i>psbF</i> , <i>psbH</i> , <i>psbI</i> , <i>psbJ</i> , <i>psbK</i> , <i>psbL</i> , <i>psbM</i> , <i>psbN</i> , <i>psbT</i> , <i>psbZ</i> , <i>ycf3</i> **
	细胞色素复合物 b/f 亚基	<i>petA</i> , <i>petB</i> *, <i>petD</i> *, <i>petG</i> , <i>petL</i> , <i>petN</i>
其他基因	ATP 合酶亚基	<i>atpA</i> , <i>atpB</i> , <i>atpE</i> , <i>atpF</i> *, <i>atpH</i> , <i>atpI</i>
	Rubisco 酶大亚基	<i>rbcL</i>
	NADH-脱氢酶亚基	—
	成熟酶	<i>matK</i>
未知功能基因	包裹膜蛋白	<i>cemA</i>
	乙酰辅酶 A 羧化酶亚基	<i>accD</i>
	c 型细胞色素合成基因	<i>ccsA</i>
	蛋白酶	<i>clpP</i> **
未知功能基因	转录起始因子	<i>infA</i>
	保守开放阅读框	<i>ycf1</i> *, <i>ycf4</i>

*含有 1 个内含子 **含有 2 个内含子

* containing one intron ** containing two introns

石斛叶绿体基因组 SSRs 类型及数量见表 3, 可见紫皮石斛叶绿体基因组中共有 42 个 SSR 位点, 包括单核苷酸重复基序 23 个, 二核苷酸重复基序 13 个,

四核苷酸重复基序 5 个和六核苷酸重复基序 1 个, 未发现三核苷酸和五核苷酸重复基序。SSRs 的类型以 A/T 为主 (23 个); 其次为 AT/AT (12 个)。

表 3 紫皮石斛叶绿体基因组 SSRs 类型及数量

Table 3 Type and quantity of SSRs of cp genome in *D. devonianum*

核苷酸类型	SSRs 重复序列	数量	占比/%	合计占比/%
单核苷酸	A/T	23	54.76	54.76
二核苷酸	AG/CT	1	2.38	30.95
	AT/AT	12	28.57	
四核苷酸	AAAG/CTTT	1	2.38	11.90
	AAAT/ATTT	1	2.38	
	AATT/AATT	1	2.38	
	ACAG/CTGT	1	2.38	
	AGAT/ATCT	1	2.38	
六核苷酸	AGATGG/ATCTCC	1	2.38	2.38
合计		42		

3.4 密码子偏好性分析

密码子使用频次统计显示, 紫皮石斛共有 64 种密码子, 总使用频次为 15 575 次, 其中 61 种密码子编码 24 种氨基酸, 其余 3 种密码子为终止密码子 (图 2)。使用频率最高的密码子为 GAA, 使用频次 691 次, RSCU 为 1.54; 使用频率最低的密码子为 UGA, 使用频次 11 次, RSCU 为 0.8。在所有

氨基酸密码子中, 频次最高的氨基酸为亮氨酸 (Leu), 编码 1541 次, 占 9.89%; 频次最低的氨基酸为色氨酸, 编码 277 次, 占 1.78%。紫皮石斛叶绿体基因组中 RSCU ≥ 1 的密码子共有 32 种, 其中 3 种以 G/C 结尾, 29 种以 A/U 结尾。此外, 紫皮石斛叶绿体基因组 ENc 值为 48.62, GC 和 GC3s 含量分别为 38.2% 和 25.8%。

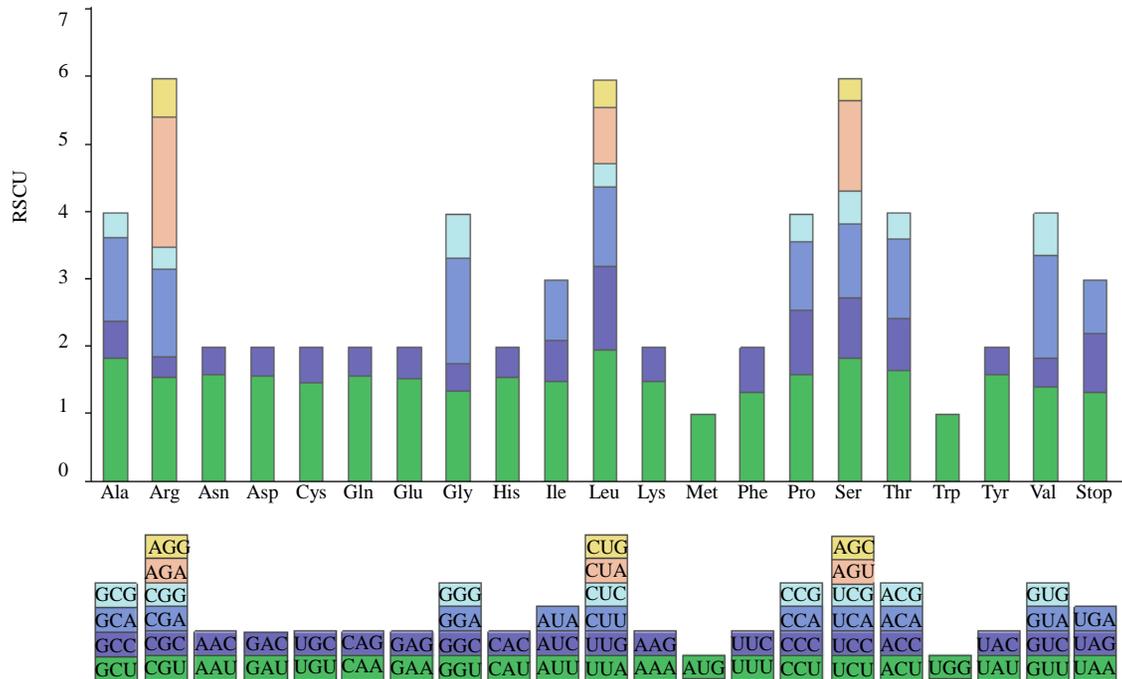


图 2 紫皮石斛叶绿体基因组相对同义密码子使用度
Fig. 2 Relative synonymous codon usage of cp genome in *D. devonianum*

3.5 叶绿体基因组边界分析

IR 区域被认为叶绿体基因组中最保守的区域,但其边界区序列可能会向外延伸扩张或向内部收缩,从而导致相关基因拷贝数的变化,或导致边界区域假基因的产生,是叶绿体基因组进化中的共有现象,也是其长度变异的主因^[32]。结果显示,紫皮石斛、曲茎石斛和翅萼石斛植物叶绿体基因组共有4个边界,分别是 IRb-LSC、IRb-SSC、IRa-SSC、IRa-LSC (图3)。

3个物种的 *rpl22* 基因均位于 IRb-LSC 边界,在 IRb 区域长度为 37~46 bp。曲茎石斛和翅萼石斛的 *ycf1* 基因均位于 IRb-SSC 和 IRa-SSC 边界,而紫皮石斛的 *ycf1* 基因完全位于 SSC 区。值得注意的是,除翅萼石斛的 *ndhF* 基因位于 IRb-SSC 边界外,其余物种的 *ndhF* 基因在 IRb-SSC 边界均缺失。此外,3个物种的 *psbA* 基因均完全位于 LSC 区,距 IRa-LSC 边界 110~120 bp; 而 *rps19* 基因则完全位于 IR 区。

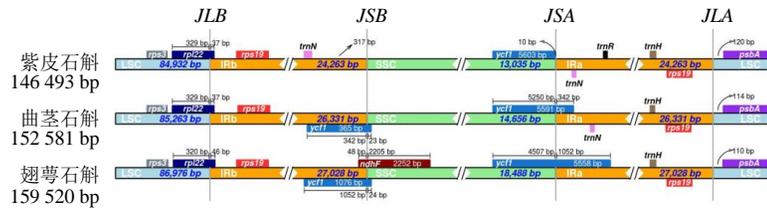


图3 3种石斛属植物的叶绿体基因组 LSC、IRs 和 SSC 边界区域比较

Fig. 3 Comparison of LSC, IRs, and SSC border regions of cp genome in three *Dendrobium* species

3.6 基因组序列变异分析

为评估石斛属叶绿体基因组序列的差异程度,本研究以翅萼石斛 (OK_173600.1) 作为参考基因组,采用 mVISTA 在线工具,对紫皮石斛、曲茎石斛和翅萼石斛的叶绿体基因组全长序列进行比对分析 (图4)。由图4可见,3条叶绿体基因组序列中非编码区变异高于蛋白编码区域; LSC 区、SSC 区变异明显大于 IR 区, rRNA 基因高度保守; 变异较大

的基因有 *matK*、*trnV-UAC*、*rbcL*、*ndhF*、*rps15*、*ycf1*; 其他基因的保守程度较高,相似度均在 90% 以上。3个石斛属植物的基因间区,如 *trnF-GAA-trnV-UAC*、*rbcL-accD*、*ycf4-cemA*、*ndhF-rpl32* 和 *ccsA-psaC*, 变异均大于基因区。此外,紫皮石斛变异相对较大,如 *ycf15*、*trnL-CAA*、*rps12* 基因,这些基因为紫皮石斛及石斛属植物的分子鉴定提供了新的选择。

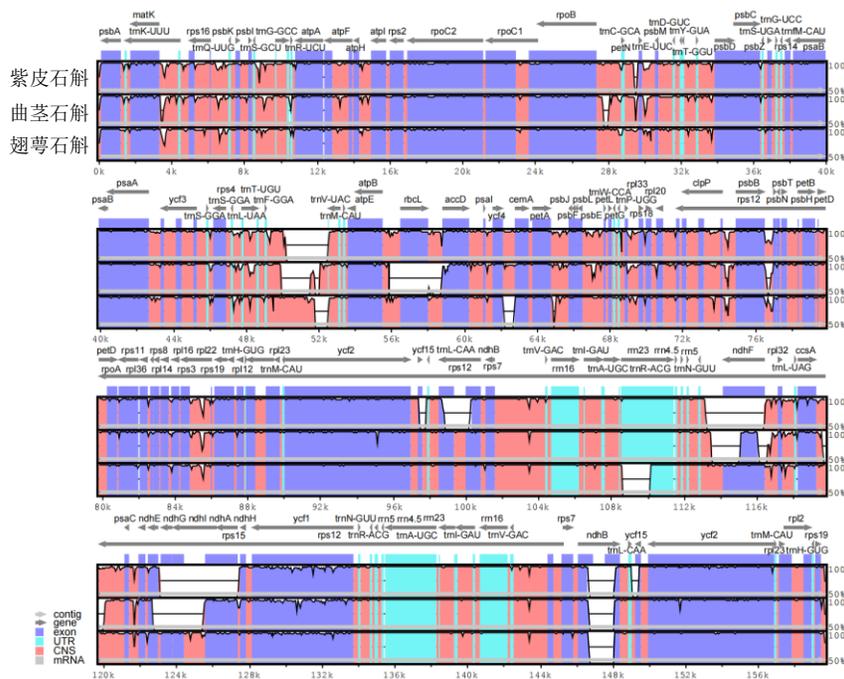


图4 3种石斛属植物叶绿体基因组全局比对分析

Fig. 4 Global alignment analysis of cp genome in three *Dendrobium* species

3.7 系统发育分析

为确定紫皮石斛的系统发育位置,本研究对 22 个石斛属植物共 29 条叶绿体基因组序列中进行分析,共提取到 53 个共有 CDS, ML 系统发育树见图 5。结果显示,曲茎石斛 3 个样本形成单系,与铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo 构成姊妹关系;紫皮石斛与兜

唇石斛 *D. aphyllum* (Rohb.) C. E. Fishcher 的亲缘关系最近,但紫皮石斛 3 个样本并未聚为一支,其中 NC_035325 和 LC_317045 构成单系分支,而 OR_231924 与兜唇石斛构成姊妹关系。此外,翅萼石斛两个样本聚为一支,并与草叶组的梳唇石斛 *D. strongylanthum* Rchb. F 互为姊妹关系,支持率达 100%。

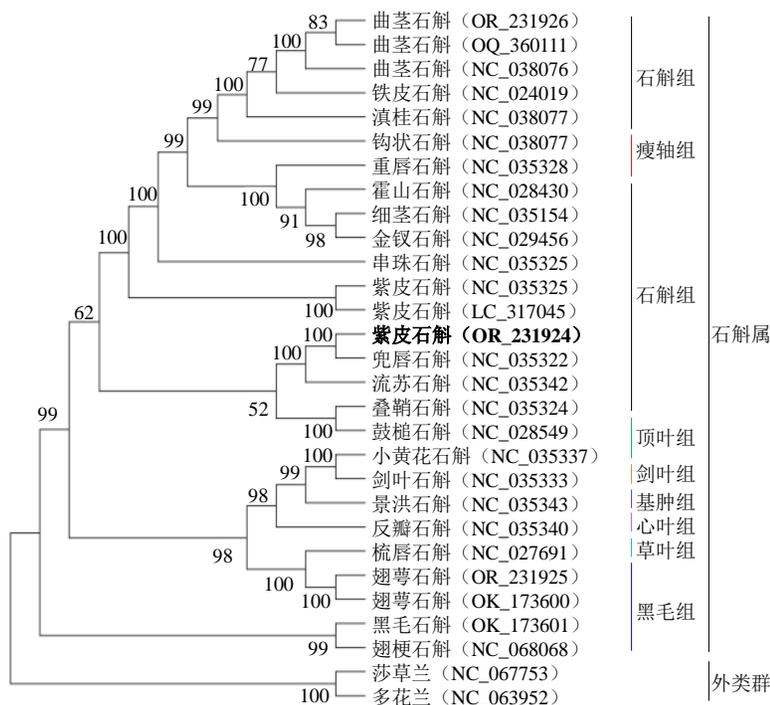


图 5 基于共有 CDS 构建石斛属 ML 系统发育树

Fig. 5 Construction of ML phylogenetic trees of *Dendrobium* and other species based on common CDS

4 讨论

4.1 叶绿体基因组序列特征及比较分析

紫皮石斛叶绿体基因组全长 146 493 bp, GC 含量为 37.4%, 共编码 118 个基因; 各区域序列中 GC 含量从高到低依次为 IRs>LSC>SSC, 其原因可能是 IR 区含有高 GC 含量的 rRNA 基因^[19], 与先前报道的尖刀唇石斛 *D. heterocarpum* Lindl.、翅梗石斛 *D. trigonopus* Rchb. F 研究结果一致^[3]。

SSRs 普遍存在于真核生物基因组中, 具有多态性高、分布广泛、两端(侧翼)序列高度保守等特点^[33-34], 其类型、数目及分布因植物不同而异, 被作为分子标记广泛用于群体遗传学、谱系地理学等相关研究^[35-36]。紫皮石斛叶绿体基因组中共检测到 42 个 SSR 位点, 以单核苷酸(54.76%)重复为主要类型, 其次为二核苷酸(30.95%); 单核苷酸和二核苷酸的重复序列类型分别以 A/T 和 AT/TA 为主, 其余 SSRs 的重复单元亦主要由 A 及 T 碱基组

合构成, 较少出现 G/C 串联重复序列, 这与多叶勾儿茶 *Berchemia polyphylla* Wall. ex Laws.、百两金 *Ardisia crispa* (Thunb.) A. DC. 等陆生植物观察到的结果一致^[28], 进一步表明叶绿体基因组的 SSRs 具有明显的 AT 偏向性, 其原因可能与 AT 和 GC 的解链难易程度有关^[37]。此外, Mukhopadhyay 等^[38]认为 AT 碱基偏向性还与叶绿体基因组各区域的变异程度相关联。根据对紫皮石斛、曲茎石斛和翅萼石斛的核苷酸变异性结果分析可发现, GC 含量较高的 IR 区变异程度显著低于 GC 含量较低 LSC 区和 SSC 区, 因此可推断, 碱基偏好性可能与序列的变异程度呈正相关。

密码子偏好性分析表明, Leu 是紫皮石斛叶绿体基因组中占比最高的氨基酸(9.89%)。RSCU 通常被用作密码子偏好性的重要指标, 当 RSCU>1 时, 表明该密码子使用频率较高, 反之则该密码子使用频率较低^[39]。紫皮石斛 RSCU>1 的 30 种密码

子中,有29种均以A/U结尾,提示紫皮石斛叶绿体基因组偏好使用A/U结尾的同义密码子,这之前发表的石斛属植物一致^[3]。此外,紫皮石斛叶绿体基因组的ENc值大于40,提示密码子使用偏好性较弱^[40];紫皮石斛叶绿体基因组GC和GC3s含量均小于50%,表明其密码子偏好使用A和T碱基,与已报道的石斛属其他物种研究结果一致^[24],在甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.^[41]和红花变豆菜 *Sanicula rubriflora* Fr. Schmidt^[37]中也发现了类似的研究结果。

IR/SC边界变异是叶绿体基因组结构变异的主要驱动力,其收缩和扩张在植物叶绿体DNA的演化过程中起着关键作用^[42-43]。本研究3个石斛属物种叶绿体基因组在IRb-SSC、IRa-SSC边界存在较大差异,IRb-LSC和IRa-LSC边界则相对较为保守,与绝大多数兰科植物相似^[44]。紫皮石斛和曲茎石斛的 $ndhF$ 基因均缺失,一般认为叶绿体中 ndh 类基因的缺失是由于该类基因的功能退化或是向核基因组发生转移;部分研究者认为真菌共生助推了该现象的发生^[45-46],在其他兰科植物中也观察到类似的情况^[47]。mVISTA分析发现,紫皮石斛、曲茎石斛和翅萼石斛叶绿体基因组序列在非基因编码区存在明显差异,其中LSC和SSC区的变异程度最大。此外,3个物种的 $matK$ 、 $trnV-UAC$ 、 $rbcL$ 、 $ndhF$ 、 $rps15$ 、 $ycf1$ 、 $trnF-GAA-trnV-UAC$ 、 $rbcL-accD$ 、 $ycf4-cemA$ 、 $ndhF-rpl32$ 和 $ccsA-psaC$ 区域存在明显变异,这些高变区可为石斛属物种的分子标记开发、特异性DNA条形码筛选及物种分类鉴定提供科学依据。

4.2 系统发育分析

本研究以莎草兰和多花兰为外类群,基于53个共有CDS构建系统发育树。研究发现紫皮石斛与兜唇石斛的亲缘关系较近。但紫皮石斛3个样本并未聚为一支,采自云南龙陵的样本OR_231924与兜唇石斛构成姊妹关系,来自贵州兴义的两个样本NC_035325和LC_317045构成单系分支;提示不同的地理来源可能导致紫皮石斛种内变异,类似的结果在艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Van.^[48]、碎米桫 *Isodon rubescens* (Hemsley) H. Hara^[49]等物种中也得到证实。此外,瘦轴组的重唇石斛 *D. hercoglossum* Rchb. F.和钩状石斛 *D. aduncum* Wall ex Lindl.与石斛组的滇桂石斛 *D. scoriarum* W. W. Smith、铁皮石斛、曲茎石斛、霍山石斛 *D. huoshanense* C. Z. Tang

et S. J. Cheng、细茎石斛 *D. moniliforme* (L.) Sw.、金钗石斛 *D. moniliforme* (L.) Sw.等物种聚在同一分支(支持率大于70%);此前基于ITS序列的系统发育分析认为重唇石斛和钩状石斛应归为石斛组,而不应归属瘦轴组^[50],王慧中等^[51]也支持上述观点;因此,本研究结果支持重唇石斛和钩状石斛并入石斛组更合适。此外,翅萼石斛2个样本未与黑毛组的黑毛石斛 *D. williamsonii* Day et Rchb. F.、翅梗石斛聚为一支,与传统的形态学分类相违背^[52],相反与草叶组的梳唇石斛形成姊妹关系,支持率达100%。翅萼石斛叶和叶鞘被黑毛,特征上与黑毛组的主要特征符合,但是否存在其他特异性状有待进一步探讨;同时,由于样本的限制,尚需更多的分子证据支持,基于叶绿体基因组更大样本的研究有可能在物种水平上解决石斛属的分类和系统进化问题。

本研究对紫皮石斛叶绿体基因组进行组装和序列分析,不仅丰富了石斛属植物的遗传资源,也为后续开展群体遗传学和遗传多样性研究奠定了科学基础,对石斛属种质资源保护及合理开发利用具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Aquino D, Cervantes R, Gernandt D, et al. Species delimitation and phylogeny of *Epithelantha* (Cactaceae) [J]. *Syst Bot*, 2019, 44: 600-615.
- [2] 宋经元,郭顺星,肖培根.近10年来石斛属植物的研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2004, 39(10): 725-727.
- [3] 李卓蔚,邱迁,郎佳琪,等.尖刀唇石斛和翅梗石斛叶绿体全基因组分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(16): 5159-5169.
- [4] 汪松,解焱.中国物种红色名录(第一卷) [M].北京:高等教育出版社,2004: 23.
- [5] 倪凯,何鹏飞,梁志庆,等.齿瓣石斛研究进展 [J]. *云南中医中药杂志*, 2023, 44(1): 86-90.
- [6] 徐海军,杨洋,董雅琪,等.石斛多糖药理作用及其作用途径的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2021, 36(7): 1527-1532.
- [7] 代国娜,尚明越,王嘉乐,等.金钗石斛多糖提取分离、结构解析及生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(12): 3821-3830.
- [8] 吴蓓丽,赵铮蓉,刘骅,等.紫皮石斛研究进展 [J]. *中成药*, 2020, 42(11): 2990-2998.
- [9] 周忠瑜,蒲婷婷,张蕾,等.石斛属植物抗糖尿病本草学、物质基础及作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2022,

- 53(18): 5934-5944.
- [10] Cao W, Zhu B J, Zhang X, *et al.* Characterization and immunological activity of polysaccharides from two types of *Dendrobium devonianum* with different appearance [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 223: 115146.
- [11] 董寿堂, 杨娇, 张旭强, 等. 紫皮石斛抗小鼠体力疲劳作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 2019, 35(1): 44-46.
- [12] 明兴加, 李博然, 叶陈娟, 等. 齿瓣石斛的原生境播种及其株丛生长特性研究 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(2): 223-233.
- [13] 吴蕾蕾, 丁玉莲, 薛亚甫, 等. 紫皮石斛联苳类化学成分研究及 TLC 鉴别 [J]. 西北药学杂志, 2020, 35(6): 791-795.
- [14] Wei X P, Sun W, Zhu P P, *et al.* Refined polysaccharide from *Dendrobium devonianum* resists H1N1 influenza viral infection in mice by activating immunity through the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 999945.
- [15] Li L D, Jiang Y, Liu Y Y, *et al.* The large single-copy (LSC) region functions as a highly effective and efficient molecular marker for accurate authentication of medicinal *Dendrobium* species [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(10): 1989-2001.
- [16] 王艳萍, 李楚然, 罗艳, 等. 中国 9 种石斛属植物的花药帽形态及其分类学意义初探 [J]. 植物科学学报, 2021, 39(4): 367-378.
- [17] 涂国章, 张显强. DNA 条形码技术在石斛分类鉴定中的应用进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(2): 154-160.
- [18] 钟志敏, 张桂芳, 黄松, 等. 石斛属叶绿体 DNA 序列的系统发育及变异位点分析 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3605-3611.
- [19] 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.
- [20] Wang J, Qian J, Jiang Y, *et al.* Comparative analysis of chloroplast genome and new insights into phylogenetic relationships of *Polygonatum* and tribe polygonateae [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 882189.
- [21] Goremykin V V, Holland B, Hirsch-Ernst K I, *et al.* Analysis of *Acorus calamus* chloroplast genome and its phylogenetic implications [J]. *Mol Biol Evol*, 2005, 22(9): 1813-1822.
- [22] Jiang Y, Miao Y J, Qian J, *et al.* Comparative analysis of complete chloroplast genome sequences of five endangered species and new insights into phylogenetic relationships of *Paris* [J]. *Gene*, 2022, 833: 146572.
- [23] Bock D G, Kane N C, Ebert D P, *et al.* Genome skimming reveals the origin of the Jerusalem Artichoke tuber crop species: Neither from Jerusalem nor an artichoke [J]. *New Phytol*, 2014, 201(3): 1021-1030.
- [24] 朱斌, 甘晨晨, 王洪程. 球花石斛 (*Dendrobium thyrsiflorum*) 叶绿体基因组特征及亲缘关系解析 [J]. 生物技术通报, 2021, 37(5): 38-47.
- [25] 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.
- [26] Liu H, Hu H B, Zhang S H, *et al.* The complete chloroplast genome of the rare species *Epimedium tianmenschanensis* and comparative analysis with related species [J]. *Physiol Mol Biol Plants*, 2020, 26(10): 2075-2083.
- [27] 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.
- [28] 曾宪法, 刘畅, 杨小英, 等. 大叶百两金和细柄百两金叶绿体全基因组解析及系统发育分析 [J]. 药学报, 2023, 58(1): 217-228.
- [29] Chen C J, Chen H, Zhang Y, *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [J]. *Mol Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [30] Poliakov A, Foong J, Brudno M, *et al.* GenomeVISTA: An integrated software package for whole-genome alignment and visualization [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(18): 2654-2655.
- [31] Katoh K, Standley D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(4): 772-780.
- [32] Liu Y Q, Shen Y, Teng L, *et al.* The traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Stemona* species: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113112.
- [33] 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.
- [34] Powell W, Morgante M, McDevitt R, *et al.* Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(17): 7759-7763.
- [35] Du Q Z, Wang B W, Wei Z Z, *et al.* Genetic diversity and population structure of Chinese White poplar (*Populus tomentosa*) revealed by SSR markers [J]. *J Hered*, 2012, 103(6): 853-862.
- [36] Chmielewski M, Meyza K, Chybicki I J, *et al.*

- Chloroplast microsatellites as a tool for phylogeographic studies: The case of white oaks in Poland [J]. *IForest*, 2015, 8(6): 765-771.
- [37] 王震, 柳驰, 任伟超, 等. 红花变豆菜叶绿体基因组组装与序列特征分析研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(22): 7183-7190.
- [38] Mukhopadhyay P, Basak S, Ghosh T C. Nature of selective constraints on synonymous codon usage of rice differs in GC-poor and GC-rich genes [J]. *Gene*, 2007, 400(1/2): 71-81.
- [39] 兰朝辉, 田徐芳, 师玉华, 等. 五月艾 *Artemisia indica* 叶绿体基因组结构及系统发育分析 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(22): 6058-6065.
- [40] Ikemura T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system [J]. *J Mol Biol*, 1981, 151(3): 389-409.
- [41] 张洁, 陆嘉惠, 王倩倩, 等. 新疆产黄甘草叶绿体基因组特征及甘草属药用植物叶绿体基因组比较与系统发育分析 [J]. *药学报*, 2022, 57(5): 1516-1525.
- [42] 富贵, 刘晶, 李军乔. 密花香薷叶绿体基因组结构及系统进化分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(6): 1844-1853.
- [43] 柏国清, 卢元, 尉倩, 等. 尾花细辛与花叶细辛叶绿体基因组比较及系统发育分析 [J]. *药学报*, 2023, 58(5): 1364-1371.
- [44] 杜致辉, 杨澜, 张朝君, 等. 黑喉石斛叶绿体基因组特征及比较分析 [J]. *热带作物学报*, 2021, 42(11): 3111-3119.
- [45] Chang C C, Lin H C, Lin I P, et al. The chloroplast genome of *Phalaenopsis aphrodite* (Orchidaceae): Comparative analysis of evolutionary rate with that of grasses and its phylogenetic implications [J]. *Mol Biol Evol*, 2006, 23(2): 279-291.
- [46] Wang B, Qiu Y L. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants [J]. *Mycorrhiza*, 2006, 16(5): 299-363.
- [47] Martín M, Sabater B. Plastid *ndh* genes in plant evolution [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 48(8): 636-645.
- [48] Chen C J, Miao Y H, Luo D D, et al. Sequence characteristics and phylogenetic analysis of the *Artemisia argyi* chloroplast genome [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 906725.
- [49] Zhou Z Y, Wang J, Pu T T, et al. Comparative analysis of medicinal plant *Isodon rubescens* and its common adulterants based on chloroplast genome sequencing [J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 1036277.
- [50] 栗丹, 李振坚, 毛萍, 等. 基于 ITS 序列石斛材料的鉴定及系统进化分析 [J]. *园艺学报*, 2012, 39(8): 1539-1550.
- [51] 王慧中, 卢江杰, 施农农, 等. 利用 RAPD 分析 13 种石斛属植物的遗传多样性和亲缘关系 [J]. *中草药*, 2006, 37(4): 588-592.
- [52] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第六卷, 第一分册) 蕨类植物门 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 126.

[责任编辑 时圣明]