

• 药材与资源 •

细辛叶绿体基因组结构特征与系统进化分析

周军辉¹, 鬲晓敏¹, 李莎莎¹, 陈 尘¹, 贾 芸¹, 张明英^{2*}, 柏国清^{1*}

1. 陕西省西安植物园 (陕西省植物研究所), 陕西植物资源保护与利用工程技术研究中心, 陕西 西安 710061

2. 陕西中医药大学药学院, 陕西省中医药管理局“秦药”研发重点实验室, 陕西 西安 712046

摘要: 目的 以细辛药材为材料, 采用高通量测序和生物信息学技术组装完整的叶绿体基因组序列, 明确其结构特征、系统发育位置。方法 基于 Illumina 测序平台对细辛叶绿体基因组序列进行结构特征分析; 同时, 采用最大似然法 (maximum likelihood, ML) 构建马兜铃科的系统发育关系。结果 华细辛和辽细辛叶绿体基因组全长为 160 521~160 555 bp, 表现出典型的四分体结构, 且两者叶绿体基因组 GC 含量均为 38.5%。细辛叶绿体基因组包含 128 个基因, 其中 85 个蛋白质编码基因, 34 个 tRNA 基因, 8 个 rRNA 基因。此外, 系统发育分析结果显示, 基于完整的叶绿体基因组和蛋白编码数据集构建的拓扑树一致, 细辛属物种和马兜铃属物种形成一个支持率的单系分支。结论 细辛叶绿体基因组测序、组装、结构特征分析, 发现其大小介于 *Asarum bracteolata* 和 *A. sieboldii* var. *seoulense* 之间, IR 区存在 *rpl16*、*rps19*、*ycf1*、*rpl23* 等基因扩张, 研究结果丰富了细辛属植物遗传资源, 为该属物种分子鉴定、系统发育以及野生资源保护与开发利用等研究提供理论基础。

关键词: 细辛; 华细辛; 辽细辛; 叶绿体基因组; 组装; 系统发育

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)24-8191-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.023

Characteristics and phylogenetic analysis of chloroplast genome of medicinal plant *Asari Radix et Rhizoma*ZHOU Jun-hui¹, GE Xiao-min¹, LI Sha-sha¹, CHEN Chen¹, JIA Yun¹, ZHANG Ming-ying², BAI Guo-qing¹

1. Shaanxi Engineering Research Centre for Conservation and Utilization of Botanical Resources, Xi'an Botanical Garden of Shaanxi Province (Institute of Botany of Shaanxi Province), Xi'an 710061, China

2. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine/Key Laboratory for Research of "Qin Medicine" of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China

Abstract: Objective The complete chloroplast genome of medicinal plant Xixin (*Asari Radix et Rhizoma*) sequenced and assembled by high-throughput sequencing and bioinformatics technology to confirm the genome structure characteristics, phylogenetic relationship and its evolutionary status. **Methods** The Illumina sequencing platform was used to perform characterization of the complete chloroplast genome sequence of *Asari Radix et Rhizoma*; Meanwhile, the maximum likelihood (ML) was used to construct the phylogenetic relationship of Aristolochiaceae. **Results** The results indicated that the whole length of Huaxixin (*Asarum sieboldii* Miq.) and Liaoxixin [*A. heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.] plastid was 160 521-160 555 bp, showing a typical tetrad structure. The GC contents of the chloroplast genome were 38.5%. The plastid genome contains 128 genes, including 85 protein-coding genes, 34 tRNA genes, and 8 rRNA genes. Furthermore, phylogenetic analysis indicated that topological trees recovered from the complete plastid genome and protein-coding datasets were consistent, suggesting that *Asarum* and *Saruma* species constitute a high support monophyletic clade. **Conclusion** Sequencing, assembly and structural analysis of *Asari Radix et Rhizoma* chloroplast genome in this study indicated that its size was between *A. bracteolata* and *A. sieboldii* var. *seoulense*, and *rpl16*, *rps19*, *ycf1* and *rpl23* genes were expanded in IR region. All research findings not only enriched the genetic resources of *Asarum*, but also provided a theoretical basis for the molecular identification, phylogeny, and protection, development and utilization of wild resources of this genus.

收稿日期: 2023-03-06

基金项目: 陕西省科学院科技计划项目 (2017K-12, 2021K-10); 西安市科技计划项目 (20193021YF009NS009); 西安市科学技术局“科技+”行动计划 (20NYF0056); 陕西省创新能力支撑计划 (2022KJXX-27); 陕西省自然科学基金研究计划项目 (2022JM-458)

作者简介: 周军辉, 男, 副研究员, 研究方向为药用植物的代谢组学分析。E-mail: zhoujh@xab.ac.cn

*通信作者: 张明英, 女, 副教授, 研究方向为分子生药学。E-mail: zhangmy@sntcm.edu.cn

柏国清, 男, 副研究员, 从事药用植物资源的开发利用研究。E-mail: bgq@ms.xab.ac.cn

Key words: *Asari Radix et Rhizoma*; *Asarum sieboldii* Miq.; *A. heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.; chloroplast genome; assembly; phylogenetic

华细辛(细辛) *Asarum sieboldii* Miq. 隶属于马兜铃科(Aristolochiaceae) 细辛属 *Asarum* L., 为一年生或多年生草本, 主要分布于我国的山东、安徽、浙江、江西、河南、湖北、陕西、四川、辽宁等省, 以及俄罗斯、日本等地, 生于山坡林下、山沟土质肥沃而阴湿地^[1]。细辛作为传统中药用于治疗多种疾病^[2], 全草皆可入药, 最早出现于东汉(公元 25~220 年)编纂的《神农本草经》^[3]。细辛药材含有丰富的化学成分, 主要包括: 甲基丁香酚、黄樟脑和其他挥发性成分(雌二醇、桉树脑和 α -松油醇等)^[4]。临床多用于治疗咳嗽、呼吸困难、头痛、风湿关节痛、鼻窦炎和牙痛等疾病^[5-8]。现代药理学研究发现细辛在镇静催眠、镇痛、麻醉、解热、强心及解痉抑菌等方面具有重要的作用^[9]。

华细辛 *A. sieboldii* Miq. 和辽细辛 *A. heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 为中药细辛的基源植物^[10], 前者主产于我国陕西、河南、四川等地, 后者主要分布于黑龙江、辽宁等地区^[11]。目前, 关于细辛的研究主要集中于化学成分^[12-13]、无机元素^[14]以及药理活性^[15]等方面。研究表明, 华细辛和辽细辛在上述方面均存在差异性^[13]。然而, 关于细辛植物叶绿体基因组组装、基因组特征和系统进化分析等相关研究报道较少。

叶绿体是绿色植物和真核藻类特有的一种亚细胞器, 在光合作用过程中起重要作用^[16], 同时也是光合作用的主要场所, 在这一过程中, 叶绿素可以搜捕太阳中的能量, 并将其转化并储蓄在 ATP 和 NADPH 分子中, 然后从水中释放氧气^[17]。随后, ATP 和 NADPH 被用来从二氧化碳中合成有机分子^[18]。此外, 叶绿体还在氨基酸、脂质、脂肪酸、维生素植物激素的生物合成中发挥重要作用^[19]。叶绿体基因组(chloroplast genome, cp genome) 一般为环状 DNA 少数为线性分子^[20]; 在细胞中以多拷贝的形式存在, 其长度是 120~170 kb。叶绿体在绝大多数被子植物中是高度保守的母系遗传细胞器, 不参与重组。因此, 在植物系统进化关系和遗传多样性等研究方面具有重要的意义^[21]。

近年来, 随着测序技术的不断改进, 测序平台的不断升级, 一系列组装和注释软件如 NOVOPlasty^[22]、GetOrganelle^[23]等的开发与更新, 很多珍稀濒危药用植物叶绿体基因组已分析公布,

如红豆杉 *Taxus wallichiana* var. *chinensis* (Pilger) Florin^[24]、人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer^[25]、紫斑牡丹 *Paeonia rockii* (S. G. Haw & Lauener) T. Hong & J. J. Li^[26]、石斛 *Dendrobium nobile* Lindl.^[27]、银杏 *Ginkgo biloba* Linnaeus^[28]和三叶崖爬藤 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg^[29]等。本研究以华细辛和辽细辛为研究对象, 采用高通量测序和生物信息技术组装完整的叶绿体基因组序列。明确细辛叶绿体基因组结构特征, 反向重复区(inverted repeat region, IR) 边界特征; 基于完整的质体基因组和蛋白编码数据集构建马兜铃科的系统发育关系, 验证该物种在科级系统发育中的亲缘关系, 为细辛种质资源的鉴定、开发和利用提供理论基础。

1 材料

用于本研究的辽细辛和华细辛鲜叶样品分别采集于辽宁省本溪和陕西省华阴市金岩沟(124°12'3.410"E, 41°06'53.660"N; 109°57'32.8758"E, 34°24'21.5478"N), 由张明英副教授鉴定为华细辛 *A. sieboldii* Miq. 和辽细辛 *A. heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. 的叶。材料凭证标本现存放在陕西省植物研究所标本馆, 标本编号分别为 XBGH-19-BGQ136 和 XBGH-19-BGQ317。

2 方法

2.1 DNA 测序

叶片带回实验室用清水冲洗, 液氮速冻后置于 -80 °C 冰箱备用。细辛及其近缘物种叶绿体基因组信息和核苷酸序列数据来自 NCBI 数据库, 见表 1。采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)方法从硅胶干燥的叶组织中提取总基因组 DNA^[30], 并通过琼脂糖凝胶电泳评估以确认 DNA 的质量。质检合格后使用 Illumina Novaseq 6000 平台进行测序。由北京诺禾致源科技股份有限公司完成相关建库测序。

2.2 叶绿体基因组组装和注释

首先, 本研究使用 NGSQCToolkit_v2.3.3^[26]工具对 Illumina 原始读数进行过滤, 以去除短于 50 bp 的序列和适配器序列。随后以完整的库页细辛叶绿体基因组(MW526993)作为参考, 使用 GetOrganelle(<https://github.com/Kinggerm/GetOrganelle>)^[23]过滤配对末端读数并组装成完整的质体基因组。使用 Perl 脚本质体基因组注释器 PGA^[32]和 DOGAM

表 1 物种基本信息
Table 1 Plant samples used in this study

物种	来源	GenBank 登录号
假蒟 <i>Piper sarmentosum</i>	NCBI	MZ958833
竹叶胡椒 <i>P. bambusifolium</i>	NCBI	NC_062129
<i>Aristolochia bracteolata</i>	NCBI	MT130705
马兜铃 <i>A. debilis</i>	NCBI	NC_036153
北马兜铃 <i>A. contorta</i>	NCBI	NC_036152
海南马兜铃 <i>A. hainanensis</i>	NCBI	NC_061937
广西马兜铃 <i>A. kwangsiensis</i>	NCBI	NC_052833
马蹄香 <i>Saruma henryi</i>	NCBI	MG520100
长毛细辛 <i>A. pulchellum</i>	NCBI	MZ440306
<i>A. misandrum</i>	NCBI	NC_058739
<i>A. maculatum</i>	NCBI	NC_058740
汉城细辛 <i>A. sieboldii</i> f. <i>seoulense</i>	NCBI	NC_037190
库页细辛 <i>A. heterotropoides</i>	NCBI	MW526993
华细辛 (细辛)	测序	
辽细辛	测序	

(<http://dogma.cccb.utexas.edu/>)^[33]对基因组进行了自动注释,并手动检查和校正。最后,叶绿体基因组物理图谱使用在线工具 Chloroplot^[34] (<https://irscope.shinyapps.io/Chloroplot/>)生成。

2.3 IR 边界的收缩和扩张分析

IR 区是叶绿体基因组中最保守的区域,但 IR 区边界区域仍存在细微的变化,其边界处的收缩和扩张是常见的进化事件,是影响叶绿体基因组大小的主要因素之一^[35]。在植物进化过程中,IR/SC 边界不同程度的扩张和收缩导致了边界和基因组长度的多样性^[36]。本研究根据注释的信息,使用 IRscope (<https://irscope.shinyapps.io/irapp/>)对 15 个马兜铃科物种叶绿体基因组的大单拷贝区 (large single copy region, LSC)/反向重复区 b (inverted repeat region b, IRb)/小单拷贝区 (small single copy, SSC)/反向重复区 a (inverted repeat region, IRa) 连接区域进行比较分析。

2.4 系统发育分析

为确定细辛在马兜铃科的系统发育位置,从 NCBI 细胞器基因组资源数据库下载马蹄香属 *Saruma* Oliv.、马兜铃属 *Aristolochia* L.和细辛属 *Asarum* L.的完整质体基因组序列。共计 11 个物种,分别是马蹄香 *Saruma henryi* Oliver (MG520100)、马兜铃 *Aristolochia debilis* Siebold & Zuccarini (NC_036153)、北马兜铃

Aristolochia contorta Bunge (NC_036152)、海南马兜铃 *Aristolochia hainanensis* (Merr.) X. X. Zhu, S. Liao & J. S. Ma (NC_061937)、广西马兜铃 *Aristolochia kwangsiensis* (Chun & F. C. How ex C. F. Liang) X. X. Zhu, S. Liao & J. S. Ma (NC_052833)、库页细辛 *Asarum heterotropoides* F. Schmidt (MW526993)、*Asarum maculatum* J. D. Hooker (NC_058740)、长毛细辛 *Asarum pulchellum* Hemsley (MZ440306)、汉城细辛 *Asarum sieboldii* f. *seoulense* (NC_037190)、*Aristolochia bracteolata* Lam. (MT130705) 和 *Asarum misandrum* B. U. Oh & J. G. Kim (NC_058739)。此外,竹叶胡椒 *Piper bambusifolium* Y. C. Tseng (NC_062129) 和假蒟 *Piper sarmentosum* Roxburgh (MZ958833) 被用作外群 (表 1)。使用软件 MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) 进行质体基因组序列比对。通过在线软件 CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2/login!input.action>) 构建具有 1000 个 Bootstrap 的最大似然法 (maximum likelihood, ML) 系统发育树。最后使用 FigTree 软件对结果进行可视化及编辑。

3 结果与分析

3.1 细辛叶绿体基因组的结构

华细辛和辽细辛叶绿体基因组经测序分别获得 17 064 512 和 17 118 521 raw reads, 经过数据过滤、组装拼接后均获得完整的环状四分体结构叶绿体基因组,序列总长度分别为 160 521 bp 和 160 555 bp, 由 LSC 区 (长度分别为 89 359、89 353 bp)、SSC 区 (16 729、16 728 bp) 以及 2 个反向 IRs (27 209、27 237 bp) 组成 (图 1)。华细辛和辽细辛叶绿体基因组的 GC 含量均为 38.5%, 其 LSC、SSC、IRs 区域的 GC 含量依次为 36.8%、33.3%、43.1% 和 36.7%、33.4%、43.0% (表 2)。

3.2 细辛叶绿体基因组的组成和特点

华细辛和辽细辛叶绿体基因组均注释到 128 个基因,包括 85 个蛋白编码基因 (PCGs)、34 个转运 RNA (tRNA) 以及 8 个核糖体 RNA (rRNA) (表 2)。LSC 包括 55 个 PCGs 和 19 个 tRNA, SSC 包括 11 个 PCGs 和 1 个 tRNA。另外,7 个 PCGs (*rpl2*、*rpl23*、*ycf2*、*ycf15*、*ndhB*、*rps7* 和 *rps12*), 7 个 tRNA (*trn I-CAU*、*trn L-CAA*、*trn V-GAC*、*trn I-GAU*、*trn*

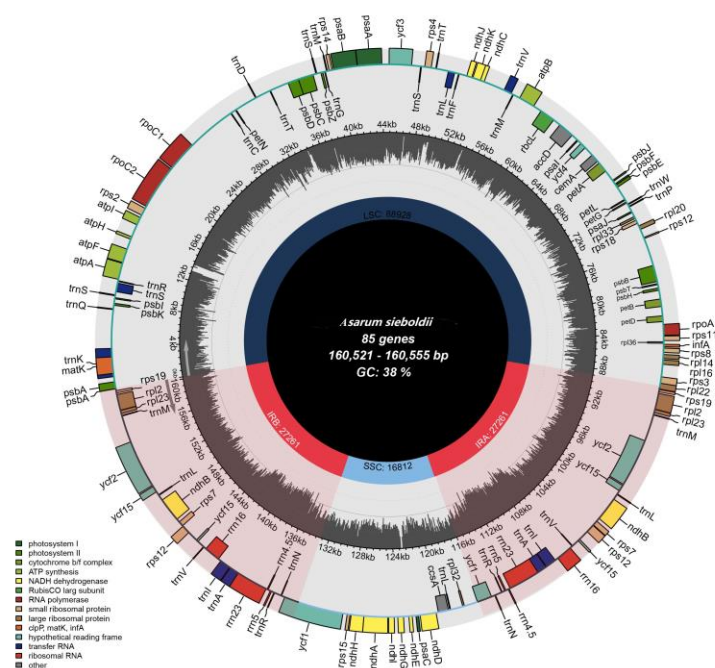


图 1 细辛叶绿体基因组图谱

Fig. 1 Map of *Asari Radix et Rhizoma* chloroplast genome

表 2 细辛叶绿体基因组信息统计

Table 2 Chloroplast genome information statistics of *Asari Radix et Rhizoma*

物种	区域	A/%	T/%	C/%	G/%	GC/%	蛋白编码基因数	tRNA 基因数	rRNA 基因数	基因总数	长度/bp
华细辛	LSC	31.0	32.3	18.7	18.1	36.8	55	19	0	74	89 359
	SSC	32.4	34.3	17.4	15.9	33.3	11	1	0	12	16 729
	IRA/IRB	28.5	28.4	20.9	22.2	43.1	9	7	8	20	27 209
	总计	30.3	31.2	19.5	19.0	38.5	85	34	8	128	160 521
辽细辛	LSC	31.0	32.3	18.7	18.0	36.7	55	19	0	74	89 353
	SSC	32.4	34.3	17.4	16.0	33.4	11	1	0	12	16 728
	IRA/IRB	28.6	28.4	20.9	22.1	43.0	9	7	8	20	27 237
	总计	30.3	31.2	19.5	19.0	38.5	85	34	8	128	160 555

A-UGC、*trnR-ACG* 和 *trnN-GUU*) 以及所有的 rRNA 均分布于 IRs 区域 (表 2)。

植物叶绿体基因组主要编码 3 类基因: 与光合作用有关的基因, 与转录翻译有关的遗传系统基因以及生物合成有关的基因。其中, 蛋白质编码基因中与自我复制相关基因 rRNA 基因和 tRNA 基因外 (表 3), 还包括 11 个核糖体小亚基基因、9 个核糖体大亚基基因和 3 个 RNA 聚合酶亚基基因; 与光合作用相关的基因 41 个; 此外, 还包括 4 个其他功能基因及 5 个未知功能基因 (表 3)。

3.3 IR 边界的特征

通过比较 13 个马兜铃科叶绿体基因组中的

IR/SC 边界信息 (图 2), 结果显示, 马兜铃科各物种边界具有较为明显的差异, *A. pulchellum*、*A. misandrum*、*A. maculatum* 和 *A. sieboldii* 的 LSC 和 IRb 区向 *rpl16* 扩张, *A. hainanensis* 和 *S. henryi* 的 LSC 和 IRb 区向 *rps19* 扩张。同时 SSC 区域与两侧 IR 区交界处有部分跨界基因, IR/SSC 边界上 *A. pulchellum* 的 *ndhF* 基因发生了跨界, SSC/IR 边界上除了 *S. henryi*、*A. pulchellum*、*A. misandrum*、*A. maculatum* 和 *A. sieboldii* var. *seoulense*, 其他物种的 *ycf1* 基因均发生了跨界。IR/LSC 边界上物种 *A. debilis*、*A. kwangsiensis* 和 *A. contorta* 的 *trnH-GUG* 基因发生了跨界, *A. sieboldii* 的 *rpl23* 基因发生了

表 3 细辛植物叶绿体基因组中存在的基因

Table 3 List of genes present in chloroplast genomes of *Asari Radix* et *Rhizoma*

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^c</i>	<i>rrn23S^c</i>	<i>rrn4.5S^c</i>	<i>rrn5S^c</i>	
		<i>trnM-CAU^c</i>	<i>trnL-CAA^c</i>	<i>trnV-GAC^c</i>	<i>trnE-UUC^{ac}</i>	<i>trnA-UGC^{ac}</i>
	转运 RNA 基因	<i>trnR-ACG^c</i>	<i>trnN-GUU^c</i>	<i>trnL-UAG</i>	<i>trnP-UGG</i>	<i>trnW-CCA</i>
		<i>trnI^a</i>	<i>trnF-GAA</i>	<i>trnL-UAA^a</i>	<i>trnT-UGU</i>	<i>trnS-GGA</i>
		<i>trnG-GCC</i>	<i>trnS-UGA</i>	<i>trnT-GGU</i>	<i>trnD-GUC</i>	<i>trnC-GCA</i>
		<i>trnR-UCU</i>	<i>trnS-CGA^a</i>	<i>trnS-GCU</i>	<i>trnQ-UUG</i>	<i>trnK-UUU^a</i>
		<i>rps2</i>	<i>rps3</i>	<i>rps4</i>	<i>rps7^c</i>	<i>rps8</i>
	核糖体蛋白小亚基	<i>rps11</i>	<i>rps12^b</i>	<i>rps14</i>	<i>rps15</i>	<i>rps18</i>
		<i>rps19^c</i>				
		<i>rpl2^c</i>	<i>rpl14</i>	<i>rpl16</i>	<i>rpl20</i>	<i>rpl22</i>
	核糖体蛋白大亚基	<i>rpl23^c</i>	<i>rpl32</i>	<i>rpl33</i>	<i>rpl36</i>	
		<i>rpoA</i>	<i>rpoC1^a</i>	<i>rpoC2</i>		
	DNA 依赖核酸聚合酶	<i>infA</i>				
	翻译起始因子					
光合作用相关基因	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^a</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>psbT</i>	<i>psbZ</i>		
	NADH 氧化还原酶	<i>ndhA^a</i>	<i>ndhB^{ac}</i>	<i>ndhC</i>	<i>ndhD</i>	<i>ndhE</i>
		<i>ndhG</i>	<i>ndhI</i>	<i>ndhJ</i>	<i>ndhK</i>	<i>ndhH</i>
	细胞色素亚基	<i>petA</i>	<i>petB</i>	<i>petD</i>	<i>petG</i>	<i>petL</i>
		<i>petN</i>				
	ATP 合酶亚基	<i>atpA</i>	<i>atpB</i>	<i>atpE</i>	<i>atpF^a</i>	<i>atpH</i>
		<i>atpI</i>				
	Rubisco 酶大亚基	<i>rbcL</i>				
其他基因	成熟酶	<i>matK</i>				
	包裹膜蛋白	<i>cemA</i>				
	乙酰辅酶 A 亚基	<i>accD</i>				
	C 型细胞色素合成基因	<i>ccsA</i>				
未知功能基因	保守开放阅读框	<i>ycf1^{ac}</i>	<i>ycf2^{ac}</i>	<i>ycf3^b</i>	<i>ycf4</i>	<i>ycf15^{ac}</i>

a 和 b 分别表示含有 1 个和 2 个内含子；c 表示含有 2 个拷贝基因

a and b indicate 1 and 2 introns respectively; c indicates 2 copies of the gene

跨界，其他物种均无跨界基因。

3.4 叶绿体基因组结构比较分析

细辛及 11 种近缘物种植物叶绿体基因组的大小介于 158 234~193 356 bp, 其中 *A. bracteolata* 的叶绿体基因组序列最短 (158 851 bp), *A. sieboldii* var. *seoulense* 的叶绿体基因组序列最长 (193 356 bp) (表 4)。华细辛和辽细辛叶绿体基因组序列长度为 160 521~160 555 bp, 介于 13 个马兜铃科植物的叶绿体基因组长度范围之内。细辛及 13 种近缘物种植物叶绿体基因组的 GC 含量在 30.8%~43.5%, 其中 *P. bambusifolium* 的 GC 含量最低 (30.8%), *A. hainanensis* 的 GC 含量最高 (43.5%)。华细辛和辽细辛叶绿体基因组的 GC 含量均为 38.5, 介于 13 个马兜铃科植物的叶绿体基

因组 GC 含量之内。同时, 利用 Geneious 软件分别获得华细辛和辽细辛及马兜铃科 13 种近缘植物的 LSC 区、SSC 区及 IR 区序列信息, 结果显示, LSC 区的序列长介于 88 643~96 554 bp, *S. henryi* LSC 区最短 (88 643 bp), *A. sieboldii* var. *seoulense* LSC 区最长 (96 554 bp), 2 个细辛样本 LSC 区的序列长度分别为 89 359 bp 和 89 353 bp。SSC 区的序列长度介于 8921~21 118 bp。其中, *A. pulchellum* 的 SSC 区最短 (8921 bp), *A. contorta* 最长为 (21 118 bp)。华细辛和辽细辛 SSC 区的序列长度分别为 16 729 bp 和 16 728 bp。IR 区的序列长度介于 25 175~48 403 bp, 其中, 华细辛和辽细辛 IR 区的序列长度分别为 27 224 bp 和 27 237 bp (表 4)。

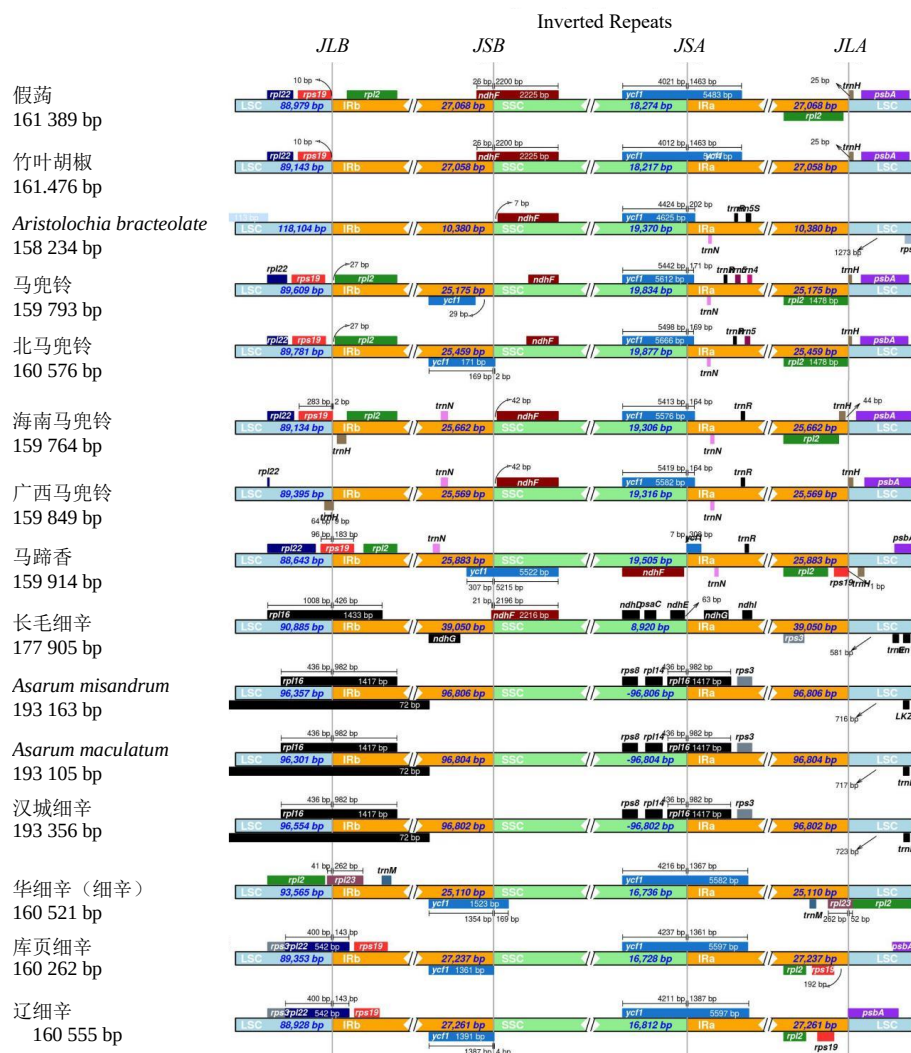


图 2 15 个马兜铃科植物叶绿体基因组 LSC、SSC 和 IR 边界比较

Fig. 2 Comparison of LSC, SSC and IR borders among 15 chloroplast genome of Aristolochiaceae

表 4 质体基因组的特征

Table 4 Characteristics of plastid genome

物种信息	总碱基长度/bp	GC/%	LSC 区/bp	SSC 区/bp	IRs 区/bp
假蒟	161 389	38.3	88 979	19 749	27 068
竹叶胡椒	161 476	30.8	89 143	19 429	27 058
马蹄香	159 914	38.8	88 643	19 504	25 884
广西马兜铃	159 849	38.8	89 395	20 817	25 568
海南马兜铃	159 764	43.5	89 134	19 306	25 662
北马兜铃	160 576	38.3	89 781	21 118	25 459
马兜铃	159 793	38.3	89 609	21 107	25 175
<i>Aristolochia bracteolata</i>	158 234	38.4	88 346	20 855	25 261
长毛细辛	177 905	37.7	90 885	8921	39 049
<i>Asarum misandrum</i>	193 163	36.2	96 357	—	48 403
<i>Asarum maculatum</i>	193 105	36.2	96 301	—	48 402
汉城细辛	193 356	36.2	96 554	—	48 401
库页细辛	160 262	38.5	88 928	16 812	27 261
华细辛 (细辛)	160 521	38.5	89 359	16 729	27 224
辽细辛	160 555	38.5	89 353	16 728	27 237

3.5 系统发育分析

本研究以假蒟和竹叶胡椒作为外类群，选取马兜铃科 13 个物种的叶绿体全基因组序列及蛋白编码序列，通过 ML 对其进行系统发育分析（图 3、图 4）。基于 2 个不同的数据集获得的系统发育结果一致，表明马兜铃科的物种可以分为 2 个大的亚支系，分别对

应于马兜铃属、细辛属和马蹄香属且具有 100% 支持率。马兜铃属和细辛属系统发育关系近缘，构成一个单系。广西马兜铃、海南马兜铃、*A. bracteolata*、北马兜铃和马兜铃聚为一支。库页细辛、辽细辛和华细辛聚为一支，并与汉城细辛、*A. maculatum*、*A. misandrum* 和长毛细辛构成的分支互为姐妹关系。

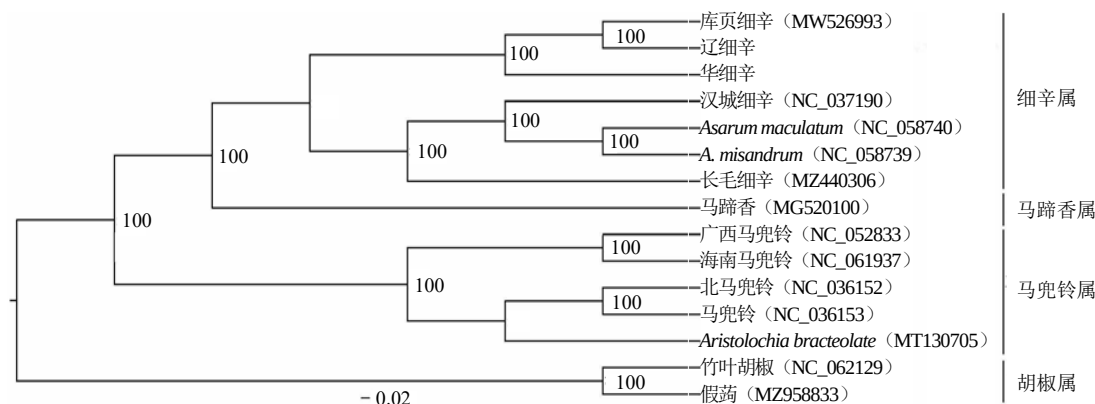


图 3 基于叶绿体全基因组构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on complete chloroplast genomes

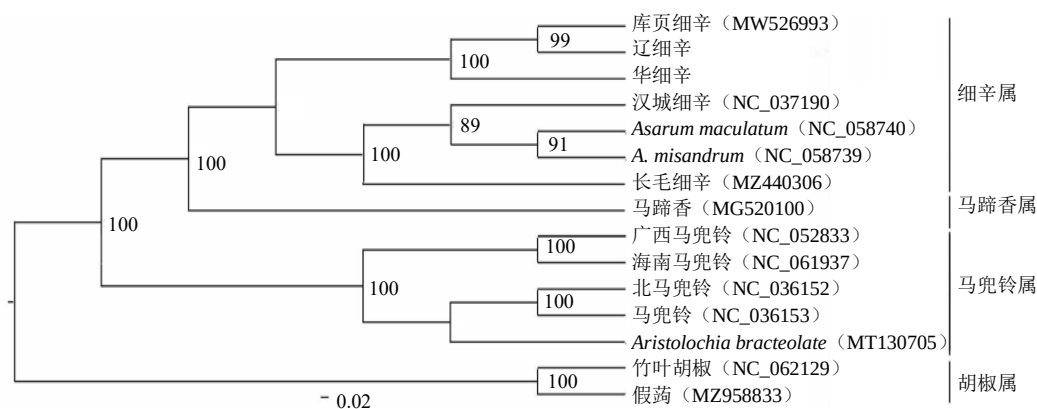


图 4 基于蛋白编码序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on protein coding sequences

4 讨论

细辛是一种传统药材，在许多国家已被广泛用于治疗牙痛、头痛、局部麻醉和口疮性口炎等疾病，具有重要的经济和药用价值。本研究完成了药用植物细辛叶绿体基因组的测序、组装和注释，并对其结构、GC 含量等进行了分析。结果显示，新测序的华细辛和辽细辛在序列长度上基本一致，总长度分别为 160 521 bp 和 160 555 bp，均介于已发表的细辛属植物的序列长度之间^[37]。华细辛和辽细辛叶绿体基因组均具有典型的四分体结构，包括一对 IR 区

域（27 209~27 237 bp）、LSC 区域（89 353~89 359 bp）和 SSC 区域（16 728~16 729 bp）。已有研究表明，在大多数被子植物中，叶绿体基因组长度通常介于 120~180 kb，但是一些藻类的叶绿体基因组的大小差异较大，如寄生性绿藻 *Helicosporidium* sp. ex *Simulium jonesi* 叶绿体基因组序列仅有 37.5 kb，是目前发现最小的叶绿体基因组^[38]。大多数植物的叶绿体基因组结构和序列相当保守，重复片段较少，除部分列当科和兰科寄生植物的叶绿体基因组部分基因发生丢失，且具有较快的进化速率^[39]。

华细辛和辽细辛均注释到 128 基因, 与已公开报道的细辛属叶绿体基因结果相似^[37]。两者 GC 含量均为 38.5%, 较高于大多数被子植物叶绿体基因组的 GC 含量 (31.0%~38.0%)^[40], IR 区域的 GC 含量最高, 其原因可能由于 rRNA 基因中较少出现 A/T 核苷酸^[41]。华细辛和辽细辛叶绿体基因组序列整体上高度相似, 但与马兜铃科其他 13 个物种的叶绿体基因组 IR 边界仍存在明显差异, 主要表现为 LSC/IRb 边界 (JLB), SSC/IRb 边界 (JSB)、SSC/IRa 边界 (JSA) 和 LSC/IRa 边界 (JLA) 的侧翼基因不同。该现象是由于马兜铃科内物种之间叶绿体基因组中基因数量不同所造成, 因此, 推测边界区域的扩张和收缩可能造成叶绿体基因组序列长度的变化^[42]。

近年来, 许多完整的质体基因组序列已测序, 以解决相关类群之间的分类问题。质体基因组为陆生植物的分类和重建系统发育提供了宝贵的信息。在大多数被子植物中, 质体基因是母系遗传的 (通过种子转移), 而核基因是双亲遗传的 (通过种子和花粉转移)^[43]。因此, 利用叶绿体基因组可为解决细辛属内植物的分类问题提供参考, 但是已发表的细辛属植物叶绿体基因组数据依然有限。在本研究中, 根据完整的质体基因组和蛋白编码序列, 重建了马兜铃科物种系统发育关系。RAxML 分析结果显示, 基于 2 个不同的数据集获得相同的拓扑树, 所有的节点都具有很高的自举值 (图 3、4)。这些结果表明, 马兜铃科的物种可以分为 2 个大的亚支系, 且细辛属与马蹄香属具有较紧密的亲缘关系。细辛属聚成一个支持率非常高的单系类群, 库页细辛、辽细辛和华细辛聚为一支, 并与汉城细辛、*A. maculatum*、*A. misandrum* 和长毛细辛分支构成姐妹关系。本研究首次对华细辛和辽细辛进行了比较完整叶绿体基因组分析, 不仅丰富了细辛属植物遗传资源, 同时为该属物种分子鉴定、系统发育以及野生资源保护与开发利用等研究提供理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 (第四十二卷, 第一分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1993: 28.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 230-231.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 348.
- [4] 王德群, 黄世华. 安徽细辛属一新种 [J]. 植物研究, 1991, 11(2): 23-25.

- [5] 刘国卿, 蒋莹. 几种中药挥发油的急性毒性及对戊巴比妥钠的协同作用 [J]. 中国药科大学学报, 1989, 20(1): 57.
- [6] 陈超, 郑卫红, 熊素兵, 等. 细辛与 verapamil 镇痛协同作用的实验研究 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(3): 337-339.
- [7] 李仪奎, 姜名瑛, 李锐, 等. 中药药理学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1992: 112.
- [8] 臧埔, 武晓琳, 邵玉钢, 等. 不同产地细辛有效成分与毒性成分的比较研究 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(4): 416-421.
- [9] 冯素萍. 对细辛药理学作用及应用中有关问题的讨论 [J]. 中医正骨, 1999, 11(2): 41-42.
- [10] 赵佳琛, 王艺涵, 翁倩倩, 等. 经典名方中细辛的本草考证 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(8): 1303-1319.
- [11] 董力, 王海洋, 马立辉, 等. 细辛属植物资源开发应用 [J]. 黑龙江农业科学, 2010(1): 55-58.
- [12] 张会宗, 郑霞, 郭振武. 气相色谱法测定细辛属植物中 α -细辛醚含量 [J]. 中成药, 2009, 31(11): 1770-1772.
- [13] 刘杰, 刘广学, 尚明英, 等. 华细辛和北细辛 HPLC 特征图谱识别与抗炎靶点及抗炎成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1374-1383.
- [14] 李妍, 何文媛, 王康宇, 等. 基于 HPLC 多指标成分测定及指纹图谱多模式识别方法的北细辛质量分析 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 238-243.
- [15] 华新振, 刘丛颖, 贺梦媛, 等. 细辛化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 4019-4035.
- [16] Liu M L, Su W, Guan Z X, et al. An overview on predicting protein subchloroplast localization by using machine learning methods [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2020, 21(12): 1229-1241.
- [17] As F, Rr D, Cb D M, et al. Chloroplast DNA: A promising source of information for plant phylogeny and traceability [J]. *J Mol Biol Methods*, 2018, 1: 1.
- [18] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Biologia molecular da célula* [M]. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010.
- [19] Martin R C, Kronmiller B A, Dombrowski J E. Transcriptome analysis of responses in *Brachypodium distachyon* overexpressing the BdbZIP26 transcription factor [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 20(1): 174.
- [20] Jansen R K, Raubeson L A, Boore J L, et al. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 395: 348-384.
- [21] Moner A M, Furtado A, Henry R J. Chloroplast phylogeography of AA genome rice species [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2018, 127: 475-487.
- [22] Dierckxsens N, Mardulyn P, Smits G. NOVOPlasty: de

- novo* assembly of organelle genomes from whole genome data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(4): e18.
- [23] 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.
- [24] Fu C N, Wu C S, Ye L J, *et al.* Prevalence of isomeric plastomes and effectiveness of plastome super-barcodes in yews (*Taxus*) worldwide [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 2773.
- [25] Zhao Y B, Yin J L, Guo H Y, *et al.* The complete chloroplast genome provides insight into the evolution and polymorphism of *Panax ginseng* [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 696.
- [26] Bai G Q, Guo H W, Zhao N, *et al.* The complete chloroplast genome of *Paeonia rockii* (Paeoniaceae), an endangered endemic species to China [J]. *Conservation Genet Resour*, 2018, 10(3): 453-456.
- [27] Biswal D, Konhar R, Debnath M, *et al.* Chloroplast genome sequence annotation of *Dendrobium nobile* (Asparagales: Orchidaceae), an endangered medicinal orchid from northeast India [J]. *PLoS Curr*, 2017, 9: ecurrents.tol.cfl709613759c2223eb582c0fa694cc7.
- [28] Yang X M, Zhou T T, Su X Y, *et al.* Structural characterization and comparative analysis of the chloroplast genome of *Ginkgo biloba* and other gymnosperms [J]. *J For Res*, 2021, 32(2): 765-778.
- [29] 蒋明, 王军峰, 应梦豪, 等. 三叶崖爬藤叶绿体基因组的组装与序列分析 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 461-468.
- [30] Doyle J, Doyle J L, Doyle J, *et al.* A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [31] Patel R K, Jain M. NGS QC Toolkit: A toolkit for quality control of next generation sequencing data [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e30619.
- [32] Qu X J, Moore M J, Li D Z, *et al.* PGA: A software package for rapid, accurate, and flexible batch annotation of plastomes [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 50.
- [33] Wyman S K, Jansen R K, Boore J L. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20(17): 3252-3255.
- [34] Zheng S Y, Pocai P, Hyvönen J, *et al.* Chloroplast: An online program for the versatile plotting of organelle genomes [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 576124.
- [35] Wang W B, Yu H, Wang J H, *et al.* The complete chloroplast genome sequences of the medicinal plant *Forsythia suspensa* (Oleaceae) [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2288.
- [36] Dong W L, Wang R N, Zhang N Y, *et al.* Molecular evolution of chloroplast genomes of orchid species: Insights into phylogenetic relationship and adaptive evolution [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(3): 716.
- [37] 赵容, 尹舒悦, 姜诚, 等. 马兜铃科药用植物叶绿体基因组比较分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(11): 2932-2937.
- [38] de Koning A P, Keeling P J. The complete plastid genome sequence of the parasitic green alga *Helicosporidium* sp. is highly reduced and structured [J]. *BMC Biol*, 2006, 4: 12.
- [39] 马潇. 兰科质体基因组系统学研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2018.
- [40] 李雪佩, 孟静, 张琳娜, 等. 黄草乌与展毛黄草乌叶绿体全基因组结构的比较分析 [J]. 中药材, 2018, 41(8): 1812-1820.
- [41] Zhou J G, Chen X L, Cui Y X, *et al.* Molecular structure and phylogenetic analyses of complete chloroplast genomes of two *Aristolochia* medicinal species [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1839.
- [42] Wang W Q, Messing J. High-throughput sequencing of three Lemnoideae (duckweeds) chloroplast genomes from total DNA [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24670.
- [43] Corriveau J L, Coleman A W. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperm species [J]. *Am J Bot*, 1988, 75(10): 1443-1458.

[责任编辑 时圣明]