

## 白花重楼叶绿体基因组特征及系统发育分析

张书东<sup>1</sup>, 凌立贞<sup>1\*</sup>, 谢丹丹<sup>1,2</sup>, 刘祯珍<sup>1,2</sup>

1. 六盘水师范学院/贵州西部民族药用植物资源研究与利用重点实验室, 贵州六盘水 553004; 2. 大连大学生命健康学院, 辽宁大连 116622

**摘要:** 白花重楼 (*Paris polyphylla* var. *alba*) 为藜芦科 (Melanthiaceae) 重楼属药用植物, 为国家二级重点保护植物。随着重楼原料药需求量逐渐上涨, 白花重楼野生资源遭到严重破坏。为保护白花重楼遗传资源和探讨该物种的系统位置, 本研究对白花重楼的全基因组进行高通量测序, 通过组装和注释获得其完整的叶绿体基因组序列。对其基因组结构特性和系统发育关系分析结果表明, 白花重楼叶绿体基因组全长 163 944 bp, 大单拷贝区 (large single-copy, LSC)、小单拷贝区 (small single-copy region, SSC) 和反向互补重复区 (inverted repeats, IR) 长度分别为 84 179、12 967、33 399 bp, 为典型的四分体结构。白花重楼叶绿体基因组共编码 134 个基因, 包括 88 个蛋白质编码基因, 38 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。白花重楼叶绿体基因组共检测到 645 个长重复序列和 97 个 SSR (simple sequence repeat) 位点, 长重复序列以正向重复和回文重复为主, SSR 以单碱基重复 A/T 类型为主。基于重楼属 34 种 (含种下单位) 叶绿体全基因组构建的系统进化树显示, 重楼属为单系类群, 可划分为 5 个大的分支, 七叶一枝花各变种虽然均位于蚤休组, 但并不构成单系, 白花重楼与毛重楼亲缘关系最近。本研究通过二代测序数据组装获得了完整的白花重楼叶绿体基因组序列, 明确了白花重楼在重楼属中的系统位置, 为研究重楼属植物的系统进化、物种鉴定和资源保护提供科学依据。

**关键词:** 白花重楼; 重楼属; 藜芦科; 系统发育; 叶绿体基因组

中图分类号: S567.239 文献标识码: A

## Characterization and Phylogenetic Analysis of the Complete Chloroplast Genome of *Paris polyphylla* var. *alba* (Melanthiaceae)

ZHANG Shudong<sup>1</sup>, LING Lizhen<sup>1\*</sup>, XIE Dandan<sup>1,2</sup>, LIU Zhenzhen<sup>1,2</sup>

1. Liupanshui Normal University / Key Laboratory of Liupanshui City for Study and Utilization of Ethnic Medicinal Plant Resources of Western Guizhou Province, Liupanshui, Guizhou 553004, China; 2. College of Life and Health, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China

**Abstract:** *Paris polyphylla* var. *alba*, a medicinal plant of Melanthiaceae, is classed as the national second-grade protected species of China. With the increasing demand for raw materials of *Rhizoma paridis*, the wild resources of *P. polyphylla* var. *alba* have been seriously damaged. In order to protect the genetic resources and clarify the systematic position of this species, Illumina HiSeq X Ten platform was used to sequence the chloroplast (cp) genome. The structural characteristics of the complete cp genome sequence and phylogenetic relationship of *P. polyphylla* var. *alba* in *Paris* were analyzed. The results showed that the cp genome was 163 944 bp in length with a typical quadripartite structure with a large single-copy (LSC) region of 84 179 bp, a small single-copy (SSC) region of 12 967 bp, and a pair of 33 399 bp inverted repeats (IRs). The genome contained 134 genes, including 88 protein-coding genes (PCGs), 38 tRNA genes and 8 rRNA genes. A total of 645 long repeats and 97 simple sequence repeats (SSRs) loci were detected in the complete cp genome, in which forward and palindromic repeats were the mainly long repeat types, and most of SSRs had A/T base preference. Phylogenetic analysis based on the complete cp genomes showed that *Paris* formed a monophyletic

收稿日期 2022-09-01; 修回日期 2022-10-11

基金项目 贵州省普通高等职业院校科技拔尖人才项目 (黔教合 KY 字[2019]061); 六盘水市科技计划项目 (No. 52020-2019-05-05, No. 52020-2022-PT-20)。

作者简介 张书东 (1979—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 植物分类和植物系统发育。\*通信作者 (Corresponding author): 凌立贞 (LING Lizhen), E-mail: 121302168@qq.com。

group, and could be further divided into five major clades corresponding to five sections, respectively. The varieties of *P. polyphylla* are located in Sect. *Euthyra*, but are not clustered a monophyletic group, and *P. polyphylla* var. *alba* is closely related to *P. mairei*. This study would provide a scientific basis for studying the phylogeny, species identification and resource conservation of *Paris*.

**Keywords:** *Paris polyphylla* var. *alba*; *Paris*; Melanthiaceae; phylogenetic analysis; chloroplast genome

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.08.004

重楼原隶属于百合科 (Liliaceae), 根据分子系统学研究结果, 现归属于藜芦科 (Melanthiaceae), 为重楼属 (*Paris*) 植物的统称, 全球约有 26 种<sup>[1]</sup>, 主要分布于我国的西南各省 (区)。重楼具有重要的药用价值, 据记载, 该属 11 个物种 (包括种下单位, 下同) 的根茎可作药用, 用于治疗损伤、中毒、腮腺炎等多种疾病<sup>[2]</sup>, 滇重楼 (*P. polyphylla* var. *yunnanensis*) 和华重楼 (*P. polyphylla* var. *chinensis*) 更是被收录进 2020 年版的《中国药典》<sup>[3]</sup>。

白花重楼 (*P. polyphylla* var. *alba*) 为七叶一枝花 (*P. polyphylla*) 的一个变种, 主要分布于我国西南地区的云南、贵州、四川、重庆以及湖北等地<sup>[4-5]</sup>。白花重楼以根茎入药, 用于治疗慢性气管炎、胃痛、扁桃体炎、腮腺炎、乳腺炎、毒虫咬伤和疮疡毒肿等病症<sup>[6]</sup>。近年来由于企业对重楼原料药需求量逐渐上涨, 野生重楼遭到掠夺式采挖, 致使部分未记录有药用价值的重楼属植物的野生资源也遭到严重破坏。根据最新发布的《国家重点保护野生植物名录》<sup>[7]</sup>, 重楼属除北重楼 (*P. verticillata*) 外均被列为国家二级重点保护植物, 白花重楼同时还被《世界自然保护联盟红色名录》(IUCN) 列为易危种。然而, 到目前为止, 有关白花重楼的研究还很少<sup>[8-10]</sup>。

为更好地开展白花重楼遗传背景、种质资源保护及系统发育等方面的研究, 本研究对白花重楼进行了全基因组测序, 从中筛选并组装出完整的叶绿体基因组, 并对白花重楼叶绿体基因组结构特征及其在重楼属的系统位置进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

采自云南省丽江市丽江高山植物园种质资源圃 (100°11'E, 27°00'N) 的白花重楼新鲜健康叶片装入取样袋后立即加入变色硅胶进行干燥, 室温保存。

### 1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 的提取和全基因组测序 取白花重楼硅胶干燥叶片, 利用 CTAB 法<sup>[11]</sup>提取

基因组总 DNA。分别采用琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop-2000 微量分光光度计检测总 DNA 质量和浓度。双端高通量测序由北京诺禾致源科技股份有限公司的 Illumina HiSeq X Ten 平台完成, 测序总数据量为 6 Gb。

1.2.2 叶绿体基因组的组装与注释 利用 SPAdes v3.6.1<sup>[12]</sup>以默认参数对原始测序数据进行从头组装生成一系列 contigs。利用 Bandage<sup>[13]</sup>手动对生成的 contigs 进行编辑, 生成可靠的完整叶绿体基因组。以金线重楼 (*P. delavayi*, 登录号: MN 125581) 为参考基因组, 利用 PGA<sup>[14]</sup>对序列进行功能注释。注释后的完整叶绿体基因组数据提交至 GenBank (登录号: MW980523)。利用 OGDRAW<sup>[15]</sup>在线工具 (<http://ogdraw.mpimp-golm.mpg.de/index.shtml>) 绘制白花重楼叶绿体基因组图谱。

1.2.3 叶绿体基因组特征分析 利用 Geneious v8.0.2<sup>[16]</sup>读取白花重楼基因组基本特征信息。利用 REPuter<sup>[17]</sup>鉴定叶绿体基因组中的长重复序列, 最小重复设置为 30 bp, 最小重复序列长度距离设置为 3。利用 MISA<sup>[18]</sup>对白花重楼叶绿体基因组进行微卫星 (simple sequence repeats, SSR) 位点检测, 参数阈值设置为单碱基、二碱基、三碱基、四碱基、五碱基和六碱基最少重复次数分别为 10、5、5、5、5、5, 2 个 SSR 位点间最小距离设置为 100 bp。

1.2.4 密码子偏好性分析 利用 Geneious v8.0.2<sup>[16]</sup>提取白花重楼叶绿体基因组蛋白质编码基因序列 (coding sequence, CDS), 并手工剔除一个 IR 区的重复序列和基因长度 < 300 bp 的序列。利用 Codon W 1.4.2 在线软件 (<http://codonw.sourceforge.net/>) 分析以 ATG 为起始密码子, 以 TAA、TAG、TGA 为终止密码子的编码基因的同义密码子相对使用度 (relative synonymous codon usage, RSCU)。RSCU 是指某一特定密码子在使用频率与其无偏好性使用时预期频率之间的比值<sup>[19]</sup>, 当 RSCU > 1 时, 表明该密码子使用频率较高; 当 RSCU = 1 时, 说明该密码子无偏好性; 当 RSCU < 1 时, 表明该密码子使用频率较低。

1.2.5 重楼属叶绿体基因组比较分析 利用 Geneious v8.0.2<sup>[16]</sup>读取重楼属已公布 33 个物种叶绿体基因组特征信息,对 34 个物种的基因组大小、基因数目、蛋白编码基因数目、转运 RNA 数目、核糖体 RNA 数目和 GC 含量进行比较分析。

1.2.6 系统发育分析 为探讨白花重楼的系统位置,从 NCBI 下载藜芦科 48 个物种的叶绿体全基因组序列用于重建重楼属的系统发育关系,包括重楼属 33 条,藜芦属 (*Veratrum*) 3 条、白丝草属 (*Chionographis*) 1 条、沼红花属 (*Helonias*) 2 条、延龄草属 (*Trillium*) 6 条、熊尾草属 (*Xerophyllum*) 1 条和丫蕊花属 (*Ypsilandra*) 2 条。根据相关研究结果<sup>[20-22]</sup>,选择藜芦属 3 个物种作为外类群。序列比对利用 MAFFT v7.245<sup>[23]</sup> (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) 完成。贝叶斯推论 (Bayesian reference, BI) 建树时选择的最佳替代模型依据赤池信息量准则 (Akaike information criterion, AIC) 利用 Modeltest<sup>[24-25]</sup> 计算。最大似然法 (maximum likelihood, ML) 建树时使用 RAxML v.8.2.11<sup>[26]</sup> 完成,核苷酸替代模型设置为 GTRGAMMA, 1000 次靴带值估算各分支的支持率 (bootstrap, BS)。贝叶斯推论建树使

用 MrBayes 3.2.6<sup>[27]</sup> 软件完成,四条马尔科夫-蒙特卡洛链 (markov chain monte carlo, MCMC) 运行 50 万代,每 100 代取样一次,当数据达到收敛时,前 25% 的样本作为老化树被丢弃。剩余样本生成 50% 的多数一致树 (50% majority-rule consensus tree),并生成各分支的后验概率 (posterior probability, PP)。

## 2 结果与分析

### 2.1 白花重楼叶绿体基因组结构特征

去除接头和低质量测序数据后,白花重楼共获得 34 225 418 条长度为 150 bp 的序列 (reads)。利用 SPAdes 软件进行组装, Bandage 手工编辑后得到白花重楼完整叶绿体基因组序列。结果表明,白花重楼叶绿体基因组总长度为 163 944 bp, GC 含量为 37.1% (表 1)。基因组呈双链环状,1 个大单拷贝区 (large single-copy, LSC) 和 1 个小单拷贝区 (small single-copy, SSC) 被 1 对反向互补重复区 (inverted repeats, IRs) 分隔成典型的四分体结构 (图 1)。GC 含量在 4 个区域存在明显差异,IR 区的 GC 含量最高 (39.7%),其次是 LSC 区 (35.7%) 和 SSC 区 (32.2%) (表 1)。

表 1 白花重楼叶绿体基因组结构组成

Tab. 1 Chloroplast genome features of *Paris polyphylla* var. *alba*

区域 Region	A/%	T/%	G/%	C/%	GC%	长度 Length/bp
大单拷贝区	31.6	32.7	17.5	18.2	35.7	84 179
小单拷贝区	35.7	32.1	16.8	16.8	32.2	12 967
反向互补重复区 a	31.7	28.6	20.9	18.8	39.7	33 399
反向互补重复区 b	31.7	28.6	20.9	18.8	39.7	33 399
全基因组	31.3	31.6	18.3	18.8	37.1	163 944

### 2.2 白花重楼叶绿体基因组基因功能及分类

利用 PGA 软件注释和手动校对后,白花重楼叶绿体基因组共注释有 134 个基因,包括 88 个蛋白编码基因、38 个转运 RNA (tRNA) 基因和 8 个核糖体 RNA (rRNA) 基因 (图 1)。根据基因功能可以把它们分为 4 大类,分别是 45 个与光合作用相关的基因、74 个与自我复制相关的基因、6 个与蛋白编码相关的其他基因,以及 8 个未知功能的蛋白质基因 (表 2)。在这些基因中,有 10 个蛋白编码基因 (*ndhB*、*rpl2*、*rpl22*、*rpl23*、*rps12*、*rps15*、*rps19*、*rps7*、*ycf1*、*ycf2*)、7 个 tRNA 基因 (*trnA-UGC*、*trnH-GUG*、*trnI-CAU*、*trnL-CAA*、*trnN-GUU*、*trnR-ACG*、*trnV-GAC*) 和 4 个 rRNA

基因 (*rrn16S*、*rrn23S*、*rrn4.5S*、*rrn5S*) 位于反向互补重复区,为双拷贝基因 (表 2)。白花重楼叶绿体基因组未注释到拷贝数大于 2 的基因。白花重楼叶绿体基因组共有 23 个基因含有内含子,其中 19 个基因 (包括 11 个蛋白编码基因和 8 个 tRNA 基因) 含有 1 个内含子,4 个蛋白质编码基因 (*ycf3*、*clpP*、*rps12*×2) 含有 2 个内含子 (表 2)。

### 2.3 白花重楼长重复序列和 SSR 分析

长重复序列分析表明,白花重楼叶绿体基因组包括全部 4 种长重复序列,其中正向重复序列 305 条,反向重复序列 21 条,互补重复序列 19 条,回文重复序列 300 条,总长度为 68 889 bp (表 3)。



表 2 白花重楼叶绿体基因组基因功能分类

Tab. 2 Functional classification of genes in chloroplast genome of *Paris polyphylla* var. *alba*

功能分类 Functional classification	基因种类 Gene group	基因名称 Gene name
光合作用相关基因	光系统 I	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>
	光系统 II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>
	细胞色素 b/f 复合体	<i>petA, petB<sup>b</sup>, petD<sup>b</sup>, petG, petL, petN</i>
	ATP 合酶	<i>atpA, atpB, atpE, atpF<sup>b</sup>, atpH, atpI</i>
	NADH 脱氢酶	<i>ndhA<sup>b</sup>, ndhB<sup>a,b</sup>, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
	二磷酸核酮糖羧合酶/羧化酶亚基	<i>rbcL</i>
自我复制相关基因	RNA 聚合酶	<i>rpoA, rpoB, rpoC1<sup>b</sup>, rpoC2</i>
	核糖体小亚基	<i>rps2, rps3, rps4, rps7<sup>a</sup>, rps8, rps11, rps12<sup>a,c</sup>, rps14, rps15, rps16<sup>b</sup>, rps18, rps19<sup>a</sup></i>
	核糖体大亚基	<i>rpl2<sup>a,b</sup>, rpl14, rpl16<sup>b</sup>, rpl20, rpl22<sup>a</sup>, rpl23<sup>a</sup>, rpl32, rpl33, rpl36</i>
	转运 RNA	<i>trnA-UGC<sup>a,b</sup>, trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-GAA, trnM-CAU, trnG-GCC, trnG-UCC<sup>b</sup>, trnH-GUG<sup>a</sup>, trnI-CAU<sup>a</sup>, trnI-GAU<sup>a,b</sup>, trnK-UUU<sup>b</sup>, trnL-CAA<sup>a</sup>, trnL-UAA<sup>b</sup>, trnL-UAG, trnM-CAU, trnN-GUU<sup>a</sup>, trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG<sup>a</sup>, trnR-UCU, trnS-GCU, trnS-UGA, trnS-GGA, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-GAC<sup>a</sup>, trnV-UAC<sup>b</sup>, trnW-CCA, trnY-GUA</i>
其他基因	核糖体 RNA	<i>rrn4.5<sup>a</sup>, rrn5<sup>a</sup>, rrn16<sup>a</sup>, rrn23<sup>a</sup></i>
	成熟酶基因	<i>matK</i>
	翻译起始因子	<i>infA</i>
	C 型细胞色素合成基因	<i>ccsA</i>
	乙酰辅酶 A 羧化酶亚基	<i>accD</i>
	包膜蛋白基因	<i>cemA</i>
	蛋白酶基因	<i>clpP<sup>c</sup></i>
未知功能基因	保守开放性阅读框	<i>ycf1<sup>a</sup>, ycf2<sup>a</sup>, ycf3<sup>c</sup>, ycf4</i>

注：<sup>a</sup> 为双拷贝基因，<sup>b</sup> 为含 1 个内含子基因，<sup>c</sup> 为含 2 个内含子基因。

Note: <sup>a</sup> means double-copy gene, <sup>b</sup> means genes with one intron, <sup>c</sup> means genes with two introns.

表 3 白花重楼长重复序列分析

Tab. 3 Long repeat sequences in complete chloroplast genome of *Paris polyphylla* var. *alba*

类型 Type	数量 Number	总长度 Total length/bp	平均长度 Average length/bp
正向重复	305	17 436	57.17
反向重复	21	680	32.38
互补重复	19	595	31.32
回文重复	300	50 178	167.26
总数	645	68 889	106.80

## 2.5 重楼属叶绿体基因组比较分析

将白花重楼与同属其他 33 种植物叶绿体基因组进行比较分析，结果显示，重楼属植物叶绿体基因组的 GC 含量均在 37% 以上，基因组大小为 155 957~163 944 bp，注释基因 133~137 个，除白花重楼（88 个）外，蛋白编码基因均为 87 个，tRNA 基因为 38~42 个，rRNA 基因数量保守均为 8 个（表 4）。白花重楼叶绿体基因组有 2 个完整的 *ycf1* 基因（图 1），因此拥有最大的叶绿体基

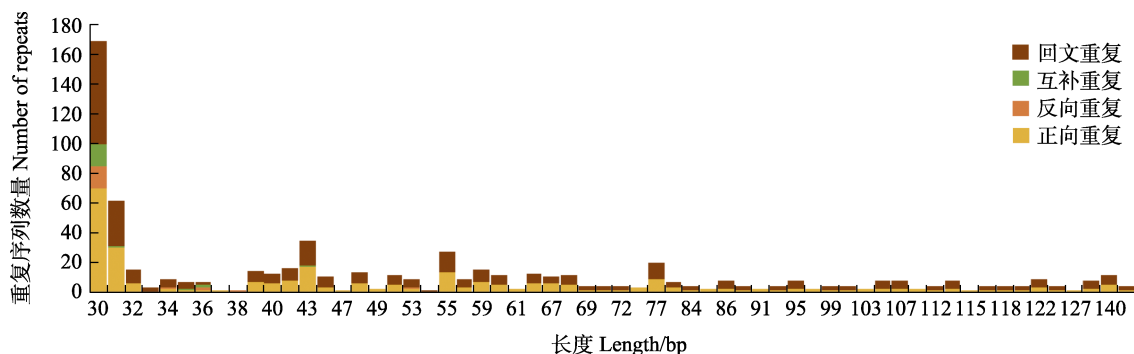


图 2 白花重楼叶绿体基因组长重复序列分析

Fig. 2 Long repeats of *Paris polyphylla* var. *alba* chloroplast genome

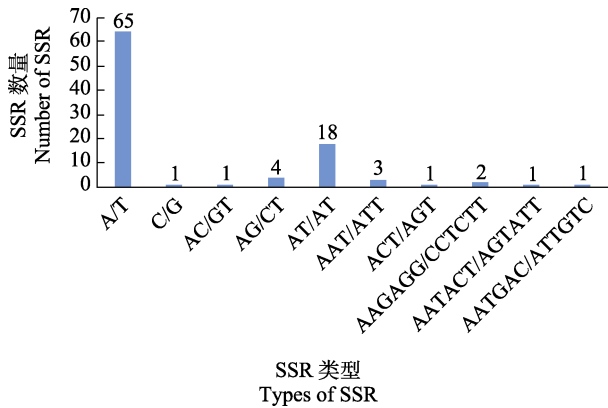


图 3 白花重楼叶绿体基因组简单重复序列分析  
Fig. 3 Simple sequence repeat of *Paris polyphylla* var. *alba* chloroplast genome

基因组序列长度。

### 2.6 重楼属叶绿体基因组系统发育分析

基于 49 条完整的叶绿体基因组数据构建的藜芦科 ML 和 BI 系统进化树 (图 5) 可见, 重楼属的 34 个种聚为一个分支, 构成一个单系类群 (BS/PP=100/1.0)。延龄草属与重楼属亲缘关系较近, 构成重楼属的姐妹群。重楼属可进一步划分为 5 个支持率很高的分支 (BS/PP=100/1.0), 分别对应于 5 个组 (蚤休组 Sect. *Euthyra*、五指莲组 Sect. *Axialis*、黑籽组 Sect. *Thibeticae*、日本重楼组 Sect. *Kinugasa* 和北重楼组 Sect. *Paris*)。七叶一枝花的几个变种均属于蚤休组, 但并不构成一个单系群, 其中白花重楼与毛重楼 (*P. mairei*)

具有较近的亲缘关系 (图 5)。

### 3 讨论

本研究通过高通量测序、生物信息学方法组装和注释获得了白花重楼完整叶绿体基因组, 其全长为 163 944 bp, 略长于该属已报道物种的叶绿体基因组<sup>[28-29]</sup>, 但与被子植物叶绿体基因组已有数据一致<sup>[30]</sup>。造成以上特征的原因是白花重楼一对 IR 区均较同属其他物种的长 (白花重楼 33 399 bp, 其他种小于 28 000 bp)。白花重楼叶绿体基因组具有典型的环状四分体结构, 包括 1 个 LSC 区, 1 个 SSC 区和 2 个 IR 区, 其 GC 含量为 37.1%, 与已报道的该属物种叶绿体基因组结构和 GC 含量相似, 并且 LSC 区 (35.7%) 和 SSC 区 (32.2%) 的 GC 含量显著低于 IR 区 (39.7%), 其原因与完全分布在 IR 区的 8 个 GC 含量较高的 rRNA 基因有关 (均在 48.5% 以上)。白花重楼叶绿体基因组共编码 134 个基因, 包括 88 个蛋白编码基因、38 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。在重楼属已报道的叶绿体基因组中, 蛋白编码基因和 rRNAs 是非常保守的, 但 tRNAs 的数目在物种间存在差异, 尽管 unique tRNAs 的数目都是 30 个。ycf1 基因是叶绿体基因组中第二长的基因且存于大多数植物叶绿体基因组中<sup>[31]</sup>, 但通常只有一个拷贝, 白花重楼因为 IR 区的扩张导致注释

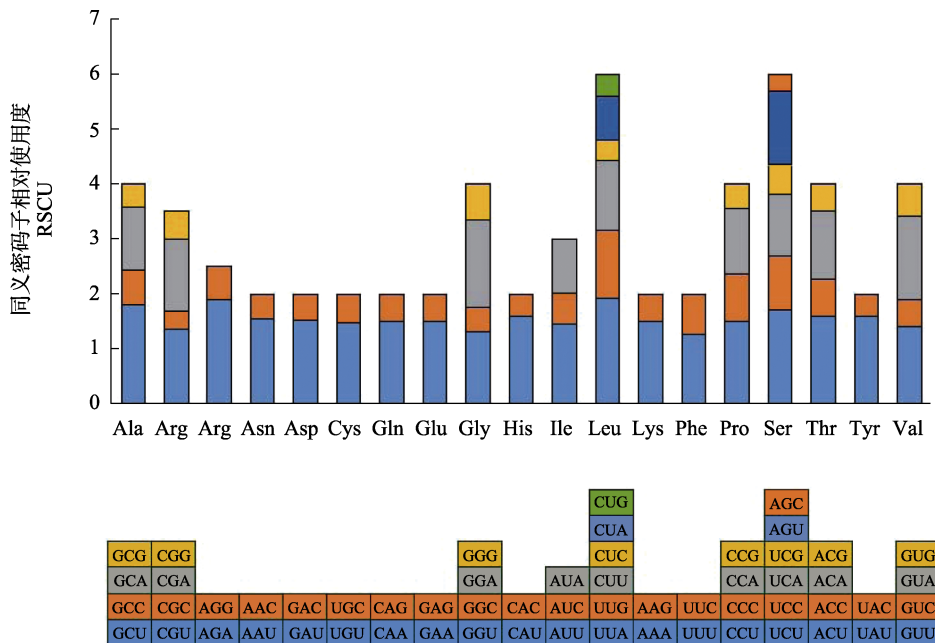


图 4 白花重楼叶绿体基因组同义密码子相对使用度  
Fig. 4 Relative synonymous codon usage of *Paris polyphylla* var. *alba* chloroplast genome

表 4 重楼属植物叶绿体基因组结构特征比较  
Tab. 4 Comparison of structure and characters of *Paris* chloroplast genomes

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession number	基因组大小 Genome size/bp	基因数目 Number of genes	蛋白编码 基因数目 Number of protein-coding genes	转运 RNA 数目 Number of tRNA genes	核糖体 RNA 数目 Number of rRNA genes	GC 含量 GC content/%
<i>Paris axialis</i>	MN125591	156 821	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.4
<i>P. bashanensis</i>	MN125580	157 320	135(113)	87(79)	40(30)	8(4)	37.7
<i>P. birmanica</i>	MN125571	157 857	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3
<i>P. caobangensis</i>	MN125593	158 256	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.2
<i>P. cronquistii</i>	MN125574	158 586	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.2
<i>P. daliensis</i>	MN125579	158 118	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3
<i>P. delavayi</i>	MN125581	158 575	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.2
<i>P. dulongensis</i>	MN125566	157 342	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.4
<i>P. dunniana</i>	MN125592	158 256	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.2
<i>P. fargesii</i>	MN125595	158 643	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.2
<i>P. forrestii</i>	MN125565	157 198	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.4
<i>P. incompleta</i>	MN125572	157 610	137(113)	87(79)	42(30)	8(4)	37.7
<i>P. japonica</i>	MH796668	155 957	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.6
<i>P. luquanensis</i>	MN125573	157 901	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3
<i>P. mairei</i>	MN125598	157 753	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.4
<i>P. marmorata</i>	MN125597	157 740	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.4
<i>P. polyphylla</i>	MN125589	158 130	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3
<i>P. polyphylla</i> var. <i>alba</i>	MW980523	163 944	134(113)	88(79)	38(30)	8(4)	37.1
<i>P. polyphylla</i> var. <i>chinensis</i>	MN125588	158 060	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3
<i>P. polyphylla</i> var. <i>emeiensis</i>	MN125583	158 406	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3
<i>P. polyphylla</i> var. <i>stenophylla</i>	MN125590	157 833	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3
<i>P. polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i>	MN125587	157 874	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3
<i>P. qiliangiana</i>	MN125576	158 354	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.2
<i>P. quadrifolia</i>	MN125594	157 350	135(113)	87(79)	40(30)	8(4)	37.7
<i>P. rugosa</i>	MN125570	157 239	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.4
<i>P. tengchongensis</i>	MN125584	157 150	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.4
<i>P. tetraphylla</i>	MN125596	156 567	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.5
<i>P. tibetica</i>	MN125569	157 389	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.4
<i>P. undulata</i>	MN125586	158 286	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.2
<i>P. vaniotii</i>	MN125567	156 846	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.4
<i>P. verticillata</i>	MH796669	157 946	137(113)	87(79)	42(30)	8(4)	37.6
<i>P. vietnamensis</i>	MN125575	158 101	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3
<i>P. xichouensis</i>	MN125585	158 225	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3
<i>P. yanchii</i>	MN125582	157 918	133(113)	87(79)	38(30)	8(4)	37.3

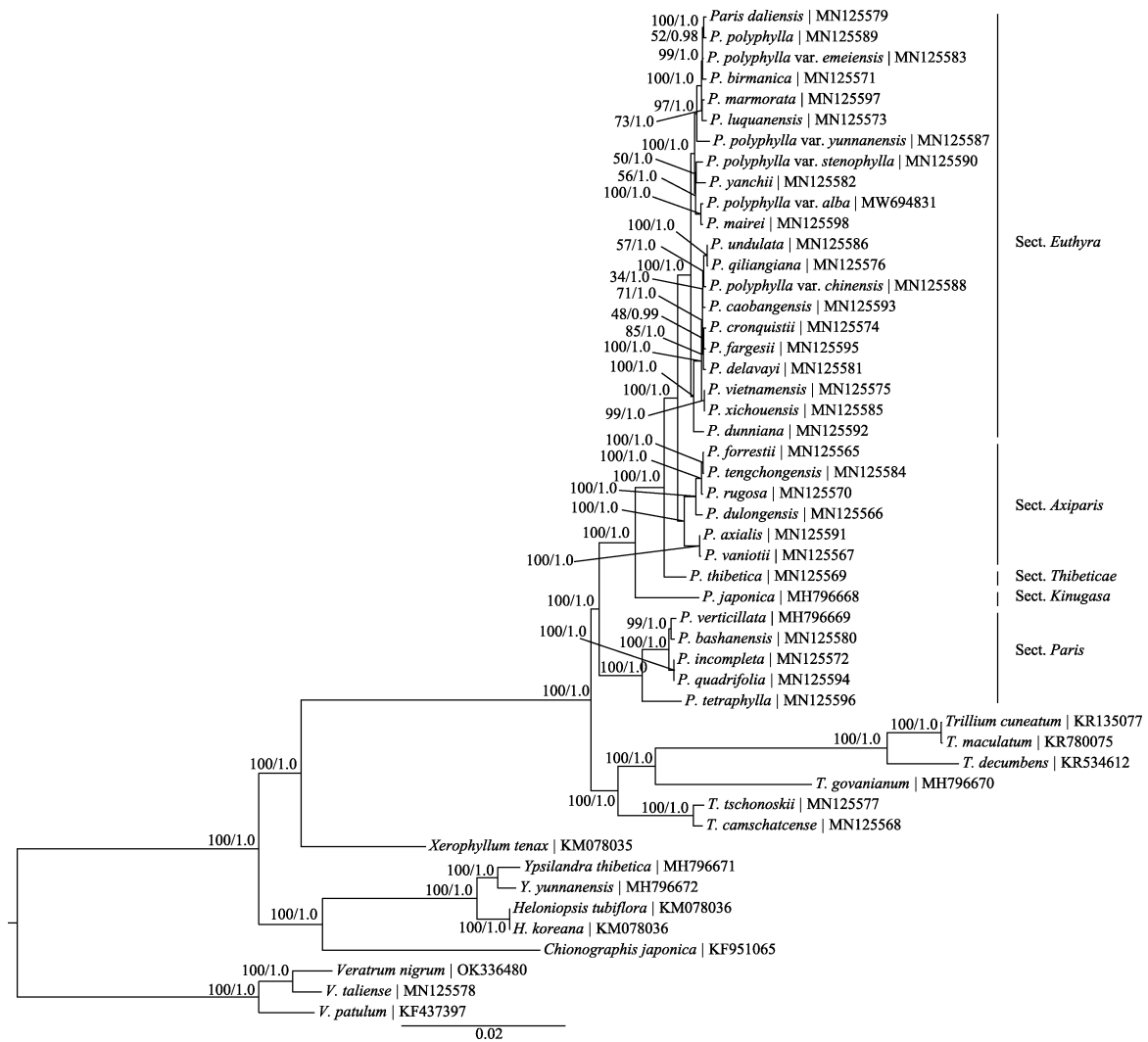
注: 基因数量统计中, 括号外的数字为基因总数, 括号内的数字为去除重复基因后的基因数目。

Note: In gene quantity statistics, the numbers outside the brackets are the total number of genes, and the numbers inside the brackets are the number of genes after removing duplicate genes.

出 2 个完整的 *ycf1* 基因 (均全部位于反向重复区), 从而使其比同属其他种多出 1 个蛋白编码

基因。

白花重楼叶绿体基因组共检测到 645 条长重



节点上数值分别代表最大似然法靴带支持率 (1000 次重复) 和贝叶斯推论后验概率。

Numbers at nodes correspond to ML bootstrap percentages (1000 replicates) and Bayesian inference (BI) posterior probabilities.

图 5 基于 49 个物种叶绿体基因组序列构建的藜芦科最大似然树

Fig. 5 Maximum likelihood tree of 49 species from Melanthiaceae inferred from the complete chloroplast genome sequences

复序列, 包括了全部 4 种重复类型, 但以正向重复比例最高, 其次是回文重复、反向重复和互补重复比例较低, 这与其他重楼属物种一致, 而与同科其他属物种的结果不同 (未发表), 说明物种的亲缘关系与长重复序列的种类及数量存在一定的相关性。白花重楼叶绿体基因组 97 个 SSR 位点以单核苷酸和二核苷酸 SSR 为主, 且含有较高的 AT 含量, 与前人报道的植物叶绿体基因组中 SSR 位点多以 A/T 碱基出现相符。这些重复序列可为重楼属物种遗传多样性研究及物种和产品鉴定提供一定的参考信息。密码子偏好性是物种在长期的进化过程中受外界环境和内部因素共同作用的结果, 密码子偏好性分析可为研究生物进化、蛋白结构、基因功能和外源基因转录和翻译提供

理论依据。本研究分析表明, 亮氨酸 (Leu) 是白花重楼叶绿体基因组中占比最高的氨基酸, 并且 RSCU>1 的 30 种密码子均以 A/U 结尾, 这之前发表的重楼属植物基本相似<sup>[32-33]</sup>。

基于叶绿体基因组的系统发育分析结果表明, 重楼属分为 5 个主要分支, 分别对应蚤休组、五指莲组、黑籽组、日本重楼和北重楼组, 这与最新的分子系统学研究结果一致<sup>[28-29]</sup>, 但与基于形态学的分类结果存在一定的分歧。本研究对七叶一枝花的 6 个变种的系统位置进行了研究, 结果显示七叶一枝花的所有变种均位于蚤休组, 但并不构成一个单系群, 白花重楼与毛重楼具有较近的亲缘关系。基于现有的分子系统学研究结果, 七叶一枝花种下的各分类单元需进一步的分类修订。

## 参考文献

- [1] JI Y H. A monograph of *Paris* (Melanthiaceae): morphology, biology, systematics and taxonomy[M]. Beijing: Science Press, 2020.
- [2] 刘玉雨, 徐福荣, 范敏, 段宝忠. 重楼属植物在少数民族医药中的应用[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(3): 449-456.  
LIU Y Y, XU F R, FAN M, DUAN B Z. Application of *Paris* (Melanthiaceae) in Chinese minority traditional medicine[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2019, 21(3): 449-456. (in Chinese)
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.  
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (part one)[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020. (in Chinese)
- [4] LIANG S Y, VICTOR G S. Flora of China(vol. 24)[M]. Beijing: Science Press, St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2000: 89.
- [5] 尹鸿翔, 文飞燕, 陈铁柱, 张浩. 四川重楼属植物地理分布新记录[J]. 西北植物学报, 2013, 33(4): 832-834.  
YIN H X, WEN F Y, CHEN T Z, ZHANG H. New records of *Paris* L. from Sichuan[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2013, 33(4): 832-834. (in Chinese)
- [6] 云南省怒江傈僳族自治州卫生局. 怒江中草药[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1991.  
Health Bureau of Nujiang Lisu Autonomous Prefecture. Nujiang herbal medicine[M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 1991. (in Chinese)
- [7] 鲁兆莉, 覃海宁, 金效华, 张志翔, 杨庆文, 洪德元, 李德铎, 李开凡, 袁良琛, 周志华. 《国家重点保护野生植物名录》调整的必要性、原则和程序[J]. 生物多样性, 2021, 29(12): 1577-1582.  
LU Z L, QIN H N, JIN X H, ZHANG Z X, YANG Q W, HONG D Y, LI D Z, LI K F, YUAN L C, ZHOU Z H. On the necessity, principle, and process of updating the List of National Key Protected Wild Plants[J]. Biodiversity Science, 2021, 29(12): 1577-1582. (in Chinese)
- [8] 周玲. 神农架三个多叶重楼变种的形态结构及光合生理研究[D]. 荆州: 长江大学, 2018.  
ZHOU L. The study on morphological structure and photosynthetic physiology of three varieties of *Paris polyphylla* smith in Shennongjia[D]. Jingzhou: Yangtze University, 2018. (in Chinese)
- [9] 吴喆, 王元忠, 张霁, 杨绍兵, 张金渝, 徐福荣. 基于红外光谱法的云南重楼及其近缘种的亲缘关系研究[J]. 中草药, 2017, 48(11): 2279-2284.  
WU Z, WANG Y Z, ZHANG J, YANG S B, ZHANG J Y, XU F R. Study on genetic relationship of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and its wild relatives based on infrared spectroscopy[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(11): 2279-2284. (in Chinese)
- [10] 刘维擘, 陈翠, 和荣华, 许琨. 四种重楼属植物光合作用特征[J]. 植物分类与资源学报, 2013, 35(5): 594-600.  
LIU W W, CHEN C, HE R H, XU K. Photosynthesis characteristics of four *Paris* (Trilliaceae) species[J]. Plant Diversity and Resources. 2013, 35(5): 594-600. (in Chinese)
- [11] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bulletin, 1987, 19: 11-15.
- [12] PRJIBELSKI A, ANTIPOV D, MELESHKO D, LAPIDUS A, KOROBENNIKOV A. Using SPAdes *de novo* assembler[J]. Current Protocols in Bioinformatics, 2020, 70(1): e102.
- [13] WICK R R, SCHULTZ M B, ZOBEL J, HOLT K E. Bandage: interactive visualization of *de novo* genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2015, 31: 3350-3352.
- [14] QU X J, MOORE M J, LI D Z, YI T S. PGA: a software package for rapid, accurate, and flexible batch annotation of plastomes[J]. Plant Methods, 2019, 15: 50.
- [15] GREINER S, LEHWARK P, BOCK R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47: W59-W64.
- [16] KEARSE M, MOIR R, WILSON A, STONES-HAVAS S, CHEUNG M, STURROCK S, BUXTON S, COOPER A, MARKOWITZ S, DURAN C, THIERER T, ASHTON B, MEINTJES P, DRUMMOND A. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data[J]. Bioinformatics, 2012, 28(12): 1647-1649.
- [17] KURTZ S, CHOUDHURI J V, OHLEBUSCH E, SCHLEIERMACHER C, STOYE J, GIEGERICH R. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(22): 4633-4642.
- [18] BEIER S, THIEL T, MÜNCH T, SCHOLZ U, MASCHER M. MISA-web: a web server for microsatellite prediction[J]. Bioinformatics, 2017, 33(16): 2583-2585.
- [19] SHARP P M, LI W H. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications[J]. Nucleic Acids Research, 1987, 15(3): 1281-1295.
- [20] KIM C, KIM S C, KIM J H. Historical biogeography of Melanthiaceae: a case of out-of-North America through the Bering Land Bridge[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 396.

- [21] KIM S C, KIM J S, CHASE M W, FAY M F, KIM J H. Molecular phylogenetic relationships of Melanthiaceae (Liliales) based on plastid DNA sequences[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 2016, 181: 567-584.
- [22] FUSE S, TAMURA M N. A phylogenetic analysis of the plastid *matK* gene with emphasis on Melanthiaceae *sensu lato*[J]. Plant Biology, 2000, 2: 415-427.
- [23] KATO H, STANDLEY D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(4): 772-780.
- [24] POSADA D, CRANDALL K. Modeltest: testing the model of DNA substitution[J]. Bioinformatics, 1998, 14(9): 817-818.
- [25] POSADA D, BUCKLEY T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests[J]. Systematic Biology, 2004, 53(5): 793-808.
- [26] STAMATAKIS A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and postanalysis of large phylogenies[J]. Bioinformatics, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [27] RONQUIST F, TESLENKO M, van der MARK P, AYRES D L, DARLING A, HÖHNA S, LARGET B, LIU L, SUCHARD M A, HUELSENBECK J P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space[J]. Systematic Biology, 2012, 61(3): 539-542.
- [28] JI Y H, YANG L F, CHASE M W, LIU C K, YANG Z Y, YANG J, YANG J B, YI T S. Plastome phylogenomics, biogeography, and clade diversification of *Paris*[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19: 543-556.
- [29] YANG L F, YANG Z Y, LIU C K, HE Z S, ZHANG Z R, YANG J, LIU H Y, YANG J B, JI Y H. Chloroplast phylogenomic analysis provides insights into the evolution of the largest eukaryotic genome holder, *Paris japonica* (Melanthiaceae)[J]. BMC Plant Biology, 2019, 19: 293-303.
- [30] WICKE S, SCHNEEWEISS G M, DePAMPHILIS C W, MULLER K F, QUANDT D. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 76: 273-297.
- [31] HENRY R J. Plant diversity and evolution: genotypic and phenotypic variation in higher plants[M]. Cambridge: CABI Publishing, 2005.
- [32] 王宇飞, 江媛, 杨成金, 王婧, 徐志超, 段宝忠. 滇重楼叶绿体基因组特征及密码子偏好性分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(22): 7448-7458.
- WANG Y F, JIANG Y, YANG C J, WANG J, XU Z C, DUAN B Z. Analysis of chloroplast genome characteristic and codon usage bias in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(22): 7448-7458. (in Chinese)
- [33] 江媛, 杨青淑, 王婧, 杨成金, 黄林芳, 杨燕, 段宝忠. 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.
- JIANG Y, YANG Q S, WANG J, YANG C J, HUANG L F, YANG Y, DUAN B Z. Complete chloroplast genome of *Paris mairei*: characterization and phylogeny[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(13): 4014-4022. (in Chinese)