

尾花细辛与花叶细辛叶绿体基因组比较及系统发育分析

柏国清, 卢元, 尉倩, 刘安成, 李仁娜, 丛晓峰, 周军辉, 陈尘*

(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)

摘要: 本研究通过 Illumina 高通量测序技术对细辛属药用植物尾花细辛 (*Asarum caudigerum* Hance) 和花叶细辛 (*A. cardiophyllum* Franchet) 进行了叶绿体基因组测序, 利用生物信息学分析方法进行组装、注释和结构特征分析, 并与已发表的 12 个马兜铃科植物叶绿体基因组进行了系统发育分析。结果显示, 尾花细辛和花叶细辛叶绿体基因组全长为 186 215~186 985 bp, 大单拷贝区 (LSC) 长度为 89 445~90 169 bp, 两个反向互补重复区 (IRs) 长 48 387~48 408 bp。两者叶绿体基因组中的 GC 含量为 37.4%~37.5%, 共注释到 144 个基因, 包括 98 个蛋白编码基因 (PCGs), 38 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。此外, 在细辛属叶绿体基因组中检测到复杂的基因组重排现象; 同时, 对序列的离散型进行可视化评估表明, 非编码区变异水平高于编码区。系统发育结果显示, 尾花细辛与长毛细辛聚为一支, 花叶细辛、汉城细辛、*A. misandrum* 和 *A. maculatum* 则聚为一支, 且这两支互为姊妹关系。本研究为细辛属物种分子鉴定、系统发育及分子植物育种等研究提供科学依据。

关键词: 细辛属; 尾花细辛; 花叶细辛; 叶绿体基因组; 系统发育

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1364-08

Comparative and phylogeny analysis of *Asarum caudigerum* and *A. cardiophyllum* complete chloroplast genomes

BAI Guo-qing, LU Yuan, WEI Qian, LIU An-cheng, LI Ren-na, CONG Xiao-feng,
ZHOU Jun-hui, CHEN Chen*

(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)

Abstract: The complete chloroplast genome of medicinal plant *Asarum caudigerum* Hance and its close relative *A. cardiophyllum* Franchet were sequenced using Illumina HiSeq technology, and assembled, annotated, and characterized by bioinformatic methods in this study. Then phylogenetic analysis of the complete chloroplast genomes of *A. caudigerum*, *A. cardiophyllum*, and twelve published species was conducted. The results indicated that the chloroplast genomes ranged from 186 215–186 985 bp in length, with a large single copy (LSC, 89 445–90 169 bp) and two inverted repeats (IRa/IRb, 48 387–48 408 bp). The overall GC content was 37.4%–37.5%. A total of 144 chloroplast genes were annotated, including 98 protein coding genes, 38 tRNA genes and 8 rRNA genes. In addition, complex genomic rearrangements were detected in the chloroplast genome of *Asarum*. Meanwhile, visual evaluation of the discrete type of the sequence indicated that the variation level of non-coding region was higher than that of coding region. Phylogenetic analyses suggested that *A. caudigerum* and *A. cardiophyllum* were clustered into a single clade and *A. cardiophyllum*, *A. sieboldii* var. *seoulense*, *A. misandrum* and *A. maculatum* were clustered into another single branch. These two clade were sister species. This study provides a scientific basis for the identification, phylogenetic relationship, molecular breeding of *Asarum* species.

收稿日期: 2022-09-13; 修回日期: 2022-10-10.

基金项目: 陕西省科学院科技计划项目 (2017K-12, 2021K-10); 陕西省重点研发计划项目 (2021SF-391); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2022JM-458); 陕西省创新能力支撑计划项目 (2022KJXX-27).

*通讯作者 Tel: 86-29-85251800, E-mail: chenchen@xab.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1055

Key words: *Asarum*; *Asarum caudigerum* Hance; *Asarum cardiophyllum* Franchet; chloroplast genome; phylogenetic

尾花细辛 (*Asarum caudigerum* Hance) 隶属马兜铃科 (Aristolochiaceae) 细辛属 (*Asarum*), 为多年生常绿药用草本植物, 在中国西南、东南及越南等地均有分布, 常生于海拔 350~1 660 m 的林下、溪边和路旁阴湿地^[1]。其全草入药, 具有温经散寒、化痰止咳、散瘀消肿、止痛之功效, 主治风寒咳嗽、慢性支气管炎、哮喘、风湿痹痛、跌打肿痛等症, 多作土细辛用, 或作兽药^[2]。花叶细辛 (*Asarum cardiophyllum* Franchet) 主要分布于中国四川、贵州和云南等西部和西南部海拔 500~1 200 m 林下阴湿地, 叶片多为肾形、心形或卵心形, 深绿色, 叶面具不规则的白色云斑, 叶背绿色或微紫色^[1]。花形奇特, 叶色美丽, 是一种极具优良观赏价值的观叶观花植物, 也是一种集药用、工业用途的种质资源^[3]。目前有关尾花细辛和花叶细辛的研究甚少, 仅在野生资源分布^[2]、种质资源遗传多样性^[4]、生物学特性及引种驯化方法和途径^[3,5,6]等方面有部分研究报道。细辛属其他植物多数含有挥发油, 在其产地也多作细辛或土细辛使用^[4], 但从外观形态上不易区分, 化学成分上也存在较大差异^[4], 在实际用药过程中极易因物种误用而危及生命安全。通常植物物种之间的亲缘关系越近, 其所含化学成分也越相似。因此, 利用植物类群之间的亲缘关系, 可高效发掘新药源及其替代品^[7]。

近年来, 叶绿体基因组已应用于羌活属^[8]、柴胡属^[9]、甘草属^[10]、芍药属^[11]及龙胆属^[12]等药用植物的条形码鉴定、分子标记和系统发育等研究, 推动了药用植物的分子鉴定和系统进化等研究进程, 进一步促进了本草基因组学科的发展^[13]。目前, 细辛属植物细辛 *A. heterotropoides*、汉城细辛 *A. sieboldii* var. *seoulense* 等物种的叶绿体基因组已有研究报道, 但对细辛属其他物种间叶绿体比较基因组学和系统发育相关研究还鲜有报道, 尤其是有关尾花细辛的叶绿体特征研究。

本研究以尾花细辛及花叶细辛为研究对象, 通过对其叶绿体基因组进行测序和比较分析, 以期挖掘更多高效的信息位点; 同时, 通过比较分析细辛属植物的叶绿体基因组结构以及构建系统发育树, 阐明细辛属种间亲缘关系。本研究不仅丰富了细辛属植物叶绿体基因组信息, 进而为该属物种分子鉴定、系统发育、分子植物育种等研究提供科学依据。

材料与方法

材料 尾花细辛和花叶细辛均采集于湖南永州

(东经 111°54'19"; 北纬 25°18'34")。采集新鲜的叶片放入硅胶中快速干燥, 用于基因组 DNA 提取。实验材料由柏国清副研究员鉴定, 凭证标本 (XBGH-20-BGQ026 和 XBGH-20-BGQ101) 保存于陕西省西安植物园标本馆。

基因组 DNA 提取和测序 总基因组 DNA 采用改良 CTAB 法提取。DNA 产物质量和浓度通过 1% 琼脂糖凝胶电泳和荧光染料进行评估。样品检测合格后, 根据 Illumina TruSeq Nano DNA LT 文库制备实验流程构建插入片段大小 (insert size) 为 400 bp 的 DNA 文库。利用 Illumina HiSeqX 测序平台对 DNA 文库进行双端测序 (paired-end, 2×150 bp)。DNA 提取和测序工作均在诺禾致源基因科技有限公司完成。

叶绿体基因组组装和注释 下机测序的原始数据 (raw data) 经过 NGSQCtoolkit_v2.3.3^[14] 工具进行数据过滤后获得 clean data。然后, 以公布的完整 *A. misandrum* 叶绿体基因组 (NC_058739) 为参考, 利用 GetOrganelle (<https://github.com/Kinggerm/GetOrganelle>)^[15] 进行组装拼接。随后利用 PGA^[16] 和 DOGAM (<http://dogma.cccb.utexas.edu/>)^[17] 对叶绿体基因组进行功能注释, 并通过 Geneious v9.0.2^[18] 进行手动校准, 最后, 使用在线工具 Chloroplot^[19] (<https://irscope.shinyapps.io/Chloroplot/>) 绘制叶绿体基因组物理图谱。本文中用到的其他叶绿体基因组序列均下载于 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 其详细信息见表 1。

叶绿体基因组比较分析 首先, 利用共线性比对软件 Mauve^[20] 进行 14 种马兜铃科植物叶绿体全基因组的结构比较分析。其次, 运用 mVISTA^[21] 中的 Shuffle-LANGAN 模式对上述物种叶绿体基因组序列进行全局比对, 进而评估序列之间的相似性。另外, 不同植物的叶绿体基因组边界通常会出现不同程度的收缩 (IR contraction) 和扩张 (IR expansion) 事件。因此, 通过 IRscope (<https://irscope.shinyapps.io/irapp/>) 对叶绿体基因组 LSC/IR 边界图和序列差异进行了绘制。

系统发育树构建 从 GenBank 中下载已发表的 13 个物种完整叶绿体基因组, 包括蹄香属 (*Saruma*) 1 个、马兜铃属 (*Aristolochia*) 5 个及细辛属 6 个物种, 以竹叶胡椒 (*Piper bambusifolium*) 作为外类群 (表 1)。利用 MAFFT^[22] 插件进行多重序列比对, 通过 Geneious v9.0.2^[18] 软件去除模糊对齐的位点。然后利用软件 JModeltest v.2.1.1^[23] 根据 AIC (Akaike informa-

Table 1 Comparison of plastid genome feature and GenBank sequence numbers from Aristolochiaceae used in this study. LSC: Large single copy; SSC: Small single copy; IR: Inverted repeat

No.	Species	From	GenBank No.	Size/bp	Overall GC content/%	LSC/bp	SSC/bp	IR/bp
1	<i>Piper bambusifolium</i>	NCBI	NC062129	161 476	30.8	89 143	19 429	27 058
2	<i>Saruma henryi</i>	NCBI	MT130705	159 914	38.8	88 643	19 504	25 884
3	<i>Aristolochia kwangsiensis</i>	NCBI	NC036153	159 849	38.8	89 395	20 817	25 568
4	<i>Aristolochia hainanensis</i>	NCBI	NC036152	159 764	43.5	89 134	19 306	25 662
5	<i>Aristolochia contorta</i>	NCBI	NC061937	160 576	38.3	89 781	21 118	25 459
6	<i>Aristolochia debilis</i>	NCBI	NC052833	159 793	38.3	89 609	21 107	25 175
7	<i>Aristolochia bracteolata</i>	NCBI	MG520100	158 234	38.4	88 346	20 855	25 261
8	<i>A. pulchellum</i>	NCBI	MZ440306	177 905	37.7	90 885	8 921	39 049
9	<i>A. misandrum</i>	NCBI	NC058739	193 163	36.2	96 357	-	48 403
10	<i>A. maculatum</i>	NCBI	NC058740	193 105	36.2	96 301	-	48 402
11	<i>A. sieboldii</i> var. <i>seoulense</i>	NCBI	NC037190	193 356	36.2	96 554	-	48 401
12	<i>A. sieboldii</i>	NCBI	OP355583	160 521	38.5	89 359	16 729	27 224
13	<i>A. heterotropoides</i> var. <i>mandshuricum</i>	NCBI	OP355584	160 555	38.5	89 353	16 728	27 237
14	<i>A. cardiophyllum</i>	Sequencing	-	186 985	37.4	90 169	-	48 408
15	<i>A. caudigerum</i>	Sequencing	-	186 215	37.5	89 445	-	48 387

tion criterion) 标准^[24]进行运算, 确定最佳的核苷酸替换模型 (GTR+I+G)。使用在线网站 (<https://www.phylo.org>) 工具包中的软件 RAxML v.8.1.24^[25]构建每个物种的系统发育树。

结果与分析

1 叶绿体基因组基本特征

尾花细辛和花叶细辛分别获得 18 473 963 和 19 914 574 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 186 215 和 186 985 bp, 由大单拷贝区 (长度分别为 89 445、90 169 bp)、两个反向重复区 (48 387、48 408 bp) 组成 (图 1)。叶绿体基因组的 GC 含量为 37.4%~37.5%, 其 LSC (大单拷贝区)、IRs (反向重复区) 区域的 GC 含量分别为 35.8%~36.1%、38.8%。

尾花细辛和花叶细辛叶绿体基因组均注释到 144 个基因, 包括 98 个蛋白编码基因 (PCGs)、38 个转运 RNA (tRNA) 及 8 个核糖体 RNA (rRNA) (表 2)。LSC 包括 59 个 PCGs 和 22 个 tRNA。另外, 20 个 PCGs (*ndhF*、*rpl32*、*ccsA*、*ndhD*、*psaC*、*ndhE*、*ndhG*、*ndhI*、*ndhA*、*ndhH*、*rps15*、*ycf1*、*rps12*、*rps7*、*ndhB*、*rpl23*、*ycf2*、*rps19*、*rpl22* 和 *rps3*)、8 个 tRNA (*trnL-UAG*、*trnN-GUU*、*trnR-ACG*、*trnA-UGC*、*trnI-GAU*、*trnV-GAC*、*trnL-CAA*

和 *trnI-CAU*) 及所有的 rRNA 分布于 IRs 区域 (表 2)。

植物叶绿体基因组主要编码三类基因: 与光合作用有关的基因, 与转录翻译有关的遗传系统基因及与生物合成有关的基因。其中, 在蛋白质编码基因中, 除与自我复制相关基因 rRNA 基因和 tRNA 基因外, 还包括 12 个核糖体小亚基基因、8 个核糖体大亚基基因和 4 个 RNA 聚合酶亚基基因; 光合作用相关的基因有 44 个; 此外还有 4 个其他功能基因及 4 个未知功能基因 (表 3)。

2 叶绿体基因组比较分析

使用 mVIST 对马兜铃科物种基因组进行比较分析, 结果显示, 叶绿体基因组序列较为保守, 具有高度的序列相似性, 但是也存在一些高变区域, 且非编码区变异明显高于编码区变异 (图 2)。在细辛属植物中, tRNA 和 rRNA 编码基因极其保守; 变异较高的区域集中在 LSC 区域, 变异稍高的基因间隔区有: *atpI-atpH*、*trnC-GCA-rpoB*、*trnT-GGU-psb* 和 *ycf4-petA* 可用作细辛属物种鉴定的潜在分子标记。

3 叶绿体基因组共线性比对及 LSC/IR 边界分析

以 *A. heterotropoides* 叶绿体基因组为参考序列, 对马兜铃科植物的叶绿体基因组进行共线性比对。结果如图 3 所示, 8 个细辛属植物存在复杂的基因组重排现象。细辛属叶绿体基因组序列信息表明, 细辛属物

Table 2 Chloroplast genome information statistics of *A. caudigerum* and *A. cardiophyllum*. PCGs: Protein coding genes; tRNA: Transfer RNA; rRNA: Ribosomal RNA; IRA: Inverted repeat A; IRB: Inverted repeat B

Species	Location	A/%	T/%	C/%	G/%	GC/%	PCGs	tRNA	rRNA	Number of genes	Length/bp
<i>A. caudigerum</i>	LSC	31.8	32.2	17.5	18.6	36.1	59	22	0	81	89 445
	IRA/IRB	30.6	30.6	19.4	19.4	38.8	20	8	4	32	48 387
	In total	31.2	31.3	18.5	19.0	37.5	98	38	8	144	186 215
<i>A. cardiophyllum</i>	LSC	32.1	32.1	17.4	18.4	35.8	59	22	0	81	90 169
	IRA/IRB	30.6	30.6	19.4	19.4	38.8	20	8	4	32	48 408
	In total	31.3	31.3	18.4	18.9	37.4	98	38	8	144	186 985

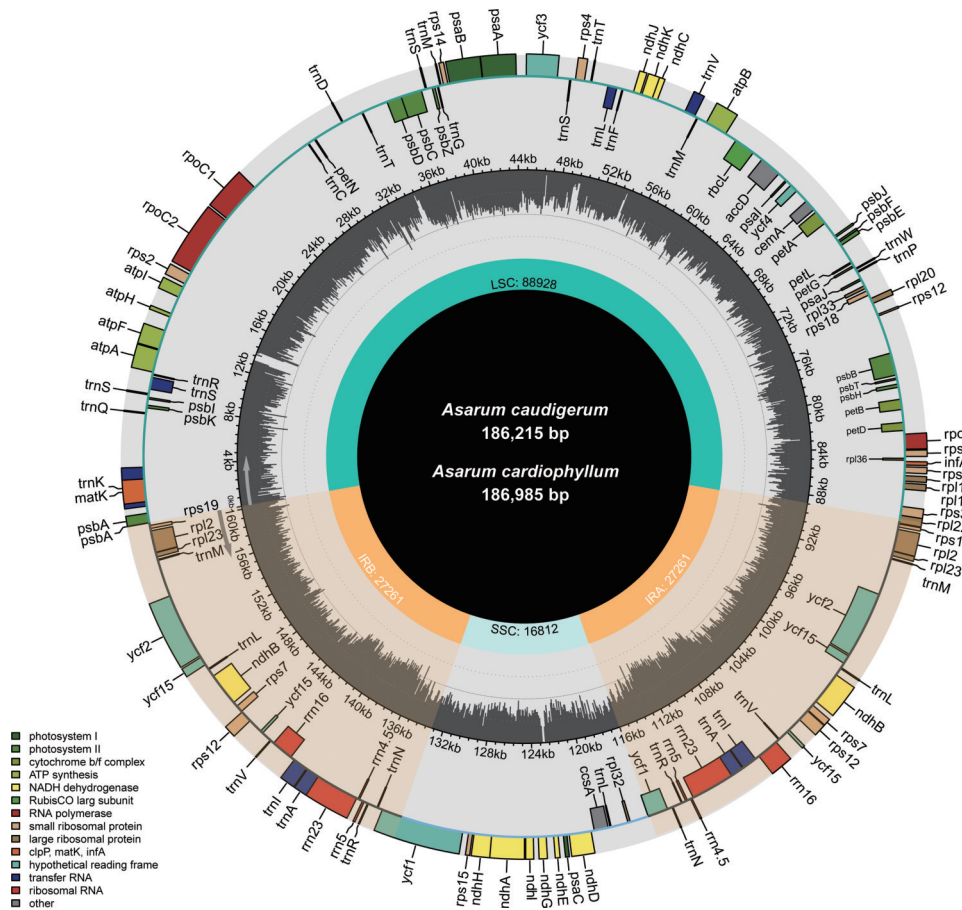


Figure 1 Chloroplast genome map of *A. caudigerum* and *A. cardiophyllum*

Table 3 Functional classification present in chloroplast genomes of *A. cardiophyllum* and *A. caudigerum*. The superscripts a and b indicate 1 and 2 introns, respectively; the superscript c indicates 2 copies of the gene. NADH: Nicotinamide adenine dinucleotide; ATP: Adenosine triphosphate

Category	Gene group	Gene name
Self-replication	Ribosomal RNA genes	<i>rrn16^c, rrn23^c, rrn4.5^c, rrn5^c</i>
	Transfer RNA genes	<i>trnE-UUC, trnY-GUA, trnD-GUC, trnR-UCU, trnG-UCC^a, trnS-GCU, trnQ-UUG, trnK-UUU^a, trnH-GUG, trnT-GGU, trnS-UGA, trnG-GCC, trnM-CAU, trnS-GGA, trnT-UGU, trnL-UAA^a, trnF-GAA, trnV-UAC^a, trnM-CAU, trnW-CCA, trnP-UGG, trnI-CAU^f, trnL-CAA^f, trnV-GAC^c, trnI-GAU^{cc}, trnA-UGC^{cc}, trnR-ACG^{cc}, trnN-GUU^f, trnL-UAG^c, trnC-GCA</i>
	Small subunit of ribosome	<i>rps2, rps3^c, rps4, rps7^c, rps8, rps11, rps12^{bc}, rps14, rps15^c, rps16^c, rps18, rps19^c</i>
	Large subunit of ribosome	<i>rpl14, rpl16^c, rpl20, rpl22^c, rpl23^c, rpl32^c, rpl33, rpl36</i>
	DNA-dependent RNA polymerase	<i>rpoA, rpoB, rpoC1^a, rpoC2</i>
	Translational initiation factor	<i>infA</i>
Genes for photosynthesis	Subunits of photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC^c, psaI, psaJ</i>
	Subunits of photosystem II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>
	NADH oxidoreductase	<i>ndhA^{ac}, ndhB^{ac}, ndhC, ndhD^c, ndhE^c, ndhF^c, ndhG^c, ndhF^c, ndhJ, ndhK, ndhH^f</i>
	Subunits of cytochrome	<i>petA, petB^a, petD^a, petG, petL, petN</i>
	Subunits of ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF^a, atpH, atpI</i>
	Large subunit of rubisco	<i>rbcL</i>
Other genes	Maturase	<i>matK</i>
	Envelope membrane protein	<i>cemA</i>
	Subunit of acetyl-CoA	<i>accD</i>
	C-type cytochrome synthesis gene	<i>ccsA^e</i>
Conserved reading frames	Conserved open reading frames	<i>ycf1^c, ycf2^c, ycf3^b, ycf4</i>

种蛋白编码基因数目 85~100, tRNA 基因数目 34~38, 基因数 128~146 及序列长度 160 521~193 356 bp (表 1)。

综上可知, 该属物种叶绿体基因组基因数目、类型和排列顺序在种间差异较大。8 个细辛属植物的 LSC/IRb

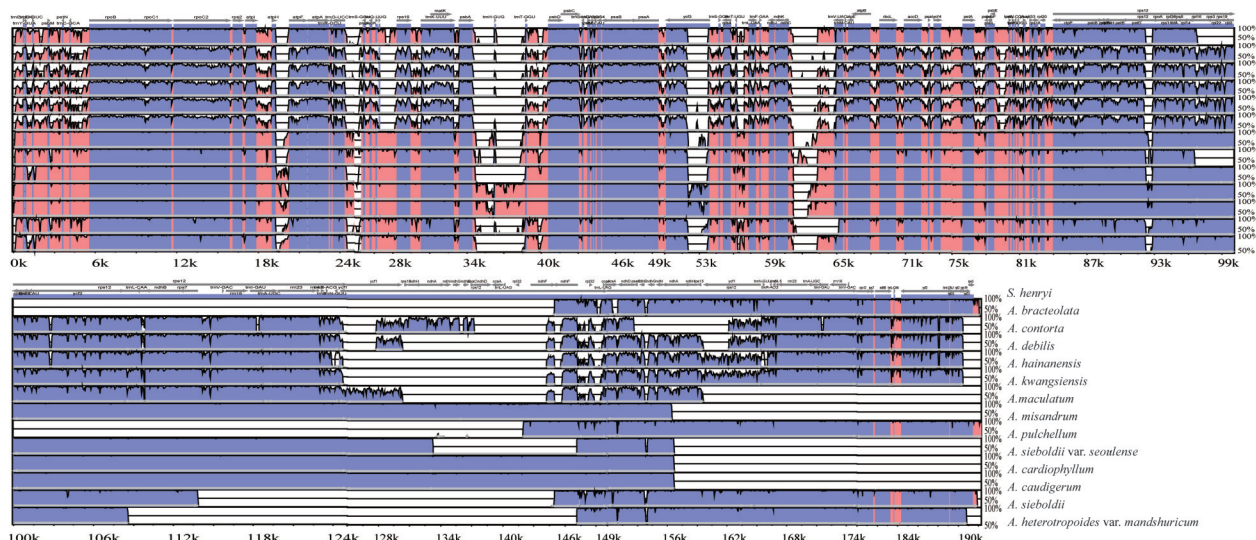


Figure 2 Sequences alignment of chloroplast genomes of 14 Aristolochiaceae plants

节点位于 *rpl22* 基因中, SSC/IRa 节点位于 *ycf1* 中, 这使得 LSC/IRb 和 SSC/IRa 节点分别保留了部分 *rpl22* 和

ycf1 基因片段。IR 区没有发生明显扩张和收缩现象 (图4), 与马兜铃科其他属植物的节点图谱类型相近。



Figure 3 Mauve alignment among 14 Aristolochiaceae plant chloroplast genomes

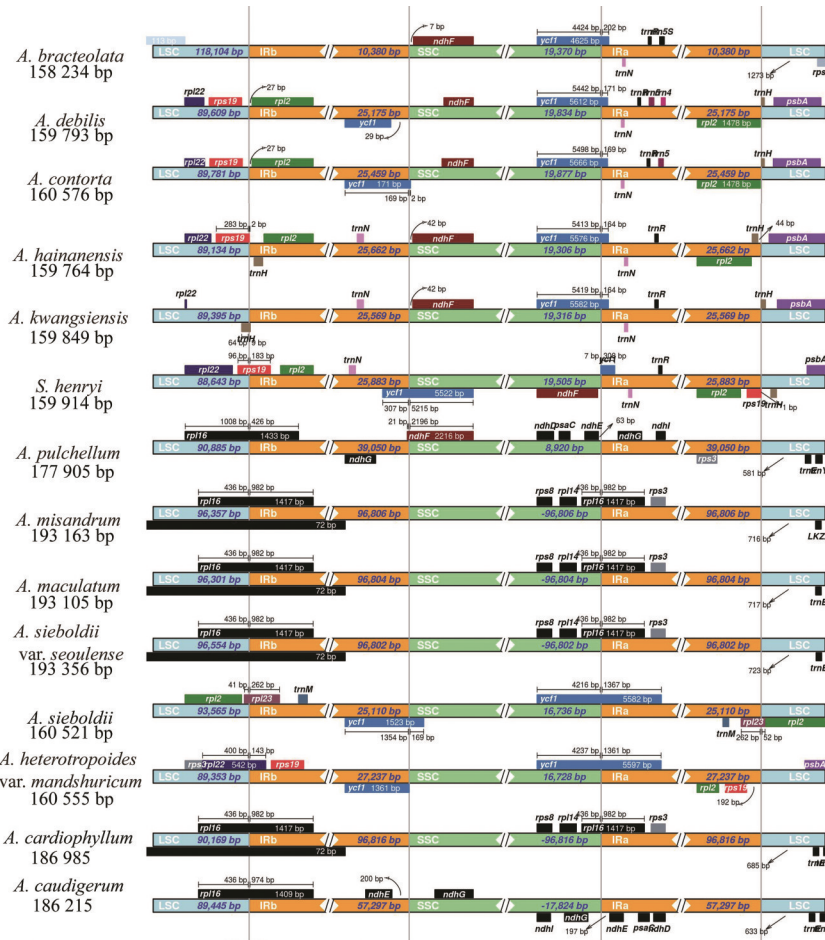


Figure 4 A comparison of LSC, SSC, and IR region borders among 14 Aristolochiaceae plants

4 系统发育分析

本研究以 *Piper bambusifolium* 作为外类群, 选取马兜铃科共 14 个个体的叶绿体全基因组序列, 通过最大似然法 (ML) 对其进行聚类分析 (图 5)。在整个马兜铃科植物系统关系上, 与细辛属植物亲缘关系最近的属是马蹄香属植物。在细辛属内, 尾花细辛与长毛

细辛聚为一支, 花叶细辛、汉城细辛、*A. misandrum* 和 *A. maculatum* 则聚为一支, 且这两支互为姊妹关系 (图 5)。

讨论

本研究完成了尾花细辛和花叶细辛叶绿体基因组

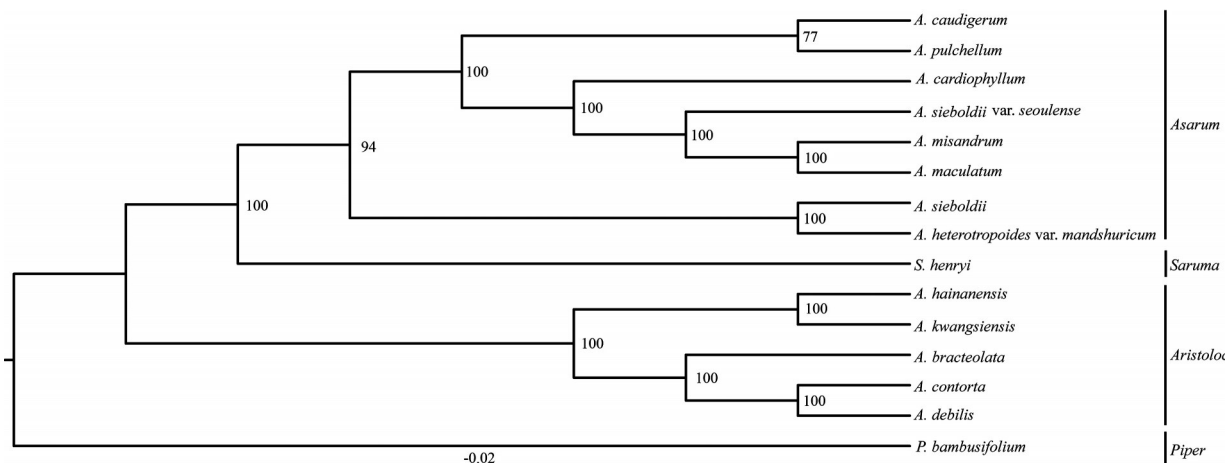


Figure 5 Phylogenetic relationship of Aristolochiaceae plant inferred from maximum likelihood (ML) based on complete chloroplast genomes

的测序、组装和注释,并对其结构、GC含量等进行了分析。结果表明,二者均具有典型的环状DNA分子,且具有保守的四分状结构,全长186 215~186 985 bp,与本题前期组装的同属植物华细辛、辽细辛等叶绿体基因组大小相似。细辛属植物约有90种,在我国分布有30种、4变种、1变型,但有关本属物种叶绿体基因组测序的报道较少,目前仅有6个物种被报道,分别是*A. pulchellum*、*A. misandrum*、*A. maculatum*、*A. sieboldii* var. *seoulense*、*A. heterotropoides* var. *mandshuricum* 和 *A. sieboldii*,通过比较叶绿体基因组组成和结构特征发现,各个区段组成及GC含量差异不明显。尾花细辛基因组GC含量为37.5%,花叶细辛GC含量为37.4%。尾花细辛和花叶细辛叶绿体基因组均注释到98个蛋白编码基因,38个tRNA基因和8个rRNA基因,以上结果与已发表的细辛属其他物种的叶绿体基因组特征较为吻合^[26-28]。

在叶绿体基因组中,其差异性主要由反向重复区的收缩与扩张引起,而IR在稳定叶绿体基因组结构和影响叶绿体基因组大小方面起着非常重要的作用^[29,30]。本研究中细辛属植物叶绿体基因组在边界LSC/IRb边界存在差异,其余边界均较为保守。该现象与已报道的柴胡属^[9],石豆兰属^[31]等植物相似。总之,叶绿体基因组的结构稳定,总体进化速度较慢,在同属内植物表现出保守性^[29]。在细辛属叶绿体基因组中检测到复杂的基因组重排现象;此外,基于mVISTA分析结果表明,非编码区变异水平高于编码区,且在*atpI-atpH*、*trnC-GCA-rpoB*、*trnT-GGU-psb*和*ycf4-petA*区域存在明显变异,符合被子植物叶绿体基因组变异的特征,这些高变区可为细辛属物种分子标记开发、特异性DNA条形码筛选及物种分类鉴定提供科学依据。

本研究以已测得的尾花细辛和花叶细辛叶绿体基因组联合课题组前期已发表的华细辛和辽细辛及NCBI下载的12种马兜铃科植物叶绿体基因组序列构建了ML进化树,结果显示,该进化树的分辨率较高,各节点也获得了较高的支持率,马兜铃科内属间呈现出较为明确的发育关系,与Zhao等^[28]的研究结果一致,即细辛属、马兜铃属及马蹄香属各聚为一支,且与传统分类结果一致。细辛属内物种呈明显的姐妹关系,尾花细辛与长毛细辛聚为一支,花叶细辛、汉城细辛、*A. misandrum*和*A. maculatum*则聚为一支。据已有细辛属植物化学特征报道,汉城细辛和辽细辛挥发油中甲基丁香酚含量较高,黄樟醚含量较低,华细辛中黄樟醚含量较高,甲基丁香酚含量较低^[32]。本研究的聚类结果显示,花叶细辛与汉城细辛的遗传一致度相对较高,而与辽细辛遗传一致度相对较低;相反,华细辛

与辽细辛的遗传一致度相对较高。该结果并未直接表明植物亲缘关系越相近,其化学特征也越相近。但也不宜一概而论,有效成分的测定可能与细辛挥发油的挥发程度有关^[4],对更加关注药用成分含量的药用植物而言更是如此,其与药材种植土壤、气候、采挖年限、季节等因素密切相关^[33]。药用细辛品质是否与种水平上的遗传特征相关仍需进一步整合大量遗传学与植物代谢组学等多学科手段来研究。

本研究首次对尾花细辛和花叶细辛叶绿体基因组进行测序组装,并对其基因结构及分布等进行了比较分析,结合已公布的马兜铃科物种叶绿体基因组序列,构建了系统发育树,阐明了不同属物种之间的系统发育关系,不仅丰富了马兜铃科植物的遗传资源,也为对植物进行分子鉴定及为后续开展细辛属物种进化和系统发育等研究奠定了科学基础。

作者贡献:第一作者柏国清负责论文设计、实验、数据分析及论文撰写;通讯作者陈尘负责论文设计、数据分析和论文指导;尉倩、刘安成、周军辉参与实验及数据分析;卢元、李仁娜、丛晓峰参与样品采集;所有作者参与论文修改。

利益冲突:所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Editorial Board of Chinese Flora, Chinese Academy of Sciences. *Aristolochiaceae* in *Flora Reipublicae Sinicae*: Vol 24 (中国植物志: 24卷) [M]. Beijing: Science Press, 1988.
- [2] Yang ZL. Natural distribution of *Aristolochiaceae* medicinal plants in Mount Emei [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 1996, 2: 17-19.
- [3] Cai SZ, Chen QB, Pan YZ et al. Biological characteristics of *Asarum cardiophyllum* and its application in gardens [J]. *North Hort* (北方园艺), 2007, 1: 130-132.
- [4] Zhou CZ, Yang CP, Wang ZR. Study on plant genetic diversity and biosystems of main germplasm resources of *Asarum* [J]. *Res Tradit Chin Med* (中药研究与信息), 2000, 2: 5.
- [5] Cai SZ, Chen QB, Pan YZ, et al. Preliminary research on introduction and domestication of *Asarum splendens* [J]. *Grassland Turf* (草原与草坪), 2004, 3: 45-47.
- [6] Cai SZ, Pan YZ, Chen QB, et al. Effects of low temperatures on physiological and biochemical indexes and growth of *Asarum splendens* [J]. *Acta Pratac Sin* (草业学报), 2010, 19: 95.
- [7] Tian X, Li ZJ, Liu XL, et al. Comparative and phylogeny analysis of *Erigeron breviscapus* and *Erigeron multiradiatus* complete chloroplast genomes [J]. *Mol Plant Breeding* (分子植物育种), 2022. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220305.1429.005.html>.
- [8] Yang J, Feng Li, Yue M, et al. Species delimitation and interspecific relationships of the endangered herb genus *Notopterygium*

- inferred from multilocus variations [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2019, 133: 142-151.
- [9] Zhang MY, Zhang YQ, Li YM, et al. Complete plastid genomes of *Bupleurum chinense* DC. and *B. boissieuanum* H. Wolff, with comparative and phylogenetic analyses of medicinal *Bupleurum* species [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 618-629.
- [10] Zhang J, Lu JH, Wang QQ, et al. Characteristics of the chloroplast genome of *Glycyrrhiza eurycarpa* P. C. Li from Xinjiang with comparison and phylogenetic analysis of the chloroplast genomes of the medicinal plants of *Glycyrrhiza* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1516-1525.
- [11] Zhang MY, Wang XF, Gao J, et al. Complete chloroplast genome of *Paeonia mairei* H. Lévl: characterization and phylogeny [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 168-176.
- [12] Dong BR, Zhao ZL, Ni LH, et al. Molecular markers based upon whole chloroplast genomes and identifying alpine *Gentiana waltonii* and *G. lhasica* (Gentianaceae) [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 2584-2591.
- [13] Wu LW, Cui YX, Nie LP, et al. The characteristics of complete chloroplast genome sequence and phylogenetic analysis of *Dendrobium moniliforme* [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1056-1066.
- [14] Patel RK, Jain M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e30619.
- [15] Jin JJ, Yu WB, Yang JB, et al. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes [J]. *Genome Biol*, 2020, 21: 241.
- [16] Qu XJ, Moore MJ, Li DZ, et al. PGA: a software package for rapid, accurate, and flexible batch annotation of plastomes [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 50.
- [17] Wyman SK, Jansen RK, Boore JL. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA [J]. *Bioinformatics*, 2004, 20: 3252-3255.
- [18] 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: 1647-1649.
- [19] Zheng S, Poczar P, Hyvönen J, et al. Chloroplast: an online program for the versatile plotting of organelle genomes [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 576124.
- [20] Darling ACE, Mau B, Blattner FR, et al. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements [J]. *Genome Res*, 2004, 14: 1394-1403.
- [21] Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, et al. VISTA: computational tools for comparative genomics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: W273-W279.
- [22] Katoh K, Toh H. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26: 1899-1900.
- [23] Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging [J]. *Mol Biol Evol*, 2008, 25: 1253-1256.
- [24] Posada D, Buckley TR. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests [J]. *Syst Biol*, 2004, 53: 793-808.
- [25] Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30: 1312-1313.
- [26] Wang M, Cui L, Feng K, et al. Comparative analysis of Asteraceae chloroplast genomes: structural organization, RNA editing and evolution [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2015, 33: 1526.
- [27] Yang JB, Yang SX, Li HT, et al. Comparative chloroplast genomes of *Camellia* species [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e73053.
- [28] Zhao R, Yin SY, Jiang CH, et al. Comparison of chloroplast genomes of medicinal plants in Aristolochiaceae [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2021, 47: 2932-2937.
- [29] Fu G, Liu J, Li JQ. Characterization of chloroplast genome structure and phylogenetic evolution of *Elsholtzia densa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 6: 1844-1853.
- [30] Lu DY, Zhang L, Hao L, et al. Analysis of chloroplast genome structure and phylogenetic evolution of *Juniperus sabina* [J]. *Acta Bot Boreal Occid Sin (西北植物学报)*, 2018, 38: 1464-1475.
- [31] Yang JP, Zhu ZL, Fan YJ, et al. Comparative plastomic analysis of three *Bulbophyllum* medicinal plants and its significance in species identification [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2736-2745.
- [32] Zhou CZ, Yang CF, Liu SL. Quality *t*-test of *Asarum* [J]. *Res Pract Chin Med (基层中药杂志)*, 1998, 12: 22-24.
- [33] Zhang HZ, Liu J, Di ZZ, et al. Quantitative analysis of aristolochic acid A in *Asarum* from different sources [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2008, 22: 2709-2711.