

昆明杯冠藤与青羊参叶绿体基因组特征比较及系统发育分析

耿应敏, 周兴乾, 张体操, 郑兰平*

(云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 昆明杯冠藤和青羊参隶属于夹竹桃科鹅绒藤属, 是重要的药用植物。本研究对昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组进行测序、组装, 并对两者叶绿体基因组的结构特征及其系统发育位置进行了分析。结果表明, 昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组均具有典型的四分体结构, 注释到 133 个基因, 两者总 GC 含量接近。密码子偏好性分析显示, 昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组中相对同义密码子使用度略有不同, 但差异不大, 且在密码子第 3 位有强烈的 A 或 U 偏好。在两者叶绿体基因组中分别检测到 91 个和 103 个简单重复序列, 以 A/T 类型重复占比最大。核苷酸多态性分析显示, 鹅绒藤属叶绿体基因组共有间区序列的核苷酸多态性值高于共有基因序列, 基于共有间区序列的高变区设计了一对引物可对昆明杯冠藤和青羊参进行鉴别。系统发育分析表明, 昆明杯冠藤和地梢瓜亲缘关系最近, 青羊参、白首乌和隔山消在鹅绒藤属中形成稳定的单系分支, 三者亲缘关系较近。对昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组特征及其系统发育的比较分析将为两种植物的物种鉴定及鹅绒藤属植物的遗传多样性和系统进化研究奠定理论基础。

关键词: 鹅绒藤属; 叶绿体基因组; 系统发育; 高通量测序; DNA 条形码

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)03-0764-11

Characterization and phylogenetic analysis of chloroplast genome of *Cynanchum wallichii* and *Cynanchum otophyllum*

GENG Ying-min, ZHOU Xing-qian, ZHANG Ti-cao, ZHENG Lan-ping*

(College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

Abstract: *Cynanchum wallichii* and *Cynanchum otophyllum* belong to the genus *Cynanchum* in the family Apocynaceae, and are important medicinal plants. In this study, we sequenced and assembled the chloroplast genomes of *C. wallichii* and *C. otophyllum*, and performed a phylogenetic analysis of the structural characteristics of their chloroplast genomes and their phylogenetic positions. The results showed that the chloroplast genomes of both *C. wallichii* and *C. otophyllum* had a typical tetrad structure, with 133 genes annotated, and the total GC contents of both were similar. Codon preference analysis showed that the relative synonymous codon usage in the chloroplast genomes of *C. wallichii* and *C. otophyllum* differed slightly, but the differences were not significant, and there was a strong A or U preference at the third codon position. In both chloroplast genomes, 91 and 103 simple sequence repeats were detected respectively, and the largest proportion of A/T type repeats. Nucleotide polymorphism analysis showed that the nucleotide diversity of the intergenic sequences in the chloroplast genome of genus *Cynanchum* were generally higher than those of the common gene sequences. A pair of primers was designed based on the high variation region of the chloroplast genome to identify *C. wallichii* and *C. otophyllum*. The phylogenetic analysis showed that the *C. wallichii* and *Cynanchum thesioides* were the closest relatives, while the *C. otophyllum*, *Cynanchum bungei* and *Cynanchum wilfordii* formed a stable monophyletic clade within the

收稿日期: 2023-05-31; 修回日期: 2023-07-21.

基金项目: 云南省基础研究项目 (202301AT070254); 云南省应用基础研究中医联合专项 (202101AZ070001-056).

*通讯作者 E-mail: casperl@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0691

genus *Cynanchum*, and the three species were closely related. The comparative analysis of the chloroplast genomic characteristics and phylogeny of *C. wallichii* and *C. otophyllum* will provide a theoretical basis for the species identification of the two plants and for the study of genetic diversity and phylogeny of the genus *Cynanchum*.

Key words: *Cynanchum*; chloroplast genome; phylogeny; high-throughput sequencing; DNA barcode

鹅绒藤属 (*Cynanchum*) 植物是我国重要的药用植物种质资源, 在常用中药和民间民族用药中应用广泛, 具有显著的资源优势^[1]。昆明杯冠藤 (*Cynanchum wallichii* Wight) 和青羊参 (*Cynanchum otophyllum* Schneid.) 是夹竹桃科 (Apocynaceae) 鹅绒藤属多年生草质藤本植物^[2]。二者均以根入药, 分别称之为断节参和青阳参, 是我国独具特色的民族中药材, 药用历史悠久, 分别作为虎力散的组成药和青阳参片的原料药^[3,4]。

昆明杯冠藤和青羊参植物形态相似, 花、果期相近, 二者形态差异主要在于叶腋有无叶托, 花萼内部腺体个数以及蓇葖果形态, 这些微小的鉴别特征在野外或用肉眼无法准确分辨^[2,5]。昆明杯冠藤生长于山坡草地、村边和路旁灌木丛中或山谷等处, 产于云南、贵州、广西和四川等省区^[2]。青羊参生长于海拔 1 500~2 800 米的山地、溪谷疏林中或山坡路边, 主要分布于我国云南、四川、贵州、湖南、广西和西藏等省区^[2]。二者生境相似且分布区域有部分重叠。

由于昆明杯冠藤和青羊参形态相似且分布区域有部分重叠, 使得二者很难被区分, 因此, 在药材采收过程中容易发生鉴定错误, 引起混用或误用^[5]。中药近缘物种的准确鉴定是安全用药的前提, 药材混用会威胁用药的安全性和影响疗效。这两个近缘物种容易被混淆的问题也曾得到部分学者的关注, 如 Yang 等^[6,7]曾先后使用生药学鉴别和随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术对青羊参及其近缘种进行研究, 其结果为其物种鉴定提供了一定参考。

近年来, 由于测序技术的发展, 叶绿体基因组研究日益受到更多学者的重视^[8,9]。本研究比较分析了昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组的基本特征和系统发育关系, 旨在为这两种中药材的安全用药提供依据和保证, 以及为其同属植物的种质资源鉴定、系统发育分析和资源利用保护等方面的研究提供基础数据。

材料与方法

实验材料 昆明杯冠藤采自云南保山芒宽 (25°5.114'N, 98°48.745'E), 青羊参采自云南丽江拉市海 (26°52.330'N, 100°9.494'E), 经云南中医药大学杨从卫老师鉴定确认。凭证标本号分别为 YUCM2021001

和 YUCM2022016, 存放于云南中医药大学。选取健康植株幼嫩叶片, 经液氮速冻后, 置超低温冰箱中保存备用。除昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组外, 其余样本均从 NCBI 下载 (表 1)。

DNA 的提取和测序 使用改良的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 方法提取昆明杯冠藤和青羊参的总 DNA^[10]。利用 Illumina Novaseq6000 高通量测序平台对青羊参和昆明杯冠藤进行双末端测序, 构建插入片段为 350~450 bp 的文库, reads 长度为 150 bp。另采用 PacBio Sequel II 平台对昆明杯冠藤进行测序, 构建插入片段为 20 kb 的文库。使用 Trimmomatic v0.39 对原始数据进行数据过滤, 最终获得 clean reads 用于后续组装和注释流程^[11]。

叶绿体基因组组装和注释 使用 GetOrganelle v1.7.5 对 Illumina 测序数据进行组装, 另使用 BWA v0.7.17 将昆明杯冠藤二代组装序列比对到 Pacbio 三

Table 1 List of selected species and their informations

No.	Species	From	Accession
1	<i>Cynanchum wallichii</i>	This study	OQ198623
2	<i>Cynanchum otophyllum</i>	This study	OQ928061
3	<i>Cynanchum bungei</i>	NCBI	OK271106
4	<i>Cynanchum thesioides</i>	NCBI	MW864598
5	<i>Cynanchum chinense</i>	NCBI	NC_057432
6	<i>Cynanchum wilfordii</i>	NCBI	NC_029459
7	<i>Cynanchum wilfordii</i>	NCBI	KX352467
8	<i>Cynanchum auriculatum</i>	NCBI	NC_029460
9	<i>Cynanchum auriculatum</i>	NCBI	KU900231
10	<i>Cynanchum sibiricum</i>	NCBI	OQ390041
11	<i>Vincetoxicum mongolicum</i>	NCBI	NC_065505
12	<i>Vincetoxicum forrestii</i>	NCBI	NC_060305
13	<i>Vincetoxicum pycnostelma</i>	NCBI	OK271107
14	<i>Vincetoxicum versicolor</i>	NCBI	NC_052877
15	<i>Vincetoxicum lindleyi</i>	NCBI	NC_069945
16	<i>Vincetoxicum hainanense</i>	NCBI	NC_051946
17	<i>Calotropis gigantea</i>	NCBI	NC_041431
18	<i>Calotropis procera</i>	NCBI	NC_041440
19	<i>Asclepias syriaca</i>	NCBI	NC_022432
20	<i>Asclepias nivea</i>	NCBI	NC_022431
21	<i>Hoya pottsii</i>	NCBI	NC_042246
22	<i>Hoya liangii</i>	NCBI	NC_042245
23	<i>Hoya thomsonii</i>	NCBI	NC_067612
24	<i>Hoya meliflua</i>	NCBI	NC_069571
25	<i>Gymnema sylvestre</i>	NCBI	NC_047175
26	<i>Pentasachme caudatum</i>	NCBI	MW136321
27	<i>Apocynum pictum</i>	NCBI	NC_070061
28	<i>Apocynum venetum</i>	NCBI	NC_053902
29	<i>Nerium oleander</i>	NCBI	NC_025656

代数据,再使用 SPAdes v3.14.1 进行混合组装^[12,13]。利用在线工具 GeSeq (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/geseq.html>) 对组装好的序列进行编码蛋白 (PCGs)、转运 RNA (tRNA) 和核糖体 RNA (rRNA) 的预测,得到原始注释结果。参考鹅绒藤属物种叶绿体基因组的注释信息,在 Geneious v2023.0.1^[14]中对昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组的注释信息进行检查及人工校正,得到高准确性的基因集。通过 BankIt 将注释结果提交到 NCBI,获得昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组的登录号: OQ198623 和 OQ928061。最后,利用在线工具 OGDRAW (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>) 绘制圈图。

叶绿体基因组特征分析 使用 CodonW v1.4.2 计算昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组中蛋白编码序列的相对同义密码子使用度 (relative synonymous codon usage, RSCU)^[15]。结合在线工具 CUSP (<https://www.bioinformatics.nl/emboss-explorer/>) 计算蛋白编码序列的总 GC 含量及密码子第 1 位、第 2 位和第 3 位的 GC 含量。蛋白编码基因的筛选标准为起始密码子为 ATG,并以 TAA、TAG、TGA 结尾;序列长度 ≥ 300 bp;且双拷贝基因只选取一个^[16]。使用 MISA 软件^[17]对叶绿体基因组序列进行简单重复序列 (simple sequence repeats, SSRs) 分析,单核苷酸、二核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸的最小重复值分别设置为 10、5、4、3、3 和 3,两个 SSR 之间的最小距离设置为 100 bp。

叶绿体基因组比较分析 利用 IRscope (<https://irscope.shinyapps.io/irapp/>) 对鹅绒藤属物种叶绿体基因组边界的收缩与扩张进行可视化。使用 mVISTA^[18]对昆明杯冠藤和青羊参在内的鹅绒藤属 8 种植物的叶绿体基因组进行比较分析,选择 Shuffle-LAGAN 模式。通过 DnaSP v6.12.03 软件^[19]计算鹅绒藤属物种叶绿体基因组共有基因和共有基因间区的核苷酸多态性 (nucleotide diversity, Pi)。

DNA 条形码鉴定分析 以共有间区序列中 Pi 值排名靠前的序列为模板设计引物,并对包括昆明杯冠藤和青羊参在内的 9 份样本进行 PCR 实验验证 (表 2)。筛选出 *rps16-trnQ-UUG* 序列可用于鉴定昆明杯冠藤和青羊参。*rps16-trnQ-UUG* 序列的引物 (F: 5'-ATTG GTTTGTAGACATCGTA-3', R: 5'-TAAAGTCTAATGT TAGCTGGA-3') 由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 扩增采用 25 μ L 反应体系,包括 2 \times EasyTaq[®] PCR SuperMix (北京全式金生物技术有限公司) 12.5 μ L,上下游引物 (2.5 μ mol \cdot L⁻¹) 各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C

终延伸 10 min。使用 ABI3730XL 测序仪对扩增产物进行 Sanger 测序,利用 SeqMan 软件^[20]对序列进行拼接。使用 MEGA X 软件^[21]进行序列比对并以 Kimura 2-parameter (K2-P) 模型计算遗传距离。最后采用邻接法 (neighbor joining, NJ) 构建系统发育树,设置 Bootstrap 值为 1 000。

Table 2 Samples used to verify the specific DNA barcode

Species	Sample part	Number	Sample No.	Location
<i>C. wallichii</i>	Leaf	2	BGTA-B	Baoshan, Yunnan
<i>C. otophyllum</i>	Leaf	2	QYSA-B	Lijiang, Yunnan
<i>C. auriculatum</i>	Root	1	FHCR	Fenghuang, Hunan
<i>C. auriculatum</i>	Stem	2	FHAS, FHBS	Fenghuang, Hunan
<i>C. auriculatum</i>	Leaf	2	FHAL, FHBL	Fenghuang, Hunan

系统发育分析 为探究昆明杯冠藤和青羊参的系统发育地位和亲缘关系,从 NCBI 下载了 24 个夹竹桃科马利筋亚科 (Asclepiadoideae) 植物样本的叶绿体基因组 (表 1)。另将夹竹桃亚科 (Apocynoideae) 的白麻 (*Apocynum pictum*)、罗布麻 (*Apocynum venetum*) 和夹竹桃 (*Nerium oleander*) 的叶绿体基因组作为外类群,与包括昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组在内的共 26 个马利筋亚科植物样本一起构建系统发育树。通过 MAFFT v7.490 对叶绿体基因组全序列进行多重序列比对,最后使用 IQ-TREE 基于最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建系统发育树,进行 1 000 次重复的 Bootstrap 检验^[22,23]。

结果

1 叶绿体基因组基本信息

昆明杯冠藤和青羊参分别获得 8 234 和 5 069 Mb 二代原始测序数据,另昆明杯冠藤获得 127.96 Mb 三代原始测序数据。最终组装得到叶绿体基因组全长分别为 159 808 和 161 050 bp,均具有典型的双链环状四分体结构,包括 1 个大单拷贝区 (large single copy, LSC)、1 个小单拷贝区 (small single copy, SSC) 和 1 对反向重复区 (inverted repeats, IR) (图 1)。昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组 LSC 的长度分别为 90 901 和 92 009 bp, SSC 的长度分别为 20 943 和 19 833 bp, IR 的长度分别为 23 982 和 24 604 bp (表 3)。昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组序列的总 GC 含量分别为 37.87% 和 37.79% (表 3),其中 IR 区的 GC 含量分别为 43.70% 和 43.21%,均高于 LSC 区 (36.15%、36.13%) 和 SSC 区 (31.92%、32.01%)。IR 区含有 GC 含量较高的 4 种 rRNA,这可能是引起 IR 区 GC 含量偏高的一个因素。

Table 3 Composition and characteristic of chloroplast genome in *C. wallichii* and *C. otophyllum*

Species	Genome		LSC		IR		SSC	
	Length/bp	G+C/%	Length/bp	G+C/%	Length/bp	G+C/%	Length/bp	G+C/%
<i>C. wallichii</i>	159 808	37.87	90 901	36.15	23 982	43.70	20 943	31.92
<i>C. otophyllum</i>	161 050	37.79	92 009	36.13	24 604	43.21	19 833	32.01

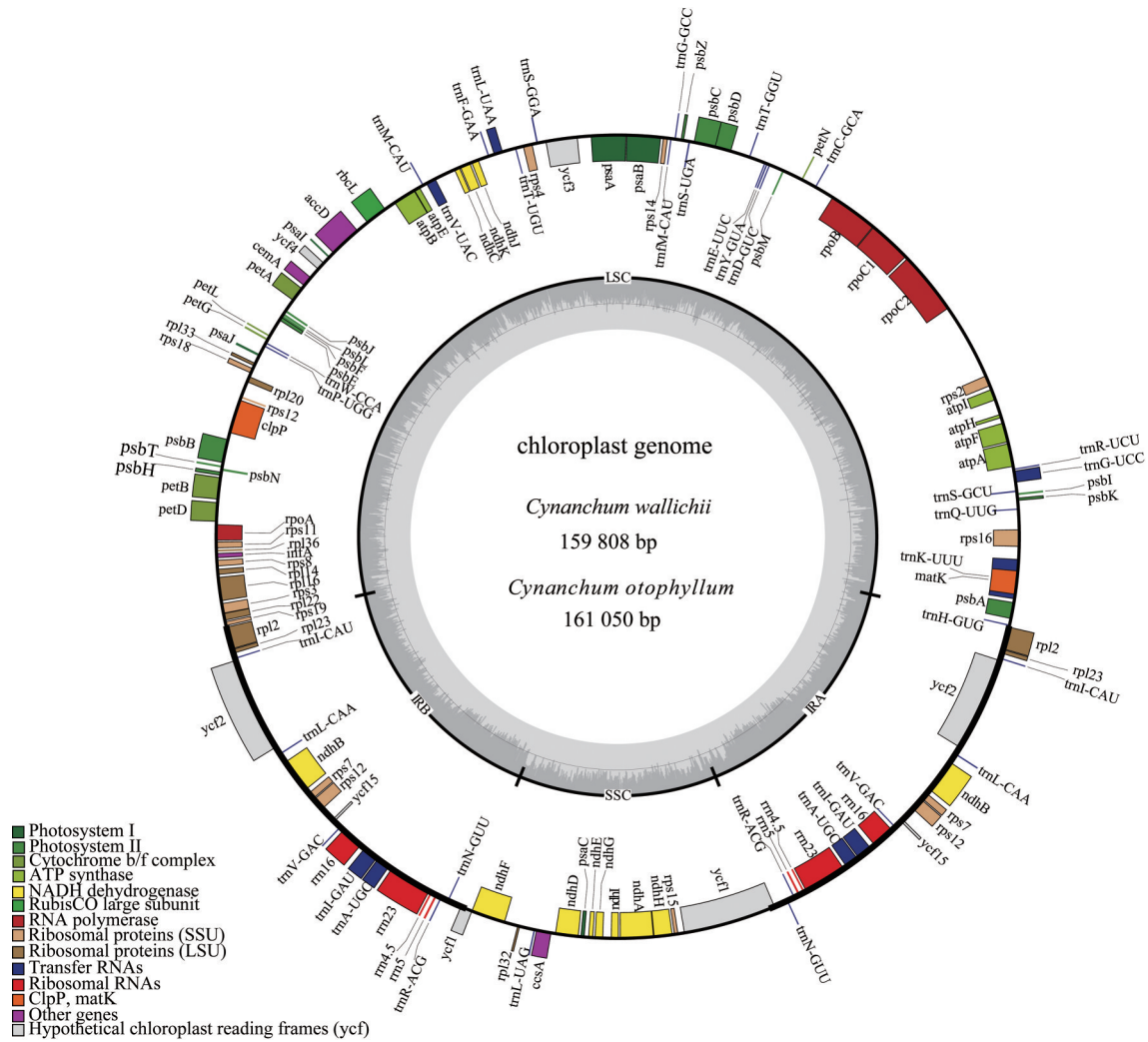


Figure 1 Map of chloroplast genome of *C. wallichii* and *C. otophyllum*

昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组均注释得到 133 个基因, 有 19 个是双拷贝基因 (表 4)。133 个基因中包含 88 个 PCGs、37 个 tRNAs 和 8 个 rRNAs。除 tRNA 和 rRNA 外, 88 个蛋白编码基因根据功能不同分为 4 类: 45 个与光合作用相关的基因, 包括 5 个光系统 I 基因、15 个光系统 II 基因、12 个 NADH 脱氢酶基因、6 个细胞色素 b/f 复合物编码基因、6 个 ATP 合成酶基因和 1 个 Rubisco 大亚基基因; 29 个与遗传复制系统相关的基因, 包括 11 个核糖体大亚基基因、14 个核糖体小亚基基因和 4 个 RNA 聚合酶基因; 此外, 还有 8 个功能未知基因和 6 个其他基因。叶绿体基因组中 4 种 rRNA (*rrn4.5S*, *rrn5S*, *rrn16S*, *rrn23S*) 均位于 IR 区, 存在双拷

贝。在 37 个 tRNA 中, *trnA-UGC*、*trnI-CAU*、*trnI-GAU*、*trnL-CAA*、*trnN-GUU*、*trnR-ACG* 和 *trnV-GAC* 等 7 个基因是双拷贝基因。

2 叶绿体基因组密码子使用偏好性分析

从昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组中均筛选出 53 条蛋白编码序列, 基于这部分序列分析两个物种的密码子使用偏好性。在两者蛋白编码序列中, 分别有 21 248 和 21 119 个密码子, 除终止密码子外, 均编码 20 种氨基酸 (图 2)。除甲硫氨酸 (Met) 和色氨酸 (Trp) 外, 其他氨基酸都有多个同义密码子。其中精氨酸 (Arg)、亮氨酸 (Leu) 和丝氨酸 (Ser) 有 6 个同义密码子; 丙氨酸 (Ala)、甘氨酸 (Gly)、脯氨酸 (Pro)、苏氨酸

Table 4 List of annotated genes in *C. wallichii* and *C. otophyllum* chloroplast genome. ^aIndicates that it contains two copies of genes

Category	Gene group	Gene name	Number
Gene for photosynthesis	Photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>	5
	Photosystem II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>	15
	Cytochrome b/f complex	<i>petA, petB, petD, petG, petL, petN</i>	6
	NADH dehydrogenase	<i>ndhA, ndhB^a, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>	12
	Subunits of ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI</i>	6
	Rubisco large subunits	<i>rbcL</i>	1
Self-replication	Lange subunits of ribosome	<i>rpl2^a, rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23^a, rpl32, rpl33, rpl36</i>	11
	Small subunits of ribosome	<i>rps2, rps3, rps4, rps7^a, rps8, rps11, rps12^a, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19</i>	14
	RNA polymerase	<i>rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2</i>	4
	Ribosomal RNA genes	<i>rrn4.5S^a, rrn5S^a, rrn16S^a, rrn23S^a</i>	8
	Transfer RNA genes	<i>trnA-UGC^a, trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-GAA, trnM-CAU, trnG-GCC, trnG-UCC, trnH-GUG, trnI-CAU^a, trnI-GAU^a, trnK-UUU, trnL-CAA^a, trnL-UAA, trnL-UAG, trnM-CAU, trnN-GUU^a, trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG^a, trnR-UCU, trnS-GCU, trnS-GGA, trnS-UGA, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-GAC^a, trnV-UAC, trnW-CCA, trnY-GUA</i>	37
Other genes	Protease	<i>clpP</i>	1
	Maturase	<i>matK</i>	1
	Translation initiation factor	<i>infA</i>	1
	Envelop membrane protein	<i>cemA</i>	1
	Subunits of acety-CoA-carboxylase	<i>accD</i>	1
	C-type cytochrome synthesis	<i>ccsA</i>	1
Unknow gene	Hypothetical chloroplast reading frames	<i>ycf1^a, ycf2^a, ycf3, ycf4, ycf15^a</i>	8
Total			133

(Thr) 和缬氨酸 (Val) 均有 4 个同义密码子; 异亮氨酸 (Ile) 有 3 个同义密码子; 其余 9 个氨基酸有 2 个同义密码子。如图 2 所示, 昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组中密码子数量最多的都是 Leu, 分别占总密码子的 10.44% 和 10.41%; 其次为 Ile, 分别占 8.08% 和 8.20%; 编码半胱氨酸 (Cys) 的密码子数量最少, 分别占 1.16% 和 1.14%。此外, 昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组中均有 30 种密码子的 RSCU 大于 1, 对应密码子在编码过程中具有偏好性, 其中 RSCU 最大的均是编码 Leu 的 UUA。编码 Met 和 Trp 的密码子分别为 AUG 和 UGG, 两者 RSCU 等于 1, 表示在编码过程中没有使用偏好。其余密码子的 RSCU 小于 1, 这些密码子的使用率较

低, 其中 RSCU 最小的密码子均为编码 Leu 的 CUC。

经统计, 昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组中编码氨基酸的密码子的总 GC 含量均为 38.62%, 仅第 3 位的 GC 含量分别为 30.57% 和 30.50%。表明两个物种叶绿体基因组中密码子使用偏好 A/U, 且在密码子第 3 位有强烈的 A/U 偏好性。

3 简单重复序列 SSR 分析

从昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组中分别检测到 91 个和 103 个 SSR, 均检测到了 6 种类型的微卫星序列。在昆明杯冠藤叶绿体基因组中发现了 61 个单核苷酸、9 个二核苷酸、4 个三核苷酸、12 个四核苷酸、1 个五核苷酸和 4 个六核苷酸。在青羊参叶绿体基因组中

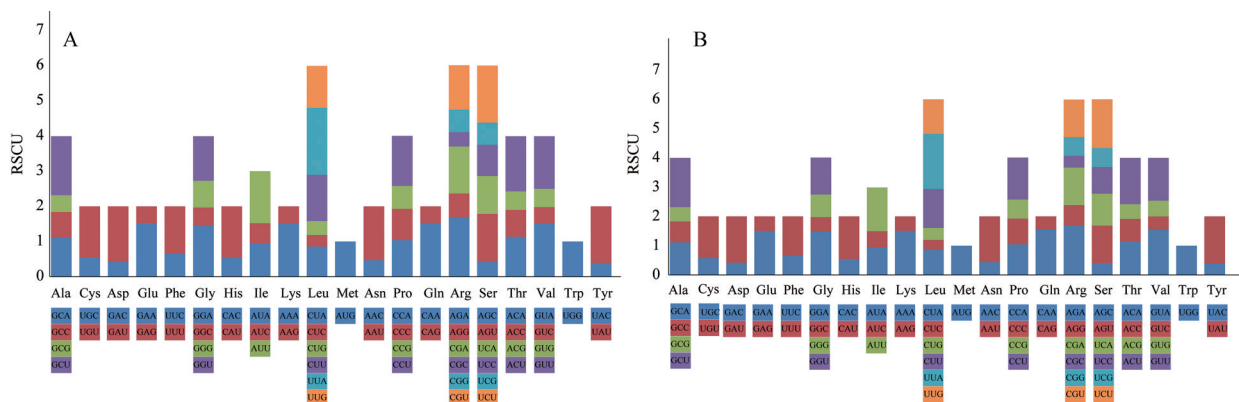


Figure 2 Relative synonymous codon usage (RSCU) of *C. wallichii* (A) and *C. otophyllum* (B). The lower box represents all codons encoding each amino acid; the height of the upper column represents the sum of RSCU of all codons; the height of the column represents the RSCU value of each codon

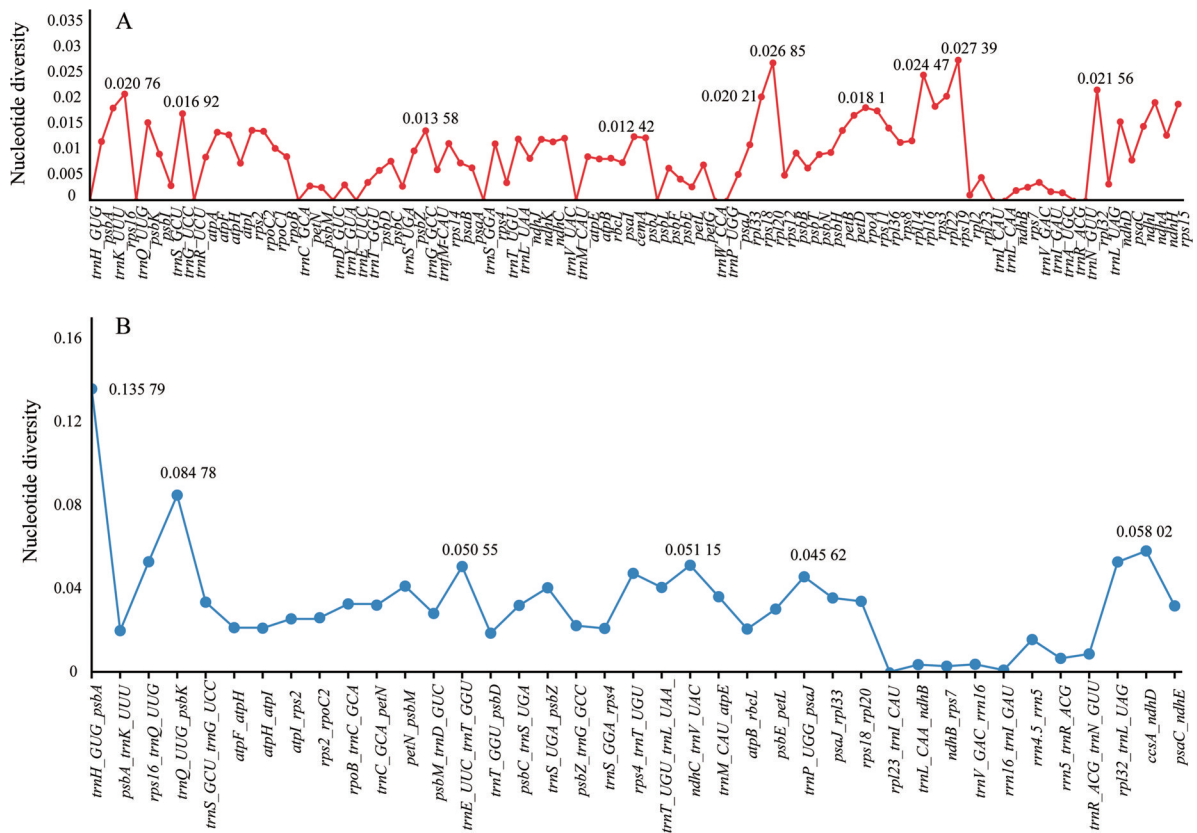


Figure 6 Comparison of nucleotide diversity (Pi) value for gene regions and intergenic spacer regions among eight species in *Cynanchum*. A shows the nucleic acid polymorphism analysis of gene regions, and B shows the nucleic acid polymorphism analysis of intergenic spacer regions

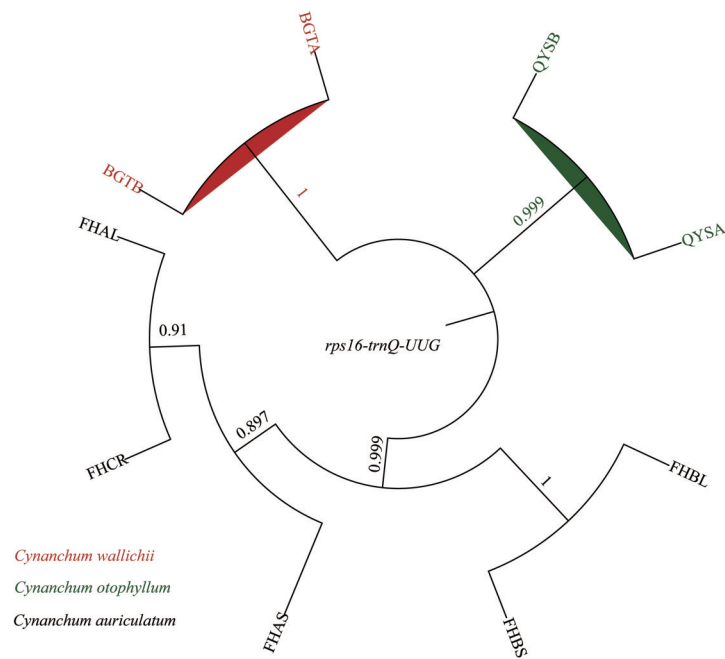


Figure 7 Neighbor joining phylogenetic tree based on DNA barcode

8 系统发育分析

为了解昆明杯冠藤和青羊参的系统发育地位,以夹竹桃亚科的白麻、罗布麻和夹竹桃作为外类群,选取

昆明杯冠藤和青羊参在内的共 26 个马利筋亚科物种的叶绿体基因组序列一起构建系统发育树。除昆明杯冠藤和青羊参外,其余样本数据均从 NCBI 下载 (表 1)。

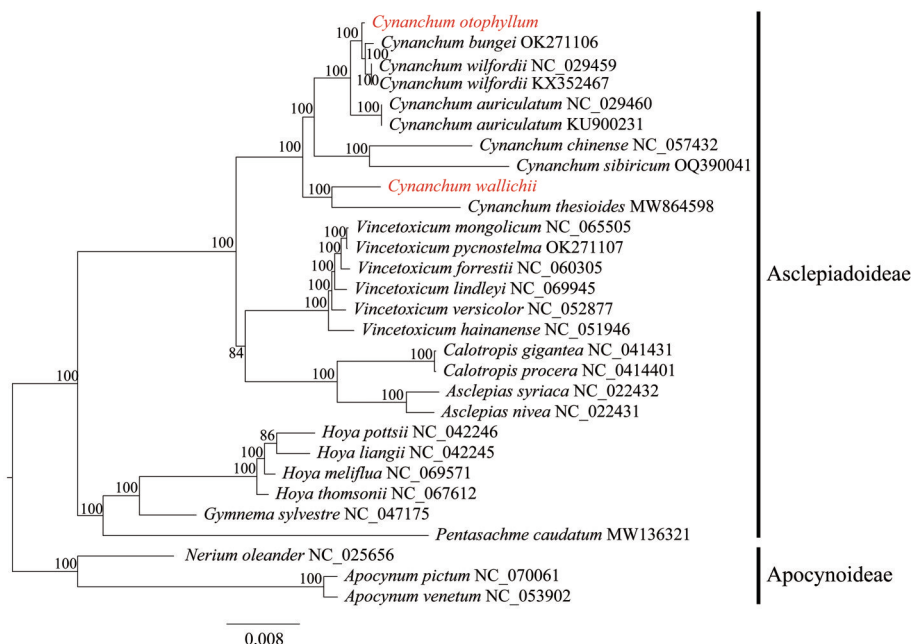


Figure 8 Phylogenetic tree constructed using the maximum likelihood (ML) method based on the whole chloroplast genomes from 29 different samples. The numbers above the branches represent the ML bootstrap values

系统发育树显示 (图8), 所有的分支均具有较高的支持率 (>80%), 说明结果可靠, 鹅绒藤属 10 个样本均以 100% 的支持率聚为一支。除外类群外, 26 个样本聚为两大类, 分别为马利筋族 (Asclepiadoideae) 和牛奶菜族 (Marsdeniaceae)。在鹅绒藤属分支中, 昆明杯冠藤和地梢瓜聚在一起, 两者亲缘关系较近; 青羊参、白首乌和隔山消三者亲缘关系较近, 聚为一支, 且进一步与牛皮消形成姐妹支。

讨论

叶绿体是绿色植物进行光合作用的场所, 具有独立基因组^[24]。与线粒体基因组或细胞核基因组相比, 叶绿体基因组在进化过程中具有高度的保守性和稳定性, 在物种鉴定、系统发育、DNA 条形码开发及遗传工程研究等领域运用广泛^[25]。目前, 有学者根据物种间叶绿体基因组的特征分析和系统发育关系来研究同属近缘物种^[26-28]。昆明杯冠藤和青羊参形态特征相似且分布地区有部分重叠, 使两者鉴别难度增加, 且药材混用会对消费者的安全造成威胁^[2,29,30]。因此, 有必要为昆明杯冠藤和青羊参的鉴定提供更多可靠的证据。

和其他被子植物一样, 昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组呈典型的四分体结构, 两者编码基因的数量、类别和排列顺序一致^[31]。IR 区的扩张和收缩被认为是造成叶绿体基因组差异性的主要原因^[32]。分析发现, 鹅绒藤属物种的 IR 区的长度范围为 23 982 ~ 24 689 bp, 有不同程度的扩张或收缩, 导致种间叶绿体基因组各

区域的长度和边界处基因存在差异, 特别是 SSC 区与 IR 区边界处的基因差异较明显。昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组的密码子偏好性与豆蔻属、刺柏属等植物相似, 密码子使用偏好 A/U^[16,33]。从昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组序列中分别检测到 91 个和 103 个 SSR, 两者均具有丰富的基元类型, 与其他被子植物 SSR 特点一致^[26,34,35], 均以 A/T 类型占比最大。这些 SSR 广泛分布于叶绿体基因组的不同位置, 可为物种的分子标记提供参考。鹅绒藤属叶绿体全基因组序列的变异分析发现, 其具有高度相似性, 相较 LSC 区和 SSC 区而言, IR 区变异程度最低。此外, 鹅绒藤属叶绿体基因组中非编码区的变异普遍高于编码区, 与丝兰属、苍术属和胡桃科等一致^[27,36,37]。其中 *trnH-GUG-psbA*、*trnQ-UUG-psbK*、*ccsA-ndhD*、*rps16-trnQ-UUG*、*rps19*、*rpl20*、*rpl16*、*rpl32* 等 Pi 值较高的共有间区和共有基因, 可为鹅绒藤属的物种鉴定和系统进化分析提供参考。本研究筛选出 *rps16-trnQ-UUG* 可作为特异性 DNA 条形码用于昆明杯冠藤和青羊参的快速、准确鉴定。

鹅绒藤属植物因性状相似, 形态界限模糊, 一直是分类学争议不休的类群^[38]。有学者曾先后使用生药鉴别手段和 RAPD 技术对青羊参及其近缘种进行了研究, 但生药鉴别需要研究人员具备丰富的生药鉴别知识和长期的经验积累且传统的性状特征和显微组织结构不易区分, 而 RAPD 技术重复性差、可靠性低, 均限制了其广泛应用^[6,7,39]。近年来, 随着分子生物学技术的发展, 分子鉴定技术在中药学领域逐渐得到推

广^[39,40]。Guo等^[41]研究涉及到了昆明杯冠藤和青羊参两个物种,但因分子标记少,序列较短,未能明确解决昆明杯冠藤和青羊参二者的系统关系。作为一个药用价值丰富的类群,进一步界定昆明杯冠藤和青羊参的系统位置十分必要。本研究表明,鹅绒藤属样本单独聚在一个分支上,与Chen等^[42,43]的研究结果一致。在鹅绒藤属分支上,昆明杯冠藤和青羊参分别与同属其他物种各自形成单系,表明二者虽然形态相似但在遗传上并不具有最近的亲缘关系。药用植物亲缘关系越相近,化学成分越相似^[44,45]。两者在叶绿体基因组水平上并不位于同一单系中,其化学成分必然有所区别,功效和用途上具有差异,因此,在用药前应确保物种鉴定无误且不能混用。

本研究首次完成了昆明杯冠藤和青羊参叶绿体基因组的比较研究,将二者与已报道的鹅绒藤属其他物种的叶绿体基因组进行对比分析。该研究不仅丰富了夹竹桃科植物的遗传资源,也从分子水平上为鉴别鹅绒藤属近缘物种提供了基础,为昆明杯冠藤和青羊参的遗传多样性研究和资源保护提供了参考。

作者贡献: 耿应敏负责实验、数据分析、论文写作及修改;周兴乾参与部分数据分析;张体操参与论文修改;郑兰平负责论文设计、样品收集、实验、数据分析及论文修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

- [1] Huang P, Zhou ZD, Zhang L, et al. Advances in chemical composition and pharmacological activity of *Cynanchum* [J]. Chin Med Mat (中药材), 2018, 41: 2248-2252.
- [2] Editorial Board of Chinese Flora, Chinese Academy of Sciences. Flora of China (中国植物志) [M]. Vol 63. Beijing: Science Press, 1988: 309-384.
- [3] Zhang ZX, Zhou J. Chemical composition of *Cynanchum wallichii* Wight [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物研究), 1982, 4: 413-418.
- [4] Li WL, He J, He J, et al. Determination of the dissolution of Qingyangshen dispersible tablets [J]. China Pharm (中国药房), 2009, 20: 1153-1155.
- [5] Zhu ZY. Important Natural Medicines in Yunnan (云南重要天然药物) [M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 2006: 246-252.
- [6] Yang ZY, Yang SD, Qian ZG. Pharmacognostic study on *Cynanchum otophyllum* [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med (云南中医药大学学报), 2008, 31: 17-20, 25.
- [7] Yang ZY, Pu CX, Qian ZG. RAPD analysis on *Cynanchum otophyllum* and its closely related species [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2009, 26: 562-566.
- [8] Soltis PS, Soltis DE, Doyle JJ. Molecular Systematics of Plants [M]. Boston, MA: Springer US, 1992: 14-35.
- [9] Khan AL, Asaf S, Lubna, et al. Decoding first complete chloroplast genome of toothbrush tree (*Salvadora persica* L.): insight into genome evolution, sequence divergence and phylogenetic relationship within brassicales [J]. BMC Genomics, 2021, 22: 312.
- [10] Li JL, Wang S, Yu J, et al. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction [J]. Chin Bull Bot (植物学报), 2013, 48: 72.
- [11] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data [J]. Bioinformatics, 2014, 30: 2114-2120.
- [12] 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.
- [13] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. J Comput Biol, 2012, 19: 455-477.
- [14] 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.
- [15] Sharp PM, Li WH. Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for rare codons [J]. Nucleic Acids Res, 1986, 14: 7737-7749.
- [16] Ma ML, Zhang W, Meng HL, et al. Codon bias analysis of chloroplast genome in medicinal plants of *Amomum* Roxb [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 3661-3670.
- [17] Beier S, Thiel T, Münch T, et al. MISA-web: a web server for microsatellite prediction [J]. Bioinformatics, 2017, 33: 2583-2585.
- [18] Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, et al. VISTA: computational tools for comparative genomics [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32: W273-W279.
- [19] Rozas J, Ferrer-mata A, Sánchez-DelBarrio JC, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets [J]. Mol Biol Evol, 2017, 34: 3299-3302.
- [20] Jin JQ, Sun YB. AutoSeqMan: batch assembly of contigs for Sanger sequences [J]. Zool Res, 2018, 39: 123-126.
- [21] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Mol Biol Evol, 2018, 35: 1547-1549.
- [22] Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability [J]. Mol Biol Evol, 2013, 30: 772-780.
- [23] Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies [J]. Mol Biol Evol, 2015, 32: 268-274.
- [24] Daniell H, Jin S, Zhu XG, et al. Green giant-a tiny chloroplast genome with mighty power to produce high-value proteins: history and phylogeny [J]. Plant Biotechnol J, 2021, 19: 430-447.
- [25] Hu Y, Woeste KE, Zhao P. Completion of the chloroplast

- genomes of five Chinese *Juglans* and their contribution to chloroplast phylogeny [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 7: 1955.
- [26] Qin N, Zhang NJ, Chen C, et al. Comparison and phylogenetic analysis of chloroplast genomes of *Viola philippica* and other *Viola* L. species [J]. *Mol Plant Breeding (分子植物育种)*, 2022, 20: 8099-8111.
- [27] Wang Y, Wang S, Liu Y, et al. Chloroplast genome variation and phylogenetic relationships of *Atractylodes* species [J]. *BMC Genomics*, 2021, 22: 103.
- [28] Tian X, Liu YY, Zhang YM, et al. Comparative and phylogeny analysis of four *Veratrum* medicinal plants complete chloroplast genomes [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 1127-1137.
- [29] Guo MY. Identification of Chinese Herbal Medicine, Molecular Systematics and Diversity of Contaminated Fungi Based on DNA Barcoding Technology (基于DNA条形码技术的中草药鉴定、分子系统学及污染真菌多样性研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2021.
- [30] Gu Z, Zhang ZL, Li HT, et al. Advances in taxonomic study of Asclepiadaceae [J]. *Biotic Resour (生物资源)*, 2021, 43: 257-267.
- [31] Jansen RK, Raubeson LA, Boore JL, et al. Methods for obtaining and analyzing whole chloroplast genome sequences [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 395: 348-384.
- [32] Odintsova MS, Iurina NP. Plastidic genome of higher plants and algae: structure and function [J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2003, 37: 768-783.
- [33] Shu JX, Yang L, Zhou T, et al. Analysis of codon bias in the chloroplast genome of four medicinal plants of *Juniperus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 7507-7515.
- [34] Guo X, Wang Z, Cai D, et al. The chloroplast genome sequence and phylogenetic analysis of *Apocynum venetum* L. [J]. *PLoS One*, 2022, 17: e0261710.
- [35] Wang Z, Liu C, Ren WC et al. Assembly and sequence analysis of chloroplast genome of *Sanicula rubriflora* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 7183-7190.
- [36] Wang F, Zhao WZ, Dong ZH, et al. Analysis of the chloroplast genome characteristics of 6 species of *Yucca* [J]. *Bull Bot Res (植物研究)*, 2023, 43: 109-119.
- [37] Shen J, Li X, Chen X, et al. The complete chloroplast genome of *Carya cathayensis* and phylogenetic analysis [J]. *Genes*, 2022, 13: 369.
- [38] Khanum R, Surveswaran S, Meve U, et al. *Cynanchum* (apocynaceae: asclepiadoideae): a pantropical asclepiadoid genus revisited [J]. *Taxon*, 2016, 65: 467-486.
- [39] Yang BS, Huang QL, Xie LX, et al. *Pueraria lobate* advances in molecular pharmacognosy [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2021, 46: 2149-2157.
- [40] Shi RZ, Tian X, Zhao Y, et al. Molecular distinguishment of original species of *Pimacao* from the adulterants: based on chloroplast DNA barcoding [J]. *Mod Chin Med (中国现代中药)*, 2023, 25: 31-37.
- [41] Guo M, Ren L, Pang X. Inspecting the true identity of herbal materials from *Cynanchum* using ITS2 barcode [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 1945.
- [42] Chen G, Zhang X. The complete chloroplast genome of Chinese medicinal herb *Cynanchum chinense* R. Br. (Apocynaceae) and its phylogenetic position [J]. *Mitochondrial DNA B Resour*, 2022, 7: 598-599.
- [43] Pei L, Shu S, Ji B, et al. Complete sequence of *Cynanchum rostellatum* (Apocynaceae: Asclepiadoideae) chloroplast genome and its phylogenetic analysis [J]. *Mitochondrial DNA B Resour*, 2022, 7: 1395-1397.
- [44] Peng Y, Yao X, Zhao RH. Research and academic thought on medicinal plants by academician Xiao Peigen [J]. *Mod Chin Med (中国现代中药)*, 2013, 15: 821-823.
- [45] Qiu SX, Li DZ, Zhang ZX, et al. Chemical classification of *Cynanchum* and its relatives with reference to recovery of *vincetoxicum* [J]. *Acta Bot Yunnan (云南植物研究)*, 1989, 11: 41-50.