

## 四种忍冬属植物叶绿体基因组结构特征及系统发育分析

熊瑶<sup>1</sup>, 童凌斐<sup>1</sup>, 曹岚<sup>2</sup>, 慕泽泾<sup>2</sup>, 沈成英<sup>1</sup>, 杜小浪<sup>2\*</sup>

(1. 江西省人民医院(南昌医学院第一附属医院)药学部, 江西 南昌 330006; 2. 江西中医药大学, 中药资源与民族药研究中心, 江西 南昌 330004)

**摘要:** 忍冬属 (*Lonicera*) 是忍冬科 (Caprifoliaceae) 最大的属, 忍冬科药用植物在我国历史悠久, 资源丰富。由于具有观赏和药用价值, 忍冬的经济价值十分突出。然而, 受巨大需求和高价刺激的影响, 市场上出现了严重的混杂现象。本文通过高通量测序技术对越橘叶忍冬 [*L. angustifolia* Wallich ex Candolle var. *myrtillos* (Hook. f. & Thomson) Q. E. Yang]、圆叶忍冬 (*L. myrtillos* Hook. f. et Thoms. var. *cyclophylla* Rehd)、四川忍冬 (*L. szechuanica* Batal) 和唐古特忍冬 (*L. tangutica* Maxim) 的叶绿体基因组进行测序和组装, 并对其进行结构比较和系统发育学研究。结果显示, 4种忍冬的叶绿体基因组呈典型的环状四分体结构, 总长度为 154 608~163 413 bp, 总 GC 含量为 37.93%~38.42%。共注释 128~129 个基因, 包括 83~84 个蛋白编码基因、8 个 rRNA 基因和 37 个 tRNA 基因。忍冬属叶绿体重复结构分析共检测到 53~68 个简单重复序列 (simple sequence repeats, SSRs) 和 133~745 个长重复序列。系统发育研究表明, 21 种忍冬属药用植物可以明显聚为一支, 其中越橘叶忍冬和四川忍冬的亲缘关系较近, 圆叶忍冬和唐古特忍冬的亲缘关系较近。本研究首次对忍冬属叶绿体基因组及系统发育关系进行了全面的研究, 为揭示忍冬属物种间的遗传信息、物种进化和遗传多样性研究提供一定的科学依据。

**关键词:** 忍冬; 叶绿体基因组; 比较分析; 系统发育关系

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-3164-08

## Structural characteristics and phylogenetic analysis of chloroplast genomes of four species of *Lonicera*

XIONG Yao<sup>1</sup>, TONG Ling-fei<sup>1</sup>, CAO Lan<sup>2</sup>, MU Ze-jing<sup>2</sup>, SHEN Cheng-ying<sup>1</sup>, DU Xiao-lang<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, Jiangxi Provincial People's Hospital, the First Affiliated Hospital of Nanchang College, Nanchang 330006, China; 2. Research Center of Chinese Herbal Medicine and Ethnic Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**Abstract:** *Lonicera* Linn. is the largest genus of family Caprifoliaceae, which has a long history and abundant resources in China. Due to its ornamental and medicinal properties, the species of *Lonicera* shows outstanding economic value. However, affected by the huge demand and high price stimulation, there is a serious mixing phenomenon on the market. In this study, high-throughput sequencing technology was used to analyze the analysis of *L. angustifolia* Wallich ex Candolle var. *myrtillos* (Hook. f. & Thomson) Q. E. Yang, *L. myrtillos* Hook. f. et Thoms. var. *cyclophylla* Rehd, *L. szechuanica* Batal and *L. tangutica* Maxim to sequence and assemble their chloroplast (CP) genomes, and to conduct structural comparisons and phylogenetic studies. The results showed that the chloroplast genomes of the four species showed a typical circular tetrad structure, with a total length of 154 608–163 413 bp and a total GC content of 37.93%–38.42%. A total of 128–129 genes were annotated, including 83–84 protein-coding genes, 8 rRNA genes, and 37 tRNA genes. A total of 53–68 SSRs and 133–745

收稿日期: 2024-03-31; 修回日期: 2024-08-16.

基金项目: 国家科技基础资源调查专项 (2018FY100703); 江西中医院大学校级科技创新团队发展计划 (CXTD22002).

\*通讯作者 E-mail: 20131059@jxutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0306

long repeats were detected by chloroplast repeat structure analysis. Phylogenetic studies showed that 21 species of *Lonicera* medicinal plants could be significantly clustered into one branch, among which the relatives of *L. angustifolia* and *L. szechuanica* were close, and the kinship of *L. myrtilus* and *L. tangutica* was close. This study is the first comprehensive study of the chloroplast genome and phylogenetic relationship of *Loicera* species, and the experimental results provide a scientific basis for revealing the genetic information, species evolution and genetic diversity of *Lonicera* species.

**Key words:** *Lonicera*; chloroplast genome; comparative analysis; phylogenetic relationship

忍冬属隶属于忍冬科,全球约200种,主要分布于北美洲、欧洲、亚洲和非洲北部的温带和亚热带地区,我国有98种,其中以西南各省种类居多。忍冬属植物在我国作为药用植物的应用历史悠久,资源丰富<sup>[1]</sup>。忍冬属植物具有良好的经济价值,不仅仅是因为其有效的药物特性、众多的保健功能,还由于其诱人的香味和漫长的花期被用来作为装饰和观赏植物。现代药理研究表明忍冬属药用植物具有抗炎<sup>[2-4]</sup>、抗菌<sup>[5]</sup>、抗病毒<sup>[6,7]</sup>、抗癌<sup>[8,9]</sup>、保肝<sup>[10]</sup>、抗氧化<sup>[11]</sup>、神经保护<sup>[12]</sup>和抗糖尿病<sup>[13]</sup>等作用。

忍冬 (*L. japonica* Thunb.) 的花蕾或初开的花被称为金银花,具有清热解毒的功效,广泛用于中成药中,例如连花清瘟胶囊和清开灵颗粒。同时,金银花作为中国卫生部批准的首批食药两用资源品种之一,被用来作为中草药茶的主要原料,如王老吉等。目前,中国药典(2020年版)中共收录5种忍冬属植物,其中忍冬为金银花的基原物种;灰毡毛忍冬 (*L. macranthoides* Hand.-Mazz.)、红腺忍冬 (*L. Hypoglauca* Miq.)、华南忍冬 (*L. confusa* DC.) 或黄褐毛忍冬 (*L. fulvoto-mentosa* Hsu et S. C. Cheng) 为山银花的基原物种<sup>[14]</sup>。由于忍冬属药用植物种类较多,容易出现同名异物的现象。而且,受金银花巨大需求和高价刺激的影响,市场上金银花基原植物存在严重的混用现象,这不利于金银花药材的质量安全、临床应用和金银花产业的健康发展。因此,为保证中医临床用药的准确、安全、有效,金银花的真伪鉴别和基原问题已成为亟待解决的问题。

叶绿体 (chloroplast) 作为质体 (plastid) 中的一种类型,是进行光合作用的重要细胞器,存在于植物、藻类和一些原生物中。其基因组大小多为150~200 kb,且结构高度保守<sup>[15,16]</sup>。叶绿体基因组可划分为4个边界区:一个大单拷贝 (large single-copy, LSC) 和一个小单拷贝 (small single-copy, SSC) 区域以及通过基因组中的连接位点 (junction sites, JS) 连成的2个相同的反向重复序列区 IR (inverted repeat, IRa 和 IRb)<sup>[17]</sup>。目前,除了传统的生药鉴定方法,以分子标记为代表的分子生物学鉴定方法已广泛应用于生药的真伪鉴别。Sun 等<sup>[18]</sup>通过 DNA 条形码对44个金银花及其近缘物

种进行检测,发现 *psbA-trnH* 更适于鉴定金银花。Gao 等<sup>[19]</sup>使用 DNA 条形码测试了47种含有金银花的中成药,结果表明,只有22%的中成药中的金银花是可信的。DNA 条形码是通过比较物种中的一段标准 DNA 片段,可不受环境、生长阶段和形态多样性的限制对物种进行快速、准确地识别和鉴定。然而,该方法对于近缘物种的鉴定还有一定的缺陷。随着测序技术的快速发展,忍冬科的大多物种已开展叶绿体基因组相关研究<sup>[20,21]</sup>,但忍冬属亲缘物种鉴定和系统发育关系的研究还不足。利用叶绿体基因组解决近缘种分类问题和阐明其系统发育关系对中草药的鉴定具有重要意义。本研究通过新一代测序技术对4种忍冬属植物(越橘叶忍冬、圆叶忍冬、四川忍冬和唐古特忍冬)进行叶绿体基因组的组装和拼接,获得其完整的叶绿体基因组,并进行了序列特征、重复序列、密码子偏好性、系统发育关系以及与近缘同属植物的叶绿体基因组的比较分析,以期对忍冬属叶绿体基因组遗传信息、遗传多样性分析及物种鉴定等研究提供参考。

## 材料与方法

**基因组 DNA 的提取和测序** 忍冬属4种植物材料均采自于中国西藏自治区,经江西中医药大学钟国跃研究员鉴定,凭证标本存放于江西中医药大学标本馆,样本信息见表1。取新鲜植物叶片,利用植物基因组 DNA 试剂盒 (DP 305-03, 天根生物技术北京有限公司) 提取基因组总 DNA。使用琼脂凝胶电泳检测 DNA 质量及浓度。检测合格的 DNA 于南京吉思汇源生物科技有限公司 Illumina Novaseq 6000 平台进行建库测序。

**叶绿体基因组的组装、注释及图谱绘制** 将测序获得的 raw reads 使用 FASTP v0.20.0 过滤掉低质量区获得 clean reads。叶绿体基因组采用 SPAdes v3.10.1 软件 (<http://cab.spbu.ru/software/Spades/>) 进行比对,将比对上的序列作为参考序列。使用 prodigal v2.6.3 (<https://www.github.com/hyatt/Prodigal>)<sup>[22]</sup> 注释叶绿体基因组的编码序列 (coding sequence, CDS) 区, hmmer v3.1b2 (<http://www.hmmer.org/>)<sup>[23]</sup> 软件预测

**Table 1** Sample collection information

Species	Location	Longitude	Latitude	Altitude/m	Specimen No.	Genbank No.
<i>L. angustifolia</i>	Jilong	85°16'7.5"	28°37'49.3"	3 722	JXZY317	OP388439
<i>L. myrtillos</i>	Nielamu	85°54'57.3"	28°9'42.8"	4 475	JXZY293	OP388440
<i>L. szechuanica</i>	Jilong	85°16'7.5"	28°37'49.3"	3 722	JXZY319	OP388441
<i>L. tangutica</i>	Changdu	96°46'35.7"	29°33'22.6"	4 187	JXZY042	OP388442

rRNA, aragorn v1.2.38 (<http://130.235.244.92/ARA-GORN/>)<sup>[24]</sup> 预测 tRNA。利用 blast v2.6 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)<sup>[25]</sup>对组装后的序列进行比对和注释,手动检查两个注释结果的差异基因,获得最佳的基因结构注释。用在线软件使用 OGDRAW (<https://chlorobox.mpimp-golm.mpg.de/OGDraw.html>)<sup>[26]</sup>绘制叶绿体基因组图谱。最后将获得的序列上传至 NCBI,获得 Genbank 登录号,登录号见表 1。

**基因组结构比较和系统发育分析** 利用软件 MISA v1.0 (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>)<sup>[27]</sup>分析叶绿体基因组 SSRs 位点, REPuter 软件分析长重复序列。用 Mauve (<http://darlinglab.org/Mauve>) 软件默认参数进行叶绿体基因组比对和共线性分析。使用在线工具 IRscope (<https://irscope.shinyapps.io/irapp/>) 完成 IR 区边界比较分析。通过 NCBI 数据库检索忍冬科的忍冬属物种 17 个和其他属物种 31 个,共 48 个叶绿体全基因组序列信息,将六道木属的南方六道木、六道木 (*Zabelia biflora*) 和细叶六道木 (*Zabelia triflora*) 作为外类群,使用 MAFFT v7.427 进行种间多序列比较,然后选择 GTRGAMMA 模型,使用 RAxML v8.2.10 (<https://cme.h-its.org/exelixis/software.html>)<sup>[28]</sup>软件进行快速 bootstrap 分析,参数 bootstrap=1 000。构建最大似然系统发育树,计算各分枝的支持率。

## 结果

### 1 叶绿体基因组基本特征

忍冬属 4 种植物的叶绿体基因组均为双链环状结构,其中包括一个 LSC、一个 SSC 和一对反向拷贝区 IRa 和 IRb,如图 1 所示。4 个叶绿体基因组的总长度为 154 608~163 413 bp, GC 含量 37.93%~38.42%; LSC 的长度为 88 542~89 628 bp, GC 含量 36.83%~36.95%; SSC 的长度为 12 759~18 937 bp, GC 含量 32.71%~33.52%; IR 的长度为 23 631~30 545 bp, GC

含量 40.31%~43.5%。越橘叶忍冬、圆叶忍冬和唐古特忍冬的叶绿体基因组中共有 128 个基因,其中包括 83 个编码蛋白、37 个 tRNA 和 8 个 rRNA; 四川忍冬中有 129 个基因,见表 2。

忍冬属 4 种植物的叶绿体基因具有高度相似性。4 种植物的基因分类情况见表 3,根据功能将其分为 3 大类:与光合作用有关的基因 (43 个)、与自我复制有关的基因 (60 个) 以及成熟酶基因 (*matK*) 等其他基因 (6 个)。在越橘叶忍冬、圆叶忍冬和唐古特忍冬中有 16 个功能基因为双拷贝基因,包括 *ndhB*、*rps12*、*rps7*、*rrn16*、*rrn23*、*rrn4.5*、*rrn5*、*trnA-UGC*、*trnI-CAU*、*trnI-GAU*、*trnL-CAA*、*trnN-GUU*、*trnR-ACG*、*trnV-GAC*、*yef15* 和 *yef2*。而在四川忍冬中 *yef1* 也是双拷贝基因。

### 2 重复序列

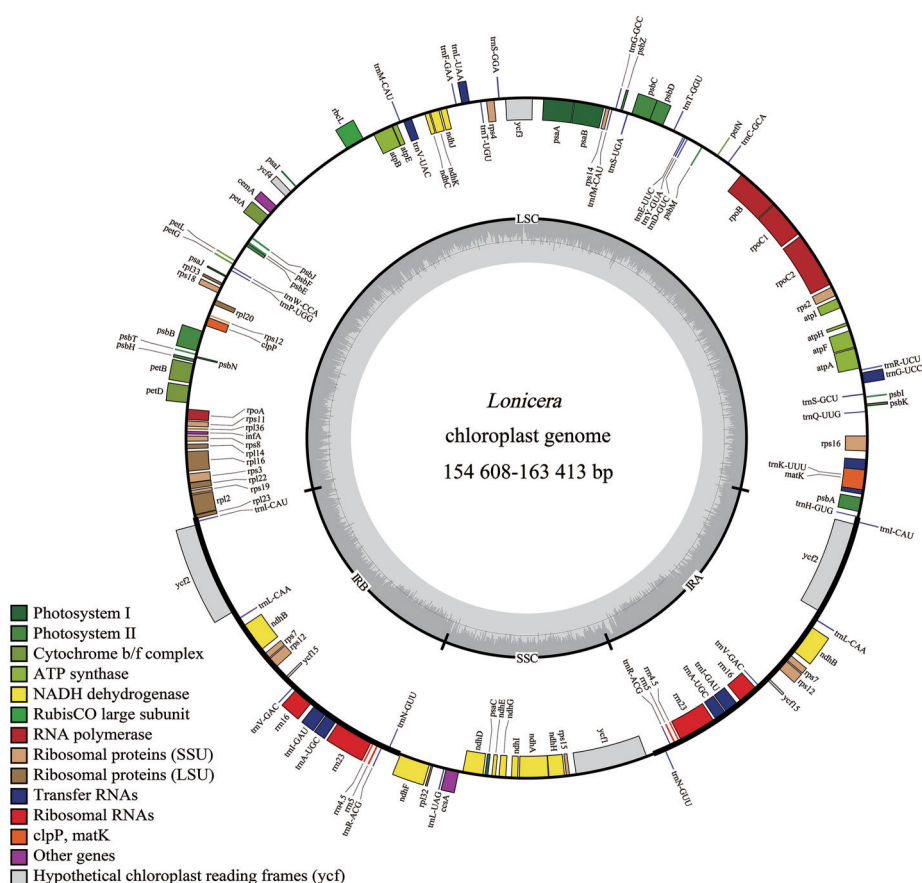
在越橘叶忍冬、圆叶忍冬、四川忍冬和唐古特忍冬中分别发现了 53、54、68 和 58 个 SSRs,分布于 4 个区域,如图 2 所示。约 50%~70% 的 SSRs 分布于大单拷贝区中,其中圆叶忍冬中大单拷贝区的重复序列最多,占 68.5%; 四川忍冬中大单拷贝区的重复序列最少,为 54.4%。长重复序列为长度大于 30 bp 的重复序列,按照方向可分为正向重复 (forward repeats)、反向重复 (reverse repeats)、回文重复 (palindromic repeats)、互补重复 (complement repeats)。在越橘叶忍冬、圆叶忍冬、四川忍冬和唐古特忍冬中分别发现了 205、133、745 和 279 条长重复序列,其中大多为正向重复和反向重复,仅在圆叶忍冬中发现 2 条回文重复、四川忍冬中发现了 12 条回文重复和 7 条互补重复,在唐古特忍冬中发现了 1 条回文重复。

### 3 密码子使用偏性分析

密码子是生物体内遗传信息传递不可缺少的物质,在编码氨基酸过程中,多种密码子可以编码同一种氨基酸,即为同义密码子。在不同生物体内,甚至同一种生物不同的蛋白质基因对密码子的使用频率不尽相

**Table 2** Characterization of four CP genomes of *Lonicera* in Caprifoliaceae

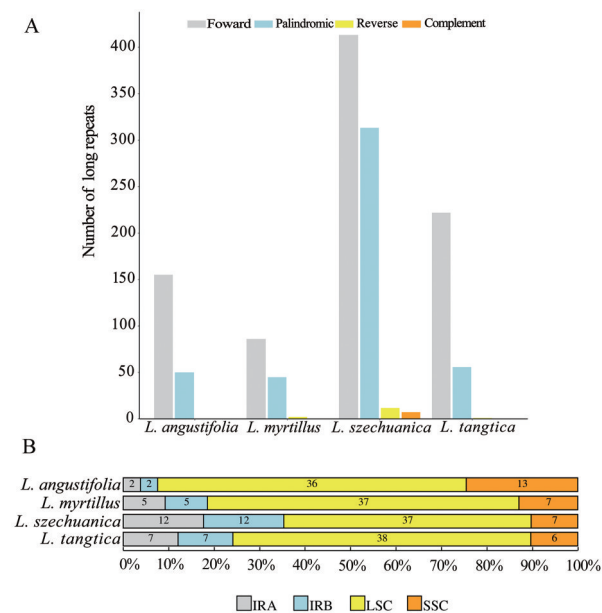
Species	Size/bp	PCG	tRNA	rRNA	Gene	GC/%	Length/bp		
							LSC	SSC	IR
<i>L. angustifolia</i>	155 899	83	37	8	128	38.42	89 628	18 937	23 667
<i>L. myrtillos</i>	154 608	83	37	8	128	38.39	88 542	18 804	23 631
<i>L. szechuanica</i>	163 413	84	37	8	129	37.93	89 564	12 759	30 545
<i>L. tangutica</i>	155 709	83	37	8	128	38.34	88 963	18 816	23 965



**Figure 1** The CP genome map of *Lonicera*. Genes are color coded by their function in the legend. Genes inside or outside the circle are transcribed in a clockwise or counter clockwise direction, respectively. The grey region of the inner circle indicates the GC content of the CP genome. LSC: Large single-copy; SSC: Small single-copy; IRA: Inverted repeat a; IRB: Inverted repeat b

**Table 3** List of genes found in four CP genomes of *Lonicera*. ×2: Copy number

Category	Group	Gene
Photosynthetic	Subunits of photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>
	Subunits of photosystem II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>
	Subunits of NADH dehydrogenase	<i>ndhA, ndhB (×2), ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
	Subunits of cytochrome b/f complex	<i>petA, petB, petD, petG, petL, petN</i>
	Subunits of ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI</i>
	Large subunit of RubisCO	<i>rbcL</i>
Self-replication	Large subunit of ribosomal	<i>rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36</i>
	Small subunit of ribosomal	<i>rps11, rps12 (×2), rps14, rps15, rps16, rps18, rps19, rps2, rps3, rps4, rps7 (×2), rps8</i>
	Subunits of RNA polymerase	<i>rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2</i>
	Ribosomal RNAs	<i>rrn16 (×2), rrn23 (×2), rrn4.5 (×2), rrn5 (×2)</i>
	Transfer RNAs	<i>trnA-UGC (×2), trnC-GCA, trnD-GUC, trnE-UUC, trnF-GAA, trnG-GCC, trnG-UCC, trnH-GUG, trnI-CAU (×2), trnI-GAU (×2), trnK-UUU, trnL-CAA (×2), trnL-UAA, trnL-UAG, trnM-CAU, trnN-GUU (×2), trnP-UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG (×2), trnR-UCU, trnS-GCU, trnS-GGA, trnS-UGA, trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-GAC (×2), trnV-UAC, trnW-CCA, trnY-GUA, trnJm-CAU</i>
Other	Translational initiation factor	<i>infA</i>
	Protease	<i>clpP</i>
	Maturase	<i>matK</i>
	Envelope membrane protein	<i>cemA</i>
	c-Type cytochrome synthesis gene	<i>ccsA</i>
	Hypothetical chloroplast reading frames	<i>ycf1, ycf15 (×2), ycf2 (×2), ycf3, ycf4</i>



**Figure 2** The number of long repeats (A) and SSRs (B) in CP genome of *Lonicera*

同,具有一定的偏性,即为同义密码子使用的偏性<sup>[29]</sup>。相对密码子使用度 (relative synonym codon usage, RSCU) 是指对于某一特定的密码子在编码对应氨基酸的同义密码子间的相对频率,当某一密码子的RSCU值大于1时,代表该密码子为使用较多的密码子<sup>[30]</sup>。在RSCU结果中,编码Arg蛋白质的密码子(AGA)使用频率最高,其中越橘叶忍冬、圆叶忍冬、四

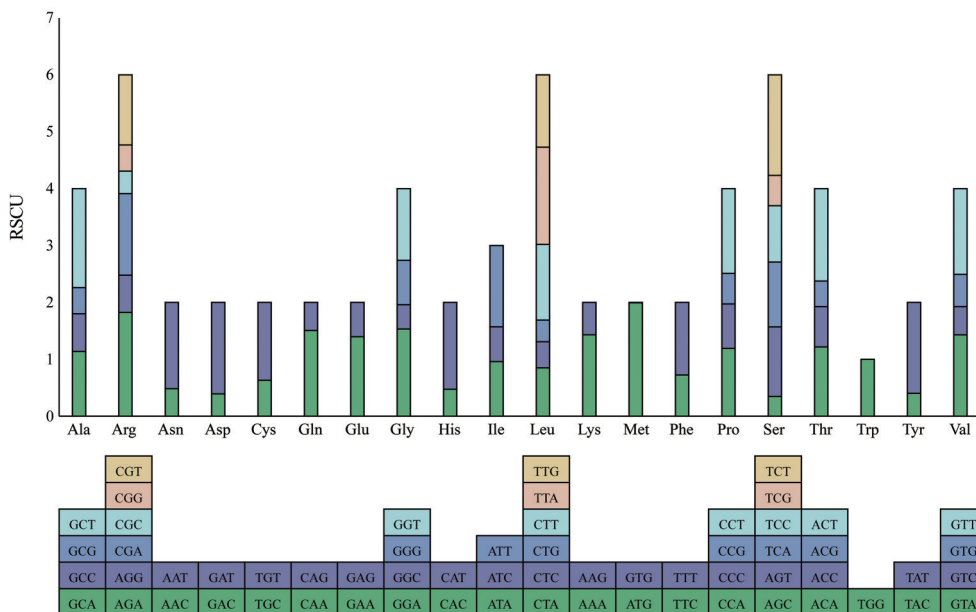
川忍冬和唐古特忍冬的RSCU值分别为1.82、1.83、1.89和1.84; 编码Leu蛋白质的密码子(CUG)使用频率最低,其中越橘叶忍冬、圆叶忍冬、四川忍冬和唐古特忍冬的RSCU值分别为0.38、0.37、0.38和0.38,见图3。在4种忍冬属植物中,各密码子的RSCU值不尽相同。

#### 4 IR区边界比较

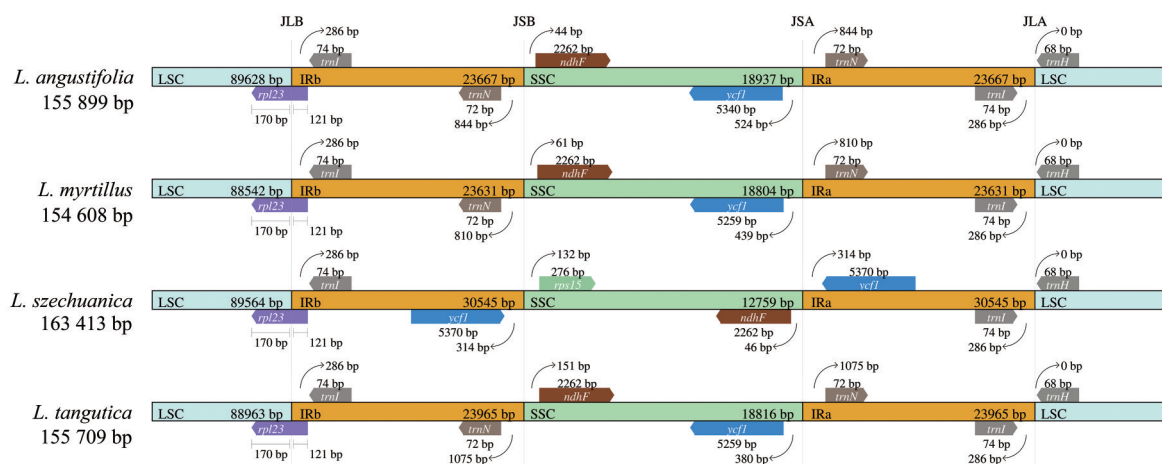
IR区域的收缩和扩张是导致叶绿体的大小发生变化的主要原因<sup>[31,32]</sup>。在叶绿体基因组中,IR区与LSC和SSC区存在4个边界,即LSC-IRb、IRb-SSC、SSC-IRa、IRa-LSC,见图4。本研究中的忍冬属植物的叶绿体基因组4个边界区相对保守。越橘叶忍冬、圆叶忍冬和唐古特忍冬都有一个 $yefl$ 基因,且距离SSC-IRa边界区分别524、439和380 bp。而四川忍冬相较于其他种多了1个 $rps15$ 基因和 $yefl$ 基因,且该 $yefl$ 基因位于IRb-SSC边界区。越橘叶忍冬、圆叶忍冬和唐古特忍冬的 $ndhF$ 基因位于IRb-SSC边界区,长度均为2 262 bp,距离边界区分别为44、61和151 bp; 而四川忍冬的 $ndhF$ 基因位于SSC-IRa。

#### 5 系统发育分析

根据本研究中组装的4种忍冬属植物叶绿体基因组和GenBank中下载的48个忍冬科植物的叶绿体基因组,将*Z. dielsii*、*Z. biflora*和*Z. triflora*设为外类群,通过RAxML软件对52个叶绿体基因组进行ML tree构建,结果如图5所示。结果显示越橘叶忍冬、圆叶忍



**Figure 3** The columnar stacking diagram of each amino acid display the codon usage within the CP genome of *Lonicera*. Colors in the column graph reflect codons in the same colors shown below the figure. RSCU: Relative synonymous codon usage; Ala: Alanine; Arg: Arginine; Asn: Asparagine; Asp: Aspartic acid; Cys: Cysteine; Gln: Glutamine; Glu: Glutamic acid; Gly: Glycine; His: Histidine; Ile: Isoleucine; Leu: Leucine; Lys: Lysine; Met: Methionine; Phe: Phenylalanine; Pro: Proline; Ser: Serine; Thr: Threonine; Trp: Tryptophan; Tyr: Tyrosine; Val: Valine



**Figure 4** Boundary comparison of IR and SC region of CP genomes in four species. Gene names and their lengths are displayed in boxes and above the boxes. JLB: LSC-IRb; JSB: IRb-SSC; JSA: SSC-IRa; JLA: IRa-LSC

冬、四川忍冬和唐古特忍冬可以和其他忍冬属植物明显聚为一支,支持率为100%。其中越橘叶忍冬和四川忍冬可以聚为一分支,圆叶忍冬和唐古特忍冬聚为一分支,支持率均为100%。

## 讨论

近年来,随着新一代测序技术的发展,叶绿体基因组研究获得了广泛关注,越来越多的物种叶绿体基因组被组装并公布。目前,忍冬属的叶绿体基因组也在相继研究中<sup>[20,21]</sup>,但越橘叶忍冬、圆叶忍冬、四川忍冬和唐古特忍冬的叶绿体基因组研究还仍为空白。本研究基于新一代测序技术和生物信息学分析方法,首次对这四种忍冬属植物的叶绿体基因组进行测序、组装和拼接,并对其基因组序列和结构进行了较为全面的分析。结果表明其基本结构均为环状四分体结构,均具有4个边界,且基因组大小差异较小,具有较高的保守性。

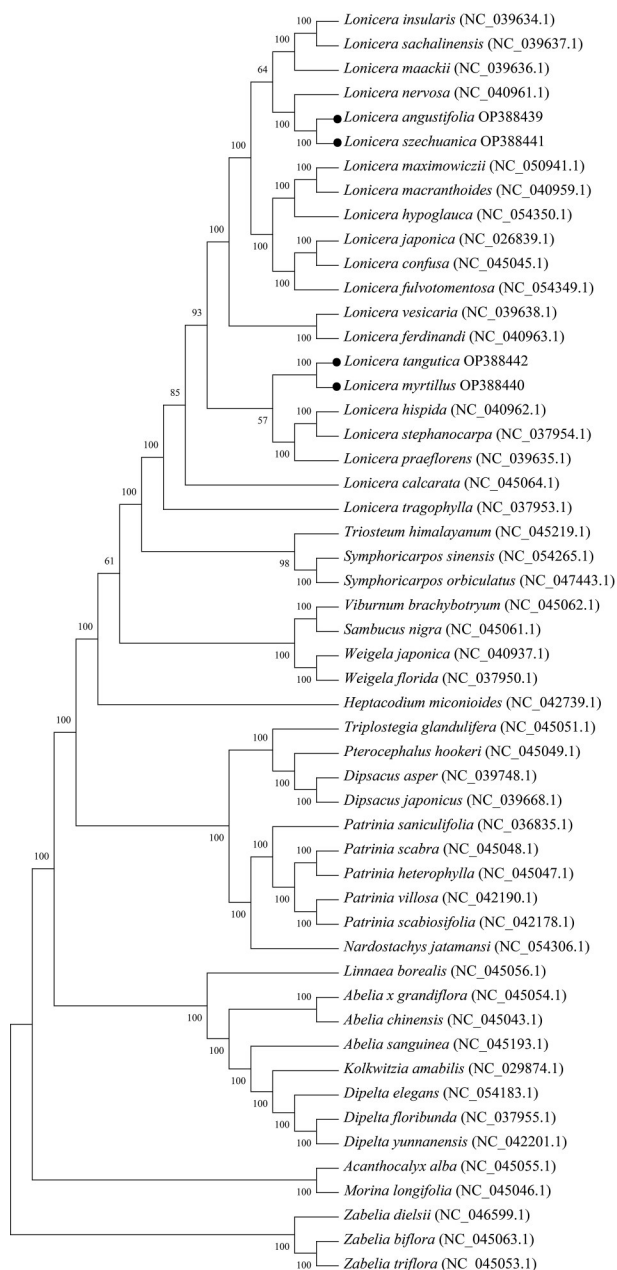
金银花是众多中成药的重要组成部分,由于其经济价值高,导致市场出现较多混伪品的现象。目前,研究者们为了保护和合理开发金银花野生资源,对其进行了分子生物学鉴定<sup>[18,19]</sup>、化学成分<sup>[33-35]</sup>和药理作用等方面的研究。Sun等<sup>[18]</sup>通过对金银花及其近缘物种的某一段DNA序列进行比较,根据物种的种内与种间距离和变异位点等方面来鉴定物种与物种间的不同。相较于DNA条形码研究,叶绿体基因组研究用于物种鉴别是基于包括上述条形码在内的、更加完整的基因组数据。对于近缘物种而言,通过DNA条形码可能会由于变异位点少等原因难以准确鉴定,而叶绿体基因组研究的结果会更加全面和准确。

SSRs分子标记由于其数量丰富、多态性高、信息

含量高且不受外界环境影响等因素已被广泛用于药用植物的群体遗传学研究<sup>[36]</sup>。本研究通过对四种忍冬属叶绿体基因组的分析,共检测到SSRs位点53~68个,重复最多的是单核苷酸重复(mono-),占55.2%~66.0%,主要分布于LSC区;其次为tetra-,占16.2%~24.1%。在四个叶绿体基因组中检测到散在重复序列133~745条,其中四川忍冬的数量最多。此外,本研究在分析中发现SSRs位点的高频CDS区,分别为*rps12*、*ycf1*、*rpoC1*和*ycf2*,其中*rps12*基因的SSRs位点数量最多,在越橘叶忍冬、圆叶忍冬、四川忍冬和唐古特忍冬中数量依次为10、12、17和19个,研究结果表明*rps12*基因在忍冬属中的高变异性,其可以作为潜在的种属特异性的分子标记。这些SSRs和长重复序列可以为今后开发忍冬科植物SSRs标记以及群体遗传学研究提供候选分子标记。

叶绿体基因组的IR区域被认为是最保守的区域,但其边界区的收缩与扩张是叶绿体基因组进化中的共有现象,也是叶绿体基因组长度变异的主因<sup>[37]</sup>。同时,本研究根据52种忍冬科叶绿体基因组重建了ML系统发育树,结果表明21种忍冬属植物可以明显聚为一支,其中越橘叶忍冬和四川忍冬亲缘关系更近,圆叶忍冬和唐古特忍冬亲缘关系更近。在中国药典(2005年版)之前,山银花的四个基原物种均被认为是金银花的替代品,此后,被归类为山银花的基原物种。本研究结果表明山银花基原物种与金银花基原物种亲缘关系近,可明显聚为一支,其中华南忍冬最近,黄褐毛忍冬次之。因此,由于金银花和山银花亲缘关系相近,在中药市场流通中更加要加以区分,避免出现中药材的滥用、误用现象。

本研究通过新一代测序技术获得四种忍冬属植物



**Figure 5** Phylogenetic relationship of 52 taxa using maximum likelihood (ML) based on concatenated sequences of 83 genes in Caprifoliaceae. Bootstrap support value shown at each node

叶绿体基因组, 并对其叶绿体基因组结构特征、重复序列、密码子偏好性、系统发育关系等进行比较分析, 丰富了忍冬科基因数据库, 为忍冬科的系统分类和进化研究提供有利证据。同时, 为金银花品种鉴定提供了有利的遗传数据和实验基础。

**作者贡献:** 熊瑶负责进行实验、数据分析和撰写论文; 曹岚和慕泽泾负责实验样品的采集鉴定、整体设计把关和论文框架的构建; 童凌斐和沈成英协助进行实验, 负责实验的设计、课题的指导; 杜小浪是本文的通讯作者, 全程指导实验设

计和稿件修改, 并最终定稿。

**利益冲突:** 作者声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Chinese Flora Commission. Flora of China: vol 73 (中国植物志: 第73卷) [M]. Beijing: Science Press, 1988: 143.
- [2] Kwon SH, Ma SX, Hong SI, et al. *Lonicera japonica* Thunb. extract inhibits lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses by suppressing NF- $\kappa$ B signaling in BV-2 microglial cells [J]. J Med Food, 2015, 187: 762-775.
- [3] Park KI, Kim GS, An SJ, et al. Regulation of proinflammatory mediators via NF- $\kappa$ B and p38 MAPK-dependent mechanisms in RAW 264.7 macrophages by polyphenol components isolated from Korea *Lonicera japonica* Thunb. [J]. Evid Based Complement Altern Med, 2012, 2012: 828521.
- [4] Xiao Y, Li B. A new constituent against rheumatoid arthritis from the flower buds of *Lonicera japonica* [J]. Phytochem Lett, 2019, 29: 160-164.
- [5] Kim SJ, Yoon SJ, Kim YM, et al. HS-23, *Lonicera japonica* extract, attenuates septic injury by suppressing toll-like receptor 4 signaling [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155: 256-266.
- [6] Wu C, Liu Y, Yang Y, et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 766-788.
- [7] Ma SC, Bi PX, Huang RC, et al. Determination of the antiviral caffeoyl quinic acids isolated from *Lonicera japonica* Thunb. [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2005, 25: 751-755.
- [8] Park KI, Park H, Nagappan A, et al. Polyphenolic compounds from Korean *Lonicera japonica* Thunb. induces apoptosis via AKT and caspase cascade activation in A549 cells [J]. Oncol Lett, 2017, 13: 2521-2530.
- [9] Ge W, Li HB, Fang H, et al. A new dimeric secoiridoids derivative, japonicaside E, from the flower buds of *Lonicera japonica* [J]. Nat Prod Res, 2019, 33: 53-58.
- [10] Tzeng TF, Tzeng YC, Cheng YJ, et al. The ethanol extract from *Lonicera japonica* Thunb. regresses nonalcoholic steatohepatitis in a methionine- and choline-deficient diet-fed animal model [J]. Nutrients, 2015, 7: 8670-8684.
- [11] Auzanneau N, Weber P, Kosinska-Cagnazzo A, et al. Bioactive compounds and antioxidant capacity of *Lonicera caerulea* berries: comparison of seven cultivars over three harvesting years [J]. J Food Compos Anal, 2018, 66: 81-89.
- [12] Kwon SH, Hong SI, Kim JA, et al. The neuroprotective effects of *Lonicera japonica* Thunb. against hydrogen peroxide-induced apoptosis via phosphorylation of MAPKs and PI3K/Akt in SH-SY5Y cells [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49: 1011-1019.
- [13] Han JM, Kim MH, Choi YY, et al. Effects of *Lonicera japonica* Thunb. on type 2 diabetes via PPAR- $\gamma$  activation in rats [J]. Phytother Res, 2015, 29: 1616-1621.

- [14] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic China (中华人民共和国药典) [S]. Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 221.
- [15] Wicke S, Schneeweiss GM, dePamphilis CW, et al. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 76: 273-297.
- [16] Raubeson LA, Jansen RK. Chloroplast Genomes of Plants [M]. London: CAB International, 2005: 45-68.
- [17] Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression [J]. *EMBO J*, 1986, 5: 2043-2049.
- [18] Sun ZY, Gao T, Yao H, et al. Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method [J]. *Planta Med*, 2010, 77: 301-306.
- [19] Gao ZT, Liu Y, Wang XY, et al. Derivative technology of DNA barcoding (nucleotide signature and SNP double peak methods) detects adulterants and substitution in Chinese patent medicines [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 5858.
- [20] He L, Qian J, Li XW, et al. Complete chloroplast genome of medicinal plant *Lonicera japonica*: genome rearrangement, intron gain and loss, and implications for phylogenetic studies [J]. *Molecules*, 2017, 22: 249.
- [21] Liu ML, Bing W, Ning F, et al. Evolutionary analysis of plastid genomes of seven *Lonicera* L. species: implications for sequence divergence and phylogenetic relationships [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 4039.
- [22] Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 119.
- [23] Mistry J, Finn RD, Eddy SR, et al. Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: e121.
- [24] Laslett D, Canback B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 11-16.
- [25] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool [J]. *J Mol Biol*, 1990, 215: 403-410.
- [26] Greiner S, Lehwark P, Bock R. OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47: W59-W64.
- [27] Li P, Zhang S, Li F, et al. A Phylogenetic analysis of chloroplast genomes elucidates the relationships of the six economically important *Brassica* species comprising the triangle of U [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 111.
- [28] Stamatakis A. RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30: 1312-1313.
- [29] Sharp PM, Li WH. Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for 'rare' codons [J]. *Nucleic Acids Res*, 1986, 19: 7737-7749.
- [30] Kumar N, Bera BC, Greenbaum BD, et al. Revelation of influencing factors in overall codon usage bias of equine influenza viruses [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0154376.
- [31] Lee HL, Jansen RK, Chumley TW, et al. Gene relocations within chloroplast genomes of *Jasminum* and *Menodora* (Oleaceae) are due to multiple, overlapping inversions [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1161-1180.
- [32] Zhang HY, Li C, Miao HM, et al. Insights from the complete chloroplast genome into the evolution of *Sesamum indicum* L. [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e80508.
- [33] Son KH, Park JO, Chung KC, et al. Flavonoids from the aerial parts of *Lonicera japonica* [J]. *Arch Pharm Res*, 1992, 15: 365-370.
- [34] Shang X, Pan H, Li M, et al. *Lonicera japonica* Thunb.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138: 1-21.
- [35] Song WX, Yang YC, Shi JG, et al. Two new  $\beta$ -hydroxy amino acid-coupled secoiridoids from the flower buds of *Lonicera japonica*: isolation, structure elucidation, semisynthesis, and biological activities [J]. *Chin Chem Lett*, 2014, 25: 1215-1219.
- [36] Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean [J]. *Genetics*, 1992, 132: 1131-1139.
- [37] Zhao K, Li L, Quan H, et al. Comparative analyses of chloroplast genomes from 14 *Zanthoxylum* species: identification of variable DNA markers and phylogenetic relationships within the genus [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 11: 605793.