

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw202308001

彭毅丹, 马楠, 叶奕含, 等, 2024. 秦巴山区三种人参属药用植物叶绿体基因组特征分析 [J]. 广西植物, 44(6): 1138–1150.

PENG YD, MA N, YE YH, et al., 2024. Analysis of chloroplast genome characteristics of three medicinal plants of *Panax* in Qinba Mountains [J]. *Guihaia*, 44(6): 1138–1150.



秦巴山区三种人参属药用植物叶绿体基因组特征分析

彭毅丹^{1,2}, 马楠^{1,2}, 叶奕含^{1,2}, 刘亦欣¹, 谭启怡¹, 陈莹^{1,2}, 张雨曲^{1,2}, 杨新杰^{1,2*}

(1. 陕西中医药大学药学院, 西安 712046; 2. 陕西省秦岭中草药应用开发工程技术研究中心, “秦药”研发重点实验室, 西安 712046)

摘要: 为明确珠子参、羽叶三七和秀丽假人参 3 种药用植物叶绿体基因组特征与系统发育关系, 该文以秦巴山区 3 种人参属药用植物为研究对象, 运用生物信息学技术, 分析其叶绿体基因组特征及密码子使用偏好性, 并探讨三者之间的亲缘关系。结果表明: (1) 3 种人参属药用植物的叶绿体基因组为典型的四分体结构, 序列全长为 156 071~156 104 bp, 总 GC 含量为 38.10%, 基因组大小相似度较高。(2) 均注释到 133 个基因, 包括 88 个蛋白编码基因、37 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。(3) 3 种人参属药用植物叶绿体密码子使用偏好性相似, 密码子第 3 位碱基以 A/U 结尾为主, 密码子使用模式在受到突变影响的同时, 主要受到自然选择的影响。(4) 系统发育结果显示, 3 种人参属药用植物的亲缘关系较近, 并且秀丽假人参同羽叶三七亲缘关系更近。综上认为, 秀丽假人参与珠子参基源植物之间存在近缘关系, 这项发现对于珠子参中药材的资源开发利用和分子鉴定, 以及进一步研究人参属物种的分类、系统发育和进化机制提供了重要依据。

关键词: 珠子参, 羽叶三七, 秀丽假人参, 叶绿体基因组, 结构特征, 密码子偏好性

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2024)06-1138-13

Analysis of chloroplast genome characteristics of three medicinal plants of *Panax* in Qinba Mountains

PENG Yidan^{1,2}, MA Nan^{1,2}, YE Yihan^{1,2}, LIU Yixin¹, TAN Qiyi¹,
CHEN Ying^{1,2}, ZHANG Yuqu^{1,2}, YANG Xinjie^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China; 2. Shaanxi Qinling Application Development and Engineering Center of Chinese Herbal Medicine, Key Laboratory for Research of “Qin Medicine” of Shaanxi Administration of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

Abstract: In order to clarify the phylogenetic relationship between the chloroplast genome characteristics of three medicinal plants, *Panax japonicus* var. *major*, *P. japonicus* var. *bipinnatifidus*, *P. pseudoginseng* var. *elegantior* in Qinba

收稿日期: 2023-12-29 接受日期: 2024-02-06

基金项目: 陕西省科技厅项目(2021SF-360); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-032); 陕西省优秀中医药人才研修项目(陕中医药函[2022]102号)。

第一作者: 彭毅丹(2000—), 硕士研究生, 主要从事中药资源学研究, (E-mail) p117816@163.com。

*通信作者: 杨新杰, 博士, 副教授, 主要从事中药质量控制、中药资源学研究, (E-mail) xxx211xxx@126.com。

Mountains, we analysed the chloroplast genome characteristics and codon usage preferences by using bioinformatics techniques. The results were as follows: (1) The chloroplast genomes of three species of *Panax* were typical tetrad structure, the genome full size was between 156 071 to 156 104 bp, and the total GC-content was 38.10% with a high degree of genome size similarity. (2) A total of 133 coding genes were annotated, including 88 protein coding genes (PCGs), 37 tRNA genes, and 8 rRNA genes with a high degree of genome size similarity. (3) The chloroplast codon usage preferences of the three medicinal plants were comparable, with the third base of codon predominantly ending in A/U. Despite being affected by mutations, the codon usage patterns of the three medicinal plants were found to be mainly influenced by natural selection. (4) The phylogenetic results showed that the three *Panax* species were closely related, and *P. pseudoginseng* var. *elegantior* was more closely related to *P. japonicus* var. *bipinnatifidus*. In conclusion, this study presents a significant relationship between *P. pseudoginseng* var. *elegantior* and the original pharmacopeial plants of *P. japonicus* var. *major*. This finding has great importance for the development, utilization, and molecular identification of traditional Chinese medicinal material resources from *P. japonicus* var. *major*, and provides an important basis for further studies on the classification, phylogeny and evolutionary mechanisms of *Panax* species.

Key words: *Panax japonicus* var. *major*, *P. japonicus* var. *bipinnatifidus*, *P. pseudoginseng* var. *elegantior*, chloroplast genome, structural characteristics, codon preference

人参属 (*Panax*) 为五加科 (Araliaceae) 植物分支之一, 本属约有 8 种, 分布于亚洲东部、喜马拉雅山脉地区、中南半岛、北美洲, 我国有 7 种 (1 种为引进栽培) (中国科学院中国植物志编委会, 2013)。人参属植物均可入药, 大多是我国传统的名贵中药材。在秦巴山区, 主要分布着 3 种人参属植物, 分别为珠子参 (*P. japonicus* var. *major*)、羽叶三七 (*P. japonicus* var. *bipinnatifidus*) 和秀丽假人参 (*P. pseudoginseng* var. *elegantior*) (中国科学院中国植物志编委会, 1978)。这 3 种人参属药用植物的根状茎外形特征极为相似, 均为串珠状, 同时三者均可作为珠子参商品出售。珠子参和羽叶三七被 2020 版《中华人民共和国药典》收录为中药材“珠子参”的基源植物进行药用, 由于秀丽假人参在形态学和分布上与珠子参、羽叶三七具有相似性, 在当地对这 3 种药用植物常出现混淆以及误用的情况。因此, 亟需开展一定的研究工作来说明秀丽假人参能否作为珠子参的替代品或扩大来源。随着人参属叶绿体基因组数量的增加, 同属其他物种的叶绿体基因组越来越容易组装, 为这 3 种人参属药用植物叶绿体基因组的组装提供了条件。

叶绿体是植物细胞中普遍存在的一种质体, 也是植物进行光合作用的场所。叶绿体作为绿色植物所特有的细胞器, 本身拥有着有一套比较完整的遗传体系, 即叶绿体基因组 (cpDNA), 能够独立指导叶绿体在植物体内进行复制等工作 (Camiolo et al., 2015)。植物物种之间的叶绿体基因组变

异现象, 在研究植物群体遗传关系和物种鉴定方面均起着重要作用。近年来, 测序技术的不断更新和生物信息学工具的快速发展对叶绿体基因组的研究起到了重要的推动作用。刘潮等 (2022) 提出, 叶绿体基因组研究可为人参属物种鉴定、起源、进化、遗传多样性分析和资源保护与利用提供基础。

当前, 关于药用植物珠子参的叶绿体基因组已有研究 (孙嘉苓, 2021), 但对于秦巴山区 3 种人参属药用植物的叶绿体基因组特征比对和系统进化关系等尚不明确。本研究通过高通量测序技术 (Wang et al., 2018), 对秦巴山区 3 种人参属药用植物进行分析, 探讨珠子参、羽叶三七和秀丽假人参的叶绿体基因组特征、密码子偏好性以及亲缘关系, 以期为人参属中药材资源的合理开发利用和 3 种药用植物的分子鉴别工作提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

珠子参、羽叶三七和秀丽假人参 3 种药用植物的新鲜健康叶片均采自陕西省宝鸡市眉县红河谷 (107° 47' 29.3928" E、34° 0' 54.2844" N, 海拔 2 276.65 m)。叶片经纯水清洗擦干后, 用锡纸包裹且进行液氮速冻, 之后于 -80 °C 冰箱中保存。凭证标本存放在陕西中医药大学, 凭证标本编号为 202020203、202020204、202020205。

1.2 基因组 DNA 提取和测序

采用植物 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取总 DNA,使用琼脂糖凝胶电泳和 Qubit3.0 检测 DNA 的质量。对检测合格的总 DNA 使用 NovSeq6000 Illumina 高通量测序平台进行序列测定。通过 CLC Genomics Workbench 22.0 软件过滤原始数据(raw data),得到待组装序列(clean data)。

1.3 叶绿体基因组组装和注释

以近缘物种竹节参(GenBank ID: KP036469.1)的叶绿体基因组序列作为参考,使用 Get Organelle(v1.6.4)软件对获得的 Clean data 进行组装,采用 CPGAVAS2 注释叶绿体基因组。注释完成后,通过 BankIt 向 NCBI 提交 3 组序列,使用在线细胞器基因组绘图软件 Chloroplot(<https://irscope.shinyapps.io/Chloroplot/>)绘制 3 种人参属药用植物叶绿体基因组物理图谱。

1.4 重复序列分析

利用 MISA 在线软件(<https://webblast.ipkgatersleben.de/misa/>)对 3 组数据进行 SSR 位点分析,设置单核苷酸至六核苷酸的最少重复性数目分别为 10、5、4、3、3、3,两个 SSR 之间的距离 ≥ 100 bp。

1.5 叶绿体基因组的比较分析

使用 mVISTA 在线工具(<https://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>)比较人参属 6 个物种的叶绿体基因组序列,输入文件为原始 fasta 格式的核苷酸序列文件和注释文件。

1.6 密码子偏好性和最优密码子的分析

在序列长度 ≥ 300 bp 且剔除重复基因的基础上,筛选珠子参、羽叶三七和秀丽假人参各自的编码蛋白,3 种药用植物分别获得 53 条满足条件的 CDS 序列。使用 Codon W 软件(<https://sourceforge.net/projects/codonw/>)和 CUSP 在线软件(<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cusp>)分析上述序列,得到密码子不同位置及总 GC 含量,同义密码子第 3 位 GC 含量(GC_{3s})、有效密码子数(effective number of condons, ENC)及相对同义密码子使用度(relative synonymous codon usage, RSCU)。同时,以 ENC 数值为基准,高表达基因的 ENC 值较低,低表达基因的 ENC 值较高,将人参属 3 种药用植物的密码子按照由大到小的顺序进行排列,从高低两端各取 10% 的基因分别建立高、低表

达基因库,并计算两个基因库每个密码子的差值 $\Delta RSCU$,将同时符合高频即 $RSCU > 1$ 与高表达即 $\Delta RSCU \geq 0.08$ 的密码子作为最优密码子(Yu et al., 2023)。

1.7 密码子偏好性的影响因素分析

1.7.1 中性绘图 以 GC_3 值为 X 轴、 GC_{12} 值(GC_1 与 GC_2 平均值)为 Y 轴作图。图中回归曲线系数趋近 1 时,密码子偏好性主要受到碱基突变压力的影响,反之主要受到自然选择的影响(毛立彦等, 2022)。

1.7.2 ENC 分析 使用 R 语言绘制以 GC_{3s} 含量为 X 轴、ENC 实测值为 Y 轴的二维散点图,同时添加表征 ENC 期望值发展趋势的标准曲线。其中, ENC 期望值 $= 2 + GC_{3s} + 29/[GC_{3s}^2 + (1 - GC_{3s})^2]$, ENC 比值 $= (ENC \text{ 期望值} - ENC \text{ 实测值}) / ENC \text{ 期望值}$ (Zhang et al., 2022), ENC 比值代表基因和标准曲线之间的距离,值越小表示该基因受自然选择的影响也越小。

1.7.3 PR2-plot 分析 统计密码子第 3 位上各碱基含量,以 $A_3/(A_3 + T_3)$ 值为纵坐标、 $G_3/(G_3 + C_3)$ 值为横坐标绘制散点图。若各编码基因在 4 个区域内均匀分布,则第 3 位嘌呤(A、G)和嘧啶(C、T)的使用频率相等,密码子偏好性主要受突变影响(王飞等, 2022)。

1.8 系统发育分析

从 NCBI 下载 16 个五加科植物的叶绿体全基因组序列,与上述组装所得的珠子参(GenBank ID: OL543604.1)、羽叶三七(GenBank ID: OL543605.1)和秀丽假人参(GenBank ID: OL543606.1)共计 19 个物种,使用 MEGA 11 软件进行多重序列比对。基于邻接法(neighbor-joining method, NJ)和双参数模型(two-parameter model)构建系统发育树。通过 Bootstrap 法检验各分支的支持率,重复 1 000 次。

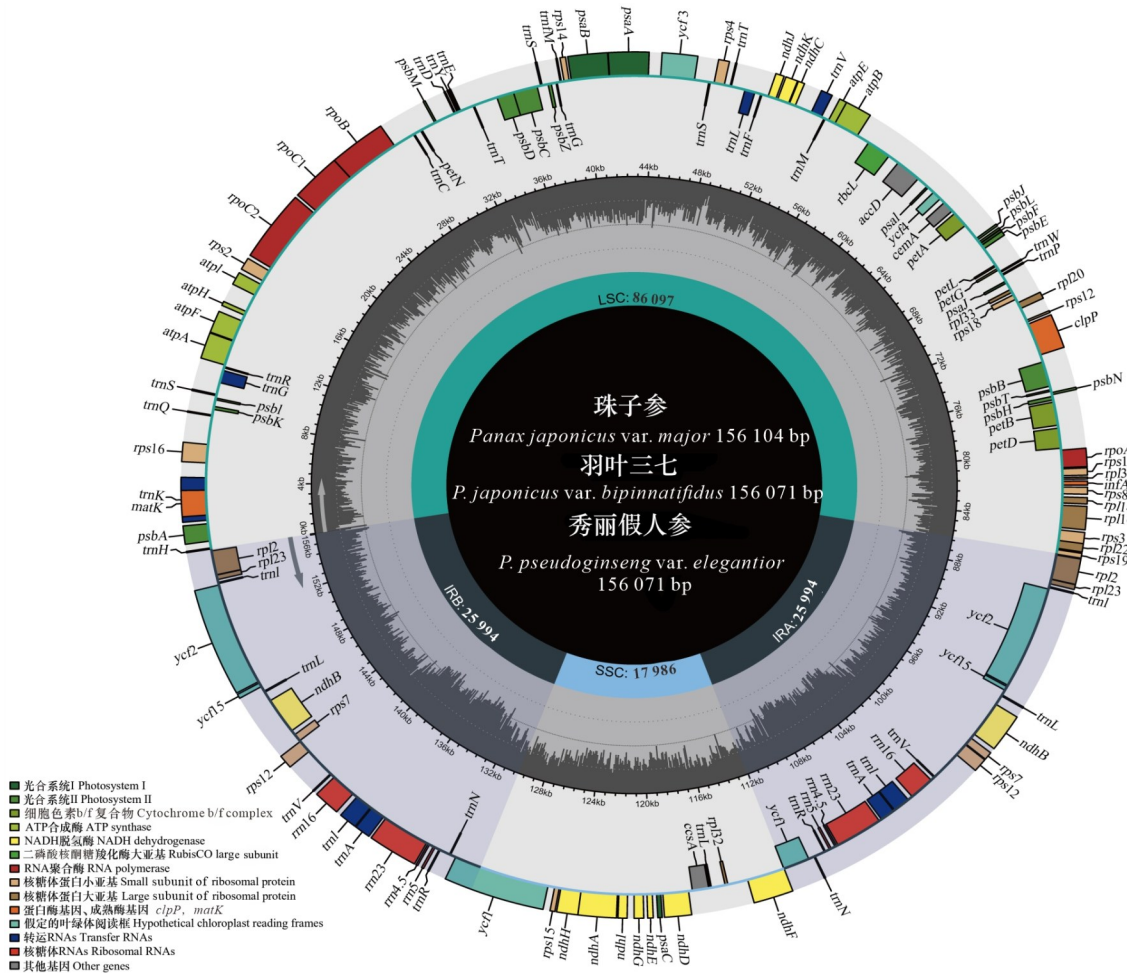
2 结果与分析

2.1 秦巴山区 3 种人参属药用植物的叶绿体基因组结构与特征

珠子参、羽叶三七和秀丽假人参的叶绿体基因组均为双链环状分子,典型的四分体结构。叶绿体基因组大小为 156 071 ~ 156 104 bp,包括一对反向重复区(25 989 ~ 25 994 bp, inverted

repeats, IRs)、一个大单拷贝区(86 097~86 114 bp, large single-copy, LSC)和一个小单拷贝区(17 986~18 012 bp, small single-copy, SSC)(图1)。基因组的 GC 含量是判断物种亲缘关系

的重要指标,3 种人参属药用植物叶绿体基因组的 GC 含量均为 38.10%, IRs 区、LSC 区和 SSC 区的 GC 含量相同(表1)。可见,三者的叶绿体基因组大小虽存在一定差异,但差异不明显。



基因的颜色差异表示不同的功能；叶绿体 GC 含量分布为内圈的灰色区域。

The color differences of genes indicate different functions; the chloroplast GC content is the gray area of the inner sphere.

图 1 人参属 3 种药用植物的叶绿体基因组图谱

Fig. 1 Chloroplast genome map of three medicinal plants of *Panax*

叶绿体基因组注释结果(表2)表明,3 种药用植物的基因编码总数均为 133 个,包含 88 个蛋白质编码基因(CDS)、37 个 tRNA 基因和 8 个 rRNA 基因。其中,7 个 tRNA 基因(*trnL-CAA*、*trnV-GAC*、*trnI-GAU*、*trnA-UGC*、*trnR-ACG*、*trnN-GUU*、*trnI-CAU*)和 4 个 rRNA 基因(*rrn23S*、*rrn4.5S*、*rrn16S*、*rrn5S*)以及 8 个 CDS 基因(*rpl2*、*rpl23*、*rps12*、*rps7*、*ndhB*、*yef1*、*yef15*、*yef2*)在 IRs 区出现 1 次重复。此外,*trnK-UUU*、*trnG-UCC*、*trnL-UAA*、*trnV-UAC*、*trnI-GAU*、

trnA-UGC、*trnI-GAU*、*rpl16*、*rpl2*、*rps16*、*rpoC1*、*atpF*、*ndhA*、*ndhB*、*petB*、*petD* 基因各含有 1 个内含子,*rps12*、*yef3*、*clpP* 基因各含有 2 个内含子。

2.2 简单重复序列(SSR)分析

在珠子参、羽叶三七和秀丽假人参叶绿体基因组中各检测到 40 个、38 个和 38 个 SSR(图2)。三者的单核苷酸重复基元分别是 22 个、17 个和 17 个;四核苷酸重复基元数目居中,均为 8 个;二核苷酸重复基元分别是 4 个、8 个和 8 个;三核苷

表 1 3 种人参属药用植物叶绿体基因组特征分析
Table 1 Characteristics analysis of the chloroplast genomes from the three medicinal plants of *Panax*

指标 Index	珠子参 <i>P. japonicus</i> var. <i>major</i>	羽叶三七 <i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	秀丽假人参 <i>P. pseudo-ginseng</i> var. <i>elegantior</i>
基因组大小 Genome size (bp)	156 104	156 071	156 071
大单拷贝区长度 Length of LSC (bp)	86 114	86 097	86 097
小单拷贝区长度 Length of SSC (bp)	18 012	17 986	17 986
反向重复区长度 Length of IRs (bp)	25 989	25 994	25 994
GC 含量 GC Content (%)	38.10	38.10	38.10
总基因数量 Total number of genes	133	133	133
tRNAs/rRNAs 数量 Number of tRNAs/rRNAs	37/8	37/8	37/8
编码蛋白基因数量 Number of protein-coding genes	88	88	88
大单拷贝区 GC 含量 GC content of LSC (%)	36.30	36.30	36.30
小单拷贝区 GC 含量 GC content of SSC (%)	32.20	32.20	32.20
反向重复区 GC 含量 GC content of IRs (%)	43.00	43.00	43.00

酸和五核苷酸重复基元均为 3 个、2 个和 2 个;在珠子参中六核苷酸重复基元未检测到,但在羽叶三七和秀丽假人参中分别检测到 1 个。在 3 种药用植物中检测到的 SSR 大部分以 A/T、AT/AT、AAT/ATT、AAAT/ATTT、AATT/AATT、AAAAT/ATTTT 为重复单元,各自的占比分别为 62.50%、76.32%、76.32%,表明 3 种药用植物中的叶绿体 SSR 偏好使用 A/T 碱基。另发现仅珠子参中含有 C/G 类型和 AAAAT/ATTTT 类型的 SSR 位点,与其他两个物种明显不同。

2.3 叶绿体基因组的比较分析

以珠子参叶绿体基因组为参考序列得到全序列比对结果(图 3)。由图 3 可知,人参属 6 个物种具有高度的相似性,分化程度较低,其中非编码区的序列差异明显大于编码区,IR 区相比于 SC 区更保守,说明人参属内的保守性、稳定性较高。6 个物种存在较大序列差异的区域为 *trnH-GUG-trnR-UCU*、*rpoC1-trnT-GGU*、*ndhF-trnL-UAG*、*rps12*、

rpl22 和 *ycf1*。同时与珠子参相比,秀丽假人参羽叶三七的序列相似度更高。

2.4 密码子偏好性分析

2.4.1 3 种人参属药用植物密码子基本特征 3 种人参属药用植物密码子不同位置的 GC 含量存在差异,均呈现出 $GC_1 > GC_2 > GC_3$ 的趋势(表 3), GC_3 含量分别为 30.59%、29.77% 和 29.77%,表明密码子第 3 位偏好于 A 或者 U 结尾。有效密码子数(ENC)的取值范围为 20~61,该值越接近 20,说明密码子偏性越强。3 种药用植物的 ENC 值分别为 49.30、47.89 和 49.23,均明显 > 45 ,表明三者的叶绿体密码子使用偏好性较弱。

2.4.2 最优密码子的确认 3 种人参属药用植物共有 59 个同义密码子(表 4),其中 $RSCU > 1$ 的高频密码子分别为 29 个、28 个和 28 个,并且大多以 A/U 结尾。3 种药用植物中 $\Delta RSCU \geq 0.08$ 的高表达优越密码子数分别为 23、23 和 24(表 5)。基于以上数据得到 3 种药用植物的最优密码子,并做交集处理,得到 3 种人参属药用植物共有 13 个最优密码子:GAA、GUA、UGU、AAA、AUU、CAA、CCU、UUA、GUU、UCU、ACU、GCU、CGU,其中 5 个以 A 结尾,其余均以 U 结尾。

2.5 密码子偏好性的影响因素分析

2.5.1 中性绘图分析 3 种人参属药用植物的基因大范围地分布在对角线的上方(图 4),以 GC_{12} 和 GC_3 拟合的回归曲线斜率为 $0.0111 \sim 0.0379$, $R^2 > 0$,表明 3 种人参属药用植物的叶绿体基因组密码子第 1、第 2 位碱基突变模式不同于第 3 位,密码子使用偏好性受到自然选择的影响要远大于碱基突变。

2.5.2 ENC 绘图分析 3 种人参属药用植物的叶绿体基因组所包含的各个基因分布范围趋于标准曲线的下方,仅有少数在标准曲线上(图 5),表明自然选择是影响 3 种药用植物密码子偏好性的主要因素。

2.5.3 PR2-plot 绘图分析 3 种人参属药用植物叶绿体基因的分布并不均匀,基因多集中出现在右下方区域(图 6)。3 种药用植物在使用碱基的频率方面, $G > C$, $T > A$,密码子第 3 位的嘧啶使用频率高于嘌呤,反映出 3 种药用植物的密码子偏好性同时受到突变和选择压力的影响。

2.6 系统发育分析

为了明确秦巴山区 3 种人参属植物之间的亲缘关系,选取 19 种五加科植物的叶绿体基因组序

表 2 3 种人参属药用植物的叶绿体基因组基因类型
Table 2 Chloroplast genome gene types of three medicinal plants of *Panax*

基因类别 Gene category	基因类群 Gene group	基因名称 Gene name	数量 Number
自我复制基因 Self replication genes	核糖体 RNAs Ribosomal RNAs	<i>rrn16S, rrn23S, rrn4.5S, rrn16S, rrn5S, rrn5S, rrn4.5S, rrn23S</i>	8
	转运 RNAs Transfer RNAs	<i>trnH-GUG, trnK-UUU*, trnQ-UUG, trnS-GCU, trnG-UCC*, trnR-UCU, trnC-GCA, trnD-GUC, trnY-GUA, trnE-UUC, trnT-GGU, trnS-UGA, trnG-GCC, trnM-CAU, trnS-GGA, trnT-UGU, trnL-UAA*, trnF-GAA, trnV-UAC*, trnM-CAU, trnW-CCA, trnP-UGG, trnI-CAU, trnL-CAA, trnV-GAC, trnI-GAU*, trnA-UGC*, trnR-ACG, trnN-GUU, trnL-UAG, trnN-GUU, trnR-ACG, trnA-UGC*, trnI-GAU*, trnV-GAC, trnL-CAA, trnI-CAU</i>	37
	核糖体蛋白大亚基 Large subunit of ribosomal protein	<i>rpl14, rpl16*, rpl2*, rpl2*, rpl20, rpl22, rpl23, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36</i>	11
	核糖体蛋白小亚基 Small subunit of ribosomal protein	<i>rps11, rps12**, rps12**, rps14, rps15, rps16*, rps18, rps19, rps2, rps3, rps4, rps7, rps7, rps8</i>	14
	RNA 聚合酶 RNA polymerase	<i>rpoA, rpoB, rpoC1*, rpoC2</i>	4
光合作用基因 Photosynthesis genes	ATP 合成酶 ATP synthase	<i>atpA, atpB, atpE, atpF*, atpH, atpI</i>	6
	光合系统 II Photosystem II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>	15
	NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase	<i>ndhA*, ndhB*, ndhB*, ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>	12
	细胞色素 b/f 复合物 Cytochrome b/f complex	<i>petA, petB*, petD*, petG, petL, petN</i>	6
	光合系统 I Photosystem I	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ, ycf3**, ycf4</i>	7
	二磷酸核酮糖羧化酶大亚基 RubisCO large subunit	<i>rbcL</i>	1
其他基因 Other genes	乙酰辅酶 A 羧化酶亚基 Acetyl-CoA carboxylase subunit	<i>accD</i>	1
	C 型细胞色素合成 C-type cytochrome synthesis	<i>ccsA</i>	1
	包膜蛋白基因 Envelop membrane protein	<i>cemA</i>	1
	蛋白酶基因 Protease gene	<i>clpP**</i>	1
	翻译起始因子 Translation initiation factor	<i>infA</i>	1
	成熟酶基因 Maturase gene	<i>matK</i>	1
未知功能基因 Genes of unknown function	假定叶绿体阅读框 Hypothetical chloroplast reading frames	<i>ycf1, ycf1, ycf15, ycf15, ycf2, ycf2</i>	6

注: * 表示一个内含子; ** 表示两个内含子。

Note: * indicates one intron; ** indicates two introns.

缘关系,选取 19 种五加科植物的叶绿体基因组序列进行系统发育关系分析,结果如图 7(节点上的数字表示各分支的支持率,支持率为 100%的不显示)所示,人参属、刺通草属、常春藤属、南鹅掌柴

属、通脱木属的植物聚为一大类,五加属植物被聚为另一大类,常春藤属的尼泊尔常春藤(*Hedera nepalensis*)被单独归为一类。其中,人参属与其他属之间呈现出较为明确的发育关系;同时观察秀

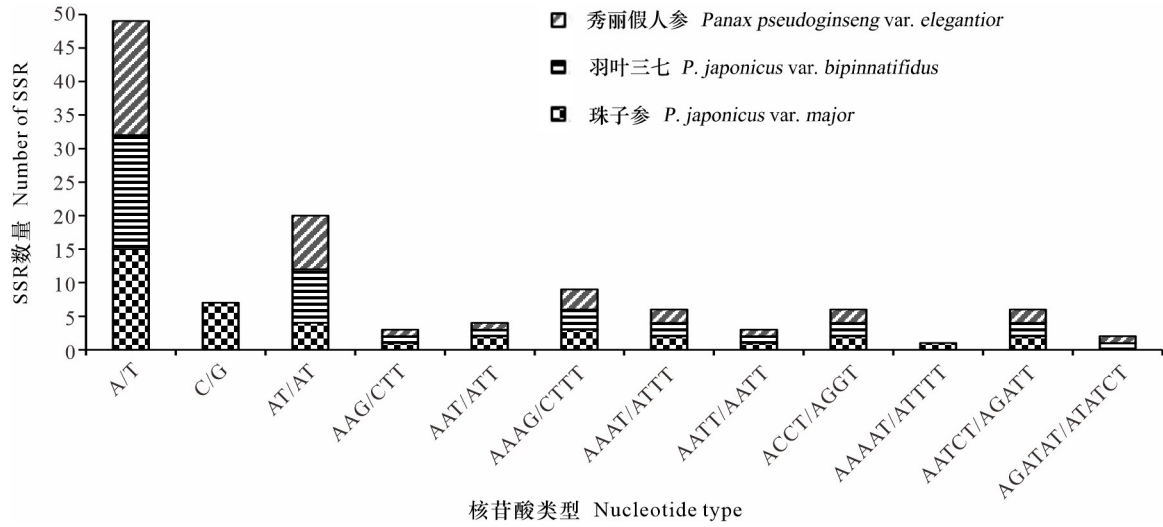
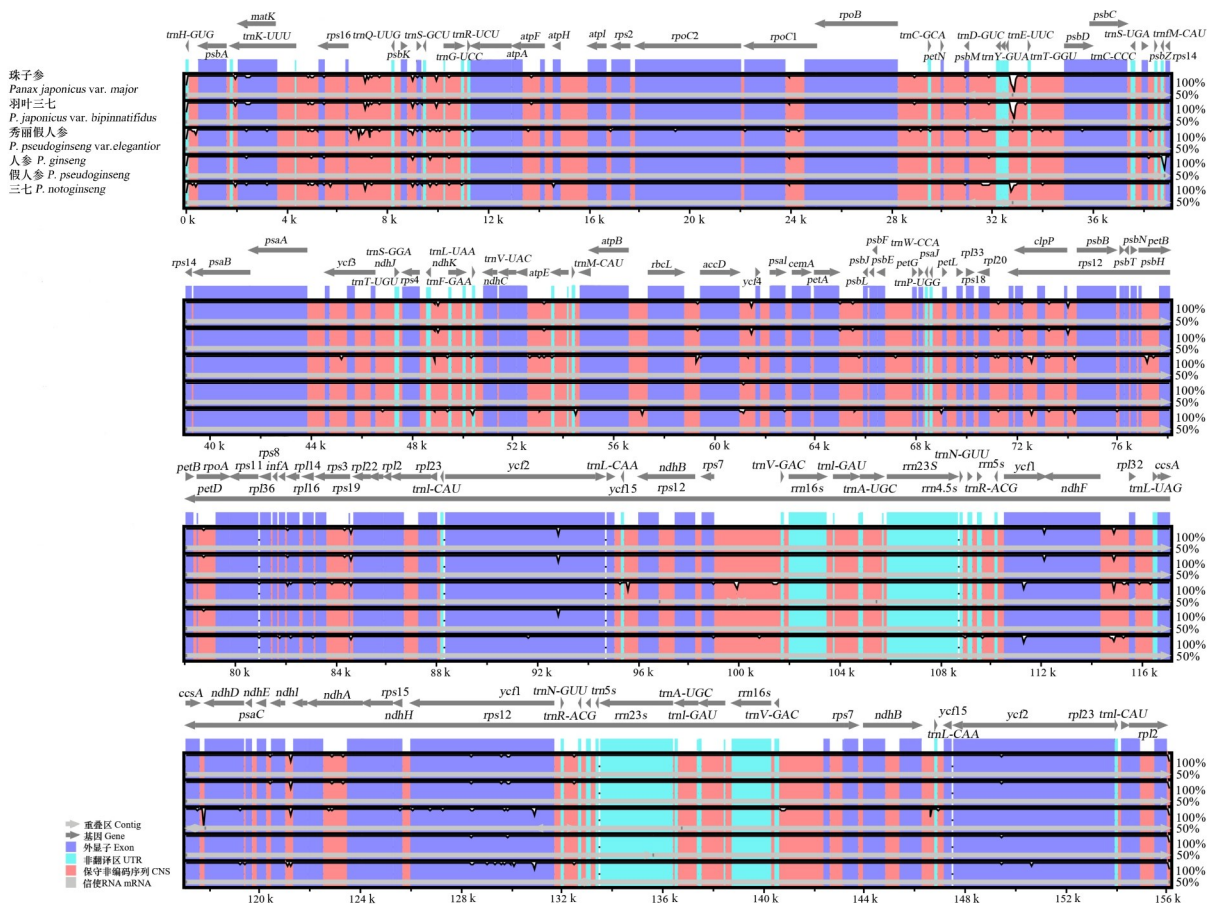


图 2 3 种人参属药用植物的核苷酸类型
Fig. 2 Nucleotide types of three medicinal plants of *Panax*



灰色箭头表示基因方向；纵轴表示相似性百分比（50%~100%）。
Grey arrows indicate gene orientation; vertical axis indicates percentage of similarity (50%–100%).

图 3 人参属叶绿体基因组的比较分析
Fig. 3 Comparative analysis of chloroplast genomes of *Panax*

表 3 3 种人参属药用植物的叶绿体密码子基本特征

Table 3 Basic characteristics of chloroplast codons in three medicinal plants of *Panax*

物种名 Species name	GC ₁ 含量 GC ₁ content (%)	GC ₂ 含量 GC ₂ content (%)	GC ₃ 含量 GC ₃ content (%)	GC _{all} 含量 GC _{all} content (%)	有效密码子数 ENC
珠子参 <i>P. japonicus</i> var. <i>major</i>	45.71	39.12	30.59	38.47	49.30
羽叶三七 <i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	47.27	39.63	29.77	38.89	47.89
秀丽假人参 <i>P. pseudoginseng</i> var. <i>elegantior</i>	47.27	39.63	29.77	38.89	49.23

表 4 3 种人参属药用植物各氨基酸的 RSCU 值

Table 4 RSCU values of amino acids in three medicinal plants of *Panax*

珠子参 <i>P. japonicus</i> var. <i>major</i>			羽叶三七 <i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>			秀丽假人参 <i>P. pseudoginseng</i> var. <i>elegantior</i>		
氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	RSCU 值 RSCU value	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	RSCU 值 RSCU value	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	RSCU 值 RSCU value
苯丙氨酸 Phe	UUU	<u>1.31</u>	苯丙氨酸 Phe	UUU	<u>1.31</u>	苯丙氨酸 Phe	UUU	<u>1.31</u>
	UUC	0.69		UUC	0.69		UUC	0.69
亮氨酸 Leu	UUA	<u>1.82</u>	亮氨酸 Leu	UUA	<u>1.92</u>	亮氨酸 Leu	UUA	<u>1.81</u>
	UUG	<u>1.27</u>		UUG	<u>1.24</u>		UUG	<u>1.27</u>
	CUU	<u>1.23</u>		CUU	<u>1.25</u>		CUU	<u>1.21</u>
	CUC	0.45		CUC	0.39		CUC	0.46
	CUA	0.84		CUA	0.81		CUA	0.84
	CUG	0.40		CUG	0.39		CUG	0.42
异亮氨酸 Ile	AUU	<u>1.40</u>	异亮氨酸 Ile	AUU	<u>1.43</u>	异亮氨酸 Ile	AUU	<u>1.39</u>
	AUC	0.64		AUC	0.62		AUC	0.65
	AUA	0.96		AUA	0.94		AUA	0.96
缬氨酸 Val	GUU	<u>1.46</u>	缬氨酸 Val	GUU	<u>1.48</u>	缬氨酸 Val	GUU	<u>1.43</u>
	GUC	0.52		GUC	0.49		GUC	0.54
	GUA	<u>1.41</u>		GUA	<u>1.45</u>		GUA	<u>1.42</u>
	GUG	0.61		GUG	0.59		GUG	0.61
丝氨酸 Ser	UCU	<u>1.65</u>	丝氨酸 Ser	UCU	<u>1.71</u>	丝氨酸 Ser	UCU	<u>1.64</u>
	UCC	0.95		UCC	0.96		UCC	0.95
	UCG	0.63		UCG	0.59		UCG	0.64
脯氨酸 Pro	CCU	<u>1.46</u>	脯氨酸 Pro	CCU	<u>1.53</u>	脯氨酸 Pro	CCU	<u>1.48</u>
	CCC	0.75		CCC	0.77		CCC	0.75
	CCA	<u>1.16</u>		CCA	<u>1.08</u>		CCA	<u>1.13</u>
	CCG	0.63		CCG	0.63		CCG	0.64
苏氨酸 Thr	ACU	<u>1.52</u>	苏氨酸 Thr	ACU	<u>1.59</u>	苏氨酸 Thr	ACU	<u>1.52</u>
	ACC	0.76		ACC	0.75		ACC	0.77
	ACA	<u>1.24</u>		ACA	<u>1.2</u>		ACA	<u>1.22</u>
	ACG	0.49		ACG	0.46		ACG	0.49
丙氨酸 Ala	GCU	<u>1.75</u>	丙氨酸 Ala	GCU	<u>1.77</u>	丙氨酸 Ala	GCU	<u>1.75</u>
	GCC	0.65		GCC	0.63		GCC	0.63
	GCA	<u>1.14</u>		GCA	<u>1.16</u>		GCA	<u>1.15</u>
	GCG	0.46		GCG	0.44		GCG	0.47

续表 4

珠子参 <i>P. japonicus</i> var. <i>major</i>			羽叶三七 <i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>			秀丽假人参 <i>P. pseudoginseng</i> var. <i>elegantior</i>		
氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	RSCU 值 RSCU value	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	RSCU 值 RSCU value	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	RSCU 值 RSCU value
酪氨酸 Tyr	UAU	<u>1.55</u>	酪氨酸 Tyr	UAU	<u>1.59</u>	酪氨酸 Tyr	UAU	<u>1.53</u>
	UAC	0.45		UAC	0.41		UAC	0.47
组氨酸 His	CAU	<u>1.54</u>	组氨酸 His	CAU	<u>1.54</u>	组氨酸 His	CAU	<u>1.54</u>
	CAC	0.46		CAC	0.46		CAC	0.46
谷氨酰胺 Gln	CAA	<u>1.48</u>	谷氨酰胺 Gln	CAA	<u>1.50</u>	谷氨酰胺 Gln	CAA	<u>1.48</u>
	CAG	0.52		CAG	0.50		CAG	0.52
天冬酰胺 Asn	AAU	<u>1.48</u>	天冬酰胺 Asn	AAU	<u>1.52</u>	天冬酰胺 Asn	AAU	<u>1.47</u>
	AAC	0.52		AAC	0.48		AAC	0.53
赖氨酸 Lys	AAA	<u>1.44</u>	赖氨酸 Lys	AAA	<u>1.48</u>	赖氨酸 Lys	AAA	<u>1.42</u>
	AAG	0.56		AAG	0.52		AAG	0.58
天冬氨酸 Asp	GAU	<u>1.56</u>	天冬氨酸 Asp	GAU	<u>1.58</u>	天冬氨酸 Asp	GAU	<u>1.55</u>
	GAC	0.44		GAC	0.42		GAC	0.45
谷氨酸 Glu	GAA	<u>1.51</u>	谷氨酸 Glu	GAA	<u>1.53</u>	谷氨酸 Glu	GAA	<u>1.51</u>
	GAG	0.49		GAG	0.47		GAG	0.49
半胱氨酸 Cys	UGU	<u>1.40</u>	半胱氨酸 Cys	UGU	<u>1.45</u>	半胱氨酸 Cys	UGU	<u>1.38</u>
	UGC	0.60		UGC	0.55		UGC	0.62
终止密码子 TER	UGA	<u>1.01</u>	终止密码子 TER	UGA	0.80	终止密码子 TER	UGA	0.85
精氨酸 Arg	CGU	<u>1.17</u>	精氨酸 Arg	CGU	<u>1.30</u>	精氨酸 Arg	CGU	<u>1.18</u>
	CGC	0.33		CGC	0.35		CGC	0.34
	CGA	<u>1.27</u>		CGA	<u>1.38</u>		CGA	<u>1.26</u>
	CGG	0.51		CGG	0.47		CGG	0.45
丝氨酸 Ser	AGU	<u>1.21</u>	丝氨酸 Ser	AGU	<u>1.24</u>	丝氨酸 Ser	AGU	<u>1.22</u>
	AGC	0.40		AGC	0.35		AGC	0.39
精氨酸 Arg	AGA	<u>1.94</u>	精氨酸 Arg	AGA	<u>1.81</u>	精氨酸 Arg	AGA	<u>1.95</u>
	AGG	0.78		AGG	0.68		AGG	0.82
甘氨酸 Gly	GGU	<u>1.30</u>	甘氨酸 Gly	GGU	<u>1.34</u>	甘氨酸 Gly	GGU	<u>1.29</u>
	GGC	0.44		GGC	0.45		GGC	0.45
	GGA	<u>1.50</u>		GGA	<u>1.51</u>		GGA	<u>1.51</u>
	GGG	0.76		GGG	0.71		GGG	0.75

注：下划线表示偏好密码子。

Note: Underline indicates preferred codons.

丽假人参与珠子参、羽叶三七的相对位置可以得到,秀丽假人参与羽叶三七亲缘关系最近,其次是珠子参、人参。

3 讨论与结论

本研究对秦巴山区 3 种人参属药用植物叶绿体基因组进行了测序和全序列比对分析。珠子

参、羽叶三七和秀丽假人参叶绿体基因组序列全长 156 071 ~ 156 104 bp,大小差异呈现为 SSC 区 (26 bp) > LSC 区 (17 bp) > IRs 区 (5 bp),其中 SSC 区的差异最大,与岳杰 (2021) 的研究结果一致。3 种药用植物叶绿体基因组总 GC 含量均为 38.10%,同时 IR 区与 SC 区相比 GC 含量最高且较稳定,结构高度保守,与大多数被子植物相似 (Zhang et al., 2012)。物种之间亲缘关系越近,表

表 5 3 种人参属药用植物叶绿体基因组最优密码子的确定

Table 5 Determination of optimal codons in the chloroplast genome of three medicinal plants of *Panax*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	珠子参 <i>P. japonicus</i> var. <i>major</i>	羽叶三七 <i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	秀丽假人参 <i>P. pseudoginseng</i> var. <i>elegantior</i>	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	珠子参 <i>P. japonicus</i> var. <i>major</i>	羽叶三七 <i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i>	秀丽假人参 <i>P. pseudoginseng</i> var. <i>elegantior</i>
苯丙氨酸 Phe	UUU	—	*	—	酪氨酸 Tyr	UAU	*	—	*
	UUC	**	—	—		UAC	—	—	—
亮氨酸 Leu	UUA	**	***	***	组氨酸 His	CAU	—	—	—
	UUG	—	—	—		CAC	—	—	—
	CUU	*	—	*	谷氨酰胺 Gln	CAA	**	**	**
	CUC	—	—	—		CAG	—	—	—
	CUA	*	*	*		天冬酰胺 Asn	AAU	—	—
CUG	—	—	—	AAC	*		—	*	
甲硫氨酸 Met	AUG	—	—	—	赖氨酸 Lys	AAA	**	**	**
异亮氨酸 Ile	AUU	**	*	**		AAG	—	—	—
	AUC	—	—	—	天冬氨酸 Asp	GAU	*	—	*
	AUA	—	—	—		GAC	—	*	—
缬氨酸 Val	GUU	**	***	***	谷氨酸 Glu	GAA	*	*	*
	GUC	—	—	—		GAG	—	—	—
	GUA	*	***	*	丙氨酸 Ala	GCU	***	**	***
	GUG	—	—	—		GCC	—	—	—
丝氨酸 Ser	UCU	***	**	***	GCA	*	—	*	
	UCC	*	—	—	GCG	—	—	—	
	UCG	—	—	—	精氨酸 Arg	CGU	**	***	***
脯氨酸 Pro	CCU	***	**	**		CGC	—	—	—
	CCC	—	*	—		CGA	—	**	**
	CCA	—	—	—	CGG	—	—	—	
苏氨酸 Thr	CCG	—	—	—	丝氨酸 Ser	AGU	—	**	*
	ACU	***	***	***		AGC	—	—	—
	ACC	—	*	—	精氨酸 Arg	AGA	—	—	—
	ACA	—	—	—		AGG	—	**	—
半胱氨酸 Cys	ACG	—	—	—	甘氨酸 Gly	GGU	—	***	***
	UGU	**	***	*		GGC	—	—	*
终止密码子 TER	UGC	—	—	—		GGA	—	—	—
	UGA	—	—	—	GGG	—	—	—	
	UAA	***	***	**	色氨酸 Trp	UGG	*	—	—

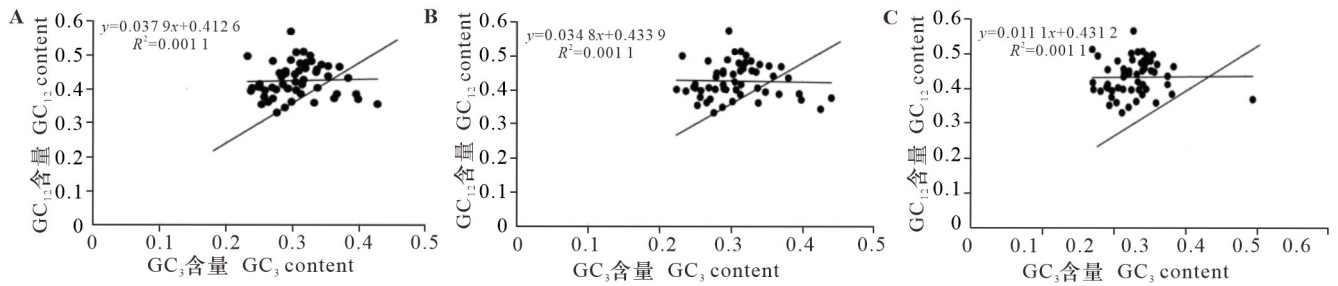
注: * 表示 $0.08 \leq \Delta RSCU < 0.3$; ** 表示 $0.3 \leq \Delta RSCU < 0.8$; *** 表示 $\Delta RSCU \geq 0.8$ 。

Note: * indicates $0.08 \leq \Delta RSCU < 0.3$; ** indicates $0.3 \leq \Delta RSCU < 0.8$; *** indicates $\Delta RSCU \geq 0.8$.

明密码子使用偏好性越类似 (Sahoo et al., 2019)。3 种人参属药用植物叶绿体基因组的密码子偏好以 A/U 结尾且主要受到自然选择的影响, 这与其他人参属物种密码子偏好性一致 (石岩硕和赵永星, 2022)。这表明生活在相似环境中的同属物种在进化过程中可能会共享类似的密码子使用偏

好, 以适应共同的生存压力。

植物叶绿体基因组序列中的突变“热点”区域可为物种鉴定提供足够的遗传信息 (Li et al., 2018); 根据 mVISTA 分析得到的 6 个突变基因片段与植物通用 DNA 条形码 (*rbcL*, *matK* 和 *ITS* 等) (Antil et al., 2023) 相比表现出更高的变异性, 这



A. 珠子参; B. 羽叶三七; C. 秀丽假人参。下同。

A. *P. japonicus* var. *major*; B. *P. japonicus* var. *bipinnatifidus*; C. *P. pseudoginseng* var. *elegantior*. The same below.

图 4 3 种人参属药用植物的密码子中性绘图分析

Fig. 4 Codon neutral mapping analysis of three medicinal plants of *Panax*

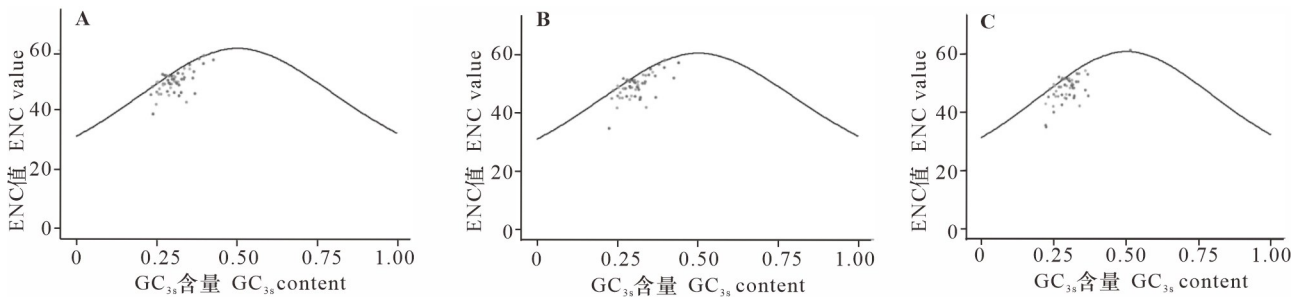


图 5 3 种人参属药用植物的 ENC 绘图分析

Fig. 5 ENC mapping analysis of three medicinal plants of *Panax*

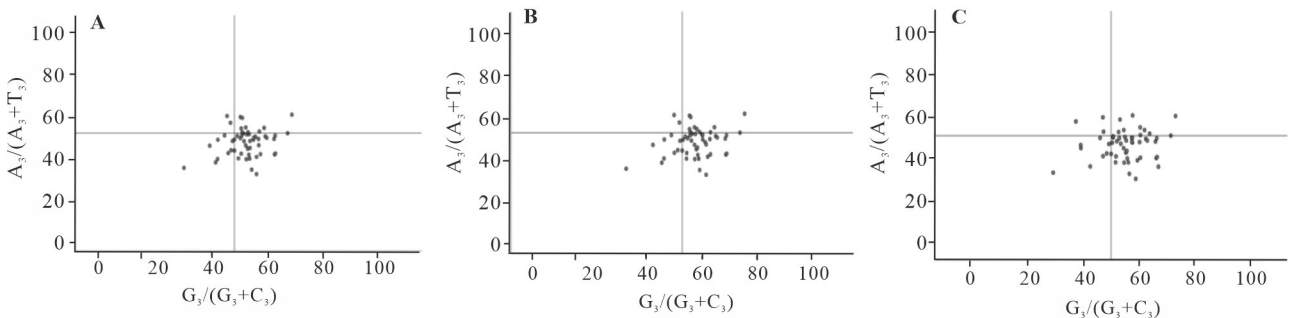


图 6 3 种人参属药用植物的 PR2-plot 绘图分析

Fig. 6 PR2-plot mapping analysis of three medicinal plants of *Panax*

些片段可用于人参属物种鉴定和系统发育研究。SSR 是一种广泛用于检测植物物种在特定位点和全基因组水平上遗传多态性的工具 (Taheri et al., 2018; Ping et al., 2021)。本研究中,羽叶三七和秀丽假人参具有相同数量及类型的核苷酸,表明二者之间更近的进化关系。3 种药用植物的核苷

酸类型均以单核苷酸重复居多,其次为四核苷酸,并且碱基偏好使用 A/T,这与人参属的三七、西洋参等相类似 (卢志宏等, 2022)。Niu 等 (2017) 研究表明, A/T 碱基在突变过程中消耗的能量比 G/C 少,这种优势导致了人参属 3 种药用植物 SSR 和密码子中 A/T 碱基偏好性的结果。本研究同时

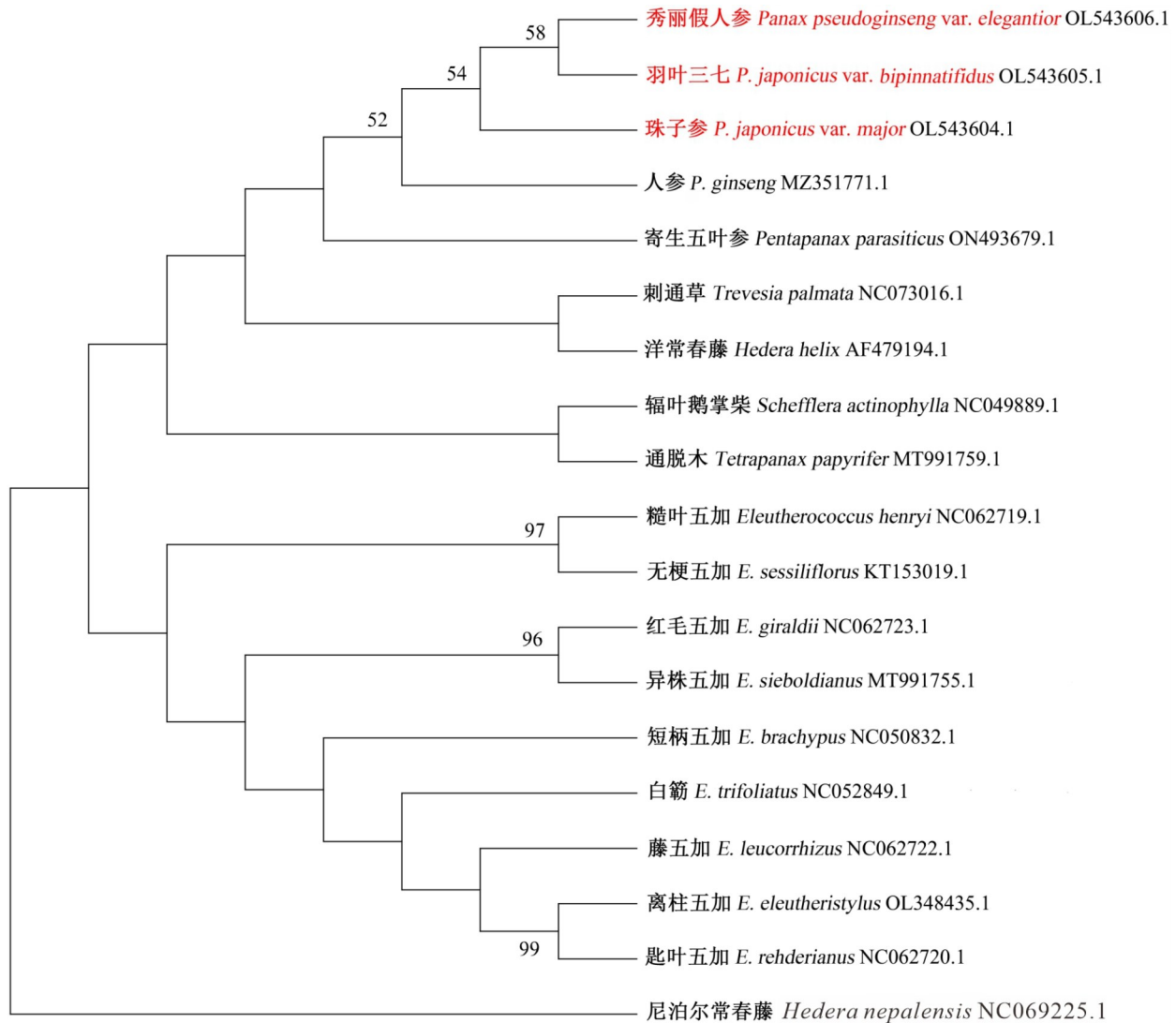


图 7 基于叶绿体基因组构建五加科 19 种植物的 NJ 系统发育树

Fig. 7 Construction of NJ phylogenetic tree of 19 Araliaceae species based on chloroplast genome

发现,珠子参的 SSR 位点类型与羽叶三七和秀丽假人参相比多出 2 种,结合 3 种人参属药用植物叶绿体基因组结构大小、基因组成及密码子 GC₃ 含量得到,羽叶三七和秀丽假人参始终保持一致,并与珠子参区别开来。因此,可以从分子水平上开发与其他两物种相区分的珠子参专用分子标记。

通过系统发育分析,可以更好地了解生物体的进化史。《中国植物志》依据 3 种药用植物地上部分的形态特征,将其归类为假人参 (*Panax pseudoginseng*) 的 3 个变种沿用至今(中国科学院中国植物志编委会,1978)。根据 *Flora of China* 的分类,秀丽假参与羽叶三七同为疙瘩七 (*Panax*

bipinnatifidus) 的变种,但该分类依据未见报道。从 NJ 建树所得的结果来看,秀丽假人参和羽叶三七聚在一支同珠子参互为姊妹群,表明秀丽假人参和羽叶三七之间较近的亲缘关系,该结果可为 *Flora of China* 中的分类提供一定科学依据。因此,叶绿体基因组用于阐明人参属物种的系统发育关系是非常有效的,但秀丽假人参能否作为药典规定珠子参基源植物的参考来源还需结合有效成分含量、临床应用效果等多方面指标综合考量。本研究利用生物信息学技术分析了秦巴山区 3 种人参属药用植物的叶绿体基因组特征,得到秀丽假参与珠子参基源植物之间存在近亲关系。因

此,有可能在其中发现与珠子参相似或相同的药用成分。这为寻找新的药用植物资源、研发新药以及合理利用珠子参等中药材资源提供了理论基础。

参考文献:

- ANTIL S, ABRAHAM JS, SRIPPOORNA S, et al., 2023. DNA barcoding, an effective tool for species identification: a review [J]. *Mol Biol Rep*, 50(1): 761–775.
- CAMIOLO S, MELITO S, PORCEDDU A, 2015. New insights into the interplay between codon bias determinants in plants [J]. *DNA Res*, 22: 461–470.
- Editorial Board of Flora of China, Chinese Academy of Sciences, 2013. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*: Vol.13 [M]. Beijing: Science Press: 489–491. [中国科学院中国植物志编委会, 2013. 中国植物志: 第 13 卷 [M]. 北京: 科学出版社: 489–491.]
- Editorial Board of Flora of China, Chinese Academy of Sciences, 1978. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*: Vol.54 [M]. Beijing: Science Press: 179–181. [中国科学院中国植物志编委会, 1978. 中国植物志: 第 54 卷 [M]. 北京: 科学出版社: 179–181.]
- LI W, LIU Y, YANG Y, et al., 2018. Interspecific chloroplast genome sequence diversity and genomic resources in *Diospyros* [J]. *BMC Plant Biol*, 18(1): 210.
- LIU C, LI M, REN YY, et al., 2022. Characteristics and evolution of *Panax* chloroplast genomes [J]. *Fujian J Agric Sci*, 37(7): 886–896. [刘潮, 李敏, 任怡园, 等, 2022. 人参属植物叶绿体基因组特征及其进化的研究 [J]. *福建农业学报*, 37(7): 886–896.]
- LU ZH, TIAN WY, YANG CD, 2022. Chloroplast genome characteristics and codon usage bias analysis of *Panax* Linn [J/OL]. *Mol Plant Breed*: 1–24 [2023–11–23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220720.1016.002.html>. [卢志宏, 田文勇, 杨传东, 2022. 人参属植物叶绿体基因组特征和密码子偏好性分析 [J/OL]. *分子植物育种*: 1–24 [2023–11–23]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220720.1016.002.html>.]
- MAO LY, HUANG QW, LONG LY, et al., 2022. Comparative analysis of codon usage bias in chloroplast genomes of seven *Nymphaea* species [J]. *J NW For Univ*, 37(2): 98–107. [毛立彦, 黄秋伟, 龙凌云, 等, 2022. 7 种睡莲属植物叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. *西北林学院学报*, 37(2): 98–107.]
- NIU ZT, XUE QY, WANG H, et al., 2017. Mutational biases and GC-biased gene conversion affect GC content in the plastomes of *Dendrobium* genus [J]. *Int J Mol Sci*, 18(11): 2307.
- PING J, FENG P, LI J, et al., 2021. Molecular evolution and SSRs analysis based on the chloroplast genome of *Callitropsis funebris* [J]. *Ecol Evol*, 11(9): 4786–4802.
- SAHOO S, DASS S, RAKSHIT R, 2019. Codon usage pattern and predicted gene expression in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gene*, 721: 100012.
- SHI YS, ZHAO YX, 2022. Codon preference analysis of chloroplast genome of *Panax* L [J]. *Mol Plant Breed*, 20(19): 6350–6361. [石岩硕, 赵永星, 2022. 人参属植物叶绿体基因组密码子偏好性分析 [J]. *分子植物育种*, 20(19): 6350–6361.]
- SUN JL, 2021. Comparative genomics study of *Panax japonicus* var. *major*, a medicinal plant of the genus Ginseng [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology. [孙嘉苓, 2021. 人参属药用植物珠子参的比较基因组研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学.]
- TAHERI S, LEE ABDULLAH T, YUSOP MR, et al., 2018. Mining and development of novel SSR markers using next generation sequencing (NGS) data in plants [J]. *Molecules*, 23(2): 399.
- WANG A, WU H, ZHU X, et al., 2018. Species identification of *Conyza bonariensis* assisted by chloroplast genome sequencing [J]. *Front Genet*, 11(9): 374.
- WANG F, ZHAO WZ, DONG ZH, et al., 2022. Analysis of chloroplast genome characteristics of *Prinsepia* [J]. *Chin J Trop Crops*, 43(9): 1759–1770. [王飞, 赵文植, 董章宏, 等, 2022. 扁核木属植物叶绿体基因组特征分析 [J]. *热带作物学报*, 43(9): 1759–1770.]
- YU X, SONG YR, ZHAO ZN, 2023. The complete chloroplast genome of *Elsholtzia fruticosa* (D. Don) Rehd. (Labiatae), an ornamental plant with high medicinal value [J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 8(3): 336–341.
- YUE J, 2021. Structural and phylogenetic analyses of the complete chloroplast genomes of four species within the genus *panax* Linn [D]. Hanzhong: Shaanxi University of Technology. [岳杰, 2021. 四种人参属植物叶绿体全基因组结构及其系统发育分析 [D]. 汉中: 陕西理工大学.]
- ZHANG Y, SHEN Z, MENG X, et al., 2022. Codon usage patterns across seven Rosales species [J]. *BMC Plant Biol*, 22(1): 65.
- ZHANG T, FANG Y, WANG X, et al., 2012. The complete chloroplast and mitochondrial genome sequences of *Boea hygrometrica*: insights into the evolution of plant organellar genomes. [J]. *PLoS ONE*, 7(1): e30531.

(责任编辑 蒋巧媛 王登惠)