

## 毛莲蒿叶绿体基因组结构及其物种鉴定意义

李晋任<sup>1</sup>, 索郎纳甲<sup>2</sup>, 赵志礼<sup>1</sup>, 米玛卓嘎<sup>3</sup>, 尕让甲<sup>3\*</sup>, 倪梁红<sup>1\*</sup>

(1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 2. 西藏自治区拉萨市林周县人民医院唐古乡分院, 西藏拉萨 851614; 3. 西藏自治区藏医院, 西藏 拉萨 850000)

**摘要:** 目的 测定毛莲蒿 *Artemisia vestita* Wall. ex Bess. 叶绿体基因组序列。方法 基于民族植物学考察, 采集样品并进行原植物鉴定; 采用 Illumina 高通量测序平台进行叶绿体基因组测序, 相关软件组装序列、注释及结构分析; 与蒿属 6 个近缘物种进行叶绿体基因组进行比较分析; 以桔梗科植物毛钟细花 *Leptocodon hirsutus* D. Y. Hong 为外类群, 基于毛莲蒿与菊科其他 32 个分类群的叶绿体基因组序列构建 ML 系统发育树。结果 毛莲蒿叶绿体基因组大小为 151 204 bp, 总 GC 含量为 36.88%; 大单拷贝区、小单拷贝区长度分别为 82 949、18 331 bp, 反向重复区长度为 24 962 bp; 共编码 134 个基因, 包括 89 个蛋白质编码基因、8 个 rRNA 基因和 37 个 tRNA 基因。基因组中共检测到 67 个简单重复序列 SSRs 和 44 个长重复序列 LSRs。与蒿属近缘物种比较, 筛选到 3 个基因高突变区 (*clpP*、*rpl36*、*ycf1*) 和 6 个基因间区高突变区 (*trnK-UUU-matK*、*rps18-rpl20*、*rpl36-infA*、*rpl14-rpl16*、*rpl16-rpl3*、*trnL-UAG-ecsA*), 可作为蒿属物种鉴定的候选 DNA 条形码序列; 系统发育分析显示, 蒿属形成一个高度支持的单系群, 毛莲蒿与白莲蒿 *A. gmelinii* Web. ex Stechm. 的亲缘关系最近。结论 本研究可为蒿属植物系统发育分析、藏药基原植物鉴定及物种 DNA 条形码构建等提供基础资料。

**关键词:** 毛莲蒿; 藏药; 叶绿体基因组; 系统发育分析; 物种鉴定

中图分类号: R282.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)06-1901-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.019

## Chloroplast genome structure of *Artemisia vestita* and its significance for species identification

LI Jin-ren<sup>1</sup>, SUOLANG Na-jia<sup>2</sup>, ZHAO Zhi-li<sup>1</sup>, MIGMAR Dol-kar<sup>3</sup>, ALA Kelsang Gyab<sup>3\*</sup>, NI Liang-hong<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacognosy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Linzhou Xian People's Hospital of Lhasa, Lhasa 851614, China; 3. Mentseekhang Traditional Tibetan Hospital, Lhasa 850000, China.)

**ABSTRACT:** **AIM** To sequence the chloroplast genome of *Artemisia vestita* Wall. ex Bess. **METHODS** Based on ethnobotanical surveys, sample collection and original plant identification were carried out. The chloroplast genome was sequenced using the Illumina platform, followed by assembly and annotation. A comprehensive comparative analysis was conducted with six *Artemisia* species. The maximum likelihood (ML) phylogenetic tree was constructed based on the chloroplast genome sequences of *A. vestita* and 32 other *Asteraceae* species, with *Leptocodon hirsutus* D. Y. Hong of *Campanulaceae* as outgroup. **RESULTS** The chloroplast genome of *A. vestita* was 151 204 bp in length, including a small single-copy region of 18 331 bp, a large single-copy region of 82 949 bp, and inverted repeat regions of 24 962 bp, with a total GC content of 37.45%. 134 genes were annotated, including 89 protein-coding genes, 8 ribosomal RNA genes, and 37 transfer RNA genes. A total of 67 SSRs and 44 LSRs were detected in the chloroplast genome. Comparative analysis with closely related species of *Artemisia*

收稿日期: 2024-10-29

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82073959); 2020年度西藏自治区藏医药管理局局级科技计划项目(JJKT2020017)

作者简介: 李晋任(1997—),男,硕士生,研究方向为中药资源与品种鉴定。E-mail: asimina199711@outlook.com

\*通信作者: 尕让甲(1982—),男,主管药师,研究方向为藏药品种鉴定。E-mail: 412772663@qq.com

倪梁红(1980—),男,教授,研究方向为中药资源与品种鉴定。E-mail: nlhtcm@126.com

revealed 3 highly variable genes (*clpP*, *rpl36*, *ycf1*) and 6 highly variable intergenic regions (*trnK-UUU-matK*, *rps18-rpl20*, *rpl36-infA*, *rpl14-rpl16*, *rpl16-rpl3* and *trnL-UAG-ccsA*), which could serve as candidate DNA barcodes for *Artemisia* identification. Phylogenetic analysis showed that *Artemisia* formed a highly supportive monophyletic group, with *A. vestita* and *A. gmelinii* Web. ex Stechm. being closely related. **CONCLUSION** This study may provide fundamental data for phylogenetic analysis of *Artemisia*, taxonomic identification and DNA barcoding construction of Tibetan herb.

**KEY WORDS:** *Artemisia vestita* Wall. ex Bess.; Tibetan herb; chloroplast genome; phylogenetic analysis; species identification

毛莲蒿 *Artemisia vestita* Wall. ex Bess. 为菊科蒿属多年生植物, 全国多地有分布<sup>[1]</sup>。根据《西藏自治区藏药材标准》, 毛莲蒿为常用藏药“普尔那”的基原植物<sup>[2]</sup>, 地上部分入药, 可清热解毒、杀虫利湿, 用于虫病引起的胃绞痛、瘟疫热症、炭疽、疮疖等病症。同时, 毛莲蒿因含有大量挥发性成分, 具有浓烈香气, 为藏香的主要原料之一<sup>[3]</sup>。

作为被子植物第一大科的菊科, 物种数目多达近3万种<sup>[4]</sup>。其中蒿属 *Artemisia* 在我国有186种, 44变种<sup>[1]</sup>。蒿属植物头状花序直径多在5 mm以下, 由数十枚小花组成。且对于药材而言, 发育成熟及完整的花序有限, 传统的基原鉴定方法局限性较大。因此, 蒿属相关藏药植物的形态特征梳理、DNA分子标记的确定尚有许多工作要做。

随着基因测序技术的发展, 叶绿体基因组在物种鉴定等领域中被广泛应用<sup>[5-6]</sup>, 其结构稳定、基因序列高度保守、分子质量较小、碱基变异速率适中, 基本不进行重组<sup>[7]</sup>, 可作为“超级条形码”, 为药用植物鉴定提供丰富的信息<sup>[8]</sup>。

目前, 蒿属植物叶绿体基因组序列资料有限, 亟需开展各亚属、组及其组下各系 (Series) 模式植物叶绿体基因组序列测定及相关研究工作。因此, 本研究在对藏药“普尔那”进行民族植物学考察及传统形态学鉴定基础上, 以毛莲蒿 *Artemisia vestita* 为对象, 测定叶绿体基因组序列, 分析其结构, 并与蒿属近缘物种比较, 探讨其物种鉴定意义, 以期为蒿属植物系统发育分析、藏药基原植物鉴定及物种DNA分子标记研究等提供基础资料。

## 1 材料

实验样品与凭证标本于2020年8月采集于西藏自治区拉萨市南山沟, 地理坐标 N 29°34.944', E 91°09.851', 海拔4 098 m; 新鲜健康叶片用硅胶快速干燥, 备用。凭证标本 (尕让甲 GRJ202002) 保存于上海中医药大学药用植物标本室。

## 2 方法

2.1 原植物鉴定 分别取干燥叶片、花序数枚, 放入80~90℃热水中, 软化处理5~10 min。待完全湿润软化后, 取出, 用吸水纸吸去多余的水分, 参考植物分类学文献 [1] 进行原植物鉴定。鉴于头状花序直径小于5 mm, 花序中边花及中央花长度小于2 mm, 将标本置于实体显微镜下进行器官解剖, 观察形态学特征并拍照。

2.2 DNA提取与测序 采用改良CTAB法从硅胶干燥叶片中提取总DNA<sup>[9]</sup>, 经质量检测后 (质量浓度大于150 ng/μL,  $A_{260}/A_{230}$  约1.8), 由武汉贝纳科技服务有限公司应用 Illumina NovaSeq6000 高通量测序平台进行叶绿体基因组测序。

2.3 叶绿体基因组组装与注释 使用 GetOrganelle v1.7.5 软件对已校正的二代DNA测序数据进行植物叶绿体组装, 得到完整的环形叶绿体基因组序列, 且其平均覆盖深度为1 000×。使用CPGAVAS2对毛莲蒿进行注释<sup>[10]</sup>, 注释结果经校正无误后使用 OGDRAW 绘制叶绿体全基因组图谱<sup>[11]</sup>, 并将序列上传至 GenBank 数据库, 序列号为 PP905386。蒿属近缘物种叶绿体基因组序列均下载自 GenBank 数据库。

2.4 IR边界收缩和扩张分析 应用 CPJSDraw 软件对叶绿体基因组中反向重复区和单拷贝区的4个连接区域边界进行比较分析及人工复核与矫正<sup>[12]</sup>。

2.5 重复序列分析 叶绿体基因组中重复序列主要包括简单重复序列 (simple sequence repeats, SSRs) 和长重复序列 (long sequence repeats, LSRs)。使用 MISA (micro-satellite identification tool) 鉴定 SSRs 的数目与类型, 单核苷酸、双核苷酸、三核苷酸、四核苷酸、五核苷酸、六核苷酸的重复单位数分别设置为10、6、4、3、3、3个<sup>[13]</sup>。使用 REPuter 对序列中的长重复序列进行统计, 参数设置为汉明距离3, 序列最短长度30 bp<sup>[14]</sup>。

2.6 密码子偏好性分析 为保证密码子丰度且排

除多拷贝基因的误差,对叶绿体基因组蛋白编码基因进行过滤,标准如下:编码基因序列长度大于300 bp;编码基因的起始子为ATG;位于重复区的基因只统计1次。所有蛋白编码序列经过滤合并后,使用codonW计算同义密码子相对使用度(relative synonymous codon usage, RSCU)<sup>[15]</sup>。

2.7 叶绿体全基因组比较分析 使用mVISTA检测毛莲蒿与其他6个蒿属物种叶绿体基因组的整体变异情况<sup>[16]</sup>。提取他们叶绿体基因组的共有基因序列和基因间区序列,经MAFFT软件比对后,使用DNAsp6计算其核酸多态性<sup>[17-18]</sup>。

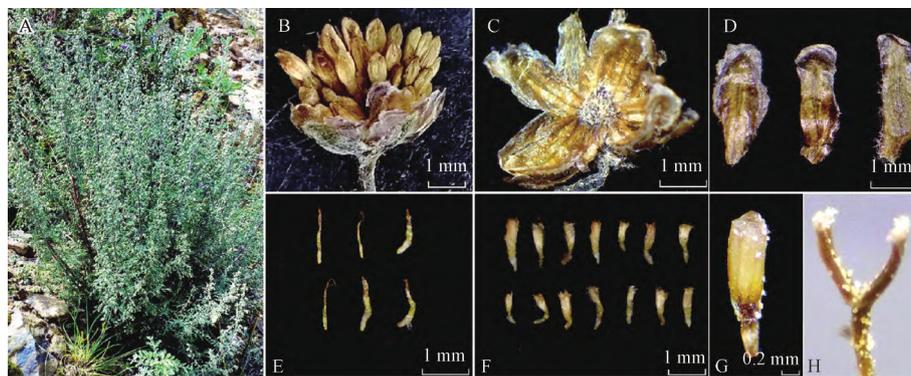
2.8 非同义替换率(Ka)/同义替换率(Ks)分析 使用KaKs\_Calculator 2.0在MLWL模型下计算Ka和Ks值<sup>[19-20]</sup>。Ka/Ks值大于1、等于1和小于1分别表示正向选择、中性选择和净化选择。

2.9 系统发育分析 基于叶绿体基因组序列,以桔梗科植物毛细钟花*Leptocodon hirsutus* D. Y. Hong为外类群,采用最大似然法(maximum likelihood, ML),为毛莲蒿和其他32个菊科植物构建系统发

育树。所有序列调整至相同的起点且SSC线性方向相同后,使用MAFFT进行多序列比对,使用RAxML工具构建系统树(模型为GTRGAMMA,重复次数为1 000)<sup>[21]</sup>。

### 3 结果

3.1 “普尔那”原植物形态特征及鉴定 形态特征:多年生小灌木,有浓烈香气,根木质。叶片被蛛丝状白毛,茎下部和中部叶卵形,三回羽状分裂,第一至第二回全裂末回深裂,小裂片细小,栉齿状椭圆形,中轴两侧有栉齿状小裂片。头状花序多数,近球形,排成近穗状的总状花序,又在茎上排成较开展的圆锥花序。总苞片三层,外层总苞片背面被白毛,具明显中肋,边缘狭膜质;中层总苞片背面微有毛,边缘宽膜质;内层总苞片膜质,无毛。花序托小,凸起,无托片及托毛;边缘雌花1层,花冠狭管状;中央花两性,花冠管状,子房发育,花柱伸出花冠外,先端两叉。经原植物鉴定,为菊科蒿属蒿亚属艾蒿组毛莲蒿系植物毛莲蒿*Artemisia vestita* Wall. ex Bess.,见图1。



注: A 为植株, B 为头状花序, C 为花序托及总苞片, D 为总苞片(3层), E 为边花(雌花), F 为中央花(两性), G 为中央花及发育子房, H 为花柱(先端二叉)。

图1 毛莲蒿植株及花部解剖图

Fig. 1 Anatomic diagram of plant and flowers of *A. vestita*

3.2 叶绿体基因组基本特征 由表1可知,毛莲蒿叶绿体基因组总长度为151 204 bp,大单拷贝区(LSC)82 949 bp,小单拷贝区(SSC)18 331 bp,反向重复区(IRa和IRb)各24 962 bp,与其他6种蒿属植物叶绿体基因组的基本结构一致,且基因组大小相近。毛莲蒿叶绿体基因组的总GC含量为37.45%,其中LSC区的GC含量为35.54%,SSC区的GC含量为30.83%,IRa、IRb区的GC含量为43.06%,IR区GC含量高于LSC区和SSC区,这是由于IR区包含更多的rRNA和tRNA基因,GC含量通常比蛋白编码基因高<sup>[22]</sup>。

由表2可知,毛莲蒿叶绿体基因组中共注释

134个基因,包括89个蛋白编码基因(CDS)、8个核糖体RNA(rRNA)基因和37个转运RNA(tRNA)基因。有20个基因位于反向重复区,包括4个rRNA(图2)。15个基因有1个内含子,*rps12*、*clpP*、*ycf3*基因有2个内含子。

3.3 边界分析 由图3可知,7种蒿属植物的基因排列完全相同,跨界基因都为*rps19*和*ycf1*,仅在跨区域长度上存在一定差异。在JLB(LSC/IRb)区域,跨界基因均为*rps19*,且位于IRb区域的长度是完全相同的,均为60 bp,在IRa区产生相应 $\psi$ *rps19*片段。同时在JSA(SSC/IRa)区域,跨界基因都为*ycf1*,位于IRa区域的序列除黄花蒿

表1 毛茛蒿与其他6种蒿属植物叶绿体基因组基本结构特征

Tab. 1 Basic characteristics of chloroplast genomes of *A. vestita* and six other *Artemisia* species

物种	GenBank 登录号	总长度/bp	LSC 长度/bp	SSC 长度/bp	IR 长度/bp	GC 含量/%
毛茛蒿 <i>A. vestita</i>	PP905386	151 204	82 949	18 331	24 962	37.45
白茛蒿 <i>A. gmelinii</i>	KU736962	151 318	83 061	18 335	24 961	37.46
黄花蒿 <i>A. annua</i>	KY085890	150 952	82 772	18 268	24 956	37.48
艾 <i>A. argyi</i>	KM386991	151 192	82 928	18 344	24 960	37.50
中亚苦蒿 <i>A. absinthium</i>	ON641321	151 283	82 982	18 333	24 984	37.40
冷蒿 <i>A. frigida</i>	JX293720	151 076	82 740	18 392	24 972	37.51
龙蒿 <i>A. dracunculus</i>	ON641353	150 977	82 775	18 284	24 959	37.48

表2 毛茛蒿叶绿体基因组注释信息

Tab. 2 Statistical table of gene information in chloroplast genome of *A. vestita*

基因分类	基因功能	基因名称
光合系统	光系统 I	<i>psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ</i>
	光系统 II	<i>psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ</i>
	NADH 脱氢酶	<i>ndhA*, ndhB*(2), ndhC, ndhD, ndhE, ndhF, ndhG, ndhH, ndhI, ndhJ, ndhK</i>
	细胞色素 b/f 复合物的亚基	<i>petA, petB*, petD*, petG, petL, petN</i>
	ATP 合酶	<i>atpA, atpB, atpE, atpF*, atpH, atpI</i>
	Rubisco 大亚基	<i>rbcL</i>
自我复制	核糖体蛋白大亚基	<i>rpl14, rpl16*, rpl2*(2), rpl20, rpl22, rpl23(2), rpl32, rpl33, rpl36</i>
	核糖体蛋白小亚基	<i>rps11, rps12**(2), rps14, rps15, rps16*, rps18, rps19(2), rps2, rps3, rps4, rps7(2), rps8</i>
	RNA 聚合酶	<i>rpoA, rpoB, rpoC1*, rpoC2</i>
	rRNA	<i>rrn16S(2), rrn23S(2), rrn4.5S(2), rrn5S(2)</i>
	tRNA	<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(2), trnT-GGU, trnT-UGU, trnV-GAC(2), trnV-UAC*, trnW-CCA, trnY-GUA, trnY-M-CAU</i>
其他基因	成熟酶	<i>matK</i>
	蛋白酶	<i>clpP**</i>
	包膜蛋白	<i>cemA</i>
	乙酰辅酶 a 羧化酶	<i>accD</i>
	c 型细胞色素合成基因	<i>ccsA</i>
	翻译起始因子	<i>infA</i>
未知基因	保守开放阅读框	<i>ycf1(2), ycf15(2), ycf2(2), ycf3**, ycf4</i>

注: \* 表示基因有 1 个内含子, \*\* 表示基因有 2 个内含子; (2) 表示有 2 个拷贝。

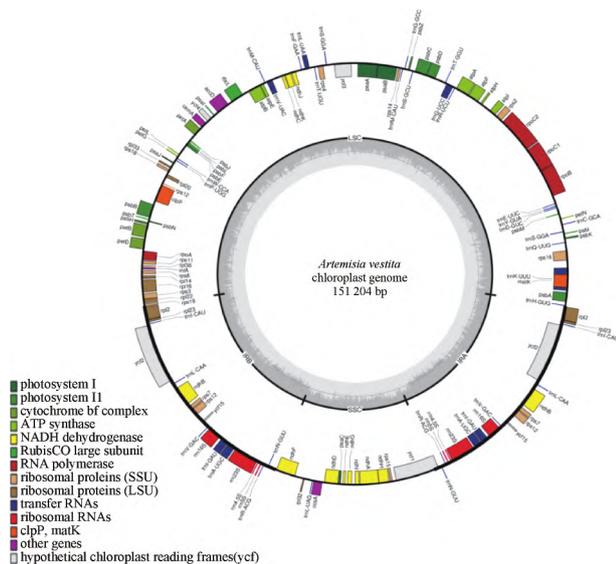
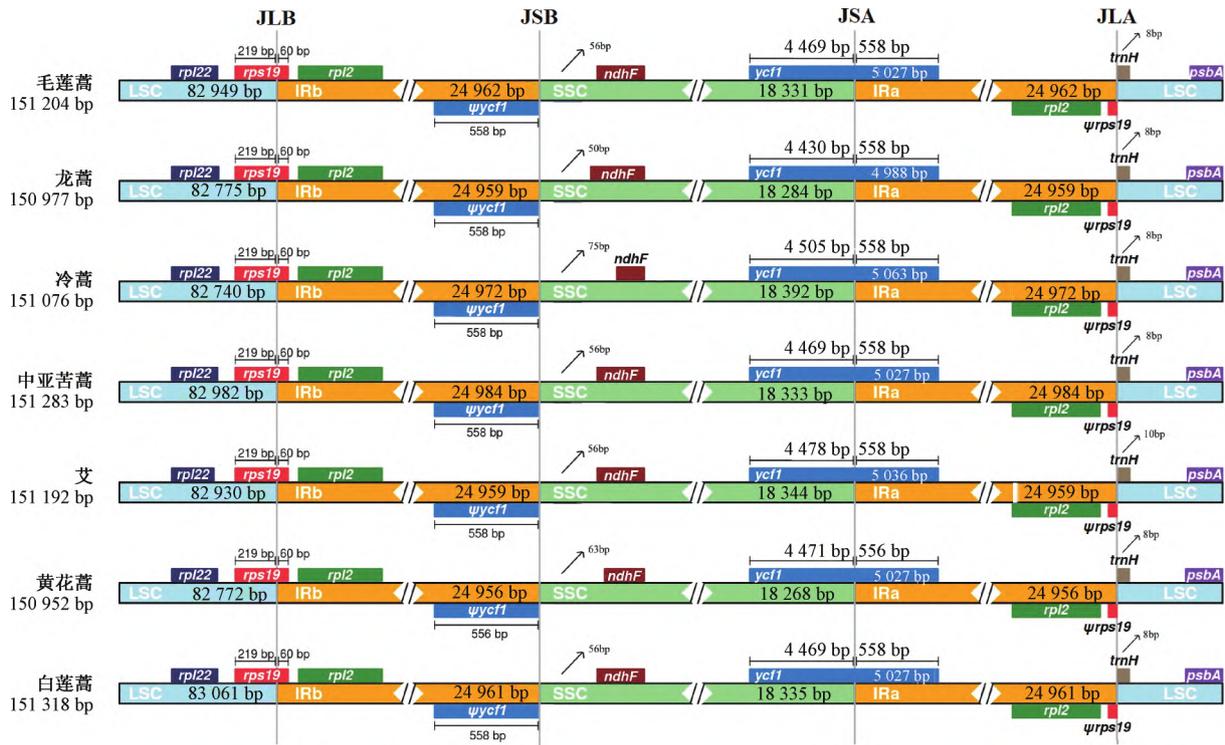


图2 毛茛蒿叶绿体基因组圈图

Fig. 2 Chloroplast genome circular map of *A. vestita*

为 556 bp 外,其他均为 558 bp,在 IRb 区产生相应  $\psi ycf1$  片段。值得注意的是, *ndhF* 基因与 JSB 区域边界的距离在 7 个蒿属植物中有较大的差异,在毛茛蒿、白茛蒿、中亚苦蒿和艾中,其距离边界均为 56 bp,而在冷蒿、黄花蒿和龙蒿中分别为 75、63、50 bp。此外, *trnH* 基因距离 JLA (LSC/IRa) 边界,除艾为 10 bp 外,其余 6 种植物均为 8 bp。

3.4 重复序列分析 毛茛蒿的叶绿体基因组中,共鉴定到 67 个 SSRs,其中单碱基 SSRs 占 59%,大多数为 A/T 重复,其他类型的重复较少。相比之下,其他 6 种蒿属植物中分别鉴定到 65、65、63、73、65、56 个 SSRs,单碱基 SSRs 的占比分别为 58%、59%、61%、61%、59%、63%。在这 7 个蒿属物种中,均表现为重复单元越长,其相对含量越低,且均未检测到六核苷酸重复序列。SSRs 均主要集中在基因间区,基因区和内含子区域的数

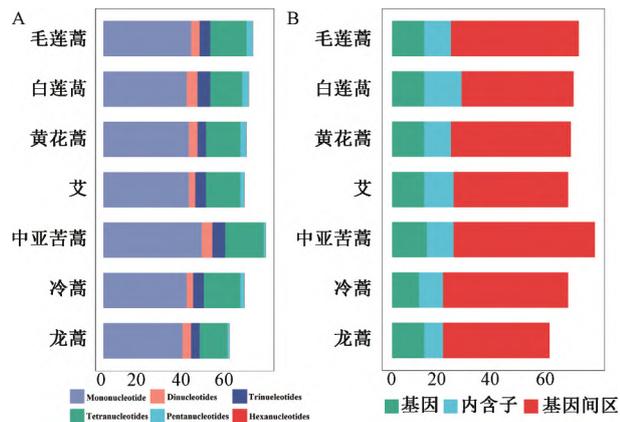


注: JLB 为 LSC 和 IRb 区边界, JSB 为 IRb 和 SSC 区边界, JSA 为 SSC 和 IRa 区边界, JLA 为 IRa 和 LSC 区边界。

图 3 毛莲蒿与其他 6 种蒿属植物叶绿体基因组边界分析

Fig. 3 Boundary analysis of chloroplast genomes of *A. vestita* and six other *Artemisia* species

目几乎相等, 见图 4。

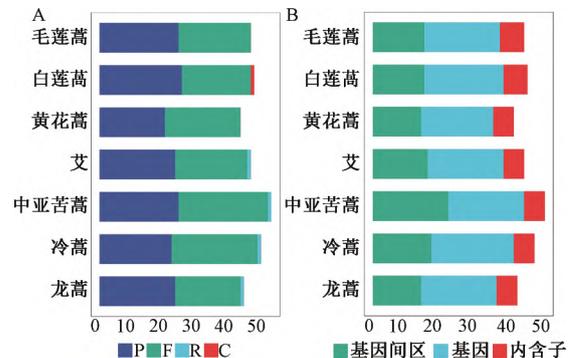


注: A 为 SSRs 中不同重复单元的统计, B 为 SSRs 在叶绿体基因组中的位置。

图 4 毛莲蒿与其他 6 种蒿属植物叶绿体基因组 SSRs 分析  
Fig. 4 SSR analysis of chloroplast genomes of *A. vestita* and six other *Artemisia* species

毛莲蒿叶绿体基因组中, 共鉴定到 44 个 LSRs, 主要为回文重复 (palindromic, P 型) 和正向重复 (forward, F 型), 仅检测到少数的反向重复 (reverse, R 型) 和互补重复 (complement, C 型)。相比之下, 在其他 6 种蒿属植物中, 分别鉴定到 45、41、44、50、47、42 个 LSRs, 主要为 P

型和 F 型, 少数 R 型和 C 型。定位分析显示, 位于基因区域的 LSRs 最多, 其次是基因间区, 位于内含子区域的最少, 见图 5。

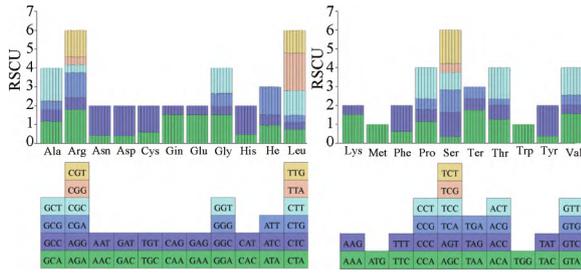


注: A 为 LSRs 中不同重复类型的统计, B 为 LSRs 在叶绿体基因组中的位置。

图 5 毛莲蒿与其他 6 种蒿属植物叶绿体基因组 LSRs 分析  
Fig. 5 LSR analysis of chloroplast genomes of *A. vestita* and six other *Artemisia* species

3.5 密码子偏好性分析 经筛选后, 毛莲蒿与其他 6 种蒿属植物的编码基因分别保留了 53、53、52、53、53、52、53 个基因。由图 6 可知, 这 7 个蒿属植物具有相似的密码子使用模式, 且使用频率最高和最低的密码子在这 7 个物种中相同, 分别是编码亮氨酸的 TTA 和编码丝氨酸的 AGC。除色

氨酸和甲硫氨酸只有1个密码子外，其他氨基酸均有2个或2个以上，且存在不同程度的密码子偏好性，例如编码酪氨酸的TAT和TAC，其RSCU值分别为1.63和0.37，表现出较高的TAT偏好性。



注：每列从左至右依次为毛茛蒿、白茛蒿、黄花蒿、艾、中亚苦蒿、冷蒿、龙蒿。Ala为丙氨酸，Arg为精氨酸，Asn为天冬酰胺，Asp为天冬氨酸，Cys为半胱氨酸，Gln为谷氨酰胺，Glu为谷氨酸，Gly为甘氨酸，His为组氨酸，Ile为异亮氨酸，Leu为亮氨酸，Lys为赖氨酸，Met为蛋氨酸，Phe为苯丙氨酸，Pro为脯氨酸，Ser为丝氨酸，Ter为终止密码子，Thr为苏氨酸，Trp为色氨酸，Tyr为酪氨酸，Val为缬氨酸。

图6 毛茛蒿与其他6种蒿属植物叶绿体基因组RSCU分析  
Fig. 6 RSCU analysis of chloroplast genomes of *A. vestita* and six other *Artemisia* species

3.6 叶绿体基因组比较分析 结果表明，所有物种具有较高的序列相似度，未检测到基因重排和反向排列现象，基因区域比基因间区更加保守，未检测到序列相似度低于50%的区域，见图7。进一步计算各物种共有片段的核苷酸多态性，共提取出107个共有基因和134个共有基因间区序列，基因间区的变异度明显高于基因区。分别以  $P_i > 0.005$  (基因) 和  $P_i > 0.015$  (基因间区) 为标准，共筛选到9个高突变区，包括3个基因 (*clpP*、*rpl36*、*yef1*)，6个基因间区 (*trnK-UUU-matK*、*rps18-rpl20*、*rpl36-infA*、*rpl14-rpl16*、*rpl16-rpl3* 和 *trnL-UAG-ccsA*)，这些高突变区可作为蒿属物种鉴定的候选DNA条形码序列，见图8。

3.7 Ka/Ks分析 在毛茛蒿与其他6种蒿属植物的87个共有基因中，有52个基因的Ka/Ks比值为0，表明这些基因在这些物种间没有发生非同义替换，进一步证实了叶绿体基因组的高保守特性。在35个Ka/Ks比值不为0的基因中，相对于毛茛蒿，部分物种的*accD*、*ndhD*、*rpoC1*、*yef1* 和 *yef2* 基因

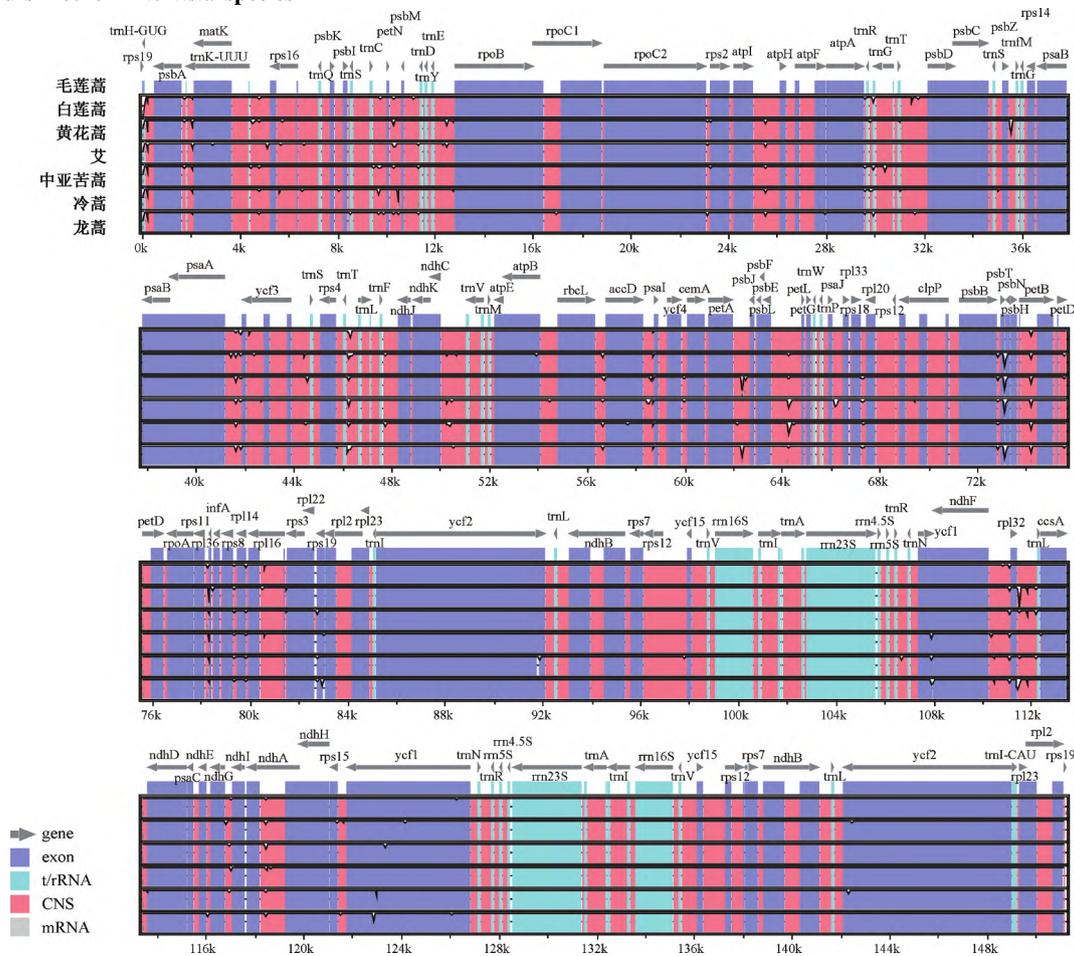
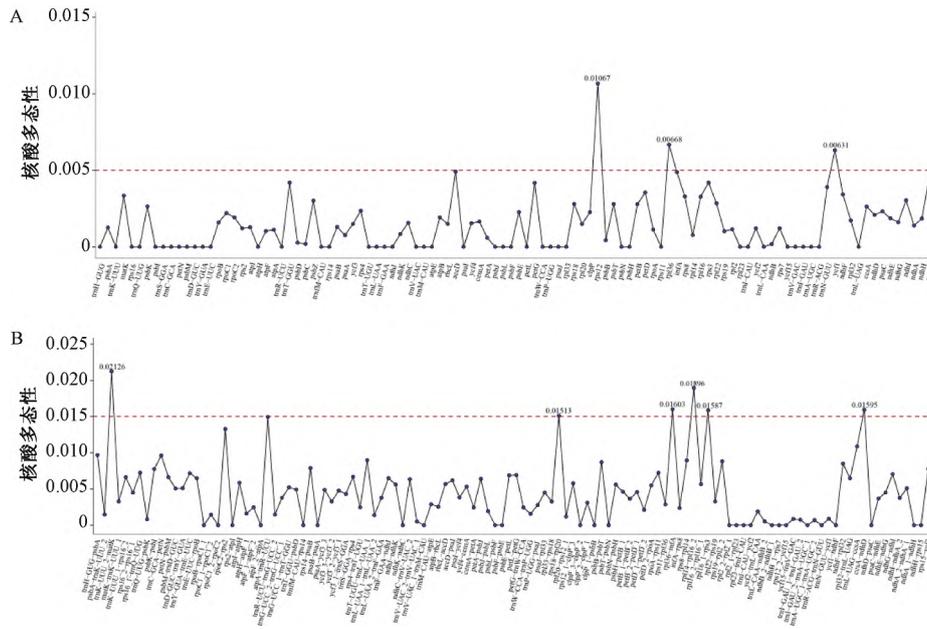


图7 毛茛蒿与其他6种蒿属植物叶绿体基因组mVISTA分析

Fig. 7 mVISTA analysis of chloroplast genomes of *A. vestita* and six other *Artemisia* species



注: A 为共有基因的核酸多态性分析, B 为共有间区基因的核酸多态性分析。

图8 毛茛蒿与其他6种蒿属植物叶绿体基因组核酸多态性分析

Fig. 8 Analysis of nucleotide diversity in chloroplast genomes of *A. vestita* and six other *Artemisia* species

的 Ka/Ks 值大于 1, 表示这些基因在相关物种中受到了正向选择的迹象。其余 30 个基因的 Ka/Ks 比值均小于 1, 表示这些基因在进化过程中普遍受到净化选择, 体现出较高的保守性。这些结果不仅支

持了叶绿体基因组在植物系统进化中的重要角色, 还为进一步研究基因功能和进化机制提供了有力的证据, 见图 9。

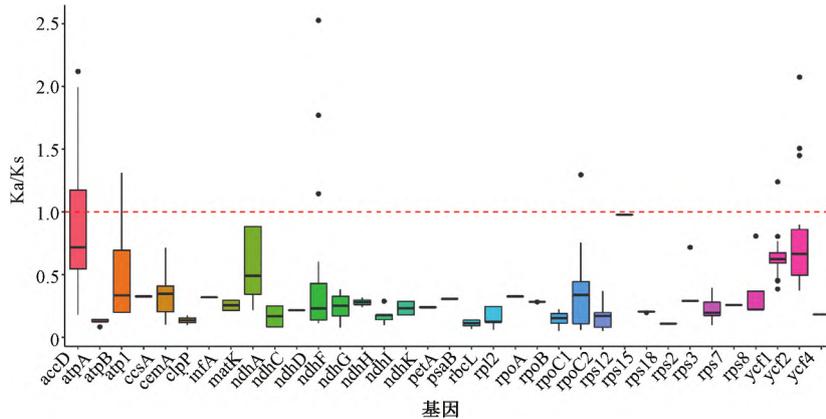


图9 毛茛蒿与其他6种蒿属植物叶绿体基因组共有基因 Ka/Ks 比较分析

Fig. 9 Comparative analysis of Ka/Ks ratios of shared chloroplast genes between *A. vestita* and six other *Artemisia* species

3.8 系统发育分析 结果显示, 其系统发育的拓扑结构与传统分类学一致, 菊科形成 1 个大支, 并分为管状花亚科、舌状花亚科 2 支。蒿属形成 1 个高度支持的单系群 (支持率为 100), 位于管状花亚科中的黄春菊族分支, 其中毛茛蒿与白茛蒿的亲缘关系最近, 见图 10。基于叶绿体基因组的系统分析, 进一步揭示了毛茛蒿在蒿属植物中的演化位

置和关系, 可为该物种的群体遗传学、分类学提供科学资料。

#### 4 讨论

藏药品种的基原整理与鉴定是确保藏药质量和疗效的基础, 对于推动藏药的现代化发展及实现资源的可持续利用具有重要作用。本研究对藏药“普尔那”进行民族植物学考察, 采集并鉴定其基

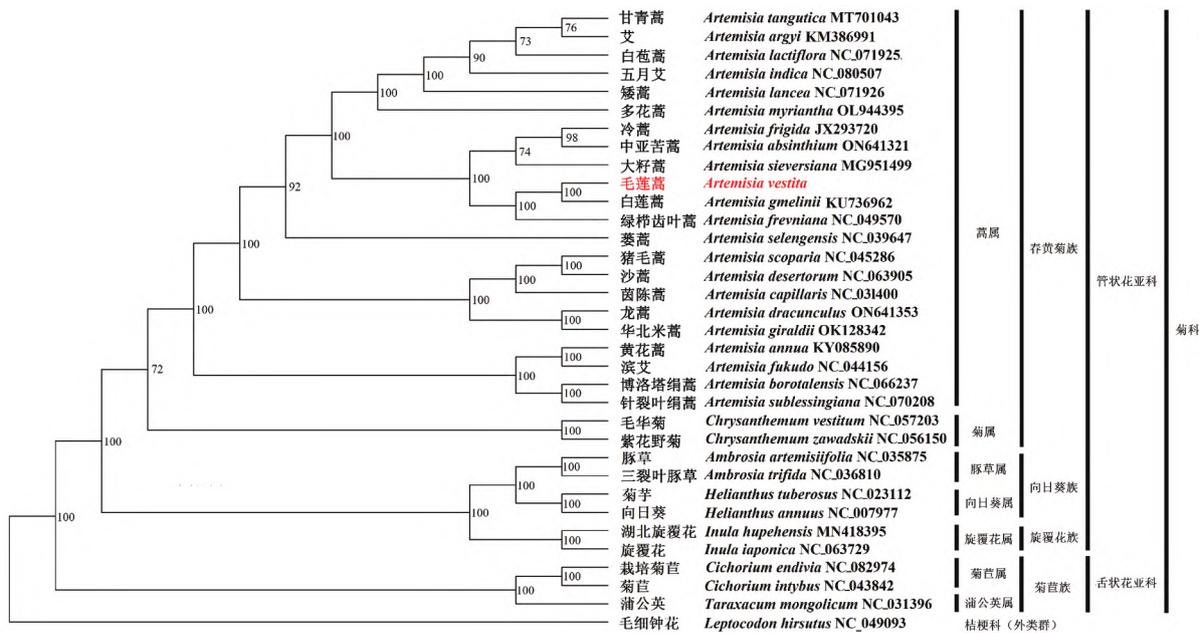


图 10 基于叶绿体基因组的菊科系统发育分析

Fig. 10 Phylogenetic analysis of *Compositae* based on chloroplast genomes

原植物毛莲蒿，梳理其形态鉴定要点。《西藏自治区藏药材标准》中收录了毛莲蒿的性状和显微鉴定特征<sup>[5]</sup>，但蒿属植物分类复杂，形态特征的掌握难度较大，且相关藏药材多为破碎的干品，因此标准中的鉴定指标专属性较低，将形态与 DNA 分子数据结合可有效提高鉴别效率。鉴于前期尚无毛莲蒿叶绿体基因组的测序报道，本实验应用高通量测序技术首次获得其叶绿体基因组序列，基于结构分析，初步筛选了具物种鉴定潜力的分子标记。ITS、*trnH-psbA*、*rbcL*、*matK* 等是目前植物 DNA 条形码分子鉴定中最常用的序列，与通用条形码相比，特异性条形码通常能提供更多的遗传信息，具有更高的分辨率<sup>[23]</sup>。本研究基于 7 个蒿属植物的核苷酸多样性分析，筛选出 9 个高变异区，可作为本属植物 DNA 条形码的候选片段，结合 ITS 等核基因片段联合分析，可为后续物种鉴定、遗传背景分析等奠定基础。同时，SSRs 具有高度的特异性、多态性，被广泛应用于植物遗传多样性分析和物种鉴定<sup>[24]</sup>。分析毛莲蒿等 7 种蒿属植物的叶绿体基因组发现，存在较丰富的 SSR 位点，可为遗传多样性分析提供数据。值得注意的是，毛莲蒿分布较广泛，本研究对西藏拉萨产的样品进行了叶绿体基因组序列分析，后续研究可扩大取样范围，系统分析该物种的遗传多样性及居群间序列差异，从而进一步构建该物种的分子鉴定方法。

我国蒿属植物种类多，属内种间系统学关系复

杂，需进一步开展蒿属内系统发育关系的梳理，及“普尔那”等藏药基原植物形态学特征的整理与 DNA 分子标记的确定。目前，蒿属植物叶绿体基因组序列资料有限，各亚属、组及其组下各系模式植物叶绿体基因组序列的测定及相关研究工作亟待开展。

#### 参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 (76 卷 2 分册) [M]. 北京: 科学出版社, 1991: 1-41; 49-50.
- [2] 西藏自治区食品药品监督管理局. 西藏自治区藏药材标准 (第二册) [S]. 拉萨: 西藏人民出版社, 2012: 47-48.
- [3] 李晋任, 尕让甲, 吴新荣, 等. 藏香的研究概况. 中国民族民间医药, 2023, 32(8): 67-70; 74.
- [4] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志 (74 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 1-2.
- [5] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 2 (6): e508.
- [6] Song H Y, Liu F, Li Z L, et al. Development of a high-resolution molecular marker for tracking *Phaeocystis globosa* genetic diversity through comparative analysis of chloroplast genomes [J]. *Harmful Algae*, 2020, 99: 101911.
- [7] Wicke S, Schneeweiss G M, dePamphilis C W, et al. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 76(3-5): 273-297.
- [8] Wu L, Wu M, Cui N, et al. Plant super-barcode: a case study on genome-based identification for closely related species of

- Fritillaria* [J]. *Chin Med* , 2021 , 16( 1) : 52.
- [ 9 ] Raimundo J , Reis C M G , Ribeiro M M. Rapid , simple and potentially universal method for DNA extraction from *Opuntia* spp. fresh cladode tissues suitable for PCR amplification[J]. *Mol Biol Rep* , 2018 , 45( 5) : 1405-1412.
- [10] Shi L C , Chen H M , Jiang M , et al. CPGAVAS2 , an integrated plastome sequence annotator and analyzer[J]. *Nucleic Acids Res* , 2019 , 47( W1) : W65-W73.
- [11] Greiner S , Lehwark P , Bock R. OrganellarGenomeDRAW ( OGDRAW) version 1.3.1: expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes[J]. *Nucleic Acids Res* , 2019 , 47( W1) : W59-W64.
- [12] Li H , Guo Q Q , Xu L , et al. CPJSDraw: analysis and visualization of junction sites of chloroplast genomes[J]. *PeerJ* , 2023 , 11: e15326.
- [13] Beier S , Thiel T , Münch T , et al. MISA-web: a web server for microsatellite prediction[J]. *Bioinformatics* , 2017 , 33( 16) : 2583-2585.
- [14] Kurtz S , Choudhuri J V , Ohlebusch E , et al. REPuter: the manifold applications of repeat analysis on a genomic scale[J]. *Nucleic Acids Res* , 2001 , 29( 22) : 4633-4642.
- [15] Sharp P M , Li W H. Codon usage in regulatory genes in *Escherichia coli* does not reflect selection for 'rare' codons[J]. *Nucleic Acids Res* , 1986 , 14( 19) : 7737-7749.
- [16] Mayor C , Brudno M , Schwartz J R , et al. VISTA: visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length[J]. *Bioinformatics* , 2000 , 16( 11) : 1046-1047.
- [17] Katoh K , Standley D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. *Mol Biol Evol* , 2013 , 30( 4) : 772-780.
- [18] Rozas J , Ferrer-Mata A , Sánchez-DelBarrio J C , et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets[J]. *Mol Biol Evol* , 2017 , 34( 12) : 3299-3302.
- [19] Wang D P , Zhang Y B , Zhang Z , et al. KaKs\_Calculator 2.0: a toolkit incorporating gamma-series methods and sliding window strategies[J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics* , 2010 , 8( 1) : 77-80.
- [20] Tzeng Y H , Pan R , Li W H. Comparison of three methods for estimating rates of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions[J]. *Mol Biol Evol* , 2004 , 21( 12) : 2290-2298.
- [21] Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. *Bioinformatics* , 2014 , 30( 9) : 1312-1313.
- [22] Su C , Wang H , Wang S , et al. Analysis of whole chloroplast genomes from three medicinal *Amomum* species[J]. *Med Plant Biol* , 2023 , 2: 14.
- [23] Zhu S , Liu Q Z , Qiu S M , et al. DNA barcoding: an efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances[J]. *Chin Med* , 2022 , 17( 1) : 112.
- [24] Xu J R , Wang Y , Wu K L , et al. Identification and characterization of functionally relevant SSR markers in natural *Dalbergia odorifera* populations[J]. *BMC Plant Biol* , 2024 , 24( 1) : 315.