

· 资源与鉴定 ·

黔产宽叶缬草叶绿体 *trnL-F*, *matK* 基因遗传关系的分析

钱志瑶¹, 饶海², 曹旭林³, 邓强³, 杨宏³, 徐昌艳³, 覃容贵^{3,4*}

- (1. 贵州医科大学 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 公共卫生学院, 贵阳 550025;
2. 贵阳市云岩区人民医院, 贵阳 550001; 3. 贵州医科大学 药学院, 贵阳 550025;
4. 贵州省高等学校 天然药物药理与成药性评价特色重点实验室,
贵阳市-贵州医科大学联合实验室, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:探讨贵州省宽叶缬草在叶绿体基因 *trnL-F*, *matK* 上的遗传关系。方法:利用 *trnL-F*, *matK* 序列对宽叶缬草进行序列分析,运用 Bioedit, MEGA 5.0 软件计算贵州省宽叶缬草居群遗传距离,并进行聚类分析建立系统发育树。结果:不同居群宽叶缬草 *trnL-F* 序列长度为 947~985 bp,鸟嘌呤和胞嘧啶质量分数为 35.92%~36.55%,其中差异位点 8 个,变异位点 5 个,居群间的遗传距离为 0.000 0~0.005 4,最小进化法(minimum-evolution, ME),最大似然法(maximum likelihood, ML),邻接法(neighbor-joining, NJ),非加权配对算数平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)4 种聚类构树结果显示 15(江口县官和乡泗渡村寨上组),18(江口县凯德镇育苗基地)号样品明显与大部分的宽叶缬草样品区分出来;不同居群宽叶缬草 *matK* 序列长度为 1 080~1 088 bp,鸟嘌呤和胞嘧啶质量分数为 35.19%~36.64%,差异位点 2 个,变异位点 1 个,简约信息位点 1 个,居群间的遗传距离为 0.000 0~0.000 9,ML, NJ, ME, UPGMA 4 种聚类构树结果显示 2(剑河县太拥乡太平村),5(剑河县岑松镇稿旁村),6(剑河县关么乡苗岭村),20(江口县闵孝镇渔凉溪村)号样品聚为一类,其余 19 份样品聚为一类。结论:贵州省宽叶缬草居群内 *trnL-F*, *matK* 序列具有高度保守性。

[关键词] 宽叶缬草; 序列分析; 聚类分析

[中图分类号] R282.2; R931.2; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)05-0036-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018050036

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171106.1601.012.html>

[网络出版时间] 2017-11-06 16:01

Analysis on *trnL-F* and *matK* Genetic Relationship of *Valeriana officinalis* var. *latifolia* in Guizhou Province

QIAN Zhi-yao¹, RAO Hai², CAO Xu-lin³, DENG Qiang³, YANG Hong³,
XU Chang-yan³, QIN Rong-gui^{3,4*}

- (1. Key Laboratory of Environmental Pollution and Disease Surveillance, Ministry of Education, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Renmin Hospital of Yunyan District in Guiyang, Guiyang 550001, China; 3. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;
4. Key Laboratory of Utilization Medicinal Resources, School of Pharmacy, Laboratory of Guiyang and Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the genetic relationship of the *Valeriana officinalis* var. *latifolia* in Guizhou province at *trnL-F* and *matK* sequence. **Method:** The *trnL-F* and *matK* sequences of *V. officinalis* var.

[收稿日期] 20170619(012)

[基金项目] 贵州省中药现代化专项(黔科合 ZY 字[2011]3008 号)

[第一作者] 钱志瑶, 硕士, 助理实验师, 从事中药资源及质量评价, E-mail: 95661575@qq.com

[通信作者] *覃容贵, 博士, 教授, 从事中药资源及质量评价, E-mail: 1346812934@qq.com

latifolia were analyzed. The genetic distance was calculated by Bioedit, Mega 5. 0, and then the clustering analysis was conducted to establish the phylogenetic tree. **Result:** In the different populations of the *V. officinalis* var. *latifolia*, the lengths of *trnL-F* sequence ranged from 947-985 bp, and the guanine and cytosine mass fraction was between 35. 92% -36. 55%, including 8 differential sites and 5 variable sites. The genetic distance ranged from 0. 000 0-0. 005 4. The branch type of phylogeny trees was constructed by ML, NJ, ME and UPGMA methods and showed that samples No. 15 and 18 could be distinguished from the most samples. In the different populations of the *V. officinalis* var. *latifolia*, the lengths of *matK* sequence ranged from 1 080-1 088 bp, the guanine and cytosine mass fraction was between 35. 19% -36. 64%, including 2 differential sites and 1 variable site. The genetic distance ranged from 0. 000 0-0. 000 9. The branch type of phylogeny trees was constructed by ML, NJ, ME and UPGMA methods, and showed that samples No. 2, 5, 6 and 20 were clustered as a class and the remained 19 samples were clustered into another group. **Conclusion:** The *trnL-F* and *matK* sequences of *V. officinalis* var. *latifolia* in Guizhou province are highly conservative.

[**Key words**] *Valeriana officinalis* var. *latifolia*; sequence analysis; cluster analysis

宽叶缬草为败酱科缬草属的一个变种,为多年生草本,其根、根茎以及全草性辛、甘、温^[1-3]。贵州是宽叶缬草的主产地之一,既有丰富的野生资源,又是主要栽培生产地区。近年来,宽叶缬草市场需求量增大,贵州缬草人工栽培品种,普遍存在品种退化,市场竞争力弱的问题,严重制约了贵州缬草产业的发展。为了避免贵州宽叶缬草药用植物的枯竭,更好地开发利用宽叶缬草,促使其走向现代化,势必要进行药材的规范化栽培种植^[4]。叶绿体非编码区叶 *trnL-F* 序列是由 *trnL-F* 内含子, *trnL-F* 间隔区与两者之间的 *trnL 3'* 基因构成^[5], 叶绿体编码区 *matK* 序列位于 *trnA* 与 *trnK 2* 个高度保守的外显子之间的内含子中,编码参与 RNA 转录的成熟酶^[6]。利用叶绿体非编码区 *trnL-F* 序列、叶绿体编码区 *matK* 序列检测贵州省不同居群宽叶缬草序列碱基的差异情况,通过对宽叶缬草遗传背景的分析,以期从遗传学角度评判贵州省宽叶缬草居群间的差异性,为宽叶缬草的栽培种植提供理论指导,同时为贵州省宽叶缬草的系统稳定性发育研究提供依据。

1 材料

宽叶缬草样品大部分由贵州省江口苗药生物科技有限公司提供,经贵州医科大学覃容贵教授鉴定为败酱科缬草属植物宽叶缬草 *Valeriana officinalis* var. *latifolia*。样品采集洗净后剪下幼嫩叶片,吸干表面残留水分置封口袋中,于 -20 ℃ 低温保存,作为提取基因组 DNA 的材料。信息详见表 1。

trnL-F, *matK* 序列引物[生工生物工程(上海)股份有限公司];DP-320 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);GoldView I 核酸染色剂,50 × TAE 缓冲液(北京索莱宝公司)。

表 1 宽叶缬草样品来源

Table 1 Sources of *Valeriana officinalis* var. *latifolia* samples

No.	产地	No.	产地
1	剑河县观么乡白胆村	13	江口县冈孝镇新寨村
2	剑河县太拥乡太平村	14	江口县民和镇黄柏山村
3	剑河县柳川镇关口	15	江口县官和乡泗渡村寨上组
4	剑河县敏洞上坝	16	江口县凯德工业园区
5	剑河县岑松镇稿旁村	17	江口县凯德镇明星村庙冲组
6	剑河县关么乡苗岭村	18	江口县凯德镇育苗基地
7	江口县怒溪乡陈家湾	19	江口县德旺镇坝溪村
8	江口县冈孝镇沙坝乡	20	江口县冈孝镇渔凉溪村
9	江口县送样	21	岑巩县凯本乡四季村茶叶地组
10	江口县桃映乡贺家庄	22	岑巩县凯本乡凯府村向家坡组
11	江口县双江镇	23	龙里县麻芝乡新民村永瑞县
12	江口县德旺乡清溪村		

DYY-12C 型电泳仪(北京市六一仪器厂); Synergy H4 型多功能酶标仪(美国 BioTeck 公司); L96G 型 PCR 扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司);Bio-Rad 凝胶成像系统(美国伯乐公司)。

2 方法与结果

2.1 基因组 DNA 提取 以宽叶缬草嫩叶为材料,选择北京天根生化科技有限公司提供的 DP-320 新型植物基因组提取试剂盒进行宽叶缬草基因组 DNA 的提取。

2.2 引物设计 宽叶缬草叶绿体 *trnL-F* 序列采用被子植物叶绿体 *trnL-F* 序列通用引物扩增目的片段^[7], *matK* 基因序列引物通过 NCBI 信息中心 Genbank 数据库里查找同源物种(Sequence ID AY362534. 1) *matK* 基因,于 *matK* 基因全序列中找

到保守区,采用 Primer Premier 5.0 软件自行进行引物设计,引物长度设置为(25 ± 2) bp,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 2。

表 2 *trnL-F, matK* 序列通用引物

Table 2 Universal primer of *trnL-F, matK* sequence

编号	引物	T/°C
<i>trnL-F</i>	C:5'-CGAAATCGGGTAGACGCTACG-3'	61.9
	F:5'-ATTGAACTGGTGACACGAG-3'	55.8
<i>matK</i>	S:5'-ATGGAGGAATTCAAAAGATATTTAACG-3'	60.8
	A:5'-TCTGATAAATCTGCCCAACTAC-3'	56.7

2.3 PCR 扩增程序 根据查阅相关文献资料^[8-10],确定宽叶缬草叶绿体 *trnL-F* 序列 PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 45 s, 63.8 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后在 72 °C 中补平 10 min。*matK* 序列 PCR 扩增程序为^[11-12] 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 59.2 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环, 最后在 72 °C 中补平 10 min。

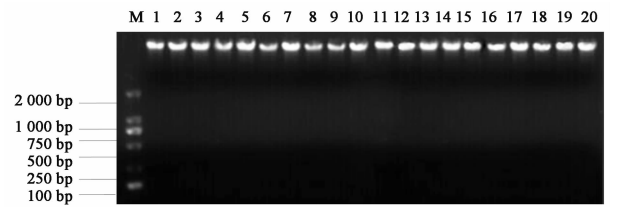
2.4 PCR 扩增体系 根据文献报道与预试验的结果^[13],确定宽叶缬草叶绿体 *trnL-F* 序列 PCR 扩增体系为: 总体积 25 μL, 包含 2 × *Taq* PCR MasterMix 12.5 μL, 引物各 0.1 μL, DNA 模板 10 ng, ddH₂O 补齐。*matK* 序列 PCR 扩增体系为总体积 25 μL, 包含 2 × *Taq* PCR MasterMix 12.5 μL, 引物各 0.1 μL, DNA 模板 10 ng, ddH₂O 补齐。

2.5 宽叶缬草叶绿体 *trnL-F, matK* 序列扩增与测序 试验选用特定的叶绿体 *trnL-F, matK* 序列对贵州省 23 份不同居群宽叶缬草样品进行 PCR 扩增分析, 扩增产物于 1.6% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 1 h 进行检测。合格的宽叶缬草叶绿体 *trnL-F, matK* 序列扩增产物委托天一辉远(武汉)生物科技有限公司进行双向测序。

2.6 数据处理 所得 *trnL-F, matK* 序列测序结果于美国国家生物技术信息中心(The National Center for Biotechnology information, NCBI) 进行序列比对, 检测宽叶缬草 *trnL-F, matK* 序列测序样品在 GenBank 中是否有同源相似 *trnL-F, matK* 序列, 以确定是否为宽叶缬草目标 *trnL-F, matK* 序列。用生物信息学软件 BioEdit 查看 *trnL-F, matK* 序列测序峰形图, 结合峰图, 手动去除序列末尾不稳定测序片段, 对双向测序序列进行拼接。整理完成后利用 MEGA 5.1 软件对各宽叶缬草 *trnL-F, matK* 序列样

品进行多序列比对、差异分析, 统计样品序列碱基差异位点、变异位点、简约信息位点, 计算鸟嘌呤和胞嘧啶含量, K2P (Kimura 2-Parameter) 距离模型计算遗传距离, 并采用最小进化法 (minimum-evolution, ME), 最大似然法 (maximum likelihood, ML), 邻接法 (neighbor-joining, NJ), 非加权配对算数平均法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 4 种常见的构树法构建分子系统发育树。

2.7 基因组 DNA 的质量检测 所提基因组 DNA 的外观显纯白色, 经溶解后的溶液透明, 无黏稠感, 电泳条带清晰、明亮、整齐, 电泳条带基本处于同一水平线, 没有弥散现象, 点样孔基本干净, 见图 1。DNA 的 A_{260/280} 在 1.65 ~ 1.85。

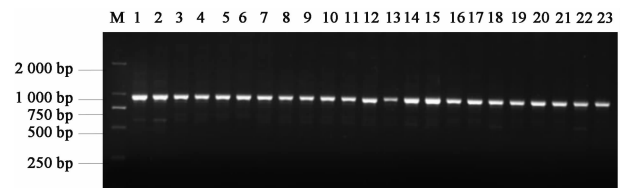


M. marker DL2000; 1. 样品 1; 2 ~ 10. 样品 3 ~ 11; 11 ~ 28. 样品 13 ~ 20; 19 ~ 20. 样品 22 ~ 23 (其中样品 2, 12, 21 已在预实验时提取 DNA 与测序)

图 1 宽叶缬草 DNA 检测电泳

Fig. 1 DNA electrophoretogram of *Valeriana officinalis* var. *latifolia*

2.8 *trnL-F, matK* 序列扩增结果 对 23 份宽叶缬草 DNA 模版进行 *trnL-F, matK* 序列 PCR 扩增, 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳图谱显示, 不同居群宽叶缬草 *trnL-F, matK* 序列 PCR 扩增产物均为一条特异性条带片段, *trnL-F* 序列大小约为 900 bp 左右, *matK* 序列大小约为 1 000 bp 左右, 且试验的全部宽叶缬草 DNA 模版均被扩增, PCR 扩增率达到了 100%, 且所扩增出的条带片段大小均一、明亮、整齐、稳定, 无明显杂带, 见图 2, 3。结果说明, *trnL-F, matK* 序列通用引物特异性好, 适用于宽叶缬草 *trnL-F, matK* 序列的扩增。



M. marker DL2000; 1 ~ 23. 样品(图 3 同)

图 2 不同居群宽叶缬草 *trnL-F* 序列扩增

Fig. 2 Different populations of *Valeriana officinalis* var. *latifolia* *trnL-F* sequence amplification electrophoresis

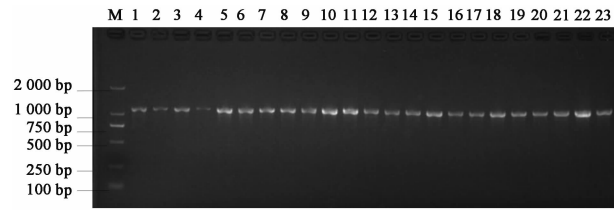


图 3 不同居群宽叶缬草 *matK* 序列扩增
Fig. 3 Different populations of *Valeriana officinalis* var. *latifolia* *matK* sequence amplification electrophoresis

2.9 *trnL-F*, *matK* 序列测序结果

2.9.1 序列测序检测 随机选取一份宽叶缬草

trnL-F, *matK* 序列 PCR 产物对其进行双向测序, 测序结果进行人工校对、拼接后, 于 NCBI 里进行同源比对, 比对发现, *trnL-F* 序列样品与 Genbank 数据库中 Sequence ID AY360118.1 序列覆盖率达到 97%, 鉴别率达到了 99%; *matK* 序列 Sequence ID AY362532.1 的序列覆盖率达到 98%, 鉴别率达到了 99%, 所得序列为目标序列, 故样品 *trnL-F*, *matK* 序列确定为宽叶缬草 *trnL-F*, *matK* 序列。同时, 从样品 *trnL-F*, *matK* 序列测序峰形图 4, 5 可观察, 测序峰形无杂峰、双峰和重叠峰的干扰, 说明所用扩增以及测序方法得到的宽叶缬草 *trnL-F*, *matK* 序列可靠。

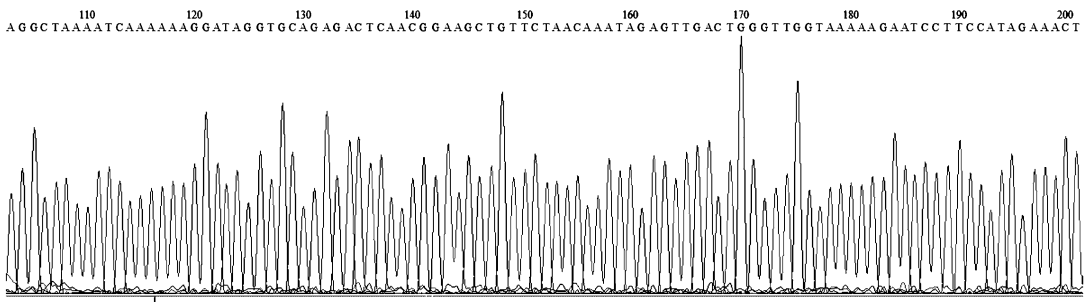


图 4 宽叶缬草 *trnL-F* 序列部分表达
Fig. 4 *trnL-F* sequence of partial screenshots of *Valeriana officinalis* var. *latifolia*

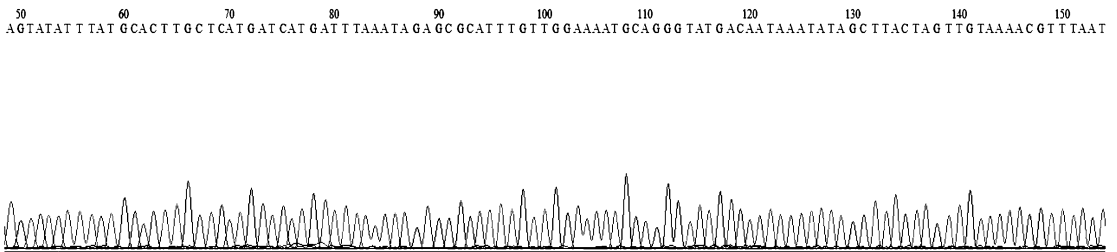


图 5 宽叶缬草 *matK* 序列部分表达
Fig. 5 *matK* sequence of partial screenshots of *Valeriana officinalis* var. *latifolia*

2.9.2 序列特征分析 分别对 23 份宽叶缬草 *trnL-F*, *matK* 序列 PCR 扩增产物进行双向测序, 通过查看测序峰形图, 人工去除 *trnL-F*, *matK* 序列尾部不稳定部分, 通过生物信息学分析软件 Bioedit 对双向序列进行拼接, 继而通过生物信息分析软件 MEGA 5.0 对处理过的不同样品 *trnL-F*, *matK* 序列进行多重比对。结果显示, 试验的 23 条宽叶缬草 *trnL-F* 序列, 长度在 947 ~ 985 bp, 鸟嘌呤和胞嘧啶质量分数为 35.92% ~ 36.55%, 经排位, 序列两端切平后, *trnL-F* 序列长度为 930 bp, 保守位点 924 个, 差异位点 8 个, 包括 381 位点处, 18 号样品碱基 G 被置换为碱基 C; 805 位点处, 15 号样品碱基 T 置

换为碱基 C; 在 807, 808, 809 位点处, 15 号样品连续 3 个碱基 T 置换为碱基 A; 901 位点处, 1 号样品缺失 1 个碱基 T; 911 位点处, 23 号样品插入了 1 个碱基 A; 918 位点处, 16 号样品缺失了 1 个碱基 A, 其中 381, 805, 807, 808, 809 位点为变异位点。试验的 23 条宽叶缬草 *matK* 序列, 长度在 1 080 ~ 1 088 bp, 质量分数为 35.19% ~ 36.64%, 经排位, 序列两端切平后, *matK* 序列长度为 1 055 bp, 保守位点 1 054 个, 差异位点 2 个, 包括 244 位点处, 1, 2, 5, 6, 19 号样品碱基 T 被置换为碱基 A; 1 046 位点处, 6, 22, 23 号样品插入了 1 个碱基 T, 其中变异位点 1 个, 为 244 位点。简约信息位点 1 个, 为 244 位点。

2.9.3 trnL-F 系统树分析 应用 MEGA 5.0 软件通过 K2P 计算出 23 份宽叶缬草居群间 trnL-F 序列的遗传距离为 0.000 0 ~ 0.005 4, 总体遗传距离为 0.000 5, 贵州省宽叶缬草居群间遗传变异较小。其

中 15 号样品与 18 号样品之间的遗传距离最大, 为 0.005 4, 说明 15 号样品与 18 号样品出现了一定的差异性, 其中, 绝大部分宽叶缬草的遗传距离为 0.000 0, 处于一定的稳定状态, 见表 3。

表 3 23 份宽叶缬草居群间 trnL-F 序列的遗传距离

Table 3 Genetic distance of 23 *Valeriana officinalis* var. *latifolia* populations of trnL-F sequences

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
1	0.000 0																								
2	0.000 0	0.000 0																							
3	0.000 0	0.000 0	0.000 0																						
4	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0																					
5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0																				
6	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0																			
7	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0																		
8	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0																	
9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0																
10	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0															
11	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0														
12	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0													
13	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0												
14	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0											
15	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.004 3	0.000 0									
16	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.004 3								
17	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.004 3	0.000 0						
18	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.001 1	0.005 4	0.001 1	0.001 1				
19	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.004 3	0.000 0	0.000 0	0.001 1				
20	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.004 3	0.000 0	0.000 0	0.001 1	0.000 0			
21	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.004 3	0.000 0	0.000 0	0.001 1	0.000 0	0.000 0		
22	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.004 3	0.000 0	0.000 0	0.001 1	0.000 0	0.000 0	0.000 0	
23	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.004 3	0.000 0	0.000 0	0.001 1	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0

基于 trnL-F 序列, 采用 ML, NJ, ME, UPGMA 4 种分析方法于宽叶缬草 K2P 遗传距离的基础上构建聚类, 见图 6, 从聚类分析图谱上观察, 贵州省不同居群宽叶缬草 trnL-F 序列系统树的发育情况基本相似。ML 分析法区分出了 15 号样品, 而 NJ, ME, UPGMA 3 种方法均显示发现 15, 18 号样品明显与大部分的宽叶缬草区分出来。聚类分析显示, 宽叶缬草种内个别居群显示出了有一定的差异性, 15 号样品被单独聚为一组; 其余 22 个样品为一组, 其中 18 号样品又在 0.000 5 阈值处被区分出来。通过观察 15 号样品与 18 号样品宽叶缬草的形态特

征可发现, 15 号居群宽叶缬草相对于其余居群宽叶缬草的叶片较大, 整体的全草高度相对较矮, 而 18 号样品宽叶缬草的叶片革制稍大。贵州省宽叶缬草 trnL-F 序列分析结果与其形态学的观察结果有着一定的关联性, 但其关联性是否就是单纯的两者之间的相关性或是宽叶缬草整个体内系统遗传差异性所导致的形态差异, 以及生长环境的不同所导致, 机制还需进一步进行深究。

2.9.4 matK 系统树分析 应用 MEGA5.0 计算出宽叶缬草居群间的遗传距离为 0.000 0 ~ 0.000 9, 序列总体遗传距离为 0.000 3, 贵州省宽叶缬草居群

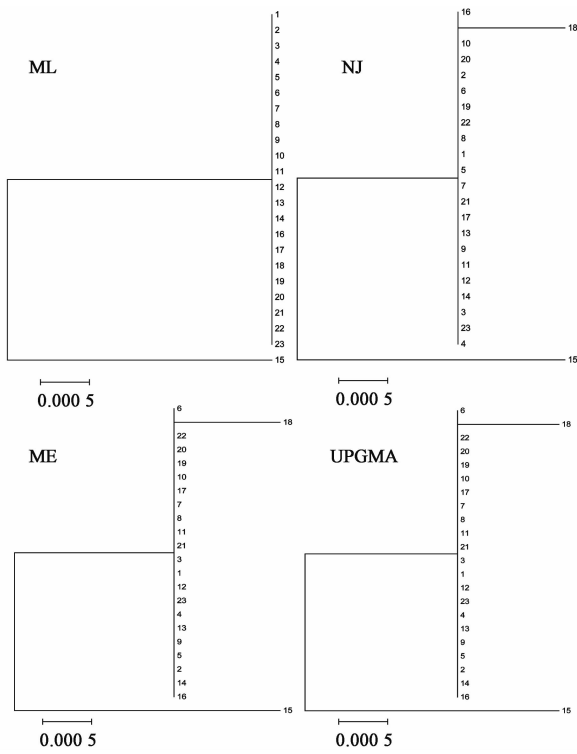


图 6 23 份宽叶缬草居群间基于 *trnL-F* 序列 4 种聚类
Fig. 6 Four clustering graphs based on *Valeriana officinalis* var. *latifolia* populations of *trnL-F* sequence

表 4 23 份宽叶缬草居群间 *matK* 序列的遗传距离

Table 4 Genetic distance of 23 *Valeriana officinalis* var. *latifolia* populations of *matK* sequences

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	0.000 0																						
2	0.000 0	0.000 0																					
3	0.000 9	0.000 9	0.000 0																				
4	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0																			
5	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0																		
6	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0																	
7	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9																
8	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0															
9	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0														
10	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0													
11	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0												
12	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0											
13	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0										
14	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0									
15	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0								
16	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0							
17	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0						
18	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0					
19	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9	0.000 9				
20	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0			
21	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 0	0.000 0
22	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 0	0.000 0
23	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 9	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 9	0.000 0	0.000 0

间遗传变异较小,其中一部分样品之间的遗传距离为 0.000 9,说明这部分样品间还是存在一定的差异性,另一部分宽叶缬草的遗传距离为 0.000 0,处于一定的稳定状态,见表 4。

基于 *matK* 序列,采用 ML,NJ,ME,UPGMA 4 种分析方法于遗传距离的基础上构建聚类分析,见图 7,从聚类分析图谱上观察,贵州省不同居群宽叶缬草 *matK* 序列系统树的发育情况基本相似,且无冲突节点。4 种方法均显示 1,2,5,6,20 号样品聚为一类,与其余宽叶缬草样品区分出来。

3 讨论

trnL-F 序列位于叶绿体基因中的非编码区,是分析分子系统发育最常运用的序列之一。由于 *trnL-F* 序列属于中度重复序列,序列长度适宜,易于扩增和测序分析,且受外界的选择压力小,进化较快,比较适用于种间及种以下水平的植物研究^[14]。试验中,不同居群宽叶缬草 *trnL-F* 序列的扩增与测序试验进行得比较顺利,说明叶绿体 *trnL-F* 序列能够有效地对不同居群宽叶缬草叶绿体基因进行扩增与测序,从而进行结果的分析。从扩增与测序结果可知,不同居群宽叶缬草的 *trnL-F* 序列间存在总体

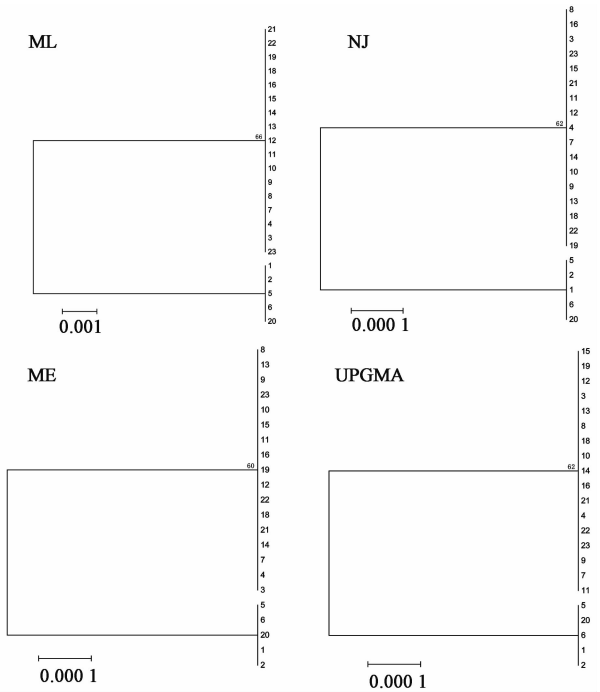


图 7 23 份宽叶缬草居群间基于 *matK* 序列 4 种聚类
Fig. 7 Four clustering graphs based on *Valeriana officinalis* var. *latifolia* populations of *matK* sequence

一致性与个体差异性,这也表明选择 *trnL-F* 序列对贵州省不同居群宽叶缬草进行分析是有意义的。贵州省不同居群宽叶缬草叶绿体 *trnL-F* 序列的分析中,宽叶缬草的种内遗传距离为 0.000 0 ~ 0.005 4,可以看出宽叶缬草种内居群间存在着一定的差异性,*trnL-F* 序列有一定的差异位点,但是属于种内个别居群所显示出的差异性,黔产宽叶缬草 *trnL-F* 序列具有一定的发育稳定性,可用作黔产宽叶缬草优良种的鉴定,系统聚类结果分析表明,黔产宽叶缬草 *trnL-F* 序列所构建的发育树,几乎所有居群样品都聚到了一起,表明宽叶缬草 *trnL-F* 序列具有高度保守性。*matK* 序列是国际 DNA 条形码研究的重要研究对象,通常用于物种间的鉴别,在不同居群的同种植物中也常常作为研究遗传多样性和亲缘关系的研究对象之一。贵州省不同居群宽叶缬草叶绿体 *matK* 序列的研究中,宽叶缬草的种内遗传距离为 0.000 0 ~ 0.000 9,同时,宽叶缬草 *matK* 序列存在个别差异位点,*matK* 序列在黔产宽叶缬草中高度保守,黔产宽叶缬草叶绿体 *matK* 基因在进化中保持一定的稳定性。

trnL-F, *matK* 序列所反映出的是关键序列的保守性,说明宽黔产叶缬草 *trnL-F*, *matK* 序列的进化是基本稳定的,在系统发育的演化关系中,黔产宽叶缬草反映出了一定的同源性与稳定性。

[参考文献]

[1] 王茹静,黄青,雍妍,等. 缬草属植物的化学成分成生物活性研究概况[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1405-1414.

[2] 周颖,方颖,刘焱文. 缬草研究进展[J]. 湖北中医杂志, 2008, 30(10): 61-64.

[3] 王有为,陈倩. 中国宽叶缬草药用功效研究概况[J]. 亚太传统医药, 2005(3): 69-71.

[4] 代泽琴,钱志瑶,周道堂,等. 海拔高度对黔产宽叶缬草中挥发油及乙酸龙脑酯含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(17): 56-58.

[5] HAO D C, HUANG B L, CHEN S L, et al. Evolution of the chloroplast *trnL-trnF* region in the gymnosperm lineages taxaceae and cephalotaxaceae [J]. Biochem Genet, 2009, 47(5/6): 351-369.

[6] Hilu K W, Alice L A. Evolutionary implications of *matK* indels in Poaceae [J]. Am J Bot, 1999, 86(12): 1735-1741.

[7] Kojoma M, Kurihara K, Yamada K. Genetic identification of cinnamon (*Cinnamomum* spp.) based on the *trnL-F* chloroplast DNA [J]. Planta Med, 2002, 68(1): 94-96.

[8] Katayama H, Tachibana M, Iketani H, et al. Phylogenetic utility of structural alterations found in the chloroplast genome of pear: hypervariable regions in a highly conserved genome [J]. Tree Genet Genomes, 2012, 8(2): 313-326.

[9] Bakker F T, Gulham A, Daugherty L C, et al. A *trnL-F* based phylogeny for species of *Pelargonium* (*Geraniaceae*) with small chromosomes [J]. Plant Syst Evolut, 1999, 216(3/4): 309-324.

[10] Kajita T, Kamiya K, Nakamura K, et al. Molecular phylogeny of *Dipterocarpaceae* in Southeast Asia based on nucleotide sequences of *matK*, *trnL* intron, and *trnL-trnF* intergenic spacer region in chloroplast DNA [J]. Mol Phylogenet Evol, 1998, 10: 202-209.

[11] 生书品,严萍,郑传进,等. 何首乌及其常见混淆品的 *matK* 基因序列分析及鉴别[J]. 中药材, 2010, 33(11): 1707-1711.

[12] Muller K F, Borsch T, Hilu K W. Phylogenetic utility of rapidly evolving DNA at high taxonomical levels: Contrasting *matK*, *trnT-F*, and *rbcL* in basal angiosperms [J]. Mol Phylogenet Evol, 2006, 41(1): 99-117.

[13] 李云霞. 基于 ITS 和 *trnL-F* 序列对青藏高原棘豆属植物的分子系统学研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.

[14] 郑丹书. 半夏遗传多样性分子标记研究[D]. 泉州: 华侨大学, 2013.

[责任编辑 顾雪竹]