

基于 *accD* 基因序列的牛至遗传多样性研究*

卓 维^{1,2}, 刘 艳¹, 卢圣鄂¹, 朱晓富¹, 黄红燕¹, 陈双扣², 任风鸣^{1,2**}

(1. 重庆市药物种植研究所·特色生物资源研究与利用川渝共建重点实验室 重庆 408435;

2. 重庆科技学院·工业发酵微生物重庆市重点实验室 重庆 401331)

摘 要:目的 基于 *accD* 基因序列分析不同产地牛至的遗传结构与分化,考察其遗传多样性。方法 以8个居群69份样品为材料,试剂盒法提取植物基因组DNA,同源克隆法获得 *accD* 序列,Sanger测序法双向测序,利用DNAsp、Arlequin等软件进行多态性分析,MEGA软件计算遗传距离并构建NJ发育树。结果 牛至 *accD* 长度为1432-1436 bp,存在10个单倍型与16个变异位点,单倍型多态性为0.595,核苷酸多样性为0.157 50;牛至居群遗传分化较高($G_{st}=0.367\ 51$, $N_{st}=0.469\ 76$, $F_{st}=0.676\ 27$),基因流较低($N_m=0.43$),居群间变异(67.62%)是主要的变异来源。系统发育关系显示10种单倍型形成3大分支,主要以H2为中心形成发散状的系统结构,种群未发生扩张。结论 牛至居群存在较高的遗传多样性与遗传分化,可能主要与生境片段化、种群隔离及生活史特征相关,本研究为牛至种质资源的保护和开发利用提供理论基础。

关键词:牛至 *accD* 基因 单倍型 遗传多样性

doi: 10.11842/wst.20220223006

中图分类号: S567

文献标识码: A

牛至(*Origanum vulgare* L.),又名滇香薷、琦香、接骨草,唇形科(Labiatae)牛至属(*Origanum*)多年生草本或半灌木,主产云南、四川、贵州及新疆维吾尔自治区等地,生于海拔500-3600 m的路旁、山坡、林下及草地^[1]。牛至是一种重要的药食两用植物,既可作为调味剂在西班牙、墨西哥等国家长期食用^[2],又是药源极为丰富价廉的民间中草药^[3],用于发汗解表、消暑化湿、疮疡肿痛。现代药理实验发现,牛至油具有抗病毒、抗菌、抗氧化等效果,不仅对呼吸系统、消化系统疾病等具有显著治疗作用^[4-5],而且是一种绿色安全的理想抗生素替代品,广泛应用于动物养殖行业,已是世界范围内认可的天然饲料添加剂^[6-7]。从2020年起,我国饲料行业全面禁止生产含有促生长类药物饲料添加剂(中药类除外)的商品饲料,减少滥用抗生素造成的危害。牛至作为优良的抗生素替代品,市场需求日益增加,原

料供不应求,野生资源受到严重威胁。但是,我国牛至资源各地分布不均,表型差异大,质量参差不齐,种质资源研究滞后,故通过研究不同产地牛至遗传多样性与遗传分化,以期对牛至种质资源的保护与开发提供理论基础。

遗传多样性是研究品种改良和种质资源创新的基础,变异丰富度决定种群对环境变化的适应力与进化能力。随着分子生物学的快速发展,扩增片段长度多态性(AFLP)、引物结合位点扩增(iPBS)、简单重复序列扩增(SSR)、DNA条形码等分子标记技术已广泛应用于植物多样性研究^[8-10]。近年来,牛至的研究主要集中在化学成分分析^[11]、抑菌抗氧化实验^[12-13]、动物生产^[14]、植物鉴定^[15]等方面,但是关于牛至遗传多样性方面的研究,国外仅有少量研究^[16-18],国内未见报道。国外学者发现不同分布的牛至种具有不同的遗传特性。

收稿日期:2022-02-23

修回日期:2022-08-29

* 重庆市科技局科研机构绩效激励引导专项项目(cstc2021jxjl130031):牛至油-中草药提取物协同抗菌机制及复合型替抗饲料添加剂研发,负责人:任风鸣;重庆科技学院工业发酵微生物重庆市重点实验室开放基金(GYFJWSW-09):乙酰-CoA羧化酶*accD*基因高效表达工程菌发酵体系构建,负责人:卓维;重庆科技局技术创新与应用发展重点项目(jsex-gksbX0144):天然植物“抗生素”——牛至种质资源研究及应用;负责人:任风鸣。

** 通讯作者:任风鸣,副研究员,主要研究方向:中药资源与利用、药用植物基因组研究。

Azizi 等^[16]使用 AFLP 和 SAMPL 技术发现位于德国的牛至种与亚种之间具有 DNA 水平上的高度遗传分化。Karagoz 等^[17]基于 10 个多态 iPBS 标记发现土耳其 *Origanum acutidens* 群体间遗传多样性与种群分化较小。Venkatesha 等^[18]发现 14 个印度牛至种质间存在显著的遗传变异,并且基因型变异系数和表型变异系数与产油量相关。不同地域的牛至种群呈现不规律的遗传分化,植物遗传特性可能是由多种因素相互影响的。

乙酰-CoA 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase, ACCase) 是植物脂肪酸合成途径的限速酶,是碳流进入脂肪酸生物合成途径的重要调控位点^[19]。accD 编码产物是 ACCase 中的 β -CT (Carboxyl transferase, CT) 亚基,其基因表达水平与 ACCase 活性和油脂的合成积累密切相关^[20]。同时,accD 亦是重要的分子标记,已应用于梨 (*Pyrus sorotina*)、油菜 (*Brassica napus*)、绞股蓝属 (*Gynostemma*) 等植物遗传学研究^[21-23]。许可^[24]使用 accD 基因探讨蕨类植物的系统发育与进化研究; Belayneh^[25]和卞阿娜^[26]的研究发现 accD 可作为潜在叶绿体分子标记,用于埃塞俄比亚咖啡 (*Coffea arabica*) 和水仙 (*Narcissus tazetta*) 系统发育与遗传多样性分析。accD 定位于叶绿体或质体基因组上,与核基因组相比,叶绿体基因组具有结构简单、进化速率中等、突变率较低、遗传稳定等特性,叶绿体 DNA 会随母本遗传给后代,无基因重组发生且进化过程中产生的变异可累积,可用于起源进化、种质鉴定、遗传多样性分析等研究^[27]。除此之外,课题组前期研究发现,不同产地牛至种质 accD 表达与精油含量息息相关,可作为牛至种质资源鉴定的候选标记。本研究基于 accD 序列,以来自四川、大理、丽江、昆明、新疆维吾尔自治区等地区的 8 个牛至居群为研究对象,发掘和分析不同牛至种质 accD 的序列特点,并进一步对其遗传多样性和系统进化关系进行探究,旨在为牛至种质资源的综合开

发利用及品种选育提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究涉及 69 个研究对象,采集的牛至野生植物样本来源于云南大理洱源县、剑川县、下关县;昆明西山区;丽江玉龙县、宁蒗县;四川凉山彝族自治州盐源县及新疆维吾尔自治区阿勒泰市布尔津县等地,按照原产地分成 8 个群体,取新鲜嫩叶清水冲洗干净,擦拭后装入含硅胶的密封袋中,使用硅胶快速干燥,保存于 -20℃ 冰箱备用,采集样品信息见表 1。

1.2 植物 DNA 提取

参照植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(购自北京擎科生物有限公司)说明书,使用球磨仪(天津杰灵仪器制造有限公司)以每分钟 1800 次的速率研磨干燥后的样品叶片 2-3 min,称取样品细粉 20 mg,按照说明书提取基因组 DNA。使用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 条带,Nanodrop 光度计(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)测定纯度和质量后置于 -20℃ 备用。

1.3 牛至 accD 基因的克隆

参考 GenBank 收录的 accD 序列 (ID: JX880022.1),采用同源克隆的方法,设计全长引物 accD-F 和 accD-R。试验反应体系为 25 μ L,包括正反向引物 (10 μ mol·L⁻¹) 各 0.6 μ L, 2×High-Fidelity Master Mix (购自北京擎科生物有限公司) 12.5 μ L, ddH₂O 8.8 μ L, 模板 DNA 2.5 μ L。扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 40 个循环。引物序列: accD-F: 5'-ATGCAAAGATGGTGGTTTAA-3'; accD-R: 5'-CTACTTGATTGAATTGGCAT-3'。

1.4 电泳检测

PCR 反应结束后,取 5 μ L PCR 产物置于 1% 的琼脂糖凝胶中电泳,电压 100 V,电流 150 mA,电泳

表 1 样品信息

居群编号	采集地点	纬度(N)	经度(E)	海拔(m)
P1	昆明西山区	N24° 56'97"	E102° 38'03"	2177
P2	大理洱源县	N26° 08'88"	E100° 08'53"	2467
P3	大理剑川县	N25° 95'54"	E100° 33'17"	2438
P4	大理下关县	N25° 43'52"	E100° 06'01"	2569
P5	丽江玉龙县	N27° 00'39"	E100° 21'24"	2648
P6	丽江宁蒗县	N27° 19'17"	E100° 57'99"	3025
P7	凉山盐源县	N27° 23'40"	E101° 37'19"	2552
P8	阿勒泰市布尔津县	N47° 56'46"	E 88° 07'57"	940

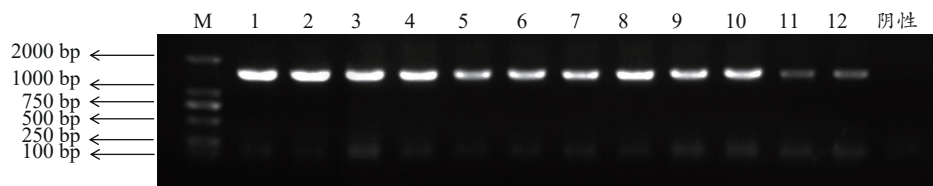


图1 部分扩增产物的琼脂糖凝胶检测电泳图

注:M:2000 Marker;1-12号为牛至accD序列扩增条带,阴性为阴性对照ddH₂O。

表2 牛至居群的单倍型分布

居群	单倍型多态性(Hd)	核苷酸多样性(Pi)	单倍型数量	单倍型
P1	0.910	0.266 96	7	H1(3); H2(1); H3(2); H4(4); H6(1); H9(1); H10(1)
P2	0.697	0.175 09	3	H2(5); H3(6); H8(1)
P3	0.643	0.144 04	3	H2(5); H3(2); H5(1)
P4	0.600	0.144 31	2	H2(2); H5(3)
P5	0.857	0.247 82	3	H1(4); H2(3); H5(1)
P6	0	0	1	H7(4)
P7	0.417	0.000 64	2	H2(8); H4(1)
P8	0.822	0.001 25	2	H2(7); H5(3)

表3 基于accD序列的AMOVA分析

变异来源	自由度(df)	方差和(SS)	方差组分	变异系数(%)
居群间	7	24.420	0.203 37 Vc	67.62
居群内	61	14.189	0.191 72 Va	32.38
总计	68	38.609	0.592 05	100

表4 基于accD序列的遗传距离分析

居群	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
P1	*							
P2	0.001 02	*						
P3	0.000 92	0.000 58	*					
P4	0.001 20	0.000 89	0.000 59	*				
P5	0.000 97	0.000 76	0.000 61	0.000 77	*			
P6	0.001 31	0.001 12	0.000 83	0.000 69	0.001 01	*		
P7	0.000 84	0.000 72	0.000 45	0.000 61	0.000 63	0.000 82	*	
P8	0.000 99	0.000 72	0.000 43	0.000 39	0.000 61	0.000 66	0.000 40	*

20 min,用DNA Marker D2000作为标准参照。电泳结束后,在紫外凝胶成像仪(美国伯乐BIO-RAD公司)中观察并拍照保存。选择单一明亮条带回收后送至北京擎科生物有限公司测序。

1.5 数据分析

测序结果用Bod Edit和DNAMAN软件对序列进行编辑和拼接;使用软件Clustal X和MEGA 7.0.14对齐序列,分析序列特征。利用DNA_{sp}5.0软件计算单倍型多态性(Hd)、核苷酸多样性(Pi)、居群间的遗传分化系数(F_{st})、基因分化系数(G_{st})、基因流(N_m)等值。通过Arlequin软件的分子方差分析AMOVA程序进行

居群间和居群内的遗传变异组成分析,并计算Tajima's D、Fu's F_s statistic 检验值。使用MEGA软件中Kimura2-parameter(K2P)双参数模型计算居群遗传距离,邻接Neighbor-Joining(NJ)模型建立系统发育树。

2 结果与分析

2.1 accD序列特征与单倍型分布

本研究对来自8个居群的69个样品进行基因扩增,经电泳检测后发现在1000-2000 bp之间出现明亮单一目的条带,扩增质量较好,未有拖带杂带现象,以ddH₂O为阴性对照未扩增出条带(图1)。纯化回收

PCR产物后送至公司测序,测序成功率为100%,经拼接校对后显示 $accD$ 序列长度为1432–1436 bp。

使用DNAMAN软件分析 $accD$ 序列特征,发现4种碱基A、C、G、T的平均含量分别为30.60%、15.40%、22.40%、31.60%。69条序列共检测到10个单倍型,单倍型多态性(Hd)为0.595,核苷酸多样性(P_i)为0.157 50,10种单倍型存在16个多态变异位点。不同单倍型类型频率差异较大,常见的单倍型有H2(44.93%)、H3(14.50%)和H5(11.59%),稀有单倍型有H4、H6、H8、H9和H10,频率均为1.45%。其中,来自昆明西山区(P1)的样品单倍型多态性与核苷酸多样性最高,Hd=0.910, P_i =0.266 96,具有7种不同单倍型;来自丽江市宁蒗县(P6)单倍型多态性与核苷酸多样性最低,均为0,单倍型也只检测到一种(表2)。

2.2 遗传多样性及遗传分化

采用Nei算法计算8个居群的遗传分化系数,结果发现基因分化系数 G_{st} =0.367 51, N_{st} =0.469 76, F_{st} =0.676 27,基因流 N_m =0.43,表明牛至居群表现出较高的遗传分化,且基因流水平较低。AMOVA结果显示(表3)牛至居群遗传变异中的67.62%来自居群间,32.38%来自居群内,即遗传变异主要来源于居群间。

2.3 遗传距离

使用MEGA软件中的K2P参数模型计算遗传距离,牛至居群内平均遗传距离为0.000 61(0.000 33–0.001 22),其中遗传距离最小是阿勒泰市布尔津县(P8),遗传距离最大的是昆明西山区(P1)。不同牛至

两两居群间的平均遗传距离是0.000 77(0.000 39–0.001 31),最大值存在于昆明西山区(P1)与丽江市宁蒗县(P6)居群之间,遗传距离为0.001 31,表明两者亲缘关系远;最小值存在大理下关县(P4)与阿勒泰市布尔津县(P8)之间,遗传距离为0.000 39,表明两者亲缘关系近(表4)。结合8个牛至居群的地理位置,发现遗传距离与地理距离之间没有形成对应关系。

2.4 单倍型系统发育关系

基于MEGA软件构建系统发育树,在NJ发育树中牛至居群的单倍型主要分化为3大分支(图2)。分支I包含H2、H5、H6和H9单倍型,自展支持率为86%,分布在除P6以外的7个居群中;分支II包含H3和H10单倍型,自展支持率为69%,分布在P1、P2、P3居群中;分支III包含H1和H4单倍型,自展支持率为58%,分布在P1、P5、P7居群中,而单倍型H7和H8单独列为一进化枝。

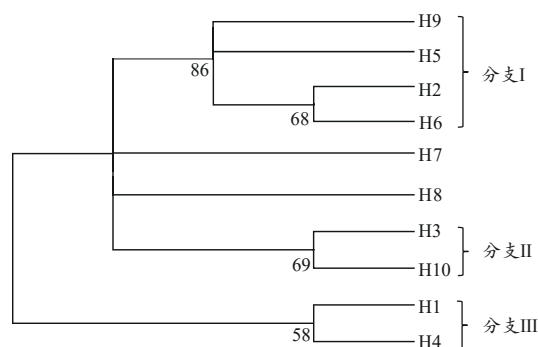


图2 基于 $accD$ 序列构建的单倍型NJ发育树

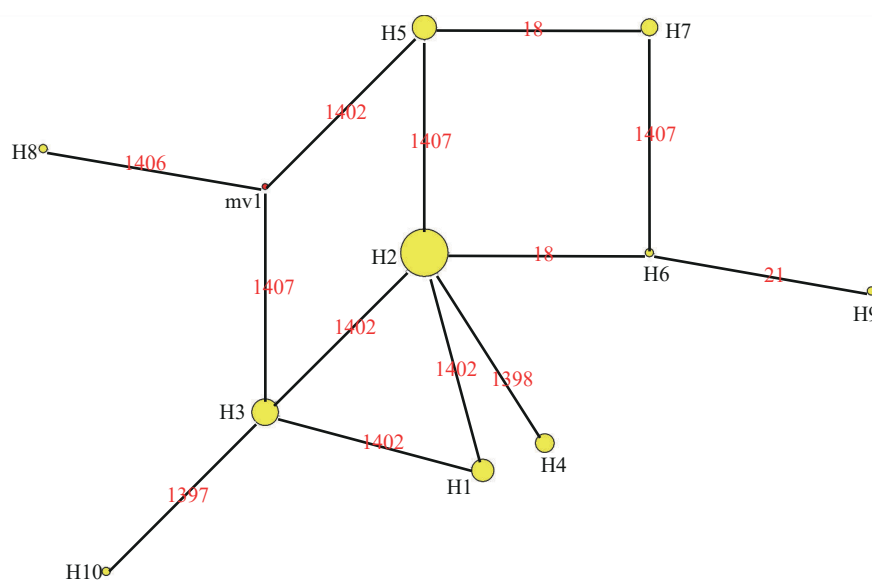


图3 基于 $accD$ 序列构建的单倍型网络图

表5 牛至8个居群的扩张检测

居群	Tajima's D 检验	Fu's Fs statistic 检验
P1	0.207 76, $P<0.05$	-2.808 56
P2	-0.428 54, $P>0.1$	0.394 13
P3	-0.447 94, $P>0.1$	-0.477 60
P4	1.224 74, $P>0.1$	0.626 15
P5	0.241 78, $P>0.1$	-0.145 81
P6	0, $P>0.1$	0
P7	-1.088 23, $P>0.1$	-0.263 48
P8	0.819 80, $P>0.1$	0.818 01

单倍型网络图表明(图3),牛至居群没有向某一方向明显扩张的趋势,四周均有发散,主要以单倍型H2为中心形成了向其他单倍型发散状的系统结构,推测H2是古老单倍型。单倍型网络图与单倍型频率相统一,频率较高的H2、H3、H5突出显示,稀有单倍型H7、H8、H9和H10等分布于外围。

2.5 居群扩张检测

运用Arlequin软件对牛至居群进行中性检验和扩张检测,*accD*序列的Tajima's D、Fu's Fs statistic 检验结果显示(表5),8个居群中只有位于昆明西山区(P1)的Tajima's D检验P值小于0.05且差异显著,错配分布曲线呈不规则多峰型。而整体分析发现,8个牛至居群Tajima's D=0.066 17, $P>0.1$,故牛至居群总体没有接受种群扩张。

3 讨论与结论

单倍型多样性(Hd)和核苷酸多样性(Pi)是衡量遗传变异的重要指标,不仅反映物种的遗传多样性水平,而且能为育种和遗传改良提供参考依据;碱基组成偏向性则可以反映特定基因组在结构和进化方面的总体特征^[28]。本研究通过基因克隆,获得的牛至*accD*基因长度为1432-1436 bp,69条序列共检测到10个单倍型和16个变异位点,单倍型多样性为0.595,核苷酸多样性为0.157 50,表明牛至较高的遗传多样性。碱基组分分析发现,*accD*序列A+T含量为62.20%,G+C的含量为37.80%,A+T含量明显高于C+G,C的含量明显低于其他3种碱基的含量,说明*accD*表现出较强的碱基组成偏向性,这与其他叶绿体基因*rpl20-rps12*^[29],*atpB-rbcL*^[30]的特点较为一致。

牛至居群中常见的单倍型有H2、H3和H5,其中H2(44.93%)的频率最高,是7个居群中(丽江宁蒗县以外)的共享单倍型,H3(14.50%)、H5(11.59%)的频

率次之,分别是3个和4个居群的共享单倍型,表明这3个单倍型是种群中相对稳定存在、适应环境能力强的优势单倍型。而在居群扩张检测中发现Tajima's D=0.066 17($P>0.1$),牛至居群总体没有发生种群扩张,以上2个结果与单倍型网络图中不同单倍型类型的分布情况相符合,清晰地展现了牛至10种单倍型的发育情况与种群未扩张现象。群体遗传距离分析发现,遗传距离最小的是位于大理下关县与阿勒泰市布尔津县的居群,遗传距离最大的是位于昆明西山区与丽江宁蒗县的居群,各个牛至居群的遗传距离与地理距离之间没有形成完全的对应关系。其原因可能是由于不同地区的海拔高度、光照强度和昼夜温度等存在一定差异,生长环境的不同一定程度影响牛至种群的遗传分化,微地理环境下种群出现变异,种质之间存在差异,致使群体间的遗传分化程度并不完全符合地理分布特征。刘景玲等^[31]的研究获得类似结果,即使位于同一锡林郭勒典型草原区,不同采样地的克氏针茅(*Stipa krylovii*)样品遗传距离和实际地理距离之间相关性不显著,在针茅种群遗传分化中起重要作用的是环境水、热差异等环境气候因子。

植物的生活史特性是影响遗传多样性的重要因素,例如非木本植物具有更高的多样性;异交为主的物种比自交种具有更多的遗传变异;广布种,通过普通虫媒传粉的物种具有较高的遗传变异性。基因流Nm指生物个体从其发生地分散出去而导致不同种群之间基因交流的过程,繁育系统方式、基因交流程度和居群隔离机制是影响居群结构的重要因素。据Balloux等^[32]和Vigilant^[33]的界定,遗传分化指数大于0.25表示遗传分化极大,居群间基因流Nm<1.0,各居群会发生强烈分化。本研究中,牛至居群的遗传分化系数Gst=0.367 51, Fst=0.676 27, Nm=0.43,说明各居群间表现出较高水平的遗传分化,基因流水平较低。作为草本植物,牛至的生境并未有特殊要求,但随着近年来人为的开发利用,牛至的分布范围逐渐缩小并碎片化,增加了近亲交配机会。同时,牛至传粉方式以虫媒传粉为主^[34],蜜蜂、蚂蚁等虫媒限制了花粉的长距离传播,导致基因流减少,遗传变异增加,因此推断繁育系统和居群隔离是限制基因流的主要原因。这与Kaoutar等^[35]和王敏求等^[36]的研究结果类似,Kaoutar等^[35]发现*Origanum compactum*可分为3大种群,种群之间高度分化、基因流低,推测是由于不同的生长环境干

扰而形成的种群隔离;王敏求等^[36]发现人为干扰,生境片段化和种群隔离等因素是引起南方红豆杉(*Taxus wallichiana*)基因流变化的主要原因。同时,牛至居群遗传分化结果与 AMOVA 分析保持一致,67.62%的遗传变异来自居群间,32.38%来自居群内,故牛至居群较高的遗传分化可能主要与生境片段化、种群隔离及生活史特征有关,遗传变异主要来自居群间的差异。

ACCCase 作为催化脂肪酸合成的关键和限速酶, *accD* 基因不仅在脂肪酸代谢工程中具有重要作用,而且广泛应用于植物分子遗传多样性研究^[37]。付三雄等^[22]发现甘蓝型油菜中 *accD* 基因高度保守, Tajima's D 检验显示未偏离中性进化,具有 1 个 SNP 位点和较低的核苷酸多样($P_i=0.000\ 09$),明显低于本研究中牛至 *accD* 基因的核苷酸多样性,其原因可能是不同植物中 *accD* 序列长度有差异,基因特点不同,也与供试材料的采集地与数量相关。付三雄等^[22]的研究还推测 ACCCase(*accD*)的多态性可能与油菜含油量的相关,依赖于其表达水平变化及其它因素协同作用。而在本课题组前期对 *accD* 基因表达与含油量相关性分析发现,同一产地 *accD* 基因表达量与牛至精油含量呈正相关,此结果也进一步佐证了前文理论推演的相关观点。除此之外,刘海瑞等^[38]基于 *rbcL-accD* 研究蕁子蕨(*Triosteum pinnatifidum*)种群遗传多样性发现,蕁子蕨主要以居群间变异为主,具有优势单倍型广分布,特有单倍型分散分布的特点,单倍型多态性和遗传多样性分别为 0.409 2 与 0.597,居群间没有检测到显著谱

系地理结构。刘晶^[39]研究中国川梨(*Pyrus pashia*) *accD-psaI* 序列发现,川梨有较高的遗传多样性($H_d=0.718$)和较大遗传分化($G_{st}=0.404$),遗传距离与其地理距离无显著相关,其单倍型的网络图呈辐射发散状分布。这两个研究的结果与本论文结果类似,其单倍型分布格局形成的原因可能是高原及其邻近地区特殊地形和不同采样地生态环境造成的地理隔离或者生境异质化。

牛至作为天然绿色“抗生素”,不仅我国农业部已批准其为饲料药物添加剂之一,而且欧盟食品安全局(EFSA)亦评估牛至精油为安全有效的动物物种的感官饲料添加剂^[40],其抗菌、抗氧化、提高免疫力等作用使其具有广阔的应用前景和发展。中国的牛至资源虽为广布种,但各产地资源量小,而生产中主要通过采挖野生牛至作种,人为开发导致其分布范围缩小,野生居群受人类活动影响较大,在一定程度上破坏了该种的遗传多样性。本研究发现牛至居群存在较高的遗传分化,主要与生境片段化导致的种群隔离有关,所以可采取合理的就地保护策略,保障野生居群的自然更新以维持物种遗传多样性。同时,应开展牛至繁育技术研究及优质高产栽培,通过人工种植扩繁牛至幼苗,建立规范化管理体系,筛选优质品种,增加高质量原材料的供给,在解决市场原料供应与安全问题的同时,减少对牛至野生资源的破坏,保护其野生资源的遗传多样性,有助于牛至产业的可持续发展。

参考文献

- 1 郑万钧,傅立国. 中国植物志(第 66 卷). 北京: 科学出版社, 1977: 242-247.
- 2 徐铮奎. 国外香料植物保健作用新探. 中国保健食品, 2013, 8(1): 20-21.
- 3 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草. 上海: 上海科学技术出版社, 1999:108-108.
- 4 Ghitea T C, El-Kharoubi A, Ganea M, et al. The antimicrobial activity of *Origanum vulgare* L. correlated with the gastrointestinal perturbation in patients with metabolic syndrome. *Molecules*, 2021, 26(2):283.
- 5 Ding Z Y, Sun Q F, Chen S X, et al. *Origanum vulgare* L. leaf extract alleviates finasteride-induced oxidative stress in mouse liver and kidney. *Asian Pac J Trop Bio*, 2021, 11(5):194.
- 6 刘艳,黄红燕,李金荣,等. 天然植物“抗生素”牛至资源及繁育研究进展. 中国野生植物资源, 2020, 39(9):51-56.
- 7 印遇龙,杨哲. 天然植物替代饲用促生长抗生素的研究与展望. 饲料工业, 2020, 41(24):5-11.
- 8 王刚,曹佩,韦学敏,等. 分子标记技术在药用植物种质资源研究中的应用. 中国现代中药, 2019, 21(11):1435-1444.
- 9 王晨宇,刘秀丽,于超. 玉兰亚属及其近缘种植物遗传多样性分析. 分子植物育种, 2020, 18(11):3786-3796.
- 10 张玉秀,刘杨,刘培卫,等. 不同产地温莪术遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(8):2845-2850.
- 11 赵芸,杨云海,王凯博,等. 牛至挥发油的化学成分及其化感作用. 应用生态学报, 2020, 31(7):2257-2263.
- 12 Prazina N, Bacic A, Hadzic H V, et al. The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) from Bosnia and Herzegovina against selected ATCC strains. *Plant Mol Bio*, 2021, 16(22):140-144.
- 13 李娜,武晓英,赵文婧,等. 牛至精油成分分析及其抗氧化性和抑菌

- 活性研究. 中国调味品, 2020, 45(9):29-33.
- 14 刘保光, 郑关民, 王国强, 等. 牛至油药理作用及在禽类生产中的应用. 畜牧兽医学报, 2020, 17(2):169-170.
 - 15 卓维, 任风鸣, 刘艳, 等. 基于 ITS DNA 条形码技术的牛至及其混伪品鉴定研究. 中国野生植物资源, 2021, 40(6):1-6.
 - 16 Azizi A, Wagner C, Honermeier B, *et al.* Intraspecific diversity and relationship between subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. *Plant Syst Evol*, 2009, 281(1):151-160.
 - 17 Karagoz H, Cakmakci R, Hosseini A, *et al.* Analysis of genetic variation and population structure among of oregano (*Origanum acutidens* L.) accessions revealed by agro-morphological traits, oil constituents and retrotransposon-based inter-primer binding sites (iPBS) markers. *Genet Resour Crop Ev*, 2020, 67(6):1367-1384.
 - 18 Venkatesha K T, Singh V R, Spoorthi V, *et al.* Genetic variability, genetic diversity, association and path analysis for economic traits in Indian oregano (*Origanum vulgare* L.). *Int J Agr Sci*, 2018, 10(12):6417-6421.
 - 19 Yin D M, Wang Y, Zhang X G, *et al.* De novo assembly of the peanut (*Arachis hypogaea* L.) seed transcriptome revealed candidate unigenes for oil accumulation pathways. *PLoS One*, 2013, 8(9):e73767.
 - 20 王磊, 裯维言, 张艳, 等. 石粟 *accD* 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析. 南方农业学报, 2013, 44(10):1602-1606.
 - 21 齐丹, 曹玉芬, 田路明, 等. 梨主栽品种叶绿体高变区 *accD-psaI* 的遗传多样性研究. 中国南方果树, 2016, 45(5):23-28.
 - 22 付三雄, 张洁夫, 陈锋, 等. 油菜 β -CT 亚基编码基因 *accD* 的 SNPs 分析及其分子进化. 江西农业学报, 2011, 23(12):7-11.
 - 23 张笑. 绞股蓝属植物系统发育和群体遗传学研究. 西安: 西北大学博士学位论文, 2019.
 - 24 许可. 蕨类植物 *rpoB*, *psbC*, *rbcL* 和 *accD* 基因的分子克隆与进化研究. 北京: 中国科学院大学硕士学位论文, 2013.
 - 25 Belayneh Y M. 埃塞俄比亚咖啡(*Coffea arabica*)种质资源的遗传多样性. 合肥: 中国科学院大学博士学位论文, 2020.
 - 26 卞阿娜. 水仙种质资源遗传多样性及高温与盐胁迫下的生理响应. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2017.
 - 27 贾婧婧, 潘小军, 张敏, 等. 叶绿体的遗传进化. 生物学通报, 2009, 44(11):7-9.
 - 28 Paulauskas A, Galdikaitė-Brazienė E, Radzijeuskaja J, *et al.* Genetic diversity of *Ixodes ricinus* (Ixodida: Ixodidae) ticks in sympatric and allopatric zones in Baltic countries. *J Vector Ecol*, 2016, 41(2):244-253.
 - 29 杨红艳. 基于 *rpl20-rps12* 序列的中国悬钩子属植物系统发育初步研究. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2016.
 - 30 朱弘, 伊贤贵, 朱淑霞, 等. 基于叶绿体 DNA *atpB-rbcL* 片段的典型樱亚属部分种的亲缘关系及分类地位探讨. 植物研究, 2018, 38(6):820-827.
 - 31 刘景玲, 高玉葆, 王金龙, 等. 克氏针茅等位酶分析及其与气候因子的相关关系. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(6):217-221.
 - 32 Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol Ecol*, 2002, 11(2):155-165.
 - 33 Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, *et al.* African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 1991, 253(5027):1503-1507.
 - 34 刘艳, 卓维, 卢圣鄂, 等. 牛至生殖生物学特性研究. 中国野生植物资源, 2021, 40(7):13-18.
 - 35 Kaoutar A, Nathalie M, Josie L, *et al.* Analysis of genetic diversity and population structure of the endangered *Origanum compactum* from Morocco, using SSR markers: Implication for conservation. *Biol Conser*, 2017, 212:172-182.
 - 36 王敏求, 武星彤, 王利宝, 等. 南方红豆杉群体基因流比较分析. 分子植物育种, 2019, 17(19):6269-6275.
 - 37 王保明, 颜士华, 谭晓风. 植物 ACCase 基因的结构功能及表达调控研究. 安徽农学通报, 2021, 27(1):17-24.
 - 38 刘海瑞, 高庆波, 张发起, 等. 基于叶绿体基因序列 *rbcL-accD* 研究荇子蕨的分子遗传多样性和谱系地理结构. 植物研究, 2018, 38(2):278-283.
 - 39 刘晶. 中国豆梨与川梨的遗传多样性和群体遗传结构研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2013.
 - 40 欧盟评估牛至精油作为饲料添加剂的安全性和有效性. 食品与生物技术学报, 2020, 39(2):96.

Study on Genetic Diversity of *Origanum Vulgare* L. Based on *accD* Gene Sequence

Zhuo Wei^{1,2}, Liu Yan¹, Lu Shenge¹, Zhu Xiaofu¹, Huang Hongyan¹, Chen Shuangkou², Ren Fengming^{1,2}

(1. Chongqing Institute of Medicinal Plant Cultivation, Bio-resource Research and Utilization Joint Key Lab.

Sichuan and Chongqing, Chongqing 408435, China; 2. Chongqing University of Science and Technology,

Chongqing Key Lab. of Industrial Fermentation Microorganism, Chongqing 401331, China)

Abstract: Objective To analyze the genetic structure and differentiation of *O. vulgare* from different origins based on the *accD* gene sequence, and to investigate its genetic diversity. Methods Using 69 samples from 8 populations as

materials, plant genomic DNA was extracted by kit method, *accD* sequence was obtained by homologous cloning method, and Sanger sequencing method was used for bidirectional sequencing. The DNAsp and Arlequin software were used for polymorphism analysis, and MEGA software was used to calculate genetic distance and construct NJ developmental tree.

Results The results showed that the sequence length of *accD* was 1432–1436 bp, with 10 haplotypes and 16 variation sites. The haplotype diversity was 0.595, and the nucleotide diversity was 0.157 50. *O. vulgare* populations had higher genetic differentiation ($G_{st}=0.367\ 51$, $N_{st}=0.469\ 76$, $F_{st}=0.676\ 27$) and lower gene flow ($N_m=0.43$), which Inter-populations variation (67.62%) was the main source of variation. The phylogenetic relationship showed that the 10 haplotypes formed 3 major branches which mainly forming a divergent phylogenetic structure with H2 as the center, and the population had not expanded.

Conclusion *O. vulgare* populations had high genetic diversity and genetic differentiation, which was mainly related to habitat fragmentation, population isolation and life history characteristics. This study provides a theoretical basis for the protection, development and utilization of *O. vulgare* germplasm resources.

Keywords: *Origanum vulgare* L., *accD* gene, Haplotype, Genetic diversity

(责任编辑: 刘玥辰)