

基于 ITS 和 *trnL-trnF* 序列的 草木樨种群遗传多样性研究

狄红艳, 骆 凯, 张吉宇*, 段 珍, 霍雅馨, 王彦荣

(草地农业生态系统国家重点实验室, 兰州大学 草地农业科技学院, 兰州 730020)

摘 要:以白花草木樨(*Melilotus alba*)和黄花草木樨(*Melilotus officinalis*) 18 个地理种群植物为材料, 用 ITS 序列和 *trnL-trnF* 序列研究了 2 种草木樨不同种群间的遗传多样性。结果表明: (1) *trnL-trnF* 序列对位后长度为 459 bp, 其中包括 6 个变异位点, 6 个简约信息位点, G+C 含量为 33.1%; ITS 序列对位后长度为 714 bp, 其中包括 5 个变异位点, 3 个简约信息位点, G+C 含量为 48.9%。(2) 在基于 *trnL-trnF* 序列构建的系统发育树中, 2 种草木樨能够形成单系分支, 说明 *trnL-trnF* 序列在草木樨中的鉴别能力较强。(3) 单倍型多样性以及核苷酸多样性分析表明, 黄花草木樨的遗传多样性高于白花草木樨。

关键词: 草木樨; ITS 序列; *trnL-trnF* 序列; 遗传多样性

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Genetic Diversity Analysis of *Melilotus* Populations Based on ITS and *trnL-trnF* Sequences

DI Hongyan, LUO Kai, ZHANG Jiyu*, DUAN Zhen, HUO Yaxin, WANG Yanrong

(State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China)

Abstract: Eighteen populations of *Melilotus alba* and *Melilotus officinalis* were used to study the genetic diversity by ITS and *trnL-trnF* sequences. The results showed as followings: (1) The aligned length of *trnL-trnF* sequences was 459 bp and there were 6 parsimonious informative sites, 6 variable sites and 33.1% G+C content. The aligned length of ITS sequence was 714 bp and there were 4 parsimonious informative sites, 6 variable sites and 48.9% G+C content. (2) All *Melilotus* L. populations could be divided into two groups in the phylogenetic tree of *trnL-trnF*, which showed that *trnL-trnF* sequence had the identify ability in the molecular phylogeny study of *Melilotus* L.. (3) The genetic diversity of *M. officinalis* was higher than that of *M. alba* in both sequences by analyzing haplotypes and nucleotide diversity.

Key words: *Melilotus* L.; ITS sequence; *trnL-trnF* sequence; genetic diversity

草木樨属(*Melilotus* L.)为豆科的一年生或二年生草本植物^[1]。全世界约 19 种, 分布于北半球的温带和亚热带, 在中国主要分布在辽宁、陕西、甘肃、内蒙古等地^[2]。主要生长在山坡、田边、路旁、河岸及荒地草丛。中国现有的草木樨有白花草木樨、黄

花草木樨、细齿草木樨和印度草木樨^[3]。目前生产上利用最广泛的是白花草木樨和黄花草木樨, 草木樨植物主要用作饲料, 也是重要的药用植物, 有清热解毒、健胃化湿等功效^[4]。草木樨适应性很强, 耐旱、耐瘠薄、耐寒、耐盐碱^[5], 既能作牧草和绿肥, 又

收稿日期: 2013-10-31; 修改稿收到日期: 2013-12-17

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项课题(20120304205); 甘肃省农业生物技术与应用开发项目(GNSW-2011-16); 兰州大学中央高校基本科研费自由探索项目(lzujbky-2013-87)

作者简介: 狄红艳(1989—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事作物栽培与耕作学研究。E-mail: HongyanDi_89@163.com

* 通信作者: 张吉宇, 博士, 副教授, 主要从事草类作物育种与生物技术方面的研究。E-mail: zhangjiyu@lzu.edu.cn

能保持水土,防风挡沙^[6],同时还是蜜源植物^[7]。作为豆科牧草它还可以和一些细菌共生固氮^[8]。草木樨植物含有香豆素,在潮湿与发热状态下,草木樨干草不仅产生霉变,而且香豆素也转变成了双香豆素,动物食用后会引起中毒,甚至死亡^[9]。

植物细胞中共有 3 种类型的 DNA,分别为叶绿体 DNA(cpDNA)、线粒体 DNA(mtDNA)和核 DNA(nrDNA)。这 3 种类型的基因组进化速率不同,核基因组进化最快,约为叶绿体基因组的 2 倍,线粒体基因组进化最慢还不到叶绿体基因组的 1/3^[10]。在进行系统学研究时,选择变异速率适宜的 DNA 片段十分重要。由于植物细胞核核糖体内转录间隔区(nrDNA ITS)进化速率较快,可以提供丰富的信息位点,广泛应用于研究植物近缘属间、种间等分类的系统发育关系^[11]。叶绿体基因组 DNA 中的 *trnL-trnF* 是基因间隔区,没有选择压力,片段长度适中,已广泛应用于植物系统学研究^[12]。

目前国内外对草木樨的研究主要集中在形态^[13]、栽培技术^[14-15]、化学成分^[16-17]等方面,在突变体^[18]、根瘤菌^[19]和分子水平的研究较少,尤其是分子系统学研究报道很少。本研究对黄花草木樨和白花草木樨植物 18 个地理种群的 ITS 序列和叶绿体 *trnL-trnF* 序列进行了分析,以天蓝苜蓿(*Medicago lupulina*)、胡枝子(*Lespedeza thunbergii*)和白三叶(*Trifolium repens*)为外类群,探讨 2 种草木樨

的系统学关系,以期为草木樨分子系统方面的研究提供资料,为培育草木樨新品种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的黄花草木樨和白花草木樨均为越年生,除 Ma-LX 05 和 Mo-LX 03 外,其它材料种子从美国国家植物种植系统(National Plant Germplasm System,NPGS)申请,于 2012 年种植于兰州大学榆中校区。幼苗期采集叶片,经液氮速冻后保存在-80℃冰箱。白花草木樨和黄花草木樨各 9 个地理种群。

1.2 目标序列 PCR 扩增

用 SDS 法^[20]提取各植物样品总 DNA。经琼脂糖凝胶电泳检测后,保存于 4℃冰箱中备用。*trnL-trnF* 序列 PCR 扩增所用引物为 *trnL-trnF*_F(CGA-AATCGGTAGACGCTACG)和 *trnL-trnF*_R(ATTG-GAACTGGTGACACGAG),ITS 序列 PCR 扩增所用引物为 EC1(GAGGAAGGAGAAGTCGTAAC)和 EC2(GTTCGCTCGCCGTTACTAAG)。

反应体系为 30 μL:DNA 模板 1 μL,引物各 2 μL,ddH₂O 12 μL,Mix 15 μL。扩增程序为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s,52℃复性 45 s,72℃延伸 1 min,36 个循环;72℃延伸 10 min。外类群天蓝苜蓿、胡枝子和白三叶的 *trnL-trnF* 序列和 ITS 序列

表 1 供试草木樨植物种群的基本情况

Table 1 Information for the 18 populations of *Melilotus*

种名 Species	种群号 Population number	起源 Origin	经度/纬度 Longitude/Latitude
白花草木樨 <i>M. alba</i>	PI 629290	美国内布拉斯加州 Nebraska, United States	99°54'W/41°29'N
	PI 593233	美国威斯康星州 Wisconsin, United States	88°47'W/43°47'N
	PI 595392	美国俄勒冈州 Oregon, United States	120°33'W/43°48'N
	PI 504542	阿斯马拉 Iliorachi, Zoannina	20°46'E/40°2'N
	PI 549128	美国内布拉斯加州 Nebraska, United States	99°54'W/41°29'N
	Ames 21248	葡萄牙贡多马尔 Crestuma Gondomar, Portugal	8°30'W/41°3'N
	PI 606750	土耳其安卡拉 Ankara, Turkey	32°51'E/39°55'N
	PI 508617	美国圣达菲 Santa Fe, United States	105°56'W/35°41'N
黄花草木樨 <i>M. officinalis</i>	Ma-LX 05	中国甘肃 Gansu, China	103°49'E/36°3'N
	PI 595388	加拿大萨斯喀彻温省 Saskatchewan, Canada	106°27'W/52°56'N
	PI 552553	美国内布拉斯加州 Nebraska, United States	99°54'W/41°29'N
	PI 634019	美国内布拉斯加州 Nebraska, United States	99°54'W/41°29'N
	PI 595393	美国明尼苏达州 Minnesota, United States	94°41'W/46°43'N
	PI 595394	加拿大 Canada	106°20'W/56°7'N
	PI 499553	中国新疆 Urumchi, China	87°43'E/43°49'N
	Ames 25658	中国天山山脉 Tianshan Mountains, China	89°27'E/43°46'N
	Ames 24111	中国昭苏 Zhaosu, China	81°37'E/43°9'N
	Mo-LX 03	中国甘肃 Gansu, China	103°49'E/36°3'N

来自 GenBank。

1.3 数据处理与分析

用 Clustal X 软件进行多序列比对,比对后适当进行手工校正。用 MEGA 软件进行最大似然性(Maximum Likelihood)分析,构建系统发育树。用 Kimura2-parameter 距离模型计算序列间进化距离,自展 Bootstrap 检验评价发育树,1 000 次重复。用 DnaSP 对草木樨进行单倍型多样性和核苷酸多样性分析。

2 结果与分析

2.1 不同种群草木樨 ITS 和 *trnL-trnF* 序列特点

trnL-trnF 和 ITS 序列的 PCR 扩增结果如图 1 和图 2 所示,扩增后的大小分别约为 500 bp 和 750 bp。测序后经软件比对,*trnL-trnF* 序列对位后长度为 459 bp,其中包括 452 个保守位点,6 个变异位点,6 个简约信息位点,没有单一位点,G+C 含量为 33.1%。ITS 序列对位后长度为 714 bp,其中包括 699 个保守位点,5 个变异位点,3 个简约信息位点,2 个单一位点,G+C 含量为 48.9%。

trnL-trnF 序列间的遗传距离在 0.000~0.014 之间,平均遗传距离为 0.007,大部分种群间的距离为 0。ITS 序列间的遗传距离在 0.000~0.060 之间,平均遗传距离为 0.002,其中一些种群间的遗传距离为 0。ITS 序列总体遗传距离较 *trnL-trnF* 序列小。

2.2 不同种群草木樨 ITS 和 *trnL-trnF* 序列系统发育分析

以天蓝苜蓿、胡枝子和白三叶为外类群对 *trnL-trnF* 序列和 ITS 序列采用最大简约法构建 2 种草木樨系统发育树(图 3 和图 4)。在基于 *trnL-trnF* 序列构建的系统发育树中外类群天蓝苜蓿、胡枝子和白三叶位于树的基部,自展支持率为 100%。所

有白花草木樨自成一枝,自展支持率为 94%。所有黄花草木樨自成一枝,自展支持率为 75%。黄花草木樨中 PI 595388、PI 552553、PI 634019、PI 595393、PI 595394、PI 499553、Ames 25658 这 7 个聚为一枝,自展支持率为 52%,它们又与当地黄花草木樨 Mo-LX 03 聚为一枝,自展支持率为 84%(图 3)。

从图 4 可以看出外类群天蓝苜蓿、胡枝子和白三叶也位于树的基部,自展支持率为 98%,所有草木樨都聚为一枝,自展支持率为 97%。其中,白花草木樨 PI 595392 和 PI 606750 聚为一枝,自展支持率为 67%;PI 504542 和 Ames 21248 聚为一枝,自展支持率为 67%。黄花草木樨 Ames 25658、PI 595388 和 Mo-LX 03 聚为一枝,自展支持率为 63%,它们又与黄花草木樨 PI 595393、PI 99553 和 PI 552553 聚为一枝,自展支持率为 61%。其余草

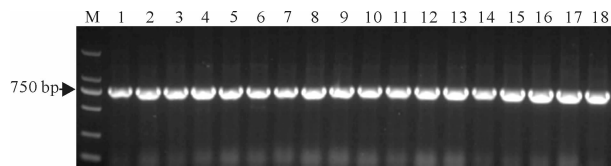


图 2 草木樨 ITS 序列扩增结果
Fig. 2 Results of PCR amplification based on *Melilotus* ITS sequence

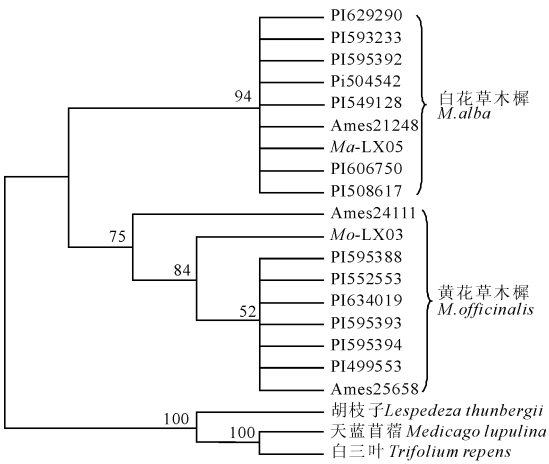


图 3 基于最大简约法构建的 2 种草木樨 *trnL-trnF* 序列系统发育树
分支上的数字为自展支持率(%);居群编号同表 1, 外类群分别为胡枝子、天蓝苜蓿、白三叶;图 4 同
Fig. 3 Maximal parsimonious tree based on *trnL-trnF* sequence of two *Melilotus* species
Numbers above branches indicate bootstrap values(%); See Table 1 for population number, *Lespedeza thunbergii*, *Medicago lupulina* and *Trifolium repens* are outgroup; The same as Fig. 4

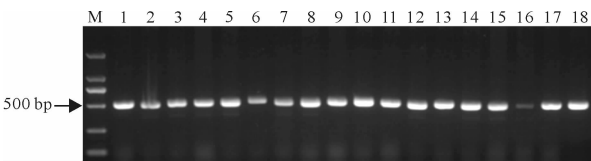


图 1 草木樨 *trnL-trnF* 序列扩增结果
1~9 为黄花草木樨;10~18 为白花草木樨;图 2 同
Fig. 1 Results of PCR amplification based on *Melilotus trnL-trnF* sequence
1~9 are *Melilotus officinalis*;
10~18 are *Melilotus alba*; The same as Fig. 2

表 2 基因组遗传多样性分析
Table 2 Analyses of genome genetic diversity

序列 Sequence	种 Species	序列长度 Length	序列数 No. of sequence	单倍型数 No. of haplotype	单倍型多样性 Haplotype diversity	核苷酸多样性 Nucleotide diversity
<i>trnL-trnF</i>	<i>M. albus</i>	434	9	1	0	0
	<i>M. officinalis</i>	459	9	3	0.417±0.191	0.001 47±0.001 40
	All populations		18	4	0.627±0.073	0.007 58±0.001 78
ITS	<i>M. albus</i>	714	9	4	0.778±0.110	0.001 42±0.000 91
	<i>M. officinalis</i>	714	9	4	0.806±0.089	0.001 74±0.000 91
	All populations		18	7	0.824±0.071	0.002 00±0.001 01

木樨均形成平行枝(图 4)。

2.3 不同种群草木樨的遗传多样性分析

trnL-trnF 序列共有 4 个单倍型,其中白花草木樨 1 种单倍型,黄花草木樨 3 种单倍型;ITS 序列共有 7 个单倍型,其中白花草木樨 4 种单倍型,黄花草木樨 4 种单倍型。通过单倍型多样性以及核苷酸多样性分析表明 2 个序列中都是黄花草木樨的遗传多样性高于白花草木樨(表 2)。

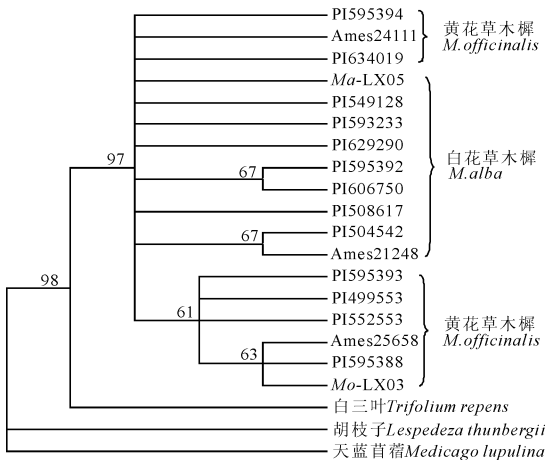


图 4 基于最大简约法构建的 2 种
草木樨的 ITS 序列系统发育树

Fig. 4 Maximal parsimonious tree based
on ITS sequence of two *Melilotus* species

3 讨论

草木樨属是豆科一年生或越年生植物,共有 19 个种。其中栽培最广泛的是黄花草木樨和白花草木樨。草木樨属染色体数均为 $2n=16$,为比较对称的核型^[21]。Kita^[22]根据草木樨属 19 个种的核型研究结果,按染色体大小,将草木樨属分为 4 种类型,其中黄花草木樨和白花草木樨都属于 A 型,说明它们之间的亲缘关系较近。目前对草木樨属的系统进化研究主要是以形态学特征为依据,通过分子手段探讨其物种间关系的研究还较少。Abdel-Moneim

Ibraheim Aboel-Atta^[23]通过 RAPD、ISSR 分子技术和等位酶研究了草木樨属的 2 个种 *M. indica* 和 *M. siculus*,结果表明它们的多态性分别为 71.4% 和 60%。本研究利用叶绿体基因 *trnL-trnF* 序列和核基因 ITS 序列,构建了白花草木樨和黄花草木樨共 18 个地理种群植物的系统发育树。

本研究中白花草木樨和黄花草木樨种群间的遗传距离较小,出现遗传变异位点较少,信息含量偏低。ITS 序列的变异非常高,而且经常出现在非常相近的物种间^[24]。也有研究指出 ITS 序列作为分子标记的应用技术的最大限制是由于进化顺序、变异、甚至分析方法等原因,在间隔区上差异性较小,不适合属内种及种群的标记^[25]。相同种的不同地理种群在基于叶绿体 *trnL-trnF* 序列构建的系统发育树中能够聚为一类,说明它们具有相同的遗传背景。但在基于 ITS 序列构建的系统发育树中不能够完全聚为一类。有研究表明,被子植物中 cpDNA 的进化速率比 nrDNA 低,而无性生殖的大多数植物细胞器基因的突变速度比核基因低^[26],这可能是导致本研究中 *trnL-trnF* 序列和 ITS 序列构建的系统发育树有差异的原因。李云霞等^[27]在基于 ITS 和 *trnL-trnF* 序列的青藏高原棘豆属植物分子系统学研究中指出 ITS 比 *trnL-trnF* 鉴别能力强,这与本研究结果不一致,这可能是由于 ITS 序列和 *trnL-trnF* 序列在不同的物种中的鉴别能力不同。

通过单倍型多样性以及核苷酸多样性分析表明 2 个序列中都是黄花草木樨的遗传多样性高于白花草木樨。黄花草木樨起源于欧洲,白花草木樨起源于亚洲西部,分布范围与引种进化历史不同可能是造成 2 种草木樨遗传多样性差异的主要原因^[28]。其次黄花草木樨为异花授粉且自交不亲和,白花草木樨为异花授粉但自交可育^[29],不同的遗传方式也是造成 2 种草木樨遗传多样性差异的原因。本研究中白花草木樨和黄花草木樨的进化距离较小,今后的研究应选取草木樨属更多的种及地理种群,以及

选择更多的基因进行序列测定,以期能够准确地说 明草木樨属植物的分子进化关系。

参考文献:

- [1] ZHANG X L(张秀玲). The study of growth characteristics of *Melilotus*[J]. *Journal of Heilongjiang Vocational Institute of Ecological Engineering*(黑龙江生态工程职业学院学报),2007,**20**(3):10—18(in Chinese).
- [2] YANG Y F(杨玉凤). The pioneer pasture *Melilotus* that have drought and barren resistance[J]. *Beijing Agriculture*(北京农业),2003,(10):25—26(in Chinese).
- [3] WANG W ZH(王文仲),DING SH H(丁守华),YANG L SH(杨连生). Cultivation and application of biennial *Melilotus*[J]. *Journal of Sichuan Grassland*(四川草原),1984,(2):31—38(in Chinese).
- [4] ZHU W M(祝文妹),WANG R ZH(王润芝). The research advancement on the clinic effect of *Melilotus*[J]. *China Healthcare Frontiers*(中国医疗前沿),2008,**3**(23):23—32(in Chinese).
- [5] MA L(马 丽). The comprehensive utilization of *Melilotus*[J]. *Xinjiang Animal Husbandry*(新疆畜牧业),2005,(4):56—57(in Chinese).
- [6] CONG J M(丛建民),CHEN F Q(陈凤清),SUN CH L(孙春玲). Study on comprehensive development of *Metlilotus suaveolens*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*(安徽农业科学),2012,**40**(5):2 962—2 963(in Chinese).
- [7] ZHAO CH SH(赵春生). Cultivation techniques of *Melilotus*[J]. *Livestock and Poultry Industry*(畜禽业),2008,(6):52—53(in Chinese).
- [8] BROMFIELD E S P,TAMBONG J T,CLOUTIER S,*et al.* Ensifer, phyllobacterium and rhizobium species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation[J]. *Microbiology*,2010,(156):505—520.
- [9] DONG K L(董魁林),ZHANG T Y(张佃元). Be ware of livestock poisoning caused by *Melilotus*[J]. *Feed Research*(饲料研究),1981,(2):50—51(in Chinese).
- [10] 高健. 野生稻与栽培稻 rDNA 的 ITS 序列分析及系统学意义[D]. 长沙:湖南师范大学,2003.
- [11] SAMUEL R,STUESSY T F. Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (Asteraceae,Cichorieae) based on ITS, plastid *trnL* intron,*trnL-F* spacer, and *matK* sequences[J]. *American Journal of Botany*,2003,**90**(3):496—507.
- [12] ZHAO W G(赵卫国),ZHANG ZH F(张志芳),PAN Y L(潘一乐),*et al.* Studies on the cpDNA *trnL-trnF* intergenic spacer sequence in the genus mulberry[J]. *Acta Sericologica Sinica*(蚕业科学),2002,**28**(2):83—86(in Chinese).
- [13] KLEBESADEL L J. Morphological, physiological, and winterhardiness comparisons among latitudinal ecotypes of biennial sweetclover (*Melilotus* spp.) in subarctic Alaska[D]. Agronomy Agricultural and Forestry Experiment Station Palmer, Alaska,1992.
- [14] SUO Y W(索幼文). Cultivation essential of *Melilotus*[J]. *Ningxia Agricultural Science and Technology*(宁夏农业科技),1980,(3):14—23(in Chinese).
- [15] CONN J S,SEEFELDT S S. Invasive white sweetclover (*Melilotus officinalis*) control with herbicides, cutting, and flaming[J]. *Invasive Plant Science and Management*,2009,(2):270—277.
- [16] ZHENG G H(郑国华),ZHANG Q G(张琼光),HUANG ZH J(黄志军),*et al.* The study of chemical constituents of *Melilotus*[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*(中成药),2009,**31**(4):638—640(in Chinese).
- [17] QUIJANO-CELIS C E,PINO J A. Chemical composition of the leaves essential oil of *Melilotus officinalis* (L.) pallas from colombia [J]. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*,2010,**13**(3):313—315.
- [18] HIRSCH A M,LEE A. An open-flower mutant of *Melilotus alba*: Potential for floral-dip transformation of a papilionoid legume with a short life cycle[J]. *American Journal of Botany*,2010,**97**(3):395—404.
- [19] BONYTHON A L,BALLARD R A,CHARMAN N. New strains of rhizobia that nodulate regenerating messina (*Melilotus siculus*) plants in saline soils[J]. *Plant and Soil*,2011,**65**(2):427—436.
- [20] SHAN ZH(单 志),WU H L(吴宏亮),LI CH L(李成磊),*et al.* Improved SDS method for general plant genomic DNA extraction[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*(广东农业科学),2011,(8):113—115(in Chinese).
- [21] LIU Y H(刘玉红). Karyotype compartive studies of nine species on *Melilotus*[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究),1984,**4**(4):145—157(in Chinese).
- [22] KITA F. Studies of morphology of the somatic chromosomes of the genus *Melilotus* (sweet clover)[J]. *Japanese Journal Bot.*,1966,**12**(2):149—174.
- [23] ABDEL-MONEIM IBRAHEIM ABOEL-ATTA. Isozymes, RAPD and ISSR variation in *Melilotus indica* (L.) and *Melilotus siculus* (Turra) B. G. Jacks. (Leguminosae)[J]. *Academic Journal of Plant Sciences*,2009,**2**(2):113—118.
- [24] FUKUDA T,SONG I J,ITO T. Comparing with phylogenetic trees inferred from cpDNA, ITS sequence and RAPD analysis in the genus *Asparagus*[J]. *Environ. Control Biol.*,2012,**50**(1):13—18.
- [25] CHEN J SH(陈剑山),ZHENG F C(郑服丛). Application of ITS sequences in fungi classification and identification[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*(安徽农业科学),2007,**35**(13):3 785—3 786,3 792(in Chinese).
- [26] TANG P(唐 萍),PENG CH(彭 程). The rate and patterns of chloroplast DNA evolution[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究),2010,**45**(6):8—10(in Chinese).
- [27] LI Y X(李云霞),LAN F R(兰芙蓉),CHANG ZH Y(常朝阳),*et al.* Molecular phylogeny of *Oxytropis* DC. of Qinghai-Tibetan Plateau by ITS and *trnL-F* sequences[J]. *Journal of Northwest A&F University*(西北农林科技大学学报),2011,**39**(11):188—193(in Chinese).
- [28] 张保烈,文荣成. 草木樨[M]. 北京:农业出版社,1978:6—11.
- [29] TURKINGTON R A,CAVERS P B,REMPEL E. The biology of Canadian weeds 29 *Melilotus alba* Desr and *M. officinalis* (L.) Lam [J]. *Canadian Journal of Plant Sciences*,1978,**58**(2):523—537.