

27 种大麻资源的 RAPD 聚类分析

张利国

(黑龙江省农业科学院经济作物研究所, 哈尔滨 150086)

摘要: 采用 RAPD 技术对 27 个大麻品种进行了分类研究。从 300 个 10 bp 随机引物中筛选出 34 个扩增效果较好的引物进行扩增, 共产生 261 条带, 其中 233 条为多态性带, 占 89.27%, 根据扩增结果构建反映品种间亲缘关系的 UPGMA 聚类图, 27 个品种可划分为 3 大类。

关键词: 大麻; RAPD; 聚类分析

中图分类号: S563.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2009)02-0014-03

RAPD Cluster Analysis of 27 Hemp Cultivars

ZHANG Li-Guo

(Industrial Crops Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA(RAPD)was used to study the classification of 27 hemp cultivars. Thirty-four 10 bp primers selected from 300 arbitrary primers were applied for amplifying the hemp DNA. Total 261 bands were produced, among which 233 bands(89.27%)were polymorphic. A dendrogram showed that genetic relationships was constructed through an unweighted pair-group method(UPGMA)based on the DNA polymorphism and the 27 cultivars were clustered into 3 main groups.

Key words: hemp; RAPD; cluster analysis

大麻(*Cannabissativa* L.), 属大麻科(*Cannabaceae*), 俗名汉麻、寒麻、线麻、花麻等, 其品种有 150 个左右, 主要分布在亚洲和欧洲, 大麻具有其它作物所不可替代的优良特性, 特别在纺织业和建筑业上, 具有其它作物所不可替代的优势, 现已成为许多国家重要的经济作物。

由于大麻分布广, 变异幅度大, 是一个形态多样化的类群, 并且大麻的引种交流逐年增多, 造成大麻的名称混乱, 即使同种大麻在不同区域的长期繁衍也会朝不同方向进化, 同种异名或同名异种的现象时有发生, 我国经过几千年的人工栽培, 形成了许多地方品种, 给大麻的种质划分, 扩大栽培等方面带来不便。

多年来国内对大麻的研究工作主要集中在引种、栽培、区划及少量品种选育等方面, 对大麻遗传多样性及育种的基础研究比较少。RAPD 标记技术是从分子水平研究大麻分化较合适的方法^[1], 由于该技术操作

简单快速, 成本低廉, 且可以在没有任何分子生物学研究基础的前提下, 对大麻进行多态性分析。

本研究选用在国内具有代表性的大麻栽培品种, 利用 RAPD 分子标记构建其基因组指纹图谱, 为大麻种质资源研究和遗传育种提供更多的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

18 个省区的 27 份大麻材料, 均来自黑龙江省农业科学院经济作物研究所大麻资源库(见表 1)。

随机引物为 Operon 公司的 OP 系列^[2,3], 共 15 组: OPA、OPE、OPG、OPH、OPO、OPP、OPQ、OPR、OPT、OPU、OPV、OPW、OPX、OPY、OPZ, 总计 300 条。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 本试验采用改进的 CTAB 法提取大麻的 DNA: 取现蕾前期的等量雌雄株叶片, 研磨至粉末后迅速放置于预热到 65℃的 2×CTAB 缓冲液(含 PVP), 酚、氯仿抽提, 最后用 75%乙醇(100 μL)清洗两次, 干燥后溶于 TE 缓冲液(pH8.0)。分光光度计测量所提取 DNA 浓度和纯度, 达到标准后分装, 置于 -20℃保存。

收稿日期: 2008-11-31

基金项目: 黑龙江省农业科学院创新工程项目(2006-2008)

作者简介: 张利国(1978-), 男, 黑龙江哈尔滨人, 硕士, 研究实习员, 从事分子细胞遗传学方面的研究。Tel: 13804522396; E-mail: zlg86@yahoo.com.cn.

表 1 27 份大麻栽培品种

编号	资源名称	主要分布省份	编号	资源名称	主要分布省份
1	五常	黑龙江	15	宝鸡	陕西
2	勃利	黑龙江	16	淮阴	江苏
3	永宁	宁夏	17	重庆	四川
4	中卫	宁夏	18	温江	四川
5	塑原	山西	19	湟中	青海
6	昌图	辽宁	20	西宁	青海
7	祥云	云南	21	长白山	吉林
8	沧源	云南	22	寒麻	安徽
9	武都	甘肃	23	叶集	安徽
10	平邑	山东	24	邢台	河北
11	郯城	山东	25	宣化	河北
12	信阳	河南	26	托克托	内蒙
13	桐乡	浙江	27	霍城	新疆
14	平湖	浙江			

1.2.2 PCR 反应体系的建立 对 dNTP、TaqDNA 聚合酶和引物的浓度进行了比较试验 热循环状态中, 影响试验的主要是预变性时间和退火温度 延伸温度是

表 2 适宜大麻分析的 RAPD 引物(5' -3')

引物	序列	引物	序列	引物	序列
OPA-01	CAGGCCCTTC	OPR-08	CCCGTTGCCT	OPV-17	ACCGGCTTGT
OPA-02	TGCCGAGCTG	OPR-12	ACAGGTGCGT	OPW-09	GTGACCGAGT
OPA-12	TGGCGGATAG	OPS-17	TGGGGACCAC	OPW-12	TGGGCAGAG
OPA-15	TTCCGAAACC	OPS-20	TCTGGACGGA	OPW-16	CAGCCTACCA
OPE-03	CCAGATGCAC	OPT-08	AACGGCGACA	OPW-17	GTCTGGGTT
OPE-16	GGTGACTGTG	OPT-13	AGGACTGCCA	OPX-09	GGTCTGGTTG
OPG-02	GGCACTGAGG	OPU-05	TTGGCGGCCT	OPX-13	ACGGGAGCAA
OPG-04	AGCGTGCTTG	OPU-12	TCACCAGCCA	OPX-17	GACACGACC
OPG-14	GGATGAGACC	OPU-15	ACGGGCCAGT	OPY-11	AGACGATGGG
OPH-18	GAATCGGCCA	OPU-17	ACCTGGGAG	OPZ-12	TCAACGGGAC
OPO-10	TCAGAGCGCC	OPV-07	GAAGCCAGCC		
OPO-15	TGGCGTCCTT	OPV-12	ACCCGCCACT		

1.2.4 数据的记录与分析 经电泳获得的基因组 DNA 指纹图谱 在两次试验中均能稳定出现的条带, 用于数据分析。

参照 Williams 等的方法^[5], 记录时按 RAPD 扩增的条带有无分别赋值, 有带记为 1, 无带记为 0, 不分强弱 根据 Nei 和 Li 方法^[6] 计算遗传距离和遗传相似性。遗传距离是用基因频率的函数表示的种群间的遗传差异, 遗传距离越大, 说明亲缘关系越小; 反之, 则亲缘关系越大。计算公式: 遗传距离 $GD=1-GI$, 遗传相似性 $GI=2N_{xy}/(N_x+N_y)$, N_x 、 N_y 分别表示 X、Y 两个个体或两个物种各自拥有的 RAPD 标记数。 N_{xy} 表示 X、Y 两个个体或两个物种共同拥有的 RAPD 标记数。 同时用 MEGA2.1 软件进行 UPGMA (unweighted pair group average) 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 大麻品种的 RAPD 多态性及遗传变异

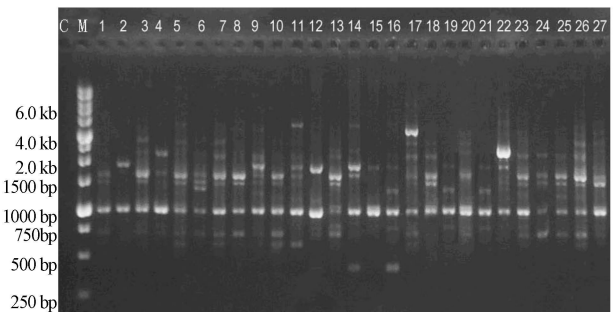
不同引物间其扩增带数和单态性带数具有一定的差异(见图 1), 34 个核苷酸引物共扩增出 261 条带, 其中单态

由 TaqDNA 聚合酶本身特性决定, 一般不需调整。模板 DNA 的纯度对扩增的特异性影响很大, 模板 DNA 的用量宁可少量, 但要纯些^[4]。

经试验确定本研究的 RAPD 反应体系: 引物浓度为 $1.0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, dNTP 为 $120\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 模板 DNA 为 45 ng, TaqDNA 聚合酶为 2 U, 镁离子浓度为 $2\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。反应热循环程序为: 预变性 94°C , 4 min; 变性 94°C , 50 s; 退火 36°C , 1 min, 72°C 延伸 3 min, 循环 40 次; 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存。

1.2.3 引物筛选 随机选取两个样品作模板, 利用稳定的试验体系对所有的 300 个引物进行扩增, 并重复一次, 以期获得稳定的试验结果, 有些引物虽然扩增条带清晰, 但位点数少于 3 个, 这类引物不适用, 从中筛选出扩增条带数较多、清晰度高、重复性好的引物作为聚类分析用的引物, 共筛选出 34 个引物(见表 2)。

带 28 条 多态带 233 条 多态位点比率为 89.27%, 计算公式为: 多态位点比率 $P=$ 具有多态的位点数/检测到的位点数。各个引物检测到的 RAPD 位点在 5~17 个, 可见, 由于大麻是异花授粉作物, 其异质性程度较高。



1~27 同表 1, C 为空白对照, M 为 Marker
图 1 引物 OPA-02 对 27 份大麻品种扩增的基因组 DNA 指纹图谱

其中 34 个核苷酸引物对安徽叶集大麻所扩增的多态位点数最多, 为 124 个, 多态位点比率为 53.22%; 对山西塑原大麻所扩增的位点数最少, 为 69 个, 多态位点比率为 29.61%。多态位点明显低于总的多态位

点比率 89.27%。

谱带统计的结果是:不同引物扩增出的带数不同;同一引物在不同供试材料间扩增出的带数也不相同。共有带越多,带型越相似的种群亲缘关系越接近。

大麻的多态位点比率较高,这与大麻的生态环境、分布密不可分。27 种大麻资源几乎分布全国,所以具有丰富的遗传多样性。大多数引物对不同品种的扩增产物存在显著的个体多态性,这些个体多态性片断是进化中变异活跃的片断,它们反映了品种的分化和变异程度,而那些品种间所共有的片段则为进化中保守的。

多态位点比率是衡量一个种群内遗传变异水平高低的一个重要指标。一个种群多态位点比率高,说明这个种群适应环境能力较强;反之,这个种群适应环境能力较弱,在长期的进化中被淘汰的可能性就越大。

其中,叶集、西宁、霍城和寒麻多态位点比率高,说明这几个品种适应环境能力较强;而塑原多态位点比率很

低,只有 29.61%,说明这个品种适应环境能力较弱。

2.2 大麻品种间的聚类分析

经计算,大麻各品种间的遗传距离为 0.0511 ~ 0.5912,平均为 0.3839,变化幅度较大。遗传距离最大的是西宁(20)和勃力(2),遗传距离为 0.5912,说明其亲缘关系最远,霍城(27)与湟中(19)之间的遗传距离次之,为 0.5624。遗传距离最小的是勃利(2)和昌图(6),为 0.0511,说明其亲缘关系最近,托克托(26)与湟中(19)的遗传距离也较小,为 0.0793。

根据 27 个品种间的遗传距离,经 UPGMA 聚类分析可得如图 2 的树状图,从中我们可以清楚的看出各个品种之间的亲缘关系,当遗传距离为 0.336 时,可将 27 种大麻分为 3 类, A 类包括 10 种大麻,为 11、7、8、13、14、22、23、17、18、24(见图 2), B 类只有两种 20 和 27, C 类包括 2、6、1、21、9、10、26、19、25、5、15、16、12、3、4 共 15 种大麻。

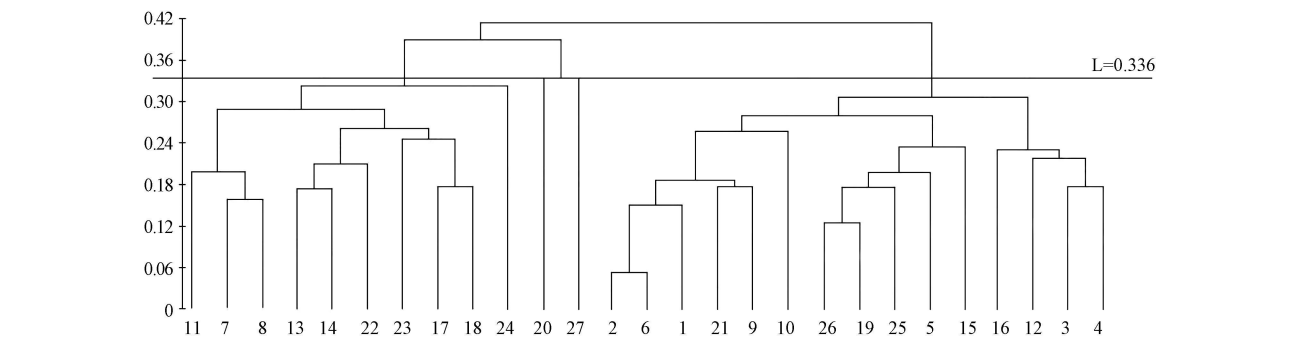


图 2 27 个大麻品种基于 RAPD 数据的 UPGMA 聚类图

从表 1 和图 2 可以看出,大麻的分类呈现出一定的地域特征,同一省或者同一地区的大麻往往聚为一类,如云南(7、8)、浙江(13、14)、安徽(22、23)、四川(17、18)的各两种大麻都聚为了 A 类,东北地区的四个品种(1、2、6、21)以及宁夏的两个品种(3、4)同属于 C 类,同时发现 A 类中大部分品种属于长江以南省份, C 类中大部分品种属于长江以北地区,而 C 类的品种比较少,只有托克托(26)和霍城(27),同属于西北部地区,这是大麻长期进化中适应当地环境的结果,这也进一步证明了 RAPD 技术用于分析大麻亲缘关系的可靠性。

但是也有部分品种不是按地域分布聚类的,即使是属于同一省的品种,比如邢台(24)和宣化(25)同属河北省,但邢台为 A 类、宣化为 C 类,山东的郯城(11)和平邑(10)分属 A 类和 C 类。具有一定的地域混杂性,这有可能是种质资源交流的结果。总之,大麻的分布总体上呈现出一定的地域性,又有一定的地域混杂性。

3 结语

就目前的报道来说,大麻的核型类型有 1B、2B、2A 三种类型,均属于比较原始的类型,基于 RAPD 的大麻聚类分析,是否能与其核型基本相对应,哪些同一地区又不属于同一 RAPD 分类的品种,它们的进化趋势是

否相同,这些都是我们很感兴趣的问题,细胞学标记是非常稳定可靠的分类依据,核型指标在种内相当恒定,即使数目相同,在染色体组中不同类型染色体的数量和位置也不同,在目前大麻研究基础比较薄弱的情况下, RAPD 技术与细胞学标记的综合应用将会有效克服单一方法存在的局限性,获得快速稳定的分类结果。为今后大麻的遗传变异、杂交育种、品种引进以及分类,提供研究基础。

参考文献:

[1] 宋书娟,刘卉,邵宏.大麻性别连锁的特异 DNA 标记的初步研究[J].中国药物依赖性杂志,2001,10(3):182-184.

[2] Faeti V, Maodolino G, Ranalli P. Genetic diversity of *Cannabis sativa* germplasm based on RAPD markers[J]. Plant Breeding 1996 11(5): 367-370.

[3] 苏友波,朱颖,林春等.大麻 RAPD 分子标记引物筛选[J].中国麻业,2002,24(5):12-16.

[4] 卢江.随机放大多态性 DNA [J].植物学报,1993,35(增刊):119-127.

[5] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA Polymerphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic morkors[J]. Nucleic Acids Res., 1990(18): 6531-6534.

[6] Nei M, W H Li. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1979, 74: 5267-5273.