

大麻品种遗传多样性的 AFLP 分析

胡尊红 郭鸿彦 胡学礼 陈璇 刘旭云 郭孟璧 张庆滢 许艳萍 郭丽芬 杨明

(云南省农业科学院经济作物研究所, 昆明 650205)

摘要: 利用 POPGENE 3.2 软件对 13 个不同来源的大麻群体进行遗传多样性分析。结果显示: 云南地区的大麻群体具有最高的遗传多样性水平 ($PPB = 88.82\%$, $He = 0.3000$, $I = 0.4571$), 其次为黑龙江群体 ($PPB = 75.66\%$, $He = 0.2572$, $I = 0.3897$)。13 个大麻群体的多态位点百分率 (PPB) 为 92.11% , Nei's 总遗传多样性 (Ht) 为 0.3837 , Shannon's 信息指数 $I = 0.5374$ 。群体内遗传多样性 (Hs) 为 0.1640 , 群体间的遗传分化系数 (Gst) 为 0.5725 , 总的遗传变异中有 57.25% 发生在群体间, 42.75% 发生在群体内。根据 Nei's (1978) 的方法计算了 13 个大麻群体间的遗传距离和遗传一致度。结果显示: 各群体间的遗传一致度在 $0.6556 \sim 0.9258$ 之间, 其中四川群体和广西群体间具有最高的遗传一致度 (0.9258); 云南群体与贵州群体和四川群体间遗传一致度分别为 0.9196 、 0.9173 。所有群体中甘肃群体和山西群体遗传一致度最低为 0.6556 , 说明大麻种内具有较大的遗传变异。

关键词: 大麻; AFLP; 遗传多样性

Genetic Diversity of *Cannabis sativa* L. Based on AFLP Analysis

HU Zun-hong, GUO Hong-yan, HU Xue-li, CHEN Xuan, LIU Xu-yun, GUO Meng-bi,

ZHANG Qing-ying, XU Yan-ping, GUO Li-fen, YANG Ming

(Industrial Crop Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650205)

Abstract: Genetic diversity of 13 *Cannabis* populations from different sources was analyzed by POPGENE 3.2 Software. AFLP analysis showed that the Yunnan population had the highest level of genetic diversity ($PPB = 88.82\%$, $He = 0.3011$, $I = 0.4571$), and then the Heilongjiang population ($PPB = 75.66\%$, $He = 0.2572$, $I = 0.3897$). The percentage of polymorphic loci (PPB) of 13 *Cannabis* populations was 92.11% . Nei's total genetic diversity (Ht) was 0.3837 , the genetic diversity (Hs) was 0.1640 . Coefficient of genetic differentiation among populations (Gst) was 0.5725 , it means that 57.25% of the total genetic variation occurred among populations, and 42.75% genetic variation in different populations. To further analyze the genetic differentiation among populations, the genetic distance and genetic identity of *Cannabis* were calculated according to Nei's (1978) method. The results showed that the genetic identity among populations was from 0.6556 to 0.9258 , the highest degree of consensus between Guangxi population and Sichuan population was 0.9258 . Genetic identity between Yunnan population and Guizhou population or Sichuan population were 0.9196 and 0.9173 . Gansu and Shanxi population with lowest genetic identity in all populations was 0.6556 . The results indicated that rich genetic diversity among 13 cannabis populations. This study analyzed genetic diversity of cannabis populations in molecular level, provided scientific evidence for the protection of seeds, breeding, evolution study of industrial hemp.

Key words: *Cannabis sativa* L.; AFLP; Genetic diversity

大麻 (*Cannabis sativa* L.) 是大麻科 (Cannabi-
nace) 大麻属 (*Cannabis*) 一年生草本植物, 又名汉

麻、火麻、线麻等, 多为雌雄异株, 雌雄比例约为 $1:1$,
也有在人工选择压力下得到的雌雄同株植株^[1-2]。

收稿日期: 2011-08-09 修回日期: 2011-09-15

基金项目: 国家麻类产业技术体系建设项目 (CARS-19-E05)

作者简介: 胡尊红, 硕士, 研究实习生。研究方向: 主要从事遗传育种与分子遗传研究。E-mail: huzh0810@yahoo.com.cn

通讯作者: 杨明, 研究员。研究方向: 主要从事大麻遗传育种研究。E-mail: ymhemp@163.com

大麻为二倍体,单属单种,染色体数为 20 条,常规染色体 18 条,雄株含有 1 条 X 和 1 条 Y 染色体,雌株有 2 个 X 染色体^[3-4]。我国大麻品种资源丰富,是我国最古老的栽培作物之一,主要分布在辽宁、云南、广西等省份^[1]。大麻的综合经济利用价值非常高,其产品涉及纺织、造纸、建材、复合材料、食品及饲料等几乎人类生活所需各个方面,其子油含有丰富的不饱和脂肪酸,如亚麻酸和亚油酸^[2]。到目前为止,世界上已选育出 30 多个应用于生产的工业大麻品种,在政府有关部门的监管下种植开发。从 20 世纪 90 年代开始,云南省农业科学院开展了工业大麻品种的选育及利用研究工作,已成功选育出目前国内仅有的云麻 1 号、云麻 2 号、云麻 3 号、云麻 4 号和云麻 5 号 5 个低毒、高产、优质、适合低纬度地区推广种植的工业大麻品种,为中国的高毒大麻禁种、替代种植及工业大麻产业的发展做出了重要贡献^[5]。

扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 具有多态性高、DNA 用量少、无需预知基因组序列信息、稳定性好等优点^[6],此技术已被应用于水稻^[7-9]、玉米^[10-11]、小麦^[12-15]、棉花^[16-18]、香蕉^[19]和燕麦^[20]等主要作物。随着分子标记技术的不断完善和发展,已应用于大麻种质分子鉴定、性别连锁标记、遗传多态性分析等方面的研究。Gillan 等^[21]和 Mareshige 等^[22]分别运用 RAPD 和 ISSR 方法对 HPLC 无法区别的大麻材料进行序列分析,结果表明 RAPD 技术可以成功鉴定 HPLC 技术无法区分的样本;ISSR 技术能区别 THC 含量相似和 CBD 相差较大的大麻样品,证实了 ISSR 技术可应用于多个大麻品种间遗传距离分析、亲缘关系的鉴定和大麻毒品物证检测。陈其军等^[23]利用 RAPD 技术用引物 S401 扩增得到 1 条约 215kb 雄性多态性片段,并对该片段进行了克隆和序列分析,将其转化为重复性和特异性更好的 SCAR 分子标记。Alghanim 等^[24]运用 SSR 标记在两个大麻单交后代上进行性别连锁标记测试,其中 6 个 SSR 标记是呈多态性,但是最终没有和性别连锁相关的。Flachowsky 等^[25]最早将 AFLP 技术应用在大麻植物上,试验了 39 个引物组合得到了 1~3 个雄性特异带,结果发现雄株丰富的性别连锁标记数量和这些标记与雄性植株完全分离,证实大麻植物中雄性染色体的存在。Peil 等^[26]通过分析 X 和 Y 染色体上 AFLP 标记来分析性别

染色体的结构,依靠 X 和(或)Y 染色体上的片段存在与否,将性别染色体上的标记被分成不同的组,发现 5 个性染色体标记和雄性 Y 染色体上两个完全连锁标记。Shannon 等^[27]通过 AFLP 技术采用 10 对引物对 3 个纤维型大麻品种和 1 个药用大麻品种进行扩增比较,共获得 1206 条谱带,其中 88% 为多态性谱带,18 条谱带在所有试验大麻品种间具有稳定的遗传多态性。郭佳等^[28]选用 55 对 AFLP 引物组合对 12 个大麻地域品种进行筛选,选出 5 对多态性好的引物组合共获得 285 条带,其中 99 条多态性条带和 10 条品种特异带,说明 AFLP 对于大麻具有很高的分辨率。因此,利用 AFLP 对大麻品种鉴定及遗传多样性分析是可行的,为今后深入地研究大麻植物遗传研究奠定了良好的基础。虽然国内外学者已采用 RAPD、SSR、AFLP 等标记从分子水平对大麻进行了研究,然而对大麻品种遗传多样性的系统性地分析仍是一项空白。本研究拟对我国主要产区的大麻品种和野生资源开展 AFLP 标记的遗传多样性分析,为便于深入地掌握品种资源遗传信息,探索品种资源间亲缘关系,对挖掘优良种质基因、新品种选育及保护、种质创新等方面研究具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

选择我国大麻主产区不同纬度、不同海拔等不同生态环境的地方品种、野生类型及选育品种,均采自云南省农业科学院经济作物研究所麻类研究中心品种圃(表 1)。

1.2 DNA 的提取

参照陈其军等^[23]方法并稍加改进提取基因组 DNA。现蕾期对每份材料雌雄株各随机选取 10 株,每株取 1~2 片叶构成品种雌雄混合 DNA 池,用于提取 DNA。

1.3 AFLP 分析

根据 Vos 等^[6]的方法进行适当调整。采用分步法对模板 DNA 进行酶切和连接。用限制性内切 *Eco*RI、*Mse* I 对基因组 DNA 双酶切。酶切体系 20 μ l,包含 DNA 2.0 μ l (100ng),*Eco*RI (5U/ μ l) 0.3 μ l, *Mse*I (10 U/ μ l) 0.5 μ l, 10*Eco*RI buffer 2.0 μ l, 100 $\times$ BSA 0.2 μ l, ddH₂O 15.0 μ l,混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 8h。连接体系 30 μ l,包含酶切产物 5 μ l, 10 $\times$ T₄连接酶 buffer 3.0 μ l, *Eco*RI 接头(50 pmol/ μ l)

表 1 供试大麻品种资源材料及编号

Table 1 The varieties resource and code of *Cannabis sativa* L.

序号 No.	品种编号 Cultivar code	来源 Origin	序号 No.	品种编号 Cultivar code	来源 Origin
1	1	云南昆明	26	289	贵州威宁
2	2	云南昆明	27	301	欧洲
3	3	云南昆明	28	400	内蒙古
4	4	云南昆明	29	406	贵州贵阳
5	8	云南昆明	30	428	贵州水城
6	34	云南昆明	31	435	甘肃环县
7	52	云南临沧	32	438	黑龙江哈尔滨
8	81	云南昆明	33	442	黑龙江拜泉
9	102	云南红河	34	443	黑龙江北安
10	124	云南昆明	35	446	黑龙江嫩江
11	165-A	云南中甸	36	448	黑龙江齐齐哈尔
12	176	云南大理	37	449	黑龙江肇州
13	179-B	云南丽江	38	455	吉林通化
14	195	云南西双版纳	39	457	吉林白山
15	223	吉林德惠	40	460	辽宁凌源
16	224	安徽六安	41	462	辽宁绥中
17	230-B	云南大理	42	464	内蒙古赤峰
18	255	云南玉溪	43	466	四川
19	258-B	甘肃古浪	44	469	山西长治
20	265-B	安徽	45	474	山西临汾
21	271	广西巴马	46	477	陕西富县
22	273	广西岚山	47	480	陕西延安
23	274-B	新疆阿勒泰	48	486	四川攀枝花
24	274-F	新疆阿勒泰	49	527	云南新平
25	281	黑龙江大兴安岭			

1~4 为选育品种, 11 为野生品种, 其他为当地品种

1~4: breeding varieties, 11: wild species, others are local varieties

1.0 μ l *Mse* I 接头 (50 pmol / μ l) 1.0 μ l *T*₄ 连接酶 (5 U / μ l) 0.2 μ l ddH₂O 19.8 μ l 混匀后 16℃ 水浴过夜 65℃ 灭活 20 min, -20℃ 保存。

预扩增采用 E + 0 / M + 0 引物组合, 体系 20 μ l, 包含 DNA 模板 2.0 μ l, 10 × PCR buffer (含 Mg²⁺ 15 mmol / L) 2.0 μ l, dNTP (各 10 mmol / L) 0.4 μ l, E₀₀ 引物 (10 pmol / μ l) 1.0 μ l, M₀₀ 引物 (10 pmol / μ l) 1.0 μ l, Taq 酶 (5 U / μ l) 0.2 μ l 加 ddH₂O 至 20 μ l。混匀离心后用以下程序扩增: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 7 min; 4℃ 保存。预扩增产物稀释 20 倍后于 -20℃ 保存。

选择性扩增选用 E + 3 / M + 3 引物组合 (表

2)。选扩体系 20 μ l, 包含稀释的预扩增产物 3.0 μ l, 10 × PCR buffer (含 Mg²⁺ 15 mmol / L) 2.0 μ l, E + 3 引物 (10 pmol / μ l) 1.2 μ l, M + 3 引物 (10 pmol / μ l) 1.2 μ l, dNTP (各 10 mmol / L) 0.4 μ l, Taq 酶 (5 U / μ l) 0.2 μ l 加 ddH₂O 至 20 μ l。混匀离心后用以下程序扩增: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 1 min, 12 个循环, 每循环降低 0.7℃; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 25 个循环; 72℃ 7 min; 4℃ 保存。

选择扩增后的样品中加入 5 μ l loading buffer (98% 甲酰胺; 10 mmol / L EDTA, pH 8.1; 0.25% 二甲苯青), 95℃ 变性 5 ~ 8 min, 然后迅速放入冰浴中

冷却,在 80W 下用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 90min,至二甲苯青指示线距板底部约 1/3 处,最后银染检测扩增产物。

表 2 AFLP 选择性扩增引物

Table 2 AFLP Selective amplified primers

限制性核酸内切酶 <i>EcoR</i> I (E)		限制性核酸内切酶 <i>Mse</i> I (M)	
E + 3 Primer	Sequence	M + 3 Primer	Sequence
1	E-AAC	1	M-CAA
2	E-AAG	2	M-CAC
3	E-ACA	3	M-CAG
4	E-ACC	4	M-CAT
5	E-ACG	5	M-CTA
6	E-ACT	6	M-CTC
7	E-AGC	7	M-CTG
8	E-AGG	8	M-CTT

E: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'; M: 5'-GATGAGTCTGAGTAA-3'

1.4 数据记录与分析

AFLP 扩增条带在相同迁移位置的,有带记为“1”,无带记为“0”,缺失或不清楚记为“-”。标记位点的多态性条带比率 PPB [percentage of polymorphic bands, $PPB = a/(a+b)$] 标记系统的有效等位基因数 Ne (effective number of allele, $Ne = 1/\sum p_i^2$), p_i 表示 i 位点的基因频率,使用 POPGEN 3.2 软件分析以上数据。同时使用 NTSYS 2.1 计算 Jaccard (1908) 相似系数,即 $G_{s_{ij}} = a/(a+b+c)$, $G_{s_{ij}}$ 是个体 i 和 j 的遗传相似性系数, a 为两个体的共享片段数, b 和 c 为 i 个体和 j 个体各自拥有的多态片段数。根据相似性系数进行 UPGMA (unweighted pair group method analysis) 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 AFLP 引物组合扩增效率及多态性比较

从 64 对 AFLP 引物组合中筛选出 5 对多态性高、分辨能力强、稳定性好的引物组合,对 49 份大麻品种进行 AFLP 扩增。如表 3 所示 5 对引物组合扩增出 442 条带,扩增片段大小集中在 100 ~ 1000bp 之间,其中多态带为 262 条。多态位点百分率为 56.0% ~ 59.5%,平均多态性为 57.5%。结果表明, AFLP 分子标记能有效地揭示品种间较高的多态性。

表 3 5 对 AFLP 引物组合在 49 份大麻材料中的多态性

Table 3 Polymorphic bands generated by 5 primer combinations from 49 materials of *Cannabis sativa* L.

引物组合 Primer combination	总位点数 No. of total loci	多态性带 No. of polymorphic bands	多态位点 百分率(%) Polymorphism rate
E-AAG / M-CAG	100	56	56.0
E-ACT / M-CTA	86	50	58.1
E-ACT / M-CTC	84	50	59.5
E-ACG / M-CTA	80	52	57.8
E-AGG / M-CAC	92	54	56.2
合计 Total	442	262	
平均 Mean	88.4	52.4	57.5

2.2 UPGMA 聚类分析

采用 NTSYS 2.0 软件对 AFLP 数据进行分析,结果显示 49 份大麻品种材料的遗传相似系数具有很大的变化范围(0.40 ~ 0.90) (图 1),表明用于本研究的大麻品种资源代表了遗传上具有分化的群体。UPGMA 聚类分析将 49 份供试材料在 0.628 的相似水平处分为 4 组(图 12): I 组包括:云南的 13 个地方品种、欧洲 301 和云南的 4 个选育品种; II 组包括:四川的 2 个地方品种、贵州的 3 个地方品种、广西的 2 个地方品种、陕西的 2 个地方品种、新疆的 2 个地方品种、甘肃的 2 个地方品种; III 组包括:黑龙江的 7 个地方品种、辽宁的 2 个地方品种、吉林的 2 个地方品种和内蒙古的 3 个地方品种; IV 是较少的一组,包括来源于山西的 2 个地方品种和 2 个安徽的地方品种。各组在聚类树上具有明显的区分,但 49 份大麻材料中并非所有材料以地理来源群体分组聚类,而是分散于 4 个组中。

2.3 遗传多样性分析

利用 POPGENE 3.2 软件对除欧洲 301 外不同地理来源的 48 个品种分为 13 个大麻群体进行遗传多样性分析,分析指数主要包括:有效等位基因数 (Ne)、 Ne 的基因多样性指数 (He)、Shannon's 信息指数 (I)、多态位点数 (P) 和多态位点百分率 (PPB)。从表 4 分析结果可以看出,对比 13 个群体, AFLP 数据显示,云南地区的大麻群体具有最高的遗传多样性水平 ($PPB = 88.82\%$, $He = 0.3000$, $I = 0.4571$),其次是黑龙江群体 ($PPB = 75.66\%$, $He = 0.2572$, $I = 0.3897$)。这 48 份大麻品种的遗传多样性为:多态位点百分率 $PPB = 92.11\%$, Ne 的遗传多样性 $He = 0.3678$, Shannon's 信息指数 $I = 0.5374$ 。说明 48 份大麻品种间具有丰富的遗传多样性,可能主要是因为大麻种植面积分布较广,异花授粉杂交,从而表现出多种多样的基因型和生态类型。

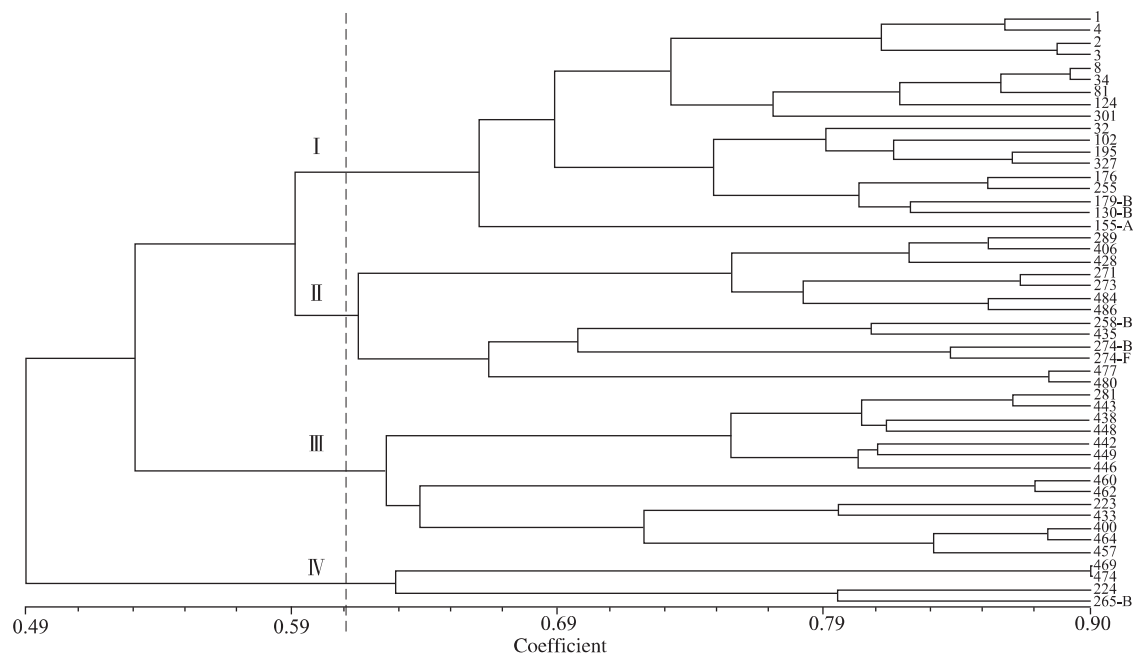


图 1 49 份大麻材料的 UPGMA 聚类图
Fig.1 UPGMA clustering dendrogram of 49 materials of *Cannabis sativa* L.
based on genetic similarity coefficients

表 4 基于 AFLP 数据的 13 个大麻群体的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity of the 13 populations of *Cannabis sativa* L. detected by AFLP

居群 Populations	居群数量 N	有效等位基因数 <i>N_e</i>	Nei's 基因多样性指数 <i>H_e</i>	Shannon's 信息指数 <i>I</i>	多态性带数 <i>P</i>	多态性带比率 <i>PPB</i>
云南 YN	17	1.4871	0.3000	0.4571	135	88.82
贵州 GZ	3	1.4446	0.2547	0.3750	99	65.13
广西 GX	2	1.3349	0.1962	0.2864	72	47.37
四川 SC	2	1.3722	0.2180	0.3183	80	52.63
甘肃 GS	2	1.2140	0.1254	0.1830	46	30.26
山西 SX1	2	1.3210	0.1880	0.2745	69	45.39
新疆 XJ	2	1.2466	0.1444	0.2109	53	34.87
黑龙江 HLJ	7	1.4251	0.2572	0.3897	115	75.66
辽宁 LN	2	1.2233	0.1308	0.1910	48	31.58
吉林 JL	2	1.2186	0.1281	0.1870	47	30.92
内蒙古 NMG	3	1.2815	0.1712	0.2585	73	48.03
陕西 SX2	2	1.2559	0.1499	0.2188	55	36.18
安徽 AH	2	1.2093	0.1226	0.1790	45	29.61
平均 Mean		1.2167	0.1704	0.2520	66	44.03
合计 Total	48	17.0341	0.3678	0.5374	937	92.11

2.4 遗传分化与群体结构分析

遗传分化的分析参数 包括总的遗传多样性 (*H_t*) , 群体内 (*H_s*) 和群体间 (*D_{st}*) 的遗传多样性及遗传分化系数 (*G_{st}*) 。如表 5 所示 大麻群体总的遗传变异量 *H_t* 为 0.3837 群体内的遗传变异 (*H_s*) 为 0.1640 群体间的遗传分化值 (*G_{st}*) 为 0.5725。为了一步分析各群体间的遗传分化程度 根据 Nei's (1978) 的方法计算了大麻

13 个群体间的遗传距离和遗传一致度。结果显示 ,各群体间的遗传一致度在 0.6556 ~ 0.9258 之间 其中四川群体和广西群体间具有最高的一致度为 0.9258; 云南群体与贵州群体间、四川群体的遗传一致度次之 , 分别为 0.9196、0.9173; 所有群体中甘肃群体和山西群体的具有最低的遗传一致度为 0.6556 表明大麻在种内有着丰富的遗传变异。

表 5 大麻 13 个群体间 Nei's 遗传一致度和遗传距离

Table 5 Nei's genetic diversity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among 13 populations of *Cannabis sativa* L.

	YN	GZ	GX	SC	GS	SX1	XJ	HLJ	LN	JL	NMG	SX2	AH
YN	*****	0.9196	0.8413	0.9173	0.7020	0.7761	0.7882	0.9160	0.8005	0.8004	0.9086	0.7740	0.8420
GZ	0.0838	*****	0.8269	0.8524	0.8463	0.7613	0.7835	0.8728	0.7741	0.8556	0.8123	0.7858	0.8169
GX	0.1729	0.1900	*****	0.9258	0.7477	0.7257	0.8530	0.8264	0.7292	0.6530	0.8005	0.7385	0.8265
SC	0.0972	0.1597	0.0771	*****	0.6968	0.7245	0.7471	0.8287	0.7197	0.6828	0.8301	0.7601	0.8524
GS	0.3538	0.1668	0.2907	0.3613	*****	0.6828	0.7630	0.7702	0.7211	0.7172	0.6842	0.6556	0.6872
SX1	0.2535	0.2727	0.3206	0.3222	0.3816	*****	0.6747	0.7562	0.7102	0.6922	0.7716	0.9660	0.7496
XJ	0.2380	0.2440	0.1590	0.2916	0.2705	0.3936	*****	0.8094	0.7831	0.7360	0.7874	0.6581	0.7787
HLJ	0.0877	0.1360	0.1906	0.1879	0.2611	0.2795	0.2115	*****	0.8616	0.8430	0.8625	0.7384	0.7777
LN	0.2225	0.2560	0.3158	0.3289	0.3270	0.3422	0.2445	0.1490	*****	0.8374	0.8328	0.7068	0.6900
JL	0.2227	0.1560	0.4262	0.3816	0.3324	0.3679	0.3065	0.1708	0.1774	*****	0.7873	0.7071	0.7060
NMG	0.0959	0.2079	0.2225	0.1863	0.4243	0.2593	0.2390	0.1480	0.1830	0.2391	*****	0.7719	0.7972
SX2	0.2562	0.2410	0.3032	0.2743	0.4222	0.0346	0.4184	0.3032	0.3470	0.3466	0.2588	*****	0.7495
AH	0.1720	0.2022	0.1905	0.1596	0.3752	0.2883	0.2501	0.2514	0.4464	0.3482	0.2267	0.2884	*****

对角线以上每个纵横交叉表示两个群体的遗传一致度; 对角线以下每个纵横交叉表示两个群体的遗传距离

The data above the diagonal indicate genetic of two populations and the data below diagonal indicate genetic distance

3 讨论

遗传多样性是生物多样性的基本组成部分, 遗传多样性存在于物种内, 是决定物种发生、进化、选择、重组和创新的物质基础^[29]。对植物遗传资源进行多样性研究, 有益于正确制定植物遗传资源收集和原位保存的策略, 鉴定植物遗传多样性的中心, 还可以用于调查居群、亚种或类型间分化及亲近程度, 构建核心种质, 绘制品种指纹图谱, 发现和利用优良的特征特性^[30]。

本试验采用 AFLP 分析, 根据树状聚类图和样品间的遗传距离, 初步揭示了大麻的遗传多样性和复杂的遗传背景。5 对引物组合共得到 442 条可统计的条带, 其中 262 个为多态性位点, 平均多态性为 57.5%, 说明 AFLP 标记具有较高的多态性及分辨能力, 同时印证了 Vos 等^[6]报道的 AFLP 方法的准确性、稳定性和重复性。采用 DICE 系数和 Nei's 遗传距离进行数据分析表明, 49 份大麻材料在遗传相似性指数为 0.628 时被聚集成 4 个明显的分支(I-IV), 有较近亲缘关系的品种聚为一支, 当把遗传相似性系数以 0.570 为基点时, I 和 II 组合为一组, III 组为一组, IV 组为一组共分为 3 组。49 份大麻材料总体规律为西南一组, 东北一组, 中部一组, 其中西南有云南为单独的一组, 广西、贵州、四川为一组, 总

体上呈现地域性特征, 这可能主要是因为品种本身地区差异较大。如北方的品种难以在南方种植, 这是一个长期的自然进化的结果。但供试材料中也有少数大麻品种未能以地理来源群体分组聚类, 而是分散于 4 个组中, 都说明大麻的起源复杂性, 同时某些地区少数民族(如云南) 的民俗利用也会大麻品种交流产生一定影响。庞晓明等^[31]对积属种质的 AFLP 分析也得出以地理来源群体分组聚类的相似结论。因本研究中云南和东北为大麻主产区, 所以材料取样时数量有些偏重造成分布不均匀可能对分析结果有一定误差, 但总体上以上研究结果与与本单位大麻课题组多年的研究结果是基本一致的。目前, 大麻遗传多样性系统性的研究方面还未曾有实质性的报道。本研究的大麻地域性分布可以作为大麻遗传多样性的一个参考依据, 因此在以后的资源收集和保存中, 就要应该注意地理分布这个特征。

本研究从分子水平分析了大麻品种的遗传多样性, 为大麻的良种保护、选育、进化研究提供参考依据, 提醒我们进行大麻品种资源的遗传多样性保护时, 要重视大群体中不同个体的区域性重点保护。同时, 随着生物技术水平和研究手段的不继发展, AFLP 技术在品种遗传多样性和亲缘关系分析、优良种质基因的挖掘, 新品种的选育和保护以及种质创新等方面有广阔的应前景。

参考文献

- [1] 陈其本, 余立惠, 杨明, 等. 大麻栽培利用及发展对策 [M]. 西安: 电子科技大学出版社, 1993
- [2] 熊和平. 麻类作物育种学 [M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2001
- [3] 辛培尧, 尚勋武, 郭鸿彦, 等. 大麻染色体行为分析 [J]. 西北植物学报, 2008, 28(11): 2189-2193
- [4] Sakamoto K. Characterization: Genome size and morphology of sex chromosomes in hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. Cytologia, 1998, 63: 459-464
- [5] 郭鸿彦, 杨明, 谢晓慧, 等. 云南工业大麻产业化发展前景广阔 [J]. 中国麻作, 2002, 24(4): 46-49
- [6] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucl Acid Res, 1995, 23: 4407-4414
- [7] Fuentes J L, Escobar F. Analysis of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers [J]. Euphytica, 1999, 109(2): 107-115
- [8] Singh K N, Nandi R, Shanmugasundaram P, et al. High-resolution DNA fingerprinting of Indian rice (*Oryza sativa* L.) varieties by amplified fragment length polymorphism [J]. Genet Resour Crop Evol, 1999, 46(5): 427-433
- [9] Mao C, Yi K, Yang L, et al. Identification of aluminium-regulated genes by DNA AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components [J]. J Exp Bot, 2004, 55: 137-143
- [10] Marsan P A, Castiglioni P, Fusari F, et al. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96(2): 219-227
- [11] Lubberstedt T, Melchinger E A, Dussle C, et al. Relationships among early European maize inbreds: IV. genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD and pedigree data [J]. Crop Sci, 2000, 40: 783-791
- [12] Lebel H S, Hauser E, Law F T, et al. mapping of sex determination loci on the white campion (*Silene latifolia*) Y chromosome using amplified fragment length polymorphism [J]. Genetics, 2002, 160: 717-725
- [13] Campbell D, Bernatchez L. Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes [J]. Mol Biol Evol, 2004, 21(5): 945-956
- [14] 胡小荣, 卢新雄, 张云兰, 等. AFLP 技术运用于小麦种子超干燥保存遗传完整性的初探 [J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(2): 162-165
- [15] 郝晨阳, 王兰芬, 董玉琛, 等. 我国西北春麦区小麦育成品种遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(4): 285-291
- [16] Pillay M, Myers G. Genetic diversity in cotton assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers [J]. Crop Sci, 1999, 39: 1881-1886
- [17] Ma X D, Xing C Z, Guo L P, et al. Analysis of differentially expressed genes in genic male sterility cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using cDNA-AFLP [J]. J Genet Genomics, 2007, 34(6): 536-543
- [18] 王省芬, 马峙英, 潘玉欣, 等. 转基因抗虫棉 SSR 和 AFLP 遗传变异研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(2): 153-158
- [19] 谭卫萍, 张秋明, 于晓英, 等. 香蕉种质遗传多样性与亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 715-720
- [20] 相怀军, 张宗文, 吴斌. 利用 AFLP 标记分析皮燕麦种质资源遗传多样性 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 271-277
- [21] Gillan R, Cole M D. Comparison of *Cannabis sativa* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and HPLC of cannabinoids: a preliminary study [J]. Sci Just, 1995, 35(3): 169-177
- [22] Mareshige K, Osamu I. DNA fingerprinting of *Cannabis sativa* using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. Planta Med, 2002, 68(1): 60-63
- [23] 陈其军, 韩玉珍, 傅永福, 等. 大麻性别的 RAPD 和 SCAR 分子标记 [J]. 植物生理学报, 2001, 27(2): 173-178
- [24] Alghanim H J, Almirall J R. Development of microsatellite markers in *Cannabis sativa* for DNA typing and genetic relatedness analyses [J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 376: 1225-1233
- [25] Flachowsky H, Schumann E, Weber W E, et al. Application of AFLP for the detection of sex-specific markers in hemp [J]. Plant Breeding, 2001, 120(4): 305-309
- [26] Peil A, Flachowsky H, Schumann E, et al. Sex-linked AFLP markers indicate a pseudoautosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107(1): 102-109
- [27] Shannon L D, George D W. Genetic variation in hemp and marijuana (*Cannabis sativa* L.) according to amplified fragment length polymorphisms [J]. J Forensic Sci, 2006, 51(2): 371-375
- [28] 郭佳, 裴黎, 彭建雄, 等. 应用 AFLP 检测大麻遗传多样性 [J]. 中国法医学, 2008, 24(5): 330-332
- [29] 徐爱遐, 冯朝芝, 肖恩时, 等. 中国西部芥菜型油菜遗传多样性研究 [J]. 作物学报, 2008, 34(5): 754-763
- [30] 夏铭. 遗传多样性研究进展 [J]. 生态学杂志, 1999, 18(3): 59-65
- [31] 庞晓明, 邓秀新, 胡春根. 枳属 36 份特异种质的 AFLP 指纹图谱构建与分析 [J]. 园艺学报, 2003, 30(4): 394-398
- [22] Dean R E, Dahlberg M S, Hopkin S E, et al. Genetic redundancy and diversity among "orange" accessions in the US national sorghum collection as assessed with simple sequence repeat (SSR) markers [J]. Crop Sci, 1999, 39: 1215-1221
- [23] 赵香娜, 岳美琪, 刘洋, 等. 国内外甜高粱种质遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 407-412
- [24] 闫锋, 陈丽, 赵春雷, 等. 不同甜高粱种质的 SSR 多态性分析 [J]. 中国糖料, 2008(3): 40-44
- [25] Nei M. Molecular Evolution Genetic [M]. New York: Columbia University Press, 1987: 190-191
- [26] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zeamays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 163-173
- [27] 陈英, 邱琳, 涂升斌, 等. 用 SSR 标记检测杂交籼稻三系亲本的遗传差异 [J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(5): 585-590
- [28] Schloss S J, Mitchell S E, White G M, et al. Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 912-920
- [29] Smith J S C, Kresovich S, Hopkins M S, et al. Genetic diversity among elite sorghum inbred lines assessed with Simple Sequence repeats [J]. Crop Sci, 2000, 40: 226-232
- [30] Agrama H A, Tuinstra M R. Phylogenetic diversity and Relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs [J]. Afr J Biotechnol, 2003, 2: 334-340

(上接第 554 页)