

摘 要

本文对红麻 7 个常规栽培种和 12 个野生种及 5 个近缘种进行了 RAPD 分子标记的研究,在探讨红麻种子基因组 DNA 提纯方法和优化 PCR 扩增反应体系的基础上,利用 RAPD 技术对红麻品种基因组 DNA 多态性进行分析,依据分子标记研究结果探索了栽培种、野生种及近缘种的亲缘关系及遗传多样性,并对红麻的起源和传播途径作了初步探讨。研究结果表明:

1. 为了提高效率,论文试验探索出一种稳定、高效的从红麻种子中提取基因组 DNA 的新方法。该方法在普通的 SDS 法的基础上进行了重大的改进。在用液氮研磨样品后,先加入预热的提取液继续研磨,然后保温,这样既抑制了 DNA 酶的水解活性,防止了其对 DNA 的降解,又使细胞中的基因组 DNA 得到充分释放。加入氯仿:异戊醇(24:1)后强烈振荡几秒钟,保证了蛋白质的充分变性,又使 DNA 和其他杂质充分分离。通过此方法获得了高浓度和高质量的基因组 DNA,较好地用于 PCR 扩增,进行 RAPD 分析。

2. 为了提高 RAPD 反应体系的稳定性,以保证实验的准确性和可重复性,对红麻 RAPD 反应参数进行了设计,通过优化实验建立了合适稳定的 RAPD 反应体系。在 25 μ l 反应体系中含有:1 $\times$ buffer, 2.0mmol/LMgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs, 0.6 μ mol/L 随机引物, 45ng 的基因组 DNA, 1.0U Taq 酶。反应扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,使模板 DNA 充分变性,然后进入下列温度循环:94 $^{\circ}$ C 变性 30sec, 38 $^{\circ}$ C 退火 45sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min30sec, 重复 40 个热循环,结束循环后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 7min。应用此条件进行多次重复,结果重现性良好。

3. 研究中筛选出了重复性好、有丰富多态性的 21 个引物,共产生 140 条带,对 12 个红麻野生种、5 个近缘种和 7 个来源广泛的各地栽培种进行 RAPD 分析,其中多态性带 119 条,占 85%,反映出不同红麻品种间存在很大的遗传差异,所筛选的 21 个引物在供试品种中都有很高的多态性。采用 UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean) 聚类方法对 GD 进行遗传分类,将供试品种聚成 3 大类:近缘种、野生种和栽培种。

4. 通过 RAPD 分子标记的研究,探索了红麻品种间的亲缘关系。研究结果表明,不同的红麻野生种同栽培种之间的亲缘关系有很大差别,其中有两个野生

种 H004、H018 也被划分在栽培种这一类, 表明了这两个野生种同栽培种亲缘关系相对其他野生种更紧密, 推测 H004、H018 两个品种属于红麻半野生品种。还发现红麻栽培种的遗传多样性并不像形态学所体现的那样丰富; 而野生种中分子生物学上的遗传多样性远比形态学和生物学特性所表现的要丰富得多, 因此在分子水平上对红麻的研究更显重要。

5. 在研究供试品种亲缘关系的基础上, 进一步探讨了红麻品种的起源和传播途径。野生种被聚类在近缘种和栽培种之间, 并且有两个野生种与栽培种聚成了一类。野生分布的红麻材料和它的非洲起源的近缘种之间的遗传距离相对栽培种与近缘种的遗传距离要近的多, 而栽培类型的红麻也通过野生红麻种与近缘种保持一定的关系, 这在一定程度上支持了红麻起源于非洲的假设, 也表明 RAPD 分析结果可用于对红麻物种进化起源等方面的研究。

关键词: 红麻 RAPD 遗传差异 亲缘关系 起源进化

Abstract

In this experimentation, random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to analyze the genetic relationship of seven cultivars, twelve wild species and six relative of *Hibiscus cannabinus L.*. The extraction methodology of genomic DNA of *Hibiscus cannabinus L.* was explored and the influential parameters were optimized. On the basis of them, RAPD was used to investigate the genetic polymorphisms among the twenty-four breeds. And both the genetic relationships and the genetic differences of them were to be researched, furthermore, the Kenaf's cradleland and its transmit route were also discussed. Results were as follows:

1. To save time and reduce workload, a steady, efficient, and applicable extraction method of Kenaf's seeds genomic DNA for RAPD analysis, which is improve greatly on the general method, was explored. and the key points of the method are triturating after adding extractive buffer(SDS) and shaking intensively after adding CIAA. The genomic DNA samples, prepared from seeds of *Hibiscus cannabinus L.* with aforementioned modified method were to be used as templates for polymerase chain reaction (PCR) and very suitable for RAPD analysis.

2. Steady reaction system is the key point to RAPD analysis, in order to reach this, The influential factors such as templates DNA, dNTPs, $MgCl_2$, primers, Taq polymerase and so on were studied and experimental parameters were optimized. They were as follows: 25 μ l reaction system containing 1 $\times$ buffer, 2.0mmol/L $MgCl_2$, 200 μ mol/L dNTPs, 0.6 μ mol/L primers, 45ng template, 1.0U Taq polymerase. The optimal amplification program was as follows: 5min at 94 $^{\circ}C$, followed by 94 $^{\circ}C$ for 30sec, 38 $^{\circ}C$ for 45sec, 72 $^{\circ}C$ for 1min30sec, 40 cycles and final extension time of 72 $^{\circ}C$ for 7min. This optimized experiment conditions could obtain reproducible and credible results.

3. Twenty-one primers selected from one seventy primers amplified 146 RAPD fragments and 118 bands of them showed polymorphism, which occupied 85%. The length of most amplified fragments ranged from 0.2 to 1.5kb. The dendrogram was

constructed by using DPS software and Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean based on their genetic diversity calculated from RAPD data. It was concluded that the twenty-four breeds could be classified into three groups-Kenaf's cultivars, Kenaf's wild breeds and Kenaf's relatives, it relatively accorded with known genetic relationships..

4. Using RAPD technique analysis , the genetic relationships among the twenty-four breeds was investigated, and the results were as follows: There is great genetic difference among those specimen and that in spite of H004、 H018 are wild stirp, they still be classified into the group of Kenaf's cultivars, shows that The genetic difference between H004、 H018 and Kenaf's cultivars were relatively closer comparing with the other wild breeds. In addition to the great genetic difference among those specimen, the genetic diversity among Kenaf's cultivars isn't as rich as the morphological analysis shows, while the genetic diversity among Kenaf's wild germplasm is richer than its morphological analysis shows. Accordingly, the research of *Hibiscus cannabinus L.* on molecular level is extraordinary important.

5. Base on the study of genetic relationships of the twenty-four breeds, the Kenaf's cradleland and its transmit or evolution route were explored in this experiment. The results of RAPD analysis show that Kenaf's wild breeds was classified between cultivars and its relatives, besides, two wild breeds H004、 H018 was also classified into the group of its cultivars. It indicated that genetic relationships between Kenaf's wild breeds and its cultivars closer than that between wild breeds and Kenaf's relatives, meanwhile, cultivars and relatives keep a certain genetic relationships through wild breeds. The results support the hypothesis that *Hibiscus cannabinus L.* rise from Africa in some extent. According to results obtained by RAPD analysis mentioned above, it is safe to say that RAPD technique is suitable to study the Kenaf's cradleland and its transmit or evolution route.

Key words: *Hibiscus cannabinus L.* ; heredity diversity ; RAPD;
genetic relationship; origin and transmit route;

目 录

1 文摘

2 英文文摘

3 独创性声明及关于论文使用授权的说明

4 1 文献综述

5 2 引言

6 3 材料与方法

7 3.1 材料的准备

8 3.1.1 红麻品种的选择

9 3.1.2 取材

10 3.2 设备、仪器和试剂

11 3.2.1 设备和仪器

12 3.2.2 试剂药品

13 3.2.3 溶液配制

14 3.3 试验方法

15 3.3.1 基因组 DNA 的提取

16 3.3.2 基因组 DNA 的检测

17 3.3.3 RAPD 反应参数的优化设计

18 3.3.4 RAPD 反应程序的设计

19 3.3.5 遗传多样性的 RAPD 分析

20 4 结果与分析

21 4.1 红麻基因组 DNA 的提纯

22 4.1.1 紫外检测

23 4.1.2 电泳检测

24 4.1.3 PCR 扩增结果分析

25 4.2 红麻 RAPD 反应体系的优化

26 4.2.1 红麻 RAPD 反应参数的优化

27 4.2.2 红麻 RAPD 循环参数的优化

28 4.3 供试红麻品种及其近缘种 RAPD 分析

29 4.3.1 引物的筛选

30 4.3.2 红麻种及近缘种间亲缘关系的 RAPD 聚类分析

31 5 讨论

32 5.1 红麻种子基因组 DNA 提纯

33 5.2 RAPD 反应的稳定性

34 5.3 红麻种和近缘种遗传差异的 RAPD 分析

35 5.3.1 供试品种的遗传差异

36 5.3.2 供试红麻品种亲缘关系及其起源与传播

37 5.3.3 RAPD 方法在红麻亲缘关系研究中的可行性和可靠性

38 6 结论

39 参考文献

40 致谢

41 个人简介

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得安徽农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：徐伟

时间：2005 年 6 月 20 日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解安徽农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意安徽农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：徐伟

时间：2005 年 6 月 20 日

第一导师签名：周斌

时间：2005 年 6 月 20 日

1 文献综述

1.1 分子标记技术的发展及应用

遗传标记(Genetic Markers)就是指与目标性状紧密连锁,同该性状共同分离且易于识别的可遗传的等位基因变异^[1~3]。遗传标记主要有 4 种类型:(1)形态学标记(Morphological Markers),即植物的外部特征,如株高、穗长、粒色等。形态学标记简单直观,但是由于可用作遗传标记的形态性状相当有限,又容易受环境的影响,已经不符合人们的要求。(2)细胞学标记^[4](Cytological Markers)细胞学标记主要指染色体组型和带型。染色体的数目与结构等特征的变化往往与表型的变化有着很大相关,因此染色体的组型与带型可以作为一种遗传标记。由于染色体制片技术和分辨率的限制,使细胞学标记的应用也受到一些限制,但是随着植物染色体制片技术和分带技术的发展,染色体原位杂交技术的应用,细胞学方法仍是遗传标记研究的一个重要部分。(3)生化标记(Biochemical Markers)生化标记是指生物的生化特征与特性,主要包括贮藏蛋白和同工酶两种标记并已经得到广泛的应用^[5~8]。它具有稳定,不受环境因素的影响、所需试材少和共显性等优点。但是,由于其多态性少,因而不能成为理想的遗传标记。(4)分子标记(Molecular Markers)近十年来迅速发展的一种新型遗传标记,通过一定方式或手段标出与生物个体或种群之间差异性性状连锁的 DNA 片段。它具有以下优点^[9]:①无表型效应,不受环境的限制,在个体的各个器官和不同的发育时期均可检测到,不受基因表达与否的影响;②标记的数量极多,遍及整个基因组;③大多数标记具有共显性;④多态性高,存在很多的自然变异,不需要创造专门的遗传工具材料;⑤表现为“中性”,目标性状与不良性状无必然的连锁。现就分子标记技术的发展与应用作一简单综述。

1.1.1 RFLPs

1974 年, Grodzicker 等人发现了 RFLPs 分子标记技术^[10]。该技术利用放射性同位素或非放射性物质标记探针,与转移于支持膜上的基因组 DNA(经限制性内切酶消化)杂交,通过显示限制性酶切片段的大小,来检测不同遗传位点等位变异(多态性)。人类遗传学家 Bostein 首次提出用 RFLP 作为构建遗传连锁图的设想^[11],并首先应用在人类遗传学的研究中^[12]。80 年代以来,这一技术也被广

泛用于植物中，并在多种作物中成功的用于遗传变异检测、起源进化探讨以及品种鉴定^[13-15]。RFLP 标记在所有生物的检测程序一致，呈简单的、孟德尔式的共显性遗传，并具有稳定性好的特点，但由于 RFLP 标记所需仪器设备较多，成本较高，检测花费时间较长，技术上难于操作，这在一定程度上限制了 RFLP 的应用。

1.1.2 AFLPs

AFLP 即扩增片段长度多态性，是由 Zabeau et al. (1993)^[16]发明的一项 DNA 指纹技术。其原理是以基因组 DNA 为模板，通过 PCR 反应，选择性扩增经限制性内切酶双酶切的基因组 DNA 片段。由于不同材料的 DNA 酶切片段存在差异，因而产生了扩增产物的多态性。该法集随机 PCR 和特异 PCR 两方面的优点，能同时揭示基因组 DNA 多个限制性酶切片段的长度多态性，且稳定性强，重复性好，能用于构建清晰度的遗传图谱，是一种十分理想而有效的遗传标记技术。该技术的缺点是需用同位素检测，成本较高。

1.1.3 SSR

SSR(Simple Sequence Repeats) 称之为简单序列重复或简单序列长度多态性(Simple Sequence Length Polymorphism SSLP)，指以少数几个核苷酸(多数为 2-4 个)为单位进行多次串连重复的 DNA 序列^[17,18]。它分布于整个基因组，有很高的多态性。由于微卫星寡核苷酸的重复次数在同一物种的不同基因型间差异很大，于是这一技术便发展为一种分子标记。并首先在人类和小鼠中构建了以微卫星为主的分子连锁图谱^[19,20]。SSR 标记具有多态性高，稳定性强，方法简便，多为共显性，并且染色体位置已知等特点，现已广泛用于资源鉴定、连锁图绘制及目标性状基因的标记等研究上，在多种植物例如拟南芥、大麦、大豆等中发展了微卫星标记并用于遗传作图和种质鉴定等^[21]。

1.1.4 RAPD

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs)即随机扩增多态性DNA，是1990年由美国杜邦公司的科学家Williams^[22]和加利福尼亚生物研究所的科学家Welsh^[23,24]领导的两个小组几乎同时发展起来的一项利用随机引物寻找多态性DNA片段的分子标记技术。这一技术的原理^[25,26]是利用一系列不同的随机排列碱基顺序的寡聚核苷酸单链为引物，对所研究基因组DNA进行PCR扩增。这些扩增产物DNA片段的多态性反映了基因组相应区域的DNA多态性。基因组DNA的多态性可

通过对PCR产物的检测测出。由于进行RAPD分析时可用引物数很大，利用一系列引物则可以使检测区域几乎覆盖整个基因组。因此RAPD可以对整个基因组DNA进行多态性检测。相对于其它分子标记技术如RFLP、AFLP等技术它具有不需要预先知道基因组序列、操作简便、快速、所需样品量少、引物具普遍性、自动化程度高等优点受到了广泛的重视^[27]。RAPD技术可用于进行基因组指纹图谱的构建，并利用指纹图谱进行品种种质鉴定和对物种进行亲缘关系及系统进化的发育研究^[28]。但RAPD的检测受反应条件影响较大，重复性较差，在基因组庞大的植物如小麦上多态性水平低致使该技术受到一定的限制^[29]。但是通过通过一系列优化实验，保证严格的反应条件，提高它的重复性和稳定性，是可以得到稳定的可靠的结果的。还可以将RAPD作为初步筛选鉴定的一种方法，然后转化为另一种新型的分子标记SCARs (Sequence Characterized Amplified Region) ^[30]，用来进行更深入的研究。

1.1.5 ISSR

ISSR (Inter-simple Sequence Repeat Polymorphism) 即内部简单重复序列多态性，是由Zietkiewica 等^[31] 于1994年提出的。其原理就是在SSR的3'或5'端加锚1-4个嘌呤或嘧啶碱基，然后以此为引物，对两侧具有反向排列的SSR的一段DNA序列进行扩增。ISSR技术利用基因组中有关SSR序列信息，结合RAPD技术优点，克服了SSR和RAPD标记技术的某些缺点，通常为显性标记 (Tsumura et al, 1996)，呈Mendel式遗传，具有很好的稳定性和多态性 (Fang and Roose)，因而是一种很好的分子标记。同RAPD一样，ISSR在对绝大多数缺乏遗传学研究背景的植物遗传多样性评价中，发挥着重要作用^[32]。

此外还有SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) 单核苷酸多态性、STS (Sequence Tag Site) 序列标定位点等新型分子标记。随着分子生物学理论与技术的快速发展，作为分子生物学发展的一个基本研究方法和内容，分析速度更快、信息量更大、准确度更高、成本更低的分子标记技术必将不断地开发出来^[33]。

1.2 红麻种质资源的现状和分子标记研究进展

红麻是锦葵科木槿属 (*Hibiscus cannabinus* L.) 一年生草本植物。其主要特征是成熟时花萼变草质或肉质，多数茎上有小刺，染色体数从二倍体 ($2n=36$)

到十倍体($2n=180$)。有超过 120 种名称,如红麻、槿麻、钟麻等。红麻在世界上分部很广^[34,35],大部分分布在亚洲、非洲、澳洲及美洲的热带和亚热带地区^[36]。大多数学者已经公认,公元前 4000 年的非洲苏丹是红麻的初级起源地^[37,38],红麻种的各种形式以及木槿属的相关种包括玫瑰茄在许多的东非国家发现呈野生分布^[34,38-40]。

红麻生长速度快,抗逆性强,适应性广,其纤维质地柔软,商业上称作“软质纤维”,是麻纺和造纸工业的重要原料作物,在植物纤维中其重要性仅次于棉花^[41,42]。我国自 1909 年由印度引入马达拉斯红品种试种开始,迄今也已近百年历史,常年种植面积和纤维总产量均居世界首位^[43],成为国内的一个主要经济作物,传统的出口产品。近些年来,在日本、美国等发达国家,红麻被看作是 21 世纪“未来派”优势作物,并在在红麻的多用途开发利用方面进行广泛研究,已涉及到其用于造纸、无纺布、吸油材料、板材、土壤改良剂、塑料填充料、动物垫床、食用和工艺品等许多领域^[36]。

目前,我国收集的红麻种质资源有 1800 多份,是目前世界上最多的国家。其中国内资源占 31%,以育成品种(系)、育种中间材料和创新种质为主。国外资源占 69%,广泛来源于 31 个国家和地区^[36]。由于过去我国保存的红麻种质资源较少,研究工作主要着眼于搜集和保存,进行比较简单的性状评价鉴定^[44,45]。但形态学鉴定易受环境条件影响,且红麻不同基因型种子外形上极为相似,要在红麻成株后方可鉴定,可靠性低,又繁琐费时。80 年代开始对红麻进行细胞学研究^[46],并已取得了很大进展。然而红麻染色体数目多、形态差异小、染色体制片难度大,加之相近种在染色体核型上并无明显区别,这在很大程度上限制了红麻的细胞学研究。

现国外红麻研究主要着眼于加工利用和选育抗病优良品种等方面,以美国、日本、澳大利亚等国科学家较多^[47]。美国红麻研究始于本世纪 40 年代,并成功选育了几个优良红麻品种,其中 EI Salvador 是优良的高抗炭疽病品种^[48]。60 年代又开展了红麻造纸利用研究。国外对红麻资源的系统研究和细胞学及分子标记的研究等均少见报道。

近年来,随着分子生物学的发展及植物基因组研究的深入,分子标记技术已被广泛地应用于动植物分类及种质鉴定的研究,而基于随机扩增基础上的 RAPD

技术,以其便捷、灵敏的特点显示出明显的优越性^[49~55]。程舟等^[56,57]曾用 RAPD 和 AFLP 分子标记方法对红麻种质资源的遗传变异和亲缘关系进行了分析。根据 RAPD 图谱模式将 6 到 12 份红麻品种区分开来;在对红麻种质资源及其近缘种玫瑰茄资源 的 AFLP 分析中,结果支持了红麻起源于非洲的假设,证实了栽培红麻首先被引到亚洲,并进一步被传播到中北美洲。郭安平^[58]等利用 RAPD 技术分析了红麻及其 6 个近缘种植物的 25 份材料,构建了它们的系统树,并将 25 份材料划分为 7 个组,将供试的近缘种、野生种和栽培种区分开来。

综上, DNA 分子标记与其他标记具有不依赖于基因表达、不依赖于基因互作、不受表型效应影响和不受环境变化的影响等特点,因而具有更高的可靠性和高效性,更容易从分子水平上研究物种亲缘关系、种质资源保存等,也为生物多样性研究提供可靠的证据。

1.3 本研究的主要目的、内容

本研究材料来自非洲、亚洲、美洲的不同国家和地区的共 19 份具有代表性、差异显著的红麻种质,包括栽培和野生类型的红麻资源。同时作为比较,选用了 5 份近缘种。结合形态特征、生物学特性和农艺性状,采用 RAPD 分子标记技术对这些种质资源的 DNA 多态性进行分析,用以丰富红麻种质资源的遗传背景,为红麻资源遗传多样性的利用、品种鉴定及红麻的分子育种提供依据,其主要研究目的和内容是:(1)研究栽培种、野生种以及栽培种和野生种间的亲缘关系,同时与近缘种比较,进行分类学研究。(2)根据非洲起源的近缘种、野生种和栽培种亲缘关系的遗传距离,探索红麻的起源进化与传播途径。

2 引言

我国红麻资源遗传多样性十分丰富，主要表现在形态特征（如叶型、茎色、花大小和颜色等），及生物学特性（如生育特性、干物质积累、光合反应、抗病性，经济性状和产量等）^[36]。但仅凭形态特征和生物学特性不能鉴定品种及其来源，如有些红麻种子有些虽然品种名称相同，但田间表现迥然不同；形态特征和生物学特性甚至细胞学特征也不能很好的说明品种之间的亲缘关系。起源相近或亲本来源相同的红麻品种资源随着时间、环境和人为等因素的影响农艺性状不断变异，但在 DNA 分子水平上的变异相对较小^[58]。因此，获得一个有效的方法来鉴定红麻品种以及建立分子水平的亲缘关系明确种质的来源很重要，它直接关系到红麻种子市场管理、红麻的开发利用和红麻不同种质资源间的优异基因和种质的交流。

红麻野生种由于长期处与野生状态，经过野外各种各样的自然环境选择，因此具有抗病、抗虫、抗逆以及能提高纤维品质特性等潜在的有利基因，如对炭疽病免疫、高抗根结线虫病、品质极优、耐逆境（盐碱、干旱、洪涝）和垦荒能力极强等，这些有利的基因往往在栽培种中很难发现。而以往对红麻种质资源的遗传变异和亲缘关系的研究对红麻的野生种都涉及不多，而探索野生种和栽培种之间的遗传距离和亲缘关系有助于将这些潜在的优异有利基因更有效的导入常规栽培品种，因而具有重要的现实指导意义。

红麻在世界上分布和使用很广，非洲是大多数学者公认的红麻初级起源地。但是这些起源的提法都是基于野外的观察和调查。在亚洲，印度是最早进行红麻商业化种植的国家，然而对红麻在印度如何确立其种植地位和推广的信息了解很少。目前世界上有超过 20 个国家种植红麻，但对世界范围内的红麻传播途径了解有限。而国内利用 RAPD 分子标记技术对红麻的起源和传播途径进行也甚少^[58]。

表 1 供试材料 (品种) 的背景资料

Table 1. Background information of seeds in *Hibiscus cannabinus* L. used in the experiments

品种名称 Name of breeds	原产地 Origin	生育天数 Days of growth	叶型 Leaf's Shape	茎色 Stem's color	叶柄色 Leafstalk's color	花冠色 Corolla's color	种子大小 Area of flower	花萼色 Calyx's color	柱头长短 Chapter's length	柱头颜色 Chapter's color	其它 Else
H115, 红叶木槿	坦桑尼亚	114	全	紫	紫	红	小	紫红	正常	紫红	近缘种
85-113, 玫瑰麻	台湾	130	裂	紫	紫	淡红	大	紫红	正常	紫红	近缘种
HR01, 金钱吊芙蓉	福建	135	裂	淡红	微红	紫红	大	点红	正常	紫	近缘种
85-283	赞比亚	125	裂	绿	绿	黄	小	微红	正常	淡黄	近缘种
H1097	坦桑尼亚	140	裂	紫	绿	黄	小	绿	正常	红	近缘种
H004	肯尼亚	125	全	绿	绿	淡黄	大	绿	正常	紫	野生
H018	肯尼亚	114	全	绿	淡红	淡黄	大	绿	正常	紫	野生
H030	肯尼亚	109	裂	绿	淡红	淡黄	小	淡红	正常	红	野生
H032	肯尼亚	109	裂	绿	绿	淡黄	小	绿	正常	紫	野生
H038	肯尼亚	114	裂	绿	绿	淡黄	小	绿	正常	紫	野生
H060	坦桑尼亚	115	裂	红	淡红	淡黄	小	黄绿	半外露	紫红	野生分枝少
H074	坦桑尼亚	114	裂	绿	淡红	淡黄	小	淡红	正常	紫红	野生
H094	坦桑尼亚	109	裂	淡红	淡红	淡黄	大	绿	正常	红	野生
H102	坦桑尼亚	109	裂	绿	淡红	紫	小	绿	外露	紫	野生分枝多
H103	坦桑尼亚	115	裂	绿	淡红	紫	小	点红	外露	紫	野生
H108	坦桑尼亚	103	裂	绿	淡红	淡黄	小	红	正常	紫	野生
H134(b)	肯尼亚	114	裂	淡红	淡红	淡黄	小	淡红	正常	红	野生

统一编号 NO.	品种名称 Name	原产地 Origin	全生育天数 Days of growth	叶型 Leaf's Shape	茎色 Stem's color	叶柄色 Leafstalk's color	株高 cm Length	茎粗 cm Stem's girth	花冠色 Corolla's color	花萼色 Calyx's color	种子大小 Area of flowe	原麻产量 kg/亩 Capacity	其他 Else
7	新安无刺	广东	230	裂	绿	绿	380	1.5	淡黄	绿	大	400	栽培种
16	台 A 紫	台湾	135	裂	红	红	310	1.4	淡黄	淡红	大	250	栽培种
63	EV41	英国	230	全	淡红	微红	375	1.6	淡黄	绿	大	420	栽培种
90	C-2	孟加拉	230	全	淡红	微红	360	1.8	淡黄	绿	大	380	栽培种
99	S-7	萨尔瓦多	150	全	红	淡红	360	1.7	淡黄	绿	大	360	栽培种
139	F302	法国	85	裂	淡红	微红	280	1.1	淡黄	黄绿	大	185	栽培种
157	Gm23	危地马拉	210	全	淡红	微红	330	1.6	淡黄	淡红	大	340	栽培种

3 材料与方法

3.1 材料的准备

3.1.1 红麻品种的选择

选用来源于世界不同地区材料包括来自非洲、亚洲、美洲的不同国家和地区
的 7 份具有代表性的红麻栽培品种，12 份来自非洲的野生类型的红麻资源和 5
份红麻近缘种。（表 1）。

3.1.2 取材

将红麻种子用清水浸泡一下，去皮，用湿纱布擦洗干净，放入带有标记的塑
料袋中，-40℃冰箱中保存备用。

3.2 设备、仪器和试剂

3.2.1 设备和仪器

（1）瓷研钵若干；（2）离心管：1.5ml，若干；0.5ml，若干；（3）烧
杯：大、中、小型若干；（4）容量瓶：100ml、500ml、1000ml 各 3 个；（5）
移液器：1-20 μ l、20-100 μ l、50-200 μ l、100-1000 μ l；（6）移液管：1ml、2ml、
5ml、10ml 若干，并专用；（7）液氮罐一个；（8）水浴锅一个；（9）冰箱：
美菱家用冰箱；（10）冷冻离心机：德国产 Tettich MIKRO 22R 型冷冻离心机；
（11）微波炉；（12）电炉；（13）平板电泳仪：北京六一仪器厂生产平行板
电泳设备一套；（14）分光光度计：上海生产的 UV751-GD 光度计；（15）
PCR 仪：珠海黑马医学仪器有限公司（Hema 4800）PCR 仪一台；（16）凝胶
成像系统：Hema 凝胶图像处理系统；（17）酸度计：德国 METTLER TOLEDO
生产的 Delta 320-s pH 计；（18）电子天平：北京赛多利斯天平有限公司（BS210S）；
（19）手提式紫外检测仪

3.2.2 试剂药品

Tris、HCl、EDTA（乙二胺四乙酸）、SDS、2-巯基乙醇（2-ME）、氯仿、异
戊醇、乙醇、NaAc、NaOH、NaCl、溴化乙锭（EB）、溴酚蓝、甘油、琼脂糖。
（以上试剂除 SDS、2-巯基乙醇、琼脂糖为国外进口外，其它均为国产分析纯。）

Taq 酶（带有 10 $\times$ 缓冲液、25mM MgCl₂）、dNTPs、10bp 随机引物、矿物油、
双蒸水、EcoR I +HindIII Marker,3。（以上均从上海生工订购）

3.2.3 溶液配制:

(1) 0.5mol/L EDTA 称取 18.61g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶解在 70ml DDW 中, 加 7ml 10N 的 NaOH, 再用 10N 的 NaOH 调至 PH8.0(约 1.2ml), 最后定容至 100ml。

(2) 0.5mol/L Tris-Cl 在 800ml DDW 中溶解 6.055g Tris 碱, 用浓盐酸调校至 PH8.0, 加水定容至 100ml。

(3) SDS 提取液 称取 1.5g SDS 溶于 50ml DDW 中, 再加入 2.922g NaCl, 加入 20ml 0.5mol/L 的 Tris-Cl (PH8.0), 10ml 0.5mol/L 的 EDTA (PH8.0), 充分混匀溶解, 定容至 100ml。

(4) TE 缓冲液: 10mmol/L Tris-Cl (PH8.0)、1mmol/L EDTA (PH8.0)。

取 2ml 0.5mol/L -Cl, 0.2ml 0.5mol/L EDTA, 加水定容至 100ml。

(5) 溴化乙锭溶液: 在 20ml DDW 中溶解 0.2g 溴化乙锭, 混匀后于 4℃ 避光保存 (注意溴化乙锭具有致癌作用)。

(6) 氯仿:异戊醇 (24:1): 取 96ml 氯仿和 4ml 异戊醇, 二者充分混匀, 保存在棕色试剂瓶中。

(7) 酚: 氯仿:异戊醇 (25:24:1): 取 20ml 酚和 20ml 的氯仿:异戊醇, 二者充分混匀, 加适量 Tris 溶液饱和密封, 在棕色试剂瓶中避光保存。

(8) 氯仿:异戊醇:乙醇 (25:24:1): 取 50ml 氯仿, 48ml 异戊醇, 2ml 乙醇混匀。保存在棕色试剂瓶中。

(9) 70%乙醇: 取 70ml 乙醇, 用 DDW 定容至 100ml。

(10) 50×TAE 电极缓冲液: 称取 121.1g Tris 碱, 先用 300 ml DDW 加热搅拌溶解后, 加 28.5ml 冰乙酸, 再加 100ml 的 500mmol/L EDTA (PH8.0), 用冰乙酸调 pH 至 8.0, 然后加 DDW 定容至 500ml。

(11) 加样缓冲液: 20% (v/v) 甘油, 0.1mol/L 的 Na_2EDTA (PH8.0), 0.25% 溴酚蓝 (w/v)。

(12) 3M NaAc: 称取 24.612g NaAc, 溶于 70ml DDW 中, 用 3M 乙酸调 PH 值至 PH5.2, 用 DDW 定容至 100ml。

(13) 3M 乙酸: 取 50.04ml 36% 的乙酸, 用 DDW 定容至 100ml。

3.3 试验方法

3.3.1 基因组 DNA 提取

3.3.1.1 SDS-I 方法

(1) 称取约 0.7g 种子放入研钵, 加适量液氮研成粉末状。

(2) 加入 2.5~3ml 预热的 SDS 提取液 (100mmol/L Tris-Cl pH8.0、500mmol/L NaCl、50mmol/L EDTA pH8.0、1.5% SDS+少许 β -巯基乙醇 1.11g/ml), 磨匀,

倒入 7ml 离心管中。

(3) 65℃水浴 30min, 每隔 5~10min 用牙签轻搅几下。

(4) 加入 2.5ml 氯仿: 异戊醇 (24: 1), 彻底混匀, 室温静置 5~10min, 6000rpm 离心 5min。

(6) 移取上清, 加等体积氯仿: 异戊醇: 乙醇 (25: 24: 1), 混匀, 室温静置 5~10min, 6000rpm 离心 5min。

(7) 可重复第五步一次。

(8) 移取上清, 加等体积异丙醇 (-20℃预冷), 上下缓慢颠倒混匀十几次, 放入-20℃冰箱中至少 30min 以上。

(9) 6000rpm 离心 5min, 弃上清, 加约 0.5ml TE (10mmol/L Tris-Cl, 1mmol/L EDTA-Na₂ pH7.6) 溶解 DNA 沉淀。

(10) 加 1.5 μl RNaseA, 混匀后 37℃水浴 30min。

(11) 加 1/10 体积 3mol/L NaAc pH5.2 和 2 倍体积预冷无水乙醇混匀, 放入-20℃冰箱中至少 30min 以上。

(12) 12000rpm 离心 5min, 弃上清。

(13) 用 4ml 70%乙醇漂洗两次, 静置 10min。

(14) 12000rpm 离心 5min, 彻底去上清, 室温凉干后加适量 TE 溶解沉淀, 放 4℃冰箱备用。

3.3.1.2 SDS-II 方法

(1) 称取约 120mg 种子剪碎, 放入研钵, 加适量液氮研成粉末状。

(2) 将研钵放入 65℃水浴至样品刚开始融化, 向研钵加入 650ul 预热的 SDS 提取液 (100mmol/L Tris-Cl pH8.0、500mmol/L NaCl、50mmol/L EDTA pH8.0、1.5%SDS+少许 β-巯基乙醇 1.11g/ml), 用力研磨 30 秒,

(3) 收集研磨好的匀浆倒入 1.5ml 离心管中。不足 650ul 加 SDS 提取液至 650ul, 旋涡震荡 15 秒, 65℃保温 30 分钟~60 分钟。

(4) 加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 用力彻底混匀, 室温静置 5~10min, 5000rpm 离心 5min。

(5) 移取上清, 加等体积氯仿: 异戊醇 (24: 1), 混匀, 室温静置 5~10min, 5000rpm 离心 5min。

- (6) 移取上清, 加等体积氯仿: 异戊醇: 乙醇 (25: 24: 1), 混匀, 室温静置 5~10min, 5000rpm 离心 5min。
- (7) 弃沉淀, 上清转入另一干净的离心管, 加入加等体积异丙醇 (-20℃预冷), 上下缓慢颠倒混匀十几次, 放入-20℃冰箱中至少 30min 以上。
- (8) 6000rpm 离心 5min, 弃上清, 加约 0.5ml TE (10mmol/L Tris-Cl、1mmol/L EDTA-Na₂ pH7.6) 溶解 DNA 沉淀。
- (9) 加 1.5 μl RNaseA, 混匀后 37℃水浴 30min。
- (10) 加 1/10 体积 3mol/L NaAc pH5.2 和 2 倍体积预冷无水乙醇混匀, 放入-20℃冰箱中至少 30min 以上。
- (11) 仔细吸取其中的絮状沉淀至另一干净的离心管, 12000rpm 离心 5min, 弃上清。
- (12) 用 4ml 70%乙醇漂洗两次, 静置 10min。
- (13) 12000rpm 离心 5min, 彻底去上清, 室温凉干后加适量 TE 溶解沉淀, 放 4℃冰箱备用。

3.3.1.3 SDS-III^[59]方法

- (1) 称取 150mg 种子剪碎, 放入研钵, 加入 500ul 氯仿进行研磨, 研磨碎后加入 700ulSDS 提取液, 继续研磨 1~2 分钟。
- (2) 将匀浆转入 1.5ml 离心管中, 10000 rpm 离心 5min。
- (3) 取上清液, 加入 500ul 氯仿: 异戊醇 (24: 1), 摇动 30 秒, 7000 rpm 离心 6min。
- (4) 重复步骤 (3)。
- (5) 仔细吸取上清, 慢慢滴入提前加入 600ul 无水乙醇的离心管中, 轻轻摇动, 使出现絮状物沉淀, 12000 rpm 离心 6min。
- (6) 去上清液, 加约 0.5ml TE (10mmol/L Tris-Cl、1mmol/L EDTA-Na₂ pH7.6) 溶解 DNA 沉淀。
- (7) 在溶解的核酸溶液中加入适量的 RNA 酶, 混匀后 37℃水浴 30min。
- (8) 重复 (3)、(5)、(6) 步, 提取完毕的 DNA 溶液贮存于 4℃备用。

3.3.2 基因组 DNA 检测

- (1) 1%琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 大小;

(2) 紫外分光光度计法检测基因组 DNA 纯度(将基因组 DNA 稀释 100 倍后分别测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 并计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值。

3.3.3 RAPD 反应参数的优化设计

3.3.3.1 模板浓度

RAPD 对模板 DNA 的浓度要求不是很高, 但其浓度若超过一定范围会影响 RAPD 带型, 因此有必要通过试验来确定合适的 DNA 模板浓度。试验中用连续增加的模板 DNA 含量梯度, 分别为 15ng、20ng、25ng、30ng、35ng、40ng、45ng, 从中选出合适的 DNA 模板量。

3.3.3.2 dNTPs 浓度

本试验在 50 μ mol/L~350 μ mol/L 之间设置了 7 个 dNTPs 浓度梯度, 分别为 50 μ mol/L、100 μ mol/L、150 μ mol/L、200 μ mol/L、250 μ mol/L、300 μ mol/L、350 μ mol/L, 分析 dNTPs 浓度对扩增效果的影响, 选择出本试验最适宜的 dNTPs 浓度。

3.3.3.3 Taq 酶浓度

在 PCR 反应中, 使用高浓度 Taq 酶不仅会造成经济上的浪费, 而且容易产生非特异扩增产物, 影响实验结果; 而 Taq 酶含量过低又会使新链的合成效率下降, 导致扩增产物减少。本试验设置 7 个 Taq 酶含量梯度, 分别为 0.25U、0.5U、0.75U、1U、1.25U、1.5U、1.75U, 选出合适的 Taq 酶用量。

3.3.3.4 引物浓度

实验在保证其他因素相同的条件下, 设立 7 种引物浓度梯度, 分别为 0.2 μ mol/L、0.4 μ mol/L、0.6 μ mol/L、0.8 μ mol/L、1.0 μ mol/L、1.2 μ mol/L、1.4 μ mol/L, 确定合适的引物浓度。

3.3.3.5 MgCl₂ 浓度

本试验参照标准的 PCR 反应中 MgCl₂ 的含量, 设计了 MgCl₂ 浓度梯度, 分别为 0.5mmol/L、1.0mmol/L、1.5mmol/L、2.0mmol/L、2.5mmol/L、3.0mmol/L、3.5mmol/L。其他反应因子相同, 同时扩增。根据扩增结果来选择合适的 MgCl₂ 浓度。

3.3.4 RAPD 反应程序的优化设计

本研究以 Williams 等^[22]的反应程序为参考, 针对变性温度、退火温度及时

间、延伸时间和循环次数等条件进行试验。所有程序在 94℃ 预变性 5min，使模板 DNA 充分变性，然后进入下列温度循环，94℃ 变性、38℃ 退火、72℃ 延伸。结束循环后 72℃ 终延伸 7min，使其反应充分。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

3.3.5 遗传多样性的 RAPD 分析

3.3.5.1 PCR 扩增

每 25 μ l 反应体系含：1 $\times$ buffer，2.0mmol/L MgCl₂，200 μ mol/L dNTPs，0.6 μ mol/L 随机引物，45ng 的基因组 DNA，1.0U Taq 酶，对照样品加除总 DNA 以外的以上成分，用重蒸水代替总 DNA。

在 PCR 仪上按下列程序扩增：94℃ 预变性 5min，40 个热循环，每个循环包括：94℃ 变性 30sec，38℃ 退火 45sec，72℃ 延伸 1min30sec。结束循环后 72℃ 终延伸 7min。

3.3.5.2 PCR 产物的电泳检测

取 10 μ l 扩增产物加 1 μ l 1 $\times$ 加样缓冲液于 1.5% 琼脂糖凝胶（含 0.5 μ g/ml EB）、1 $\times$ TAE 缓冲液中，100V 稳压电泳约 2 小时，PCR Marker 作标准。在 Hema 凝胶自动成像系统上拍照，将图片存入电脑。并且为了尽量避免假阳性，每一扩增反应实验重复 3 次，选择稳定性较好、重复性较高的图片进行扩增产物的分析。

3.3.5.3 扩增产物的分析

统计扩增结果，在电泳图谱上同一 RAPD 位点上有电泳条带记为 1，无电泳条带记为 0，以此为基础进行以下分析：

(1) 多态性频率：单个引物的所有品种带型完全一致，记为无多态性，如果在一个片段上有差异，则记为多态性^[60]。多态性频率=多态性品种数/总品种数。

(2) 遗传分类：按 Nei^[61] 的方法计算品种间的相似系数（GS）： $GS = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$ ，其中 N_X 、 N_Y 分别是样本 X 和样本 Y 扩增出的 DNA 片段总数， N_{XY} 是样本 X 和样本 Y 共有的 DNA 片段数，遗传差异 $GD = 1 - GS$ ，应用 DPS 软件，采用 UPGMA（Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean）聚类方法对 GD 进行遗传分类，构建分子系统树状图构建树系图^[62]。

4 结果与分析

4.1 红麻基因组 DNA 提纯

红麻种子中多糖成分及果胶含量高, DNA 提取难度较大, 对此已有一些研究, 提出了一些在红麻种子中提取 DNA 的方法。本研究在此基础上者采取了 3 种不同的方法提取红麻品种新安无刺 007 和台 A 紫 016 的基因组 DNA, 比较和探讨了它们的提取效果, 并将其中最优的方法分别运用于提取红麻种子基因组, 用于 RAPD 扩增。

4.1.1 紫外检测

取 $3\mu\text{l}$ DNA 提取液, 加入 $150\mu\text{l}$ dd H_2O , 即将其稀释 50 倍于 UV-1600 紫外可见分光光度计上测定波长 260nm、280nm 处的吸光度。根据 A_{260}/A_{280} 值判断 DNA 纯度, A_{260} 值计算 DNA 浓度 (表 2、表 3)。

表 2 不同提取法所得种子 DNA 的紫外分析结果
Table 2. The result of UV analysis by different extracted method in DNA of seeds

提取方法 Mothed	品种 breeds	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	DNA 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) Concentration	提取物溶解 Dissolution
SDS-I 方法	新安无刺 007	1.301	0.807	1.612	3252.5	难
	台 A 紫 016	1.575	0.895	1.76	3937.5	难
SDS-II 方法	新安无刺 007	0.992	0.55	1.803	2480	易
	台 A 紫 016	0.999	0.492	2.03	2475	易
SDS-III 方法	新安无刺 007	0.366	0.256	1.429	915	极难
	台 A 紫 016	0.213	0.134	1.589	532.5	极难

从表 2 可以看出, 使用 SDS-II 方法从两个品种中获得的 DNA 浓度分别达到了 $2480\mu\text{g/ml}$ 、 $2475\mu\text{g/ml}$, 而且其 A_{260}/A_{280} 分别为 1.803 和 2.03, 纯度较高。本试验在提取基因组过程中, 省略了去除 RNA 步骤, 所以 A_{260}/A_{280} 值接近 2.0 是合理的, 它对实验结果没有影响。虽然 SDS-I 方法获得的 DNA 浓度较大, 两个品种分别达到了 $3252.5\mu\text{g/ml}$ 和 $3937.5\mu\text{g/ml}$, 但是其 A_{260}/A_{280} 分别为 1.612 和 1.76, 其纯度相对 SDS-II 方法不够高, 而且提取结果不够稳定。SDS-III 方法无论 DNA 浓度和纯度均不符合要求, 可见此方法不适合红麻基因组的提

取。所以本实验采用 SDS-II 法从红麻种子中提取基因组，效果较为理想，符合分子生物学的要求。用 SDS-II 法对 24 种红麻及其近缘种 DNA 提取的紫外分析结果见表 3。

表 3 SDS-II 方法对 24 种红麻品种的种子 DNA 提取的紫外分析结果

Table 3. The result of UV analysis by SDS-II method in DNA of
Hibiscus cannabinus L. 's 24 cultivars' seeds

序号 No.	品种 Breed	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA 浓度 (μg/ml) dissolution
1	063 EV41	1.596	0.847	1.884	3922.5
2	139 F302	0.805	0.404	1.991	2012.5
3	157 GM23	0.953	0.476	2	2382.5
4	016 台 A 紫	0.999	0.492	2.013	2475
5	007 新安无刺	0.992	0.55	1.803	2480
6	090 C-2	1.263	0.619	2.044	3150
7	099 S-7	1.24	0.646	1.919	3100
8	H115 红叶木槿	0.771	0.423	1.823	1927.5
9	H097 H.calyphyllus	1.235	0.619	1.995	3087
10	85-283 H.hiernianus	1.602	0.933	1.717	4005
11	HR01 金钱吊芙蓉	0.985	0.484	2.035	2462.5
12	85-113 玫瑰麻	0.721	0.387	1.86	1802.5
13	H004	0.297	0.154	1.929	742.5
14	H018	0.546	0.271	2.014	1365
15	H030	0.667	0.356	1.874	1667.5
16	H032	0.854	0.432	1.977	2135
17	H038	0.754	0.401	1.88	1885
18	H060	0.132	0.087	1.517	330
19	H074	0.667	0.332	2.009	1667.5
20	H094	1.382	0.742	1.863	3455
21	H102	0.819	0.41	1.997	2047.5
22	H103	0.838	0.503	1.666	2095
23	H108	1.391	0.716	1.943	3477.5
24	H134 (b)	0.493	0.259	1.903	1232.5

4. 1. 2 电泳检测

本试验采用 Lambda DNA/EcoR I +HindIII Marker,3 为标准于 1.0%琼脂糖凝胶中电泳 DNA 样品、拍照以判断 DNA 浓度及分子量大小。从不同提取法所得的 DNA 电泳图谱 (图 1) 中可看出, 各种方法所提取的基因组 DNA 均在 21kb

左右，从亮度可判断出 SDS- I 方法所提取的 DNA 浓度最大。从 SDS- II 方法对 24 种红麻品种的种子 DNA 提取的电泳图谱（图 2）看出它们的大小和浓度都满足 PCR 扩增和 RAPD 分析的要求。

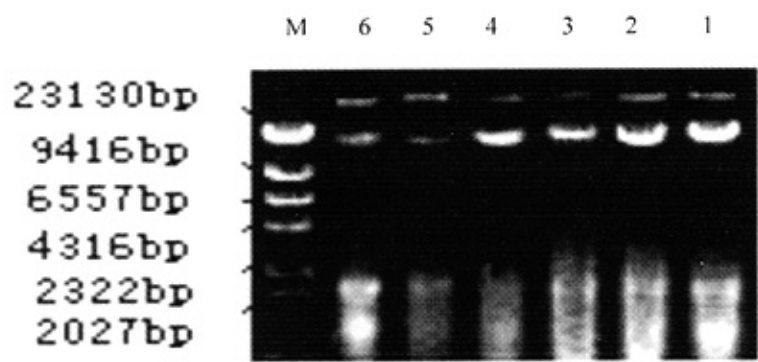


图 1 不同提取法获得的红麻种子 DNA 图谱

Figure 1. Agarose gel electrophoresis analysis of *Hibiscus cannabinus* L.'s genomic DNA

1, 2: SDS- I 方法 3, 4: SDS- II 方法 5, 6: SDS- III 方法

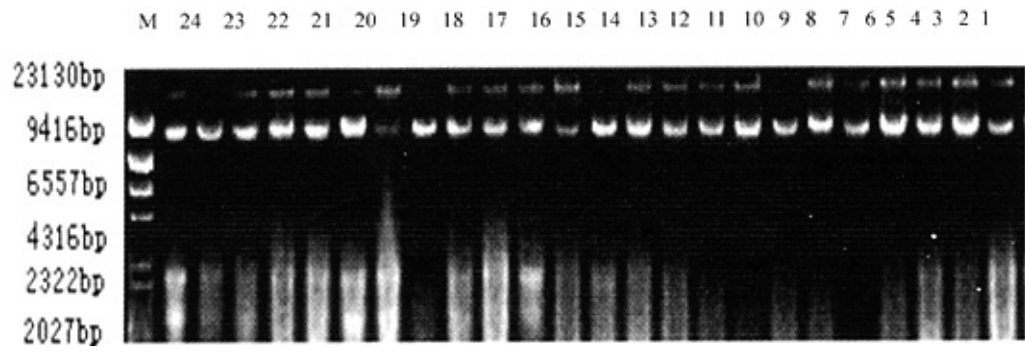


图 2 用 SDS- II 方法提取 24 种红麻品种的种子 DNA 图谱

Figure 2. Agarose gel electrophoresis analysis by SDS- II method in genomic DNA of *Hibiscus cannabinus* L.'s twenty-four seeds

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木樨 9. H097 H calyphyllus 10. 85-283 H. hiemianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032 17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

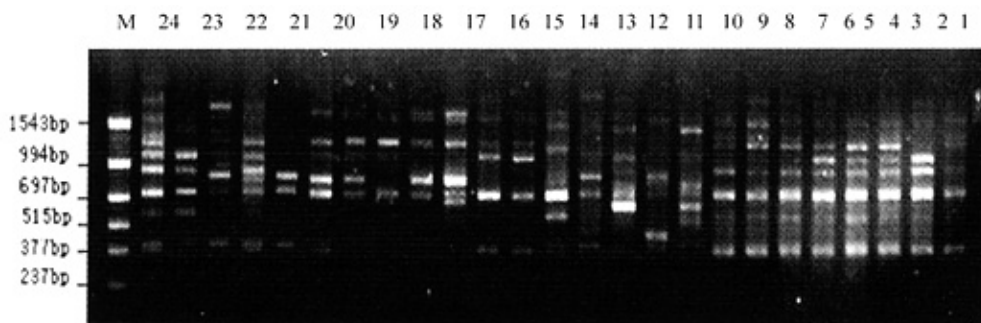


图 3 用 SDS-II 方法提取 24 种红麻品种的种子 DNA 的 PCR 扩增图谱 (引物 S₃₂)

Figure 3. The result of PCR analysis with primer S₃₂ by SDS-II method in genomic DNA of *Hibiscus cannabinus* L.'s twenty-four seeds

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiernianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

4. 1. 3 PCR 扩增结果分析

以提取的 24 个品种的种子 DNA 为模板, 10 个碱基寡核苷酸引物于 Hema 4800 PCR 仪上作 PCR 扩增。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 检测扩增效果, 并在 Hema 凝胶摄影系统上拍照 (图 3)。从电泳图谱中可见所提取的 24 个品种的种子 DNA 皆能扩增出条带, 说明模板 DNA 质量符合 PCR 扩增的要求。通过紫外检测、电泳检查和 PCR 扩增, 表明 SDS-II 方法适用于红麻种子的 DNA 提取, 是一种有效、稳定的能够用于 RAPD 分析的红麻种子 DNA 提取新方法。

4. 2 红麻 RAPD 反应体系的优化

4. 2. 1 红麻 RAPD 反应参数的优化

进行 RAPD 分析, 首先应建立稳定的、可重复的 RAPD 优化反应体系, 这样才能将 RAPD 谱带用于品种间遗传差异比较, 确保实验结果的准确性。本试验对红麻 RAPD 反应中的模板浓度、dNTPs 浓度、Taq 酶浓度、引物种类和浓度、MgCl₂ 浓度和反应程序进行了设计, 建立了重复性强、稳定的红麻 RAPD 反应参数。

4. 2. 1. 1 不同模板浓度对扩增效果的影响

RAPD 对模板 DNA 的浓度要求不是很高, 但是其浓度仍是制约扩增产物获得率及产物特异性的一个重要因素^[63]。过高或过低均会对实验结果有很大影响。本试验设置了 5ng、15 ng、25 ng、35 ng、45 ng、55 ng、65 ng 7 个 DNA 浓度梯度, 比较了不同的模板浓度对扩增的影响 (图 4)。结果表明: 模板浓度

在 15—65 ng 范围内时带型和扩增强度基本相同。条带清晰、稳定，分辨率高。本实验选出合适的模板量为 45 ng。

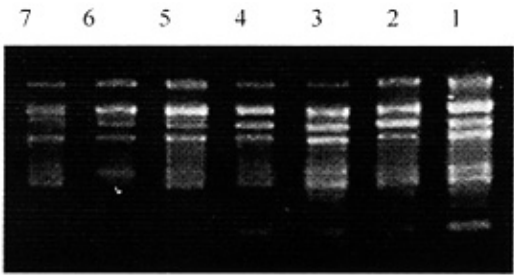


图 4 不同模板浓度扩增的 RAPD 带型（引物 S₁₁₃₅）

Figure 4. The RAPD profile with primer S₄₃₀ and different DNA concentrations

1. 5ng 2. 15ng 3. 25ng 4. 35ng 5. 45ng 6. 55ng 7. 65ng

4. 2. 1. 2 不同引物浓度对扩增效果的影响

RAPD 扩增中，引物浓度过低则无法检测出所有的位点，浓度过高会产生引物二聚体，且因 RAPD 所用的退火温度较低，随机引物碱基较少，高浓度的引物还会增加非特异性扩增的增加。在同一引物，不同模板；同一模板，不同引物的条件下扩增，可看出结果也不太一致（图 5、6）。实验中设置了 7 种引物浓度梯度，分别为 0.1 μmol/L、0.4 μmol/L、0.6 μmol/L、1.0 μmol/L、1.4 μmol/L、1.6 μmol/L、1.8 μmol/L，从图 7 结果看出引物浓度的增加引起扩增的 DNA 含量有所增加。引物量为 1.8 μmol/L 时扩增产物稍有弥散。本实验确定合适的引物浓度为 0.6 μmol/L。

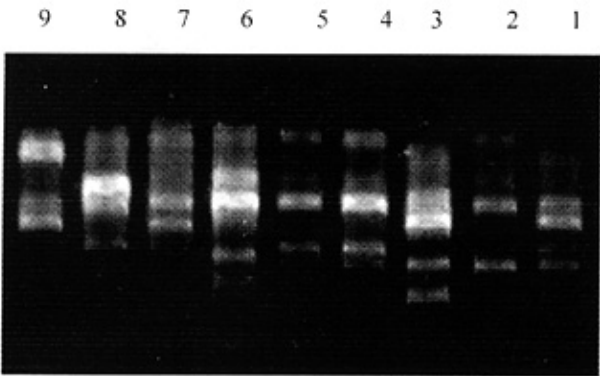


图 5 同一模板（台 A 紫 016）不同引物扩增的 RAPD 带型

Figure 5. The RAPD profile with same template 台 A 紫 016 and different primers

1. S₁₁₂ 2. S₇₇ 3. S₁₂ 4. S₃₉ 5. S₁₃₀ 6. S₁₅₆ 7. S₁₅₈ 8. S₁₇₆ 9. S₁₅₆

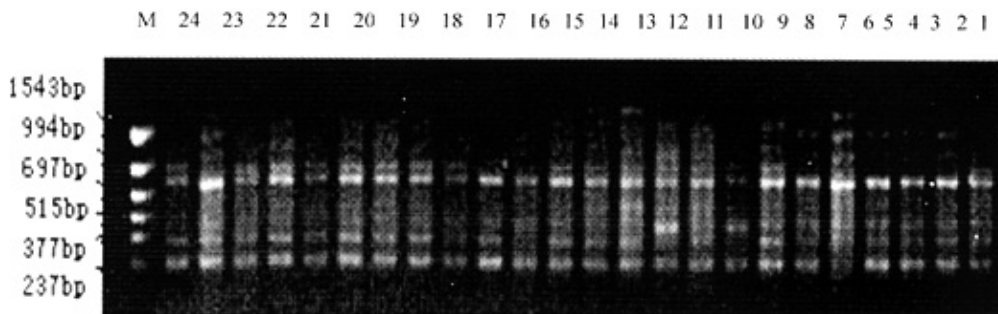


图 6 同一引物（引物 S_{108} ）不同模板扩增的 RAPD 带型

Figure 6. The RAPD profile with primer S_{108} and different templates

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木樨 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.biernianus 11. H001 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

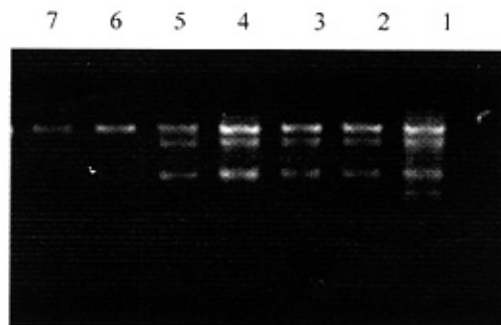


图 7 不同引物 S_{363} 浓度扩增的 RAPD 带型

Figure 7. The RAPD profile with different primer S_{363} concentrations

1. 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 2. 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 3. 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 4. 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 5. 1.4 $\mu\text{mol/L}$ 6. 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 7. 1.8 $\mu\text{mol/L}$

4. 2. 1. 3 不同 Mg^{2+} 浓度对扩增效果的影响

Mg^{2+} 是酶活性的必需因素，它不仅会影响酶的活性及合成的忠实性，而且

还会影响引物与模板的结合效率、模板与 PCR 产物的解链稳定及产物的特异性和引物二聚体的形成等^[64]。其浓度的变化不仅影响 RAPD 带型的相对强弱，还会影响带的有无。所以合适的 Mg^{2+} 浓度对扩增反应非常重要。本实验设计了 7 个 $MgCl_2$ 浓度梯度，分别为 0.5mmol/L、1.0mmol/L、1.5mmol/L、2.0mmol/L、2.5mmol/L、3.0mmol/L、3.5mmol/L，从图 8 的结果表明， $MgCl_2$ 浓度为 0.5mmol/L 时扩出的条带少， $MgCl_2$ 浓度为 1.0mmol/L、1.5mmol/L、2.0mmol/L、2.5mmol/L 时都能扩增出清晰的谱带，而 $MgCl_2$ 浓度为 3.0mmol/L、3.5mmol/L 时扩增带呈弥散状态。本实验选择合适的 $MgCl_2$ 浓度为 2.0mmol/L。

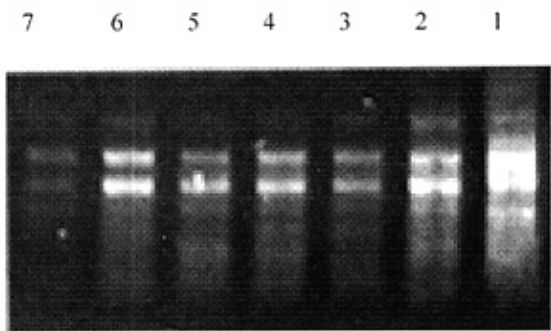


图 8 引物 S_{173} 在不同的 $MgCl_2$ 浓度下扩增的 RAPD 带型

Figure8. The RAPD profile with primer S_{173} and different $MgCl_2$ concentrations

1. 0.5mmol/L 2. 1.0mmol/L 3. 1.5mmol/L 4. 2.0mmol/L
5. 2.5mmol/L 6. 3.0mmol/L 7. 3.5mmol/L

4. 2. 1. 4 不同 dNTPs 浓度对扩增效果的影响

dNTPs 是 PCR 扩增的原料之一。因为脱氧核苷三磷酸与 Mg^{2+} 之间呈数量关系结合^[65]，所以 dNTPs 浓度太高时会影响 Mg^{2+} 与酶的结合，进而抑制 Taq 酶的活性；而浓度过低导致原料不足，又会影响扩增产物的量。在 RAPD 中 dNTPs 的浓度一般在 $150\mu\text{mol/L}\sim250\mu\text{mol/L}$ 之间较为合适^[64]。本实验在 $50\mu\text{mol/L}\sim350\mu\text{mol/L}$ 之间设置了 7 个 dNTPs 浓度梯度，分别为 $50\mu\text{mol/L}$ 、 $100\mu\text{mol/L}$ 、 $150\mu\text{mol/L}$ 、 $200\mu\text{mol/L}$ 、 $250\mu\text{mol/L}$ 、 $300\mu\text{mol/L}$ 、 $350\mu\text{mol/L}$ ，从图 9 的结果表明，dNTPs 浓度为 $50\mu\text{mol/L}$ 、 $100\mu\text{mol/L}$ 、 $300\mu\text{mol/L}$ 、 $350\mu\text{mol/L}$ 时扩增谱带不稳定，浓度为 $150\mu\text{mol/L}$ 、 $200\mu\text{mol/L}$ 、 $250\mu\text{mol/L}$ 时带型清晰稳定。故选 dNTPs 浓度为 $200\mu\text{mol/L}$ 。

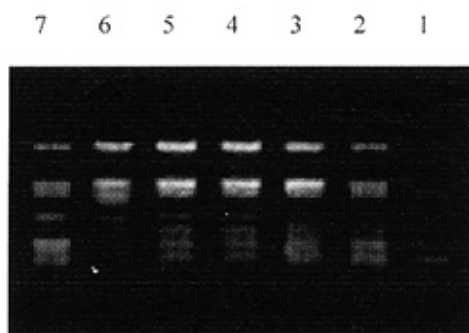


图 9 不同 dNTPs 浓度扩增的 RAPD 带型 (引物 S_{160})

Figure 9. The RAPD profile with primer S_{160} and different dNTPs concentrations

1.50 $\mu\text{mol/L}$ 2.100 $\mu\text{mol/L}$ 3.150 $\mu\text{mol/L}$ 4.200 $\mu\text{mol/L}$
5.250 $\mu\text{mol/L}$ 6.300 $\mu\text{mol/L}$ 7.350 $\mu\text{mol/L}$

4.2.1.5 不同 Taq 酶浓度对扩增效果的影响

Taq 酶浓度和质量对扩增结果有决定性的影响。在条件合适时, 每 100 μl 体系中一般使用 1~2.5U Taq 酶^[66,67]。Taq 酶浓度太低, 将导致无扩增产物或产物量少; 浓度过高, 不仅会造成经济上的浪费, 而且容易产生非特异性产物的积累, 影响实验结果。使用来源于不同品牌的 Taq 酶因为存在质量、浓度等差别, 得出的实验结果也不一样。实验中设置为 0.25u、0.5 u、0.75 u、1.0 u、1.25、1.5U、2.0 u 七种 Taq 酶用量 (图 10)。结果表明, Taq 酶用量在 < 0.5 u 时带纹少而且较模糊; 用量在 > 1.25u 时带型有些弥散。为保证试验结果准确, Taq 酶用量定为 1.0u/25ul。

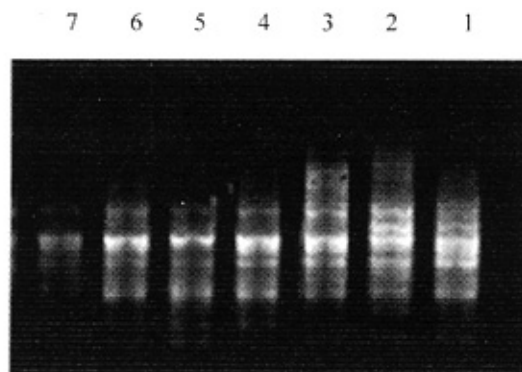


图 10 不同 Taq 酶浓度扩增的 RAPD 带型 (引物 S_{363})

Figure 10. The RAPD profile with primer S_{363} and different Taq DNA polymerases concentrations

1. 0.25U 2. 0.5U 3. 0.75U 4. 1U 5. 1.25U 6. 1.5U 7. 2.0U

4.2.2 红麻 RAPD 循环参数的优化

4.2.2.1 变性温度和时间对扩增效果的影响

典型的 RAPD 变性温度在 94℃~95℃，时间为 30sec 至 1min 左右。变性温度过低，双链 DNA 解链不彻底，容易导致 PCR 失败。变性温度时间过长，会导致酶活性的损失。本试验设置变性温度为 94℃和 95℃；变性时间设置为 15sec、30sec 和 60sec。其结果表明（图 11）94℃变性 30sec（泳道 2）和 60sec（泳道 3）所扩增出的带型结果基本一致。故本实验中变性温度和时间设置为 94℃、30s。

4.2.2.2 退火温度和时间对扩增效果的影响

复性温度决定着扩增的特异性，引物和模板复性所需要的温度与时间取决于引物的长度、浓度和其碱基中 G+C 的含量。RAPD 的 10 个碱基的引物，退火温度一般在 40℃以下，一般退火温度为 36℃~38℃。本实验分别在 36℃、38℃、340℃三种退火温度条件下进行扩增，电泳结果显示（图 11 泳道 4，5，6），38℃（泳道 5）所扩增的结果产物条带数较为合适。本实验分别比较了 38℃时退火 30sec（泳道 7）、60sec（泳道 8）和 90 sec（泳道 9）对扩增结果的影响。从图中可以看出，这 3 种退火时间扩增结果相似，本实验选择退火时间 60sec。

4.2.2.3 延伸时间对扩增效果的影响

Taq 酶最适作用温度为 72℃，PCR 扩增中一般均采用 72℃的延伸温度。在一定的反应体系中，延伸时间主要是由欲扩增的目的片段长度所决定的。本试验中设置了 60s、90s 和 120s 三种延伸时间。从结果看（图 11 泳道 10，11，12），三种延伸时间扩增出的带型差异不大，在 60s 下谱带稍弱；在 90s 和 120s 时谱带较为清晰且稳定。本实验选择延伸时间 90s。

4.2.2.4 循环次数对扩增效果的影响

PCR 循环次数决定到扩增产物的量，一般为 45 个循环，以使产物足够被检测到。最适循环次数主要取决于靶序列的初始浓度。本实验分别进行了 30 次（泳道 13）、40 次（泳道 14）、50 次（泳道 15）循环次数的实验，结果表明，除扩增出谱带的强度有所差别外，扩增出的带型基本一致。本实验选择循环次数 40 次。

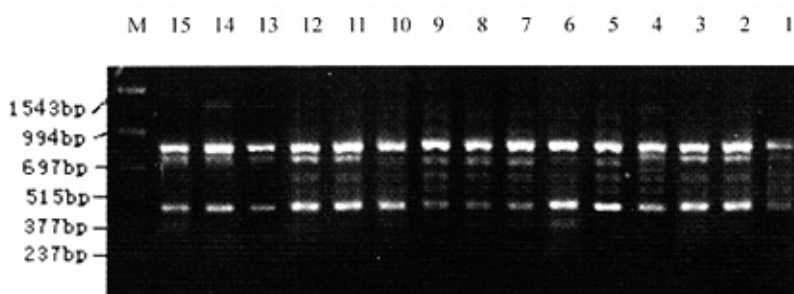


图 11 （引物 S₁₇₅）不同扩增参数对 RAPD 图谱的影响

Figure 11. Effects on RAPD profile with primer S₁₇₅ and different amplifying parameters

4.3 供试红麻品种及其近缘种 RAPD 分析

4.3.1 引物的筛选

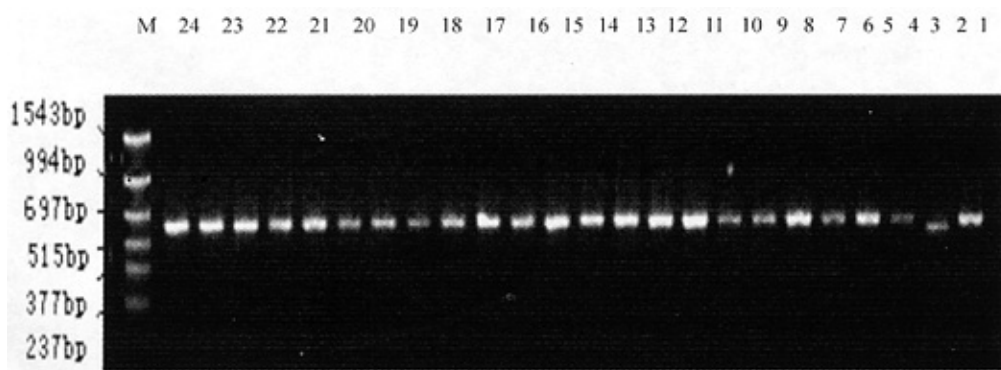
以近缘种玫瑰麻 85-113、野生种 H004、H032 和栽培种新安无刺等 4 个品种的基因组 DNA 为模版，对 70 个 Sangon 公司的 S 系列的 10bp 随机引物进行筛选，只有那些能得到清晰的、可重复的扩增产物的引物才用于 RAPD 分析，共选出 21 个引物，它们的名称、序列及扩增结果见表 4。部分引物扩增图谱见图 12~27。

21 个引物的 PCR 扩增，每个引物扩增的 DNA 片段数为 3~11 个，共产生 140 条带，平均每个引物扩增出 6.7 条带。其中，单态带 21 条，平均每个引物扩增出 1 条，多态带 119 条，占 85%，平均每个引物扩增出 5.7 条多态带，可看出所筛选的 21 个引物在供试品种中都有很高的多态性。在全部供试材料中，各个引物扩增的位点数相差较大，不同引物的扩增带数变幅从 3—11 条不等，其中扩增带数最多的为 s189 号引物，具 11 条扩增带引物，最少的为 s22 号引物，仅具 3 条扩增带。

表 4 红麻基因组 DNA 21 个引物扩增结果

Table4 The amplified result of 21 primers in *Hibiscus cannabinus* L.genomic DNA

引物 primer	序列 sequence	总计 summon	单态带 monomorphism	多态带 polymorphism	P*%
s21	CAGGCCCTTC	4	2	2	50
s22	TGCCGAGCGT	3	1	2	66.6
s32	TCGGCGATAG	10	2	8	80
s27	GAAACGGGTG	10	1	9	90
s34	TCTGTGCTGG	6	0	6	100
s139	CCTCTAGACC	5	1	4	80
s161	ACCTGGACAC	8	2	6	75
s178	TGCCCAGCCT	5	0	5	100
s456	TCGGCGGTTC	3	1	2	66.6
s153	CCCGATTCGG	4	0	4	100
s1146	AGGCAGCCTG	7	1	6	85.7
s166	AAGGCGGCAG	5	1	4	80
s151	GAGTCTCAGG	7	0	7	100
s162	GGAGGAGAGG	8	1	7	87.5
s160	AACGGTGACC	8	1	7	87.5
s188	TTCAGGGTGG	9	1	8	88.8
s173	CTGGGGCTGA	7	1	6	85.7
s187	TCCGATGCTG	8	1	7	87.5
s189	TCCTGGTCCC	11	2	9	81.8
s170	ACAACGCGAG	5	2	3	60
S1123	AGCCAGGCTG	7	1	6	85.7
合计 21 个		140	22	118	85

图 12 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下 (引物 S₁₁₁₁) 扩增的单态性图谱Figure 12. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₁₁₁

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiemianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

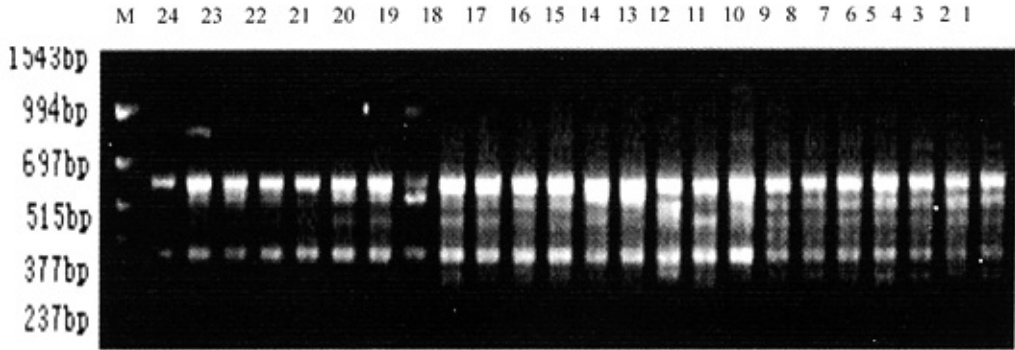


图 13 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₂₁）扩增的多态性图谱

Figure 13 The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S₂₁

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiemianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

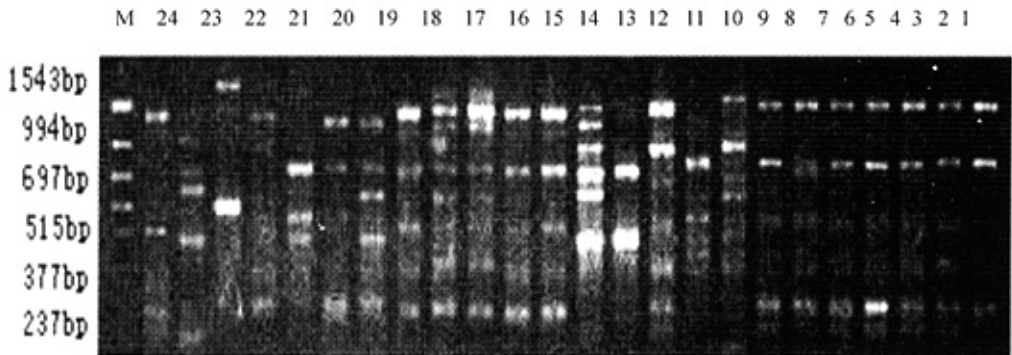


图 14 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₂₇）扩增的多态性图谱

Figure 14. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S₂₇

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiemianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

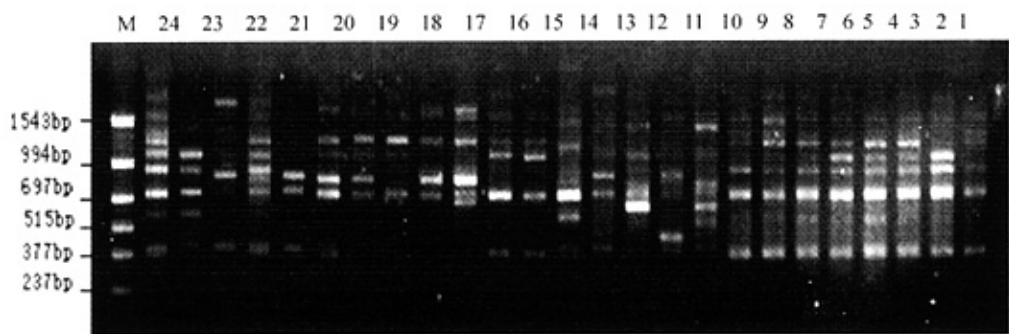


图 15 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S_{32} ）扩增的多态性图谱

Figure 15. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S_{32}

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiemianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

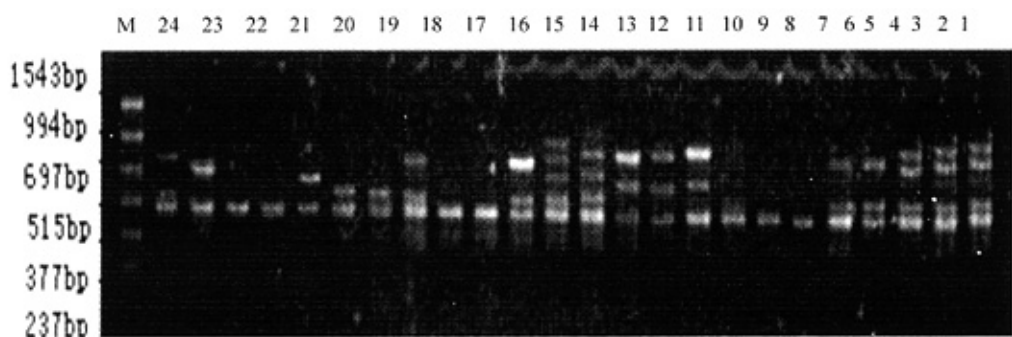


图 16 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S_{139} ）扩增的多态性图谱

Figure 16. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S_{139}

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiemianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

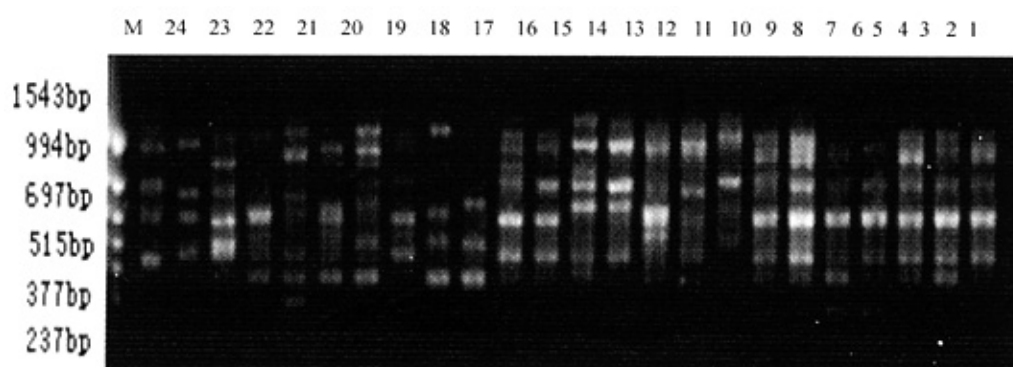


图 17 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S_{151} ）扩增的多态性图谱

Figure 17. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S_{151}

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiemianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

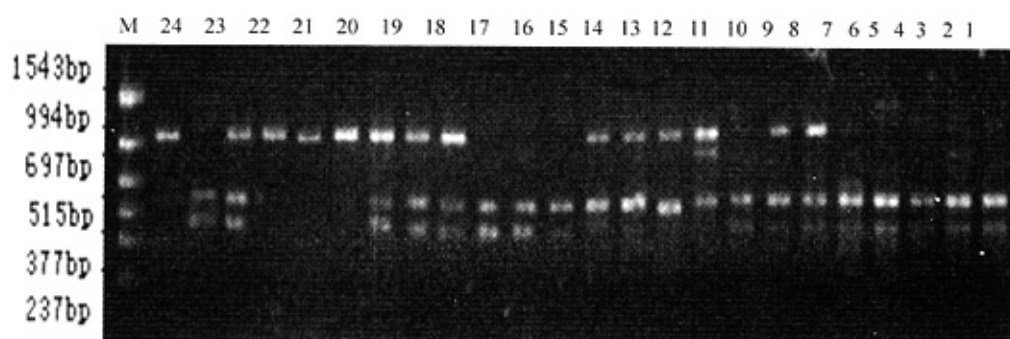


图 18 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S_{153} ）扩增的多态性图谱

Figure 18. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S_{153}

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiemianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

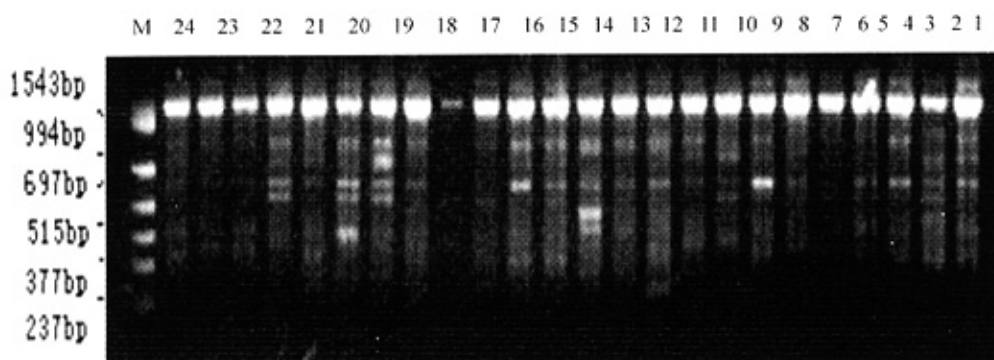


图 19 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₆₂）扩增的多态性图谱

Figure 19. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S₁₆₂

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiernianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

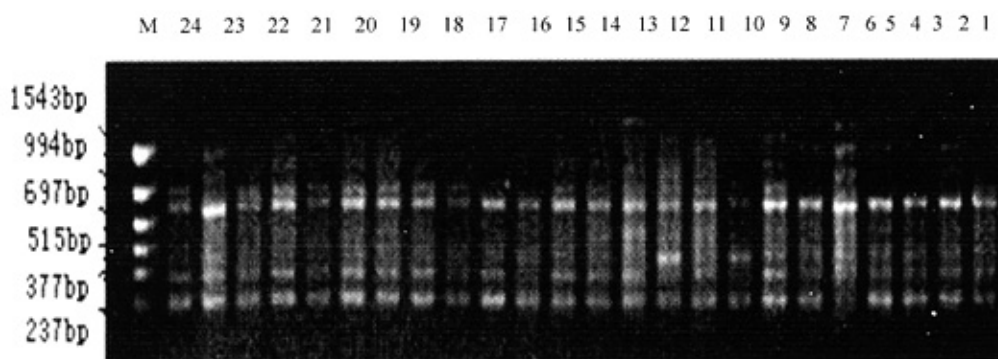


图 20 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₆₆）扩增的多态性图谱

Figure 20. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S₁₆₆

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiernianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

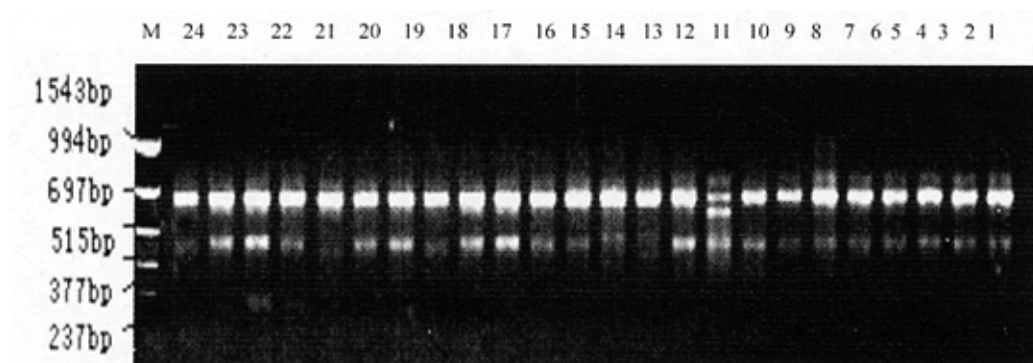


图 21 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₇₀）扩增的多态性图谱

Figure 21. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₇₀

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiernianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

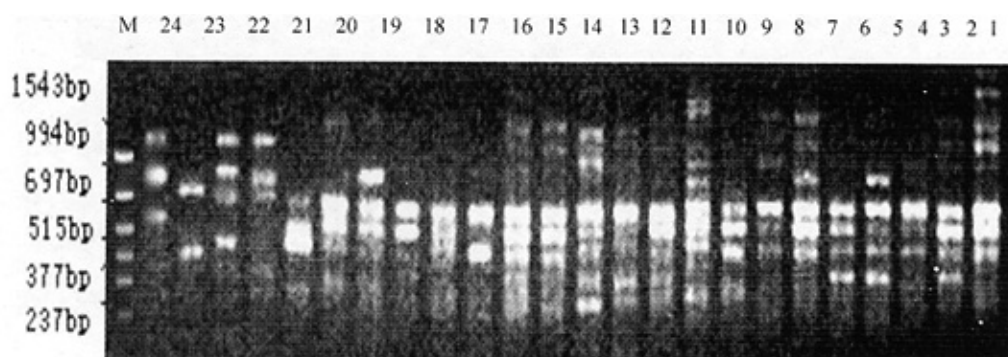


图 22 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₇₃）扩增的多态性图谱

Figure 22. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₇₃

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiernianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

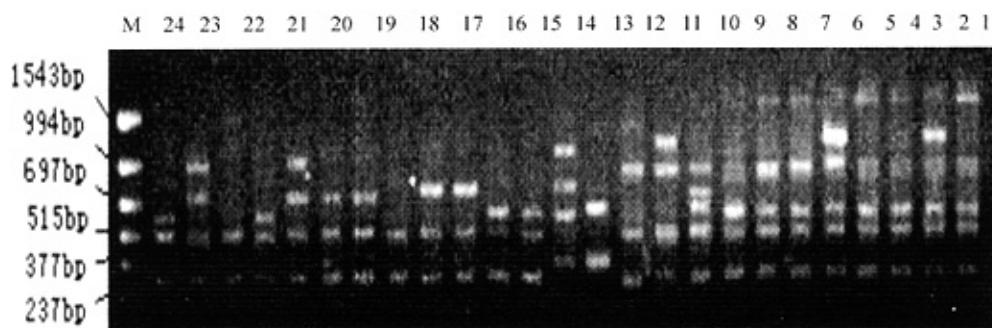


图 23 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S_{178} ）扩增的多态性图谱

Figure 23. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S_{178}

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiemianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

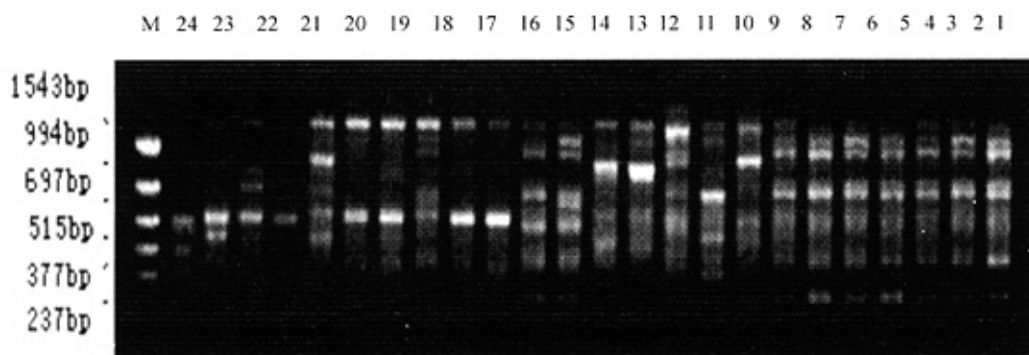


图 24 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S_{187} ）扩增的多态性图谱

Figure 24. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S_{187}

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiemianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

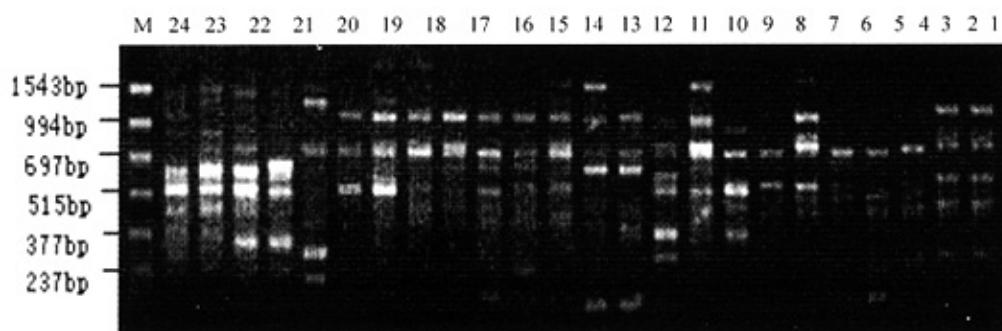


图 25 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S_{189} ）扩增的多态性图谱

Figure 25. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S_{189}

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiernianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

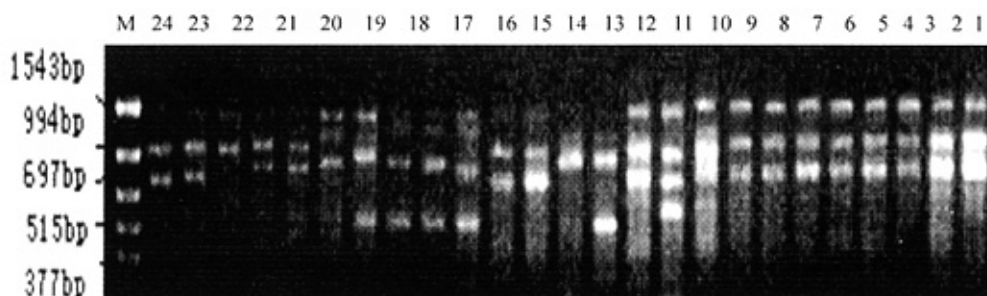


图 26 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S_{366} ）扩增的多态性图谱

Figure 26. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S_{366}

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiernianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

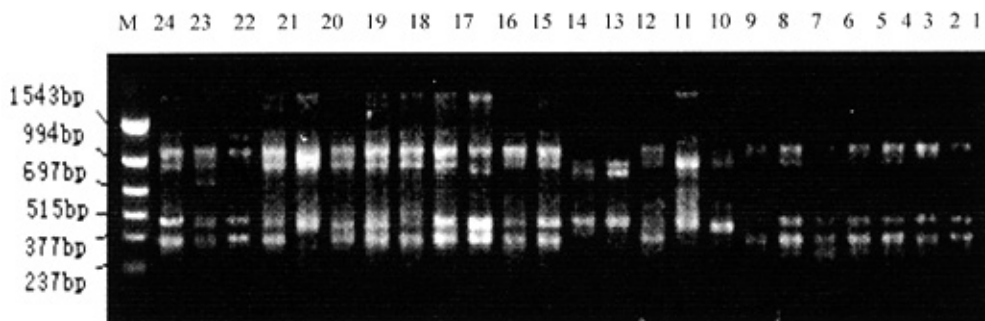


图 27 红麻 24 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S_{1123} ）扩增的多态性图谱

Figure 27. The RAPD profile of 24 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars

with optimized reaction system and primer S_{1123}

1. 063 EV41 2. 139 F302 3. 157 GM23 4. 016 台 A 紫 5. 007 新安无刺 6. 090 C-2 7. 099 S-7 8. H115 红叶木槿 9. H097
H.calyphyllus 10. 85-283 H.hiernianus 11. HR01 金钱吊芙蓉 12. 85-113 玫瑰麻 13. H004 14. H018 15. H030 16. H032
17. H038 18. H060 19. H074 20. H094 21. H102 22. H103 23. H108 24. H134 (b)

表 5 任意两个品种间的遗传差异度 (表下部)

Table5. Genetical distance between any two individuals

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0																							
2	0.10	0																						
3	0.12984	0.0952	0																					
4	0.1654	0.1406	0.0984	0																				
5	0.2066	0.1311	0.1379	0.1017	0																			
6	0.1811	0.1719	0.1311	0.129	0.1695	0																		
7	0.157	0.1639	0.1034	0.1525	0.1429	0.1186	0																	
8	0.5455	0.5495	0.5238	0.5514	0.5446	0.4953	0.505	0																
9	0.4454	0.4167	0.4211	0.431	0.4545	0.2931	0.4	0.4545	0															
10	0.371	0.344	0.3782	0.3719	0.3739	0.3388	0.3391	0.3654	0.3982	0														
11	0.5701	0.537	0.549	0.5385	0.5918	0.5577	0.5102	0.5862	0.4792	0.4455	0													
12	0.5537	0.5246	0.569	0.5593	0.5893	0.5763	0.5714	0.6238	0.5273	0.4957	0.2245	0												
13	0.2203	0.2773	0.2566	0.3043	0.3211	0.2696	0.2844	0.5714	0.4766	0.4107	0.5789	0.5229	0											
14	0.3091	0.3514	0.3333	0.3458	0.3663	0.3271	0.3069	0.5556	0.5354	0.4038	0.5632	0.5446	0.1429	0										
15	0.6117	0.6154	0.5714	0.58	0.5745	0.5	0.5532	0.6386	0.5435	0.5258	0.7	0.7234	0.4725	0.4458	0									
16	0.6327	0.6162	0.5699	0.6	0.5955	0.5579	0.573	0.5897	0.5862	0.587	0.7067	0.6854	0.5349	0.5385	0.2676	0								
17	0.4369	0.4615	0.3878	0.44	0.4894	0.44	0.4043	0.6145	0.5217	0.4433	0.55	0.5957	0.3187	0.3253	0.3947	0.3521	0							
18	0.5514	0.5556	0.5098	0.5385	0.6122	0.5	0.5306	0.6782	0.4792	0.5446	0.5714	0.6327	0.4947	0.5172	0.3	0.3067	0.275	0						
19	0.56	0.5248	0.4737	0.567	0.5604	0.5052	0.4945	0.675	0.573	0.5319	0.6623	0.6923	0.4773	0.475	0.2877	0.3529	0.2877	0.1948	0					
20	0.6238	0.6275	0.5833	0.6531	0.6739	0.6122	0.6087	0.5802	0.5556	0.5368	0.6154	0.6739	0.6404	0.6543	0.5676	0.4493	0.5676	0.4872	0.4648	0				
21	0.5882	0.6311	0.5876	0.5758	0.6129	0.5556	0.5269	0.6585	0.6703	0.5417	0.7468	0.7419	0.5111	0.5122	0.4667	0.4857	0.44	0.3671	0.3333	0.6164	0			
22	0.5	0.5413	0.5146	0.5619	0.5556	0.5238	0.4949	0.6136	0.6082	0.5098	0.6471	0.5758	0.4167	0.4545	0.4815	0.5789	0.4321	0.5765	0.5128	0.6203	0.425	0		
23	0.5315	0.5179	0.5094	0.537	0.5294	0.5	0.549	0.5824	0.58	0.5429	0.6136	0.5294	0.4545	0.4945	0.5	0.5443	0.4762	0.5682	0.5309	0.5366	0.5181	0.2584	0	
24	0.4107	0.4513	0.4393	0.4862	0.4757	0.4495	0.4175	0.5652	0.5644	0.4528	0.573	0.4951	0.42	0.413	0.5529	0.575	0.4353	0.5281	0.4634	0.6386	0.4048	0.2444	0.3118	0

4.3.2 红麻种及近缘种间亲缘关系的 RAPD 聚类分析

根据任意两个品种RAPD图谱中共有的DNA片段数和扩增出的DNA片段总数, 求出它们之间的相似系数(表9)。应用DPS软件采用系统聚类法中的UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean) 聚类方法进行聚类分析24个红麻基因型材料两两间的遗传差异GD, 得到树系图。

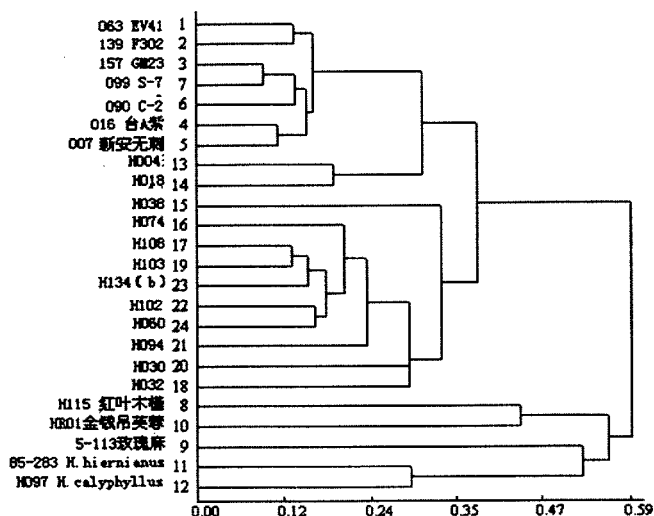


图 28 红麻 24 个品种遗传差异聚类图

Figure 28. The dendrogram of genetic distance of 24 *Hibiscus cannabinus* L. genoplasm base on RAPD fragments

表 6 红麻 14 个品种的 21 个引物 140 个 RAPD 片段的聚类结果

Table 6. The clustering results of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars based on 140 RAPD markers amplified with 21 primers

类群 groupe	材料数目 number	材料 material
I	5	8、9、10、11、12
II	10	15、16、17、19、23、22、24、21、20、18
III	9	1、2、3、4、5、6、7、13、14

从图 28 可以看出聚类分析证明了 24 份供试材料的 GD 在 0.07~0.59 之间, 表

现出丰富的遗传多样性，尤其是红麻和红麻近缘种之间遗传差异最大，GD 为 0.57。根据不同的遗传距离可以分出 3 个主要组（如表 6）。I 组包括五份近缘种；II 组由 15、16、17、19、23、22、24、21、20 和 18 组成；III 组除了 13、14 之外，均由栽培种组成。

5 份红麻近缘种聚成一组，在 GD 值为 0.59 的水平上同其他所有材料分开。这 5 份近缘种之间的遗传差异也非常明显，GD 值在 0.3 到 0.55 之间。其中 85-113 玫瑰麻、HR01 金钱吊芙蓉两份材料之间的差异稍小，GD 为 0.29。

当在 GD 值为 0.4 的水平上划分时，栽培种和野生种共划分为两类：一类由 10 个野生品种组成，虽其种内遗传差异较近缘种小，GD 变幅在 0.12~0.35 之间，但仍表现出一定的遗传多样性。在树状图中，野生红麻被聚在近缘种和栽培种之间，尽管野生种和栽培种之间的差异仍很大（GD 值为 0.4），但是与近缘种相比要小得多。

另一类则由 7 个栽培品种构成，GD 变幅在 0.10~0.30 之间，种内遗传差异较小，此外，有两个野生种 H004、H018 也被划分在这一类，表明了这两个野生种同栽培种亲缘关系相对其他野生种更紧密，但这两个野生种同栽培种的遗传差异仍很明显，GD 达到 0.3。在 GD 0.15 处再进一步细分时，栽培种又可被分成 3 组。第一组由美国品种 063 EV41 和来自法国的 139 F302；第二组 099 S-7 和 157 GM23 和 090 C-2 组成；第三组由中国的 016 台 A 紫和 007 新安无刺组成。第一组与其他两组遗传差异最大（GD 为 0.18），第二组中来自非洲的 099 S-7 和 157 GM23 遗传差异最小，GD 仅为 0.12。

5 讨 论

5.1 红麻种子基因组 DNA 提纯

在分子生物学中,核酸是重要的研究对象,对 DNA 的研究更是重中之重。无论是各种分子标记、基因转入还是重要基因的定位、克隆和测序等工作,都必须提取高产量、高纯度的总 DNA。根据所采用的试剂不同,植物 DNA 提取方法可分为 SDS、CTAB、脲法等^[58],其基本程序为:首先破碎植物组织,其次破碎细胞壁,然后从细胞核中抽提 DNA,最后是纯化 DNA。针对不同的植物及其不同的特性,可选用不同的提取液提取。提取基因组的关键就是细胞核中抽提 DNA 步骤和纯化 DNA 步骤,前者关系得率,后者决定纯度。在一般的情况下,对试验结果影响最大的是纯度,尤其是对红麻等含有大量糖分和单宁等物质的植物。红麻 DNA 的提取与纯化工作最早开始于李世民等^[68]用简便易行的相分配法,结合酶解,分子筛凝胶层析等方法,得到红麻胚芽 DNA。曹德菊^[69]等提出了利用 1%抗坏血酸保护单宁、多酚类物质不被褐化,避免了其褐化产物与 DNA 形成不可逆的复合物,提高了 DNA 得率。并且,提取缓冲液采用高 pH 条件下 Na_2CO_3 存在可加速果胶碱解,分离果胶等杂质,获得了基因组 DNA。

为了缩短时间,减少工作量,对有些作物的研究可从其种子中提取基因组,早在 1991 年就开始了这种尝试^[70],至今已经从玉米、棉花、大豆、小麦、水稻等作物种子中提取了基因组^[71-73],并成功地用于 PCR 扩增。国内学者从种子中提取 DNA 并用于 RAPD 分析也有许多成功的报道^[74-78]。本实验在参考其他文献的基础上,使用 SDS 提取液采用 3 种不同的操作步骤,从红麻种子中提取 DNA,并对它们各自的提取效果作了比较。SDS-I 法较为传统, DNA 得率很高,但是纯度稍差,而且结果不够稳定,不太适用于大量样品的基因组提取。此外,这种方法各种药品用量很大,易造成浪费。SDS-III 方法选用先加氯仿研磨,再用提取液抽提 DNA^[59],这与在液氮中研磨的原理和效果相似,用来延迟 DNA 释放时间,减少研磨期间 DNA 酶对 DNA 的降解作用,又能提前使细胞质中释放的蛋白质失活变性。此方法能使蛋白质和 DNA 酶随着从植物组织中释放而逐渐被氯仿失活变性,在加入提取液后 DNA 集中释放。另外,该方法减少了转移、离心等程序,大大缩短了提取核酸的时间。然而结果表明,该方法在提取红麻基因组时,可能是由于红麻叶片中含有大量的单宁、多糖类及色素物质,影响了 DNA

的提纯, 结果导致 DNA 溶液中蛋白质含量很高。SDS-II 法是在 SDS-I 法的基础上做了改进。在用液氮研磨样品后, 先加入预热的提取液继续研磨, 然后保温, 这样既抑制了 DNA 酶的水解活性, 防止了其 DNA 的降解, 又使细胞中的基因组 DNA 得到充分释放。加入氯仿: 异戊醇 (24:1) 后强烈振荡几秒钟, 保证了蛋白质的充分变性, 又使 DNA 和其他杂质充分分离。结果表明该方法提取效果明显优于其他两种方法。在振荡过程中会损坏部分 DNA 片段的完整性, 但是因为在红麻中的大量糖分和单宁等物质在提取液中形成了粘稠状混合物, 它的缓冲作用降低了震荡对完整 DNA 片断机械力剪切, 故震荡对红麻 DNA 的得率影响很小, 却获得了高纯度的红麻总 DNA。而且此方法非常稳定, 从表 3 可以看出, 获得的 DNA 溶液 A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.0 之间。表明 SDS-II 法是从红麻种子中提取基因组的一种稳定、高效的方法。

5.2 RAPD 反应的稳定性

RAPD 是一种显性标记, 通常 RAPD 扩增反应中产生的一条带即代表基因组中的一个位点, 同时具有快速、简便、灵敏度高等优点, 然而 RAPD 反应受到各种因素的影响, 特别是使用较短的引物, 较低的退火温度, 以及无 3' -5' 外切功能的 Taq 酶等容易造成碱基错配的发生, 使得 RAPD 技术的稳定性和重复性较差, 如何获得重复性好的研究结果仍然需要进行探索。对于不同的物种进行 RAPD 分析, 首先必须建立稳定的反应体系, 才能确保试验结果的精确性。实验中通过梯度试验, 对反应体系中的模板、引物、dNTPs、Taq 酶和 $MgCl_2$ 等药品的不同浓度所扩增的效果进行了筛选比较, 从而选出最适宜的浓度用于所有供试品种的 RAPD 分析。此外, 反应程序也通过梯度设计找出最适宜的变性、退火温度时间以及合适循环次数。最终用于 RAPD 反应的各参数是: (25 μ l 反应体系) 1 $\times$ buffer, 2.0mmol/L $MgCl_2$, 200 μ mol/LdNTPs, 0.6 μ mol/L 随机引物, 45ng 的基因组 DNA, 1.0U Taq 酶。在 PCR 仪上按下列程序扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 40 个热循环, 每个循环包括: 94 $^{\circ}$ C 变性 30sec, 38 $^{\circ}$ C 退火 45sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min30sec。结束循环后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 7min。

在 RAPD 实验中, 任何细微条件的变化都可能引起扩增结果的改变, 如研究的物种、更换药品及仪器、反应参数及条件的变化等。所以对于特定物种的同一批实验, 在优化实验参数的前提下, 要尽可能地保持实验条件的恒定。故除了对反应参数和程序进行优化外, 试验中还注意到以下问题: 如最好用同一公司生产的同一批次的试验耗材、试剂, 以便将试验系统误差减少到最低范围; buffer、dNTPs 等药品分装成小

包装放入 -20°C 冰箱储备,避免因反复冻融而引起生物大分子被破坏。为了更好地保证实验的准确性和可重复性,除了尽可能地保持实验条件的恒定外,还做了必要的重复实验。重复结果很好,表明反应体系很稳定。

5.3 红麻种和近缘种遗传差异的 RAPD 分析

5.3.1 供试品种的遗传差异

本试验中选择了 12 个红麻野生品种、5 个红麻近缘种和 7 个栽培品种,所取的红麻野生品种均来自非洲,近缘品种来自非洲和中国,栽培品种数量不多,但从来源上来看,它们包含了亚洲、美洲和欧洲的品种,在遗传上具有很广泛的代表性。从这 24 份供试材料的遗传差异系数及 RAPD 分子聚类结果表明,红麻栽培种、野生种和近缘种的遗传多样性较为丰富,遗传差异 GD 从 0.32~0.59, GD 在 0.59 水平上,近缘种和其他所有品种分开,表明红麻与其近缘种之间遗传差异非常明显,结果支持了它们在分类学上的独立性。5 份近缘种之间的遗传差异也非常大, GD 在 0.3~0.55 之间,其中 85-113 玫瑰麻、HR01 金钱吊芙蓉 GD 为 0.29,遗传差异相对较小,从表 1 也可以看出它们的形态学上的特征也较近。

GD 在 0.4 的水平上划分时,其余 19 份红麻品种共划分为两类:一类由 10 个野生品种组成,虽其种内遗传差异较近缘种小得多, GD 变幅在 0.12~0.35 之间,但仍表现出一定的遗传多样性。另一类由 7 个栽培种加上 H004、H018 两个野生种,表明它们在分子水平上相对其他野生种与栽培种亲缘关系更紧密,对照表 1 中所列的各供试品种的形态及生物学特征,发现这两个野生种的叶型都为全叶,而其他野生红麻的叶型均为裂叶,而且它们的种子大小也比大多数野生红麻的种子稍大,这两个野生种与其他供试野生种的形态差异在分子水平上也得到了验证。红麻从其野生种到栽培种的变异是逐步的,其驯化过程是缓慢长期的,故栽培种与野生种之间应该存在半野生类型的过度品种,推测 H004、H018 这两个红麻种正是属于半野生品种,这正好解释了它们在形态上与其它供试野生种的差异和分子水平上与栽培种接近的现象,但需要更深入的研究去证实。栽培种之间与这两个野生种之间也有较显著的遗传差异, GD 达到了 0.3。与野生类型红麻相比,栽培品种之间在分子水平上变异相对较小, GD 变幅在 0.10~0.30 之间。红麻野生种与栽培种的明显差异也支持了红麻在长期的驯化过程中产生的变异。关于 H004、H018 两个野生种被划分在栽培组中,对照表 1 中所

列的各供试品种的形态及生物学特征,还发现红麻栽培种的遗传多样性并不象形态学所体现的那样丰富;而野生种中分子生物学上的遗传多样性远比形态学和生物学特性所表现的要丰富的多。其原因可能是因为红麻栽培种花大色艳,易通过蜜蜂、蚂蚁等昆虫传播花粉,自然杂交率很高,导致部分农艺性状变异很快,但是其 DNA 分子水平上的相对变异较小。而不同的野生种因为地处不同的野外生存环境,相互之间基因交流较少,所以尽管形态差别不大,但是其遗传距离却较明显。

5.3.2 供试红麻品种亲缘关系及其起源与传播

亲缘关系的遗传距离探明,有助于了解红麻的起源与传播途径^[57]。象木槿属的许多相关种都是非洲起源一样,大多数学者认同红麻起源于非洲,之后在南亚次大陆开始商业化栽培。它的近缘种玫瑰茄也起源于非洲^[58]。本实验 RAPD 聚类结果表明 GD 在 0.4 时,所有的红麻种被聚成两大组:野生种类型和栽培、野生种。野生种被聚类在近缘种和栽培种之间。尽管野生红麻明显远离栽培红麻,但是, H004、H018 两个野生种仍在 GD 为 0.3 的水平上接近栽培种,这在一定程度上支持了红麻起源于非洲的假设。野生分布的红麻材料和它的非洲起源的近缘种之间的遗传距离相对栽培种与近缘种的遗传距离要近的多,而栽培类型的红麻也通过野生红麻种与近缘种保持一定的关系。野生红麻起源于非洲,并被传播,各种栽培类型品种被选育。只有在 GD < 0.18 时,栽培种才能进一步分类,表明供试的栽培品种有着密切的亲缘关系。GD 取 0.14 处对红麻栽培种进一步细分,可得到 3 个组,第一组由美国品种 063 EV41 和来自法国的 139 F302;第二组由非洲的 099 S-7、157 GM23 和来自南亚的 090 C-2 组成;第三组由中国的 016 台 A 紫和 007 新安无刺组成。非洲的 099 S-7、157 GM23 遗传差异最小, GD 仅为 0.12, 南亚品种 090 C-2 与其在一组表明它们的亲缘关系较近。在 GD 取 0.16 时,第三组首先与第二组聚为一类,表明来自中国的红麻栽培种与非洲和南亚栽培种的亲缘关系相对第一组要近,这个结果支持了亚洲是最早引进红麻的大陆,并进一步向世界其他地方传播的观点。

5.3.3 RAPD 方法在红麻亲缘关系研究中的可行性

RAPD 有其固有的缺点,在用于亲缘关系研究中有一些限制。如汪小全^[63]等认为, RAPD 方法在应用于种内亲缘关系研究时,结果很可靠;在应用于种间研究时,就有一定的局限性。迁移率一致的片段可能仅是因为长度一样而序列不一定相同^[82],因此 RAPD 在不同种的扩增产物难以作同源性分析,但可以从相似性或遗传距离上去分析

亲缘关系。

早先在对芸苔属^[79]、花生^[80]、和葱属^[81]等植物的 RAPD 亲缘关系分析中, 所得结果与以往的形态学水平上的分类结果完全一致。这些结果表明 RAPD 标记适用于种内、种间乃至属间的分类学研究, 在亲缘关系分析中具有很高的应用价值^[63]。RAPD 方法也应用在红麻亲缘关系研究中。由于起源相近或亲本来源相同的红麻种随环境变化农艺性状往往发生可观的变异, 而 DNA 水平上的差异很小, 故红麻形态学的差异与基因差异相关性并不大, 由此从分子水平上对红麻进行亲缘关系分析就显得及其重要。本试验通过对红麻野生种、近缘种和来源广泛的各地栽培种进行 RAPD 分析, 研究了供试品种之间的遗传多样性和亲缘关系, 探讨了红麻品种的起源和传播途径, 并取得了良好效果, 表明 RAPD 方法对红麻的研究是可行且可靠的。

6 结 论

1. 为了提高效率, 论文试验探索出一种稳定、高效的从红麻种子中提取基因组 DNA 的新方法。该方法在普通的 SDS 法的基础上进行了重大的改进。在用液氮研磨样品后, 先加入预热的提取液继续研磨, 然后保温, 这样既抑制了 DNA 酶的水解活性, 防止了其对 DNA 的降解, 又使细胞中的基因组得到充分释放。加入氯仿: 异戊醇后强烈振荡几秒钟, 保证了蛋白质的充分变性, 又使 DNA 和其他杂质充分分离。通过此方法获得了高浓度和高质量的基因组 DNA, 较好地用于 PCR 扩增, 进行 RAPD 分析。

2. 为了提高 RAPD 反应体系的稳定性, 以保证实验的准确性和可重复性, 对红麻 RAPD 反应参数进行了设计, 通过优化实验建立了合适稳定的 RAPD 反应体系。在 25 μ l 反应体系中含有: 1 $\times$ buffer, 2.0mmol/LMgCl₂, 200 μ mol/L dNTPs, 0.6 μ mol/L 随机引物, 30ng 的基因组 DNA, 1.0U Taq 酶。反应扩增程序为: 94℃预变性 5min, 使模板 DNA 充分变性, 然后进入下列温度循环: 94℃变性 30sec, 38℃退火 45sec, 72℃延伸 1min30sec, 重复 40 个热循环, 结束循环后 72℃终延伸 7min。应用此条件进行多次重复, 结果重现性良好。

3. 研究中筛选出了重复性好、有丰富多态性的 21 个引物, 共产生 140 条带, 对 12 个红麻野生种、5 个近缘种和 7 个来源广泛的各地栽培种进行 RAPD 分析, 其中多态性带 119 条, 占 85%, 反映不同红麻品种间存在很大的遗传差异, 所筛选的 21 个引物在供试品种中都有很高的多态性。采用 UPGMA (Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean) 聚类方法对 GD 进行遗传分类, 将供试品种聚成 3 大类: 近缘种、野生种和栽培种。

4. 通过 RAPD 分子标记的研究, 探索了红麻品种间的亲缘关系。研究结果表明, 红麻栽培种野生种和近缘种之间存在很大的遗传差异, 其中有两个野生种 H004、H018 也被划分在栽培种这一类, 表明了这两个野生种同栽培种亲缘关系相对其他野生种更紧密, 推测 H004、H018 两个品种属于红麻半野生品种。结果还表明, 不同的红麻野生种同栽培种之间的亲缘关系有很大差别, 还发现红麻栽培种的遗传多样性并不象形态学所体现的那样丰富; 而野生种中分子生物学上的遗传多样性远比形态学和生物学特性所表现的要丰富得多, 因此在分子水平上对红麻的研究更显重要。

5. 在研究供试品种亲缘关系的基础上, 进一步探讨了红麻品种的起源和传播途径。

野生分布的红麻材料和它的非洲起源的近缘种之间的遗传距离相对栽培种与近缘种的遗传距离要近的多，而栽培类型的红麻也通过野生红麻种与近缘种保持一定的关系，这在一定程度上支持了红麻起源于非洲的假设，也表明 RAPD 分析结果可用于对红麻物种进化起源等方面的研究。

参 考 文 献

- [1] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1~10
- [2] 刘勋甲, 郑用琰, 尹艳. 遗传标记的发展及分子标记在农作物遗传育种中的应用 I 遗传标记的发展及分子标记的检测技术[J]. 湖北农业科学, 1998, 1: 33~35
- [3] 周延清. 遗传标记的发展[J]. 生物学通报, 2000, 35(5): 17~18
- [4] 李竞雄, 宋同明著. 植物细胞遗传学[M]. 北京: 科学出版社, 1997, 1~51
- [5] Cooke R J. Gel electrophoresis for the identification of plant varieties. *Journal of chromatography*, 1995, 698: 281~299
- [6] 胡志昂, 王洪新. 蛋白质多样性和品种鉴定. *植物学报*, 1991, 33(7): 556~564
- [7] Staub J E, Serquen F C, Gupta M. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding[J]. *Hort Science*, 1996, 31(5): 729~741
- [8] 沈法富, 刘凤珍, 于元杰. 分子标记在植物育种中的应用[J]. *山东农业大学学报*, 28(1): 83~91
- [9] 陆朝福, 朱立煌. 植物育种中分子标记辅助选择. *生物工程进展*, 1995, 15(4): 11~17
- [10] Grodzicker J. Cold Spring Harbour Symp Quant Biol[J]. 1974, 39: 493
- [11] Donis-keller H. A genetic linkage map of the human genome[J]. *Cell*, 1987, 51: 319~337
- [12] Donis-keller H. A genetic linkage map of the human genome[J]. *Ce L1*, 1987, 51: 3 19~337
- [13] Beckmann J S, Soller M. Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement: Methodologies, mapping and costs, *Theor. Appl. Ge net*, 1983, 67: 35~43
- [14] 肖顺元, 张文才. RFLP在柑橘遗传多样性研究上的应用. *果树科学*, 1995, 1(1): 1~4
- [15] 张立平, 林伯年, 沈德绪等. 葡萄属指纹核糖体基因的RFLP分析. *园艺学报*, 1997, 24(4): 385~387
- [16] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting[P]. *European Patent Application*, No. 05 344-858A1, 1993
- [17] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 (第二版), 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999
- [18] 黎裕. 生物技术通报, 1999, 15(4): (19-22)
- [19] Dietrich W F. A comprehensive genetic map of the mouse genome[J]. *Nature*, 1996, 380: 149~152
- [20] Dib C. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5246 microsatell

- ites[J]. *Nature* 1996, 380:152~154
- [21] 何平. 真核生物中的微卫星及其应用[J]. *遗传*, 1998, 20(4):42~47
- [22] Williams. J. G. K, Kubelik. A. R, Libak. K. J, Rafalski. J. A, Tingey. S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(22):6531~6535
- [23] Welsh. J, McClelland. M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990(18):7213~7218
- [24] Welsh. J, Peterson. C, McClell and. M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCS in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Research*, 1991(19):303~306
- [25] 惠东威, 陈受宜. RAPD 技术及其应用. *生物工程进展*, 1992, 12(6):1~5, 27
- [26] 石太渊等. PCR, RAPD 技术在植物研究中的应用. *国外农学-杂粮作物*, 1995(5):16~18
- [27] 王冰冰等. RAPD 技术进展及其在小麦遗传育种中的应用 (综述). *农业生物技术学报*, 1997, 5(3):227~233
- [28] *Plant Genetic Resources Newsletter*, 1996(107):50~54
- [29] Devos K M and Gale M D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992 84:567~572
- [30] Paran et al. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. *Theor Appl Genet*, 1993, 85:985~993
- [31] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labudu D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genome*, 20:178~183
- [32] Chahal BA, Leverich WJ, Rogstad SH. 1991 comparison of methods for assessing genetic variation in *Plant Conservation Biology*. New York: Oxford University Press. 123~134
- [33] 王志林等. 分子标记技术及其进展. *生命的化学*. 2001. 21(4) 39~42
- [34] Dempsey, J. M. Kenaf, Roselle. In: *Fiber Corps* Rose Printing Company, Tallahassee, FL, 1975, 203~250.
- [35] Sellers, T. and Reichert, N. A. Kenaf properties, processing and products. State University, MS. 1999
- [36] 栗建光等. 我国红麻种质资源的遗传多样性与评价利用. *中国麻业*, 2004. 26(1) 5~9
- [37] International Jute Organization, 1987, Proceedings of the IJO/ICAR Orientation Course

- [38]熊和平. 坦桑尼亚黄麻红麻种质资源考察. 中国麻作, 1989
- [39]Wilson, F. D. and Menzel, M. Y. Kenaf, Roselle. Econ. Bot. 1964, 18:80~91
- [40]李爱青. 肯尼亚红麻红麻种质资源考察报告. 中国麻作, 1990, 12 (1): 16~21
- [41]Frank E. Robinson. California Agriculture. September~October, 1988, 31, p:31~32
- [42]Frank. X. Werber. Proceedings International Kenaf Conference. March, Fresno. California 1993, p:3~6,
- [43]祁建民等. 红麻种质资源创新的理论与实践. 中国麻作, 1999, 21(1):43~44
- [44]邓丽卿. 我国红麻品种资源研究. 作物品种资源, 1986(2):15~17
- [45]邓丽卿. 红麻不同熟型品种生长发育与纤维产量关系研究. 中国麻作, 1987(3):22~27
- [46]朱凤绥等. 麻类作物染色体组型分析及 Giemsa 带型初步观察. 中国麻作, 1981(3):1~9
- [47]唐守伟等. 我国麻类生产现状和发展对策. 中国麻作, 1999, 21(3):45~49
- [48]Proceedings of International Kenaf Association Conference, Albuquerque, NM. USA. March, 1996, 21~23
- [49]Keil. M. et al. Use of random amplified polymorphic DNA variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). Theor. Appl. Genet, 1994(90):767~770
- [50]Vierling. R. A. et al. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. Theor. Appl. Genet, 1992(84):835~838
- [51]López - Braña I, et al. Analysis of *Heterodera avenae* populations by the random amplified polymorphic DNA technique. Genome, 1996(39):118~122
- [52]Demeke T. et al. A DNA marker for Bt-10 Common bunt resistance gene in wheat. Genome, 1996(39):51~55
- [53]Penner. G. A. et al. Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene. pg. 3. Theor. Appl. Genet, 1993(85):702~705
- [54]Reiter. R. S. et al. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992(89):1477~1481
- [55]Wilde. J. et al. Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet, 1992:871~877

- [56] 程舟, 蛟岛一彦等. 红麻种质资源遗传变异和亲缘关系的 RAPD 分析. 中国麻业, 2002, 24(1): 1~12
- [57] 程舟, 杨晓伶等. 红麻种质资源遗传多样性和亲缘关系的 AFLP 分析. 中国麻业, 2003, 25(4): 162~167
- [58] 郭安平等. 红麻及其近缘种的 RAPD 分析. 热带亚热带植物学报. 2002. 10(4): 306~312
- [59] 李维平, 赵文明等. 一种少量提取植物组织 DNA 的快速方法. 西北农林科技大学学报(自然科学版). 2002. 30(6) 125~128
- [60] 马文宾, 庄杰云, 彭应财等. 遗传, 1998, 20(2): 1~4
- [61] 根井正利著, 王家玉译. 分子群体遗传学. 北京: 农业出版社, 1983, 143~172
- [62] Guidet F, Rogowsky P. Cloning and characterization of a new rye specific repeated sequence. Genome, 1991, 34: 81~87
- [63] 汪小全等. 植物学报, RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题, 1996, 38(12): 954~962
- [64] 林万明主编. PCR 技术操作和应用指南. 人民军医出版社, 1993, 7~14
- [65] Lowe A J. et al. Plant Genetic Resources Newsletter, 1996, 107: 50~54
- [66] Kaya Z, et al. Utility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for linkage mapping in Turkish Red Pine (*Pinus brutia* Ten. *Silvae Genetics*, 1995, 44: 110~116
- [67] Wei J, et al. Genetic variability in Russian Wildrye (*Psathyrostachys juncea*) assessed by RAPD. Genetic Resources and Crop Evolution, 1994, 44: 117~125
- [68] 李世民, 苏业瑜. 红麻 (*Hibiscus cannabinus*) DNA 的提取与纯化. 中国麻作, 1986, 3: 9~11
- [69] 曹德菊等. 红麻基因组提纯方法研究. 中国麻作, 1999, 21(1): 9~12
- [70] Edwards K, et al. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6): 1349
- [71] McDonald M B, Elliot L J, Sweeney P M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies[J]. Seeds Science and Technology, 1994, 22: 171~176
- [72] Chunwongse J, Martin G B, Tanksley S D. Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds[J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 694~698
- [73] Yoshihashi T, Nakamura S, Fujii T, et al. Identification of domestic rice cultivars by RAPD analysis using one grain of milled rice as a sample[J].

- [74]赵姝华. 农作物种子及半粒种子 DNA RAPD 扩增研究. 国外农学—杂粮作物, 1999, 19(3): 22~25
- [75]翟文学等. 谷类作物半粒种子的 PCR 分析及其在标记辅助选择育种中的应用. 生物工程学报, 1996, 12(4):416~421
- [76]王玉民等. 玉米半粒种子 DNA 提取及 RAPD 分析. 玉米科学, 1996, 4(3):27~28
- [77]乔爱民等. 直接从人工老化的菜心干种子中提取基因组 DNA 用于 RAPD 分析. 植物学通报, 1999, 16(6):701~704
- [78]郭景伦等. 玉米单粒种子 DNA 提取新方法及其在玉米种质鉴定中的应用研究. 种子, 1999(2):37~38
- [79]Demeke T. Adams R P. Chibbar R. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA(RAPD). A case study in Brassica. *Theor Appl Genet.* 1992. 84:990~994
- [80]Halward T. Stalker T. LaRue E *et al.* Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut(*Arachis hypogaea* L.). *Plant Mol Biol.* 1992 18:315~325
- [81]Wilkie S E. Isaac P G. Slater R J. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) markers for genetic analysis in Allium. *Theor Appl Genet.* 1993. 86:497~504
- [82]Thormann C E. Ferreira M E. Camargo L E A *et al.* Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor Appl Genet.* 1994. 88:973~980

致 谢

本文是在导师周立人、李爱青研究员的悉心指导下完成的。二位导师渊博的学识、活跃敏锐的科研思路、严谨的治学精神和为人师表的高尚风范时刻影响着我不断进步。他们在论文的选题立项、资料收集和组织撰写等方面对学生进行了精心的指导和耐心的教诲。在此，向二位导师表达我深深地敬意和由衷的感谢。

在论文的实验和撰写过程中，得到了许多老师和同学的热情关怀和帮助，在此，谨向林毅、李展、徐明照、田秋元等老师和厉荣玉、谈应权、王洲、李蕾娜、丁茂予、徐恒、李佳新、程灿、任冲、韩国明、王晓红等同学致以衷心的感谢。同时，向中国农业科学院麻类研究所的粟建光研究员在试验材料和背景资料的提供方面给与的大力协助表示诚挚的谢意。

向三年来为我提供良好的学习和生活环境的生命科学学院、研究生部的领导、老师们表示诚挚的谢意。

个人简介

徐伟，男，1979年3月出生于安徽省枞阳县。1998年2002年就读于安徽农业大学农学系种子专业，2002年2005年于安徽农业大学生命科学学院遗传学专业攻读硕士学位，研究方向为分子遗传学。