

摘 要

本试验进行了红麻 11 个常规栽培种和 3 个野生种的细胞学标记及 RAPD 分子标记的研究。通过建立 14 个品种的核型模式图在染色体水平上比较红麻不同品种间的遗传差异,并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 多态性进行研究,检测出各品种的特异性 DNA 谱带,并依据分子标记研究结果探索了栽培种与野生种的亲缘关系,为红麻种质资源的系统进化研究和开发利用提供了科学依据,同时也为红麻种质鉴定建立起一种快速、简便、实用的方法。通过以 RAPD 分子标记为主,细胞学标记为辅的红麻品种遗传差异和种质鉴定的研究分析,结果表明:

1.细胞学标记研究采用了稍加改进的 F-BSG 法获得了根尖细胞染色体分散、平展、分裂相多、随体清晰的染色体制片。核型分析结果表明 14 个品种的核型均为基本对称核型,但染色体的随体大小、数目等方面还存在一些差异。所以,红麻细胞学研究可以作为一种细胞学标记用于红麻不同基因型材料亲缘关系及种质鉴定的分析。

2.为了缩短时间,减少工作量,本试验探索出一种经济、快速、简便、能够用于 RAPD 分析的红麻种子基因组 DNA 提取新方法。针对红麻种子中富含蛋白质、脂肪和糖类等贮藏物质,可能还含有丰富的酚类物质及酚氧化酶等,在提取液中加入适量 β -巯基乙醇,有效地防止氧化褐变,排除杂质的干扰。同时,采用氯仿-异戊醇代替酚抽提,避免了酚难去除带来的交叉污染等,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。

3.稳定的 RAPD 反应体系是进行 RAPD 分析的关键。通过实验优化建立了合适的 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 基因组 DNA, 0.75U 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。按照优化的 RAPD 条件进行的重复实验, 重现性较好, 为红麻分子生物学研究提供参考依据。

4.采用 RAPD 技术对红麻 14 个品种进行基因组 DNA 多态性分析,从 150 个随机引物中筛选出了重复性好、有丰富多态性的 99 个引物,共产生 766 条带,其中多态性带 347 条,占 45.3%,反映不同红麻品种间存在遗传差异。扩增片段长度大多数集中在 0.2~1.5kb 之间。应用 SAS 软件,采用系统聚类法中的 Average Linkage Cluster Analysis 对 GD 进行遗传分类,构建树系图,将 14 个红麻品种聚成七类,这同一般形态分类和已知的亲缘关系较吻合。从聚类结果中还可以看出,勐海紫茎和元江红麻虽然原产地都是在云南,但两者的遗传差异较大,元江红麻是早熟特性,而勐海紫茎是迟熟特性;NA 414 尽管是野生种,但它同红引 135 的遗传差异为 0.07,亲缘关系比较近,它们在表型上也表现出一定的一致性。说明用 RAPD 方法对红麻进行分类和亲缘关系研究是有效的。

5.RAPD 分析能检测出大量变异,通过比较各品种间的特异带或特征带的差异,可进行品种鉴别和纯度鉴定。利用 14 个引物扩增获得的 14 条 RAPD 特征带,作为一组 DNA 指纹图谱可以区分所有供试的 14 个红麻品种。其中,MX 247、UG 93、NA 414、塔什干、古巴 8 号五个品种分别在引物 S₁₅₃、S₁₈₀、S₁₈₄、S₂、S₁₈₆ 扩增时产生 S₁₅₃-320bp、S₁₈₀-1543bp、S₁₈₄-1100bp、S₂-1100bp、S₁₈₆-980bp 特征性条带,利用这些特征带可进行红麻品种的早期鉴定。

6.本研究的创新之处就在于首次将 RAPD 分子标记技术同细胞学标记技术相结合应用于红麻 11 个常规栽培种和 3 个野生种的遗传差异研究,探索品种间亲缘关系,并根据扩增出的特异性 DNA 谱带进行种质鉴定。研究表明不同品种的核型、随体大小及数目的差异与 RAPD 分析结果基本一致,RAPD 分子标记和细胞学标记研究结合更能在一定程度上反映出品种的内在遗传差异。这些都表明 RAPD 技术辅之以细胞学标记技术检测出的 DNA 水平上的遗传差异,不仅有可能解决传统的红麻形态学分类方法所不能解决的疑难问题,而且还可为红麻品种的早期鉴定提供分子指标。

关键词: 红麻 核型分析 RAPD 遗传差异 种质鉴定

Abstract

In this experimentation, random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique and chromosome karyotype analysis were used to analyze the genetic relationship of eleven cultivars and three wild stirps of *Hibiscus cannabinus L.* As to cytological markers, comparing karyotypes and finding heredity differences of them by establishing fourteen idiograms. 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 fourteen breeds. And the relations of them was to be researched, RAPD characteristic markers were to be found. RAPD molecular markers being main part assisting cytological markers, the analysis of heredity differences and breeds distinction were carried out. Results were as follows:

1. In studies of cytological markers, cells of chromosomes scattered, flatted, more split phases were obtained using modified F-BSG method. The results of study for karyotype showed that fourteen breeds had similar karyotypes, but they also had some differences among them. According to those we could identify them. Therefore this cytological research can be cytological markers used to analyze the relations and the breeds distinction of various genotypes of *Hibiscus cannabinus L.*

2. To save time and reduce workload, a economical, rapid, simple, and applicable for RAPD analysis extraction methodology of seeds genomic DNA of *Hibiscus cannabinus L.* was explored. Aimed at much protein, grease, sugar and oxidized polyphenolic components in seeds of *Hibiscus cannabinus L.*, it is a best way of adding suitable β -EM to lysis. Furthermore, high concentration and good quality seeds genomic DNA of *Hibiscus cannabinus L.* were obtained using CIAA instead of propanone. 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.

3. Steady reaction system is the key point to RAPD analysis. The influential

factors such as templates DNA, dNTPs, MgCl₂, primers, Taq polymerase and so on were studied and experimental parameters were optimized. They were as follows: 25 μl reaction system containing 1× buffer, 2.0mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTPs, 0.6 μmol/L primers, 30ng template, 0.75U Taq polymerase. The optimal amplification program was as follows: 5min at 94°C, followed by 94°C for 30sec, 38°C for 45sec, 72°C for 1min30sec, 40 cycles and final extension time of 72°C for 7min. This optimized experiment conditions could obtain reproducible results and provide good references to molecular biology.

4. The genetic polymorphism of *Hibiscus cannabinus* L. was investigated using random amplified polymorphism DNA marker, the detected materials included eleven cultivars and three wild stirps. Ninety-nine primers selected from one hundred and fifty primers amplified 766 RAPD fragments and 347 bands of them showed polymorphism, which occupied 45.3%. The length of most amplified fragments ranged from 0.2 to 1.5kb. The dendrogram was constructed by using SAS software and Average Linkage Cluster Analysis method based on their genetic differences calculated from RAPD data. It was concluded that fourteen breeds which have been tested in the research could be classified into seven groups. The map relatively accorded with morphological analysis and known relationships. It also showed that the genetic difference between Menghaizijing and Yuanjianghongma were comparatively farther, although they all originated from Yunnai. The genetic difference between NA 414 and Hongyin135 were relatively closer, in spite of NA 414 is wild stirp. These fragments were efficiently used in the analysis of the relationship of the fourteen breeds.

5. RAPD analysis can examine lots of variations. There were fourteen RAPD characteristic markers, which were detected as a group of DNA fingerprints to identify all the fourteen cultivars. Specific markers were found in five cultivars, that is MX 247, UG 93, NA 414, Tashengan and Gubabahao, which were S₁₅₃-320bp, S₁₈₀-1543bp, S₁₈₄-1100bp, S₂-1100bp and S₁₈₆-980bp. These specific bands were important characterization for distinguishing *Hibiscus cannabinus* L. cultivars.

6. The innovative spot of this research is initially combination RAPD markers

and chromosome karyotype analysis used to analyze the genetic relationship of eleven cultivars and three wild stirps of *Hibiscus cannabinus L.*. The experiment showed that the differences in chromosome satellites and so on of karyotypes were relatively accorded with the results of RAPD analysis. They all indicated that the application of RAPD molecular markers being main part assisting cytological markers to heredity difference study had gained some resolution which could not be obtained by morphological analysis and could provide available data for developing *Hibiscus cannabinus L.* production and for distinguishing cultivars at early period.

Key words: *Hibiscus cannabinus L.* Karyotype analysis RAPD
heredity difference Germplasm distinction

目 录

└─┐文摘

└─┐英文文摘

└─┐综述

└─┐材料与方法

└─┐└─┐一、红麻的细胞学标记研究

└─┐└─┐└─┐1. 试验材料

└─┐└─┐└─┐2. 方法

└─┐└─┐二、红麻的 RAPD 分子标记研究

└─┐└─┐└─┐1. 试验材料

└─┐└─┐└─┐2. 方法

└─┐结果与分析

└─┐└─┐一、红麻的细胞学标记研究

└─┐└─┐└─┐1. 红麻的染色体数目

└─┐└─┐└─┐2. 红麻的染色体形态

└─┐└─┐└─┐3. 红麻染色体的随体

└─┐└─┐└─┐4. 红麻染色体的核型模式图

└─┐└─┐二、红麻的 RAPD 分子标记研究

└─┐└─┐└─┐1. 红麻基因组 DNA 提纯方法研究

└─┐└─┐└─┐2. 红麻 RAPD 反应参数的优化

└─┐└─┐└─┐3. 不同红麻品种遗传差异的 RAPD 分析

└─┐讨论

└─┐└─┐一、红麻的细胞学标记研究

└─┐└─┐└─┐1. 核型分析

└─┐└─┐└─┐2. 核型分析与物种亲缘关系的探讨

└─┐└─┐二、红麻的 RAPD 分子标记研究

└─┐└─┐└─┐1. 关于红麻种子基因组 DNA 提纯

└─┐└─┐└─┐2. 关于 RAPD 反应参数的优化

└─┐└─┐└─┐3. 关于红麻品种遗传差异的 RAPD 分析

└─┐└─┐三、红麻的细胞学标记和 RAPD 分子标记的综合分析

└─┐结论

└─┐参考文献

└─┐附录

└─┐致谢

└─┐作者简介

综 述

为了更好地识别生物的不同基因型，充分利用生物种质资源(Germplasm Resources)，人们进行了一系列遗传标记的研究。所谓遗传标记(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]。遗传标记在遗传学的建立和发展过程中起着举足轻重的作用，同时也是作物遗传育种的重要工具。随着遗传学的发展，遗传标记的种类和数量也在不断地增加，已经历了形态学、细胞学、生化及分子标记等几个主要发展阶段，但尤以分子标记的发展最为迅猛，也最为有效，是前三种标记所无法比拟的。分子标记已成为分子生物学研究的重要方面，在遗传图谱的构建、基因定位、标记辅助育种、系统进化、遗传多样性和种质鉴定等研究中起着重要作用。现就遗传标记的发展与应用作一简单综述。

1. 形态学标记 (Morphological Markers)

在众多的遗传标记中，以形态学标记的应用最为悠久，其历史可以追溯到孟德尔对豌豆单基因控制的形态性状的经典研究，建立了著名的遗传规律，即分离规律和自由组合规律。1901 年，摩尔根等通过对果蝇的深入细致研究，提出了连锁遗传规律，并创立了基因学说，把抽象的基因概念落实在染色体上，从而为遗传标记的广泛应用奠定了基础。但是，形态性状大多易受生理因素和发育阶段等环境因素的影响，有些性状要到个体成熟时才能表现出来。形态学标记的最大缺点在于可用作遗传标记的形态性状相当有限，利用形态学标记检测亲缘关系很近的基因型时往往不能获得令人满意的结果。

2. 细胞学标记 (Cytological Markers)

随着遗传学和细胞学的发展，人们将遗传现象与染色体结合起来。1875 年，德国细胞学家 Strasburger 率先描述了细胞核内染色体 (Chromosome) 的存在，直到 1903 年，Sutton 和 Boveri 把遗传因子同染色体结合起来，才真正形成了细胞遗传学这一学科^[4]。染色体数目及结构的变化常常引起表型的变化，因此染色体的变化可以作为一种细胞学的遗传标记。细胞学标记主要指染色体组型和带型。

真核生物的细胞中都有一定数目的染色体，染色体的数目在种内通常是相对恒定的。染色体组型(Chromosome Karyotype)是指生物体细胞内所有可被测定的染色体特征总称。染色体组型分析，也称核型分析，是研究一个物种细胞核内染色体的数目及各染色体的形态特征，包括染色体总数、染色体组数、每条染色体的大小和形态、着丝粒的位置、随体的有无等。它是物种持有的染色体信息之一，具有很高的稳定性和再现性。染色体组型为鉴别真伪杂种、研究染色体结构和数目的变异及生物的遗传进化、分类学等提供细胞学证据。核型模式图 (Idiogram)^[5]是根据一定数量的细胞求得若干参数（染色体长度、长臂长度、短臂长度、随体长度和各条染色体的相对长度等）的平均值绘制出来的。细胞分类学上一般用核型模式图来比较个体或类群之间核型的异同。

染色体分带 (Chromosome Banding) 是指借助于一套特殊的处理程序，使染色体显现出深浅不同的带纹，呈现鲜明的个体性。因其在同一物种群体的各个个体之间呈现出一定程度的染色体带型差异，所以它可作为一种有效的遗传标记加以利用。染色体分带在鉴定品种(系)和遗传多样性方面的灵敏度远非一般表型特征观察所能达到。应用染色体分带技术对近缘物种亲缘关系的分析、植物系统发育尤其是栽培植物起源等方面均取得了不同程度的进展。目前，国内外在植物染色体分带上通用 Sumner(1972)的 BSG 法 (Barium/ Saline/ Giemsa)。1979 年 6 月湖南农学院作物遗传育种研究室参考仓田和大村 (1979) 创用的去壁、低渗、火焰干燥等技术对水稻染色体进行核型分析，发展了 F-BSG 法，即经过火焰(Flame)干燥等一系列处理后的 BSG 法，使水稻染色体呈现带纹，随后又在稻属的种和亚种 42 个品种中分带取得成功。此后，F-BSG 法在粮食、纤维、油料、蔬菜、果树、茶树、林木等 67 种植物上也获得了染色体带纹。因此，可以把染色体带型作为一种遗传标记，有效地识别不同物种之间、同一物种不同染色体之间的差异。常见的染色体带型有 C 带、N 带、G 带、R 带、Q 带等^[4]。近些年来，用原位杂交技术与染色体分带技术相结合的方法研究植物染色体的基因定位是细胞学标记应用的新突破。总之，核型分析或染色体组型分析以及染色体分带技术能够对物种的亲缘关系、起源演化和遗传多样性等提供染色体水平上的遗传标记，但是该标记也有数目有限等弱点。

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。贮藏蛋白与种子的萌发等发育过程有关，具有生物种属的特异性，可以作为遗传标记。最广泛地用于种质鉴别的蛋白即种子蛋白，其组分的差异可以反映出基因型的不同，因而可以作为品种的“生化指纹”。种子蛋白分析在大多数作物的品种鉴定中得到广泛的应用^[6,7]。在一些重要作物上，许多国家已建立了种子蛋白指纹图谱数据库^[8]。

1952年 Neimands 首次结晶出两种类型的乳酸脱氢酶，并证实它们为同工酶，即它们是来源相同、催化反应的性质相同而分子结构有差异的酶蛋白分子。与其他蛋白质一样，同工酶是基因表达的产物。由于不同的同工酶所带的电荷不同，可通过电泳分离，并经与底物反应或染色来检测它们的存在与否和分子质量的大小，因而也可作为遗传标记。现在已有几十种同工酶系统，例如酯酶同工酶、过氧化物同工酶等。同工酶标记已被广泛用于建立遗传图谱、种群分析等研究中^[9,10]。同工酶作为遗传标记具有以下特点：首先它比较稳定，不受环境因素的影响；其次，它所需试材少，且在种子和幼苗期就可以鉴定；再次，同工酶不象显隐性性状那样，杂交后代隐性性状被显性性状所掩盖，而是共显性即来自双亲的一对等位基因可以在杂交后代中同时被检测出来。目前已对 30 多种植物进行了 40 多种同工酶分析，许多重要农作物都已有了比较完整的同工酶图谱^[11]。但是，在植物的种质资源研究中，仅有 10~20 种同工酶表现出位点的多态性，因而同工酶标记也具有其局限性，不能成为更加理想的遗传标记。

4. 分子标记 (Molecular Markers)

分子标记分广义和狭义两种^[12]。广义指可遗传的并可检测的DNA序列或蛋白质，包括生化标记在内。而狭义的分子标记仅指DNA标记。1974年，Grodzicker^[13]等人发现了DNA水平上的分子标记—RFLP，它是最早发展的分子标记。1980年，人类遗传学家Bostein^[14]首先提出了用RFLP作为构建遗传连锁图的设想。1987年，Donis-kellen^[15]等报道了第一张人类RFLP遗传图谱，开创了分子标记应用的新纪元。近20年来，特别是在人类基因组计划 (Human Genome Project, HGP) 的推动下，分子标记的研究与应用得到了迅速发展。与形态学标记、细胞学标记、生化标记相比，分子标记具有众多优点^[16]，如在植物的各个组织、器官及整个发育时期均可检测到，不受阶段特异性、器官特异性和环境的限制；表现为共显性，

能够鉴别出纯合基因型与杂合基因型，对隐性的农艺性状选择有利；分子标记数量多，覆盖整个基因组；表现为“中性”，目标性状与不良性状无必然的连锁；其多态性高，自然中广泛存在着变异，不需要遗传材料进行特殊的处理。

4.1 RFLP标记

限制性片段长度多态性（Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLPs）指用某种限制性内切酶切割基因组DNA时，在同一种生物的不同个体间出现含同源序列的酶切片段长度差异。差异的产生主要分两类：一是碱基突变导致的酶切位点改变，称为点多态性（Point Polymorphism）；另一类是DNA内部序列重排，包括大的DNA片段的缺失、交换、重组和插入等，或DNA内部“高变区”（Highly Variable Region）串联重复序列的拷贝数不同而引起的。差异的显示和检测，是通过DNA凝胶电泳和用克隆的DNA片段作为探针进行分子杂交，再通过放射自显影（或非同位素技术）实现的。RFLPs的优点是：(1)无表型效应。RFLP标记的检测不受性别、年龄的局限，也不会因表达的组织、发育阶段或外界环境的不同而受影响。(2)DNA序列上的突变为中性突变，即不影响生物体的表型。而RFLP标记座位的等位基因间是共显性。通过杂交后电泳带型可以直接区别出杂合子与显性纯合子。(3)非等位的RFLP之间不存在上位互作效应，因而互不干扰。(4)RFLP标记源于基因组DNA自身变异，在数量上几乎不受限制。只要选用特异的探针或限制性内切酶，将产生足够多的RFLP标记。近几年，又产生了一种高分辨率RFLPs（High Resolution Restriction Fragment Length Polymorphism）分析法，是先利用PCR反应，对大片段DNA分成若干片段分别扩增，然后酶切电泳，进行分析。它相对于常规的RFLPs方法可精确地控制片段大小，以控制每个片段内的切点数，故不受整个片段的切点数及整个片段长度的限制。用多种识别位点、覆盖率较高的、识别4碱基的内切酶进行酶切，提高酶切位点覆盖率，即大大提高了分辨率，从而可进行微量DNA样品分析，适用于群体遗传研究中大范围检测DNA遗传多态性及确定变位点，也可用于疾病相关基因突变的检测中。

RFLPs作为遗传标记已被成功地用于检测植物基因组DNA的多态性，如已在玉米^[17]、番茄^[18]等多种作物中建立了遗传图谱。此外RFLPs为检测和分析植物遗传变异提供了大量的遗传标记，也为区分不同物种及种内不同个体提供了大量的标记，并在多种作物中成功地用于遗传变异检测、起源演化探讨以及品种鉴

定, 国外在大麦属、稻属、桉属、苏铁科等多种植物上进行了研究^[19]。国内, RFLP 技术在柑橘^[20]、葡萄属^[21]等种质资源的研究中得到应用。利用 RFLPs 进行多态性分析具有众多优点, 主要表现在: 第一, 较高可靠性, 这是由限制性内切酶识别序列的专一性决定; 第二, 来源于自然变异, 依据 DNA 上丰富的碱基变异不需任何诱变剂处理; 第三, 多样性, 通过酶切反应 DNA 水平上所有差异, 因而在数量上无任何限制; 第四, 共显性, 指 RFLP 能够区别杂合体与纯合体; 第五, 数量性, 具有数量化。

尽管 RFLP 标记在众多的研究领域得到了广泛的应用并取得了显著成果, 但它也存在着诸如技术较复杂、成本高、劳动强度大、放射性物质污染、对所研究对象需要有一定的遗传背景知识等不足。因此, RFLP 技术的应用和推广受到了一定的限制。

4.2 DNA指纹标记

DNA指纹 (DNA Finger-printing) 标记是以重复序列为探针进行分子杂交, 由于不同基因型中的重复次数不同而产生多态性的分子标记。目前常用的DNA指纹标记主要有微卫星和小卫星DNA标记。

(1) 微卫星DNA标记。微卫星 (Microsatellite) DNA是指以少数几个核苷酸 (多数为2~4个) 为单位多次串联重复的DNA序列, 也称之为简单序列重复 (Simple Sequence Repeats, SSRs)、短串联重复 (Short Tandem Repeats, STRs) 或简单序列长度多态性 (Simple sequence length polymorphisms, SSLPs)。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, 于是这一技术很快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^[22,23]。目前已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^[24]。

(2) 小卫星DNA标记。小卫星 (Minisatellite) DNA作为分子标记最早由Teffery等和Nakamura等提出, 后者也称之为数目可变串联重复序列 (Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs)。小卫星DNA是由1个11~60个核苷酸的基本序列单位重复排列而成, 其重复数从10~10000不等, 分散或成簇分布。多态性的产生是由于重复单位之间的不平衡交换, 从而产生不同的等位基因^[25,26], 现已广泛应用于许多作物的品种鉴定和遗传多样性研究^[27]。

与其它分子标记相比，DNA 指纹具有两个显著特点：一是多位点性。DNA 指纹图谱中每一个条带代表一个位点，其位点广泛分布于整个基因组中。一个 DNA 指纹探针一次能同时检测十几个至二十几个变异。二是高度的 DNA 指纹变异性。主要表现在多个可分辨的条带数和单个条带在群体中出现的低频率。DNA 指纹所检测的位点是基因组中有高度变异性的位点，由多个这种位点上的基因所组成的图谱就具有更高的变异性。

与 RFLPs 标记相比，微卫星和小卫星 DNA 在基因组中非常丰富，多态性比 RFLPs 显著增加。但是探针缺乏，研究者不得不自己合成探针或利用人类基因组研究获得的 DNA 片段与作物 DNA 杂交。SSRs 还必须针对每个染色体座位的微卫星发现其两端的单拷贝序列以设计引物，因而给 SSR 标记的利用带来一定困难。并且由于小卫星和微卫星 DNA 不是单拷贝 DNA，难以跟踪分离群体（如 F_2 或回交群体）中个体基因组同源区域的分离。此外，还有研究^[28]表明小卫星 DNA 分布较为集中，因而限制了它的应用。

4.3 AFLP 标记

扩增片段长度多态性（Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLPs）是使用双链人工接头（Artificial Adaptor）与基因组 DNA 特异性酶切片段相连接作为扩增的模板，对酶切片段进行选择性地扩增。具体是将基因组 DNA 经限制性内切酶双酶切后，形成分子量大小不等的随机性片段，将特定的接头连接在这些 DNA 片段两端，形成一个带接头的特异片段，通过接头序列和 PCR 引物 3' 末端的识别来扩增特异性片段。不同来源的 DNA 酶切片段存在差异，故产生的扩增产物呈现多样性。它是由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos^[29]于 1993 年发明，其实质是 RFLPs 和 RAPD 两项技术的结合。其多态性丰富，一般可检测到 40~150 个扩增产物；呈共显性表达，不受环境影响，无复等位效应；带纹丰富，灵敏度高，自动化程度高；所需 DNA 量少，如一个 0.5mgDNA 样品，可做 4000 个反应，获 8 万个标记，650 万条带纹。而且，AFLPs 稳定性好，重复性强。由于 AFLPs 可采用的限制酶种类很多，所以标记数目多。AFLPs 非常适合绘制品种的指纹图谱及分类研究。

利用 AFLP 标记进行遗传多样性、构建遗传图谱、标定基因辅助育种等研究灵敏度高、快速高效、无复等位效应、多态性丰富。美国的 Blair^[30]利用 AFLP

技术分析了 54 份水稻品种的遗传多样性。目前, AFLP 技术在蔬菜、林木及拟南芥上得到广泛应用。但 AFLPs 采用了同位素检测手段, 随着银染技术和荧光 AFLP 技术的发展, 可大大提高 AFLPs 的安全性。不过, 这种标记步骤繁琐, 并已申请了专利, 费用较高。

4.4 RAPD 标记

RAPD 技术全称为 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^[31]和加利福尼亚生物研究所的科学家 Welsh^[32,33]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^[34,35]是建立在聚合酶链式反应 (PCR: Polymerase Chain Reaction) 扩增基础上。它利用一系列 (通常数百个) 不同的随机排列碱基顺序的寡聚核苷酸单链 (通常为 10 碱基) 为引物, 对所研究基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增产物通过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离, 经 EB 染色或放射性自显影检测扩增产物 DNA 片段的多态性, 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。RAPD 所用的一系列引物 DNA 序列各不相同, 但对于任一特定的引物, 它同基因组 DNA 序列有其特定的结合位点。这些特定的结合位点在基因组某些区域内的分布如符合 PCR 扩增反应的条件, 即引物在模板的两条链上有互补位置, 且引物 3' 端相距在一定的长度范围之内, 就可扩增出 DNA 片段。因此如果基因组在这些区域发生 DNA 片段插入、缺失或碱基突变就可能引起这些特定结合位点分布发生相应的变化, 而使 PCR 产物增加、缺少或发生分子量的改变。通过对 PCR 产物的检测即可测出基因组 DNA 在这些区域的多态性。由于进行 RAPD 分析时可用引物数很大, 虽然对每一个引物而言其检测基因 DNA 多态性的区域是有限的, 但是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。

由于 RAPD 技术能对整个基因组进行多态性检测, 因此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^[36]。RAPD 技术在此方面表现出独特的优势^[37]: 首先, RAPD 可以在对物种没有任何分子生物学研究的情况下, 对这些物种进行基因组指纹图谱的构建。并且通过统计分析为物种进化和分类研究提供 DNA 分子水平的证据。

第二，操作简便，实验周期短，能在较短的时间内筛选大量样品。第三，所需样品量极少，一次扩增仅需 20~100ng 的模板 DNA，且对其质量要求不苛刻。第四，引物具普遍适应性。通过购买已形成商品化的引物可应用于不同生物的研究。第五，特异性强，灵敏度高。在短期内可获得大量的多态性 DNA 片段，只要遗传特异性发生变化，即使亲缘关系非常近的个体也能识别。第六，从其 DNA 分子组成上直接检测个体间遗传上的差异，不受环境条件及发育状况等因素影响，具有较高的分辨力和可靠性。第七，适应于自动化操作和分析。

在国外，Hu和Quiros^[38]用4个引物鉴别14个青花菜和12个花椰菜品种，发现每种作物有12.5%的特异性标记，用2~3个引物就能鉴别出这些品种。Graham等^[39]利用10个RAPD引物对13个不同悬钩子属 (*Rubus*) 植物进行了分类研究，并确定了它们之间的遗传距离。Virk等^[40]应用同样的方法在44个栽培水稻品种中确定并建立了相互间遗传距离。Dos Santo^[41]对青花菜、花椰菜和结球甘蓝的RAPD标记的聚类分析将3个变种分开。Kresovich等^[42]在芜菁中选择不同的代表个体，利用25个引物进行RAPD研究，获得了140个不同的多态性带。在国内，丁晓东等^[43]采用改进的CTAB方法提取34个荔枝品种的基因组DNA为模板，从50个10碱基的随机引物中获得了37个多态性RAPD标记，聚类分析结果表明这34个荔枝品种可以分成4组。李云海等^[44]用100个RAPD引物分析了具有广泛遗传资源代表性和较大应用面积的24个水稻雄性不育系、3个保持系和3个生产中应用最广的恢复系。贾建航等^[45]用RAPD技术对4类紫菜的15个无性系丝状体进行了遗传多样性分析，从50个OPERON引物中经过初筛，其中6个引物可以扩增出稳定的可重复的图谱。李海真等^[46]从200个10bp随机引物筛选出17个引物，对23个南瓜品种(系)的染色体组DNA进行PCR扩增，共产生80条扩增带，其中77条在南瓜属三个种间表现出差异，可作为遗传RAPD标记。彭建营等^[47]建立了适合枣种质RAPD分析的技术体系，进而用于几个枣品种的亲缘演化关系的探讨。揭雨成等^[48]报道了利用RAPD技术分析苧麻不同基因型间的亲缘关系并进行品种分类。周东新等^[49]以假黄麻、假长果、越南圆果等为材料，建立了黄麻DNA的提取方法以及对RAPD分析的影响因素，建立了适于黄麻种质RAPD分析的PCR反应体系。

5. 红麻种质资源研究现状

红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 是锦葵科木槿属的一年生韧皮纤维作物。其

纤维质地柔软，商业上称作“软质纤维”，具有吸湿性强，散水、散热快，耐腐蚀，拉力强等特性，是麻纺和造纸工业的重要原料作物^[50,51]，在植物纤维中其重要性仅次于棉花。

红麻起源于非洲，据记载在当地已有数千年历史^[52,53]。自本世纪初我国引入印度品种马达拉斯红试种开始，迄今也已近百年历史，成为我国的主要经济作物之一，传统的出口产品。尤其 1963 年中国农业科学院麻类研究所采用引进越南红麻抗原，筛选出红麻良种青皮 3 号，经各地试种，表现出纤维产量高，品质良好，抗逆性、抗病性较强，适应性广，耐旱、耐盐碱等特性。80 年代以来红麻成为我国栽培面积最大，总产和单产最高的麻类作物，中国一跃成为最大的红麻生产国，现种植面积和纤维总产量均居世界首位^[54]。

安徽是我国主要红麻产区，具有悠久的种植历史，目前种植面积和总产居全国前列，常年种植面积在 100 万亩左右^[55,56]。随着人类返朴归真对自然纤维的需求愈加紧迫，麻作已成为我省的支柱产业，产品已远销海外，出口创汇，创造了巨大的经济效益和社会效益。大力发展麻作生产显得非常重要。

红麻属喜温短日照作物，晚熟品种在长江流域及以北地区种植表现花而不实，无法繁殖留种^[57]。因此，长期以来我省一直从福建、广东、广西三大留种基地调种，即“南种北植”^[58]。这种“南种北植”栽培虽对我省红麻生产的发展起到积极的作用，但由于没有建立完善的良好繁育和供应制度，红麻生产用种供种渠道多，流通大，混杂严重，有的地区本来就不具备繁种条件而大量繁殖劣质、早花品种；有的甚至将北方自留的早花品种种子运往南方后再向北方倾销；还有的购回发芽率低，甚至霉变并完全丧失发芽率的种子投放市场，麻种市场一片混乱^[57,58,59]，出现了许多早花早蕾的假冒种，致使北方麻农饱受麻种质量低劣之苦，早花早蕾现象严重，纤维产量低甚至收不到纤维，严重损害了麻农利益，挫伤了农民种麻的积极性，阻碍了红麻生产发展。据安徽省 1997 年对霍邱、六安等地（市）调查，20%的红麻发生早花早蕾，亩减产 15%左右，且麻纤维质量严重下降^[57]，影响了地方经济的发展。所以，研究一种简便、可靠、科学的麻种鉴定方法，杜绝伪劣种子在市场上流通，确保引种的可靠性，使红麻生产协调、稳定、健康的发展，是麻作生产中亟待解决的重要问题，势在必行^[60]。

对于红麻种质资源的研究，世界各国主要以植物学形态表现作为分类依据

[61]。最早 1911 年 Howard.A 和 G.L.C.Howard 曾根据叶型、茎色、叶柄色、熟型和花瓣色等性状，将红麻划分为“*Simplex*”、“*Viridis*”、“*Ruber*”、“*Purpureus*”和“*Vulgaris*”5 个变种^[62]。印度、苏联也曾依据叶型、茎色、叶柄色、生育期将红麻划分为 5 个或 3 个变种或类型^[63]。虽然评价指标和性状有一定变动，但这一评价、鉴定及分类方法一直沿用至今^[64]。

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深入较多^[65]。美国红麻研究始于本世纪 40 年代，1943 年由于二战期间包装纤维原料的严重短缺，美国农业部和联合纤维共同体(CFC)合作在古巴开展了一个红麻研究项目，成功选育了几个优良红麻品种，其中 El-Salvador 是优良的高抗炭疽病品种^[66]。60 年代又开展了红麻造纸利用研究，80 年代中期成立了红麻国际协会(Kenaf International)，主要进行红麻在美南部地区的试种研究和综合开发利用。针对红麻生长快，生物产量高的特点，从 500 多个草本植物中，筛选出红麻作为可替代木本植物的造纸原料，经过工厂试验，足以证明红麻作为造纸原料具有潜在的优势。日本、澳大利亚在充分分析自身的自然资源和 21 世纪的农业发展战略下，成立了专门的红麻造纸协会并立项研究。日本红麻造纸协会属于日本环境厅，澳大利亚的红麻协会隶属于澳大利亚农业发展中心。而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。

过去，由于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^[67,68]。中国农业科学院麻类研究所根据叶型、茎色、生育期将 68 份红麻种质资源分成 23 种形态类型^[69]。这对识别品种有一定的作用，但对如何充分利用这些资源便于提供利用，并反映出不同资源的亲缘关系，尚不够理想。通过多年来的收集利用与评价，尤其是 1985 年赴美首次搜集到野生资源材料，大大丰富了我国红麻基因库^[70]，至 1987 年我国已保存有红麻种质资源（包括近缘种）600 多份^[71]，成为拥有红麻资源数量最多的国家，因此有可能和必要对保存的红麻种质资源作较系统深入的研究。1991 年邓丽卿等研究了 450 份红麻栽培及野生资源的形态特征、生物学特性、主要经济性状、品质、抗性、产量及一些遗传变异规律等，并依据果实种子、株型、花冠、叶型、花色的形态，将红麻共分为 16 个形态类型，提出仅以品种形态类型或变种来分类，难以反映

材料间的亲缘关系。为此认为红麻种内应存在两个亚种，即大粒籽亚种和小粒籽亚种，然后再分为 16 个品种类型^[63]，这为资源的利用提供科学依据及基础资料。1993 年李爱青等^[72]进一步从形态学和细胞遗传学角度证明了红麻亚种存在的可能性。1992 年栗建光等^[73]对 67 份红麻种质资源的生育特性、经济性状和纤维品质进行了研究，鉴定出一批具有遗传研究和育种利用价值的特异种质资源，并对种质资源进行了主成份分析和聚类分析，按欧氏距离值的大小，将其中有代表性的 35 份种质资源聚类为 2 群、3 类、6 组。1994 年邓丽卿等^[74]对 420 份红麻种质资源的农艺性状研究，鉴定出一批高产、抗病、优质及特异类型品种。上述分类方法对品种的鉴定和归类虽有一定的指导意义，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，可靠性不足，又繁琐费时。

红麻的细胞学研究始于 80 年代^[75]。Menzel^[76]根据染色体同源性，将木槿属 *Furcaria* 组的种分成三类，第三类包含红麻共 11 个二倍体和四倍体种，一般为 B 和 A 染色体组。我国也是 80 年代才开始取得进展。朱凤绥等^[75]曾对麻类作物的染色体组型和 Giemsa 带型初步进行了系统的分析研究。此后，李爱青^[77]、黄培坤^[78]也分别进行了红麻染色体组型或显带的研究探索。朱凤绥等^[79]报道了麻类作物 G 带的研究，为了解我国丰富的麻类植物资源及它们之间的亲缘关系研究提供了染色体的直接证据。邓丽卿等^[80]对红麻的细胞遗传学进行了研究，观察到红麻的染色体构型一般为 18 个二价体，全部配对，但也发现极少数为 17 个二价体加 2 个单价体（即 $17\text{II}+2\text{I}$ ）或 16 个二价体加 4 个单价体（即 $16\text{II}+4\text{I}$ ）的，没有观察到三价以上的染色体，因此，红麻是二倍体，染色体基数为 18，并选用 17 份不同类型红麻品种进行核型分析，发现 2 种核型，即 $2n=36=32\text{M}+4\text{SM}$ 和 $2n=36=30\text{M}+6\text{SM}$ ，且根据着丝点位置和随体大小发现野生种的染色体结构较对称，具有较原始特性。李爱青曾发现品种间在染色体带型和随体等方面有差异^[77,81]，并于 1991 年研究了 7 份不同来源红麻品种异染色质，结果表明：品种间异染色质含量变幅为 16.1%~26.3%，品种内不同染色体间异染色质含量也有明显差异。研究还发现，红麻染色体有两种类型异染色质。空气干燥时间对不同类型异染色质的显现有很大影响^[82]。进而报道了 17 份红麻稀有材料的细胞学分类^[72]，即以染色体核型分析为依据，对麻种鉴定具有一定指导意义。然而红麻染色

体数目多、形态小、染色体制片难度大，且在显微镜下染色体的形态很难区分得很精确，加之相近种在染色体核型上并无明显区别，从而使常规麻种鉴定陷入困境，无法得知所调种的真伪及纯度。曹德菊等^[83,84]报道将外源抗除草剂基因(*bar*)导入红麻作为标记，对红麻转基因株进行检测，具有一定意义，但仅限于转基因品种，对常规麻种检测不具有广谱性。

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^[85~91]。程舟等^[92]曾用 RAPD 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。6 个引物对 14 份日本使用的红麻品种扩增出总共 30 条 RAPD 多态性条带。根据 RAPD 图谱模式将红麻品种区分开来，区分范围从 6 份（用 OPA-20 引物扩增）到 12 份（用 OPA-11 引物扩增）的品种。用这 30 条多态性条带构建出的聚类分析树状图，将这 14 份红麻品种聚成源于印度、中国、越南的三大类。在随后进行的用 4 个引物对 19 份从美国引入的红麻种质资源的 RAPD 分析中，获得以 35 条多态性条带为基础的 RAPD 图谱并构建了树状图。结果认为这 19 份材料的大部分源于 EI Salvador 种系。程舟等认为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。根据红麻的农艺性状等很难判定品种的来源，而 RAPD 方法可区分鉴定品种以及明确品种资源间的亲缘关系。

6. 本研究的依据、目的及意义

植物遗传标记的应用促进了遗传育种学的发展。从形态学标记、细胞学标记、生化标记向分子标记方向发展，经历了由现象到本质，由宏观到微观，由形态学水平、染色体水平到 DNA 分子水平的发展过程。但由于形态学标记等易受环境因素的影响，不能用来精确描述遗传标记。而细胞学标记和 DNA 分子标记与它们相比具有：(1)标记基于自然变异；(2)不依赖于基因表达；(3)不依赖于基因互作；(4)不受表型效应影响；(5)不受环境变化、生理因素、组织器官、发育阶段的影响等特点。因此，它们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。同时，DNA 分子标记也为生物多样性研究提供可靠的证据。

开展不同种质资源材料与现有品种间的系统进化研究,可以明确不同材料间的亲缘关系,为品种鉴别和种质资源鉴定打下坚实基础,而采用便捷可靠的研究方法则对种质资源进一步开发和利用具有重要作用。本研究通过现代分子生物学技术结合细胞学分析方法,对目前使用的代表性 11 个红麻常规栽培种和 3 个野生种的遗传差异进行 RAPD 分子标记研究,探索栽培种与野生种的亲缘关系,找出各常规栽培种的特异性 DNA 谱带,建立红麻常规栽培种的 DNA 指纹图谱库,从而为分析红麻种子纯度,鉴别品种真伪,提供了一种快速、简便、可靠的分子标记鉴定技术,从根本上改变国内无系统可靠的麻种鉴定方法的现状,防止早花早蕾假冒种的危害,保证了红麻增产农民增收,具有重要的理论意义与实践意义。

但 RAPD 方法在实际应用中也表现出一些不足。所以,对于不同的生物体不可能采取统一模式方法进行研究,应具体问题具体分析。本研究的创新之处就在于首次将 RAPD 分子标记技术同细胞学标记技术结合应用于红麻不同基因型材料亲缘关系和种质鉴定的研究,填补了该研究领域的空白,使我国麻类种质资源研究继续保持世界领先水平。

材料与方法

一、红麻的细胞学标记研究

1 试验材料

1.1 红麻材料

选用来源于世界不同地区在中国较普遍栽种的不同生态类型及安徽省具代表性的主栽品种 11 份和 3 份野生种（表 1）。

1.2 设备、仪器和试剂

1.2.1 设备和仪器

Olympus-CH 显微镜、显微摄影系统（Olympus VANOX 万能研究显微镜）、人工气候箱、-40℃低温冰箱、放大机、显影罐、清洁载片、测微尺、镊子、吸管、酒精灯等。

1.2.2 试剂

0.002mol/L 8-羟基喹啉、0.075mol/L KCl 低渗液、2.5%混合酶液（纤维素酶与果胶酶各占 2.5%）、甲醇：冰醋酸（3：1）固定液、20：1 的 Giemsa 染液（用 pH7.0 1/15mol/L 磷酸缓冲溶液稀释）、D-19 显影液、F-5 定影液等。

2 方法

2.1 制片（参考 F-BSG 法^[93]稍加改进）

- (1) 材料培养：种子在 25℃发芽,根长至 1~1.5cm 时进行前处理。
- (2) 前处理：切取分裂旺盛部分根尖，放在 0.002 mol/L 8-羟基喹啉中处理 1.5~2 小时。
- (3) 前低渗：倒去 8-羟基喹啉，冲洗 2~3 次，加入 0.075 mol/L KCl 低渗液或 ddH₂O，在 20℃~25℃处理约 30 分钟。
- (4) 去壁：倒去 KCl 溶液，加入 2.5%混合酶液在 25℃下处理 2~5 小时，间歇摇动，100 条红麻根尖（只切取分生区）加入 1ml 酶液为宜。
- (5) 后低渗：倒掉酶液，20℃~25℃蒸馏水冲洗 2~3 次，在蒸馏水中停留 10~30 分钟进行后低渗。
- (6) 制备细胞悬液：倒去蒸馏水，用镊子立即将根尖夹碎，制成细胞悬浮液。
- (7) 固定：向细胞悬液中加入新配制的甲醇：冰醋酸（3：1）固定液约 2~3ml。
- (8) 去沉淀：静止片刻，使大块组织沉淀，倒取上层细胞悬浮液，去掉沉淀物。

表 1 试验材料（品种）的背景资料

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

品种 编号	品种名	原产地	生育 类型	叶型	茎色	叶柄色	支数	拉力	株高 (cm)	茎粗 (cm)	皮厚 (mm)	出麻率	抗炭 疽病	原麻产量 (kg/亩)	品种 类型
1	阿联红麻	埃及	迟	全	绿	红	298.0	32.8	360	1.20	1.00	4.60	弱	300.0	栽培
2	勐海紫茎	云南	迟	裂	红	红	298.0	38.2	389	1.80	0.98	6.20	弱	350.0	栽培
3	7804	湖南	中	裂	绿	绿	255.0	48.5	385	1.90	1.50	6.30	中	400.0	栽培
4	塔什干	苏联	早	裂	淡红	淡红	284.0	40.6	320	1.40	1.35	6.10	弱	150.0	栽培
5	泰红 763	泰国	迟	裂	淡红	微红	334.0	44.4	390	2.00	1.36	6.20	中	420.0	栽培
6	元江红麻	云南	早	裂	红	红	280.0	42.6	360	1.50	1.11	5.90	弱	300.0	栽培
7	青皮 3 号	越南	迟	裂	绿	绿	264.0	45.0	370	1.70	1.36	6.20	中	380.0	栽培
8	MX247	墨西哥	中	裂	淡红	绿	240.5	44.0	191	1.07	0.80	5.59	高抗	40.8	野生
9	NA414	尼日利亚	迟	裂	淡红	淡红	228.8	38.3	338	1.84	1.25	5.71	中抗	230.2	野生
10	红引 135	美国	迟	裂	淡红	淡红	283.0	46.0	380	1.80	1.50	5.70	强	385.0	栽培
11	福红 991	福建	中	裂	绿	微红	282.0	41.0	400	1.80	1.21	5.80	高抗	450.0	栽培
12	早熟红麻	辽宁	早	裂	绿	绿	232.0	41.3	240	1.20	0.80	5.30	弱	125.0	栽培
13	UG93	乌干达	迟	全	淡红	淡红	205.5	41.8	346	1.78	1.40	6.19	高抗	126.8	野生
14	古巴 8 号	古巴	迟	全	淡红	微红	286.0	42.0	380	1.90	1.70	6.00	强	380.0	栽培

- (9) 去上清液：将上层细胞悬浮液静止 20~30 分钟，已见细胞沉淀，用吸管吸去上层清液，留约 1ml 细胞悬浮液制备标本。
- (10) 标本制备：取一张预先在 dd H₂O 中冷冻的清洁载片，用吸管滴 4~5 滴细胞悬浮液于其上，立即将载片一端抬起，轻轻吹气，使细胞迅速分散，然后在酒精灯火焰上微微加热烤干。
- (11) 染色：干燥的片子以 20:1 的 Giemsa 染液染色约 1.5 小时，蒸馏水冲洗，空气干燥后镜检。
- (12) 选那些细胞分散、染色体平展互不缠连、分裂相清晰的制片进行拍照、胶卷冲洗、照片放大。每种材料观察 50~60 个细胞，取 10 个左右细胞进行核型分析。

2.2 核型分析

2.2.1 测量与计算

(1) 染色体长度：

1.测放大照片的染色体长度：以测微尺拍摄的 100 倍放大长度作为放大倍数比例（具随体的染色体其随体长度不计算在内）。

2.染色体相对长度=单条染色体长度/单套染色体组总长×100%

(2) 测臂比：臂比=长臂长度/短臂长度，且根据臂比值来确定着丝粒位置^[94,95]

1.臂比值在 1~1.7 之间的为中部着丝粒（Metacentric），用“M”表示。

2.臂比值在 1.7~3.0 之间的为亚中部着丝粒（Submetacentric），用“SM”表示。

3.臂比值在 3.0~7.0 之间的为亚端部着丝粒（Subtelocentric），用“ST”表示。

4.臂比值在 7.0 以上的为端部着丝粒（Telocentric），用“T”表示。

(3) 随体（Satellite）：根据随体的有无，可区分和识别特定的染色体，随体以“SAT”示之。

(4) 臂指数或称 N.F.值：把具中部或近中部着丝粒的“V”型计算为两个臂，把具近端和端着丝粒的“J”或“I”型计算为一个臂，统计核型中总臂数。

(5) 根据 Stebbins^[96,97]对核型的分类，其分类标准是对称性，把染色体组中最大染色体与最小染色体的比值分为 3 级，把臂比大于 2 的染色体在整个染色体组

中的比例划分为 4 级（表 2），确定核型类别。

表 2 核型按对称性程度分类的示意图

Table 2. Classification of chromosome karyotypes according to symmetry degree

最长/最短	臂比大于 2 的染色体的比例			
	0.00	0.01~0.50	0.51~0.99	1.00
<2	1A*	2A	3A	4A
2~4	1B	2B	3B	4B
>4	1C	2C	3C	4C*

*: 1A 为最对称核型，4C 为最不对称核型

2.2.2 配对

根据目测和染色体的相对长度、臂比、次缢痕的有无和位置、随体的有无、形状和大小进行同源染色体剪贴和配对。

2.2.3 排列

按染色体的相对长度由长至短依次排列，长度和形态结构相同的两条染色体配成对。等长染色体以短臂长的排在前。剪贴时短臂排在上面，长臂排在下面，着丝粒位置排列在同一条直线上，具有随体的染色体排在最后。

2.2.4 综合描述^[98]

说明供试材料的染色体总数；染色体组型的公式；染色体的大小；染色体组型的分类。

染色体大小的确定：规定 $1\mu\text{m}$ 以下的为极小染色体； $1\sim 4\mu\text{m}$ 的为小染色体； $4\sim 12\mu\text{m}$ 为中染色体；长 $12\mu\text{m}$ 以上的为大染色体。

染色体组型的分类：即核型的分类。同一核型中染色体相对大小不一，一般可根据核型中染色体臂比及其比值大小，以及它们所具有的数目比例而划分，由 M 染色体组成的，称为对称性组型；大多数由 M 染色体组成的，称为基本对称组型；大多数由 SM 和 ST 组成的称为基本不对称组型；由 ST 组成的，称为不对称组型。

根据 Arano H.^[99]提出的长臂总长与全组染色体总长比的核型不对称系数（A.S.K%）来确定染色体核型不对称程度。

2.2.5 绘制核型模式图

以所测各染色体的相对长度平均值绘制核型模式图。

二、红麻的 RAPD 分子标记研究

1 试验材料

1.1 红麻材料

1.1.1 红麻品种的选择

选用来源于世界不同地区在中国较普遍栽种的不同生态类型及安徽省具代表性的主栽品种 11 份和 3 份野生种（表 1）。

1.1.2 取材

将红麻种子用清水泡一下，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。

1.2 设备、仪器和试剂

1.2.1 设备和仪器

小型高速离心机（TGL-16C）、PCR 扩增仪（Hema 4800）、UV-1600 紫外可见分光光度仪、Hema 凝胶自动成像系统、电泳仪和电泳槽（北京六一仪器厂）。

常温冰箱、-40℃低温冰箱、液氮罐、高压灭菌锅、超净工作台、恒温水浴锅、手提式紫外检测仪、连续可调微量移液器及其他分子生物学常用设备。

1.2.2 试剂

十二烷基硫酸钠（SDS），十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、10bp 随机引物、Taq 酶、dNTPs、MgCl₂、PCR Buffer、Lambda DNA/EcoR I +HindIII Marker³ 和矿物油等均购自加拿大 Sangon 生物工程公司。Tris-Cl、PCR Markers 和 RNaseA 酶购自上海华美生物工程公司。其他试剂均为国产分析纯产品。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取

2.1.1 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。
- (5) 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。
- (6) 可重复第五步一次。
- (7) 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。
- (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) 6000rpm 离心 5min, 弃上清, 尽量去尽。
- (12) 用 4ml 70%乙醇漂洗, 静置 10min。
- (13) 6000rpm 离心 5min, 彻底去上清, 加适量 TE, 放 4℃冰箱备用。并取部分样品用紫外分光光度仪检测所得 DNA 的质量。

2.1.2 SDS- II 方法^[100]

- (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 II (300ml 中含 18.6g 葡萄糖、6.0gPVP、240 μl β-巯基乙醇 1.11g/ml), 磨匀, 倒入 7ml 离心管中。9000 rpm 离心 10min。
- (3) 去上清, 沉淀加 5mlSDS 提取液 I (100mmol/L Tris-Cl pH8.0、500mmol/L NaCl、20mmol/L EDTA pH8.0、1.5%SDS), 用牙签缓慢搅匀, 65℃水浴 45min, 每隔 5~10min 用牙签轻搅几下。
- (4) 加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 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: 乙醇 (25: 24: 1), 混匀, 室温静置 5~10min, 5000rpm 离心 5min。其他步骤同 SDS- I 方法。

2.1.3 CTAB- I 方法^[101]

约 0.7g 种子液氮下研磨成粉末, 加入 65℃预热过的 CTAB 抽提液

(100mmol/L Tris-Cl pH8.0、1.4mol/L NaCl、20mmol/L EDTA pH8.0、2%CTAB) 约 2.5ml 于 65℃保温 30min, 缓慢颠倒混匀数次, 冷却至室温后加入等体积氯仿: 异戊醇 (24: 1), 混匀, 室温静置 5~10min, 10000rpm 离心 5min。取上清加 1/10 体积 10ml/100ml CTAB 液 (10ml/100mlCTAB、0.7 mol/L NaCl), 混匀, 再用氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提一次。取上清加入等体积 CTAB 沉淀缓冲液 (10ml/100ml CTAB、50mmol/L Tris-Cl pH8.0、10mmol/L EDTA pH8.0), 放入-20℃冰箱中至少 30min 以上。5000 rpm 离心 10min, 70%乙醇、无水乙醇各洗涤一次沉淀物以除盐, 溶于高盐 TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-Cl pH8.0、1.0mol/L NaCl、1mmol/L EDTA pH8.0) 中。其他步骤同 SDS- I 方法。

2.1.4 CTAB- II 方法^[102]

约 0.7g 种子液氮下研磨成粉末, 加入 65℃预热过的 CTAB 抽提液 (100mmol/L Tris-Cl pH8.0、1.4mol/L NaCl、20mmol/L EDTA pH8.0、2%CTAB) 约 2.5ml 于 65℃保温 30min, 缓慢颠倒混匀数次, 冷却至室温后加入等体积 3mol/L KAc pH7.2, 10000rpm 离心 5min, 取上清, 加等体积氯仿: 异戊醇 (24: 1), 混匀, 室温静置 5~10min, 10000rpm 离心 5min。可重复一次, 取上清加 2/3 体积预冷异丙醇, 放入-20℃冰箱中至少 30min 以上。5000 rpm 离心 10min, 70%乙醇、无水乙醇各洗涤一次沉淀物以除盐, 溶于 TE 中。其他步骤同 CTAB- I 方法。

2.1.5 高盐低 pH 法^[103,104]

提取液 (100mmol/L NaAc、50mmol/L EDTA、500mmol/L NaCl、2%PVP、1.4%SDS、pH5.5), 其他步骤同 CTAB- II 方法。

2.1.6 氯仿-异戊醇-核糖核酸酶法^[103]

提取液 (0.045mol/L 柠檬酸钠、0.1mol/L EDTA、0.45mol/L NaCl、1%SDS、pH7.0), 其他步骤同 CTAB- II 方法。

2.1.7 高 pH、Na₂CO₃-SDS 法^[105]

提取液 (189mmol/L Na₂CO₃、50mmol/L EDTA、1mol/L NaCl、1%Vc、1.5%SDS、pH8.8), 其他步骤同 CTAB- II 方法。

此外, 本试验还进行了用 SDS- I 方法分别对种子、幼叶、根、茎提取 DNA 的比较研究。

2.2 红麻 RAPD 反应参数的设计

2.2.1 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。

2.2.2 dNTPs 浓度

本试验在 $50\mu\text{mol/L}$ ~ $350\mu\text{mol/L}$ 之间设置了 7 个 dNTPs 浓度梯度,分别为 $50\mu\text{mol/L}$ 、 $100\mu\text{mol/L}$ 、 $150\mu\text{mol/L}$ 、 $200\mu\text{mol/L}$ 、 $250\mu\text{mol/L}$ 、 $300\mu\text{mol/L}$ 、 $350\mu\text{mol/L}$,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。

2.2.3 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。

2.2.4 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 $0.2\mu\text{mol/L}$ 、 $0.4\mu\text{mol/L}$ 、 $0.6\mu\text{mol/L}$ 、 $0.8\mu\text{mol/L}$ 、 $1.0\mu\text{mol/L}$ 、 $1.2\mu\text{mol/L}$ 、 $1.4\mu\text{mol/L}$,确定合适的引物浓度。

2.2.5 MgCl_2 浓度

本试验参照标准的 PCR 反应中 MgCl_2 的含量,设计了 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 。其他反应因子相同,同时扩增。根据扩增结果来选择合适的 MgCl_2 浓度。

2.3 红麻反应程序的设计

本研究以 Williams 等^[31]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°C 预变性 5min,使模板 DNA 充分变性,然后进入下列温度循环, 94°C 变性、 72°C 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。

2.4 红麻品种遗传多样性的 RAPD 分析

2.4.1 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, 30ng 的基因组 DNA, 0.75U 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。

2.4.2 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三次, 选择稳定性较好、重复性较高的图片进行扩增产物的分析。

2.4.3 扩增产物的分析

统计 99 个引物对 14 个样品的扩增情况, 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: 单个引物对 14 个品种所有带型完全一致, 记为无多态性, 如果 14 个品种至少在一个片段上有差异, 则记为多态性^[106]。多态性频率=多态性品种对数/总品种对数。

(2)遗传分类: 按 Nei^[107]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 SAS 软件, 采用系统聚类法中的 Average Linkage Cluster Analysis 对 GD 进行遗传分类, 构建树系图^[108]。

结果与分析

一、红麻的细胞学标记研究

用来源于不同地区的红麻品种进行细胞学研究表明（核型照片见附图 1～14）：

1.红麻的染色体数目

经细胞学观察结果表明，供试的红麻各类型品种染色体数目均为 $2n=36$ 。

2.红麻的染色体形态

供试的红麻不同类型品种染色体的长臂、短臂、总长、相对长度、臂比、着丝粒位置见附表 1～14。各品种的核型基本相似，染色体全部是中部着丝粒或亚中部着丝粒，无端部着丝粒及亚端部着丝粒，相对长度变幅在 9.82%～3.48%，绝对长度变幅在 $1.85\mu\text{m}\sim 7.00\mu\text{m}$ ，为中、小染色体，但也存在一些差异（表 3）。从表 3 中可见这 14 个红麻品种存在 9 种核型公式，根据核型中染色体的长度比和臂比两项主要特征区分核型的不对称与对称程度，将它们分为 3 种核型即 1A、1B、2B。红麻染色体大多数由 M 染色体组成，为基本对称组型。核型不对称系数在 53.5%～58.6%之间，核型较为对称。

3.红麻染色体的随体

研究结果发现，红麻染色体有的品种（MX 247、泰红 763）无随体，有的品种（元江红麻、阿联、勐海紫茎、古巴 8 号、红引 135、NA 414、塔什干、青皮 3 号）有 1 对随体，有的品种（UG 93、早熟红麻、7804、福红 991）有 2 对随体；随体大小又可分为普通型随体（呈小圆球形）、较大型随体（直径近似染色体短臂直径，长度比短臂略短）和特大型随体（直径等于或略大于染色体短臂直径，长度比短臂长）3 种类型（表 4），这样根据随体的有无、多少和大小形态的细胞学特征就可将红麻不同基因型材料加以区分。

4.红麻染色体的核型模式图

供试的 14 个红麻品种的核型模式图见附图 15～28。核型模式图尽管不象核型那样真实、具体，但它却消除了由于分裂时期的不完全一致带来的细胞之间染色体收缩程度上的差异和制片等因素造成的染色体扭曲、拉长等误差，因而更准确、更真实地反映了核型。

表 3 14 个红麻品种的核型比较

Table 3. Differences in karyotypes of fourteen *Hibiscus cannabinus* L. 's cultivars

品 种	核型不对称系数 (A.S.K%)	N.F.值	核 型 类 别	核 型 公 式
阿联红麻	58.6	72	1B	$2n=36=32M+2SM+2M(SAT)$
勐海紫茎	53.8	72	1B	$2n=36=34M+2M(SAT)$
7804	55.9	72	1A	$2n=36=28M+4SM+4M(SAT)$
塔什干	54.8	72	1B	$2n=36=32M+2SM+2M(SAT)$
泰红 763	58.5	72	2B	$2n=36=30M+6SM$
元江红麻	55.2	72	1A	$2n=36=32M+2SM+2M(SAT)$
青皮 3 号	56.9	72	2B	$2n=36=28M+6SM+2SM(SAT)$
MX 247	57.6	72	1B	$2n=36=36M$
NA 414	55.8	72	2B	$2n=36=32M+2SM+2SM(SAT)$
红引 135	56.4	72	1B	$2n=36=34M+2M(SAT)$
福红 991	53.5	72	1A	$2n=36=32M+4M(SAT)$
早熟红麻	56.6	72	1B	$2n=36=30M+2SM+4M(SAT)$
UG 93	56.3	72	1B	$2n=36=30M+2SM+4M(SAT)$
古巴 8 号	56.9	72	2B	$2n=36=32M+2SM+2M(SAT)$

表 4 12 个红麻品种随体型的差异

Table 4. Differences in satellites of twelve *Hibiscus cannabinus* L. 's cultivars

随体型	品种	随体大小范围 (长×宽) μm
特大型	阿联	2.50×2.00
	NA 414	2.45×1.50
较大型	元江红麻	1.82×1.20
	7804	1.19×1.40
	UG 93	0.95×0.85
	勐海紫茎	0.65×0.55
普通型	红引 135	0.85×0.80
	福红 991	0.88×0.80
	青皮 3 号	0.90×0.65
	塔什干	0.95×0.90
	早熟红麻	1.00×0.85
	古巴 8 号	0.90×0.65

二、红麻的 RAPD 分子标记研究

1. 红麻基因组 DNA 提纯方法研究

本试验针对红麻种子中多糖成分及果胶含量高, DNA 提取难度大的特点, 采取了 7 种不同的方法提取红麻种子基因组 DNA, 探讨了各种方法的提取效果, 并将最适宜的方法分别运用于提取红麻种子、根、茎、叶的 DNA, 通过比较筛选出适用于 RAPD 扩增的红麻种子基因组 DNA 提取方法。

1.1 紫外检测

取 20 μ l DNA 提取液, 加入 3ml dd H₂O, 即将其稀释 150 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 A₂₆₀/A₂₈₀ 值判断 DNA 纯度, A₂₆₀ 值计算 DNA 浓度 (表 5、表 6、表 7)。

表 5 不同提取法所得福红 992 种子 DNA 的紫外分析结果

Table 5. The result of UV analysis by different extracted method in DNA of Fuhong 992' seeds

提取方法	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA 浓度 (μ g/ml)
SDS- I 方法	0.268	0.147	1.82	2010.0
SDS- II 方法	0.145	0.093	1.56	1087.5
CTAB- I 方法	0.070	0.033	2.12	525.0
CTAB- II 方法	0.055	0.022	2.50	412.5
高盐低 pH 法	0.118	0.075	1.57	885.0
氯仿-异戊醇-核糖核酸酶法	0.171	0.120	1.43	1282.5
高 pH、Na ₂ CO ₃ -SDS 法	0.093	0.040	2.33	697.5

表 6 SDS- I 方法分别对福红 992 的种子、幼叶、根、茎提取 DNA 的紫外分析结果

Table 6. The result of UV analysis by SDS- I method in DNA of Fuhong 992' seeds, leaves, roots and stalks respectively

不同部位	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA 浓度 (μ g/ml)
种子	0.268	0.147	1.82	2010.0
幼叶	0.110	0.063	1.75	825.0
根	0.044	0.030	1.47	330.0
茎	0.008	0.004	2.00	60.0

表 7 SDS- I 方法对 14 种红麻品种的种子 DNA 提取的紫外分析结果
Table 7. The result of UV analysis by SDS- I method in DNA of
Hibiscus cannabinus L. 's fourteen cultivars' seeds

品种	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DNA 浓度 (μg/ml)
阿联	0.100	0.059	1.69	750.0
勐海紫茎	0.031	0.022	1.41	232.5
7804	0.078	0.048	1.63	585.0
塔什干	0.057	0.040	1.43	427.5
泰红 763	0.037	0.022	1.68	277.5
元江红麻	0.087	0.052	1.67	652.5
青皮 3 号	0.081	0.045	1.80	607.5
MX247	0.185	0.101	1.83	1387.5
NA414	0.246	0.135	1.82	1845.0
红引 135	0.113	0.063	1.79	847.5
福红 991	0.295	0.169	1.75	2212.5
早熟红麻	0.065	0.039	1.67	487.5
UG93	0.037	0.022	1.68	277.5
古巴 8 号	0.062	0.035	1.77	465.0

从表 5 可看出, SDS- I 方法所获得的 DNA 浓度最大为 2010 μg/ml, 且其 A₂₆₀/A₂₈₀=1.82 纯度高。SDS- II 方法和氯仿-异戊醇-核糖核酸酶法所获得的 DNA 浓度也较大分别为 1087.5 μg/ml、1282.5 μg/ml, 但其 A₂₆₀/A₂₈₀ 分别为 1.56 和 1.43 纯度不高。其他方法如 CTAB- I 方法、CTAB- II 方法、高盐低 pH 法和高 pH、Na₂CO₃-SDS 法获得的 DNA 得率均较低, 且纯度不理想。所以, 本试验采用的较简便易行的 SDS- I 方法取得较理想的效果, 符合分子生物学要求。

从表 6 可看出, 从红麻根和茎中提取的 DNA 浓度和纯度均不太理想, 不符合分子生物学的要求。从幼叶中提取的 DNA 虽然浓度和纯度较高, 但试验中可见所提取的 DNA 不够纯白, 可能含有多酚氧化物等杂质, 而这些杂质对 PCR 扩增和 RAPD 分析都有一些影响。相比之下从红麻种子中所提取的基因组 DNA 浓度最大且纯度最高。

用 SDS- I 方法对 14 种红麻品种的种子 DNA 提取的紫外分析结果见表 7, 它们皆满足于 PCR 扩增和 RAPD 分析的要求。

1.2 电泳检查

本试验采用 Lambda DNA/EcoR I +HindIII Marker,3 为标准于 0.7%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福红 992 种子 DNA 电泳图谱（图 1、图 2）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- I 方法分别对福红 992 的种子、幼叶、根、茎提取 DNA 的电泳图谱（图 3）可看出，4 种不同部位提取的 DNA 大小均在 21kb 左右。从亮度可看出用种子和幼叶提取的 DNA 浓度较大。从 SDS- I 方法对 14 种红麻品种的种子 DNA 提取的电泳图谱（图 4）看出它们的大小和浓度都满足 PCR 扩增和 RAPD 分析的要求。

1.3 PCR 扩增结果分析

以提取的 14 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 5）。从电泳图谱中可见所提取的 14 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- I 方法适用于红麻种子的 DNA 提取，是一种快速、简便、适用性强，能够用于 RAPD 分析的红麻种子 DNA 提取新方法，并省却了许多较昂贵的仪器和试剂，如高速冷冻离心机、重蒸酚试剂、PVP、CTAB 等，降低了实验成本。

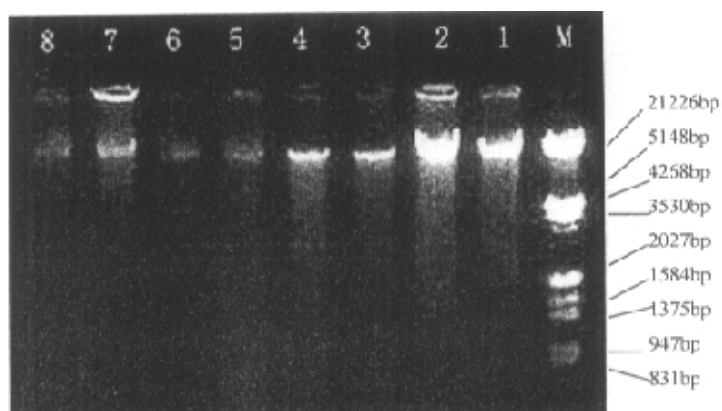


图 1 不同提取法获得的福红 992 种子 DNA 图谱（一）

Figure 1. Agarose gel electrophoresis analysis of Fuhong 992's genomic DNA (1)

M: Lambda DNA/EcoR I +HindIII Marker, 3 1、2.SDS- I 方法 3、4.SDS- II 方法
5、6.CTAB- I 方法 7、8.CTAB- II 方法

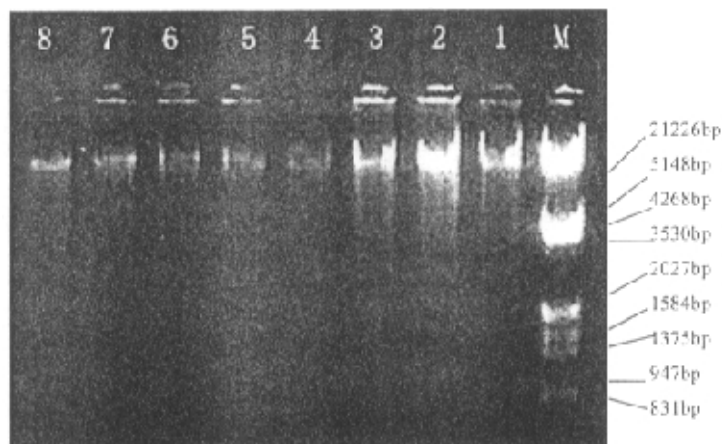


图 2 不同提取法获得的福红 992 种子 DNA 图谱（二）

Figure 2. Agarose gel electrophoresis analysis of Fuhong 992's genomic DNA (2)

M: Lambda DNA/EcoR I +HindIII Marker, 3 1、2.SDS- I 方法 3、4.高盐低 pH 法
5、6.氯仿-异戊醇-核糖核酸酶法 7、8.高 pH、 Na_2CO_3 -SDS 法

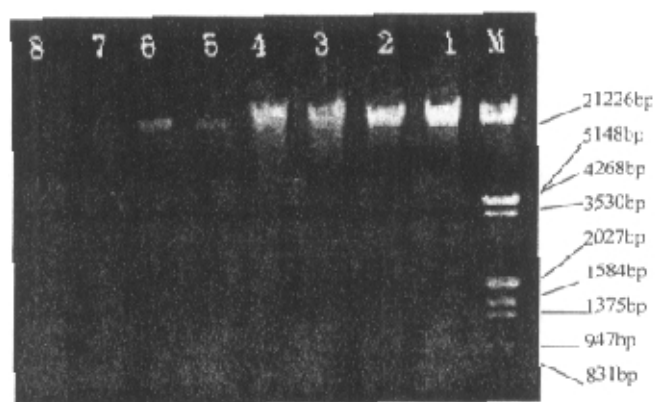


图 3 SDS- I 方法分别对福红 992 种子、幼叶、根、茎提取的 DNA 图谱
Figure 3. Agarose gel electrophoresis analysis by SDS- I method in genomic DNA of
Fuhong 992' seed, leaves, roots and stalks respectively
M: Lambda DNA/EcoR I +HindIII Marker,3 1、2 .种子 3、4.叶 5、6.茎 7、8.根

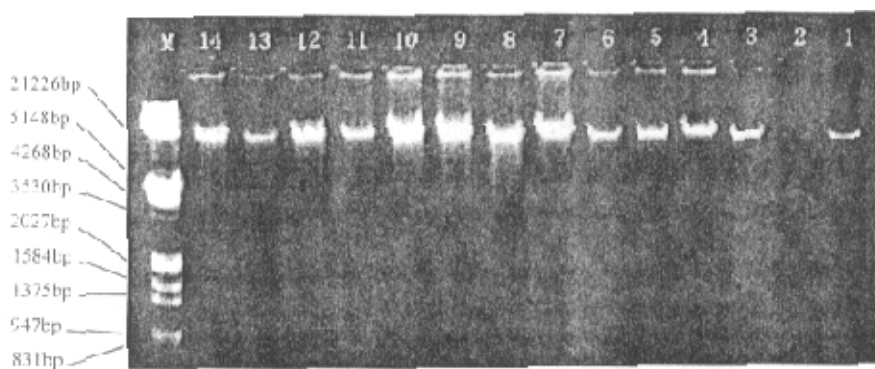


图 4 用 SDS- I 方法提取 14 种红麻品种的种子 DNA 图谱
Figure 4. Agarose gel electrophoresis analysis by SDS- I method in genomic DNA of
Hibiscus cannabinus L.'s fourteen cultivars' seeds
1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.占巴 8 号 M: Lambda DNA/EcoR I +HindIII Marker.3

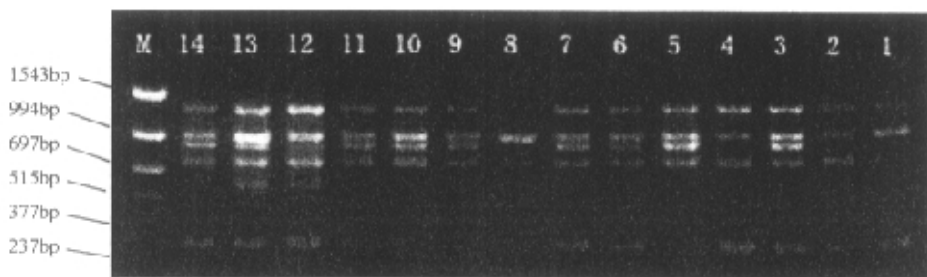


图 5 用 SDS- I 方法提取 14 种红麻品种的种子 DNA 的 PCR 扩增图谱
Figure 5. The result of PCR analysis by SDS- I method in genomic DNA of
Hibiscus cannabinus L. 's fourteen cultivars' seeds

1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.占巴 8 号 M: PCR Markers

2. 红麻 RAPD 反应参数的优化

RAPD 技术在应用中的一个主要问题是重复性差，实验结果易受多种因素的影响。因此，对红麻不同品种进行 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，为红麻品种间 RAPD 分析提供了一个标准化程序。

2.1 红麻 RAPD 实验条件的优化

2.1.1 模板浓度的影响

DNA 模板浓度是制约扩增产物获得率及产物特异性的一个重要因素。模板含量过低，引物就会与模板结合的机率小，偶然性大，扩增产物检测不到或重复性差；若模板含量过高，又会相应增加非特异性谱带，造成弥散型电泳结果。

本实验设置了 15ng、20ng、25ng、30ng、35ng、40ng、45ng 7 个浓度梯度，比较了不同的模板浓度对扩增的影响，从图 6 的结果表明，在这 7 个浓度下，扩增出的谱带及扩增强度基本相同。本实验选出合适的 DNA 模板量为 30ng。

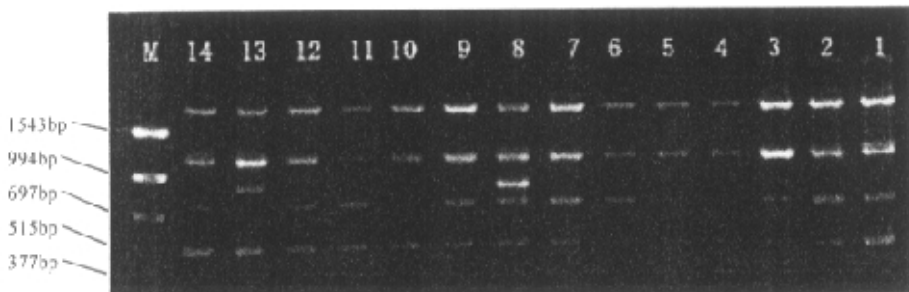


图 5 用 SDS- I 方法提取 14 种红麻品种的种子 DNA 的 PCR 扩增图谱
Figure 5. The result of PCR analysis by SDS- I method in genomic DNA of
Hibiscus cannabinus L. 's fourteen cultivars' seeds

1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.占巴 8 号 M: PCR Markers

2. 红麻 RAPD 反应参数的优化

RAPD 技术在应用中的一个主要问题是重复性差,实验结果易受多种因素的影响。因此,对红麻不同品种进行 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,为红麻品种间 RAPD 分析提供了一个标准化程序。

2.1 红麻 RAPD 实验条件的优化

2.1.1 模板浓度的影响

DNA 模板浓度是制约扩增产物获得率及产物特异性的一个重要因素。模板含量过低,引物就会与模板结合的机率小,偶然性大,扩增产物检测不到或重复性差;若模板含量过高,又会相应增加非特异性谱带,造成弥散型电泳结果。

本实验设置了 15ng、20ng、25ng、30ng、35ng、40ng、45ng 7 个浓度梯度,比较了不同的模板浓度对扩增的影响,从图 6 的结果表明,在这 7 个浓度下,扩增出的谱带及扩增强度基本相同。本实验选出合适的 DNA 模板量为 30ng。

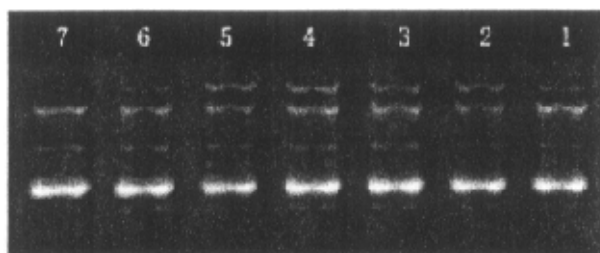


图 6 不同模板浓度扩增的 RAPD 带型（引物 S₄₃₀）

Figure 6. The RAPD profile with primer S₄₃₀ and different DNA concentrations

1. 15ng 2. 20ng 3. 25ng 4. 30ng 5. 35ng 6. 40ng 7. 45ng

2.1.2 dNTPs 浓度的影响

dNTPs 作为 PCR 反应的原料参与新链 DNA 的合成。过高的 dNTPs 含量会导致 Taq 酶在非靶位置的启动和延伸时核苷酸的错误掺入,影响了 Taq 酶的活性。虽然较低的 dNTPs 浓度可提高特异性和准确性,但过低的 dNTPs 浓度又会影响 DNA 的合成效率,甚至会因 dNTPs 的过早消耗而使合成产物单链化影响扩增效果。本实验在 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,从图 7 的结果表明,dNTPs 浓度为 50 μ mol/L、100 μ mol/L、350 μ mol/L 时扩增谱带不稳定,浓度为 150 μ mol/L、200 μ mol/L、250 μ mol/L、300 μ mol/L 时带型基本没变化。本实验选出合适的 dNTPs 浓度为 200 μ mol/L。

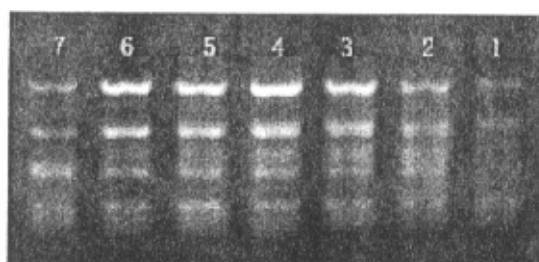


图 7 不同 dNTPs 浓度扩增的 RAPD 带型（引物 S₄₃₀）

Figure 7. The RAPD profile with primer S₄₃₀ and different dNTPs concentrations

1. 50 μ mol/L 2. 100 μ mol/L 3. 150 μ mol/L 4. 200 μ mol/L
5. 250 μ mol/L 6. 300 μ mol/L 7. 350 μ mol/L

2.1.3 Taq 酶浓度的影响

Taq 酶浓度过低会使新链的合成效率下降，导致扩增产物不足。而使用高浓度的 Taq 酶虽然能确保扩增产物的合成，但却容易产生非特异性扩增产物的积累影响实验结果，造成假阳性，且 Taq 酶用量的增大还提高了实验成本，造成了经济上的浪费。另外，Taq 酶的用量还与不同品牌的 Taq 酶活性有关。本实验设置了 7 个浓度梯度，分别为 0.25U、0.5U、0.75U、1U、1.25U、1.5U、1.75U，从图 8 的结果表明，Taq 酶浓度为 0.25U 时扩不出条带，Taq 酶浓度为 0.5U 时扩增 DNA 强度较弱，Taq 酶浓度为 0.75U、1U、1.25U、1.5U、1.75U 时扩增出的 DNA 带型和强度都较好。但浓度为 1.25U、1.5U、1.75U 时扩出的带型有些弥散，可能是产生了非特异性带的缘故。在保证实验结果准确性的前提下，为节省试剂，本实验选出合适的 Taq 酶浓度为 0.75U/25 μ l。

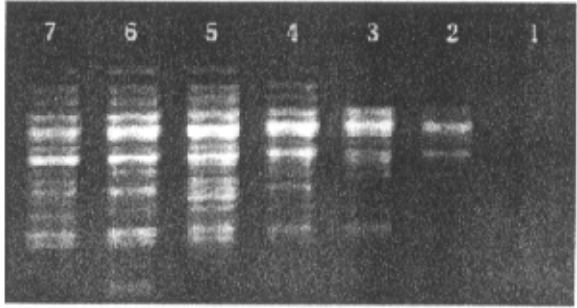


图 8 不同 Taq 酶浓度扩增的 RAPD 带型 (引物 S₃₆₃)

Figure 8. The RAPD profile with primer S₃₆₃ and different Taq DNA polymerases concentrations

1. 0.25U 2. 0.5U 3. 0.75U 4. 1U 5. 1.25U 6. 1.5U 7. 1.75U

2.1.4 引物种类和引物浓度的影响

同一引物，不同模板扩增的带型不同；同一模板，不同引物扩增的带型也不同（图 9、图 10）。此外，同一模板，不同引物浓度扩增的结果也不太一致。本实验设置了 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，从图 11 的结果表明，随着引物浓度的增加，扩增的 DNA 含量有所增加，但引物量过大也会导致非特异性扩增产物的增加。本实验确定合适的引物浓度为 0.6 μ mol/L。

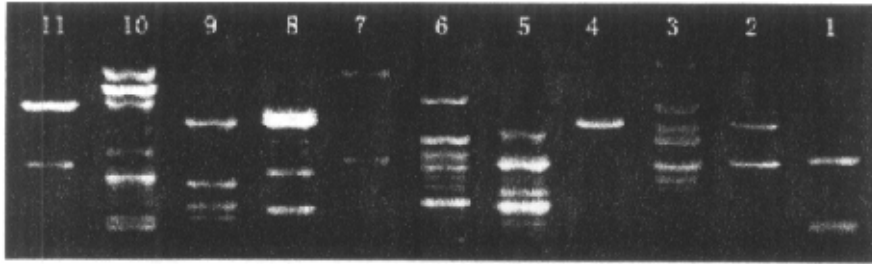


图 9 同一模板（MX 247）不同引物扩增的 RAPD 带型

Figure 9. The RAPD profile with same template MX 247 and different primers

1. S₃₉ 2. S₃₆ 3. S₉₁ 4. S₂ 5. S₁₅₈ 6. S₁₉₀ 7. S₁₈₄ 8. S₁₆₄ 9. S₁₅₃ 10. S₁₈₁ 11. S₁₈₆

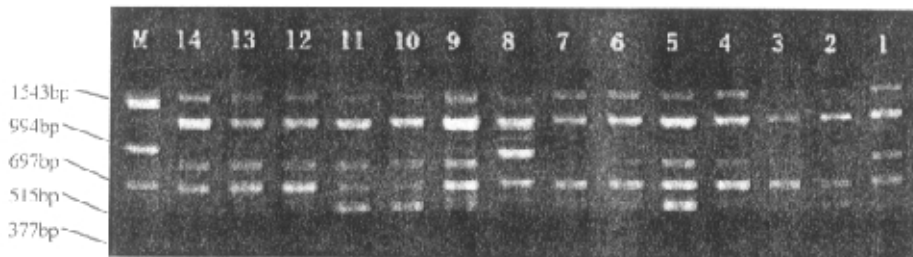


图 10 同一引物（引物 S₁₁₀₈）不同模板扩增的 RAPD 带型

Figure 10. The RAPD profile with primer S₁₁₀₈ and different templates

1.阿联红麻 2.勐海紫茶 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.占巴. 8 号 M: PCR Markers

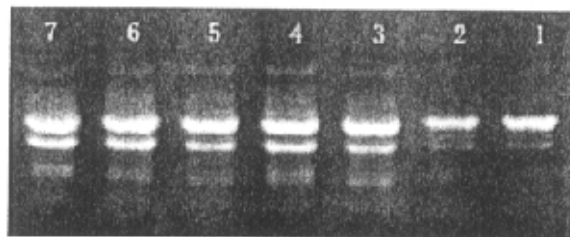


图 11 不同引物 S₃₆₃ 浓度扩增的 RAPD 带型

Figure 11. The RAPD profile with different primer S₃₆₃ concentrations

1. 0.2 μ mol/L 2. 0.4 μ mol/L 3. 0.6 μ mol/L 4. 0.8 μ mol/L
5. 1.0 μ mol/L 6. 1.2 μ mol/L 7. 1.4 μ mol/L

2.1.5 $MgCl_2$ 浓度的影响

$MgCl_2$ 浓度的变化会导致带型的改变。虽然使用一系列 $MgCl_2$ 浓度可以获得谱带的重复性，但带的强度和因非特异导致的背景变化要受影响。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 12 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。

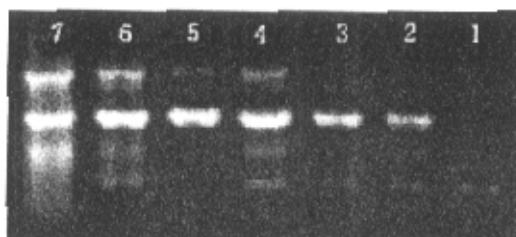


图 12 引物 S_{2130} 在不同的 $MgCl_2$ 浓度下扩增的 RAPD 带型

Figure 12. The RAPD profile with primer S_{2130} 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

2.2 红麻 RAPD 反应程序的优化

2.2.1 变性温度和时间

许多资料表明，RAPD 的变性温度在 $94^{\circ}C \sim 95^{\circ}C$ 。但高温持续的时间过长会降低 Taq 酶的活性，故一般 RAPD 的变性时间为 30sec 至 1min 左右。本实验设置变性温度为 $94^{\circ}C$ ，变性时间为 30sec 和 1min。其结果表明（图 13） $94^{\circ}C$ 变性 30sec（泳道 8）和 1min（泳道 9）所扩增出的带型结果基本一致。

2.2.2 退火温度和时间

影响 RAPD 分析中的 PCR 扩增因素是复杂的，引物序列短和退火温度低是其不稳定的重要因素。退火温度过低就会导致 RAPD 扩增产物过多使其特异性下降，而退火温度过高，会使引物和模板结合不好，扩增产物过少。故合适的退火温度对 RAPD 的特异性是十分重要的。大量的资料表明，对于 RAPD 的 10 个

碱基的引物，退火温度一般在 40℃ 以下。本实验分别采用 36℃、37℃、38℃、39℃ 四种退火温度，结果表明 36℃ 时（泳道 4）扩增出的条带较多，37℃（泳道 3）、38℃（泳道 2）、39℃（泳道 1）所扩增的产物条带数较为合适，故以 37℃～39℃ 为退火温度均较适宜。本实验分别比较了 38℃ 时退火 1min（泳道 5）、45sec（泳道 6）和 30sec（泳道 7）对扩增结果的影响。从图中可以看出，本实验这三种退火时间对带型的影响不大，故选择退火时间 45sec 比较适宜。

2.2.3 延伸温度和时间

由于 Taq 酶的最适作用温度为 72℃，所以大部分的 PCR 中采用的延伸温度为 72℃，故本实验所用的延伸温度为 72℃。PCR 的延伸时间主要是由欲扩增的片段长度所决定的，在 RAPD 研究中分别采用了 1min30sec（泳道 10）和 2min（泳道 11）两种延伸时间，从结果可以看出两者所扩增出的带型差异不大。故采用 1min30sec 的延伸时间较为理想。

2.2.4 循环次数的影响

PCR 循环的次数决定着扩增的产量。适宜的循环次数主要受模板的初始浓度所影响，由于 PCR 的产物量呈指数级增长，若循环次数太少，则 PCR 扩增出的产物量极少；若循环次数过多，则可能会引起非特异性扩增。在本实验 25 μl 的系统中模板量为 30ng 的条件下，分别进行了 30 次（泳道 12）、40 次（泳道 13）、50 次（泳道 14）循环次数的实验，结果表明扩增出的带型基本一致，但扩增强度有所差别。由图中可以看出 30 个循环的扩增量较少，50 个循环的扩增量较多，40 个循环已经达到本实验的要求。

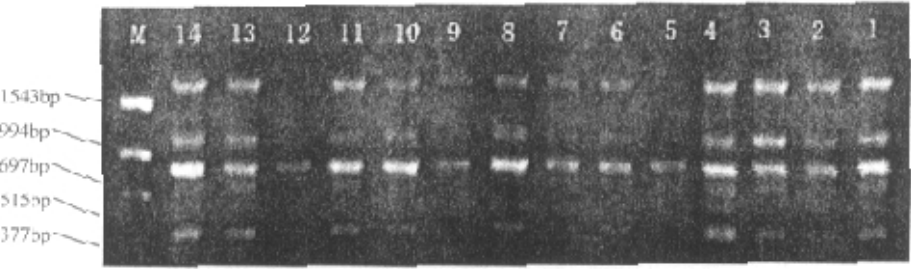


图 13（引物 S₁₇₅）不同扩增参数对 RAPD 图谱的影响

Figure 13. Effects on RAPD profile with primer S₁₇₅ and different amplifying parameters

综上所述，最后确定的 RAPD 反应体系为（25 μ l）：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，0.75U 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。

3. 不同红麻品种遗传差异的 RAPD 分析

3.1 随机引物的筛选

对 150 个 10bp 的随机引物（Sangon 公司）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 99 个引物。

99 个引物的 PCR 扩增，每个引物扩增的 DNA 片段数为 2~12 个，共产生 766 条带，平均每个引物扩增出 7.7 条带。其中，单态带 419 条，平均每个引物扩增出 4.2 条，多态带 347 条，占 45.3%，平均每个引物扩增出 3.5 条多态带。

表 8 红麻基因组 DNA 99 个引物扩增结果
Table 8. The amplified result of 99 primers in *Hibiscus cannabinus* L.genomic DNA

引 物	序 列	总 计	单态带	多态带	P [*] %
S ₁₁₂	ACGCGCATGT	8	4	4	50.0
S ₂₃	AGTCAGCCAC	6	1	5	83.3
S ₂₇	GAAACGGGTG	11	7	4	36.4
S ₁₂₄	GGTGATCAGG	7	2	5	71.4
S ₃₂	TCGGCGATAG	8	4	4	50.0
S ₃₁	CAATCGCCGT	8	4	4	50.0
S ₃₉	CAAACGTCGG	7	2	5	71.4
S ₁₃₀	GGAAGCTTGG	11	5	6	54.5
S ₄₀	GTTGCGATCC	7	7	0	0
S ₃₆₃	CCAGCTTAGG	8	3	5	62.5
S ₃₆	AGCCAGCGAA	8	2	6	75.0
S ₃₆₆	CACCTTTCCC	10	6	4	40.0
S ₃₄₇	CCTCTCGACA	8	6	2	25.0
S ₄₃₀	ACAACCTGGGG	10	4	6	60.0
S ₉₁	TGCCCCGTCGT	9	4	5	55.6
S ₂	TGATCCCTGG	4	3	1	25.0
S ₄₅₆	TCGGCGGTTC	6	5	1	16.7
S ₂₁₃₀	GGGATAAGGG	4	2	2	50.0
S ₂₁₃₅	ACGGGAGAGA	5	4	1	20.0
S ₁₅₈	GGAATGCAGA	6	5	1	16.7
S ₁₇₆	TCTCCGCCCT	7	7	0	0

S ₁₇₇	GGTGGTGATG	5	4	1	20.0
S ₁₉₀	ACCGTTCCAG	7	3	4	57.1
S ₁₅₉	ACGGCGTATG	9	1	8	88.9
S ₁₈₀	AAAGTGCGGC	7	4	3	42.9
S ₁₈₄	CACCCCCTTG	10	2	8	80.0
S ₁₆₄	CCGCCTAGTC	10	4	6	60.0
S ₁₆₇	CAGCGACAAG	9	6	3	33.3
S ₁₇₂	AGAGGGCACA	6	6	0	0
S ₁₅₃	CCCCATTCTGG	4	3	1	25.0
S ₁₅₄	TGCGGCTGAG	7	3	4	57.1
S ₁₅₅	ACGCACAACC	9	5	4	44.4
S ₁₇₈	TGCCCAGCCT	7	5	2	28.6
S ₁₈₁	CTACTGCGCT	5	2	3	60.0
S ₁₆₉	TGGAGAGCAG	8	3	5	62.5
S ₁₈₆	GATACCTCGG	8	1	7	87.5
S ₁₇₅	TCATCCGAGG	5	4	1	20.0
S ₁₆₆	AAGGCGGCAG	8	7	1	12.5
S ₁₅₆	GGTGACTGTG	8	3	5	62.5
S ₁₅₁	GAGTCTCAGG	8	4	4	50.0
S ₁₆₈	TTTGCCCGGT	2	2	0	0
S ₁₆₂	GGAGGAGAGG	7	6	1	14.3
S ₁₈₃	CAGAGGTCCC	8	3	5	62.5
S ₁₈₅	TTTGGGGCCT	6	4	2	33.3
S ₁₆₃	CAGAAGCCCA	7	7	0	0
S ₁₆₀	AACGGTGACC	8	6	2	25.0
S ₁₈₇	TCCGATGCTG	9	3	6	66.7
S ₁₇₃	CTGGGGCTGA	8	8	0	0
S ₁₈₉	TCCTGGTCCC	9	2	7	77.8
S ₁₇₄	TGACGGCGGT	8	5	3	37.5
S ₁₆₅	TGTTCCACGG	6	3	3	50.0
S ₁₅₇	CTACTGCCGT	8	1	7	87.5
S ₁₆₁	ACCTGGACAC	12	7	5	41.7
S ₁₇₉	AATGCGGGAG	4	1	3	75.0
S ₁₇₀	ACAACGCGAG	6	2	4	66.7
S ₁₅₂	TTATCGCCCC	7	3	4	57.1
S ₁₇₁	ACATGCCGTG	7	4	3	42.9
S ₁₈₂	CCTCTGACTG	8	1	7	87.5
S ₁₁₂₆	GGGAACCCGT	9	2	7	77.8
S ₁₁₁₁	AGATGCGCGG	10	3	7	70.0
S ₁₁₀₅	GGGCTATGCC	9	4	5	55.6
S ₁₁₃₈	TGTCCTGCGT	11	3	8	72.7
S ₁₁₄₁	AAGACGACGG	8	5	3	37.5
S ₁₁₀₈	ACCACGACTG	7	3	4	57.1
S ₁₁₀₂	ACTTGACGGG	11	5	6	54.5

S ₁₁₁₃	CACGGCACAA	9	4	5	55.6
S ₁₁₃₀	CTGTGTGCTC	7	6	1	14.3
S ₁₁₀₆	CTCGGGATGT	6	3	3	50.0
S ₁₁₀₄	GAGGGACCTC	8	7	1	12.5
S ₁₁₂₁	ACTCCACGTC	6	6	0	0
S ₁₁₂₃	AGCCAGGCTG	11	11	0	0
S ₁₁₂₀	ACCAACCAGG	8	3	5	62.5
S ₁₁₂₉	GGGGGAGATG	8	8	0	0
S ₁₁₃₆	GTGTTCGAGTC	7	6	1	14.3
S ₁₁₀₇	AACCGCGGCA	5	3	2	40.0
S ₁₁₁₀	CAGACCGACC	8	3	5	62.5
S ₁₁₁₅	GATGCGATGG	12	4	8	66.7
S ₁₁₃₇	TCAGCACAGG	6	3	3	50.0
S ₁₁₃₅	TGATGCCGCT	9	4	5	55.6
S ₁₁₁₄	TGGTTGCGGA	9	7	2	22.2
S ₁₁₀₁	TCACGTACGG	9	4	5	55.6
S ₁₁₂₇	TCGCTGCGGA	9	2	7	77.8
S ₁₁₃₄	AGCCGGGTAA	8	4	4	50.0
S ₁₁₁₇	GCTAACGTCC	8	3	5	62.5
S ₁₁₁₈	ACGGGACTCT	5	5	0	0
S ₁₁₃₁	GTCCATGCAG	7	4	3	42.9
S ₁₁₂₄	GGCGTAAGTC	11	11	0	0
S ₁₁₂₂	CACCGCAGTT	8	8	0	0
S ₁₁₀₉	TGCCGGTTCA	7	5	2	28.6
S ₁₁₂₈	AAGGCTGCTG	4	3	1	25.0
S ₁₁₁₂	TCTCACCGTC	7	4	3	42.9
S ₁₁₀₃	CTTCCCTGTG	4	3	1	25.0
S ₁₁₁₉	CCAGGTCTTC	6	3	3	50.0
S ₁₁₁₆	TGGCGGTTTG	8	3	5	62.5
S ₁₁₃₂	AACGGCGGTC	7	5	2	28.6
S ₁₁₂₅	GGGTGCAGTT	8	8	0	0
S ₁₁₃₉	ACCACGCCTT	6	5	1	16.7
S ₁₁₄₀	GAGTCCTCAC	11	7	4	36.4
S ₁₁₃₃	CTTCCAGGAC	7	4	3	42.9
合计 99 个		766	419	347	45.3

注：*多态性条带所占的比例

此 99 个引物间的检测效率相差很大，有的引物在 14 个品种间扩增的带全为多态带；有的显示出某些品种的特性，为某些品种的特征带；有的在品种间扩增出完全相同的谱带。引物扩增多数集中在 0.2~1.5kb。

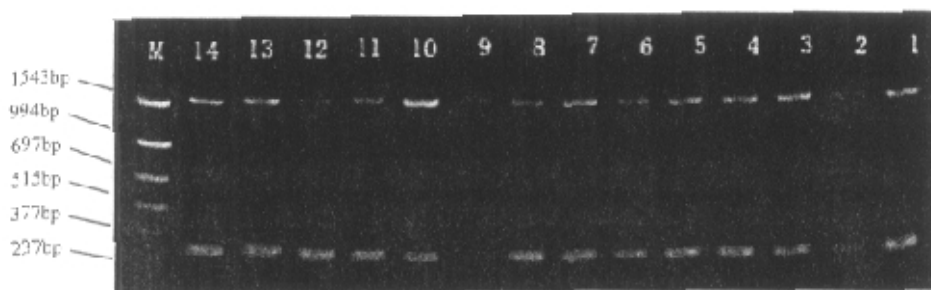


图 14 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₆₈）扩增的单态性图谱

Figure 14. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₆₈

1.阿联红麻 2.勐海紫茶 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers



图 15 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₁₂）扩增的多态性图谱

Figure 15. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₁₂

1.阿联红麻 2.勐海紫茶 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

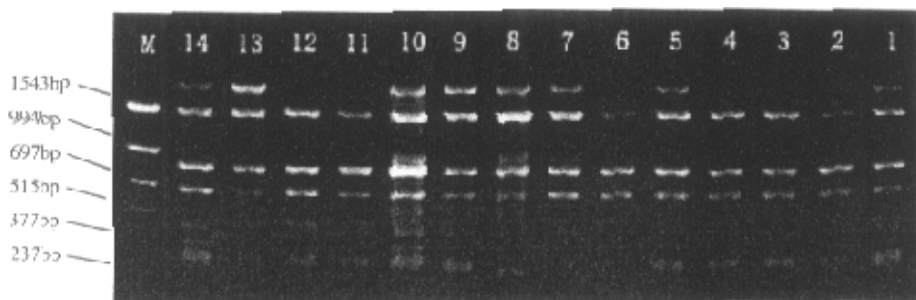


图 16 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₁₃₆）扩增的多态性图谱

Figure 16. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₁₃₆

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茶 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers



图 17 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₆₇）扩增的多态性图谱

Figure 17. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₆₇

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茶 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

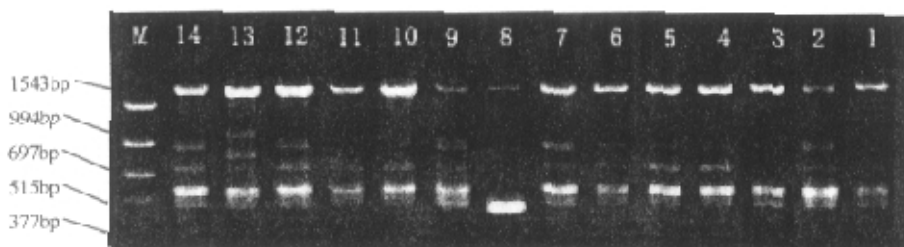


图 18 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₈₂）扩增的多态性图谱

Figure 18. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₈₂

1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers



图 19 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₉₀）扩增的多态性图谱

Figure 19. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₉₀

1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

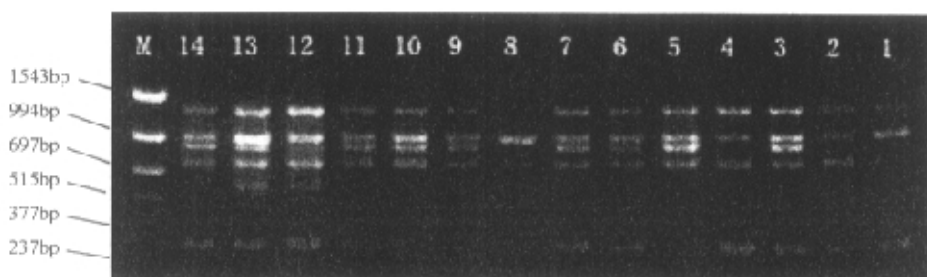


图 20 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₆₅）扩增的多态性图谱

Figure 20. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₆₅

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

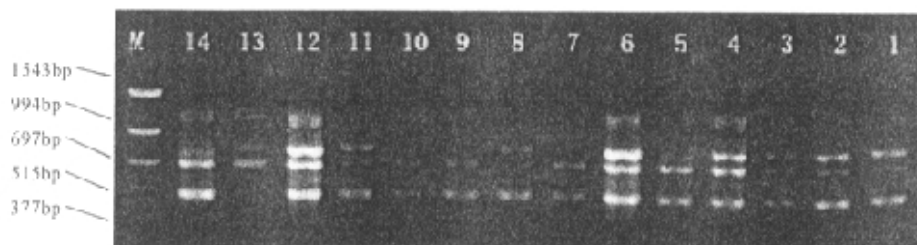


图 21 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₈₅）扩增的多态性图谱

Figure 21. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₈₅

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

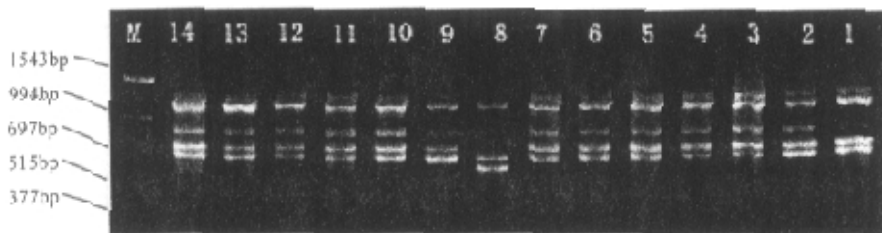


图 22 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₅₆）扩增的多态性图谱

Figure 22. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₅₆

1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

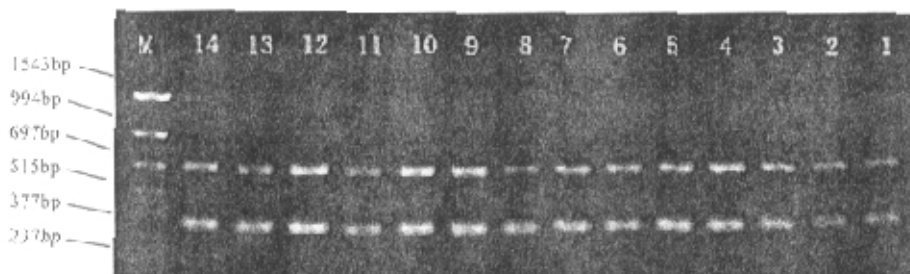


图 23 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₃₉）扩增的多态性图谱

Figure 23. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₃₉

1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

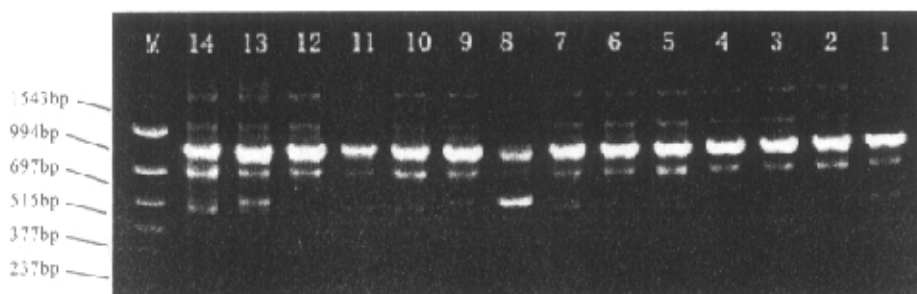


图 24 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₃₆₃）扩增的多态性图谱

Figure 24. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars with optimized reaction system and primer S₃₆₃

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

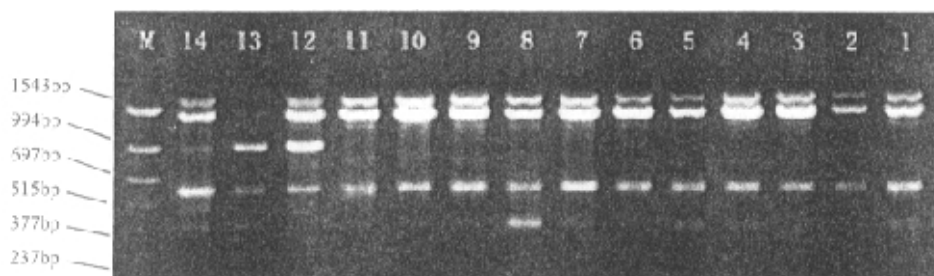


图 25 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₈₁）扩增的多态性图谱

Figure 25. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars with optimized reaction system and primer S₁₈₁

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

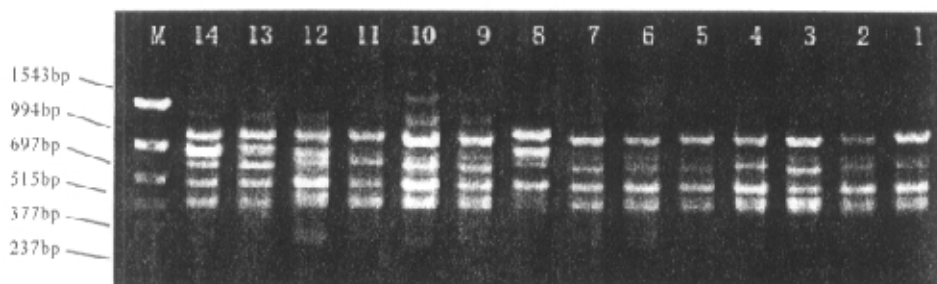


图 26 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₉₁）扩增的多态性图谱

Figure 26. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₉₁

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茶 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.占巴 8 号 M: PCR Markers



图 27 红麻 14 个品种在优化的 RAPD 反应条件下（引物 S₁₁₀₅）扩增的多态性图谱

Figure 27. The RAPD profile of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
with optimized reaction system and primer S₁₁₀₅

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茶 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.占巴 8 号 M: PCR Markers

表 9 任意两个品种间的遗传相似度（表上部），RAPD 图谱中共有的片段数和扩增片段总数（表下部）
Table 9. Genetical similarity distance between any two individuals (above diagonal), the numbers of the shared fragments and total numbers of fragments amplified in RAPD patterns (below diagonal)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1		0.052	0.076	0.068	0.072	0.057	0.064	0.204	0.087	0.091	0.087	0.082	0.126	0.086
2 486/1025*			0.067	0.057	0.080	0.078	0.078	0.201	0.090	0.088	0.092	0.091	0.113	0.096
3 477/1032	482/1033			0.052	0.062	0.064	0.061	0.183	0.079	0.071	0.076	0.097	0.125	0.087
4 482/1034	488/1035	494/1042		0.065	0.061	0.067	0.182	0.090	0.080	0.090	0.085	0.127	0.089	
5 479/1032	475/1033	488/1040	487/1042		0.063	0.046	0.200	0.079	0.069	0.090	0.106	0.127	0.070	
46 6 486/1031	476/1032	486/1039	489/1041	487/1039		0.053	0.188	0.078	0.074	0.081	0.088	0.122	0.079	
7 486/1038	479/1039	491/1046	489/1048	499/1046	495/1045		0.199	0.071	0.068	0.070	0.087	0.109	0.073	
8 398/1000	400/1001	412/1008	413/1010	403/1008	409/1007	406/1014		0.193	0.202	0.198	0.212	0.220	0.208	
9 477/1045	476/1046	485/1053	480/1055	485/1053	485/1052	492/1059	412/1021		0.069	0.090	0.108	0.136	0.087	
10 467/1027	469/1028	481/1035	477/1037	482/1035	479/1034	485/1041	400/1003	488/1048		0.072	0.098	0.131	0.079	
11 462/1012	460/1013	471/1020	465/1022	464/1020	468/1019	477/1026	396/988	470/1033	471/1015		0.103	0.127	0.095	
12 475/1035	471/1036	471/1043	478/1045	466/1043	475/1042	479/1049	396/1011	471/1056	468/1038	459/1023		0.114	0.086	
13 444/1016	451/1017	448/1024	448/1026	447/1024	449/1023	459/1030	387/992	448/1037	443/1019	438/1004	455/1027		0.106	
14 474/1037	469/1038	477/1045	477/1047	486/1045	481/1044	487/1051	401/1013	483/1058	479/1040	464/1025	479/1048	460/1029		

注：*分子为两个样本共有的 DNA 片段数，分母为两个样本 DNA 片段总数

3.2 基于 RAPD 的红麻品种间亲缘关系的聚类分析

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和遗传差异（表9）。应用SAS软件采用系统聚类法中的Average Linkage Cluster Analysis对14个红麻基因型材料两两间的遗传差异GD进行聚类分析得到树系图。

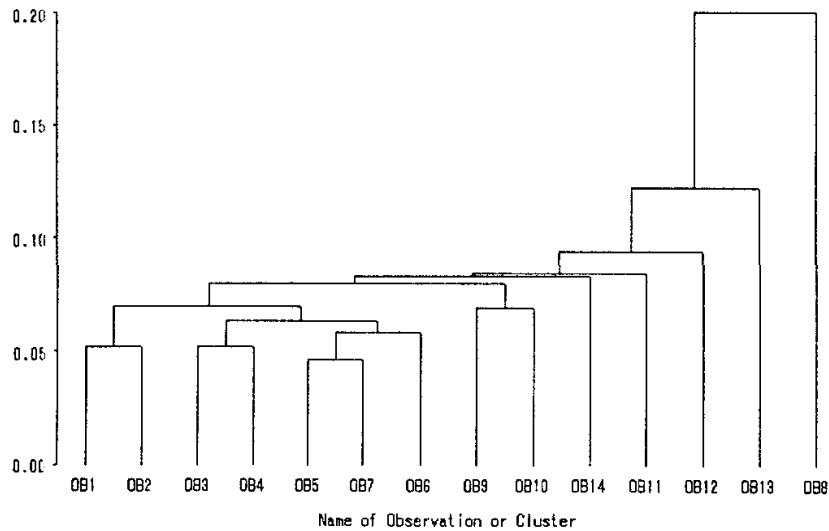


图 28 红麻 14 个品种遗传差异聚类图

Figure 28. The dendrogram of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars using Average Linkage Cluster Analysis of genetic distance

从图 28 可以看出，除了 MX 247、UG 93 这两个品种外，其它红麻品种之间的遗传差异不是很大，在 0.045~0.09 之间，这表明红麻各个品种间的亲缘关系十分密切。为了便于分析，在遗传差异为 0.055 处作结合线 L，在结合线 L 处，14 个品种被划分为 I~VII 7 个组。其中 I 组包含有 1~7，II 组包含有 9、10，III 组、IV 组、V 组、VI 组、VII 组各由 14、11、12、13、8 单独成组（表 10）。

表 10 红麻 14 个品种的 99 个引物 766 个 RAPD 片段的聚类结果
Table 10. The clustering results of 14 *Hibiscus cannabinus* L. cultivars
based on 766 RAPD markers amplified with 99 primers

类群	材料数目	材料名称
I	7	阿联、勐海紫茎、7804、塔什干、泰红 763、青皮 3 号、元江红麻
II	2	NA 414、红引 135
III	1	古巴 8 号
IV	1	福红 991
V	1	早熟红麻
VI	1	UG 93
VII	1	MX 247

第一组包括 7 个品种，其中泰红 763 和青皮 3 号在 14 个供试品种中的遗传差异最小为 0.045，说明两个品种亲缘关系最近，可能来源于相同的亲本，两个品种在表型上具有一致性，都表现为迟熟、裂叶、拉力较强、株高、茎粗、皮厚近似、出麻率皆为 6.2、中抗炭疽病、每亩原麻产量高等特点。勐海紫茎和元江红麻虽然原产地都是在云南，但两者的遗传差异较大，元江红麻是早熟特性，而勐海紫茎是迟熟特性。此外，阿联和勐海紫茎及 7804 和塔什干之间表型也有相似之处。所以，将这 7 个品种聚为一大类群。

第二组有 2 个品种，尽管 NA 414 是野生种，但本试验结果表明它同红引 135 的遗传差异为 0.07，亲缘关系比较近。这两个品种在表型上也表现出一定的一致性，如生育类型皆为迟熟、裂叶、茎色和叶柄色都为淡红色、拉力较强、株高、茎粗、皮厚近似、出麻率皆为 5.7、中抗或强抗炭疽病、每亩原麻产量较高等特点。

第三组由古巴 8 号单独成一组，原产古巴，表现为迟熟、全叶、茎色和叶柄色都为微红色、拉力较强、出麻率为 6.0、强抗炭疽病、每亩原麻产量高等特点。

第四组由福红 991 单独成一组，是福建培育出的杂交种，表现为中熟、裂叶、茎绿色、叶柄色为微红、拉力较强、出麻率为 5.8、高抗炭疽病、每亩原麻产量非常高等特点。

第五组由早熟红麻单独成一组，原产辽宁，表现为早熟、裂叶、茎色和叶柄色都为绿色、拉力较强、出麻率为 5.3、弱抗炭疽病、每亩原麻产量较低等特点。

第六组由 UG 93 单独成一组，UG 93 是野生材料，原产乌干达，表现为迟熟、全叶、茎色和叶柄色都为淡红色、拉力较强、出麻率为 6.19、高抗炭疽病、

每亩原麻产量较低等特点。

第七组由 MX 247 单独成一组。MX 247 也是野生材料，原产墨西哥，它与其他各品种的遗传差异都较大，表现为中熟、裂叶、茎淡红色、叶柄绿色、拉力较强、出麻率为 5.59、高抗炭疽病、每亩原麻产量非常低等特点。

3.3 RAPD 多态性区分红麻品种

所用的引物数目影响着品种鉴定结果^[109]。由于不同引物 G+C 的含量与被测基因组 G+C 的含量间存在差异，当引物中的 G+C 的含量接近于基因组 G+C 的含量时，扩增的 DNA 片段最多，反之则较少^[110]。本研究选择引物时，着重选择 G+C 含量高的。

利用 14 个随机引物扩增出的 14 条多态性条带，可将 14 个品种区分开来(表 11)。首先，可根据 8、13、9、4、14 五个品种分别在引物 S₁₅₃、S₁₈₀、S₁₈₄、S₂、S₁₈₆ 扩增时产生 S₁₅₃-320bp、S₁₈₀-1543bp、S₁₈₄-1100bp、S₂-1100bp、S₁₈₆-980bp 特征性条带将它们鉴定出来。再根据 3、2、11、12 四个品种分别在引物 S₁₁₁₇、S₁₁₀₁、S₂₁₃₀、S₁₂₄ 扩增时不产生 S₁₁₁₇-1500bp、S₁₁₀₁-2000bp、S₂₁₃₀-1650bp、S₁₂₄-800bp 条带，而相应其他品种皆有，可将它们识别出来。在引物 S₁₁₃₈ 的扩增谱带中，800bp 处品种 1 和 8 无此条带从而可把品种 1 区分出来。S₁₁₁₆-280bp (品种 2、3、4、5、9 有) 将品种 5 鉴别出来；S₁₅₂-1250bp (品种 2、7、11 有) 将品种 7 区分出来；S₁₁₄₀-1900bp (品种 5、7、9、10、14 有) 将品种 10 区分出来；最后，S₁₇₈-1150bp (品种 4、6、12 有) 将品种 6 鉴定出来。

对于红麻这种南种北植的经济作物，品种的鉴别尤为重要。利用某些品种特征性的 RAPD 标记，就可以鉴定种子的真伪和纯度。品种间的差异有时用同工酶或其他生化标记很难鉴别，几乎没有差异，而用 RAPD 技术则可较方便地鉴别出来。RAPD 技术用于品种鉴别具有多态性高、快速、简便的特点，而且成本不高，只需少量试材就可以进行，应用前景广阔。

表 11 红麻品种 RAPD 多态性标记
Table 11. The polymorphous bands of RAPD in the sampled *Hibiscus cannabinus* L.

RAPD 多态性 片 段	红 麻 品 种													
	(1) 阿 联	(2) 勐 海 紫 茎	(3) 7804	(4) 塔 什 干	(5) 泰 红 763	(6) 元 江 红 麻	(7) 青 皮 3 号	(8) M X 247	(9) N A 414	(10) 红 引 135	(11) 福 红 991	(12) 早 熟 红 麻	(13) U G 93	(14) 古 巴 8 号
S ₁₅₃ -320bp	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
S ₁₈₀ -1543bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
S ₁₈₄ -1100bp	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
S ₂ -1100bp	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S ₁₈₆ -980bp	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
S ₁₁₁₇ -1500bp	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S ₁₁₀₁ -2000bp	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S ₂₁₃₀ -1650bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
S ₁₂₄ -800bp	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
S ₁₁₃₈ -800bp	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
S ₁₁₁₆ -280bp	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
S ₁₅₂ -1250bp	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
S ₁₁₄₀ -1900bp	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1
S ₁₇₈ -1150bp	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0

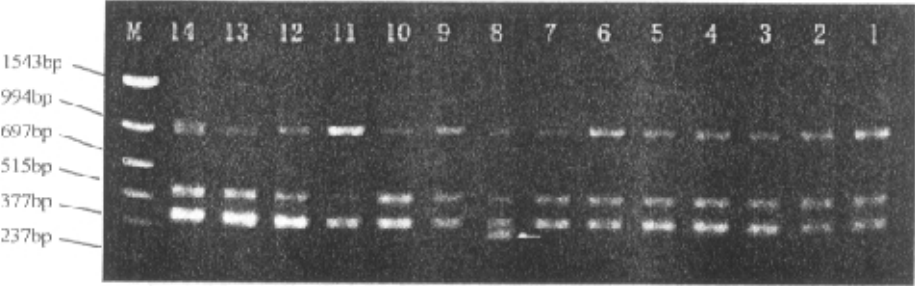


图 29 MX 247 在引物 S₁₅₃ 条件下扩增的特征性条带（尖头所指）
Figure 29. The specific band of RAPD profile from MX 247 with primer S₁₅₃ (the arrow indicates)
1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

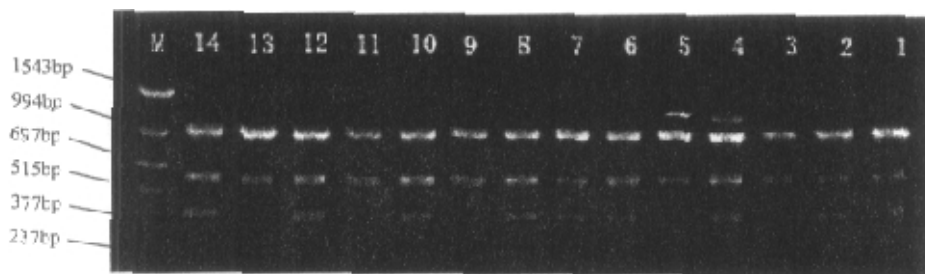


图 30 塔什干在引物 S_2 条件下扩增的特征性条带（尖头所指）

Figure 30. The specific band of RAPD profile from Tashengan
with primer S_2 (the arrow indicates)

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers



图 31 古巴 8 号在引物 S_{186} 条件下扩增的特征性条带（尖头所指）

Figure 31. The specific band of RAPD profile from Gubabahao
with primer S_{186} (the arrow indicates)

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

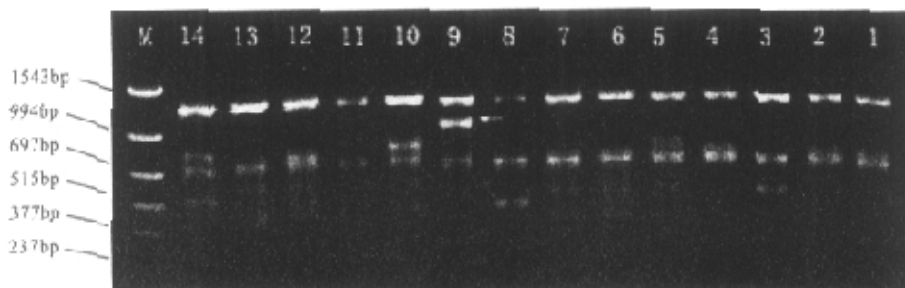


图 32 NA 414 在引物 S₁₈₄ 条件下扩增的特征性条带（尖头所指）

Figure 32. The specific band of RAPD profile from NA 414 with primer S₁₈₄ (the arrow indicates)

1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers



图 33 UG 93 在引物 S₁₈₀ 条件下扩增的特征性条带（尖头所指）

Figure 33. The specific band of RAPD profile from UG 93 with primer S₁₈₀ (the arrow indicates)

1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

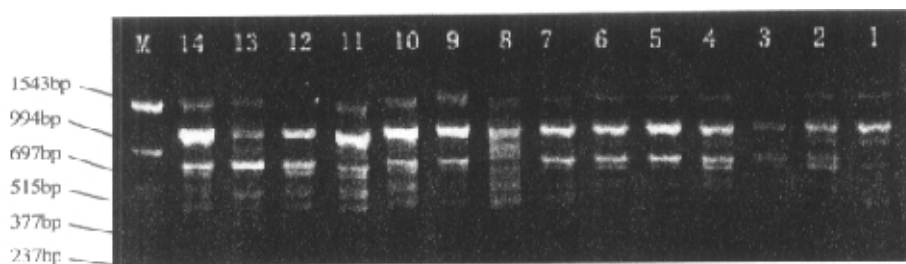


图 34 引物 S₁₁₁₇ 条件下扩增的 RAPD 图谱（可将 7804 区分出来）

Figure 34. The RAPD profile with primer S₁₁₁₇ (distinction of 7804)

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

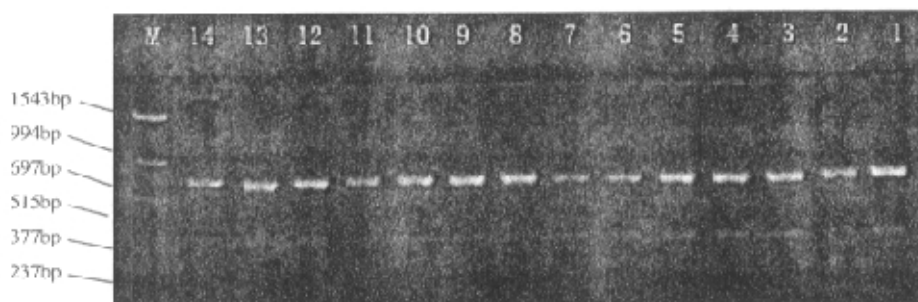


图 35 引物 S₁₁₀₁ 条件下扩增的 RAPD 图谱（可将勐海紫茎区分出来）

Figure 35. The RAPD profile with primer S₁₁₀₁ (distinction of Menghaizijing)

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

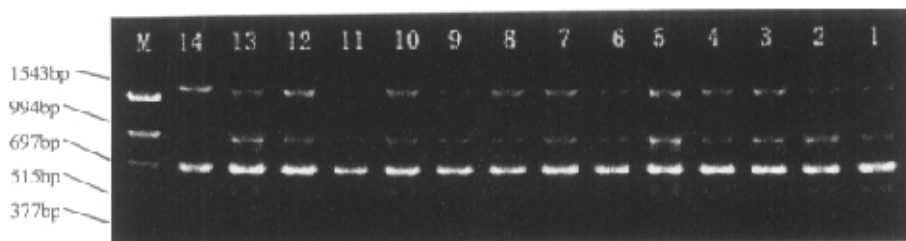


图 36 引物 S_{2130} 条件下扩增的 RAPD 图谱（可将福红 991 区分出来）

Figure 36. The RAPD profile with primer S_{2130} (distinction of Fuhong 991)

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

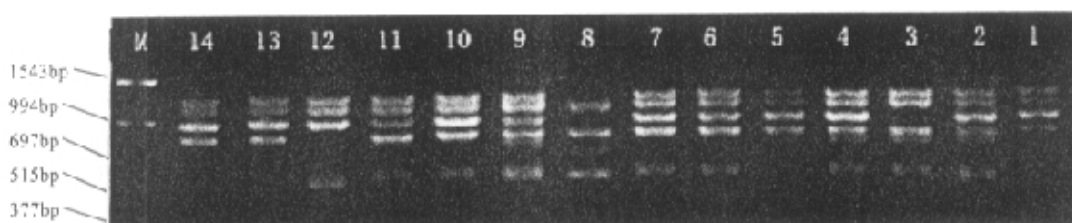


图 37 引物 S_{124} 条件下扩增的 RAPD 图谱（可将早熟红麻区分出来）

Figure 37. The RAPD profile with primer S_{124} (distinction of Zaoshuhongma)

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

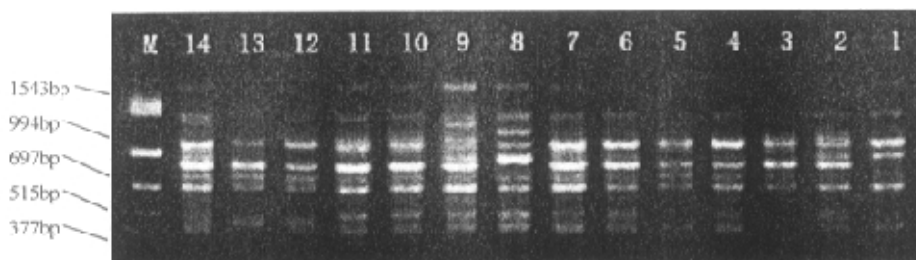


图 38 引物 S_{1138} 条件下扩增的 RAPD 图谱（可将阿联红麻区分出来）

Figure 38. The RAPD profile with primer S_{1138} (distinction of Alianhongma)

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

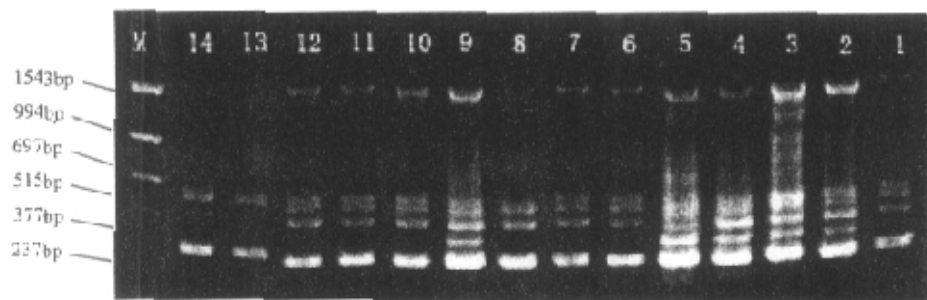


图 39 引物 S₁₁₁₆ 条件下扩增的 RAPD 图谱（可将泰红 763 区分出来）

Figure 39. The RAPD profile with primer S₁₁₁₆ (distinction of Taihong 763)

1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers



图 40 引物 S₁₅₂ 条件下扩增的 RAPD 图谱（可将青皮 3 号区分出来）

Figure 40. The RAPD profile with primer S₁₅₂ (distinction of Qingpisanhao)

1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

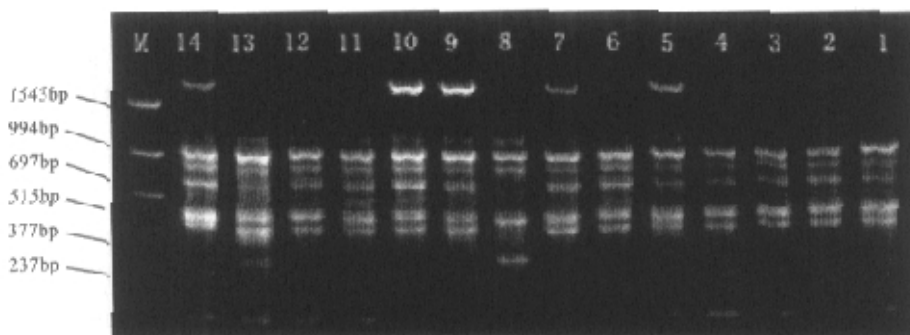


图 41 引物 S_{1140} 条件下扩增的 RAPD 图谱 (可将红引 135 区分出来)

Figure 41. The RAPD profile with primer S_{1140} (distinction of Hongyin 135)

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

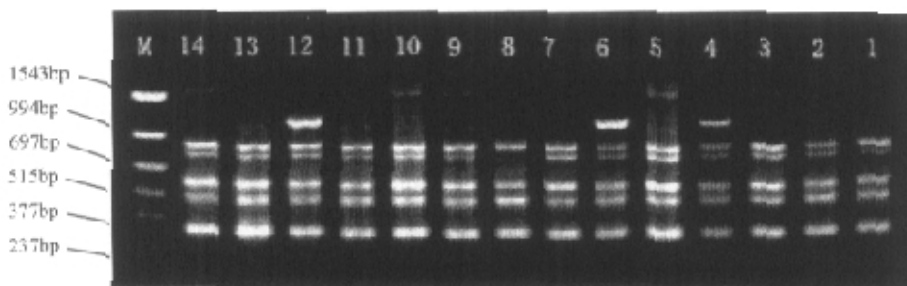


图 42 引物 S_{178} 条件下扩增的 RAPD 图谱 (可将元江红麻区分出来)

Figure 42. The RAPD profile with primer S_{178} (distinction of Yuanjianghongma)

- 1.阿联红麻 2.勐海紫茎 3.7804 4.塔什干 5.泰红 763 6.元江红麻 7.青皮 3 号
8.MX 247 9.NA 414 10.红引 135 11.福红 991 12.早熟红麻 13.UG 93
14.古巴 8 号 M: PCR Markers

讨 论

一、红麻的细胞学标记研究

1. 核型分析

染色体核型 (Karyotype), 也称为染色体组型。它表示一个个体或一个物种细胞中核内的染色体组成。核型分析(Karyotype Analysis)或组型分析, 主要是研究体细胞染色体的形态特点。因此, 一般以体细胞有丝分裂中期的染色体形态为分析材料进行研究。但近些年来, 因体细胞有丝分裂前中期或晚前期时的染色体有许多有价值的形态指标, 如染色体较长、随体易清晰可见等, 特别是对有较小且较多染色体的物种来说, 此时个性明显, 也是识别染色体形态的适宜时期。但不论是用有丝分裂中期的染色体, 还是前中期或晚前期的染色体, 染色体都必须分散、完整, 然后用显微测量或显微摄影方法, 在放大照片上对单个染色体逐一进行测量, 根据染色体的长度及其他形态特征, 依次排列、编号, 通过对放大后的染色体照片的剪贴、配对和染色体相对长度、臂比的测量及着丝粒位置的确定等, 可以阐明生物染色体组的构成, 鉴别出各条染色体的形态特点, 为种质资源鉴定提供细胞学证据。

目前对红麻的染色体数目都有较为一致的结果, 但在染色体组型方面还或多或少存在争议, 如染色体的排列次序, 随体染色体的数目以及大小等。如本试验的结果就表明, 红麻有的品种无随体, 有的品种有 1 对随体, 有的品种有 2 对随体, 而这与以前报道的红麻只有一对随体^[75]和有两对随体^[77]皆不同, 且本试验所得到的红麻核型公式也与以往报道的不尽相同。笔者分析可能是因为其中一对随体较小易于染色体紧密粘连所致。尤其制片过程中常见情况是随体不甚明显或随体离携带它的染色体太远。所以, 本试验其他几种未看到 SAT 染色体, 是由于技术上的原因致使随体未能显现, 还是这些植物没有随体, 有待进一步研究观察。但是从核型照片可见有的随体染色深, 有的随体不染色, 显示了植物染色体上随体的某些结构的特定差异。

为此, 对多随体物种的研究, 单靠组型分析确定随体数目有时很困难, 还需要结合染色体分带才能正确反映出随体数目。本试验由于时间的限制, 未继续对红麻染色体进行带型分析, 否则可通过带纹对红麻的染色体进行更准确的分析, 从而制订出更公认的标准核型模式图。

2. 核型分析与物种亲缘关系的探讨

自上世纪七十年代染色体分带技术应用到植物上以来,各国学者采用分带法并结合染色体核型分析,研究属、种及亚种间的染色体结构差异,探讨物种的亲缘关系,以及核型与表型的联系等^[111~117],取得了一定进展。但对于种内品种间的细胞学研究则开展的较少。

红麻是一种重要的韧皮纤维作物,在世界分布很广。由于不同生态条件的长期影响,形成了很多不同类型品种。所以,探讨红麻不同基因型品种间的细胞学异同及其与外部形态特征的关系,了解它们之间的亲缘关系,为育种和引种提供科学的染色体证据是有实际意义的。

依据 Stebbins^[96]的核型分类法,在植物界核型进化的基本趋势,是由对称向不对称发展的,系统演化上处于比较古老或原始的植物,大多具有较对称的核型,而不对称的核型则常见于衍生的或进化较高级的植物中。但是,在具体应用这一学说时,应取慎重的态度。因为生物的进化策略是多样化的。现已知某些科、属内,核型的进化表现为由不对称到对称,或者两个相反的过程均存在^[118]。本实验研究结果就表明野生型品种的核型并不是较对称的,例如, MX 247 的核型类别为 1B 型; NA 414 的核型类别为 2B 型; UG 93 的核型类别为 1B 型; 而栽培型 7804、元江红麻、福红 991 的核型类别却皆为非常对称的 1A 型。应用红麻细胞学标记技术,从核型分类来分析红麻不同品种间染色体结构上的差异,确定其亲缘关系远近,为红麻遗传育种亲本选配等方面提供一定的参考依据。

二、红麻的 RAPD 分子标记研究

1. 关于红麻种子基因组 DNA 提纯

近年来,有关基因组 DNA 的提取方法已有许多文献报道^[119~121]。大多数学者以新鲜叶片或发芽幼苗作为提取 DNA 的组织,但是在进行品种鉴定和纯度分析时,用新鲜叶片或幼苗提取 DNA,比较费时麻烦。为了缩短时间,减少工作量,用种子提取 DNA 较为合适。McDonald 等^[122]从玉米、棉花、大豆、小麦和三叶草的干种子中提取 DNA,利用 RAPD 技术成功扩增了 DNA 片段; Chunwongse^[123]用水稻半粒种子(胚乳)提取的 DNA 进行 PCR 扩增; Yoshihashi 等^[124]用一个磨碎的谷粒作为样品,对水稻品种进行 RAPD 分析。Edwards 等^[125]报道了一种简单快速的抽提方法,以干种子胚乳和少量叶段为材料,获得了可成

功进行 PCR 反应的 DNA 样品, 所得样品可在 4℃ 贮存一年以上。国内学者从种子中提取出基因组 DNA 用于 RAPD 分析也有许多成功的报道^[126~130]。这些都表明用种子提取 DNA, 进行 RAPD 分析是可行的。

红麻 DNA 的提取与纯化最早是李世民等^[131]用简便易行的相分配法, 结合酶解, 分子筛凝胶层析等方法, 得到纯度较高的红麻胚芽 DNA。曹德菊等在多种基因组提取方法的基础上, 针对红麻基因组提取中的难点即富含酚类、萜类、单宁、果胶等物质, 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, 获得了高纯度基因组 DNA。但这种方法似乎较适用于叶片, 而对于红麻种子 DNA 的提取不太适宜。红麻中富含酚类等次生代谢物质, 提取红麻中的 DNA 比提取一般农作物中的 DNA 更难。试验表明, 所用供试材料对 DNA 提取效率和质量影响较大, 选择适宜的材料十分重要。由于红麻叶片中含有大量的单宁、多糖类及色素物质, 这些物质易与 DNA 结合成复合物, 形成粘稠的胶状物, 既难溶解, 又易抑制 Taq 酶活性, 从而影响 PCR, 所以探索一种快速、简便、实用性, 能够用于 RAPD 分析的红麻种子 DNA 提取新方法非常必要。

植物的种子中富含蛋白质、脂肪和糖类等贮藏物质, 有些还含有丰富的酚类物质及酚氧化酶, 在提取种子 DNA 时很难将这些干扰物质完全去除。所以, 在使用本试验建立的利用红麻种子提取基因组 DNA 方法时应注意以下几点: 实验室应该尽量用液氮迅速研磨种子, 然后加入预热的提取液, 以便及时钝化 DNase 酶活性, 这点非常重要, 否则材料容易变褐; 提取液中加入适量 β -巯基乙醇, 因其具有抗氧化作用, 有效地控制了酚类化合物褐变, 所得的 DNA 为白色絮状物, 易溶解; 在提取 DNA 的过程中, 所有的操作均需动作轻柔, 避免剧烈振动, 以免 DNA 断裂降解; 采用氯仿-异戊醇代替酚抽提, 由于氯仿-异戊醇易溶于异丙醇, 并易于挥发, 由此克服了由于酚等的残留带来的交叉污染。总之, 直接利用红麻种子提取 DNA 具有简捷、省时、检测效率高、费用低等特点。该方法可以为作物直接利用种子提取 DNA 进行 RAPD 分析及种子纯度检验提供参考。

2. 关于 RAPD 反应参数的优化

RAPD 分析虽然具有快速、简便、灵敏度高等优点, 但由于试验目的不同,

扩增的适宜条件差异很大,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。

RAPD-PCR 同常规的特异 PCR 相比有所不同,后者在加大模板浓度时,只会获得更大的扩增量,而不会扩增更多的位点,产生非特异带。RAPD 反应容易受条件变化的影响,所以必须强调结果的可重复性,保证在选定的模板浓度范围内,不发生多带或少带的现象。此外,这种变化在不同的物种中有所不同。在本实验中,模板浓度的适宜范围较宽,以 15ng~45ng 反应为佳。

适宜的 dNTPs 浓度可根据扩增片段的长度和碱基组成通过实验确定。dNTPs 浓度过低,影响扩增强度,而过高的 dNTPs 浓度也不利于 DNA 的扩增,这可能由于高浓度的 dNTPs 抑制了 Taq 酶活性所致。在 PCR 热循环过程中,50 次循环以后大约质量分数 50%应为 dNTPs,反应中每秒 dNTPs 的终浓度为 20~200 μ mol/L,此时产物量、特异性、忠实性较好^[132]。

Taq 酶在 PCR 中的用量受到反应体积、酶的活性、酶的耐热性等因素的制约。在条件合适时,每 100 μ l 体系中一般使用 1~2.5U Taq 酶^[133,134]。由于不同产地、不同生产批次的 Taq 酶在活性上经常有所不同,因此,有必要对每一批 Taq 酶进行最佳使用浓度的试验,从而避免由于酶活性的变化造成人为的假象。本实验使用 Sangon 生物工程的同一批次 Taq 酶,浓度保持在 0.75U/25 μ l。

在 RAPD 分析中,引物的种类和浓度对扩增有很大影响,引物与模板的比例也关系到实验的重复性。本实验通过梯度分析的结果表明合适的引物浓度为 0.6 μ mol/L。

MgCl₂ 浓度对引物的退火温度、模板及 PCR 产物的解链温度、Taq 酶活性、产物的特异性等都有影响,尤其是 Taq 酶发挥其聚合酶活性所必须的一个重要因素。对于不同的 Taq 酶所需的 MgCl₂ 浓度一般不同。本实验分析结果表明,2.0mmol/L 的 MgCl₂ 浓度是比较适宜的。

一般的变性温度范围在 92℃~95℃。在 RAPD 中,通常使用 94℃为变性温度。由于高温变性时间过久会造成 Taq 酶活力降低,所以本实验比较了 94℃变性 30sec 和 1min 的结果,表明扩增效果基本相同。为了节省时间,实验采用 94℃变性 30sec。

在 RAPD 分析中, 扩增反应的引物为 10 个碱基对, G+C 含量在 60%~70%。退火温度因与它们有关, 所以比常规 PCR 的退火温度低, 一般在 36℃~39℃之间。本实验设置了相应变化的退火温度和退火时间, 认为 38℃退火 45sec 最为合适。

RAPD 研究中的延伸温度采用 72℃。延伸时间影响扩增片段长度, 本实验比较了 1min30sec 和 2min 的延伸结果, 可以看出所扩增的带型差异不大, 从节省时间的角度出发, 决定采用延伸时间为 1min30sec。

一般认为在 PCR 反应中, 只要 Taq 酶有活力, 产物就会以 2^n 积累。实际上, 当产物和反应物达到一定平衡后, 产物基本上不再增加, 所以选择合适的循环数不仅可扩增出较好的结果, 也可以节省时间。本实验通过比较认为 40 个循环数较为理想。

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, 如改变研究的物种、更换药品及仪器、反应参数及条件的变化等。所以为了保证实验的准确性和可重复性, 除了必要的重复实验外, 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。

3. 关于红麻品种遗传差异的 RAPD 分析

3.1 不同红麻品种遗传差异的检测

本试验中选择了 11 个红麻栽培品种和 3 个野生品种, 所取的红麻栽培品种虽然在数量上不多, 但从来源上来看, 它们很多是引自或起源于我国红麻栽培区, 在遗传上具有了一定的代表性。而红麻野生品种的分析对栽培品种的分析起到一定参照价值。已有的研究表明, 栽培品种与野生品种有复杂的遗传背景, 品种之间差异较大。但另一方面, RAPD 标记的聚类分析结果表明, 试验所研究的红麻品种间的相似系数大多数在 78%以上, 最高达 95.4%, 从这些数据可以看出, 在 DNA 水平上, 红麻的遗传多样性并不象形态学所体现的那样丰富。理论上, 要提高一个物种群体的遗传多样性程度, 不外乎通过两个途径, 一是随着物种进化发生新的基因突变; 二是通过有性过程同其它物种进行杂交获得新基因, 而后者在提高一个物种遗传多样性方面起到的作用更大。

不同红麻品种进行 RAPD 分析, 必须使用一定数量的引物, 目前绝大多数研究至少用 13 个引物^[135]。为使分析结果更加客观, 本试验共使用了 150 个随机

引物，从中筛选清晰的、重复性好的 99 个引物，共扩增出 347 条多态带，反映了不同品种间存在着遗传差异。在遗传差异为 0.055 处，14 个品种聚成 7 类，其中 14 个引物产生的 14 条 RAPD 特异带，可以作为一组 DNA 指纹将这 14 个品种从分子水平上区分开来。所以，99 个引物检测出的信息量是相当丰富的。

3.2 RAPD 在红麻品种亲缘关系分析及遗传多样性中应用的可行性

传统的亲缘关系研究大多采用系谱、地理分布，形态及生化分析来进行，这些分析虽然对植物亲缘关系的研究起了很大的作用，但也有一定的局限性，由于 RAPD 技术的日趋成熟和完善，运用它进行物种亲缘关系及遗传进化分析的学者越来越多。利用 RAPD 技术进行遗传多样性和物种起源演化的研究，方法简便快速。通常 RAPD 反应中产生的一条带代表基因组的一个位点，可作为一个标记。本研究中 99 个引物共产生 766 条扩增带。这就意味着对红麻基因组中的 766 个位点进行了检测，这种效率是同工酶、RFLP 等其它方法所无法比拟的，尤其适用于象红麻这样遗传上较为保守，且对其基因组的基础研究又较为薄弱的物种。本试验表明红麻 14 个品种有 45.3% 表现出丰富的多态性，这一丰富的遗传多样性资源，可为红麻品种选育和改良提供丰富的育种材料。本研究聚类分析结果与地理分布基本吻合，证实了 RAPD 技术用于种类品种间遗传变异性分析的可行性。

3.3 RAPD 在红麻种质分子鉴定中应用的可行性

以往种子纯度鉴定主要利用传统形态学方法、同工酶电泳、种子蛋白电泳等方法。现在种子蛋白电泳和同工酶电泳已广泛用于种子纯度检测和品种鉴定，但由于蛋白质水平上的差异较小，而且能被检测的种类有限，因此具有一定的局限性，而同工酶电泳常需要几种同工酶同时使用才能获得可靠的结果。选用 RAPD 作为品种和种子纯度检测手段，具有其独特的优越性。首先因为它检测的是基因的碱基组成而不是基因产物，它不受环境条件与发育状况等的影响，具有更高的分辨力和可靠性。其次，随机引物数量大，完全可以区分所有的自交系和杂交种。此外，随着一些性状的分子标记的建立，RAPD 分析还可以辅助进行杂种后代的早代筛选，加速育种进程。总之，该技术的建立为红麻育种及种子检验提供了一种新的可靠的鉴定手段。

3.4 RAPD 标记的稳定性

RAPD 分析程序简单，周期短；所需 DNA 量极少且质量要求不苛刻，设备简单。它使研究者快速高效地获取涉及许多个体或基因型的许多位点的 DNA 序列多态性资料。另外，由于它不受种属特异性和基因组结构限制，一套引物可适于任何物种，包括那些无任何分子生物学研究基础的物种，因而该技术已应用于生物学的各个领域，在许多方面得到了广泛的应用。但也有其不足，一个突出问题就是稳定性差。有人认为 RAPD 重复性不好是由于单链引物随机结合在众多反向重复序列上，因而每次得到的实验结果不可能一致，与假阳性反应较多有关。PCR 反应中的变性、退火、延伸的温度和时间，以及反应过程循环数、热循环反应条件，反应体系中的多种试剂来源、引物浓度、 $MgCl_2$ 浓度、DNA 模板浓度、Taq 酶批次等诸多因素都会对其结果产生影响。所以，在操作过程中严格控制实验条件（包括仪器、试剂型号、试剂来源、反应程序等），保证其一致性，是可以得到可靠重复结果的。就本研究而言，在保证实验优化条件的一致性情况下，实验进行 3 次重复，重复性较好，且试验中以重蒸水作对照，所以结果是可靠的。

三、红麻细胞学标记和 RAPD 分子标记的综合分析

我国收集有丰富的红麻种质资源，利用 RAPD 分子标记技术和核型分析技术相结合可以更好地了解红麻种质资源的特点，为红麻选种、引种、遗传育种、系统地进行种质鉴定，探讨红麻不同基因型材料的亲缘关系和进行分子标记研究，建立红麻种质 DNA 指纹图谱库提供科学依据。

不同红麻品种间虽然同源成分很高，但染色体组总是存在一定的差异，因而用细胞学标记和 RAPD 技术能在染色体水平和 DNA 分子水平上检测出其多态性，从而可用于分析品种间的遗传关系、鉴定品种纯度和区分真假杂交种等。本试验表明不同品种的核型差异、随体大小及形态的差异与 RAPD 分析结果基本是一致的。如 RAPD 分析结果显示阿联和勐海紫茎归类于第一类群的第一组，而这与细胞学分析得出的它们都具有一对较大随体结果一致。又如通过 RAPD 分析表明 NA 414 与红引 135 同属于第二类群，这与细胞学分析得出的它们都具有一对较小随体结果一致，且 NA 414 与红引 135 在生育类型、叶型、茎色、叶柄色等方面相同，说明 RAPD 分析与细胞学研究和品种农艺性状表现大体是一致的，RAPD 分析和细胞学研究结合能更好地反映出品种的内在遗传差异。

植物形态上的差异，如果是遗传差异上的表现，可以通过 RAPD-PCR 技术高效地检测出来。如在引物 S₁₇₅ 扩增时 MX 247 和 UG 93 两品种在 1210bp 处产生特征性条带（图 5），而其他品种无此条带，可利用此条带作为这两品种的特征带将其鉴定出来。MX 247 和 UG 93 有独特的形态特征，即都是小籽粒种子。相信如果试验继续深入研究，或许可以将小籽粒种子的特性与特异的谱带联系起来。又如塔什干、元江红麻和早熟红麻的 DNA 模板在引物 S₁₇₈ 的扩增下于 1150bp 处产生特异性条带（图 42），结合它们的农艺性状，发现它们都是早熟表现，所以设想早熟性状是否可以与此特异性谱带有关系呢？同样，相信随着试验的继续进行是可以得到解释的。由此可见，形态和生理特性的差异在分子水平上也能充分体现出来。品种特有的遗传标记已作为重要的分子性状用于作物的品种鉴定。红麻某个品种特有的遗传标记一旦被检出，即可将这个品种的 RAPD 分子标记转化为另一种新型的分子标记 SCARs（Sequence Characterized Amplified Region）^[136]。SCARs 标记为共显性标记，可以区分纯合子和杂合子，起到对 RAPD 的补充作用。

红麻基因组 DNA 遗传多样性与其植物学性状的多样性是紧密联系的，RAPD 分析不仅证明了传统形态学分类框架的正确性，而且对传统的形态学分类加以补充。由于蛋白质的表达受人工选择和栽培措施等外界环境的影响，其表达程度在不同物种、不同栽培条件下有所不同。因此，根据主要形态性状作出的分类，有时会掩盖品种间的遗传差异。这种差异在 DNA 水平上可能较大，而在农艺性状上的表现却不明显。所以，本试验采用 RAPD 分子标记与细胞学标记方法尽可能地揭示出品种的内在遗传差异，且分子与细胞对照，尽量避免了 PCR 的假阳性。RAPD 分析可以避免人的主观性及外界环境的矫饰作用，揭示更为客观细微的遗传信息。理论上，采用引物越多，揭示的信息量越丰富，分类结果越详尽可靠。本试验采用 99 个引物完全能揭示红麻品种间的遗传差异，至于找到 RAPD 分子标记特征带与核型及品种性状的对应关系，特征带之间的相关性、同源性问题，有待于今后更深入的研究。

结 论

1.本试验采用了稍加改进的 F-BSG 法制片,对根尖细胞染色体进行细胞学标记。核型分析结果表明 14 个品种的核型均为基本对称核型,但在染色体随体大小、数目等方面存在一些明显差异。所以,本试验的红麻细胞学研究可以作为一种细胞学标记用于红麻不同基因型亲缘关系及种质鉴定的分析。

2.为了缩短时间,减少工作量,本试验探索出一种经济、快速、简便、能够用于 RAPD 分析的红麻种子基因组 DNA 提取新方法。针对红麻种子中富含蛋白质、脂肪和糖类等贮藏物质,可能还含有丰富的酚类物质及酚氧化酶等,在提取液中加入适量 β -巯基乙醇,有效地防止氧化褐变,排除杂质的干扰。另外,采用氯仿-异戊醇代替酚抽提,避免了酚难去除带来的交叉污染等,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。

3.对红麻 RAPD 反应参数的设计,通过实验优化建立了合适的 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, 0.75U 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,结果重现性较好,为红麻分子生物学研究提供参考依据。

4.本研究中使用 150 个随机引物,从中筛选出了重复性好、有丰富多态性的 99 个引物,共产生 766 条带,其中多态性带 347 条,占 45.3%,反映不同红麻品种间存在遗传差异。应用 SAS 软件,采用系统聚类法中的 Average Linkage Cluster Analysis 对 GD 进行遗传分类,构建树系图,将 14 个红麻品种聚成七类,从聚类结果中还可以看出,勐海紫茎和元江红麻虽然原产地都是在云南,但两者的遗传差异较大,元江红麻是早熟特性,而勐海紫茎是迟熟特性; NA 414 尽管是野生种,但它同红引 135 的遗传差异为 0.07,亲缘关系比较近,它们在表型上也表现出一定的一致性。说明用 RAPD 方法对红麻进行分类和亲缘关系研究是有效的。

5.RAPD 分析能检测出大量变异,通过比较各品种间的特异带或特征带的差

异, 可进行品种的鉴别和纯度鉴定。利用 14 个引物扩增获得的 14 条 RAPD 特征带, 作为一组 DNA 指纹图谱可以区分所有供试的 14 个红麻品种。其中, MX 247、UG 93、NA 414、塔什干、古巴 8 号五个品种分别在引物 S₁₅₃、S₁₈₀、S₁₈₄、S₂、S₁₈₆ 扩增时产生 S₁₅₃-320bp、S₁₈₀-1543bp、S₁₈₄-1100bp、S₂-1100bp、S₁₈₆-980bp 特征性条带, 利用这些特征带可进行红麻品种的早期鉴定。

6. 本试验研究表明不同品种的核型、随体大小及形态的差异与 RAPD 分析结果是基本一致的。如 RAPD 分析结果显示阿联和勐海紫茎归类于第一类群的第一组, 而这与细胞学分析得出的它们都具有一对较大随体结果一致。又如通过 RAPD 分析表明 NA 414 与红引 135 同属于第二类群, 这与细胞学分析得出的它们都具有一对较小随体结果一致, 且 NA 414 与红引 135 在生育类型、叶型、茎色、叶柄色等方面相同, 说明 RAPD 分析与细胞学研究和品种农艺性状表现大体是一致的, RAPD 分析和细胞学研究结合更能在一定程度上反映出品种的内在遗传差异。

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. 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. 湖北农业科学, 1998, 1:33~35
- [3]周延清. 遗传标记的发展. 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. 北京:科学出版社, 1997, 1~51
- [5]洪德元编著. 植物细胞分类学. 北京:科学出版社, 1990
- [6]Cooke R J. Gel electrophoresis for the identification of plant varieties. Journal of chromatography, 1995, 698:281~299
- [7]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
- [8]Draper S R. ISTA variety committee report of the working group for biochemical tests for culture identification 1983~1986. Seed Sci and Technical, 1987, 15:431~434
- [9]Staub J E, Serquen F C, Gupta M. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. Hort Science, 1996, 31(5):729~741
- [10]沈法富, 刘凤珍, 于元杰. 分子标记在植物育种中的应用. 山东农业大学学报, 28(1):83~91
- [11]白建荣, 郭秀容, 后变英. 分子标记的类型、特点及在育种中的应用. 山西农业科学, 1999, 27(4):33~38
- [12]黎裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展. 生物技术通报, 1999, 4:19~22
- [13]Grodzicker J. Cold Spring Harbour Symp Quant Biol. 1974, 39:493
- [14]Bostein D, White R L, Skolnick M and Davis. Construction of a genetic map in man using restriction fragment polymorphisms. Am J Hum Genet, 1980, 32:314~331
- [15]Donis-keller H. A genetic linkage map of the human genome. Cell, 1987, 51:319~337
- [16]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
- [17]徐吉臣. 遗传图谱中的分子标记. 生物工程进展, 1992, 12(5):1~3
- [18]Beckmann M. Genetic diversity analysis in plant with RFLP method.

- Euphtica, 1986, 35:111~124
- [19]Beckmann J S, Soller M. Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement:methodologies, mapping and costs. Theor Appl Genet, 1983, 67:35~43
- [20]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, 12(1):1~4
- [21]张立平, 林伯年, 沈德绪. 葡萄属植物核糖体基因的 RFLP 分析. 园艺学报, 1997, 24(4): 385~387
- [22]Dietrich W F. A comprehensive genetic map of the mouse genome. Nature, 1996, 380:149~152
- [23]Dib C. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5264 microsatellites. Nature, 1996, 380:152~154
- [24]何平. 真核生物中的微卫星及其应用. 遗传, 1998, 20(4):42~47
- [25]吴敏生, 王守才. 指纹图谱技术在品种鉴定和纯度分析上的应用. 农业生物技术学报, 1998, 6(1):51~55
- [26]危文亮, 赵应忠. 分子标记在作物育种的应用. 生物技术通报, 2000, 2:12~16
- [27]Nybom H. DNA fingerprinting: A useful tool in fruit breeding. Euphytica, 1994, 77, 1-2:59~64
- [28]刘榜, 张庆德, 李奎. 微卫星 DNA 作为遗传标记的优点及前景. 湖北农业科学, 1997, 2:49~51
- [29]Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplication: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application, No. 05344858A1, 1993
- [30]Blair. International plant genome conference III. January, 1995, San Diego USA
- [31]Williams J G K, Kubelik A R, Libak K J, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorohisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22):6531~6535
- [32]Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 1990(18):7213~7218
- [33]Welsh J, Peterson C, McClell M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCS in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. Nucleic Acids Research, 1991(19):303~306
- [34]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

- [35]石太渊. 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
- [36]Plant Genetic Resources Newsletter, 1996(107):50~54
- [37]王冰冰. RAPD 技术进展及其在小麦遗传育种中的应用. 农业生物技术学报, 1997, 5(3):227~233
- [38]Hu J, Quiros C F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant cell Rep, 1991, 10:505~511
- [39]Graham J, McNicol R T. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationship within and between kubus species. Theor Appl Genet, 1995, 90:1128~1132
- [40]Virk P S, Newbury H J, Tackson M T. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. Theor Appl Genet, 1995, 90:1049~1055
- [41]Dos Santos J B, Nienhuis J, Skroch P. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among Brassica aleracea L genotype. Theor Appl Genet, 1994, 87:909~915
- [42]Kresovich S, Williams J G K, McFerson J R. Characterization of genetic identifies and relationships of Brassica aleracea L via a random amplified polymorphic DNA assay. Theor Appl Genet, 1992, 85:190~196
- [43]丁晓东, 吕柳新. 利用 RAPD 标记研究荔枝品种的亲缘关系. 热带亚热带植物学报, 2000, 8(1):49~54
- [44]李云海, 钱前. 我国主要杂交水稻亲本的 RAPD 鉴定及遗传关系研究. 作物学报, 2000, 26(2):171~176
- [45]贾建航, 王萍. RAPD 标记在紫菜遗传多样性检测和种质鉴定中的应用. 植物学报, 2000, 42(4):403~407
- [46]李海真, 许勇. 南瓜属三个种的亲缘关系与品种的分子鉴定研究. 农业生物技术学报, 2000, 8(2):161~164
- [47]彭建营, 束怀瑞. 枣 RAPD 技术体系建立与几个品种亲缘关系的研究. 农业生物技术学报, 2000, 8(2):155~159
- [48]揭雨成. 苧麻不同基因型亲缘关系的 RAPD 分析. 中国麻作, 1999, 21(1):1~6
- [49]周东新. 黄麻 DNA 提取与 RAPD 反应体系的建立. 福建农业大学学报, 2001, 30(3):334~

- [50] Frank Robinson. California Agriculture. September~October, 1988, 31, pp. 31~32
- [51] Frank X Werber. Proceedings International Kenaf Conference. March, 3~6, 1993, Fresno. California
- [52] International Jute Organization, 1987, Proceedings of the IJO/ICAR Orientation Course on "Germplasm Collection, Characterization and Conservation of Jute Allied Fibers"
- [53] 熊和平. 坦桑尼亚黄麻红麻种质资源考察. 中国麻作, 1989
- [54] 祁建民. 红麻种质资源创新的理论与实践. 中国麻作, 1999, 21(1): 43~44
- [55] 李爱青. 安徽省沿淮地区红麻生产特点与发展措施. 中国麻作, 1993(1): 29~30, 28
- [56] 李爱青. 红麻新品种 917 安徽试验示范简报. 中国麻作, 1994, 16(4): 9
- [57] 谢国炎. 我国红麻种子产、销现状及发展方向. 中国麻作, 1998, 20(3): 35~37
- [58] 孙进昌. 红麻生产中存在的主要问题及对策. 农业科技通讯, 1998(5)
- [59] 汤永海. 我国红麻种子工作的主要问题及其对策. 中国麻作, 1994, 16(3): 37~41
- [60] 陈安国. 走杂交红麻种子产业化道路发展和完善我国的红麻生产. 中国麻作, 1998, 20(4): 44~45, 28
- [61] T. Ghosh. Handbook of Jute, FAO of United Nations. Rome, 1983
- [62] Howard A and G L C Howard. 1911, Mem. Dept. Agr. India, Bot. Ser. 4(2)
- [63] 邓丽卿. 红麻种质资源的形态及分类研究. 中国麻作, 1991(4): 16~20
- [64] Edmonds J M. Herbarium survey of Corchorus and Hibiscus. IJO technical reports, Dhaka, Bangladesh, 1987
- [65] 唐守伟. 我国麻类生产现状和发展对策. 中国麻作, 1999, 21(3): 45~49
- [66] Proceedings of International Kenaf Association Conference. Albuquerque, NM. USA. March, 21~23, 1996
- [67] 邓丽卿. 我国红麻品种资源研究. 作物品种资源, 1986(2): 15~17
- [68] 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
- [69] 中国农业科学院麻类研究所主编. 中国黄麻红麻品种志. 农业出版社, 北京, 1985, p. 8
- [70] 黄培坤. 国外引进红麻种质资源鉴定和利用研究. 中国麻作, 1989(4): 5~9
- [71] I R Denton (Ed). Report of the 1st~5th IJO germplasm collection missions for jute and kenaf and allied fibers in Kenya and Tanzania. IJO, Dhaka, Bangladesh, 1987~

1988

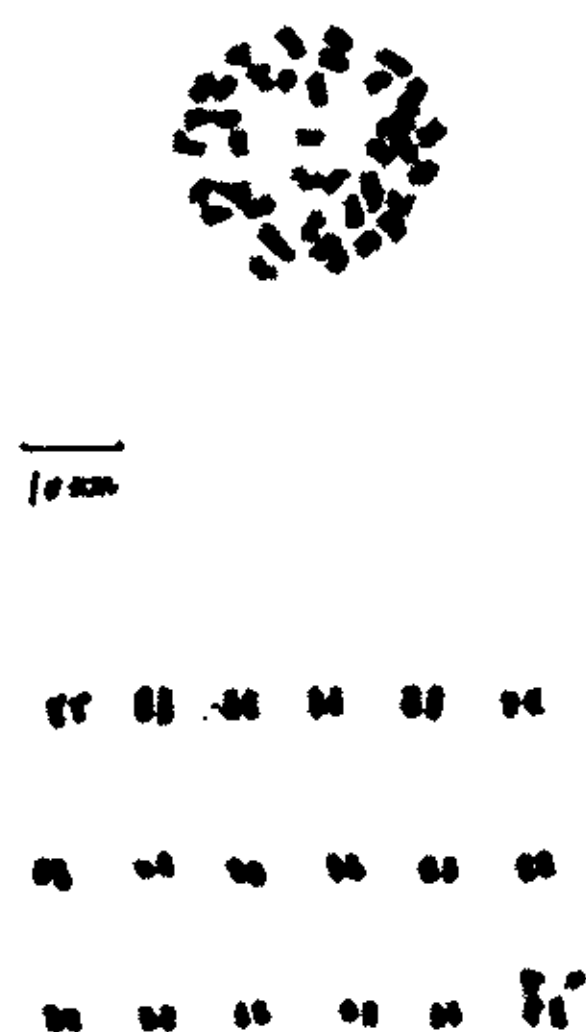
- [72] 李爱青. 红麻稀有材料分类地位研究. 作物学报, 1993, 19(3):239~245
- [73] 粟建光. 红麻种质资源农艺性状的遗传变异和数量分类. 中国农业科学, 1992, 25(3):
50~57
- [74] 邓丽卿. 红麻种质资源的农艺性状研究与利用. 中国麻作, 1994, 16(4):1~4
- [75] 朱凤绥. 麻类作物染色体组型分析及 Giemsa 带型初步观察. 中国麻作, 1981(3):1~9
- [76] Menzel M Y. 1986, pidy printing press Ltd. Kanachi
- [77] 李爱青. 红麻不同类型品种的形态特征与细胞学研究. 中国麻作, 1985(2):6~10
- [78] 黄培坤. 红麻染色体构型的初步研究. 中国麻作, 1987(1):1~2
- [79] 朱凤绥. 麻类作物 G 带的研究. 中国麻作, 1993(2):16~18, 26
- [80] 邓丽卿. 红麻和木槿属 *Furcaria* 组植物的形态分类及细胞遗传学研究. 湖南农学院学报, 1994, 20(4):310~317
- [81] 李爱青. 红麻不同类型随体染色体与几个不同性状遗传关系研究初报. 中国麻作, 1988(3):6~9
- [82] 李爱青. 不同来源红麻品种异染色质研究. 中国麻作, 1991(1):1~3
- [83] 曹德菊. 花粉管法将外源抗除草剂基因导入红麻的有效方法及参数研究. 中国麻作, 2000, 1
- [84] 曹德菊. 抗除草剂转基因红麻的分子验证. 中国麻业, 2001, 3
- [85] Keil M. Use of random amplified polymorphic DNA rariation in the eggplant, *Solanum melorgena* L. (Solanaceac). Theor Appl Genet, 1994(90):767~770
- [86] Vierling R A. Use of RAPD marlers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. Theor Appl Genet, 1992(84):835~838
- [87] López - Braña I. Analysis of Heterodera avenae populations by the random amplified polymorphic DNA technique. Genome, 1996(39):118~122
- [88] Demeke T. A DNA marker for Bt-10 Common bunt resistance gene in wheat. Genome, 1996(39):51~55
- [89] Penner G A. Identification of a RAPD marker linked to the oat stem rust gene. P3, Theor Appl Genet, 1993(85):702~705
- [90] Reiter R S . 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
- [91] Wilde J. Genetic fingerprinting of Theobroma clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor Appl Genet, 1992:871~877
- [92] 程舟, 鲛岛一彦. 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
- [93] 朱凤绥. 植物染色体 F-BSG 分带方法与带型. 遗传, 1982, 4(3):25~28
- [94] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题. 武汉植物学研究所, 1985, 3(4):297~302
- [95] Levan A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes, Hereditas, 1964, 52:201~220
- [96] Stebbins G L. Chromosomal evolution in higher plant. London, Edwards Arnold Ltd, 1971
- [97] Stebbins G L. Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol, 1958, 23:365~378
- [98] 季道藩主编. 遗传学实验. 北京:中国农业出版社, 1992, 5, P59
- [99] Arano H. Cytological studies in subfamily Cardeaeellompositae of Japan. IX, Bot Mar, Tokyo, 1963, 76:128~140
- [100] Mc Couch S R. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor Appl Genet, 1988, 76:815~829
- [101] 赵姝华, 王富德. 提取、纯化植物 DNA 方法的比较. 国外农学—杂粮作物, 1998, 18(2):35~38
- [102] Pierre G, Haurence M D. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method. Plant Mol Biol Rep, 1992, 10:60~65
- [103] 邹喻苹, 汪小全. 几种濒危植物及其近缘类群总 DNA 的提取与鉴定. 植物学报, 1994, 36(7):528~533
- [104] 王玉富. 亚麻总 DNA 快速提取方法研究. 中国麻作, 1997, 19(1):19~21
- [105] 曹德菊. 红麻基因组提纯方法研究. 中国麻作, 1999, 21(1):9~12
- [106] 马文宾, 庄杰云, 彭应财. 遗传, 1998, 20(2):1~4
- [107] 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
- [108] Guidet F, Rogowsky P. Cloning and characterization of a new rye specific

- repeated sequence. *Genome*, 1991, 34:81-87
- [109] Wilkie S E, Isaac P G and Later R J. *Theor Appl Genet*, 1993, 86:497~504
- [110] Hardry H, Balick M and Schierwater B. *Mol, Ecol*, 1992, 1:55~66
- [111] 朱凤绥. 染色体 Giemsa 分带新技术在二十几种农作物上显带成功. *湖南农学院学报*, 1980, 1:34
- [112] Greilhuber J. Giemsa karyotypes and their evolutionary significance in *Scilla bifolia*, *S. drunensis* and *S. rindobnensis*. *Plant Syst, Evol*, 1977, 127: 171~190
- [113] 刘玉红. 五种黄芪植物的核型分析. *植物分类学报*, 1984, 22(2):125~127
- [114] J M Leggett. Chromosome relationships and morphological comparisons in the hybrid *Avena hybrid* × *A. Sativa* and *A. hybrid* × *A. maroccana*. *Can J Genet Cytol*, 1983, 25(3):255~260
- [115] Fiskesjo G. 1975, *Hereditas*, 81:23
- [116] Merker A. 1973, *Hereditas*, 75:304~306
- [117] 朱澄主编. 《植物染色体及染色体技术》. 科学出版社, 1982, P154
- [118] 李懋学, 陈瑞阳, 徐宗尧编著. 植物染色体研究技术. 河北. 昌黎, 1988, 7
- [119] Kim C S. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25:1085~1086
- [120] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苳提取适于分子生物学分析的真菌 DNA. *真菌学报*, 1994, 13(1):34~40
- [121] 郭安平. 几种麻类作物及其近缘种植物总 DNA 的提取与鉴定. *中国麻作*, 1997, 19(4): 4~10
- [122] McDonald M B, Elliot L J, Sweeney P M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. *Seeds Science and Technology*, 1994, 22:171~176
- [123] Chunwongse J, Martin G B, Tanksley S D. Pre-germination genotypic screening using PCR amplification of half-seeds. *Theor Appl Genet*, 1993, 86:694~698
- [124] Yoshihashi T, Nakamura S, Fujii T. Identification of domestic rice cultivars by RAPD analysis using one grain of milled rice as a sample. *Nippon-Shokuhin-Kagaku-Kogaku-Kaishi*, 1999, 46(4):250~254
- [125] Edwards K. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA

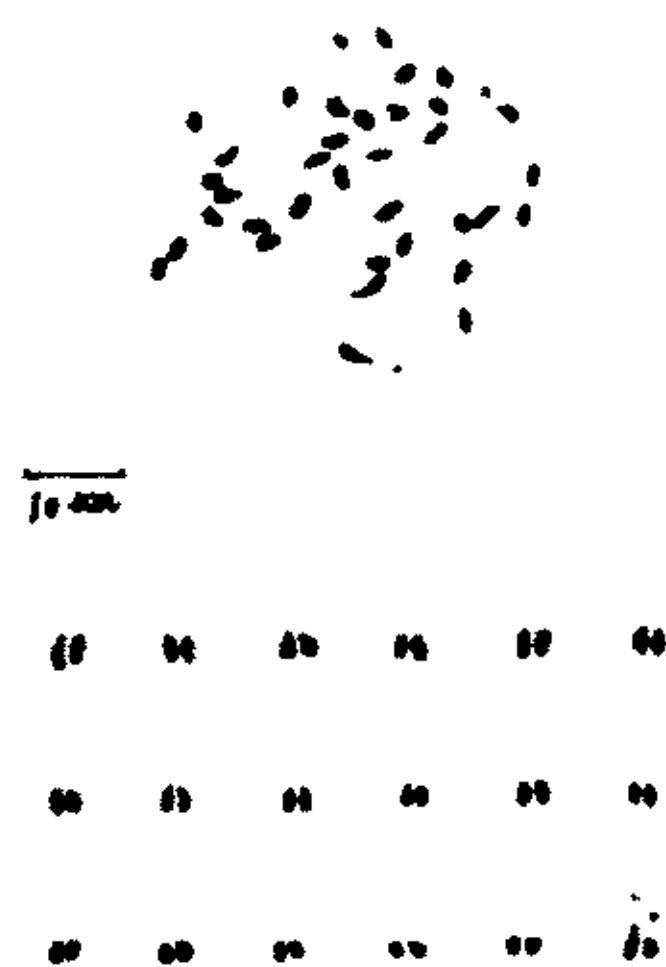
- for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(6):1349
- [126]赵姝华. 农作物种子及半粒种子 DNA RAPD 扩增研究. *国外农学—杂粮作物*, 1999, 19(3): 22~25
- [127]翟文学. 谷类作物半粒种子的 PCR 分析及其在标记辅助选择育种中的应用. *生物工程学报*, 1996, 12(4):416~421
- [128]王玉民. 玉米半粒种子 DNA 提取及 RAPD 分析. *玉米科学*, 1996, 4(3):27~28
- [129]乔爱民. 直接从人工老化的菜心干种子中提取基因组 DNA 用于 RAPD 分析. *植物学通报*, 1999, 16(6):701~704
- [130]郭景伦. 玉米单粒种子 DNA 提取新方法及在玉米种质鉴定中的应用研究. *种子*, 1999(2):37~38
- [131]李世民, 苏业瑜. 红麻(*Hibiscus cannbinus*) DNA 的提取与纯化. *中国麻作*, 1986, 3: 9~11
- [132]林万明. PCR 技术操作和应用指南. 北京:人民军医出版社, 1993
- [133]Kaya Z. Utility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for linkage mapping in Turkish Red Pine (*Pinus brutia* Ten) . *Silvae Genetics*, 1995, 44:110~116
- [134]Wei J. Genetic variability in Russian Wildrye(*Psathyrostachys juncea*) assessed by RAPD. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1994, 44:117~125
- [135]Stiles J L, Lemme C, Sondur S, Morshidi M B and Mansharst M. *Theor Appl Genet*, 1993, 85:697~701
- [136]Paran. Development of reliable PCR-based markers linged to downy mildew resistance gene in lettuce. *Theor Appl Genet*, 1993, 85:985~993

附录



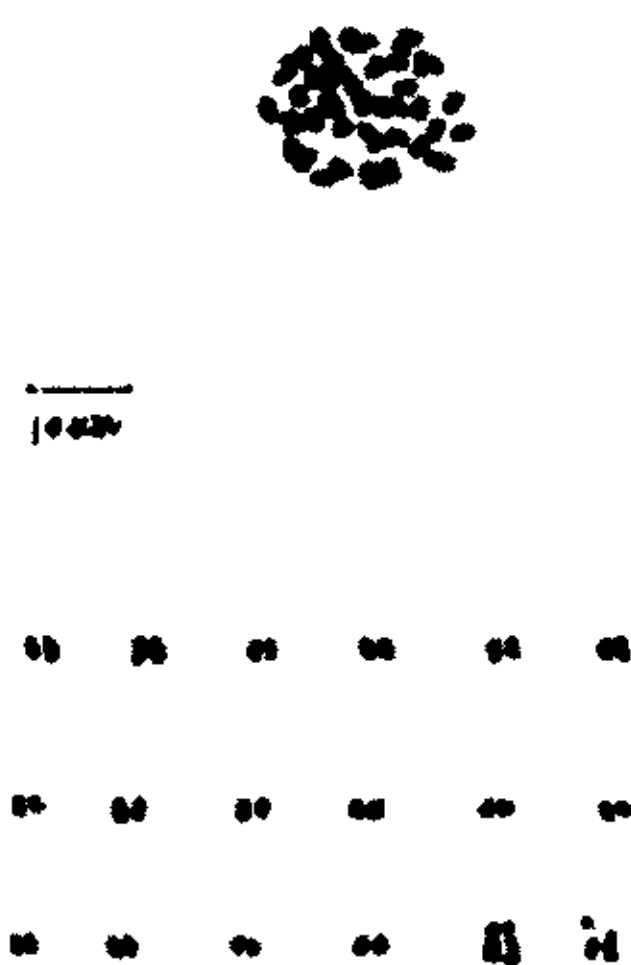
附图 1. 红麻（阿联）染色体的核型

Supplemental pattern 1. Chromosomal
karyotype of Alian Kenaf



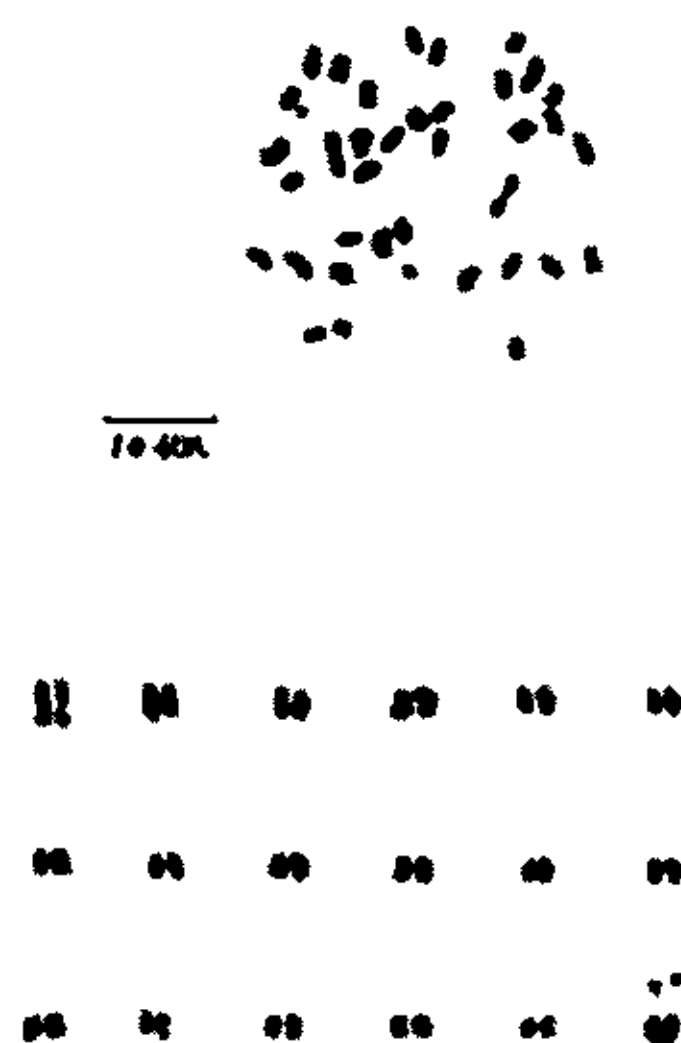
附图 2. 红麻（勐海紫茎）染色体的核型

Supplemental pattern 2. Chromosomal
karyotype of Menghaizijing Kenaf



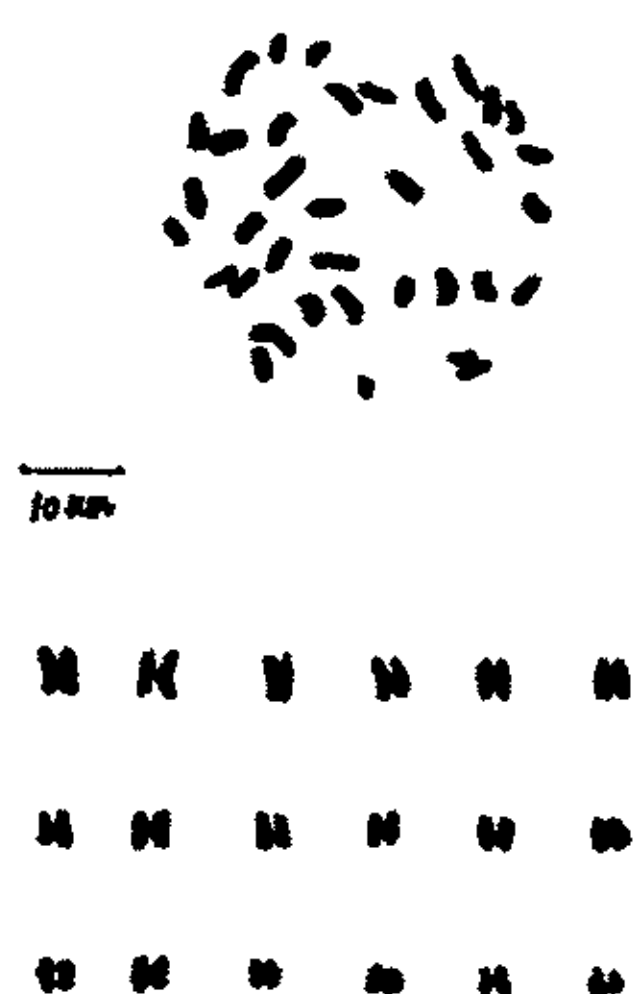
附图 3. 红麻（7804）染色体的核型

Supplemental pattern 3. Chromosomal
karyotype of 7804 Kenaf

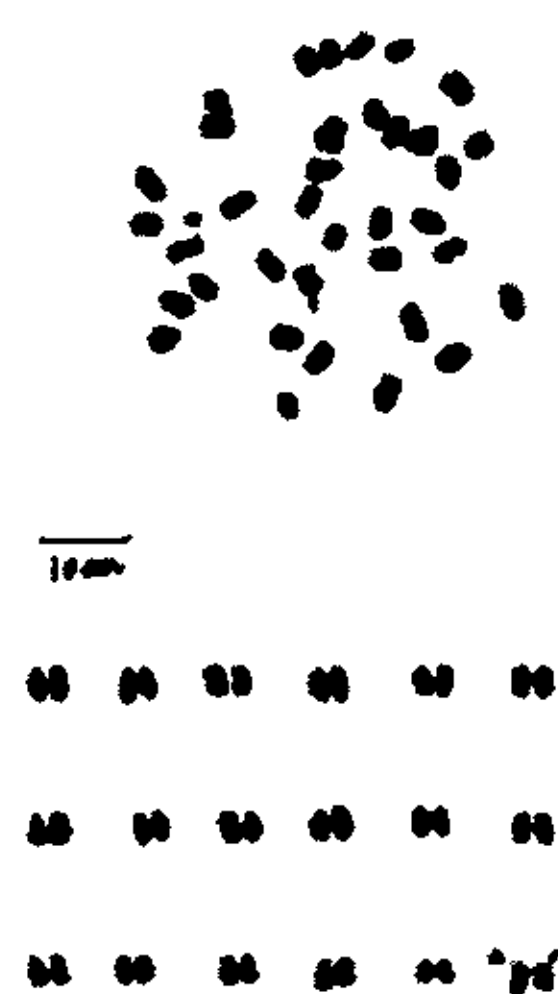


附图 4. 红麻（塔什干）染色体的核型

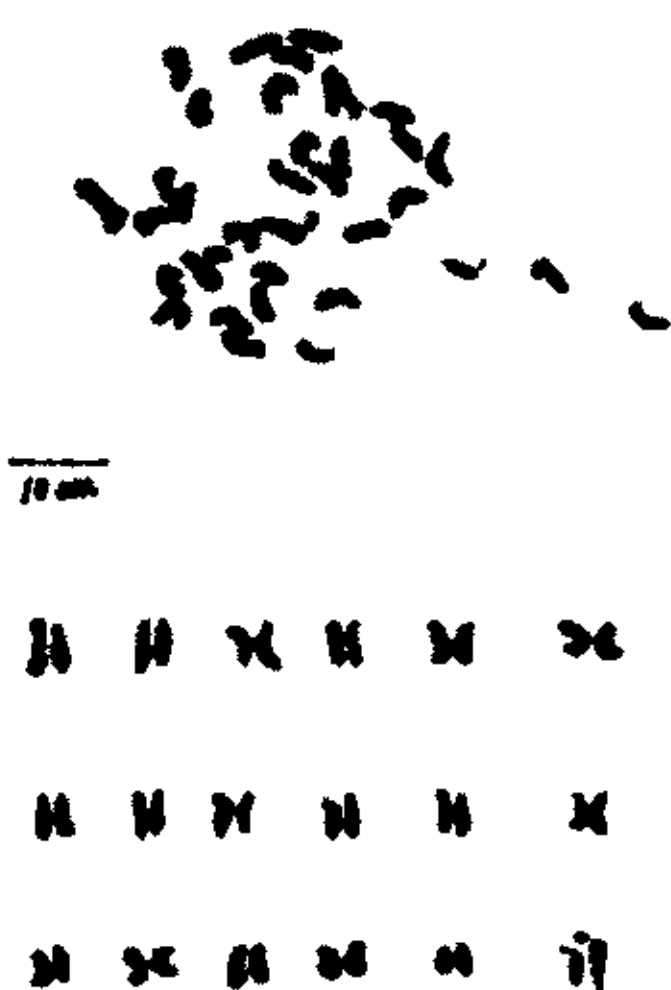
Supplemental pattern 4. Chromosomal
karyotype of Tashengan Kena



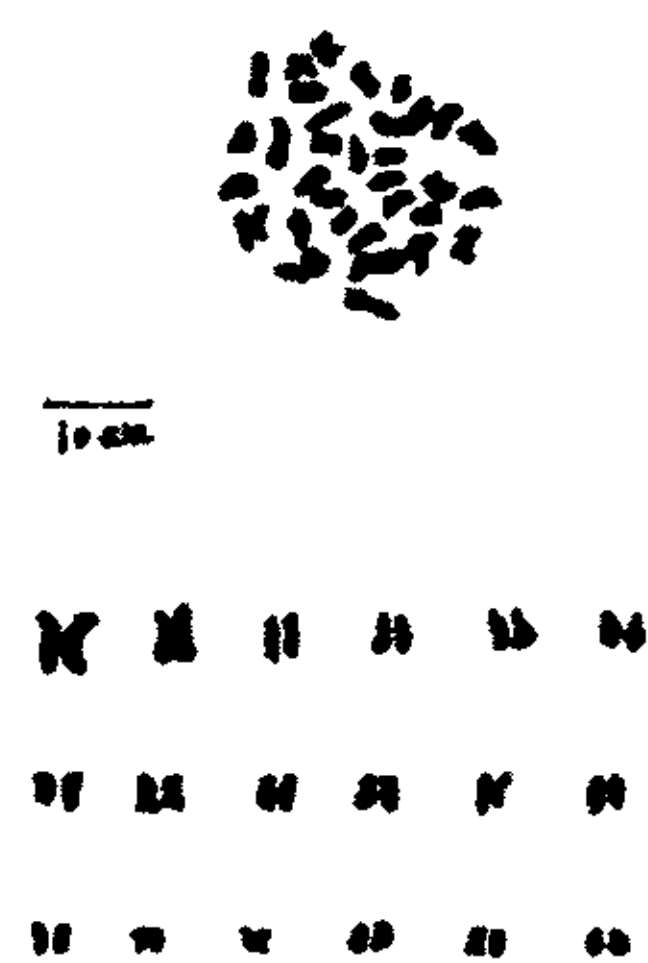
附图 5. 红麻（泰红 763）染色体的核型
Supplemental pattern 5. Chromosomal
karyotype of Taihong763 Kenaf



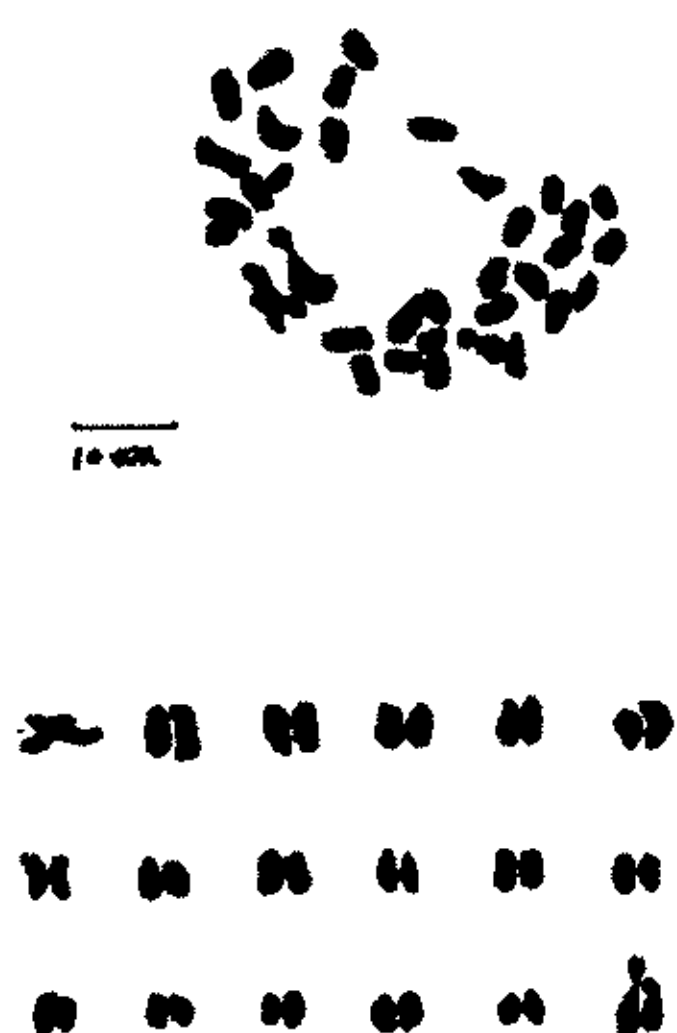
附图 6. 红麻（元江红麻）染色体的核型
Supplemental pattern 6. Chromosomal
karyotype of Yuanjiang Kenaf



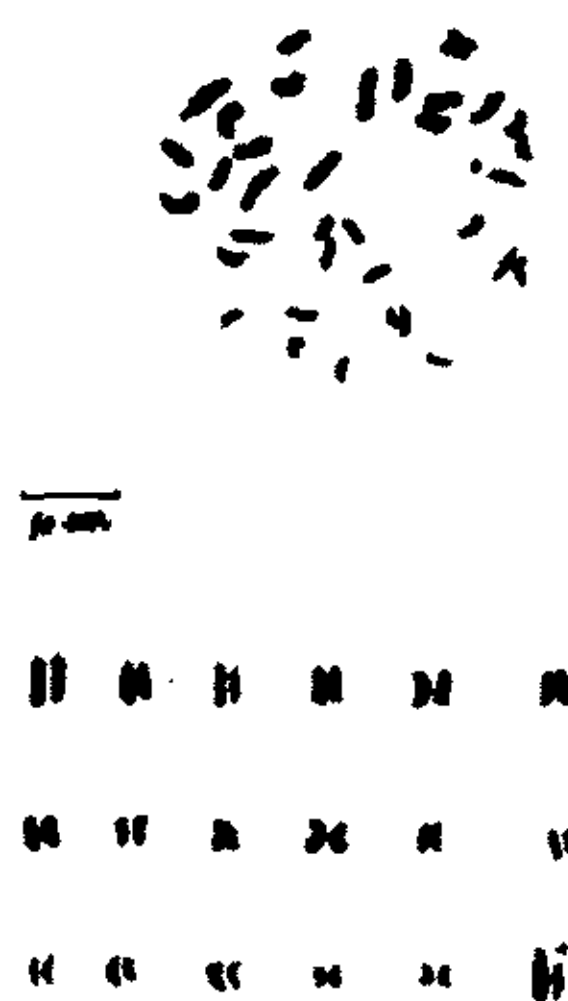
附图 7. 红麻（青皮 3 号）染色体的核型
Supplemental pattern 7. Chromosomal
karyotype of Qingpisanhao Kenaf



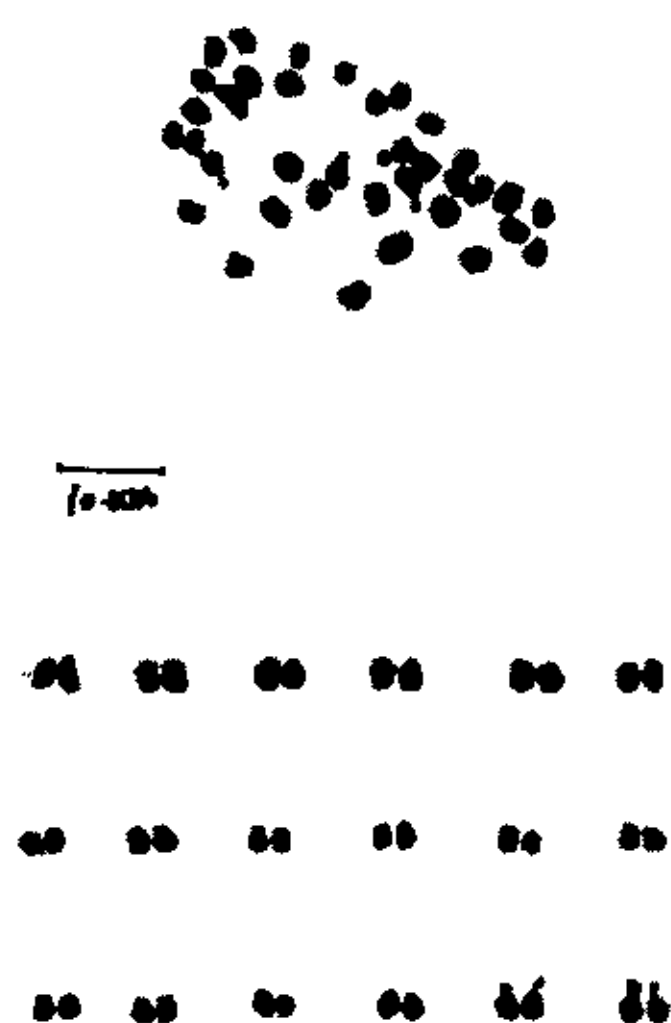
附图 8. 红麻（MX 247）染色体的核型
Supplemental pattern 8. Chromosomal
karyotype of MX 247 Kenaf



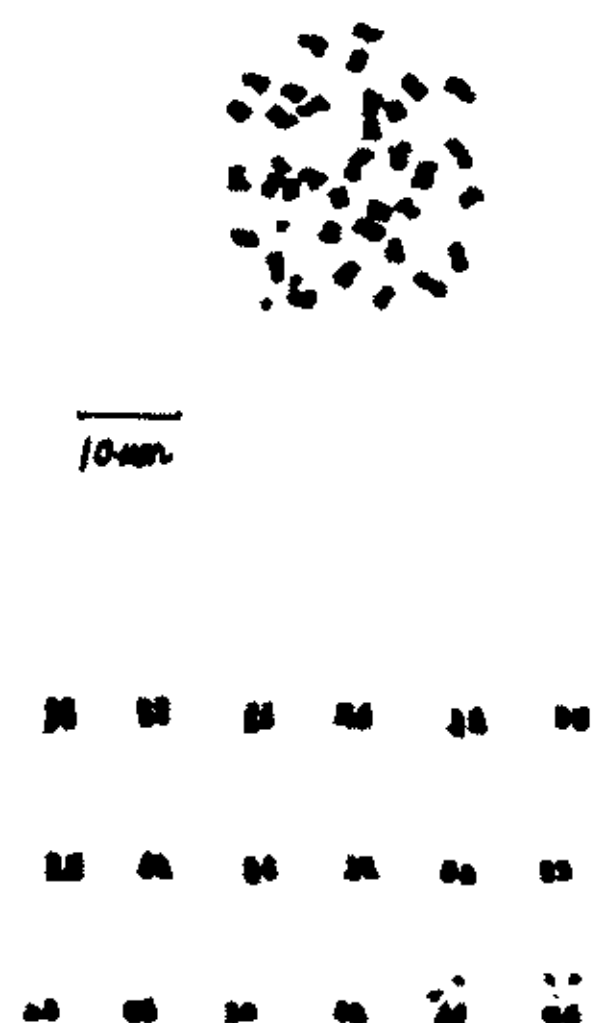
附图 9. 红麻 (NA 414) 染色体的核型
Supplemental pattern 9. Chromosomal
karyotype of NA 414 Kenaf



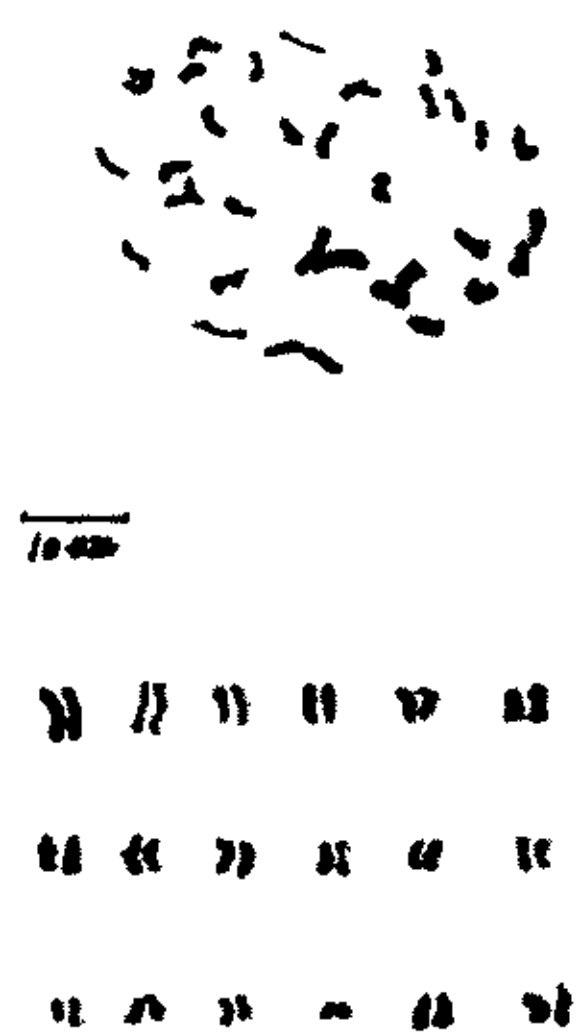
附图 10. 红麻 (红引 135) 染色体的核型
Supplemental pattern 10. Chromosomal
karyotype of Hongyin135 Kenaf



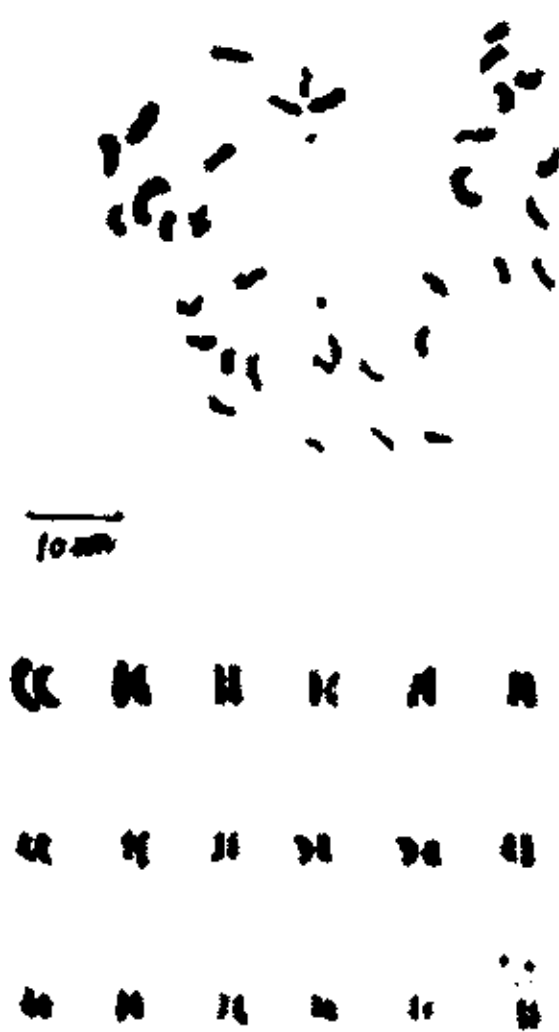
附图 11. 红麻 (福红 991) 染色体的核型
Supplemental pattern 11. Chromosomal
karyotype of Fuhong991 Kenaf



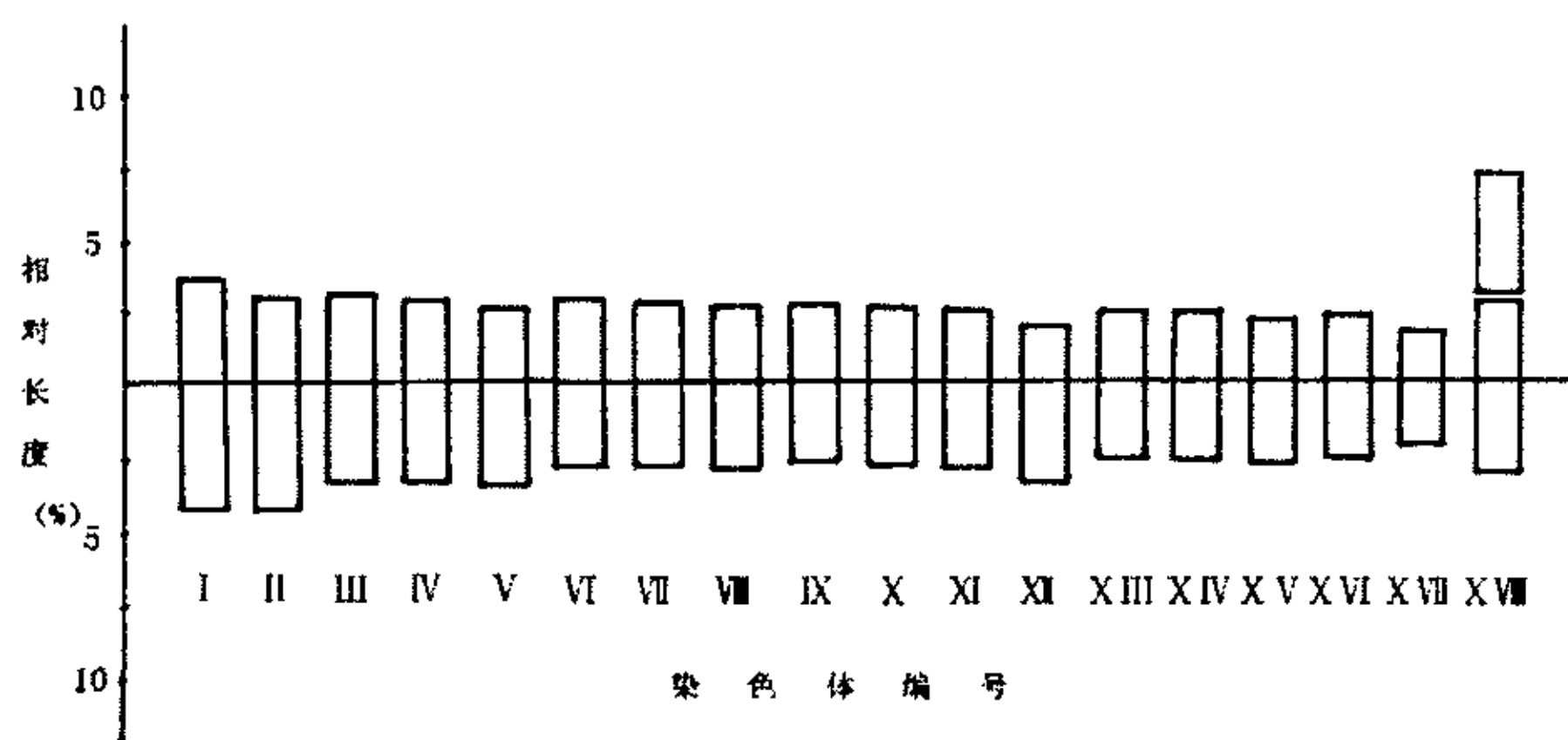
附图 12. 红麻 (早熟红麻) 染色体的核型
Supplemental pattern 12. Chromosomal
karyotype of Zaoshu Kenaf



附图 13. 红麻（UG 93）染色体的核型
Supplemental pattern 13. Chromosomal
karyotype of UG 93 Kenaf

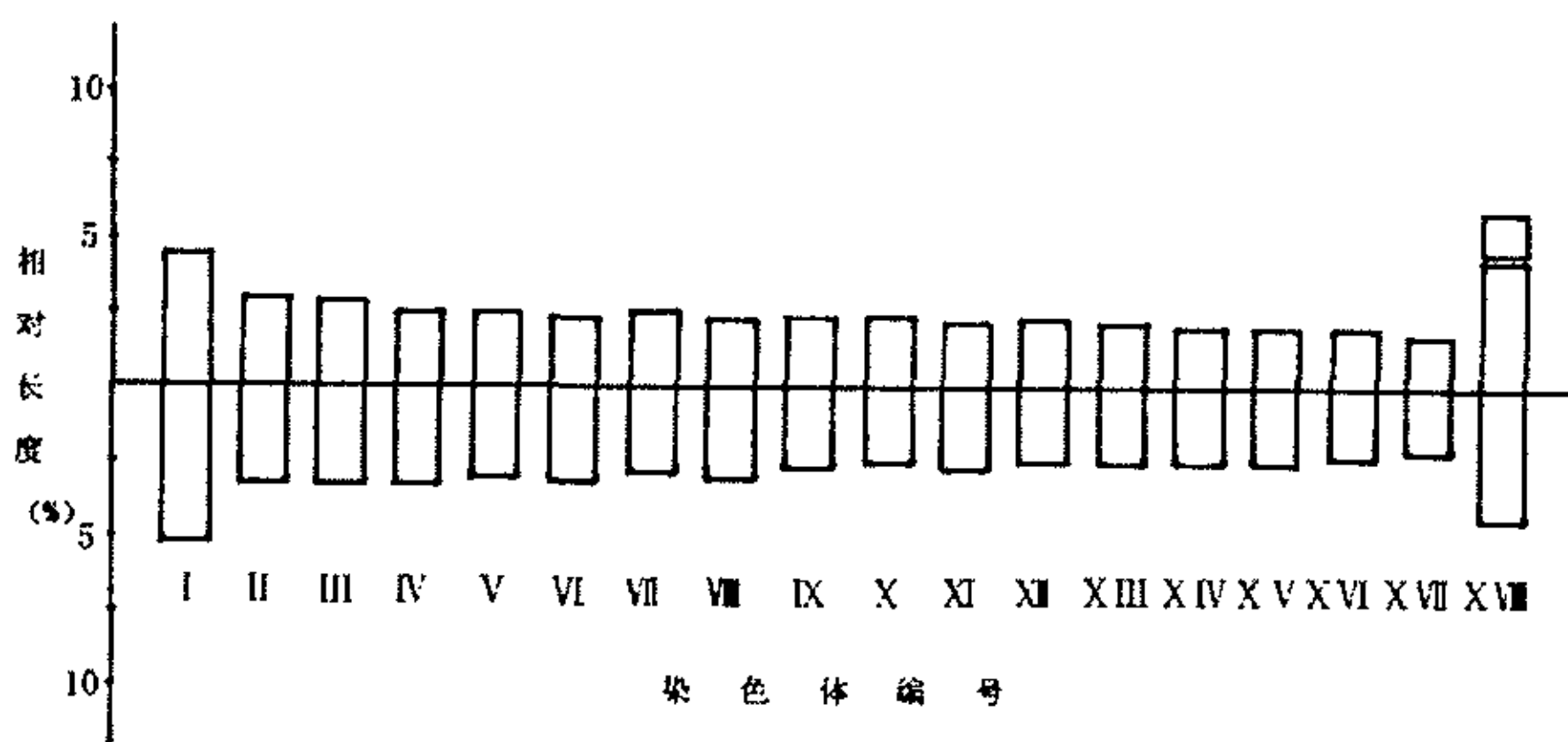


附图 14. 红麻（古巴 8 号）染色体的核型
Supplemental pattern 14. Chromosomal
karyotype of Gubabahao Kenaf



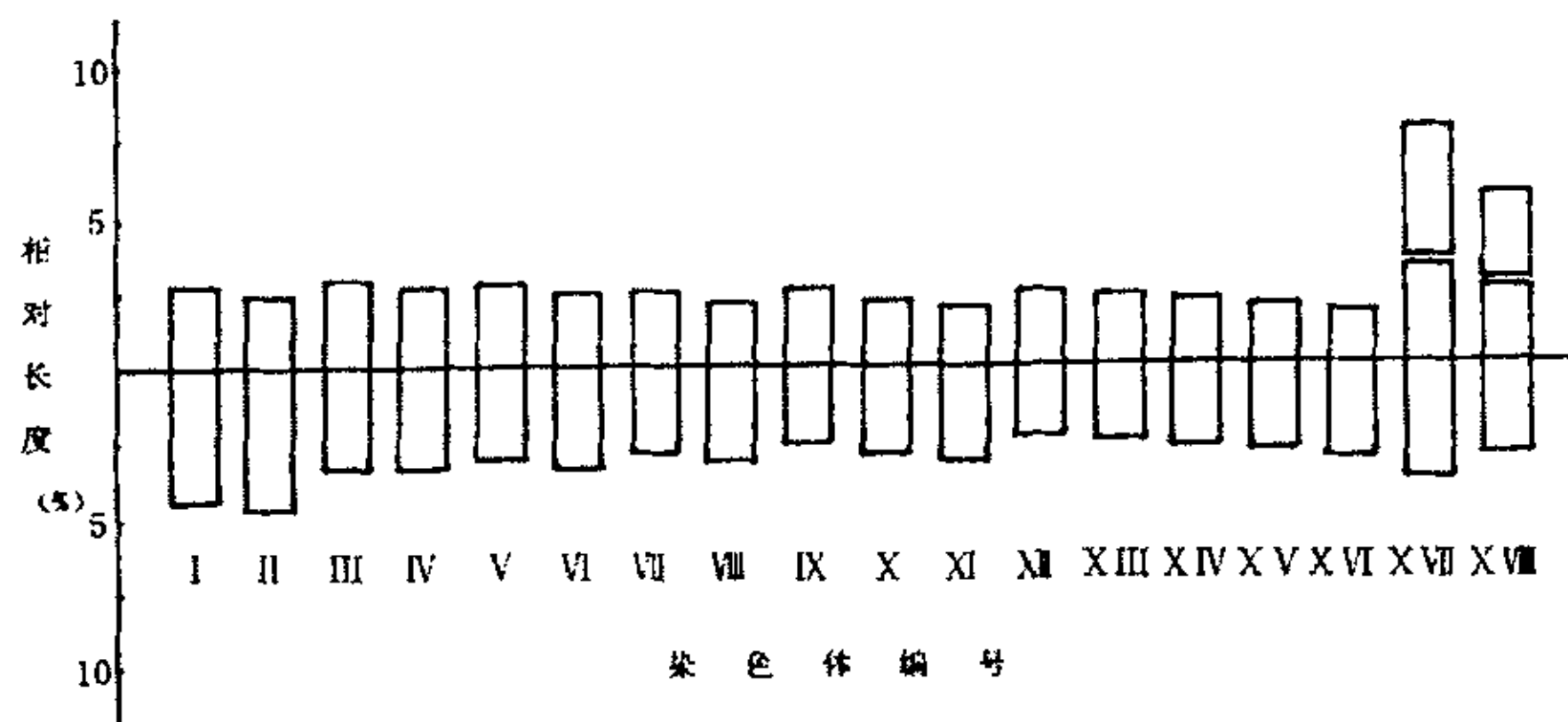
附图 15. 红麻（阿联）染色体核型模式图

Supplemental pattern 15. Chromosomal ideogram of Alian



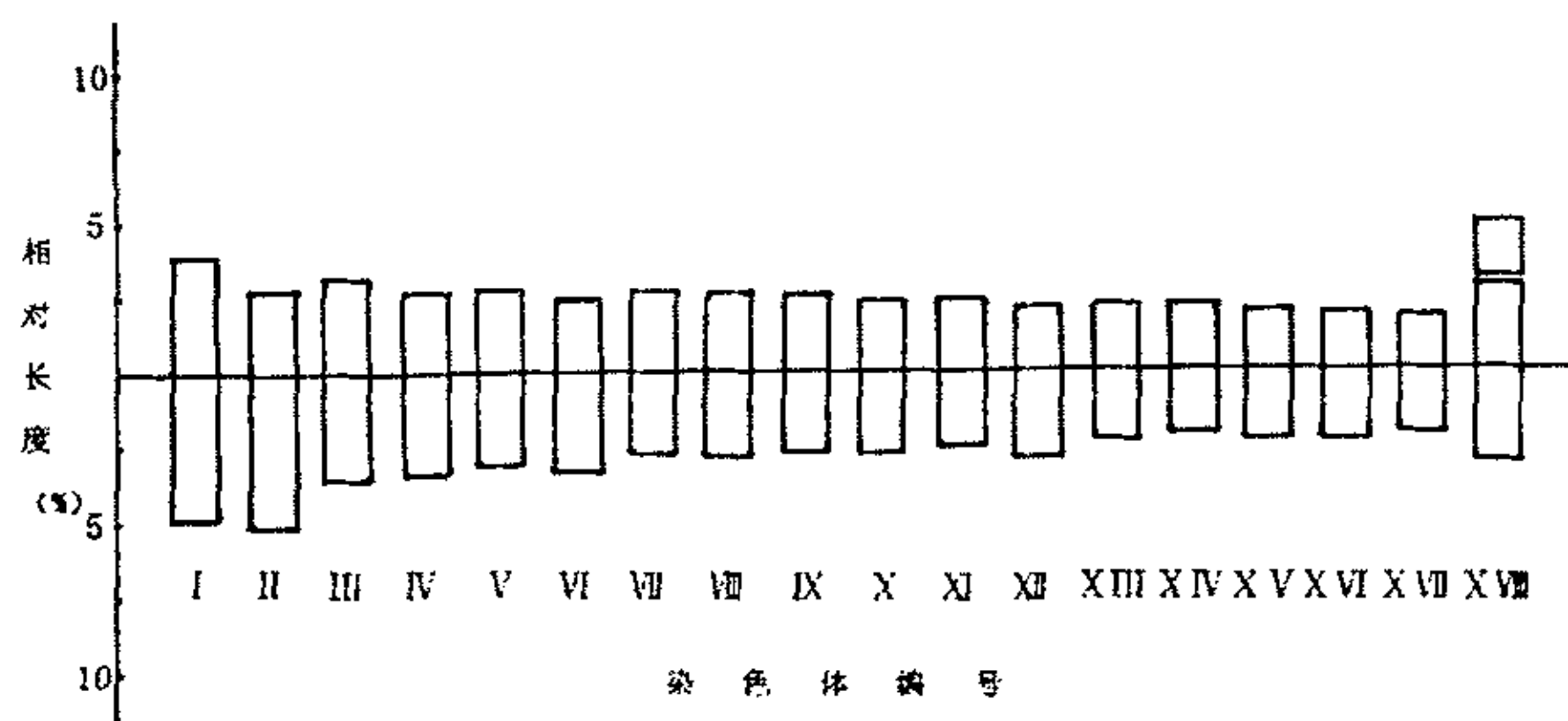
附图 16. 红麻（勐海紫茎）染色体核型模式图

Supplemental pattern 16. Chromosomal ideogram of Menghaizijing



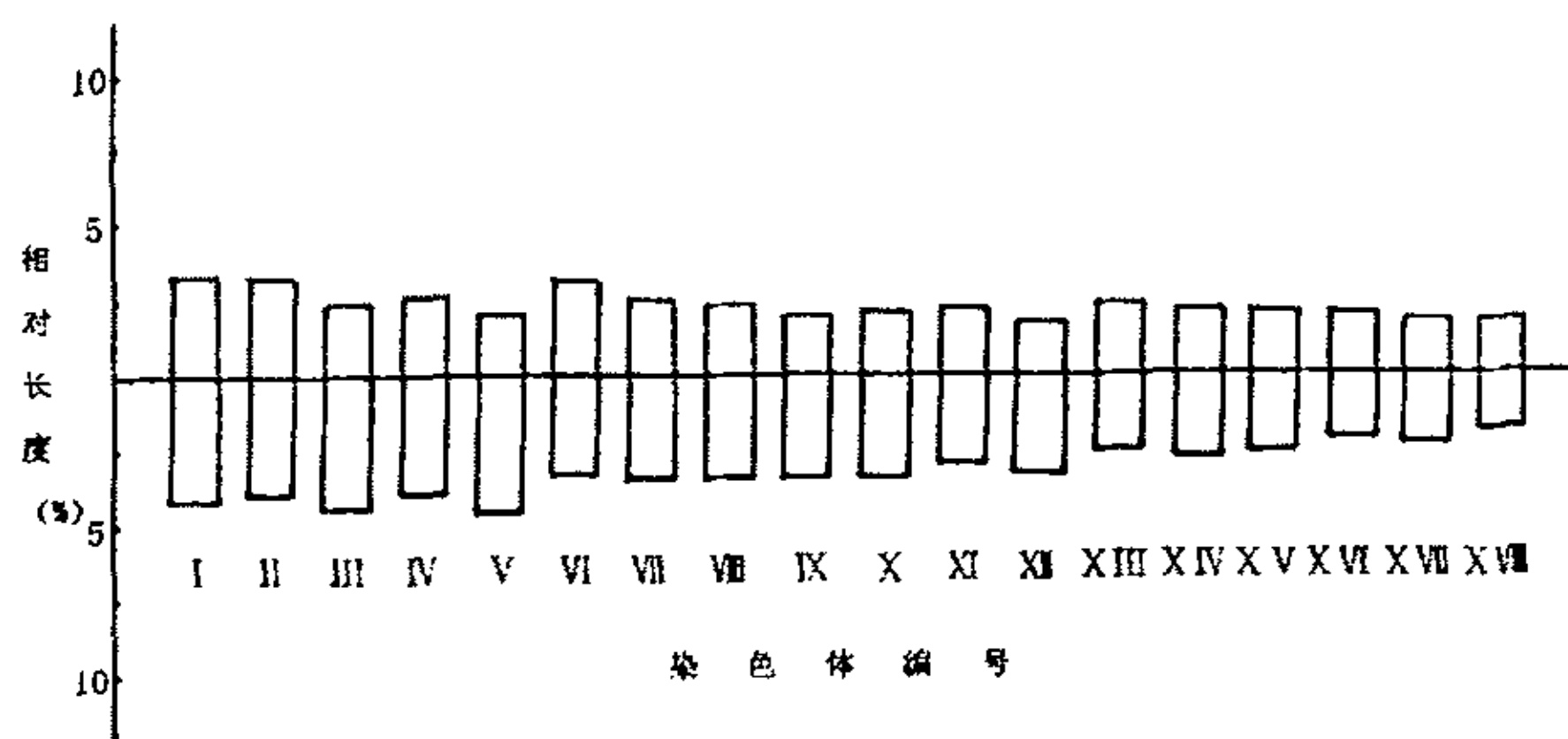
附图 17. 红麻 (7804) 染色体核型模式图

Supplemental pattern 17. Chromosomal idiogram of 7804



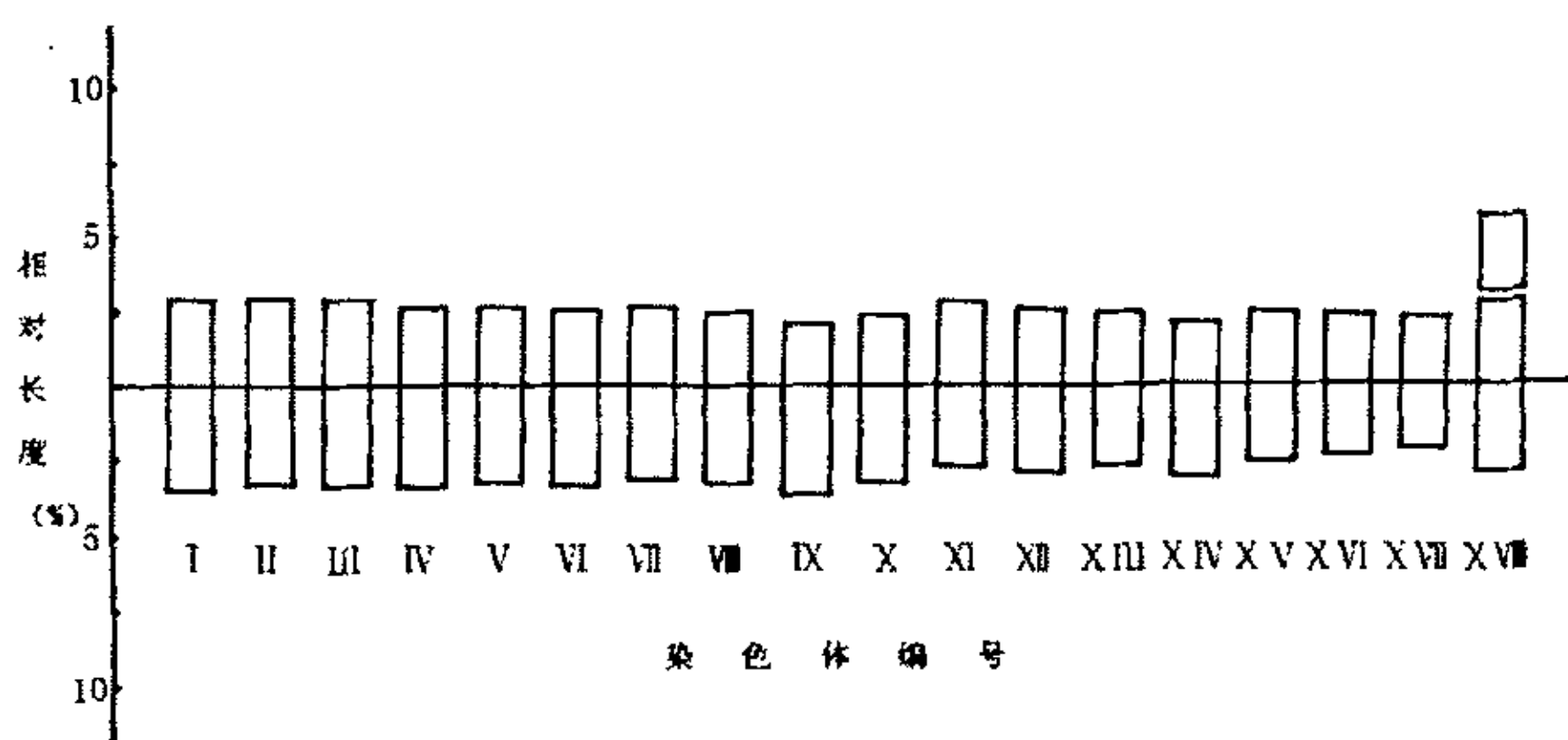
附图 18. 红麻 (塔什干) 染色体核型模式图

Supplemental pattern 18. Chromosomal idiogram of Tashengan



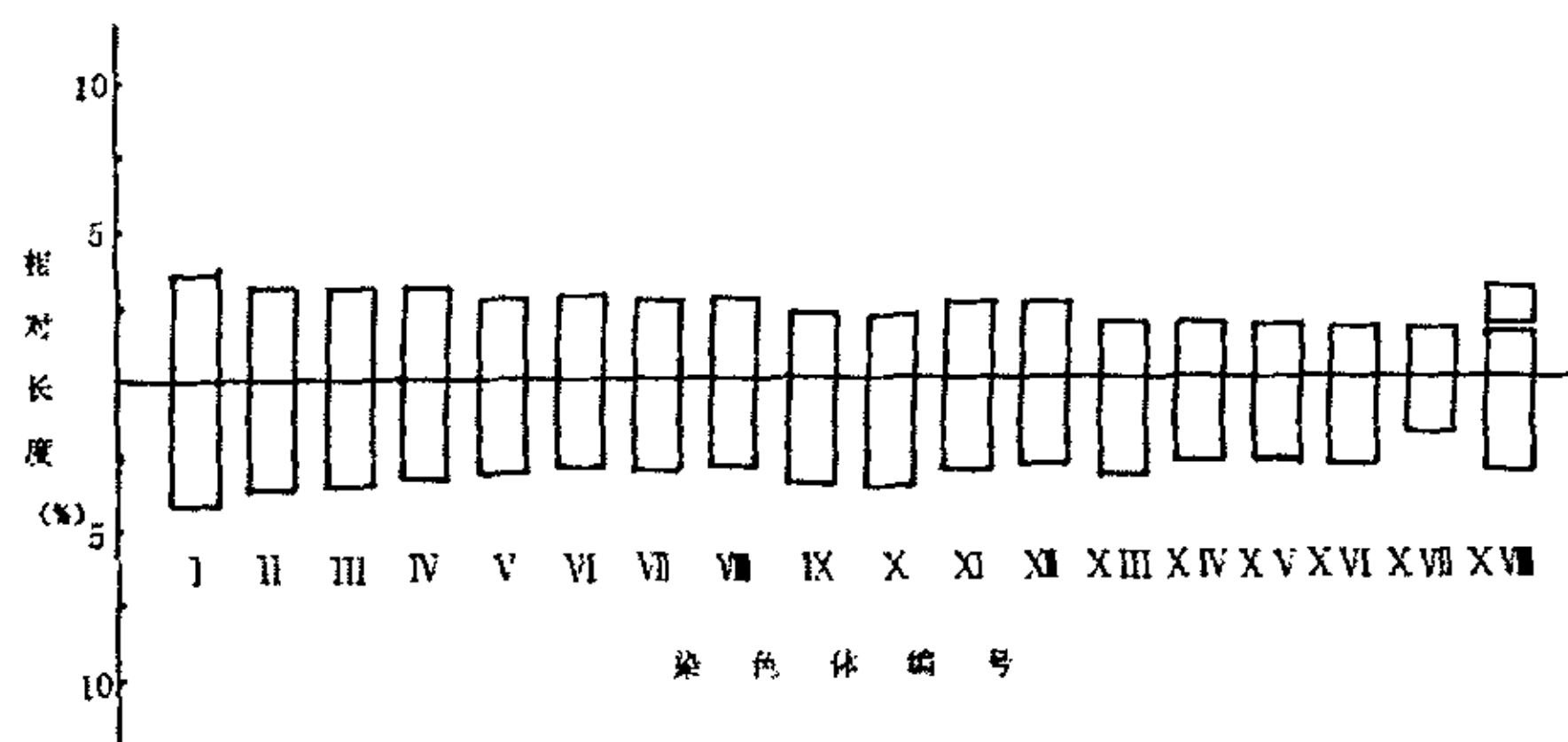
附图 19. 红麻（泰红 763）染色体核型模式图

Supplemental pattern 19. Chromosomal idiogram of Taihong763



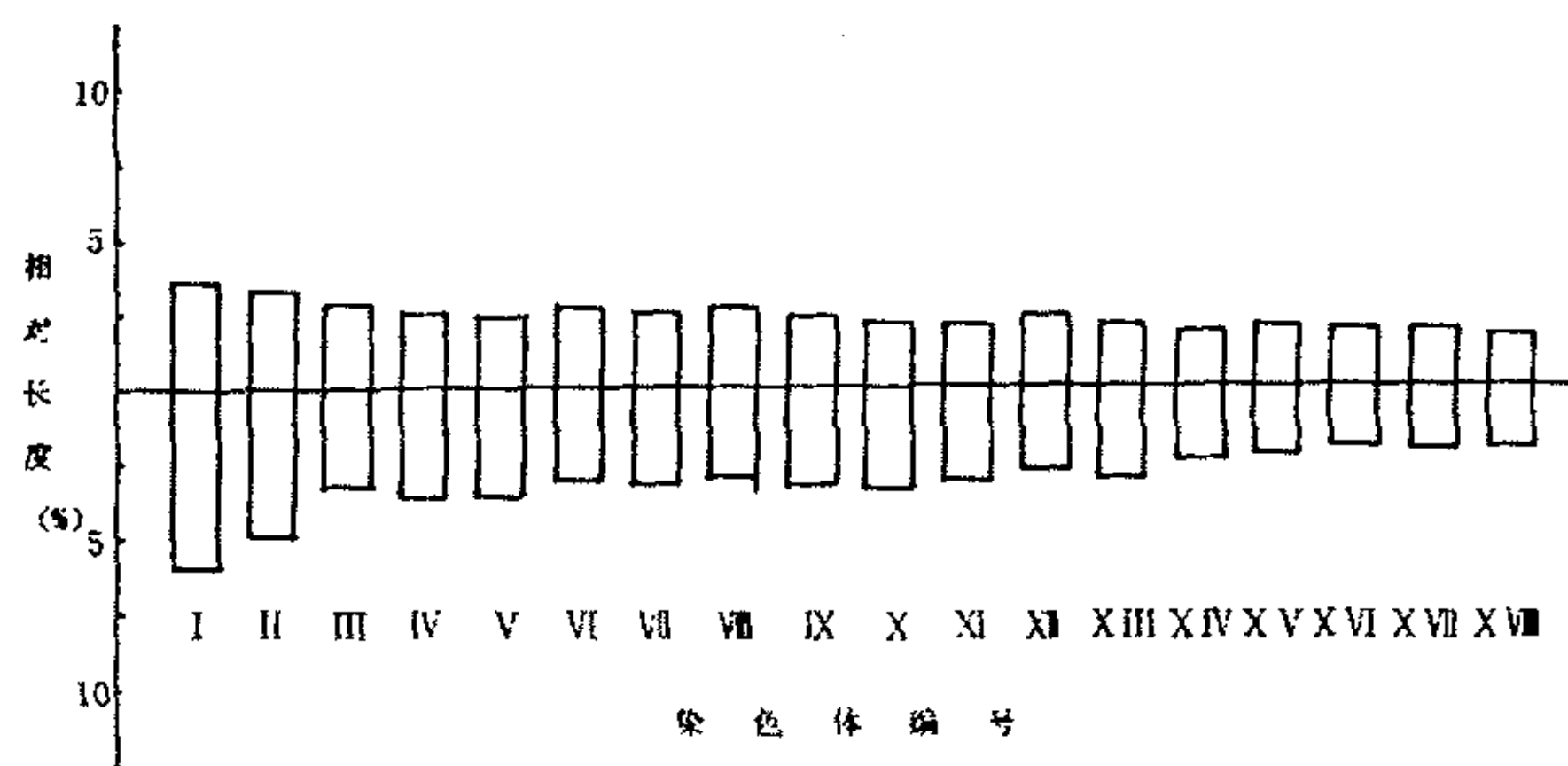
附图 20. 红麻（元江红麻）染色体核型模式图

Supplemental pattern 20. Chromosomal idiogram of Yuanjianghongma



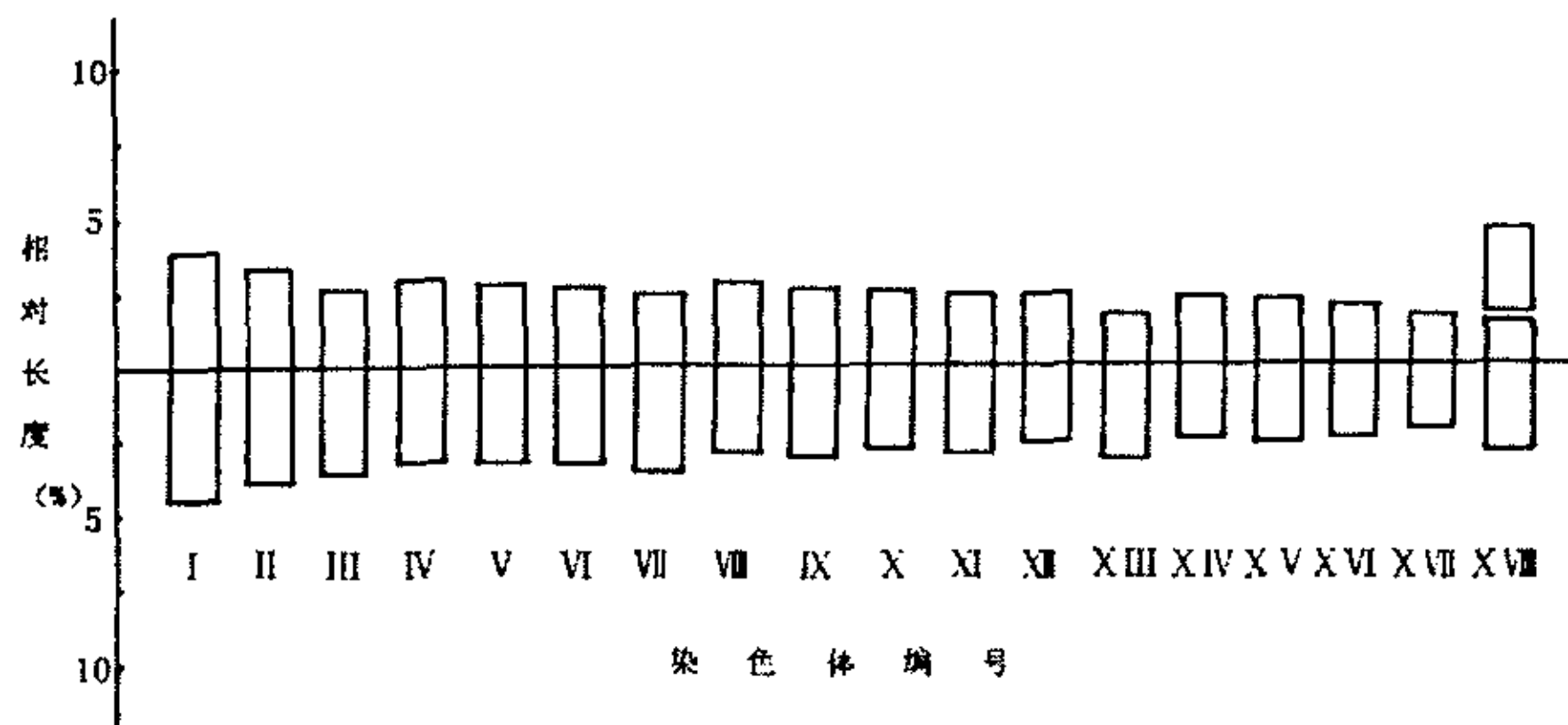
附图 21. 红麻（青皮 3 号）染色体核型模式图

Supplemental pattern 21. Chromosomal idiogram of Qingpisanhao



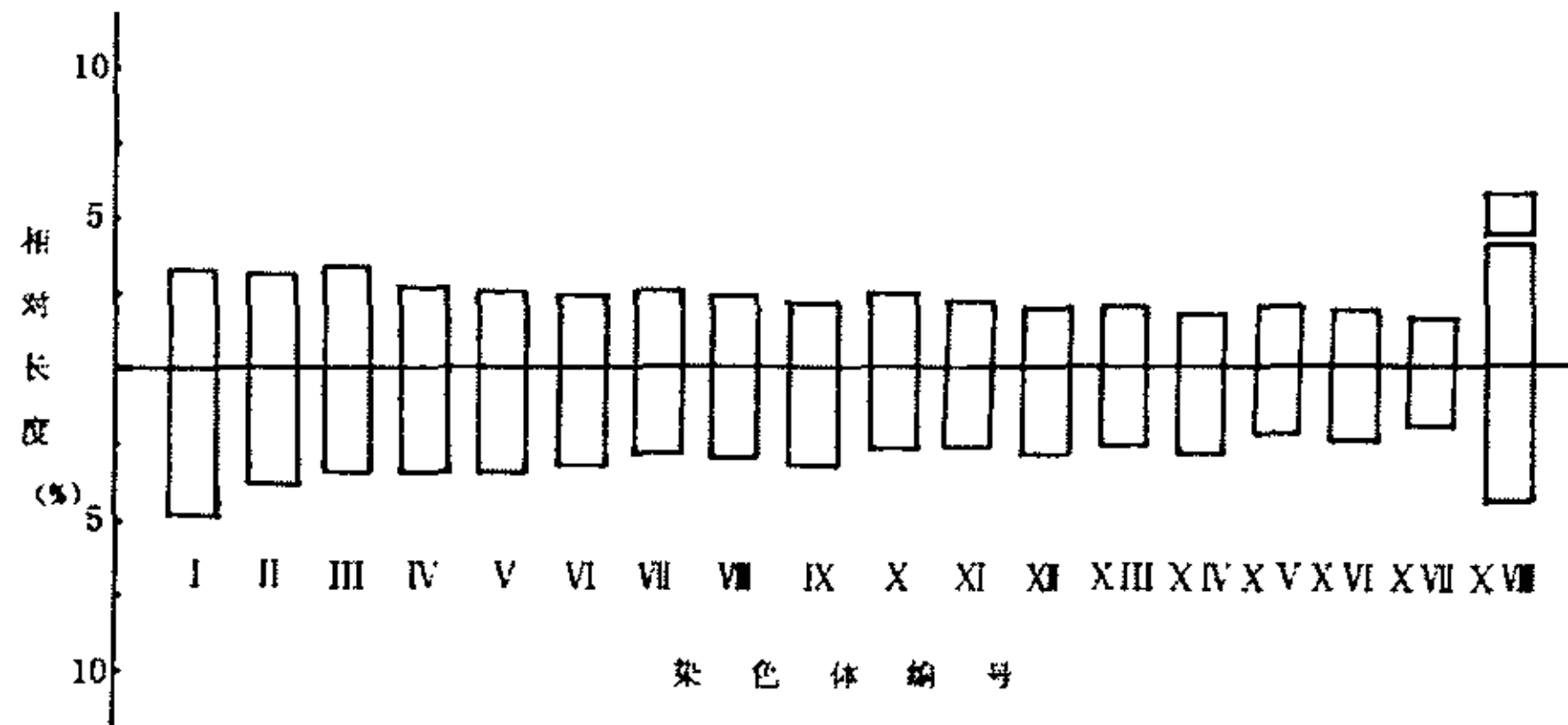
附图 22. 红麻（MX 247）染色体核型模式图

Supplemental pattern 22. Chromosomal idiogram of MX 247



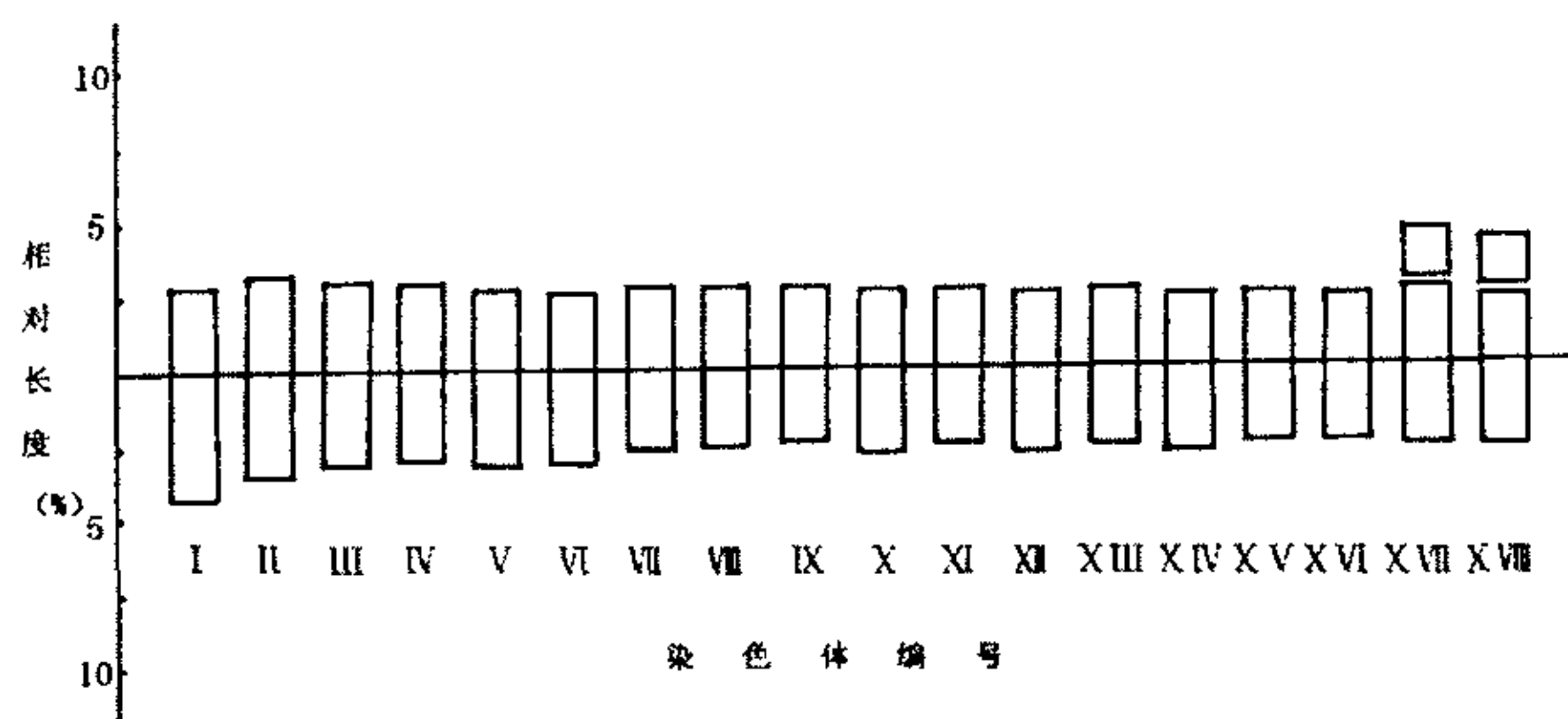
附图 23. 红麻 (NA 414) 染色体核型模式图

Supplemental pattern 23. Chromosomal ideogram of NA 414



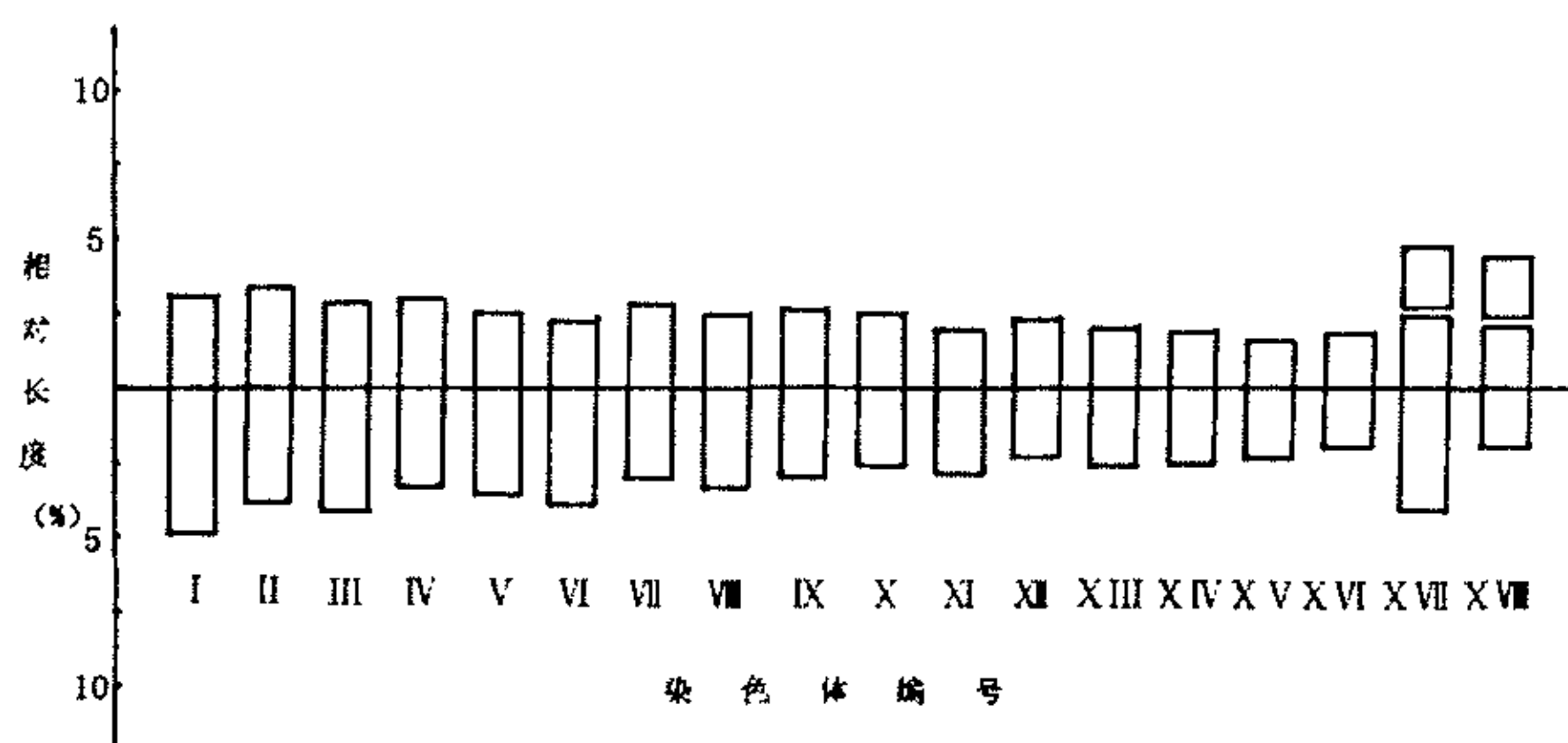
附图 24. 红麻 (红引 135) 染色体核型模式图

Supplemental pattern 24. Chromosomal ideogram of Hongyin135



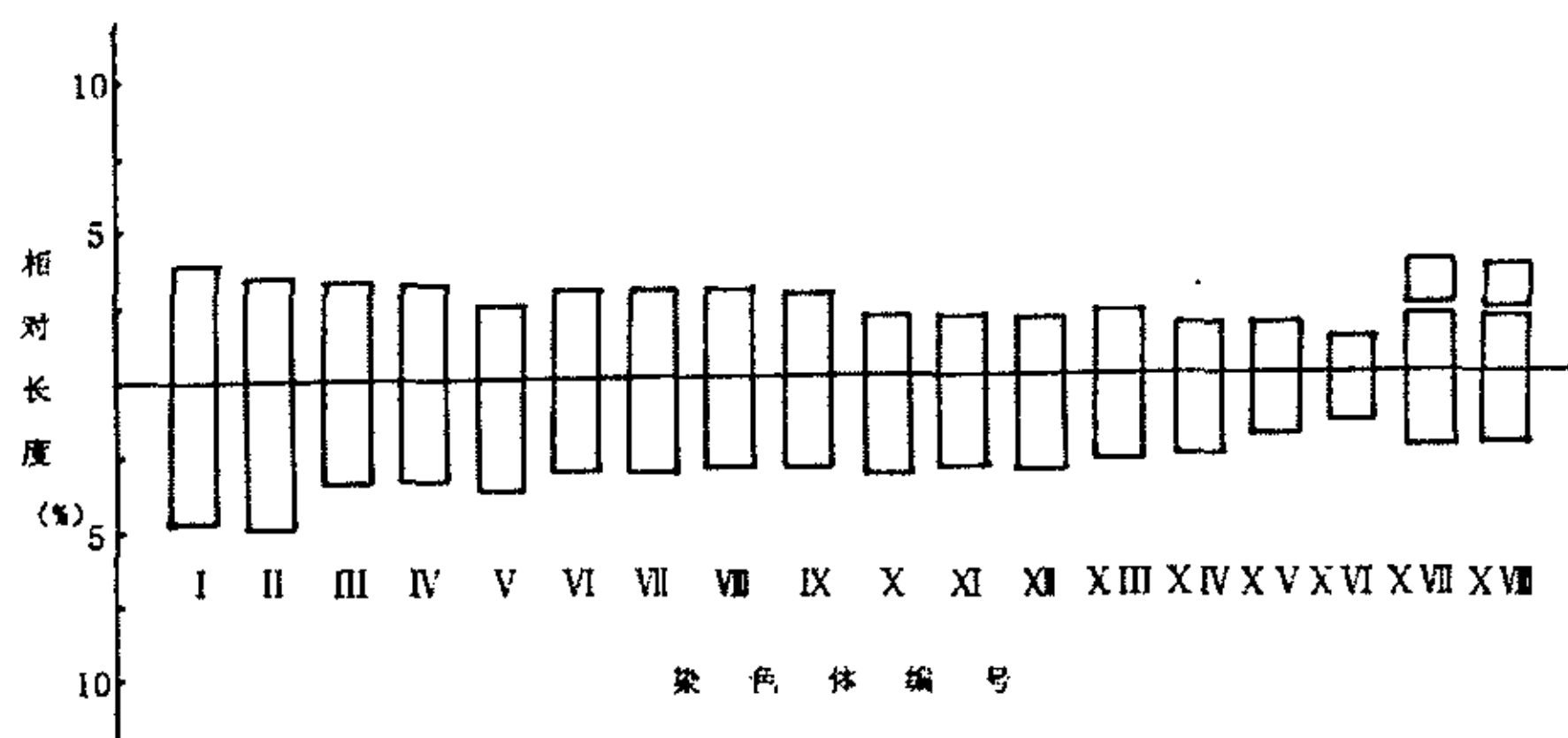
附图 25. 红麻（福红 991）染色体核型模式图

Supplemental pattern 25. Chromosomal ideogram of Fuhong991



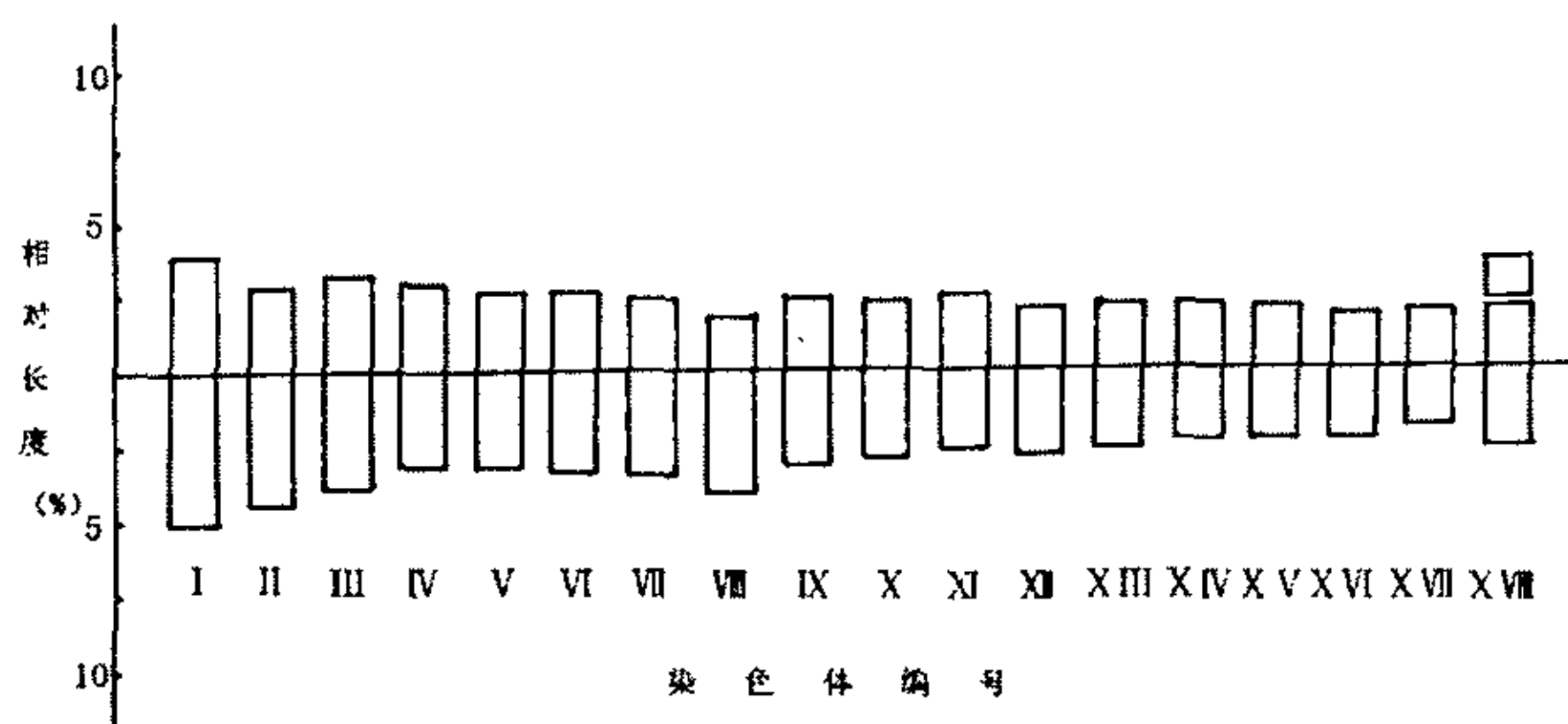
附图 26. 红麻（早熟红麻）染色体核型模式图

Supplemental pattern 26. Chromosomal ideogram of Zaoshuhongma



附图 27. 红麻 (UG 93) 染色体核型模式图

Supplemental pattern 27. Chromosomal ideogram of UG 93



附图 28. 红麻 (古巴 8 号) 染色体核型模式图

Supplemental pattern 28. Chromosomal ideogram of Gubabahao

附表 1. 红麻（阿联）染色体测量数据

Supplemental table 1. Metrical data of Alian's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	2.00	2.40	4.40	7.75	1.20	M	无
II	1.65	2.40	4.05	7.13	1.45	M	无
III	1.70	1.90	3.60	6.34	1.12	M	无
IV	1.55	1.90	3.45	6.07	1.23	M	无
V	1.40	2.00	3.40	6.00	1.43	M	无
VI	1.60	1.60	3.20	5.63	1.00	M	无
VII	1.50	1.60	3.10	5.46	1.07	M	无
VIII	1.45	1.65	3.10	5.46	1.14	M	无
IX	1.50	1.50	3.00	5.28	1.00	M	无
X	1.40	1.60	3.00	5.28	1.14	M	无
XI	1.35	1.65	3.00	5.28	1.22	M	无
XII	1.10	1.90	3.00	5.28	1.73	SM	无
X III	1.35	1.45	2.80	4.93	1.07	M	无
X IV	1.30	1.50	2.80	4.93	1.15	M	无
X V	1.25	1.55	2.80	4.93	1.24	M	无
X VI	1.30	1.40	2.70	4.75	1.08	M	无
X VII	1.00	1.20	2.20	3.87	1.20	M	无
X VIII	1.50	1.70	3.20	5.63	1.13	M	有

染色体总长= $56.8 \mu\text{m}$

附表 2. 红麻（勐海紫茎）染色体测量数据

Supplemental table 2. Metrical data of Menghaizijing's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	2.15	2.55	4.70	9.82	1.19	M	无
II	1.45	1.55	3.00	6.27	1.07	M	无
III	1.35	1.55	2.90	6.06	1.15	M	无
IV	1.20	1.55	2.75	5.75	1.29	M	无
V	1.20	1.45	2.65	5.54	1.21	M	无
VI	1.10	1.50	2.60	5.43	1.36	M	无
VII	1.20	1.35	2.55	5.33	1.13	M	无
VIII	1.10	1.45	2.55	5.33	1.32	M	无
IX	1.15	1.25	2.40	5.02	1.07	M	无
X	1.15	1.20	2.35	4.91	1.04	M	无
XI	1.05	1.30	2.35	4.91	1.24	M	无
XII	1.10	1.20	2.30	4.81	1.09	M	无
XIII	1.05	1.20	2.25	4.70	1.14	M	无
XIV	1.05	1.20	2.25	4.70	1.14	M	无
XV	0.95	1.20	2.15	4.49	1.26	M	无
XVI	0.95	1.10	2.05	4.28	1.16	M	无
XVII	0.85	1.05	1.90	3.97	1.24	M	无
XVIII	2.05	2.10	4.15	8.67	1.02	M	有

染色体总长= 47.85 μm

附表 3. 红麻（7804）染色体测量数据

Supplemental table 3. Metrical data of 7804's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	1.15	1.85	3.00	7.19	1.61	M	无
II	1.00	1.95	2.95	7.07	1.95	SM	无
III	1.20	1.40	2.60	6.23	1.17	M	无
IV	1.10	1.40	2.50	5.99	1.27	M	无
V	1.15	1.25	2.40	5.75	1.09	M	无
VI	1.00	1.40	2.40	5.75	1.40	M	无
VII	1.00	1.20	2.20	5.27	1.20	M	无
VIII	0.90	1.30	2.20	5.27	1.44	M	无
IX	1.05	1.05	2.10	5.03	1.00	M	无
X	0.90	1.20	2.10	5.03	1.33	M	无
XI	0.80	1.30	2.10	5.03	1.63	M	无
XII	1.00	1.00	2.00	4.79	1.00	M	无
XIII	0.95	1.05	2.00	4.79	1.11	M	无
XIV	0.85	1.15	2.00	4.79	1.35	M	无
XV	0.80	1.20	2.00	4.79	1.50	M	无
XVI	0.70	1.30	2.00	4.79	1.88	SM	无
XVII	0.85	1.05	2.90	6.95	1.24	M	有
XVIII	1.00	1.30	2.30	5.51	1.30	M	有

染色体总长= $41.75 \mu\text{m}$

附表 4. 红麻（塔什干）染色体测量数据

Supplemental table 4. Metrical data of Tashengan's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	2.00	2.50	4.50	8.86	1.25	M	无
II	1.40	2.60	4.00	7.87	1.86	SM	无
III	1.60	1.80	3.40	6.69	1.13	M	无
IV	1.40	1.75	3.15	6.20	1.25	M	无
V	1.40	1.60	3.00	5.91	1.14	M	无
VI	1.25	1.70	2.95	5.81	1.36	M	无
VII	1.40	1.40	2.80	5.51	1.00	M	无
VIII	1.30	1.50	2.80	5.51	1.15	M	无
IX	1.30	1.40	2.70	5.31	1.08	M	无
X	1.20	1.40	2.60	5.12	1.17	M	无
XI	1.20	1.30	2.50	4.92	1.08	M	无
XII	1.05	1.45	2.50	4.92	1.38	M	无
XIII	1.10	1.20	2.30	4.53	1.09	M	无
XIV	1.10	1.10	2.20	4.33	1.00	M	无
XV	1.00	1.20	2.20	4.33	1.20	M	无
XVI	0.95	1.25	2.20	4.33	1.32	M	无
XVII	0.90	1.10	2.00	3.94	1.22	M	无
XVIII	1.40	1.60	3.00	5.91	1.14	M	有

染色体总长= $50.8 \mu\text{m}$

附表 5. 红麻（泰红 763）染色体测量数据

Supplemental table 5. Metrical data of Taihong763's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	2.15	2.65	4.80	7.51	1.23	M	无
II	2.10	2.50	4.60	7.20	1.19	M	无
III	1.50	2.80	4.30	6.73	1.87	SM	无
IV	1.70	2.50	4.20	6.57	1.47	M	无
V	1.30	2.90	4.20	6.57	2.23	SM	无
VI	2.00	2.10	4.10	6.42	1.05	M	无
VII	1.60	2.20	3.80	5.95	1.38	M	无
VIII	1.50	2.20	3.70	5.79	1.47	M	无
IX	1.30	2.20	3.50	5.48	1.69	M	无
X	1.30	2.15	3.45	5.40	1.65	M	无
XI	1.40	1.90	3.30	5.16	1.36	M	无
XII	1.10	2.10	3.20	5.01	1.91	SM	无
XIII	1.50	1.60	3.10	4.85	1.07	M	无
XIV	1.30	1.80	3.10	4.85	1.38	M	无
XV	1.30	1.65	2.95	4.62	1.27	M	无
XVI	1.30	1.40	2.70	4.22	1.08	M	无
XVII	1.10	1.50	2.60	4.07	1.36	M	无
XVIII	1.10	1.20	2.30	3.60	1.09	M	无

染色体总长= $63.9 \mu\text{m}$

附表 6. 红麻（元江红麻）染色体测量数据

Supplemental table 6. Metrical data of Yuanjianghongma's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	2.00	2.50	4.50	6.41	1.25	M	无
II	2.10	2.30	4.40	6.27	1.10	M	无
III	2.00	2.30	4.30	6.13	1.15	M	无
IV	1.80	2.40	4.20	5.98	1.33	M	无
V	1.85	2.30	4.15	5.91	1.24	M	无
VI	1.75	2.35	4.10	5.84	1.34	M	无
VII	1.80	2.20	4.00	5.70	1.22	M	无
VIII	1.70	2.30	4.00	5.70	1.35	M	无
IX	1.40	2.60	4.00	5.70	1.86	SM	无
X	1.60	2.30	3.90	5.56	1.44	M	无
XI	1.90	1.90	3.80	5.49	1.00	M	无
XII	1.75	2.05	3.80	5.49	1.17	M	无
XIII	1.70	1.90	3.60	5.13	1.12	M	无
XIV	1.40	2.20	3.60	5.13	1.57	M	无
XV	1.70	1.80	3.50	5.00	1.06	M	无
XVI	1.60	1.70	3.30	4.70	1.06	M	无
XVII	1.50	1.55	3.05	4.34	1.03	M	无
XVIII	1.90	2.10	4.00	5.70	1.11	M	有

染色体总长= 70.2 μm

附表 7. 红麻（青皮 3 号）染色体测量数据

Supplemental table 7. Metrical data of Qingpisanhao's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	3.20	3.60	6.80	7.73	1.13	M	无
II	2.70	3.20	5.90	6.71	1.19	M	无
III	2.70	3.10	5.80	6.59	1.15	M	无
IV	2.70	2.90	5.60	6.37	1.07	M	无
V	2.40	2.80	5.20	5.91	1.17	M	无
VI	2.50	2.60	5.10	5.80	1.04	M	无
VII	2.35	2.75	5.10	5.80	1.17	M	无
VIII	2.40	2.60	5.00	5.69	1.08	M	无
IX	1.90	3.10	5.00	5.69	1.63	M	无
X	1.80	3.20	5.00	5.69	1.78	SM	无
XI	2.20	2.70	4.90	5.57	1.23	M	无
XII	2.20	2.60	4.80	5.46	1.18	M	无
XIII	1.60	2.90	4.50	5.12	1.81	SM	无
XIV	1.60	2.50	4.10	4.66	1.56	M	无
XV	1.55	2.45	4.00	4.55	1.58	M	无
XVI	1.40	2.60	4.00	4.55	1.86	SM	无
XVII	1.45	1.70	3.15	3.58	1.17	M	无
XVIII	1.30	2.70	4.00	4.55	2.08	SM	有

染色体总长= 87.95 μm

附表 8. 红麻 (MX 247) 染色体测量数据

Supplemental table 8. Metrical data of MX 247's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	2.40	4.00	6.40	9.52	1.67	M	无
II	2.20	3.30	5.50	8.18	1.50	M	无
III	1.90	2.20	4.10	6.10	1.16	M	无
IV	1.70	2.40	4.10	6.10	1.41	M	无
V	1.60	2.40	4.00	6.10	1.5	M	无
VI	1.80	2.10	3.90	5.80	1.17	M	无
VII	1.70	2.20	3.90	5.80	1.29	M	无
VIII	1.80	2.00	3.80	5.65	1.11	M	无
IX	1.60	2.20	3.80	5.65	1.38	M	无
X	1.45	2.25	3.70	5.50	1.55	M	无
XI	1.35	2.15	3.50	5.20	1.59	M	无
XII	1.55	1.85	3.40	5.06	1.19	M	无
XIII	1.35	2.05	3.40	5.06	1.52	M	无
XIV	1.25	1.65	2.90	4.31	1.32	M	无
XV	1.20	1.70	2.90	4.31	1.17	M	无
XVI	1.30	1.40	2.70	4.01	1.08	M	无
XVII	1.25	1.45	2.70	4.01	1.16	M	无
XVIII	1.15	1.45	2.60	3.87	1.26	M	无

染色体总长= 67.25 μm

附表 9. 红麻 (NA 414) 染色体测量数据

Supplemental table 9. Metrical data of NA 414's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	3.20	3.80	7.00	8.35	1.19	M	无
II	2.80	3.30	6.10	7.27	1.18	M	无
III	2.20	3.00	5.20	6.20	1.36	M	无
IV	2.40	2.70	5.10	6.08	1.13	M	无
V	2.30	2.70	5.00	5.96	1.17	M	无
VI	2.25	2.75	5.00	5.96	1.22	M	无
VII	2.00	3.00	5.00	5.96	1.50	M	无
VIII	2.30	2.50	4.80	5.72	1.09	M	无
IX	2.10	2.60	4.70	5.61	1.24	M	无
X	2.10	2.40	4.50	5.37	1.14	M	无
XI	2.00	2.50	4.50	5.37	1.25	M	无
XII	2.00	2.20	4.20	5.01	1.10	M	无
XIII	1.40	2.70	4.10	4.89	1.93	SM	无
XIV	1.90	2.10	4.00	4.77	1.11	M	无
XV	1.80	2.20	4.00	4.77	1.22	M	无
XVI	1.70	2.10	3.80	4.53	1.24	M	无
XVII	1.45	1.80	3.25	3.88	1.24	M	无
XVIII	1.15	2.45	3.60	4.29	2.13	SM	有

染色体总长= 83.85 μm

附表 10. 红麻（红引 135）染色体测量数据

Supplemental table 10. Metrical data of Hongyin135's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	2.00	2.90	4.90	8.11	1.45	M	无
II	1.85	2.35	4.20	6.95	1.27	M	无
III	2.00	2.10	4.10	6.79	1.05	M	无
IV	1.15	1.55	3.70	6.13	1.35	M	无
V	1.50	2.10	3.60	5.96	1.40	M	无
VI	1.45	1.95	3.40	5.63	1.34	M	无
VII	1.50	1.70	3.20	5.30	1.13	M	无
VIII	1.40	1.80	3.20	5.30	1.29	M	无
IX	1.25	1.95	3.20	5.30	1.56	M	无
X	1.45	1.65	3.10	5.13	1.14	M	无
XI	1.30	1.60	2.90	4.80	1.23	M	无
XII	1.15	1.75	2.90	4.80	1.52	M	无
XIII	1.20	1.60	2.80	4.64	1.33	M	无
XIV	1.05	1.75	2.80	4.64	1.67	M	无
XV	1.70	1.90	2.60	4.30	1.12	M	无
XVI	1.10	1.50	2.60	4.30	1.36	M	无
XVII	0.90	1.20	2.10	3.48	1.33	M	无
XVIII	2.40	2.70	5.10	8.44	1.13	M	有

染色体总长= 60.4 μm

附表 11. 红麻（福红 991）染色体测量数据

Supplemental table 11. Metrical data of Fuhong991's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	1.60	2.40	4.00	7.10	1.50	M	无
II	1.80	2.00	3.80	6.75	1.11	M	无
III	1.65	1.80	3.45	6.13	1.09	M	无
IV	1.65	1.70	3.35	5.95	1.03	M	无
V	1.50	1.80	3.30	5.86	1.20	M	无
VI	1.40	1.80	3.20	5.68	1.29	M	无
VII	1.50	1.55	3.05	5.42	1.03	M	无
VIII	1.50	1.50	3.00	5.33	1.00	M	无
IX	1.45	1.55	3.00	5.33	1.07	M	无
X	1.40	1.60	3.00	5.33	1.14	M	无
XI	1.45	1.50	2.95	5.24	1.03	M	无
XII	1.35	1.60	2.95	5.24	1.19	M	无
XIII	1.40	1.50	2.90	5.15	1.07	M	无
XIV	1.30	1.60	2.90	5.15	1.23	M	无
XV	1.35	1.50	2.85	5.06	1.11	M	无
XVI	1.30	1.50	2.80	4.97	1.15	M	无
XVII	1.40	1.60	3.00	5.33	1.14	M	有
XVIII	1.20	1.60	2.80	4.97	1.33	M	有

染色体总长= 56.3 μm

附表 12. 红麻（早熟红麻）染色体测量数据

Supplemental table 12. Metrical data of Zaoshuhongma's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	1.55	2.45	4.00	8.09	1.58	M	无
II	1.70	1.90	3.60	7.28	1.12	M	无
III	1.40	2.00	3.40	6.88	1.43	M	无
IV	1.50	1.60	3.10	6.27	1.07	M	无
V	1.25	1.75	3.00	6.07	1.40	M	无
VI	1.10	1.90	3.00	6.07	1.73	SM	无
VII	1.40	1.50	2.90	5.86	1.07	M	无
VIII	1.25	1.65	2.90	5.86	1.32	M	无
IX	1.30	1.50	2.80	5.66	1.15	M	无
X	1.20	1.30	2.50	5.06	1.08	M	无
XI	0.95	1.45	2.40	4.85	1.53	M	无
XII	1.10	1.20	2.30	4.65	1.09	M	无
XIII	1.00	1.30	2.30	4.65	1.30	M	无
XIV	0.85	1.30	2.15	4.35	1.53	M	无
XV	0.80	1.20	2.00	4.04	1.50	M	无
XVI	0.90	1.00	1.90	3.84	1.11	M	无
XVII	1.20	2.00	3.20	6.47	1.67	M	有
XVIII	1.00	1.00	2.00	4.04	1.00	M	有

染色体总长= 49.45 μm

附表 13. 红麻 (UG 93) 染色体测量数据

Supplemental table 13. Metrical data of UG93's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	2.55	3.15	5.70	8.55	1.23	M	无
II	2.25	3.30	5.55	8.32	1.47	M	无
III	2.15	2.35	4.50	6.75	1.09	M	无
IV	2.10	2.25	4.35	6.52	1.07	M	无
V	1.60	2.50	4.10	6.15	1.56	M	无
VI	1.95	2.05	4.00	6.00	1.05	M	无
VII	1.95	2.05	4.00	6.00	1.05	M	无
VIII	1.90	2.00	3.90	5.85	1.05	M	无
IX	1.85	2.05	3.90	5.85	1.11	M	无
X	1.35	2.15	3.50	5.25	1.59	M	无
XI	1.30	2.10	3.40	5.10	1.62	SM	无
XII	1.25	2.15	3.40	5.10	1.72	M	无
XIII	1.40	1.90	3.30	4.95	1.36	M	无
XIV	1.10	1.85	2.95	4.42	1.68	M	无
XV	1.15	1.40	2.55	3.82	1.22	M	无
XVI	0.75	1.10	1.85	2.77	1.47	M	无
XVII	1.30	1.65	2.95	4.42	1.27	M	有
XVIII	1.25	1.55	2.80	4.20	1.24	M	有

染色体总长= $66.7 \mu\text{m}$

附表 14. 红麻（古巴 8 号）染色体测量数据

Supplemental table 14. Metrical data of Gubabahao's chromosomes

染色体 编 号	染 色 体 长 度			相对长度 (%)	臂 比 (X : 1)	着丝粒 位 置	随体
	(μ m)						
	短臂	长臂	总长				
I	2.70	3.50	6.20	9.05	1.30	M	无
II	1.90	3.10	5.00	7.30	1.63	M	无
III	2.15	2.65	4.80	7.01	1.23	M	无
IV	2.00	2.20	4.20	6.13	1.10	M	无
V	1.80	2.20	4.00	5.84	1.22	M	无
VI	1.75	2.25	4.00	5.84	1.29	M	无
VII	1.65	2.35	4.00	5.84	1.42	M	无
VIII	1.20	2.80	4.00	5.84	2.33	SM	无
IX	1.65	2.15	3.80	5.55	1.30	M	无
X	1.55	2.05	3.60	5.26	1.32	M	无
XI	1.70	1.80	3.50	5.11	1.06	M	无
XII	1.40	2.00	3.40	4.96	1.43	M	无
XIII	1.45	1.85	3.30	4.82	1.28	M	无
XIV	1.50	1.70	3.20	4.67	1.13	M	无
XV	1.35	1.65	3.00	4.38	1.22	M	无
XVI	1.15	1.65	2.80	4.09	1.43	M	无
XVII	1.25	1.35	2.60	3.80	1.08	M	无
XVIII	1.35	1.75	3.10	4.53	1.30	M	有

染色体总长= 68.50 μ m

致 谢

本文是在导师周立人教授、李爱青研究员和曹德菊副教授的悉心指导下完成的。三位导师在论文的选题立项、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。尤其是周立人老师对我的成长倾注了大量的心血,使我在业务能力和科研素质等方面有了很大提高。导师们渊博的学识、严谨的治学态度、为人师表的高尚风范和对科学的执着追求精神影响并激励着我,对学生的谆谆教诲将使我受益匪浅,终生难忘。值论文成稿之际,向三位导师致以由衷的感谢。

在学习过程中,安徽农业大学农学系、生命科学学院领导和校研究生处的老师们给予了我周到的照顾和大力的支持,在此一并致谢。

本试验所用红麻材料均由中国农业科学院麻类研究所提供,在此向粟建光研究员致以谢意。

在论文实验和撰写过程中,得到了许多老师和同学的热情关怀和帮助,在此,谨向江昌俊、李展、项艳、陶珍、李培金、李纯、郭宁、朱苏文、田秋元、徐明照、李兴林、司红起等老师和黄兴峰、杨朝柱、常成、檀琮萍、丁勇、张水明、赵海军、屈海勇、韩国民、蒋培东、任冲、徐伟等同学致以衷心地感谢。同时,向黄训端师兄在核型分析等方面的大力协助表示诚挚的谢意。

三年来,父亲和家人给予了我无私的关爱、支持和鼓励,在此对他们表示深深的谢意。

最后,再次向导师们以及许许多多关心我的家人、老师和朋友们表示衷心的感谢和真诚的祝福。

作者简介

唐晓敏，女，1978年12月出生于安徽省安庆市。1996~2000年就读于安徽农业大学园艺系，2000年考入安徽农业大学作物遗传育种专业攻读硕士学位，研究方向为植物的细胞与分子育种。在读期间参与发表和拟发的学术论文有：

1. “红麻不同基因型遗传差异的 RAPD 分析”，拟发《中国麻作》
2. “红麻种子基因组 DNA 提取的方法研究”，拟发《中国麻作》
3. “红麻不同类型品种的核型分析比较研究”，拟发《安徽农业大学学报》
4. “红麻种质资源研究综述”，拟发《安徽农业大学学报》
5. “猕猴桃园套种魔芋的实验研究”，2002年第2期《安徽农业科学》
6. “南淝河水体诱变物污染的植物微核监测”，2002年第5期《安徽农业科学》