

独创性声明

本人声明，所提交的学位（毕业）论文，是本人在指导教师的指导下独立完成的研究成果，并且是自己撰写的。尽我所知，除了文中作了标注和致谢中已作了答谢的地方外，论文中不包含其他人发表或撰写过的研究成果。与我一同对本研究做出贡献的同志，都在论文中作了明确的说明并表示了谢意，如被查有侵犯他人知识产权的行为，由本人承担应有的责任。

学位（毕业）论文作者亲笔签名：王 晓 飞 日期：2006年6月12日

论文使用授权的说明

本人完全了解福建农林大学有关保留、使用学位（毕业）论文的规定，即学校有权送交论文的复印件，允许论文被查阅和借阅；学校可以公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。

保密，在 年后解密可适用本授权书。

不保密，本论文属于不保密。

学位（毕业）论文作者亲笔签名：王 晓 飞 日期：2006年6月12日

指导教师亲笔签名： 日期：2006年6月12日

摘 要

红麻是麻纺与造纸重要的纤维原料作物。为深化红麻种质资源研究,本研究以从国内外引进的 84 份红麻野生种和栽培品种为材料,在完成红麻供试材料 DNA 提取的基础上,对 84 份材料进行了 SRAP 分子标记,用筛选出的多态性较好的 26 对 SRAP 引物对其进行 PCR 扩增和标记分析。按 Nei-li 的方法计算其相似系数分别对包括野生种和栽培种在内的 84 份材料和 69 份栽培品种材料进行分子聚类分析;并利用 74 份栽培品种的 10 个产量与品质性状进行主成分分析和系统聚类分析。结果表明:

(1) 在 74 份红麻栽培品种 10 个产量与品质性状主成分分析结果表明:前 4 个主成分第一主成分为韧皮纤维产量构成因子,贡献率为 52.68%;第二主成分为茎秆皮骨比构成因子,贡献率为 12.96%;第三主成分为纤维品质构成因子,贡献率为 10.77%;第四主成分为晒干率构成因子,贡献率为 9.18%。其累计贡献率达 86.07%,均有互为独立的性状构成因子。其主成分构成因素合理,能够较客观地揭示红麻核心种质主成分构成向量特性及其相对重要性。

(2) 在欧氏距离聚类图中,当取值 $D = 25.18$ 切线 L_1 时可把上述 74 份栽培品种分成 2 类,即由 58 个品种组成 1 个大类群和散布构成的个类群体。当取值 $D = 20.08$ 时切线,聚在同一个大类群的 58 个品种可分成 10 类,即由 32 个品种聚成的一个大类群、由 12 个品种组成的一个中类群、由 3 个品种组成的 3 个小类群,以及由 ZB90、Bg52-1、福红 6 号、85-135 和粤引 4 号 5 个单一品种自成体系的个类。

(3) 对 84 份供试材料提取的基因组 DNA,筛选出多态性好的 26 对 SRAP 引物共扩增出 329 条带,多态条带计 248 条,多态条带比率 (PPB) 为 75.4%。

(4) 从 84 份红麻材料 SRAP 数据构建的分子树状图可知,在切割线 L_1 取值为 8.5 时可将供试材料中的野生种与半野生种和栽培品种完全分开。说明野生种与半野生种和栽培品种的亲缘关系较远,它们的基因型明显有别于半野生种和栽培品种;揭示了野生种与半野生种和栽培品种之间的基因型遗传差异较大。而在栽培品种的不同类群中,也存在一定的遗传差异。

(5) 从 69 份红麻材料 SRAP 数据构建的树状图可知,国内选育的多数供试材料之间的基因型遗传差异较小,其遗传基础相对狭窄,应通过种质创新拓展红麻的遗传基础。研究还表明,利用类群间的遗传差异性选配杂交亲本,能比较快地选育出基因互补的优良新品种;SRAP 分子标记可提供供试品种遗传多样性和亲缘关系等有价值的生物学信息。

本研究还对红麻 DNA 提取质量、红麻遗传多样性和亲缘关系等作了讨论。

关键词:红麻;遗传多样性;SRAP;聚类分析;亲缘关系

Abstract

Kenaf is an important fiber crop for textile industry and paper manufacture. The genetic diversity and relationships of 84 representative kenaf varieties from here and abroad, was evaluated according to SRAP markers in which genomic DNAs were amplified with 26 SRAP primers. The 84 kenaf varieties were clustered into different groups according to the similarity coefficient (Nei-li), which represented the genetic relationship of different varieties. Principal components(PC) of ten yield and quality characters in 74 kenaf varieties were analysed. The main results showed as follows:

(1) The results of the Principal components(PC) of ten yield and quality characters in 74 kenaf varieties are as follow: the first four PCs, which might be regarded as fiber yield component factor(52.68%), fiber and stem weight proportion factor(10.77%), fiber quality factor(10.77%) and fiber and stem weight proportion factor(9.18%).The cumulative contribution of the four factors was 86.07% among the varieties.

(2) At the level of $D=25.18$, all varieties were clustered into one major group and several single-variety groups. At the level of $D=20.08$, the major group was clustered into one large group which include 32 varieties, 4 small groups and 5 single-variety groups (ZB90、Bg52-1、Fuhong 6、85-135 and Yueyin 4).

(3) 329 DNA bands were amplified with 26 SRAP primers, of which 248 (75.4%) were polymorphic .

(4) From the UPGMA cluster based on the genetic similarity (GS) , at the level of 8.5, wild species, semi-wild species and cultivating-varieties were established from the 84 kinds of kenaf varieties respectively. The result showed that wild species have distant relationship from semi-wild species and cultivating-varieties and their genotypes are quite different with the latter. There is certain genetic differences among different groups of cultivating-varieties. In order to breed new Kenaf varieties, hybridizing parents which have distant relationship should be chose.

(5) From the UPGMA cluster based on the genetic similarity (GS) , the study indicated that the genetic difference among the kenaf varieties in China was small comparatively , which can be improved through germplasm innovation. Using the genetic difference to choose hybridizing parents with germplasm renewed to each other could breed new Kenaf varieties faster than traditional method. SRAP markers

can provide abundant polymorphism information at molecular level, which is a valid way to study genetic diversity and relationship of kenaf species.

The issues of DNA extraction quality in Kenaf, genetic diversities and genetic relationships among 84 Kenaf varieties were also discussed in the paper.

Key words: kenaf; SRAP; genetic diversity ; cluster analysis; relationship

目录

└─┬独创性声明及论文使用授权的说明

└─┬摘要

└─┬英文摘要

└─┬1 前言

└─┬┬1.1 红麻生产概况及其综合利用的研究进展

└─┬┬┬1.1.1 红麻生产的重要性

└─┬┬┬1.1.2 麻综合利用的重要性

└─┬┬┬1.1.3 红麻的生态环保作用

└─┬┬┬1.1.4 麻的饲用价值

└─┬┬┬1.1.5 红麻种子中不饱和脂肪酸等物质的医疗保健功能

└─┬┬┬1.1.6 红麻全秆抄制纸浆的研发

└─┬┬┬1.1.7 红麻纤维高档纺织品的开发

└─┬┬┬1.1.8 红麻纤维的工业与建材利用

└─┬┬┬1.2 红麻种质资源研究进展

└─┬┬┬┬1.2.1 红麻种质资源的收集与保存

└─┬┬┬┬1.2.2 红麻种质资源的形态与细胞学分类研究

└─┬┬┬┬1.2.3 红麻种质资源性状鉴定与评价研究

└─┬┬┬┬1.2.4 红麻特异种质的鉴定、发掘、创新与利用研究

└─┬┬┬┬1.2.5 红麻种质资源的分子标记及亲缘关系研究

└─┬┬┬┬1.2.6 红麻特异种质创新与抗虫、抗除草剂转基因研究

└─┬┬┬┬1.2.7 红麻种质遗传改良优异材料的创新

└─┬┬┬┬1.2.8 国外红麻种质资源研究进展

└─┬┬┬┬1.3 分子标记及其应用

└─┬┬┬┬┬1.3.1 RAPD

└─┬┬┬┬┬1.3.2 RFLP

└─┬┬┬┬┬1.3.3 AFLP

└─┬┬┬┬┬1.3.4 SSR

└─┬┬┬┬┬1.3.5 ISSR

└─┬┬┬┬┬1.3.6 SNP

└─┬┬┬┬┬1.3.7 SRAP

└─┬┬┬┬┬1.3.8 SRAP 与其它分子标记的比较

└─┬2 材料与方法

└─┬┬2.1 材料

└─┬┬┬2.1.1 植物实验材料

└─┬┬┬2.1.2 SRAP 引物

└─┬┬2.2 方法

└─┬┬┬2.2.1 实验设计与统计方法

└─┬┬┬2.2.2 实验的技术路线

└─┬┬┬2.2.3 红麻基因组 DNA 的提取

└─┬┬┬2.2.4 红麻基因组 DNA 的纯化

└─┬┬┬2.2.3 SRAP 反应体系的建立

2.2.5	SRAP 反应程序
2.2.6	SRAP 引物组合筛选
2.2.7	电泳检测
2.2.8	数据处理与统计分析
3	结果与分析
3.1	遗传多样性分析及品种综合评价
3.1.1	主成分分析
3.1.2	主成分二维分析
3.1.3	聚类分析
3.2	红麻品种 SRAP 标记聚类分析
3.2.1	对 84 个材料的 SRAP 标记聚类分析
3.2.2	对 69 个材料的 SRAP 标记聚类分析
4	小结与讨论
4.1	关于红麻优异种质的主成分及系统聚类分析与评价
4.1.1	优异种质资源性状主成分分析与优异品种评价
4.1.2	系统聚类分析
4.2	关于红麻优异种质的遗传多样性与亲缘关系 SRAP 分子标记研究
4.2.1	供试红麻材料的数量对研究结果的影响
4.2.2	红麻 DNA 提取质量对 SRAP 的影响
4.2.3	不同引物对 SRAP 分子标记的影响
4.2.4	关于 SRAP 分子标记的稳定性与多态性
4.2.5	SRAP 分子标记在红麻种质资源研究中应用的可行性
4.2.6	红麻优异种质遗传多样性与亲缘关系
	参考文献
	附录
	致谢

1 前言

1.1 红麻生产概况及其综合利用的研究进展

1.1.1 红麻生产的重要性

红麻 (*Hibiscus cannabinus* L., Kenaf) 属锦葵科木槿属, 又称槿麻, 是一年生草本韧皮纤维植物, 生长期约 4-6 个月, 在世界上分布范围广, 热带、亚热带、温带和寒带均有种植。在非洲各地普遍有野生红麻散布, 亚洲也发现有野生或半野生状态的红麻, 根据前人的研究, 推断其原产于非洲或东南亚^[1-3]。红麻具有生长速度快、抗逆性强、适应性广等特点; 红麻纤维具有强力大、吸湿性好、散失水分快和耐腐蚀等特点, 有很重要的利用价值^[4]。红麻纤维传统用途主要是用于麻线、麻绳、麻袋、麻布等产品。我国红麻栽培从 1908 年自印度引入马达拉斯红麻品种试种开始, 迄今有近一百年的历史, 常年种植面积在 33 万公顷左右, 总产量仅次于印度和孟加拉, 居世界第三位, 单产居世界首位^[5]。由于红麻具有生长速度快、适应性广、耐旱、耐盐碱、纤维产量高、纤维品质优良等特性, 二十世纪 80 年代以来几乎取代黄麻, 成为我国栽培面积最大, 单产和总产最高的麻类作物^[1, 2]。

红麻的适应性很强, 在我国南部、长江流域、黄淮地区和我国西部地区种植均有很好的产量表现。以红麻作为替代作物不仅可以增加农民收入, 而且在综合利用和深加工方面可发挥极大的经济和社会效益。由于其巨大的发展潜力, 及其优良的生长特性和抗逆性, 被视为二十一世纪潜在的优势作物, 它在我国农业结构调整中, 将发挥重要的作用^[6]。

1.1.2 红麻综合利用的重要性

长期以来森林资源的大量砍伐, 导致生态环境破坏的加剧, 成为可持续发展的制约因素。红麻是一年生作物, 生育期只有几个月; 其巨大的生物产量 (为松木的 3-5 倍), 极强的二氧化碳吸收能力 (为树木的 4 倍) 以及抄制纸浆可与针叶林相媲美的优良品质。在日本、美国等发达国家, 红麻被看作是二十一世纪优势作物, 并多用途开发利用方面进行系统研究和应用, 涉及到麻纺、造纸、装饰材料、板材、动物饲料、可降解地膜、食用、药用等许多领域^[7]。

1.1.3 红麻的生态环保作用

由于红麻抗风、耐盐碱、抗干旱、耐洪涝能力强，生长速度比一般植物快的多，红麻在种植过程中本身就有环保作用，单位面积上红麻比一般的林木吸收CO₂多2-3倍，呼出氧气是一般林木的5-6倍，有显著的制氧功能和净化空气作用，对改善气候环境极为有利。红麻活植株还有净化污水、除去有害成分的功能。红麻根入土较深，可达到增深并保护耕作层的目的^[8]。因此，调整农业结构，发展红麻生产，满足人类对自然纤维的需求，对维护生态平衡具有广阔前景和重要的社会经济意义。

1.1.4 红麻的饲用价值

红麻嫩梢、嫩叶富含营养，其叶片蛋白质含量达30%—40%^[9]。又据刘娇（2002）报道，红麻叶粉中含粗蛋白15.7%，粗脂肪8.1%，粗纤维15.1%，无氮浸出物38.5%，灰分9.1%，柠檬酸9%—11%，是家畜的好饲料^[10]。红麻油饼含粗蛋白24%，粗脂肪9.3%，粗纤维20%，可与其它饲料混喂，效果良好。麻杆芯主要成分为纤维素和木质素，经粉碎加工后是多种圈养动物精饲料中粗纤维和粗蛋白的很好替代物，能帮助动物对饲料其他成分的消化和吸收。麻芯色泽好、体积小、浮力大，也是水产养殖饲料的较好添加剂。麻杆芯色白质软，碎片吸湿性高，透气性好，用于铺垫动物窝圈，对家养宠物或是对垫草过敏的马匹尤为适用。麻杆芯做为动物窝的铺垫材料在国外销售前景看好。而且可二次利用于花卉和蔬菜栽培，也是很好的堆肥原料^[11]。

1.1.5 红麻种子中不饱和脂肪酸等物质的医疗保健功能

红麻种子含油分20%-25%，可食用；其中亚油酸含量为25%-52%，油酸含量在25%左右^[12]。油酸、亚油酸、亚麻酸是人体必需的脂肪酸。红麻种子富含亚油酸，其共轭亚油酸具有抗癌、抗粥样动脉硬化、抑制脂肪积累、防治糖尿病等特殊功能。由于人体不能自然合成亚油酸和亚麻酸，因此必须经外界进食补充；而红麻种子中这两种物质的含量较高，加工后可满足人体健康的需要。因此红麻种子亚油酸在医疗保健品研发上引起药理学家、营养学家和油脂化学家的广泛兴趣。日本琉球大学从红麻种子中提取水溶性多糖，然后混入食物中喂食老鼠，结果发现混入1%红麻种子水溶性多糖的处理与对照相比可大幅度降低老鼠的无益胆固醇含量，而有益的胆固醇含量保持稳定，认为红麻种子的水溶性多糖可有效预防动脉硬化。

1.1.6 红麻全杆抄制纸浆的研发

早在 20 世纪 50-70 年代以美国为首，就对 500 多种非木材植物进行了研究筛选和制浆造纸试验，筛选出几种有希望的植物，作为造纸原料以补充木材之不足，红麻就是其中最具有前途的最适于替代木浆的优质非木材造纸原料作物之一。由于红麻浆可替代木浆，从而节约木材，同时红麻韧皮纤维细胞长，而木材木质部纤维细胞短，因此红麻浆与木浆混合能提高纸制品的拉力及产品质量。利用红麻全秆抄制红麻纸浆，可用于生产复印纸、铜板纸、过滤纸、卷烟纸等较高档的纸制品，也可与其他纸浆混合，生产牛皮纸和纸箱板纸、新闻纸等中档纸制品。1980 年以来，美国率先开展红麻全秆造纸和全秆综合利用研究，现在红麻制浆已越来越为人们广泛重视，大型红麻全秆制浆工厂遍布世界各地。红麻也以其产量高、容易种植、手感柔软厚实、印刷性好等优点成为世界上公认的最有潜力的新型造纸原料。我国森林储量逐年下降，原料短缺这个制约中国纸业发展的关键问题依然没有得到解决，并且随着造纸总产量的迅速增长这个问题变得更加突出。目前造纸企业木浆原料的来源，仍然是以国外进口为主，在价格上也自然受制于国际木浆价格波动。根据一些行业人士的预测，中国到 2010 年，木浆缺口将达到 3000 万吨。要解决中国造纸工业所需的木浆原料问题，完全依靠从国外大量进口木浆不可能，完全依靠国内自己发展林木资源再建浆厂也不现实，因此要解决木纤维短缺这一制约中国纸业发展的瓶颈问题，还必须有新思路：利用红麻等作物替代木材作为纸浆原料。红麻由于是一种速生可再生资源，生物学产量高，其生长量之大是乔灌木所不及的，比生长量较大的杨树高 3-5 倍，红麻对土地的要求不高，管理简单且适应性广。美国、泰国和日本等国家较早利用红麻作为原料抄造各种纸张。二十世纪八十年代以来，我国的科研单位和高等院校也对红麻造纸特性等进行了一系列研究，九十年代以后红麻全秆抄制纸浆的工艺日臻完善。预计未来 20 年内，我国红麻造纸会取得突飞猛进的发展^[13,14]。

1.1.7 红麻纤维高档纺织品的开发

红麻纤维的纤维素含量一般为 70%—75%，木质素为 13%—20%，果胶为 7%—8%，灰分为 2%。红麻是很好的棉纺材料，在我国国民经济建设中发挥重要作用。但是由于受到化纤的冲击，红麻传统生产市场严重萎缩。近年来由于人类返朴归真意识的增强，对自然纤维的需求也日益增多；因而红麻综合利用和多用途开发也受到重视并已全面展开。随着我国加入 WTO，特别是 2005 年 1 月 1 日全球全面取消纺织品配额制度后，我国的纺织品在国际市场上占有的份额大大

增加。但是由于贸易歧视及我国产品品质较差等原因，我国的纺织品在国际市场上受到西欧和美国的贸易壁垒和反倾销等贸易摩擦增加，使我国相关行业遭受巨大损失。要从根本上改变这种被动局面，必须提高产品的品质。红麻纤维与棉花等其它纤维可以混纺成高档纺织品。红麻纤维同亚麻、苧麻类纤维一样有着优良的吸湿和透气性，充分利用与苧麻、亚麻纤维性能相近的红麻纤维作纺织原料，不仅可大大降低生产成本，而且也是发展绿色纺织品的重要内容。研究表明，棉麻混纺织物具有清爽、透气、抗菌、舒适、防静电等优点^[15]。

1.1.8 红麻纤维的工业与建材利用

由于红麻种子的碘价低，可作为制造肥皂的良好原料；用硫化方法产生完全乳化液，可作为皮革工业上的脂肪乳剂。

红麻全秆经加工可生产生态型隔热绝缘垫和轻型建筑板材夹心，其价格也比同类产品低廉，在建材开发利用上前景看好。日本京都大学和南京林业大学联合开发出一项新技术，将红麻韧皮纤维经多层层压加工成板材。目前日本松下电工株式会社已开始生产这种以红麻为原料的新型人造板材^[16]。

综上所述，红麻在纺织、造纸、建筑、环境保护等各个领域都有重要的作用，是重要的特色经济作物。

1.2 红麻种质资源研究进展

作物优良种质资源的收集、保存和评价利用是我国农业持续发展不可忽视的基础性研究工作。丰产、优质、多抗等优异基因的发掘和利用，是作物育种取得突破性进展的关键，也是我国农业生产飞跃发展的前提。我国十分重视种质资源的收集保存工作，建国以来数次派专家到东非如肯尼亚和坦桑尼亚等国收集红麻种质资源^[17,18,19]。

红麻自二十世纪初引入我国栽培以后，南方麻区主要栽培品种为印度引进的马达拉斯红茎，北方麻区为前苏联的塔什干，直至建国初期仍为生产上主要栽培品种。以后由于这两个品种不抗红麻炭疽病，逐渐被新的品种所代替。随着红麻生产的进一步发展，我国自1960年代开始红麻的杂交育种，但由于品种资源少，遗传基础狭窄，育种进展缓慢，到1980年我国大面积推广的品种仍以国外引进的青皮3号（越南）为主^[20]。

1.2.1 红麻种质资源的收集与保存

我国十分重视麻类种质资源工作，从“六·五”到“十·五”都把麻类种质资源研究列入国家科技攻关项目，保证了麻类资源的连续性和系统性。我国原来保存的红麻种质资源很少，1984年统计仅有68份，且品种间亲缘关系较近，因此当时的研究工作仅限于搜集、保存和进行简单的性状鉴定。根据“资源共享”原则，我国得到了红麻9个近缘种遗传资源155份。从非洲搜集到的野生红麻资源在沼泽地或接近沙漠等不同环境下均能生长，表现出较强的抗逆性。1985年中国农业科学院麻类研究所从美国引进来源于31个国家和地区的红麻品种325份，并首次搜集到野生资源，大大丰富了我国红麻基因库^[21-25]。1986年国际黄麻组织（IJO）为丰富黄、红麻的基因库，先后派了包括中国农业科学院麻类研究所等单位的5个考察队，到非洲肯尼亚和坦桑尼亚东北部搜集黄、红麻资源^[26]。我国许多科研单位搜集和保留了红麻种质资源，如中国农科院麻类研究所、广西农科院、福建农林大学、辽宁省棉麻所、广东省农科院经作所等。1987年我国已保存有红麻种质资源600多份，成为拥有红麻资源数量最多的国家，因此有条件进行系统深入的研究。

1.2.2 红麻种质资源的形态与细胞学分类研究

在红麻种质资源研究的初始阶段，世界各国主要以植物学形态分类和性状鉴定为研究重点。根据不同品种的茎色，红麻可分为绿茎和红茎两大类型。在红茎类型中，红麻可分为微红、淡红、红和紫红等。红麻叶型变化较大，按叶片有无开裂可分为全叶型和裂叶型两种。在裂叶型品种中，根据裂片数目又分为五裂叶和七裂叶等。根据不同品种在原产地或接近地区的生育期长短，红麻品种可划分为特早熟、早熟、中熟、晚熟和极晚熟五种类型。Howard等提出以叶型、茎色、叶柄色、熟型和花瓣色等性状将红麻进行分类（Dempsey, J.M.1979）。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被广泛采用（Edmonds, J.M, 1987）。中国农业科学院麻类所根据叶型、茎色、生育期等将68份红麻种质资源分为23种形态类型（1982）。邓丽卿等（1991）对来源于不同国家和地区的450份红麻栽培及野生资源进行了分类研究，认为红麻的植物学形态特征十分丰富，其叶、茎、花、果、种子等都展现出多种多样的形态。如红麻的叶型有裂叶和全叶两大类；叶柄色分绿、微红、浅红、红、紫等；花冠大小分为普通型、特大型、小花型等三类；花的颜色有黄、红、紫、蓝等多类；株型分高大型、矮生短结间型、分枝型等三类；种子分大籽粒与小籽粒等。依据形态观察

结果，把我国保存的红麻种质资源分为 29 个类型。同时他们以从国外引进的木槿属 *Furcaria* 组植物 14 个种为材料，研究了其形态分类、细胞遗传学和生物学特性等。研究表明红麻群落内种的差异主要区别于苞片及萼片，其次为叶、茎和种子等。对细胞遗传学观察的结果表明，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 个一价体或 16 个二价体加 4 个一价体，没有观察到三价以上的染色体（邓丽卿等，1994）。种间杂交结果表明，具有相同染色体数目的亲本杂交较易成功；若两亲本染色体数目不同，则以染色体数目较少的亲本为母本，杂交较易成功；花柱长度基本相同的两个种杂交也较易成功。栗建光等（1995）对 9 份红麻材料的核型分析认为，染色体的随体按大小可分为普通型、较大型和特大型 3 类。李爱青（1991）研究了 7 份不同来源红麻品种的异染色质，发现红麻染色体有两种类型异染色质，且品种间异染色质含量变幅较大。唐晓敏（2003）对 14 个红麻品种的染色体核型进行了研究，结果表明 14 个品种的核型基本为对称型，但染色体的随体大小、数目等方面存在一些差异。可见不同类型随体的存在对红麻基因定位、生物技术应用、种质纯度鉴定有一定意义。以上研究为红麻细胞遗传学、品种选育和生物学基础研究提供了科学依据^[27-30]。

1.2.3 红麻种质资源性状鉴定与评价研究

虽然形态学分类方法对品种的鉴定和归类有一定的指导意义，但所涉及性状与纤维产量、品质关系不大，不易反映种质资源的育种利用价值。为了全面客观地评价红麻种质资源的遗传潜力和育种利用价值，需对其生育特性、产量和品质性状的遗传多样性及其分类作进一步的深入研究。栗建光等（1992）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，鉴定出一批对红麻遗传育种有利用价值的特异种质资源，如古巴 8 号、S-55、BG163、NA91、印度红等。并认为最好用株型性状表现较好、生物产量中等的材料作杂交亲本，以选育出符合育种目标的高产品种。黄培坤等（1989）对从美国南方植物引种站和佛罗里达州立大学等单位引进的 325 份红麻及其近缘种进行了鉴定，认为国外引进的红麻种质资源具有类型丰富、高产、抗病、品质优良等特性，并筛选出具有高产、出浆得率高、抗病力较强等综合性状优良的品种 BG52-135；抗根结线虫病力强的品种 J-1-113；抗炭疽病力强的品种 85-224；高产的品种台农 1 号、K292 等。1998 年中国农业科学院麻类研究所从 22 份材料中选出了 ZGR5、ZGR15

和 ZGR8 等 7 个适于造纸的品种，它们的干茎产量、纸浆得率与对照相比达到极显著差异；抗炭疽病力、皮骨比值也都优于对照。粟建光、邓丽卿等在全国 3 个生态试验点研究了 15 份红麻优异种质资源的生态适应性和利用潜力，从中选出了适合不同生态区推广种植和利用的优良红麻种质。陈洪福等（1991）对国内外 316 份红麻材料进行了抗炭疽病鉴定，获得了 85-224、85-133、85-253、71-4 等 8 个高抗材料，并首次发现了抗病力极强的亚免疫材料 85-224。粟建光等研究了非洲红麻的发芽特点、生育期、主要经济性状等生物学特性，鉴定出几份经济性状表现较好的材料^[31-33]。上述材料的鉴定对高产、优质、抗逆性强的红麻新品种的选育具有重要意义。

1.2.4 红麻特异种质的鉴定、发掘、创新与利用研究

经过几十年的努力，我国已初步建成了红麻遗传资源的研究体系，资源性状鉴定、优异基因的发掘、生物学、纤维品质和分类等研究也取得了很大成就，并发掘出一大批优、特资源提供育种、科研和生产利用。如福建农林大学育成的高产、中偏迟熟无刺红麻新品种金山无刺（祁建民等，1999），茎秆光滑无刺，减轻了麻农在田间作业和种子收获时的肌肤之苦，受到广大麻农的欢迎。中国农业科学院麻类研究所在 1996 年配置的一个杂交组合后代中发现了红麻雄性不育株。其开花时自交结实率为 0，表现为全不育。雄性不育株来自于从澳大利亚引进的红麻品种 ATA 的组合后代。雄性不育株的发现对大规模利用红麻杂种优势具有重要的理论和实际意义（陈安国，2003）^[34-35]。

1.2.5 红麻种质资源的分子标记及亲缘关系研究

红麻是常异花授粉作物，自然杂交率可达 20% 以上。在鉴定红麻品种及其来源时，仅凭种子外观、叶型、茎色、熟期等农艺性状无法准确鉴定。而且红麻花大色艳，容易通过蜜蜂、蚂蚁等传播花粉，使得自然杂交率提高，部分农艺性状变异较快。因此，其遗传变异、亲缘关系难以从表型上加以区别，有必要研究一种简便、科学、有效的方法来鉴定红麻种质亲缘关系，以及明确种质间遗传差异的关系，为红麻杂交亲本的选配、新品种的选育和红麻生产利用提供可靠的科学依据。试验表明，分子标记技术能很好地区分、鉴定品种及明确品种资源间的遗传关系。程舟等（2003）用 AFLP 分子标记技术对红麻种质资源遗传多样性进行了研究，实验结果支持了红麻起源于非洲的假设，并证实了栽培红麻首先被引到亚洲，并进一步被传播到中北美洲。同时对从日本和美国引进的 33 份红麻种

质资源进行了 RAPD 标记分析, 以其图谱为基础构建了树状图, 进一步明确了这些材料的来源。安徽农业大学的唐晓敏等也用 RAPD 分子标记对 15 份红麻材料进行了聚类分析, 将其按亲缘关系远近进行了分类。结果表明所用材料之间差异不大, 亲缘关系很近^[36-37]。祁建民等 (2003) 用 ISSR 和 RAPD 技术研究了黄麻种质资源的遗传多样性及其亲缘关系, 能较好地揭示种间和种内基因型的遗传差异和亲缘关系。中国麻类所李德芳利用杂交亲本的血缘关系研究和分析了我国新育成品种的亲缘与血缘关系。陶爱芬用 ISSR 技术分析了红麻优异种质资源遗传多样性与亲缘关系。但用 SRAP 技术对红麻种质资源进行研究目前尚未见报道^[38-40]。

1.2.6 红麻特异种质创新与抗虫、抗除草剂转基因研究

随着基因工程技术的发展, 人们越来越重视利用基因工程技术来改良作物品种。红麻基因工程的研究起步较晚但进展迅速, 曹德菊等 (2000) 对利用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进行了研究, 并通过 PCR 分析及 Southern 杂交技术对所获抗除草剂转基因红麻进行了分子水平的验证, 证明外源抗除草剂基因已整合入红麻基因组^[41]。如福建农林大学采用外源 DNA 直接导入和辐射诱变, 结合回交与轮回选择等技术, 在我国首次创新 2 份茎秆光滑无刺稀有红麻重要种质 901 和 902, 并育成了茎秆光滑无刺的品种金山无刺。最近又相继育成无刺超高种子产量 (高油) 特用红麻新类型红光 1 号、红光 2 号, 并在亚油酸的多用途研发有重大进展^[42]。祁建民、徐建堂等通过花粉管法将外源抗虫、抗除草剂基因导入红麻基因组, 目前已选育出表现高抗的品系, 其大田和实验室分子水平鉴定已经得到验证。

1.2.7 红麻种质遗传改良优异材料的创新

我国红麻种质资源的研究起步晚, 但经过几十年由简单到深入的发展已取得很大成就, 鉴定、评价的方法也有了较大进展。先后鉴定出一批由系统选育、杂交育种和杂种优势利用所育成新品种的重要遗传资源, 如红麻 7 号、非洲裂叶、EV-41 等; 评价、鉴定出一批高产、优质、抗病的优异资源, 如纤维品质优异种质资源泰红 763、闽红 397、印度红、福红 5 号、福红 7 号等, 高产优质遗传资源福红 2 号、福红 3 号、福红 951、福红 991、KB11、KB2 等, 优异高抗资源 85-224、85-133 等。我国红麻种质资源的搜集、鉴定、评价和创新等研究工作对红麻品种改良起到了重要作用^[43-44]。至 20 世纪 80 年代我国红麻育种取得了

较大突破，育成了一批高产优质抗病新品种，并在生产上大面积推广应用，使我国红麻单产居国际领先水平。“十·五”期间我国育种单位选育的福红 951、福红 952、KB11、KB2、闽红 88/31、浙 3 等品种比对照粤 743 增产 12.39%—17.75%，其它性状大部分优于对照。中国农业科学院麻类研究所选育的 H305、SCS11-04 分别比对照红引 135 增产 22.10%和 17.04%，其纤维品质、主要农艺性状、抗逆性均优于对照(汤清明等，2001)^[45-46]。福建农林大学根据红麻为喜温短日常异交作物的特性，改革了红麻传统的育种程序，采用混合一系谱法与穿梭育种法相结合的综合育种新技术，育成了一批丰产性高、纤维品质优良、稳定性好、适应性广的红麻新品种，如福红 1 号、福红 2 号、福红 3 号、福红 991、福红 992 等福红系列品种。2003—2004 年通过的福建省区试鉴定品种福红 992 两年 8 点次平均每公顷原麻产量 7778t，比对照粤 743 增产 25.7%，居福建省区试供试品种首位。(陈双龙等，2005)^[47]。

1.2.8 国外红麻种质资源研究进展

国外红麻种质资源的研究始于 20 世纪中叶。1943 年美国农业部曾与联合纤维共同体(CFC)合作，在古巴开展了一个红麻研究项目，成功地选育了几个优良红麻品种 Cuba108, Cuba2032 等^[48-51]。美国于上个世纪六十年代通过种间杂交，引进木槿属近缘种的抗根结线虫基因，玫瑰麻 (*H.Sabdariffa* var *altissima*) 被确认为最理想的提供外源抗原的红麻近缘种。美国科学家 Colyer, Cook, Riggs, Mullin 等已发表了一系列有关病原病害或根结线虫影响红麻产量的报道。因此，对红麻种质抗这些逆生境的鉴定与评价工作尤其必要。过去几十年中，美国等国家红麻品种改良研究在增强品种的增产潜力，提高抗炭疽病和根结线虫能力方面取得了很大成功^[52-54]。今后的重点将继续放在提高红麻种质的纤维品质、增强抗根结线虫、真菌病害和盐碱能力等方面，以保持红麻种植业的健康、快速发展。

21 世纪农作物育种技术的总体发展方向是：种质扩增、改良和创新提高农产品的质量；应用生物技术研究，提高育种效率和创新能力。红麻育种核心目标是加速提高杂交种的生产潜力和利用价值。通过遗传改良的途径，达到抗病、抗虫、优质、耐旱、耐贫瘠、耐低磷等种质的创新，以及在红麻杂种优势利用上的跨越发展(陈安国等，2001)^[56]。由此可见红麻优异种质资源的评价、鉴定和创新在红麻新品种选育和生产发展中有着举足轻重的作用。

1.3 分子标记及其应用

遗传学上通常将生物体中可识别的染色体或染色体的一段、等位基因、或在家系中传递的任何一种遗传特性等称为遗传标记 (genetic markers)。遗传标记的内涵是随着遗传学,特别是基因概念的发展而发展的。经典遗传学中是以形态标记和细胞学标记为基础的。20 世纪末,由于遗传学在基因定位、遗传作图、基因组研究及群体遗传学与进化遗传学等领域的扩展与应用,经典的、基于表型的形态学、细胞学水平上的遗传标记已经远远不能满足要求,一批新型的遗传标记,如蛋白质标记、同工酶标记、DNA 标记等分子标记被开发利用^[57-60]。当前遗传标记主要有 4 种类型:

(1) 形态标记 (**morphological markers**): 即植物的外部特征特性,如株高、根粗、穗长、粒色、生物学产量等。在众多的遗传标记中,形态学标记的应用历史最为悠久。孟德尔正是利用豌豆 7 对单基因控制的形态性状进行研究,并建立了著名的分离规律和自由组合规律。形态标记简单直观,但其标记数有限、多态性很差、易受环境条件影响。因而其在应用上及其有限。

(2) 细胞标记 (**cytological markers**): 染色体畸变如倒位、移位等使得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。细胞学标记主要是染色体核型(染色体数目、大小、着丝点位置等)和带型。显然这些标记的数目也很有限。

(3) 生化标记 (**biochemical markers**): 主要包括同工酶和贮藏蛋白,其标记数亦有限,不能满足种质资源鉴定和育种工作的需要。

(4) 分子标记 (**molecular markers**) 是一种新的理想的遗传标记形式。分子标记辅助选择(Molecular marker-assisted selection, 简称 MAS)是现代分子生物学与传统遗传育种的结合点,借助分子标记可以对育种材料从 DNA 水平上进行选择,从而达到作物产量、品质和抗性等综合性状的高效改良。20 世纪 80 年代初,限制性内切核酸酶技术和基因扩增技术以及随之而来的 DNA 直接测序,引发了对 DNA 多态性的研究。DNA 分子标记是在 DNA 分子水平上,通过一定方式或特殊手段来反映生物个体或种群之间具有差异性的 DNA 片段。它有以下优点:(1) 在植物体的各个组织、各发育阶段均可检测到,不受外界环境限制,不存在表达与否的问题;(2) 多态性高;(3) 数量极多,遍布整个基因组。目前,分子标记已广泛应用于种质资源研究、遗传图谱构建、目的基因定位、起源进化研究和标记辅助选择育种等方面。分子标记育种需要以下技术的支撑:(1) 多态

性高的分子标记绘制的遗传图谱；(2) 高效自动化技术；(3) 与目标农艺性状基因紧密连锁的经济有效的分子标记。生物在长期进化过程中产生了许多由 DNA 碱基序列变异所致的遗传变异。以物种内这种极为丰富的 DNA 碱基序列变异为基础发展起来的分子标记技术已相继出现几十种，它们各具特色，为不同的研究提供了丰富的技术手段。但是分子标记育种技术目前尚不完善和成熟，其不能作为一种育种方法单独使用，应将分子标记育种技术与常规育种技术相结合^[61-63]。目前，常用的 DNA 分子标记有 RAPD、RFLP、AFLP、SSR、ISSR、SNP 和 SRAP 等。

1.3.1 RAPD

RAPD (随机扩增多态性 DNA, Random Amplified Polymorphism DNA) 技术是 1990 年由 Williams 发展起来的一种分子标记技术。它是以 PCR (Polymerase chain reaction) 技术为基础，以人工合成的寡核苷酸单链 (通常为 10 个碱基) 作引物，以组织中分离出来的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳、分离和溴化乙锭染色后，可得到分子量大小不等、长度不同的多态性条带，这些扩增片段的多态性反应了相应区域基因组 DNA 的多态性。RAPD 标记具有很高的通用性，同一套引物可以应用于任何一种植物的研究。它具有广泛性，可以在不知道物种任何分子生物学研究的背景下对其进行多态性分析，而且扩增所需 DNA 用量极少，对 DNA 的纯度要求也不高，操作简单、方便、快速，可以在短时间内进行大量样品分析。自 1990 年以来，该技术已受到广泛应用。例如遗传多样性检测、品种和种质纯度鉴定、起源演化研究、基因定位及分子遗传图谱构建等各个方面。目前在红麻、黄麻、小麦、玉米、水稻、棉花等作物上的研究已均有报道。但由于 RAPD 扩增产物的重复性和稳定性差，因而扩增结果易受多种因素的影响，所以在特定的作物上必须对其反应条件和影响因素进行筛选，建立优化反应体系与反应条件^[64-68]。

1.3.2 RFLP

RFLP 称为限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism)，是 1974 年 Grodzicker 等开发的分子标记技术，是一项利用放射性同位素 (常用 ³²P) 或非放射性物质 (如地高辛) 通过膜上杂交显示限制性酶切片段的大小，来检测不同遗传位点等位变异的技术。它是指用一种限制性内切酶切割来自不同个体的基因组 DNA 分子上，内切酶的识别序列有差异，这种差

异反映在酶切片段的长度和数目上。其多态性的产生是由于不同 DNA 分子限制性内切酶位点上碱基变化,或者由于染色体水平倒位、易位、缺失而引起酶切位点的增加、消失或位置变化。RFLP 具有无表型效应、标记座位的等位基因间是共显性、非等位基因间不存在互作效应等优点。自 20 世纪 80 年代 RFLP 在植物上应用以来,目前在小麦(Liu, 1992; Gale, 1993)、水稻(Sasaki, 1995; Song, 1995)、大麦(Peterson, 1989)、番茄(Sarfatti et al, 1989)、大豆(Keim et al, 1994)等作物上的研究都已有报道。但 RFLP 的多态信息含量是相对而言的,在一些作物上 RFLP 探针可以进行品种间及种间鉴别,而在小麦、马铃薯、大豆等作物上的多态性较低^[69]。

1.3.3 AFLP

AFLP (扩增片段长度多态性, Amplified Fragment Length Polymorphism) 是 1993 年由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos 发展起来的一种检测 DNA 多态性的新方法。实际上是 RFLP 和 PCR 相结合的一种技术。AFLP 的原理是基于对植物基因组总 DNA 双酶切经 PCR 扩增后的限制片段进行选择。具体是植物基因组 DNA 经限制性内切酶双酶切后,形成分子量大小不等的随机限制性片段,将特定双接头(adapter)连接在这些 DNA 片段的两端,形成一个带接头的特异片段,作为 DNA 扩增的模板。接头序列以及与其相连的限制位点作为随后进行的限制片段扩增的引物结合位点。PCR 引物 3' 末端含有选择核苷酸,选择核苷酸延伸到酶切片段区,这样就只有那些两端序列能与选择核苷酸配对的限制性酶切片段被扩增。扩增片段通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离检测。利用这一方法,在不预先知道 DNA 序列信息的情况下就可以同时进行多数 DNA 酶切片的 PCR 扩增。它利用 RFLP 的可靠性和 PCR 的高效性,对基因组 DNA 酶切片段进行选择性扩增。由于不同材料的 DNA 酶切片段存在差异,因而便产生了扩增产物的多态性。扩增产物经 4%~6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后根据凝胶上 DNA 谱带的有无来检测其多态性^[70]。

AFLP 兼具 RFLP 和 RAPD 的优点,多态性强,具有较高的可靠性和重复性,操作简便、速度快、DNA 用量少。因此 AFLP 被认为是有效的分子标记,非常适合绘制品种的指纹图谱和进行分类研究。其缺点是对模板反应迟钝、成本高、对技术要求严格。

1.3.4 SSR

SSR (Simple Sequence Repeat) 又称微卫星 (Microsatellite)、短序列串联重复等。人类及动植物的基因组中存在许多由 1-5 个碱基对组成的简单重复序列, 如 $(GAA)_n$ 、 $(GA)_n$ 、 $(AC)_n$ 等。同一类的微卫星可分布于整个基因组的不同位置上, 每个座位上重复单位的数目及序列都不可能完全相同, 因而造成了每个座位上的多态性。由于每个微卫星 DNA 两端得序列多是相对保守的单拷贝序列, 因此可根据其两端的序列设计一对特异引物, 通过扩增产生多态性。与 RFLP 标记相比, SSR 检测的多态性要高得多 (Gregan et al, 1994), 可见其多态性信息含量是较高的。微卫星标记已广泛应用于遗传图谱的构建 (Hearne et al, 1993)、比较基因组研究 (Dayanandan et al, 1997)、遗传多样性分析 (Jain et al, 1999; Primmer et al, 1998) 和起源演化研究 (吴小雷等, 2001) 等。通过对微卫星 DNA 序列的研究, 相应产生了使用人工合成的寡核苷酸作探针的方法, 也检测到大量的多态性。SSR 是目前较受欢迎的指纹图谱技术, 但由于这种方法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才能设计引物, 这给 SSR 标记在植物基因组研究中的广泛应用带来了不便 (Wu et al, 1993; Beckmn and Soller, 1990) [71]。

1.3.5 ISSR

ISSR (内部简单重复序列多态性, Inter-simple Sequence Repeat Polymorphism) 是由 Zietkiewicz et al 于 1994 年提出的。其原理就是在 SSR 的 3' 或 5' 端加锚 1-4 个嘌呤或嘧啶碱基, 然后以此为引物, 对两侧具有反向排列的 SSR 的一段 DNA 序列进行扩增。对扩增产物进行电泳、染色, 根据条带的有无及相对位置, 来分析不同样品间 ISSR 标记的多态性。ISSR 通常为显性标记 (Tsumura et al, 1996), 呈 Mendel 式遗传, 具有很好的稳定性和多态性 (Fang and Roose, 1997), 因而是非常理想的分子标记, 可用于构建 PCR 为基础的分子图谱。ISSR 分子标记已用于遗传多样性分析、绘制 DNA 指纹图谱、品种鉴定等许多研究领域, 潜力很大。Gilbery (1999) 和 Yang (1996) 等的研究表明, ISSR 对 PCR 反应的敏感性低于 RAPD, 稳定性优于 RAPD。Jonsson (1996) 等研究认为在进行植物遗传多样性的研究时可优先考虑使用 ISSR^[72-75]。Gao (1999) 等研究认为, ISSR 和 RAPD 检测疣粒野生稻遗传变异的能力都高于等位酶分析, 根据多态条带比率和 Shannon 多样性指数分析, ISSR 能比 RAPD 检测到更多的遗传多态性。ISSR 技术利用基因组中有关 SSR 序列的信息, 结合 RAPD 技术优

点, 克服了 SSR 和 RAPD 标记技术的某些缺点^[76-79]。

近年来 ISSR 技术已应用于植物遗传分析的各个方面, 如品种鉴定、遗传关系及遗传多样性分析、基因标签、植物基因组作图等研究^[80]。

1.3.6 SNP

单核苷酸多态(single nucleotide polymorphism)指的是不同个体的基因组 DNA 序列在某一特定位置上的单个核苷酸的差别, 这种差异包括单个或多个碱基的缺失、置换或插入。例如在人类基因组中, 比较任意两条同源染色体序列, 就会发现平均每 1000bp 有一个碱基的差异。SNP 是新近发展起来的一种基于测序的分子标记, 可以检测出基因组中因一个碱基的不同而产生的 DNA 多态性。SNP 利用不同碱基在测序过程中峰值不同来检出 DNA 中因一个碱基的替换引起的 DNA 多态性。其多态性更为丰富, 目前利用 SNP 标记已发现与人类一些重要疾病(哮喘病、糖尿病、精神分裂症等)相连锁的标记座位(Risch and Merikangas, 1996; Collins et al, 1997)。因此, SPN 标记在基因组中是很丰富的。SNP 标记具有分布广泛、数量众多、易于批量检测等优点, 已经应用于水稻, 小麦, 大豆, 人类基因组的研究。SNP 是直接以 DNA 序列变异作为标记, 所以他的遗传分析完全摒弃了经典的凝胶电泳方法, 以最新的 DNA 芯片技术取而代之, 因而应用前景十分广阔^[81-84]。

1.3.7 SRAP

相关序列扩增多态性 (Sequence-related amplified polymorphism) 是一种新型的基于 PCR 的标记系统, 是由美国加州大学蔬菜系 Li 与 Quiros 博士于 2001 年在芸薹属植物开发出来, 又叫基于序列扩增多态性 (sequence-based amplified polymorphism, SBAP)。引物设计是 SRAP 分析的核心。SRAP 分为上下两套引物。在一组正向引物长 17bp, 5' 端的前 10 bp 是一段填充序列, 紧接着是 CCGG 与前面的填充序列组成一套引物核心序列, 加上 3' 端 3 个选择碱基 SRAP 引物中使用 “CCGG” 序列, 其目的是使之特异结合可译框 ORFs (open reading frames) 区域中的外显子。研究表明外显子一般处于富含 GC 区域, 如拟南芥 2 和 4 号染色体的全序列中, 外显子 CG 比例分别为 46.5% 和 44.08%, 而内含子中则为 32.1% 和 33.08%; 而且除着丝粒区域有较低基因密度外, 基因几乎平均分布在这两个染色体上。在另一组反向引物长 18bp, 5' 端的前 11bp 是一段填充序列, 紧接着是 AATT, 它们组成核心序列及 3' 端 3 个选择碱基, 对内含子区域、启动子区域进行

特异扩增。产生多态性是因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不同。由于外显子序列在不同个体中通常是保守的，这种低水平多态性限制了将它们做为标记的来源。由于内含子、启动子和间隔序列在不同物种甚至不同个体间变异很大，富含AT的区域序列通常见于启动子和内含子中，SRAP中使用的反向引物的3'端含有核心AATT，以特异结合富含AT区，这就使得有可能扩增出基于内含子与外显子的SRAP多态性标记。该标记具有简便、高效、产率高、高共显性、重复性好、易测序，以及便于克隆目标片段的特点，目前已被成功的应用于遗传多样性分析、遗传图谱的构建、重要性状的标记^[1]以及相关基因的克隆等方面。Budak等利用SRAP标记分析了野牛草 (*Buffalograss*) 的43个基因型遗传多样性，结果也表明SRAP是一个评价遗传多样性、品种鉴定和系统发生的有效工具。目前已在其他作物如马铃薯、水稻、生菜、油菜、大蒜、苹果、樱桃、柑橘与芹菜中成功扩增^[85-89]。

由于SRAP是近年刚刚发展起来的分子标记，对它详细反应体系的建立的报道较少，而且引物应用于不同的物种反应条件也不同，因此对引物的筛选和反应条件的优化是非常必要的。本研究以若干红麻野生种、半野生种与栽培种种质资源为试验材料，旨在探讨红麻DNA的提取和SRAP分析技术的最佳方案。为进一步开展红麻种质资源的SRAP分析以及遗传连锁图的构建提供科学的依据。

1.3.8 SRAP与其它分子标记的比较

每一种分子标记都具有其优点和缺点(如表 1)。由于 PCR 技术的优点，基于 PCR 的标记体系类型多样，应用广泛，但各自的复杂性、可靠性与遗传信息不同。如 RAPD 方法简单、成本低，但重复性较差、检测位点不多；SSR 多为共显性、重复性好，但位点较少、引物开发成本高；AFLP 谱带多，但分析程序复杂、成本高，有时要用到同位素；多数情况下，RAPD 与 AFLP 标记测序需要克隆，增加了工作量。Ferriol 等 (2003) 对甜瓜 (*Cucurbita pepo*) 的 2 个变种 69 份类型代表性材料遗传多样性进行了 SRAP、AFLP 标记与形态学分析，结果表明，与形态学变异及类型的进化历史一致性方面，SRAP 标记提供的信息比 AFLP 标记更优良；11 个 SRAP 引物组合获得 88 条可重复的条带，平均 8 条，其中 64 条 (72.7%) 为多态，大小在 154-653bp 之间；利用 SRAP 标记对笋瓜 (*C. maxima*) 19 份种质及 8 份南瓜属材料遗传多样性进行分析，24 个引物组合产生的 114 个标记中多态性占 33%，虽然低于 RAPD 比例，但聚类分析与主坐标分析表明，SRAP 标记

分析可将材料按照使用类型（食用、饲用、观赏用）来分组。因此，在对育种目标性状的评价方面，明显优于 RAPD 标记^[90-92]。

表 1.1 常用的 DNA 分子标记特性比较

Table 1.1 The comparison of main DNA molecular Markers

特性	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	ISSR	SRAP
分布	普遍	普遍	普遍	普遍	普遍	普遍
可靠性	高	中等	高	高	高	高
重复性	高	中等	高	高	高	高
多态性	中等	高	非常高	高	高	非常高
DNA 需求	2-30ng	1-100ng	100ng	50-100ng	2-30ng	2-30ng
放射性	一般有	无	有或无	无	无	无
技术难度	中等	简单	中等	简单	简单	简单
样品生产率	中低	高	非常高	高	高	高
时间因素	慢	快	中等	快	快	快
探针类型	低拷贝 DNA 或 cDNA 克隆	随机序列	特异 DNA 序列	特异 DNA 重复序列	特异 DNA 序列	特异 DNA 序列
探测部分	低拷贝编码 区域	整个基因 组	整个基因 组	整个基因 组	整个基因 组	整个基因 组

与其它分子标记相比, SRAP 的特点主要表现在: 方便快捷, 只需要极少量 DNA 材料, 不需要 Southern 杂交, 不需要预先知道 DNA 的顺序信息, 试验结果稳定可靠, 可以快速获得大量的信息。而且再现性高, 重复性好, 因而非常适合于品种指纹图谱的绘制, 遗传连锁图的构建及遗传多样性等方面的研究。在一些多态性很少, 而且待测样品较少的情况下, 用 SRAP 分析能达到满意的结果。研究结果均表明 SRAP 所产生的多态性远远超过了 RFLP 和 RAPD 等, 目前被认为是 DNA 分子标记技术中多态性最为丰富的一项技术。由于 SRAP 特殊的引物设计, 可检测基因的可译框区域, 因而体现的是物种基因之间的多态性, 因而检测的结果更能反映物种的遗传多样性和亲缘关系^[93]。

随着研究工作的发展, 会有越来越多重要作物农艺性状的分子标记被开发出

来, 它们将在分子标记辅助育种方面发挥巨大作用。

2 材料与amp;方法

2.1 材料

2.1.1 植物实验材料

征集并选取供试材料共 84 份, 其中包括从美国、古巴、澳大利亚、非洲等 22 个国家和地区引进的红麻野生种及半野生种 22 份, 我国“八·五”至“十·五”期间由中国农科院麻类研究所、福建农林大学、广东农科院等育种单位选育的红麻新品种 52 份。材料名称、来源和品种类型见表 2.1。

表 2.1 供试红麻品种, 来源及品种类型
Table 2.1 Kenaf varieties and there origins

代 号	品种名称	来源	品种类型	代 号	品种名称	来源	品种类型
1	福红 2-1	福建农大	栽培品种	43	H305	中国麻类所	栽培品种
2	福红 2 号	福建农大	栽培品种	44	Bg52-1	马里	栽培品种
3	福红 3 号	福建农大	栽培品种	45	粤 743	广东农科院	栽培品种
4	福红 4 号	福建农大	栽培品种	46	粤引 1 号	广东	栽培品种
5	福红 5 号	福建农大	栽培品种	47	粤引 4 号	古巴	栽培品种
6	福红 6 号	福建农大	栽培品种	48	非洲裂叶	非洲	栽培品种
7	福红 7 号	福建农大	栽培品种	49	金山无刺 (早)	福建农大	栽培品种
8	福红 8 号	福建农大	栽培品种	50	金山无刺 (晚)	福建农大	栽培品种
9	福红 9 号	福建农大	栽培品种	51	泰红 763	泰国	栽培品种
10	福红 951 (红)	福建农大	栽培品种	52	古巴 8 号	古巴	栽培品种
11	福红 952 (绿)	福建农大	栽培品种	53	83-20	美国	栽培品种
12	福红 991(红)	福建农大	栽培品种	54	85-15	波兰	栽培品种
13	福红 992 (绿)	福建农大	栽培品种	55	F65	未知	栽培品种
14	福红 02/9	福建农大	栽培品种	56	AS-277	澳大利亚	栽培品种
15	福引 0-16-1	福建农大	栽培品种	57	AS233	澳大利亚	栽培品种
16	闽红 88/31	福建农科院	栽培品种	58	阿联红麻	埃及	栽培品种
17	闽红 321	福建农科院	栽培品种	59	ZF78	南非	栽培品种

来，它们将在分子标记辅助育种方面发挥巨大作用。

2 材料与方方法

2.1 材料

2.1.1 植物实验材料

征集并选取供试材料共 84 份，其中包括从美国、古巴、澳大利亚、非洲等 22 个国家和地区引进的红麻野生种及半野生种 22 份，我国“八·五”至“十·五”期间由中国农科院麻类研究所、福建农林大学、广东农科院等育种单位选育的红麻新品种 52 份。材料名称、来源和品种类型见表 2.1。

表 2.1 供试红麻品种，来源及品种类型
Table 2.1 Kenaf varieties and there origins

代 号	品种名称	来源	品种类型	代 号	品种名称	来源	品种类型
1	福红 2-1	福建农大	栽培品种	43	H305	中国麻类所	栽培品种
2	福红 2 号	福建农大	栽培品种	44	Bg52-1	马里	栽培品种
3	福红 3 号	福建农大	栽培品种	45	粤 743	广东农科院	栽培品种
4	福红 4 号	福建农大	栽培品种	46	粤引 1 号	广东	栽培品种
5	福红 5 号	福建农大	栽培品种	47	粤引 4 号	古巴	栽培品种
6	福红 6 号	福建农大	栽培品种	48	非洲裂叶	非洲	栽培品种
7	福红 7 号	福建农大	栽培品种	49	金山无刺 (早)	福建农大	栽培品种
8	福红 8 号	福建农大	栽培品种	50	金山无刺 (晚)	福建农大	栽培品种
9	福红 9 号	福建农大	栽培品种	51	泰红 763	泰国	栽培品种
10	福红 951 (红)	福建农大	栽培品种	52	古巴 8 号	古巴	栽培品种
11	福红 952 (绿)	福建农大	栽培品种	53	83-20	美国	栽培品种
12	福红 991(红)	福建农大	栽培品种	54	85-15	波兰	栽培品种
13	福红 992 (绿)	福建农大	栽培品种	55	F65	未知	栽培品种
14	福红 02/9	福建农大	栽培品种	56	AS-277	澳大利亚	栽培品种
15	福引 0-16-1	福建农大	栽培品种	57	AS233	澳大利亚	栽培品种
16	闽红 88/31	福建农科院	栽培品种	58	阿联红麻	埃及	栽培品种
17	闽红 321	福建农科院	栽培品种	59	ZF78	南非	栽培品种

18	闽红 964	福建农科院	栽培品种	60	85-135	菲律宾	栽培品种
19	H318	中国麻类所	栽培品种	61	PA264	巴基斯坦	栽培品种
20	H316	中国麻类所	栽培品种	62	85-13	苏丹	栽培品种
21	LC0301	中国麻类所	栽培品种	63	H029	坦桑尼亚	野生种
22	福红 992	福建农大	栽培品种	64	H038	肯尼亚	野生种
23	福红 9913	福建农大	栽培品种	65	H060	坦桑尼亚	野生种
24	ZH-01	浙江棉麻所	栽培品种	66	H070	坦桑尼亚	野生种
25	K03-2	广西大学	栽培品种	67	H076	坦桑尼亚	野生种
26	中国红麻 4 号	中国麻类所	栽培品种	68	H094	坦桑尼亚	野生种
27	青皮 3 号	越南	栽培品种	69	H098	坦桑尼亚	野生种
28	02/11 (绿)	福建农大	栽培品种	70	H102	坦桑尼亚	野生种
29	02/12 (无刺)	福建农大	栽培品种	71	塔什干	原苏联	栽培品种
30	02/29 (绿)	福建农大	栽培品种	72	GA42	加纳	半野生种
31	02/31 (红)	福建农大	栽培品种	73	ZB90	赞比亚	半野生种
32	02/51(绿)	福建农大	栽培品种	74	IDN147	印尼	半野生种
33	KB11	中国麻类所	栽培品种	75	85-244	肯尼亚	半野生种
34	KB2	中国麻类所	栽培品种	76	SL-254	萨尔瓦多	半野生种
35	SCS11-04	德国	栽培品种	77	ZM412	津巴布韦	半野生种
36	SCS11-06-1	德国	栽培品种	78	NA414	尼日利亚	半野生种
37	SCS11-09	德国	栽培品种	79	85-132	苏丹	半野生种
38	C2032	古巴	栽培品种	80	MX247	墨西哥	半野生种
39	EV-41	美国	栽培品种	81	ZB324	赞比亚	半野生种
40	红引 135	中国麻类所	栽培品种	82	SD124	苏丹	半野生种
41	83 引 6	巴基斯坦	栽培品种	83	UG93	乌干达	半野生种
42	83 引 7	巴基斯坦	栽培品种	84	H118	坦桑尼亚	野生种

注：中国麻类所系指中国农科院麻类研究所；福建农大系指福建农林大学。

2.1.2 SRAP 引物

SRAP 引物购自上海生物技术有限公司，上引物 15 个，编号为 Me1— Me15。

下引物 15 个，编号也是 Me1— Me15。SRAP 引物编号及序列见表 2.2 和 2.3。

表 2.2 SRAP 上引物编号及序列

Table 2.2 List of SRAP forward primers and their sequence in this study

上引物代号	引物序列	上引物代号	引物序列
Me1	TGA GTC CAA ACCGGATA	Me9	TGA GTCCAAACCGGAGG
Me2	TGA GTC CAAACCGGAGC	Me10	TGA GTCCAAACCGGAAA
Me3	TGA GTC CAA ACCGGAAT	Me11	TGA GTCCAAACCGGAAC
Me4	TGA GTC CAA ACCGGACC	Me12	TGA GTCCAAACCGGAGA
Me5	TGA GTC CAAACCGGAAG	Me13	TGAGTCCAAACC GGAAG
Me6	TGA GTC CAAACCGGACA	Me14	TGAGTCCAAACCGGT AG
Me7	TGA GTC CAAACCGGACG	Me15	TGAGTC CAAACC GGCAT
Me8	TGAGTC CAA ACC GGACT		

表 2.3 SRAP 下引物编号及序列

Table 2.3 List of SRAP forward reverse primers and their sequence in this study

下引物代 号	引物序列	下引物代号	引物序列
Me1	GAC TGC GTA CGA ATT AAT	Me9	GAC TGC GTA CGAATTAG
Me2	GAC TGC GTA CGA ATT TGC	Me10	GACTGCGTACGAATTCAT
Me3	GAC TGC GTA CGA ATT GAC	Me11	GACTGCGTACGAATTCTA
Me4	GAC TGC GTA CGA ATT TGA	Me12	GACTGCGTACGAATTCTC
Me5	GAC TGC GTA CGA ATT AAC	Me13	GACTGCGTACGAATTCTG
Me6	GAC TGC GTA CGA ATT GCA	Me14	GACTGCGTACGA ATT CTT
Me7	GAC TGC GTA CGA ATT CAA	Me15	GACTGCGTACGA ATT GAT
Me8	GAC TGC GTA CGA ATT CA		

2.2 方法

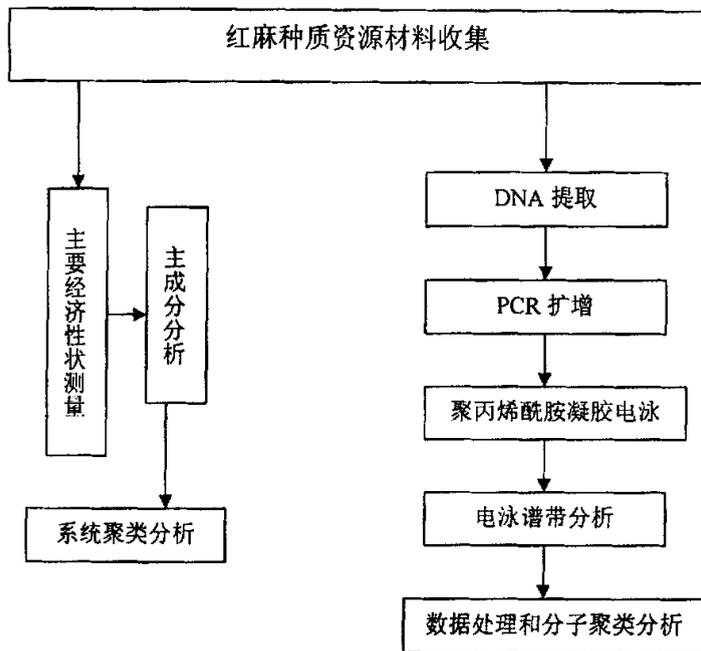
2.2.1 实验设计与统计方法

供试红麻品种材料 84 份, 实验采用随机区组设计, 3 次重复, 小区长 5m, 畦宽 1.3m。于 2004 年 5 月 3 日种植在福建农林大学教学农场, 5 月 6 日出苗。每小区定苗 100 株, 田间管理同大田。于工艺成熟期时剔除 10 份野生种, 74 份

供试材料每小区随机抽取 10 株，考测株高、茎粗、韧皮厚度、单株鲜茎重、单株生皮重、单株干皮重、鲜茎出麻率、晒干率、皮骨比和纤维支数等 10 个产量与纤维品质性状。因纤维脱胶过度，纤维强力性状没有测定。本研究对 74 份红麻品种的 10 个纤维产量性状及纤维品质性状作系统的测定，应用 DPS 软件中的主成分分析及欧氏距离聚类，估算红麻优异种质的主成分，评选出高产、优质、综合性状优良的品种，以期为良种的推广、开发利用及其遗传改良提供科学依据。

2.2 SRAP 分子标记的技术材料、实验方法和技术体系优化

2.2.1 本实验的技术路线为：



通过以上的试验技术可以从产量与品质构成和分子水平上明确 84 份红麻种质资源、主成分构成、通过 SRAP 分析明确供试材料的发遗传多样性和亲缘关系，以及品种基因型的遗传差异，进而为红麻种质资源亲缘关系鉴定和品种遗传改良亲本选配提供科学依据。

2.2.2 红麻基因组 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法^[94]，红麻基因组 DNA 的提取步骤为：

(1) 采集红麻苗期幼嫩叶片，称取 6~7g；注意叶片不能有水珠，否则影响

研磨效果;

(2) 倒入足量的液氮一次性研磨成粉末, 迅速装入 50ml 离心管, 先加入 150~300 μ l β -巯基乙醇和 0.2g 非水溶性的 PVP, 再加入 15ml 提取缓冲液混匀, 可先放入 4℃ 冰箱中, 直到研磨完所有的样品, 此步要保证研磨的叶片粉末不要融化;

(3) 加入 2.5 ml 在 65℃ 下预热的 15%CTAB, 轻轻混匀, 在 65℃ 水浴 30min, 冷却至室温;

(4) 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1), 温和上下颠倒离心管 20-30 次, 8000rpm 离心 10min 或者 4000rpm 离心 20min, 此步要充分离心, 否则杂质太多;

(5) 取上清, 转入新的离心管, 并加等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1), 重抽提 1 次, 取上清, 加等体积的冰冷无水乙醇, 温和颠倒 3-5 次, 直至絮状沉淀集结, 在冰上或者室温静置 30min-1h (或在 -20℃ 冰箱中 20min, 或在 -80℃ 冰箱中 10min);

(6) 钩出 DNA 沉淀, 转入 1.5ml 离心管中, 用 70%乙醇漂洗 2 次;

(7) 置于超净工作台上晾干, 将晾干的 DNA 溶于 300 μ l TE 中;

(8) 作为母液, 将 DNA 浓度稀释到 20ng/ μ l 备用。

2.2.3 红麻基因组 DNA 的纯化

(1) 在超净工作台吹干后加 500 μ l T50E10 (含 10mg/ml Rasa), 65℃ 水浴溶解 20min(或过夜);

(2) 加等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1), 温和上下颠倒离心管 30-50 次, 4℃, 12000rpm, 10min, 取上清, 加 2 倍体积的冰冷无水乙醇, 静置 5min, 沉淀 DNA; 4℃, 8000rpm, 5min, 弃上清;

(3) 用 70%乙醇漂洗 DNA 沉淀 2-3 次, 超净工作台风干, 溶于 TE 中, 于 -20℃ 冰箱中保存。

2.2.4 SRAP 反应体系的建立

在冰上建立 25 μ l 的 PCR 反应体系见表 2.4:

表 2.4 PCR 反应体系

Table 2.4 PCR reaction system

反应体系	所加的量	终浓度
Primer pair(4 μ M)	2 μ l	0.2 μ M
10 \times buffer	2.5 μ l	1 \times buffer
Mg ²⁺ (25mM)	2.5 μ l	2.5mM
dNTPs(10mM)	0.375 μ l	150 μ M
Taq 酶(5U/ μ l)	0.3 μ l	1.5U/ μ l
DNA(20ng/ μ l)	2 μ l	1.5ng/ μ l
Sterile water	15.325 μ l	

2.2.5 SRAP 反应程序

反应程序为：在 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟，反应前 5 个循环在 94 $^{\circ}$ C 1min, 33 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min 条件下运行；随后的 34 个循环复性温度提高到 55 $^{\circ}$ C，最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min，并在 4 $^{\circ}$ C 下保存。

2.2.6 SRAP 引物组合筛选

以福红 9 号、金山无刺（早）、H070、阿联红麻、85-15、塔什干的基因组 DNA 为模板，对 225 个 SRAP 引物组合，在 25 μ l 反应体系中以 200nmol/L 引物终浓度进行筛选，共选出 26 个多态性较理想的引物组合。筛选出的引物组合如下：

M1E2 M1E4 M1E5 M1E7 M1E11 M2E1 M2E6 M2E8 M2E14
M3E3 M4E1 M4E3 M4E4 M4E8 M4E12 M4E11 M4E14 M5E15
M6E1 M6E2 M6E3 M6E7 M6E8 M6E9 M7E2 M8E10

注：M 代表上引物，E 代表下引物。

SRAP 反应扩增的 DNA 片段大小一般在 300—1500bp 之间，如图 2.1 所示。引物扩增情况见表 2.5。

表 2.5 SRAP 标记的扩增情况

Table 2.5 Summary of the detection of SRAP markers in kenaf

项目	数据
多态性引物组合数	26
多态性引物组合扩增出的条带总数	329
扩增产物的大小范围	0.3—1.5kb
检测出的多态性条带总数	248
多态性条带占总带数的比例	75.4%

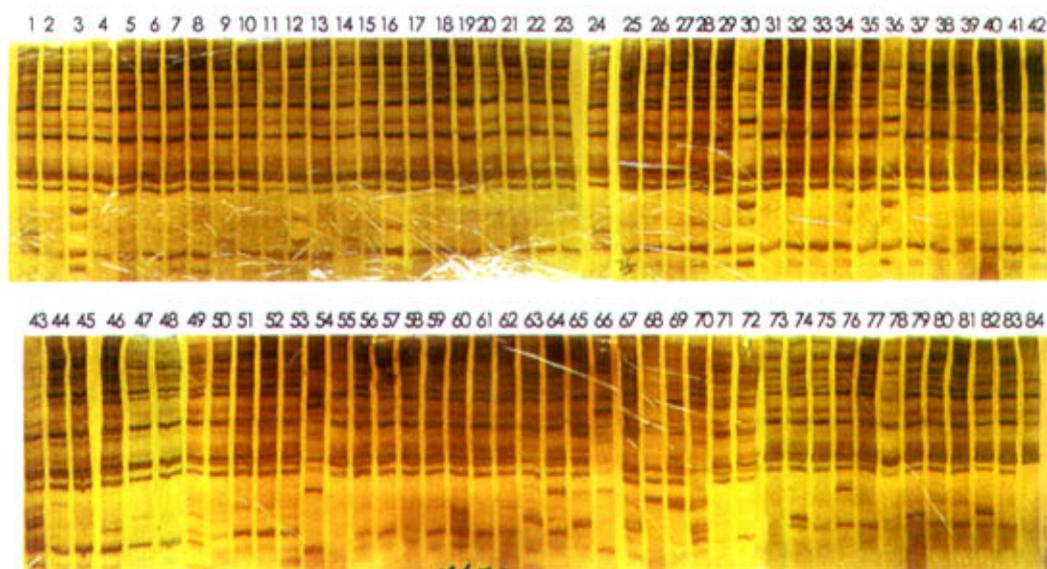


图 2.1 引物组合 M6E3 的扩增结果

Fig 2.1 Amplified result of primer M6E3

2.2.7 电泳检测

PCR 产物采用北京六一仪器厂生产的 DYY-5 型稳压稳流电泳仪,用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳缓冲液为 1×TBE。聚丙烯酰胺凝胶电泳的步骤见附

录。

2.2.8 数据处理与统计分析

对清晰可辨的电泳条带全部用于统计分析,按扩增条带有无记数,当某一扩增带出现时,赋值为“1”,不存在时赋值为“0”,从而把图形资料转换成数据资料。根据 Nei-li 相似系数法(也称为 Dice 法)求得品种 i 和 j 之间得相似系数 S_{ij} :

$$S_{ij}=2N_{ij}/(N_i+N_j)$$

其中 N_i 表示品种 i 中的条带数目; N_j 表示品种 j 的条带数目; N_{ij} 表示品种 i, j 共有的条带数目。然后用类平均聚类方法(UPGMA)对其进行聚类分析^[95]。

3 结果与分析

3.1. 红麻种质资源主成分分析及品种综合评价

3.1.1 主成分分析

在供试 84 份红麻种质资源中,剔除 10 份野生种,对 74 份红麻种质资源的 10 个性状进行主成分分析(品种名称见表 3.2)。分析结果表明品种间差异均达显著水平,用 DPS 数据处理系统解出的特征根和特征向量见表 3。从表 3 可以看出,前 4 个特征根累计贡献率达 85.61%,其中第 1 主成分贡献率达 52.68%,其特征向量所凝聚的生物学信息主要是韧皮纤维产量构成因素,故称为韧皮纤维产量构成因子。其向量间的关系表明,植株较高、茎较粗、皮较厚,则鲜茎、生皮、干皮、干茎都较重。也即株高、茎粗、皮厚是红麻生物产量关键性构成因子。第 2 主成分贡献率为 12.96%,其性状特征根中出麻率和茎杆皮骨比的贡献较大,因而称为茎杆皮骨比构成因子,其特征向量所揭示的生物学信息主要是韧皮部纤维与麻杆芯产量比率关系。其凝聚的向量关系表明:出麻率越高,皮骨比越大。第 3 主成分贡献率为 10.77%,特征向量中纤维支数贡献较大,故称为纤维品质构成因子。纤维支数则与大多数韧皮纤维产量构成因子呈负相关。特征向量所揭示的生物学信息是纤维支数较高,一般植株较高茎粗较粗,这与近年来育成品种多数为高产优质品种有关。而其他性状的特征根都相对较小。第 4 主成分贡献率为 9.18%,特征向量中晒干率贡献较大,故称为晒干率构成因子。特征向量所揭示的生物学信息是皮骨比较低和生皮重较轻的一般晒干率比较高,或鲜茎出麻率高的,晒干率也较高。

从育种产量因子考虑,第 1 主成分宜越大越好,因此要获得生物产量高的品

录。

2.2.8 数据处理与统计分析

对清晰可辨的电泳条带全部用于统计分析,按扩增条带有无记数,当某一扩增带出现时,赋值为“1”,不存在时赋值为“0”,从而把图形资料转换成数据资料。根据 Nei-li 相似系数法(也称为 Dice 法)求得品种 i 和 j 之间得相似系数 S_{ij} :

$$S_{ij}=2N_{ij}/(N_i+N_j)$$

其中 N_i 表示品种 i 中的条带数目; N_j 表示品种 j 的条带数目; N_{ij} 表示品种 i, j 共有的条带数目。然后用类平均聚类方法(UPGMA)对其进行聚类分析^[95]。

3 结果与分析

3.1. 红麻种质资源主成分分析及品种综合评价

3.1.1 主成分分析

在供试 84 份红麻种质资源中,剔除 10 份野生种,对 74 份红麻种质资源的 10 个性状进行主成分分析(品种名称见表 3.2)。分析结果表明品种间差异均达显著水平,用 DPS 数据处理系统解出的特征根和特征向量见表 3。从表 3 可以看出,前 4 个特征根累计贡献率达 85.61%,其中第 1 主成分贡献率达 52.68%,其特征向量所凝聚的生物学信息主要是韧皮纤维产量构成因素,故称为韧皮纤维产量构成因子。其向量间的关系表明,植株较高、茎较粗、皮较厚,则鲜茎、生皮、干皮、干茎都较重。也即株高、茎粗、皮厚是红麻生物产量关键性构成因子。第 2 主成分贡献率为 12.96%,其性状特征根中出麻率和茎杆皮骨比的贡献较大,因而称为茎杆皮骨比构成因子,其特征向量所揭示的生物学信息主要是韧皮部纤维与麻杆芯产量比率关系。其凝聚的向量关系表明:出麻率越高,皮骨比越大。第 3 主成分贡献率为 10.77%,特征向量中纤维支数贡献较大,故称为纤维品质构成因子。纤维支数则与大多数韧皮纤维产量构成因子呈负相关。特征向量所揭示的生物学信息是纤维支数较高,一般植株较高茎粗较粗,这与近年来育成品种多数为高产优质品种有关。而其他性状的特征根都相对较小。第 4 主成分贡献率为 9.18%,特征向量中晒干率贡献较大,故称为晒干率构成因子。特征向量所揭示的生物学信息是皮骨比较低和生皮重较轻的一般晒干率比较高,或鲜茎出麻率高的,晒干率也较高。

从育种产量因子考虑,第 1 主成分宜越大越好,因此要获得生物产量高的品

种, 应加强对株高、茎粗和皮厚的选择。从第 2 主成分性状因子间的特征向量关系可知, 加强对出麻率和皮骨比的选择, 有利于提高纤维支数。而第 3 主成分特征向量间的关系表明, 加强红麻株高和中等茎粗的选择能够较好地协调产量与纤维品质性状的正向关系。因此, 在品种选育中, 为确保高产优质, 应注意对株高、中等茎粗、韧皮厚度、皮骨比和出麻率进行综合选择, 以协调品质与产量的矛盾。又鉴于前四个主成分累计贡献率达 85.61%, 已凝聚了红麻产量和纤维品质性状的大部分生物学信息。

表 3.1 入选的 3 个主成分及特征向量

Table 3.1 Principal component analysis of 10 quantitative characters

性状	第 1 主成分	第 2 主成分	第 3 主成分	第 4 主成分
株高	0.37596	-0.13054	0.19129	-0.16132
茎粗	0.31086	-0.22349	-0.26717	0.19592
皮厚	0.35083	-0.20572	0.25922	0.0711
单株鲜茎重	0.37671	-0.36247	-0.09971	-0.02123
单株生皮重	0.41039	-0.03513	-0.06701	-0.29436
单株干皮重	0.41748	0.07405	-0.19258	-0.08709
鲜茎出麻率	0.23673	0.49107	0.11739	0.30245
晒干率	0.20705	0.36578	-0.44279	0.53932
皮骨比	0.16736	0.6054	0.03226	-0.58636
纤维支数	0.16553	0.10553	0.74995	0.33119
特征值	5.26844	1.29657	1.07785	0.91856
百分率	52.68436	12.96566	10.7785	9.18556
累计贡献率	52.68436	65.65003	76.42852	85.61409
主成分名称	产量构成因子	茎秆皮骨比构成因子	纤维品质构成因子	晒干率构成因子

表 3.2 74 份红麻品种名称
Table 3.2 The names of 74 kenaf varieties

代号	品种名称	来源	品种类型	代号	品种名称	来源	品种类型
1	福红 2-1	福建农大	栽培品种	38	C2032	古巴	栽培品种
2	福红 2 号	福建农大	栽培品种	39	EV-41	美国	栽培品种
3	福红 3 号	福建农大	栽培品种	40	红引 135	中国麻类所	栽培品种
4	福红 4 号	福建农大	栽培品种	41	83 引 6	巴基斯坦	栽培品种
5	福红 5 号	福建农大	栽培品种	42	83 引 7	巴基斯坦	栽培品种
6	福红 6 号	福建农大	栽培品种	43	H305	中国麻类所	栽培品种
7	福红 7 号	福建农大	栽培品种	44	Bg52-1	马里	栽培品种
8	福红 8 号	福建农大	栽培品种	45	粤 743	广东农科院	栽培品种
9	福红 9 号	福建农大	栽培品种	46	粤引 1 号	广东	栽培品种
10	福红 951 (红)	福建农大	栽培品种	47	粤引 4 号	古巴	栽培品种
11	福红 952 (绿)	福建农大	栽培品种	48	非洲裂叶	非洲	栽培品种
12	福红 991(红)	福建农大	栽培品种	49	金山无刺 (早)	福建农大	栽培品种
13	福红 992 (绿)	福建农大	栽培品种	50	金山无刺 (晚)	福建农大	栽培品种
14	福红 02/9	福建农大	栽培品种	51	泰红 763	泰国	栽培品种
15	福引 0-16-1	福建农大	栽培品种	52	古巴 8 号	古巴	栽培品种
16	闽红 88/31	福建农科院	栽培品种	53	83-20	美国	栽培品种
17	闽红 321	福建农科院	栽培品种	54	85-15	波兰	栽培品种
18	闽红 964	福建农科院	栽培品种	55	F65	未知	栽培品种
19	H318	中国麻类所	栽培品种	56	AS-277	澳大利亚	栽培品种
20	H316	中国麻类所	栽培品种	57	AS233	澳大利亚	栽培品种
21	LC0301	中国麻类所	栽培品种	58	阿联红麻	埃及	栽培品种
22	福红 992	福建农大	栽培品种	59	ZF78	南非	栽培品种
23	福红 9913	福建农大	栽培品种	60	85-135	菲律宾	栽培品种
24	ZH-01	浙江棉麻所	栽培品种	61	PA264	巴基斯坦	栽培品种
25	K03-2	广西大学	栽培品种	62	85-13	苏丹	栽培品种
26	中国红麻 4 号	中国麻类所	栽培品种	63	塔什干	原苏联	栽培品种
27	青皮 3 号	越南	栽培品种	64	GA42	加纳	半野生种
28	02-11 (绿)	福建农大	栽培品种	65	ZB90	赞比亚	半野生种
29	02-12 (无刺)	福建农大	栽培品种	66	IDN147	印尼	半野生种
30	02-29 (绿)	福建农大	栽培品种	67	85-244	肯尼亚	半野生种
31	02-31 (红)	福建农大	栽培品种	68	SL-254	萨尔瓦多	半野生种
32	02-51(绿)	福建农大	栽培品种	69	ZM412	津巴布韦	半野生种
33	KB11	中国麻类所	栽培品种	70	NA414	尼日利亚	半野生种
34	KB2	中国麻类所	栽培品种	71	85-132	苏丹	半野生种
35	SCS11-04	德国	栽培品种	72	MX247	墨西哥	半野生种
36	SCS11-06-1	德国	栽培品种	73	ZB324	赞比亚	半野生种
37	SCS11-09	德国	栽培品种	74	SD124	苏丹	半野生种

3.1.2 主成分二维分析

从主成分分析可以看出,前3个主成分累计贡献率达76.43%,因而品种间这三个主成分值的特征向量在较大程度上反映出它们基因型的遗传差异。本研究以第1主成分作横坐标,分别以第2和第3主成分分别为纵坐标做成二维散点分布图(图3.1,图3.2),可以更加直观地揭示红麻品种间基因型产量与品质综合性状的遗传差异状况,使之更具直观、简便地显示出各品种遗传潜势自然类型分类的特点。

在供试品种中,第1和第2主成分二维排序图(图1)上品种的横坐标与纵坐标值越大,其纤维产量与皮骨比(出麻率)的综合性状越好。从图1可见当在横坐标1.5处作竖切线,在纵坐标0.5处作横切线,可把74个品种散布图分划成I、II、III和IV4个象限,其中第I象限中的13个品种,即:福红02-9(14)、福红992(22)、02-51(绿)(32)、02-31(红)(31)、福红9913(23)、02-29(绿)(30)、福红6号(6)、福红2-1(1)、H318(F₂)(19)、福红2号(2)、83-20(53)、闽红964(18)、H316(20)等为综合性状优良和较高出麻率的红麻种质资源。在第II象限中共有5个品种,即福红992(绿)(13)、非洲裂叶(48)、泰红763(51)、金山无刺(早)(49)、福红991(红)(12)。在第III象限中,有11个品种为高出麻率中等产量的种质资源,即:金山无刺((晚)(50)、GA42(64)、02-12(无刺)(29)、CSC11-09(37)、福红7号(7)、ZB90(65)、85-244(67)、IDN147(66)、SL-254(68)、ZM412(69)、AS233(57)、KB2(34)和AS-277(56)。这些品种的皮骨比和出麻率较高,是选育麻纺优良品种的理想亲本。而在第IV象限中的其他多数品种是产量和出麻率、皮骨比均为较低品种资源。福红991(红)(12)、福红992(绿)(13)、非洲裂叶(48)、泰红763(51)、金山无刺(早)(49)等5个品种是丰产性与出麻率及皮骨比结合最好、表现最突出的优良品种,是麻纺与造纸兼用的最佳品种。

从第1和第3主成分二维排序图(图2)可见,当在横坐标0.9处作竖切线,在纵坐标1.0处作横切线,可把74个品种散布图分划成I、II、III和IV4个象限,其中第I象限中有22个品种。其中有产量较高品质优良的品种20个,即:福红3号(3)、福红5号(5)、Bg52-1(44)、福红2号(2)、福红4号(4)、02-11(绿)(28)、02-29(绿)(30)、福红2-1(1)、福红02-9(14)、闽红964(18)、泰红763(51)、金山无刺(早)(49)、福红6号(6)、H316(20)、C2032(38)、H318(19)、非洲裂叶(48)、福红9913(23)、02-51(绿)(32)和02-31(红)(31)。其中13个是福建农林大学选育的品种,H316(20)和H318(19)是中国农科院麻类研究所提供的品种。第II象限有6个品种,即:ZM412(69)、福红991(红)(12)、02-12(无刺)(29)、福红951(红)(10)、福红952(绿)(11)、福红992(22)。其中的5个是由福建农林大学选育的品种,它们是高产与优质兼顾最好的品种。第

III象限有8个品种，即金山无刺（晚）(50)、福红9号(9)、H305 (43)、福红8号(8)、红引135(40)、闽红321(17)、福红7号(7)和SSCS11-09 (36)。它们是品种优质、产量中等的品种，是红麻遗传改良上值得重视和可利用的优良种质资源。而在第IV象限中的大多数品种是产量和品质均为较低品种资源。

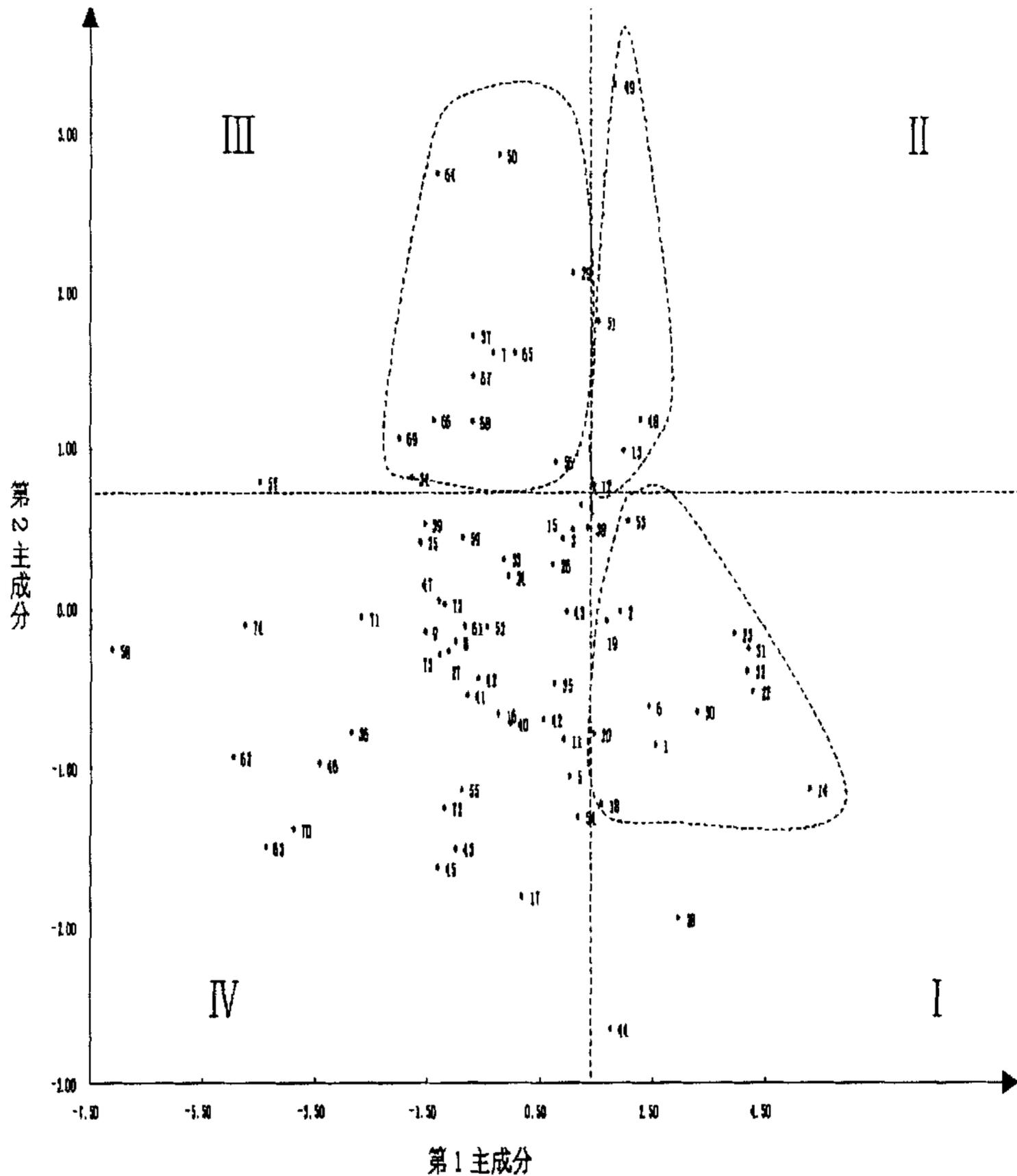


图 3.1 74 个红麻品种第 1、2 主成分二维排序图
 Fig 3.1 2D-sorting fig. based on the first and second principle components of 74 kenaf cultivars

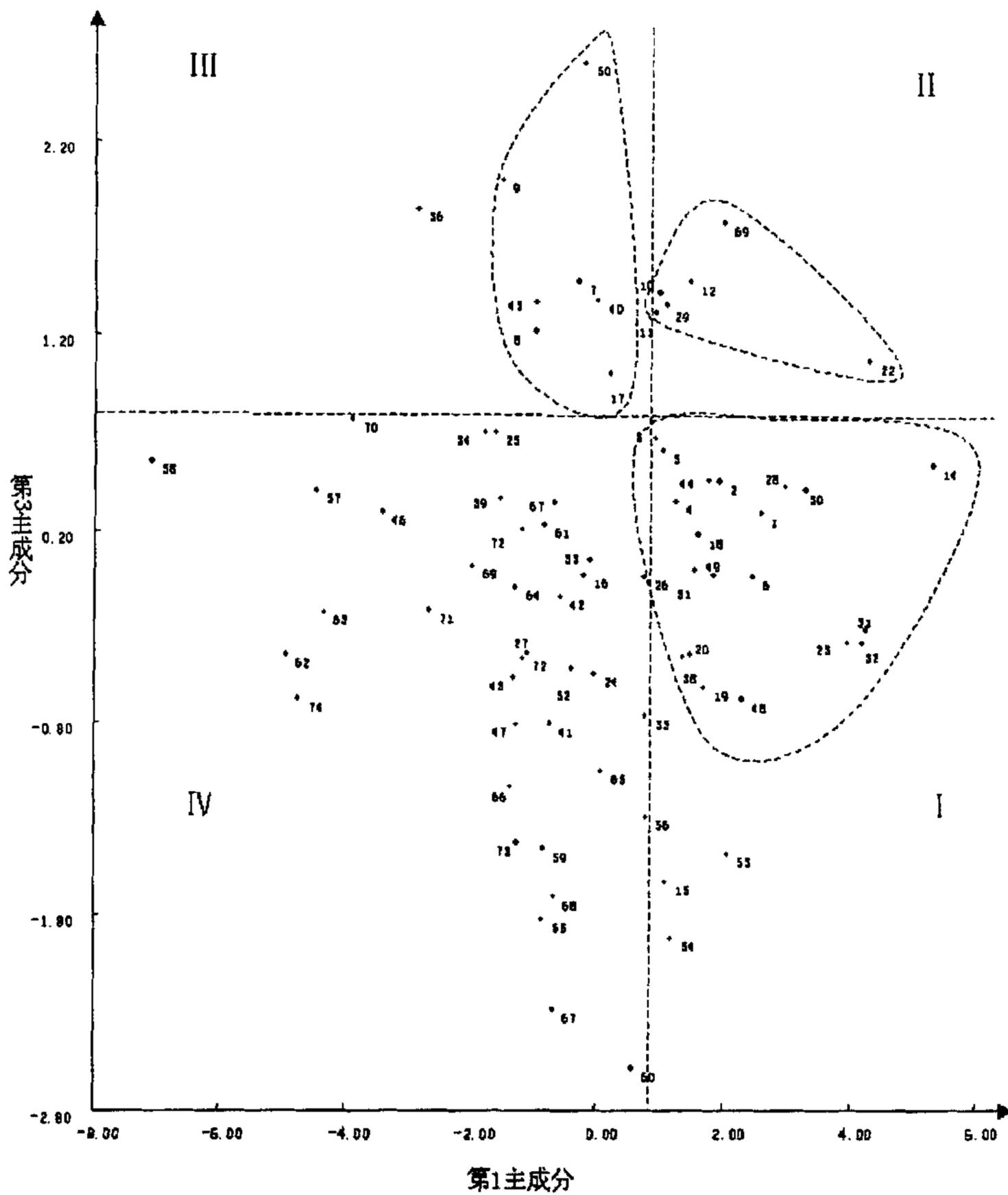


图 3.2 74 个红麻品种第 1、3 主成分二维排序图

Fig 3.2 2D-sorting fig based on the first and third principle components of 74 kenaf cultivars

注：图 3.1、图 3.2 的代号为 3.2 代号相同

3.1.3 聚类分析

3.1.3.1 供试品种纤维产量评价及其聚类分析

74 份红麻遗传资源系统聚类结果如图 3.3。当横切线取值 $D = 25.18$ 时可把 74 份品种分成 2 类，即由 58 个品种聚成的一个大类群和 16 个品种组成的小类群及单一品种自成体系的个类，这显示出 74 个品种基因型间的遗传差异。由考种数据可知，这 16 个种质资源的单株干皮重、纤维支数等性状与其它供试品种有较大差异，因此必为另类。

进一步对聚在一个大类群的 58 个品种分类分析，结果见图 3.4。当横切线取值 $D = 20.08$ 时可把 58 份品种分成 10 类，即由 32 个品种聚成的大类群、由 12 个品种组成的中类群、由 3 个品种组成的三个小类群，以及由 ZB90、Bg52-1、福红 6 号、85-135 和粤引 4 号 5 个单一品种自成体系的个类。显示出 58 个品种基因型间的遗传差异。各类群性状特征如表 3.3。

3.1.3.1.1 第 I_1 类群的数量分类及性状特征

从表 3.3 可知，第 I_1 类群有 32 个品种组成，即：福红 2-1、福红 5 号、闽红 964、福红 952(绿)、闽红 88/31、ZH-01、中国红麻 4 号、古巴 8 号、SCS11-04、C2032、福红 3 号、福红 4 号、非洲裂叶、金山无刺(早)、H305、AS-277、泰红 763、LC0301、83 引 17、青皮 3 号、GA42 ZDN147 SCS11-09、福红 2 号、02/29(绿)、福红 7 号、02/12(无刺)、红引 135、闽红 321、福红 951(红)、福红 991(红)和 02/11(绿)。性状特征是：品种产量性状表现中上，纤维品质性状优良。主要性状特征在平均单株干茎重(80.0g)、皮骨比(64.0%)、纤维支数(288.2 支)等这 3 个性状表现相对较突出(表 3.3)。而其它性状如株高、茎粗等表现为中等偏上。说明这 32 个品种在韧皮纤维的利用上有较大的遗传优势。

3.1.3.1.2 第 I_2 类群的品种组成及性状特征

第 I_2 类群由 12 个品种组成，即：福红 8 号、福红 9 号、MX247、ZB324、KB2、粤引 1 号、粤 743、ZF78、SL-254、KB11、PA264 和 EV-41。其株高、茎粗、单株鲜茎重等产量性状表现一般，出麻率和皮骨比表现中等，纤维支数达 278.3 支。说明它们在品质上比较优良。

3.1.3.1.3 第 I_4 类群的品种组成及性状特征

第 I_4 类群由 K03-2、ZM412、SCS1-06-1 等 3 个品种组成，其株高、茎粗、单株鲜茎重等产量性状表现一般，出麻率和皮骨比表现中等，纤维支数达 304.2

支，明显高于其它类群。

3.1.3.1.4 第 I₅类群的品种组成及性状特征

第 I₅类群由 83 引 6、85-244、F65 等 3 个品种组成，其株高、茎粗、皮厚、单株鲜茎重等产量性状表现一般，鲜茎出麻率和皮骨比表现中等。

3.1.3.1.5 第 I₆类群的品种组成及性状特征

第 I₆类群由 H318、H316 和 83-20 等 3 个品种组成，其株高 4.7 米，明显高于 I₁、I₃ 等其它类群，而且它们在单株鲜茎重、单株生皮重、单株干皮重等产量性状表现优异，但是它们得纤维支数和皮骨比表现中等。

3.1.3.1.6 其它个类的组成及性状特征

I₇-I₁₀ 等 5 个类每个只有一个品种，分别为 ZB90、Bg52-1、福红 6 号、85-135 和粤引 4 号。如图 3.3 所示，第 I₂ 类群有 1 个品种即 ZB90，这个品种性状特征是株高 4.0m，茎粗 2.5cm，皮厚 1.4mm，其综合产量性状的表现较突出，和其它品种有较大差异，说明 ZB90 属于产量性状优良、丰产性好的种质资源。从表 3.3 还可以看出，其皮骨比也较非常高，但纤维支数表现一般。ZB90 与其它品种在性状表现上仍有一定差异。Bg52-1 产量性状表现中等偏上，出麻率、皮骨比较低，纤维拉力和纤维支数等品质性状表现较差。福红 6 号产量性状表现很好，株高、茎粗、皮厚、单株干皮重、皮骨比等产量性状表现优良；纤维指数达到 276.8 支，表现为中等偏上。85-135 的株高、茎粗、皮厚、单株干皮重、皮骨比等产量性状表现为中等偏上。粤引 4 号表现一般。这 5 个单一品种的基因型与其它类群的其它品种有一定差异，其中 ZB90、Bg52-1、85-135 和粤引 4 号等 4 个品种分别来自赞比亚、马里、菲律宾和古巴；福红 6 号的杂交亲本之一为国外品种。

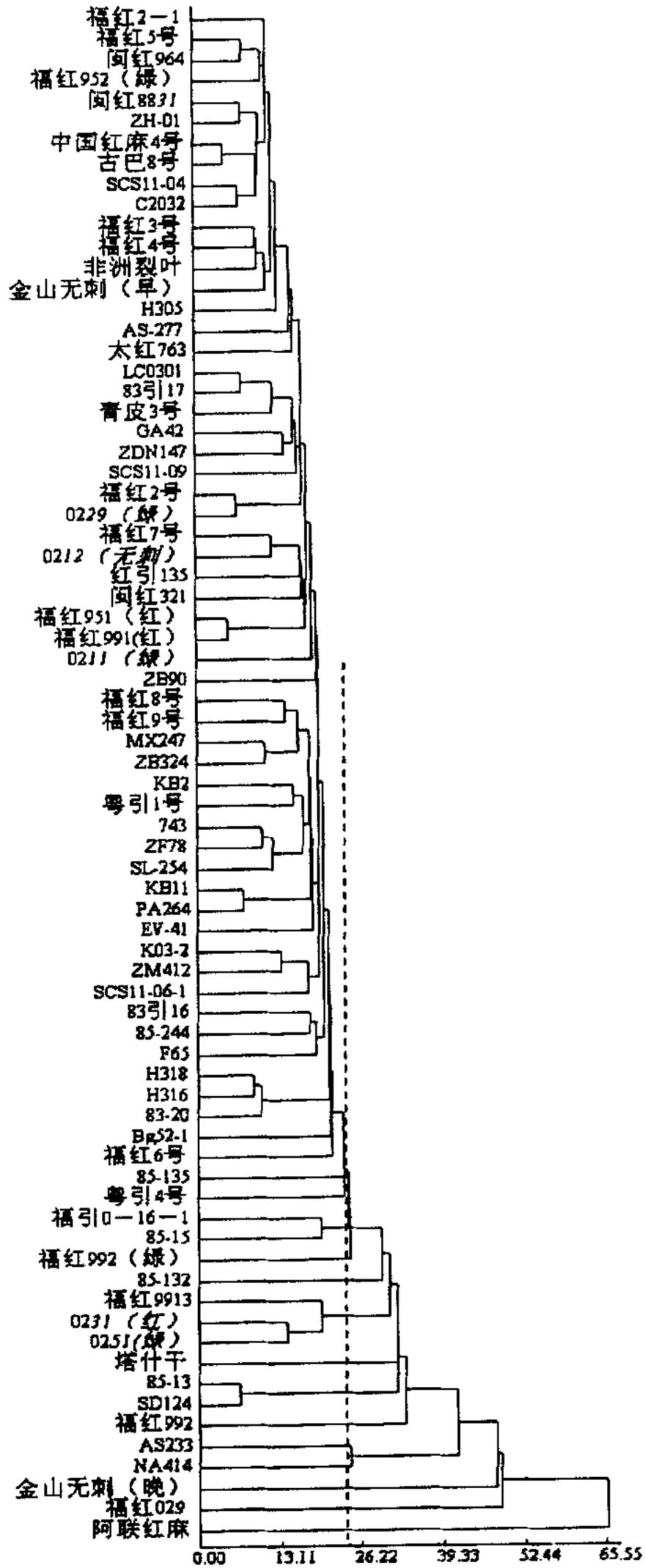


图 3.3 74 份红麻材料系统聚类图

Fig. 3.3 Hierarchical cluster diagram of 74 kenaf accessions

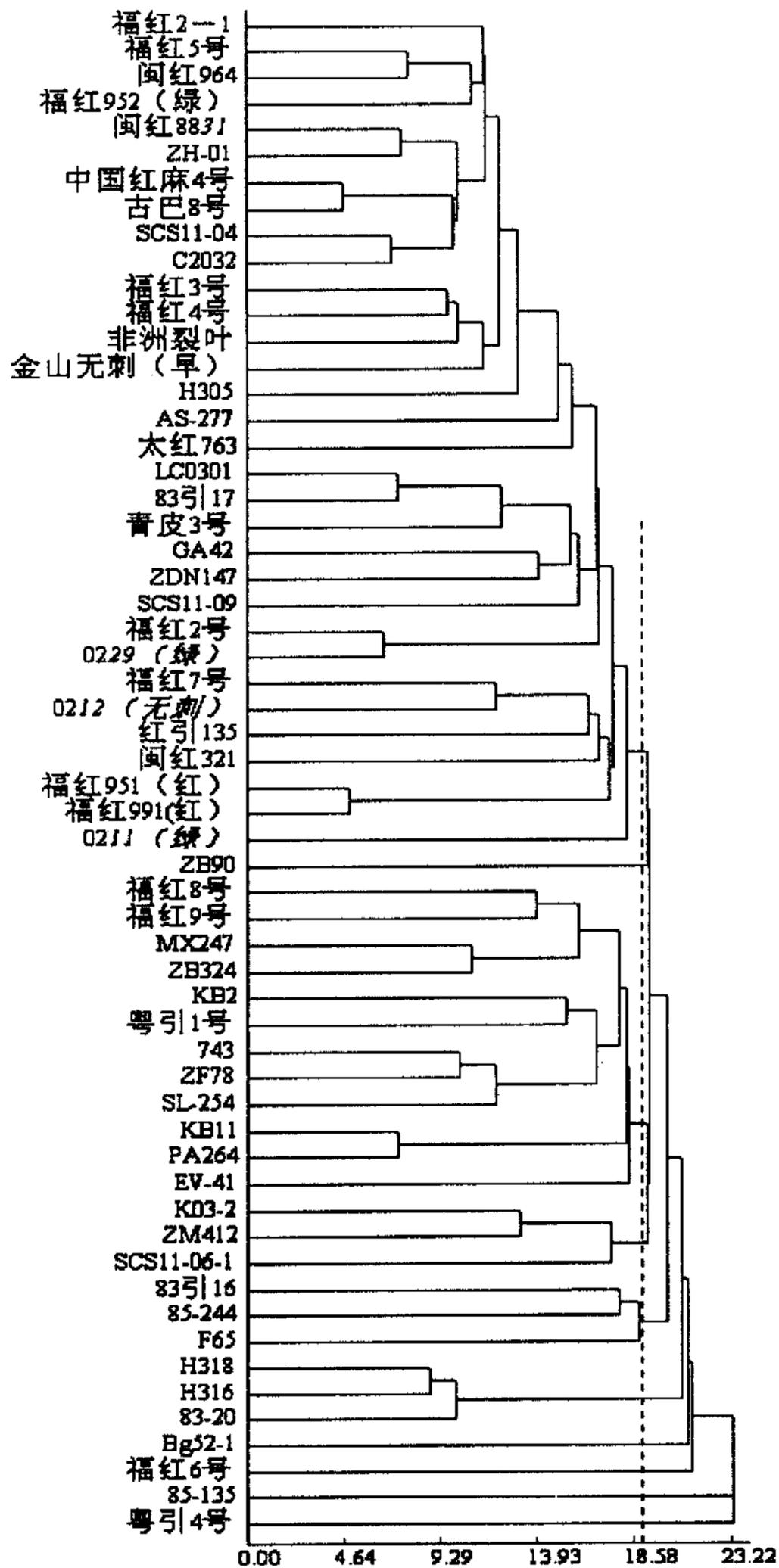


图 3.4 58 份红麻材料系统聚类图

Fig. 3.4 Hierarchical cluster diagram of 58 kenaf accessions

表 3.3 58 份红麻品种聚类群及其性状特征

Table 3.3 The classification and characters of 58 kenaf varieties

性状	类群									
	I ₁	I ₂ (ZB90)	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆	I ₇ (Bg52)	I ₈ (福红 6 号)	I ₉ (85-135)	I ₁₀ (粤引 4 号)
株高 (m)	4.4	4.0	4.0	4.1	3.9	4.7	4.7	4.6	4.0	4.4
茎粗 (cm)	2.4	2.5	2.3	2.3	2.4	2.4	2.7	2.6	2.6	2.4
壁厚 (mm)	1.6	1.4	1.5	1.5	1.5	1.6	1.8	1.8	1.4	1.6
单株鲜茎重 (Kg)	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0	1.2	1.3	1.2	1.2	0.9
单株生皮重 (g)	413.1	423.3	354.2	321.1	389.3	438.1	433.3	453.3	400.1	346.7
单株干皮重 (g)	82.0	84.1	70.6	64.2	78.2	89.4	79.0	89.8	86.9	68.9
鲜茎出麻率 (%)	8.0	7.9	7.7	7.3	7.7	8.4	8.0	8.3	8.0	7.6
晒干率 (%)	19.8	19.9	19.9	20.0	20.1	20.4	18.2	19.8	21.7	19.9
皮骨比 (%)	64.0	77.7	57.1	58.4	61.7	61.2	51.7	62.2	50.2	62.2
纤维支数 (公支)	288.2	253.2	278.3	304.2	227.7	249.5	272.9	276.8	241.1	228.4

3.2 红麻品种 SRAP 标记聚类分析

3.2.1 对 84 个材料的 SRAP 标记聚类分析

由图 3.5 可以看出, 以 84 个红麻材料进行聚类分析时, 在遗传相异系数为 19.5% 处作切割线 L1 时, 84 份红麻材料可分为两个部分, 呈分散分布的 H029、H038、H118、H070、H102、H076、H098、H060 和 H094 等 9 个材料均是野生种。另一类群 75 个材料是由半野生种和栽培种组成的。

对 9 个野生种进行分析时, 可以见到它们不仅与近缘野生种和栽培种的亲缘关系较远, 而且它们之间的亲缘关系也较远。从农艺性状观察可知, 它们在株高、

茎粗、分枝数、开花期等方面有独特的表现。把 H070 和 H102 的叶、花、果拍摄的照片与栽培品种（福红 2 号）对照可以看到它们在形态上是很独特的（照片见附录）。

当在遗传相异系数为 12.5% 处对由 75 个材料组成的大类群分析作切割线 L2 时，这 75 份红麻材料可分为两个部分，即包括 14 个材料的半野生种和 61 个材料的栽培品种。

半野生种类群包括 IDN147（印尼）、85-244（肯尼亚）、SL-254（萨尔瓦多）、ZM412（津巴布韦）、NA414（尼日利亚）、MX247（墨西哥）、ZB324（赞比亚）、85-132（苏丹）、SD124（苏丹）、UG93（乌干达）、85-13（苏丹）、ZB90（赞比亚）、塔什干（前苏联）、GA42（加纳）。它们在农艺性状上与栽培品种差别不大，而与野生种差别很大。说明它们在渐进的演化中其基因型已经与栽培种趋向一致。其中塔什干是一个特例，它是前苏联一个典型较为古老的品种，我国在 1927 年引进，曾在我国北方地区大量种植。塔什干和 GA42 聚在一起，说明它们的亲缘关系很近，这是由于前苏联品种的亲本来源于非洲。从这里也可以看到红麻在演化路线是以非洲为中心，后来扩散到包括前苏联的欧洲地区。H118 是近缘野生种，它在形态特征和农艺性状上是非常独特的；其红叶红秆红花，开花期和成熟期极晚；而且从其基因组分子标记的结果来看，它的基因组与其它种质和品种有很大的特异性。因此 H118 是很稀有的重要育种材料。

另外 61 个品种分布在一个大的类群中，其中大部分是我国各个育种单位在八五至十五期间选育成的新品种，少部分是由国外引进的栽培品种。

对 61 个品种在在遗传相异系数为 8.5% 处作切割线 L3 时，它们又可以分为两个部分，从而把国外品种和国内品种分别开来。以分散分布的 14 个材料大多是国外引进的栽培品种；剩余的归在一个类群中的 47 个品种是国内育成的品种和在国内长期种植的国外引进品种。

3.2.2 对 69 个材料的 SRAP 标记聚类分析

由于 84 份材料在聚类时分布太密，不太容易进行分析。为方便起见，剔除野生种 15 份材料，把 69 份材料单独聚类分析，聚类图见图 3.6。

对 69 个材料在在遗传相异系数为 19.1% 处作切割线 L2 时，可以把半野生种和栽培品种分开。此切割线相当于对 84 个材料分析时的切割线 L2。9 个半野生种分为一类，它们大多数来自于非洲，如赞比亚、苏丹、乌干达、肯尼亚、尼日

利亚等国家。另外 60 个材料都是国内或国外育成的栽培品种。

对 60 个栽培品种在遗传相异系数为 11.8% 处作切割线 L3 时, 可以把国外栽培品种和国内栽培品种分开。国内栽培品种 33 个, 国外栽培品种 27 个。

3.2.2.1 对国外引进的栽培品种分析

对国外品种类群进行分析时, 金山无刺(早)和 H305 是两个例外。金山无刺(早)是由福建农林大学育成的品种。由于金山无刺(早)是由外源 DNA (黄麻) 导入结合核物理辐射选育的稀有无刺早熟特异种质, 因此与其它品种有明显区别, 是一个基因型比较独特的稀有种质材料, 从而在分子标记中把它和从国外引进的栽培种聚在一起。因此它在杂交育种中可作为稀有新型亲本加以利用, 其种子产量和亚油酸含量高, 是油麻兼用难得的宝贵材料。

阿联红麻是从埃及引进的栽培品种, 它单独成为一类。从形态上看, 阿联红麻有特殊的农艺性状。它是圆叶红茎, 叶柄也是红色的。其千粒重特别大, 其基因组 DNA 分子标记的差异是和其形态上的差异相符合的。

金山无刺(晚)是从金山无刺(早)选育出来的新品系。因为金山无刺(早)成熟期很早, 它的产量不高。为了提高它的产量和品质, 用它和福红 7 号杂交, 通过多代回交和无刺选择, 育成晚熟无刺品种。因此其基因组同源性比金山无刺(早)更接近于国内栽培品种。在聚类图中它与从国外引进的栽培品种聚在一起。

泰红 763、AS-277 和 AS233F 分别从泰国和澳大利亚引进的品种, 它们聚在一起, 说明它们的亲缘关系较近。这与它们的传播和亲缘关系有关。

SCS11-06-1、C2032、EV-41、红引 135、SCS11-09、83 引 6、83 引 7、Bg52-1 和粤 743 分布在一个类群里面, 它们分别来自德国, 古巴, 美国, 马里等国家。说明它们的基因型差异较小, 亲缘关系较近, 这与其所使用的杂交亲本的来源可能有较大的关系。

3.2.2.2 对国内栽培种分析

在对国内品种分析时, 在遗传相异系数为 9.7% 处作切割线 L4, 可以把这 33 个材料分成四个类群。

最大的一个类群是由 20 个品种聚为一类。其中 14 个是由福建农林大学育成的品种, 3 个是由中国麻类研究所提供的品种, 3 个是福建农科院提供的品种。福建农林大学育成的品种福红 3 号、福红 4 号、福红 5 号、福红 6 号、福红 7 号、福红 8 号和福红 9 号聚在一起。由于红麻是常异交作物, 异交率达 20% 以上。

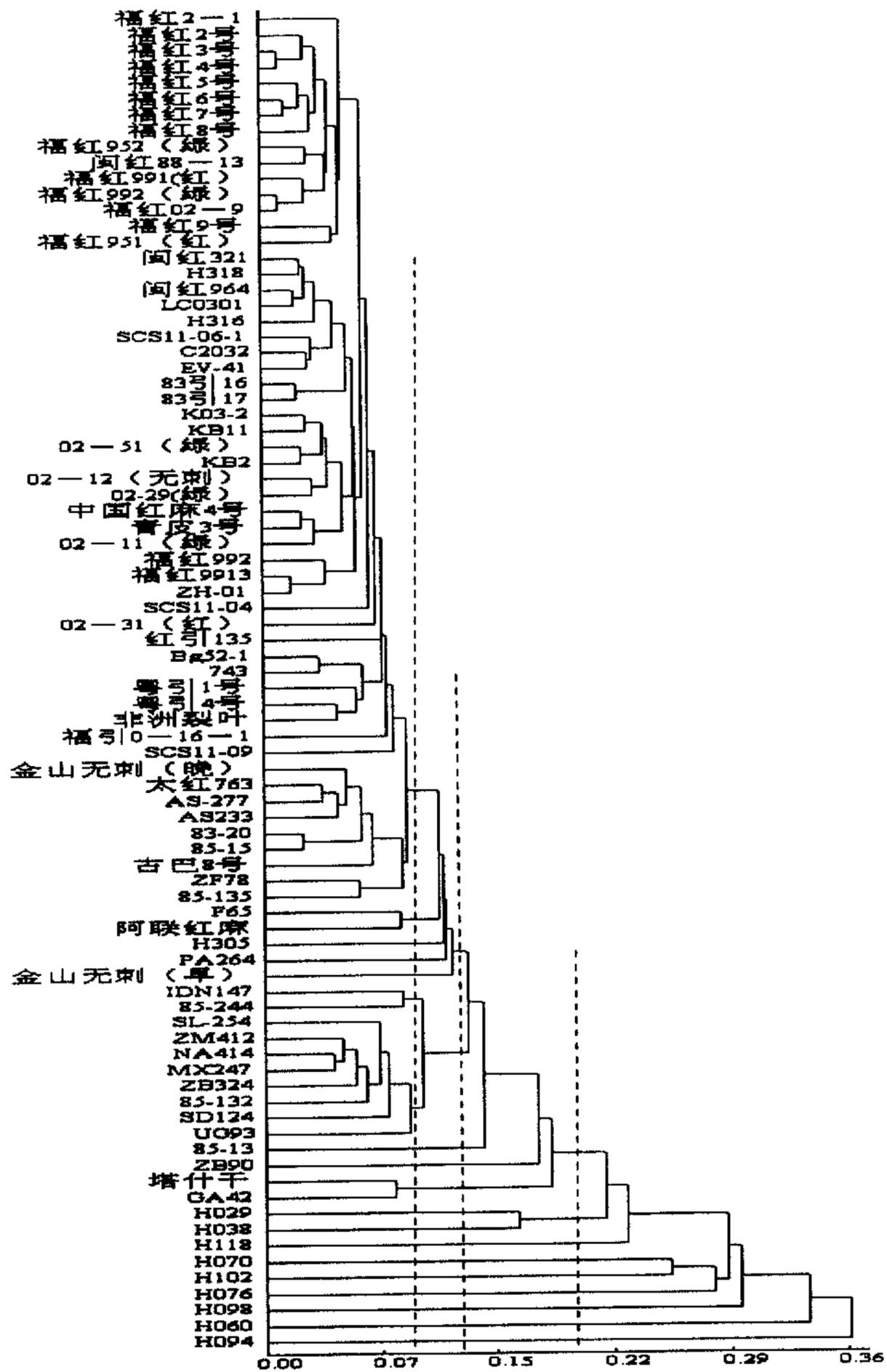


图 3.5 基于 SRAP 数据绘制的 84 份红麻材料之间的聚类图

Fig3.5 Dendrogram of cluster of 84 kenaf accessions based on SRAP markers

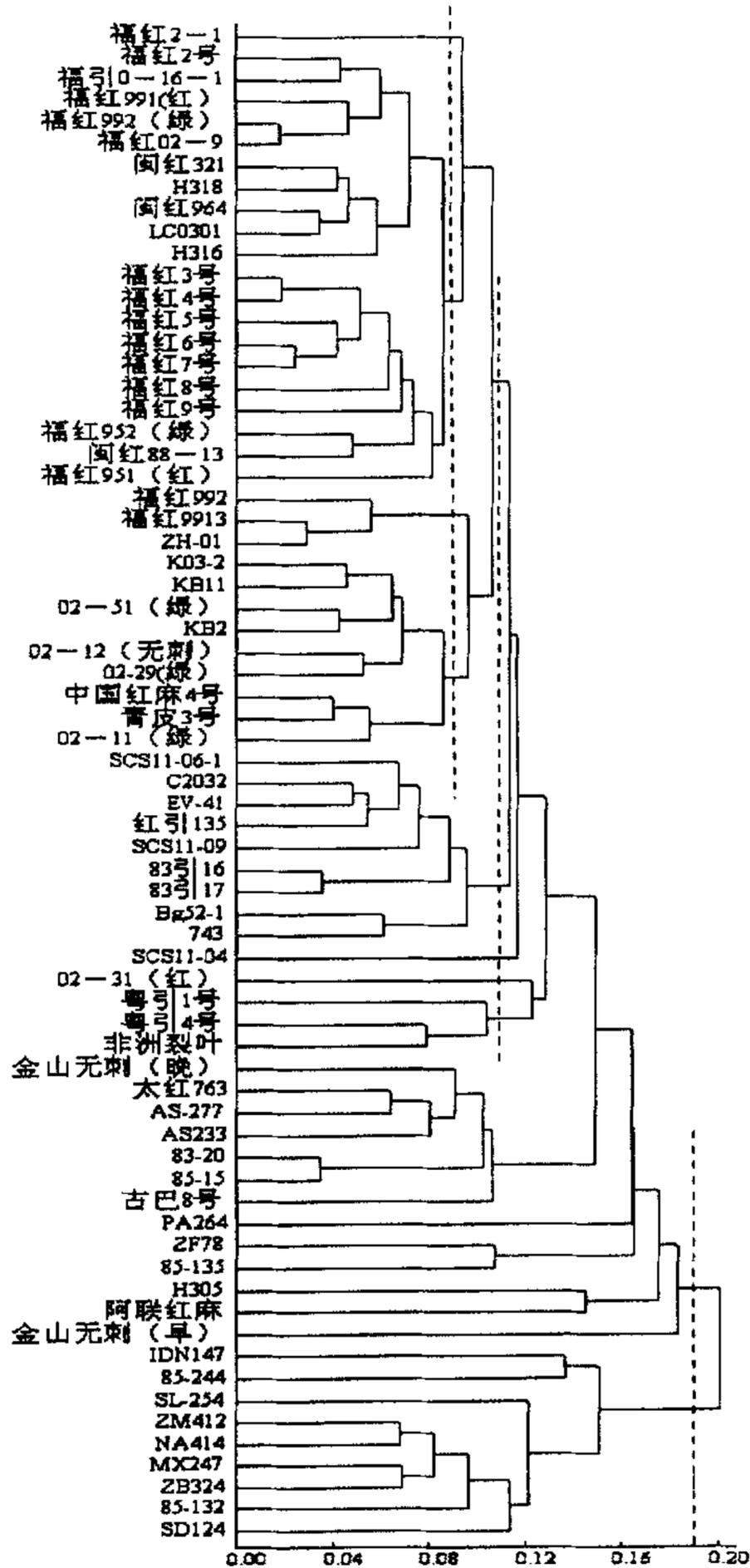


图 3.6 基于 SRAP 数据绘制的 69 份红麻材料之间的聚类图

Fig3.6 Dendrogram of cluster of 69 kenaf accessions based on SRAP markers

4. 小结与讨论

4.1 关于红麻优异种质的主成分及系统聚类分析与评价

4.1.1 优异种质资源性状主成分分析与优异品种评价

主成分分析可以从产量和品质构成的诸多因素关系中揭示基因型的特征与特点。红麻品种产量与品质也是由多个数量性状构成，通过主成分分析，可以了解供试品种产量与品质性状主成分构成因子及其特征和生物学意义，进而筛选出优良品种供生产应用，并为品种的客观评价和品种选育提供科学直观的参考依据。供试 74 份红麻品种主成分分析结果表明：前 4 个主成分分别为韧皮纤维产量构成因子（52.68%）、茎秆皮骨比构成因子（12.96%）、纤维品质构成因子（10.77%）、晒干率构成因子（9.18）。其累计贡献率达 86.07%，均有互为独立的性状构成因子。其主成分构成因素合理，能够较客观地揭示红麻优异种质主成分的向量特性。

4.1.2 系统聚类分析

在 74 份红麻材料聚类图中，当取值 $D = 25.18$ 时可把 74 份品种分成 2 类，即由 58 个品种组成 1 个大类群和由单个品种组成的个类群体。对聚在一个大类群的 58 个品种和种质资源进一步单独聚类分析，当横切线取值 $D = 20.08$ 时可把 58 份品种分成 10 类，即由 32 个品种聚成的大类群、由 12 个品种组成的中类群、各由 3 个品种组成的三个小类群，以及由 ZB90、Bg52-1、福红 6 号、85-135 和粤引 4 号 5 个单一品种自成体系的个类。这 5 个单一品种的基因型与其它类群的其它品种有一定差异，其中 ZB90、Bg52-1、85-135 和粤引 4 号等 4 个品种分别来自赞比亚、马里、菲律宾和古巴；福红 6 号的一个亲本为国外品种；这些品种在品种遗传改良上有重要的利用价值，是宝贵的种质资源。本实验对 74 份红麻种质资源 10 个性状的聚类，能较好地对品种资源综合性状的差异所构成的不同类群进行科学评价，以便更好地了解品种特性，为红麻品种基因型遗传改良提供科学利用的客观依据。

4.2 关于红麻优异种质的遗传多样性与亲缘关系 SRAP 分子标记研究

4.2.1 供试红麻材料的数量对研究结果的影响

在以前对红麻的种质资源遗传多样性和亲缘关系的研究中，大多数使用 20

到 40 个材料。因为红麻是很早被人类利用分布范围很广的作物，它的基因型多态性高，较少的材料不足以更精确的分析其种质资源的遗传基础。本研究采用 84 个材料作为研究对象，它们包括从世界各地尤其从东非征集的材料、我国栽培的古老品种和多个红麻育种单位 20 多年选育的品种。因为材料涵盖的范围广，本研究能更准确地鉴定红麻的种质资源遗传多样性和亲缘关系及对它们的遗传基础进行科学分析，并为红麻杂交育种亲本利用提供科学的理论依据。

4.2.2 红麻 DNA 提取质量对 SRAP 的影响

红麻材料 DNA 的提取质量往往是决定 PCR 成功与否的关键。由于红麻叶片中含有大量单宁、多糖类及色素等物质，同时蛋白质含量也较高，且越老的叶片中这些杂质含量越高，这些物质易与 DNA 结合形成粘稠的胶状物，既难溶解，又易抑制 Tag 酶活性，从而影响 PCR 反应的质量。本研究以刚采摘的新鲜幼嫩红麻叶片为材料，用足量的液氮一次性研磨成粉末，研磨时加入非水溶的 PVP 及 β -巯基乙醇，有效的防止了褐变。加入提取液之前加 150~300 μ l 的 β -巯基乙醇。提取过程中增加用氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提的次数，以彻底去除蛋白质、色素等各类杂质。DNA 提取时操作不当会使 DNA 严重机械损伤，因此在试验的操作过程中既要保证充分的混匀，又要防止剧烈的震荡。经紫外分光光度计检测所获得的部分 DNA (所含 RNA 对扩增无影响) 能够较好的进行 SRAP 分析。对含 RNA 和蛋白质含量很高而影响 PCR 扩增的红麻 DNA 进行了纯化，纯化后的 DNA 杂质含量很少，可较好地满足实验的要求。

4.2.3 不同引物对 SRAP 分子标记的影响

引物大小和引物组合是成功进行 SRAP 分析的关键。多数 SRAP 产生高强带，很少有重叠。研究发现 SRAP 不同引物的扩增效果存在较大差异。本研究在对 255 个引物组合的筛选结果看，发现扩增产物的多态性与引物有关。可见引物的筛选在 SRAP 分子标记中起着重要的作用。

4.2.4 关于 SRAP 分子标记的稳定性与多态性

新型的 SRAP 标记技术因使用较高的退火温度和较长的引物，不但保证了扩增的稳定性，而且产物易测序，从而可以提供给更多的遗传信息。因此，SRAP 可以弥补 RAPD 和 ISSR 的缺陷，使优良的基因得以稳定定位，从而可使分子标记辅助育种真正的在红麻上得以实现。

由于 SRAP 特殊的引物设计，可检测基因的可译框区域，因而体现的是物种

基因之间的多态性，所检测的结果更能反映物种的遗传多样性和亲缘关系。

4.2.5 SRAP 分子标记在红麻种质资源研究中应用的可行性

不同红麻种质在纤维产量和纤维品质等方面存在着明显的差异。但仅凭红麻的农艺性状如外观、叶型、株高、茎色、工艺成熟期等无法鉴定品种遗传基础的差异程度。因此应用现代分子生物技术尤其是分子标记技术在对红麻的遗传多样性和亲缘关系的研究中显得尤为重要。研究红麻分子标记起步较晚，目前对红麻种质资源的遗传关系仍缺乏全面的了解。以往的研究仅仅对三十多份到四十份红麻进行RAPD和ISSR分子标记的探索。已有的研究表明，SRAP技术是一种研究种质资源遗传多样性和亲缘关系及建立种质的DNA指纹档案等的有效方法。本研究用筛选出的26对SRAP引物组合对84份红麻材料进行PCR扩增，共扩增出329条条带，平均每个引物12.62条，其中多态性条带共248条，占总数的75.4%。而且根据所得条带进行聚类分析后，分别用84个红麻品种和69个品种按亲缘关系远近划分为不同的类群。由此可见，SRAP技术可以很好地确定红麻种质资源的遗传多样性和亲缘关系远近，又能够提供基因组DNA丰富的信息，是红麻种质资源研究中快速、可靠、有效的新技术，能为杂交育种亲本组配提供可靠的依据。

通过用SRAP分子标记的分析，能很好的把野生种和栽培种、国外引进的栽培种和国内选育的栽培种以及国内各个育种单位选育的品种很好的区分开来。而且SRAP分子标记和形态差异基本吻合的，表明应用这种技术对红麻进行遗传多样性和亲缘关系分析具有更高的可信度。

4.2.6 红麻优异种质遗传多样性与亲缘关系

依据对69个供试红麻品种和种质用SRAP分子标记的遗传相似系数聚类后，可将69份红麻材料的野生种和栽培种、国外栽培种和国内栽培种及国内不同育种单位的栽培种聚为不同的类群。虽然国内栽培种由不同来源的亲本培育而成，但由于育种单位在繁种时长期种植在一起，发生异交和基因交流，使它们的基因型逐渐趋向一致。金山无刺（晚）是福建农林大学用红麻DNA导入红麻而选育的，在聚类图中它归在国外栽培种中，因此它的基因型与国内栽培种有很大的差别。金山无刺（晚）具有茎秆光滑无刺、纤维品质优良，丰产性较好，种子产量特别高等优点，是一个基因型比较独特稀有的宝贵种质材料，可在杂交育种中作为亲本加以利用。

参考文献

- [1] 卢浩然主编. 中国麻类作物栽培学. 北京: 农业出版社, 1993: 151-155
- [2] LiZ-D(李宗道). Theory and Techinology of Fiber Crops(麻类的理论与技术). Shanghai:Shanghai Technology and Science Press, 1980, 541-595
- [3] 孙志强. 红麻种质资源遗传多样性的 ISSR 分子标记研究. 福建农林大学硕士学位论文, 6-15
- [4] 林培青, 林荔辉, 吴建梅, 等. 中晚熟红麻新品种福红 4 号的选育. 中国麻业 2004, 26 (1) 1-3
- [5] 林培青 祁建民 林荔辉 李维明. 加强红麻种业体制建设和产品综合开发的若干思考. 福建农业科技 2000 年, 6
- [6] 邓丽卿, 粟建光, 黄培坤, 等. 红麻种质资源的形态及分类研究. 中国麻作, 1991 (4): 16-20
- [7] 程舟, 鲛岛一彦, 陈家宽. 日本的红麻研究、加工和利用. 中国麻业, 2001, 23 (3): 16-24
- [8] 邓丽卿, 粟建光, 李爱青. 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
- [9] 李宗道著. 麻类的理论与技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1980b, 523
- [9] 刘娇. 叶蛋白饲料资源的开发利用. 湖南饲料, 2002, (4): 29
- [10] 卢浩然主编. 中国麻类作物栽培学. 北京: 农业出版社, 1993: 51-75
- [11] 张根旺, 杨天奎, 郭诤. 生物活性物质 CLA 的研究. 中国油脂 [J], 2000, 25(6):13-16
- [12] 邵群, 张惠, 边际. 功能性油脂——共轭亚油酸研究进展, 食品科学 [J], 2002, 23 (2): 5-7
- [13] 谭石林, 李德芳, 龚友才, 等. 造纸用红麻品种的筛选. 中国麻作, 1998, 20 (4): 25-28
- [14] 李敬机. 红麻制浆造纸现状及发展方向. 中国造纸, 1996 (1): 52-57
- [15] 姚金怀, 胡宝玲, 朱世金. 黄红麻、棉混纺织物的开发与生产. 河南纺织科技, 2003, 24 (4): 28-29

- [16] 程舟. 中日合作开发绿色红麻板材. 林产工业, 2002, 29 (6), 54
- [17] 陶爱芬, 祁建民, 李爱青, 方平平, 等. 红麻优异种质资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析
- [18] 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
- [19] 熊和平. 坦桑尼亚黄麻红麻种质资源考察. 中国麻作, 1989 (4): 5-9
- [20] 卢浩然主编. 中国麻类作物栽培学. 北京: 农业出版社, 1993: 41-55
- [21] 粟建光, 邓丽卿, 罗玲玲, 等. 红麻优异种质在不同生态地区的利用潜力研究. 中国麻作, 1997, 19 (3): 9-12
- [22] 粟建光, 龚友才, 关凤芝, 等. 麻类种质资源的收集、保存、更新与利用. 中国麻业, 2003, 25 (1): 4-8
- [23] 万永芳, 颜济. 小麦近缘野生植物的赤霉病抗性研究. 植物病理学报, 1997, 27 (2): 107-111
- [24] 陈洪福, 张怀芳, 邓丽卿, 等. 红麻种质资源抗炭疽病鉴定. 作物品种资源, 1991, 3: 24-25
- [25] 李爱青. 肯尼亚黄麻红麻种质资源的考察报告. 中国麻作, 1990 (1): 16-21
- [26] Edmonds, J.M.: Herbarium survey of *Corchorus* and *Hibiscus*, IJO technical reports, Dhaka, 1987
- [27] 邓丽卿, 黄培坤, 粟建光, 等. 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
- [28] 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
- [29] 蔡从利, 王建波, 景润春, 等. 山羊草属异源多倍体植物基因组进化的 RAPD 分析. 遗传学报, 2001, 28 (2): 158-165
- [30] 陈尚安, 董玉琛等. 小麦野生近缘植物抗病性鉴定. 中国农业科学, 1990, 23 (1): 54-59
- [31] 黄培坤, 邓丽卿, 粟建光, 等. 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
- [32] 粟建光, 邓丽卿, 俞世蓉, 等. 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

- [33] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. 植物学报, 1996, 38 (12): 954-962
- [34] 祁建民, 黄华康, 林培青, 等. 高产抗病强适应性红麻新品种福红 3 号的选育. 中国麻业, 2003, 25 (3): 105-111
- [35] 陈安国. 红麻雄性不育株的发现及其初步研究. 中国麻业, 2003, 25 (2): 61
- [36] 程舟, 蛟岛一彦, 陈家宽. 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): 1-11
- [37] 程舟, 杨晓伶, 卢宝荣, 等. 红麻种质资源遗传多样性和分子鉴定技术研究. 中国麻业, 2003, 25 (4): 162-167
- [38] 陶爱芬. 红麻优异种质综合评价及其 ISSR 分子标记研究. 福建农林大学硕士学位论文. 3-18
- [39] 陶爱芬, 祁建民, 李爱青, 方平平, 等. 红麻优异种质资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析
- [40] 郭平安, 周鹏, 栗建光. 红麻及其近缘种的 RAPD 分析. 热带亚热带植物学报 2002, 10: 306-312
- [41] 曹德菊, 程备久, 林毅, 等. 抗除草剂转基因红麻的分子验证. 中国麻业, 2001, 23 (3) :1-4
- [42] 祁建民, 李维明, 吴为人, 等. 红麻种质资源创新的理论与实践. 中国麻作, 1999, 21 (1): 43-44
- [43] 陈安国, 李德芳. 红麻杂种优势利用的现状与展望. 中国麻作, 2000, 23(1): 44-45
- [44] 祁建民, 陈幼玉, 周瑞阳, 等. 红麻产量和纤维品质性状的遗传效应与杂种优势分析. 作物学报, 2005, 4:469-475
- [45] 汤清明, 臧巩固. 1997-1998 年国家红麻新品种区域试验总结. 中国麻作, 1999, 21 (2): 5-8
- [46] 汤清明, 臧巩固. 1999-2000 年全国红麻新品种 (系) 区域试验总结. 中国麻作, 2001, 23 (2): 2-7
- [47] 陈双龙, 吴建梅, 洪建基, 等. 福建省 2003-2004 年红麻新品种 (系) 区试实验总结. 中国麻业, 2005, 27 (4): 1-2
- [48] 黄培坤, 邓丽卿, 栗建光, 等. 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
- [49] 路颖, 关凤芝, 王玉富, 等. 国内外亚麻种质资源的综合评价. 中国麻业, 2002, 24 (4): 5-8
- [50] Kawai, S, et al. Manufacture of oriented fiberboard from kenaf bast fibers and its application to the composite panels. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Hiroshima, Japan, Oct, 13-14, 2000:144-148
- [51] 粟建光译. 美国红麻育种的回顾与展望. 中国麻作, 1999, 21 (4): 46-47
- [52] J. M. Dempsey: Fiber crops, Univ. Press Florida, USA, 1979
- [53] Kano, T. Development and project of kenaf board (in Japanese). Reference No. 47 of the Kenaf Society of Kochi & Economic Reports of Ehime, November 10, 1997, 25(44)
- [54] Kashida, H, et al. Processing and quality of kenaf boards made from core (in Japanese). Proceeding of the 47th Annual Meeting of the Japan Wood Research Society in Kochi, April, 1997:265
- [55] Liu, A M. World production and potential utilization of jute, kenaf and allied fiber. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Hiroshima, Japan. 2000:30-35
- [56] 陈安国, 李德芳. 红麻需求分析与育种技术发展趋势. 中国麻业, 2001, 23 (4): 26-30
- [57] 梁明山, 曾宇, 周翔, 等. 遗传标记及其在作物品种鉴定中的应用. 植物学通报, 2001, 18 (3): 257-265
- [58] 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
- [59] 杜金昆, 姚颖垠, 倪中福, 等. 普通小麦、斯卑尔脱小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究. 遗传学报, 2002, 29(5): 445-452
- [60] 高翔, 庞红喜, 裴阿卫. 分子标记技术在植物遗传多样性研究中的应用. 河南农业大学学报, 2002, 36 (4): 356-359
- [61] 李造哲, 扈廷茂. 分子标记及其在植物育种中的应用. 内蒙古农业大学学报, 2000, 21 (3): 102-105

- [62] 刘春林. 分子标记辅助选择与植物品种选育. 作物研究, 1996, 10(1): 47-49
- [63] 黄碧光. 黄麻属几个种核型的初步研究. 福建农林大学学士论文, 1993, 1-6
- [64] 蔡从利, 王建波, 景润春, 等. 山羊草属异源多倍体植物基因组进化的 RAPD 分析. 遗传学报, 2001, 28 (2): 158-165
- [65] 汪小全, 邹喻苹, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. 植物学报, 1996, 38 (12): 954-962
- [66] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性. 植物学报, 2000, 42 (7): 741-750
- [67] 王心宇, 郭旺珍, 张天真, 等. 我国短季棉品种的 RAPD 指纹图谱分析. 作物学报, 1997, 23 (6): 669-676
- [68] 张继益, 董玉琛. 旱麦草属种质资源的随机扩增多态性 DNA (RAPDs) 分析. 遗传学报, 1999, 26 (1): 54-60
- [69] 唐定中, 李维明. 利用 RFLP, AFLP 标记构建水稻分子连锁图. 高技术通讯. 1999, 9 (3): 48-52
- [70] 缪颖. AFLP 分子标记及其应用(综述)亚热带植物通讯. 1999, 28(2): 55-60
- [71] 吴晓雷, 贺超英, 陈受宜, 等. 用 SSR 分子标记研究大豆属种间亲缘关系. 遗传学报, 2001, 28 (4): 359-366
- [72] 何予卿, 张宇, 孙梅, 等. 利用 ISSR 分子标记研究栽培稻和野生稻亲缘关系. 农业生物技术学报, 2001, 9 (2): 123-127
- [73] 刘华清. ISSR 标记在水稻分子遗传图谱构建和稻米蒸煮品质 QTL 定位上的应用. 福建农林大学硕士论文, 1998
- [74] 马朝枝, 傅廷栋, Stine Tuevesson, 等. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性. 中国农业科学. 2003, 36 (11): 1403-1408
- [75] Esseelman E J, Li J Q, Crawford D J, et al. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and RAPD and ISSR markers[J]. *Mol Ecol*, 1999, 8:443-451
- [76] Fang D Q, Krueger R R, Roose M L. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. *J Amer soc Horticul*

- Sci, 1998, 123:612-617
- [77] 祁建民, 周东新, 吴为人, 等. 用 ISSR 标记检测黄麻野生种与栽培种遗传多样性. 应用生态学报, 2003, 14 (9): 1473-1477
- [78] Gilbert J E, Levis R V, Wilkinson M J, et al. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. Theor Appl Genet, 1999, 98:1125-1131
- [79] Jiang Shuye et al. RAPD and ISSR Analysis between Photoperiod Sensitive Genic Male Sterile Rice Nongken58S and its Original Variety Nongken58. Journal of Agriculture Biotechnology, 2000, 8(1):63-66
- [80] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用. 遗传, 2002, 24(5): 613-616
- [80] Tabor HK. Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations[J]. Nature Reviews, 2002, 3:1-7
- [82] 马立人 蒋中华著. 生物芯片[M]. 化学工业出版社, 2000
- [83] Nachman MW. Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans[J]. Trends in Genetics, 2001, 17 (9):481-485
- [84] Brookes A J. The essence of SNPs[J]. Gene, 1999, 234:177-186
- [85] 柳季旺, 龚义勤等. 新型分子标记——SRAP 与 TRAP 及其应用. 遗传, 777-781, 2004 1-5
- [86] G. Li. C. F. Quiros Sequence-related amplified polymorphism(SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction:its application to mapping and gene tagging in Brassica Theor Appl Genet (2001) 103:455-461
- [87] 梁景霞, 祁建民, 等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立. 中国烟草学报. 2005, 11(4):33-38
- [88] Li G. Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP). A new marker system based on a simple PCR reaction:its application to mapping and gene tagging in Brassica .Theor Appl Genet. 2001. 103:455~461. Ammiraju J S, Dholakia B B, Santra D K, et al. Identification of inter simple sequence repeat(ISSR) markers

- associated with seed size in wheat[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102:726-732
- [89] 方宣钧 吴为人 等. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京:科学出版社, 2001
- [90] 王关林 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998
- [91] Ferriol M. Pico B. Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers. Theor Appl Genet. 2003. 107:271-282
- [92] Lin Z, Zhang X, Nie Y, He D , Wu M. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. Chinese Science Bulletin. 2003, 48(19) :2063-2067
- [93] 任玉, 王得元, 张银东. 相关序列扩增多态性 (SRAP) 一种新的分子标记术. 中国农学通报. 2004, 20 (6): 11-13, 22
- [94] 吴冠芸 潘华珍 . 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 25
- [95] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic bbariation in terms of restriction endonucleases. Proc Nell Acad Sci, 1979, 76:5269-5273

附 录

1. 实验所用溶液配方

1.1 DNA 提取 (CTAB 法)

1.5×CTAB

1.5%CTAB	15g	CTAB 粉末
75mM Tris-HCl	75ml	1M Tris-HCl pH8.0
1.5mM EDTA	30ml	0.5M EDTA pH8.0
1.05M NaCl	61.4g	NaCl

加蒸馏水至 1000ml
β-巯基乙醇用前加入(2%)

10% CTAB

CTAB 粉末	100g
NaCl	40.95g

加蒸馏水至 1000ml

TE

10mM	Tris-HCl	pH8.0
1mM	EDTA	pH8.0

1.2 电泳

Tris-硼酸(5×TBE)

Tris-碱	54g	
硼酸	27.5g	
0.5mM	EDTA (pH8.0)	20ml

加蒸馏水至 1000ml, 用时稀释 10 倍 (即 0.5×TBE)

6×Loading Buffer

0.25%	溴酚蓝
40%(W/V)	蔗糖

水溶液于 4℃ 保存

2.聚丙烯酰胺凝胶电泳的步骤为:

A.凝胶配置 (一块板):

30% 聚丙烯酰胺 5.4ml (290 克丙烯酰胺+15 克双丙烯酰胺, 695ml 水)

1XTBE 21.4ml

10% 过硫酸铵 200 ul

TEMED 14-20ul

总体积 27ml

可采用玻璃棒引流, 插入梳子, 用夹子夹紧。

B.电泳:

大约 1 小时后可以上样, 采用 40%蔗糖的上样缓冲液;

电泳缓冲液为 1XTBE, 电泳电压 300V, 时间 2.5 小时;

电泳结束后, 取下胶管, 去掉琼脂糖, 从底部缝隙处敲开玻璃板, 用刀片沿打磨玻璃条划一次, 反转后, 在底角处将凝胶剥离, 利用自身重力从玻板上分离。同时注意保留记号, 以便区分。

C.银染: (一次可 3-4 块胶)

固定: 在小盘中 (略微大于胶的面积), 加 10%的酒精 100ml, 再加 500ul 的冰醋酸。摇匀, 加入凝胶, 摇动, 3-5min;

染色: 加入 1ml 的 20%硝酸银, 摇动 5-8min;

洗涤: 倒去废液, 蒸馏水清洗 2-3 次, 约 1min (时间过长, 带淡而不清晰; 过短, 可能背景深);

显影: 加入 100ml 3%的氢氧化钠和 500ul 甲醛, 震荡, 平行摇动至条带清晰;

洗涤: 自来水冲洗。

注意事项:

丙烯酰胺为粉剂, 具有神经性毒性, 称量时要防止口鼻吸入, 同时也要防止通过皮肤吸收。

硝酸银和皮肤接触后会形成黑点, 使用时要注意防止污染天平、工作台、衣服和皮肤等。

过硫酸铵最好为新鲜的, 不宜超过两星期, 否则条带分散, 不清晰。

3 H070 和 H102 的花、叶、果照片与福红 2 号的比较。

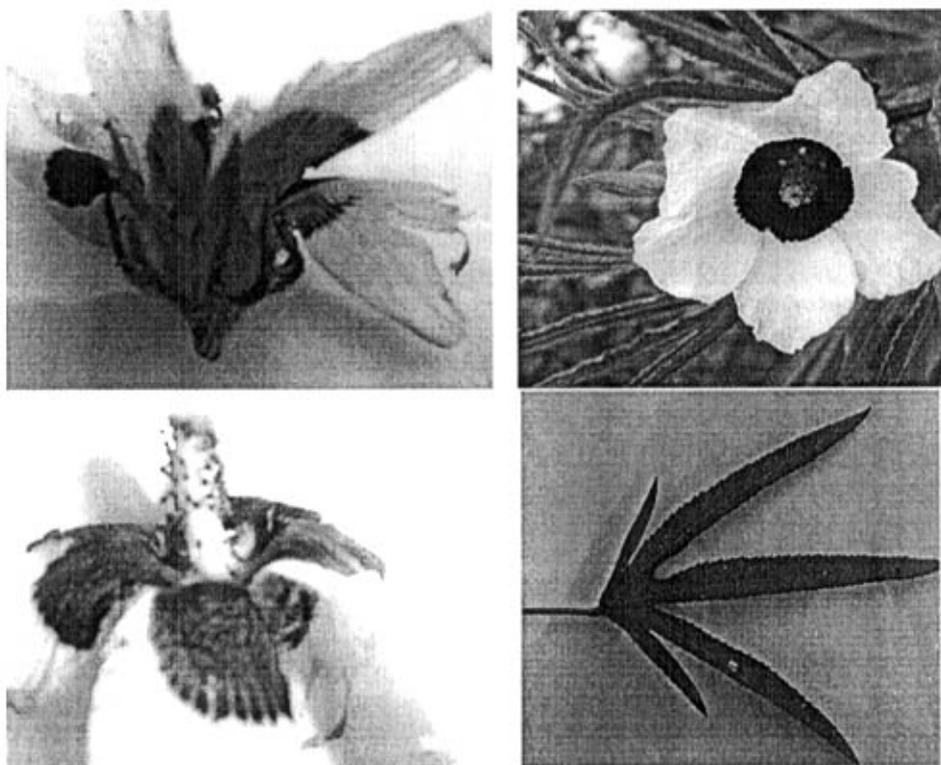


图 H070 的花、叶照片



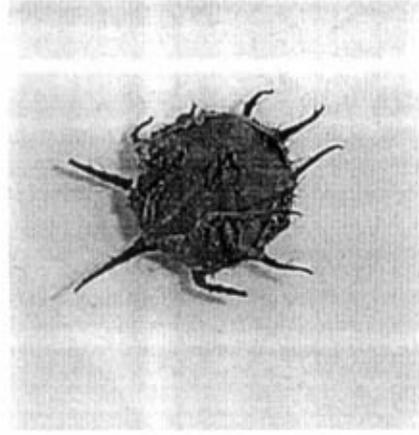


图 H102 的花、叶、果照片



图 福红 2 号的花、叶、果照片

致 谢

本论文是在导师祁建民研究员的悉心指导下完成的，我衷心地对他感恩不尽。在三年的研究学习中，恩师不仅在学习和实验上给我无微不至的关怀和帮助，而且在生活上对弟子父亲般的关爱令我终生难忘。其谆谆教导令我一生享用不尽，使我受益终生。在此论文完成之际，谨向我的恩师致以最崇高的敬意和诚挚的感谢。

在本实验的许多种质材料由中国农科院麻类研究所粟建光研究员和戴志刚助理研究员提供的，特此致谢。湖南农业大学李爱青博士也在实验中给了大力的指导和协作，在此表示特别的感谢。也感谢徐建堂同学在实验中与我同舟共济以及对我的大力支持。

感谢吴为人教授、段远霖博士和兰涛博士。他们给予我许多宝贵的建议和关心，使试验得以如期圆满完成；感谢遗传所常规组全体工作人员在学习与生活上的支持及同级研究生在实验室中的互谅互让及关心和支持。

在实验和论文的写作过程中，也得到师姐陶爱芬的热情指导，她在我实验最困难的阶段，对我的一贯的鼓励使我度过难关。同学刘中华、张广庆、马红勃在论文写作过程中，协助完成数据处理和部分论文输入工作。还得到了实验室的梁景霞、蔡红霞、郑鹭、韩庆典、王雪琴和阮奇成的热心帮助。没有他们的大力协助，本论文是不可能完成的，在此表示特别的感谢！

最后，再次衷心感谢所有给过我关心、帮助、支持和鼓励的老师、同学和朋友们，虽然在这里我没办法一一列出他们的名字，但对他们所给予的一切我将永远铭记在心。祝他们永远幸福！