

## 中文摘要

本研究以我国“八·五”至“十·五”期间育种单位选育的及近年从国外引进的40个红麻品种为材料,估算了红麻品种12个产量和纤维品质性状的主成分,以前3个主成分欧氏距离为基础作系统聚类分析,并以第1主成分分别与第2主成分和第3主成分向量作二维排序分类。并在上述研究的基础上,选择供试材料中有代表性的30份品种进行ISSR分子标记,用筛选出的多态性较好的17个ISSR引物对其进行PCR扩增,按Nei-li的方法计算其相似系数并进行聚类分析。试验结果表明:

(1)在40份红麻种质中,前3个主成分累计贡献率达86.07%。第1主成分为韧皮纤维产量构成因子(53.44%),第2主成分为茎秆皮骨构成因子(24.94%),第3主成分为纤维品质构成因子(7.69%)。根据品种性状主成分表现,评选出综合性状优良的红麻新品种有福红952-1、福红2-1、KB11、福红992、SCS11-09、KB2、福红2号等7个。其中福红992、KB11、KB2和福红952-1等品种3个主成分构成因子协调最好。研究表明品种主成分二维排序散布图具有简便、直观、与实际表现相近的特点。

(2)在欧氏距离聚类图中,当取值 $D=51.08$ 时可把40份品种分成4类,即1个大类群和1个亚类群,以及2个单一品种自成体系的个类(福红952-1、福红2号)。在 $D=39.12$ 水平面上,第I大类又可分为3个小亚类群和5个相互距离较远的单一品种自成体系的个类,这5个品种分别为C2032、BG52-1、泰红763、金山无刺(迟)和福红7号。

(3)根据30份红麻材料ISSR数据构建的树状图可知,在切割线 $L_1$ 取值为0.785时可将供试材料分为1个大类群和一个由福红951和非洲裂叶两个品种构成的亚类群,以及一个由金山无刺(迟)构成的个类。说明这三个品种的基因型明显有别于其它供试材料,与其它品种的亲缘关系较远,表现出明显的遗传差异性。同时揭示了多数供试材料之间的基因型遗传差异较小。由此可见,我国红麻品种的遗传基础相对狭窄,应通过种质创新拓展红麻的遗传基础。本研究还

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；ISSR 分子标记可提供品种遗传多样性和亲缘关系的有价值的生物学信息。

关键词：红麻 ISSR 聚类分析 遗传多样性 亲缘关系

## Abstract

Principal components(PC) of twelve yield and quality characters of 40 kenaf varieties from abroad and our country, which were selected by breeding institutes of our country during the period from "eighth five-year plan" to "tenth five-year plan", were estimated. The varieties were classified according to the scatter plot of the first two PC vectors, the first and third PC vectors. Genetic diversity and relationship of the 30 representative kenaf varieties was evaluated according to ISSR markers, which genomic DNAs were amplified with 17 ISSR primers selected from 80 primers. The 30 kenaf varieties were clustered into different groups according to the similarity coefficient (Nei-li), which represented the genetic relationship of different varieties. The major results are as follow:

(1) the first three PCs, which might be regarded as fiber yield component factor(53.44%), fiber and stem weight proportion factor(24.94%) and fiber quality factor(7.69%), account for 86.07% variation among the varieties. Based on the coefficients of the first three PCs, seven elite varieties were identified: Fu Hong 952-1, Fu Hong 2-1, KB11, Fu Hong 992, SCS11-09, KB2, Fu Hong 2. The coefficients of the first three PCs of KB11, Fu Hong 992, KB2, Fu Hong 2 were better than others. The result was similar to that of traditional classification. The classification by scatter plot of the two PC vectors was a more direct and simpler method, which was also effect.

(2) At the level of  $D=51.08$ , all varieties were clustered into one major group, one inferior group and 2 single-variety groups(Fu Hong 952-1, Fu Hong 2). At the level of  $D=39.12$ , the major group was clustered into 3 inferior groups and 5 single-variety groups(C2032, BG52-1, Tai Hong 763, Jin Shan Wu Ci, Fu Hong 7).

(3) From the UPGMA cluster based on the genetic similarity (GS), at the level of 0.785, 30 kenaf varieties were clustered into one major group, one inferior group

which had two varieties: Fu Hong 951 and Fei Zhou lie Ye ,and one single-variety group which had only Jin Shan Wu Ci(chi). The result indicated the three varieties have further relationship with others, which genotypes were more different from others too; the genotypes of most varieties we studied were closer. The study also indicated that the genetic difference between the kenaf varieties of our country was relative closer, which might be improved through germplasm innovation. Using the genetic difference to choose hybridizing pararents could breed new elite varieties faster which germplasm renewed each other. ISSR markers can apply abundant polymorphism information at molecular level, which is a valid way to study genetic divesity and relationship of kenaf species.

**Key words:** kenaf; ISSR; cluster analysis; genetic diversity ; relationship



□	5.2.1	ISSR 分子标记在红麻种质资源研究中应用的可行性
□	5.2.2	不同引物对 ISSR 分子标记的影响
□	5.2.3	红麻 DNA 提取质量对 ISSR 的影响
□	5.2.4	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

作物种质资源是人类赖以生存的宝贵资源,其遗传多样性是作物遗传改良、生物技术育种的重要基础。种质资源的搜集、保存、鉴定和创新是拓展栽培种遗传基础和作物新品种选育及其产量、品质改良的重要条件,而特异种质资源和有利基因的发掘与利用,是作物育种取得突破性进展的关键。

中国是一个古老的农业大国,麻类种质资源丰富。红麻则是上个世纪初由国外引入我国栽培的,1980年代已取代黄麻成为我国栽培面积最大、总产最高的麻类纤维作物之一。麻类种质资源研究的初始阶段,国内外育种单位多以种质资源形态分类和性状鉴定为重点(T.Ghosh,1983)。如Howard等提出根据叶型、茎色、叶柄色、熟期和花瓣色等性状对红麻进行分类(J.M.Dempsey,1979)。1970年代后,我国红麻种质资源的引进、搜集和性状鉴定与利用等研究取得了较大进展,对红麻品种改良起到了重要作用并取得了系列成果(汤清明,2001)。“八·五”以来,我国科研部门相继育成了一批新的优良品种,对这批优异种质材料的鉴定、评价与利用做了大量工作,但对其遗传基础及遗传关系则了解甚少。因此应用现代分子生物学技术对其遗传多样性及亲缘关系进行系统研究显得尤为重要。

二十世纪生物技术的快速发展,给作物分子辅助遗传育种研究带来了巨大变化,分子标记技术的应用是其中最显著的变化之一。以往许多无法在分子水平上进行的研究,如种质资源遗传多样性及其亲缘关系、系统进化、基因定位等,在分子标记技术的帮助下已经开展。红麻作为特用经济作物,分子标记研究起步相对较晚,目前对红麻种质资源的遗传关系仍缺乏全面的了解。已有的研究表明ISSR分子标记是一种研究种质资源亲缘关系的有效技术。但这一技术用于麻类种质遗传多样性和亲缘关系的研究刚刚起步(祁建民等,2003)。为了深化红麻种质资源的研究,为红麻遗传育种研究提供可资利用的科学依据,本研究对我国“八·五”至“十·五”期间选育的优良品种及国外引进的共40个品种的产量与品质性状进行了系统鉴定与综合评价,并采用ISSR技术对其中

有代表性的 30 份红麻优异材料进行了 PCR 扩增,以期分析其遗传多样性及亲缘关系远近, 鉴定和评价出优质、高产、多抗、综合性状优良的新品种, 为红麻遗传改良、分子辅助育种, 以及为纺织与造纸等多用途综合利用提供科学依据。

## 2 文献综述

### 2.1 红麻生产与多功能综合利用研发进展

#### 2.1.1 红麻在农业生产上的重要性

红麻 (*Hibiscus cannabinus* L.) 是锦葵科木槿属一年生韧皮纤维作物, 原产于公元前 4000 年的非洲苏丹, 具有生长速度快、抗逆性强、适应性广等特点。红麻纤维传统上主要作为加工麻绳、麻袋、地毯等的原料 (Dempsey, J.M, 1975; 李宗道, 1980)。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 90 多年的历史, 常年种植面积在 33 万公顷左右, 总产仅次于印度和孟加拉, 居世界第三位, 单产居世界首位。由于红麻具有纤维产量高、适应性广、耐旱、耐盐碱等特性, 上个世纪 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 (祁建民等, 1999)。进入九十年代, 随着森林资源的大量砍伐, 生态环境恶化导致的全球变暖及荒漠化的加剧, 成为人类所面临的最严重的环境问题之一。红麻以其巨大的生物产量 (为松木的 3—5 倍), 极强的二氧化碳吸收能力 (为树木的 4 倍) 及品质可与针叶林木相媲美等优点倍受关注。尤其在日本、美国等发达国家, 红麻被看作是 21 世纪未来派优势作物, 并在其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、土工布、板材、动物饲料、吸油材料、可降解纸地膜、食用、药用等许多领域 (程舟等, 2001)。

#### 2.1.2 红麻综合利用的重要性

##### 2.1.2.1 红麻纤维高档纺织品的开发

红麻传统生产由于受到化纤的冲击其市场严重萎缩, 而印度由于重视红麻高档麻纺织品的开发, 一直占距世界红麻生产的鳌头, 并取得巨大的社会效益。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已全面展开。红麻纤维与棉花等其它纤维混纺成高档纺织品是其多用途利用的途径之一。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能。加入 WTO 以后, 我国的纺织品将在国际市场上占有

更大的份额。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。东华大学纺织学院在黄、红麻混纺纱工艺与设备方面做了初步的探索研究，并取得了一定成果（史春霞等，2001）；河南省豫北纺织有限责任公司成功开发出了黄红麻与棉纤维混纺纱线及其织物；浙江萧山在开发以红麻纤维为原料生产高档装饰墙布方面取得显著的经济效益，开辟了一个新的麻产品深加工途径。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（姚金怀等，2003）。

#### 2.1.2.2 红麻全杆抄制纸浆的研发

早在50年代美国农业部北方研究院就从300多种一年生植物中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植物之一（李敬机，1996）。红麻以其产量高、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。美国、泰国、日本等国家较早利用红麻作为原料抄造各种纸张。上个世纪八十年代以来，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，九十年代以后我国湖南、山东、河南等省的造纸厂率先在红麻制浆造纸上进行了试生产，目前工艺已日臻完善。新疆屯和、石河子，甘肃酒泉等地的大型造纸厂近年也开始用红麻为原料进行制浆和纸制品生产。利用麻纤维或其它植物纤维制成的纸地膜，与传统的塑料地膜在原料上有本质区别，使用后不需回收，可与肥料一起混合埋入土中，对环境无任何污染，同时可以增加土壤的有机质，而且制造成本低廉（周文春等，2002）。预计未来20年内，我国红麻造纸会取得突飞猛进的发展。

#### 2.1.2.3 红麻叶梢加工青贮饲料的有效利用

红麻嫩梢、嫩叶富含营养，其粗蛋白含量分别为29.7%和14.3%（李宗道，1980）。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。日本爱媛大学和高知大学联合对红麻作为青贮饲料的品质和饲料价值

进行了研究和探讨, 结果表明红麻叶给家畜喂用后消化率较高, 宜作为奶牛、羊等家畜的粗饲料。

#### 2.1.2.4 红麻种子有效成分的化工与饲用利用

红麻种子含油分 25% 左右, 可食用; 由于它的碘价低, 可作为制造肥皂的良好原料; 用硫化方法能产生完全乳化液, 可作为皮革工业上的脂肪乳剂。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。

#### 2.1.2.5 红麻种子中不饱和脂肪酸等物质的医疗保健功能

研究表明, 红麻种子含油量为 25%, 其中油酸含量为 50%, 亚油酸含量 25% 以上, 亚麻酸含量稍少。油酸、亚油酸、亚麻酸是人体必需的脂肪酸。1996 年 Kepler 首次发现共轭亚油酸(CLA)的存在(张根旺等, 2000)。研究表明亚麻酸是 DHA、EPA 的前体(邵群等, 2002)。现代医学及营养学证实, CLA 具有抗癌、抗粥样动脉硬化、抑制脂肪积累、增强肌体免疫力、防治糖尿病、改善骨组织代谢等多种作用(Lee K N et al, 1994; Park Y et al, 1999; Michiro S et al, 1998; Chin SF et al, 1994)。DHA、EPA 则具有降低血脂、治疗心血管疾病、防止大脑衰老等特殊功效。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。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(程舟等, 2001)。

#### 2.1.2.6 红麻纤维的工业与建材利用

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。日本丰田汽车的车体和零部件生产厂家 Araco 公司用红麻韧皮纤维代替树脂等原料开发汽车内装复合材, 强度与现有的 ABS 树脂等车体

内装材相当，且废弃后不会对环境造成污染。

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。

## 2.2 红麻种质资源重要性及其研究进展

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（方嘉禾，2002）。

国家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（粟建光等，2003）。红麻是上世纪初由国外引入我国栽培的纤维作物。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。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。1986年国际黄麻组织（IJO）为丰富黄、红麻的基因库，先后派了包括我国农业科学院麻类研究所等单位的5个考察队，到肯尼亚和坦桑尼亚东北部搜集黄、红麻资源。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（李爱青，1990）。其中紫花型红麻对根结线虫有高抗能力，是培育抗病品种的有效资源（熊和平，1989）。1987年我国已保存有红麻种质资源600多份（I.R.Dention,1997-1998），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。

### 2.2.1 红麻种质资源的形态与细胞学分类研究

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（T.Ghosh,1983）。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、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、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。粟建光等(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。

### 2.2.2 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做进一步的深入研究。粟建光等(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 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(谭石林等,1998)。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(1995)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。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。

### 2.2.3 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)。

#### 2.2.4 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变异的关系, 为红麻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。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。但用 ISSR 技术对红麻种质资源进行研究目前尚未见报道。

#### 2.2.5 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。麻类作物上基因工程的研究起步较晚, 王玉富等(1996)初步报道了将

外源 DNA 导入亚麻的研究；中国农业科学院麻类研究所的臧巩固等报导了苧麻转基因研究的初步结果。红麻的转基因育种研究也取得了初步进展。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迟熟品种金山无刺，受到广大麻农的欢迎。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，在油麻特用红麻新类型的多用途研发上有重要的利用价值。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。福建农林大学通过花粉管法将外源抗虫、抗除草剂基因导入红麻基因组，目前已于田间筛选出表现高抗的植株，其分子水平上的验证正在进行中。

#### 2.2.6 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经过几十年由简单到深入的发展已取得了很大成就，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，如非洲裂叶、红麻 7 号、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 号等，高产优质遗传资源福红 2 号、KB2、KB11 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。至 20 世纪 80 年代我国红麻育种取得了较大突破，育成了一批比对照粤 743 增产 10%—15%左右的高产优质抗病红麻新品种，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（祁建民等，2003）。“九·五”期间我国育种单位选育的 KB11、KB2、福红 951、福红 952、闽红 88/31、D92、浙 3 等品种比对照 743 增产 12.39%—15.75%，其它性状大部分优于对照（汤清明等，1999）。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)。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 (祁建民等, 2003)。

### 2.2.7 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上个世纪中叶。美国的红麻种质资源研究始于上个世纪 40 年代, 1943 年由于二战期间包装纤维原料严重短缺, 美国农业部与联合纤维共同体(CFC)合作, 在古巴首次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。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严重影响红麻产量水平的报道, 因此, 对红麻种质抗这些逆生境的鉴定与评价工作尤为必要。过去几十年中, 美国的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较大成功。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 (栗建光, 1999)。但国外尚未见到用分子标记技术研究红麻种质资源的相关报道。

21 世纪农作物育种技术的发展方向是: 1) 种质扩增、改良和创新; 2) 提高农产品的质量; 3) 应用生物技术研究, 提高育种效率和创新能力。红麻育种目标的核心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、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)。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。

## 2.3 分子标记技术及其发展

遗传标记 (genetic markers) 是基因型的特殊易于识别的表现形式。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。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、穗长、粒色等。在众多的遗传标记中, 形态学标记的应用历史最为悠久, 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, 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, 但其标记数少、多态性差、易受环境条件影响。(2) 细胞标记 (cytological markers): 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) 是一种新的较为理想的遗传标记形式, 近年来发展非常迅速。它是在 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状的 DNA 片段, 具有以下优点: 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; 数量极多, 遍布整个基因组; 多态性高。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、标记辅助选择育种等方面 (徐云碧和朱立煌, 1994; 贾继增, 1996; 刘春林, 1996; Ribaut et al, 1998)。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) 与目标农艺性状基因紧密连锁的经济有效的分子标记; (3) 高效自动化技术。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。需要注意的是, 分子标记育种技术目前尚不成熟和完善, 不能作为一种育种方法单独使用, 因此应注意

将分子标记育种技术与常规育种技术相结合。目前，常用的分子标记有 RFLP, AFLP, RAPD, SSR, ISSR, SNP 等。

### 2.3.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP (限制性片段长度多态性) 是 Grodzicker 等于 1974 年发明的分子标记技术, 是一项利用放射性同位素 (常用  $^{32}\text{P}$ ) 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。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易位、倒位、缺失而引起酶切位点的消失、增加或位置变化。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, 目前在水稻 (Sasaki, 1995; Song, 1995)、小麦 (Liu, 1992; Gale, 1993)、大麦 (Peterson, 1989; Graner et al, 1991)、大豆 (Keim et al, 1994; Manser, 1993)、番茄 (Sarfatti et al, 1989) 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。而且 RFLP 标记对 DNA 的需要量较大 (5-10ug), 需要的仪器设备多, 技术也较复杂, 需要同位素标记且成本高, 因而 RFLP 在指纹图谱中的应用受到限制。

### 2.3.2 RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)

RAPD (随机扩增多态性 DNA) 技术是 1990 年由 Williams 和 Welsh 领导的两个小组几乎同时发展起来的一种分子标记技术 (Williams et al, 1990; Welsh et al, 1990)。它是以 PCR (Polymerase chain reaction) 为基础, 以人工合成的寡核苷酸单链 (一般为 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, 可在紫外灯下检测到新合成的分子量大小不等的 DNA 片段所形成的多态性条带, 这些扩增片段的多态性反应了基因组 DNA 相应区域的多态性。RAPD 标记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, 同一套引

物可以应用于任何种植物的研究,具有广泛性和通用性,而且扩增所需 DNA 用量少,对 DNA 的纯度要求也不高,操作简单、快速,可以在短时间内进行大量样品分析,因此受到许多学者的重视。自 1990 年以来,该技术已广泛应用于遗传多样性检测 (Jarret et al, 1994; 汪小全等, 1996;)、品种和种质纯度鉴定 (Mailer et al, 1994; 吴敏生等, 1999;)、起源演化研究 (李宽钰等, 1997; 蔡从利等, 2001; 庞延军等, 1998; 吴燕民等, 1999; 张继益等, 1999)、基因定位及分子遗传图谱构建 (Carlson et al, 1991; Reiter et al, 1992; 朱立煌等, 1994;) 等各个方面。目前在小麦 (NGUYEN et al, 1992)、玉米 (吴敏生等, 1999;)、水稻 (钱韦等, 2000)、棉花 (武耀廷等, 2001)、红麻 (程舟等, 2003)、黄麻 (周东新等, 2001) 等作物上的研究已均有报道。但由于 RAPD 扩增所用的引物序列较短 (9-10 个碱基)、退火温度较低 (一般为 37℃), 因而扩增结果易受多种因素的影响, 在一些作物上扩增产物的重复性和稳定性差, 所以必须对其反应条件和影响因素进行筛选, 建立优化反应体系以获得较稳定的实验结果。

### 2.3.3 SSR (Simple Sequence Repeat)

SSR 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)<sub>n</sub>、(GA)<sub>n</sub>、(AC)<sub>n</sub> 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)。

#### 2.3.4 ISSR (Inter-simple Sequence Repeat Polymorphism)

ISSR (内部简单重复序列多态性)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。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。概括起来,有以下几个方面的特点 (Zietkiewicz et al, 1994; Gupta et al, 1994; Sanchez et al, 1996):

- (1)可以在没有任何分子生物学研究基础的情况下,进行基因组指纹图谱构建,为物种演化和分类研究提供 DNA 水平上的证据。
- (2)可以同时检测基因组多个 SSR 位点。
- (3)可以采取类似 RAPD 的方法寻找与所定位基因组相连锁的 DNA 标记,快速完成基因定位。

(4) 可以在生长周期的任何阶段进行检测, 且 DNA 用量少。

(5) 通常为显性标记, 呈 Mendel 式遗传。

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 (Fang and Roose, 1997; 江树业等, 2000)、遗传关系及遗传多样性分析 (余爱丽等, 2002; 武耀廷等, 2001; 杜金昆等, 2002; 祁建民等, 2003; Albani et al, 1998)、基因标签 (Ratnaparkh et al, 1998)、植物基因组作图 (Kojima et al, 1998; 刘华清等, 1998) 等研究。

### 2.3.5 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP (扩增片段长度多态性) 是 1993 年由荷兰的 Zabeau 和 VOS 博士发明的一项技术。实际上是 RFLP 和 PCR 相结合的一种技术。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的扩增。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。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。

### 2.3.6 SNP (Single nucleotide polymorphisms)

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)。作为一种遗传多态, SNP 具有分布广泛、数量众多、易于批量检测等优点, 并已用于人类第三代基因图的绘制。

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。

### 3 材料与amp;方法

#### 3.1 材料

##### 3.1.1 植物材料

供试红麻品种共 40 份，主要为“八·五”至“十·五”期间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，以及中国农业科学院麻类研究所等单位从美国、非洲等国家和地区引进的红麻种质资源。40 份材料全部在福建农林大学教学农场种植。材料名称和来源见表 1。

表 1 供试红麻品种及来源

Table 1 Kenaf varieties and there origins

代码	品种名称	来源	代码	品种名称	来源
1	KB2	中国麻类所	21	粤引 4 号	古巴
2	83 引 6	中国麻类所	22	福红 952-1	福建农林大学
3	福红 952	福建农林大学	23	粤红 743	广东农科院
4	闽红 88/31	福建农科院	24	BG52-1	马里
5	福红 2-1	福建农林大学	25	青皮 3 号	越南
6	C2032	美国	26	福红 4 号	福建农林大学
7	福红 991-1	福建农林大学	27	F99-12	福建农林大学
8	SCS11-04	中国麻类所	28	福红 7 号	福建农林大学
9	红引 135	中国麻类所	29	福红 2 号	福建农林大学
10	福红 3 号	福建农林大学	30	金山无刺迟	福建农林大学
11	泰红 763	泰国	31	SCS11-06-1	中国麻类所
12	SCS11-09	中国麻类所	32	福红 9 号	福建农林大学
13	H305	中国麻类所	33	福红 5 号	福建农林大学
14	EV-41	美国	34	粤引 1 号	古巴
15	福红 992	福建农林大学	35	83 引 7	中国麻类所
16	福引 0-16-1	福建农林大学	36	闽红 321	福建农科院
17	福红 6 号	福建农林大学	37	KB11	中国麻类所
18	金山无刺	福建农林大学	38	非洲裂叶	非洲
19	福红 991	福建农林大学	39	福红 992-1	福建农林大学
20	福红 8 号	福建农林大学	40	福红 951	福建农林大学

##### 3.1.2 ISSR 引物

ISSR 引物购自加拿大 British Columbia 大学，编号为 UBC810-890，共 80 个引物。

## 3.2 方法

### 3.2.1 实验设计与统计方法

供试红麻品种材料 40 份, 重复田间实验 2 年, 分别于 2002 年 5 月 5 日和 2003 年 4 月 25 日种植在福建农林大学教学农场。实验采用随机区组设计, 3 次重复, 小区长 5m, 畦宽 1.3m, 每公顷定苗 18 万株。两年分别于品种工艺成熟期, 每小区随机抽取 10 株, 考测株高、茎粗、韧皮厚度、原麻产量、纤维干重、干茎重、出麻率、纤维强度、纤维支数等 12 个产量与纤维品质性状。本研究对 40 份红麻品种的 12 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和遗传距离, 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。

### 3.2.2 ISSR 分子标记的材料与实验方法

从上述从国内外征集到的 40 份红麻品种中, 选用较有代表性的 30 份材料 (见表 2) 的基因组 DNA 为模板进行 ISSR 扩增, 对标记结果作对比分析, 以便从分子水平上明确 30 份红麻优良品种的遗传多样性和亲缘关系, 明确不同品种基因型的遗传差异。并进一步和田间聚类分析结果作比较, 为红麻种质资源亲缘关系鉴定和品种遗传改良提供科学依据。其主要技术路线为: 基因组 DNA 的提取→PCR 扩增→琼脂糖电泳→电泳谱带分析→数据处理和系统聚类分析。

#### 3.2.2.1 红麻基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法并加以改进。将 5g 新鲜幼嫩红麻叶片用液氮研磨成粉末, 迅速转移至预热至 100℃ 的  $1.5 \times$  CTAB (1.5%CTAB, 75mmol/lTris-HCl, 15mmol/LEDTA, 1.05mol/LNaCl, 2%(V/V)  $\beta$ -巯基乙醇) 的提取液 15ml 中, 迅速搅匀后置于 56℃ 水浴 20 分钟, 加入等体积氯仿/异戊醇 (24: 1), 充分混匀, 室温下 4000rpm 离心 10 分钟, 将上清液倒入另一新的 50ml 离心管, 再用氯仿/异戊醇 (24: 1) 抽提 1 次, 加入 1/10 体积 10% CTAB (预热至 56℃) 及等体积

的氯仿/异戊醇，充分混匀，4000rpm 室温离心 10 分钟，转移上清液至另一个新管中，加入 2 倍体积无水乙醇，轻轻摇晃沉淀 DNA，过夜，挑出烘干，烘干的 DNA 溶于 300ul TE 缓冲液中，作为母液，将 DNA 浓度稀释到 20ng/ul 备用。

表 2 ISSR 标记所用的 30 份红麻材料的代号及名称

Table 2 30 Kenaf varieties for ISSR markers

代号	名称	代号	名称	代号	名称
1	福红 951	11	福红 4 号	21	EV-41
2	非洲裂叶	12	青皮 3 号	22	SCS11-09
3	KB11	13	BG52-1	23	泰红 763
4	闽红 321	14	粤红 743	24	福红 3 号
5	福红 5 号	15	福红 952-1	25	红引 135
6	福红 9 号	16	粤引 4 号	26	SCS11-04
7	SCS11-06	17	福红 991	27	C2032
8	金山无刺 (迟)	18	福红 6 号	28	福红 2-1
9	福红 2 号	19	福引 00-16-1	29	福红 952
10	福红 7 号	20	福红 992	30	KB2

### 3.2.2.2 ISSR 反应体系的建立

在冰上建立 PCR 反应体系：

10×Buffer	2.5ul
dNTP	0.375ul
Mg <sup>2+</sup>	2.5ul
ISSR 引物	4ul
Tag 酶	0.3ul
模板 DNA	2ul
ddH <sub>2</sub> O	13.325ul

反应体积为 25ul，反应混合物加 30 ul 石蜡油覆盖，以防止反应过程中液体蒸发。本实验 PCR 反应所用的 10×Buffer、dNTP、MgCl、Tag 酶均为上海生物工程产品。反应所用的 PCR 仪为 PTC-100 多功能 PCR 仪。各种反应物的终浓度为：MgCl 2.5mM，引物 0.2uM，dNTP 150uM，1×Buffer(10mMTris-HCl(pH8.0))，

50mMKCl, 0.1%Triton<sup>®</sup>X-100), 1.5U<sup>Taq</sup> 酶。

### 3.2.2.3 ISSR 反应程序

反应程序为: 94℃预变性 5min; 94℃45s, 52℃1min10s, 72℃1min30s, 41 个循环; 72℃7min; 4℃20hrs。

### 3.2.2.4 电泳检测

PCR 产物经含 EB 的 1.4%琼脂糖凝胶电泳后,用 BIO-RAD 公司的 GelDoc1000 型凝胶成像系统观察并成像记录。

### 3.2.2.5 数据处理与统计分析

应用 Vilber Lourmat VDS 公司提供的 Bio 1D++软件进行电泳谱带检测,手工检带除去因胶板上亮点及点样孔所引起的计算机误检。清晰可辨的电泳条带全部用于统计分析,按扩增条带的有无记数,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。

## 4 结果与分析

### 4.1. 遗传多样性分析及品种综合评价

#### 4.1.1 主成分分析

40份红麻种质资源的12个性状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3个特征根累计贡献率已达86.07%,其中第1主成分贡献率达53.44%,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构成的关键性因子。第2主成分贡献率为24.94%,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。当出麻率和皮骨比高时,纤维拉力一般较高;纤维支数则与上述3个性状呈负向关系。第3主成分贡献率为7.69%,特征向量中纤维拉力和纤维支数贡献较大,故称为纤维品质构成因子。特征向量所揭示的生物学信息是纤维强力和支数较高,一般植株较高茎粗较粗,反之亦然。而其他性状的特征根都相对较小。

表3 入选的3个主成分及特征向量

Table3 Principal component analysis of 12 quantitative characters

性状	第1主成分	第2主成分	第3主成分
株高	0.3071	-0.0777	0.3333
茎粗	0.3644	-0.0169	0.1980
皮厚	0.2879	0.1743	-0.1150
鲜茎重	0.3746	-0.1186	-0.0164
生皮重	0.3812	0.0313	-0.1103
干皮重	0.3808	0.0497	-0.0895
麻芯重	0.3031	-0.3474	-0.0334
干茎重	0.3538	-0.2231	-0.0566
出麻率	0.1231	0.5318	-0.0788
皮骨比	0.1274	0.5278	-0.0731
纤维拉力	0.0429	0.3326	0.7720
纤维支数	-0.0954	-0.3214	0.4519
特征值	6.412	2.993	0.9224
累计贡献率	53.44%	78.38%	86.07%
主成分名称	纤维产量构成因子	茎杆皮骨构成因子	纤维品质构成因子

从产量因子和品质因子综合考虑,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,有利于提高纤维拉力。而第3主成分特征向量间的关系表明,加强红麻株高和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、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。又鉴于前两个主成分累计贡献率达78.38%,已凝聚了红麻产量和纤维品质性状的大部分生物学信息。本实验根据供试各品种主成分分量的表现,评选出高产、优质的优良品种有福红2号、福红952-1、福红2-1、KB11、SCS11-09、福红992和KB2共7个(表4)。上述7个品种中,以福红2号、福红952-1第1主成分最大,其丰产性最优良,其次为福红2-1和KB11,说明了上述4个品种是供试40个品种中主要产量性状表现最突出的高产优良品种,这一结论与全国区试鉴定结果一致。从三个主成分综合考虑,福红992、福红952-1、KB11及KB2是产量与品质性状协调最好的几个优良红麻新品种。福红2号、KB11、福红952-1、KB2等4个新品种均列为“九·五”和“十·五”国家科技部、国家农业部重点推广的红麻优良新品种。从第2主成分可以看出,SCS11-04(代号为8)和SCS11-09(代号为12)第2主成分分别达4.24和3.66,皮骨比和出麻率特别好(图1),与其它品种差异亦达显著水平;福红991-1(7)和迟熟品种金山无刺(30)第3主成分分别为2.59和1.67,纤维品质特别好(图2),与其它品种达极显著差异,是红麻品质改良可利用的优异种质。

表4 7个优良品种的主成分值

Table 4 Coefficients of the first three PCs for 7 elite varieties

品种代号	品种名称	第一主成分	第二主成分	第三主成分
1	KB2	0.779	1.821	1.474
5	福红2-1	3.732	1.161	-0.615
12	SCS11-09	1.872	3.663	-0.368
15	福红992	1.136	1.809	0.395
22	福红952-1	5.735	1.579	0.277
29	福红2号	7.683	-1.334	-0.453
37	KB11	3.005	0.804	0.479

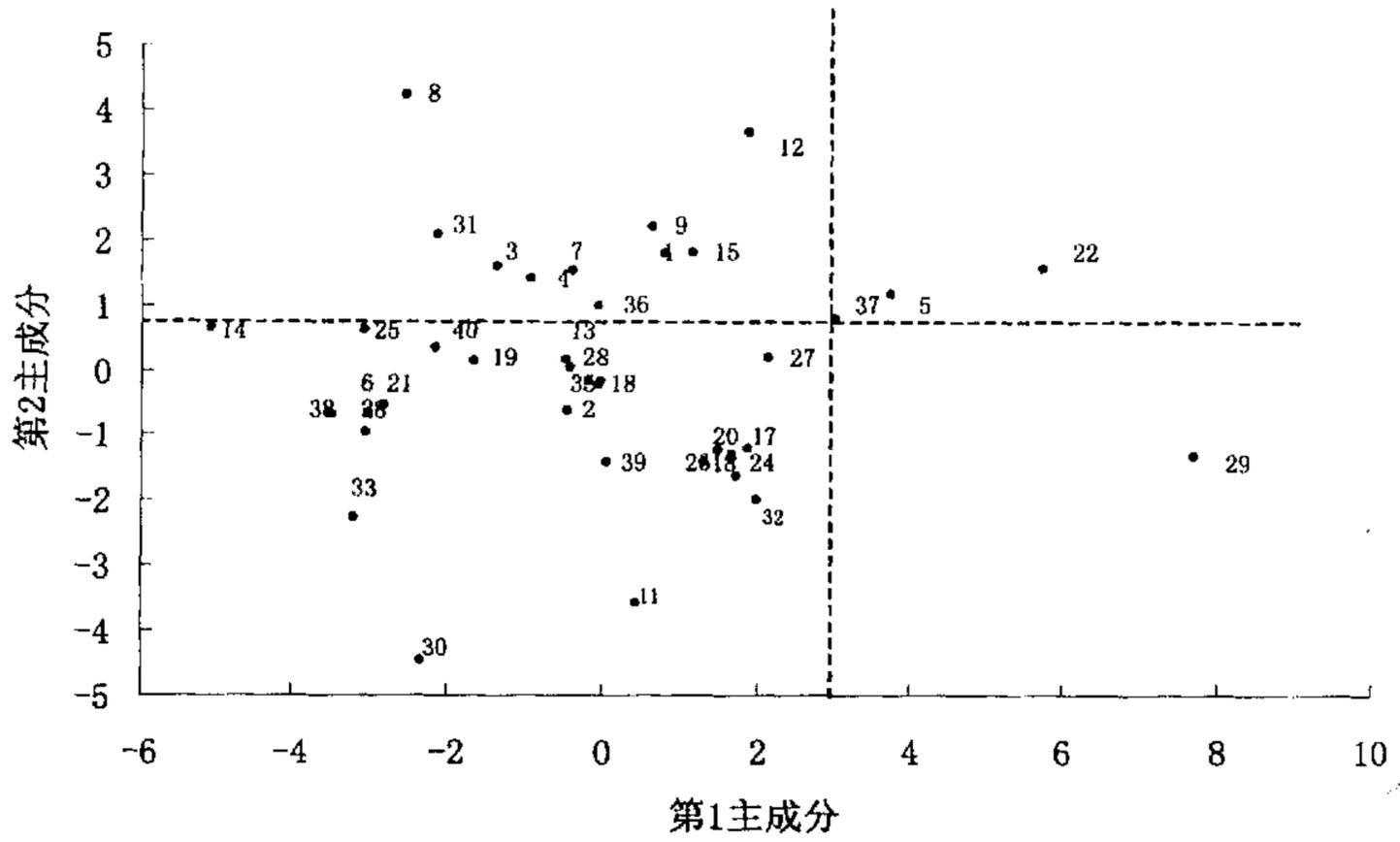


图1 40个红麻品种第1、2主成分二维排序图

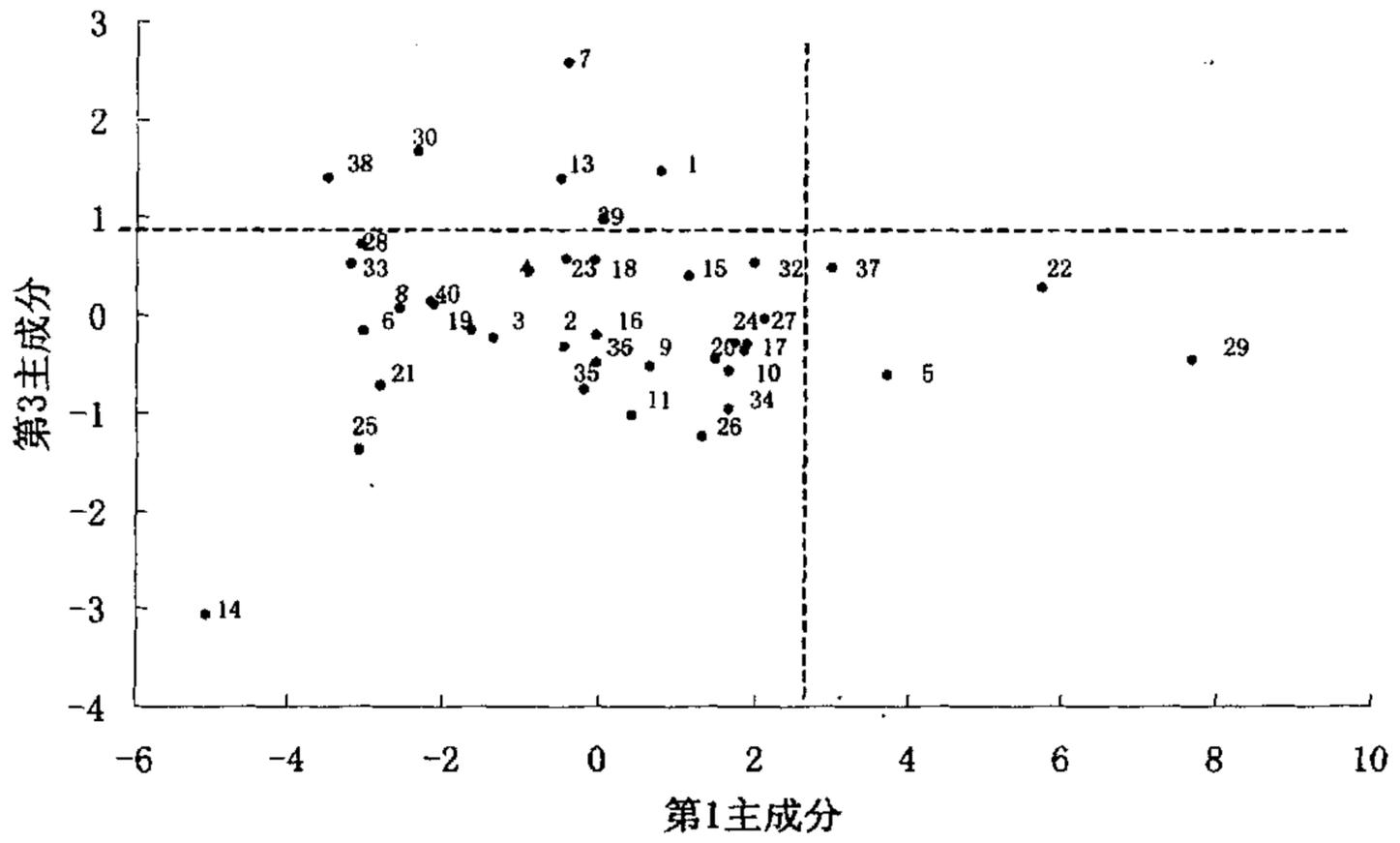


图2 40个红麻品种第1、3主成分二维排序图

#### 4.1.2 二维排序分析

从主成分分析可以看出,前3个主成分累计贡献率达86.06%,因而品种间这三个主成分值的差异在很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主成分为纵坐标做成散点图(图1,图2),可以更加直观地揭示红麻品种间基因型差异状况,能更具直观、简便地显示出各品种自然类型分类的特点。

二维排序图上品种的横坐标与纵坐标越大,其纤维产量与出麻率和皮骨比的综合性状越好。从图1可见,福红2号(29)、福红952-1(22)、福红2-1(5)、KB11(37)等4个品种第1主成分值(纤维产量构成因子)较其它品种大,是丰产性最优良的新品种;SCS11-04(8)、SCS11-09(12)、红引135(9)、SCS11-06-1(31)、KB2(1)、福红992(15)、福红952-1(22)、福红2-1(5)、福红952(3)、福红991-1(7)、闽红88/31(4)、KB11(37)等品种的第2主成分值(茎秆皮骨比构成因子)均高于0.8,说明其皮骨比和出麻率较高,是选育造纸与麻纺兼用优良品种的理想亲本。其中福红952-1(22)、福红2-1(5)和KB11(37)三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)可以看出,在供试品种中,高产与优质兼顾最好的品种主要有福红952-1(22)、KB11(37),其次是福红992(15)、福红9号(32)和KB2(1)。而纤维拉力和纤维支数品质最优异的品种是福红991-1(7)、金山无刺迟(30)、KB2(1)、H305(13)、非洲裂叶(38),其第3主成分最高,是红麻遗传改良上值得重视和可利用的优良种质资源。

#### 4.1.3 聚类分析

##### 4.1.3.1 供试品种的聚类构成

40份红麻遗传资源系统聚类结果如图3。当横切线取值 $D=51.08$ 时可把40份品种分成4类,即由36个品种聚成的第I大类群和由SCS11-04和EV-41组成的第II小亚类群,以及由福红952-1和福红2号2个单一品种自成体系的

个类。显示出 40 个品种基因型间的遗传差异。福红 952-1 和福红 2 号 2 个品种的株高分别为 503cm 和 510.5cm, 茎粗为 2.24cm 和 2.28cm, 皮厚为 1.32mm 和 1.38mm, 单株生皮重为 350.2g 和 369.3g, 单株干皮重为 96.1g 和 99.5g, 单株干茎重为 263.95g 和 296g。由以上数据可以看出, 福红 952-1 和福红 2 号的产量性状综合明显优于其它品种, 和其它品种的差异很显著, 是丰产性特别好的优异品种。其皮骨比和出麻率也有突出表现, 纤维拉力在 40 个品种中也名列前茅。由此可见, 福红 952-1 和福红 2 号是综合性状特别优良的品种。第 II 类群特征: 第 II 类群由 EV-41 和 SCS11-04 两个品种组成, 基因型与第 I 大类差异较大, 主要性状特征是平均株高 441.5cm, 茎粗 1.94cm, 单株干茎重 191.4g, 单株干皮重 65.9g, 单株鲜茎重 643g, 纤维拉力 27.2kg/g, 其产量与品质性状表现均较差。其中的 EV-41 是来自美国的品种。

#### 4.1.3.2 第 I 大类群的分类及性状特征

从图 3 可以看出, 当横切线取值为 39.12 时, 第 I 大类群又可分为  $I_1$ 、 $I_2$ 、 $I_3$  3 个亚类群和 5 个由单一品种构成的个类。各类群性状特征如表 5。第 I 大类群由 36 个品种组成, 性状特征是: 品种产量性状表现中上, 纤维品质性状构成中等。

##### 4.1.3.2.1 第 $I_1$ 类群的品种组成及性状特征

从图 3 可知, 第  $I_1$  类群有 18 个品种, 主要性状特征在平均单株皮厚(1.3mm)、皮骨比(51.1%)、出麻率(33.7%)、纤维拉力(31.7Kg/g)这 4 个性状表现相对较突出(表 5)。而其它性状如株高、茎粗等表现为中等偏上。说明这 18 个品种在韧皮纤维的利用上有较大的遗传优势。

##### 4.1.3.2.2 第 $I_2$ 类群的品种组成及性状特征

如图 3 所示, 第  $I_2$  类群有 10 个品种, 分别为福红 2-1(5)、福红 3 号(10)、福红 6 号(17)、福红 8 号(20)、福红 4 号(26)、F99-12(27)、福红 9 号(32)、粤引 1 号(34)、KB11(37) 和福红 992-1(39)。这些品种性状特征是平均株高 482.3cm, 茎粗 2.11cm, 皮厚 1.3mm, 单株鲜茎重 819.5g, 单株生皮重 310.7g

(表 5), 以上品种综合产量性状的表现较突出, 仅次于福红 952-1 和福红 2 号, 和其它品种有较大差异, 说明这 10 个品种属于产量性状优良、丰产性好的高产品种。从表 5 还可以看出, 其皮骨比和出麻率也较高, 但纤维支数和纤维拉力表现一般。I<sub>2</sub>中的福红 8 号 (20)、KB11 (37) 和福红 992-1 (39) 3 个品种与类内其它品种在性状表现上仍有一定差异。

#### 4.1.3.2.3 第 I<sub>3</sub>类群的品种组成及性状特征

第 I<sub>3</sub>类群由 SCS11-06-1 (31)、福红 5 号 (33)、非洲裂叶 (38) 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 298.7, 明显高于 I<sub>1</sub>和 I<sub>2</sub>, 与 I<sub>1</sub>和 I<sub>2</sub>类群在纤维支数上有一定差异。

#### 4.1.3.2.4 其它个类的组成及性状特征

I<sub>4</sub>-I<sub>8</sub>等 5 个类每个只有一个品种, 分别为 C2032、BG52-1、泰红 763、金山无刺 (迟) 和福红 7 号。由表 5 可见, C2032 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也表现较差。BG52-1 产量性状表现一般, 但纤维拉力达到 29.1Kg/g, 表现为中等偏上。泰红 763 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, 纤维支数较高, 达 308.1。福红 7 号纤维支数为 354.7, 是 40 个品种中纤维支数最高的, 但其皮骨比和出麻率较低, 其它性状则表现中等。金山无刺 (迟) 株高、茎粗、皮厚等产量性状表现一般偏上, 其纤维支数为 345, 仅次于福红 7 号。这 5 个单一品种的基因型与 I 大类群的其它品种有一定差异, 其中 C2032、BG52-1、泰红 763 等 3 个品种分别来自美国、马里和泰国; 福红 7 号的一个亲本为国外品种; 金山无刺表现为茎秆光滑, 与其它品种在外观上差异亦较大。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。

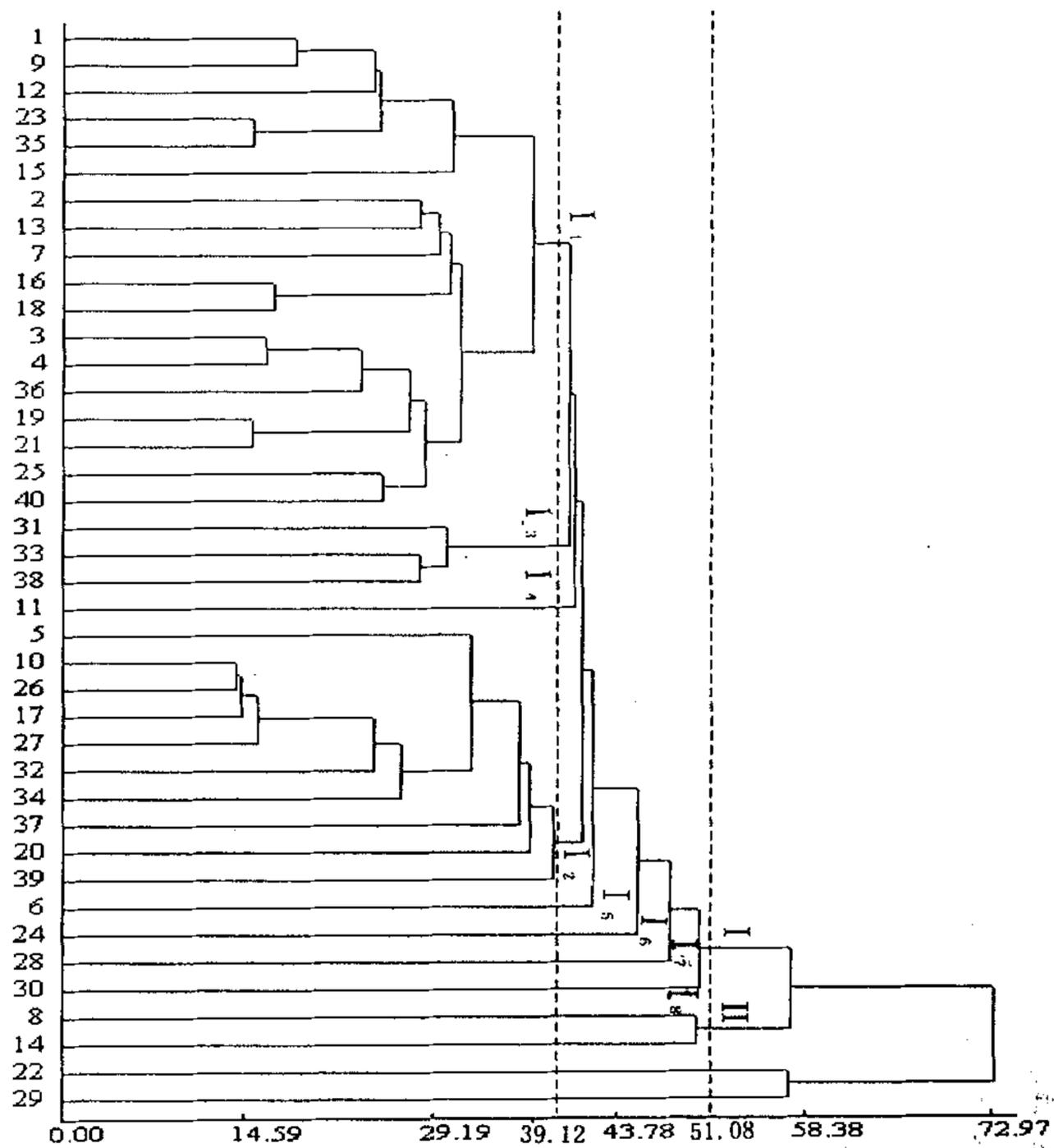


图3 系统聚类图

Fig.3 Hierarchical cluster diagram

表 5 40 份红麻品种聚类群及其性状特征

Table 5 The classification and characters of 40 kenaf varieties

性状	I											IV
	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub> (C2032)	I <sub>5</sub> (BG52-1)	I <sub>6</sub> (#1.763)	I <sub>7</sub> (金山壳制)	I <sub>8</sub> (福红7号)	II EV-41	III	福红 952-1	
株高 (cm)	467.7	482.3	450.9	462.1	449	464.9	452.9	468.5	441.5	503	510.5	
茎粗 (cm)	2.0	2.11	2.0	2.07	1.96	2.06	2.0	2.07	1.94	2.24	2.28	
皮厚 (mm)	1.3	1.3	1.24	1.25	1.23	1.3	1.29	1.23	1.26	1.32	1.38	
单株鲜茎重 (g)	748.3	819.5	708.3	791	674	824	716	738	643	913	943	
单株生皮重 (g)	285.8	310.7	270.2	291.2	252.5	303.2	262.4	252.7	257.7	350.2	369.3	
单株干皮重 (g)	74.4	81.1	65.7	77.1	70.3	85.8	64.9	65.3	65.9	96.1	99.5	
单株麻芯重 (g)	148.6	167.4	140.3	182.9	150.2	176.5	137	164.4	125.6	167.9	196.5	
单株干茎重 (g)	222.9	248.5	206	259.9	220.4	262.3	201.9	229.7	191.4	263.95	296	
出麻率 (%)	33.7	32.9	32.4	29.7	32.1	33	32.2	28.5	35.1	36.7	33.9	
皮骨比 (%)	51.1	49.0	47.9	42.3	47.3	49.4	47.5	40	54	58.3	51.3	
纤维拉力 (Kg/g)	31.7	28.7	30.7	24.5	29.1	27.1	27.3	27.1	27.2	31.2	27.2	
纤维支数 (公支)	251.3	257.4	298.7	261.1	274	308.1	345	354.7	237.15	259.6	258	

## 4.2. ISSR 引物筛选

以福红 2 号、金山无刺 (迟)、EV-41、泰红 763 的基因组 DNA 为模板, 对 UBC810-UBC890 等 80 个 ISSR 引物, 在 25 $\mu$ l 反应体系中以 200nmol/L 引物终浓度进行筛选, 共选出 30 个多态性较理想的引物, 对表 2 所列的 30 份红麻供试材料进行扩增, 选用扩增条带清晰、多态明显的 17 个引物进行了统计分析。17 个引物中 2 核苷酸重复序列有 13 个, 占 76.5%, 3 核苷酸重复序列有 2 个 (U864、U868), 4 核苷酸重复序列有 1 个 (U873), 5 核苷酸重复序列有 1 个 (U881)。2 核苷酸重复序列中 (AC) $n$  和 (CA) $n$  较多, 占 53.8%, 且产生的多态性条带最多, 说明红麻基因组中含有丰富的 TG/GT 重复序列。所用引物的编号及序列见表 6。

表 6 ISSR 引物编号及序列

Table 6 List of ISSR primers and their sequence in this study

编号	引物序列	编号	引物序列
U814	CTCTCTCTCTCTCTA	U848	CACACACACACACACARG
U815	CTCTCTCTCTCTCTCTG	U855	ACACACACACACACYT
U818	CACACACACACACACAG	U856	ACACACACACACCCYC
U825	ACACACACACACACACT	U864	ATGATGATGATGATGATG
U827	ACACACACACACCG	U868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
U828	TGTGTGTGTGTGTGTGA	U873	GACAGACAGACAGACA
U836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	U881	GGGTGGGGTGGGGTG
U841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	U889	DBDACACACACACAC
U844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC		

B=(C, G, T), D=(A, G, T), R=(A, G), Y=(C, T)

ISSR 反应扩增的 DNA 片段大小一般在 400—2000bp 之间, 如图 4 所示。引物扩增情况见表 7。根据 ISSR 扩增结果, 应用 Viber Lourmat VDS 凝胶成像系统分析软件, 按 Nei-li 的方法, 统计了 30 份红麻材料两两之间的遗传相似系数, 并对图像进行聚类分析, 结果为表 8 和图 6。

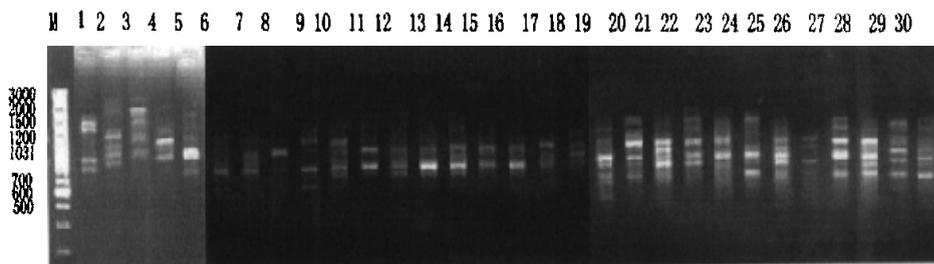


图4 引物U818的扩增结果

Fig 4 Amplified result of primer U818

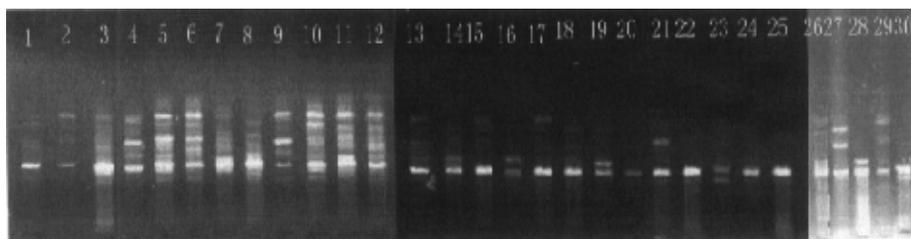


图5 引物U815的扩增结果

Fig 5 Amplified result of primer U815

表7 ISSR 标记的扩增情况

Table 7 Summary of the detection of ISSR markers in kenaf

项目	数据
多态性引物数	17
多态性引物扩增出的条带总数	149
扩增产物的大小范围	0.4—2.0kb
检测出的多态性条带总数	97
多态性条带占总带数的比例	65.1%

### 4.3 红麻品种 ISSR 标记聚类分析

由图 6 可以看出, 当在遗传相似系数为 78.5% 处作切割线  $L_1$  时, 30 份红麻材料可分为 1 个大类群 I 和 1 个亚类群 II, 以及 1 个由单一品种构成的个类 III。其中第 I 大类群包括 27 个品种, 第 II 亚类群中只有 2 个品种, 为福红 951 和非洲裂叶, 第 III 个类为品种金山无刺 (迟)。福红 951 是福建农林大学育成的品种, 它与非洲裂叶聚为一类, 说明福红 951 基因型与非洲裂叶较相似, 二者有较近的亲缘关系。福红 951 与其它品种的相似系数最低为 0.69, 最高为 0.87; 非洲裂叶与其它品种的相似系数最低为 0.66, 最高为 0.81, 说明这两个品种与其它品种亲缘关系相对较远, 基因型遗传差异较大。品种金山无刺 (迟) 是一份用外源 DNA 导入结合辐射诱变育成的特异品种类型, 因此与第 I 大类群 27 份品种和第 II 亚类群 2 个品种的基因型有较大的遗传差异, 其与其它品种的遗传相似系数在 0.69 至 0.87 之间, 且大部分低于 0.8, 表明该品种与其它品种的亲缘关系相对较远。而其它 27 个品种间的相似系数均高于 0.73, 且大部分高于 0.8, 最高达 0.95, 说明第 I 大类群 27 个品种间亲缘关系较近。虽然所用材料中有从国外引进的品种, 但从聚类结果和遗传相似系数看其和国内选育品种多数亲缘关系较近, 基因型遗传差异不太大, 可能与其杂交亲本亲缘关系较近有关。

#### 4.3.1 第 I 大类群的品种组成及遗传多样性分析

为了便于了解供试材料第 I 大类群中 27 个品种基因型的遗传差异和亲缘关系, 在相似系数为 83% 处作切割线  $L_2$ , 第 I 大类群被分为  $I_1$ — $I_4$  个亚类群。从图 6 还可以看出, 有些品种虽然有相同的地理来源但相互之间亲缘关系相对较远, 基因型差异较大, 如来自美国的品种 C2032、BG52-1、EV-41 因亲缘关系较远而聚在不同的亚类中; 而有些品种虽然有不同的地理来源, 但其基因型差异较小, 亲缘关系较近。这与其所使用的杂交亲本的来源有较大的关系。

##### 4.3.1.1 第 $I_1$ 亚类群品种组成及遗传多样性分析

由图 6 可见, 第  $I_1$  亚类群由 KB11、闽红 321、福红 5 号、福红 9 号、

福红 2 号、SCS11-06、福红 7 号、福红 4 号和粤红 743 等 9 个品种组成，除 SCS11-06 以外，全是国内育种单位品种杂交选育的品种，其基因型较接近，遗传相似性较高。其中 KB11 和闽红 321 又单独聚为一个小类，其遗传相似系数高达 0.93，表明这两个品种基因型基本相似，亲缘关系相近；而与其它 7 个品种的遗传相似系数相对较小，说明这两个品种与同一亚类群内的其它品种基因型遗传差异相对较大，亲缘关系相对较远。

#### 4.3.1.2 第 I<sub>2</sub>亚类群品种组成及遗传多样性分析

第 I<sub>2</sub>亚类群由 6 个品种组成，分别是青皮 3 号、BG52-1、粤引 4 号、福红 952-1、福红 991 和福红 6 号，其中青皮 3 号来自越南，BG52-1 来自美国，粤引 4 号来自古巴，这 3 个品种虽然来自不同的国家，但其遗传相似系数达 0.88，由此可见其亲缘关系比较近，基因型比较接近，遗传相似性较高。而福红 952-1 和福红 991 遗传相似性也较高，有一定的亲缘关系。品种福红 6 号单独成为一类，说明与其它 5 个品种基因型差异相对较大，亲缘关系较远。

#### 4.3.1.3 第 I<sub>3</sub>亚类群品种组成及遗传多样性分析

第 I<sub>3</sub>类共有 5 个品种，其中包括 SCS11-09、来自泰国的泰红 763，来自美国的 EV-41 和国内品种福红 992、福引 00-16-1，其中 EV-41 和泰红 763 的相似系数高达 0.89，说明来自不同国家和地区的品种之间通过杂交育种基因交流后其亲缘关系也可能很近。

#### 4.3.1.4 第 I<sub>4</sub>亚类群品种组成及遗传多样性分析

第 I<sub>4</sub>亚类群由福红 3 号、红引 135、C2032、SCS11-04、福红 952、KB2、福红 2-1 等 7 个品种组成。由图 6 可见，福红 952 与 KB2 遗传相似性较高，其原因是福红 952 有来自古巴的品种粤引 1 号的血缘，而粤引 1 号与 KB2 的国外血缘有较近的关系。C2032 和 SCS11-04 来自国外，但与国内品种的遗传相似系数最高可达 0.90，亲缘关系较近。福红 2-1 与其它品种的相似系数最低为 0.71，在第 I<sub>4</sub>亚类中成为单独的一个个类，表明其与其它 6 个品种亲缘关系相对较远，基因型差异相对较大。

83% 78.5%

福红951  
 非洲裂叶  
 Kb 11  
 闽红321  
 福红5号  
 福红9号  
 福红2号  
 SCS11-06  
 福红7号  
 福红4号  
 粤红743  
 青皮3号  
 BG52-1  
 粤引4号  
 福红952-1  
 福红991  
 福红6号  
 福引0-16-1  
 福红992  
 EV-41  
 SCS11-09  
 泰红763  
 福红3号  
 红引135  
 C2032  
 SCS11-04  
 福红952  
 Kb2  
 福红2-1  
 金山无刺(迟)



图6 基于 ISSR 数据绘制的 30 份红麻材料之间的聚类图

Fig6 Dendrogram of cluster of 30 kenaf accessions based on ISSR markers



## 5 小结与讨论

### 5.1 关于红麻优异种质的主成分及系统聚类分析与评价

#### 5.1.1 优异种质资源性状主成分分析与优异品种评价

供试 40 份红麻品种主成分分析结果表明：前 3 个主成分分别为韧皮纤维产量构成因子（53.4%）、茎秆皮骨比构成因子（25%）、纤维品质构成因子（7.7%），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。根据品种主成分表现可以看出福红 2 号、福红 952-1、福红 2-1、KB11 4 个品种综合产量性状优良；而 SCS11-04、SCS11-09、SCS11-06-1、KB2、KB11、福红 2-1、福红 952、福红 991-2、闽红 321、福红 952-1 等品种的第 2 主成分值（茎秆皮骨构成因子）均高于 0.8，说明其皮骨比和出麻率较高；福红 991-2、金山无刺（迟）、KB2、非洲裂叶、福红 992、福红 7 号等品种纤维品质性状优良，其纤维拉力和支数较其它品种高。综上所述，福红 2 号、福红 952-1、福红 2-1、KB11、KB2、福红 991-2 和 SCS11-09 等 7 个品种表现为高产优质，是综合性状优良的新品种，可在生产上大面积推广种植。

主成分分析可以从产量、品质构成的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。

从供试品种主成分聚类群及个类的品种性状特征可知（表 5），福建农林大学选育的红麻新品种福红 2 号、福红 952-1 株高均在 5 米以上，产量构成因子最为优良，是两个综合性状最为优良的品种，“九五”、“十·五”期间被农业部和国家科技部列为国家科技成果重点推广的红麻新品种。

### 5.1.2 系统聚类分析

在 40 份红麻材料聚类图中, 当取值  $D = 51.08$  时可把 40 份品种分成 4 类, 即 1 个大类群和 1 个小亚类群, 以及 2 个单一品种自成体系的个类。这两个单一品种分别是福红 952 和福红 2 号。结果表明这两个品种在产量和品质性状表现上与其它品种有明显差别, 是高产优质的新品种。这一结果与主成分二维排序得出的结果一致。在  $D = 39.12$  水平面上, 第 I 类群又可分为 3 个亚类群和 5 个单一品种的亚类。5 个单一品种分别为 C2032、BG52-1、泰红 763、金山无刺(迟)和福红 7 号。其性状表现与 I 大类群的其它品种有一定差异, 其中 C2032、BG52-1、泰红 763 等 3 个品种分别来自美国、马里和泰国; 福红 7 号的一个亲本为国外品种; 金山无刺(迟)茎秆光滑无刺, 表型明显区别于其它品种, 说明其基因型比较独特, 与其它品种亲缘关系较远。这些品种可在遗传改良上或生产上直接推广利用, 是宝贵的种质资源。如福红 952-1 是由非洲裂叶与粤引 1 号杂交选育的, 该两个亲本分别聚在不同的类群中, 其遗传差异比较大, 因此基因重组后选育出丰产性很好的红麻新品种福红 952-1。

利用系统聚类既可揭示品种类群间的遗传差异与相互关系, 又可了解类群内品种的遗传相似性, 在聚类分析中引入主成分的目的是用尽可能少的主成分说明生物学的大部分信息, 减少统计的复杂性。若第 1 和第 2 主成分贡献率大, 用前两个主成分作二维排序的结果与系统聚类相似, 具有简洁、直观的特点。本实验对 40 份红麻种质资源 12 个性状的聚类, 能较好地对品种资源综合性状进行科学评价, 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。

## 5.2 关于红麻优异种质的遗传多样性与亲缘关系 ISSR 分子标记研究

### 5.2.1 ISSR 分子标记在红麻种质资源研究中的可行性

不同品种的红麻在纤维产量和纤维品质等方面存在着明显的差异。因此根据不同的用途提供稳定的优质红麻原料变得十分重要。但仅凭红麻种

子外观、叶型、茎色、熟期等农艺性状无法鉴定品种及其来源。因此应用分子生物技术研究红麻的遗传多样性和亲缘关系显得尤为重要。在红麻上的分子标记研究起步较晚,因此目前对红麻种质资源的遗传关系仍缺乏全面的了解。已有的研究表明 ISSR 技术是一种研究种质资源遗传多样性和亲缘关系的有效方法。本研究用筛选出的 17 个 ISSR 引物对 30 份红麻材料进行 PCR 扩增,共扩增出 149 条条带,平均每个引物 8.76 条,其中多态性条带共 97 条,占总数的 65.1%。而且根据所得条带进行聚类分析后可将 30 个红麻品种按亲缘关系远近划分为不同的类群,由此可见,ISSR 可以较好地确定红麻种质资源的遗传多样性和亲缘关系远近,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有价值的分子水平上的信息。

#### 5.2.2 不同引物对 ISSR 分子标记的影响

虽然 ISSR 引物为通用引物,但研究发现不同植物类群中能扩增出带纹的引物存在较大差异,如 Ammiraju 等用 100 个引物对小麦基因组进行扩增,55 个引物能扩增出带纹,产生多态带纹最多的是二核苷酸引物 (CT)<sub>n</sub>、(GA)<sub>n</sub>、(CA)<sub>n</sub>。Moreno 等在葡萄、Blair 等在水稻上的研究发现,5' 端加 3 个碱基锚定的引物产生较多的条带,而 3' 端加锚的引物产生较少的条带。在柑橘、水稻、欧洲栗中发现 (AT)<sub>n</sub> 引物均无扩增条带,而 (CA)<sub>n</sub>、(GA)<sub>n</sub> 可以产生较多的条带。本研究亦发现扩增产物的多态性与引物序列有关。筛选出的条带清晰的引物中 76.5% 为二核苷酸重复序列,且序列为 (CA)<sub>n</sub>、(AC)<sub>n</sub> 的引物扩增出的条带多态性较高,其所占比例也最高,达到 50% 以上。说明红麻基因组中 GT/TG 含量丰富。而序列为 (GATA)<sub>n</sub> 的四核苷酸重复序列引物则没有扩增出任何条带。由此可见,引物的筛选在 ISSR 分子标记中起着重要的作用。

#### 5.2.3 红麻 DNA 提取质量对 ISSR 的影响

植物材料 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。早在 1986 年李世民等对红麻 DNA 的提取与纯化进行了研究，用相分配法结合酶解、分子筛层析等方法得到了纯度较高的红麻胚芽 DNA。曹德菊等提出了用 1% 的抗坏血酸保护红麻叶片中的单宁、多酚类物质不被褐化，避免了其褐化产物与 DNA 结合形成不可逆的复合物，提高了 DNA 得率。本研究以刚采摘的新鲜幼嫩红麻叶片为材料， $\beta$ -巯基乙醇在临用前加入，视 DNA 褐变情况可适当增加用量。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。经紫外分光光度计检测所获得的 DNA（所含 RNA 对扩增无影响）能够较好的进行 ISSR 分析。

#### 5.2.4 红麻优异种质遗传多样性与亲缘关系

依据供试红麻品种 ISSR 分子标记的遗传相似系数聚类后，可将 30 份红麻材料分为 1 个大类群、1 个亚类群和 1 个自成体系的个类。其中大类群中包括 27 个品种，亚类群中只有 2 个品种：福红 951 和非洲裂叶。福红 951 与其它品种的相似系数最低为 0.69，非洲裂叶与其它品种的相似系数最低为 0.66，说明这两个品种与其它品种亲缘关系相对较远，基因型差异较大。而两个品种之间亲缘关系很近，说明福红 951 与来源于非洲的品种有一定的亲缘关系。品种金山无刺（迟）单独成为第 III 类。该品种与其它品种的相似系数最低为 0.69，且大部分低于 0.8，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。金山无刺（迟）是由外源 DNA 导入结合核物理辐射选育的稀有无刺中晚熟特异种质，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，可在杂交育种中作为亲本加以利用。

30 份供试红麻品种之间遗传相似系数较高，除福红 951、非洲裂叶和金山无刺（迟）外，其它品种间的相似系数均高于 0.73，且大部分高于 0.8，

最高达到了 0.95, 说明其亲缘关系较近。虽然所用材料中有从国外引进的品种, 但从分子聚类结果可以看出其和国内品种亲缘关系较近, 有些品种基因型差异不大。这主要是由于我国红麻品种多数由国外引进品种杂交育成, 虽然在以后的育种过程中通过遗传改良的手段育成了一批优异种质, 但由于其所用亲本来源差别不大, 基因型和亲缘关系相对较近, 因而遗传基础仍相对狭窄。由此可见, 在 DNA 水平上, 红麻的遗传多样性并不像形态学所体现的那样丰富。理论上, 要提高一个物种的遗传多样性程度, 不外乎通过三个途径, 一是随着物种进化发生新的基因突变, 二是通过生物技术创新种质新类型, 三是通过有性过程同近缘野生种杂交扩大遗传基础, 而后者起到的作用更大。因此在红麻遗传改良过程中, 若要以本研究供试品种为材料, 则应选择不同类群间亲缘关系相对较远、基因型和性状差异较大、综合性状优良的品种为亲本, 这样有利于杂交优势的产生和优异新品种的选育。已有的研究表明, 野生种和半野生种与栽培种之间相似系数较小, 最低可达 0.47 (程舟, 2003)。所以在以后的研究中可选用有特色的野生种或近缘野生种作材料, 以扩大红麻育种的遗传基础, 为红麻育种提供分子水平的可靠依据。

## 参考文献

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 程舟. 中日合作开发绿色红麻板材. 林产工业, 2002, 29 (6), 54
- 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
- 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
- 程舟, 蛟岛一彦, 陈家宽. 日本的红麻研究、加工和利用. 中国麻业, 2001, 23 (3): 16-24
- 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
- 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
- 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
- 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
- 方嘉禾. “九五”期间我国作物种质资源研究取得重大进展. 植物遗传资源科学, 2002, 3 (3): 37-40
- 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
- 郭安平, 黄明, 郑学勤, 等. 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

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 李敬机. 红麻制浆造纸现状及发展方向. 中国造纸, 1996 (1): 52-57
- 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
- 李宗道. 麻作的理论与技术. 上海科技出版社, 541-595, 1980
- 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
- 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
- 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. 福建农林大学硕士学位论文, 1998
- 刘娇, 叶蛋白饲料资源的开发利用. 湖南饲料, 2002, (4): 29
- 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
- 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
- 庞延军, 陆军. 从看肿节少穗竹的分类地位问题出探. 南京大学学报 (自然科学版), 1998, 34 (5): 531-535
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 史春霞, 白洋, 郁崇文. 黄、红麻资源的优化与开发利用. 中国麻作, 2001, 23 (1): 40-43
- 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
- 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
- 粟建光, 邓丽卿, 李爱青, 等. 非洲红麻某些生物学特性的研究. 华中农业大学学报, 1994, 14 (2): 120-124
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 王晓鸣, 金达生, 戴法超, 等. 作物遗传资源的抗病虫多样性与农业可持续发展. 中国农业科技导报, 2000, 2 (5): 67-70
- 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
- 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
- 吴敏生, 戴景瑞, 王守才. 在玉米品种鉴定和纯度分析中的应用. 作物学报, 1999, 25 (4): 489-493
- 吴燕民, 李嘉瑞. 用 RAPD 分析麻核桃起源与分类地位. 林业科学, 1999, 35 (4): 25-30
- 武耀廷, 张天真, 殷剑美. 利用分子标记和形态学性状检测的陆地棉栽培品种遗传多

- 样性. 遗传学报, 2001, 28 (11): 1040—1050
- 徐云碧, 朱立煌著. 分子数量遗传学. 中国农业出版社, 1994
- 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
- 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
- 杨晓伶, 程舟. 地球环境保全及植物资源利用——日本第五届红麻等植物资源利用研究会概述. 中国麻业, 2002, 24 (6): 36—37
- 余爱丽, 张木清, 陈如凯. ISSR 分子标记在甘蔗及其近缘属分类上的应用. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2002, 31 (4): 484—489
- 张根旺, 杨天奎, 郭谔. 生物活性物质 CLA 的研究, 中国油脂[J], 2000, 25(6): 13—16
- 张恒庆, 安利佳, 祖元刚, 等. 红松 RAPD 实验中各组成成分含量对实验结果的影响. 植物研究, 1999, 19 (2): 183—188
- 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
- 周东新, 祁建民, 吴为人. 黄麻提取与反应体系的建立. 福建农业大学学报, 2001, 30 (3): 334—339
- 朱立煌. 用分子标记定位一个未知的抗瘟病基因. 中国科学 (B 辑), 1994, 24 (10): 1048—1052
- 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
- Beckman JS, Soller M. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. Bio/technology: 1990, 9: 30—32
- Blair M W, Panaud O, McCouch S R. Inter-simple sequence repeat amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa L*)[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98: 780—792
- Carlson J.E. et al. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. TAG, 1999, 83: 194—200
- Chin SF, Storkson, Albridge, et al. Conjugated Linoleic Acid is growth factor for rice as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency, J. Nutr[J], 1994, 124(12): 2344—2349
- Dayanadan S, Bawa K S, Kesseli R. Conservation of microsatellites among tropical tree. American Journal of Botany, 1997, 84(12):

1658-1663

- Dirlewanger E, Pronier V, Parvery C, et al. Genetic linkage map of peach(*Prunus persica* L.) using morphological and molecular markers[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 888-895
- Edmonds J.M.: Herbarium survey of *Corchorus* and *Hibiscus*, IJO technical reports, Dhaka, 1987
- 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
- 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 Horticult Sci*, 1998, 123: 612-617
- Food and Agriculture Organization (FAO). FAO Production Yearbook 1998, vol 52
- Gao L Z, GE S, HONG D Y, et al. A study on population genetic structure of *Oryza meyeriana* Hall from Yunnan and its in situ conservation significance[J]. *Sci China: Ser C*, 1999, 42: 102-108
- 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
- Hearne C, Ghosh S, Todd J. Microsatellites for linkage of genetic traits. *Trends in Genetics*, 1993, 8: 288-294
- I.R. Denton (Ed): Report of the 1<sup>st</sup>-5<sup>th</sup> IJO germplasm collection missions for jute and kenaf and allied fibers in Kenya and Tanzania. IJO, Dhaka, Bangladesh, 1987-1988
- Jain A, Apparanda C, Bhalla P L. Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of *Pandorea* by RAPD and inter-SSR PCR. *Genome*, 1999, 42(4): 714-719
- Jarret R.L. Genetic diversity and systematic relationships in sweet potato and related species as revealed by RAPD analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1994, 41: 165-173
- 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
- Jonsson B O, Jonsdottir I S, Gronberg N. Clonal diversity and allozyme variation in population of the arctic. *Carex Bigelowii* (Cyperaceae) *J Ecol*, 1996, 84: 449-459
- Kantety R V, Zeng X, Bennetzen J. Assessment of genetic diversity in popcorn (*Zea mays* L.)

- inbred lines using inter-simple sequence repeat(ISSR) amplification[J].Mol bread,1995,1:365-373
- 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, Hireshima, Japan, Oct,13-14,2000:144-148
- J. M. Dempsey: Fiber crops, Univ. Press Florida,USA,1979
- Kano,T. Development and propect of kenaf board(in Japanese). Reference No. 47 of the Kenaf Society of Kochi & Economic Reports of Ehime, November 10,1997,25(44)
- Kashida,H, et al.Processing and quality of kenaf boards made from core(in Japanese). Proceeding of the 47<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Wood Research Society in Kochi, April,1997:265
- Lee K N, Kritchvesky, Pariza. Conjugated Linoleic Acid and Atherosclerosis Rabbits. Inform[J],1994,108(1):19-25
- 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
- Mailer R J et al. Discrimination among cultivars of rape seed using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. TAG,1994,87:697-704
- Michiro S, Akira, Masso. Conjugated linoleic acid modulates tissue levers of chemical mediators. Lipids[J],34(3):243-248
- Moreno S, Martin J P, Ortiz M. inter-simple sequence repeats(ISSR) PCR for characterization of close lyrelated grapevine germplasm[J]. Euphytica,1998,101:117-125
- Park Y, Albridge, Storkson, et al.1999, Changes in body composition in Micc during feeding and withdrawl of CLA, Lipids[J],34(3):243-248
- Primmer C R, Ellegren H, Patterns of molecular evolution in avain microsattelites. Mol.Biol.Evol,1998,15(8):997-1008
- Reiter R S et al. Global and local genome mapping in Arabidopsis thaliana by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. Proc Natl Acad Sci USA,1992,89:1477-1481
- Siepe, T. Ventrella, D, Lapenta , E . Evaluation of genetic variability in a collection of *Hibiscus cannabinus* (L) and *Hibiscus spp*(L). Ind. Crop Prod. 1997,6: 343-352
- T.Ghosh:Handbook of Jute,FAO of United Nations,Rome,1983
- Welsh J, Peterson C, Mcclelland M, et al. Genomic fingerprinting using arbitrary primed PCR

and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Research*, 1990,19:5275-5279

Williams J K, Kubelik A R, Livak K L, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990,18(22):6531-6535

Wu K.S. et al. Abundance polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *MGG*, 1993,241:225-245

Yang W P, Oliveira A C, Godwin I et al. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums[J]. *Crop Sci*,1996,36:1669-1676

## 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

## 致 谢

本文是在导师祁建民研究员的悉心指导下完成的，论文的选题立项、资料收集及写作等方面都倾注了导师大量心血。三年来，导师不仅在学习和试验上给予我耐心教诲和精心指导，而且在生活上也给予了无微不至的关怀和帮助。我在业务能力和科研素质上取得的点滴进步都离不开导师的关心、鼓励和帮助。导师严谨的科研态度、科学的创新精神及为人师表的高尚风范将使我终生受益。值此论文完成之际，谨向我的导师致以最崇高的敬意和最诚挚的谢意。

特别感谢课题组的吴为人教授和周元昌教授，他们在各方面都给予我很大的帮助和支持，使得试验得以如期完成；感谢实验室的兰涛、段远霖和刘华清老师，他们在试验过程中给予我许多宝贵的建议和帮助；感谢遗传所常规组全体工作人员在学习、生活上的关心和帮助。

在试验过程中，得到孙志强、王涛、王学兴、郑艳、谢小芳、景艳军、张积森、梁景霞、王晓飞、徐建堂、阮奇城等同学的无私帮助，特此致谢。同时感谢实验室的其它研究生给予的协助。

在数据处理过程中，得到农业部重点实验室甘蔗研究所及周会博士的热忱帮助，在此表示衷心的感谢。感谢生命科学学院林文雄教授提供部分引物；感谢王经源老师给予的热心帮助。

最后，感谢我的亲人、朋友和三年来朝夕相处的同学，感谢所有关心和帮助过我的人。祝你们永远幸福！