摘　要

锦葵科木槿属一年生植物红麻（*Hibiscus cannabinus* L.）是世界上重要的经济作物之一。其用途已从传统的麻纺扩展到许多领域，潜力很大。可是，红麻品种的鉴定没有一个行之有效的方法，同时我们对红麻种质资源的遗传多样性和亲缘关系的了解程度还十分有限，这些都严重制约着红麻的有效利用和红麻遗传资源的保护。

本研究探讨利用形态特征、农艺性状、RAPD 分析和 AFLP 分析鉴定红麻品种；评价红麻种质资源的遗传多样性和亲缘关系；揭示红麻的起源、传播以及目前世界范围的分布格局。实验材料为来源于世界各国不同地域大陆的红麻种质资源和 2 份红麻近缘种玫瑰茄（*H. sabdariffa* var. *altissima*）资源。从获得的形态农艺性状数据以及对所评价的红麻品种分析表明，茎粗、全茎重和 50% 开花天数在红麻品种分类中起着非常重要的作用。这些性状只能对红麻品种作出一个粗略的分类和鉴定，因此仅基于形态农艺性状来鉴定特定的红麻品种十分费力而且不可靠。与形态农艺性状相比，用 RAPD 和 AFLP 数据鉴定红麻品种更具效果。从 RAPD 和 AFLP 分析结果可以看出，虽然所检测到的 RAPD 多态性条带相对较少，但是只要根据用少量引物扩增出的 RAPD 和 AFLP 分子标记就能够鉴定红麻品种。同时，分子标记分析为红麻种质资源提供了一个相对明瞭的遗传关系。因此，RAPD 和 AFLP 分子标记分析对红麻品种鉴定和遗传关系的有效检测都是非常有效的手段。

根据 AFLP 分子标记检测到的红麻与玫瑰茄之间的遗传差异支持了它们在分类学上的独立性，同时在红麻种质资源中检测到很大的遗传变异。基于 AFLP 分析获得的发现支持了红麻起源于非洲的假设。证实了栽培红麻首先被引到印度，然后传播到亚洲其他国家。

关键词：红麻种质资源，鉴定，多样性，遗传关系，主成分分析，随机扩增多态性 DNA，扩增性酶切片段长度多态性

ABSTRACT

Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.), which classified in the genus *Hibiscus* (*Malvaceae*), is one of the world's most economically important fiber crops and has a great potential for its multipurpose utilization, in addition to its traditional usage. Varietal identification of kenaf is always problematic and knowledge on genetic diversity of kenaf varieties is also limited, which significantly hindered our effective utilization and conservation of the valuable kenaf germplasm.

The objectives of this study were to (i) find a proper method for identifying kenaf varieties; (ii) estimate its diversity and genetic relationships; (iii) reveal origin and dissemination of kenaf, through which kenaf formed its current distribution pattern worldwide. Morpho-agronomic characters, random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, and amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting were analyzed for different kenaf varieties and also two varieties of its relative, roselle (*H. sabdariffa* var. *altissima*). Data from morphological analysis showed that the evaluated kenaf varieties could be divided into three major groups. The characters, such as middle stem diameter, whole stalk weight, and days to 50% flowering, are highly responsible for the variation of the kenaf varieties, but it is difficult to identify individual varieties merely by the morpho-agronomic characters, due to their limited variation. On the other hand, clearly separation of the kenaf varieties was achieved based on the RAPD and AFLP fingerprintings, although the detected RAPD polymorphic fragments were relatively low. They provided a relatively clear pattern of genetic relationships among the collected kenaf germplasm. The RAPD analysis

and AFLP fingerprinting are effective tools in identifying of kenaf varieties and determining their genetic relationships, particularly when combined with the analysis of morpho-agronomic characters.

The AFLP analysis showed that kenaf and roselle are independent species with close relationships, and great genetic diversity was also detected among the kenaf germplasm with different origins. The AFLP analysis strongly supports the opinion that kenaf was originated in Africa. It also demonstrated that the dissemination of kenaf was from Africa through Asia to Central and North America.

Key words: kenaf germplasm, identification, diversity, genetic relationships, principal component analysis, RAPD, AFLP

目 录

文摘
英文文摘
第一章 前言
第二章 红麻的起源、分类和种质资源概况
第三章 红麻资源的开发利用
3.1 制浆造纸
3.2 饲料
3.3 纺织
3.4 食用
3.5 板材和汽车内装复合材料
3.6 药用
3.7 环境净化
3.8 作为建设废弃泥土中性固化剂
3.9 自然降解无纺布及土工布
3.10 红麻杆芯香菇菌床
3.11 吸油材和杆芯炭
第四章 DNA 分子标记在植物种质资源遗传关系的确定和品种鉴定上的应用
4.1 多态性与分子标记
4.2 DNA 分子标记
4.3 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)和 PCR-RFLP
4.4 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)
4.5 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)
4.6 SSR(Simple Sequence Repeat)
4.7 DALP(Direct Amplification of Length Polymorphisms)
4.8 SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)
4.9 分子标记的选择
第五章 红麻种质资源遗传变异和亲缘关系的农艺性状和 RAPD 分析
5.1 材料与方法
5.1.1 材料及性状观测
5.1.2 DNA 提取
5.1.3 RAPD 分析
5.1.4 数据分析
5.2 结果
5.2.1 形态农艺性状分析
5.2.2 RAPD 分析
5.3 讨论
第六章 红麻种质资源鉴定和遗传关系的 AFLP 分析
6.1 材料和方法
6.1.1 材料和 DNA 提取
6.1.2 AFLP 分析和银染检测
6.1.3 数据分析
6.2.结果

6.2.1 形态特征和农艺性状的变异
6.2.2 AFLP 指纹图谱式样的变异
6.3 讨论
6.3.1 红麻种质资源的鉴定
6.3.2 红麻种质资源的变异和遗传关系
6.3.3 红麻的起源和传播
参考文献
致谢
博士后期间发表论文
近年刊物发表的论文
近年学术会议发表论文
个人简历和个人经历

第一章 前 言

锦葵科木槿属一年生植物红麻（*Hibiscus cannabinus* L.）是一种古老而具有新概念的作物。红麻原产于公元前 4000 年的非洲苏丹，传统上作为生产麻绳、麻袋、地毯等的原料（Dempsey, 1975; 李宗道, 1980）。近年来，随着森林资源被大量砍伐，全球变暖及沙漠化已成为人类所面临的最严重的环境问题之一。而红麻以其巨大的生物产量（为树木的三到四倍），极强的二氧化碳吸收能力，及可与木材相媲美的品质等优点，倍受关注。它被看作是一种极具潜力的木材纤维的替代作物，其多用途利用作为保护森林资源，防止全球变暖的对策之一，更加引起重视。尤其在日本、美国等发达国家，红麻被看作是未来派作物，并开始在其多用途开发利用方面进行研究，涉及到其用于造纸、无纺布、板材、土壤改良剂、塑料填充料等许多领域（Sellers & Reichert, 1999; AKS, 2000; JKA, 2000）。马来西亚也于 2000 年启动为其 5 年的国家红麻开发计划，总投入为 20 亿马元(马来西亚农业部，2000)。在我国西北部地区种植和开发红麻符合生态环境目标与经济利益相统一的持续发展的原则，具有一定的开发前景。新疆屯河和云南玉溪都计划开展以红麻造纸为主的多用途开发利用。

在红麻多用途开发利用过程中存在着一些问题。首先，随着多用途利用涉及领域的不断扩大，根据不同的用途筛选专一品种，提供优质的红麻原料变得十分重要。而不同品种的红麻在纤维品质、制浆造纸特性等方面存在着明显的差异(谭石林等, 1994; Cheng, 2000)。其次，根结线虫的危害将关系到我国西部干旱、贫瘠、盐碱、荒芜地区红麻原料基地建设的成败。虽然在红麻栽培种中还没有发现根结线虫的抗原，但是野生红麻及红麻近缘种玫瑰茄（*Hibiscus sabdariff var. Altissima*）和醋酸马鞍种（*Hibiscus acetosella*）具有高抗根结线虫的特性(Wilson, 1978)。因此，红麻资源包括野生红麻及近缘种的收集、筛选和鉴定，其遗传关系的分析和评价，以及优质、抗虫资源的研究和挖掘对多用途开发利用至关重要。但是国内外对红麻资源的评价都是仅调查了其形态及农艺性状(邓丽卿等, 1994; Siepe et al., 1997)，对资源的遗传关系仍缺乏了解，更没有在分子水平上的分析和评价，这直接影响红麻资源的有效利用。美国、澳大利亚、意大利、联合国国际黄麻组织（IJO）等拥有不少红麻资源，但很少进行筛选。偶有对红麻资源从形态及农艺性状进行评价，但所得到的结论只是所有的红麻资源仅在熟期上存在早晚差别(Siepe et al., 1997)。这显然不能对应红麻的多用途开发之需。我国红麻种植历史悠久，是主要的产麻大国，拥有丰富的红麻资源。选育出不少优良的品种用于生产，但红麻的用途仍基本停留在传统的麻纺上面。虽然也开展过红麻资源的农艺性状的评价利用研究（邓丽卿等,

1994) 及杆芯造纸用红麻资源的筛选、评价和利用的研究(梅祯和程舟,1993)，但与多用途开发对红麻资源的需求存在不小的差距。

另外，对红麻品种的鉴定也没有一个行之有效的方法。目前红麻品种的鉴定都是基于种子外观、叶形、茎色、熟期等形态和农艺特征，但是仅凭这些特征来鉴定品种及其来源有较大的难度。这使得红麻在种子产销、品种保护等方面缺少判定依据，同时也影响红麻产量和品质的稳定性。国内红麻种子的生产管理比较混乱，特别是因为种植了早熟品种所造成的红麻减产及品质降低问题相当严重(汤永海,1994)。而原料品质的不稳定也将直接影响到红麻的开发利用。我国加入 WTO 以后，急需建立一个农产品质量评价保证体系。所以，获得一种有效的方法来鉴定红麻品种尤为重要。近年来随着分子生物学方法的不断发展，分子标记技术已广泛用于种质资源的遗传多样性和亲缘关系的分析和评价，在红麻资源方面的利用尚刚刚开始(Cheng et al., 2000; 程舟等, 2002)。

本研究对经过多年努力从美国种质资源保存机构(U.S. Germplasm Repository)和密西西比种子保存库(Mississippi Seed Inventory)、联合国国际黄麻组织（IJO）等处收集到的包括野生红麻及玫瑰茄在内的世界各地的种质资源，通过形态特征、农艺性状和分子标记等实验手段首次系统分析世界红麻资源的遗传多样性，评价红麻资源的遗传关系，阐明其分布规律；确立红麻品种的分子鉴定技术。为红麻资源遗传多样性的有效利用、品种鉴定及红麻的分子育种提供依据，对解决当前红麻多用途开发利用过程中存在的问题具有重要意义，也可为红麻种子产销、品种保护和产品质量评价提供判断依据。

第二章　红麻的起源、分类和种质资源概况

红麻 kenaf（*Hibiscus cannabinus* L.）是一种非常重要的纤维作物。红麻在世界上分布的范围很广，热带、亚热带和温带均有种植。红麻有超过 120 种称谓，如红麻、槿麻、钟麻、mesta、palungi、ambari 等等，也说明了红麻分布和使用的广泛性。目前主要在中国、印度、泰国、越南、印度尼西亚等远东和南亚国家种植（FAO, 1998; Liu, 2000）。

红麻起源于非洲。大多数作者都同意非洲是红麻的起源地，因为红麻和木槿属的一些种在许多非洲国家呈野生状态分布。而且红麻很可能早在公元前 4000 年的苏丹西部被驯化的（Murdock，1959）。Menzel 和 Wilson （1964，1978）认为红麻的起源驯化地苏丹西部与传播中心并不一致，并进一步推测安哥拉是红麻的传播中心。许多调查研究发现红麻在非洲尤其是东部非洲的很多国家如肯尼亚、坦桑尼亚、苏丹、埃及和埃塞俄比亚等国广泛分布（Wilson & Menzel, 1964; 熊和平, 1989; 李爱青, 1990）。在这些国家野生红麻分布广泛，从沼泽和易涝地到干旱和接近沙漠的地区，以及农田、山地等不同海拔和不同的环境均有生长，具有较强的抗病抗逆性。

印度是周知的最早的、在 1900 年左右就已开始红麻商业化栽培和利用的国家。但红麻如何传至印度并在印度确立鲜为人知，尤其是红麻在印度如何确立其种植地位和推广知之甚少（Dempsey, 1975）。

红麻在我国已有 90 多年的历史。我国南方各省栽培红麻，最早为台湾省，1908 年台湾省农业试验场从印度引入红麻试种和推广，至 1943 年又引种推广到浙江杭州一带。至 1956 年后，由于红麻炭疽病危害严重，种植面积减少。1956 年后由于抗病品种的出现，红麻生产又呈发展趋势，江西、湖南、河南、安徽等省相继引种栽培，成为南方各省的主要韧皮纤维作物之一。北方各地栽培红麻以东北最早，1927 年公主岭农事试验场从苏联引入“塔什干”红麻品种，开始种植于辽东、辽西沿河一带，以后又陆续扩展到吉林、河北、山东等省（李宗道, 1980）。目前红麻从我国的南部海南、广东、广西、云南及长江流域、淮河流域到东北的辽宁吉林、黑龙江、西北的新疆、陕西、甘肃、宁夏、内蒙古等地均可以种植。

红麻韧皮部重量占全杆的 30~40%，韧皮纤维细胞长度 2.6mm 左右，可与针叶木相媲美；红麻木质部纤维细胞长度 0.7mm 左右，接近阔叶木。红麻是一种速生性可再生资源，生育期短（120~160 天），生物学产量高，其生长量是树木所不及的，如比生长量较大的杨木高 3~5 倍，比芦苇、竹子高 1~3 倍。因品种和栽培条件不同，生长 120 天左右，红麻风干茎全杆产量一般 12~15 吨/公顷；生长 160 天，其风干茎产量 16~20 吨/公顷，干叶 4 吨/公顷左右。良种配良法，

在适宜条件下栽培，红麻风干茎最高可达 25~30 吨/公顷以上。株高一般 3~4 米，高的可达 5~6 米。红麻化学浆的纸得率为 43~48%，化学机械浆的纸浆得率为 75%左右；且红麻耐盐碱、干旱、洪涝能力强，对土壤的要求不高，适应性广，管理简单，可不与粮棉、油、菜争良地；红麻活植株有净化污水、除去有害物质的作用。

红麻（*Hibiscus cannabinus*）属于锦葵科（*Malvaceae*）、木槿属（*Hibiscus*）短日照一年生纤维作物。木槿属大约有 200 个种，有草本、灌木和乔木，广泛分布于热带、亚热带世界各地。叶片为单生，掌状叶脉，花大而鲜艳，两性花，腋生，多数为种状，副萼有几个小苞叶，花萼 5 个，花瓣 5 片，雄蕊位于中间，果实 5 室。锦葵科木槿属的分类列于图 2-1。木槿属分为 *Furcaria*、*Alyogne*、*Abelmoschus*、*Ketmia*、*Calyphyllia*、*Azanza* 6 个组。*Furcaria* 组有 40 多个种，在我国有 24 个种和 16 个变种，其中一年生或多年生的草本有 8 种。木槿属 *Furcaria* 组植物的主要形态列于表 2-1。

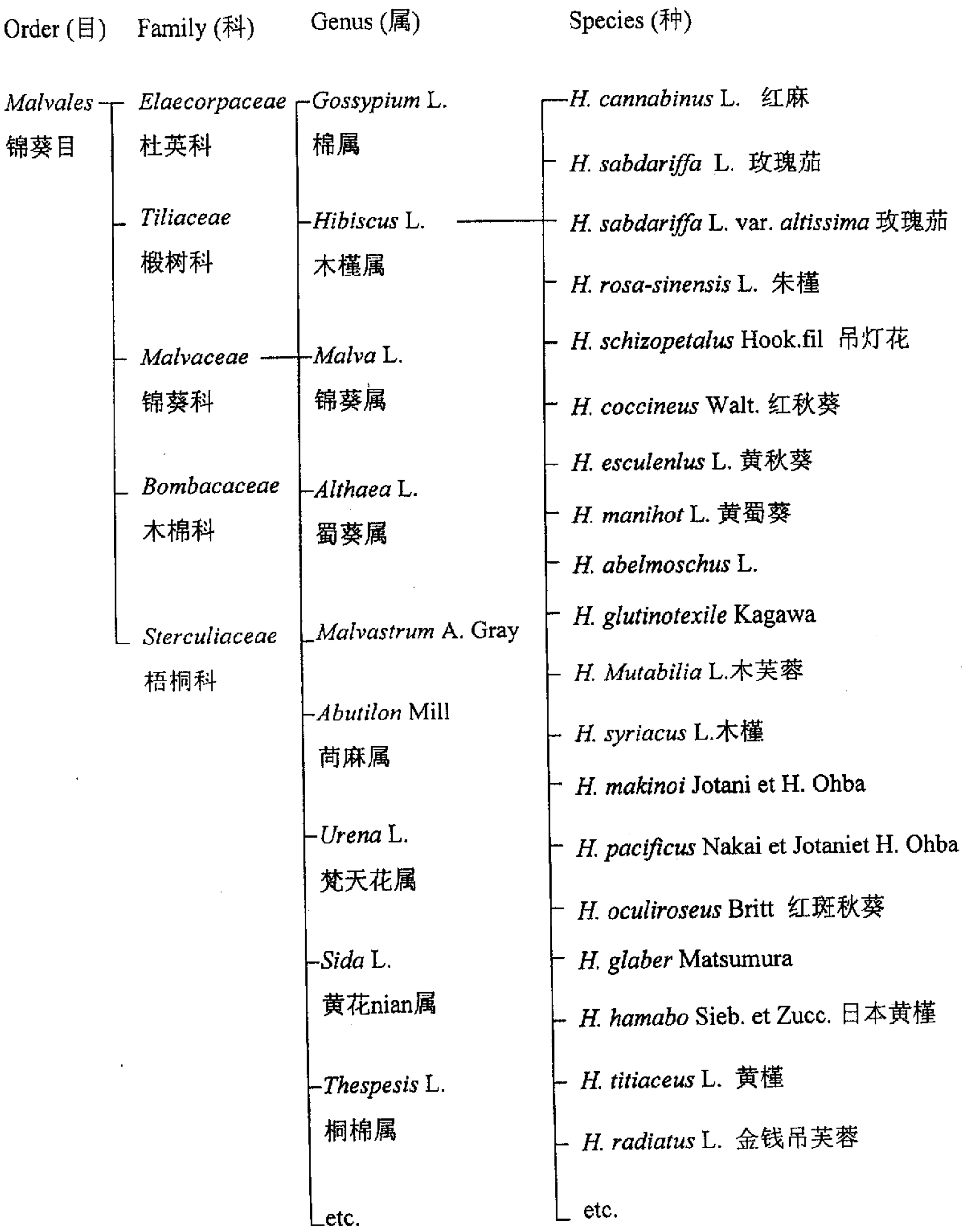
表 2-1 木槿属 *Furcaria* 组植物的主要形态

Table 2-1 Main morphology of *Hibiscus* section *Furcaria*

种名	苞片尖端	花萼蜜腺	花萼绒毛	花萼颜色	种子表面	花色	叶色	叶型	株高(m)	分枝性	茎表面	茎色
红麻	完整	有	有	绿	光滑	黄、紫	绿	裂或近园	2—4	弱	有刺	绿或红
玫瑰茄	有槽	有	无	红	光滑	黄、红	深绿	裂	2—3	弱	光滑	绿或红
金钱吊芙蓉	分叉	无	有	绿	光滑	黄、红	绿	裂	1—3	中	有刺	绿
野西瓜苗	完整	无	无	绿	光滑	黄	深绿	裂	1—2	强	有长毛	绿
H. acetosella	分叉	有	有	红	短绒毛	红	红	裂	2—3	中	光滑	红
H. diversifolius	完整	有	有	红	较光滑	深黄	深绿	近园	2—3	中	多刺	红
H. lunarifolius	完整	无	无	绿	较光滑	淡黄	绿	近卵	2—3	强	有毛	绿
H. pendurifomis	分叉	有	有	红	较光滑	深黄	绿	浅裂宽	1—2	强	稀刺	绿
H .vitifolius	完整	无	无	绿	多绒毛	黄	绿	近园	1—2	强	有毛	深绿
H. calyphyllus	有槽	有	无	绿	较光滑	深黄	绿	裂	1—2	弱	多刺	绿
H. bifurcatus	分叉	有	无	绿	光滑	淡紫	绿	浅裂宽	1—3	中	有刺	绿
H. surattensis	分叉	无	无	绿	光滑	深黄	绿	裂	1—2	弱	有刺	绿
H. costatus	分叉	有	无	红	光滑	淡紫	红	浅裂宽	2—3	弱	有刺	绿
H. furcellatus	分叉	有	无	绿	光滑	淡紫	绿	近卵	1—3	中	有刺	绿

图 2-1 锦葵科木槿属分类图

Fig.2-1Taxonomy of *Hibiscus* genus, *Malvaceae* family



国际上，美国、澳大利亚、意大利、联合国国际黄麻组织（IJO）等保存有不少红麻资源，对红麻资源从形态及农艺性状进行了评价，结论是可将红麻资源分为早熟和迟熟类型(Siepe et al., 1997)。

我国红麻栽培历史较短，原来保存的红麻种质资源较少，迄止 1984 年统计仅 68 份，且品种间亲缘关系较近。后经中国农科院麻类研究所于 1985 年从美国引进了源自 31 个国家或地区的红麻品种 325 份（黄培坤等，1989），1989 年从肯尼亚和坦桑尼亚等红麻原产地收集了一百多份红麻种质资源（熊和平，1989；李爱青，1990）。目前保存红麻种质资源 500 多份，形态多样，类型丰富。依据观察结果，可把我国目前保存的红麻种质资源分成 29 个类型(表 2-2)。大

表 2-2 红麻种质资源分类 (邓丽卿等，1994)

Table 2-2 Taxonomy by kenaf germplasm resources

类型	种子大小	株型	花冠大小	叶型类型	花冠颜色	茎颜色	序号
栽培型	大籽	高大不分枝	普通型	裂叶	黄	绿	1
						红	2
						紫	3
					紫、红	绿	4
						红	5
					纯红	绿	6
						红	7
				全叶	黄	绿	8
						红	9
						紫	10
					紫、红	红	11
						紫	12
					纯黄	红	13
	大籽	矮、有分枝	普通型	裂叶	黄	绿	14
						红	15
				全叶	黄	绿	16
						红	17
		高大不分枝	普通型	裂叶	紫、红	绿	18
						红	19
				全叶	黄	绿	20
						红	21
野生型			特大型	裂叶	黄	绿	22
						红	23
					紫、红	红	24
	小籽	矮、多分枝			黄	绿	25
						红	26
			极小型	裂叶	紫、红	红	27
					纯黄	红	28
				全叶	黄	红	29

的种子的千粒重为 30 g 左右，小的种子的千粒重为 10 g 左右。花冠根据直径大小分普通型（直径 12 cm 左右）、特大型（直径 16 cm 左右）、极小型（直径 4 cm 左右）3 种类型。花冠的颜色有黄、紫红（含淡红、红、紫、蓝等）；花瓣基部通常为紫色。茎的颜色分绿、红（含淡红、微红）及紫红等；叶片形状分裂叶型和全叶型两大类（邓丽卿等，1994）。但绝大多数的栽培品种都表现为大粒种子、普通黄色花冠、裂叶或全叶、绿茎或红茎类型。邓丽卿等（1994）从形态特征、生育特性、经济性状、产量品质、抗病性等方面评价了 420 份红麻种质资源，结果表明表明：全生育天数为 86—240 天，株高为 200—428 厘米，茎粗为 0.8—2.3 厘米，鲜皮厚为 0.6—1.9 毫米，束纤维强度为 28—52 kg/g，束纤维支数为 215—388 支，纤维亩产 60—220 公斤。鉴定出一批高产、抗病优质及特异类型的种质资源。

第三章　红麻资源的开发利用

红麻传统上作为生产麻绳、麻袋、地毯等的原料（Dempsey, 1975; 李宗道, 1980）。同时，红麻叶片的蛋白质含量达 25%，也是牛、羊、猪的好饲料。红麻作为最具潜力的非木材纤维资源的提案最初是由美国农业部提出的。当时美国在经历了五十年代石油危机后生物资源被重新得以重视的历史背景下，加上纸浆工业的发展急需大量的速生材，同时对当时国内过剩的粮食作物和棉花生产也需找到一种可代替的农作物。因此，美国自 1957 年起的十几年里，花费了巨额经费，开展了名为「新纤维作物的探寻的研究」(Nelson et al., 1961, 1966; Nieschlag et al.,1960a,b, 1961; Clark et al., 1962a,b, 1965, 1967, 1969, 1971; Cunningham et al., 1970; Trotter, 1962; White, 1969)。经过了大量的评价试验后，红麻从大约 3000 种的植物中（其中包括 500 多种纤维植物），以其纤维产量高、纸浆得率高、品质优、适用传统农艺手法种植等特点脱颖而出。在随后的几十年里，围绕红麻种植和造纸用开发展开了一系列的研究（Atchison, 1996）。

进入九十年代，随着森林资源被大量砍伐，全球变暖及沙漠化已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（为树木的三到四倍），极强的二氧化碳吸收能力，及品质可与木材相媲美等优点，倍受关注。它被看作是一种极具潜力的木材纤维的替代作物。其多用途利用作为保护森林资源，防止全球变暖的对策之一，更加引起重视。尤其在日本、美国等发达国家，红麻被看作是未来派作物，并开始在其多用途开发利用方面进行研究，涉及到其用于造纸、无纺布、吸油材料、板材、动物饲料、污水净化、土壤改良剂、塑料填充料、动物垫床、食用等许多领域（表 3-1）(AKS, 2000; Sellers et al., 1999; JKA, 2000)。此外，日、美等国还把红麻作为环保教材加以宣传引导。在日本，通过包括 NHK 等官方电视台在内的各种媒体的宣传报道，和以红麻为题材的电视连续剧的播放，以及普及于全国各地的大小红麻组织的活动，红麻已是家喻户晓。并引起了联合国的重视。2000 年 4 月 22 日在美国纽约，由联合国秘书长夫人 Nane Annan 出席的配合 5 月 2 日世界环境日（2000 年的主题是全球变暖）而举办的世界儿童植树活动中，红麻种子被作为爱惜资源、保护环境的教材提供给了会场的中小学生们。

美国对红麻的栽培、品种选育、收获、原料运输等方面研究比较深入。Graham 等（2000）分析了红麻的种植密度和行距对生物产量和麻皮产量的影响，结果表明在同样的密度条件下，窄的行距可增加产量。Scott Jr.等（2000）进行了红麻和太阳麻（Sunn hemp）的收获期试验，认为在得克萨斯的 Monte Alto 地区红麻收获期适宜在 11 月上旬之前。1994 年以来选育出了‘SF459’、‘Gregg’和‘Dowling’等新品种（Bitzer et al., 2000）。在密西西比（Baldwin, 2000）、得

克萨斯（Sij et al., 2000）、科罗拉多（Pearson, 2000）和乔治亚（Kaldor & Kissel, 2000）等州开展了较大规模的红麻商业化种植，从栽培技术、收获运输和经济效益等方面进行了红麻产业化的探讨。同时也开展了红麻用于造纸、动物垫床等的研究和产品开发生产。

表 3-1 红麻各种部位的用途一览表

Table 3-1 List of the utilizations of each part of kenaf

茎			根	叶	花	种子
麻皮（韧皮纤维）	杆芯（木质纤维）	全杆				
1.纺织：绳、网、袋、帽子、服装等； 2.无纺布：厚薄地膜、吸油剂、医用等； 3.制浆造纸：高级印刷用纸、墙纸、办公用纸、纸杯食品容器、音响纸、电解绝缘纸等。	1.片或粉末：塑料填充剂、吸油剂、土壤改良剂、泥土吸收剂、食用菌培基等； 2.压榨成型：板材、建材、家具、动物垫床等； 3.炭化：活性炭、吸油剂、水净化剂、脱臭脱色剂； 4.制浆造纸：增加纸的平滑、透明、耐油性。	1.作为比重轻的材料利用； 2.制浆造纸：普通纸、墙纸、办公用纸包装用纸、信封明信片、纸杯食品容器、卫生用纸、音响纸、模板纸等。	1.放置于田中改良土壤等； 2.炭化：活性炭、脱臭脱色剂等。	1.家畜饲料； 2.食品添加剂等。	1.观赏； 2.染色等。	1.食用； 2.榨油； 3.医用； 4.肥皂原料等。

而日本对红麻的研究主要着重于红麻原料的利用和产品开发，目前开展的研究开发有以下几个方面：

3.1 制浆造纸

红麻的韧皮纤维和木质纤维在形态特性上完全不同，它们的纤维长度分别与针叶木和阔叶木相当（表 3-2）。同时，红麻麻皮和杆芯在化学组成和结构上也存在明显差异（表 3-3, 3-4, 3-5）。例如，红麻麻皮不仅其木素含量大大低于杆芯，而且其木素的化学结构也明显不同于杆芯（表 3-5）。日本高知大学对造纸用全杆红麻的栽培管理指标进行了研究，明确了品种、收获时期、种植密度对红麻全杆硫酸盐浆的得率和强度等的影响，并在日本丘陵地区进行了实证试验（Cheng et al., 1997, 1998, 2000; Mazumder et al., 2000a）。

表 3-2 红麻及其他原料的纤维形态

Table 3-2 Finer dimensional characteristics of kenaf and other raw materials

纤维形态	红麻韧皮部	红麻木质部	红麻全杆	松树	杨树	云杉
长度 (mm)	2.50	0.68	1.28	2.27	0.78	3.16
宽度 (μ)	23.3	39.4	33.5	41.1	21.32	43.8
壁厚 (μ)	3.9	5.5	------	3.2	3.1	---
胞间宽 (μ)	8.1	19.6	------	31.7	14.3	---

同时，日本对红麻麻皮的制浆方法进行了较多的研究。日本高知大学用苏打法蒸煮麻皮，在液比 5：1 和 15%有效碱的条件下，麻皮浆的得率为 51%，并探讨了蒽醌添加量对麻皮碱法制浆的影响（Ohtani et al., 1996）。其次，他们开发出在常压下通过醋酸铵预处理和碱性过氧化氢处理的方法制造麻皮浆，所获浆的强度特性除耐折度以外均高于商业针叶木浆（Bibhuti et al., 1998）。此外，他们调查了制浆方法与麻皮浆粘度之间的关系，筛选出一种高粘度麻皮浆制造

表 3-3 红麻、红松和白桦的化学组成

Table 3-3 Chemical compositions of kenaf, Japanese red pine, and birch

化学成分 (%，绝干重量)	红麻韧皮部	红麻木质部	红松	白桦
全纤维素	79.6	77.6	65.8	76.8
α一纤维素	69.8	45.3	43.6	56.4
木素	9.2	19.0	26.1	17.6
灰分	1.1	1.4	0.2	0.2
乙醇一苯抽出物	3.4	3.0	4.1	2.0
热水抽出物	15.9	7.5	2.6	5.3

表 3-4 红麻韧皮部和木质部全纤维素的单糖组成

Table 3-4 Monosaccharide component of holocellulose of kenaf bast and core

单糖	韧皮部 （占全糖%）	木质部（占全糖%）
阿戊糖	3.2	4.8
木糖	18.1	29.8
甘露糖	1.5	1.3
半乳	1.7	1.5
葡萄糖	75.5	62.6

表 3-5　红麻韧皮部和木质部木素得率和氧化硝酸苯的芳香族化合物摩尔比

Table 3-5　Yields and molar ratio of armatic composition of nitrobenzene oxidation of bark and core kenaf lignins

	G (%, KL)	S (%, KL)	H (%, KL)	S/G (molar ratio)
Bark	5.6	31.0	0.4	4.3
Core	14.1	26.6	1.1	1.5

G: guaiacyl unit, S:syringyl unit, H: p-hydroxy phenyl unit, KL: Klason lignin

方法，即通过醋酸铵预处理、常温氢氧化钠蒸煮和酸性亚氯酸盐脱木素处理可获得粘度达 162 centipoise 的红麻麻皮浆，远远高于用其他方法制成的麻皮浆（10.8-52.8 centipoise）和商业漂白硫酸盐针叶木浆(35.0 centipoise)，并在进一步完善该方法（Mazumder et al., 2000b）。北海道大学对麻皮（成色分绿色和褐色两种）用碱性氧气蒸煮并进行漂白，发现这种方法对绿色麻皮（新麻皮）尤其适合，粗浆得率最高可达 78.3%，未漂白度为 40%。用此法处理的两种麻皮不论漂前漂后，均可与硫酸盐针叶木浆相媲美（敖日格勒和佐野, 2000）。日本神奈川大学进行了红麻的无药品制浆和漂白的研究开发，并已获得专利（釜野, 2000）。有些研究属企业秘密、但从已开发出的纸产品的品种和数量来看，在红麻的制浆造纸研究上已相当深入。由于硫酸盐制浆法的废水处理不易，日本对红麻全杆倾向于用苏打法、苏打+蒽醌法制浆，或制成机械浆。

日本主要是利用红麻原料的特点开发音响纸、电解绝缘纸等有高附加值的特种纸。同时也开发出一些用量较大的大众化纸产品，如印刷用纸、墙纸、办公用纸、包装用纸、信封明信片、纸杯食品容器、卫生用纸等。其中一半以上的红麻全杆浆是用于生产各种各样印刷用纸。日本自 1992 年起从泰国进口红麻全杆浆，进口量逐年增加，价格也居高不下。日本现在使用红麻浆造纸的大造纸公司有：王子制纸、日本制纸、大王制纸、北越制纸、中越制纸、东海浆、日本造纸等。日本目前的红麻全杆浆年消费量近万吨，价格高出针叶木浆几成，如果红麻全杆浆供应渠道稳定、价格合理的话，预计年需求量可超过 8 万吨（海外产业植树中心, 1999）。

日本对红麻浆的潜在需求很大，为了降低浆价和开拓进口红麻浆的渠道，同时从保护森林资源和改善地球环境的角度出发，日本红麻协议会和非木材纸普及协会等多方一直努力寻求在海外建立一座具有模范效应的红麻浆厂。根据多年的调查研究和实际操作以及现阶段日本国内的政策等，对红麻用于制浆造纸的可行性作出如下分析：

1）红麻是非木材造纸原料中的首选。理由：容易种植、产量高、利用方便、价格上有竞争力、有环境生态效应、具有类似木浆的特性。

2）红麻全杆浆优于针叶木浆的特性：不透明度高、手感柔软厚实、密度低、平滑、印刷性好。欠缺点：浆价高、强度低于针叶木浆、不容易入手。

3）在日本种植红麻没有经济效益，因此不可能在日本大规模种植。又由于红麻比重轻体积大的特点，必须在海外制成浆进口。

4）从环境保护等角度获得日本政府贷款的可能性较大。最近日本政府出台今后对中国的 ODA 政府开发援助项目的援助定位于：（1）保护环境（治沙、治酸雨等），都是目前已在中国展开的项目；（2）传染病防治；（3）减少贫困。红麻制浆造纸可占两项。仅就红麻开发项目，美国、马来西亚、印度尼西亚等国都希望日本政府援助。日本国际协力机构（JICA）已开始对马来西亚利用红麻生产饲料的可行性进行调查。

如果我国能从改善环境，治沙绿化，多吸收二氧化碳，并增加当地农民收入等社会、环境效益的角度出发，在种植红麻进行制浆造纸等开发的同时，营造多用途森林——用于防沙、绿化、造纸和薪炭等，建立一个可持续发展的农林生产利用模式，获日本政府援助的可能性就更大了。

3.2 饲料

日本三木特种纸公司等分析比较了红麻叶和菠菜的营养成分，结果除了维生素 C 和含铁量以外，红麻叶的蛋白质、钙、维生素 B1、维生素 E、多酚类等含量均明显高于菠菜。可用于食用或家畜饲料（三木, 1999）。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进行了研究和探讨（熊井, 1999）。结果表明红麻叶粗纤维含量低，粗蛋白等营养成分含量高，给家畜喂用后，消化率较高，宜作为奶牛、羊等家畜的粗饲料（表 3-6）。加上红麻叶的 pH 值在 3.1-3.3 之间，为强酸性，不经乳酸发酵也能作为青贮饲料。高知大学则进

表 3-6 红麻叶的 pH 值和化学组成

Table 3-6 pH and chemical composition of kenaf leaf

取样日	pH	一般成分（绝干重量，%）					可溶性碳水化合物(%)
		粗蛋白质	粗脂肪	粗纤维	天然纤维	粗灰分	
8 月 2 日	3.1	17.6	4.9	10.4	58.6	8.5	9.8
9 月 7 日	3.1	14.7	4.7	12.5	60.3	7.8	6.9
10 月 13 日	3.3	14.7	4.1	12.8	60.0	8.4	7.7

一步探讨了红麻叶呈强酸性的原因，对麻叶中存在的该有机酸物质进行分析、提纯和鉴定（宫南, 1999）。并期待进一步探讨该物质在药用等方面的功效。

3.3 纺织

日本 Flex Japan 公司和东洋纺织公司最近联合开发出一种红麻混纺衬衫，由 10%红麻纤维、55%塑料瓶再生聚脂纤维和 35%棉花纺织而成，其红麻纤维的使用比例已由试生产时的 5%提高了一倍。他们通过测定手感、穿着舒适性、运动前后的心电图、人体皮肤温度变化、衬衫内部及表面温度变化等指标，表明这种衬衫与由 55%棉花和 45%聚脂纤维织成的衬衫相比，具有穿着挺刮不易皱，散热效果好，高温下不易出汗，有凉快感，可减少因高温引起的不快感。是高温多湿季节理想的服装材料。市场零售价每件 3900 日圆，作为春夏用装预计年销售量可达 10 万件。同时准备着手开发秋冬用红麻服装（北沢, 2001）。

3.4 食用

日本神户女子短期大学对红麻干叶粉末作为食品添加剂进行了探讨，在 9 种食品中添加，分析了理化指标和食感。例如添加了 5%红麻叶粉末的面条在色、香、味、硬度等方面合格，并且能提高食品的钙和纤维含量。还提出了把新鲜麻叶蒸 10 分钟后，在 60℃的微波下干燥 150 秒的方法，可使红麻叶获得最佳的食味（Hosomi et al., 2000）。日本已有不少地方在销售红麻叶添加食品如面包、饼干、馒头等。此外，通过特殊技术开发出以红麻叶为原料的茶叶。

3.5 板材和汽车内装复合材料

由于红麻原料比重轻，容易加工等特点，日本对用红麻生产板材的研究也相当多。已开发出中间是麻杆芯表面是韧皮纤维的复合纤维板（张敏, 2001; Kawai et al., 2000）、不用任何粘胶剂的红麻杆芯板（Kano, 1997）、 与树脂混合的合成板、密度为 0.15－0.40g/cm^3 的低密度板等（Kashida, 1997, 1998）。即使是用常规的木材合成板生产方法加工红麻板材，所获得的红麻板材也因与木材合成板具有不同的特性而可占市场一席之地。但是要完全达到产业化的目标还需要改善红麻板材的耐水、耐久性以及确保红麻原料的供应。

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替代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，废弃后不会对环境造成负荷。目前该公司已在其印度尼西亚分公司批量生产，用于高档丰田车的内装（Hirata, 2000）。

3.6 药用

日本琉球大学从红麻种子中抽提水溶性多糖，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（玉城等, 2001）。

3.7 环境净化

江河湖泊池塘等水体因水中氮磷含量的增加产生富营养化，引起藻类大量繁殖，造成水体恶臭、水质下降，影响正常的工农业生产和人民生活。氮磷等营养物质的除去如用化学方法成本昂贵，而利用植物资源除去不仅成本低，而且获得的生产物又可作为工业原料，一举两得。

日本农林水产省农业研究中心从 1999 年开始进行为期 3 年的『水田替换作物红麻的栽培、收获、调制技术等的确立』的研究，包括红麻栽培技术的确立、红麻机械收获调制技术的确立、红麻环境净化机能的解明。其中最后一项是评价红麻对各种环境（水、土壤、空气）的净化机能（山本, 2000）。该中心的水质保护研究室利用红麻的养分吸收能力、天然矿物过虑材料的吸附过虑能力和微生物的净化能力组成生物矿物过虑器（Biogeofilter），对生活污水进行处理，红麻的平均氮和磷除去率分别为 0.73g/m^2/d 和 0.11g/m^2/d（Abe & Ozaki, 2000; 阿部和尾崎, 2001）。日本高知大学同样用包含有红麻的生物矿物过虑器对农村人口密集地区的生活污水进行高度处理（Yimarattanabovorn et al., 2000）；日本群马工业高专调查了种植红麻对利根川流域的水质净化及环境改善的影响（Aoi, 2000）。研究结果表明与其他植物相比，红麻具有特强的氮磷钾等吸收能力，适宜于各种水体的富营养化治理和生活污水的高度处理。此外，种植红麻可清除土壤中多余的养分，改良土壤。

日本东京大学等经分析测定得出红麻具有极强的 CO_2 吸收能力，其 CO_2 的固定量可为热带雨林的 3-4 倍以上（Lam et al., 2000）。据日本神奈川新闻记事报道，日本横滨市在 2000 年度进行的利用红麻削减 CO_2、NO_2 的实验获得成功的基础上，今年拨款 3000 万日圆的大气净化研究事业费开展利用红麻削减废气的公益事业。在市中心 3 个主要道路的中央隔离带种植红麻 800 到 2400 株（http://www.ne.jp, 2001）。

3.8 作为建设废弃泥土中性固化剂

建设废弃泥土通常是用石灰类或水泥类等物质进行固化处理，因所获得的处理土为碱性，无法作为农田用土等进行再利用。日本前田建设工业公司等用红麻微粉末作为固化剂对各种建设淤泥进行固化处理，未加入任何化学药剂和

有害物质，均能获得中性的固化土。可以归还农田改善土壤松软度，也可以用于覆土、添埋等。有利建设废弃泥土的再利用（Katsumata, 2000）。

3.9 自然降解无纺布及土工布

日本高知大学用苏打、柔软剂等处理红麻麻皮，可获得质量较好的可自然降解无纺布（Yang, 1999）。日本电发环境绿化中心等将红麻土工布(Geo－Textile)用于山坡斜面等处的植树绿化，对防止水土流失效果明显，又因该材料可自然降解对环境无任何不良影响（Maeda, 2000）。

3.10 红麻杆芯香菇菌床

日本高知县利用红麻杆芯生产香菇菌床获得成功并已批量生产。他们发现用 30%红麻杆芯配合 70%木粉做成的菌床所产香菇的质量产量在所有处理中为最好，产量是 100%木粉菌床的 2 倍。这与红麻杆芯较好的吸水保水性有直接的关系（Miyaji, 2000）。

3.11 吸油材和杆芯炭

红麻杆芯具有很强的吸油吸水性能。高知大学调查了红麻杆芯炭化前后的吸油吸水性能都明显优于其他原料（Sameshima et al., 2000）（图 1）。这与红麻杆芯密度低有关。群马工业高专用在净化水处理试验中获得的红麻杆芯制成活性炭，并与有代表性的水处理活性炭进行比较。结果红麻杆芯活性炭具有更强力的吸色、吸霉臭等吸附能力（大森等, 1998）。因此红麻杆芯可用作吸油材料、家畜的垫床。

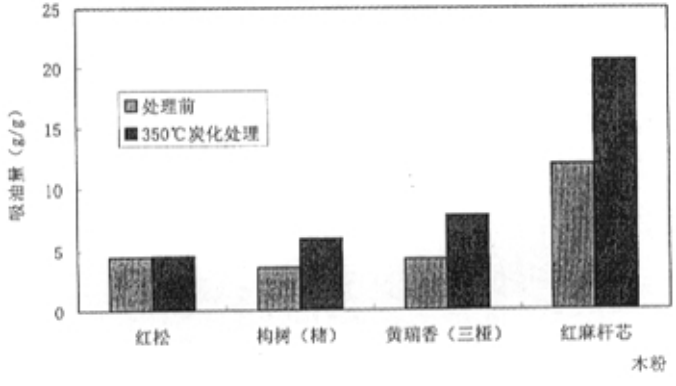


图1 红麻杆芯等木质原料炭化前后的吸油量
Fig.1 Oil absorptivity of kenaf and other raw materials before and after carbonization

其他，如马来西亚也于 2000 年启动为其 5 年的国家红麻开发计划，总投入为 20 亿马元(马来西亚农业部, 2000)。研究内容涉及农业和产业化开发的诸多领域，分 5 个领域 17 个分科：品种和栽培管理（7 分科研究）、採种（2 分科研究）、饲料生产（6 分科研究）、利用（1 分科研究）、其它的用途（1 分科研究）。

我国红麻种植历史悠久，是世界上红麻种植面积最大的国家，年均种植面积 30 万公顷左右，最高年份的 1985 年达 90 万公顷，同时也育成了一大批红麻良种和杂交组合，红麻杂交技术居国际领先水平。但除少量用于造纸等以外，基本上只取麻皮用于传统的麻袋、麻布等包装制品的生产，在红麻的多用途研究开发利用方面明显落后。目前我国正在红麻资源的多用途开发方面加强研究。

第四章　DNA 分子标记在植物种质资源遗传关系的确定和品种鉴定上的应用

4.1　多态性与分子标记

多态性是描述遗传变异大小的一个术语，DNA 多态性则是用于描述 DNA 分子变异大小。分子标记是指能反映遗传变异信息的多态位点，与感兴趣的性状或目的基因连锁的多态位点。能提供分子标记的分子生物学技术称为分子标记技术。

分子标记可分为蛋白质标记和 DNA 分子标记。蛋白质标记技术主要是基于蛋白质多态性的蛋白质电泳及其配套的专一性染色技术，如种子蛋白的肽谱分析和等位酶分析。此外还有蛋白质序列分析。

4.2　DNA 分子标记

DNA 分子标记有 DNA 序列分析、DNA 指纹分析和 DNA 构象分析等。DNA 序列分析是采用某种策略测定核苷酸在基因组 DNA 特定区域的排列顺序。DNA 指纹是描述 DNA 变异反映多态位点的电泳图谱，是重要的分子标记技术。目前已有 RFLP、RAPD、SSR、AFLP 等指纹技术用于各种研究。下面就各种分子标记技术以及在植物种质资源遗传关系的确定和品种鉴定方面的应用作一简述。

4.3　RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）和 PCR-RFLP

限制性片段长度多态性，于 1974 年创立的(Grodzicker，1975)，是利用限制性内切酶对专一位点进行酶切，由于碱基的改变和染色体结构的变化导致生物个体或种群之间限制性酶切片段长短或位点的存失造成的变化，经琼脂糖凝胶电泳分离后，将 DNA 分子从凝胶转移到尼龙或纤维素薄膜上，再用 DNA 分子探针进行 Southern 杂交，放射性自显影后，将其上相对应的片段做电泳分离及进行多态性分析。RFLP 具有共显性，灵敏度较高，可重复性强的特点，但可选择的内切酶实际上有限，而且存在操作时间长，需载体，有放射性等缺点。

而如今得到广泛使用的是 PCR-RFLP 技术，它是对 PCR 扩增的 DNA 片段进行限制性酶切位点分析，即选出有足够变异以进行居群遗传或系统发育的 DNA 片段，根据其两翼序列设计引物进行扩增，再选择合适的限制性内切酶消化 PCR 产物，经电泳分离鉴定多态性。相对于在杂交基础上的 RFLP 而言简便而高效。

Rieseberg 等(1988)用 36 个酶对向日葵属(*Helianthus*)三个近缘种的 cpDNA

和核 rDNA 进行了 RFLP 分析，明确了它们的种间关系及种内居群间的关系。Gebhardt 等（1989）用 RFLP 进行了两倍体和四倍体马铃薯品种鉴定。Isshiki 等（1998）用 rbcL/ORF106 片断的 PCR-RFLP 探讨了茄属（*Solanum*）植物的分类，鉴定了茄子与相关茄属种的种间关系。Rajapakse 等（1992）用 RFLP 鉴定了玫瑰品种。Mahbubur 等(1997)用 cpDNA 中 rbcL/ORF106 片断的 PCR-RFLP 揭示了蕃荔枝属（*Annona*）6 个种的种间关系，区分了野生种和栽培种。

4.4 RAPD（Random Amplified Polymorphic DNA）

随机扩增多态性 DNA，是由 Williams 等（1990）在 PCR 基础上发展起来的分子标记。其基本原理是以一个 10 碱基的任意序列的寡核苷酸片段为引物对未知序列的基因组 DNA 通过 PCR 进行随机扩增，经电泳分离染色后分析多态性。一次 RAPD 反应过程是一个单引物与基因组 DNA 混合，在耐热 DNA 聚合酶和合适的缓冲系统存在下进行经典的 PCR 反应（高温变性、低温退火、适温延伸）。DNA 模板在 92-94℃变性解链后，在足够低的温度（33-37℃）下根据碱基互补原则，单个引物退火到基因组 DNA 模板两条反向链的不同位置上，在 DNA 聚合酶的作用下，dNTP 从引物的 3'端掺入，接上与模板 DNA 互补的各种单核苷酸，延伸到一定长度得到一段新的互补 DNA 链。在基因组上，某一引物可能会与单链 DNA 的多个位点互补结合，但只有这些在彼此可扩增距离内（间距为 200-2000bp）的结合位点可通过 PCR 反应产生一组不连续的分子量不等的 DNA 片段。

通过 RAPD 技术检测出的多态性在理论上来自于几种行为（Williams et al。1993）：

1） 在两个退火位点之间插入了一个大片段致使原来的片段太长而不能扩增，因此失去这个位点。
2） 引物的两个退火位点之一缺失一个 DNA 片段也导致一个位点的丢失。
3） 因为同源性变化而引起的一个核苷酸替换也影响在所给位点上引物的退火而导致多态性片段的得失或改变片段的大小。
4） 小片段 DNA 的插入或缺失会改变扩增片段的大小，但实际上片段大小的改变很少见到。

RAPD 技术操作简单容易掌握，成本较低，而且是用单个任意序列的引物扫描全基因组，不需要预先知道基因组的序列信息，能快速高效地检测遗传变异。RAPD 引物较短，在较低的退火温度下引物与模板之间互补结合不很稳定，且易造成错配，因此这种随机扩增容易受到诸多因素的影响：如模板浓度与纯度、引物与 dNTP 用量、Mg^{2+}的浓度、聚合酶的种类与用量、扩增程序与循环周期等。但一般采用相同的流程，在条件控制得当的情况下，RAPD 重复性能

得到保证。

除了 RAPD 标记以外，任意引物的随机扩增根据所用引物的长短不同，还有 AP-PCR（arbitrary primer PCR，任意引物 PCR）（Welsh & McClelland, 1990）和 DAF（DNA amplification fingerprinting，DNA 扩增指纹）（Caetano-Anolles 1991）两种方法。前者所用引物较长，20-30 个碱基，扩增片段少，特异性强；后者所用引物短，5-8 个碱基，扩增产物多。RAPD 标记自 20 世纪 90 年代以来已广泛用于动植物遗传育种、基因诊断、种群遗传学、生物系统学与进化研究。RAPD 标记能及其灵敏地揭示两个亲缘关系十分相似的个体之间的遗传变异，因此适合于检测种下的多样性，如野生植物天然居群的遗传结构分析、种质资源的评估、栽培植物品种的鉴定等。

Buso 等（1998）用等位酶和 RAPD 标记分析了南美野生稻居群（*Oryza glumaepatula*）的遗传变异。Ge 等（1999）对中国和巴西的野生稻（*Oryza rufipogon*）居群内和居群间的遗传变异进行了 RAPD 分析。Yang（1993）用 RAPD 标记成功地对芹菜（*Apium graveolen*）品种进行了鉴定和分类。Torres（1993）用 8 个随机引物区分了 5 个玫瑰（*Rose. spp.*）品种，为品种鉴定和专利保护建立了 RAPD 指纹技术。惠东威等（1994）探讨了大豆属 13 个种的种间关系。邹喻苹等（1999）通过对芍药属牡丹组 7 个种 13 个居群 67 个样品的 RAPD 分析构建了种下与种间关系的系统树状图。揭雨成等（1999）对苎麻栽培种 6 个抗旱性较强的基因型及 6 个抗旱性较弱的基因型，选用 12 个随机引物，对总 DNA 共扩增出 90 个条带，将 12 个基因型聚成两类三组，直观地揭示了苎麻基因型间亲缘关系。姜玉新等（1998）对北京和吉林左家特区的栽培人参和西洋参四大居群各 10 个样本进行了 RAPD 分析，各居群中均有丰富的多样性存在，西洋参的遗传多态性明显高于人参。马小军等（1998）RAPD 标记技术对来源不同的山参和园参进行了遗传多样性检测和遗传分析。结果发现山参的遗传变异较大，但山参之间及其与园参之间的遗传变异，没有超出与近缘种西洋参之间的遗传差异。

4.5 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

扩增性酶切片段长度多态性，是 Zabeau 和 Vos 等人发明的一种结合 RELP 和 PCR 技术优点的基因组 DNA 指纹技术(Vos et al., 1995)。其基本原理是：基因组 DNA 经两种限制性内切酶酶切，酶切片断的末端和特定的人工接头相连接，然后用与接头和位点相匹配的引物进行预扩增，预扩增产物再选用特异引物进行选择性扩增，扩增后的产物用变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离和检测。AFLP 分析包括三个步骤：基因组 DNA 的限制性内切酶消化和接头的连接，限制性片段的扩增、扩增产物的分离与检测。

具体为：1）酶切：采用 2 个限制性内切酶，一种是多切点酶，酶切位点较少（识别位点为 4 碱基，如 *Mse*I），产生 DNA 小片段；另一种是少切点酶，酶切位点较多（识别位点为 6～8 碱基，如 *Eco*RI 识别 6 个），产生 DNA 大片段。这样便形成分子量大小不等的限制性酶切片段。扩增的片段是 2 种酶组合产生的的片段即 *Eco*RI-*Mse*I。这样可以灵活有效地控制扩增片段的大小和数目这一步要求酶切彻底，产生符合连接要求的底物。2）接头连接：用于连接的 AFLP 接头是双链寡核苷酸，包括 1 个核心序列和 1 个内切酶专一序列。用 T4 连接酶把两种接头跟限制性片段相连接，而接头的特定序列将作为下一步 PCR 扩增的引物的结合位点。3）预扩增:将连接好的限制性片段，用一对各带有 1 个（或 0 个）选择性碱基的引物进行扩增。4）选择性扩增:然后用各带 2 个或 3 个选择性碱基的引物对预扩增产物进行 PCR 扩增。扩增产物一般在数百 bp，用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。

所有 AFLP 引物和接头都包含有 1 个核心序列和 1 个内切酶专一序列（酶切位点）。而 AFLP 引物还包含数个选择性碱基，选择性碱基较少时能提高引物的特异性，一般不超过 3 个，而当选择性碱基超过 4 个时错配率增加。根据生物基因组的大小调整选择性碱基的数目，目的是控制扩增片段的数目和大小。理论上，AFLP 能产生的标记数目是无限的。一般对应生物基因组的大小，通过调节引物选择性碱基的数目，将 AFLP 的扩增条带控制在 50-100 条。针对生物基因组大小的不同，Gibco（Life Science）出售的 AFLP 试剂盒有 3 种。他们主要的差别在于预扩增引物和选择性扩增引物所带的选择性碱基数目有差异。

AFLP 扩增产物的检测方式有放射性同位素检测、荧光检测和银染检测 3 种。前 2 种方法，用同位素 γ -32P 和 γ -33P 或荧光染料对其中的一个引物进行标记，而银染检测则不需要。放射性同位素检测方法比较成熟，但有放射性污染的可能，需必要的防护设施。还有同位素曝光一般要几天的时间，实验周期较长。荧光检测需要自动测序仪（如 ABI377，373）进行电泳分离及分析软件进行结果分析。分析软件（PE Applied Biosystems， Perkin Elmer GeneScan Collection， GeneScan Analysis， Genotyper）。整个操作全部自动化，高效，灵敏和精确，一次性投资较大。银染检测操作安全、快速、成本低，不需要特殊的实验设备和防护设施，可在一般的实验室中进行(Chalhoub et al., 1997; Briard et al., 2000)。从电泳到银染仅需半天，实验周期短。还有无论用同位素还是用荧光，胶板都不可长期保存，而银染后的胶板经干燥后可长期保存，有利于研究和分析。而且对于特异性的条带可直接从胶上准确地切出，然后进一步扩增和克隆，从而获得特异性的 DNA 分子标记。

操作 AFLP 有一定难度。AFLP 实验步骤多，流程长，需要优化每一步的条件。如模板 DNA 的纯化，内切酶的选择和完全消化，接头的有效连接，扩增条

件，扩增产物的稀释，选择性扩增时引物组合的筛选都需要摸索。还有，AFLP不是万用表，也存在一些缺陷，如对模板反应迟钝，谱带可能发生错配与缺失，成本较高，对技术要求苛刻等。

AFLP 是对限制性酶切片段进行分析，稳定可靠，同时利用 PCR 有选择地扩增 DNA 片段，兼顾了 PCR 的高效性和 RFLP 的准确性。该技术由于重复性好、检测的多态性高、无需预先知道被分析基因组 DNA 序列信息等优点，在农作物种质资源的品种鉴定、遗传多样性检测和亲缘关系确定等研究领域有广阔的应用前景(Degani et al., 2001; Goulao et al., 2001; Incirli & Akkaya, 2001; Tomkins et al., 2001)。

Huylenbroeck 等（2000）用 AFLP 标记分析了木槿属的 *Hibiscus syriacus*、*Hibiscus sinosyriacus* 和 *Hibiscus paramutabilis* 的种间以及种内关系。Incirli & Akkaya（2001）用 AFLP 标记鉴定了 15 个土耳其硬质小麦品种，明确了它们的遗传关系。因为土耳其硬质小麦品种间的遗传差异不明显，AFLP 标记非常适宜于它们的鉴定和遗传关系分析。Goulao 等（2001）对 41 个苹果品种进行了 RAPD 和 AFLP 分析，鉴定和评价了苹果种质。Tomkins 等（2001）用 AFLP 标记评价了自 1940 年以来选育出的萱草属（*Hemerocallis*）种质资源的遗传变异，结果表明因为选育种的不断加强以及四倍体种质资源库的有限性，导致它们的遗传相似性不断增加。现代（1991-1998 年）的萱草品种之间的遗传相似性比最初的萱草种质资源增加了 10%。

由于大多数 AFLP 扩增片段与基因组的单一位置相对应。通过 AFLP 多态性检测，寻找到优良品系或抗逆品系的特定标记，建立标记与目的基因之间的连锁关系，然后通过克隆分离鉴定该目的基因。

4.6 SSR（Simple Sequence Repeat）

简单序列重复或叫微卫星（microsatellite）是真核细胞基因组中普遍存在的排列为 1～6 个核苷酸的短串联重复单位，由于串联重复的数目是可变的而呈现高度的多态性，在单个微卫星位点上可进行共显性的等位基因分析。在真核基因组中微卫星很丰富，统计分析测出人类微卫星的平均突变率是 0.1%。不同物种的微卫星在突变率上有同样的稳定性 SSR 指纹的式样及多态性水平取决于物种的遗传背景、寡核苷酸探针的序列和限制性内切酶的种类。

经典的 SSR 指纹分析是在杂交的基础上进行的，其实验流程包括：基因组 DNA 的限制性酶切消化，限制性片段的电泳分离，分离的 DNA 片段在滤膜（或在干胶）上变性与印迹，膜或干胶与（非）放射性标记的多态点探针杂交，杂交片段通过放射性自显影或非放射性途径检测等步骤。

如今基于 PCR 的 SSR 指纹检测发展很快。一旦得知微卫星 DNA 两翼区域

的序列，就可以根据这个信息来设计专业的引物，在 PCR 上扩增出单个微卫星位点，进行 SSLP（simple sequence length polymorphism，简单序列长度多态性）分析，以及在此基础上分析微卫星位点的序列。SSR 的 PCR 引物设计为对一个高变重复位点是专一的，用引物扩增相应的这段微卫星后，再通过高浓度的琼脂糖胶或聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，变化可经溴化乙锭染色或银染后观察。一个一般种群常可显示数种类型的等位基因。该方法的主要缺点首先是要花时间了解高变区的序列，去设计引物。获得 SSR 引物的途径有三条，一是查询公用 DNA 序列数据库（如 EMBL、GeneBank）或有关文章；二使用近缘种的引物；三是构建所研究植物基因组的文库，筛选 SSR 位点，并根据位点两翼的序列来设计引物。SSR 位点的分离筛选方法涉及 5 个步骤：1）构建小片段基因文库：利用限制性内切酶或超声波将基因组 DNA 切割成小片段，选择其中的 200～500 碱基部分，构建基因文库，以便于其后的 DNA 测序。2）杂交筛选：利用经标记的由数个核心序列构成的寡聚核苷酸作探针在基因文库中筛选相应的 SSR。3）DNA 测序：对呈现阳性的克隆进行 DNA 测序。4）引物设计及位点特异性 PCR 分析：根据包含 SSR 的克隆 DNA 的两翼序列设计引物，两引物的 Tm 值应相近，扩增后的 DNA 片段大小最好在 100～300 碱基之间，以便于分析。5）多态性分析：引物设计完成后，应在相应植物不同基因型上进行扩增以检测该位点是否呈现多态性。

此外，与 SSR 相关的分子标记还有 ISSR 等。ISSR（Inter simple sequence repeat）简单序列重复区间扩增多态性，是由 Zietkiewicz 等(1994)提出的 SSR 新策略。它是利用在基因组中常出现的 SSR 本身设计引物，无需预先克隆和测序，借助 PCR 扩增，获得多态性。用于 ISSR－PCR 扩增的引物通常为 16～18 个碱基序列，由 1～4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成，从而保证了引物与基因组 DNA 中 SSR 的 5’或 3’末端结合，扩增位于反向排列且间隔不太大的重复序列间的 DNA 片段。锚定引物的 ISSR-PCR 可以检测到基因组许多位点的差异。

有时为了增加多态性，常常采用一个 SSR 序列和一个随机引物组成的引物对，这样就又获得了另一种与 SSR 相关的标记(Wang et al., 1998)。这种标记一端可以锚定在 SSR 序列中，另一端则可以通过随机引物来筛选，同一个 SSR 序列引物与不同的随机引物组合，可以获得各种各样的组合，从而得到更多的多态性。

SSR 的特点是其产物经聚丙烯酰胺凝胶分离具有单碱基的高分辨率，遗传信息量大，一个 SSR 座位最多可以检测到 26 个等位基因。SSR 的主要缺点是必须依赖每类 SSR 两端序列测序设计引物。ISSR 通常为显性标记，呈孟德尔式遗传，具有很好的稳定性和多态性(Tsumura et al.,1996; Fang & Roose, 1997)，且

DNA 用量少，技术要求低，成本低廉，且 PCR 扩增时退火温度在 52℃左右，保证了 PCR 扩增的可重复性。

SSR 可用于鉴定品种及杂交种纯度。Akaji 等利用 15 个多态性 SSR 区分 59 个遗传基础极其狭窄的日本粳稻育成品种，而利用其中 5 个，即可区分 53 个品种。Russell 等(1997a,b)在大麦的研究中发现，由 4 个 SSR 组成的 3 个不同组合均可以区分 24 个大麦品种，错误概率仅为千分之一。用 SSR 标记来分辨 66 个优良美国大豆品种,只用 13 个位点就可以做到过去按成熟期、形态等农艺性状对其划分(Song et al., 1999)。

SSR 的遗传共显性特点使其在杂交种纯度鉴定方面极为有用。武耀廷等（2001）筛选出 4 个 SSR 标记,可用于陆地棉杂交种的分子鉴定和种子纯度的检测。

SSR 用于种质资源保存、评价和利用。Christiansen 等（2002）用了 47 个 SSR 引物组合对 20 世纪选育出的 75 个北欧春小麦品种进行了遗传变异的评价，结果表明不同时期的不同选择明显影响着微卫星位点的出现频率，包括有些位点的消失以及有些新位点的出现。

SSR 标记用于亲缘关系分析、系谱和进化关系的探讨。中国农业科学院种质资源研究所用 SSR 方法佐证了山西是我国大豆发源地之一的结论(许占友等, 1999)。Brown-Guedira 等（2000）运用三对引物,结合 RAPD 标记,研究北美大豆 18 个细胞质供体祖先和 87 个引进大豆品种之间的关系,发现有几种引进品种与北美祖先遗传型不同。

4.7 DALP（Direct Amplification of Length Polymorphisms）

直接扩增片段长度多态性，是采用随机引物 PCR（AP-PCR）获取基因组 DNA 指纹多态性，并能够对扩增出的特异性条带进行直接测序。所用引物是在通用引物 M13 为核心序列的基础上任意添加少数碱基而成的，M13 通用引物序列广泛存在于真核、原核细胞基因组中，并有多个位点。DALP 技术和 RAPD 和 AFLP 技术一样无需预先知道被分析基因组 DNA 序列信息。与 RAPD 技术相比，因为其引物较长（17-21 个碱基），加上 PCR 扩增时的退火温度较高（50-55℃），DALP 具有更高的重复性和稳定性。与 AFLP 技术相比，DALP 省去了酶切和连接步骤。同时，由于使用了通用测序引物 M13 为核心序列的双引物扩增，得到的 DNA 条带 5'端和 3'端的序列不一样，但都含有对应的 M13 序列，可用 M13 引物直接测序，省去了繁琐的克隆步骤。

DALP 最早是由 Desmarais 等（1998）提出的，他们采用该方法检测了基因组中微小的插入、缺失、变异和微卫星位点。DALP 适合于检测种群间的遗传变异，同时也非常适用于快速筛选遗传多态性，遗传等位位点的变异和分裂共

显性多态位点（Perrot-minnot, et al.，2000）。DALP 技术可有效鉴定人参和西洋参，Ha 等（2000）获得了一个在所有人参中呈显性而在所有西洋参中呈隐形的等位位点。

4.8 SSCP（Single Strand Conformation Polymorphism）

单链构象多态性，其基本原理是：由于核苷酸序列的变化而引起单链 DNA 折叠等空间构象的变化，从而影响电泳迁移率，产生单链 DNA 构象多态性(Orita et al., 1989; Hayashi, 1991; Fukuoka et al., 1994)。根据不同构象的等长 DNA 单链在聚丙烯酰胺凝胶上的电泳迁移率变化来检测基因变异。目前基于 PCR 技术基础上的 PCR-SSCP 已广泛应用。首先对要设计引物对目的基因进行 PCR 扩增，然后对 PCR 产物进行单链聚丙烯酰胺凝胶电泳，用溴化乙锭或银染或荧光检测 DNA 单链构象多态性。SSCP 的优点在于一旦获得了 DNA 序列，就可以采用相对简单的技术(PCR 及凝胶电泳)分析许多样品，具有快速、简便、灵敏、适于大样本筛选和检测，非常适合于群体遗传学研究。SSCP 可有效检出碱基置换、缺失、插入等基因变异。其缺点是不能确定变异的位置，检测存在假阳性，对于大于 300bp 的 DNA 片段随着长度的增加，检测的灵敏度逐渐降低（Hayashi, 1992）。

SSCP 分析最初用于检测基因的突变，诊断某些遗传病或进行基础研究(Orita et al., 1989)。后来随着植物基因序列的不断积累，PCR-SSCP 开始用于植物的遗传分析(Bodenes et al., 1996)。卢孟柱等（2000）对松树单倍体胚乳、双倍体的针叶材料的 5 个叶绿体基因组和核基因组的 DNA 片段进行了 SSCP 分析，结果表明用 SSCP 分析针叶树种的遗传分析是可行。王翠亭等（2001）利用 PCR—SSCP 结合测序技术检测到小麦耐盐突变体的突变位点。

4.9 分子标记的选择

Weising 等（1995）曾指出，令人满意的分子标记应该符合以下标准: 1）多态性高；2）共显性遗传，能区分二倍体生物的纯合与杂合状态；3）在基因组中频繁出现，甚至贯穿分布于整个基因组；4）选择中性；5）探针或引物容易获得；6）容易操作，自动化程度高；7）重复性好；8）所得数据可在实验室之间交流和比较。迄今为止，还没有任何一种分子标记是十全十美的，在研究中要根据具体的研究对象、目的等选择合适的标记技术。

第五章　红麻种质资源遗传变异和亲缘关系的农艺性状和RAPD分析

如前所述，随着环境保护意识的不断提高，以及全球可持续发展的呼声日益高涨，一年生作物红麻无论是从其作为木材等纤维资源的替代作物，还是其本身所具有的高生物产量、极强的二氧化碳吸收能力和其他环境改善机能考虑，红麻已越来越受到各国的广泛关注，被看作是未来派作物。其用途也已开始从传统的麻纺原料转为多用途开发，涉及到其用于造纸、无纺布、板材、土壤改良剂、塑料填充料等许多领域（Sellers & Reichert, 1999; AKS, 2000; JKA, 2000）。

红麻目前作为重要的经济作物在世界上二十多个国家种植，主要分布在中国、印度、泰国、越南、印度尼西亚等远东和南亚国家。许多红麻品种在这些国家被栽种，同时也作为遗传资源对世界红麻栽培品种的改良起着重要作用。利用这些红麻遗传资源选育出适应世界各地栽培条件的高产抗病的红麻品种（Dempsey, 1975; Bitzer et al.， 2000）。但是，红麻品种的鉴定也没有一个行之有效的方法，同时我们对红麻种质资源的特征特性和遗传关系的了解程度还十分有限，这些都严重制约着红麻的有效开发利用和红麻遗传资源的保护。

到目前为止，精确到某个特定红麻品种的鉴定依然比较复杂。传统的红麻品种鉴定方法都只是基于叶形、茎色、熟期等形态和农艺特征，但是事实上完全依照这些特征来进行品种鉴定有较大难度，尽管红麻原料品质以及纸浆特性随红麻品种的变化差异很大(谭石林等, 1991；李祖士, 1994; Cheng et al., 1997)。市场上存在的以次充好以及在优质原料中混入品质低劣的原料等现象影响红麻产业化的有效开发利用。因此，寻找一种有效的方法来鉴定红麻品种就显得非常重要。对红麻种子提供质量和鉴定的保证也是红麻产业化的潜在需求。

近年来，随着分子生物学的不断发展，分子标记技术已广泛用于基因作图、分子标记辅助育种、构建指纹图谱和资源的遗传多样性和亲缘关系的分析和评价(Rafalski et al., 1996; Vogel et al., 1996)。RAPD（Random Amplified Polymorphic DNA）随机扩增多态性 DNA 技术是鉴定生物遗传变异的有效手段（Welsh & McClelland, 1990; Williams et al.,1990）。RAPD 技术操作简单容易掌握，成本较低，而且是用单个任意序列的引物扫描全基因组，不需要预先知道基因组的序列信息，能快速高效地检测遗传变异。该技术已被用于很多作物的遗传变异的评价和研究，如大豆、水稻、玫瑰、芥菜等(Fujishiro & Sasakuma, 1994; Takeuchi, 1994; Debener et al., 1996; Lin et al., 1996)，但红麻在这方面的研究未见报道。本章的主要目的是 1）探讨利用形态特征、农艺性状和 RAPD 分析鉴定红麻品种；2）在形态农艺性状和分子水平上明瞭收集的红麻种质资源的亲缘关系。

5.1 材料与方法

5.1.1 材料及性状观测

日本普遍使用的从 3 个国家引进的 14 份红麻品种（表 5-1）。有些材料是在不同年份引进的但标有相同品种名称，但有些标有相同品种名称的材料在形态等方面表现明显不同。形态特征和农艺性状调查分析于 1999 年安排在日本高知县南国市种植，随机区组设计，小区面积 $20m^2$，重复三次。所有的品种材料于 4 月 16 日播种，10 月 18 日收获。选择观察和测定了与红麻产量构成和熟期有关的 7 个的数量性状和 2 个质量性状，结果列于表 2。

Table 5-1 Kenaf varieties used in the present study with their code and origin

表 5-1 日本普遍使用的红麻品种的编号和来源

Variety name	Code	Collecting year	Source	Inferential origin
Khon Kaen 60	Khkaen1	1998	Khon Kaen, Thailand	Thailand via India
Indian Selection	Indians2	1998	Mississippi, USA	India
Everglades 41	Evergla3	1998	Mississippi, USA	Florida, USA via Cuba--India
Everglades 71	Evergla4	1998	Mississippi, USA	Florida, USA via Cuba--India
Tainung 2	Tainung5	1998	Mississippi, USA	Taiwan via India
Aokawa 3a	Aokawa6	1998	China	Vietnam
Aokawa 3b	Aokawa7	1997	China	Hunan, China
Maruba 204	Maruba8	1998	China	Hunan, China
Zhehong 8310a	Zhhong9	1996	China	Zhejiang, China
Zhehong 8310b	Zhhong10	1997	China	Zhejiang, China
Zhehong 8310c	Zhhong11	1998	China	Guangdong, China
Sekkou Chuziku	Sekkou12	1997	China	Vietnam
Zhehong 832	Zhhong13	1999	China	Zhejiang, China
Yufeng 1	Yufeng14	1999	China	Guangdong, China

5.1.2 DNA 提取

a) 采用 CTAB 法 (Murray & Thompson, 1980)的改进方法(Hayagawa, 1997)，取 0.2-0.3g 红麻新鲜叶片，在液氮中研成粉末，移至 1.5ml 离心管中。

b) 加入 500μl CTAB 提取缓冲液 [2%CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、100mM Tris-HCl pH8.0、20mM EDTA、1.4M NaCl]，充分混匀，65℃保温 30 分钟。

c) 加等体积的氯仿/异戊醇(24:1)轻轻混匀 5 分钟，12000rpm 离心 15 分钟，取上清至一新 1.5ml 离心管。重复一次。

d) 加入等体积 CTAB 沉淀缓冲液[1%CTAB、50mM Tris-HCl、10mM EDTA]，均匀混合后，室温放置 1 小时，8000rpm 离心 10 分钟收集沉淀。

e) 加入 400μl 1MCsCl，使沉淀完全溶解。加 800μl 100%乙醇，混匀后在-20℃放置 20 分钟以上。12000rpm 离心 5 分钟收集沉淀。

f) 400μl 70%乙醇洗涤沉淀，12000rpm 离心 5 分钟。

g) 晾干沉淀，溶于 50μl TE 缓冲液 [10mM Tris-HCl(pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)]。

h) 加入 2%(v/v) RNase (10mg/ml)，37℃保温 1 小时。

i) 加入 5μl 3M NaAc 和 100μl 100%乙醇，4000rpm 离心沉淀。

j) 400μl 70%乙醇洗涤沉淀，12000rpm 离心 5 分钟。风干沉淀，溶于 50μl TE。

k) 0.7%琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 质量和浓度。与 λ -DNA/Hind III 分子量标准比较，将 DNA 浓度调整至 25ng/μl。

5.1.3 RAPD 分析

采用 Williams 等人的方法 (Williams et al., 1990) 进行 RAPD-PCR 扩增反应。PCR 反应总体积为 25μl，其中含有 10mM Tris-HCl pH8.0，50mM KCl，2mM $MgCl_2$，200μM dNTPs，0.2μM 随机引物，0.5U EX TaqTM 酶(TaKaRa 公司)和约 25ng 的模板 DNA，并用 30μl 石蜡油覆盖。使用 DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer 公司) PCR 仪进行扩增反应。扩增条件: 95℃预热 3 分钟；45 个循环：94℃变性 1 分钟，36℃复性 1 分钟，72℃延伸 2 分钟；最后 72℃延伸 5 分钟。使用美国 Operon 公司 10mer 随机引物 A 试剂盒的 20 个引物。并对上述反应体系进行了不同退火温度(34℃、36℃、40℃、44℃)和模板 DNA 浓度(1、5、10、30、50、100、200ng/μl)的摸索。扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶、1X TAE 缓冲液中电泳，电泳完毕后经 EB 染色，在紫外光下观察结果并拍照 (Sambrook et al., 1989)。

在 Williams 等人 (Williams et al., 1990) 建立的 RAPD-PCR 反应体系的基础上对 4 种退火温度和 7 种模板 DNA（青皮 3 号/98）浓度进行了摸索。结果随着退火温度的提高，扩增出的 DNA 条带减少。不同模板浓度能够扩增出相同的条带，并以 10~50ng/ul 的浓度最佳(数据未列出)。最终选择了退火温度 36℃、模板浓度 25ng/ul 作为本研究红麻种质资源 RAPD 分析的 PCR 反应体系。

Table 5-2 Morph-agronomic characters of kenaf varieties studied for morphological analysis. Means followed by different letters within the same column are statistically different at the 0.01 level of significance based on the Protected Least Significant Difference Test. ([1] Oven dried weight; [2] 1=Palmate, 2=Entire; [3] 1=Green, 2=Green with red spots, 3=Red; [4] M=Mean; [5] ST=Standard deviation)

表 5-2 红麻品种的形态特征和农艺性状

Code	Height (cm)		Middle stem diameter (cm)		Internodal length (cm)		Population density (paints/M^2)		Yield (tons/ha)		Whole stalk weight (g/plant)[1]		Days to 50% flowering		Leaf type[2]	Stem color[3]
	M[4]	ST[5]	M	ST	M	ST	M	ST	M	ST	M	ST	M	ST		
Khkaen1	286.2cd	14.8	1.1bc	0.10	3.7f	0.2	17.3bcd	4.2	8.1bcde	1.7	46.8bc	4.1	185.4ab	2.3	1	3
Indians2	202.0e	20.2	1.0bcd	0.12	2.7g	0.1	14.3bcd	2.1	7.4bcde	3.7	54.8bc	36.8	184.3b	1.6	1	3
Evergla3	283.1d	18.8	0.8d	0.05	4.6cd	0.2	35.3a	13.8	7.6bcde	1.3	22.9c	6.0	191.5a	1.4	2	3
Evergla4	324.1bc	13.4	1.1ab	0.09	4.5cd	0.2	20.3bcd	4.9	9.9b	1.8	50.0bc	14.2	189.7ab	2.1	1	3
Tainung5	304.8bcd	13.1	0.9bcd	0.13	6.4a	0.3	25.0abc	8.7	7.5bcde	1.4	31.7c	7.9	189.2ab	1.8	1	3
Aokawa6	341.8ab	5.9	1.2bc	0.05	4.9bc	0.2	15.3cd	4.5	9.4bc	1.6	63.0abc	8.3	177.8c	1.2	1	1
Aokawa7	317.7bcd	14.7	0.9cd	0.03	4.9bc	0.2	18.0bcd	3.5	6.8cde	1.7	38.0bc	5.2	146.0d	3.0	1	1
Maruba8	307.1bcd	11.5	1.0bc	0.03	4.4de	0.2	18.3bcd	3.1	6.0de	0.9	32.5c	1.1	150.8d	2.2	2	2
Zhhong9	373.3a	17.0	1.3a	0.03	4.8bcd	0.2	9.7d	0.6	9.4bc	1.3	97.7a	17.8	173.6c	1.7	1	1
Zhhong10	340.0ab	10.8	1.1b	0.15	4.9bc	0.1	19.0bcd	2.7	8.4bcd	0.6	45.1bc	9.0	176.7c	1.9	1	1
Zhhong11	304.5bcd	7.4	1.0bcd	0.04	4.0ef	0.2	14.6cd	3.8	5.7e	0.7	39.9bc	6.5	146.5d	3.1	2	2
Sekkou12	363.5a	5.8	1.1b	0.08	5.1b	0.2	12.3d	1.5	6.9cde	1.4	56.2abc	10.6	148.0d	2.9	1	1
Zhhong13	367.8a	17.6	1.3ab	0.09	4.7bcd	0.3	19.0bcd	5.2	13.8a	0.1	76.2ab	18.4	174.2c	2.4	1	1
Yufeng14	295.2cd	27.0	1.0bcd	0.04	5.0bc	0.1	19.0bcd	1.7	6.2de	2.1	32.4c	9.3	145.8d	3.2	1	1

5.1.4 数据分析

农艺性状：对所测不同品种的各性状的平均值用最小显著差数法(LSD 法)比较、评估品种间的差异。对各变量（性状）标准化处理后的数据得出 9 个变量的相关矩阵，利用 Minitab statistical package (Minitab，1994)进行主成分分析（PCA 分析）。

RAPD：根据 RAPD 多态性条带的有无分别用“1”和“0”表示，以 ASCII 文本形式保存。只有在 2 次重复试验中扩增出的条带被用于分析。用 Jaccard 法计算相关系数，并采用 NTSYS-pc Numerical Taxonomy System 分析软件(Rohlf，1998)用 UPGMA 法进行聚类分析，并绘出树状图。

5.2 结果

5.2.1 形态农艺性状分析

14 份红麻品种的 9 个形态农艺性状被用于最小显著差数法分析（表 5-2）。根据标准差的差异表明 7 个数量性状在品种之间的变异程度不同。在有些品种内，株高、收获密度、产量、单株全杆重这几个性状的变异很大，同时和其他性状相比，50%开花的天数的变化明显要小。品种间也显示出不同得叶型和茎色。品种间农艺性状的差异也较大，尤其是株高、节间长和产量。3 个都标为“Zhehong 8310”的品种(Zhhong9, Zhhong10, and Zhhong11)在大部分性状上表现明显不同，而 2 个标为“Aokawa 3” (Aokawa6 and Aokawa7)的品种仅在茎粗和 50%开花天数上有明显差异。

主成分分析表明前 3 个主成分的特征值大于 1，累计方差贡献率为 83.4%（表 5-3）。对第一主成分贡献较大的是茎粗、单株全杆重和株高，贡献率为 43.8%。对第二主成分贡献较大的是 50%开花天数、产量和茎色，贡献率为 22.2%。显而易见，茎粗和 50%开花天数在红麻品种分类中起着非常重要地作用。从根据累计贡献率为 65.7%的第一主成分和第二主成分作成的散布图上可以看出，14 个红麻品种三个组（图 5-1）。Zhhong11、Yufeng14、Aokawa7、Maruba8 和 Sekkou12 构成一个比较紧凑的组。Zhhong10、Aokawa6、Zhhong9 和 Zhhong13 则位于第二个组中。Evergla3、Tainung5、Indians2、Khkaen1and Evergla4 组成了第 3 组。从列于表 5-2 中的各红麻品种 50%开花天数计算出的这 3 个组的 50%开花平均天数分别约为 150 天、175 天和 188 天。这 3 个组可被分别看成是早中熟、中迟熟和迟熟熟型组。值得一提的是，2 个“Aokawa 3”及 3 个“Zhehong 8310”品种没有聚集在一起，同时红麻品种的产地不同对品种分类上起了一定的作用。

5.2.2 RAPD 分析

从 Operon 公司 10mer 随机引物 A 试剂盒中筛选能够扩增出多态性条带的引物。其中 30%即 6 个引物 OPA-3、OPA-7、OPA-11、OPA-12、OPA-16 和 OPA-20

Table 5-3 The eigenvalues of the correlation matrix for nine characters on 14 samples of kenaf. ([1]values in the parentheses correspond to the eigenvalues and proportion of the total variation accounted for by each component)

表 5-3 14 份红麻品种 9 个性状相关矩阵的特征根

Character	Principle components[1]		
	First (3.899; 43.3%)	Second (2.018; 22.4%)	Third (1.588; 17.6%)
Middle stem diameter	0.469	-0.130	-0.389
Whole stalk weight	0.448	-0.171	0.100
Plant height	0.378	0.184	-0.709
Stem color	-0.349	-0.424	-0.491
Population density	-0.333	-0.209	-0.157
Yield	0.326	-0.429	0.217
Leaf type	-0.297	0.189	-0.111
Internodal length	0.085	0.188	-0.004
Days to 50% flowering	-0.046	-0.664	0.101

Table 4 Number of patterns that can be distinguished within the 14 kenaf varieties with different RAPD primers and total number of polymorphic fragments in the data set

表 5-4 14 份红麻品种扩增出的 RAPD 多态性条带数和谱带模式数

Primer	Sequence(5'-3')	Number of patterns	Polymorphic fragments	Total fragments	Polymorphism (%)
OPA-3	AGTCAGCCAC	8	5	5	100
OPA-7	GAAACGGGTG	8	4	6	66.7
OPA-11	CAATCGCCGT	12	7	9	77.8
OPA-12	TCGGCGATAG	7	5	8	62.5
OPA-16	AGCCAGCGAA	6	3	5	60.0
OPA-20	GTTGCGATCC	6	6	6	100
			Total 30	**Total 39**	**Average 76.9**

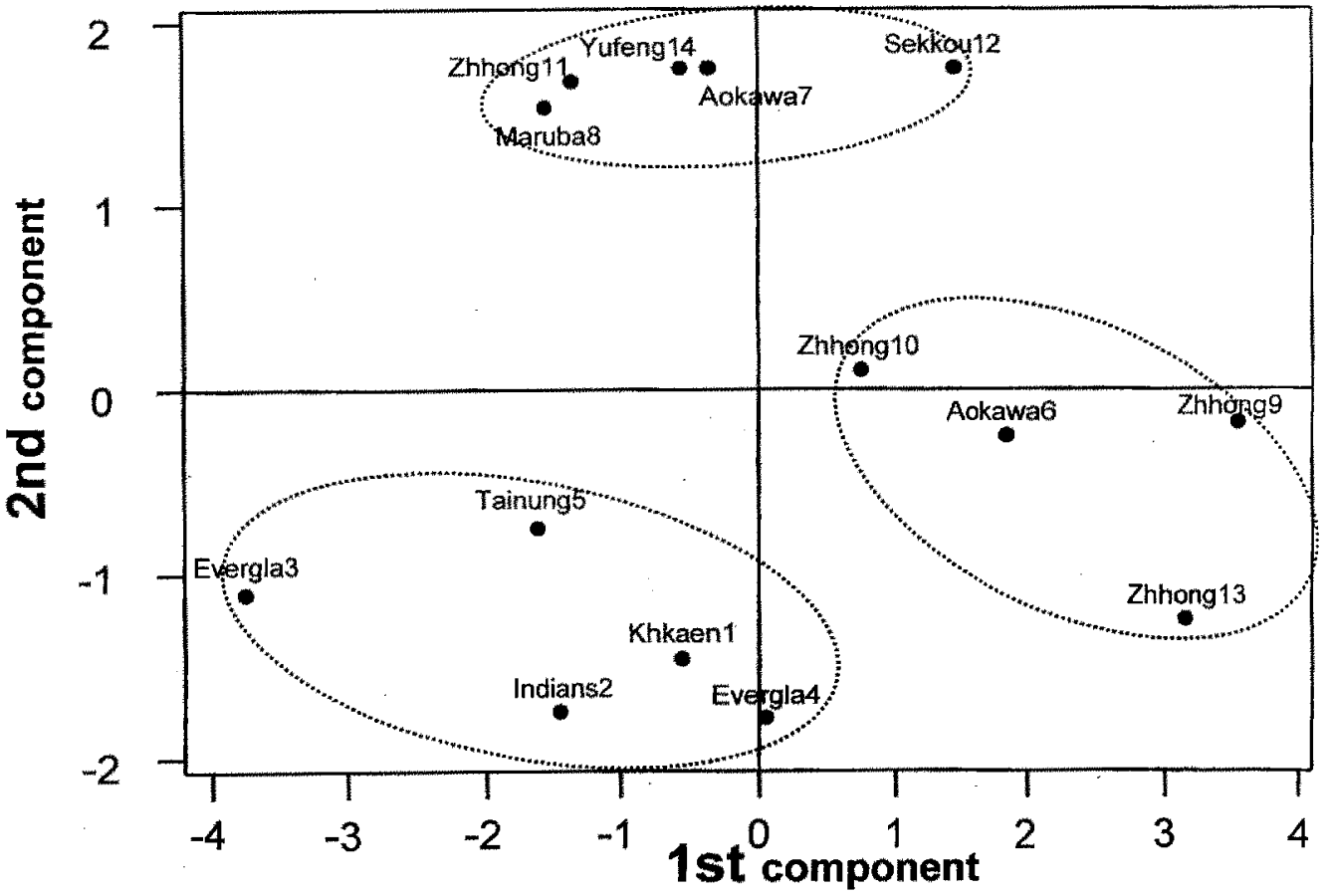


Fig. 5-1 Scatter plot showing agronomic variation in the 14 kenaf varieties obtained from the first two components of principle components analysis. For variety codes refer to Table 5-1.

图5-1 根据第一和第二主成分构建的14份红麻品种农艺性状变异的散布图

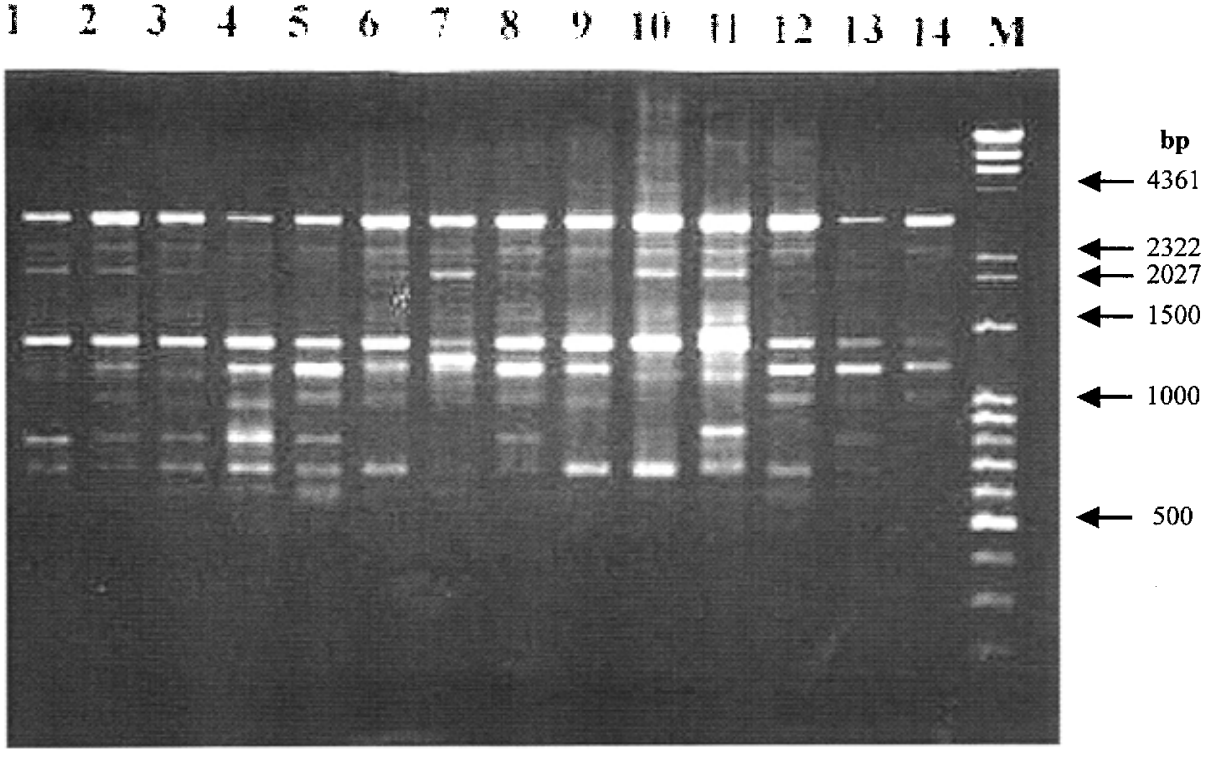


Fig. 5-2 RAPD fragment patterns of 14 kenaf varieties generated by the primer OPA-11.

图5-2 引物OPA-11对14份红麻品种扩增出的RAPD条带图谱

Lane 1: Khkaen1, 2: Indias2, 3: Evergla3, 4: Evergla4, 5: Tainung5, 6: Aokawa6, 7: Aokawa7, 8: Maruba8, 9: Zhhong9, 10: Zhhong10, 11: Zhhong11, 12: Sekkou12, 13: Zhhong13, 14: Yufeng14, M: Size marker (mixture of λ DNA-*Hin*d III Digest and 100 bp DNA Ladder).

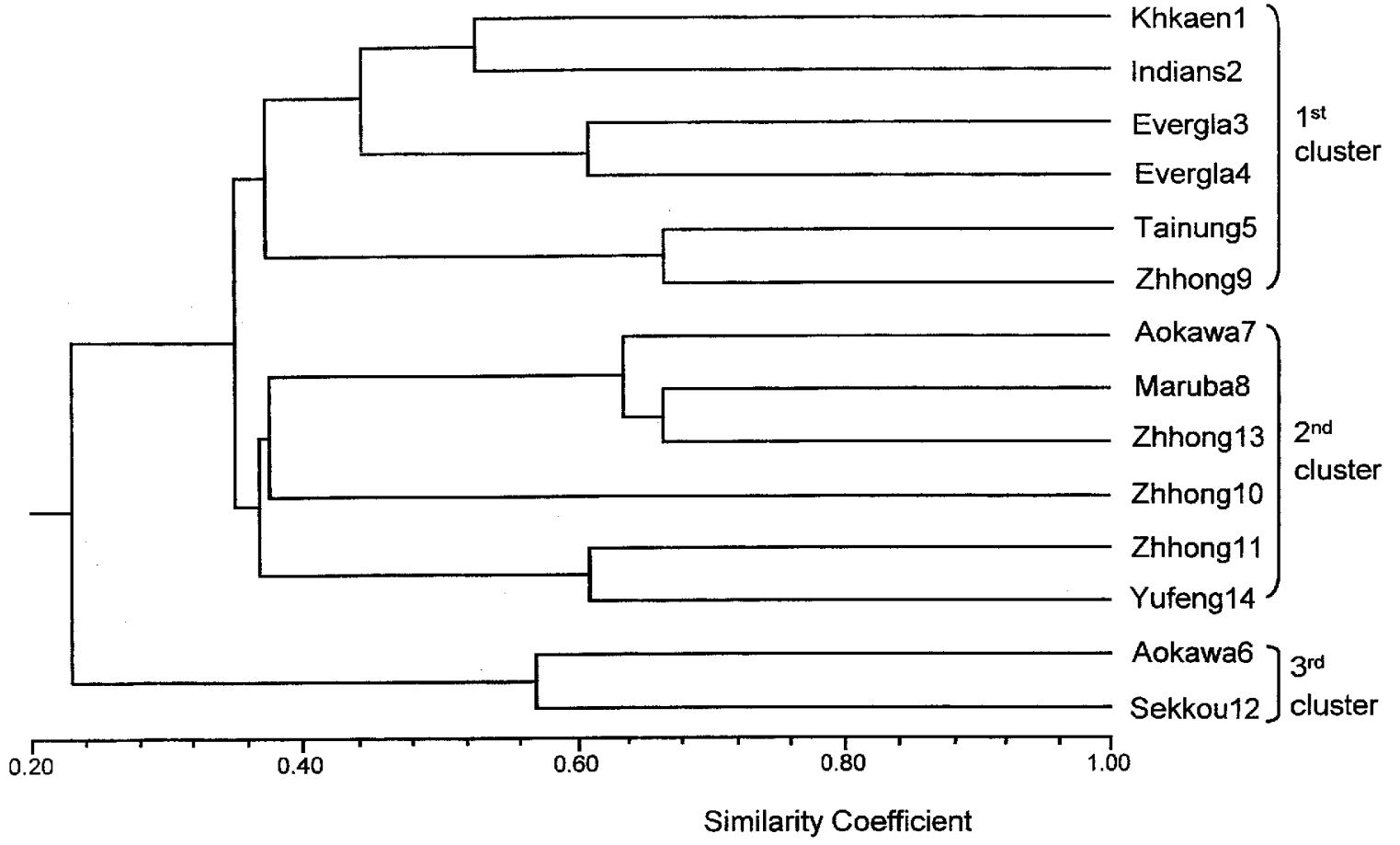


Fig. 5-3 A dendrogram showing genetic relationships of kenaf varieties obtained by the Jaccard index and the UPGMA clustering method.
图5-3 红麻品种的聚类分析树状图

能够获得明显的 DNA 多态性条带。这 6 个引物被进一步用于红麻种质资源的遗传变异等的 RAPD 分析。

14 份红麻品种材料用预选出的 6 个引物进行 PCR 扩增，RAPD 分析表明红麻品种之间遗传差异很大。平均每个品种/引物所获得的多态性条带数为 2.2 条。多态率在 60%到 100%之间（表 5-4）。红麻品种可根据各自的 RAPD 图谱模式很容易被区分开来，获得的 RAPD 图谱模式可分别区分从 6 份（用 OPA-20 引物扩增）到 12 份（用 OPA-11 引物扩增）的品种（图 5-2 和表 4）。像“Aokawa 3”和“Zhehong 8310”不同年份收集但被标有相同名称的品种材料显示出明显不同的 RAPD 图谱模式。总共有 30 条多态性条带可用于鉴定这些红麻品种材料，并被用于分析它们之间的遗传关系。根据这些 RAPD 条带的差异构建了聚类分析系统树状图（图 5-3）。系统树状图中可以看出，14 份红麻品种在相似系数 0.35 水平上分成 3 个主要的分支，其中 2 个分支相距较近而另一个分支则和这 2 个分支的距离较远。

5.3 讨论

如上所述，阻碍红麻种质资源有效利用的主要问题是品种的有效鉴定比较困难。标有相同品种名称的红麻却表现出明显不同的形态农艺性状的现象经常发生。除了在红麻种子生产和销售中的人为因素之外，多数是误定造成的。这种误定导致种子市场上红麻品种的混乱(汤永海，1994)。因此，育种家和研究者们迫切希望建立一个准确鉴定红麻品种的有效方法（谢国炎等，1998）。此外，我们对红麻种质资源的遗传多样性和遗传关系缺乏了解，也是阻碍着红麻资源的有效利用和保存。虽然已有红麻在形态和农艺性状方面的遗传变异的研究，但是由于形态农艺性状分析的局限性使得红麻种质资源的遗传关系至今仍不明瞭（邓丽卿等，1991, 1994；Siepe et al.，1997）。针对品种鉴定、遗传变异和遗传关系检测的分子 DNA 分析将极大地增进我们对红麻种质资源的了解。

如表 5-2 所示，大多数形态农艺性状在品种内和品种间存在着明显的差异，既便是那些标有相同名称的品种。这表明通常红麻品种间的遗传变异较大，同时那些标有相同名称的品种应该不是同一品种。茎粗和 50%开花天数相对稳定可以用于红麻品种分类。但是，所测得的形态农艺性状还是不能作为鉴定某一特定红麻品种的判定指标。根据形态农艺性状的主成分分析，红麻品种大致可分为 3 个组，而且与熟型有关，早中熟（第一组）、中迟熟（第二组）和迟熟（第三组）。这种分法相似于 Siepe 等（1997）的分类，他们把红麻种质资源分成 2 个组：早熟类型和迟熟类型。

根据品种系谱的记载（White，1969, Dempsey，1975, Khon Kaen Field Crops Research Center, 1987），迟熟组中所有的品种都与“EI Salvador”种系有关。EI

Salvador 种系原产于印度尼西亚 Java，本身又包含有两个古老的印度种系 vulgaris（裂叶）和 viridis（全叶）。形态农艺性状分析也表明这 5 个红麻品种之间的关系较近，处于较独立的位置并远离其他品种。而其他 2 个组则包括了在中国广泛推广的品种，如十几年来一直使用的传统改良种和新育成的品种（含标有相同名称的品种）。标有相同名称的品种材料处于不同的分组中表明他们或许是不同的品种。“Aokawa 3”是我国 1963 年从越南引进的传统的晚熟裂叶品种（中国麻类研究所，1985）。但是本研究中，2 个标有“Aokawa 3”（Aokawa6 和 Aokawa7）的材料被分在不同的组中（中迟熟组和早中熟组）。根据形态农艺特征，Aokawa6 可被考虑为真正的“Aokawa 3”（中国麻类研究所，1985）。因此，早中熟类型 Aokawa7 肯定不是“Aokawa 3”，应该是误标。Sekkou12 是 80 年代从"Aokawa 3"品种中系选出的高产中熟品种（郑志钲，1988）。它的形态农艺性状已完全与“Aokawa 3”不同，这从主成分分析的结果中也可以得到证实。红麻品种名称的误标也同样发生在育成于 1987 年的“Zhehong 8310”品种上（梅桢，1996）。3 个标为“Zhehong 8310”（Zhhong9、Zhhong10 和 Zhhong11）分别处于不同的分组中，表明他们在形态农艺性状方面的显著差异。按照系谱来看（(梅桢，1996），只有 Zhhong10 符合“Zhehong 8310”的特点，而另外 2 个大概属于误标品种。可见，误标品种多数是热销的高利润的品种，因此对红麻种子销售市场实行合理正确的管理迫在眉睫。本研究所获得的形态农艺性状数据以及分析表明这些性状只能对红麻品种作出一个粗略的分类和鉴定。仅基于形态农艺性状来鉴定特定的红麻品种十分费力而且不可靠。

与形态农艺性状相比，用 RAPD 数据鉴定红麻品种更具效果。从 RAPD 分析结果可以看出，只要根据用少量引物扩增出的某些 RAPD 分子标记就能够鉴定红麻品种。通过分子标记来鉴定某一品种明显优于形态特性，即使是标有相同标签的品种也能很容易被鉴定。因此，DNA 指纹技术是红麻品种鉴定的有效方法。

同时本研究所获得的 30 个 RAPD 标记也支持了红麻品种间存在较大的遗传变异。聚类分析获得的系统树状图显示了红麻的 3 个主要分支。第一个分支包括 6 个源于印度种系的品种，除了 Zhhong9 被认为是误标的品种外，和形态农艺性状分析获得的迟熟组有较好的吻合。李宗道（1980）描述我国红麻最早于 1908 年从印度引进栽种在台湾，然后在 1943 年左右推广扩种至浙江杭州地区。因此在该地区应该会存有印度祖先种系的后代。Zhhong9 和 Tainug5 在分子水平上的亲近关系暗示误标的 Zhhong9 可能是“Tainung 2”及其它的台湾亲近品种。根据分子标记分析得到的红麻品种分类进一步证实了在形态农艺性状分析中得出的印度种系的亲缘关系。

第二个分支也包括 6 个品种，全部是中国育成的红麻品种。Zhhong10（正宗的“Zhehong 8310”和 Zhhong13 差异明显，证实了它们属于不同的品种。中国湖南省选育出的 Maruba8 显示与 Zhhong13 较近的遗传关系，表明这 2 个中国品种的出处很近。这有力地支持了形态农艺分析所表明的 Aokawa7 是误标品种。另一误标品种 Zhhong11 与一个广东省选育的新品种 Yufeng14 的遗传关系很近，Zhhong11 很可能因某种原因从 Yufeng14 误标而成。这 2 个品种在形态特征上也极为相似，都是园叶。

第三个分支仅包括 2 个品种，Aokawa6 和 Sekkou12，是越南原产。虽然这 2 个品种因熟期的差异而处在不同的形态性状分组中，但是他们的较近的遗传关系还是被检测出来。这有力地支持了 Sekkou12 是从越南品种“Aokawa 3”中系选出来的，是一个早熟变异品种。

研究证实了 RAPD 分子标记分析对红麻品种鉴定和遗传关系的有效检测都是非常有效的手段，尽管品种之间的形态特征和农艺性状差异明显但用于检测品种等依然十分困难。本研究根据 RAPD 分析获得的红麻品种遗传变异的模式跟所知的种系谱和来源相符。这些结果将有助于从种质资源中获得与特殊农艺性状关连的分子标记的筛选并推动分子标记辅助育种。同时考虑到形态特征和农艺性状在检测红麻种质资源的遗传变异和遗传关系方面能起到一定的作用，因此将形态农艺性状和分子标记的方法结合起来用于红麻品种的鉴定和遗传关系的检测效果更佳。

第六章　红麻种质资源鉴定和遗传关系的 AFLP 分析

红麻在世界上分布的范围很广，有超过 120 种称谓，如红麻、槿麻、钟麻等，也说明了红麻分布和使用的广泛性。红麻的近缘种玫瑰茄 roselle（H. *sabdariffa* var. *altissima*）有时也被称为红麻。很多学者都认同红麻起源于非洲，红麻种的各种形式以及木槿属的相关种包括玫瑰茄在许多东非国家被发现呈野生分布（Wilson & Menzel, 1964; Dempsey, 1975; 熊和平, 1989; 李爱青, 1990）。所有这些红麻起源的提法都仅基于野外的观察和调查，没有收集到遗传研究数据来支撑这些观点。

在亚洲，印度是最早进行红麻商业化种植的国家，始于 1900 年左右；玫瑰茄于 1938 年左右被引到印度尼西亚的 Java（Dempsey, 1975）。然而除了少数很少的文献记载印度红麻是从非洲引入（Roxburgh, 1795-1819; Royle, 1855; Hooker, 1875; Howard & Howard, 1910），对红麻在印度如何确立其种植地位和推广知之甚少。此外，虽然有关红麻品种的选择、花器构造和授粉机制的研究很早就有报道（Howard & Howard, 1911），但关于 1900 年之前红麻选育种的信息几乎没有。目前在世界上有超过 20 多个国家种植红麻（FAO, 1998; Liu, 2000），但是对世界范围的红麻分布情况等了解有限。

自红麻商业化种植以来，选育了大量的红麻品种，同时它们作为遗传资源对高产抗病品种的改良起着重要的作用。根据形态特征和农艺性状很难鉴定品种，而且我们对红麻种质资源的遗传关系缺乏了解（邓丽卿等, 1991, 1994; Siepe et al., 1997）。我们在第四章中论述了利用 RAPD 分子标记能鉴定红麻品种以及检测它们的遗传关系，但是所用的品种材料来源比较狭窄，同时检测到的 DNA 的多态性条带相对较少（Cheng et al., 2002）。因此，为进一步检测世界范围的红麻种质资源的遗传变异和遗传关系，并使 DNA 分子标记的应用更有效，更多的分子标记需要积累。

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)，扩增性酶切片段长度多态性，是 Vos 等(1995)发明的一种结合 RELP 和 PCR 技术优点的基因组 DNA 指纹技术。其基本原理是：基因组 DNA 经两种限制性内切酶酶切，酶切片断的末端和特定的人工接头相连接，然后用与接头和位点相匹配的引物进行预扩增，预扩增产物再选用特异引物进行选择性扩增，扩增后的产物用变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。选择性扩增产物电泳分离后可通过银染检测获得清晰的 DNA 指纹图谱。银染检测操作安全、快速、成本低，可在一般的实验室中进行 (Chalhoub et al., 1997; Briard et al., 2000)。AFLP 是对限制性酶切片段进行分析，稳定可靠，同时利用 PCR 有选择地扩增 DNA 片段，兼顾了 PCR 的高效性和 RFLP 的准确性。该技术由于重复性好、检测的多态性高、无需预先知道被分析

基因组 DNA 序列信息等优点（Prabhu & Gresshoff, 1994; Lu et al., 1999）。AFLP 技术已广泛用于很多农作物种质资源的品种鉴定、遗传多样性检测和亲缘关系确定等研究，如大豆（Maughan et al., 1996）、向日葵（Hongtrakul et al., 1997）、茶叶（Paul et al., 1997）、玉米（Ajmone et al., 1998）、草莓（Degani et al., 2001）、苹果（Goulao et al., 2001）、萱草（Tomkins et al., 2001）、小麦（Aytiil & Akkaya, 2001）。

本章研究的目的是：1）通过 AFLP 分析同时比较形态特征，对源自世界不同地区的来源广泛的红麻品种进行鉴定；2) 评价它们的变异和遗传关系；3）揭示红麻的起源、传播以及目前世界范围的分布格局。

6.1 材料和方法

6.1.1 材料和 DNA 提取

材料包括源自 14 个国家的 23 份红麻种质，基本代表了栽培和野生类型的红麻资源。作为比较，选用了 2 份近缘种玫瑰茄。所有材料于 2001 年 5 月 25 号在复旦大学邯郸校区种植，调查每份材料的形态特征和生育特性（表 6-1）。由于 AFLP 技术对 DNA 模板的纯度要求较高，我们采用前述（第五章）的 CTAB 法(减少了 CsCl 溶解沉淀步骤)从红麻发芽 3 天后的幼根和子叶中提取基因组 DNA，经酚氯仿纯化后，用琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测 DNA 的质量和浓度。

6.1.2 AFLP 分析和银染检测

采用美国 GIBCO－BRL 公司的 AFLP Analysis System I 试剂盒和 Promega 公司的 Silver Sequence Staining Reagents 试剂，实验在参照试剂盒使用说明的基础上，略作改动。操作步骤如下：

6.1.2.1 基因组 DNA 的限制性酶切

在 25 μl 的反应体系中含有 5 μl 5X 酶切反应缓冲液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.5)，50 mM $MgAc_2$，250 mM KAc]，400 ng 基因组 DNA，2.5 U *Eco*RI，2.5 U *Mse*I，经轻微混匀、离心，37℃酶切 4-5 小时后，于 70℃保温 15 分钟使酶灭活，然后置于冰上。

6.1.2.2 接头的连接

在上述酶切产物中加入 24 μl 接头连接反应液 [*Eco*RI 接头 5 pmol，*Mse*I 接头 50 pmol，0.4 mM ATP，10 mM Tris-HCl (pH 7.5)，10 mM $MgAc_2$，50 mM KAc] 和 1 μl T_4 DNA 连接酶(1 unit/μl)，经轻微混匀、离心后，37℃连接

Table 6-1. Kenaf germplasm used in the AFLP analysis with its source and origin
表 6-1 用于 AFLP 分析的红麻种质资源的编号、来源和原产地

Species	Name of accession	Code	Line	Source	Country of origin
Kenaf (*H. cannabinus*)	Kenya	Keny	PI 292207	MSU[1], USA	Kenya
	Sudan 1	Sud1	PI 273463	MSU[1], USA	Khartoum, Sudan
	Sudan Pre (Precoce)	SudP	PI 267666	MSU[1], USA	Sudan
	Sudan Tra (Tradiff)	SudT	PI 267667	NARC[2], Japan	Sudan
	Rama	Rama	PI 268079	MSU[1], USA	Kaduna, Nigeria
	Indian Selection	InSe	-	MSU[1], USA	India
	Khon Kaen 60	KK60	PI 538258	Thailand	Khon Kaen, Thailand
	Krasnador	Kras	PI 318726	MSU[1], USA	Russian Federation
	Florida A65-656	Flor	PI 318723	NARC[2], Japan	Iran
	Tainung 1	Tan1	PI 365441	MSU[1], USA	Taiwan
	Tainung 2	Tan2	PI 532872	MSU[1], USA	Taiwan
	Aokawa 3	Aok3	-	China	Vietnam
	Sekkou Chuziku	SeCh	-	China	Vietnam
	IX 51	IX51	PI 189210	MSU[1], USA	Java, Indonesia
	EI Salvador	EISa	-	NARC[2], Japan	Java, Indonesia
	Cuba 108	C108	-	MSU[1], USA	Cuba
	Cubano	Cubn	PI 208832	MSU[1], USA	Cuba
	Guatemala 4	Gut4	PI 270104	MSU[1], USA	Guatemala
	Guatemala 7	Gut7	PI 270105	MSU[1], USA	Guatemala
	Master Fiber	MasF	PI 329185	MSU[1], USA	San Salvador, EI Salvador
	Everglades 41	EV41	PI 532873	MSU[1], USA	USA
	Everglades 71	EV71	PI 532874	MSU[1], USA	USA
	SF 459	S459	PI 586657	MSU[1], USA	Texas, USA
Roselle (***H. sabdariffa* var. *altissima***)	Noon Soon 2	Noo2	-	Thailand	Thailand
	Keawyai	Keay	-	Thailand	Thailand

[1] MSU: Mississippi State University, USA.

[2] NARC: National Agricultural Research Center, Japan.

过夜（12 小时）。

6.1.2.3　预扩增

取 5 μl 连接产物，加入 40 μl 预扩增混合液（0.25 mM dNTP，*Eco*RI 引物 (*Eco*RI +C)75 ng，*Mse*I 引物 (*Mse*I+A) 75 ng），5 μl 10X PCR 缓冲液（含 20 mM $MgCl_2$），1 U *EX Taq*™ DNA 聚合酶（TaKaRa，Japan），用 Eppendorf Mastercycler Gradient 5331 PCR 仪（Germany）进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为：94℃30 秒，56℃60 秒，72℃60 秒，共二十个循环。取 10 μl 预扩增产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检查预扩增结果。

6.1.2.4　选择性扩增

取 5 μl 稀释 10 倍后的预扩增产物，加入 0.36 μl *Eco*RI+3 引物 (27.8ng/μl)，4.5 μl *Mse*I＋3 引物 (6.7 ng/μl，1 mM dNTPs)，2 μl 10X PCR 缓冲液（含 20 mM $MgCl_2$），0.5 U *EX Taq*™ DNA 聚合酶，加灭菌水至 20 μl，进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94℃30 秒，65℃30 秒，72℃60 秒，然后每个循环退火温度减 0.7℃，循环 13 次。接着进行 94℃30 秒，56℃30 秒，72℃60 秒，23 个循环。

6.1.2.5　变性聚丙烯酰胺凝胶制备

清洗长短玻璃，并用 95%乙醇擦洗凉干。配制 1 ml 粘和硅烷溶液 [1 ml 的 95%乙醇中含 0.5%冰醋酸和 5ul Binding Silane (Promega)]，沿同方向均匀涂满长玻璃。5 分钟后，用干净的吸水纸浸透 95%乙醇，轻轻擦洗玻璃，重复 2 次。同时，用 1 ml 的剥离硅烷 (5%二氯二甲基硅烷一氯仿溶液) 沿同方向均匀涂满短玻璃。5 分钟后，用干净的吸水纸轻轻擦去多余的剥离硅烷。涂布二种硅烷时不能相互污染。用夹子夹紧装好边条的硅化好的玻璃，用胶布封牢玻璃的两侧和底边。

配制 6%聚丙烯酰胺凝胶（19:1 丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺，7.0 M 尿素，1X TBE 电泳缓冲液），取 40 ml 的 6%的聚丙稀酰胺凝胶溶液，加入 200 μl 10%过硫酸胺和 50 μl TEMED，搅匀后连续倒入。管满后反插入梳子并将玻板平置。凝胶聚合 2 小时后即可使用。 聚合完成后，靠近梳子下方出现一条折射率不同的纹线。

6.1.2.6　凝胶电泳

采用 26 孔 Shelton 电泳槽(Shelton Scientfic Mfg. Shelton USA)， 恒功率 30W 预电泳 30 分钟。在选择性扩增产物中加入等体积的上样缓冲液（98％甲

酰胺，10 mM EDTA，0.25%溴酚篮，0.25%二甲苯氰），95℃变性 5 分钟，立即置于冰上。然后每个样品上样 4 μl，恒功率 30 W 电泳， 直到二甲苯氰迁移至凝胶 2/3 长度，停止电泳，约 3 小时。

6.1.2.7 银染显色

电泳结束后，小心分开两块玻璃板，将带胶的一块玻璃板放入 10%的冰乙酸固定液中，轻轻摇动 30—40 分钟，至二甲苯氰颜色褪尽。用重蒸水洗涤 2 次，每次 2 分钟。空干水后，放入染色液（2g 硝酸银，3ml 37%甲醛溶于 2L 重蒸水）中，轻轻摇动 45 分钟。染色后在重蒸水中轻漂 5-6 秒后立即转移到显影液（60g 碳酸钠溶于 2L 重蒸水，要求 4℃预冷，用前加 3ml 37%甲醛和 400μl 10%硫代硫酸钠）中显影，轻轻摇动至条带清晰。加入等体积 10%冰乙酸定影（原固定液），轻轻摇动 5 分钟。用重蒸水洗涤凝胶 2 次，室温下自然干燥。干燥后用计算机图象扫描仪扫描，保存图片。

6.1.3 数据分析

从保存的扫描图片中统计 AFLP 条带，条带的有无分别用“1”和“0”表示。用 Jaccard 法（a/n-d）计算两两相似性，a 为两样品都有的条带数，b 为两样品都没有的多态性条带数，n 为多态性条带总数。相关系数的计算，UPGMA 法聚类分析以及系统树状图的绘制均采用 NTSYS-pc Numerical Taxonomy System 分析软件进行(Rohlf, 1998)。

6.2. 结果

6.2.1 形态特征和农艺性状的变异

23 份红麻材料和 2 份玫瑰茄材料的形态特征等列于表 6-2。红麻和玫瑰茄在种子特征、叶型和花色等方面差异明显。玫瑰茄的熟期要明显迟于红麻，通常在北纬 30 度以北玫瑰茄不能开花。而 23 份红麻间的变异较小。除了 Kenya（小粒种子、紫花、茎带刺）和 Sudan 1（小粒种子、紫茎）两份材料表现为极晚熟以及有一些特有的特征外，大部分红麻材料为红或青茎、裂或圆叶、淡黄色花和大粒种子，缺少多样性。红麻材料的熟型可分为 4 种，其中大多数表现为晚熟特性，尤其是“Keny”品种为极晚熟类型，接近于玫瑰茄材料。

6.2.2 AFLP 指纹图谱式样的变异

在预备试验中，用两个遗传关系相对较近的红麻材料 Eerglades 71 和 Guatemala 4 对 AFLP Analysis System I 中的 64 对引物组合进行评价和筛选

Table 6-2 Morphological characters of the collected kenaf germplasm (Only one measurement for each variable was made)
表 6-2 红麻种质资源的形态特征

Code	Seed weight (g/1000 seed)	Seed shape	Seed hilum	Stem color	Leaf shape	Flower color	Maturity[1]
C108	25.0	Irregularly subreniform	Yellow-brown, inconspicuous	Red	Palmate	Cream	Late
Cubn	33.6	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Late
Gut4	26.8	Idem	Idem	Red	Entire	Cream	Late
Gut7	35.2	Idem	Idem	Red	Entire	Cream	Late
MasF	34.7	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Late
EISa	29.9	Idem	Idem	Red	Entire	Cream	Late
EV41	26.0	Idem	Idem	Red	Entire	Cream	Late
EV71	30.2	Idem	Idem	Red	Entire	Cream	Late
S459	31.5	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Late
InSe	23.8	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Late
Tan1	32.6	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Late
Tan2	31.1	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Late
Aok3	26.2	Idem	Idem	Green	Palmate	Cream	Late
SeCh	27.9	Idem	Idem	Green	Palmate	Cream	Medium
IX51	29.8	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Late
KK60	32.7	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Late
Kras	26.6	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Early
Flor	19.5	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Early
Sud1	12.5	Idem	Idem	Bronze	Entire	Cream	Late
SudP	32.3	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Late
SudT	36.2	Idem	Idem	Red	Palmate	Cream	Late
Keny	9.7	Idem	Idem	Green	Deep palmate	Purple	Extreme-late
Rama	33.1	Idem	Idem	Green	Entire	Cream	Late
Noo2	23.3	Subreniform	Brownish-red, conspicuous	Green	Deep palmate	Yellow	Extreme-late
Keay	26.3	Idem	Idem	Green with red spot on node	Deep palmate	Yellow	Extreme-late

[1]According to the days to 50% flowering from seed germination, Early: <130 days; Medium: 131-165days; Late: 166-200 days; and Extreme-late: >201.

Table 6-3 AFLP primer combination selection using two kenaf accessions
表 6-3　2 份红麻材料对 AFLP 引物组合的评价和筛选

	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	A	B	NR	A	B	NR	A	NR
E-AAG	C	C	C	C	C	C	B	C
E-ACA	NR	NR	C	B	B	B	B	NR
E-ACC	NR	NR	C	C	C	B	A	C
E-ACG	A	A	NR	B	B	B	B	B
E-ACT	B	B	B	NR	B	NR	NR	NR
E-AGC	A	NR	A	B	A	A	B	B
E-AGG	B	B	B	B	NR	B	A	B

NR = No reaction

A = 5 or more polymorphic fragments when comparing both accessions

B = 4 or less polymorphic fragments between both accessions

C = No polymorphic fragments in the two accessions

Table 6-4 Polymorphism generated by six selected oligonucleotide primer combinations from the kenaf germplasm in AFLP analysis

表 6-4　6 对引物组合扩增出的红麻种质资源的 AFLP 多态性条带数和多态率

Primer combination	Total number of fragments			Polymorphic fragments			Polymorphic (%)		
	All 25 accessions	23 Kenaf accessions	2 Roselle accessions	All 25 accessions	23 Kenaf accessions	2 Roselle accessions	All 25 accessions	23 Kenaf accessions	2 Roselle accessions
E-AAC/M-CTG	104	82	57	93	64	1	89	78	2
E-ACC/M-CTG	77	56	38	74	49	4	96	88	12
E-ACG/M-CAA	76	55	42	69	43	0	91	78	0
E-ACG/M-CAC	80	72	39	72	60	0	90	83	0
E-AGC/M-CAA	124	121	54	108	102	0	87	84	0
E-AGC/M-CTA	99	90	57	89	78	0	90	87	0
Total	560	476	287	505	396	5	Mean	90	83	2

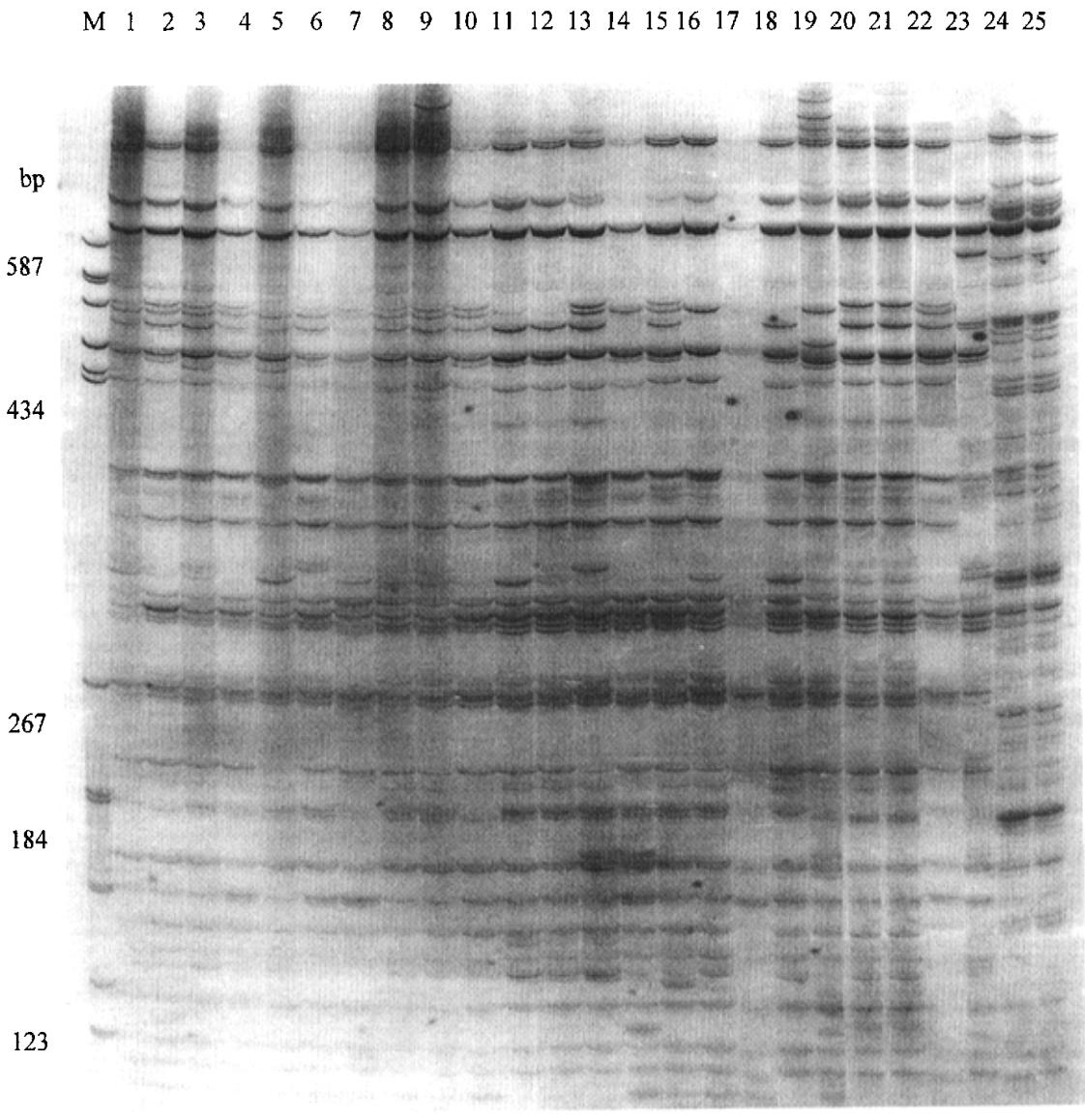


Figure 6-1 AFLP banding pattern of kenaf germplasm generated by the primer combination *Eco*RI- AAC and *Mse*I- CTG

图6-1 引物组合(*Eco*RI- AAC和 *Mse*I- CTG) 扩增出的红麻种质资源AFLP指纹图谱

(M) Size marker, PBR322 DNA/Hae III markers, (1) C108, (2) Cubn, (3) EV41, (4) EV71, (5) EISa, (6) Gut4, (7) Gut7, (8) Tan1, (9) Tan2, (10) KK60, (11) InSe, (12) Kras, (13) SudP, (14) Rama, 15) MasF, (16) SeCh, (17) Aok3, (18) Flor, (19) Sud1, (20) SudT, (21) IX51, (22) S459, (23) Keny, (24) Noo2, (25) Keay.

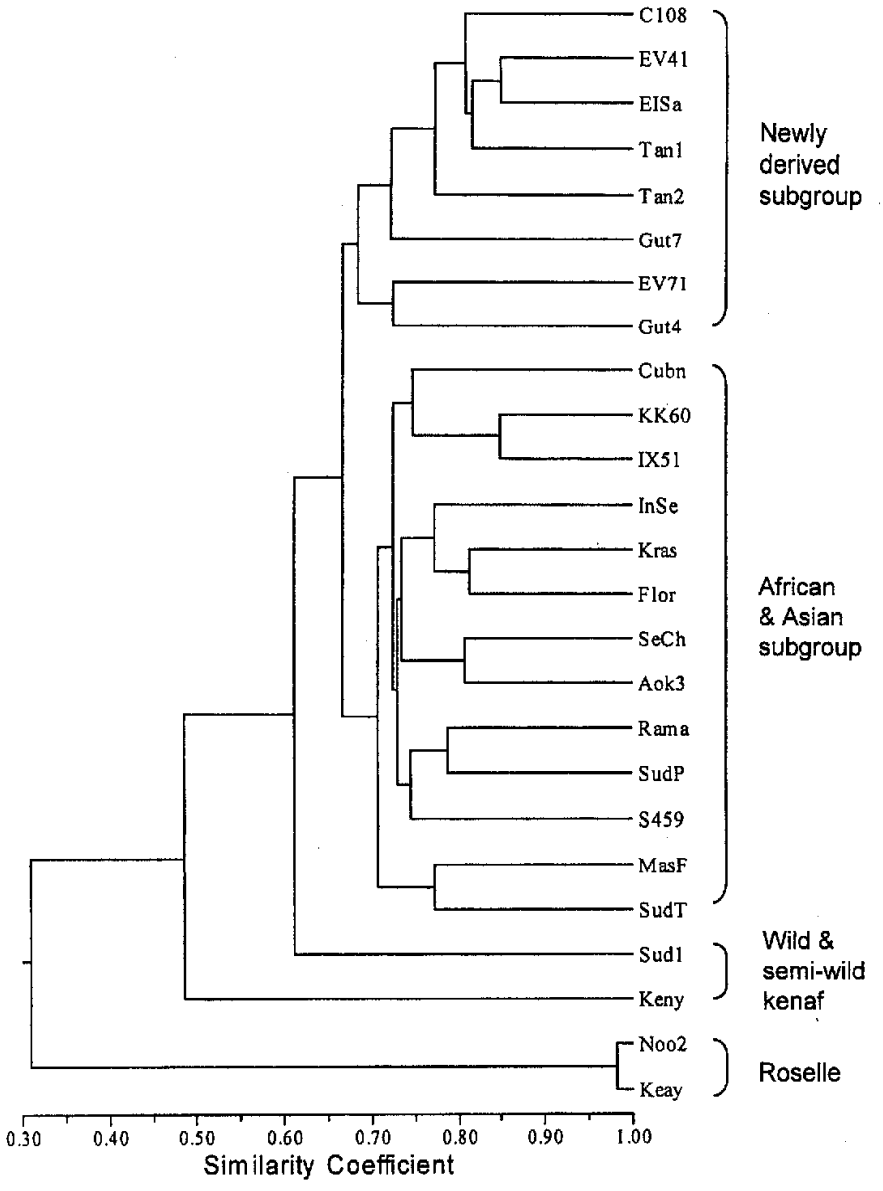


Figure 6-2 UPGMA dendrogram of genetic relationships of kenaf germplasm, based on the Jaccard similarity coefficient from the 560 AFLP fragments.

图6-2 红麻种质资源遗传关系的聚类分析树状图

（表 6-3）。不同的引物组合产生的条带数差异很大，范围从 0 条（如 E-ACA/M-CTT）到 91 条（E-AGC/M-CAA）。有 49 对引物组合获得了条带，其中只有 11 对引物组合在这两份材料之间产生 5 条或 5 条以上的多态性条带。尤其是部分引物如 M—CAA、M—CTG、E—AAC 和 E—AGC 等能产生较多的多态性条带，从中选取 6 对引物组合（表 6-4）用于构建红麻种质资源的指纹图谱。

用 6 对引物组合从 23 份红麻材料和 2 份玫瑰茄材料中总共产生 560 条条带，其中 505 条为多态性条带（图 6-1 & 表 6-4）。多态率从 87％（E-AGC/M-CAA）至 96％（E-ACC M-CTG），平均为 90％（表 6-4）。根据 AFLP 指纹图谱和条带模式，所有的实验材料均能容易地被区分开来。这 6 对引物在 23 份红麻材料间和 2 份玫瑰茄材料间分别获得了 396 条和 5 条多态性条带。平均每对引物组合/每份红麻材料产生多态性条带 33.1 条。

根据 25 份材料的 505 条 AFLP 分子标记计算出的相似系数而构建了系统树状图（图 6-2）。聚类分析证明了供试材料在遗传上存在一定的分歧，尤其是红麻和玫瑰茄之间。在系统树状图中，根据不同的相似性水平可以分出 3 个主要的组。2 份玫瑰茄聚成一组，在相似系数 0.31 的水平上跟其他所有材料明显分开。这 2 份玫瑰茄几乎没有差异，它们的相似系数为 0.98。野生和半野生红麻“Keny”和“Sud1”在树状图中处在玫瑰茄和其他所有栽培类型红麻材料之间。尽管野生和半野生类型的红麻明显远离其他的栽培类型红麻，但是半野生类型的红麻还是接近与栽培类型红麻，它们的相似系数为 0.66。所有的红麻栽培类型材料聚在一个大的组中，同时该大组又可明显地分成 2 小组。除了 2 个台湾材料“Tan1”和“Tan2 外，所有的非洲和亚洲材料被聚在一个小组中，我们定义为“非洲亚洲小组”。此外，3 份来自于中北美洲的红麻材料“MasF”、“S459”和“Cubn”也聚在“非洲亚洲小组”中。“非洲亚洲小组”的红麻材料间的相似系数在 0.72 到 0.85 之间。大多数在美国栽种的红麻材料被聚在另一小组。我们把它定义为“新派生小组”，因为该小组中的很多材料都是从一个亚洲红麻种系中派生出来的。“新派生小组”的红麻材料间的相似系数在 0.67 到 0.85 之间。

6.3. 讨论

6.3.1 红麻种质资源的鉴定

基于形态特征的红麻品种鉴定一般是很困难的，因为它们的变异程度较小同时可供选择的特征性状十分有限。以前的很多报道也都提到形态特征等可用于红麻品种鉴定的信息非常少（Deng et al., 1991, 1994; Siepe et al., 1997; Cheng

et al., 2002）。如果光根据种子特性、叶片形状和花色只能将 2 份玫瑰茄从红麻材料中区分开来，而无法进行红麻品种的鉴定。相反 AFLP 分析是红麻品种鉴定的可靠且强有力的分子手段。该章的 AFLP 分析是第一次利用 AFLP 分子标记对来源广泛的红麻种质资源以及近缘种进行鉴定。而且只用了 6 对引物组合就达到了预定目标，既便是对于 2 份在形态变异上变异极小的玫瑰茄材料。实际上，只要用 1 至 2 对能产生高信息量的引物组合就能获得足够的标记来鉴定所有的供试材料（图 6-1）。我们比较了 RAPD 和 AFLP 方法在红麻种质资源中产生的条带的式样，AFLP 方法在产生的总条带数、多态性条带、多态率、还是每个（对）引物/每份种质产生的多态性条带都明显高于 RAPD 方法（Cheng et al., 2002）。AFLP 技术在红麻种质资源的鉴定方面比 RAPD 分析更有力可靠。AFLP 分析已广泛用于其他很多作物的变异分析研究，结果反映 AFLP 技术在种质鉴定上都表现出高效、准确等优点（Aytiil & Akkaya, 2001; Tomkins et al., 2001）。因此，我们推荐利用 AFLP 指纹图谱技术鉴定红麻种质资源。

6.3.2 红麻种质资源的变异和遗传关系

极大多数保存在美国农业部作物遗传资源保存机构的或者用于本研究的红麻种质资源都缺少出身系谱的详细资料。它们一般都只标有该材料是从何国家收集的或是受赠的。因此，我们研究目标之一就是评价供试材料的遗传关系以及它们可能的来源。无论是形态特征还是 AFLP 指纹图谱都显示出红麻和玫瑰茄之间的明显差异，AFLP 分析结果将玫瑰茄单独聚为一组。根据 AFLP 分子标记检测到的红麻与玫瑰茄之间的遗传差异支持了它们在分类学上的独立性，尽管有时它们都被称为红麻。2 份玫瑰茄间的遗传变异非常小，这很可能与有限的供试样品数量关系密切。

虽然红麻种质资源的形态变异很小不足以用于红麻的鉴定，但根据 AFLP 指纹图谱在红麻种质资源中检测到很大的遗传变异，相似系数在 0.47-0.85 之间。AFLP 分析对来源较广的红麻种质资源提供了一个相对明瞭的遗传关系图。所有的红麻材料被聚成 2 大组：野生和半野生类型组以及栽培类型组（图 6-2）。野生类型“Keny”和半野生类型“Sud1”被聚在玫瑰茄组和红麻栽培类型组之间，同时“Keny”更接近于玫瑰茄而“Sud1”则靠近于栽培类型的红麻。这表明它们在遗传上与相关的类型接近，但是它们俩本身之间又有较显著的变异。与野生和半野生类型红麻相比，栽培类型红麻在分子水平上的变异相对较小。红麻野生类型和栽培类型之间的巨大差异支持了红麻在驯化过程中所产生了变异。

根据我们的 AFLP 分析数据，栽培类型红麻可分成 2 个小组：“非洲和亚洲小组”和“新派生小组”。大多数来源自非洲和亚洲国家的红麻材料都包括在

et al., 2002）。如果光根据种子特性、叶片形状和花色只能将 2 份玫瑰茄从红麻材料中区分开来，而无法进行红麻品种的鉴定。相反 AFLP 分析是红麻品种鉴定的可靠且强有力的分子手段。该章的 AFLP 分析是第一次利用 AFLP 分子标记对来源广泛的红麻种质资源以及近缘种进行鉴定。而且只用了 6 对引物组合就达到了预定目标，既便是对于 2 份在形态变异上变异极小的玫瑰茄材料。实际上，只要用 1 至 2 对能产生高信息量的引物组合就能获得足够的标记来鉴定所有的供试材料（图 6-1）。我们比较了 RAPD 和 AFLP 方法在红麻种质资源中产生的条带的式样，AFLP 方法在产生的总条带数、多态性条带、多态率、还是每个（对）引物/每份种质产生的多态性条带都明显高于 RAPD 方法（Cheng et al., 2002）。AFLP 技术在红麻种质资源的鉴定方面比 RAPD 分析更有力可靠。AFLP 分析已广泛用于其他很多作物的变异分析研究，结果反映 AFLP 技术在种质鉴定上都表现出高效、准确等优点（Aytiil & Akkaya, 2001; Tomkins et al., 2001）。因此，我们推荐利用 AFLP 指纹图谱技术鉴定红麻种质资源。

6.3.2 红麻种质资源的变异和遗传关系

极大多数保存在美国农业部作物遗传资源保存机构的或者用于本研究的红麻种质资源都缺少出身系谱的详细资料。它们一般都只标有该材料是从何国家收集的或是受赠的。因此，我们研究目标之一就是评价供试材料的遗传关系以及它们可能的来源。无论是形态特征还是 AFLP 指纹图谱都显示出红麻和玫瑰茄之间的明显差异，AFLP 分析结果将玫瑰茄单独聚为一组。根据 AFLP 分子标记检测到的红麻与玫瑰茄之间的遗传差异支持了它们在分类学上的独立性，尽管有时它们都被称为红麻。2 份玫瑰茄间的遗传变异非常小，这很可能与有限的供试样品数量关系密切。

虽然红麻种质资源的形态变异很小不足以用于红麻的鉴定，但根据 AFLP 指纹图谱在红麻种质资源中检测到很大的遗传变异，相似系数在 0.47-0.85 之间。AFLP 分析对来源较广的红麻种质资源提供了一个相对明瞭的遗传关系图。所有的红麻材料被聚成 2 大组：野生和半野生类型组以及栽培类型组（图 6-2）。野生类型“Keny”和半野生类型“Sud1”被聚在玫瑰茄组和红麻栽培类型组之间，同时“Keny”更接近于玫瑰茄而“Sud1”则靠近于栽培类型的红麻。这表明它们在遗传上与相关的类型接近，但是它们俩本身之间又有较显著的变异。与野生和半野生类型红麻相比，栽培类型红麻在分子水平上的变异相对较小。红麻野生类型和栽培类型之间的巨大差异支持了红麻在驯化过程中所产生了变异。

根据我们的 AFLP 分析数据，栽培类型红麻可分成 2 个小组：“非洲和亚洲小组”和“新派生小组”。大多数来源自非洲和亚洲国家的红麻材料都包括在

“非洲和亚洲小组”，同时 3 个源自中北美洲的红麻材料“MasF”、“S459”和“Cubn”也聚在该组。这表明非洲和亚洲的红麻材料的遗传关系十分接近，它们又与美洲的红麻材料在遗传上存有十分紧密的联系。“MasF”是由萨尔瓦多赠送的但缺乏系谱材料，它在形态树状图中与苏丹材料“SudT”关系较近。“S459”是美国从“45-9 种系”中选育出的耐根结线虫病品种（Cook et al. 1995）。虽然在种子库中没有“45-9 种系”的系谱和出处的详细描述，“S459”品种应该含有野生类型红麻的遗传物质，因为据报道红麻只有野生类型被证实抗根结线虫病（Wilson & Menzel 1964; Wilson 1978）。而且在树状图中，“S459”与 2 份非洲材料“SudP”和“Rama”关系较近。“Cubn”古巴通过“EI Salvador”种系和其他印度尼西亚 Java 的种质资源间的杂交而选育成的（Dempsey, 1975）。“Cubn”在树状图中显示出与印度尼西亚材料“IX51”在分子水平上的遗传关系较近。总之，AFLP 技术是分析红麻种质资源遗传关系的有效手段，即使是对于缺乏详细系谱的材料也能准确地反映它们的遗传关系。

“新派生小组”包括了那些在中北美洲从 Java 种系祖先中选育出来的材料。第二次世界大战期间及战后，在古巴、危地马拉和美国的佛罗里达州有关高产抗病红麻品种的选育研究被广泛深入地开展（Wilson & Menzel, 1964; Dempsey, 1975）。5 个在这些研究项目中育成的品种都包括在该小组中。它们有直接从“EI Salvador”种系中筛选出的，或者从“EI Salvador”种系和其他遗传背景较狭窄的 Java 种质资源的杂交或回交组合中选育而成的。Dempsey（1975）叙述 EI Salvador 种系原产于印度尼西亚 Java，本身又包含有两个古老的印度种系 vulgaris（裂叶）和 viridis（全叶）。该种系于 1942 年被引到古巴，然后被用于红麻的选育种研究。本研究证实了亚洲和美洲红麻材料之间的极强连带关系。2 份台湾材料“Tan1”和“Tan2”是于 1950 年从“EI Salvador”种系中直接选出的（FCES, 1970），它们和该小组的其他材料有着很近的遗传关系。因此该小组的红麻材料都是直接或间接地从“EI Salvador”中派生出来的。除了“Cnbn”聚在“非洲和亚洲小组”中以外，“EISa”和它的后代均聚在“新派生小组”中，但有相对较大的变异。“EISa”根据其系谱和来源考虑，应该和亚洲材料相近。但是有些 EI Salvador 种系的后代如“Cubn”聚在亚洲材料中，这表明一些原始亲本的遗传背景在频度较高的选育种过程中在它的后代中产生了变异和分化。

6.3.3 红麻的起源和传播

象木槿属的许多相关种都是非洲起源一样，大多数作者认同红麻起源于非洲（Wilson & Menzel, 1964; Dempsey, 1975; Xiong, 1989; Li, 1990），它的近缘种玫瑰茄也起源于西非国家安哥拉和刚果（Wilson & Menzel, 1964; Dempsey,

1975）。对于世界上最早进行红麻商业化栽种的是在南亚次大陆的提法仅仅是一个假设。而且这个假设也仅仅是基于野外调查和文献查询，没有可以提供的遗传数据来进一步支持和证实这种假设。在本章的研究中，我们基于 AFLP 分析获得的发现支持了红麻起源于非洲的假设。尽管野生分布的红麻材料和它的非洲起源的近缘种之间的遗传距离很近，栽培类型的红麻也始终通过野生和半野生红麻和玫瑰茄保持较紧密的关系（图 6-2）。野生红麻起源于非洲，并被当地农民传播，各种栽培类型被选择。在非洲由于原始的农业栽种体制及野生和栽培类型的红麻之间经常性的基因渗透，半野生类型的红麻依然大量存在。这是对为何来自非洲国家的红麻材料具有相对丰富的遗传多样性的较有说服力的解释。

亚洲被推测为是最早引进红麻的大陆然后成为了最主要的红麻产区。根据文献记载，在 20 世纪初红麻被直接从非洲引到印度并开始了商业化栽培（Dempsey, 1975）。推测古埃及和古代印达斯之间的文化交流等对红麻从非洲传到印度起了非常重要的作用。红麻栽培随后由印度扩大其他亚洲国家。从 AFLP 分析揭示的非洲红麻和亚洲红麻之间的遗传关系表明两个大洲的红麻材料具有非常密切的联系。这也支持了栽培红麻首先被引到印度，然后传播到亚洲其他国家。

有些红麻品种如“EISa”和“MasF”在 20 世纪 40 年代被引到中北美洲，然后选育出许多适合当地气候和用途的品种。来自中北美洲的大多数红麻材料都育自 Java 种系如“EISa”。因此，它们都聚在“新派生小组”中，尽管美洲和亚洲材料之间的亲缘关系不远。“新派生小组”的祖先亲本的遗传背景不够丰富，但小组中的红麻材料间的遗传变异相对较大，这应归结于当时中北美洲高强度的红麻选育种。不同地域大陆的红麻种质资源间的遗传变异也大体反应了红麻的起源、传播、利用以及红麻种质作为遗传资源的选育种成果。通过了解和选择拥有不同遗传背景的红麻种质对有效地开展品种改良、利用和种质资源的保护具有十分重要的意义。

参 考 文 献

程舟，鲛岛一彦，陈家宽. 2002. 红麻种质资源遗传变异和亲缘关系的 RAPD 分析. 中国麻业 **24** (1): 1-12.

邓丽卿，栗建光，黄培坤，李爱青. 1991. 红麻种质资源的形态及分类研究. 中国麻作 **13** (4): 16-20.

邓丽卿，栗建光，李爱青. 1994. 红麻种质资源的农艺性状研究与利用. 中国麻作 **16** (4): 1-4.

邓丽卿，黄培坤，栗建光，李曼瑞. 1994. 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 **20** (4): 310-317.

黄培坤，邓丽卿，栗建光，李爱青. 1989. 国外引进红麻种质资源鉴定和利用研究. 中国麻作 **11** (4): 5-9.

惠东威，庄炳昌，顾京. 1994. 利用 RAPD 对大豆属植物系统学研究的初报. 科学通报 **39** (2): 175-178.

姜玉新，石思信，张志娥，肖建平. 1998. 人参、西洋参的基因组 DNA 的 RAPD 分析. 特产研究 1998 (1):5-9.

揭雨成，周青文，陈佩度. 1999. 苎麻不同基因型亲缘关系的 RAPD 分析. 中国麻作 **21** (1): 1-6.

李宗道. 1980. 麻作的理论与技术. 上海科学技术出版社. 541-595.

李祖士. 1994. 皮骨兼优红麻新品种浙红 832 的选育. 中国麻作 **16** (4): 5-8, 15.

卢孟柱，王晓茹, E.S.Alfred. 2000. PCR-SSCP 用于针叶树种遗传分析的可行性.林业科学研究 **13** (4): 349-354.

马小军，汪小全，徐昭玺，肖培根，洪德元. 2000. 人参不同栽培群体遗传关系分析. 植物学报 **42** (6): 584-590.

梅祯，程舟.1993. 杆芯造纸用红麻品种及其主要栽培技术的研究. 科技通报 **9** (4): 249-254.

谭石林，刘伟杰，汤清明. 1991. 不同红麻品种及其部位得浆率的研究. 中国麻作 **13** (4): 41- 43.

汤永海. 1994. 我国红麻种子工作中的主要问题及其对策. 中国麻作 **16** (3): 37-41.

王翠亭，黄占景，何聪芬，秘彩莉，沈银柱. 2001. PCR-SSCP 与测序技术相结合检测小麦耐盐突变体. 遗传学报 **28** (9): 852-855.

武耀廷,张天真,郭旺珍,殷剑美. 2001. 陆地棉品种 SSR 标记的多态性及用于杂交种纯度检测的研究, 棉花学报 **13** (3): 131-133.

谢国炎，栗建光，薛召东. 1998. 我国红麻种子产、销现状及发展方向. 中国麻作 **20** (3): 35-37.

熊和平. 1989. 坦桑尼亚黄麻红麻种质资源考察. 中国麻作 **11** (3): 18-22.

许占友, 邱丽娟, 常汝镇, 李向华, 郑翠明, 刘立宏, 郭蓓. 1999. 利用 SSR 标记鉴定大豆种质.中国农业科学 **32** (增刊): 40-48.

郑志钰. 1988. 红麻新品种“浙萧麻 1 号”的选育. 中国麻作 **10** (3): 13-16.

邹喻苹, 蔡美琳, 王子平. 1999. 芍药属牡丹组的系统学研究一基于 RAPD 分析. 植物分类学报 **37** (3): 220-227.

中国农业科学院麻类研究所. 1985. 中国黄红麻品种志. 农业出版社. pp.165.

敖日格勒, 佐野嘉拓. 2000. ケナフ靭皮のアルカリ酸素パルプ化およびケナフ酸素パルプの漂白. 紙パ技協誌 **54** (7): 969-976. (日文)

阿部薫, 尾崎保夫. 2001. 水田に植栽、畝間湛水したケナフの水質浄化機能, 日本土壌肥料学会講演要旨集 (第 47 集), 高知, pp. 207. (日文)

大森美香子, 青井透, 大島秀則. 1998. 水質浄化に利用したケナフから製造した活性炭の色度、かび臭除去性能の評価, 第 35 回環境工学研究フォーラム講演集, 京都, Nov., pp.4-6. (日文)

海外产业植林中心. 1999. 发展中国家的环保对策调查一红麻等非木材纤维利用可能性调查报告. (日文)

釜野德明. 1999. 关于红麻栽培和无药品制浆的开发. JELBA Report No.9, pp.10-12. (日文)

北沢裕二. 2001. Kenaf brend dress shirt, 21 世紀の天然素材. 第 10 回高知红麻研究会资料, Apr., 高知. (日文)

熊井清雄. 1999.農場副産品を利用したケナフ葉サイレージの品質と飼料価. 畜産の研究. **53** (2): 47-49. (日文)

玉城康智, 金城一彦, 上池俊德, 本乡富士弥, 鮫島一彦, 屋我嗣良. 2001. ケナフ種子に含有する水溶性多糖類がラットのコレステロール上昇抑制作用に及ぼす影響 (第 1 報). 木材学会誌 **47** (2): 159-163. (日文)

张敏. 2001. 実大サイズのケナフ複合ボードの製造とその性質. 第 51 回日本木材学会大会要旨集, 東京, pp.256. (日文)

马来西亚农业部. 2000. 马来西亚国家红麻研究项目研究进展报告. (日文)

三木辉久. 1999. ケナフ葉部の成分について. 第 4 回ケナフ等植物資源利用研究会予稿集, 东京, pp.6-1-6-2. (日文)

宮南亮. 1999. ケナフ葉部の有効利用に関する研究. 第 4 回ケナフ等植物資源利用研究会予稿集, 东京, pp.7-1-7-2. (日文)

山本泰由. 2000. 農業研究センターにおけるケナフ研究の現状. 高知县红麻研究会资料 No.191. (日文)

Abe, K. & Y. Ozaki. 2000. Evaluation of kenaf for wastewater treatment in plant bed filter ditchs. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima,

Japan, pp.165-170.

Aoi, T. 2000. Phytoremediation by kenaf in the Tone Reviver basin. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima, Japan, pp.51-54.

Atchison, J. E. 1996. Twenty-five years of global progress in nonwood plant fiber repulping. *Tappi J.* 79 (10): 87-95.

Ajmone, M.P., P. Castiglioni, F. Fusari, M. Kuiper & M. Motto. 1998. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 219–227.

American Kenaf Society (AKS). 2000. Proceedings of the 3rd Annual American Kenaf Society Conference, Feb, 23-25, Corpus Christi, TX, USA.

Aytiil, I. & M.S. Akkaya. 2001. Assessment of genetic relationships in durum wheat cultivars using AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **48**: 233-238.

Bibhuti, B. M., Y. Ohtani & K. Sameshima. 1998. Normal pressure pulping of jute, kenaf, and mesta bast fibers. *Sen'I Gakkaishi* **54** (12): 654-660.

Bitzer, M.J., C.G. Cook & B.S. Baldwin. 2000. The development of kenaf varieties in the United States. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima, Japan, pp.91-94.

Bodenes, C., F. Laigret & A. Kremer. 1996. Inheritance and molecular variations of PCR-SSCP fragment in Pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Theor. Appl. Genet.* **93**: 348-354.

Brown-Guedira, G. L., J. A. Thompson, R. L. Nelson & M. L. Warburton. 2000. Evaluation of genetic diversity of soybean introductions and North American ancestors using RAPD and SSR markers. *Crop Science* **40** (3): 815-823.

Baldwin, B.S. 2000. Growing kenaf on a commercial scale in Mississippi. Proceedings of the 3rd Annual American Kenaf Society Conference, Feb. 23-25, Corpus Christi, TX, USA, pp.49-53.

Briard, M., V. Le Clerc, D. Grzebelus, D. Senalik & P. W. Simon. 2000. Modified Protocols for Rapid Carrot Genomic DNA Extraction and AFLP Analysis using Silver Stain or Radiosotopes. *Plant Molecular Biology Reporter* **18** (3): 235-241.

Buso, G.S.C., P.H. Rangel & M.E. Ferreira. 1998. Analysis of genetic variability of South American wild rice population (*Oryza glumaepatula*) with isozames and RAPD markers. *Mol. Ecol.* 7: 107-117.

Caetano-Anolles, G., B.J. Bassam & P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* **9**: 553-557.

Chalhoub, B.A., S. Thibault, V. Laucou, C. Rameau, H. Hofte, & R. Cousin. 1997. Silver staining and recovery of AFLP amplification products on large denaturing polyacrylamide

gels. *BioTechniques* **22**: 216-220.

Cheng, Z., Y. Ohtain, K. Sameshima & Z. Mei. 1997. Selection of kenaf (*Hibiscus cannbinus* L.) varieties for papermaking on arid hillside land in China. *Mokuzai Gakkaishi* **43** (9): 770-777.

Cheng, Z., Y. Ohtain, K. Sameshima & Z. Mei. 1998. Selection of plant population of kenaf as a papermaking raw material on arid hillside land in China. *Journal of Wood Science* **44** (4): 296-302.

Cheng, Z. 2000. Studies on production management indicators of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) whole stalk for papermaking. *The Bulletin of the Kochi University Forests* **26**: 63-136.

Cheng, Z., Y. Ohtain & K. Sameshima. 2000. Analysis of DNA polymorphisms among kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) varieties by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Proceedings of the 3rd Annual American Kenaf Society Conference, Feb. 23-25, Corpus Christi, TX, USA, pp.142-154.

Christiansen, M. J., S. B. Andersen & R. Ortiz. 2002. Diversity changes in an intensively bred wheat germplasm during the 20th century. *Molecular breeding* **9** (1): 1-11.

Clark, T. F., G. H. Nelson & I. A. Wolff. 1962a. A search for new fiber crops, Part V. Pulping studies on kenaf. *Tappi J.* **45** (10): 780-786.

Clark, T. F. & I. A. Wolff. 1962b. A search for new fiber crops, Part VI. Kenaf and wood pulp blends. *Tappi J.* **45** (10): 786-789.

Clark, T. F. & I. A. Wolff. 1965. A search for new fiber crops, Part VIII. Sulfate pulping of kenaf (*Hibiscus cannabinus*). *Tappi J.* **48** (6): 381-384.

Clark, T. F., S. C. Uhr & I. A. Wolff. 1967. A search for new fiber crops, Part X. Effect of plant maturity and location of growth on kenaf composition and pulping characteristics. *Tappi J.* **40** (11): 52A-56A.

Clark, T. F. & I. A. Wolff. 1969. A search for new fiber crops, Part XI. Compositional characteristics of Illinois kenaf at several population densities and maturities. *Tappi J.* **52** (11): 2111-2116.

Clark, T. F. & I. A. Wolff. 1971. A search for new fiber crops, Part XIV. Bond paper containing continuously pulped kenaf. *Tappi* J. **54** (1): 63-65.

Cook, C.G. & A.W.Jr. Scott. 1995. Registration of "SF459" kenaf. *Crop Sci.* **35**: 1712.

Cunningham, R. L., T. F. Clark, W. F. Kwolek, I. A. Wolff & Q. Janes. 1970. A search for new fiber crops, Part XIII. Laboratory-scale pulping studies continued. *Tappi J.* **53** (9): 1697-1700.

Debener, T., C. Bartels & L. Matiesch. 1996. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose varieties and selected wild rose species. *Molecular Breeding* **2**: 321-327.

Degani, C., L.J. Rowland, J.A. Saunders, S.C. Hokanson, E.L. Ogden, A.G. Goldhirsh & G.J. Galletta, 2001. A comparison of genetic relationship measures in strawberry based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. *Euphytica* **117**: 1-12.

Dempsey, J. M. 1975 Kenaf, Roselle. *In*: Fiber Crops. Rose Printing Company, Tallahassee, FL., pp.203-250.

Desmarais, E., I. Lanneluc & J. Lagnel. 1998. Direct amplification of length polymorphisms (DALP), or how to get and characterize new genetic markers in many species. *Nucl. Acids Res.* **26**: 1458-1465.

Fang, D. Q., & M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 408-417.

Fiber Crops Experiment Station, Taiwan, 1970. A review of work carried out at Fiber Crops Experiment Station. Taiwan Agricultural Research Institute, Tainan, Taiwan.Food and Agriculture Organization (FAO), 1998. FAO Production Yearbook Vol.52.

Fujishiro, T. & T. Sasakuma. 1994. Variety identification and molecular characterization of newly bred line by RAPD marker in *Brassica juncea*. *Breeding Science* **44** (Suppl. 1): 132.

Fukuoka, S., T. Inoue & A. Miyao. 1994. Mapping of sequence tagged sited in rice by single strand conformation polymorphism. *DNA Res.* **1**: 271-277.

Ge, S., G.C.X. Olivera & B.A. Schaal. 1999. RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity* **82**: 638-644.

Gebhardt, C., C. Blomendahl & U. Schachtschabel. 1989. Identification of 2n breeding lines and 2n varieties of potato (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*) with RFLP-fingerprints. *Theor. Appl. Genet.* **78**: 16-22.

Goulao, L., L. Cabrita, C.M. Oliveira & J.M. Leitao. 2001. Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple cultivars. *Euphytica* **119**: 259-270.

Graham, J.W. & B.S. Baldwin. 2000. A summary of the effects of plant population and row spacing on biomass yield and bast turnout. Proceedings of the 3rd Annual American Kenaf Society Conference, Feb, 23-25th , Corpus Christi, TX, USA, pp.15-17.

Grodzicker, T., J. Williams, P. Sharp & J. Sambrook. 1975. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **39**: 439-446.

Ha, W.Y., F.C.F. Yau, P.P.H. But, J. Wang & P.C. Shaw. 2001. Direct amplification of length polymorphism analysis differentiates Panax ginseng from P. quinquefolius. *Planta Medica* **67**: 587-589.

Hayagawa, K. 1997. DNA and RNA isolation of tobacco. In: Shimamoto, K. & T. Sasaki (Eds.),

PCR Protocol of Plants (New edition). Shujunsha Co., Ltd., Tokyo.

Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA. PCR Methods and Applications I, 34-38.

Hayashi, K. 1992. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. GATA 9 (3): 73-79.

Hirata, S. 2000. The development of automobile interior materials with utilizing kenaf fibers. International Kenaf Forum, July 25th-26th, Tokyo, pp.56-60.

Hongtrakul, V., G.M. Huestis & S.J. Knapp. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 400-407.

Hooker, J.D. 1875. Flora of British India. Vol. 1. London.

Hosomi, K., Y. Okada, T. Morishita & H. Inagaki. 2000. Utilization of dried kenaf-leaves to the meals. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima, Japan, pp.171-176.

Howard, A. & G.L.C. Howard. 1910. Studies in Indian fibre plants. No. 1. *Hibiscus cannabinus* L. Mem. Dept. Agr. India Bot. Ser. 4.

Howard, A. & G.L.C. Howard. 1911. Studies in Indian fibre plants. No.2. On some new varieties of *Hibiscus cannabinus* L. and Hibiscus sabdariffa L. Mem. Dept. Agr. India Bot. Ser. 4, No.2.

Huylenbroeck, J.M.V., J.D. Riek & M. De Loose. 2000. Genetic relationships among *Hibiscus syriacus*, *Hibiscus sinosyriacus* and *Hibiscus paramutabilis* revealed by AFLP, morphology and ploidy analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47: 335–343.

http://www.ne.jp/asahi/doken/home/charoko/kenaf/whatsnew.htm#anka3.

Incirli, A. & M.S. Akkaya. 2001. Assessment of genetic relationships in durum wheat cultivars using AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **48**: 233-238.

Isshiki, S., T. Uchiyama & Y. Tashiro. 1998. RFLP analysis of PCR amplified region of chloroplast DNA in eggplant and related Solanum species. *Euphytica* **102** (3): 295-299.

Japan Kenaf Association (JKA). 2000. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima, Japan.

Kaldor, A. & D.E. Kissel. 2000. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima, Japan, pp.95-104.

Kano, T. 1997. Development and prospect of kenaf board. Reference No.47 of The Kenaf Society of Kochi & *Economic Reports of Ehime* November 10, **25** (44). (in Japanese)

Kashida, H. 1997. Processing and quality of kenaf boards made from core (1). Proceedings of the 47th Annual Meeting of the Japan Wood Research Society in Kochi, Apr., pp.265. (in Japanese)

Kashida, H. 1998. Processing and quality of kenaf boards made from core (2). Proceedings of the 48th Annual Meeting of the Japan Wood Research Society in Shizuoka, Apr., pp.300. (in Japanese)

Katsumata, M. 2000. Development soil stabilizer by kenaf fibers. International Kenaf Forum, July 25th-26th, Tokyo, pp.72-76.

Kawai, S., K. Ohnishi, Y. Okudaira & M. Zhang. 2000. Manufacture of oriented fiberboard from kenaf bast fibers and its application to the composite panels. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima, Japan, pp.144-148.

Khon Kaen Field Crops Research Center. 1987. A reccommended variety of Kenaf: Khon Kaen 60 by Field Crops Research Institute, Department of Agriculture, Thailand. 1987, pp.19. (in Thai)

Kobayashi, Y. 1991. Kenaf- a useful paper resource for environmental protection. In: Arai. S. (ed), Yuni Press Inc., Tokyo, pp.20-21. (in Japanese)

Lam, T.B.T. & K. Iiyama. 2000. Structural details of keaf cell walls and fixation of carbon dioxide. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima, Japan, pp.81-90.

Lin, J.J., J. Kuo, J. Ma, J.A. Saunders, H.S. Beard, M.H. Macdonald, W. Kenworthy, G. N. Ude & B.F. Matthews. 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Molecular Biology Reporter* **14** (2): 156-169.

Liu, A.M. 2000. World production and potential utilization of jute, kenaf and allied fibers. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Hiroshima, Japan. p.30-35.

Lu, J., M.R. Knox, M.J. Ambrose, J.K.M. Brown & T.H.N. Ellis. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP and PCR based methods. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1103-1111.

Maeda, K. 2000. Kenaf fibers as geotextile material. International Kenaf Forum, July 25th-26th, Tokyo, pp.45-48.

Mahbubur, S.M.R., M. Yamada & M. Yoshida. 1997. Relationship of *Annona* species as revealed by PCR-RFLP analysis. *Breeding Science* **47** (4): 335-339.

Maughan, P.J., M.A. Saghai Maroof, G.R. Buss & G.M. Huestis. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.* **93**: 392–401.

Mazumder, B.B., Z. Cheng, Y. Ohtani, I. Sameshima & K. Sameshima. 2000a. Development of industrial plant resources in the Japanese mountainous villages (4) A practical cultivation

trial of kenaf as a papermaking raw material. *Journal of the Japanese Society of Agricultural Technology Management* 7:(1) 15-20. (In Japanese)

Mazumder, B.B., Y. Ohtani, Z. Cheng & K. Sameshima. 2000b. A combination treatment of kenaf bast fiber for high viscosity pulp. *Journal of Wood Science* **46**: 364-370.

Mei, Z. 1996. Research and development on kenaf as a raw material for papermaking. Proceedings of the 1st symposium on utilization of kenaf and other alternative resources, Dec. Tokyo, pp.13-19. (in Japanese)

Minitab. 1994. Minitab Statistical Software Release 10 for Windows. Minitab Inc.

Miyaji, K. 2000. Cultivation of oriental black mushroom by kenaf. International Kenaf Forum, July 25th-26th, Tokyo, pp.61-62.

Murdock, G.P. 1959. Africa: its peoples and their cultural history. Macmillan, N.Y.

Murray, M. & W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* **8** (19): 4321-4325.

Nelson, G.H., H.J. Nieschlag, M.E. Daxenbichler, I.A. Wolff & R.E.Jr. Perdue. 1961. A search for new fiber crops, Part Ⅲ. Laboratory-scale pulping studies. *Tappi J.* **44** (5): 319-325.

Nelson, G. H., T.F. Clark, I.A. Wolff & Q. Jones. 1966. A search for new fiber crops, Part Ⅸ. Analytical evaluations. *Tappi J.* **49** (1): 40-48.

Nieschlag, H. J., G.H. Nelson, I.A. Wolff & R.E.Jr. Perdue. 1960a. A search for new fiber crops. *Tappi J.* **43** (3): 193-201.

Nieschlag, H. J., F.R. Earle, G.H. Nelson & R.E.Jr. Perdue. 1960b. A search for new fiber crops, Part Ⅱ. Analytical evaluations, continued. *Tappi J.* **43** (12): 993-998.

Nieschlag, H. J., G.H. Nelson & I.A. Wolff. 1961. A search for new fiber crops, Part Ⅳ. Kenaf composition. *Tappi J.* **44** (7): 515-516.

Ohtani, Y., T. Noguchi & K. Sameshima. 1996. Influence of anthraquinone addition method on alkali pulping of kenaf bast. *Sen'i Gakkaishi* **52** (4): 175-179.

Orita, M., H. Iwahana & H. Kanazawa. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 2766-2770.

Paul, S., F.N. Wachira, W. Powell & R. Waugh. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **94**: 255–263.

Pearson, C.H. 2000. Agronomic performance of kenaf in Western Colorado. Proceedings of the 3rd Annual American Kenaf Society Conference, Feb. 23-25th, Corpus Chris ti, TX, USA, pp.137-142.

Perrot-Minnot, M.J., J. Lagnel, E. Desmarais & M. Navajas. 2000. Isolation and characterization

by direct amplification of length polymorphisms (DALP) of codominant genetic markers with Mendelian inheritance in *Neoseiulus californicus* (Acari: Phytoseiidae). *Experimental and Applied Acarology* **24**: 795-803.

Prabhu R.R. & P.M. Gresshoff, 1994. Inheritance of polymorphic markers generated by DNA amplification fingerprinting and their use as genetic markers in soybean. *Plant Mol. Biol.* **26**: 105-116.

Rafalski, J.A., M. Morgante, W. Powell, J.M. Vogel & S.V. Tingey. 1996. Generating and using DNA marker in plants. In: Birren, B., Lai, E. (eds) Analysis of Non-mammalian Genomes: A practical guide, press. Academic Press, Boca Raton, FL.

Rajapakse, S., M. Hubbard & J. Kelly. 1992. Identification of rose cultivars by restriction fragment length polymorphism. *Sci. Hotic.* **52**: 237-245.

Rieseberg, L.H., D.E. Soltis & J.D. Palmer. 1988. A molecular reexamination of introgression between *Hilianthus annuus* and *H. bolanderi* (Composita). *Evolution* **42**: 227-238.

Roxburgh, W. 1795-1819. The plants of the coast of Coromandel. London.

Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0). Exeter Software, Applied Biostatistics Inc. New York.

Royle, J.F. 1855. The fibrous of India. Smith, Elder & Co., Cornhill, England.

Russell, J., J. Fuller, G. Young, B. Thomas, G. Taramino, M. Macaulay, R. Waugh & W. Powell. 1997a. Discrimination between barley genotypes using micro -satellite markers. *Genome* **40**: 442-450.

Russell, J.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell & R. Waugh. 1997b. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 714-722.

Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a Laboratory Manual. (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sameshima, K., T. Atsushi & Y. Ohtani. 2000. Improvement of kenaf core oil absorpotion property by heat treatment at 200-500°C. Proceedings of 3nd Annual American Kenaf Society Conference, Feb. 23-25th, Corpus Christi, TX, February, pp.64-72.

Sarma, M.S. 1967. Breeding procedures for *Hibiscus*. ICAR (New Delhi), Tech. Bull. (Agr.), **11**: 1-50.

Scott, Jr.A.W., C. G. Cook & C.S. Taylor. 2000. The effects of harvest timing on kenaf and sunn hemp – two year study. Proceedings of the 3rd Annual American Kenaf Society Conference, Feb, 23-25th, Corpus Christi, TX, USA, pp.30-37.

Sellers, T. & N.A. Reichert. 1999. Kenaf properties, processing and products. Mississippi State University, MS.

Siepe, T., D. Ventrella & E. Lapenta, 1997. Evaluation of genetic variability in a collection of Hibiscus cannabinus (L.) and Hibiscus spp (L.). *Ind. Crop Prod.* **6**: 343-352.

Sij, J.W., J. Campbell & C. Cook. 2000. Areas for growing kenaf in Texas. Proceedings of the 3rd Annual American Kenaf Society Conference, Feb. 23-25th, Corpus Christi, TX, USA, pp.54-58.

Song, Q.J., C.V. Quigley, R.L. Nelson, T.E. Carter, H.R. Boerma, J.L. Strachan & P.B. Cregan. 1999. A selected set of trinucleotide simple sequence repeat markers for soybean culitvar identification. *Plant Varieties and Seeds* **12** (3): 207-220.

Takeuchi, A. 1994. Identification of close related varieties in Niigata Pref. based on DNA markers. *Breeding Science* **44** (Suppl. 1): 129. (in Japanese)

Tomkins, J.P., T.C. Wood, L.S. Barnes, A. Westman & R.A. Wing. 2001. Evaluation of genetic variation in the daylily (*Hemerocallis* spp.) using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **102**: 489-496.

Torres, A.M. 1993. Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. *HortScience* **28** (4): 333-334.

Trotter, W. K. 1962. A search for new fiber crops, Part Ⅶ. An economic assessment. *Tappi J.* **45** (12): 915-919.

Tsumura, Y., K. Ohba & S.H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*).*Theor. Appl. Genet.* **92**: 40-45.

Vogel, J.M., A. Rafalski, W. Powell, M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey & S.V. Tingey. 1996. Application of genetic diagnostics to plant genome analysis and plant breeding. *HortScience* **31** (7): 1107-1108.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Fijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* **23**: 4407-4414.

Wang, G., R. Mahalingam & H.T. Knap. 1998. (C-A) and (G-A) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphisms in soybean, *Glycine max* (L.) Merr.). *Theor. Appl. Genet.* **96**: 1086-1096.

Weising, K., H. Nybom, K. Wolff & W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Inc., Boca Raton.

Welsh, J. & M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl Acids Res 18: 7213-7218.

White, G.A. 1969. A search for new fiber crops, Part XII. Field yields of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Tappi J.* **52** (4): 656-659.

Williams, J.G.K., A.K. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski & S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res.* **18**: 6531-6535.

Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, J.A. Rafalski et al. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Neth. Enzymol.* **218**: 704-740.

Wilson, F.D. & M.Y. Menzel. 1964. Kenaf (*Hibiscus cannabinus*), Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Econ. Bot.* **18**: 80-91.

Wilson, F.D. 1978. Wild kenaf, *Hibiscua cannabinus* L. (*Malvaceae*), and related species in Kenya and Tanzania. *Econ. Bot.* **32**: 199-204.

Yang, Q., Y. Ohtani & K. Sameshima. 1999. Kenaf bast fiber refinement for nonwoven fabrics. Abstracts of the 11th Annual Meeting Chugoku Shikoku Branch of the Japan Wood Research Society, Sep., Matsue, pp.58-59.

Yang, X. & C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* **86**: 205-212.

Yimarattanabovorn, J., K. Iwasaki, Z. Cheng, Y. Ohtani & K. Sameshima. 2000. A combination system in advanced wastewater treatment consist of charcoal, Kanuma soil and kenaf. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima, Japan, pp.160-164.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski & D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176-183.

致　谢

衷心感谢陈家宽教授对我在研究上的指导以及生活上的关心。记得两年前的夏天，我回国第一次遇见陈家宽教授，当时的情景至今历历在目。两年来，陈家宽教授为我提供了宽松的研究环境，使我学到了很多东西，开阔了研究思路，让我受益终生。

感谢我的博士导师，日本高知大学农学部的鲛岛一彦教授，在我回国后对我一如既往的关心和支持。

感谢卢宝荣教授在我研究遇到困难时给予的帮助和鼓励，感谢钟杨和李博教授对我的关心和支持，三位教授的言行让我受益匪浅。感谢李林初教授连续两年给我的基金申请书提出了非常宝贵的意见。感谢张文驹副教授能经常跟我探讨实验上的具体操作细节，使实验得以顺利完成。

感谢研究所的所有老师和同学对我的关心和帮助。尤其是蒋如敏老师和经佐琴老师在工作和生活上的无私帮助。张陆、王琼和田春杰等同学在实验及野外采样调查工作中的合作。

感谢生命科学学院博士后流动站各位专家给予我的支持和鼓励。感谢博士后工作办公室顾美娟老师对我的关心和帮助。

感谢美国密西西比州立大学 B. S. Baldwin 博士和日本农林水产省农业研究中心为本研究提供部分红麻种质资源。

最后，我要感谢我的家人，特别是我的母亲两年来对我生活上的照顾，使我能安心完成研究工作。

本研究得到日本学术振兴会外国人特别研究员奖励基金（No.P98475）、教育部高等学校重点实验室访问学者基金、中国博士后科学基金、留学回国人员科研启动基金的资助。

博士后期间发表论文

1. 程舟, 鲛岛一彦, 陈家宽. 2001. 日本的红麻研究、加工和利用. 中国麻业 **23** (3): 16-24.
2. 程舟, 鲛岛一彦, 陈家宽. 2002. 红麻种质资源遗传变异和亲缘关系的 RAPD 分析. 中国麻业 **24** (1): 1-12.
3. Jareeya,Y., K. Iwasaki, **Z. Cheng**, S. Fujiwara, Y. Ohtani & K. Sameshima. 2002. Development of a tertiary treatment system for domestic wasterwater (1) A combination system composed of charcoal, kanuma soil and kenaf. *Environ. Sci.* **15** (1): 49-57.
4. **Cheng, Z.**, B.R. Lu, K. Sameshima & J.K. Chen. 2002. Comparative studies of genetic diversity in kenaf varieties based on analysis of agronomic and RAPD data. *Hereditas* ,**136**: - Accepted.（SCI 刊物）
5. **Cheng, Z.**, B.R. Lu, K. Sameshima & J.K. Chen. Identification and genetic relationships of kenaf germplasm revealed by AFLP analysis Genetic diversity in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) germplasm revealed by AFLP fingerprinting. *Genetic Resources and Crop Evolution*, Accepted.（SCI 刊物）

近年刊物发表的论文

1. **Cheng, Z.**, Z.-G. Li, Y. Ohtani, K. Sameshima & Z. Mei. 1995. On agronomic foundation of kenaf for papermaking. *Acta Agriculturae Zhejiangensis* 7 (1), 38-41.
2. **Cheng, Z.**, Z.-G. Li, Y. Ohtani, K. Sameshima & Z. Mei. 1995.On fiber length and its distribution of kenaf. *Acta Agriculturae Zhejiangensis* 7 (4), 293-296.
3. **Cheng, Z.**, Y. Ohtani, K. Sameshima & Z. Mei. 1997. Selection of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) varieties for papermaking on arid hillside land in China. *Mokuzai Gakkaishi* **43** (9): 770-777. (SCI 刊物)
4. **Cheng, Z.**, Y. Obtani, K. Sameshima & Z. Mei. 1998. Selection of plant population of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) as a papermaking raw material on arid hillside land in China. *Journal of Wood Science* **44** (4): 296-302. (SCI 刊物)
5. 谭石林, 李爱青, 梅桢, 程舟, 邝仕均等. 1998. 红麻品种的筛选, I. 产量及主要性状的评价. 中国麻作 **20** (4): 25-28.
6. 谭石林, 李爱青, 邝仕均, 梅桢和程舟等. 1999. 红麻品种的筛选, II. 红麻品种纤维形态结构与化学成分的比较研究. 中国麻作 **21** (1): 13-16.
7. **Cheng, Z.**, S. Fujiwara, Y. Obtani & K. Sameshima. New method of sample preparation for kenaf bast fiber length analysis with automated fiber length analyzer. *Holzforschung* **54** (2): 213-218. (SCI 刊物)
8. Mazumder, B.B., Y.Ohtani, **Z. Cheng** & K. Sameshima. 2000. A combination treatment of kenaf bast fiber for high viscosity pulp. *Journal of Wood Science* **46**: 364-370. (SCI 刊物)
9. **Cheng, Z.** 2000. Sudies on production management indicators of kenaf (*Hibiscus canabinus* L.) whole stalk for papermaking. *The Bulletin of the Kochi University Forests* **26**: 63-136.
10. Mazumder B. B., **Z. Cheng,** Y. Ohtani, I. Sameshima & K. Sameshima. Development of industrial plant resources in the Japanese mountainous villages (4) A practical cultivation trial of kenaf as a papermaking raw material. *Journal of the Japanese Society of Agricultural Technology Management* 7 (1): 19-25. (in Japanese)

近年学术会议发表论文

1. 程舟. 1996. 中国における製紙用ケナフの品種および栽培に関する研究. 平成8年度環境　バイオ技術セミナー　「環境　資源問題にかかわる新しい紙パルプ産業技術の視点」, 10月, 愛媛.
2. 程舟, 大谷慶人, 鮫島一彦, 梅禎. 1996. 中国乾燥傾斜地における製紙用ケナフ品種の選択. 第46回日本木材学会大会, 4月, 熊本, 和第1回ケナフ等植物資源利用研究会, 9月, 東京.
3. 程舟, 大谷慶人, 鮫島一彦, 梅禎. 1997. 中国乾燥傾斜地におけるケナフ栽培 (3) 製紙用ケナフの植栽密度の選択. 第2回ケナフ等植物資源利用研究会, 12月, 東京.
4. 程舟, 藤原新二, 大谷慶人, 鮫島一彦. 1998. ケナフの靭皮繊維長測定における新しいサンプル調製法. 平成10年度繊維学会年次大会, 6月, 東京, pp.G-98.
5. 鮫島一彦, 程舟, Mazumder B.B., 馮宇, 大谷慶人. 1998. 中山間地域におけるケナフ栽培の実証試験. 平成10年度繊維学会年次大会, 6月, 東京, pp.P-9.
6. Mazumder, B.B, 程舟, 大谷慶人, 鮫島一彦. 1998. ケナフ靭皮繊維からの高粘度溶解用パルプの調製法. 第43回リグニン討論会, 10月, 東京, pp.9-12. (ISTP 收录)
7. Mazumder, B.B, 程舟, 大谷慶人, 鮫島一彦. 1998. ケナフ靭皮繊維原料の常圧蒸解に関する研究. 第3回ケナフ等植物資源利用研究会, 12月, 東京.
8. Sameshima, K., **Z. Cheng**, B.B. Mazumder, I. Sameshima & Y. Ohtani. 1999. Development of kenaf activities in Kochi, Japan. Proceedings of the 2nd Annual American Kenaf Society Conference, Feb. 25-26, San Antonio, TX, USA, pp.72-84.
9. 鮫島一彦, 宮南量, B.B. Mazumder, 鮫島沙子, 大谷慶人, 程舟. アグロフォーレストリー資源作物としてのケナフの多用途開発 (2)　ナフサイレージにおける未知酸性物質について（その2）. 第49回日本木材学会大会, 4月, 東京, pp.492.
10. Mazumder, B.B, Y. Ohtani, **Z. Cheng** & K. Sameshima. 1999. A new method for high viscosity pulp from kenaf bast fiber. 10th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, June 7-10, Yokohama, Japan, Vol.III, pp.310-315.
11. Jareeya Y., **Z. Cheng**, Y. Ohtani & K. Sameshima.1999. Trial of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) use as a bio-geofilter in a rural sewage treatment system. 11th Annual Meeting Chugoku Shikoku Branch of the Japan Wood Research Society, September, Matsue, Japan, pp.60-61.
12. 宮南量, 程舟, 鮫島沙子, 大谷慶人, 鮫島一彦. 1999. ケナフ葉部の有効利用に関する研究. 第4回ケナフ等植物資源利用研究会, 12月, 東京, pp.7-1—7-2.
13. **Cheng, Z.**, Y. Ohtani & K. Sameshima. 2000. Analysis of DNA polymorphisms among kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) varieties by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Proceedings of the 3rd Annual American Kenaf Society Conference, Feb. 23-25, Corpus

Christi, TX, USA, pp.142-154.

14. 程舟, 宮南量, 大谷慶人, 鮫島一彦. 2000. RAPD マーカーによるケナフ品種の同定法に関する研究. 第 50 回日本木材学会大会, 4 月, 京都.

15. Jareeya Y., K. Iwasaki, **Z. Cheng**, Y. Ohtani & K. Sameshima.2000. Use of local resources in advanced domestic wasterwater treatment system. Proceedings of the 23th Annual Japan Enverimernt Society Conference, Sep. 19-21, Tsukuba, Japan, pp.14-15.

16. **Cheng, Z.**, Jareeya Y., Y. Ohtani & K. Sameshima. Fundamental studies for kenaf seed production in Japan. 2000. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima, Japan, pp.45-50.

17. Jareeya Y., K. Iwasaki, **Z. Cheng**, Y. Ohtani & K. Sameshima. 2000. A combination system consisted of charcoal, Kanuma soil and kenaf. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Oct. 13-14th, Hiroshima, Japan, pp.160-164.

18. Jareeya Y., K. Iwasaki, Z. **Cheng** & K. Sameshima. 2001. Utilization of kenaf and charcoal in a tertiary treatment system for domestic wastewater. Proceeding of the 4th Annual Conference of the American Kenaf Society, November 15-17th, Atlanta, Georgia, USA.

19. 金磯牧夫, 藤原新二, 鮫島一彦, 程舟. 2002. ケナフ靭皮繊維束の層状分離と繊維長測定. 台 4 回日本木材学会中国　四国支部研究発表会, 9 月, 高知, pp.58-59.

个 人 简 历

姓　　名：程 舟	性　　别：男	民　　族：汉 族
出生年月：1967 年 1 月	籍　　贯：浙江省嘉善县	
专　　业：植物学	研究方向：资源植物学	联系导师：陈家宽教授

联系电话：13311901366

电子邮件：chengzhou18@21cn.com; chengzhou18@hotmail.com

通讯地址：200436 上海市宝山区锦秋路 699 弄 锦秋花园 7 区 1508 号

个 人 经 历

时　　间	所 在 单 位	工作/学习
2001 年 01 月-2002 年 11 月	复旦大学生命科学学院	博士后
1998 年 10 月-2001 年 01 月	日本高知大学农学部	博士后
1995 年 10 月-1998 年 09 月	日本爱媛大学大学院	博　士
1993 年 08 月-1995 年 09 月	浙江省农业科学院作物研究所	助理研究员
1987 年 08 月-1993 年 07 月	浙江省农业科学院作物研究所	实习研究员
1983 年 09 月-1987 年 07 月	浙江农业大学农学系	学　士