

独创性声明

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

学位（毕业）论文作者亲笔签名：孙志强 日期：2005.5.31

论文使用授权的说明

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

保密，在 年后解密可适用本授权书。 ☐

不保密，本论文属于不保密。 ☒

学位（毕业）论文作者亲笔签名：孙志强 日期：2005.5.31

指导教师亲笔签名：祁建民 日期：2005.5.31

中文摘要

本研究以从国外引进及国内科研部门近年育成的红麻品种材料共 32 份, 其中野生种 9 份, 分别来自乌干达、加纳、印度尼西亚、肯尼亚、萨尔瓦尔、津巴布韦、尼日利亚、苏丹、赞比亚; 从国外引进栽培种 10 份, 分别来自古巴、美国、前苏联、法国、波兰、澳大利亚、埃及、南非、菲律宾、巴基斯坦; 由国内育成的品种 13 份, 分别来自中国麻类所、福建农林大学、福建农科院等单位。为进一步研究这批红麻种质的遗传多样性和亲缘关系, 2004 年我们采用 ISSR 分子标记技术对上述 32 份红麻核心种质的遗传基础进行了分析, 从 70 个 ISSR 引物中, 筛选出多态性好的引物 13 个, 对供试 32 份材料进行 PCR 扩增, 按 Nei-li 的方法计算其遗传相似系数, 将供试材料基因组进行分子聚类分析。结果表明:

1. 从 32 份红麻核心材料 ISSR 数据构建的树状分子聚类图可知, 在切割线 L_1 取值为 0.68 时可将供试材料分为 1 个由 28 份品种材料构成的大类群, 以及 1 个由 SL254、ZM412 和 NA414 三个野生种构成的亚类群, 1 个由 85-244 单一野生种构成的个类。说明这四个野生种的遗传基础明显有别于其他供试材料, 其中 SL254、ZM412 和 NA414 分别是引自萨尔瓦尔 (拉美)、津巴布韦 (非洲)、尼日利亚 (非洲) 的红麻野生种, 它们聚为一类, 说明该三个野生种类型基因型较相似, 三者间有较近的亲缘关系。同时这三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。而野生种 85-244 是一份在肯尼亚 (非洲) 搜集到的野生品种, 与第 I 大类群 28 份品种和第 II 亚类群 3 个品种的基因型有较大的遗传差异。

2. 当切割线 L_2 取值为 0.72 时可将第 1 个大类群 (包括栽培种及进化较为现代的半野生类型) 重新划分为 3 个亚类和 1 个独立的个类。第 I_1 亚类群由国外引进栽培种、半野生种和福红、闽红系列等国内培育品种共 22 份材料组成 (可再细分为六组); 第 I_2 亚类群由我国 “十五” 期间新育成的 3 个品种 (国家区试 R5、R6、R8) 组成, 与国外品种有较近的血缘关系。第 I_3 亚类群由阿联红麻、IDN147 两个品种组成。第 I_4 亚类群 85—132 (苏丹) 是仅有一个半野生类型的单独的个类, 表明其与其它 27 个品种亲缘关系相对较远, 基因型差异相对较大。

3.本研究揭示了多数供试材料之间的基因型遗传差异较小。可见我国红麻品种的遗传基础相对狭窄,还应进一步通过种质创新,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,能比较快地选育出遗传基础不同的有利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。

4. 由植物地理学和魏格纳大陆板块漂移学说,我们推测非洲东部为红麻的世界起源中心,沿以下的 3 条可能路线逐步扩散传播到了南北半球:(1) 非洲东部——北非西亚——南美洲北部及加勒比岛域;(2) 非洲东部——东南亚及印度支那;(3) 非洲东部——非洲南部——澳大利亚。从本实验 9 份红麻野生种的 ISSR 分析聚类来看,比较独立的 4 份红麻野生种应该更为原始:3 个来自非洲,1 个来自南美洲,其他 UG93、GA42、IDN147、85-132 和 ZB324 共 5 份野生种类型应定性为半野生类型,因为它们与栽培品种亲缘关系较近。地方栽培种的数量及古代农业也是研究起源的重要参考依据,可能为驯化培育的初级扩散地。这也间接印证了上面提出起源与扩散路线。

关键词:红麻, 种质资源, ISSR, 遗传多样性, 聚类分析

Abstract

In order to provide new evidence for the study of *H. cannabinus* genetic diversity and genetic relationships among 32 accessions of kenaf, including 4 wild species, 5 semi-wild species, 10 cultivating-varieties of kenaf introduced overseas, 13 internal cultivating-varieties of kenaf, collected from Cuba, America, former Soviet Union, France, Poland, Canada, Australia, Egypt, South Africa, Philippines, Pakistan, Uganda, Ghana, Indonesia, Kenya, Salvador, Nigeria, Sudan, Zambia and selected by breeding institutes of our country during the period of "tenth five-year plan", were investigated with the technique of ISSR analysis. These DNAs were amplified with 13 ISSR primers selected from 70 primers. The 32 kenaf varieties were clustered into different groups according to the similarity coefficient (Nei-li), which represented the genetic relationship of different varieties. Major results are as follows:

1. From the UPGMA cluster based on the genetic similarity (GS), at the level of 0.68, 32 kenaf varieties were clustered into one major group (including 28 varieties), one inferior group which had three varieties: SL254, ZM412 and NA414, and one single-variety group which had only 85-244. The latter 4 wild-varieties are quite different from others. SL254 was selected from Salvador, ZM412 was from Zambia and NA414 was from Nigeria. The 3 types were clustered together, which means that they may have closer relationship; but these 3 types are further from other types, which means they have only a little similar character with others. The 85-244 was a wild specie selected from Kenya, it has quite further relationship from the 1st major group and from the 2nd inferior group.

2. Based on the genetic similarity (GS) at the level of 0.73, the 1st major group (including 28 varieties) could be clustered into three inferior groups (I₁, I₃, I₄) and one single-variety groups (I₂). The I₁ inferior group includes 22 varieties (cultivating-varieties, semi-wild species, internal cultivating-varieties — Fu Hong series and Min Hong series et al) which could be classed into 6 part. The I₂ inferior group includes Chinese Region Trial varieties (R5, R6, R8), which have closer relationships with varieties overseas. The I₃ inferior group includes 2 varieties — Ah Lian kenaf and IDN147. The I₄ inferior group is a

single-variety group (85-132). It is a semi-wild specie selected from Sudan. And it may have further relationship or larger-scale genetic difference from the other 27 varieties.

3. The result indicated the four 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.

4. Due to the plant geography and the Theory of Continental Drift of AL Wegener , and connected with the result of our ISSR molecular marker , we conjecture that the kenaf (*H. cannabinus* L.)'s origin region in the world is the east of Africa .And then it is spread into the total globe along the following 3 lines .

I : East Africa — North Africa and West Asia — Latin America

II : East Africa — South Africa — Australia

III: East Africa — Southeast Asia and Indo-China

From the diagram of cluster of 9 wild-varieties kenaf in our experiment, we deduce the 4 wild-varieties (SL254, Zm412, NA414, 85-244)are more primeval, 3varieties from Africa and 1 variety from South America. In the same time other 5 “wild-species”(UG93, GA42, IDN147, 85-132, ZB324) should be semi-wild species, because they have closer relationships with cultivating-varieties. The amount of regional varieties and distribution of antique agriculture is also the major reference to the studying of the origin. It may be the primary spreading area for domesticating and breeding. This also indirectly confirms the above-mentioned route of kenaf's origin and spreading.

Key words: kenaf; germplasm ; ISSR; genetic diversity ; cluster analysis

目 录

独创性声明和论文使用授权的说明	
中文摘要	
英文摘要	
1 前言	
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	
2.1.2 红麻综合利用的重要性	
2.2 红麻种质资源重要性及其研究进展	
2.2.1 红麻种质资源的形态与细胞学分类研究	
2.2.2 红麻种质资源性状鉴定与评价研究	
2.2.3 红麻特异种质的鉴定、发掘、创新与利用研究	
2.2.4 红麻种质资源的分子标记及亲缘关系研究	
2.2.5 红麻特异种质创新与抗虫、抗除草剂转基因研究	
2.2.6 红麻种质遗传改良优异材料的创新	
2.2.7 国外红麻种质资源研究进展	
2.3 分子标记技术及其发展	
2.3.1 RFLP	
2.3.1 AFLP	
2.3.1 RAPD	
2.3.1 SSR	
2.3.1 ISSR	
2.3.1 SRAP	
3 材料与方法	
3.1 材料	
3.1.1 植物材料	
3.1.2 ISSR 引物	
3.2 方法	
3.2.1 ISSR 分子标记的材料与实验方法	
3.2.2 红麻基因组 DNA 的提取	
3.2.3 ISSR 反应体系的建立	
3.2.4 ISSR 反应程序	
3.2.5 电泳检测	
3.2.6 数据处理与统计分析	
4 结果与分析	
4.1 ISSR 引物筛选	
4.2 红麻品种 ISSR 标记聚类分析	
4.2.1 第 I 大类群的品种组成及遗传多样性与亲缘关系分析	
4.2.2 第 II 类群的品种组成及遗传多样性与亲缘关系分析	
4.2.3 第 III 个类的品种组成及遗传多样性与亲缘关系分析	
4.3 红麻起源的探讨	
4.4 红麻的演化	

□5 小结与讨论

□5.1 ISSR 分子标记在红麻种质资源遗传多态性研究中的可行性

□5.2 不同引物序列对 ISSR 分子标记的影响

□5.3 红麻 DNA 提取质量对 ISSR 的影响

□5.4 红麻核心种质遗传多样性与亲缘关系

□参考文献

□附录

□致谢

1 前言

植物种质资源是人类赖以生存和发展的宝贵资源,其遗传多样性是作物遗传改良、生物技术育种的重要物质基础。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。

麻类是我国重要的天然纤维作物。中国是一个古老的农业大国,麻类种质资源丰富。但是,麻类种质创新和有利基因的利用等基础研究与其他主要农作物比较,还存在较大的差距。

红麻是 20 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。最高年份(1985 年)其种植面积近 100 万公顷,产量 412 万吨。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。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)。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不够。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,给作物遗传育种研究和分子辅助育种带来了巨大变化,分子标记技术的应用是其中最显著的变化之一。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,目前对我国保存的或新育成的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)。本研究对外国引进及我国近年选育的共 32 个品种采用 ISSR 技术对其进行了 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，品种鉴定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., kenaf) 是锦葵科木槿属一年生韧皮纤维作物，据专家推断原产于公元前 4000 年的非洲。传统上，红麻纤维主要作为加工麻绳、麻袋、地毯等的原料 (李宗道, 1980)，是麻纺和造纸工业的重要原料。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，1928 年从原苏联引进“塔什干”品种试种成功，迄今有近 100 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)。

红麻的主要优点是一年生，生长周期短，植株高大粗壮，干物质积累快，单位面积的生物学产量大(为树木的 3-4 倍)；耐环境胁迫能力强，如抗旱、耐盐碱、耐瘠、耐涝和耐淹性比大多数作物强，广适应性，对土壤和气候的要求不严格，种植区域极广；生产投入少，成本较低，栽培管理要求不严，病虫害轻，农药、化肥和除草剂使用少；纤维品质好、纤维强力高，种子富含亚油酸、是医疗保健品生产的难得的生物资源，花可制保健饮品，全株根、茎、叶、花、果均可利用。产品少污染，容易生物降解，植株群体吸收 CO₂ 能力强(为森林的 4-5 倍)，有极好的环保效应，被誉为“环境的朋友”。

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危机之一。近年来，我国和美国、日本、欧盟诸国等对红麻表现出浓厚的兴趣，把红麻列为 21 世纪“未来派”的优势作物。许多政府机构、非政府组织、企业及民间团体纷纷投入到红麻的研究和开发行列中。目前，红麻除传统的纺织用外，还可用于造纸、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、食用和工艺品等,红麻产业呈现勃勃生机,前景十分光明。

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

国内红麻的传统生产由于受到廉价聚乙烯等化纤产品及集装箱和散装化运输发展的冲击,其市场严重萎缩。随着人类返朴归真意识的增强,对天然纤维的需求也日益增多,而红麻综合利用和多用途开发也已全面展开。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,它与棉花等其它纤维混纺成高档纺织品是其崭新的利用途径之一。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)。加入WTO以后,我国具有比较优势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、河南省豫北纺织有限责任公司分别成功研制开发了黄红麻与棉纤维混纺技术及相关产品。浙江萧山开辟了一个新的麻产品深加工途径,开发了以红麻纤维为原料生产高档装饰墙布并取得显著的经济效益,。

2.1.2.2 红麻全杆抄制纸浆的研发

早在50年代美国农业部某研究院就从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。20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、甘肃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 30%, 粗脂肪 9.3%, 粗纤维 20%, 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 25%, 亚油酸含量 50% 以上, 亚麻酸含量略少。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, 将红麻原茎经多层层压加

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,是我国农业得以可持续发展的基础性研究工作。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)。

我国十分重视麻类种质资源工作,从“六·五”到“十·五”都把麻类种质资源研究列入国家科技攻关项目,保证了麻类资源的连续性和系统性(栗建光等,2003)。红麻是 20 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,当时仅限于搜集、保存和进行简单的性状鉴定等研究工作。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(IIO)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)。目前,我国收集的红麻种质资源有 1800 多份,是目前世界上保存红麻种质资源最多的国家,有条件进行系统深入的研究;这批遗传资源主要由地方品种、育成品种、国外引进品种、野生种、野生近缘种、育种中间材料和创新材料组成(栗建光等,2004)。

中国农科院麻类所等完成了 667 份红麻种质资源的全面鉴定,并整理编入《中国

主要麻类作物品种资源目录》(第一、二、三册)(见表 1)。

表 1 中国红麻种质资源统计

Table 2 The accessions hoding of kenaf germplasm in China

国内资源份数		国外资源份数					
省(自治区)	份数	国家	份数	国家	份数	国家	份数
湖南	88	美 国	74	南 非	14	孟加拉	3
福建	44	巴基斯坦	56	古 巴	10	泰 国	3
广东	27	法 国	42	尼日利亚	9	印度尼西亚	2
浙江	26	赞比亚	39	苏 丹	8	越 南	2
辽宁	14	澳大利亚	28	伊 朗	6	菲律宾	1
台湾	10	危地马拉	26	津巴布韦	5	哥斯达黎加	1
广西	6	坦桑尼亚	22	苏 联	5	韩 国	1
云南	5	尼泊尔	21	埃 及	4	马 里	1
贵州	2	萨尔瓦多	18	波 兰	4	乌干达	1
北京	1	印 度	18	墨西哥	4	象牙海岸	1
山东	1	肯尼亚	15	加 纳	3		
合计	220	合计					447

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)。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,其叶、茎、花、果、种子等都展现出多种多样的形态。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(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。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的生物技术应用、种质纯度鉴定有一定意义。

2.2.2 红麻种质资源性状鉴定与评价研究

形态学分类方法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,需对其生育特性、产量和品质性状的遗传多样性做进一步研究。黄培坤等(1989)对从美国引进的 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。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 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。栗建光等(1992)对 67 份红麻种质资源的生育特性、经济性状和纤维品质进行了研究,鉴定出一批对红麻遗传育种有利用价值的特异种质资源,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。通过研究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(栗建光等,1995)。中国农科院麻类所从 22 份材料中选出了 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)。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)。湖北农学院周瑞阳利用卫星宇航育种, 发现了长花柱红麻突变体, 异交率可达 80% 左右, 并首次育成了红麻不育系, 为红麻杂种优势利用奠定了良好的基础。

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差异的程度, 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, 可为红麻育种亲本选配提供切实有用的科学依据。目前, 利用 ISSR 技术对红麻种质资源进行遗传多样性及亲缘关系的研究刚刚起步。

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成果。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 2001 年通过花粉管法将外源抗虫、抗除草剂基因质粒导入红麻推广品种中,目前已于田间筛选出表现高抗的植株,经 PCR 扩增已检测到目的基因。

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—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 20 世纪中叶。美国的红麻种质资源研究始于 20 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 20 世纪 60 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)。但国内外用分子标记技术研究红麻种质资源的相关报道尚且不多。

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的能力。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。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。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) 和带型的变化。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。

常用的分子标记有 RFLP, AFLP, RAPD, SSR, ISSR, SNP, SRAP 等。

2.3.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP (核酸限制性片段长度多态性分析) 是 80 年代中期发展起来的一种最早的

分子标记。1980年 Bostein 首先提出了利用 RFLP 作为标记构建遗传图谱,直到 1987 年 Donis Keller 等人才构建出第一张人的 RFLP 图谱。RFLP 是由于 DNA 分子中限制性内切酶酶切识别序列中出现碱基的插入、缺失、置换、倒位而导致酶切位点的增减所引起的基因型间限制性片段长度的差异。它的基本原理是:不同材料的 DNA 用已知的限制性内切酶消化后,产生许多大小不等的 DNA 片段,电泳分离、Southern 印迹转移到硝酸纤维膜上,用放射性标记的探针与膜上变性的酶切的 DNA 进行杂交,放射自显影,即可显示出不同材料的多态性图谱,即显示出所分析的 DNA 序列间的 RFLP。目前,有 2 种方法可进行 DNA 的 RFLP 分析。一是上述原理所述,其中用作 RFLP 的探针可以是特殊基因的 DNA 克隆、cDNA 克隆、随机的基因组 DNA 克隆和合成的低聚核苷酸克隆。二是对那些分子量较小的 DNA 样本(如线粒体 DNA、核糖体 DNA 等),可在酶切后对其产物直接电泳,将不同大小的限制性酶切 DNA 片段分离,从而得到该 DNA 的 RFLP 图谱。

RFLP 标记呈孟德尔式遗传,大多数 RFLP 的等位基因为共显性,在任何分离群体中能区分纯合基因型与杂合基因型。目前在水稻、小麦、大麦、大豆、番茄等作物上的研究都已有报道。标记的数目多且稳定,可用于构建高密度的遗传图谱。但该技术 在操作过程中涉及了 DNA 的提取、酶切、电泳分离、探针的制备和 southern 杂交等一系列分子生物学技术,步骤繁杂,工作量大,且分析中需要的 DNA 量大(2~10 μg),因此在很大程度上限制了 RFLP 技术的应用。

2.3.2 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。

2.3.3 RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA)

RAPD (随机引物扩增多态性 DNA) 是 1990 年由 Williams 和 Welsh 领导的 2 个研究小组几乎同时发展起来的建立在 PCR 基础上的一种新型的 DNA 分子标记技术。它的基本原理是: 采用随机合成的寡核苷酸(通常 10bp)作 PCR 反应的引物, 对所研究生物基因组 DNA 进行 PCR 扩增。一般说某一引物在真核基因组中可能有很多的结合位点, 但只有在 4000bp 之内, 存在反向平行的与该引物互补的双链 DNA, 才能将合成的新链作下一次合成的模板, 经 35—40 个循环, 即可得到大量的 DNA 片段, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳、EB 染色, 紫外下显示 RAPD 带纹。

RAPD 技术具有其自身独特的优点: ①不需要 DNA 探针; ②使用随机引物, 合成引物时无需预知被研究的生物的基因组序列, 一套引物可用于不同生物的研究, ③RAPD 技术操作简便、快速, 可免去 RFLP 中的克隆制备、同位素标记、Southern 杂交等步骤; ④RAPD 分析所得 DNA 量少, 每个反应仅需几十纳克的 DNA, 仅为 RFLP 的 $1/1000 \sim 1/200$, 这对生物早期取样鉴定或在 DNA 样本受限制的情况下大有益处。但 RAPD 技术也有自身的局限性, 主要表现在两个方面。第一, RAPD 标记为显性分子标记, 因此不能在 F_2 代区分纯合体与杂合体, 必须进行 F_3 分析, 第二, RAPD 扩增中退火温度较常规的 PCR 反应低, 一般为 37°C 左右, 这样能保证短核苷酸引物与模板的稳定配对并允许适当的错配, 增大了引物在基因组 DNA 中配对的随机性, 提高了对基因组的分析效率, 但是由于采用的引物短, T_m 值低, 扩增结果易受外界因素的影响, 实验的重复性较差, 因此在实验中要严格控制实验条件, 对其反应条件和影响因素进行筛选、建立优化反应体系, 才能得到可重复、理想的扩增效果。

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、品种和种质纯度鉴定、起源演化研究、基因定位及分子遗传图谱构建等各个方面。目前在小麦 (NGUYEN et al, 1992)、玉米 (吴敏生等, 1999)、水稻 (钱

韦等, 2000)、棉花(武耀廷等, 2001)、黄麻(周东新等, 2001)、红麻(程舟等, 2003)等作物上的研究已均有报道。

2.3.4 SSR (Simple Sequence Repeat)

在真核生物基因组中, 散在分布着由 1—4 个碱基对组成的简单重复序列, 即 SSR, 如 $(GAA)_n$ 、 $(GA)_n$ 、 $(AC)_n$ 等; 它又称为微卫星 DNA(Microsatellite DNA)、短序列串联重复。SSR 序列的侧翼具有保守的 DNA 序列, 由于重复基数的数目变化大, 因此 SSR 显示出较强的多态性。人们把以微卫星 DNA 标记建立的遗传连锁图称为继 RFLP 作图后的第二代遗传连锁图。它有高度的个体差异, 且按孟德尔方式稳定遗传, 在法医鉴定方面作出了贡献。该技术一般检测到的是一个单一的多等位基因位点, 此标记为共显性, 所得的结果重复性高。为了提高分辨率, 常使用变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 它可检测出单拷贝差异。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 (Gegan et al, 1994), 可见其多态性信息含量是较高的。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。

2.3.5 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。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。研究表明, ISSR 对 PCR 反应的敏感性低于 RAPD, 稳定性优于 RAPD; 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; 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。

2.3.6 SRAP (Sequence-related amplified polymorphism)

SRAP (相关序列扩增多态性) 是一种新型的基于 PCR 的标记系统,是由美国加州大学蔬菜系 Li 与 Quiros(2001)博士在芸薹属作物中开发出来。该标记通过独特的双引物设计对基因的 ORFs 的特定区域进行扩增,目前已被成功的应用于作物遗传多样性分析 (Ferriol M et al, 2003)、遗传图谱的构建 (Lin Z et al, 2003)、重要性状的标记 (Li G et al, 2001) 以及相关基因的克隆等方面。每一种分子标记都具有其优点和缺点 (见表 2), 与其它分子标记相比, SRAP 的特点主要表现在: 它结合了 AFLP 及 RAPD 各自的优点, 方便快捷。只需要极少量 DNA 材料, 不需要 Southern 杂交, 不需要预先知道 DNA 的顺序信息, 试验结果稳定可靠, 可以快速获得大量的信息。而且再现性高, 重复性好, 因而非常适合于品种指纹图谱的绘制, 遗传连锁图的构建及遗传多样性的研究。在一些多态性很少, 而且待测样品较少的情况下 (如近等基因系和 BSA 分析),

用 SRAP 分析能达到满意的结果。在国外已经应用于水稻、棉花、油菜、马铃薯、苹果、柑橘类果树、樱桃、梅子、大蒜、莴苣、芹菜以及水稻稻瘟病的研究中,表现了简便、高效、产率高、高共显性、重复性好、易测序、便于克隆目标片段的特点。Budak et al (2004) 在研究野牛草 (Buffalograss) 时表明, SRAP 更适合于检测亲缘关系比较近的栽培种之间的差别。Ferriol M et al(2003) 对甜瓜的研究表明 SRAP 比 AFLP 更能反映形态学的变异与进化历史。

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。

表 2.几种类型的 DNA 分子标记的特点比较

Table2 The comparison of main DNA Molecular Markers

	RFLP	AFLP	RAPD	SSR	ISSR	SRAP
基因组分布	低拷贝编码序列	整个基因组	整个基因组	整个基因组	整个基因组	整个基因组
遗传特点	共显性	显性/共显性	多数显性	共显性	显性/共显性	共显性
多态性	中等	较高	较高	高	较高	较高
DNA 用量	2—30ng	100ng	1-100ng	50-100ng	3-100ng	2—100ng
DNA 质量要求	高	高	低	中等	低	中等
放射性	一般有	有/无	无	无	无	无
技术难度	高	中等	低	低	低	低
耗时	多	中等	少	少	少	少
探针类型	低拷贝 DNA 或 cDNA 克隆	特异 DNA 序列	随机序列	特异 DNA 重复序列	简单重复序列	特异双引物
重复性	高	高	中等	高	高	高
可靠性	高	高	中等	高	高	高
成本	高	较高	低	较高	低	较高

3 材料与方法

3.1 材料

3.1.1 植物材料

供试红麻品种共 32 份, 主要为“八·五”至“十·五”期间中国农业科学院麻类研究所等单位从美国、古巴、原苏联、法国、波兰、澳大利亚、埃及、南非、菲律宾、巴基斯坦、乌干达、加纳、印度尼西亚、肯尼亚、萨尔瓦尔、津巴布韦、尼日利亚、苏丹、赞比亚等国家和地区引进的红麻种质资源以及我国教学、育种单位新育成的参加“十五”国家区试和省区试的红麻新品种; 其中国外品种 19 份, 国内品种 13 份。在 32 份遗传资源中, 野生种或半野生种类型有 9 份(代码 11——19)。所有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 3。

表 3 供试红麻品种及来源

Table 3 Kenaf varieties and there origins

代码	品种名称	来源	品种类型	代码	品种名称	来源	
1	古巴 8 号	古巴	栽培品种	17	NA414	尼日利亚	野生种
2	83—20	美国	栽培品种	18	85—132	苏丹	半野生种
3	83—15	原苏联	栽培品种	19	ZB324	赞比亚	半野生种
4	F65	法国	栽培品种	20	国家区试 R1	中国麻类所	栽培品种
5	85—13	波兰	栽培品种	21	国家区试 R2	中国麻类所	栽培品种
6	AS233	澳大利亚	栽培品种	22	国家区试 R3	待查	栽培品种
7	阿联红麻	埃及	栽培品种	23	国家区试 R5	福建农林大学	栽培品种
8	ZF78	南非	栽培品种	24	国家区试 R6	待查	栽培品种
9	85—135	菲律宾	栽培品种	25	国家区试 R8	待查	栽培品种
10	PA264	巴基斯坦	栽培品种	26	福红 02-29 绿	福建农林大学	栽培品种
11	UG93	乌干达	半野生种	27	福红 02/51 绿	福建农林大学	栽培品种
12	GA42	加纳	半野生种	28	闽红 321	福建农科院	栽培品种
13	IDN147	印尼	半野生种	29	红引 135	中国麻类所	栽培品种
14	85—244	肯尼亚	野生种	30	福红 02/11 绿	福建农林大学	栽培品种
15	SL254	萨尔瓦尔	野生种	31	福红 02/31 红	福建农林大学	栽培品种
16	ZM412	津巴布韦	野生种	32	闽红 964	福建农科院	栽培品种

3.1.2 ISSR 引物

ISSR 引物购自加拿大 British Columbia 大学, 编号为 UBC800-870, 共 70 个引物。

3.2 方法

3.2.1 ISSR 分子标记的材料与实验方法

供试红麻品种材料共 32 份, 2004 年 4 月 30 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。以上述从国内外征集到的 32 份红麻品种的基因组 DNA 为模板进行 ISSR 扩增, 对标记结果作比较分析, 以便从分子水平上明确 32 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基础与遗传差异, 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。

主要技术路线为:

全基因 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 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×CTAB (1.5% CTAB, 75mmol/L Tris-HCl, 15mmol/L EDTA, 1.05mol/L NaCl, 2%(V/V) β-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, 4000 rpm 室温离心 10 分钟, 转移上清液至另一个新管中, 加入 2 倍体积无水乙醇或 2/3 体积的异丙醇, 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。

3.2.3 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 ²⁺	2.5ul
ISSR 引物	4ul
Tag 酶	0.3ul
模板 DNA	2ul
ddH ₂ O	13.325ul

反应体积为 25ul, 反应混合物加 25ul 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 酶均为上海生工产品。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), 50mM KCl, 0.1%Triton^RX-100), 1.5UTag 酶。

3.2.4 ISSR 反应程序

反应程序为: 94℃预变性 5min; 94℃45s, 54℃1min30s, 72℃1min30s, 41 个循环; 72℃7min; 10℃20hrs。

3.2.5 电泳检测

PCR 产物经含 EB 的 1.3%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。

3.2.6 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)对其进行聚类分析并自动作图。

4 结果与分析

4.1 ISSR 引物筛选

以福红 2 号、古巴 8 号、阿联红麻、UG93、ZM412 的基因组 DNA 为模板,用 UBC800-UBC870 等 70 个 ISSR 引物,在 25 μ l 反应体系中以 200nmol/L 引物终浓度进行筛选,共选出 22 个多态性较理想的引物,对表 3 所列的 32 份红麻供试材料进行扩增,选用扩增条带清晰、多态明显的 13 个引物进行了统计分析。13 个引物中有 12 为 2 核苷酸重复序列,所占比例为 92.3%;其中 (AC) $_n$ 和 (CA) $_n$ 较多,占 58.3%,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 4。

表 4 筛选后所选用 ISSR 引物的编号及序列

Table 4 List of ISSR primers and their sequence in this study

编号	引物序列	编号	引物序列
U809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	U843	CTC TCT CTC TCT CTC T(A,G)A
U812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	U848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG
U818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	U850	GTG TGT GTG TGT GTG T(CT)C
U825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	U855	ACA CAC ACA CAC YT
U827	ACA CAC ACA CAC CG	U856	ACA CAC ACA CAC CYC
U836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	U866	CTC CTC CTC CTC CTC
U841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC		

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。引物扩增情况见表 5。根据 ISSR 扩增结果,应用 Viber Lourmat VDS 凝胶成像系统分析软件、借助 DPS 统计软件,按 Nei-li 的方法统计了 32 份红麻材料两两之间的遗传相似系数,进而进行类平均聚类分析,结果为表 6 和图 2。

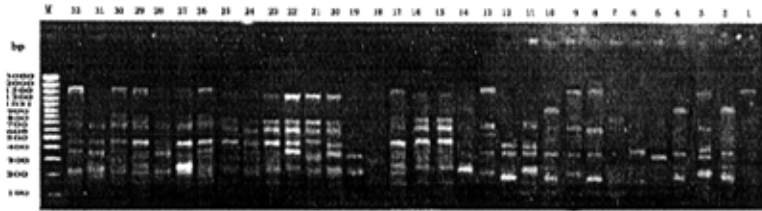


图 1 引物 U836 的扩增结果

Fig 1 Amplified result of primer U836

表 5 ISSR 标记的扩增情况

Table 5 Summary of the detection of ISSR markers in kenaf

项目	数据
多态性引物数	13
多态性引物扩增出的条带总数	59
扩增产物的大小范围	0.4—2.0kb
检测出的多态性条带总数	47
多态性条带占总带数的比例	79.66%

4.2 红麻品种 ISSR 标记聚类分析

由图 2 可以看出, 当在遗传相似系数为 68.5% 处作切割线 L_1 时, 32 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 28 个品种, 第 II 亚类群中只有 3 个品种, 为 SL254、ZM412 和 NA414, 第 III 个类为 85-244 品种。

4.2.1 第 I 大类群的品种组成及遗传多样性与亲缘关系分析

第 I 大类群 28 个品种间的遗传相似系数 (GS) 均高于 0.52, 且大部分 GS 高于 0.68, 最高 GS 达 0.88, 说明第 I 大类群 28 个品种间亲缘关系较近。虽然供试材料中有 16 份品种或类型从国外引进, 但从聚类结果和遗传相似系数看, 其和国内选育的 12 份品种多数亲缘关系较近, 基因型遗传表现出明显的血缘关系, 可能与其杂交亲本亲缘关系较近有关; 而在第 I 大类群 28 个品种中 5 个所谓“野生种”, 可能遗传进化较为现代, 为半野生种类型, 加上可能与栽培品种发生交流, 故而与栽培品种聚为一类、基因型与栽培品种已差异不大。

为了便于了解供试材料第 I 大类群中 28 个品种基因型的遗传差异和亲缘关系, 在相似系数为 72% 处作切割线 L_2 , 第 I 大类群被分为 I_1 — I_4 等 4 个亚类群。从图 2 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, 如来自我国的国家区试品种 R1、R5 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地理来源 (如阿联红麻、IDN147), 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。如在第 I 大类中的福红系列 4 个品种和闽红系列 2 个品种, 虽然杂交亲本各不相同, 但由于红麻为常异交作物, 育种谱的长期异交和基因交流, 使它们之间的血缘渗透而较为亲近, 而福建是红麻育种基地, 异交使品种之间的基因逐渐渗透; 因此新近育成的品种其遗传基础较为接近, 加上系统选育的作用, 使新选育的品种表现出明显的地域性和相似性。

4.2.1.1 第 I_1 亚类群品种组成及遗传多样性分析

由图 2 可见, 第 I_1 亚类群由古巴的古巴 8 号、美国的 83—20、原苏联的 83—15、红引 135、国家区试 R2、R3、R1、乌干达的 UG93、加纳的 GA42、波兰的 85—13、南非的 ZF78、巴基斯坦的 PA264、法国的 F65、澳大利亚的 AS233、菲律宾的 85—135、

赞比亚的 ZB324 和省区试的几个品种——福红 02/51 绿、闽红 321、闽红 964、福红 02-29 绿、福红 02/11 绿、福红 02/31 红等共 22 个品种组成。可再分为六组：

a 组：两个品种

古巴 8 号与 83—20 都是国外引进栽培种（分别来自古巴和美国），其基因型较接近，遗传相似性较高。这可能与两国地理上接近，相互之间的自然与文化交流较多不无关系。

b 组：五个品种

包括 83—15（来自原苏联），红引 135（来自中国麻类所（引种与系统选育）、国家区试 R2、R3、R1（均为中国麻类所选育的品种或杂交组合）。从图 2 来看，红引 135 可能有原苏联的 83—15 等血缘关系，或者说二者有相似的育种材料来源，而国家区试的 3 个品种也来自中国麻类所，相互之间亲缘关系较密切。

c 组：两个品种

两个非洲半野生类型材料 UG93、GA42 较为近缘：其中 UG93 来自乌干达，GA42 来自加纳。二者是中北非地区半野生类型，地缘的邻近可能造成相互间的基因交流，这也和遗传演化有密切关系。

d 组：三个品种

这一组有 ZF78（来自南非）、PA264（来自巴基斯坦）、85—13（来自波兰），都是引进的国外栽培品种。PA264（巴基斯坦）、85—13（波兰）两个品种地理差异较大，但却聚为较近一类，二者又与 ZF78（南非）间亲缘关系较近。

e 组：三个品种

包括 F65（来自法国）、AS233（来自澳大利亚）、85—135（来自菲律宾），是另外一组较为近缘的国外栽培品种。因为杂交亲本无从考查，虽然地理上较为远缘，但可以推测可能与引种或基因交流有关。

f 组：七个品种

ZB324（来自赞比亚）和福建省区试的几个品种——福红 02/51 绿、闽红 321、闽红 964、福红 02-29 绿、福红 02/11 绿、福红 02/31 红，聚为一组。这一组除 ZB324 可能为半野生种外，其余 6 个品种都为福建省各科研单位培育的栽培种，说明该地区的

品种可能有较直接的基因交流,因而有较相似的血缘联系,相互之间通过杂交育种或系统选育后其亲缘关系或遗传基础很接近。

4.2.1.2 第 I₂ 亚类群品种组成及遗传多样性分析

85—132(苏丹)是一个单独的个类,原为野生类型,它与其与其它 27 个品种亲缘关系相对较远,基因型差异相对较大,但却聚为同一大类,应为半野生类型。按经典的考据讲,红黄麻起源于非洲东部到东南部的沿印度洋一线的窄长地带;而第 I₂ 个类的 85—132 从某种程度上印证了这一点。

4.2.1.3 第 I₃ 亚类群品种组成及遗传多样性分析

第 I₃ 亚类群由阿联红麻、IDN147 两个供试材料组成,遗传相似系数为 0.75,亲缘关系比较近。阿联红麻引种源于北非地中海沿岸的文明古国——埃及,是一种半野生种,可能是一类该地区较古老的农作物品种之一;遗传进化较为现代,与通过自然选择与人工选择的结果有关。IDN147 引自东南亚的“千岛之国”——印度尼西亚,也是一个野生种。阿联红麻与 IDN147 这两个品种搜集地跨越几千上万公里,竟然有如此较近的亲缘关系,可能有中世纪以来人类航海文明发展促进的间接因素在里面。

4.2.1.4 第 I₄ 亚类群品种组成及遗传多样性分析

第 I₄ 亚类群由 3 个品种组成,分别是国家区试 R5、R6、R8。已知 R5 系福建农林大学选育的品种,其一亲本为“非洲裂叶”,故而有着非洲的血统。我们猜测 R6、R8 也是有着该地区的优良血统。

4.2.2 第 II 亚类群的品种组成及遗传多样性与亲缘关系分析

SL254、ZM412 和 NA414 分别是引自萨尔瓦尔(拉美)、津巴布韦(非洲)、尼日利亚(非洲)的野生品种,它们聚为一类,说明相互基因型较相似,三者间有较近的亲缘关系。SL254 与其它品种的相似系数最低为 0.54,最高为 0.72; ZM412 与其它品种的相似系数最低为 0.55,最高为 0.80; NA414 与其它品种的相似系数最低为 0.50,最高为 0.75,说明这三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。其表型或基因型表现出明显野生种特征,因此可确认为野生种。

4.2.3 第III个类的品种组成及遗传多样性与亲缘关系分析

品种 85-244 是一份在肯尼亚（非洲）搜集到的野生品种，与第 I 大类群 28 份品种和第 II 亚类群 3 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 0.53 至 0.71 之间，且大部分低于 0.68，表明该野生种与其它半野生种或栽培品种的遗传基础差异最大，亲缘关系相对较远。在遗传进化中，该供试材料处于较基础的地位，当是一份较为原始的野生种之一。

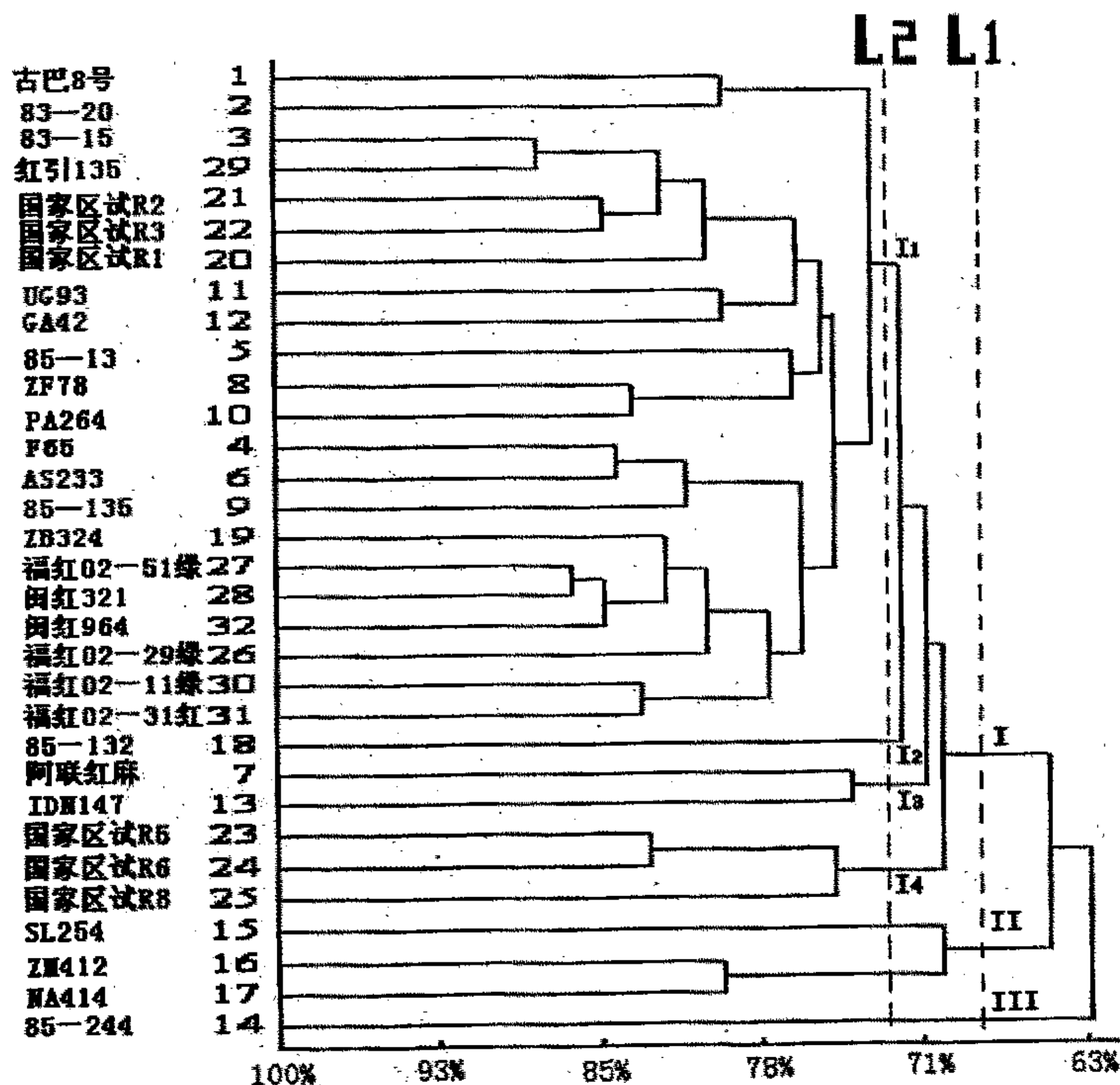


图2 基于 ISSR 数据绘制的 32 份红麻材料之间的聚类图

Fig 2 Dendrogram of cluster of 32 kenaf accessions based on ISSR markers

表6 基于ISSR数据计算的32份红麻材料之间的相似系数 (Table 6 Genetic similarity of 32 kenaf accessions based on ISSR analysis)

代码	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32
L1	1.00																															
L2	0.80	1.00																														
L3	0.72	0.70	1.00																													
L4	0.71	0.81	0.68	1.00																												
L5	0.73	0.68	0.76	0.75	1.00																											
L6	0.67	0.78	0.73	0.84	0.75	1.00																										
L7	0.68	0.69	0.80	0.64	0.69	0.73	1.00																									
L8	0.73	0.74	0.76	0.69	0.74	0.77	0.72	1.00																								
L9	0.70	0.75	0.70	0.78	0.75	0.84	0.66	0.77	1.00																							
L10	0.74	0.72	0.77	0.76	0.78	0.78	0.76	0.84	0.75	1.00																						
L11	0.75	0.64	0.72	0.74	0.73	0.70	0.71	0.76	0.73	0.74	1.00																					
L12	0.73	0.65	0.76	0.72	0.78	0.81	0.76	0.74	0.78	0.78	0.80	1.00																				
L13	0.75	0.69	0.80	0.64	0.63	0.69	0.74	0.72	0.79	0.73	0.71	0.73	1.00																			
L14	0.63	0.67	0.56	0.68	0.60	0.64	0.58	0.64	0.71	0.62	0.66	0.57	0.69	1.00																		
L15	0.72	0.70	0.59	0.64	0.59	0.66	0.57	0.70	0.70	0.67	0.65	0.70	0.60	0.57	1.00																	
L16	0.76	0.67	0.60	0.68	0.64	0.61	0.55	0.67	0.67	0.72	0.73	0.71	0.68	0.70	0.69	1.00																
L17	0.67	0.65	0.50	0.63	0.61	0.61	0.51	0.68	0.69	0.63	0.75	0.69	0.55	0.63	0.70	0.80	1.00															
L18	0.73	0.70	0.69	0.68	0.70	0.74	0.62	0.70	0.74	0.65	0.73	0.74	0.72	0.70	0.61	0.66	0.64	1.00														
L19	0.70	0.68	0.67	0.81	0.80	0.77	0.63	0.80	0.74	0.78	0.79	0.74	0.60	0.57	0.66	0.700	0.65	0.70	1.00													
L20	0.70	0.68	0.76	0.69	0.68	0.62	0.60	0.68	0.65	0.66	0.76	0.65	0.69	0.61	0.60	0.74	0.620	0.70	0.71	1.00												
L21	0.82	0.77	0.78	0.75	0.77	0.77	0.69	0.77	0.77	0.78	0.76	0.80	0.72	0.61	0.70	0.67	0.68	0.80	0.71	0.80	1.00											
L22	0.76	0.75	0.84	0.75	0.72	0.77	0.81	0.77	0.72	0.75	0.79	0.80	0.76	0.59	0.64	0.65	0.60	0.71	0.74	0.82	0.85	1.00										
L23	0.64	0.62	0.73	0.66	0.62	0.68	0.66	0.65	0.68	0.69	0.64	0.75	0.66	0.53	0.63	0.64	0.61	0.67	0.74	0.74	0.77	0.80	1.00									
L24	0.62	0.70	0.68	0.67	0.63	0.80	0.67	0.69	0.73	0.70	0.62	0.80	0.67	0.53	0.64	0.65	0.62	0.68	0.69	0.82	0.79	0.83	1.00									
L25	0.64	0.65	0.61	0.70	0.62	0.68	0.52	0.59	0.65	0.53	0.64	0.62	0.63	0.64	0.54	0.60	0.57	0.71	0.68	0.72	0.68	0.69	0.75	0.74	1.00							
L26	0.69	0.73	0.75	0.77	0.67	0.70	0.62	0.73	0.70	0.71	0.69	0.73	0.68	0.60	0.65	0.66	0.67	0.66	0.76	0.73	0.76	0.78	0.76	0.71	0.67	1.00						
L27	0.75	0.73	0.74	0.84	0.78	0.76	0.65	0.72	0.73	0.71	0.75	0.78	0.68	0.63	0.62	0.66	0.64	0.78	0.83	0.72	0.78	0.78	0.76	0.68	0.70	0.85	1.00					
L28	0.74	0.72	0.73	0.81	0.69	0.81	0.67	0.75	0.78	0.73	0.74	0.78	0.73	0.68	0.67	0.71	0.63	0.77	0.86	0.75	0.75	0.80	0.84	0.76	0.82	0.82	0.86	1.00				
L29	0.78	0.76	0.88	0.80	0.76	0.79	0.75	0.81	0.79	0.77	0.81	0.76	0.80	0.70	0.66	0.70	0.65	0.78	0.81	0.84	0.81	0.86	0.82	0.72	0.77	0.83	0.85	0.87	1.00			
L30	0.77	0.78	0.74	0.79	0.72	0.75	0.73	0.72	0.69	0.73	0.71	0.72	0.76	0.68	0.61	0.65	0.63	0.68	0.72	0.72	0.75	0.81	0.69	0.67	0.73	0.80	0.79	0.81	0.85	1.00		
L31	0.69	0.73	0.66	0.80	0.67	0.73	0.68	0.67	0.67	0.71	0.66	0.73	0.62	0.66	0.68	0.70	0.64	0.66	0.73	0.70	0.73	0.76	0.76	0.75	0.67	0.81	0.77	0.80	0.78	0.83	1.00	
L32	0.71	0.72	0.73	0.78	0.66	0.75	0.64	0.77	0.78	0.73	0.71	0.72	0.73	0.62	0.64	0.68	0.63	0.68	0.77	0.77	0.75	0.77	0.78	0.73	0.73	0.79	0.84	0.86	0.87	0.78	0.74	1.00

4.3 红麻起源的探讨

先引两段相关文献资料:

《中国植物志 第四十九卷 第二分册》

大麻槿(广州常见经济植物) 芙蓉麻(华北经济植物志要), 洋麻(经济植物手册)
Hibiscus cannabinus Linn.

一年生或多年生草本, 高达3米, 茎直立, 无毛, 疏被锐利小刺。叶异型, 下部的叶心形, 不分裂, 上部的叶掌状3—7深裂, 裂片披针形, 长2—11厘米, 宽6—20毫米, 先端渐尖, 基部心形至近圆形, 具锯齿, 两面均无毛, 主脉5—7条, 在下面中肋近基部具腺; 叶柄长6—20厘米, 疏被小刺; 托叶丝状, 长6—8毫米。花单生于枝端叶腋间, 近无柄小苞叶7—10, 线形, 长6—8毫米, 分离, 疏被小刺; 花萼近钟形, 长约3厘米, 被刺和白色绒毛, 下部以下合生, 裂片5, 长尾状披针形, 长1—2厘米, 下面基部具1大脉; 花大, 黄色, 内面基部红色, 花瓣长圆状倒卵形, 长约6厘米; 雄蕊柱长1.5—2厘米, 无毛; 花柱枝5, 无毛。蒴果球形, 直径约1.5厘米, 密被刺毛, 顶端具短喙; 种子肾形, 近无毛。花期秋季。

我国黑龙江、辽宁、河北、江苏、浙江、广东和云南等省栽培。原产印度, 现各热带地区均广泛栽培。

本种的茎皮纤维柔软, 韧度大, 富弹性, 是供织麻袋、麻布、鱼网和搓绳索等的上好原料。对气候适应幅度大, 寒、温、热三带气候均能适应, 在有盐碱的土壤和干湿之地均可生长, 因此值得大力推广种植。

《种子植物分类学》汪劲武

锦葵目的分类地位

英国哈钦松(J. Hutchinson)系统(1959):

假设的原生被子植物——双子叶植物——木本支木兰目——五桠果目——红木目——椴树目——锦葵目

苏联塔赫他间(A. Takhtajan)系统(1980):

【木兰亚纲】木兰目——【五桠果亚纲】五桠果目——山茶目——堇菜目——锦葵目

美国柯朗奎斯特(A. Cronquist)系统(1981):

原生被子植物——【五桠果亚纲】五桠果目——山茶目——锦葵目

大部分人都认为红麻起源于非洲，但因缺少明显证据而不能得到确认；而上面《中国植物志》的编者当时（1984 年）认为红麻起源于印度。又由 9 个野生种中 7 个为非洲采集，余者一为东南亚（毗邻澳大利亚）、一为南美洲北部地区。这似乎暗示了三大地区间的某种历史渊源及对红麻起源地贡献的主次关系。

在中生代侏罗纪的石灰岩中即有古代被子植物残余化石的发现，被子植物的兴起大约始于该时期。到中生代末白垩纪时，就很快布满了陆地，到新生代则更为繁盛，直到现代，约有 300 余科，10 000 多属，25 万种左右，占植物界的一半以上。

由大陆板块移动学说来看，许多学者都认为晚古生代后期，地球的各陆块氏紧挨在一起的联合古陆（图 3）（方宗熙等，1986；刘德生，1988；张金泉，1989；祁建民等，1997；刘南威，2000）当时北美洲和欧亚大陆组成的劳亚古陆与由非洲、南美洲、印度、南极洲和澳大利亚组成的冈瓦纳古陆是连在一起的。经历了约 1 亿年后，于距今 2 亿年前开始发生分裂，三叠纪末期劳亚古陆和冈瓦纳古陆裂开，中间隔着古地中海，南美洲-非洲和南极洲-澳大利亚陆块分开，接着印度和南极洲分开，并迅速北移。侏罗纪时继续漂移，大西洋和印度洋继续扩张，北美洲向西北漂移（图 4）。侏罗纪末期一条裂谷使南美洲和非洲开始滑离，至白垩纪末期南美洲和非洲完全分开（图 5）（刘南威，2000）。南极洲继续向西缓慢漂移，直到新生代大陆才漂移到今天的位置。

同一物种的一切个体，同一属甚至更高级的群的一切物种都是从共同的祖先传下来的，现在不管在地球上怎样遥远的和隔离的地点被发现，他们一定是在连续世代的过程中从某一点迁徙到一切其他地点的（达尔文）。在冈瓦纳古陆分裂前，南半球各分开的陆块上具有相似的兴盛植物区系（刘德生，1988）。生活在隔离区的同属的不同物种的变异是非常缓慢的。我们认为红麻在大陆分裂以前就已经存在，而且已经由非洲向东南方向传播到了南部非洲、亚洲和澳大利亚等陆块，向西到西北方向传播到了南美洲北部与加勒比群岛一带。这也是为什么在石炭纪、二叠纪时期，南方的冈瓦

纳大陆出现了地史上第二次大冰期，覆盖了南美洲东南部、非洲南部、印度大部分地区、澳大利亚西部和整个南极洲（图 3）。我们认为这次冰期导致了南极洲、非洲南部和美洲地区的物种的部分灭绝，包括部分红麻野生种；这也是为什么在东南亚—大洋洲只发现极少量野生种的原因之一。

综上所述，我们推测红麻在非洲东部起源，其野生种及野生类型至今仍广泛分布，沿三条路线逐步扩散传播到了南北半球：

非洲东部——北非西亚——南美洲北部及加勒比岛域……；

非洲东部——非洲南部——澳大利亚……；

非洲东部——东南亚及印度支那……。



图3 按照现代活动论推演的二叠纪海陆分布图
实心圆点为拼合后各大洲的古地磁极，阴影为石炭纪、二叠纪冰盖范围



图4 早侏罗世古大陆位置及新海洋的形成

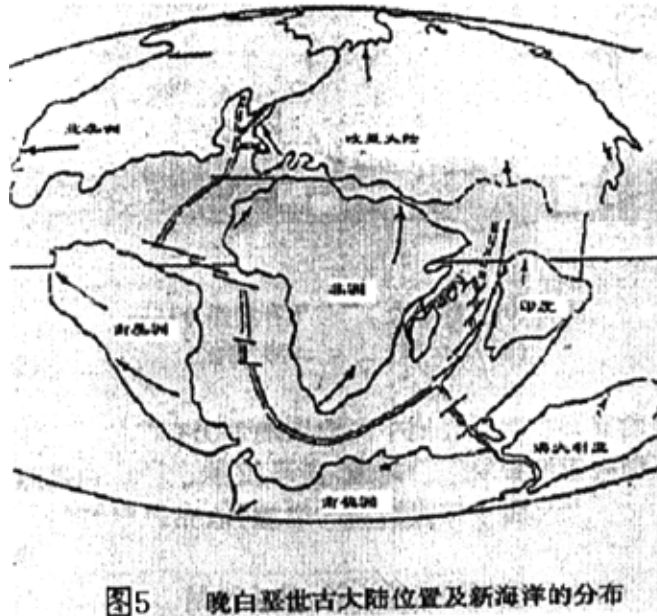


图5 晚白垩世古大陆位置及新海洋的分布

4.4 红麻的演化

锦葵科约有 50 属，约 1000 多种，分布在热带至温带。根据花和果实的构造，本科分为锦葵族、梵天花族和木槿族。其中锦葵族有锦葵属、花葵属、蜀葵属、赛葵属、黄花稔属、隔蒴苘属、苘麻属、翅果麻属等，梵天花族有梵天花属、悬铃花属等，木槿族有秋葵属、木槿属、十裂葵属、桐棉属、棉属、大萼葵属等（《中国植物志》，1984）。

英国哈钦松（J. Hutchinson）分类系统中，锦葵目源于椴树目。我们知道椴树科里有与红麻利用价值不相上下的黄麻。苏联塔赫他间（A. Takhtajan）系统（1980）与美国柯朗奎斯特（A. Cronquist）系统（1981）观点相似，锦葵目源于山茶目。而关于黄麻属两个栽培种的起源—演化中心，有研究认为长果栽培种第一起源中心在非洲东部、第二起源中心是在

中国南部—印度—缅甸地区；圆果栽培种在非洲没有发现野生种类型及现代栽培品种类型，在中国、印度支那则有分布，据此推断，圆果种的第一起源演化中心应在中国南部—印度—缅甸地区（祁建民等，1997）。

综上所述，从本实验的红麻 ISSR 分析聚类来看，在 9 个野生种材料中比较独立的 4 个种应该更为原始：3 个来自非洲，1 个来自南美洲。其他 5 份半野生种的进化更为现代。栽培种的直接来源未必是真正起源地，但一般可能会是驯化培育的初级扩散地。这也间接印证了我们前面提出的 3 条红麻起源与扩散路线。

5 小结与讨论

5.1 ISSR 分子标记在红麻种质资源遗传多态性研究中的可行性

红麻不同品种在纤维产量和纤维品质等性状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。比起其他主要农作物红麻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 13 个 ISSR 引物对包括野生种、半野生种和栽培种在内的 32 份红麻供试材料进行 PCR 扩增,共扩增出 59 条条带,平均每个引物 4.53 条,其中多态性条带共 47 条,占总数的 79.7%。而且根据所得条带进行聚类分析后可较好地将 32 个不同红麻品种或类型按亲缘关系远近划分为不同的类群。本研究结果与本单位 2003 年采用 30 份栽培品种进行 ISSR 分析的结论相近。2003 年的研究,用筛选的 17 个 ISSR 引物,扩增出的多态性条带占总带数的比例为 65.1%,而 2004 年的研究多态条带占总带数的比例为 79.7%,提高了 14.6 个百分点,究其原因引用了部分红麻野生材料,增加红麻品种类型的遗传差异性所致。

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 不同引物序列对 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 个引物能扩增出谱带,产生多态谱带最多的是二核苷酸引物(CT)_n、

(GA)_n、(CA)_n。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)_n 引物均无扩增条带, 而(CA)_n、(GA)_n 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大多数为二核苷酸重复序列, 且序列为(CA)_n、(AC)_n 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。由此可见, 引物的筛选在 ISSR 分子标记中起着重要的作用。

5.3 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 Taq 酶活性, 从而影响 PCR 反应的质量。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, β -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。获得的 DNA (所含 RNA 对扩增无影响) 经紫外分光光度计检测能够较好的进行 ISSR 分析。

5.4 红麻核心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 32 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。其中第一大类群中包括 24 个栽培种和 5 个半野生种, 而一个亚类群中只有 3 个野生种: 为 SL254、ZM412 和 NA414, 一个自成体系的个类为红麻野生种 85-244。本研究首次把供试的 9 份红麻野生材料, 根据其与栽培品种基因组的亲缘关系的远近, 划分为野生种类型和半野生类型。本研究中的 9 份野生材料,

SL254、ZM412、NA414 和 85-244 这 4 份材料均为红麻较为原始的野生种，而 UG93、GA42、IDN147、85-132 和 ZB324 等 5 份材料为红麻半野生种材料，它们的进化及与栽培品种的基因交流，使之与栽培品种聚成一类。可见其进化已经较为现代。

SL254 与其它品种的相似系数最低为 0.54，ZM412 与其它品种的相似系数最低为 0.55，NA414 与其它品种的相似系数最低为 0.50，说明这三个较为原始的野生种与其它品种基因型遗传差异较大，亲缘关系相对较远。而三个品种之间亲缘关系很近，说明 SL254（来自南美）与来源于非洲的野生种或半野生种有一定的亲缘关系。品种 85-244 单独成为第 III 类，是一份在肯尼亚（非洲）搜集到的野生种，与其它品种的遗传相似系数在 0.53 至 0.71 之间，且大部分低于 0.68，表明该野生种与其它品种的亲缘关系相对较远。有报道称该野生种是一抗性极佳育种材料；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。而其它 28 个品种类型中含有 5 个半野生种材料，供试材料间的相似系数均高于 0.52，且大部分高于 0.68，最高达 0.88，说明第 I 大类群 28 个品种间亲缘关系较近。虽然所用材料中有从国外引进品种，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。

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，并表现出明显的地域性。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，由于红麻为常异交作物，使之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杂交亲本，这样有利于有利基因的互补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。

关于红麻的起源与传播，学术界仍无定论。有学者认为红麻起源于非洲；亚洲是最早引进红麻的大陆（程舟，2003）。我们也认同红麻起源于非洲，但对于其演化提出三种可能扩散途径，这种发散的思路有待后续研究来考证。

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, 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
- 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
- 达尔文著, 周建人, 叫笃庄, 方宗熙译. 物种起源. 北京: 商务印书馆, 1995, 528-530
- 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. 湖南农业学报, 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, 姚颖根, 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
- 方宗熙, 江乃萼. 进化论. 北京: 高等教育出版社, 1986, 141-143
- 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
- 葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬等. 孑遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析. 生物多样性, 2003, 11 (4): 276-287
- 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
- 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
- 刘德生. 世界地理. 北京: 高等教育出版社, 1988, 10-15
- 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
- 刘南威. 自然地理学. 北京: 科学出版社, 2000, 140-145
- 刘小莉, 刘飞虎, 李宗菊, 等. 10 种报春花亲缘关系的 ISSR 分析. 云南大学学报 (自然科学版), 2004, 26 (5): 454—458
- 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
- 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, 李维明, 吴为人, 等. 黄麻的起源与进化研究. 作物学报, 1997, 23 (6): 677—682
- 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, 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, 戴志刚, 龚友才, 等. 我国红麻种质资源的遗传多样性与评价利用. 中国麻业, 2004, 26 (1): 5—9
- 粟建光, 揭雨成, 龚友才, 等. 麻类优异种质的创新与利用研究 69
- 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
- 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
- 汪劲武. 种子植物分类学. 北京: 高等教育出版社, 1985, 113—115, 276—278
- 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
- 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

- 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
- 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
- 徐云碧, 朱立煌著. 分子数量遗传学. 中国农业出版社, 1994
- 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
- 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
- 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
- 张金泉. 植物地理学. 重庆: 重庆出版社, 1989, 224-244
- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第四十九卷 第二分册. 北京: 科学出版社, 1984, 61—89
- 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: 930-932
- Dirlewanger E, Pronier V, Parvry 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
- 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
- Gilbert J E, Lewis 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.Dention(Ed):Report of the 1st-5th IJO germplasm collection missions for jute and kenaf and allied fibers in Kenya and Tanzania. IJO, Dhaka, Bangladesh,1987-1988
- Jain A, Apparanda C, Bhalla P L. Evaluation of gen etics 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
- Jonsson B O, Jonsdiottir I S, Gronberg N. Clonal diversity and allozyme variation in population of the arctic. Carex Bigelowej(Cyperaceae) J Eco1,1996,84:449-459
- Dempsey. J. M: Fiber crops, Univ. Press Florida,USA,1979
- 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
- 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
- T.Ghosh:Handbook of Jute,FAO of United Nations,Rome,1983
- 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

实验所用溶液配方

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

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 (即为 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,导师严谨的治学态度、科学的创新精神和勤奋的创业精神,以及三年来给予我工作上、学习和生活上的关心和鼓励,令我终生受益,在此谨向我的导师致以最崇高的敬意和诚挚的感谢。尤其是在我的思想和实验处于极度波动与低潮时,是祁老师及时而又耐心地启发与援助了我,这恩情将令我终身难忘。

特别感谢本课题组的吴为人教授、周元昌教授和段远霖副教授,他们给予我许多宝贵的建议、关心和支持,使试验得以如期圆满完成;感谢遗传所常规组全体工作人员在学习与生活上的支持及同级研究生在实验室的互谅互让、互帮互助。

在实验过程中,得到兰涛老师、黄碧光老师、陶爱芬老师、王涛、徐建堂、李小辉、何小娜、吴斌、林岸清等同学的很多帮助,特此致谢。感谢同学梁景霞、王晓飞、刘中华等,帮助完成红麻的田间种植管理和部分论文的数据处理工作。感谢吕新华、张永生、蔡红霞、韩庆典、林碧源、王雪琴、罗文彬、束爱萍、阮奇城等同学的真诚协助。

感谢同宿舍的王劭、王昌伟、刘振国几位同学,大家一起生活、一起探讨问题,彼此间建立了深厚的友谊。

感谢支持本研究的老师、朋友、亲人们和三年来朝夕相处的同学,感谢所有关心和帮助过我的人,正是他们的真挚和心诚使得论文得以如期完成。祝他们永远幸福!