

## 独创性声明

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

学位（毕业）论文作者亲笔签名：187 阮 日期：2007年6月17日

## 论文使用授权的说明

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

保密，在 年后解密可适用本授权书。

不保密，本论文属于不保密。

学位（毕业）论文作者亲笔签名：187 阮 日期：2007年6月17日

指导教师亲笔签名：  日期：

## 摘 要

红麻 (*Hibiscus cannabinus*) 是麻纺和造纸的重要纤维植物, 分子标记辅助育种及遗传连锁图谱构建研究滞后与其他主要作物。目前, 红麻的遗传连锁图谱构建尚未见报道, 分子标记遗传图谱的构建可以为红麻基因结构提供详细的描述, 既是红麻遗传学研究的重要领域, 又是红麻基因定位和克隆等应用研究的理论基础。为促进红麻基础科学研究的发展, 本研究利用SRAP和ISSR分子标记技术构建红麻的遗传连锁图谱, 取得以下的研究成果。

- (1) 以半野生种Ga42(源自加纳)和栽培种阿联红麻(源自埃及)杂交, F<sub>1</sub>自交产生的203株F<sub>2</sub>代分离群体作为作图群体。
- (2) 从19X19对SRAP上游与下游引物组合和30个ISSR引物中, 以Ga42和阿联红麻为模板筛选出多态性较好的27对SRAP引物组合和5个ISSR引物。
- (3) 利用SRAP和ISSR两个分子标记筛选出了32个引物组合及引物, 对F<sub>2</sub>作图群体进行PCR扩增, 共产生108个多态条带, 平均每个引物组合产生3.4个多态条带, 最多的可以产生8条。
- (4) 使用Mapmaker/3.0, 我们构建了包括68个SRAP标记位点和10个ISSR标记位点的红麻的连锁图谱, 这些标记被分为16个连锁群(LOD $\geq$ 3.0), 总长1423.9 cM, 平均两个标记位点间距为18.25cM。每对标记组合可以产生10—50个大小在100—2000bp的清晰可辨的条带, 其中70%的条带较亮。
- (5) 这108个标记位点当中, 有58个(54%)偏离3:1的分离比, 偏分离十分严重。在我们的实验中, 仅检测到2个共显性位点, 和Li等报道的高共显性不太一致。红麻有18对染色体, 而我们仅构建出16个连锁群, 可能与我们目前所用的多态性引物还不够多有关, 因此得到的多态性标记位点密度还不够高, 导致有些连锁群位点不够均匀。

关键词: 红麻, SRAP, ISSR, 遗传连锁图谱

## Abstract

*Kenaf* (*Hibiscus cannabinus*) is the important fiber crop for textile industry and paper manufacture. Molecular markers-assistant breed and genetic map construction is drop behind the major crop. By now, the genetic map of kenaf has not been reported. Genetic map construction can offer the detail description of kenaf gene structure, it's not only the important field in kenaf genetic research, but it's also the theoretical basis for kenaf gene location and gene clone. using SRAP and ISSR markers we constructed the kenaf genetic linkage map in kenaf. The major results are as follow:

- (1) with an 203  $F_2$  individuals from the cross of two kenaf lines Ga42 (from gana) and a lian kenaf (from Egypt). sequence-related amplified polymorphism (SRAP) and Inter-simple Sequence Repeat Polymorphism (ISSR) were used to construct a genetic linkage map in kenaf.
- (2) From the kenaf genome, 27 SRAP primer pairs and 5 ISSR primers, which could reveal poly-morphisms between Ga42 and a lian kenaf, were screened out of 19X19 primer combinations of SRAP and 30 ISSR primers.
- (3) These markers generated 108 polymorphic bands in the  $F_2$  population analysis. The average of polymorphic bands produced by one primer pair was 3.4, and the maximum was 8.
- (4) using Mapmaker/3.0, a linkage map was constructed, which consisted of 68 SRAP markers and 10 ISSR markers distributed in sixteen linkage groups ( $LOD \geq 3.0$ ) and spanned 1423.9 cM with an average interval of 18.25 cM between markers. each SRAP primer pair could generate 10—50 clear bands with a length range between 100 and 1000 bp. and about 70% of bands showed strong signal.
- (5) Among the 108 markers, 58 markers (54%) segregated aberrantly against the expected 3:1 ratio. As to Li et al. some SRAP markers

revealed co—dominant alleles in Brassic, but in this study only two co—dominant loci were detected. As kenaf has 18 pairs of chromosomes, In the present study, the kenaf SRAP map includes 16 linkage groups, which may be attributed to small number of markers.

**Key words:** kenaf, SRAP, ISSR, genetic linkage map

# 目 录

## 1 声明

## 2 摘要

## 3 英文摘要

## 4 前言

### 4.1 红麻生产概况及其综合利用的研究进展

#### 4.1.1 红麻生产概况

#### 4.1.2 红麻的研究价值

#### 4.1.3 红麻的生态环保作用

#### 4.1.4 红麻的饲用价值

#### 4.1.5 红麻种子中不饱和脂肪酸等物质的医疗保健功能

#### 4.1.6 红麻全杆抄制纸浆的研发

#### 4.1.7 红麻纤维高档纺织品的开发

#### 4.1.8 红麻纤维的工业与建材利用

### 4.2 红麻种质资源研究进展

#### 4.2.1 红麻种质资源的收集与保存

#### 4.2.2 红麻种质资源的形态与细胞学分类研究

#### 4.2.3 红麻特异种质的鉴定、发掘、及雄性不育材料的创新与利用研究

#### 4.2.4 红麻种质资源的分子标记及亲缘关系研究

#### 4.2.5 红麻特异种质创新与抗虫、抗除草剂转基因研究

#### 4.2.6 红麻种质遗传改良优异材料的创新

#### 4.2.7 国外红麻种质资源研究进展

### 4.3 遗传标记及其应用

#### 4.3.1 SRAP

#### 4.3.2 SRAP 与其它分子标记的比较

### 4.4 分子遗传连锁图谱的构建及研究进展

#### 4.4.1 理论基础

#### 4.4.2 作图群体的建立

#### 4.4.3 遗传连锁图谱的研究进展

#### 4.4.4 构建 DNA 分子遗传图谱的应用研究

## 5 材料与amp;方法

### 5.1 材料

#### 5.1.1 植物材料

#### 5.1.2 实验所用引物

### 5.2 方法

#### 5.2.1 遗传作图亲本及 F2 群体的建立

#### 5.2.2.1 技术路线

#### 5.2.2.2 红麻基因组 DNA 的提取

#### 5.2.2.3 反应程序

#### 5.2.2.4 反应体系

#### 5.2.2.5 电泳检测

#### 5.2.3 数据统计与分析

## 6 结果与分析

3.1	红麻基因组 DNA 提取技术及 SRAP 反应体系优化
3.1.1	红麻基因组 DNA 提取与纯化
3.1.2	SRAP 反应体系的优化
3.2	引物组合筛选
3.3	遗传作图数据处理与统计分析
3.4	红麻 SRAP 分子标记连锁图的构建
4	讨论
	参考文献
	附录
	致谢

## 1 前言

### 1.1 红麻生产概况及其综合利用的研究进展

#### 1.1.1 红麻生产概况

红麻 (*Hibiscus cannabinus*) 属锦葵科木槿属, 俗称洋麻、钟麻, 是一年生草本韧皮纤维植物, 生长期约 4-6 个月, 在世界上分布范围广, 热带、亚热带、温带和寒带均有种植。在非洲各地普遍有野生红麻散布, 亚洲也发现有野生或半野生状态的红麻, 根据前人的研究, 推断其原产于非洲或东南亚<sup>[1-3]</sup>。红麻具有生长速度快、抗逆性强、适应性广等特点; 红麻纤维具有强力大、吸湿性好、散失水分快和耐腐蚀等特点, 有很重要的利用价值<sup>[4]</sup>。红麻纤维传统用途主要是用于麻线、麻绳、麻袋、麻布等产品。我国红麻栽培从 1908 年自印度引入马达拉斯红麻品种试种开始, 迄今有近一百年的历史, 我国是世界第三大红麻生产国, 总产量仅次于印度和孟加拉。历史最高年 1985 年全国种植面积达 100 万  $\text{hm}^2$ , 总产 206 万吨。据 1998—2002 年全国红麻生产调查, 红麻生产面积很不稳定, 1998 年全国生产总面积 5 万  $\text{hm}^2$ , 2001 年最低仅 2.7 万  $\text{hm}^2$ , 之后生产面积逐渐稳定上升, 至 2005 年恢复达 8 万  $\text{hm}^2$ , 近 10 年全国红麻生产呈“V”型发展<sup>[5]</sup>。由于红麻具有生长速度快、适应性广、耐旱、耐盐碱、纤维产量高、纤维品质优良等特性, 二十世纪 80 年代以来几乎取代黄麻, 成为我国栽培面积最大, 单产和总产最高的麻类作物<sup>[1, 2]</sup>。

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

#### 1.1.2 红麻的研究价值

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

材料、板材、动物饲料、可降解地膜、食用、药用等许多领域<sup>[7]</sup>。

### 1.1.3 红麻的生态环保作用

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

### 1.1.4 红麻的饲用价值

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

### 1.1.5 红麻种子中不饱和脂肪酸等物质的医疗保健功能

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

益胆固醇含量,而有益的胆固醇含量保持稳定,认为红麻种子的水溶性多糖可有效预防动脉硬化。

### 1.1.6 红麻全杆抄制纸浆的研发

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

### 1.1.7 红麻纤维高档纺织品的开发

红麻纤维的纤维素含量一般为 70%—75%,木质素为 13%—20%,果胶为 7%—8%,灰分为 2%。红麻是很好的棉纺材料,在我国国民经济建设中发挥重

要作用。但是由于受到化纤的冲击,红麻传统生产市场严重萎缩。近年来由于人类返朴归真意识的增强,对自然纤维的需求也日益增多;因而红麻综合利用和多用途开发也受到重视并已全面展开。随着我国加入WTO,特别是2005年1月1日全球全面取消纺织品配额制度后,我国的纺织品在国际市场上占有的份额大大增加。但是由于贸易歧视及我国产品品质较差等原因,我国的纺织品在国际市场上受到西欧和美国的贸易壁垒和反倾销等贸易摩擦增加,使我国相关行业遭受巨大损失。要从根本上改变这种被动局面,必须提高产品的品质。红麻纤维与棉花等其它纤维可以混纺成高档纺织品。红麻纤维同亚麻、苧麻类纤维一样有着优良的吸湿和透气性,充分利用与苧麻、亚麻纤维性能相近的红麻纤维作纺织原料,不仅可大大降低生产成本,而且也是发展绿色纺织品的重要内容。研究表明,棉麻混纺织物具有清爽、透气、抗菌、舒适、防静电等优点<sup>[15]</sup>。

### 1.1.8 红麻纤维的工业与建材利用

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

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

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

## 1.2 红麻种质资源研究进展

我国红麻种植历史悠久,1908年,由台湾省从印度孟买引进Madras Red, Madras Blue, Cabac等试种,1927年吉林省公主岭农事试验场从前苏联引进“塔什干”红麻品种种植,1934年引入浙江杭州湾一带栽培,获得成功。但引进品种易感红麻炭疽病一号生理小种,早熟,纤维单产低。为提高品种抗病力和单产水平,20世纪50年代末至60年代加强了新品种选育与国外高产品种的引进,先后育成并投入红麻2号、4号、7号、植保506、辽红1号、辽34早、714等以及引进青皮三号品种,控制了炭疽病对红麻毁灭性危害。60年代末70年代中,国内大面

积推广国外引进品种青皮三号、非洲红麻的过程中，同时带来红麻炭疽病二号生理小种，导致国内原有品种严重染病。为尽快克服红麻品种抗病，科研部门经过筛选抗病新材料、配置新组合，成功选育722、7139、南选、宁选、7435等，这些品种产量、抗性比引进上一轮育成品种有很大提高，对解决品种抗性与提高我国当时纺织原料紧缺发挥了重要作用。80年代选育出高产、优质、多抗品种7804、粤743、浙433、832、闽红一号等品种；随着创新种质资源大量积累，综合抗逆性好、超高产杂交组合“中红系列”、“中杂系列”、“福红系列”、粤743特色品种投入生产，每年以1—1.4万 $\text{hm}^2$ 速度递增，一般增产20%~35%，新品种覆盖率65%。由于良种高产与抗病融为一体，给我国红麻产业发展和种子集约化生产注入了新的活力<sup>[5]</sup>。

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

### 1.2.1 红麻种质资源的收集与保存

我国十分重视麻类种质资源工作，从“六·五”到“十·五”都把麻类种质资源研究列入国家科技攻关项目，保证了麻类资源的连续性和系统性。我国原来保存的红麻种质资源很少，1984年统计仅有68份，且品种间亲缘关系较近，因此当时的研究工作仅限于搜集、保存和进行简单的性状鉴定。根据“资源共享”原则，我国得到了红麻9个近缘种遗传资源155份。从非洲搜集到的野生红麻资源在沼泽地或接近沙漠等不同环境下均能生长，表现出较强的抗逆性。1985年中国农业科学院麻类研究所从美国引进来源于31个国家和地区的红麻品种325份，并首次搜集到野生资源，大大丰富了我国红麻基因库<sup>[21-25]</sup>。1986年国际黄麻组织（IJO）为丰富黄、红麻的基因库，先后派了包括我国农业科学院麻类研究所等单位的5个考察队，到非洲肯尼亚和坦桑尼亚东北部搜集黄、红麻资源<sup>[26]</sup>。我国许多科研单位搜集和保留了红麻种质资源，如中国农科院麻类研究所、广西农科院、福建农林大学、辽宁省棉麻所、广东省农科院经作所等。1987年我国已保存有红麻种质资源600多份，2006年我国已搜集保存国内外红麻种质资源

材料 1600 多份，成为拥有红麻资源数量最多的国家，因此有条件进行系统深入的研究。

### 1.2.2 红麻种质资源的形态与细胞学分类研究

在红麻种质资源研究的初始阶段，世界各国主要以植物学形态分类和性状鉴定为研究重点。根据不同品种的茎色，红麻可分为绿茎和红茎两大类型。在红茎类型中，红麻可分为微红、淡红、红和紫红等。红麻叶型变化较大，按叶片有无开裂可分为全叶型和裂叶型两种。在裂叶型品种中，根据裂片数目又分为五裂叶和七裂叶等。根据不同品种在原产地或接近地区的生育期长短，红麻品种可划分为特早熟、早熟、中熟、晚熟和极晚熟五种类型。Howard 等提出以叶型、茎色、叶柄色、熟型和花瓣色等性状将红麻进行分类 (Dempsey, J.M.1979)。虽然评价指标和性状有一定变动，但这一评价、鉴定及分类方法一直被广泛采用 (Edmonds, J.M, 1987)。中国农业科学院麻类所根据叶型、茎色、生育期等将 68 份红麻种质资源分为 23 种形态类型 (1982)。邓丽卿等 (1991) 对来源于不同国家和地区 450 份红麻栽培及野生资源进行了分类研究，认为红麻的植物学形态特征十分丰富，其叶、茎、花、果、种子等都展现出多种多样的形态。如红麻的叶型有裂叶和全叶两大类；叶柄色分绿、微红、浅红、红、紫等；花冠大小分为普通型、特大型、小花型等三类；花的颜色有黄、红、紫、蓝等多类；株型分高大型、矮生短结间型、分枝型等三类；种子分大籽粒与小籽粒等。依据形态观察结果，把我国保存的红麻种质资源分为 29 个类型。同时他们以从国外引进的木槿属 *Furcaria* 组植物 14 个种为材料，研究了其形态分类、细胞遗传学和生物学特性等。研究表明红麻群落内种的差异主要区别于苞片及萼片，其次为叶、茎和种子等。对细胞遗传学观察的结果表明，红麻的染色体构型一般为 18 个二价体，全部配对。但也发现极少数为 17 个二价体加 2 个一价体或 16 个二价体加 4 个一价体，没有观察到三价以上的染色体 (邓丽卿等, 1994)。种间杂交结果表明，具有相同染色体数目的亲本杂交较易成功；若两亲本染色体数目不同，则以染色体数目较少的亲本为母本，杂交较易成功；花柱长度基本相同的两个种杂交也较易成功。粟建光等 (1995) 对 9 份红麻材料的核型分析认为，染色体的随体按大小可分为普通型、较大型和特大型 3 类。李爱青 (1991) 研究了 7 份不同来源红麻品种的异染色质，发现红麻染色体有两种类型异染色质，且品种间异染色质含

量变幅较大。唐晓敏（2003）对 14 个红麻品种的染色体核型进行了研究，结果表明 14 个品种的核型基本为对称型，但染色体的随体大小、数目等方面存在一些差异。可见不同类型随体的存在对红麻基因定位、生物技术应用、种质纯度鉴定有一定意义。以上研究为红麻细胞遗传学、品种选育和生物学基础研究提供了科学依据<sup>[27-30]</sup>。

### 1.2.3 红麻特异种质的鉴定、发掘、及雄性不育材料的创新与利用研究

经过几十年的努力，我国已初步建成了红麻遗传资源的研究体系，资源性状鉴定、优异基因的发掘、生物学、纤维品质和分类等研究也取得了很大成就，并发掘出一大批优、特资源提供育种、科研和生产利用。如福建农林大学育成的高产、中偏迟熟无刺红麻新品种金山无刺（祁建民等，1999），茎秆光滑无刺，减轻了麻农在田间作业和种子收获时的肌肤之苦，受到广大麻农的欢迎。中国农业科学院麻类研究所在 1996 年配置的一个杂交组合后代中发现了红麻雄性不育株。其开花时自交结实率为 0，表现为全不育。雄性不育株来自于从澳大利亚引进的红麻品种 ATA 的组合后代。雄性不育株的发现对大规模利用红麻杂种优势具有重要的理论和实际意义（陈安国，2003）<sup>[31-32]</sup>。2006 年中国麻类研究所已成功利用其所发现的雄性不育系配置出优势较强的杂交红麻新组合。此外，2001 年湖北农学院在红麻杂交、自交和卫星搭载红麻种子后代中发现了一类表现数量遗传特征的雄性不育株，其原始群体中有半不育、可育和后期发生育性转换等现象。他们还在野生红麻中发现了一株雄性不育突变体，表现为花药瘦瘪不裂开，当即以栽培品种为父本于两类不育材料杂交，还以野生红麻为母本与栽培品种杂交，于 2004 年育成 K03A 红麻雄性不育系。此后，还育成了保持系，并测交筛选出优势为中等的杂交红麻组合。

### 1.2.4 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遗传多样性与亲缘关系。而且红麻花大色艳，蜜腺特别丰富，容易通过蜜蜂、昆虫等传播花粉，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材料的亲缘关系，以及明确种质间的遗传差异性，为红麻新品种的选育、杂交亲

本的选配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。郭安平等(2002)利用 RAPD 标记对 Furcari 组中红麻及其 6 个近源种 25 份材料,用筛选的 16 个引物扩增出 192 个 RAPD 条带,其其中多态性条带 149 条,多态性比率为 77.6%,并将 25 份材料划分为 7 个组。可将近源种与栽培品种按亲缘关系远近清楚分为不同的类群。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<sup>[33-34]</sup>。祁建民等(2003)用 ISSR 和 RAPD 技术研究了黄麻种质资源的遗传多样性及其亲缘关系,能较好地揭示种间和种内基因型的遗传差异和亲缘关系。中国麻类所李德芳利用杂交亲本的血缘关系研究和分析了我国新育成品种的亲缘与血缘关系。陶爱芬用 ISSR 技术分析了红麻优异种质资源遗传多样性与亲缘关系<sup>[17][35]</sup>。王晓飞、祁建民等(2005)对 84 份红麻材料用 SRAP 分子标记进行了聚类分析,揭示了野生种与半野生种和栽培品种之间的基因型遗传差异较大。而在栽培品种的不同类群中,也存在一定的遗传差异<sup>[36]</sup>。

### 1.2.5 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。红麻基因工程的研究起步较晚但进展迅速,曹德菊等(2000)对利用花粉管法将外源抗除草剂基因导入红麻的有效方法及参数进行了研究,并通过 PCR 分析及 Southern 杂交技术对所获抗除草剂转基因红麻进行了分子水平的验证,证明外源抗除草剂基因已整合入红麻基因组<sup>[37]</sup>。如福建农林大学采用花粉管通道法将苧麻的 DNA 直接导入并和辐射诱变技术结合,通过回交与轮回选择等技术,在我国首次创新 2 份茎秆光滑无刺的稀有红麻重要种质 901 和 902,并育成了茎秆光滑无刺的品种金山无刺。最近又相继育成无刺超高种子产量(高油)的特用红麻新类型红光 1 号、红光 2 号,并在亚油酸的多用途研发上有重大进展<sup>[38]</sup>。祁建民、徐建堂等通过花粉管法将外源抗虫、抗除草剂基因导入红麻基因组,目前已

选育出表现高抗的品系，其大田和实验室分子水平鉴定已经得到验证。

### 1.2.6 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起步晚，但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，如红麻 7 号、非洲裂叶、EV-41 等；评价、鉴定出一批高产、优质、抗病的优异资源，如纤维品质优异种质资源泰红 763、闽红 397、印度红、福红 5 号、福红 7 号等，高产优质遗传资源福红 2 号、福红 3 号、福红 951、福红 991、KB11、KB2 等，优异高抗资源 85-224、85-133 等。我国红麻种质资源的搜集、鉴定、评价和创新等研究工作对红麻品种改良起到了重要作用<sup>[39-40]</sup>。至 20 世纪 80 年代我国红麻育种取得了较大突破，育成了一批高产优质抗病新品种，并在生产上大面积推广应用，使我国红麻单产居国际领先水平。“十·五”期间我国育种单位选育的福红 951、福红 952、KB11、KB2、闽红 88/31、浙 3 等品种，比对照粤 743 增产 12.39%—17.75%，其它性状大部分优于对照。中国农业科学院麻类研究所选育的 H305、SCS11-04 分别比对照红引 135 增产 22.10%和 17.04%，其纤维品质、主要农艺性状、抗逆性均优于对照(汤清明等，2001)<sup>[41-42]</sup>。福建农林大学根据红麻为喜温短日常异交作物的特性，改革了红麻传统的育种程序，采用混合一系谱法与穿梭育种法相结合的综合育种新技术，育成了一批丰产性高、纤维品质优良、稳定性好、适应性广的红麻新品种，如福红 1 号、福红 2 号、福红 3 号、福红 991、福红 992 等福红系列品种。2003—2004 年通过的福建省区试鉴定品种福红 992 两年 8 点次平均每公顷原麻产量 7778t，比对照粤 743 增产 25.7%，居福建省区试供试品种首位(陈双龙等，2005)<sup>[43]</sup>。

### 1.2.7 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。1943 年美国农业部曾与联合纤维共同体(CFC)合作，在古巴开展了一个红麻研究项目，成功地选育了几个优良红麻品种 Cuba108, Cuba2032 等<sup>[44-47]</sup>。美国于上个世纪六十年代通过种间杂交，引进木槿属近缘种的抗根结线虫基因，玫瑰麻 (*H.Sabdariffa var altissima*) 被确认为最理想的提供外源抗原的红麻近缘种。美国科学家 Colyer, Cook, Riggs, Mullin 等已发表了一系列有关病原病害或根结线虫影响红麻产量的报道。因此，

对红麻种质抗这些逆生境的鉴定与评价工作尤其必要。过去几十年中,美国等国家红麻品种改良研究在增强品种的增产潜力,提高抗炭疽病和根结线虫能力方面取得了很大成功<sup>[48-51]</sup>。今后的重点将继续放在提高红麻种质的纤维品质、增强抗根结线虫、真菌病害和盐碱能力等方面,以保持红麻种植业的健康、快速发展。

21 世纪农作物育种技术的总体发展方向是:种质扩增、改良和创新提高农产品的质量;应用生物技术研究,提高育种效率和创新能力。红麻育种核心目标是加速提高杂交种的生产潜力和利用价值。通过遗传改良的途径,达到抗病、抗虫、优质、耐旱、耐贫瘠、耐低磷等种质的创新,以及在红麻杂种优势利用上的跨越发展(陈安国等, 2001)<sup>[52]</sup>。由此可见红麻优异种质资源的评价、鉴定和创新在红麻新品种选育和生产发展中有着举足轻重的作用。

### 1.3 遗传标记及其应用

遗传学上通常将生物体中可识别的染色体或染色体的一段、等位基因、或在家系中传递的任何一种遗传特性等称为遗传标记(genetic markers)。遗传标记的内涵是随着遗传学,特别是基因概念的发展而发展的。经典遗传学中是以形态标记和细胞学标记为基础的。20 世纪末,由于遗传学在基因定位、遗传作图、基因组研究及群体遗传学与进化遗传学等领域的扩展与应用,经典的、基于表型的形态学、细胞学水平上的遗传标记已经远远不能满足要求,一批新型的遗传标记,如蛋白质标记、同工酶标记、DNA 标记等分子标记被开发利用<sup>[18] [53-55]</sup>。当前遗传标记主要有 4 种类型:

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

(2) 细胞标记(cytological markers):染色体畸变如倒位、移位等使得染色体数目及结构的变化常常引起表型的变化,因此染色体的变化可以作为一种细胞学的遗传标记。细胞学标记主要是染色体核型(染色体数目、大小、着丝点位置等)和带型。显然这些标记的数目也很有限。

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

表 1 常用的 DNA 分子标记特性比较

Table 1 The comparison of main DNA molecular Markers

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

(4) 分子标记 (molecular markers) 是一种新的理想的遗传标记形式。分子标记辅助选择 (Molecular marker-assisted selection, 简称 MAS) 是现代分子生物学与传统遗传育种的结合点, 借助分子标记可以对育种材料从 DNA 水平上进行选择, 从而达到作物产量、品质和抗性等综合性状的高效改良。20 世纪 80 年代初, 限制性内切核酸酶技术和基因扩增技术以及随之而来的 DNA 直接测序, 引

发了对 DNA 多态性的研究。DNA 分子标记是在 DNA 分子水平上, 通过一定方式或特殊手段来反映生物个体或种群之间具有差异性状 DNA 片段。它有以下优点: (1) 在植物体的各个组织、各发育阶段均可检测到, 不受外界环境限制, 不存在表达与否的问题; (2) 多态性高; (3) 数量极多, 遍布整个基因组。目前, 分子标记已广泛应用于种质资源研究、遗传图谱构建、目的基因定位、起源进化研究和标记辅助选择育种等方面。分子标记育种需要以下技术的支撑: (1) 多态性高的分子标记绘制的遗传图谱; (2) 高效自动化技术; (3) 与目标农艺性状基因紧密连锁的经济有效的分子标记。生物在长期进化过程中产生了许多由 DNA 碱基序列变异所致的遗传变异。以物种内这种极为丰富的 DNA 碱基序列变异为基础发展起来的分子标记技术已相继出现几十种, 它们各具特色, 为不同的研究提供了丰富的技术手段。但是分子标记育种技术目前尚不完善和成熟, 其不能作为一种育种方法单独使用, 应将分子标记育种技术与常规育种技术相结合<sup>[56-58]</sup>。目前, 常用的 DNA 分子标记有 RAPD、RFLP、AFLP、SSR、ISSR、SNP 和 SRAP 等。常用分子标记的特性如表 1。

### 1.3.1 SRAP

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

们做为标记的来源。由于内含子、启动子和间隔序列在不同物种甚至不同个体间变异很大,富含AT的区域序列通常见于启动子和内含子中,SRAP中使用的反向引物的3'端含有核心AATT,以特异结合富含AT区,这就使得有可能扩增出基于内含子与外显子的SRAP多态性标记。该标记具有简便、高效、产率高、高共显性、重复性好、易测序,以及便于克隆目标片段的特点,目前已被成功的应用于遗传多样性分析、遗传图谱的构建、重要性状的标记以及相关基因的克隆等方面。Budak等利用SRAP标记分析了野牛草(*Buffalograss*)的43个基因型遗传多样性,结果也表明SRAP是一个评价遗传多样性、品种鉴定和系统发生的有效工具。目前已在其他作物如马铃薯、芸薹、水稻、玉米、莲藕、红花、苧麻、西瓜、花生、生菜、油菜、大蒜、苹果、樱桃、柑橘、甘薯、辣椒、烤烟、芹菜以及草业中成功扩增。并用SRAP分子标记成功构建了芸薹、烤烟、棉花、黄瓜、甘薯等的遗传连锁图谱,定位了黄瓜的始花基因。<sup>[59-74]</sup>。

由于SRAP是近年刚刚发展起来的分子标记,对它详细反应体系的建立的报道较少,而且引物应用于不同的物种反应条件也不同,因此对引物的筛选和反应条件的优化是非常必要的。本研究以阿联红麻和Ga42为亲本杂交产生F<sub>2</sub>代构建红麻的遗传连锁图谱,旨在探讨红麻DNA的提取和SRAP分子标记构建红麻遗传连锁图谱的可行性。为进一步开展红麻的基因定位、标记辅助育种、数量性状位点(Quantitative Trait Loci, QTL)定位等提供科学的依据。

### 1.3.2 SRAP与其它分子标记的比较

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

及 8 份南瓜属材料遗传多样性进行分析, 24 个引物组合产生的 114 个标记中多态性占 33%, 虽然低于 RAPD 比例, 但聚类分析与主坐标分析表明, SRAP 标记分析可将材料按照使用类型 (食用、饲用、观赏用) 来分组。因此, 在对育种目标性状的评价方面, 明显优于 RAPD 标记<sup>[75-77]</sup>。

与其它分子标记相比, SRAP 的特点主要表现在: 方便快捷, 只需要极少量 DNA 材料, 不需要 Southern 杂交, 不需要预先知道 DNA 的顺序信息, 试验结果稳定可靠, 可以快速获得大量的信息。而且再现性高, 重复性好, 因而非常适合于品种指纹图谱的绘制, 遗传连锁图的构建及遗传多样性等方面的研究。在一些多态性很少, 而且待测样品较少的情况下, 用 SRAP 分析能达到满意的结果。研究结果均表明 SRAP 所产生的多态性远远超过了 RFLP 和 RAPD 等, 目前被认为是 DNA 分子标记技术中多态性最为丰富的一项技术。由于 SRAP 特殊的引物设计, 可检测基因的可译框区域, 因而体现的是物种基因之间的多态性, 因而检测的结果更能反映物种的遗传多样性和亲缘关系<sup>[78]</sup>。

## 1.4 分子遗传连锁图谱的构建及研究进展

构建遗传连锁图谱的基本步骤包括: 选择适合作图的 DNA 标记; 根据遗传材料之间的 DNA 多态性, 选择用于建立作图群体的亲本组合; 建立具有大量 DNA 标记处于分离状态的分离群体或衍生系; 测定作图群体中不同个体或株系的标记基因型; 对标记基因型数据进行连锁分析, 构建标记连锁图。

### 1.4.1 理论基础

连锁图谱构建的理论基础是染色体的交换与重组。在细胞减数分裂时, 非同源染色体上的基因相互独立、自由组合, 同源染色体上的基因产生交换与重组, 交换的频率随基因间距离的增加而增大。位于同一染色体上的基因在遗传过程中一般倾向于维系在一起, 而表现为基因连锁。它们之间的重组是通过一对同源染色体的两个非姊妹染色单体之间的交换来实现的。假设某一对同源染色体上存在 A-a, B-b 两对连锁基因, 现有两个亲本 P<sub>1</sub> 和 P<sub>2</sub>, 它们的基因型分别为 AABB 和 aabb, 两亲本杂交产生 AaBb 双杂合体。F<sub>1</sub> 在减数分裂过程中应产生 4 种类型的配子, 其中两种为亲型配子 AB 和 ab, 两种为重组型配子 Ab 和 aB。由于 A-a 和 B-b 位于同一染色体上, 要产生重组型配子必须在这两个基因的连锁区段上发生交换。重组型配

子所占的比例取决于减数分裂细胞中发生交换的频率。交换频率越高,则重组型配子的比例越大。重组型配子最大可能的比例是50%,这时在所有减数分裂的细胞中,在两对基因的连锁区段上都发生交换,相当于这两对基因间无连锁,表现为独立遗传。重组型配子占总配子的比例称为重组率,用 $r$ 表示。重组率的高低取决于交换的频率,而两对基因之间的交换频率取决于它们之间的直线距离。重组率的值变化于完全连锁时的0%到完全独立时的50%之间。因此重组率可用来表示基因间的遗传图距,图距单位用厘摩 (centi-Morgan, cM) 表示,1cM的大小大致符合1%的重组率<sup>[74]</sup>。

#### 1.4.2 作图群体的建立

要构建DNA标记连锁图谱,必须建立作图群体。建立作图群体需要考虑的重要因素包括亲本的选配、分离群体类型的选择及群体大小的确定等。

##### 1.4.2.1、亲本的选配

亲本的选择直接影响到构建连锁图谱的难易程度及所建图谱的适用范围。一般应从四个方面对亲本进行选择,首先要考虑亲本间的DNA多态性。亲本之间的DNA多态性与其亲缘关系有着密切关系,这种亲缘关系可用地理的、形态的或同工酶多态性作为选择标准。一般而言,异交作物的多态性高,自交作物的多态性低。第二,选择亲本时应尽量选用纯度高的材料,并进一步通过自交进行纯化。第三,要考虑杂交后代的可育性。亲本间的差异过大,杂种染色体之间的配对和重组会受到抑制,导致连锁座位间的重组率偏低,并导致严重的偏分离现象,降低所建图谱的可信度和适用范围;严重的还会降低杂种后代的结实率,甚至导致不育,影响分离群体的构建。由于各种原因,仅用一对亲本的分离群体建立的遗传图谱往往不能完全满足基因组研究和各种育种目标的要求,应选用几个不同的亲本组合,分别进行连锁作图,以达到相互弥补的目的。第四,选配亲本时还应对亲本及其 $F_1$ 杂种进行细胞学鉴定。若双亲间存在相互易位,或多倍体材料(如小麦)存在单体或部分染色体缺失等问题,那么其后代就不宜用来构建连锁图谱<sup>[74]</sup>。

##### 1.4.2.2 分离群体类型的选择

根据其遗传稳定性可将分离群体分成两大类:一类称为暂时性分离群体,如 $F_2$ 、 $F_3$ 、 $F_4$ 、BC、三交群体等,这类群体中分离单位是个体,一经自交或近交其

遗传组成就会发生变化,无法永久使用。另一类称为永久性分离群体,如RI、DH群体等,这类群体中分离单位是株系,不同株系之间存在基因型的差异,而株系内个体间的基因型是相同且纯合的,是自交不分离的。这类群体可通过自交或近交繁殖后代,而不会改变群体的遗传组成,可以永久使用。构建植物遗传连锁图谱的群体有:F<sub>2</sub>代群体、回交群体(Bc)、回交自交系群体(BIL)、重组自交系群体(RII S)、单粒传系群体(SSD)、加倍单倍体群体(DHs)、近等基因系群体(NII),不同群体的特点见表2。目前构建遗传连锁图谱主要应用F<sub>2</sub>代群体、RIIs和DH群体。F<sub>2</sub>代群体能提供大量的信息,但实验不能重复,而构建永久性分离群体是作图成功和高效的关键,RILs和DH群体为永久性群体,稳定性较好<sup>[79]</sup>。

表2 主要作图群体类型及特点

Table 2 Types and characteristics of main mapping population

特点 Characteristics	F <sub>2</sub>	BC <sub>1</sub>	BIL	DH	RIL	NIL
群体的形成 Form of colony	F <sub>1</sub> 自交个体 Individual of F <sub>1</sub> selfing	F <sub>1</sub> 回交后代 Generation of F <sub>1</sub> back-cross	F <sub>2</sub> 自交回交后代 Generation of F <sub>2</sub> selfing and back-cross	F <sub>1</sub> 花培 Flower culture of F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub> 自交后代 Generation of F <sub>2</sub> selfing	F <sub>2</sub> 回交自交后代 Generation of F <sub>2</sub> back-cross and selfing
准确度 Accuracy	低 Low	低 Low	高 High	高 High	高 High	最高 Highest
需群体大小 Need big or small colony	大 Big	大 Big	小 Small	小 Small	小 Small	小 Small
是否永久群体 Permanent colony(yes/no)	否 No	否 No	否 No	是 Yes	是 Yes	是 Yes
分离比率 Ratio of segregation	1:2:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
构建费用 Construction cost	低 Low	低 Low	高 High	中等 Middle	中等 Middle	高 High
构建时间 Construct time	短 Short	短 Short	长 Long	短 Short	长 Long	长 Long

#### 1.4.2.3 群体大小的确定

遗传图谱的分辨率和精度,很大程度上取决于群体大小。群体越大,则作图精度越高。但群体太大,不仅增大实验工作量,而且增加费用。因此确定合适的群体大小是十分必要的。合适群体大小的确定与作图的内容有关。大量的作图实践表明,构建DNA 标记连锁图谱所需的群体远比构建形态性状特别是数量性状的遗传图谱要小,大部分已发表的分子标记连锁图谱所用的分离群体一般都不足100个单株或家系。而如果用这样大小的群体去定位那些控制农艺性状尤其是数量性状的基因,就会产生很大的试验误差。从作图效率考虑,作图群体所需样本容量的大小取决于以下两个方面:一是从随机分离结果可以辨别的最大图距,二是两个标记间可以检测到重组的最小图距。因此,作图群体的大小可根据研究的目标来确定。作图群体越大,则可以分辨的最小图距就越小,而可以确定的最大

图距也越大。如果建图的目的是用于基因组的序列分析或基因分离等工作,则需用较大的群体,以保证所建连锁图谱的精确性。在实际工作中,构建分子标记骨架连锁图可基于大群体中的一个随机小群体(如150个单株或家系),当需要精细地研究某个连锁区域时,再有针对性地在骨架连锁图的基础上扩大群体。这种大小群体相结合的方法,既可达到研究的目的,又可减轻工作量。作图群体大小还取决于所用群体的类型。如常用的 $F_2$ 和 $BC_1$ 两种群体,前者所需的群体就必须大些。这是因为, $F_2$ 群体中存在更多种类的基因型,而为了保证每种基因型都有可能出现,就必须有较大的群体。一般而言, $F_2$ 群体的大小必须比 $BC_1$ 群体大约大一倍,才能达到与 $BC_1$ 相当的作图精度。所以说, $BC_1$ 的作图效率比 $F_2$ 高得多。在分子标记连锁图的构建中,DH群体的作图效率在统计上与 $BC_1$ 相当,而RI群体则稍差些。总的说来,在分子标记连锁图的构建方面,为了达到彼此相当的作图精度,所需的群体大小的顺序为 $F_2 > RI > BC_1$ 和DH<sup>[74]</sup>。

#### 1.4.2.4 分离数据的收集与数字化

从分离群体中收集分子标记的分离数据,获得不同个体的DNA多态性信息,是进行遗传连锁分析的第一步。通常各种DNA标记基因型的表现形式是电泳带型,将电泳带型数字化是DNA标记分离数据进行数学处理的关键。下面以RFLP为例来说明将DNA标记带型数字化的方法。假设某个RFLP座位在两个亲本( $P_1, P_2$ )中各显示一条带,由于RFLP是共显性的,则 $F_1$ 个体中将表现出两条带,而 $F_2$ 群体中不同个体的带型有三种,即 $P_1$ 型、 $P_2$ 型和 $F_1$ (杂合体)型。可以根据习惯或研究人员的喜好,任意选择一组数字或符号,来记录 $F_2$ 个体的带型。例如,将 $P_1$ 带型记为1, $P_2$ 带型记为3, $F_1$ 带型记为2。如果带型模糊不清或由于其它原因使数据缺失,则可记为0。进行DNA标记带型数字化的基本原则是,必须区分所有可能的类型和情况,并赋与相应的数字或符号。比如在上例中,总共有4种类型,即 $P_1$ 型、 $F_1$ 型、 $P_2$ 型和缺失数据,故可用4个数字1、2、3和0分别表示之。如果存在显性标记,则 $F_2$ 中还会出现两种情况。一种是 $P_1$ 对 $P_2$ 显性,于是 $P_1$ 型和 $F_1$ 型无法区分,这时应将 $P_1$ 型和 $F_1$ 型作为一种类型,记为4。另一种情况正好相反, $P_2$ 对 $P_1$ 显性,无法区分 $P_2$ 型和 $F_1$ 型,故应将它们合为一种类型,记为5。对于 $BC_1$ 、DH和RI群体,每个分离的基因座都只有两种基因型,不论是共显性标记还是显性标记,两种基因型都可以识别,加上缺失数据的情况,总共只有3种类型。因而用3个数字就可

以将标记全部带型数字化。在分析质量性状基因与遗传标记之间的连锁关系时,也必须将有关的表型数字化,其方法与标记带型的数字化相似。例如,假设在DH群体中,有一个主基因控制株高,那么就可以将株系按植株的高度分为高秆和矮秆两大类,然后根据亲本的表现分别给高秆和矮秆株系赋值,如1和2。将质量性状经过这样的数字化处理,就可以与DNA标记数据放在一起进行连锁分析。DNA标记数据的收集和处理应注意以下问题:(1)应避免利用没有把握的数据。由于分子多态性分析涉及许多实验步骤,很难避免出现错误,经常会遇到所得试验结果(如X-光片)不清楚等问题。如果硬性地利用这样没有把握的数据,不仅会严重影响该标记自身的定位,而且还会影响到其它标记的定位。因此,应删除没有把握的数据,宁可将其作为缺失数据处理或重做试验。(2)应注意亲本基因型,对亲本基因型的赋值(如P<sub>1</sub>型为1, P<sub>2</sub>型为2),在所有的标记座位上必须统一,千万别混淆。如果已知某两个座位是连锁的,而所得结果表明二者是独立分配的,这就有可能是把亲本类型弄错引起的。(3)当两亲本出现多条带的差异时,应通过共分离分析鉴别这些带是属于同一座位还是分别属于不同座位。如属于不同座位,应逐带记录分离数据<sup>[74]</sup>。

#### 1.4.3 遗传连锁图谱的研究进展

我国的植物基因组及相关研究始于20世纪90年代初,比国外晚3~5年。1992年,我国农作物的基因研究项目——“中国水稻基因组”计划正式开始启动。不久,国家“863”、“973”、“948”、国家自然科学基金、国家基础研究项目、国家攻关计划以及各部门与地方上的许多研究计划都先后设立了许多与植物遗传连锁图谱构建有关的研究项目,如国家“863”计划设立了“大豆基因图谱的构建与抗病基因标记”等项目。自我国植物遗传作图开展以来,发展非常迅速,在短短的十几年时间内,已有上千名科学工作者和几十家高校及科研单位投入该领域研究,促进该研究领域的快速发展。目前,我国已构建了主要农作物的遗传连锁图,并完成了部分林木遗传连锁图谱的绘制。目前用于植物遗传作图的主要分子标记有RFLP、RAPD、AFIP、SCAR、SSR、TAS、ISSR等<sup>[79]</sup>,而新开发的SRAP分子标记仅在芸苔、棉花、黄瓜、甘薯中成功构建了遗传图谱<sup>[62-64][71]</sup>,我们用SRAP构建的红麻的首张遗传图谱,填补了国内外的遗传图谱领域的一个空白遗传连锁图谱的构建是进行基因组系统研究的基础,而红麻遗传连锁图谱的构建目

前国内外尚未见到报道。图谱构建后可为进一步的构建高密度的分子标记连锁图、红麻基因克隆、基因定位、分子标记辅助育种等研究的开展打下坚实的基础,从而促进现代生物技术与常规育种技术相结合,缩短育种进程,提高育种效率,大大促进红麻遗传育种的理论与实践,为红麻改良应用提供有价值的科学依据。

#### 1.4.4 构建DNA分子遗传图谱的应用研究

##### 1.4.4.1 QTL定位

遗传图谱构建的一个重要方面就是将数量性状分解成多个QTL,将这些QTL定位到染色体的精确位点,并计算每一QTL对表型的贡献率以及各个相对QTL间的相互作用方式(如加性效应、显性效应和隐性效应等)及不同QTL之间的互助关系。这不仅可以阐明复杂的多基因控制的数量性状的遗传基础,而且可以根据QTL相邻的分子标记及QTL对表型的贡献大小,实现对数量性状的分子标记辅助选择<sup>[80]</sup>。随着分子遗传图谱的建立和发展,QTL定位经历了单标记定位法、区间作图法和复合区间作图法等几个阶段<sup>[81]</sup>。

近年来主要对农作物的育性、抗性、生长发育、产量及其构成因素和品质等进行了研究,在有关的染色体连锁群上找到了相应的QTL位点<sup>[81, 82]</sup>。这些研究结果对进一步辅助选择育种及基因克隆都有重要意义。例如王风平等<sup>[83]</sup>利用全基因组QTL扫描方法对水稻一个籼型光敏不育组合(32001S / 明恢63)的240个F<sub>2</sub>群体的育性相关位点进行了检测,结果发现在第2、3、7、9和11染色体上分别找到了育性相关的QTL位点。李维明等<sup>[84]</sup>的研究发现,控制小麦千粒重的QTL有2个,被定位在7D染色体上。

##### 1.4.4.2 比较基因组研究

比较基因组研究主要是利用相同的DNA分子标记在相关物种之间进行遗传或物理作图,比较这些标记在不同物种基因组中的分布特点,揭示染色体或染色体片段上的基因及其排列顺序的相同(共线性)或相似性(同线性),并由此对相关物种的基因组结构和起源进化进行分析<sup>[85]</sup>。例如Moore等<sup>[86]</sup>在水稻19个连锁区段的基础上,对水稻、小麦、玉米、谷子、甘蔗、高粱6种作物进行了比较遗传作图。将6种作物的染色体分成区段并重排,发现其具有高度相似性。6种作物的保守同源区段排列在一起形成了一个环状的禾本科原始基因组框架,表明它们来源于一

个共同的祖先,这对起源进化的研究具有重大意义。比较基因组研究除了对进化研究领域有重大影响外,还可显著增加各种植物可供利用的遗传标记的数量,这对遗传研究较为滞后的植物来说尤为重要<sup>[87]</sup>。目前,一些生物的基因组全序列测序已经完成,比较基因组研究也随之步入了一个新的时代,即可直接在DNA序列水平上对不同生物基因组进行分析,从而对生物的遗传本质达到更深刻的了解<sup>[85]</sup>。

#### 1.4.4.3 基于遗传图谱的基因克隆

克隆基因是分子遗传图谱构建最重要的应用之一。基于遗传图谱的基因克隆也叫定位克隆(Positional cloning),又称图位克隆(Map-based cloning)<sup>[88]</sup>。随着高密度遗传图谱和物理图谱的构建,定位和克隆已成为可能。其过程为首先利用分子遗传图谱,在目标基因的侧翼得到连锁非常紧密的标记;然后由这些标记去筛选大片段DNA文库,鉴定出与标记有关的克隆,继之以亚克隆和染色体步移(Chromosome walking)获得含有目的基因的克隆片段,最终再辅之以转化和互补测验加以验证<sup>[85]</sup>。近年来,运用基于图谱的克隆技术已分离到了大量的植物基因,尤其是与抗病有关的基因<sup>[89, 90]</sup>。例如利用图位克隆法已得到了水稻的白叶枯抗性基因Xa21<sup>[91]</sup>和Xa1基因<sup>[92]</sup>。

#### 1.4.4.4 标记辅助选择(Marker-assisted selection, MAS)

MAS就是通过对与目标性状(基因)紧密连锁的分子标记的检测达到对目标性状的控制。而传统的选择主要是依靠肉眼观测表型性状,这对于受环境条件影响较大的性状则选择效率很低,对于抗病性等质量性状的选择则需采用特殊的接种方法才能鉴定筛选,而生理生化等性状的选择程序则更为复杂。MAS则直接从DNA水平检测目的基因的有无,不受植株生长、性状表达与否(如隐性基因)的影响,真实可靠<sup>[90]</sup>。MAS的优越性主要体现在以下几个方面<sup>[93]</sup>:可克服性状基因型鉴定的困难;可克服性状表现型鉴定的困难;可以在早期进行选择;可以进行更广泛和强度更大的选择;可进行非破坏性性状评价和选择;可提高回交育种效率。例如利用传统回交方法将一个野生种的优良基因转移到栽培品种中,回交20代以上还有可能带有100个以上的其它非期望基因。如果是QTL的转移,由于上位效应问题和连锁累赘更为复杂,将更加困难。利用MAS可以允许选择出那些含有重组染色体(打破了连锁累赘)的个体,从而帮助减小不需要的染色体片断,使得育种

效率至少提高10倍以上<sup>[94]</sup>

## 2 材料与方方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 植物材料

以GA42和阿联红麻为亲本, 杂交产生F<sub>1</sub>代, 对F<sub>1</sub>套袋自交得F<sub>2</sub>代. 将F<sub>2</sub>单株种植, 获得270株单株, 随机选取203株单株作为作图群体. 其中GA42是来源于加纳的半野生种品种, 为裂叶绿杆型, 种子千粒重28克; 阿联红麻是来源于埃及的栽培品种, 为圆叶红杆型, 种子千粒重特大为40克以上, 花、果、茎等可标记性状丰富. 2005年F<sub>1</sub>代到海南三亚福建南繁基地种植, 2006年亲本及F<sub>2</sub>代在福建农林大学遗传所田间实验基地种植.

#### 2.1.2 实验所用引物

SRAP引物采用Li和Quiros、林忠旭等人<sup>[74]</sup>发表的引物, 引物购自上

表 3 SRAP 上引物编号及序列

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

上引 物代号	引物序列	上引 物代号	引物序列
Me1	TGA GTC CAA ACCGGATA	Me11	TGA GTCCAAACCGGAAC
Me2	TGA GTC CAAACCGGAGC	Me12	TGA GTCCAAACCGGAGA
Me3	TGA GTC CAA ACCGGAAT	Me13	TGAGTCCAAACCGGAAG
Me4	TGA GTC CAA ACCGGACC	Me14	TGAGTCCAAACCGGTAG
Me5	TGA GTC CAAACCGGAAG	Me15	TGAGTC CAAACC GGCAT
Me6	TGA GTC CAAACCGGACA	Me16	TGAGTC CAAACC GGTCT
Me7	TGA GTC CAAACCGGACG	Me17	TGAGTC CAAACC GGTAA
Me8	TGAGTC CAAACC GGACT	Me18	TGAGTC CAAACC GGTCC
Me9	TGA GTCCAAACCGGAGG	Me19	TGAGTC CAAACC GGTGC
Me10	TGA GTCCAAACCGGAAA		

表 4 SRAP 下引物编号及序列

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

下引物代号	引物序列	下引物代号	引物序列
Me1	GAC TGC GTA CGA ATT AAT	Me11	GACTGCGTACGAATTCTA
Me2	GAC TGC GTA CGA ATT TGC	Me12	GACTGCGTACGAATTCTC
Me3	GAC TGC GTA CGA ATT GAC	Me13	GACTGCGTACGAATTCTG
Me4	GAC TGC GTA CGA ATT TGA	Me14	GACTGCGTACGAATTCTT
Me5	GACTGCGTACGAATTAAC	Me15	GACTGCGTACGAATTGAT
Me6	GACTGCGTACGAATTGCA	Me16	GACTGCGTACGAATTGTC
Me7	GACTGCGTACGAATTCAA	Me17	GACTGCGTACGAATTCTGA
Me8	GACTGCGTACGAATTCA	Me18	GACTGCGTACGAATTCCA
Me9	GACTGC GTA CGAATTAG	Me19	GACTGCGTACGAATTCTT
Me10	GACTGCGTACGAATTCAT		

海生工, 上引物 19 个, 编号为 Me1— Me19。下引物 19 个, 编号也是 Em1— Em19。SRAP 引物编号及序列见表 3 和 4。

ISSR 引物: 30 个 ISSR 引物购自上海生工, 编号为 UBC801-UBC870。

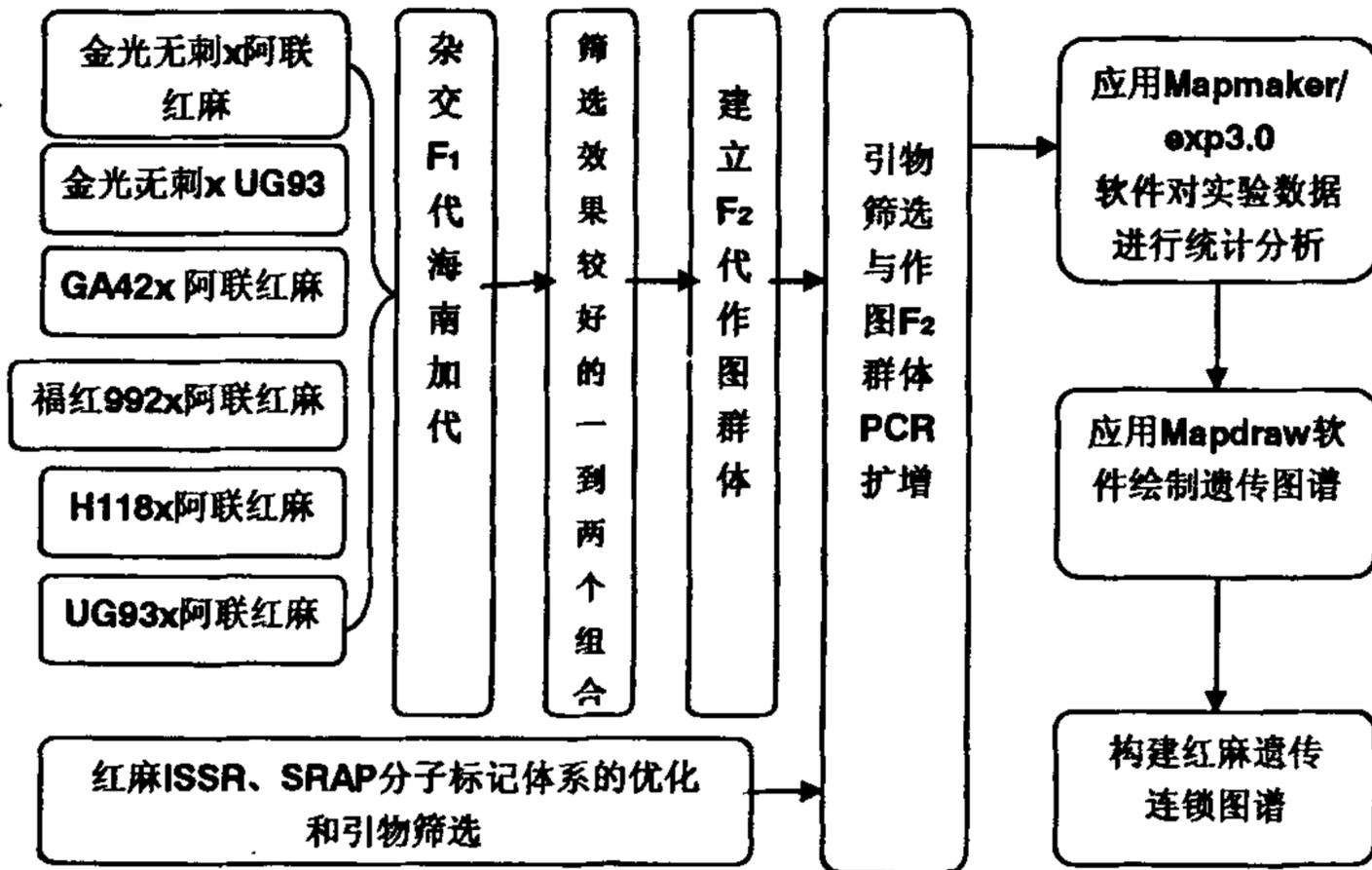
## 2.2 方法

### 2.2.1 遗传作图亲本及 F<sub>2</sub> 群体的建立

本实验选用的作图杂交亲本是在已有的表型性状及 ISSR 和 SRAP 等分子标记聚类分析的基础上选择遗传距离远的品种作为杂交亲本, 为保证实验顺利进行和进行比较分析, 我们选取了六个杂交组合, 分别为 GA42/阿联红麻、福红 992/阿联红麻、金光无刺/阿联红麻、金光无刺/UG93、UG93/阿联红麻、H118/阿联红麻等正反交组合, 为了使各组合花期吻合, 对极晚熟品种 H118 进行每天 10 小时的短日照处理, 于现蕾开花前每天下午去除次日将要开花的母本的雄蕊并套袋, 第二天早上 7、8 点时用杂交父本的花粉给母本花蕾授粉并重新套袋, 所获 F<sub>1</sub> 代种子于当年冬到海南加代, F<sub>1</sub> 套袋自交获得 F<sub>2</sub> 代种子, 根据显隐性关系及表型

去除假杂种，例如裂叶对圆叶为显性，红杆对绿杆为显性。再选择农艺性状差异和基因组DNA遗传距离较大的杂交组合在福建农林大学遗传所田间实验基地种植F<sub>2</sub>代幼苗，观察并记录F<sub>1</sub>代和F<sub>2</sub>代的表型性状。最终，我们选取了组合GA42/阿联红麻的F<sub>2</sub>代幼苗提取F<sub>2</sub>群体各单株基因组DNA在-20保存作为作图群体DNA。

### 2.2.2. 技术路线



### 2.2.3 红麻基因组 DNA 的提取

采用经改进后的 CTAB 法：称取 5g 红麻各单株苗期幼嫩叶片，加入 0.3g 左右的 PVP，用液氮研磨成粉末，迅速装入 50ml 离心管，先加入 150-300  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇，再加入 15ml 提取缓冲液 [Tris-HCl(PH=8.0), 100mmol/L; NaCl, 1.4mol/L; EDTA(PH=8.0), 20mmol/L]，混匀，放入 4℃ 冰箱中，直到研磨完所有的样品，加入 2.5 ml 在 65℃ 下预热的 15%CTAB，轻轻混匀，在 65℃ 水浴 30min，冷却至室温，加入等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1)，温和上下颠倒离心管 30-50 次，4800rpm 离心 20min，取上清，转入新的离心管，并加等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1)，重抽提 1 次，取上清，加两倍体积的冰冷无水乙醇，室温放置，直至絮状沉淀集结，在冰上静置 30min (或在 -20℃ 冰箱中 20min)，钩出 DNA 沉淀 (或稍离心)，转入 1.5ml 离心管中，用 70%乙醇漂洗 2 次，吹干后

加 500—600  $\mu$ l  $T_{50}E_{10}$ , 50 $^{\circ}$ C 水浴溶解 30min, 加 20  $\mu$ l 20  $\mu$ g/ml 的 RnaseA, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30min, 然后加等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1), 温和上下颠倒离心管 30-50 次, 4 $^{\circ}$ C, 12000rpm, 10min, 取上清, 加 2 倍体积的冰冷无水乙醇, 静置 5min, 沉淀 DNA; 4 $^{\circ}$ C, 8000rpm, 5min, 弃上清, 用 70%乙醇漂洗 DNA 沉淀 2-3 次, 超净工作台风干, 溶于 400 $\mu$ l TE 中, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存作为母液, 用时稀释到 50ng/ $\mu$ l。本实验还对红麻基因组 DNA 纯化前后做了对比分析。

#### 2.2.4 反应程序

SRAP 反应程序为: 在 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 反应前 5 个循环在 94 $^{\circ}$ C 1min, 32.8 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min 条件下运行; 随后的 34 个循环复性温度提高到 52 $^{\circ}$ C, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 并在 4 $^{\circ}$ C 下保存。

ISSR 反应程序为: 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 52 $^{\circ}$ C 1min 10s, 72 $^{\circ}$ C 1min 30s, 41 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7min; 4 $^{\circ}$ C 20hrs.

#### 2.2.5 反应体系

在冰上建立 20 $\mu$ l PCR 反应体系见表 5. 由于 ISSR 是单引物, 所以引物量加倍, 为 86 ng/20 $\mu$ l, 其他和 SRAP 一样。由于 SRAP 是一种较新的标记, 所以, 我们对其作了优化。

表 5 SRAP PCR 反应体系

Table 2.4 PCR reaction system

反应体系	所加的量	终浓度
Primer pair(33ng/ $\mu$ l)	1.3 $\mu$ lX2	43 ng/20 $\mu$ l
10xbuffer	2.3 $\mu$ l	1.2xbuffer
Mg <sup>2+</sup> (23mM)	2.3 $\mu$ l	2.7mM
dNTPs(10mM)	0.42 $\mu$ l	0.2mM
Taq 酶(5U/ $\mu$ l)	0.3 $\mu$ l	1.5U/20 $\mu$ l
DNA(50ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l	60ng/20 $\mu$ l
Sterile water	13.1 $\mu$ l	

#### 2.2.6 电泳检测

PCR 产物采用北京六一仪器厂生产的 DYY-5 型稳压稳流电泳仪, 用 6%聚丙

烯酰胺凝胶电泳分离。电泳缓冲液为  $1\times$ TBE。聚丙烯酰胺凝胶电泳的步骤见附录。

### 2.3 数据统计与分析

根据亲本及  $F_2$  作图群体的基因组 DNA 做 PCR 后跑出的多态性电泳条带的显隐性或共显性关系来统计条带，用于计算机分析。

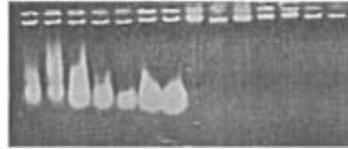
## 3 结果与分析

### 3.1 红麻基因组 DNA 提取技术及 SRAP 反应体系优化

#### 3.1.1 红麻基因组 DNA 提取与纯化

红麻不同生长时期的材料用于 DNA 的提取，对效率和质量会产生一定的影响。成熟的红麻叶片中含有丰富的酚类、单宁、果胶等杂质，且越老的叶片中这些物质含量越高，酚类、单宁易与 DNA 结合形成不可逆复合物，极难除去<sup>[95]</sup>，从而影响 DNA 及 PCR 扩增质量。有些实验在提取完 DNA 后没有进行纯化，结果 PCR 扩增质量不好，甚至扩增不出条带。本研究以苗期红麻新鲜幼嫩叶片为材料，在加液氮研磨之前先加少量 PVP， $\beta$ -巯基乙醇要在加提取缓冲液前临时加入，加入  $\beta$ -巯基乙醇后迅速加入提取缓冲液，整个过程要快，尽量减少所用时间。获得的 DNA 能够进行 PCR 扩增及 SRAP 和 ISSR 分析。如图 1 所示，右边为纯化过的基因组 DNA，左边为没有纯化基因组的 DNA。PCR 扩增结果也有很大差别如图 2。

图 1



#### 3.1.2 SRAP 反应体系的优化

以王晓飞<sup>[36]</sup>等建立的反应体系为基础，本实验对体系作进一步优化，其步骤如下：

##### (1) DNA 浓度梯度

模板 DNA 的含量是制约扩增产量及特异性的一个因素，一般说来，有一个较宽的浓度适宜范围，但太少时无扩增带，太多时特异带又很难出现。本试验从  $20\text{ng}/20\mu\text{l}$ — $120\text{ng}/20\mu\text{l}$  设置梯度试验，反应结果见图 2。结果表明在  $50\text{ng}/20\mu\text{l}$ — $120\text{ng}/20\mu\text{l}$  时效果最佳。

烯酰胺凝胶电泳分离。电泳缓冲液为  $1\times$ TBE。聚丙烯酰胺凝胶电泳的步骤见附录。

### 2.3 数据统计与分析

根据亲本及  $F_2$  作图群体的基因组 DNA 做 PCR 后跑出的多态性电泳条带的显隐性或共显性关系来统计条带，用于计算机分析。

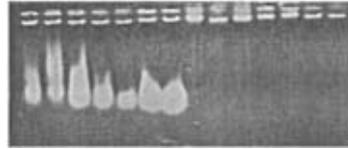
## 3 结果与分析

### 3.1 红麻基因组 DNA 提取技术及 SRAP 反应体系优化

#### 3.1.1 红麻基因组 DNA 提取与纯化

红麻不同生长时期的材料用于 DNA 的提取，对效率和质量会产生一定的影响。成熟的红麻叶片中含有丰富的酚类、单宁、果胶等杂质，且越老的叶片中这些物质含量越高，酚类、单宁易与 DNA 结合形成不可逆复合物，极难除去<sup>[95]</sup>，从而影响 DNA 及 PCR 扩增质量。有些实验在提取完 DNA 后没有进行纯化，结果 PCR 扩增质量不好，甚至扩增不出条带。本研究以苗期红麻新鲜幼嫩叶片为材料，在加液氮研磨之前先加少量 PVP， $\beta$ -巯基乙醇要在加提取缓冲液前临时加入，加入  $\beta$ -巯基乙醇后迅速加入提取缓冲液，整个过程要快，尽量减少所用时间。获得的 DNA 能够进行 PCR 扩增及 SRAP 和 ISSR 分析。如图 1 所示，右边为纯化过的基因组 DNA，左边为没有纯化基因组的 DNA。PCR 扩增结果也有很大差别如图 2。

图 1



#### 3.1.2 SRAP 反应体系的优化

以王晓飞<sup>[36]</sup>等建立的反应体系为基础，本实验对体系作进一步优化，其步骤如下：

##### (1) DNA 浓度梯度

模板 DNA 的含量是制约扩增产量及特异性的一个因素，一般说来，有一个较宽的浓度适宜范围，但太少时无扩增带，太多时特异带又很难出现。本试验从  $20\text{ng}/20\mu\text{l}$ — $120\text{ng}/20\mu\text{l}$  设置梯度试验，反应结果见图 2。结果表明在  $50\text{ng}/20\mu\text{l}$ — $120\text{ng}/20\mu\text{l}$  时效果最佳。

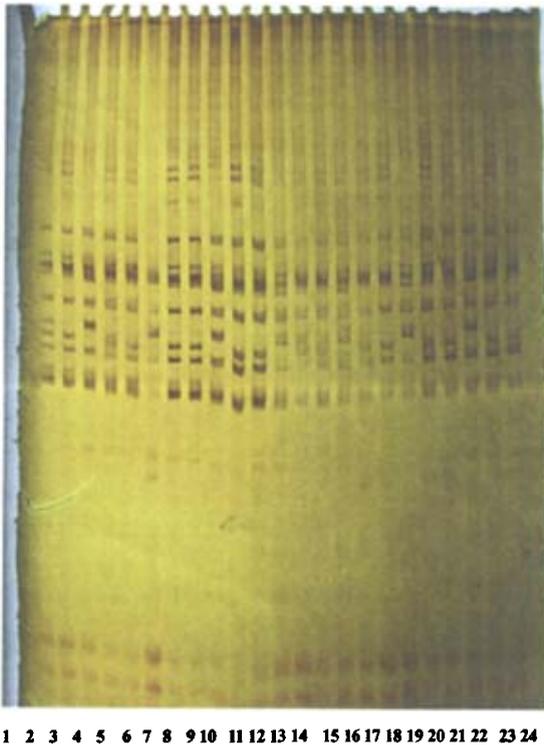


图 2

注: 1—12 个为纯化过的基因组 DNA 用 SRAP 引物 M4E4 扩增的产物, 且 DNA 浓度从 20ng/20 $\mu$ l, 30ng/20 $\mu$ l, 50ng/20 $\mu$ l, 120ng/20 $\mu$ l 每三个一组递增。13—24 为对应的没纯化的基因组 DNA 的 M4E4 扩增的产物。

## (2) $Mg^{2+}$ 浓度梯度

$Mg^{2+}$ 浓度除影响酶活性外, 也影响着引物的退火、模板和中间产物的解离温度、产物的特异性、引物二聚体的形成等。本试验  $Mg^{2+}$ 在 1.5~3.0mM 进行扩增, 反应结果见图 3, 最佳的  $Mg^{2+}$ 反应浓度是 2.7mM。

## (3) Taq 酶浓度梯度

本试验设置的 Taq 酶浓度为 1.0U、1.5U、2.0U、2.5 U。如图 4, 从图 4 可知, 出 1.0 U 条带稍微模糊以外, 其他 3 个浓度差异并不明显。所以我们选择 1.5 U。

## (4) 引物浓度梯度

本试验从 23~53ng 设置梯度进行扩增, 反应结果见图 5。当引物的量为 23ng 和 33ng 时, 扩增的条带模糊而且产生的多态性带减少, 有些条带不能扩增出来。43ng 得到了很好的扩增, 53ng 时部分条带模糊。由此可见, 当引物浓度低时, 因引物与模板结合的效率低, 产生的多态性带少; 随引物浓度的增加, 产生的多态性带增加, 但过高的引物浓度会导致非特异的扩增和引物二聚体的形成, 影响

靶序列的产量, 因此引物的最佳含量为 43ng

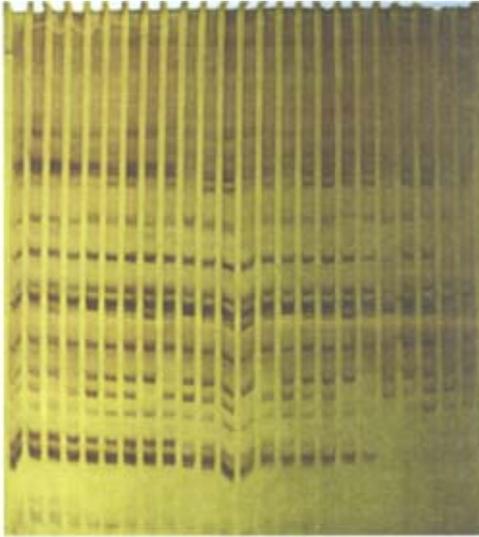


图 3 SRAP 引物 M4E4 的  $Mg^{2+}$  梯度筛选  
1-6 为 3.0 mM,  
7-12 为 2.7 mM,  
13-18 为 2.3 mM  
19-24 为 1.5 mM

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

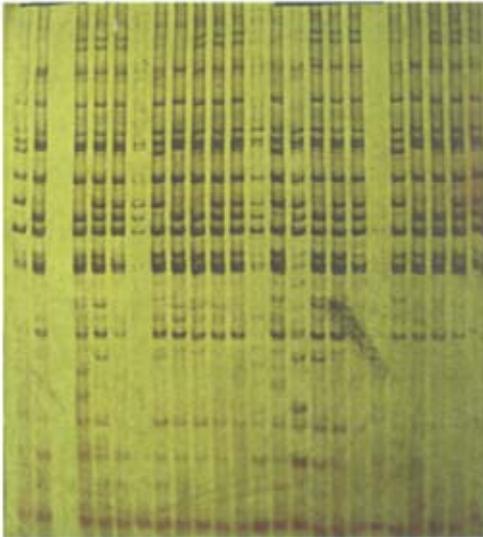
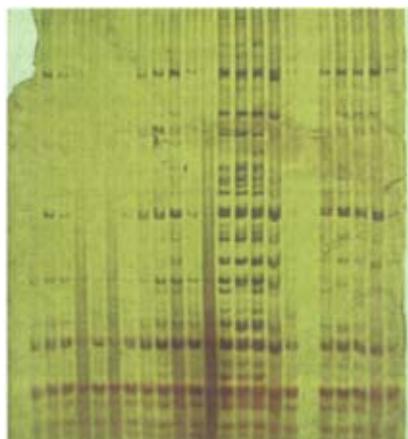


图 4 SRAP 引物 M4E4 的 Tap 酶梯度筛选  
1-6 为 1.0U/20 $\mu$ l,  
6-12 为 1.5U/20 $\mu$ l,  
12-18 为 2.0U/20 $\mu$ l  
18-24 为 2.5U/20 $\mu$ l

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



12 34 5 67 89 10 1112 1314 1516 1718 1920 2122 2324

图 5 SRAP 引物 M4E3 的引物梯度筛选

1-6 为 23ng/20 $\mu$ l,  
7-12 为 33 ng/20 $\mu$ l,  
13-18 为 43 ng/20 $\mu$ l  
19-24 为 53 ng/20 $\mu$

### 3.2 引物组合筛选

先用两个亲本的DNA对19X19对SRAP引物组合(如图6)及30个ISSR引物进行筛选(如图7),每个SRAP引物组合可产生10-50个清晰可辨的条带,条带主要分布在100-1000bp之间,每个ISSR引物可以产生10-60个清晰可辨的条带,条带主要分布在200-2000之间。本研究还用两个亲本和四个F<sub>2</sub>代群体再筛选一次(如图8),选取多态性好的27对SRAP引物组合和5个ISSR引物,然后再用两个亲本和24个F<sub>2</sub>代群体进行扩增(如图9),选择多态性在F<sub>2</sub>代中分布较好的引物组合对F<sub>2</sub>代作图群体进行PCR扩增(如图10)。然后统计多态条带,共得到108条多态性条带,每个组合的多态性条带从1-8个不等,平均每个引物组合产生3.4个多态性条带表6。

所筛选出的SRAP引物组合如下:

M2E8 M2E14 M4E1 M4E3 M4E4 M4E14 M5E5 M8E18  
M9E5 M12E4 M12E6 M13E6 M13E9 M13E10 M13E13 M13E16  
M16E4 M16E6 M16E9 M16E13 M16E17 M16E19 M17E18 M1E1  
M1E4 M1E7 M2E6

所筛选出的ISSR引物为:

UBC836 UBC864 UBC873 UBC885 UBC888

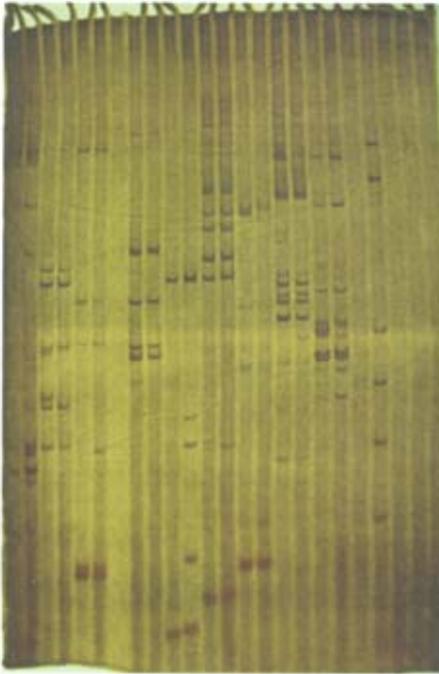


图6

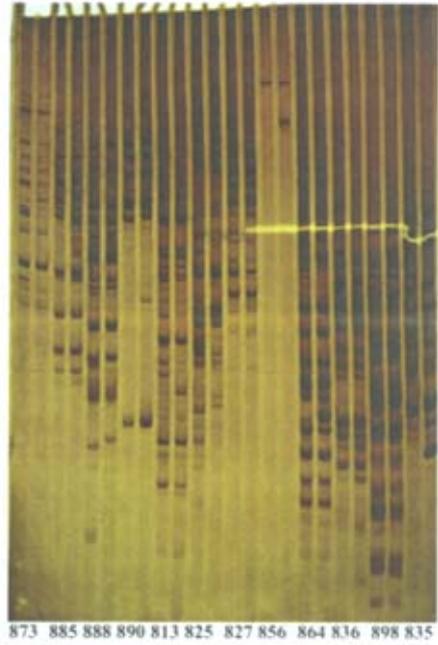


图7

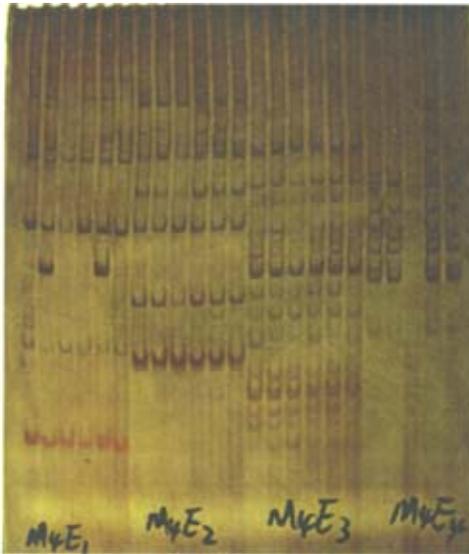


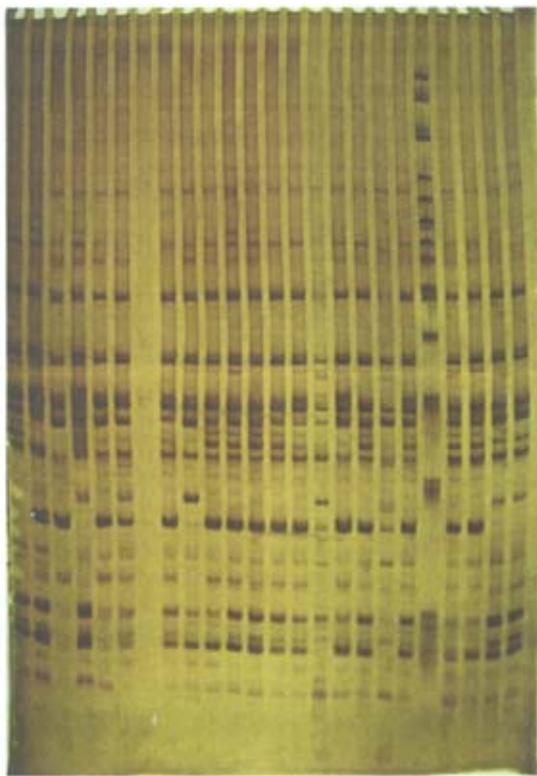
图8

图6、7、8. 注:

图6为SRAP引物M11E10—M11E19用两个亲本的筛选结果

图7为ISSR引物用两个亲本的筛选结果,如873代表UBC873。

图8为SRAP引物M4E1, M4E2, M4E3, M4E4的筛选,每六个为一个引物,每个引物前两个为亲本阿联红麻和Ga42。



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

图 9  
SRAP 引物 M13E16 对小  
样本的 F2 群体的扩增结  
果，1—19 为 F2 群体。  
21, 22 为阿联红麻，23，  
24 为 Ga42，20 为 100bp  
的 mark

图 9

表 6 SRAP、ISSR 标记的扩增情况

Table 2.5 Summary of the detection of SRAP、ISSR markers in kenaf

项目	SRAP 数据	ISSR 数据
多态性引物组合数	27	5
扩增产物的大小范围	0.1—1.0kb	0.2—2.0kb
检测出的多态性条带总数	91	17
平均每个引物扩增出的条带数	3.4	3.4

图 10

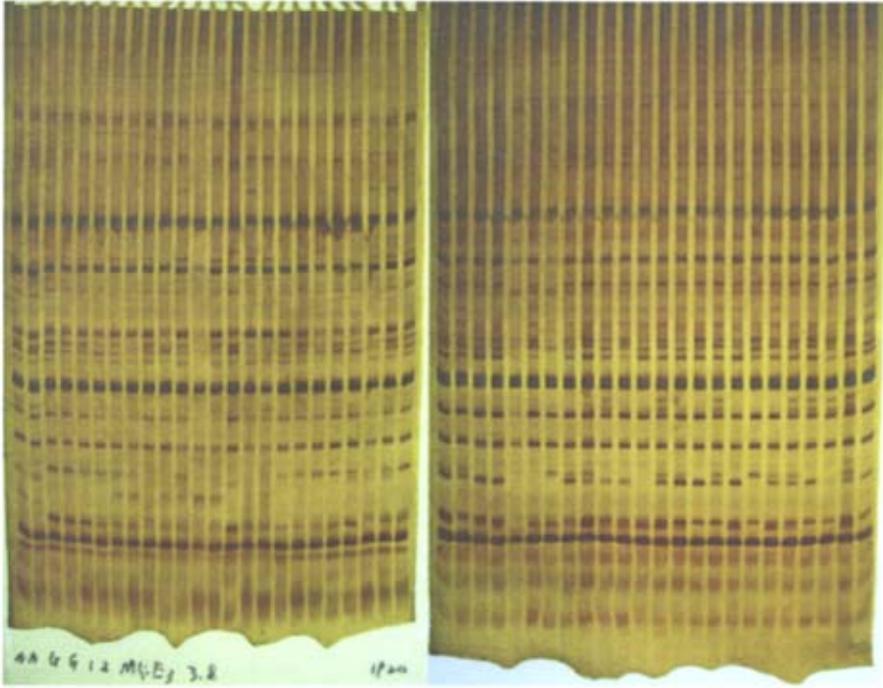


图 10 为 SRAP 引物 M4E3 对部分 F<sub>2</sub> 代群体的扩增结果，

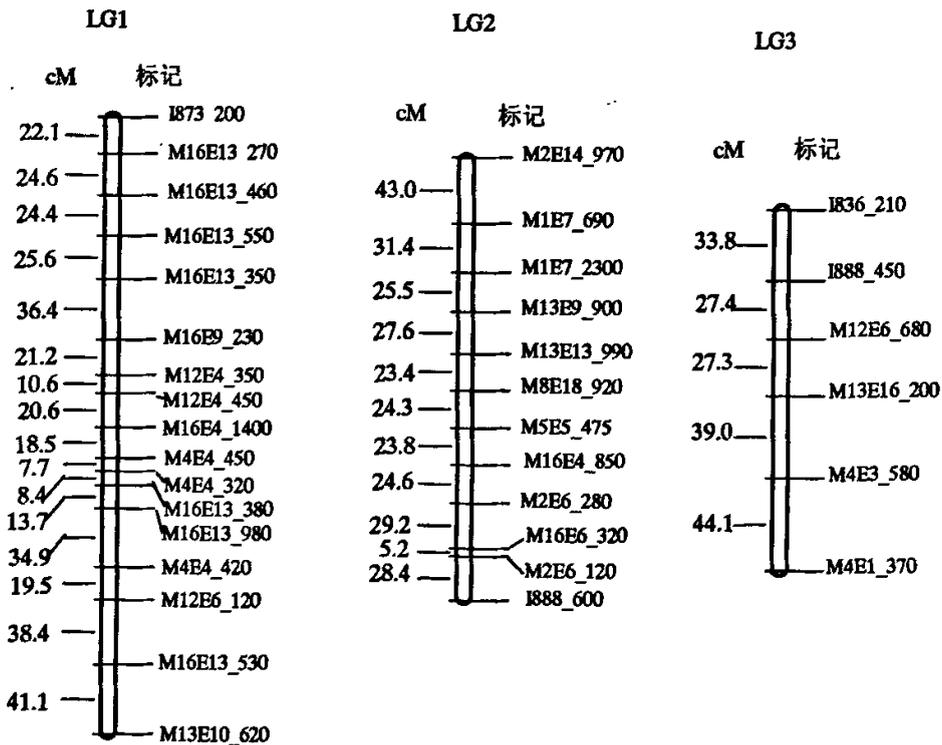
### 3.3 遗传作图数据处理与统计分析

本研究作图所用的SRAP和ISSR标记扩增的每条扩增带以所用引物及片段大小(碱基对数)命名,如M1E1-280指用SRAP引物Me1Em1扩增出的长度为280 bp的扩增带, I836-310指用ISSR引物UBC836扩增出的长度为310bp的扩增带,其近似分子量用100bp ladder估计。所有标记亲本Ga42的带型的计为1,亲本阿联红麻的带型计为2,如果该条带Ga42对阿联红麻为显性,则F<sub>2</sub>代中显性的计为3,隐性的计为2;如果该条带Ga42对阿联红麻为隐性,则F<sub>2</sub>代中显性的计为4,隐性的计为1。由此得到分子标记的分离数据,通过卡方测验卡方检验标记是否符合3: 1的分离比例。将所得数据输入电脑,用Mapmaker/3.0软件进行分析,先用group (LOD=3.0 r=0.3)对68个分离比例符合3: 1的标记以及十分可靠(条带较亮)的位点进行分群,进而用order、compare和try命令对各个群内的标记排序,然后用try命令加入剩下的标记,再用build和try命令将没有连锁到连锁群上的标记连

上去。最后用Kosambi函数将重组率转换成图距单位(cM),再以Map命令建立连锁图。随后用Mapdraw画出连锁图。

### 3.4 红麻SRAP 分子标记连锁图的构建

用两种标记所筛选的多态性引物对 $F_2$ 作图群体各个个体的基因组DNA进行PCR扩增,对得到的108个多态性标记用Mapmaker/3.0构建遗传连锁图.78个标记位点进入16个连锁群( $LOD \geq 3.0$ ),另30标记位点个独立,总长1423.9 cM 每个连锁群有2~17个标记位点,最长的连锁群为367.7 cM,最短的连锁群为0.5cM. 标记间最大间距为44.1 cM,最小间距为0 cM,标记间平均间距18.25 cM. 标记在整个连锁群中分布比较均匀,没有标记聚集在一起的现象.这是首张用SRAP和ISSR标记构建的红麻分子遗传连锁图谱.所构建的包括16个连锁群的红麻的遗传连锁图谱如图11.



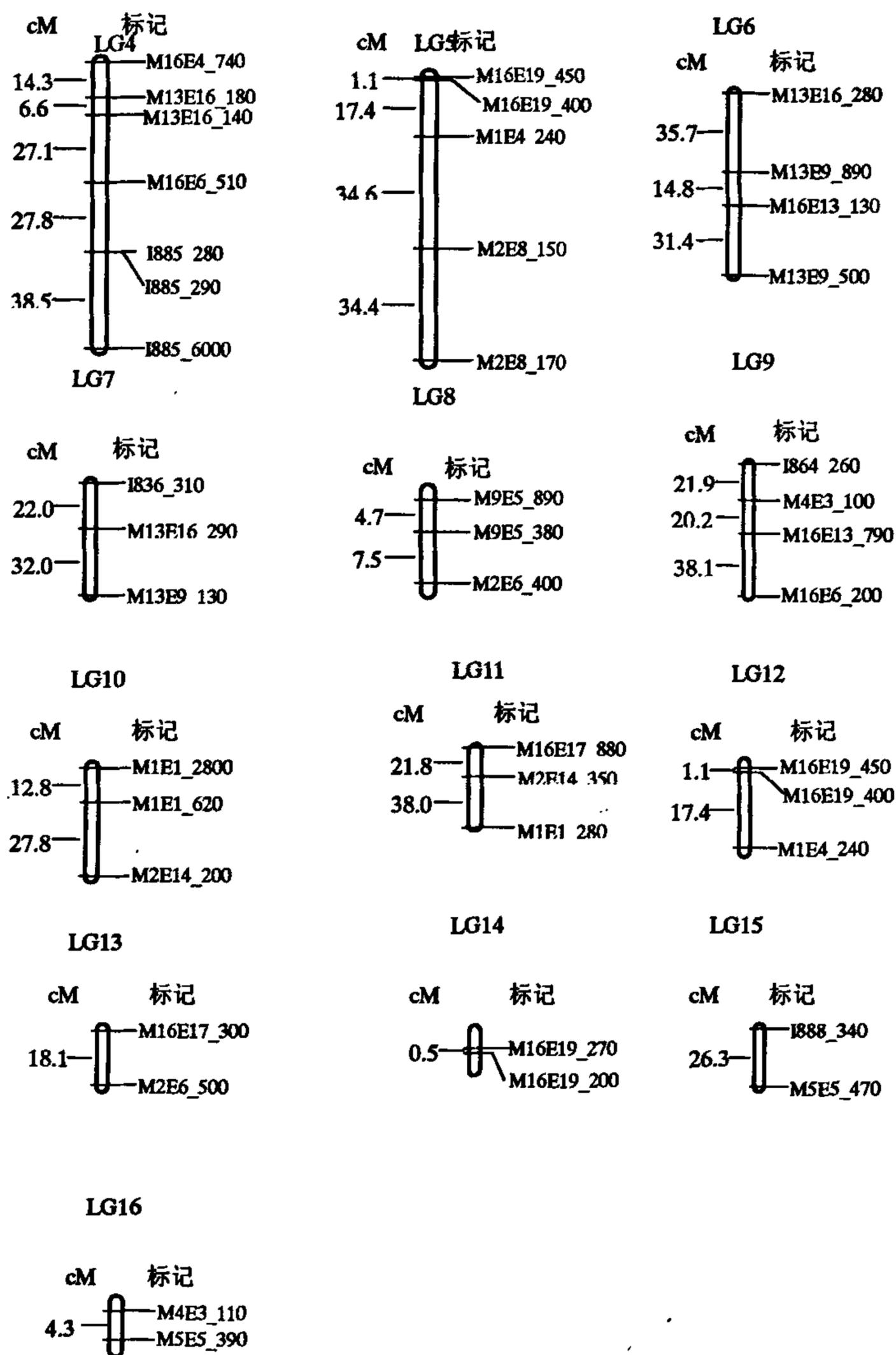


图11 红麻的SRAP和ISSR分子标记遗传连锁图谱

## 4 讨论

SRAP作为一种新的标记技术已经应用于多种植物种质资源遗传多样性与亲缘关系等的分析,并应用于芸薹、棉花、黄瓜、烟草的遗传连锁图谱构建<sup>[65-67]</sup>,特别是在棉花上,已成功构建出密度较高的首张遗传连锁图谱,棉花和红麻同属锦葵科植物,其结果给红麻提供了借鉴。到目前为止,国内外还没有关于红麻遗传连锁图谱构建的报道,红麻是重要的纤维作物,2005年王晓飞等<sup>[36]</sup>对红麻的SRAP体系及程序的优化和建立,为我们构建遗传图谱提供了依据。本研究中SRAP分析参照Li<sup>[71]</sup>等的程序,并作适当改良,获得较好的扩增效果。平均每对引物从红麻基因组中扩增出10-50条清晰条带。用6%的聚丙烯酰胺凝胶电泳比琼脂糖电泳效果好。本实验研究表明,模板的质量和浓度对扩增效果的影响很大,开始时我们曾用没有纯化过的模板DNA,结果其中有些F<sub>2</sub>代个体扩增条带不太清晰。虽然在20-200ng/ul模板浓度之间都能扩增出条带,但扩增质量有很大差别,经过我们做梯度实验选择50ng/ul-100ng/ul的浓度为最佳。另外,通过对SRAP和ISSR标记的比较分析表明,SRAP标记扩增出的条带在100-1000之间分布更加均匀,亮带更多。ISSR虽然条带比SRAP的要多,但有些不太清晰,亮带较集中,给分辨带来困难。

108个标记位点当中,有58个(54%)偏离3:1的分离比例,偏分离十分严重,F<sub>2</sub>代中的偏分离现象可能和我们选用的亲本为一个半野生种一个栽培种,遗传距离较远以及配子体选择和合子选择较严重有关,而且,我们在统计过程中对模糊的条带一律记为空白,可能这些条带带型绝大多数是显性的,即为“1”,所以统计0/1比时会偏大,但是,考虑到实验的严谨性,我们只能这样做。希望在以后的实验中随着标记数的增加,我们可以尽量多的使用符合分离比的多态性位点,这样,图谱应该会更加准确。在我们的实验中,仅检测到2个共显性位点,和Li等报道的高共显性不太一致。。在划分连锁群时,我们尽量避免使用偏分离标记,划分好群后,再把偏分离标记用order、compare和try命令插进去。对没有进入连锁群的标记,我们用build和try命令把它加入。从19X19对SRAP引物组合和30个ISSR引物中,以Ga42和阿联红麻为模板筛选出多态性较好的27对SRAP引物组合和5个ISSR引物,这32个引物组合在F<sub>2</sub>代群体中共产生108个多态条带,平均每个引物组合产生3.4个多态条带,最多的可以产生8条。使用Mapmaker/3.0,

我们构建了包括68个SRAP标记位点和10个ISSR标记位点的红麻的连锁图谱, 这些标记被分为16个连锁群( $LOD \geq 3.0$ ), 覆盖总长度为1423.9 cM, 平均两个标记位点间距位18.25cM。上述结果与肖炳光等构建的烟草遗传连锁图趋势相近。每对SRAP标记组合可以产生10—50个大小在100—1000bp的清晰可辨的条带, 其中70%的条带较亮。在使用mapmaker 3.0过程当中, 我们发现使用group命令时, LOD值和r值的设定对结果影响很大, 所以要谨慎使用, 要保证 $LOD \geq 3.0$ , 把没有进入连锁群的标记用build命令加入时, LOD可以放宽到2.0。

分子标记遗传连锁图谱构建的理论基础是交换和重组, 分子连锁群的数目应该同相应物种的染色体数目一致。红麻有18对染色体, 而我们仅构建出16个连锁群, 可能是由于我们目前所用的标记引物数量还不够多, 得到的多态性标记位点较少, 不足以覆盖到整个基因组, 在后面工作中我们将继续扩大筛选ISSR和SRAP标记的多态性引物数量, 进一步对 $F_2$ 群体进行PCR扩增, 以增加连锁群数及群内标记密度。由于分子标记在染色体上分布的随机性及染色体不同区段交换值的异质性, 连锁群上常常会产生较大的间隙, 严重者则出现小片段的连锁群<sup>[96]</sup>。本研究中有9个连锁群只包括2—3个标记, 表明本研究还存在相当大的间隙, 有待于后续研究进一步深化, 以构建出一张分不均匀, 位点密度较高的红麻的遗传连锁图谱。红麻种子繁殖系数较高, 若对 $F_1$ 进行打顶促分枝, 可获得足够量的 $F_2$ 建图群体单株的种子数量, 种子干燥低温储存, 则可供长期利用。本研究利用红麻 $F_2$ 群体及SRAP和ISSR标记构建了国内外第一张红麻分子遗传连锁图, 为红麻性状的基因定位及分子标记辅助育种等奠定了良好的基础。

由于完成硕士学位论文研究的时间限制, 本研究仍然存在构图不尽完善的客观问题。本人认为, 可在现有的工作基础之上, 进一步选择适当的标记或继续扩大筛选SRAP和ISSR标记, 将有可能构建出红麻的18个连锁群, 并使连锁群的位点分布更均匀, 密度更高, 一张完善的遗传连锁图谱的构建, 对提升我国红麻基础科学核心竞争力和在遗传育种上的应用, 将有一定的理论和实际应用价值。

## 参考文献

- [1] 卢浩然主编. 中国麻类作物栽培学. 北京: 农业出版社, 1993: 151-155
- [2] 李宗道著. 麻类的理论与技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1980b, 467
- [3] 孙志强. 红麻种质资源遗传多样性的 ISSR 分子标记研究. 福建农林大学硕士毕业论文, 6-15
- [4] 林培青, 林荔辉, 吴建梅, 等. 中晚熟红麻新品种福红 4 号的选育. 中国麻业 2004, 26 (1) 1-3
- [5] 谭石林, 陈强云等. 我国红麻种子生产现状与产业发展对策. 中国麻业, 2006, 28, (3), 1-3
- [6] 邓丽卿, 粟建光, 黄培坤, 等. 红麻种质资源的形态及分类研究. 中国麻作, 1991 (4): 16-20
- [7] 程舟, 鲛岛一彦, 陈家宽. 日本的红麻研究、加工和利用. 中国麻业, 2001, 23 (3): 16-24
- [8] 邓丽卿, 粟建光, 李爱青. 红麻种质资源的农艺性状研究与利用. 中国麻作, 1994, 16 (4): 1-4
- [9] 刘娇. 叶蛋白饲料资源的开发利用. 湖南饲料, 2002, (4): 29
- [10] 卢浩然主编. 中国麻类作物栽培学. 北京: 农业出版社, 1993: 51-75
- [11] 张根旺, 杨天奎, 郭净. 生物活性物质 CLA 的研究. 中国油脂 [J], 2000, 25 (6): 13-16
- [12] 邵群, 张惠, 边际. 功能性油脂——共轭亚油酸研究进展, 食品科学 [J], 2002, 23 (2): 5-7
- [13] 谭石林, 李德芳, 龚友才, 等. 造纸用红麻品种的筛选. 中国麻作, 1998, 20 (4): 25-28
- [14] 李敬机. 红麻制浆造纸现状及发展方向. 中国造纸, 1996 (1): 52-57
- [15] 姚金怀, 胡宝玲, 朱世金. 黄红麻、棉混纺织物的开发与生产. 河南纺织科技, 2003, 24 (4): 28-29
- [16] 程舟. 中日合作开发绿色红麻板材. 林产工业, 2002, 29 (6), 54
- [17] 陶爱芬, 祁建民, 李爱青, 方平平, 等. 红麻优异种质资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析

- [18] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种. 中国农业科学, 1996, 29 (4): 1-10
- [19] 熊和平. 坦桑尼亚黄麻红麻种质资源考察. 中国麻作, 1989 (4): 5-9
- [20] 卢浩然主编. 中国麻类作物栽培学. 北京: 农业出版社, 1993: 41-55
- [21] 粟建光, 邓丽卿, 罗玲玲, 等. 红麻优异种质在不同生态地区的利用潜力研究. 中国麻作, 1997, 19 (3): 9-12
- [22] 粟建光, 龚友才, 关凤芝, 等. 麻类种质资源的收集、保存、更新与利用. 中国麻业, 2003, 25 (1): 4-8
- [23] 李宗道著. 麻类的理论与技术. 上海: 上海科学技术出版社, 1980b, 523
- [24] 陈洪福, 张怀芳, 邓丽卿, 等. 红麻种质资源抗炭疽病鉴定. 作物品种资源, 1991, 3: 24-25
- [25] 李爱青. 肯尼亚黄麻红麻种质资源的考察报告. 中国麻作, 1990 (1): 16-21
- [26] Edmonds, J. M.: Herbarium survey of *Corchorus* and *Hibiscus*, IJO technical reports, Dhaka, 1987
- [27] 邓丽卿, 黄培坤, 粟建光, 等. 红麻和木槿属 *Furcaria* 组植物的形态分类及细胞遗传学研究. 湖南农学院学报, 1994, 20 (4): 310-317
- [28] 李爱青. 不同来源红麻品种异染色质研究. 中国麻作, 1991 (1): 1-3
- [29] 蔡从利, 王建波, 景润春, 等. 山羊草属异源多倍体植物基因组进化的 RAPD 分析. 遗传学报, 2001, 28 (2): 158-165
- [30] 陈尚安, 董玉琛等. 小麦野生近缘植物抗病性鉴定. 中国农业科学, 1990, 23 (1): 54-59
- [31] 祁建民, 黄华康, 林培青, 等. 高产抗病强适应性红麻新品种福红 3 号的选育. 中国麻业, 2003, 25 (3): 105-111
- [32] 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
- [33] 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
- [34] 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

- [35] 郭平安,周鹏,栗建光.红麻及其近缘种的 RAPD 分析.热带亚热带植物学报 2002, 10: 306-312
- [36] 王晓飞.红麻种质资源遗传多样性的 SRAP 分子标记研究.福建农林大学硕士毕业论文, 23-42
- [37] 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
- [38] 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
- [39] 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
- [40] 祁建民,陈幼玉,周瑞阳,等.红麻产量和纤维品质性状的遗传效应与杂种优势分析.作物学报, 2005, 4:469-475
- [41] 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
- [42] 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
- [43] 陈双龙,吴建梅,洪建基,等.福建省 2003-2004 年红麻新品种(系)区试试验总结.中国麻业, 2005, 27 (4): 1-2
- [44] 黄培坤,邓丽卿,栗建光,等.国外引进红麻种质资源鉴定和利用研究.中国麻作, 1989 (4): 5-9
- [45] 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
- [46] Kawai, S, et al. Manufacture of oriented fiberboard from kenaf bast fibers and its application to the composite panels. Proceeding of the 2000 International Kenaf Symposium, Hiroshima, Japan, Oct, 13-14, 2000:144-148
- [47] 栗建光译.美国红麻育种的回顾与展望.中国麻作, 1999, 21 (4): 46-47
- [48] J. M. Dempsey: Fiber crops, Univ. Press Florida, USA, 1979
- [49] Kano, T. Development and project of kenaf board(in Japanese).

- Reference No. 47 of the Kenaf Society of Kochi & Economic Reports of Ehime, November 10, 1997, 25(44)
- [50] Kashida, H, et al. Processing and quality of kenaf boards made from core (in Japanese). Proceeding of the 47th Annual Meeting of the Japan Wood Research Society in Kochi, April, 1997:265
- [51] 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
- [52] 陈安国, 李德芳. 红麻需求分析与育种技术发展趋势. 中国麻业, 2001, 23(4): 26-30
- [53] 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
- [54] 杜金昆, 姚颖垠, 倪中福, 等. 普通小麦、斯卑尔脱小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究. 遗传学报, 2002, 29(5): 445-452
- [55] 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
- [56] 李造哲, 扈廷茂. 分子标记及其在植物育种中的应用. 内蒙古农业大学学报, 2000, 21(3): 102-105
- [57] 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
- [58] 黄碧光. 黄麻属几个种核型的初步研究. 福建农林大学学士论文, 1993, 1-6
- [59] 柳季旺, 龚义勤等. 新型分子标记——SRAP 与 TRAP 及其应用. 遗传, 777-781, 2004, 1-5
- [60] 张建成, 王传堂等. SRAP 标记技术在花生种子纯度鉴定中的应用. 中国农学通报, 35-39, 2005, 12(21)
- [61] 彭 飒, 郭美丽. 红花 SRAP 扩增体系的建立和优化. 第二军医大学学报, 2006, 27-5
- [62] 林忠旭, 张献龙等. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建. 科学通报, 2003, 15-48
- [63] 肖炳光 徐照丽等 利用 DH 群体构建烤烟分子标记遗传连锁图 中国烟草学报 2006 12-4

- [64] 潘俊松 王刚等黄瓜SRAP遗传连锁图谱的构建及始花节位的基因定位 自然科学进展, 167-172, 2005 , 2-15
- [65] 任羽, 王得元. 辣椒SRAP-PCR反应体系的建立与优化. 分子植物育种 , 2004, 2-5
- [66] 李 严, 张春庆 西瓜杂交种遗传多态性的SRAP标记分析. 园艺学报, 2005 32-4
- [67] 陈福. 新型标记SRAP及其在草业研究中的应用前景. 草业与畜牧, 2006-7
- [68] 刘立军 蒙祖庆 苎麻基因组SRAP 扩增体系的优化研究 分子植物育种 2006, 4-5
- [69] 赵新亮, 马强. 玉米SRAP 反应体系的建立与优化. 安徽农业科学, 2006, 34 -15
- [70] 刘月光, 滕永勇 应用标记对莲藕资源的聚类分析 氨基酸和生物资源 2006, 28(1):29~32
- [71] G. Li. C. F. Quiros Sequence-related amplified polymorphism(SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction:its application to mapping and gene tagging in Brassica Theor Appl Genet (2001) 103:455-461
- [72] 梁景霞, 祁建民, 等. 烟草 DNA 的提取与 SRAP 反应体系的建立. 中国烟草学报. 2005, 11(4):33-38
- [73] 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
- [74] 方宣钧 吴为人 等. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京:科学出版社, 2001
- [75] 王关林 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998
- [76] Ferriol M. Pico B. Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers. Theor Appl Genet. 2003. 107:271-282
- [77] Lin Z, Zhang X, Nie Y, He D , Wu M. Construction of a genetic linkage map for cotton based on SRAP. Chinese Science Bulletin. 2003, 48(19):

2063-2067

- [78] 任玉, 王得元, 张银东. 相关序列扩增多态性 (SRAP) 一种新的分子标记术. 中国农学通报. 2004, 20 (6): 11-13, 22
- [79] 阮成江、何祯祥 中国植物遗传连锁图谱构建研究进展 西北植物学报 2002, 22(6)
- [80] 冯宗云, 苟琳, 何萍, 等. DNA 分子标记与作物数量性状改 8133. 西南农业学报, 1998, 11(增刊), 67—72.
- [81] 沈金雄, 易斌, 傅廷栋, 等. 植物数量性状基因定位研究概述[J]. 植物学通报, 2003, 20(3): 257-263.
- [82] 阮成江, 何祯祥, 钦佩. 我国农作物 QTL 定位研究的现状和进展[J]. 植物学通报, 2003, 20(1): 10—22.
- [83] 王风平. 徐才国, 李香花. 籼型光敏不育组合 (32001S / 明恢 63) 育性 QTL 位点分析[J]. 厦门大学学报, 1999, 38(3): 467—470.
- [84] 李维明, 吴为人, 卢浩然. 小麦 7D 染色体数量性状基因定位和效应估计的研究[J]. 作物学报, 2000. 22(6): 641-645.
- [85] 王永飞, 马三梅. 刘翠萍, 等. 分子标记在植物遗传育种中的应用原理及现状[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2001, 29(增刊): 106—113
- [86] Moore G, Devos K M, Wang Z, et al. Grasses, line up and form a circle[J]. Curt Bioi, 1995, 5(7): 737~739.
- [87] 张德水, 陈受宜. DNA 分子标记、基因作图及其在植物遗传育种上的应用 [J]. 生物技术通报, 1998, (5): 15—22.
- [88] 景润春, 黄青阳, 朱英国. 图位克隆技术在分离植物基因中的应用[J]. 遗传, 2000, 22(3): 180—185.
- [89] Zeng Z B. Precision mapping of quantitative trait loci [J]. Genetics, 1994, 136: 1457~ 1468.
- [90] 易小麦, 朱祯, 周开达. 水稻抗性基因定位及相关分子标记研究进展[J]. 生物工程学报, 1998, 18(5): 40—44.
- [91] Song W Y, Wang G L, Chen L L. et al. A receptor kinase—like protein encoded by the rice disease resistance gene Xa21[J]. Science, 1995,

270: 1804—1806.

- [92] Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, et al. Expression of Xa 1, a bacterial blight—resistance gene in rice is induced by bacterial inoculation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(4): 1663—1668.
- [93] 沈新莲, 张天真. 作物分子标记辅助选择育种研究的进展与展望[J]. 高技术通讯, 2003, (2): 105.
- [94] Tanksley S D, Young N D, Paterson A H. et al. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science[J]. Bio/Technology, 1989, 7: 257—264.
- [95] 曹德菊, 程备久, 李培金等. 红麻基因组提纯方法研究. 中国麻作, 1999, 21.
- [96] 于拴仓, 王永健, 郑晓鹰. 大白菜分子遗传图谱的构建与分析[J]. 中国农业科学, 2003, 36(2): 190. 195.

## 附 录

## 1. 实验所用溶液配方

## 1.1 DNA 提取 (CTAB 法)

## 1.5×CTAB

1.5%CTAB	15g	CTAB 粉末
75mM Tris-HCl	75ml	1M Tris-HCl pH8.0
1.5mM EDTA	30ml	0.5M EDTA pH8.0
1.05M NaCl	61.4g	NaCl
加蒸馏水至 1000ml		
β-巯基乙醇用前加入(2%)		

## 10% CTAB

CTAB 粉末	100g
NaCl	40.95g
加蒸馏水至 1000ml	

## TE

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

10×PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup>)

100mM Tris-HCl(PH=8.0)	10ml	1M Tris-HCl(PH=8.0)
500mM KCl	3.7275g	KCl
23mM MgCl <sub>2</sub>	0.4676g	MgCl <sub>2</sub>
0.8% NonidetP40	0.8ml	NonidetP40
加双蒸水至 100 ml, 高压灭菌		

## 1.2 电泳

## Tris-硼酸(10×TBE)

Tris-碱 108g  
硼酸 55g  
0.5mM EDTA (pH8.0) 40ml

加蒸馏水至 1000ml, 用时稀释 10 倍 (即 1×TBE)

#### 6×Loading Buffer

0.25% 溴酚蓝  
40%(W/V) 蔗糖  
水溶液于 4℃ 保存

#### 2.聚丙烯酰胺凝胶电泳的步骤为:

##### A.凝胶配置 (一块板):

30% 聚丙烯酰胺 8ml (290 克丙烯酰胺+10 克双丙烯酰胺, 定容到 1000ml)  
1XTBE 32ml  
10% 过硫酸铵 270 ul  
TEMED 24ul

总体积 40ml

可采用玻璃棒引流, 插入梳子, 用夹子夹紧。

##### B.电泳:

大约预电泳半小时后可以上样, 采用 40%蔗糖的上样缓冲液;

电泳缓冲液为 1XTBE, 电泳电压 320V, 时间视引物 2—3.5 小时不等;

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

##### C.银染: (一次可多块胶)

固定: 在小盆中, 加 10%的酒精 100ml, 再加 500ul 的冰醋酸。摇匀, 加入凝胶, 摇动, 3-5min;

染色: 加入 1ml 的 20%硝酸银, 摇动 5-8min;

洗涤: 倒去废液, 蒸馏水清洗 2-3 次, 约 1min (时间过长, 带淡而不清晰; 过

短, 可能背景深);

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

洗涤: 自来水冲洗。

注意事项:

丙烯酰胺为粉剂, 具有神经性毒性, 称量时要防止口鼻吸入, 同时也要防止通过皮肤吸收。硝酸银和皮肤接触后会形成黑点, 使用时要注意防止污染天平、工作台、衣服和皮肤等。过硫酸铵最好为新鲜的, 不宜超过两星期, 否则条带分散, 不清晰。染色时间要准确控制, 否则底板过黑或者条带颜色太淡。

## 致 谢

本研究是在导师祁建民研究员和方平平老师的悉心指导和关怀下，经历种种困难才得以完成，对他们表示最衷心的感谢。

本实验借鉴了很多王晓飞师兄和徐建堂师兄的经验和成果，在体系优化上得到了徐建堂师兄的指导，在数据统计和软件运用上，兰涛老师给了我耐心而细致的指导。特此致谢！

感谢遗传育种实验室的吴为人老师、段远霖老师、官华忠老师教导，感谢梁景霞、刘中华、郑鹭、吴建梅、马宏博、张晓琛、姜海青、徐鲜君、焦美霞、韩庆典等同学的大力帮助和支持；在提DNA过程当中，祁建民老师的几乎所有的研究生和本科生都参与其中，表现了强大的团队合作精神，在此对你们表示由衷的感谢；在我实验最紧张的阶段感谢陈晖同学的鼎力相助，感谢遗传育种实验室的同学们对我的支持和谦让，使我能够顺利的完成实验。

特别感谢我的家人在求学道路上对我的支持和关爱，感谢爱人筠燕在精神上的鼓励和在生活上的照顾。

再次衷心感谢所有支持我、关心我、帮助我以及为本实验作出贡献的老师和同学们，没有你们的关心和帮助，不可能有今天的实验成果。谢谢!!!