

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2009.00311

## 橡胶树 EST-SSR 标记的开发与应用

安泽伟<sup>1</sup>, 赵彦宏<sup>2</sup>, 程汉<sup>1</sup>, 李维国<sup>1</sup>, 黄华孙<sup>1</sup>

1. 中国热带农业科学院橡胶研究所, 国家橡胶树育种中心, 儋州 571737;

2. 鲁东大学生命科学院, 烟台 264025

**摘要:** 通过对橡胶树 10 778 条 EST 序列进行拼接, 共得到 Unigene 3 090 条, 从中发掘出分布于 353 条 Unigene 的 430 个 EST-SSR 位点, SSR 发生频率为 11.42%, 平均分布距离为 3.93 kb。在橡胶树 EST-SSR 中, 二核苷酸和三核苷酸重复是主要的重复类型, 分别占 63.49%、32.09%。TC/AG、CT/GA 和 CTT/GAA、AAG/TTC、AGA/TCT 是二、三核苷酸的优势重复类型。利用 PRIMER5.0 设计引物 148 对, 随机挑选 21 对引物进行合成, 并用其中 15 对扩增较好的引物, 通过变性聚丙烯酰胺凝胶结合银染的方法对 44 个橡胶树无性系进行了遗传多样性检测, 构建了聚类分析树状图。研究结果表明, 从橡胶树 EST 中开发 SSR 标记是有效、可行的, 文章所开发的 EST-SSR 引物可用于橡胶树遗传分析研究。

**关键词:** 橡胶树; SSR; EST

## Development and application of EST-SSR markers in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

AN Ze-Wei<sup>1</sup>, ZHAO Yan-Hong<sup>2</sup>, CHENG Han<sup>1</sup>, LI Wei-Guo<sup>1</sup>, HUANG Hua-Sun<sup>1</sup>

1. Rubber Research Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, State Center for Rubber Breeding, Danzhou 571737, China;

2. College of Life Sciences, Ludong University, Yantai 264025, China

**Abstract:** Three thousand and ninety Unigenes were obtained from 10 778 *Hevea brasiliensis* ESTs. Four hundred and thirty SSRs were distributed in 353 Unigenes, which accounts for 11.42% of the total number of Unigenes. The frequency of SSRs was 1/3.93 kb. Dinucleotide and trinucleotide repeats were the dominant types among the obtained unigenes, accounting for 63.49% and 32.09%, respectively. TC/AG, CT/GA and CTT/GAA, AAG/TTC, and AGA/TCT were the most abundant motifs for dinucleotide and trinucleotide motifs. One hundred and forty-eight primer pairs were designed by PRIMER5.0 and 21 primer pairs were synthesized. Among them, 15 primer pairs can produce clear and stable bands, and the PCR products were screened in denaturing polyacrylamide gel following silver staining. Genetic diversity of 44 rubber clones were investigated with these primer pairs, and a dendrogram of 44 rubber clones was built. The results indicated that it is an effective and feasible way to develop EST-SSR markers from *H. brasiliensis* EST sequences, and the primers designed in this study can be used in genetic study of rubber tree.

**Keywords:** *Hevea brasiliensis*; SSR; EST

收稿日期: 2008-06-10; 修回日期: 2008-07-25

基金项目: 基金国家科技支撑计划项目(编号: 2006BAD01A06-3), 国家自然科学基金项目(编号: 30860221), 中国热带农业科学院科技基金项目(编号: Rky0733)资助。

作者简介: 安泽伟(1978-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 橡胶树分子遗传。E-mail: azwcn@126.com

通讯作者: 黄华孙(1963-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 橡胶树遗传育种。E-mail: xjshhs@163.com

随着分子生物学技术的发展,各种分子标记技术不断出现,大大提高了科研人员对植物进行遗传分析研究的能力,其中以SSR标记在植物遗传研究上应用最为广泛。简单重复序列(Simple sequence repeat, SSR),广泛分布于动植物基因组中,是一类由几个(多为 1~6 个)碱基组成的基序串联重复而成的DNA序列,如(GA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>, (GATA)<sub>n</sub>等重复,其中n代表重复次数。SSR标记可分为基因组SSR和EST-SSR,传统的基因组SSR标记开发过程较慢,需要进行基因组文库的构建、重复序列克隆的识别和筛选、测序、引物设计等环节,不仅费时耗力,成本也很高。近年来EST发展十分迅速,以每周 10 000 个的速度从大量cDNA文库中被开发出来<sup>[1]</sup>,因而EST-SSR标记的开发就更加快速、简便。EST-SSR不仅具有基因组SSR标记的多态性高、共显性、重复性好等特点,而且在种属间有良好的通用性<sup>[2~5]</sup>。目前已被广泛应用于遗传连锁图谱的构建,种质资源多样性的分析,以及比较基因组学等研究。

橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)又名巴西橡胶树、三叶橡胶树,原产于南美洲亚马逊河流域,属于大戟科三叶橡胶树属。橡胶树所分泌的胶乳是

2 000 多种产胶植物中特性最好的,已成为重要的工业原料,其胶乳产量占到了世界天然橡胶产量的90%以上<sup>[6]</sup>。我国的橡胶树种植始于 20 世纪初,现在主要集中在海南和云南两省,天然橡胶种植业已成为我国热区农业的重要支柱产业。目前国内外还没有关于橡胶树EST-SSR分子标记研究的相关文献报道,但EST-SSR标记已在小麦<sup>[2]</sup>、水稻<sup>[3]</sup>、咖啡树<sup>[4]</sup>、谷子<sup>[5]</sup>、玉米和高粱<sup>[7]</sup>等作物中得到了应用。本研究根据NCBI数据库已收录的 1 万多条橡胶树EST序列信息,设计扩增SSR位点的特异引物,通过对合成引物的多态性检测,开发橡胶树EST-SSR分子标记,旨在为橡胶树遗传图谱构建、重要性状的分子标记和基因克隆等遗传研究提供一种新型的高效工具。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本实验所用的 44 个橡胶树无性系均取自中国热带农业科学院橡胶研究所国家橡胶树种质资源圃,材料具体名称见表 1。

表 1 供试材料名称和来源

序 号	无性系	来 源	序 号	无性系	来 源
1	RRIM600	马来西亚	23	Reyan7-18-55	中 国
2	GT1	印度尼西亚	24	Haiken6	中 国
3	RRIM703	马来西亚	25	Haiken2	中 国
4	PR107	印度尼西亚	26	Haiken1	中 国
5	IAN873	巴西	27	Yunyan77-2	中 国
6	RRIC100	斯里兰卡	28	Yunyan77-4	中 国
7	PB260	马来西亚	29	Yunyan277-5	中 国
8	RRIC36	斯里兰卡	30	Yunyan68-273	中 国
9	BPM24	印度尼西亚	31	Wenchang217	中 国
10	RRIM712	马来西亚	32	Wenchang7-35-11	中 国
11	Reshi5	马来西亚	33	Wenchang11	中 国
12	Reshi8	马来西亚	34	Wenchang33-24	中 国
13	Reshi10	马来西亚	35	Wenchang193	中 国
14	Reshi21	马来西亚	36	Zhenxuan1	中 国
15	Reyan93-59	中 国	37	Baoting155	中 国
16	Reyan7-33-97	中 国	38	Baoting933	中 国
17	Reyan7-20-59	中 国	39	Baoting235	中 国
18	Reyan2-14-39	中 国	40	Baoting3410	中 国
19	Reyan78-3-5	中 国	41	Baoting911	中 国
20	Reyan8-79	中 国	42	Dafeng78-25	中 国
21	Reyan8-333	中 国	43	Dafeng95	中 国
22	Reyan88-13	中 国	44	Dafeng78-184	中 国

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因组 DNA 的提取

供试材料的基因组DNA用改良的CTAB<sup>[8]</sup>法提取。

### 1.2.2 EST 的获得与处理

从 NCBI 公共数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)下载了 10 778 条橡胶树胶乳 EST 序列; 采用 CAP3 软件进行 EST 拼接, 从而获得 Unigene; 通过 SSRIT 软件对 Unigene 进行 SSR 位点搜索, 搜索参数设置为重复次数至少为 5 次, 重复单元为 2、3、4、5、6 的核苷酸基序。

### 1.2.3 EST-SSR 引物设计

选择具有 SSR 位点, 且串联重复长度大于 15 bp 的 Unigene, 用 PRIMER5.0 设计 SSR 引物, 引物设计时主要考虑以下几方面因素: GC% 为 40%~60%, 引物长度 15~25 bp, 上下游引物复性温度相差不大于 5, 预期扩增产物 100~500 bp; 尽量避免引物二聚体、发夹结构和错配等。

### 1.2.4 PCR 扩增和变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。PCR 反应体系为 10  $\mu$ L, 其中含 2 $\times$ Taq PCR MasterMix 5  $\mu$ L(天根生化科技北京有限公司), 上、下游引物各 0.2  $\mu$ mol/L, 模板 DNA 20 ng, 补充无菌超纯水至 10  $\mu$ L。反应程序为 94 预变性 4 min, 然后进行 35 个循环, 每个循环包括 94 变性 1 min, 复性 45 s, 72 延伸 1 min, 最后 72 延伸 10 min。PCR 反应在 Mastercycler Gradient PCR 仪(GERMANY)上进行。引物最佳复性温度通过梯度 PCR 反应确定, 温度梯度范围为 55  $\pm$  8。

PCR产物用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶分离。PCR 结束后, 将产物与 6 $\times$ 变性上样缓冲液等体积混合, 95 预变性 7 min后, 迅速冰浴 3 min, 然后取 1.5  $\mu$ L 点样, 在 DYCZ-24B型电泳槽(北京六一仪器厂)中进行电泳。电极缓冲液为 1 $\times$ TBE, 200 V预电泳 30 min, 175 V恒压(BIO-RAD P3 电泳仪)电泳 100 min。电泳结束后, 凝胶用快速银染法染色<sup>[9]</sup>, GS800 (BIO-RAD)扫描仪扫描图像, 记录结果。用pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker估计扩增产物片段长度。

### 1.2.5 数据处理

根据电泳结果, 在相同迁移位置有带的记为 1,

无带的记为 0, 建立 0、1 矩阵。用 POPGen 软件计算各位点的杂合度。在 NTSYSpc 2.0 软件中依据简单匹配系数法(Simple matching coefficient)计算参试材料的遗传相似度(Genetic similarity, GS), 并用 UPGMA 法进行聚类分析。

$$GS = (a+d)/(a+b+c+d)$$

a: 表示两无性系共有的带; b 和 c: 分别表示两无性系各自特有的带; d: 表示两无性系均没有的带。

### 1.2.6 Unigene 功能预测

在 GenBank 中用 Blastn 对含有 SSR 位点的 Unigene 进行序列比对分析, 预测其功能。

## 2 结果与分析

### 2.1 橡胶树 EST-SSRs 分布、频率和特点

用 CAP3 软件拼接共得到 3 090 条 Unigene, 其中含有 SSR 位点的为 353 条, 发生频率(含有 SSR 位点的 Unigene 与总 Unigene 数目之比)为 11.42%。在含有 SSR 位点的 Unigene 中, 只含有一个 SSR 位点的为 287 条, 含有 2 个或 2 个以上 SSR 位点的为 66 条。3 090 条 Unigene 中共检出 430 个 SSR 位点, 平均每隔 3.93 kb 就有一个 EST-SSR。EST-SSRs 具体分布情况见表 2。

SSR 位点搜索结果表明, 橡胶树中 EST-SSR 的种类比较丰富, 二至六核苷酸重复都有出现, 各自出现的频率有所不同(图 1, a~d), 主要集中在二、三

表 2 橡胶树中 EST-SSRs 的分布特点

参数	数值
搜索 EST 数量	1 0778
经拼接后得到的 Unigene	3 090
有 SSR 位点的 Unigene 总数	353
只含有一个 SSR 位点的	287
含有多个 SSR 位点的	66
有 2 个 SSR 位点的	57
有 3 个 SSR 位点的	7
有 4 个 SSR 位点的	2
重复类型	
双核苷酸	273 (63.49%)
三核苷酸	138 (32.09%)
四核苷酸	6(1.40%)
五核苷酸	3(0.70%)
六核苷酸	10(2.33%)
总 SSR 位点的数目	430
Unigene 的全长度(bp)	1690831
SSR 的平均距离(kb)	3.93

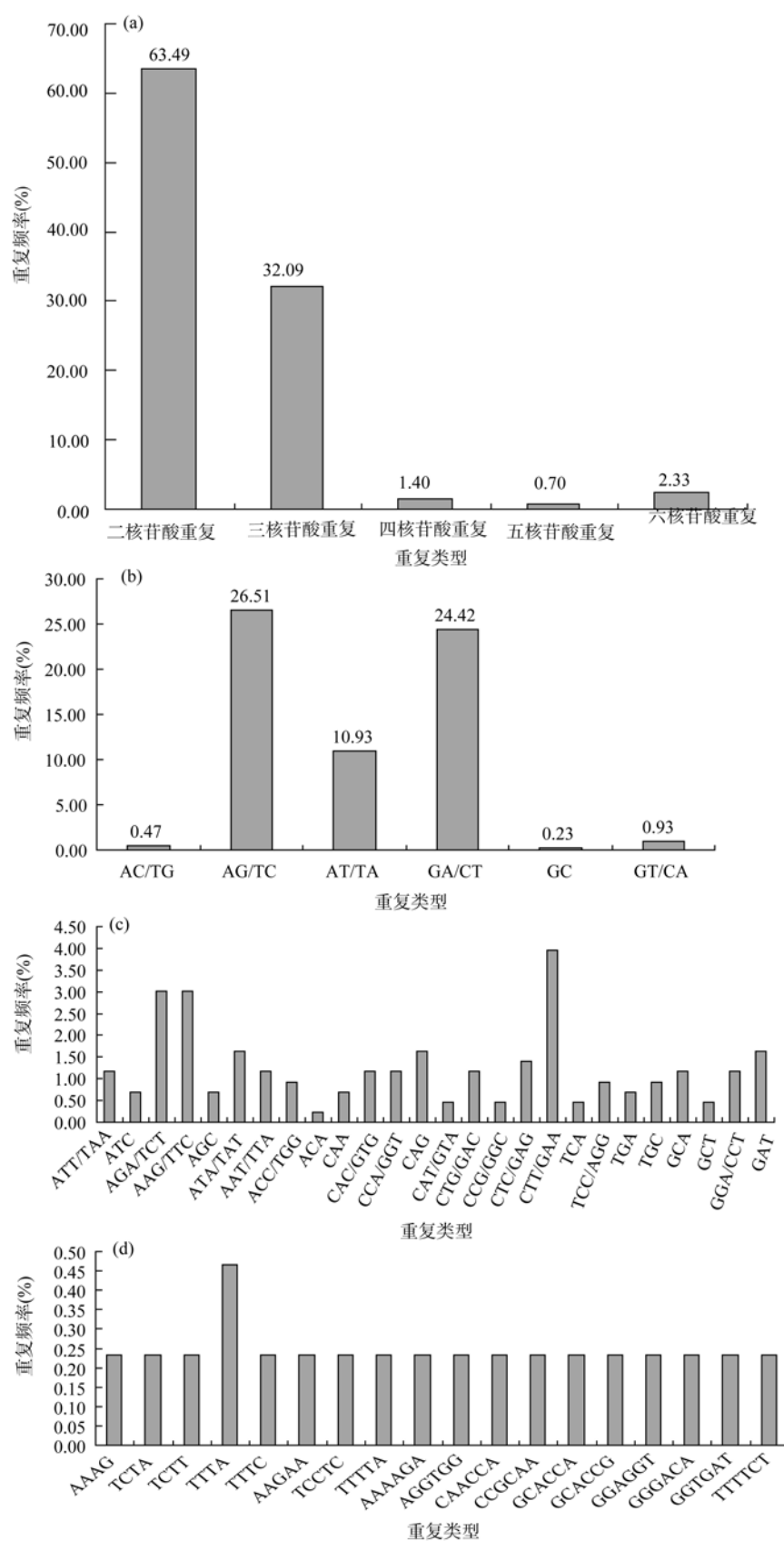


图 1 橡胶树 EST-SSRs 不同重复基序的出现频率

核苷酸重复上, 共占 EST-SSR 的 95.58%, 分别是 63.49%、32.09%, 二核苷酸重复出现的频率明显高于其它类型; 四至六核苷酸重复所占比例较小, 总计 4.43%。在本研究共观察到 50 种 EST-SSR 重复基序, 其中二核苷酸重复基序有 6 种, 三核苷酸重复基序有 26 种, 四、五、六核苷酸重复基序种类分别为 5、3、10 种。从出现的频率来看, 二核苷酸重复基序中出现最多的是 AG/TC 和 GA/CT, 分别占 SSR 总数的 26.51% 和 24.42%; 三核苷酸重复基序的类型比较分散, 以 CTT/GAA 为最多, 占到了总 SSR 位点数的 3.95%, 其次是 AGA/TCT 和 AAG/TTC, 二者均为 3.02%; 四、五、六核苷酸重复基序中除 TTTA 出现两次外, 其余类型均只出现了一次。

## 2.2 EST-SSR 标记的多态性

根据含有 SSR 位点的 Unigene 序列信息, 共设计了 148 对引物, 从中随机选取 21 对进行合成。其中有 15 对引物能扩增出清晰的, 大小与预期片段相近的条带, 占扩增引物的 71.4%, 部分引物扩增结果见图 2。在 15 对引物的扩增位点中, 二核苷酸重复的引物为 11 对, 三核苷酸重复的引物为 3 对, 还有一对为六核苷酸重复。用这 15 对引物对 44 个橡胶树无性系进行了遗传多样性分析, 结果表明, 15 对引物共扩增出 53 条带, 平均每对引物可扩增出 3.5 条带, 多态性条带占 92.5%。每个位点的等位基

因有 2~7 个不等, 实际观察杂合度从 0.0455 至 0.8286, 期望杂合度从 0.2038 至 0.8393, 杂合度高的位点等位基因数目也较多。各位点具体特性见表 3。

## 2.3 Unigene 的功能预测

对经扩增验证的含有 SSR 位点的 15 个 Unigene 在 GenBank 中进行了核酸比对分析, 结果表明, 只有一个 Unigene 未找到高度同源序列, 其余的 14 个 Unigene 都找到了高度同源的 EST 序列, 其中有 4 个功能不明, 具体分析结果见表 4。

## 2.4 遗传多样性分析

用 15 对引物对 44 份橡胶树无性系进行遗传多样性分析, 结果表明, 44 份材料的遗传基础狭窄, 相似系数在 0.64~0.98 之间(数据未列出), 相似系数变化范围较小; RRIM600 和 Reyan78-3-5 的相似系数最大, 为 0.98。从 UPGMA 法聚类图(图 3)中可知, 参试品种并没有根据来源地进行聚类, 而是在相似系数为 0.688 处依据亲本组成聚为 A、B、C 三个组, A 组包括 28 个品种, 其中多数品种的亲本之一是 RRIM600; B 组包括 6 个品种, 它们的亲本之一是 IAN873 或 PB86; C 组包括 8 个品种, 多数品种的亲本之一是 PR107。品种 IAN873 和 Reyan8-333 虽然与其他品种有共同的亲本, 却没有归入相应的组内, 而是独立成组。

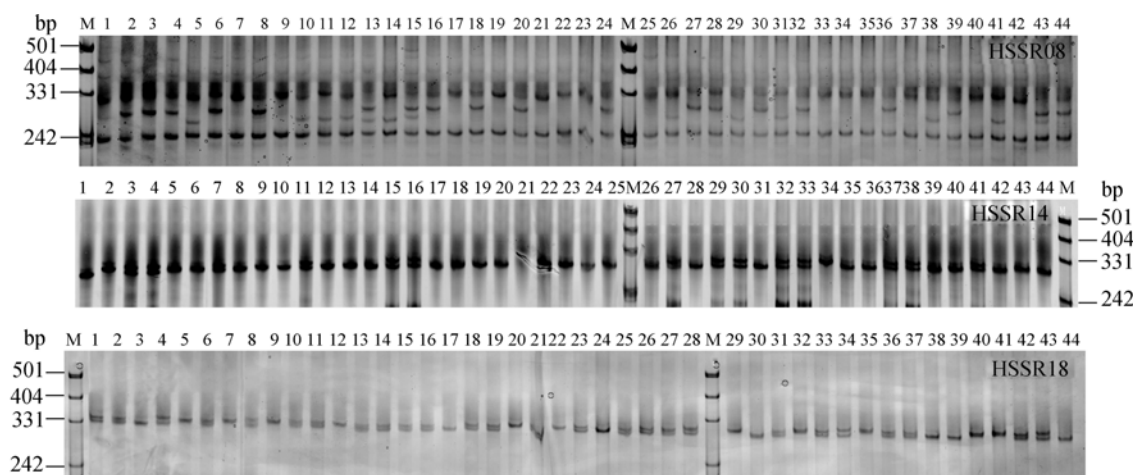


图 2 EST-SSR 引物在不同橡胶树品种中的扩增结果

1~44 号材料名称见表 1; M 为 pUC19 DNA/Msp (Hpa) Marker。

表3 橡胶树中15个EST-SSR位点的特性

位点/GenBank 登录号	重复单元	引物序列(5' 3')	Ta( )	预计片段长度(bp)	等位基因数量	$H_o$	$H_E$
<i>HSSR001</i> /EC605199	(CT) <sub>14</sub>	F: AAGGCAACGACGAAGAAAGA R: CGTTAAAAAGGGGATGAAAGC	57.8	254	2	0.3636	0.3553
<i>HSSR002</i> /EC607632	(AT) <sub>11</sub>	F: AAGGCATCAACCACCAAATC R: AACCGTTGTTGACGAAGGAC	62.8	269	2	0.0455	0.3553
<i>HSSR004</i> /EC606056	(TA) <sub>11</sub>	F: ACCACATCACTCCCCCAGTA R: GACGAGGAAGATGAGGAGGA	59.8	139	5	0.4773	0.4778
<i>HSSR005</i> /EC609877	(CT) <sub>12</sub>	F: ACCCTTGGTGGGAAAGAATC R: GCTGTTAGCAGTGCAGGACA	62.8	236	2	0.2571	0.4807
<i>HSSR006</i> /EC609548	(CG) <sub>14</sub>	F: ACCTCGATCCACAAACGAAC R: CTGAGGGCGTAAGAATCGAA	61.6	150	7	0.7045	0.8393
<i>HSSR008</i> /EC609578	(CT) <sub>21</sub> (TA) <sub>14</sub>	F: AGCAGTAGCAGCGACAGTGA R: GAGGATTGCACACACCACAC	47.2	234	3	0.5909	0.5593
<i>HSSR009</i> /EC608474	(TA) <sub>14</sub>	F: CCACCCAAATTCCCACATAG R: GGCATTGGAAGAAGGATTGA	53.4	232	2	0.2500	0.2213
<i>HSSR010</i> /EC608003	(GCACCA) <sub>10</sub>	F: CCCAAAGATCAACCAAAGGA R: CACAGGCGGTGTATATGCTG	49.5	279	6	0.8286	0.7979
<i>HSSR011</i> /EC608677	(TC) <sub>13</sub>	F: CCCGTGAAACTCGCTTAAAA R: AGATGAGGAAGGGGGAGAGA	51.3	132	4	0.2955	0.4809
<i>HSSR012</i> /EC606350	(GAT) <sub>12</sub>	F: CCGCCTCAAGAAGAACAAAG R: TCCCCTCGAGAGCTTATCAA	53.4	187	5	0.6667	0.7531
<i>HSSR013</i> /EC604892	(CT) <sub>12</sub>	F: CCGGGATGATTTTGAGAAAG R: GATCCTGAAGCTCTGAGAGAA	57.8	273	3	0.3636	0.3083
<i>HSSR014</i> /EC609705	(CT) <sub>11</sub>	F: CTCAACTCTTCTGTCTTCTCCA R: TCACAGCCATCACAGTCCAT	55.6	211	2	0.2273	0.2038
<i>HSSR016</i> /EC607534	(AAT) <sub>15</sub>	F: CGACTGCTGCTGTGACAAAT R: CAGGAACACAACGTCCTCTTTT	51.3	216	4	0.6364	0.5771
<i>HSSR018</i> /EC608804	(AG) <sub>13</sub>	F: CGGAGATTGTTTGGGAGAGA R: ATTGGGTGGGGATACGTTTT	51.3	295	2	0.5682	0.5034
<i>HSSR019</i> /EC604918	(ATT) <sub>13</sub>	F: CGTCATTCTTCTTTTGCTTTG R: CGTTCGGCTTTAGCTTTCAC	51.3	166	4	0.6818	0.5849

Ta.: 复性温度;  $H_E$ : 期望杂合度;  $H_O$ : 观察杂合度。

表 4 Unigene 比对结果

位点/GenBank 登录号	比对结果		
	所在 EST 注释	登录号	期望值
HSSR001/EC605199	热激蛋白基因	X58710	6e-20
HSSR002/EC607632	K <sup>+</sup> 通道基因	AJ249962	1e-16
HSSR004/EC606056	胱硫醚β-合成酶	NM_121124	2e-103
HSSR005/EC609877	功能不明	NM_125814	5e-90
HSSR006/EC609548	WD40 基因家族 <i>zfw2</i> 基因	NM_124577	7e-32
HSSR008/EC609578	类固醇激素受体协同激活因子 <i>src1</i>	AB000129	1e-27
HSSR009/EC608474	功能不明	EF147256	3e-47
HSSR010/EC608003	重金属转运蛋白	AK221731	1e-09
HSSR011/EC608677	功能不明	AM424761	5e-28
HSSR012/EC606350	耐盐蛋白 SRTG152	AY822590	7e-70
HSSR013/EC604892	——	——	——
HSSR014/EC609705	重金属转运蛋白	NM_105774	1e-60
HSSR016/EC607534	功能不明	EF147873	3e-27
HSSR018/EC608804	3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶	AF429388	1e-170
HSSR019/EC604918	内膜蛋白 70	NM_126258	7e-89

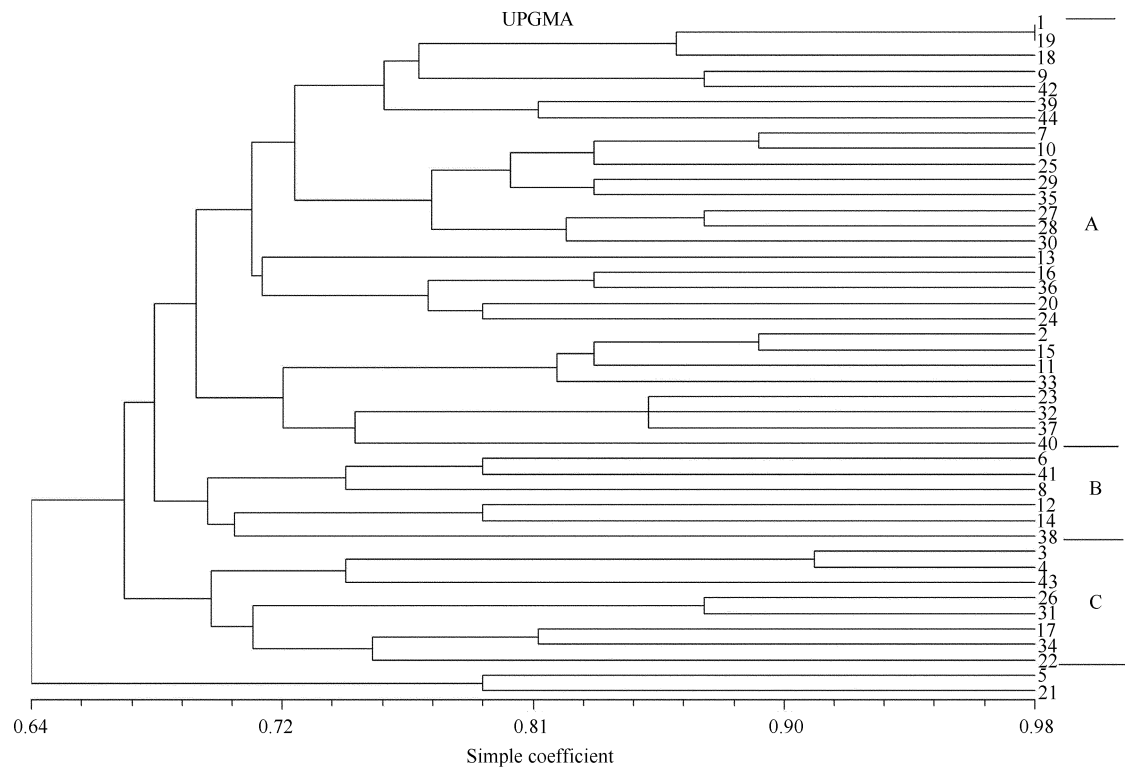


图 3 44 份橡胶树无性系聚类分析树状图  
1~44 号材料名称见表 1。



### 3 讨论

#### 3.1 橡胶树 EST-SSR 的开发

随着EST和cDNA大规模测序的开展,众多植物中进行了EST-SSR引物的开发研究。Eujayl等<sup>[10]</sup>根据DuPont公司的EST数据库信息设计了137对EST-SSR引物,其中有22对引物在64个硬粒小麦中扩增出多态性。Gupta等<sup>[2]</sup>利用GenBank/dbEST和EMEST的15 000条EST检测到897个SSR(1~7 bp),设计了78个EST-SSR引物对。Gao等<sup>[11]</sup>利用超过85 Mb的水稻、小麦、大豆、玉米EST序列,发现了4 394个SSR(1~6 bp),并设计了597对小麦EST-SSR引物,其中,478对引物可以扩增出PCR产物。陈海梅等<sup>[12]</sup>从151 695条小麦EST中设计了249对引物,其中166对在各种小麦品种有清晰的扩增条带。本研究利用10 778条橡胶树胶乳EST序列,查找到430个EST-SSR位点,设计了148对引物,在合成的21对中有15对可以扩增出有效PCR产物,而且在橡胶树无性系中也表现出了较高的多态性,说明开发EST-SSR标记用于橡胶树遗传研究是可行的。由于EST-SSR标记具有较好的种属通用性<sup>[2-5]</sup>,橡胶树EST-SSR的开发应用,将有助于促进橡胶树近缘种遗传研究的发展;对挖掘和利用橡胶树近缘种的优良基因,拓宽橡胶树栽培种质的遗传基础也具有重要作用。

#### 3.2 橡胶树 EST-SSR 的特点

本研究结果表明,橡胶树EST-SSR的出现频率较高,重复基序类型丰富,在3 090条橡胶树Unigene中共找到430个SSR位点,平均分布距离为3.93 kb,分布频率虽低于茶树(3.22 kb)<sup>[13]</sup>,但略高于油菜(4.34 kb)<sup>[14]</sup>、黄瓜(4.6 kb)<sup>[15]</sup>、小麦(9.2 kb)<sup>[2]</sup>、咖啡(7.73 kb)<sup>[4]</sup>、棉花(14.8 kb)<sup>[16]</sup>等植物。从目前的报道来看,大多数植物EST-SSR主要集中在二、三核苷酸重复类型,但主要的重复基序类型则有所差异,例如在茶树<sup>[13]</sup>、黄瓜<sup>[15]</sup>、猕猴桃<sup>[17]</sup>、杏树和桃树<sup>[18]</sup>中,以二核苷酸重复为主;在小麦<sup>[2]</sup>、葡萄<sup>[19]</sup>、咖啡<sup>[4]</sup>、柑橘<sup>[20]</sup>、苜蓿<sup>[21]</sup>、棉花<sup>[16]</sup>中则以三核苷酸重复为主;油菜<sup>[14]</sup>和近缘白菜<sup>[22]</sup>的二、三核苷酸重复所占比例相差不大。本研究中,橡胶树EST-SSR以二核

苷酸重复为主,占总EST-SSR的63.49%,而在二核苷酸基序中AG/TC为最多,这一现象与多数植物中报道的情况相同<sup>[23]</sup>;三核苷酸基序中则以CTT/GAA重复为主,与油菜<sup>[14]</sup>、黄瓜<sup>[15]</sup>、柑橘<sup>[20]</sup>、棉花<sup>[16]</sup>等植物中的类似,该类型也是双子叶植物中最丰富的重复类型<sup>[11]</sup>。

#### 3.3 橡胶树栽培品种的遗传多样性

目前,我国和东南亚各植胶国的橡胶树栽培品种主要是由魏克汉从原产地亚马逊河流域引种的22株野生种质驯化繁衍而成的<sup>[24]</sup>,遗传基础比较狭窄。而我国的自育品种绝大多数又都可以追溯到从东南亚引进的少数几个无性系,如PR107、RRIM600等,因此我国橡胶树品种的遗传基础更加狭窄。在本研究中44个无性系的相似系数变异范围仅仅在0.64~0.98之间,也证明了这一点。遗传基础狭窄已严重制约了我国橡胶树选育种的进程,只有将橡胶树野生种质的遗传物质导入栽培品种,拓宽我国橡胶树栽培品种的遗传基础,才能加快优良品种的选育进程。鉴于橡胶树的种间杂交障碍较小<sup>[6]</sup>,也可以选取具优良性状的近缘种与栽培种质进行杂交。

聚类结果表明,参试品种没有根据来源地进行聚类,而是依据亲本组成进行了聚类,这与橡胶树的育种特点有关。由于橡胶树是异花授粉植物,所以在育种过程中常常是对选出的优良F<sub>1</sub>单株进行无性繁殖,从而F<sub>1</sub>的遗传组成就能稳定地在无性繁殖后代中得到保留。另外,品种IAN873和Reyan8-333并没有依据亲本组成进聚类,这可能与实验所用引物数量少有关系,进一步增加引物数量可能会得到理想的结果。

#### 参考文献(References):

- [1] 周延清. DNA分子标记技术在植物研究中的应用. 北京: 化学工业出版社, 2005, 186-187.
- [2] Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan HS. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Gen Genomics*, 2003, 270: 315-323. [\[DOI\]](#)
- [3] Yu JK, Rota M La, Kantety RV, Sorrells ME. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice. *Mol Gen Genomics*, 2004, 271: 742-751.



- [4] Poncet V, Rondeau M, Tranchant C, Cayrel A, Hamon S, Kochko A, Hamon P. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as markers for the *Coffea* genus. *Mol Gen Genomics*, 2006, 276: 436–449. [\[DOI\]](#)
- [5] Jia Xiao-Ping, Shi Yun-Su, Song Yan-Cun, Wang Guo-Ying, Wang Tian-Yu, Li Yu. Development of EST-SSR in fox-tail millet (*Setaria italica*). *Genet Resour Crop Evol*, 2007, 54: 233–236. [\[DOI\]](#)
- [6] Priyadarshan PM, Goncalves P de S. *Hevea* gene pool for breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2003, 50: 101–114. [\[DOI\]](#)
- [7] Kantety RV, Rota ML, Matthews DE, Sorrells ME. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol Biol*, 2002, 48: 501–510. [\[DOI\]](#)
- [8] 安泽伟, 黄华孙. 一种提取橡胶树叶总DNA的方法. *植物生理学通讯*, 2005, 41(4): 513–515.
- [9] Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 1994, 17: 915–919.
- [10] Eujayl I, Sorrells ME, Baum M, Wolters P, Powell W. Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 399–407. [\[DOI\]](#)
- [11] Gao LF, Tang JF, Li HW, Jia JZ. Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Mol Breed*, 2003, 12: 245–261. [\[DOI\]](#)
- [12] Chen HM, Li LZ, Wei XY, Li SS, Lei TD, Hu HZ, Wang HG, Zhang XS. Development, chromosome location and genetic mapping of EST-SSR markers in wheat. *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50 (20): 2328–2336. [\[DOI\]](#)
- [13] 刘振, 王新超, 赵丽萍, 姚明哲, 王平盛, 许玫, 唐一春, 陈亮. 基于 EST—SSR 的西南茶区茶树资源遗传多样性和亲缘关系分析. *分子植物育种*, 2008, 6 (1): 100–110.
- [14] 李小白, 张明龙, 崔海瑞. 油菜 EST-SSR 标记的建立. *分子细胞生物学报*, 2007, 40(2): 137–144.
- [15] 孔秋生. 基于公共序列数据库的 *Cucumis* 属 EST-SSR 标记的鉴定、开发和利用 [学位论文]. 华中农业大学, 2006, 9.
- [16] 王长彪, 郭旺珍, 蔡彩平, 张天真. 雷蒙德氏棉 EST-SSRs 分布特征及开发与利用. *科学通报*, 2006, 51(3): 316–320.
- [17] Fraser LG, Harvey CF, Crowhurst RN, De Silva HN. EST-derived microsatellites from *Actinidia* species and their potential for mapping. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1010–1016. [\[DOI\]](#)
- [18] Jung S, Abbott A, Jesudurai C, Tomkins J, Main D. Frequency type distribution and annotation of simple sequence repeats in Rosaceae ESTs. *Funct Integr Genomics*, 2005, 5: 136–143. [\[DOI\]](#)
- [19] Scott KD, Eggler P, Seaton G, Rossetto M, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 723–726. [\[DOI\]](#)
- [20] 江东, 钟广炎, 洪棋斌. 柑橘 EST-SSR 分子标记分析. *遗传学报*, 2006, 33 (4): 345–353.
- [21] Eujayl I, Sledge MK, Wang L, May GD, Chekhovskiy K, Zwonitzer JC, Mian MAR. *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 414–422. [\[DOI\]](#)
- [22] 忻雅, 崔海瑞, 卢美贞, 姚艳玲, 金基强, 林容杓, 崔水莲. 白菜 EST-SSR 信息分析与标记的建立. *园艺学报*, 2006, 33 (3): 549–554.
- [23] 李永强, 李宏伟, 高丽锋, 何蓓如. 基于表达序列标签的微卫星标记(EST-SSR)研究进展. *植物遗传资源学报*, 2004, 5: 91–95.
- [24] Tan H. Strategies in Rubber Tree Breeding. In: *Improving Vegetative Propagated Crops*. London: Academic Press, 1987, 27–62.