

橡胶树四倍体来源鉴定及不同倍性叶片解剖结构比较

张源源¹, 岳秦伊², 濮寿琴², 郑瑶², 祝青², 方家林¹, 黄肖¹, 李维国¹

(¹中国热带农业科学院橡胶研究所 / 国家橡胶树育种中心 / 农业农村部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室 / 省部共建国家重点实验室培育基地 - 海南省热带作物栽培生理学重点实验室 / 农业农村部儋州橡胶树种质资源圃, 海口 571101; ²海南大学热带农林学院, 海口 570228)

摘要: 利用 25 对 SSR 引物, 采用基于 PCR 的毛细管电泳法鉴定 14 株人工诱导四倍体的来源, 并采用 2 种切片方法比较橡胶树不同倍性叶片的厚度差异。结果表明, 14 株四倍体中 9 株为同一无性系, 另有 5 株为同一无性系或全同胞子代, 14 株四倍体的同源二倍体的亲本之一为热研 73397。橡胶树二、三、四倍体间的叶片、上表皮、栅栏组织、海绵组织的厚度差异极显著 ($P < 0.01$), 且随着倍性的增加而增加。二、三、四倍体鲜叶厚度分别为 $159.98 \pm 16.04 \mu\text{m}$ 、 $188.52 \pm 16.29 \mu\text{m}$ 、 $204.21 \pm 16.45 \mu\text{m}$, 叶片石蜡切片厚度分别为 $139.94 \pm 13.22 \mu\text{m}$ 、 $169.53 \pm 15.07 \mu\text{m}$ 、 $180.84 \pm 26.71 \mu\text{m}$ 。以鲜叶厚度 $177.81 \mu\text{m}$ 或石蜡切片厚度 $160.70 \mu\text{m}$ 为临界值可以区分人工体细胞诱导四倍体橡胶树获得的二、四倍混合群体中的二倍体和四倍体。不同倍性的叶片结构紧密度和栅海比大小排序均为: 三倍体 > 四倍体 > 二倍体, 叶片结构疏松度大小排序为: 二倍体 > 四倍体 > 三倍体。本研究结果为橡胶树多倍体资源的鉴定和多倍体育种策略选择提供了参考。

关键词: 橡胶树; 多倍体; SSR; 来源鉴定; 叶片厚度

Source Identification of Tetraploids and Comparison of Leaf Anatomy Structure of Different Ploidy in *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.

ZHANG Yuan-yuan¹, YUE Qin-yi², PU Shou-qin², ZHENG Yao², ZHU Qing²,
FANG Jia-lin¹, HUANG Xiao¹, LI Wei-guo¹

(¹Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/State Centre for Rubber Breeding/Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China/State Key Laboratory Incubation Base for Cultivation & Physiology of Tropical Crops/ Rubber Tree Germplasm Repository, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, P.R.China, Haikou 571101; ²Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: In order to reveal the genetic origin of 14 tetraploid lines, 25 simple sequence repeat markers were subjected for analyzing the diversity within this study. The leaf anatomy structure of diploid, triploid and tetraploid lines were analyzed using two section methods to evaluate the difference between ploidy. As a result, all 14 tetraploids are derived from the same clone or full siblings, and the diploid line Reyan73397 serves as one of the parental lines. The thickness of the leaves, upper epidermis, palisade tissue and sponge tissue between the diploid, triploid and tetraploid of the rubber tree was significantly different and increased with the increasing of the ploidy. The thickness of diploid, triploid and tetraploid fresh leaves are $159.98 \pm 16.04 \mu\text{m}$, $188.52 \pm 16.29 \mu\text{m}$, $204.21 \pm 16.45 \mu\text{m}$, and the thickness of the paraffin leaves are $139.94 \pm 13.22 \mu\text{m}$, $169.53 \pm 15.07 \mu\text{m}$,

收稿日期: 2019-03-04 修回日期: 2019-04-25 网络出版日期: 2019-05-14

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190304001>

第一作者研究方向为橡胶树多倍体育种, E-mail: yuanyuanhill@sina.com; 岳秦伊为共同第一作者

通信作者: 李维国, 研究方向为橡胶树遗传育种, E-mail: leewg23@163.com

基金项目: 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金 (1630022018008); 现代农业产业技术体系 (CARS-34-YZ2)

Foundation project: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund for Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (1630022018008), China Agriculture Research System (CARS-34-YZ2)

180.84 ± 26.71 μm respectively. The demarcation of fresh leaf thickness of 177.81 μm or the paraffin wax thickness of 160.70 μm can be used to identify tetraploid from mixed population of diploid and tetraploid. The rank of Cell Tense Ratio and Palisade tissue/Spongy tissue ratio in different ploidy was as follows: triploid>tetraploid>diploid, the rank of Spongy Ratio in different ploidy was as follows: diploid>tetraploid>triploid. Taken together, the findings derived from this study are valuable for clarifying the polyploidy resources and future breeding in polyploidy rubber trees.

Key words: *Hevea brasiliensis*; polyploid; SSR; source identification; leaf thickness

橡胶树 [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.] 的次生代谢产物橡胶是重要的工业原料之一, 在经济社会发展中起重要作用。选育高产、高抗、品质优良的橡胶树新品种, 是推动橡胶产业发展, 保障国家战略需求的基础。当前, 橡胶树遗传育种研究面临着遗传基础狭窄的问题^[1], 严重制约着新品种选育的进程, 而多倍体育种是解决该问题的途径之一。在云南广泛栽培的橡胶树云研 77-2 和云研 77-4 被证明为三倍体^[2], 表明橡胶树多倍体育种是一条可行之路。

收集和鉴定多倍体资源是开展植物多倍体育种研究的基础工作。表型鉴定是筛选植物多倍体的主要手段之一。通常认为, 植物多倍体表现出个体高大、叶片宽厚、叶色加深、分枝数少、花果少、种子大等形态特征^[3-6], 这些特点为植物多倍体鉴定提供了思路。橡胶树中存在大量自然多倍体^[7-8], 胡东琼等^[9]通过形态鉴定筛选出了少量自然多倍体植株。郑学勤等^[10]发现人工诱导多倍体(四倍体)与对照二倍体相比具有叶片显著增厚、叶色浓绿、叶脉增粗、叶片主侧脉夹角变小、顶蓬古铜色小叶挺拔且三小叶所成夹角大等特点, 并运用这些特点筛选出部分人工诱导多倍体(四倍体)。张源源等^[11]比较了二、三、四倍体的气孔性状差异, 结果表明以气孔长度 15.15 μm、气孔宽度 10.38 μm 和气孔密度 555.32 个/mm² 为临界值, 可以鉴定二、四倍体混合群体中的四倍体, 以气孔长度 14.04 μm、气孔宽度 8.58 μm 和气孔密度 764.80 个/mm² 为临界值, 可以筛除二、三、四倍体混合群体中的部分二倍体, 提高多倍体鉴定的效率。大量研究表明, 植物多倍体尤其是四倍体较二倍体表现出明显的叶片加厚特点^[12-15], 但橡胶树中尚没有相关报道。

本研究在前期通过流式细胞仪鉴定出的来源不明的人工诱导四倍体和自然三倍体的基础上, 通过 SSR 分子标记手段鉴定人工诱导四倍体的亲本来源, 比较二、三、四倍体的叶片解剖结构差异, 探讨通过叶片厚度鉴定橡胶树多倍体资源的可能性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用于四倍体来源鉴定的候选亲本(均为二倍体, 2n=36)为: 热研 21439、RRIM600、RRIM623、热研 71855、热研 73397、IAN873、热研 879、热研 8813、93114、GT1、PR228、PB86、PR107、PR303、海垦 1、海垦 2、海垦 3、南华 1; 用于叶片厚度测量的二倍体品系为: 热研 73397、热研 72059、热垦 501、热垦 525、热垦 628、热研 8813、海垦 1、海垦 2、IAN873、PR107, 均取自国家橡胶树种质资源圃。三倍体为定植于国家橡胶树育种中心基地的橡胶树品种 GT1 的半同胞子代。四倍体为发现于中国热带农业科学院试验场的 14 株四倍体, 代号为 T1~T14。所有材料的倍性均已经过流式细胞术鉴定^[10]。高效植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP350) 购自天根生化科技(北京)有限公司; Hi-Di 去离子甲酰胺、POP-7 Polymer、GS-500LIZ 分子量内标、毛细管电泳 10 × Buffer 和 2 × Taq Plus PCR Master Mix 购自 Applied Biosystems 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 称取四倍体和候选亲本的嫩叶 300 mg, 参照高效植物基因组 DNA 提取试剂盒使用说明提取基因组 DNA。用 1% 的琼脂糖凝胶和 Nanodrop 2000 检测质量和纯度, 工作浓度稀释至 20 ng/μL。

1.2.2 SSR 引物筛选及合成 通过毛细管电泳检测, 从 30 对在橡胶树中具有多态性位点的引物中, 筛选出 25 对在本研究具有多态性的引物, 其序列及文献来源见表 1。引物 5' 端连接 TAMRA、HEX、FAM 或 ROX 荧光标记, 并由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增 反应体系 10.0 μL: DNA 模板 0.5 μL, Taq Plus PCR Master Mix 5.0 μL, 10 μmol/L 上游引物 0.1 μL, 10 μmol/L 下游引物 0.1 μL, 无菌水补足 10.0 μL。扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 50~60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 进行 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物于 4 °C 保存。

表 1 SSR 引物序列及参考文献

Table 1 SSR primer sequence and reference sources

位点 Loci	引物序列 Primer sequence (5'-3')F	引物序列 Primer sequence (5'-3')R	重复单元 Motif	差异等位 基因数量 Number of Alleles	文献来源 Reference
EHB034	ATAGCCGACCCAAATCTT	GGACAGCAAGACATGAAGAGTG	(AGTTG) _n	2	[16]
EHB065	CCAGTGAGCACAGGCATAAT	TGGAGAGTGCAGATGAATGC	(AAT) _n	4	[16]
EHB070	CCCCACATGCGATTTAAGTT	TGGGCTGTGTTGTGCTATTC	(AAG) _n	2	[16]
EHB079	CCTATCCTTCTGCTCGTTCG	TTCCACAGAAGGAAGGTG	(ATC) _n	3	[16]
EHB087	CGGAGCTAAGTTCGAGTCCTT	CTGGAACCGTATTTCAGGT	(ATT) _n	3	[16]
EHB109	GAAAGCTAACGGTGGACTCG	ACGAATCGGACTTTGGTGTT	(ATC) _n	4	[16]
EHB113	GAGGCACTTGAGCTCCAAAC	CGAATCCGGAATTTTCTTCA	(GCT) _n	2	[16]
EHB133	GGCCATCACTCAACATCCTT	CTCACCTTTTGAAAGCGAA	(CTT) _n	4	[16]
EHB136	GGGTATGGATGTGGTGAAGG	ATGGTTTGGTTCTCATCCCA	(GTG) _n	3	[16]
EHB159	TACCAAGCATGTTGCCATA	TCTCAGAAACAAGGGTTGGG	(CA) _n	6	[16]
EHB160	TAGAAGCTGCCACAATGC	TTGACGCCAAATGTTTATGC	(AAT) _n	6	[16]
EHB177	TCGCTTTCTCCATATAGATTTCA	CAGCAAGAAATCCCTCAACC	(GAA) _n , (TTC) _n	3	[16]
HB-1	CTGATGCTGCCAAGCAATAC	CAAACATCGACTCTCTCTCA	(TG) _n	6	[17]
HB-24	GCCAAATCAATCACTCATCC	GTGCTTCGGCTCAATCTGTT	(CA) _n	2	[17]
HB-9	CACTCATCCATGGTTTAAATGG	CCATGGAGGCTCTGAAGTG	(GT) _n	9	[17]
HESR050	TGCTGTTGGAGGAAGA	CCAGGGACTTTGTTAGAC	(CTT) _n	3	[18]
HESR055	TTGCTGAGATGTGATG	GAGGTTTAACTGCTAAG	(GAA) _n	3	[18]
HSSR004	ACCACATACTCCCCAGTA	GACGAGGAAGATGAGGAGGA	(TA) _n	3	[19]
HSSR006	ACCTCGATCCACAAACGAAC	CTGAGGGCGTAAGAATCGAA	(CG) _n	6	[19]
HSSR011	CCCGTGAAACTCGCTTAAAA	AGATGAGGAAGGGGGAGAGA	(TC) _n	4	[19]
HSSR012	CCGCTCAAGAAGAACAAG	TCCCCTCGAGAGCTTATCAA	(GAT) _n	4	[19]
HSSR013	CCGGGATGATTTGAGAAAG	GATCCTGAAGCTCTGAGAGAA	(CT) _n	3	[19]
HSSR016	CGACTGCTGCTGTGACAAAT	CAGGAACACAACGTCTTCTTTT	(AAT) _n	6	[19]
HSSR019	CGTCATTCTTTCTTTGCTTTG	CGTTCGGCTTTAGCTTTCAC	(ATT) _n	5	[19]
unigene17757	GACTTGCTCTCCAGACC	CCTTATCCTATCTTTTGTTTTCC	(GA) _n	7	[20]

1.2.4 毛细管电泳检测和 SSR 分析 4 种 PCR 产物(分别连接 TAMRA、HEX、FAM 和 ROX 荧光标记)各 0.3 μL 、分子量内标 0.5 μL 和去离子甲酰胺 9.5 μL 混合后加入 PCR 板, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却, 于 ABI-3730XL 基因分析仪上检测。检测结果使用 Gene-Marker V2.20 读取分析。

1.2.5 叶片厚度测量 取橡胶树稳定期的三出复叶的中间叶片, 在叶片中部主叶脉一侧避开侧叶脉部位, 取 3 个 0.25 cm^2 大小叶块用于新鲜叶片厚度测量。在主叶脉对侧取相同面积叶块用 FAA 固

定 24 h 以上, 用于石蜡切片厚度测量。将新鲜叶片嵌入胡萝卜内, 使用 Leica RM2235 石蜡切片机切成 15~20 μm 厚的切片, 置于载玻片上, 在 leica DM4 显微镜下测量厚度。采用石蜡切片法制作 10~15 μm 厚的石蜡切片, 在显微镜下测量叶片、上表皮、栅栏组织、海绵组织和下表皮的厚度。不同倍性各取 10 株橡胶树, 每株取 3 片叶, 每片叶取 3 个叶块, 每个叶块制作 3 个切片, 每个切片测量 1 次, 即每个叶片测量 3 个数据, 每株测量 9 个数据, 每个倍性测量 90 个数据。

1.3 数据处理

将毛细管电泳结果读取为0/1数据,使用NTSYSpc-2.10软件计算四倍体和二倍体候选亲本的遗传相似系数,运用UPGMA法进行聚类分析。叶片厚度数据在Microsoft Excel 2016中整理,使用IBM SPSS 22.0进行方差同质性检验、方差分析、多重比较和相关性分析,使用R语言绘制密度分布曲线图。

2 结果与分析

2.1 基因组DNA提取结果

32个供试材料的基因组DNA浓度为22.9~388.1 ng/ μ L, OD₂₆₀/OD₂₈₀为1.795~2.107,琼脂糖凝胶电泳检测结果(图1)表明,提取的基因组DNA质量较好,条带完整,可用于后续试验。

2.2 SSR引物筛选结果

毛细管电泳检测结果表明,从30对引物中筛选出25对在四倍体和候选亲本中具有差异条带的引物,筛出率为83.33%。利用25对引物对32个供试材料进行PCR扩增,共扩增出103条差异性条带,平均每对引物扩增出4.1个条带,每个位点的等位基因数为2~9个(表1)。

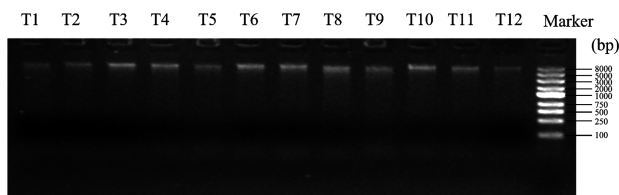


图1 部分基因组DNA电泳结果

Fig.1 Part results of genomic DNA electrophoresis

2.3 橡胶树四倍体来源鉴定

遗传相似性和遗传距离分析结果(表2)表明,18个候选亲本之间的遗传相似系数为0.53~0.84,遗传距离为0.39~0.68,四倍体平均与18个候选亲本的遗传相似系数为0.58~0.86,遗传距离为0.37~0.65。T1~T14之间的遗传相似系数为0.95~1.00,其中9株的遗传距离为0,另有5株的遗传距离在0.10~0.22之间(表略),聚类分析显示14个四倍体单独聚为一类(图2),说明14个四倍体为同一个无性系或全同胞子代。候选亲本中遗传相似系数最高和遗传距离最近的均为热研73397,聚类分析显示只有热研73397同T1~T14归为一类群,表明热研73397为四倍体T1~T14的亲本之一。

2.4 叶片解剖结构差异分析

叶片厚度测量结果(表3)表明,橡胶树不同倍性间的新鲜叶片法测得的叶片总厚度、石蜡切片法测得的上表皮、栅栏组织、海绵组织、下表皮厚度和叶片总厚度,以及叶片组织紧密度(CTR,栅栏组织厚度/叶片厚度)、叶片组织疏松度(SR,海绵组织厚度/叶片厚度)和栅海比(P/S,栅栏组织厚度/海绵组织厚度)差异均极显著,同一倍性不同品种、不同基因型、不同单株间叶片厚度差异极显著。随着倍性的提高,叶片厚度、上表皮、栅栏组织和海绵组织的厚度增加,只有下表皮表现为二倍体较三倍体厚。叶片不同组织的厚度间差异不同,三倍体和四倍体间栅栏组织厚度差异不显著,但极显著高于二倍体;二倍体和三倍体间海绵组织厚度差异不显著,但极显著低于四倍体。两种方法测量叶片厚度的相关系数为0.837,相关性极显著,表明通过新鲜切片法测量叶片厚度是可靠的。不同倍性的组织紧密度和栅海比大小排序均为:三倍体>四倍体>二倍体,组织疏松度大小排序为:二倍体>四倍体>三倍体。

不同倍性橡胶树叶片厚度值密度曲线(图3)表明,三倍体的鲜叶切片厚度和石蜡切片厚度分布区间同二、四倍体均有较大重合,但二倍体和四倍体的重合区间较小,表明以鲜叶厚度177.81 μ m或石蜡切片厚度160.70 μ m为临界值可以较准确地区分橡胶树二、四倍混合群体中的二倍体和四倍体。二、三、四倍体的上表皮、栅栏组织、海绵组织和下表皮厚度的分布区间均有较大的重合,其中上表皮和海绵组织方面,三倍体靠近二倍体,栅栏组织方面三倍体靠近四倍体,下表皮3个倍性几乎完全重合。

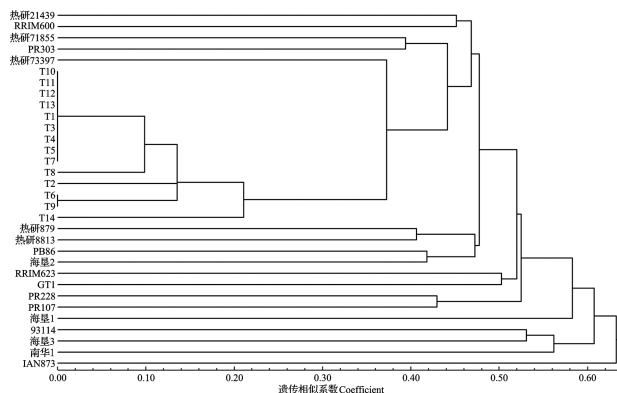


图2 品种/无性系之间的聚类分析

Fig.2 Dendrogram of varieties/clones

表 2 品种 / 无性系之间的遗传相似系数 (左下) 和遗传距离 (右上)
 Table 2 Genetic similarity (bottom left) and genetic distance (upper right) of varieties/clones

品种 (无性系) Varieties (clones)	热研 21439 Reyan21439	RRIM600	RRIM623	热研 71855 Reyan71855	热研 73397 Reyan73397	IAN873	热研 879 Reyan879	热研 8813 Reyan8813	93114	GT1	PR228	PB86	PR107	PR303	海垦 1 Haiken1	海垦 2 Haiken2	海垦 3 Haiken3	南华 1 Nanhua1	T1~T14 平均 Average of T1-T14
热研 21439	1.00	0.45	0.49	0.50	0.50	0.62	0.54	0.53	0.59	0.55	0.57	0.45	0.61	0.50	0.58	0.53	0.60	0.64	0.47
RRIM600	0.80	1.00	0.46	0.49	0.47	0.61	0.47	0.46	0.60	0.50	0.57	0.44	0.62	0.49	0.52	0.48	0.54	0.58	0.46
RRIM623	0.76	0.79	1.00	0.55	0.53	0.64	0.51	0.48	0.58	0.50	0.52	0.48	0.63	0.53	0.59	0.52	0.54	0.62	0.54
热研 71855	0.75	0.76	0.70	1.00	0.44	0.66	0.44	0.47	0.59	0.53	0.47	0.53	0.44	0.39	0.53	0.49	0.55	0.65	0.46
热研 73397	0.75	0.78	0.72	0.81	1.00	0.65	0.44	0.53	0.61	0.51	0.47	0.51	0.46	0.42	0.60	0.53	0.60	0.64	0.37
IAN873	0.62	0.63	0.59	0.56	0.58	1.00	0.63	0.62	0.66	0.65	0.68	0.54	0.66	0.66	0.65	0.57	0.62	0.66	0.63
热研 879	0.71	0.78	0.74	0.81	0.81	0.60	1.00	0.41	0.56	0.49	0.45	0.49	0.50	0.44	0.60	0.45	0.53	0.56	0.45
热研 8813	0.72	0.79	0.77	0.78	0.72	0.61	0.84	1.00	0.60	0.52	0.54	0.46	0.58	0.53	0.59	0.48	0.50	0.60	0.50
93114	0.65	0.64	0.66	0.65	0.63	0.56	0.69	0.64	1.00	0.55	0.57	0.57	0.59	0.56	0.65	0.47	0.53	0.56	0.63
GT1	0.70	0.64	0.75	0.72	0.74	0.57	0.76	0.73	0.70	1.00	0.50	0.48	0.58	0.53	0.61	0.48	0.52	0.62	0.52
PR228	0.68	0.67	0.73	0.78	0.78	0.53	0.80	0.71	0.68	0.75	1.00	0.54	0.43	0.41	0.64	0.50	0.61	0.55	0.52
PB86	0.80	0.81	0.77	0.72	0.74	0.71	0.76	0.79	0.68	0.77	0.71	1.00	0.62	0.45	0.54	0.42	0.56	0.63	0.41
PR107	0.63	0.62	0.60	0.81	0.79	0.56	0.75	0.66	0.65	0.66	0.82	0.62	1.00	0.48	0.60	0.53	0.60	0.62	0.53
PR303	0.75	0.76	0.72	0.84	0.83	0.56	0.81	0.72	0.69	0.72	0.84	0.80	0.77	1.00	0.57	0.47	0.60	0.61	0.42
海垦 1	0.66	0.73	0.65	0.72	0.64	0.57	0.64	0.65	0.58	0.63	0.59	0.71	0.64	0.68	1.00	0.56	0.57	0.65	0.59
海垦 2	0.72	0.77	0.73	0.76	0.72	0.67	0.80	0.77	0.78	0.77	0.75	0.83	0.72	0.78	0.69	1.00	0.54	0.55	0.54
海垦 3	0.64	0.71	0.71	0.70	0.64	0.61	0.72	0.75	0.72	0.73	0.63	0.69	0.64	0.64	0.67	0.71	1.00	0.57	0.62
南华 1	0.59	0.66	0.62	0.57	0.59	0.56	0.69	0.64	0.69	0.62	0.70	0.60	0.61	0.63	0.58	0.70	0.68	1.00	0.65
T1~T14 平均	0.78	0.79	0.71	0.79	0.86	0.60	0.80	0.75	0.61	0.73	0.73	0.83	0.72	0.82	0.66	0.71	0.62	0.58	1.00

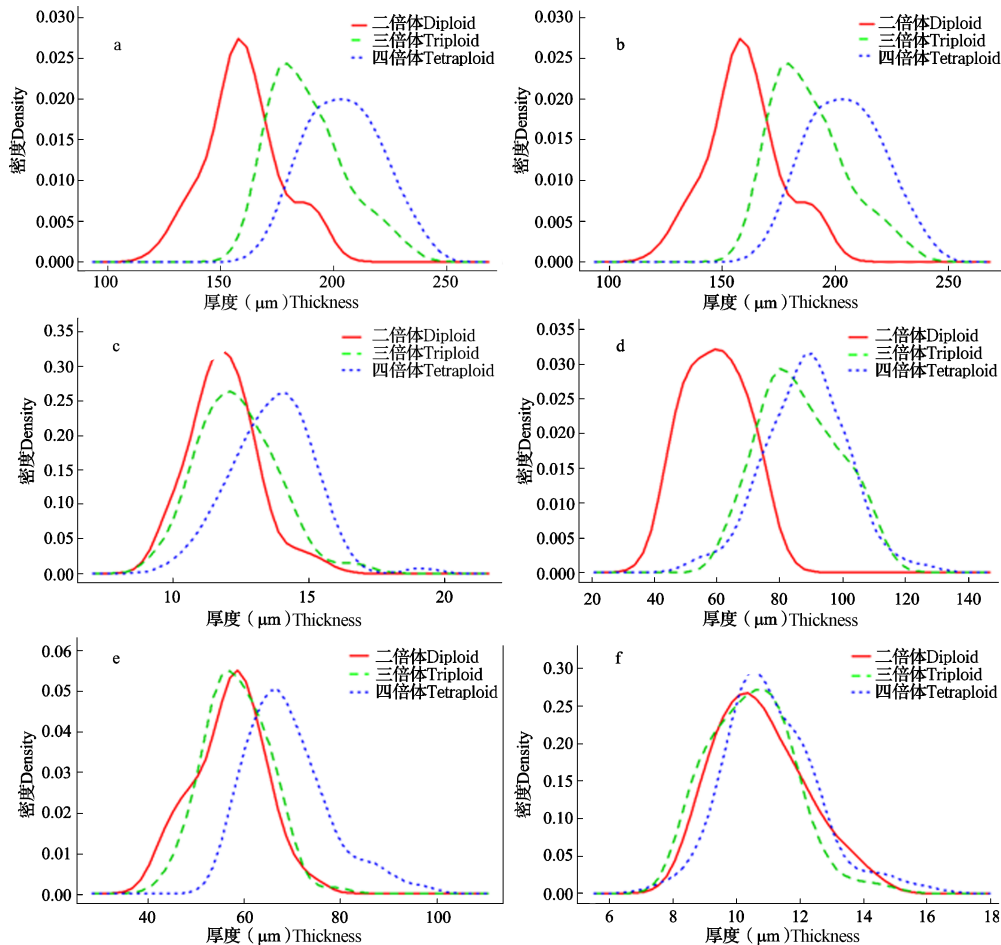
表3 橡胶树不同倍性叶片组织结构参数比较

Table 3 comparison of structural parameters of leaf tissue in different ploidy of rubber tree

切片方法 Section methods	项目 Item	二倍体 Diploid	三倍体 Triploid	四倍体 Tetraploid	P 值 P value
新鲜切片法 Fresh section	叶片厚度 (μm) Leaf thickness	159.98 ± 16.04Cc	188.52 ± 16.29Bb	204.21 ± 16.45Aa	1.49 × 10 ⁻⁴⁸
石蜡切片法 Paraffin section	叶片厚度 (μm) Leaf thickness	139.94 ± 13.22Cc	169.53 ± 15.07Bb	180.84 ± 26.71Aa	4.38 × 10 ⁻³⁵
	上表皮厚度 (μm) Thickness of upper epidermis	11.87 ± 1.20Bc	12.37 ± 1.44Bb	13.65 ± 1.48Aa	6.63 × 10 ⁻¹⁶
	栅栏组织厚度 (μm) Palisade tissue thickness	59.49 ± 9.52Bb	86.43 ± 12.36Aa	88.42 ± 12.88Aa	9.43 × 10 ⁻⁴⁹
	海绵组织厚度 (μm) Spongy tissue thickness	56.9 ± 7.19Bb	58.48 ± 6.34Bb	69.04 ± 8.41Aa	9.74 × 10 ⁻²⁶
	下表皮厚度 (μm) Thickness of lower epidermis	10.76 ± 1.39ABab	10.46 ± 1.28Bb	11.08 ± 1.38Aa	0.01
	紧密度 CTR Tightness of palisade tissue structure	0.42 ± 0.041C	0.51 ± 0.039A	0.48 ± 0.035B	9.83 × 10 ⁻³⁷
	疏松度 SR Looseness of sponge tissue structure	0.41 ± 0.035A	0.35 ± 0.034C	0.38 ± 0.032B	2.21 × 10 ⁻²⁶
	栅海比 P/S Palisade tissue and spongy tissue ratio	1.06 ± 0.18C	1.49 ± 0.25A	1.29 ± 0.19B	3.05 × 10 ⁻³²

同列数据后的不同大写字母表示不同倍性间差异极显著 ($P < 0.01$)

Data with different capital letters in the same column indicate statistically significant differences at $P < 0.01$ between ploidy



a: 新鲜切片; b: 石蜡切片; c: 上表皮; d: 栅栏组织; e: 海绵组织; f: 下表皮

a: Fresh leaves, b: Paraffin section of leaves, c: Upper epidermis, d: Palisade tissue, e: Spongy tissue, f: Lower epidermis

图3 橡胶树不同倍性叶片厚度值的密度分布曲线

Fig.3 Density distribution curve of leaf thickness in different ploidy of rubber tree

3 讨论

SSR 标记因为具有多态性高、重复性好、检测容易、稳定性高等特点,是亲本鉴定普遍采用的手段^[21-24]。同源四倍体是通过二倍体基因组复制(染色体加倍)产生的,理论上,不考虑人工诱变导致的突变情况,二倍体和其同源四倍体具有相同的等位基因。肖亮等^[25]通过 36 对 SSR 标记引物扩增出的 672 条带比较了二倍体木薯(*Manihot esculenta* Crantz)及其同源四倍体基因组的遗传差异,结果没有检测到差异位点。栾丽等^[26]选用随机分布于 12 条染色体上的 15 对 SSR 引物分析水稻(*Oryza sativa* L.)二倍体和其同源四倍体的遗传差异,结果表明同源四倍体与其二倍体基因组大部分相同,只在某些位点上有差异。以上结果表明,可以通过 SSR 标记鉴定同源四倍体的来源。在本研究中,14 株四倍体中的 9 株四倍体位点多态性一致,可确定为同一无性系,另有 5 株四倍体有少量的位点差异,推测为全同胞子代或因基因突变造成位点差异,具体需要进一步研究。本研究确定热研 73397 为四倍体的同源二倍体的亲本之一,另一个亲本因候选亲本范围所限无法确定。

植物多倍化的结果之一是叶片解剖结构的改变。大量研究表明,多倍体的叶片厚度较二倍体增加,如大青杨(*Populus ussuriensis* Kom.)的三倍体和四倍体的叶片厚度、表皮细胞厚度、栅栏组织厚度均比二倍体高,且呈现随倍性增加的趋势^[15]。石斛属(*Dendrobium* Sw.)二、三、四倍体的叶片厚度与染色体倍性呈极显著正相关^[27]。盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C.H.Wright)二、三、四倍体的叶片厚度随倍性增加依次增大,且 3 个倍性之间差异显著^[28]。同时,不是倍性越高,叶片厚度越高,如云南山茶(*Camellia reticulata* Lindl.)的二、四、六倍体中,四倍体的叶片厚度、角质层厚度和上下表皮厚度均以四倍体最大^[29]。此外,不是所有的多倍体都比二倍体叶片厚,如部分滇杨(*Populus yunnanensis* Dode)同源四倍体的叶片厚度与二倍体的叶片没有显著差异^[13]。叶片不同组织厚度的表现同叶片厚度的规律基本一致,但有例外,如大青杨^[15]和盾叶薯蓣^[28]中栅栏组织厚度为三倍体高于二倍体和四倍体。在本研究中,橡胶树不同倍性的叶片厚度和不同组织的厚度均表现随倍性增加而增加的趋势,只有下表皮表现为三倍体厚度最低,同时

有部分多倍体的叶片较部分二倍体薄,推测是基因型和立地条件等因素综合导致。

叶片组织结构在一定程度上能够反映植物的生理适应性,可将植物叶片组织结构作为种质资源评价、育种和抗逆性研究的重要依据^[30]。因为单一组织厚度会随着植物生境和生理状态的不同而变化,而不同组织厚度的比值因为遗传上的制约关系而相对稳定^[31],因此,当前普遍用组织紧密度、组织疏松度和栅海比作为植物光合能力、抗性的评价指标。大量研究表明,组织紧密度和栅海比越高,组织疏松度越低,植物的光合作用能力越强,抗旱性和抗寒性越好^[32-35]。本研究中组织紧密度和栅海比均为三倍体最高,组织疏松度则相反,研究结果同大青杨^[15]中的类似。表明三倍体具有较强的光合作用能力和抗逆性,在橡胶树多倍体育种中具有更高的价值。

本研究提出以鲜叶厚度 177.81 μm 或石蜡切片厚度 160.70 μm 为临界值区分橡胶树二、四倍混合群体中的二倍体和四倍体,结合橡胶树不同倍性的气孔性状差异^[11],可以在没有流式细胞仪时较准确快速地鉴定体细胞诱导同源四倍体时获得的二、四倍混合群体中的四倍体。三倍体的组织紧密度、栅海比最高,组织疏松度最低,表明三倍体具有较好的光合作用能力和抗逆性,可作为橡胶树多倍体育种的主要研究方向。本研究结果可为橡胶树多倍体资源鉴定和多倍体育种策略选择提供参考。

参考文献

- [1] 吴春太,李维国,高新生,张晓飞,张伟算.我国橡胶树育种面临的问题和对策.江西农业学报,2009,21(12):74-77
Wu C T, Li W G, Gao X S, Zhang X F, Zhang W S. Problems in rubber tree breeding in China and their countermeasures. Acta Agriculturae Jiangxi, 2009, 21(12): 74-77
- [2] 李惠波,周堂英,宁连云,李国华.橡胶树新品种云研 77-2 和 77-4 的细胞学鉴定及育种过程.热带亚热带植物学报,2009,17(6):602-605
Li H B, Zhou T Y, Ning L Y, Li G H. Cytological identification and breeding course of Hevea Yunyan 77-2 and Yunyan 77-4. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2009, 17(6): 602-605
- [3] 谭德冠,庄南生,黄华孙.林木多倍体诱导的研究进展.华南热带农业大学学报,2005,11(1):27-30
Tan D G, Zhuang N S, Huang H S. Research advances in tree polyploid induction. Journal of South China University of Tropical Agriculture, 2005, 11(1): 27-30
- [4] Jackson R C. Evolution and systematic significance of polyploidy. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics,

- 1976(7): 209-234
- [5] 雷家军,王冲.观赏植物多倍体诱导研究进展.东北农业大学学报,2012,43(1): 18-24
Lei J J, Wang C. Review of polyploid induction in ornamental plants. Journal of Northeast Agricultural University, 2012, 43(1): 18-24
- [6] 钟彩虹,李大卫,韩飞,刘小莉,张鹏,黄宏文.猕猴桃品种果实性状特征和主成分分析研究.植物遗传资源学报,2016,17(1): 92-99
Zhong C H, Li D W, Han F, Liu X L, Zhang P, Huang H W. Fruit characters and principal component analysis of different ploidy of kiwifruit cultivars (*Actinidia chinensis* Planch). Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(1): 92-99
- [7] 张源源,康向阳,李维国.橡胶树多倍体诱导机制和途径.热带农业科学,2014,34(5): 44-49, 58
Zhang Y Y, Kang X Y, Li W G. Mechanisms and pathways of polyploid formation in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2014, 34(5): 44-49, 58
- [8] 张源源,黄肖,李维国.温度对橡胶树GT1的2n雌配子发生频率的影响.西南农业学报,2017,30(12): 2634-2638
Zhang Y Y, Huang X, Li W G. Effect of temperature on frequency of 2n female gametes of diploid clone in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(12): 2634-2638
- [9] 胡东琼,梁茂寰,吴云通.橡胶树自然多倍体的选择与分离的研究初报.热带作物研究,1982(3): 1-5
Hu D Q, Liang M H, Wu Y T. Selection and separation of natural polyploid in rubber tree. Tropical crop research, 1982(3): 1-5
- [10] 郑学勤,曾宪松,陈向民,杨光凌.几个高产和抗性无性系多倍体的研究.热带作物研究,1983(1): 5-7
Zheng X Q, Zeng X S, Chen X M, Yang G L. Studies on several polyploids of high yield and resistant clones. Tropical crop Research, 1983(1): 5-7
- [11] 张源源,郭涵,袁红章,王祥军,黄肖,李媛,李维国.橡胶树不同倍性的气孔性状差异研究.热带作物学报,2017,38(3): 389-394
Zhang Y Y, Guo H, Yuan H Z, Wang X J, Huang X, Li Y, Li W G. Stomatal differences among diploid, triploid and tetraploid in rubber tree. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(3): 389-394
- [12] Baker L R, Yarkhunova Y, Vidal K, Ewers E B, Weinig C. Polyploidy and the relationship between leaf structure and function: implications for correlated evolution of anatomy, morphology, and physiology in Brassica. BMC Plant Biology, 2017, 17: 3
- [13] 邱芬,辛亚龙,唐军荣,李斌,何承忠,许程,辛培尧.不同倍性滇杨叶片解剖结构差异分析.中南林业科技大学学报,2017,37(6): 56-59, 69
Qiu F, Xin Y L, Tang J R, Li B, He C Z, Xu C, Xin P Y. Analysis of leaf anatomical structure differences in *Populus yunnanensis* with different ploidy. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2017, 37(6): 56-59, 69
- [14] 辛亚龙,邝凡,唐军荣,邱芬,李斌,辛培尧.不同倍性金铁锁叶和茎解剖结构差异分析.北方园艺,2017(8): 160-164
Xin Y L, Kuang F, Tang J R, Qiu F, Li B, Xin P Y. Difference analysis on stem and leaf anatomical structure of different ploidy *Psammosilene tunicoides*. Northern Horticulture, 2017(8): 160-164
- [15] 祁廷磊,靳春莲,李开隆,李志新,赵慧.不同倍性大青杨的光合特性及叶片解剖结构比较.植物生理学通讯,2010,46(9): 917-922
Qi C L, Jin C L, Li K L, Li Z X, Zhao H. Comparison of photosynthetic characteristics and leaf anatomy structure of different ploidy *Populus ussuriensis* Kom. Plant Physiology Journal, 2010, 46(9): 917-922
- [16] Triwitayakorn K, Chatkulkawin P, Kanjanawattanawong S, Sraphet S, Yoocha T, Sangsrakru D, Chanprasert J, Ngamphiw C, Jomchai N, Therawattanasuk K, Tangphatsornruang S. Transcriptome sequencing of *Hevea brasiliensis* for development microsatellite markers and construction of a genetic linkage map. DNA Research, 2011, 18: 471-482
- [17] Souza M L, Mantello C C, Santos M O, Goncalves S P, Souza P A. Microsatellites from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) for genetic diversity analysis and cross-amplification in six *Hevea* wild species. Conservation Genetics Resources, 2009, 1: 75-79
- [18] An Z W, Li Y C, Zhai Q L, Xie L L, Zhao Y H, Huang H S. Development and characterization of novel expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers in *Hevea brasiliensis* (rubber tree). Genetics and Molecular Research, 2013, 12(4): 5905-5910
- [19] 安泽伟,赵彦宏,程汉,李维国,黄华孙.橡胶树EST-SSR标记的开发与应用.遗传,2009,31(3): 311-319
An Z W, Zhao Y H, Cheng H, Li W G, Huang H S. Development and application of EST-SSR markers in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. Hereditas, 2009, 31(3): 311-319
- [20] Li D, Deng D, Qin B, Liu X, Men Z. De novo assembly and characterization of bark transcriptome using Illumina sequencing and development of EST-SSR markers in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). BMC Genomics, 2012, 13: 192
- [21] 刘振,赵洋,杨培迪,成杨,宁静,杨阳. SSR、SPAP、ISSR分子标记在茶树品种亲本鉴定上的比较分析.茶叶科学,2014,34(6): 617-624
Liu Z, Zhao Y, Yang P D, Cheng Y, Ning J, Yang Y. Comparison of parents identification for tea variety based on SSR, SRAP, and ISSR markers. Journal of Tea Science, 2014, 34(6): 617-624
- [22] 王燕龙,姜言生,曲志才,单雷. SSR分子标记在作物种质资源鉴定中的应用.山东农业科学,2012,44(10): 11-18
Wang Y L, Jiang Y S, Qu Z C, Shan L. Application of SSR markers in crop germplasm identification. Shandong Agricultural Sciences, 2012, 44(10): 11-18
- [23] 杨丽娟,饶庆琳,李洪有,王艳,冉盼,崔娅松,陈庆富. 荞麦属植物多年生种间杂种的鉴定.植物遗传资源学报,2019,20(2): 387-395
Yang L J, Rao Q L, Li H Y, Wang Y, Ran P, Cui Y S, Chen Q F. Identification of perennial interspecific hybrids on genus *fagopyrum*. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(2): 387-395
- [24] 戚建锋,李晓鹏,王文然,贾海锋.利用基于SSR标记的

- MCID 法鉴定 72 个柿地方品种. 植物遗传资源学报, 2019, 19(5): 895-903
- Qi J F, Li X P, Wang W R, Jia H F. Identification of 72 persimmon landraces by using SSR markers-based MCID method. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 19(5): 895-903
- [25] 肖亮, 周慧文, 谢向誉, 尚小红, 陈松笔, 严华兵. 木薯及其同源四倍体基因组与 DNA 甲基化差异分析. 热带作物学报, 2018, 39(5): 833-839
- Xiao L, Zhou H W, Xie X Y, Shang X H, Chen S B, Yan H B. Analysis of genetic variation and DNA methylation diversity in diploid and autotetraploid of Cassava. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 39(5): 833-839
- [26] 栾丽, 孔繁伦, 何涛, 刘刚, 涂升斌. 用 SSR 标记检测同源四倍体与二倍体水稻的遗传差异. 应用与环境生物学报, 2004, 10(5): 556-558
- Luan L, Kong F L, He T, Liu G, Tu S B. Genetic variation of tetraploid and diploid rice revealed by microsatellite marks. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2004, 10(5): 556-558
- [27] 廖道龙, 谢利, 曾瑞珍, 黎扬辉, 易懋升, 张志胜. 石斛属植物倍性与形态学性状的相关性研究. 西北植物学报, 2012, 32(10): 2023-2029
- Liao D L, Xie L, Zeng R Z, Li Y H, Yi M S, Zhang Z S. Relationship between chromosome ploidy and morphology characters in *Dendrobium*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, 32(10): 2023-2029
- [28] 朱艳, 徐增莱, 汪琼, 赵猛. 不同倍性盾叶薯蓣营养器官解剖结构比较. 亚热带植物科学, 2010, 39(1): 34-39
- Zhu Y, Xu Z L, Wang Q, Zhao M. Comparative anatomy of vegetative organs of *Dioscorea zingiberensis* in different ploidies. *Subtropical Plant Science*, 2010, 39(1): 34-39
- [29] 杨桂英, 王兵益, 何瀚, 杨时宇, 吴强达, 李娟娟. 从叶片解剖结构探讨云南山茶不同倍性的耐旱潜力. 西南农业学报, 2015, 28(6): 2714-2719
- Yang G Y, Wang B Y, He H, Yang S Y, Wu Q D, Li J J. Drought resistance potential of different ploidy of *Camellia reticulata* from leaf anatomic traits view. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 28(6): 2714-2719
- [30] 陈雪峰, 景晨娟, 赵习平, 武晓红. 植物叶片组织结构在抗逆研究中的应用进展. 河北农业科学, 2018, 22(3): 50-53
- Chen X F, Jing C J, Zhao X P, Wu X H. Advances in application of plant leaf tissue structure in the research of stress tolerance. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2015, 28(6): 2714-2719
- [31] 间令成, 孙德兰, 施国雄, 曾秋涛. 不同柑桔种类叶片组织的细胞结构与抗寒性的关系. 园艺学报, 1986, 13(8): 163-168
- Jian L C, Sun D L, Shi G X, Zeng Q T. Leaf tissue structure in the cell of different kinds of citrus and its relation to cold hardiness. *Acta Horticulturae Sinica*, 1986, 13(8): 163-168
- [32] 肖芳, 冯天杰, 吴娜. 野芙蓉叶片解剖结构与抗旱性关系的研究. 河北农业大学学报, 2006, 29(3): 33-35
- Xiao F, Feng T J, Wu N. The relation between leaf anatomical structure and drought resistance of *Abelmoschus manihot* (Linn.) Medicus. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2015, 28(6): 2714-2719
- [33] 马英姿, 梁文斌, 陈建华. 经济植物的抗寒性研究进展. 经济林研究, 2005, 23(4): 89-94
- Ma Y Z, Liang W B, Chen J H. Advances in researches on plant frost hardiness. *Non-wood Forest Research*, 2005, 23(4): 89-94
- [34] 李嘉诚, 罗达, 史彦江, 宋锋惠. 平欧杂种榛叶片解剖结构的抗旱性研究. 西北植物学报, 2019, 39(3): 462-471
- Li J C, Luo D, Shi Y J, Song F H. Study on drought resistance of leaf anatomical structure of *Corylus heterophylla* × *Corylus avellane*. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2019, 39(3): 462-471
- [35] 滕尧, 李安定, 郝自远, 张洪亮, 张丽敏, 蔡国俊. 西番莲解剖结构特征及低温胁迫下叶片结构与抗寒性的关系. 浙江农业学报, 2018, 30(11): 1849-1858
- Teng Y, Li D A, Hao Z Y, Zhang H L, Zhang L M, Cai G J. Anatomical structure of *Passiflora caerulea* L. and relationship between leaf structure and cold resistance under low temperature stress. *Acta Agriculturae Zhejiang*, 2018, 30(11): 1849-1858