

# SSR 分子标记在橡胶树栽培品种鉴定中的应用

安泽伟, 曾霞, 胡彦师, 方家林, 程汉, 位明明, 黄华孙

(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, 海口 571101)

**摘要:** 橡胶树是我国重要的热带经济作物, 主要通过形态特征进行品种鉴定, 但橡胶树品种间形态差异较小, 品种鉴定难度较大。为建立一种快速、稳定且准确的橡胶树品种鉴定方法, 本研究从 426 对橡胶树 SSR 引物中筛选出 5 对产物清晰且扩增稳定的引物组成核心引物对, 利用高通量基因分型技术构建了 129 份橡胶树品种的特异 DNA 指纹图谱, 5 对引物共扩增出 71 条带, 全部为多态性条带, 引物平均 PIC 值达到 0.69。基于 129 份品种的特异 DNA 指纹图谱, 建立了每份品种的特异 DNA 指纹二维码。研究成果的获得为橡胶树品种鉴定提供了一种准确、稳定、高效的鉴定方法, 也为橡胶树品种知识产权保护提供了可靠的技术支撑。

**关键词:** 橡胶树; DNA 指纹; 分子标记; 品种

## Identification of Rubber Tree Clones Based on Simple Sequences Repeats Molecular Markers

AN Ze-wei, ZENG Xia, HU Yan-shi, FANG Jia-lin, CHENG Han, WEI Ming-ming, HUANG Hua-sun

(State Centre for Rubber Breeding, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou 571101)

**Abstract:** Rubber tree is an important tropical economic crop. Rubber clones are mainly identified by morphological characters, which is difficult due to the minor morphological differences among them. In order to establish a stable, accurate, and efficient method for rubber clone identification, 5 (out of 426) pairs of SSR primers with clear and stable amplification profiles were selected as core primer sets. Based on these primer sets, high throughput genotyping of 129 rubber tree clones were performed. A total of 71 bands were detected, all of which were polymorphic. The average PIC of the primer pairs was 0.69. According to the polymorphic bands, specific DNA fingerprint of each clone was successfully constructed, and all of the specific DNA fingerprints were converted into quick response (QR) code. The results indicated that an effective method for rubber tree clone identification was constructed, which can provide sufficient technological supports for the protection of rubber tree clone intellectual property.

**Key words:** rubber tree; DNA fingerprint; molecular marker; clone

橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.) 起源于南美洲亚马逊河流域, 是典型的热带树种。英国人 Wickham 于 1876 年将 70000 粒橡胶树种子引种

至英国, 从而开启了橡胶树的驯化历程<sup>[1]</sup>。目前, 橡胶树已成为世界天然橡胶的主要来源, 在中国和东南亚地区得到广泛种植, 该地区已成为世界天然

收稿日期: 2020-06-22 修回日期: 2020-07-14 网络出版日期: 2020-08-19

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20200622001>

第一作者研究方向为橡胶树种质资源与分子育种, E-mail: azwcn@126.com

通信作者: 胡彦师, 研究方向为橡胶树种质资源创新利用, E-mail: mfcjason@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 (1630022020020, 1630022020026); 农业农村部作物种质资源保护项目 (2130135)

**Foundation project:** Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund for Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (630022020020, 1630022020026), Crop Germplasm Resources Conversation Project of Ministry of Agriculture and Rural Affairs (2130135)

橡胶的主产区。据天然橡胶生产国联盟(ANRPC, Association of Natural Rubber Producing Countries)统计,2018 年全球共生产天然橡胶 1396 万 t,其中约 90% 来自中国及东南亚产胶国。

现在国内外主要依据叶型、蜜腺、叶色、小叶柄、株形等形态特征对橡胶树品种进行鉴定,但由于橡胶树栽培种质起源于少数的几株野生种质,遗传基础狭窄,且经过 60 多年的近亲繁殖和选择育种,导致生产上使用的品种形态差异较小,并且橡胶树品种多数是全同胞或半同胞品种,用形态学鉴定方法很难进行准确区分。虽然经验丰富的操作人员可以提高形态学鉴定方法的准确率,但鉴定结果的准确性容易受操作人员主观因素的影响。我国在 2017 年颁布实施了《非主要农作物品种登记办法》,橡胶树被列入第一批非主要农作物登记目录,只要符合品种 DUS 基本条件,经试验确定品种特征特性和适宜推广范围,且不存在严重安全问题的橡胶树品种皆可登记。因此,发展一种准确高效的方法用于橡胶树品种鉴定,将有助于解决橡胶树品种鉴定难的问题,提高对橡胶树栽培品种的保护能力,同时也有助于促进我国橡胶树品种市场化的规范管理。

近年来随着分子生物学研究的不断深入,微卫星分子标记(SSR, simple sequence repeats)由于具有良好的重复性和稳定性,已广泛应用于植物遗传育种研究的各个领域。国际植物品种权保护联盟(UPOV, International Union for the Protection of New Varieties of Plants)将 SSR 标记和 SNP 标记确定为构建植物品种 DNA 指纹数据库的首选标记<sup>[2]</sup>。目前研究人员已在多种植物中开展了应用 SSR 标记鉴定品种的研究,如辣椒<sup>[3]</sup>、向日葵<sup>[4]</sup>、萝卜<sup>[5]</sup>、天麻<sup>[6]</sup>、黄麻<sup>[7]</sup>、莴苣<sup>[8]</sup>、马铃薯<sup>[9]</sup>、柑橘<sup>[9]</sup>、高粱<sup>[10]</sup>等。在橡胶树中,相关研究也有少量报道。Saha 等<sup>[11]</sup>用 4 对 SSR 引物将 27 份橡胶树栽培品种进行了逐一区分。谢黎黎等<sup>[12]</sup>用 5 对 SSR 引物在 87 份栽培品种中进行品种鉴定研究,成功获得 65 份品种的特异 DNA 指纹。本研究拟利用 SSR 分子标记高通量检测技术,构建我国国家橡胶树种质资源圃保存的橡胶树栽培品种的 DNA 指纹图谱,创建其数字身份证,旨在建立一种快速、准确且不受环境和发育时期影响的橡胶树品种鉴定方法,解决生产中品种鉴定难的问题,为橡胶树品种知识产权保护提供技术支撑,同时也为橡胶树选育种亲本选配提供一定的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验所用 129 份橡胶树栽培品种来自马来西亚、印度尼西亚、斯里兰卡、巴西和中国,均由中国热带农业科学院橡胶研究所国家橡胶树种质资源圃收集、保存(表 1)。

### 1.2 方法

**1.2.1 叶片 DNA 的提取与检测** 叶片总 DNA 的提取参照改良的 CTAB 法进行<sup>[13]</sup>。取 1  $\mu\text{L}$  DNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳,检测其质量,并利用 NanoDrop2000 紫外分光光度计检测 DNA 纯度。

**1.2.2 SSR-PCR 反应** 本研究所用 SSR 引物(表 2)均由国家橡胶树育种中心根据橡胶树基因组和转录组信息及已发表文献设计而来<sup>[11,14]</sup>。实验所用 SSR 引物合成与 5' 端荧光标记(HEX 或 6-FAM),由上海生工生物工程有限公司完成。

PCR 反应体系为 10  $\mu\text{L}$ ,其中包括:10  $\times$  Buffer 1  $\mu\text{L}$ , 25 mmol/L  $\text{Mg}^{2+}$  0.8  $\mu\text{L}$ , 10 mmol/L dNTPs 0.15  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{mol/L}$  上下游引物各 0.02  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  Taq 聚合酶 0.15  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 20 ng, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足 10  $\mu\text{L}$ 。Taq 聚合酶、dNTPs、 $\text{Mg}^{2+}$  等试剂均为上海生工生物工程有限公司产品。PCR 反应在 Mastercycler PCR 扩增仪(GERMANY)上进行,程序为:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共进行 35 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保温。

PCR 反应结束后,取 0.3  $\mu\text{L}$  反应产物、0.5  $\mu\text{L}$  分子量内标和 9.5  $\mu\text{L}$  去离子甲酰胺,混匀后加入 PCR 板,95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  冷却,于 ABI-3730XL 基因分析仪上进行产物检测。检测结果使用 GeneMarker V2.20 读取分析。

**1.2.3 指纹图谱数字身份证构建** 根据电泳结果,按照条带分子量从小到大的顺序,依次记录每对引物扩增出的条带,有条带记为“1”,无条带记为“0”,然后对条带进行赋值,将 SSR 图谱转换成数字指纹图谱,最后利用二维码生成软件将数字指纹图谱转换成二维码,形成种质的数字身份证。

**1.2.4 种质遗传多样性分析** 利用 PowerMaker 3.25 软件统计基因型数、等位基因数和等位基因频率,计算引物多态信息含量(PIC, polymorphism information content),129 份材料间的遗传距离<sup>[15]</sup>。用 MEGA X 软件中 Neighbor-joining 法进行聚类分析,并生成聚类图。

表1 供试材料名称及其来源

Table 1 Information of plant materials used in the study

编号 Number	品种 Clone	来源 Source	编号 Number	品种 Clone	来源 Source	编号 Number	品种 Clone	来源 Source
1	RRIM600	马来西亚	44	大丰 78-184	中国	87	红星 72-5	中国
2	GT1	印度尼西亚	45	大丰 318	中国	88	保亭 32-33-10	中国
3	RRIM703	马来西亚	46	大丰 117	中国	89	RRIM503	马来西亚
4	PR107	印度尼西亚	47	大丰 78-50	中国	90	云研 911	中国
5	IAN873	巴西	48	大丰 99	中国	91	大岭 989	中国
6	RRIC100	斯里兰卡	49	大岭 17-155	中国	92	海垦 3	中国
7	PB260	马来西亚	50	大岭 64-36-101	中国	93	保亭 3414	中国
8	RRIC36	斯里兰卡	51	合口 3-11	中国	94	大岭 64-36-100	中国
9	BPM24	印度尼西亚	52	红星 1	中国	95	大岭 17-48	中国
10	RRIM712	马来西亚	53	广西 6-68	中国	96	文昌 24-29	中国
11	热垦 509	马来西亚	54	南华 1	中国	97	化州 40-14	中国
12	热垦 523	马来西亚	55	南强 1-97	中国	98	针选 2号	中国
13	热垦 525	马来西亚	56	南俸 70	中国	99	PB255	马来西亚
14	热垦 628	马来西亚	57	南俸 37	中国	100	RRIC89	斯里兰卡
15	热研 93-59	中国	58	热研 6-47	中国	101	化州 38-6	中国
16	热研 7-33-97	中国	59	热研 6-62	中国	102	热垦 178	马来西亚
17	热研 7-20-59	中国	60	热研 4-19	中国	103	热垦 179	马来西亚
18	热研 2-14-39	中国	61	热研 4-51	中国	104	热垦 501	马来西亚
19	热研 78-3-5	中国	62	保亭 3406	中国	105	热垦 502	马来西亚
20	热研 8-79	中国	63	保亭 3412	中国	106	热垦 514	马来西亚
21	热研 8-333	中国	64	热研 78-11-66	中国	107	热垦 515	马来西亚
22	热研 88-13	中国	65	热研 4	中国	108	热垦 516	马来西亚
23	热研 7-18-55	中国	66	热研 217	中国	109	热垦 524	马来西亚
24	海垦 6	中国	67	热研 6-231	中国	110	大岭 21-65	中国
25	海垦 2	中国	68	PB86	马来西亚	111	RRIM725	马来西亚
26	海垦 1	中国	69	PB235	马来西亚	112	热垦 191	马来西亚
27	云研 77-2	中国	70	文昌 238	中国	113	RA	马来西亚
28	云研 77-4	中国	71	文昌 162	中国	114	热垦 194	马来西亚
29	云研 277-5	中国	72	文昌 215	中国	115	热研 87-4-26	中国
30	云研 68-273	中国	73	大岭 68-38	中国	116	RRIM623	马来西亚
31	文昌 217	中国	74	大岭 21-38	中国	117	热垦 161	马来西亚
32	文昌 7-35-11	中国	75	热研 6-18	中国	118	热研 99-2	中国
33	文昌 11	中国	76	天任 31-45	中国	119	PB 28/59	马来西亚
34	文昌 33-24	中国	77	RRIM71	马来西亚	120	热垦 192	马来西亚
35	文昌 193	中国	78	RRIC52	斯里兰卡	121	热垦 165	马来西亚
36	针选 1号	中国	79	RRIM501	马来西亚	122	热垦 167	马来西亚
37	保亭 155	中国	80	RRIM612	马来西亚	123	热研 2-73	中国
38	保亭 933	中国	81	PB5/63	马来西亚	124	热垦 187	马来西亚
39	保亭 235	中国	82	PB5/51	马来西亚	125	热垦 171	马来西亚
40	保亭 3410	中国	83	RRIM803	马来西亚	126	热垦 181	马来西亚
41	保亭 911	中国	84	Tjir 1	印度尼西亚	127	RRIM 717	马来西亚
42	大丰 78-25	中国	85	AV1734	印度尼西亚	128	93-114	中国
43	大丰 95	中国	86	闽林 71-22	中国	129	徐育 141	中国

表 2 SSR 引物信息

Table 2 Information of SSR primers used in this study

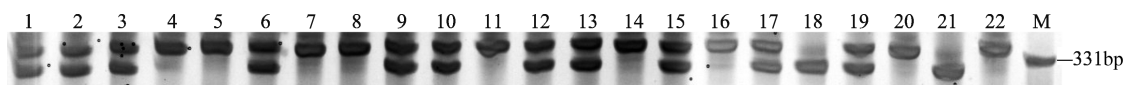
引物 Primer	登记号 GenBank No.	引物序列 (5' - 3') Forward primer	引物序列 (5' - 3') Reverse primer	退火温度 (°C) Annealing temperature
HGSR24	AF221702	atctgcataatagtgtgaaccaca	agctctcatcatagtgaagtctgg	55
HGSR36	AY486908	catctccaccacctaca	aggagagcaataaccaac	51
HGSR50	AY486894	atcaagcaaagaaacctc	gtaagtgtctcaacctctgt	58
HGSR55	AY486889	tatggctatgttctgctatgc	ggactcttgatgattttgggt	58
HGSR73	AY135657	tcggttggtttaccatgaca	acatcacatgagtgtatctgatctc	58

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 核心引物筛选

本研究共筛选了由基因组 SSR 引物和 EST-SSR 引物组成的 426 对 SSR 引物, 筛选过程分 2 步完成。首先, 随机选取 5 个待测样品对所有引物进行粗筛, 利用银染法进行检测, 筛选出 117 对多态

性丰富的引物。然后, 利用 117 对多态性引物对随机选取的 22 个待测样品进行 SSR 分析, 扩增产物用银染法进行检测 (图 1), 根据扩增结果确定由 HGSR24、HGSR36、HGSR50、HGSR55、HGSR73 等 5 对扩增稳定且具有丰富多态性的引物作为核心引物, 用于构建橡胶树栽培品种指纹图谱。入选核心引物的 5 对引物均为基因组 SSR 引物。



1-22: 为 22 个随机选取的样品; M: pUC19 DNA/MspI (HpaII) DNA Marker

1-22: 22 random samples, M: pUC19 DNA/MspI (HpaII) DNA Marker

图 1 引物 HGSR50 扩增结果

Fig.1 The amplification profile of primer HGSR50

### 2.2 核心引物检测能力分析

利用 5 对核心引物对所有样品进行 SSR 分析, 结合高通量毛细管电泳进行基因分型, 结果表明, 5 对引物共扩增出 71 条片段, 全部为多态性条带, 平均每对引物可扩增出 14 条多态性条带, 引物平均 PIC 值为 0.69, 其中引物 HGSR55 能检测到 20

个等位基因, 是检测能力最强的引物, PIC 值达到 0.81。利用单个引物 HGSR36、HGSR50、HGSR55、HGSR24 可构建 48 份材料的特异 DNA 指纹图谱, 将这些材料从 129 份材料中逐一进行鉴别 (表 3), 其余材料通过不同的引物组合也可逐一进行区分 (表 4), 最终将全部材料完全区分开。

表 3 用单一引物对进行鉴定的橡胶树品种

Table 3 Rubber tree clones identified by single SSR primer pair

引物 Primer	橡胶树品种 Rubber tree clones
HGSR24	热研 7-20-59、热研 4-19、云研 911、文昌 11、针选 1 号、大岭 21-65、热垦 178、热垦 191、热垦 167、热垦 171、PB260、RRIM803、RRIM503
HGSR36	热研 78-3-5、热研 6-47、针选 1 号、针选 2 号、保亭 235、大岭 17-155、化州 38-6、热垦 628、热垦 191、热垦 171、RRIC52、RRIM612、RRIM717
HGSR50	化州 40-14、RRIM600、RRIM703
HGSR55	热研 78-11-66、海垦 1、云研 277-5、保亭 235、保亭 3410、大丰 95、大丰 78-50、针选 2 号、热垦 514、RA、PB28/59、PB260、PB5/63、AV1734、RRIM703、RRIM71、RRIC100、RRIC52

表 4 用引物组合进行鉴定的橡胶树品种

Table 4 Rubber tree clones identified by multi-SSR primer pairs

引物 Primers	橡胶树品种 Rubber tree clones
HGSR36 + HGSR24	PR107、RRIC36、RRIC89、RRIM623、RRIM712、RRIM725、PB5/51、PB255、PB235、热垦 509、热垦 525、热垦 501、热垦 502、热垦 515、热垦 524、热垦 194、热垦 161、热垦 192、热垦 187、热垦 181、热研 6-18、热研 87-4-26、热研 6-62、热研 4-51、热研 217、热研 6-231、热研 7-33-97、热研 2-14-39、热研 88-13、热研 7-18-55、海垦 6、海垦 2、云研 77-2、云研 77-4、文昌 7-35-11、文昌 33-24、文昌 238、文昌 215、文昌 24-29、大丰 78-25、大丰 78-184、大丰 117、大岭 64-36-100、大岭 17-48、大岭 68-38、大岭 21-38、天任 31-45、保亭 155、保亭 32-33-10、徐育 141、93-114

表 4(续)

引物 Primers	橡胶树品种 Rubber tree clones
HGSR36 + HGSR24 + HGSR55	GT1、BPM24、RRIM501、Tjir1、热研 93-59、热研 8-79、热研 8-333、热研 99-2、云研 68-273、文昌 217、文昌 162、保亭 3406、保亭 3412、保亭 933、保亭 3414、保亭 911、大丰 318、大丰 99、大岭 64-36-101、大岭 989、合口 3-11、红星 1、广西 6-68、南华 1、南俸 70、南俸 37、PB86、闽林 71-22、海垦 3、热垦 179、热垦 165
HGSR36 + HGSR24 + HGSR55 + HGSR50	热垦 523、文昌 193、红星 72-5、IAN873
HGSR36 + HGSR24 + HGSR55 + HGSR50 + HGSR73	南强 1-97、热研 4、热垦 516、热研 2-73

2.3 橡胶树品种遗传多样性分析

数据分析结果表明, 129 份材料的亲缘关系较近, 材料间的遗传距离分布在 0.050~0.900, 平均遗传距离只有 0.3685, 其中品种合口 3-11 与 RRIM612 之间的遗传距离最大, 达到 0.900, 有 7 对

品种的遗传距离达到群体的最小值 0.050。聚类分析结果表明, 129 份不同来源地的材料混杂在一起, 所有材料按亲本组成依次聚为 3 大类(图 2), 类群 I 由 20 个品种组成, 类群 II 由 37 个品种组成, 类群 III 包括品种数最多, 由 72 个品种组成。

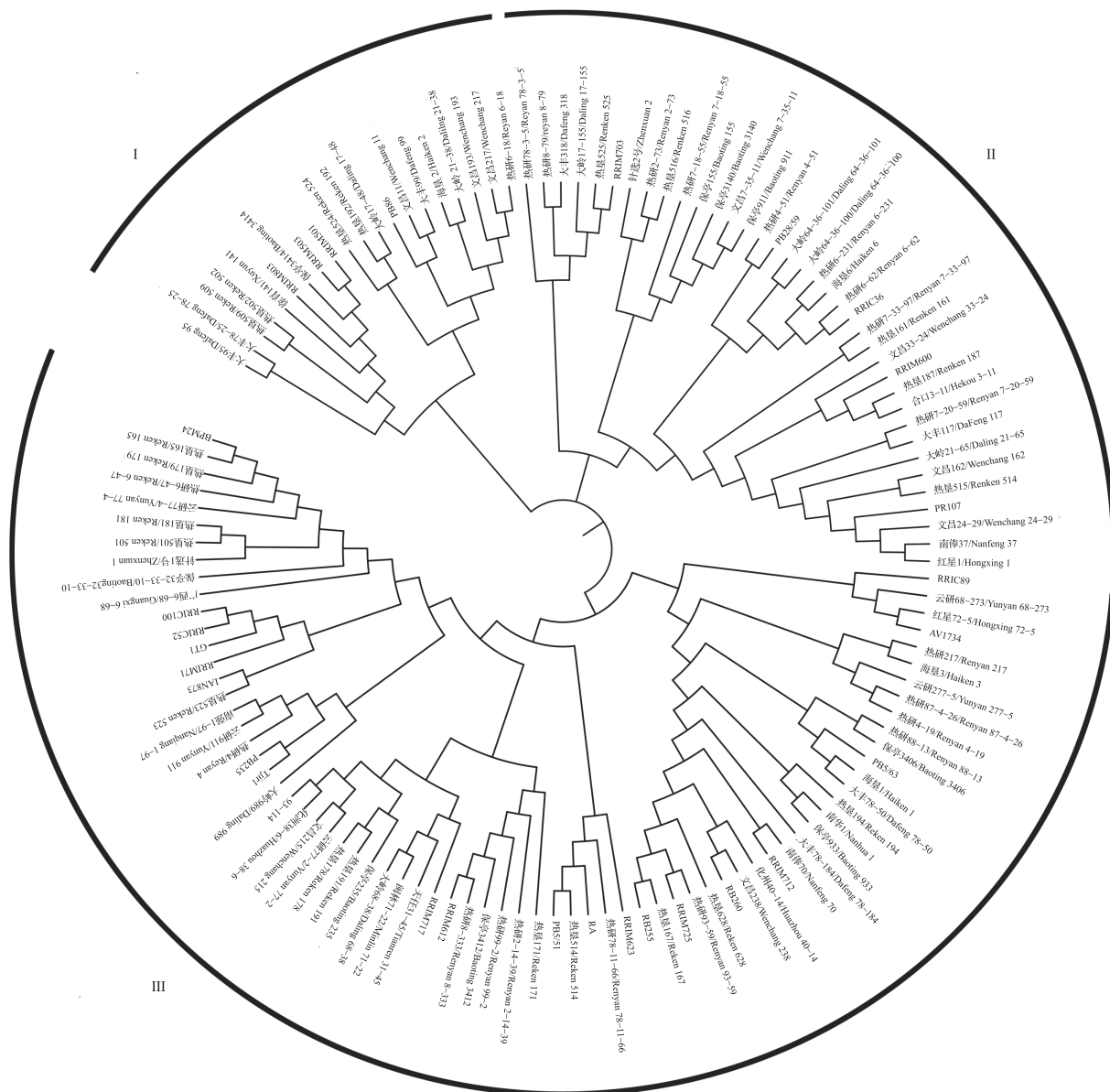


图 2 129 份橡胶树栽培品种聚类分析  
Fig.2 Cluster analysis of 129 rubber tree clones

## 2.4 橡胶树品种 SSR 数字指纹图谱

根据 5 对 SSR 引物在 129 份橡胶树栽培品种中的扩增结果,对每个扩增片段进行赋值,从而将每对引物在材料中的扩增结果转换成 4 位数的阿拉伯数字编码,最终每份材料就具有 1 个由 20 位数字组

成的唯一编码,这一编码可作为种质的数字身份证,在橡胶树品种鉴定中进行应用。同时,为了使用方便,将 20 位的数字编码转换成可供扫描的二维码(表 5),通过扫描二维码可获得每份材料指纹图谱的详细信息。

表 5 橡胶树栽培品种 DNA 数字指纹信息

Table 5 Details of numerical DNA fingerprints of rubber tree clones





























编号 No.	品种 Clone	数字指纹 Numerical fingerprint	二维码 QR code	编号 No.	品种 Clone	数字指纹 Numerical fingerprint	二维码 QR code
1	RRIM600	05150818090903060808		15	热研 93-59	10151818091102050909	
2	GT1	05111218071402050808		16	热研 7-33-97	13140811121405060808	
3	RRIM703	10151017070701060808		17	热研 7-20-59	05100815111502060809	
4	PR107	10131518071406060808		18	热研 2-14-39	05100811071202020808	
5	IAN873	05151818071405060508		19	热研 78-3-5	01040818071401050808	
6	RRIC100	05101221141402060808		20	热研 8-79	08100815070905060808	
7	PB260	05051420071605050909		21	热研 8-333	05110818071402020808	
8	RRIC36	05131115121205060808		22	热研 88-13	05081618070905050813	
9	BPM24	15151218121202050808		23	热研 7-18-55	05130203091505060808	
10	RRIM712	05050818121402050913		24	海垦 6	05101515091405060808	
11	热垦 509	10111218070705050808		25	海垦 2	13141118091205050808	
12	热垦 523	05151818071402050808		26	海垦 1	05151014071505051013	
13	热垦 525	10151218070702060808		27	云研 77-2	10101118091502060808	
14	热垦 628	02041818070905050509		28	云研 77-4	05101818121202050808	

表 5(续)





































编号 No.	品种 Clone	数字指纹 Numerical fingerprint	二维码 QR code	编号 No.	品种 Clone	数字指纹 Numerical fingerprint	二维码 QR code
29	云研 277-5	10141123071502050813		47	大丰 78-50	05101423070705050808	
30	云研 68-273	10131215070902050808		48	大丰 99	13151823071505050808	
31	文昌 217	10151115091205050808		49	大岭 17-155	06101823070705060808	
32	文昌 7-35-11	05131518121405050808		50	大岭 64-36-101	10131523070905060813	
33	文昌 11	13151518050705050808		51	合口 3-11	10150808090906060913	
34	文昌 33-24	13150811091102060808		52	红星 1	10100815070906060808	
35	文昌 193	10151518091201050808		53	广西 6-68	05151218071202050808	
36	针选 1号	05181818020402050808		54	南华 1	10151121090905050910	
37	保亭 155	05131118070900000808		55	南强 1-97	05150818071202050816	
38	保亭 933	05151118070902050910		56	南俸 70	05081518091205050913	
39	保亭 235	05141018091202060708		57	南俸 37	05101515070706060808	
40	保亭 3410	05131418071405060808		58	热研 6-47	06151818101202050808	
41	保亭 911	05130818071405050808		59	热研 6-62	05081515101205060813	
42	大丰 78-25	05101121071405050808		60	热研 4-19	08101118091002050813	
43	大丰 95	05101214060805050808		61	热研 4-51	08151115091505060813	
44	大丰 78-184	05101218070905060914		62	保亭 3406	05081518070705050813	
45	大丰 318	05100815070705060808		63	保亭 3412	05080818070702020808	
46	大丰 117	10100808071402060814		64	热研 78-11-66	11150105071502050608	

表 5(续)


































































编号 No.	品种 Clone	数字指纹 Numerical fingerprint	二维码 QR code	编号 No.	品种 Clone	数字指纹 Numerical fingerprint	二维码 QR code
65	热研 4	05150818071202050608		83	RRIM803	10151212151502050808	
66	热研 217	10150811071202050814		84	Tjir 1	15150815071202050808	
67	热研 6-231	05101518121402060808		85	AV1734	10100915070902020808	
68	PB86	05151518071205050808		86	闽林 71-22	10150818091102021313	
69	PB235	05150815091202050808		87	红星 72-5	08101315070902040816	
70	文昌 238	05050815070702050916		88	保 32-33-10	13151118111202050808	
71	文昌 162	13151121071506060816		89	RRIM503	10101212071102050813	
72	文昌 215	05101118090905060815		90	云研 911	15150818071002050816	
73	大岭 68-38	15150818091402050813		91	大岭 989	05150818070902050808	
74	大岭 21-38	10140811071205050808		92	海垦 3	05101113070702050508	
75	热研 6-18	10151118121405050808		93	保亭 3414	10151212070902050813	
76	天任 31-45	11151218111202020816		94	大岭 64-36-100	10131523121405060813	
77	RRIM71	05050718091402050808		95	大岭 17-48	05151521090905050808	
78	RRIC52	05161217121402060808		96	文昌 24-29	10131115071206060808	
79	RRIM501	10101212070902050813		97	化州 40-14	05150818070901010909	
80	RRIM612	11111818070702020808		98	针选 2 号	13161117091402050808	
81	PB5/63	10152023070905050813		99	PB255	05111818070902050909	
82	PB5/51	05151821070702050808		100	RRIC89	10141518071402050810	



表 5(续)

编号 No.	品种 Clone	数字指纹 Numerical fingerprint	二维码 QR code	编号 No.	品种 Clone	数字指纹 Numerical fingerprint	二维码 QR code
101	化州 38-6	10181821070902060813		116	RRIM623	10150820091502050808	
102	热垦 178	05100821091302040707		117	热垦 161	13150815121402060808	
103	热垦 179	15151818071202050808		118	热研 99-2	05080818091202020808	
104	热垦 501	05151818111202050808		119	PB 28/59	08151016000005060208	
105	热垦 502	10111218070905050808		120	热垦 192	11151521091402050808	
106	热垦 514	05152121070902060808		121	热垦 165	15151818121202050808	
107	热垦 515	13150811070706060808		122	热垦 167	05111818061402050909	
108	热垦 516	13181113070902050810		123	热研 2-73	13181113070902050808	
109	热垦 524	05151218091105050808		124	热垦 187	15150820091206060808	
110	大岭 21-65	05100811121506060808		125	热垦 171	05100818061102050808	
111	RRIM725	11151821111405050909		126	热垦 181	05171818111402020808	
112	热垦 191	09151618010902050107		127	RRIM 717	08110818091102050814	
113	RA	05152122071502050308		128	93-114	10110818091202060813	
114	热垦 194	13151118071502050913		129	徐育 141	11151212070902050808	
115	热研 87-4-26	08101118060802051314					

### 3 讨论

#### 3.1 橡胶树品种的遗传多样性

目前,橡胶树是商品化天然橡胶的主要来源,中国和东南亚地区已成为世界天然橡胶的主产区。然而,橡胶树起源于南美亚马逊河流域,并不是主产区的本土物种。1876 年英国人 Wickham 从南美将橡胶树种子引种至英国,然后将 1000 多株橡胶树幼苗又引种到斯里兰卡,从此开启了橡胶树在东南亚的种植历史<sup>[1]</sup>。我国在 20 世纪 50 年代通过引种东南亚的 RRIM600、PR107、GT1 等少数几个橡胶树优良品种,大规模发展橡胶树产业。世界橡胶树种植业的发展史表明,现有橡胶树品种的遗传基础狭窄,品种的遗传多样性有待提高。本研究结果很好地证明了这一点。来自不同国家的 129 个橡胶树品种间的平均遗传距离只有 0.3685,中国品种保亨 3414 和马来西亚品种 RRIM501 的遗传距离仅为 0.050。所有品种并没有按来源地区进行聚类,而是按亲本组成进行了分组,类群 I 中包括的品种较少,亲本之一主要是 PB86、PB5/51;类群 II 包括 37 个品种,大多数品种是 PR107 的后代;类群 III 由 72 个品种组成,其亲本之一主要是 RRIM600。印尼品种 PR107 和马来西亚品种 RRIM600 是世界植胶业发展早期选育出的优良品种,在各植胶国得到了广泛推广种植,也成为了早期杂交育种的主要亲本。在今后的橡胶树品种选育工作中,应该引进更多的优异野生种质做杂交亲本,从而增强品种的遗传多样性,拓宽其遗传基础。

#### 3.2 橡胶树品种 DNA 指纹图谱构建

橡胶树品种遗传基础狭窄,大多数品种在形态上差异不大,品种的田间鉴定需要技术人员具有丰富的实践经验。此外,生产上通过无性繁殖方式进行橡胶树品种繁育,使用单位常常自行嫁接繁殖,而不需要通过种苗公司购买品种苗木,种苗缺乏统一管理,导致生产上品种来源混乱,质量参差不齐,同时橡胶树品种的知识产权也难以保护。品种 DNA 指纹具有特异性,差异由遗传组成决定,通过 DNA 指纹可准确鉴定品种的真伪,能为新品种登记和知识产权保护提供可靠的依据。国务院办公厅在《关于加强农业种质资源保护与利用的意见》(国办发[2019]56 号)中也明确提出要开展 DNA 指纹图谱库的构建。由于 SSR 分子标记不受环境条件的影响,品种间变异丰富,且检测技术可操作性强,易于实现标准化。国际植物品种权保护联盟将 SSR 标

记确定为构建植物品种 DNA 指纹数据库的首选标记之一<sup>[2]</sup>。SSR 标记已在多种作物 DNA 指纹图谱构建中得到应用<sup>[3-12]</sup>。谢黎黎等<sup>[12]</sup>用 5 对 SSR 引物构建的指纹图谱仅能区分开 65 个橡胶树品种,而本研究利用高通量检测技术进行 SSR 分型,使 SSR 标记的灵敏度得到了进一步提高,仅用 5 对引物就构建了 129 个橡胶树品种的特异指纹图谱,品种的鉴别率达到了 100%。但我们也应该认识到,品种 DNA 指纹图谱库构建是一项动态且长期性基础工作,随着新品种的不断出现,指纹图谱库收录的品种指纹也需要不断更新,这样才能实现橡胶树品种的准确鉴定。将 DNA 指纹图谱转化成数字指纹图谱会更有利于品种指纹图谱的规范化管理和共享利用,更好地为橡胶树品种的推广和知识产权保护提供客观、科学的技术支撑。

#### 参考文献

- [1] Priyadarshan P M. Refinements to *Hevea* rubber breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 2017, 13(1): 20
- [2] International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Guidelines for DNA-profiling: molecular markers selection and database construction. Geneva: Office of the Union, 2010, 1-13
- [3] 管俊娇,余志慧,杨晓洪,王江民,张鹏,黄清梅,张建华. SSR 标记在辣椒 DUS 测试中的应用研究. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(2): 396-405  
Guan J J, Yu Z H, Yang X H, Wang J M, Zhang P, Huang Q M, Zhang J H. Study on the application of SSR markers in pepper (*Capsicum annuum* L.) DUS testing. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(2): 396-405
- [4] 冯飞,汪磊,傅春玲,谭美莲,汪魏,严兴初,王力军. 基于 SSR 标记的向日葵 DNA 指纹图谱构建. *中国油料作物学报*, 2018, 40(4): 508-515  
Feng F, Wang L, Fu C L, Tan M L, Wang W, Yan X C, Wang L J. Establishment of DNA fingerprint for sunflower by SSR markers. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2018, 40(4): 508-515
- [5] 邱杨,李锡香,李清霞,陈亦辰,沈镡,王海平,宋江萍. 利用 SSR 标记构建萝卜种质资源分子身份证. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(3): 648-654  
Qiu Y, Li X X, Li Q X, Chen Y C, Shen D, Wang H P, Song J P. Establishment of the molecular identification for radish germplasm using SSR markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2014, 15(3): 648-654
- [6] 周天华,丁家玺,徐皓,陈琛. 天麻种质资源的 SSR 指纹图谱研究. *西北植物学报*, 2018, 38(5): 830-838  
Zhou T H, Ding J X, Xu H, Chen C. SSR fingerprinting on *Gastrodia elata* Bl. germplasms. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, 38(5): 830-838
- [7] Zhang L W, Cai R R, Yuan M H, Tao A F, Xu J T, Lin L H, Fang P P, Qi J M. Genetic diversity and DNA fingerprinting in jute (*Corchorus* spp.) based on SSR markers. *The Crop*

- Journal, 2015, 3 ( 5 ): 416-422
- [ 8 ] Rauscher G, Simko I. Development of genomic SSR markers for fingerprinting lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars and mapping genes. BMC Plant Biology, 2013, 13: 11
- [ 9 ] Lopez-Vizcón C, Ortega F. Detection of mislabelling in the fresh potato retail market employing microsatellite markers. Food Control, 2012, 26 ( 2 ): 575-579
- [ 10 ] 王瑞, 张福耀, 程庆军, 田承华, 凌亮. 利用 SSR 荧光标记构建 20 个高粱品种指纹图谱. 作物学报, 2015, 41 ( 4 ): 658-665
- Wang R, Zhang F Y, Cheng Q J, Tian C H, Ling L. Establishment of 20 sorghum hybrids fingerprints using SSR fluorescent marker. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41 ( 4 ): 658-665
- [ 11 ] Saha T, Bindu R C, Nazeer M A. Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of *Hevea brasiliensis*. Plant Breeding, 2005, 124 ( 1 ): 86-92
- [ 12 ] 谢黎黎, 黄华孙, 安泽伟, 程汉, 胡彦师, 曾霞. 基于 SSR 标记的橡胶树无性系鉴定方法的建立. 热带作物学报, 2009, 30 ( 9 ): 1314-1319
- Xie L L, Huang H S, An Z W, Cheng H, Hu Y S, Zeng X. Identification of *Hevea brasiliensis* clones based on SSR markers. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30 ( 9 ): 1314-1319
- [ 13 ] An Z W, Wang Q T, Hu Y S, Zhao Y H, Li Y C, Cheng H, Huang H S. Co-extraction of high-quality RNA and DNA from rubber tree (*Hevea brasiliensis*). African Journal of Biotechnology, 2012, 11 ( 39 ): 9308-9314
- [ 14 ] 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 ( Beijing ), 2009, 31 ( 3 ): 311-319
- [ 15 ] Nei M. Genetic distance between populations. The American Naturalist, 1972, 106 ( 949 ): 283-292