

## 巴西橡胶树 DUS 测试指南研制初探

高新生<sup>1</sup>, 李维国<sup>1</sup>, 黄华孙<sup>1</sup>, 陈艳丽<sup>2</sup><sup>1</sup>中国热带农业科学院橡胶研究所, 儋州 571737; <sup>2</sup>海南大学园艺园林学院, 儋州 571737)

**摘要:**为加强橡胶树新品种保护工作,在国际新品种保护联盟(UPOV)对DUS测试的基本要求和品种的生物特性学的基础上,制定巴西橡胶树DUS测试指南,阐述了其研制过程,品种测试的特殊性,性状的筛选原则和发展方向等。建议橡胶树DUS测试标准不宜定太高,测试性状要能体现中国育种水平和方向,并遵循UPOV原则。并认为分子标记技术与表型测试技术相结合将逐步成为橡胶树DUS测试的主要手段。

**关键词:**巴西橡胶树;品种性状;DUS测试

**中图分类号:**Q59 **文献标识码:**A

**Study on Establishment of DUS Testing Guidelines for *Hevea Brasiliensis***Gao Xinsheng<sup>1</sup>, Li Weiguo<sup>1</sup>, Huang Huasun<sup>1</sup>, Chen Yanli<sup>2</sup><sup>1</sup>Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Danzhou 571737;<sup>2</sup>Horticulture and Landscape College, Hainan University, Danzhou 571737)

**Abstract:** DUS testing guidelines of *Hevea Brasiliensis* were established which based on basic requirements of International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) and biological characters for enhancing the protection of new variety. The formulation process, testing particularities, rules of character selection and the development direction of DUS testing were introduced in this paper. It was suggested that the criterions of DUS testing should not be so high, and the testing characters should demonstrate Chinese breeding level and direction by following the UPOV principles. It was believed that techniques combined molecular markers and morphology testing will become the primary means of DUS testing on rubber.

**Key words:** *Hevea brasiliensis*, variety character selection, DUS testing

天然橡胶是重要的工业原料和战略物资,在国民经济中起着重要作用。橡胶树的选育种是一项规模大、周期长、投资多的系统工程,为了保护育种者的合法权益和应对加WTO后国际间日益频繁的合作交流,亟待加强橡胶树的新品种保护工作。2008年5月4日,巴西橡胶树被农业部正式列入第七批农业植物新品种保护名录。而制定相应的DUS测试指南是对植物新品种进行保护的基础。

DUS测试是指对申请保护的植物新品种进行特异性(Distinctness)、一致性(Uniformity)和稳定性(Stability)测试的过程,是对新品种授权的客观、公正、准确及其有效性检测的重要技术,也是品种权审批的关

键环节和获得品种权的实质条件。而国家制定的规范的DUS测试技术和测试标准即为DUS测试指南,测试指南应当具有简明、实用和可操作性强的特点<sup>[1,2]</sup>。

中国热带农业科学院橡胶研究所于2006年初承担了橡胶树测试指南的研制任务,编制完成了《巴西橡胶树DUS测试指南》行业标准,并通过专家审定,该研究主要对DUS测试中的相关技术问题进行了探讨。

**1 橡胶树DUS测试指南研制思路与指导原则**

为与国际接轨,测试指南编写多采取自主研发与借鉴吸收结合,由于目前国际无公开发布的橡胶树DUS测试指南,因此操作中笔者着力于自主创新,从橡胶树生物学特性和中国行业发展具体特点出发,参

基金项目:农业部948项目“植物新品种DUS测试技术与标准的引进”(2004-Z30)。

第一作者简介:高新生,男,1980年出生,硕士,主要从事巴西橡胶树遗传育种工作。通信地址:571737 海南省儋州市中国热带农业科学院橡胶研究所, Tel:0898-23300464, E-mail:hagaogs@163.com。

收稿日期:2008-06-04, 修回日期:2008-07-04。

考经济林类作物测试指南的特点,以资料分析与科学试验结合、田间试验与室内分析相结合的方法编写。

在编制原则上以农业部制定的“《DUS 测试指南》编写要求”为指导,并遵循 UPOV(国际新品种保护联盟)对 DUS 测试规定的总的原则(TG/1/3)及配套规定的 DUS 测试指南编制的系列文件(TGP 系列文件)<sup>[3,4]</sup>。具体工作流程为:收集 DUS 测试相关方面,构建测试框架,设计试验方案,制定测试性状表,筛选标准品种,进行田间试验与实验室测定,分析结果,设计技术问卷,编写、完善测试指南。

## 2 巴西橡胶树测试指南的部分核心问题

### 2.1 巴西橡胶树 DUS 测试的特殊性

巴西橡胶树是一种原产于巴西热带雨林的常绿乔木,生物学周期很长,从初始定植到胶园更新的时间在 35 年以上,其特殊的物种特性、起源背景和在中国的发展历史决定了其特异性、一致性和稳定性测试体系将有别于绝大部分短周期作物。其特殊性体现在以下几方面。

2.1.1 标准品种(对照品种)的筛选范围狭窄 中国从 1904 年开始橡胶树的引种植,品种选育也是 50 年代以后才开始,育种历史很短,选育出的品种较少,2003 年中国海南、广东和云南垦区推荐种植大、中规模推级别的品种总共才 38 个<sup>[5]</sup>,在中国实际推广面积较大的更少。

2.1.2 测试中独特性的判定较为困难 林木育种多使用当地常用种源作对照,中国属传统非适宜植胶区,植胶条件复杂。海南等三大橡胶主垦区的气候类型、生态环境差异很大,所使用的当家品种各不相同;即使同一垦区,由于区域环境存在地形、朝向、土质等的差别,品种上遵循“对口推荐,适地适种”,因此造成多品种混杂并存使得独特性判定难度较大。

2.1.3 标准品种的确定很困难,特异性标准不能定的太高 林木育种多以遗传改良为主,橡胶树也不例外。当前橡胶树的主栽品种几乎全是 Wickham 种质的后代,亲缘关系近,基因型狭窄,在遗传学并无根本改变,而理论上基因型的差异决定性状上的差别程度,造成了橡胶树种间的植物学、农艺学性状甚至生理学特性上差别都较小,也决定了测试中要适当多用不受环境和发育阶段影响的,遗传稳定的染色体、分子标记等性状<sup>[6,7]</sup>。

2.1.4 测试中稳定性标准不宜太高 橡胶树的繁殖材料主要有芽接无性系,优良组合的有性系等。对于芽接繁殖的无性系,芽片的质量存在年龄效应和位置差异,顶部老态和基部幼态芽片其遗传效应上有差别;其次橡

胶树品种本身与砧木、环境有很强的互作关系,同一品种由于砧木和立地环境不同,表现差异很大。例如热研 88-13、PR107 的旺产期胶树在海南垦区平均株产为 5~8kg,但在云南垦区存在株产 120~130kg 的超高产单株,受砧木和环境影响差异巨大。而对于有性系,采种园生产的种子受气候波动、区域环境等因素的影响较大,也会造成种子遗传和活力上的差异。

基于橡胶树测试的上述特点,在实际操作中笔者把特异性检测作为重点,并与一致性和稳定性有机结合起来。

### 2.2 巴西橡胶树 DUS 测试指南的主要内容

巴西橡胶树新品种 DUS 测试指南共包括四部分,其中第一部分为总体技术要求;其中包括测试应用范围、所需材料、测试方法、DUS 判定标准及田间分组实验组织等。第二部分为性状表,包括橡胶树从抽芽到落叶生育期内的 78 个测试性状及性状的描述、对应的标准品种、分级代码和观测时期。第三部分为性状解释,明确了性状的观测期、观测部位、观测方法、观测量、分级标准和图片收集方法等;第四部分为标准型附录部分,包括橡胶树新品种测试技术问卷、测试记载内容和报告格式等。

### 2.3 巴西橡胶树测试指南测试性状及标准品种选择

在 DUS 测试指南中,测试性状的选择是其核心内容。从性状认可程度区分,分为强制性、辅助性和参考性 3 类,后二者的性状在测试过程中可随认可程度升高逐步升级。强制性的性状主要指测试体系中居于主导地位的性质,主要包括统一的形态学特征或农艺、品质和抗逆性状。从功能上区分,又可分必测性状和补充性状,其中必测性状是用于国际间规范品种描述且重要的测试性状,补充性状则是在当使用必测性状无法判别测试品种的特异性时进行后续增补测试的性状<sup>[8,9]</sup>。在性状选择上,要遵循以下原则:能被准确定义,准确识别和清晰的被描述;便于操作,费用低,可靠性与重复性强;表现稳定,不受或受环境影响小;多选易于定性分析的质量性状,如外观形态,减少或尽量避免难于权衡的数量性状,尽量少与产量和经济性状相联系;能体现育种的选育水平和发展方向。根据上述思路和 UPOV 测试指南总则的要求,共筛选出巴西橡胶树各个生育期的 70 个测试性状。从类型上看,性状中包括质量性状 38 个,例如叶痕性状、芽眼形态、腺点排列方式等;数量性状 15 个,例如小叶柄长度、主侧脉角度、干胶含量等;假质量性状 5 个,例如种子形状、叶片颜色、叶蓬形状等;特殊性状(主要为抗逆性状、品质性状)12 个,例如机械稳定度、挥发性脂肪酸、铜含量、抗

白粉病性等。从功能上看,性状中包括必测性状有 29 个,选择性性状 41 个。选用了叶蓬形状、叶形、蜜腺形态、抗白粉病性、种子大小、第一蓬叶抽叶期 6 个性状作为分组性状(详见表 1)。

表 1 巴西橡胶树的测试性状

	外观形态性状		农业生物学性状	生理生化性状	抗性性状
叶痕形状	小叶枕膨大长度	主侧脉角度	第一蓬叶抽叶期	机械稳定度	抗寒性
托叶痕着生角度	蜜腺形态	三小叶间距	第一蓬叶稳定期	挥发脂肪酸	风害累计断倒率
鳞片痕和托叶痕联成的形状	腺点着生状态	种子大小	开始落叶期	铜含量	抗旱性
芽眼形态	腺点排列方式	种子形状	完全落叶期	锰含量	抗白粉病
芽眼与叶痕距离	腺点周边	种脊	死皮率	热稳定性	抗炭疽病
叶蓬形状	腺点面形态	种背条沟	胶乳长流	游离钙镁含量	
大叶柄形状	叶形	种背维管束痕	爆皮流胶	塑性初值	
大叶柄长度	叶基形状	种背底色	胶乳颜色		
叶枕伸展形态	两侧小叶基外缘形态	种背斑纹	种子千粒重		
叶枕沟	叶端形状	种子发芽孔着生状态	干胶含量		
叶枕膨大	叶缘波浪	种子发芽孔形态			
叶枕弯曲	叶片横切面形状	种脐形态			
小叶柄形态	叶面平滑状况	种脐痕形态			
小叶柄长度	叶面光泽	种腹侧胸			
小叶柄沟	叶片翻转状况	种腹后凹			
小叶柄先端沟	叶片质地				
小叶枕膨大	叶片颜色				

在标准品种选择上,以试种级以上品种为主,首选应用面积较大、推广级别较高品种。例如小叶柄着生角度性状分为半直立、水平、半下垂 3 种,其标准品种分别对应为 RRIM600、GT1 和 PB235, 前 2 个品种为广泛应用的大规模推广级品种, 而后者为从马来西亚引至国家橡胶树种质圃保存的小规模推广级品种。

### 3 巴西橡胶树 DUS 测试的发展方向

目前 DUS 测试指南中性状构成还是以生物学性状等为主,这些性状虽然测试简单、实用,但有其明显的缺陷:如某些性状的准确表达需要适宜的条件,如光照、生态类型区、种植规格等;测试所需时间久,要经过 2~3 年的重复观察;受季节限制,也易受自然灾害、病虫害等因素的影响;测试性状多,费工费时费力;测试性状多数为多基因控制的数量性状,表现为连续变异,性状分级不明显;中国植胶区生态类型复杂,要找到一套适应所有生态区的标准品种很困难,且标准品种与测试品种生育期的不同可能使性状无法比较,因而对于属遗传改良、基因资源狭窄的橡胶树和将来可能出现的仅有单个基因差异的转基因植株,表观特征鉴定已愈发不能满足要求,所以寻求快捷、简便、准确的测试方法就成为必然。

综合来看,新的 DUS 测试体系应包括两部分,基于植物学形态特征测试的主导技术和对基因型测试的

辅助技术。DNA 分子检测技术作为植物新品种 DUS 快速测试的核心技术,一直被各国所重视。分子标记应用于 DUS 测试的优越性是显而易见的,如多态性高,较少的标记就可满足鉴定的需要;测试周期短,不受季节的限制,任何时候都可进行测试,可大大缩短从申请到授权的时间测试,且分子指纹图谱完全相同的概率仅为 1/2,准确性毋庸置疑;不受环境的影响,可确保试验的顺利进行和确保试验结果的准确性;可选择的标记数量多,完全可以适应品种数量不断增多的要求等。目前全世界已经发展了 60 多种分别以 Southern 杂交、PCR 和基因组序列为基础的各类分子标记技术,并已经在水稻、玉米、大豆、小麦和油菜等作物进行了 DUS 测试的应用研究<sup>[10-15]</sup>,有学者提出同工酶电泳和 SSR (simple sequence repeat) 标记技术是植物新品种特异性鉴定的最好方法<sup>[16-18]</sup>。

目前,DNA 分子标记技术距离在新品种测试体系中发挥作用尚需做好以下工作:

(1)对 DNA 指纹技术进行标准化,建立一套完善的、标准化的技术体系,制定公认的行业标准,真正做到简单、快速、准确、可靠。从技术层面看,DNA 指纹技术实验操作程序需进行进一步的优化,以降低检测成本。需要重点解决的问题有:DNA 提取方法的改进,PCR 扩增程序和反应体系的进一步优化和扩增产物



检测方法的改进。

(2)做好应用前期基础研究工作。首先要根据不同生态环境类型区,选定核心的品种群体,构建完成分子标记的基础群体;其次要选定多态性好的分子标记方法,并进行体系的优化,确定一套DNA指纹检测标准操作体系,确定相对固定的测试所需的核心引物以及每个引物的等位梯度分子量标准;再则对基础群体进行分子标记分析,构建品种的遗传连锁图,形成基础品种的DNA指纹图库,并对新品种DNA指纹图谱标准图库不断增添完善。

巴西橡胶树当前主要开展了以SSR (simple sequence repeat)、AFLP (amplified fragment length polymorphism)等标记方法指纹图谱构建工作,分子标记检测体系已基本完成,正在进一步优化。随着分子标记等技术的逐步成熟,橡胶树将有望形成以生物形态特征与基因型分析有机结合的新DUS测试体系,将为植物新品种审查测试和保护工作奠定坚实的基础。

#### 参考文献

- [1] 农业部科技发展中心. GB/T.19557.1-2004.植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南总则.北京:中国标准出版社,2004:5.
- [2] 马世青.植物新品种保护基础知识.北京:蓝天出版社,1999:55-58.
- [3] International Union for the Protection of New Plant Varieties (UPOV). General introduction to the examination of distinctness, uniformity and stability and the development of harmonized descriptions of new varieties of plant. TG/1/3. Geneva, Switzerland, UPOV, 1979:52.
- [4] International Union for the Protection of New Plant Varieties (UPOV). Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability. Cucumis sativus L. TG/61/6. Geneva, Switzerland :UPOV, 1993:25.
- [5] 黄华孙.橡胶树种质资源描述规范和数据标准.北京:中国农业出版社,2006:32-35.
- [6] 郑成木.植物分子标记原理与方法.长沙:湖南科学技术出版社,2003:56-57.
- [7] 姜金仲,黄发吉,等.林木植物新品种DUS测试指南编写方案的探讨.世界林业研究,2006,19(6):70-74.
- [8] 李晓辉,李新海,张世煌.植物新品种保护与DUS测试技术.中国农业科学,2003,36(11):1419-1422.
- [9] 王风格,赵久然,邢锦丰,等.关于玉米品种DUS测试的几点思考.玉米科学,2005,13(03):126-129.
- [10] 陈海荣,王加红,等.辣椒的新品种保护和DUS测试.辣椒杂志,2006,26(4):15-19.
- [11] 魏兴华,朱智伟,余汉勇.水稻新品种DUS测试技术.中国稻米,2004,(4):15-16.
- [12] 解艳华.大豆DUS测试标准品种测试性状表达差异性分析.大豆科学,2007,26(2):284-286.
- [13] 张瑞英.玉米DUS测试概述.玉米科学,2005,13(3):130-132.
- [14] 辛业芸,张展,熊易平,等.应用SSR分子标记鉴定超级杂交水稻组合及其纯度.中国水稻科学,2005,(02):44-47.
- [15] 张建华,张金渝,杨晓洪,等.用SSR标记建立玉米黄早四DNA标准指纹图谱的方法研究.西南农业学报,2006,19(3):345-350.
- [16] 王彦荣,崔野韩,南志标,等.植物新品种DUS测试指南中的性状选择与标样品种确定.草业科学,2002,19(2):44-47.
- [17] 杨晓洪,张建华,张金渝,等.玉米DUS测试技术体系构建的研究.西南农业学报,2006,19(5):765-771.
- [18] Chen X, Temnykh S, Xu Y, et al. Development of a microsatellite framework map providing genome wide coverage in rice (Oryza sativa L.) [J]. Theory Appl Genet, 1997, 95: 553-567.