

差异显示技术在橡胶树分子生物学研究中的应用

吴华玲^{1,2,*}, 于波^{1,*}, 段翠芳¹, 曾日中^{1,**}

¹中国热带农业科学院橡胶研究所, 农业部橡胶树生物学重点开放实验室, 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, 海南儋州 571737; ²广东省农业科学院茶叶研究所, 广州 510640

The Applications of Differential Display Techniques in the Molecular Biology Research of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

WU Hua-Ling^{1,2,*}, YU Bo^{1,*}, DUAN Cui-Fang¹, ZENG Ri-Zhong^{1,**}

¹Key Laboratory of Rubber Biology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory Breeding Base of Cultivation & Physiology of Tropical Crops, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China;

²Tea Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China

摘要: 差异显示技术是从分子水平研究细胞、组织、器官中基因结构和表达变异的手段之一, 在巴西橡胶树研究中也已有应用。本文从DNA、RNA和蛋白质水平上介绍了近年来差异显示技术在橡胶树分子生物学研究中的进展, 并对其前景作了展望。

关键词: 差异显示; 巴西橡胶树; 基因; 分子标记; 差异表达

天然橡胶(*cis*-1,4-polyisoprene)作为一种不可替代的工业原料和战略物资, 在世界经济和社会发展中一直占据十分重要的地位。巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)因产量高、品质好和易采收等优点而成为天然橡胶的主要商业来源。因此, 从橡胶的经济意义来说, 橡胶树的分子生物学研究十分重要, 现已成为许多国家的研究热点。

差异显示技术是研究细胞和组织器官中基因结构和表达变异的一种有效的分子生物学手段, 目前已成功应用于橡胶树分子标记、特异条件下(包括伤害、病害、死皮和激素刺激等)差异表达谱分析和目的基因的克隆等研究。本文从DNA、RNA和蛋白质三个水平上介绍近年来橡胶树分子生物学研究领域中涉及的差异显示技术的原理和优缺点, 并简要介绍这一技术在橡胶树分子生物学研究的进展。

1 基于DNA水平的差异显示技术

以DNA为基础的差异显示技术包括RFLP、SSR、ISSR、RAPD和AFLP等分子标记技术。目前这些技术在橡胶树遗传多样性分析、品种鉴定、遗传图谱构建、QTL定位及辅助育种中得到广泛的应用。

1.1 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术 RFLP技术是特定的核酸内切酶切割DNA分子所产生的DNA片段

在长度上的多态性。该技术不受性别、年龄、组织、发育阶段或外界环境变化的影响, 但对样品纯度要求高, 样品用量大, 多态性水平过分依赖于限制性内切酶的种类和数量, 加之步骤繁琐、工作量大、成本较高, 所以其应用受到了一定的限制, 在橡胶树研究中的应用也多限于90年代。1993年, Besse等(1993b)对橡胶树73个魏克汉种质和95个野生种质的核糖体DNA的RFLP分析结果表明, 虽然魏克汉种质表现的多样性比野生种质的低, 但也具有较高的多样性。采用31个探针与内切酶的组合分析92个野生种质和72个魏克汉种质的结果显示, 所产生的124个多态性RFLP标记可以将所选的野生种质分成与地理位置相对应的3个类群(Besse等1994)。Luo等(1995)也以RFLP检测345个来自巴西、哥伦比亚和秘鲁的橡胶树野生种质和50个栽培品种线粒体DNA的遗传差异性, 结果表明栽培种间的多态性低, 而野生型间的遗传变异很大, 且大部分具有相同RFLP多态性的野生种的地理来源也相同。Low等(1996)应用RFLP标记

收稿 2009-05-20 修定 2009-06-19

资助 国家科技计划前期(973前期)研究专项(2007CB116203)和橡胶所基本业务费项目(XJSYWFZX-2009-13)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: wuhualing@163.com; Tel: 0898-23300776)。

将PR255与PR261、RRIM901与RRIM905等全同胞品种区分开,并用这些标记和其它一些标记构建了橡胶树遗传图谱。

1.2 扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术 AFLP是对基因组DNA经限制性内切酶酶切后产生长度不等的限制性片段的扩增。此技术得到的带型稳定,灵敏度高,重复性好,分辨率高;但是和RFLP一样,由于涉及同位素的使用,对样品DNA质量要求严格,操作过程复杂,费用又高,所以在橡胶树中应用的报道不多。罗安定等(2001)曾采用2对引物组合对25种分别具有高产/低产、抗白粉病/感白粉病、抗寒/不抗寒以及死皮/不死皮性状的橡胶树无性系进行了AFLP指纹图谱分析,共扩增出518条谱带,多态性比率超过98.6%。遗传多样性分析表明,橡胶树种质间遗传距离为0.25~0.81,RRIM600种质内遗传距离为0.07~0.17,同时通过基因分型分析获得一条320 bp与抗白粉病连锁的AFLP标记。

1.3 随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术 RAPD技术是用一系列单个随机引物(通常为10个核苷酸),对存在于基因组DNA的众多反向重复序列进行PCR扩增,以检测引物结合位点的改变和DNA碱基的缺失、插入或置换导致扩增片段在数目和长度上的多态性。这一技术操作简单,需要样品量少,成本又低,设计引物不需知道序列信息,能覆盖整个基因组,因此具有广泛的适用性和通用性。目前,用RAPD技术对橡胶树进行遗传多样性分析、品种鉴定和辅助育种已有许多报道。陈守才等(1994)采用52条RAPD引物对橡胶树11个抗白粉病品系和11个感病品系基因组进行分析,发现了一个与抗白粉病表型密切连锁的RAPD标记OPV-390,并对这一标记片段进行了克隆和测序分析。Venkatachalam等(2004)在一个 F_1 群体中获得了一个长1.4 kb的与矮生相关的RAPD标记。这些标记的获得表明RAPD技术是分离功能基因的有效途径,为橡胶树分子育种奠定了基础。在橡胶树种质资源研究中,安泽伟等(2004)应用RAPD技术对8份野生种质和12份栽培种质进行遗传多样性分析,他们将20份材料分别聚为野生种质和栽培种质两大类;Hernández等(2006)以RAPD分析25份橡胶树(其中6份来自南美,17份来自亚洲,2份来自中美)的结果显示,尽

管这些橡胶树之间的同源性很高,但仍能显著分离成两大类,其中来自南美的6份材料都聚在同一亚族中。这些发现为橡胶育种的亲本选择,尤其野生种质优良特性导入栽培种质提供了基础。

1.4 简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)技术 SSR即微卫星(microsatellite)标记,它广泛分布于真核生物基因组中,一般是由2~6 bp重复单元串连而成的简单重复序列,基本单元重复次数的不同形成SSR多态性。此技术易检测,重复性较好,多态性丰富,省时,适合于自动化分析。微卫星DNA在橡胶树基因组中也广泛存在,目前,通过构建文库的方式分离了大量橡胶树基因组SSR(Roy等2004)。Besse等(1993a)曾用人源微卫星探针对73个魏克汉种质进行了SSR研究,所选的73个种质已逐个得到区分,而且同一品种内不同植株的DNA指纹相同。Saha等(2005)用4个SSR引物可将27个无性系区分开。Lekawipat等(2003)分析108个橡胶树无性系的SSR标记后,认为野生种质的遗传多样性要高于栽培种质。

除了上述来源于基因组的SSR (genomic SSR, gSSR)以外,基于表达区域表达序列标签开发的EST-SSR (expressed sequence tag SSR)是另一种新型微卫星分子标记,它不但具有基因组SSR标记的特点,而且信息量高,可转移,费用低廉。随着橡胶树中大规模EST测序项目的开展,数据库中数量迅速增加的EST已经成为开发橡胶树EST-SSR分子标记的重要资源。华玉伟等(2008)从GenBank中11 809条橡胶树胶乳和树皮组织EST检索到358个EST-SSR,并采用根据这些EST-SSR设计的60对特异引物对43份包括巴西橡胶树魏克汉种质、1981'野生种质以及光亮橡胶、色宝橡胶和少花橡胶3个种材料进行了扩增,筛选到40对具有多态性的EST-SSR引物,而且这些引物在光亮橡胶、色宝橡胶和少花橡胶3个种中均能获得多态性扩增。随后,Feng等(2009)和安泽伟等(2009)也通过橡胶树中的大量EST序列拼接和检索,分别获得799个和430个EST-SSR位点,并根据这些EST-SSR设计特异引物扩增进行了遗传多样性检测,这对促进橡胶树近缘种优良基因的挖掘和利用无疑是有意义的,同时将有有助于拓宽橡胶树栽培种质的遗传基础。

1.5 简单重复序列区间扩增(inter-simple sequence repeat, ISSR)技术 ISSR是在SSR基础上发展起

来的,它揭示真核生物基因组内广泛存在的简单重复序列间的遗传多样性。由于其引物设计比SSR简单,多态性高,稳定性强,现已在多种动植物的种质鉴定、遗传作图、基因定位和遗传多样性等研究中得到应用。橡胶树的ISSR技术起步比较晚,目前应用还不多,刊发的报道中只有An等(2005)曾用12条ISSR引物对14份野生橡胶树种质和我国的37份栽培品种进行了遗传多样性分析,共产生101条带,多态性占87.1%,聚类分析将野生种质和栽培品种两大类明显分开,说明ISSR技术可以成为橡胶树品种鉴定和遗传多样性研究中的有效手段。

2 基于RNA水平的差异显示技术

基于RNA水平的差异显示技术主要应用于特定性状和功能相关基因的克隆和表达调控研究,目前应用于橡胶树上的主要有mRNA差异显示、抑制差减杂交、cDNA-AFLP、Northern杂交、反向Northern杂交、半定量RT-PCR和Real-time PCR等。前3种技术反映的是同一组织细胞在不同状态下的基因表达谱信息,可以进一步揭示植物某一性状和功能形成的分子机制,因此也正成为当前研究橡胶树差异表达基因的重要手段。而Northern杂交、反向Northern杂交、半定量RT-PCR和Real-time PCR等一般针对鉴定和验证特异基因的表达变化,在本文中不作详细介绍。

2.1 mRNA差异显示(mRNA differential display, DDRT-PCR)技术 mRNA差异显示技术的核心是利用高等生物的mRNA 3'末端都有一段多聚腺苷酸(polyA)尾的特性,设计3'端的锚定引物oligo(dT)_n MN, M为A、C、G中的任意一种, N为A、C、G、T中的任意一种。锚定引物最后2个碱基的12种不同组合可以将所有cDNA分成12个亚群。用3'端锚定引物和5'端10个碱基组成的随机引物对cDNA进行PCR扩增,凝胶电泳后即可分析差异表达的基因。该方法操作简单、快捷, RNA用量少,重复性好,从而迅速成为分析橡胶树基因差异表达的有效工具。

在橡胶树死皮相关基因的克隆研究中,Chen等(2003)采用这一技术从橡胶树无性系RRIM600胶乳中克隆到1个Myb家族转录因子*HbMyb1*,其表达量在健康树中高于死皮树,抗死皮种质中高于死皮敏感种质,树皮中高于叶中,远离死皮树割线的

树皮中高于割线附近树皮,因此认为此基因是死皮抗性相关基因。最近,Venkatachalam等(2009)也采用这一技术筛选出10个健康橡胶树和死皮树的差异表达cDNA片段,并采用半定量RT-PCR和Northern杂交技术对其中一个位于线粒体膜上的转位酶*HbTOM20*基因进行了进一步的表达分析,结果证明死皮树中的*HbTOM20*显著下调,因此推测该基因可能和死皮病的发生有关。

除此之外,mRNA差异显示技术也用于区分来自巴西橡胶树同一基因型的不同愈伤组织的胚胎发生和再生潜力。Charbit等(2004)对5个具有不同胚胎发生与再生能力的愈伤组织中差异表达基因的分析结果表明,在胚性再生型愈伤组织系诱导期间共鉴定出28个差异表达的cDNA,其中有5个可用于区分诱导之前具有不同胚胎发生潜力的愈伤组织系,可以预测橡胶树松散型愈伤组织的胚胎发生潜力。

2.2 抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术 SSH是一种高效鉴定和分离差异表达基因的技术,它运用了杂交二级动力学和链内退火优先于链间的原理,使非目的片段两端反向重复序列退火时产生发卡结构,不能与引物配对,从而选择性地抑制非目的片段扩增,并使原丰度有差别的单链cDNA相对含量基本一致。该方法假阳性率低,灵敏度高,并能有效地检测到低丰度基因的表达差异,目前在橡胶树基因表达差异分析中有着广泛的应用。

茉莉酸和乙烯均促进橡胶树胶乳的合成,是橡胶树的信号分子。为探讨其对胶乳代谢和橡胶生物合成的影响及其作用的分子机制,有人用SSH方法检测了橡胶胶乳中分别响应这2种激素的基因。曾日中等(2003)构建了外源茉莉酸刺激橡胶树胶乳的消减文库,对随机挑选的25个阳性克隆分析的结果表明,其中有一个是与胶乳合成代谢直接相关的甲羟戊酸磷酸激酶基因。刘宽灿等(2007)用SSH技术发现乙烯可强烈诱导胶乳中泛素延伸蛋白(ubiquitin extension protein)基因的表达,由于F-box蛋白EBF1/EBF2可以通过泛素/26S蛋白酶体降解途径作用于介导乙烯信号转导的关键分子EIN3,促使其迅速降解,从而调控乙烯信号的转导过程。据此,有人推测泛素延伸蛋白有可能是通过调节胶乳中泛素/26S蛋白酶体的降解和EIN3蛋白的含量而

调控乙烯信号的转导, 从而增加橡胶树胶乳产量。

SSH 技术也是检测和筛选橡胶树死皮相关基因的有效手段, Venkatachalam等(2007)用这一技术对健康树和死皮树胶乳差异基因作了比较全面的分析。他们从构建的健康树和死皮树胶乳的正反2个差减文库中获得352个阳性差异表达克隆, 共组成134个非冗余基因cDNA序列, 这些基因的功能涉及胁迫反应、蛋白合成和降解、细胞骨架、细胞分裂和生长、转录调控以及橡胶的合成代谢, 其中 *Myb* 和 *TCTP* 是2个与死皮病相关的基因, 将来有可能用其作为鉴定橡胶死皮病的分子标记。

2.3 cDNA 扩增片段长度多态性(cDNA-amplified fragment length polymorphism, cDNA-AFLP)技术 cDNA-AFLP 是在 AFLP 技术基础上结合 RT-PCR 发展而来的技术, 其基本原理是用识别序列分别为 6 bp 和 4 bp 的 2 种限制性内切酶消化双链 cDNA, 酶切片段与人工接头连接后, 采用与接头序列互补的引物进行预扩增和选择性扩增, 可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳显示其多态性。此法具有重复性好和假阳性低的特点, 能检测低丰度表达的 mRNA, 可对生物体转录组进行全面而系统的分析。

cDNA-AFLP 技术在橡胶树中的应用也多集中于胶乳, 尤其是高产橡胶树胶乳的特异表达基因的筛选和鉴定, 探讨胶乳合成和高产的机制等方面的研究(Ko 等 2003; Xiao 等 2009)。Ko 等(2003)用 cDNA-AFLP 技术得到 20 000 多个胶乳特异表达 cDNA 片段, 认为胶乳中基因的表达模式非常独特, 有 7 个基因家族的 EST 数量占到胶乳所有转录子的 51% 以上, 其中和胶乳合成密切相关的橡胶延伸因子(rubber elongation factor, REF)和小橡胶粒子蛋白(small rubber particle protein, SRPP)的 EST 数目最多, 共占 29%, 其次是与抗逆防卫相关的基因, 这从分子水平上印证了前人关于胶乳是橡胶树的一种抗逆保护物的观点。

3 基于蛋白质水平的差异显示技术

基于蛋白质水平的差异显示可直接从基因产物水平上研究生物的遗传变异, 从而在一定程度上反映出生物体遗传的多样性和不同刺激条件下基因的选择性表达。这一技术在橡胶树中的应用比较广泛, 主要有同工酶技术和蛋白质双向电泳技术。

3.1 同工酶(isozymes)技术 同工酶是指作用于底物相似或完全相同的酶的不同分子形式, 即催化同

一种反应而结构不同的一族酶。同工酶酶谱作为基因编码的表现形式, 其变化可很好的代表 DNA 分子水平上的变化, 其结构的相似性可反映生物间的亲缘关系。作为有效的生化试验手段, 同工酶技术早成为一种重要的分子遗传标记技术。迄今为止, 已研究了几百种同工酶, 在橡胶树中研究较多的有酯酶同工酶、过氧化物酶(peroxides, POD)同工酶和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)同工酶。

孔德睿等(1987)通过巴西橡胶树酯酶酶谱的分析发现, C-乳清中的酯酶同工酶带数比叶中丰富, 活性亦较强, 且不同无性系的酶谱差异比较显著, 特别是其中的 C 区带, 可能和胶乳产量有一定的相关性, 可作为分析鉴定无性系的标志区带; 酯酶同工酶酶谱中 C_a 区有明显差别的杂交亲本, 如果同时具有 C_o 带则可能有较好的配合力。Yeang 和 Chevallier (1999)用橡胶树酯酶同工酶的谱带分析, 表明橡胶树的花粉在自然条件下可传播 0.3~1.1 km。这些发现对橡胶树杂交育种中亲本的选配和种植距离的制定有很好的参考价值。

POD 是创伤反应的标志酶, 其生成是创伤抗病的原因子, 而 SOD 是细胞的保护酶, 具有清除活性氧并防止氧自由基侵袭橡胶中黄色体膜的能力, 因此常应用于橡胶树伤害和病害的抗逆性研究。许闻献和校现周(1988)比较正常树与死皮树中 POD 同工酶和 SOD 同工酶酶谱的结果显示, 死皮病树的 SOD 活性比健康树皮低, 而其 POD 同工酶活性比正常树高很多, 而且 POD 酶活性的诱导与死皮的诱发基本上是同步发生和发展的, 距离病灶愈近, 酶活性愈高, 因此认为 POD 有可能成为割胶强度、刺激强度和死皮发生的“标志酶”。史学群等(2002)研究 7 个对橡胶树炭疽病抗感不同的橡胶品系在大古铜至淡绿期接种强毒力菌株 S3 的结果表明, 所有橡胶品系叶片接种炭疽菌后, POD 活性均提高, 但抗病性强的品系比中感和高感品系更早达到酶活性高峰, 其峰值也明显高于中感和高感品系, 并且强抗病性品系有新的酶带产生; 而所有橡胶品系接种前后的酯酶同工酶酶带数量和活性变化差异不大, 说明酯酶同工酶与橡胶树抗炭疽病的能力无关。

此外, 通过离子交换和亲和色谱技术从橡胶树中还分离出 2 个与热稳定性相关的 α -1,3-葡聚糖酶

同工酶 GI 和 GII, 其中的 GII 可能在橡胶树应答真菌感染过程中起作用(Churngchow 等 1995)。

3.2 蛋白质双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)技术 2-DE 是将蛋白质等电点(PI)和分子量两种特性结合起来进行蛋白质分离的技术, 其原理是第一向基于 PI 的不同, 用等电聚焦(isoelectrofocusing, IEF)分离, 第二向则基于亚基分子量的不同, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离。与传统的单向电泳方法相比, 2-DE 电泳具有高通量、高分辨率和高灵敏度的优势, 近年来已成为研究比较蛋白质组学和获得差异表达蛋白的核心方法。

参与橡胶生物合成的橡胶转移酶、橡胶延长因子等酶类和相关蛋白质调控因子均定位于胶乳中, 因此橡胶树胶乳的比较蛋白质组学一直是研究的热点。段翠芳等(2006)利用 2-DE 技术成功分离了橡胶粒子膜蛋白, 这一体系的建立为全面研究橡胶粒子膜蛋白的组成及其变化奠定了基础, 进一步的比较蛋白质组学的研究发现, 橡胶粒子膜上存在乙烯和茉莉酸信号响应蛋白, 推测乙烯和茉莉酸对橡胶生物合成的调控作用可能与这些蛋白有关(段翠芳等 2006)。此外, 有报道指出 14.5、24.0、27.0、32.0、34.0 和 49.0 kDa 等蛋白条带的含量在不同直径大小的橡胶粒子有明显变化, 说明这些蛋白可能与橡胶粒子直径大小或发育有关(吴坤鑫等 2008)。用 2-DE 技术比较橡胶树死皮株与健康株胶乳 C-乳清和黄色体的蛋白质组表达差异的结果显示, C-乳清中 REF 和 SRPP 均在死皮树胶乳中大量积累(闫洁和陈守才 2008; 闫洁等 2008)。这与 Sookmark 等(2002)以单向电泳得到的结果一致, 而黄色体中渗透蛋白在死皮株中的下调表达可能与死皮树胶乳黄色体膜出现破裂现象及死皮病的发生有一定的关系。

4 结束语

差异显示技术在橡胶树分子生物学领域的应用已经给人们提供了一个崭新的视角, 但是与许多其他植物相比, 这一技术在橡胶树中的应用开展较晚, 差距还较大。随着橡胶树大规模基因组和 EST 测序工作的开展和推进, GenBank 数据库中迅速增加的橡胶树基因和 EST 信息为在橡胶树中开发新的差异显示技术奠定了良好的基础。在橡胶树分子标记方面, 应大力开展 SCAR、SRAP 等多种新

技术研究, 为重要质量性状和数量性状的基因定位、目的基因的克隆、基因功能的阐明以及分子标记辅助育种等工作提供了丰富的分子标记。在橡胶树基因表达谱分析方面, 可通过 GenBank 中对现有的大量 EST 序列信息进行筛选, 设计其特异探针制作橡胶树 cDNA 芯片, 利用芯片杂交高通量、快捷、准确地获得反映差异表达基因的动态变化。随着技术的发展和研究的深入, 差异显示技术将会在橡胶树分子生物学研究中发挥越来越重要的作用。

参考文献

- 安泽伟, 黄华孙, 姚庆收, 方家林(2004). 橡胶树种质资源遗传多样性研究. I. 速生种质遗传多样性 RAPD 分析. 植物遗传资源学报, 5 (2): 128~132
- 安泽伟, 赵彦宏, 程汉, 李维国, 黄华孙(2009). 橡胶树 EST-SSR 标记的开发与应用. 遗传, 31 (3): 311~319
- 陈守才, 邵寒霜, 胡东琼, 林盛, 郑学勤(1994). 用 RAPD 技术鉴定橡胶树抗白粉病基因连锁标记. 热带作物学报, 15 (2): 21~26
- 段翠芳, 聂智毅, 曾日中(2006). 橡胶粒子膜蛋白双向电泳体系的建立和质谱初步分析. 热带作物学报, 27 (3): 22~29
- 华玉伟, 卢轶, 龙青娥, 曾霞, 胡彦师, 黄华孙(2008). 橡胶树 EST-SSRs 发掘研究. 热带作物学报, 29 (5): 583~588
- 孔德赛, 黄俊生, 潘志强(1987). 巴西橡胶树酯酶等同工酶酶谱初步研究. 热带作物学报, 8 (2): 43~51
- 刘宽灿, 杨云, 赵丽红, 张治礼(2007). 乙烯利诱导橡胶树胶乳 cDNA 消减文库的构建. 热带作物学报, 28 (3): 1~4
- 罗安定, 陈守才, 吴坤鑫, 符少萍(2001). AFLP 在橡胶树优异种质研究中的应用. 植物学报, 43 (9): 941~947
- 史学群, 宋海超, 郑服从(2002). 过氧化物酶、过氧化物同工酶、酯酶同工酶与橡胶树抗炭疽病的关系. 海南大学学报(自然科学版), 20 (2): 140~144
- 吴坤鑫, 王震, 姚茂平, 陈雄庭, 陈守才(2008). 橡胶树不同品系橡胶粒子蛋白的比较研究. 安徽农业科学, 36 (36): 15785~15787, 15803
- 许闻献, 校现周(1988). 橡胶死皮树过氧化物酶同工酶和超氧化物歧化酶同工酶的研究. 热带作物学报, 9 (1): 31~36
- 闫洁, 陈守才(2008). 橡胶树死皮病黄色体蛋白质组差异分析与初步鉴定. 湖北农业科学, 47 (8): 858~862
- 闫洁, 陈守才, 夏志辉(2008). 橡胶树死皮病胶乳 C-乳清差异表达蛋白的筛选与鉴定. 中国生物工程杂志, 28 (6): 28~36
- 曾日中, 段翠芳, 黎瑜, 郝秉中(2003). 茉莉酸刺激的橡胶树胶乳 cDNA 消减文库的构建及其序列分析. 热带作物学报, 24 (3): 1~6
- An Z, Sun A, Cheng H, Huang H, Fang J (2005). Genetic diversity among wild and cultivated accessions of *Hevea brasiliensis* (rubber tree) detected by RAPDs and ISSRs. J Trop Subtrop Bot, 13 (3): 246~252
- Besse P, Lebrun P, Seguin M, Lanaud C (1993a). DNA fingerprints in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) using human minisatellite probes. Heredity, 70: 237~244

- Besse P, Seguin M, Lebrun P, Lanaud C (1993b). Ribosomal DNA variations in wild and cultivated rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Genome*, 36 (6): 1049~1057
- Besse P, Seguin M, Lebrun P, Chevallier MH, Nicolas D, Lanaud C (1994). Genetic diversity among wild and cultivated populations of *Hevea brasiliensis* assessed by nuclear RFLP analysis. *Theor Appl Genet*, 88 (2): 199~207
- Charbit E, Legavre T, Lardet L, Bourgeois E, Ferriere N, Carron MP (2004). Identification of differentially expressed cDNA sequences and histological characteristics of *Hevea brasiliensis* calli in relation to their embryogenic and regenerative capacities. *Plant Cell Rep*, 22 (8): 539~548
- Chen S, Peng S, Huang G, Wu K, Fu X, Chen Z (2003). Association of decreased expression of a Myb transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol*, 51 (1): 51~58
- Churngchow N, Suntaro A, Wittsuwannakul R (1995). β -1, 3-glucanase isozymes from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, 39 (3): 505~509
- Feng SP, Li WG, Huang HS, Wang JY, Wu YT (2009). Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Mol Breeding*, 23: 85~97
- Hemández R. CA, Kafuri LA, Isaza RA, Arias ML (2006). Analysis of genetic variation in clones of rubber (*Hevea brasiliensis*) from Asian, South and Central American origin using RAPDs markers. *Rev Colomb Biotecnol*, 8 (2): 29~34
- Ko JH, Chow KS, Han KH (2003). Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Plant Mol Biol*, 53 (4): 479~492
- Lekawipat N, Teerawatanasuk K, Rodier-Goud M, Seguin M, Vanavichit A, Toojinda T, Tragoonrung S (2003). Genetic diversity analysis of wild germplasm and cultivated clones of *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. by using microsatellite markers. *J Rubb Res*, 6 (1): 36~47
- Low FC, Safiah A, Hafisah J, Tan H (1996). Recent advances in the development of molecular markers for *Hevea* studies. *J Nat Rubb Res*, 11 (1): 32~44
- Luo H, van Coppenolle B, Seguin M, Boutry M (1995). Mitochondrial DNA polymorphism and phylogenetic relationships in *Hevea brasiliensis*. *Mol Breeding*, 1 (1): 51~63
- Roy CB, Nazeer MA, Saha T (2004). Identification of simple sequence repeats in rubber (*Hevea brasiliensis*). *Current Sci*, 87 (6): 807~811
- Saha T, Roy CB, Nazeer MA (2005). Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of *Hevea brasiliensis*. *Plant Breeding*, 124: 86~92
- Sookmark U, Pujade-Renaud V, Chrestin H, Lacote R, Naiyanetr C, Seguin M, Romruensukharom P, Narangajavana J (2002). Characterization of polypeptides accumulated in the latex cytosol of rubber trees affected by the tapping panel dryness syndrome. *Plant Cell Physiol*, 43 (11): 1323~1333
- Venkatachalam P, Priya P, Gireesh T, Amma CKS, Thulaseedharan A (2004). Identification, cloning and sequence analysis of a dwarf genome-specific RAPD marker in rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.]. *Plant Cell Rep*, 23 (5): 327~332
- Venkatachalam P, Thulaseedharan A, Raghothama K (2007). Identification of expression profiles of tapping panel dryness (TPD) associated genes from the latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Planta*, 226 (2): 499~515
- Venkatachalam P, Thulaseedharan A, Raghothama K (2009). Molecular identification and characterization of a gene associated with the onset of tapping panel dryness (TPD) syndrome in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell.) by mRNA differential display. *Mol Biotechnol*, 41 (1): 42~52
- Xiao X, Li H, Tang C (2009). A silver-staining cDNA-AFLP protocol suitable for transcript profiling in the latex of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree). *Mol Biotechnol*, 42 (1): 91~99
- Yeang HY, Chevallier MH (1999). Range of *Hevea brasiliensis* pollen dispersal estimated by esterase isozyme markers. *Ann Bot*, 84 (5): 681~684