

## RFLP 揭示的籼粳基因组多态性

王松文<sup>1</sup>, 刘霞<sup>2</sup>, 王勇<sup>2</sup>, 徐才国<sup>3</sup>, 施利利<sup>1</sup>, 张欣<sup>1</sup>, 丁得亮<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>天津农学院, 天津 300384; <sup>2</sup>南开大学, 天津 300071; <sup>3</sup>华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:**【目的】揭示籼粳基因组的多态性。【方法】选用分布于水稻 12 条染色体上的 RFLP 对多个水稻品种进行分析, 结合生物信息学方法分析这些籼粳特异性标记的籼粳特异性及其序列分子的生物学基础。【结果】筛选到 28 个 RFLP 籼粳特异性探针, 籼粳特异性标记的生物信息学分析表明, 这些标记在基因组水平上存在差异。【结论】这些标记能对水稻品种进行籼粳分子分类。水稻基因组序列图的完成和释放, 使得这些籼粳特异性标记揭示的基因组多态性可以在基因组序列水平上进行分析和验证。

**关键词:** 水稻; RFLP; 基因组多态性

## Genome Polymorphisms Between Indica and Japonica Revealed by RFLP

WANG Song-wen<sup>1</sup>, LIU Xia<sup>2</sup>, WANG Yong<sup>2</sup>, XU Cai-guo<sup>3</sup>, SHI Li-li<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>1</sup>, DING De-liang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Tianjin Agricultural College, Tianjin 300384; <sup>2</sup>Nankai University, Tianjin 300071;

<sup>3</sup>National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract:** 【Objective】Revealing the genome polymorphisms between Indica and Japonica subspecies. 【Method】RFLP markers, which are distributed on 12 chromosome of rice, were used to analyze Indica-Japonica differentiation in different rice varieties. The same time, genome sequence variations of screened loci were analyzed by bioinformatics method. 【Result】Twenty-eight RFLP probes, which can classify Indica-Japonica rice, were confirmed. Subspecies genome polymorphisms of screened loci were found by analyzing the publication of the genome sequences data of rice. 【Conclusion】The study indicated that these screened markers can be used for classifying Indica-Japonica subspecies. With the publication of the genome sequences of rice, marker polymorphisms between Indica and Japonica subspecies can be revealed by genome sequence differentiation.

**Key words:** Rice; RFLP; Genome polymorphisms

### 0 引言

【本研究的重要意义】水稻是重要的粮食作物和模式植物。亚洲栽培稻 (*Oryza sativa* L.) 主要分为两个亚种: 籼稻和粳稻。籼、粳亚种在形态和生理上存在显著差异<sup>[1]</sup>, 亚种间杂交可产生巨大的杂种优势, 这是超级杂交稻实现高产、稳产的根本途径之一<sup>[2, 3]</sup>。广亲和品种(系)、籼粳中间型材料的发现和利用, 为亚种间杂种优势利用开辟了道路, 然而这些广亲和品种和中间型品种及其后代已难以用形态学指标进行准

确的籼粳分类。大量的研究表明籼粳亚种基因组间存在着明显的序列多态性<sup>[4, 5]</sup>, 鉴定籼、粳亚种基因组特异分子标记, 利用这些标记进行籼粳分类将大大提高籼粳分类的准确性。同时籼粳特异性分子标记也是鉴定籼粳亚种特有基因、研究籼粳亚种进化的有利工具。

【前人研究进展】籼粳分类一直是一个十分重要的研究焦点<sup>[6, 7]</sup>。Kato 等首先提出栽培稻可分为籼稻和粳稻两个亚种<sup>[8]</sup>, Morishima 和 Oka 系统研究了籼粳亚种形态水平上的系统演变。Second 等发现了 40 个同工酶的籼粳位点差异<sup>[9]</sup>。为了应用上的方便, Cheng

收稿日期: 2005-06-30; 接受日期: 2006-02-17

基金项目: 国家水稻基因组谱研究项目(101-09-06)、天津市导向重大项目(973122711)、PRO-TAC 国际合作项目资助(Ref:2004/2001)、天津市自然科学基金项目(01306611)

作者简介: 王松文和刘霞对本文有同等贡献。王松文(1958-), 男, 河北沧州人, 副教授, 博士, 研究方向为水稻分子育种。刘霞(1976-), 女, 天津人, 博士研究生, 研究方向为植物生理与分子生物学。Tel: 13820765129; E-mail: liuxia831930@yahoo.com.cn。王松文和王勇同为通讯作者, 王松文: dw186001@yahoo.com.cn; 王勇: wangyong@nankai.edu.cn

提出了 6 个形态特征为核心内容的程氏指数法来进行籼粳分类<sup>[10]</sup>。随着全球性水稻基因组计划的深入开展,大量 RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 探针及 RFLP 遗传图谱陆续出现,为籼粳分化研究提供了新的条件。Zhang 等使用 RFLP 标记对籼粳稻多态性和籼粳分化进行了分析<sup>[11]</sup>; Qian 等鉴定出一些籼粳特异性探针<sup>[12, 13]</sup>。Xu 等使用 100 个 RFLP 探针对 236 个水稻品种进行分析,发现 RZ329, RZ403, RG181 对籼粳的检测率可达 99%<sup>[14]</sup>。钱前等还对程氏指数的 6 个性状相关的 QTL 位点进行了基因组扫描,将籼粳分类的形态指数相关性状 QTL 定位在不同染色体上<sup>[15]</sup>。Zhang 等<sup>[5]</sup>鉴定了 70 个籼稻特有的 EST,比较分析表明籼粳基因组间存在大量的碱基缺失/插入/替换。【本研究切入点】但是,籼粳基因组间的遗传分化是复杂的,RFLP 标记揭示的籼粳基因组多态性一直未能在基因组序列层面系统阐明,使用籼粳特异性标记,结合生物信息学方法进行籼粳分类的研究报道则更少。本研究在籼粳基因组全序列绘制完成的大背景条件下,通过大量的 RFLP 探针在不同水稻间的多态性分析,对筛选到的籼粳特异性 RFLP 探针进行测序,将此序列与日本晴、93-11 相应序列进行比对,分析籼粳特异性 RFLP 标记多态性的基因组多态性基础。【拟解决的关键问题】以期对分子标记多态性与籼粳稻基因组多态性关系进行研究,为鉴定籼粳亚种特有基因及进行籼粳亚种进化研究提供参考。同时,应用筛选到的籼粳特异性 RFLP 探针可进行不同水稻品种的籼粳分类,对种质资源分类提供有价值的分子标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验时间、地点

本研究 RFLP 试验在华中农业大学作物遗传改良重点实验室完成,测序在宝生物公司进行,数据统计与生物信息学分析在天津农学院进行。本研究于 2005 年完成。

### 1.2 试验材料

供试水稻材料共 19 个,包括 10 个籼稻品种,9 个粳稻品种,其中 7 个云南地方稻种,5 个广亲和性材料。所有材料进行了籼粳综合指数法分类和典型性分析。供试材料见表 1。

### 1.3 试验方法

1.3.1 RFLP 分析 水稻 DNA 的提取,总 DNA 的酶解、电泳, Southern 印迹转移,同位素标记、探针制

表 1 供试水稻材料

Table 1 Rice varieties tested in this study

序号 No.	材料 Variety	类型 Type	备注 Remark
1	矮脚南特 Aijiaonante	籼 Indica	籼粳测验种 Test variety
2	广陆矮 4 号 Guangluai4	籼 Indica	
3	农垦 58S Nongken58S	粳 Japonica	
4	八月糯 Bayuenuo	粳 Japonica	云南地方品种 Original
5	马罗糯谷 Maluonuogu	粳 Japonica	云南地方品种 Original
6	竹丫糯 Zhuyanuo	粳 Japonica	云南地方品种 Original
7	勐宋 1 号 Menyong1	粳 Japonica	云南地方品种 Original
8	鸡血糯 Jixuenuo	籼 Indica	云南地方品种 Original
9	矮子乌骚 Aiziwusao	籼 Indica	云南地方品种 Original
10	夷方糯 Yifangnuo	粳 Japonica	云南地方品种 Original
11	培矮 64S Peiai64S	籼 Indica	WCV
12	培迪 Peidi	籼 Indica	WCV
13	轮回 422 Lunhui422	籼 Indica	WCV
14	Dular	籼 Indica	WCV
15	02428	粳 Japonica	WCV
16	巴利拉 Balicao	粳 Japonica	籼粳测验种 Test variety
17	秋光 Akicali	粳 Japonica	籼粳测验种 Test variety
18	南京 11 Nangjing11	籼 Indica	籼粳测验种 Test variety
19	IR36	籼 Indica	籼粳测验种 Test variety

备,杂交和放射自显影参照 Zhang 等<sup>[11]</sup>介绍的方法。水稻总 DNA 用 *Bam*HI、*Eco*RI 和 *Hind*III 3 种限制性内切酶酶解,所选用的分布于 12 条染色体的 RFLP 探针分别来源于美国康乃尔大学 Tanksley 博士实验室和日本水稻基因组计划。

1.3.2 籼粳稻基因型鉴定 所有 RFLP 探针来源于 Cornell 大学和日本水稻基因组计划 (RGP), Cornell 探针源于水稻品种 IR36 (籼), RGP 探针源于水稻品种日本晴 (粳)。RFLP 探针经 ABI377 自动测序仪测序,依据所测序列在 RGP 获取所在染色体序列信息,选取相应区段序列在 NCBI 通过 BLAST 获得相应区段籼、粳稻序列信息,然后进行籼粳稻基因组鉴定分析。通过 DNASTar 软件进行籼粳稻的序列分析。

1.3.3 数据分析 每个探针选取一个探针/酶切组合,每条带作为一个信息单位,以 1 (籼稻型)、0 (粳稻型) 和 2 (其它带型) 记录每个样品的基因型。

聚类分析,以 28 个 RFLP 探针在 19 个水稻品种中的 1 (籼型位点)、0 (粳型位点) 和 2 (其它位点) 的分布记录每个品种的籼粳基因型位点,使用 DNAMAN 软件进行品种聚类分析,绘制 19 个水稻品

种的分子聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 RFLP 多态性和籼粳特异性标记

在基因组中按一定间隔(10~20 cM)选取多态性探针,对 19 个不同籼粳品种(表 1)进行 RFLP 分析,筛选到 28 个为籼粳特异性探针,其在染色体上的分布及对 19 个品种的籼粳检测见表 2。这些探针有的成簇分布,如 G376、RG1109、G181、RG303 分布在第 11 染色体的 101.9cM~118.25cM 的一个区域内,形成“籼粳分化区”,有的单独存在,如 RZ404,可能反映的只是一个籼粳特异性分子插入或缺失事件。

在这些籼粳特异性探针中,有的籼粳检测性强,几乎对所有参试品种都能检测。

在典型的籼粳品种中,只能检测籼型位点或粳型位点,南京 11、IR36、秋光、巴利拉这些广亲和测验种,矮脚南特、广陆矮 4 号、农垦 58S 等这些典型的

籼粳稻用 28 个籼粳特异性探针中的任何一个进行籼粳判定都能检测。而在云南地方品种中,除了典型的籼粳位点外,还能检测到一些地方品种的特有位点,如 RG400、RG64、RG553 等都能在云南地方稻品种中检测到稀有位点(表 2)。在现代育成品种中,也有一些品种存在特有位点,如探针 CD0337 检测到培矮 64S 的特有位点。在广亲和品种中,籼中有粳(如籼稻培矮 64S 的 RZ993 位点为粳位点),粳中有籼(如粳稻 02428 的 RG348 点为籼位点)的特点也能用这些探针检测到。但是,综合 28 个特异性探针进行检测能对所有参试品种准确无误的分类(图 1)。

表 2 表明,这些籼粳特异性探针可以检测籼稻特异性(表 2 中用 1 表示)和粳稻特异性(表 2 中以 0 表示)。每个特异性探针所探明的特异性及相关信息都是特定的,这些特定信息将随着籼粳分化及其生物学、生态学、育种学意义的深刻阐明而得到进一步的认识。

图 1 表明,用 28 个籼粳特异性探针可以将所有

表 2 28 个 RFLP 探针对 19 个品种的籼粳特异性分析

Table 2 Analysis of Indica-Japonica speciality of 19 rice varieties using 28 RFLP probes

探针 Probes	材料 Matetial																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
RG472(1)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RG400(1)	1	1	0	2	2	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RG811(1)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
*RZ154(1)	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RZ876(2)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
*RZ906(2)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RG324(2)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RG913(3)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RZ993(3)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
CDO337(3)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0	1	0	0	0	0	1	1
RG620(4)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
*RG207(5)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RG64(6)	1	1	0	0	0	0	2	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RG348(6)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
RG404(7)	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RG351(7)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RG553(9)	1	1	0	0	0	2	0	1	1	2	1	1	1	1	0	0	0	1	1
CDO590(9)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1
*RZ404(9)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
RG1094(11)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
G376(11)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
G181(11)	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1
RG1109(11)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1
RG303(11)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
*RG958(12)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
CDO127(12)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1
1—17(-)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
1—12(-)	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1

括号内数字表示探针所在染色体

The No. in the brackets indicates the chromosomes of the probe

19 个参试品种进行分类。10 个籼稻品种分为籼亚组，9 个粳稻分为粳亚组。农垦 58S、巴利拉、秋光、南

京 11、广陆矮 4 号、矮脚南特、IR36 等现代育成品种的籼糯性是很典型的，可以作为籼糯判定和评价的参照品种。云南稻种则不同，它们的形态特征和分子特征都与现代育成品种有所不同，在本研究中，用 28 个籼糯特异性探针对其分类，鸡血糯、矮子乌骚属籼稻，而勐宋 1 号、八月糯、马罗糯谷、竹丫糯、夷方糯则属粳稻。在广亲和性品种中，它们都有特异性，主要表现在：02428 用 RG348 检测为籼位点，培迪、Dulur、轮回 422 都携带籼位点。而培矮 64S 则是另外的情况，它是“四合一”（既籼、粳、广亲和、不育性），如 RZ993 探针检测到培矮 64S 来自农垦 58S 的粳稻等位基因。

### 2.2 RFLP 探针揭示的籼糯基因组多态性

RFLP 探针对籼糯稻基因组多态性的检测源于籼糯稻基因组序列的多态性（如插入/缺失/替换），有时以 SNP 的形式表现在限制性内切酶酶切位点的差异上。本研究对源于 IR36 的 RFLP 探针 RZ906 测序结果表明，除 IR36 第 56 和 57 位为 AC，而日本晴为 CT 外，全长 cDNA 1409 bp 序列无差别。探针 RZ906 的 cDNA 所对应的基因为 3567 bp，该基因在 1735 bp 处第 2 内含子内部有一个 *EcoRI* 酶切位点，将基因切成 1730 bp 和 1837 bp 两个片段，该基因上游 4010 bp 处，也有一个 *EcoRI* 酶切位点，其籼(93-11)与粳(日本晴)序列无差别，而该基因下游 *EcoRI* 的酶切位点籼稻 93-11 在 1200 bp 处，粳稻日本晴在 950 bp 处，因而产生 RFLP 不同模式（图 2）。这在 19 个不同籼糯品种 RFLP 分析中得到完全一致的验证（图 3）。

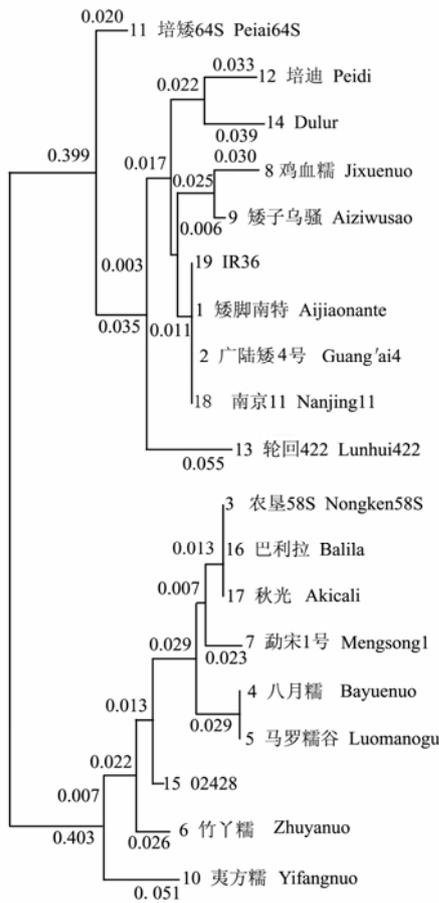
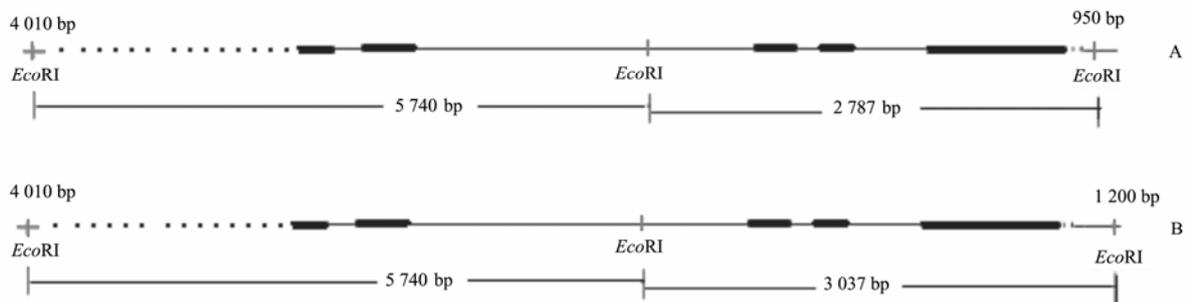


图 1 19 个水稻品种的聚类

Fig. 1 The dendrogram of 19 rice varieties



A.日本晴（粳）；B. 93-11（籼）。黑框表示外显子，细线表示内含子

A. Nipponbare (Japonica); B. 93-11 (Indica). Exons are indicated by black boxes and introns by lines

图 2 RZ906 对应的基因结构及基因内部与基因侧翼序列 *EcoRI* 酶切位点的分布

Fig. 2 Gene structure corresponding to probe RZ906 and distribution of *EcoRI* cleaving sites in its gene and flanking sequence

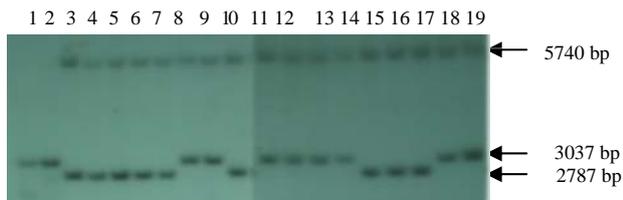


图 3 RZ906 探针对 19 个品种进行的多态性分析

Fig. 3 Polymorphic analysis of 19 rice varieties using probe RZ906

### 3 讨论

#### 3.1 水稻籼粳特异性 RFLP 探针

不同研究者使用不同水稻材料筛选出一些籼粳特异性标记,这些籼粳特异性标记在水稻 12 条染色体上均有分布<sup>[9-15]</sup>。本研究确定的 28 个 RFLP 籼粳特异性探针有些与前人的研究结果相同,如 RG64 (第 6 染色体)、RG351 (第 7 染色体)在 Qian<sup>[12]</sup>等对广亲和品种的鉴定中也发现了这两个特异性探针。但多数标记为新鉴定出的籼粳特异性标记。Xu<sup>[14]</sup>等使用 100 个 RFLP 探针,发现了 RZ329, RZ403, RG181 3 个籼粳特异性探针,与本研究发现的 28 个籼粳特异性探针完全不同。以前的研究证明,籼粳两个亚种间已发生深刻的遗传进化<sup>[16]</sup>。这些研究结果均表明,在水稻中可以选用不同的特异性探针检测籼粳品种,但是需要大量研究以揭示籼粳分化的实质。

#### 3.2 结合生物信息学方法揭示籼粳基因组多态性

本研究在进行籼粳特异性标记筛选的基础上,以 RZ906 探针为例,使用 RZ906 测序所得序列与 GenBank 上日本晴和 93-11 序列比对,钓取相应侧翼序列进行酶切位点分析,确定酶切位点和限制性酶切片段大小,对所筛选到的 RZ906 标记进行了生物信息学分析,不仅揭示籼粳分化的深刻基因组序列差异,而且对了解籼、粳分化的分子生物学机理和开展籼粳品种分类研究具有积极意义。

在 RFLP 多态性分析所涉及的生物信息学分析中,进行了日本晴和 93-11 生物信息学分析和 RFLP 实验结果关联分析,由于目前 GenBank、RGP 等数据库只有日本晴、93-11 等少数品种的基因组全序列,因此这些分析结果是一种趋势性结果,大量水稻个体序列测定和深入解析才能更全面的揭示籼粳基因组多态性的实质和规律。

不同研究者根据不同材料得到不同籼粳特异性标记,都有助于对籼粳基因组多态性的认识。随着水稻功能基因组研究及相关研究的不断深入,籼粳稻基因组多态性的研究将进一步揭示出籼粳分化的分子基础和演化实质、鉴定籼粳特异性基因,从而推动产生新的可预见或不可预见的应用。

#### 3.3 籼粳特异性探针在选育超级杂交稻中的重要意义

中国已全面实施超级杂交稻计划。亚种间杂种利用和远缘杂种利用被认为是重要的育种途径。选育超级杂交稻首先需要研究几个关键技术问题:(1)超高产及巨大产量潜力;(2)超级杂交稻的基因组结构;

(3)近缘及远缘基因的表达及与受体基因组的协调和互作;超级杂交稻对环境的反应及互作。然而,这些关键技术与理论问题的解决首先要明确水稻种质的籼粳分类以便应用;其次,了解籼粳基因组多态性实质进而研究亚种间杂交稻的基因组结构,分析超级杂交稻优势的实质,为进一步利用远缘杂种优势打下深刻的理论基石。因此,筛选、利用籼粳特异性探针进行种质分类,并利用这些探针在基因组层面揭示籼粳基因组多态性对选育超级杂交稻、揭示杂种优势机理具有重要意义。

#### 3.4 籼粳特异性标记与籼粳特有基因的鉴定

所谓的籼粳特异性探针是能够在大多数或全部籼/粳亚种间表现出两亚种基因型差异的探针,而出现这一现象的原因很可能是在这些籼/粳特异性标记位点处存在籼/粳特异性基因。因此,分析籼粳特异性标记基因组多态性与籼粳形态、生理等的相关性,将为我们鉴定出籼粳特有基因提供理论基础。

Zhang 等鉴定出 70 个籼稻特异性 EST<sup>[5]</sup>,但是在未来的基因图上如果按 3 倍估计,籼稻特有基因应为 210 个,如果粳稻与籼稻特有基因相当,粳稻特有基因也为 210 个。籼稻表现型是籼稻在热带、亚热带生长时籼稻基因在特定条件下的基因环境互作型。粳稻表现型是粳稻在温带、高海拔地区生长时粳稻基因在特定条件下的基因环境互作型。在这方面,02428/3037(F<sub>1</sub>)在低温条件下表现出的低结实率和低温敏感性是一个最好的例证。由于籼稻和粳稻的遗传分化和表现型极为复杂,这就需要我们以一些研究作为起点、基于一些科学事实寻找进一步深入研究的途径和方法。笔者确定的 28 个籼粳特异性探针中 RZ154、RZ876、RZ906、RZ993、CDO337、CDO590、RZ404、CDO127 也是基因探针,所以它们反映的信息比其它

探针更为丰富, 为我们彻底揭示籼粳分化、绘制水稻基因组图、利用水稻远缘杂种优势<sup>[17]</sup>提供了思路。

## 4 结论

通过对 19 个水稻籼粳代表性品种的 RFLP 分析, 确定了 28 个籼粳特异性 RFLP 探针, 这些特异性标记可以对不同籼粳品种进行分类。进而以 RZ906 为例, 进行了籼粳特异性及其序列分子生物学解析。结果表明: (1) 所筛选到的特异性分子标记可用于水稻分类、分化研究; (2) 籼粳特异性分子标记多态性与基因组序列多态性研究具有一致性, 这为全面揭示水稻籼粳分化的实质奠定了新的基础。

本研究利用分子标记从全基因组筛选籼、粳亚种的特异性分子标记, 并结合生物信息学进一步比较了这些特异性籼粳分化标记所揭示的基因组序列的差异, 对了解籼、粳分化的分子生物学机理和开展籼粳品种分类研究具有方法学意义。

**致谢:** 感谢华中农业大学张启发教授在论文设计和试验中给予的指导和支持。

## References

- [1] Liu H L. *Study and Progress of Crop Breeding*. Beijing: Agriculture Press, 1993: 85.
- [2] Yuan L P. *Hybrid Rice Science*. Beijing: China Agriculture Press, 2002: 35. (in Chinese)
- [3] Zou J S, Lü C G. Practice and thinking on rice breeding for high yield. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31: 254-258.
- [4] Li C, Zhang Y, Ying K, Liang X L, Han B. Sequence variations of simple sequence repeats on chromosome-4 in two subspecies of the Asian cultivated rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 392-400.
- [5] Zhang J W, Qi F, Jin C Q. Features of the expressed sequences revealed by a large-scale analysis of ESTs from a normalized cDNA library of the elite indica rice cultivar Minghui63. *The Plant Journal*, 2005, 42: 772-780.
- [6] Claszmann J C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 1987, 74: 21-30.
- [7] Morishima H, Oka H I. Phylogenetic differentiation of cultivated rice, XX II, Numerical evaluation of the evolve the indica and japonica type of rice cultivars. *Euphytica*, 1982, 331: 637-650.
- [8] Kato S, Kosaka H, Hara S. On the affinity of rice varieties as shown by the fertility of hybrid plants. *J DEP Agr Kyushu Imp Univ*, 1928, 3: 132-147. (in Japanese)
- [9] Second G. Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp.): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Japanese Journal of Genetics*, 57: 25-57.
- [10] Cheng K S. A statistical evaluation of the classification of rice cultivars into hsien and keng subspecies. *Rice Genetics Newsletter*, 1985, 2: 46-48.
- [11] Zhang Q E, Saghai-Marooof M A, Lu T Y, Shen B Z. Genetic diversity and differentiation of indica and japonica rice detected by RFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 83: 495-499.
- [12] Qian H R, Zhuang J Y, Lin H X, Lu J, Zheng K L. Identification of a set of RFLP probes for subspecies differentiation in *Oryza sativa* L., *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90: 878-884.
- [13] Qian H R, Shen B, Lin H X, Lu J, Zhuang J Y, Zheng K L. Screening of subspecies differentiating RFLP markers and phylogenetic analysis of wide compatibility varieties in *Oryza sativa*. *Chinese Journal of Rice Science*, 1994, 8(2): 65-71.
- [14] Xu Y B, Ishii T, McCouch S R. Marker-assisted evaluation of germplasm of resources for plant breeding. Rice science: innovation and impact for livelihood. Proceeding of the International Rice Research Conference. Beijing, 213-219. (China)
- [15] 钱 前, 何 平, 郑先武, 陈 英, 朱立煌. 籼粳分类的形态指数及其相关鉴定性状的遗传分析. *中国科学(C 辑)*, 2000, 30: 305-310.  
Qian Q, He P, Zheng X W, Chen Y, Zhu L H. Genetic analysis of morphological index and its related taxonomic traits for classification of indica/japonica rice. *Science in China (Series C)*, 2000, 30: 305-310. (in Chinese)
- [16] 王松文. 36 个水稻骨干系的分子聚类及其遗传育种学意义 I 分子标记多态性与杂交亲和性关系的研究. *华北农学报*, 1997, 12: 1-6.  
Wang S W. RFLP analysis of 36 rice elite line and their genetic breeding significance I Molecular marker diversity and hybrid sterility in different rice crosses. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 1997, 12: 1-6. (in Chinese)
- [17] Zhao B R, Xing Q H, Xia H A, Yang H H, Jin D M, Liu X, Wang S W, Wang B, Yuan L P. DNA polymorphism among Yewei B, V20B, and *Oriza minto* J. S. Presl. ex C. B. Presl. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2005, 47: 1485-1492.

(责任编辑 于 竞)