

水稻同核异质不育系及其保持系核基因组的 SSR 分析

李金泉 李伟 程桂平 蔡善信 冯九焕*

(华南农业大学 广东省植物分子育种重点实验室, 广东 广州 510642; * 通讯联系人, E-mail: jhfeng@scau.edu.cn)

SSR Analysis on Nuclear Genome of Isonuclear Alloplasmic Male Sterile Lines and Their Maintainer Lines in Rice (*Oryza sativa*)

LI Jin quan, LI Wei, CHENG Gui ping, CAI Shan xin, FENG Jiu huan*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

* Corresponding author, E-mail: jhfeng@scau.edu.cn)

Abstract: Four sets of rice isonuclear alloplasmic lines, including 15 male sterile lines and their maintainer lines were analyzed by using 42 SSR markers, which were randomly selected from 12 chromosomes of rice. A total of 63 alleles were detected in the 15 lines. The frequency of polymorphic loci was 40.48%, the average number of alleles per locus was 1.5, and the average gene diversity was 0.18. Four sets of the isonuclear alloplasmic male sterile lines shared 54.5 identical loci, corresponding to 86.51% of the total alleles; and meanwhile, there were 8.5 different loci between them, it was equal to 13.49%. Average 77.78% identical loci and 22.22% different loci were detected between the isonuclear alloplasmic male sterile lines and their maintainer lines. Similarly, average 53.97% identical loci and 46.03% different loci were existed among the homogeneous allonucleus male sterile lines. The SSR fingerprints for some male sterile lines and maintainer lines were established. Based on the cluster analysis, the 15 lines could be divided into three groups at the 0.22 of the genetic distance. The first group consists of eight lines including the male sterile lines and their maintainer lines of Huanong A and Huayu A. The second group consists of three sterile lines of Kezhen 2A, including N9A, N10A and N11A. The third group includes four isonuclear alloplasmic lines of Zhenshan 97A, i.e., N12A, N13A, N14A and N12-16B. The isonuclear alloplasmic lines of the same sets are mostly clustered in the same group, which is consistent with their pedigrees.

Key words: rice; isonuclear alloplasmic male sterile lines; maintainer lines; simple sequence repeats marker

摘要: 以 4 套共 15 份同核异质水稻雄性不育系和保持系为试验材料,应用随机分布于水稻 12 条染色体上的 42 对 SSR 引物,分析其核基因组的遗传多样性和亲缘关系。在 15 份材料间共检测到 63 个等位基因,多态性位点百分率为 40.48%,平均每个位点的等位基因数为 1.5 个,平均基因多样性为 0.18。4 套同核异质不育系的平均相同位点为 54.5 个,占总等位基因数的 86.51%,差异位点为 8.5 个,占 13.49%。同核异质的不育系与保持系间具有平均 77.78% 的相同位点和 22.22% 的差异位点。同质异核不育系中则具有平均 53.97% 的相同位点和 46.03% 的差异位点。同时,获得了一些不育系和保持系的指纹图谱。根据不育系和保持系聚类分析图,在遗传距离为 0.22 处划分为 3 群,第 1 群包括华农 A 和华育 A 不育系及其保持系共 8 份材料,第 2 群包括 N9A、N10A 和 N11A 等 3 份科珍 2A 材料,第 3 群包括 N12A、N13A、N14A 和 N12-16B 等 4 份珍汕 97A 同核异质系。同一套同核异质系基本上都优先聚类在一起,与其选育系谱一致。

关键词: 水稻; 同核异质不育系; 保持系; 微卫星标记

中图分类号: Q943; S511.03

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2007)02-0117-06

三系杂交水稻杂种优势利用的关键在于亲本的选育,突破性亲本尤其是不育系的育成起着关键作用。在我国,由野败胞质不育系所配组合一直是生产上的主栽品种。据 1996 - 1998 年的统计,野败胞质所配的组合分别占杂交水稻总面积的 69.0%、64.7% 和 57.8%^[1]。这种细胞质单一化的倾向很可能导致遗传上的脆弱性。因此,从各种稻种资源中寻找并利用优良的新型胞质不育系是一个重要研究课题。蔡善信^[2-3]经过多代回交选育,育成了多套核背景相同而胞质不同(包括夜公、野败及饶平野稻胞质)的同核异质不育系,进行细胞质效应的研究,并育成细胞质源于华南晚粳农家品种夜公的一系列 Y 型不育系^[4]。其中的 Y 华农 A 于 1997 年

通过广东省成果鉴定,2000 年获得国家植物新品种权^[5]。至 2006 年 4 月,已由 Y 华农 A 选配出 19 个新组合,30 次通过省级以上品种审定,展示了这一新型不育系的巨大育种价值。

目前已对水稻同核异质不育系的不育特性^[6-7]、农艺性状^[8]、细胞质效应^[3-9]、对稻瘟病和白背飞虱的抗性^[10-11]等进行了研究,但对其核基因组的差异性研究鲜有报道。SSR (simple sequence repeats) 标记是近年发展起来的分子标记,具有可

收稿日期: 2006-08-15; 修改稿收到日期: 2006-10-30。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(032244); 广东省教育厅自然科学基金资助项目(Z03004)。

第一作者简介: 李金泉(1974-),男,博士,助理研究员。

靠性强、重复性高且品种间多态性丰富等优点,已广泛应用于连锁图谱的构建、基因定位、遗传关系分析和品种鉴定等领域。同时,由于 SSR 标记属共显性标记,在杂交水稻及其亲本的鉴定方面具有明显优势^[12]。本研究从多套同核异质不育系中,选择 4 套水稻同核异质不育系(华农 A、华育 A、科珍 2A 和珍汕 97A)及其保持系作为研究材料,分析它们核基因组的 SSR 标记基因型差异和彼此间的亲缘关系,并对新质源 Y 型不育系与其他不育系进行对比研究,明确其核基因背景,为进一步分析其细胞质不育基因打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的材料如表 1 所示,包括以夜公、野败、饶平野稻为细胞质供体育成的华农 A、华育 A、科珍 2A 和珍汕 97A 等 4 套同核异质不育系,以及其中相应的 3 个保持系。同一套不育系和保持系均具有相同的核基因背景,但细胞质各不相同。

1.2 DNA 的提取

DNA 提取按简易 SDS 抽提法^[13]稍加修改。

1.3 PCR 反应

20 μ L 的反应体系中包括:3 μ L 引物,10 \times PCR buffer(含 15 mmol/L $MgCl_2$) 2 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.3 μ L, 50 ~ 100 ng 模板 DNA, 1 U *Taq* 酶。反应程序为:94 $^{\circ}C$ 下预变性 5 min, 循环(94 $^{\circ}C$ 下 1 min, 55 $^{\circ}C$ 下 1 min, 72 $^{\circ}C$ 下 1 min) 35 次,最后

72 $^{\circ}C$ 下延伸 5 min。扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.4 统计分析

以 Marker 为对照,在凝胶中由下至上依次读取 SSR 标记的主带,位置不同的主带视作不同的等位基因,根据某一等位基因的有无分别赋值为 1 和 0。根据 Treecon 软件 (Version 1.3b)^[14]对 SSR 标记数据进行遗传距离的估算,遗传距离 (Genetic distance, GD) 按公式 $GD = 1 - GS$ 计算,遗传相似系数 (Genetic similarity, GS) 按公式 $GS = 2 N_{ij} / (N_i + N_j)$ 计算,其中 N_{ij} 表示基因型间共有条带数目, N_i 和 N_j 表示两基因型各自的条带数目;利用 UPGMA 方法进行聚类分析。多态性位点百分率等遗传多样性指标根据 Sun 等^[15]进行计算。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记的遗传多样性

随机选择分布于水稻 12 条染色体上的 42 对 SSR 引物(表 2),在 15 份材料间共检测出 63 个等位基因,多态性位点百分率为 40.48%,平均每个位点的等位基因数为 1.5 个,多态性位点的平均等位基因数为 2.24 个,等位基因有效数目平均数为 1.37 个,平均基因多样性为 0.18。表明这 4 套水稻同核异质系具有较低的遗传多样性。在所用的 42 对引物中,多态性信息含量 (polymorphism index of content, PIC) 以引物 RM415 为最高,达 0.62,其次为 RM1、RM515、RM189、RM410 和 RM27,其 PIC 值

表 1 试验所用的水稻不育系和保持系

Table 1. Sterile lines and maintainer lines used in the experiment.

编号 Accession	不育系/保持系名称 Name of sterile line or maintainer line	品种代号 Symbol of line	细胞质类型 Cytoplasm type	世代 Generation
1	华农 A Huanong A	N3A	夜公 Yegong	BC ₁₈
2	华农 A Huanong A	N4A	野败 Wild abortive	BC ₁₈
3	华农 A Huanong A	N5A	饶平野稻 Raoping wild rice	BC ₁₈
13	华农 B Huanong B	N3-5B		
4	华育 A Huayu A	N6A	夜公 Yegong	BC ₁₇
5	华育 A Huayu A	N7A	野败 Wild abortive	BC ₁₇
6	华育 A Huayu A	N8A	饶平野稻 Raoping wild rice	BC ₁₇
14	华育 B Huayu B	N6-8B		
7	科珍 2A Kezhen 2A	N9A	夜公 Yegong	BC ₁₉
8	科珍 2A Kezhen 2A	N10A	野败 Wild abortive	BC ₃₃
9	科珍 2A Kezhen 2A	N11A	饶平野稻 Raoping wild rice	BC ₁₉
10	珍汕 97A Zhenshan 97A	N12A	夜公 Yegong	BC ₉
11	珍汕 97A Zhenshan 97A	N13A	野败 Wild abortive	BC ₃₂
12	珍汕 97A Zhenshan 97A	N14A	饶平野稻 Raoping wild rice	BC ₃₀
15	珍汕 97B Zhenshan 97B	N12-16B		

表 2 所用引物及其在染色体上的位置和产生的等位基因数

Table 2 . Primers , their positions on the chromosome and alleles generated .

引物名称 Primer	染色体 Chromosome	遗传距离 Genetic distance/cM	等位基因数 No . of alleles	多态性 信息含量 PIC ¹⁾	引物名称 Primer	染色体 Chromosome	遗传距离 Genetic distance/cM	等位基因数 No . of alleles	多态性 信息含量 PIC ¹⁾
RM499	1	0.0	1	0.00	RM510	6	20.8	2	0.48
RM1	1	29.7	3	0.59	RM541	6	75.5	1	0.00
RM483	1	58.9	2	0.48	RM454	6	99.3	1	0.00
RM129	1	78.4	1	0.00	RM412	6	142.0	1	0.00
RM423	2	28.7	2	0.48	RM436	7	0.0	1	0.00
RM27	2	66.0	2	0.50	RM455	7	65.7	2	0.49
RM526	2	136.0	2	0.09	RM429	7	96.9	2	0.32
RM138	2	196.8	1	0.00	RM506	8	0.0	1	0.00
RM523	3	11.0	1	0.00	RM407	8	5.7	2	0.32
RM517	3	42.9	1	0.00	RM515	8	80.6	3	0.56
RM411	3	128.0	1	0.00	RM458	8	124.6	1	0.00
RM520	3	191.0	1	0.00	RM464	9	3.3	2	0.36
RM417	4	56.2	1	0.00	RM410	9	64.4	2	0.50
RM119	4	76.1	1	0.00	RM189	9	90.7	3	0.56
RM470	4	116.0	1	0.00	RM474	10	0.0	2	0.41
RM127	4	150.1	1	0.00	RM484	10	97.3	2	0.46
RM509	5	65.8	1	0.00	RM441	11	43.9	1	0.00
RM31	5	118.8	1	0.00	RM457	11	83.0	1	0.00
RM538	5	133.0	1	0.00	RM415	12	0.0	3	0.62
RM435	6	2.2	1	0.00	RM453	12	28.2	2	0.48
RM469	6	2.2	1	0.00	RM463	12	75.5	1	0.00

¹⁾ PIC , Polymorphism index of content .

表 3 试验材料的特异性 SSR 指纹

Table 3 . SSR fingerprints of the tested lines .

材料名称 Name	特征性 SSR 谱带 Characteristic SSR bands
N6A	RM526 的谱带 1
N12A 和 N12-16B	RM515 的谱带 1 和 RM423 的谱带 2
N9A、N10A 和 N11A	RM407 或 RM189 的谱带 3、RM1 的谱带 3 和 RM415 的谱带 3
N12A、N13A 和 N14A	RM189 的谱带 2、RM429 或 RM515 的谱带 1 和 RM423 的谱带 2

均在 0.5 以上 ,表明这些引物对本试验材料具有较好的分辨力。共有 25 对引物由于在 15 份材料中分别只有 1 个等位基因 ,其 PIC 值均为 0。

2.2 4 套不育系和保持系的 SSR 指纹图谱

一些特征性的带型可作为鉴定这批试验材料的指纹图谱。如表 3 所示 ,RM526 的谱带 1 是 N6A 的特征性谱带。RM515 的谱带 1 是 N12A 和 N12-16B 的共有谱带 ,再通过 RM423 的谱带 2 的有无可将两者区分开来。RM407 或 RM189 的谱带 3 是 N9A、N10A 和 N11A 这一套同核异质不育系的特征性谱带 ,再通过 RM1 的谱带 3 (N9A 有带)和 RM415 的谱带 3 (N10A 有带)可将三者区分开来。同样地 ,RM189 的谱带 2 是 N12A、N13A 和 N14A 这一套同核异质不育系的特征性谱带 ,再根据

RM423 的谱带 2 (N14A 有带)和 RM515 或 RM429 的谱带 1 的有无可将三者区分开来 (其指纹图谱参见 <http://www.ricesci.cn>)。

2.3 核基因组差异性比较

如表 4 所示 ,4 套同核异质不育系间的平均相同位点为 54.5 个 ,占 86.51% ,差异位点为 8.5 个 ,占 13.49% ,说明回交取得了较明显的效果。核基因组差异最大的是珍汕 97A ,差异位点百分率达到了 20.63% ;最小的为华农 A 和华育 A ,同一套内各不育系间的相同位点达到 90.48%。同核异质的不育系与保持系间的平均相同位点为 49.3 个 ,占 77.78% ,差异位点 13.7 个 ,占 22.22%。与同核异质的不育系相比 ,虽然均是同核异质 ,保持系与其同核异质不育系间的差异位点多 8.73 个百分点。同

表 4 4 套同核异质水稻核基因组差异性比较

Table 4 . Comparisons of the nuclear genome in the four sets of isonuclear alloplasmic rice .

比较项目 Item	相同位点数 Number of identical loci	百分比 Percent/%	差异位点数 Number of different loci	百分比 Percent/%
同核异质不育系间 ¹⁾ Among the isonuclear alloplasmic sterile lines ¹⁾				
华农 A Huanong A	57	90.48	6	9.52
华育 A Huayu A	57	90.48	6	9.52
科珍 2A Kezhen 2A	54	85.71	9	14.29
珍汕 97A Zhenshan 97A	50	79.37	13	20.63
平均 Average	54.5	86.51	8.5	13.49
同核异质不育系与保持系间 Between isonuclear alloplasmic sterile lines and their maintainer lines				
华农 A 与华农 B Huanong A and Huanong B	48	76.19	15	23.81
华育 A 与华育 B Huayu A and Huayu B	55	87.30	8	12.70
珍汕 97A 与珍汕 97B Zhenshan 97A and Zhenshan 97B	45	71.43	18	28.57
平均 Average	49.3	77.78	13.7	22.22
同质异核不育系间 ²⁾ Among the homogenous allonucleus sterile lines ²⁾				
Y 型细胞质不育系 Y type of cytoplasmic male sterile lines	35	55.56	28	44.44
WA 型细胞质不育系 WA type of cytoplasmic male sterile lines	36	57.14	27	42.86
CW 型细胞质不育系 CW type of cytoplasmic male sterile lines	32	50.79	31	49.21
平均 Average	34.3	53.97	28.7	46.03

¹⁾ 华农 A 包括 N3A、N4A 和 N5A ; 华育 A 包括 N6A、N7A 和 N8A ; 科珍 2A 包括 N9A、N10A 和 N11A ; 珍汕 97A 包括 N12A、N13A 和 N14A , 每一套不育系具有相同的核基因组和不同的细胞质。

²⁾ Y 型细胞质不育系包括 N3A、N6A、N9A 和 N12A 具有夜公的不育细胞质 ; WA 型细胞质不育系包括 N4A、N7A、N10A 和 N13A , 具有野败型不育细胞质 ; CW 型细胞质不育系包括 N5A、N8A、N11A 和 N14A 具有饶平野稻的不育细胞质。

¹⁾ Huanong A includes N3A , N4A and N5A ; Huayu A includes N6A , N7A and N8A ; Kezhen 2A includes N9A , N10A and N11A ; Zhenshan 97A includes N12A , N13A and N14A . Each set of sterile line shares the same nuclear genome and different cytoplasm .

²⁾ Y type of cytoplasmic male sterile lines with Yegong cytoplasm includes N3A , N6A , N9A and N12A ; WA type of cytoplasmic male sterile lines with wild abortive cytoplasm includes N4A , N7A , N10A and N13A ; CW type of cytoplasmic male sterile lines with Raoping wild rice cytoplasm includes N5A , N8A , N11A and N14A .

质异核不育系中 , 平均相同位点数为 34.3 个 , 占 53.97% , 变幅为 50.79% ~ 57.14% , 差异位点数为 28.7 个 , 占 46.03% , 变幅为 42.86% ~ 49.21% 。从上述结果可以看出 , 同核异质不育系间相同的位点最多 , 材料间的差异最小 , 其次是同核异质不育系与其保持系 , 最少相同位点的是同质异核不育系 , 材料间的差异最大。

2.4 4 套不育系和保持系的遗传关系分析

图 1 是应用 42 对 SSR 引物对 4 套水稻不育系与保持系的聚类分析结果。可以看出 , 在遗传距离为 0.22 处可以将它们分成 3 群 , 第 1 群包括华农 A 和华育 A 不育系及其保持系共 8 份材料 , 说明这两套材料间的亲缘关系最近。第 2 群包括 N9A、N10A 和 N11A 等 3 份科珍 2A 材料。第 3 群包括 N12A、N13A、N14A 和 N12.16B 等 4 份珍汕 97A 同核异质系。除 N5A 外 , 同一套同核异质系基本上都优先聚类在一起 , 说明这些材料彼此的遗传关系较近 , 核遗传背景接近。

3 讨论

通过应用随机分布于水稻 12 条染色体上的 42 对 SSR 引物对 15 份同核异质不育系和保持系的核基因组遗传多样性进行了检测 , 共扩增到 63 个等位基因 , 多态性位点百分率为 40.48% , 平均每个位点的等位基因数为 1.5 个 , 平均基因多样性为 0.18。已有的研究报道 , 每个 SSR 标记在栽培稻和野生稻中检测到 6.8 个等位基因^[16] , 平均每个 RFLP 探针在栽培稻中检测到 2.34 个等位基因^[15] , 平均每个同工酶位点在栽培稻中检测到 3.6 个等位基因^[17]。与此相比 , 本试验平均每个位点检测到的等位基因数偏少。朱作峰等^[18]用 SSR 标记比较了亚洲栽培稻和普通野生稻的遗传多样性 , 发现栽培稻和普通野生稻的平均基因多样性分别为 0.67 和 0.90。汤圣祥等^[19]对 4408 份中国栽培稻种资源 12 个位点的同工酶分析表明其平均基因多样性为 0.012 ~ 0.547。可以看出 , 本试验材料具有较低的遗传多样

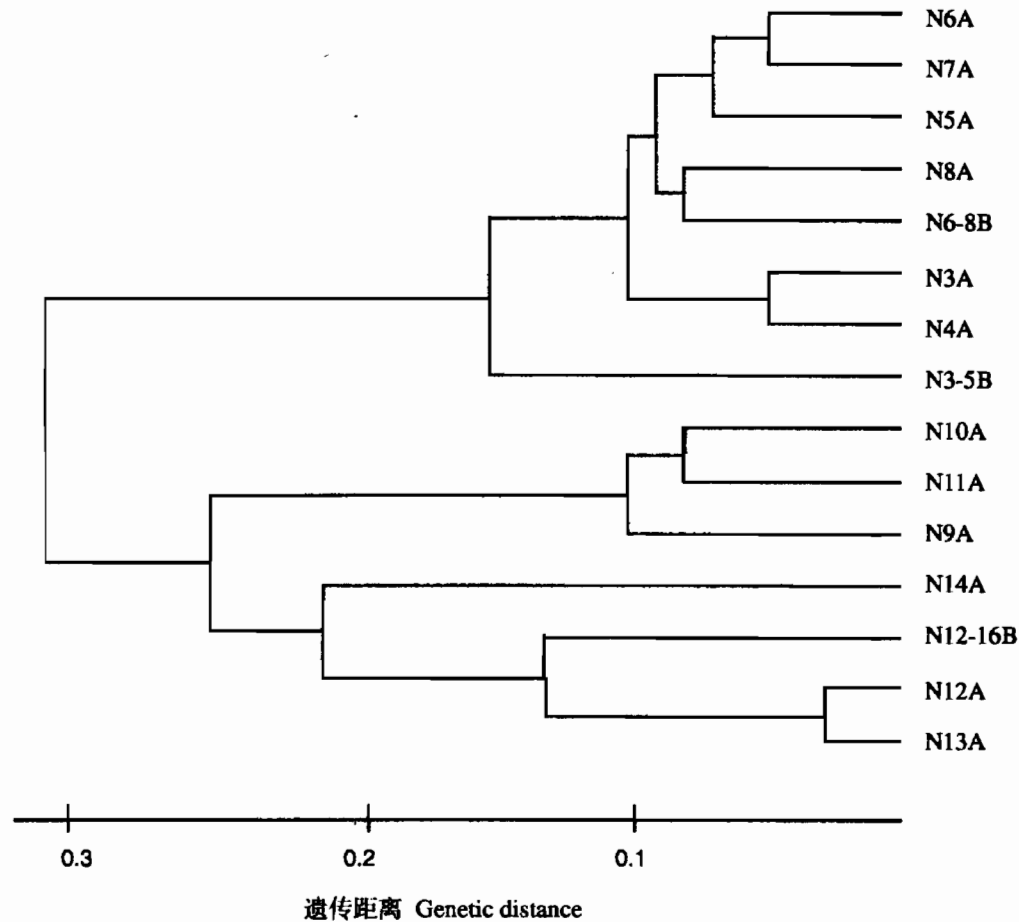


图1 4套水稻同核异质不育系与保持系的聚类分析

Fig. 1. Cluster analysis of the four sets of the isonuclear alloplasmic sterile lines and maintainer lines.

性,其原因一方面是由于3个保持系的差异较小,如华农B、华育B和科珍2B都有一个或多个共同的亲本;另一方面是由于它们分属于4套同核异质系,同一套材料均具有相类似的系谱,大部分材料均回交了17~33代,核基因组趋于接近。

水稻同核异质不育系一般均经过多代回交选育而成,理论上杂交稻成对的不育系和保持系之间只有育性差异,分子标记是几乎检测不到差异的。但从本实验的结果来看,同一套同核异质不育系间核基因组平均相同位点百分率达86.51%,最高的一套同核异质系间的相同位点百分率达90.48%,说明经过多代回交和人工选择具有较明显的效果。另一方面,虽然经过多代回交,4套同核异质不育系间平均差异位点百分率仍在13.49%。同核异质不育系与保持系间的平均差异位点百分率达22.22%。造成这个结果的原因比较复杂:1)可能与这些材料的选育系谱有关。在这些不育系的选育过程中,它们的回交亲本并不完全相同,如华农A的回交亲本包括建梅早、6964、粳慧、BⅡ44-5;华育A所用的回交亲本包括建梅早、6964、粳慧、BⅡ40;科珍2A不育系的回交亲本包括建梅早、二九矮4、科珍;珍汕97A不育系的回交亲本包括建梅早、珍汕97。而且

多个不育系最后一个轮回亲本的回交世代为5~6代,各个不育系的回交世代的多少也有所不同^[20]。因此它们的核基因组是比较复杂的。2)这些不育系和保持系是根据形态性状特别是育性表现来选育的,就有这样的可能:形态性状表现一致,而核基因组并不一定一致。另外由于整个水稻基因组包括大量基因位点,完全恢复为轮回亲本遗传背景的速度会较慢。其机理尚有待进一步阐明。若能在回交过程中结合分子标记辅助选择,则回交的效果会更好。

尽管多数供试材料具有相似的核基因组遗传背景,甚至是从同一骨干亲本转育而来,但SSR标记仍然可检测到一定水平的多态性,说明SSR标记可用于杂交水稻及其亲本的系谱分析鉴定。筛选在杂交水稻亲本材料间具有较高多态性的SSR引物,建立杂交水稻亲本的SSR指纹,可有效解决水稻雄性不育系、保持系及其杂交种的鉴别问题。

此外,本研究发现,4套水稻不育系和保持系彼此间的亲缘关系较近,其相似系数达70%以上。这与李云海等^[21]研究认为目前生产中应用面积达70%左右的水稻雄性不育系的遗传变异较小,其相似系数在0.81~0.96的研究结果是一致的。因此,从各种稻种资源中寻找并利用优良的新型胞质不育

系,并注意选育核基因组遗传多样性广泛的不育系,仍是当前三系杂交水稻选育的重要任务。

参考文献:

- [1] 曾千春,周开达,朱 祯,等.中国水稻杂种优势利用研究现状.中国水稻科学,2000,14(4):243-246.
- [2] 蔡善信.筛选水稻雄性不育细胞质研究初报.广东农业科学,1990(2):1-4.
- [3] 蔡善信.水稻雄性不育细胞质效应的研究.华南农业大学学报,1994,15(1):115-121.
- [4] 蔡善信.华南晚粳夜公细胞质(Y型)雄性不育系的选育.中国水稻科学,2002,16(2):185-188.
- [5] 蔡善信.水稻夜公细胞质雄性不育系 Y 华农 A 的选育和应用//杂交水稻产业化国际学术讨论会论文集.北京:中国农业出版社,2005:362-370.
- [6] 戴 捷,梅启明,刘小川,等.水稻农垦 58 同核异质雄性不育系的选育及其不育特性的研究.湖北农业科学,2003(3):14-16.
- [7] 汤述翥,孙 叶,张宏根,等.同核异质粳稻不育系特性比较.中国水稻科学,2005,19(6):521-526.
- [8] 占小登,曹立勇,翟虎渠,等.水稻同核异质广亲和不育系的选育及主要农艺性状分析.作物学报,2003,29(2):241-244.
- [9] 汤述翥,张亚东,孙红芹,等.水稻同核异质广亲和不育系细胞质效应的研究.作物学报,2003,29(2):202-207.
- [10] 闫芝芬,马春红,王立安,等.稻瘟病菌致病毒素对水稻珍汕 97 雄性不育细胞质酯酶同工酶的影响.河北农业科学,1999,3(4):1-4.
- [11] 刘光杰,占小登,沈君辉,等.水稻同核异质不育系材料对白背飞虱抗性的研究初报.中国水稻科学,2003,17(1):89-90.
- [12] 于永红,李云海,马荣荣,等.用微卫星 DNA 标记建立宁 2A 的指纹图谱.中国水稻科学,2001,15(3):215-217.
- [13] Zheng K L, Huang N, Bennett J, et al. PCR based marker assisted selection in rice breeding//IRRI Discussion Paper Series 12. Manila, Philippines:IRRI, 1995.
- [14] van de Peer Y. Treecon for Windows (version 1.3b). [2006-08-14]. <http://bioe.wvu.edu/~yvdp/treeconw.html>.
- [15] Sun C Q, Wang X K, Li Z C, et al. Comparison of the genetic diversity of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 157-162.
- [16] Ni J, Colowit P M, Mackill D J, et al. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers. *Crop Sci*, 2002, 42: 601-607.
- [17] Glaszmann J C. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor Appl Genet*, 1987, 74(1): 21-30.
- [18] 朱作峰,孙传清,付永彩,等.用 SSR 标记比较亚洲栽培稻与普通野生稻的遗传多样性.中国农业科学,2002,35(12):1437-1441.
- [19] 汤圣祥,江云珠,魏兴华,等.中国栽培稻同工酶的遗传多样性.作物学报,2002,28(2):203-207.
- [20] 蔡善信.水稻 Y 型细胞质雄性不育系 Y 华农 A 的选育.杂交水稻,2001(6):9-10.
- [21] 李云海,肖 晗,张庆春,等.用微卫星 DNA 标记检测中国主要杂交水稻.植物学报,1999,41(10):1061-1066.