

SSR 和 ISSR 标记技术应用进展

蒋彩虹, 王元英*, 孙玉合

(中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101)

摘要: 介绍了 SSR 和 ISSR 标记的原理和特点, 综述了这两种技术在种质遗传多样性、基因定位及分子标记辅助育种、遗传图构建及种子纯度和真伪鉴定等研究中的应用进展, 并提出了在烟草遗传育种中应用的建议。

关键词: SSR; ISSR; 分子标记; 烟草

中图分类号: S572.035

文献标识码: A

文章编号: 1007-5119 (2007) 02-0001-05

Application Advance of Molecular Marker Techniques of SSR and ISSR

JIANG Caihong, WANG Yuaning*, SUN Yuhe

(Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China)

Abstract: The principle and characteristics of the molecular marker techniques of SSR and ISSR were described. The advances in their application to various genetic and breeding studies, including genetic diversity analyses, fingering maps and purity control of cultivars, gene localization, and marker-assisted selection were reviewed. The potential application in tobacco was suggested.

Keywords: SSR; ISSR; molecular marker; tobacco

DNA 分子标记是 DNA 水平上的遗传多态性的直接反映, 是继形态学标记、细胞学标记及生化标记之后, 近年来广泛应用的一种新的遗传标记。它有许多优点: 直接以 DNA 作为研究对象, 在植物体各个组织、各个发育时期均可检测到; 标记数量极多, 遍及整个基因组; 多态性高, 自然存在着许多等位变异; 有许多分子标记表现为共显性, 能够鉴别出纯合基因型与杂合基因型, 提供完整的遗传信息^[1]。DNA 分子标记已广泛应用于种质资源研究、遗传图谱构建、目的基因定位、起源进化研究以及标记辅助育种等方面。目前常用的分子标记有 RFLP、AFLP、RAPD、SSR、ISSR 等。前两者操作较复杂, RAPD 稳定性和重复性较差。SSR 和 ISSR 与它们相比, 具有稳定可靠、操作简单等特点, 下面具体介绍 SSR 和 ISSR 技术及其应用进展。

1 SSR 和 ISSR 标记简介

1.1 SSR 标记

SSR 标记由 Moore 等于 1991 年创立, 是当今流行的分子标记技术之一。简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 又叫微卫星 (microsatellite), 主要是以 1~4 个核苷酸为基本单位的串联重复序列, 其长度大多在 100~200 bp。尽管 SSR 分布于基因组的不同位置, 但其两端多是保守的单拷贝序列, 因此可以根据两端的序列设计一对特异引物, 通过 PCR 技术将其扩增出来, 利用电泳分析技术获得其长度多态性, 即 SSR 标记^[2]。

1.1.1 SSR 的分布 SSR 广泛存在于真核生物基因组中, 少数原核生物基因组中也有^[3]。真核生物基因组中 SSR 的分布是随机的, 大约每隔 10~50 kb 就有 1 个 SSR。它既可以存在于内含子中, 又可存在于外显子中。在不同的生物体间, SSR 的数量、重复次数和单位、拷贝数变异及染色体分布等有着很大的差别^[4]。在真核生物基因组中, 二核苷酸微卫星序列最丰富, 三核苷酸微卫星的含量比二核苷酸微卫星序列大约低 10 倍, 而四核苷酸微卫星序

基金项目: 国家烟草专卖局资助项目 (110200601008)

作者简介: 蒋彩虹 (1972-), 女, 在读硕士研究生, 从事烟草遗传育种方面的研究。*通讯作者: E-mail:wyytob@126.com

收稿日期: 2007-04-06

列则相对较少^[5]。在植物基因组中 (AT)_n 最多^[6]。

1.1.2 SSR 标记的特点 SSR 标记的主要特点有:

(1) 数量丰富, 广泛分布于整个基因组; (2) 具有较多的等位性变异; (3) 共显性标记, 可鉴别出杂合子和纯合子; (4) 实验重复性好, 结果可靠^[2]。由于创建新的 SSR 标记时需知道重复序列两端的序列信息, 因此其开发有一定难度, 费用也较高。SSR 标记在引物开发阶段需要投入大量人力物力, 但引物开发一旦成功, 只需利用商品化的 SSR 引物进行 PCR 扩增, 即可获得丰富的 DNA 多态性^[7]。

1.2 ISSR 标记

ISSR 标记 (inter-simple sequence repeats) 是由 Zietkiewicz 等提出的一种标记技术^[8], 采用 17~22 碱基的重复锚定引物扩增重复序列之间的片段。ISSR 标记使用比 RAPD 引物更长的引物, 克服了 RAPD 标记稳定性和重复性差等缺点, 操作简单, 重复性好, 多态性丰富。目前, ISSR 标记技术已被广泛应用于品种鉴定、多样性分析、指纹图谱的构建等研究中。

ISSR 与 SSR 相比, 能检测出更多的多态性, 且 1 套 ISSR 引物可在多种作物中通用, 利用率高, 在遗传关系研究方面的应用前景更广阔。

2 SSR 和 ISSR 的应用进展

2.1 在遗传多样性研究中的应用

采用快捷可靠的方法对作物种质资源进行遗传多样性分析, 确定其遗传距离, 弄清其亲缘关系对于种质资源的充分利用、遗传学研究及育种实践均有重要意义。利用系谱分析、地理来源及有限的表型鉴定数据, 难以将大量的品种资源区别开来。SSR 和 ISSR 标记具有丰富的等位变异, 实验结果稳定可靠, 非常适合遗传多样性研究。

Rongwen 等用 SSR 标记技术对 96 种大豆基因型进行聚类分析, 并将其结果与 RFLP 标记法比较, 表明 SSR 标记比 RFLP 标记多态性高, 非常适合于大豆遗传特性分析^[9]。Maughan 等用 5 对 SSR 引物在 94 个大豆品种中检测到 79 个等位位点^[10]。Doldi 等用 12 对 SSR 引物成功地对 18 种大豆基因型作了系谱分析^[11]。任小俊等对晋豆 23 与灰布支黑豆的

F₃ 代群体共 61 个单株进行了 ISSR 分析, 共检测出 376 个基因位点, 多态性位点 82 个^[12]。

杨本超等利用 ISSR 标记分析了 24 份代表性烤烟种质的遗传多样性。从 100 个 ISSR 引物中筛选出 10 个引物, 利用其中 2 个多态性好的 ISSR 引物将这 24 份材料分开, 每个品种都有各自独特的指纹图谱, 表明 ISSR 标记适于烟草品种鉴定和遗传多样性研究^[13]。Nunome 等评估了 SSR 标记在茄科植物中的应用潜力, 设计了 37 对引物, 其中 23 对扩出 1 条或几条带^[14]。Hayes 等定位了 *Melongena spp.* 的 8 个 SSR, 确定了佛罗里达州和阿拉巴马州的所有已知的 20 个种群的约 500 个体的基因型, 每个位点有 8~28 个高水平的等位变异, 且每位点的杂合性在 0.148~0.799 (平均 0.624)^[15]。郑景生等应用 SSR 标记分析了 18 份野生稻不同基因组材料的遗传多样性, 将其分为 3 大组, 同组内的野生稻亲缘较近, 不同组间的亲缘较远^[16]。李云峰等从 88 对平均分布于水稻 12 条染色体的 SSR 引物中筛选出 24 对用于 33 份美国稻和 13 份中国稻的多态性分析, 24 对引物共检测到 189 条带, 其中多态性带 177 条^[17]。刘希慧等用 SSR 标记对 12 个玉米自交系进行遗传多样性分析, 划分了杂种优势群。在 SSR 分析中, 选用 107 对基本均匀分布在玉米 10 条染色体上的扩增带清晰且具有多态性的 SSR 引物, 在供试材料中共检出 419 个等位基因变异, 平均每个引物检出 3.9 个等位基因。用 SSR 标记划分杂种优势群与自交系系谱关系基本一致^[18]。

2.2 在基因定位及分子标记辅助育种中的应用

目标基因的分子标记按其利用的群体主要分为两种: 一是近等基因系法 (near isogenic lines, NIL), 利用仅在目标性状上有差异的近等基因系作为分子标记的群体; 二是分离群体分组分析法 (bulked segregant analysis, BSA), 选择表型性状具有差异的 1 对亲本进行杂交, F₁ 自交获得性状分离的 F₂ 群体, 按目标基因的表型或基因型分别在 2 个分离群体中选取一定数量的单株, 分别抽提 DNA 并等量混合, 两池内除目的基因所在的 DNA 片段有差异外其余基本相同, 因此, 分析两个池内 DNA 的多态性差异即可迅速获得与目的基因连锁的标

记^[19-20]。分子标记辅助选择 (MAS) 是现代分子生物学与传统育种学的结合, 借助与目的基因紧密连锁的分子标记, 对育种材料从 DNA 水平上进行选择, 从而避免了依赖于表型性状的表现间接推断其基因型, 缩短了育种年限, 提高了育种效率。

Orf 等研究了 400 多个 RFLP 和 SSR 标记与大豆植株高度、倒伏、开花期、生殖期、成熟期、产量、种子重量、种子含油量等数量性状之间的关系, 分析了部分主效基因的影响^[21]。许占友等用 2 个大豆不育系和 5 个恢复系的核基因组为模版, 从 60 对 SSR 核心引物中筛选出多态性高的引物, 来标记与恢复基因有关的 3 个等位位点, 经 F₂ 分离群体分析, *satt441* 与恢复基因的遗传连锁距离为 9.2 cM^[22]。蒙忻等选用在大豆 G 连锁群上与 *rhg-R4g1* 抗性座位相距 2.0 cM 的 SSR 标记 *Satt 610* 及在 A 连锁群上与 *rhgR4a2* 抗性座位相距 0.2 cM 的 SSR 标记 *Sat_162*, 对供试的 41 份大豆资源进行 PCR 检测。结果表明, 7 份高抗 SCN4 号生理小种的大豆抗源具有 *Sat_162* 和 *Satt610* 标记的特征带谱, 这初步表明 *Sat_162* 和 *Satt610* 标记可用于大豆抗 SCN 性状的辅助鉴定^[23]。

袁有禄用 221 对 SSR 引物、1 840 个 RAPD 引物和 77 个 ISSR 引物对棉花亲本和纤维强度、麦克隆值和长度极值库筛选后得到了 15 个标记, 其中 12 个标记分成了 3 个连锁群, 并检测到一个高强纤维的主效 QTLs^[24]。柳李旺等用棉花胞质雄性不育恢复系 0-613-2R 与转 Bt 基因抗虫棉 R019 杂交、回交产生 BC₂ 群体。利用 CMS 恢复基因 *Rf1* 紧密连锁的 3 个 SSR 标记和 Bt 基因的 PCR 标记开展分子标记辅助选择培育聚合有 *Rf1* 和 Bt 的转基因抗虫棉恢复系。综合标记分析结果, 共获得 54 个同时具有 *Rf1* 和 Bt 基因的聚合单株。这些单株自交后, 通过标记辅助选择, 获得 10 株含 Bt 基因且 *Rf1* 纯合的单株, 为棉花优良恢复系的快速培育奠定了基础^[25]。朱美霞等应用 BSA 法, 获得了 1 个与控制棉酚腺体有无性状连锁的 SSR 标记, 两者相距 2.4 cM^[26]。

黄朝锋利用 2 个 SSR 标记和一个 STS 标记将水稻抗稻瘰蚊基因 *Gm6* 初定位在第 4 染色体的长臂上, 同时, 他选择第 4 号染色体上具有多态性的

SSR 标记对抗褐飞虱基因 *Bph3* 进行分子定位, 发现两个标记 *RM261* 和 *RM119* 与 *Bph3* 的遗传距离均为 8.0 cM。在这两标记之间的区域内发展特异 SSR 标记, 两个新发展的 SSR 标记 *PSM323* 和 *PSM194* 与 *Bph3* 基因的遗传距离分别为 8.0 cM 和 3.8 cM。因而该基因被定位在第 4 染色体长臂上 *PSM323* 和 *PSM194* 两标记之间^[27]。朱文银利用 74 个 SSR 标记对杂种 F₂ 群体进行偏态分离标记的筛选, 同时根据 F₂ 和 F₃ 群体花粉育性和具有偏态分离的 SSR 标记之间的连锁关系, 对特异亲和基因 (F₁ 花粉不育基因) *S-e* 座位进行了分子定位^[28]。陈志伟等根据已报道的两侧连锁标记并利用已公布的水稻基因组序列信息, 在广谱抗稻瘟病基因 *Pi-2(t)* 的附近找到了 1 个新的 SSR 标记, 记为 *SRM24*, 估计它与 *Pi-2(t)* 间的距离大约只有 0.5 cM 或 43 kb。利用该标记, 成功地将 *Pi-2(t)* 从供体材料 5173 导入到迄今广泛使用的雄性不育保持系珍汕 97 B 中, 获得了 1 批带有 *Pi-2(t)* 的珍汕 97 B 近等基因系^[29]。

刘保申等对小麦 K 型恢复系进行 SSR 分析发现, 恢复系 LK783 的育性基因与 SSR 标记 *Xgwm11*、*Xrwm18*、*Xgwm273* 的遗传距离为 6.54±4.37 cM, 与 *Xgwm264a* 的遗传距离为 5.71±4.10 cM, 利用染色体缺体进一步将这 4 个 SSR 位点定位于 1BS, 但在 1BS 上的相对位置与 *Rfv1* 不同^[30]。张萃等以 T 型细胞质雄性不育系 75-3369A×恢复系 7269-10 的 F₂ 群体作为育性调查和基因定位群体, 通过育性分析, 确定该恢复系含有 2 个主效恢复基因; 结合群分法, 对恢复基因进行了 SSR 标记定位, 在 230 对 SSR 引物中, *Xgwm136* 和 *Xgwm550* 分别与 2 个主效恢复基因连锁。这 2 个标记与 *Rf* 基因之间的距离分别为 6.7 cM 和 5.1cM, 从而将该恢复基因定位在 1AS、1BS 染色体上^[31]。曹双河等对通过多年鉴定发现的一个优良的光温敏核雄性不育小麦品系农大 3338 运用 SSR 和 ISSR 两种标记对其光温敏核雄性不育基因进行了定位, 检测到了 2 个光温敏核雄性不育基因座位, 并分别命名为 *ptms1* 和 *ptms2*, 其中 *ptms1* 的基因效应是 *ptms2* 的 2~3 倍^[32]。

2.3 在遗传图构建及种子纯度和真伪鉴定等研究中的应用

遗传图谱是通过遗传重组所得到的基因线性排列图^[33]。它是基因组研究的基础,反映了遗传标记与少数功能基因之间的相对关系,是开展重要性状基因位点分析的基础。由于 SSR 标记具有共显性,多态率高且位点稳定等特点,在图谱的构建上一般作为锚定标记,有助于图谱连锁群或染色体的归并和不同连锁群的整合^[3]。

Akkaya 等通过大豆近等基因系杂交得到的 F₂ 代 60 个单株,用 40 个 SSR 标记对这个分离群体进行研究,有 34 个 SSR 标记定位于 29 个连锁群中的 18 个上,同 13 个传统性状中的 9 个性状,7 个同工酶座位中的 2 个连锁^[34]。Mansur 等通过 2 个栽培大豆 Minsoy 与 Noirl 杂交得到了 284 个 F₇ 代的重组自交系单株,用 45 个 SSR 标记对其中的 223 个单株进行分析,添加了其中 22 个 SSR 标记于图谱上^[35]。2004 年, Song 等报道了一张新的大豆“公共图谱”,他们利用 BAC(Bacterial Artificial Chromosome)文库及原有 SSR、RFLP 标记在这些区间发展新的 SSR 标记,并报道了新的 SSR 的创制和新图谱的构建。共有 391 个 SSR 标记是从大豆的基因组文库发展来的,有 24 个来自 GenBank 中已有的基因或 ESTs (expressed sequence tags), 5 个来自 BAC 末端序列^[36]。

SSR 标记在绘制水稻 DNA 指纹进行品种鉴定方面有较多的应用。Akagi 等用 SSR 标记对亲缘关系较近的 59 个粳稻栽培品种进行了 DNA 指纹鉴定^[37]。彭锁堂等用引物 RM17 对杂交稻组合汕优 63 和两优培九进行了 SSR 鉴定,所测纯度分别为 96.0%和 98.0%,与田间纯度 96.2%和 97.2%非常接近^[38]。李进波等利用 SSR 标记对两系杂交稻两优培胜的种子纯度进行了鉴定,结果与田间种植鉴定结果完全吻合^[39]。曾大力等对湖北省某公证处封存的 2 份杂交稻材料进行了真伪鉴定,使用的 42 个 SSR 标记中有 5 个标记有多态性,结果显示送检的 2 份材料在 SSR 指纹上差异明显^[40]。

3 结 语

SSR 和 ISSR 标记技术发展至今, SSR 和 ISSR 标记技术发展至今,已经是十分成熟的标记技术。实践证明,它们可以被应用于许多研究领域,是

可靠高效的标记技术。烟草是一种重要的模式植物和经济作物,但对其进行分子标记的研究还不多,目前在烟草研究中应用较多的分子标记是 RFLP 和 RAPD,有关 SSR 和 ISSR 应用于烟草研究的报道很少。烟草的已知序列较少,开发 SSR 引物困难,我们可以从已知的 ESTS 序列中寻找 EST-SSRS,也可以尝试使用近缘茄科作物(如茄子、番茄、辣椒等)的 SSR 引物。ISSR 标记使用的是随机引物,通用性好,将其应用于烟草研究前景应该很好。我们应该积极拓宽 DNA 分子标记技术在烟草研究上的应用种类和深度,特别是在烟草种质资源遗传多样性研究和抗病遗传育种研究等方面,借鉴分子标记在其他作物上应用的成功经验,促进烟草研究的进步。

参考文献

- [1] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29 (4): 1-10.
- [2] 陈考科, 黄少伟. 桉树的分子标记技术及遗传图谱构建进展[J]. 分子植物育种, 2005, 3 (2): 255-260.
- [3] 梁慧珍, 王珍, 李卫东. 微卫星序列的长度多态性及在大豆研究中的应用[J]. 分子植物育种, 2004, 2 (5): 721-727.
- [4] 朱宏波, 方宣钧, 杨仁崔. 利用水稻基因组序列数据开发 SSR 标记的方法[J]. 分子植物育种, 2003, 1 (2): 273-276.
- [5] Ma Z Q, Roeder M, Sorrells M E. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetranucleotide microsatellites in wheat[J]. Genome, 1996, 39: 123-130.
- [6] 方宣钧, 宛煜嵩, 程大新, 等. 应县小黑豆对大豆孢囊线虫 4 号生理小种抗性的遗传分析[J]. 中国农学通报, 2001, 17 (6): 12-15.
- [7] 李进波, 江良荣, 李春海, 等. 水稻光温敏核不育系的 ISSR 和 SSR 遗传分析比较[J]. 分子植物育种, 2003, 1 (1): 42-47.
- [8] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [9] Rongwen J, Akkaya M S, Bhagwat A A, et al. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification[J]. Theor. Appl. Genet., 1995, 90 (1): 43-48.
- [10] Maughan P J, Saghai Maroof M A, Buss G R.

- Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean[J].*Genome*, 1995, 138: 715-723.
- [11] Doldi, M L, Vollmann J, Lelley L. Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis[J]. *Plant Breeding*, 1997, 116(4): 331-335.
- [12] 任小俊, 马俊奎, 章彦, 等. 应用 ISSR 标记分析灰布支黑豆与晋豆 23 的 F₃ 群体的遗传多样性[J]. *分子植物育种*, 2003, 1 (5/6): 629-632.
- [13] 杨本超, 肖炳光, 陈学军, 等. 基于 ISSR 标记的烤烟种质遗传多样性研究[J]. *遗传*, 2005, 27 (5): 753-758.
- [14] Nunome T, Suwabe K, Iketani H, et al. Identification and characterization of microsatellites in eggplant[J]. *Plant Breeding*, 2003, 122: 256-262.
- [15] Hayes K A, Karl S A. Characterization of microsatellite markers from the gastropod genus *Melongena*[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(4): 755-757.
- [16] 李义珍, 符文英, 陈良兵, 等. 野生稻不同基因组的 SSR 多样性分析[J]. *分子植物育种*, 2004, 2 (1): 25-33.
- [17] 李云峰, 钟秉强, 杨正林, 等. 中国稻与美国稻的 SSR 标记多态性分析[J]. *分子植物育种*, 2004, 2 (6): 801-806.
- [18] 刘希慧, 刘文欣, 张义荣, 等. 利用 SSR 分子标记鉴定若干玉米自交系的亲缘关系[J]. *分子植物育种*, 2005, 3 (2): 179-187.
- [19] 易小平, 朱祯, 周开达, 等. 水稻抗性基因定位及相关分子标记研究进展[J]. *生物工程进展*, 1998, 18 (5): 40-44.
- [20] 胡会庆, 李子银. 分子标记在植物遗传研究中的应用进展[J]. *生物学杂志*, 1997, 14 (6): 32-34.
- [21] Orf J H, Chase K, Jarvik T, et al. Genetics of soybean agronomic traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations[J]. *Crop Sci.*, 1999, 39: 1642-1651.
- [22] 许占友, 邱丽娟, 常汝镇, 等. 利用 SSR 标记鉴定大豆种质[J]. *中国农业科学*, 1999, 32 (增刊): 40-48.
- [23] 蒙忻, 刘学义, 方宣钧. 利用大豆分子连锁图定位大豆孢囊线虫 4 号生理小种抗性 QTL[J]. *分子植物育种*, 2003, 1 (1): 6-21.
- [24] 袁有禄. 棉花优质纤维特性的遗传及分子标记研究[D]. 南京农业大学, 博士学位论文, 2000.
- [25] 柳李旺, 朱协飞, 郭旺珍, 等. 分子标记辅助选择聚合棉花 Rf1 育性恢复基因和抗虫 Bt 基因[J]. *分子植物育种*, 2003, 1 (1): 48-52.
- [26] 朱美霞, 李永起, 戴小枫. 棉酚腺体和棉酚含量的遗传分析及 SSR 标记[J]. *分子植物育种*, 2004, 2 (2): 235-239.
- [27] 黄朝锋. 水稻 PSM 标记的发展及抗虫基因的分子定位[D]. 华南农业大学, 硕士学位论文.
- [28] 朱文银. 水稻特异亲和基因 S-e 的分子定位[D]. 华南农业大学, 硕士学位论文.
- [29] 陈志伟, 官华忠, 吴为人, 等. 抗稻瘟病基因 Pi-2 (t) 紧密连锁的 SSR 标记的筛选与应用[J]. *分子植物育种*, 2004, 2 (3): 321-325.
- [30] Liu B S, Sun Q X, Sun L Z, et al. RAPD and ISSR markers of fertility restoring gene for *Aegilops kotschy* cytoplasmic male sterility in wheat [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(4): 446-450.
- [31] 张萃, 王宏英, 沈银柱, 等. 用微卫星标记定位小麦 T 型 CMS 的恢复基因[J]. *遗传学报*, 2003, 30 (5): 459-464.
- [32] 曹双河, 刘立科, 刘冬成, 等. 小麦光温敏核雄性不育基因的初步定位[J]. *遗传学报*, 2004, 31 (3): 293-298.
- [33] 刘树兵, 王洪刚, 孔令让, 等. 高等植物的遗传作图[J]. *山东大学学报 (自然科学版)*, 1999, 30 (1): 73-78.
- [34] Akkaya M S. Integration of simple sequence repeat (SSR) DNA markers into a soybean linkage map[J]. *Crop Sci.*, 1995, 35: 1439-1445.
- [35] Mansur L M, Orf J H, Chase K, et al. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean [J]. *Crop Sci.*, 1996, 36: 1327-1336.
- [36] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C, Lark K G, Concibido V C, Delannay X, Specht J E, Cregan P B. A new integrated genetic linkage map of the soybean [J]. *Theor. Appl.*, 2004, 109: 122-128.
- [37] Akagi H. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 94 (1): 61-67.
- [38] 彭锁堂, 庄杰云, 颜启传, 等. 我国主要杂交水稻组合及其亲本 SSR 标记和纯度鉴定[J]. *中国水稻科学*, 2003, 17 (1): 1-5.
- [39] 李进波, 江良荣, 李春海, 等. 利用微卫星标记鉴定两系杂交稻两优培胜的种子纯度[J]. *中国农学通报*, 2002, 18 (6): 10-13.
- [40] 曾大力, 钱前, 何平, 等. 利用分子生物学技术鉴别真假杂交稻的研究[J]. *中国农业科学*, 1999, 32(2): 93-96.