

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01584

一个新的水稻花粉半不育性位点的定位分析

曾 波¹ 李 敏¹ 杨祖荣² 谭陈菊¹ 董华林¹ 余四斌^{1,*}

¹ 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430070; ² 湖北省种子集团公司, 湖北武汉 430070

摘 要: 利用一套以籼稻珍汕 97B 为背景的粳稻日本晴染色体片段代换系, 鉴定发现 1 个半不育的代换系。全基因组基因型分析表明, 该代换系仅含 3 个粳稻导入片段, 而其他遗传背景与珍汕 97B 相同。在湖北武汉和海南分别种植其衍生的 F₂ 和 F₃ 分离群体, 采用单标记分析和区间作图法分析花粉育性和小穗育性的数量性状位点(QTL), 结果表明, 该代换系的半不育性是第 2 染色体上的粳稻导入片段引起的, 该片段 RM262~RM475 区间存在 1 个新的影响花粉育性的 QTL, 其贡献率为 13.9%。研究结果将为进一步精细定位水稻育性 QTL 以及鉴定相关功能基因提供重要的试验基础。

关键词: 染色体片段代换系; 花粉不育; QTL; 水稻

Mapping of a Novel Semi-Sterile Pollen QTL in Rice

ZENG Bo¹, LI Min¹, YANG Zu-Yong², TAN Chen-Ju¹, DONG Hua-Lin¹, and YU Si-Bin^{1,*}

¹ College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ² Hubei Seed Group Company, Wuhan 430070, China

Abstract: Hybrid sterility has been an obstacle in utilization of potential heterosis in inter-subspecific hybrids of *indica* and *japonica*. In order to understand the genetic basis of pollen sterility of *indica-japonica* hybrid, we identified a line (IL37) with semi-sterility from a set of chromosomal segment substitution lines, of which each contained a single or few substitution segments from a *japonica* variety Nipponbare in the genetic background of *indica* variety Zhenshan 97B. The graphical genotype analysis of the line (IL37) by using 160 polymorphic SSR revealed that there were three chromosomal segments from the *japonica* with the similar genetic background of Zhenshan 97B. Its derived F₂ and F₃ segregation populations were planted respectively in Wuhan and Hainan, and evaluated for quantitative trait loci (QTLs) conferring pollen fertility and spikelet fertility via single-marker analysis and interval mapping. One new QTL of pollen sterility was detected at the interval RM262–RM475 on chromosome 2, explaining the phenotypic variation of 13.9%. The results suggest that *japonica* substitution segment carrying the QTL is a major cause of the semi-sterility in IL37. Further fine mapping and identification of candidate genes in the QTL region would facilitate a better understanding of the genetic basis of pollen sterility in rice.

Keywords: Chromosomal segment substitution line; Pollen semi-sterility; Quantitative trait loci; Rice (*Oryza sativa* L.)

杂种不育是种间和亚种间生殖隔离最为普遍的一种现象^[1-2]。水稻籼粳亚种存在的杂种优势, 为水稻增产提供了巨大的潜力。然而, 水稻亚种间杂种往往存在着部分或完全的不育性, 已成为亚种间基因转移或杂种优势利用的主要障碍。因此, 定位和克隆水稻育性相关基因, 研究它们的功能, 对克服亚种间杂种育性障碍具有重要的理论和实践意义。

花粉育性的下降, 是造成水稻结实率下降的主要原因^[3]。目前, 在粳稻与非洲栽培稻、栽培稻与野生稻等构建的遗传群体已定位了 44 个花粉育性相关

的数量性状基因位点(quantitative trait locus, QTL) (http://www.gramene.org/db/qtl/qtl_display), 分布于水稻 12 条染色体的 29 个区域。近年来, 随着高密度分子标记的发展, 许多与水稻花粉成熟、花粉萌发以及花粉与胚囊识别等育性基因被精细定位或克隆^[4-13]。这些结果为深入研究水稻育性的分子遗传机理奠定了基础。如水稻第 1 染色体着丝粒附近的隐性不育基因 *ms91(t)* 控制着花粉的发育^[11], 能使正常植株不产生花粉粒; 第 8 染色体上的花粉育性基因 *pss1* 使植株表现为雌配子正常但花药瘦小、花粉育性和结

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10Z151)和高等学校博士学科点专项科研基金(20050504001)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 余四斌, E-mail: ysb@mail.hzau.edu.cn

Received(收稿日期): 2009-02-25; Accepted(接受日期): 2009-05-05.

实率表现为典型的半不育^[12]; 而 $S33(t)$ 和 $S34(t)$ 主要影响杂种的花粉育性和花粉萌发率^[13]。最近, Chen 等^[14]成功地克隆了第 6 染色体上控制胚囊育性的基因 $S5$ 。它具有 3 种等位基因, 分别存在于籼稻($S5-i$)、粳稻($S5-j$)和广亲和品种中($S5-n$); $S5-i$ 和 $S5-j$ 仅有两个碱基的差别, 引起编码氨基酸的替换; 而广亲和品种的 $S5-n$ 则在其编码蛋白的 N 末端有大片段缺失, 造成该蛋白的亚细胞定位的改变, 可能导致其功能丧失。但这些等位基因如何相互作用控制杂种育性, 并不完全清楚。

我们在粳稻(日本晴)片段导入籼稻珍汕 97B 的代换系群体中发现 1 个稳定表现的半不育株系。本实验利用该代换系及其衍生的 F_2 和 F_3 分离群体, 验证并检测粳稻片段影响花粉育性的一个新位点。

1 材料与方法

1.1 材料

以测序粳稻品种日本晴为供体亲本, 籼型保持系珍汕 97B 为轮回亲本, 通过连续回交构建一套以珍汕 97B 为背景的日本晴染色体片段代换系^[15]。2005 年在武汉种植该代换系群体, 田间鉴定发现一份结实率明显下降的株系(编号为 IL37), 并与珍汕 97B 正反交, 获得相应杂种 F_1 。2006 年湖北武汉正季种植 IL37 及其衍生的 F_2 ; 从 F_2 群体中利用分子标记辅助选择目标区段杂合的 1 个单株, 套袋收获种子, 即为衍生 F_3 群体。2007 年海南陵水种植 IL37、正反交 F_1 及衍生的 F_3 群体。亲本、IL37 及 F_1 各种植 30 个单株; F_2 和 F_3 群体分别种植 100 和 150 个单株用于表型验证及 QTL 定位。

1.2 育性调查

在抽穗期, 选取单株已完全抽出的 3 个穗子, 每穗取中上部成熟未开颖花, 置于乙醇: 冰乙酸(3:1)的固定液中, 4℃冰箱保存。镜检时, 取出 6 朵颖花的花药混合捣碎, 用 1% I_2 -KI 溶液染色, 普通光学显微镜 10 倍目镜下观察花粉育性。每个样本观察 3 个视野, 观察花粉粒不少于 200 个。根据花粉染色及形态, 染色深、饱满、圆形花粉粒为可育花粉, 不染或染色浅、皱缩和空瘪的畸形花粉粒为不育花粉^[16], 用可育花粉的百分率表示花粉育性。成熟时考察各单株的自然结实率, 作为小穗育性。

1.3 SSR 标记检测与连锁图的构建

采集亲本、代换系及群体单株的苗期叶片 1~2 cm, 分别放入 1.5 mL 离心管中并编号。采用 CTAB

法^[17]提取 DNA。依据 McCouch 等^[18]发表的水稻简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记连锁图谱, 选择覆盖水稻全基因组的 572 对 SSR 筛选珍汕 97B 和日本晴之间的多态性。SSR 引物序列信息来自 <http://www.gramene.org/microsat/>, 由上海英骏生物工程有限公司合成。用双亲间具有多态性的引物进行代换系全基因组扫描及 F_2 和 F_3 群体的基因型分析。珍汕 97B 带型记为“A”, 日本晴带型记为“B”, 杂合带型记为“H”。利用 MapMaker Version 3.0 软件^[19]建立分子标记连锁图谱。

用 20 μ L PCR 扩增反应体系, 含 150 nmol 的引物、250 mmol L⁻¹ dNTPs、10×PCR buffer (20 mmol L⁻¹ Tris、50 mmol L⁻¹ KCl、2.5 mmol L⁻¹ MgCl₂、0.1 mmol L⁻¹ EDTA、1 mmol L⁻¹ DTT、50% glycerol)、约 20 ng 的模板 DNA、1 U 的 *Taq* DNA 聚合酶。反应程序为 94℃ 4 min, 33 次循环(94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 50 s), 72℃ 5 min。PCR 反应在 PTC-100 热循环仪中进行。扩增产物经 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及银染后进行带型分析^[20]。

1.4 数据分析

单因素方差分析和数据反正弦转换在 Microsoft Excel 中完成。双因素方差分析在 Statistica5.5 软件中完成^[21]。采用 QTLmapper 2.0 区间作图定位花粉育性 QTL^[22]。以 LOD 值 2.0 作为阈值检测可能存在的 QTL, 若标记区间 LOD 值>2.0, 则认为该区间 LOD 值最高处对应的位点为该性状的 QTL。QTL 的命名原则遵循 McCouch (1997)的方法^[23]。

2 结果与分析

2.1 代换系的基因型和育性表现

双亲间(珍汕 97B 和日本晴)检测到 170 对多态性标记, 多态性比例为 29.7%。从中挑选均匀覆盖水稻 12 条染色体的 160 对标记, 进行代换系 IL37 的基因型分析, 结果表明, 该代换系仅在第 1 和第 2 染色体上存在日本晴导入片段, 其他基因组(背景)与珍汕 97B 完全相同。第 1 染色体 RM283 附近的导入片段约 5 cM, 第 2 染色体上的 RM475 区段约 12 cM, RM525 区段约 24 cM (图 1)。3 个导入片段的遗传长度约占整个基因组的 2.3%。

代换系(IL37)的花粉育性和小穗育性均表现为半不育(表 1 和图 2), 而其他农艺性状与珍汕 97B 基本一致。IL37 在海南的平均株高为 77 cm, 抽穗期为 75 d, 珍汕 97B 的平均株高 83 cm, 抽穗期 74 d。

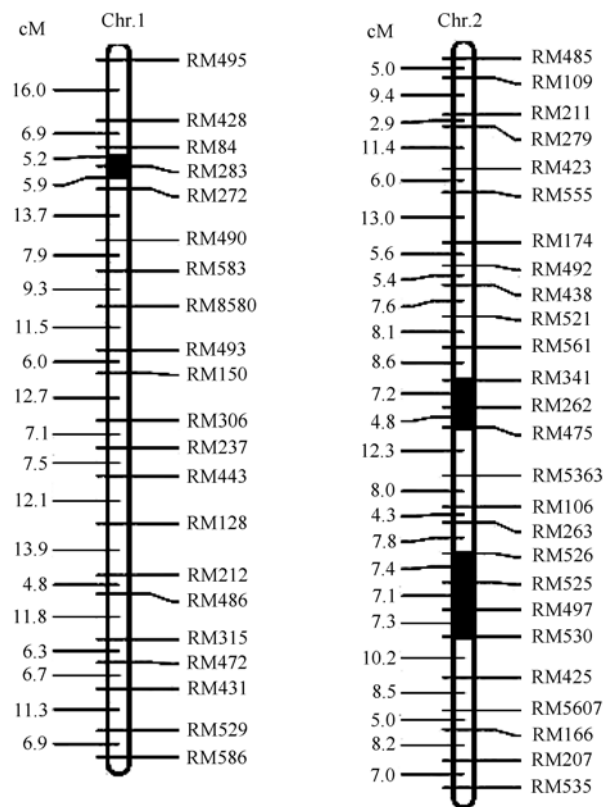


图 1 代换系 IL37 的导入片段的图示基因型(显示染色体 1 和 2 上的 3 个日本晴导入片段)

Fig. 1 Graphical genotype of IL 37 showing three introgression segments on chromosome 1 and 2

表 1 还显示,正反交杂种 F_1 的小穗育性均比 IL37 显著提高,但正反交杂种间存在一定差异,以珍汕 97B 为父本的杂种育性显著低于以 IL37 为父本的杂种。结合图示基因型分析(图 1)可以推断,IL37 中 3 个导入片段上可能存在影响花粉和小穗育性的 QTL。

2.2 导入片段遗传效应的验证与分析

针对 F_2 群体,单标记方差分析结果表明,第 2 染色体上 2 个导入片段(RM475 和 RM525 区段)对花粉育性具有显著效应,RM475 区段对小穗育性可能

有一定效应($P = 0.07$);而第 1 染色体上 RM283 标记区段对花粉和小穗育性均没有显著作用(表 2)。说明 IL37 的半不育性主要是第 2 染色体上的 RM475 或 RM525 标记片段(或基因)引起的。

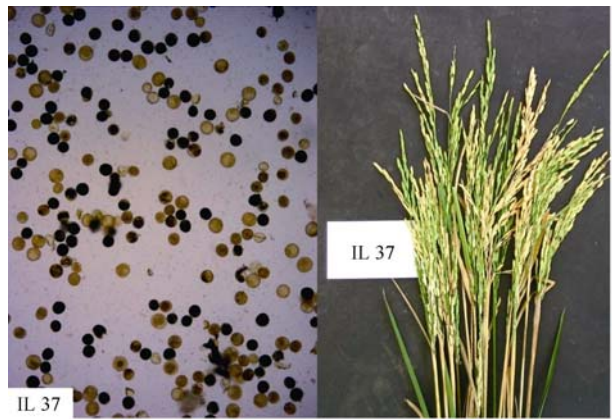


图 2 代换系 IL37 的花粉碘染和小穗结实情况

Fig. 2 Pollens stained with I_2 -KI and seed setting in panicles of the chromosome segment substitution line (IL37)

选择 F_2 群体中第 2 染色体目标区段(RM475 和 RM525)均为杂合,而第 1 染色体上不含导入片段的单株衍生出 F_3 群体。图 3 显示, F_3 群体的平均花粉育性和小穗育性均出现可育与不育的分离,但呈连续分布,表现出数量性状的遗传特点。对第 2 染色体上 2 个导入片段的 14 个相关标记位点作方差分析,结果表明,只有标记位点 RM262、RM475 和 RM525 极显著或显著地影响 F_3 群体的花粉育性和小穗育性(表 2),从而验证了 IL37 的花粉育性或小穗育性是第 2 染色体上的导入片段(或基因)引起的。

2.3 花粉育性的 QTL 定位

表 3 列出了利用 F_3 群体检测到的 1 个影响花粉育性的 QTL ($qPS2$)。它位于 RM262~RM475 区间,解释的表型变异为 13.9%。在该 QTL 上,杂合基因型的花粉育性与珍汕 97B 纯合基因型无显著差异,但

表 1 亲本、IL37 及正反交 F_1 代的花粉育性和小穗育性(海南)

Table 1 Pollen and spikelet fertility of parents, IL37 and reciprocal F_1 in Hainan

株系 Line	花粉育性 Pollen fertility (%) ^{a)}	小穗育性 Spikelet fertility (%)
珍汕 97B Zhenshan 97B	92.5±3.7	92.1±5.1
日本晴 Nipponbare	90.3±4.1	91.2±4.7
IL37	57.9±9.1	27.9±6.2
IL37/珍汕 97B IL37/Zhenshan 97B	未调查 Data not available	64.2±4.8
珍汕 97B/IL37 Zhenshan 97B/IL37	未调查 Data not available	78.2±10.8

^{a)} 平均数±标准差,每份材料调查 30 株。
^{a)} Mean ± SD measured from thirty individuals per line.

表 2 单标记分析导入片段对花粉和小穗育性的影响(湖北武汉和海南陵水)
Table 2 Single-marker analysis of introgressed segments on pollen and spikelet fertility (in Wuhan and Hainan)

性状 Trait	标记 Marker	染色体 Chr.	湖北武汉 F ₂ F ₂ in Wuhan			海南 F ₃ F ₃ in Hainan		
			均方 MS	F 值 F-value	P 值 P-value	均方 MS	F 值 F-value	P 值 P-value
花粉育性 Pollen fertility	RM283	1	0.012	0.485	0.6185	—	—	—
	RM262	2	—	—	—	0.121	8.905	0.0001
	RM475	2	0.128	6.581	0.0030	0.141	10.152	0.0000
	RM525	2	0.084	3.933	0.0263	0.077	5.199	0.0015
小穗育性 Spikelet fertility	RM283	1	0.015	1.059	0.3506	—	—	—
	RM262	2	—	—	—	0.069	3.905	0.0102
	RM475	2	0.035	2.715	0.0713	0.092	5.109	0.0072
	RM525	2	0.019	1.435	0.2431	0.060	3.103	0.0286

较日本晴纯合基因型显著提高(图 4), 表明来源于日本晴的等位基因为隐性。针对小穗育性, 该区间的 LOD 值(1.7)接近但未超过统计阈值(表 3), 是否存在结实率 QTL, 还需要进一步实验。

为了明确第 2 染色体上 2 个导入片段是否存在互作效应, 对 F₃ 群体的花粉育性及其反正弦转化数据进行了双因素方差分析。图 5 是其反正弦转化数据分析的结果, 表明 2 个片段(分别以 RM475 和 RM525 代表)不存在影响花粉育性的显著互作。

3 讨论

本研究从籼粳亚种衍生的代换系中发现 1 个结实率显著下降的株系。该代换系含有的粳稻导入片

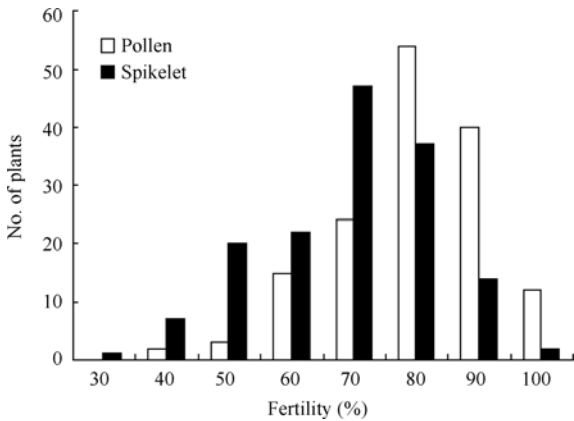


图 3 衍生 F₃ 群体的花粉育性和小穗育性的频率分布(海南)
Fig. 3 Distributions of fertility for pollen and spikelet in the derived F₃ population (Hainan)

表 3 F₃ 群体中花粉育性的 QTL 检测
Table 3 QTL for pollen fertility detected in the derived F₃ lines

性状 Trait	基因座 QTL	标记区间 Interval	LOD 值 LOD	加性效应 Additive	显性效应 Dominant	贡献率 Variance (%)
花粉育性 Pollen fertility	<i>qPS2</i>	RM262–RM475	5.6	7.2	2.9	13.9
小穗育性 Spikelet fertility		RM262–RM475	1.7	4.8	0.3	6.1

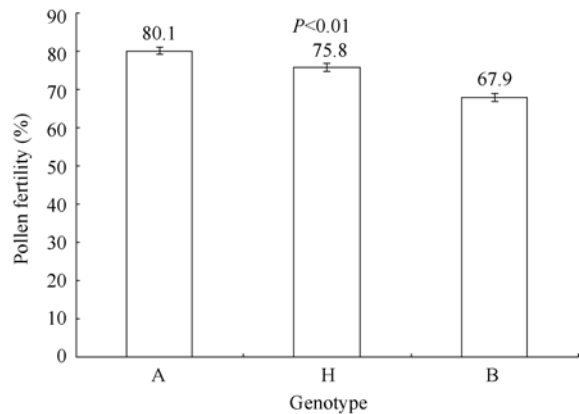


图 4 QTL 上不同基因型的花粉育性差异
Fig. 4 Pollen fertility of three genotypes at the QTL identified in the derived F₃ population
A, B, and H represent homozygous Zhenshan 97B, homozygous Nipponbare, and the heterozygous, respectively.

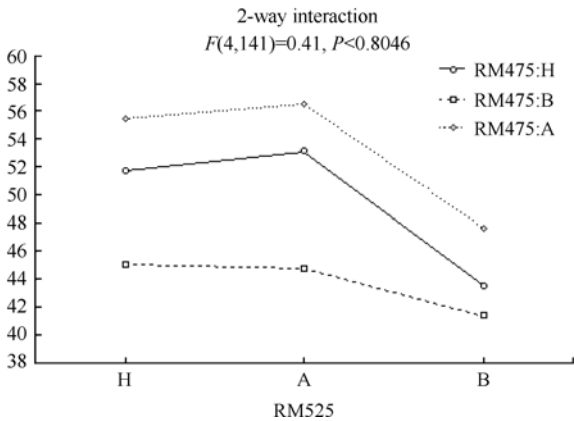


图 5 双因素方差分析表明第 2 染色体上两个片段不存在互作
Fig. 5 Two-way ANOVA showing no significant interaction between the two introgression segments on chromosome 2
A, B, and H represent homozygous Zhenshan 97B, homozygous Nipponbare, and the heterozygous, respectively.

段(RM262~RM475)及其上的花粉育性基因(*qPS2*)是导致其花粉育性和小穗育性降低的主要原因。*qPS2*只在导入纯合的情况下才表现出花粉育性的显著降低,杂合基因型并无明显的育性改变(图4)。这与其他许多研究结果所展示的杂合基因型的效应是不同的^[6,13]。如第3染色体的*S33*纯合基因型的花粉育性约为90%,而杂合基因型则降低到53.6%^[13];第5染色体的*S31*纯合基因型的平均育性约为60%,而杂合基因型则降低到41%^[6]。另外,在水稻第2染色体上已定位有两个影响花粉育性的QTL。一个是在旱稻与非洲稻衍生的群体中发现的*S29*。该位点杂合时,其花粉育性显著下降^[9]。另一个是控制杂种花粉低温不育的*qLTSPS2*,其杂合基因型比纯合型显著降低花粉育性^[8]。但它们与本实验发现的*qPS2*在位置和效应上都不一样。因此,*qPS2*是一个影响水稻花粉育性的新基因。这为精细定位或分离鉴定育性基因提供了重要的实验基础。

值得提出的是在粳稻日本晴背景下,*qPS2*的不育效应是检测不到的,只有纯合导入到珍汕97B的遗传背景中才表现出来。这种“隐蔽”的基因效应在其他高世代回交群体的研究中也报道^[24]。就籼粳杂交育种实践而言,如果粳稻中一些有利基因与不育基因紧密连锁,杂交后代因不育基因逐渐纯合导致结实率降低,进而被选择淘汰,则不利于籼粳基因的相互转移和利用;另一方面,该基因的杂合并未引起杂种育性的降低,可能有利于杂种优势的利用,因此,这类基因的发掘应引起重视。

水稻亚种间杂交后代出现的结实率变化,除受环境影响较大外,一般是由花粉育性或胚囊育性、或两者同时引起的。本研究在武汉和海南两种环境、两个群体(F_2 和 F_3)中都发现*qPS2*区段影响花粉育性(表2),且 F_3 群体中花粉育性和小穗育性的相关系数(0.348)达到极显著水平,由此认为,*qPS2*主要是一个控制花粉育性的位点。但该QTL尚不足以完全解释分离群体中花粉育性的变异。这可能有以下几个原因:(1)水稻亚种间杂种后代的育性容易受到诸如温度等环境因素的影响^[25]。如本试验在武汉和海南两种环境下显著影响小穗育性的标记位点就有一定差异(表2),表明某些QTL可能受到环境影响而未被检测到。(2)存在上位性互作的影响。已有研究表明^[26-27],育性基因的互作影响亚种间的杂种不育性。在本研究中,尽管*qPS2*与染色体2上一个导入片段(基因)没有互作效应(图5),但并不能排除它与遗

传背景中其他基因存在互作。由于本实验在 F_2 群体中未检测到第1染色体上导入片段的效应,故在 F_3 群体未对其作进一步分析。但该导入片段是否与*qPS2*互作,尚待验证。(3)我们仅在染色体1和2上增加了标记密度,而其他染色体上只以10 cM左右的密度间隔选择标记作基因型分析,所以,代换系可能还有未被检测到的微小导入片段,它们含有与*qPS2*互作或直接影响育性的基因。另外,我们发现,正反交 F_1 代的平均结实率存在显著差异(表1),可能暗示代换系的结实率变化除受花粉育性的影响外,还有其他因素的影响。总之,为了清楚地解析以上这些问题,有必要设计相关实验对花粉育性基因进行精细定位和深入分析。

4 结论

水稻第2染色体上RM262~RM475区间存在1个新的影响花粉育性QTL(*qPS2*)。在该位点上,纯合日本晴基因会导致代换系育性的显著下降,而杂合基因型对其花粉育性影响不大。该位点与染色体2上的另一个导入片段(基因)不存在互作。

References

- [1] Sano Y. Rice Genetics. Manila: International Rice Research Institute, 1986. pp 109–118
- [2] Kato S, Kosaka H, Hara S. On the affinity of rice varieties as shown by fertility of hybrid plants. Bulletin of Sciences of Faculty of Agriculture, Kyushu University, 1928, 3: 132–147
- [3] Chaudhary R C, Virmani S S, Khush G S. Patterns of pollen abortion in some cytoplasmic-genetic male sterile lines of rice. *Oryza*, 1981, 18: 140–142
- [4] Lu C G, Takabatake K, Ikehashi H. Identification of segregation distortion neutral alleles to improve pollen fertility of *indica-japonica* hybrids in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 2000, 113: 101–107
- [5] Lu Q, Li X H, Guo D, Xu C G, Zhang Q. Localization of *pms3*, a gene for photoperiod-sensitive genic male sterility, to a 28.4-kb DNA fragment. *Mol Gen Genomics*, 2005, 273: 507–511
- [6] Zhao Z G, Wang C M, Jiang L, Zhu S S, Ikehashi H, Wan J M. Identification of a new hybrid sterility gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 2006, 151: 331–337
- [7] Li D T, Chen L M, Jiang L, Zhu S S, Zhao Z G, Liu S J, Su N, Zhai H Q, Ikehashi H, Wan J M. Fine mapping of *S32(t)*, a new gene causing hybrid embryo sac sterility in a Chinese landrace rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2007, 100: 697–712
- [8] Yang J(杨杰), Zhai H-Q(翟虎渠), Wang C-L(王才林), Zhong W-G(钟维功), Zou J-S(邹江石), Ikehashi H(池桥宏), Wan J-M(万建民). QTL analysis of low-temperature-sensitive pollen

- sterility in *indica-japonica* hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2005, 32(5): 507–513 (in Chinese with English abstract)
- [9] Hu F Y, Xu P, Deng X N, Zhou J W, Li J, Tao D Y. Molecular mapping of a pollen killer gene *S29(t)* in *Oryza glaberrima* and co-linear analysis with *S22* in *O. glumaepatula*. *Euphytica*, 2006, 151: 273–278
- [10] Li W T, Zeng R Z, Zhang Z M, Ding X H, Zhang G Q. Identification and fine mapping of *S-d*, a new locus conferring the partial pollen sterility of intersubspecific F_1 hybrids in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2008, 116: 915–922
- [11] Liu X, Wang S W, Wang Y, Wei S. Genetic analysis and molecular mapping of a nuclear recessive male sterility gene, *ms91(t)*, in rice. *Genome*, 2007, 50: 796–801
- [12] Li W C, Jiang L, Zhou S R, Wang C M, Liu L L, Chen L M, Ikehashi H, Wan J M. Fine mapping of *pss1*, a pollen semi-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2007, 114: 939–946
- [13] Jing W, Zhang W W, Jiang L, Chen L M, Zhai H Q, Wan J M. Two novel loci for pollen sterility in hybrids between the weedy strain Ludao and the *japonica* variety Akihikari of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2007, 114: 915–925
- [14] Chen J J, Ding J H, Ouyang Y D, Du H Y, Yang J Y, Cheng K, Zhao J, Qiu S Q, Zhang X L, Yao J L, Liu K D, Wang L, Xu C G, Li X H, Xue Y B, Xia M, Ji Q, Lu J F, Xu M L, Zhang Q F. A tri-allelic system of *S5* is a major regulator of the reproductive barrier and compatibility of *indica-japonica* hybrids in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 11436–11441
- [15] Yu S-B(余四斌), Mu J-X(穆俊祥), Zhao S-J(赵胜杰), Zhou H-J(周红菊), Tan Y-B(谭友斌), Xu C-G(徐才国), Luo L-J(罗利军), Zhang Q-F(张启发). Development and selection of introgression lines with the identical genetic background of varieties Zhenshan 97B and 9311. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2005, 3(5): 629–636 (in Chinese with English abstract)
- [16] Li Z-B(李泽炳). A preliminary discussion about the classification of male sterile lines of rice in China. *Acta Agron Sin* (作物学报), 1980, 6(1): 17–26 (in Chinese)
- [17] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from Plant Tissue. *Plant Mol Biol Manual*, A6. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1988. p 1210
- [18] McCouch S R, Teytelman L, Xu Y B, Lobos K B, Clare K, Walton M, Fu B Y, Maghirang R, Li Z K, Xing Y Z, Zhang Q F, Kono I, Yano M, Fjellstrom R, DeClerck G, Schneider D, Cartin-hour S, Ware D, Stein L. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res*, 2002, 9: 199–207
- [19] Lincoln S E, Daly M J, Lander E S. Constructing Genetics Maps with MapMaker/EXP3.0. Whitehead Institute Technical Report. Cambridge: MA, 1992
- [20] Brant J B, Gustavo C A, Peter M G. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, 1991, 196: 80–82
- [21] StatSoft. Statistica. StatSoft Incorporated, Tulsa, Oklahoma, 1997
- [22] Wang D L, Zhu J, Li Z K, Paterson A H. Mapping QTLs with epistatic effects and QTL by environment interactions by mixed linear model approaches. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 1255–1264
- [23] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, Paul E, Blinstrub M, Morishima H, Kinoshita T. Report on QTL nomenclature. *Rice Genet Newsl*, 1997, 14: 11–13
- [24] Ali A J, Xu J L, Ismail A M, Fu B Y, Vijaykumar C H M, Gao Y M, Domingo J, Maghirang R, Yu S B, Gregorio G, Yanagihara S, Cohen M, Carmen B, Mackill D, Li Z K. Hidden diversity for abiotic and biotic stress tolerances in the primary gene pool of rice revealed by a large backcross breeding program. *Field Crops Res*, 2006, 97: 66–76
- [25] Li H B, Wang J, Liu A M, Liu K D, Zhang Q, Zou J S. Genetic basis of low-temperature-sensitive sterility in *indica-japonica* hybrids of rice as determined by RFLP analysis. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 1092–1097
- [26] Kubo T, Yoshimura A. Epistasis underlying female sterility detected in hybrid breakdown in an *indica-japonica* cross of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 346–355
- [27] Long Y M, Zhao L F, Niu B X, Su J, Wu H, Chen Y L, Zhang Q Y, Guo J X, Zhuang C X, Mei M T, Xia J X, Wang L, Wu H B, Liu Y G. Hybrid male sterility in rice controlled by interaction between divergent alleles of two adjacent genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 18871–18876