

# 原、异位保存普通野生稻种质资源的遗传多样性比较研究

杨庆文<sup>1</sup>, 余丽琴<sup>2</sup>, 张万霞<sup>1</sup>, 陈大洲<sup>2</sup>, 时津霞<sup>1</sup>, 任军方<sup>1</sup>, 苗 晗<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院作物品种资源研究所, 北京 100081; <sup>2</sup>江西省农业科学院水稻研究所, 南昌 330200)

**摘要:** 为了明确我国异位保存的普通野生稻是否能够代表原居群遗传多样性的完整性, 利用 SSR (简单序列重复) 方法对江西省东乡县庵家山和水桃树 2 个普通野生稻居群的原、异位群体进行了遗传多样性比较研究。结果表明, 庵家山居群原、异位保存群体的遗传多样性指数分别为 0.5000 和 0.3555, 异位保存群体的遗传多样性只有原位保存群体的 71.1%, 并且异位保存材料在聚类图中聚集在一起, 仅为原位保护材料聚类图中的一个分支; 虽然水桃树居群原、异位群体的遗传多样性指数分别为 0.4100 和 0.4577, 相差较小, 并且原、异位保存材料在聚类图中混合聚类, 似乎异位保存群体能够代表原居群的遗传多样性, 但异位保存的 14 份材料在聚类图中有 6 份相邻的材料聚集在一起, 说明异位保存取样时没有考虑野生稻植株的空间分布, 属于重复取样, 重复取样的比率高达 42.9%。将 2 个分布点原、异位材料合并进行遗传多样性研究, 结果与庵家山分布点的研究结果基本一致。据此推测我国保存的普通野生稻资源所包含的遗传变异相对较少, 重复频率较高。建议进行普通野生稻遗传资源的再收集, 并对已保存的野生稻种质资源进行全面鉴定, 剔出重复样品。

**关键词:** 普通野生稻; SSR; 遗传多样性; 原生境保护; 异位保护

## Comparative Studies on Genetic Diversities Between *In-situ* and *Ex-situ* Conserved Germplasm of *Oryza rufipogon*

YANG Qing-wen<sup>1</sup>, YU Li-qin<sup>2</sup>, ZHANG Wan-xia<sup>1</sup>, CHEN Da-zhou<sup>2</sup>, SHI Jin-xia<sup>1</sup>, REN Jun-fang<sup>1</sup>, Miao Han<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>2</sup>Institute of Rice Research, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200)

**Abstract:** *Ex-situ* conservation of *Oryza rufipogon* genetic resources has been well done and about 6000 accessions were preserved in the National Genebank and vegetative nurseries. However, whether they could be representative for the whole genetic integrity of *Oryza rufipogon* has also been concerned. In this study, two populations with their *in-situ* and *ex-situ* conserved groups in Dongxiang County, Jiangxi Province, were selected to study the genetic diversity by using SSR. The results indicated that, the genetic diversity indices of *in-situ* and *ex-situ* conserved groups of Anjiashan population were 0.5000 and 0.3555, respectively. The genetic diversity index of *ex-situ* conserved group was only 71.1% of that of *in-situ* conserved group. Moreover, all *ex-situ* preserved samples were clustered together in the dendrogram and was one branch of the whole "tree". For Shuitaoshu population, the distance of genetic diversity index of *in-situ* group (0.4100) and that of *ex-situ* group (0.4577) was very small, and all *ex-situ* samples clustered together with *in-situ* samples. It seems that the *ex-situ* conserved group could be representative for the genetic diversity of the original population. However, six of the fourteen *ex-situ* samples were close to the samples with the successive numbers, meaning that about 42.9% *ex-situ* samples were redundant. Furthermore, genetic diversity study on the total samples of *in-situ* and *ex-situ* collections from above two sites also showed similar results with those of Anjiashan site. Based on the above results, it is concluded that the genetic diversities of *ex-situ* preserved groups used in this study can not be representative for the genetic diversities of the original populations, and thus refers that the genetic variation contained in the preserved *O. rufipogon* genetic resources in China is relatively low and there are some redundant samples in the genebanks. Therefore, re-collection of genetic resources of *O. rufipogon* and getting rid of the redundant samples based on evaluation are necessary.

**Key words:** *Oryza rufipogon*; SSR; Genetic diversity; *In-situ* conservation; *Ex-situ* conservation

收稿日期: 2004-07-12

基金项目: 国家财政专项 (农业野生植物保护)

作者简介: 杨庆文 (1964-), 湖北广水人, 副研究员, 博士, 主要从事野生稻的保护与种质创新工作。Tel/Fax: 010-62189165; E-mail: qwyang@mail.caas.net.cn

普通野生稻 (*O. rufipogon* Griff.) 是亚洲栽培稻 (*O. sativa* L.) 的祖先种, 是水稻品种改良的重要种质资源。中国南方 8 省 (区) 分布有普通野生稻, 遗传多样性非常丰富, 因此, 普通野生稻遗传多样性的保护一直受到中国学者的高度关注。野生稻种质资源的保护方式有异位保护 (*ex-situ* conservation) 和原生境保护或原位保护 (*in-situ* conservation) 两种。异位保护是将种子或活体材料保存于其原产地以外的地方, 如种质库、种质圃、试管苗或超低温保存等<sup>[1]</sup>。但是, 异位保护带来了自然进化的终止, 不利于遗传多样性的发展, 还可能由于遗传飘移和基因重组等原因, 使有潜在利用价值的基因受到破坏或丢失<sup>[2]</sup>。原生境保护是在物种的原生地通过保护其原有的生态环境而保存完整的遗传多样性和其固有的遗传进化途径, 从而使科学家在未来的研究中源源不断地发掘其潜在的有利基因<sup>[3]</sup>。

种质资源异位保存是目前国际国内普遍采用的保存方法之一, 中国已开展的野生稻种质资源保存也主要侧重于异位保存。目前中国已编目的普通野生稻种质资源 5 909 个编号, 保存于国家种质库及广州和南宁 2 个国家野生稻种质圃中<sup>[4]</sup>。但是, 由于生物界本身的复杂性和科学技术水平的局限性, 我国历次进行的野生稻种质资源收集只是根据科学家的直观判断选取不同类型的种子或种茎, 基本没有按照居群进行取样<sup>[5]</sup>, 所采集的样品能否代表居群的遗传多样性, 能否用于居群遗传结构分析和保护遗传学研究一直备受关注。

遗传多样性研究是保护生物学的核心研究领域之一。对遗传多样性的研究可以揭示物种或居群的遗传变异程度, 为珍稀濒危物种及作物野生近缘植物的保护提供科学依据<sup>[6,7]</sup>。近年来, 国内外利用形态标记、生化标记和分子标记对普通野生稻的遗传多样性进行了大量研究, 不仅阐明了普通野生稻种内丰富的遗传变异, 而且提出了普通野生稻的保护策略<sup>[8-13]</sup>。但是, 对原、异位保存的普通野生稻的遗传多样性进行比较研究目前尚未见报道。本研究旨在运用 SSR 技术对异位保存的 2 个群体所有个体及其对应的原始居群按照居群取样原则所采集的样品进行遗传多样性比较研究, 分析原位和异位保护的野生稻种质资源之间遗传多样性相互关系, 为野生稻遗传结构分析和保护遗传学研究以及国家制定野生稻保护策略提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

本试验所用材料必须符合 2 个条件, 一是异位保存材料应具有明确的采集地点, 二是原生地资源保存较为完整。可是, 中国目前保存的普通野生稻资源主要是 1978~1982 年全国野生稻普查所收集的, 大多数居群记载的地点只有自然村 (生产队) 名, 无从考证所收集资源的具体地点。另外, 经过 20 多年的变化, 许多居群的野生稻资源或者完全消失或者大面积萎缩, 为试验材料的采集带来了很大的困难。通过对中国已保存野生稻资源的广泛筛选, 只有江西省东乡县庵家山和水桃树 2 个野生稻居群基本符合试验材料的要求。因此, 原位保护的野生稻材料采自庵家山和水桃树围墙内, 每个取样点相距约 5 m, 异位保护野生稻材料取自 1982 年从上述保护点中取样并保存于江西农业科学院野生稻保存圃中的所有个体。每份样品分单株取嫩叶 2~3 片, 硅胶干燥保存。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 按 Rogers 等人<sup>[14]</sup>的 CTAB 法并稍有改进, 利用紫外分光光度计测定浓度, 0.8% 琼脂糖检测 DNA 质量, 用 TE 稀释至 20 ng·μl<sup>-1</sup> 备用。

1.2.2 PCR 反应 采用仪器为 PE 公司 5700 序列测序仪, 反应体系为每 20 μl 反应体积中含有 100 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 50 mmol·L<sup>-1</sup> KCl, 1U Taq DNA 聚合酶, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs, 4 μmol·L<sup>-1</sup> SSR 引物, 100 ng DNA 模板。反应程序为: 94℃ 4 min, 35 个循环 (94℃ 1 min, -0.5℃/s 至退火温度, 退火温度 1 min, +0.5℃/s 至 72℃ 1 min), 72℃ 保温 10 min。所用引物的退火温度范围为 56~71℃。扩增产物在变性 6% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 恒定电压 2 500 V, 电泳 1 h, 按文献方法<sup>[15]</sup>银染后观察并照相。选择分布于水稻 12 条染色体且扩增效果较好的 30 对 SSR 引物进行统计分析。

1.2.3 聚类分析 每对 SSR 引物检测 1 个位点, 视每条多态性带为 1 个等位基因, 有此带时赋值为“1”, 无此带时赋值为“0”, 缺项赋值为“999”, 获得矩阵, 根据欧氏距离, 采用离差平方和法, 用 NTSYSpc-2.0 软件进行聚类分析。

1.2.4 遗传多样性评价 多态位点的平均等位基因丰富度  $A_p$ :  $A_p = \sum A_{pi} / np$ 。式中  $A_{pi}$  为第  $i$  个多态位点的等位基因数,  $np$  为所检测的多态位点的总数<sup>[16,17]</sup>。

多态位点比率  $P$ :  $P = (\text{多态位点数} / \text{检测位点数}) \times 100\%$ 。

遗传多样性指数  $H_e$ :  $H_e = \sum h_e / n$ ;  $h_e = 1 - \sum P_{ij}^2$ 。

式中  $P_{ij}$  表示第  $i$  位点上, 第  $j$  个等位基因的频率,  $n$  为检测位点的总数。

居群内的遗传多样性  $H_s$ :  $H_s=1 - 1/n \sum P_{ij}^2$ 。式中,  $P_{ij}$  表示第  $i$  位点上, 第  $j$  个等位基因的频率,  $n$  为检测的位点数。

总居群的遗传多样性  $H_T$ :  $H_T=1 - \sum r_j^2$ 。式中,  $m$  表示该位点上的等位基因数,  $r_j$  表示该位点上第  $j$  个等位基因在总居群中的平均频率。

居群间的遗传多样性  $D_{ST}$ :  $D_{ST}=H_T - H_s$ 。

遗传分化系数  $G_{ST}$ :  $G_{ST}=(H_T - H_s)/H_T$ 。式中  $H_T$  为总群体遗传多样性指数,  $H_s$  为亚群体遗传多样性指数。

## 2 结果与分析

### 2.1 庵家山分布点原、异位保存的野生稻遗传多样性

从 120 对引物中根据扩增效果选择分别位于 12 条染色体上的 30 对 SSR 引物, 对异位保存的 6 份材料 (编号 BE1~BE6) 和原位保护点随机取样的 25 份

材料 (编号 BI1~BI25) 基因组 DNA 进行 PCR 扩增。30 对引物中有 23 对出现多态, 多态位点比率  $P$  为 76.7%; 23 个多态位点的等位变异数为 90 个, 多态位点的平均等位变异丰富度  $A_p$  为 3.9。将原、异位保存的野生稻资源分别作为 2 个群体, 则原位保存群体和异位保存群体的遗传多样性指数分别为 0.5000 和 0.3555。两个群体的总遗传多样性、群体内遗传多样性、群体间遗传多样性以及群体间遗传分化系数计算结果见表 1。从表 1 可以看出, 两个群体总遗传多样性仅比原位保存群体的遗传多样性高 0.0002, 几乎没有差别; 群体内的遗传多样性约为群体间遗传多样性的 6 倍, 说明 2 个群体的遗传多样性主要来自群体内, 并且来自原位保存群体; 群体间的遗传分化系数也说明, 2 个群体的遗传分化程度非常低。

将 2 个群体所有材料的 SSR 检测数据利用 NTSYSpc-2.0 计算机软件进行聚类分析, 得到的聚类图见图 1。在图 1 中, 当遗传相似系数约为 0.75 时, 所有材料大致可以分为 4 类, 并且所有异位保存材料

表 1 庵家山分布点原、异位保存材料的遗传多样性

Table 1 Genetic diversity of *in-situ* and *ex-situ* conserved wild rice in Anjiashan

引物 Locus	染色体 Chromosome	等位基因数 Alleles	总遗传多样性 Total gene diversity ( $H_T$ )	居群内遗传多样性 Gene diversity within population ( $H_s$ )	居群间遗传多样性 Gene diversity among population ( $D_{ST}$ )	遗传分化系数 Coefficient of gene differentiation ( $G_{ST}$ )
RM104	1	2	0.239	0.139	0.100	0.4194
RM129	1	2	0.488	0.473	0.014	0.0296
RM250	2	3	0.665	0.638	0.027	0.0402
RM240	2	3	0.653	0.576	0.077	0.1174
RM154	2	2	0.444	0.237	0.208	0.4675
RM16	3	3	0.615	0.566	0.049	0.0799
RM282	3	2	0.500	0.500	0.000	0.0000
RM161	5	2	0.499	0.466	0.032	0.0649
RM305	5	5	0.500	0.500	0.000	0.0000
RM159	5	5	0.000	0.000	0.000	0.0000
RM314	6	6	0.489	0.250	0.239	0.4885
RM172	7	7	0.500	0.500	0.000	0.0000
RM118	7	7	0.213	0.291	0.078	0.3650
RM125	7	7	0.750	0.683	0.067	0.0889
RM331	8	8	0.734	0.625	0.109	0.1486
RM332	8	8	0.727	0.653	0.074	0.1018
RM321	9	2	0.500	0.500	0.000	0.0000
RM278	9	3	0.643	0.328	0.315	0.4904
RM242	9	3	0.411	0.233	0.178	0.4331
RM222	10	2	0.402	0.219	0.183	0.4554
RM167	11	2	0.500	0.488	0.012	0.232
RM229	11	3	0.544	0.483	0.060	0.1111
RM247	12	3	0.489	0.488	0.001	0.0005
平均值 Average		3.9	0.5002	0.4277	0.0724	0.1489

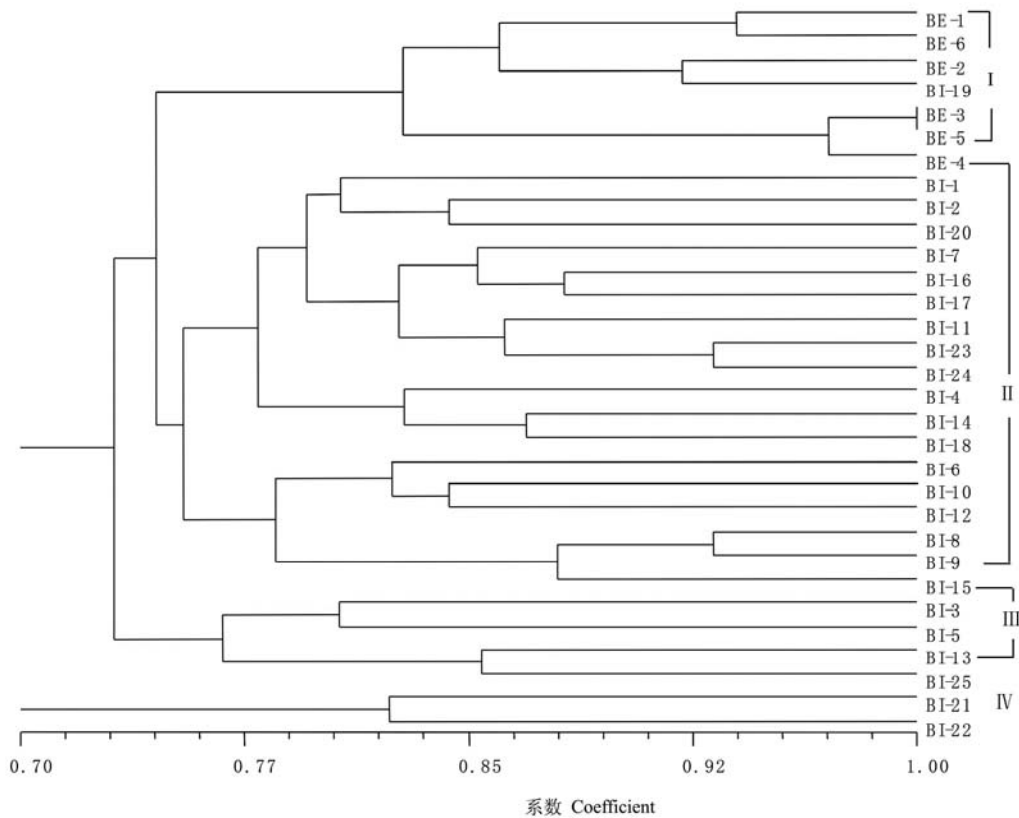


图1 庵家山分布点原、异位保存材料的聚类分析树状图

Fig. 1 Dendrogram of *in-situ* and *ex-situ* conserved wild rice in Anjiashan based on SSR data

均集中在第 I 类, 而原位保存材料除 BI19 外都分布在另外三类中, 而从整个聚类图来看, 当划分分界线的遗传相似系数减小时, 第 I 类实际上只是其中的一个分支, 即: 异位保存材料是原位保存材料的一部分。

## 2.2 水桃树分布点原、异位保存的野生稻遗传多样性

水桃树异位保存的材料编号为 DE1~DE14, 原位保护材料编号为 DI1~DI19, 利用与庵家山分布点相同的 30 对 SSR 引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增。30 对引物共出现 22 个多态位点, 多态位点比率 P 为 73.3%, 多态位点的等位变异数为 71, 平均等位变异丰富度为 3.2。原、异位群体的遗传多样性指数分别为 0.4100 和 0.4577, 相差较小; 两个群体的总遗传多样性、群体内遗传多样性、群体间遗传多样性以及群体间遗传分化系数计算结果见表 2。从表 2 可以看出, 群体内的遗传多样性约为群体间遗传多样性的 40 倍, 说明 2 个群体总的遗传多样性几乎都来自群体内, 群体间遗传多样性的贡献率极低, 而且群体间的遗传分化系数仅为 0.0253, 几乎不存在遗传差异。

按照 Nei (1972, 1978) 发表的计算方法计算其

遗传相似系数并利用 NTYSYSPC-2.0 计算机软件进行聚类分析。尽管水桃树保护点原、异位保存材料的 SSR 数据聚类图 (图 2) 也可以按照遗传相似系数分为几类, 但原、异位保存材料混合聚集在一起, 没有明显的界限。然而, 异位保存材料中序号相连的材料聚集在一起的频率较高, 占异位保存样本数的 42.9%, 如 DE2、DE3、DE4 号, DE10、DE11、DE12 号等, 而原位保存点取样的材料连号集中的情况比较少, 只有 DI12 和 DI13 两份样本, 仅占原位保存样本数的 10.5%。这可能是当时异位保存取样时没有考虑野生稻地下茎的覆盖范围, 属于重复取样, 本次在原位保护点取样时, 每隔 5~8 m 设一个取样点, 大大降低了重复取样的概率。据报道, 野生稻的克隆植株覆盖范围可达 12 m<sup>[18]</sup>, 并推荐进行普通野生稻异位保存取样时, 取样距离应大于 12 m。虽然本试验的取样距离小于该推荐距离, 但从试验结果看, 基本避免了重复取样的问题。

## 2.3 东乡两个居群原、异位保存的野生稻遗传多样性比较

表 2 水桃树分布点原、异位保存材料的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of *in-situ* and *ex-situ* conserved wild rice in Shuitaoshu

引物 Locus	染色体 Chromosome	等位基因数 Alleles	总遗传多样性 Total gene Diversity ( $H_T$ )	居群内遗传多样性 Gene diversity within population ( $H_S$ )	居群间基因多样性 Gene diversity among population ( $D_{ST}$ )	遗传分化系数 Coefficient of gene differentiation( $G_{ST}$ )
RM104	1	2	0.337	0.308	0.028	8.42
RM129	1	4	0.657	0.617	0.039	5.97
RM250	2	3	0.613	0.606	0.007	1.11
RM240	2	2	0.418	0.391	0.026	6.32
RM154	2	4	0.252	0.255	0.004	1.40
RM16	3	2	0.500	0.500	0.000	0.00
RM282	3	3	0.541	0.543	0.002	0.33
RM161	5	2	0.499	0.496	0.003	0.64
RM305	5	3	0.553	0.555	0.002	0.29
RM159	5	3	0.271	0.259	0.012	4.38
RM314	6	2	0.193	0.196	0.003	1.40
RM172	7	5	0.578	0.560	0.017	2.96
RM118	7	2	0.492	0.491	0.001	0.10
RM125	7	4	0.606	0.599	0.007	1.12
RM331	8	6	0.709	0.674	0.036	5.04
RM332	8	5	0.606	0.605	0.001	0.10
RM321	9	6	0.580	0.580	0.000	0.07
RM278	9	3	0.109	0.110	0.001	0.31
RM222	10	2	0.153	0.145	0.007	4.88
RM167	11	2	0.500	0.454	0.046	9.27
RM229	11	3	0.601	0.592	0.009	1.45
RM247	12	3	0.469	0.440	0.029	6.19
平均值 Average		3.2	0.445	0.434	0.011	2.53

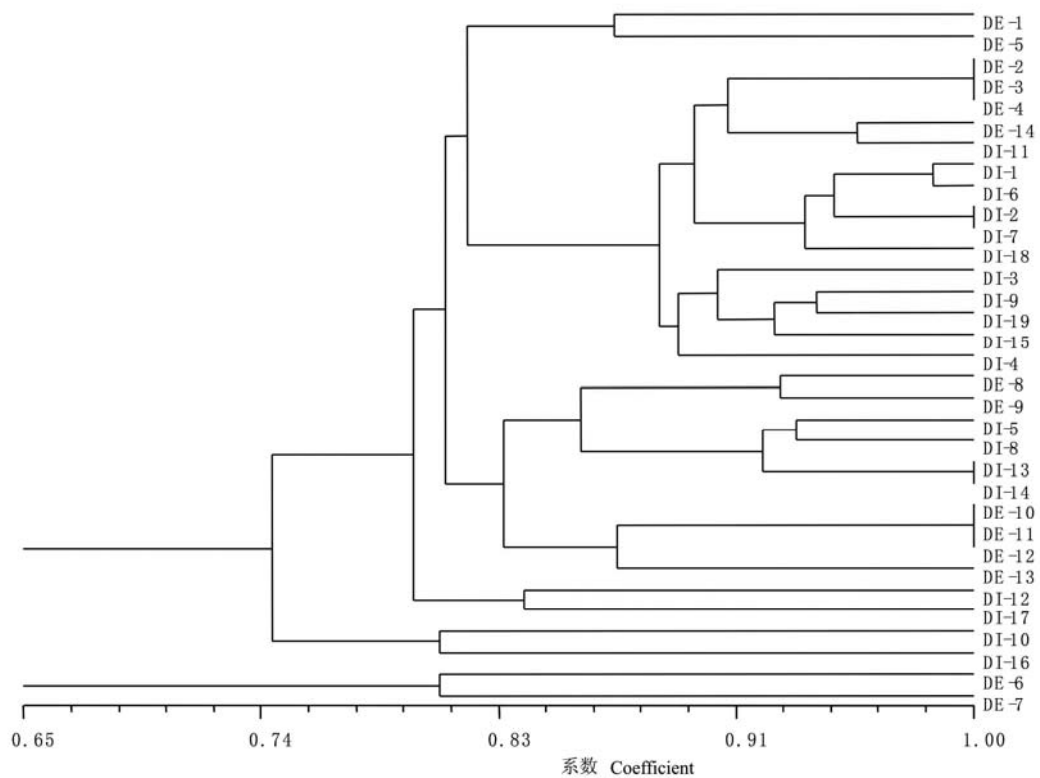


图 2 水桃树分布点原、异位保存材料的聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of *in-situ* and *ex-situ* conserved wild rice in Shuitaoshu based on SSR data

东乡野生稻现存的 2 个居群虽然相隔约 5 km, 但 2 个居群之间有水系相连, 根据本课题组 2004 年对 2 个居群遗传分化的研究, 这 2 个居群实际起源于 1 个大局群 (杨庆文等, 未发表数据), 因此可将 2 个居群的原、异位保存材料合并进行遗传多样性分析。研究表明, 20 份异位保存材料 (BE1~BE6, DE1~DE14) 的遗传多样性指数为 0.3820, 而 44 份原位保存材料 (BI1~BI25, DI1~DI19) 的遗传多样性指数为 0.5059, 前者只占后者的 75.51%。将所有原位保存材料和异位保存材料分别作为居群进行研究, 结果表明, 总的遗传多样性为 0.5003, 居群内遗传多样性和居群间遗传多样性分别为 0.4742 和 0.0261, 遗传分化系数为 0.0522, 说明总遗传多样性主要来自居群内, 并且来自原位保存材料, 与庵家山分布点的研究结果基本一致。

### 3 讨论与结论

#### 3.1 开展异位保存野生稻的遗传多样性研究, 进行野生稻种质资源再收集

合理取样是生物多样性有效保护、研究和利用所面临的基本问题。由于物种内存在着大量的遗传变异和不同的基因型, 进行野外采集时因受到人力和物力的限制, 只能采集到其中的一部分基因型或遗传变异<sup>[19]</sup>。对于一个给定的居群, 如何使所采集的样本尽可能多地包含其固有的遗传多样性是保护生物学家和种质资源学家共同关注的问题, 其中取样点如何设置、取样数目等又是其核心问题之一。Xie 等<sup>[18]</sup>对野生稻取样策略的研究结果表明, 在进行遗传多样性研究和异位保护时, 每群体的取样个体数应不少于 25 株, 相邻取样个体间的距离应大于 12 m。

本研究所用的异位保存样品数较少, 特别是取自庵家山居群的材料, 总共只有 6 株, 所以与原位保护的材料相比, 其遗传多样性非常低, 在聚类图上仅为其中的一个分支, 无法代表该居群的遗传多样性; 虽然取自水桃树居群的材料较多, 但相连序号的材料聚集在一起的频率也较高, 说明当时取样时取样点之间的距离较近, 属于重复取样, 也不能代表整个居群的遗传多样性。本实验所选择的 2 个异位保存群体是从我国已保存的普通野生稻资源中按照实验要求经过精心挑选的, 即使如此, 也不能代表原有居群的遗传多样性, 由此可以断定, 中国保存的普通野生稻资源所包含的遗传变异非常有限。同时, 水桃树分布点异位保存材料中 42.9% 的重复样品从另一个侧面说明, 中

国保存的野生稻种质资源重复频率较高。因此, 一方面, 为了进一步丰富中国普通野生稻的遗传资源库, 必须尽早再次开展收集工作, 并且分居群严格按照居群取样原则进行取样, 这样既能充分保存我国普通野生稻的遗传多样性, 又有利于今后进行居群遗传学及其它研究工作, 另一方面, 为了减少野生稻保存过程中人力、物力和财力的浪费, 必须对已保存的野生稻种质资源全面进行遗传多样性鉴定, 剔除重复, 提高保存效率。

#### 3.2 原生境保护有利于丰富普通野生稻的遗传多样性

野生植物在其自然生态条件下, 在与环境互作的进程中往往会发生遗传变异, 正是这些遗传变异对丰富植物的遗传多样性起着不可或缺的作用。早在上个世纪初叶, 前苏联著名植物学家和农学家瓦维洛夫就已经意识到这些遗传变异的重要性, 在他组织的植物遗传资源考察收集过程中, 强调每隔 10 年对植物起源中心或遗传多样性中心进行一次再收集。在本研究中, 庵家山居群原、异位保护的普通野生稻遗传多样性出现了显著差异, 并且原位保护群体的遗传多样性几乎等于原、异位保护群体总的遗传多样性。分析其原因, 除取样数目直接影响遗传多样性的代表性外, 原生境保护产生的新的遗传变异也可能是导致这种差异的主要因素。然而, 水桃树居群原、异位保护的普通野生稻遗传多样性又为何没有出现这种差异呢? 调查发现, 水桃树居群原位保护点内的野生稻分布面积在近 20 年大量萎缩, 现存的只是其中的一部分, 而庵家山居群原位保护点内野生稻分布面积变化较小 (陈大洲, 个人通讯), 而且围墙引起的小生境变化可能增加了遗传变异的可能性<sup>[3]</sup>。因此, 对于普通野生稻遗传资源的保护, 应着重进行原生境保护, 异位保护只能作为一种补充保护手段。

### References

- [1] 马缘生. 作物种质资源保存技术. 学术书刊出版社, 1989: 4-5.  
Ma Y S. *Preservation Technology for Crop Germplasm Resources*. Press of Academic Books and Periodicals, 1989: 4-5. (in Chinese)
- [2] 刘 旭. 作物种质资源与农业科技革命. 中国农业科技导报, 1999, 2: 31-35.  
Liu X. Crop germplasm resources and agro-science revolution. *Science and Technology Review of Chinese Agriculture*, 1999, 2: 31-35. (in Chinese)
- [3] 杨庆文, 张万霞, 贺丹霞, 陈大洲, 戴陆园, 陈成斌, 黄坤德. 中国野生稻原生境保护方法研究. 植物遗传资源学报, 2003, 4(1):

- 63-67.  
Yang Q W, Zhang W X, He D X, Chen D Z, Dai L Y, Chen C B, Huang K D. Studies on *in-situ* conservation methods of wild rice in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2003, 4(1): 63-67. (in Chinese)
- [4] 张万霞, 杨庆文. 中国野生稻收集、鉴定和保存现状. 植物遗传资源学报, 2003, 4(4): 369-373.  
Zhang W X, Yang Q W. Collection, evaluation and conservation of wild rice resources in China. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2003, 4(4): 369-373. (in Chinese)
- [5] 金燕, 卢宝荣. 遗传多样性的取样策略. 生物多样性, 2003, 11(2): 155-161.  
Jin Y, Lu B R. Sampling strategy for genetic diversity. *Biodiversity Science*, 2003, 11(2): 155-161. (in Chinese)
- [6] Millar C I, Libby W J. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species. In: Falk D A, Holsinger K E (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 1991: 149-170.
- [7] Schaal B A, Leverich W J, Rogstad S H. Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. In: Falk D A, Holsinger K E (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. New York: Oxford University Press, 1991: 123-134.
- [8] Second G. Different rates of genome divergence presumed between two species group in the genus *Oryza*. *The Nucleus*, 1984, 27: 44-48.
- [9] Sarkar R, Raina S N. Assessment of genome relationships in the genus *Oryza* L. based on seed-protein profile analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 1992, 85: 127-132.
- [10] Ichikawa H, Hirai A, Katayama T. Genetic analyses of *Oryza* species by molecular markers for chloroplast genomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 1986, 72: 353-358.
- [11] Sano Y H, Yi X, Shao Q Q. Ribosomal DNA spacer-length variations in a wild rice population from Dongxiang China. Proc. of the 16<sup>th</sup> International Congress of SABRAO. Tsukuba, Japan, 1989: 493-496.
- [12] Martin C, Juliano A, Newbury H J. The use of RAPD markers to facilitate the identification of *Oryza* species within a germplasm collection. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1997, 44: 175-183.
- [13] Akimoto M, Shimamoto Y, Morishim H. The extinction of genetic resources of Asian wild rice. *Oryza rufipogon* Griff. A case study in Thailand. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1999, 46: 419-425.
- [14] Rogers O S, Bendich A J. Extration of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual*, 1988, A6: 1-10.
- [15] Sourdille P, Charmet G, Trottet M, Tixier M H, Boeuf C, Neger D, Barloy D, Bernard M. Linkage between RFLP molecular markers and the dwarfing gene *Rht-B1* and *Rht-D* in wheat. *Hereditas*, 1998, 128: 41-46.
- [16] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89: 583-590.
- [17] Nei M. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 1972, 106(949): 283-292.
- [18] Xie Z W, Lu Y Q, Ge S, Hong D Y, Li F Z. Clonality in wild rice (*Oryza rufipogon*) and its implications for conservation management. *American Journal of Botany*, 2001, 88: 1 058-1 064.
- [19] Marshall D R, Brown A H D. Optimum sampling strategies in genetic conservation. In: Frankel O H, Hawles J G (eds.). *Crop Genetic Resource for Today and Tomorrow*. London: Cambridge University Press, 1998: 53-80.

(责任编辑 孙雷心)