

王明卓,樊颖伦,张思亮,等. 野生稻渗入系苗期耐铝 QTL 定位分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(11):25-28.

野生稻渗入系苗期耐铝 QTL 定位分析

王明卓¹,樊颖伦²,张思亮¹,赵志超³,张 辉¹,张文会¹

(1. 聊城大学生命科学学院,山东聊城 252000; 2. 聊城大学农学院,山东聊城 252000;

3. 中国农业科学院作物科学研究所,北京 100081)

摘要:以元江普通野生稻与优良栽培稻亲本“特青”配制的野生稻染色体片段代换系为材料,在幼苗生长阶段,利用室内、室外株高、干重抑制率的表型数据检测与耐铝相关的 QTL,分别检测到 11、18、14、5 个与耐铝相关的 QTL,分布于不同的染色体上。室内、室外株高抑制率的表型数据检测结果表明,位于第 11 染色体 RM260 附近和第 8 染色体 RM310 附近贡献率较大,分别为 14%、12%,是主效 QTL;室内、室外干重抑制率的表型数据检测到的最大 QTL 的贡献率分别只有 9% 和 8%,未检测到主效 QTL;重复检测到的 QTL 分布于第 7、第 8、第 9、第 11、第 12 染色体上,第 8 染色体上有 2 个 QTL,其中 RM310 附近的 QTL 被 3 次重复检测到,其余的被检测到 2 次,这些是稳定的 QTL。

关键词:野生稻;特青;苗期;耐铝;QTL

中图分类号: Q945.78;S511.03

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2013)11-0025-04

铝(Al)是地壳中含量最丰富的元素,也是酸性土壤中限制作物产量的重要逆境因子之一。全世界酸性土壤的比例达到可耕地面积的 40%^[1],其中包括我国亚热带、热带地区 14 个省(区)有酸性红壤土。随着世界范围的环境污染愈演愈烈,酸雨对农作物的影响不可避免,铝毒害问题也变得更加严重,另外,土壤酸化与大量施用氮肥有关。土壤 pH 值变化会影响铝存在的形态,在酸性土壤环境中,铝存在形态主要为 Al^{3+} 、 $Al(OH)^{2+}$ 和 $Al(OH)^{+}$,这些单体态铝离子对植物具有较大的毒性^[2-3]。在我国,铝毒成为酸性土壤中影响植物生长及作物产量的最重要的外界因素之一。

自 1918 年 Hartwell 和 Pember 首次发现铝对植物的毒害作用以来,广大学者进行了大量研究,目前已对植物铝毒及耐铝毒机制有了较深入的了解。植物根构造的改变以及根伸长的抑制被认为是铝毒害最重要的症状。铝对根的影响主要是通过质外体运输,仅有较少部分进入共质体,可以与胞内靶点相互作用^[4],在铝胁迫环境下,容易导致质膜表面结构的改变,干扰细胞骨架动态结构^[5],钙离子内环境稳态以及信号转导发生变化^[6],通过活性氧簇对膜造成氧化损伤,线粒体机能异常,以上这些细胞分子水平的改变最终导致根生长的抑制^[7]。虽然,大多数植物种类表现出对铝胁迫的敏感性,但是仍然有部分作物表现出对铝胁迫的遗传学耐性^[8],因此,植物耐铝毒的分子机制也成为研究的热点。2004 年,在植物上获得的第 1 个耐铝毒基因是控制铝胁迫下小麦根尖苹果酸分泌的转运蛋白基因 *ALMT1*^[9]。2006 年,拟南芥和油菜中介导苹果酸分泌的转运蛋白基因也被克隆^[10-11]。2007

年,克隆了大麦耐铝毒基因(*Alp*)^[12-13],该基因位于大麦第 4 号染色体上,编码属于多药和有毒化合物排出家族(MATE)的跨膜蛋白(HvMATE)。

与小麦、大麦、黑麦和高粱等其他重要农作物相比,水稻是禾本科中最耐铝胁迫的农作物之一^[14],其耐性水平与黑麦相当。水稻是世界上重要的粮食作物,热带、亚热带的酸性土壤条件成为限制水稻产量的主要因素之一^[15]。近年来,生理研究和遗传分析均表明水稻耐铝毒性状是受多个基因控制的数量性状。Khatriwade 等对 62 个水稻品种进行铝毒耐性检测,表明铝毒耐性为部分显性,有较高的遗传力,环境对其影响较小^[16]。Watanabe 等对铝敏感籼稻品种 IR1552 与耐铝的粳稻品种 Azucena 及其杂交构建的重组自交系,采用 AFLP 和 RFLP 标记进行基因型分析,分别在 1 号和 12 号染色体上检测到 2 个耐铝的 QTLs^[17]。Nguyen 等利用耐铝的粳稻品系 CT9993 和对铝毒敏感的籼稻品系 IR62266 构建 DH 群体,以此研究不同遗传背景下水稻苗期耐铝性的基因控制,结果表明,在 10 条染色体上检测到 20 个 QTLs,说明耐铝性是多基因控制的性状,其中遗传效应最大的 2 个 QTLs 分别位于 1 号和 8 号染色体上^[18]。Mao 等在 Watanabe 等研究的基础上,继续以铝敏感的籼稻品种 IR1552 与耐铝的粳稻品种 Azucena 构建的 RILs 群体为材料进行耐铝 QTL 定位,共获得 3 个贡献率较大的 QTLs,其中在 1 号染色体上标记 RZ801~RG381 区间的有利等位基因来自 Azucena, Al^{3+} 处理 7、14 d 后对表型的贡献率分别为 16%、9%,进一步表明位于 1 号染色体上的 *OsAR28* 基因很可能是耐铝性的候选基因^[19-20]。薛永等利用亲本 Kinmaze 和 DV85 及其重组自交系群体检测到水稻 5 个耐铝毒的数量性状基因座,分别位于第 1、第 5、第 8、第 9、第 11 染色体上^[21]。

通过 QTL 定位分析水稻耐铝多基因与加性效应。目前,有 2 个耐铝基因 *STAR1* (sensitive to Al rhizotoxicity 1) 和 *STAR2* 被克隆^[22],*STAR1* 是利用 star1 与 Kasalath 的 F_2 分离群体,通过图位克隆策略分离得到的,该基因位于水稻第 6 染色体长臂上,*STAR2* 是根据拟南芥中已克隆的耐铝毒基因

收稿日期:2013-04-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:30771340、30771156、31071412)。

作者简介:王明卓(1986—),男,吉林磐石人,硕士研究生。E-mail: mingzhuo. ti@163. com。

通信作者:张文会,博士,教授,硕士生导师,研究方向为植物胁迫生理。Tel: (0635)8230714; E-mail: whzhang@lccu. edu. cn。

(*Alk3*), 通过同源克隆方法获得, *STAR1* 和 *STAR2* 基因都受铝离子特异性诱导表达, 表达部位均主要在根部, 这 2 个基因中任何一个基因功能缺失将导致水稻对铝毒的超敏反应。*STAR1* 编码核苷酸结合结构域, *STAR2* 编码跨膜结构域, 二者形成的复合物是一种功能类似于细菌型 ABC 转运子, 这个转运子的特异性是转运尿苷二磷酸葡萄糖 (UDP-glucose), 是水稻去铝毒所必需的。UDP-glucose 是一种用于细胞壁修饰的物质。由此推测水稻耐铝毒机制与细胞壁成分的合成有关。

长期的实践表明, 挖掘水稻的耐铝性资源、弄清楚其耐铝性的遗传与基因控制机理、选择和培育耐酸铝较强的植物基因型、发掘和利用一批新基因、培育耐铝品种, 是缓解与克服酸铝毒害、进一步提高水稻产量的根本途径。

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻材料为云南元江普通野生稻与优良籼稻品种“特青”配制的高代回交渗入系群体, 由中国农业大学孙传清博士提供。

1.2 试验方法

1.2.1 遗传图谱构建 根据 Temnykh 等发表的水稻 SSR 序列合成引物^[23], 用在亲本间有多态性的 112 个 SSR 标记, 调查群体 106 个株系的基因型。

1.2.2 DNA 提取及 PCR 扩增 按照 Rogers 和 Ben-dich 提出的 CTAB 法, 在略有改动的情况下提取水稻叶片 DNA: 取每个株系的适量叶片并置于液氮中, 快速研磨后移入 1.5 mL 离心管中, 加 2% CTAB 600 μ L, 65 $^{\circ}$ C 温浴 30 min 后加氯仿异戊醇 (24:1) 600 μ L, 颠倒混匀, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液; 加预冷异丙醇 600 μ L, 放于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中 1 h 以上, 10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 沉淀 DNA 用体积分数为 70% 乙醇清洗 2 次, 稍吹干加 200 μ L TE 缓冲液溶解后作 PCR 分析模板用。PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L (含 Mg^{2+})、2.5 mmol/L dNTP1 μ L、模板 DNA 1 μ L、*Taq* 酶 0.215 U/L Primer (10 mol/L) 0.6 μ L、加去离子水至 20 μ L。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 53 ~ 65 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶下电泳银染显影并统计分析。

1.2.3 氯化铝处理 选取发芽一致的种子分别播于含有营养土的塑料槽中, 每份材料播种 15 粒, 塑料槽长 50 cm、宽 80 cm; 播种后置于室外和室温 25 $^{\circ}$ C/20 $^{\circ}$ C (昼/夜)、湿度 70% ~ 80%、光照时间为 14 h、光照强度约 120 μ mol/($m^2 \cdot s$) 的组织培养室内培养; 苗高约 3 cm 时, 每槽加 0.5 倍的 Yoshida 培养液 2 000 mL, 培养期间注意补水; 待第 2 张叶完全展开时, 用 1.2% 氯化铝溶液处理, 处理液以及补水的 pH 值均调至 4.5; 处理 2 周测量株高和干重, 并换算成株高及干重抑制率: 株高抑制率 = (对照株高 - 处理株高)/对照株高 \times 100%; 干重抑制率 = (对照干重 - 处理干重)/对照干重 \times 100%。将发芽抑制率、株高抑制率和干重抑制率作为检测 QTL 的表型数据。

1.2.4 QTL 分析 采用 Map Manager QTX b17 软件, 取概率

小于 0.05 作为判断 QTL 存在的阈值, 采用单标记分析法进行定位分析。以 Temnykh 等发表的水稻 SSR 连锁图谱^[23]为框架, 构建连锁图谱, 112 个 SSR 标记分布于 12 条染色体上, 各染色体上最多的有 13 个标记, 最少的有 7 个标记, 平均每条染色体 9.3 个标记, 标记平均间距 17.8 cM, 基本能满足 QTL 定位需要。

2 结果与分析

由图 1 可见, 室内、室外株高、干重抑制率的分布均呈正态分布, 说明所得数据适于 QTL 分析。

利用室内株高抑制率表型数据共检测到 11 个与耐铝相关的 QTL (表 1), 分别位于第 1、第 7、第 8、第 9、第 11 和第 12 染色体上。其中, 位于第 1 染色体 OSR27、第 8 染色体 RM152、RM38、RM310, 位于第 11 染色体 RM202、RM287、RM260 以及位于第 12 染色体 RM277 附近的 QTL 表现为来源于栽培稻亲本特青的等位基因提高耐铝性。位于第 7 染色体 RM295、第 9 染色体 RM219 附近的 QTL, 表现为来源于野生稻的等位基因提高幼苗的耐铝性。在检测到的 QTL 中, 位于第 8 染色体 RM38、第 11 染色体 RM260 以及第 12 染色体 RM277 附近的 QTL 的贡献率较大, 分别达 12%、14% 和 13%, 尤其是 RM38 附近的 QTL 贡献率和加性效应均较大, 是主效 QTL。

利用室外株高抑制率表型数据共检测到 18 个与耐铝相关的 QTL (表 2), 分别位于第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 7、第 8、第 9、第 11 和第 12 染色体上, 其中, 位于第 1 染色体 RM315、第 2 染色体 RM6、第 3 染色体 RM16、第 4 染色体 RM255、第 7 染色体 RM214、第 8 染色体 RM25、RM310、第 11 染色体 RM187、RM260 以及第 12 染色体 RM309、RM277 附近的 QTL 表现为来源于栽培稻亲本特青的等位基因提高耐铝性。位于第 3 染色体 RM231、第 5 染色体 RM13、RM249、RM509 和第 9 染色体 RM219、RM296、RM105 附近的 QTL, 表现为来源于野生稻的等位基因提高幼苗的耐铝性。在检测到的 QTL 中, 位于第 3 染色体 RM231、第 7 染色体 RM214、第 8 染色体 RM25、RM310、第 9 染色体 RM296 以及第 12 染色体 RM277 附近的 QTL 的贡献率较大, 分别达 10%、11%、10%、12% 和 11%, 是主效 QTL。

利用室内干重抑制率表型数据共检测到 14 个与耐铝相关的 QTL (表 3), 分别位于第 2、第 3、第 5、第 7 和第 10 染色体上。其中, 位于第 3 染色体 RM85、第 5 染色体 RM153 附近的 QTL 表现为来源于栽培稻亲本特青的等位基因提高耐铝性。位于第 2 染色体 RM250、第 3 染色体 RM545、RM282、RM130、第 5 染色体 RM534、第 7 染色体 RM295、RM481、RM298、RM82、RM125 及第 10 染色体 RM258、RM333 附近的 QTL, 表现为来源于野生稻的等位基因提高幼苗的耐铝性。在检测到的 QTL 中, 最大的贡献率只有 9%, 因此, 未检测到主效 QTL。

利用室外干重抑制率表型数据共检测到 5 个与耐铝相关的 QTL (表 4), 分别位于第 1、第 3 和第 8 染色体上。其中, 位于第 1 染色体 RM23、RM5, 第 8 染色体 RM25、RM310 上的 QTL 表现为来源于栽培稻亲本特青的等位基因提高耐铝性。位于第 3 染色体 RM81B 附近的 QTL 表现为来源于野生稻的

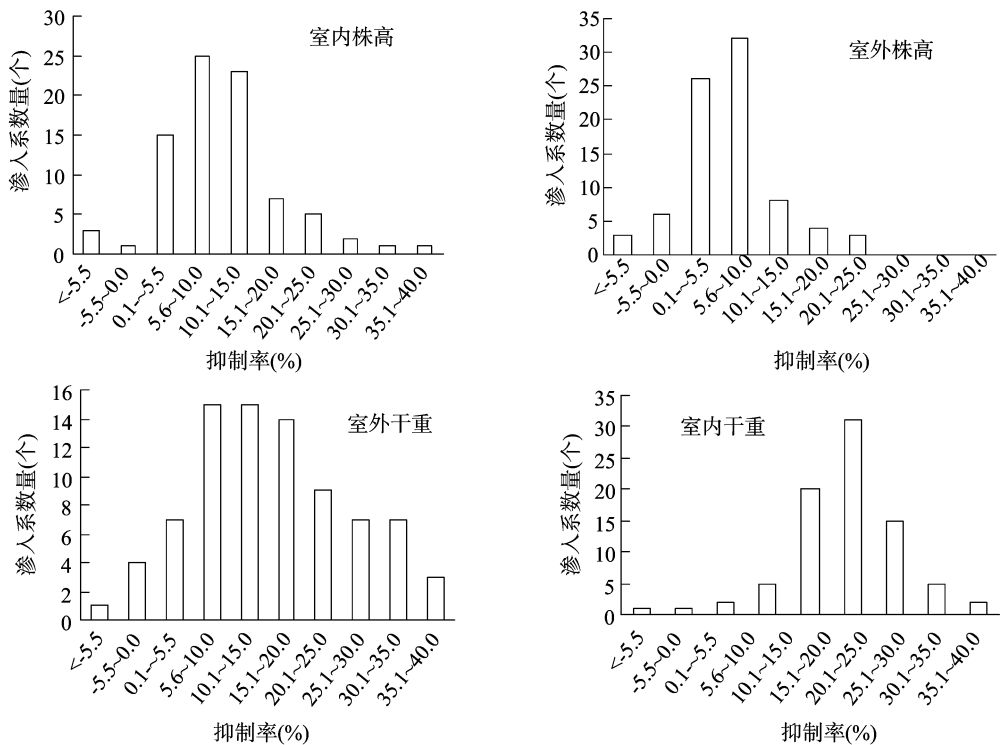


图1 室内外株高、干重抑制率分布

表 1 用室内株高抑制率检测到的 QTL

染色体编号	位点	Stat	贡献率 (%)	P 值	CI	加性效应
1	OSR27	6.0	7	0.014 50	92	-4.46
7	RM295	6.7	8	0.009 60	82	5.47
8	RM152	4.7	6	0.030 36	116	-2.88
8	RM38	10.1	12	0.001 51	56	-13.34
8	RM310	5.7	7	0.017 17	97	-5.73
8	RM339	5.7	7	0.017 36	97	-5.17
9	RM219	5.6	7	0.018 33	99	6.47
11	RM202	5.9	7	0.015 56	94	-4.48
11	RM287	7.4	9	0.006 59	75	-5.73
11	RM260	12.4	14	0.000 43	46	-5.45
12	RM277	10.8	13	0.001 02	53	-6.30

等位基因提高幼苗的耐铝性。在检测到的 QTL 中,最大的 QTL 的贡献率只有 8%,未检测到主效 QTL。

3 小结

目前,水稻耐铝遗传与育种研究以对水稻苗期耐铝性的研究为主。本研究选取水稻的生长阶段也为苗期,利用室内、室外株高、干重抑制率的表型数据检测与耐铝相关的 QTL。室内株高抑制率的表型数据共检测到 11 个与耐铝相关的 QTL,分别位于第 1、第 7、第 8、第 9、第 11 和第 12 染色体上,位于第 8 染色体 RM38 附近的 QTL 贡献率和加性效应均较大,是主效 QTL;室外株高抑制率的表型数据共检测到 18 个与耐铝相关的 QTL,分别位于第 1、第 2、第 3、第 4、第 5、第 7、第 8、第 9、第 11 和第 12 染色体上,位于第 8 染色体 RM310 附近的 QTL 的贡献率较大,分析是主效 QTL;在室内、室外干重抑制率的表型数据分别检测到 14、5 个与耐铝相关的 QTL,其

表 2 用室外株高抑制率检测到的 QTL

染色体编号	位点	Stat	贡献率 (%)	P 值	CI	加性效应
1	RM315	8.2	9	0.004 24	68	-4.75
2	RM6	5.5	7	0.018 48	99	-4.34
3	RM231	8.3	10	0.003 91	67	3.79
3	RM16	3.9	5	0.047 24	138	-3.48
4	RM255	4.0	5	0.046 53	137	-4.16
5	RM13	7.5	9	0.006 26	74	4.12
5	RM249	5.9	7	0.015 3	93	8.17
5	RM509	6.2	7	0.012 8	89	3.77
7	RM214	9.9	11	0.001 66	57	-6.73
8	RM25	8.5	10	0.003 46	65	-6.59
8	RM310	10.2	12	0.001 39	55	-6
9	RM296	9.7	11	0.001 86	58	4.82
9	RM219	6.7	8	0.009 74	83	5.58
9	RM105	4.0	5	0.044 81	135	3.61
11	RM260	7.1	8	0.007 61	78	-3.31
11	RM187	3.9	5	0.049 15	140	-4.49
12	RM277	10.0	11	0.001 6	56	-4.8
12	RM309	4.7	6	0.029 97	116	-4.01

中最大 QTL 的贡献率分别只有 9%、8%,未检测到主效 QTL。从 4 次抑制率的表型数据检测结果(表 5)看,重复检测到的 QTL 分布于第 7、第 8、第 9、第 11、第 12 染色体上,分子标记分别是 RM295、RM310、RM25、RM219、RM260 和 RM277,第 8 染色体上有 2 个 QTL,其中 RM310 附近的 QTL 被重复检测到 3 次,其余的被检测到 2 次,说明这些 QTL 是稳定的;但在室内株高抑制率的表型数据检测中,位于第 8 染色体 RM38 附近的 QTL 为主效 QTL,没有被重复检测到,可能是测定指标

表 3 用室内干重抑制率检测到的 QTL

染色体 编号	位点	Stat	贡献率 (%)	P 值	CI	加性效应
2	RM250	3.9	5	0.049 35	141	8.38
3	RM545	7.9	9	0.004 81	70	8.52
3	RM282	5.2	6	0.022 47	105	7.66
3	RM130	6.7	8	0.009 78	83	11.95
3	RM85	4.1	5	0.043 03	133	-8.82
5	RM153	5.9	7	0.015 36	94	-10.50
5	RM534	4.5	5	0.033 85	121	16.71
7	RM295	5.7	7	0.016 74	96	10.38
7	RM481	4.7	6	0.029 33	115	7.92
7	RM298	4.6	6	0.031 48	118	8.48
7	RM82	4.7	6	0.029 33	115	7.92
7	RM125	4.1	5	0.043 09	133	8.42
10	RM258	6.1	7	0.013 5	90	8.82
10	RM333	4.6	6	0.031 79	118	7.39

表 4 室外用干重抑制率检测到的 QTL

染色体 编号	位点	Stat	贡献率 (%)	P 值	CI	加性效应
1	RM23	5.8	7	0.016 16	95	-5.36
1	RM5	4.1	5	0.042 37	132	-4.35
3	RM81B	4.5	5	0.033 37	120	3.71
8	RM25	5.7	7	0.016 88	96	-9
8	RM310	7.2	8	0.007 32	77	-8.42

表 5 重复检测到的 QTL

染色体 编号	检测到 QTL 的分子标记			
	室内株高	室外株高	室内干重	室外干重
7	RM295		RM295	
8	RM310	RM310		RM310
8		RM25		RM25
9	RM219	RM219		
11	RM260	RM260		
12	RM277	RM277		

和室内外环境的影响,但此结果有待进一步验证。

参考文献:

[1] Kochian L. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants[J]. Ann Rev Plant Biol,1995,46:237-260.

[2] Kinraide T B, Parker D R. Assessing the phytotoxicity of mononuclear hydroxy-aluminum[J]. Plant Cell Envir,1987,12(5):479-487.

[3] Parker D R, Zelazny L W, Kinraide T B. On the phytotoxicity of polynuclear hydroxy-aluminum complexes[J]. Soil Sci Soc America J,1989,53(3):789-796.

[4] Taylor G J, McDonald-Stephens J L, Hunter D B, et al. Direct measurement of aluminum uptake and distribution in single cells of *Chara corallina*[J]. Plant Physiology,2000,123(3):987-996.

[5] Sivaguru M, Pike S, Gassmann W, et al. Aluminum rapidly depolymerizes cortical microtubules and depolarizes the plasma membrane; evidence that these responses are mediated by a glutamate receptor[J]. Plant & Cell Physiology,2003,44(7):667-675.

[6] Jones D L, Gilroy S, Larsen P B, et al. Effect of aluminum on cytoplasmic Ca²⁺ homeostasis in root hairs of *Arabidopsis thaliana* (L.) [J]. Planta,1998,206(3):378-387.

[7] Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi S R, et al. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells[J]. Plant Physiology,2002,128(1):63-72.

[8] Taylor G J. Current views of the aluminum stress response: The physiological basis of tolerance[J]. Curr Top Plant Biochem Physiol, 1991,10:57-93.

[9] Ma J F, Nagao S, Sato K, et al. Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley[J]. Journal of Experimental Botany,2004,55(401):1335-1341.

[10] Hoekenga O A, Maron L G, Piñeros M A, et al. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006,103(25):9738-9743.

[11] Ligaba A, Katsuhara M, Ryan P R, et al. The *BnALMT1* and *BnALMT2* genes from rape encode aluminum-activated malate transporters that enhance the aluminum resistance of plant cells[J]. Plant Physiology,2006,142(3):1294-1303.

[12] Furukawa J, Yamaji N, Wang H, et al. An aluminum-activated citrate transporter in barley[J]. Plant & Cell Physiology,2007,48(8):1081-1091.

[13] Wang J, Raman H, Zhou M, et al. High-resolution mapping of the *Alp* locus and identification of a candidate gene *HvMATE* controlling aluminium tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics,2007,115(2):265-276.

[14] Foy C D. Plant adaptation to acid, aluminum-toxic soils[J]. Soil Sci Plant Anal,1988,19:959-987.

[15] 卢永根,傅雪琳,褚绍尉,等. 水稻耐铝遗传机理与基因定位研究进展[J]. 华南农业大学学报,2009,30(4):1-6.

[16] Khatiwada S P, Senadhira D, Carpena A L, et al. Variability and genetics of tolerance for aluminum toxicity in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genetics,1996,93(5/6):738-744.

[17] Watanabe T, Okada K. Interactive effects of Al, Ca and other cations on root elongation of rice cultivars under low pH[J]. Annals Bot, 2005,95(2):379-385.

[18] Nguyen V T, Nguyen B D, Sarkarung S, et al. Mapping of genes controlling aluminum tolerance in rice: comparison of different genetic backgrounds[J]. Molecular Genetics and Genomics,2002,267(6):772-780.

[19] Mao C Z, Yang L, Zheng B S, et al. Comparative mapping of QTLs for Al tolerance in rice and identification of positional Al-induced genes [J]. Journal of Zhejiang University. Science,2004,5(6):634-643.

[20] Mao C, Yi K, Yang L, et al. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components[J]. Journal of Experimental Botany,2004,55(394):137-143.

[21] 薛永,江玲,张文伟,等. 利用重组自交系群体检测水稻耐铝毒数量性状基因座[J]. 作物学报,2005,31(5):560-564.

[22] Huang C F, Yamaji N, Mitani N, et al. A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice[J]. Plant Cell, 2009,21(2):655-667.

[23] Temnykh S, William D P, Nicola A, et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoret and Applied Genetics,2000,100(5):697-712.