

利用热稳定蛋白特异条带鉴别籼粳稻的方法研究

付深造, 辛霞, 张志娥, 陈晓玲, 辛萍萍, 卢新雄

(中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要:以 85 份栽培稻为材料, 利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白免疫印迹技术分析籼稻和粳稻热稳定蛋白的表达差异, 探讨利用特异蛋白来建立籼粳稻的鉴别方法。结果表明, 在籼粳稻品种之间存在热稳定蛋白的差异表达, 尤其在分子量约 42~47kD 范围。其中 45.2kD 条带 (Band I) 和 46.5 kD (Band II) 条带为典型粳稻特异蛋白 (Os03g0168100) 的标志带, 42.0 kD 条带 (Band III) 为典型籼稻特异蛋白 (OsL10172) 的标志带。以这 3 条带作为鉴别方法, 并与程氏指数法进行比较, 典型籼稻和粳稻的一致度分别为 80.0% 和 86.4%, 表明热稳定蛋白标志带法在一定程度上可用于鉴别典型的籼稻和粳稻。

关键词: 籼稻; 粳稻; 热稳定蛋白; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 蛋白免疫印迹

Method for Identifying *Indica*-*Japonica* Rice by Using Specific Heat-Stable Protein Bands

FU Shen-zao XIN Xia ZHANG Zhi-e, CHEN Xiao-ling XIN Ping-ping LU Xin-xiong

(Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract Differential expression of heat-stable proteins in eighty-five cultivated rice (*Oryza sativa* L.) was analyzed by using SDS-PAGE and western blotting to explore the feasibility of using specific proteins to identify *Indica*-*Japonica* rice. The results showed that the heat-stable proteins expressed differentially between *Indica* and *Japonica* rice, especially in the molecular weight of about 42-47kD range. Among them, 45.2kD band (Band I) and 46.5kD band (Band II) were marker bands for typical *Japonica* rice. Both bands matched to Os03g0168100 in NCBI protein databank, 42.0kD band (Band III) matched to OsL10172) was marker band for typical *Indica* rice. Eighty-five *Indica* and *Japonica* rice varieties were identified based on the expression pattern of these three bands, and then compared the results with Cheng's index. The concordances were 80.0% and 86.4% in typical *Indica* rice and *Japonica* rice, respectively. Therefore, the method of heat-stable protein marker bands can be used for identifying typical *Indica* rice and *Japonica* rice.

Key words *Indica* rice; *Japonica* rice; Heat-stable protein; SDS-PAGE; Western blotting

亚洲栽培稻 (*Oryza sativa* L.) 分为籼粳 2 类已为多数学者认可, 直接利用籼粳间杂种优势已成为水稻超高产杂交育种的主攻方向。然而, 水稻亚种间杂交容易产生不育或育性较低的 F_1 植株, 尤其是在典型的籼粳稻亚种之间, 这成为限制水稻杂种优势利用的瓶颈。因此, 了解水稻品种的遗传分化程度及其籼粳归属, 尤其是正确认识籼粳中间型材料在分类系统中的地位, 对于籼粳稻杂种优势的利用、

广亲和材料的选育及水稻基因工程的顺利进行都具有重要的指导意义。所以, 亟待建立一种科学有效的籼粳鉴别方法, 更好地进行水稻分类和籼粳分化研究, 从而为水稻种质资源和育种工作服务。日本 Kato 等^[1]最早应用现代科学分类法将亚洲栽培稻分成籼粳 2 个亚种, 奠定了稻种分类的基础。随后人们根据栽培稻在形态学性状和同工酶酶谱等方面的差异, 分别提出了形态分类法^[2-4]和同工酶分类

收稿日期: 2010-05-26 修回日期: 2010-08-16

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAD13B10); 农业部财政专项 (2130135)

作者简介: 付深造, 硕士研究生, 研究方向为种质资源保存。E-mail: fushenzao01@163.com

通讯作者: 卢新雄, 研究员。E-mail: xxl@caas.net.cn

法^[5-8]。近 10 多年来, 分子标记技术的广泛应用以及相应的遗传图谱的构建, 为鉴别籼粳稻提供了较准确的分子水平上的新依据。大量研究报道, RFLP^[9-11] 及 SSR^[12-15] 等 DNA 分子标记技术可作为鉴别籼粳稻的分子生物学手段。但是有关利用蛋白质鉴别籼粳稻的报道很少。本研究通过分析籼稻和粳稻热稳定蛋白的表达差异, 探讨利用特异蛋白来建立籼粳稻的鉴别方法, 从而为水稻种质资源的有效利用提供理论和科学依据。

表 1 供试栽培稻品种名称及类型

Table 1 Name and type of experimental cultivated rice

编号 No	品种名称 Variety name	籼粳类型 I-J type	编号 No	品种名称 Variety name	籼粳类型 I-J type	编号 No	品种名称 Variety name	籼粳类型 I-J type
1	二包矮 204	I	30	LITON	J'	59	9308	I'
2	泉香 61	I	31	铁屎糯	J	60	川 7号	I'
3	青丰占 35	I	32	宫牌种	J	61	CDR22	I'
4	新油占	I	33	白米束	J	62	泰引 1号	I'
5	小农占	I	34	巴利拉	J	63	晚华矮 1	I'
6	青华矮 6号	I	35	日本晴	J	64	竹包 384	I'
7	南京 11号	I	36	京系 17号	J	65	白芒稻	I'
8	R36	I	37	秋光	J	66	测 64	I'
9	93-11	I	38	金南风	J	67	圭 630	I'
10	特青 2号	I	39	双平头农垦 58	J	68	Suw eon290	I'
11	晚华 11选	I'	40	桂花黄	J	69	中花 9号	J'
12	秋桂矮 11	I'	41	窄叶青 8号	I	70	关东糯 37	J'
13	青竹矮 1	I'	42	桂朝 13号	I	71	巴西陆稻	J'
14	451	I'	43	佳禾早占	I	72	T984	J'
15	R24	I'	44	BG367	I	73	C418	J'
16	白米谷	I'	45	RAT265	I	74	越富(丰)	J
17	明恢 63	I'	46	广陆矮 4号	I	75	立穗	J
18	矮糯	I'	47	矮脚南特	I	76	东农 419	J
19	三粒寸	I'	48	闽科早 1号	I	77	中作 946	J
20	密阳 46	I'	49	南京 14	I	78	乌嘴糯	J
21	西什 145	J'	50	扬稻 2号	I	79	中花 10号	J
22	矮子粘	J'	51	青四矮	I	80	中作 180	J
23	白壳糯	J'	52	双桂 1号	I	81	春江 20	J
24	满仓 515	J'	53	南特号	I	82	津稻 1187	J
25	当地水稻	J'	54	成恢 047	I	83	农垦 58	J
26	稻翅 1	J'	55	BG94-1	I	84	IIA182	J
27	奥羽 326	J'	56	丛矮 2号	I'	85	Cps b17	J
28	麻晚糯	J'	57	明恢 86	I'			
29	澳粳粘	J'	58	扬稻 6号	I'			

籼粳类型: I-典型籼稻, I'-偏籼稻, J'-偏粳稻, J-典型粳稻。下同

I-J type: I-Typical Indica, I'-Indicaclinous, J'-Japonicaclinous, J-Typical Japonica. The same as below.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究共选用 85 份栽培稻作为供试材料, 包含 25 个典型籼稻品种、23 个偏籼品种、15 个偏粳品种和 22 个典型粳稻品种, 其籼粳类型的划分是根据程氏指数法, 详见表 1。供试材料由中国农业科学院作物科学研究所和中国水稻研究所提供。

1.2 水稻种子热稳定蛋白的提取

15~20粒种子去壳后在液氮下研磨至粉碎, 转移至2ml离心管中, 加入1.5ml -20℃预冷丙酮, 充分悬浮粉末, 置于-20℃冰箱中沉淀过夜; 14000rpm离心15min, 倒掉上清, 重新加入1ml -20℃的冷丙酮, 悬浮沉淀, 置于-20℃冰箱中沉淀2~3h; 14000rpm离心15min, 倒掉上清; 将沉淀置于真空抽干器中抽掉残余丙酮, 加入含1mmol/L二硫苏糖醇(DTT)和1mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF)的50mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 充分匀浆后在4℃冰箱中放置2h, 中间取出漩涡混匀2次; 14000rpm离心15min, 上清液即为可溶性蛋白; 将可溶性蛋白转移至新的2ml离心管中, 100℃水浴煮沸10min, 14000rpm离心30min, 上清即为热稳定蛋白, 取出上清保存在-20℃冰箱中备用。

1.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

方法参照《生物化学技术原理及应用》^[16], 丙烯酰胺储液单体质量浓度之比为30:0.8, 浓缩胶浓度为9%, 分离胶浓度为12%。浓缩胶缓冲液为0.5mol/L Tris-HCl(pH6.8), 分离胶缓冲液为1.5mol/L Tris-HCl(pH8.8)。每个点样孔上样量为10μg蛋白。采用Bio-Rad Mini-Protein Tetra Cell系统进行SDS-PAGE, 电极缓冲液为(25mmol/L Tris-HCl, 192mmol/L甘氨酸, 0.1% SDS, pH8.3), 采用恒压模式, 其中浓缩胶中电压为80V; 分离胶中电压为200V。

1.4 特异蛋白质的分离纯化及鉴定

蛋白进行SDS-PAGE后, 参照康彬等^[17]的电洗脱法回收目标条带。回收得到的特异蛋白质利用双向电泳进行纯化, 具体步骤参考Bio-Rad双向电泳操作手册。

纯化后的蛋白质点进行胶内酶切后由解放军军事医学科学院进行质谱鉴定(所用仪器为英国Micromass公司的Q-TOF2)。质谱测序获得的多肽序列用NCBI protein blast生物信息学软件在非冗余蛋白序列数据库中进行检索, 以获得匹配蛋白质的有关信息。

1.5 蛋白质一抗制备及蛋白免疫印迹(western blotting)

根据生物信息学分析得到的粳稻蛋白质氨基酸序列进行一抗制备, 由上海英潍捷基(Invitrogen)贸易有限公司完成。

Western blotting方法参照《生物化学技术原理

及应用》^[16], 二抗选用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体。

2 结果与分析

2.1 籼粳稻差异表达蛋白的筛选

利用SDS-PAGE对表1中编号1~40的栽培稻品种的热稳定蛋白进行分离, 结果表明, 籼粳稻品种之间存在热稳定蛋白的差异表达: 典型粳稻品种在分子量约45kD处有2个特异条带, 分别标记为Band I(45.2kD)和Band II(46.5kD), 而典型籼稻品种在相同的分子量位置则没有这2个条带(图1)。各品种所含条带类型见表2。

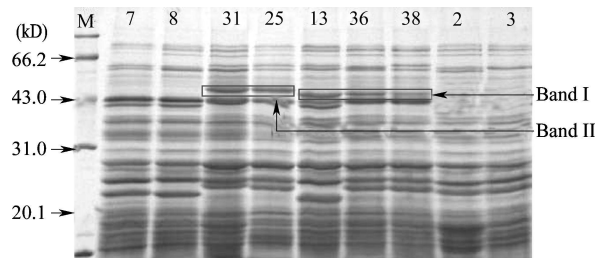


图1 栽培稻品种间的热稳定蛋白差异表达图

Fig 1 Differential expression of heat stable protein in cultivated rice varieties

图左侧为标准蛋白质分子量

Molecular weight of standard proteins on the left of the figure

从表2可以看到: 10个典型粳稻品种中, 5个品种含有Band I, 5个品种含有Band II; 10个典型籼稻均未检测到Band I或II; 10个偏粳稻品种中, 除4个品种含有Band I外, 其他品种均未检测到Band I或II; 10个偏粳稻品种中, 除3个品种未检测到这2个条带外, 其他7个品种均含有Band I或II。假如将Band I、II作为粳稻特异蛋白, 则在40个供试品种中: 100%的典型粳稻含有特异蛋白, 70%的偏粳稻含有特异蛋白, 60%的偏籼稻不含有特异蛋白, 典型籼稻都未检测到特异蛋白。因此初步断定Band I、II为粳稻特异蛋白标志带, 并用于鉴别籼粳稻。

2.2 粳稻特异蛋白的鉴定

为了解粳稻特异蛋白Band I、II的相关性质和功能, 以及进一步能在更大范围来验证粳稻特异蛋白Band I、II的特异性, 选取日本晴(含Band I)和官牌种(含Band II)2个典型粳稻品种对Band I、II进行分离纯化和质谱鉴定。条带经SDS-PAGE和电洗脱纯化后进行双向电泳(预制胶条购自Bio-Rad, 7cm, pH3~10), 电泳图片如图2所示。由图2

表 2 40个栽培稻品种所含条带类型

Table 2 Band type of 40 cultivated rice varieties

编号 No	籼粳类型 I-J type	条带类型 Band type	编号 No	籼粳类型 I-J type	条带类型 Band type	编号 No	籼粳类型 I-J type	条带类型 Band type
1	I	-	15	I'	I	29	J'	-
2	I	-	16	I'	I	30	J'	I
3	I	-	17	I'	-	31	J	II
4	I	-	18	I'	I	32	J	II
5	I	-	19	I'	-	33	J	II
6	I	-	20	I'	-	34	J	I
7	I	-	21	J'	I	35	J	I
8	I	-	22	J'	-	36	J	I
9	I	-	23	J'	I	37	J	I
10	I	-	24	J'	-	38	J	I
11	I'	-	25	J'	II	39	J	II
12	I'	-	26	J'	I	40	J	II
13	I'	I	27	J'	I			
14	I'	-	28	J'	I			

条带类型: “I、II、-” 分别代表 BandI、BandII 和未检测到条带
Band type: “I、II、-” stand for BandI、BandII and nothing

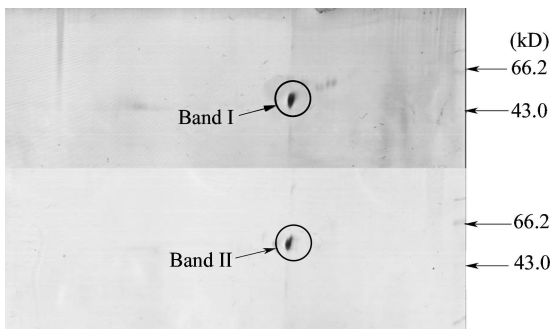


图 2 目标条带经双向电泳分离纯化结果

Fig 2 Results of target bands purification after two dimensional electrophoresis

图右侧为标准蛋白质分子量

Molecular weight of standard proteins on the right of the figure

可以看出回收的 BandI、II 经双向电泳后主要聚焦为一个蛋白点, 其等电点均为 7.5 左右。

双向电泳后的 Band I、II 进行 Q-TOF 测序, 获得的序列 (如下) 在 NCBI 数据库中进行 Protein Blast 蛋白质数据库选用 Non-redundant protein sequences Organism 选用粳稻。结果发现, BandI 和 Band II 在粳稻数据库中与一个名称为 O3g0168100 的蛋白相匹配, 这说明 Band I 和 Band II 可能是同一蛋白的不同表现形式, 其 SDS-PAGE 的差异可能是由于蛋白质修饰造成的。该蛋

白全长 400aa 属于未知功能的 LEA 蛋白。

BandI 测得序列为: N-WAWETAEAAR; VTGADD-AADHGQEK; SAQHTASEAGR; EAAEATA SQSSK; HH-VADVDEEEDAAR; QEVHEQSK-C。

BandII 测得序列为: N-WAWETAEAAR; VTGADDAADHGQEK; SAQHTASEAGR; QEVHEAGSK; EAAEATASGASSKAEAGAK-C。

2.3 抗体制备

选取蛋白 O3g0168100 的一段多肽序列 (EK-ANEGYEKVKKEKAKEK) 进行抗体制备, 所制备抗体名称为 Anti-O3g0168100。抗体制备完成后, 首先对抗体的质量进行检测, 利用典型籼粳稻品种的热稳定蛋白做抗原进行 Western blotting 品种名称和籼粳类型见表 1, 结果见图 3。

由图 3 可以看出, 所制备抗体对粳稻特异蛋白 BandI、II 都能较好地免疫。但同时也发现典型籼粳稻品种在分子量约 42.0kD 处也有一免疫条带, 标记为 Band III (图 3), 并且其表达量与粳稻的 Band I、II 相似。这说明所制备的抗体不是粳稻特异的, 籼稻中具有一个 42.0kD 的蛋白能够与多肽 “EK-ANEGYEKVKKEKAKEK” 制备的抗体免疫。

将制备抗体的抗原序列 “EKANEGYEKVKKEKAKEK” 利用 NCBI 数据库进行 Protein Blast, 结果表明, 抗原序列 “EKANEGYEKVKKEKAKEK” 在籼稻

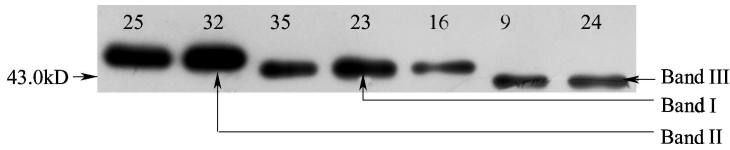


图 3 抗体 Anti-Os03g0168100 质量检测

Fig 3 Quality test of antibody Anti-Os03g0168100

图左侧为标准蛋白质分子量, 下同

Molecular weight of standard proteins on the left of the figure The same as below

数据库中与名称为 OsI_10172 的蛋白相匹配。该蛋白全长 380 aa 属于未知功能的 LEA 蛋白。

2.4 籼粳稻分化特异蛋白质的验证

虽然所制备的抗体不是粳稻特异的, 但是 western blotting 检测结果 (图 3) 表明, 粳稻中的 Band I、II 和籼稻中的 Band III 分子量是不同的, 因此可以根据所出现的免疫带型鉴别籼粳稻。为了验证籼粳稻特异热稳定蛋白条带在栽培稻中是否广泛存在, 又选取了 45 份栽培稻进行 Western blotting 检测。部分 Western blotting 检测结果见图 4。结果表明, 栽培稻中绝大多数品种只具有 Band I、II 和 III 中的一条免疫条带, 有 4 个品种 (实验编号为 15、21、55 和 77) 同时具有 Band I 和 III 2 条免疫条带。统计

结果如表 3 所示。

若将含有 Band I 或 II 的品种判为粳稻, 而含有 Band II 的品种判为籼稻, 利用这 3 条热稳定蛋白标志带对供试的 85 份栽培稻品种进行鉴别, 发现热稳定蛋白标志带法除将栽培稻分为籼稻和粳稻外, 还存在 4.7% (4/85) 的品种 (同时含有 Band I 和 III) 属于籼粳难辨品种 (表 3), 而这可能与栽培稻品种的遗传背景有关。将此分类结果与程氏指数法分类结果进行比较发现, 二者在典型籼稻和典型粳稻中的一致度分别为 80.0% (20/25) 和 86.4% (19/22)。说明利用热稳定蛋白标志带法对典型的栽培稻进行分类是可行的。

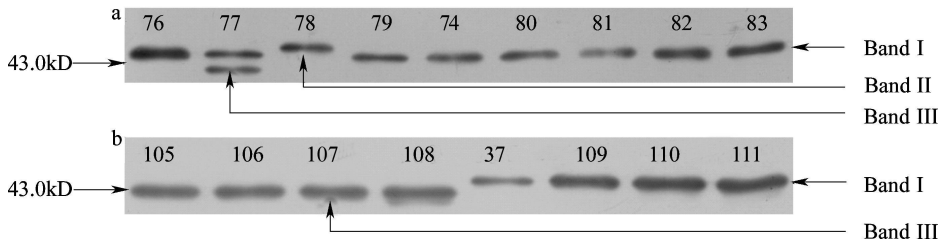


图 4 几个栽培稻品种的 Western blotting 结果

Fig 4 Western blotting results of some cultivated rice varieties

表 3 4 种类型的栽培稻中含有不同条带的品种数目

Table 3 The number of varieties containing different bands in four types of cultivated rice

类型 Type	数目 Amount	条带类型及品种数目 Band type and number of varieties		
		Band I 或 II	Band III	Band I 和 III
		I	25	4
I'	23	7	15	1
J'	15	11	3	1
J	22	19	2	1

3 讨论

目前籼粳稻的鉴别方法大都集中在形态学水

平、同工酶水平以及 DNA 分子水平方面。Sano 等^[18]通过调查来自尼泊尔、锡金和阿萨姆山区的地方品种的 4 个主要形态性状和 6 个同工酶位点的变异, 发现在典型籼稻和粳稻中主要形态性状法和同工酶法的分类结果非常一致。Li 等^[10]利用 RFLP 分子标记和同工酶分析了 111 份水稻家系的遗传分化, 并与程氏指数法的形态分化进行比较, 发现在典型籼稻和粳稻中, 基于形态学性状、同工酶和 DNA 标记的分类相互匹配得很好。然而, 利用蛋白质鉴别籼粳稻的研究报道很少。Saruyama 等^[19]利用双向电泳比较了 29 份栽培稻的种胚蛋白质表达差异, 发现典型籼稻含有蛋白质 E, 典型粳稻含有蛋白质 A、F, 其中蛋白质 E 和 F 具有几乎相同的分子量 (33.0kD)。但该文未对这 3 个蛋白质进行鉴定, 也

未对更多的籼粳稻进行鉴别验证。

本研究利用 SDS-PAGE 和 western blotting 对籼粳稻的热稳定蛋白进行分析,发现籼粳稻存在特异表达蛋白 Os03g0168100 (Band I、II) 和 OsI_10172 (Band III)。据此建立了鉴别籼粳稻的热稳定蛋白标志带法,对 85 份栽培稻品种进行分类(表 3),发现热稳定蛋白标志带法与程氏指数法的分类结果在典型籼稻和粳稻中的一致度分别为 80.0% 和 86.4%,说明在典型籼稻和粳稻中,基于热稳定蛋白标志带法和程氏指数法的分类相互匹配得较好,这支持了遗传学与形态学同步分化的论点^[10-18]。San 等^[18]和 L 等^[10]认为,典型籼稻和粳稻之间的中间类型在杂交过程中结合了籼稻(或偏籼)的形态学性状与粳稻(或偏粳)的基因组基因,反之亦然。这或可解释在本研究的中间类型材料中,热稳定蛋白标志带法与程氏指数法的分类结果一致度较低的现象。但总体趋势是偏籼稻品种趋向于含有典型籼稻特异蛋白标志带 Band III 偏粳稻品种趋向于含有典型粳稻特异蛋白标志带 Band I、II。因此,特异蛋白 Os03g0168100 和 OsI_10172 可作为鉴定籼粳稻分化的标志,并且可以利用它们对典型籼稻和粳稻进行分类。

程侃声等^[4]的程氏指数法能在现场对单个材料的归属做出较准确的判断,对一般的水稻工作者颇为适用。但此法只适用于较典型的籼粳稻,而对一些籼粳难辨的品种并不理想,而且应用了较多的数量性状,受环境影响较大,进行分类需要一定的经验。同工酶分类法和分子标记法虽然方法可行,但是实验过程和数据处理比较繁琐。本研究的热稳定蛋白标志带法判断方法比较直观,便于统计,可同时对大量样本进行分析。因此,通过对热稳定蛋白标志带法的进一步完善和更大样本量的应用验证,相信该法能广泛应用于典型籼稻和粳稻的鉴别。

致谢:中国农业科学院作物科学研究所稻类种质资源课题组的韩龙植老师和曹桂兰老师、中国水

稻研究所的魏兴华老师和袁筱萍老师在试验材料提供方面给予了很大帮助,特此感谢。

参考文献

- [1] Kato S, Kosaka H, Hara S. On the affinity of rice varieties as shown by fertility of hybrid plants [J]. Bull Sci Fac Agric Kyushu Univ, 1928, 3: 132-147
- [2] Matsuo T. Genealogical studies on cultivated rice [J]. Bull Natl Inst Agric Sci 1952, 3: 1-111
- [3] Oka H L. Intervarietal variation and classification of cultivated rice [J]. Indian J Genet 1958, 18: 79-89
- [4] 程侃声, 周季维, 卢义宣, 等. 云南稻种资源的综合研究与利用 II 亚洲栽培稻分类的再认识 [J]. 作物学报, 1984, 10(4): 271-280
- [5] Glaszmann J C. Isozymes and classification of Asian rice varieties [J]. Theor Appl Genet 1987, 74: 21-30
- [6] 张尧忠, 程侃声, 才宏伟, 等. 栽培稻和普通野生稻酯酶同工酶带的初步研究 [J]. 西南农业学报, 1994, 7(4): 1-6
- [7] 张尧忠, 杨桂芬, 徐宁生, 等. 一条新发现的水稻酯酶酶带及其应用 [J]. 西南农业学报, 1996, 9(3): 125-127
- [8] 孙新立, 才宏伟, 王象坤. 同工酶基因数量化方法对亚洲栽培稻的分类研究 [J]. 作物学报, 1996, 22(6): 693-699
- [9] Takahige I, Darshan S B, Gerard S, et al. Nuclear genome differentiation in Asian cultivated rice as revealed by RFLP analysis [J]. Jpn J Genet 1995, 70(5): 643-652
- [10] Li R H, Jiang T B, Xu C G, et al. Relationship between morphological and genetic differentiation in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Euphytica 2000, 114: 1-8
- [11] 王松文, 刘霞, 王勇, 等. RFLP 揭示的籼粳基因组多态性 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(5): 1038-1043
- [12] 樊叶杨, 庄杰云, 吴建利, 等. 应用微卫星标记鉴别水稻籼粳亚种 [J]. 遗传, 2000, 22(6): 392-394
- [13] 朱作峰, 孙传清, 李自超, 等. 用 SSR 标记对水稻品种的分类研究 [J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(1): 58-61
- [14] 敖光辉, 王丽, 魏琴, 等. 籼粳稻亚种间分子标记差异分析 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(5): 1778-1780
- [15] 张辉, 姜勇. 利用程氏指数和 SSR 标记分析水稻籼粳性 [J]. 山东农业科学, 2009(3): 36-40
- [16] 赵永芳. 生物化学技术原理及应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [17] 康彬, 童哲. 一种利于蛋白质回收的快速 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色-脱色方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(2): 210-211
- [18] Sano R, Morishima H. *Indica-Japonica* differentiation of rice cultivars viewed from variations in key characters and isozymes with special reference to landraces from the Hainan hilly areas [J]. Theor Appl Genet 1992, 84: 266-274
- [19] Sanuyan A H, Shinbashi N. Identification of specific proteins from seed embryos by two-dimensional gel electrophoresis for the discrimination between *indica* and *japonica* rice [J]. Theor Appl Genet 1992, 84: 947-951