

水稻种质资源全基因组 DNA 指纹鉴定方法研究

马小定¹, 崔迪¹, 韩冰¹, 焦成智^{1,2}, 韩龙植¹(¹ 中国农业科学院作物科学研究所/农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程, 北京 100081; ² 天津极智基因科技有限公司, 天津 301700)

摘要: 开展水稻种质资源 DNA 指纹鉴定可以赋予每份种质统一的身份信息, 对于查清我国资源家底、评估资源遗传基础、提高资源利用效率和保护种业知识产权等具有重要意义。本研究利用已完成全基因组 DNA 重测序的 5374 份水稻种质资源为研究材料, 通过参考样本资源的选择、高质量 SNP 位点分析以及最优 SNP 数量和 SNP 组合的挑选, 建立了 2 套水稻种质资源全基因组 DNA 指纹标准。通过主成分分析和系统进化树分析, 指纹标准 1 和 2 选择的 SNP 可以代表 94, 197 个高质量群体共有 SNP 进行群体遗传多样性检测; 群体遗传相似度分析验证了指纹标准 1 和 2 对于开展水稻种质资源遗传相似性鉴定的有效性。本研究有望为水稻种质资源保护与利用以及种业知识产权保护等提供技术支撑, 并为其它作物制定全基因组 DNA 指纹鉴定标准提供参考。

关键词: SNP 标记; 指纹图谱; 遗传相似度; 实质性派生品种

Identification and Evaluation Method for Genome-wide DNA Fingerprinting of Rice Germplasm

MA Xiao-ding¹, CUI Di¹, HAN Bing¹, JIAO Cheng-zhi^{1,2}, HAN Long-zhi¹(¹ National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences,Beijing 100081 ; ² Smartgenomics Technology Institute, Tianjin 301700)

收稿日期: 2022-12-20

修回日期:

网络出版日期:

URL:

第一作者: 马小定, 研究方向为水稻种质资源, E-mail: maxiaoding@caas.cn

通信作者: 韩龙植, 研究方向为水稻种质资源, E-mail: hanlongzhi@caas.cn

焦成智, 研究方向为作物进化与功能基因组学, E-mail: jiaocz1990@163.com

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD1200500); 中国农业科学院科技创新工程项目; 国家农作物种质资源保护项目(2018NWB036-01, 2018NWB036-12-2); 国家农作物种质资源平台项目(NICGR2018-001)

Foundation projects: National Key Research and Development Program of China (2021YFD1200500); the CAAS Science and Technology Innovation Program; Protective Program of Crop Germplasm of China (2018NWB036-01, 2018NWB036-12-2); the National Infrastructure for Crop Germplasm Resources (NICGR2018-01)

Abstract: DNA fingerprinting analysis that enables assigning uniform identity information for each rice germplasm is of great significance for identifying the genetic basis of rice germplasm resources, improving their utilization efficiency and protecting the intellectual property rights of the seed industry in China. In this study, using 5374 rice accessions that have been genotyped by the whole-genome resequencing, two sets of genome-wide DNA fingerprinting standards were established through the selection of reference sample resources, analysis of high-quality SNP loci, and selection of the optimal number of SNPs and SNP combinations. Through principal component analysis and phylogenetic tree analysis, SNPs in the collection of fingerprinting standards 1 and 2 could represent 94,197 high-quality population common SNPs applicable for the population genetic diversity. In addition, population genetic similarity analysis verified the effectiveness of fingerprinting standards 1 and 2 to uncover the genetic similarity identification of rice germplasm resources. This study is expected to provide technical support for the conservation and utilization of rice germplasm resources and the protection of intellectual property rights in the seed industry, and to provide reference for the development of DNA fingerprinting standards for other crops.

Key words: SNP marker; Fingerprinting; Genetic similarity; Essentially derived variety

“DNA 指纹”概念最早由英国科学家 Alec Jeffreys 于 1985 年提出^[1], 用于表示人类基因组 DNA 经酶切和探针杂交后形成的 DNA 条带。在人类基因组中存在的多态性极高的区域, 该区域 DNA 经酶切形成的 DNA 条带可区分不同的个体, 像人的指纹一样, 因此称为 DNA 指纹。多个 DNA 指纹组合在一起, 形成了某个个体的指纹图谱。

近年来, 随着 DNA 指纹鉴定技术的快速发展与种质资源的有效保护和高效利用的迫切需求, 水稻等重要农作物种质资源的 DNA 指纹鉴定工作越来越受到重视。目前在我国国家作物种质库保存水稻种质资源达 9 万余份, 包括野生稻、地方品种、选育品种、品系和遗传材料以及国外引进资源等, 对这些水稻种质资源构建 DNA 指纹图谱是当务之急^[2,3]。首先, 通过构建 DNA 指纹图谱, 可以克服依赖形态特征鉴定种质资源的局限性, 且为优异基因发掘和种质资源的有效利用提供 DNA 指纹信息, 将显著提高种质资源的利用效率; 其次, 可以为水稻品种知识产权保护提供 DNA 指纹鉴定技术支撑。新《种子法》大幅提升了针对种业创新的相关知识产权保护, 尤其是涉及国家粮食安全及老百姓饭碗的种业知识产权保护。DNA 指纹鉴定赋予品种统一的身份信息, 可以明晰知识产权归属、保护产权人权益和打击假冒伪劣套牌侵权行为。此外, 通过 DNA 指纹鉴定, 可以鉴别和剔除种质库保存的重复资源, 节省宝贵的库存空间, 减少鉴定评价的工作量, 提高种质资源的保存质量与利用效率。

水稻是我国最重要的粮食作物之一, 对保障国家粮食安全具有举足轻重的地位^[4], 因此水稻 DNA 指纹鉴定一直备受关注。水稻品种 DNA 指纹鉴定方法的研究起始于 2007 年, 主要是利用 24 个 SSR 分子标记扩增产物的电泳图谱对不同水稻品种进行鉴别。到目前为止, 水稻 DNA 指纹鉴定的分子标记类型经历了 SSR、SNP 和 MNP 等, 检测位点的数量由 24 个增加到几千个, 基因分型方法包括银染、荧光扫描和 SNP

芯片扫描等^[5-8]。已建立的水稻 DNA 指纹鉴定方法主要是针对水稻选育品种，而针对野生稻、地方品种、国外引进资源和遗传材料等类型的种质资源鉴定方法还鲜有报道。另外，现有 DNA 鉴定平台间的指纹数据相对独立，不同种质资源相同检测平台的鉴定数据统一性也不完全一致，这些问题将为后续水稻种质资源的相似度比较、特别是实质性派生品种的鉴别增加了难度。

本研究利用来自全国不同省份和不同国家的 5374 份水稻种质资源为基本分析群体，包括选育品种（品系）、地方品种、国外引进资源以及杂草稻和野生稻等种质资源，结合深度（15×）全基因组重测序数据，全面分析 SNP 在染色体上的均匀分布、样本多样性和两两样本间遗传相似度等指标，通过迭代计算明确了构建全基因组 DNA 指纹所包括的最优 SNP 数量和 SNP 组合，提出了水稻种质资源全基因组 DNA 指纹鉴定方法（图 1），期望为水稻种质资源的保护与利用、种业知识产权的保护等提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料共 5374 份，包括选育品种（品系）3749 份、地方品种 1203 份、国外引进资源 297 份以及杂草稻 104 份和野生稻 21 份。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组重测序

DNA 提取与质检：使用 DNasecure Plant Kit（TIANGEN）进行 DNA 提取，使用 NanoDrop 2000 分光光度计（Thermo Fischer Scientific）、琼脂糖凝胶电泳和 Qubit 荧光计（Invitrogen）三种方法对提取的 DNA 进行定量和质检。

文库构建：检验合格的 DNA 样品通过 Covaris 破碎仪随机打断成长度为 350bp 的片段。采用 TruSeq Library Construction Kit 进行建库，严格使用说明书推荐的试剂和耗材。DNA 片段经末端修复、加 ployA 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成整个文库制备。

文库质检：文库构建完成后，先使用 Qubit2.0 进行初步定量，稀释文库至 1ng/μl，随后使用 Agilent 2100 对文库的插入片段大小进行检测。插入片段大小符合预期后，使用 qPCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量（文库有效浓度 > 2 nM），以保证文库质量。

上机测序：库检合格后，把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后，利用 Illumina NovaSeq6000 测序平台进行 PE150 模式测序。

1.2.2 参考基因组比对和变异检测

数据质控：利用 fastp^[9]的默认参数进行质控，过滤不合格 reads，得到的 clean reads 用于后续分析。reads

过滤标准如下：(1) 修整带接头序列的 reads；(2)当单端测序 read 中含有 N 的碱基数大于 5，去除此对 paired-end reads；(3)当单端测序 read 中含有的低质量（ $Q \leq 15$ ）碱基数超过该条 read 长度比例的 40%时，需要去除此对 paired-end reads。

比对参考基因组：基于 clean reads，使用 BWA 软件^[10]（参数“bwa mem -k 32 -M -R”）进行参考基因组比对分析，使用 Samtools^[11]对比对结果进行排序和去重，参考基因组选择水稻日本晴基因组 MSU v.7.0 版。

SNP 检测与过滤：使用 GATK 软件^[12]进行 SNP 变异检测。

1.2.3 SNP 位点筛选

为获得高质量的 SNP 标记，按照如下标准进行过滤：(1)SNP 的 reads 支持数不低于 8；(2)位点对比的质量值(RMS Mapping Quality, MQ)不低于 40；(3)基因型的质量值(Genotype Qualit, GQ)不低于 5；(4)每个位点的样品缺失率为 0；(5)每个位点的最小等位基因频率 $MAF > 0.2$ ；(6)每个位点的杂合度 < 0.05 ；(7)独立标记位点的连锁强度(r^2) < 0.8 。

1.2.4 主成分分析

使用 GCTA 软件^[13]进行主成分降维聚类，取遗传解释率最高的前三个主成分对 5374 份水稻种质材料进行聚类。

1.2.5 系统进化树分析

使用 TreeBest (v1.9.2)^[14]软件对 5374 份水稻种质材料进行系统进化树分析，并进行 1000 次迭代检验。

1.2.6 遗传相似度计算

$$GS_{ij} = n_{ij}/N_{ij} \times 100\%$$

式中 GS_{ij} 表示样品 i 与指定资源 j 的遗传相似度； n_{ij} 表示样品 i 与指定资源 j 中均检测出、而且基因型相同的 SNP 位点数目； N_{ij} 表示样品 i 与指定资源 j 中均检测出的 SNP 位点数目。

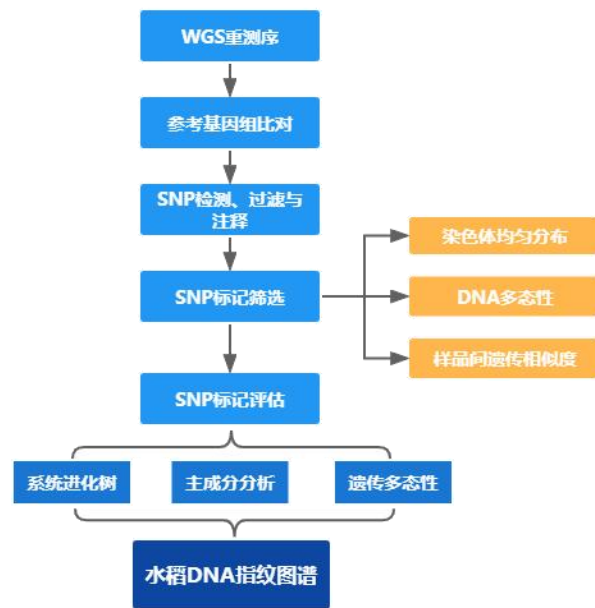


图 1 指纹图谱构建流程

Fig. 1 Fingerprint construction workflow

2 结果与分析

2.1 群体共有 SNP 位点分析

前期，实验室利用重测序技术对 5374 份水稻种质资源进行了基因型精准鉴定^[15-16]，测序平均深度约 15.2×，与参考基因组比对后，共获得了覆盖全基因组的 28,683,046 个初始 SNP；然后，根据测序深度、比对质量值、基因型质量值、位点缺失率、最小等位基因频率、杂合率等参数过滤后获得 94,197 个高质量的群体共有 SNP；最后，根据 LD 连锁强度 (r^2) 过滤掉连锁紧密的 SNP，最终获得 6,819 个高质量的独立 SNP。

2.2 SNP 位点筛选

根据 5374 份种质资源的地理来源与种质类型，从中选取了 3960 份资源用于 SNP 位点筛选的参考群体。以 6,819 个高质量的独立 SNP 为基础，根据标记在染色体上的均匀分布度、标记在群体中的多样性表现和两两样本间遗传相似度 ($\leq 92\%$ ^[8]) 等指标，通过迭代计算确定构建全基因组 DNA 指纹所包括的最优 SNP 数量和 SNP 组合。为了使鉴定结果更可靠，构建了 2 套 DNA 指纹标准。

2.2.1 指纹标准 1

为了提高种质资源指纹鉴定效率，我们首先构建了指纹 1 标准，每条染色体包括 20 个 SNP，共 240 个位点；较少的位点数以提高后续指纹数据库比对运算速度。为了明确最有效的 SNP，以染色体分布均匀性为基础，每次抽取 240 个 SNP，随机抽取 20 次，计算两两样本间的遗传相似度，以遗传相似度 $\leq 92\%$ 为标准统计可区分的样本数。其中，第 11 次抽样的 SNP 组合可区分的样本数最多，为 2907 个样本（图 2），

占总样本数的 73.4%，并且染色体分布也比较均匀（图 3）。因此，将第 11 次抽样得到的 240 个 SNP 标记定为指纹图谱 1 标准，具体信息见附表 1。

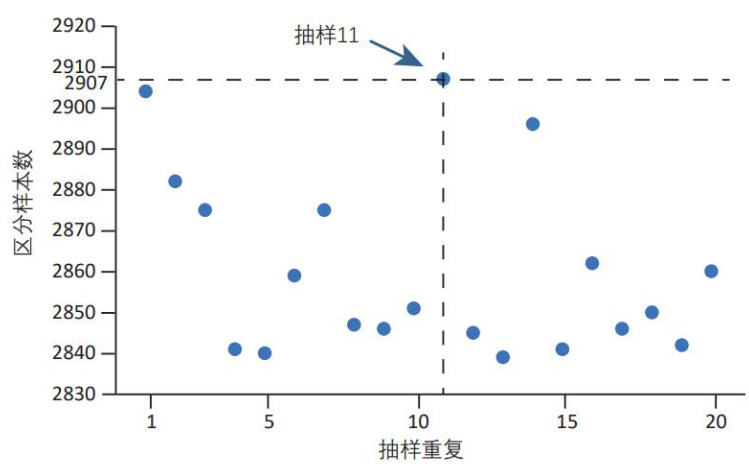


图 2 20 次随机抽样的 SNP 组合可区分的样本数量
Fig.2 Number of samples distinguishable by 20 randomly sampled SNPs

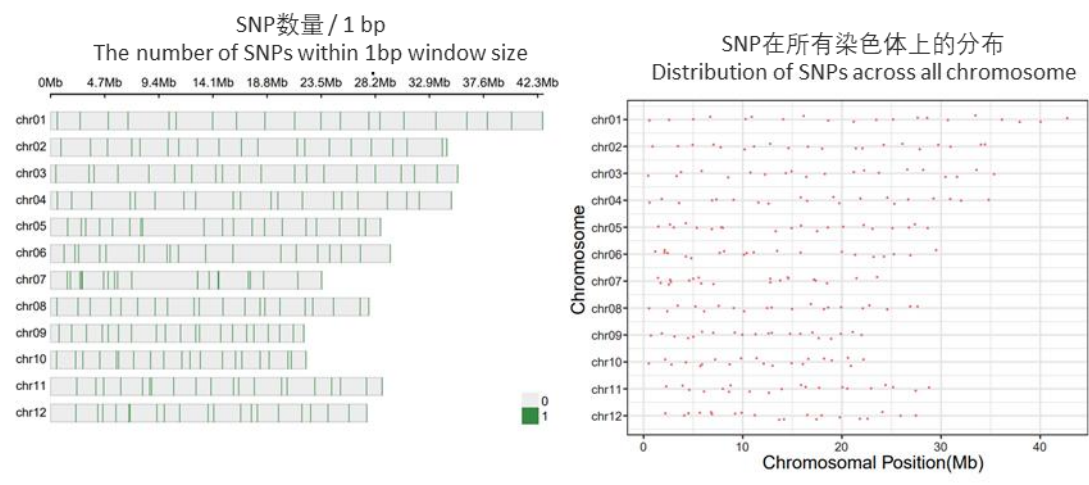


图 3 指纹 1 SNP 标记在染色体上的分布
Fig.3 Distribution of SNP markers on chromosomes in fingerprint standard1.

2.2.2 指纹标准 2

在指纹 1 的基础上，我们构建了指纹 2 标准，目的是以最少的 SNP 标记区分最多种质资源。以指纹 1 的 240 个 SNP 为基础，每轮增加 12 个 SNP（每条染色体 1 个 SNP），考虑 SNP 的染色体分布均匀性，随机抽取 20 次，每次抽样都进行 2000 次迭代计算，然后基于增加后的 SNP 计算两两样本间的遗传相似度，以遗传相似度 $\leq 92\%$ 为标准统计可区分的样本数量。在标记增加到第 313 轮（924 个 SNP）的第 11 次抽样

时可区分的样本数最多，为 3730 个样本（图 4），占总样本数的 94.2%，并且染色体分布也比较均匀（图 5）。
将迭代到 313 轮、第 11 次抽样得到的 924 个 SNP 标记定为指纹 2 标准，具体信息见附表 2。

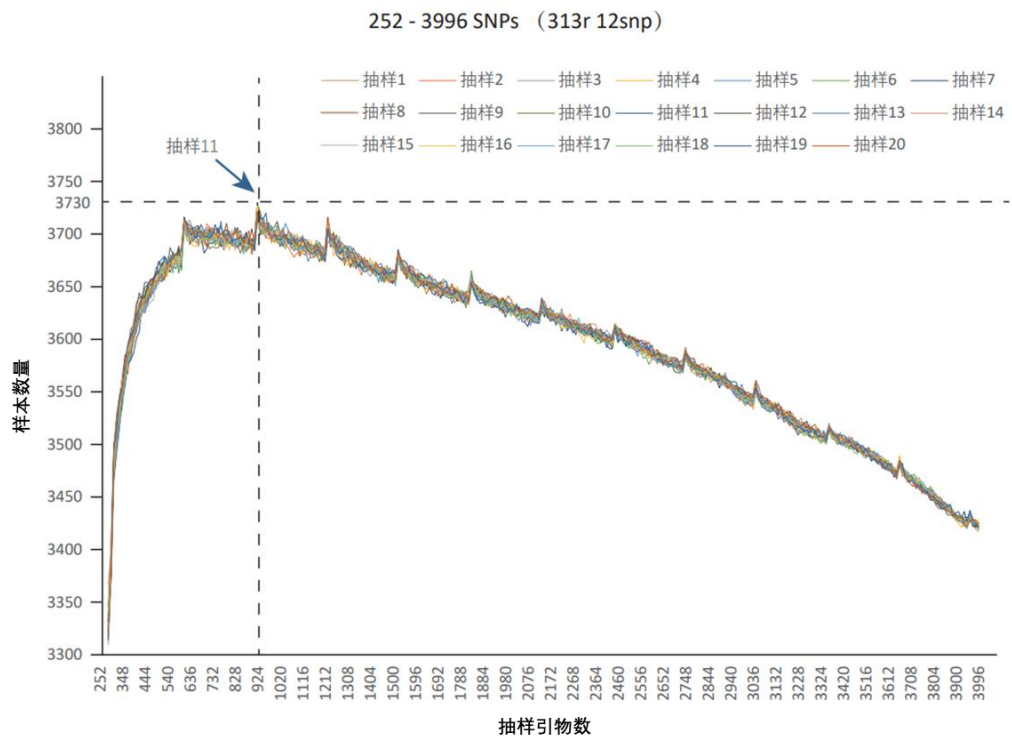


图 4 随机抽样和迭代计算的 SNP 组合可区分的样本数量
Fig.4 Number of samples distinguishable by the randomly sampled and iterative calculated SNPs

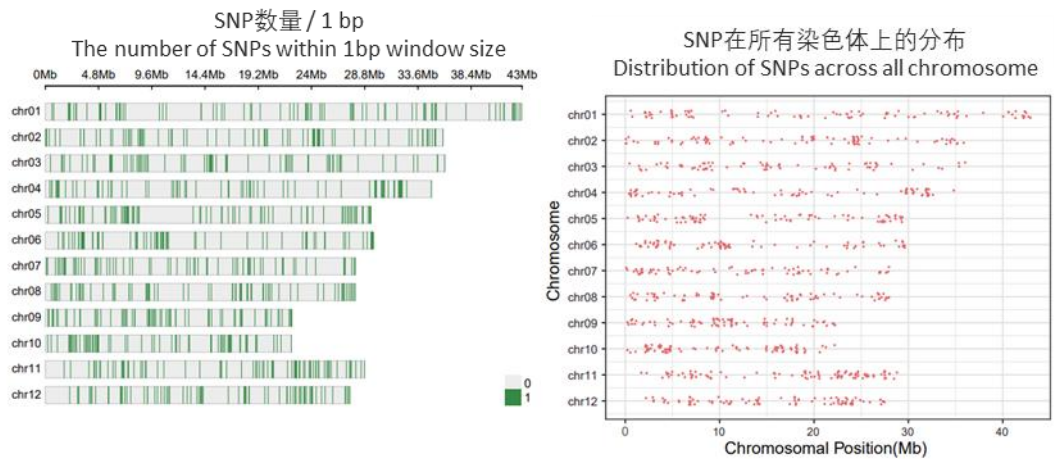


图 5 指纹 2 SNP 标记在染色体上的分布
Fig.5 Distribution of SNP markers on chromosomes in fingerprint standard 2.

2.3 SNP 位点评估

为了评估建立的指纹标准 1 和 2 能否有效检测群体的遗传多样性，针对 5374 份水稻种质资源，分别利用 94,197 个高质量的群体共有 SNP、指纹 1 的 240 个 SNP 和指纹 2 的 924 个 SNP 进行系统进化关系和 PCA

主成分聚类分析。

根据系统进化树分析，基于 94,197 个高质量群体共有 SNP 将 5374 份水稻种质资源划分为籼、粳稻两个主要类群，每个类群内部又划分为选育品种、地方品种、杂草稻和野生稻等（图 6A），种质类型相同的资源基本聚合在一起；基于指纹 1 的 240 个 SNP 标记和指纹 2 的 924 个 SNP 标记进行系统进化关系分析，其聚类效果与 94,197 个 SNP 的结果一致（图 6B, 6C）。

根据主成分分析，基于 94,197 个高质量的群体共有 SNP 将 5374 份水稻种质资源划分为粳、籼稻两个主要类群，每个类群内部又分为若干小类群（图 7A），种质类型相同的资源基本聚合在一起；基于指纹 1 和指纹 2 的 SNP 标记进行主成分聚类分析，其聚类效果与 94,197 个 SNP 的结果一致（图 7B, 7C）。因此，本研究建立的指纹标准 1 和 2 所选取的 SNP 可以有效代表 94,197 个高质量的群体共有 SNP 的进行群体遗传多样性检测。

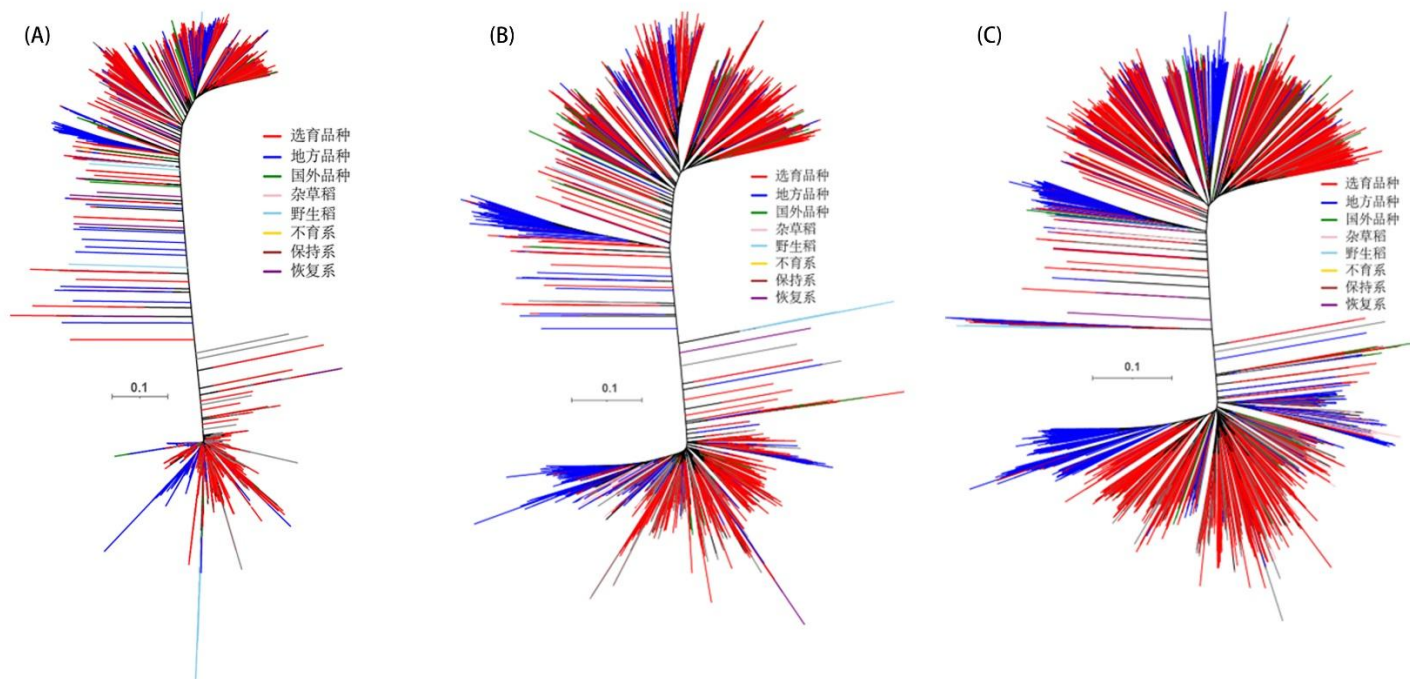


图6 基于94,197个SNP (A)、指纹1的240个SNP (B)和指纹2的924个SNP (C) 分析5374份水稻种质资源的系统进化关系

Fig. 6 Phylogenetic relationship of 5374 rice accessions built from 1,000 randomly selected 94,197 SNPs(A), 240 SNPs (B) and 924 SNPs (C).

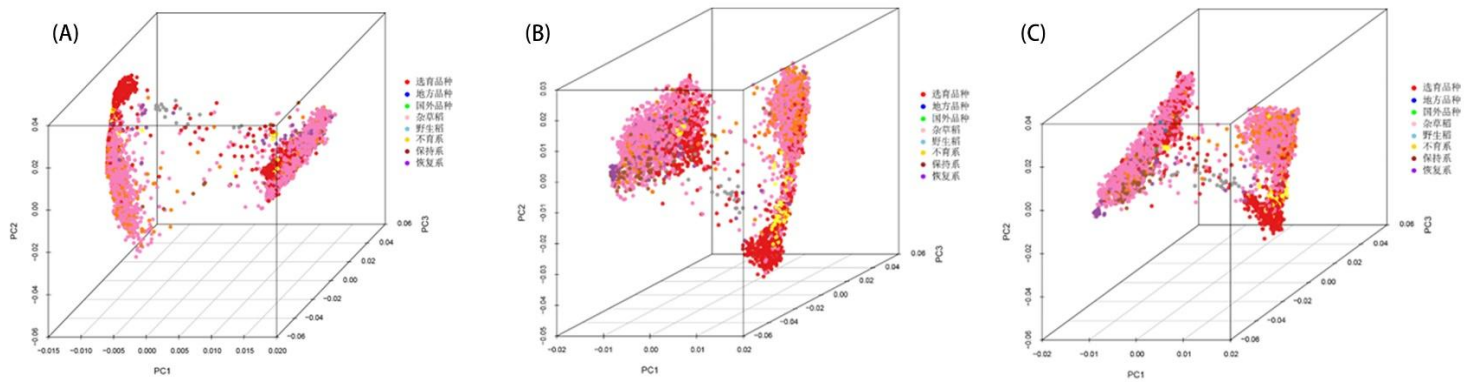


图 7 基于 94,197 个 SNP (A)、指纹 1 的 240 个 SNP (B)和指纹 2 的 924 个 SNP (C) 分析 5374 份水稻种质资源的主成分聚类图

Fig.7 PCA plots of 5374 rice accessions built by 94,197 SNPs(A), 240 SNPs (B) and 924 SNPs (C).

2.4 群体遗传相似度分析

为了验证建立的指纹标准的检测效果，针对筛选的 3960 份参考群体，分别利用指纹标准 1 和 2 的 SNP 计算了两两样本间的遗传相似度。基于指纹标准 1 的 SNP 位点，3960 份水稻资源的两两遗传相似度在 11.67%–99.58%之间，均值为 55.34%，中位数为 51.67%。小于 92%的样本对有 7832535 对，占总样本对的 99.920%；大于 92%且小于 97%的样本对有 6190 对，占总样本对的 0.079%；大于 97%的有 95 对，占总样本对的 0.001%（图 8A）。

基于指纹标准 2 的 SNP 位点，5374 份水稻资源的两两遗传相似度在 18.29%–96.75%之间，均值为 54.90%，中位数为 50.43%。小于 92%的样本对有 7838504 对，占总样本对的 99.996%；大于 92%且小于 97%的样本对有 316 对，占总样本对的 0.004%；没有大于 97%的样本对（图 8B）。从结果可以看出，两套指纹标准相似度分布有差异；在相似度阈值为 92%时，指纹标准 2 鉴定的样本对数更多。因此，通过 2 套标准进行综合分析，鉴定结果可以相互验证，说明建立 2 套指纹标准是非常必要的。

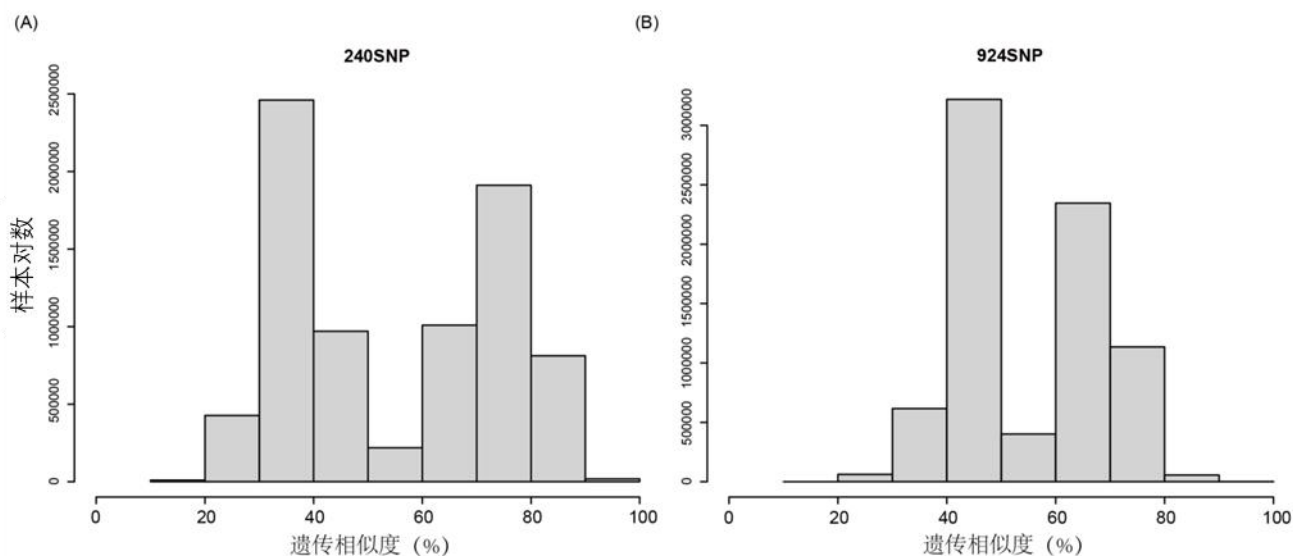


图8 基于指纹1的240个SNP(A)和指纹2的924个SNP(B)分析3960份水稻种质资源两两间遗传相似度

Fig.8 Pairwise genetic similarity 3960 rice accessions calculated by 240 SNPs (A) and 924 SNPs (B)

3 讨论

本研究利用水稻种质资源 DNA 第二代重测序数据，以群体共有的 6819 个独立 SNP 为基础，根据 SNP 在染色体上的均匀分布、多样性表现和两两样品遗传相似度等三个方面分析，构建了 2 套 DNA 指纹标准。第 1 套 DNA 指纹标准包括 240 个 SNP，第 2 套 DNA 指纹包括 924 个 SNP。在最优 SNP 数量和 SNP 组合筛选时，根据 92% 的相似度阈值，指纹标准 2 可鉴别的资源份数多于指纹标准 1 的，可鉴别样本总数的 94%，但是仍然没有达到 100%。可能的原因是，虽然从地理来源和种质类型上，在一定程度上规避了参考样本的同质性，但是不能避免有些资源通过不同区域相互引种而产生的高遗传相似性。利用指纹标准 1、2 选择的 SNP 位点，对 5374 份种质资源进行系统进化树和主成分分析，结果显示指纹 1 和指纹 2 的 SNP 的聚类效果与利用 94,197 个高质量的群体共有 SNP 标记聚类结果一致，说明本研究 SNP 位点选择的有效性。

本研究构建的 2 套 DNA 指纹标准具有广泛的应用前景。开展水稻种质资源 DNA 指纹鉴定，不仅能赋予每份种质资源独一无二的身份信息，而且还可以将拟入库资源与库存资源进行比对，提高种质资源收集保护效率。目前，利用 2 套 DNA 指纹标准，我们已经构建了超过 10,000 份水稻种质资源的指纹图谱数据库，并开发了查询和相似度比对系统（即将上线）。通过标准的 DNA 指纹鉴定，可以方便、快速、准确的查询和比对两两样本或者样本与数据库种质的遗传相似度，特别适合《新种子法》的实质性派生品种的界定。

与现有方法比较，本研究构建的 DNA 指纹鉴定方法具有三方面优势：一是本指纹标准适用的范围更广。在构建参考样本群体时，我们增加了地方品种、国外品种、野生稻和杂草稻等特殊资源类型，确保选择的 SNP 位点多样性可以覆盖这些类型的水稻资源。利用本研究的标准，可以很明确的将不同类型资源进行进化树分析和群体结构分析，充分说明了本标准的广适用性。而目前其它鉴定方法，仅针对水稻育成品种^[6-9]，

而对其它类型的水稻种质鉴定效果未知。二是鉴定结果更可靠。为了鉴定结果的准确性，我们构建了 2 套指纹标准，当鉴定两两样本是否为同一材料时，如果指纹 1 鉴定的相似度 $\leq 92\%$ ，可以确定两两样本不是同一材料；当指纹 1 鉴定的相似度 $> 92\%$ 时，可以利用指纹 2 的标准再分析，如果相似度 $\leq 92\%$ ，可以确定两两样本不是同一材料，如果相似度 $> 92\%$ 时，可以确定一个样本是另一个样本的实质性派生品种或者两两疑似为同一品种。三是可以低成本、高通量开展鉴定。水稻基因组很小，第二代测序成本越来越低，而且本方法是一次性投入，即可进行全面分析。后续我们将构建从测序下机到 DNA 指纹自动输出的一站式分析系统，使每位研究人员都可以快速判断自己研究材料的独特性和新颖性。

参考文献

- [1] Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL: Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 1985, 314(6006):67-73
- [2] 刘旭, 李立会, 黎裕, 等. 作物种质资源研究回顾与发展趋势. *农学学报*, 2018 (1): 1-6
Liu X, Li L H, Li Y, et al. Crop germplasm resources advances and trends. *Journal of Agriculture*, 2018 (1): 1-6
- [3] 韩龙植. 水稻种质资源基础性工作研究进展. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(1):195
Han LZ. Research progress of basic work on rice germplasm resources. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013,14 (1):195
- [4] Surridge C. Rice cultivation: feast or famine? *Nature*, 2004, 428(6981):360-361
- [5] 中华人民共和国农业行业标准. NY/T 1433-2007, 水稻品种鉴定 DNA 指纹方法
Agricultural industry standard of the People's Republic of China. NY/T 1433-2007, Identification of Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties Using Microsatellite Markers
- [6] 中华人民共和国农业行业标准. NY/T 1433-2014, 水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法
Agricultural industry standard of the People's Republic of China. NY/T 1433-2014, Protocol for identification of Rice Varieties - SSR Marker Method
- [7] 中华人民共和国农业行业标准. NY/T 2745-2021, 水稻品种真实性鉴定 SNP 标记法
Agricultural industry standard of the People's Republic of China. NY/T 2745-2021, Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties Genuineness Identification – SNP based Method
- [8] 中华人民共和国国家标准. GB/T 38551-2020, 植物品种鉴定 MNP 标记法
The State Standard of the People's Republic of China. GB/T 38551-2020, Identification of Plant Varieties – MNP marker Method
- [9] Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. 2018, 34(17):i884-i890
- [10] Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009, 25(16):2078-2079
- [11] Li H. and Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 2009, 25:1754-60
- [12] Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013;43(1110):11.10.1-11.10.33
- [13] Yang J, Lee SH, Goddard ME, Visscher PM. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 2011, 88:76-82
- [14] A.J. Vilella, J. Severin, A. Ureta-Vidal, L. Heng, R. Durbin, E. Birney. EnsemblCompara GeneTrees: complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates *Genome Res*, 2009, 19:327-335
- [15] Bing Han, Di Cui, Xiaoding Ma, Guilan Cao, Hui Zhang, Hee Jong Koh, Longzhi Han. Evidence for evolution and selection of drought-resistant genes based on high-throughput resequencing in weedy rice, *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(7): 1949–1962
- [16] Di Cui, Han Zhou, Xiaoding Ma, Zechuan Lin et al. Genomic insights on the contribution of introgressions from Xian/Indica to the genetic improvement of Geng/Japonica rice cultivars. *Plant Communications*, 2022, 3(3):100325,
<https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100325>