

云南地方稻 waxy 基因序列多样性分析

马继琼,孙一丁,杨奕,王炎炎,许明辉

(云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所/云南省农业生物技术重点实验室/
农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室,昆明 650223)

摘要:利用特异引物 Wx-F/AG-2 对来源于云南省 16 个州市 64 个县 252 份地方稻种 waxy 基因中含有微卫星序列 (CT)_n 和第一内含子的序列进行 PCR 扩增并测序。结果表明在 268 个碱基的序列内检测到 4 个变异位点:第一内含子上游 56 位处 (CT)_n 存在 (CT)₁₀、(CT)₁₁、(CT)₁₂、(CT)₁₄、(CT)₁₆、(CT)₁₇、(CT)₁₈、(CT)₁₉、(CT)₂₀、(CT)₂₁ 等 10 种变异;(CT)₁₁、(CT)₁₈、(CT)₁₇、(CT)₁₂、(CT)₁₀ 等 5 种单倍型是云南优势类型,合计占供试材料的 92.85%;籼稻以 (CT)₁₀、(CT)₁₁、(CT)₁₂ 为主,而粳稻以 (CT)₁₁、(CT)₁₂、(CT)₁₇ 和 (CT)₁₈ 为主;第一内含子 +1 位存在 G/T 变异,81.75% 品种是 G,T 只出现在 (CT)₁₆、(CT)₁₇、(CT)₁₈ 和 (CT)₂₀ 的品种中,其频率在籼稻中为 13.48%,粳稻 20.86%,水稻 16.17%,陆稻 22.35%,粘稻 10.47%,糯稻 42.62%。+86-88 位存在 ATA/GTA/A--3 种变异;+128 位处存在 (AATT)₅ 和 (AATT)₆ 2 种变异。根据这 4 个变异位点,可将 252 个云南地方稻种归为 16 种单倍型,其中 Wx4 (32.54%)、Wx9 (13.89%)、Wx12 (12.7%)、Wx5 (12.3%)、Wx1 (8.33%)、Wx11 (7.94%) 是主要类型,合计 87.7%,其他类型频率较低。籼/粳亚种、水/陆稻和粘/糯中存在单倍型种类和单倍型频率两方面的差异,籼稻/粳稻、水/陆稻和粘/糯各亚种或生态型均有独享的单倍型,共享单倍型频率也存在差异,表明亚种间或生态型间发生了一定的遗传分化。单倍型地理分布分析表明,临沧、普洱单倍型种类最丰富,以之为中心向外扩展,单倍型种类有减少的趋势,第一内含子 +1 位的 T 主要分布在临沧、普洱、西双版纳、德宏等南部地区。本研究揭示了云南地方稻种群 waxy 基因的变异和分布特点。

关键词:水稻;云南;waxy 基因;单倍型

Diversity Analysis of the waxy Gene of the Local Rice Variety from Yunnan

MA Ji-qiong, SUN Yi-ding, YANG Yi, WANG Yan-yan, XU Ming-hui

(The Key Laboratory of Biotechnology Research of Yunnan Province/Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation of Ministry of Agriculture/Institute of Biotechnology and Genetic Resources, YAAS, Kunming 650223)

Abstract: The waxy gene sequences including the microsatellite sequence (CT)_n and the part of first intron were amplified and sequenced using the PCR specific primers Wx-F/AG-2 for 252 rice landraces from 16 areas 64 counties of Yunnan. The results showed that four variable sites were detected in the waxy gene sequences including 268 bases. The variations (CT)₁₀, (CT)₁₁, (CT)₁₂, (CT)₁₄, (CT)₁₆, (CT)₁₇, (CT)₁₈, (CT)₁₉, (CT)₂₀, (CT)₂₁ were tested at site 56 in the upstream of the first intron, and (CT)₁₁, (CT)₁₈, (CT)₁₇, (CT)₁₂, (CT)₁₀ were the advantages types, which accounted together for 92.85% in the test material, and indica with (CT)₁₀, (CT)₁₁, (CT)₁₂ and japonica with (CT)₁₁, (CT)₁₂, (CT)₁₇ and (CT)₁₈. The variation G/T was present in the first intron +1 site, 81.75% cultivars possessing G. T was present only in the cultivars with (CT)₁₆, (CT)₁₇, (CT)₁₈, and (CT)₂₀, and the frequency was 13.48% in indica and japonica 20.86%, water rice 16.17% and upland rice 22.35%, no-glutinous rice 10.47% and glutinous rice 42.62. There were three variations including ATA/

收稿日期:2016-01-28 修回日期:2015-04-28 网络出版日期:2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1548.040.html>

基金项目:科技部基础性工作专项(2012FY110200);国家自然科学基金(31360331)

第一作者主要从事作物种质资源研究。E-mail: mjq_503@163.com

通信作者:许明辉,主要从事作物分子遗传学。E-mail: xuminhui@sohu.com

GTA/A at +86-88 site of first intron, and (AATT)₅ and (AATT)₆ variations at +128 site. According to these four polymorphic sites, the 252 rice landraces were classified into 16 haplotypes, and W_{x4} (32.54%), W_{x9} (13.89%), W_{x12} (12.7%), W_{x5} (12.3%), W_{x1} (8.33%), W_{x11} (7.94%) were the main types in Yunnan, which accounted together for 87.7%, other types were rare. The subspecies *indica*/*japonica*, the ecotypes water/upland rice and non-glutinous/glutinous rice had respectively exclusive haplotype, indicating that genetic differentiation were occurred between subspecies or ecotypes. Geographical distribution of haplotypes showed that the areas of Lincang and Puer were the central area with abundant haplotypes, and outward the haplotypes were decreased gradually, the T at the first intron +1 site were mainly distributed in the southern area of Yunnan, Lincang, Pu'er, Xishuangbanna and Dehong. This study revealed the variability and distribution of the waxy gene in local rice cultivar population of Yunnan.

Key words: rice; Yunnan; waxy gene; haplotype

稻米的直链淀粉含量主要受 W_x 位点控制,直链淀粉是影响稻米品质的重要性状,为此该基因不仅受到自然选择,同时受到人类长期的强烈的人工选择。H. F. J. Bligh 等^[1]发现 W_x 基因第一内含子剪切点上游 56 bp 处有一段 (CT)_n 微卫星序列,并设计了相应的分析引物 484/485。(CT)_n 的多态性及与水稻直链淀粉含量之间的相关性已被证实^[2-6]。不过在研究实践中发现引物 484/485 的 PCR 产物存在重复性差和电泳难分辨重复数等问题。进一步研究揭示,W_x 基因第一内含子中 +1 位置的碱基是 G 还是 T 与直链淀粉含量相关^[7-11]。N. M. Ayres 等^[2]根据 W_x 基因第一内含子供体 +1 位 G/T 多态性,最早设计了 PCR-Acc I 检测方法,蔡秀玲等^[12]发展成为 PCR-Acc I 分子标记,毛兴学等^[13]又根据 PCR 扩增时引物 3' 末端碱基与模板的匹配程度对扩增效率的影响而设计了 PCR 一步法。在实际应用中,这些方法均存在过程烦琐、结果重复性差等问题。

云南由于地形气候复杂,位于中国与南亚 2 个稻种起源中心之间,受 2 个独立起源中心的强烈影响,从海拔 76 m 的河口到 2700 m 的永宁镇均有亚洲栽培稻分布,加上各少数民族的各种各样的传统耕作习惯和农耕文化的影响,是世界上最大的稻种遗传多样性中心之一^[14-16],品种数约占中国栽培稻的 8.6%,中国初级核心种质的四分之一,为中国栽培稻变种的总和^[17],在遗传进化上具有一定的特殊性。

本研究利用特异引物 W_x-F/AG-2 对来源于云南省 16 个州市 64 个县的 252 份地方稻种 waxy 基因中含有微卫星序列 (CT)_n 和第一内含子的序列进行 PCR 扩增并测序。以揭示云南地方稻种群 waxy 基因的变异和分布特点,指导种质资源发掘利用,并为稻种演化传播研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

材料为来源于云南省 16 个州市 64 个县(市)的 252 份地方稻品种。按籼粳稻分类,籼稻 89 份、粳稻 163 份;按水陆稻分类,水稻 167 份、陆稻 85 份;按粘糯稻分类,粘稻 191 份、糯稻 61 份。材料均由云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所保存。以日本晴作为测序对照品种,以云南推广品种楚粳 27 作为现代粳稻对照品种。

1.2 DNA 提取

采用 CTAB 法提取基因组 DNA。

1.3 PCR 扩增及测序

利用蔡秀玲等^[12]设计的 PCR 引物 W_x-F (5' CTTTGTCTATCTCAAGACAC 3') 和 AG-2 (5' TCAGCCTAACCAAACATAACGAA 3'),由华大基因公司合成。反应体系为 20 μL: Buffer 2 μL, dNTPs 1 μL, primer W_x-F 1 μL, AG-2 1 μL, Ex Taq 酶 0.4 μL, ddH₂O 13.6 μL, DNA 模板 1 μL。反应程序:95 °C, 5 min; 95 °C, 40 s; 57 °C, 30 s; 72 °C, 50 s; 41 个循环; 72 °C, 10 min。PCR 扩增产物送至华大基因公司用引物 AG-2 进行测序(由于 CT 重复的影响,不可用 W_x-F 作为测序引物),每个材料重复测序 2 次,所得序列用软件 BioLign 进行比较分析。

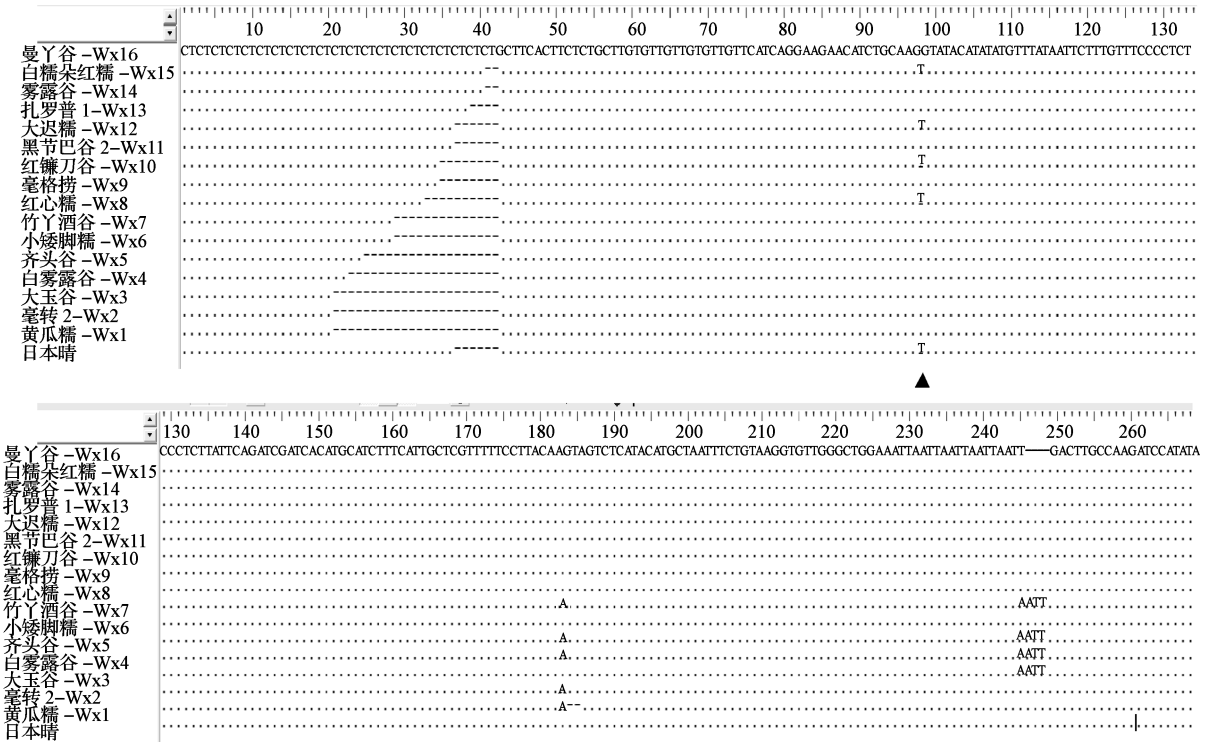
2 结果与分析

2.1 云南地方稻种 waxy 基因 (CT)_n 卫星序列和第一内含子变异位点和特点

蔡秀玲等^[12]设计的 PCR 引物 W_x-F 和 AG-2 分别位于 (CT) 重复上游 13 ~ 25 个碱基处和第一内含子 +190 处,对基因组 DNA 可扩增出 300 bp 左右的 1 条带,扩增的序列包含了 (CT) 重复和 190 bp 第一

内含子的序列。扩增产物送至华大基因公司进行测序。试验所获得的日本晴序列长度和碱基顺序与从 GenBank 获得的序列 NC_008399.2 一致,说明测序资料可靠。本研究对 268 个碱基序列(图 1)碱基进

行比较分析,该序列包含第一内含子上游 97 个碱基(图 1 中标尺 1~97)和第一内含子+1-170(图 1 中标尺 98~268)碱基。



“.”代表与第 1 行碱基相同,“-”代表碱基缺失,箭头所指为第一内含子+1 位(G/T 变异)

“.”:the same as the bases of the first line,“-”:the missing bases,the arrow mark;the site +1 of first intron of waxy gene

图 1 云南 16 个品种 waxy 基因单倍型序列比较

Fig. 1 The sequences of 16 haplotype of waxy gene from Yunnan

通过比对,在这段序列上,品种间存在 4 个变异位点,即第一内含子上游 56 位前(图 1 中标尺 1~42 位)CT 重复次数存在 10 种变异,即 (CT) 10、(CT) 11、(CT) 12、(CT) 14、(CT) 16、(CT) 17、(CT) 18、(CT) 19、(CT) 20、(CT) 21, N. M. Ayres 等^[2] 分析的美国品种和舒庆尧等^[4] 分析的中国南方稻区推广品种分别有 8 种和 7 种变异,云南地方稻中未发现 (CT) 8 类型,但新发现了 (CT) 12 和 (CT) 21 2 种变异类型;第一内含子+1 位(图 1 中标尺 98)存在 G/T 变异;+86-88(图 1 中标尺 183~185)存在 ATA/GTA/A--3 种变异;+128 位处存在 (AATT)5 和 (AATT)6 2 种变异(图 1 中标尺 225~248)。根据上述 4 个变异位点,可将 252 个云南地方稻种归为 16 种单倍型(表 1,图 1),其中对照品种日本晴和云南推广品种楚粳 27 归为单倍型 Wx12。从表 1 可以看出,各个单倍型的频率存在极大的差异,其出现顺序是 Wx4(32.54%)、Wx9(13.89%)、Wx12(12.7%)、Wx5(12.3%)、Wx1(8.33%)、

Wx11(7.94%)、Wx10(3.97%)、Wx13(2.38%)、Wx14(1.19%)、Wx16(1.19%)、Wx2(0.79%)、Wx8(0.79%)、Wx15(0.79%)、Wx3(0.4%)、Wx6(0.4%)、Wx7(0.4%),前 6 种单倍型品种占 87.7%,是云南的主要类型。

(CT)_n 变异类型出现频率存在极大的差异(表 1),频率顺序是 (CT) 11(单倍型 Wx4,占供试材料的 32.54%),(CT) 18(Wx11、Wx12,合计 20.63%),(CT) 17(Wx9、Wx10,合计 17.86%),(CT) 12(Wx5,12.30%),(CT) 10(Wx1、Wx2、Wx3,合计 9.52%),(CT) 19(Wx13,2.38%),(CT) 20(Wx14、Wx15,合计 1.98%),(CT) 21(Wx16,1.19%),(CT) 14(Wx6、Wx7,合计 0.79%),(CT) 16(Wx8,0.79%),其中 (CT) 11、(CT) 18、(CT) 17、(CT) 12、(CT) 10 等 5 种单倍型是云南优势类型,合计占供试材料的 92.85%。可见,在 (CT)_n 位点上云南地方稻种是由多个优势单倍型组成,而中国南方稻区推广品种优势类型集中在 (CT) 11 和 (CT) 18^[4]。(CT)_n

表 1 Waxy 基因变异位点与单倍型在各生态类型中的分布

Table 1 Waxy gene mutation loci and the distribution of haplotype in various ecological types

单倍型 Haplo- type	(CT) _n	+1 位	+86 -88 位	(AA- TT) _n	总体		籼稻		粳稻		水稻		陆稻		粘稻		糯稻	
					Population		<i>Indica</i>		<i>Japonica</i>		Water rice		Upland rice		Non-glutinous rice		Glutinous rice	
					品种数 Variety No.	比例 (%) Frequ- ency	品种数 Variety No.	比例 (%) Frequ- ency	品种数 Variety No.	比例 (%) Frequ- ency	品种数 Variety No.	比例 (%) Frequ- ency	品种数 Variety No.	比例 (%) Frequ- ency	品种数 Variety No.	比例 (%) Frequ- ency	品种数 Variety No.	比例 (%) Frequ- ency
Wx1	10	G	A--	5	21	8.33	13	14.61	8	4.91	19	11.38	2	2.35	15	7.85	6	9.84
Wx2	10	G	ATA	5	2	0.79			2	1.23			2	2.35	2	1.05		
Wx3	10	G	GTA	6	1	0.40	1	1.12			1	0.6			1	0.52		
Wx4	11	G	ATA	6	82	32.54	37	41.57	45	27.61	60	35.93	22	25.88	69	36.13	13	21.31
Wx5	12	G	ATA	6	31	12.30	18	20.22	13	7.98	24	14.37	7	8.24	26	13.61	5	8.20
Wx6	14	G	GTA	5	1	0.40			1	0.61	1	0.60					1	1.64
Wx7	14	G	ATA	6	1	0.40			1	0.61	1	0.60			1	0.52		
Wx8	16	T	GTA	5	2	0.79	1	1.12	1	0.61	0	0	2	2.35			2	3.28
Wx9	17	G	GTA	5	35	13.89	4	4.49	31	19.02	23	13.77	12	14.12	31	16.23	4	6.56
Wx10	17	T	GTA	5	10	3.97	4	4.49	6	3.68	4	2.40	6	7.06	4	2.09	6	9.84
Wx11	18	G	GTA	6	20	7.94	3	3.37	17	10.43	8	4.79	12	14.12	15	7.85	5	8.20
Wx12	18	T	GTA	5	32	12.70	7	7.87	25	15.33	23	13.77	9	10.59	16	8.38	16	26.23
Wx13	19	G	GTA	5	6	2.38	1	1.12	5	3.07	2	1.20	4	0.12	5	2.62	1	1.64
Wx14	20	G	GTA	5	3	1.19			3	1.84	1	0.60	2	2.35	3	1.57	0	0
Wx15	20	T	GTA	5	2	0.79			2	1.23			2	2.35			2	3.28
Wx16	21	G	GTA	5	3	1.19			3	1.84			3	3.53	3	1.57	0	0
合计 Total					252		89		163		167		85		191		61	

变异在籼/粳、水/陆、粘/糯间存在差异,籼稻以(CT)10、(CT)11、(CT)12为主,而粳稻以(CT)11、(CT)12、(CT)17和(CT)18为主,二者群体结构上存在显著差异。水稻以(CT)11、(CT)18、(CT)17、(CT)12和(CT)10为主,陆稻以(CT)11、(CT)18、(CT)17和(CT)12为主;粘稻和糯稻均以(CT)11、(CT)18、(CT)17、(CT)12和(CT)10为主。可见,水稻和陆稻间,粘稻和糯稻间,单倍型种类上差异不显著,仅单倍型频率上存在差异。

第一内含子+1位上,81.75%品种是G,T只出现在重复次数16以上的单倍型Wx8、Wx10、Wx12、Wx15中,由于籼稻以(CT)10、(CT)11、(CT)12为主,故籼稻和粳稻间T的频率存在差异,籼稻携带T的品种为13.48%,粳稻为20.86%。水稻中携带T的品种为16.17%,陆稻为22.35%;粘稻中

10.47%,糯稻中42.62%(表1),在出现T的46个品种(Wx8、Wx10、Wx12、Wx15)中,有糯稻26个。

2.2 云南地方稻种 waxy 单倍型在各生态型中的分布特点

从表1可以看出,16种单倍型在籼/粳亚种、水/陆稻和粘/糯中存在单倍型种类和单倍型频率两方面的差异,说明亚种间和生态型间发生了遗传上的分化。

籼稻出现10种单倍型,粳稻出现15种单倍型,其中有9种单倍型为2个亚种共享,即籼稻的多数单倍型包含在粳稻的单倍型中,从单倍型数量来看粳稻更为丰富,这可能与云南粳稻分布更广有关;有7个单倍型(Wx2、Wx6、Wx7、Wx14、Wx15、Wx16)仅在粳稻中出现,1个单倍型Wx3仅在籼稻中出现,但频率一般较低。籼稻的主要

类型是 W_x4 (41.57%)、W_x5 (20.22%)、W_x1 (14.61%), 粳稻的主要类型是 W_x4 (27.61%)、W_x9 (19.02%)、W_x12 (15.33%)、W_x11 (10.43%)、W_x5 (7.98%)。

水稻和陆稻分别出现 12 和 13 种单倍型, 它们共享 8 种单倍型, 但 W_x2、W_x8、W_x14、W_x15、W_x16 仅在陆稻中出现, W_x3、W_x6、W_x7 仅在水稻中出现, 但频率一般很低; 水陆稻中各种单倍型频率也不同, 水稻的主要类型是 W_x4 (35.93%)、W_x5 (14.37%)、W_x9 (13.77%)、W_x12 (13.77%)、W_x1 (11.38%), 陆稻的是 W_x4 (25.88%)、W_x9 (14.12%)、W_x11 (14.12%)、W_x12 (10.59%)、W_x5 (8.24%)、W_x10 (7.06%), 水稻中 W_x4、W_x5 和 W_x1 频率比陆稻高, 而陆稻中 W_x10 和 W_x11 频率较水稻高。

粘稻出现 13 种单倍型, 糯稻中出现 11 种单倍型, 它们共享其中的 8 种单倍型, 而 W_x2、W_x3、W_x7、W_x16 仅在粘稻中出现, W_x6、W_x8、W_x15 仅在糯稻中出现, 但频率较低; 粘稻中 W_x4、W_x5、W_x9 频率明显高于糯稻, 而糯稻中 W_x10、W_x12 频率高于粘稻。

表 2 Waxy 单倍型在云南各州市的分布

Table 2 The distribution of the Waxy haplotype in the areas in Yunnan

地市 Area	品种数	单倍型数																	
	No. of variety	No. of haplotype	W _x 1	W _x 2	W _x 3	W _x 4	W _x 5	W _x 6	W _x 7	W _x 8	W _x 9	W _x 10	W _x 11	W _x 12	W _x 13	W _x 14	W _x 15	W _x 16	
临沧	39	10	5		1	14	3				3	3	3	5		1	1		
普洱	54	10	3	2		17	5				9	2	5	7	3	1			
西双版纳	25	9				3	3		1	3	3	6	3	1				2	
德宏	14	8	4			2	1		1	1	1	2	2						
文山	17	8	3			5	2				1	2	2				1	1	
红河	15	6	1			7	2					1	3		1				
保山	22	6	2			6	8				3		2	1					
昭通	18	6	2			10	1		1		2		2						
玉溪	14	5				7	3	1			2			1					
丽江	15	4				5	1				6		3						
曲靖	5	4				1					2	1	1						
昆明	2	2				1					1								
大理	5	4	1			1					2		1						
怒江	5	4				3	1						1						
楚雄	1	1					1												
迪庆	1	1											1						
合计 Total	252		21	2	1	82	31	1	1	2	35	10	20	32	6	3	2	3	

2.3 waxy 单倍型在地理上的分布特点

16 种单倍型在 16 个州市的分布列于表 2。由表 2 可以看出, W_x4、W_x5、W_x9、W_x12 4 种单倍型品种数最多, 分布也最广, 分别分布在 14、12、12、12 个州市; 而享有单倍型 W_x2、W_x3、W_x6、W_x7、W_x14、W_x15、W_x16 的品种较少, 属于稀少单倍型, 分布范围小, 但除 W_x7 的 1 个品种分布在昭通外, 其他的 12 个品种均分布在云南中南部地区; 携带 W_x1、W_x8、W_x10、W_x11、W_x13 的品种数 6~21 个, 这些品种也多分布在云南中南部地区。州市间比较可知, 临沧、普洱单倍型种类最丰富, 以之为中心向外扩展, 单倍型种类有减少的趋势, 临沧、普洱、西双版纳、德宏、文山是单倍型种类丰富的地区, 这与这些地区少数民族较多并以稻米为主食, 气候和地形多样相关。第一内含子 +1 位为 T 一般认为直链淀粉含量低, 在 16 种单倍型中, 只有 W_x8、W_x10、W_x12、W_x15 携带 T, 由表 2 可以看出, 这些单倍型主要分布在临沧、普洱、西双版纳、德宏等南部地区。

3 讨论

一般认为,普通野生稻是栽培稻的祖先。S. Yamanaka 等^[18]的研究发现野生稻第一内含子供体 +1 碱基都是 G,孙一丁等^[19]对云南元江野生稻的分析也均为 G,W. Xin 等^[20]对来源中国的普通野生稻的分析在该位点上也均为 G。本课题组研究表明普通野生稻 waxy 基因微卫星序列 (CT)_n 一般 8~12 个重复,第一内含子供体 +1 位碱基均为 G。可见,(CT)_n 重复少,第一内含子供体 +1 位碱基为 G 是野生稻的特征,而 (CT)_n 重复多,第一内含子供体 +1 位置的碱基 T 是变异类型。本研究对云南地方稻品种的分析表明,籼粳稻均存在 (CT)_n 重复少,第一内含子供体 +1 位碱基为 G 的类型,也存在 (CT)_n 重复多,第一内含子供体 +1 位碱基为 T 的类型,这进一步表明籼粳稻是同步进化的。携带 T 的品种多分布在云南南部地区,这为在云南地方稻中发掘中低直链淀粉含量资源指明了方向,这也证明云南南部是稻遗传分化的中心之一。

第一内含子 +86-88(图 1 中标尺 183~185)存在 ATA/GTA/A--3 种变异。本课题组的野生稻分析资料表明,野生稻此位点均为 GTA,携带 GTA 的单倍型更为原始。一般认为籼稻变异大于粳稻,但本研究结果表明粳稻 Waxy 单倍型种类比籼稻多,籼稻的单倍型包含在粳稻的类型内,这可能与云南粳稻分布更广有关,也可能另有原因,有待进一步研究。本研究表明第一内含子供体 +1 位碱基 T 只在 (CT)_n 重复大于 16 的品种中出现,碱基 G 向 T 突变只在 (CT)_n 重复大于 16 的品种发生,这意味着这种突变可能发生在 (CT)_n 增多之后,二者间存在的关联需要进一步的研究。

参考文献

[1] Bligh H F J, Till R I, Jones C A. A microsatellite sequence closely linked to the waxy gene of *Oryza sativa* [J]. *Euphytica*, 1995, 86: 83-85

[2] Ayres N M, McClung A M, Larkin P D, et al. Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 773-781

[3] Tan Y F, Zhang Q F. Correlation of simple sequence repeat (SSR) variant s in the leader sequence of the waxy gene with amylose content of the grain in rice [J]. *Acta Bot Sin*, 2001, 43 (2): 146-150

[4] 舒庆尧, 吴殿星, 夏英武, 等. 籼稻和粳稻中蜡质基因座位上微卫星标记的多态性及其与直链淀粉含量的关系 [J]. *遗传学报*, 1999, 26(4): 350-358

[5] Bao J S, Corke H, Sun M. Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physico-chemical properties in non waxy rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 1185-1196

[6] 万映秀, 邓其明, 王世全, 等. 水稻 Wx 基因的遗传多态性及其与主要品质指标的相关性分析 [J]. *中国水稻科学*, 2006, 20(6): 603-609

[7] Cai X L, Wang Z Y, Xing Y Y, et al. Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5' UTR and decreased expression of waxy gene in rice cultivars of intermediate amylose content [J]. *Plant J*, 1998, 14(4): 459-465

[8] Bligh H F J, Larkin P D, Roach P S, et al. Use of alternate splice sites in granulebound starch synthase mRNA from low amylose rice varieties [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 38: 407-415

[9] Isshiki M, Morino K, Nakajima M, et al. A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first intron [J]. *Plant J*, 1998, 15(1): 133-138

[10] Hirano H Y, Eiguchi M, Sano Y. A single base change altered the regulation of the waxy gene at the post transcriptional level during evolution of rice [J]. *Mol Biol Evol*, 1998, 15: 978-987

[11] 张娅丽, 许明辉, 曾亚文, 等. 云南地方稻种 Wx 基因第一内含子供体 +1 位碱基变异与直链淀粉含量的关系 [J]. *中国水稻科学*, 2007, 21(1): 20-24

[12] 蔡秀玲, 刘巧泉, 汤述翥, 等. 用于筛选直链淀粉含量为中等的籼稻品种分子标记 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2002, 8(2): 137-144

[13] 毛兴学, 肖昕, 陈建伟, 等. PCR 一步法检测水稻蜡质基因第一内含子剪接供体 +1 位碱基 [J]. *中国水稻科学*, 2005, 19(3): 285-287

[14] 王象坤, 孙传清, 才宏伟. 亚洲各国普通野生稻分类与遗传多样性研究 [M] // 杨庆文, 陈大洲. 中国野生稻研究与利用: 第一届全国野生稻大会论文集. 北京: 气象出版社, 2004: 107-117

[15] 黄燕红, 孙新立, 王象坤. 中国栽培稻遗传多样性中心和起源研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2005, 6(2): 125-129

[16] Nakagahra M. The differentiation, classification and center of genetic diversity of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) by isozyme analysis [J]. *Trop Agr Res Ser*, 1978, 11: 77-82

[17] Zeng Y W, Shen S Q, Li Z C. Ecogeographic and genetic diversity based on morphological characters of indigenous rice (*Oryza sativa* L.) in Yunnan, China [J]. *Genet Res Crop Evol*, 2003, 50(6): 566-577

[18] Yamanaka S, Nakamura I, Watanabe K N, et al. Identification of SNPs in the waxy gene among glutinous rice cultivars and their evolutionary significance during the domestication process of rice [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1200-1204

[19] 孙一丁, 陆辉, 许明辉. 云南元江普通野生稻群体 Wx 基因 (CT)_n 重复序列和第 1 内含子 G/T 位碱基分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(4): 647-649

[20] Xin W, Qiao W H, Chen Y T. Domestication and geographic origin of *Oryza sativa* in China: insights from multilocus analysis of nucleotide variation of *O. sativa* and *O. rufipogon* [J]. *Mol Ecol*, 2012(12): 5073-5087