

珍稀濒危植物大果木莲 ISSR-PCR 反应体系的建立

毛云玲¹, 陈少瑜^{1*}, 韩燕², 吴涛¹, 司马永康¹, 郝佳波¹, 付玉嫔¹ (1. 云南省林业科学院, 国家林业局云南珍稀濒危特森林植物保护和繁育重点实验室, 云南省森林植物培育与开发利用重点实验室, 云南昆明 650204; 2. 西南林学院资源学院, 云南昆明 650224)

摘要 [目的] 建立高效稳定的大果木莲 ISSR-PCR 反应体系。[方法] 以珍稀濒危植物大果木莲新鲜嫩叶为材料, 在高盐沉淀法提取高质量基因组 DNA 的基础上, 通过 ISSR-PCR 反应体系中 5 个主要因素的单因子梯度试验, 优化并最终建立了大果木莲稳定而高效的 ISSR-PCR 反应体系和反应程序。[结果] 试验建立的大果木莲的 ISSR-PCR 反应体系为: 20.0 μl 反应体系中含 10 \times buffer 2.0 μl 、 Mg^{2+} 2.0 mmol/L、*Taq* 酶 0.5 U、DNA 模板 40 ng、引物 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、dNTPs 0.2 mmol/L 和 ddH_2O 13.3 μl , 其反应程序为: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 1 min, 50 ~ 60 $^\circ\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 2 min, 40 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 完全延伸 7 min。[结论] 该研究为进一步揭示大果木莲群体的遗传多样性和遗传结构状况以及制定科学的保护措施提供了理论依据。

关键词 珍稀濒危植物; 大果木莲; 基因组 DNA; ISSR-PCR 反应体系

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)31-15163-04

Establishment of ISSR-PCR Reaction System for the Rare and Endangered Plant *Manglietia grandis* Hu et Cheng

MAO Yun-ling et al (Yunnan Academy of Forestry, Yunnan Key Laboratory for the Protection and Propagation of Rare and Endangered Forest Plants of State Forestry Bureau, Key Laboratory for the Cultivation and Exploitation of Forest Plants in Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650204)

Abstract [Objective] The study aimed to establish the effective and stable ISSR-PCR reaction system for *Manglietia grandis* Hu et Cheng. [Method] With the leaves of rare and endangered plant *M. grandis* as tested material, based on high quality DNA extracted by high salt precipitation method, the single factor grade experiment with 5 factors in ISSR-PCR reaction system was taken to optimize and finally establish the effective and stable ISSR-PCR reaction system through single-factor gradient test. [Result] The effective and stable ISSR-PCR reaction system for *M. grandis* was established, which contained 10 \times buffer 2.0 μl , Mg^{2+} 2.0 mmol/L, *Taq* enzyme 0.5 U, DNA template 40 ng, primer 0.8 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs 0.2 mmol/L, ddH_2O 13.3 μl in total 20.0 μl system. The PCR amplification program was that the initial denaturation was for 5 min at 94 $^\circ\text{C}$, followed by 40 cycles of denaturing at 94 $^\circ\text{C}$ for 1 min, annealing at 50 ~ 60 $^\circ\text{C}$ for 45 s, extension at 72 $^\circ\text{C}$ for 2 min, and a final extension was at 72 $^\circ\text{C}$ for 7 min. [Conclusion] The study provided the theoretical basis for further opening out the genetic diversity and structure and making out the scientific protection measures.

Key words Rare and endangered plants; *Manglietia grandis* Hu et Cheng; Genomic DNA; ISSR-PCR reaction system

大果木莲 (*Manglietia grandis* Hu et Cheng) 为木兰科 (Magnoliaceae) 木莲属 (*Manglietia*) 常绿乔木, 是我国 2 级重点保护野生植物和国家 3 级濒危保护物种。大果木莲分布范围极窄, 据报道, 仅零星分布于云南东南部麻栗坡、马关、西畴及广西西南部靖西、那坡等县的局部地区^[1], 生长于海拔 800 ~ 1 500 m 的山地峡谷^[2]。作为木莲属中较为原始的种类, 又是我国特有的珍稀树种, 大果木莲对植物区系及木莲属分类研究有一定的科研价值。其木材细致, 具有耐腐、耐水湿、虫不蛀等特点, 是优良的用材树种; 其叶大亮绿, 花大色艳, 芳香怡人, 树形优美, 又是非常珍贵的庭园观赏树种^[3-4]。由于大果木莲现存种群数量少, 种群规模小, 天然更新困难, 且生境受到严重破坏, 按 IUCN 地方濒危等级标准评价属于“极危种 (CR)”^[1], 因此, 很有必要探索其濒危的原因并采取相应的保护措施。

ISSR (inter-simple sequence repeat) 又称简单重复序列间扩增, 是 Zietkiewicz 等于 1994 年创建的一种新的分子标记技术^[5]。它结合了 RAPD 和 SSR 的优点, 具有操作简便快速、开发成本低、试验重复性好、多态性丰富、稳定性较高等优点^[6], 已被广泛应用于植物种质资源遗传多样性研究、品种鉴别及遗传图谱构建等^[7-9]。笔者旨在建立高效稳定的大果木莲 ISSR-PCR 反应体系, 为进一步揭示其群体的遗传多样性和遗传结构状况以及制定科学的保护措施提供理论

依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料 在大果木莲自然分布区的云南省文山州麻栗坡县分单株采集其天然种群植株的嫩叶, 标记后放入装有硅胶的封口塑料袋, 带回实验室置于 -30 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2 试剂及仪器 2 \times CTAB 提取缓冲液 (pH 值 8.0, 内含 1% PVP 和 1% β -巯基乙醇); TE 缓冲液 (pH 值 8.0); DNA 聚合酶、dNTP 和 Marker 等购自上海申能博彩生物科技有限公司; DL 2 000 bp DNA Marker 购自大连宝生物有限公司; ISSR 引物由上海生工合成。

电子天平; BECKMAN 台式超速冷冻离心机; 奥立龙 pH 计; SZ-97 自动三重纯水蒸馏器; SANYO 超低温冰箱 (-40、-80 $^\circ\text{C}$); PE9700 PCR 扩增仪; Bio-Rad powerPac 电泳系统及 Gene Genius Bio 凝胶成像系统。

1.3 试验方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取。 采用高盐沉淀法^[10-11]: ①称取 1.0 g 幼嫩叶片, 放入研钵, 同时倒入 5 ml 预热的 2 \times CTAB 提取液, 迅速研磨后, 转入 10 ml 的离心管中, 于 65 $^\circ\text{C}$ 水浴保温 30 min。②12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 12 000 r/min 离心 10 min。③取上清, 加入等体积的氯仿: 异戊醇 (24:1), 12 000 r/min 离心 10 min。④取上清, 加入 2.5 倍上清体积的 -20 $^\circ\text{C}$ 无水乙醇, -20 $^\circ\text{C}$ 静置 1 h。⑤挑出 DNA 沉淀, 溶于 100 μl TE 中。⑥加入 4 mmol/L NaCl, 使溶液中 NaCl 的终浓度为 2.0 mmol/L。⑦ -20 $^\circ\text{C}$ 无水乙醇沉淀 DNA, 70% 酒精溶液漂洗 2 次, 风干,

基金项目 云南省自然科学基金项目 (2006C0066M)。

作者简介 毛云玲 (1965 -), 女, 河南南乐人, 工程师, 从事林木种质资源与植物生理和生化研究。* 通讯作者, 副研究员, E-mail: sherry9872@yahoo.com.cn。

收稿日期 2009-06-29

100 μl TE 充分溶解, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.3.2 DNA 质量与浓度的检测。采用琼脂糖凝胶电泳对 DNA 的质量与浓度进行检测。取一定量(1 或 2 μl)提取的 DNA 样品及不同浓度的 λ -DNA, 加入溴酚兰(Loading Buffer), 于 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳缓冲液为 $0.5 \times \text{TBE}$, 80 ~ 100 V 恒压电泳 30 ~ 40 min。通过紫外凝胶成像系统观察提取的 DNA 质量, 同 λ -DNA 进行对比, 粗略估计提取的 DNA 浓度。

1.3.3 ISSR-PCR 反应体系的优化及建立。参照同属其他种相关试验结果^[12], ISSR-PCR 原初反应体系为 20.00 μl : 10 \times *Taq* 酶配套 buffer 2.00 μl ; 25.0 mmol/L MgCl_2 1.20 μl , 终浓度 1.5 mmol/L; 5 U/ μl *Taq* 酶 0.16 μl , 终用量 0.8 U; 60 ng/ μl DNA 模板 1.00 μl , 终用量 60 ng; 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 引物 1.60 μl , 终浓度 0.8 $\mu\text{mol/L}$; 10.00 mmol/L dNTPs 0.50 μl , 终浓度 0.25 mmol/L; 无菌 ddH_2O 13.54 μl 。反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 50 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 完全延伸 7 min。

退火温度由引物碱基序列计算出的 T_m 值初步确定, 或以 T_m 值为基础的梯度试验, 大多在 50 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 进行。

以上述反应体系和扩增程序为基础, 进行 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* 酶用量、引物浓度和模板 DNA 用量 5 个因素的单因素梯度试验, 以优化和确定大果木莲 ISSR-PCR 最终的反应体系。各因素及梯度见表 1。

表 1 大果木莲 ISSR-PCR 反应体系各因素及梯度试验

Table 1 Experiment on the factors and gradients of ISSR-PCR reaction system of *Manglietia grandis*

梯度 Gradients	因素 Factors				
	Mg^{2+} 浓度 mmol/L Mg^{2+} content	引物浓度 $\mu\text{mol/L}$ Primer concentration	<i>Taq</i> 酶 量//U <i>Taq</i> enzyme amount	dNTP 浓度 mmol/L dNTP concentration	模板 DNA 用量//ng Template DNA amount
1	0.50	0.20	0	0.05	20
2	1.00	0.40	0.25	0.10	40
3	1.50	0.60	0.50	0.15	60
4	2.00	0.80	0.75	0.20	80
5	2.50	1.00	1.00	0.25	100
6	3.00	1.20	1.25	0.30	

扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 以 DL 2 000 bp DNA Marker 为标记, 结果用凝胶成像系统进行拍照和分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取效果电泳检测 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测高盐沉淀法提取的大果木莲 DNA, 结果见图 1。由图 1 可见, 该方法提取大果木莲基因组 DNA 结果较为理想。

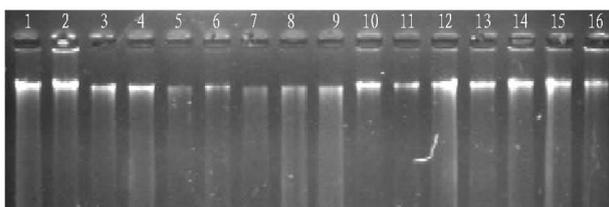


图 1 大果木莲总 DNA 电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis for total DNA of *Manglietia grandis*

用不同浓度的 λ -DNA 为对照, 与提取样品同时进行凝胶电泳, 粗略估计样品 DNA 浓度, 结果如图 2 所示。对于浓

度为 20 或 30 ng/ μl 的 DNA(图中 2、4、7、8 号样品), 需进一步浓缩, 方法为: 预冷的无水乙醇沉淀 15 min, 风干, 用少量的 TE 溶液(50 μl) 充分溶解, 重新测定其浓度; 对浓度高于 50 ng/ μl 的 DNA(图中 3、5、6 号), 或 100 ng/ μl 及以上的(图中 1 号), 则取出一定量的 DNA, 加入适量 TE 进行稀释, 直至其浓度检测结果达到 40 ng/ μl 。

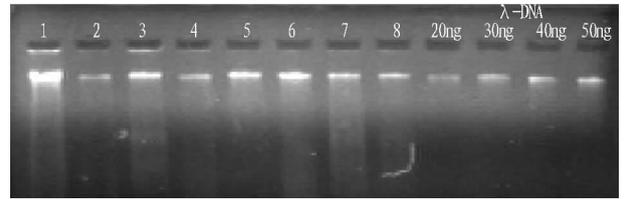


图 2 大果木莲 DNA 浓度电泳检测

Fig. 2 Electrophoresis for DNA concentration of *Manglietia grandis*

2.2 反应体系的优化

2.2.1 Mg^{2+} 浓度对扩增结果的影响。 Mg^{2+} 浓度是影响 ISSR-PCR 反应结果的重要因素之一。*Taq* DNA 聚合酶是对 Mg^{2+} 依赖性酶, 对 Mg^{2+} 浓度非常敏感, 不仅如此, Mg^{2+} 还能与反应中的 dNTP、模板 DNA 及引物结合, 影响引物与模板的结合效率、模板与产物的解链温度以及产物的特异性和引物二聚体的形成^[13-14]。该试验 6 个不同浓度的 Mg^{2+} 扩增结果(图 3)表明: 不同浓度 Mg^{2+} 的扩增结果差异很大: 0.5 mmol/L 无扩增产物; 1.0 ~ 3.0 mmol/L 范围内均有扩增产物, 但 1.0 mmol/L 时, 谱带缺失现象严重, 1.5 mmol/L 偶有谱带缺失。因此, 选用 2.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 浓度进行大果木莲的 ISSR-PCR 扩增。

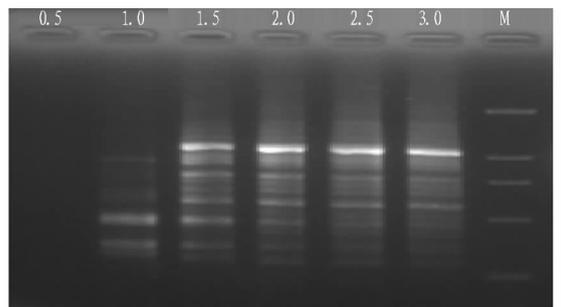


图 3 不同浓度 Mg^{2+} 对 ISSR 扩增结果的影响

Fig. 3 The effect of Mg^{2+} at different concentration on ISSR amplification

2.2.2 引物浓度对扩增结果的影响。引物浓度对 ISSR 反应有一定的影响, 浓度过低可能无扩增带, 而过高则产生非特异性扩增。由图 4 可以看出, 引物浓度低于 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 时, 扩增条带数量少; 浓度为 1.0 ~ 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 结果不稳定, 产生非特异性条带。因此, 引物浓度确定为 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2.3 *Taq* 酶用量对扩增结果的影响。在 ISSR-PCR 反应体系中, *Taq* 酶的种类以及用量直接影响扩增反应的成功与否。使用高浓度的 *Taq* 酶不仅提高了成本, 而且容易产生非特异性扩增产物; 而当 *Taq* 酶浓度过低时, 则会导致产物的合成效率下降。由图 5 可以看出, *Taq* 酶用量为 0.50 ~ 1.25 U 时, 4 个泳道均有扩增产物; 用量为 0.25 U 时, 谱带不清晰; 用量为 1.25 U 时, 扩增产物明显变少; 用量为 0.50 ~ 1.00 U 时, 扩增效果大致相同。考虑到成本, *Taq* 酶用量以 0.50 U

为宜。

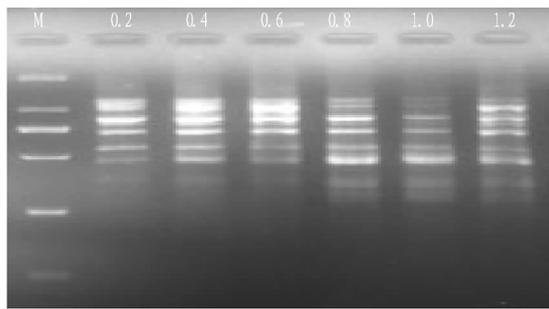


图 4 不同浓度引物对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

Fig. 4 The effect of primer at different concentration on ISSR-PCR amplification results

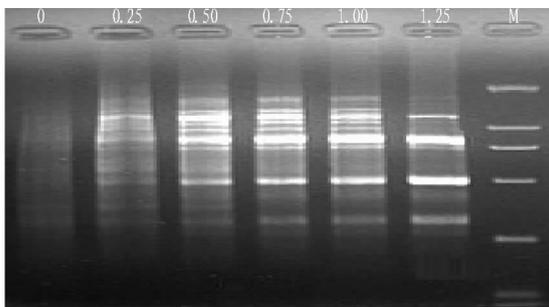


图 5 不同用量 Taq 酶对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

Fig. 5 The effect of different Taq polymerase amount on ISSR-PCR amplification results

2.2.4 dNTP 浓度对扩增结果的影响。dNTP 是 PCR 扩增的原料,其浓度过高会导致 PCR 错配,从而出现非特异性扩增并竞争 Mg^{2+} ,影响 Taq 酶的作用效率;浓度过低又会影响合成效率,甚至会因过早的消耗而使产物单链化,影响扩增效果^[15]。由图 6 可以看出,dNTP 浓度小于 0.15 mmol/L 或浓度为 0.30 mmol/L 时,皆出现条带缺失;浓度为 0.20 和 0.25 mmol/L 时,谱带清晰稳定,扩增效果均较理想。因此,可将 dNTP 浓度定为 0.20 或 0.25 mmol/L。

2.2.5 模板 DNA 用量对 ISSR 扩增结果的影响。适宜的模板量是保证特异性扩增的前提,最佳的模板浓度取决于研究对象和模板纯度。模板量过多会降低特异性扩增效率,增加非特异性产物^[2]。不同用量 DNA 模板的扩增结果(图 7)表明,用量在 20 ~ 80 ng 范围内均有条带扩增,但用量高于 60 ng 时扩增谱带出现缺失现象。因此,DNA 模板的用量以

40 ng 较为适宜。

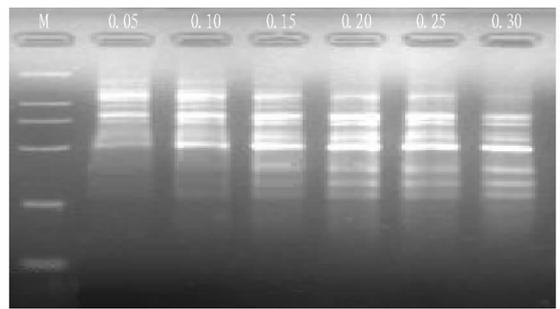


图 6 dNTP 浓度对 ISSR 扩增结果的影响

Fig. 6 Effects of dNTP concentration on ISSR amplification results

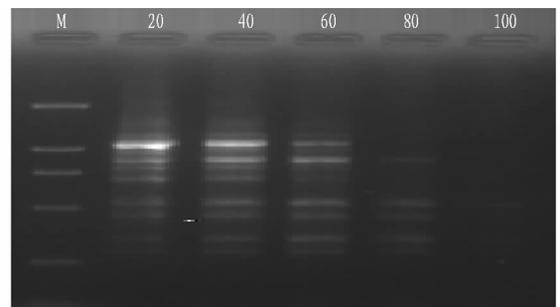


图 7 不同用量模板 DNA 的 ISSR-PCR 扩增结果

Fig. 7 The results of ISSR-PCR amplification with different amount of template DNA

2.3 大果木莲 ISSR-PCR 反应体系的建立及稳定性检测

2.3.1 大果木莲 ISSR-PCR 反应体系。通过以上反应因素及水平梯度试验,最终确定大果木莲 20.0 μ l ISSR-PCR 反应体系中:10 \times Taq 酶配套 buffer 2.0 μ l;25.0 mmol/L $MgCl_2$ 1.6 μ l,终浓度 2.0 mmol/L;5 U/ μ l Taq 酶 0.1 μ l,终用量 0.5 U;40 ng/ μ l DNA 模板 1.0 μ l,终用量 40 ng;10.0 μ mol/L 引物 1.6 μ l,终浓度 0.8 μ mol/L;10.0 mmol/L dNTPs 0.4 μ l,终浓度 0.2 mmol/L;无菌 ddH₂O 13.3 μ l。反应程序同“1.3.3”。

2.3.2 反应体系稳定性的 ISSR-PCR 检测。随机选择若干大果木莲 DNA 样本,分别用引物 864 和 825 对优化的 ISSR-PCR 体系进行检测,结果如图 8、9 所示。由图 8、9 可见,2 种引物均能对大果木莲 DNA 扩增出清晰、重复性好的谱带,表明这一体系是稳定、可靠的。

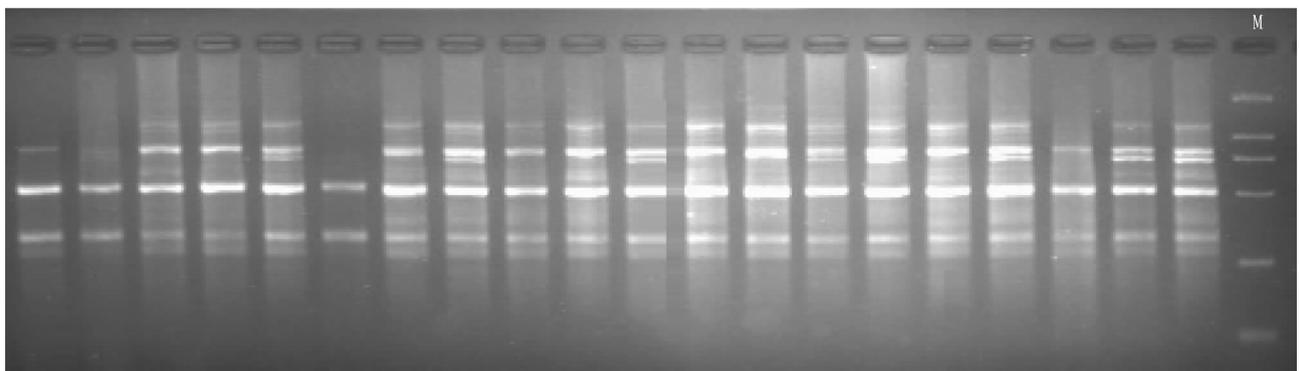


图 8 优化的 ISSR 体系对 20 个样品的扩增结果(引物 864)

Fig. 8 The ISSR amplification results of 20 samples by the optimum ISSR system(primer 864)

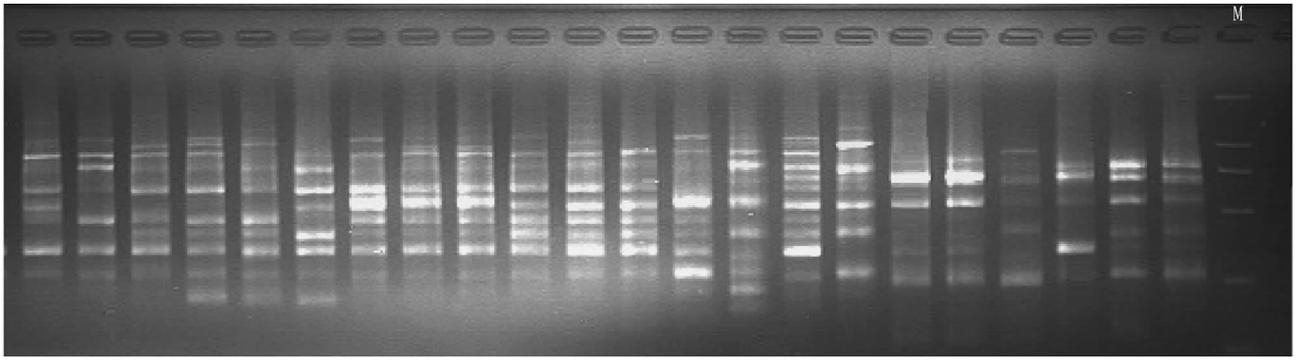


图9 优化的 ISSR 体系对 22 个样品的扩增结果(引物 825)

Fig.9 The ISSR amplification results of 22 samples by the optimum reaction system(primer 825)

3 小结与讨论

对于要求检测大量样本的遗传多样性和种群遗传结构研究来说,检测手段的稳定性至关重要。由于 ISSR 引物序列较长(10 ~ 24 bp),反应退火温度较高(50 ~ 60 °C),引物-模板复合物比较稳定,减少了由于靶定的位点太多而产生的弥散,因而使扩增结果具有较高的稳定性和可重复性^[16]。尽管 ISSR 显性遗传标记的特点妨碍了该技术在种群遗传学中的广泛应用,但对基于基因型鉴定的种群遗传学和分子生态学研究,标记体系的显性遗传方式并无太大的影响。笔者在参考同属其他种相关试验的基础上,针对大果木莲进行了 ISSR-PCR 反应体系的优化,最终建立了稳定、高效的反应体系和反应程序,为进一步开展大果木莲的相关研究、开发和利用奠定了基础。

参考文献

- [1] 云南省林业厅,云南省林业科学院,国家林业局云南珍稀濒危特森林植物保护和繁育重点实验室. 云南国家重点保护野生植物[M]. 昆明:云南科技出版社,2005.
- [2] 姜静,杨传平,刘桂丰,等. 桦树 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. 生态学杂志,2003,22(3):91-93.
- [3] 傅立国. 中国植物红皮书——稀有濒危植物(第1册)[M]. 北京:科学出版社,1992.
- [4] 傅立国,陈潭清,郎楷永,等. 中国高等植物[M]. 青岛:青岛出版社,2001.
- [5] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20: 176-183.
- [6] WOLFF K, ZIETKIEWICZ E, HOFSTRA H. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91: 439-447.

- [7] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. *遗传*, 2002, 24(5): 613-616.
- [8] 谢佳燕,张知彬. ISSR 标记技术及其在遗传多样性研究中的应用[J]. *兽类学报*, 2004, 24(1):71-77.
- [9] 孙洪,程静,詹克慧,等. ISSR 标记技术及其在作物遗传育种中的应用[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(1):123-127.
- [10] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [11] 曹国艳,陈少瑜,司马永康,等. 金叶含笑叶片基因组 DNA 提取方法的比较[J]. *林业调查规划*, 2008, 33(5):33-35.
- [12] 曹国艳. 木兰科含笑属与相关属的 ISSR 系统发育分析[D]. 昆明:西南林学院,2009.
- [13] 林万明. PCR 技术操作和应用指南[M]. 北京:人民军医出版社,1993.
- [14] 尹佟明,韩正敏,黄敏仁,等. 林木 RAPD 分析及试验条件的优化[J]. *南京林业大学学报*, 1999, 23(4):7-12.
- [15] 朱为民,王曙霞,杨少军,等. 番茄 ISSR-PCR 反应体系的优化[J]. *上海农业学报*, 2007, 23(3):5-8.
- [16] GE X J, SUN M. Reproductive biology and genetic diversity of a Cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrtinaceae) using allozyme and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis[J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8:2061-2069.
- [17] 贾文杰,李恩香,杨柏云,等. 白木香基因组 DNA 的提取及 ISSR 反应条件的优化[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(24):10365-10367, 10370.
- [18] 赵杨,王秀荣,何可权,等. 贵州石笔木 DNA 提取与 ISSR-PCR 反应体系的建立[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(29):12607-12610.
- [19] 柴素芬,陈兆贵,洪彩霞. 芸香科药用植物 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(33):14433-14435, 14512.
- [20] 马丽娅,孙小琴,贾文杰,等. 春兰 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(34):14912-14914.
- [21] 黎海利,董丽,谭飞理. 草苧 ISSR-PCR 最佳反应体系的建立[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(12):4884-4885.
- [22] 周丽,胡春根. 送春与多花兰杂种 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(17):7904-7906.

(上接第 15154 页)

- [14] ANN-CHRISTINE SYVÄNEN. Accessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. *Nature*, 2001, 2:930-939.
- [15] JORDE L B, WATKINS W S, BAMSHAD M J, et al. The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial autosomal and Y-chromosome data[J]. *Am J Hum Genet*, 2000, 66:979-988.
- [16] LANDER E S. The new genomics: global views of biology[J]. *Science*, 1996, 274:536-539.
- [17] TSUI C, LAURA E COLEMAN, JACQULYN L GRIFFITH, et al. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) that map to gaps in the human SNP map[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(16):4910-4916.
- [18] CHO R J, MINDRINOS M, RICHARDS D R, et al. Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature Genetics*, 1999, 23:203-207.
- [19] IARAMINO G, TINGEY S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize[J]. *Genome*, 1996, 39:277-287.
- [20] MULLIKIN J C, HUNT S E, COLE G C, et al. An SNP map of human chromosome 22[J]. *Nature*, 2000, 407:516-520.

- [21] BHATTARAMAKKI D, DOLAN M, HANAFEY M, et al. Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers[J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(6):537-547.
- [22] STUMPF P M H. Haplotype diversity and the block structure of linkage disequilibrium[J]. *Trends in Genetics*, 2002, 18:226-228.
- [23] HIRANO H Y, EIGUCHI M, SANO Y. A single base change altered the regulation of the uaxy gene at the post-transcriptional level during evolution of rice[J]. *Mol Biol Evol*, 1998, 15:978-987.
- [24] OLSEN K M, PURUGGANAN M D. Molecular evidence on the origin and evolution of glutinous rice[J]. *Genetics*, 2002, 162:941-950.
- [25] BAO J S, CORKE H, SUN M. Microsatellites in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105:898-905.
- [26] 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(7):1200-1204.