

SSR 和 AFLP 分析玉米遗传多样性的研究

杜金友^{1,2}, 黎 裕¹, 王天宇¹, 石云素¹, 宋燕春¹, 王海波³

(1. 中国农业科学院作物品种资源研究所, 北京 100081; 2 河北张家口农业高等专科学校,
河北 张家口 075131; 3 河北省农林科学院, 河北 石家庄 050051)

摘要: 利用 SSR, AFLP 两种分子标记方法研究了 23 个玉米种质材料的遗传多样性, 并对这两种分子标记系统进行了比较。利用筛选出的 40 对 SSR 引物, 检测到了 202 个等位基因。用 12 对 AFLP 引物组, 检测到了 444 条有多态性的带。SSR 和 AFLP 分子标记均有很高的多态性, SSR 位点的平均多态性信息量(PIC) 值达 0.60, 而 AFLP 多态性带比例是 72%。两种分子标记结果将玉米种质划分为 5 组, 与系谱分析基本一致, 两种分子标记划分的结果也相近。研究认为 SSR, AFLP 两种分子标记系统均适合于玉米种质的遗传多样性研究。

关键词: 玉米; AFLP; SSR; 遗传多样性; 分析比较

中图分类号: S513.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2003)01-0059-05

Studies of Genetic Diversity in Maize Inbred Lines Based on SSRs and AFLPs Markers

DU Jin-you^{1,2}, LI Yu¹, WANG Tian-yu¹, SHI Yun-su¹, SONG Yan-chun¹, WANG Hai-bo³

(1. Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Zhangjiakou Agricultural College, Zhangjiakou 075131, China; 3. Hebei Academy of
Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: The genetic diversity of 23 maize inbred lines and one teosinte accession was analyzed based on microsatellite (SSR) and AFLPs markers. With 40 pairs of SSR primers, totally 202 polymorphic fragments were detected. Twelve AFLP primer combination (Pst I / Mse I) were used, and totally 444 polymorphic bands were produced. Both SSRs and AFLPs were highly polymorphic. The average of polymorphic information content (PIC) was 0.6 for SSRs. Percentage of polymorphic AFLP bands was 72%. The results of cluster analysis showed that the accessions assessed could be clustered into five groups in both marker systems. This is partly in accordance with the previous classification based on conventional methods but with some difference. It was suggested that both system can be used to analyze the genetic diversity of maize inbred lines.

Key words: Maize; SSR; AFLP; Genetic diversity

近年来植物基因组学的迅速发展使人们对作物种质的分析进入到了分子水平。目前分子标记正逐渐成为分析生物遗传多样性的有力工具, 在农作物遗传分析中应用最广的主要有 RFLP, RAPD, SSR, AFLP 等。其中, SSR 标记是一种共显性标记, 重复性好, 可靠性高, 分析简便, 易于实现自动化, 而且灵敏度高, 检测遗传变异的能力较高。而 AFLP 技术

自开发以来, 以其高可靠性、高重复性, 尤其是检测信息量大等特点, 已广泛用于遗传多样性分析、基因作图及基因标记等^[1~3]。

遗传多样性分析是玉米种质资源利用与保护的基础, 国内外的学者利用不同方法^[4], 从形态特征、亲缘关系到生化指标, 对玉米的遗传多样性进行了细致的研究。分子标记的出现, 为玉米的遗传多样

收稿日期: 2002-05-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170581); 国家转基因植物研究与产业化开发专项-转基因农作物生物安全研究(J00-C-002-01)

作者简介: 杜金友(1970-), 男, 河北张家口人, 讲师, 农学硕士, 主要从事作物育种的研究工作。

性分析提供了更深层次的技术。

本研究同时利用 SSR 和 AFLP 两种分子标记技术, 分析了 23 个有代表性玉米材料的遗传变异, 并对这两种分子标记方法作了对比, 旨在探讨更为合适的玉米遗传多样性分析的分子标记体系。

1 材料和方法

1.1 试验材料及 DNA 提取

选用了 22 个玉米自交系材料和一种野生近缘种一大刍草(*Zea luxurians*), 其来源见表 1。试验材料 2001 年 5 月 1 日播种, 5 月 29 日取样, 每个材料选取 10 株, 每株取大小相近的叶片 3~5 g, 混合后采用酚-氯仿法提取 DNA^[3]。

表 1 23 份玉米材料及其来源

| 材 料 | 来 源 |
|---------|-----------------------|
| S37 | 热带种质 |
| 旅 9 宽 | 旅大红骨 |
| Oh43 | 兰卡斯特 |
| E28 | 旅 9× A619 |
| D 黄 212 | D729× 黄早四 |
| 矮金 525 | 武陟矮× 金皇后 |
| K36 | 冀群 6 |
| H21 | 唐山四平头 |
| 龙抗 56A | 南斯拉夫三交种 |
| 黄早四 | 唐山四平头杂株 |
| 获白 | 综合种选亚种 |
| 双 741 | 唐山四平头 |
| 齐 35 | 兰卡斯特 |
| 辽 6017 | 瑞得黄马牙 |
| B73 | BSSSC5 |
| Mo17 | C. I. 187-2× C10 |
| 自 330 | Oh43× 可利 67 |
| 获唐黄 17 | 获唐白× Mo17Ht1 |
| 丹 340 | 白骨旅 9× 有稃玉米 |
| 二南 24 | 南 107(来源 187-2)× 南 55 |
| 大刍草 | 来源于危地马拉 |
| 旅 28 | 旅大红骨 |
| B75 | BSSS# 3 |

1.2 SSR 分析

SSR 引物、Taq DNA 聚合酶及其他试验试剂均购自上海生工生物技术公司。PCR 反应体系为: 20 μL 总体积中含 50 ng 模板 DNA、0.6 单位的 TaqDNA 聚合酶、400 μmol/L dNTP、2.5 mmol/L MgCl₂、1× PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 100 μg/mL Gelatin, pH 值为 8.3)、100 ng SSR 引物, 反应液上覆盖 20 μL 矿物油。PCR 扩增在 PTG-100 型 PCR 扩增仪上完成, 扩增程序参照 Senior^[4]。扩增产物加甲

酰胺变性染料后于 94℃ 条件下变性 8 min, 在 5% 聚丙烯酰胺变性胶上电泳, 电泳缓冲液 1× TBE, 100 W, 电泳 1 h。电泳结束后, 将胶板用银染方法显影。

1.3 AFLP 分析

AFLP 的酶切采用 Mse I 和 Eco I 双酶切组合, 内切酶购自 NEB 公司, T4 连接酶购自 Promega 公司, AFLP 接头、引物、Taq DNA 聚合酶及其他试验试剂均购自上海生工生物技术公司。PCR 扩增在 PTG-100 型 PCR 扩增仪上完成^[5]。选扩产物加甲酰胺变性染料后 94℃ 变性 8 min, 在 5% 聚丙烯酰胺变性胶上电泳, 电泳缓冲液 1× TBE, 80 W, 电泳 1.5 h。电泳结束后, 利用银染方法显影。

1.4 数据处理与分析

谱带按 0/1 系统记录, 有带计为 1, 无带计为 0, 缺失计为 9, 利用简单配对参数(Simple matching coefficient)估计基因频率, 依据 $GS = m / (m + n)$ 计算遗传相似系数, 其中 m 为基因型间共有带的数目, n 为差异带的数目。记录结果利用 NTSYS-pc 1.7 版^[6]软件分析。然后采用 UPGMA (Unweighted pair group method arithmetic averages) 法进行聚类, 标记位点的多态性信息量(Polymorphism information content, PIC 值)采用 Smith^[7]的方法计算, 即: $PIC = 1 - \sum f_i^2$, 其中 f_i 为 i 位点的基因频率。

2 结果与分析

2.1 分子标记结果

本研究筛选了分布于玉米整个基因组 10 个染色体上的 50 对 SSR 引物, 其中 40 个 SSR 引物的扩增产物有多态性, 而且扩增稳定, 重复性好, 详细资料见表 2。这 40 个 SSR 引物在 23 个材料中共标出 202 个多态性等位基因, 最少的可标记出 2 个, 最多的可标出 10 个, 片段长度从 49~286 bp, 23 个玉米材料的遗传相似系数 0.17~0.71。这些 SSR 引物的 PIC 值从 0.13 到 0.86(表 2), 与 Smith^[7]得到的 PIC 值(0.62)和 Senior^[4]得到的 PIC 值(0.59)相近, 高于袁力行^[8](0.54)及李新海^[9](0.511)的结果。

在 AFLP 标记中, 本研究选用 12 对 AFLP 引物组合, 扩增出可以辨认的带 621 条, 片段长度分布在 70~560 bp 之间, 23 个玉米材料的相似系数为 0.55~0.95。在 621 条带中表现多态性的带有 444 条, 多态性 72%(表 3)。其中特征带只在一个材料中出现, 共 78 条, 单态性带 99 条。平均每个引物扩增出 51.75 条带, 特征带 6.5 条, 多态性带 37 条。这个结

果说明 AFLP 检测到的多态性是很丰富的。吴敏生^[10]的结果也说明玉米有较高的多态性。在所有特征带中, 有 44 条特征带是大刍草特有的带, 这表明大刍草与其他材料的遗传距离比较远。

表 2 SSR 引物及其在 23 个玉米材料中等位基因数、片段大小、图谱位置、PIC 值

| SSR 引物 | 图谱位置 | 重复种类 | 等位基因数 | 片段大小 | PIC 值 |
|----------|--------------|----------------|-------|----------|-------|
| bnlg1347 | 1. 1 | AG(23) | 9 | 68~ 118 | 0. 82 |
| bnlg1055 | 1. 11 | AG(22) | 7 | 182~ 242 | 0. 80 |
| bnlg1268 | 1. 09 | AG(20) | 6 | 106~ 158 | 0. 50 |
| bnlg182 | 1. 03 | | 8 | 64~ 148 | 0. 65 |
| umc1499 | 1. 07 | AG(6) | 9 | 50~ 150 | 0. 71 |
| bnlg257 | 1. 07 | | 4 | 84~ 90 | 0. 41 |
| umc1079 | 2. 06 | (CA) 17(TA) 5 | 5 | 125~ 184 | 0. 70 |
| bnlg1138 | 2. 06 | AG(14) | 5 | 170~ 192 | 0. 70 |
| bnlg1327 | 2. 02 | CT(25) | 4 | 181~ 218 | 0. 81 |
| bnlg1908 | 2. 08 | AG(19) | 3 | 188~ 195 | 0. 13 |
| mmc0271 | 2. 07 | GA(39) | 10 | 49~ 211 | 0. 86 |
| bnlg1325 | 3. 03 | AG(18) | 9 | 127~ 284 | 0. 85 |
| bnlg1350 | 3. 08 | AG(13) | 8 | 70~ 128 | 0. 71 |
| bnlg1496 | 3. 09 | AG(18) | 10 | 123~ 188 | 0. 86 |
| bnlg1957 | 3. 05 | AG(10) | 6 | 150~ 174 | 0. 77 |
| bnlg1755 | 4. 05 | AG(27) | 4 | 95~ 125 | 0. 66 |
| bnlg1784 | 4. 07 | AG(13) | 2 | 235~ 238 | 0. 29 |
| umc1126 | 4. 03 | AG(20) | 3 | 202~ 218 | 0. 59 |
| umc1173 | 4. 09 | AC(7) | 3 | 172~ 182 | 0. 58 |
| bnlg1006 | 5 | AG(20) | 7 | 164~ 225 | 0. 73 |
| bnlg1287 | 5. 04 | AG(15) | 3 | 140~ 152 | 0. 51 |
| umc1341 | 6. 01~ 6. 06 | CTGT(4) | 3 | 112~ 126 | 0. 75 |
| umc1083 | 6. 02 | GA(16) | 6 | 50~ 120 | 0. 85 |
| umc1296 | 6. 87 | GCT(7) | 6 | 102~ 138 | 0. 23 |
| umc1463 | 6. 06 | ACA(6) | 3 | 72~ 80 | 0. 60 |
| bnlg1003 | 7. 02 | AG(12) | 2 | 216~ 234 | 0. 50 |
| bnlg1070 | 7. 03 | AG(15) | 5 | 204~ 244 | 0. 55 |
| phi161 | 7. 06 | ACTG/ ACG | 5 | 182~ 210 | 0. 77 |
| bnlg1056 | 8. 08 | AGGAG | 6 | 90~ 120 | 0. 59 |
| bnlg1812 | 8. 05 | AG(22) | 6 | 162~ 200 | 0. 73 |
| bnlg1828 | 8. 06 | GA(8) | 3 | 125~ 129 | 0. 69 |
| umc1172 | 8. 04 | CCA(4) | 3 | 102~ 152 | 0. 47 |
| umc1714 | 9. 07~ 9. 08 | AGG(8) | 3 | 187~ 238 | 0. 30 |
| bnlg1913 | 9. 02 | AG(12) | 4 | 160~ 210 | 0. 17 |
| umc1277 | 9. 08 | AATA(5) | 3 | 153~ 157 | 0. 52 |
| bnlg1367 | 10. 03 | GA(6) | 4 | 127~ 170 | 0. 64 |
| phi062 | 10. 04 | ACG | 3 | 156~ 163 | 0. 53 |
| umc1061 | 10. 06 | TCG(6) | 4 | 82~ 88 | 0. 31 |
| umc1152 | 10. 02 | (ATAG) 6 | 3 | 159~ 168 | 0. 63 |
| umc1179 | 10. 03 | (AAG) 4 | 3 | 150~ 185 | 0. 47 |

2.2 聚类结果

通过 SSR 分析, 我们可以将 23 份材料聚为 5 组(图 1)。其中旅 9 宽、E28、S37、B73 为 A 组, Mo17、自 330、获唐黄 17、矮金 525 为 B 组, 获白、D 黄 212、黄早四、B75 为 C 组, 齐 35、双 741、K36 为 D 组, Oh43、

H21、龙抗 56A 为 E 组。我们可以看到大刍草与其他材料距离很远。

表 3 AFLP 分析所选用的引物组合及其遗传变异

| 引物组合 | 扩增带数 | 特征带 | 多态性带 | 多态性(%) |
|----------|--------|------|------|---------|
| E35/ M58 | 43 | 1 | 28 | 65 |
| E38/ M52 | 57 | 8 | 37 | 65 |
| E35/ M36 | 58 | 9 | 37 | 64 |
| E35/ M37 | 61 | 8 | 44 | 72 |
| E34/ M48 | 87 | 13 | 64 | 74 |
| E35/ M41 | 52 | 6 | 34 | 64 |
| E42/ M38 | 35 | 10 | 19 | 54 |
| E32/ M38 | 45 | 4 | 35 | 78 |
| E35/ M37 | 54 | 5 | 42 | 78 |
| E42/ M39 | 59 | 8 | 44 | 75 |
| E32/ M35 | 40 | 3 | 37 | 93 |
| E35/ M52 | 30 | 3 | 23 | 77 |
| 平均 | 51. 75 | 6. 5 | 37 | 72 |

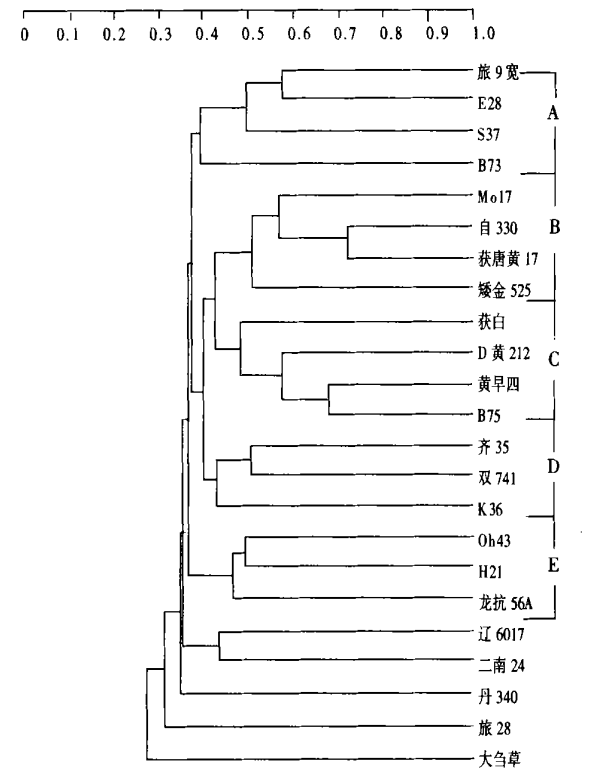


图 1 23 个玉米材料 SSR 聚类图

根据 AFLP 结果, 23 份材料也被聚为 5 组(图 2)。其中旅 9 宽、E28、Oh43 为 A 组, Mo17、齐 35、自 330、获唐黄 17、辽 6017、丹 340 为 B 组, 获白、矮金 525、二南 24 为 C 组, D 黄 212、黄早四、B75、双 741 为 D 组, B73、龙抗 56A、S37 为 E 组。在 AFLP 结果中大刍草距离其他材料也很远。

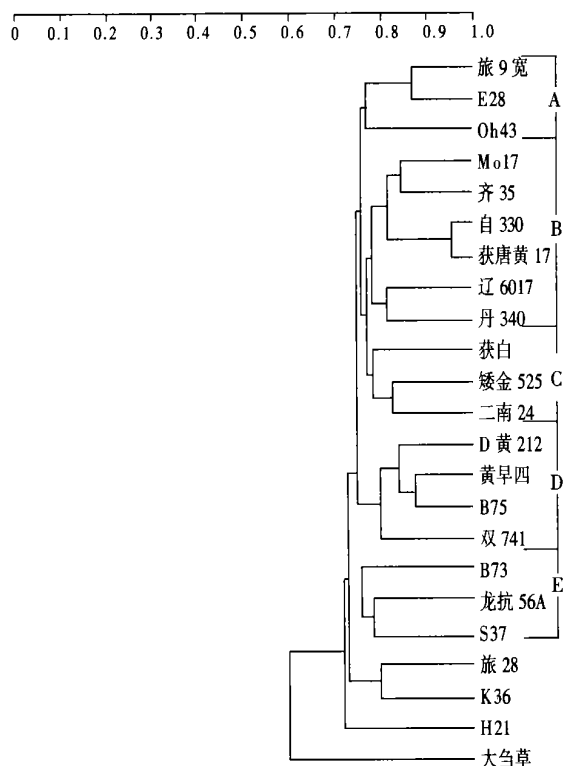


图2 23个玉米材料 AFLP 聚类图

综合分析两种分子标记结果,发现它们在分析玉米多样性的结论上相似,如:旅9宽和E28,自330、获唐黄17和Mo17,黄早四、B75和D黄212等材料,在两种分子标记结论中均在相同的组里。获唐黄17由获唐白和Mo17Ht1杂交后代选出,王懿波等将其划到综合种选亚种中^[14],但在本研究中,AFLP和SSR的聚类结果均将它和Mo17聚在一起(B组)。可能这个结论更趋于实际。同时大乌草和其他的材料距离均很远。这说明,在玉米遗传多样性分析中,两种分子标记技术的结论比较一致。

结合已知的亲缘关系,E28来源于旅9和A619杂种后代,获唐黄17来源于Mo17和获唐白的杂种后代,而D黄212是D729和黄早四杂交后代选育而成,它们聚在一起是合乎传统的。说明基于分子标记的遗传多样性与系谱分析相一致。但是也有例外,旅28在传统上一直划在旅大红骨类,而在本研究中,它与旅大红骨的典型种质旅9宽距离很远。

3 讨论

3.1 分子标记技术在玉米遗传多样性分析中的应用

Smith^[7]用131个SSR位点对58个自交系和4个杂交种进行分析后认为SSR技术比RFLP技术更

优越。Barrett^[1]认为AFLP适合于小麦的遗传多样性分析。Pejic等^[11]也认为AFLP是有效的分子标记系统,结果可靠,可以取代RFLP用于遗传多样性分析。而Ajmone-Marsan等^[12]在比较了RFLP和AFLP在QTLs作图中的应用后,发现这两种标记发生在染色体的不同区域,而且AFLP标记的效率高于RFLP标记。袁力行等^[8]在比较了RFLP, RAPD, SSR, AFLP后认为SSR有最高的多态性信息量,适合于玉米种质的遗传多样性分析,而AFLP拥有高多态性检测效率。本研究利用40对SSR引物,获得了202个等位基因,将23个玉米材料聚成5个组,SSR位点的多态信息量较高,说明SSR技术是适合进行玉米的遗传多样性研究的方法。而本研究利用12对AFLP引物组合,就获得444条多态性的等位基因,显示出AFLP标记检测数量大,多态性位点多,检测效率很高,可见用AFLP标记分析遗传多样性更具有大的优势。然而,大部分SSR位点在基因组中已定位,而AFLP标记尚未定位。进一步将AFLP位点定位于RFLP或SSR连锁图上,将有助于AFLP的更广泛应用。

3.2 玉米杂种优势群的划分及杂种优势预测

有关我国玉米种质的杂优群的划分,几十年来,很多学者一直在利用各种方法进行分析,早期人们利用亲缘关系、形态学对其进行研究,后来,同工酶等生理生化指标也被采用。吴景锋^[13]首先对我国自交系的亲本构成和来源进行了分析,并提出遗传基础狭窄的问题。王懿波^[14]将我国的玉米自交系分为五大杂种优势群、9个亚群。Y. Li^[15]也对我国的玉米种质的来源进行了详细的研究。只是这些研究均是基于系谱和亲缘关系的。扬太兴等^[16]利用9种同工酶对199个材料进行了分析,认为同工酶对预测杂种优势有一定帮助。

分子标记的出现,为杂种优势群的划分提供了新的方法。Senior等用70个SSR位点对94个美国优良自交系进行分析,共获得365个等位基因,用SSR资料对其进行聚类分析,其结果与系谱吻合,划分成的9组对应于主要的杂种优势群;用5个SSR位点即可建立每个自交系不同的指纹图谱。本研究利用AFLP、SSR两种分子标记手段对23份玉米材料进行了分析,结果显示两种分子标记在玉米杂种优势群划分中均起到一定作用,聚类结果与传统分类大致相同,而这两种分子标记的结果有很高的相似程度。这显示出分子标记将是进行玉米杂种优势

群划分的一种有效的方法。本研究中有某些材料的聚类结果与系谱有所不同,可能是分子标记分布于整个基因组,有些在基因内部,有些则与基因,特别是与产量相关的基因不一定有关,而在传统划群中,依据系谱来源、配合力和杂种优势来划分,这样,利用分子标记聚类的结果与杂种优势群划分的结果有所不同也是正常的。Senior 等也发现了类似现象。总之,通过分子标记划分杂种优势群,来预测杂种优势,尚存在一定的难度^[17~19]。分子标记与杂种优势密切程度,尚需进一步深入的研究。

3.3 分子标记检测玉米品种遗传多样性与遗传修饰的转基因玉米(GMOs)的应用

近年来,国内外已成功地用多种转化方法把不同的目的基因转入玉米,获得了再生转基因植株,转基因玉米在许多国家已进入商品化生产^[20]。在我国已有多个品种(案例)被批准进入中间试验,进入大面积生产也是指日可待。但是就目前的认识而言,转基因作物应用对生态环境的潜在威胁还不能排除。玉米引入中国 400 多年来形成了丰富的遗传变异,转基因玉米的大面积应用对中国玉米多样性及相关受体作物的影响及其种性保持是倍受关注的问题之一^[21]。借助可靠的分子标记检测玉米栽培品种及其种质资源的遗传多样性及其遗传结构,确定合理的转基因玉米应用的范围,将是安全、有效地大面积应用转基因玉米的基础。

参考文献:

- [1] Barrett B A, Kidwell K K. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest [J]. *Crop Sci*, 1998, 38: 1261-1271.
- [2] Ajmone P, Gorni C, Redaelli R, *et al.* Identification of QTLs for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using an AFLP map, different testers, and cofactor analysis [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, (102): 230-243.
- [3] Sharp R L, Kreis M, Sewry P R, *et al.* Location of β -amylase sequences in wheat and its relatives [J]. *Theor Appl Genet*, 1988, (75): 286-290.
- [4] Senior M L, Murphy J P, Goodman M M, *et al.* Utility of SSR for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system [J]. *Crop Sci*, 1998, (38): 1088-1098.
- [5] Vos P, Hogers R, Bleeder M, *et al.* AFLP a new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23 (21): 4407-4414.
- [6] Rohlf J F. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System [M]. Version 1. 7 Exeter Software. Setauket, NY. 1992. 1-132.
- [7] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, *et al.* An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, (95): 163-173.
- [8] 袁力行, 傅俊骅, Warburton M, 等. 利用 RFLP、SSR、AFIP、RAPD 标记分析玉米自交系遗传的比较研究 [J]. *遗传学报*, 2000, 27(8): 725-733.
- [9] 李新海, 傅俊骅, 张世煌, 等. 利用 SSR 标记研究玉米自交系的遗传变异 [J]. *中国农业科学*, 2000, 33(2): 1-9.
- [10] 吴敏生, 王守才, 戴景瑞, 等. AFLP 分子标记在玉米优良自交系优势群划分中的应用 [J]. *作物学报*, 2000, 26 (1): 9-13.
- [11] Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, *et al.* Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, (97): 1248-1255.
- [12] Ajmone Marsan P, Castiglioni P, Fusari F, *et al.* Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, (96): 219-227.
- [13] 吴景锋. 我国玉米杂交种发展的主要历程、差距和对策 [J]. *玉米科学*, 1995, 3(3): 1-5.
- [14] 王懿波, 王振华, 陆利行, 等. 中国玉米种质基础、杂种优势群划分与杂优模式研究 [J]. *玉米科学*, 1998, 6 (1): 9-13, 28.
- [15] Li Y. Development and germplasm base of maize hybrids in China [J]. *Maydica*, 1998, (43): 259-269.
- [16] 杨太兴, 段章雄, 郭乐群, 等. 同工酶与玉米杂种产量优势预测的研究 [J]. *植物学报*, 1995, 37(6): 432-436.
- [17] Melchinger A E, Lee M, Lamkey K R, *et al.* Genetic diversity for restriction length polymorphisms and heterosis for two diallele sets of maize inbreds [J]. *Theor Appl Genet*, 1990, (80): 488-496.
- [18] Godshalk E B, Lee M, Lamkey K R. Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of maize [J]. *Theor Appl Genet*, 1990, 80: 273-280.
- [19] Dudley J W, Saghai-Maroof M A, Ruffner G K. Molecular marker information and selection of parents in corn breeding programs [J]. *Crop Sci*, 1992, 32: 301-304.
- [20] 赵久然, 郭景伦, 腾海涛, 等. 玉米转基因研究进展 [J]. *玉米科学*, 2000, 8(3): 14-17.
- [21] Quist D, Chapela I H. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico [J]. *Nature*, 2001, 414: 541-543.