

分子标记技术在玉米育种中的应用

张正¹, 连灵燕², 王高鸿¹, 杜艳伟¹, 李颜方¹, 赵晋锋^{1*}

1.山西省农业科学院谷子研究所, 山西 长治 046011;

2.山西省长治市城区农林委员会, 山西 长治 046011

摘要: 生物技术的发展促进了分子生物学和育种学的交叉融合,极大地推进了育种工作的进程和效率。论述了 DNA 分子标记技术及其在玉米杂种优势群的划分、品种纯度和真实性检测、功能基因定位、遗传多样性分析以及转基因检测等多个领域中的应用,并对其现阶段存在的问题和今后的发展前景进行了分析讨论,以为玉米分子育种研究提供相应的参考。

关键词: 玉米; 育种; 分子标记; DNA

DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2015.04.02

The Application of Molecular Markers in Maize Breeding

ZHANG Zheng¹, LIAN Ling-yan², WANG Gao-hong¹, DU Yan-wei¹, LI Yan-fang¹, ZHAO Jin-feng^{1*}

1. Millet Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Shanxi Changzhi 046011, China;

2. Changzhi Urban Agriculture and Forestry Commission of Shanxi Province, Shanxi Changzhi 046011, China

Abstract: Development of biotechnology promote the chiasmatic fusion of molecular biology and thremmatology, promote the process and efficiency of breeding work. This paper mainly introduced the application of the division of heterosis group, varietal purity and authenticity of detection, functional gene location, the genetic variety of analysis and transgenic detection, analyzed and discussed the problems existing in present and the development prospect in the future, which was expected to provide reference for maize molecular breeding.

Key words: maize; breeding; molecular markers; DNA

种子是农业生产的根本,关系着农业增产、农民增收和农村发展的实现。传统的育种方法在作物增产和品质改良上取得过巨大的成就,但是由于受生物隔离和基因连锁等的制约,已经不能满足现今快速发展的育种需要。分子标记以 DNA 为表现形式遍及整个基因组,数量极多,在生物的各个部分均可检测到,且不受发育阶段和环境限制。自然界植物群体中存在大量的等位变异,而分子标记可检测的变异位点几乎是无限的,且多态性高。分子标记技术现在已广泛应用于玉米杂种优势群的划分、品种纯度和真实性检测、功能基因定位、遗传多样性分析以及构建植物遗传生理图谱等多个方向,为玉米育种工作提供更加

快捷、准确、高效的指导工作。

1 分子标记技术简介及分类

20 世纪 80 年代分子标记技术开始得到应用^[1]。分子标记以个体间遗传物质内的 DNA 序列变异为研究对象,是遗传多态性在基因水平上的直接反映。广义的分子标记指可遗传的并可检测的核苷酸序列和蛋白质,狭义的分子标记仅指 DNA 序列。

经过多年发展, DNA 标记技术已达几十种,主要分为:①基于分子杂交的分子标记。这类标记先通过限制性内切酶和凝胶电泳提取 DNA 分

收稿日期:2015-02-10; 接受日期:2015-05-11

基金项目:山西省农业科学院博士启动项目(YBSJJ1306)资助。

作者简介:张正,硕士研究生,主要从事分子育种研究。E-mail:zhangjuzheng5219@163.com。* 通信作者:赵晋锋,副研究员,主要从事玉米、谷子功能基因组与分子育种研究。E-mail:zhaojfmail@126.com

子,然后再与特异探针杂交,最后通过非同位素显色技术或放射性自显影技术检测 DNA 的多态性,主要有 RFLP 和 VNTR 两种。②基于 PCR 技术的指纹分子标记。这类标记是指以传统的 PCR 技术为基础,通过改进引物等方法,改良而来的 PCR 技术。根据引物的选择方式可以分为非特异引物的 PCR 标记和特异引物的 PCR 标记,前者主要包括 DAF、AP-PCR 和 RAPD 等;后者主要有 SRAP、SSR、SPAR、SSCP、SCAR、ddF、DAMD、ISTR、IFLP、RAMPO、RFLP-PCR 和 STS 技术等。③基于限制性酶切和 PCR 技术的分子标记。该技术是利用限制性内切酶可以切割特异的双链 DNA 序列的特性,结合 PCR 技术演变而来的一种分子标记技术。根据酶切对象的不同分为 AFLP 和 CAPS。④基于 DNA 芯片技术的分子标记技术。该技术是将大量探针分子固定于支持物上,然后与样品进行分子杂交,再通过检测杂交信号强度,获得关于样品分子的基因序列和基因数量。主要有 SNP 标记和 InDel 标记技术。

2 分子标记技术在玉米育种中的应用

随着玉米基因组序列测序的完成、玉米高密度遗传图谱和物理图谱的构建,使分子标记技术在玉米育种工作中得到更广泛的应用。目前在玉米育种工作中,分子标记技术已被广泛应用于品种纯度和真实性检测、分析遗传多样性、定位功能基因、划分杂种优势群以及转基因检测等方面。

2.1 品种纯度和真实性检测

品种鉴定包括品种真实性和种子纯度两个方面。品种鉴定的方法经历了两大历程:传统鉴定和现代鉴定。传统品种鉴定技术包括形态鉴定、物理特性鉴定、化学特性鉴定、细胞学性状鉴定和生理指标鉴定。现代鉴定技术包括蛋白质指纹图谱和 DNA 分子标记鉴定。每种鉴定方法在相应的历史时期都为品种鉴定做出了巨大贡献,但受技术的先天缺陷(如多态性差、鉴定周期长、费用高等)制约,大部分鉴定方法因难以满足纯度等方面的需求(快速、准确、自动、综合),渐渐退出了历史舞台。目前在品种鉴定中使用最广泛的方法是 DNA 分子标记技术,该技术可以鉴别表型上难以辨别的品种,能满足目前的鉴定要求。常用的 DNA 分子标记技术包括:RFLP、RAPD、AFLP、

InDel、SSR 和 SNP。

李保军等^[2]利用测得品种的性状与 AFLP 分析结果进行比较,记录各性状的特异性位点,建立了玉米 DUS 测试 AFLP 数据库,可应用于新品种的测试。李雪等^[3]研究表明 SSR 和 SNP 两种标记在数据完整性、区分品种能力和位点稳定性等方面差别较小。宋伟等^[4]从公共数据库筛选出 48 个玉米核心 SNP 位点,研究发现 42 个 SNP 位点的基因分型数据信息可以将 105 份自交系材料区分开。罗黎明等^[5]通过对 RAPD、RFLP、SSR 和 AFLP 等分子标记技术在种子纯度鉴定和品种真实性检测中的应用进行了比较,研究发现,SSR 分子标记技术是目前最适宜检测品种真实性和种子纯度的技术。张体付等^[6]以 B73 和 Mo17 基因组序列信息为背景,采用 InDel 标记对 6 个玉米杂交种的亲本及其 F₁ 代杂交种进行了检测,开发了 143 个代表基因的功能性 InDel 标记,研究发现 13 个共显性 InDel 标记可准确鉴定 6 个杂交种的纯度。

2.2 分析遗传多样性

遗传多样性又称基因多样性,是生物多样性的的重要组成部分,也是物种分化和生命进化的基础。遗传多样性可以分为广义遗传多样性(地球上生物所携带的各种遗传信息的总和)和狭义的遗传多样性(生物种内的遗传变异),多样性的高低决定了族群对于环境适应的能力。多样性的检测对象经历了形态、细胞(染色体)、生理生化指标和基因 4 个水平的发展历程。目前使用的分子检测技术主要有:RFLP、AFLP、RAPD、ISSR、TRAP、SNP 和 SSR。

田松杰等^[7]对 50 个有代表性的玉米及其野生近缘种使用 AFLP 进行了遗传关系分析,将 50 个材料分为 3 大类。姚正培^[8]利用 RAPD 标记技术,结合 7 份已知系谱来源的玉米自交系对 14 份未知系谱来源的玉米自交系进行遗传多样性分析,筛选出 14 个 RAPD 随机引物可对 21 份材料扩增出多态性条带。刘永忠等^[9]利用 ISSR 标记技术,对 10 个不同玉米丝黑穗病抗性自交系进行了多态性分析,研究发现,不同玉米丝黑穗病抗性背景自交系中具有较高的多态性。van Liet 等^[10]利用 ISSR 分子标记对从老挝北部山区和越南收集的 21 份玉米种质材料进行遗传多样性分析,21 份玉米种质材料被分为 3 大类,并建立了玉米种

质材料系统树。王寒玉等^[11]使用 ISSR 技术对 40 份玉米自交系的亲缘关系进行聚类分析,结果表明 40 份玉米自交系大部分与自交系的谱系相符合。祁丽婷等^[12]利用 ISSR 对 40 个山西主要玉米品系的自交系进行了遗传多样性分析,将供试种质材料分为 5 个类群。吴金凤^[13]利用 40 对 SSR 荧光标记引物和 1 041 个 SNP 位点,构建了 72 份国内常用玉米自交系的指纹数据库,并进行了遗传多样性划分。袁力行等^[14]对 15 个玉米自交系使用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 4 种方法分析了遗传多样性。张丽等^[15]利用 24 对 TRAP 引物分析了 16 个玉米自交系的遗传多样性,研究发现 TRAP 标记可用于玉米种质遗传多样性研究。

2.3 划分杂种优势群

杂种优势是指杂交种通过继承其父本和母本的不同优势,可能获得一个更好的生物特性。杂种优势通常表现为杂合体在一种或多种性状上优于两个亲本的现象。群体划分的方法经历了系谱法、地理差异法、配合力高低法、生物化学法和分子标记法的演变^[16]。由于种质资源广泛和频繁的交流、血统不明自交系的使用、人工选择、基因漂移和性状受环境影响等因素的影响,近年来系谱法等群体划分的方法逐渐被分子标记法替代。分子标记技术发展至今已有数十种,群体划分中常用的分子标记法主要有:RFLP、AFLP、RAPD、SNP 和 SSR。

Lee 等^[17]利用 RFLP 标记构建了杂种优势群,Dubreuil 等^[18]利用 RFLP 标记技术划分了玉米自交系的杂种优势群,发现结果与系谱分析结果基本一致。黄益勤等^[19]采用 54 个玉米 RFLP 探针和 3 种限制性内切酶对我国南方常用的 41 份自交系和美国 4 份代表主要玉米杂种优势群的自交系进行了多态性分析,通过聚类分析将供试材料划分为 6 大类群。廖勇等^[20]用 AFLP 分子标记技术对 49 个自交系进行了玉米杂种优势群划分,研究表明 AFLP 分子标记具有更强的多态性,可为建立杂种优势模式提供指导。崔月^[21]用 AFLP 分子标记技术以 8 份玉米自交系为材料,用 20 对引物组合进行遗传距离研究,把 8 个自交系分为 4 个大群。景建洲等^[22]以 RAPD 技术对玉米 10 个品种的全基因组 DNA 进行 PCR 扩增,将 10 个玉米品种划分为 3 个类群。彭忠华等^[23]利用 RAPD 标记对中单 340、自 330、7922、苏 37、

449、黄早四和适应我国喀斯特高海拔山区的玉米骨干自交系进行遗传多样性和杂种优势群划分,将适合我国喀斯特高海拔山区玉米种质资源的 16 个骨干自交系划分为 5 个类群。邱红波等^[24]利用 RAPD 技术将 36 个玉米自交系划分为 6 大类,SSR 分子标记将其划分为 5 大类,研究表明,RAPD、SSR 两种分子标记系统均适合于玉米种质的遗传多样性研究,但 SSR 更可取。丁孝营等^[25]采用 RAPD 技术,用 16 个引物将 13 个玉米自交系和遗传改良系分为 7 个类群。吴金凤^[13]利用 SSR 和 SNP 分子标记方法将 72 份自交系划分为 7 个杂种优势群,分别是瑞德群、改良瑞德群、兰卡斯特群、旅大红骨群、塘四平头群、P 群和糯质群。郑璐璐^[26]使用 SNP 标记技术,将 58 个玉米自交系分成 6 个类群。张伟玮等^[27]用 SSR 分子标记技术,使用 70 对引物将 116 份供试材料划分为 5 个种质类群。李娟^[28]选用了 52 份遗传背景有差异的甜玉米自交系材料,用表型聚类和 SSR 聚类两种方法,对其进行了类群划分,通过两种聚类分析,均将 52 份亲本材料分为 4 大类,得到的聚类结果基本吻合,与供试材料的系谱来源基本一致,但也存在不一致的个体。

2.4 定位功能基因

广义的基因定位是指基因所属连锁群或染色体以及基因在染色体上的位置的测定。狭义的基因定位仅指基因在染色体上的位置的测定。目前,根据基因控制的性状,通常把功能基因划分为两大类:质量性状基因(如器官颜色、芒或绒毛的有无和抗逆性等)和数量性状基因(如生长期、品质、产量和育性基因等)。分子标记技术可以在早期对目的基因进行辅助选择,提高育种效率。功能基因定位中,常用到的分子标记技术有 STS、AFLP、SNP、SSR、SCAR 和 RFLP 等。

马侠^[29]用设计的引物 I -2 和引物 II -4 对 34 个抗病自交系和 20 个感病自交系进行验证,研究发现 STS 标记 I -2 和 STS 标记 II -4 与自交系感抗病的相关性都达到极显著水平。结果表明 STS 标记 I -2 和 STS 标记 II -4 可以直接应用于玉米抗粗缩病的分子标记辅助育种中。宋欣^[30]使用 AFLP 分子标记技术建立了玉米双低频酶 cDNA-AFLP 技术体系,并运用于玉米穗数性状相关基因的差异表达研究。李蕾娜^[31]使用改进的单酶切 cDNA-AFLP 标记技术,分离出玉米对生性状

相关基因差异表达片段。赵靖^[32]通过 9 个与磷胁迫直接相关的基因片段,对玉米 cDNA 文库进行分析后获得了 9 个玉米相关基因的全长 cDNA 序列。马骏等^[33]通过 SNP 基因芯片(56 110 个 SNP)对 A619 感、A619Ht3 抗玉米大斑病近等基因系进行分析,采用生物信息学和比较基因组学方法进行显著 SNP 位点候选基因筛查和功能预测,研究发现 38 个 SNP 被确定与大斑病抗性相关。郑德波等^[34]研究发现,广西南宁和湖北武汉两种环境条件下共定位到 21 个株高 QTL 和 27 个穗位高 QTL。李凯^[35]利用 30 对 SSR 引物对选取的 2 个 F₂ 群体的 P₁、P₂、F₁、F₂ 单株进行 PCR 扩增,对筛选出的多态性引物进行验证,筛选出了 4 个玉米花期相关性状的主效 SSR 标记。徐党^[36]利用分布在玉米 10 条染色体上的 115 对 SSR 标记对 172 份玉米自交系的遗传多样性进行了分析,研究发现 172 份玉米自交系可分为 5 个亚群,21 个 SSR 标记与 10 个产量性状相关联,总位点数为 42 个;其中 4 个位点与穗行数相关联,与行粒数和粒重相关联的均为 5 个位点,7 个位点与穗重相关联,与穗长、秃尖长、穗粗、轴粗关联的位点均为 3 个,与出籽率相关联的位点仅有 1 个。石红良^[37]采用 SSR 和 SCAR 标记定位了玉米抗丝黑穗病的 6 个主效 QTL 连锁标记。曹永国等^[38]使用 RFLP 标记技术研究了自交系 5003 的致矮作用,发现了 5 个 QTL。乐素菊等^[39]利用 3 个 SNP 位点中的 103(A/G) 位点进行等位基因特异 PCR,成功地鉴定了超甜玉米自交系的基因型,建立了通过等位基因特异 PCR 辅助筛选 *bt2* 基因的平台。

2.5 转基因检测

随着分子生物学的发展,转基因技术被越来越多的应用于玉米品质改良研究中,对转基因的安全性,现阶段还存在很大的争议,因此,转基因检测就显得尤为重要。同时,转基因检测也可以提前检验转基因育种的结果,提高育种效率。转基因检测的方法依据检测内容可分为蛋白表达产物检测和核酸序列检测。蛋白表达产物检测主要有:Elisa 检测技术和试纸条检测技术。蛋白质表达产物检测只能检测未变性的蛋白质,检测受较多限制。核酸序列检测主要有:PCR 检测技术(定性 PCR 检测和 Real-time 荧光定量 PCR 检测)、核酸等温扩增检测技术(环介导的等温扩增

技术和依赖核酸序列的扩增技术等)、基因芯片检测技术、高通量测序技术、生物传感器技术和毛细管电泳技术等。现阶段转基因检测还是以 PCR 检测技术为主。

王世伟等^[40]使用 59 条 RAPD 引物,对高粱基因组 DNA 和导入前后的玉米基因组总 DNA 扩增,研究发现,其中 9 条引物检测出后代和原种间存在差异,并在 4 个玉米自交系检测出高粱的 DNA。周琳华等^[41]以转基因玉米 MON810 为模板,建立了环介导的等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 检测体系。张丽^[42]通过定量 PCR 技术,完善了转基因检测基体标准物质研制技术和转基因检测质粒标准物质制备技术并且完成了转基因筛查策略研究。张广远^[43]以转基因玉米 MIR162、BVLA430101、MON88017,转基因大豆 MON89788、GTS40-3-2,转基因油菜 MS₁、RF₁ 为研究对象,建立了上述 7 种转基因品系的基因芯片检测方法。

3 存在问题与展望

分子生物学的深入研究以及与传统育种学的相互渗透、相互融合,使分子标记技术在作物育种工作的作用越来越大,并逐渐成为育种工作中的一个强大支柱。但是两个学科的融合和应用仍存在着一些问题:

第一,分子标记在杂种优势群的划分、模式构建、预测以及优势遗传机理的研究等方面均有着广阔的应用前景。但是,由于分子标记在杂种优势群体划分上还处于起步阶段,没有一套完善的标准,只能是在传统划分上起到一个论证的作用。

第二,分子标记技术已经成为品种纯度和真实性检测方面最主要的检测方法。但是,由于作物基因组非常庞大以及部分性状的多基因控制等因素,在生产中对于检测结果的确定和认可还需要更加明确的界定。

第三,在功能基因定位上,分子标记技术发挥了巨大作用。但由于实验条件的限制,定位不够精确,达不到应用于育种选择实践的效果,而且功能基因在后代中因为重组而分离,所以目前还没有分子标记育种成功育成新品种的报道。

第四,分子标记技术成本过高,规模较小。分

子标记辅助选择比表型选择效果更加明显,而且不受自然条件的制约,但由于高昂的试验成本,造成规模较小。

第五,常规育种方法与分子标记技术联系不紧密。分子标记技术尽管已有了巨大的发展,但是在育种工作中的作用还没有完全发挥,大量的研究成果尚未得到实践的充分验证。

第六,转基因技术在作物育种中的大量使用以及转基因作物中的外源片段越来越丰富等因素,给转化体的鉴定带来了很大困难。

分子生物学技术的快速发展做到了育种目标明确化,加速了玉米育种中品质的完善,极大地提高了育种效率,但是育种的最终目的还是要应用于生产,再先进的技术只有通过生产实践的反复检验才能证明其功效。所以,要正确认识分子标记技术和育种实践的关系,尽量缩短两者间的距离,加快由实验室向生产实践转化的步伐。另一方面,应进一步量化各种检测标准,使检测标准更加具有科学性和实用性。完善的检验标准,既是对育种结果的一种合理评判,又是对市场的尊重,品种审定结果应该更加贴近百姓需求,尽可能的避免审定和生产需求相脱节。随着科技的不断进步,未来将会研发出成本更低、精度更高的分子标记技术,在今后的育种工作中发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] 周延洁. DNA 分子标记技术在植物中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2005,5.
- [2] 李保军.AFLP 分子标记在玉米 DUS 测试中的应用[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,硕士学位论文,2011.
- [3] 李雪,田红丽,王风格,等.SSR 和 SNP 两种标记技术在玉米品种真实性鉴定中的比较分析[J]. 分子植物育种,2014,12(5):1000-1004.
- [4] 宋伟,王风格,田红丽,等.利用核心 SNP 位点鉴别玉米自交系的研究[J].玉米科学,2013,21(4):28-32.
- [5] 罗黎明,刘丽,于丽娟,等. DNA 分子标记技术在玉米种子纯度鉴定中的应用[J].生物技术进展,2011,1(1):7-13.
- [6] 张体付,葛敏,韦玉才,等.玉米功能性 Insertion/Deletion (InDel) 分子标记的挖掘及其在杂交种纯度鉴定中的应用[J].玉米科学,2012,20(2):64-68.
- [7] 田松杰,石云素,宋燕春,等.利用 AFLP 技术研究玉米及其野生近缘种的遗传关系[J].作物学报,2004,30(4):354-359.
- [8] 姚正培.玉米抗旱-耐盐种质筛选及 RAPD 分子标记研究[D].乌鲁木齐:新疆大学,硕士学位论文,2007.
- [9] 刘永忠,赵晋峰,王高鸿,等.不同丝黑穗病抗性玉米自交系 ISSR 多态性分析[J].山西农业科学,2010,38(7):11-15.
- [10] van Liet V, Linh N T T, Thuy N T, et al.. Genetic diversity of maize (*Zea mays* L.) accessions using inter~ simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. J. Southern Agric., 2011, 42(9): 1029-1034.
- [11] 王寒玉,杜艳伟,李萍,等.40 份玉米自交系的 ISSR 遗传多样性分析[J].生物技术进展,2011,1(3):214-218.
- [12] 祁丽婷,李中青,赵晋峰,等.玉米种质材料遗传多样性的 ISSR 分析[J].安徽农业科学,2014,42(34):12046-12047,12050.
- [13] 吴金凤.利用 SSR 和 SNP 标记研究玉米自交系的遗传多样性[D].长春:吉林农业大学,硕士学位论文,2014.
- [14] 袁力行,傅骏骅,Warburton M,等.利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究[J].遗传学报,2000,27(8):725-733.
- [15] 张丽,郭志富,刘君,等.利用 TRAP 标记分析玉米遗传多样性的研究[J].作物杂志,2008,2:266-270.
- [16] 刘新芝,彭泽斌,傅骏骅,等.采用 RAPD 分子标记、表型和杂种优势聚类分析法对玉米自交系类群的划分[J].华北农学报,1998,13(4):36-41.
- [17] Lee M, Godshalk E B, Lamkey K R, et al.. Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with the agronomic performance of their crosses[J]. Crop Sci., 1989, 29:1067-1071.
- [18] Dubreuil R, Dufour P, Krejci E, et al.. Organization of RFLP diversity among inbred lines of maize representing the most significant heterotic groups[J].Crop Sci.,1996,36:790-799.
- [19] 黄益勤,李建生.利用 RFLP 标记划 45 份玉米自交系杂种优势群的研究[J].中国农业科学,2001,34(3):244-250.
- [20] 廖勇.AFLP 分子标记与米产量杂种优势的关系的研究[D].北京:中国农业大学,硕士学位论文,2003.
- [21] 崔月.玉米 AFLP 遗传距离与光合特性杂种优势相关分析[D].长春:吉林农业大学,硕士学位论文,2011.
- [22] 景建洲,张勇,李东亮,等.利用 RAPD 分子标记分析玉米种质遗传多样性[J].中国农学通报,2006,22(12):450.
- [23] 彭忠华,张明生,邱红波,等.喀斯特高海拔山区玉米骨干自交系遗传多样性 RAPD 标记[J].分析植物遗传资源学报,2005,6(2):140-144.
- [24] 邱红波,彭忠华,张文龙,等.利用 RAPD 和 SSR 分析 36 个贵州主要玉米种质的比较研究[J].种子,2009,28(12):39-43.
- [25] 丁孝营,刘永莉,党拥华,等.利用 RAPD 分子标记技术分析玉米种质遗传多样性[J].延边大学农学学报,2010,32(4):277-280.
- [26] 郑璐璐.SNAP 分子标记检测玉米 *Ael*, *Sul*, *D9*, *ZmRap* 基因多态性[D].武汉:华中师范大学,硕士学位论文,2011.
- [27] 张伟玮.玉米自交系杂种优势群划分研究[D].兰州:甘肃农业大学,硕士学位论文,2012.
- [28] 李娟.表型聚类和 SSR 聚类对甜玉米自交系类群的划分及杂种优势分析[D].长春:吉林农业大学,硕士学位论文,2014.
- [29] 马侠.中美玉米种质粗缩病抗性的聚类分析及 STS 分子标记的筛选[D].山东泰安:山东农业大学,硕士学位论文,2011.

- [30] 宋欣. 玉米双低频酶 cDNA-AFLP 体系的建立及穗数性状相关基因的差异表达分析[D]. 贵阳: 贵州大学, 硕士学位论文, 2008.
- [31] 李蕾娜. 利用单酶切 cDNA-AFLP 技术分离玉米对生性状相关基因差异表达片段[D]. 合肥: 安徽农业大学, 硕士学位论文, 2005.
- [32] 赵靖. 利用 cDNA_AFLP 技术分离玉米耐低磷相关基因的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 硕士学位论文, 2011.
- [33] 马骏, 王延波, 刘欣芳, 等. 玉米大斑病感、抗近等基因系 SNP 基因芯片分析[J]. 玉米科学, 2014, 22(5): 153-158.
- [34] 郑德波, 杨小红, 李建生, 等. 基于 SNP 标记的玉米株高及穗位高 QTL 定位[J]. 作物学报, 2013, 39(3): 549-556.
- [35] 李凯. 玉米花期相关性状的遗传分析及主效 SSR 标记筛选[D]. 长春: 吉林农业大学, 硕士学位论文, 2014.
- [36] 徐党. 玉米自交系遗传多样性及产量性状与 SSR 标记的关联分析[D]. 江苏扬州: 扬州大学, 硕士学位论文, 2012.
- [37] 石红良. 玉米抗丝黑穗病分子标记开发与主效抗病基因定位[D]. 四川雅安: 四川农业大学, 博士学位论文, 2009.
- [38] 曹永国, 王国英, 王守才, 等. 玉米 RFLP 遗传图谱的构建及矮生基因定位[J]. 科学通报, 1999, 44(20): 2178-2182.
- [39] 乐素菊, 刘鹏飞, 曾慕衡, 等. 超甜玉米 *bt2* 基因 SNP 位点的分析及分子标记辅助筛选[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(11): 73-78.
- [40] 王世伟, 杨晓杰, 王中革, 等. RAPD 分子标记对高粱 DNA 经花粉管导入玉米自交系的验证[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2011, 27(1): 54-60.
- [41] 周琳华, 肖维威, 吴永彬, 等. 苏云金芽孢杆菌 *Cry1A(b)* 杀虫基因 LAMP 检测方法的建立与应用[J]. 生物技术通报, 2012, 4: 165-169.
- [42] 张丽. 转基因产品检测标准物质研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 博士学位论文, 2012.
- [43] 张广远. 转基因食品基因芯片检测及鉴定方法的建立[D]. 济南: 山东师范大学, 硕士学位论文, 2013.