

文章编号: 1005-0906(2006)03-0001-05

玉米基因组学研究进展

田清震, 谢传晓, 李新海, 李明顺, 张世煌

(中国农科院作物科学研究所, 农业部作物遗传育种重点实验室, AMBIONET- 中国实验室, 北京 100081)

摘要: 简要介绍了玉米基因组学发展背景, 概述了玉米基因组学研究进展。在结构基因组学方面, 新发展的 DNA 编码序列富集与过滤技术大大推动了玉米基因组学测序工作的进展, 目前已获得基因组中 80% 的编码序列。功能基因组学在 EST 计划、Mu-tagging 技术、芯片技术和 TILLING 技术的推动下也取得了长足的进展。与水稻和拟南芥等的比较基因组学, 有助于解读基因组序列, 推测未知基因的功能, 并促进了基因作图。生物信息学则积累了海量的数据库并呈指数增加, 新软件开发、数据的解读和图谱的整合是其重要的研究方向。讨论了基因组学发展对玉米育种的影响。

关键词: 玉米基因组学; 生物信息学; 玉米育种**中图分类号:** S513.035.3**文献标识码:** A

Progress of the Maize Genomics

TIAN Qin-zhen, XIE Chuan-xiao, LI Xin-hai, LI Ming-shun, ZHANG Shi-huang

(Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Key Lab of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture. AMBIONET-China Lab., Beijing 100081, China)

Abstract: The background and progress of the maize genomics was introduced and summarized. More than 80% of encoding sequences in maize genome had been sequenced as the great progress in structural genomics due to enriching and filtration methodology of encoding sequences which were developed recently. Functional genomics was also promoted great forward with the promoting of the EST project, Mu-tagging, microarray technology and TILLING strategy. Meanwhile, the comparative genomics with deciphered sequences and data from Arabidopsis and rice genome facilitate to decode the sequences, to deduce their function, and to aid the mapping. Exponentially accumulating data, newly developed softwares, sequence deciphering were the key subjects in bioinformatics nowadays. The impact of the genomics on corn breeding was discussed too.

Key words: Maize genomics; Bioinformatics; Maize breeding

玉米不仅是重要的粮食作物, 也是植物遗传学特别是细胞遗传学、数量遗传学、转座子与突变和染色体重组等重要学科与学术研究的模式生物体 (Bennetzen J. L. et al. 2001)。随着基因组学技术的发展, 新近发展起来的编码基因 DNA 富集技术、高通量 DNA 芯片技术、单核酸多态性 (SNP) 技术和 TILLING 技术等为玉米基因组学发展奠定了技术上的基础。其它植物如: 水稻 (*Oryza sativa* L.) 基因组学的发展以及拟南芥基因组学的研究成果, 不仅为玉米比较基因组学的研究提供了基础, 同时也提供了经验

与技术, 为玉米基因组学研究带来了机遇。

目前, 美国正有计划大规模地研究玉米基因资源与基因组学, 抢占基因知识产权制高点。1998 ~ 2004 年, 美国国家科学基金 NSF (National Science Foundation, 简称 NSF) 资助了 126 个与玉米基因组相关的研究项目, 投资 1.794 亿美元。除美国外, 法国、澳大利亚、英国和加拿大也都设立了玉米基因组学项目。由国际农业研究组织、5 个发达国家和 2 个发展中国家的农业研究机构联合发起的“挑战计划” (Challenge Program), 拟投资 1.3 亿美元, 从 2003 年起用 10 年时间, 发掘重要新基因, 开展作物改良与基因组学研究。本文就玉米基因组学研究的进展及其对玉米育种有可能产生的影响进行简要综述。

收稿日期: 2005-07-11; **修回日期:** 2005-09-13**作者简介:** 田清震, 男, 博士, 副研究员, 从事玉米育种研究。

E-mail: cxxie@caas.net.cn

张世煌为本文通讯作者。Tel: 010-62139443 68918566

E-mail: cshzhang@public.bta.net.cn

1 结构基因组学

玉米基因组大小约为 2 500 Mb(Arumuganathan & Earle, 1991),与人类相当,为拟南芥的 20 倍,水稻的 6 倍,大约包含 50 000 个基因,基因数目约为水稻的 1.5 倍 (Martienssen, et al., 2004)。美国 Missouri 大学在 NSF 的资助下,对玉米结构基因组学的研究起步较早。他们以 B73 × Mo17 的永久作图群体为基础,构建了一个含有 80 多个核心标记的玉米 IBM 图谱(Intermated B73 × Mo17 Map),该图全长 5 289.2 cM,包含 190 个 RFLP 位点和 1 051 个 SSR 位点。还利用富含 SSR 的基因文库和 Stanford 大学开发的 ESTs,开发出大量定位的 SSR 标记。MaizeGDB 数据库中存储了大量的分子标记,包括 2 000 个 RFLP, 1 855 个 SSR,其中 1 797 个被定位在染色体特定位置。目前许多实验室构建了 BAC 文库和 YAC 文库,例如:用 B73 构建的双酶切 BAC 库,包含 221 184 个克隆,覆盖 10 倍基因组。并尝试组装重叠克隆群(contigs)。Cone 等(2002)发展了高密度的遗传图谱,用作锚定物理图谱。利用 SNP 标记特异基因和 BAC 聚集(BAC pooling)的策略用来锚定 BAC contigs,检测没有定位的 contigs 以促进遗传图谱和物理图的整合。

玉米很可能是一种异源四倍体起源的生物。禾谷类作物中,80%以上的单拷贝 RFLP 标记在玉米基因组中是重复的,甚至某些染色体区段也存在这种现象(Gaut & Doebley, 1997; Helentjaris et al., 1988, 1995)。在染色体 2 和 7、3 和 8、6 和 8、1 和 9、2 和 10、4 和 5 间大量存在重复序列,表明它们有共同的起源。此外,玉米基因组中还有大量的转座子(Bennetzen, 1996),大部分序列由为数不多的几种反转录转座子构成,在基因组内形成高度重复(Bennetzen, 1996; SanMiguel, et al., 1996),占到基因组的 80%。比较作图也发现,玉米基因组的大小是高粱的 35 倍,但主要是重复 DNA 含量所致,而与基因总量或基因顺序无关。Grivet et al.(1994)也发现在玉米与甘蔗之间和玉米与高粱之间普遍存在染色体重排现象。对于基因在基因组内的排列与组织方式,一般认为不是随意排列的,而是相似功能的基因形成大致的基因簇,如抗病基因簇和与发育功能相关的基因簇(McMullen & Simcox, 1995)。除染色体 7 和 9 以外,在玉米的每条染色体上都发现这样的基因簇。总体来说,玉米的基因组较复杂,但同时也为玉米功能基因组研究提供了便利。转座子的转座可以产生插入突变。一方面,大量重复序列限制玉米基因组学的发展,但另一方面转座子又使它成为禾本科作物基因组功能研究的有效工具。

2002 年 9 月开始的玉米基因组测序,初步确定了玉米的基因数量和它们的相对位置。通过霰弹法(shotgun)对全基因组 BAC 进行大规模测序,而后通过 DNA 指纹(DNA fingerprinting)的方法,将这些序列整合成连续的序列,重复的 BAC 组合成 FPCs (fingerprinted contigs, FPCs),并定位在遗传图上。这种方法对于重复序列少的基因组非常有效,但对于重复序列高的玉米则比较困难(Timmermans, et al., 2004)。但基于传统结构基因组学技术在玉米基因组研究中进展相当缓慢,主要是由于玉米基因组中大量的重复序列致使 contigs 的组装不能有效完成。针对于此,目前发展了两种新技术以测定玉米大部分编码基因的序列。一种方法叫 methylation filtration (MF),利用大多数基因甲基化程度较低的特点(Rabinowicz, et al., 2003),通过细菌限制体系(bacterial restriction systems)排除高度甲基化 DNA 序列,富集甲基化程度低的克隆进行测序,反转录转座子序列在次(低)甲基化 DNA 中含量大大降低(Rabinowicz, et al., 1999; Meyers, et al., 2001),该方法首先在冷泉港实验室采用;另一种方法叫 High Cot(HC),该研究首先在 Georgia 大学遗传系开展,其原理是编码基因的 DNA 大都为“低拷贝”序列(Cot 比较高),而非编码基因通常“高拷贝”序列(Cot 比较低)所占比例较高,对基因组内高 Cot 的低拷贝基因富集序列进行测序(Peterson, et al., 2002; Yuan, et al., 2003),可以富集编码基因的序列。两种方法针对基因组中序列的特点,相互结合使用,可以克服各自的不足,将基因富集区从基因贫乏区分离出来,因而测序工作量比全基因组测序减少了 4 倍,显著地提高了工作效率。

克隆 QTL 经典的方法是利用 F₂、重组近交系等群体进行 QTL 分析。利用图位克隆技术已经成功地克隆出一些 QTL,但只限于那些遗传效应较大的位点。通过检测群体中的连锁不平衡(Linkage-Disequilibrium, LD)对天然群体进行关联分析,可能是分析和分离微效位点的有效手段(Thornsberry, et al., 2001; Remington, et al., 2001)。此外,通过对筛选得到的近等基因导入系(Near Isogenic Introgressing Lines, NIL)进行基因扫描,可以检测诸如耐旱性等复杂性状的 QTLs,并发掘与此相关的基因网络(黎志康, 2004)。

2 功能基因组学

基因组表达序列标签 EST(expressed sequence tags)、基因定量表达技术和通过转座子标签(transposon tagging)3 项技术的发展,推动了玉米功能基因组学研究的发展。

EST 和 Rescue Mu 是 MGDp 项目发掘新基因两种主要方法。1998 年,NSF 的“玉米基因发掘计划”(MGDP: http://www.zmldb.iastate.edu/zmldb/nsf_grant_online.html)项目为 Stanford 大学斥资 1 200 万美元,进行玉米 EST 大规模测序。该项目认为,作物改良相关的信息蕴藏在转录谱(以蛋白质合成为模板转录的基因组部分)中,项目的总体目标是获得完成覆盖 50 000 个玉米基因的 EST 序列。利用现有的 cDNA 文库资源和测序条件,能够快速低成本地对转录谱进行测序。除了极个别情况外,理论上能对每个基因找到序列标签,从而为玉米基因发掘与功能分析提供捷径。到目前为止,这项计划取得显著成效,通过对叶原基、顶端分生组织、逆境根系、胚乳、雄穗、花丝及混合花药花粉等组织 cDNA 文库的测序,到 2005 年 5 月,已经在 NCBI 公共信息数据库发布 452 984 条 EST 序列。因此,研究者已经接近于可以得到代表玉米全部基因组的 EST 序列。EST 数据库将是发现表达基因、进行种间序列比较和基因表达分析等最有价值的资源。此外,利用 EST 和全序列两方面的信息可以将模式植物中基因组序列与来自其它植物的 EST 资料或其它序列进行比较分析,从而更多地了解、认识高等植物基因组。目前有 3 大类方法可用于高质量的基因功能分析:①用最大相似的同源基因的功能注释咨询序列;②MOTIF 搜索,MOTIF 常常是功能相关的保守序列;③用 Tatusov 等的直系同源簇方法(cluster of orthologous group, COG),即利用不同物种的基因成对相似聚类法把它们划分成各种直系同源簇(或称正向同源),然后用同一簇中的已知基因注释未知基因的功能。由于禾谷类作物的基因组广泛存在相似性,因此通过将水稻基因组序列与其它植物的 EST 资料及其序列进行比较,可分离和研究诸如玉米的相关基因,并鉴定同一基因的表达或功能的差异。

Rescue Mu 是一种经过加工的转座子标签,序列已知,容易追踪,插入基因区域后,通过对旁侧序列的测序发掘基因。经过改造的 Rescue Mu 转座子可直接克隆到标记的基因中。为了鉴定基因突变,建立永久性标签文库,将会得到总计 5 000 万个独立插入。这些文库能被 PCR 筛选以鉴定任何基因的突变。

基因表达信息更全面和高通量的鉴定方法是应用高密度 cDNA 克隆阵列杂交分析和利用转座子插入突变而进行基因敲除的鉴定分析。随着表达芯片技术出现,从 EST 数据库得到相关信息变得更为有效(Schena, 1996)。许多实验室发展了玉米特异组织

的、包含成千上万序列的微阵列(Lee, et al., 1999; Velasco, et al., 1999)。基因微阵列(Microarray)也是一种大规模发掘基因的方法,Arizona 大学在 MGDp 项目支持下开发芯片,研究玉米胚乳特性的表达(<http://ag.arizona.edu/research/larkinslab/>),每个芯片包含的 cDNA 大约有 15 000 个基因。Stanford 大学还正在建立玉米表达 cDNAs 微阵列的公益性研究,目标是对 50 000 个表达的 cDNAs 进行测序,产生 25 000 个在不同组织中表达基因的高密度的微阵列。

目前,已经成功地开发出多种高通量的反向遗传学基因敲除策略(gene knockout strategies)。在拟南芥和水稻等植物中 T-DNA 标签(T-DNA tagging)技术是功能基因组学研究的有效方法(Steven Henikoff, et al., 2003)。自从 40 年代后期,Mc Clintock 发现玉米转座子以来,转座子已经成为研究玉米基因组必不可少的工具。玉米转座子有 *En/Spm* 系统、Ac/Uq (Ds)系统和 *Mu* 3 大类。并克服了 T-DNA 的不足之处:转座子产生的插入通常是完整的单一因子,很容易进行分子分析;转座子用于基因、启动子和增强子陷阱(gene/promoter/enhancer trap)时,极少产生表达假象;只需转化一次,新的插入就可通过杂交或繁殖来不断地产生。许多转座子在转移酶存在的情况下,可从插入基因切离,使表型回复到野生型或产生具有弱表型的等位基因,因此可确定该突变是先插入连锁位置的特点,通过转座子的重新移动,可在一个感兴趣的特殊区域产生局部突变。位点选择转座子突变技术,能够插入的特异基因(Das & Martienssen, 1995; Edwards et al., 1999)。有证据表明,*Mu* 转座子优先插入基因内部和基因周围,正向突变频率为 $10^{-4} \sim 10^{-5}$,比野生玉米高出近 30 倍,且绝大多数突变由显性变成隐性,*Mu* 插入已成为研究变异的热点,从而为玉米基因鉴定的 EST 表达分析提供补充。基于 *Mu* 转座子的 tagging 系统正在大规模试验之中,这些技术大大地推动了功能基因组学发展。*Mu* 优先插入基因内和基因周围,导致对不连锁基因比 Ac/Spm 高 100 倍的突变频率(Lunde, C.F., Walbot, 1992)。通过对大量的突变体进行形态或生化鉴定进行筛选。转座子表型可通过分子的方法,如以杂交为基础的克隆和 PCR 来鉴别。已经通过这种方法克隆了几个重要基因(Bennetzen, et al., 1987; Wise, et al., 1996)。根据 Robertson 报道,已经发展了许多转座子突变库,并发展了 MuID 和 MuArray 等在特定发育时期高效鉴别突变植株的新方法。MuArray 和 MuID 都是基于一种叫做 MuAFLP 的对插入转座子旁侧序列进行扩增的方法,这种筛选方法结合荧光

MuAFLP、表达微阵列和一系列生化生理及分子方法来鉴别突变植株。在获得大量含有位点选择性突变的突变体基础上,对目的基因的突变体进行 PCR 筛选,通过对 PCR 产物进行序列分析,筛选转座子插入目的突变体,从而确定目的基因的生物学功能。

一种技术不可能解决所有问题,事实上难以获得并分析基因组内每一个基因的敲除突变体。这是由于:①某些必需基因(essential genes)在细胞内行使基本的生物学功能,插入突变对个体来说是致死的,因此无法通过获得这样的突变体来分析它们的功能;②有些基因本身很小,有待插入的目标区域也就小,难以获得正好敲除这个基因的突变体;③在植物中,很多基因具有多个拷贝或是功能相似的复等位基因,对同一个基因很难同时获得不同的拷贝,或复等位基因的所有位点均被敲除的突变体,因而无法分析该基因的功能。上述几种情况,均很难从现有的反向遗传学技术来分析基因的功能 (Henikoff, et al., 2003)。最近发展的 TILLING(Targeting Induced Local Lesions in Genomes)为解决该问题提供了新的途径,它是一种随机诱变技术与基于 PCR 技术筛选相结合的反向遗传学方法,以发现和分析目标区域点突变(McCallum, et al., 2000)。原理是:利用一种特异切割错配的内切酶—CEL I 与凝胶电泳建立起来的一种高通量、低成本的突变发现平台。主要步骤是突变处理后,对大量的个体分单株提取 DNA 并建库,8 倍库(8-fold pools)混合 DNA 以增加工作通量,PCR 技术扩增大量的目标分析区域,此 PCR 产物与野生型植株 PCR 产物混合,再经过变性、退火,突变子产物与野生型产物产生错配,用 CEL I 酶切割,产物再在变性聚丙烯酰胺胶上电泳发现突变子,再在 8 倍库中锁定个体单株,并推测可能的突变位点,通过测序技术完成突变位点的分析工作,通过表型与多种序列分析工具(如:CODDLE—Choosing Codons to Optimize Discovery of Deleterious Lesions; PARESNP—Project Aligned Related Sequences and Evaluate SNPs; SIFT—Sorting Intolerant From Tolerant) 分析相应的突变位点以及基因的功能(Colbert, et al., 2001; Steven Henikoff, et al., 2003)。通过 TILLING 技术发现的可能突变类型包括错义突变(missense mutation)、基因截短型损伤(truncation lesion—在基因内诱变出终止子),这两种点突变对基因的功能分析都相当有用。总结起来,TILLING 技术最主要的优势是发现大量的等位基因系列,可以对 essential gene、长度很小的基因和复等位基因等 tagging 技术难以分析的基因进行有目的的分析,以完善基于反向遗传学技术的

功能基因组学。

3 比较基因组学

玉米和水稻在 6 000 万年前开始分化,虽然在 15 000 个位点上发生了重组,二者仍具有非常高的同源性。水稻基因组是玉米的六分之一,都是单子叶禾本科植物,因此水稻基因组学的研究成果有助于玉米基因组学的发展(Sasaki, et al., 2000; Feng, et al., 2002)。以水稻基因为依据,对包括禾本科植物在内的不同种的植物比较作图,有助于种间分子、遗传和杂交育种所必需的信息的转译,建立具有较为广泛联系和适应多种植物的遗传骨架。如:发现了高等植物着丝点的结构与组织方式,鉴定出了调控植物对不利环境反应的基因;发现了水稻的第一个活性转位子和真核生物的第一个活性微倒转重复序列,重新认识了后生基因沉默的机理;发现了植物识别和抵抗病原菌的新途径和新基因。还有,这种整合汇集了植物基因组学的研究资源。例如,收集了 200 万个植物 EST,建立了 72 种植物的 BAC 文库,收集了一大批用于研究玉米和拟南芥基因功能的转座子标签系,完成了玉米、大豆、小麦和其他植物的深度物理图谱,建立了多种植物基因组数据库,开发出了一系列植物基因组研究工具,拟南芥和水稻的全序列已经公布,系统地进行了基因敲除研究并将最终揭示这些基因的功能(Somerville, et al., 1999)。

比较作图的意义在于:①根据不同种的基因组及其排列顺序的高度保守特点绘制成的比较图谱,可以研究和探明它们的进化线索;②解读基因组序列,即通过同源性比较来推测未知基因的功能;③促进基因作图。根据不同物种同源基因的相似性,大基因组物种相应基因的遗传信息可以通过研究基因组较小的物种的相关基因组而得到有益的线索,基因组小的植物物种有利于对直向的同源基因(orthologous gene)进行基于图谱的克隆。1999 年,CIMMYT 和国际水稻研究所(IRRI)发起“玉米—水稻功能基因组计划”,旨在借助水稻基因组学的研究成果促进玉米基因组学的发展,发掘耐旱相关基因,为育种实践提供分子生物学手段。高粱与玉米祖先的分化估计为 1 190 万年前,而水稻与玉米、高粱祖先的分化估计在 5 000 万年前。通过对玉米和高粱同源位点的测序,发现两个物种平均 14%的同源基因是非共线性的(Lai, et al., 2004; Wilson, et al., 1999),利用相同的 262 个 RFLP 标记构建了玉米和水稻的比较图谱,清楚地显示了玉米和水稻染色体的共线性关系,同时比较图谱所用的大部分标记都被整合在玉米高

密度分子标记连锁图上。

4 生物信息学

获得基因组部分或全部序列信息后,迫切需要对测序结果进行破译和解读。这就要求分子生物学、化学、计算机科学、数字和统计学等多学科的密切合作。近年来,相应的多学科卓有成效的合作形成了一门新的学科——生物信息学。其具体内容包括:①开发各种基因组数据库的生物信息学工具;②开发建立基因组信息数据库所需的通用标准和界面,以增强数据库的互用性能;③建立基因组数据库中信息资料贮存的国际协调机制,包括数据库的信息贮存机制和数据库的标准化操作准则等;④开发植物基因组学数据分析的新运算法则,尤其是比较基因组学和群体遗传学的新运算法则。通过开发针对基因组信息分析的计算资源和分析工具,将有助于增加人们对一些植物基本过程的认识,如光合作用、呼吸作用、碳氮代谢、固氮、初级代谢和次级代谢、多倍性与驯化、植物与微生物的关系等。过去的10年中,通用和专用数据库扩展很快,在序列搜索和比较、基因组图谱的构建、DNA和蛋白质分析、多序列比较、进化和系统发生等多方面均有了迅速和深入的发展。随着公共数据库中来自植物的基因序列及EST的增多,特别是拟南芥和水稻全序列测序,使人们可以充分利用这些方面的信息了解和认识植物基因组,发现、分离和研究新基因,并根据植物比较基因组的研究结果,研究同一基因在不同物种中的表达与功能的差异。

1991年,美国农业部农业研究社(USDA-ARS, U.S. Department of Agriculture's Agricultural Research Service)任命Ed Coe为MNL主编,建立玉米基因组数据库(MaizeDB)。1998年,在Walbot的带领下,玉米基因发掘项目(MGDP)与10个研究小组合作,研制基因芯片、EST克隆、转座子插入文库、蛋白质序列以及种子等,并通过ZmDB公开。2003年9月1日,USDA-ARS开始将MaizeDB和ZmDB整合为MaizeGDB,包含前MaizeDB和ZmDB的遗传资料、基因组和DNA序列资料、基因产物和功能鉴定资料、参考文献以及玉米研究单位和科学家名录等几大部分内容,成为全球玉米遗传学家不可缺少的信息资源。

5 基因组学对玉米遗传育种的影响

基因组学是从总体上认识植物基因的结构与功能,使育种家从根本上认识亲本选配、基因互作、基

因与环境互作和选择效应的本质,使人们对育种理论的认识产生飞跃。随着相关技术的发展,农业将越来越受益于基因组的发展。在材料方面,通过基因组学将会发现一批具有目标性状的基因资源,探明基因位点与效应,从而解决育种亲本贫乏和选择效率低的问题;从基因来源上,基因组学不仅提供大量目标基因供转基因育种使用,而且能实现物种之间的跨越。玉米基因组学的发展,将建立起在全基因组水平进行抗病、抗逆、优质玉米基因组学研究的技术体系,从而培育出相应的基础遗传材料,还可以开发出玉米抗病、抗逆和优质基因鉴定玉米DNA芯片,提供玉米种质资源基因鉴定,供玉米分子育种研究利用。生物技术特别是分子标记辅助育种技术,已开发出系列的功能性(functional)与中性的(neutral)DNA标记,可以对材料进行目的性选择,如优质蛋白玉米(QPM)回交转育过程中对*Opaque2*的选择(田清震,等. 2004),实现了育种方法的变革。国内还有专家大胆地提出农作物分子虚拟设计育种的设想,即利用基因组学已取得的成果,丰富作物丰产、抗逆、品质等重要性状在分子水平上的研究,建立相应的数据库。根据育种的需要,有目的的对亲本进行选择,对目标优良基因进行聚合育种。综上所述,玉米基因组学研究以及推动生物技术的发展,将带来玉米育种新的变革。

参考文献:

- [1] Benetzen J L, Chandler V L, Schnable P. National science foundation-sponsored workshop report. Maize Genome Sequencing Project. Plant Physiology, 2001, 127: 1572-1578.
- [2] Bradley J Till, Steven H Reynolds, Steven Henikoff, et al. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. Genome Res. 2003, 13: 524-530.
- [3] Colbert T, Till B J, Tompa R, et al. High-throughput screening for induced point mutations. Plant Physiol., 2001, 126: 480-484.
- [4] Cone K C, McMullen M D, Bi I V. Genetic, physical, and informatics resources for maize. On the road to an integrated map. Plant Physiol., 2002, 130: 1598-1605.
- [5] Doebley J, Stec A, Hubbard L. The evolution of apical dominance in maize. Nature, 1997, 386: 485-488.
- [6] Edward Coe, Karen Cone, Michael McMullen, et al. Access to the maize genome: An integrated physical and genetic map. Plant Physiol., 2002, 128: 9-12.
- [7] Fraser A G, Kamath R S, Zipperlen P, et al. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. Nature, 2000, 408: 325-330.
- [8] Giaever G, Chu A M, Ni L, et al. Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. Nature, 2002, 418: 387-391.
- [9] http://www.generationcp.org/sccv10/sccv10_upload/SP3CL3.pdf.

- [10] Lai J S, Ma J X, Swigon Z, et al. Gene loss and movement in the maize genome. *Genome Res.*, 1924–1831.
- [11] Lawrence C J, Dong Q F, Polacco M L, et al. Maize GDB, the community database for maize genetics and genomics. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32: D393–D397.
- [12] Liu L X, Spoecker J M, Mulligan E L, et al. High-throughput isolation of *caenorhabditis elegans* deletion mutants. *Genome Res.* 1999, 9: 859–867.
- [13] Lunde C F, Morrow D J, Roy L M, Walbot V. Progress in maize gene discovery: a project update. *Funct Integr Genomics*, 2003, 3(1–2): 25–32.
- [14] Martienssen R A, Rabinowicz P D, O'Shaughnessy A, McCombie W R. Sequencing the maize genome. *Curr Opin Plant Biol.*, 2004, 7(2): 102–107.
- [15] McCallum C M, Comai L, Greene E A, Henikoff S. Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.*, 2000, 18: 455–457.
- [16] O'Sullivan D M, Edwards D, Edwards K J. Maize genomics. *Ag-Biotech Net*, 2000, 2: 036.
- [17] Palmer, et al. Maize genome sequencing by methylation filtration. *Science*, 2003, 302: 2115–2117.
- [18] Palmer L E, Rabinowicz P D, O'Shaughnessy A L, et al. Maize genome sequencing by methylation filtration. *Science*, 2003, 302: 2115–2118.
- [19] Peterson D G, Schulze S R, Paterson A H. Intergration of Cot analysis, DNA cloning, and high-throughput sequencing facilitates genome characterization and gene discovery. *Genome Res.*, 2002, 12: 795–807.
- [20] Piano F, Schetter A J, Mangone M, et al. RNAi analysis of genes expressed in the ovary of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.*, 2000, 10: 1619–1622.
- [21] Ross-Macdonald P, Coelho P S, Roemer T, et al. Large-scale analysis of the yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature*, 1999, 402: 413–418.
- [22] Salah Aljanabi. Genomics and plant breeding. *Biotechnology Annual Review*. 2001, 7: 195–238.
- [23] Timmermans M C P, Brutnell T P, Becraft P W. The 46th annual maize genetics conference. Unlocking the secrets of the maize genome. *Plant Physiology*, 2004, 136: 2633–2640.
- [24] Varotto C, Leister D. Maize in the genomics era. *Maydica*, 2002, 47: 203–211.
- [25] Whitelaw C A, Barbazuk W B, Pertea G, et al. Enrichment of gene-coding sequences in maize by genome filtration. *Science*, 2003, 302: 2118–2120.
- [26] Whitelaw C A, Barbazuk W B, Pertea G, et al. Quackenbush. Enrichment of gene-coding sequences in maize by genome filtration. *Science*, 302: 2118–2120.
- [27] Winzeler E A, Shoemaker D D, Astromoff A, et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, 1999, 285: 901–906.
- [28] Yuan Y N, SanMiguel P J, Bennetzen J L. High-Cot sequence analysis of the maize genome. *The Plant J.*, 2003, 34: 249–255.
- [29] 田清震, 李新海, 李明顺, 等. 优质蛋白玉米的分子标记辅助选择[J]. *玉米科学*, 2004, 12 (2): 108–110.