

# 转基因水稻吉生粳 2 号的外源基因旁侧序列分离及事件特异性 PCR 检测方法

金永梅, 马 瑞, 于志晶, 林秀峰\*

(吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033)

**摘 要:** 利用染色体步移方法从转基因水稻吉生粳 2 号基因组中分离了外源基因 T-DNA 整合左边界旁侧序列, 长度为 297 bp。通过对左边界旁侧序列的同源性比对分析定位了外源基因 T-DNA 在吉生粳 2 号基因组中的整合位点, 为水稻基因组第 1 号染色体的第 41 607 441 bp 处 (GenBank sequence ID: NC\_008394.4)。依据整合位点右侧设计的 1 条引物和 T-DNA 右边界设计的 3 条引物分别进行 PCR 扩增分离到了右边界旁侧序列。根据左边界旁侧序列和 T-DNA 整合位点, 建立了吉生粳 2 号事件特异性定性 PCR 检测方法, 该方法为转基因水稻吉生粳 2 号的身份识别提供了有效手段。

**关键词:** 转基因水稻; 旁侧序列; 事件特异性检测

中图分类号: S511.035.3

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)01-0014-06

## Identification of the T-DNA Flanking Sequences and Event-Specific PCR Detection of Transgenic Rice ‘Jishengjing 2’

JIN Yongmei, MA Rui, YU Zhijing, LIN Xiufeng\*

(*Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China*)

**Abstract:** Using genome walking PCR, left flanking sequence of the T-DNA integration site on rice genome was amplified. T-DNA integration site on rice genome was determined by nucleotide blast using left flanking sequence as query. The results showed that T-DNA was inserted into the position 41 607 441 bp of chromosome 1 (GenBank sequence ID: NC\_008394.4). Right flanking sequence of the T-DNA integration site was also amplified by using T-DNA right border specific primers and right primer of insertion site. Based on the left flanking sequence and insertion site, the T-DNA left border specific primer and insertion site specific primers on ‘Jishengjing 2’ genome were designed. Using the primers, the event-specific detection PCR for ‘Jishengjing 2’ was established. It will provide the effective method for identification of ‘Jishengjing 2’.

**Key words:** Transgenic rice; Flanking sequences; Event-specific detection

水稻是我国第一大粮食作物, 约占粮食总产量的 40%<sup>[1]</sup>, 年播种面积在 2800 万 ~ 3000 万 hm<sup>2</sup> 范围内<sup>[2]</sup>。我国既是世界最大的水稻生产国, 又是最大的水稻消费国, 随着人口的增加和耕地的不断减少, 我国农作物的单产需在现有的基础上提

高 50% 以上才能满足粮食的安全供给<sup>[3]</sup>。转基因技术为水稻新品种培育提供了一个崭新的途径, 其可以克服生殖隔离实现物种间遗传物质的转移, 是解决粮食安全的有效途径。目前, 全球转基因水稻研究进展迅速, 已有数百例转基因水稻获准田间试验, 涉及抗虫、抗病、抗除草剂、品质和农艺性状改良等多方面内容。我国转基因水稻研发与世界同步, 其中抗虫转基因水稻处于世界领先水平<sup>[2]</sup>。

目前, 我国为 2 个转基因抗虫水稻颁发了安全证书, 其他含有各种优良性状的转基因水稻也已经进入田间试验和环境释放阶段<sup>[4]</sup>。然而, 由于国内外有关转基因安全性方面的争论、政策的不确定性, 致使我国转基因水稻产业化进程进展缓慢, 仍处于技术和品种储备阶段, 商业化生产

收稿日期: 2015-09-16

基金项目: 吉林省农业科技创新工程项目 (吉教厅 [2012]1072 号); 吉林省留学人员科技创新创业项目 (RL201322); 吉林省科技发展计划项目 (20140204014NY); 农业部转基因生物新品种培育科技重大专项 (2014ZX08001-001-009)

作者简介: 金永梅 (1974-), 女, 副研究员, 博士, 主要从事水稻转基因育种研究。

通讯作者: 林秀峰, 女, 硕士, 研究员, E-mail: linxiufeng8581@163.com

尚有待时日<sup>[2,4]</sup>。对转基因水稻商品化种植可能带来的生物安全问题进行科学研究和评价是对转基因水稻进行监督管理,保障其健康发展的重要技术基础。转基因生物检测技术是生物安全评价的关键技术<sup>[5]</sup>,其核心内容是针对转基因生物中整合在染色体上的DNA片段或者其翻译的蛋白质进行测试,包括分子杂交技术、PCR检测方法、基因芯片技术、ELISA、Western blot等。其中PCR方法是目前最准确应用于转基因植物检测的方法,可用于单重、多重筛选检测或品系鉴定,根据其检测的目标分为:针对外源目的基因和调控元件检测的基因特异性检测方法,针对遗传转化载体特征建立的载体特异性检测方法,针对外源DNA整合特征序列建立的转基因作物品系特异性检测方法等三类<sup>[6]</sup>。由于每个转基因作物品系,外源基因在受体基因组中的整合位点具有随机性、特异性和不可重复性,因此与前两种方法相比,转基因作物品系特异性检测方法具有最高的特异性,最适合转基因产品的定性和定量检测,并且能够鉴别外源DNA整合的纯合或杂合状态。该方法是在外源基因整合位点旁侧序列已知的情况下,根据旁侧序列设计引物,通过PCR来进行鉴定的方法。因此,旁侧序列的分离对于转基因植株的身份验证具有重要意义,并有助于对外源基因的表达机理和外源基因在受体基因组中所能产生的影响进行研究,从而有利于转基因植株的安全性做出充分评估<sup>[7]</sup>。目前已经有部分专利和文献报道了利用品系特异性PCR检测方法鉴定转基因植物的方法。张琰等<sup>[8]</sup>根据转基因水稻品系科丰6号外源整合片段的边界序列设计了品系特异性引物和特异性探针,提供了可以快速检测转基因水稻科丰6号的方法;金莞军等<sup>[9]</sup>基于旁侧序列建立了鉴定纯合型转基因抗虫水稻品系TT51-1的方法。

染色体步移(chromosome walking)是指从生物基因组或基因组文库中的已知序列出发,逐步探知其旁邻的未知序列或与已知序列呈线性关系的目标序列的方法。目前,分离侧翼序列的染色体步移方法主要有两种:一种方法是结合基因组文库为主要手段的染色体步移技术,构建基因组文库进行染色体步移尽管步骤比较繁琐,但是适于长距离步移,可以获得代表某一特定染色体的较长连续区段的重叠基因组克隆群;另一种方法是基于PCR扩增为主要手段的染色体步移技术。此方法步移距离相对较短,但是操作比较简单,

尤其适合于已知一段核苷酸序列的情况下进行的染色体步移<sup>[10]</sup>。

笔者利用农杆菌介导的遗传转化法,已将*Bt*抗虫基因*Cry1C*导入到吉林省主栽水稻品种中获得了抗虫转基因水稻材料吉生梗2号并完成了中间试验。本研究旨在通过染色体步移方法和巢式PCR获得抗虫转基因水稻吉生梗2号的左、右旁侧序列,依据旁侧序列定位T-DNA在基因组中的整合位点,并建立事件特异性PCR检测方法和基因型检测方法,为该转基因水稻的育种及监管提供必需的技术支撑。

## 1 材料与方 法

### 1.1 水稻材料

转基因水稻吉生梗2号含有*Bar*基因和*Cry1C*基因,外源基因为单拷贝整合,由本课题组培育保存;非转基因水稻吉梗88由吉林省农业科学院水稻研究所提供。

### 1.2 DNA的提取

将种子播种在1/2MS培养基中,7 d后取叶片-80℃保存。采用CTAB方法提取0.1 g水稻样品中的基因组DNA<sup>[11]</sup>。DNA样品的纯度和浓度用NanoDrop进行检测。

### 1.3 分离转基因水稻吉生梗2号左边界旁侧序列

本实验采用Clontech公司的BD Genome Walker™试剂盒分离吉生梗2号中外源载体整合位点处的旁侧序列,步骤详见试剂盒使用说明书(BD Genome Walker™ Universal Kit User Manual, Cat. No.638904)。用平末端限制性内切酶*DraI*、*PvuII*、*EcoRV*和*StuI*分别酶切转基因水稻吉生梗2号的基因组DNA并连接接头,构建带有接头的基因组DNA步移文库,用于第一轮PCR反应的模板。

表1 巢式PCR引物序列

引物名称	引物序列
GM-AP1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
GM-AP2	5'-ACTATAGGGCAGCGCTGGT-3'
RT058-R1	5'-TAATGTGTGAGTAGTTCACAGATAAG-3'
RT058-R2	5'-TCATGTGTTGAGCATATAAGAAA-3'

建立4个平行的PCR反应体系,分别以4个接头连接的DNA“库”取1 μL作模板,采用巢式PCR方法进行扩增:第一轮PCR用接头引物AP1和基因特异性引物GSP1;第二轮PCR用接头引物AP2和基因特异性引物GSP2(表1)。从5个库为模板的PCR产物中,选取长度和亮度合适的特异

性扩增条带,回收克隆后测序。引物合成及测序均由上海生工完成。

### 1.4 外源 T-DNA 在吉生粳 2 号基因组中整合位点的定位

将 PCR 产物进行回收、克隆、测序,并对测序结果进行序列同源分析。利用 NCBI BLAST 检索 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 程序进行序列比对分析,定位外源 T-DNA 在吉生粳 2 号基因组中的整合位点。

### 1.5 右边界旁侧序列的获得

根据已确定的外源 T-DNA 在吉生粳 2 号基因组中的整合位点,在整合位点右侧设计 1 条反向引物,分别与 T-DNA 右边界设计的 3 条正向引物进行 PCR 扩增。引物序列为: HM-C4R1, CGC GCTTAAAGATATACAAACCA; 3'-SP1-F, TACAAC GTCGTGACTGGGAAAA; 3'-SP2-F, TTAATCGCCT TGCAGCACATCC; 3'-SP3-F, GCTAGAGCAGCTTG AGCTTGGA。PCR 产物经过回收、纯化、测序获得右边界旁侧序列。

### 1.6 吉生粳 2 号事件特异性 PCR 检测

特异性 PCR 检测反应在 25  $\mu$ L 体系中进行:康为世纪 2 $\times$ Es Taq MasterMix(含有 Es Taq DNA Polymerase, PCR buffer, 3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 400  $\mu$ mol/L dNTP mix), 1  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 正向引物, 1  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 反向引物, 1  $\mu$ L T-DNA 特异性引物, 200 ng 基因组 DNA。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C PCR 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 35 循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 引物序列如下: 正向引物为 HM-C4F1: ACGAGA CATGGCAAAGTTTGATT, 反向引物为 HM-C4R1: CGCGCTTAAAGATATACAAACCA, T-DNA 特异性引物为 RT058-R1: TAATGTGTGAGTAGTTCCCA GATAAG。扩增产物利用 1% 琼脂糖凝胶检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离转基因水稻吉生粳 2 号左边界旁侧序列

利用染色体步移 PCR 方法分离转基因水稻吉生粳 2 号左边界旁侧序列。用 4 种限制性内切酶分别酶切转基因水稻吉生粳 2 号的基因组 DNA, 并连接接头构建基因组 DNA 步移文库。用上述文库 DNA 为模板, 利用 T-DNA 的左边界的巢式引物, 经过两轮的巢式 PCR, 获得了扩增产物(图 1)。

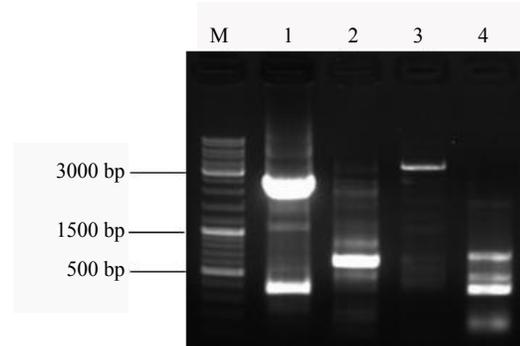


图 1 染色体步移方法获得左边界旁侧序列的 PCR 扩增结果

注: M. DNA Marker; 1. *DraI* 酶切之后的 PCR 产物; 2. *PvuII* 酶切之后的 PCR 产物; 3. *EcoRV* 酶切之后的 PCR 产物; 4. *StuI* 酶切之后的 PCR 产物

将 PCR 扩增产物的特异性条带进行回收、克隆、测序。对测序结果进行序列同源性分析表明, 用 *StuI* 酶切后的 PCR 扩增产物的部分序列与水稻基因组序列有 100% 的同源性。序列测定片段总长度为 297 bp, 其中 1 ~ 156 bp 为载体序列, 157 ~ 271 bp 与水稻基因组 1 号染色体序列中的 (Genebank sequence ID: NC\_008394.4) 41 607 441 ~ 41 607 382 bp 区段序列完全一致。初步确认 T-DNA 在吉生粳 2 号基因组中的整合位点为水稻基因组 1 号染色体第 41 607 441 bp 处(图 2)。



图 2 左边界旁侧序列

注: 黑体部分为载体 T-DNA 序列; 斜体部分为水稻基因组序列

### 2.2 右边界旁侧序列的获得

根据已确定的吉生粳 2 号基因组中 T-DNA 的整合位点, 在整合位点右侧基因组中设计反向引

物(HM-C4R1)与 3 条在 T-DNA 的右边界特异性引物(3'-SP1-F, 3'-SP2-F, 3'-SP3-F)分别进行组合, 以转基因水稻吉生粳 2 号基因组 DNA 为模板

进行PCR扩增。PCR扩增结果均获得了与预期大小相近的单条带,说明根据左边界旁侧所预测的T-DNA整合位点正确(图3)。对引物组合HM-

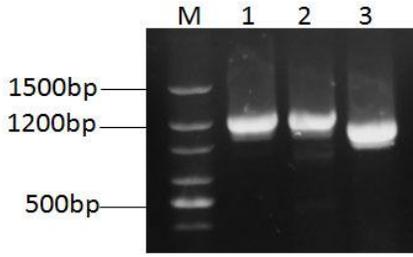


图3 右边界旁侧序列的扩增

注:M. DNA Marker; 1. HM-C4R1与3'-SP1-F的PCR扩增产物  
2. HM-C4R1与3'-SP2-F的PCR扩增产物; 3. HM-C4R1与3'-SP3-F的PCR扩增产物

C4R1和3'-SP1-F扩增出的PCR片段进行了回收、纯化、测序。序列同源性分析表明,其7~96bp为载体序列,97~894bp为水稻基因组第1号染色体的第41 607 469~41 608 264bp区域(Genebank sequence ID:NC\_008394.4)。根据右边界旁侧序列判断的T-DNA整合位点为水稻基因组第1号染色体的第41 607 469bp处(图4),这与根据左边界旁侧序列定位的整合位点41 607 441bp仅仅相距28bp。这些结果说明根据左、右边界旁侧序列定位的T-DNA在水稻基因组中的整合区域完全一致,但T-DNA在整合过程中发生了28bp长度水稻基因组核苷酸序列的缺失。

Oryza sativa Japonica Group DNA, chromosome 1, complete sequence, cultivar: Nipponbare  
Sequence ID: [ref|NC\\_008394.4|](#) Length: 45064769 Number of Matches: 10

Query	97	TGTTACTGCTAGCTACTTAAAGTTtactacatccgtcctagaaatataacaacttttagct	156
Sbjct	41607489	TGTTACTGCTAGCTACTTAAAGTTTACTACATCCGTCCTAGAAATATAACAACCTTTAGCT	41607528
Query	157	ataaatctgaacacacagttggtcagattcatagctaaaataattacattttgggacgzg	216
Sbjct	41607529	ATAAATCTGAACACACAGTTGTT CAGATTCA TAGC TAAAATA TTTACATT TTGGGACGG	41607588
Query	217	atggagtaCTTAAGGGCAGTAGCCAGTAGATAGAGGATCAGGTTCATTTCAGAGTGTAT	276
Sbjct	41607589	ATGGAGTACTTAAGGGCAGTAGCCAGTAGATAGAGGATCAGGTTCATTTCAGAGTGTAT	41607648
Query	277	GAATCGCTGTG-GTTC TTAT AGA AAAC AAAACTGATTATGTC AAAT TCTAGTGA GAATA	336
Sbjct	41607649	GAATCGCTGTG-GTTC TTAT AGA AAAC AAAACTGATTATGTC AAAT TCTAGTGA GAATA	41607708
Query	337	CTGTGAATTTCA TGGT TCCATCT AGAGAAIT AGCCCTGATTAT AATGTGAGACTTTGCAT	396
Sbjct	41607709	CTGTGAATTTCA TGGT TCCATCT AGAGAAIT AGCCCTGATTAT AATGTGAGACTTTGCAT	41607768
Query	397	TGAC TAAT AAAA TADC TGCT TGT TATAACGGATTTCTAATTAT ATGTCTTAAGTTGITAG	456
Sbjct	41607769	TGAC TAAT AAAA TADC TGCT TGT TATAACGGATTTCTAATTAT ATGTCTTAAGTTGITAG	41607828

图4 右边界旁侧序列的同源性比对分析

注:Query. PCR扩增产物测序结果片段;Sbjct. 水稻基因组1号染色体DNA序列

### 2.3 吉生梗2号事件特异性PCR检测

根据已确定的吉生梗2号基因组中T-DNA的整合位点,在整合位点两侧的基因组中设计正向引物和反向引物HM-C4F1和HM-C4R1,在T-DNA的左边界设计特异性引物RT058-R1(图5)。其中HM-C4F1与HM-C4R1引物退火位点序列长度为1026bp,RT058-R1与HM-C4F1之间距离为446bp。

以非转基因对照、纯合型转基因水稻品系、杂合型转基因水稻品系基因组DNA为模板,用HM-C4F1、HM-C4R1、RT058-R1,3条引物同时进行PCR。为了防止引物HM-C4F1和HM-C4R1在转基因水稻中的扩增,在PCR扩增程序中延伸时间限定为40s。PCR结果发现,在纯合型转基因水稻中只能扩增出一条446bp的片段;杂合型转基因水稻中扩增出两条片段,一条片段长度为1026bp(非

转基因特异性片段),另一条片段长度为446 bp(转基因特异性片段);而非转基因水稻中只扩增出一条1026 bp片段(图6)。对446 bp转基因特异性片段进行测序,发现该序列与已获得的左边

界旁侧完全同源。PCR扩增及其条带测序结果表明,引物HM-C4F1、HM-C4R1、RT058-R1能够特异地识别吉生粳2号转化事件,并能鉴定吉生粳2号的基因型即纯合或杂合状态。

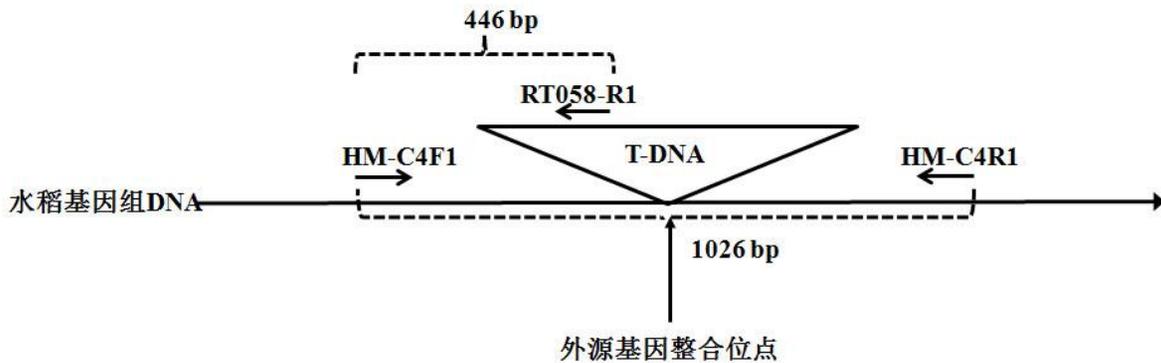


图5 事件特异性PCR引物位置图

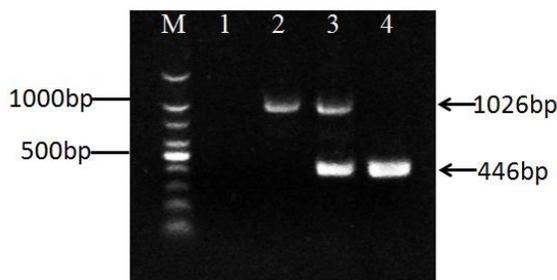


图6 转基因水稻吉生粳2号的基因型鉴定PCR

注: M. DNA Marker; 1. 空白对照; 2. 非转基因水稻; 3. 杂合型转基因水稻; 4. 纯合型转基因水稻

### 3 讨论

发展准确、快速、高效的转基因检测技术成为转基因作物研究和安全管理的必然要求。对转基因植物进行品系特异性检测是对转基因植物进行监督管理,保障其健康发展的重要技术基础。转基因植物中T-DNA旁侧序列的分离是进行品系特异性检测的关键,它对于阐述T-DNA整合方式、染色体定位、外源及内源基因表达活性等方面都具有非常重要的意义。本研究通过染色体步移方法分离到转基因水稻吉生粳2号基因组中与T-DNA左边界序列相连的旁侧序列(图1、图2)。通过对旁侧序列的同源性比对分析,初步定位了外源基因在转基因水稻吉生粳2号基因组中的整合位点,并利用T-DNA右边界引物与整合位点右侧的引物进行PCR扩增、测序、同源性比对分析进一步分离出右边界旁侧序列(图3、图4)。通过对左、右边界旁侧序列同源性分析最终定位了T-

DNA在吉生粳2号基因组中的整合区域,并确认此区域为非编码区。进一步分析发现T-DNA整合到吉生粳2号基因组的过程中,水稻基因组序列缺失了28 bp。外源T-DNA的整合区域与外源基因的稳定表达及基因沉默的发生具有非常密切的关系。吉生粳2号转基因水稻的外源基因T-DNA没有插入到基因编码区,避免了外源基因的插入对水稻内源基因表达造成的影响<sup>[12]</sup>,通过对转基因水稻吉生粳2号多个世代农艺性状数据的考察和分析发现,除了抗虫性之外其他农艺性状与对照品种没有显著差异。外源片段整合入靶标位点的过程中,经常伴随基因组序列的缺失、重组等现象,因此通过旁侧序列的分离及整合位点的定位确认外源基因的整合情况非常重要。

事件特异性检测是基于转基因T-DNA整合位点旁侧序列特征建立的PCR检测技术。由于转化过程中含有外源基因的T-DNA序列随机整合到受体基因组中,因此每一个独立、稳定的转化事件都是特异性的。转化事件特异性检测方法已经被应用于多种转基因作物的检测中,该方法根据旁侧序列设计引物,PCR扩增部分包括部分T-DNA序列和部分基因组序列的融合序列<sup>[13]</sup>。本研究中,非转基因对照吉粳88中未发生外源基因的整合,所以其PCR产物只有由基因组引物扩增出的长度为1026 bp的水稻基因组条带;而转基因水稻吉生粳2号纯合系的两条同源染色体上均有外源基因的整合,在特定的PCR扩增条件下只能扩增出长度为446 bp的部分T-DNA和基因组序列的融合序列(图5、图6)。因此,根据对照品

种和转基因水稻PCR扩增条带大小,可以快速准确判断特定的转化事件。

利用常规PCR方法筛选转基因纯合体,需要根据目的基因从T<sub>1</sub>代到T<sub>3</sub>代的PCR分离比才可以判断是否为纯合体,因此这种方法耗时又耗力;采用实时荧光定量PCR鉴定纯合株系,特异性好、灵敏度高,但操作复杂、遇到多拷贝情况还会影响到检测结果的准确性。本研究中,根据外源基因T-DNA在吉生梗2号基因组中的整合位点,在整合位点两侧和T-DNA左边界共设计3条引物,建立了通过一次PCR反应便能够鉴定出转基因纯合株系的3引物PCR法(图5、图6)。该方法可借助一个分离世代即可鉴定出纯合体,提高了转基因材料的鉴定效率、缩短了获得转基因纯合体的时间,对加快育种进程具有很高的使用价值。

### 参考文献:

- [1] 程式华,胡培松.中国水稻科技发展战略[J].中国水稻科学,2008,22(3):223-226.
- [2] 朱 祯.转基因水稻研发进展[J].中国农业科技导报,2010,12(2):9-16.
- [3] 程式华.水稻遗传育种回顾与展望[A].科技创新成就辉煌—

中国农业科学院建院50周年学术文集[C].2007:84-91.

- [4] 李黎红,叶卫军,郭龙彪.我国转基因水稻研究进展和商业化前景分析[J].中国稻米,2012,18(6):1-4.
- [5] 郭 斌,祁 洋,尉亚辉.转基因植物检测技术的研究进展[J].中国生物工程杂志,2010,30(2):120-126.
- [6] 张大兵,郭金超.转基因生物及其产品检测技术和标准化[J].生命科学,2011,23(2):195-204.
- [7] 刘 蓓.外源基因插入位点旁侧序列的研究方法及进展[J].农业与技术,2012(4):97.
- [8] 张 琰,黄 新,朱水芳.检测待测水稻是否为科丰6号转基因水稻的方法及其专用试剂盒:中国,101724699A[P].2010-06-09. www.soopat.com.
- [9] 金芑军,宛煜嵩,贺辉群,等.一种鉴定纯合型转基因抗虫水稻品系TT51-1的方法:中国,103131758A[P].2013-06-05. www.soopat.com.
- [10] 梁成真,张 锐,郭三堆.染色体步移技术研究进展[J].生物技术通报,2009(10):75-82.
- [11] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002:742-744.
- [12] 杨瑞芳,白建江,朴钟泽,等.转cryIacI基因抗虫水稻的培育[J].分子植物育种,2014,12(6):1103-1111.
- [13] 申爱娟,陈 松,周晓婴,等.转基因油菜W-4 T-DNA旁侧序列分析与事件特异性检测[J].江苏农业学报,2014,30(1):14-20.

(责任编辑:范杰英)

(上接第3页)

续表3

品种	组合	掖478改良系	血缘	审定情况
吉东7	D33×D22	D22	掖478×7922	2008 吉审
禾玉18号	H28×四68	H28	K14×掖478	2008 吉审
平全9	Bs5078×Bs1133	Bs5078	掖478×150	2008 吉审
鸿基107	H9987-3×J24	H9987-3	掖478×丹9046/丹9046	2008 吉审
吉农大678	B146×JND58	JND58	掖478×9046	2009 吉审
亨达22	K3×HD601	HD601	C8605-2×掖478	2009 吉审
长大19	P288×P291	P291	掖478×丹340/丹340	2010 吉审
杰尼336	E030×J033	E030	PH6WC×掖478	2011 吉审
瑞秋113	L5233×L6060	L6060	4112×掖478	2012 吉审
长丰59	Wm08×C801	C801	9046与掖478	2012 吉审

### 参考文献:

- [1] 孙发明,李凤任,陶占山.国外玉米种质资源在吉林的利用与贡献[J].玉米科学,1998,6(3):35-38.
- [2] 焦仁海,王绍萍,孙发明,等.吉林省玉米种质基础的分析与归纳[J].玉米科学,2006,14(1):21-25.
- [3] 汪黎明,王庆成,孟昭东.中国玉米品种及其系谱[M].上海:上海科学技术出版社,2010:169-192.
- [4] 孙发明,焦仁海,徐艳荣,等.玉米兰卡种质在东北地区的应用与创新[J].湖北农业科学,2012,51(1):12-15.
- [5] 宋 雷,宋 雨,缪玲敏.玉米新品种良玉66号选育及栽培技术[J].农业科技通讯,2010(2):89-90.

- [6] 才 卓,柳迎春,许明学.玉米自交系吉853的选育与应用研究[J].玉米科学,2010,18(3):1-5.
- [7] 宋协良,宋 雷,宋 雨.浅谈密植型玉米品种良玉88的选育思路与技术创新[J].农业科技通讯,2011(6):19-20.
- [8] 郭海鳌.我国玉米育种史上有卓越贡献的会议—东北春玉米协作区区试总结和育种经验交流会[J].杂粮作物,2003,23(1):13-14.
- [9] 徐艳荣,刘兴斌,孙发明,等.论Mo17及其衍生系种质在我国玉米育种中的应用[J].吉林农业科学,2006,31(3):26-28.
- [10] 林 红,潘丽艳,王玉杰,等.Reid类群在吉林省玉米育种和生产中的应用[J].吉林农业科学,2001,26(1):54-57.

(责任编辑:范杰英)