

家蚕 RAPD、AFLP 和 SSR 标记的研究及比较分析

房守敏^{1,2}, 余泉友¹, 李斌¹, 代方银¹, 苗雪霞³, 黄勇平³, 鲁成¹

(¹西南大学蚕学与生物技术学院, 蚕学与系统生物学研究所, 重庆 400715; ²西华师范大学生命科学学院, 南充 637002;

³中国科学院上海生命科学院植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要: 【目的】探讨 RAPD、AFLP 和 SSR 标记系统在家蚕遗传学研究中各自适用领域, 为其在种质资源研究中选择适合的分子标记系统提供参考。【方法】利用 RAPD、AFLP 和 SSR 3 种分子标记方法研究了 15 个家蚕品种的遗传多样性指数, 同时对 3 种标记系统进行了比较分析。【结果】SSR 标记位点的期望异质性 (H_e) 最大 (0.40), AFLP 标记位点的 H_e 最小 (0.25), 但 AFLP 有最高标记指数 (MI, 15.60) 和最高的多态性检测效率 (A_i , 74.75)。【结论】SSR 比 AFLP 和 RAPD 的信息含量高, 使得它最适合用于种质资源的遗传多样性分析; AFLP 的检测效率高即能够在 1 次 PCR 扩增反应中检测到最多的 DNA 带型, 非常适合于种质鉴定与保护和构建连锁遗传图谱。

关键词: 家蚕; SSR; AFLP; RAPD; 遗传分析

Comparison of SSR, AFLP and RAPD Markers for Genetic Analysis of Domestic Silkworm

FANG Shou-min^{1,2}, YU Quan-you¹, LI Bin¹, DAI Fang-yin¹, MIAO Xue-xia³, HUANG Yong-ping³, LU Cheng¹

(¹The Institute of Sericultural and System Biology, School of Sericulture and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715; ²School of Life Sciences, China West Normal University, Nanchong 637002; ³Institute of Plant & Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

Abstract: 【Objective】It can provide a reference for selecting appropriate marker system for germplasm resource research through studies of its respective suitable domain of RAPD, AFLP and SSR marker systems in domestic silkworm (*Bombyx mori*) genetics research. 【Method】RAPD, AFLP and SSR were used to study the genetic diversity index of 15 *B.mori* strains. And the three marker systems were compared. 【Result】The results indicated that SSR presented the highest expected heterozygosity (0.40). While the lowest values of expected heterozygosity were obtained from AFLPs, which nevertheless obtained the highest marker index (MI, 15.60) and value of assay efficiency (A_i , 74.75). 【Conclusion】SSRs had higher information content than RAPD and AFLP, so it is adapted to genetic analysis of germplasm. AFLP had higher assay efficiency, i.e. it can generate more DNA bands in single PCR amplification. It is suitable for identification and protection of germplasm and construction of genetic linkage map.

Key words: *Bombyx mori*; SSR; AFLP; RAPD; Genetic analysis

0 引言

【研究意义】20 世纪 90 年代以来, 基于 PCR 技术的分子标记逐步发展起来, 如随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, 简称 RAPD)^[1]、扩增片段长度多态性 (amplified length polymorphism, 简称 AFLP)^[2]、简单序列重复, 又称微卫星 DNA

(simple sequence repeat, 简称 SSR)^[3]等, 被广泛应用于动植物种质资源研究。不同分子标记技术的原理和检测手段不同, 因而所揭示的 DNA 水平上的遗传变异也各不相同, RAPD 的多态性是指同一引物在不同个体的基因组中有着不同的结合位点或者是在同一结合位点上扩增出大小不同的片段; AFLP 反映的是限制性酶切位点的变异, 也有类似于上述 RAPD 产生

收稿日期: 2006-11-16; 接受日期: 2007-09-18

基金项目: 教育部博士点专项基金 (20040625009); 国家自然科学基金 (30170719) 和西华师范大学科研启动基金 (05B33)

作者简介: 房守敏 (1978-), 女, 安徽萧县人, 讲师, 硕士, 研究方向为家蚕遗传与分子生物学。E-mail: fangshoumin@126.com。通讯作者鲁成 (1957-), 男, 重庆人, 教授, 研究方向为家蚕遗传育种与分子生物学。Tel: 023-68250346; E-mail: lucheng@swu.edu.cn

多态性的原因; 而 SSR 多态性则由于两碱基、三碱基或四碱基等单元重复次数的不同^[4]。因此, 对 RAPD、AFLP 和 SSR 标记系统进行比较研究, 以探讨各自适用的领域, 为选择适合的分子标记系统提供参考具有重要的意义。【前人研究进展】目前, 多种分子标记技术的比较分析在植物中有大量的报道^[5~10], 但在昆虫以及其他动物中的研究较少。在家蚕中, Nagaraju 等^[11]用滞育性和非滞育性的共 13 个家蚕品种对 RFLP, ISSR, SSR 和 RAPD 4 种标记技术的多样性指数 (diversity index, DI), 期望异质性 (He)、有效复合比 (effective multiplex ratio, E) 和标记指数 (marker index, MI) 进行了比较; 分析结果表明 ISSR 和多重 RFLP 较适合于做指纹图谱分析, 而 SSR 在遗传多样性分析、种质进化及基因图谱方面有很大的优越性, 对于 RAPD 有最低的 DI 值, 重复性不高。【本研究切入点】随着分子标记技术的发展, AFLP 被广泛应用于家蚕遗传学研究中, 而在家蚕中 SSR、AFLP 和 RAPD 这 3 种常用的分子标记比较还未见报道。【拟解决的关键问题】本文利用 15 个家蚕品种为材料, 比较分析了 SSR、AFLP 和 RAPD 这 3 种常用的分子标记系统的多种指数。通过对这些指数的比较, 探讨这 3 种标记系统在家蚕遗传学研究中各自适用领域, 为其在种质资源研究选择适合的分子标记系统提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料与基因组 DNA 提取

所选的 15 个家蚕品种来自家蚕的 4 个系统, 每个品种各取 10 个个体, 分别提取基因组 DNA, 然后等量混合成基因池。其名称及主要特征详见表 1。供试材料均由西南大学家蚕基因库提供。

模板 DNA 制备参照文献^[12]的方法。电泳检测, 并用 Bio-Rad Smart SpecTM 3000 分光光度计测定浓度, 保证 DNA 纯度 $A_{260/280}$ 在 1.8 左右。

1.2 RAPD 标记分析

PCR 扩增参照文献^[13]的方法并进行优化, 反应采用 oil-free 管在 Thermolyne Amplitron I 型 DNA 合成仪上进行。随机引物: OPS-18、OPS-19、OPC-18、OPZ-06、OPZ-13、OPW-03、OPB-08、OPB-10、OPB-11、OPB-14、OPB-17、OPB-18、OPC-01、OPC-02、OPC-05 共 15 个。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 2 h ($2.5\text{v}\cdot\text{cm}^{-1}$), 经 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ EB 染色 15 min 左右, 在凝胶成像系统上观察分析。

表 1 家蚕品种及其主要特征

Table 1 Strain and major characteristics of *Bombyx mori*

编号 Serial No.	品种名 Strains	系统 System	化性 Voltinism
1	甘肃种 Gansu strain	中系 Chinese	一化 V ¹
2	三眠白卵 M ³ white egg	中系 Chinese	一化 V ¹
3	黔三眠 Qian M ³	中系 Chinese	一化 V ¹
4	小石丸 Xiaoshiwan	中系 Chinese	一化 V ¹
5	土种 01 Tuzhong01	中系 Chinese	一化 V ¹
6	C108 C108	中系 Chinese	二化 V ²
7	苏 17 Su17	中系 Chinese	二化 V ²
8	白夏 B BaixiaB	中系 Chinese	多化 V ³
9	大造 Dazao	中系 Chinese	多化 V ³
10	柬埔寨 Cambodia	热带 Tropical	多化 V ³
11	欧 18 Europe 18	欧系 European	一化 V ¹
12	苏联 1 号 Sovlet Union No.1	欧系 European	一化 V ¹
13	巴格达 Baghdad	欧系 European	一化 V ¹
14	意 16 Italy16	欧系 European	一化 V ¹
15	7532 7532	日系 Japanese	二化 V ²

1.3 AFLP 标记分析

AFLP 所用引物序列及其分析方法见文献^[14]。

1.4 SSR 标记分析

SSR 标记的选择参照沈利等^[15]的方法。PCR 扩增体系为 15 μl , 包括 $10\times\text{buffer}$ (含 Mg^{2+}) 1.5 μl , dNTPs ($10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.25 μl , Taq 酶 ($5\ \text{u}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) 0.15 μl , 引物 (上、下游均为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 0.6 μl , 模板 10 ng。反应程序是 Touchdown 程序: 95°C 3 min; 94°C 30 s, 63°C 1 min (每个循环降低 0.5°C), 72°C 1 min, 循环 16 次; 接着 94°C 30 s, 56°C 1 min, 72°C 1 min, 循环 24 次; 最后一个循环置 72°C 延伸 10 min, 扩增产物 4°C 保存。PCR 反应在 Biometra T3000 型 DNA 合成仪上完成。将 SSR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 由电泳结果来估计样品聚丙烯酰胺凝胶电泳时的上样量。然后将扩增产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺胶上分离, 银染检测。采用了 20 对引物, 最后筛选出 11 对扩增比较好的引物进行的数据统计和分析。

1.5 数据分析

数据统计时在相同迁移位置有带记为 1, 无带记为 0, 建立数据库。估算了 15 个家蚕品种间的下列数据:

多态性带的数量 (n_p);

非多态性带的数量 (n_{np});

每个引物平均多态性带的数量 (n_p/U , U 为引物

数量)；

位点数 (L)：对于 RAPD, AFLP 理论上位点数的最大数量是多态性带的数量加上非多态性带的数量 ($n_p + n_{np}$)；

每个引物检测到的位点数： $n_u = L/U$ ；

每位点平均等位基因数 (n_{av})。SSR 每位点平均等位基因数为 $n_{av} = n_p/L$ ，对于 RAPD, AFLP 每位点平均等位基因数就认为是 $n_{av} = 2$ ；

多态位点的期望异质性 (Hep)： $Hep = 1 - \sum p_i^2$ ，

其中 P_i 为第 i 个等位基因的频率

多态位点的比例 (β)^[5]： $\beta = n_p / (n_p + n_{np})$ ；

期望异质性 (He)^[5]： $He = \beta \sum H n_p / n_p$ ；

每个位点有效等位基因数量 (n_e)^[16]： $n_e = 1 / \sum p_i^2$ ，

其中 P_i 为第 i 个等位基因的频率；

有效等位基因总的数量 (Ne)^[9]： $Ne = \sum n_e$ ；

多态性检测效率 (Ai)^[9]： $Ai = Ne/U$ ；

有效复合比 (E)^[5]： $E = n_u \beta$ ；

标记指数 (MI)^[5]： $MI = E Hep$ ；

数据分析借助了 POPGENE version 1.31 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>) 完成。

2 结果与分析

2.1 多态性水平的分析

RAPD 标记分析中用 15 个随即引物进行扩增总

共得到 181 条可区分的 DNA 带型，其中 168 条多态性的带 (平均每个随机引物 11.20 条)；5 个 AFLP 引物组合共获得 311 条可区分的 DNA 带型，其中有 260 条多态性带 (平均每个引物组合 52.00 条)；11 对 SSR 引物共得到 102 条可区分的 DNA 带型，其中 102 条多态性带 (平均每对引物 9.27 条)。3 种分子标记比较结果表明，所有标记系统在家蚕品种间都能产生各自有效的多态性带，这也意味着它们信息含量的不同。

2.2 RAPD、AFLP 和 SSR 标记信息含量的比较

RAPD 分析结果平均每个引物获得 12.07 个位点，AFLP 平均 62.20 个位点，SSR 平均一个引物 1 个位点。每个位点平均等位基因数最高的是 SSR (9.27)，RAPD 和 AFLP 为显性标记，每个位点仅有 2 个等位基因形式。每位点有效等位基因数最高的也是 SSR (1.67)，其他依次为 RAPD (1.56)，AFLP (1.44)。从期望异质性 (He) 来看最高的还是 SSR (0.40)，接着是 RAPD (0.33)、AFLP (0.25) 表 2。这几个指数 SSR 都是最高的，说明这 3 种标记系统相比，SSR 标记系统有最高的多态性信息含量，RAPD 次之，最低的是 AFLP。

2.3 标记指数和标记效率的比较

标记指数 (MI) 是衡量一个标记系统效用优劣的技术指标，它是多态性期望异质性 (Hep) 和有效复合比 (E) 的综合反映^[17]。AFLP 有较高的多态性检测

表 2 3 种分子标记系统的结果比较

Table 2 Comparison of RAPD, AFLP and SSR marker systems among 15 *B. mori* strains

参数 Parameters	缩写 Abbr.	分子标记 Marker system		
		RAPD	AFLP	SSR
引物对数 Number of assay units	U	15	5	11
多态性带的数量 Number of polymorphic bands	n_p	168	260	102
非多态性带 Number of monomorphic bands	n_{np}	13	51	0
平均多态性条带的数量 Average number of polymorphic bands/ assay unit	n_p/U	11.20	52.00	9.27
总位点数 Number of loci	L	181	311	11
每个引物的平均位点数 Number of loci/ assay unit	n_u	12.07	62.20	1.00
每位点平均等位基因数 Average number of alleles per locus	n_{av}	2.00	2.00	9.27
多态位点的期望异质性 Expected heterozygosity of the polymorphic loci	Hep	0.36	0.30	0.40
多态位点的比例 Fraction of polymorphic loci	β	0.9282	0.8360	1.00
期望异质性 Expected heterozygosity	He	0.33	0.25	0.40
每位点有效等位基因数 Effective number of alleles per locus	n_e	1.56	1.44	1.67
有效基因的总数量 Total number of effective alleles	Ne	261.80	373.75	18.33
多态性检测效率 Assay efficiency index	Ai	17.45	74.75	1.67
有效复合比 Effective multiplex ratio	E	11.20	52.00	1.00
标记指数 Marker index	MI	4.03	15.60	0.40

效率 (Ai) 和标记指数 (MI), 分别为 74.75 和 15.60, SSR 的最低分别为 1.67 和 0.40, 而 RAPD 的值处在 AFLP 和 SSR 中间。AFLP 有较高的 MI 是因为它有最高的有效复合比 (E), 其他两种的 E 值依次为 RAPD (11.20) SSR (1.00)。以上结果可以看出 AFLP 有较高的多态性检测效率 (Ai) 和标记指数 (MI) 值, 使其明显区别与其它两个标记。这是因为 AFLP 一个反应可以产生多条多态性的带, 而不是每个位点检测到的多态性水平高^[9], 但它的期望异质性 (He) 在被比较的 3 种标记方法中却是最低的。

3 讨论

据推测, SSR 多态性产生的机制是因为 DNA 复制和修复过程中碱基的滑动、错配或减数分裂过程中姊妹染色单体的不均等交换^[5]; 而 AFLP, RAPD 是因为单核苷酸的突变、插入及缺失, 所以 SSR 多态性产生的机率大于 AFLP 和 RAPD, 从而导致了 SSR 的高度多态性和高信息含量^[5,18]。另外, SSR 是共显性遗传, 每个位点有多个等位基因, 因此 SSR 标记的期望异质性比 AFLP 和 RAPD 高。但是, 由于材料的不同, 这种情况也可能存在有例外。例如: 在四倍体马铃薯中, AFLP 的期望异质性比 SSR, RAPD 高^[19]。同时, 与其它两种标记系统相比, SSR 每位点有效等位基因数远远小于每位点平均等位基因数, 表明了 SSR 能检测出一些独特的或者是稀有基因。本研究中这 3 种标记系统信息含量的比较与以前在许多植物^[5,6,9]和动物^[11]中研究的结果是基本一致的。在家蚕品种间 SSR 的信息含量也是最高的。

标记指数 (MI) 表示一个标记系统效用的优劣, 它是有效复合比 (E) 和多态性期望异质性 (Hep) 的综合反映。AFLP 有最高的 MI 值是因为其有较高的 E 值, 但 AFLP 的 E 值较高并不是绝对的, 可以通过改变限制性酶切位点和 3'-末端碱基的个数来调节^[20]。在笔者对家蚕的研究中 AFLP 和 RAPD 的 MI 值比 SSR 的高, 但是也有报道在大豆中 SSR 的 MI 值高于 RAPD^[5]。因此, 不同物种或品种间不同分子标记系统的比较是必要的。与 MI 相似, 在对家蚕研究中 AFLP 的多态性检测效率 (Ai) 比 RAPD、SSR 高; AFLP 的 Ai 值较高, 在玉米中也有报道^[9,21]。Ai 值又与每个位点有效等位基因的数目有关, 因此在家蚕研究中可利用 AFLP 快速构建连锁遗传图。

4 结论

本文比较分析表明, SSR、AFLP 和 RAPD 这 3 种标记系统都可以用于家蚕种质资源研究领域, 但是不同的标记系统有着各自侧重的应用。SSR 标记有较高的多态性信息含量即多态性期望异质性 (Hep), 因此它较适用于分析育种材料的遗传多样性和分子连锁图谱的构建; AFLP 具有较高的多态性检测效率, 能够在一次 PCR 扩增中检测出 DNA 水平上的微小差异, 因而它在构建指纹图谱方面表现出较大的优势, 且适合于种质鉴定与保护^[22]; RAPD 标记由于可靠性问题和不利于实验室间交流, 其应用受到一定的限制, 但是其实验成本较低和操作简单, 还有着一定的应用。

References

- [1] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 7213-7218.
- [2] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [3] Tautz D. Hypervariability of simple sequence as general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(16): 6463-6471.
- [4] Reddy D K, Abraham E G, Nagaraju J. Microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: Abundance, polymorphism and strain characterization. *Genome*, 1999, 42 (6): 1057-1065.
- [5] Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 1996, 2: 225-238.
- [6] Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L, Trujillo I. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107(4): 736-744.
- [7] Xu F X, Sun M. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain amaranths and their wild relatives (*Amaranthus*; Amaranthaceae) using internal transcribed spacer, Amplified Fragment Length Polymorphism, and double-primer fluorescent Intersimple Sequence Repeat markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 21(3): 372-387.
- [8] Talhinhas P, Neves-Martins J, Leitao J. AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus spp.*

- Plant Breeding*, 2003, 122(6): 507-510.
- [9] Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G, Motto M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97: 1248-1255.
- [10] 陈劲枫, 庄飞云, 逯明辉, 钱春桃, 任 刚. 采用 SSR 和 RAPD 标记研究黄瓜属(葫芦科)的系统发育关系. *植物分类学报*, 2003, 41(5): 427-435.
- Chen J F, Zhuang F Y, Lu M H, Qian C T, Ren G. Phylogenetic relationships in Cucumis (Cucurbitaceae) revealed by SSR and RAPD analyses. *Acta Pyhtotaxonomica Sinica*, 2003, 41(5): 427-435. (in Chinese)
- [11] Nagaraju J, Reddy K D, Nagaraja G M, Sethuraman B N. Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity*, 2001, 86(Pt 5): 588-597.
- [12] 夏庆友, 周泽扬, 鲁 成, 向仲怀. 家蚕不同地理品种分子系统学研究. *昆虫学报*, 1998, 41(1): 32-40.
- Xia Q Y, Zhou Z Y, Lu C, Xiang Z H. Molecular phylogenetic study on the racial differentiation of *Bombyx mori* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Acta Entomologica Sinica*, 1998, 41(1): 32-40. (in Chinese)
- [13] 夏庆友, 周泽扬, 鲁 成, 向仲怀. 家蚕 RAPD 的扩增条件, 重复性及遗传模型研究. *蚕业科学*, 1996, 22(1): 20-25.
- Xia Q Y, Zhou Z Y, Lu C, Xiang Z H. A Study on conditions, and repeatability and inheritance pattern of Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) in F₁ of Silkworm (*Bombyx Mori*). *Acta Sericologica Sinica*, 1996, 22(1): 20-25. (in Chinese)
- [14] 鲁 成, 赵爱春, 周泽扬, 万春玲, 向仲怀. 中国野桑蚕和家蚕的 AFLP 分析. *蚕业科学*, 2001, 27(4): 243-252.
- Lu C, Zhao A C, Zhou Z Y, Wan C L, Xiang Z H. AFLP analysis of Chinese mulberry wild silkworm (*Bombyx mandairina*) and domestic silkworm (*Bombyx mori*). *Acta Sericologica Sinica*, 2001, 27(4): 243-252. (in Chinese)
- [15] 沈 利, 李木旺, 李明辉, 苗雪霞, 鲁 成, 黄勇平. 家蚕微卫星标记的筛选及其在遗传多样性分析中的应用. *蚕业科学*, 2004, 30(3): 230-236.
- Shen L, Li M W, Li M H, Miao X X, Lu C, Huang Y P. Development and diversity analysis of microsatellite markers in silkworm, *Bombyx mori* L. *Acta Sericologica Sinica*, 2004, 30(3): 230-236. (in Chinese)
- [16] Morgante M, Rafalski A, Biddle P, Tingey S, Olivieri A M. Genetic mapping and variability of seven soybean Simple Sequence Repeat loci. *Genome*, 1994, 37(5): 763-769.
- [17] 缪 颖. AFLP 分子标记及其应用. *亚热带植物通讯*, 1999, 28(2): 55-60.
- Miao Y. AFLP marker and its application. *Subtropical Plant Research Communications*, 1999, 28(2): 55-60. (in Chinese)
- [18] Mibourne D, Meyer R, Bradshaw J E, Baird E., Bonar N., Provan J., Powell W., Waugh R. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 127-136.
- [19] McGregor C E, Lambert C A, Greyling M M, Louw J H, Warnich L A. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 2000, 113: 135-144.
- [20] Zabeau M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application* 92402629.7. 1992.
- [21] 袁力行, 张世煌, 傅骏骅, 李新海, 彭泽斌, 田志国, 李明顺. 玉米遗传多样性与杂种优势群研究. *中国农业科学*, 2000, 33(增刊): 9-14.
- Yuan L X, Zhang S H, Fu J H, Li X H, Peng Z B, Tian Z G, Li M S. Study on genetic diversity and heterotic groups in maize (*Zea mays* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 3 (Suppl.): 9-14. (in Chinese)
- [22] 袁力行, 傅骏骅, Warburton M, 李新海, 张世煌, Khairallah M, 刘新芝, 彭泽斌, 李连城. 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. *遗传学报*, 2000, 27(8): 725-733.
- Yuan L X, Fu J H, Warburton M, Li X H, Zhang S H, Khairallah M, Liu X Z, Peng Z B, Li L C. Comparison of genetic diversity among maize inbred lines based on RFLPs, SSRs, AFLPs and RAPDs. *Acta Genetic Sinica*, 2000, 27(8): 725-733. (in Chinese)

(责任编辑 王红艳)