

文章编号: 1005-0906(2014)01-0067-06

转录组测序技术在玉米中的应用研究进展

许波¹, 张伟强^{1,2}, 冯晓曦¹, 王成业¹, 张海申¹,
许海涛¹, 王友华¹, 张今瀚¹

(1.河南驻马店市农业科学院, 河南 驻马店 463000; 2.中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘要: 随着功能基因组时代的到来, 转录组测序技术快速发展且应用相对广泛。玉米基因组测序的完成, 有力地推动着玉米转录组结构的注释和功能的深入解析。简述玉米基因组研究概况以及 GS FLX、Solexa GA IIx、SOLiD 等测序技术的发展, 回顾转录组测序技术在玉米新基因挖掘、分子标记开发、代谢网络、分子进化、miRNAs 等相关研究领域上的应用, 为玉米复杂农艺性状的分子机制、不同发育阶段基因表达调控网络乃至分子设计育种等工作的深入研究提供参考。

关键词: 玉米; 转录组测序; 基因挖掘; 标记开发; 代谢网络; 分子进化; miRNA

中图分类号: S513.035

文献标识码: A

Application Progress of Transcriptome Sequencing Technology in Maize

XU Bo¹, ZHANG Wei-qiang^{1,2}, FENG Xiao-xi¹, WANG Cheng-ye¹, ZHANG Hai-shen¹,
XU Hai-tao¹, WANG You-hua¹, ZHANG Jin-han¹

(1. *Zhumadian Academy of Agricultural Sciences, Zhumadian 463000;*

2. *China Agricultural University, College of Agronomy and Biotechnology, Beijing 100193, China*)

Abstract: With the development of functional genomics, the transcriptome sequencing has a rapid development and a wide application. Maize genome sequencing is completed, which has strongly promoted to the maize transcriptome structure annotation and functional probing analysis. The maize genome research and the developing of sequencing technology such as GS FLX, Solexa GA IIx, SOLiD were summarized, and the application of transcriptome sequencing technology in maize about new genes mining, development of molecular markers, metabolic networks, molecular evolution, miRNAs and other related research fields were reviewed, trying to provide a beneficial reference in maize of further research into the molecular mechanism of complex agronomic traits, gene expression regulatory network in different developmental stages and even the molecular design breeding.

Key words: Maize; Transcriptome sequencing; Gene mining; Markers development; Metabolic network; Molecular evolution; miRNA

收稿日期: 2012-07-29

基金项目: 河南省现代玉米产业技术体系项目(Z-2010-2-4)、河南省重点科技攻关项目“高产稳产抗病玉米新品种选育研究”(092102110085)

作者简介: 许波(1972-), 男, 河南上蔡人, 副研究员, 从事玉米遗传育种及高产栽培技术研究。Tel: 0396-3258588

E-mail: xubo_zmd@126.com

张伟强同为本文第一作者。

玉米遗传育种的主要任务是寻找控制目标性状的基因, 研究这些基因在目标环境群体下的表达形式, 聚合存在于不同材料中的有利基因和基因组合, 从而为大田生产培育适宜的品种^[1]。分子设计育种通过多种技术的集成与整合, 对育种程序中的诸多因素进行模拟、筛选和优化, 提出最佳的符合育种目标的基因型以及实现目标基因型的亲本选配和后代选择策略, 以提高作物育种中的预见性和育种效率, 实现从传统的“经验育种”到定向、高效的“精确育

种”的转化^[2,3]。

遗传学、分子生物学研究表明,生命遗传信息在一系列精密调控下通过信使 RNA(mRNA)自 DNA 传递到蛋白质^[4],转录水平的调控是生物体基因表达调控的最主要方式之一。玉米其不同生长发育阶段或功能状态下特定组织或细胞转录而来的所有 RNA 的总和称为转录组(Transcriptome),包括 mRNA 和非编码 RNA(non-coding RNA, ncRNA)。在玉米优良品种、自交系选育以及各种生物与非生物胁迫应答过程中,其 RNA 转录水平涉及的激素信号转导、基因表达模式都会发生显著变化,一般通过染色质重塑、细胞周期调控、基因印记、剪接、翻译、mRNA 降解等机制发挥其生物学功能^[5-7]。因此,解析玉米转录组序列的结构及功能,有助于探索重要农艺性状相关基因的结构及功能,揭示玉米植株形态建成、产量形成、生物与非生物逆境胁迫以及其内源激素信号转导等分子机制,对与玉米种质创新及新品种选育等相关应用研究具有重要的促进作用。本研究通过回顾玉米基因组研究概况,概述转录组测序技术相关原理与方法,阐述转录组测序技术在玉米遗传育种工作中的应用前景,为相关工作的开展提供参考。

1 玉米基因组学研究概况

玉米为二倍体植物,起源于墨西哥与危地马拉,由大刍草进化而来,其基因组约 2 300~2 500 Mb,与人类相当,为拟南芥的 20 倍,估计有 39 000 多个基因^[8-10]。与近年来完成基因组测序的植物(如拟南芥、水稻、高粱)相比,玉米基因组结构最大的特点在于包含大量的转座子,这些转座子非均匀分散于整个基因组中的几百个转座子家族,其转座元件负责大量基因片段的捕获与扩增,影响着着丝点的大小、组成和位置,在基因组内形成高度重复,占基因组 60%~85%,这类基因组范围内的重复事件是其基因组较大的重要原因,而与基因总量或基因顺序无关^[8-12]。随着分子生物学、生物信息学的迅猛发展以及自交系 B73 参考序列的发布,玉米基因组研究从以全基因组测序为目标的结构基因组学逐步向以基因组分类、注释、富集分析和功能预测为目标的功能基因组学发展^[13]。前人研究表明,转录水平的调控是生物体基因表达调控的主要方式之一^[14],作为功能基因组学重要部分和出发点,玉米转录组水平的深入研究不仅有助于深化人们对杂种优势等遗传机制的认识,而且对于解析玉米重要农艺性状生长发育分子机制具有重要意义^[15]。

2 转录组测序基本原理及平台

随着基因组时代的到来,转录组测序成为率先发展且应用相对广泛的技术^[16]。最早广泛应用测序技术为 70 年代的 Sanger 法,这也是完成人类基因组计划的基础,因其测序通量低、费时费力,科学家们一直在寻求通量更高、速度更快、价格更便宜、自动化程度更高的测序技术。自 2005 年以来,以 Roche 公司的 454 技术、Illumina 公司的 Solexa 技术以及 ABI 公司的 SOLiD 技术为标志的高通量测序技术相继诞生^[17]。相较于传统方法,该技术主要特点是测序通量高、测序时间和成本显著下降,可以一次对几十万到几百万条 DNA 分子序列测定,这使某物种全基因组和转录组的全貌细致分析成为可能,又称为深度测序,很多文献中称其为新一代测序技术,足见其划时代意义^[18]。利用深度测序技术进行对某物种转录组分析的技术即 RNA 测序(RNA-Seq),该项技术能够在单核苷酸水平对任意生物种的整体转录进程检测,不仅可以分析转录本的结构和表达水平,还能够发现未知转录本和稀有转录本,准确地识别可变剪切位点以及 cSNP(编码序列单核苷酸多态性),使得到的转录组信息更为全面,便于进一步注释分类^[19]。与基因芯片相比, RNA-Seq 无需预先设计探针即可对特定条件下任意物种生长发育阶段整体转录活动进行检测,提供更精确的数字化信号、更高的检测通量以及更广泛的检测范围,因而其成为目前深入研究转录组复杂变化活动的强大且颇具优越性的技术手段。一般来说,上述所有的高通量测序技术都能进行转录组测序,但不同平台和机型的测序方法及效果差异决定了各种高通量测序仪具有不同的应用侧重(表 1),这就要求在熟悉各种高通量测序仪内在技术特点的基础上进行选择应用;另一方面,也可尝试结合其他生物技术以获得更好的数据覆盖度和更为廉价的成本^[20]。

2.1 Roche/454、GS FLX 技术平台

454 公司创始人 Jonathan Rothberg 于 2005 年首次推出基于焦磷酸测序法的高通量基因组测序系统—Genome Sequencer 20 System(GS 20)。此后不久,454 与罗氏公司合并,推出性能更强的第二代测序系统—Genome Sequencer FLX System。2008 年, Roche 公司又将 GS FLX 升级成为 GS FLX Titanium。GS FLX 采用边合成边测序(Sequencing By Synthesis)的方法,在核苷酸聚合过程中释放焦磷酸,在 ATP 硫酸化酶和荧光素酶的作用下,焦磷酸经过一系列化学反应

产生光信号。将每个碱基的聚合与荧光信号的释放实时确定 DNA 序列^[21]。偶联起来,通过测定感应荧光信号的释放可以实现

表 1 主要转录组测序平台
Table 1 The main transcriptome sequencing platforms

机型、平台 Model/ platform	原理 Principle	读长 (bp) Read length	通量 (Gb/run) Flux	准确率 (%) Accuracy	错误类型 Error type	耗时(d) Time- consuming	优点 Advantage	缺点 Shortcoming
Roche/454 GS FLX	边合成边测序 (焦磷酸测序)	400	0.5	≥99	插入,缺失	0.35	读长更长; 运行快	试剂等花费高; 重复序列出错率高
Illumina/Solexa GA IIx	边合成边测序 (可逆终止子)	100	54~60	≥98	替换	4	性价比高; 应用广泛	读长短; 样品多样性差
ABI/SOLiD SOLiD3	边连接边测序 (双碱基编码)	50	100	≥99.94	替换	7	准确率高	读长短; 运行费时

注:由于测序技术迅速发展,费用和运行时间可能会降低和缩短,而序列的长度、数据量和准确率将增加。

Note: With the rapid development of sequencing technology, the costs and the running time could be lower and shorter, and the length, and the accuracy of the data sequence will be increased.

2.2 Illumina/Solexa GA IIx 技术平台

2007年,Solexa公司与Illumina公司推出新一代高通量测序仪 Genome Analyzer。采用边合成边测序的方法,单循环过程里将荧光标记的核苷和聚合酶加入到单分子阵列;互补的核苷和核苷酸片段的第一个碱基配对,在反应中同时加入4种核苷标签,针对每种碱基特定波长的激光激发而结合的核苷,其相应标记释放出荧光。荧光信号得到 CCD 采集,而后通过整个阵列的快速扫描,使特定的结合到每个片段上的碱基被检测到。通过上述过程,检测可重复几十个循环,这样就有可能决选出核苷酸片段包含的几十个碱基。GA作为新一代测序技术平台,具有高准确性、高通量、高灵敏度和低运行成本等突出优势,是目前使用最广泛的新一代测序平台。

2.3 ABIS OLiD 技术平台

20世纪80年代,世界上第一台DNA测序仪ABI 370被ABI公司推出,这奠定了该公司在核酸分析领域的地位,但随着Roche GS FLX和Solexa等技术的应用,该公司在核酸测序领域的领先地位产生动摇。2007年底,ABI公司推出SOLiD(Supported Oligo Ligation Detetion)新一代测序平台。该项技术以四色荧光标记寡核苷酸的连续连接合成为基础,替代传统的聚合酶链式反应,实现对单拷贝DNA片段进行大规模扩增以及高通量并行测序,以DNA连接酶驱动反应进行边合成边测序。该技术的特别之处在于应用双碱基编码,即每个碱基被阅读2次,因此很大程度上降低了错误率,同时还可以方便的区分SNP和测序错误。

3 转录组测序技术在玉米研究中的应用

3.1 新基因挖掘及其功能预测

大规模转录组测序的核心目标是获取、鉴定某生物体或其组织表达的全部基因序列,而基于这些组织转录组测序资料,进一步比对数据库中的已知序列,科研工作者可以挖掘新基因并预测其功能^[22,23]。就玉米来说,首先,要从玉米相关组织器官中提取RNA,这些组织可能来自于玉米生长发育的不同阶段或经过特殊处理的株系(经过光、温度、水分或营养胁迫处理、基因过量表达或敲除等);其次,对这些组织样品单细胞所有RNA即整个转录组进行测序获得结果;最后,对照参考基因组(Reference genome),依靠后期强大的生物信息学分析能力,挖掘新基因并进行功能预测。有学者利用454测序系统在对玉米植株的转录组研究中发现了新基因的存在^[24]。Poroyko等^[25]对玉米幼苗根尖处转录本的种类和表达丰度进行探究,发现玉米幼苗根尖的转录组至少有22000个基因表达;将玉米根部转录组与拟南芥分析比较,发现二者根组织中的基因表达存在明显不同,只有不到5%的高丰度转录本同时出现在玉米和拟南芥中,证实根尖的转录本含有突出的功能。Lai等^[26]基于高通量测序技术对6个玉米骨干自交系(郑58、5003、478、178、昌7-2和Mo17)进行全基因组重测序,鉴定出数百个基因获得与丢失变异(Presence/absence variations, PAVs),其中296个B73的基因在6个品系中的至少1个品系中发生丢失,

而6个玉米品系中也有数百个基因在B73中不存在。推测这些骨干亲本组合基因组的组合可以弥补另一方功能元件的缺失,这种PAVs的多态变化和其他无义突变的互补作用可能与杂种优势有关。

3.2 SNP的筛选与分子标记的开发

分子标记是以个体间遗传物质(核苷酸序列)变异为基础的遗传标记,是DNA水平遗传多态性的直接反映。常用的分子标记包括简单重复序列(SSR)和单核苷酸多态性(SNP)等,SNP被称为第三代分子标记,在基因的精细定位、基因组比较等相关研究中广泛应用。SNP主要是指在基因组水平上由单碱基变异而引发DNA序列多态性,其作为分子标记可以精细区分不同生物体遗传物质差异^[27]。Barbazuk等^[28]在对不同玉米自交系B73和Mo17茎尖顶端分生组织转录组的研究中检测到大量的SNP存在,有超过85%的SNP得到了Sanger测序法验证,保守估计其中有4900个正确的SNP分布在2400个基因上。这些工作表明基于454测序系统的转录组测序是挖掘筛选SNP的有效途径,并且其获得SNP的数量与生物信息学工具检测条件是否严格直接相关实际应用中需要谨慎酌定。Lai等分析6个玉米骨干自交系全基因组序列,共发现1273124个单核苷酸多态性位点(SNPs),得到30178个1~6bp的插入缺失位点(InDels),这些SNPs和InDels提供了1个高密度的全基因组标记信息。Li等^[29]利用RNA-seq方法进行了子粒发育期的转录组大规模测序,挖掘了103万SNP,获得了28769个基因的表达量数据,为认识高油玉米的遗传结构变异提供了理论基础,对进一步改良玉米油分的含量和质量有重要指导意义。

3.3 代谢网络研究领域的应用

玉米产量、品质等相关重要农艺性状多属数量性状,精确定量对其描述不仅影响常规育种准确度,同时也对分子设计育种具有重要意义。利用代谢物(或代谢网络)来定量上述性状在玉米主生代谢途径网络(包括光合作用、糖酵解、三羧酸循环、呼吸途径、氨基酸和脂肪酸代谢等)相关表征,有利于鉴定、改良和利用相关遗传资源^[30]。Riedelsheimer等^[31]利用含有56110个SNP的芯片和代谢组学技术对570个测交群体(285个不同的Dent自交系与2个Flint亲本杂交获得)分析建模,并利用模型对玉米7个性状的一般配合力进行预测,其中利用SNP分型的预测准确率为0.72~0.81,而利用130个代谢物信息构建的模型的预测准确率为0.60~0.80。Li等^[32]将玉米自交系B73苗期的第3叶分为4个发育梯度

部分(叶基区、过渡区、正在成熟区和成熟区),并从叶尖中分离出维管束鞘细胞群和叶肉细胞群,利用RNA-seq技术对此6个叶样品进行了转录组测序分析,转录本丰度的定量分析结果发现,不同发育梯度中,叶片形成相关基因存在不同的mRNA加工事件,其中64%的基因呈现差异表达,而21%的基因在维管束与叶肉细胞中表达量不同。进一步对数据聚类分析发现,从叶基部的初生细胞壁、基本细胞代谢到过渡到叶尖的次级细胞壁生物合成、C₄植物光合作用的发育的转录组呈现动态变化状态。此类研究工作的整合产生了一个高分辨率和高准确性的转录本图谱,为建立生理和代谢数据集的系统框架,深入开展光合作用发育相关研究提供了基础。

3.4 在分子进化研究领域的应用

玉米是典型的异交作物,具有丰富的遗传多样性。考古学和分子遗传学证实玉米是在6250年前从墨西哥中南部由大刍草驯化而来,一年生小颖玉米亚种可能是其直接祖先^[33,34]。前人研究表明,任何两个玉米品种核苷酸沉默位点存在大约1.4%的差异,是其他驯化禾本科作物的2~5倍,是人类之间差异的14倍,接近人类和大猩猩之间的多态性^[35,36]。从分子层面解释玉米进化,首要问题是大规模收集亲缘关系相近的陆生植物基因组数据,而转录组数据收集是重要一环。首先,在经济上比较合算;其次,转录组蕴含的数据映射编码蛋白质基因区域,而这些数据的细化和分析也为未来的近缘物种转录本本比较积累一定的参考。以保守序列推测进化史,用同源关系提示保守的生化 and 生理功能,有助于基因组的准确分类和详尽注释。Vega-Arreguín等利用454焦磷酸测序对生长约2周的兰卡血缘玉米祖先品种cDNA进行测序,得到150万条序列,和EST数据库比对发现86069个序列可能是新的转录本,和MAGIs序列比对发现,约11%具有转录活性,为研究玉米变异和进化多样性提供了大量信息。

3.5 在miRNAs研究中的应用

随着RNA介导沉默现象机制的深入研究,细胞内一大批小分子非编码RNA(sncRNA),主要包括微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)等被发现,他们分别在转录及转录后水平调控基因表达,组成了RNA调控网络,从而参与生物细胞增殖、分化和凋亡等一系列生理过程的调控,影响植物的生长发育。尽管miRNA与siRNA生成途径和作用途径中多种蛋白质因子,但二者也存在明显的区别,如miRNA是由RNA聚合酶II内源转录而来,约含

21~24 个核苷酸,通常在翻译水平负调控靶 mRNA 的表达;siRNA 来自于转基因、内源重复序列、病毒或转座子,由长的双链 RNA 经 Dicer 样的 RNase III 家族的酶切割产生,约含 20~24 个核苷酸。植物中 miRNA 介导发育上的基因调控被大量报道,如 miRNA 调控生长素信号途径以及叶片发育机制的阐述以及利用 cDNA 文库方法发现并分析拟南芥、水稻中 miRNA 功能等^[37,38]。但因各种生物和非生物胁迫的发生,较难检测到在少量细胞中的 miRNA 低量表达,而转录组测序分析有助于该问题的解决^[39]。Nobuta 等^[40]利用 Illumina Solexa 测序技术研究野生型玉米和 mopl1(拟南芥 rdr2 同源基因)突变体的 sncRNA,结果发现,miRNA 合成过程中,因 RDR2 的功能不同致使玉米突变体中 22~24 nt siRNA 显著减少,miRNA 明显富集。Wang 等^[41]构建了浸水 24 h 后玉米种子的小 RNAs 文库并使用 Solexa 技术对其进行测序分析,发现 115 个已知玉米 miRNAs 和 167 个新的 miRNAs,其已知 miRNAs 和新发现 miRNAs 的信息被生物学重复实验所证实。这些研究有助于人们对 miRNAs 调控玉米生长发育的认知,也将促进相关基因功能的深入研究。

4 展 望

以转录组测序为代表的高通量测序技术已广泛应用于多种生物功能基因组学研究。就遗传育种及生长发育研究来说,玉米转录组测序数据将大大丰富和验证对基因组参考序列(以 B73 为代表)及功能注释。①通过解析农艺性状相关基因的核酸序列,深度发掘基因(新)的功能,进而为研究相应的蛋白序列及功能提供一种可能;②SNP 的发现以及各种分子标记的开发,对基因多态性等信息的获得、遗传图谱的绘制、基因克隆及相关进化关系的理解更为透彻,从而促进对玉米遗传多样性的分子机制研究;③通过提高实验的准确性,尤其是对低丰度表达的转录本,使玉米转录组的测序成为其生长发育相关领域研究进步的标志之一;④转录组测序技术还可用于不同样本间基因表达差异、可变剪接等的比较,其灵敏性、可操作性以及海量数据处理的便捷性会使玉米(遗传育种、生理生化等)科研工作者深化已有的研究成果,也会大大促进包括玉米在内的农作物比较基因组学的发展。综上所述,转录组测序相关研究既有助于在分子水平上对玉米遗传育种开展更为深入细致的研究,而且作为重要的模式植物之一,深化玉米遗传发育进程认识也将对分子设计育种、

分子遗传学的理解和认识大有裨益。基因组的从头测序和重测序、染色质免疫沉淀测序(ChIP-seq)、甲基化测序(Methyl-seq)等新的测序技术为科学家们对基因组学相关研究提供了更多的选择^[42,43]。如以 ChIP-seq 研究蛋白质与 DNA 的相互作用,能够得到高分辨率的转录因子结合数据和组蛋白修饰等表观遗传学数据;将 ChIP-seq 数据与转录组测序得到的转录组数据进行综合分析,将大大推进人们对复杂农艺性状相关基因转录调控系统的认识。

以转录组测序为代表的高通量测序技术,现在所解释的生物学现象和遗传机制也存在局限性,即使获得了转录组/基因组信息,如何选用先进的生物信息学处理、解释和应用它仍是未来需要逐渐解决的问题。基因图谱的绘制和解析并不意味着所有遗传密码蕴含信息的破解,全基因组序列的公布也难以解决所有的生命疑惑。仅就玉米研究来说,其 DNA 序列变异的模式、RNA 转录的可变剪接以及进化机制、基因调控网络的结构和相互作用方式、复杂农艺性状的分子遗传基础等仍是遗传学家和玉米科研工作者要面对的难题,而转录组测序的广泛应用,无疑可以揭示更多奥秘。

致谢:感谢深圳华大基因位艳丽研究员在全文修改过程中给予的协助和支持。

参考文献:

- [1] 王建康,李慧慧,张学才,等.中国作物分子设计育种[J].作物学报,2011,37(2):191-201.
Wang J K, Li H H, Zhang H C, et al. Molecular Design Breeding in Crops in China[J]. Acta Agron. Sin., 2011, 37(2): 191-201. (in Chinese)
- [2] Peleman J D, van der Voort J R. Breeding by design[J]. Trends in Plant science, 2003, 8(7): 330-334.
- [3] 万建民.作物分子设计育种[J].作物学报,2006,32(3):455-462.
Wan J M. Perspectives of molecular design breeding in crops[J]. Acta Agron. Sin., 2006, 32(3): 455-462. (in Chinese)
- [4] 祁云霞,刘永斌,荣威恒.转录组研究新技术:RNA-Seq 及其应用[J].遗传,2011,33(11):1191-1202.
Q Y X, Liu Y B, Rong W H. RNA-Seq and its applications: a new technology for transcriptomics[J]. Hereditas, 2011, 33(11): 1191-1202. (in Chinese)
- [5] Gong C, Maquat L E. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements[J]. Nature, 2011, 470(7333): 284-288.
- [6] Hung T, Wang Y, Lin M F, et al. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters[J]. Nature Genetics, 2011, 43(7): 621-629.
- [7] 夏 天,肖丙秀,郭俊明.长链非编码 RNA 的作用机制及其研究方法[J].遗传,2013,35(3):269-280.
Xia T, Xiao B X, Guo J M. Acting mechanisms and research methods of

- long noncoding RNAs [J]. *Hereditas*, 2013, 35(3): 269–280. (in Chinese)
- [8] 田清霞, 谢传晓, 李新海, 等. 玉米基因组学研究进展 [J]. *玉米科学*, 2006, 14(3): 1–5.
- Tian Q Z, Xie C X, Li X H, et al. Progress of the maize genomics [J]. *Journal of Maize Sciences*, 2006, 14(3): 1–5. (in Chinese)
- [9] Schnable P S, Ware D, Fulton R S, et al. The B73 maize genome: complexity, diversity and dynamics [J]. *Science*, 2009, 326: 1112–1115.
- [10] Messing J, Dooner H K. Organization and variability of the maize genome [J]. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2006, 9: 157–163.
- [11] 韩永华, 宋运淳, 金危危. 玉米基因组重复序列的研究进展 [J]. *玉米科学*, 2007, 15(4): 37–40.
- Han Y H, Song Y C, Jin W W. Research progress of repetitive sequence in maize genome [J]. *Journal of Maize Sciences*, 2007, 15(4): 37–40. (in Chinese)
- [12] 黎 裕, 王天宇. 玉米基因组学的发展现状及我国的对策 [J]. *玉米科学*, 2003, 11(3): 3–8.
- Li Y, Wang T Y. Current situation of maize genomics and strategies in China [J]. *Journal of Maize Sciences*, 2003, 11(3): 3–8. (in Chinese)
- [13] 肖景华, 吴昌银, 韩 斌, 等. 中国水稻功能基因组研究进展 [J]. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2009, 39(10): 909–924.
- Xiao J H, Wu C Y, Han B, et al. Research progress of rice functional genomics in Chinese [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2009, 39(10): 909–924. (in Chinese)
- [14] 张椿雨, 龙 艳, 冯 吉, 等. 植物基因在转录水平上的调控及其生物学意义 [J]. *遗传*, 2007, 9(7): 793–799.
- Zhang C Y, Long Y, Feng J, et al. Transcriptional regulation of plant genes and its significance in biology [J]. *Hereditas*, 2007, 29(7): 793–799. (in Chinese)
- [15] Hansey C N, Vaillancourt B, Sekhon R S, et al. Maize (*Zea mays* L.) genome diversity as revealed by RNA-seq [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33071.
- [16] Lockhart D J, Winzler E A. Genomics, gene expression and DNA arrays [J]. *Nature*, 2000, 405(6788): 827–836.
- [17] 周晓光, 任鲁风, 李运涛, 等. 下一代测序技术: 技术回顾与展望 [J]. *中国科学 生命科学*, 2010, 40(1): 23–37.
- Zhou X G, Ren L F, Li Y T, et al. The next-generation sequencing technology: a technology review and future perspective [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2010, 40(1): 23–37.
- [18] Schuster S C. Next-generation sequencing transforms today's biology [J]. *Nature*, 2008, 200(8): 16–18.
- [19] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(1): 57–63.
- [20] 杨晓玲, 施苏华, 唐 恬. 新一代测序技术的发展及应用前景 [J]. *生物技术通报*, 2010(10): 76–81.
- Yang X L, Shi S H, Tang T. Research progress and application of next-generation sequencing [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(10): 76–81. (in Chinese)
- [21] 滕晓坤, 肖华胜. 基因芯片与高通量 DNA 测序技术前景分析 [J]. *中国科学 生命科学*, 2008, 38(10): 891–899.
- Teng X K, Xiao H S. Prospect analysis of gene chip and high-throughput DNA sequencing technology [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2008, 38(10): 891–899. (in Chinese)
- [22] 梁 焯, 陈双燕, 刘公社. 新一代测序技术在植物转录组研究中的应用 [J]. *遗传*, 2011, 33(12): 1317–1326.
- Liang Y, Chen S Y, Liu G S. Application of next generation sequencing techniques in plant transcriptome [J]. *Hereditas*, 2011, 33(12): 1317–1326. (in Chinese)
- [23] 郝大程, 马 培, 穆 军, 等. 中药植物虎杖根的高通量转录组测序及转录组特性分析 [J]. *中国科学 生命科学* 2012, 42(5): 398–412.
- Hao D C, Ma P, Mu J, et al. High-throughput sequencing and characteristic analysis of *Polygonum cuspidatum* (a Chinese medicinal plant) root transcriptome [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2012, 42(5): 398–412. (in Chinese)
- [24] Vega-Arreguín J C, Ibarra-Laclette E, Jiménez-Moraila B, et al. Deep sampling of the Palomero maize transcriptome by a high throughput strategy of pyrosequencing [J]. *BMC Genomics*, 2009, 10(1): 299.
- [25] Poroyko V, Hejlek L G, Spollen W G, et al. The maize root transcriptome by serial analysis of gene expression [J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(3): 1700–1710.
- [26] Lai J, Li R, Xu X, et al. Genome-wide patterns of genetic variation among elite maize inbred lines [J]. *Nature genetics*, 2010, 42(11): 1027–1030.
- [27] Parchman T, Geist K, Grahnen J, et al. Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 180.
- [28] Barbazuk W B, Emrich S J, Chen H D, et al. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing [J]. *The Plant Journal*, 2007, 51(5): 910–918.
- [29] Li H, Peng Z, Yang X, et al. Genome-wide association study dissects the genetic architecture of oil biosynthesis in maize kernels [J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(1): 43–50.
- [30] 张凤霞, 王国栋. 植物代谢组学应用研究—现状与展望 [J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15(2): 28–32.
- Zhang F X, Wang G D. The applications of metabolomics in plant biology—current status and prospective [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2013, 15(2): 28–32. (in Chinese)
- [31] Riedelsheimer C, Czedik-Eysenberg A, Grieder C, et al. Genomic and metabolic prediction of complex heterotic traits in hybrid maize [J]. *Nature Genetics*, 2012, 44(2): 217–220.
- [32] Li P, Ponnala L, Gandotra N, et al. The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(12): 1060–1067.
- [33] Doebley J, Stec A, Wendel J, et al. Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F₂ population: implications for the origin of maize [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1990, 87(24): 9888–9892.
- [34] Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman M M, et al. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99(9): 6080–6084.
- [35] Tenaillon M I, Sawkins M C, Long A D, et al. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(16): 9161–9166.

- [46] 卢宝荣,夏 辉,杨 箫,等. 杂交-渐渗进化理论在转基因逃逸及其环境风险评价和研究中的意义[J]. 生物多样性, 2009, 17(4): 362-377.
Lu B R, Xia H, Yang X, et al. Evolutionary theory of hybridization-introgression: its implication in environmental risk assessment and research of transgene escape[J]. Biodiversity Science, 2009, 17(4): 362-377. (in Chinese)
- [47] Lu B R. Transgenic escape from GM crops and potential biosafety consequences: an environmental perspective[J]. Collection of Biosafety Reviews, 2008, 4: 66-141.
- [48] 路兴波,孙红炜,杨崇良,等. 转基因玉米外源基因通过花粉漂移的频率和距离[J]. 生态学报, 2005, 25(9): 2450-2453.
Lu X B, Sun H W, Yang C L, et al. Gene flow of transgenic corn to cultivated relatives in China[J]. Acta Ecologica Sinica, 2005, 25(9): 2450-2453. (in Chinese)
- [49] Quist D, Chapela H I. Transgenic DNA, introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico[J]. Nature, 2001, 414: 541-543.
- [50] 陈小文,李吉崇,郭玉海,等. 抗虫转基因玉米荒地生存竞争力评价[J]. 杂草科学, 2012, 30(1): 31-34.
Chen X W, Li J C, Guo Y H, et al. Assessment of survival competitiveness in wasteland for transgenic *Bt* maize[J]. Weed Science, 2012, 30(1): 31-34. (in Chinese)
- [51] 卢宗志,江晓东,张 明,等. 玉米花粉扩散频率及距离研究[J]. 玉米科学, 2012, 20(2): 149-152.
Lu Z Z, Jiang X D, Zhang M, et al. Diffusion frequency and distance assessment of corn pollen[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(2): 149-152. (in Chinese)
- [52] Devos Y, Demont M, Dillen K, et al. Coexistence of genetically modified(GM) and non-GM Crops in the European Union: A review[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2009, 29(1): 11-30.
(责任编辑:高 阳)

(上接第 72 页)

- [36] Chen F C, Li W H. Genomic divergences between humans and other hominoids and the effective population size of the common ancestor of humans and chimpanzees[J]. American Journal of Human Genetics, 2001, 68(2): 444.
- [37] Jones-Rhoades M W, Bartel D P, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants[J]. Annu. Rev. Plant Biol., 2006, 57: 19-53.
- [38] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [39] 闫绍鹏,杨瑞华,冷淑娇,等. 高通量测序技术及其在农业科学研究中的应用[J]. 中国农学通报, 2012, 28(30): 171-176.
Yan S P, Yang R H, Leng S J, et al. High-fluxed DNA sequencing technology and its application in agricultural science research[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(30): 171-176. (in Chinese)
- [40] Nobuta K, Lu C, Shrivastava R, et al. Distinct size distribution of endogenous siRNAs in maize: Evidence from deep sequencing in the mop1-1 mutant[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008, 105(39): 14958-14963.
- [41] Wang L, Liu H, Li D, et al. Identification and characterization of maize microRNAs involved in the very early stage of seed germination[J]. BMC genomics, 2011, 12(1): 154.
- [42] 潘星华,朱海英, MARJANI Sadie L. 单细胞基因组学分析的技术前沿[J]. 遗传, 2011, 33(1): 17-24.
Pan X H, Zhu H Y, MARJANI S L. Technological advances in single-cell genomic analyses[J]. Hereditas, 2011, 33(1): 17-24. (in Chinese)
- [43] 岳桂东,高 强,罗龙海,等. 高通量测序技术在动植物研究领域中的应用[J]. 中国科学 生命科学, 2012, 42(2): 107-124.
Yue G D, Gao Q, Luo L H, et al. The application of high-throughput sequencing technology in plant and animal research[J]. Scientia Sinica Vitae, 2012, 42(2): 107-124. (in Chinese)
(责任编辑:高 阳)