

冯发强, 张 晶, 王青峰,等. 甜玉米 LCYE 等位基因多态性及功能分析[J]. 华南农业大学学报,2014,35(5):25-30.

甜玉米 LCYE 等位基因多态性及功能分析

冯发强^{1†},张 晶^{1†},王青峰¹,杨瑞春¹,王国华¹,李小琴^{1,2} (1华南农业大学农学院,广东广州 510642;

2 华南农业大学, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】鉴定甜玉米材料中 LCYE 基因的多态性和 β - 胡萝卜素和类胡萝卜素含量的变异,为了解甜玉米 LCYE 基因的等位基因功能及维生素 A 源强化育种提供参考和依据.【方法】以 47 份甜玉米自交系为材料,用高效液相色谱法检测 β - 胡萝卜素和总类胡萝卜素的含量,扩增 LCYE 基因并测序,结合 LCYE 基因的测序结果和 β - 胡萝卜素、总类胡萝卜素含量的表型值作关联分析.【结果和结论】在 47 份甜玉米自交系的 LCYE 基因的测序结果中共发现 75 个多态性位点,其中 49 个多态性位点分布在非编码区,26 个多态性位点分布于 LCYE 基因的外显子区,且均为 SNP,第 5 外显子区多态性位点最丰富,第 4 和第 9 外显子区未检测到多态性位点,其保守程度较高. 关联分析检测到与 β - 胡萝卜素相关联的位点 3 个,与总类胡萝卜素含量关联的位点 6 个,位点 exon1 - 2 和exon5 - 6 与 2 种表型极显著相关. 本研究证明在甜玉米中 LCYE 基因与 β - 胡萝卜素和类胡萝卜素的合成显著相关,为甜玉米的维生素 A 源强化育种提供了理论基础.

关键词:等位基因; 甜玉米; LCYE 基因; 维生素 A 源; 多态性

中图分类号:S513

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2014)05-0025-06

Identification of polymorphism and function of *LCYE* allele in sweet corns

 $FENG\ Faqiang^{1\dagger},\ ZHANG\ Jing^{1\dagger},\ WANG\ Qingfeng^{1},\ YANG\ Ruichun^{1},\ WANG\ Guohua^{1},\ LI\ Xiaoqin^{1,2}$

(1 College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this investigation was to identify the polymorphisms of LCYE gene and the variation of β - carotene and carotenoids for understanding LCYE allele function in sweet corns and providing the reference and basis for biofortification breeding of pro-vitamin A. [Method] The contents of β -carotene and total carotenoid were measured by HPLC in 47 sweet corn inbred lines. The whole length of LCYE was amplified, cloned and sequenced. Association analysis was performed by combining the sequences of LCYE gene with the content of β -carotene and total carotenoid. [Result and conclusion] The total of 75 polymorphism sites were detected in this study, which included 49 polymorphism sites located on the non-coding chromosome region and 26 polymorphism sites located on the exons of the LCYE gene. All these sites on the exons were SNPs and most of them were located on the fifth exon except for the forth and the ninth exon with a conserved sequence. All 13 detected INDELs located on the non-coding region. The fragment of these INDELs ranged from 1 to 40 bp and most of them were from 4 bp to 8 bp. Three polymorphic sites were detected to be associated with β -carotenoid and 6 polymorphic sites were detected

收稿日期:2013-09-24 优先出版时间:2014-07-17

优先出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140717.0909.025.html

作者简介:冯发强(1976—),男,助理研究员,博士,E-mail: fengfq@scau. edu. cn;张 晶(1981—),女,博士研究生,E-mail: 24970989@qq.com;†:对本文贡献相同;通信作者:李小琴(1967—),女,教授,博士,E-mail: xiaoqinli2000@126.com 基金项目:国家自然科学基金(31071427)

to be associated with total carotenoid. Exon 1 - 2 and exon 5 - 6 were found to be significantly associated with these two phonotypes. The result identifies that LCYE gene is related to the biosynthetic pathway of the carotenoids and provides the theoretical basis for biofortificated breeding of pro-vitamin A in sweet corns,

Key words: allele; sweet corn; *LCYE* gene; pro-vitamin A; polymorphism

维生素 A 是脂溶性醇类物质,是人类及动物所 必需的一种营养素. 维生素 A 主要的生理功能包括 维持正常的视觉反应、维持上皮组织的正常形态与 功能、维持正常的骨骼发育、维护皮肤细胞功能的作 用等[1-2]. 维生素 A 缺乏在世界范围内广泛存在,已 和铁缺乏、碘缺乏一同被定为世界性三大微量营养 素缺乏性疾病,正受到越来越多的关注[3]. 植物组织 中并不直接含有维生素 A, 而是以维生素 A 源—— 类胡萝卜素的形式存在,维生素 A 源能在人体内转 变为具有生理活性的维生素 A.

玉米 Zea mays 是富含维生素 A 源的主要粮食作 物之一,其籽粒包含5种主要的类胡萝卜素:α-胡 萝卜素、β-胡萝卜素、β-隐黄质、叶黄素和玉米黄 质,这些类胡萝卜素 95%~97% 都位于胚乳中,1% 左右位于胚中[4]. 人们利用类胡萝卜素合成突变体 及类胡萝卜素生物合成阻断的抑制剂,逐渐阐明了 类胡萝卜素的生物合成代谢途径[5],其中 PSY、LCYE 和 HYD 是重要的合成限速基因. Harjes 等[5] 采用关 联分析、连锁作图、表达分析及突变体分析的方法对 玉米类胡萝卜素合成途径中的关键限速基因 LCYE 进行了克隆,1个单拷贝的 LCYE 基因全长 3 640 bp, 包含10个外显子,位于第8号染色体8.05Bin,其变 异可改变胡萝卜素合成途径 α - 胡萝卜素分枝和 β-胡萝卜素分枝的流量,4 个 LCYE 等位基因可解释 58%的(α - 胡萝卜素 + 叶黄素)/(β - 胡萝卜素 + β -隐黄质+玉米黄质)表型变异,可产生3倍的维生素 A 源活性差异.

目前国内鲜见对鲜食玉米材料进行 LCYE 等位 基因多样性分析的报道,本研究以47份甜玉米自交 系为材料,采用高效液相色谱法检测其 β -胡萝卜素 和总类胡萝卜素的含量,在甜玉米的基因组中扩增 了 LCYE 基因,通过克隆测序对 LCYE 基因进行遗传 变异分析,发现了新的等位基因,对 LCYE 基因的遗 传多态性及功能进行分析,以期为甜玉米的维生素 A 源强化育种奠定基础.

材料与方法

1.1 材料

47 份甜玉米材料是由华南农业大学农学院甜玉 米组自行选育的骨干系,来源及表型多样.于 2009 年秋在华南农业大学增城实验基地种植,行长 4 m、

http://xuebao.scau.edu.cn

宽 0.67 m,每个基因型种植 2 行,顺序排列,田间管 理与大田管理基本相同. 每个甜玉米通过自交授粉 保持基因型稳定,于授粉后第21天每种基因型选取 5个无病虫害感染的果穗风干后脱粒、混匀,同一材 料取样 3 次,磨粉后避光保存于 4 ℃冰箱.

1.2 类胡萝卜素的提取与检测

样品中类胡萝卜素的提取与检测均在中国农业 大学国家玉米改良中心实验室进行. 类胡萝卜素的 提取方法参考 Egesel 等[6]的方法进行. 采用高压液 相色谱法(HPLC)分离样品类胡萝卜素各组分,基于 外标法[7]构建的回归方程对样品类胡萝卜素各组分 含量进行量化分析. 其标样由中国农业大学国家玉 米改良中心提供,液相色谱系统为日本岛津公司生 产的2001 Simzdu 操作系统,色谱柱为反相 YMC 类 胡萝卜素 C30 柱子(5 μm, 4.6 mm × 250 mm, Waters chromatography, Milford, MA). 采用等度洗脱,流速 是 2 mL·min⁻¹,柱温控制在 30 ℃,检测波长为 450 nm. 检测的类胡萝卜素组分有叶黄素、玉米黄质、β-隐黄质、 α - 胡萝卜素和 β - 胡萝卜素共 5 种, 总类胡 萝卜素含量等于5种成分含量之和.

1.3 DNA 的提取及主要试剂

采用改良 CTAB 法提取叶片 DNA[8],叶片于大 喇叭口期采集、储存于-70℃冰箱备用.

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Buffer、MgCl2 等购自晶 美生物工程有限公司; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试 剂盒购自上海生物工程公司,pGEM-T Easy vector 试 剂盒购自 Promega 公司, Ex-Taq DNA 聚合酶购自大 连宝生物工程公司,高保真 Taq DNA 聚合酶购自 Toyobo 公司, DL-2000 购自大连宝生物工程公司产 品;大肠杆菌 JM109 感受态细胞由华南农业大学农 学院水稻研究室惠赠. 引物合成及 PCR 产物测序由 北京奥科鼎盛生物科技公司完成.

1.4 引物设计和 PCR 反应体系

用于扩增玉米 LCYE 基因的引物序列信息由中 国农业大学国家玉米改良中心提供,将 LCYE 基因全 长分为9段,设计9对引物,引物位置及引物名称见 图 1,扩增包括 LCYE 基因的 5'UTR 到 3'UTR,拼接 为全长为3640 bp 的片段,引物合成由北京奥科鼎 盛生物科技公司完成.

PCR 反应在 PTC-100TMPCR 仪上完成,反应总 体系为20 μL,其中玉米材料基因组 DNA 50~60 ng,

10 × PCR Buffer (含 Mg^{2+}) 2. 00 μ L, 25 μ L, 每种引 dNTPs 0. 20 μ L, 2 U · μ L $^{-1}$ Taq 酶 0. 50 μ L, 每种引 物质量浓度为 30 μ R · μ L $^{-1}$, ddH_2 O 12. 30 μ L. PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ ① 预变性 5 μ E $^{\circ}$ 1 μ E $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 1 μ E $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 1 μ E $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 4 $^{\circ}$ 1 μ E $^{\circ}$ 3 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 4 $^{\circ}$ 3 $^{\circ}$ 6 $^{\circ}$ 6 $^{\circ}$ 6 $^{\circ}$ 7 $^{\circ}$ 7 $^{\circ}$ 7 $^{\circ}$ 8 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 3 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 3 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 2 $^{\circ}$ 9 $^{\circ}$ 1 $^{\circ}$ 9 $^$

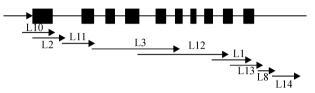


图 1 LCYE 基因结构及测序引物位置

Fig. 1 The structure of *LCYE* gene and the position of sequencing primers

1.5 PCR 产物的回收与纯化

从每种基因型中筛选 2 个典型单株进行 PCR 扩增及序列测定. 用 20 g·L⁻¹的琼脂糖凝胶分离 PCR 产物,将目的带切下后用上海生物工程公司 UNIQ-10柱式 DNA 胶回收试剂盒纯化回收;对每个单株的 PCR 产物进行独立扩增、纯化,产物与 pGEM-T Vectorsystem连接后转化到大肠杆菌感受态细胞,提取质粒作为测序模板,每个基因型至少挑取2个克

隆子分别测序. 测序反应由北京奥科鼎盛生物科技公司完成.

1.6 DNA 序列分析及多态性位点功能分析

通过美国国家生物技术信息中心(NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov)网站的BLAST (Basic local alignment search tool)软件,将测序后获得的DNA序列与GenBank数据库中公布的LCYE基因进行序列同源性比较,以鉴定所获得的DNA序列.采用TASSEL2.0中的GLM(Generallinear model)模型结合LCYE基因测序数据、群体结构数据和表型性状数据进行标记-性状的关联分析,确定关联位点.

2 结果与分析

2.1 47 份甜玉米材料的类胡萝卜素含量变异

对 47 份超甜玉米自交系籽粒类胡萝卜素各组分含量进行了测定. 结果(表 1)表明,47 份甜玉米自交系中 β -胡萝卜素质量分数的均值为 0.88 μ g·g⁻¹,变幅为 0.02 ~4.48 μ g·g⁻¹,变异系数为 1.04;总类胡萝卜素质量分数的均值为 28.94 μ g·g⁻¹,变幅为 1.44 ~75.98 μ g·g⁻¹,变异系数为 0.54,不同基因型的 β -胡萝卜素和总类胡萝卜素含量存在显著差异,47 份甜玉米中 β -胡萝卜素和总类胡萝卜素均存在丰富的变异.

表 1 47 份甜玉米材料 β-类胡萝卜素和总类胡萝卜素含量

Tab. 1	The content of β -carotene and total carotenoid in 47 sweet corn lines	$w/(\mu g \cdot g^{-1})$
--------	--	--------------------------

	Tab. 1	The content of β -carotene and	total carote	noid in 47 sweet corn lines	w/(μg·g ⁻¹)
材料编号	β-胡萝卜素	总类胡萝卜素	材料编号	β-胡萝卜素	总类胡萝卜素
A01	0.33 ± 0.00	17.61 ± 1.12	A25	0.78 ± 0.28	24.25 ± 2.41
A02	1.09 ± 0.07	28.16 ± 4.03	A26	0.66 ± 0.03	32.87 ± 2.13
A03	1.34 ± 0.10	23.76 ± 0.70	A27	0.37 ± 0.22	14.65 ± 2.82
A04	0.22 ± 0.00	11.06 ± 2.73	A28	0.46 ± 0.03	23.56 ± 3.90
A05	4.48 ± 0.00	75.98 ± 2.02	A29	0.31 ± 0.02	18.49 ± 1.77
A06	1.86 ± 0.13	60.62 ± 5.34	A30	0.44 ± 0.09	21.48 ± 1.44
A07	2.17 ± 0.32	39.05 ± 0.54	A31	0.41 ± 0.03	23.49 ± 1.05
A08	2.13 ± 0.40	33.36 ± 1.62	A32	0.43 ± 0.01	24.86 ± 0.13
A09	0.68 ± 0.05	5.81 ± 0.04	A33	0.56 ± 0.14	57.58 ± 2.13
A10	0.91 ± 0.22	7.46 ± 1.94	A34	0.06 ± 0.01	19.89 ± 0.45
A11	0.66 ± 0.01	20.33 ± 0.97	A35	0.06 ± 0.01	18.70 ± 2.56
A12	0.98 ± 0.13	25.78 ± 1.04	A36	3.14 ± 0.36	40.05 ± 1.52
A13	0.53 ± 0.01	26.00 ± 2.80	A37	3.69 ± 0.23	67.18 ± 3.34
A14	0.65 ± 0.03	21.27 ± 3.44	A38	0.41 ± 0.01	29.80 ± 1.42
A15	0.50 ± 0.03	25.90 ± 0.75	A39	0.42 ± 0.02	25.18 ± 1.33
A16	0.65 ± 0.01	26.14 ± 1.78	A40	0.63 ± 0.02	30.96 ± 1.63
A17	1.75 ± 0.03	31.81 ± 2.59	A41	0.62 ± 0.06	25.12 ± 1.12
A18	0.72 ± 0.00	44.63 ± 3.78	A42	0.66 ± 0.06	22. 10 ± 0.62
A19	0.48 ± 0.02	42.45 ± 2.98	A43	0.44 ± 0.03	15.80 ± 0.63
A20	0.17 ± 0.01	20.97 ± 2.28	A44	1.14 ± 0.05	36.65 ± 1.28
A21	0.46 ± 0.09	24.79 ± 0.73	A45	0.33 ± 0.06	24.88 ± 2.05
A22	0.84 ± 0.19	40.36 ± 2.94	A46	0.04 ± 0.04	3.09 ± 1.80
A23	1.02 ± 0.23	50.59 ± 2.17	A47	0.02 ± 0.01	1.44 ± 0.21
A24	0.64 ± 0.18	54.02 ± 3.91	均值	0.88 ± 0.92	28.94 ± 15.85

In

2.2 47 份甜玉米材料 *LCYE* 基因的同源性与变异分析

经比对和统计,47 份甜玉米的 LCYE 基因中共 检测到75 个多态性位点,其中在第1至10 外显子区 共检测到26 个多态性位点,均为 SNP,平均每60 bp 检测到1个多态性位点(表2).第5 外显子区多态性 位点最丰富,有8个 SNP 位点,第4 和第9 外显子无 多态性位点,保守程度较高.

表 2 LCYE 基因外显子序列多态性分布 Tab. 2 Polymorphic locations within exons of LCYE gene

外显子	序列长度	多态位点数目	多态位点类型
1 st	315	4	SNP
2nd	172	2	SNP
$3 \mathrm{rd}$	136	2	SNP
4th	214	0	SNP
5th	144	8	SNP
6th	108	4	SNP
7th	97	1	SNP
8th	129	2	SNP
9th	133	0	SNP
10th	166	3	SNP

在 LCYE 基因的非编码区共检测到 49 个多态性位点,平均每 94 bp 检测到 1 个. 检测到的 49 个非编码区的多态性位点中包含 13 个 Indel 位点,其中,Indel 12 是单核苷酸的 Indel,6 个 Indel 的插入与相邻序列相同,实质是多了 1 个拷贝,Indel 片段的长度在 1~40 bp 之间,长度在 6~8 bp 之间的 Indel 最多,达7 个,超过所检测到的 Indel 总数的 50% (表 3 和图 2). 多态性位点在整个基因上的分布很不均匀,检测

表 3 LCYE 基因的 Indel 多态性位点 Tab. 3 Indel polymorphic sites of LCYE gene

位点编号	插入的序列	插入位点/bp
Indel 1	TCGCCTAGCGGTAGGCAACGCG-	993
	TTTCACCTTCCTGGCTGG	
Indel 2	ATCGTGA	1 144
Indel 3	GCGCTAGG	1 423
Indel 4	GTATGTGACTGCACAGAA-	1 453
	CAGAAGAGCTTCCT	
Indel 5	TCAATA	1 488
Indel 6	TTTCAACTTTACATGGCATCA	1 665
Indel 7	AAATTT	2 538
Indel 8	GACGA	3 176
Indel 9	TATA	3 241
Indel 10	CCTGCAAG	3 900
Indel 11	CGTGTTG	4 065
Indel 12	T	4 120
Indel 13	GGCCGTAC	4 753

	61	GTGGAGAGTG	GCACCACGTC GACACTCACG Potential	GCTCACGCCC	CCGGCGCCCT	CCTGAAAATG	CGAAAACCAT
	121 181 241 301	ATCCACGCCG GCCTCCCCGG CAGCCAAGTC AGCAAGAGAG	CGTGGGCCCT CCTCTCGTGT CTCTCCGCTC CCGCACCAGG	GTGCCAATCC CTCGTCGTCT TCTTCGCCGC AGAAGATATA	AAAACCGCCA CCCTCTCCCT CACCGCCGAC GTGAGAGTGA	CGTGCCATAT CCACAACGGC AAATAACCGC GAGCCCGAGG	CCGGTGATAC ATAGCTGCAG CGCAATTCGA AGGGGGTGGC
Start 361	GCG/	onl" exon TGGGGC TCT(CGGGCGC GACC GCGGAGGTAA GCGTTGGCGG	GATOTOG GOGO	COGCTOG GCTO	CTCCGT CCTC	CCGCTGC
		SNPG/CSN	√P (T/G)				
	9	NPC/GSNPC/1	TCGGGGGGGC GCGAGCTGCT				
	721 781 841	TTTGTTCTAG TTTCTTGTGC AATATTACCT	TGATCGTGAT TGGTATTTGG TTTCCGGTAG	TAACGTGTGA AGATTTACAT AAAATTAAAA	AGGAAAAAAT GATGGAATCC GAAAACATAA	AAATTATAGG AGAACATCAT CCAATGTTTA	TTTCGCCCCC GCACCTACTG GGGCACGAAA
961 1	GCTA .021	CCTAGCGGTAC CAAGGA TGT: AGATTGACAT	TTTCAATATG GCAACGCGTTT CACTGG AAAC AGTTTGCCCG ATGGCAGTAC	CACCTTCCTGO CAGGGT GAT TTTGTAAATG	<mark>CTGG)</mark> FTTGCAT TCTA TATGTAAATT	AGATGTT TCGA AAATATTCTG	AGCCAGT GAAATGCATT
I: 1 1	nde 141 201	12 (ATCGTGA GTGAGAACAA ACGAACTACA		CGTACTTATC GCACATTAAT	TGGACTATTC TAACGACCGT	TAACAAGATA TGTTTTTTT	AGCCAGTTAT GTGCGCACTA
In 1 1	.381 de 1 .441 .501	ACTTGCTATA 4 (GTATGTTGA AACCTGGATA ATCTCCTGCC	ATTTGAGCAG ACTGCACAGAAC ATTTGTATAG GACCGTTAAA	TCAAGTGGAG CAGAAGAGCTTC TGCCATTTTT AAAAAACAGCA	Indel TACTCTAGCT CCT) TCCCCTTCTG GAGCTTCAAA	3 (GCGCTAGG) AGGCACAGGC Indel5 (TCA TATCAATACA TGGAGGCCTTT	AATTCCTCAA AATA) AGTTGAGCAT GTGCCATTAT
Inde	1 6 .621	TTTCTTCATA	TGGAATACGT AAAAAACTAT	TTTGCTTCAG	GGCGAGGTAA	CCAATTTTCA	ACTTTACATG
1	741	GAAAGTTAAC	TTTTTTATAT	TGTTCTGTTT	GCAGCTATCG	2 nd exon CCCATATCTG	ATGAAAATAC
	.801	SNPG/ASNPG/	TTGGTTATCA A GGTCTCACTG				
1 1 3 rd exc	.921 .981 on <mark>SNE</mark>	TGGTGTGTGG CTGCATAACA	GAGGATGAAT TCTCTGTCAG	TTAAAGGTAT TGTCAGCCCA	TCTGTTATTT ACTTAACATG	GCTTGTTGAA ATGATATATA	CGCAGAGTGC CTTTTTTTC
			TGTCCAGATC CTAGACAATA				
2	2221	CTCAGAAGTA	CTCCATGAGG TCTTTTCCAT	GCATGGTGAT	GTATAATATA 4 th exon	ATTGACGAGT	AGCAACACTT
2	2341 2401	TCATAGAATC GCAGGCTTGC GGGGTCCCCG	CAGATGCTAT TCCAGATGGA CATTGTTGCT TGTTTGCGTG de1 7 (AAAT	CACAGAGTAG TOGGGGGCAG CAGACTGCAT	TCTGTTGTGA CATCTGGTAG	GCTTCTAGAG	GAGATAATTT TATGAGGTTG
2	2521 2581	CAAGAATCTG	TTCTTTTTT TAGTTGAAAT	TTTGTTATTG	CTTGCACAAA TCATTTATGT	TTAGACAGAC GCTAGATGTT	CAGTTTGCTC CGTTATTTCA
		SNI		G <mark>T</mark> GGAAAATA IPT/C	ACCCATATGA		
		_	A ATTGTTTC	SNPC/TSNPA/	_		
2	2821	TGTTACCTCT	TATGCCCATG GTGATTAAGC	AACCCGCGCT	TCCCATCAAA 6 th exo	TTCTCAAAAT	TTGTGACTAA
	C18	IDC /ACMDC /AS	ACAGGAAACA SNPCZA				
3	3001	AGGTAAGAGG	GATGTATCGG GTCTACAATT	CTTAATTCTC	ACACATTATA	TTCTGAAGAT	TAACTGAAAT
3	3061	GTTCTTGGTT	TAAGGAATGG SNPT/G In	TCCTACATTC de 1 8(GA)	CTGTTGGAGG CGA) GTATGGTGCA	GTCCTTACCA	AACACAGATC
Ir	3181 1 de 1	AGAAAAACCT TTAATTTTTT 9 (TATA) AGGGTACTCA	TGCATT GGT GCACACCAGT GTGGTCAGAT	TTCCTCCTAG	8th exon	TOCTGCAACA CAATGTTTCA TATGCTTCTG	CAAAATACAT
			AATCGAGTTC GCTAAGCATT			Q.	evon
3 3 3	3421 3481 3541	TGTAAAGGTT CTGTGGCCTC ATCCAACTGA	CAGACAAGTA AAGAGAGGAA ATAATGAAGG ACTTTTTACC	AGCGAAACTA ACGCCAACGA CATACAAACA	TTATAATATG TCCTTCTTCC TTCTTCGAAG	ATGTTTCAGC TTTTCGGATT CCTTTTTCAG	ATGGAGAACA AGCGTTGATA GGTGCCGAGA
			ACTTTTTACC CCATAATGTT GGCTCGACCC				10° exon
		SNPC/TS	SNPG/A CCAAATCAAT	TGCGAATGAA	CCTTGTCAG		
3	841	TGGCTCATCC	ATGATCAAGA	<mark>C/G</mark> Stop cod C <mark>T</mark> ACCTGAC	ion CTTATAAAAC	CATTTGCACC	AGGCTGCAAG
3	8901 8961	GGGGGGTTAC	CTCTTAGAAA TTGGCGGCGG	ATCTAGGGGT	TAGCAGCAAT Inde1 11	GCTATAATAC (CGTGTTG)	ACTGTAAATC
			GCTATGGTGA	TTGGATAGAG	AAGCACACCG Inde l 12 (*	TGTT <mark>GT</mark> GCAT	GATGGAAGAA
		CGGCGCCTCT	GATCAGGTGA CAAATCGTCC (GGCCGTAC)				
		GTTCATCTCC	TGTACCCATT				
表中结	红色	字体表示	插入/缺失	.Indel 后面	〒的数字表	示插入/#	束失的长

表中红色字体表示插入/缺失, Indel 后面的数字表示插入/缺失的长度, 红色填充表示 SNP 位置及碱基变化, 黄色填充表示 exon 的位置及长度.

图 2 47 份甜玉米自交系中 LCYE 基因位点的序列变异

Fig. 2 The variation of LCYE gene in 47 sweet corn lines

到的13个 Indel 中有6个集中在第1外显子和第2外显子之间696 bp的区域内,而SNP位点在整个基因上的分布相对比较均匀.

2.3 LCYE 基因多态性位点的功能分析

为了检测已发现的 LCYE 基因序列的多态性位 点与维生素 A 源含量表型之间真实存在的关联,在 考虑群体结构影响的基础上,进行候选基因与表型 性状的关联分析. 其中, 群体结构分析来源于黄君[9] 已获得的结果. 将获得的甜玉米自交系的 LCYE 基因 序列比对结果、群体结构以及这些自交系授粉后第 21 天收获籽粒得到的β-胡萝卜素和总类胡萝卜素 含量表型值一起导入 TASSEL 软件,使用 GLM (Generallinear model)模型进行关联分析,当P<0.05 时认 为该多态性位点与所分析表型值存在显著关联. 共 检测到7个与β-胡萝卜素和总类胡萝卜素有显著 关联的多态性位点,其中与β-胡萝卜素相关联的位 点有3个,与总类胡萝卜素总含量关联的多态性位 点有 6 个. exon 1-2 和 exon 5-6 这 2 个位点同时与 β -胡萝卜素和总类胡萝卜素总含量显著关联,Exon 1-2 与这 2 种表型关联的程度达到极显著,分别可解 释β-胡萝卜素 13% 的表型变异和维生素 A 源 15% 的表型变异(表4).

表 4 LCYE 基因多态性位点与 β - 胡萝卜素和总类胡萝卜 素含量的关联分析

Tab. 4 Association analyse of β -carotene, total carotenoid content and polymorphic sites of *LCYE* gene

性状	多态性位点	P	R^2
β-胡萝卜素	exon 1-2	0.0004	0.13
	exon 1-4	0.034 2	0.03
	exon 5-6	0.0017	0.04
总类胡萝卜素	exon 1-2	0.000 3	0.15
	exon 2-2	0.043 2	0.01
	exon 5-6	0.0020	0.06
	exon 5-8	0.022 1	0.04
	exon 6-3	0.0104	0.02
	exon 6-4	0.035 8	0.05

3 讨论

甜玉米品质有外观品质、营养品质、食用品质等,其中营养品质和食用品质在育种过程中占据首要地位[10].维生素是有机体中极其重要的微量营养素,甜玉米中维生素的含量是评价甜玉米营养品质的重要指标之一.在甜玉米籽粒中只有部分类胡萝卜素是维生素 A 的前体物质,可在人体内转变为具有生理活性的维生素 A. 玉米籽粒中可转化为维生

素 A 的类胡萝卜素包括 α – 胡萝卜素、 β – 胡萝卜素和 β – 隐黄质等^[4,7,11-13],还有不能转化为维生素 A 的物质,即玉米黄质和叶黄素,它们是眼睛合成黄斑色素的必要物质^[13]. 而甜玉米以鲜食为主,强化其营养品质的研究,提高其微营养元素含量对于防止微营养缺乏,增进人体健康有重要意义.

普通玉米中已有大量关于类胡萝卜素的研究. Wong 等[14] 对普通玉米 200 个 F_{2: 3}家系和 185 个杂 交种的类胡萝卜素含量进行了测定,β-胡萝卜素和 总类胡萝卜素的质量分数最大分别 3.97 和 33.21 $\mu g \cdot g^{-1}$. Harjes 等 $^{[5]}$ 对 204 份黄玉米自交系的类胡萝 卜素含量进行了测定,发现 β -胡萝卜素和总类胡萝 卜素质量分数的变化范围为 0.06~13.60 和 5.5~ 66.0 μg·g⁻¹. 对于甜玉米中的类胡萝卜素研究较 少,本研究以47份甜玉米自交系为材料,发现 β -胡 萝卜素质量分数均值为 0.88 μg·g⁻¹,变幅为 $0.02 \sim 4.48 \, \mu \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 总类胡萝卜素质量分数的均值 为 28. 94 μg·g⁻¹,变幅为 1. 44~75. 98 μg·g⁻¹,结 果表明甜玉米中的β-胡萝卜素和总类胡萝卜素含 量存在丰富的变异,其变异范围与普通玉米相当,可 利用甜玉米材料本身的β-胡萝卜素和总类胡萝卜 素含量变异进行高维生素 A 源的新品种选育.

而关于玉米维生素 A 源遗传规律的研究由来已 久, Mangelsdorf 等[15]于 1931 年提出深黄色玉米的类 胡萝卜素含量比淡黄色和白粒玉米丰富,且类胡萝 卜素的遗传符合孟德尔规律,随后,Aurand 等[16]发 现玉米类胡萝卜素受遗传控制. 随着分子标记技术 的发展,QTL 定位广泛应用于玉米的数量性状研究, Wong 等[14] 首次对类胡萝卜素进行了基因定位,检测 到 $17 ext{ } ext{$ 黄质和叶黄素含量相关. Chander 等[17] 进行了类胡 萝卜素的基因定位,检测到 31 个 QTL 与 α - 胡萝卜 素、β-胡萝卜素、β-隐黄质、玉米黄质和叶黄素含 量相关. Harjes 等[5] 和 Yan 等[18] 分别克隆了玉米维 生素 A 合成中的 2 个关键基因 LCYE 和 crtRB1,为分 子标记辅助转育维生素 A 合成关键基因强化玉米的 维生素 A 源打下了坚实的基础. 在 Harjes 等[5]的研究 中,普通玉米中LCYE基因共检测到7个位点与 β -胡 萝卜素和总类胡萝卜素含量均存在显著关联,分别 位于5'-TE、第1外显子、第4内含子和第10内含子. 本研究以47份甜玉米材料对 LCYE 基因进行了等位 基因的多样性研究,检测到75个多态性位点,7个与β - 胡萝卜素和总类胡萝卜素含量有显著关联,2个位 点与 Harjes 等[5] 检测到的位点相同,说明在甜玉米背 景下 LCYE 基因是影响其类胡萝卜素合成涂径的重要

http://xuebao.scau.edu.cn

基因,已开发的 *LCYE* 基因功能标记可应用于甜玉米的高维生素 A 源含量分子标记辅助选择育种.

致谢:感谢中国农业大学国家玉米改良中心李建生教授对 本试验的指导与支持!

参考文献:

- [1] 常世敏,张智强. 浅谈维生素 A 代谢与生理功能[J]. 中国食物与营养,2005(2):55-57.
- [2] 张雅稚. 维生素 A 的生理功能与应用方法[J]. 中国食物与营养, 2007(12): 55-56.
- [3] 王朝阳,邓立新,郭延俭,等. 维生素 A 缺乏对机体影响的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学,2012(1):47-48.
- [4] WURTZEL E T. Chapter five Genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis [J]. Recent Adv Phytochem, 2004, 38; 85-110.
- [5] HARJES C E, ROCHEFORD T R, BAI L, et al. Natural genetic variation in *lycopene epsilon cyclase* tapped for maize biofortification [J]. Science, 2008, 319 (5861): 330-333.
- [6] EGESEL CO, WONG JC, LAMBERT R J, et al. Combining ability of maize inbreds for carotenoids and to-copherols [J]. Crop Sci, 2003, 43(3): 818-823.
- [7] KURILICH A C, JUVIK J A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(5): 1948-1955.
- [8] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochemi Bull, 1987, 19: 11-15.
- [9] 黄君. 甜玉米自交系遗传多样性及群体结构分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2011.
- [10] 牛丽影,宋江峰,李大婧,等. 甜玉米及其加工品营养特

- 点与食用品质评价研究进展[J]. 粮食与油脂, 2011 (4): 9-11.
- [11] MUZHINGIT, YEUM K, RUSSELL R M, et al. Determination of carotenoids in yellow maize, the effects of saponification and food preparations [J]. Int J Vitam Nutr Res, 2008, 78(3): 112-120.
- [12] CHANDER S, GUO Y Q, YANG X H, et al. Using molecular markers to identify two major loci controlling carotenoid contents in maize grain [J]. Theor Appl Genet, 2008, 116(2): 223-233.
- [13] SANDMANN G. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: Strategies, problems and achievements [J]. Trends Plant Sci, 2001, 6(1): 14-17.
- [14] WONG J C, LAMBERT R J, WURTZEL E T, et al. QTL and candidate genes phytoene synthase and ζ-carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108(2): 349-359.
- [15] MANGELSDORF P C, FRAPS G S. a direct quantitive relationship between vitamin A in corn and the number of genes for yellow pigmentation [J]. Science, 1931, 73 (1887): 241-242.
- [16] AURAND L W, HUBER L L, MILLER R C. Influence of heredity on carotene and protein contents of corn [M]. Pennsylvania State: Pennsylvania State College, 1950.
- [17] CHANDER S, GUO Y, YANG X, et al. Genetic dissection of tocopherol content and composition in maize grain using quantitative trait loci analysis and the candidate gene approach [J]. Mol Breeding, 2008, 22(3); 353-365.
- [18] YAN J, KANDIANIS C B, HARJES C E, et al. Rare genetic variation at *Zea mays crtRB1* increases [β]-carotene in maize grain[J]. Nat Genet, 2010, 42(4); 322-327.

【责任编辑 周志红】