



冯发强, 王国华, 王青峰, 等. 甜玉米类胡萝卜素合成关键基因 *PSY1*、*LCYE* 和 *CrtRB1* 的功能分析[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(5): 36-42.

# 甜玉米类胡萝卜素合成关键基因 *PSY1*、*LCYE* 和 *CrtRB1* 的功能分析

冯发强<sup>1</sup>, 王国华<sup>1</sup>, 王青峰<sup>1</sup>, 杨瑞春<sup>1</sup>, 李小琴<sup>1,2</sup>

(1 华南农业大学 农学院/广东省植物分子育种重点实验室, 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】鉴定玉米类胡萝卜素合成关键基因 *PSY1*、*LCYE* 和 *CrtRB1* 的功能标记在 47 份甜玉米骨干自交系中的多态性和对类胡萝卜素各组分含量的影响, 为了解玉米类胡萝卜素合成关键基因的功能及维生素 A 源强化育种提供参考和依据。【方法】以 47 份甜玉米骨干自交系为材料, 用高效液相色谱法检测籽粒乳熟期类胡萝卜素各组分的含量, 合成基因 *PSY1*、*LCYE* 和 *CrtRB1* 的 6 个功能标记并在 47 份甜玉米自交系中检测其基因型, 结合基因型和类胡萝卜素各组分的含量, 检测 3 个关键基因的单倍型效应, 并分析联合单倍型效应。【结果和结论】除 *CrtRB1* 基因的标记 Indel4 未检出多态性, 其余标记均检测出多态性。 *PSY1* 的 Indel1 和 Indel4 组成的单倍型可解释玉米黄质和总类胡萝卜素含量表型变异的 14.81% 和 13.00%, *LCYE* 的 5'Indel 和 3'Indel 位点分别可解释  $\beta$ -胡萝卜素、维生素 A 源和总类胡萝卜素含量表型变异的 15.77%、20.75% 和 15.92%, *CrtRB1* 的标记 3'TE 未检测出显著性。基因 *PSY1*、*LCYE* 和 *CrtRB1* 组成的联合单倍型分别可解释  $\beta$ -胡萝卜素、维生素 A 源和总类胡萝卜素含量表型变异的 37.20%、40.71% 和 41.11%。基因间联合单倍型效应高于单基因单倍型效应。 *PSY1* 和 *LCYE* 有利等位基因对甜玉米中类胡萝卜素的合成有重要影响, 其功能标记可用于分子标记辅助选择, 为甜玉米的维生素 A 源强化育种奠定了基础。

**关键词:** 甜玉米; *PSY1* 基因; *LCYE* 基因; *CrtRB1* 基因; 类胡萝卜素; 单倍型

中图分类号: S513

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2015)05-0036-07

## Functional analysis of the key carotenoid biosynthetic genes *PSY1*, *LCYE* and *CrtRB1* in sweet corn

FENG Faqiang<sup>1</sup>, WANG Guohua<sup>1</sup>, WANG Qingfeng<sup>1</sup>, YANG Ruichun<sup>1</sup>, LI Xiaoqin<sup>1,2</sup>

(1 College of Agriculture, South China Agricultural University/ Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, Guangzhou 510642, China; 2 State Key Lab for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:**【Objective】To identify the polymorphisms of functional markers for the key carotenoids biosynthetic genes *PSY1*, *LCYE* and *CrtRB1* in sweet corn and their effects on the contents of carotenoid for a better understanding of the functions of these genes so as to provide a reference and basis for bio-fortification breeding of pro-vitamin A. 【Method】The contents of carotenoid components were measured by HPLC in 47 sweet corn elite inbred lines. Six functional markers for *PSY1*, *LCYE* and *CrtRB1* genes were synthesized and amplified to detect the genotypes of these lines. The effects of single gene haplotype and

收稿日期: 2014-11-15 优先出版时间: 2015-07-27

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20150727.1455.020.html>

作者简介: 冯发强 (1976—), 男, 助理研究员, 博士, E-mail: fengfq@scau.edu.cn; 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); 高等学校博士学科点专项科研基金(20114404110005).

joint haplotype were analyzed using the functional polymorphic sites of *PSY1*, *LCYE*, and *CrtRBI* genes together with the carotenoid content variation. [Result and conclusion] The polymorphism was detected in 5 functional markers except for indel4 for *CrtRBI*. The haplotype with Indel1 and Indel4 for *PSY1* could explain 14.81% of the zeaxanthin content variation and 13.00% of the total carotenoid content variation. The haplotype with 5'Indel and 3'Indel for *LCYE* could explain 15.77% of  $\beta$ -carotene content variation, 20.75% of pro-vitamin A content variation and 15.92% of the total carotenoids content variation. No significant effect was detected in the haplotype of *CrtRBI*. The joint haplotype of *PSY1*, *LCYE* and *CrtRBI* could explain 37.20% of  $\beta$ -carotene content variation, 40.71% of pro-vitamin A content variation and 41.11% of the total carotenoids content variation. The joint effect of *PSY1*, *LCYE* and *CrtRBI* was higher than that of single gene. *PSY1* and *LCYE* genes are important in the biosynthesis of carotenoid. Their functional markers can be used in the molecular-assisted selection and provide a theoretical basis for bio-fortification of pro-vitamin A in sweet corn by breeding.

**Key words:** sweet corn; *PSY1* gene; *LCYE* gene; *CrtRBI* gene; carotenoid; haplotype

据世界卫生组织调查,全球 78 个国家确认存在维生素 A 缺乏的公共健康问题,约 1/4 的儿童和孕妇(2.5 亿)存在维生素 A 缺乏症,每年超过 25 万儿童因维生素 A 缺乏失明,近半在 1 年内死亡(<http://www.harvestplus.org/vita.html>). 中国属中度亚临床维生素 A 缺乏,贫困地区儿童的维生素 A 缺乏较为严重,人体不能合成维生素 A,需从食物中摄取,植物性维生素 A 源占 70%,是人类的主要维生素 A 源<sup>[1-2]</sup>. 提高植物性食物中维生素 A 源是解决贫困人口维生素 A 缺乏的重要途径.

玉米是富含维生素 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: $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\beta$ -隐黄质、叶黄素和玉米黄质,非维生素 A 源的叶黄素和玉米黄质是其类胡萝卜素的主要成分<sup>[3-5]</sup>. 玉米富含能量,是赞比亚、南非、墨西哥等地区主要粮食来源,人均年消费量在 100 kg 以上,提供了人体所需的能量及蛋白质的 30%~60%<sup>[6]</sup>. 生物强化是通过育种提高主要粮食作物的微量营养物质含量,是有效和可持续解决长期微量营养不良的有效方法之一,从经济的角度来看,生物强化更适合于农村或偏远地区、其他方法如药物补充等方法不能完全覆盖的地方<sup>[7]</sup>. 丰收计划项目根据人体日常摄入维生素 A 的基本量(成人 400 g·d<sup>-1</sup>、儿童 200 g·d<sup>-1</sup>)将玉米的维生素 A 源生物强化指标设定为 15  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ <sup>[8]</sup>. 而维生素 A 源强化育种面临的最大问题是高昂的检测费用.

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<sup>[9]</sup>. 其中 *PSY*、*LCYE* 和 *HYD* 基因是重要的合成限速基因. *PSY* 基因编码八氢蕃茄红素合

酶,是类胡萝卜素合成的第一步. Fu 等<sup>[10]</sup>克隆了玉米、大刍草、摩擦禾、薏苡和高粱 5 个物种和 4 个水稻品种的 *PSY* 基因,并用 2 个自然群体对其进行了关联分析. Harjes 等<sup>[9]</sup>采用关联分析等方法对玉米类胡萝卜素合成途径中的关键基因 *LCYE* 进行了克隆,检测到 4 个等位基因变异,可解释 58%的( $\alpha$ -胡萝卜素 + 叶黄素)/( $\beta$ -胡萝卜素 +  $\beta$ -隐黄质 + 玉米黄质)表型变异. Yan 等<sup>[11]</sup>用 3 个关联分析群体克隆了 *HYD* 基因并更名为 *CrtRBI*,检测到 3 个等位基因变异,分别命名为 5'*TE*、*InDel4* 和 3'*TE*, 5'*TE* 可解释 32%的  $\beta$ -胡萝卜素表型变异, *InDel4* 和 3'*TE* 可解释 7%~27%的类胡萝卜素表型变异. 以上 3 个基因均已开发了基于 PCR 技术的功能标记,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类胡萝卜素各组分的含量,合成 *PSY1*、*LCYE* 和 *CrtRBI* 基因的功能标记并在 47 份甜玉米自交系中检测其基因型,结合基因型和类胡萝卜素各组分的含量,检测 3 个关键基因的单倍型效应,并分析其联合单倍型效应,以期对甜玉米的维生素 A 源强化育种奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以华南农业大学农学院甜玉米组选育的 47 份甜玉米骨干系为材料,其来源多样、表型存在明显差异. 普通玉米 KUI3/B77 的 F<sub>2,3</sub> 后代家系 KB-7,包含 *PSY1*、*LCYE* 和 *CrtRBI* 有利等位基因,由中国农业大学国家玉米改良中心提供. 于 2009 年秋季在华南农业大学增城试验基地种植,行长 4.00 m、宽 0.67 m,每个自交系种植 2 行,顺序排列,田间管理与大田管

理基本相同。每个甜玉米材料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<sup>[12]</sup>的方法进行。采用高压液相色谱法(HPLC)<sup>[13]</sup>分离样品类胡萝卜素各组分,基于外标法<sup>[3]</sup>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2001Simzdu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<sup>-1</sup>,柱温控制在30℃,检测波长为450 nm。

### 1.3 DNA 的提取及主要试剂

于大喇叭口期采集各自交系幼嫩叶片,采用改良 CTAB 法提取叶片基因组总 DNA<sup>[14]</sup>,并用紫外分光光度计测量 DNA 浓度和相对纯度,用1 × TE 将 DNA 稀释至25 ng · μL<sup>-1</sup>,于-20℃冰箱中保存备用。主要试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、Buffer、MgCl<sub>2</sub> 等购自晶美生物工程有限公司,引物由北京奥科鼎盛生物科技公司合成。

### 1.4 引物及 PCR 反应体系

用于扩增甜玉米基因 *PSYI*、*LCYE* 和 *CrtRBI* 的引物序列信息分别来自于文献[9, 11, 15],本研究选用 *PSYI* 基因的 Indel1 和 Indel4、*LCYE* 基因的 5'Indel 和 3'Indel 及 *CrtRBI* 基因的 Indel4 和 3'TE 位点进行基因的单倍型分析(表1)。

PCR 反应在 PTC-100™ PCR 仪上完成,反应总体系为20 μL<sup>[13]</sup>,其中玉米材料基因组 DNA 50~60 ng,10 × PCR Buffer(含 Mg<sup>2+</sup>)2.00 μL,25 mmol · L<sup>-1</sup> dNTPs 0.20 μL,2 U · μL<sup>-1</sup> Taq 酶 0.50 μL,每种引物质量浓度为30 ng · μL<sup>-1</sup>,ddH<sub>2</sub>O 12.30 μL。PCR 扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃1 min,55℃1 min,72℃1 min,35个循环;最后72℃再延伸5 min。不同的引物扩增时退火温度不同。

### 1.5 统计分析

采用 Agilent 1200 色谱数据工作站记录和分析 HPLC 的测定结果,以1/2(β-隐黄质 + α-胡萝卜素) + β-胡萝卜素含量为维生素 A 源含量,5种组分的总和为总类胡萝卜素含量;PCR 扩增结果与 KB-7 带

型位置相同带型记为1,无带记为0,用 SAS8.0 的 GLM 程序进行单倍型效应分析。

表1 基因 *PSYI*、*LCYE* 和 *CrtRBI* 单倍型分析所用引物序列  
Tab.1 The sequences of primers for haplotype analysis of *PSYI*, *LCYE* and *CrtRBI* genes

基因	标记名称	引物名称	引物序列(5'→3')		
<i>PSYI</i>	Indel1	YC1F	AGACATCACACACACACGACAC		
		YC1R	GTAACACTACCAGGCTCACTTGT		
	Indel4	Y1-1F	TCCACCACAAGAAGATGC		
		Y1-1R	GACGTCGTAGACCTTCTGC		
<i>LCYE</i>	5'Indel	CAU3F1	CGCTAGCAAGCCCATTTATTTTA		
		CAU3R1	CGTTGCTCTGCAGCCGCTACTTCA		
	3'Indel	LCYE3SF	ACCCGTACGTCGTTTCATCTC		
		LCYE3SR	ACCCTGCGTGGTCTCAAC		
		<i>CrtRBI</i>	Indel4	CrtR4SF	ACCGTCACGTCGCTTCGTGCC
			CrtR4SR	CTTCCCGCCCTCCTTCTC	
3'TE	CrtR65F	ACACCACATGCACAAGTTCG			
	CrtR62R	GTGTTTCATGGCCAGAGTGT			

## 2 结果与分析

### 2.1 甜玉米材料的类胡萝卜素含量变异

对47份甜玉米自交系乳熟期籽粒类胡萝卜素各组分的定量分析结果(表2)表明,甜玉米中类胡萝卜素质量分数从高到低依次为叶黄素、玉米黄质、β-隐黄质、α-胡萝卜素和β-胡萝卜素,其变异范围分别为0.99~43.52、0.31~19.07、0.07~35.48、0.03~3.85和0.04~4.48 μg · g<sup>-1</sup>,均值分别为15.83、7.43、4.28、0.52和0.88 μg · g<sup>-1</sup>。总类胡萝卜素均值为28.94 μg · g<sup>-1</sup>,变异范围为1.44~75.98 μg · g<sup>-1</sup>,最高值与最低值相差52.7倍,变异系数达0.548;维生素A源均值为3.282 μg · g<sup>-1</sup>,变异范围为0.07~22.75 μg · g<sup>-1</sup>,变异系数达1.867,最高值与最低值相差307.5倍,其中A5和A37的维生素A源质量分数高于15 μg · g<sup>-1</sup>。

### 2.2 类胡萝卜素合成关键基因的单倍型分析

在用来进行单倍型鉴定的功能标记 *PSYI* 基因的 Indel1 和 Indel4、*LCYE* 基因的 5'Indel 和 3'Indel 及 *CrtRBI* 基因的 Indel4 和 3'TE 中,仅 *CrtRBI* 基因的 Indel4 未在47份甜玉米骨干系检测出多态性,其余5个标记均可检测出多态性。基因 *PSYI* 的 Indel1 和 Indel4 与乳熟期甜玉米籽粒中玉米黄质和总类胡萝卜素含量显著相关,由 Indel1 和 Indel4 位点组成的单倍型分别可解释玉米黄质和总类胡萝卜素含量表型变异的14.81%和13.00%(表3)。

表2 47份甜玉米自交系类胡萝卜素各组分及维生素A源的含量平均值

Tab.2 The average values of carotenoid components and pro-vitamin A contents in 47 sweet corn inbred lines

材料编号	$w/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$						
	叶黄素	玉米黄质	$\beta$ -隐黄质	$\alpha$ -胡萝卜素	$\beta$ -胡萝卜素	维生素A源	总类胡萝卜素
A1	6.12 ± 0.06	9.54 ± 0.17	1.56 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.33 ± 0.00	1.14 ± 0.00	17.61 ± 0.23
A2	11.52 ± 0.31	12.89 ± 0.48	2.49 ± 0.02	0.16 ± 0.00	1.10 ± 0.01	2.42 ± 0.03	28.16 ± 0.83
A3	13.43 ± 0.03	5.58 ± 0.03	1.84 ± 0.03	1.56 ± 0.02	1.34 ± 0.02	3.04 ± 0.05	23.76 ± 0.14
A4	4.63 ± 0.64	5.31 ± 0.75	0.86 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.22 ± 0.00	0.67 ± 0.00	11.06 ± 1.39
A5	15.89 ± 0.23	19.07 ± 0.21	35.48 ± 0.03	1.06 ± 0.01	4.49 ± 0.00	22.76 ± 0.01	75.99 ± 0.42
A6	35.60 ± 0.66	11.74 ± 0.24	7.57 ± 0.12	3.84 ± 0.06	1.86 ± 0.03	7.57 ± 0.11	60.62 ± 1.10
A7	19.00 ± 0.23	10.63 ± 0.08	6.57 ± 0.11	0.68 ± 0.02	2.17 ± 0.07	5.80 ± 0.13	39.05 ± 0.11
A8	13.14 ± 0.79	8.21 ± 0.43	9.31 ± 0.38	0.58 ± 0.00	2.13 ± 0.08	7.07 ± 0.27	33.36 ± 0.75
A9	1.64 ± 0.01	0.56 ± 0.00	2.87 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.68 ± 0.01	2.14 ± 0.00	5.81 ± 0.01
A10	2.01 ± 0.15	0.83 ± 0.06	3.65 ± 0.14	0.07 ± 0.00	0.91 ± 0.04	2.77 ± 0.12	7.46 ± 0.40
A11	8.56 ± 0.07	8.60 ± 0.11	2.47 ± 0.02	0.04 ± 0.00	0.66 ± 0.00	1.92 ± 0.01	20.33 ± 0.20
A12	11.78 ± 0.11	9.98 ± 0.04	2.98 ± 0.04	0.06 ± 0.00	0.98 ± 0.03	2.50 ± 0.05	25.78 ± 0.22
A13	9.27 ± 0.28	13.62 ± 0.28	2.50 ± 0.02	0.07 ± 0.00	0.53 ± 0.00	1.82 ± 0.01	26.00 ± 0.58
A14	7.12 ± 0.26	11.03 ± 0.43	2.41 ± 0.02	0.06 ± 0.00	0.65 ± 0.01	1.89 ± 0.01	21.27 ± 0.71
A15	9.87 ± 0.03	12.49 ± 0.04	2.94 ± 0.08	0.10 ± 0.00	0.50 ± 0.01	2.02 ± 0.05	25.90 ± 0.15
A16	12.35 ± 0.34	10.01 ± 0.01	2.89 ± 0.00	0.24 ± 0.04	0.65 ± 0.00	2.22 ± 0.02	26.14 ± 0.37
A17	13.49 ± 0.50	12.51 ± 0.44	3.73 ± 0.01	0.34 ± 0.00	1.75 ± 0.01	3.78 ± 0.00	31.81 ± 0.95
A18	32.96 ± 0.60	9.16 ± 0.18	1.46 ± 0.00	0.33 ± 0.00	0.72 ± 0.00	1.62 ± 0.00	44.63 ± 0.78
A19	32.85 ± 0.94	8.34 ± 0.27	0.65 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0.48 ± 0.00	0.87 ± 0.01	42.45 ± 1.23
A20	15.76 ± 0.38	4.40 ± 0.09	0.49 ± 0.00	0.15 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.49 ± 0.00	20.97 ± 0.47
A21	10.85 ± 0.08	10.34 ± 0.16	3.01 ± 0.06	0.14 ± 0.00	0.46 ± 0.02	2.03 ± 0.05	24.79 ± 0.15
A22	28.09 ± 0.58	5.39 ± 0.11	3.91 ± 0.18	2.13 ± 0.11	0.84 ± 0.04	3.86 ± 0.18	40.36 ± 1.02
A23	34.91 ± 1.00	10.69 ± 0.31	3.60 ± 0.10	0.37 ± 0.02	1.02 ± 0.05	3.00 ± 0.11	50.59 ± 1.48
A24	42.44 ± 1.13	9.48 ± 0.41	1.22 ± 0.05	0.25 ± 0.01	0.64 ± 0.04	1.37 ± 0.07	54.03 ± 1.63
A25	11.74 ± 0.20	4.52 ± 0.20	6.53 ± 0.52	0.70 ± 0.05	0.78 ± 0.06	4.39 ± 0.23	24.25 ± 0.91
A26	13.68 ± 0.20	7.96 ± 0.41	9.60 ± 0.15	0.97 ± 0.03	0.67 ± 0.01	5.95 ± 0.08	32.87 ± 0.44
A27	6.59 ± 1.35	5.47 ± 0.38	1.50 ± 0.27	0.71 ± 0.12	0.38 ± 0.05	1.48 ± 0.24	14.65 ± 1.41
A28	16.21 ± 0.59	4.63 ± 0.22	1.73 ± 0.04	0.53 ± 0.05	0.46 ± 0.01	1.60 ± 0.00	23.56 ± 0.80
A29	8.59 ± 0.14	6.67 ± 0.68	2.74 ± 0.15	0.18 ± 0.03	0.31 ± 0.00	1.77 ± 0.09	18.49 ± 0.36
A30	11.04 ± 0.71	7.25 ± 0.02	2.22 ± 0.07	0.54 ± 0.10	0.44 ± 0.02	1.82 ± 0.11	21.48 ± 0.92
A31	17.51 ± 0.16	3.25 ± 0.06	1.60 ± 0.01	0.73 ± 0.00	0.41 ± 0.01	1.57 ± 0.00	23.49 ± 0.22
A32	18.81 ± 0.09	3.27 ± 0.02	1.62 ± 0.03	0.74 ± 0.01	0.43 ± 0.00	1.61 ± 0.02	24.86 ± 0.03
A33	43.52 ± 0.26	9.33 ± 0.09	3.17 ± 0.08	1.00 ± 0.02	0.56 ± 0.03	2.64 ± 0.06	57.58 ± 0.44
A34	16.51 ± 0.06	3.01 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.09 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.22 ± 0.01	19.89 ± 0.09
A35	15.12 ± 0.48	3.14 ± 0.04	0.27 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.25 ± 0.00	18.70 ± 0.53
A36	12.61 ± 0.37	8.47 ± 0.23	15.44 ± 0.24	0.39 ± 0.02	3.14 ± 0.08	11.05 ± 0.20	40.05 ± 0.93
A37	24.13 ± 0.16	8.00 ± 0.08	29.95 ± 0.37	1.41 ± 0.03	3.69 ± 0.05	19.37 ± 0.25	67.18 ± 0.69
A38	21.14 ± 0.29	6.35 ± 0.05	1.55 ± 0.04	0.35 ± 0.02	0.41 ± 0.00	1.36 ± 0.03	29.80 ± 0.29
A39	18.12 ± 0.14	5.23 ± 0.07	1.00 ± 0.04	0.40 ± 0.02	0.42 ± 0.00	1.12 ± 0.03	25.18 ± 0.27
A40	19.59 ± 0.23	8.33 ± 0.09	1.31 ± 0.01	1.10 ± 0.00	0.63 ± 0.00	1.84 ± 0.01	30.96 ± 0.34
A41	16.85 ± 0.08	5.84 ± 0.08	1.37 ± 0.04	0.44 ± 0.02	0.62 ± 0.01	1.53 ± 0.04	25.12 ± 0.23
A42	7.99 ± 0.03	8.89 ± 0.07	4.38 ± 0.07	0.17 ± 0.00	0.66 ± 0.01	2.93 ± 0.05	22.10 ± 0.13
A43	5.88 ± 0.06	6.22 ± 0.06	3.11 ± 0.00	0.14 ± 0.00	0.44 ± 0.01	2.07 ± 0.01	15.80 ± 0.13
A44	25.01 ± 0.26	6.59 ± 0.03	2.84 ± 0.01	1.07 ± 0.02	1.14 ± 0.01	3.09 ± 0.01	36.65 ± 0.27
A45	16.89 ± 0.53	5.20 ± 0.16	2.18 ± 0.12	0.28 ± 0.01	0.33 ± 0.01	1.56 ± 0.08	24.89 ± 0.83
A46	2.06 ± 0.24	0.89 ± 0.12	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.01	3.09 ± 0.37
A47	0.99 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.07 ± 0.00	1.44 ± 0.04

表3 甜玉米自交系中 *PSY1* 基因 Indel1 和 Indel4 的单倍型效应分析

Tab.3 Haplotype effects of Indel1 and Indel4 for *PSY1* gene in sweet corn inbred lines

单倍型	Indel1	Indel4	n	$w/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$						
				叶黄素	玉米黄质	$\beta$ -隐黄质	$\alpha$ -胡萝卜素	$\beta$ -胡萝卜素	维生素A源	总类胡萝卜素
00	0	0	3	18.45 ± 6.48	7.09 ± 1.25	2.34 ± 0.79	0.85 ± 0.65	0.53 ± 0.16	2.12 ± 0.87	29.26 ± 2.57
10	1	0	42	16.32 ± 1.56	7.78 ± 0.57	4.61 ± 1.08	0.52 ± 0.10	0.95 ± 0.14	3.52 ± 0.69	30.18 ± 2.38
01	1	1	2	1.58 ± 0.54	0.60 ± 0.29	0.07 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.01	2.27 ± 0.82
P				0.124	0.029	0.576	0.434	0.311	0.503	0.048
R <sup>2</sup> /%				9.04	14.81	2.48	3.73	5.16	3.00	13.00

基因 *LCYE* 的 5'Indel 和 3'Indel 位点组成的单倍型效应除叶黄素含量外其余均达显著和极显著水平,分别可解释  $\beta$ -胡萝卜素、维生素 A 源和总类胡萝卜素含量表型变异的 15.77%、20.75% 和 15.92%。其

中单倍型“11”的类胡萝卜素各组分及维生素 A 源含量均高于其他单倍型(表 4)。基因 *CrtRB1* 的功能标记 3'TE 在类胡萝卜素各组分及总类胡萝卜素含量上均未检测出显著性(表 5)。

表 4 甜玉米自交系中 *LCYE* 基因的 5'Indel 和 3'Indel 单倍型效应分析

Tab. 4 Haplotype effects of 5'Indel and 3'Indel for *LCYE* gene in sweet corn inbred lines

单倍型	Indel1	Indel4	n	$w/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$							
				叶黄素	玉米黄质	$\beta$ -隐黄质	$\alpha$ -胡萝卜素	$\beta$ -胡萝卜素	维生素 A 源	总类胡萝卜素	
00	0	0	3	13.08 $\pm$ 4.77	8.06 $\pm$ 2.25	2.05 $\pm$ 0.86	0.24 $\pm$ 0.10	0.79 $\pm$ 0.48	1.94 $\pm$ 0.94	24.22 $\pm$ 6.61	
01	0	1	41	15.66 $\pm$ 1.62	7.00 $\pm$ 0.54	3.65 $\pm$ 0.80	0.45 $\pm$ 0.08	0.79 $\pm$ 0.12	2.83 $\pm$ 0.52	27.54 $\pm$ 2.19	
11	1	1	3	20.84 $\pm$ 7.95	12.69 $\pm$ 3.45	15.09 $\pm$ 10.31	1.81 $\pm$ 1.03	2.26 $\pm$ 0.18	10.72 $\pm$ 6.24	52.70 $\pm$ 16.22	
<i>P</i>				0.636	0.039	0.011	0.001	0.023	0.006	0.022	
$R^2/\%$				2.04	13.76	18.44	25.78	15.77	20.75	15.92	

表 5 甜玉米自交系中 *CrtRB1* 基因的 3'TE 单倍型效应分析

Tab. 5 Haplotype effect of 3'TE for *CrtRB1* in sweet corn inbred line

单倍型	3'TE	n	$w/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$							
			叶黄素	玉米黄质	$\beta$ -隐黄质	$\alpha$ -胡萝卜素	$\beta$ -胡萝卜素	维生素 A 源	总类胡萝卜素	
0	0	35	16.59 $\pm$ 1.93	6.93 $\pm$ 0.69	3.68 $\pm$ 1.02	0.57 $\pm$ 0.13	0.80 $\pm$ 0.14	2.93 $\pm$ 0.67	28.58 $\pm$ 2.84	
1	1	12	13.60 $\pm$ 1.61	8.87 $\pm$ 0.68	6.01 $\pm$ 2.42	0.38 $\pm$ 0.12	1.12 $\pm$ 0.32	4.31 $\pm$ 1.56	29.99 $\pm$ 3.83	
<i>P</i>			0.391	0.129	0.300	0.412	0.308	0.344	0.794	
$R^2/\%$			1.64	5.04	2.35	1.500	2.31	1.99	0.15	

### 2.3 基因 *PSYI*、*LCYE* 和 *CrtRB1* 的互作效应分析

对基因 *PSYI*、*LCYE* 和 *CrtRB1* 进行基因间联合单倍型分析,3 个基因的 5 个多态性标记共检测到 8 种组合方式,其组成的联合单倍型效应除叶黄素含量外其余均达极显著水平,分别可解释  $\beta$ -胡萝卜素、维生素 A 源和总类胡萝卜素含量表型变异的 37.20%、40.71% 和 41.11%。其中单倍型“10110”的类胡萝卜素各组分及维生素 A 源含量均高于其他单倍型(表 6)。与单基因效应值相比,基因间联合单倍型能够解释的各成分表型变异显著提高。对不同单倍型材料

的  $\beta$ -胡萝卜素、维生素 A 源和总类胡萝卜素含量分析发现,基因间联合单倍型能解释的  $\beta$ -胡萝卜素含量表型变异由 *PSYI* 基因的 5.16%、*LCYE* 基因的 15.77% 和 *CrtRB1* 基因的 2.31% 提高到 37.20%,维生素 A 源和总类胡萝卜素含量也由原来的最大值 20.75% 和 15.92% (*LCYE* 基因) 提高到现在的 40.71% 和 41.11%。可见 *PSYI*、*LCYE* 和 *CrtRB1* 基因均对甜玉米籽粒中维生素 A 源含量有一定的增效作用,3 个基因互作时,表型的增效作用大于简单的效应累加,基因间存在上位性互作效应。

表 6 甜玉米自交系中 *PSYI*、*LCYE* 和 *CrtRB1* 基因 5 个标记的联合单倍型效应分析<sup>1)</sup>

Tab. 6 Joint haplotype effects of 5 functional markers for *PSYI*, *LCYE* and *CrtRB1* genes in sweet corn inbred lines

单倍型	<i>PSYI</i>		<i>LCYE</i>		<i>CrtRB1</i>	n	$w/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$							
	Indel1	Indel4	5'Indel	3'Indel	3'TE		叶黄素	玉米黄质	$\beta$ -隐黄质	$\alpha$ -胡萝卜素	$\beta$ -胡萝卜素	维生素 A 源	总类胡萝卜素	
00000	0	0	0	0	0	1	21.14	6.35	1.55	0.35	0.41	1.36	29.80	
00010	0	0	0	1	0	2	17.11 $\pm$ 10.99	7.46 $\pm$ 2.08	2.73 $\pm$ 1.18	1.09 $\pm$ 1.04	0.59 $\pm$ 0.25	2.50 $\pm$ 1.36	28.99 $\pm$ 11.38	
10000	1	0	0	0	0	2	9.06 $\pm$ 4.43	8.91 $\pm$ 3.60	2.30 $\pm$ 1.43	0.19 $\pm$ 0.15	0.99 $\pm$ 0.77	2.23 $\pm$ 1.56	21.43 $\pm$ 10.38	
10010	1	0	0	1	0	26	17.41 $\pm$ 2.22	6.6 $\pm$ 0.65	2.85 $\pm$ 0.50	0.47 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.10	2.35 $\pm$ 0.34	28.02 $\pm$ 2.59	
10011	1	0	0	1	1	11	13.83 $\pm$ 1.74	9.02 $\pm$ 0.73	6.36 $\pm$ 2.63	0.37 $\pm$ 0.13	1.18 $\pm$ 0.35	4.54 $\pm$ 1.69	30.76 $\pm$ 4.10	
10110	1	0	1	1	0	2	25.74 $\pm$ 9.85	15.41 $\pm$ 3.67	21.53 $\pm$ 13.95	2.45 $\pm$ 1.39	3.17 $\pm$ 1.31	15.16 $\pm$ 7.59	68.30 $\pm$ 7.68	
10111	1	0	1	1	1	1	11.04	7.246	2.223	0.536	0.443	1.823	21.49	
11010	1	1	0	1	0	2	1.53 $\pm$ 0.54	0.6 $\pm$ 0.29	0.08 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.01	2.27 $\pm$ 0.83	
<i>P</i>							0.327	0.003	0.009	0.001	0.008	0.003	0.003	
$R^2/\%$							17.7	40.79	36.46	43.38	37.20	40.71	41.11	

1) 单倍型 00000 和 10110 在本研究的群体中仅有一份自交系。

### 3 讨论与结论

随着生活水平的提高,人们越来越关注食品的营养和健康.甜玉米是一种鲜食类型玉米,是重要的果蔬来源,其品质可分为外观品质、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越来越受重视<sup>[16]</sup>.类胡萝卜素是甜玉米中重要的微量营养元素,各组均对人体有重要作用.在甜玉米籽粒中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  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素和  $\beta$ -隐黄质等<sup>[3, 17-20]</sup>,还有非维生素 A 前体成分玉米黄质和叶黄素,它们是眼睛合成黄斑色素的必要物质<sup>[20]</sup>.甜玉米鲜食为主,更有一些水果型甜玉米可生食<sup>[21-22]</sup>,强化其营养品质、提高其微量营养元素含量对于增进人体健康有重要意义.

已有大量关于玉米类胡萝卜素的研究.Chander 等<sup>[5]</sup>对中国的 87 份普通玉米自交系类胡萝卜素各组分含量进行了测定, $\beta$ -胡萝卜素和总类胡萝卜素的质量分数均值分别 0.449 和 10.298  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,变异范围为 0.016 ~ 1.726 和 0.096 ~ 22.495  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ .Harjes 等<sup>[9]</sup>对 204 份黄玉米自交系的类胡萝卜素含量进行了测定,发现  $\beta$ -胡萝卜素和总类胡萝卜素质量分数的变化范围为 0.06 ~ 13.6 和 5.5 ~ 6.6  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ .甜玉米的研究较少,Kurilich 等<sup>[3]</sup>检测了 44 份甜玉米和普通玉米自交系, $\beta$ -胡萝卜素和总类胡萝卜素质量分数的变异范围为 0.07 ~ 7.64 和 0.15 ~ 33.11  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ .本研究中以 47 份甜玉米自交系为材料,发现  $\beta$ -胡萝卜素质量分数均值为 0.88  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,变幅为 0.02 ~ 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  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,变幅为 1.44 ~ 75.98  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,维生素 A 源质量分数均值为 3.282  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,变异范围为 0.07 ~ 22.75  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ .表明甜玉米中的  $\beta$ -胡萝卜素和总类胡萝卜素含量存在丰富的变异,可利用甜玉米材料本身的  $\beta$ -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.

玉米中维生素 A 源自然变异已有大量研究,玉米类胡萝卜素合成的 3 个关键基因的鉴定克隆为玉米分子标记辅助选择奠定了基础,利用多个普通玉米群体进行功能分析的研究已有报道.Fu 等<sup>[15]</sup>用 2 个群体对 *PSY1* 基因进行功能分析,发现上游的一个 378 bp 的 Indel 和第 5 外显子的一个 SNP 分别可解释 7% 和 8% 的总类胡萝卜素变异.Babu 等<sup>[23]</sup>选用

*LCYE* 和 *CrtRBI* 基因的 3 个功能标记 (5'Indel、3'Indel 和 3'TE) 在 26 个热带遗传背景和普通玉米群体中进行了功能分析,发现 *CrtRBI* 基因的 3'TE 标记可使  $\beta$ -胡萝卜素和总类胡萝卜素含量分别增加 2 ~ 10 倍,*LCYE* 基因的功能标记可导致  $\alpha$ -胡萝卜素/ $\beta$ -胡萝卜素比值下降 0 ~ 30%、增加维生素 A 源的含量.本研究中,单基因单倍型效应分析发现 *PSY1* 基因的 Indel1 和 Indel4 位点可解释玉米黄质和总类胡萝卜素含量表型变异的 14.81% 和 13.00%,*LCYE* 基因的 5'Indel 和 3'Indel 单倍型分别可解释  $\beta$ -胡萝卜素、维生素 A 源和总类胡萝卜素含量表型变异的 15.77%、20.75% 和 15.92%,而 *CrtRBI* 基因的 3'TE 在类胡萝卜素各组分中未检测出显著性差异.基于 3 个基因的联合单倍型效应除叶黄素含量无差异外,其余组分均达极显著水平,分别可解释  $\beta$ -胡萝卜素、维生素 A 源和总类胡萝卜素含量表型变异的 37.20%、40.71% 和 41.11%.其中 *LCYE* 和 *CrtRBI* 有利等位基因组成的单倍型类胡萝卜素各组分及维生素 A 源含量最高,与单基因效应值相比,基因间联合单倍型能够解释的各成分表型变异显著提高.与前人的研究相比,*PSY1* 和 *LCYE* 有利等位基因在普通玉米和甜玉米中均对类胡萝卜素的合成有重要影响,其功能标记可用于育种分子标记辅助选择.

**致谢:** 特别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] 毛德倩,郭宁,陈竞,等.中国农村不同地区 3~12 岁儿童血浆维生素 A 营养状况调查[J].卫生研究,2009(2):200-202.
- [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] 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.
- [4] WONG J C, LAMBERT R J, WURTZEL E T, et al. QTL and candidate genes phytoene synthase and  $\zeta$ -carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108(2): 349-359.
- [5] CHANDER S, MENG Y, ZHANG Y, et al. Comparison of nutritional traits variability in selected eighty-seven inbreds from Chinese maize (*Zea mays* L.) germplasm[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(15): 6506-6511.

- [6] ATLIN G N, PALACIOS N, BABU R, et al. Quality protein maize: Progress and prospects [J]. *Plant Breeding Rev*, 2011, 34: 83-130.
- [7] QAIM M, STEIN A J, MEENAKSHI J V. Economics of biofortification [J]. *Agric Econ*, 2007, 371: 119-133.
- [8] BOUIS H E, WELCH R M. Biofortification: A sustainable agricultural strategy for reducing micronutrient malnutrition in the global south [J]. *Crop Sci*, 2010, 50 (S2): 20-32.
- [9] 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.
- [10] FU Z, YAN J, ZHENG Y, et al. Nucleotide diversity and molecular evolution of the *PSYI* gene in *Zea mays* compared to some other grass species [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, 120(4): 709-720.
- [11] YAN J, KANDIANIS C B, HARJES C E, et al. Rare genetic variation at *Zea mays* *crtRBI* increases  $[\beta]$ -carotene in maize grain [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(4): 322-327.
- [12] EGESELE C O, WONG J C, LAMBERT R J, et al. Combining ability of maize inbreds for carotenoids and tocopherols [J]. *Crop Sci*, 2003, 43(3): 818-823.
- [13] 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.
- [14] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19: 11-15.
- [15] FU Z, CHAI Y, ZHOU Y, et al. Natural variation in the sequence of *PSYI* and frequency of favorable polymorphisms among tropical and temperate maize germplasm [J]. *Theor Appl Genet*, 2013, 126(4): 923-935.
- [16] 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.
- [17] WURTZEL E T. Chapter five genomics, genetics, and biochemistry of maize carotenoid biosynthesis [J]. *Recent Adv Phytochem*, 2004, 38: 85-110.
- [18] MUZHINGI T, 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.
- [19] 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.
- [20] SANDMANN G. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: Strategies, problems and achievements [J]. *Trends Plant Sci*, 2001, 6(1): 14-17.
- [21] 梁书英, 韦杏茹. 水果玉米农甜 88 不同密度下产量效应研究 [J]. *农业科技通讯*, 2013(5): 57-58.
- [22] 沈雪芳, 王义发, 张璧, 等. 早熟优质水果甜玉米‘金珠蜜’的选育 [J]. *上海农业学报*, 2012(4): 11-14.
- [23] BABU R, ROJAS N, GAO S, et al. Validation of the effects of molecular marker polymorphisms in *LcyE* and *CrtRBI* on provitamin A concentrations for 26 tropical maize populations [J]. *Theor Appl Genet*, 2013, 126(2): 389-399.

【责任编辑 周志红】