

利用转录组测序鉴定玉米白色籽粒突变基因 *PDS*

付修义 殷鹏飞 季生辉 贾博森 许静 杨小红*

(中国农业大学 农学院,北京 100193)

摘要 为探讨转录组测序在玉米质量性状基因克隆上的应用,以玉米自交系 B73 籽粒表现为白色的 EMS 突变体为材料,对该突变体授粉后 15 d 的籽粒进行转录组分析。通过与玉米 B73 参考基因组序列的比对分析,共鉴定到 138 个突变位点,其中 51 个突变位点对基因的功能有显著影响。通过基因功能注释与分类,发现该突变体在类胡萝卜素合成途径中的八氢番茄红素去饱和酶基因(*PDS*)发生无义突变,导致 *PDS* 蛋白翻译提前终止,阻断类胡萝卜素代谢途径中有色体番茄红素的生物合成,造成玉米籽粒白化。这些结果表明利用转录组测序技术能够快速准确地鉴定玉米 EMS 突变体的突变基因。

关键词 玉米; 转录组测序; EMS 突变体; 类胡萝卜素; 八氢番茄红素去饱和酶

中图分类号 S513 **文章编号** 1007-4333(2019)07-0001-09 **文献标志码** A

Identification of *PDS* for white kernels in maize via RNA-seq

FU Xiuyi, YIN Pengfei, JI Shenghui, JIA Bosen, XU Jing, YANG Xiaohong*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract To verify the possibilities of RNA-seq in cloning qualitative genes in maize, here, an ethyl methane sulfonate (EMS)-induced mutant for white kernels in maize with B73 background are taken as study material. A total of 138 mutant sites are identified in the developing kernels 15 d after pollination of the EMS mutant, and 36.96% (51/138) of these sites have high/moderate effects on these genes functions. Among which, a stop gained *pds* mutant was identified and confirmed by resequencing. *PDS* encodes a phytoene desaturase, which functions in the upstream of carotenoids biosynthesis. The results in the blocked biosynthesis of maize kernel carotenoids, which leads to the white kernels. The results indicate that RNA-seq is really an accurate and time saving way to identify the EMS-induced mutant genes in maize.

Keywords maize; transcriptome sequencing; EMS mutant; carotenoids; phytoene desaturase

玉米(*Zea mays* L.)起源于墨西哥巴拉斯山脉的大刍草,属禾本科(Gramineae)玉蜀黍族(Maydeae)玉蜀黍属(*Zea* L.)^[1],籽粒富含类胡萝卜素。类胡萝卜素属于天然植物色素,参与植物光合作用中的电子传递,而且是重要的光保护剂^[2-3]。对人体来说,类胡萝卜素是重要的维生素 A 原和抗氧化剂来源^[4],在维持人体健康上起关键作用。因此,克隆玉米籽粒类胡萝卜素相关基因不仅有助于理解玉米籽粒类胡萝卜素合成的生物学机理,还有

助于玉米籽粒类胡萝卜素的生物强化育种。典型的类胡萝卜素是 8 个异戊二烯单位首尾相连缩合而成的 C₄₀ 四萜类色素^[5],其代谢途径在拟南芥中已有清楚的研究^[6]。类胡萝卜素的合成前体为质体中甲基赤藓-4-磷酸(MEP)途径合成的异戊二烯焦磷酸(IPP)和二甲烯丙基焦磷酸(DMAPP)^[7]。IPP 和 DMAPP 在牻牛儿苗基牻牛儿苗焦磷酸合成酶(GGPPS)的催化下合成牻牛儿苗基牻牛儿苗焦磷酸(GGPP),为类胡萝卜素的合成提供前体。GGPP

收稿日期: 2019-07-31

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671697)

第一作者: 付修义,博士研究生, E-mail: fuxiuyi@cau@163.com

通讯作者: 杨小红,教授,主要从事玉米基因组研究, E-mail: yxiaohong@cau.edu.cn

在八氢番茄红素合成酶(PSY)的作用下缩合形成八氢番茄红素,并进一步通过八氢番茄红素去饱和酶(PDS)和 ζ -胡萝卜素去饱和酶(ZDS)的连续去饱和反应生成番茄红素。在此基础上,经过多种酶的催化可以衍生出多种类型的类胡萝卜素^[8]。然而,到目前为止,玉米中只克隆了少数几个控制籽粒类胡萝卜素含量的基因,例如 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)^[9]、番茄红素 ϵ 环化酶(LCYE)^[10]、八氢番茄红素合成酶(PSY)^[11]和类胡萝卜素 β -羟化酶(crtRB1)^[12]等基因。

图位克隆是玉米质量性状和数量性状基因克隆的重要方法,但玉米基因组较大、重复序列多且结构复杂^[13-14],不利于重组断点的鉴定,进而增加图位克隆的难度。随着高通量测序技术的发展及其成本的降低,基于二代测序和生物信息学的基因克隆技术应运而生。二代测序(NGS)是测序技术的一次革新,最早出现在 2004 年,至今已经发展了多种测序平台,如罗氏 454 公司的 GSFLX,ABI 公司的 SOLiD,Thermo 公司的 Ion S5 540 以及 Illumina 公司的 HiSeq X Ten 和 NovaSeq^[15]。Ng 等^[16]最早运用外显子测序鉴定出人类孟德尔遗传疾病米勒综合症的致病基因 *DHODH*。此后,对突变体和野生型进行直接高通量测序成为鉴定突变基因的重要方法。例如,Ng 等^[17]利用外显子测序确定了弗里曼谢尔登综合症的致病基因 *MYH3*; Ashelford 等^[18]利用基因组重测序成功克隆了拟南芥中引起节律改变的突变基因 *AtNFXL-2*; Ale 等^[19]利用基因组重测序克隆了日本骨干水稻栽培品种 Hitomebore 淡绿色叶片及半矮生数量性状微效基因。这些研究表明高通量二代测序为质量性状和数量性状的基因克隆提供了新的契机。

根据测序对象,二代测序可分为全基因组测序、转录组测序和外显子测序^[20]。一般而言,全基因组重测序因数据中包含大量基因间区和内含子序列,在相同数据量的条件下测序覆盖度较低,这不仅增加了处理数据的难度,同时也影响数据的准确性。相对于全基因组测序,外显子测序只鉴定外显子上的变异位点,成本较低且覆盖度高,但该技术不能鉴定非翻译区(UTR)的变异位点及可变剪切导致的变异^[21]。转录组测序不依赖于物种全基因组信息,能够准确快速地获取植物全转录本序列信息,包括 UTR、编码区的变异位点及可变剪切信息^[22]。应用转录组测序技术了解基因的表达、完成基因功能的

注释、挖掘单核苷酸多态性(SNP)标记等是当前的研究热点^[23]。例如,在玉米中应用转录组测序进行新基因的挖掘、SNP 标记的开发和代谢网络研究等^[24-26]。EMS 诱变可以使单核苷酸发生突变,且多数发生在基因的外显子区段^[27]。当编码区单核苷酸发生突变,可导致基因编码的氨基酸序列改变,从而影响蛋白质的功能。因此,对 EMS 突变体进行转录组测序,结合生物信息学分析可鉴定 EMS 突变体的突变位点,进而确定控制突变表型的候选基因。当前,应用转录组测序鉴定玉米突变基因的研究鲜有报道。本研究以玉米自交系 B73 籽粒白化突变体为材料,利用转录组测序方法鉴定突变基因,旨在为转录组测序在玉米质量性状基因克隆方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

在玉米自交系 B73 的 EMS 突变体库^[28]中,通过对玉米黄白籽粒突变表型的筛选获得了玉米籽粒白色突变体 *ems0547*。2016 年种植于中国农业大学海南南繁基地,选取自交后代果穗发生黄白粒分离的果穗,将杂合果穗上表型正常的黄色籽粒于 2017 年种植于中国农业大学北京上庄实验站,自交授粉。授粉后 15 d,检测果穗籽粒颜色的分离情况,对表现黄白分离的果穗按籽粒颜色分别取样,同时取相同发育时期的 B73 籽粒,置于 -80 °C 的冰箱中冷冻保存。

1.2 表型观测和卡方检验

将 *ems0547* 自交后代中籽粒发生颜色分离的果穗脱粒,鉴定籽粒颜色(黄/白),按籽粒颜色计数,进行卡方检验,判断突变性状是否由单基因控制。

1.3 RNA 提取和转录组测定

使用北京天根生化科技有限公司的多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(DP441)提取授粉后 15 d 黄白分离果穗上的白色籽粒和 B73 籽粒的总 RNA。将白色籽粒的总 RNA 送至北京诺禾致源公司进行建库和转录组测序。建库使用 NEB Next® Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina 试剂盒(E7530),测序使用 Illumina 公司的 HiSeq X Ten 测序平台。

1.4 突变位点的检测

首先利用 STAR^[29]建立索引,即构建测序片段的比对模板,这里使用 B73 参考基因组序列(ftp://

ftp. gramene. org/pub/gramene/release-58/fasta/zea_mays)建立索引。使用 STAR 将原始测序数据与索引进行比对(gff3 文件下载地址:ftp://ftp.ensemblgenomes. org/pub/plants/release-31/gff3/zea_mays/, 版本号为:AGPv3. 31), 组装高通量测序数据,得到完整的储存转录组序列的 sam 文件。用 samtools^[29]将 sam 文件转换为易于处理的二进制 bam 文件,并过滤掉可比对到基因组多个位置的 reads,仅保留与基因组唯一比对的 reads。将 bam 文件进行进一步过滤,去除测序深度<5 的 reads,保证测序的准确性。最终用 SnpEff (http://snpeff. sourceforge. net/) 进行注释,注明 SNP calling 得到的突变位点的突变类型、在基因组上的位置和碱基变化等信息。

1.5 候选基因的确定

首先对突变位点所在的基因进行基于 MapMan (http://mapman. gabipd. org/)的基因功能分类和基于 Gramene 网站 (http://ensembl. gramene. org/)的基因功能注释。选择对基因功能可能产生较大影响的突变类型,这里以 SnpEff 说明书 (http://snpeff. sourceforge. net/VCFannotationformat_v1. 0. pdf) 给出的不同突变类型对基因功能的影响程度为依据,选择影响等级为 high 或 moderate 的突变类型,包括提前终止 (Stop gained) 和错义突变 (Missense variant) 等,并将这些具有 high/moderate 的突变基

因作为初步候选基因,对初步候选基因进行基因注释,确定突变基因的具体功能。根据 MapMan 的分类结果,筛选到与类胡萝卜素合成代谢途径有关的基因,在 Gramene 中进一步查询候选基因在玉米中的相关功能,并以水稻和拟南芥中的同源基因作为参考,确定候选基因。最后,在候选基因参考序列上标注出突变位点的具体位置及突变情况,与候选基因的编码区(CDS 区)进行序列比对,确保突变位点在 CDS 区内,并对突变序列进行翻译,探明氨基酸的变化情况。当翻译发生提前终止或氨基酸的极性或酸性碱性发生改变时,蛋白质的功能可能会受到影响。

1.6 突变位点的验证和目的基因表达量的测定

利用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ 反转录试剂盒将突变体和野生型 B73 授粉后 15 d 籽粒的总 RNA 反转录成 cDNA。利用 Primer5 (http://www. premierbiosoft. com/) 在突变位点两侧设计合适的引物(表 1),以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,凝胶电泳验证合格后送至北京奥科鼎盛公司进行测序验证。同时,为检测突变体和野生型 B73 之间候选基因的表达量是否发生变化,使用 TaKaRa 公司的 TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒对突变体和野生型授粉后 15 d 籽粒的表达量进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR),所用引物见表 1。

表 1 本研究所用引物序列信息
Table 1 List of primers used in this study

项目 Item	引物名称 Name of primer	引物序列(5'~3') Sequence of primer (5'-3')
重测序验证 Resequencing verification	<i>pds-F</i> <i>pds-R</i>	GATTTTCCAAGACCTCCA AAACCTCATCGTTACCC
实时荧光定量 PCR qRT-PCR	<i>qpds-F</i> <i>qpds-R</i>	CTGGAGAAGTTGGTGGGA CATTGAACGGTTTGGGTC

2 结果与分析

2.1 突变体 *ems0547* 的表型特征与遗传分析

突变体 *ems0547* 与野生型 B73 对比,籽粒与幼苗表型差异显著(图 1)。野生型 B73 籽粒表现为正常的黄色,而突变体籽粒则表现为明显的白化(图 1(a))。种子萌发后,突变体 *ems0547* 幼苗叶片完全白化,易枯

萎;茎叶发育迟缓,茎基部纤细;根系弱小,侧根未分化,只有主根。由此可见,相较于野生型 B73, *ems0547* 整体发育迟缓,植株生长力弱(图 1(b))。
对 4 个杂合果穗的黄白籽粒进行统计分析,发现黄色和白色的籽粒数呈现 3 : 1 分离(黄色籽粒 : 白色籽粒, $\chi^2 < \chi^2_{0.05} = 3.84; P > 0.05$; 表 2)。这表明该突变籽粒的白化由隐性单基因控制。



(a) B73 和 *ems0547* 籽粒的颜色特征 (Bar=1 cm); (b) B73 和 *ems0547* 幼苗特征 (Bar=1 cm)
(a) Kernel phenotypes of B73 and *ems0547*; (b) Seedling phenotypes of B73 and *ems0547*
图 1 玉米自交系野生型 B73、突变体 *ems0547* 籽粒 (a) 和幼苗 (b) 的特征
Fig. 1 The kernel and seedling phenotypes of B73 (a) and *ems0547* (b)

表 2 杂合果穗黄白籽粒的卡方检验

Table 2 Chi-square test for the number of yellow-white seeds from heterozygous ears

材料编号 ID	黄色籽粒数量 Yellow kernel number	白色籽粒数量 White kernel number	卡方值 χ^2	P 值 P-value
35-1	181	69	0.901	0.342
36-2	186	63	0.012	0.913
36-7	182	48	2.093	0.148
37-1	181	72	1.614	0.204

2.2 突变位点的筛选及其特征

对突变体 *ems0547* 授粉后 15 d 的籽粒进行 RNA-seq, 共获得 11.65 G clean data (7.8×10^7 bp clean data, Accession Number: SRP161537), 测序深度为 72×。将得到的 clean reads 与玉米 B73 参考基因组数据进行比对分析, total mapped reads 为 68 336 468 个, 占总 clean reads 的 88%, 其中 multiple mapped 占 3.58%, uniquely mapped 占 84.43%, 85.5% 的 clean reads 比对到基因的外显子区。在此基础之上, 与 B73 参考序列进行比对, 共鉴定到 138 个 SNP。对这些 SNP 进行进一步序列特征分析, 发现 51 个可能对基因功能产生影响的 SNP。其中 98% 的 SNP 为错义突变 (50/51), 2% 的 SNP 为提前终止 (1/51)。这些 SNP 所在基因可 作为该突变体的初步候选基因。

2.3 候选基因的确定

利用 MapMan 对 51 个发生错义突变或提前终止的 SNP 所在的基因进行功能分类, 可分为 12 大类 (图 2)。其中, 在次级代谢 (Secondary

metabolism) 这一功能类别中, *Zm00001d027936* 编码八氢番茄红素去饱和酶 (phytoene desaturase, PDS), 是类胡萝卜素合成代谢途径中的关键酶基因, 催化八氢番茄红素生成 ζ -胡萝卜素 (图 3(a))^[30]。八氢番茄红素为无色物质, 番茄红素是整个类胡萝卜素合成过程中产生的第一个有色类胡萝卜素^[31]。已有研究显示, 番茄 PDS 基因功能丧失, 番茄红素合成受阻, 进而影响类胡萝卜素的生物合成过程^[32]。因此, *Zm00001d027936* 可视为突变体中影响籽粒白化的候选基因。

PDS 基因在玉米中有 9 个转录本 (图 3(b)), 除 T004、T008 和 T009 外, 其余 6 个转录本均包含胺氧化酶 (amine oxidase) 功能域。其中 T001、T002、T003 和 T005 能编码完整的 PDS 蛋白, 而 T004、T006、T007、T008 和 T009 不能编码完整的 PDS 蛋白。将突变位点比对到能编码完整 PDS 蛋白的 4 个转录本上, 发现该突变位点能够将编码谷氨酰胺的密码子 CAG 突变为终止密码子 TAG。各转录本在合成一段较短的多肽链后翻译即终止,

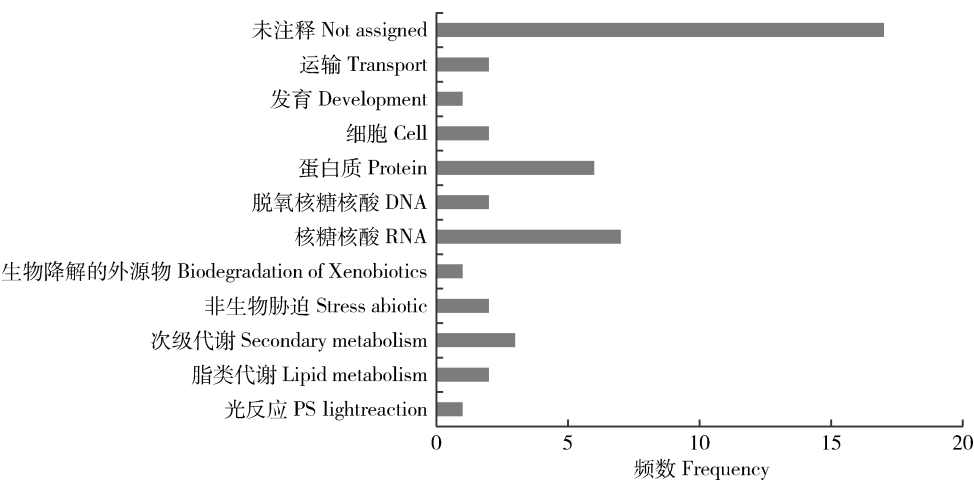


图 2 51 个基因的功能分类

Fig. 2 Functional classification of 51 genes

使 *PDS* 蛋白质的功能完全丧失。在拟南芥中的研究表明：*PDS3* 突变之后至少影响 20 种代谢途径，包括类胡萝卜素、叶绿素和赤霉素等生物合成。这些代谢物的变化可导致拟南芥幼苗发育迟缓、植株矮化和叶片白化^[33]。玉米突变体 *ems0547* 的幼苗表现与拟南芥 *pds3* 突变体类似，即幼苗长势弱、叶片白化(图 1(b))。这些结果进一步说明 *PDS* 基因突变是突变体 *ems0547* 籽粒白化的原因。

对突变位点在 B73 和突变体中进行了重测序验证(图 3(c)和(d))。重测序结果与转录组测序的结果一致，验证了突变位点存在的真实性，进而证明转录组测序的准确性以及利用转录组测序方法对玉米 EMS 突变体的突变基因进行快速定位的可行性。

对 *PDS* 基因进行 RT-qPCR 检测，发现野生型和突变型 *PDS* 基因表达量的差异不显著($t < t_{0.05} = 2.776, P > 0.05$)(图 4)，表明突变体 *ems0547* 中 *PDS* 基因的突变不会影响该基因的表达水平，进一步证实 *PDS* 基因外显子上单碱基的突变是该基因的突变位点。

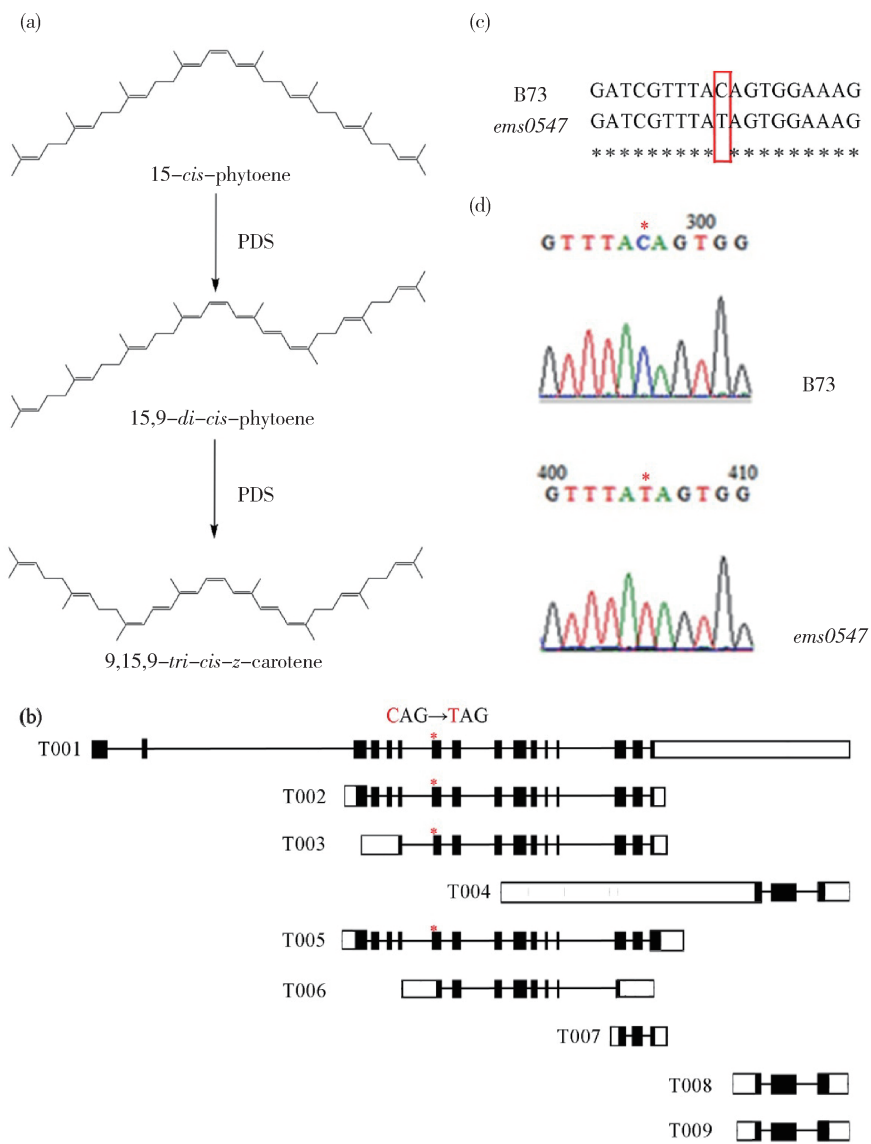
3 讨 论

3.1 转录组测序在鉴定 EMS 突变基因上的应用

EMS 突变体的突变位点多为外显子区域的单碱基替换^[27]。转录组测序的测序目标为全转录组，鉴定的变异位点集中在外显子和 UTR 区，适合于玉米 EMS 突变体突变位点的鉴定。相对于经典的图位克隆方法，结合 EMS 突变体的转录组测序无

需构建定位群体、开发作图标记、构建遗传连锁图谱、筛选重组单株等，不仅缩短了突变基因的鉴定时间，还降低了突变基因鉴定的成本。例如，在玉米突变体基因鉴定方面，往往需要利用 F₂ 群体，该群体的构建至少需要 1.5 年，而结合 EMS 突变体的转录组测序只要 0.5 年即可取样测序，如果所用的组织为叶片，时间更短。此外，当目标基因位于重组率较低的基因组区域，利用图位克隆方法往往很难精细定位到单个基因的水平，但结合 EMS 突变体的转录组测序能直接筛选到突变位点。最后，由于玉米 B73 的全基因组序列已被测定，对于以 B73 为背景的玉米 EMS 突变体，只需要对突变样本进行测定即可鉴定突变基因。因此，转录组测序是鉴定玉米 EMS 突变体突变位点的一种有效的方法，并可作为其他作物 EMS 突变体突变位点的鉴定提供借鉴。

尽管如此，当参考基因组中没有目标基因的序列或目标基因的表达量很低时，或者当候选基因为未知基因或代谢途径尚未研究清楚时，结合 EMS 突变体的转录组测序可能很难鉴定到突变位点。另外，转录组测序可直接用于其他类型突变体突变位点的鉴定。例如，玉米 Mu 突变体中发生大片段插入/缺失(InDel)突变。对于这些突变体，基于分离群体转录组测序(BSR-Seq)技术是一种比较可行的快速方法。Tang 等^[34]利用 BSR-Seq 分析将玉米木质素相关基因 *BM2* 定位到第 1 染色体的 289 ~ 291 Mb，并最终将突变基因确定为亚甲基四氢叶酸还原酶基因(*HTHFR*)。Liu 等^[35]利用 BSR-Seq



(a) PDS 参与的催化反应。在 PDS 关键酶的催化作用下,15-顺式-八氢番茄红素经连续两步 PDS 的催化最终生成 9,15,9'-三-顺式- ζ -胡萝卜素。(b) PDS 的基因结构图。星号表示突变位点。T001-T009 分别为 PDS 基因的 9 个不同转录本。(c) 野生型 B73 和突变体 *ems0547* 的序列比较。(d) 重测序验证的测序峰星号表示突变位点。

(a) The catalytic reactions by PDS. The PDS enzyme catalyzes 15-*cis*-phytoene to produce 9,15,9'-*tri-cis*- ζ -carotene with two consecutive steps of reaction. (b) Gene structure of PDS. The red stars refer to the mutation site. T001-T009 are 9 different transcripts of PDS gene, respectively. (c) Sequence comparison of the mutation site in wild type and *ems0547*. (d) The sequence profiles in sequence validation The red stars refer to the mutation site.

图 3 PDS 参与的催化反应、基因结构和重测序验证

Fig. 3 The catalytic reactions by PDS, gene structure of PDS and resequencing verification

分析验证了玉米蜡质基因 *GL3* 突变之后使玉米叶片形成表皮蜡质。但是,这种方法往往只把目标基因定位在一个区间,还需结合其他方法确定候选基因。

3.2 PDS 基因与玉米籽粒颜色的相关

类胡萝卜素的累积使玉米籽粒由无色变为有色^[36],玉米籽粒的颜色与籽粒胚乳中不同类胡萝卜

素的含量有关,各类胡萝卜素组分及其含量的差异使籽粒发生从浅黄到深橙的颜色变化^[37]。玉米籽粒颜色与总类胡萝卜素含量呈现中度正相关,颜色较浅的玉米籽粒类胡萝卜素的含量一般少于颜色较深的籽粒^[10]。相较于黄色的玉米籽粒,白色籽粒具有最低水平的类胡萝卜素含量^[38]。因此玉米籽粒由白色变为黄色可以反映玉米籽粒类胡萝卜素的

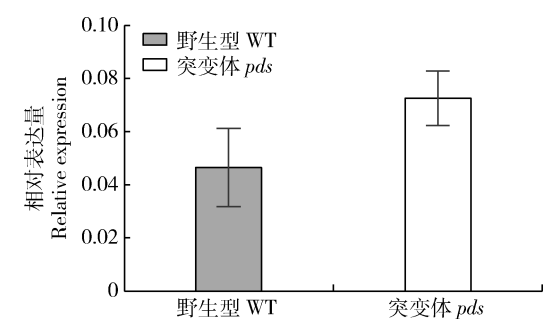


图 4 野生型 B73 和突变体 *ems0547* 授粉后 15 d 籽粒的 *PDS* 表达量

Fig. 4 Expression pattern of *PDS* in B73 and *ems0547*

积累。

目前,*PDS* 基因已经在多种藻类、高等植物中克隆出来,在植物体内以单拷贝形式存在,其编码的蛋白定位于叶绿体的类囊体上^[39]。本研究结合 EMS 突变体和转录组测序鉴定了控制玉米籽粒颜色的基因 *PDS*,该基因发生突变,籽粒颜色变白,同时苗期叶片变白。这种表型与类胡萝卜素代谢途径种的八氢番茄红素合成酶基因 *PSY1* 发生突变的表型一致。*PSY1* 编码类胡萝卜素合成的第一步限速酶,功能缺失后导致八氢番茄红素的急剧下降,进而影响下游类胡萝卜素的合成,在玉米中表现籽粒和叶片双白化的表型^[40]。同时,由于番茄红素的合成与类胡萝卜素、叶绿素和赤霉素等多种代谢物的合成相关,*PDS* 基因的突变影响 20 个多个代谢途径,进而影响植株的生长发育^[33]。

4 结 论

本研究对 EMS 突变体 *ems0547* 授粉后 15 d 的白色籽粒进行转录组测序,与玉米 B73 参考基因组序列比对,共获得 138 个突变位点。通过评估突变位点对基因功能影响的大小,最终筛选得到 51 个显著影响基因功能的突变位点。结合突变体的表型、突变位点所在基因的功能以及突变位点对基因功能的影响程度,最终确定编码八氢番茄红素去饱和酶基因 *PDS* 提前终止突变导致玉米突变体 *ems0547* 籽粒白化。该研究结果证实了利用转录组测序技术在玉米 EMS 突变体突变基因定位上应用的可行性。

参考文献 References

[1] 刘纪麟. 玉米育种学[M]. 北京:农业出版社,1991

Liu J L. *Maize Breeding* [M]. Beijing: Agricultural Press, 1991 (in Chinese)

[2] Sandmann G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1994, 223(1): 7-24

[3] Niyogi K K. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches [J]. *Annual Review in Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 1999, 50(50): 333-359

[4] Goff S A, Klee H J. Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value[J]. *Science*, 2006, 311(5762): 815-819

[5] 王纪报. 类胡萝卜素合成酶基因 *PSY* 及 *HIV-1 gp120* 基因对水稻的遗传转化[D]. 长春: 吉林大学, 2006

Wang J B. Genetic transformation of rice with carotenoid synthase gene *PSY* and *HIV-1 gp120* gene [D]. Changchun: Jilin University, 2006 (in Chinese)

[6] Ruizola M Á, Rodríguezconcepción M. Carotenoid biosynthesis in Arabidopsis: A colorful pathway [J]. *Arabidopsis Book*, (2012-01-19) DOI: 10. 1199/tab. 0158

[7] Lange B M, Rujan T, Martin W, Croteau R. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes [J]. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 2000, 97(24): 13172-13177

[8] Breitenbach J, Sandmann G. ζ -Carotene *cis* isomers as products and substrates in the plant poly-*cis* carotenoid biosynthetic pathway to lycopene [J]. *Planta*, 2005, 220(5): 785-793

[9] Vallabhaneni R, Bradbury L M, Wurtzel E T. The carotenoid dioxygenase gene family in maize, sorghum, and rice [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2010, 504(1): 104-111

[10] Harjes C E, Rocheford T R, Bai L, Brutnell T P, Kandianis C B, Sowinski S G, Stapleton A E, Vallabhaneni R, Williams M, Wurtzel E T, Yan J, Buckler E S. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification [J]. *Science*, 2008, 319(5861): 330-333

[11] Shumskaya M, Bradbury L M, Monaco R R, Wurtzel E T. Plastid localization of the key carotenoid enzyme phytoene synthase is altered by isozyme, allelic variation, and activity [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(9): 3725-3741

[12] Yan J, Kandianis C B, Harjes C E, Bai L, Kim E H, Yang X, Skinner D J, Fu Z, Mitchell S, Li Q, Fernandez M G, Zaharieva M, Babu R, Fu Y, Palacios N, Li J, Dellapenna D, Brutnell T, Buckler E S, Warburton M L, Rocheford T. Rare genetic variation at *Zea mays crtRBI* increases β -carotene in maize grain [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(4): 322

[13] Schnable P S, Ware D, Fulton R S, Stein J C, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves T A, Minx P, Reily A D, Courtney L, Kruchowski S S, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock S M, Belter E, Du F, Kim K, Abbott R M, Cotton M, Levy A, Marchetto P, Ochoa K, Jackson S M, Gillam B, Chen W, Yan L, Higginbotham J,

- Cardenas M, Waligorski J, Applebaum E, Phelps L, Falcone J, Kanchi K, Thane T, Scimone A, Thane N, Henke J, Wang T, Ruppert J, Shah N, Rotter K, Hodges J, Ingenthron E, Cordes M, Kohlberg S, Sgro J, Delgado B, Mead K, Chinwalla A, Leonard S, Crouse K, Collura K, Kudrna D, Currie J, He R, Angelova A, Rajasekar S, Mueller T, Lomeli R, Scara G, Ko A, Delaney K, Wissotski M, Lopez G, Campos D, Braidotti M, Ashley E, Golser W, Kim H, Lee S, Lin J, Dujmic Z, Kim W, Talag J, Zuccolo A, Fan C, Sebastian A, Kramer M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, Miller B, Ambroise C, Muller S, Spooner W, Narechania A, Ren L, Wei S, Kumari S, Faga B, Levy M J, McMahan L, VanBuren P, Vaughn M W, Ying K, Yeh C T, Emrich S J, Jia Y, Kalyanaraman A, Hsia A P, Barbazuk W B, Baucom R S, Brutnell T P, Carpita N C, Chaparro C, Chia J M, Deragon J M, Estill J C, Fu Y, Jeddeloh J A, Han Y, Lee H, Li P, Lisch D R, Liu S, Liu Z, Nagel D H, McCann M C, San Miguel P, Myers A M, Nettleton D, Nguyen J, Penning B W, Ponnala L, Schneider K L, Schwartz D C, Sharma A, Soderlund C, Springer N M, Sun Q, Wang H, Waterman M, Westerman R, Wolfgruber T K, Yang L, Yu Y, Zhang L, Zhou S, Zhu Q, Bennetzen J L, Dawe R K, Jiang J, Jiang N, Presting G G, Wessler S R, Aluru S, Martienssen R A, Clifton S W, McCombie W R, Wing R A, Wilson R K. The B73 Maize genome: Complexity, diversity, and dynamics[J]. *Science*, 2009, 326(5956): 1112-1115
- [14] Jiao Y, Peluso P, Shi J, Liang T, Stitzer M C, Wang B, Campbell M S, Stein J C, Wei X, Chin C S, Guill K, Regulski M, Kumari S, Olson A, Gent J, Schneider K L, Wolfgruber T K, May M R, Springer N M, Antoniou E, McCombie W R, Presting G G, McMullen M, Ross-Ibarra J, Dawe R K, Hastie A, Rank D R, Ware D. Improved maize reference genome with single-molecule technologies[J]. *Nature*, 2017, 546(7659): 524-527
- [15] Goodwin S, McPherson J D, McCombie W R. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17(6): 333-351
- [16] Ng S B, Buckingham K J, Lee C, Bigham A W, Tabor H K, Dent K M, Huff C D, Shannon P T, Jabs E W, Nickerson D A, Shendure J, Bamshad M J. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder[J]. *Nature Genetics*, 2016, 42(1): 30
- [17] Ng S B, Turner E H, Robertson P D, Flygare S D, Bigham A W, Lee C, Shaffer T, Wong M, Bhattacharjee A, Eichler E E, Bamshad M, Nickerson D A, Shendure J. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes[J]. *Nature*, 2009, 461(7261): 272
- [18] Ashelford K, Eriksson M E, Allen C M, D'Amore R, Johansson M, Gould P, Kay S, Millar A J, Hall N, Hall A. Full genome re-sequencing reveals a novel circadian clock mutation in *Arabidopsis*[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(3): 28
- [19] Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, Matsumura H, Yoshida K, Mitsuoka C, Tamiru M, Innan H, Cano L, Kamoun S, Terauchi B. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap[J]. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(2): 174-178
- [20] 张全芳, 李军, 范仲学, 杨连群, 步迅. 高通量测序技术在农业研究中的应用[J]. *山东农业科学*, 2013, 45(1): 137-140
- Zhang Q F, Li J, Fan Z X, Yang L Q, Bu X. Application of high-throughput sequencing technology in agricultural research[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2013, 45(1): 137-140 (in Chinese)
- [21] 陆才瑞, 邹长松, 宋国立. 高通量测序技术结合正向遗传学手段在基因定位研究中的应用[J]. *遗传*, 2015, 37(8): 765-776
- Lu R C, Zhou C S, Song G L. Application of high-throughput sequencing technology combined with forward genetics in gene mapping research[J]. *Genetics*, 2015, 37(8): 765-776 (in Chinese)
- [22] 时小东, 朱学慧, 盛玉珍, 庄国庆, 陈放. 基于转录组序列的楠木 SSR 分子标记开发[J]. *林业科学*, 2016, 52(11): 71-78
- Shi X D, Zhu X H, Sheng Y Z, Zhuang G Q, Chen F. Development of SSR molecular markers based on transcriptome sequences in Nanmu[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016, 52(11): 71-78 (in Chinese)
- [23] 贾昌路, 张瑶, 朱玲, 张锐. 转录组测序技术在生物测序中的应用研究进展[J]. *分子植物育种*, 2015, 13(10): 2388-2394
- Jia C L, Zhang Y, Zhu L, Zhang R. Application of transcriptome sequencing technology in biological sequencing[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, 13(10): 2388-2394 (in Chinese)
- [24] Vega-Arreguín J C, Ibarra-laclette E, Jiménez-Moraila B, Martínez O, Vielle-Calzada J P, Herrera-Estrella L, Herrera-Estrella A. Deep sampling of the Palomero maize transcriptome by a high throughput strategy of pyrosequencing[J]. *BioMed Central Genomics*, 2009, 10(1): 1-10
- [25] Barbazuk W B, Emrich S J, Chen H D, Li L, Schnable P S. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2010, 51(5): 910-918
- [26] Li P, Ponnala L, Gandotra N, Wang L, Si Y, Tausta S L, Kebrom T H, Provart N, Patel R, Myers C R, Reidel E J, Turgeon R, Liu p, Sun Q, Nelson T, Brutnell T P. The developmental dynamics of the maize leaf transcriptome[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(12): 1060-1067
- [27] 邱福林. EMS 诱变及稻瘟病候选基因功能研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2007
- Qiu F L. Study on the function of EMS mutagenesis and rice blast candidate genes[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [28] Lu X, Liu J, Ren W, Yang Q, Chai Z, Chen R, Wang L, Zhao J, Lang Z, Wang H, Fan Y, Zhao J, Zhang C. Gene-indexed mutations in maize[J]. *Molecular Plant*, 2018, 11(3): 496-504
- [29] Engström P G, Steijger T, Sipos B, Steijger T, Sipos B, Grant G R, Kahles A, The RGASP Consortium, Ratsch G, Goldman N,

- Hubbard T J, Harrow J, Guigó R, Bertone P. Systematic evaluation of spliced alignment programs for RNA-seq data [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(12): 1185
- [30] Bartley G E, Scolnik P A. Plant carotenoids; Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health[J]. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 1027-1038
- [31] Isaacson T, Hirschberg J. Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of beta-carotene and xanthophylls in plants[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(2): 333-342
- [32] Simkin A J, Labouré A M, Kuntz M, Sandmann G. Comparison of carotenoid content, gene expression and enzyme levels in tomato (*Lycopersicon esculentum*) leaves[J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 2003, 58(5-6): 371
- [33] Qin G, Gu H, Ma L, Peng Y, Deng X W, Chen Z, Qiu L. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis[J]. *Cell Research*, 2007 (5): 471-482
- [34] Tang H M, Liu S, Hill-Skinner S, Wu W, Reed D, Yeh C T, Nettleton D, Schnable P S. The maize brown midrib2 (bm2) gene encodes a methylenetetra hydrofolate reductase that contributes to lignin accumulation[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2014, 77(3): 380
- [35] Liu S, Yeh C T, Tang H M, Nettleton D, Schnable P S. Gene mapping via bulked segregant RNA-Seq (BSR-Seq) [J]. *PLoS One*, (2012-05-07) DOI:10.1371/journal.pone.0036406
- [36] Palaisa K, Morgante M, Tingey S, Rafalski A. Long-range patterns of diversity and linkage disequilibrium surrounding the maize Y1 gene are indicative of an asymmetric selective sweep [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(26): 9885
- [37] Weber E J. Carotenoids and tocopherols of corn grain determined by HPLC[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1987, 64(8): 1129-1134
- [38] Kandianis C. Genetic dissection of carotenoid concentration and compositional traits in maize grain[D]. Urbana-Champaign: University of Illinois, 2009
- [39] Grünwald K, Eckert M, Hirschberg J, Hagen C. Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyceae) [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122(4): 1261-1268
- [40] Buckner B, Miguel P S, Janickbuckner D, Bennetzen J T. The *yl* gene of maize codes for phytoene synthase [J]. *Genetics*, 1996, 143(1): 479-488

责任编辑：吕晓梅