

中国小麦微核心种质资源 *Psy* 基因的等位变异

蔡华^{1,2}, 马传喜², 司红起², 乔玉强²

(1 滁州学院化学与生命科学系, 安徽 滁州 239000; 2 安徽农业大学农学院, 安徽 合肥 230036)

摘要: 根据已发表的麦族植物 *Psy* 基因序列的保守区设计引物 *Psy02*, 克隆小麦 *Psy* 基因 (片段)。结果表明, *Psy02* 引物的扩增产物出现 2 种带型: 196 bp 和 233 bp, 序列分析表明两条特异条带涵盖了小麦 *Psy* 基因第 2 外显子全部序列, 相差的 37 bp 为 *Psy* 基因第 2 内含子中的一段插入序列, 可反映不同黄色素含量 (YPC), 属小麦 *Psy* 基因的等位变异。验证试验表明, 248 份小麦微核心种质中有 153 份材料 (占样品数的 65.7%) 扩增出 196 bp 条带, 群体内 YPC 均值 7.314 mg kg⁻¹, 属高 YPC 范畴; 另有 95 份材料 (占样品总数的 38.3%) 扩增出 233 bp 条带, 群体内 YPC 均值为 5.207 mg kg⁻¹, 属低 YPC 范畴, 方差分析表明二者 YPC 差异达 1% 极显著水平差异, 说明上述 37 bp 的插入序列是导致小麦品种间 YPC 产生差异的原因之一, 因此该引物扩增的 *Psy* 基因对小麦 YPC 具有显著影响, 引物 *Psy02* 是对小麦 YPC 进行分子鉴定的重要标记。

关键词: 小麦; 微核心种质; *Psy* 基因; 等位变异

中图分类号: Q 943

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2009) 05-408-07

Allelic Variation of *Psy* Gene in Chinese Wheat Micro-Core Collections

CAI Hua^{1,2}, MA Chuan-Xi^{2**}, SI Hong-Qi², QIAO Yu-Qiang²

(1 Department of Chemistry and Life Science, Chuzhou University, Chuzhou 239000, China;

2 College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Primer *Psy02* was designed according to conservative areas of *Psy* gene sequence of Triticum, and partial sequence of *Psy* gene of wheat was cloned. The results showed that, two different PCR products were amplified with 196 bp and 233 bp, both of which covered whole sequence of the second exon of wheat *Psy* gene, and the 37 bp difference between two bands was an insertion sequence of the second exon of *Psy* gene, which display different YPC in wheat. Verification test showed, that among 248 wheat micro core collections, 153 samples amplified 196 bp band while the rest samples amplified 233 bp band which accounted for 61.7% and 38.3% respectively. The YPC average value of 153 samples was 7.314 mg kg⁻¹ which belong to high YPC rang and that of 95 samples was 5.207 mg kg⁻¹ which belong to low YPC rang. Variance analysis showed that the YPC difference reached 1% significant level, which proved the 37 bp insertion sequence was one of the reasons of different YPC in cultivars, in a word, the YPC of wheat was significantly affected by the *Psy* gene and, primer *Psy02* was an important molecular marker to identifying YPC.

Key words: Wheat; Micro-Core collections; *Psy* gene; Allelic variation

普通小麦 (*Triticum aestivum* L. 2n = 6x = AA-BBDD) 籽粒黄色素 (Yellow Pigment, YP) 是造

成面粉白度下降的重要因素, 黄色素含量对蒸煮面食品的色泽以及小麦的营养品质等均具有显著

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD01A02), 公益性行业 (农业) 科研支项 (nyhyzx07-002) 和农业部 “引进国际先进农业科学技术” 项目 (2006-G2)

通讯作者: Author for correspondence; E-mail: machx@163.net; Tel: 0551-5786213

收稿日期: 2009-07-14, 2009-08-13 接受发表

作者简介: 蔡华 (1972-) 男, 博士研究生, 副教授, 主要从事小麦遗传育种研究。E-mail: caihua1721220@163.com

影响 (张立平等, 2006)。不同食品对面粉色泽的要求不同, 日本、东南亚和澳大利亚等国的通心面和加碱黄面条要求面粉黄色素含量较高, 而其他食品如面包、馒头和普通面条等却要求黄色素含量低, 这样才能生产出高白度的蒸煮面食 (孙道杰等, 2005)。

黄色素是由多种物质组成的混合物, 其主要成分是类胡萝卜素 (Naik 等, 2003; Sharp, 2001)。类胡萝卜素的生物合成是在八氢番茄红素合成酶 (Phytoene synthase, *Psy*) 作用下进行的, 此酶为类胡萝卜素生物合成途径中的首要限速酶 (Fraser 等, 2002; Galagher 等, 2004; R mer and Fraser, 2005), 其基因也是类胡萝卜素基因操作的首选基因。在禾谷类植物中, 黄色素最初是在黄玉米 (*Zea mays* L.) 的成熟籽粒中被发现的, 而白玉米中则没有 (Gallagher 等, 2004)。研究表明, 在不同环境下富含黄色素的黄玉米 (深黄色胚乳) 中 *Psy* 基因高剂量表达, 而在白玉米 (浅白色胚乳) 中却没有, 这一现象表明虽然环境对黄色素含量存在一定影响, 但基因型是其主要影响因素 (Miskelly, 1984), 同时黄色素含量表达量的差异也提示 *Psy* 基因存在等位变异, 这一点从近年来发表于 NCBI 网站上的大量玉米 *Psy* 等位基因序列已得到证明 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 序列号未列出)。然而迄今对小麦 *Psy* 基因的等位变异研究很少, 鉴于此, 本文在最近研究的基础上对小麦 *Psy* 基因的等位变异进行研究, 旨在明确小麦 *Psy* 基因与黄色素含量之间的关系, 为解释小麦黄色素生物合成的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试小麦品种 (系) 为安徽农业大学小麦育种与品质改良实验室的育种材料, 共 248 份遗传多样性丰富的小麦微核心种质资源, 于 2004~2005 两年分别种植于安徽农业大学试验农场 (合肥) 和校外试验基地 (凤阳)。

1.2 方法

1.2.1 小麦籽粒黄色素含量的测定 参照 AACC 方法, 称取 3.00 g 面粉加 15 ml 水饱和正丁醇, 反复振荡 1 h, 静置 10 min, 移上清液至离心管内, 4000 r min⁻¹ 下离心 10 min, 以水饱和正丁醇为对照, 436 nm 下测其吸光值, 3 次重复, 取其平均值乘以 30.1 作为黄色素含量 YPC 的数值 (AACC, 1995)。

1.2.2 小麦基因组 DNA 的提取 采用改良的单籽粒法, 取一粒饱满的小麦籽粒充分研碎后放入 1.5 ml 离心管中, 加入 700 μ l SDS 样品提取液 (0.288 mol L⁻¹ NaCl, 0.200 mol L⁻¹ Tris-HCl (pH8.0), 0.025 mol L⁻¹ EDTA, 0.5% SDS), 60 $^{\circ}$ C 水浴 45 min, 酚 + 氯仿 + 异戊醇 (25:24:1, V:V:V) 抽提蛋白, DNA 经异丙醇沉淀、乙醇漂洗后真空干燥, 1% 琼脂糖凝胶检测 DNA 浓度, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 引物设计和合成 参考 He 等 (2008) 的方法设计引物 *Psy*02, 交由上海 Sango 生物公司合成, 其序列为: Forward: 5'-GGACCTTGCTGATGACCGAG-3'; Reverse: 5'-TGACGGTCTGAAGTGAGAATGA-3'。

1.2.4 PCR 反应体系和扩增程序 优化的 PCR 反应体系总体积为 20 μ l, 各成分如下: 10 \times PCR 的 buffer (2.0 μ l)、2.5 mmol L⁻¹ 的 dNTP (0.8 μ l)、1 μ mol L⁻¹ 的 Forward Primerr 和 Reverse Primerr (各 5 μ l)、1 U 的 Taq DNA 聚合酶 (0.2 μ l)、2.5 mmol L⁻¹ 的 MgCl₂ (1.2 μ l)、50 ng DNA 模板、无菌去离子水 (补足至 20 μ l)。以上试剂均购自上海 Sango 生物工程公司。PCR 反应扩增程序如下 (以引物 *Psy*04 为例, 其它引物的反应条件依据引物设计时提供的退火温度适当调整): 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共循环 40 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离检测, 电泳缓冲液为 1 \times TAE 溶液, 100~120 V 电压电泳 1 h, 溴化乙锭 (EB) 染色, 凝胶成像系统扫描并保存图像。

1.2.5 PCR 扩增产物的测序及序列分析 PCR 扩增产物交由上海 Sango 生物工程公司纯化、测序 (每对引物的 PCR 扩增结果至少测序列 3 次以上, 以确保测序结果的正确性)。测序结果递交至 <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind> 网站进行基因结构预测, 并在 NCBI 网站上进行 BLAST 分析。利用 DNASTar 5.0 软件包的 EditSeq 程序对 BLAST 搜索结果中 E 值 $1e^{-20}$ 的各序列进行比对分析 (Li 等, 2006), 同时寻找被测序列的最大开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF), 并将 ORF 转换成氨基酸序列, 在 NCBI 网站对氨基酸序列进行 BLASTx 分析。

2 结果与分析

2.1 小麦籽粒黄色素含量的变异及分布

对供试材料 248 份中国小麦微核心种质的黄色素含量进行测定, 结果表明, 248 份实验材料的 YPC 变幅在 3.477~16.645 mg kg⁻¹ 之间, 平均含量为 6.472 mg kg⁻¹, 最高、最低 YP 含量相差 4.8 倍, 高于平均数的品种 109 个, 低于平均数的品种 139, 总体呈正态分布 (图 1), 品种间 YP 含量达极显著水平差异 (表 1)。

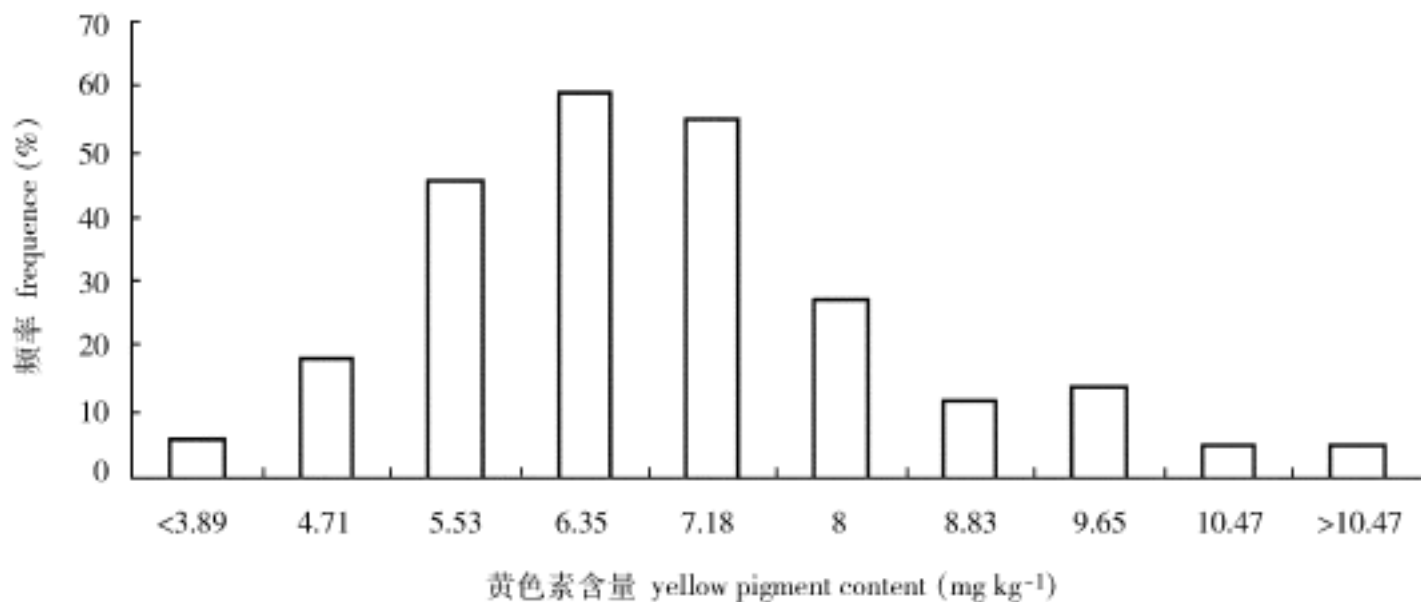


图 1 248 份普通小麦品种黄色素含量的分布频率

Fig . 1 Distribution of yellow pigment content in 248 wheat cultivars

表 1 248 份普通小麦黄色素含量的变异

Table 1 Variation of yellow pigment content in 248 wheat cultivars

变异来源 Source	自由度 DF	平方和 SS	均方 MS	F 值 F ratio	F _{0.05}	F _{0.01}
重复间 Repeat	1	0.32	0.32	4.55	3.94	6.9
品种间 Cultivar	247	7256.18	28.12	16.18**	1.48	1.73
误差 Error	247	4.48	0.02			
总变异 Total error	495	7260.98				

2.2 引物 Psy02 的 PCR 扩增结果

引物 Psy02 在黄色素含量不同的小麦品种中表现出多态性, 图 2 显示在 6 个高 YPC 品种中 (编号: ANW098, ANW268, ANW277, ANW261, ANW147 和 ANW146) 扩出一个小于 200 bp 的 PCR 产物, 而在 2 个低 YPC 品种中 (编号: ANW208 和 ANW291) 却扩出一条大于 200 bp 的特异条带, 表明该引物可能为小麦黄色素含量进行分子鉴定

的重要标记。

2.3 引物 Psy02 扩增产物的序列分析及 *Psy* 基因的等位变异

8 条 PCR 产物经回收纯化后测序, 结果表明 6 个高 YPC 品种扩增的片段其序列完全一致, 为 196 bp, 而 2 个低 YPC 品种扩增的基因片段其序列也完全一致, 为 233 bp, 两序列相差 37 bp (图 3)。DNAMAN 序列比对后发现, 两序列的第 2 ~ 52 bp

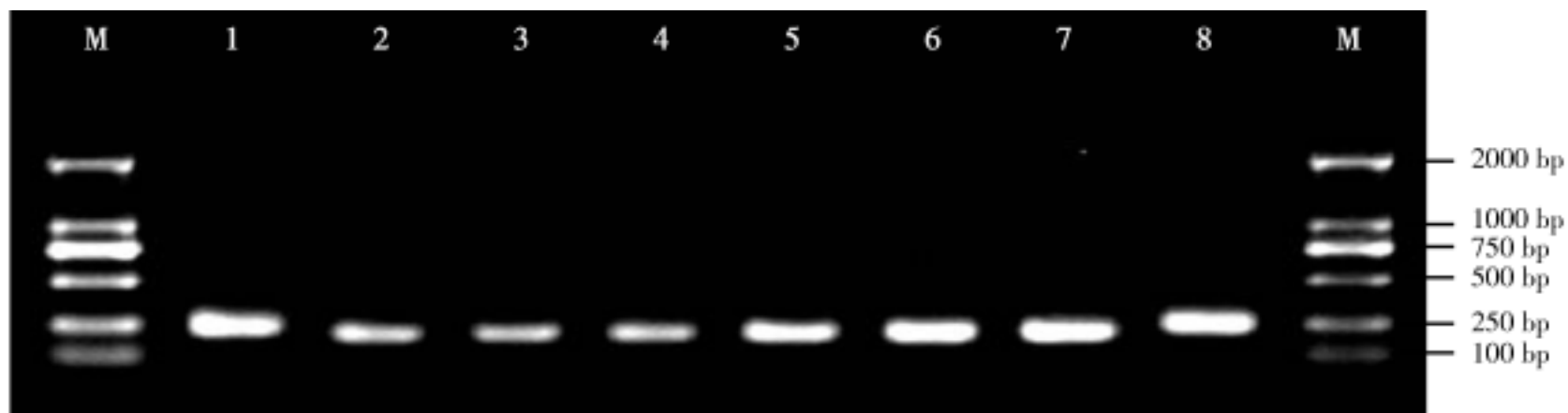


图 2 引物 Psy02 的 PCR 扩增结果

M: DNA 标准分子量; 1, 8: YP 含量低的小麦品种 (ANW208 和 ANW291); 2~7: YP 含量高的小麦品种 (ANW098, ANW268, ANW277, ANW261, ANW147 和 ANW146)

Fig . 2 Results of PCR amplification in primer Psy02

M: DNA marker; 1, 8: wheat cultivar (ANW208 and ANW291) with low YPC; 2~7: wheat cultivar (ANW098, ANW268, ANW277, ANW261, ANW147 and ANW146) with high YPC

Forward Primer		
Low YPC. seq	TGGACCTTGCTGATGACCGAGGAGCGGCGGCGCCATATGGGCCATCTACGGTA	55
EF600064-800-1030	-----	54
EU096090-1575-1768	-----	54
EU096091-579-772	-----	54
High YPC. seq	-----	55
EF600063-800-993	-----	54
Low YPC. seq	ATCTGAAAATTCGCCGCCATATGGGCCATCTACGGTAATCTGAAAATTCACCATG	110
EF600064-800-1030	-----	109
EU096090-1575-1768	-----.....-----	72
EU096091-579-772	-----.....-----	72
High YPC. seq	-----.....-----	73
EF600063-800-993	-----.....-----	72
Low YPC. seq	CCTGGTTTGGACCCTCCATTGTTGCTCCCCTGTTGTGGTATCAGTATGTGTCACA	165
EF600064-800-1030	-----	164
EU096090-1575-1768	-----	127
EU096091-579-772	-----	127
High YPC. seq	-----	128
EF600063-800-993	-----	127
Reverse Primer		
Low YPC. seq	CAGTGTTAGTTAGTGTCAGTAATGTGACTGAAAATTCAGCTAGTTTCATTCTCAC	220
EF600064-800-1030	-----	219
EU096090-1575-1768	-----a-----	182
EU096091-579-772	-----	182
High YPC. seq	-----	183
EF600063-800-993	-----	182
Low YPC. seq	TTCAGACCGTCAGA	233
EF600064-800-1030	-----	232
EU096090-1575-1768	-----	195
EU096091-579-772	-----	195
High YPC. seq	-----	196
EF600063-800-993	-----	195

图 3 高、低 YPC 的 PCR 产物及探针的序列比对

阴影部分为 *Psy* 基因第 2 外显子序列；.....为 37 bp 的插入序列；方框内为引物 *Psy*02 识别位点

Fig. 3 Sequences alignment between PCR products of high low YPC wheat and primers

The 2th exon of *Psy* gene are shadowed,are insertion sequences with 37 bp, the sequence of the forward primerr and complementary sequence of the reverse primerr for *Psy*02 are boxed

区域与用于设计引物的探针序列 (EF600063、EF600064、EU096090 和 EU096091) 的第 2 外显子序列完全一致 (同源率达 100%)，因此确定本次实验获得的 DNA 片段为小麦 *Psy* 基因。

对照已发表序列 EF600063、EF600064、EU096090 和 EU096091 的基因信息，发现序列

EF600064 为低 YPC 品种的 *Psy* 基因 (He 等, 2008)，序列 EF600063、EU096090 和 EU096091 为高 YPC 品种的 *Psy* 基因 (He 等, 2008; Zhang and Dubcovsky, 2008)，两类序列在 *Psy* 基因第 2 内含子区域内也相差 37 bp，且与本实验高低 YPC 品种的 37 bp 序列完全一致 (图 4)，因此，可以推

断低 YPC 小麦品种相对高 YPC 品种多出的 37 bp 插入序列的差异是导致小麦 YPC 产生表型变异的原因之一, 说明不同 YPC 品种间 *Psy* 基因的等位变异与 YPC 存在明显的相关性。

序列分析同时表明, 高低 YPC 的扩增片段内含子部分与探针序列第 2 内含子相应序列的同源率达 99.03%, 仅出现 1 个 SNP (图 5), 即使

排除测序错误的可能, 也能说明小麦 *Psy* 基因的第 2 外显子和第 2 内含子在不同品种中具有高度的保守性。但是与玉米 *Psy* 基因相应区段相比, 却存在明显的多态性, 图 6 显示, 小麦 *Psy* 基因第 2 外显子虽然与玉米 U32636 一样, 都含有 51 bp, 共编码 17 个氨基酸, 但在此区域内二者却存在 7 个 SNPs, 并由此导致 5 个氨基酸编码顺序

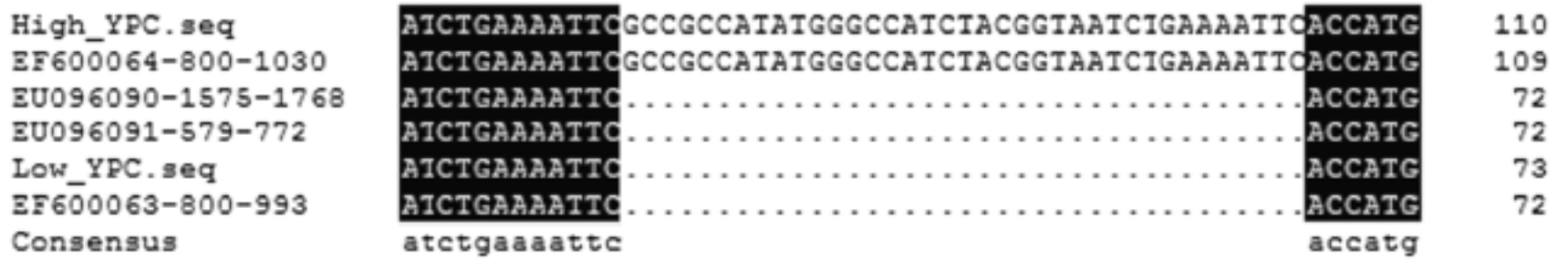


图 4 小麦 *Psy* 基因第 2 内含子内 37 bp 的等位变异

Fig .4 37 bp allelic variation in the 2th intron of wheat *Psy* gene



图 5 小麦 *Psy* 基因第 2 内含子内的 1 个 SNP

Fig .5 1SNP in the 2th intron of wheat *Psy* gene



图 6 小麦和玉米 U32636 第 2 外显子及内含子序列比对 (阴影部分为第 2 外显子序列)

Fig .6 Sequences alignment between the 2th exons and introns of wheat and maize U32636 (The sequences of 2th exon are shadowed)

的改变，变异率 29.4%。因此，对于不同物种，*Psy* 基因及其编码的氨基酸序列在进化过程中产生了明显的变异和分化，从而导致不同物种黄色素含量存在明显的表型变异。而且，该序列的内含子部分与玉米相应序列存在更多的 SNPs 和氨基酸编码的变异，说明无论是基因序列结构，还是基因表达调控，*Psy* 基因在小麦和玉米两物种间均产生了明显的变异，这一结果与此前 *Psy* 基因第 4 外显子的分子特性的研究结果基本一致 (蔡华等, 2008)。

2.4 *Psy*02 引物在核心种质中的稳定性及对 YPC 进行分子鉴定的应用

248 份小麦材料用于重复上述试验和黄色素含量的分子鉴定，其中 95 份扩出 233 bp 的基因片段，153 份扩增出 196 bp 的基因片段。扩增出 233 bp 的样品其 YPC 均值 (5.207) 显著低于 196 bp 样品 YPC 均值 (7.314) (表 2)，说明 *Psy*02 引物可作为一种功能标记对小麦 YPC 进行分子鉴定。前已述及 248 份小麦材料 YPC 平均值为 6.472，若以此值为临界将实验材料分为高 YPC 品种 (109 个) 和低 YPC 品种 (139 个)，则 *Psy*02 引物的 PCR 结果与上述 YPC 测定结果不完全相符，符合率 86.3%。造成这一差异的原因可能是小麦黄色素 YPC 的测定方法有待完善，或者是因为 YPC 属复杂数量性状，不同年份间其含量的差异导致平均 YPC 测定值产生误差。而且除了 *Psy*02 引物扩增出的一个基因 (片段) 外，可能还有其他非同源染色体上的 *Psy* 基因共同决定或调控黄色素的生物合成，或者 *Psy* 含量受主效基因控制，其它微效基因也会影响其含量。

3 小结

对麦族植物黄色素含量相关的 *Psy* 基因研究较少，现有的研究已表明 (He 等, 2008) 麦族植

物 *Psy* 基因主要存在于 7A 染色体上 (EF600063、EF600064、EU096091)，但 5A 染色体上也有 *Psy* 基因 (EF115116、EF115117、EF115118)，此外也有其它非同源染色体上较丰富等位变异的 QTL 证据。孙道杰等 (2006) 用玉米 U32636 序列为探针设计引物在小麦基因组 DNA 中扩增出一个 *Psy* 基因，应用中国春缺体—四体的非整倍体材料将该基因定位于小麦 1D 染色体上。Kuchel 等 (2006) 和 Pozniak 等 (2007) 分别在六倍体普通小麦和四倍体硬粒小麦的 7BL 染色体上定位了一个面粉黄色度 b 和 *Psy* 基因的主效 QTL。Pozniak 等 (2007) 在四倍体硬粒小麦 7B 染色体长臂上发现了一个黄色素含量的 QTL，命名为 *Psy-B1* 基因，并认为该基因可能成为禾谷类植物黄色素育种的一个重要候选基因。上述研究表明，麦族 *Psy* 基因存在丰富的遗传多态性。

本次试验表明，引物 *Psy*02 在普通小麦中具有典型的多态性，这种多态性与小麦黄色素含量存在明显的相关性，即在黄色素含量低的小麦品种中具有 233 bp 的 *Psy* 基因序列，而在黄色素含量高的小麦品种中具有 196 bp 的 *Psy* 基因序列，高低黄色素含量的表型差异与两种序列的差异显著相关 ($P > 99\%$)，在 DNA 水平上表现为一段 37 bp 插入序列的差异。

基因组序列出现变异是等位基因遗传的基本特征之一，它是各种生物进化和适应环境的必然结果，基因组序列变异导致了“基因多态性”，其中也包括了等位基因之间的多态性 (Guo 等, 2004)。鉴于 *Psy*02 引物的特异性，我们认为该引物可作为小麦黄色素含量分子鉴定的遗传标记和黄色素含量分子育种的辅助选择标记和候选基因，无论对小麦黄色素生物合成分子机制的理论研究还是黄色素含量遗传育种的实践应用都具有重要意义。

表 2 248 个小麦品种的黄色素含量方差分析

Table 2 Statistical analysis of the association between PCR band and YPC in 248 wheat accessions

扩增片段大小 Size of PCR products (bp)	数目 Number	比例 (%) YPC	均值 Mean of YPCYPC	变幅 Rang of YPC
233	95	35.6	5.207a	3.492-9.090
196	153	64.4	7.314b	4.123-16.645

注：a、b 表示两群体 YP 含量均值间达极显著差异 ($P < 0.01$)

a, b show different letters following the mean YP content indicate highly significant differences between the two groups ($P < 0.01$)

[参 考 文 献]

- American Association of Cereal Chemist (AACC), 1995. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists [M]. New York: AACC press, 14—50
- Cai H (蔡华), Ma CX (马传喜), Si HQ (司红起) *et al.*, 2008. Cloning and molecular characterization of *Psy* gene in wheat yellow pigment biosynthesis [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 30 (6): 693—698
- Fraser PD, Mer S, Shipton CA *et al.*, 2002. Biochemical evaluation of transgenic tomato plants expressing an addition phytoene synthase in a fruit specific manner [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 1092—1097
- Gallagher CE, Matthews PD, Li FQ *et al.*, 2004. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses [J]. *Plant Physiology*, 135: 1776—1783
- Guo M, Rupe MA, Zinselmeier C *et al.*, 2004. Allelic variation of gene expression in maize hybrids [J]. *Plant Cell*, 16 (7): 1707—1716
- He XY, Zhang YL, He ZH *et al.*, 2008. Characterization of phytoene synthase 1 gene (*Psy1*) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 213—221
- Kuchel H, Langridge P, Mosionek L *et al.*, 2006. The genetic control of milling yield, dough rheology and baking quality of wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 112: 1487—1495
- Li YY, Ma CZ, Fu TD *et al.*, 2006. Construction of a molecular functional map of rapeseed (*Brassica napus* L.) using differentially expressed genes between hybrid and its parents [J]. *Euphytica*, 152: 25—39
- Miskelly DM, 1984. Flour components affecting paste and noodle colour [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 35: 463—471
- Naik PS, Khurana SM, Kallou G, 2003. Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants [J]. *Current Science*, 85 (1): 1423—1430
- Pozniak CJ, Knox RE, Clarke FR *et al.*, 2007. Identification of QTL and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 525—537
- R mer S, Fraser PD, 2005. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation [J]. *Planta*, 211: 305—308
- Sharp PJ, 2001. Validation of molecular markers for wheat breeding [J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52: 1357—1366
- Sun DJ (孙道杰), He ZH (何中虎), Wang H (王辉), 2006. Genes related with yellow pigments in wheat flour [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica* (西北植物学报), 26 (4): 0655—0660
- Zhang LP (张立平), Yan J (阎俊), Xia XC (夏先春) *et al.*, 2006. QTL mapping for kernel yellow pigment content in common wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 32 (11): 51—45
- Zhang W, Dubcovsky J, 2008. Association between allelic variation at the Phytoene synthase 1 gene and yellow pigment content in the wheat grain [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 116 (5): 635—645