

## 小麦黄色素合成途径中 $P_{sy}$ 基因的克隆及分子特性

蔡华<sup>1,2</sup>, 马传喜<sup>1</sup>, 司红起<sup>1</sup>, 乔玉强<sup>1</sup>

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

**摘要:** 对普通小麦 (*Triticum aestivum*) 黄色素 (YP) 合成途径中的首要限速酶——八氢番茄红素合成酶 ( $P_{sy}$ ) 基因进行克隆和测序, 并和玉米  $P_{sy}$  基因进行序列比对。结果表明, 在高和低 YP 含量小麦品种中均扩增出一条长 1 192 bp 的  $P_{sy}$  基因片段, 该片段包含一条可编码 78 个氨基酸的小麦  $P_{sy}$  基因的外显子, 与玉米  $P_{sy}$  基因第 4 外显子的核苷酸序列同源率为 80.74%, 同源区域内有 47 个 SNPs, 但仅 11 个 SNPs 导致氨基酸编码序列的改变, 二者氨基酸序列的同源率达 85.89%, 推测  $P_{sy}$  基因在不同物种中的表达具有较高的保守性。BLAST 聚类分析表明, 禾谷类植物  $P_{sy}$  基因的分类与物种的亲缘关系存在明显的相关性, 小麦  $P_{sy}$  基因在系统进化中比禾谷类其他植物更为高级。

**关键词:** 小麦; 黄色素;  $P_{sy}$  基因; 外显子; 序列分析

中图分类号: Q 78, Q 943

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700 (2008) 06-693-06

## Cloning and Molecular Characterization of $P_{sy}$ Gene in Wheat Yellow Pigment Biosynthesis

CAI Hua<sup>1,2</sup>, MA Chuan-Xi<sup>1\*</sup>, SI Hong-Qi<sup>1</sup>, QIAO Yu-Qiang<sup>1</sup>

(1 College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2 Department of Chemistry and Life Science, Chuzhou University, Chuzhou 239000, China)

**Abstract:** Phytoene synthase ( $P_{sy}$ ) gene, a primary rate-limiting enzyme in the biosynthesis pathway of wheat yellow pigment (YP), was cloned and sequenced in this study, at the same time, the  $P_{sy}$  gene sequences between wheat and maize were compared. The results showed that, a 1 192 bp DNA fragment was amplified by polymerase chain reaction in DNA samples extracted from the high YP and low YP content wheat cultivar, the gene fragment contains a intact exon of  $P_{sy}$  gene, which codes 78 amino acids. Sequence analysis showed that the wheat DNA fragment was closely homologous to those of the maize 4th exon, with homology rate of nucleotide and amino acids sequences at 80.74% and 85.89%. Although there were 47 SNPs in the homology area of wheat and maize, only 11 SNPs led to the variation of amino acid sequences, which indicates  $P_{sy}$  gene was conservative in different species. Blast clustering analysis showed, the class of  $P_{sy}$  gene was significantly related to their genetic relationship in gramineous plants, the  $P_{sy}$  gene of wheat was more advanced than other cereal plants in system evolution.

**Key words:** Wheat; Yellow pigment;  $P_{sy}$  gene; Exon; Sequence analysis

普通小麦 (*Triticum aestivum* L.  $2n = 6x = AABBD$ ) 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

煮面食品色泽以及小麦的营养品质等均具有显著影响 (张立平等, 2006)。相反, 对硬粒小麦 (*Triticum turgidum* L.  $2n = 4x = AABB$ ) 而言, 黄

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD01A02)、公益性行业 (农业) 科研专项 (nyhyzx07-002)、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: 2008-04-10, 2008-05-16 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: caihua19721220@163.com

色素含量高的品种却可制作出高品质的黄亮的面制食品,因此,无论高低,黄色素含量都是四倍体硬粒小麦和六倍体普通小麦遗传育种研究的重要内容 (Zhang and Dubcovsky, 2008)。

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), 它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。该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。近年来, 有关 *Psy* 基因的研究已在辣椒 (R mer 等, 1993)、拟南芥 (Scolnik and Bartley, 1994)、甜瓜 (Zoi Karvouni 等, 1995)、黄水仙 (Burkhardt 等, 1997)、番茄 (Faqiang 等, 2008) 等植物中广泛开展。

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, 而白玉米中则没有 (Gallagher 等, 2004)。目前对普通小麦黄色素及相关基因的研究仅见表型及与 *Psy* 连锁的分子标记等相关报道。已有研究表明, 虽然环境条件对小麦黄色素含量有一定影响, 但它受基因型的影响更大, 遗传力达 0.68, 不同品种间黄色素含量可相差 3~4 倍 (Baik, 1995)。Parker (1998) 报道了一个位于 7A 染色体的黄色素 RFLP 标记, 可解释黄色素变异的 60%。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, 均能解释面粉颜色 40% 以上的表型变异, Zhang 等 (2006) 在 7A 染色体上发现了一个能解释小麦籽粒黄色素含量 12.9%~37.6% 表型变异的另一个主效 QTL。然而迄今真正针对普通小麦 *Psy* 基因的研究仍然极少, 为此, 本研究以已发表的玉米 *Psy* 基因序列为探针克隆小麦 *Psy* 基因, 并进行序列比对分析, 为深入研究小麦黄色素生物合成的分子机制和高低黄色素含量小麦新品种的选育提供遗传学和分子生物学基础。

## 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, 包括 218 份小麦微核心种质资源和 19 份品质性状典型的品种 (系), 2003~2005 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  $\mu$ l SDS 样品提取液 (288 mmol L NaCl, 200 mmol L Tris-HCl, 25 mmol L 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。

1.2.2 引物设计和合成 从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 网站上获取最新发表的玉米 *Psy* 基因序列, 以其 cDNA 为探针 BLAST 搜索小麦 EST 序列, 选择同源性较高的序列拼接后应用 Premier 5.0 软件设计引物, 经试扩增获得一对有效引物 PSY01, 其序列为: Forward Primer: 5'-TAGACAATGCATTCAACGCG-3'; Reverse Primer: 5'-TTGTTGTAATACTTTGTAAGG-3'。引物交由上海 Sango 生物工程公司合成。

1.2.3 PCR 反应体系和扩增程序 优化的 PCR 反应体系总体积为 20  $\mu$ l, 各成分如下: 10 $\times$  PCR buffer (2.0  $\mu$ l)、2.5 mmol L dNTP (0.8  $\mu$ l)、1  $\mu$ mol L Forward Primer 和 Reverse Primer (各 5  $\mu$ l)、1 U Taq DNA 聚合酶 (0.2  $\mu$ l)、2.5 mmol L MgCl<sub>2</sub> (1.2  $\mu$ l)、50 ng DNA 模板、无菌去离子水 (补足至 20  $\mu$ 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: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61  $^{\circ}$ 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, 缓冲体系为 1 $\times$  TAE 溶液, 100 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。

1.2.4 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。测序结果递交至 <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&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  $1e-20$  (Li 等, 2006) 的各序列进行比对分析, 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 引物 PSY01 的 PCR 扩增结果

以玉米序列 U36360 的 cDNA 为探针, 经

BLAST 搜索共获得 137 条小麦 EST, 分属于 79 个序列, 以同源性 > 70%、长度 > 200 bp 和 E 值  $1e^{-20}$  为标准筛选出 4 条序列, 分别为 AL822090、CJ685595、DR739164 和 CJ579028 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), 4 条序列共包含 16 个 EST, 由此构建的重叠群 (contig) 覆盖了玉米 U32636 基因全部编码区 (coding sequence, CDS) 1 394 ~ 4 936 bp 区域的 6 个外显子 (图 1)。由上述 EST 序列设计的引物 PSY01 在实验群体中黄色素含量最高和最低的两品种 (济宁 12 和郑 9023) 总 DNA 中均扩增出一条长约 1 200 bp 的片段 (图 2)。

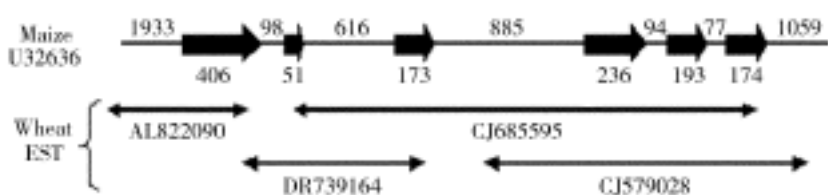


图 1 玉米 *Psy* 基因 (U32636) 外显子-内含子结构及 4 条小麦 EST 用于设计引物

Fig. 1 The exon-intron structure of *Psy* from maize (U32636) and 4 wheat ESTs used to design primers

黑色箭头示玉米 *Psy* 基因的 6 个外显子及序列长度;

玉米 U32636 线下为 4 条小麦 EST 序列及其长度

The black solid arrows on maize U32636 denote 6 exons with their sizes; The lines under U32636 represent the aligned 4 wheat ESTs with their sizes

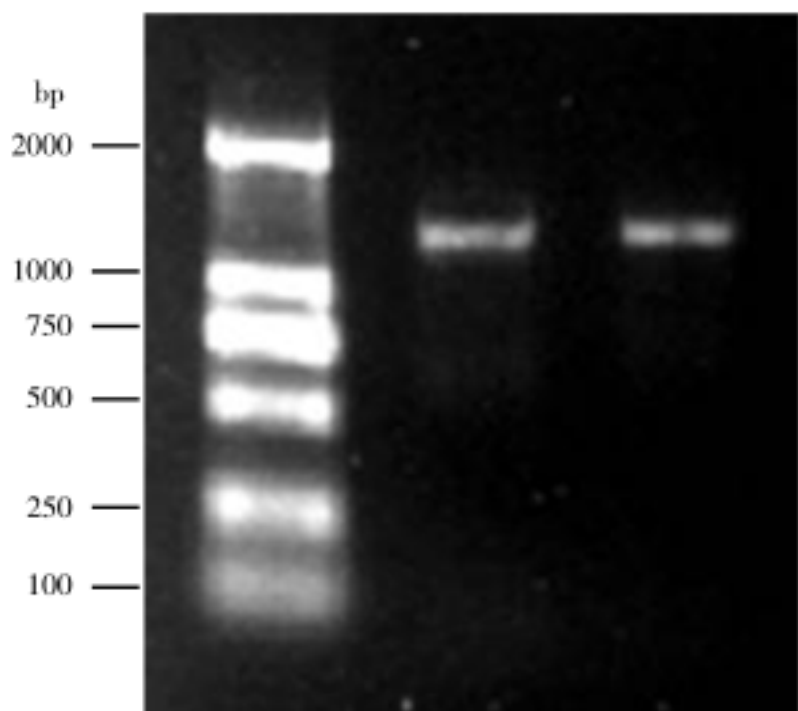


图 2 小麦 *Psy* 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 2 Results of PCR amplification in wheat *Psy* gene

M: DNA 标准分子量; 1: YP 含量低的小麦品种 (郑 9023);

2: YP 含量高的小麦品种 (济宁 12)

M: DNA marker; 1: wheat cultivar Annon95083 with low YP content;

2: wheat cultivar Jiling12 with high YP content

## 2.2 小麦 *Psy* 基因片段的序列特征

PCR 产物经回收纯化后测序, 表明该片段全长为 1 192 bp, 经 DNAMAN 软件的 Alignment 比对, 发现该片段第 799 ~ 1 042 bp 区与玉米 U32636 第 4 160 ~ 4 403 bp 区的 244 个碱基存在 80.74% 的同源率 (E 值 <  $1e^{-20}$ ), 说明该片段属于黄色素 *Psy* 合成相关基因。这一结果与 <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfin> 网站对该片段的基因结构分析报告基本一致。对照玉米 U32636 序列的 CDS 区域, 发现该同源片段正好覆盖了玉米 *Psy* 基因的第 4 外显子 (4 163 ~ 4 398 bp, 图 1), 表明这个区域可能包含小麦 *Psy* 基因的一个完整外显子。序列分析表明, 该区域内小麦与玉米 *Psy* 基因的第 4 外显子序列存在 47 个单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP) 变异, 未发现 GAPS。但在外显子的两侧翼序列却与玉米 U32636 同一位置的内含子区域存在广泛的变异, 内含子的 5 和 3 端符合 GT AG 法则 (图 3)。以该片段第 799 ~ 1 042 bp 序列为探针, 进行 BLAST-EST 搜索, 发现同源性最高的 EST 序列为 CJ685595 和 CJ579028, 同源率分别为 100% 和 99%, 仅在 CJ579028 序列内存在一个碱基的缺失。

应用上述引物方法共设计 5 对引物以扩增小麦 *Psy* 基因全长并进行序列比对分析, 结果表明, 5 对引物的扩增产物长度分别为 690 bp、302 bp、989 bp、785 bp 和 1 192 bp, 覆盖了 *Psy* 基因的全部 6 个外显子和 5 内含子, 且在各外显子区域内和玉米 U32636 的序列同源率均达 80% 以上, 所以认为 5 对引物的扩增产物均为小麦 *Psy* 基因片段, 经 DNAMAN 软件组装成一个全长 3 437 bp、包括 6 个外显子和 5 个内含子的小麦 *Psy* 基因 (图 4)。

## 2.3 小麦 *Psy* 基因编码的氨基酸序列分析

应用 DNAMAN 软件将小麦 PCR 产物的 799 ~ 1 042 bp 区和玉米 U32636 第 4 外显子区翻译成一条编码 78 个氨基酸的序列 (图 5), 序列分析表明虽然小麦与玉米在该区域存在 47 个 SNPs, 但仅有 11 个 SNPs 影响到基因所编码的氨基酸序列, 其余的 36 个 SNPs 并未改变氨基酸的编码顺序, 属同义 cSNP (Coding SNP), 两物种 *Psy* 基因的氨基酸序列在该区域的同源率为 85.89%。

Maize4160-4403	CAGCCATTCAGGGACATGATTGAAGGGATGAGGAGTGATCTTAGGAAGAC	50
Wheat799-1042	---c---a---c---c---c---cg---c---c---a---g---	50
Maize4160-4403	AAGGTATAACAACCTTCGACGAGCTCTACATGTACTGCTACTATGTTGCTG	100
Wheat799-1042	g---c---g---t-----c-	100
Maize4160-4403	GAACTGTCGGGTTAATGAGCGTACCTGTGATGGGCATCGCAACCGAGTCT	150
Wheat799-1042	-c---c---g---g---c---g---t---gc---c---c	150
Maize4160-4403	AAAGCAACAACCTGAAAGCGTATACAGTGCTGCCTTGGCTCTGGGAATTGC	200
Wheat799-1042	--g---g---g---g---c---tg---c---c---tc-----c---gc---c---	200
Maize4160-4403	GAACCAACTCACGAACATACTCCGGGATGTTGGAGAGGAGTAAG	244
Wheat799-1042	---g---c---a---c---a---	244

图3 玉米 *Psy* 基因第4外显子与小麦 *Psy* 基因同源区域的序列比对

注：阴影部分为玉米 *Psy* 基因第4外显子的5端和3端；方框部分为小麦该区域的5端和3端

Fig. 3 Sequence alignment of *Psy* gene between the 4th exon of maize and the homologous area of wheat

Note: The shaded part are 5 and 3 end of the 4th exon of maize *Psy* gene; the pane part are 5 and 3 end of the homologous area of wheat

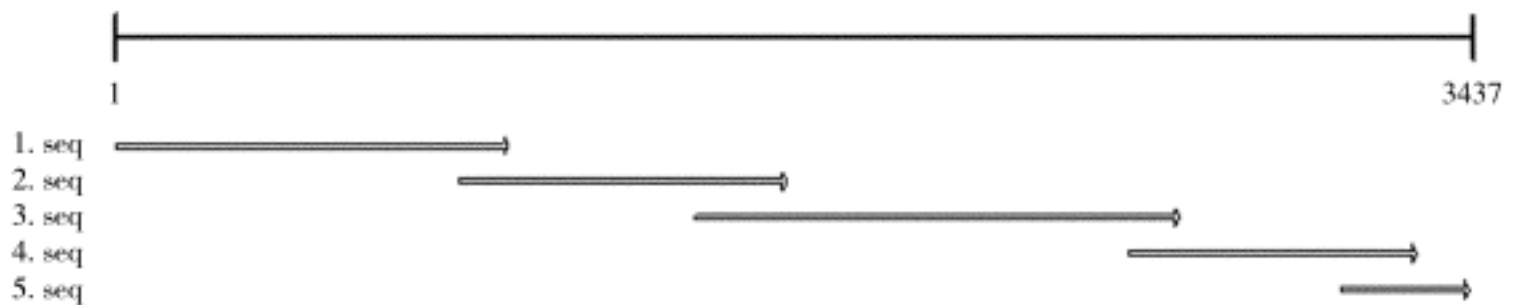


图4 小麦 *Psy* 基因全长。箭头示5对引物扩增的PCR产物

Fig. 4 Full length of wheat *Psy* gene. The solid arrows down black line denote PCR products of 5 primer sets

Maize4163-4398	PFRDMIEGMRSDLRKTRYNNFDELYMYCYYVAGTVGLMSVPVMGI
Wheat799-1042	PFKDMIDGMRTDLKKARYKNFDELYMYCYYVAGTVGLMSVPVMGI
Maize4163-4398	ATESKATTESVYSAALALGLANQLTNILRDVGE
Wheat799-1042	APDSKATAESVYGAALALGLANQLTNILRDVGE

图5 玉米 U32636 第4外显子和小麦 *Psy* 基因编码的氨基酸序列比对

Fig. 5 Sequence alignment of *Psy* gene between wheat CDS and the 4th exon of maize

#### 2.4 *PSY* 基因的进化分析

以实验获得的小麦 *Psy* 基因片段 (编号 18729) 为探针, 在 GenBank 中进行 BLAST 搜索, 共得到 56 条同源性较高的目的序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), 包括 4 条六倍体普通小麦基因序列 (EF600063、EF600064、EU096091 和 EU096094)、6 条四倍体硬粒小麦基因序列 (DQ642439、DQ642440、DQ642443、DQ642444、EU096090 和 EU096092)、1 条水稻 (*Oryza sativa*) 基因序列 (AP005750)、1 条高粱

(*Sorghum bicolor*) 基因序列 (AY705389) 和 1 条中间偃麦草 (*Thinopyrum ponticum*) 基因序列 (EU096095), 其余均为玉米序列 (序列号未列出), 所有序列都是 *Psy* 合成酶基因。4 条普通小麦序列均为 2008 年刚注册, 6 条硬粒小麦序列中 4 条 2007 年注册, 2 条 2008 年注册, 提示对麦族 *Psy* 基因的研究已逐渐引起重视。BLAST 聚类分析表明, 这些 *Psy* 基因可归为 3 类, 水稻、玉米和高粱聚为一类 (玉米不同基因序列因同源性极高未全部列入); 中间偃麦草单独聚为一类,

四倍体硬粒小麦和六倍体普通小麦聚为第 3 类, 这一结果与上述物种的植物学分类基本一致, 也即禾谷类植物 *Psy* 基因的分类与物种的亲缘关系存在明显的相关性。聚类分析同时显示本实验获得的 *Psy* 基因片段可能来源于普通小麦 A 组染色体, 属于 *Psy1-A1* 基因或其等位变异 (图 6)。聚类分析图的进化距离表明, *Psy* 基因的进化趋势为: 普通小麦 > 硬粒小麦 > 中间偃麦草 > 水稻 > 高粱 > 玉米。

### 3 讨论

利用已报道的基因序列, 尤其是近缘物种的基因序列, 进行同源克隆是基因克隆的一条重要途径。本研究以玉米 *Psy* 基因序列 U32623 为探针, 在 GenBank 中 BLAST 搜索普通小麦的 EST 序列, 在能覆盖玉米 U32623 全部开放阅读框 (ORF) 区域内设计引物, 通过同源克隆的方法获得一条普通小麦的 *Psy* 基因, 长 1 192 bp, 虽然只是该基因的一个片段, 但它包含一个完整的外显

子序列, 编码 78 个氨基酸, 因此该基因片段可用于制备小麦核酸探针, 为进一步深入研究小麦黄色素生物合成的分子机制奠定基础。应用这种方法同样可以设计出多对引物, 可实现小麦 *Psy* 基因组全长的扩增, 以及小麦 *Psy* 基因内全部外显子和内含子的结构分析。实验同时表明, 该基因编码区与玉米第 4 外显子的同源区域存在 47 个单核苷酸多态性变异, 而其中仅有 9 个 SNP 导致小麦和玉米在该区域内编码氨基酸的变异, 推测虽然小麦和玉米属亲缘关系较远的物种, 但 *Psy* 基因在不同物种中的表达却具有较高的保守性。

已有研究表明, 在籽粒 (或果实) 发育过程中, *Psy* 对于类胡萝卜素合成途径中代谢物质的流量有着极大的影响, 是一个限速酶。在籽粒成熟期, *Psy* 基因的表达量显著升高 (Ronen 等, 2000)。这一现象表明在籽粒中, 转录水平的调控是控制类胡萝卜素合成的重要方式。 *Psy* 基因在玉米中又称 *y1* 基因, 决定玉米胚乳的颜色 (Buckner 等, 1996), 被认为是黄色素合成过程中

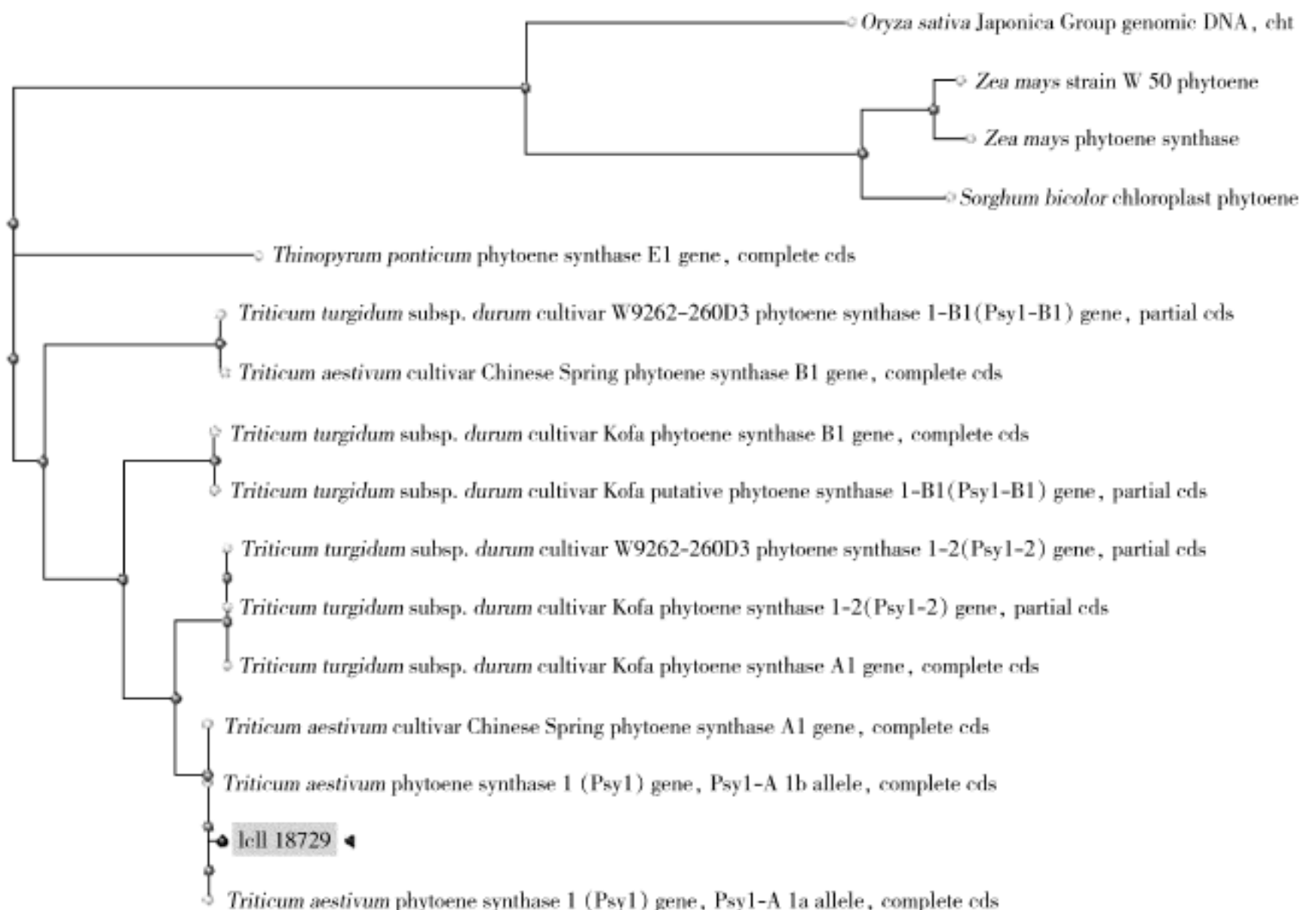


图 6 小麦 *PSY* 基因核苷酸序列的 BLAST 聚类分析

Fig. 6 Blast clustering of nucleotide sequence in *Psy* gene between wheat and other cereal plants

的“瓶颈”基因，定位在第6号染色体上（Palaisa 等，2003；Wong 等，2004）。因玉米第6染色体与小麦第7同源群有着广泛的共线性（extensive synteny）（Gale and Devos, 1998），所以小麦 *Psy* 基因应位于第7同源群上，结合 *Psy* 基因的 BLAST 聚类分析，本实验克隆的 *Psy* 基因应定位在小麦 7A 染色体上。进一步分析 BLAST 聚为一类的麦族 *Psy* 基因序列及所研究的普通小麦和硬粒小麦品种特性，发现除了依据 *Psy* 基因的分类（*Psy1-A1* 和 *Psy1-B1*）外，不同实验材料黄色素含量高低也是 BLAST 重要的分类依据（见各基因序列提供的详细资料，未列出）。因此开发出具有多态性的 *Psy* 基因分子标记对小麦黄色素含量的分子鉴定和高低黄色素含量的小麦新品种的分子标记辅助选择育种（Molecular Marker Assisted Selection, MAS）具有重要意义。

### 〔参 考 文 献〕

- Baik BK, Czuchajowska Z, Pomeranz Y, 1995. Discoloration of dough for oriental noodles [J]. *Cereal Chem*, 72: 198—205
- Buckner B, Miguel PS, Janick-Buckner D *et al.*, 1996. The *yl* gene of maize codes for phytoene synthase [J]. *Genetics*, 143 (1): 479—488
- Burkhardt PK, Beyer P, Wünn J *et al.*, 1997. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 11 (5): 1071—1078
- Faqiang Li, Ratnakar Vallabhaneni, Eleanore T, 2008. PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and Regulator of abiotic stress-induced root Carotenogenesis [J]. *Plant Physiol*, 146 (3): 1333—1345
- 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]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 1092—1097
- Galagher CE, Matthews PD, Liif Q *et al.*, 2004. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses [J]. *Plant Physiol*, 135 (6): 1776—1783
- Gale MD, Devos KM, 1998. Comparative genetics in the grasses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 1971—1974
- Gallagher CE, Matthews PD, Li FQ *et al.*, 2004. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses [J]. *Plant Physiol*, 135: 1776—1783
- Kuchel H, Langridge P, Mosionek L *et al.*, 2006. The genetic control of milling yield, dough rheology and baking quality of wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 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
- Naik PS, Khurana SM, Kalloo G, 2003. Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants [J]. *Curr Sci*, 85 (1): 1423—1430
- Parker GD, 1998. Mapping loci associated with flour color in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 97: 238—245
- Palaisa KA, Morgante M, Williams M *et al.*, 2003. Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci [J]. *Plant Cell*, 15: 1795—1806
- 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]. *Theor Appl Genet*, 114: 525—537
- R mer S, Fraser PD, 2005. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation [J]. *Planta*, 211: 305—308
- Ronen G, Carmel, Goren L *et al.*, 2000. An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of beta and old-gold color mutations in tomato [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 11102—11107
- R mer S, Huguency P, Bouvier F *et al.*, 1993. Expression of the genes encoding the early carotenoid biosynthetic enzymes in *Capsicum annuum* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 196: 1414—1421
- Scolnik PA, Bartley GE, 1994. Nucleotide sequence of an *Arabidopsis* cDNA for phytoene synthase [J]. *Plant Physiol*, 104 (4): 1471—1472
- Sharp PJ, 2001. Validation of molecular markers for wheat breeding [J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52: 1357—1366
- Wong JC, Lambert RJ, Wurtzel ET, 2004. QTL and candidate genes phytoene synthase and carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize [J]. *Theor Appl Genet*, 108: 349—359
- Zhang W, Dubcovsky J, 2008. Association between allelic variation at the Phytoene synthase 1 gene and yellow pigment content in the wheat grain [J]. *Theor Appl Genet*, 116 (5): 635—645
- 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 Agronom Sin* (作物学报), 32 (11): 51—45
- Zoi Karvouni, Isaac John, Jane E *et al.*, 1995. Turner1 and Don Grier-son Isolation and eharacterisation of a melon cDNA clone encoding phytoene synthase [J]. *Plant Mol Biol*, 27: 1153—1162