

研究报告

A Letter

小麦中 *TAXI- I*、*XIP- I* 和 *TLXI* 三类木聚糖酶抑制剂基因检测

牛存秀¹, 司红起¹, 高雅¹, 陈璨¹, 王永玖², 马传喜¹

1. 安徽农业大学农学院, 合肥, 230036

2. 安徽省怀远县龙亢农场, 怀远, 233428

✉ 通讯作者: sihq2002@163.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第79篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0079

收稿日期: 2011年05月16日

接受日期: 2011年06月15日

发表日期: 2011年06月22日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

牛存秀等, 2011, 小麦中 *TAXI- I*、*XIP- I* 和 *TLXI* 三类木聚糖酶抑制剂基因检测, 分子植物育种 Vol.9 No.79 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0079)

摘要 木聚糖酶抑制剂基因参与植物的抗病防御反应, 在小麦抗病育种中具有一定的应用价值。为了了解木聚糖酶抑制剂基因在不同小麦品种中的分布状况, 本文选取来自全国各麦区的 260 份小麦品种, 利用三对特异引物分别对 *XIP- I*、*TAXI- I*、*TLXI* 三类木聚糖酶抑制剂基因进行了分子检测, 结果表明, 在 260 份材料中, 有 148 份材料含有 *XIP- I* 基因(占 57.0%), 116 份材料含有 *TAXI- I* 基因(占 44.6%), 161 份材料含有 *TLXI* 基因(占 61.9%), 60 份材料同时含有 *XIP- I* 和 *TAXI- I* 两类基因(占 23.1%), 88 份材料同时含有 *XIP- I* 和 *TLXI* 两类基因(占 33.8%), 75 份材料同时含有 *TAXI- I* 和 *TLXI* 两类基因(占 28.8%), 37 份材料同时含 *XIP- I*、*TLXI* 和 *TAXI- I* 三类基因(占 14.2%), 20 份材料三类基因都不含有(占 7.7%)。聚合了三类木聚糖酶抑制剂基因的种质资源可作为抗病育种的亲本。

关键词 小麦; 木聚糖酶抑制剂基因; *XIP- I*; *TAXI- I*; *TLXI*

Molecular Identification of Xylanase Inhibitor Genes-*XIP- I*、*TAXI- I*、*TLXI* in Common Wheat

Niu Cunxiu¹, Si Hongqi¹, Gao Ya¹, Chen Can¹, Wang Yongjiu², Ma Chuanxi¹

1. Anhui Agricultural University, Hefei, 230036, P.R. China

2. Longkang Farm of Huaiyuan County, Huaiyuan, 233428, P.R. China

✉ Corresponding author, sihq2002@163.com; ✉ Authors

Abstract Endoxylanase inhibitor genes play an important role in plant disease-resistant defense reactions, and have some application values in wheat disease-resistant breeding. In order to understand the distribution of three-type endoxylanase inhibitor genes in different wheat varieties, in this paper three-type genes, *XIP- I*, *TAXI- I* and *TLXI*, were identified by using three specific primers in 260 wheat cultivars from all over the country in China. The results showed that 148 of the 260 wheat cultivars contain *XIP- I* gene, accounting for 57.0%, 116 of the 260 wheat cultivars contain *TAXI- I* gene, accounting for 44.6%, and 161 of the 260 wheat cultivars contain *TLXI*, accounting for 61.9%. 60 of the 260 materials contain *XIP- I* and *TAXI- I* genes, accounting for 23.1%, *XIP- I* and *TLXI* genes exist in 88 different wheat varieties which account for 33.8%, *TAXI- I* and *TLXI* genes together exist in 75 materials which account for 28.8%, 37 materials contain *XIP- I*, *TLXI* and *TAXI- I* genes, accounting for 14.2%, 20 materials do not contain the three genes. In this paper we suggested that the wheat cultivars with three genes should be used as breeding parents for disease resistant in wheat.

Keywords Wheat (*Triticum aestivum* L.); endoxylanase inhibitors gene; *XIP- I*; *TAXI- I*; *TLXI*

研究背景

早在1997年, Debyser等人研究阿拉伯木聚糖的溶解及抑制时发现小麦粉的粗提取物中存在能抑制木聚糖酶活性的蛋白组分(Debyser et al., 1997), 并进一步分离纯化, 定名为小麦木聚糖酶抑制剂(*Triticum aestivum* xylanase inhibitor, TAXI)

(Debyser et al., 1999)。此后McLauchlan、Fierens等先后从小麦中又分离出两种结构不同的木聚糖酶抑制剂 XIP (xylanase inhibitor protein) 和 TLXI (thaumatin-like xylanase inhibitor) (McLauchlan et al., 1999; Fierens et al., 2007)。迄今为止, 在谷物中只发现这三类结构不同的木聚糖酶抑制剂, TAXI和

*XIP*型抑制剂都属多态家族, 包含许多结构相近、抑制特异性相似的亚型。后来发现黑麦、大麦、玉米等谷物中也存在*TAXI*或*XIP*木聚糖酶抑制剂, 推测它们可能广泛存在于单子叶植物中(Goesaert et al., 2004)。许多研究结果表明木聚糖酶抑制剂能抑制病原菌木聚糖酶活性而参与植物的防御反应。

*TAXI*型木聚糖酶抑制剂属于非糖基蛋白, 专一性作用于细菌和真菌的GH11家族木聚糖酶, 对GH10家族的木聚糖酶没有抑制活性(Gebruers et al., 2001), 目前发现有四种亚型, 即*TAXI-I*、*TAXI-II*、*TAXI-III*和*TAXI-IV*。*TAXI- I*与胡萝卜细胞外周糖蛋白、拟南芥及水稻中的多拷贝序列有较高的相似性, 但具不同功能。*TAXI- I*基因的表达受茉莉酸甲酯的强烈诱导(Weng et al., 2010)。*TAXI-III*和*TAXI-IV*基因的表达都依赖于病原体和被感染组织的特异性, 在受损叶片中, *TAXI- I*、*TAXI-III*与*TAXI-IV*都强烈表达(Igawa et al., 2004)。黑麦和大麦中也存在木聚糖酶抑制剂*SCXI*和*HVXI*基因, 与*TAXI- I*序列相似(Raedschelders, 2005)。后来许多学者在不同的小麦品种中克隆出*TAXI*型基因, 序列均有差异。

*XIP*型木聚糖酶抑制剂是一种糖基化单体蛋白, 只抑制来自真菌GH10和GH11家族木聚糖酶(Juge et al., 2004)。这种特异性抑制真菌来源木聚糖酶的特征并不是因为真菌酶具有糖基化(Brutus et al., 2004)。研究发现*XIP-I*具有两个独立的酶结合位点, 分别与GH10和GH11家族的木聚糖酶相结合, 但有关*XIP*型木聚糖酶抑制剂的抑制特异性迄今还没有定论。目前发现的有*XIP-I*、*XIP-II*、*XIP-III*、*XIP-R1*、*XIP-R2*等亚型。研究*XIP- I*基因表达时发现, *XIP- I*基因在白粉病侵染及受损的叶片中显著表达, 被茉莉酸甲酯诱导时表达增强。*XIP- I*基因的表达与病原体的种类和侵染部位有关。*XIP- I*和*XIP-III*基因序列有92.2%的相似性, 在功能上*XIP- I*基因起主要作用(Igawa et al., 2005)。Takahashi-Ando等在六倍体小麦的根中又克隆出多条与*XIP- I*型高相似的基因*XIP-R*, 其中*XIP-R1*为主要成员, 在小麦白粉病菌侵染的叶片中表达增强, 在赤霉菌感染的小穗中不表达, 推测六倍体小麦有一个大的*XIP*型家族, 在特定的组织中仅某些基因表达并参与防御反应(Takahashi-Ando et al., 2007)。

新发现的*TLXI*型抑制剂, 其结构与类奇异果甜蛋白相似, 有独特的抑制专一性, 以非竞争性抑制方式抑制GH11家族木聚糖酶, 同*TAXI*一样, 也不能抑制GH10家族木聚糖酶, 属于慢性紧密结合抑制剂(Fierens et al., 2007)。

前人对*TAXI- I*、*XIP- I*和*TLXI*抑制剂基因在小麦中的分布及其与小麦抗病相关性研究较少。本文选取三对特异引物, 采用PCR技术检测260份小麦品种中三类木聚糖酶抑制剂基因, 探讨*TAXI- I*、*XIP- I*和*TLXI*三类木聚糖酶抑制剂基因在不同小麦品种中的存在与分布, 以期对小麦抗病基因工程育种做出一定贡献。

1 结果与分析

1.1 *XIP- I*、*TAXI- I*、*TLXI* 三类木聚糖酶抑制蛋白基因检测

1.1.1 *XIP- I* 基因检测

用引物对 *XIP-1F1*/*XIP-1R1* 分别对 260 份供试育种材料进行 *XIP- I* 基因克隆, 检测结果显示供试品种中 57%能扩增出约 939bp 的条带, 43%的品种没有扩增出任何条带(图 1)。琼脂糖凝胶电泳显示, 有些品种扩出的条带非常弱, 重复几次结果相同, 说明该引物较稳定。



图 1 *XIP-1* 引物扩增 *XIP-1* 基因

注: 1: 陕农 138; 2: 西农 889; 3: 科农 181; 4: 郑麦 9694; 5: 项城 986; 6: 漯 9908; 7: 许农 5 号; 8: 新麦 18; 9: 轮选 01-1; 10: 浚 99-7; 11: 洛麦 21; 12: 豫教 0388; 13: 明天 0420; 14: 新麦 89019; M: Trans2K DNA marker

Figure 1 Amplification of *XIP-1* genes by *XIP-1* primer

Note: 1: Shan nong 138; 2: Xinong 889; 3: Kenong 181; 4: Zheng mai9694; 5: Xiangcheng 848; 6: Lei 9908; 7: Xunong 5; 8: Xinmai 18; 9: Lunxuan 01-1; 10: Jun6, 99-7; 11: Luomai 21; 12: Yujiao 0388; 13: Mingtian 0420; 14: Xinmai 89019; M: Trans2K DNA marker

1.1.2 *TAXI- I* 基因检测

用引物对 *TAXI-5*/*TAXI-3* 分别对 260 份供试小

麦品种进行 *TAXI- I* 基因克隆, 检测结果显示供试品种中 44.6%能扩增出仅有 1256 bp 的一条带, 其余品种都无扩增条带, 约 70 个品种扩增效果差(图 2)。

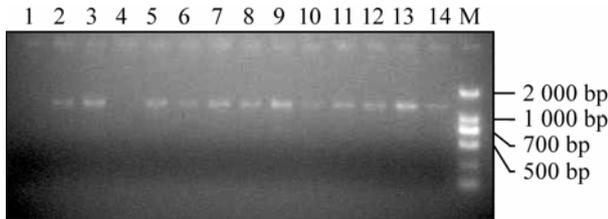


图 2 *TAXI- I* 引物扩增 *TAXI- I* 基因

注: 1: 西农 4; 2: 西农 1; 3: SL02-12; 4: SL02-04; 5: 丰优 1718; 6: 丰优 161; 7: 早优 63; 8: 早优 62; 9: 早优 61; 10: 登海 5348; 11: 登海 5049; 12: 烟 0469; 13: 烟 0428; 14: 泰山 6259; M: Trans2K DNA marker

Figure 2 Amplification of *TAXI- I* genes by *TAXI- I* primer

Note: 1: Xinong 4; 2: Xinong 1; 3: SL02-12; 4: SL02-04; 5: Fenyou1718; 6: Fenyou161; 7: Hanyou 63; 8: Hanyou 62; 9: Hanyou 61; 10: Denghai 5348; 11: Denghai 5049; 12: Yan 0469; 13: Yan 0428; 14: Taishan 6259; M: Trans2K DNA marker

1.1.3 *TLXI* 基因检测

用引物对 *Lintf/Xi2* 分别对 260 份供试小麦品种进行 *TLXI* 基因克隆, 检测结果显示供试品种中 61.9%能扩增出 561 bp 一条带, 其余品种未扩出条带(图 3)。



图 3 *tlxi* 引物扩增 *TLXI* 基因(129-140)

注: 1: 春 0501; 2: 新麦 9817; 3: 太空 6 号; 4: 陕 715; 5: 内乡 203; 6: 西农 4211; 7: 春 534; 8: 4110; 9: 新原 958; 10: 04 中 36; 11: 丰华 8829; 12: 淮核 0308; M: Trans2K DNA marker

Figure 3 Amplification of *TLXI* genes by *tlxi* primer

Note: 1: Spring 0501; 2: Xinmai9817; 3: Taikong 6; 4: shan 715; 5: NeiXiang 203; 6: Xinong 4211; 7: Spring 534; 8: 4110; 9: Xinyuan 958; 10: 04 zhong 36; 11: Fenghua 8829; 12: Huaihe 0308; M: Trans2K DNA marker

1.2 *XIP- I*、*TAXI- I*、*TLXI* 三类木聚糖酶抑制剂基因在供试材料中的分布

根据上述检测结果, 统计 *XIP- I*、*TAXI- I*、*TLXI* 三类木聚糖酶抑制剂基因在 260 份供试小麦品种中的分布。在 260 份材料中, 有 35 份材料含有 *XIP- I* 基因, 占总材料的 13.5%, 10 份材料含 *TAXI- I* 单基因, 占 3.8%, 29 份材料含有 *TLXI* 单基因, 占 11.2%, 60 份材料含 *XIP- I* 和 *TAXI- I*, 88 份含 *XIP- I* 和 *TLXI*, 75 份含 *TAXI- I* 和 *TLXI*, 37 份含 *XIP- I*、*TLXI* 和 *TAXI- I* (图 4)。

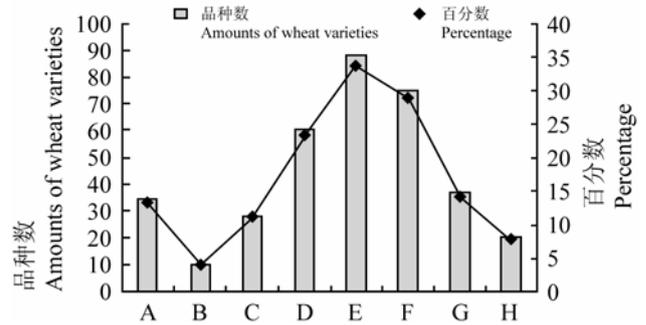


图 4 三类木聚糖酶抑制剂基因分布

注: A: 表示 *XIP- I* 单基因; B: 表示 *TAXI- I* 单基因; C: 表示 *TLXI* 单基因; D: 表示 *XIP- I* 和 *TAXI- I* 两类基因; E: 表示 *XIP- I* 和 *TLXI* 两类基因; F: 表示 *TAXI- I* 和 *TLXI* 两类基因; G: 表示 *XIP- I*、*TAXI- I* 和 *TLXI* 三类基因; H: 表示三基因都不含有

Figure 4 The distribution of three endoxylanase inhibitor genes
Note: A: only *XIP- I*; B: only *TAXI- I*; C: only *TLXI*; D: *XIP- I*+*TAXI- I*; E: *XIP- I*+*TLXI*; F: *TAXI- I*+*TLXI*; G: *XIP- I*+*TAXI- I*+*TLXI*; H: without three genes above

2 讨论

本实验对 260 份不同小麦品种材料的木聚糖酶抑制剂基因检测发现, *XIP- I*、*TAXI- I*、*TLXI* 三类木聚糖酶抑制剂基因在小麦中的分布不同步, 且存在差异。有些品种只含有一类基因, 有些品种含有两类, 有些品种同时含有三类基因, 而少数品种不含这些基因。推测在不同小麦品种中木聚糖酶抑制剂基因的类型和序列有差异。

在全基因组中 *XIP* 型基因属于大基因家族。Elliott 等(2002)最先从小麦品种 *Soissons* 中克隆 *XIP- I* 的 cDNA, Igawa 等(2005)又从小麦品种 *Norin 61* 中克隆出 *XIP- III* 基因, *XIP- I* 和 *XIP- III* 序列相似度 92.2%, 但在功能上 *XIP- I* 基因为 *XIP* 型家族的主要基因。Takahashi-Ando 等(2007)在六倍体小麦 (hexaploid wheat) 的根中克隆得到 *XIP-R1* 和 *XIP-R2*

的 cDNA 序列, 发现在病原防御中 XIP-R1 基因起主要作用。比对 XIP- I、XIP-R1 和 XIP-R2 基因序列, 其相似性较低。推测在不同小麦品种及不同组织中有不同的 XIP 型基因表达。TAXI 型基因家族与 XIP 型不同, 各基因有不同的功能。本实验所检测的三类基因中, TAXI- I 基因所占比例最少, 且扩出的条带较弱, 其原因可能是 TAXI- I 型基因序列变异性高。分析 NCBI 数据库中 TAXI- I 型基因的核苷酸序列发现, 同一小麦品种可扩出不同的 TAXI- I 基因序列, 例如来自中国春的 6 条 TAXI- I 序列相似性仅 70% 左右。

研究表明, XIP 型抑制剂与糖苷水解酶 18 家族的几丁质酶 III 有很高同源性, 而 TLXI 型结构上与类奇异果甜蛋白同源, 因此 XIP 型和 TLXI 型可分别归为病程相关蛋白(pathogenesis-related proteins) PR5 和 PR8 类型。TAXI- I 型抑制剂基因的表达受病原体的诱导。已证实三类木聚糖酶抑制剂参与植物的抗病防御反应。本实验只初步分析了不同小麦品种中 XIP I、TAXI- I、TLXI 三类木聚糖酶抑制

剂基因的分布, 各家族亚型之间的相关性及其与抗病性的关系还需要进一步深入研究。

3 材料与方法

3.1 试验材料

本实验选用了国内以及国外引种的 260 份小麦品种进行分子克隆检测, 其中包括引种材料 35 份、地方品种 1 份、育成或推广品种 224 份。国内品种/品系分别来自陕西、四川、重庆、河南、山东、河北、安徽、江苏、云南、湖北等多个不同麦区, 实验材料具有一定的代表性和广泛性。

3.2 试验方法

3.2.1 引物的合成

参照 Igawa、Fierens 等人发表的引物, XIP-1/F1/XIP-1/R1 引物对特异扩增 XIP- I 基因序列; TAXI-5/TAXI-3 引物对特异扩增 TAXI- I 序列; Lintf/Xi2 引物对特异扩增 TLXI 序列。PCR 特异引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成(见表 1)。

表 1 木聚糖酶抑制蛋白基因扩增引物

Table 1 Xylanase inhibiting protein genes amplification primers

扩增基因	引物名称	引物序列(5to3)	扩增长度	退火温度	参考文献
Amplification gene	Primers name	Primers sequences (5to3)	Length	Annealing temperature	Reference
XIP- I	XIP-1/F1	CTAGCCAGTACTTGGAGAAACCAA	939	59°C	Igawa et al., 2005
	XIP-1/R1	GGATCAAACCGACGGTGATGCAAG			
TAXI- I	TAXI-5	CAAGAAAGATGCCACCAGTG	1256	58°C	Fierens et al., 2003
	TAXI-3	GTAGTGGACGAATCCACCTGTC			
TLXI	Lintf	CAAGCGCGGCACCGCTCACCATC	561	55°C	Fierens et al., 2003
	Xi2	AATACCTGACACACGTGTACGG			

3.2.2 基因组总 DNA 的提取

取 2 粒小麦籽粒磨碎, 参照孙道杰博士论文“小麦籽粒 PPO 活性分子标记及面粉黄色素相关基因研究”中描述的方法(孙道杰, 2005), 提取小麦基因组总 DNA, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

3.2.3 PCR 检测

PCR 扩增于 BIO-RAD My Cyclyer 1.0 上进行。反应体系为: 总体积 10 μ L, 其中含有 0.25 mmol/L dNTP, 1 \times PCR Buffer, 2.5 mmol/L Mg²⁺, 上下游引

物各 0.25 μ mol/L, 0.5 U DNA Taq 聚合酶, 40 ng 模板共 30 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存。PCR 扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶, DNA。

PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 50 sec, 50°C~60°C 退火 55 sec; 72°C 延伸 1 min, 以 120V 恒压电泳分离, EB 染色, 凝胶成像系统照相保存。

作者贡献

牛存秀、高雅、陈璨是本研究的实验设计和实验研究

的执行人; 司红起、牛存秀完成数据分析, 论文初稿的写作; 高雅、陈璨参与实验设计, 试验结果分析; 王永玖为本实验提供实验材料; 马传喜、司红起是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由现代农业产业技术体系(nycytx-03)和国家科技支撑计划(2009BADA6B01)共同资助, 本文中提到了我们实验中涉及的有关试剂供应商和测序服务商, 这并非我们为这些试剂供应商和测序服务商的产品和服务提供推荐或背书。

参考文献

- Brutus A., Villard C., Durand A., Tahir T., Furniss C., Puigserver A., Juge N., and Giardina T., 2004, The inhibition specificity of recombinant *Penicillium funiculosum* xylanase B towards wheat proteinaceous inhibitors, *Biochim Biophys Acta*, 1701(1-2): 121-128
- Debyser W., Derdelinckx G., and Delcour J.A., 1997, Arabinoxylan solubilisation and inhibition of the barley malt xylanolytic system by wheat during mashing with wheat wholemeal adjunct: Evidence for a new class of enzyme inhibitors, *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 55: 153-156
- Debyser W., Peumans W.J., Van Damme E.J.M., and Delcour J.A., 1999, Triticum aestivum xylanase inhibitor (TAXI- I), a new class of enzyme inhibitor affecting breadmaking performance, *J. Cereal Science*, 30(1): 39-43
- Elliott G.O., Hughes R.K., Juge N., Kroon P.A., and Williamson G., 2002, Functional identification of the cDNA coding for a wheat endo-1, 4- β -D-xylanase inhibitor, *FEBS Letters*, 519(1-3): 66-70
- Fierens E., Rombouts S., Gebruers K., Goesaert H., Brijs K., Beaugrand J., Volckaert G., Van Campenhout S., Proost P., Courtin C.M., and Delcour J.A., 2007, TLXI, a novel type of xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*) belonging to the thaumatin family, *Biochem J.*, 403(3): 583-591
- Fierens K., Brijs K., Courtin C.M., Gebruers K., Goesaert H., Raedschelders G., Robben J., Van Campenhout S., Volckaert G., and Delcour J.A., 2003, Molecular identification of wheat endoxylanase inhibitor TAXI-I, member of a new class of plant proteins, *FEBS Lett*, 540(1): 259-263
- Gebruers K., Debyser W., Goesaert H., Proost P., Van Damm E.J., and Delcour J.A., 2001, *Triticum aestivum* L.endoxylanase inhibitor (TAXI) consists of two inhibitors, TAXI-I and TAXI-II, with different specificities, *Biochem icaf Journaf*, 353(2): 239-244
- Goesaert H., Elliott G., Kroon P.A., Gebruers K., Courtin C.M., Robben J., Delcour J.A., Juge N., 2004, Occurrence of proteinaceous endoxylanase inhibitors in cereals, *Biochim Biophys Acta*, 1696(2): 193-202
- Igawa T., Ochiai-Fukuda T., Takahashi-Ando N., Ohsato S., Shibata T., Yamaguchi I., and Kimura M., 2004, New TAXI-type xylanase inhibitor genes are inducible by pathogens and wounding in hexaploid wheat, *Plant Cell Physiol*, 45(10): 1347-1360
- Juge N., Payan F., and Williamson G., 2004, XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: A novel protein function, *Biochim Biophys Acta*, 1696(2): 203-211
- McLauchlan W.R., Garcia-Conesa M.T., Williamson G., Roza M., Ravestein P., and Maat J., 1999, A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases, *Biochemical Journaf*, 338(2): 441-446
- Takahashi-Ando N., Inaba M., Ohsato S., Igawa T., Usami R., and Kimur Ma., 2007, Identification of multiple highly similar XIP-type xylanase inhibitor genes in hexaploid wheat, *Biochem Biophys Res Commun*, 360(4): 880-884
- Raedschelders G., Fierens K., Sansen S., Rombouts S., Gebruers K., Robben J., Rabijns A., Courtin C.M., Delcour J.A., Van Campenhout S., and Volckaert G., 2005, Molecular identification of wheat endoxylanase inhibitor TAXI-II and the determinants of its inhibition specificity, *Biochem Biophys Res. Commun*, 335(2): 512-522
- Weng X.Y., Huang Y.Y., Gao H., and Sun J.Y., 2010, Characterization of a xylanase inhibitor TAXI-I from wheat, *Biologia Plantarum*, 54(1): 154-158
- Igawa T., Tokai T., Kudo T., Yamaguchi I., and Kimura M., 2005, A wheat xylanase inhibitor gene, Xip- I, but not Taxi- I, is significantly induced by biotic and abiotic signals that trigger plant defense, *Biosci. Biotechnol Biochem*, 69(5): 1058-1063
- Sun D.J., 2005, Development of molecular marker for grain PPO activity and detection of flour yellow pigment candidate genes in bread wheat, Dissertation for Ph.D., Northwest A & F University, Supervisor: Wang H., He Z.H., Xia X.,C., pp.27-28 (孙道杰, 2005, 小麦籽粒PPO活性分子标记及面粉黄色素相关基因研究, 博士学位论文, 西北农林科技大学, 导师: 王辉, 夏先春, pp.27-28)