

栗小英,刘景坤,张艳俊,等. 信号分子与叶锈菌诱导下小麦病程相关蛋白 1 基因的表达分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):28-31.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.007

信号分子与叶锈菌诱导下小麦病程相关蛋白 1 基因的表达分析

栗小英, 刘景坤, 张艳俊, 王海燕, 刘大群

(河北农业大学植物保护学院/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心,河北保定 071000)

摘要:病程相关蛋白 1 (pathogenesis-related proteins1, PR1) 是一类以基因家族形式存在的重要病程相关蛋白,在前期研究中,在小麦抗叶锈病近等基因系材料 TaLr35 中成功获得了 1 个小麦病程相关蛋白 1 基因 *TaLr35PR1*,具有植物防御体系中的 SCP 保守结构域。利用生物信息学方法进一步明确,该基因含有信号肽,定位于细胞间隙,可能含有跨膜结构域,相对分子量为 17.3 ku,与多个植物病程相关蛋白 1 序列具有较高同源性;利用半定量 RT-PCR 方法结合 genetools、SPSS 软件分析 *TaLr35PR1* 基因表达模式,结果表明,信号分子水杨酸(salicylic acid, SA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)明显诱导该基因表达,且用信号分子预处理后接种叶锈菌,基因表达量明显增加;构建了 *TaLr35PR1* 基因的原核表达载体 pEASY-PR1,在大肠杆菌中高效表达分子量约为 17 ku 的融合蛋白,明确其最佳诱导条件为在 0.8 mmol/L IPTG 下于 25 ℃ 诱导 8 h。

关键词:叶锈菌;信号分子;病程相关蛋白 1;表达分析;原核表达

中图分类号: Q756 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0028-04

植物在长期的进化过程中,为了抵抗病害对自身生长的不良影响,在一定程度上发展了感受生物胁迫信号的机制,通过体内的信号传导途径,激发转录因子与相应的顺式作用元件的结合,进而启动特定基因的转录和表达,最后导致植物对胁迫作出反应^[1]。病程相关(pathogenesis-related, PR)蛋白质在信号传递与胁迫应答中起调节作用。PR 基因的最初发现主要是由于它们在植物受到病原物侵染时会大量表达。PR 蛋白质除了在抗病反应中发挥重要作用外,在植物抗衰老、伤害、非生物逆境胁迫和激素处理,以及正常生长中也发挥重要作用。在 PR 蛋白家族中,PR1 是一类重要的蛋白,但对其作用机制以及靶物质还尚不了解^[2]。水杨酸(salicylic acid, SA)或乙烯(ethylene)可诱导 PR1 基因的表达,常被作为系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)的分子标记^[3],因此,PR1 基因编码的蛋白质成为目前的研究热点。

PR1 蛋白最早从烟草中发现,随后从许多单子叶和双子叶植物中鉴定出 PR1 基因。PR1 是一类可经病原菌和 SA 大量诱导表达的 PR 蛋白,蛋白分子量为 14~17 ku,有酸性和碱性,大多呈碱性。PR1 被证实具有抗病毒扩散、限制真菌入侵和保护植物抵御逆境胁迫等功能^[4-5]。Agrawal 等研究证明 *OsPR1a*、*OsPR1b* 基因受茉莉酸(jasmonic acid, JA)、SA、过氧化氢(H₂O₂)、蛋白酶抑制剂斑蝥素(cantharidin, CN)、草藻

灭(endothall, EN)和稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)的诱导,对光伤害及磷酸酶抑制剂等环境胁迫和化学处理作出反应^[6-8]。杨德翠等研究发现,PR1 基因表达量与水杨酸的积累密切相关,表达量的升高增强了牡丹对柱枝孢叶斑病(*Cylindrocladium canadense*)的抗性,并且发现该病侵染牡丹 24 h 后,PR1 基因的表达显著提高^[9]。

小麦(*Triticum aestivum*)是重要的粮食作物,是全世界一半以上人口的主粮。小麦生产经常受到病虫害的威胁,尤其由小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)引起的小麦叶锈病是威胁全球小麦稳产高产的主要病害之一。小麦抗叶锈病基因 *Lr35*,其抗性从 2 叶期开始表达,6 叶期完全表达,是 1 个十分有效的成株抗叶锈病基因。笔者前期利用 RT-PCR 和 cDNA 末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术从含有小麦抗叶锈病基因 *Lr35* 的近等基因系材料 TeLr35 中获得 1 个 PR1 基因的 cDNA 全长,命名为 *TaLr35PR1*^[10]。本研究拟利用半定量 RT-PCR 明确 *TaLr35PR1* 基因在受叶锈菌和信号分子诱导后核酸水平的表达特征,为进一步探究其在生物与非生物胁迫过程中的功能及了解生物胁迫应答机理提供线索。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物材料为携带小麦抗叶锈病基因 *Lr35* 的回交 6 代近等基因系材料 TeLr35,及与其遗传背景相同的感病亲本“Thatcher”;供试小麦叶锈菌菌株为 07-10-426-1 (PHNT),该菌株对 TeLr35 呈非亲和反应(反应型为 1 型),对 Thatcher 呈亲和反应(反应型为 4 型)。各种限制性内切酶、质粒、胶回收试剂盒、Taq DNA 聚合酶购自生工生物工程上海(股份)有限公司;原核表达载体 pEASYTM-E1 购自北

收稿日期:2014-08-27

基金项目:国家重点基础研究发展计划(编号:2013CB127700);河北省自然科学基金(编号:C2012204005)。

作者简介:栗小英(1988—),女,河北张家口人,硕士研究生,研究方向为分子植物病理。E-mail:506112516@163.com。

通信作者:王海燕,副教授,主要从事分子植物病理学研究。E-mail:ndwanghaiyan@163.com。

京全式金生物技术有限公司。

1.2 试验方法

化学试剂处理:参考 Zambounis 等的方法^[11] 配制 50 $\mu\text{mol/L}$ SA 溶液、50 $\mu\text{mol/L}$ ABA 溶液,喷洒于六叶期的成株小麦叶片表面至溶液滴下,于 18~25 $^{\circ}\text{C}$ 、光照时间 10~14 h 的温室培养,处理 3 d 后,开始接种叶锈菌 07-10-426-1 (孢子萌发率为 80% 以上),以未接菌处理为对照,分别在接种后 0、6、12、24、36、48、72、120 h 取 0.1 g 叶片,液氮速冻后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 储藏备用。

1.3 总 RNA 的提取和 cDNA 第 1 链的合成

采用 Bio-Flux 公司的 BIOZOL 试剂盒提取小麦各处理样品总 RNA,按照宝生物工程(大连)有限公司的反转录酶试剂盒说明书合成 cDNA 第 1 链。反转录合成的模板直接用于 *PR1* 基因的半定量 RT-PCR 分析。

1.4 小麦 *TaLr35PR1* 生物信息学分析

利用 SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMM (<http://www.hsls.pitt.edu/obrc/index/>)、ProtScale (<http://expasy.org/tools/>) 和 Spidey (<http://www.nebi.nlm.nih.gov/spidey/>) 在线工具完成对基因结构模式的分析。分别利用 SOPMA 程序和 Phyre2 在线工具完成对蛋白质二级、三级结构的预测。

1.5 小麦 *TaLr35PR1* 基因表达模式分析

根据 *TaLr35PR1* 基因开放阅读框(open reading frame, ORF) 设计特异引物 *TaLr35PR1*-F、*TaLr35PR1*-R (*TaLr35PR1*-F: 5'-CCCAAGCTTTAGTATGGTTTCTGTC-CAATGAT-3'; *TaLr35PR1*-R: 5'-CGCGGATCCAACTCGC-CTCAGGACTAC-3'), 以小麦中组成型表达的基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因(GenBank 登录号: AF251217; GAPDH-F: 5'-AACTGCCTTGCTCTCTTGC-3'; GAPDH-R: 5'-CTGTTGT-CACCCTGGAAGTCA-3') 作为内标基因。以叶锈菌、ABA、SA 处理后不同时间点的小麦叶片的 cDNA 为模板进行半定量 RT-PCR。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环。每个样品设 3 个重复。试验数据通过 genetools 软件得出表达量大小, 利用 SPSS 软件计算方差和显著性, 综合进行分析, 获得 *TaLr35PR1* 基因的相对表达量。

1.6 小麦 *TaLr35PR1* 原核表达载体的构建与诱导表达

设计原核表达特异引物 YTaLr35PR1-F: 5'-CGCGGATCCAACTCGCTCAGGACTAC-3'; YTaLr35PR1-R: 5'-CCCAAGCTTTAGTATGGTTTCTGTC-CAATGAT-3'; PCR 产物与表达载体 pEASY-E1 进行连接并转化。首先使用 PCR 扩增用引物验证目的片段与载体连接是否成功, 再利用上游引物 YTaLr35PR1-F 和载体自带 T7 终止子引物 T7terminator (5'-TAGTTATTGCTCAGCGGTGG-3') 验证目的片段插入的方向性, 然后转入表达载体 BL21(DE3) 感受态细胞后进行诱导表达。

2 结果与分析

2.1 小麦 *TaLr35PR1* 基因特征分析

ProtScale 软件^[12] 预测 *TaLr35PR1* 编码的蛋白总体表现为

疏水性; SignalP 4.1^[13] 预测 *TaLr35PR1* 氨基酸序列具有信号肽, 信号肽酶切位点在第 1~24 个氨基酸残基之间。利用 SMART 在线软件对 *TaLr35PR1* 基因进行结构分析, 结果表明该基因具有保守的抗真菌结构域 SCP(图 1); 利用 Phyre2 软件分析, 结果表明该基因由 4 条 α 螺旋、4 条 β 折叠构成, 呈三明治般的 $\alpha\beta\alpha$ 结构。

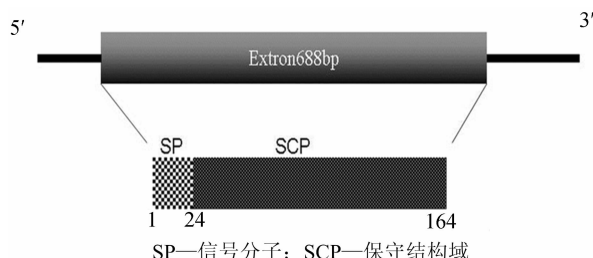
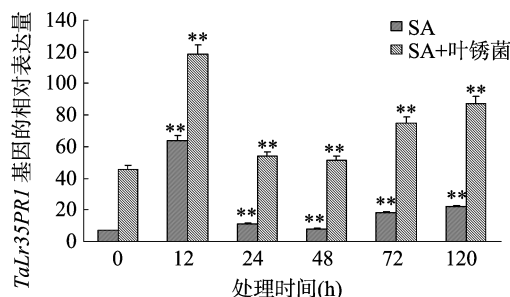


图1 *TaLr35PR1* 基因结构模式

2.2 小麦 *TaLr35PR1* 基因表达模式

2.2.1 SA 诱导叶片中 *TaLr35PR1* 基因的表达谱分析

50 $\mu\text{mol/L}$ SA 胁迫处理后, *TaLr35PR1* 基因表达量在处理 12 h 明显增加, 并达到最大, 约为对照组(0 h)表达量的 7.6 倍; 之后随着时间延长, 表达量减少, 到 120 h 又略有增加, 约为对照组(0 h)表达量的 2.6 倍(图 2)。为了明确信号分子与叶锈菌的协调作用, 50 $\mu\text{mol/L}$ 水杨酸胁迫处理 3 d 后, 再接种叶锈菌, *TaLr35PR1* 基因表达量在接种 12 h 极显著增加并达到最大 ($P < 0.01$), 约为对照组(0 h)的 2.6 倍; 之后随着接种时间延长, 表达量显著减少, 到 120 h 又略有增加, 约为未接种对照组(0 h)表达量的 1.8 倍。水杨酸预处理后再接种叶锈菌的表达趋势与未接菌处理基本一致, 但整体表达水平高于未接菌处理; 接菌 0 h 后, *TaLr35PR1* 基因表达量约为未接菌处理 5.9 倍。上述结果均扣除了 Thatcher 的表达量。



“*”代表与对照相比差异显著($P < 0.05$); “***”代表与对照相比差异极显著($P < 0.01$)。图3同

图2 50 $\mu\text{mol/L}$ SA及接菌处理 *TaLr35PR1* 基因的表达

2.2.2 ABA 诱导叶片中 *TaLr35PR1* 基因的表达谱分析

50 $\mu\text{mol/L}$ ABA 胁迫处理后, *TaLr35PR1* 基因表达量在处理 12 h 明显增加, 72 h 达到表达高峰, 约为对照组(0 h)表达量的 3.6 倍, 至 120 h 表达量减少(图 3)。为了明确信号分子与叶锈菌的协调作用, 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 脱落酸胁迫预处理后, 再接种叶锈菌。结果表明, *TaLr35PR1* 基因表达量在接种 12 h 后显著增加, 至 72 h 达到最大 ($P < 0.05$), 约为未接种对照组(0 h)的 1.8 倍; 之后随着接种时间延长, 表达量稍有减少, 整体表达趋势与未接菌处理一致, 但表达量明显高于未接菌处理; 接菌 0 h 后, *TaLr35PR1* 基因表达量约为脱落酸处理(0 h)的 3.2 倍。上述结果均扣除了 Thatcher 的表达量。

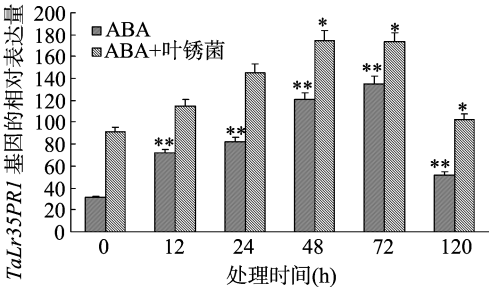


图3 50 μmol/L ABA 及接菌处理 *TaLr35PR1* 基因的表达

2.3 *TaLr35PR1* 基因原核表达载体的构建

利用 pEASY - E1 表达试剂盒构建表达载体 *TaLr35PR1* - pEASY,为验证目的片段是否与载体成功连接,利用 Y*TaLr35PR1* - F、Y*TaLr35PR1* - R 引物进行 PCR 扩增,对重组子进行初筛,获得约 420 bp 左右的片段,与该引物对 *TcLr35* 总 RNA 的 PCR 扩增产物大小一致,说明目的基因已经整合到 pEASY - E1 载体上。为验证目的片段插入载体的方向是否正确,使用 Y*TaLr35PR1* - F、T7terminator 重组引物对重组子进行筛选,预期扩增产物为目的片段与载体序列的重组片段,获得约 500 bp 左右的片段(图 4),证明插入载体的方向正确。测序结果进一步表明,目的片段插入表达载体的位置和读码框正确。

2.4 *TaLr35PR1* 基因的体外诱导表达

以不同温度、不同 IPTG 浓度、不同时间诱导转化了表达载体 pEASY - PR1 的大肠杆菌 BL21 (DE3)。经 SDS - PAGE

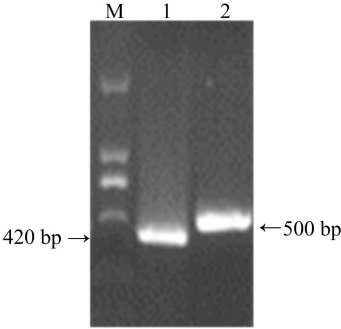


图4 表达载体 *TaLr35PR1*-pEASY 鉴定结果

分析可见,在 25 ℃ 温度下,诱导的 pEASY - PR1 在 17 ku 左右产生 1 条新的诱导条带,大小与理论值推算相符,而在 27 ℃ 温度下未见明显诱导条带(图 5 - A);以未经诱导的 pEASY - PR1 为对照,0.01 ~ 0.80 mmol/L IPTG 诱导菌株均产生 1 条约 17 ku 的新条带,确定 0.80 mmol/L IPTG 为最佳的诱导浓度(图 5 - B);随着诱导时间的延长,诱导 2 h 蛋白表达量增加明显,6 h 至过夜趋于稳定,最佳诱导时间为 8 h (图 5 - C)。结果表明,小麦 *TaLr35PR1* 基因在大肠杆菌中得到了高效表达,获得了分子量约为 17 ku 的融合蛋白,最佳诱导条件为在 0.8 mmol/L IPTG 下于 25 ℃ 诱导 8 h。

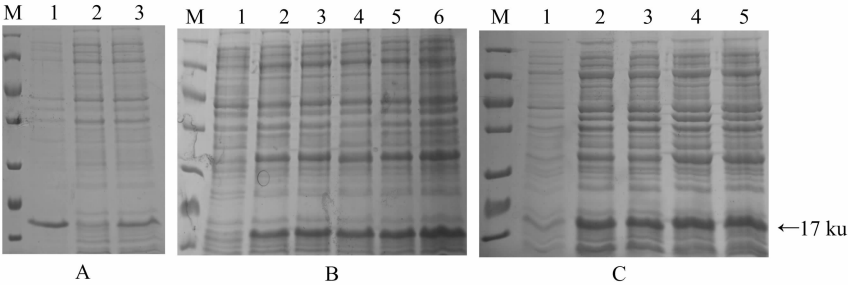


图5 不同条件诱导对融合蛋白表达的影响

3 结论与讨论

有报道证明拟南芥在抵抗病原物后的茉莉酸(JA)、SA 信号转导网络协调拟南芥抗病性^[14]。此外,在病原物侵染前用 SA 处理拟南芥,发现可以诱导 SAR 反应以及 PR 蛋白的表达,以增强抗病能力^[15]。*PR1* 基因能被病菌侵染和信号分子胁迫所诱导^[16-17],*PR1* 基因的表达增强了植物抵御病害和其他各种胁迫的能力。机械损伤、植物激素(JA、SA、ET)、蛋白磷酸酶抑制剂斑蝥素(CN)、草藻灭(EN)都能诱导水稻 *OsPR1a* 基因的表达^[18]。SA 介导的 SAR 反应主要对活体营养型病菌起作用,而 JA/ET 介导的抗病信号途径对抵抗腐生型真菌侵染起到作用^[19]。棉花的 *PR3*、*PR10*、*GST18* 基因在转录水平上不仅受 JA、SA 的诱导,而且受棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)诱导后表达水平显著

上调^[11]。小麦叶锈菌为典型的活体营养型病菌。本研究旨在明确 SA 和叶锈菌诱导对 *TaLr35PR1* 基因表达的影响,结果发现 *TaLr35PR1* 基因表达受 SA 单独诱导;同时,在 SA 胁迫处理后再接种叶锈菌,*TaLr35PR1* 基因表达趋势与 SA 诱导表达趋势一致,而且 SA 与叶锈菌协同作用显著增加了 *TaLr35PR1* 表达量,且其表达量明显高于叶锈菌单独诱导。

ABA 是调节植物生长发育的一种激素。当植物面临不利的自然环境时,植物体内 ABA 的含量会增加,进而促进植物生长。植物体内存在 ABA、非 ABA 2 种调节系统^[20]。实现这种调节必须能够顺利完成从刺激到准确反应的一系列信号转导过程,这主要包括以受体为中心的脱落酸信号的细胞识别、以第二信使为中心的胞内信号转换,以及以蛋白磷酸化为中心的信号放大与传导等过程^[14]。在前期研究中证明 ABA 可以诱导病程相关蛋白的表达^[21],在本研究中发现

TaLr35PR1 基因表达受 ABA 诱导,而且脱落酸与叶锈菌协同作用明显诱导 *TaLr35PR1* 基因的表达,而且表达量显著高于 SA 和叶锈菌单独诱导。基于 2 种信号分子对 *TaLr35PR1* 基因的诱导表达模式,推测小麦 *TaLr35PR1* 基因在参与小麦抗叶锈病防御反应时,可能通过 SA、ABA 2 种信号途径,但具体作用机制还需进一步探讨。

水稻、小麦等作物中关于病程相关蛋白从蛋白水平验证抗病性的研究报道较多。李雪姣等研究发现,在水稻与白叶枯病菌互作时,病程相关蛋白 1 家族在接菌后不同时间点、不同生长期都发挥作用^[22]; 关明俐等的研究有力地证明了不同的病程相关蛋白在水稻与白叶枯病菌互作时发挥作用^[23]; 此外,牛吉山等应用 RT-PCR 和 cDNA 文库筛选技术,从抗白粉病小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系中分离到 1 个小麦类甜蛋白基因的全长 cDNA, Western 分析表明其可能与小麦 6VS/6AL 易位系的抗白粉病性相关^[24]; 余宇克隆得到了小麦类甜蛋白基因的全长序列,并利用原核表达得到纯度较高的类甜蛋白^[25]。后续研究将进一步制备单克隆抗体,从蛋白水平分析其表达模式,并分析其他信号分子对该基因的影响,探析信号传递途径。

参考文献:

- [1] Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(4): 436-442.
- [2] Hou M, Xu W, Bai H, et al. Characteristic expression of rice pathogenesis-related proteins in rice leaves during interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Plant Cell Reports*, 2012, 31(5): 895-904.
- [3] van Loon L C, van Strien E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1999, 55(2): 85-97.
- [4] Cutt J R, Harpster M H, Dixon D C, et al. Disease response to tobacco Mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related *PR1b* gene [J]. *Virology*, 1989, 173(1): 89-97.
- [5] Rauscher M, Adám A L, Wirtz S, et al. PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean [J]. *The Plant Journal*, 1999, 19(6): 625-633.
- [6] Agrawal G K, Jwa N S, Rakwal R. A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic *PR1* gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 274(1): 157-165.
- [7] Agrawal G K, Rakwal R, Jwa N S. Rice (*Oryza sativa* L.) *OsPR1b* gene is phytohormonally regulated in close interaction with light signals [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 278(2): 290-298.
- [8] Agrawal G K, Rakwal R, Jwa N S, et al. Signalling molecules and blast pathogen attack activates rice *OsPR1a* and *OsPR1b* genes: a model illustrating components participating during defence/stress response [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, 39(12): 1095-1103.
- [9] 杨德翠, 张玉喜, 郑国生. 牡丹病程相关蛋白 1 基因的克隆及表达分析 [J]. *园艺学报*, 2013, 40(8): 1583-1590.
- [10] 王海燕, 刘大群, 杨文香, 等. *TcLr35* 小麦中病程相关蛋白 1 基因的克隆及分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2007, 8(1): 16-20, 29.
- [11] Zambounis A G, Kalamaki M S, Tani E E, et al. Expression analysis of Defense-Related genes in cotton (*Gossypium hirsutum*) after *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* infection and following chemical elicitation using a salicylic acid analog and methyl jasmonate [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012, 30(1): 225-234.
- [12] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157(1): 105-132.
- [13] Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, et al. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites [J]. *Protein Engineering*, 1997, 10(1): 1-6.
- [14] Berrocal-Lobo M, Molina A. Arabidopsis defense response against *Fusarium oxysporum* [J]. *Trends in Plant Science*, 2008, 13(3): 145-150.
- [15] Edgar C I, McGrath K C, Dombrecht B, et al. Salicylic acid mediates resistance to the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* in the model host *Arabidopsis thaliana* [J]. *Australas Plant Pathology*, 2006, 35(6): 581-591.
- [16] Tang Y, Kuang J F, Wang F Y, et al. Molecular characterization of *PR* and *WRKY* genes during SA- and MeJA-induced resistance against *Colletotrichum musae* in banana fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2013, 79: 62-68.
- [17] Agrawal G K, Jwa N S, Rakwal R. A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic *PR1* gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 274(1): 157-165.
- [18] von Dahl C C, Baldwin I T. Deciphering the role of ethylene in plant herbivore interactions [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2007, 26: 201-209.
- [19] Glazebrook J. Contrasting mechanism of defence against biotrophic pathogens [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2005, 43: 205-227.
- [20] Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J K. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(395): 225-236.
- [21] 栗小英, 高琳, 张艳俊, 等. 叶锈菌及信号分子诱导小麦 *TcLr35* 中 β -1,3-葡聚糖酶基因的表达式分析 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47(14): 2774-2783.
- [22] 李雪姣, 范伟, 牛东东, 等. 水稻病程相关 PR1 家族蛋白质在叶片生长及与白叶枯病菌互作反应中的表达 [J]. *植物学报*, 2014, 49(2): 127-138.
- [23] 关明俐, 窦世娟, 李雪姣, 等. 病程相关蛋白质在水稻与白叶枯病菌互作过程中的表达 [J]. *中国农业科学*, 2013, 46(20): 4179-4188.
- [24] 牛吉山, 于玲, 陈佩度, 等. 小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系叶片 cDNA 文库构建及鉴定 [J]. *南京农业大学学报*, 2001, 24(1): 5-8.
- [25] 余宇. 小麦类甜蛋白 *TLP* 基因的克隆与原核表达 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.