

小麦高分子量麦谷蛋白亚基鉴定及其品质效应研究进展

刘会云¹, 刘畅¹, 王坤杨¹, 杜丽璞¹, 王轲¹, 余茂云², 叶兴国¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所/国家基因资源与遗传改良重大科学工程, 北京 100081; ²安徽省农业科学院作物研究所, 合肥 230031)

摘要:高分子量谷蛋白亚基(HMW-GS, high molecular weight glutenin subunits)是小麦子粒贮藏蛋白的重要组成部分, 其组成、搭配、表达水平及含量决定面团弹性和面包加工品质。本文主要介绍了小麦 HMW-GS 编码基因的克隆、分子特征、分子标记开发及其在小麦育种中的应用, 并综述了不同 HMW-GS 与面粉加工品质之间的关系, 以及 HMW-GS 基因遗传转化、微量配粉和突变体培育等方面的研究进展, 分析了目前研究中存在的主要问题, 认为通过分子标记辅助选择和转基因技术聚合优质亚基, 培育优质面包小麦品种和明确各个 HMW-GS 基因的品质效应是今后的研究重点。

关键词:小麦; 高分子量谷蛋白亚基; 无性系变异体; 基因克隆; 面包品质

Review on the Identification and Bread-making Quality of High Molecular Weight Glutenin Subunits in Wheat

LIU Hui-yun¹, LIU Chang¹, WANG Kun-yang¹, DU Li-pu¹, WANG Ke¹, SHE Mao-yun², YE Xing-guo¹

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081; ²Crop Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

Abstract: High molecular weight glutenin subunits (HMW-GS) are the most important components in the storage protein of wheat grains. Their compositions, expressions and contents determine the dough elasticity and baking-quality. This article summarized the progress of cloning, molecular characterization and functional studies of HMW-GS as well as their marker development and application in wheat breeding. Update status of different HMW-GS effects on flour processing quality, genetic transformation of several HMW-GS genes, small-scale mixograph analysis by adding prokaryotic expressed HMW-GS, and mutant developing on HMW-GS loci, were also reviewed. Besides, crucial issues in current studies on wheat HMW-GS were discussed. It is suggested that the key point on HMW-GS in the future will be to pyramid some desirable HMW-GS genes by marker assisted selection and transgenic strategies for the development of wheat varieties with good bread-making quality and the functional dissection of each HMW-GS gene accurately.

Key words: wheat; high molecular weight glutenin subunits; somatic variation; gene cloning; bread-making quality

小麦(*Triticum aestivum* L.)是异源六倍体作物, 包括 A、B、D 3 个基因组。作为世界上最重要的粮食作物之一, 小麦产量大部分作为食用, 仅约 1/6 用

作饲料。小麦的营养价值高, 子粒富含糖类、蛋白质、脂肪三大营养物质, 同时富含钙、铁等矿物质, 以及硫胺素、核黄素、烟酸及维生素 A 等维生素。小

收稿日期: 2015-10-21 修回日期: 2015-12-03 网络出版日期: 2016-04-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160608.1434.022.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31371621); 安徽省农业科学院科技创新团队项目(13C0202); 安徽省种子工程项目(14D0202)

第一作者主要从事小麦品质改良基因工程研究。E-mail: 15093139524@163.com

通信作者: 叶兴国, 主要从事小麦分子育种研究。E-mail: yexingguo@caas.cn

麦面粉和面团具有独特的物理特性,即粘弹性和延展性,适合制作面包、披萨、面条、馒头、糕点、饼干等食品。

小麦子粒蛋白按功能可分为代谢蛋白和贮藏蛋白,代谢蛋白包括酶蛋白、水溶性的清蛋白、盐溶性的球蛋白等。贮藏蛋白的种类和特性对小麦面粉的加工特性起主要决定作用^[1],包括麦醇溶蛋白(Gliadins)和麦谷蛋白(Glutenins)两大类,约占子粒蛋白总量的85%左右^[2]。麦醇溶蛋白主要包括 α 、 β 、 γ 和 ω 4种类型,影响面团的延展性^[3]。麦谷蛋白分为高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS, high molecular weight glutenin subunits)和低分子量麦谷蛋白亚基(LMW-GS, low molecular weight glutenin subunits),分别占胚乳总蛋白含量的10%和40%左右^[4]。研究表明, HMW-GS 分子量为80~130 kDa, 主要赋予面团弹性,而 LMW-GS 分子量为12~50 kDa, 赋予面团黏性^[5]。尽管 HMW-GS 在子粒中的含量较低,

但是影响着约2/3的面包烘烤参数变异^[6],所以 HMW-GS 基因克隆和功能鉴定一直是国内外小麦品质改良研究的重点。

1 小麦 HMW-GS 亚基鉴定和编码基因克隆

HMW-GS 由小麦第一群染色体长臂上的 *Glu-A1*、*Glu-B1* 和 *Glu-D1* 的 *Glu-1* 位点编码^[7],每个位点包括2个紧密连锁的基因,即一个编码较大的 x-型亚基(分子量为80~88 kDa),另一个编码较小的 y-型亚基(分子量为67~73 kDa)^[8]。这2种亚基的主要差别是半胱氨酸含量和重复区的 motifs 组成不同^[3]。小麦及其近缘种属在 *Glu-1* 位点的等位变异十分广泛, P. I. Payne 等^[9]对中国春的 HMW-GS 进行 SDS-PAGE 分析,首次建立了小麦 HMW-GS 通用的标准图谱。目前,已经从不同倍性小麦及其野生近缘种中克隆了20多个 HMW-GS 基因(表1)。

表1 小麦及其野生种中克隆的部分 HMW-GS 基因的主要信息

Table 1 Information of some HMW-GS encoding genes in wheat and its wild relatives

亚基名称	GenBank 号	基因大小(bp)	供体品种	文献
HMW-GS name	GenBank number	Gene size	Donor lines	References
1Ax1	X61009	2885	Hope	[10]
1Ax2*	M22208	6837	Cheyenne	[11]
1Ay	X03042	8117	Cheyenne	[12]
1Bx7	X13927	20425	Cheyenne	[11]
1Bx7 ^{OE}	DQ119142	4392	<i>Triticum aestivum</i>	[13]
1Bx13	EF540764	2391	Atlas66, Jimai 20	[14]
1Bx14	KF733216	2373	Xiaoyan 54, Xiaoyan 6, Yanzhan 1, Shanyou 225	[15]
1Bx14	AY367771	4021	Xiaoyan 54, Olympic, Gabo	[16]
1Bx17	Q42451	789aa	Cheyenne	[11]
1Bx23	AY553933	3426	SY95-71	[17]
1By9	X61026	2996	Cheyenne	[18]
1By15	KF733215	2154	Xiaoyan 54, Xiaoyan 6, Yanzhan 1, Shanyou 225	[15]
1By16	EF540765	2220	Atlas66, Jimai 20	[14]
1By18	KF430649	2163	CB037	[19]
1By20	DQ086215	2418	Xiaoyan 6	[20]
1Dx2	X03346	3193	Yamhill	[21]
1Dx2.2	AY159367	2919	MG7249	[22]
1Dx2.2*	AJ893508	3072	MG315	[22]
1Dx5	X12928	8463	Cheyenne	[11]
1Dy10	X12929	6462	Cheyenne	[11]
1Dy12	X03041	3095	Chinese Spring	[23]
1Dx3 ¹	HM347447	2538	<i>Aegilops tauschii</i>	[24]
1Dx4 ¹	DQ307383	2527	<i>Aegilops tauschii</i>	[24]
1S ¹ x2.3*		2829	<i>Aegilops longissima</i>	[25-26]
1S ¹ y16*		2250	<i>Aegilops longissima</i>	[25-26]

研究发现, HMW-GS 的缺失、重复、转座、不均等交换都会引起麦谷蛋白多态性的产生^[27-28]。在小麦近源种属如山羊草、簇毛麦、燕麦草、冰

草、黑麦、赖草和大麦等植物中,已鉴定出一定数量的 HMW-GS^[24-26,29-31],根据蛋白结构判断,它们中的一些可能对小麦面粉的品质有正效应。

不同小麦品种中 HMW-GS 数量、电泳迁移率及其组合类型各不相同, L. Y. Gao 等^[32] 对不同小麦品种中的 HMW-GS 组成进行了 SDS-PAGE 分析, 鉴定出了多个 HMW-GS 基因, 如 *1Ax1*、*1Ax2*^{*}、*1Ax2*、*1Ax2.1*^{*}、*1Bx7*、*1By8*、*1Bx13*、*1Bx14*、*1By15*、

1By16、*1Bx17*、*1By18*、*1By19*、*1Bx20*、*1Bx23*、*1By20*、*1By22*^{*}、*1Dx2*、*1Dx2.2*、*1Dx3*、*1Dx5*、*1Dy10*、*1Dy12* 等 (图 1)。目前还发现了一些结构特殊的 HMW-GS 基因, 如 *1Bx7*^{OE}、*1Dx2.2*^{*}、*1S'x2.3*^{*}、*1S'y16*^{*} 等^[25,33-35]。

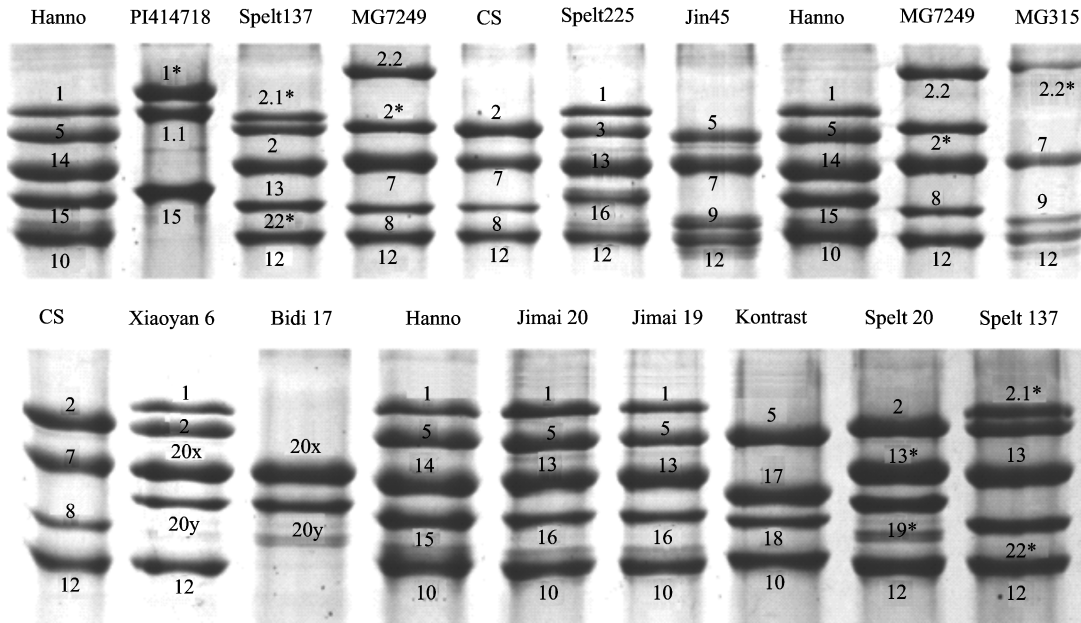


图 1 小麦中主要 HMW-GS 的 SDS-PAGE 鉴定^[32]

Fig. 1 Identification of important HMW-GSs in various bread wheat cultivars by SDS-PAGE^[32]

HMW-GS 编码基因在基因组结构上的一个最显著的特点是没有内含子, cDNA 与 gDNA 序列一致。如 *1By8* 基因的完整序列是 3020 bp, 包含 857 bp 的上游序列和一个没有内含子的 2166 bp 的开放读码框, 编码 720 个氨基酸。*1By8* 基因与 *1By9*、*1Ay*、*1Ax2*^{*}、*1Dx5* 和 *1Dy10* 进行序列比对, 发现它们在 5'侧翼区有着相似的结构, 包含真核生物的典型特点, 如 1 个 TATA 盒子, 谷物储藏蛋白编码基因中保守的 -300 元件, 以及真核生物中高度保守的 CCACC 序列^[34], 他们可能与贮藏蛋白组织特殊表达和有效地起始翻译相关。另外, 在 HMW-GS 基因的调控序列中鉴定出了 1 个高度保守的 TGA-CATGTAAAGTGAATAAG/ATGAGTCATG 序列, 被认为是 HMW-GS 基因表达的主要调控元件之一^[36]。

HMW-GS 编码基因的另一个显著特征是序列高度相似, 不同亚基主要体现在重复序列数目的差异, 保守区的序列高度一致。例如, *1By8* 亚基重复区具有典型的 y-型高分子量谷蛋白亚基特征, 由 58 个六肽 (PGQGQQ) 和 22 个九肽 (GYPTSLQQ) 组成串联重复区域, 而三肽 (GQQ) 多出现在 x-型高分子量谷蛋白亚基中, 在 *1By8* 亚基中没有出现。*1By8*

亚基与 *1By9* 亚基具有很高的序列相似性, 只是 *1By8* 亚基在第 342 位置出现了一个额外的 15 个氨基酸残基 (QYPASQQQPAQGQQG) 的插入。除此之外, *1By8* 亚基包含 157 个疏水性氨基酸残基, 而 *1Bx7* 亚基包含 168 个疏水性氨基酸残基, 所以 *1By8* 亚基的疏水性不如 *1Bx7* 亚基^[34]。

与 *1Bx20* 亚基相比, *1Bx14* 亚基有 4 个半胱氨酸残基, 在 366 ~ 370 位置有一个 SEQGQ 插入, 146 ~ 151 位置有一个 SGQGQQ 缺失, 在 521 ~ 526 位置有另外一个 QEQQSG 缺失^[15]。*1Bx20* 亚基与其他 x-型亚基 N 端氨基酸序列不同, 其前 47 个氨基酸残基中仅出现了 1 个半胱氨酸, 而在其他 x-型亚基中第 22 和 37 位置出现的半胱氨酸在 *1Bx20* 亚基中被酪氨酸取代^[37]。典型 x-型亚基 N 端区包含 3 个半胱氨酸, C 端区包含 1 个半胱氨酸^[27], 而 *1Bx20* 亚基仅包含 2 个半胱氨酸。除了含有比较少的半胱氨酸残基外, *1Bx20* 亚基在构象稳定性方面也不同于其他 HMW 亚基, 在 SDS 凝胶电泳中展现出一个不同的图像模式^[38]。认为 *1Bx20* 亚基中较低的半胱氨酸含量造成了较差的构象稳定性, 导致其较差的面团品质^[39]。

利用等位基因特异 PCR (AS-PCR) 方法先后从粗山羊草中克隆了 1Dx3' 和 1Dx4' 亚基的完整开放读码框^[24], 从高大山羊草中克隆了 1S¹x2.3* 和 1S¹y16* 亚基的完整开放读码框^[25]。其中, 1Dx3' 和 1Dx4' 的 DNA 序列长度分别为 2535 bp 和 2508 bp, 分别编码 845 和 836 个氨基酸, 编码蛋白的大小分别为 87.7 kDa 和 86.7 kDa。1Dx3' 与 1Dx4' 相比有 18 个 SNP 的差异, 1Dx3' 比 1Dx5 在 146 ~ 151 位置多了一段 6 个氨基酸的插入, 1Dx4' 相比 1Dx3' 存在一段 9 个氨基酸的缺失^[24]。1S¹x2.3* 和 1S¹y16* 的 DNA 序列长度分别为 2829 bp 和 2250 bp, 1S¹x2.3* 除具有典型 x-型亚基的结构特征外, 重复区含有一致性很高的三肽 (GQQ) 和六肽 (PGQGQQ 和 SGQGQQ) 重复^[25-26], 是 *Glu-B1* 位点目前发现编码最大 x-型 HMW-GS 亚基的谷蛋白基因, 其核苷酸长度仅比 *Glu-D1* 位点 2 个较大的 HMW-GS 基因 1Dx2.2 (2919 bp) 和 1Dx2.2* (3078 bp) 基因略小^[22]。1S¹y16* 是目前从小麦族植物 B 基因组中克隆获得的最大的 y-型 HMW-GS 基因, 它的重复区含有 52 个六肽。利用 SDS-PAGE 方法对山羊草属中 S¹、C、U、M、N 和中国春-高大山羊附加系中 1S¹ 基因组上编码的 HMW-GS 进行鉴定, 发现尾状山羊草、高大山羊草、中国春-高大山羊草附加系中存在比代换系大的 HMW-GS 亚基, 对克隆的 7 个 x-型 HMW-GS 基因的序列分析发现, 196x、123x、136x1、288x 和 1S¹x2.2 不仅含有较长的基因序列, 而且还含有很多整齐性的三肽和六肽重复, 其中, 1S¹x2.2 是目前克隆的第二大 HMW-GS 基因^[25-26]。

2 HMW-GS 基因功能分子标记开发

目前有 4 种方法可以鉴别小麦子粒中不同的 HMW-GS, 其中, SDS-PAGE 是最为常用的方法, 具有操作简单和低成本的优势, 但是该方法操作复杂、分辨率较低^[40]。反相高效液相色谱 (RP-HPLC, reversed-phase high-performance liquid chromatography) 分辨率高, 选择性好, 检测灵敏度高, 操作自动化, 但它的缺点是成本较高、用时较长, 不适合于分析大量样品。毛细管电泳法 (CE, capillary electrophoresis) 能克服 SDS-PAGE 和 RP-HPLC 的缺点, 但在进样量、制备能力、重复性等方面仍有不足。与以上的 3 种方法相比, 分子标记能反映生物个体或种群间基因组中具有差异的 DNA 片段, 可以有效区别 HMW-GS 的等位基因^[41]。

功能性分子标记是分子标记中的一种, 它不同于

其他分子标记, 通过对基因序列的扩增而与表达序列紧密连锁, 因而被广泛用于高密度遗传图谱的构建^[42]。为了方便地辨别出不同小麦品种中的高分子量谷蛋白亚基等位基因, 根据 HMW-GS 基因的 SNP 位点或插入和缺失片段, 利用多重 PCR 进行了功能分子标记开发^[43]。例如, 通过设计合适的 PCR 引物, 对 HMW-GS 基因进行扩增, *Glu-A1* 位点的 1Ax2* 基因出现了 1319 bp 的特异片段; *Glu-B1* 位点的 1Bx7 基因出现了 2 条 630 bp 和 766 bp 的共显性片段, 1Bx17 基因出现了 669 bp 的特异片段; *Glu-D1* 位点的 1Dx5 基因出现了 478 bp 的特异片段^[43]。目前, 已经成功开发了 1Dx5、1Dy10、1Dx2、1Dy12、1Ax2*、1Bx7^{OE}、1Bx6、1By8、1Bx17、1By18、1Bx7、1By8*、1Bx7、1By9、1Bx13、1By16、1Bx14、1By15 和 1Bx20 等基因的功能分子标记 (表 2)。基于这些特殊的分子标记, 对来自 20 个国家的 718 个小麦品种进行了检测, 结果发现, 311 个品种在 *Glu-A1* 位点具有 1Ax2* 亚基, 197 个品种在 *Glu-B1* 位点具有 1By8 亚基, 264 个品种在 *Glu-B1* 位点具有 1By9 亚基, 44 个品种在 *Glu-B1* 位点具有 1By16 亚基, 22 个品种在 *Glu-B1* 位点具有 1Bx7^{OE} 亚基, 446 个品种在 *Glu-D1* 位点具有 1Dx5 亚基。1Ax2* 亚基多出现在加拿大 (83.3%)、罗马尼亚 (91.7%)、俄罗斯 (72.2%)、美国 (72.2%) 的小麦品种中, 在智利 (22.0%)、中国 (20.4%)、德国 (1.3%) 的小麦品种中出现频率较低, 在奥地利和日本的小麦品种中没有出现。1By8 亚基在日本 (60.0%) 和罗马尼亚 (62.5%) 的小麦品种中出现的频率较高, 1By9 亚基多出现在奥地利 (100.0%) 和俄罗斯 (72.2%) 的小麦品种中, 1Dx5 亚基在匈牙利 (90.0%)、罗马尼亚 (95.8%)、俄罗斯 (88.9%) 和乌克兰 (92.3%) 的小麦品种中出现的频率较高^[47]。

根据 1Bx20 基因特异分子标记的检测结果, 发现 1Bx20 亚基广泛分布在四倍体硬粒小麦中, 在检测的 502 个品种中有 33.5% 品种中存在 1Bx20 亚基, 在法国 195 个品种中具有 1Bx20 亚基的品种占 32.8%^[48]。在六倍体普通小麦中, *Glu-B1* 位点编码的 HMW-GS 多态性最高, 尤其 1Bx17 + 1By18 和 1Bx14 + 1By15 组合有利于面包品种的改良。Q. Xu 等^[49]基于 *Glu-B1x* 基因序列, 设计了 2 对 PCR 标记, 可准确鉴别 *Glu-B1x* 位点编码的 5 个 HMW-GS, 并进一步在来源于 Jing771 与 Pm97034 的 22 个重组自交系中验证这 2 个标记, 认为利用 *Glu-B1x* 位点的分子标记辅助选择可加速小麦品质育种。

表 2 部分 HMW-GS 基因的分子标记
Table 2 Molecular markers developed for some HMW-GS

亚基名称	引物序列 (5'→3')	片段长度 (bp)	参考文献
Alleles name	Primer sequence (5'→3')	Fragment size	References
1Ax1	CGAGACAATATGAGCAGCAAG CTGCCATGGAGAAGTTGGA	362	[44]
1Ax2 *	ATGACTAAGCGGTTGGTTCTT ACCTTGCTCCCTTGCTCTTT	1319	[43]
1By8	TTAGCGCTAAGTGCCTCT TTGTCCTATTTGCTGCCCTT	527	[45]
1By9	TTCTCTGCATCAGTCAGGA AGAGAAGCTGTGTAATGCC	707,662	[45]
1Bx17	CGCAACAGCCAGGACAATT TGGTCCGTCCTACTATCTTGAGA	669	[43]
1Bx7 ^{OE}	CCACTTCCAAGGTGGGACTA TGCCAACACAAAAGAAGCTG	844	[13]
1Dx5	TGCCAACACAAAAGAAGCTG CGTCCCTATAAAAGCCTAGC AGTATGAAACCTGCTGCGGAC	478	[43]
1Dx2,1Dx5	GGGACAATACGAGCAGCAAA CTTGTTCCGGTTGTTGCCA	299,281	[44]
1Dy10,1Dy12	CGCAAGACAATATGAGCAAACT TTGCCCTTTGTCCTGTGTGC	397,415	[44]
1Ax1,1Ay1 ^{null} , 1Bx14,1By15, 1Dx2,1Dy12	TTGAACTCATTGGGAAGT GTCTGCTAAAGCCACGTAAT	528,463, 595,554, 526,543	[46]

3 HMW-GS 组成与面粉加工品质关系的常规分析

P. I. Payne 等^[50]利用 SDS-PAGE 分析了小麦谷蛋白组成,发现 1Ax1 亚基影响小麦面粉的烘烤品质,自此以来,人们对小麦 HMW-GS 组成与加工品质关系开展了大量研究。从目前在小麦及其近缘种属中鉴定的 20 多个 HMW-GS 来看,不同亚基组成和不同亚基组合对小麦面包加工品质的影响不同。已被认为是优质的 HMW-GS 亚基有 1Dx5 + 1Dy10、1Ax1、1By8、1Bx13 + 1By16 和 1S¹x2.3* + 1S¹y16*,而 1Dx2 + 1Dy12 和 1Bx20 属于对小麦加工品质有负向作用的 HMW-GSs^[15,22,25-26]。一般认为,重复区长、分子量大的 HMW-GS 对小麦加工品质的影响越大。1By8、1By9 和 1Dy10 亚基对面粉筋力的影响程度为 1Dy10 > 1By8 > 1By9,1Bx7 + 1By8 亚基组合对面筋的弹性和强度具有重要贡献^[51]。含有 *Glu-A1* 位点的 Ax1 和 Ax2* 亚基,*Glu-B1* 位点的 Bx7 + By8、Bx7 + By9、Bx13 + By16 亚基和 *Glu-D1* 位点的 Dx5 + Dy10 亚基的面团具有较高的弹性,更适合做面包^[52-54]。与 *Glu-B1* 位点的其他亚基相比,

1Bx20 亚基的存在导致面团加工品质变差,因此含有 1Bx20 亚基的小麦品种不适合做面包^[55]。对于面团加工品质来说,来自野生种的 196x、123x、136x1、288x、1Dx3¹、1Dx4¹和 1S¹x2.2 等认为是潜在的候选优质亚基^[24-26]。

对 10 个 HMW-GS 亚基不同组合的加工品质进行分析发现,含有 (1Bx7 + 1By8、1Dx5 + 1Dy10)、(Null、1Bx7 + 1By9、1Dx5 + 1Dy10)、(Null、1Ax1、1Bx7 + 1By9、1Dx5 + 1Dy10)和 (1Ax1、1Bx7 + 1By8、1Dx5 + 1Dy10)亚基组合的小麦品种其品质效应最佳^[56]。对小麦加工品质正向效应最大的是 1Dx5 + 1Dy10 亚基组合,1Bx7 + 1By8、1Ax2* 和 1Dx4 + 1Dy12 组合次之,而 1Bx6 + 1By8、1Dx2 + 1Dy12 组合及 1Bx20 和 Null 亚基的作用较小^[57]。对 162 份欧洲小麦品种的研究发现,在 *Glu-B1* 位点上不同亚基组合的品质效应依次是:1Bx13 + 1By16 ≥ 1Bx17 + 1By18 ≥ 1Bx7 + 1By9 = 1Bx7 + 1By8 = 1Bx7 = 1Bx6 + 1By8^[58]。尤其发现,1Bx13 + 1By16 亚基对面粉加工品质具有重要贡献^[59]。

贮藏蛋白是一个由大基因家族所编码的产物,不仅要考虑单个基因位点的效应,还需要考虑不同位点之间的互作效应^[60]。研究发现,*Glu-D1* 基因位点具有上位效应,只有与 *Glu-D1* 基因位点的 1Dx5 + 1Dy10 亚基同时存在时,*Glu-A1* 基因位点的 1Ax1 和 1Ax2* 亚基才优于 null 亚基^[61]。

此外,HMW-GSs 对小麦加工品质的作用也受子粒蛋白含量的影响^[62]。研究表明,当子粒蛋白含量在 10% ~ 15% 的范围时,HMW-GS 的等位变异才能显著影响面包的烘烤品质^[48]。通过对随机选择的 266 个小麦品种(系)进行品质测定,发现在蛋白含量较低时,1Dx2 + 1Dy12 和 1Dx5 + 1Dy10 亚基组合对品质影响不显著,但是这 2 个亚基组合对面包体积的影响随着蛋白含量的提高而改变^[61]。研究还发现,过量表达 1Bx7 亚基的小麦品种与含有 1Dx5 + 1Dy10 亚基组合的小麦品种具有相似的面筋强度^[63]。因此,子粒中蛋白含量的高低是 HMW-GSs 发挥加工品质效应的前提。

谷蛋白大聚合物(GMP, glutenin macropolymer)是谷蛋白在面筋中的存在形式,通过影响面团形成进而影响小麦的加工品质。GMP 的作用机制和品质效应与 HMW-GS 的组成、含量,特别是半胱氨酸残基的数量相关性较大。有报道认为,1Dx5 属于优质亚基的原因是近 N 端的中间重复区有 1 个额外的半胱氨酸残基,这个半胱氨酸残基可能在形成更

大的 GMP 的过程中参与了分子间二硫键的形成,进一步提高了面团的弹性和面包的烘烤品质^[16]。1Dx5 + 1Dy10 亚基组合之所以优于 1Dx2 + 1Dy12 亚基组合,是因为中间重复区的三肽、六肽、九肽的排列比 1Dx2 + 1Dy12 亚基组合的排列更加规则,有利于形成高质量的 GMP 结构^[64]。优质亚基 1Bx13 和 1By16 都具有重复性较好的六肽、九肽序列,间接支持了以上的观点。在面粉中分别加入 Dx - 型亚基和 Dy - 型亚基,发现加入 Dx - 亚基比加入 Dy - 型亚基的面团品质高,且 Dx - 和 Dy - 型亚基组合同时加入较单一亚基加入对面团品质贡献大,组合加入的最佳比例是 1:1^[65-66]。

4 利用遗传转化和微量配粉鉴定 HMW-GS 基因的功能

转基因技术是鉴定 HMW-GS 品质效应和培育优质小麦品种最有效的途径之一。利用基因枪介导的转化方法, F. Barro 等^[52]、A. E. Blechl 等^[67]、F. Altpeter 等^[68]、L. Rooke 等^[69] 先后将 1Ax1、1Dx5、1Dy10 等基因导入了小麦幼胚或幼穗,通过筛选和再生获得了稳定过表达 1Ax1、1Dx5、1Dy10 等亚基的转基因植株,转基因小麦面团弹性和加工特性得到改进。进一步对转 1Ax1 和 1Dx5 基因小麦进行了详细的加工品质分析,发现 1Ax1 亚基可明显增加面团的黏性、延展性、可塑性和沉降值,而 1Dx5 亚基对面团黏性的改变很小,但显著降低了面团的延展性、塑性和沉降值,1Ax1 和 1Dx5 亚基的转入导致受体小麦品种中其他内源 HMW-GS 含量减少^[70]。

由于之前小麦转化效率非常低,高效转基因体系还没有建立,利用转基因方法直接鉴定 HMW-GS 功能的研究工作受到了限制,大多数 HMW-GSs 品质效应的直接鉴定还处于空白。为了鉴定其他 HMW-GSs 的功能,将 1By8、1By9 和 1Dy10 基因转入大肠杆菌中进行原核表达,然后从大肠杆菌中回收目标蛋白,纯化后添加到小麦面粉中,发现他们对面粉筋力的影响程度为 1Dy10 > 1By8 > 1By9,确认 1Bx7 + 1By8 对面筋的弹性和强度有重要影响^[51]。将 60 mg 原核表达的 1By8、1By9、1Dy10 蛋白亚基混合到 10 g 京 411 面粉中进行和面参数分析,发现 y - 型高分子量谷蛋白亚基的混入能在很大程度上改变面团的混合参数,对面团筋力的影响程度顺序为 1Dy10 > 1By8 > 1By9 基因^[34]。将原核表达的 1Dx2、1Dx5、1Dy10 和 1Dy12 蛋白亚基添加到小麦面粉中,进行了一系列的品质参数测定,发现含有

1Dx5 和 1Dy10 亚基的小麦其面团具有较高的弹性,更适合做面包,而含有 1Dx2 和 1Dy12 亚基的小麦其面团品质明显变差,不适合烘烤面包^[71]。利用羧甲基纤维素媒介离子交换层析法从麦谷蛋白中分离、纯化 1Bx7 和 1Bx20 亚基,将 10 mg 的 1Bx7 或 1Bx20 亚基分别添加到 2 g 小麦面粉中进行和面仪参数分析,发现添加 1Bx7 增加了面团弹性和稳定性,而添加 1Bx20 对面团参数有负面影响^[39],这与其他分析方法获得的结果一致,1Bx20 亚基对小麦加工品质的贡献不大^[57]。

5 HMW-GS 突变体培育及其在品质效应分析中的应用

利用各种诱变方法培育 *Glu-1* 位点发生变异的小麦变异体或近等基因系,是准确鉴定 HMW-GS 亚基品质效应的另一个主要策略。为此, G. J. Lawrence 等^[72] 利用常规选择方法获得了 7 个在 HMW-GS 组成发生缺失的小麦材料,分别缺失了 *Glu-A1*、*Glu-B1* 和 *Glu-D1* 位点的 1 个或 2 个亚基,缺失体分别与对照小麦材料杂交,对杂交后代进行品质分析,研究了 1Dx5、1Dy10、1Bx17 和 1By18 亚基对面包烘烤品质的贡献。

Glu-A1、*Glu-B1* 和 *Glu-D1* 位点编码 HMW-GS 亚基在相同遗传背景下的品质效应不同,常规杂交方法获得的 HMW-GS 变异体难以消除遗传背景的影响。Y. Yang 等^[46] 利用离子束诱导技术培育了 3 个分别缺失 *Glu-A1*、*Glu-B1* 或者 *Glu-D1* 位点的缺失系,在这 3 个突变体中发现 LMW-GS 亚基含量减少,醇溶蛋白含量增加。品质分析发现 3 个 *Glu-1* 位点在面筋功能方面的遗传效应为 *Glu-D1* > *Glu-B1* > *Glu-A1*,证实 *Glu-1* 位点的 HMW-GS 通过促进 GMP 的形成,保持 HMW-GS、LMW-GS 和醇溶蛋白之间的平衡,进而对面筋功能产生影响。

为了精确分析单个 HMW-GS 亚基的品质效应, Y. W. Li 等^[73] 用甲基磺酸乙酯 (EMS, ethyl methane sulfonate) 处理冬性小麦品种 Xiaoyan54,获得了 5 个高分子量谷蛋白亚基 1Ax1、1Bx14、1By15、1Dx2 和 1Dy12 敲除或错义的突变体,品质分析发现 1Ax1 和 1Bx14 亚基对面团功能和面粉品质的贡献差异很大,1Ax1 亚基在面筋弹性和面包品质方面的作用优于 1Bx14 亚基,但 1Bx14 亚基对面团延展性的影响更大。

本实验室在轮选 987 小麦品种的组织培养后代中筛选到了 1 个无性系变异体 AS208, SDS-PAGE 和

RP-HPLC 鉴定发现,AS208 中缺失了 *Glu-B1* 位点的 1Bx20 和 1By20 亚基。品质分析结果表明,1Bx20 和 1By20 亚基对面粉加工品质有至关重要的影响。尤其,该突变体在鉴定其他 HMW-GS 功能和培养优质弱筋小麦等方面具有潜在应用价值(资料待发表)。

6 问题和启示

尽管不同 HMW-GS 及其不同组合对小麦品质具有不同贡献,但有些品种虽然 HMW-GSs 组成完全相同,加工品质方面却表现出较大差异,这与其中的 LMW-GS、醇溶蛋白组成及含量有很大关系^[74]。虽然 1Dx5 + 1Dy10 属于优质亚基组合,但并不是所有含有 1Dx5 + 1Dy10 亚基的小麦品种都有较好的面包烘烤品质,如农大 142 含有 1Dx5 + 1Dy10,但其品质较差,甚至还不及一些含有 1Dx2 + 1Dy12 亚基组合的小麦品种^[75]。可见,决定小麦加工品质的遗传基础比较复杂,不但取决于 HMW-GS,也取决于 LMW-GS 和醇溶蛋白,不但取决于各个亚基或蛋白的含量,也取决于相互间的搭配和组合。

分子标记是跟踪检测育种材料中 HMW-GS 基因最方便的技术。目前虽已经开发了 1Dx5、1Dy10、1Dx2、1Dy12、1Ax2*、1Bx7^{0E}、1Bx6、1By8、1Bx17、1By18、1Bx7、1By8*、1Bx7、1By9、1Bx13、1By16、1Bx14 和 1By15 等 HMW-GS 基因的功能 PCR 标记^[43-46],但 1Bx20、1By20、1Bx7*、1Bx21、1Bx22、1Bx23、1By24、1Bx6.8、1Dx1.5、1Dy10.5、1Dx2.2、1Dy10.5、1Dx3'、1Dx4'、1S¹x2.2* 和 1S¹y16* 等 HMW-GS 基因还没有相应的分子标记,需要开发这些基因特异的功能性分子标记,以便实现优质亚基编码基因的聚合,尤其利用分子标记将一些存在于野生种的优质亚基编码基因以染色体片段易位方式转入小麦。另外,与澳大利亚、加拿大和美国的小麦品种相比,理想的 HMW-GS 等位基因在中国小麦品种中出现的频率比较低^[47],需要运用分子标记技术将 Ax2*、Bx7 + By8、Bx13 + By16、Dx5 + Dy10 等优质亚基转入目标小麦品种中,提高中国小麦的加工品质。

目前鉴定 HMW-GS 功能主要利用传统方法,比较、分析含有不同 HMW-GS 小麦品种的品质测定结果,由于遗传背景的千差万别,所得结果不能令人非常信服。一些实验室采用在大肠杆菌中表达 HMW-GS,经纯化后利用微量配粉的方法对 HMW-GS 进行功能鉴定。但是,原核表达方式回收 HMW-GS 的量

很少,加入面粉中进行微量品质鉴定的可靠性不高。虽然也可以将 HMW-GS 基因转入烟草或拟南芥中鉴定功能,但毕竟小麦与烟草和拟南芥亲缘关系较远,且这 2 个作物的种子产量很低,所得结果的准确性也不高。因此,需要培育 HMW-GS 发生沉默的小麦变异体,以这些变异体作为受体材料,利用转基因技术准确鉴定 HMW-GS 基因的功能。

转基因技术是鉴定 HMW-GS 基因加工品质功能最直接的方法,与野生型遗传背景一致,所得结果可靠性较高。以前虽然通过转基因方法对 1Ax1、1Dx5、1Dy10 等少数 HMW-GS 基因进行了初步功能鉴定,但由于小麦转化效率较低,不能对多数 HMW-GS 基因进行大量、细致的品质效应分析。近年来日本烟草公司建立了农杆菌介导转化小麦幼胚的高效遗传转化体系,转化效率高达 40%^[76-77]。我们通过对该技术的引进、消化吸收和创新,转化多个中国小麦品种取得了成功,转化率为 3% ~ 20%,为在小麦中鉴定不同 HMW-GS 亚基编码基因的功能奠定了基础^[78]。

总之,今后关于 HMW-GS 的研究重点是继续从小麦及其近缘植物中挖掘优质 HMW-GS 亚基,开发跟踪检测候选优质 HMW-GS 亚基的功能性分子标记,通过分子标记辅助选择聚合优质亚基,培育优质面包小麦品种。同时,利用转基因技术将优质 HMW-GS 基因转入适宜的小麦品种,聚合优质亚基,可靠鉴定各个 HMW-GS 基因的品质效应,培育优质转基因小麦新材料。

参考文献

- [1] Wrigley C W. Giant proteins with flour power [J]. *Nature*, 1996, 381:738-739
- [2] Majoul T, Bancel E, Tribou E, et al. Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: Characterization of heat responsive proteins from non-prolamins fraction [J]. *Proteomics*, 2004, 4:505-513
- [3] Metakovsky E V, Novoselskaya A Y, Sozinov A A. Genetic analysis of gliadin components in winter wheat using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Theor Appl Genet*, 1984, 69:31-37
- [4] Rasheed A, Xia X, Yan Y, et al. Wheat seed storage proteins: Advances in molecular genetics, diversity and breeding applications [J]. *J Cereal Sci*, 2014, 60:11-24
- [5] Ma W, Apples R, Bekes F, et al. Genetic characterization of drought rheological properties in a wheat doubled haploid population: additive genetic effects and epistatic interactions [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111:410-422
- [6] He Z H, Liu L, Xia X C, et al. Composition of HMW and LMW glutenin subunits and their effects on dough properties, pan bread and noodle quality of Chinese bread wheats [J]. *Cereal Chem*, 2005, 82:345-350
- [7] D'Ovidio R, Masci S. The low-molecular-weight glutenin subunits

- of wheat gluten [J]. J Cereal Sci, 2004, 39:321-339
- [8] Mackie A M, Lagudah E S, Sharp P J, et al. Molecular and biochemical characterization of HMW glutenin subunits from *T. tauschii* and the D genome of hexaploid wheat [J]. J Cereal Sci, 1996, 23:213-225
 - [9] Payne P I, Lawrence G J. Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* which code for high molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat [J]. Cereal Res Commun, 1983, 11:29-35
 - [10] Halford N G, Field J M, Blair H, et al. Analysis of HMW-GS glutenin subunits encoded by chromosome 1A of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) indicates quantitative effects on grain quality [J]. Theor Appl Genet, 1992, 83:373-378
 - [11] Anderson O D, Greene F C. The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread wheat [J]. Theor Appl Genet, 1989, 77:689-700
 - [12] Forde J, Malpica J M, Halford N G, et al. The nucleotide sequence of a HMW-GS glutenin subunit gene located on chromosome 1A wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13:6817-6832
 - [13] Ragupathy R, Naeem H A, Reimer E. Evolutionary origin of the segmental duplication encompassing the wheat *Glu-B1* locus encoding the overexpressed Bx7 (Bx7^{OE}) high molecular weight glutenin subunit [J]. Theor Appl Genet, 2008, 116:283-296
 - [14] Pang B S, Zhang X Y. Isolation and molecular characterization of high molecular weight glutenin subunit genes *1Bx13* and *1By16* from hexaploid wheat [J]. J Integr Plant Biol, 2008, 50:329-337
 - [15] Xiao L L, Wang K, Liu Y L, et al. Molecular characterization of high molecular weight glutenin allele *Glu-B1h* encoding 1Bx14 + 1By15 subunits in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Crop Pasture Sci, 2014, 65:215-226
 - [16] Li W, Wan Y, Liu Z, et al. Molecular characterization of HMW glutenin subunit allele *1Bx14*: further insights into the evolution of *Glu-B1-1* alleles in wheat and related species [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109:1093-1104
 - [17] Yang Z J, Li G R, Shu H L, et al. Molecular characterization of high molecular weight glutenin subunit allele *1Bx23* in common wheat introduced from hexaploid triticale [J]. Hereditas, 2006, 143:159-166
 - [18] Halford N G, Forde J, Anderson O D, et al. The nucleotide and deduced amino acid sequence of an HMW glutenin subunit gene from chromosome 1B of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and comparison with those of genes from chromosome 1A and 1D [J]. Theor Appl Genet, 1987, 75:117-126
 - [19] Liang X N, Zhen S M, Han C X, et al. Molecular characterization and marker development for hexaploid wheat-specific HMW glutenin subunit *1By18* gene [J]. Mol Breeding, 2015, 35:221
 - [20] Wang H Q, Zhang X Y. An approach for isolating high-molecular-weight glutenin subunit genes using molecular antibodies [J]. Genome, 2006, 49:181-189
 - [21] Suqiya T, Rafalski A, Peterson D. A wheat HMW glutenin subunit gene reveals a highly repeated structure [J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13:8729-8737
 - [22] Wan Y, Yan Z, Liu K, et al. Comparative analysis of D genome-encoded high-molecular-weight subunits of glutenin [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111:1183-1190
 - [23] Thompson R D, Bartels D, Harberd N P. Nucleotide sequence of a gene from chromosome 1D of wheat encoding a HMW-GS-glutenin subunit [J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13:6833-6846
 - [24] Wang K, An X L, Pan L P, et al. Molecular characterization of HMW-GS *1Dx3'* and *1Dx4'* genes from *Aegilops tauschii* and their potential value for wheat quality improvement [J]. Hereditas, 2012, 49:41-49
 - [25] Wang S L, Yu Z T, Cao M, et al. Molecular Mechanisms of HMW Glutenin subunits from 1S¹ genome of *Aegilops longissima* positively affecting wheat breadmaking quality [J]. PLoS One, 2013, 8:e58947
 - [26] Zhu G R, Wang S L, Zhen S M, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of unusual x-type HMW glutenin subunits from 1S1 genome of *Aegilops longissima* [J]. Genetika, 2015, 47:185-203
 - [27] Shewry P R, Halford N G, Tatham A S. The high molecular weight subunits of wheat glutenin [J]. J Cereal Sci, 1992, 15:105-120
 - [28] Shewry P R, Halford N G, Belton P S, et al. The structure and properties of glutenin elastic protein from wheat grain [J]. Philos T R Soc B, 2002, 357:133-142
 - [29] Bustos A D, Rubio P, Jouve N. Characterization of two gene subunits on the 1R chromosome of rye as orthologs of each the *Glu-1* genes of hexaploid wheat [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103:733-742
 - [30] Sun X, Hu S, Liu X, et al. Characterization of the HMW glutenin subunits from *Aegilops searsii* and identification of a novel variant HMW glutenin subunit [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113:631-641
 - [31] Williams M D, Peña H M, Mujeeb Kazi A. Seed protein and isozyme variations in *Triticum tauschii* (*Aegilops squarrosa*) [J]. Theor Appl Genet, 1993, 87:257-263
 - [32] Gao L Y, Ma W J, Chen J, et al. Characterization and comparative analysis of wheat high molecular weight glutenin subunits by SDS-PAGE, RP-HPLC, HPCE, and MALDI-TOF-MS [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58:2777-2786
 - [33] Juhasz A, Larroque O R, Tamas L, et al. Bankuti 1201-an old Hungarian wheat variety with special storage protein composition [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107:697-704
 - [34] Yan Y M, Jiang Y, An X L, et al. Cloning, expression and functional analysis of HMW glutenin subunit *1By8* gene from Italy pasta wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. durum) [J]. J Cereal Sci, 2009, 50:398-406
 - [35] Jiang Q T, Wei Y M, Wang F, et al. Characterization and comparative analysis of HMW glutenin 1Ay alleles with differential expression [J]. BMC Plant Biol, 2009, 9:16
 - [36] Thomas M S, Flavell R B. Identification of an enhancer element for the endosperm-specific expression of high molecular weight glutenin [J]. Plant Cell, 1990, 2:1171-1180
 - [37] Tatham A S, Field J M, Keen J N, et al. Purification and characterization of HMW glutenin subunits encoded by chromosome 1B of durum wheat (*Triticum durum*) [J]. J Cereal Sci, 1991, 14:111-116
 - [38] Lafiandra D, Turchetta T, D'Ovidio R, et al. Conformational polymorphism of high molecular glutenin subunits detected by transverse urea gradient gel electrophoresis [J]. J Cereal Sci, 1999, 30:97-104
 - [39] Shewry P R, Gilbert S M, Savage A W J, et al. Sequence and properties of HMW subunit 1Bx20 from pasta wheat (*Triticum durum*) which is associated with poor end use properties [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106:744-750
 - [40] Zhang W, Gianibelli M C, Rampling L R, et al. Characterization and marker development for low molecular weight glutenin genes from *Glu-A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108:1409-1419
 - [41] Pagnotta M A, Nevo E, Beiles A, et al. Wheat storage proteins: glutenin diversity in wild emmer, *Triticum dicoccoides*, in Israel and Turkey. 2. DNA diversity detected by PCR [J]. Theor Appl Genet, 1995, 91:409-414
 - [42] 陆才瑞, 喻树迅, 于雯雯, 等. 功能型分子标记 (ISAP) 的开发及评价 [J]. 遗传, 2008, 30(9):1207-1216
 - [43] Ma W, Zhang W, Gale K R. Multiplex-PCR typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat [J]. Euphytica, 2003, 134:

- 51-60
- [44] Liu S X, Chao S M, Anderson J A. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 118: 177-183
 - [45] Lei Z S, Gale K R, He Z H, et al. Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the *Glu-B1* locus in hexaploid wheat [J]. *J Cereal Sci*, 2006, 43: 94-101
 - [46] Yang Y, Li S, Zhang K, et al. Efficient isolation of ion beam-induced mutants for homoeologous loci in common wheat and comparison of the contributions of *Glu-1* loci to gluten functionality [J]. *Theor Appl Genet*, 2014, 127: 359-372
 - [47] Jin H, Yan J, Peña R J, et al. Molecular detection of high and low-molecular-weight glutenin subunit genes in common wheat cultivars from 20 countries using allele-specific markers [J]. *Crop Pasture Sci*, 2011, 62: 746-754
 - [48] Branlard G, Autran J C, Monneveux P. High molecular weight glutenin subunit in durum wheat (*T. durum*) [J]. *Theor Appl Genet*, 1989, 78: 353-358
 - [49] Xu Q, Xu J, Liu C L, et al. PCR-based markers for identification of HMW-GS at *Glu-B1x* loci in common wheat [J]. *J Cereal Sci*, 2008, 47: 394-398
 - [50] Payne P I, Corfield K G. Subunit composition of wheat glutenin proteins, isolated by gel filtration in a dissociating medium [J]. *Planta*, 1979, 145: 83-88
 - [51] Pogna N E, Autran J C, Mellini F, et al. Chromosome 1B-encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: genetics and relationship to gluten strength [J]. *J Cereal Sci*, 1990, 11: 15-34
 - [52] Barro F, Rooke L, Bekes F, et al. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties [J]. *Nat Biotechnol*, 1997, 15: 1295-1299
 - [53] Liu L, He Z H, Yan J, et al. Allelic variation of the *Glu-1* and *Glu-3* loci, presence of the 1B·1R translocation, and their effects on mixographic properties in Chinese bread wheats [J]. *Euphytica*, 2005, 142: 197-204
 - [54] Li Y L, Zhou R H, Branlard G, et al. Development of introgression lines with 18 alleles of glutenin subunits and evaluation of the effects of various alleles on quality related traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *J Cereal Sci*, 2010, 51: 127-133
 - [55] Liu C Y, Shepherd K W, Rathjen A J. Improvement of durum wheat pastamaking and breadmaking qualities [J]. *Cereal Chem*, 1996, 73: 155-166
 - [56] 毛沛, 李宗智, 卢少源. 小麦遗传资源 HMW 麦醇溶蛋白亚基组成及其与面包烘烤品质关系的研究 [J]. *中国农业科学*, 1995, 28(S): 22-27
 - [57] 许自成, 段国新. 对小麦不同 HMW 麦谷蛋白亚基评分系统的评价 [J]. *粮食储藏*, 1998(1): 76-82
 - [58] Branlard G, Dardevet M, Saccomano R, et al. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality [J]. *Euphytica*, 2001, 119: 59-67
 - [59] 刘丽, 何中虎, 于亚雄, 等. 小麦谷蛋白研究进展 [J]. *西南农业大学学报*, 2003(16): 54-61
 - [60] Dong H, Sear R G, Cox T S, et al. Relationships between protein composition and mixograph and loaf characteristics in wheat [J]. *Cereal Chem*, 1992, 69: 132-136
 - [61] Kolster P, Krechting C F, Gilder W M J. Quantitative variation of total and individual high molecular weight glutenin subunits of wheat in relation to variation in environmental conditions [J]. *J Sci Food Agr*, 1991, 57: 405-415
 - [62] Kolster P, Vereijken J M. Evaluating HMW glutenin subunits to improve breadmaking quality of wheat [J]. *Cereal Food World*, 1993, 38: 76-82
 - [63] Butow B J, Ma W, Gale K R, et al. Molecular discrimination of *Bx7* alleles demonstrates that a highly expressed high-molecular-weight glutenin allele has a major impact on wheat flour dough strength [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 1524-1532
 - [64] Flavell R B, Goldsborough A P, Robert L S, et al. Genetic variation in wheat HMW glutenin subunits and the molecular basis of bread-making quality [J]. *Nat Biotechnol*, 1989, 7: 1281-1285
 - [65] Anderson O D, Bekes F. Incorporation of high-molecular-weight glutenin subunits into dough using 2 gram mixograph and extensigraphs [J]. *J Cereal Sci*, 2011, 54: 288-295
 - [66] Anderson O D, Bekes F, D'Ovidio R. Effects of specific domains of high-molecular-weight glutenin subunits on dough properties by an *in vitro* assay [J]. *J Cereal Sci*, 2011, 54: 280-287
 - [67] Blechl A E, Anderson O D. Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 875-879
 - [68] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, et al. Integration and expression of the high molecular weight glutenin subunit *1Ax1* gene into wheat [J]. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 1155-1159
 - [69] Rooke L, Bekes F, Fido R, et al. Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength [J]. *J Cereal Sci*, 1999, 30: 115-120
 - [70] Barro F, Barceló P, Lazzeri P A. Functional properties of flours from field grown transgenic wheat lines expressing the HMW glutenin subunit *1Ax1* and *1Dx5* genes [J]. *Mol Breed*, 2003, 12: 223-229
 - [71] Dowd C, Bekes F. Large-scale expression and purification of HMW glutenin subunits [J]. *Protein Express Purif*, 2002, 25: 97-104
 - [72] Lawrence G J, Macritchie F, Wrigley C W. Dough and baking quality of wheat lines deficient in glutenin subunits controlled by the *Glu-A1*, *Glu-B1* and *Glu-D1* loci [J]. *J Cereal Sci*, 1988, 7: 109-112
 - [73] Li Y W, An X L, Yang R, et al. Dissecting and enhancing the contributions of high-molecular-weight glutenin subunits to dough functionality and bread quality [J]. *Mol Plant*, 2015, 8: 332-334
 - [74] Manifesto M M, Eisingold S, Hopp H E, et al. Molecular markers associated with differences in bread-making quality in a cross between bread wheat cultivars with the same high molecular glutenins [J]. *J Cereal Sci*, 1998, 27: 217-227
 - [75] 朱金宝, 刘广田, 张树榛, 等. 小麦籽粒高、低分子量谷蛋白亚基及其与品质关系的研究 [J]. *中国农业科学*, 1996, 29(1): 34-39
 - [76] Richardson T, Thistlethorn J, Higgins T J, et al. Efficient *Agrobacterium* transformation of elite wheat germplasm without selection [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2014, 119: 647-659
 - [77] Ishida Y, Tsunashima M, Hiei Y, et al. Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1223: 189-198
 - [78] Ye X G. Development and application of plant transformation techniques [J]. *J Integr Agric*, 2015, 14: 411-413