

# 优质 HMW 谷蛋白亚基转基因小麦的获得及其遗传稳定性和品质性状分析

张晓东 梁荣奇 陈绪清 杨凤萍 张立全

(北京市农林科学院农业生物技术研究中心, 北京 100089. E-mail: zhangxd@public3.bta.net.cn)

**摘要** 利用编码除草剂 PPT 抗性的 *bar* 基因作为选择标记, 构建了含有优质 HMW 谷蛋白亚基 1Dx5 和 1Dy10 基因的植物表达载体 pBPC30, 用基因枪导入京花 1 号、京 411 号和京冬 6 号等受体品种的幼胚和幼穗, 获得了一批转基因小麦植株( $T_0$ )及其后代株系( $T_1 \sim T_5$ ). PCR, 点杂交和 Southern 杂交鉴定表明, 外源基因已整合到转化植株  $T_0$  的基因组, 并稳定表达. 转基因植株  $T_1$  代能抗 20~80 mg/L 的 PPT, 其中 1 株抗性超过 150 mg/L. 经 SDS-PAGE 分析表明, 外源 1Dx5 和 1Dy10 基因在  $T_2$  代不同株系中获得了表达. 转基因系 TG3-74 缺失了亚基 8, 但亚基 2, 5, 10 和 12 都表达, 同时出现了一个新的亚基位于亚基 7 与原有亚基 8 之间(暂记为 8\*). 品质分析结果表明, 有 5 个株系的 Zeleny 沉淀值为 44.2~49.0 mL, 与对照 CNN(48.0 mL)相当, 分别比京花 1 号(26.9 mL)和京冬 6 号(30.7 mL)提高了 59.6%~64.3%.  $T_5$  代株系的粉质曲线稳定时间比受体品种(3~7 min)大幅增长, 转基因株系 TG5-23b 的稳定时间为 16 min, TG1-28d, TG3-76b, TG5-98 和 TG5-99 的面团稳定时间高达 30 min 以上.

**关键词** 小麦 HMW 谷蛋白亚基 转基因 品质 遗传稳定性

小麦高分子量谷蛋白亚基(high molecular weight glutenin subunit, HMW-GS)的类型和数量直接关系到面筋的弹性和强度, 从而决定了面粉的烘烤品质<sup>[1~3]</sup>. 研究表明, 普通六倍体小麦(*T. aestivum* L)的 HMW-GS 由第一部分同源染色体长臂近着丝点处的 Glu-A1, Glu-B1 和 Glu-D1 三个复合位点控制, 每个位点上有 2 个紧密连锁的基因 *Glu-1-1* 和 *Glu-1-2*<sup>[4,5]</sup>, 分别编码 x 和 y 型亚基. 从理论上, 普通小麦应含有 6 条 HMW-GS 谱带, 但因部分基因沉默或不表达<sup>[6~8]</sup>, 一般品种实际只有 3~5 条谱带, 其中 Glu-A1 位点基因编码 1 条或没有; Glu-B1 位点基因编码 1 条或 2 条; Glu-D1 位点编码 2 条<sup>[9~11]</sup>.

在我国小麦品种中, 优质亚基及其组合 1Dx5 + 1Dy10, 1Ax2\* 和 1Bx17 + 1By18 频率较低, 其中具有 1Dx5 + 1Dy10 亚基品种的比例只有国外品种的 30%, 具有 1Bx7 + 1By8, 1Bx7 + 1By9 和 1Dx2 + 1Dy12 等劣质亚基的品种较多. 由于具有优质亚基 5 + 10, 1 或 2\* 的品种往往具有较高的沉淀值和优良的面包烘烤品质. 因此, 在我国小麦品质育种中应该选择和培育含有优质亚基的品种.

Altpeter 等人<sup>[12]</sup>将 HMW-GS 1Ax1 基因用基因枪导入美国春小麦品种 Bob White 的幼胚中, 经过筛选获得的 21 个转化株系中, 有 20 个株系 *bar* 基因获得

了表达, 有 9 个株系 1Ax1 基因得到了表达. 在不同的转化株系中, 高分子量谷蛋白亚基 1Ax1 基因编码蛋白占总蛋白的含量变幅为 0.6%~2.3%, 从而使总 HMW 谷蛋白增加 70%.

本研究构建了来自美国优质面包小麦品种 Cheyenne(CNN)的 5 + 10 编码基因和编码除草剂 Basta 抗性的 *bar* 基因的亚克隆重组质粒, 以当前北京地区推广的高产小麦品种(如京 411, 京冬 6 号等)为材料, 用 PDS1000/He 高压氦气基因枪转化小麦幼胚和幼穗, 获得了一批转基因小麦植株及其后代株系, 并用 PCR, 点杂交, Southern 杂交和除草剂 Basta 抗性等进行了鉴定和筛选. 进一步用 SDS-PAGE 的方法对 HMW-GS 基因的表达类型、遗传稳定性以及  $T_3 \sim T_6$  代转基因小麦株系的烘烤品质性状进行了研究和分析.

## 1 材料和方法

(i) 材料. 以京花 1 号、京 411 和京冬 6 号等受体品种的幼穗、幼胚作为外植体. 质粒和酶类购自 Promega 公司, 普通试剂购自华美公司, 地高辛(DIG)标记与检测试剂盒和化学发光检测试剂盒购自 Roche 公司. 高压氦气基因枪(PDS1000/He)购自 BioRad 公司. 质粒的构建方法、过程及基因枪转化

参考文献[13]. 质粒 pBPC30 的结构见图 1.

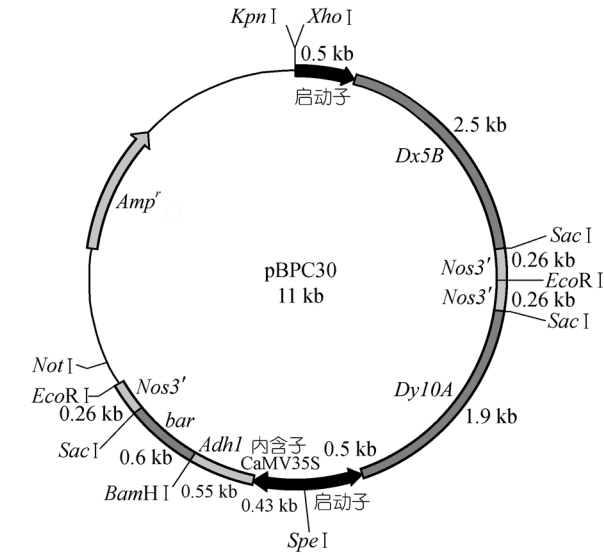


图 1 植物表达载体 pBPC30 的结构示意图

(ii) *GUS* 基因的瞬时表达. *GUS* 基因检测染色液的配制和染色方法按照 Jefferson 等人<sup>[14]</sup>的方法进行. 将转化后 3 ~ 7 d 的材料进行染色, 以检测瞬时表达结果.

(iii)  $T_1$  代转基因植株的 PCR 检测. 按照 CTAB 法提取植物总 DNA, 采用 D'Ovidio 等人<sup>[15]</sup>设计的 1Dx5 基因特异引物, 对基因组 DNA 进行了 PCR 检测.

(iv) 除草剂抗性检测. 将  $T_1$  代转基因植株部分后代种子, 用 Basta 水溶液作除草剂抗性发芽实验.

(v) 分子杂交.

(1) 探针的标记. 1Dx5 基因用 *Hind*III 酶切, 回收 0.8 kb 片段作为杂交的探针. 纯化的 *bar* 基因(0.5 kb)和 1Dx5 基因 0.8 kb 片段为标记靶序列, 按试剂盒说明书用随机引物法进行 DIG 标记.

(2) 点杂交. 取植物 DNA 5  $\mu$ L(1  $\mu$ g/ $\mu$ L), 加入 5  $\mu$ L 0.4 mol/L NaOH 和 10  $\mu$ L 20  $\times$  SSC, 混匀变性 5 min, 点样于尼龙膜上, 80  $^{\circ}$ C 烤膜 2 h. 杂交方法同 Southern 杂交.

(3) Southern 杂交. 将 10  $\mu$ g 植物 DNA 用 *Bam*H I/*Hind*III (或 *Xba*I/*Eco*R I) 酶切消化, 以未转化植株为阴性对照, 质粒为阳性对照. 信号检测按照试剂盒介绍的方法. 其余操作参考文献[16].

(vi) 种子蛋白的提取. 取 1 粒种子粉碎后, 加 0.8 mL 样品提取缓冲液(66 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8,

3% SDS (质量体积比), 3%甘油(体积比), 0.05%溴酚兰(质量体积比), 2%  $\beta$ -巯基乙醇(体积比), 充分震荡混匀. 室温静置 1 h, 60  $^{\circ}$ C 水浴中提取 4 ~ 5 h. 5000 r/min 离心 2 min 后, 取上清液点样.

(vii) SDS-PAGE 电泳. 采用 10%的非连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶系统. Protean II xi 型电泳槽(BioRad 公司), 胶高 16 cm, 厚 0.75 cm, 上样量 40  $\mu$ L, 20 V 电泳 24 ~ 36 h. 凝胶用 5%三氯乙酸固定 30 min, 考马斯亮蓝染色 0.5 ~ 2 h, 脱色 5 ~ 12 h.

(viii) 品质性状分析. 用 Dicky-John 近红外分析仪(美国)分别测定种子含水量、总蛋白含量和面粉蛋白含量. 参照刘广田等人<sup>[17]</sup>的方法测定  $T_3$  ~  $T_4$  代株系全麦粉的 SDS 沉淀值. Zeleny 沉淀值的测定按 AACC 方法 56-61A 进行. 粉质图分析来用德国 Bar-bender<sup>®</sup>粉质仪, 按照 ISO5530-1- 1988 方法测定转基因小麦  $T_5$  代种子的面团流变特性.

## 2 结果与分析

### 2.1 转基因植株及其后代的获得

(i) 基因枪转化及瞬时表达效率的检测. 目前, 转基因小麦获得成功的报道多以小麦幼胚及其来源的愈伤组织作为基因枪转化的受体. 本研究用 PDS1000/He (BioRad) 基因枪将质粒 pAHC25 (*Ubi-bar*, *Ubi-GUS*, 9.5 kb)转化小麦幼胚和幼胚诱导的愈伤组织, 用 X-gluc 检测 *GUS* 基因的瞬时表达效率. 结果发现, 幼胚是比较理想的转化受体, 转化效率相当高, 分散度很好, 在盾片部位的瞬时表达最强(图 2).

以京花 1 号, 京 411, 丰抗 8 号, 京 1744 和京冬 6 号等 5 个品种的幼胚为受体, 用基因枪转化质粒 pBPC30, 经过 Basta 抗性筛选和植株分化再生, 其分别转化再生频率为 6%, 1%, 0, 11.9%和 12.8%, 平均为 9.3%.

(ii)  $T_0$  代转基因植株的 PCR 检测. 对  $T_0$  代转基因植株的总 DNA, 用 D'Ovidio 等人<sup>[15]</sup>设计的 1Dx5 基因特异引物进行了 PCR 检测(图 3). 结果表明, 阳性对照质粒(泳道 1)扩增出 450 bp 的 5 亚基特异片段, 阴性对照京 411 没有扩增带; 泳道 3, 5 和 6 等转基因植株也扩增出了 5 亚基特异带, 说明外源 1Dx5 基因已经进入转基因植株.

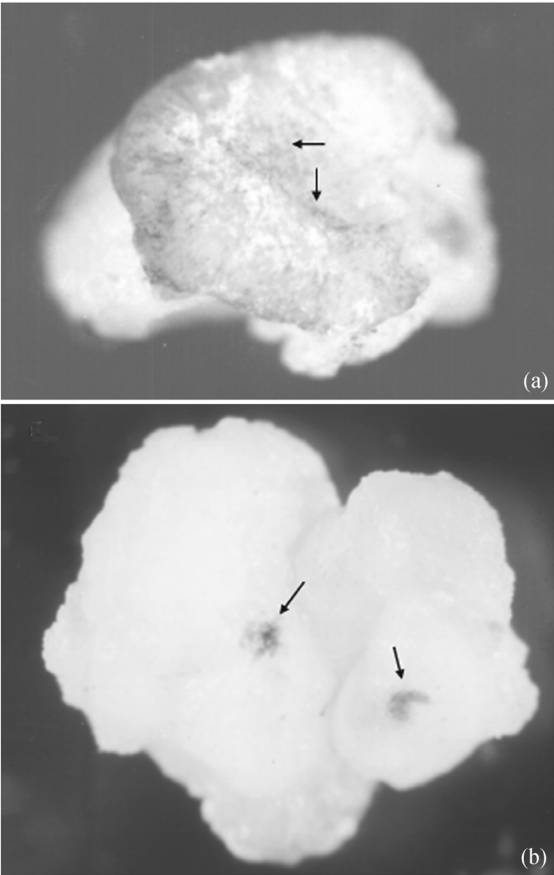


图 2 *GUS* 基因的瞬时表达结果  
(a) 转化幼胚盾片上分布的蓝色点, (b) 转化幼胚愈伤组织上分布的蓝色点(箭头所示)

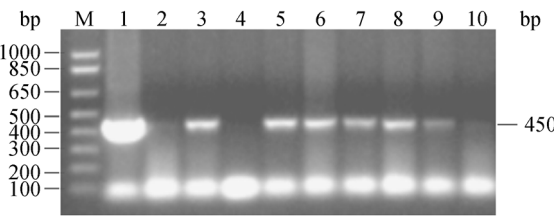


图 3  $T_0$  代转基因植株的 PCR 检测  
M 示标准分子量, 1 示质粒, 2 示京 411, 3~10 示转基因植株

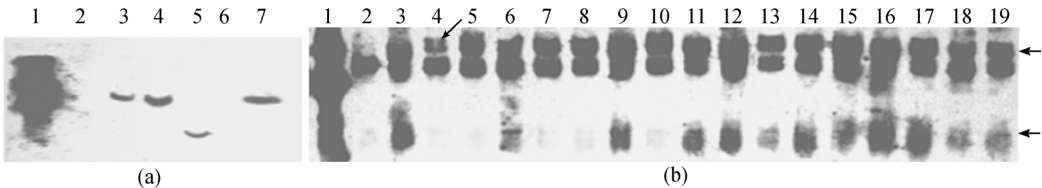


图 5 转基因植株的 Southern 杂交分析  
(a) 1 示 pBPC30, 2 示京花 1 号(CK), 3~7 示转基因植株; (b) 1 示 pBPC30, 2 示京花 1 号(CK), 3~19 示转基因植株. 箭头所示为特异亚基

(iii) 转基因植株的分子杂交鉴定.

(1) 点杂交. 将 1995 年用质粒 pAHC25 转化获得的 16 株转基因植株与 1996 年用质粒 pBPC30 转化得到的 21 株转基因植株分别提取总 DNA. 用地高辛 (DIG, Roche) 标记 0.5 kb 的 *bar* 基因作为探针, 点杂交结果表明, 对照植株为阴性, 转基因植株中阳性率达 75%(图 4).

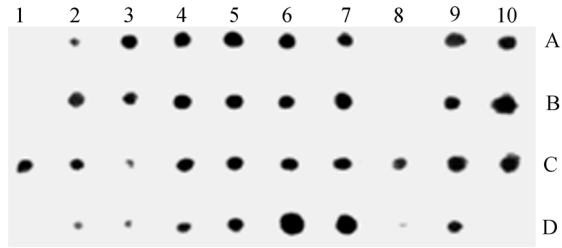


图 4 转基因小麦植株的点杂交分析结果  
A1 示 pBSK 质粒(1  $\mu$ g), D6~D10 示 pBPC30 100 pg ~ 0.1 pg, A2~A7 示京 411 (A2 为 CK, A3~A7 为转基因植株, 各 5  $\mu$ g), A8~D5 示京花 1 号(A8 为 CK, A9-D5 为转基因植株, 各 5  $\mu$ g)

(2) Southern 杂交. 将转基因植株及对照的总 DNA 经 *Bam*H I/*Hind* III 酶切后电泳, 以  $\lambda$ DNA/*Hind* III/*Eco*R I 为标样; 京花 1 号为阴性对照, *Hind* III 酶切的质粒 pBPC30 样品为阳性对照, 用地高辛 DIG 标记的 *bar* 基因作探针. 结果表明, 其中 4 株转基因植株为阳性(图 5(a)), 说明 *bar* 基因已整合到了基因组上.

将转基因植株及对照的总 DNA 经 *Xba* I/*Eco*R I 酶切后电泳, 并以 DIG 标记的  $\lambda$ DNA/*Hind* III/*Eco*R I 为标样, 京花 1 号为阴性对照, 经 *Xba* I/*Eco*R I 酶切的质粒 pBPC30 样品为阳性对照, 地高辛 DIG 标记的 HMW 谷蛋白亚基 5 基因为探针. 结果发现(图 5(b)), 泳道 2 京花 1 号有紧相邻的 2 条带(约 3.5 kb). 17 棵转基因植株(泳道 3~19)中 14 株有 4 条带(4.5 和 5.0 kb 左右各 2 条带), 两两紧密相连.

由于 HMW 谷蛋白亚基之间具有较强的同源性,

在阴性对照植株中出现了 2 条 3.5 kb 左右阳性条带. 转基因植株中额外多出的 4.5 和 5.0 kb 左右的 2 条带, 应为导入的外源亚基, 可以确定 *1Dx5* 和 *1Dy10* 基因已整合到了基因组上.

(iv) 转基因植株及其后代的除草剂抗性. 取  $T_1$  代转基因植株种子进行除草剂 Basta(含 PPT 95%)抗性实验. 结果发现, 培养 10 d 后, 对照品种(京花 1 号和京 411)的叶片明显变黄(Basta, 20 mg/L), 供试的 16 个转基因株系均表现不同程度的抗性(20 ~ 80 mg/L); 13 d 后大部分转基因株系开始从叶尖变黄, 只有 1 个株系(TG6-1-2a)为绿色无黄化迹象; 16 d 后对照株已明显死亡, 大部分转基因株系都严重黄化, 只 TG6-1-2a 仍全为绿色, 生长繁茂, 抗性高达 150 mg/L(图 6). 说明 *bar* 基因已在转基因植株中表达, 与 *bar* 基因的点杂交和 Southern 杂交结果相一致.

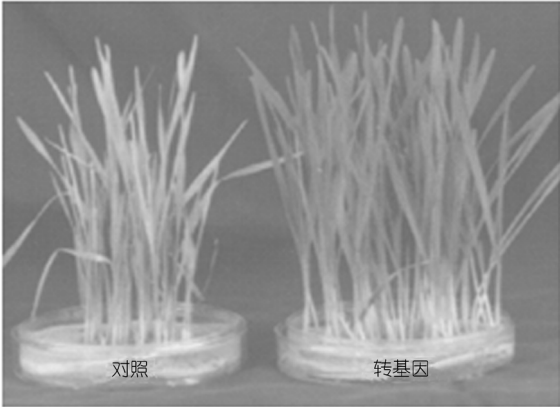


图 6 转基因植株对除草剂 PPT 的抗性

(v) 转基因植株及其后代 HMW-GS 的表达. 对 60 个  $T_2$  代单株的电泳结果表明, 8 个株系只有 *1Dy10* 基因的表达, 4 个株系同时有 *1Dx5* 和 *1Dy10* 亚基基因表达. 阴性对照京花 1 号、京冬 6 号和京 411 的 HMW-GS 带型为 2 + 7 + 8 + 12. 图 7 中, 京花 TG1- 35 (泳道 B, C 和 D) 为 2 + 5 + 7 + 10 + 12, 京冬 6 号转化系 TG4-13(泳道 E)带型为 2 + 7 + 10 + 12, 京花 1 号转基因株系 TG3-74(泳道 F, G 和 H), 带型为 2 + 5 + 7 + 8\* + 10 + 12, 其中 8\* 为一个新亚基(箭头所示), 位置介于亚基 7 和 8 之间, 表明外源 *1Dx5* 和 *1Dy10* 基因在不同株系中表达, 并且引起了原亚基的缺失和新亚基的产生.

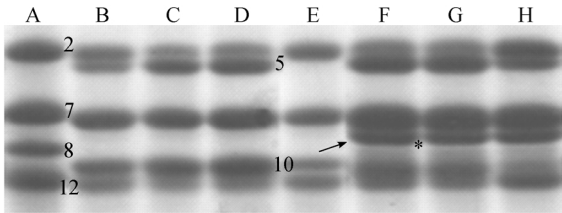


图 7  $T_2$  代转基因株系的 HMW-GS 表达类型  
A 示京花 1 号, B~H 示转基因植株. 箭头所示为新亚基

2.2 转基因植株及其后代的遗传稳定性

(i) 除草剂抗性. 采用除草剂涂抹幼叶叶片的方法, 对  $T_1$  和  $T_2$  代 75 个转基因后代株系 *bar* 基因表达的遗传稳定性作了鉴定, 结果表明, *bar* 基因的遗传基本符合孟德尔 3 : 1 分离比例.  $T_1$  代检测的抗性与非抗性的比例为 61 : 14.  $T_2$  代植株中, 来自 14 个无抗性的株系, 仍无抗性; 来自具有抗性后代的 23 个株系, 抗性能稳定遗传, 另外 38 个株系出现了分离现象.

(ii) HMW-GS 基因的表达. 对  $T_2$  HMW-GS 类型为 5 + 10 的转基因植株所结种子( $T_3$ )进行 SDS-PAGE, 结果发现,  $T_3$  代几乎全部籽粒均为 5 + 10 类型, 说明外源 5 + 10 基因在转基因植株中稳定遗传.

对 TG3-74 株系  $T_2$  代群体中由 1D 染色体编码 HMW-GS 类型为 2 + 5 + 10 + 12 的部分株系进行追踪, 结果在  $T_3$  中检测到了 2 + 5 + 10 + 12, 2 + 10 + 12, 5 + 10 + 12, 2 + 12 和 5 + 10 等多种类型, 说明 2 + 5 + 10 + 12 型转基因植株在  $T_2$ ~ $T_3$  代陆续发生分离(表 1).

2.3 转基因植株后代的品质性状分析

(i) 粗蛋白含量和沉淀值. 用 Dicky-John 近红外分析仪分别对  $T_3$ ~ $T_6$  代转基因株系的种子含水量、总蛋白含量和面粉蛋白含量进行了测定. 结果发现, 7 个株系籽粒总蛋白含量由对照京花 1 号的 11.6% 升高为 12.8%~15.1%, 总蛋白含量提高了 10.3%~30.2%.

表 1  $T_2$  代株系在  $T_3$  代 HMW-GS 表达类型的分离

| $T_2$ 代株系 2 + 5 + 10 + 12 | $T_3$ 代检测到的 HMW-GS 类型                        |
|---------------------------|----------------------------------------------|
| 3-74-1-2                  | 2 + 10 + 12, 5 + 10, 2 + 12                  |
| 3-74-1-3                  | 5 + 10 + 12, 2 + 12, 5 + 10                  |
| 3-74-2-5                  | 2 + 5 + 10 + 12, 5 + 10 + 12, 2 + 12, 5 + 10 |
| 3-74-12-2                 | 2 + 5 + 10 + 12, 2 + 12                      |
| 3-74-18-4                 | 2 + 5 + 10 + 12, 2 + 12, 5 + 10              |
| 3-74-27-3                 | 2 + 5 + 10 + 12, 2 + 12, 5 + 10              |
| 3-74-60-5                 | 2 + 5 + 10 + 12, 5 + 10, 2 + 12              |
| 3-74-61-2                 | 5 + 10, 2 + 12                               |

采用 Zeleny 法和 SDS 法对 102 个  $T_3 \sim T_6$  代转基因小麦株系的沉淀值进行了分析(表 2), 结果发现, 来自京花 1 号的 25 个转基因后代株系中, 有 9 个株系的 Zeleny 沉淀值变幅为 29.4 ~ 46.1 mL, 明显高于非转基因对照京花 1 号 (26.9 mL), 提高了 9.3% ~ 74.3%, 其中转基因株系 TG1-46b, TG1-28d, TG3-74e 和 TG3-76 的 Zeleny 沉淀值为 35 ~ 46.1 mL, 比对照高 30% ~ 74.3%. TG3-74e 的 SDS 沉淀值为 81.6 mL, 与 Cheyenne 的 82.4 mL 接近, 比京花 1 号提高了 65.9%.

来自京冬 6 号的 26 个转基因后代株系中, 有 10 个株系的 Zeleny 沉淀值在 37.1 ~ 49 mL 之间, 比非转化对照京冬 6 号(30.7 mL)提高了 20.9% ~ 59.6%. 其中 TG5-23 最高, 其 SDS 沉淀值为 73.8 mL, 比对照提高了 38.4%.

(ii) 粉质图稳定时间. 对  $T_5$  代转基因小麦株系进行了面团流变特性分析, 结果表明, 非转基因的对照京花 1 号和京 411 的面团稳定时间仅为 3 ~ 7 min. 而转基因株系 TG5-23b 的面团稳定时间为 16 min, TG1-28d, TG3-76b, TG5-98 和 TG5-99 的面团稳定时间高达 30 min 以上, 远远超过了优质面包小麦的国家标准. 因此, 利用基因工程方法导入 HMW-GS 优良亚基基因, 可以提高面团强度, 改善面团的流变特性.

3 讨论

3.1 转基因小麦的遗传稳定性

与受体品种京花 1 号(2 + 7 + 8 + 12)相比, 转基

因植株 TG3-74 的 HMW-GS 带型都有亚基 8 的缺失和 8\*亚基的产生, TG1-35 植株只有 8 亚基的缺失,说明在转基因植株中外源 1Dx5 和 1Dy10 基因插入小麦基因组具有一定的倾向性, 可能优先发生在 1B 染色体上 1By8 基因位点或其旁侧区, 其次才可能是发生在 1D 染色体上的 1Dx2 + 1Dy12 的位点或附近. 由于外源基因的整合或插入主要依据 DNA 序列同源或部分同源规则进行, 再加上 HMW-GS 编码基因高度同源(尤其是 N 端和 C 端保守区的同源性很高), 1By8 基因可能以较小的 DNA 片段交换了外源基因较大的片段(也可能插入了一段外源片段), 使得编码的蛋白分子量变大, 在电泳过程中滞后于 8 亚基. 而外源 5 + 10 基因与 2 + 12 的完全交换就获得了 5 + 10 的转基因植株, 这样外源基因就可以在转基因植株中稳定遗传. 转基因植株 TG3-74 后代株系中 HMW-GS 的分离, 可能源于 HMW-GS 基因的不对称交换, 以及正常的基因间分离和组合.

由此可以推测, 外源基因的整合与插入是以 HMW-GS 基因间的替换(如原有品种的亚基 2 被亚基 5 替换, 亚基 12 被亚基 10 替换)、部分替换产生新亚基和随机插入等多种方式进行. 其规律和机理有待于进一步研究和探讨.

3.2 转基因小麦的品质改良效果

随着分子生物学的飞速发展以及基因克隆技术和重组 DNA 技术的建立与渐趋完善, 利用植物基因工程方法和以多种分子标记方法为主体的分子标记辅助选择育种为手段, 直接在分子水平开展植物的

表 2 部分  $T_4$  代转基因株系的品质分析结果

| 品 种      | 株 系      | 总蛋白含量/% | Zeleny 沉淀值/mL             | SDS 沉淀值/mL                |
|----------|----------|---------|---------------------------|---------------------------|
| Cheyenne |          | 14.0    | 48.0                      | 82.4                      |
|          | CK       | 11.6    | 26.9                      | 49.2                      |
|          | TG1-46b  | 15.1    | 46.1 (71.4 <sup>*</sup> ) | 60.6 (23.2 <sup>*</sup> ) |
|          | TG3-74e  | 14.5    | 44.2 (64.3 <sup>*</sup> ) | 81.6 (65.9 <sup>*</sup> ) |
|          | 25 个株系平均 | 12.9    | 29.2 (8.5 <sup>*</sup> )  | 56.3 (14.4)               |
| 京冬 6 号   | CK       | 13.6    | 30.7                      | 53.4                      |
|          | TG5-23   | 14.8    | 49.0 (59.6 <sup>*</sup> ) | 73.8 (38.4 <sup>*</sup> ) |
|          | 26 个株系平均 | 14.4    | 35.5 (15.6 <sup>*</sup> ) | 63.1 (11.8 <sup>*</sup> ) |
| 京 411    | CK       | 11.8    | 22.4                      | 43.0                      |
|          | 34 个株系平均 | 12.6    | 28.8 (28.6 <sup>*</sup> ) | 52.9 (23.0 <sup>*</sup> ) |

\* 示转基因株系比相应对照增加的百分数

品质改良已逐步成为可能,即“分子育种”,它是以微观水平的核酸、蛋白质、酶乃至单个基因等的差异作为“性状”来考察研究与改良.与“传统育种”方法相比,“分子育种”更为直接、准确、可靠,展示在育种家面前的是植物种质或育种后代材料更深层次分子水平性状的差异<sup>[18~20]</sup>.

Blechl 等人<sup>[21]</sup>发现,外源 *1Dx5* 和 *1Dy10* 基因所编码的亚基在转基因植株种子中的积累水平可与其在原品种的 HMW-GS 亚基的表达量相当. Shimoni 等人<sup>[21]</sup>认为,可以在转基因小麦中通过 HMW-GS 的超量表达来改变谷蛋白的组装和特性,实现对面包烘烤品质的改良. Barro 等人<sup>[22]</sup>为增加面包小麦 HMW-GS 亚基的比例和改良面粉的基本特性,通过转化面包小麦,获得了一系列不同表达水平的转基因植株,部分植株导入新亚基的表达水平量远高于内源亚基的表达,对具有 1~2 个导入亚基的转基因植株的 T<sub>2</sub> 代进行分析表明,面团的弹性增加.

我们对转基因株系的分析结果表明,有 5 个株系的 Zeleny 沉淀值为 44.2~49.0 mL,与对照 CNN(48.0 mL)相当,分别比京花 1 号(26.9 mL)和京冬 6 号(30.7 mL)提高了 59.6%~64.3%. T<sub>5</sub> 代株系的粉质曲线稳定时间比受体品种(3~7 min)大幅增长,转基因株系 TG5-23b 的稳定时间为 16 min, TG1-28d, TG3-76b, TG5-98, 和 TG5-99 的面团稳定时间高达 30 min 以上,远远超过了优质强筋小麦的国家标准.研究表明,可以通过基因工程方法来改变 HMW-GS 的组成和含量,从而达到改良面包烘烤品质的目的.

参 考 文 献

1 Payne P I, Corfield K G, Holt L M. Correlation between the inheritance of certain HMW-GS and bread wheat making quality in progenies of six crosses of bread wheat. *J Sci Food Agri*, 1981, 32: 51~60

2 Lorenzo A, Kronstad W E, Vieira G E. Relationships between HMW-GS and loaf volume in wheat as measured by the SDS sedimentation test. *Crop Sci*, 1987, 27: 253~257

3 Huang D Y, Kham K. Quantitative determination of high molecular weight glutenin subunits of hard red spring wheat by SDS-PAGE II. Quantitative effects of individual subunits on bread-making quality characteristics. *Cereal Chem*, 1997, 74(6): 786~790

4 Payne P I, Holt L M, Worland A G. Structure and genetical studies on the HMW-GS: III. Telocentric mapping of the subunits genes on the long arm of the homoeologous group I chromosomes. *Thero Appl Genet*, 1982, 63: 129~138

5 Thompson R, Harberd N P, Flavell R B. Characterization of the

multigene family coding for HMW-GS in wheat using cDNA clones. *Thero Appl Genet*, 1983, 67: 87~96

6 Ford J, Malpica J M, Halford N G. The nucleotide sequence of a HMW-GS gene located on chromosome 1A of wheat (*Triticum aestivum*). *Nucleic Acids Res*, 1985, 13: 6817~6832

7 Galili G, Feldman M. Intergenomic suppression of endosperm protein genes in common wheat. *Can J Genet Catal*, 1984, 26: 651~656

8 Lawrence G J, MacRitch F, Wrigly 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 Cereal Sci*, 1988, 7: 109~112

9 Payne P I, Lawrece G J. Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for HMW-GS in hexaploid wheat. *Cereal Res Commu*, 1983, 11: 29~35

10 Moonen J H E, Scheapstia A, Graveland A. Biochemical properties of some high molecular weight subunits of wheat glutenin. *J Cereal Sci*, 1985, 3: 17~27

11 刘广田, 许明辉. 普通小麦胚乳高分子量谷蛋白亚基的变异和遗传. *中国农业科学*, 1988, 21: 56~58

12 Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, et al. Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit *1Ax1* gene into wheat. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(9): 1155~1159

13 张晓东, 李冬梅, 徐文英, 等. 利用基因枪将 HMW 谷蛋白亚基基因与除草剂 Basta 抗性基因导入小麦不同外植体获得转基因植株, 遗传(增刊), 1998, 20: 18~23

14 Jefferson R A. GUS fusion:  $\beta$ -gluronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in high plants. *EMBO J*, 1987, 6: 3901~3907

15 D'Ovidio O A, Porceddu E, Lafiandra E. PCR analysis of genes encoding allelic variants of high molecular weight glutenin subunits at Glu-D1 locus. *Thero Appl Genet*, 1994, 88: 175~180

16 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

17 刘广田, 刘恩忠. 预测小麦杂种早代材料烘烤品质的微量 SDS 沉淀值测定法. *作物杂志*, 1985, 4: 35~36

18 Takumi S, Shimada T. Variation in transformation frequencies among six common wheat cultivars through particle bombardment of scutellar tissues. *Genes Genet Syst*, 1997, 72(2): 63~69

19 Shimoni Y, Blechl A E, Anderson O D, et al. A recombinant protein of two high molecular weight glutenins alters gluten polymer formation in transgenic wheat. *J Biol Chem*, 1997, 272(24): 15488~15495

20 Barro F, Rooke L, Bekes F, et al. Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(12): 1295~1299

21 Blechl A E, Anderson O D. Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(7): 875~879

22 Barcelo P, Hagel C, Becker D, et al. Transgenic cereal (*Tritordeum*) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. *Plant J*, 1994, 5(4): 583~592

(2002-08-06 收稿, 2002-11-19 收修改稿)