

研究报告 Original Papers

新型HMW-GS基因*H1By16*改良转基因小麦面粉品质

陈凡国, 夏光敏*

山东大学生命科学院, 植物细胞工程与种质创新教育部重点实验室, 济南250100

摘要: 小麦高分子量麦谷蛋白亚基的组成和含量是决定面团弹性的主要因素, 发掘和利用新的高分子量麦谷蛋白亚基是提高小麦面粉品质的关键。我们利用农杆菌转化技术将小麦体细胞杂种来源的高分子量麦谷蛋白亚基等位变异新基因*H1By16*转入高产、抗盐小麦新品种‘山融3号’(SR3), 经过PCR筛选和遗传分析, 我们获得了3个转基因纯系T16-like-1、-2和-3。通过SDS-PAGE技术分析了转基因株系的高分子量麦谷蛋白亚基表达情况, 在T16-like-2和-3两个株系中, 目的基因出现表达沉默现象; 而在株系T16-like-1中, 目的基因表达, 并且降低了内源高分子量麦谷蛋白亚基基因*IBy9*的表达量。面团揉面实验显示新型高分子量麦谷蛋白亚基*H1By16*可以提高小麦的面粉品质。

关键词: 小麦; 高分子量麦谷蛋白亚基; 基因转化; 面团功能特性

Transformation of Wheat with a Novel High-Molecular-Weight Glutenin Subunit Gene *H1By16* Improving Functional Properties of Wheat Flour

CHEN Fan-Guo, XIA Guang-Min*

The Key Laboratory of Plant Cell Engineering and Germplasm Innovation, Ministry of Education, School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China

Abstract: Composition and content of high-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GSs) of wheat are the major determinants of the dough elastic properties. It is the key point of the current wheat quality breeding to explore and use the novel HMW-GSs for improving wheat flour quality. A novel HMW-GS gene *H1By16*, allelic variation from *IBy9*, characterized from wheat somatic hybrid was transformed into a high-yield and salt-resistant new wheat variety Shanrong No.3 (SR3) by agrobacterium-mediated transformation technique. Three transgenic homozygous lines were obtained after PCR screening and genetic analysis, named T16-like-1, -2 and -3. Expression of HMW-GS in the above three lines was examined by SDS-PAGE method. The *H1By16* was not expressed in two lines (T16-like-2 and -3), while expressed in line T16-like-1. Otherwise, the expression of endogenous gene *IBy9* was remarkably decreased shown in the protein profile of T16-like-1. It was indicated that the dough strength of transformed wheat flour with novel HMW-GS *H1By16* was significantly increased by the dough mixing test.

Key words: *Triticum aestivum* L.; high-molecular-weight glutenin subunit (HMW-GS); gene transformation; dough functional properties

目前全球小麦产量达6亿吨, 养活约35%的人口(<http://www.fao.org>)。在我国, 小麦作为主要的粮食作物种植已历千年, 具有种植面积广、种类多、产量高、加工后用途广泛等特点。世界范围内, 小麦的需求量每年增加约2%, 而依靠常规育种技术, 小麦每年产量仅有1%的提高(Chauhan等2011)。随着生活水平的提高, 对小麦面粉品质也提出了很高的要求。小麦的面粉品质主要取决于占胚乳中储藏蛋白含量80%的麦谷蛋白家族, 这一类蛋白赋予了小麦面粉特有的粘弹性, 从而可以生产多样的小麦制品(She等2011)。因此, 应用现代生

物技术, 选育优质、高产的小麦新品系(种), 以实现小麦育种的新突破成为急需解决的问题之一。

成熟小麦种子储藏蛋白主要由谷醇溶蛋白(prolamins)家族组成, 包括麦谷蛋白(glutenin)和醇溶蛋白(gliadin)。根据SDS-PAGE中迁移率的不同, 麦谷蛋白又可以分为高分子量麦谷蛋白亚基(high-molecular-weight glutenin subunit, HMW-GS)和低

收稿 2013-04-01 修定 2013-04-11
资助 国家自然科学基金(31271706)和国家转基因专项(2009-ZX08009-010B-3)。

* 通讯作者(E-mail: xiagm@sdu.edu.cn; Tel: 0531-88364525)。

分子量麦谷蛋白亚基(low-molecular-weight glutenin subunit, LMW-GS)。HMW-GS虽然只占小麦蛋白总量的很少部分,但是研究的最为深入,已知它在面包烘烤过程中起着非常关键的作用,是面粉弹性的主要决定因素。LMW-GS因其位点多且家族庞大,研究相对较少,通常认为它与HMW-GS一起决定面粉的弹性。醇溶蛋白是小麦胚乳的主要储藏蛋白,在组成和遗传上具有高度的复杂性和异质性,一般认为它们可以通过非共价键的形式与麦谷蛋白互作,决定了小麦面粉的延展性。编码HMW-GS的基因位于第1染色体同源群长臂的*Glu-1*位点上;编码LMW-GS的基因主要位于第1染色体同源群短臂的*Glu-3*位点上,与大部分的 γ -全部的 ω -醇溶蛋白的位点紧密连锁(Shewry等2003);醇溶蛋白主要由*Gli-1*和*Gli-2*两个位点编码,它们分别位于第1和第6染色体同源群。除此之外,还有一些微小的基因位点,编码少量的 ω -醇溶蛋白(Shewry等2003)。在麦谷蛋白中, HMW-GS和LMW-GS对小麦面粉的品质具有累加效应和互作效应;越来越多的研究表明醇溶蛋白在小麦烘烤品质方面也发挥着重要的作用,虽然目前还不清楚每一种醇溶蛋白对面粉品质的作用,但是初步的研究结果表明不同醇溶蛋白对小麦面粉品质的作用是不同的。

为了克服传统育种的局限性,现代生物技术尤其是转基因技术已经在小麦育种理论和实践研究中广泛开展。转基因育种的优势在于不但扩大了育种的基因源,打破了物种间基因交流的限制,而且可以实现精确的遗传改良,缩短育种周期。转基因技术还可以与常规育种相结合,有效地改良小麦种质资源。当前,转基因小麦研究主要集中在抗性育种、品质改良和提高产量等方面。统计发现较为常用的小麦转基因方法是基因枪法和农杆菌介导法,与基因枪法相比,农杆菌介导法具有操作简单,设备要求低,插入片段稳定性好及拷贝数低等优点,但是此方法最大的不足就是转化效率受宿主基因型的限制很大。自1983年第1株转基因植物问世,经过近30年的发展,无论在基础理论研究方面还是实际生产应用领域,转基因技术都取得了很大的进步。小麦转基因研究起步较晚,Vasil等(1992)用基因枪法将*bar*基因导入小麦

幼胚,获得了世界上第1株转基因小麦;Weeks等(1993)初步建立了基因枪法转化小麦的技术体系,将*gus*基因和*bar*基因转入小麦;Cheng等(1997)和Xia等(1999)利用农杆菌介导法转化小麦,成功获得转基因株系。Zhao等(2006)和赵同金等(2010)报导了利用小麦生长点转化技术,成功获得了转基因的抗病小麦的后代。Blechl和Anderson(1996)首次利用转基因技术改良小麦面粉品质,将HMW-GS 1Dx5+1Dy10嵌合基因导入小麦,转基因株系的HMW-GS的含量得到了提高,这为利用转基因技术改良小麦加工品质奠定了基础。

国内外的HMW-GS转基因研究主要集中在对提高面粉品质有很大影响的优质亚基,如1Ax1、1Dx5和1Dy10(Altpeter和Vail 1996; Blechl和Anderson 1996; Barro等1997; Vasil等2001; 施农农等2005; Blechl等2007; León等2009, 2010; Wang等2009),将这些亚基通过基因工程的方法转化小麦,以期提高面团的强度,获得新的小麦种质资源。另外,有些研究将HMW-GS亚基基因嵌合后在小麦中表达。如McIntire等(2005)用Dy10亚基的N-端取代Dx5亚基的N-端,将这种嵌合的新基因转入小麦后,转基因株系表现出弱的面粉品质。推测其原因可能是这种嵌合亚基的N-端和C-端通过一个二硫键形成一个单体亚基,因而影响了面粉的品质。Yue等(2008)将Bobwhite小麦中的1Dx5亚基基因通过RNA干扰方法使其沉默。在获得的6个转基因株系中,有4株1Dx5亚基完全沉默,另外2株1Dx5亚基部分沉默。对这2个株系面粉实验发现,它们均表现出谷蛋白表达和面粉品质的降低,由此也说明了1Dx5亚基对面粉品质的重要作用。在转基因株系中还表现出1Bx7亚基的表达显著降低。

小麦HMW-GS转基因研究虽然已经取得了一定的进展,但是还有诸多问题有待解决,例如:目前可用的与面粉优质相关的HMW-GS基因较少;小麦HMW-GS转基因后代中目的基因沉默和表达不稳定现象较为突出等。‘山融3号’是本实验室创制的小麦渐渗系新品种,具有高产和抗盐等特点,但是前期的研究表明该品种面粉品质一般,而通过改变HMW-GS的组成和表达量的方法可以提高受体小麦的面粉品质(Shewry等2003)。本研究将

小麦与长穗偃麦草体细胞杂种后代II-12 (Xia等2003)中经等位变异产生的面粉优质相关HMW-GS编码基因*H1By16* (Feng等2004)转化SR3, 以期获得高产、优质、抗逆的小麦新品种和新种质资源。

材料与方 法

1 植物材料

本实验室创制和保存的小麦渐渗系高产、抗盐新品种‘山融3号’(SR3)及其亲本普通小麦‘济南177’(JN177), 它们的HMW-GS组成均为1A null、1Bx7+1By9和1Dx2+1Dy12, 不含有H1By16亚基。

2 真核表达载体的构建

目的基因*H1By16*是由本实验室从小麦体细胞杂种株系II-12中克隆并保存在pUCm-T中(Feng等2004), 因其蛋白电泳迁移率与普通小麦来源的1By16相同而命名, 所使用的启动子为HMW-GS基因*1Bx17*的启动子, 全长为1 991 bp, 该启动子可以保证目的基因在小麦胚乳中特异表达(Tamás等2009), 由Li ZY博士(CSIRO Division of Plant Industry, Australia)提供; 另外, 该质粒还携带有筛选标记基因*NPTII*, 用于转基因植物的筛选。实验方法参照标准实验程序(Sambrook等1989)。

3 小麦遗传转化

首先将含有目的基因的质粒p1Bx17::H1By16转化感受态的根癌农杆菌AGL1中, 阳性转化子经菌落PCR筛选和测序验证正确后备用。其次, 对待转化小麦种子进行灭菌处理, 经乙醇(75%, 30 s)→无菌水(2~3次, 每次3 min)→0.1%的升汞(10 min)→无菌水(3~5次, 每次3 min)处理后摆放在盛有饱和无菌水滤纸的培养皿中过夜, 待种子露白后转入4 °C冰箱中春化30 d以上; 待麦芽长至1~3 cm后待用, 具体转基因操作参照赵同金等(2010)。

4 转基因植物的筛选和目标基因的表达检测

4.1 卡那霉素喷苗筛选

待检测转基因小麦在花盆中培养至小苗健壮后, 用50 μg·mL⁻¹卡那霉素溶液喷洒小苗, 隔日喷洒, 待喷洒2~3周后将存活的麦苗移栽到温室转基因隔离区继续培养。

4.2 转化麦苗的PCR检测和转基因纯系的获得

利用CTAB法提取叶片总DNA。用以检测阳性株系的上游引物P1位于启动子区域, 序列为:

5'-ACCGATTGTTCTTCTCACGCT-3'; 下游引物P2位于目的基因内部, 序列为: 5'-TGTGGTCTCGCCAGGGTAGAA-3'。PCR反应是在20 μL体系中进行的, 反应条件为: 预变性95 °C 5 min, 35个循环为: 94 °C 45 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 最后72 °C延伸10 min, PCR产物用1.2% Agrose电泳鉴定。利用基因组PCR技术对转基因T₀~T₂代进行检测, 并对T₁代进行遗传统计和卡方检测, 结合T₂代的PCR结果以确定转基因纯系。

4.3 转基因植物目标基因的表达检测

经PCR分析的T₃和T₄代纯系随机选取2粒种子, 按照单粒小麦磨粉, 每4 mg 样品中加入100 μL 蛋白提取液, 其组成含有0.125 mol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液(pH6.8)、4% SDS (W/V)、1% DTT (W/V)、20%甘油(W/V)、0.03% Pyronin Y, 混合均匀, 沸水中煮沸10 min, 18 000×g 离心30 min, 收集上清液用于SDS-PAGE电泳检测。电泳采用不连续缓冲体系, 即4%的浓缩胶和7.5%~10%的梯度分离胶, 交联度均为2.66%。4 °C下稳流电泳(10 mA)至指示剂迁移至凝胶底部。电泳后的凝胶在考马斯亮蓝染液[含有0.1% (W/V)考马斯亮蓝R250、10% (W/V)甲醇和50% (W/V)乙酸]中染色30 min, 染色后在热水中脱色至背景干净。

5 转基因后代籽粒面粉品质相关参数的测定

微面团实验所用仪器为10 g Mixograph (National Mfg. Co., Lincoln, NE) (Walker和Walker 1992), 所使用参数包括3个反映面团强度的正效应值: 揉面时间(mixing time, MT), 8分钟宽度(TxW), 峰值时带宽(PW); 1个负效应值: 峰值衰落斜率(RPS) (Walker和Walker 1992; Lee等1999)。实验用T₄代转基因种子, 同年同地块种植的转基因受体SR3及其体细胞杂种亲本JN177作为对照, 使用10 g面粉(含水量为14.5%), 操作过程为: 加入6.2 mL 蒸馏水搅拌30 s后关闭仪器, 静置5 min后开启仪器继续搅拌10 min, 实验过程中的峰图和各项参数由Mixograph设备记录。

实验结果

1 胚乳特异表达载体的构建

已有研究表明, *1Bx17*的启动子是小麦胚乳特异的强启动子, 有利于HMW-GS基因的高效表达

(Tamás等2009)。利用内切酶*Bgl*III和*Eco*RV双酶切含有HMW-GS基因*H1By16*的克隆载体pUCm-T, 释放的目的基因片段与利用*Bam*HI和*Kpn*I双酶切的载体pZLBx17casNKEco相连, 这样就将*H1By16*插在启动子*IBx17*下面; 利用*Xba*I分别单切前面构建的中间载体和真核表达载体pBIN20, 最后将释放的*IBx17+H1By16*片段与与pBIN20以粘末端相连, 构建好的载体命名为p1Bx17::H1By16 (图1)。

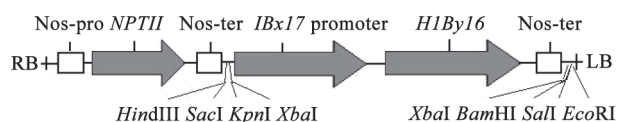


图1 植物表达载体p1Bx17::H1By16的构建
Fig.1 The construction of plant expression vector p1Bx17::H1By16

2 HMW-GS变体H1By16转化小麦SR3与转基因植物鉴定

选取本实验室培育成功的高产、抗盐小麦新品种SR3为转化受体, 对转化后存活的850株T₀代小麦株系进行卡那霉素初步筛选, 获得了104株抗性材料, 这些材料大部分生长旺盛。利用CTAB法提取抗性植株叶片DNA, 以引物P1和P2进行PCR检测, 并通过测序进行确认。结果发现, 经卡那霉素初步筛选的104棵植株中, 阳性植株有14棵(图2), 占总转化850棵小麦的1.7%。进一步对阳性植株的旗叶和幼穗进行PCR检测, 均获得了目标条带, 表明这些转基因植株不是嵌合体。

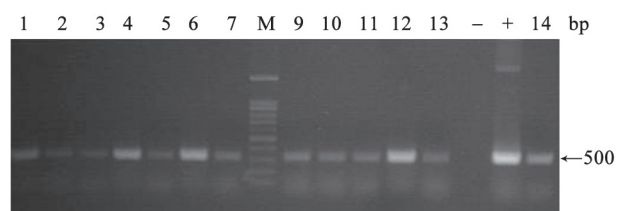


图2 T₀代转基因植株PCR扩增结果
Fig.2 PCR amplification of putative transgenic plants T₀

1~14为阳性植株, M为分子量标准, “-”为阴性对照, “+”为阳性对照, 箭头指示阳性条带。

将得到的14个T₁代种子春化后播种, 通过幼苗卡那霉素筛选和PCR检测, 筛选出了3个单基因插入的阳性株系, χ^2 检测显示其遗传分离比接近理

论值3:1, 符合单基因位点显性孟德尔遗传规律(表1); 经进一步对T₂代单株的PCR检测和筛选, 获得了转基因纯系(图3), 分别命名为T16-like-1、T16-like-2和T16-like-3。

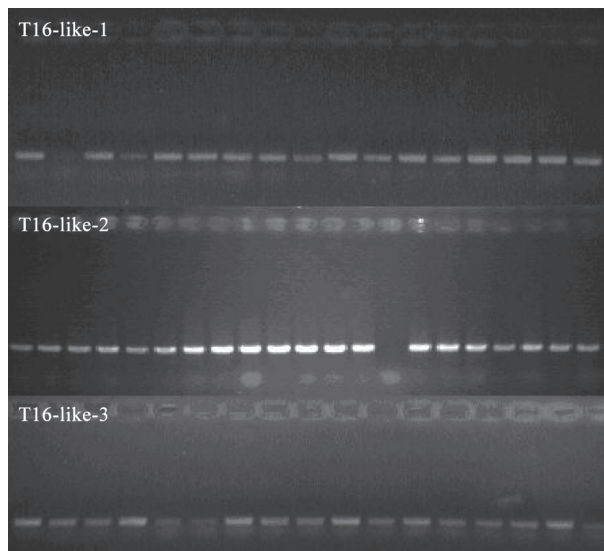


图3 转基因纯系T₂代PCR鉴定
Fig.3 T₂ progeny PCR profile of transgenic homozygous lines

3 转基因小麦的表达分析

为了确定目的基因是否在受体小麦中表达, 利用SDS-PAGE检测3个转基因纯系的T₃和T₄代种子中高分子量麦谷蛋白亚基的组成。结果发现, T16-like-2和-3两个株系的高分子量谷蛋白亚基组成与受体亲本一致, 可能是发生了转基因沉默; 转基因株系T16-like-1在HMW-GS 1By16处出现了较强的蛋白条带, 而内源HMW-GS基因*IBy9*的表达则受到了明显的抑制(图4)。

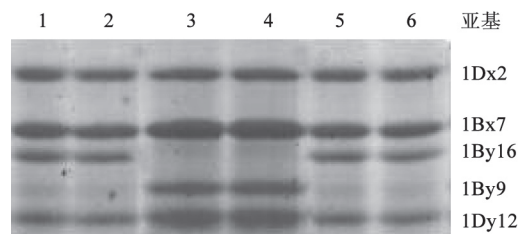


图4 转基因株系T16-like-1 T₃和T₄代种子高分子量谷蛋白亚基的SDS-PAGE图谱
Fig.4 SDS-PAGE profile of HMW-GS from T₃ and T₄ seeds of transgenic strain T16-like-1
1和2为T₃代的种子, 3和4为SR3的种子(受体), 5和6为T₄代的种子。

4 微面团实验

为了验证目的基因的导入是否影响了受体的面粉品质特性,选取了相同位置种植的同期T16-like-1的T₄代及受体小麦SR3和JN177的种子经磨粉后进行了揉面实验。3次重复实验的四项参数(揉面时间MT, 8分钟宽度TxW, 峰值时带宽PW和峰值衰落斜率RPS)的平均值见表2。结果显示,与对照SR3和JN177相比,转基因株系面团的MT、PW和TxW值提高显著,而RPS值则显著降低,这说明H1By16亚基的转入显著地提高了转基因小麦的面团强度。

讨 论

应用遗传工程技术进行小麦面粉加工品质改良主要有两种策略:(1)是利用其本身贮藏蛋白基因或改造后进行转化;(2)是利用小麦近缘种属的优良基因导入小麦。小麦面粉加工品质的改良目前侧重于烘烤品质的提高,而影响烘烤品质最重要的因素是谷蛋白中的HMW-GS。尽管HMW-GS在种子贮藏蛋白中所占比例很小(约占种子总蛋白的5%~10%),但它们的组成和含量与谷蛋白聚合体的形成密切相关,是决定面团弹性的主要因素(Shewry等2003)。HMW-GS的组成与数目受遗传控制,具有品种的稳定性。由于编码x型和y型HMW-GS的基因紧密连锁,传统的育种方法只能对同一位点的不同亚基组合进行面粉品质贡献的评价。研究认为在*Glu-1A*位点1Ax1或者1Ax2*对加工品质的贡献大于1AxNull,在*Glu-1B*位点1Bx13+1By16、1Bx14+1By15、1Bx17+1By18以及1Bx7+1By8对加工品质的贡献大于1Bx7+1By9或1Bx6+1By8,在*Glu-1D*位点上1Dx5+1Dy10的贡献要大于1Dx2+1Dy12 (Payne 1987; Shewry等1992, 2003)。但越来越多的研究表明同一小麦在不同地区种植品质表现不同,因此科研者根据各国的具体情况对该评分标准进行了修正(Shewry等1992)。另外,有些品种尽管含有优质亚基(如‘农大142’含有1Dx5+1Dy10),但烘烤品质并不好;有的品种含优质亚基数目较少或不含优质亚基,却有好的烘烤品质,因此这些问题有待进一步的研究,以便对小麦加工品质育种进行更好的指导。

随着转基因技术的应用,对单个HMW-GS在

小麦面粉品质的作用研究提供了便利的手段,大量的体外和转化小麦的实验证明1Ax1、1Dx5和1Dy10等单个亚基可以提高受体小麦的面团强度。同时,部分温室和大田HMW-GS基因转化小

表1 转基因植株T₁代遗传分析

Table 1 Genetic analysis of T₁ progeny of transgenic wheat plants

| T ₁ 代 | 植株数 | 阳性数:阴性数 | 理论比值 | χ^2 | P |
|------------------|-----|---------|------|----------|-----------|
| T16-like-1 | 75 | 52:23 | 3:1 | 1.26 | 0.25~0.5 |
| T16-like-2 | 62 | 50:12 | 3:1 | 0.77 | 0.25~0.5 |
| T16-like-3 | 73 | 49:24 | 3:1 | 2.01 | 0.10~0.25 |

麦实验也显示导致了面团强度的降低(Shewry等2006; León等2009)。另外转基因技术的应用也为鉴定和应用小麦近缘属种的优质HMW-GS成为可能。一般认为HMW-GS中半胱氨酸残基的数目、位置以及二级结构是影响它们对面粉最终品质的关键因素之一(Shewry等2003)。本实验所利用的目的基因H1By16来自于小麦体细胞杂种II-12,研究发现该基因来自1By9的等位变异,具有额外的半胱氨酸残基和不同于1By9的二级结构,更利于蛋白大聚体的形成,是一个潜在的优质亚基(Feng等2004)。受体小麦SR3具有产量高、抗盐等特点, HMW-GS组成为1Bx7+1By9, 1Dx2+1Dy12, 没有优质亚基或组合,面粉加工品质较差,因而是比较理想的检测外源HMW-GS基因功能的受体(León等2009)。Feng等(2004)认为H1By16的结构特点有利于蛋白大聚体的形成,可能会增强面团的强度。在本实验中,转化H1By16基因后,小麦面粉品质明显地大幅度提高(表2)。通过SDS-PAGE和A-PAGE对其麦谷蛋白和醇溶蛋白组成分别进行了检测,发现除了抑制非优质亚基基因1By9的表达

表2 转基因株系T16-like-1的面团品质参数

Table 2 Mixograph parameters of T16-like-1 flour

| 小麦品种(系) | MT/m | TxW/% | PW/A.U. | RP%/min ⁻¹ |
|------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------------|
| JN177 | 2.1 ^B | 5.0 ^B | 88 ^C | -1.6 ^B |
| SR3 | 2.3 ^B | 6.1 ^B | 134 ^B | -2.35 ^A |
| T16-like-1 | 2.8 ^A | 19.4 ^A | 187 ^A | -1.45 ^B |

表中的参数为3次实验结果的平均值,不同大写字母表示当P<0.01时有显著差异。

外, LMW-GS和醇溶蛋白几乎没有发生变化(图略)。因此我们推测, H1By16的出现, 虽然没有增加转基因小麦的HMW-GS基因的拷贝数和表达量, 但是由于自身的结构特点更有利于大面团的形成, 因而促进了面粉品质的提高。

在本实验所筛选的3个转基因纯系中, 有2个株系没有表达H1By16蛋白, 可能是出现了转基因沉默现象; 此外即使在有目的基因表达的株系T16-like-1中也出现了内源基因*1By9*表达下调或沉默的情况, 这种情况在以往的实验中也有出现(施农农等2005; Barro等1997; Alvarez等2000)。从遗传上分析, HMW-GS基因在转基因植株中的表达和稳定性可能主要受外源基因在受体基因组中的整合情况和转录情况等因素的影响(Alvarez等2000)。首先可能是整合位置的影响, 如果整合处于高度甲基化或异染色质的地方, 可以导致目的基因的甲基化或异染色质化使得外源基因发生沉默; 其次, 受体基因组对外源基因的表达可能存在一种防卫机制, 如对外来基因进行甲基化等, 导致转录水平的沉默; 第三, 共抑制现象, 当外源基因同内源基因高度同源时, 两者可能同时发生表达沉默, 这属于转录后的基因沉默; 第四, 在一些遗传转化中, 目的基因和受体植物染色体同源的DNA发生断裂, 使目的基因和宿主同源片段发生DNA重排现象; 此外, 转入的目的基因不稳定整合等也影响着外源基因的表达(王关林和方宏筠2009)。本实验中出现的转基因抑制或沉默现象有待设计系统实验探讨其发生的机制。

参考文献

施农农, 何光源, 李克秀, Jones HD, Shewry PR (2005). 基因枪法获得优质HMW亚基基因表达的转基因小麦. 中国农业科学, 38 (5): 874~881

王关林, 方宏筠(2009). 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 397~405

赵同金, 刘恒, 赵双宜, 陈惠民, 夏光敏(2010). 农杆菌介导的大麦*Mlo*反义基因转化小麦获得抗白粉病后代. 植物生理学通讯, 46 (7): 731~736

Altpeter F, Vail V (1996). Integration and expression of the high-molecular-weight glutenin subunit 1Ax gene in wheat. Nature Biotechnol, 14 (9): 1155~1159

Alvarez ML, Guelman S, Halford NG, Lustig S, Reggiardo MI, Ryabushkina N, Shewry P, Stein J, Vallejos RH (2000). Silencing of HMW glutenins in transgenic wheat expressing extra HMW subunits. Theor Appl Genet, 100: 319~327

Barro F, Rooks L, Bekes F, Gras P, Tatham AS, Fido R, Lazzeri PA,

Shewry PR, Barcelo P (1997). Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. Nat Biotechnol, 15: 1295~1299

Blechl A, Lin J, Nguyen S, Chan R, Anderson OD, Dupont FM (2007). Transgenic wheats with elevated levels of Dx5 and/or Dy10 high-molecular-weight glutenin subunits yield doughs with increased mixing strength and tolerance. J Cereal Sci, 45: 172~183

Blechl AE, Anderson OD (1996). Expression of a novel high-molecular-weight gluten subunit gene in transgenic wheat. Nat Biotechnol, 14 (7): 875~879

Chauhan H, Khurana N, Tyagi AK, Khurana JP, Khurana P (2011). Identification and characterization of high temperature stress responsive genes in bread wheat and their regulation at various stages of development. Plant Mol Biol, 75: 35~51

Cheng M, Fry JE, Pang SZ, Zhou HP, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan YC (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiol, 115 (3): 971~980

Feng DS, Xia GM, Zhao SY, Chen FG (2004). Two quality-associated HMW glutenin subunits in a somatic hybrid line between *Triticum aestivum* and *Agropyron elongatum*. Theor Appl Genet, 110: 136~144

Lee YK, Bekes F, Gras PW, Appels R, Morell MK (1999). The low-molecular-weight glutenin subunit proteins of primitive wheats. IV. Functional properties of products from individual genes. Theor Appl Genet, 98: 149~155

León E, Aouni R, Piston F, Rodríguez-Quijano M, Shewry PR, Martín A, Barro F (2010). Stacking HMW-GS transgenes in bread wheat: Combining subunit 1Dy10 gives improved mixing properties and dough functionality. J Cereal Sci, 51: 13~20

León E, Mañín S, Giménez MJ, Piston F, Rodríguez-Quijano M, Shewry PR, Barro F (2009). Mixing properties and dough functionality of transgenic lines of a commercial wheat cultivar expressing the 1Ax1, 1Dx5 and 1Dy10 HMW glutenin subunit genes. J Cereal Sci, 49: 148~156

McIntire TM, Lew EJJ, Adalsteins AE, Blechl A, Anderson OD, Brant DA, Kasarda DD (2005). Atomic force microscopy of a hybrid high-molecular-weight glutenin subunit from a transgenic hexaploid wheat. Biopolymers, 78: 53~61

Payne PI (1987). Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality. Ann Rev Plant Physiol, 38: 141~153

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2nd ed). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press

She M, Ye X, Yan Y, Howit C, Belgard M, Ma W (2011). Gene networks in the synthesis and deposition of protein polymers during grain development of wheat. Funct Integr Genomics, 11: 23~35

Shewry PR, Halford NG, Lafiandra D (2003). Genetics of wheat gluten proteins. Adv Genet, 49: 111~184

Shewry PR, Halford NG, Tatham AS (1992). The high molecular weight subunits of wheat glutenin. J Cereal Sci, 15: 105~120

Shewry PR, Powers S, Field JM, Fido RJ, Jones HD, Arnold GM, West J, Lazzeri PA, Barcelo P, Barro F et al (2006). Comparative

- field performance over 3 years and two sites of transgenic wheat lines expressing HMW subunit transgenes. *Theor Appl Genet*, 113: 128~136
- Tamás C, Kisgyörgy BN, Rakszegi M, Wilkinson MD, Yang MS, Láng L, Tamás L, Bedo Z (2009). Transgenic approach to improve wheat (*Triticum aestivum* L.) nutritional quality. *Plant Cell Rep*, 28 (7): 1085~1094
- Vasil IK, Bean S, Zhao J, McCluskey P, Lookhart G, Zhao HP, Altpeter F, Vasil V (2001). Evaluation of baking properties and gluten protein composition of field grown transgenic wheat lines expressing high molecular weight glutenin gene *1Ax1*. *J Plant Physiol*, 158 (4): 521~528
- Vasil V, Castillo AM, Fromm ME, Vasil IK (1992). Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile. *Nat Biotechnol*, 10: 667~674
- Walker AE, Walker CE (1992). Documentation and User Instructions for Mixsmart Software. Lincoln: National Mfg, Chapter 10
- Wang LH, Zhao XL, He ZH, Ma W, Appels R, Peña RJ, Xia XC (2009). Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit *Glu-B3* genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 118: 525~539
- Weeks JT, Anderson OD, Blechl AE (1993). Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol*, 102 (4): 1077~1084
- Xia GM, Xiang FN, Zhou AF, Wang H, He SX, Chen HM (2003). Asymmetric somatic hybridization between wheat (*Triticum aestivum* L.) and *Agropyron elongatum* (Host) Nevski. *Theor Appl Genet*, 107: 299~305
- Xia GM, Li ZY, He CX, Chen HM, Richard B (1999). Transgenic plant regeneration from wheat (*Triticum aestivum* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Phytophysiol Sin*, 25 (1): 22~28
- Yue SJ, Li H, Li YW, Zhu YF, Guo JK, Liu YJ, Chen Y, Jia X (2008). Generation of transgenic wheat lines with altered expression levels of 1Dx5 high-molecular weight glutenin subunit by RNA interference. *J Cereal Sci*, 47: 153~161
- Zhao TJ, Zhao SY, Chen HM, Zhao QZ, Hu ZM, Hou BK, Xia GM (2006). Transgenic wheat progeny resistant to powdery mildew generated by *Agrobacterium* inoculum to the basal portion of wheat seedling. *Plant Cell Rep*, 25: 1199~1204