

小麦籽粒硬度及其分子遗传基础研究回顾与展望

陈 锋¹, 李根英¹, 耿洪伟¹, 夏兰芹¹, 夏先春¹, 何中虎^{1,2}

(¹中国农业科学院作物科学研究所/国家小麦改良中心, 北京 100081; ²国际玉米小麦改良中心中国办事处, 北京 100081)

摘要: 籽粒硬度是最重要的小麦品质性状之一, 是市场分级和定价的重要依据。随着硬度测试方法的日趋完善, 其分子遗传基础的研究逐步加快。硬度主要受位于 5D 染色体短臂上一个主效基因和多个微效基因控制, *Pina* 和 *Pinb* 是形成小麦籽粒硬度的基础。PINA 蛋白的缺失或编码 PINB 蛋白的基因突变均造成小麦胚乳质地变硬。中国目前该项研究较少, 与国外相比仍有很大差距, 本文着重阐述了小麦胚乳结构及硬度的生化和遗传基础, 旨在为我国小麦籽粒硬度的研究提供理论依据。

关键词: 普通小麦; 籽粒硬度; Friabilin; Puroindoline; *Pina*; *Pinb*

Review and Prospect of Wheat Kernel Hardness and Its Molecular Genetics Basis

CHEN Feng¹, LI Gen-ying¹, GENG Hong-wei¹, XIA Lan-qin¹, XIA Xian-chun¹, HE Zhong-hu^{1,2}

(¹Institute of Crop Sciences/National Wheat Improvement Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ²CIMMYT China Office, Beijing 100081)

Abstract: Kernel hardness, controlled by a major gene located on the short arm of chromosome 5D, is one of the most important wheat quality characteristics and determines marketing and classification of common wheat. With the development of hardness measuring, the molecular genetic basis of kernel hardness has rapidly progressed. It is known that *Pina* and *Pinb* form the molecular basis of wheat kernel hardness and lacking of PINA or mutation in *Pinb* caused wheat endosperm become hard. Endosperm structure and genetic basis of hardness are summarized in order to provide useful information in understanding the formation of grain hardness.

Key words: Common wheat; Kernel hardness; Friabilin; Puroindoline; *Pina*; *Pinb*

籽粒硬度是小麦分类和市场分级重要性状之一, 影响润麦加水量、出粉率、破损淀粉粒数量和面粉颗粒度大小, 并最终决定磨粉品质和食品加工品质。按胚乳质地把普通小麦分为硬麦和软麦。硬质麦面粉颗粒度大、破损淀粉含量高, 具有较强的吸水能力, 适合制作面包和优质面条等食品; 软质麦面粉颗粒度较小、破损淀粉含量低, 吸水能力较弱, 适合于做饼干和糕点等甜食类食品。Rahman 等^[1]根据高压液体层析法 (RP-HPLC) 和氨基酸序列分析, 证实了决定硬度的 friabilin 蛋白主要由 PINA 和 PINB 两类亚基组成, 进一步促进了硬度的生化机理研究。当一组大约

15 kD 的 friabilin 蛋白多肽从小麦籽粒中被提取出来后^[2], 籽粒硬度在分子水平上的研究进程大大加快。

1 小麦籽粒硬度及其测定

1.1 硬度及其形成

胚乳约占小麦籽粒体积的 80%, 其主要成分是淀粉颗粒和储藏蛋白。淀粉颗粒在造粉体 (amyloplast) 内合成, 种子储藏蛋白是在包埋膜蛋白体 (membrane embedded protein body) 中沉淀而成。小麦胚乳细胞成熟期间, 蛋白体融合, 形成连续的蛋白质基质 (protein matrix), 而淀粉颗粒由于被残留的造粉体膜所包围,

收稿日期: 2004-05-24

资助项目: 国家 863 计划 (2002AA207003)、国家自然科学基金 (30260061) 和 973 重点发展研究规划 (2002CB11130)

作者简介: 陈 锋 (1978-), 男, 河南驻马店人, 博士研究生, 主要从事小麦遗传育种研究。E-mail: chf0088@sina.com。何中虎为通讯作者, Tel: 010-68918547; Email: zhhe@public3.bta.net.cn

能够维持原状。Barlow 等^[3]分别测试了淀粉颗粒和储藏蛋白质基质的硬度值, 软麦和硬麦没有显著差异。小麦籽粒未成熟时, 都是角质的, 在成熟过程中, 由于水分的散失, 胚乳的淀粉颗粒与蛋白质基质结合能力逐渐发生变化, 硬麦胚乳中二者的结合能力较强, 能够保持角质胚乳, 软麦胚乳中二者结合能力较弱, 易于分开, 成熟后常常形成粉质胚乳, 从而造成了硬麦和软麦之间硬度值的差异^[4]。Bechtel 等^[5]将未成熟的硬麦收获后分别置于室温和低温下, 干燥后发现放在室温的籽粒形成了硬质胚乳, 而放置在低温的硬麦则形成了软质胚乳, 进一步验证了胚乳硬度是在籽粒脱水干燥过程中形成的。因此, 磨粉后软质麦游离淀粉颗粒较多, 面粉较为细腻, 而硬麦由于淀粉颗粒与蛋白质基质间结合能力较强, 许多淀粉颗粒粘着在蛋白质基质上, 磨粉过程中形成了较多破损淀粉颗粒, 面粉较软质麦粗糙。Stenvert 等^[6]认为, 籽粒硬度主要由蛋白质基质的连续性、结构及其包被淀粉颗粒能力的大小决定。在硬质小麦中, 蛋白质基质具有连续性, 淀粉颗粒深陷其中, 两者不易分离; 软质小麦中, 蛋白质基质不具有连续性, 其包被的淀粉颗粒容易从四周空隙处渗漏出来, 致使两者结合能力减弱。由此可见, 籽粒硬度主要由籽粒中淀粉和蛋白质基质间的粘合力以及包被淀粉颗粒的蛋白质基质连续性决定的。

1.2 测定方法

最初根据咬力大小判断硬度大小, 目前分别根据压力、磨粉功耗、研磨时间和吸光度不同, 主要通过玻璃质法、压力法、研磨法和近红外法来测定硬度大小, 其中颗粒指数法、近红外光谱法、单籽粒谷物特性测定法等应用最为广泛。

颗粒指数法是测试籽粒硬度最为广泛和标准的参考方法, 许多方法都由此法衍生而来。首先将一定重量的小麦籽粒磨成粉, 经规定筛子筛一定时间后, 计算筛后与筛前重量的比值即是该样品的 PSI 值。一般小于 16 为硬麦, 16~25 为混合麦, 大于 25 为软麦。近红外光谱测试法是近些年发展起来的一种快速、高效测试方法, 可同时测定多个籽粒性状, 主要是利用波长 1 680 和 2 230 nm 处两个近红外光的强吸收点建立模型进行检测, 结果一般在 0~100 之间, 数值越高, 质地越硬。该法建立在传统的测试基础之上, 易受常规测试影响, 且需要定期校正。单粒谷物特性测定系统由美国谷物市场研究室和瑞典波通 (perten) 仪器公司建立, 利用压力作用把籽粒压碎, 然后通过传感器

感应力的大小确定样品的硬度。可以同时测定籽粒千粒重、直径、硬度指数和水分含量。一般硬度指数小于 40 多为软质麦, 大于 60 多为硬质麦, 40~60 为混合麦。此方法检测快速、操作简单、数据可靠、重复性好, 近年来已广泛用于小麦市场分级并成为测试硬度的重要仪器, 但该仪器价格较高, 且易受杂物及大颗粒影响而堵塞。

1.3 硬度与角质率

硬度通常与角质率混同, 其实二者是两个截然不同的概念。角质率主要受环境因素如籽粒成熟期土壤中氮素和水分含量、空气温度及干燥条件等外界因素影响较大, 遗传力较低, 高温有利于角质率的形成。角质率与硬度之间存在一定的相关性, 同一环境下可以用角质率大致反映硬度大小, 而不同环境下反映能力较差^[3]。硬度受以加性为主、显性为辅的 1 对主基因和一些微效基因控制。Pomeranze 等^[7]研究表明, 籽粒硬度受主效基因控制, 遗传力较高, 硬麦和软麦受不同遗传因子控制, 但这些因子都位于 5D 染色体短臂的 Ha 位点。Sourdille 等^[8]对 144 个重组近交系进行 QTL 标记研究表明, 控制硬度主效基因位于 5DS, 可解释总变异的 63.2%, 4 个微效基因分别定位于 2AL、2DL、5BL 和 6DS, 每个微效基因占总方差的 4.0%~5.7%。Perretant 等^[9]用 187 个小麦双倍体系进行了 QTL 分析, 证实已标记的主效 QTL 在 5DS, 两个微效 QTL 分别在 1A 和 6D 染色体上, 基因型方差分别占总变异的 3.0%和 5.5%。由此表明, 小麦籽粒硬度主要由一对主效基因和多个微效基因控制, 角质率则主要是受环境影响, 反映籽粒透明程度的一项重要指标。

2 硬度的生化及遗传基础

2.1 Friabilin 蛋白的发现

研究籽粒硬度生化基础的重大突破是 friabilin 的发现。Greenwell 等^[2]从水洗小麦淀粉表面分离出一种 15kD 的蛋白质, 通过 SDS-PAGE 将其分离, 这种蛋白质在软麦的水洗淀粉中丰富, 在硬麦淀粉中却相对较少, 而在硬粒小麦中完全缺失, 并发现表达这种蛋白质的基因位于 5D 染色体上, 随后这种蛋白被命名为 friabilin, 其中, 56 份研究材料中有 53 份的籽粒硬度与 friabilin 含量存在对应关系, 软质麦蛋白谱带的 friabilin 表达量约为硬质麦的 10 倍。

Rahman 等^[1]对 friabilin 蛋白做了详细研究, 从软质小麦品种 Rosella 中提取了 friabilin 蛋白, 并命名为

GSP (grain softness protein), 通过将分离的 GSP 与制备的多克隆抗体进行 Western 杂交, 表明利用全麦粉提取 friabilin 的量, 在硬质麦与软质麦之间没有明显差别, 但经过水洗之后二者之间差异极为显著。因此, friabilin 在软麦和硬麦中都出现, 但表达量不同, 硬质品种 friabilin 的变异比软质品种大。Morris 等^[10]研究表明 friabilin 具有软化小麦胚乳的作用, 并发现 friabilin 蛋白可溶解于由甲醇、水和醋酸组成的凝胶固定剂中, 这进一步促进了该蛋白和淀粉颗粒表面相互作用的研究。郭世华等^[11]认为, friabilin 蛋白表达量与籽粒硬度呈显著负相关, 即 friabilin 谱带强, 籽粒硬度数值低, 与软麦和硬麦的 SKCS 测定值之间相关系数为-0.68 和-0.66, 达到了 1%显著水平。

在经过电泳、色谱等技术对蛋白质分离和鉴定后发现 friabilin 可能是由多个蛋白成分组成的。Morris 等^[10]进行 friabilin 全蛋白(提取时提取液中没有加 β -巯基乙醇) SDS-PAGE 分析时, 发现了两种分子量只差 0.7 kD 的蛋白质。

2.2 Puroindoline 蛋白的发现

随着 friabilin 蛋白研究的逐步深入, 其成分也为人们所知。Blochet 等^[12,13]从小麦面粉中分离了一种可溶于 TritonX-114 的蛋白质, 经高压液相层析技术(RP-HPLC)分析后, 出现 6 个主峰, 其中 3 个主峰的氨基酸组成为嘌呤硫素(purothionins), 另 3 个峰中两个峰“peak5”和“peak7”具有较高的同源性, 且“peak5”含量较多。对“peak5”全序列测序分析, 发现其中存在一个富含色氨酸的区域, 将其命名为“Puroindoline”。Marion 等^[14]根据 Puroindoline 序列设计了一个寡核苷酸, 以其作探针分离到了两个 cDNA 克隆家族, 测序发现, 一个与“peak5”相对应, 命名为 Puroindoline a (*Pina*), 另一个与“peak7”相对应, 命名为 Puroindoline b (*Pinb*)。PINA 和 PINB 蛋白序列具有约 60%的同源性。Lillemo 等^[15]发现普通小麦品种中的 *Pina* 和 *Pinb* 基因序列其启动子上游的 400 个碱基同源性为 78.4%, 起始密码子下游 400 个碱基同源性只有 54.8%, 两种蛋白大部分异质序列存在于 10~20 个氨基酸残基之间, 主要发生在序列末端, 比较 puroindoline 蛋白和 friabilin 蛋白 N 端序列可知, puroindoline 蛋白是 friabilin 蛋白主要的成分。Puroindoline 蛋白是一种富含色氨酸的碱性蛋白质, 属于 CM (chloride modified) 蛋白家族。野生型小麦的 puroindoline 蛋白主要为 PINA 和 PINB, 由于二者序列高度一致, 分子量又非常接近, 利用 SDS-PAGE 分

离效果较差, 而 Day 等^[16]用毛细管电泳技术分析表明, 由于 PINA 和 PINB 迁移率不同, 可以利用毛细管电泳技术准确的将二者分开, 从而将软麦和硬麦以及两种硬质麦区分开来。Corona 等^[17]采用 pH 3.0 的酸性电泳(A-PAGE)也能够明显的将二者分开, 发现 PINA 有缺失和出现两种带型, PINB 有野生型和两种突变型 3 种带型。

Puroindoline 蛋白结构的研究较为滞后, 三级结构目前还不太清楚。Marion 等^[14]将 puroindoline 与三级结构已知的脂转移蛋白(LTP)比对后发现, 除相对应的色氨酸丰富区外, 二者其他序列同源性很高, 以 LTP 三级结构作为模板进行结构分析可以推测, puroindoline 蛋白质很可能包含 4 个螺旋, 每个螺旋由环(loop)连接, Trp 丰富区域位于第一个和第二个螺旋之间的环中, 通过二硫键连接。Lillemo 等^[18]通过对蛋白质二级结构分析, 也进一步验证了上述论断。

GSP-1 最初被认为是一种 friabilin 蛋白^[19], 之后发现是不同于 friabilin 的另外一种蛋白, 但二者序列相似, 都靠近 5D 染色体短臂 *Ha* 端^[20]。Rahman 等^[11]研究表明, *Gsp-1*、*Pina* 及 *Pinb* 位于一个约 100 kb 的区间内。Tranquilli 等^[21]研究表明, 编码 PINA、PINB 和 GSP-1 三种蛋白的基因位于一个 36 kb 区域内, 同时在染色体 5AS 和 5BS 末端也发现了 *Gsp-1* 位点。按已克隆的 cDNA 序列分别将位于 A、B 和 D 组染色体上的 *Gsp-1* 命名为 *Gsp-A1*、*Gsp-B1* 和 *Gsp-D1*^[22], 目前又发现 D 组染色体上 *Gsp-1* 存在多种变异^[23], 分别命名为 *Gsp-D1b*、*Gsp-D1c*、*Gsp-D1d*、*Gsp-D1e*、*Gsp-D1f*、*Gsp-D1g* 和 *Gsp-D1h*, 属于 CM 家族。Giroux 等^[22]认为, 尽管编码 GSP-1 蛋白的基因和 *Ha* 基因紧密连锁, 但在决定籽粒硬度中不起作用, 且不单独受到 5D 染色体的控制, 它的转录本(transcript)同样出现在硬粒小麦中。然而 Morris 等^[23]认为 *Gsp-1* 对籽粒硬度的形成产生一定影响, 但作用大小仍不清楚。

2.3 Puroindoline 突变类型及其分布

小麦品种籽粒硬度的差异是由 *Pina* 和 *Pinb* 基因的不同变异类型造成的, *Pina* 不表达或 *Pinb* 基因序列发生突变均会导致小麦胚乳质地变硬。Gautier 等^[20]对两个硬麦品种研究后发现, 相对于野生型序列 *Pinb* 基因中有一位点发生了突变, 导致相应氨基酸序列中 46 位点的 Gly 变为 Ser, 将此类型突变基因命名为 *Pinb-D1b*。Giroux 等^[24]在硬麦品种 Falcon 中发现了 PINA 蛋白的完全缺失类型, 将其命名为 *Pina-D1b*, 相应的野生型命名为 *Pina-D1a*。从此, 人类对籽粒硬

度的认识进入了一个快速发展阶段。随后, *Pinb-D1c*、*Pinb-D1d*、*Pinb-D1e*、*Pinb-D1f*和*Pinb-D1g*也相继被命名。最近, Morris等^[23]在山羊草中发现了*Pina*六种和*Pinb*七种新突变类型, 即*Pina-D1c*、*Pina-D1d*、*Pina-D1e*、*Pina-D1f*、*Pina-D1g*、*Pina-D1h*和*Pinb-D1h*、*Pinb-D1i*、*Pinb-D1j*、*Pinb-D1k*、*Pinb-D1m*、*Pinb-D1n*、*Pinb-D1o*, 这些均为多位点突变, 表现为软质。结果汇总见表1。

在 *puroindoline* 分子标记检测的基础上, 对其不同变异类型的分布也进行了研究。Lillemo等^[18]分析了不同地理来源小麦种质的硬度变异类型, 发现所调查的302份春麦中, *Pinb-D1b*有171份, *Pinb-D1c*有89份, 26份冬麦中*Pinb-D1b*有14份, *Pinb-D1c*有2份。Morris等^[25]所调查的54份冬麦中有52份是

*Pinb-D1b*突变, 71份春麦中有47份是*Pinb-D1b*突变。Xia等^[27]对中国251份小麦的硬度调查中发现*Pinb-D1b*占具了硬质麦的70.2%, 并发现了有10个品种拥有新突变, 命名为*Pinb-D1p*, 同样表明*Pinb-D1b*是硬质麦中最为常见的突变类型。其他学者对意大利和澳大利亚等国家的小麦也做了研究, 总体来说, *PINA*缺失类型较少, *Pinb*突变类型较多, 其中*Pinb-D1b*在不同国家分布最为广泛, 占有所有类型的54.8%, 其中中国和北美最多, 其次为挪威、瑞典和意大利, *Pinb-D1a*和*Pina-D1b*基因型的品种比例分别是17.2%、12.7%和10.0%, 主要集中在中国、挪威、意大利和北美; *Pinb-D1d*、*Pinb-D1e*、*Pinb-D1f*和*Pinb-D1g*在中国分布相对较多, 其他国家较少, 只零星分布在北美和澳大利亚等国, 详见表2。

表1 目前已知的 *puroindoline a* 和 *b* 的突变类型、表现型和分子变化及来源

Table 1 Known mutation of *puroindoline a* and *b*, phenotype, and molecular basis

<i>Pina</i>	<i>Pinb</i>	表现型 Phenotype	分子变化 Molecular change	参考文献 References
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	软 Soft	Wild-type	Giroux and Morris 1998 ^[22]
<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	硬 Hard	<i>Pina</i> 缺失 Null	Giroux and Morris 1998 ^[22]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	硬 Hard	Gly-46 to Ser-46, GGC→AGC	Giroux and Morris 1997 ^[22]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1c</i>	硬 Hard	Leu-60 to Pro-60, CTG→CCG	Lillemo and Morris 2000 ^[18]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>	硬 Hard	Trp-44 to Arg-44, TGG→AGG	Lillemo and Morris 2000 ^[18]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1e</i>	硬 Hard	Trp-39 to stop codon TGG→TGA	Morris et al. 2001 ^[25]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1f</i>	硬 Hard	Trp-44 to stop codon TGG→TGA	Morris et al. 2001 ^[25]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1g</i>	硬 Hard	Cys-56 to stop codon TGC→TGA	Morris et al. 2001 ^[25]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1i</i>	硬 Hard	Lys-45 to Glu-45	Pan 2004 ^[26]
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1p</i>	硬 Hard	碱基 A 缺失 A deletion	Xia et al. 2005 ^[27]

表2 不同地理起源小麦种质和 *puroindoline* 基因型

Table 2 Wheat germplasm lines sorted by geographical origin and *puroindoline* alleles

来源 Origin	品种数 Number	软质 Soft		硬质 Hard								
		<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1c</i>	<i>Pinb-D1d</i>	<i>Pinb-D1e</i>	<i>Pinb-D1f</i>	<i>Pinb-D1g</i>	<i>Pinb-D1p</i>
挪威 Norway	69	3		48	18							
瑞典 Sweden	56	2		29	25							
芬兰 Finland	18	2		7	9							
西欧 West Europe	21	4		5	12							
东欧 East Europe	15	2	1	11	1							
北欧 North Europe	26	8	1	14	2	1						
中国 China	251	79	16	91		2						10
拉丁美洲 Latin America	29	6	12	10	1							
加拿大 Canada	14		1	11	3							
美国 America	123	9	15	93	6							
北美 North America	157	15	18	109	5	5	3	1	1			
非洲 Africa	9	1	2	6								
澳大利亚 Australia	56	11	12	33						2		
意大利 Italy	60	15	17	24		4						
其它国家 Other country	27	2	2	14	9							

资料来源: Lillemo等^[18]、Morris等^[25]、Turnbull等^[29]、Pogna等^[29]、Cane等^[28]和Xia等^[27]

Data from Lillemo et al. ^[18], Morris et al. ^[25], Turnbull et al. ^[29], Pogna et al. ^[29], Cane et al. ^[28] and Xia et al. ^[27]

另外, Morris 等^[25]发现有些品种同时拥有 *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1c* 的混合基因型以及 *Pinb-D1b* 和 *Pinb-D1c* 的混合基因型, Cane 等^[28]在对澳大利亚南部小麦进行研究时也发现有些品种同时拥有 *Pinb-D1b* 和 *Pina-D1b* 两种基因型。

2.4 Puroindoline 与小麦品质性状的关系

2.4.1 Puroindoline 与籽粒硬度

Puroindoline 蛋白两个组分 PINA 和 PINB 则是形成小麦籽粒硬度的基础。Turnbull 等^[30]研究表明, 小麦种子在收获后 10 d 内 puroindoline 蛋白含量极低, 从第 15 天后开始快速增加, 到第 32 天达到最大值, 但总含量是软麦高于硬麦。整个后熟过程中, 硬度指数没有明显变化。Igrejas 等^[31]研究遗传和环境因素对法国面包小麦中 PINA 和 PINB 影响时, 认为 PINA 和 PINB 含量均不受环境的影响, 二者之间的相关程度在软麦中较高, 为 0.58~0.72, 并发现第 4 个地点的软质麦中 PINB 含量和籽粒硬度呈明显的负相关, 研究还表明籽粒硬度与 PINA 和 PINB 含量呈极显著负相关^[32], 相关系数分别为 -0.86 和 -0.80。他利用 QTL 对主效基因定位后发现, 位于 5D 染色体短臂的主效 QTL 基因临近 *mta9* 位点, 这个基因能够解释表型方差的 63%, 解释 PINA 和 PINB 含量的 77%和 45%。

现在一致认为, 普通小麦中 *Pina* 基因不表达或 *Pinb* 基因序列发生的各种突变均会导致小麦胚乳质地变硬, 但是不同的突变类型对硬度的影响也不相同。为调查 *Pina* 基因对籽粒硬度的作用, Capparelli 等^[33]研究表明 *Pina* 转录本的表达水平决定着与淀粉相连的 friabilin 表达量, 即软麦中 puroindoline 蛋白基本上都与淀粉相连, *Pinb-D1b* 的硬麦中只有很少与淀粉相连, 而 *Pina-D1b* 的硬麦中则不能检测到。许多研究表明, 拥有 *Pina-D1b* 突变因子的胚乳比拥有 *Pinb-D1b* 突变因子的胚乳硬度值高。Lillemo 等^[18]比较了各个突变因子对硬度影响大小, 其 SKCS 硬度值分别为软麦 45, *Pina-D1b* 75, *Pinb-D1b* 68, *Pinb-D1c* 72, 但依此作为判断各个突变位点对硬度影响大小的理由还不充分, 仍需进一步研究。

2.4.2 Puroindoline 与小麦加工品质性状

籽粒硬度分子基础的研究对小麦品质改良有重要的指导意义。Dubreil 等^[34]研究表明小麦面粉中增加 puroindoline 蛋白对其流变学特性和面包加工品质有显著影响, 对两种小麦品种 FA 和 EC 面粉进行了重组, 在面粉中增加 0.1% puroindoline 蛋白后, 发现 EC 和 FAEC (FA 和 EC 按 1:1 比例混合) 面团强度和延伸性分别下降

了 8%、7.4%和 33.8%、30%, FA 则分别增加了 40%和 28.5%, 这有利于改善面包结构, 使气孔大小分布均匀, 但会造成面包体积下降。闫俊等(中国农业科学院小麦品质育种实验室资料)在小麦中优 9507 中发现了两种不同硬度类型的品系, 二者的 PSI 和面包体积存在显著差异。Martin 等^[35]用 *Pina-D1b* 和 *Pinb-D1b* 杂交的 149 份重组近交系为材料研究了 *Pina* 和 *Pinb* 基因的不同变异类型对磨粉品质和面包品质性状的影响, 发现 *Pinb-D1b* 组小麦籽粒明显比 *Pina-D1b* 组偏软, 出粉率、皮磨出粉率、磨粉评分较高, 面包体积较大, 面粉灰份低, 但面包结构评分较低。Cane 等^[28]研究了澳大利亚南方小麦品种研究不同类型硬质小麦对品质影响, 表明 *Pina-D1b* 基因型小麦 PSI 值和吸水率比 *Pinb-D1b* 基因型小麦高, 但出粉率和面团形成时间明显比后者偏低。他还认为将来有可能根据 puroindoline 基因去预测面团形成时间, 从而用于小麦品质的改良。

2.5 Puroindoline 存在广泛性

Puroindoline 基因广泛存在于小麦族和燕麦族的大部分作物中, 但在玉米和水稻中缺乏^[36]。Lillemo 等^[37]通过反向 PCR 表明该基因存在于一粒小麦 (*T.monococcum*)、乌拉尔图小麦 (*T.urartu*)、节节麦 (*A.tauschii*)和拟斯卑尔脱山羊草 (*Aegilops speltoides*) 中, 但拥有硬质胚乳的四倍体硬粒小麦却缺乏这种蛋白, 这很可能是约 9000 年前种子驯化过程中, 形成四倍体小麦的品种 puroindoline 基因发生了缺失, 而二粒小麦 (*T.dicoccum*) 和节节麦杂交的软质六倍体小麦则保留了该基因^[36]。另外, puroindoline 蛋白在软质黑麦、小黑麦和大麦的水洗淀粉中也相继被发现, 其作用与在小麦中相似^[18,38]。

4 籽粒硬度的基因工程改良

随着生物技术的快速发展, 有关小麦籽粒硬度转基因的研究也取得了一定进展。Giroux 等^[39]将野生型 *Pinb-D1a* 转入携带 *Pinb-D1b* 的硬粒小麦中, 转基因籽粒表现软质, 水洗淀粉中 friabilin 含量增加显著, 籽粒硬度、破损淀粉颗粒数明显减少。Beecher 等^[40]将中国春野生型 *Pinb-D1a* 序列转入硬麦中, 使其在胚乳中表达, SKCS 硬度值由 70 降为 25, 与典型软质麦相同, 破损淀粉也有原来的 3.71%减少为 1.69%。Krishnamurthy 等^[41]将野生型 *Pina* 和 *Pinb* 基因转入水稻中, 转基因水稻胚乳质地明显变软。Hogg 等^[42]将小麦硬度野生型基因转入硬红冬麦中, Northern 杂交

结果分析表明, 转录本增加, 籽粒硬度明显变软, 变化幅度与其原有基因和外来基因的表达时序有关, 他还认为, 增加 PINB 含量使小麦籽粒硬度减少程度要大于因增加 PINA 含量使其减少的程度, friabilin 含量与野生型 *Pina* 和 *Pinb* 表达量有关, 与总 puroindoline 蛋白无关, PINA 和 PINB 相互作用形成 friabilin, 二者共同决定着籽粒硬度数值的高低。目前, 笔者已对中国小麦硬度主效基因 *Pina* 和 *Pinb* 进行了克隆, 成功构建了小麦硬度主效基因过量表达载体、RNA 干扰表达载体、融合基因表达载体和反义表达载体, 并通过花粉管通道法将过量表达载体转入中优 9507 中, T₁ 代植株分子鉴定和遗传分析正在进行, 为中国小麦硬度的基因工程改良奠定了基础。尽管如此, 转基因系的硬度稳定性及对其他相关性状的影响还有待确定, 但上述研究表明通过对作物 puroindoline 的调控表达来改善谷物籽粒的组织结构是可行的, 这为人们控制籽粒硬度大小, 使小麦等作物的硬度值朝着人们预定的目标发展成为可能。

References

- [1] Rahman S, Jolly C J, Skerritt J H, Walloscheck A. Cloning of a wheat 15 kDa grain softness protein (GSP). GSP is a mixture of puroindoline-like polypeptides. *Europe Journal of Biochemistry*, 1994, 223: 917-925.
- [2] Greenwell P, Schofield J D. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chemistry*, 1986, 63: 379-380.
- [3] Barlow K K, Buttrose M S, Simmonds D H, Vesik M. The nature of the starch-protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chemistry*, 1973, 50: 443-454.
- [4] Simmonds D H, Barlow K K, Wrigley C W. The biochemical basis of grain hardness wheat. *American Association of Cereal Chemists*, 1973: 553-562.
- [5] Bechtel D B, Wilson J D, Martin C R. Determining endosperm texture of developing hard and soft red winter wheats by different methods using the single-kernel wheat characterization system. *Cereal Chemistry*, 1996, 73: 567-570.
- [6] Stenvert N L, Kingswood K. The influence of the physical structure of the protein matrix on wheat hardness. *Journal of Science Food Agriculture*, 1997, 28: 11-19.
- [7] Pomeranze Y W. Wheat hardness: its genetic, structural, and biochemical background, measurement, and significance. *Advances in Cereal Science and Technology*, 1990: 471-549.
- [8] Sourdille P, Perretant M R, Charmet G, Leroy P, Gautier M F, Joudrier P, Nelson J C, Sorrels M E, Bernard M. Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93: 580-586.
- [9] Perretant M R, Cadalen T, Charmet G, Sourdille P, Nicolas P, Boeuf C, Tixier M H, Branlard G, Bernard S. QTL analysis of bread-making quality in wheat using a doubled haploid population. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 1 168-1 175.
- [10] Morris C F, Greenblatt G A, Bettge A D, Malkawi H I. Isolation and characterization of multiple forms of friabilin. *Journal of Cereal Science*, 1994, 20: 167-174.
- [11] 郭世华, 何中虎, 王洪刚, 夏兰芹, 张庆祝, 张岐军, 于亚雄. Friabilin 蛋白表达量与小麦籽粒硬度的关系. *中国农业科学*, 2003, 36(9): 991-995.
Gou S H, He Z H, Wang H G, Xia L Q, Zhang Q Z, Zhang Q J, Yu Y X. Association of friabilin protein and grain hardness in common wheat. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(9): 991-995. (in Chinese)
- [12] Blochet J E, Kaboulou A, Compoin J P, Marion D. Amphiphilic proteins from wheat flour specific extraction, structure and lipid binding properties. *American Association of Cereal Chemists*, 1991, 314-325.
- [13] Blochet J E, Chevalier C, Forest E, Pebay-peyroula E. Complete amino acid sequence of puroindoline. A new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS*, 1993, 329: 336-340.
- [14] Marion D, Gautier M F, Joudrier P, Ptak M, Pezolet M, Forest E, Clark D C, Broekaert W. Structure and function of wheat lipid binding proteins. *University Delegation Study Transaction*, 1994: 175-180.
- [15] Lillemo M, Simeone M C, Morris C F. Analysis of puroindoline a and b sequences from *Triticum aestivum* cv. 'penawawa' and related diploid taxa. *Euphytica*, 2002, 126: 321-331.
- [16] Day L, Greenwell P, Lock S, Brown H. Analysis of wheat flour proteins related to grain hardness using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1999, 836: 147-152.
- [17] Corona V, Gazza L, Boggini G, Pogna N E. Variation in friabilin composition as determined by A-PAGE fractionation and PCR amplification, and its relationship to grain hardness in bread wheat. *Journal of Cereal Science*, 2001, 34: 243-250.
- [18] Lillemo M, Morris C F. Aleucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 1 100-1 107.
- [19] Jolly C J, Rahman S, Kortt A A, Higgins T J V. Characterization of the wheat Mr 15000 "grain-softness protein" and analysis of the

- relationship between its accumulation in the whole seed and grain softness. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 86: 589-597.
- [20] Gautier M F, Aleman M E, Guirao A, Marion D, Joudrier P. *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Molecular Biology*, 1994, 25: 43-57.
- [21] Tranquilli G, Heaton J, Chicaza O, Dubcovsky J. Substitutions and deletions of gene related to grain hardness in wheat and their effect on grain texture. *Crop Science*, 2002, 42: 1 812-1 817.
- [22] Giroux M J, Morris C F. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in friabilin components puroindoline a and b. *Proceedings of the National Academic Science of the USA*, 1998, 95: 6 262-6 266.
- [23] Morris C F, Massa A, Gedye K, Gill B S. Sequence diversity of the puroindoline a and b genes in *Aegilops tauschii*-relationship to kernel texture in wheat. *Proceedings of the 10th International Wheat Genetics Symposium*, 2003, 1: 451-454.
- [24] Giroux M J, Morris C F. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95: 857-864.
- [25] Morris C F, Lillemo M, Simeone M C, Giroux M J, Babb S L, Kimberlee K K. Prevalence of Puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats. *Crop Science*, 2001, 41: 218-228.
- [26] Pan Z, Song W, Meng F, Xu L, Liu B, Zhu J. Characterization of genes encoding wheat grain hardness from Chinese cultivar GaoCheng 8901. *Cereal Chemistry*, 2004, 81: 287-289.
- [27] Xia L Q, Chen F, He Z H, Chen X M, Morris C F. Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats. *Cereal Chemistry*, 2005, 82: 38-43.
- [28] Cane K, Spackman M, Eagles H A. Puroindoline genes and their effects on grains quality traits in southern Australian wheat cultivars. *Australian Journal of Agriculture Research*, 2004, 55: 89-95.
- [29] Pogna N, Gazza L, Corona V, Zanier R, Niglio A, Mei E, Palumbo M, Boggini G. Puroindolines and kernel hardness in wheat species. *American Association of Cereal Chemists*, 2002: 155-169.
- [30] Turnbull K M, Marion D, Gaborit T, Apples R, Rahman S. Early expression of grain hardness in the developing wheat endosperm. *Planta*, 2003, 216: 699-706.
- [31] Igrejas G, Gaborit T, Oury F X, Chiron H, Marion D, Branlard G. Genetic and environmental effects on puroindoline-a and puroindoline-b content and their relationship to technological properties in French bread wheats. *Journal of Cereal Science*, 2001, 34: 37-47.
- [32] Igrejas G, Leroy P, Charmet G, Gaborit T, Marion D, Branlard G. Mapping QTLs for grain hardness and puroindoline content in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 106: 19-27.
- [33] Capparelli R, Borriello G, Giroux M J, Amoroso M G. Puroindoline A-gene expression is involved in association of puroindoline to starch. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 1 463-1 468.
- [34] Dubreil L, Méliande S, Chiron H, Compoin J P, Quillien L, Branlard G, Marion D. Effect of puroindolines on the breadmaking properties of wheat flour. *Cereal Chemistry*, 1998, 75: 222-229.
- [35] Martin J M, Froberg R C, Morris C F, Talbert L E, Giroux M J. Milling and bread baking traits associated with puroindoline sequence type in hard red spring wheat. *Crop Science*, 2001, 41: 228-234.
- [36] Gautier M F, Cosson P, Guirao A R, Joudrier P. Puroindoline genes are highly conserved in diploid ancestor wheat and related species but absent in tetraploid *Triticum* species. *Plant Science*, 2000, 153: 81-91.
- [37] Lillemo M, Ringlund K. Impact of puroindoline b alleles on the genetic variation for hardness in soft×hard wheat crosses. *Plant Breeding*, 2002, 121: 210-217.
- [38] Ramirez A, Gabriela T, Perea, Pablo D, Alberto R. The occurrence of friabilins in triticale and their relationship with grain hardness and baking quality. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2003, 51: 7 176-7 181.
- [39] Giroux M J, Luther T, Habernicht D K, Lanning S, Hemphill A, Martin J M. Association of puroindolines sequence type and grain hardness in hard red spring wheat. *Crop Science*, 2000, 40: 370-374.
- [40] Beecher B, Bettge A, Smidansky E, Giroux M J. Expression of wild-type pinB sequence in transgenic wheat complements a hard phenotype. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105: 870-877.
- [41] Krishnamurthy K, Giroux M J. Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice enhances grain softness. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 1-5.
- [42] Hogg A C, Sriro T, Beecher B, Martin J M, Gorpux M J. Wheat puroindolines interact to form friabilin and control wheat grain hardness. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 1 089-1 097.

(责任编辑 孙雷心)