

晁岳恩,王沙沙,汪庆昌,等. 基于转录组比较的燕麦类似贮藏蛋白在小麦面团强度性状中的作用[J]. 江苏农业学报,2024,40(5):777-784.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.05.002

基于转录组比较的燕麦类似贮藏蛋白在小麦面团强度性状中的作用

晁岳恩, 王沙沙, 汪庆昌, 黄超, 李巍, 时锋

(河南省农业科学院小麦研究所,河南 郑州 450002)

摘要: 面团强度是影响小麦加工应用的主要品质指标之一。为鉴定与面团强度性状相关的贮藏蛋白编码基因,本研究以高相对分子量麦谷蛋白亚基组合完全相同的2个品种(郑麦366:高面团强度品种;郑麦366杂交后代品种郑麦369:低面团强度品种)为研究材料,比较开花后14 d、21 d、28 d的贮藏蛋白编码基因表达差异,评估基因编码蛋白的面团强度贡献值,以及面粉的巯基含量差异等。结果表明,在25个显著差异表达的贮藏蛋白编码基因中,无高相对分子量麦谷蛋白亚基、低相对分子量麦谷蛋白亚基基因;其中郑麦366显著上调表达基因14个,包含8个燕麦类似蛋白编码基因和6个醇溶蛋白编码基因;显著下调表达基因11个,包括10个醇溶蛋白编码基因和1个燕麦类似蛋白编码基因。贮藏蛋白面团强度评价模型的评分结果显示,差异表达基因编码的燕麦类似贮藏蛋白对面团强度性状的贡献值不低于优质麦谷蛋白亚基,暗示燕麦类似贮藏蛋白可能也是影响面团强度性状的重要蛋白质类型。

关键词: 小麦;燕麦类似贮藏蛋白;面团强度;自由巯基;转录组

中图分类号: S512.1;S331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)05-0777-08

Effect of avenin-like proteins on wheat dough strength traits based on comparative transcriptome

CHAO Yueen, WANG Shasha, WANG Qingchang, HUANG Chao, LI Wei, SHI Feng

(Institute of Wheat Research, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Wheat dough strength is one of the important quality indicators that can affect the processing and application of wheat. To identify genes that coding grain storage proteins (GSPs) related to dough strength quality, two wheat cultivars (cultivar Zhengmai 366, with high dough strength; cultivar Zhengmai 369, with low dough strength, which was filial generation of Zhengmai 366) with the same combination of high molecular weight-glutenin subunits (HMW-GSs) were used as the test materials in this study. Expression differences of storage proteins encoding genes were compared 14 d, 21 d and 28 d after flowering. The contribution value of gene encoding proteins to dough strength and sulfhydryl content difference of flour were evaluated. The results showed that, in 25 significantly differentially expressed GSP encoding genes, there weren't any high or low molecular weight-glutenin subunits, and there were 14 genes of Zhengmai 366 significantly up-regulated (including eight avenin-like encoding genes and six gliadin coding genes), 11 genes were significantly down-regulated (including ten gliadin coding genes and one avenin-like encoding gene). The prediction results of evaluation model for dough strength of storage proteins indicated that, the avenin-like proteins encoded by differentially expressed genes may contribute more to dough strength than the elite glutenin subunit. The results suggest that maybe avenin-

收稿日期:2023-05-23

基金项目:河南省农业科学院自主创新项目(2023ZC004);河南省科技攻关项目(232102110254)

作者简介:晁岳恩(1974-),河南濮阳人,博士,副研究员,主要从事小麦遗传育种工作。(E-mail)nkychaoyueen@163.com

including ten gliadin coding genes and one avenin-like encoding gene). The prediction results of evaluation model for dough strength of storage proteins indicated that, the avenin-like proteins encoded by differentially expressed genes may contribute more to dough strength than the elite glutenin subunit. The results suggest that maybe avenin-

like proteins are also important protein types that can influence dough strength.

Key words: wheat; avenin-like proteins; dough strength; free sulfhydryl groups; transcriptome

小麦是三大农作物之一,是多种面食产品的原料。小麦面粉的独特性在于其含有的贮藏蛋白(也称为面筋蛋白)可以与水相互作用,形成具有黏弹性的高分子网状胶状物质——面筋,面筋的含量与流变学特性决定着面粉的最终加工用途^[1]。

小麦的加工品质主要由籽粒中贮藏蛋白的类型与含量决定,通常情况下小麦粉的面团强度性状与贮藏蛋白含量呈正相关^[2]。小麦贮藏蛋白主要包括麦谷蛋白和醇溶蛋白两类,每一类又可进一步分为若干亚类。根据相对分子量大小,麦谷蛋白可分为高相对分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)、低相对分子量麦谷蛋白亚基(LMW-GS)2个亚类。HMW-GS可通过自由巯基(未形成分子内二硫键的半胱氨酸残基)与其他蛋白质的自由巯基形成分子间二硫键,是构建面筋骨架的最主要的蛋白质类型,HMW-GS的含量与类型是决定面团强度性状的主要遗传因素^[3]。一些关于转基因技术或突变体的研究结果也证明了HMW-GS对面团强度性状有重要影响^[4-6]。不同类型的HMW-GS组合被认为是决定面粉质量的主要遗传因素,其中Dx5+Dy10被认为是较好的亚基组合方式^[7]。一种近年来被发现的、被称为非典型面筋蛋白(Atypical gluten)类型的燕麦类似蛋白质(Avenin-like proteins),也对面团强度性状具有正向作用^[8-9]。另外,栽培措施、环境等非遗传因素也对小麦品质有较大影响^[10]。

虽然HMW-GS组合被认为是影响面粉质量的主要原因,但生产上也存在HMW-GS组合完全一致而面粉质量差异很大的品种。此前,我们也曾对HMW-GS组合完全相同但面粉质量不同的2个品种间的基因表达差异进行了分析,筛选出一些可能与面团强度性状相关的贮藏蛋白基因^[11],其面粉质量效应正在进一步验证中。本研究拟对遗传背景更为相似,但面团强度性状不同的2个品种(郑麦366和其杂交后代郑麦369)间的贮藏蛋白基因表达差异进行对比,尝试分析在遗传背景近似、HMW-GS组合相同的情况下,导致面粉质量变化的贮藏蛋白编码基因表达差异。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验品种为郑麦366和郑麦369,郑麦369为郑

麦366的杂交(郑麦366×良星99)后代品种,2个材料于2019–2020年种植在河南省农业科学院试验基地(113°42′4″E,35°0′17″N),每品种种植2行,行长2 m,行间距24 cm,品种间距30 cm,各品种田间管理相同。转录组测序分析所用样品分别取自开花后14 d、21 d、28 d的穗中部两侧籽粒,取样后用液氮速冻带回实验室用–80℃冰箱保存,在干冰包装条件下寄送至杭州联川生物技术有限公司。收获成熟籽粒用于面粉品质分析和蛋白质电泳。

1.2 面粉品质分析

蛋白质含量(干基)采用GB/T 5009.5–2016的方法测定;湿面筋含量采用GB/T 5506.2–2008的方法测定;吸水量、面团形成时间、面团稳定时间采用GB/T 14614–2019的方法测定,操作流程及仪器型号等参见文献[12]。

1.3 贮藏蛋白的提取和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

小麦醇溶蛋白和麦谷蛋白提取方法参照文献[13]。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的分离胶浓度为12%,浓缩胶浓度为4%,电泳蛋白质上样量为10 μl,采用考马斯亮蓝(R-250)染色。

1.4 转录组测序及生物信息学分析

转录组分析样品的RNA提取、测序及生物信息学分析均由杭州联川生物技术有限公司完成,设3次生物学重复。基因差异表达倍数>2.0倍或<0.5倍,且 $P<0.05$ 定义为差异表达基因。

1.5 硫元素含量及巯基含量的测定

硫元素含量测定:称量10 mg面粉,加入200 μl浓硝酸,在95℃下消化30 min,然后在115℃下消化90 min,冷却至室温后用超纯水定容至1 ml。采用液相离子色谱测定硫元素含量,阴离子标准液来自Wako Pure Chemicals(Japan),详细操作参照文献[14]。

巯基含量测定,自由巯基含量测定:取面粉15 mg加入并悬浮在1.00 ml Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.0)中,在室温、7 600 g的条件下离心,取4.00 ml上清液加入0.04 ml DTNB[5,5′-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid),5,5′-二硫代双(2-硝基苯甲酸)]

(0.3%),室温下反应 15 min,以空白缓冲液作空白对照,在 412 nm 处测定吸光度值;总巯基含量测定:取面粉悬浮于 1.00 ml Tris-甘氨酸缓冲液中,加入 0.05 ml 巯基乙醇和 4.00 ml 尿素胍盐酸盐溶液充分混合,室温放置 1 h,加入 5.00 ml 三氯乙酸(1.2%)离心并用三氯乙酸洗涤 2 次,将沉淀溶解在 10.00 ml 8 mol/L 尿素中,加入 0.04 ml DTNB(0.3%),室温下反应 15 min,在 412 nm 处测定吸光度值。详细操作及含量计算方法参考文献[15]。

1.6 蛋白质的质量评价

差异表达基因编码的蛋白质的二硫键预测及蛋

白质的质量评分方法参照文献[12]。

2 结果与分析

2.1 面粉质量参数

从 2 个品种小麦面粉质量参数(表 1)可以看出,2 个品种小麦面粉之间的湿面筋含量、粗蛋白含量和面团强度代表性参数(面筋指数、面团形成时间和稳定时间)都有显著或极显著差异,除吸水率外郑麦 366 其他所有参数均显著或极显著高于郑麦 369,表明郑麦 366 面粉中含有较多对面团强度性状有利的蛋白质类型。

表 1 2 个小麦品种的面粉品质特性

Table 1 Processing quality of flour from two wheat cultivars

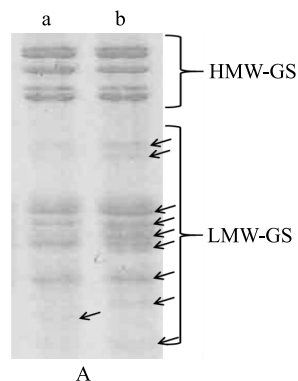
品种	粗蛋白含量 (干基,%)	湿面筋含量 (%)	面筋指数 (%)	吸水率 (%)	面团形成时间 (min)	面团稳定时间 (min)
郑麦 366	16.30±0.50*	35.7±1.2*	84.4±4.5*	64.6±2.6	10.0±1.3**	12.3±1.6**
郑麦 369	13.90±1.52	32.5±1.3	70.1±5.5	68.5±1.9	6.2±0.9	8.4±1.5

* 和 ** 分别表示品种间差异达到显著水平($P<0.05$)和极显著水平($P<0.01$)。

2.2 面筋蛋白电泳

一般认为, HMW-GS 组合是决定面粉质量的主要遗传因素,但从电泳结果(图 1)来看,2 个品种小麦面粉的 HMW-GS 组合完全一致,表明 HMW-GS 组合可能不是导致这 2 个品种间面粉质量差异的主要原因;在 LMW-GS 的条带位置和浓度上 2 个品种间略有差异;对于醇溶蛋白,郑麦 369 条带类型较多

且含量较高,这也与传统上认为的醇溶蛋白与面团强度性状之间呈负相关的看法一致。另外,对于被称为非典型面筋蛋白的燕麦类似蛋白,目前尚未探索出可靠有效的包含所有亚类的提取方法,这类蛋白质很可能会随着醇溶蛋白或麦谷蛋白被提取,因此电泳结果中的蛋白质丰度差异和相对分子量差异也有可能是燕麦类似蛋白造成的。



a: 郑麦 366; b: 郑麦 369。HMW-GS: 高相对分子量麦谷蛋白; LMW-GS: 低相对分子量麦谷蛋白。箭头所示为条带位置或蛋白质浓度差异。

图 1 2 个品种小麦面粉的麦谷蛋白(A)和醇溶蛋白(B)电泳结果差异

Fig.1 Electrophoresis result differences of glutenins (A) and gliadins (B) in flour from two wheat cultivars

2.3 贮藏蛋白的基因表达差异

从不同时间点的籽粒贮藏蛋白编码基因表达差异情况(表 2)来看,显著差异表达的贮藏蛋白编码基因中没有 HMW-GS 相关基因,这也与蛋白质电泳

结果相似,从基因表达方面证明了 HMW-GS 组合不是 2 个品种间面团强度差异的主要原因。与电泳结果不符的是 LMW-GS 相关基因表达也无差异,但在 3 个时间点上均有燕麦类似蛋白编码基因的相对表

达量存在显著差异,推测可能某些燕麦类似蛋白与 麦谷蛋白的溶解性相似,随着麦谷蛋白一起被提取。

表 2 不同发育时期的显著差异表达的小麦籽粒贮藏蛋白编码基因

Table 2 Differentially expressed genes of wheat grain storage proteins on different developmental stages of two wheat cultivars

类别	基因	基因编码蛋白	FPKM(郑麦 366)			FPKM(郑麦 369)			log ₂ (fc)	郑麦 366 较郑麦 369 相对表达量的变化
			重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3		
开花后 14 d 差异表达的贮藏蛋白基因	<i>TraesCS7A02G035300</i>	燕麦类似蛋白 b6	15.99	1 041.07	916.52	13.93	18.00	15.51	5.38	上调
	<i>TraesCS4A02G451811</i>	燕麦类似蛋白 b1	445.59	490.48	436.42	27.23	18.26	15.01	4.50	上调
开花后 21 d 差异表达的贮藏蛋白基因	<i>TraesCS7D02G031700</i>	燕麦类似蛋白 b6	7 162.56	6 691.14	7 401.18	2 864.22	1 719.27	3 576.55	1.38	上调
	<i>TraesCS7A02G035300</i>	燕麦类似蛋白 b6	1 205.26	1 339.04	1 452.14	22.39	23.79	20.44	5.91	上调
	<i>TraesCS4A02G453400</i>	燕麦类似蛋白 a4	5 128.53	3 994.80	4 223.96	1 059.80	539.90	1118.48	2.30	上调
	<i>TraesCS7A02G035500</i>	燕麦类似蛋白 a3	4 806.55	4 436.20	4 782.23	1 114.69	624.73	1 252.49	2.23	上调
	<i>TraesCS7A02G035600</i>	燕麦类似蛋白 a4	1 136.63	1 154.38	1 195.76	572.67	252.40	561.49	1.33	上调
	<i>TraesCS7D02G032000</i>	燕麦类似蛋白 a1	207.72	120.83	154.36	0	1.36	4.90	6.27	上调
	<i>TraesCS7D02G032100</i>	燕麦类似蛋白 a4	7 314.39	6 396.89	6 627.66	1 653.42	954.10	1 828.25	2.20	上调
	<i>TraesCS4A02G451811</i>	燕麦类似蛋白 b1	468.83	323.05	680.24	36.27	44.38	26.46	3.78	上调
	<i>TraesCS6A02G049200</i>	α/β-醇溶蛋白	3 976.51	3 739.58	3 810.38	1 590.70	1 802.44	1 793.64	1.15	上调
	<i>TraesCS6A02G049600</i>	α/β-醇溶蛋白	4 347.41	3 975.64	3 842.06	1 513.12	1 793.68	1 474.89	1.35	上调
	<i>TraesCS6A02G049800</i>	α-醇溶蛋白	6 672.91	6 535.95	6 294.03	2 849.66	3 173.88	2 758.94	1.15	上调
	<i>TraesCS6B02G066001</i>	α/β-醇溶蛋白	335.84	313.51	319.40	542.05	853.41	591.64	-1.04	下调
	<i>TraesCS7D02G033200</i>	燕麦类似蛋白 b1	30.06	30.64	36.05	128.74	125.67	94.56	-1.85	下调
	<i>TraesCS1B02G011300</i>	γ-醇溶蛋白	1 801.95	1 921.61	2 981.80	4 234.25	3 341.76	6 841.15	-1.10	下调
	<i>TraesCS6B02G066000</i>	α/β-醇溶蛋白	1 211.60	1 245.75	1 432.39	3 519.74	4 333.83	2 919.17	-1.47	下调
	<i>TraesCSU02G153800</i>	α/β-醇溶蛋白	10.44	18.08	13.68	2 343.40	3 554.11	2 554.39	-7.65	下调
	<i>TraesCS6A02G048900</i>	α/β-醇溶蛋白	14.31	17.73	13.83	1 303.17	1 923.00	1 421.39	-6.66	下调
	<i>TraesCSU02G265913</i>	α-醇溶蛋白	432.50	368.65	387.28	1 266.51	1 465.09	1 081.92	-1.68	下调
	<i>TraesCSU02G149938</i>	α-醇溶蛋白	1 723.79	1 788.27	2 222.28	5 999.89	6 839.63	4 515.25	-1.60	下调
	<i>TraesCSU02G108700</i>	α-醇溶蛋白	2 288.13	1 439.82	1 847.63	6 840.07	7 623.03	6 817.99	-1.93	下调
	<i>TraesCSU02G149946</i>	α/β-醇溶蛋白	2 079.68	1 923.01	2 132.77	4 976.33	6 327.84	5 152.47	-1.42	下调
	<i>TraesCSU02G149951</i>	α/β-醇溶蛋白	1 745.07	1 649.55	1 872.65	5 146.20	5 823.52	4 559.62	-1.56	下调
开花后 28 d 差异表达的贮藏蛋白基因	<i>TraesCS1D02G001100</i>	γ-醇溶蛋白 11	1 999.39	1 474.60	939.68	738.70	677.93	535.35	1.18	上调
	<i>TraesCS7D02G031700</i>	燕麦类似蛋白 b6	562.95	1 741.26	2 692.33	265.76	257.26	627.89	2.12	上调
	<i>TraesCS7A02G035300</i>	燕麦类似蛋白 b6	168.04	441.73	496.21	13.57	15.10	12.59	4.74	上调
	<i>TraesCS4A02G451811</i>	燕麦类似蛋白 b1	30.58	66.79	48.34	7.36	7.53	6.34	2.78	上调
	<i>TraesCS1A02G007700</i>	γ-醇溶蛋白 A	2 231.34	4 324.54	4 235.11	1 106.69	1 334.61	1 656.62	1.40	上调
	<i>TraesCS6A02G049800</i>	α-醇溶蛋白	10 019.78	8 129.97	6 368.13	3 054.99	2 720.32	1 948.55	1.67	上调
	<i>TraesCS6A02G049200</i>	α/β-醇溶蛋白	6 255.41	5 912.83	4 733.27	1 581.39	1 711.62	1 212.69	1.91	上调
	<i>TraesCS6A02G049600</i>	α/β-醇溶蛋白	6 026.00	4 696.04	3 515.49	1 705.85	1 519.40	1 022.98	1.74	上调
	<i>TraesCS6A02G049400</i>	α-醇溶蛋白	5 357.74	4 532.11	3 764.19	2 480.52	2 268.09	1 628.05	1.10	上调
	<i>TraesCS6A02G048900</i>	α/β-醇溶蛋白	11.63	17.99	10.63	4 196.96	4 339.83	2 981.35	-8.16	下调
	<i>TraesCSU02G153800</i>	α/β-醇溶蛋白	11.36	19.45	12.15	6 695.06	5 722.66	5 105.81	-8.67	下调

FPKM:每千个碱基转录每百万映射读取的测序片段数。fc:倍数变化,表示两样品(组)间相对表达量的比值。

2 个小麦品种在 3 个时间点上共有 25 个(35 次)基因显著差异表达,其中郑麦 366 中显著上调表达基因 14 个(22 次),显著下调表达基因 11 个(13 次)。在显著上调表达的贮藏蛋白编码基因中,

包括 8 个燕麦类似蛋白编码基因(13 次)、6 个醇溶蛋白编码基因(9 次)。在显著下调表达基因中,包括 10 个醇溶蛋白编码基因(12 次)和 1 个燕麦类似蛋白编码基因(1 次)。

在面团稳定时间参数较大的郑麦 366 中,燕麦类似蛋白编码基因数占显著上调表达贮藏蛋白基因总数的一半以上(57.0%),暗示燕麦类似蛋白可能在调控面团强度性状中有重要作用。显著下调表达的基因中,醇溶蛋白编码基因数占总数的 90.9%,这也与一般认为的醇溶蛋白对于面团强度具有负向效应的观点一致^[16-17]。

对差异表达基因的染色体分布情况分析可知,A、B 和 D 染色体组上分别有 11 个、3 个和 5 个基因,另有 6 个基因定位不明;另从显著上调表达基因的染色体组分布看,郑麦 366 上调表达的基因全部位于 A、D 染色体组,其中 A 染色体组基因出现 10 个,占总数的 71.4%,D 组染色体有 4 个基因,B 组和未知染色体组上都是 0 个基因。所以,仅从本研究选用的 2 个研究材料来看,A 组染色体的贮藏蛋白与面团强度性状的相关性最高,D 组次之,B 组染色体最低。

2.4 面粉硫含量及巯基集团含量分析

分子间二硫键是贮藏蛋白形成面筋时键能最大的化学键类型,蛋白质分子中的自由巯基是形成分子间二硫键的化学基础,而蛋白质中的硫元素又是含硫氨基酸的必需元素,所以面粉中的硫元素及巯基集团含量都有可能影响到面粉质量^[18-20]。2 个品种面粉的硫和巯基含量分析结果(表 3)表明,郑麦 366 的硫含量和总巯基含量均显著高于郑麦 369,自由巯基含量与郑麦 369 间差异不显著;二硫键含量计算结果表明,郑麦 366 中的总二硫键含量达到郑麦 369 的 2

倍以上,由于二硫键是以 2 个半胱氨酸的自由巯基相互结合而成的,再综合考虑 2 个品种间的总硫含量,可以推测郑麦 366 贮藏蛋白中的含硫氨基酸以半胱氨酸形式存在的比例较高。这些结果也证实了巯基集团含量与面团强度之间具有正相关性。

2.5 差异表达蛋白质的质量评价

为进一步分析差异表达基因编码的贮藏蛋白对面团强度性状的贡献,我们以 HMW-GS 的面团强度贡献值作为参考,假定将面团强度贡献值为 3.6 及以上的蛋白质作为优质蛋白质(相当于该蛋白质至少有 4 个自由巯基,对于维持面筋的三维结构贡献比较大),将面团强度贡献值为 1.8 及以下的蛋白质作为劣质蛋白质(表明该蛋白质至多含有 1 个自由巯基,对于维持面筋的三维结构贡献较小),其他中间类型的蛋白质(面团强度贡献值为 1.8~3.6)定义为普通类型蛋白质(表 4)。郑麦 366 中显著上调表达的 8 个燕麦类似蛋白全部达到优质蛋白质标准(表 5);对于醇溶蛋白,在开花后 21 d、开花后 28 d 都上调表达的 3 个基因、1 个仅在开花后 28 d 上调表达的基因和全部下调表达的 10 个基因中,仅有 2 个达到优质蛋白质(蛋白编码基因: *TraesCS1D02G001100*、*TraesCS1B02G011300*)标准。结合郑麦 366 的高面团强度性状可以推测,燕麦类似蛋白对面团强度性状可能具有重要作用。

表 3 2 个小麦品种面粉中的硫和巯基含量分析

Table 3 Sulfur and sulfhydryl group contents in flour of two wheat cultivars

品种	硫含量 (mg/g)	自由巯基含量 ($\mu\text{mol/g}$)	总巯基含量 ($\mu\text{mol/g}$)	总二硫键含量 ($\mu\text{mol/g}$)
郑麦 366	1.54 \pm 0.07 *	13.80 \pm 0.31	18.14 \pm 0.66 *	2.170
郑麦 369	1.42 \pm 0.06	13.56 \pm 0.17	15.55 \pm 1.36	0.995

* 表示品种间差异显著($P<0.05$)。

表 4 基于巯基预测结果的高相对分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)质量评价

Table 4 Quality evaluation of high molecular weight-glutenin subunits (HMW-GS) based on predicted results of sulfhydryl group

蛋白质名称	GenBank 登录号	半胱氨酸数量 (个)	有无分子 内二硫键	自由巯基数量 (个)	评估分值	分类
1Dy10.1	AAU04841.1	7	无	7	6.3	优质蛋白质
1Dx5	DAA06555.1	5	无	5	4.5	优质蛋白质
1Dy3	AIE47879.1	5	无	5	4.5	优质蛋白质
1Ax1	AHZ62762.1	4	无	4	3.6	优质蛋白质
Bx7OE	AEP33190.1	4	无	4	3.6	优质蛋白质
1Dy12	AYM46701.1	8	有	2	2.7	普通蛋白质
1Ay	AWM72944.1	6	有	2	2.4	普通蛋白质
1Ay	AVK88282.1	6	有	2	2.4	普通蛋白质
1Dy12.6	AKP95632.1	7	有	1	1.8	劣质蛋白质
1By9	CAA43361.1	7	有	1	1.8	劣质蛋白质

表 5 基于巯基预测结果的差异表达基因编码蛋白质的质量评价

Table 5 Quality evaluation of proteins encoded by differentially expressed genes based on predicted results of sulfhydryl group

蛋白质类型	郑麦 366 显著表达方向	基因	半胱氨酸 数量(个)	有无分子 内二硫键	自由巯基 含量	评估分值
燕麦类似蛋白 b6	开花后 14 d、21 d、28 d 上调表达	<i>TraesCS7A02G035300</i>	19	有	3	5.1
燕麦类似蛋白 b1	开花后 14 d、21 d、28 d 上调表达	<i>TraesCS4A02G451811</i>	10	有	2	3.0
燕麦类似蛋白 b6	开花后 21 d、28 d 上调表达	<i>TraesCS7D02G031700</i>	18	有	4	5.7
燕麦类似蛋白 a4	开花后 21 d 上调表达	<i>TraesCS4A02G453400</i>	14	有	2	3.6
燕麦类似蛋白 a3	开花后 21 d 上调表达	<i>TraesCS7A02G035500</i>	14	有	2	3.6
燕麦类似蛋白 a4	开花后 21 d 上调表达	<i>TraesCS7A02G035600</i>	14	有	2	3.6
燕麦类似蛋白 a1	开花后 21 d 上调表达	<i>TraesCS7D02G032000</i>	14	有	2	3.6
燕麦类似蛋白 a4	开花后 21 d 上调表达	<i>TraesCS7D02G032100</i>	14	有	2	3.6
γ-醇溶蛋白 11	开花后 28 d 上调表达	<i>TraesCS1D02G001100</i>	8	无	8	7.2
α/β-醇溶蛋白	开花后 21、28 d 下调表达	<i>TraesCSU02G153800</i>	6	有	2	2.4
α/β-醇溶蛋白	开花后 21、28 d 下调表达	<i>TraesCS6A02G048900</i>	6	有	2	2.4
α/β-醇溶蛋白	开花后 21 d 下调表达	<i>TraesCS6B02G066001</i>	7	有	3	3.3
γ-醇溶蛋白	开花后 21 d 下调表达	<i>TraesCS1B02G011300</i>	8	有	4	4.2
α/β-醇溶蛋白	开花后 21 d 下调表达	<i>TraesCS6B02G066000</i>	6	有	2	2.4
α-醇溶蛋白	开花后 21 d 下调表达	<i>TraesCSU02G265913</i>	7	有	1	1.8
α-醇溶蛋白	开花后 21 d 下调表达	<i>TraesCSU02G149938</i>	5	有	1	1.5
α-醇溶蛋白	开花后 21 d 下调表达	<i>TraesCSU02G108700</i>	6	有	0	0.9
α/β-醇溶蛋白	开花后 21 d 下调表达	<i>TraesCSU02G149946</i>	6	有	0	0.9
α/β-醇溶蛋白	开花后 21 d 下调表达	<i>TraesCSU02G149951</i>	6	有	0	0.9

3 讨论

一般认为 HMW-GS 及其组合情况是影响小麦品质的主要因素,但从本研究选用的 2 个品种来看,燕麦类似蛋白对于面团强度性状的贡献并不低于优质 HMW-GS。燕麦类似蛋白是一类富含半胱氨酸的小麦贮藏蛋白,也被称为非典型面筋蛋白,包括 2 个大类和多个亚类^[21-22]。作者前期研究也发现,部分燕麦类似蛋白对面团强度性状具有正向效应^[11-12]。b 类燕麦类似蛋白的转基因研究结果也证实了该类蛋白质能够提高面团强度性状^[23-25],但尚未检索到 a 类燕麦类似蛋白的转基因研究。从本研究结果来看,在郑麦 366 中上调表达的 5 个 a 类燕麦类似蛋白均能达到优质 HMW-GS 的水平,推测该类蛋白质也是与高面团强度性状相关的蛋白质类型,但其面粉质量效应尚需进一步验证。

在 25 个显著差异表达基因中共有 9 个燕麦类似蛋白编码基因,分别定位于 7D(4 个)、7A(3 个)

和 4A(2 个)染色体,从理论上来说,小麦的 A、B、D 染色体组都应该存在燕麦类似蛋白编码基因,但本研究的结果中 B 组染色体上没有发现燕麦类似蛋白的差异表达基因。据前人研究推测,普通小麦的四倍体祖先中可能出现过 4AL/7BS 易位或近着丝粒倒位情况,导致位于 7BS 的燕麦蛋白编码位点转移到了 4AL 上^[26-27]。

醇溶蛋白约占总贮藏蛋白的 40%~50%,一般认为它们以非共价键形式结合到面筋中,对面团强度性状的贡献较小。本研究结果也表明,在低面团强度品种郑麦 369 中,显著上调表达的贮藏蛋白编码基因中 90.9%属于醇溶蛋白类型基因,也证明了醇溶蛋白对面团强度性状具有负向效应的观点。但也有研究结果表明,某些醇溶蛋白在面筋中也能形成分子间二硫键,特别是半胱氨酸残基数量为奇数的醇溶蛋白,至少能形成 1 个分子间二硫键^[12, 28-29]。本研究鉴定到的在郑麦 366 中显著上调表达的 γ-醇溶蛋白(蛋白质编码基因:*TraesCS1D02G001100*)含

有8个半胱氨酸残基,且二硫键预测程序分析结果表明其不含分子内二硫键,8个自由巯基都可以与其他贮藏蛋白结合成分子间二硫键,在面团强度方面的贡献评分值(7.2分)高于通常认为的优质高分子麦谷蛋白亚基1Dx5(4.5分)和1Dy10.1(6.3分),推测也是与高面团强度性状相关的蛋白质,但其面粉质量效应还需要进一步验证。

4 结论

燕麦类似贮藏蛋白可能是决定面团强度性状的重要贮藏蛋白类型之一,个别类型的醇溶蛋白可能对面团强度性状也有贡献;深入研究燕麦类似贮藏蛋白与面粉质量的关系,对于完善现有优质小麦育种技术具有一定的参考意义。

参考文献:

- [1] ANJUM F M, KHAN M R, DIN A, et al. Wheat gluten; high molecular weight glutenin subunits-Structure, genetics, and relation to dough elasticity[J]. *Journal of Food Science*, 2007, 72(3): 56-63.
- [2] STEIN I S, SEARS R G, HOSENEY R C, et al. Chromosomal location of genes influencing grain protein concentration and mixogram properties in Plainsman-V winter wheat[J]. *Crop Science*, 1992, 32(3): 573-580.
- [3] DELCOUR J A, JOYE I J, PAREYT B, et al. Wheat gluten functionality as a quality determinant in cereal-based food products[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2012, 3(1): 469-472.
- [4] ZHANG Y J, HU M Y, LIU Q, et al. Deletion of high-molecular-weight glutenin subunits in wheat significantly reduced dough strength and bread-baking quality[J]. *BMC Plant Biology*, 2018, 18: 1-12.
- [5] CHEN Q, ZHANG W J, GAO W J, et al. High molecular weight glutenin subunits 1Bx7 and 1By9 encoded by Glu-B1 locus affect wheat dough properties and sponge cake quality[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(42): 11796-11804.
- [6] CHEN H Q, LI S J, LIU Y W, et al. Effects of 1Dy12 subunit silencing on seed storage protein accumulation and flour-processing quality in a common wheat somatic variation line[J]. *Food Chemistry*, 2021, 335(15): 127663.
- [7] JIANG P H, XUE J S, DUAN L N, et al. Effects of high-molecular-weight glutenin subunit combination in common wheat on the quality of crumb structure[J]. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(4): 1501-1508.
- [8] ANDERSON O D, HSIA C C, ADALSTEINS A E, et al. Identification of several new classes of low-molecular-weight wheat gliadin-related proteins and genes[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 307-315.
- [9] KAN Y C, WAN Y F, BEAUDOIN F, et al. Transcriptome analysis reveals differentially expressed storage protein transcripts in seeds of *Aegilops* and wheat[J]. *Journal of Cereal Science*, 2006, 44(1): 75-85.
- [10] BANACH J K, MAJEWSKA K, ZUK-GOŁASZEWSKA K. Effect of cultivation system on quality changes in durum wheat grain and flour produced in North-Eastern Europe[J]. *PLoS One*, 2021, 16(1): e0236617.
- [11] 晁岳恩, 李文旭, 王沙沙, 等. 不同面团强度小麦品种差异表达贮藏蛋白基因分析[J]. *河南农业科学*, 2022, 51(10): 17-24.
- [12] 晁岳恩. 小麦面粉蛋白质质量评价模型构建及蛋白质质量再评价[J]. *麦类作物学报*, 2022, 42(8): 980-987.
- [13] HETTY C V D B, ANTOINE H P A, MARINUS J M S, et al. A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat[J]. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877(10): 975-982.
- [14] LI H Q, SUYAMA A, MITANI-UENO N, et al. A low level of NaCl stimulates plant growth by improving carbon and sulfur assimilation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plants*, 2021, 10(10): 2138.
- [15] WANG N, MA S, LI L, et al. Aggregation characteristics of protein during wheat flour maturation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 99(2): 719-725.
- [16] LI D, JIN H B, ZHANG K P, et al. Analysis of the Gli-D2 locus identifies a genetic target for simultaneously improving the bread-making and health-related traits of common wheat[J]. *The Plant Journal*, 2018, 95(3): 414-426.
- [17] AGHAGHOLIZADEH R, KADIVAR M, NAZARI M, et al. Capability of solvent retention capacity to quality of flat bread in three wheat cultivars[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 56(2): 775-782.
- [18] WANG D W, ZHANG K P, DONG L L, et al. Molecular genetic and genomic analysis of wheat milling and end-use traits in China: progress and perspectives[J]. *The Crop Journal*, 2018, 6(1): 68-81.
- [19] SUN J, CHEN M, HOU X X, et al. Effect of phosphate salts on the gluten network structure and quality of wheat noodles[J]. *Food Chemistry*, 2021(358): 129895.
- [20] ZHANG L L, GUAN E Q, YANG Y L, et al. Impact of wheat globulin addition on dough rheological properties and quality of cooked noodles[J]. *Food Chemistry*, 2021, 362: 130170.
- [21] CHEN X Y, CAO X Y, ZHANG Y J, et al. Genetic characterization of cysteine-rich type-b avenin-like protein coding genes in common wheat[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 30692.
- [22] ZHANG Y J, HU X, JUHASZ A, et al. Characterising avenin-like proteins (ALPs) from albumin/globulin fraction of wheat grains by RP-HPLC, SDS-PAGE, and MS/MS peptides sequencing[J]. *BMC Plant Biology*, 2020, 20: 45.
- [23] MA F G, LI M, LI T T, et al. Overexpression of avenin-like b proteins in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) improves dough mixing properties by their incorporation into glutenin polymers[J].

- PLoS One, 2013(8):e66758.
- [24] MA F G, LI M, YU L L, et al. Transformation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) with avenin-like b gene improves flour mixing properties[J]. Molecular Breeding, 2013, 32:853-865.
- [25] WANG Y Q, LI M, GUAN Y B, et al. Effects of an additional cysteine residue of avenin-like b protein by site-directed mutagenesis on dough properties in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67:8559-8572.
- [26] DEVOS K M, DUBCOVSKY J, DVORÁK J, et al. Structural evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B and its impact on recombination[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91(2):282-288.
- [27] DVORAK J, WANG L, ZHU T T, et al. Reassessment of the evolution of wheat chromosomes 4A, 5A, and 7B[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131:2451-2462.
- [28] FERRANTE P, MASCI S, D'OVIDIO R, et al. A proteomic approach to verify in vivo expression of a novel gamma-gliadin containing an extra cysteine residue[J]. Proteomics, 2010, 6(6):1908-1914.
- [29] VENSEL W H, TANAKA C K, ALTENBACH S B. Protein composition of wheat gluten polymer fractions determined by quantitative two-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry[J]. Proteome Science, 2014, 12(1):8.

(责任编辑:陈海霞)