

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00613

小麦近缘种低分子量麦谷蛋白亚基基因 *Glu-B3* 克隆及系统发育分析

王林海¹, 周敏², 李慧玲³, 何中虎^{1,4}, 夏先春¹

1. 中国农业科学院作物科学研究所, 国家小麦改良中心, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081;
2. 北京农学院, 北京 102206;
3. 河北省廊坊市种子管理站, 廊坊 065000;
4. 国际玉米小麦改良中心(CIMMYT)中国办事处, 北京 100081

摘要: 发掘小麦近缘种低分子量麦谷蛋白基因, 可为小麦品质改良提供更多的基因资源。文章利用 *Glu-B3* 位点特异性标记 LB1F/LB1R、LB2F/LB2R、LB3F/LB3R 和 LB4F/LB4R, 对普通小麦 B 染色体组的 7 个可能供体近缘种, 即硬粒小麦(*T. durum*)、栽培二粒小麦(*T. dicoccum*)、野生二粒小麦(*T. dicoccoides*)、拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltoides*)、高大山羊草(*Ae. longissima*)、西尔斯山羊草(*Ae. searsii*)和双角山羊草(*Ae. bicornis*)共 20 份材料进行 PCR 扩增, 克隆小麦近缘种中 *GluB3-1*、*GluB3-2*、*GluB3-3* 和 *GluB3-4* 基因的等位变异, 并对 *Glu-B3* 位点基因进行系统发育分析。共获得 16 个新等位变异, 其中 *GluB3-1* 基因的新等位变异 1 个, 命名为 *GluB3-16*, 其推导氨基酸分子量为 39.2 kDa; *GluB3-3* 的新等位变异有 3 个, 分别命名为 *GluB3-35*、*GluB3-36* 和 *GluB3-37*, 其推导氨基酸分子量为 44.5 kDa(*GluB3-36*)或 44.6 kDa(*GluB3-35* 和 *GluB3-37*); *GluB3-4* 的新等位变异 12 个, 分别命名为 *GluB3-46*、*GluB3-47*、*GluB3-48*、*GluB3-49*、*GluB3-410*、*GluB3-411*、*GluB3-412*、*GluB3-413*、*GluB3-414*、*GluB3-415*、*GluB3-416* 和 *GluB3-417*, 其推导氨基酸分子量变化在 38.6(*GluB3-414*)~ 42.5 kDa(*GluB3-413*)之间; 16 个新等位变异都包含单一的完整开放阅读框, 具有低分子量麦谷蛋白亚基的典型结构。文章进一步拓展了低分子量麦谷蛋白基因资源, 揭示不同 *Glu-B3* 基因的进化过程不完全相同, 为有效地利用小麦近缘种材料和转基因育种提供了新的基因资源。

关键词: 普通小麦; 小麦近缘种; 低分子量麦谷蛋白亚基; *Glu-B3*; 系统发育

Cloning and phylogenetic analysis of low-molecular-weight glutenin subunit genes at *Glu-B3* locus in common wheat relative species

WANG Lin-Hai¹, ZHOU Min², LI Hui-Ling³, HE Zhong-Hu^{1,4}, XIA Xian-Chun¹

1. Institute of Crop Science, National Wheat Improvement Center/The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081, China;
2. Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China;
3. The Department of Seed Administration, Langfang 065000, China;
4. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) China Office, Beijing 100081, China

收稿日期: 2009-10-15; 修回日期: 2009-12-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10Z1A7, 2006AA100102)和国家自然科学基金项目(编号: 30830072)资助

作者简介: 王林海(1979-), 男, 博士, 研究方向: 作物遗传育种。E-mail: linhai7960@126.com

通讯作者: 周敏(1962-), 女, 副教授, 研究方向: 作物遗传育种。Tel: 010-80799405; E-mail: zmskx@yahoo.com.cn

夏先春(1963-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 小麦遗传育种。Tel: 010-82108610; E-mail: xiexianchun@caas.net.cn

Abstract: The common wheat relative species are important germplasm for wheat breeding. In the present study, novel allelic variants at *Glu-B3* locus were cloned to provide gene resources for wheat quality improvement. Four *Glu-B3*-locus specific primer sets LB1F/LB1R, LB2F/LB2R, LB3F/LB3R, and LB4F/LB4R were employed to isolate novel allelic variants of *GluB3-1*, *GluB3-2*, *GluB3-3*, and *GluB3-4* from seven common wheat relative species, i.e., *T. durum*, *T. dicoccum*, *T. dicoccoides*, *Aegilops longissima*, *Ae. searsii*, *Ae. Bicornis*, and *Ae. speltoides*, and the software MEGA 4 was used to construct a phylogenetic tree. In total, 16 novel allelic variants of *GluB3-1*, *GluB3-3*, and *GluB3-4* genes were isolated from the seven common wheat relative species, designated *GluB3-16*, *GluB3-35*, *GluB3-36*, *GluB3-37*, *GluB3-46*, *GluB3-47*, *GluB3-48*, *GluB3-49*, *GluB3-410*, *GluB3-411*, *GluB3-412*, *GluB3-413*, *GluB3-414*, *GluB3-415*, *GluB3-416* and *GluB3-417*, respectively. In detail, *GluB3-16* was cloned from *T. dicoccoides* with LB1F/LB1R, and the molecular weight of the deduced amino acid was 39.2 kDa. *GluB3-35*, *GluB3-36*, and *GluB3-37* were isolated from *T. durum* and *T. dicoccum* with the primer set LB3F/LB3R, and the molecular weights of their deduced peptides were 44.5 kDa (*GluB3-36*) and 44.6 kDa (*GluB3-35* and *GluB3-37*). The molecular weight of deduced peptides of *GluB3-4* ranged from 38.6 kDa (*GluB3-414*) to 42.5 kDa (*GluB3-413*). All the 16 new allelic variants showed a single open reading frame (ORF), and their deduced amino-acid sequences had a typical sequence structure of LMW-GS. The allelic variants at *Glu-B3* locus identified in common wheat relative species provide potential gene resources for wheat quality breeding and gene transformation. The results suggested that these *Glu-B3* genes originated from different evolution processes.

Keywords: *Triticum aestivum* L.; wheat related species; LMW-GS; *Glu-B3*; phylogenetics

随着生产的发展和生活水平的不断提高,高产与优质已成为我国小麦生产的两个主要目标。尽管我国品质育种取得了较好进展,但我国适合制作优质面包的硬质、高蛋白的强筋小麦品种还很少,适合制作优质饼干、糕点的软质、低蛋白的弱筋型小麦极缺,大多为中间类型^[1]。因此加强小麦品质相关性状的基础研究,特别是对贮藏蛋白的研究,对培育优质小麦品种具有重要意义。小麦面筋蛋白是决定面团黏弹性的主要因素,其主要由麦谷蛋白和醇溶蛋白组成。低分子量麦谷蛋白(Low-molecular-weight glutenin subunits, LMW-GS)是麦谷蛋白的重要组成部分,主要由位于第一同源群染色体短臂 *Glu-3* 位点(*Glu-A3*、*Glu-B3* 和 *Glu-D3*)的基因家族编码^[2,3],对面筋延展性起着重要作用。根据Southern杂交分析推测,六倍体小麦的LMW-GS总拷贝数在10~15^[4]至35~40^[5]之间,基因家族多拷贝和高度相似性是鉴定不同位点基因的重要障碍^[6-8]。

近年来,随着对一些低分子量麦谷蛋白编码基因的深入研究^[6,7],为进一步挖掘小麦近缘种基因资源提供了重要信息。小麦近缘种中含有广泛的基因变异,能够为小麦育种提供优异的基因资源,如抗逆、抗病及提高光合效率等^[9-11]。从小麦近缘种中克隆和鉴定低分子量麦谷蛋白基因,有可能获得对普通小麦品质改良有重要价值的基因资源。然而,

由于近缘种低分子量麦谷蛋白基因克隆较为困难,目前仅对A和D组的供体研究较多,并揭示了较为广泛的变异^[12-16]。普通小麦B组染色体的低分子量麦谷蛋白及其编码基因组成为较为复杂^[6],且其起源问题一直存在较大争议,虽然已在形态学、染色体配对、分子标记^[17-20]等方面进行了广泛的研究,高山羊草(*Ae. Longissima*, *S^lS^l*)、西尔斯山羊草(*Ae. searsii*, *S^sS^s*)、双角山羊草(*Ae. bicornis*, *S^bS^b*)、拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltoides*, *SS*)都曾被认为是其可能供体,但都缺乏充分的证据,因而对该基因组近缘种 *Glu-B3* 位点基因的研究较少。普通小麦B组染色体起源与进化的复杂性,也为小麦育种提供了丰富的种质资源,为育种者挖掘和利用一些特有基因提供了可能。在我们先前的研究中,利用设计的特异性标记分别获得了4个 *Glu-B3* 和6个 *Glu-D3* 位点基因,并进一步分析了这些基因与蛋白亚基之间的关系^[7,8,21],为进一步研究基因等位变异打下了基础。

本文根据以前的研究结果^[21],利用 *Glu-B3* 位点特异性标记LB1F/LB1R、LB2F/LB2R、LB3F/LB3R和LB4F/LB4R对普通小麦B组染色体的可能供体进行分析,克隆小麦近缘种中 *Glu-B3* 基因的新等位变异,挖掘低分子量麦谷蛋白基因资源,并为B组染色体进化研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料包括 20 份含有普通小麦B染色体组可能供体的近缘种材料: 硬粒小麦(*T. durum*, AABB)、栽培二粒小麦(*T. dicoccum*, AABB)、野生二粒小麦(*T. dicoccoides*, AABB)、高大山羊草(*Ae. longissima*, *S^lS^l*)、西尔斯山羊草(*Ae. searsii*, *S^sS^s*)和双角山羊草(*Ae. bicornis*, *S^bS^b*)各 3 个系、拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltoides*, SS)2 个系(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

基因组DNA提取采用CTAB法^[22]。每个材料提取 2 份, 每份取 1 个籽粒提取DNA。

1.2.2 小麦近缘种中 *Glu-B3* 基因的克隆

用本课题组开发的 4 对*Glu-B3* 位点特异性引物(LB1F/LB1R、LB2F/LB2R、LB3F/LB3R 和 LB4F/LB4R)对 20 份普通小麦近缘种材料进行扩增, 其中

LB1F/LB1R的目标产物约为 1 200 bp, LB2F/LB2R的目标产物约为 1 400 bp, LB3F/LB3R的目标产物约为 1 300 bp, LB4F/LB4R的目标产物约为 1 600 bp^[21]。

目标PCR产物克隆至pEASY-T1 载体上进行测序。为减少或排除克隆测序缺陷^[23], 回收的PCR产物也用于测序。每个样品的测序重复 3~6 次(送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序)。核苷酸序列及推导氨基酸序列比对分析用DNAMAN (www.lynnon.com)和Bioedit 7.0 (http://www.mbio.ncsu.edu)软件。

1.2.3 引物设计及 PCR 扩增

在基因 *GluB3-1*、*GluB3-2* 和 *GluB3-3* 的编码区域, 根据各个基因等位变异的一致序列, 分别设计 1 对引物, 用于分析所克隆基因在小麦近缘种中的分布特点。引物序列及 PCR 扩增条件见表 2。

1.2.4 系统发育树的构建

本研究从小麦近缘种中共获得 16 个新的 *Glu-B3* 基因等位变异, 连同从普通小麦中克隆到的 17 个

表 1 克隆 *Glu-B3* 位点基因所用的小麦近缘种材料及克隆的等位基因

物种名称	基因组	品系	来源	<i>Glu-B3</i> 位点的基因			
				<i>GluB3-1</i>	<i>GluB3-2</i>	<i>GluB3-3</i>	<i>GluB3-4</i>
硬粒小麦 <i>T. durum</i>	AABB	Nopoleon	NFCRI	/	/	<i>GluB3-35</i>	<i>GluB3-46</i>
		Spectra	NFCRI	/	/	<i>GluB3-35</i>	<i>GluB3-46</i>
		Plenty	NFCRI	/	/	<i>GluB3-35</i>	<i>GluB3-46</i>
栽培二粒小麦 <i>T. dicoccum</i>	AABB	DM28	NFCRI	/	/	<i>GluB3-36</i>	<i>GluB3-47</i>
		DM37	NFCRI	/	/	<i>GluB3-32</i>	<i>GluB3-44</i>
		DM47	NFCRI	/	/	<i>GluB3-37</i>	<i>GluB3-45</i>
野生二粒小麦 <i>T. dicoccoides</i>	AABB	DS6	NFCRI	<i>GluB3-14</i>	<i>GluB3-23</i>	/	<i>GluB3-48</i>
		DS7	NFCRI	<i>GluB3-16</i>	<i>GluB3-23</i>	/	<i>GluB3-41</i>
		DS8	NFCRI	<i>GluB3-15</i>	<i>GluB3-23</i>	/	<i>GluB3-49</i>
拟斯卑尔脱山羊草 <i>Ae. speltoides</i>	SS	Le49	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-410</i>
		PI226616	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-411</i>
		Y152	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-412</i>
高大山羊草 <i>Ae. longissima</i>	<i>S^lS^l</i>	Y155	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-413</i>
		P107	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-414</i>
		PI599121	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-415</i>
西尔斯山羊草 <i>Ae. searsii</i>	<i>S^sS^s</i>	PI599122	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-415</i>
		PI599133	NFCRI	/	/	/	<i>GluB3-415</i>
		CWI4250	CIMMYT	/	/	/	<i>GluB3-416</i>
双角山羊草 <i>Ae. bicornis</i>	<i>S^bS^b</i>	CWI4266	CIMMYT	/	/	/	<i>GluB3-416</i>
		C70	CIMMYT	/	/	/	<i>GluB3-417</i>

“/”表示在对应的品系中没有获得相应的基因; NFCRI: 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程; CIMMYT: 国际玉米小麦改良中心。

表 2 *GluB3-1*、*GluB3-2* 和 *GluB3-3* 基因编码区域引物及 PCR 扩增条件

引物	序列 (5'→3')	扩增基因*	PCR 条件			
BFN1	ACAGCAACCATGTTTCACAA	<i>GluB3-1</i>	94	35 s, 58	35 s, 72	90 s
BRN1	TGCTGCGAAAATGATGGC					
BFN2	ATCCAACAACAACCACAACCATATT	<i>GluB3-2</i>	94	35 s, 58	35 s, 72	90 s
BRN2	CTGTTGGGGTTGCTGCTGAG					
BFN3	CACCATGAAGACCTTCCTCA	<i>GluB3-3</i>	94	35 s, 59	35 s, 72	90 s
BRN3	CTATACAACGGCACATTAACATT					

*基因序列参见文献[21]。

Glu-B3 基因序列(*GluB3-11*、*GluB3-12*、*GluB3-13*、*GluB3-14*、*GluB3-15*、*GluB3-21*、*GluB3-22*、*GluB3-23*、*GluB3-31*、*GluB3-32*、*GluB3-33*、*GluB3-34*、*GluB3-41*、*GluB3-42*、*GluB3-43*、*GluB3-44*和*GluB3-45*)用于构建系统发育树[21]。所有的基因序列首先应用软件ClustalW 1.83 进行比对, 比对后用于系统发育树的构建。用软件MEGA 4 构建邻位相连树(Neighbour-joining tree)和最大简约树(Maximum-parsimony tree), 自举测试(Bootstrap testing)均为 1 000 次重复, 在前一种算法中, 缺口(gap)只在两两比对时才被去除; 而对于后一种算法, 所有的位点都被当作有意义的字符而包括在运算过程中。另外, 应用PHYLP软件包, 还以默认的参数构建了一个最大似然树(Maximum-likelihood tree)。

2 结果与分析

2.1 小麦近缘种中 *Glu-B3* 基因的等位变异

在 20 个材料中, 引物 LB1F/LB1R 仅能在野生二粒小麦的 3 个品系和西尔斯山羊草的 3 个品系中获得扩增产物(图 1A)。经测序发现, 在野生二粒小麦 DS6 中获得的序列与 *GluB3-14* 完全一致; 在 DS8 中获得序列与 *GluB3-15* 完全一致; 在 DS7 中获得了一个新的等位变异, 命名为 *GluB3-16*(GenBank 登录号: FJ824786), 其序列与 *GluB3-15* 高度一致, 仅在中间重复区域多出一个密码子 CAA; 在 3 个西尔斯山羊草中获得的序列与基因 *GluB3-1* 的差异较大, 而与基因 *GluB3-4* 的等位变异 *GluB3-415* 序列一致。

引物 LB2F/LB2R 仅能在 3 个野生二粒小麦系

中获得扩增产物(图 1B), 所获得的 3 条序列与从普通小麦中获得的 *GluB3-23* 完全一致。

引物 LB3F/LB3R 仅能在 3 个硬粒小麦系和 3 个野生二粒小麦系中获得扩增产物(图 1C), 共获得 3 个新等位变异, 分别命名为 *GluB3-35*、*GluB3-36* 和 *GluB3-37*(GenBank 登录号: FJ824787、FJ824788 和 FJ824789)。其中, *GluB3-35* 存在于 3 个硬粒小麦品系中, *GluB3-36* 和 *GluB3-37* 分别存在于野生二粒小麦材料 DM28 和 DM47 中, 而在 DM37 中获得的序列与普通小麦的 *GluB3-32* 完全一致。

引物 LB4F/LB4R 在 20 份材料中获得了 12 个 *GluB3-4* 基因的新等位变异(图 1D)。其中, 在 3 个硬粒小麦中获得 1 个等位变异, 命名为 *GluB3-46*(GenBank 登录号: FJ824790), 它与普通小麦中 5 个等位变异(*GluB3-41*、*GluB3-42*、*GluB3-43*、*GluB3-44*和*GluB3-45*)的序列相似性在 99.3%~99.4%之间; 在 3 个栽培二粒小麦中, 从 DM28 中获得一个等位变异 *GluB3-47*(GenBank 登录号: FJ824791), 它与普通小麦中等位变异的序列相似性在 99.2%~99.9%之间; 在 3 个野生二粒小麦中, 从 DS6 和 DS8 中各获得一个等位变异, 分别命名为 *GluB3-48*(GenBank 登录号: FJ824792)和 *GluB3-49*(GenBank 登录号: FJ824793), 其与普通小麦中等位变异的相似性在 99.1%~99.9%之间, 而从 DS7 中获得的序列与 *GluB3-41* 完全一致; 在两个拟斯卑尔脱山羊草 Le49 和 PI226616 中, 各获得一个等位变异, 分别命名为 *GluB3-410*(GenBank 登录号: FJ824794)和 *GluB3-411*(GenBank 登录号: FJ824795), 它们与普通小麦中等位变异的相似性在 94.7%~95.3%之间; 在 3 个高大山羊草中获得了 3 个等位变异, 分别命名为 *GluB3-412*(GenBank 登录号: FJ824796)、*GluB3-413*(GenBank 登录号: FJ824797)

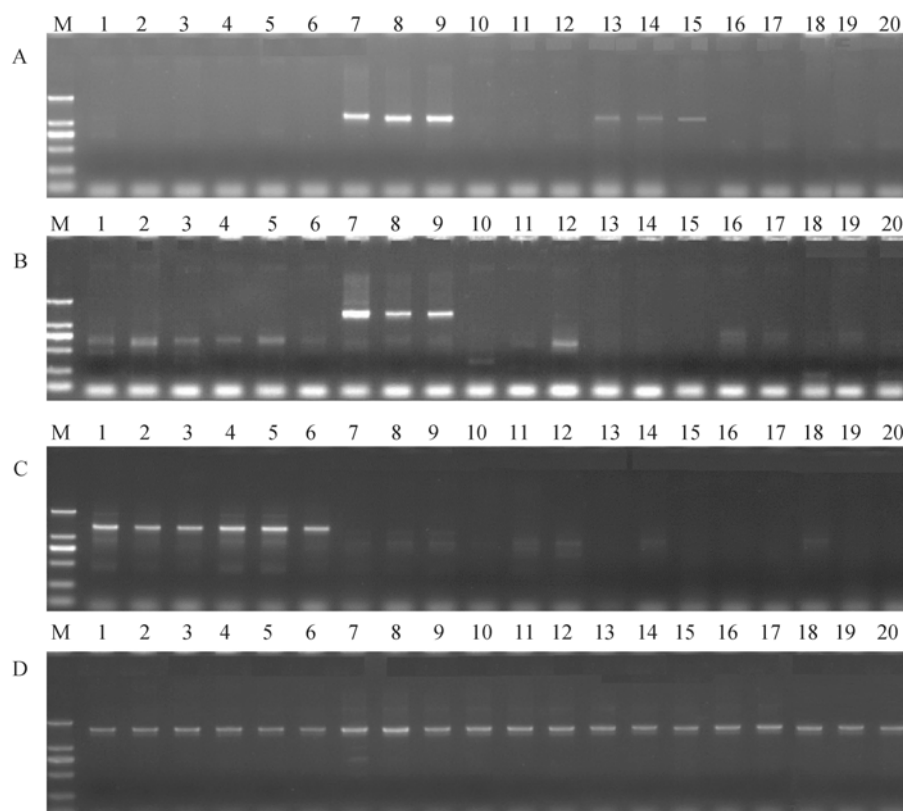


图 1 *Glu-B3* 位点基因特异性引物在普通小麦近缘种中的扩增产物电泳检测

A: 引物 LB1F/LB1R 扩增产物; B: 引物 LB2F/LB2R 扩增产物; C: 引物 LB3F/LB3R 扩增产物; D: 引物 LB4F/LB4R 扩增产物。1: Nopoleon; 2: Spectra; 3: Plenty; 4: DM28; 5: DM37; 6: DM47; 7: DS6; 8: DS7; 9: DS8; 10: Y152; 11: Y155; 12: P107; 13: PI599121; 14: PI599122; 15: PI599133; 16: CWI4250; 17: CWI4266; 18: C70; 19: Le49; 20: PI226616; M: DL2000 DNA Marker(100、250、500、750、1 000 和 2 000 bp)。

和 *GluB3-414*(GenBank 登录号: FJ824798), 它们与普通小麦中等位变异的相似性在 94.8%~96.7%之间; 在 3 个西尔斯山羊草中获得了一个新等位变异 *GluB3-415*(GenBank 登录号: FJ824799), 其与普通小麦中 5 个等位变异的相似性在 94.9%~95.0%之间; 在双角山羊草中, CWI4250 和 CWI4266 含有相同的新等位变异 *GluB3-416*(GenBank 登录号: FJ824800), 而 C70 含有新等位变异 *GluB3-417*(GenBank 登录号: FJ824801), 这 3 个等位变异与普通小麦中等位变异的相似性在 96.8%~97.0%之间。

从对 20 个近缘种材料的扩增及测序结果上看, 基因 *GluB3-1*、*GluB3-2*、*GluB3-3* 与 *GluB3-4* 有明显区别, 似乎 *GluB3-1* 和 *GluB3-2* 仅存在于野生二粒小麦中, 而 *GluB3-3* 则为栽培二粒小麦和硬粒小麦所共有(图 1)。为分析这一现象是否因引物选择性扩增所造成, 分别用基因 *GluB3-1*、*GluB3-2* 和 *GluB3-3* 编码区域引物, 对 20 个材料进行 PCR 扩增。电泳结果显示, *GluB3-2* 和 *GluB3-3* 编码区域引物(BFN2/BRN2 和

BFN3/BRN3)的扩增产物与基因特异引物 LB2F/LB2R 和 LB3F/LB3R 的扩增结果一致(图 2: B、C), 测序结果也显示所扩增的片段为目标片段。*GluB3-1* 的编码区域引物(BFN1/BRN1)除能在野生二粒小麦中获得产物外, 其在西尔斯山羊草和拟斯卑尔脱山羊草中也能扩增出产物, 但西尔斯山羊草中产物的分子量明显大于目标带(图 2A), 对扩增产物测序后发现, 其在西尔斯山羊草的产物属于基因 *GluB3-4* 的等位变异, 而在拟斯卑尔脱山羊草中的产物由于片段较小(约 200 bp), 考虑到低分子量麦谷蛋白之间及其与部分醇溶蛋白基因的序列相似性较高, 还不能确定其属于哪个基因。然而, 由于此引物的扩增区域位于基因的中间重复区, 推测它很可能产生了非特异扩增。

2.2 小麦近缘种 *Glu-B3* 基因等位变异推导的氨基酸特征

本研究获得的 16 个 *Glu-B3* 等位变异都包含完整的编码区域, 包括起始密码子 ATG 和典型的双终

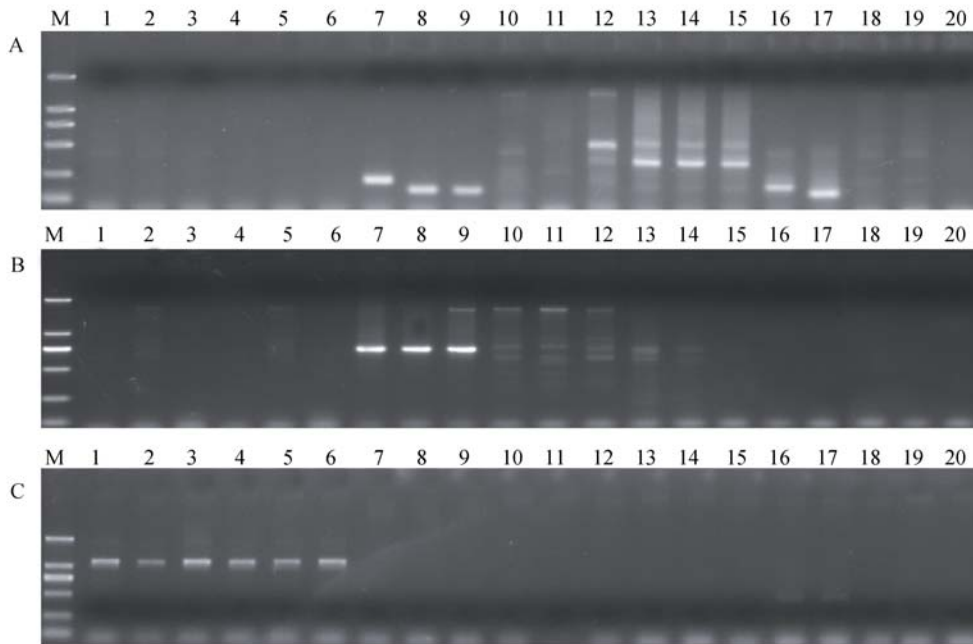


图 2 *GluB3-1*、*GluB3-2* 和 *GluB3-3* 基因编码区域引物在普通小麦近缘种中的 PCR 产物

A: 引物 BFN1/BRN1 扩增产物; B: 引物 BFN2/BRN2 扩增产物; C: 引物 BFN3/BRN3 扩增产物。1: Nopoleon; 2: Spectra; 3: Plenty; 4: DM28; 5: DM37; 6: DM47; 7: DS6; 8: DS7; 9: DS8; 10: Y152; 11: Y155; 12: P107; 13: PI599121; 14: PI599122; 15: PI599133; 16: CWI4250; 17: CWI4266; 18: C70; 19: Le49; 20: PI226616; M 为 DNA Ladder 2000(100、250、500、750、1 000 和 2 000 bp)。

止密码子序列, 其中, 终止密码子序列在 1 个 *GluB3-1* 和 12 个 *GluB3-4* 的新等位变异中为 TGATAA, 在 3 个 *GluB3-3* 的新等位变异中为 TAATAA。其推导氨基酸序列都具有典型的低分子量麦谷蛋白序列特征, 包含 20 个氨基酸的信号肽、N-端保守序列、富含谷氨酰胺的中间重复序列和 C-端保守区等 4 个区域。

GluB3-16 的推导氨基酸序列的分子量为 39.2 kDa, 其与 *GluB3-15* 的推导氨基酸序列高度一致, 前者仅在中间重复区比后者多出一个谷氨酰胺残基(Gln)。*GluB3-35*、*GluB3-36* 和 *GluB3-37* 推导的多肽链分别命名为 BP3-5、BP3-6 和 BP3-7, 其分子量为 44.5 kDa (BP3-6)和 44.6 kDa(BP3-5 和 BP3-7); 三者与基因 *GluB3-3* 在普通小麦中等位变异推导的氨基酸序列 (BP3-1、BP3-2、BP3-3、BP3-4)长度一致, 其相似性在 97.6%~99.7%之间。在结构上, 三者的 N-末端都为 MENSHP-; 在 C-末端保守区, BP3-7 序列为-GIGTG VGGY, 其他两个为-GVGTGVGGY(图 3)。

基因 *GluB3-4* 的 12 个新等位变异的推导肽链分别命名为 BP4-6、BP4-7、BP4-8、BP4-9、BP4-10、BP4-11、BP4-12、BP4-13、BP4-13、BP4-15、BP4-16 和 BP4-17, 其氨基酸残基数目在 340(BP4-14)~371(BP4-13)之间,

分子量变化在 38.6(BP4-14)~42.5 kDa(BP4-13)之间。与普通小麦基因 *GluB3-4* 推导的氨基酸序列(BP4-1、BP4-2、BP4-3、BP4-4 和 BP4-5)的相似性在 91.3% (BP4-15 与 BP4-1、BP4-2、BP4-3 和 BP4-4)~100% (BP4-8 与 BP4-5、BP4-9 与 BP4-4)之间。与 BP4-1 相比, 二倍体近缘种中等位基因的推导氨基酸除具有较多的单个氨基酸残基变异外, 还具有较多的缺失或插入(图 4 和表 3)。其中, BP4-10 和 BP4-11 分别在 4 个位置产生了缺失或插入, 使其推导氨基酸链序列的长度分别达到 364 和 363 个氨基酸; BP4-13 在第 100 和第 142 个氨基酸后, 分别出现 24 个和 7 个氨基酸的插入, 使其肽链长度达到 371 个氨基酸, 这也是所有等位变异中氨基酸个数最多的一个。在 N-末端保守区, BP4-12、BP4-16 和 BP4-17 的氨基酸序列为 METSHIL-, BP4-15 为 METSYIP-, 其他的 8 个都为 METSHIP-。在 C-末端保守区, BP4-10 和 BP4-11 的氨基酸序列为-GVGTQVGAY, 其余的都为-GVGTRVGAY。在所有的 12 个推导氨基酸序列中, 除 BP4-13 的第 8 个半胱氨酸(Cys)位置为精氨酸(Arg)外, 其他的序列都包含 8 个典型的半胱氨酸残基。

BP3-1	MKTFLIFALLAVAATSIAIAQMENSHIPGLERPSQQQPLPPQQTLSHHQQQQPIQQQPHQFPQQQP <u>CS</u> QQQ	70
BP3-2H.....	70
BP3-3T.....	70
BP3-4H.....	70
BP3-5H.....	70
BP3-6H.....	70
BP3-7H.....	70
BP3-1	QQPPLSQQQPPFSQQQPPFSQQQPPVLPQQPSFSQQQLPPFSQQQPPFSQQQPPVLPQQPSFSQQQL	140
BP3-2	140
BP3-3	140
BP3-4	140
BP3-5	140
BP3-6	140
BP3-7L.....	140
BP3-1	PPFSQQQLPPFLQQQPPVLPQQPPFSQQQLPPFSQQQLPPFSQQQPPVLPQQPPFSQQ-QQQPILPQQPPFS	209
BP3-2S.....	209
BP3-3S.....	209
BP3-4S.....	209
BP3-5S.....	209
BP3-6S.....	209
BP3-7S.....P.....	209
BP3-1	QQQQPVLLQQQIPFVHPSILQQLNPCKVFLQQQCSFVAMPQSLARSQMLQQRSCCHVMQQQCCQQLPQIPQ	279
BP3-2H.....S.....	279
BP3-3S.....	279
BP3-4S.....	279
BP3-5H.....S.....	279
BP3-6S.....	279
BP3-7H.....S.....	279
BP3-1	QSRYEAIRAIVYSIILQEQQQVQGSIQTQQQQPQQLGQCVSQPQQQLQQQLGQQPQQQQLAQGTFLQPHQ	349
BP3-2S.....	349
BP3-3S.....	349
BP3-4S.....	349
BP3-5S.....	349
BP3-6S.....H.....	349
BP3-7T.....S.....	349
BP3-1	IAQLEVMTSIALRTLPTMCNVNVPLYRTTTRVPFGVGTGVGGY	392
BP3-2	392
BP3-3S.....	392
BP3-4	392
BP3-5	392
BP3-6	392
BP3-7I.....	392

图 3 近缘种中 3 个 *GluB3-3* 位点新等位变异推导的氨基酸序列(BP3-5~BP3-7)和普通小麦中 4 个 *GluB3-3* 等位变异推导的氨基酸序列(BP3-1~BP3-4)比对

半胱氨酸残基被加粗并下划线, 圆点指示与 BP3-1 的共有序列, 短横线标示缺失或插入, 突变位置以对应氨基酸标出; ▼指示 N 末端保守区的起始点; ▽指示 N 末端重复区的起始点; ↓指示 C 末端区的 3 个亚区(即半胱氨酸富集区、谷酰胺富集区和末端保守区)起始点。

BP4-1	MKTFLIFALLAVAATSIAIAQMETSHIPSLKPLQQQPLPLQQLWYQQQQPIQQQ-----PQFPFPQQPPC	65
BP4-2	65
BP4-3	65
BP4-4	65
BP4-5	65
BP4-6	65
BP4-7	64
BP4-8	65
BP4-9	65
BP4-10I.G.....G.N.S.....Q.....H.....	65
BP4-11I.G.....G.N.S.....Q.....H.....	65
BP4-12I.....L.....S.....H.....	65
BP4-13G.....S.....R.....H.E.....P.....	65
BP4-14F.....Y.G.....S.....H.....PIQQQ.....	70
BP4-15L.....V.....H.....	65
BP4-16L.....H.....	65
BP4-17L.....H.....	65
BP4-1	SQQQQP--PLSQQQQPPFSQQQ-PPFSQQQQPILPQQP-----PFSQQQQFPQQQPLLP	118
BP4-2L.....V.....	118
BP4-3L.....V.....	118
BP4-4L.....V.....	118
BP4-5L.....V.....	111
BP4-6L.....V.....	118
BP4-7L.....V.....	117
BP4-8L.....V.....	111
BP4-9L.....V.....	118
BP4-10QQP.....S.....V.....PFSQQQP-----P.....P.....	126
BP4-11Q-P.....S.....V.....PFSQQQP-----P.....P.....	125
BP4-12Q.....Q.....V.....PFSQQQP-----Q.P.....	106
BP4-13Q.....V.....PFWQQQQPVLPQQP.....P.....L.....	132
BP4-14V.....PVSQQQQP-----	131

BP4-15	...L--...--...V...--...E..PP.S..--...	112
BP4-16	...--...I...--...V...--...--...--...	111
BP4-17	...--...I...--...V...--...--...--...	111
BP4-1	QQPPFSQQPPFSQQQQQ-----PPFSQQ-----QQQPILLQQPPFSQHQQPVLPQQQIPSVQPSIL	175
BP4-2	-----P-----	175
BP4-3	-----P-----	175
BP4-4	-----I-----	175
BP4-5	-----I-----Q.IP-----	168
BP4-6	-----P-----	175
BP4-7	-----I-----	174
BP4-8	-----I-----Q.IP-----	168
BP4-9	-----P-----	175
BP4-10	PFLPQQ-----P-----Y.H-----	189
BP4-11	PFLPQQ-----P-----Y.H-----	188
BP4-12	PVLPQQ-----P-----	169
BP4-13	-----VLP-----SPFLQQQ-----S.R-----L-----F-----	196
BP4-14	-----VLP-----	165
BP4-15	Q.VLP-----ILP-----L-----	160
BP4-16	PVLPQQ-----R-----P-----	174
BP4-17	PVLPQQ-----R-----P-----	174
BP4-1	QQLNPCVKVFLQQQCSPVAMPQSLARSQMLWQSSCHVMQQQCCCRQLPQIPEQSRDYAIRAIYSIVLQEQQ	245
BP4-2	-----	245
BP4-3	-----	245
BP4-4	-----T-----	245
BP4-5	-----	238
BP4-6	-----	245
BP4-7	-----	244
BP4-8	-----	238
BP4-9	-----T-----	245
BP4-10	-----T-----Q-----R-----	259
BP4-11	-----T-----Q-----R-----	258
BP4-12	-----Q-----K-----	239
BP4-13	-----Q-----R-----	266
BP4-14	-----I-----Q-----	235
BP4-15	-----Q-----K-----L-----Q-----	230
BP4-16	-----N-----	244
BP4-17	-----N-----	244
BP4-1	---HGQGLNQPPQQPPQSVQGVSPQPPQQKQLGQCFSFQQPPQQQLGQWPQQ-----QQVPQGTLL	303
BP4-2	-----	303
BP4-3	-----	303
BP4-4	-----	303
BP4-5	-----	296
BP4-6	-----	303
BP4-7	-----	302
BP4-8	-----	296
BP4-9	-----	303
BP4-10	---Q---F-----E-----	317
BP4-11	---Q---F---L-----E-----	316
BP4-12	-----R-----S-----H.S.S-----	324
BP4-13	-----F-----R-----S-----H.S.S-----	293
BP4-14	QQQQ---F-----P-----N-----QLGQWPQQ-----	300
BP4-15	---D-----	302
BP4-16	---D-----	302
BP4-17	---D-----	302
BP4-1	QPHQIAQLEVMTSIALRTLPTMCNVNVPVYGTITVPFGVGTTRVGAY	350
BP4-2	-----	350
BP4-3	-----	350
BP4-4	-----	350
BP4-5	-----	343
BP4-6	-----	350
BP4-7	-----	349
BP4-8	-----	343
BP4-9	-----	350
BP4-10	-----M-----S-----Q-----	364
BP4-11	-----M-----S-----Q-----	363
BP4-12	-----R-----S-----	344
BP4-13	-----R-----S-----	371
BP4-14	-----L-----S-----	340
BP4-15	-----L-----S-----	347
BP4-16	-----	349
BP4-17	-----	349

图 4 近缘种中 *GluB3-4* 位点 12 个新等位变异推导的氨基酸序列 (BP4-6~BP4-17) 与在普通小麦中的 5 个 *GluB3-4* 等位变异推导的氨基酸序列 (BP4-1~BP4-5) 比对

半胱氨酸残基被加粗并下划线, 半胱氨酸残基突变位置被加了阴影, 圆点指示与 BP4-1 的共有序列, 短横线标示缺失或插入, 突变位置以对应氨基酸标出; ▼ 指示 N 末端保守区的起始点; ▽ 指示 N 末端重复区的起始点; ↓ 指示 C 末端区的 3 个亚区 (即半胱氨酸富集区、谷酰胺富集区和末端保守区) 起始点。

表 3 近缘种中 12 个 *GluB3-4* 位点新等位变异推导的肽链与 BP4-1 差异比较

推导肽链	单氨基酸突变(个)	缺失/插入氨基酸(个)													
		55 ^a	71	85	94	100	108	109	113	136	142	143	245	294	
BP4-6	2														
BP4-7	0	-1													
BP4-8	6						-7								
BP4-9	2														
BP4-10	20		+2			+7		-1		+6					
BP4-11	21		+1			+7		-1		+6					
BP4-12	7			+1	-7			-6		+6					
BP4-13	28					+14					+7				
BP4-14	9	+5				+8					-23				
BP4-15	28								-6			-9	+4	+8	
BP4-16	7						-7			+6					
BP4-17	8						-7			+6					

^a 对应于普通小麦BP4-1 序列的氨基酸位置, 其他相同; “+” 代表在对应氨基酸后面有插入; “-” 代表在对应氨基酸后面有缺失。

2.3 普通小麦及其近缘种中*Glu-B3*基因的系统发育关系

应用软件 MEGA 和 PHYLIP 构建了 3 个基于不同算法的进化树, 其相似程度较高, 其中仅拟斯卑尔脱山羊草与双角山羊草在最大简约法与邻位链接法或最大似然法中的位置交换, 因而本文仅列出其中的邻位相连树(图 5)。本研究共涉及 4 个 *Glu-B3* 基因, 其中 *GluB3-4* 的等位变异最多, 达 12 个, 分布在所有的 7 个近缘种中。从图 5 可以看出, 4 个基因的等位变异分别聚成一簇, 自举值都达到 100, 说明这 4 个基因在进化过程中分别有自己的特征和取向, 也可能暗示其来源于不同的祖先。在 *GluB3-4* 的基因簇中, 所有的栽培二粒小麦、野生二粒小麦和硬粒小麦等四倍体近缘种与普通小麦首先聚成一个多倍体簇, 自举值为 100。在这一簇中, 有 3 个小的分枝分别含有栽培二粒小麦、野生二粒小麦和普通小麦的印迹, 说明三者的亲缘关系较近。硬粒小麦虽然单独成为一个分枝, 但从其在进化树上的位置来看, 其与以上 3 个种的关系都较近, 揭示了这 4 个物种的直系同源关系。在与二倍体近缘种的关系中, 双角山羊草与多倍体簇关系较近, 其次是拟斯卑尔脱山羊草, 关系最远的为西尔斯山羊草; 高大山羊草基因在进化树上的分布较为复杂, 其等位变异 *GluB3-412* 和 *GluB3-414* 与多倍体簇的进化关系较近, 而 *GluB3-413* 则稍远, 与拟斯卑尔脱山羊草处于同一层次。

在所研究的近缘种中, 基因 *GluB3-1* 和 *GluB3-2* 的等位变异仅在野生二粒小麦中得到, 且在序列上

与普通小麦极为相似或相同, 进一步揭示了野生二粒小麦与普通小麦间的亲缘关系。基因 *GluB3-3* 的等位变异仅能从栽培二粒小麦和硬粒小麦中获得, 从进化树上可以看出三者的亲缘关系较近。

3 讨论

本研究从普通小麦 B 组染色体的可能供体中, 克隆了 16 个新的等位变异。将这些等位变异与 GenBank 上的序列比对发现, GenBank 上相应的序列与从四倍体近缘种获得的等位变异具有高度的一致性, 而与从二倍体近缘种获得的 8 个等位变异的一致性较低。例如, 与 *GluB3-410* 和 *GluB3-411* 最高的相似性仅为 95.4%或 95.7%, 与其他 6 条序列的相似性则更低。这进一步说明目前对普通小麦 B 组染色体可能供体中低分子量麦谷蛋白基因研究的缺乏。

根据成熟蛋白序列N-末端的结构组成特点, 低分子量麦谷蛋白可以划分为LMW-m、LMW-s和LMW-i等 3 种类型, 分别对应于N-末端氨基酸残基甲硫氨酸(Met)、丝氨酸(Ser)和异亮氨酸(Ileu)^[24]。基因*GluB3-4* 新等位变异的推导肽链中, BP4-12、BP4-16 和BP4-17 的N-末端氨基酸序列为METSHIL-, BP4-15 为METSYP-, 其余的为METSHIP-, 因而理论上都应归为LMW-m类型; 在C-末端保守区, BP4-10 和BP4-11 的氨基酸序列为-GVGTQVGAY, 其余的为-GVGTRVGAY。基因*GluB3-1*、*GluB3-2* 和*GluB3-3* 新等位变异的推导氨基酸都为LMW-s型。16 个新等位变异的推导氨基酸中, 仅BP4-13 的第 8 个半胱氨酸(Cys)位置为精氨酸(Arg), 进一步说明了低分子

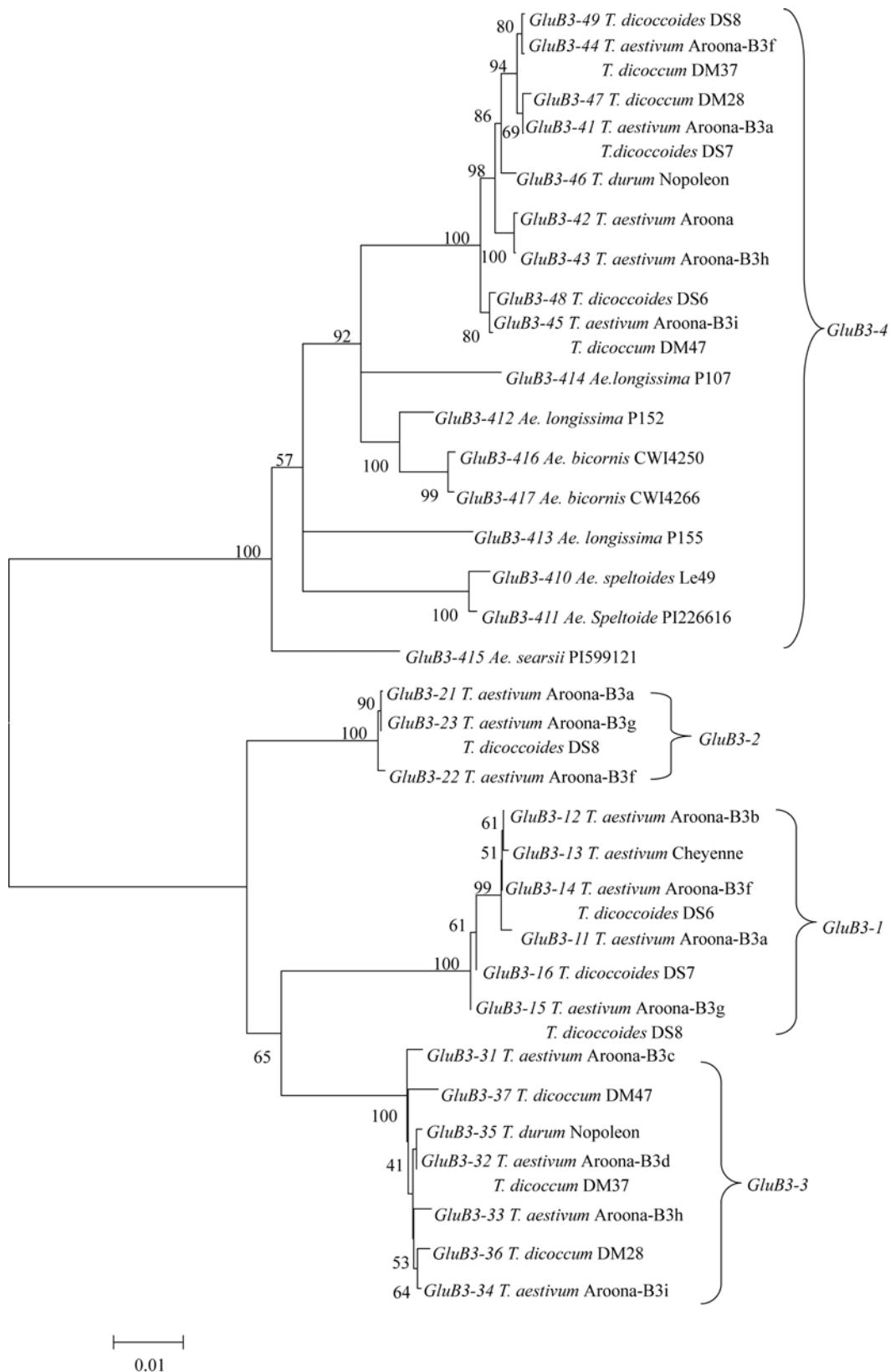


图 5 普通小麦及其近缘种 *Glu-B3* 位点等位变异的系统发育树

该系统发育树用 MEGA 4 软件基于邻位相连算法构建, 包含 *Glu-B3* 位点的 4 个基因及其等位变异。每个等位变异都标示出基因名称、物种名称和品系名称(标识号)。每一分支点上的数字为自举值, 图旁的标尺代表每一个位点的核苷酸替换率。

量麦谷蛋白序列中半胱氨酸的保守性。然而,在推导氨基酸序列长度上,从二倍体近缘种获得的等位变异具有较大的变异,如BP4-10、BP4-11和BP4-13的序列长度分别为364、363和371个氨基酸。一般认为,较长的低分子量麦谷蛋白序列中间重复区域对小麦面粉的品质性状有着积极影响^[23,25],因而对这些基因的作用有必要进一步分析。

关于普通小麦的起源,目前主要的观点认为它是经过两次遗传事件由其二倍体祖先进化而成的^[20,26~28]。首先发生的遗传事件是乌拉尔图小麦(*T. urartu*, 基因组为A“*A*”,普通小麦的A基因组供体)与拟斯卑尔脱山羊草(*Ae. speltoides*, 基因组为SS,一般被认为是普通小麦B基因组的供体)或者其近缘物种杂交并随后染色体加倍,最终形成野生二粒小麦(*T. dicoccoides*, AABB)。随后,栽培二粒小麦(*T. dicoccum*, AABB, 由野生二粒小麦驯化而成)与粗山羊草(*Ae. tauschii*, DD, 普通小麦的D基因组供体)杂交而生成六倍体普通小麦(基因组为AABBDD)。除了普通小麦的祖先种外,另外几个物种也与其存在紧密的亲缘关系,如硬粒小麦(*T. durum*, AABB),也认为是由野生二粒小麦驯化而来,与栽培二粒小麦有着很近的亲缘关系^[29,30]。本研究中,基因*GluB3-4*的等位变异分布广泛,存在于所有研究的近缘种中,特别是在栽培二粒小麦和野生二粒小麦中都获得了与普通小麦一致的等位变异,这可能说明普通小麦中的等位变异发生在该物种形成之前。在与二倍体近缘种的关系上,本研究发现基因*GluB3-4*并不是与拟斯卑尔脱山羊草最近,相对而言,与双角山羊草和部分高大山羊草显得更近。然而,考虑到各个二倍体与普通小麦等位变异间的相似性差异不大,还不能确定普通小麦基因*GluB3-4*的二倍体祖先,这一方面说明了B组染色体,尤其是1B染色体上低分子量麦谷蛋白基因进化的复杂性,另一方面也支持B组染色体起源于多个二倍体山羊草祖先的假设^[31]。

值得注意的是,基因*GluB3-1*和*GluB3-2*的等位变异仅出现在野生二粒小麦中,却没有在栽培二粒小麦和硬粒小麦中发现,而*GluB3-3*的等位变异则仅出现在栽培二粒小麦和硬粒小麦中。很明显,这3个*Glu-B3*基因的进化特点难以用传统上普通小麦进化模式解释,说明不同*Glu-B3*基因的进化机制可能不同。此外,这3个基因在所研究的二倍体近缘种中都没有克隆到新等位变异,根据分析的结果,它

们很可能不是由所研究的二倍体物种直接进化而来。考虑到B组染色体进化的复杂性及低分子量麦谷蛋白基因间的高度相似性^[6~8],很可能该基因位点在进化过程中有其他染色体组供体的基因渗入,因而若要了解其起源,需进一步分析更多的近缘种,包括其他染色体的可能供体。从序列和进化树上看,与硬粒小麦相比,栽培二粒小麦和野生二粒小麦与普通小麦的亲缘更近。以上这些结果进一步证明了栽培二粒小麦和野生二粒小麦与普通小麦紧密的进化关系,同时进一步验证了普通小麦可能有多个四倍体祖先的推论^[32]。

参考文献(References):

- [1] 何中虎,林作楫,王龙俊,肖志敏,万富世,庄巧生. 中国小麦品质区划研究. 中国农业科学, 2002, 35(4): 359–364.
- [2] Payne PI, Seekings JA, Worland AJ, Jarvis MG, Holt LM. Allelic variation of glutenin subunits and gliadins and its effect on bread-making quality in wheat: Analysis of F₅ progeny from Chinese Spring × Chinese Spring (Hope 1A). *J Cereal Sci*, 1987, 6(2): 103–118. [\[DOI\]](#)
- [3] Singh NK, Shepherd KW. Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group-1 chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1988, 75(6–7): 628–641. [\[DOI\]](#)
- [4] Harberd NP, Bartels D, Thompson RD. Analysis of the gliadin multigene loci in bread wheat using nullisomic-tetrasomic lines. *Mol Gen Genet*, 1985, 198(2): 234–242. [\[DOI\]](#)
- [5] Cassidy BG, Dvorak J, Anderson OD. The wheat low-molecular-weight glutenin genes: characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure. *Theor Appl Genet*, 1998, 96(6–7): 743–750. [\[DOI\]](#)
- [6] D’Ovidio R, Masci S. The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J Cereal Sci*, 2004, 39: 321–339. [\[DOI\]](#)
- [7] Zhao XL, Xia XC, He ZH, Gale KR, Lei ZS, Appels R, Ma WJ. Characterization of three low-molecular-weight *Glu-D3* subunit genes in common wheat. *Theor Appl Genet*, 2006, 113(7): 1247–1259. [\[DOI\]](#)
- [8] Zhao XL, Xia XC, He ZH, Lei ZS, Appels R, Yang Y, Sun QX, Ma WJ. Novel DNA variations to characterize low molecular weight glutenin *Glu-D3* genes and develop STS markers in common wheat. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(3): 451–460. [\[DOI\]](#)
- [9] Levy AA, Galili G, Feldman M. Polymorphism and genetic control of high molecular weight glutenin subunits in wild tetraploid wheat *Triticum turgidum* var. *dicoccoides*. *He-*

- redity, 1988, 61(1): 63–72. [\[DOI\]](#)
- [10] Valkoun JJ. Wheat pre-breeding using wild progenitors. *Euphytica*, 2001, 119(1–2): 17–23. [\[DOI\]](#)
- [11] Xu SS, Khan K, Kindworth DL, Faris JD, Nygard G. Chromosomal location of genes for novel glutenin subunits and gliadins in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*). *Theor Appl Genet*, 2004, 108(7): 1221–1228. [\[DOI\]](#)
- [12] Li XH, Wang AL, Xiao YH, Yan YM, He ZH, Appels R, Ma WJ, Hsam SLK, Zeller FJ. Cloning and characterization of a novel low molecular weight glutenin subunit gene at the *Glu-A3* locus from wild emmer wheat (*Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides*). *Euphytica*, 2008, 159(1–2): 181–190.
- [13] Lafiandra D, Margiotta B, Colaprico G, Masci S, Roth MR, MacRitchie F. Introduction of the D-genome related high and low-Mr glutenin subunits into durum wheat and their effect on technological properties. In: Shewry PR, Thatam AS, eds. *Wheat Gluten*. Royal Society of Chemistry, UK, 2000, 51–54.
- [14] Pflüger LA, D'Ovidio R, Margiotta B, Pena R, Mujeeb-Kazi A, Lafiandra D. Characterisation of high- and low-molecular weight glutenin subunits associated to the D genome of *Aegilops tauschii* in a collection of synthetic hexaploid wheats. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(8): 1293–1301. [\[DOI\]](#)
- [15] An X, Zhang Q, Yan Y, Li Q, Zhang Y, Wang A, Pei J, Tian J, Wang H, Hsam SLK, Zelle FJ. Cloning and molecular characterization of three novel LMW-i glutenin subunit genes from cultivated einkorn (*Triticum monococcum* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 113(3): 383–395. [\[DOI\]](#)
- [16] Zhao XL, Yang Y, He Z H, Lei ZS, Ma W, Sun QX, Xia XC. Characterization of novel LMW-GS genes at *Glu-D3* locus of chromosome 1D in *Aegilops tauschii*. *Hereditas*, 2008, 145(5): 238–250. [\[DOI\]](#)
- [17] 陈佩度, Gill BS. 四倍体小麦染色体 4A 和 B, G 染色体组的起源. *作物学报*, 1984, 10(3): 146–153.
- [18] Kimber G, Athwal RS. A reassessment of the course of evolution of wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69(4): 912–915. [\[DOI\]](#)
- [19] Daud HM, Gustafson JP. Molecular evidence for *Triticum speltoides* as a B-genome progenitor of wheat. *Genome*, 1996, 39(3): 543–548. [\[DOI\]](#)
- [20] Feuillet C, Penger A, Gellner K, Mast A, Keller B. Molecular evolution of receptor-like kinase genes in hexaploid wheat. Independent evolution of orthologs after polyploidization and mechanisms of local rearrangements at paralogous loci. *Plant Physiol*, 2001, 125(3): 1304–1313. [\[DOI\]](#)
- [21] Wang LH, Zhao XL, He ZH, Ma W, Appels R, Peña RJ, Xia XC. Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit *Glu-B3* genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2009, 118(3): 525–539. [\[DOI\]](#)
- [22] Gale KR, Ma W, Zhang W, Rampling L, Hill AS, Appels R, Morris P, Morrel M. Simple high-throughput DNA markers for genotyping in wheat. In: Eastwood R, Hollamby G, Rathjen T, Gororo N (eds.) *Proceedings of 10th Australian wheat breeding assembly*, Wheat Breeding Society of Australia, Mildura, VIC, 16–21 September 2001, 26–31.
- [23] Masci S, D'Ovidio R, Lafiandra D, Kasarda DD. Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer. *Plant Physiol*, 1998, 118(4): 1147–1158. [\[DOI\]](#)
- [24] Lew EJL, Kuzmicky DD, Kasarda DD. Characterization of low molecular weight glutenin subunits by reversed-phase high-performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and N-terminal amino acid sequencing. *Cereal Chem*, 1992, 69(5): 508–515.
- [25] Masci S, D'Ovidio R, Lafiandra D, Kasarda DD. A 1B coded low-molecular-weight glutenin subunit associated with quality in durum wheats show strong similarity to subunits present in some bread wheat cultivars. *Theor Appl Genet*, 2000, 100(3–4): 396–400. [\[DOI\]](#)
- [26] Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, Gornicki P. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(12): 8133–8138. [\[DOI\]](#)
- [27] Gu YQ, Coleman-Derr D, Kong XY, Anderson OD. Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four *Triticeae* genomes. *Plant Physiol*, 2004, 135(1): 459–470. [\[DOI\]](#)
- [28] Petersen G, Seberg O, Yde M, Berthelsen K. Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol Phylogenet Evol*, 2006, 39(1): 70–82. [\[DOI\]](#)
- [29] Luo MC, Yang ZL, You FM, Kawahara T, Waines JG, Dvorak J. The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(6): 947–959. [\[DOI\]](#)
- [30] Jauhar PP. Meiotic restitution in wheat polyhaploids (amphihaploids): a potent evolutionary force. *J Heredity*, 2007, 98(16): 188–193. [\[DOI\]](#)
- [31] Liu B, Segal G, Rong JK, Feldman M. A chromosome-specific sequence common to the B genome of polyploid wheat and *Aegilops searsii*. *Plant Sys E*, 2003, 241(1–2): 55–66. [\[DOI\]](#)
- [32] He XY, He ZH, Morris CF, Xia XC. Cloning and phylogenetic analysis of polyphenol oxidase genes in common wheat and related species. *Genet Resour Crop Evol*, 2009,

56(3): 311–321.[\[DOI\]](#)