

# 黄淮麦区小麦子粒多酚氧化酶活性 基因等位变异的分子检测

陈杰, 陈锋, 詹克慧, 崔党群

(河南农业大学农学院/河南省粮食作物生理生态与遗传改良国家重点实验室培育基地, 郑州 450002)

**摘要:** 子粒多酚氧化酶(PPO, polyphenol oxidase)活性是造成面粉以及面粉制品褐变的主要因素,了解不同小麦品种子粒PPO活性基因的等位变异情况,有助于遗传改良中提高面粉制品的外观品质。本研究利用2A染色体上*Ppo-A1*的标记*PPO18*以及2D染色体上*Ppo-D1*的标记*PPO16*和*PPO29*检测该基因在118份黄淮麦区小麦品种中的等位变异。结果表明:在*Ppo-A1*位点,48.3%的小麦品种含*Ppo-A1a*(高PPO活性)型等位基因,51.7%的小麦品种含*Ppo-A1b*(低PPO活性)型等位基因,*Ppo-A1a*和*Ppo-A1b*两者之间的差异达到显著水平( $P < 0.05$ )。在*Ppo-D1*位点,55.1%的小麦品种含*Ppo-D1a*(低PPO活性)型等位基因,44.9%的小麦品种含*Ppo-D1b*(高PPO活性)型等位基因,*Ppo-D1a*和*Ppo-D1b*两者之间的差异也达到显著水平( $P < 0.05$ )。在*Ppo-A1*和*Ppo-D1*2个位点共检测到*Ppo-A1a/Ppo-D1a*(中间型PPO活性)、*Ppo-A1a/Ppo-D1b*(高PPO活性)、*Ppo-A1b/Ppo-D1a*(低PPO活性)、*Ppo-A1b/Ppo-D1b*(中间型PPO活性)4种变异组合类型,分布频率分别为28.8%、19.5%、26.3%和25.4%,彼此之间的差异均达到显著水平( $P < 0.05$ )。总体来看,这3个基因特异性标记可以快速、准确和方便地检测子粒PPO基因的不同等位变异。此外,本研究检测出部分材料具有低PPO活性,可为选育具有低PPO活性的小麦品种提供有用信息。

**关键词:** 小麦; PPO活性; PPO基因; 功能标记; 分子检测

## Molecular Identification of the Polyphenol Oxidase Genes in Bread Wheat Cultivars from Huanghuai Wheat Region

CHEN Jie, CHEN Feng, ZHAN Ke-hui, CUI Dang-qun

(Agronomy College of Henan Agricultural University/Key Laboratory of Physiological Ecology and Genetic Improvement of Food Crops in Henan Province, Zhengzhou 450002)

**Abstract:** Grain polyphenol oxidase (PPO, polyphenol oxidase) activity is the main factor causing flour and flour products browning. Understanding of allelic variation of *PPO* gene contributes to improvement of the appearance qualities of flour products in wheat breeding. A total of 118 wheat cultivars from Huanghuai wheat region were used to identify *Ppo-A1* alleles with functional marker *PPO18* and *Ppo-D1* alleles with functional markers *PPO16* and *PPO29*, respectively. The results showed that in the *Ppo-A1* locus 48.3% and 51.7% of wheat varieties were surveyed to possess *Ppo-A1a* (high PPO activity) and *Ppo-A1b* alleles (low PPO activity), respectively, and PPO activities of cultivars with *Ppo-A1a* was significantly higher than that of *Ppo-A1b* ( $P < 0.05$ ). In the *Ppo-D1* locus, 55.1% and 44.9% of wheat varieties were surveyed to possess *Ppo-D1a* (low PPO activity) and *Ppo-D1b* (high PPO activity) allele, and PPO activity of cultivars with *Ppo-D1b* was significantly higher than that of *Ppo-D1a* allele ( $P < 0.05$ ). Four types of allelic combinations of *Ppo-A1a/Ppo-D1a* (intermediate PPO activity), *Ppo-A1a/Ppo-D1b* (high PPO activity), *Ppo-A1b/Ppo-D1a* (low PPO activity), and *Ppo-A1b/Ppo-D1b* (intermediate PPO ac-

收稿日期: 2012-12-10 修回日期: 2013-01-19 网络出版日期: 2013-08-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130809.1120.001.html>

基金项目: 国家科技支撑计划(2011BAD07B01); 河南省高校科技创新人才项目(2012HASTIT007); 河南省高校青年骨干教师资助计划项目(2011GGJS-044)

第一作者主要从事小麦分子遗传育种工作。E-mail: 465460728@qq.com

通信作者: 陈锋, 主要从事小麦分子育种工作。E-mail: chf0088@sina.com.cn

詹克慧, 主要从事小麦遗传育种工作。E-mail: kh486@163.com

tivity) were detected in surveyed wheat cultivars, and their distribution frequencies were 28.8%, 19.5%, 26.3%, and 25.4%, respectively, and the differences among PPO activities of above four genotypes were significant ( $P < 0.05$ ). Therefore, the three gene-specific markers were rapid, accurate, and convenient to identify allelic variations of *PPO* gene. This study found some wheat cultivars with low PPO activity and could provide useful information for improvement of wheat quality.

**Key words:** Wheat; PPO activity; PPO genes; functional marker; molecular identification

面制食品是我国北方地区的传统主食,在人们的膳食结构中占有非常重要的地位。我国的面制食品主要是馒头、面条和饺子等蒸煮食品,对面粉的色泽要求较高。然而在面制食品的加工和储藏过程中,容易产生食品颜色的褐变,这不仅影响食品的外观品相,而且对其营养价值也有一定的影响。面粉颜色是一个复杂的性状,多酚氧化酶(PPO, polyphenol oxidase)活性、黄色素含量、蛋白质含量和脂肪氧化酶活性等都能影响面粉颜色。大量研究表明<sup>[1-5]</sup>,籽粒PPO活性是导致面制食品颜色褐变的主要原因,因而降低小麦籽粒PPO活性是小麦品质改良的重要目标。

基因型和环境都能影响小麦籽粒PPO活性,但基因型的影响较大<sup>[6]</sup>。尽管小麦第3、5同源群及6B、7D等染色体上存在一些PPO微效基因,但控制PPO活性的主要基因位于第2同源群染色体上<sup>[7-11]</sup>。R. Raman等<sup>[10]</sup>研究发现,控制PPO活性的第1主效基因位于2AL染色体上,能够解释82%~84%的表型变异;张立平等<sup>[11]</sup>研究表明,控制PPO活性的主效基因位于2AL和2DL染色体上,分别解释37.2%~50.1%和25.1%~29.1%的表型变异。T. Demeke等<sup>[8]</sup>研究表明,2BL染色体上也存在影响PPO活性的基因,但其影响相对较小。在控制籽粒中PPO活性的主效基因定位逐渐明确之后,对小麦籽粒中PPO活性基因的克隆也取得了较快发展<sup>[12]</sup>。D. J. Sun等<sup>[13]</sup>根据PPO基因(AY596268)的序列在2A染色体上的等位基因变异开发了功能标记*PPO18*。在高、低PPO活性品种中,*PPO18*的PCR扩增产物分别为685 bp和876 bp。随后,X. Y. He等<sup>[14]</sup>利用PPO基因(AY515506)序列在*Ppo-D1*位点的2个等位变异*Ppo-D1a*和*Ppo-D1b*,分别开发了1对互补的显性标记*PPO16*与*PPO29*。其中*PPO16*扩增出的713 bp片段与低PPO活性相关。这些功能标记可以有效地鉴定高、低PPO活性的小麦品种<sup>[15-17]</sup>。随着小麦籽粒PPO基因研究的逐步深入,*Ppo-B1*位点的基因克隆也取得了进展。H. Q. Si等<sup>[18]</sup>根据*SSPPO-B1*基因(AB254804)的序列在2B染色体上的等位基因变异

开发了功能标记,该标记在低PPO活性品种中扩增产物为400 bp和600 bp 2条带,在高PPO活性品种中扩增产物则仅为400 bp 1条带。

黄淮麦区是我国小麦最为重要的生产区,其播种面积和总产量均居全国首位。经过几代小麦育种工作者的努力,小麦品种的产量得到了大幅度的提高。但与高产育种相比,品质育种进展较为缓慢,仍相对滞后,其重要原因是目前缺乏品质性状较为优良的优异基因资源,因此,加强优异种质资源筛选可以在一定程度上加快品质育种的进程<sup>[19]</sup>。本研究利用功能标记*PPO18*、*PPO16*和*PPO29*对118份黄淮麦区小麦品种进行PPO基因等位变异分子检测,旨在了解本地区小麦品种中*Ppo-A1*和*Ppo-D1*基因的等位变异分布情况,并筛选出低PPO活性材料,从而为该地区小麦品质改良提供一定信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

选用118份黄淮麦区小麦品种为材料,其中河南省45份,河北省42份,山东省31份(表1),这些材料基本上反映了目前本地区小麦育种和生产利用现状。试验材料于2011-2012年度种植于河南农业大学科教示范试验园区,每份材料种6行,行长2 m,行距20 cm,单粒点播,株距10 cm。田间管理按当地常规方法进行,收获的种子用于PPO活性的测定和分子标记检测。

### 1.2 籽粒多酚氧化酶活性测定

参照J. V. Anderson等<sup>[20]</sup>和左爱辉等<sup>[21]</sup>方法,用10 mmol/L L-DOPA和50 mmol/L MOPS试剂和分光光度计测定小麦籽粒PPO活性,每个材料重复3次,利用下列公式计算PPO活性,若3次数值之间任意2个相差超过1.0,则重新进行测试。最终PPO活性为3次结果的平均值。

PPO活性的计算方法为: $A_{475}/(g \cdot \min \cdot 10^3) = \text{吸光值 } A_{475}/(30 \min \times 15 \text{ 粒种子克数} \times 10^3)$ 。

### 1.3 基因组DNA的提取

每个品种选取1粒有代表性的种子,用锤子砸

碎后放入 2.0 mL 离心管中,按 F. Chen 等<sup>[22]</sup>方法快速提取基因组 DNA。

#### 1.4 STS 标记检测

利用 D. J. Sun 等<sup>[13]</sup>和 X. Y. He 等<sup>[14]</sup>等开

发的 STS 标记 *PPO18*、*PPO16* 和 *PPO29* 检测 118 份黄淮麦区小麦品种在 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 基因的等位变异,引物序列和相关信息详见表 2。

表 1 供试小麦材料 PPO 活性及其基因型

Table 1 Genotypes and phenotypes of grain PPO in wheat varieties surveyed

| 品种<br>Cultivar | 基因型 Haplotype |               | 子粒 PPO 活性<br>( $\text{g} \cdot \text{min} \cdot 10^3$ )<br>Grain PPO activity | 来源<br>Origin | 品种<br>Cultivar | 基因型 Haplotype |               | 子粒 PPO 活性<br>( $\text{g} \cdot \text{min} \cdot 10^3$ )<br>Grain PPO activity | 来源<br>Origin |
|----------------|---------------|---------------|---|--------------|----------------|---------------|---------------|---|--------------|
|                | <i>Ppo-A1</i> | <i>Ppo-D1</i> |   |              |                | <i>Ppo-A1</i> | <i>Ppo-D1</i> |   |              |
| 多丰 2000        | b             | b             | 12.68   | 山东           | 师乐 02-1        | b             | b             | 30.97   | 河北           |
| 黑马 1 号         | b             | a             | 10.25   | 山东           | 石家庄 10 号       | a             | a             | 39.02   | 河北           |
| 济麦 19          | b             | a             | 12.92   | 山东           | 石麦 12 号        | b             | a             | 28.15   | 河北           |
| 济麦 20          | b             | b             | 17.58   | 山东           | 石麦 14 号        | b             | b             | 31.50   | 河北           |
| 济麦 21          | a             | b             | 27.46   | 山东           | 石麦 15 号        | b             | a             | 32.74   | 河北           |
| 济麦 22          | b             | b             | 19.78   | 山东           | 石麦 16 号        | b             | b             | 32.01   | 河北           |
| 济宁 12          | b             | a             | 13.70   | 山东           | 石麦 18 号        | b             | b             | 33.25   | 河北           |
| 济宁 13          | a             | b             | 34.64   | 山东           | 石新 539         | b             | a             | 39.46   | 河北           |
| 济宁 16          | a             | a             | 26.05   | 山东           | 石新 733         | a             | a             | 39.27   | 河北           |
| 莱州 95021       | b             | a             | 13.80   | 山东           | 石新 828         | a             | b             | 49.85   | 河北           |
| 聊麦 16          | a             | b             | 35.10   | 山东           | 石优 17 号        | a             | b             | 50.51   | 河北           |
| 鲁原 301         | b             | b             | 20.86   | 山东           | 石优 20 号        | a             | a             | 39.30   | 河北           |
| 优麦 3 号         | a             | b             | 36.18   | 山东           | 唐麦 8 号         | b             | b             | 33.28   | 河北           |
| 山农 12          | a             | b             | 29.56   | 山东           | 中麦 12          | b             | b             | 33.57   | 河北           |
| 山农 14 号        | b             | b             | 21.95   | 山东           | 01 中 89        | a             | a             | 29.22   | 河南           |
| 山农 15          | b             | b             | 22.21   | 山东           | 04 中 70        | b             | a             | 15.75   | 河南           |
| 山农 18          | b             | a             | 13.85   | 山东           | 安麦 8 号         | a             | a             | 29.43   | 河南           |
| 山农 8355        | b             | a             | 14.33   | 山东           | 百农 160         | b             | a             | 15.75   | 河南           |
| 泰麦 1 号         | b             | a             | 14.33   | 山东           | 鹤麦 1 号         | a             | a             | 29.92   | 河南           |
| 泰农 18          | b             | a             | 14.37   | 山东           | 济麦 1 号         | a             | b             | 41.36   | 河南           |
| 泰山 22 号        | b             | b             | 22.61   | 山东           | 济麦 2 号         | a             | b             | 41.70   | 河南           |
| 泰山 24          | b             | b             | 38.42   | 山东           | 浚 9917         | a             | a             | 31.08   | 河南           |
| 泰山 9818        | a             | b             | 37.07   | 山东           | 开麦 18          | a             | a             | 15.46   | 河南           |
| 郑麦 98          | a             | b             | 37.12   | 山东           | 兰考矮早 8         | b             | b             | 35.66   | 河南           |
| 潍麦 7 号         | a             | a             | 28.40   | 山东           | 洛早 6 号         | b             | a             | 16.19   | 河南           |
| 汶农 6 号         | a             | b             | 39.78   | 山东           | 洛麦 21          | a             | a             | 31.82   | 河南           |
| 烟 2415         | a             | b             | 40.47   | 山东           | 洛麦 23          | b             | a             | 8.46  | 河南           |
| 烟农 23          | b             | a             | 14.80   | 山东           | 平麦 998         | b             | b             | 23.13   | 河南           |
| 烟农 24          | b             | b             | 22.81   | 山东           | 濮麦 10 号        | a             | b             | 42.82   | 河南           |
| 烟农 5158        | a             | b             | 40.77   | 山东           | 濮麦 9 号         | b             | a             | 16.35   | 河南           |
| 洲元 9369        | b             | b             | 22.87   | 山东           | 濮优 866         | b             | b             | 24.29   | 河南           |
| NC2 号          | b             | b             | 27.78   | 河北           | 太空 6 号         | a             | a             | 32.36   | 河南           |
| 白硬冬 2 号        | b             | a             | 18.92   | 河北           | 新麦 19          | a             | a             | 32.47   | 河南           |
| 保麦 9 号         | b             | a             | 19.14   | 河北           | 新麦 20          | a             | a             | 17.18   | 河南           |
| 沧麦 028         | a             | b             | 45.58   | 河北           | 新麦 208         | a             | a             | 33.07   | 河南           |
| 藁优 2018        | b             | a             | 19.17   | 河北           | 偃展 4110        | a             | a             | 33.79   | 河南           |
| 藁优 9618        | b             | b             | 28.50   | 河北           | 豫保 1 号         | a             | b             | 43.91   | 河南           |

表 1(续)

| 品种<br>Cultivar | 基因型 Haplotype |               | 子粒 PPO 活性<br>( $\text{g}\cdot\text{min}\cdot 10^3$ )<br>Grain PPO activity | 来源<br>Origin | 品种<br>Cultivar | 基因型 Haplotype |               | 子粒 PPO 活性<br>( $\text{g}\cdot\text{min}\cdot 10^3$ )<br>Grain PPO activity | 来源<br>Origin |
|----------------|---------------|---------------|--|--------------|----------------|---------------|---------------|--|--------------|
|                | <i>Ppo-A1</i> | <i>Ppo-D1</i> |  |              |                | <i>Ppo-A1</i> | <i>Ppo-D1</i> |  |              |
| 邯 7086         | a             | a             | 35.02  | 河北           | 豫麦 18-99       | a             | b             | 32.77  | 河南           |
| 邯优 3475        | a             | a             | 24.88  | 河北           | 豫麦 70-36       | b             | a             | 16.45  | 河南           |
| 河农 4198        | a             | a             | 36.79  | 河北           | 豫农 035         | b             | a             | 16.67  | 河南           |
| 河农 58-3        | b             | a             | 20.26  | 河北           | 豫农 201         | b             | a             | 17.09  | 河南           |
| 河农 6049        | a             | a             | 36.80  | 河北           | 豫农 202         | a             | a             | 21.01  | 河南           |
| 河农 822         | b             | a             | 21.22  | 河北           | 豫农 949         | b             | a             | 17.96  | 河南           |
| 河农 827         | b             | b             | 29.23  | 河北           | 豫农 982         | a             | a             | 33.97  | 河南           |
| 河农 9206        | a             | a             | 36.97  | 河北           | 豫农 9901        | b             | a             | 18.16  | 河南           |
| 衡 0628         | a             | a             | 37.06  | 河北           | 豫展 4 号         | a             | a             | 34.42  | 河南           |
| 衡 4399         | a             | a             | 37.46  | 河北           | 源育 3 号         | a             | a             | 22.79  | 河南           |
| 衡 6599         | a             | a             | 38.06  | 河北           | 郑麦 9405        | b             | b             | 24.37  | 河南           |
| 衡 95 观 26      | a             | a             | 38.56  | 河北           | 郑麦 9694        | a             | a             | 34.92  | 河南           |
| 冀 5265         | a             | b             | 46.29  | 河北           | 郑麦 98          | a             | b             | 44.87  | 河南           |
| 冀 6358         | b             | b             | 29.94  | 河北           | 郑农 16          | b             | a             | 18.64  | 河南           |
| 冀丰 703         | a             | a             | 43.99  | 河北           | 郑农 17          | a             | b             | 45.40  | 河南           |
| 金麦 54          | b             | b             | 30.20  | 河北           | 郑育麦 9987       | b             | b             | 24.59  | 河南           |
| 晶白麦 1 号        | a             | a             | 38.69  | 河北           | 众麦 998         | a             | b             | 42.17  | 河南           |
| 科麦一号           | a             | a             | 38.70  | 河北           | 周麦 17          | a             | a             | 34.92  | 河南           |
| 科农 1093        | b             | a             | 21.28  | 河北           | 周麦 19          | b             | a             | 18.87  | 河南           |
| 科农 213         | a             | b             | 48.87  | 河北           | 周麦 20          | b             | b             | 25.53  | 河南           |
| 良星 99          | b             | b             | 30.93  | 河北           | 周麦 22          | b             | b             | 25.72  | 河南           |
| 轮选 061         | b             | a             | 23.11  | 河北           | 周麦 23          | b             | b             | 26.73  | 河南           |

“a”表示基因型 *Ppo-A1a* 或 *Ppo-D1a*; “b”表示基因型 *Ppo-A1b* 或 *Ppo-D1b*

“a” represents genotype *Ppo-A1a* or *Ppo-D1a*; “b” represents genotype *Ppo-A1b* or *Ppo-D1b*

表 2 鉴定不同位点 PPO 基因型所需引物一览表

Table 2 Primers for identification of different PPO alleles

| 标记<br>Marker | 引物序列(5'-3')  | 扩增片段(bp) | 目标等位变异<br>Targeted allele | 参考文献<br>Reference |
|--------------|--|----------|---------------------------|-------------------|
| <i>PPO18</i> | F: AACTGCTGGCTCTTCTCCCA<br>R: AAGAAGTTGCCCATGTCCGC | 685/876  | <i>Ppo-A1a/Ppo-A1b</i>    | [13]              |
| <i>PPO16</i> | F: TGCTGACCGACCTTGACTCC<br>R: CTCGTCACCGTCACCCGTAT | 713      | <i>Ppo-D1a</i>            | [14]              |
| <i>PPO29</i> | F: TGAAGCTGCCGGTCATCTAC<br>R: AAGTGGCCCATGTCTCCGC  | 490      | <i>Ppo-D1b</i>            | [14]              |

STS 标记的 PCR 扩增在 MJ Research PTC-200 和 ABI9700 型 PCR 扩增仪上进行。PCR 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 含  $10\times$  PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 50 mmol/L KCl, 1.0% Triton X-100),

1.5 mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , 0.3 mmol/L dNTP, 每条引物 10 pmol/L, 0.5 U *Taq* 酶, 模板 DNA 100 ng。标记 *PPO18* 的 PCR 程序采用步降(Touch down)退火程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 由 68  $^{\circ}\text{C}$  开始

每个循环的退火温度降低 1 °C, 72 °C 延伸 30 s, 以上循环 8 次; 然后 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 循环 35 次; 最后 72 °C 延伸 7 min。标记 *PPO16* 和 *PPO29* 的 PCR 程序同样采用步降温程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 由 66 °C 开始每个循环的退火温度降低 0.3 °C, 退火时间 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。

PCR 扩增产物在含有溴化乙锭 (EB) 的 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离检测, 缓冲液体系为 1 × TBE 的溶液, 180 V 电压电泳 20 min, 在 Alpha Imager HP 凝胶成像系统上扫描成像并存入计算机。

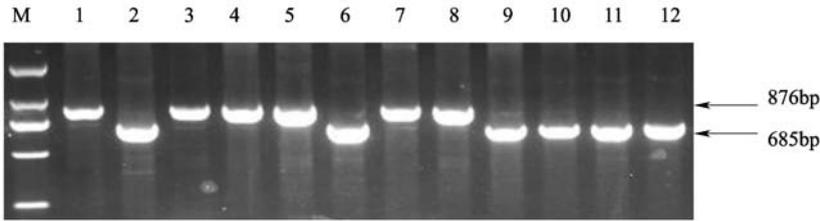
### 1.5 统计分析

利用 Excel 软件进行平均数的计算和差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点基因型的分布及其与 PPO 活性的关系

*PPO18* 标记在检测的 118 份小麦品种中表现出多态性, 在一部分品种中扩增出 685 bp 的片段, 而在另一部分品种中扩增出 876 bp 的片段, 对应的等位变异分别以 *Ppo-A1a* 和 *Ppo-A1b* 表示 (GenBank 注册号分别为 EF070147 和 EF070148) (图 1)。*Ppo-A1* 位点检测结果表明, 在 118 份品种中, 有 57 份属于 *Ppo-A1a* 类型等位基因, 61 份属于 *Ppo-A1b* 类型等位基因, 分别占总数的 48.3% 和 51.7%。*Ppo-A1b* 比 *Ppo-A1a* 出现的频率高 3.4%。



M: DL2000; 1: 济麦 22; 2: 济麦 21; 3: 泰山 22 号; 4: 石麦 18 号; 5: 周麦 22; 6: 聊麦 16; 7: 山农 18; 8: 中育 12; 9: 河农 6049; 10: 豫农 202; 11: 新麦 20; 12: 众麦 998

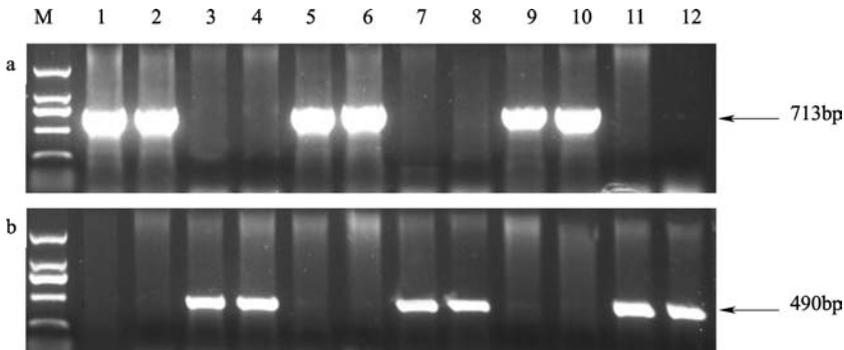
M: DL2000, 1: Jimai 22, 2: Jimai 21, 3: Taishan 22, 4: Shimai 18, 5: Zhoumai 22, 6: Liaomai 16, 7: Shannong 18, 8: Zhongyu 12, 9: Henong 6049, 10: Yunong 202, 11: Xinmai 20, 12: Zhongmai 998

图 1 *PPO18* 特异性标记的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of allele-specific marker *PPO18*

分别采用 *PPO16* 和 *PPO29* 标记对 *Ppo-D1* 位点进行分子检测。118 份材料中, 有 65 份扩增出 713 bp 的特异性条带, 其余 53 份扩增出 490 bp 的特异条带, 说明这 65 份品种为 *Ppo-D1a* 类型 (GenBank 登

录号为 EF070149), 占参试材料总数的 55.1%; 其余 53 份品种为 *Ppo-D1b* 类型 (GenBank 登录号为 EF070150), 占 44.9%。因此, 参试材料中含有 *Ppo-D1a* 基因型的小麦品种比例较高。



M: DL2000; 1: 烟农 23; 2: 鲁原 301; 3: 郑麦 9405; 4: 保麦 9 号; 5: 豫农 201; 6: 洛早 6 号; 7: 石新 733; 8: 冀丰 703; 9: 金麦 54; 10: 藁优 2018; 11: 源育 3 号; 12: 郑麦 98

M: DL2000, 1: Yannong 23, 2: Luyuan 301, 3: Zhengmai 9405, 4: Baomai 9, 5: Yunong 201, 6: Luohan 6, 7: Shixin 733, 8: Jifeng 703, 9: Jinmai 54, 10: Gaoyou 2018, 11: Yuanyu 3, 12: Tanmai 98

图 2 *PPO16* (a) 和 *PPO29* (b) 特异性标记的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of allele-specific markers *PPO16* (a) and *PPO29* (b)

从表 3 可以看出, *Ppo-A1a*、*Ppo-A1b*、*Ppo-D1a* 和 *Ppo-D1b* 基因型的 PPO 活性均值分别为 32.73、27.37、25.77 和 32.78  $\text{g}\cdot\text{min}\cdot 10^3$ , *Ppo-A1a* 和 *Ppo-A1b* 两者之间的差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ ),

*Ppo-D1a* 和 *Ppo-D1b* 两者之间的差异也达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。这表明 *Ppo-A1a* 和 *Ppo-D1b* 是控制高 PPO 活性的基因型,而 *Ppo-A1b* 和 *Ppo-D1a* 是控制低 PPO 活性的基因型。

表 3 PPO 基因型在黄淮麦区的频率分布

Table 3 Frequency of PPO haplotypes in wheat cultivars surveyed from Huanghuai wheat region

| 基因型            | 样品数        | 频率 (%)    | 籽粒 PPO 活性 ( $\text{g}\cdot\text{min}\cdot 10^3$ ) | 标准差   | 变异范围 (%)        |
|----------------|------------|-----------|---|-------|-----------------|
| Haplotype      | Sample No. | Frequency | Grain PPO activity                                | SD    | Variation range |
| <i>Ppo-A1a</i> | 57         | 48.3      | 32.73a  | 6.59  | 15.46 ~ 43.99   |
| <i>Ppo-A1b</i> | 61         | 51.7      | 27.37b  | 10.77 | 8.46 ~ 50.51    |
| <i>Ppo-D1a</i> | 65         | 55.1      | 25.77b  | 9.71  | 8.46 ~ 43.99    |
| <i>Ppo-D1b</i> | 53         | 44.9      | 32.78a  | 9.08  | 12.68 ~ 50.51   |

不同字母表示差异达 0.05 显著水平,下同

Different letters indicate significant differences at the 0.05 probability level, the same as below

## 2.2 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点等位变异组合分布及其与 PPO 活性的关系

在普通小麦中,控制 PPO 活性的 2 个主效基因位点 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 存在 4 种不同的等位变异组合类型。在检测的 118 份小麦品种中,不同组合类型的总体分布比例如表 4。其中低 PPO 活性组合 *Ppo-A1b/Ppo-D1a* 有 31 份,占样品总数的 26.3%;高 PPO 活性组合 *Ppo-A1a/Ppo-D1b* 有 23 份,占样品总数的 19.5%。中间型 PPO 活性组合 *Ppo-A1a/Ppo-D1a* 和 *Ppo-A1b/Ppo-D1b* 各有 34 份和 30 份,分别占总数的

28.8% 和 25.4%。可以看出,检测的小麦品种以中间型 PPO 活性类型为主,比例为 54.2%。

从表 4 可以看出,4 种不同的等位变异组合 *Ppo-A1a/Ppo-D1a*、*Ppo-A1a/Ppo-D1b*、*Ppo-A1b/Ppo-D1a* 和 *Ppo-A1b/Ppo-D1b* 的 PPO 活性均值分别为 32.73、40.62、18.13 和 26.77  $\text{g}\cdot\text{min}\cdot 10^3$ ,其中任意两种类型 PPO 活性之间差异均达到显著水平 ( $P < 0.05$ ),这表明 *Ppo-A1b/Ppo-D1a* 组合控制低 PPO 活性,*Ppo-A1a/Ppo-D1b* 组合控制高 PPO 活性,*Ppo-A1b/Ppo-D1b* 和 *Ppo-A1a/Ppo-D1a* 两种组合控制中等 PPO 活性。

表 4 PPO 活性基因不同等位变异组合在黄淮麦区小麦材料中的分布

Table 4 Frequency of PPO allelic combination in wheat cultivars surveyed from Huanghuai wheat region

| 等位变异组合                 | 样品数        | 频率 (%)    | 籽粒 PPO 活性 ( $\text{g}\cdot\text{min}\cdot 10^3$ ) | 标准差  | 变异范围 (%)        |
|------------------------|------------|-----------|---|------|-----------------|
| Allelic combination    | Sample No. | Frequency | Grain PPO activity                                | SD   | Variation range |
| <i>Ppo-A1a/Ppo-D1a</i> | 34         | 28.8      | 32.73b  | 6.59 | 15.46 ~ 43.99   |
| <i>Ppo-A1a/Ppo-D1b</i> | 23         | 19.5      | 40.62a  | 6.17 | 27.46 ~ 50.51   |
| <i>Ppo-A1b/Ppo-D1a</i> | 31         | 26.3      | 18.13d  | 6.16 | 8.46 ~ 39.46    |
| <i>Ppo-A1b/Ppo-D1b</i> | 30         | 25.4      | 26.77c  | 5.73 | 12.68 ~ 38.42   |

## 2.3 不同地区小麦品种 PPO 活性差异及其基因分布规律

所调查的黄淮麦区小麦品种中,不同省份之间小麦的 PPO 基因型的分布情况也不相同(表 5)。选用的山东小麦品种中,单一基因型分布频率的大小顺序:*Ppo-D1b* (64.5%) > *Ppo-A1b* (61.3%) > *Ppo-A1a* (38.7%) > *Ppo-D1a* (35.5%),等位变异组合分布频率的大小顺序:*Ppo-A1b/Ppo-D1b* (中间型 PPO 活性) > *Ppo-A1a/Ppo-D1b* (高 PPO 活性) > *Ppo-A1b/Ppo-D1a* (低 PPO 活性) > *Ppo-A1a/Ppo-D1a* (中间型 PPO 活性)。

所调查的河北小麦品种中,单一基因型分布频率的大小顺序:*Ppo-D1a* (64.4%) > *Ppo-A1a* (55.6%) > *Ppo-A1b* (44.4%) > *Ppo-D1b* (35.6%),等位变异组合分

布频率的大小顺序:*Ppo-A1a/Ppo-D1a* (中间型 PPO 活性) > *Ppo-A1b/Ppo-D1a* (低 PPO 活性) > *Ppo-A1b/Ppo-D1b* (中间型 PPO 活性)  $\geq$  *Ppo-A1a/Ppo-D1b* (高 PPO 活性)。

在河南小麦品种中,单一基因型分布频率的大小顺序:*Ppo-A1a* (71.4%) > *Ppo-D1a* (59.5%) > *Ppo-D1b* (40.5%) > *Ppo-A1b* (28.6%),等位变异组合分布频率的大小顺序:*Ppo-A1a/Ppo-D1a* (中间型 PPO 活性) > *Ppo-A1b/Ppo-D1b* (中间型 PPO 活性) > *Ppo-A1b/Ppo-D1a* (低 PPO 活性) > *Ppo-A1b/Ppo-D1b* (中间型 PPO 活性) > *Ppo-A1a/Ppo-D1b* (高 PPO 活性)。

低 PPO 活性组合 *Ppo-A1b/Ppo-D1a* 在山东、河北、河南的分布频率分别为 29%、26.6%、23.8%。

表 5 PPO 活性基因不同等位变异组合在黄淮麦区不同省份的分布

Table 5 Frequency of PPO allelic combination in different provinces of Huanghuai wheat region

| 省份<br>Province | 样品数<br>Sample<br>No. | 频率(%) Frequency |                |                |                |                             |                             |                             |                             |
|----------------|----------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                |                      | <i>Ppo-A1a</i>  | <i>Ppo-A1b</i> | <i>Ppo-D1a</i> | <i>Ppo-D1b</i> | <i>Ppo-A1a/<br/>Ppo-D1a</i> | <i>Ppo-A1a/<br/>Ppo-D1b</i> | <i>Ppo-A1b/<br/>Ppo-D1a</i> | <i>Ppo-A1b/<br/>Ppo-D1b</i> |
| 山东 Shandong    | 31                   | 38.7            | 61.3           | 35.5           | 64.5           | 6.5                         | 32.2                        | 29.0                        | 32.3                        |
| 河北 Hebei       | 42                   | 55.6            | 44.4           | 64.4           | 35.6           | 37.8                        | 17.8                        | 26.6                        | 17.8                        |
| 河南 Henan       | 45                   | 71.4            | 28.6           | 59.5           | 40.5           | 35.7                        | 11.9                        | 23.8                        | 28.6                        |

### 3 讨论

黄淮麦区小麦品种中 *Ppo-A1b* (低 PPO 活性) 和 *Ppo-D1a* (低 PPO 活性) 基因型分布频率较高, 分别为 51.7% 和 55.1%。这与肖永贵等<sup>[15]</sup> 和王欣等<sup>[23]</sup> 的研究结果基本一致。在黄淮麦区中, 不同省份之间的 PPO 活性基因的分布情况也有很大差异。其中, 高 PPO 活性特征的 *Ppo-D1b* 基因型在山东小麦中的分布频率较高(64.5%), 而高 PPO 活性特征的 *Ppo-A1a* 基因型在河南小麦中的分布频率较高(71.4%)。不同 PPO 基因型组合中, 所调查 3 个省份均表现出中间类型 PPO 基因型组合占有最高比例, 因而在以小麦颜色性状为主要目标的品质育种中, 应重点考虑不同 PPO 基因型带来的影响。本研究也筛选出了一批 PPO 活性相对较低的品种, 如济麦 19 (鲁麦 13/临汾 5064)、黑马 1 号(76597 辐射诱变)、洛麦 23 (豫麦 18/淮阴 9628)、多丰 2000 (肥 48/113)、济宁 12(8261/755\_1) 和烟农 23 (烟 1061/鲁麦 14) 等 31 份具有 *Ppo-A1b/Ppo-D1a* 基因型组合的材料(表 1), 在综合考虑其他农艺性状的情况下, 可作为杂交亲本有选择的加以利用。

PPO 活性的测定方法很多, 其中较为常用的有邻苯二酚法和 L-DOPA 法。对于测定的对象也不同, 有的用小麦子粒进行测定<sup>[15,21]</sup>, 有的用小麦全粉或面粉进行测定<sup>[24-26]</sup>, 从而导致同一品种在不同研究中表型间有较大差异。本研究采用 L-DOPA 法测量小麦子粒 PPO 活性, 该方法已被美国谷物化学协会(AACC, american association of cereal chemists)作为标准方法所采用。通过对参试小麦材料 PPO 活性的测定结果可以看出, 低 PPO 活性组合 *Ppo-A1b/Ppo-D1a* 中也有活性值高达 39.46 的材料, 这比高 PPO 活性组合 *Ppo-A1a/Ppo-D1b* 中的最低活性值 27.46 还要高, 造成这种现象的原因, 笔者认为主要有以下几点:(1) 微效基因所致, T. Demeke 等<sup>[8]</sup> 和 J. Udall<sup>[9]</sup> 认为 2B、3B、3D、6B 和 7D 染色体上也存在一些微效

基因影响 PPO 活性; 另外, 如 H. Q. Si 等<sup>[18]</sup> 发现 *PPO-B1* 位点变异对子粒 PPO 活性也具有重要影响, 还开发了相应的功能性分子标记。(2) 环境因素所致, 葛秀秀等<sup>[6]</sup> 认为环境对 PPO 活性的影响为 11.2%; (3) 其他因素的影响, 穗发芽、子粒大小、子粒完熟程度、子粒颜色等因素也都能够影响 PPO 活性<sup>[27-30]</sup>。

在过去的几年中, 功能标记的开发与应用已成为小麦分子育种的重要方向<sup>[31]</sup>。功能标记位于基因内部的功能区, 该功能区内的序列多态性直接与表型相关, 这就使功能标记与标记的性状完全共分离, 可在不同的群体中直接应用。因此, 基因功能性标记能够准确的鉴定期望性状的等位基因, 可大大提高分子标记选择辅助(MAS, marker-assisted selection)的效率和准确度。目前许多新的小麦功能标记已经开发出来, 其中部分功能标记已经在作物遗传改良中得到广泛应用。本试验利用的分子标记 *PPO18*、*PPO16* 和 *PPO29* 是依据小麦第 2 同源群染色体 *Ppo-A1* 或 *Ppo-D1* 基因序列开发的功能标记, 与目标基因共分离, 稳定性好, 能够准确鉴定出 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 的等位基因变异类型, 可直接作为 PPO 活性基因分子标记辅助选择的有效工具。

### 参考文献

- [1] Simeone R, Pasqualone A, Clodoveo M L, et al. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat[J]. Cell Mol Biology Letters, 2002, 7: 763-769
- [2] McCallum J A, Walker J R L. O-diphenol oxidase activity, phenolic content and color of new Zealand wheat, flours and milling streams[J]. J Cereal Sci, 1990, 12: 83-96
- [3] Dexter J E, Preston K R, Matsuo R R, et al. Development of a high extraction flour for the GRL Pilot Mill to evaluate Canadian wheat potential for the Chinese market [J]. Can Inst Food Sci Technol J, 1984, 14: 253-259
- [4] Baik B K, Czuchajowska Z, Pomeranz Y. Discoloration of dough for oriental noodles[J]. Cereal Chemistry, 1995, 72: 198-205
- [5] Fuerst E P, Anderson J V, Morris C F. Delineating the role of polyphenol oxidase in the darkening of alkaline wheat noodles [J]. J Agriculture Food Chemistry, 2006, 54: 2378-2384
- [6] 葛秀秀, 张立平, 何中虎, 等. 冬小麦 PPO 活性的主基因 + 多基因混合遗传分析[J]. 作物学报, 2004, 30(1): 18-20
- [7] Jimenez M, Dubcovsky J. Chromosome location of genes affecting polyphenol oxidase activity in seeds of common and durum wheat

- [J]. *Plant Breeding*, 1999, 118; 395-398
- [8] Demeke T, Morris C F, Campbell K G, et al. Wheat polyphenol oxidase; distribution and genetic mapping in three inbred line populations[J]. *Crop Sci*, 2001, 41; 1750-1757
- [9] Udall J. Important alleles for noodle quality in winter wheat as identified by molecular markers[D]. M S. Thesis, University of Idaho, Moscow, ID, 1997
- [10] Raman R, Raman H, Johnstone K, et al. Genetic and silico comparative mapping of the polyphenol oxidase gene in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Funct Integr Genomic*, 2005, 5; 185-200
- [11] 张立平, 葛秀秀, 何中虎, 等. 普通小麦多酚氧化酶活性的 QTL 分析[J]. *作物学报*, 2005, 31(1): 7-10
- [12] 陈锋, 左爱辉, 崔党群. 小麦籽粒多酚氧化酶及其控制基因研究进展[J]. *麦类作物学报*, 2011, 31(4): 780-785
- [13] Sun D J, He Z H, Xia X C, et al. A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat[J]. *Molecular Breeding*, 2005, 16; 209-218
- [14] He X Y, He Z H, Zhang L P, et al. Allelic variation of polyphenol oxidase (*PPO*) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the *PPO* genes in common wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115; 47-58
- [15] 肖永贵, 何心尧, 刘建军, 等. 中国冬小麦品种中多酚氧化酶活性基因等位变异检测及其分布规律研究[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(4): 954-960
- [16] 叶石, 张影全, 张晓科, 等. 渭北旱原冬小麦籽粒 PPO 活性和 YP 含量基因型的分子检测[J]. *西北农业学报*, 2010, 19(8): 44-49
- [17] 王亮, 穆培源, 徐红军, 等. 新疆小麦品种中多酚氧化酶 (*PPO*) 活性基因等位变异的分布[J]. *麦类作物学报*, 2008, 28(5): 766-771
- [18] Si H Q, Zhou Z L, Wang X B, et al. A novel molecular marker for the polyphenol oxidase gene located on chromosome 2B in common wheat [J]. *Mol Breeding*, 2012, 30; 1371-1378
- [19] 詹克慧, 王林海, 程西永, 等. 黄淮麦区部分小麦种质资源的遗传差异分析[J]. *农业生物技术学*, 2006, 14(4): 578-584
- [20] Anderson J V, Morris C F. An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity [J]. *Crop Sci*, 2001, 41; 1697-1705
- [21] 左爱辉, 陈锋, 尚晓丽, 等. 河南小麦新品种 (系) 的多酚氧化酶基因等位变异 [J]. *麦类作物学报*, 2012, 32(6): 1072-1078
- [22] Chen F, Xu H X, Zhang F Y, et al. Physical mapping of puroindoline b-2 genes and molecular characterization of a novel variant in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) [J]. *Mol Breeding*, 2011, 28; 153-161
- [23] 王欣, 窦秉德, 叶建, 等. 小麦品种面粉色泽相关 PPO 基因的多态性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(4): 594-600
- [24] 何克勤, 马传喜, 王晓波, 等. 小麦低多酚氧化酶活性品种资源的筛选[J]. *麦类作物学报*, 2007, 27(4): 603-606
- [25] 葛秀秀, 何中虎, 杨金, 等. 我国冬小麦品种多酚氧化酶活性的遗传变异及其与品质性状的相关分析 [J]. *作物学报*, 2003, 29(3): 481-485
- [26] 陆成彬, 程顺和, 张伯桥. 基因型和地点对小麦品种面粉多酚氧化酶活性的影响研究[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(1): 13-16
- [27] Demeke T, Change H G, Morris C F. Effect of germination, seed abrasion and seed size on polyphenol oxidase activity in wheat [J]. *Plant Breeding*, 2001, 120; 369-373
- [28] 胡瑞波, 田纪春. 小麦多酚氧化酶研究进展[J]. *麦类作物学报*, 2004, 24(1): 81-85
- [29] Taneja S R, Abrol Y P, Sachar R C. Modulation of o-diphenolase and monophenolase enzymes during wheat grain development [J]. *Cereal Chem*, 1974, 51; 457-465
- [30] McCaig T N, Fenn D Y K, Knox R E, et al. Measuring polyphenol oxidase activity in a wheat breeding program [J]. *Can J Plant Sci*, 1999, 79; 507-514
- [31] Bagge M, Xia X C, Lobberstedt T. Functional marker in wheat [J]. *Curt Opin Plant Biol*, 2007, 10; 211-216

## 欢迎订阅 2014 年《分子植物育种》

《分子植物育种》(ISSN1672-416X, CN46-1068/S)是由海南省科学技术协会主管,海南省生物工程协会主办,公开发行科学期刊。

本刊是中国科技核心期刊、全国中文核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊。围绕水稻、小麦、玉米、油菜、大豆、棉麻、薯类、果树、蔬菜、花卉、茶叶、林草等,刊登分子遗传育种理论、分子育种方法、分子育种研究动态以及优良种质培育等方面的科学论文报道。

双月刊,单月 28 日出版,国内定价:¥40.00/期,¥240.00/年;国际定价:\$40.00/期,\$240.00/年。国内统一刊号:CN46-1068/S,国际标准刊号:ISSN1672-416X,邮发代号:84-23。订户可到当地邮局订阅,或直接汇款至编辑部,免收邮费。

### 银行汇款

开户银行:中国农业银行海口市海秀支行 开户帐号:21 16000 10400 23776

单位名称:海南省生物工程协会

### 邮局汇款

地址:(570206)海南省海口市海秀大道 128 号双岛公寓 13B 室

收款单位:海南省生物工程协会

联系电话:0898-68966415

传真:0898-68958180

E-mail:mpb@sophiapublisher.com;mpb@hibio.org

网址:http://www.molplantbreed.org