

蔡 瑾, 杨继书, 翟文玲, 等. 长江中下游麦区小麦低多酚氧化酶活性种质的初步鉴定[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(3): 545-554.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.03.001

长江中下游麦区小麦低多酚氧化酶活性种质的初步鉴定

蔡 瑾, 杨继书, 翟文玲, 付必胜, 张巧凤, 吴纪中

(江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 选取 145 份长江中下游麦区小麦种质以及 1 份美国种质和 1 份意大利种质进行籽粒多酚氧化酶 (*PPO*) 活性分析及 2 个主效基因等位研究。结果表明长江中下游麦区种质间籽粒 *PPO* 活性差异明显, 具有很大的遗传改良潜力; 运用 2 个 *PPO* 活性主效基因的功能标记检测上述 147 份种质, 发现 4 种基因型 *PPO* 活性均值大小顺序为: Ppo-D1aPpo-D1aPpo-A1bPpo-A1b (L1L1L2L2) < Ppo-D1bPpo-D1bPpo-A1bPpo-A1b (H1H1L2L2) < Ppo-D1aPpo-D1aPpo-A1aPpo-A1a (L1L1H2H2) < Ppo-D1bPpo-D1bPpo-A1aPpo-A1a (H1H1H2H2)。基因型为 L1L1L2L2 的种质在长江中下游麦区各省份的分布频率不同, 其中在湖北省的分布频率最低, 其小麦品质改良应加强对低 *PPO* 活性的选育。通过分析, 最终筛选出了 IDO580、宁麦 69、阿夫、宁麦 9 号、扬辐麦 2054、宁麦 13 和农丰 88 等 13 份基因型为 L1L1L2L2 的低 *PPO* 活性小麦种质。

关键词: 小麦; 多酚氧化酶活性; 种质资源

中图分类号: S512.102.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2021)03-0545-10

Preliminary identification of wheat germplasm with low polyphenol oxidase activity in the wheat region of the middle and lower reaches of Yangtze River valley

CAI Jin, YANG Ji-shu, ZHAI Wen-ling, FU Bi-sheng, ZHANG Qiao-feng, WU Ji-zhong

(*Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*)

Abstract: 145 wheat germplasms of the wheat region in the middle and lower reaches of the Yangtze River, an American germplasm and an Italian germplasm were selected for the analysis of grain polyphenol oxidase (*PPO*) activity and the study of two allelic variation of major genes. The results showed that, the grain *PPO* activities between different wheat germplasms of the wheat region in the middle and lower reaches of the Yangtze River varied obviously and had great potential in genetic improvement. After detecting the above 147 germplasms by two functional markers of major genes related to *PPO* activity, average *PPO* activities of four genotypes showed the following order: Ppo-D1aPpo-D1aPpo-A1bPpo-A1b (L1L1L2L2) < Ppo-D1bPpo-D1bPpo-A1bPpo-A1b (H1H1L2L2) < Ppo-D1aPpo-D1aPpo-A1aPpo-A1a (L1L1H2H2) < Ppo-D1bPpo-D1bPpo-A1aPpo-A1a (H1H1H2H2). The distribution frequencies of germplasm with L1L2 genotype in different provinces of the middle and lower reaches of the Yangtze River varied a lot. Among them, the distribution frequency in Hubei province was the lowest, so more efforts should be made in breeding wheat with low *PPO* activity during the quality improvement of the area. Finally, thirteen wheat germplasms with low *PPO* activity and L1L1L2L2 genotype were screened

out, including IDO580, Ningmaizi 69, Funo, Ningmai 9, Yangfumai 2054, Ningmai 13 and Nongfeng 88, etc.

Key words: wheat; polyphenol oxidase activity; germplasm

收稿日期: 2020-09-04

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20170596); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(18) 1001]

作者简介: 蔡 瑾(1985-), 女, 江苏南京人, 博士, 助理研究员, 研究方向为小麦种质资源等。(E-mail) caijin@ jaas.ac.cn

通讯作者: 吴纪中, (E-mail) wujz@ jaas.ac.cn

小麦面粉及面制品白度是小麦品质改良的重要

评价指标。在面粉贮藏与面制品加工过程中,褐变现象非常普遍。褐变不仅会降低面粉或面制品的白度,而且会影响其营养价值^[1]。小麦籽粒中高含量多酚氧化酶(*PPO*)是引起面团酶促褐变的主要原因^[2]。在有氧条件下,*PPO*能够催化酚类底物形成醌,醌在植物体中进一步氧化聚合生成褐色色素,从而导致面团褐变^[2-3]。小麦籽粒中*PPO*活性可以解释面团色泽稳定性的50%~70%^[4]。因此,通过遗传育种途径降低*PPO*活性,对提升小麦面粉白度、保障食品安全具有重要意义。

小麦籽粒*PPO*活性是多基因控制的数量性状^[5-6]。前人通过对多个不同遗传群体以及基因表达分析发现,控制小麦籽粒*PPO*活性的主效基因位于第2部分同源群染色体上,且2A染色体长臂(2AL)上的*Ppo-A1*对小麦籽粒*PPO*活性的影响要大于2D染色体长臂(2DL)上的*Ppo-D1*^[7-12]。同时,在其他染色体(例如3B、3D、4B和6B)上也定位到一些微效基因^[8-9,13-16]。国内外多位研究者报道了与*PPO*活性紧密连锁的分子标记。早在2005年,Raman等^[9]利用小麦Chara/WW2449 DH(Double Haploid)群体鉴定出2AL上控制*PPO*活性的主效QTL的3个SSR标记,*Xgwm294*、*Xwmc170*和*Xgwm312*。Sun等^[11]依据2A上*PPO*基因的DNA序列设计了STS标记*PP018*,其685 bp(*Ppo-A1a*)扩增条带对应高*PPO*活性,而876 bp(*Ppo-A1b*)对应低*PPO*活性,这个标记被认为是检测*Ppo-A1*基因的有效标记。He等^[17]运用*Ppo-D1*基因的2个等位变异分别开发了互补显性STS标记*PP016*和*PP029*。王小波等^[18]又运用2D上小麦籽粒*PPO* mRNA序列(AY15506)开发了功能标记*STS01*,可以作为*PP016*的替代标记。近年来开发的与小麦籽粒*PPO*活性相关的功能标记还有位于2A上的*PP005*^[19]、*PP030*和*PP033*^[17]、*F4*^[20]、*WPP0-1*^[21]和*PP08*^[22],位于2B上的*F8*^[23]、*MG8*和*MG3*^[24],以及位于2D上的*PP043*^[17]和*WPP0-2*^[21]。其中,*Ppo-A1*基因的功能性标记*PP018*,*Ppo-D1*基因的功能性标记*STS01*与*PP016*、*PP029*可靠、实用、高效,广泛应用于小麦分子标记辅助选择育种。

中国科研人员从本世纪初开始进行低*PPO*活性小麦种质资源的鉴定工作^[21,25-27]。中国当前大面积推广品种的*PPO*活性普遍偏高,而低*PPO*活性种质严重缺乏,因此,低*PPO*活性种质的鉴定是新

*PPO*基因发掘和低*PPO*活性小麦育种的前提与关键。目前,国内外众多学者已经鉴定出宁麦9号、CA9632、Funo、Lolo等一批低*PPO*活性的小麦种质^[13,27-31]。本单位引自美国Idaho州农业试验站的小麦种质IDO580籽粒*PPO*活性极低,比美国低*PPO*活性品种IDO377s、Lolo以及Jefferson低50%以上^[32-33]。但是,前人对低*PPO*活性种质资源的筛选工作大多针对中国北方麦区或全国多个麦区的比较。本研究致力于对长江中下游麦区种质资源进行筛选,进一步发掘长江中下游麦区的低*PPO*活性小麦种质,为该麦区以及全国低*PPO*活性小麦育种提供新的亲本资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

参试材料共147份,包括长江中下游麦区各地收集的小麦种质145份以及1份美国种质和1份意大利种质(表1),由江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所有种质资源评价与创新研究室保存与提供。

1.2 田间种植

147份参试材料种植于江苏省农业科学院六合试验基地,播种时间为2019年10月25日。每个材料种植5行,点播,行距0.25 m,行长2 m,每行均匀播种40粒,出苗后保证每行密度相同,田间管理同大田。

1.3 DNA提取及功能标记检测

基因组DNA的提取参照Saghai-Maroo等^[34]的CTAB提取法。采用中国农业科学院作物科学研究所开发的*Ppo-A1*基因功能性标记*PP018*^[11]、*Ppo-D1*基因功能性标记*PP016*^[17]和安徽农业大学开发的*Ppo-D1*基因功能性标记*STS01*^[18]标记序列及扩增条件。所有引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 小麦籽粒*PPO*活性检测

采用多巴(*L*-DOPA/MOPS)为底物,*PPO*催化*L*-DOPA形成醌类物质,进而引起褐变。活性测定按照Anderson等^[14]的方法,并略作修改。反应底物为现配的10 mmol/L *L*-DOPA(*L*-3,4-Dihydroxyphenylalanine, Sigma-Aldrich Co.)与50 mmol/L MOPS[3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid, Sigma-Aldrich Co.]缓冲液(pH6.5)。对每份材料设8个重复和1个空白对照,选取无破损、无病害的籽粒,称质量后放入酶标板中,每孔加入上述反应底物15 μ l。在37 $^{\circ}$ C条件下匀速振荡60 min后(100

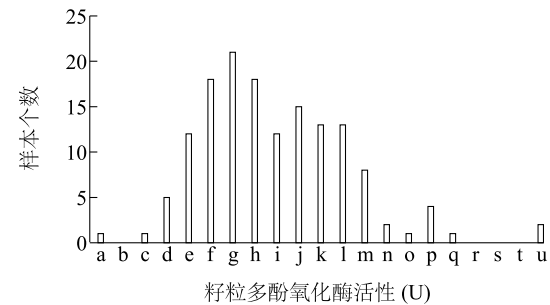
r/min),在 EPOCH 微孔板分光光度计 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) 475 nm 处读取其吸光值。*PPO* 活性值为 $\Delta A/(60 \times m \times 10^{-3})$, 其中 ΔA 为样品吸光值与空白吸光值的差值, 60 为反应时间 60 min, m 表示单粒种子的质量 (g)。数据处理及分析采用 Excel 和 SAS9.2 软件。

2 结果与分析

2.1 小麦种质间 *PPO* 活性的变异

参照 Anderson 等^[14] 方法对 145 份长江中下游麦区种质以及 1 份美国种质和 1 份意大利种质籽粒 *PPO* 活性进行了检测。结果表明, 上述材料的籽粒 *PPO* 活性分布广泛 (表 1、图 1), 变幅在 4.56 U 到 208.98 U 之间, 平均 *PPO* 活性为 84.23 U, 最高、最低 *PPO* 活性相差 45.8 倍, 高于平均数的种质 68 份, 低于平均数的种质 79 份, 总体呈正态分布, 峰值略偏向低 *PPO* 活性端。方差分析结果表明 *PPO* 活性在种质间的差异极显著 ($P < 0.0001$), 而各个种

质重复之间的差异不显著 (表 2), 说明该 147 份参试材料 *PPO* 活性的表型变异较为明显, 而各种质重复之间的一致性较好。



a: 0~10.0; b: 10.1~20.0; c: 20.1~30.0; d: 30.1~40.0; e: 40.1~50.0; f: 50.1~60.0; g: 60.1~70.0; h: 70.1~80.0; i: 80.1~90.0; j: 90.1~100.0; k: 100.1~110.0; l: 110.1~120.0; m: 120.1~130.0; n: 130.1~140.0; o: 140.1~150.0; p: 150.1~160.0; q: 160.1~170.0; r: 170.1~180.0; s: 180.1~190.0; t: 190.1~200.0; u: 200.1~210.0。

图1 参试小麦材料多酚氧化酶 (*PPO*) 活性频率分布图

Fig.1 Frequency distribution of polyphenol oxidase (*PPO*) activity in wheat varieties tested

表 1 长江中下游麦区小麦种质低 *PPO* 活性基因型

Table 1 Low *PPO* activity genotypes of wheat varieties in the middle and lower reaches of the Yangtze River

种质	来源	基因型	<i>PPO</i> 活性 (U)	标准差	种质	来源	基因型	<i>PPO</i> 活性 (U)	标准差
IDO580	美国	L1L1L2L2	4.56	1.09	徽红 225	安徽	L1L1H2H2	96.65	25.86
阿夫	意大利	L1L1L2L2	35.58	8.39	鄂麦 251	湖北	L1L1H2H2	92.02	21.17
安徽 11	安徽	L1L1L2L2	59.73	6.28	华 2720	湖北	L1L1H2H2	104.27	14.54
鄂麦 16	湖北	L1L1L2L2	45.56	11.98	鄂麦 11	湖北	L1L1H2H2	104.31	23.50
鄂恩 1 号	湖北	L1L1L2L2	48.87	10.91	鄂麦 9 号	湖北	L1L1H2H2	104.41	22.73
鄂麦 25	湖北	L1L1L2L2	55.73	7.57	鄂麦 18	湖北	L1L1H2H2	124.21	32.35
鄂麦 27	湖北	L1L1L2L2	62.78	14.10	华麦 2566	湖北	L1L1H2H2	150.60	25.03
鄂麦 22	湖北	L1L1L2L2	63.52	7.77	江东门	江苏	L1L1H2H2	39.49	14.42
鄂麦 19	湖北	L1L1L2L2	64.17	15.11	望麦 15	江苏	L1L1H2H2	56.41	14.91
湘 M 友	湖南	L1L1L2L2	70.12	15.69	宁麦 6 号	江苏	L1L1H2H2	66.99	15.59
湘 1629	湖南	L1L1L2L2	93.29	15.45	扬麦 15	江苏	L1L1H2H2	69.84	14.07
宁麦资 69	江苏	L1L1L2L2	23.67	3.62	扬麦 12	江苏	L1L1H2H2	79.21	15.10
宁麦 9 号	江苏	L1L1L2L2	36.05	10.25	镇麦 6 号	江苏	L1L1H2H2	84.07	18.65
扬辐麦 2054	江苏	L1L1L2L2	38.22	9.20	镇 10126	江苏	L1L1H2H2	85.07	16.06
宁麦 13	江苏	L1L1L2L2	39.26	7.27	明麦 16	江苏	L1L1H2H2	85.93	17.72
农丰 88	江苏	L1L1L2L2	42.85	9.28	扬麦 25	江苏	L1L1H2H2	87.29	24.02
扬 12-125	江苏	L1L1L2L2	47.69	6.97	扬麦 10 号	江苏	L1L1H2H2	92.85	24.83
镇麦 8 号	江苏	L1L1L2L2	49.14	9.86	扬麦 11	江苏	L1L1H2H2	94.16	23.31
南农 13Y137	江苏	L1L1L2L2	50.15	9.77	扬 85-85	江苏	L1L1H2H2	94.35	24.31

续表1 Continued1

种质	来源	基因型	PPO 活性 (U)	标准差	种质	来源	基因型	PPO 活性 (U)	标准差
扬辐麦 2166	江苏	L1L1L2L2	51.19	7.13	隆麦 28	江苏	L1L1H2H2	98.14	19.97
扬麦 27	江苏	L1L1L2L2	51.68	9.81	扬麦 14	江苏	L1L1H2H2	102.20	24.72
NMAS020	江苏	L1L1L2L2	54.08	12.61	扬麦 13	江苏	L1L1H2H2	107.90	12.14
扬麦 22	江苏	L1L1L2L2	55.88	13.86	扬麦 21	江苏	L1L1H2H2	115.95	10.14
明麦 133	江苏	L1L1L2L2	55.99	7.41	扬麦 158	江苏	L1L1H2H2	119.39	35.08
扬麦 19	江苏	L1L1L2L2	56.23	6.33	扬麦 2 号	江苏	L1L1H2H2	124.07	25.96
矮秆红	江苏	L1L1L2L2	58.33	13.41	扬 11-118	江苏	L1L1H2H2	129.35	33.33
扬麦 18	江苏	L1L1L2L2	59.54	9.66	小紫秆子	安徽	H1H1H2H2	104.22	22.40
扬麦 1 号	江苏	L1L1L2L2	59.85	9.11	鄂麦 15	湖北	H1H1H2H2	60.13	15.20
鉴 37	江苏	L1L1L2L2	62.21	7.45	华麦 13	湖北	H1H1H2H2	71.22	7.08
扬麦 4 号	江苏	L1L1L2L2	62.55	12.84	鄂麦 26	湖北	H1H1H2H2	75.65	9.78
宁麦 3 号	江苏	L1L1L2L2	63.27	13.37	鄂麦 580	湖北	H1H1H2H2	76.20	17.77
矮秆早	江苏	L1L1L2L2	63.72	13.60	鄂麦 596	湖北	H1H1H2H2	97.18	11.89
扬麦 5 号	江苏	L1L1L2L2	66.50	15.08	华麦 12	湖北	H1H1H2H2	97.92	15.23
扬麦 20	江苏	L1L1L2L2	73.63	9.25	华麦 8 号	湖北	H1H1H2H2	100.68	15.65
苏麦 3 号	江苏	L1L1L2L2	113.01	17.95	华麦 9 号	湖北	H1H1H2H2	108.93	19.49
丽麦 16	浙江	L1L1L2L2	48.32	8.71	三月黄选系	湖北	H1H1H2H2	111.57	28.64
九兰	浙江	L1L1L2L2	72.60	11.33	华麦 2668	湖北	H1H1H2H2	119.60	18.98
红和尚头	安徽	H1H1L2L2	67.23	10.30	骡丝麦选系	湖北	H1H1H2H2	161.63	15.25
荆麦 103	湖北	H1H1L2L2	45.90	13.85	铁秆麦选系	湖北	H1H1H2H2	203.76	40.44
华麦 1168	湖北	H1H1L2L2	60.37	10.72	高山小麦选系	湖北	H1H1H2H2	208.98	45.32
鄂麦 17	湖北	H1H1L2L2	71.28	17.80	湘麦 1 号	湖南	H1H1H2H2	48.34	8.00
华矮 01	湖北	H1H1L2L2	75.75	10.86	糯麦	湖南	H1H1H2H2	146.95	36.76
鄂麦 24	湖北	H1H1L2L2	82.66	9.40	华麦 9026	江苏	H1H1H2H2	50.86	27.50
华麦 2152	湖北	H1H1L2L2	111.50	37.53	南农 13Y110	江苏	H1H1H2H2	72.80	18.35
湘 1022	湖南	H1H1L2L2	86.05	19.48	资 0849	江苏	H1H1H2H2	84.91	19.78
扬辐麦 4 号	江苏	H1H1L2L2	44.44	8.64	南大 2419	江苏	H1H1H2H2	85.82	17.11
宁麦资 119	江苏	H1H1L2L2	46.75	14.14	扬 12-126	江苏	H1H1H2H2	97.56	12.32
钟山 3 号	江苏	H1H1L2L2	51.67	10.87	华东 6 号	江苏	H1H1H2H2	106.07	19.15
宁麦资 66	江苏	H1H1L2L2	57.49	8.74	骊英 3 号	江苏	H1H1H2H2	107.99	17.33
宁麦 16	江苏	H1H1L2L2	58.55	9.99	生抗 1 号	江苏	H1H1H2H2	110.03	21.79
生选 6 号	江苏	H1H1L2L2	60.03	14.46	农麦 1 号	江苏	H1H1H2H2	111.45	22.24
宁麦资 67	江苏	H1H1L2L2	62.19	23.75	扬麦 17	江苏	H1H1H2H2	112.00	25.45
宁麦 8 号	江苏	H1H1L2L2	62.70	10.14	镇 7495	江苏	H1H1H2H2	117.08	24.16
扬辐麦 2 号	江苏	H1H1L2L2	63.56	12.16	早熟突变	江苏	H1H1H2H2	118.90	23.19
资 0821	江苏	H1H1L2L2	64.99	10.24	中农 28	江苏	H1H1H2H2	131.42	27.94
镇 12096	江苏	H1H1L2L2	71.00	13.06	华东 3 号	江苏	H1H1H2H2	150.04	57.83
长江 8809	江苏	H1H1L2L2	74.39	16.19	扬麦 16	江苏	H1H1H2H2	151.72	38.75

续表1 Continued1

种质	来源	基因型	PPO 活性 (U)	标准差	种质	来源	基因型	PPO 活性 (U)	标准差
长江 8863	江苏	H1H1L2L2	76.09	16.53	扬麦 23	江苏	H1H1H2H2	152.88	34.75
长江 8866	江苏	H1H1L2L2	76.34	16.09	光明麦 1307	上海	H1H1H2H2	127.38	20.92
宁丰 308	江苏	H1H1L2L2	78.44	17.47	万年 2 号	浙江	H1H1H2H2	68.40	10.46
农丰 118	江苏	H1H1L2L2	80.39	17.10	鄂麦 6 号	湖北		60.22	15.26
黄麦	江苏	H1H1L2L2	88.67	18.09	华 1151	湖北		99.34	13.75
镇麦 9 号	江苏	H1H1L2L2	92.36	21.21	苏夫	湖南		55.47	7.60
宁 7840	江苏	H1H1L2L2	95.91	23.49	农丰 125	江苏		41.65	8.83
镇麦 168	江苏	H1H1L2L2	99.57	14.70	苏麦 198	江苏		47.31	9.66
扬 12G16	江苏	H1H1L2L2	103.53	13.66	扬辐麦 2049	江苏		62.17	13.22
吉利麦	江苏	H1H1L2L2	116.20	13.74	扬辐麦 2330	江苏		70.67	14.54
苏州 8828	江苏	H1H1L2L2	125.33	26.24	望水白	江苏		78.02	15.19
白朝玉	江苏	H1H1L2L2	126.40	20.90	矮苏麦 3 号	江苏		78.47	21.83
苏麦 6 号	江苏	H1H1L2L2	127.85	16.87	华麦 9026	江苏		105.16	27.51
苏麦 2 号	江苏	H1H1L2L2	130.98	25.30	光明麦 1319	上海		100.24	21.04
叶子黄 40	上海	H1H1L2L2	128.59	43.88	剑子麦	浙江		91.89	18.42
软秆洋麦	浙江	H1H1L2L2	114.04	25.97	白蒲(落青)	浙江		100.17	26.40
马场 2 号	安徽	L1L1H2H2	92.28	16.05					

基因型中 *L1* 表示 *Ppo-D1a* 等位基因, *H1* 表示 *Ppo-D1b* 等位基因, *L2* 表示 *Ppo-A1b* 等位基因, *H2* 表示 *Ppo-A1a* 等位基因。鄂麦 6 号、华 1151、苏夫、农丰 125、苏麦 198、扬辐麦 2049、扬辐麦 2330、望水白、矮苏麦 3 号、华麦 9026、光明麦 1319、剑子麦、白蒲(落青)13 份材料未扩增出任何条带,表明这些材料可能为 *Ppo-D1a*、*Ppo-D1b*、*Ppo-A1b*、*Ppo-A1a* 以外的其他等位变异类型。

表 2 不同小麦种质间 PPO 活性差异显著性检验

Table 2 Test for significance difference of polyphenol oxidase(PPO) activity in wheat germplasms tested

变异来源	自由度 (df)	平方和 (SS)	均方 (MS)	F 值	P 值
品种间	146	1 042 774.24	7 142.29	21.83	<0.000 1
重复间	7	2 222.61	317.52	0.97	0.451 5
误差	979	320 362.39	327.23		
总计	1 132	1 365 946.58			

上述 147 份小麦种质的籽粒 PPO 活性差异很大,说明品种具有很大的改良潜力。种质籽粒 PPO 活性整体上呈正态分布,根据 PPO 活性平均值和标准方差(*s*)将 147 份小麦材料分为 5 组。以平均值 84.23 U 为界,PPO 活性小于 17.88 U ($-3s$) 的只有 1 份,为极低 PPO 活性种质;PPO 活性为 17.88~51.05 U ($-2s$) 的有 18 份,为低 PPO 活性种质(表 3)。PPO 活性为 51.06~117.40 U ($-1s\sim+1s$) 的有 108 份,为中等 PPO 活性种质;PPO 活性为 117.41~183.74 U ($+2s\sim+3s$) 的有 18 份,为高 PPO 活性材料;PPO 活性高于 183.74 U ($+4s$) 的种质有 2 份,为

极高 PPO 活性种质(表 3)。

表 3 参试小麦材料 PPO 活性类型的划分

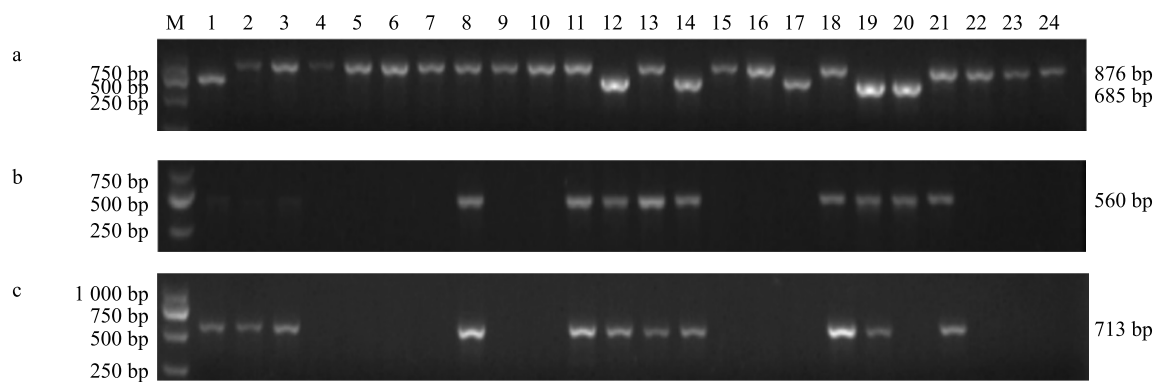
Table 3 Classification of polyphenol oxidase(PPO) activity types of wheat germplasms tested

类型	方差(<i>s</i>)范围	PPO 活性范围 (U)	种质数量
极低 PPO 活性	$-3s$	小于 17.88	1
低 PPO 活性	$-2s$	17.88~51.05	18
中等 PPO 活性	$-1s\sim+1s$	51.06~117.40	108
高 PPO 活性	$+2s\sim+3s$	117.41~183.74	18
极高 PPO 活性	$+4s$	大于 183.74	2

2.2 PPO 基因分子标记检测结果与等位基因分析

利用 *Ppo-A1* 基因的功能标记 *PPO18*^[11] 和 *Ppo-D1* 基因的功能性标记 *STS01*^[18]、*PPO16*^[17] 对 147 份种质进行基因检测。其中, *STS01* (图 2b) 与 *PPO16* (图 2c) 互为替代, 为显性标记。 *STS01* 与 *PPO16* 标记分别在 560 bp 和 713 bp 处扩增出一条低 *PPO* 活性条带的为 *Ppo-D1a* 等位基因, 而无条带扩增的则为 *Ppo-D1b* 等位基因, 分别以 *L1* 和 *H1* 表示; *PPO18* (图 2a) 为共显性标记, 分别扩增 *Ppo-A1b* (876 bp) 和 *Ppo-A1a* (685 bp) 2 种等

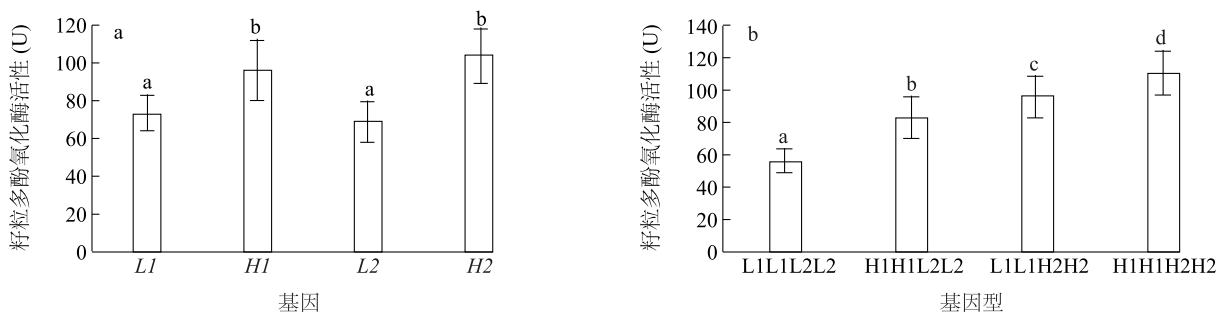
位基因, 分别以 *L2* 和 *H2* 表示。携 *L1* 等位基因的种质 64 份, 平均 *PPO* 活性为 72.83 U, 携 *H1* 等位基因的种质 70 份, 平均 *PPO* 活性为 96.14 U, 方差分析结果表明 2 种类型间差异显著 ($P < 0.05$) (图 3a)。分别携 *L2* 和 *H2* 等位基因的种质为 73 和 61 份, 平均 *PPO* 活性分别为 69.02 U 和 104.13 U, 方差分析结果表明二者差异显著 ($P < 0.05$) (图 3a)。共 13 份材料未扩增出任何条带, 即未含 *Ppo-D1a*、*Ppo-D1b*、*Ppo-A1b*、*Ppo-A1a* 等位基因。



M: DNA ladder 2000; 1: 江东门 (L1H2); 2: ID0580 (L1L2); 3: 宁麦 9 号 (L1L2); 4: 扬辐麦 4 号 (H1L2); 5: 宁麦 16 (H1L2); 6: 宁麦 119 (H1L2); 7: 宁麦 66 (H1L2); 8: 扬麦 20 (L1L2); 9: 生选 6 号 (H1L2); 10: 扬 12G16 (H1L2); 11: 扬辐麦 2054 (L1L2); 12: 扬麦 14 (L1H2); 13: 扬麦 18 (L1L2); 14: 扬麦 21 (L1H2); 15: 鄂麦 17 (H1L2); 16: 宁 7840 (H1L2); 17: 华麦 8 号 (H1H1H2H2); 18: 阿夫 (L1L2); 19: 隆麦 28 (L1H2); 20: 明麦 16 (L1H2); 21: 农丰 88 (L1L2); 22: 荆麦 103 (H1L2); 23: 华麦 2152 (H1L2); 24: 扬辐麦 2 号 (H1L2)。L1、H1、L2、H2 见表 1 注。

图 2 运用功能标记 *PPO18* (a)、*STS01* (b) 和 *PPO16* (c) 检测小麦种质 *PPO* 基因的等位变异

Fig.2 Allelic variation of polyphenol oxidase (*PPO*) genes in wheat germplasms detected by functional markers such as *PPO18* (a), *STS01* (b) and *PPO16* (c)



L1、H1、L2、H2 见表 1 注。不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 3 不同等位基因及基因型小麦种质 *PPO* 活性分布

Fig.3 Distribution of polyphenol oxidase (*PPO*) activities in different alleles and genotype combinations of wheat germplasms tested

通过基因标记对上述小麦种质进行检测, 共出现 L1L1L2L2、L1L1H2H2、H1H1L2L2、H1H1H2H2 4 种基因型。计算不同基因型的 *PPO* 活性均值并进

行多重比较, 结果 (表 4、图 3b) 表明, 不同基因型种质 *PPO* 活性均值的高低顺序为: L1L1L2L2 < H1H1L2L2 < L1L1H2H2 < H1H1H2H2, 其中,

L1L1L2L2 基因型的 *PPO* 活性极显著低于其他 3 种基因型,H1H1L2L2 基因型的 *PPO* 活性极显著低于 L1L1H2H2 和 H1H1H2H2 2 种基因型,H1H1H2H2 基因型的 *PPO* 活性显著高于其他 3 种基因型。说明以 *PP018* 为 *Ppo-A1* 基因的功能标记,以 *STS01* 和 *PP016* 互为替代为 *Ppo-D1* 基因的功能标记,可以有效地进行小麦低 *PPO* 活性种质的分子标记辅助选择。

表 4 不同基因型小麦种质 *PPO* 活性均值

Table 4 Average polyphenol oxidase (*PPO*) activity of wheat germplasms with different genotypes

基因型	品种数	<i>PPO</i> 活性均值	变幅
L1L1L2L2	37	55.66 a	4.56~113.01
H1H1L2L2	36	82.76 b	44.44~130.98
L1L1H2H2	27	96.35 c	39.49~150.60
H1H1H2H2	34	110.30 d	48.34~208.98

L1、*H1*、*L2*、*H2* 见表 1 注。不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.3 小麦种质等位基因的地区分布

对 147 份小麦种质进行了等位基因地区分布分

表 5 参试小麦种质被测等位基因地区分布频率

Table 5 Regional distribution frequency of allele genotypes of wheat germplasms tested

类 型	频率 (%)					
	种质	安徽省	湖北省	湖南省	江苏省	浙江
含 <i>L1</i> 等位基因种质	43.54	60.00	36.36	33.33	46.74	33.33
含 <i>L2</i> 等位基因种质	49.66	40.00	36.36	50.00	54.35	50.00
同时含 <i>L1</i> 和 <i>L2</i> 等位基因种质	25.17	20.00	18.18	33.33	26.09	33.33

L1、*H1*、*L2*、*H2* 见表 1 注。

2.4 小麦低 *PPO* 活性种质资源筛选

在 147 份种质材料中,极低 *PPO* 活性种质 IDO580 的基因型检测为 L1L1L2L2 型,低 *PPO* 活性品种宁麦资 69、阿夫、宁麦 9 号、扬辐麦 2054、宁麦 13、农丰 88、鄂麦 16、鄂恩 1 号和镇麦 8 号等基因型为 L1L1L2L2,极高 *PPO* 活性品系铁秆麦选系和高山麦选系以及高 *PPO* 活性品种华麦 2668、扬麦 16、扬麦 23、光明麦 1307、中农 28 和华东 3 号等基因型为 H1H1H2H2。上述材料,尤其是一些大面积推广的小麦品种 *PPO* 活性差异很大,变异范围广,表明这些品种的改良潜力很大,通过育种途径改善面粉及面制品的颜色褐变现象是可行的。例如,系谱中含有低 *PPO* 活性种质宁麦 9 号的小麦品种宁麦 13、宁麦 16、扬辐麦 4 号、扬辐麦 2166、镇麦 6 号和宁麦

析,种质分别来自湖北、湖南、江苏、上海、浙江、河南和安徽 7 个省(市),2 份种质分别引自美国和意大利。因上海、河南 2 省(市)以及美国和意大利各自的样本量较少(<5 份),本研究不进行比较分析。在 *Ppo-D1* 和 *Ppo-A1* 位点上控制低 *PPO* 活性的等位基因 *L1* 和 *L2*,在供试种质中出现的平均频率分别为 43.54%和 49.66%,后者比前者高 6.12 个百分点。其中,*L1* 等位基因的频率低于相对应控制高 *PPO* 活性的 *H1* 等位基因频率,而 *L2* 等位基因的频率高于 *H2* 等位基因。

在 *Ppo-D1* 和 *Ppo-A1* 位点的 4 种基因型中,L1L1L2L2 的 *PPO* 活性最低,该基因型在湖北、湖南、江苏、浙江和安徽 5 个省份的参试材料中平均出现频率为 26.19%,略高于 4 种基因型类型的平均值 25.00%,其中,湖南省和浙江省的频率最高,为 33.33%,其次是江苏省 26.09%,而湖北省最低,为 18.18%(表 5)。

资 66 等的 *PPO* 活性都相对较低。系谱中含有极低 *PPO* 活性种质 IDO580 的小麦创新种质宁麦资 69 的 *PPO* 活性也极低。本研究筛选出 IDO580、宁麦资 69、阿夫、宁麦 9 号、扬辐麦 2054、宁麦 13 和农丰 88 等 13 份 L1L1L2L2 基因型种质,*PPO* 活性低于 51.05 U,可以为小麦品质育种提供一批低 *PPO* 活性材料(表 6)。

3 讨论

本研究通过对长江中下游麦区种质的 *PPO* 活性分析发现,当前该麦区生产应用的品种 *PPO* 活性差异极大,不同 *PPO* 活性的种质频次分布呈正态分布,峰值略倾向低 *PPO* 活性一端。然而当前大面积推广小麦品种,如镇麦 9 号、扬麦 13、扬麦 21、扬麦

表 6 筛选出的低 *PPO* 活性小麦种质Table 6 Selected wheat gemplasms with low polyphenol oxidase (*PPO*) activity

序号	品种	原产地	基因型	<i>PPO</i> 活性 (U)
1	IDO580	美国	L1L1L2L2	4.56
2	宁麦资 69	江苏省农业科学院	L1L1L2L2	23.67
3	阿夫	意大利	L1L1L2L2	35.58
4	宁麦 9 号	江苏省农业科学院	L1L1L2L2	36.05
5	扬辐麦 2054	江苏里下河地区农业科学研究所	L1L1L2L2	38.22
6	宁麦 13	江苏省农业科学院	L1L1L2L2	39.26
7	农丰 88	江苏神农大丰种业科技有限公司	L1L1L2L2	42.85
8	鄂麦 16	湖北省农业科学院	L1L1L2L2	45.56
9	扬 12-125	江苏里下河地区农业科学研究所	L1L1L2L2	47.69
10	丽麦 16	浙江丽水地区农业科学研究所	L1L1L2L2	48.32
11	鄂恩 1 号	湖北恩施地区农业科学研究所	L1L1L2L2	48.87
12	镇麦 8 号	江苏丘陵地区镇江农业科学研究所	L1L1L2L2	49.14
13	南农 13Y137	南京农业大学	L1L1L2L2	50.15

L1、*H1*、*L2*、*H2* 见表 1 注。

158、鄂麦 9 和鄂麦 11 等品种的 *PPO* 活性较高 (> 100 U), 扬麦 16 和扬麦 23 等品种的 *PPO* 活性则高达 150 U 以上, 说明中国长江中下游麦区当前大面积推广品种的 *PPO* 活性普遍偏高, 急需导入低 *PPO* 活性基因, 进行小麦面粉白度品质的遗传改良。前人报道的低 *PPO* 活性品种宁麦 9 号、阿夫和江东门等均为长江中下游麦区的种质。本研究中鉴定出的宁麦 13、宁麦 16、扬辐麦 4 号、镇麦 6 号、扬辐麦 2166 和宁麦资 66 的 *PPO* 活性相对较低或中等偏低, 它们的系谱中都含有宁麦 9 号, 而宁麦资 69 的系谱中含有引自美国的极低 *PPO* 活性种质 IDO580, 它的 *PPO* 活性仅为 23.67 U。说明种质资源在新品种选育中非常重要。同时也说明有意识地利用低 *PPO* 活性种质可以降低小麦籽粒的 *PPO* 活性。目前, 国内鉴定出的低 *PPO* 活性种质与国外引进的低 *PPO* 活性种质 IDO580 相比, 其 *PPO* 活性普遍要高出 8~9 倍, 因此, 在小麦低多酚氧化酶活性的遗传改良上, IDO580 可能会有更好地利用前景。

本研究运用 *Ppo-A1* 与 *Ppo-D1* 基因的功能标记对 145 份长江中下游麦区小麦种质以及 1 份美国种质和 1 份意大利种质进行检测。结果表明: 携等位基因 *H1* 和 *L1* 种质 *PPO* 活性具有极显著的差异 ($P < 0.0001$), 携等位基因 *H2* 和 *L2* 种质 *PPO* 活性也存在极显著差异 ($P < 0.0001$)。但是, 携等位基因 *Ppo-A1b* (*L2*) 平均 *PPO* 活性 (69.02 U) 要低于携

等位基因 *Ppo-D1a* (*L1*) 种质平均 *PPO* 活性 (72.83 U)。因此, *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 这 2 个控制小麦 *PPO* 活性的主效基因中, *Ppo-A1* 基因对小麦籽粒 *PPO* 活性的影响要大于 *Ppo-D1* 基因, 此结果也印证了前人对 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 这 2 个基因的研究结果^[7-12]。然而, L1L1L2L2 基因型小麦种质的平均 *PPO* 活性虽然低至 55.66 U, 但是变幅较大 (4.56 ~ 113.01 U), 其中, IDO580 的 *PPO* 活性仅为 4.56 U, 而湘 1629 和苏麦 3 号 2 个品种的 *PPO* 活性接近或高于 100 U。相同基因型品种间 *PPO* 活性差异仍然较大, 说明可能还存在其他影响小麦籽粒 *PPO* 活性的基因, 因此仍需进一步发掘影响小麦 *PPO* 活性的新基因, 并明确这些基因对小麦籽粒 *PPO* 活性的影响。本研究中发现的极低 *PPO* 活性的品种就是引自美国的 IDO580, 该品种的 *Ppo-A1* 基因的等位基因为 *L2*, 用 *STS01* 标记检测为无条带 *Ppo-D1* 基因的等位基因为 *Ppo-D1b* (*H1*), 然而, 用 *PP016* 标记检测结果为等位基因 *Ppo-D1a* (*L1*)。因此, *STS01* 标记与 *PP016* 标记的检测结果并不完全一致, 以这 2 个标记相互替换能够更加准确地检测 *Ppo-D1* 的等位基因。此外, IDO580 的 *PPO* 活性极低, 只有公认的低 *PPO* 活性种质宁麦 9 号 *PPO* 活性的 1/9, 说明该种质可能存在其他未经报道的主效基因或等位变异, 值得进一步研究。

通过对 *PPO* 活性基因等位基因的检测, 发现等

位基因频率在不同省份间的差异较大。低 *PPO* 活性等位基因 *Ppo-D1a*(*L1*) 和 *Ppo-A1b*(*L2*) 出现的频率范围均为 33.33%~60.00%,*L1*、*L2* 同时出现的频率范围为 18.18%~33.33%。因此,在培育低 *PPO* 活性小麦品种(系)中,不同省份在选育策略上应该因地制宜。其中,安徽省品种中低 *PPO* 活性基因 *Ppo-D1a*(*L1*) 出现的频率最高(60.00%),其次是江苏省品种中 *Ppo-D1a*(*L1*),频率为 46.74%,比陈冷等^[31]的报道低,而江苏省品种中低 *PPO* 活性基因 *Ppo-A1b*(*L2*) 出现的频率最高(54.35%),与陈冷等^[31]的报道较为一致。长江中下游麦区当前大面积推广品种中 *L1L1L2L2* 基因型的比例仍然较低,*PPO* 活性普遍偏高。在 *L1L1L2L2* 基因型的品种中,湖北省的分布频率最低(18.18%),其平均 *PPO* 活性高达 94.57 U,说明该地区小麦品质改良尤其应加强对低 *PPO* 活性的选育。湖南、江苏和浙江 3 省的 *L1L1L2L2* 基因型频率高于湖北省,其平均 *PPO* 活性也相对较低,分别为 83.37 U、82.57 U 和 80.41 U,说明长江中下游麦区应进一步挖掘新的籽粒低 *PPO* 活性基因,并加速这些基因的聚合,从而增强长江中下游麦区品种的白度品质。

虽然中国在本世纪初已经开始了小麦籽粒低 *PPO* 活性种质资源的筛选工作,但是,目前筛选的种质在小麦白度品质育种中仍然不足。本研究通过对长江中下游麦区 145 份小麦种质以及 1 份美国种质和 1 份意大利种质进行 *PPO* 活性与功能标记检测,初步筛选出了 IDO580、宁麦 69、扬辐麦 2054、宁麦 13 和农丰 88 等 13 份低 *PPO* 活性种质,其中,从美国引进的 IDO580 的 *PPO* 活性极低,丰富了国内低多酚氧化酶活性种质资源。

参考文献:

- [1] KRUGER J E, HATCHER D W, DEPAUW R A. Whole seed assay for polyphenol oxidase in Canadian prairie spring wheats and its usefulness as a measure of noodle darkening [J]. *Cereal Chemistry*, 1994, 71: 324-326.
- [2] MAYER A M, HAREL E. Polyphenol oxidases in plants [J]. *Phytochemistry*, 1979, 18:193-215.
- [3] TARANTO F, PASQUALONE A, MANGINI G, et al. Polyphenol oxidases in crops: biochemical, physiological and genetic aspects [J]. *International Journal of Molecular Science*, 2017, 18: 377.
- [4] KRUGER J E. Effects of flour refinement on raw Cantonese noodle color and texture [J]. *Cereal Chemistry*, 1994, 71:177-182.
- [5] MARTIN J M, BERG J E, HOFER P, et al. Allelic variation of polyphenol oxidase genes impacts on Chinese raw noodle color [J]. *Journal of Cereal Science*, 2011, 54:387-394.
- [6] BEECHER B S, CARTER A H, SEE D R. Genetic mapping of a new family of seed-expressed polyphenol oxidase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 124:1463-1473.
- [7] 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.
- [8] 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, 25(1):7-10.
- [9] RAMAN R, RAMAN H, JOHNSTONE K, et al. Genetic and in silico comparative mapping of the polyphenol oxidase gene in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2005, 5:185-200.
- [10] BEECHER B S, SKINNER D. Molecular cloning and expression analysis of multiple polyphenol oxidase genes in developing wheat (*Triticum aestivum*) kernels [J]. *Journal of Cereal Science*, 2011, 53:371-378.
- [11] 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.
- [12] NILTHONG S, GRAYBOSCH R A, BAENZIGER P S. Enzyme activity in wheat breeding lines derived from matings of low polyphenol oxidase parents [J]. *Euphytica*, 2013, 190:65-73.
- [13] DEMEKE T, MORRIS C F. Wheat polyphenol oxidase: distribution and genetic mapping in three inbred line populations [J]. *Crop Science*, 2001, 41:1750-1757.
- [14] ANDERSON J V, MORRIS C F. An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity [J]. *Crop Science*, 2001, 41:1697-1705.
- [15] WATANABE N, TAKEUCHI A, NAKAYAMA A. Inheritance and chromosomal location of the homoeologous genes affecting phenol colour of kernels in durum wheat [J]. *Euphytica*, 2004, 139:87-93.
- [16] ZHAI S N, HE Z H, WEN W E, et al. Genome-wide linkage mapping of flour color-related traits and polyphenol oxidase activity in common wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129(2):377-394.
- [17] 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.
- [18] 王小波,马传喜,何克勤,等. 小麦 2D 染色体上多酚氧化酶 (*PPO*) 基因 STS 标记的开发与应用 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(6):1583-1590.
- [19] WANG X B, MA C X, SI H Q, et al. Gene markers for grain polyphenol oxidase activity in common wheat [J]. *Molecular Breeding*, 2009, 23(1):163-170.
- [20] 周志良,司红起,闫小燕,等. 小麦籽粒 2A 染色体 *PPO* 基因新

- 分子标记的开发与应用[J]. 分子植物育种, 2011, 9(1): 81-86.
- [21] 常成. 小麦及近缘种属籽粒硬度、多酚氧化酶性状的分子机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.
- [22] SUN Y, HE Z, MA W, et al. Alternative splicing in the coding region of *Ppo-A1* directly influences the polyphenol oxidase activity in common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Functional & Integrative Genomics, 2011, 11: 85-93.
- [23] SI H, ZHOU Z, WANG X, et al. A novel molecular marker for the polyphenol oxidase gene located on chromosome 2B in common wheat [J]. Molecular Breeding, 2012, 30(3): 1371-1378.
- [24] TARANTO F, MANGINI G, PASQUALONE A, et al. Mapping and allelic variation of *Ppo-B1* and *Ppo-B2* gene-related polyphenol oxidase activity in durum wheat [J]. Molecular Breeding, 2015, 35: 80.
- [25] PARK W J, SHELTON D R, PETERSON C J, et al. Variation in polyphenol oxidase activity and quality characteristics among hard white wheat and hard red winter wheat samples [J]. Cereal Chem, 1997, 74: 7-11.
- [26] 葛秀秀, 何中虎, 杨金, 等. 我国小麦品种多酚氧化酶活性的遗传变异及其与品质的相关分析 [J]. 作物学报, 2003, 29(4): 481-485.
- [27] 肖永贵, 何心尧, 刘建军, 等. 中国冬小麦品种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.
- [28] BAIK B K, CZUEHJOWSKA Z, POMERANZ Y. Comparison of polyphenol oxidase activities in wheats and flours from Australian and U.S. cultivars [J]. Journal of Cereal Science, 1994, 19: 291-296.
- [29] 马传喜, 王晓波, 司红起, 等. 小麦多酚氧化酶活性的品种间差异及其遗传分析研究进展 [J]. 安徽农业大学学报, 2007, 34(3): 305-310.
- [30] 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.
- [31] 陈冷, 高春保, 朱展望, 等. 小麦黄色素含量与多酚氧化酶活性相关基因的分子标记检测及分布差异 [J]. 湖北农业科学, 2017, 56(24): 4893-4898.
- [32] SOUZA E J, GUTTIERI M J, UDALL J A. Registration of 'IDO580' spring wheat germplasm [J]. Crop Science, 2005, 45: 429-430.
- [33] ONTO S. Genetics of polyphenol oxidase (*PPO*) activity in wheat (*Triticum aestivum* L.) [D]. Nebraska, USA: University of Nebraska, 2011.
- [34] SAGHAI-MAROOF M A, SOLIMAN K M, JORGENSEN RA, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics [J]. Proceeding of National Academy Science, USA, 1984, 81: 8014-8018.

(责任编辑: 张震林)