

## 普通小麦多酚氧化酶活性的 QIL 分析

张立平<sup>1</sup> 葛秀秀<sup>1</sup> 何中虎<sup>1,2,\*</sup> 王德森<sup>1</sup> 闫俊<sup>1</sup> 夏先春<sup>1</sup> Mark W Sutherland<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院作物栽培育种研究所, 国家小麦改良中心, 北京 100081; <sup>2</sup> CIMMYT 中国办事处, 北京 100081; <sup>3</sup> 澳大利亚南昆士兰大学, Toowoomba 4350)

**摘要:** 多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 是引起面团 (片) 颜色褐变的主要原因。利用 122 对 SSR 引物、4 对贮藏蛋白 STS 引物和 10 对 AFLP 引物组合, 分析了中优 9507 × CA9632 的 71 个 DH 系的基因型, 构建了由 173 个位点组成的遗传连锁图, 在小麦 21 个连锁群上覆盖 2 881 cM。将该群体种植于 3 个环境, 采用复合区间作图法 (CIM) 进行了 PPO 活性的 QIL 分析。结果表明, 控制籽粒 PPO 活性的主效 QIL 有 2 个, 分别位于染色体 2AL 和 2DL 上, 贡献率分别为 37.9% ~ 50.0% 和 25.0% ~ 29.1%。所有 QIL 都来自高 PPO 活性亲本中优 9507。讨论了通过遗传途径降低 PPO 活性及利用分子标记辅助育种的可能性。

**关键词:** 普通小麦; 多酚氧化酶 (PPO); 分子标记; QIL 分析  
中图分类号: S512

## Mapping QILs for Polyphenol Oxidase Activity in a DH Population from Common Wheat

ZHANG Li-Ping<sup>1</sup>, GE Xiu-Xiu<sup>1</sup>, HE Zhong-Hu<sup>1,2,\*</sup>, WANG De-Sen<sup>1</sup>, YAN Jun<sup>1</sup>, XIA Xian-Chun<sup>1</sup>, Mark W Sutherland<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Crop Breeding and Cultivation, National Wheat Improvement Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>2</sup> CIMMYT China Office, Beijing 100081, China; <sup>3</sup> University of South Queensland, Toowoomba, QLD 4350, Australia)

**Abstract:** The polyphenol oxidase (PPO) activity is a major factor to cause an undesirable brown discoloration of wheat based end products during processing or storage. A double haploid (DH) population with 71 lines derived from Zhongyou 9507 with higher PPO activity and CA9632 with lower PPO activity, were sown at three locations with two replications. A total of 173 loci included SSR, STS of storage protein and AFLP markers were used to construct a linkage map, covering 2 881 cM of whole genome at 21 linkage groups. With the method of composite interval mapping (CIM), two putative major QILs were detected on chromosome 2AL and 2DL, accounting for 37.9% - 50.0% and 25% - 29.1% of the phenotypic variance across three environments, respectively. The QIL on 2AL played a more significant role than the QIL on 2DL. Reduction of PPO activity through genetic improvement and molecular marker assisted selection was also discussed.

**Key words:** Common wheat; *Triticum aestivum* L.; Polyphenol oxidase; Molecular marker; Quantitative trait loci (QIL)

在馒头、饺子和鲜面蒸煮前的几个甚至几十个小时的贮存期间或挂面干燥过程中, 颜色褐变现象十分普遍<sup>[1]</sup>。多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 活性及其相应的底物是引起颜色褐变的主要原因, 其决定面条 (团) 颜色稳定性的 50% ~ 70%<sup>[2~4]</sup>。环境和基因型都影响 PPO 的活性, 但 PPO 活性主要受基因型影响; 不同品种间 PPO 活性相差很大, 因此, 通过遗传育种途径改良面制品颜色的褐变是可行的<sup>[5]</sup>。

许多植物 PPO 由多基因家族编码<sup>[6]</sup>, 小麦 PPO 的同工酶也有 12 种之多<sup>[7]</sup>。葛秀秀<sup>[8]</sup> 应用植物数量性状主基因 + 多基因混合遗传模型对冬小麦 PPO 活性的遗传分析表明, PPO 活性受 2 对独立主基因控制。Jimenz<sup>[9]</sup> 和 Anderson 等<sup>[10]</sup> 通过对代换系 PPO 活性的测定, 也推测控制小麦 PPO 的主效基因为 1 ~ 2 个, 同时指出针对 PPO 的底物专化性存在多个等位基因。Udall<sup>[11]</sup> 和 Demekes 等<sup>[12]</sup> 利用 RFLP 标记分别研究了 4 个重组近交系群体, Mares 等<sup>[13]</sup> 利用

基金项目: 国家自然科学基金 (30270822) 和国家重点基础发展规划 (2002CB111300) 项目资助。

作者简介: 张立平 (1969 - ), 女, 山西大同人, 博士, 在北京市农林科学院杂交小麦中心从事小麦品质遗传研究。

\* 通讯作者: 何中虎。Tel: 010-68918547; Fax: 010-68918547; E-mail: zhhe@public3.bta.net.cn

Received (收稿日期): 2003-11-10, Accepted (接受日期): 2004-02-27.

AFLP 标记分析了一个 DH 群体,发现控制 PPO 活性的主效基因位于第二同源群染色体上,但其他染色体如 3B、3D、6B 上亦存在一些微效基因。Demeke 和 Morris<sup>[14]</sup>利用同源序列方法扩增出了 444 bp 的小麦 PPO 基因片段,并由此向两端延伸获得大小为 1 509 bp 的小麦 PPO 的 DNA 序列。迄今为止还没有有可应用于辅助育种的 PPO 活性分子标记。

早期的研究表明,中优 9507 具较高 PPO 活性而 CA9632 的 PPO 活性较低<sup>[8]</sup>。本文对中优 9507 和 CA9632 以及由它们构建的 DH 群体进行 PPO 活性分析,利用已构建的分子连锁图谱标记定位 PPO 活性的 QIL,为进一步利用分子标记辅助育种等手段进行优良面粉颜色品种的选育提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料和田间试验

71 个中优 9507/CA9632 的双单倍体 (doubled-haploid, DH) 系,通过小麦 × 玉米杂交 (玉米花粉诱导) 方法获得。中优 9507 和 CA9632 分别是高、低 PPO 活性亲本。田间试验于 2001 - 2002 年度分别在中国农科院作物所 (北京)、中国农科院棉花所 (河南安阳) 和山东农科院作物所 (山东济南) 3 点进行,每点 2 次重复,小区为 3 行区,行长 2 m,每行播种 80 粒。田间管理按当地产量比较试验进行。

### 1.2 籽粒 PPO 活性的测试

参照华盛顿州立大学小麦品质实验室方法<sup>[10]</sup>,用 D,L-DOPA、MOPS 试剂和分光光度计测定籽粒的 PPO 活性。

### 1.3 统计分析

应用 SAS 软件对 PPO 活性进行统计分析,包括平均值、范围、标准差、变异系数、频率分布和方差分析。

### 1.4 遗传图谱的构建

SSR 标记:利用 Röder 等<sup>[15]</sup>发表的 239 对 Xgwm 引物,SSR 协作组的 536 对 wmc 引物,Pestsova 等<sup>[16]</sup>发表的 38 对 Xgdm 引物,Devos 等<sup>[17]</sup>发表的 1 对 *GluA3* SSR 引物和 Lee 等<sup>[18]</sup>发表的 1 对 *Gl-B1* SSR 引物,共 815 对 SSR 引物,筛选出 122 对多态性引

物,包括 154 个多态性位点。

AFLP 引物:选用 3 个选择性碱基的 P 引物和 M 引物各 9 个,随机组成 10 对引物组合,每对引物获得的多态性位点 2 ~ 10 个,共 42 个多态性标记位点。

STS 标记:5 对贮藏蛋白的 STS 标记,有 4 对具有多态性,即 011A (*GluA3*)、011B (*GluB3*)、1Dx5 和 1Dy10/12 (这两个位点合并作为 *GluD1* 位点记录)。

应用 MAPMAKER 3.0 软件,将 200 个多态性标记 (位点) 中的 143 个 SSR 标记、4 个贮藏蛋白标记和 26 个 AFLP 标记共 173 个位点绘在遗传连锁图上。采用 Kosambi 函数将标记之间的重组交换率转换为遗传图距单位 (cM)。连锁图的总长度是 2 881 cM,标记间的平均遗传距离为 16.6 cM。

### 1.5 QIL 分析

应用 Cartograph 软件包的复合区间作图法 (CIM) 分别进行 3 个地点 PPO 活性的 QIL 分析,LOD 的阈值为 2.5。

## 2 结果与分析

### 2.1 方差分析

表 1 说明,PPO 活性在不同环境和基因型间存在极显著差异,但基因型和环境互作及重复间差异不显著。

表 1 PPO 活性的方差分析

变异来源 Source	自由度 df	均方 MS	F 值	P
环境 Environment	2	22.02	6.65 **	0.0016
重复 Replicate	1	0.22	0.07	0.7983
基因型 Genotype	70	21.14	6.38 **	0.0001
基因型 × 环境 Genotype × Environment	129	2.93	0.89	0.7725
误差 Error	194	3.31		

### 2.2 简单统计量和变异分布

3 个地点种植的 DH 系间 PPO 活性的变异系数都较大,北京、安阳和济南分别为 32.6%、33.2% 和 33.5%,但平均值相差不大,分别为 6.65、6.65 和 5.99  $A_{475}/(g \cdot min) \times 10^3$  (表 2)。

表 2 籽粒 PPO 活性的基本统计量

Table 2 Grain PPO activity in three locations

地点 Location	样品数 Number of samples	平均值 Average	范围 Range	变异系数 CV (%)
北京 Beijing	70	6.65	2.72 - 11.97	32.6
河南安阳 Anyang, Henan	71	6.65	2.92 - 12.92	33.2
山东济南 Jinan, Shandong	61	5.99	3.11 - 12.42	33.5

从 DH 群体的分布图(图 1)可以看出,群体不符合正态分布,PPO 活性在 3 个地点的变异范围基本一致,存在明显的超亲现象,其中超高亲的品系较

多,超低亲的品系较少。由于该群体的 PPO 活性的观察值不符合正态分布,将其转化为自然对数值进行 QIL 分析。

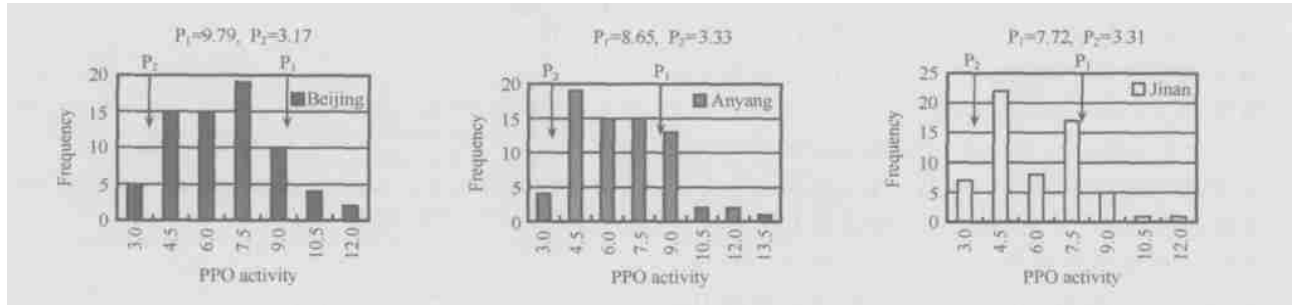


图 1 PPO 活性的频率分布

Fig. 1 Frequency distribution of PPO activity [ $A_{475}/(g \cdot \min) \times 10^3$ ]

2.3 QIL 分析

QIL 分析表明(表 3),3 个地点检测到效应最大的 2 个 QIL 都位于 2AL 和 2DL(图 2),此外不同地点还存在一些效应较小的 QIL,如安阳点在 1A 和

1B、济南点在 2B 染色体上,这些微效 QIL 在 3 个地点中没有重复出现。所有 QIL 都来自于高 PPO 活性亲本中优 9507。

表 3 复合区间作图法检测籽粒多酚氧化酶(PPO)活性的 QIL

Table 3 QILs of grain polyphenol oxidase (PPO) activity based on composite interval mapping analysis

地点 Location	染色体 Chrom.	位置 Pbs. (cM)	标记区间 Marker interval	LOD 值 LOD score	加性效应 Additive	贡献率 Var. (%)
北京 Beijing	2AL	169.5	Xgwm382-Xgwm312	9.6	1.55	37.9
	2DL	227.9	WMC36a-WMC41	7.8	1.39	29.1
河南安阳 Anyang, Henan	1A	15.0	WMC336a-P41/M32e	2.8	0.42	3.4
	1B	1.0	<i>Glur-B3/Glr-B1</i> -WMC367	4.4	0.55	5.4
	2AL	170.5	Xgwm382-Xgwm312	23.5	1.73	50.0
山东济南 Jinan, Shandong	2DL	230.5	WMC41-P41/M32a	16.1	1.27	25.0
	2AL	176.9	Xgwm294-P42/M45c	14.8	1.66	48.1
	2B	19.0	Xgwm410-Xgwm374	3.3	0.53	6.3
	2DL	230.5	WMC41-P41/M32a	11.7	1.12	25.8

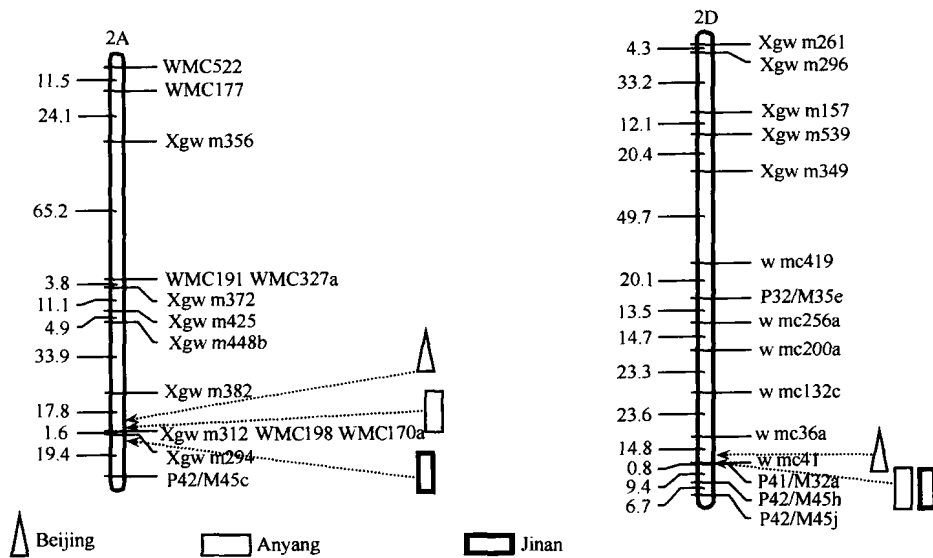


图 2 PPO 活性主效 QIL 的位置

Fig. 2 The position of major QILs for PPO activity

3个地点2AL上QTL的位置和效应略有差异,但都在Xgwm312和Xgwm294附近(两者的遗传距离为1.6 cM),而且效应最大。北京、安阳和济南点的QTL分别距Xgwm312的遗传距离为2.8、1.8和4.6 cM,在该区域QTL的LOD值分别为9.6、23.5和14.8,加性效应分别为1.55、1.73和1.66,贡献率分别为37.9%、50.0%和48.1%。

位于2DL上的QTL在WMC41和P41/M32a附近(两者的遗传距离为0.8 cM),定位区间在3个地点亦略有差异。北京、安阳和济南点的QTL分别距WMC41的遗传距离为1.8、0.8和0.8 cM,距P41/M32a的遗传距离为2.6、0和0 cM,在该区域QTL的LOD值分别为7.8、16.1和11.7,加性效应分别为1.39、1.27、1.12,贡献率分别为29.1%、25.0%和25.8%。

### 3 讨论

本文首次在同一个小作图群体中检测出2个PPO活性的主效QTL,分别位于2AL和2DL上,而且前者的效应明显大于后者。位于2AL上的QTL与Udall<sup>[11]</sup>报道的PPO的一个RFLP标记(Xcdo373)的位置相近,位于2DL的QTL的位置与Mares等<sup>[13]</sup>(标记P41/M32-1)和Demekes等<sup>[12]</sup>(Xfba314)所得的结果接近。在本研究群体中影响PPO活性的主效基因有2个,属于“主效基因+微效多基因”的遗传模式,与葛秀秀等<sup>[8]</sup>用数量遗传模型分析方法所得的结果相吻合。

本研究还首次应用以SSR标记为主的遗传连锁图进行PPO活性的QTL分析。用于遗传分析的常用分子标记有RFLP、RAPD、AFLP和SSR,在小麦中由于RFLP标记的多态性较小、实验步骤多、费时费力等缺点,限制了它的应用。RAPD标记稳定性和重复性差,目前很少使用。AFLP标记的稳定性和重复性比RAPD高,一般为显性标记,但数据统计较复杂,而且多态性片段只有转化为STS或SCAR标记才可用于分子育种。SSR标记具有较高的多态性,一般为共显性标记,位点专化性较强,标记覆盖整个基因组,DNA样本用量少等优点,在小麦、水稻、玉米、大豆、高粱、大麦等主要作物中广泛用来构建遗传图谱,进行遗传变异和分子标记等研究,而且寻找到的特异标记大多可直接应用。本实验检测出的与PPO活性相关的两个主效QTL在3个地点的效应都较大,而且标记区间基本一致。QTL的位置

与其中一个SSR标记紧密连锁,因此有利于将这些标记转化为辅助育种的分子标记,为杂种后代的选择服务。

### References

- [1] Liu J-J (刘建军), He Z-H (何中虎), Jiang S-T (姜善涛), Zhu L-X (朱连先), Wu X-Y (吴祥云), Zhao Z-D (赵振东). Study on flour whiteness and its correlated factors of wheat commercial varieties. *Shandong Agricultural Sciences* (山东农业科学) 2002, 2: 10 - 12 (in Chinese with English abstract)
- [2] Miskelly D M. Flour components affecting paste and noodle color. *J Sci Food Agric*, 1984, 35: 463 - 471
- [3] Kruger J E. Effects of flour refinement on raw Cantonese noodle color and texture. *Cereal Chem*, 1994, 71: 177 - 182
- [4] Morris C F, Jeffers H C, Engle D E. Effect of processing, formula and measurement variables on alkaline noodle color-toward an optimized laboratory system. *Cereal Chem*, 2000, 77: 77 - 85
- [5] Ge X-X (葛秀秀), He Z-H (何中虎), Yang J (杨金), Zhang Q-J (张歧军). Polyphenol oxidase activities of Chinese winter wheat cultivars and correlations with quality characteristics. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2003, 29(4): 112 - 116 (in Chinese with English abstract)
- [6] Peng S-Q (彭世清). Recent progress of polyphenol oxidase in plants. *Chinese J of Tropical Agri* (热带农业科学), 2000, 3: 61 - 66
- [7] Kruger J E. Changes in the polyphenol oxidases of wheat during kernel growth and maturation. *Cereal Chem*, 1976, 53: 201 - 213
- [8] Ge X-X (葛秀秀), Zhang L-P (张立平), He Z-H (何中虎), Zhang Y-M (章元明). The mixed inheritance analysis of polyphenol oxidase activities in winter wheat. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2004, 30(1): 18 - 20 (in Chinese with English abstract)
- [9] Jimenez M, J Dubcovsky. Chromosome location of genes affecting polyphenol oxidase activity in seeds of common and durum wheat. *Plant Breed*, 1999, 118: 395 - 398
- [10] Anderson J V, Morris C F. An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity. *Crop Sci*, 2001, 41: 1 697 - 1 705
- [11] Udall J. Important alleles for noodle quality in winter wheat as identified by molecular markers. MS thesis, University of Idaho, Moscow, ID, 1997
- [12] Demekes T, Morris C F. Wheat polyphenol oxidase: distribution and genetic mapping in three inbred line populations. *Crop Sci*, 2001, 41: 1 750 - 1 757
- [13] Mares D J, Campbell A W. Mapping components of flour and noodle colour in Australian wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2001, 52: 1 297 - 1 309
- [14] Demekes T, Morris C F. Molecular characterization of wheat polyphenol oxidase (PPO). *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 813 - 818
- [15] Röder M S, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M H, Leroy P, Ganal M W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998, 149: 2 007 - 2 023
- [16] Pestsova E, Ganal M W, Röder M S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome*, 2000, 43: 689 - 697
- [17] Devos K M, Bryan G J, Collins A J, Stephenson, Gale M D. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 247 - 252
- [18] Lee S J, Penner G A, Devos K M. Characterization of loci containing microsatellite sequences among Canadian wheat cultivars. *Genome*, 1995, 38: 1 037 - 1 040