

小麦多酚氧化酶 (PPO) 活性的 SSR 标记筛选与验证

孙道杰^{1,3}, 张立平¹, 夏先春¹, 何中虎^{1,2}, 葛秀秀¹, 徐兆华¹, 王辉³

(¹中国农业科学院作物科学研究所/国家小麦改良中心, 北京 100081; ²CIMMYT 中国办事处, 北京 100081;
³西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100)

摘要: 小麦多酚氧化酶 (PPO) 活性是引起面条和面团储存期间颜色褐变的主要因素。发掘可应用于籽粒 PPO 活性辅助选择的分子标记, 将有助于小麦面粉颜色性状的遗传改良。本研究选来自全国不同麦区的 203 份冬小麦品种, 验证 SSR (simple sequence repeat) 引物 *Xgwm312* 的 PCR 扩增片段大小与籽粒 PPO 活性的关系。结果表明, 198bp 扩增片段的有无同籽粒 PPO 活性大小密切相关, 该片段的出现通常意味着籽粒 PPO 活性较高。*Xgwm312* 可应用于籽粒 PPO 活性的分子标记辅助育种。

关键词: 普通小麦; 多酚氧化酶 (PPO); SSR 标记; 分子标记辅助选择

Validation of SSR Marker Assisted Selection for Polyphenol Oxidase Activities in Common Wheat

SUN Dao-jie^{1,3}, ZHANG Li-ping¹, XIA Xian-chun¹, HE Zhong-hu^{1,2}, GE Xiu-xiu¹, XU Zhao-hua¹, WANG Hui³

(¹ Institute of Crop Sciences / National Wheat Improvement Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences; ² CIMMYT China Office, Beijing 100081; ³ College of Agronomy, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100)

Abstract: Polyphenol oxidase (PPO) is highly related to undesirable brown discoloration of wheat-based end products such as noodles. It is important to identify molecular markers associated with PPO activities for marker-assisted selection (MAS) for wheat quality improvement. A total of 203 Chinese winter wheat cultivars and lines were analyzed to investigate the correlation of PPO activities with a SSR (simple sequence repeat) marker *Xgwm312*. The results indicated that a fragment with 198 bp is apparently correlated with high PPO activities in wheat grain. The marker *Xgwm312* can be used for MAS for PPO activities.

Key words: *Triticum aestivum* L.; Polyphenol oxidase; SSR marker; MAS

颜色是评价面条和馒头等小麦制品品质的重要指标, 是品质遗传改良的重要目标。多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 所催化的化学反应是引起面团或面条颜色褐变的主要原因, 可解释面条颜色变异的 55%~70%^[1,2]。PPO 主要分布在小麦籽粒的糊粉层, 面粉 PPO 的含量仅占籽粒总 PPO 的 3%左右^[3]。早在 1907 年人们就开始了 PPO 的研究, 至今已在小麦中发现了 12 种 PPO 同工酶^[4-6]。Okot-Kotber 等研究表明, 基因型是决定小麦 PPO 活性的主要因素, 但也受环境条件的影响^[7]。不同品种间酶活性可相差 10~14 倍^[8-10], 因此通过遗传途径降低 PPO 活性是可行的,

有可能培育出多酚氧化酶活性接近零的品种。美国、加拿大、澳大利亚等国的小麦育种项目已将其列为重要育种目标。我国冬小麦品种间 PPO 活性变异较大, 培育低 PPO 活性小麦品种的工作已经初步开展^[11]。

目前主要利用生化方法测定籽粒 PPO 活性, 对育种材料和后代进行选择, 成本较高, 且仅是对表型的选择, 可靠性较差。寻找与小麦籽粒 PPO 活性紧密连锁的分子标记进行辅助选择, 是基于基因型的选择, 可靠性强。国外研究发现的一些 PPO 活性分子标记多为 RFLP 和 AFLP 标记^[1,12], 在育种实践中应用起来比较烦琐, 不适宜于分子标记辅助选择。因而, 筛选易

收稿日期: 2004-06-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30270822)、“973”国家重点研究规划项目(2002CB111300)、“863”计划项目(2002AA207003)和“948”重大农业国际科技合作项目资助

作者简介: 孙道杰 (1970-), 男, 博士研究生, 主要从事小麦遗传育种研究。何中虎为通讯作者, Tel: 010-68918547; Fax: 010-68918547; E-mail: zhhe@public3.bta.net.cn

于应用且成本较低的 SSR 标记, 用于 PPO 活性的辅助选择, 必将有利于小麦制品颜色性状的遗传改良。

张立平等研究表明, 在小麦染色体 2AL 上有一个籽粒 PPO 活性的主效 QTL (quantitative trait locus), 可解释 PPO 活性遗传变异的 37.9%~50.0%, 该 QTL 与 SSR 引物 *Xgwm312* 紧密连锁^[13]。本实验的目的是验证 *Xgwm312* 与小麦品种 PPO 活性的关系, 以明确使用 *Xgwm312* 进行 PPO 活性分子标记辅助育种的可能性。

1 材料与方法

1.1 供试材料

2000~2001 年度, 203 份冬麦区品种 (系) 种植于河南安阳中国农科院棉花研究所, 田间管理按常规进行, 收获籽粒用于 PPO 活性差异筛选。这些品种 (系) 多为生产上的主栽品种和有推广应用前景的品系, 基本上反映了我国冬播麦区小麦生产和育种的现状。

1.2 PPO 活性测定方法

参照华盛顿州立大学小麦品质实验室方法^[14]。

1.3 小麦基因组 DNA 的提取

参照 Sharp 等人 (1998) 的 SDS 方法提取小麦叶片的基因组 DNA。

1.4 SSR (simple sequence repeat) 引物

根据 Röder 等研究开发的 SSR 引物 *Xgwm312* 的序列合成^[15]。

上游引物: ATC GCA TGA TGC ACG TAG AG

下游引物: ACA TGC ATG CCT ACC TAA TGG

1.5 SSR 标记检测

1.5.1 PCR 反应体系与反应条件 PCR 反应体系为: 20 μ l 总体积中包含 1 \times PCR buffer (50 mmol·L⁻¹ KCl,

10 mmol·L⁻¹ Tris·Cl, 0.01%明胶)、MgCl₂ 1.5 mmol·L⁻¹、dNTP (A. T. C. G) 各 250 μ mol·L⁻¹、TaqDNA 聚合酶 1U、每条引物 4pmol、模板 DNA 80 ng。PCR 反应程序为: 首先 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 55 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 36 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.5.2 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳 电泳缓冲液为 pH8.0 的 1 \times TBE; 制胶用 6%聚丙烯酰胺胶储存液 (UREA 420.2g、Acrylamide 60.0 g、N'N-Methylene-bisacrylamide 3.16 g、10 \times TBE 50 ml, 定容至 1 000 ml) 60 ml、10%过硫酸铵 (APS) 300 μ l、TEMED 60 μ l、混合均匀后灌胶, 胶型为 380 mm/300 mm/0.4 mm; 电泳程序为首先 100W 预电泳 30 min, 插 60 孔加样梳, 点样后 80W 电泳 60 min。

1.5.3 银染程序: (1) 脱色与固定: 将胶板放入 10%冰醋酸中轻摇 30min; (2) 漂洗: 用蒸馏水漂洗 3 次, 每次 3 min; (3) 银染: 1L 1%的 AgNO₃ 溶液中加 2 ml 37%的甲醛, 放入胶板轻摇 30 min; (4) 蒸馏水漂洗约 20 s; (5) 显影: 在预冷的 1L 30%的 Na₂CO₃ 溶液中加 2 ml 甲醛和 200 μ l 1% NaS₂O₃ 溶液, 放入胶板轻摇直到目标片段显示出来; (6) 终止: 迅速将胶板转入 10%冰醋酸溶液中, 终止显色反应; (7) 用蒸馏水漂洗 2 min; (8) 将胶板自然干燥后, 记录带型并用数码相机照相。

2 结果与分析

2.1 小麦品种 (系) 籽粒 PPO 活性的遗传变异

将供试品种 (系) 籽粒 PPO 活性的平均值等参数列于表 1。

由表 1 可知, 203 份冬小麦籽粒 PPO 活性变化范围为 1.19~12.00A475/g min⁻¹ \times 10³, 最大值是最小值

表 1 203 份冬小麦品种 (系) PPO 活性的平均值、变化范围和标准差

Table 1 Mean, range and Sd of PPO activities in 203 Chinese winter wheat genotypes

	籽粒 PPO 活性 Grain PPO activity (A475/g min ⁻¹ \times 10 ³)		
	平均值 Mean	范围 Range	标准差 Sd
北部冬麦区 Northern China Plain Winter Wheat Zone	6.35a	1.85~11.43	2.54
黄淮冬麦区 Yellow and Huai Valley's Winter Wheat Zone	6.84a	1.19~12.00	2.53
长江中下游冬麦区 Middle and Lower Yangtze Valley's Winter Wheat Zone	6.36a	1.31~11.80	2.88
西南冬麦区 Southwest Winter Wheat Zone	6.79a	2.44~10.69	2.74
总计 Total	6.67	1.19~12.00	2.55

相同小写字母 a 表示差异不显著 ($P > 0.05$)

The common letter 'a' indicates no significant difference at 5% probability level

的 10 倍, 多数品种 PPO 活性分布在 3~9 之间。这说明中国冬小麦品种(系)间籽粒 PPO 活性存在很大差异, 变异范围广, 选择潜力大, 通过育种途径改善小麦制品颜色褐变现象是可能的。但各个麦区之间籽粒 PPO 活性平均值没有显著差异。总体来看, 籽粒 PPO 活性较低品种(系)有 CA9641、农大 3291、原冬 8585、冬丰 9801、冬丰 611、晋麦 50、冀麦 38、藁城 8901、豫麦 47、豫麦 54、豫麦 56、郑州 974、85 中 33、中育 5 号、鲁麦 22、鲁麦 23、济麦 19、济麦 20、山农 617、徐 858、扬麦 5 号、扬麦 9 号、鄂 81027、和绵阳 980127 等, 它们可作为杂交亲本, 用于面粉颜色性状的品质改良。

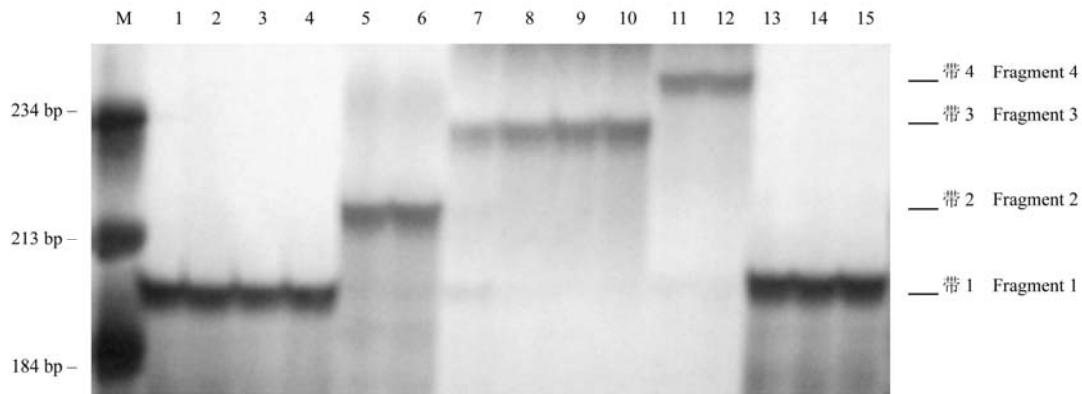
2.2 SSR 引物 *Xgwm312* PCR 扩增产物带型在品种(系)间的多态性

203 份冬小麦品种(系)的 PCR 扩增产物共出现 4 种片段(带)(图 1), 构成 8 种带型。其中 80 个品种(系)具有带型 '1', 只扩增出 198 bp 片段(带 1); 32 个品种(系)具有带型 '2', 只扩增出 216 bp 片段(带 2); 68 个品种(系)具有带型 '3', 只扩增出 232 bp 片段(带 3); 4 个品种(系)具有带型 '4', 只扩增出 240 bp 片段(带 4); 5 个品种(系)具有带型 '5', 能同时扩增出 198 bp 和 216 bp 两个

片段(带 1 和 2); 8 个品种(系)具有带型 '6', 能同时扩增出 198 bp 和 232 bp 两个片段(带 1 和 3); 2 个品种(系)具有带型 '7', 能同时扩增出 198 bp 和 240 bp 两个片段(带 1 和 4); 4 个品种(系)具有带型 '8', 能同时扩增出 216 bp 和 232 bp 两个片段(带 2 和 3)。中国冬麦品种(系)中 '1'、'2' 和 '3' 带型出现频率较高, 其它带型仅在少数品种(系)中出现。

2.3 带型与品种(系)籽粒 PPO 活性间的关系

各种带型品种(系)的平均籽粒 PPO 活性值见表 2 对表 2 中 4 种带型 ('1'、'2'、'3' 和 '4') 的品种 PPO 活性平均值之间的差异显著性分析表明, 具有带型 '1' 的品种 PPO 活性平均值与具有其它带型的品种的差异均达到 1% 显著水平, 而带型 '2'、'3' 和 '4' 的品种差异不显著。凡具有带型 1 的品种或品系, 其籽粒 PPO 活性大多比较高, 98% 的品种 PPO 活性大于 $6.0A_{475}/g \text{ min}^{-1} \times 10^3$, 变异系数也较小; 凡是籽粒 PPO 活性比较低的品种或品系, 大多数不具有带型 1; 在不具有带型 1 的品种或品系中, 70% 的品种 PPO 活性小于 $6.0A_{475}/g \text{ min}^{-1} \times 10^3$, 但少数材料的籽粒 PPO 活性也比较高。



由下至上出现的 4 种片段分别称为带 1、2、3 和 4, 片段大小分别约为 198bp、216bp、232bp 和 240bp

M. pBR332DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) marker; 1. 苏引 10 号 (Grain PPO activity: $10.29 A_{475}/g \text{ min}^{-1} \times 10^3$); 2. 农大 152 (9.07); 3. 豫麦 21 (9.34); 4. 中梁 88375 (11.83); 5. 扬麦 5 号 (2.08); 6. 豫麦 56 (3.09); 7. 冬丰 9801 (2.96); 8. 晋麦 50 (2.50); 9. 藁城 8901 (3.29); 10. 高优 503 (4.60); 11. 冀麦 38 (2.88); 12. 98 中 18 (7.27); 13. 临汾 138 (9.62); 14. 云麦 46 (8.61); 15. 山东 928802 (11.83)

From bottom to top the fragments were called as fragment 1, fragment 2, fragment 3 and fragment 4, respectively

M. pBR332DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) marker; 1. Suyin 10 (Grain PPO activity: $10.29 A_{475}/g \text{ min}^{-1} \times 10^3$); 2. Nongda 152 (9.07); 3. Yumai 21 (9.34); 4. Zhongliang 88375 (11.83); 5. Yangmai 5 (2.08); 6. Yumai 56 (3.09); 7. Dongfeng 9801 (2.96); 8. Jinmai 50 (2.50); 9. Gaocheng 8901 (3.29); 10. Gaoyou 503 (4.60); 11. Jimai 38 (2.88); 12. 98 Zhong 18 (7.27); 13. Linfen 138 (9.62); 14. Yunmai 46 (8.61); 15. Shandong 928802 (11.83)

图 1 SSR 引物 *Xgwm312* PCR 扩增产物带型在品种(系)间的多态性

Fig.1 Electrophoresis of PCR product amplified with *Xgwm312* for winter wheat cultivars in silver-stained denaturing polyacrylamide gel

表 2 不同带型品种(系)的平均籽粒 PPO 活性 ($A_{475}/g \text{ min}^{-1} \times 10^3$) 统计

Table 2 The mean grain PPO activity of the cultivars with different fragment types

带型 Fragment types	品种数 Number of genotypes	籽粒 PPO 活性 Grain PPO activity ($A_{475}/g \text{ min}^{-1} \times 10^3$)	标准差 Sd	变异范围 Range
1	80	8.47A	1.57	4.45~12.0
2	32	5.37B	2.48	1.31~9.70
3	68	4.78B	1.93	1.19~8.34
4	4	5.45B	2.58	2.88~8.03
5	5	6.93	2.00	4.75~8.92
6	8	5.61	2.10	2.87~7.96
7	2	3.41	1.40	2.40~4.04
8	4	3.99	1.54	2.60~6.02

不同大写字母 A 和 B 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。‘5’、‘6’、‘7’、‘8’ 4 种类型因样本数较小, 未进行多重比较

The different uppercase letters A and B follow the data indicate significant difference at 0.01 probability level

3 讨论

中国推广种植的小麦品种籽粒 PPO 活性普遍较高^[11], 高水平的 PPO 活性与小麦制品馒头和面条^[16~18]的褐变密切相关, 所以应将降低小麦籽粒 PPO 活性纳入品质育种目标。分子标记辅助选择是直接针对基因型的选择, 具有很大的优越性。本研究表明, SSR 分子标记 *Xgwm312* 的聚丙烯酰胺凝胶电泳带型在品种(系)间呈现出多态性; 带型 1 (约 198 bp 的 PCR 扩增片段) 的出现意味着该材料具有比较高的籽粒 PPO 活性, 符合率达 98%; 在扩增产物中没有 198 bp 片段的品种(系)中, 大约有 70% 具有较低水平的籽粒 PPO 活性 (PPO 活性小于 $6.0 A_{475}/g \text{ min}^{-1} \times 10^3$)。这说明 SSR 分子标记 *Xgwm312* 的 PCR 扩增产物可以作为分子标记进行籽粒 PPO 活性的辅助选择。选育低 PPO 活性品种时, 可以淘汰具有带型 1 的材料; 对于不具有带型 1 的材料可以选留, 也可以进一步进行测试验证。

小麦多酚氧化酶 (PPO) 活性由两个以上主效基因控制^[1,12], 与 SSR 引物 *Xgwm312* 扩增位点相连锁的基因只是几个 QTL 中的一个主效位点, 因而该标记不可能解释 PPO 活性变异的全部。在辅助选择过程中, 尤其是多基因性状的辅助选择过程中, 如果有两到 3 个标记能同时使用, 选择的可靠性将会大大提高。所以, 对于小麦籽粒 PPO 活性分子标记还需要做更多的研究据。

4 结论

SSR 引物 *Xgwm312* 的 PCR 扩增片段 198 bp 的有

无同籽粒 PPO 活性密切相关, 可用于分子标记辅助育种。

References

- [1] Demeke T, Morris C F, Campbell K G, King G E, Anderson J A, Chang K G. Wheat polyphenol oxidase: distribution and genetic mapping in three inbred line populations. *Crop Science*, 2001, 41: 1750-1757.
- [2] Demeke T, Morris C F. Molecular characterization of wheat polyphenol oxidase (PPO). *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 104: 813-818.
- [3] Baik B K, Czuchajowska Z, Pomeranz Y. Comparison of polyphenol oxidase activities in wheats and flours from Australian and U. S. cultivars. *Journal of Cereal Science*, 1994, 19: 291-296.
- [4] Anderson J V, Morris C F. Purification and analysis of wheat grain polyphenol oxidase (PPO) protein. *Cereal Chemistry*, 2003, 80: 135-143.
- [5] Sosulski F, Krygier K, Hogge L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 3. Composition of phenolic acids in cereal and potato flours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1982, 30: 337-340.
- [6] Jackson G M, Hoseney R C. Effect of endogenous phenolic acids on the mixing properties of wheat flour doughs. *Journal of Cereal Science*, 1986, 4: 79-85.
- [7] Moses O K, Liavoga A, Yong K J, Bagorogoza K. Activity and inhibition of polyphenol oxidase in extracts of bran and other milling fractions from a variety of wheat cultivars. *Cereal Chemistry*, 2001, 78: 514-520.
- [8] Bernier A M, Howes N K. Quantification of variation in tyrosinase activity among durum and common wheat cultivars. *Journal of Cereal*

- Science*, 1994, 19: 157-159.
- [9] Every D, Gilpin M, Larsen N G. Ascorbate oxidase levels in wheat and their relationship to baking quality. *Journal of Cereal Science*, 1996, 23: 145-151.
- [10] Park W J, Shelton D R, Peterson C J, Martin T J, Kachman S D, Wehling R L. Variation in polyphenol oxidase activity and quality characteristics among hard white wheat and hard red winter wheat samples. *Cereal Chemistry*, 1997, 74: 7-11.
- [11] 葛秀秀, 何中虎, 杨金, 张歧军. 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. *作物学报*, 2003, 29: 481-485.
- Ge X X, He Z H, Yang J, Zhang Q J. Polyphenol oxidase activities of Chinese winter wheat cultivars and correlations with quality characteristics. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29: 481-485. (in Chinese)
- [12] Mares D J, Campbell A W. Mapping components of flour and noodle colour in Australian wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 2001, 52: 1297-1309.
- [13] 张立平, 葛秀秀, 何中虎, 王德森, 闫俊, 夏先春, Sutherland M W. 普通小麦多酚氧化酶活性的 QTL 分析. *作物学报*, 2005, 31: 7-10.
- Zhang L P, Ge X X, He Z H, Wang D S, Yan J, Xia X C, Sutherland M W. Mapping QTLs for polyphenol oxidase activity in a DH population from common wheat. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31: 7-10. (in Chinese)
- [14] Anderson J V, Morris C F. An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity. *Crop Science*, 2001, 41: 1697-1705.
- [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: 2007-2023.
- [16] Kruger J E, Matsuo R R, Preston K. A comparison of methods for the prediction of Cantonese noodle colour. *Canadian Journal of Plant Science*, 1992, 72: 1021-1029.
- [17] Hatcher D W, Symons S J, Kruger J E. Measurement of the time-dependent appearance of discolored spots in alkaline noodles by image analysis. *Cereal Chemistry*, 1999, 76: 189-194.
- [18] Morris C F, Jeffers H C, Engle D A. Effect of processing, formula and measurement variables on alkaline noodle color-toward an optimized laboratory system. *Cereal Chemistry*, 2000, 77: 77-85.

(责任编辑 孙雷心)

关于本刊中文版使用结构式写作模版的通知

鉴于广大作者迫切需要掌握科技学术论文写作技巧, 以及论文投稿过程中经常存在的结构性错误等问题, 本刊编辑部拟使用结构式写作模版, 即在国家规定的总体结构框架下, 细化每部分的写作规范。事实上每部分的写作规范本来就已有之。其它行业科技学术期刊也已实行多年。为了体现以读者为本, 同时提高作者稿件的写作水平, 拓展论文的扩散范围, 加快论文的传播效率, 方便审稿专家和期刊、论文评价机构的评审, 从 2006 年第一期开始, 本刊正式使用结构式写作模版。其整体结构见本刊网站 www.ChinaAgriSci.com 中首页右列“标准化规范化”频道→排版格式/模版。从即日起, 作者即应按照这一规范进行写作。有兴趣、有心计的作者, 最好按照本刊规定的版式、样式(网站首页右列, 排版格式)用 word 格式进行排版, 以缩短刊发时滞。限于篇幅, 本刊印刷版将分段介绍摘要、引言、材料与方法、结果、讨论等部分的细化规范。

《中国农业科学》编辑部
2005-06-29