DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.01089

小麦多酚氧化酶基因 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点等位变异与穗发芽抗性的关系

黄义文¹ 代旭冉¹ 刘宏伟¹ 杨 丽¹ 买春艳² 于立强³ 于广军³
张宏军^{1,*} 李洪杰^{1,*} 周 阳^{1,*}

¹ 中国农业科学院作物科学研究所 / 作物分子育种国家工程实验室, 北京 100081; ² 新乡县矮败小麦育种技术创新中心, 河南新乡 453731; ³ 石家庄市农林科学研究院赵县实验基地, 河北赵县 051530

摘 要: *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 是控制小麦多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性的关键基因。有报道 PPO 活性与穗发芽抗性有关, 但 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点不同等位变异对穗发芽抗性的影响尚不明确。本研究利用 248 份我国主栽小麦品种 3 年发芽指数, 结合 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点等位变异分型结果, 研究两个位点不同等位变异及其等位变异组合与穗发芽抗性的关系。结果表明, 发芽指数主要受年份、*Ppo-A1* 位点和 *Ppo-A1* × *Ppo-D1* 互作共同影响。在 *Ppo-A1* 位点, 携带低 PPO 活性等位变异 *Ppo-A1b* 的小麦品种发芽指数显著低于携带高 PPO 活性等位变异 *Ppo-A1a* 的品种, 平均发芽指数相差 5.22%; 相反, 在 *Ppo-D1* 位点携带低 PPO 活性等位变异 *Ppo-D1a* 品种的发芽指数高于携带高 PPO 活性等位变异 *Ppo-D1b* 的品种, 但差异不显著。在 4 种等位变异组合中, *Ppo-A1bPpo-D1b* 组合类型品种的发芽指数最低。上述 *Ppo-A1* 位点等位变异与穗发芽抗性的关系在轮选 13 × 济麦 20 F₂ 及 F_{2:3} 分离群体中得到验证。PPO 活性和 *Ppo-A1* 相对表达量均与发芽指数呈显著正相关。本研究表明, *Ppo-A1b* 等位变异的分子标记可以有效地用于穗发芽抗性辅助选择。

关键词: 小麦; 抗穗发芽育种; 多酚氧化酶; *Ppo-A1b* 等位变异; 分子标记辅助选择

Relationship between the allelic variations at the *Ppo-A1* and *Ppo-D1* loci and pre-harvest sprouting resistance in wheat

HUANG Yi-Wen¹, DAI Xu-Ran¹, LIU Hong-Wei¹, YANG Li¹, MAI Chun-Yan², YU Li-Qiang², YU Guang-Jun³, ZHANG Hong-Jun^{1,*}, LI Hong-Jie^{1,*}, and ZHOU Yang^{1,*}

¹ Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Engineering Laboratory for Crop Molecular Breeding, Beijing 100081, China; ² Center for Technological Innovation of Dwarf-male-sterile Wheat Breeding (Xinxiang), Xinxiang 453731, Henan, China; ³ Zhaoxian Experiment Station, Shijiazhuang Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Zhaoxian 051530, Hebei, China

Abstract: *Ppo-A1* and *Ppo-D1* are the major genes that control the activity of polyphenol oxidase (PPO) in wheat. It has been reported that the activity of polyphenol oxidase affects pre-harvest sprouting (PHS) resistance, but the effect of different alleles/allelic combinations at the *Ppo-A1* and *Ppo-D1* loci on PHS resistance remains unclear. The current study was carried out to elucidate the effects based on the germination index obtained from 248 Chinese wheat cultivars in a three-year trial in combination with genotypic data at the *Ppo-A1* and *Ppo-D1* loci. Analysis of variation for the *Ppo-A1* and *Ppo-D1* loci showed that year, *Ppo-A1* locus and *Ppo-A1* × *Ppo-D1* interaction had significant effects on germination index. At locus *Ppo-A1*, germination index of cultivars carrying the allele *Ppo-A1b* of low PPO activity was 5.22% lower than that carrying the allele *Ppo-A1a* of high PPO

本研究由河北省现代种业科技专项(19226351D), 国家重点研发计划项目(2017YFD0101000)和中国农业科学院创新工程项目资助。This study was supported by the Science and Technology Project for Modern Seed Industry of Hebei (19226351D), the National Key Research and Development Program of China (2017YFD0101000), and the Agricultural Science and Technology Innovation Program of Chinese Academy of Agricultural Sciences.

* 通信作者(Corresponding authors): 张宏军, E-mail: zhanghongjun01@caas.cn; 李洪杰, E-mail: lihongjie@caas.cn; 周阳, E-mail: zhouyang@caas.cn

第一作者联系方式: E-mail: 18838916683@163.com

Received (收稿日期): 2020-11-20; Accepted (接受日期): 2021-03-19; Published online (网络出版日期): 2021-04-01.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20210401.1308.009.html>

activity on average. In contrast, the cultivars carrying the allele *Ppo-D1a* of low PPO activity had higher germination index than that carrying the allele *Ppo-D1b* of high PPO activity at locus *Ppo-D1*, but no significant differences between two alleles. Among the four allelic combinations, the cultivars with the *Ppo-A1bPpo-D1b* had the lowest germination index. The relationship between the alleles at locus *Ppo-A1* and PHS resistance had been verified in the Lunxuan 13 × Jimai 20 F₂ and F_{2,3} segregation populations. There were significantly positive correlations between PPO activity / relative expression level of *Ppo-A1* gene and germination index. This study suggests that functional markers of allele *Ppo-A1b* can be effectively applied in marker-assisted selection for PHS resistance.

Keywords: *Triticum aestivum*; the breeding for resistance to pre-harvest sprouting; polyphenol oxidase; *Ppo-A1b* allele; molecular marker-assisted selection

中国是世界上最大的小麦生产国, 约占全球总产量的 17%^[1]。穗发芽是限制小麦产量和品质的重要自然灾害之一, 在小麦主产国频繁发生^[2]。穗发芽可导致小麦价格降低 20%~50%, 全球每年因穗发芽损失高达 10 亿美元^[3]。我国 83% 的小麦种植地区受到不同程度的穗发芽影响^[4]。近年来, 收获期间的极端天气导致穗发芽频发, 例如 2013、2015 和 2016 年小麦主产区黄淮冬麦区和长江中下游冬麦区穗发芽大面积发生, 对小麦生产造成严重影响^[5]。因此, 提高品种的穗发芽抗性成为我国小麦主产区的重要育种目标。

小麦穗发芽抗性是由多基因控制的复杂数量性状^[6-7], 受环境因素影响大, 分子标记辅助选择能够提高小麦抗穗发芽育种的选择效率。目前, 已经定位了 42 个与穗发芽抗性相关的 QTL^[3,8]。其中, 位于第二、三部分同源群染色体和 4A 染色体上的 6 个穗发芽抗性基因 *TaSdr*^[9]、*TaMFT-3A*^[10]、*Tamyb10*^[11]、*TaDFR*^[12]、*TaVp1*^[13]和 *TaMKK3-A*^[14]已经被克隆并开发出相应的功能标记。Lin 等^[15]利用含有 *TaMFT-3A* 和 *TaMKK3-A* 抗性位点变异的小麦品种 Tutoumai 分别与 AUS1408 和 NW97S186 杂交并回交构建 BC₂F_{2,3} 群体, 发现 *TaMFT-3A* 基因在不同的环境下能够降低发芽率 8.3%~29.0%; *TaMKK3-A* 基因可降低发芽率 6.7%~27.6%; 2 个基因的聚合体可使发芽率降低 9.0%~49.2%。

多酚物质的减少或缺失导致无原花色素大麦突变体休眠期缩短、吸水性增强, 从而加重穗发芽发生^[16]。在小黑麦休眠种子中酚类物质含量较高, 而在发芽的种子中明显较低, 表明酚类物质能够抑制穗发芽的发生^[17]。此外, 在甜樱桃^[18]、苜蓿^[19]和藏红花^[20]等植物上也证实穗发芽抗性与酚类物质含量呈显著正相关。小麦 PPO 可以催化酚类的羟基转化为醌或者催化多酚类变为氧化醌^[21]。醌类物质因其较强的电学性质而发生的自动氧化反应, 是导致小麦面粉食品加工储藏过程中发生褐变的主要原

因^[22]。有研究发现 PPO 活性与小麦穗发芽抗性有关, 并提出 PPO 活性可作为穗发芽抗性筛选的指标^[23-24], 但这需要更多品种和遗传群体验证, 加之 PPO 活性的测定耗时耗力, 因而这个指标难于用于育种后代规模化选择。

控制小麦 PPO 活性基因主要包括位于 2AL 和 2DL 染色体上的 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1*^[25-26]。*Ppo-A1* 基因内含子 191 bp 的插入缺失(InDel)与 PPO 活性密切相关, STS 标记 PPO18 可用来检测高、低 PPO 活性等位变异 *Ppo-A1a* 和 *Ppo-A1b*^[25]。针对 *Ppo-D1* 基因开发的一对显性互补 STS 标记 PPO29 和 PPO16, 可分别检测高、低 PPO 活性等位变异 *Ppo-D1b* 和 *Ppo-D1a*^[26]。这 3 个功能标记可用于 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点不同 PPO 活性等位变异的检测。本研究的目的是阐明这 2 个位点不同等位变异与穗发芽抗性关系, 为开展育种后代穗发芽抗性的分子标记辅助选择提供理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为 248 份 1971—2020 年小麦主栽品种, 其中包括北部麦区品种 13 份、黄淮冬麦区品种 204 份、长江中下游冬麦区品种 17 份和西南冬麦区品种 14 份。利用穗发芽敏感品种轮选 13 (*Ppo-A1aPpo-A1a* 基因型)做为母本, 抗穗发芽品种济麦 20 (*Ppo-A1bPpo-A1b* 基因型)做为父本, 构建轮选 13 × 济麦 20 F₂ 和 F_{2,3} 群体, 共计 266 个家系, 用于验证 *Ppo-A1* 位点不同等位变异与穗发芽抗性关系。

1.2 田间试验

2017—2018 年、2018—2019 年和 2019—2020 年小麦生长季, 在中国农业科学院作物科学研究所新乡试验站(35°31'N, 113°85'E)开展田间试验。小麦主栽品种和轮选 13 × 济麦 20 群体 F_{2,3} 家系每个材料种植 1 行, 行长 2 m, 行距 20 cm, 株距 5 cm; 轮选 13 × 济麦 20 群体 F₂ 单株种植采用 2 m 行长, 行

距 20 cm, 株距 10 cm。播种前, 施用复合肥折合纯 N 200 kg hm⁻², P₂O₅ 191 kg hm⁻² 和 K₂O 41 kg hm⁻² [27]。其他田间管理按照当地大田生产管理进行。

1.3 穗发芽抗性表型评价

2018、2019 和 2020 年连续 3 年对主栽小麦品种穗发芽抗性进行表型鉴定。采用籽粒发芽指数法鉴定穗发芽抗性, 发芽指数越高, 穗发芽抗性越差 [28]。在生理成熟期(开花后约 35 d, 穗茎变黄), 每个材料收获 30 个穗子。室温(25℃)自然风干 4 d, 手工脱粒后放入-20℃冰柜中保存, 统一进行表型评价。发芽指数鉴定设 3 次重复, 每次重复 50 粒种子。种子用 5% 的 NaClO 消毒 15 min, 蒸馏水冲洗 3 次。在无菌培养皿中垫上两张灭菌滤纸并加入适量的蒸馏水, 将消毒后的种子摆放在培养皿中, 种子腹沟朝下。在 25℃ 的条件下培养 7 d。每天统计发芽数, 并挑出发芽的种子。发芽指数(germination index, GI)计算公式如下: $GI (\%) = [(7 \times n_1 + 6 \times n_2 + 5 \times n_3 + 4 \times n_4 + 3 \times n_5 + 2 \times n_6 + n_7) / 7 \times N] \times 100\%$, 其中 n_1 、 n_2 、 n_3 …… n_7 分别代表第 1、2、3……7 d 的发芽数, N 为总粒数 [9]。2019 年和 2020 年, 采用相同方法对轮选 13 × 济麦 20 群体 F₂ 和 F_{2.3} 代进行穗发芽抗性鉴定, 3 次实验重复。在生理成熟期, F₂ 代分单株收获、脱粒、风干后进行

表型鉴定; F_{2.3} 代每个家系随机取 20 个穗子混脱, 风干后进行穗发芽抗性评价。

1.4 PPO 活性基因不同等位变异分子检测

主栽品种每个材料取 10 粒种子放在培养皿中, 取室温生长 5 日龄叶片, 利用 DNA 快速提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司, 北京)提取小麦基因组 DNA。在分蘖期, 轮选 13 × 济麦 20 群体 F₂ 代分单株挂牌取叶片进行 DNA 提取。F_{2.3} 代家系分系取穗进行穗发芽抗性鉴定, 其基因型直接用对应的 F₂ 单株基因型代替。利用 PPO18、PPO16 和 PPO29 引物检测 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点不同等位变异, 扩增片段大小和退火温度见表 1。PCR 扩增在赛默飞世尔 SimpliAmp PCR 仪(ThermoFisher Scientific, USA)上进行, 反应体系为 10 μL, 包括 1 μL DNA 模板(50~100 ng μL⁻¹), 5 μL 2× Taq PCR Master Mix, 正反引物各 1 μL (10 μmol L⁻¹) 和 2 μL ddH₂O。PCR 扩增程序为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环, 72℃ 后延伸 10 min。利用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物, GeneFinder (Bio-V, 中国福建)染色后用 Bio-Rad Gel Doc XR+ 凝胶成像系统扫描, 分析基因型。

表 1 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点不同等位变异检测的功能标记信息

Table 1 Information on the functional markers for identifying different alleles at the *Ppo-A1* and *Ppo-D1* loci

位点 Locus	标记 Marker	引物序列 Primer sequence (5'-3')	等位基因 Allele	扩增片段 Amplified fragment (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	参考文献 Reference
<i>Ppo-A1</i>	PPO18	F: AACTGCTGGCTCTTCTTCCCA	<i>Ppo-A1a</i>	685	60	[25]
		R: AAGAAGTTGCCCATGTCCGC	<i>Ppo-A1b</i>	876		
<i>Ppo-D1</i>	PPO16	F: TGCTGACCGACCTTGACTCC	<i>Ppo-D1a</i>	713	60	[26]
		R: CTCGTCACCGTCACCCGTAT				
	PPO29	F: TGAAGCTGCCGGTCATCTAC	<i>Ppo-D1b</i>	490		
		R: AAGTTGCCCATGTCCTCGCC				

1.5 籽粒 PPO 活性测定

根据 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点等位变异四种组合类型, 每种组合选择 10 个品种进行 PPO 活性测定, 共计 40 个品种。同时, 根据 *Ppo-A1* 位点等位变异差异, 在轮选 13 × 济麦 20 F_{2.3} 群体中各选取 20 个株系进行 PPO 活性测定。两次实验重复。小麦籽粒 PPO 活性测定参照 Anderson 和 Morris [29] 的方法。每个材料挑选 15 粒饱满、无病、大小均匀一致的成熟种子用蒸馏水清洗 2 次, 拭去表面水分, 称重后置于 50 mL 离心管中, 然后加入配好的 L-DOPA/

MOPS 反应缓冲液(50 mmol L⁻¹ 的 MOPS 缓冲液, pH 6.5; 10 mmol L⁻¹ L-DOPA 溶液, 吐温 20) 4.5 mL; 在振荡器上振荡 30 min, 结束后立即放至冰上结束反应。以 L-DOPA/MOPS 反应缓冲液作为空白对照, 利用 SPECORD 200 紫外可见分光光度计 (Analytik Jena AG, Jena, Germany) 测定 475 nm 的吸光值 A。PPO 活性公式如下: PPO 酶活值 (A_{475nm} min⁻¹ g⁻¹ × 10³) = A / (30 min × 15 粒种子克数) × 10³。

1.6 RNA 提取及 qRT-PCR 分析

用于 PPO 活性测定的材料同时用于 *Ppo-A1* 和

Ppo-D1 基因的 qRT-PCR 分析。籽粒总 RNA 提取及纯化采用种子果实 RNA 提取试剂盒(北京金百特生物技术有限公司, 北京)。利用 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司, 北京)进行 RNA 反转录, 反应体系为 20 μL , 包括 4 μL dNTPs Mix, 2 μL Primer Mix, 2 μL RNA 模板 (200~300 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$), 4 μL 5 $\times$ RT buffer, 2 μL (0.1 $\text{mol } \text{L}^{-1}$) DTT, 1 μL (200 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$) HiFi-MMLV 和 7 μL RNAase-free H_2O 。反转录反应程序为 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30~50 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 反应结束后, 置于冰上

冷却。qRT-qPCR 扩增在 CFX Touch 实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad, Hercules, USA)上进行, 反应体系为 20 μL , 包括 10 μL 2 $\times$ Universal SYBR Green Fast qPCR Mix (武汉爱博泰克生物科技有限公司, 湖北武汉), 4 μL cDNA 模板(25 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$), 正反向引物各 0.4 μL (10 $\mu\text{mol } \text{L}^{-1}$), 5.2 μL Nuclease-free H_2O 。引物序列见表 2。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。*Actin* 基因作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法^[30]计算 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 基因相对表达量。设置 3 次重复。

表 2 qRT-PCR 分析引物
Table 2 Primers for qRT-PCR

基因 Gene	上游引物序列 Forward primer sequence (5'-3')	下游引物序列 Reverse primer sequence (5'-3')
<i>Ppo-A1</i>	GCAACTGCCAAACGCCCGAGC	CAGCACGAAGTCGGTGATGCC
<i>Ppo-D1</i>	CCGGACCTTGAGATCCAGGTG.	GAAGGTGTCGTCGCCGATGAG
<i>Actin</i>	GTTTCCTGGAATTGCTGATCGCAT	CATTATTTCATACAGCAGGCAAGC

1.7 统计分析

利用 Microsoft Excel 2019 数据分析工具对发芽指数表型数据进行分析。利用 SAS v9.2 软件(SAS Institute, Cary, NC, USA)进行方差分析和相关分析。通过 SPSS16.0 软件(International Business Machines Corporation, Armonk, New York, USA)对 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点不同等位变异间发芽指数进行差异显著性 *t* 检验和不同等位变异组合发芽指数、PPO 活性以及基因相对表达量多重比较分析(LSD 法)。采用下列公式计算广义遗传力(h^2): $h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_{gy}^2 / y + \sigma_e^2 / ry)$, 其中, σ_g^2 、 σ_{gy}^2 、 σ_e^2 、 r 和 y 分别表示基因型、基因型 $\times$ 年份间互作、重复和年份^[31]。

2 结果与分析

2.1 穗发芽抗性表型分析

248 份小麦品种 3 年发芽指数方差分析发现, 基因型、年份及基因型与年份间互作均方显著($P < 0.01$), 表明发芽指数受三者共同影响(表 3)。发芽指数广义遗传率为 0.95。年份间供试品种发芽指数呈

极显著正相关, 相关系数为 0.69~0.80 ($P < 0.01$) (图 1)。由表 4 可见, 小麦品种间发芽指数差异显著。供试品种 3 年平均发芽指数为 46.70%, 变幅为 11.55%~88.70%, 变异系数为 36.41%。不同年份间发芽指数存在差异。2019 年平均发芽指数最高为 58.39%, 变幅为 17.14%~92.19%, 变异系数为 30.10%; 2020 年平均发芽指数最低为 34.21%, 变幅为 2.95%~88.71%, 变异系数为 55.59%。不同种皮颜色品种间发芽指数同样存在显著差异, 红粒品种发芽指数(36.15%)明显低于白粒品种(48.19%)。发芽指数较低的白粒品种有洛旱 11 (13.84%)、丰产 3 号 (16.38%)和百农 3217 (16.96%), 红粒品种有扬麦 20 (11.56%)、扬麦 15 (14.53%)和扬麦 16 (15.68%)。

亲本轮选 13 平均发芽指数(81.68%)显著高于济麦 20 (28.68%) ($P < 0.05$) (图 2)。2019 年轮选 13 $\times$ 济麦 20 群体 F_2 平均发芽指数为 59.49%, 变幅为 18.10%~90.76%, 变异系数为 27.88%; 2020 年 $F_{2:3}$ 平均发芽指数为 46.94%, 变幅为 19.14%~79.53%, 变异系数为 28.18%。

表 3 2018–2020 年 248 份小麦品种发芽指数方差分析
Table 3 Analysis of variance of germination index of 248 wheat cultivars from 2018 to 2020

变异来源 Source of variation	自由度 DF	均方 Mean square
基因型 Genotypes (G)	247	0.26**
年份 Years (Y)	2	10.91**
基因型 $\times$ 年份互作 G $\times$ Y interaction	494	0.03**
重复 Replications	2	0.04
误差 Error	1486	0.01

**表示在 $P < 0.01$ 水平下差异显著。 **Significance at $P < 0.01$.

图 1 小麦品种年份间发芽指数相关分析
Fig. 1 Correlation analysis of germination index between years in the Chinese wheat cultivars examined
**表示在 $P < 0.01$ 水平下差异显著。 **Significance at $P < 0.01$.

表 4 248 份小麦品种和轮选 13 × 济麦 20 群体平均发芽指数、标准差、变幅和变异系数
Table 4 Mean germination index, standard deviation (SD), variation range, and coefficient of variation from 248 wheat cultivars and Lunxuan 13 × Jimai 20 population (%)

品种/群体 Cultivar/population	年份 Year	均值±标准差 Mean ± SD	变幅 Range	变异系数 Coefficient of variation
248 份小麦品种 248 wheat cultivars	2018	47.46 ± 19.48	5.33–93.71	40.97
	2019	58.39 ± 17.61	17.14–92.19	30.10
	2020	34.21 ± 19.05	2.95–88.71	55.59
	平均 Mean	46.70 ± 17.03	11.55–88.70	36.41
轮选 13 × 济麦 20 群体 Lunxuan 13 × Jimai 20 population	2019 (F_2)	59.49 ± 16.59	18.10–90.76	27.88
	2020 ($F_{2,3}$)	46.94 ± 13.22	19.14–79.53	28.18

图 2 亲本轮选 13 (A)和济麦 20 (B)穗发芽抗性比较(发芽 3 d)
Fig. 2 Comparison of pre-harvest sprouting resistance between parents Lunxuan 13 (A) and Jimai 20 (B) after germination for three days

2.2 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点不同等位变异检测

利用 PPO18、PPO16 和 PPO29 标记检测 248 份小麦品种 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点的不同等位变异。在 *Ppo-A1* 位点, PPO18 标记在洛旱 7 号、新麦 20 和淮麦 20 等 113 份小麦品种中扩增出 685 bp 片段, 表明这些品种携带高 PPO 活性等位变异 *Ppo-A1a*; 京 411、山农 20 和石 4185 等 135 份小麦品种中扩增出 876 bp 片段, 表明这些品种携带低 PPO 活性等位变异 *Ppo-A1b* (图 3-A)。在 *Ppo-D1* 位点, PPO16 标记在石麦 12、山农 20 和新麦 20 等 129 份小麦品种中扩

增出 713 bp 片段, 表明这些品种携带低 PPO 活性等位变异 *Ppo-D1a*; PPO29 标记在京 411、洛旱 7 号和石 4185 等 119 份小麦品种中扩增出 490 bp 片段, 表明这些品种携带高 PPO 活性等位变异 *Ppo-D1b* (图 3-B)。所有供试品种在 2 个位点没有发现杂合基因型。
2.3 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点不同等位变异与穗发芽抗性关系

248 份小麦品种 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点 3 年发芽指数方差分析发现, 发芽指数受年份、*Ppo-A1* 位点以及 *Ppo-A1* × *Ppo-D1* 互作共同影响(表 5)。在

图 3 分子标记 PPO18、PPO16 和 PPO29 检测部分小麦品种 *Ppo-A1* (A)和 *Ppo-D1* (B)位点的不同等位变异
Fig. 3 Detection of alleles at the *Ppo-A1* and *Ppo-D1* loci in selected wheat cultivars using markers PPO18, PPO16, and PPO29
M: DNA ladder 2000; 1: 京 411; 2: 洛旱 7 号; 3: 山农 20; 4: 石 4185; 5: 石麦 12; 6: 新麦 20; 7: 开麦 20; 8: 许农 5 号; 9: 淮麦 20; 10: 邢麦 13。
M: marker DNA ladder 2000; 1: Jing 411; 2: Luohan 7; 3: Shannong 20; 4: Shi 4185; 5: Shimai 12; 6: Xinmai 20; 7: Kaimai 20; 8: Xunong 5; 9: Huaimai 20; 10: Xingmai 13.

表 5 248 份小麦品种 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点 3 年发芽指数方差分析
Table 5 Analysis of variance of germination index for 248 wheat cultivars at the *Ppo-A1* and *Ppo-D1* loci over three years

变异来源 Source of variation	自由度 DF	均方 Mean square
年份 Years (Y)	2	3.543**
<i>Ppo-A1</i>	1	0.512**
<i>Ppo-D1</i>	1	0.009
<i>Ppo-A1</i> × <i>Ppo-D1</i> 互作 <i>Ppo-A1</i> × <i>Ppo-D1</i> interaction	1	0.173*
<i>Ppo-A1</i> × 年份互作 <i>Ppo-A1</i> × Y interaction	2	0.010
<i>Ppo-D1</i> × 年份互作 <i>Ppo-D1</i> × Y interaction	2	0.001
<i>Ppo-A1</i> × <i>Ppo-D1</i> × 年份互作 <i>Ppo-A1</i> × <i>Ppo-D1</i> × Y interaction	2	0.010
误差 Error	732	0.035

*和**表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平下差异显著。* and ** represent significance at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

Ppo-A1 位点, 携带 *Ppo-A1b* 等位变异品种(135 份)发芽指数显著低于携带 *Ppo-A1a* 等位变异品种(113 份) ($P < 0.01$)。2018 年、2019 年和 2020 年, *Ppo-A1b* 品种比 *Ppo-A1a* 品种发芽指数分别降低 3.90%、6.33%和 5.43%, 3 年平均降低 5.22% (图 4-A)。相反, 在 *Ppo-D1* 位点

携带低多酚氧化酶等位变异 *Ppo-D1a* 品种(129 份)一致表现比携带高多酚氧化酶等位变异 *Ppo-D1b* 品种(119 份)更高的发芽指数, 但两种等位变异品种间发芽指数差异不显著。在 2018 年、2019 年、2020 年以及 3 年平均分别高 1.6%、1.4%、1.5%和 1.5% (图 4-B)。

图 4 小麦品种 *Ppo-A1* (A)和 *Ppo-D1* (B)位点不同等位变异间发芽指数比较
Fig. 4 Comparison of germination index between alleles at the *Ppo-A1* (A) and *Ppo-D1* (B) loci in the wheat cultivars examined
表示在 $P < 0.01$ 水平下差异显著。圆点: 极端值。 represents significant at $P < 0.01$. Dot: outlier.

2.4 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点不同等位变异组合与穗发芽抗性关系

方差分析发现 *Ppo-A1* × *Ppo-D1* 互作均方显著, 表明 2 个位点共同影响穗发芽抗性。4 种等位变异组合发芽指数比较分析发现, 不同等位变异组合品种间存在差异。其中, *Ppo-A1* 位点低 PPO 活性等位变异 *Ppo-Alb* 和 *Ppo-D1* 位点高 PPO 活性等位变异 *Ppo-D1b* 组合品种 *Ppo-AlbPpo-D1b* (71 份) 平均发芽指数最低, 为 42.52%; 其次为两个低 PPO 活性等位变异组合品种 *Ppo-AlbPpo-D1a* (64 份), 平均发芽指

数为 46.30%; 两个高 PPO 活性等位变异组合 *Ppo-AlaPpo-D1b* (48 份) 发芽指数最高, 平均为 50.90% (图 5)。4 种组合品种中, *Ppo-AlbPpo-D1b* 与 *Ppo-AlaPpo-D1b* 相比, 2018 年、2019 年、2020 年和 3 年平均发芽指数分别降低 5.88%、9.19% ($P < 0.01$)、10.10% ($P < 0.01$) 和 8.39% ($P < 0.01$); *Ppo-AlbPpo-D1b* 与 *Ppo-AlaPpo-D1a* 相比, 2018 年、2019 年、2020 年和 3 年平均发芽指数分别降低 4.95%、6.88% ($P < 0.01$)、6.16% 和 5.99% ($P < 0.01$)。其他等位变异组合间发芽指数无显著差异。

图 5 小麦品种 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点不同等位变异组合间发芽指数比较

Fig. 5 Comparison of germination index among allelic combinations at the *Ppo-A1* and *Ppo-D1* loci in the wheat cultivars examined. Different letters indicate significance at $P < 0.01$ in germination index between alleles. Dot: outlier.

Different letters indicate significance at $P < 0.01$ in germination index between alleles. Dot: outlier.

图 6 轮选 13 × 济麦 20 群体 *Ppo-A1* 位点不同等位变异间发芽指数比较

Fig. 6 Comparison of germination index among genotypes at the *Ppo-A1* locus in the Lunxuan 13 × Jimai 20 population. Different letters indicate significant difference at $P < 0.01$ in germination index between alleles.

Different letters indicate significant difference at $P < 0.01$ in germination index between alleles.

2.5 轮选 13 × 济麦 20 遗传群体 *Ppo-A1* 位点不同等位变异间穗发芽抗性比较

利用 PPO18 标记分析, 轮选 13 × 济麦 20 F_2 群

体检测出 80 株纯合 *Ppo-Ala* 基因型(*Ppo-AlaPpo-Ala*), 64 株纯合 *Ppo-Alb* 基因型(*Ppo-AlbPpo-Alb*), 122 株是杂合基因型(*Ppo-AlaPpo-Alb*)。根据 F_2 和 $F_{2:3}$ 表型, *Ppo-AlbPpo-Alb* 基因型发芽指数显著低于杂合型和 *Ppo-AlaPpo-Ala* 基因型($P < 0.01$)。与 *Ppo-AlaPpo-Ala* 基因型相比, *Ppo-AlbPpo-Alb* 基因型发芽指数在 2019 年和 2020 年分别降低 9.17% ($P < 0.01$) 和 4.77% ($P < 0.01$); 与杂合型相比, *Ppo-AlbPpo-Alb* 基因型发芽指数在 2019 年和 2020 年分别下降 10.44% ($P < 0.01$) 和 5.48% ($P < 0.01$) (图 6)。*Ppo-AlaPpo-Ala* 基因型与杂合型间发芽指数差异不显著。

2.6 不同基因型 PPO 活性以及 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 基因表达分析

4 种等位变异组合品种 *Ppo-AlaPpo-D1a*、*Ppo-AlaPpo-D1b*、*Ppo-AlbPpo-D1a* 和 *Ppo-AlbPpo-D1b* 的平均 PPO 活性分别为 19.32、20.13、5.00 和 4.33 ($A_{475nm}min^{-1}g^{-1} \times 10^3$)。其中, 组合 *Ppo-AlbPpo-D1a* 和 *Ppo-AlbPpo-D1b* 的 PPO 活性和发芽指数显著低于 *Ppo-AlaPpo-D1a* 和 *Ppo-AlaPpo-*

D1b 组合($P < 0.01$) (图 7-A)。在轮选 13 × 济麦 20 $F_{2:3}$ 群体中, 基因型 *Ppo-A1aPpo-A1a* 和 *Ppo-A1bPpo-A1b* 平均 PPO 活性分别为 19.33 和 9.62 ($A_{475nm}min^{-1}g^{-1} \times 10^3$), 两种基因型间在 PPO 活性和发芽指数上同样存在极显著差异($P < 0.01$) (图 7-B)。相关分析发现, 40 个等位变异组合品种 PPO 活性与发芽指数呈极显著正相关($r = 0.80$, $P < 0.01$), 并且在 $F_{2:3}$ 群体中 40 个家系 PPO 活性与发芽指数同样呈现极显著正相关($r = 0.74$, $P < 0.01$)。qRT-PCR 分析发现, 在低发芽指数 *Ppo-A1bPpo-D1a* 和 *Ppo-A1bPpo-D1b* 组合品种中 *Ppo-A1* 基因相对表达量要低于高发芽指数的 *Ppo-A1aPpo-D1a* 和 *Ppo-A1aPpo-D1b* 组合品种(图 8-A), 相比

之下, *Ppo-D1* 基因表达量无明显差异(图 8-B)。在轮选 13 × 济麦 20 $F_{2:3}$ 群体中, 两种不同基因型间 *Ppo-A1* 基因相对表达量存在显著差异(图 8-C)。

3 讨论

本研究发现, 供试小麦品种间发芽指数存在较大差异。其中, 丰产 3 号、百农 3217 和洛旱 11 等白粒品种以及扬麦 20、扬麦 15 和扬麦 16 等红粒品种发芽指数较低, 表明这些品种具有很好的穗发芽抗性, 而且它们大部分曾经是各自生态区主推的小麦品种, 具有优良的农艺性状, 可作为抗穗发芽育种的亲本。不同麦区品种穗发芽抗性存在显著差异, 其中, 长江中下游冬麦区供试的 17 个品种抗穗发芽

图 7 不同基因型品种(A)和轮选 13 × 济麦 20 群体 $F_{2:3}$ 株系(B) PPO 活性比较

Fig. 7 Comparison of PPO activity among wheat cultivars (A)/ $F_{2:3}$ lines (B) in the Lunxuan 13 × Jimai 20 population with different genotypes

不同字母表示基因型间发芽指数或者 PPO 活性在 0.01 水平显著。

Different letters indicate significant difference at $P < 0.01$ in germination index (GI) / PPO activity among genotypes.

图 8 不同基因型品种(A 和 B)和轮选 13 × 济麦 20 群体 $F_{2:3}$ 株系(C) *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 基因实时定量表达分析

Fig. 8 Quantitative real time-PCR expression analysis of *Ppo-A1* and *Ppo-D1* genes in wheat cultivars (A and B) and $F_{2:3}$ lines (C) in the Lunxuan 13 × Jimai 20 population

不同字母表示基因型间发芽指数或者基因相对表达水平在 0.01 水平显著。

Different letters indicate significant difference at $P < 0.01$ in germination index (GI) / relative expression level among genotypes.

能力整体较强。可能原因一是这个麦区是穗发芽高发区,自然选择和育种的有目的选择使品种的穗发芽抗性较强;二是这些品种大部分是红粒品种,一般红粒品种比白粒品种的穗发芽抗性更强^[8]。

本研究通过对 248 份主栽品种 *Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点等位变异与穗发芽抗性关系分析表明,携带低 PPO 活性等位变异 *Ppo-A1b* 的小麦品种发芽指数显著低于携带高 PPO 活性等位变异 *Ppo-A1a* 的品种。利用轮选 13 × 济麦 20 组合 F_2 和 $F_{2.3}$ 分离群体验证得出相同的结论。在 *Ppo-D1* 位点,两种等位变异间穗发芽抗性差异不显著。张立平等^[33]利用中优 9507 × CA9632 DH 群体在染色体 2AL 和 2DL 上发现了 2 个控制小麦 PPO 活性主效 QTL,分别解释表型变异 37.9%~50.0%和 25.0%~29.1%,说明 *Ppo-D1* 位点对 PPO 活性的效应小于 *Ppo-A1* 位点。携带 *Ppo-A1a* 的品种 PPO 活性(单位为 $A_{475nm} \min^{-1} g^{-1} \times 10^3$)为 40.5,携带 *Ppo-A1b* 的品种 PPO 活性为 20.6,两者相差 19.9;携带 *Ppo-D1a* 的品种 PPO 活性为 27.5,携带 *Ppo-D1b* 的品种 PPO 活性为 34.5,两者相差 7.0^[26]。在某些遗传背景下,*Ppo-D1* 位点不同等位变异之间 PPO 活性无差异或呈现相反的表现型,即含有 *Ppo-D1a* 等位变异却表现高 PPO 活性^[32]。通过对 40 个主栽品种 PPO 活性测定发现,携带 *Ppo-D1a* 等位变异的品种为 12.18, *Ppo-D1b* 等位变异的品种为 13.91,两者间无显著差异。由此可见, *Ppo-D1* 位点效应较小,并且不同等位变异间 PPO 活性无明显差异,可能是导致该位点不同等位变异间穗发芽抗性差异不显著的主要原因。

Nilthong 等^[32]发现, *Ppo-A1* 位点杂合基因型 PPO 活性介于两种纯合基因型之间,尽管略高于双亲的平均值,但明显低于纯合 *Ppo-A1a* 基因型。在轮选 13 × 济麦 20 群体中,纯合高 PPO 活性等位变异 *Ppo-A1a* 基因型和杂合基因型材料的发芽指数相近,而且均显著高于纯合低 PPO 活性等位变异 *Ppo-A1b* 基因型,由此可见,杂合基因型发芽指数明显偏离中亲值,具体原因有待进一步研究。但值得注意的是在轮选 13 × 济麦 20 F_2 和 $F_{2.3}$ 群体中杂合基因型均表现出与纯合高 PPO 活性 *Ppo-A1a* 基因型相近的高发芽指数,高 PPO 活性 *Ppo-A1a* 基因表现出显性效应。

方差分析发现, *Ppo-A1* × *Ppo-D1* 互作均方显著,表明两个位点共同影响穗发芽抗性,但 4 种等位变异组合发芽指数比较分析发现,2 个低 PPO 活性等位

变异组合品种 *Ppo-A1bPpo-D1a* (64 份, 46.30%) 的发芽指数并非最低,而是组合 *Ppo-A1bPpo-D1b* (71 份, 42.52%) 的发芽指数最低,且分别低于携带等位变异 *Ppo-A1b* (44.31%) 和 *Ppo-D1b* (45.90%) 品种在单个位点的发芽指数;加之在单个位点,等位变异 *Ppo-A1b* 和 *Ppo-D1b* 相对于同一位点另一个等位变异具有更好的穗发芽抗性。由此可见, *Ppo-A1bPpo-D1b* 组合具有更低的发芽指数可能是等位变异 *Ppo-A1b* 和 *Ppo-D1b* 的累加效应造成的结果。

降低 PPO 活性是重要的小麦品质育种目标,根据 *Ppo-A1b* 优良等位基因开发的功能标记已经用于低 PPO 活性材料筛选^[34]。本研究表明, *Ppo-A1b* 功能标记可以同时用于穗发芽抗性的选择,为选育优质、抗穗发芽品种提供了重要信息。抗穗发芽基因的分子标记辅助选择技术在许多国家的小麦育种中广泛应用^[15,35],选择同时具有抗穗发芽基因和低 PPO 活性基因可能是提高穗发芽抗性的重要育种途径之一。

4 结论

我国小麦育成品种间发芽指数变异较大。*Ppo-A1* 和 *Ppo-D1* 位点发芽指数受年份、*Ppo-A1* 位点以及 *Ppo-A1* × *Ppo-D1* 互作共同影响。*Ppo-A1* 位点不同等位变异间穗发芽抗性差异显著; *Ppo-D1* 位点等位变异间发芽指数没有显著差异。4 种等位变异组合品种中,具有 *Ppo-A1bPpo-D1b* 的品种发芽指数最低(42.52%), *Ppo-A1bPpo-D1a* 组合次之(46.30%)。轮选 13 × 济麦 20 遗传群体研究结果进一步证明低 PPO 活性等位变异 *Ppo-A1b* 与穗发芽抗性显著相关,这个等位变异分子标记可用于穗发芽抗性育种的分子标记辅助选择。

References

- [1] Li H J, Zhou Y, Xin W L, Wei Y Q, Zhang J L, Guo L L. Wheat breeding in northern China: achievements and technical advances. *Crop J*, 2019, 7: 718–729.
- [2] Ali A, Cao J J, Jiang H, Chang C, Zhang H P, Sheikh S W, Shah L, Ma C X. Unraveling molecular and genetic studies of wheat (*Triticum aestivum* L.) resistance against factors causing pre-harvest sprouting. *Agronomy*, 2019, 9: 117.
- [3] Depauw R M, Knox R E, Singh A K, Fox S L, Humphreys D G, Hucl P. Developing standardized methods for breeding pre-harvest sprouting resistant wheat, challenges and successes in Canadian wheat. *Euphytica*, 2012, 188: 7–14.
- [4] Liu C X, Ding F, Hao F H, Yu M, Lei H H, Wu X Y, Zhao Z X, Guo H X, Yin J, Wang Y L. Reprogramming of seed metabolism

- facilitates pre-harvest sprouting resistance of wheat. *Sci Rep*, 2016, 6: 20593.
- [5] Zhu Y L, Wang S X, Wei W X, Xie H Y, Liu K, Zhang C, Wu Z Y, Jiang H, Cao J J, Zhao L X. Genome-wide association study of pre-harvest sprouting tolerance using a 90K SNP array in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2019, 132: 2947–2963.
 - [6] Liu Y J, Liu Y X, Zhou Y, Wight C, Pu Z, Qi P F, Jiang Q T, Deng M, Wang Z X, Wei Y M. Conferring resistance to pre-harvest sprouting in durum wheat by a QTL identified in *Triticum spelta*. *Euphytica*, 2017, 213: 19.
 - [7] Shao M Q, Bai G H, Rife T W, Jesse P, Lin M, Liu S B, Cai H, Tadele K, Allan F, Harold T. QTL mapping of pre-harvest sprouting resistance in a white wheat cultivar Danby. *Theor Appl Genet*, 2018, 131: 1683–1697.
 - [8] Vetch J M, Stougaard R N, Martin J M, Giroux M J. Revealing the genetic mechanisms of pre-harvest sprouting in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci*, 2019, 281: 180–185.
 - [9] Zhang Y J, Xia X C, He Z H. The seed dormancy allele *TaSdr-A1a* associated with pre-harvest sprouting tolerance is mainly present in Chinese wheat landraces. *Theor Appl Genet*, 2017, 130: 81–89.
 - [10] Nakamura S, Abe F, Kawahigashi H, Nakazono K, Tagiri A, Matsumoto T, Utsugi S, Ogawa T, Handa H, Ishida H. A wheat homolog of MOTHER OF FT AND TFL1 acts in the regulation of germination. *Plant Cell*, 2011, 23: 3215–3229.
 - [11] Himi E, Noda K. Red grain colour gene (*R*) of wheat is a Myb-type transcription factor. *Euphytica*, 2005, 143: 239–242.
 - [12] Yang G H, Zhao X Q, Li B, Liu J Z, Li Z S. Molecular cloning and characterization of a DFR from developing seeds of blue-grained wheat in anthocyanin biosynthetic pathway. *Acta Bot Sin*, 2003, 45: 1329–1338.
 - [13] Bailey P C, McKibbin R S, Lenton J R, Holdsworth M J, Flintham J E, Gale M D. Genetic map locations for orthologous *Vp1* genes in wheat and rice. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 281–284.
 - [14] Torada A, Koike M, Ogawa T, Takenouchi Y, Tadamura K, Wu J, Matsumoto T, Kawaura K, Ogihara Y. A causal gene for seed dormancy on wheat chromosome 4A encodes a MAP kinase. *Curr Biol*, 2016, 26: 782–787.
 - [15] Lin M, Liu S B, Zhang G R, Bai G H. Effects of *TaPHS1* and *TaMKK3-A* genes on wheat pre-harvest sprouting resistance. *Agronomy*, 2018, 8: 210.
 - [16] 吴玉良, 杨煜峰. 无原花色素大麦突变体穗发芽的研究. 浙江农业大学学报, 1996, 22: 647–650.
Wu Y L, Yang Y F. Study on pre-harvest sprouting of barley mutants without proanthocyanidins. *J Zhejiang Agric Univ*, 1996, 22: 647–650 (in Chinese with English abstract).
 - [17] Weidner S, Krupa U, Amarowicz R, Karamac M, Abe S. Phenolic compounds in embryos of triticale caryopses at different stages of development and maturation in normal environment and after dehydration treatment. *Euphytica*, 2002, 126: 115–122.
 - [18] 魏海蓉, 高东升, 李宪利. 植物生长调节剂对甜樱桃休眠的调控及花芽酚类物质含量的影响. 园艺学报, 2005, 32: 17–21.
Wei H R, Gao D S, Li X L. Effects of plant growth regulators on the content of phenolics in sweet cherry dormant flower buds and dormancy. *Acta Horti Sin*, 2005, 32: 17–21 (in Chinese with English abstract).
 - [19] 宋亮, 潘开文, 王进闯, 马玉红. 酚酸类物质对苜蓿种子萌发及抗氧化酶活性的影响. 生态学报, 2006, 10: 3393–3403.
Song L, Pan K W, Wang J C, Ma Y H. Effects of phenolic acids on seed germination and seedling antioxidant enzyme activity of alfalfa. *Acta Ecol Sin*, 2006, 10: 3393–3403 (in Chinese with English abstract).
 - [20] Esmaeili N, Ebrahimzadeh H, Abdi K. Correlation between polyphenol oxidase (PPO) activity and total phenolic contents in *Crocus sativus* L. Corms during dormancy and sprouting stages. *Pharmacogn Mag*, 2017, 13: S519–S524.
 - [21] Demeke T, Morris C F, Campbell K G, King G E, Anderson J A, Chang H G. Wheat polyphenol oxidase: distribution and genetic mapping in three inbred line populations. *Crop Sci*, 2001, 41: 1750–1757.
 - [22] Baik B, Czuchajowska Z, Pomeranz Y. Comparison of polyphenol oxidase activities in wheats and flours from Australian and US cultivars. *J Cereal Sci*, 1994, 19: 291–296.
 - [23] 王宝凤, 付金锋, 董立峰. 多酚氧化酶活性与小麦抗穗发芽的关系及抗穗发芽新品种秦麦 3 号的选育. 麦类作物学报, 2006, 29: 97–100.
Wang B F, Fu J F, Dong L F. The Relationship between activity of polyphenol oxidase and resistance to pre-harvest sprouting in wheat and breeding of Qinmai 3 with high resistance to PHS. *J Triticeae Crops*, 2006, 29: 97–100 (in Chinese with English abstract).
 - [24] 王宝凤, 杨雪, 付金锋, 董立峰, 马理. 低酚酶活性选择对小麦穗发芽的影响. 核农学报, 2015, 29: 899–907.
Wang F B, Yang X, Fu J F, Dong L F, Ma L. Effects of consecutive selection for low polyphenol oxidase activity on wheat pre-harvest sprouting. *J Nucl Agric Sci*, 2015, 29: 899–907 (in Chinese with English abstract).
 - [25] Sun D J, He Z H, Xia X C, Zhang L P, Morris C F, Appels R, Ma W J, Wang H. A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat. *Mol Breed*, 2005, 16: 209–218.
 - [26] He X Y, He Z H, Zhang L P, Sun D J, Morris C F, Fuerst E P, Xia X C. 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. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 47–58.
 - [27] 买春艳, 李洪杰, 刘宏伟, 杨丽, 于立强, 周阳, 张宏军. 北方冬麦区小麦品种产量相关性状和幼穗分化特点研究. 麦类作物学报, 2018, 7: 773–781.
Mai C Y, Li H J, Liu H W, Yang L, Yu L Q, Zhou Y, Zhang H J. Characterization of yield related traits and inflorescence differentiation in representative wheat cultivars from the northern China winter wheat region. *J Triticeae Crops*, 2018, 7: 773–781 (in Chinese with English abstract).
 - [28] Martinez S A, Godoy J, Huang M, Zhang Z W, Carter A H, Garland Campbell K A, Steber C M. Genome-wide association mapping for tolerance to pre-harvest sprouting and low falling numbers in wheat. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 141.
 - [29] Anderson J V, Morris C F. An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity. *Crop Sci*, 2001, 41: 1697–1705.
 - [30] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression

- data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402–408.
- [31] Jin H, Wen W E, Liu J D, Zhai S N, Zhang Y, Yan J, Liu X Y, Xia X C, He Z H. Genome-wide QTL mapping for wheat processing quality parameters in a Gaocheng 8901/Zhoumai 16 recombinant inbred line population. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1032.
- [32] 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 Agron Sin*, 2005, 31: 7–10 (in Chinese with English abstract).
- [33] Nilthong S, Graybosch R A, Baenziger P S. Inheritance of grain polyphenol oxidase (PPO) activity in multiple wheat (*Triticum aestivum* L.) genetic backgrounds. *Theor Appl Genet*, 2012, 125: 1705–1715.
- [34] 张晓, 高德荣, 李曼, 刘大同, 吴素兰, 江伟, 吕国锋. 小麦面粉和鲜面片色泽及 *Psy-A1* 与 *Ppo-A1* 等位变异检测. *麦类作物学报*, 2019, 39: 415–422.
- Zhang X, Gao D R, Li M, Liu D T, Wu S L, Jiang W, Lyu G F. Color of flour and fresh dough sheet of wheat varieties and detection of allelic variations for genes *Psy-A1* and *Ppo-A1*. *J Triticeae Crops*, 2019, 39: 415–422 (in Chinese with English abstract).
- [35] Kato K, Maruyama-Funatsuki W, Yanaka M, Ban Y, Takata K. Improving preharvest sprouting resistance in durum wheat with bread wheat genes. *Breed Sci*, 2017, 67: 466–471.