

文章编号:1000-8551(2013)01-0028-05

# 利用 CAPS 标记推测花生品种(系) FAD2 位点基因型的研究

陈静<sup>1</sup> 白鑫<sup>2</sup> 胡晓辉<sup>1</sup> 苗华荣<sup>1</sup> 崔凤高<sup>1</sup> 禹山林

(1. 山东省花生研究所/农业部花生生物学与遗传育种重点实验室,山东省花生重点实验室,山东 青岛 266100;

2. 青岛农业大学,山东 青岛 266109)

**摘要:**以 5 个高油酸含量花生品种(系)和 2 个普通油酸含量花生品种为试材,利用 CAPS 标记对这些品种(系)的 FAD2 位点基因型进行分析。结果表明:5 个高油酸含量花生品种(系)的油酸含量均在 80% 以上,普通油酸含量品种花育 22 号和花育 28 号油酸含量分别为 51.62% 和 41.38%。基于 CAPS 标记在 7 个品种(系)中的扩增产物及酶切带型分析推测,AhFAD2A 位点花育 28 号为野生型,其他 6 个品种(系)符合 448 G > A 突变类型;AhFAD2B 位点花育 28 号和花育 22 号为野生型,开农 H03-3、花育 32 号、P76 和 F18 符合 441-442insA 突变类型,而 06B16 在该位点不符合 441-442insA 突变类型。

**关键词:**花生;高油酸;CAPS 标记

## IDENTIFICATION OF FAD2 GENOTYPE FOR PEANUT CULTIVARS AND STRAINS BY CAPS MARKER

CHEN Jing<sup>1</sup> BAI Xin<sup>2</sup> HU Xiao-hui<sup>1</sup> MIAO Hua-rong<sup>1</sup> CUI Feng-gao<sup>1</sup> YU Shan-lin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Peanut Biology and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, P. R. China, Shandong Provincial Key Laboratory of Peanut, Shandong Peanut Research Institute, Qingdao, Shandong 266100; 2. Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract:** In this study, five high-oleate cultivars (strains) and two normal-oleate cultivars were selected as materials. FAD2 genotype of these cultivars and strains were analyzed. The results showed that the oleic acid content of five high-oleate cultivars and strains exceeded 80%. The oleic acid content of normal-oleate cultivars (Huayu 22 and Huayu 28) were 51.62% and 41.38%, respectively. According to the amplicons and digested products, i. e CAPS marker analysis, we deduced that Huayu 28 had wild-type alleles of ahFAD2A, while other six cultivars (strains) had mutant allele for the CAPS of 448G > A transition. For another CAPS of the ahFAD2B, a base pair insertion (441-442), Huayu 28 and Huayu 22 had the wild-type allele, while ahFAD2B of high-oleate cultivars (strains) except 06B16 had the mutant allele.

**Key words:** peanut; high oleic acid; CAPS marker

花生是世界范围内广泛栽培的油料作物,也是我国重要的油料作物和经济作物。花生子仁中的油酸含量是影响花生油理化稳定性和营养价值的重要品质指标,亚油酸含量高的花生油易于氧化酸败、货架寿命短,油酸含量高的花生油对人体有益,可降低超重人群的心血管疾病和血浆中的低密度脂蛋白胆固醇含量、

维持高密度脂蛋白胆固醇的含量<sup>[1]</sup>。所以“十五”以来我国花生品质育种的重要目标之一就是培育高油酸花生品种。截止目前,花生高油酸特性的遗传规律、高油酸突变体的创制、分子机制的研究以及高油酸品种的培育均有报道<sup>[2]</sup>。高油酸含量是花生重要的品质性状,为提高育种效率,该性状 DNA 标记辅助选择方

收稿日期:2012-02-23 接受日期:2012-04-23

基金项目:山东省良种工程(高产优质出口专用花生新品种培育),青岛市科技发展计划(10-3-4-14-2-jch)

作者简介:陈静(1976-),女,博士研究生,副研究员,主要从事花生遗传育种研究。Tel:0532-97631512;E-mail:mianbaohua2008@126.com

法的建立也非常必要。Chu 等<sup>[3,4]</sup>基于花生高油酸突变候选基因 *FAD2A* 和 *FAD2B* 的序列开发了 CAPS 标记,用于区分美国的高油酸突变材料。Barkley 等利用荧光定量 PCR 法鉴别美国核心种质资源中的 *FAD2B* 位点<sup>[5]</sup>,其局限性一是需要荧光定量标记探针,增加了花费;二是仅能区分 *FAD2B* 位点是否发生突变。这些研究均基于美国的高油酸花生材料,我国也有一些高油酸突变材料和育成的高油酸花生品种,相关标记在我国高油酸材料中的应用有待进一步分析。本研究利用 CAPS 标记对我国的 2 个普通油酸含量和 5 个高油酸含量花生品种(系)进行扩增酶切,分析酶切带型,推测这些品种(系)FAD 位点的突变类型,以期为大规模鉴别我国花生品种 FAD 位点的基因型奠定基础,为高油酸育种工作中亲本的选择提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

以 5 个高油酸含量的品种(系)(开农 H03-3<sup>[8]</sup>、花 育 32 号<sup>[9]</sup>、P76、06B16<sup>[10]</sup>、F18)和 2 个普通油酸含

量的品种花 育 22 号<sup>[6]</sup>、花 育 28 号<sup>[7]</sup>为试材。其中开农 H03-3 来源于河南省开封市农林科学研究所,通过安徽省品种鉴定;花 育 32 号来源于山东省花生研究所,通过山东省品种审定;P76 和 F18 为来源于山东省花生研究所的高油酸品系;06B16 来源于美国;花 育 22 号和花 育 28 号均由山东省花生研究所育成,通过山东省农作物品种审定委员会审定。材料种植于山东省花生研究所试验站。

### 1.2 脂肪酸测定方法

采用 GC 法测定花生种子脂肪酸含量。样品处理:将待测花生仁磨碎,称取 20mg 加入 5mL 离心管中,加入 1mL 的笨:石油醚(1:1),静置 5min。加入 1.5mL 的 0.5mol·L<sup>-1</sup>的甲醇钠溶液,静置 10min。加入 2mL 的饱和 NaCl 溶液,静置至上清液清澈(30min 以上)。取上清 60μL 至样品瓶中,加入 600mL 石油醚稀释后上机检测。测定参数:气相色谱仪型号 AgilentTechnologies 7890A。载气为氦气,色谱柱初温 210℃,维持 9min,升温速率 20℃·min<sup>-1</sup>,程序升温至 230℃,并在此温度下维持 8min。分流比 30:1,检测器温度 300℃。氢气流量 40mL·min<sup>-1</sup>,空气流量 400

表 1 高油亚比花生的分子标记<sup>[4]</sup>

Table1 Molecular markers for high oleic:linoleic acid ratio (O/L) peanut

目标基因 target gene	突变 mutation	引物 primer	分子标记 molecular marker	高油亚比花生 high O/L peanut
AhFAD2A	448 G > A	af19 (F) : gattactgattattgactt 1056 (R) : ccaacccaacaccttcagag	Hpy99I AhFAD2A 突变位点无法酶切 ahFAD2A mutant allele can not be digested AhFAD2A 野生位点可以酶切 ahFAD2A wild-type allele can be digested	F435 及其后代 F435 and its derivatives Georgia - 02C, Georgia - 05E GeorgiaHi-O/L C458 (Flavorrunner 458)
AhFAD2B	441-442insA	1344 (F) : ggagctttaacaacacaa 1345 (R) : atatgggagcataagggt	Hpy188I AhFAD2B 突变位点酶切 ahFAD2B mutant allele can be digested AhFAD2A 和 AhFAD2B 均为野生位点的无法酶切 ahFAD2A allele and ahFAD2B wild-type alleles can not be digested	F435 及其后代 F435 and its derivatives Georgia-02C Georgia-05E GeorgiaHi-O/L
		bf19 (F) : cagaaccattagctttg R1/FAD (R) : ctctgactatgcatcag	Hpy188I 突变位点酶切 (bp) : 505 263 213 171 32 12 Digestion products of mutant allele (bp) : 505, 263, 213, 171, 32, 12 野生位点酶切 (bp) : 736 263 171 32 12 Digestion products of wild-type allele (bp) : 736, 263, 171, 32, 12	
	665 - 666 insMITE	bf19 (F) : cagaaccattagctttg R1/FAD (R) : ctctgactatgcatcag	AhFAD2B 突变位点产物片段大小为 1.4kb ahFAD2B mutant allele has a fragment size of 1.4kb AhFAD2B 野生位点产物片段大小为 1.2kb ahFAD2B wild-type allele has a fragment size of 1.2kb	C458 (Flavorrunner 458)

mL·min<sup>-1</sup>,尾吹高纯度氦气流量 10mL·min<sup>-1</sup>。

### 1.3 CAPS 标记分析

采用 CTAB 法提取 DNA<sup>[11]</sup>。CAPS 标记引物序列来自 Chu<sup>[3,4]</sup>,由金思瑞生物科技公司合成。25μL PCR 反应体系:模板 1.0μL,全式金 Trans Taq-T 酶 0.8μL,引物 1μL,dNTP 2.5μL,ddH<sub>2</sub>O 16.7μL。引物 af19(F)和 1056(R) PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 30s,48.5℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,35 个循环;72℃ 延伸 7min。PCR 产物酶切:8μL PCR 产物加入 0.4U 的 Hpy99I 在 37℃ 酶切 1h,酶切产物在 2% 琼脂糖凝胶电泳,Gelred 染色。引物 1344(F)和 1345(R)的 PCR 体系同上;PCR 反应程序为退火温度 51℃;PCR 产物酶切:PCR 产物 8μL + 4.8μL 的水 + 0.2μL 或 2UHpy188I 的混合液 37℃ 酶切过夜,酶切产

物在 2% 琼脂糖凝胶电泳,Gelred 染色。引物 bf19(F)和 R1/FAD+(R) 反应程序及酶切同引物 1344(F)和 1345(R)。

## 2 结果与分析

### 2.1 7 个花生品种(系)的脂肪酸含量

由 GC 测定结果可以看出(表 2),普通油酸含量品种花育 22 号和花育 28 号的油酸含量分别为 51.62% 和 41.38%,5 个高油酸含量花生品种(系)油酸含量均在 80% 以上。普通油酸含量花生品种和高油酸含量花生品种(系)相比较,除油酸含量低外,还表现出棕榈酸含量高、花生烯酸含量低的特点。

表 2 供试品种(系)的脂肪酸含量

Table 2 Fatty acid content of tested cultivars and strains

(%)

材料 cultivars (strains)	棕榈酸 C16:0	硬脂酸 C18:0	油酸 C18:1	亚油酸 C18:2	花生酸 C20:0	花生烯酸 C20:2	山嵛酸 C22:0	二十四碳烷酸 C24:0
花育 22 号 Huayu 22	9.96	3.65	51.62	28.28	1.57	0.91	2.69	1.31
花育 28 号 Huayu 28	11.87	4.67	41.38	36.11	1.68	0.64	2.70	0.95
开农 H03-3 Kainong H03-3	5.97	2.33	80.63	3.98	1.12	1.79	2.54	1.64
花育 32 号 Huayu 32	5.42	4.18	80.60	2.35	1.85	1.32	3.07	1.21
P76	5.95	4.40	80.70	2.25	1.78	1.21	2.63	1.08
06B16	5.68	1.77	82.09	2.92	0.99	2.19	2.63	1.72
F18	6.31	4.64	80.07	2.45	1.72	1.15	2.53	1.14

### 2.2 CAPS 标记在品种(系)间的扩增结果

由 CAPS 标记在花育 22 号、花育 28 号、P76 和 06B16 4 个花生品种(系)中的扩增产物酶切带型可以看出(图 1),CAPS 标记 af19-1056 扩增产物经 Hpy99I 酶切后,花育 28 号的扩增产物被酶切开,花育 22 号、P76 和 06B16 的扩增产物均无法酶切;CAPS 标记 1344~1345 扩增产物经 Hpy188I 酶切后,P76 的扩增产物被酶切开,花育 22 号、花育 28 号和 06B16 的扩增

产物均无法酶切;CAPS 标记 bf19-RAD 扩增产物经 Hpy188I 酶切后,花育 22 号、花育 28 号、P76 和 06B16 的扩增产物均被酶切开,但得到的酶切片段有差异。

将 3 个 CAPS 标记用于 7 个品种(系)的鉴别(图 2),CAPS 标记 f19-1056 扩增产物经 Hpy99I 酶切后,仅有花育 28 号的扩增产物被酶切开,其他 6 个品种(系)的扩增产物均未被酶切开;CAPS 标记 1344~1345 扩增产物经 Hpy188I 酶切后,开农 H03-3、花育

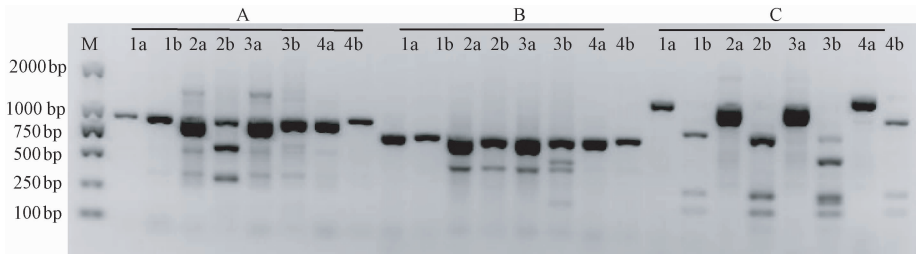


图 1 CAPS 标记在 4 个品种(系)中的扩增酶切结果

Fig. 1 Digested results of CAPS in four cultivars or strains

1:花育 22 号;2:花育 28 号;3:P76;4:06B16。a:扩增产物;b:酶切产物

1:Huayu 22; 2: Huayu 28; 3: P76; 4: 06B16。a:PCR 产物;b:酶切产物。

A: af19-1056 (Hpy99I); B: 1344-1345 (Hpy188I); C: bf19-RAD (Hpy188I)

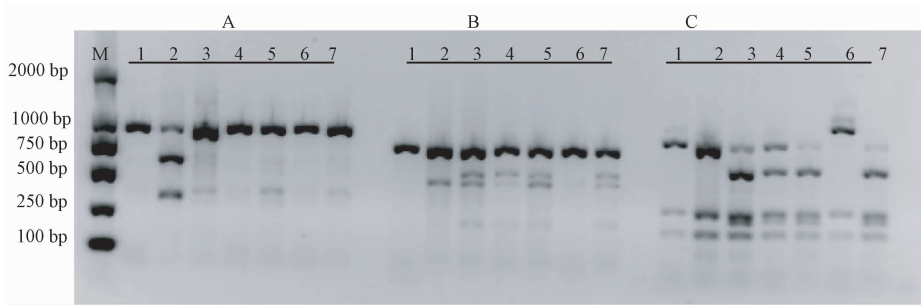


图 2 CAPS 在 7 个品种(系)中的酶切结果

Fig. 2 Digested products of CAPS in seven cultivars or strains

1: 花育 22 号; 2: 花育 28 号; 3: 开农 H03-3; 4: 花育 32 号; 5: P76; 6: 06B16; 7: F18。

1: Huayu 22; 2: Huayu 28; 3: Kainong H03-3; 4: Huayu 32; 5: P76; 6: 06B16; 7: F18.

A: af19-1056 (Hpy99I); B: 1344-1345 (Hpy188I); C: bf19-RAD (Hpy188I)

32 号、P76 和 F18 的扩增产物被酶切开, 花育 22 号、花育 28 号和 06B16 的扩增产物均未被酶切开; CAPS 标记 bf19-RAD 扩增产物经 Hpy188I 酶切后, 7 个品种(系)的扩增产物均被酶切开, 其中花育 22 号、花育 28 号的酶切带型一致, 开农 H03-3、花育 32 号、P76 和 F18 的酶切带型一致, 06B16 与其他 6 个品种(系)的酶切带型均不同。

### 2.3 7 个花生品种(系)FAD2 位点的推测

基于 3 对 CAPS 标记在 7 个品种(系)中的扩增产物及酶切带型, 结合与 Chu 等<sup>[3,4]</sup>的结果比较推测, AhFAD2A 位点花育 28 号为野生型, 其他 6 个品种(系)符合 448 G > A 突变类型; AhFAD2B 位点花育 28 号和花育 22 号为野生型, 开农 H03-3、花育 32 号、06B16 和 F18 均符合 441-442insA 突变类型, 而 P76 在该位点的突变类型不符合 441-442insA(表 3)。

表 3 7 个花生品种(系)FAD2 的突变类型

Table 3 Mutant type of FAD2 for seven cultivars or strains

品种(系) cultivars(strains)	AhFAD2A (CAPS marker: af19-1056)	AhFAD2B (CAPS marker: 1344-1345 and bf19-RAD)
花育 22 号 Huayu 22	448 G > A	野生型 wild type
花育 28 号 Huayu 28	野生型 wild type	野生型 wild type
开农 H03-3 Kainong H03-3	448 G > A	441-442insA
花育 32 号 Huayu 32	448 G > A	441-442insA
P76	448 G > A	441-442insA
06B16	448 G > A	-
F18	448 G > A	441-442insA

## 3 讨论

已有研究表明花育 32 号和 F18 均为 SPI098 的后代, Yu<sup>[12]</sup>对 SPI098 的其他后代 E11 进行分子生物学研究, 检测出 E11 在 AhFAD2B 位点发生突变, 在 442bp 处有碱基 A 的插入, 在 AhFAD2A 位点未检测出与低油酸含量花生品种间的差异, 本研究通过 CAPS 标记扩增产物的酶切带型推测花育 32 号和 F18 在 AhFAD2B 位点的突变类型与 Yu 的研究结果一致。本研究中推测 06B16 在 AhFAD2A 位点的突变符合 448 G > A 突变类型, 但 AhFAD2B 位点不符合 441-442insA

突变类型, 根据 CAPS 标记 bf19-RAD 对 06B16 扩增片段大小看, 略大于该引物在野生型品种中的扩增片段, 推测 06B16 在 AhFAD2B 位点的突变可能与 C485 在该位点的突变类型相一致<sup>[13]</sup>, 但是否一致尚需进一步分析验证。

### 参考文献:

- [1] Vassiliou E K, Gonzalez A, Garcia C, Tadros J H, Chakraborty G, Toney J H. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  both in vitro and in vivo system[J]. Lipids Health Disease, 2009, 8:25
- [2] 陈 静. 高油酸花生遗传育种研究进展[J]. 植物遗传资源学报,

2011, 12(2): 190 - 196

- [ 3 ] Chu Y, Ramos L, Holbrook C C, Ozias-Akins P. Frequency of a loss-of-function mutation in oleoyl-PC desaturase (ahFAD2A) in the mini-core of the U. S. Peanut Germplasm Collection[J]. *Crop Sci*, 2007, 47:2372 - 2378
- [ 4 ] Chu Y, Corley Holbrook C, Peggy Ozias-Akins. Two alleles of ahFAD2B control the high oleic acid trait in cultivated peanut[J]. *Crop Sci*, 2009, 49:2029 - 2036
- [ 5 ] Barkley N A, Chenault-Chamberli K D, Wang M L, Pittman R N. Development of a real-time PCR genotyping assay to identify high oleic acid peanuts (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Mol Breeding*, 2010, 25:541 - 548
- [ 6 ] 吴兰荣,陈 静,石运庆,苗华荣,齐 卫,陈效东,胡文广.<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 射线与杂交相结合选育新品种花育 22 号[J]. *核农学报*, 2006, 3:309 - 312
- [ 7 ] 苗华荣,吴兰荣,崔凤高,石运庆,胡晓辉,陈 静.早熟高产油用小花生新品种花育 28 号及其高产栽培技术[J]. *山东农业科*

学,2011,11:107 - 108

- [ 8 ] 禹山林.中国花生品种及其系谱[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2008
- [ 9 ] 山东省农作物品种审定委员会文件,鲁农审字[2009]1号 [EB/OL]. <http://www.seedsd.com>,2010
- [ 10 ] PVPO认证数据库 [EB/OL]. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/display.pl? 1540771>
- [ 11 ] 陈 静,胡晓辉,苗华荣,崔凤高,禹山林. CTAB 法提取花生总 DNA 在 SSR 和 SRAP 中的扩增效果 [J]. *花生学报*, 2008, 37(1):29 - 32
- [ 12 ] Yu S L, Pan L J, Yang Q L, Min P, Ren Z K, Zhang H S. Comparison of the  $\Delta^{12}$  fatty acid desaturase gene between high-oleic and normal-oleic peanut genotypes [J]. *J Genet Genomics*, 2008, 35:679 - 685
- [ 13 ] Patel M, Jung S, Moore K, Powell G, Ainsworth C, Abbott A. High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the FAD2 gene [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108:1492 - 1502

\*\*\*\*\*

## 《核农学报》简介及征订启事

《核农学报》1987 年创刊,由中国农业部主管,中国原子能农学会与中国农业科学院农产品加工研究所主办,是国内核技术和生物物理技术在农业和生物学研究应用领域唯一的学术期刊,属“中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊”和“中国科学引文数据库统计期刊”。学报作为 985 高校、国家级科研机构评审认定的一级学报,2011 年影响因子 0.977,在 46 种农学类核心期刊中名列第七位。本刊国内统一刊号:CN11-2265/S;国际标准刊号:ISSN1000-8551。

本刊为月刊,栏目主要包括:

1、植物诱变育种·农业生物技术:诱变类收录诱变育种和诱变生理等与诱变相关的研究论文及综述;农业生物技术类主要收录基因克隆、功能表达、分子标记、蛋白分析、遗传分析及细胞学等涉及生物学手段的研究论文和综述。

2、农产品辐照研究·食品科学:收录辐照加工、农产品贮藏保鲜、食品科学、食品安全等研究成果,主要包括食品加工工艺、食品功能性成分分析、食品微生物、农产品产地溯源、单克隆抗体、生物毒素降解等方面论述成果。

3、同位素示踪·资源环境·动植物生理:收录同位素在农业、环境中的应用及动植物生理动态示踪方面研究成果;农业与土壤生态、环境效应等方向具有创造性的研究成果;不同环境因子对动植物生理生化指标影响方面的成果。

欢迎广大学者、从业人员热切关注,具体投稿要求详见官网:[www.hnxb.org](http://www.hnxb.org)。来稿请登录官网投稿系统,咨询电话:010-62815961。

国内自办发行,咨询电话:010-62815961。

国内定价:¥264 元(12 期)。

地址:北京海淀圆明园西路 2 号院中国农科院农产品加工研究所,邮编 100193。

银行账号:北京,农业银行海淀支行营业室,050101040010253。

户名:中国农业科学院原子能利用研究所。

国外总发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱,邮编 100044),发行代码 BM449。