

高油酸花生 (*Arachis hypogaea* L.) 杂交后代 *ahFAD2B* 基因的分子标记辅助选择

孟 硕, 李 丽, 何美敬, 崔顺立, 王鹏超, 闫丛丛, 鞠晓影, 刘立峰, 穆国俊

(河北农业大学/河北省作物种质资源实验室/省部共建华北作物种质资源重点实验室, 保定 071001)

摘要: 本研究利用等位基因特异性 PCR 技术 (AS-PCR, allele-specific PCR) 对高油酸父本 CTWE 与 4 个低油酸母本组配的 330 个杂交后代进行分子鉴别, 其中 230 个获得了 539 bp 的特异性条带。白沙 1016 × CTWE、海花 1 号 × CTWE、冀 0212-2 × CTWE 以及远杂 9847 × CTWE 的真杂种百分率分别为 83.3%、50.0%、57.1% 和 50.0%。本研究采用单粒近红外光谱分析法对 $F_{2,3}$ 家系进行检测, 结果表明远杂 9847 × CTWE、白沙 1016 × CTWE、冀 0212-2 × CTWE 以及海花 1 号 × CTWE 的 $F_{2,3}$ 家系中, 全部为高油酸类型的家系分别为 9 个、8 个、2 个和 3 个, 推断 F_2 群体中, 基因型为 *FAD2B-m/FAD2B-m* 的个体的比例分别为 9.47%、4.17%、3.39% 和 3.37%。4 个杂交组合高油酸性状的遗传在 $P=0.05$ 水平上符合 2 对基因的遗传模式。本研究结果对于高油酸性状的分子鉴定、高油酸花生新品种的培育以及育种效率的提高具有一定的参考价值。

关键词: 花生; 高油酸; *FAD2B*; AS-PCR; 近红外光谱分析

Molecular Marker Assisted Selection of *ahFAD2B* Gene in High Oleate Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Hybrids

MENG Shuo, LI Li, HE Mei-jing, CUI Shun-li, WANG Peng-chao,

YAN Cong-cong, JU Xiao-ying, LIU Li-feng, MU Guo-jun

(Agricultural University of Hebei/Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Hebei/North China

Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Education Ministry, Baoding 071001)

Abstract: Allele-specific PCR (AS-PCR) was adopted to evaluate 330 hybrids from 4 hybridization combinations, which including one high-oleate male parent CTWE and four low-oleate female parents. The results showed that only 230 hybrids had specific 539 bp band. True hybrid percentage of Baisha 1016 × CTWE, Haihua1 × CTWE, Ji 0212-2 × CTWE, and Yuanza 9847 × CTWE were 83.3%, 50.0%, 57.1%, and 50.0% respectively. High oleic $F_{2,3}$ family lines of Yuanza 9847 × CTWE, Baisha 1016 × CTWE, Ji 0212-2 × CTWE, and Haihua1 × CTWE were 9, 8, 2, and 3, respectively by near-infrared spectroscopy analysis. The deduced ratio of *FAD2B-m/FAD2B-m* in F_2 population were 9.47%, 4.17%, 3.39%, and 3.37%, respectively. The genetic pattern of the high oleic trait of 4 hybridization combinations was all accord with two pairs of genes at $P=0.05$ level. This study had certain reference value for molecular identification and new variety cultivation of high oleic peanut, and also could increase the efficiency of high oleic peanut breeding.

Key words: peanut; high oleate; *FAD2B*; AS-PCR; NIRS

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 又名落花生, 是世界范围内广泛栽培的油料作物之一, 是油脂和蛋白质

收稿日期: 2014-01-22 修回日期: 2014-03-04 网络出版日期: 2014-12-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141211.2211.012.html>

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-14); 河北省高等院校科学技术研究重点项目 (ZH2011209); 河北农业大学 2012 年大学生课外科技创新活动基金项目 (zrx022)

第一作者研究方向为花生分子遗传育种。E-mail: mengshuo08@sina.com

通信作者: 穆国俊, 研究方向为花生分子遗传育种及种质资源的利用。E-mail: muguojun@hebau.edu.cn

刘立峰, 研究方向为花生分子遗传育种及种质资源的利用。E-mail: liulifeng@hebau.edu.cn

的重要来源。花生油含有多种抗衰老成分,是营养学界公认的具有预防心脑血管疾病功效的食用油^[1]。油脂中两个主要的脂肪酸油酸(C18:1, Δ^9)和亚油酸(C18:2, Δ^9, Δ^{12})大约占脂肪酸总量的80%^[2]。油酸去饱和生成亚油酸,亚油酸分子结构中不饱和的烯键数目多于油酸,因而易于氧化酸败从而衍生出醛类、酮类及其他产生恶臭味的烃类等^[3-5]。油酸/亚油酸(O/L)比值在常规栽培花生品种中的范围是1.0~4.0,而高油酸突变品种可以达到35~40^[6]。殷冬梅等^[7]对花生主要品质性状的主成分进行分析,得出对花生品质贡献由大至小的顺序为油酸含量>蛋白质含量>粗脂肪含量>棕榈酸含量,因此花生油酸含量及O/L值的提高对延长花生及其制品的货架期^[8]、降低冠心病等心脏病风险具有重要意义^[9-10]。目前,选育高油酸花生品种已成为研究的热点之一。

自 A. J. Norden 等^[6]于1987年发现第1个高油酸花生突变体品种 F435 以来,许多国家如美国、澳大利亚等相继开展了高油酸花生育种方面的工作,并培育出多个高油酸品种。相比之下,我国高油酸花生的育种工作较为迟缓,仅育成花育32号、开农H03-3和冀花11号等为数不多的品种。制约我国高油酸花生育种的原因之一是油酸检测手段及基础理论研究的滞后。在花生油酸的检测方面,气相色谱可精确测定花生油酸含量,另外近红外技术(NIRS, near-infrared spectroscopy)和数字折光仪(digital refractometer)也可选出高油酸花生材料。由于气相色谱仪价格昂贵、操作繁琐,国内多数实验室不具备该设备;而NIRS和数字折光仪所测数据精确度较低,只适合高油酸材料的初选,同时由于高油酸类型在后代中比例较低,因此,在育种实践方面需鉴定出携带 *FAD2B* 基因的突变型,并建立快速、简便、实用的高油酸鉴定方法如分子标记辅助选择等^[11]。在基础理论研究方面,由于花生基因组DNA的特殊性和分子遗传学研究的不足,目前尚未建立栽培花生的精细遗传连锁图谱。任小平等^[12]对国内外分子标记在花生上的研究进展进行了概括,发现其中一些分子标记如RAPD^[13]、AFLP^[14]、ISSR^[15]等的研究多数限于对花生种质资源遗传多样性的鉴定方面^[16]。

Y. Lopez 等^[17]通过对高油酸花生品种 F435 和普通油酸花生的 *ahFAD* 序列比对,发现在 *ahFAD2A* 的448位点出现一个错义突变(G448A, D150N),在 *ahFAD2B* 的编码区442位点发生一个碱基的插入

(442insA)。针对 *ahFAD2* 的序列特点, C. C. Holbrook 等^[18]利用CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence)标记计量 *ahFAD2A* 基因在美国核心种质中的突变频率,同时区分了 *ahFAD2* 基因的野生型和突变型。N. A. Barkley 等^[19]针对 *ahFAD2B* 上的差异采用实时定量PCR的方法区分野生型和突变型。C. T. Wang 等^[20]采用等位基因特异性PCR(AS-PCR, allele-specific PCR)的方法鉴别了高油酸花生杂交后代的真实性。AS-PCR是一种更为简便、特异性较高、费用少、便于推广的检测方法。K. P. Singh 等^[21]研究表明, A 和 B 基因组对整个基因组的贡献几乎相等,但是 B 基因组较 A 基因组 *ahFAD2B* 的高油酸贡献率更高一些。因此,本研究针对 *ahFAD2B* 基因的突变位点设计 AS-PCR 引物^[22],结合 NIRS 对高油酸杂种后代进行鉴评,并依据全部个体均为高油酸 F_{2,3} 家系的比值推断所配杂交组合的 *ahFAD2* 遗传模式,以期高油酸性状的分子鉴定、高油酸花生新品种的培育以及育种效率的提高提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 父本花生:CTWE 由山东省花生研究所王传堂研究员惠赠,油酸含量为81.84%, O/L 比值为28.55;母本花生:白沙1016、海花1号、冀0212-2和远杂9847由本实验室保存,油酸含量分别为41.29%、41.75%、43.83%和40.77%, O/L 比值分别为1.10、1.13、1.23和1.07;4个杂交组合的 F₁ 后代共计330株。

1.1.2 菌种和试剂 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 宿主菌, pMD18-T 载体(大连 TaKaRa 公司); *Taq* 酶、dNTP 等(TaKaRa 公司), 引物合成和测序(生工生物工程(上海)股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 扩增 可采取 CTAB 法提取 DNA^[23], 并利用 Nano drop 微量紫外可见分光光度计检测提取的 DNA 纯度与浓度, 选择 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值在 1.8~2.0 范围内的 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。参照 C. T. Wang 等^[20]的方法, 利用针对 *ahFAD2B* 基因的突变位点设计的 AS-PCR 引物进行 PCR 扩增, 其引物序列为 FAD2B-F: CA-GAACCATTAGCTTTGTAGTAGTG, FAD2B-A: AACACT-TCGTCGCGGTTT, FAD2-R: CTCTGACTATGCATCA-GAACTTGT。

ahFAD2B 部分编码区上游序列及部分 ORF 区域 PCR 扩增体系:1 μ L 的 DNA 模板 (30 ng/ μ L), 1 μ L 的 FAD2B-F (10 μ mol/L), 1 μ L 的 FAD2-R (10 μ mol/L), 2 μ L 的 10 $\times$ buffer, 1.6 μ L 的 dNTP 和 0.2 μ L 的 *Taq* 酶;反应程序为 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s; 15 个循环, 45.5 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min; 接着进行 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 20 个循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 49.2 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min; 最后是 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min, 10 $^{\circ}$ C 保存。

AS-PCR 反应体系: 5 μ L DNA 模板 (30 ng/ μ L), 1 μ L 的 FAD2B-F (10 μ mol/L), 1 μ L 的 FAD2B-A (10 μ mol/L), 0.25 μ L FAD2-R (10 μ mol/L), 2.5 μ L 的 10 $\times$ buffer, 2 μ L 的 dNTP 和 0.2 μ L 的 *Taq* 酶; 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 30 个循环, 53 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 最后延伸 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。扩增结束后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

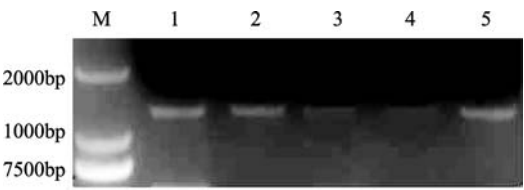
1.2.2 DNA 扩增序列的测定 将扩增获得的 PCR 产物进行纯化回收, 连接至 pMD18-T 载体并转化 DH5 α 感受态细胞, 于 500 μ L LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养 50 ~ 60 min, 取 100 μ L 转化产物涂布于含 4 μ L IPTG 和 40 μ L X-gal 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12 ~ 16 h。挑选白色菌落并接种至含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 12 h, 经菌液 PCR 鉴定后进行测序验证。

1.2.3 油酸含量的测定及不同油酸类型的界定 参照 B. L. Tillman 等^[24] 方法, 应用单粒近红外光谱分析技术进行油酸含量的测定。参照黄冰艳等^[25] 的研究, 普通 (低) 油酸类型含量为 41% ~ 44%、中

低油酸类型含量为 48% ~ 52%、中高油酸类型含量为 54% ~ 60%、高油酸类型含量为 68% ~ 74%。

2 结果与分析

2.1 亲本材料 *FAD2B* 编码序列的扩增与比对
采用 FAD2B-F/FAD2-R 对 5 个亲本材料即 CTWE、白沙 1016、海花 1 号、冀 0212-2 和远杂 9847 进行扩增, 获得 1241 bp 的特异性条带 (图 1)。通过 NCBI Genbank 数据库比对, 结果表明所得片段始于 *FAD2B* 的 -80 位点, 包含该基因的整个 ORF 区段和部分编码区上游序列区段。测序结果表明, 白沙 1016、海花 1 号、冀 0212-2 和远杂 9847 这 4 个母本材料的 1241 bp 序列没有差异, 为野生型 *FAD2B-w/FAD2B-w*。父本材料 CTWE 在 442bp 位点出现 A 插入 (图 2), 导致移码突变, 为突变型 *FAD2B-m/FAD2B-m*。以该突变位点设计的 AS-PCR 引物 FAD2B-A/FAD2-R, 能够在 CTWE 中扩增出 539 bp 的特异性条带 (图 3), 而在 4 个母本材料中不能扩增出该条带 (图 3)。



M: DL2000; 1: CTWE; 2: 海花 1 号; 3: 冀 0212-2; 4: 白沙 1016; 5: 远杂 9847, 下同
M: DL2000, 1: CTWE, 2: Haihua 1, 3: Ji 0212-2, 4: Baisha 1016, 5: Yuanza 9847, the same as below

图 1 5 个亲本材料的 AS-PCR 检测结果

Fig.1 Detection for 5 parent materials by AS-PCR



图 2 5 个亲本材料的 *FAD2B* 编码序列比对

Fig.2 Sequence comparison of *FAD2B* coding region of 5 parent materials

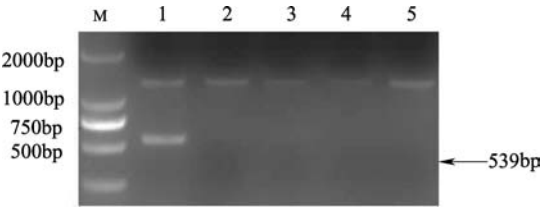


图 3 5 个亲本材料的 AS-PCR 检测

Fig.3 AS-PCR detection for 5 parent materials

2.2 F_1 的分子检测

对 4 种类型杂交组合的 F_1 进行检测。真实杂种的基因型应为 *FAD2B-w/FAD2B-m*, 可以扩增获得 539 bp 的条带, 而假杂种不存在 A 碱基的插入不能扩增出该条带 (图 4)。在 4 个杂交组合的 330 个后代中有 230 个获得了 539 bp 的条带, 表明这些后代为真实杂种。白沙 1016、海花 1 号、冀 0212-2 和远杂 9847 与 CTWE 的杂交后代个数分别是 120 个、80 个、70 个

和 100 个,其中获得 539 bp 条带的杂交后代个数分别是 100 个、40 个、40 个和 50 个,即白沙 1016、海花 1 号、冀 0212-2 以及远杂 9847 与 CTWE 的真杂种百分率分别为 83.3%、50.0%、57.1% 和 50.0%。

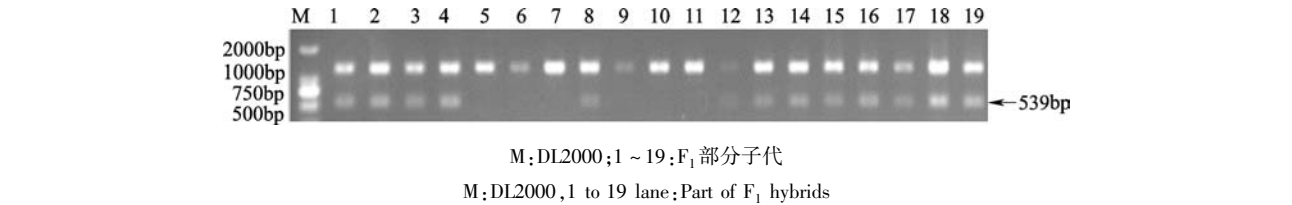


图 4 F₁ 部分子代琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Agarose electrophoresis result of some F₁ hybrids

2.3 高油酸性状遗传分析

远杂 9847 × CTWE、白沙 1016 × CTWE、冀 0212-2 × CTWE 和海花 1 号 × CTWE 杂交组合分别得到 95 个、192 个、59 个、89 个 F_{2,3} 家系,其中全部为高油酸类型的家系分别为 9 个、8 个、2 个和 3 个。在以上所有高油酸家系中,油酸含量变幅为 72.5% ~ 80.1%。AS-PCR 鉴定结果显示,所有高油酸单株均能扩增出 539 bp 条带(图 5)。

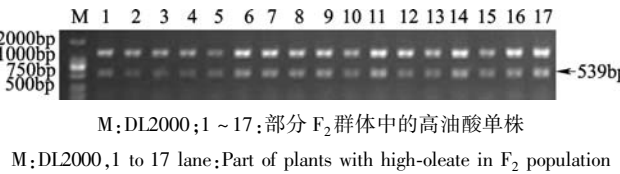


图 5 部分高油酸单株的 AS-PCR 结果

Fig. 5 AS-PCR results of some of the high oleic acid plants

根据 F_{2,3} 家系内单粒种子油酸含量的比例,可以直接推断 F₂ 群体内纯合基因型个体占整个群体

的比例。远杂 9847 × CTWE、白沙 1016 × CTWE、冀 0212-2 × CTWE 和海花 1 号 × CTWE 杂交组合的 F₂ 群体中,高油酸类型分别占 9.47%、4.17%、3.39% 和 3.37%。若杂交组合的两亲本仅存在 1 对基因之差即 *FAD2A-w/FAD2A-w FAD2B-w/ FAD2B-w* 和 *FAD2A-w/FAD2A-w FAD2B-m/FAD2B-m*,则 F₂ 群体中出现中高油酸类型 (*FAD2A-w/FAD2A-w FAD2B-m/FAD2B-m*) 的概率理论上应为 1/4;若杂交组合的两亲本存在 2 对基因之差即 *FAD2A-w/FAD2A-w FAD2B-w/FAD2B-w* 和 *FAD2A-m/FAD2A-m FAD2B-m/FAD2B-m*,则 F₂ 群体中出现高油酸类型 (*FAD2A-m/FAD2A-m FAD2B-m/FAD2B-m*) 的概率理论上应为 1/16,折合百分比为 6.25%。通过 χ^2 测验,4 个杂交组合的 F₂ 群体中高油酸类型所占比例在 $P=0.05$ 水平上均符合 2 对隐性基因控制的遗传模式(表 1)。

表 1 2 对基因控制的遗传模式的 χ^2 验证

Table 1 χ^2 test for the genetic pattern controlled by 2 pairs of genes

杂交组合	F _{2,3} 家系总数	高油酸类型观测值	高油酸类型期望值	其他类型观测值	其他类型期望值	χ^2	P
Hybridization combination	No. of F _{2,3} family line	Observation value of high oleate type	Expected value of high oleate type	Observation value of other types	Expected value of other types		
远杂 9847 × CTWE	95	9	5.91	86	80.63	1.979	0.20 > P > 0.10
白沙 1016 × CTWE	192	8	11.97	184	172.50	2.085	0.10 > P > 0.05
冀 0212-2 × CTWE	59	2	3.70	57	53.44	1.018	0.80 > P > 0.70
海花 1 号 × CTWE	89	3	5.53	86	80.63	1.517	0.30 > P > 0.20

3 讨论

本试验所选用的高油酸亲本材料 CTWE 在 442 bp 位点出现 A 碱基插入,导致移码突变,其突变位点及其导致 *FAD2B-w* 基因沉默的遗传机理与美国的 F435 和中国的鲁花 12 完全一致^[2]。试验过程中的某些杂交组合的后代在 1241 bp 有条带出现但是在 539 bp 处未显现出条带,应为由于去雄不严

格等原因导致的假杂种。AS-PCR 技术能够快速的使用于高油酸的鉴定,避免了由于假杂种造成的人力物力的浪费,提高了育种的选择效率,该结果与 C. T. Wang 等^[20]的研究结论一致。

本研究利用 4 个普通油酸与高油酸材料配制杂交组合并利用其 F_{2,3} 家系推测的 F₂ 群体,以卡方测验遗传模型分析了花生高油酸性状的遗传特性。结果表明,在本研究中花生高油酸性状的遗传不符合

单基因遗传模式,而主要受 2 对隐性基因的调控。黄冰艳等^[25]的研究结果表明,花生的油酸和亚油酸性状分别由 2 对主基因控制,同时存在基因互作及多基因效应,第 1 对主基因的加性和显性效应均大于第 2 对主基因。通过采用 AS-PCR 技术能够在 F_2 群体中检测到具有 539 bp 条带的个体,即至少含有 1 个 *ahFAD2B-m* 基因,另一对基因存在 3 种可能性,即 *ahFAD2A-w/ahFAD2A-w*, *ahFAD2A-w/ahFAD2A-m*, *ahFAD2A-m/ahFAD2A-m*。若基因型为 *ahFAD2A-w/ahFAD2A-w* 则可以在其后代中筛选到油酸含量为 54% ~ 60% 的中高油酸类型;若基因型为 *ahFAD2A-w/ahFAD2A-m* 或 *ahFAD2A-m/ahFAD2A-m* 则可以在其后代中筛选到油酸含量为 68% ~ 74% 以上的高油酸类型。若 F_2 个体中未检测到 539 bp 条带,即便另一对基因含有 *ahFAD2A-m* 在其后代最多可以筛选到油酸含量为 48% ~ 52% 的中低油酸类型。因此在高油酸实际育种过程中可以应用该标记在 F_2 中直接筛选具有 539 bp 条带的单株,并对其进行继代选择; F_2 中未检测出 539 bp 条带的单株,有 3 种可能的基因型,即 *ahFAD2A-w/ahFAD2A-w*, *ahFAD2B-w/ahFAD2B-w*, *ahFAD2A-w/ahFAD2A-m*, *ahFAD2B-w/ahFAD2B-w* 和 *ahFAD2A-m/ahFAD2A-m*, 理论上分别占 F_2 群体的 1/16、2/16 和 1/16,这些单株均可被直接淘汰,因此育种效率得到极大提高。通过姜慧芳等^[26]对 *ahFAD2B* 等位基因 (*ahFAD2B-w*、*ahFAD2B-m*) 在中国花生小核心种质中的分布研究,并结合油酸含量的测定,明确了 *ahFAD2B* 突变型基因 (*ahFAD2B-m*) 与高油酸密切相关。*ahFAD2A* 对花生油酸及亚油酸的贡献及作用机理尚待进一步研究。本研究结果对于高油酸性状的分子鉴定以及育种效率提高具有一定参考意义。

参考文献

- [1] 张礼红,谭兴和,王锋,等. 国外花生研究进展[J]. 食品科技, 2007, 32(6): 13-16
- [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] Davis J P, Dean L O, Faircloth W H, et al. Physical and chemical characterizations of normal and high oleic oils from nine commercial cultivars of peanut[J]. J Am Oil Chem Soc, 2008, 85(3): 235-243
- [4] Uematsu T, Parkányiová L, Endo T, et al. Effect of the unsaturation degree on browning reactions of peanut oil and other edible oils with proteins under storage and frying conditions [C]// Elsevier: International Congress Series, 2002, 1245: 445-446
- [5] 韩柱强,高国庆,周瑞阳,等. 龙生型高油酸花生种质油酸亚油酸含量及其比值的遗传分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 17-22
- [6] Norden A J, Gorbet D W, Knauff D A, et al. Variability in oil quality among peanut genotypes in the Florida breeding program [J]. Peanut Sci, 1987, 14(1): 7-11
- [7] 殷冬梅,张幸果,王允,等. 花生主要品质性状的主成分分析与综合评价[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 507-512
- [8] Grundy S M. Monounsaturated fatty acids and cholesterol metabolism: implications for dietary recommendations[J]. J Nutr, 1989, 119: 529-533
- [9] Grundy S M, Florentin L, Nix D, et al. Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for reducing raised levels of plasma cholesterol in man [J]. Am J Clin Nutr, 1988, 47: 965-969
- [10] Higgs J. The beneficial role of peanuts in the diet--an update and rethink Peanuts and their role in CHD[J]. Nutr Food Sci, 2002, 32(6): 214-218
- [11] 雷永. 花生高油酸的分子遗传机制及其高效遗传改良体系构建[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010
- [12] 任小平,姜慧芳,廖伯寿,等. 花生分子标记的研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(3): 368-371
- [13] Subramanian V, Gurtu S, Rao R C N, et al. Identification of DNA polymorphism in cultivated groundnut using random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay [J]. Genome, 2000, 43(4): 656-660
- [14] He G, Prakash C S. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Euphytica, 1997, 97(2): 143-149
- [15] Gimenes M A, Lopes C R, Valls J F M. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP[J]. Genet Mol Biol, 2002, 25: 349-354
- [16] 姜慧芳,任小平,张晓杰,等. 中国花生小核心种质的 SSR 遗传多样性[J]. 中国油料作物学报, 2010, 32(4): 472-478
- [17] Lopez Y, Nadaf H L, Smith O D, et al. Isolation and characterization of the $\Delta 12$ -fatty acid desaturase in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and search for polymorphisms for the high oleate trait in Spanish market-type lines[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101(7): 1131-1138
- [18] Holbrook C C, Dong W. Development and evaluation of a mini core collection for the US peanut germplasm collection[J]. Crop Sci, 2005, 45(4): 1540-1544
- [19] Barkley N A, Chamberlin K D C, Wang M L, et al. Development of a real-time PCR genotyping assay to identify high oleic acid peanuts (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Mol Breeding, 2010, 25(3): 541-548
- [20] Wang C T, Hu D Q, Ding F Y, et al. A new set of allele-specific PCR primers for identification of true hybrids in normal oleate $\times$ high oleate crosses in groundnut[J]. J SAT Agric Res, 2011, 12(9): 1-4
- [21] Singh K P, Raina S N, Singh A K. Variation in chromosomal DNA associated with the evolution of *Arachis* species [J]. Genome, 1996, 39(5): 890-897
- [22] Chen Z, Wang M L, Barkley N A, et al. A simple allele-specific PCR assay for detecting *FAD2* alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection[J]. Plant Mol Biol Rep, 2010, 28(3): 542-548
- [23] 周浩,闫彩霞,郭凌超,等. CTAB 法少量快速提取花生基因组 DNA[J]. 山东农业科学, 2012, 44(7): 8-9
- [24] Tillman B L, Gorbet D W, Person G. Predicting oleic and linoleic acid concentration of single peanut seeds using near-infrared reflectance spectroscopy[J]. Crop Sci, 2006, 46: 2121-2126
- [25] 黄冰艳,张新友,苗利娟,等. 花生油酸和亚油酸含量的遗传模式分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(4): 617-624
- [26] 姜慧芳,任小平. 我国栽培种花生资源农艺和品质性状的遗传多样性[J]. 中国油料作物学报, 2006, 28(4): 421-426