

胡麻亚麻酸亚油酸相关 KASP 标记的开发

穆艳鑫^{1,2}, 伊六喜⁴, 高凤云³, 赵小庆¹, 周 宇³, 贾霄云³, 何江峰¹, 苏少锋¹,

斯钦巴特尔¹

(¹ 内蒙古自治区农牧业科学院生物技术研究所, 呼和浩特 010013; ² 内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010070; ³ 内蒙古自治区农牧业科学院特色作物研究所, 呼和浩特 010013; ⁴ 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019)

摘要: 胡麻是北方地区特有的、富含不饱和脂肪酸的油料作物。培育高亚麻酸品种、高亚油酸品种是胡麻品质育种的主要目标。分子标记辅助选择能提高胡麻育种效率, 缩短育种年限。本研究进行了胡麻资源材料自然群体多年多点脂肪酸检测数据的统计分析和基因分型群体构建、亚麻酸、亚油酸相关 SNP 位点的 KASP 基因分型及其验证等研究, 取得了以下几个方面的结果: 1. 检测 247 份胡麻种质资源材料多年多点 5 种脂肪酸成分, 并对其进行了统计分析。相关性分析结果显示, 亚麻酸与其他成分之间呈显著负相关, 尤其是亚麻酸和亚油酸之间负相关性最高 (-0.794^{**})。2. 对 5 种脂肪酸表型数据统计分析, 确定了亚麻酸、亚油酸相关 SNP 标记分型群体: 包括 49 份高亚麻酸 ($\geq 54\%$) 材料、36 份低亚油酸 ($\leq 13.5\%$) 材料, 及 8 号和 254 号高亚油酸低亚麻酸材料。3. 验证并确定了 7 个 SNP 位点: g6-6229142、g10-19305239、g9-18961021 与亚麻酸显著关联; g6-19208888、g9-14900088、g15-22369840 和 g2-7680441 与亚油酸显著关联。4. 对确定的 7 个 SNP 位点进行了高通量测序, 结果与 KASP 基因分型结果完全一致, 证明 KASP 基因分型体系的有效性及其准确性。

关键词: 胡麻; 脂肪酸; SNP 标记; KASP 基因分型; SNP 验证

Development of KASP Markers for Linolenic and Linoleic Acid in Flax

MU Yan-xin^{1,2}, YI Liu-xi⁴, GAO Feng-yun³, ZHAO Xiao-qing¹, ZHOU Yu³, JIA Xiao-yun³, HE Jiang-feng¹,

SU Shao-feng¹, SIQIN Bateer¹

(¹ Biotechnology Institute, Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Hohhot, 010013, ² School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot, 010070, ³ Special Crops Institute, Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Hohhot, 010013, ⁴ College of Agriculture, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, 010019)

Abstract: Flax is a special oil crop cultivated in the northern China and rich on unsaturated fatty acids. Breeding of high linolenic acid varieties and high linoleic acid varieties is the main objective in flax quality breeding programs. Molecular marker assisted selection can improve flax breeding efficiency and shorten breeding duration. In this study, analysis of fatty acid phenotypic datasets gained from a natural population of 247 flax accessions, together with the construction of genotyping population, the KASP genotyping and verification of linolenic acid and linoleic acid-related SNP loci were carried out. We obtained the following results mainly including: 1. The linolenic acid was significantly negatively correlated with other components, and especially the negative correlation between linolenic acid and linoleic acid was the highest (-0.794^{**}); 2. Linolenic acid and linoleic acid-related SNP genotyping populations were established consisting of 87 accessions, which included 49 high linoleic acid ($\geq 54\%$) accessions, 36 low linoleic acid ($\leq 13.5\%$) accessions, and two accessions simultaneously showing high linoleic acid and low linolenic acid; 3. Seven SNPs associated with particular traits were validated, i.e. three SNPs g6-6229142, g10-19305239, and g9-18961021 were significantly associated with linolenic acid, four SNPs g6-19208888, g9-14900088, g15-22369840, and g2-7680441 were significantly associated

收稿日期: 2022-07-27 修回日期: 2022-08-16 网络出版日期:
URL:

第一作者主要研究方向为植物生理生化与分子生物学, E-mail: 379773506@qq.com

通讯作者: 斯钦巴特尔, 主要研究方向为作物分子育种, E-mail: nmgbaater@163.com

基金项目: 内蒙古自然科学基金 (2019ZD04); 国家自然科学基金 (31760400); 内蒙古农牧业创新基金 (2019CXJJN10)

Foundation Projects: Inner Mongolia Nature Fund Project (2019ZD04), National Natural Science Foundation of China (31760400), Inner Mongolia Agricultural and Animal Husbandry Innovation Fund Project (2019CXJJN10)

with linoleic acid; 4. A coincidence of the 7 SNP loci was detected by high-throughput sequencing and KASP genotyping, confirming the effectiveness and accuracy of the KASP genotyping.

Keywords: Flax; Fatty acid; SNP marker; KASP genotyping; SNP verification

胡麻 (*Linum usitatissimum* L., $2n = 2x = 30$), 属油用亚麻, 亚麻科 (Linaceae) 亚麻属一年生草本植物, 具有较强耐旱耐寒耐贫瘠特点, 其生长周期短, 适应性强, 主要生长于我国西北和华北干旱半干旱地区^[1]。油用胡麻籽含油率为 45%~55%, 其中亚油酸和 α -亚麻酸总含量可高达 60%以上^[2-3]。亚油酸和 α -亚麻酸, 作为长链多不饱和脂肪酸, 对人体具有多重保健功能。是构成人体脑细胞和组织细胞的重要成分, 是一种人体必需脂肪酸, 与视力、脑发育和行为发育密切相关^[4]; 此外亚麻酸在降血脂血糖、抗氧化、抗菌消炎、抗癌、防治心血管疾病、抗糖尿病和脑部、视网膜发育等都起着关键作用^[5]。因此培育高亚麻酸品种和高亚油酸品种是胡麻育种的主要目标之一。

目前胡麻育种仍然以传统的常规育种技术为主, 育种周期长, 效率低。而分子标记辅助选择技术对目标基因进行更为准确、简便、高效的鉴定, 具有不受环境影响、提高效率的选择技术。单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), 是指基因组 DNA 序列中由于单个核苷酸(A, T, C, G)的替换而引起的多态性, SNP 具有密度高、多态性丰富、易于实现自动化检测和分析、遗传稳定、易于基因分型等优点, 作为第 3 代的遗传标记, SNP 在作物遗传图谱构建、基于连锁不平衡的关联图谱、基因定位、品种纯度鉴定、遗传多样性和物种亲缘关系研究、分子标记辅助育种中具有巨大潜力^[6-7]。竞争性等位基因特异性 PCR

(KASP, kompetitive allele specific PCR) 是目前 SNP 基因分型的主要方法之一^[9], 只需合成 2 个不同颜色的荧光基团和双链通用探针, 无需针对每个 SNP 位点分别设计荧光探针, 具有高通量、便捷、低成本的特点^[8]。该技术在植物基因作图、基因分型、遗传多样性以及植物分子标记辅助育种等方面具有广泛的应用前景。陈思平^[10]通过国际水稻基因组数据库获得 565 个 SNP 位点并利用 481 个水稻种质资源对与产量及品质相关的目标性状 SNP 位点进行 KASP 基因分型验证, 获得了 37 个与粒型、粒重显著相关的标记。Cheon 等^[11], 在韩国温带粳稻品种中开发了基于 SNP 的 1225 个多态性 KASP 标记, 平均分布在水稻基因组中, 标记密度为每 Mbp 3.3 个 KASP 标记。所开发的 KASP 标记同时将为温带粳稻的 QTL/基因定位和分子标记辅助选择提供依据。CerealsDB www.cerealsdb.uk.net 是一个包含一系列小麦基因组数据集 (*Triticum aestivum*) 的在线数据库, 该数据库当前包含超过 100,000 个推定的品种 SNP, 通过 KASP 进行分型验证, 其中数千个已通过实验验证^[12]。Wilkinson 等^[13]在六倍体面包小麦中开发和验证 1114 个 SNP 并在 CerealsDB 数据库中报道了在 23 个小麦品种中的 KASP 基因分型结果。可以在 Avalon×Cadenza 的双单倍体作图群体中检查已验证的 SNP 并快速有效地生成包含数百个单核苷酸多态性标记的连锁图。Rasheed 等^[14]开发并验证了 152 对与小麦适应性、产量、胁迫等经济性状相关的 KASP 标记, 结果显示与栽培品种与双亲群体相关表型显著相关, 同时验证了 KASP 检测的速度比基于凝胶 PCR 标记高 45 倍, KASP 标记的开发有助于小麦育种计划中最大限度地提高遗传收益。张维军等^[15], 利用 4 个粒重相关指标和 4 个粒重相关基因的 KASP 标记, 209 份小麦种质资源进行基因北京分析, 阐明了 7 种优异单倍体型组合对籽粒表型性状的综合效应, 为分子标记辅助提供支撑。纯度是玉米种子质量的重要指标之一, 杂交种的纯度高低是影响田间产量、品质以及农民收益的关键因素之一。王蕊等^[16]基于 12 套玉米杂交种样本及 335 份标准 SNP 指纹, 从 384 个 SNP 基

基础位点中筛选获得了 60 个候选位点，确定了 20 个引物作为玉米杂交种纯度鉴定的核心引物，能够有效鉴定 99.7% 供试样品纯度。玉米自交系中存在大量 SNP 位点的变异，这些变异的 SNP 位点能够起到划分玉米杂种优势群，构建连锁群，及确定种植遗传资源背景的作用。陆海燕等^[17]利用 205 份不同来源的玉米自交系全基因组重测序数据，过滤出 1,660,336 个 SNP 位点，开发出 700 个 KASP 分子标记，其中 202 个 KASP 标记得以验证。经济作物中基于 KASP 技术的基因分型多为抗病基因。Zhao 等^[18]在棉花 VW 抗性 120 个 SNP 中结合全基因组关联研究、QTL-seq 和转录组测序，确定了 8 个黄萎病抗性候选基因，十个 KASP 标记在不同的棉花品系中成功验证可用于标记辅助育种以增加 VW 抗性。在番茄中针对 Ty-1、Mi-1、Tm-22、Sw-5 和 Frl 5 个抗病基因建立了 KASP 技术分型体系并与普通 PCR 结果比对一致，加速番茄抗病性基因的鉴定^[19]。胞囊线虫（SCN）病是大豆主要病害之一，世界各地大豆产区均有发生。练云等^[20]，利用 SCN 抗性主效位点 *rhg1* 和 *Rhg4* 的 7 套 KASP 标记，对 487 份大豆材料进行分析，筛选出了 20 份含有抗性位点并且优异农艺性状的材料，为培育抗病大豆新品种奠定了基础。孟君仁等^[21]通过与现有桃种质资源的基因组序列进行比对，对桃果实外观、抗性、肉质等 5 对性状 30 份材料进行基因分型验证，获得与目标性状紧密连锁的 KASP 标记，以达到加速品种培育，缩短育种年限。KASP 分子标记辅助育种在马铃薯^[22]、苹果^[23]、辣椒^[24]、向日葵^[25]等经济作物中也进行了相关的育种研究。

在前期研究中利用胡麻 F₂ 群体绘制了高密度遗传连锁图谱并进行了 QTL 定位，获得亚麻酸、亚油酸相关的 QTL 各 5 个，共计 19 个 SNP 位点。经过 GWAS 分析得到亚麻酸、亚油酸相关 SNP 位点 39 个，共计 58 个位点。本研究针对这些 SNP 位点，采用 KASP 基因分型技术，进行基因分型和验证，同时建立稳定、有效的 SNP 位点检测与基因分型的 KASP-SNP 分型技术体系。本项目的实施及完成将从分子层面进行胡麻种质资源的鉴定和亚麻酸、亚油酸相关分子标记的开发，可为提高胡麻品质育种效率提供理论和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

收集胡麻种质资源材料 247 份，其中国内材料 127 份，国外材料 120 份（表 1）。将供试种质资源材料连续 2 年（2019 年—2020 年）种植于内蒙古呼和浩特市（北纬 40° 46′ 东经 111° 39′）、乌兰察布市察哈尔右翼前旗（北纬 41° 13′ 东经 113° 10′）、锡林郭勒盟太仆寺旗（北纬 42° 21′ 东经 115° 19′）和新疆伊犁州（北纬 43° 55′ 东经 81° 05′）4 个不同地区。每份材料种 3 行，行距 20 cm，行长 1.5 m，重复 2 次。常规的田间管理方法进行管理，成熟后收集种子，提取脂肪酸成分。

1.2 试验方法

1.2.1 胡麻种子脂肪酸成分提取及检测 采用超声波辅助溶剂浸出法提取胡麻种子脂肪酸，用气相色谱技术检测 5 种脂肪酸成分，按面积归一化法以峰值面积计算 5 种脂肪酸成分相对含量。用 SPSS 22 软件进行 5 种脂肪酸成分检测数据的统计分析，包括最大值、最小值、平均值、方差、标准差、变异系数以及性状之间的 Pearson 相关性分析^[26-27]。

1.2.2 胡麻基因组 DNA 提取 采集新鲜嫩叶，用高通量组织研磨仪（Qiagen）进行组织研磨，按照 LabServ Plant DNA Kit 核酸试剂盒和磁珠法核酸提取仪（Thermo Fisher）操作说明进行基因组 DNA 高通量提取。采用 Nanodrop 和琼脂糖凝胶电泳方法检测其浓度和纯度，置于 -80℃ 保存备用。

1.2.3 KASP 引物设计 在前期研究中, 通过 QTL 定位和 GWAS 分析技术得到了 72 个亚麻酸和亚油酸相关 SNP 位点^[28-30]。获取相关 SNP 位点前后 100bp 的序列, 进行 KASP 引物的设计^[31]。对 58 个位点成功设计出引物, 其中亚油酸相关的 34 个, 亚麻酸相关的 24 个 (表 2)。每套引物 (Primer Mix) 包括 3 条引物: 两条竞争性引物和一条通用引物, 两条竞争性引物 3' 末端碱基为 SNP 位点变异碱基, 5' 端分别加上 FAM (5' GAAGGTGACCAAGTTCATGCT3') 和 HEX (5' GAAGGTCGGA GTCAACGGATT3') 荧光序列标签。将引物干粉稀释至 $100 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 按照 12 (FAM 引物): 12 (HEX 引物): 30 (通用引物): 46 (ddH₂O) 比例制备引物混合物 (Primer Mix)。

1.2.4 KASP-SNP 扩增与基因分型 96 孔板的 KASP 基本反应体系为 $10 \mu\text{L}$: $2 \mu\text{L}$ DNA 模板 ($30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), $5 \mu\text{L}$ KASP master mix (LGC, KBS 1016-016), $0.14 \mu\text{L}$ 引物混合物, $2.86 \mu\text{L}$ ddH₂O。使用 LightCycler480 Instrument II 进行 PCR 扩增。PCR 循环分 3 步: 94°C 预变性 15 min, 循环 1 次; 94°C 变性 20 s, 61°C - 55°C 复性/延伸 60 s ($-0.6^{\circ}\text{C}/\text{循环}$), 循环 10 次; 94°C 变性 20 s, 55°C 复性/延伸 60 s, 循环 26 次^[31]。

利用 LightCycler480 software1.5.1 进行 SNP 分型: 纯合基因型在 KASP 反应过程中产生单一的荧光, 即 FAM (蓝色) 荧光聚集在 X 轴或 HEX (绿色) 荧光聚集在 Y 轴; 杂合基因型将产生一半的 FAM 荧光和一半 HEX 荧光即混合红色荧光。

运用 EXCEL2010 记录样品基因分型颜色, 统计分析 KASP 基因分型蓝色、绿色、红色三种颜色在高低亚麻酸表型、高低亚油酸表型中分布情况。

1.2.5 相关 SNP 位点高通量测序 为了验证 KASP 基因分型结果的准确性, 对 KASP 基因分型筛选得到的亚麻酸和亚油酸相关位点进行高通量测序。获取该 7 个 SNP 位点前后 300 bp, 在 NCBI 数据库中进行了 blastx 对比分析, 发现 g6-6229142、g10-19305239、g9-18961021、g6-19208888、g9-14900088 这 5 个位点未发现显著相似性, 针对这 5 个位点分别设计引物。而 g15_22369840 和 g2-7680441 位点序列分别与 fatty acid desaturase 3a (*FAD3a*) 和 fatty acid desaturase 3b (*FAD3b*) 同源性最高。将 *FAD3a* 基因和 *FAD3b* 基因序列分别分成 14 和 12 个片段设计引物。每个引物 5' 端连接 8 个碱基的标签序列 (表 3)。将来自同一个资源材料的 PCR 产物混合, 在 Illumina 平台上进行高通量测序 (PE250)。将测序数据与 KASP 基因分型结果进行比对。

表 1 参试材料名称和来源

Table1 The name and origin of the accessions studied

编号 No	名称 name	来源 origin	编号 No	名称 Name	来源 Origin	编号 No	名称 Name	来源 Origin	编号 No	名称 Name	来源 Origin	编号 No	名称 Name	来源 Origin
1	坝亚 15 号	河北	26	H919	内蒙古	65	VIRING	法国	103	平罗红	宁夏	76	临汾白胡麻	甘肃
2	宁亚 21	宁夏	40	坝亚 11 号	河北	66	定亚 9 号	甘肃	104	NO 547	摩洛哥	77	雁农 1 号	山西
3	轮选 2 号	内蒙古	41	陇亚 8 号	甘肃	80	宁亚 17 号	宁夏	105	定亚 5 号	甘肃	78	PALE	美国
4	晋亚 2 号	山西	42	15F-565 (808)	加拿大	81	KENY C.1.709	波兰	27	H920	内蒙古	79	OTTAWA	美国
5	定西 17	甘肃	43	89-21	西德	82	临泽白	甘肃	28	NO 841	乌拉圭	106	晋亚 1 号	山西
6	天水市老胡麻	甘肃	44	宁亚 14	宁夏	83	天亚 5 号	甘肃	29	H922	内蒙古	107	晋亚 11 号	山西
7	黄胡麻	加拿大	45	MIMI B15	美国	84	JWS	非洲	30	伊亚 4 号	新疆	108	莎车亚麻	新疆
8	CH-89	内蒙古	47	宁亚 6 号	宁夏	85	KOREAN	阿富汗	31	内亚六号	内蒙古	109	集宁 2 号	内蒙古
9	线胡麻	甘肃	48	尚义详	河北	86	RTEN TINE	美国	32	PI177451	土耳其	110	粒高秆	内蒙古
10	同亚 9 号	山西	49	宁亚 15 号	宁夏	87	LINA GROSSES	法国	33	BLANC	加拿大	111	坝 68-1-542	河北
11	BGOLDXREDWING44X3	美国	50	宁亚 2 号	宁夏	88	皋兰白	甘肃	34	PI1181058	土耳其	112	雁北 7532-4	山西
12	坝亚 7 号	河北	51	库车	新疆	89	民勤胡麻	甘肃	35	山丹白	甘肃	113	陇亚 1 号 (J)	甘肃
13	同亚 8 号	山西	52	东乡白	甘肃	90	宁亚 19 号	宁夏	36	礼县低角	甘肃	114	陇亚 13 号 (J)	甘肃
14	TY58	巴基斯坦	53	Drane	法国	91	内亚油一号	内蒙古	37	坝 810	河北	115	普通胡麻	内蒙古
15	西礼白	甘肃	54	坝亚 1 号	河北	92	陇亚 4 号	甘肃	38	尧甸白胡麻	甘肃	116	华德小胡麻	内蒙古
16	TY21	巴基斯坦	55	静宁选 2 号	宁夏	93	DEHISLINTL CREPIIN	俄罗斯	39	天亚 6 号	甘肃	117	喀拉沁	内蒙古
17	坝亚 13 号	河北	56	天水线	甘肃	94	AC EMERSON	加拿大	67	沙县	山西	118	乌拉特 3 号	内蒙古
18	同亚 11 号	山西	57	CALAR	奥地利	95	崇礼小	河北	68	内蒙红	内蒙古	119	集宁 1 号	内蒙古
19	灵台五星	甘肃	58	张亚 1 号	河北	96	晋亚 4 号	山西	69	天水渭南	甘肃	120	伊尖 44-53	新疆
20	伊亚 3	新疆	59	CHAURRAOLA	匈牙利	97	VIMY	加拿大	70	礼县	甘肃	121	克山 1 号	内蒙古
21	张亚 2	河北	60	MOROCCD	摩洛哥	98	陇亚 10 号	甘肃	71	天亚 1 号	甘肃	122	May-11	加拿大
22	晋亚 8	山西	61	陇杂 1 号	甘肃	99	轮选 3 号	内蒙古	72	MACBETH	加拿大	123	晋亚 5 号	山西
23	康东 1	甘肃	62	清亚 1 号	甘肃	100	晋亚 7 号	山西	73	雁杂 10 号	山西	124	化德小胡麻	内蒙古
24	定亚 15	甘肃	63	CRISTA FIBER	加拿大	101	坝选 3 号	河北	74	定西红	甘肃	125	2 号	罗马尼亚
25	PALE (BLVE)	美国	64	东乡红 2 号	甘肃	102	莎车早熟种红	新疆	75	12 号	黑龙江	126	多伦大胡麻	内蒙古
127	内亚 7 号	内蒙古	154	CFRESBR106	荷兰	186	Hungry 247	匈牙利	222	MONTN7	美国	248	安西红胡麻	甘肃
128	陇亚 11 号	甘肃	155	CFRESBR95	荷兰	190	I191	伊朗	223	MONTN19	美国	249	灵台五星	甘肃
129	15-566	加拿大	156	CFRESBR91	荷兰	191	I184	伊朗	224	MONTN16	美国	250	AC Lightning	加拿大
130	轮选 1 号	内蒙古	157	CFRESBR105	荷兰	192	I157	伊朗	225	RUSSI6	俄罗斯	251	AC EMERSON	加拿大
131	陇亚 6 号	甘肃	158	CFRESBR96	荷兰	193	I185	伊朗	226	RuSSI5	俄罗斯	253	AC Linora	加拿大
132	LILA	波兰	159	CFRESBR107	荷兰	194	I187	伊朗	227	INDI69	印度	254	CI637PI91037	俄罗斯

133	SUMPERSKYZDR	波兰	160	CFRESBR94	荷兰	195	I159	伊朗	228	INDI68	印度	255	AC MCBETH	加拿大
134	天亚 9 号	甘肃	161	CFRESBR111	荷兰	196	ARGENTINA589	阿根廷	229	EGYPT66	埃及	256	AC HNLEY	加拿大
135	坝亚 6 号	河北	163	CFRESBR99	荷兰	197	ARGENTINA592	阿根廷	230	EGYPT65	埃及	257	AC MCDUFF	加拿大
136	定亚 18 号	甘肃	165	CFRESBR1077	荷兰	198	ARGENTINA597	阿根廷	232	EGYPT62	埃及	258	CI2824	俄罗斯
137	庆阳老	甘肃	166	CFRESBR1076	荷兰	199	ARGENTINA594	阿根廷	233	MINNESOT8	美国	259	CI2786	新西兰
138	匈牙利 3 号	匈牙利	168	CFRESBR1091	荷兰	200	ARGENTINA591	阿根廷	234	MINNESOT9	美国	260	CI1499PI194000	美国
139	新 18 号	新疆	169	CFRESBR21101	荷兰	201	ARGENTINA595	阿根廷	235	MINNESOT61	美国	261	CDC ARRAS	加拿大
140	15-510	俄罗斯	171	CFRESBR1089	荷兰	202	ARGENTINA600	阿根廷	236	乌 19 号	内蒙古	262	NOR MAN	加拿大
141	宁亚 11 号	宁夏	172	CFRESBR1095	荷兰	205	PAKISTAN160	巴基斯坦	237	临河 17 号	内蒙古	263	CDC BETHIMC	加拿大
142	宁亚 7 号	宁夏	173	Hungry 140	匈牙利	206	PAKISTAN169	巴基斯坦	238	乌 25 号	内蒙古	264	静宁红胡麻	宁夏
143	庆阳	甘肃	174	Hungry 138	匈牙利	209	PAKISTAN181	巴基斯坦	239	乌 402 号	内蒙古	265	10446146	阿根廷
144	NORTHDK510	美国	175	Hungry 145	匈牙利	210	PAKISTAN170	巴基斯坦	240	大粒 6 号	河北	266	晋亚 6 号	山西
146	NORTHDK507	美国	176	Hungry 137	匈牙利	212	PAKISTAN165	巴基斯坦	241	乌 17 号	内蒙古	267	G7	新疆
147	NORTHDK514	美国	177	Hungry 146	匈牙利	213	FRANCE313	法国	242	乌 13 号	内蒙古	268	临夏白	甘肃
149	NORTHDK518	美国	178	Hungry 141	匈牙利	215	FRANCE316	法国	243	乌 44 号	内蒙古	269	R43	内蒙古
150	NORTHDK505	美国	179	Hungry 147	匈牙利	216	FRANCE314	法国	244	乌 53 号	内蒙古	270	坝亚 12 号	河北
151	NORTHDK509	美国	180	Hungry 150	匈牙利	218	FRANCE319	法国	245	乌 33 号	内蒙古			
152	CFRESBR108	荷兰	184	Hungry 240	匈牙利	220	FRANCE295	法国	246	乌 41 号	内蒙古			
153	CFRESBR115	荷兰	185	Hungry 248	匈牙利	221	FRANCE291	法国	247	乌 19 号	内蒙古			

表 2 亚麻酸亚油酸相关位点 KASP 引物序列

Table 2 KASP primer sequence of linoleic acid linolenic acid related sites

引物序号 Primer No.	引物名称 Primer name	FAM 引物(5' - 3') FAM primer (5' - 3')	HEX 引物 (5' - 3') HEX primer (5' - 3')	通用引物(5' - 3') Common primer (5' - 3')	FAM allele	HEX allele	方向 Direction
1	g1_22713315	CTTGTTTACTTTTTTGG	CTTGTTTACTTTTTTGC	TGAATTTAGTGGATGCT	G	C	F
2	g2_5264478	AGCTAGTAGTGGTGGATGT	AGCTAGTAGTGGTGGATGC	GAAGGCCAGAGAGAGTCGTCGG	T	C	F
3	g2_5787845	GTATGGAGGGTTTTCTGGC	GTATGGAGGGTTTTCTGGA	GCCACCATTCCTCATCGCT	C	A	F
4	g3_12036686	AAATTACCATGCTTCAGGTTTGCAATTA	AAATTACCATGCTTCAGGTTTGCAATTG	TGCAACAGAATGGATAAGATGC	A	G	F
5	g3_12036697	AACCACAACCCTACTACAAA	AACCACAACCCTACTACAAG	TAGGATACGTGTTGGAGCTTGAATTCAG	T	C	R
6	g3_12037614	GTCCTATTCGACTATATCAGGC	TCCTATTCGACTATATCAGGT	TCCAAGGCCCGAGTCATGCA	C	T	F
7	g3_807938	CTTCTTCTCCTCAATTGTGATCC	CTTCTTCTCCTCAATTGTGATCA	TCATGGTAATCACGATTATAATGACGCGATT	C	A	F
8	g3_807940	CTTCTTCTCCTCAATTGTGATCCTC	CTTCTTCTCCTCAATTGTGATCCTT	GTAATCACGATTATAATGACGCGATTAAAGGG	C	T	F
9	g6_6229142	AATGTAGATTTAGTTCCTAAAAATTG	AATGTAGATTTAGTTCCTAAAAATT	GATCCTATAAGTTTATTTAAGCCTAACGTC	G	T	F
10	g9_17724430	AACCTAGTGAAGTTTCTAC	AACCTAGTGAAGTTTCTAT	TGTTACAGAATCGAATTGGGACATC	C	T	F

11	g9_18455369	AAAAGATGTAGTTGCACAATT	AAAAGATGTAGTTGCACAATC	CACACACAATTTATACTAATTCAT	A	G	R
12	g9_18627795	CGATAATACATTTAATTC	CGATAATACATTTAATCT	TCATCTATCCTGAGATAATTGTGA	C	T	F
13	g9_18910454	ACTGATGCTAAACTACATGATCAAAA	ACTGATGCTAAACTACATGATCAAAAG	AGTGTTGAGTACTGTTCTGGT	A	G	F
14	g9_18953067	TCTTGAATTTTGAGTTTACTTC	TCTTGAATTTTGAGTTTACTTAA	CTATATATATAACGGGGAATCTA	C	A	F
15	g9_18954449	CTTTAATGTTAAAAATTATATTC	CTTTAATGTTAAAAATTATATTA	TAAATCATAGGCGTACTAT	C	A	F
16	g9_18956680	GTTTTAAGTTTGCCAATAGAAGATT	GTTTTAAGTTTGCCAATAGAAGATC	GACATGGTTGTTGCGAAAGGTAATG	A	G	R
17	g9_18961021	CTTCTTTCTCAAATCCTACAGCACAA	CTTCTTTCTCAAATCCTACAGCACAC	GAAATGGTGTTGATCAAACGAC	T	G	R
18	g9_19101453	TAAGGCCTAAATTCATAATCAAG	TAAGGCCTAAATTCATAATCAAA	TTGTGTTAATCAATCTGATGTG	G	A	F
19	g10_19294584	AAGTACTGGAAGTTTTTC	GGAAGTACTGGAAGTTTTTA	TTGATGACAGGATCTGTGCTGGTTTGAATAT	C	A	F
20	g10_19295213	TTGATATGGATTAAAGGACC	TTGATATGGATTAAAGGACT	CTGGTATTGAGATTCGGCTCATT	G	A	R
21	g10_19298475	TGATTATAGTGGTGTCATATG	TGATTATAGTGGTGTCATATA	GAGCTAAATGGTACAGATGTCATGGA	G	A	F
22	g10_19298563	ACATTA AAAAGTCCAA	GACATTA AAAAGTCCAG	TGACATCTGTACCATTAGCTC	T	C	R
23	g10_19298605	TTGTTCTACTATCCTGCAAC	TTGTTCTACTATCCTGCAAT	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCAATC	C	T	F
24	g10_19305239	ATTTTCTCTAAGGTCTCAAAGTT	ATTTTCTCTAAGGTCTCAAAGTC	ACTAGAGTCGATTTTCTCTAAGGTCTCAAA GT	A	G	R
25	g2-7680441	CTGAGCGACCTCCAGGGGTTCTTCACC	CTGAGCGACCTCCAGGGGTTCTTCACT	GCGAAGAAGCAGCTCGATTTCGAC	G	A	R
26	g6_14807619	ATAATTA AACTCTGAATGTGCAGC	ATAATTA AACTCTGAATGTGCAGT	GGAAGAGAGAGAAATAAGATAAGTAGG	G	A	R
27	g6_14817525	CTATCGGTACTAAAATCAGTAAC	CTATCGGTACTAAAATCAGTAAT	TAGTGGTGGYTGGGACTAGGTAGCTATG	C	T	F
28	g6_14817586	CATGGTTTCGATAGTTCTATGGTTTCG	CATGGTTTCGATAGTTCTATGGTTTCA	ATCATAGCTACCTAGTCCCA	C	T	R
29	g6_14817602	TCGCTACTCACATGGTTTCG	GTCGCTACTCACATGGTTTCT	TCAGTAACATCATAGCTACCTAGTCCCAAC	C	A	R
30	g6_14817782	TCCACTATATATATGGTTAGGAA	TCCACTATATATATGGTTAGGAT	TCGCATACACATCAAGCTAAGTCTAAG	T	A	R
31	g6_14817808	CTTCCTAACCATATATATAGTGGATCAC	CTTCCTAACCATATATATAGTGGATCAT	GATAGTCCTTGTTGGTGTCTTGCAGT	C	T	F
32	g6_14817812	AGCTCATGATTGATTGTGCAGTGG	AGCTCATGATTGATTGTGCAGTGT	CAACACATATCGCATACACACATC	C	A	R
33	g6-19208888	ACGGGTTACTGTTGTTCT	GCTAAAGGGAGTTTCAATAAGA	TCTTATGAACTCCCTTTAGC	C	T	F
34	g6_25701813	TCATAATATCATTATTAAT	TCATAATATCATTATTAAC	CAATTGCACATCATATCACTAACT	T	C	F
35	g9_22580423	ATGTACATTTGTAAATTTTTTT	ATGTACATTTGTAAATTTTTTA	CCGGATGTTTAAATTTGTTTTCATTCCC	T	A	F
36	g9_22867151	CTTCATCTAATTCCTTAG	CTTCATCTAATTCCTTAA	CGTCTTGATTGTTGCTTGCGTCTAG	C	T	R
37	g9_22870988	AAGTGGAATGCATATATAGGTGGA	AAGTGGAATGCATATATAGGTGGT	ATTCTGCCATCATCAGACC	A	T	F
38	g9_18053455	AGGGATTGAGAGTCGTCCTGGGT	AGGGATTGAGAGTCGTCCTGGGA	CTTACTATCCAAGAAGCAAGCTG	T	A	F
39	g9_18336172	ATCATACATCAAAAATTCGGG	ATCATACATCAAAAATTCGGA	CATGCGATATAACATTCAATTGG	G	A	F
40	g9-14900088	AGTGAAAGGACTGGAATAC	AGTGAAAGGACTGGAATAA	AGTTGAGGGTAGTTGGTG	C	A	F
41	g10_19305845	AATTCCTTTGTGAAAA	AATTCCTTTGTGAAAC	CGTACCGCGCCTTATGCACATTCCACATCCT CCAAAATGC	A	C	F
42	g10_20397204	TTTACTACTATTACATAACAATGATTAA	TTTACTACTATTACATAACAATGATTAT	CAATGGAGTTTTTGACAGTTGCAGAGGC	A	T	F
43	g11_15965129	GGCTTTTCAGTCGTTCTTTTTC	GCTTTTCAGTCGTTCTTTTTC	GGGACTATGTAATGTTTATGGGAG	C	G	F
44	g11_18501275	ACGGCCTCATTGAGTTACTAGGTA	TCATTGAGTTACTAGGTG	TGGTATTGGAATTGAGAGTTTGG	A	G	F

45	g11_18642313	ACAACCATATCCCCACA	ACAACCATATCCCCACT	ATGCACACTAGTGAGCCGCTCGCAG	T	A	R
46	g12_12041745	CAAATACAAAAATAGAAATTTCA	CAAATACAAAAATAGAAATTTCT	CTGATTCATCAAGCTATAAAAAATAAGA	A	T	F
47	g13_23649585	AGCAACTCTCTCAATTAGAAT	AGCAACTCTCTCAATTAGAAC	CACGTGGAGAAGAAAGCTC	T	C	F
48	g13_23667211	GTCCCATCATTCCTCTGTTTTT	GTCCCATCATTCCTCTGTTTTT	TAAGGCTCGTAGAAGTCAACTC	A	G	R
49	g13_25323287	CATTATCAAAAACCATCCCTAT	CATTATCAAAAACCATCCCTAC	GCCAGAGTCAATGTTTATCTCAGTA	A	G	R
50	g13_25336617	GTATAGTCCATCTCCTCTTA	GTATAGTCCATCTCCTCTTG	GGAAGTATGCCAAGGATTAG	A	G	F
51	g13_25343930	GTGTTTATGGTTCTGGACTTT	GTGTTTATGGTTCTGGACTTA	GCACATTTATCATTTCATTGCAATAC	A	T	R
52	g13_25345695	AATAGTCCAAACACTAGCTTAT	AATAGTCCAAACACTAGCTTAG	GATTTAGTATCCATCCTAGG	T	G	F
53	g13_25345705	CACTAGCTTATCATAACTACA	CACTAGCTTATCATAACTACG	TGATTTAGTATCCATCCTAGGT	A	G	F
54	g13_29116425	ATCCTGTCCCTTTCTTTATT	ATCCTGTCCCTTTCTTTATG	CCATATCGTGGTGTATCGTG	T	G	F
55	g15_2018584	AACAAAAAATCTAAAATATTAC	AACAAAAAATCTAAAATATTAT	TAGGTTGTGACGCAGAAATTATA	G	A	R
56	g15_2018606	ATGTTTCTCTCTAGTTCGCATTATTGA	ATGTTTCTCTCTAGTTCGCATTATTGG	TGACGATATGCCTATAAGTAGTAA	T	C	R
57	g15_2050725	CTTCCCAACATTAGTGACC	CTTCCCAACATTAGTGACF	CGTCTTTCGTGGTACAGTTG	C	T	F
58	g15-22369840	CATTGTTGGGTGAAGAACCCTGG	CATTGTTGGGTGAAGAACCCTGA	TACCAGAAAGATCATGTGAAATTACC	G	A	F

注：1—24 为亚麻酸相关的引物；25—58 为亚油酸相关的引物

Note: 1-24 were linolenic acid related primers; 25-58 were linoleic acid related primers

表 3 高通量测序引物序列

Table 3 Primers used in high throughput sequencing

引物序号 Primer No.	引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence		引物序号 Primer No.	引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence	
		上游引物 Upper primer	下游引物 Down primer			上游引物 Upper primer	下游引物 Down primer
1	fad3a_286	<u>ACAGCAGAGC</u> ACGACCAAAC ATGAGC	<u>ATCCTGTAG</u> AACAAAGACTGCC AGAAC	17	fad3b_723	<u>TCCGTCTAT</u> TCAGCTGAAGAA TCCA	<u>TGAAGAGAT</u> GGGAGAGGAATG GTGAAC
2	fad3a_474	<u>GCCACATAT</u> CAGCTACGTCCTG AGAGA	<u>CACTTCGAG</u> AGGATTGAGGAATG GAGT	18	fad3b_971	<u>CCTAATCC</u> ACCAGCACTAAGT TCATGA	<u>CCATCCTCT</u> CTAGATATTCTGTT GAT
3	fad3a_714	<u>ACTATGCAG</u> CTTCTCAGACAGT TGGTTGT	<u>AGAGTCAAC</u> ATCTTTCTCCACAT TGCCG	19	fad3b_1201	<u>TAGGATGAG</u> ATTACGGAATAT GTATCA	<u>ATTGGCTCG</u> AATATCCATCGGG GTAAGA
4	fad3a_888	<u>AGATCGCAC</u> ACAAGACCCATCA CCAGA	<u>CGCATACAC</u> GAGTCAACCAAACC AGGT	20	fad3b_1441	<u>GAGTTAGCA</u> TCTAGAATGGGT CCA	<u>GAACAGGCG</u> ACGCGGAAAACG ACACCT
5	fad3a_1160	<u>CAATGGA</u> AAAGTAGGAACATAAT GACA	<u>CGAACTTGA</u> AATACCCGATTTC AGT	21	fad3b_1694	<u>CGGATTGCG</u> TCACTAGTTTAA TGTAACA	<u>AGGCTAACT</u> TGAGACCGGAGC GAAG
6	fad3a_1324	<u>AGCAGGAAT</u> CGGAATATGTATC AACAGA	<u>CAACCACAA</u> AAATGCATGACAGTA GTGT	22	fad3b_1987	<u>AATCCGTCT</u> TACTCTCTGCTA CTCATCG	<u>GTCGTAGAT</u> TTTACCGCTTCCAC AAGGT
7	fad3a_1574	<u>CTGGCATA</u> GTATCTAGTGGAATT ATTGGA	<u>CCGTGAGA</u> AACCGTTGACCTGTAT ATTATCA	23	fad3b_2245	<u>CACCTTACC</u> CTCAAATGCCAC ACTATCAC	<u>AGCACCTCT</u> CCTCAACGCAGGT CAAAG
8	fad3a_1796	<u>CAAGGAGCG</u> AACTGGACACAT ATGAC	<u>GAATCTGA</u> TGGTCGAGAATTAGG CGGT	24	fad3b_2513	<u>ATAGCGACA</u> CAAGAAGTTTCTC GATCA	<u>CCTCTATCC</u> AAATGTGTGTACT AAGTAT
9	fad3a_1982	<u>CATACCAAC</u> TCCAAACCGCACC AAA	<u>GATAGACAG</u> GACTTCTCCTCCAC TGTT	25	fad3b_2743	<u>AGCCATGCG</u> TATACTAAGTGC TGTAC	<u>ATCATTCCC</u> AAGTACCCAAACA AGTG
10	fad3a_2157	<u>TTCACGCAG</u> AATCGGTATACCT CGTCA	<u>GATGAATC</u> CTGCTCGTACCCGTG GTGGTGA	26	fad3b_3011	<u>TATCAGCA</u> ACAGAGAGCCGA AGAAATCA	<u>GCTAACGAG</u> GACAAGATAAAC AGCCTGC

11	fad3a_2389	<u>GCGAGTAAT</u> CATCTACGGCTTC CTTCC	<u>CTCAATGACAAGAC</u> CTCCTTACC GCTT	27	g6-6229142	<u>ACACAGAAT</u> CTCTAAACGAAA GCGAG	<u>GAGCTGAA</u> GAGTTGAAGGAGA TAGCAA
12	fad3a_2652	<u>TGGTGGTAGAAG</u> CGGTAAGGA GGTCT	<u>CGACTGGACGGCT</u> AGGGTGATCA TGT	28	g6-19208888	<u>CGACACACACGGG</u> TACTGTT GTTCT	<u>GCTCGGTATCTT</u> ATGAACTCCCT TTAGC
13	fad3a_2855	<u>AGTCACTAGAAAA</u> TGTCCTGAG CAGT	<u>CAGCGTTAAAT</u> CATGTCCTTGCTC TGA	29	g9-18961021	<u>ACACGACCTCACG</u> ATGCTGAC TCTTT	<u>ACAGATTCCA</u> ACTGGAGCAGAA GAAT
14	fad3a_3167	<u>AATGTTGCTTT</u> CAGAGACAAGA CATGA	<u>AAGAGATCCAAT</u> ATCATCAGCTA GA	30	g9-14900088	<u>AGATGTACAGT</u> GAAAGGACT GGAATAC	<u>CCGACAACAGT</u> TGAGGGTAGTT GGTG
15	fad3b_185	<u>CCGAAGTAGCAGG</u> ACCAA ACTATGAGC	<u>GGAGAACATGAG</u> CAACCCAGTA AAGAGG	31	g10-19305239	<u>TCTTCACAGGG</u> CGTGATTGTA TTAGA	<u>TGGAACAACCA</u> AGACAGTAAC AGGAAT
16	fad3b_445	<u>GTGTTCTAGGC</u> CTCTTTACTGG GTTGCT	<u>TGGCTTCAGT</u> CTTGTGGCTAATT CT				

注：下划线部分为标签序列

Note: Underlined were tag sequences

2 结果与分析

2.1 脂肪酸成分数据统计分析及基因分型材料选择

在不同的种植环境和不同的年份脂肪酸成分含量有所不同。在 247 份资源材料中，8 号和 254 号材料为高亚油酸低亚麻酸材料，亚油酸含量在 57.32%~64.91%之间，亚麻酸含量在 9.01%~18.94%之间。在其余的 245 份材料，其亚麻酸含量均比亚油酸含量高，亚麻酸含量在 35.85~73.96 之间，变异系数为 5.5~11.96 之间;亚油酸含量在 9.46~23.18 之间，变异系数为 0.09~0.17 之间（表 4）。

表 4 胡麻种质资源脂肪酸检测数据（平均值）统计分析

Table 4 Statistical analysis of fatty acid data (average) of flax germplasm resources

脂肪酸成分 Fatty acid component	棕榈酸 Pamatic acid	硬脂酸 Stearic acid	油酸 Oleic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid
最小值 Min	4.82	3.16	13.89	10.98	13.67
最大值 Max	7.35	7.85	27.16	61.5	62.92
平均值±标准差(%) Mean±SD	6.17±0.44	4.8±0.78	21.03±2.28	14.71±4.06	53.9±4.34
方差	0.19	0.6	5.19	16.49	18.86
变异系数(%) CV	7.14	16.25	10.85	27.6	8.05

五种脂肪酸成分之间的相关性分析结果显示，亚麻酸与其他成分之间呈极显著负相关，尤其是亚麻酸和亚油酸之间负相关性最高；亚油酸与硬脂酸和油酸之间呈显著和极显著负相关；棕榈酸、硬脂酸和油酸之间呈极显著正相关（表 5）。

根据亚麻酸和亚油酸含量，挑选出高、低亚麻酸资源材料和高、低亚油酸资源材料，作为用于亚麻酸和亚油酸相关 SNP 标记的基因分型与验证的群体。8 号和 254 材料为高亚油酸低亚麻酸类型。至少在 6 个环境条件下，亚麻酸含量高于 54%的资源材料为高亚麻酸类型，共选出 49 份材料。至少在 6 个环境条件下亚油酸含量低于 13.5%的为低亚油酸类型，共筛选出 36 份材料（图 1）。

表 5 胡麻脂肪酸成分之间的相关性

Table 5 Correlation between fatty acid components of flax

脂肪酸 Fatty acid	棕榈酸 Palmatic acid	硬脂酸 Stearic acid	油酸 Oleic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid
棕榈酸 Palmatic acid	1	0.539**	0.177**	0.097	-0.354**
硬脂酸 Stearic acid		1	0.436**	-0.130*	-0.300**
油酸 Oleic acid			1	-0.281**	-0.330**
亚油酸 Linoleic acid				1	-0.794**
亚麻酸 Linolenic acid					1

注：“**”表示 0.01 水平显著相关，“*”表示 0.05 水平显著相关

Note: “**”significantly correlated at 0.01 level, “*”significantly correlated at 0.05 level

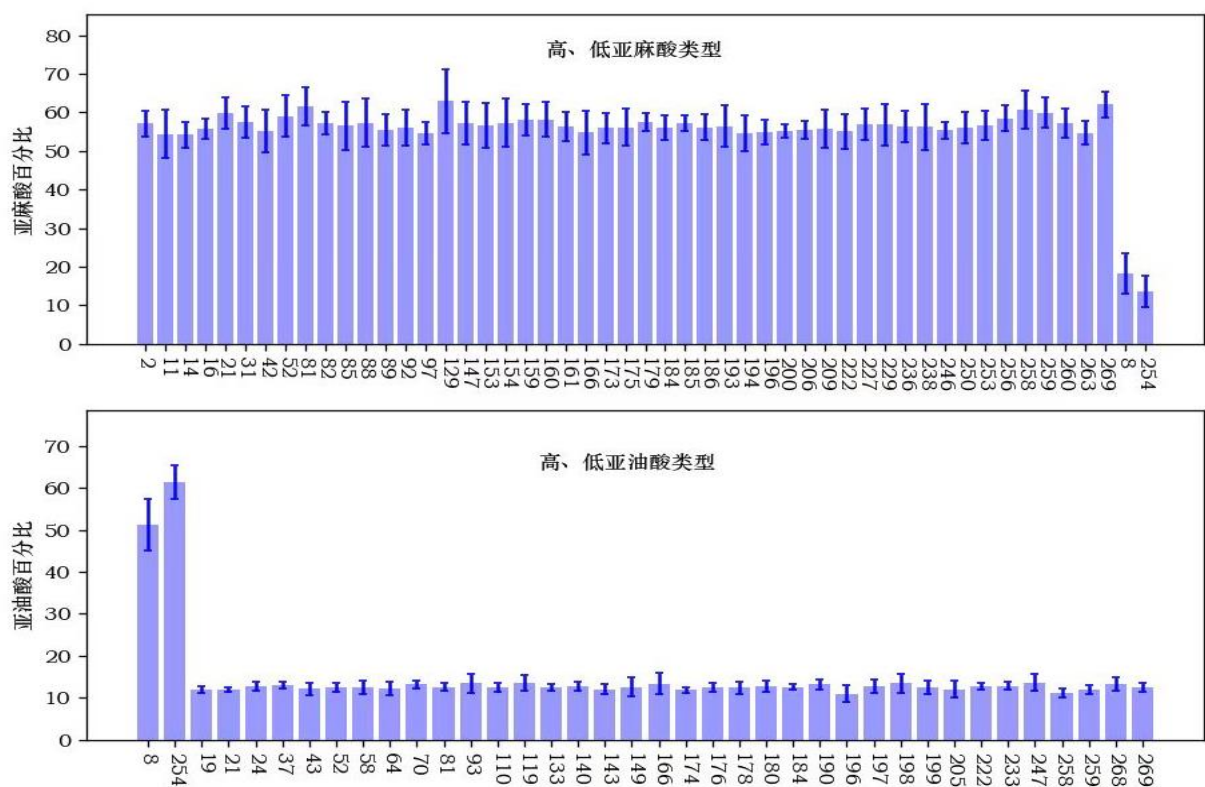


图 1 用于 SNP KASP 基因分型的资源材料

Fig.1 Varieties used in SNP KASP genotyping

2.2 胡麻脂肪酸 KASP 基因分型及其验证

利用设计好的 KASP 引物，在高、低亚麻酸和高、低亚油酸群体材料中，针对 58 个相关 SNP 位点进行基因分型检测。根据分型结果，显示 2 种或 3 种颜色的为有效引物，显示单一颜色或灰色的为无效引物。在亚麻酸相关 SNP 位点中，13 个位点显示出多态性，其中 3 个位点（g6-6229142、g10-19305239 和 g9-18961021）显示的颜色（基因型）在高亚麻酸材料和低亚麻酸材料之间有明显差异，说明这些 SNP 位点与亚麻酸显著相关；在亚油酸相关 SNP 位点的基因分型结果显示，22 个显示出多态性，其中 4 个位点（g6-19208888、g9-14900088，以及 g15-22369840 和 g2-7680441）显示的颜色（基因型）在高亚油酸材料和低亚油酸材料之间有明显差异，说明这些 SNP 位点与亚油酸显著关联。总体上，表型和推导的 SNP 基因型之间符合率大于等于 96%。在基因分型群体中，7 个显著关联位点的荧光颜色、推导的基因型详情见表 6。

表 6 KASP 标记分型结果表

Table 6 KASP genotyping results

SNP 位点 SNP Loci	表型 Phenotype	荧光颜色 Fluorescence color	推导的基因型 Deduced genotype	资源材料 Accessions	表型与基因分型符合率 Consistency rate between phenotype and genotype
g6_6229142	高亚麻酸	红色	G/T	所有高亚麻酸材料	100%
	低亚麻酸	蓝色	G/G	8、254	100%
g10_19305239	高亚麻酸	红色	G/A	238、260	96%
		蓝色	A/A	其余 47 份高亚麻酸材料	
g9_18961021	低亚麻酸	绿色	G/G	8、254	100%
	高亚麻酸	红色	G/T	260	96%

		绿色	G/G	147	
		蓝色	T/T	其余 47 份高亚麻酸材料	
g6_19208888	低亚麻酸	绿色	G/G	8、254	100%
	高亚油酸	红色	C/T	8、254	100%
	低亚油酸	红色	C/T	184	97%
		蓝色	C/C	58	
g9-14900088		绿色	T/T	其余 34 份低亚麻酸材料	
	高亚油酸	红色	C/A	8、254	100%
	低亚油酸	蓝色	C/C	269	97%
g15-22369840		绿色	A/A	其余 35 份低亚麻酸材料	
	高亚油酸	绿色	TT	8、254	100%
	低亚油酸	蓝色	AA	所有低亚麻酸材料	100%
g2-7680441	高亚油酸	绿色	CC	8、254	100%
	低亚油酸	蓝色	GG	所有低亚麻酸材料	100%

2.3 高通量测序分析 SNP 位点多样性及验证 KASP 分型结果

为了验证 KASP 基因分型结果的准确性，针对筛选得到的 7 个位点 g6-6229142、g10-19305239、g9-18961021、g6-19208888、g9-14900088、g15-22369840 和 g2-7680441，对 78 份材料进行了高通量测序，测序结果与基因分型结果完全一致（图 2）。

为了验证 KASP 基因分型结果的准确性，针对筛选得到的 7 个位点 g6-6229142、g10-19305239、g9-18961021、g6-19208888、g9-14900088、g15-22369840 和 g2-7680441，对 78 份材料进行了高通量测序，测序结果与基因分型结果完全一致（图 2）。

胡麻脂肪酸脱氢酶 *FAD3a* 和 *FAD3b* 基因分别位于 15 号和 2 号染色体上，是一对旁系同源基因（Paralogous Gene），功能相似，均参与由亚油酸转换成亚麻酸的生物化学过程中。g15-22369840 SNP 位点位于 *FAD3a* 基因第 5 个外显子内。在 8 号和 254 号两个材料中该位点的碱基由 C 变成 T，遗传密码子由 CGA 变成 TGA，氨基酸由精氨酸（R）变成终止密码子。g2-7680441 SNP 位点位于 *FAD3b* 基因的第一个外显子内。在 8 号和 254 号两个材料中该位点的碱基由 G 变成 A，遗传密码由 TGG 变成 TGA，氨基酸由 W 变成终止密码子（图 4）。所有的低亚油酸材料中，2 个位点未发生变异。在 8 号和 254 号这两个材料中，g15-22369840 和 g2-7680441 位点同时发生无义突变，*FAD3a* 基因和 *FAD3b* 基因编码过程提前终止，*FAD3a* 和 *FAD3b* 两个酶的活性大大降低，因此亚油酸的含量高，亚麻酸的含量低。





图 2 亚麻酸和亚油酸相关 SNP 位点的高通量测序结果

Fig. 2 High-throughput sequencing results of high linolenic acid and linoleic acid related SNP loci

3 讨论

胡麻品种选育以优质、高产、抗逆性强为主要目标。高通量基因特异性分子标记的开发与利用可有效提升分子标记辅助品质育种效率。通过 KASP 基因分型技术，针对选定的品质性状相关位点，进行高通量、低成本、快速简便验证，可筛选出实用型 KASP 标记。

1. 高品质胡麻种质资源为高效育种提供种质基础。本文收集国内外胡麻种质资源材料 247 份，通过多年多点（共 8 个环境）脂肪酸检测数据，共选了 78 份材料，包括 2 个高亚油酸、低亚麻酸类型的材料，49 份高亚麻酸类型材料和 36 份低亚油酸类型材料。这些种质资源材料在不同的环境下表型（脂肪酸含量）稳定，形成了本研究的基因分型群体，保证了数据分析结果的可靠性。高亚麻酸、高亚油酸、低亚麻酸等专用品种的培育是胡麻品质育种的主要目标，这些种质资源材料还可以作为胡麻品质育种的候选亲本来研究。

2. 只有少数的 SNP 位点得到了验证。其原因有 2 个：（1）一部分 SNP 位点在设计 KASP 引物时被淘汰掉。有些 SNP 位点距离近，其中选择一部分进行引物设计；有些 SNP 位点周围的碱基序列不适合 KASP 引物的；（2）前期获得的 SNP 位点的假阳性比较高。

3. SNP 位点区域的遗传背景需要进一步的深入研究。

本文通过 KASP 分型技术验证了 7 个与胡麻亚麻酸和亚油酸相关的 SNP 标记，并将其转化为 KASP 标记。g15_22369840 和 g2_7680441 分别位于脂肪酸脱氢酶基因（*Fatty Acid Desaturase*，*FAD3*）*FAD3a* 和 *FAD3b* 的外显子当中。在高亚油酸材料中同时发生了无义突变，影响了酶的活性。而其他 5 个 SNP 位点区域的遗传背景尚不清楚，这些 SNP 位点与目标基因之间的距离有多远、与目标性状有着什么样的关系需要

进一步的深入研究,才能成为可用于胡麻分子标记辅助选择过程中的真正的实用性分子标记。

本文利用筛选构建的自然群体中在 58 个亚麻酸、亚油酸相关的 SNP 位点中运用 KASP 基因分型技术成功验证了 7 个 SNP 标记,并通过高通量测序验证了 KASP 基因分型体系有效性及准确性,将来可用于胡麻分子标记辅助选择过程中。如何将这 7 个 SNP 标记用于胡麻品质育种过程中,需要在育种实践过程中进一步深入研究。除此之外,只有 7 个 SNP 标记还远远不够,需要挖掘更多的实用性标记。

参考文献

- [1] 胡晓军.亚麻产业技术发展现状与对策.山西农业科学, 2010, 38(7):8-10.
Hu X J. Current Situation and Measures of Technology Development in Flax Industry. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2010, 38(7): 8-10.
- [2] 邓乾春,禹晓,黄庆德,黄凤洪,钮琰星,郭萍梅,刘昌盛.亚麻籽油的营养特性研究进展.天然产物研究与开发,2010,22(4):715-721.
DENG Q C, YU X, HUANG Q D, HUANG F H, NIU Y X, GUO P M, LIU W C. Research Prograss on Nutritional Characteristics of Linseed Oil, Natural Product Research and Development, 2010, 22(4): 715-721.
- [3] 《中国居民膳食指南(2016)》发布.中国妇幼健康研究,2016, 27(5): 670.
Release of "Dietary Guideline for Chinese Residents (2016)". Chinese Journal of Woman and Child Health Research, 2016, 27(5): 670.
- [4] 柏薇薇. α -亚麻酸的功效.食品界, 2017, 10: 99.
Bai W W. Fuction of α -Linolenic Acid. Food Industry, 2017, 10: 99.
- [5] 廖振林,李倩滢,陈俊杰,杜李宇,王洁,方祥.亚麻籽油组分的功能活性研究进展.现代食品科技,2021, 37(11): 379 - 389.
Liao Z L, LI Q Y, CHEN J J, DU L Y, WANG J, FANG X. Research Progress on the Functional Activity of Flaxseed Oil Components. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 379-389.
- [6] 邓艳,魏东霞,朱兴全.单核苷酸多态性及其检测方法.中国畜牧兽医, 2005, 05:32-36.
Deng Y, WEI D X, ZHU X Q. Single Nucleotide Polymorphism and Its Detection Measures. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2005, 5: 32-36.
- [7] 谭建萍,李映萍,余江勇,杨雪,金生英,谭本智.分子标记在作物遗传育种中的应用.绿色科技, 2015. 10: 65-67
Tan J P, LI Y P, YU J Y, YANG X, JIN S Y, TAN B Z. Applications of Molecular Markers in Crop Genetics and Breeding. Journal of Green Science and Technology, 2015, 10: 65-67.
- [8] Rasheed A, Hao Y F, XIA X C, Khan A, XU Y B, Rajeev K, Varshney, HE Z H. Crop breeding chips and genotyping platforms: progress, challenges and perspectives. Molecular Plant, 2017;S1674205217301740.
- [9] Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. Molecular Breeding, 2014, 33(1):1-14.
- [10] 陈思平. 基于 KASP 的水稻基因组 SNP 标记开发及其育种应用.华南农业大学,2017.
Chen S P. Development of Rice SNP Marker Based KASP Technology and its Application in Breeding. South China Agricultural University, 2017.
- [11] Cheon K S, Jeong Y M, Oh H, Oh J, Kang D Y, Kim N, Lee E, Baek J, Kim S L, Choi I, Yoon I S, Kim K H, Won Y J, Cho Y I, Han J H, Ji H. Development of 454 New Kompetitive Allele-Specific PCR (KASP) Markers for Temperate japonica Rice Varieties. Plants (Basel). 2020 Nov 10;9(11):1531.
- [12] Wilkinson P A, Winfield M O, Barker G L, Allen A M, Burridge A, Coghill J A, Edwards K J. Cereals DB 2.0: an integrated resource for plant breeders and scientists. BMC Bioinformatics,13,1(2012-09-03), 2012, 13(1):219.
- [13] Wilkinson P A, Allen A M, Tyrrell S, Wingen L U, BIAN X D, Winfield M O, Burridge A, Shaw D S, Zaucha J, Griffiths S, Davey R P, Edwards K J, Baeker G L. CerealsDB—new tools for the analysis of the wheat genome: update 2020. Database (2020) Vol. 2020: article ID baaa060; doi:10.1093/database/baaa060.
- [14] Rasheed A, Wen W, GAO F M, ZHAI S N, JIN H, LIU J D, GUO Q, ZHANG Y J, Dreidigacher S, XIA X C, HE Z H. Development and validation of KASP assays for genes underpinning key economic traits in bread wheat. Theoretical & Applied Genetics, 2016, 129(10):1843-1860. DOI 10.1007/s00122-016-2743-x.
- [15] 张维军, 赵俊杰, 何进尚, 郝晨阳, 王小亮, 亢玲, 张富国, 张学勇, 陈东升. 宁夏小麦种质资源粒重基因 KASP 标记检测及验证, 植物遗传资源学报, 2021, <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20211225001>.
ZHANG WJ, ZHAO JJ, HE JS, HAO CY, WANG XL, KANG L, ZHANG FG, ZHANG XY, CHEN DS. Detection and Validation of Grain Weight Related Genes Using KASP Assays in Ningxia Wheat Germplasm. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20211225001>.
- [16] 王蕊,施龙建,田红丽,易红梅,杨扬,葛建镡,范亚明,任洁,王璐,陆大雷,赵久然,王凤格.玉米杂交种纯度鉴定 SNP 核心引物的确定及高通量检测方案的建立.作物学报,2021,47(4):770-779.

- WANG R, SHI L J, TIAN H L, YI H M, YANG Y, GE J G, FAN Y M, REN J, WANG L, LU D L, ZHAO J R, WANG F G. Identification of SNP Core Primers and Establishment of High Throughput Detection Scheme for Purity Identification in Maize Hybrids. ACTA AGRONOMICA SINICA, 2021, 47(4): 770-779.
- [17] 陆海燕, 周玲, 林峰, 王蕊, 王凤格, 赵涵. 基于高通量测序开发玉米高效 KASP 分子标记[J]. 作物学报, 2019, 45(6):872-878.
LU H Y, ZHOU L, LIN F, WANG R, WANG F G, ZHAO H. Development of Efficient KASP Molecular Markers Based on High Throughput Sequencing in Maize. ACTA AGRONOMICA SINICA, 2019, 45(6): 872-878.
- [18] Zhao Y, Chen W, Cui Y, Sang X, Lu J, Jing H, Wang W, Zhao P, Wang H. Detection of candidate genes and development of KASP markers for Verticillium wilt resistance by combining genome-wide association study, QTL-seq and transcriptome sequencing in cotton. Theor Appl Genet. 2021 Apr;134(4):1063-1081.
- [19] 王鹏, 田哲娟, 康忱, 李亚栋, 王洪乐, 杨超沙, 邛光伟, 康亮, 范庆杰, 吴志明. 番茄 5 个抗病基因 KASP 分型技术体系的建立与应用[J]. 园艺学报, 2021, 48(11):2211-2226.
WANG P, TIAN Z J, KANG C, LI Y D, WANG H L, YANG C S, MANG G W, KANG L, FAN Q J, WU Z M. Establishment and Application of a Tomato KASP Genotyping System Based on Five Disease Resistance Genes. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(11): 2211-2226.
- [20] 练云, 李海朝, 李金英, 周扬, 王仕伟, 张辉, 雷晨芳, 吴永康, 张景鹏, 卢为国. 利用 KASP 标记筛选含 *rhg1* 和 *Rhg4* 位点的大豆抗病资源, 植物遗传资源学报, 2021, 22 (2): 399-406.
LIAN Y, LI H C, LI J Y, ZHOU Y, WANG S W, ZHANG H, LEI C F, WU Y K, ZHANG J P, LU W G. Marker-Assisted Screening of Soybean Cyst Nematode Germplasm Harboring Resistance Loci *rhg1* and *Rhg4*. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(2): 399-406.
- [21] 孟君仁, 曾文芳, 邓丽, 潘磊, 陆振华, 崔国超, 王志强, 牛良. 桃若干重要性状的 KASP 分子标记开发与应用. 中国农业科学, 2021, 54(15):13.
MENG J R, ZENG W F, DENG L, PAN L, LU Z H, CUI G C, WANG Z Q, NIU L. Development and Application of KASP Molecular Markers of Some Important Traits for Peach. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(15): 3295-3307.
- [22] Kaiser N R, Jansky S, Coombs J J, Collin P, Alsagkany M, Douches D S. Assessing the Contribution of Sli to Self-Compatibility in North American Diploid Potato Germplasm Using KASP Markers. American Journal of Potato Research, 2021, 98: 104-113.
- [23] Winfield M, Burridge A, Ordidge M, Harper H, Wilkinfield P, Thorogood D, Copas L. Development of a minimal KASP marker panel for distinguishing genotypes in apple collections. PLoS ONE, 2020, 15(11): e0242940-.
- [24] Holdsworth, W L, Mazourek M. Development of user-friendly markers for the pvr1 and Bs3 disease resistance genes in pepper. Molecular Breeding, 2015, 35(28), <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0260-2>.
- [25] Gascuel Q, Bordat A, Sallet E, Pouilly N, Carrere S, Roux F, Vincourt P, Godiard L. Effector Polymorphisms of the Sunflower Downy Mildew Pathogen Plasmopara halstedii and Their Use to Identify Pathotypes from Field Isolates. PLOS ONE 11(2): e048513. doi: 10.1371/journal.pone.0148513..
- [26] 孙逸敏. 利用 SPSS 软件分析变量间的相关性[J]. 新疆教育学院学报, 2007, 23 (2): 120-123.
SUN Y M. Using SPSS Software to Analyze the Correlation between Variables. Journal of Xinjiang Education Institute, 2007, 23(2): 120-123.
- [27] 杜家菊, 陈志伟. 使用 SPSS 线性回归实现通经分析的方法[J]. 生物学通报, 2010, 45 (2): 4-6.
DU J J, CHEN Z W. A Method to Accomplish Pass Analysis by Using SPSS Linear Regression. Bulletin of Biology, 2010, 45(2): 4-6.
- [28] 高凤云, 斯钦巴特尔, 张辉, 伊六喜, 侯建华, 周宇. 亚麻主要农艺与品质相关性状 QTL 定位. 西北植物学报, 2018, 38 (3) : 0465-0477.
GAO F Y, SIQIN Bateer, ZHANG H, YI L X, HOU J H, ZHOU Y. QTL Locations of Main Agronomic and Quality Traits in Flax. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2018, 38 (3) : 0465-0477.
- [29] 伊六喜, 胡麻产量和品质相关性状的全基因组关联分析, 内蒙古农业大学, 2018.
YI L X. Genome-Wide Association Analysis of Yield and Quality Related Traits in Flax. Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [30] 高凤云, 斯钦巴特尔, 周宇, 贾霄云, 苏少锋, 赵小庆, 金晓蕾. 基于 SSR 标记的胡麻粗脂肪酸及脂肪酸组分的关联分析. 作物杂志, 2022 (1) : 44-49.
GAO F Y, SIQIN Bateer, ZHOU Y, JIA X Y, SU S F, ZHAO X Q, JIN X L. Association Analysis of Crude Fat and Fatty Acid Components in Flax Based on SSR Markers. Crops, 2022 (1) : 44-49.
- [31] Uzma M, Essam D, Shoaib U R, ZHANG X Y. Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): A Singleplex Genotyping Platform and Its Application. Journal of Agricultural Science, 2019, 11(1): 11-20.