

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.01752

花生 *ahFAD2A* 等位基因表达变异与种子油酸积累关系

黄冰艳^{1,2} 张新友^{2,*} 苗利娟² 高伟² 韩锁义² 董文召² 汤丰收²
刘志勇^{1,*}

¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193; ² 河南省农业科学院经济作物研究所 / 农业部黄淮海油料作物重点实验室 / 河南省油料作物遗传改良重点实验室, 河南郑州 450002

摘要: 花生 *ahFAD2A* 是控制种子油酸、亚油酸含量和油亚比的关键基因。利用 *ahFAD2A* 基因特异引物检测远杂 9102、豫花 9416 等 52 个花生品种的 *ahFAD2A* 基因等位变异, 并比较其中 13 个品种的 *ahFAD2A* 基因序列。结果表明, 花生 *ahFAD2A* 基因存在 G-A 两种单核苷酸等位变异(野生型 *ahFAD2A-wt* 和突变体 *ahFAD2A-m*)。DNA 序列比对结果证实, 豫花 9416 等 10 个品种(突变体)与远杂 9102、延津花籽和开农白 2 号(野生型)相比, 在 *ahFAD2A* 基因的 448 bp 处存在核苷酸 G-A 突变。应用 real-time PCR 检测 *ahFAD2A* 等位基因在种子不同发育时期的表达动态显示, 突变体豫花 9416 等位基因(*ahFAD2A-m*)在种子发育中期表达量稍高, 种子发育后期表达量下降速度较野生型远杂 9102 (*ahFAD2A-wt*)更快。进一步测定豫花 9416 和远杂 9102 在种子不同发育时期的油酸、亚油酸积累和油亚比动态, 发现 2 个品种间存在明显差异, 豫花 9416 在籽粒发育前期油酸相对含量已超过亚油酸, 油亚比大于 1 并逐渐增加, 而远杂 9102 到籽粒发育中后期油酸相对含量才高于亚油酸, 油亚比逐渐接近于 1 左右。

关键词: 花生; 油酸含量; 亚油酸含量; *ahFAD2A*; 等位变异; 等位基因表达变异

Allelic Expression Variation of *ahFAD2A* and Its Relationship with Oleic Acid Accumulation in Peanut

HUANG Bing-Yan^{1,2}, ZHANG Xin-You^{2,*}, MIAO Li-Juan², GAO Wei², HAN Suo-Yi², DONG Wen-Zhao², TANG Feng-Shou², and LIU Zhi-Yong^{1,*}

¹ College of Agronomy & Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ² Industrial Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Oil Crops in Huanghuaihai Plains, Ministry of Agriculture / Henan Provincial Key Laboratory for Oil Crops Improvement, Zhengzhou 450002, China

Abstract: *ahFAD2A* is a key regulator controlling oleic acid content in peanut. Using *ahFAD2A* allelic specific primers, the allelic variations of *ahFAD2A* were tested in 52 peanut varieties and the DNA sequences of 13 typical varieties, including Yuanza 9102, Yuhua 9416, wt08-0932, and wt08-0934, were compared. PCR results revealed that the presence of two alleles of *ahFAD2A* (referred as to wild type *ahFAD2A-wt* and mutant *ahFAD2A-m* respectively) in peanut germplasm, and the G/A single nucleotide polymorphism (SNP) at 448 bp site of *ahFAD2A* was further confirmed by sequences comparison of 13 peanut varieties. Allelic expression variations of *ahFAD2A* alleles in peanut seeds were detected by real-time PCR at different developmental stages. The results indicated that the expression level of mutant allele (*ahFAD2A-m*) from Yuhua 9416 was slightly higher than that of the wild type allele (*ahFAD2A-wt*) from Yuanza 9102 during the early to middle developmental stages (17–38 days). However, a rapid decrease in expression level was observed for the mutant allele as compared with its wild type at the late developmental stage (after 45 days). Further determination revealed that the *ahFAD2A-m* genotype showed higher oleic acid content than linoleic acid content with high O/L ratio (>1.0) starting at early seed developmental stages in Yuhua 9416 while the *ahFAD2A-wt* genotype remained lower oleic acid content than linoleic acid content with steady O/L ratio (<1.0) until seed maturity stage in Yuanza 9102. This relationship between oleic acid accumulation and *ahFAD2A* allelic expression variation in peanut provide the fundamental

本研究由国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2011CB109304), 国家现代农业产业技术体系建设项目(CARS-14), 河南省科技创新人才计划项目(104200510003)和河南省科技攻关重点项目(092102110044)资助。

* 通讯作者(Corresponding authors): 刘志勇, E-mail: zhiyongliu@cau.edu.cn, Tel: 010-62731211; 张新友, E-mail: haasz@sohu.com, Tel: 0371-65729560

第一作者联系方式: E-mail: huangbingyan@yahoo.com.cn, Tel: 0371-65718247

Received(收稿日期): 2012-02-20; Accepted(接受日期): 2012-06-10; Published online(网络出版日期): 2012-07-27.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120727.0841.001.html>

information for genetic regulation and improvement of seed oleic acids content.

Keywords: *Arachis hypogaea* L.; Oleic acid content; Linoleic acid content; *ahFAD2A*; Allelic variation; Allelic expression variation

花生种子中脂肪含量占 50%左右, 其总脂肪酸的 80%以上为油酸(C18¹)和亚油酸(C18²), 其次为棕榈酸(C16⁰), 约占 8%~12%。花生脂肪酸的组成与花生油及其制品的营养品质和加工用途以及产品的货架期密切相关。花生为异源四倍体(AABB), 我国花生根据植物学性状分为 2 个亚种(密枝亚种和疏枝亚种)和 4 个变种(密枝变种、茸毛变种、疏枝变种和珠豆变种), 分别对应于普通型、龙生型、多粒型和珍珠豆型品种类型。经过长期的进化, 不同类型花生的脂肪酸组成差异很大, 我国花生品种资源的油酸含量一般为 38%~56%, 亚油酸含量一般为 26%~39%, 油亚比(油酸与亚油酸比值)为 0.9~1.7 左右。食用高油酸有益于人体健康, 高油酸也有利于延长花生油及花生产品的货架期, 培育高油亚比花生品种是花生育种工作的重要目标。

花生油酸含量存在丰富的遗传变异。根据种子油酸的含量和油亚比通常将花生分为高油酸、中等油酸和普通油酸 3 种类型。美国 Nordon 等^[1]于 1987 年首次发现了花生高油酸的自发突变体 F435, 其油酸含量达 80%, 亚油酸为 2%; 随后, 美国又用化学诱变创造出高油酸突变体 M2-225 和 C458^[2], 花生高油酸突变体的发现极大地推动了高油酸育种。已有研究证明, *ahFAD2* 基因是控制油酸脱氢向亚油酸转换的关键基因^[3-5], 与花生种子中的油酸含量直接相关。花生基因组中存在 2 个 *ahFAD2* 基因, 即 *ahFAD2A* 和 *ahFAD2B*, 分别来自 A 和 B 基因组^[6-7]。高油酸是 *ahFAD2A* 基因在 448 bp 处发生 G-A 碱基替换, 同时 *ahFAD2B* 丧失功能的结果^[8]。目前发现的花生品种自然变异或诱变高油酸突变体中 *ahFAD2B* 基因突变位点不同^[9]。高油酸天然突变体 F435 的 *ahFAD2B* 基因在起始密码子后第 442 位核苷酸有一个碱基 A 插入, 导致移码突变, 使翻译提前终止。高油酸突变体 M2-225 和 C458 分别是在 *ahFAD2B* 基因起始密码子后 997 bp 和 665 bp 处存在 MITE 插入, 导致基因功能丧失。

花生种质资源中 *ahFAD2A* 基因等位变异与普通油酸和中等油酸含量变异有关^[10-12]。该基因在起始密码子后第 448 个碱基的 G-A 突变导致普通油酸含量到中等油酸含量的变异。Bruner 等^[13]利用定点突变基因载体在酵母中表达, 发现 *ahFAD2A* 基因发生

碱基 G-A 替换导致油酰磷脂脱氢酶活性降低, 认为油酰磷脂脱氢酶活性降低是自发突变体油酸含量提高的原因。该变异在不同类型的花生品种中发生频率不同, 推测该突变发生较早, 可能产生于花生从其起源中心向外传播之前。据报道, 花生密枝亚种中存在较高频率的 *ahFAD2A* 基因的 G-A 突变^[11], 我国的龙花生普遍具有中等油酸含量, 普通型花生中也有少量中等油酸含量的品种^[14-17]。

等位基因由于编码区或调控区的序列变异可能存在于不同的表达模式。人类基因组中普遍存在等位基因的表达变异^[18-19], 在高等植物中也同样存在等位基因的表达变异^[20]。为探明花生 *ahFAD2A* 基因 G-A 等位变异是否存在表达模式差异, 以及该基因的等位表达变异与花生种子中油酸积累的关系, 本研究利用 *ahFAD2A* 基因位点特异 PCR 引物分析了 52 个品种的 *ahFAD2A* 基因等位变异特性, 选取 2 种不同等位变异类型的花生育成品种进行等位基因表达变异动态分析, 以期明确 *ahFAD2A* 等位基因表达变异与花生种子油酸积累的关系, 为花生高油酸品质育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与取样方法

选择河南省审定的 49 个花生品种和从美国引进的 2 个高油酸材料 wt08-0932、wt08-0934 及农家品种延津花籽共 52 个品种于 2009 年种植于河南省农科院(原阳)试验基地。由于从美国引进的高油酸种质 wt08-0932 和 wt08-0934 的 *ahFAD2* 基因除存在 *ahFAD2A* 变异外, 还存在 *ahFAD2B* 变异(另文发表); 为了排除 *ahFAD2B* 基因变异导致的背景差异对 *ahFAD2A* 的表达及其效应的影响, 在进行 *ahFAD2A* 基因等位变异表达及油酸积累特点分析时, 选用河南省近年来育成的大面积推广品种远杂 9102 (*ahFAD2A*-wt)和豫花 9416 (*ahFAD2A*-m)为代表品种。每品种种植 1 行(远杂 9102 和豫花 9416 分别种植 40 行), 行距 40 cm, 株距 20 cm, 行长 4 m。采用常规田间管理方法。在封垄前分别采集 52 个品种的顶部未展开叶片, 液氮速冻后 -80℃ 保存。在远杂 9102 和豫花 9416 品种盛花期分别标记开花日期, 在花针入土后 10、17、24、31、38 和 45 d 分别采集花生

幼果;剥取幼嫩种子迅速保存于 RNA 保护剂,每时期采集 3 个样本;液氮速冻后 -80°C 保存。花生花针入土后 30 d 荚果体积基本定型,进入籽粒充实期。在籽粒充实期(30 d 以后)每间隔 7 d 取样进行籽粒脂肪酸组成测定,每时期采集 3 个样本。

1.2 花生基因组 DNA 提取及 *ahFAD2A* 基因片段扩增和测序

利用 TaKaRa 公司的 Universal Genomic DNA Extraction Kit (Ver.3.0)提取 52 个花生品种的基因组 DNA。用 Thermo SCIENTIFIC 的 NANODROP 2000 微量分光光度计检测 DNA 浓度及纯度。用于检测 *ahFAD2A* 基因 G-A 突变的特异引物为 2A-F: 5'-ATCCAAGGCTGCATTCTCAC-3', WT-R2: 5'-TGGGACAAACACTTCGTC-3' (检测特异位点的核苷酸为 G), SUB-R2: 5'-TGGGACAAACACTTCGTT-3' (检测特异位点的核苷酸为 A), 扩增目的片段为 194 bp^[8]。PCR 总体积 25 μL , 含 10 \times buffer 2.5 μL 、2.5 mmol L^{-1} dNTPs 2.5 μL 、10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 引物各 1.0 μL 、模板 DNA 100 ng、*Taq* 聚合酶 1 U。PCR 条件为 94°C 2 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 35 次循环; 72°C 10 min。PCR 仪为 Bio-Rad MyCycler 热循环仪。

用于扩增 *ahFAD2A* 基因(包含 88 bp 的 5'UTR 区和 738 bp 的编码区)^[9]的引物组合为: 上游引物 aF19: 5'-GATTACTGATTATTGACTT-3', 下游引物 P1056: 5'-CCAACCCAAACCTTTCAGAG-3', PCR 产物 826 bp。PCR 总体积 50 μL , 含 10 \times buffer 5 μL 、2 mmol L^{-1} dNTPs 5 μL 、25 mmol L^{-1} MgSO_4 3 μL 、10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 引物各 1.5 μL 、模板 DNA 200 ng、KOD-Plus-Neo 酶 1 U; PCR 条件为 94°C 2 min, 98°C 10 s, 55°C 30 s, 68°C 30 s, 35 次循环; 72°C 10 min。PCR 仪为 Eppendorf 热循环仪。PCR 产物以上游引物 aF19 为测序引物直接测序。

1.3 花生种子 RNA 提取、反转录及定量 PCR

采用天泽柱式植物 RNA_{OUT} 2.0 (TIANDZ, 90404B)试剂盒提取种子总 RNA; Promega 反转录系统(A3500)合成单链 cDNA; SYBR Premix Ex *Taq* II 试剂盒(TaKaRa, DRR081A)进行荧光定量 PCR 检测。靶基因引物同检测 *ahFAD2A* 基因突变位点特异引物, 目的片段 194 bp; 以 *Actin* 为内参基因(参考序列 DQ873525), AC-F1: 5'-TCTTCCAGCCATCCATGATCGGG-3', AC-R1: 5'-GCTACTCGGTGCCAATGCTGT-3', 目的片段 191 bp。定量 PCR 仪为 Eppendorf realplex⁴。PCR 条件为 95°C 2 min, 95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 35 个循环。结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析, 设

2 次重复。

1.4 脂肪酸的气相色谱测定方法

在河南省农业科学院农业质量标准与检测技术研究中心进行脂肪酸的气相色谱测定。样品前处理及甲酯化反应如下。称取样品 0.5 g 于 15 mL 刻度试管中, 加入 5 mL 乙醚+石油醚(1+1)混合液溶解, 在涡旋振荡器上涡旋 1 min, 混合均匀, 超声 10 min; 加入 5.4% KOH 甲醇溶液 2 mL, 再涡旋 1 min, 超声 20 min; 放置反应 1 h; 加入 5% NaCl 水溶液 10 mL, 静置分层, 取上层清液上机测定。仪器为安捷伦 6890N 气相色谱仪(美国 Agilent 公司), 进样量为 1 μL ; 分流比为 1:100; 进样口温度为 250°C ; 检测器温度为 270°C ; 柱温采用程序升温, 初温为 190°C , 以 $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ 升温至 215°C 保持 10 min, 以 $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ 升温至 230°C , 保持 5 min。

2 结果与分析

2.1 *ahFAD2A* 基因等位变异检测和序列比较

利用 *ahFAD2A* 基因 G-A 突变特异引物对 52 个花生品种进行 PCR 扩增。引物组合 2A-F+SUB-R2 可以在豫花 9331、开农 8 号、开农 49、濮科花 3 号、郑 8159-1、豫花 9416、wt8-0932、wt8-0934、濮 263 和开农 27 共 10 个品种上扩增出 194 bp 的目标 DNA 条带, 不能在其他 42 个品种上扩增出目标条带(图 1), 初步表明这 10 个品种具有 *ahFAD2A* 基因碱基 A 突变位点, 为 *ahFAD2A* 基因突变型(以 *ahFAD2A-m* 表示)。引物组合 2A-F+WT-R2 能在其他 42 个品种上扩增出 194 bp 的目标条带, 说明检测的其他品种含有 *ahFAD2A* 基因碱基 G 野生型位点, 为 *ahFAD2A* 基因野生型(以 *ahFAD2A-wt* 表示)。以 *ahFAD2A* 基因特异引物组合 aF19+P1056 对上述 10 个品种与远杂 9102、延津花籽和开农白 2 号的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 得到约 800 bp 的 DNA 条带, 然后回收测序。序列比对结果表明, 在 *ahFAD2A* 基因起始密码子 ATG 之后 448 bp 处存在核苷酸 G-A 单核苷酸多态性, 远杂 9102、延津花籽和开农白 2 号 3 个品种在该处的核苷酸序列为 G, 豫花 9416、wt8-0932 和 wt8-0934 等 10 个品种在该处的核苷酸序列为 A, 进一步验证了这 10 个品种在 *ahFAD2A* 基因的该核苷酸位点上存在 G-A 突变(图 2)。

2.2 花生 *ahFAD2A* 等位基因在种子发育不同时期的表达特点

花生花针入土 5~10 d 后, 顶端逐渐膨大, 形成鸡头状幼果, 内含物主要为碳水化合物, 至 30~40 d

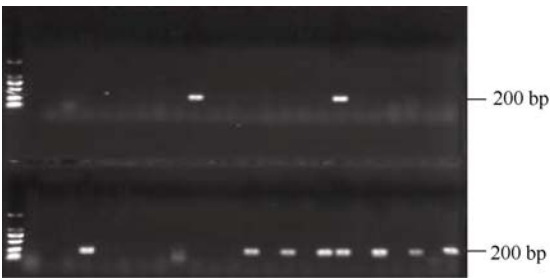


图 1 花生 *ahFAD2A* 基因引物组合 2A-F+SUB-R2 在不同花生品种上的扩增结果

Fig. 1 Amplification patterns of primer pair 2A-F+ SUB-R2 on different peanut varieties

左右，果型大小基本定型，籽粒开始迅速充实。为了解花生 *ahFAD2A* 基因 G-A 等位变异这一对等位基因在种子发育不同时期的表达动态，选取远杂 9102 (*ahFAD2A-wt*)和豫花 9416 (*ahFAD2A-m*)为代表品种，在花针入土不同时期取样提取 RNA，利用 *ahFAD2A* 等位基因位点特异引物进行 *ahFAD2A* 等位基因表达定量 PCR 分析。结果表明，随着种子发育，在花针入土后 *ahFAD2A-wt* 和 *ahFAD2A-m* 基因表达量均逐渐增加(图 3)。在花针入土后 38 d，*ahFAD2A-wt* 和 *ahFAD2A-m* 基因表达量达到高峰，是其花针入土 10 d 的 3~4 倍，之后又逐渐下降。在花针入土 38 d 之前，豫花 9416 的 *ahFAD2A-m* 基因的表达量均稍高于远杂 9102 的 *ahFAD2A-wt* 基因，但差异均不显著。在花针入土 38 d 后，*ahFAD2A-wt* 和 *ahFAD2A-m* 基因表达量开始下降，在花针入土 45 d，豫花 9416 中 *ahFAD2A-m* 基因表达量下降的程度显著快于远杂 9102 中 *ahFAD2A-wt* 基因。说明 *ahFAD2A* 这一对等位基因在花生不同发育时期存在显著的表达差异。

2.3 不同发育时期花生种子油酸积累规律

从果针入土 30 d 起，每间隔 7 d 取花生籽粒分析远杂 9102 (*ahFAD2A-wt*)和突变体豫花 9416 (*ahFAD2A-m*)油酸和亚油酸积累变化。结果表明，远杂 9102 和豫花 9416 不同发育时期油酸和亚油酸变化趋势基本相同，花生种子发育初期亚油酸相对含量

最高，随着种子的发育进程，亚油酸相对含量逐渐下降，油酸相对含量逐渐上升。但豫花 9416 油酸、亚油酸相对含量变化更明显，在籽粒发育前期(果针入土 40 d 左右)油酸相对含量已超过亚油酸，油亚比增加较快；而 9102 到中后期(果针入土 60 d 以后)油酸相对含量才高于亚油酸，油亚比增加较慢。表现出远杂 9102 与豫花 9416 种子发育过程中脂肪酸积累的不同特点(图 4 和图 5)。

2.4 花生 *ahFAD2A* 基因等位变异与油酸、亚油酸含量的相关性

ahFAD2A 基因突变体(*ahFAD2A-m*)的 10 个基因型均具中等以上油酸含量(45%以上)及较大油亚比(1.4 以上)，其余的 42 个 *ahFAD2A* 基因野生型(*ahFAD2A-wt*)等位变异基因型的油酸含量及油亚比均较低，统计分析表明，突变基因型的平均油酸含量和油亚比显著高于野生基因型($t_{\text{油酸差异}}=4.66$, $t_{\text{油亚比差异}}=6.21$, $t_{0.01,50}=2.66$, $P<0.01$)。 *ahFAD2A* 基因 G-A 突变与种子油酸含量和油亚比高度正相关(表 1)。

3 讨论

3.1 花生 *ahFAD2A* 基因 G-A 等位变异的意义

在目前已知的花生高油酸突变体中，无论是自然突变体 F435，还是诱发突变体 M2-225 等，除了 *ahFAD2B* 基因发生突变外，均存在 *ahFAD2A* 基因的 G-A 点突变^[2,17]。本研究对 13 个花生品种 *ahFAD2A* 基因的序列比较中，wt08-0932 和 wt08-0934 为来源于美国的高油酸材料，豫花 9416、豫花 9331、开农 8 号、开农 49、濮科花 3 号、郑 8159-1、濮阳 263 和开农 27 这 8 个品种为河南省审定的中等油酸含量品种，其余 3 个品种远杂 9102、开农白 2 号和延津花籽为普通油酸含量的河南省审定品种和农家品种。前 10 个品种的 *ahFAD2A* 基因序列相同，为 *ahFAD2A* 基因突变基因型(*ahFAD2A-m*)，与远杂 9102、开农白 2 号、延津花籽相比，在 *ahFAD2A* 基

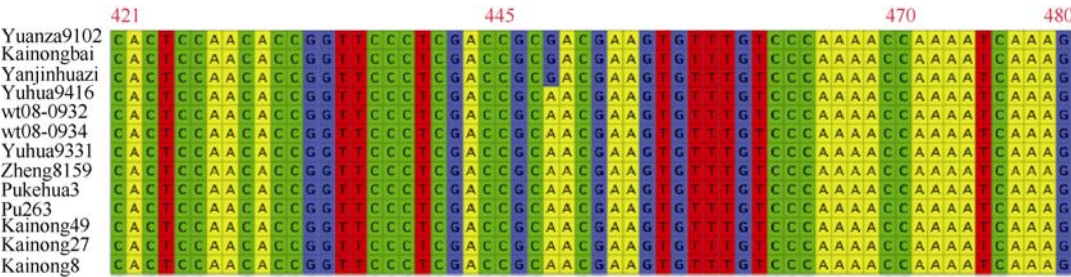


图 2 花生品种 *ahFAD2A* 基因部分序列比对(示 G-A 变异)

Fig. 2 Partial sequence alignment of *ahFAD2A* gene in peanut varieties

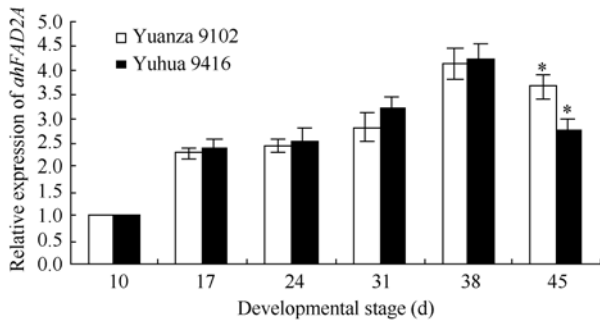


图3 花生种子不同发育时期 *ahFAD2A* 等位基因相对表达量
Fig. 3 Allelic expression variation of *ahFAD2A* at differential developmental stages

误差线为标准误。The error bars denote the standard error, * $P < 0.05$.

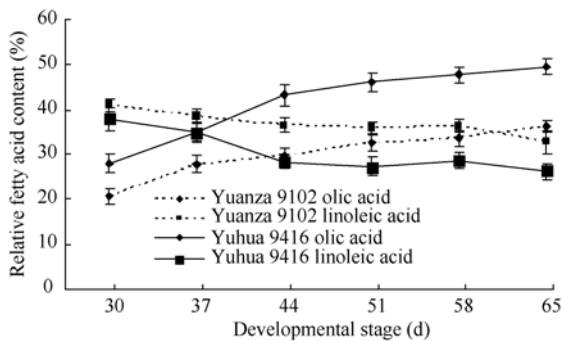


图4 花生种子不同发育时期脂肪酸相对含量

Fig. 4 Relative fatty acid contents in peanut seeds at different developmental stages

误差线为标准误。The error bars denote the standard error.

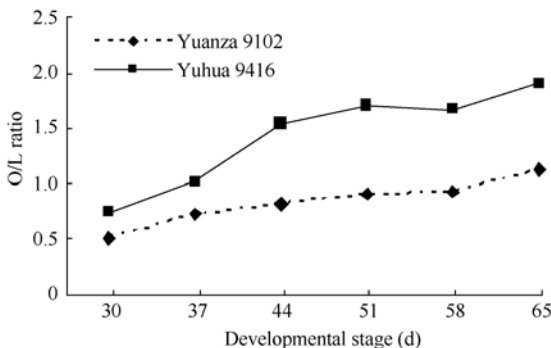


图5 花生种子不同发育时期油酸亚油酸比值

Fig. 5 O/L ratio in peanut seeds at different developmental stages

因的 448 bp 处存在 G-A 单碱基突变位点。序列比较的结果与位点特异 PCR 扩增的结果一致, 同时可以看到这 10 个品种都具有中等以上油酸含量的表型。在高油酸育种中, 应该尽可能选用具有中等以上油酸含量的亲本, 引入 *ahFAD2A* 基因的单碱基突变位点, 为后代油酸含量的提高奠定遗传基础。

3.2 花生 *ahFAD2A* 等位基因表达特性及其与种子不同发育时期的油酸积累关系

Han 等^[18]最早在人类基因组中发现等位基因的

表达变异, 在 13 对存在 SNP 的等位基因中, 有 6 对存在不同程度的表达差异, 变异程度为 3%~30%。随后 Lo 等^[19]对人类全基因组中的 602 个存在单个 SNP 的等位基因进行等位基因表达变异检测, 发现有 326 对等位基因(54%)在不同的组织器官或个体间存在表达变异, 并认为这种等位基因间的表达变异是普遍存在的, 并对性状的变异产生影响。Guo 等^[20]在玉米中的研究进一步证实了高等植物中等位基因表达变异的普遍性, 并认为该变异可能与抗逆性和杂种优势有关。目前在农作物中, 较多的研究集中在对重要功能基因的等位变异发掘上, 并进一步开发出等位基因特异的功能性分子标记用于分子标记辅助选择育种。对于存在 SNP 的等位基因表达差异的研究仍然较少, 与重要农艺性状的关系也不十分清楚。

花生 *ahFAD2* 基因是影响种子油酸、亚油酸含量和油亚比的重要功能基因。在花生种质资源中该基因存在 G-A 单核苷酸 SNP 变异, 并与种子油酸、亚油酸和油亚比有直接关系。为明确其间的相关性, 非常有必要明确 *ahFAD2* 的这一对等位基因间是否存在表达变异。由于在种子发育后期提取 RNA 较为困难, 我们选择种子发育早中期(花针入土后 10~45 d)进行 *ahFAD2A* 等位基因表达检测; 而由于种子发育早期其内含物以碳水化合物居多, 难以满足脂肪酸成分气相色谱测定的样品量, 故在种子发育的中后期(花针入土后 30~65 d)进行脂肪酸测定。尽管二者测定时期不尽一致, 但基因表达和脂肪酸积累的变化趋势已经非常明确, 豫花 9416 (*ahFAD2A-m*)的 *ahFAD2A* 基因表达量在前期稍高于远杂 9102 (*ahFAD2A-wt*), 并在 38 d 达到高峰后迅速降低, 到 45 d 已显著低于远杂 9102; 与此相对应的是, 豫花 9416 油酸含量在 40 d 左右开始超过亚油酸含量, 油亚比与 *ahFAD2A* 基因后期表达量呈现出负相关性。

Mikkilineni 等^[21]利用 Northern 杂交比较了 90 个高油玉米授粉后 14、21、28 和 35 d 的幼穗中 *fad2* 基因表达水平, 认为玉米 *fad2* 基因在这 4 个时期的胚中均稳定表达, 授粉后 14 d 的胚中表达量最高; *fad2* 基因前 3 个时期在胚乳中表达也相对稳定, 35 d 显著下降。Belo 等^[22]在对 553 个玉米自交系的 *fad2* 基因等位变异的全基因组高油酸关联分析中, 利用 real-time PCR 分析了授粉 25 d 的玉米幼胚中的 *fad2* 基因 RNA 水平, 4 个组合中有 2 个组合的高油酸自交系的 *fad2* 基因表达较低, 但未对籽粒发育其他时

表 1 花生 *ahFAD2A* 基因等位变异与油酸、亚油酸含量的关系
 Table 1 Relationship between *ahFAD2A* mutation and contents of oleic acid and linoleic acid

品种 Variety	突变位点 Mutation site	油酸 Oleic acid content (%)	亚油酸 Linoleic acid content (%)	O/L
wt08-0932	A	76.46	5.49	13.93
wt08-0934	A	71.66	11.03	6.50
豫花 9416 Yuhua 9416	A	49.40	28.00	1.76
开农 49 Kainong 49	A	49.90	29.60	1.69
豫花 9331 Yuhua 9331	A	49.50	29.50	1.68
濮阳 263 Puyang 263	A	48.50	31.50	1.54
开农 27 Kainong 27	A	43.00	29.10	1.48
开农 8 号 Kainong 8	A	46.30	31.70	1.46
濮科花 3 号 Pukehua 3	A	46.30	32.90	1.41
郑 8159-1 Zheng 8159-1	A	44.90	32.40	1.39
郑花 5 号 Zhenghua 5	G	45.50	33.10	1.37
豫花 12 Yuhua 12	G	43.70	34.50	1.27
延津花籽 Yanjinhuaizi	G	44.56	35.70	1.25
豫花 15 Yuhua 15	G	43.00	35.10	1.23
豫花 9502 Yuhua 9502	G	42.30	34.90	1.21
远杂 9307 Yuanza 9307	G	41.90	35.00	1.20
豫花 6 号 Yuhua 6	G	42.00	35.40	1.19
濮科花 2 号 Pukehua 2	G	43.00	36.70	1.17
周花 2 号 Zhouhua 2	G	42.30	36.80	1.15
新花 1 号 Xinhua 1	G	41.90	37.40	1.12
豫花 3 号 Yuhua 3	G	40.80	37.10	1.10
豫花 4 号 Yuhua 4	G	41.30	37.60	1.10
开农白 2 号 Kainongbai 2	G	40.80	37.20	1.10
豫花 9 号 Yuhua 9	G	41.40	37.80	1.10
远杂 9102 Yuanza 9102	G	39.40	36.20	1.09
驻花 1 号 Zhuhua 1	G	39.90	36.80	1.08
豫花 16 Yuhua 16	G	40.20	37.40	1.07
豫花黑 1 号 Yuhuahei 1	G	39.20	36.80	1.07
郑花 7 号 Zhenghua 7	G	40.50	38.10	1.06
豫花 1 号 Yuhua 16	G	40.30	38.60	1.04
濮花 1 号 Puhua 1	G	40.50	39.00	1.04
豫花 9326 Yuhua 9326	G	39.40	38.00	1.04
豫花 10 号 Yuhua 10	G	39.40	38.20	1.03
豫花 5 号 Yuhua 5	G	39.30	38.20	1.03
开农 5 号 Kainong 5	G	39.70	38.70	1.03
豫花 9327 Yuhua 9327	G	38.70	38.20	1.01
豫花 2 号 Yuhua 2	G	38.90	38.60	1.01
豫花 8 号 Yuhua 8	G	39.60	39.40	1.01
开农 36 Kainong 36	G	38.80	38.80	1.00
濮花 17 Puhua 17	G	38.80	38.80	1.00
濮花 16 Puhua 16	G	39.40	39.50	1.00
开农 37 Kainong 37	G	38.30	38.70	0.99
豫花 13 Yuhua 13	G	38.50	39.20	0.98
豫花 14 Yuhua 14	G	38.40	39.10	0.98
开农 41 Kainong 41	G	38.60	39.60	0.97
濮科花 15 Pukehua 15	G	38.60	39.70	0.97
豫花 7 号 Yuhua 7	G	38.00	40.20	0.95
豫花 9414 Yuhua 9414	G	37.30	40.00	0.93
濮科花 4 号 Pukehua 4	G	37.80	40.80	0.93
开农 30 Kainong 30	G	37.00	40.10	0.92
豫花 11 Yuhua 11	G	36.60	40.90	0.89
远杂 9614 Yuanza 9614	G	31.90	44.00	0.73

期的 *fad2* 基因表达进行检测。

花生种子的结构及脂肪酸组成与玉米明显不同, 其 *fad2* 基因也表现出不同的表达特点。Patel 等^[2]、Jung 等^[6]、Lopez 等^[23]和 Yu 等^[24]研究发现, 花生 *ahFAD2* 基因在种子发育中期转录水平最高, 前期和后期较低; *ahFAD2A* 基因在高油酸和普通油酸含量的品种中均有表达, 但在高油酸品种中, *ahFAD2B* 基因的 mRNA 显著降低或提前终止。本研究结果表明, 在普通和中等油酸含量花生品种中, *ahFAD2A* 基因的表达在中期达到高峰, 然后有所下降, 与前人研究结果基本一致^[6], 但本研究利用位点特异引物检测了 *ahFAD2A* 的等位基因 G-A 单碱基突变的转录特点, 首次明确了 *ahFAD2A* 等位基因在种子发育过程中的表达动态及其与种子中油酸、亚油酸和油亚比的相关性, 说明等位基因的表达变异与脂肪酸积累模式有关。这一结果为明确 *ahFAD2A* 基因的调控机理和进一步通过遗传操作调控花生种子的脂肪酸含量和成分提供了理论依据。

4 结论

花生 *ahFAD2A* 基因对种子油酸、亚油酸含量和油亚比有重要影响。花生种质资源及育成品种中存在两种 *ahFAD2A* 基因的等位变异(*ahFAD2A-wt* 和 *ahFAD2A-m*), *ahFAD2A-m* 基因的表达强度在种子发育中期以后比 *ahFAD2A-wt* 基因的表达较快降低; *ahFAD2A-m* 基因型普遍具有中等以上油酸含量, 与 *ahFAD2A-wt* 基因型油酸含量间差异极显著。*ahFAD2A* 等位基因在种子发育过程中的表达动态与种子中油酸、亚油酸含量和油亚比密切相关。

References

- [1] Norden A J, Gorbett D W, Knauff D A, Young C T. Variability in oil quality among peanut genotypes in the Florida breeding program. *Peanut Sci*, 1987, 14: 7–11
- [2] 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. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1492–1502
- [3] Ray T K, Holly S P, Knauff D A, Abbott A G, Powell G L. The primary defect in developing seed from the high oleate variety of peanut (*Arachis hypogaea* L.) is the absence of Δ^{12} -desaturase activity. *Plant Sci*, 1993, 91: 15–21
- [4] Lopez Y, Nadaf H L, Smith O D, Connell J P, Reddy A S, Fritz A K. Isolation and characterization of the Δ^{12} -fatty acid desaturase in peanut (*Arachis hypogaea* L.) and search for polymorphisms for the high oleate trait in Spanish market-type lines. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 1131–1138
- [5] Lopez Y, Smith O D, Senseman S A, Rooney W L. Genetic factors influencing high oleic acid content in Spanish market-type peanut cultivars. *Crop Sci*, 2001, 41: 51–56
- [6] Jung S, Swift D, Sengoku E, Patel M, Teule F, Powell G, Moore K, Abbott A. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): I. Isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl-PC desaturases. *Mol Gen Genet*, 2000, 263: 796–805
- [7] Jung S, Powell G, Moore K, Abbott A. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.): II. Molecular basis and genetics of the trait. *Mol Gen Genet*, 2000, 263: 806–811
- [8] Chen Z, Wang M L, Barkley N A, Pittman R N. 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. *Plant Mol Biol Rep*, 2010, 28: 542–548
- [9] Chu Y, Holbrook C C, Ozias-Akins P. Two alleles of *ahFAD2B* control the high oleic acid trait in cultivated peanut. *Crop Sci*, 2009, 49: 2029–2036
- [10] Chu Y, Ramos L, Holbrook C C, Ozias-Akins P. Frequency of a loss-of-function mutation in oleoyl-PC desaturase (*ahFAD2A*) in the minicore of the U.S. peanut germplasm collection. *Crop Sci*, 2007, 47: 2372–2378
- [11] Lei Y(雷永), Jiang H-F(姜慧芳), Wen Q-G(文奇根), Huang J-Q(黄家权), Yan L-Y(晏立英), Liao B-S(廖伯寿). Frequencies of *ahFAD2A* alleles in Chinese peanut mini core collection and its correlation with oleic acid content. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2010, 36(11): 1864–1869 (in Chinese with English abstract)
- [12] Wang M L, Sukumaran S, Barkley N A, Chen Z, Chen C Y, Guo B, Pittman R N, Stalker H T, Holbrook C C, Pederson G A, Yu J. Population structure and marker-trait association analysis of the US peanut (*Arachis hypogaea* L.) mini-core collection. *Theor Appl Genet*, 2011, 123: 1307–1317
- [13] Bruner A C, Jung S, Abbott A G, Powell G L. The naturally occurring high oleate oil character in some peanut varieties results from reduced oleoyl-PC desaturase activity from mutation of aspartate 150 to Asparagine. *Crop Sci*, 2001, 41: 522–526
- [14] Yu S-L(禹山林), Isleib T G. The inheritance of high oleic acid content in peanut of Virginia type in USA. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2000, 22(1): 34–37 (in Chinese with English abstract)
- [15] Han Z-Q(韩柱强), Gao G-Q(高国庆), Zhou R-Y(周瑞阳), Tang R-H(唐荣华), Zhong R-C(钟瑞春), Zhou C-Q(周翠球), He L-Q(贺梁琼). Inheritance of oleic, linoleic acid content and O/L ratio in high oleic acid *Arachis hypogaea* L. var. *hirsuta*. *J Plant Genet Resour* (植物遗传资源学报), 2010, 11(1): 17–22 (in Chinese with English abstract)
- [16] Jiang H-F(姜慧芳), Ren X-P(任小平), Huang J-Q(黄家权), Liao B-S(廖伯寿), Lei Y(雷永). Establishment of peanut mini core collection in China and exploration of new resource with high oleate. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2008, 30(3): 294–299 (in Chinese with English abstract)
- [17] Ding J-P(丁锦平), Han Z-Q(韩柱强), Zhou R-Y(周瑞阳), Gao G-Q(高国庆), Yang Y-P(杨玉萍). Genetic analysis of oleic/linoleic (O/L) ratio in peanut. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2007, 29(3): 233–237 (in Chinese with English abstract)
- [18] Yan H, Yuan W, Velculescu V E, Vogelstein B, Kinzler K W. Allelic variation in human gene expression. *Science*, 2002, 297:

- 1143
- [19] Lo S H, Wang Z, Hu Y, Yang H H, Gere S, Buetow K H, Lee M P. Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res*, 2003, 13: 1855–1862
- [20] Guo M, Rupe M A, Zinselmeier C, Habben J, Bowen B A, Smith O S. Allelic variation of gene expression in maize hybrids. *Plant Cell*, 2004, 16: 1707–1716
- [21] Mikkilineni V, Rocheford T R. Sequence variation and genomic organization of fatty acid desaturase-2 (*fad2*) and fatty acid desaturase-6 (*fad6*) cDNAs in maize. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 1326–1332
- [22] Belo A, Zheng P, Luck S, Shen B, Meyer D J, Li B, Tingey S, Rafalski A. Whole genome scan detects an allelic variant of *fad2* associated with increased oleic acid levels in maize. *Mol Genet Genom*, 2008, 279: 1–10
- [23] Lopez Y, Nadaf H L, Smith O D, Simpson C E, Fritz A K. Expressed variants of Δ^{12} -fatty acid desaturase for the high oleate trait in Spanish market-type peanut lines. *Mol Breed*, 2002, 9: 183–190
- [24] Yu S, Pan L, Yang Q, Min P, Ren Z, Zhang H. Comparison of the Δ^{12} fatty acid desaturase gene between high-oleic and normal-oleic peanut genotypes. *J Genet Genom*, 2008, 35: 679–685

欢迎订阅 2013 年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的学术期刊。前身可追溯到 1919 年创办的《中华农学会丛刊》。主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及与作物生产有关的生物技术、生物数学等学科具基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。办刊宗旨是报道本领域最新研究动态和成果, 为繁荣我国作物科学研究、促进国内外学术交流、加速中国农业现代化建设服务。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》从 2000 年起连续 12 年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助。2006—2012 年连续 7 年获“中国科协精品科技期刊工程项目”资助。从 2002 年起连续 10 年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。2011 年获“第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖”, 2005 年获“第三届国家期刊奖提名奖”。2008 和 2011 年被中国科学技术信息研究所授予“中国精品科技期刊”称号。2009 年被中国期刊协会和中国出版科学研究所授予“新中国 60 年有影响力的期刊”称号。据北京大学图书馆编著的《中文核心期刊要目总览》(2004、2008 和 2011 年版)登载, 《作物学报》被列在“农学、农作物类核心期刊表”的首位。

《作物学报》为月刊, 2013 年定价 50 元/册, 全年 600 元。可通过全国各地邮局订阅, 刊号: ISSN 0496-3490, CN 11-1809/S, 邮发代号: 82-336。也可向编辑部直接订购。

地址: 北京市海淀区中关村南大街 12 号, 中国农业科学院作物科学研究所《作物学报》编辑部(邮编 100081)

电话: 010-82108548; 传真: 010-82105793; 网址: <http://www.chinacrops.org/zwxw/>
E-mail: zwxw301@mail.caas.net.cn; xbzw@chinajournal.net.cn