

# 标记辅助创制富集花青素高油酸的花生种质

李佳伟<sup>1</sup>, 马钰聪<sup>1</sup>, 李 丽<sup>2</sup>, 杨鑫雷<sup>1</sup>, 崔顺立<sup>1</sup>, 刘立峰<sup>1</sup>, 王 涛<sup>3</sup>, 穆国俊<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 河北农业大学农学院, 保定 071001; <sup>2</sup> 河北工程大学园林与生态工程学院, 邯郸 056009; <sup>3</sup> 河北易园生态农业科技有限公司, 保定 074200)

**摘要:** 花生 (*Arachis hypogaea* L.) 油酸和花青素含量是花生品质育种的重要目标。本研究以高油酸粉色种皮品系 G110 为母本和普通油酸紫色种皮品系紫珍珠为父本组配杂交组合。亲本子仁在开花后 30 d 和 45 d 的转录组分析结果表明, 氧化-还原过程 (GO: 0055114) 和脂肪酸合成过程 (GO: 0006633) 为主要的 GO 富集代谢通路。差异基因表达结果表明, *ahFAD2B* (arahy. 5913QL) 在 G110 中显著上调表达, 而 *ahFAD2A* (arahy. 42CZAS) 在两个品种中的差异表达水平不显著。FAM tail-1/AlleleX<sup>a/b</sup> 分别确定 *ahFAD2A* 和 *ahFAD2B* 中的突变型为 *aabb*, HEX tail-2/AlleleY<sup>a/b</sup> 分别确定 *ahFAD2A* 和 *ahFAD2B* 中的野生型为 *AABB*。利用 Kompetitive Allele-Specific PCR (KASP) 荧光标记 A004807 和 A004808, 在 F<sub>2</sub> 筛选出 *aabb* 高油酸单株 66 株。经继代繁育后, 在 F<sub>7</sub> 得到紫色种皮高油酸种质材料 3 个, 分别为 18-B-40、18-B-49 和 18-B-54, 其油酸含量分别为 79.46%、78.77% 和 78.09%, 分别是紫珍珠的 1.77 倍、0.99 倍和 0.99 倍; 油亚比 (O/L) 分别为 14.69、11.89 和 10.88, 分别是紫珍珠的 11.58 倍、9.37 倍和 8.58 倍; 花青素含量分别为 30.20 OD/g、28.77 OD/g 和 29.13 OD/g, 分别是 G110 的 23.91 倍、22.77 倍和 23.06 倍。本研究获得的富集花青素高油酸花生种质材料对丰富我国高油酸花生种质资源具有重要的现实意义, 同时对花生油酸代谢机制的深入研究提供参考。

**关键词:** 花生; 油酸; 花青素; KASP; 转录组分析

## Marker-Assisted Generation of High-oleic Germplasm Accessions Enriched with Anthocyanins in Peanut (*Arachis hypogaea* L.)

LI Jia-wei<sup>1</sup>, MA Yu-cong<sup>1</sup>, LI Li<sup>2</sup>, YANG Xin-lei<sup>1</sup>, CUI Shun-li<sup>1</sup>, LIU Li-feng<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>3</sup>, MU Guo-jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Agronomy, Hebei Agricultural University, Baoding 071001; <sup>2</sup> School of Landscape and Ecological Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056009; <sup>3</sup> Hebei Yiyuan Ecological Agriculture Technology Co., Ltd, Baoding 074200)

**Abstract:** The content of oleic acid and anthocyanin is an important target for quality breeding in peanut (*Arachis hypogaea* L.). In this study, a high-oleic acid peanut line with pink testa G110 lines (♀) was crossed with a landrace line with purple testa Purple Pearl lines (♂). Kernels of both parent lines on 30 days after flowering and 45 days were sampled for the transcriptomic analysis. The differentially expressed genes (DEGs) enrichments in oxidation-reduction process (GO: 0055114) and fatty acid biosynthetic process (GO: 0006633) were observed. The gene *ahFAD2B* (arahy.5913QL) was up-regulated in G110, while differential expression levels of another gene *ahFAD2A* (arahy. 42CZAS) in the two varieties were not significant difference ( $p>0.05$ ). FAM tail-1/AlleleX<sup>a/b</sup> identifies mutant genotype *aabb* in *ahFAD2A* and *ahFAD2B*, respectively, and HEX tail-2/AlleleY<sup>a/b</sup> identifies wild genotype *AABB* in *ahFAD2A* and *ahFAD2B*, respectively. By taking use of kompetitive

收稿日期: 2021-12-09 修回日期: 2022-03-20 网络出版日期: 2022-04-26

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20211209001>

第一作者研究方向为植物种质资源创制与利用, E-mail: 1796890718@qq.com

通信作者: 穆国俊, 研究方向为花生种质资源创制与利用, E-mail: mgj99999@126.com

**基金项目:** 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2019051); 河北省重点研发计划项目现代种业科技专项 (19226363D); 2021 年度河北省保定市农业科技园区建设项目 (2111N004)

**Foundation projects:** Key Project of Science and Technology Research in Colleges and Universities of the Department of Education in Hebei Province (ZD2019051); Key Project of Science and Technology Research of Modern Seed Industry of the Department of S&T in Hebei Province (19226363D); Project of Agricultural Science and Technology Park Construction in Baoding City, Hebei Province (2111N004)

allele-specific PCR (KASP) markers A004807 and 4004808, 66 high-oleic acid plants of genotype *aabb* in  $F_2$  populations were obtained, followed by self-pollination to  $F_7$ . Of them three superior accessions namely 18-B-40, 18-B-49 and 18-B-54, with purple testa and high-oleic acid were identified, in which the oleic acid content was 79.52%, 78.84%, and 78.02%, 1.77 folds, 0.99 folds and 0.99 folds higher than that of “Purple Pearl”, respectively. The oleic to linoleic ratio (O/L) was 14.69, 11.91, and 10.90, which increased by 11.58 folds, 9.37 folds and 8.58 folds compared with that of “Purple Pearl”. The anthocyanin content was 30.87 OD/g, 29.16 OD/g, and 14.51 OD/g, which increased by 23.91 folds, 22.77 folds and 23.06 folds compared with that of G110. Collectively, this study obtained peanut germplasm accessions showing simultaneous enrichments of anthocyanin and high oleic, which might have implications for enriching high oleic peanut germplasms in China and future uncovering the mechanism of peanut oleic acid metabolism.

**Key words:** peanut; oleic acid; anthocyanin; KASP; transcriptomic analysis

花生 (*Arachis hypogaea* L.) 在世界范围内广为种植<sup>[1]</sup>。中国花生种植面积居世界第二,仅次于印度,总产量位居世界第一。花生子仁富含不饱和脂肪酸,具有极高的营养价值。花生种皮富含花青素,在中药学中又称花生衣,具有较大的医疗保健价值。紫色种皮花生的花青素含量明显高于其他种皮颜色的花生品种<sup>[2]</sup>。花生子仁中油亚比 (O/L) 是决定花生脂肪酸组成的重要因素。花生子仁中油酸与亚油酸之和约占脂肪的 80%,两者呈明显负相关关系<sup>[3]</sup>。油酸能够降低有害低密度脂蛋白 (LDL, low-density lipoproteins)、维持高密度脂蛋白 (HDL, high-density lipoprotein)<sup>[4]</sup>,具有预防心脑血管疾病等多种保健功效<sup>[5]</sup>。油酸中含有一个不饱和烯键,对氧气、高温等环境因子更加稳定,不易酸败,因此高油酸花生及其制品更耐储存<sup>[6]</sup>。高油酸花生的培育是目前品质育种工作中的重要目标之一<sup>[7]</sup>。Jung 等<sup>[8]</sup>研究结果表明,油酸含量受 2 对主效隐性基因控制 (*aabb*)。López 等<sup>[9]</sup>进一步发现高油酸是 *ahFAD2A* 编码区的 448 位点出现一个错义突变 (G448A、D150N) 和在 *ahFAD2B* 编码区 442 位点插入碱基 A (442 insA) 的结果。Liu 等<sup>[10]</sup>研究发现 19 号染色体上的编码  $\omega$ -6 脂肪酸脱氢酶的 *ahFAD2B* 基因显著下调,从而形成高油酸花生。Wang 等<sup>[11]</sup>利用花生子叶组织快速提取  $F_1$  种子 DNA,采用 *ahFAD2B* 特异引物扩增并测序,根据测序峰图来区分杂种真伪。Noelle 等<sup>[12]</sup>用实时定量 PCR 的方法区分野生型和突变型花生在 *ahFAD2B* 上的差异。目前分子标记辅助选择已成为高油酸花生育种过程中的有效手段之一。Chen 等<sup>[13]</sup>用 Allele-specific PCR (AS-PCR) 的方法可以区分 *ahFAD2* 在 A 基因组和 B 基因组上的野生型和突变型,但无法准确区分 5 种杂合基因型。Zhao

等<sup>[14]</sup>利用竞争性等位基因特异性 PCR (KASP, kompetitive allele specific PCR) 方法检测出不同杂交子代中 *ahFAD2A* 和 *ahFAD2B* 的所有基因型。KASP 标记辅助选择现已成为高油酸花生育种的重要选育手段之一。

油酸和花青素是花生中重要的营养和保健物质。本研究采用“粉色种皮高油酸花生 × 紫色种皮普通花生”组合,利用高通量测序与 KASP 标记辅助育种相结合的育种方法,使亲本高油酸和高花青素优良性状在子代富集并获得了富集花青素高油酸花生种质材料。本研究结果对我国丰富高油酸花生种质资源具有重要的现实意义,同时对花生油酸代谢机制的深入研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与取样处理

粉色种皮高油酸品系 G110,来源于远杂 9874 × CTWE; 紫色种皮普通油酸品系紫珍珠,来源于河北易园生态农业科技有限公司。以 G110 为母本、紫珍珠为父本,于 2018 年 7 月进行杂交组配,2018 年 10 月按标记收获;2018 年 11 月至 2019 年 4 月在海南三亚南滨农场进行  $F_1$  加代。2019 年 5 月将  $F_2$  群体种植在河北易园生态农业科技有限公司科技示范园并进行单株叶片 KASP 标记检测。KASP 标记检测由中玉金标记生物技术股份有限公司 (北京,中国) 进行。2019 年 10 月按照 KASP 标记结果筛选  $F_3$  高油酸单株;2019 年 11 月至 2021 年 4 月进行南繁继代,将  $F_3$  单株种植,行长 5 m。收获  $F_4$  时每一行保留紫色种皮单株,淘汰粉色种皮单株,单株种植,行长 5 m,直至得到表型稳定的  $F_7$  新品系。2021 年 7 月至 10 月采用果针悬挂吊牌的方式记录 G110 和紫珍珠的开花时间,取开花后 30 d 和 45 d

的 G110 (G1、G2, 粉色种皮) 和紫珍珠 (Z1、Z2, 紫色种皮) 的花生子仁样品 10 g, 3 次生物学重复。转录组分析由基迪奥生物科技有限公司 (广州, 中国) 进行测序。

### 1.2 总花青素、油酸和亚油酸含量检测

采用紫外-可见分光光度计<sup>[15]</sup>测定花生的总花青素, 采用气相色谱法<sup>[16]</sup>测定油酸和亚油酸含量并计算 O/L 值。利用 IBM SPSS Statistics 26 进行差异显著性分析, 3 次生物学重复。

### 1.3 转录组分析

参照前人的 Trizol 沉淀法<sup>[17]</sup>提取 RNA, 选用 RIN  $\approx 10$ ; 28 s/18 s  $\geq 1.5$ ; 1.7 < OD260/OD280 < 2.0 的样品进行转录组测序。采用 Illumina 平台 (<http://www.illumina.com>) 进行测序, 3 次生物学重复。利用边合成边测序 (SBS, sequencing by synthesis) 技术将得到的高质量 Clean Data 通过 HISAT2<sup>[18]</sup> 高效对比系统与四倍体栽培花生参考基因组 [https://v1.legumefederation.org/data/public/Arachis\\_hypogaea/Tifrunner.gnml.ann1.CCJH/](https://v1.legumefederation.org/data/public/Arachis_hypogaea/Tifrunner.gnml.ann1.CCJH/) 进行比对, 对 4 个样本每千个碱基的转录每百万映射读取值 (FPKM, fragments per kilobase per million) 进行统计。利用 DESeq2<sup>[19]</sup> 计算差异比较样本之间的 FPKM 比值 (FC, fold change) 和误差率 (FDR, false discovery rate), 以  $|\log_2 FC| \geq 1$  和 FDR < 0.05 为标准筛选差异基因。

### 1.4 *ahFAD2A* 和 *ahFAD2B* ORF 的扩增及 KASP 检测

DNA 提取、引物设计和 PCR 体系及过程按照 Patel 等<sup>[20]</sup> 进行。将 aF19<sup>a</sup>/R1 和 bF19<sup>b</sup>/R1 扩增获得的 PCR 产物回收和转化, 挑选阳性克隆进行序列测定, 采用 DNAMAN 进行比对分析 (表 1)。

表 1 PCR 引物名称和序列

Table 1 Primers and sequences of PCR

引物名称 Primer name	序列 (5' -3') Sequence (5' to 3')
aF19 <sup>a</sup>	GATTACTGATTATTGACTT
bF19 <sup>b</sup>	CAGAACCATAGCTTTG
R1	CTCTGACTATGCATCAG

特异性非标记寡核苷酸 KASP 引物工作液包含两个等位基因特异性的正向引物、一个反向引物和 Master mix (由 FRET 试剂盒中的 FAM tail-1 和 HEX tail-2 组成) (表 2)。利用 Omega 荧光信号阅读器在 520 nm 和 556 nm (25 °C, 2 min) 下获得荧

光信号。采用 Kraken<sup>TM</sup> (LGC 公司提供) 进行基因型分析。采用 SNPviewer2 软件进行数理统计分析。

表 2 KASP 引物名称和序列

Table 2 Primers and sequences of KASP

引物名称 Primer name	序列 (5' -3') Sequence (5' to 3')
AlleleX <sup>a</sup>	TTTGGTTTGGGACAAACACTTCGTC
AlleleY <sup>a</sup>	ATTTTGGTTTGGGACAAACACTTCGTT
AlleleX <sup>b</sup>	GACAAACACTTCGTCGCGGTCT
AlleleY <sup>b</sup>	ACAAACACTTCGTCGCGGTCTG
Common-A	GCCGCCACCACTCCAACACC
Common-B	GCCGCCACCACTCCAACACA
FAM tail-1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCT
HEX tail-2	GAAGTTCGGAGTCAACGGATT

### 1.5 特征性差异表达基因进行 qRT-PCR 验证

提取花生子仁总 RNA, 并检验 RNA 浓度及质量。qRT-PCR 以编码花生肌动蛋白 *ACT7* 基因作为内参基因, 采用 Premier 5.0 software 设计引物 (表 3)。qRT-PCR 反应体系为: cDNA 模板 1  $\mu$ L (100 ng/ $\mu$ L), 正向引物 1  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 反向引物 1  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), TBGreenPremixExTaq (TliRNaseHPlus) (2x) 12.5  $\mu$ L, 加超纯水至 25  $\mu$ L。反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算相对表达量, 每个基因分别进行 3 次重复。

表 3 荧光定量引物

Table 3 Fluorescent quantitative primers

引物名称 Primer name	序列 (5' -3') Sequence (5' to 3')
5913QL-F	GGGAGGGCTATTTCCTT
5913QL-R	CCAACCCAAACCTTTCAA
42CZAS-F	GGGAGGGCTATCTCCCTC
42CZAS-R	CCAACCCAAACCTTTACG
ACT7-F	GATTGGAATGGAAGCTGCTG
ACT7-R	CGGTCAGCAATACCAGGGAA

## 2 结果与分析

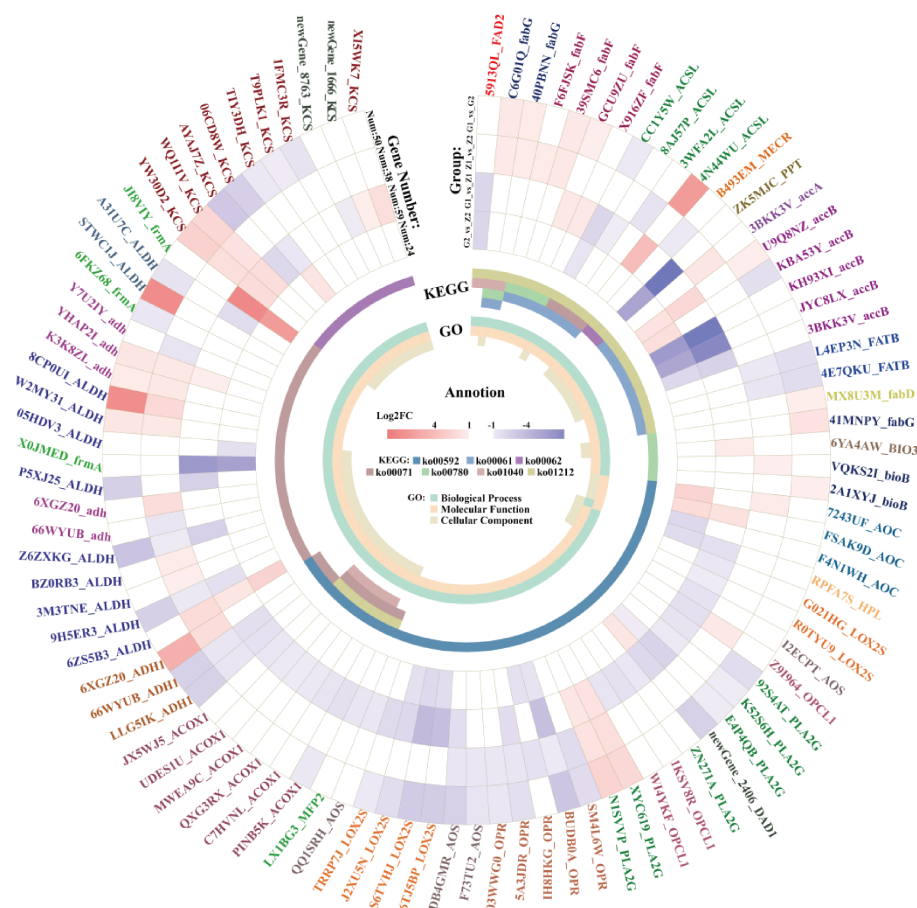
### 2.1 子仁 GO 及 KEGG 分析

对 G110 和紫珍珠的开花后 30 d 和 45 d 的子仁构建了 12 个 cDNA 文库, 得到 85.68 Gb Clean Data, Clean Data  $\geq 5.95$  Gb, Q30  $\geq 92.37\%$ 。2 个



品种的 Reads 与参考基因组的比对效率为 88.72%~94.61%。G110 开花后 45 d 相对于 30 d (G1\_vs\_G2)、紫珍珠开花后 45 d 相对于 30 d (Z1\_vs\_Z2)、紫珍珠开花后 30 d 相对于 G110 开花后 30 d (G1\_vs\_Z1) 和紫珍珠开花后 45 d 相对于 G110 开花后 45 d (G2\_vs\_Z2) 比较组共筛选出 24704 个差异表达基因 (DEGs, differentially expressed genes), 其中上调表达基因分别为 2187、4364、3275 和 2322 个; 下调表达基因分别为 1912、2963、5354 和 2327 个。KEGG 富集结果表明, 脂肪酸代谢 (ko01212)、 $\alpha$ -亚麻酸代谢 (ko00592) 和脂肪酸降解 (ko00071) 为主要富集通路, 分别富集与脂肪酸代谢相关的基因 29、39 和 26 个。GO 富集

结果表明, 94 个差异表达基因在分子功能、生物过程和细胞组分均有富集, 其中氧化还原过程 (GO: 0055114) 和脂肪酸生物合成过程 (GO: 0006633) 为主要富集代谢通路。4 个比较组共筛选出脂肪酸代谢的差异表达基因 94 个。在 G1\_vs\_G2 中, 上调表达基因 19 个, 下调表达基因 31 个; 在 Z1\_vs\_Z2 中, 上调表达基因 21 个, 下调表达基因 17 个; 在 G1\_vs\_Z1 中, 上调表达基因 15 个, 下调表达基因 44 个, 其中 *ahFAD2B* (arahy. 5913QL) 在 G110 中显著上调表达; 在 G2\_vs\_Z2 中, 上调表达基因 8 个, 下调表达基因 16 个, 其中 *ahFAD2B* (arahy. 5913QL) 在 G110 中显著上调表达。



外第 1 圈文本表示 Gene\_ID+ko\_ID, 并按照 ko\_ID 进行分类, 以不同的颜色标识; 外第 2~5 圈表示 4 个比较组的差异表达基因的 Log2FC 值, 红色表示上调表达, 蓝色表示下调表达; 外第 6~9 圈表达基因所对应的 KEGG Pathways; 外第 10~12 圈表示 GO Classify1

The text of the outside circle 1 indicates Gene\_ID + ko\_ID, and is classified according to ko\_ID with different colors; The outside circles 2-5 indicate the Log2FC values of the differentially expressed genes in the four comparison groups, Up-regulated expressions are shown in red, and down-regulated ones are shown in blue; The outside circle 6-9 indicate the KEGG Pathways corresponding to the expressed genes;

The outside circle 10-12 indicate GO Classify1

图 1 花生油酸差异表达基因的鉴定和富集分析

Fig.1 Identification and enrichment analysis of DEGs of oleic acid in peanut



## 2.2 特征性差异表达基因 qRT-PCR 验证分析

对油酸含量差异表达基因 *ahFAD2A* (arahy.42CZAS) 和 *ahFAD2B* (arahy.5913QL) 进行 qRT-PCR 分析, 结果表明 *ahFAD2B* (arahy.5913QL) 在高油酸花生材料 G110 中上调表达, 在普通油酸

花生材料紫珍珠中下调表达; *ahFAD2A* (arahy.42CZAS) 的相对表达量未达到差异表达水平 (图 2)。油酸含量差异表达基因的 qRT-PCR 结果和 RNA-seq 表达趋势一致。

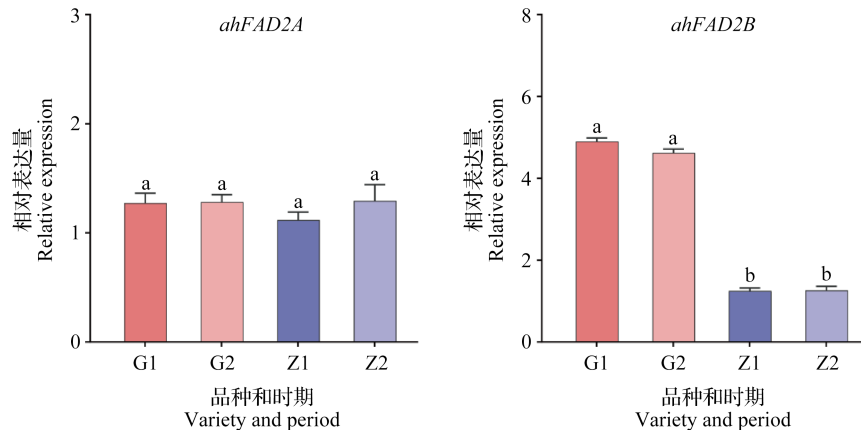


图 2 qRT-PCR 验证结果  
Fig.2 qRT-PCR verification results

## 2.3 *ahFAD2A* 和 *ahFAD2B* 基因序列分析和 KASP 荧光标记建立

以 aF19<sup>a</sup>/R1 和 bF19<sup>b</sup>/R1 为引物扩增亲本的全基因组, 扩增出约 1250 bp 的特异性条带。测序结果表明, 在起始密码子后的第 448 位碱基处, G110 的 *ahFAD2A* 为 A, 紫珍珠的 *ahFAD2A* 为 G; 在起始密码子后的第 442 位碱基处, G110 的 *ahFAD2B* 有 A 插入, 紫珍珠的 *ahFAD2B* 在此位点无 A 插入。G110 与美国高油酸材料 F435 突变位点一致, 基因型为 *aabb*。紫珍珠基因型为 *AABB*。利用 432 位点处的 SNP 设计公共 3' 端下游引物区分 A 和 B 亚

基因组 (Common-A, Common-B), 利用 448/442 位点处 SNP 设计等位基因特异性的上游引物 FAM tail-1/AlleleX<sup>a</sup> 确定 *ahFAD2A* 的突变型 *aabb*、HEX tail-2/AlleleY<sup>a</sup> 确定 *ahFAD2A* 的野生型 *AABB*, FAM tail-1/AlleleX<sup>b</sup> 确定 *ahFAD2B* 的突变型 *aabb*、HEX tail-2/AlleleY<sup>b</sup> 确定 *ahFAD2B* 的野生型 *AABB*, 最终得到 KASP 特异性荧光标记分别为: A004807: GGTTCCTCGACCGC[ G/A ]ACGAAGTGTTCGTC; A004808: AACACAGGTTCCCTC[ A/- ]GACCGCGACGAAGT (图 3)。

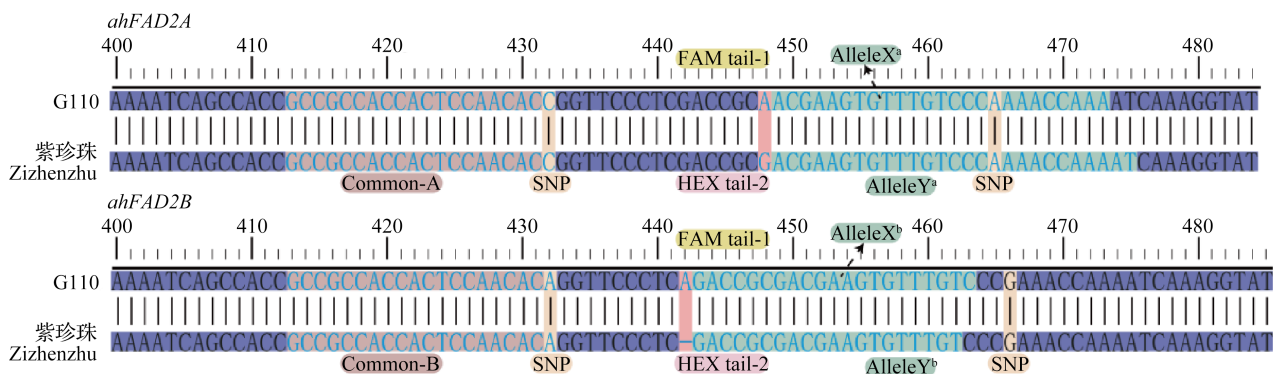
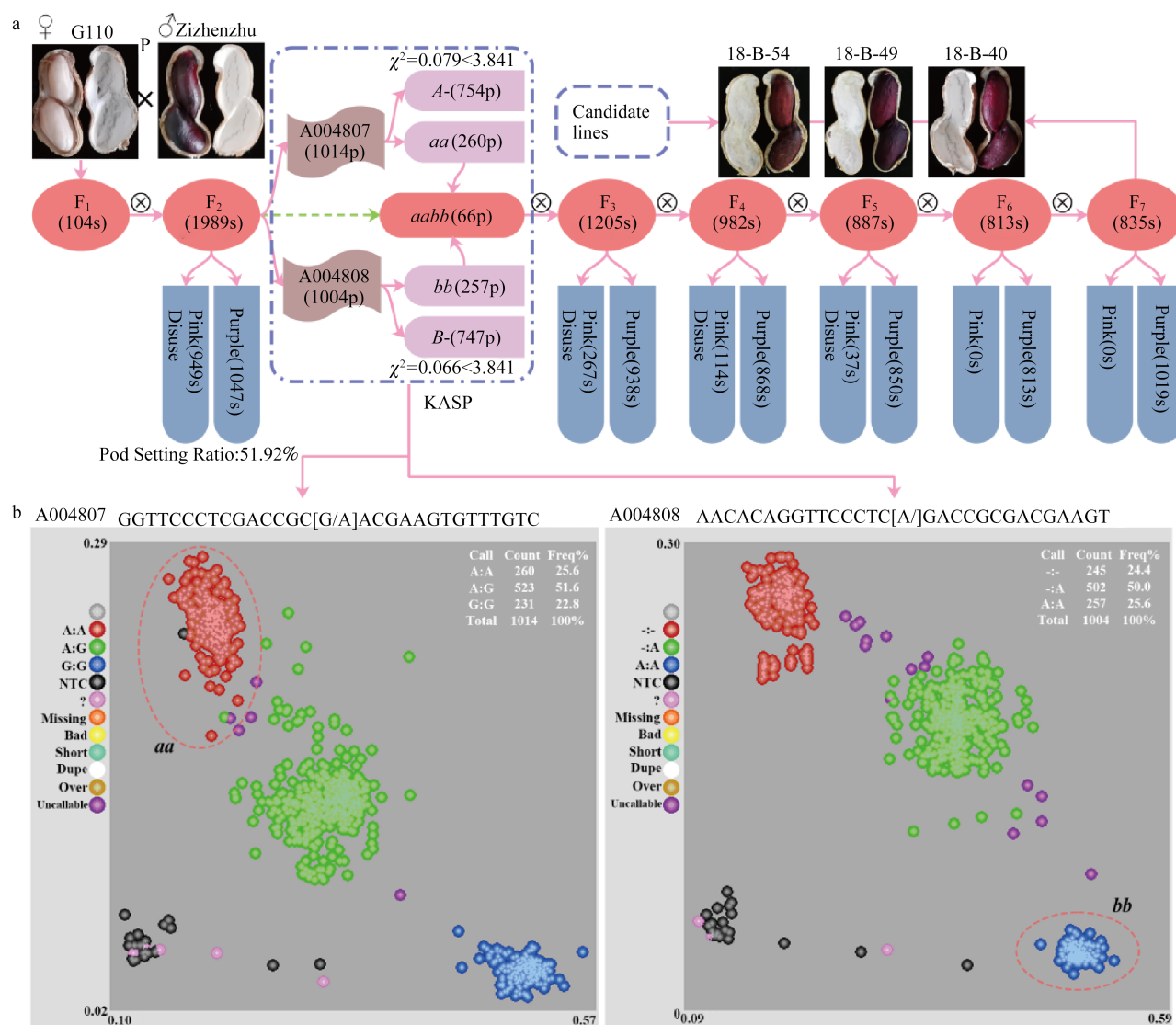


图 3 *ahFAD2A* 和 *ahFAD2B* 部分序列的比对及 KASP 引物设计  
Fig.3 Partial sequence alignment of *ahFAD2A/ahFAD2B* and KASP primer design

## 2.4 KASP 标记辅助育种及品种选育

通过亲本杂交,共获得 104 粒  $F_1$  粉色种皮种子,获得 1989 粒  $F_2$  种子。通过种皮颜色判断,其中紫色种皮 1047 粒,粉色种皮 949 粒,杂交成功率为 51.92%。通过 KASP 荧光标记 A004807 和 A004808 对紫色种皮单株进行检测, *ahFAD2A* 基因分型结果表明,231 株为 *AA*,523 株为 *Aa*,260 株为 *aa*,符合  $3:1$  ( $\chi^2=0.079<3.841$ ); *ahFAD2B* 基因分型结果表明,245 株为 *BB*,502 株为 *Bb*,257 株为 *bb*,

符合  $3:1$  ( $\chi^2=0.066<3.841$ )。高油酸植株 *aabb* 为 66 株。继代繁育结果表明,  $F_3$  共筛选到 1205 粒种子,其中 938 粒为紫色种皮,267 粒为粉色种皮;  $F_4$  共筛选得到 982 粒种子,其中 868 粒紫色种皮,114 粒为粉色种皮;  $F_5$  共筛选得到 887 粒种子,其中 850 粒为紫色种皮,37 粒为粉色种皮;  $F_6$  共筛选得到 813 粒种子,均为紫色种皮;在  $F_7$  筛选出高油酸、紫色种皮新品系 3 个,分别为 18-B-40、18-B-49 和 18-B-54 (图 4)。



a: 数字 + s 表示种子数目, 数字 + p 表示株数, purple 表示紫色种皮后代, pink 表示粉色种皮后代;

b: 符号与基因型的对应关系分别为 A: *A=aa*, A: *G=Aa*, G: *G=AA*, -: *==BB*, -: *A=Bb*, A: *A=bb*, 其中, NTC 为检测标记

a: Number + s represents the number of seeds, number + p represents the number of plants, purple represents the progeny of purple testa, and pink represents the progeny of pink testa;

b: The correspondence between symbols and genotypes is A: *A=aa*, A: *G=Aa*, G: *G=AA*, -: *==BB*, -: *A=Bb*, A: *A=bb*, where NTC indicates mark for detection

图 4 紫色种皮高油酸候选品系 KASP 分型及继代杂交结果

Fig.4 KASP genotypic typing and successive selection of the high-oleic candidate lines with purple testa

2.5 富集花青素高油酸花生新品系表型鉴定

总花青素、油酸和亚油酸含量进行测定结果表明, 品系 18-B-40、18-B-49 和 18-B-54 的总花青素含量的均值分别为 30.20 OD/g、28.77 OD/g 和 29.13 OD/g, 分别是 G110 的 23.91 倍 ( $P=1.17 \times 10^{-7}$ )、22.77 倍 ( $P=4.00 \times 10^{-10}$ ) 和 23.06 倍 ( $P=1.63 \times 10^{-10}$ )。18-B-40、18-B-49 和 18-B-54 的油酸含量

分别为 79.46%、78.77% 和 78.09%, 分别是紫珍珠的 1.77 倍 ( $P=3.61 \times 10^{-9}$ )、0.99 倍 ( $P=1.21 \times 10^{-9}$ ) 和 0.99 倍 ( $P=1.45 \times 10^{-9}$ )。18-B-40、18-B-49 和 18-B-54 的 O/L 比分别为 14.69、11.89 和 10.88, 分别是紫珍珠的 11.58 倍 ( $P=4.01 \times 10^{-15}$ )、9.37 倍 ( $P=7.92 \times 10^{-15}$ ) 和 8.58 倍 ( $P=4.51 \times 10^{-15}$ ) (表 4)。

表 4 总花青素、油酸和亚油酸测定  
Table 4 Determination of total anthocyanin, oleic acid and linoleic acid

品种 Variety	总花青素含量 (OD/g) Total anthocyanin content	油酸含量 (%) Oleic acid content	亚油酸含量 (%) Linoleic acid content	油亚比 O/L
G110	1.26 <sup>b</sup>	75.83 <sup>a</sup>	5.56 <sup>a</sup>	13.65 <sup>a</sup>
紫珍珠 Zizhenzhu	28.34 <sup>a</sup>	44.79 <sup>b</sup>	35.31 <sup>b</sup>	1.27 <sup>b</sup>
18-B-40	30.20 <sup>a</sup>	79.46 <sup>a</sup>	5.41 <sup>a</sup>	14.69 <sup>a</sup>
18-B-49	28.77 <sup>a</sup>	78.77 <sup>a</sup>	6.63 <sup>a</sup>	11.89 <sup>a</sup>
18-B-54	29.13 <sup>a</sup>	78.09 <sup>a</sup>	7.18 <sup>a</sup>	10.88 <sup>a</sup>

3 讨论

我国自 20 世纪 80 年代以来,高油酸花生育种一直为持续的研究热点之一。本研究结果表明, *ahFAD2B* (arahy. 5913QL) 在 G1\_vs\_Z1 和 G2\_vs\_Z2 被准确定位,并在 G110 中显著上调表达,该结果与李珂<sup>[21]</sup>研究一致。*ahFAD2A* 在 4 个比较组中均无显著差异表达,油酸含量随着生长发育而逐渐增加并与亚油酸呈相反趋势<sup>[22]</sup>。本研究结果显示,在 9 号染色体上编码  $\omega$ -6 脂肪酸脱氢酶的 *ahFAD2A* (arahy.42CZAS) 未达到差异水平,该结果与李兰等<sup>[22]</sup>的研究结果一致。Jung 等<sup>[23]</sup>研究表明, *ahFAD2A* 在普通油酸含量和高油酸花生种子中均有表达。Liu 等<sup>[24]</sup>在蛋白组学的研究表明, *ahFAD2A* 翻译的 AhFAD2 蛋白的表达未能达到差异水平。综上所述, *ahFAD2A* 较 *ahFAD2B* 在高油酸花生代谢过程中隶属次要位置。

Pasupuleti 等<sup>[25]</sup>利用正向遗传学分析结果表明,除 *AhFAD2* 外,乙酰辅酶 A 合成酶基因 (*ACSL*, acyl-CoA synthetase) 可影响花生脂质代谢。Mandal 等<sup>[26]</sup>研究表明,质体上的 *ACSL* 可以将游离的脂肪酸活化为 CoA 硫酯,并最终形成 18 碳的硬脂酸和油酸等。本研究 G1\_vs\_G2 中, *ACSL6 X1* (arahy. CC1Y5W) 上调表达, *ACSL2 X1* (arahy. 4N44WU) 下调表达; Z1\_vs\_Z2 中, *ACSL1* (arahy. 3WFA2L) 上调表达; G1\_vs\_Z1 中, *ACSL2 X1* (arahy. 4N44WU) 上调表达, *ACSL6 X1* (arahy.

CC1Y5W) 和 *ACSL1 X2* (arahy. 8AJ57P) 下调表达; G2\_vs\_Z2 中, *ACSL6 X1* (arahy. CC1Y5W) 下调表达。上述结果暗示 *ACSL2 X1* 和 *ACSL1 X2* 可能是高油酸花生前期油酸形成的关键基因, *ACSL1* 可能是普通油酸花生前期油酸形成的关键基因, *ACSL6 X1* 可能是普通油酸花生后期和高油酸花生全时期油酸形成的关键基因,该内容有待进一步研究。

本研究选择两种性状互补的亲本进行杂交,通过种皮颜色表型判断紫色种皮为 F<sub>2</sub> 真杂种后代。该方法极大地提高了杂种选择的准确性。在 Chen 等<sup>[27]</sup>花生种皮颜色的研究中也采用相似的杂交组合,精简了杂交育种进程。分子标记辅助育种是花生遗传改良的重要手段,Chu 等<sup>[28]</sup>选育出了具有双亲优良性状的高油亚比抗线虫 Tifguard 花生品种,促进了分子标记辅助育种与高通量测序平台相结合的育种模式在花生育种中的广泛应用。本研究利用 RNA-Seq 和 KASP 基因分型相结合的方法建立荧光分子标记,将种皮表型与子仁基因型重组,较传统 AS-PCR 辅助选择更加准确、高效。

目前,市场上的普通花生品种正在逐步被高油酸花生品种替换。花生产业品种更新及花生种质资源创新对提高我国人民营养健康水平具有重要意义<sup>[29]</sup>。中国高油酸花生起步较晚,截止到 2020 年底全国共审定了 110 多个高油酸品种,全部为粉色种皮。目前为止,富集花青素的紫色种皮高油酸花



生品种的相关研究鲜有报道<sup>[30]</sup>。本研究获得 18-B-40、18-B-49 和 18-B-54 3 个花生优良种质材料,油酸含量均达到 75% 以上, O/L 均高于 10%, 属于高油酸类型<sup>[31]</sup>, 其花青素含量分别是粉色种皮亲本花青素含量的 23.91 倍、22.77 倍和 23.06 倍, 含量差异极显著, 属于富集花青素类型。3 个品系将两种优良性状重组, 获得了富集花青素高油酸优异资源, 丰富了我国高油酸花生种质资源类型。

## 参考文献

- [1] Huang J Y, Xing M H, Li Y, Cheng F, Gu H H, Yue C P, Zhang Y J. Comparative transcriptome analysis of the skin-specific accumulation of anthocyanins in black peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(4): 1312-1324
- [2] 李佳伟, 马钰聪, 杨鑫雷, 王梅, 崔顺立, 侯名语, 刘立峰, 胡梦蝶, 蒋晓霞, 穆国俊. 花生种皮色素合成相关通路的转录组-代谢组学联合分析. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(1): 240-254  
Li J W, Ma Y C, Yang X L, Wang M, Cui S L, Hu M D, Liu L F, Hu M D, Jiang X X, Mu G J. Transcriptomics-Metabolomics combined analysis highlight the mechanism of testa pigment formation in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(1): 240-254
- [3] 陈静. 高油酸花生遗传育种研究进展. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(2): 190-196  
Chen J. Advances in genetics and breeding of high oleic acid peanut. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(2): 190-196
- [4] Toborek M, Lee Y W, Garrido R, Kaiser S, Hennig B. Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 75(1): 119-125
- [5] 李峰, 纵瑞收, 韩永华, 纵蓓, 蒋继宏, 李宗芸, 李华, 纵榜强, 李洪祥. 我国超高油酸花生品种研究进展与利用探究. 南京: 2014 年中国作物学会学术年会, 2014  
Li F, Zong R S, Han Y H, Zong B, Jiang J H, Li Z Y, Li H, Zong B Q, Li H X. Research progress and utilization of ultra-high oleic peanut varieties in China. Nanjing: China Academic Journal Electronic Publishing House, 2014
- [6] Tsunemi U, Lucie P, Tatsuo E, Chinami M, Tomohiro Y, Mitsuyoshi M, Hidetoshi S, Jan P. Effect of the unsaturation degree on browning reactions of peanut oil and other edible oils with proteins under storage and frying conditions. *International Congress Series*, 2002, 1245: 445-446
- [7] 许燕, 张绍龙. 我国高油酸花生育种研究进展. *广东农业科学*, 2011, 38(1): 43-45  
Xu Y, Zhang S L. Research progress of high-oleic flower growth species in China. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 38(1): 43-45
- [8] 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. *Molecular and General Genetics*, 2000, 263(5): 806-811
- [9] López Y, Nadaf H L, Smith O D, Connell J P, Reddy A S, Fritz A K. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101(7): 1131-1138
- [10] Liu H, Gu J Z, Lu Q, Li H F, Hong Y B, Chen X P, Ren L, Deng L, Liang X Q. Transcriptomic analysis reveals the high-oleic acid feedback regulating the homologous gene expression of stearoyl-ACP desaturase 2 (*SAD2*) in peanuts. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(12): 3091
- [11] Wang C T, Yu S L, Zhang S W, Wang X Z, Tang Y Y, Zhang J C, Chen D X. Novel protocol to identify true hybrids in normal oleate x high oleate crosses in peanut. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2010, 13(5): 18-19
- [12] Noelle A B, Kelly D C C, Ming L W, Roy N P. Development of a real-time PCR genotyping assay to identify high oleic acid peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Molecular Breeding*, 2010, 25(3): 541-548
- [13] Chen Z B, Wang M L, Noelle A B, Roy N P. 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 Molecular Biology Reporter*, 2010, 28(3): 542-548
- [14] Zhao S Z, Li A Q, Li C S, Xia H, Zhao C Z, Zhang Y, Hou L, Wang X J. Development and application of KASP marker for high throughput detection of AhFAD2 mutation in peanut. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2017, 25: 9-12
- [15] Huang W, Khaldun A B, Chen J, Zhang C, Lv H, Yuan L, Wang Y. A R2R3-MYB transcription factor regulates the flavonol biosynthetic pathway in a traditional chinese medicinal plant, *Epimedium sagittatum*. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 21(7): 1089
- [16] 李丽. 高油酸花生种质创制及 *ahFAD2A* 基因型效应分析. 保定: 河北农业大学, 2015  
Li L. Creation of peanut germplasm with high oleic acid and genotype effect analysis of *ahFAD2A*. Baoding: Hebei Agricultural University, 2015
- [17] Kingston R E, Chomczynski P, Sacchi N. Guanidine methods for total RNA preparation. *Current Issues In Molecular Biology*, 2001, DOI: 10.1002/0471142727.mb0402s36
- [18] Kim D, Langmead B, Salzberg S L. HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature Methods*, 2015, 12(4): 357-360
- [19] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550
- [20] Patel M, Jung S, Moore K, Powell G, Ainsworth C, Abbott A. High-oleic peanut mutants result from a MITE insertion into the *FAD2* gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(8): 1492-1502
- [21] 李柯. 花生高油酸性状遗传特征与表达调控网络研究. 郑州: 河南农业大学, 2020  
Li K. Study on the genetic characteristics and expression regulatory network of high oil and acidity in peanut. Zhangzhou: Henan Agricultural University, 2020
- [22] 李兰, 彭振英, 陈高, 王莹莹, 张斌, 毕玉平. 花生种子发育过程中脂肪酸积累规律的研究. *华北农学报*, 2012, 27(1):

- 173-177  
Li L, Peng Z Y, Chen G, Wang Y Y, Zhang B, Bi Y P. Study on the accumulation of fatty acids in the process of peanut seed development. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27 ( 1 ): 173-177
- [ 23 ] Jung S, Swift D, Sengoku E, Patel M, Teulé 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. *Molecular and General Genetics*, 2000, 263 ( 5 ): 796-805
- [ 24 ] Liu H, Li H, Gu J, Deng L, Ren L, Hong Y, Lu Q, Chen X, Liang X. Identification of the candidate proteins related to oleic acid accumulation during peanut (*Arachis hypogaea* L. ) seed development through comparative proteome analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 ( 4 ): 1235
- [ 25 ] Pasupuleti J, Manish K P, Yaduru S, Murali T V, Manda S, Pawan K, Surendra S M, Patne N, Manish K V, Gyan P M, Radhakrishnan T, Manivannan N, Dobariya K L, Vasanthi R P, Rajeev K V. Molecular breeding for introgression of fatty acid desaturase mutant alleles (*ahFAD2A* and *ahFAD2B*) enhances oil quality in high and low oil containing peanut genotypes. *Plant Science*, 2016, 242: 203-213
- [ 26 ] Mandal M N, Santha I M, Lodha M L, Mehta S L. Cloning of acyl-acyl carrier protein (*ACP*) thioesterase gene from *Brassica juncea*. *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28 ( 6 ): 967-969
- [ 27 ] Chen H, Chen X, Xu R, Liu W, Liu N, Huang L, Luo H, Huai D, Lan X, Zhang Y, Hu R, Chen J, Tang Z, Lin G, Jiang H. Fine-mapping and gene candidate analysis for *AhRt1*, a major dominant locus responsible for testa color in cultivated peanut. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134 ( 11 ): 3721-3730
- [ 28 ] Chu Y, Wu C L, Holbrook C C, Tillman B L, Person G, Ozias-Akins P. Marker-assisted selection to pyramid nematode resistance and the high oleic trait in peanut. *The Plant Genome*, 2011, 4 ( 2 ): 110-117
- [ 29 ] 徐永菊, 叶霄, 侯睿, 李爽, 张小军, 岳福良, 张相琼, 刘行, 李文均, 张小红. 高油酸花生四川引种试验. *农学学报*, 2022, 12 ( 1 ): 6-11  
Xu Y J, Ye X, Hou R, Li S, Zhang X J, Yue F L, Zhang X Q, Liu H, Li W J, Zhang X H. High-oleic peanut varieties in sichuan introduction trial. *Journal of Agriculture*, 2022, 12 ( 1 ): 6-11
- [ 30 ] 刘芳, 张哲, 王积军. 中国高油酸花生种植及应用技术研究进展. *中国油料作物学报*, 2020, 42 ( 6 ): 956-959  
Liu F, Zhang Z, Wang J J. Progress on production and technology development of high-oleic acid peanut in China. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2020, 42 ( 6 ): 956-959
- [ 31 ] Yaduru S, Manish K V, Manish K P, Pasupuleti J, Murali T V, Surendra S M, Shyam N N, Baozhu G, Rajeev K V. Molecular mapping of oil content and fatty acids using dense genetic maps in groundnut (*Arachis hypogaea* L. ). *Frontiers in Plant Science*, 2017, 22 ( 8 ): 1-14