

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 246 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极显著负相关, 尤其是亚麻酸和亚油酸之间负相关性最高; (2) 对 5 种脂肪酸表型数据进行统计分析, 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 (CH-89) 和 254 号 (CI637PI91037) 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

¹Biotechnology Institute, Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031; ²School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010070; ³Special Crops Institute, Inner Mongolia Academy of Agricultural & Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031; ⁴College 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 246 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; (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 No. 8 (CH-89) and NO. 254 (CI637PI91037) simultaneously showing high linoleic acid and low

收稿日期: 2022-07-27 修回日期: 2022-08-16 网络出版日期: 2022-09-09

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220727002>

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

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

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

Foundation projects: Natural Fund Project of Inner Mongolia Autonomous Region (2019ZD04); National Natural Science Foundation of China (31760400); Inner Mongolia Agricultural and Animal Husbandry Innovation Fund Project (2019CXJJN10)

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 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.

Key words: 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、抗糖尿病及脑部、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常规育种技术为主, 育种周期长, 效率低。而采用分子标记辅助选择技术对目标基因进行鉴定, 更为准确、简便, 而且不受环境影响, 效率较高。单核苷酸多态性(SNP, single nucleotide polymorphism), 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^[8], 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^[9]。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Mb 3.3个KASP标记。所开发的KASP标记将为温带粳稻的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(*Triticum aestivum* L.)基因组数据集的在线数据库, 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了1114个SNP标记, 并且在CerealsDB数据库中报道了在23个小麦品种中的KASP基因分型结果。利用这些被验证了的SNP标记, 在Avalon×Cadenza的双单倍体作图群体中绘制生成了连锁图。Rasheed等^[14]开发并验证了152对与小麦适应性、产量、胁迫等经济性性状相关的KASP标记, 结果显示这些标记与栽培品种、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, 对209份小麦种质资源进行基因背景分析, 阐明了7种优异单倍型组合对籽粒表型性状的综合效应, 为分子标记辅助育种提供支撑。纯度是玉米种子质量的重要指标之一, 杂交种的纯度高是低是影响田间产量、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%的供试样品纯度。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, 及确定种质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]结

合全基因组关联研究、QTL-seq 和转录组测序在棉花 VW 抗性 120 个 SNP 中, 确定了 8 个黄萎病抗性候选基因, 10 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 Fr1 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, 加速了番茄抗病性基因的鉴定^[19]。胞囊线虫 (SCN, soybean cyst nematode) 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农艺性状优异的材料, 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 分别为 4 个和 5 个, 共计 63 个 SNP 位点。经过 GWAS 分析得到亚麻酸、亚油酸相关 SNP 位点 9 个, 共计 72 个位点^[28-29]。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。本研究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 246 份, 其中国内材料 126 份, 国外材料 120 份 (表 1)。将供试种质资源材料连续 2 年 (2019-2020 年) 种植于内蒙古呼和浩特市 (40°46'N, 111°39'E)、乌兰察布市察哈尔右翼前旗 (41°13'N, 113°10'E)、锡林郭勒盟太仆寺旗 (42°21'N, 115°19'E) 和新疆伊犁州 (43°55'N, 81°05'E) 4 个不同地区。每份材料种植 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, 成熟后收集种子, 提取脂肪酸成分。

表 1 参试材料名称和来源

Table 1 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
1	坝亚 15 号	中国河北	26	H919	中国内蒙古	52	东乡白	中国甘肃	77	雁农 1 号	中国山西
2	宁亚 21	中国宁夏	27	H920	中国内蒙古	53	Drane	法国	78	PALE	美国
3	轮选 2 号	中国内蒙古	28	NO 841	乌拉圭	54	坝亚 1 号	中国河北	79	OTTAWA	美国
4	晋亚 2 号	中国山西	29	H922	中国内蒙古	55	静宁选 2 号	中国宁夏	80	宁亚 17 号	中国宁夏
5	定西 17	中国甘肃	30	伊亚 4 号	中国新疆	56	天水线	中国甘肃	81	KENY C.1.709	波兰
6	天水市老胡麻	中国甘肃	31	内亚六号	中国内蒙古	57	CALAR	奥地利	82	临泽白	中国甘肃
7	黄胡麻	加拿大	32	PI177451	土耳其	58	张亚 1 号	中国河北	83	天亚 5 号	中国甘肃
8	CH-89	中国内蒙古	33	BLANC	加拿大	59	CHAURRAOLA	匈牙利	84	JWS	非洲
9	线胡麻	中国甘肃	34	PI1181058	土耳其	60	MOROCCD	摩洛哥	85	KOREAN	阿富汗
10	同亚 9 号	中国山西	35	山丹白	中国甘肃	61	陇杂 1 号	中国甘肃	86	RTEN TINE	美国
11	BGOLDXRED WING44X3	美国	36	礼县低角	中国甘肃	62	清亚 1 号	中国甘肃	87	LINA GROSSES	法国
12	坝亚 7 号	中国河北	37	坝 810	中国河北	63	CRISTA FIBER	加拿大	88	皋兰白	中国甘肃
13	同亚 8 号	中国山西	38	尧甸白胡麻	中国甘肃	64	东乡红 2 号	中国甘肃	89	民勤胡麻	中国甘肃
14	TY58	巴基斯坦	39	天亚 6 号	中国甘肃	65	VIRING	法国	90	宁亚 19 号	中国宁夏
15	西礼白	中国甘肃	40	坝亚 11 号	中国河北	66	定亚 9 号	中国甘肃	91	内亚油一号	中国内蒙古

表1(续)

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
16	TY21	巴基斯坦	41	陇亚8号	中国甘肃	67	沙县	中国山西	92	陇亚4号	中国甘肃
17	坝亚13号	中国河北	42	15F-565(808)	加拿大	68	内蒙红	中国内蒙古	93	DEHISLINTL CREPIIN	俄罗斯
18	同亚11号	中国山西	43	89-21	西德	69	天水渭南	中国甘肃	94	AC EMERSON	加拿大
19	灵台五星	中国甘肃	44	宁亚14	中国宁夏	70	礼县	中国甘肃	95	崇礼小	中国河北
20	伊亚3	中国新疆	45	MIMI B15	美国	71	天亚1号	中国甘肃	96	晋亚4号	中国山西
21	张亚2	中国河北	47	宁亚6号	中国宁夏	72	MACBETH	加拿大	97	VIMY	加拿大
22	晋亚8	中国山西	48	尚义洋	中国河北	73	雁杂10号	中国山西	98	陇亚10号	中国甘肃
23	康东1	中国甘肃	49	宁亚15号	中国宁夏	74	定西红	中国甘肃	99	轮选3号	中国内蒙古
24	定亚15	中国甘肃	50	宁亚2号	中国宁夏	75	12号	中国黑龙江	100	晋亚7号	中国山西
25	PALE(BLVE)	美国	51	库车	中国新疆	76	临汾白胡麻	中国甘肃	101	坝选3号	中国河北
102	莎车早熟红	中国新疆	128	陇亚11号	中国甘肃	155	CFRESBR95	荷兰	190	I191	伊朗
103	平罗红	中国宁夏	129	15-566	加拿大	156	CFRESBR91	荷兰	191	I184	伊朗
104	NO 547	摩洛哥	130	轮选1号	中国内蒙古	157	CFRESBR105	荷兰	192	I157	伊朗
105	定亚5号	中国甘肃	131	陇亚6号	中国甘肃	158	CFRESBR96	荷兰	193	I185	伊朗
106	晋亚1号	中国山西	132	LILA	波兰	159	CFRESBR107	荷兰	194	I187	伊朗
107	晋亚11号	中国山西	133	SUMPERSK YZDR	波兰	160	CFRESBR94	荷兰	195	I159	伊朗
108	莎车亚麻	中国新疆	134	天亚9号	中国甘肃	161	CFRESBR111	荷兰	196	ARGENTINA589	阿根廷
109	集宁2号	中国内蒙古	135	坝亚6号	中国河北	163	CFRESBR99	荷兰	197	ARGENTINA592	阿根廷
110	粒高秆	中国内蒙古	136	定亚18号	中国甘肃	165	CFRESBR1077	荷兰	198	ARGENTINA597	阿根廷
111	坝68-1-542	中国河北	137	庆阳老	中国甘肃	166	CFRESBR1076	荷兰	199	ARGENTINA594	阿根廷
112	雁北7532-4	中国山西	138	匈牙利3号	匈牙利	168	CFRESBR1091	荷兰	200	ARGENTINA591	阿根廷
113	陇亚1J号	中国甘肃	139	新18号	中国新疆	169	CFRESBR21101	荷兰	201	ARGENTINA595	阿根廷
114	陇亚13J号	中国甘肃	140	15-510	俄罗斯	171	CFRESBR1089	荷兰	202	ARGENTINA600	阿根廷
116	华德小胡麻	中国内蒙古	141	宁亚11号	中国宁夏	172	CFRESBR1095	荷兰	205	PAKISTAN160	巴基斯坦
117	喀拉沁	中国内蒙古	142	宁亚7号	中国宁夏	173	Hungry 140	匈牙利	206	PAKISTAN169	巴基斯坦
118	乌拉特3号	中国内蒙古	143	庆阳	中国甘肃	174	Hungry 138	匈牙利	209	PAKISTAN181	巴基斯坦
119	集宁1号	中国内蒙古	144	NORTHDK 510	美国	175	Hungry 145	匈牙利	210	PAKISTAN170	巴基斯坦
120	伊尖44-53	中国新疆	146	NORTHDK 507	美国	176	Hungry 137	匈牙利	212	PAKISTAN165	巴基斯坦
121	克山1号	中国内蒙古	147	NORTHDK 514	美国	177	Hungry 146	匈牙利	213	FRANCE313	法国
122	May-11	加拿大	149	NORTHDK 518	美国	178	Hungry 141	匈牙利	215	FRANCE316	法国

表1(续)

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
123	晋亚5号	中国山西	236	乌19号	中国内蒙古	248	安西红胡麻	中国甘肃	261	CDC ARRAS	加拿大
124	化德小胡麻	中国内蒙古	150	NORTHDK 505	美国	249	灵台五星	中国甘肃	262	NOR MAN	加拿大
125	2号	罗马尼亚	151	NORTHDK 509	美国	179	Hungry 147	匈牙利	263	CDC BETHIMC	加拿大
126	多伦大胡麻	中国内蒙古	152	CFRESBR 108	荷兰	180	Hungry 150	匈牙利	216	FRANCE314	法国
127	内亚7号	中国内蒙古	153	CFRESBR115	荷兰	184	Hungry 240	匈牙利	218	FRANCE319	法国
223	MONTN19	美国	154	CFRESBR 106	荷兰	185	Hungry 248	匈牙利	220	FRANCE295	法国
224	MONTN16	美国	237	临河17号	中国内蒙古	186	Hungry 247	匈牙利	221	FRANCE291	法国
225	RUSSI6	俄罗斯	238	乌25号	中国内蒙古	250	AC Lightning	加拿大	222	MONTN7	美国
226	RuSSI5	俄罗斯	239	乌402号	中国内蒙古	251	AC EMERSON	加拿大	264	静宁红胡麻	中国宁夏
227	INDI69	印度	240	大粒6号	中国河北	253	AC Linora	加拿大	265	10446146	阿根廷
228	INDI68	印度	241	乌17号	中国内蒙古	254	CI637PI91037	俄罗斯	266	晋亚6号	中国山西
229	EGYPT66	埃及	242	乌13号	中国内蒙古	255	AC MCBETH	加拿大	267	G7	中国新疆
230	EGYPT65	埃及	243	乌44号	中国内蒙古	256	AC HNLEY	加拿大	268	临夏白	中国甘肃
232	EGYPT62	埃及	244	乌53号	中国内蒙古	257	AC MCDUFF	加拿大	269	R43	中国内蒙古
233	MINNESOT8	美国	245	乌33号	中国内蒙古	258	CI2824	俄罗斯	270	坝亚12号	中国河北
234	MINNESOT9	美国	246	乌41号	中国内蒙古	259	CI2786	新西兰			
235	MINNESOT61	美国	247	乌19号	中国内蒙古	260	CI1499PI194000	美国			

1.2 试验方法

1.2.1 胡麻种子脂肪酸成分提取及检测 采用超声波辅助正己烷浸出法提取胡麻种子脂肪酸,用气相色谱技术检测棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸,按面积归一化法以峰面积计算5种脂肪酸成分相对含量。每个环境2个重复的脂肪酸检测数据求计算平均值,作为一个环境的表型数据。最后,用SPSS 22软件,对每个资源材料8个环境的数据进行统计分析,包括最大值、最小值、平均值、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,德国)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,美国)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分析得到了72个亚麻酸和亚油酸相关SNP位点^[28-29]。获取相关SNP位点前后100 bp的序列,进行KASP引物的设计^[30]。58个SNP位点均成功设计出引物,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'-GAAGGTGACCAAGTTCATGCT-3')和HEX(5'-GAAGGTCGGAGTCAACGGATT-3')荧光序列标签。将引物干粉稀释至100 μmol/μL,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。

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 μL:2 μL DNA模板(30 ng/μL),5 μL KASP master mix(LGC, KBS 1016-016),0.14 μL引物混合物,2.86 μL ddH₂O。使用LightCycler480 Instrument II(Roche,瑞士)进行PCR扩增。PCR循

环分3步:94℃预变性15 min,循环1次;94℃变性20 s,61~55℃复性/延伸60 s(-0.6℃/循环),循环10次;94℃变性20 s,55℃复性/延伸60 s,循环26次^[30]。

利用 LightCycler480 software1.5.1 (Roche, 瑞

士)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。

表2 亚麻酸和亚油酸相关位点KASP引物序列

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

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等位位点 FAM allele	HEX等位位点 HEX allele	方向 Direction	备注 Remarks
g1_22713315	CTTGTTTACTTTTT GG	CTTGTTTACTTTTT GC	TGAATTTAGTGGATG CT	G	C	F	亚麻酸相 关位点
g2_5264478	AGCTAGTAGTGGTG GATGT	AGCTAGTAGTGGTGG ATGC	GAAGGCCAGAGAGAG TCGTCGG	T	C	F	KASP 引物
g2_5787845	GTATGGAGGGTTTT CTGGC	GTATGGAGGGTTTTCT GGA	GCCACCATTCCCCATC GCT	C	A	F	
g3_12036686	AAATTACCATGCTTC AGGTTTGCAATTA	AAATTACCATGCTTCA GGTTTGCAATTG	TGCAACAGAATGGATA AGATGC	A	G	F	
g3_12036697	AACCACAACCCTAC TACAAA	AACCACAACCCTACT ACAAG	TAGGATACTGTGTTGG AGCTTGAATTCAG	T	C	R	
g3_12037614	GTCCTATTCGACTAT ATCAGGC	TCCTATTCGACTATAT CAGGT	TCCAAGGCCCGAGTCA TGCA	C	T	F	
g3_807938	CTTCTTCTTCCTCAT TGTGATCC	CTTCTTCTTCCTCATT GTGATCA	TCATGGTAATCACGATT ATAATGACGCGATT	C	A	F	
g3_807940	CTTCTTCTTCCTCAT TGTGATCCTC	CTTCTTCTTCCTCATT GTGATCCTT	GTAATCACGATTATAAT GACGCGATTAAGGGT	C	T	F	
g6_6229142	AATGTAGATTTAGTT CCTAAAATTG	AATGTAGATTTAGTTC CTAAAATT	GATCCTATAAGTTTATT TAAGCCTAACGTC	G	T	F	
g9_17724430	AACCTAGTGAAGTT TCTAC	AACCTAGTGAAGTTT CTAT	TGTTACAGAATCGATT TGGGACATC	C	T	F	
g9_18455369	AAAAGATGTAGTTG CACAATT	AAAAGATGTAGTTGC ACAATC	CACACACAATTTATAC TATTCAT	A	G	R	
g9_18627795	CGATAATACATTTAT TCC	CGATAATACATTTATT CT	TCATCTATCCTGAGATA TTGTGA	C	T	F	
g9_18910454	ACTGATGCTAAACT ACATGATCAAAA	ACTGATGCTAAACTA CATGATCAAAG	AGTGTGAGTACTGTT CTGGT	A	G	F	
g9_18953067	TCTTGAATTTTGAGT TTACTTC	TCTTGAATTTTGAGTT TACTTA	CTATATATATAACGGGG AATCTA	C	A	F	
g9_18954449	CTTTAATGTTAAAAA TTATATTC	CTTTAATGTTAAAAAT TATATTA	TAAATCATAGGCGTAC TAT	C	A	F	
g9_18956680	GTTTTAAGTTTGCC AATAGAAGATT	GTTTTAAGTTTGCCA ATAGAAGATC	GACATGGTTGTTTCGAA AGGTAATG	A	G	R	
g9_18961021	CTTTCTTTCTCAAAT CCTACAGCACAA	CTTTCTTTCTCAAATC CTACAGCACAC	GAAATGGTGTGATCA AACGAC	T	G	R	
g9_19101453	TAAGGCCTAAATTC ATAATCAAG	TAAGGCCTAAATTCAT AATCAAA	TTGTGTTTAAATCAATCT GATGTG	G	A	F	
g10_19294584	AAGTACTGGAAAAGT TTTTTC	GGAAGTACTGGAAAAG TTTTTA	TTGATGACAGGATCTG TGCTGGTTTGAATAT	C	A	F	
g10_19295213	TTGATATGGATTAA GGACC	TTGATATGGATTAAAG GACT	CTGGTATTCAGATTTCG GCTCATT	G	A	R	
g10_19298475	TGATTATAGTGGTGT CATATG	TGATTATAGTGGTGT ATATA	GAGCTAAATGGTACAG ATGTCATGGA	G	A	F	
g10_19298563	ACATTA AAAAGTCC AA	GACATTA AAAAGTCC AG	TGACATCTGTACCATT AGCTC	T	C	R	

表2 (续)

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等位位点 FAM allele	HEX等位位点 HEX allele	方向 Direction	备注 Remarks
g10_19298605	TTGTTCTACTATCCT GCAAC	TTGTTCTACTATCCTG CAAT	GAAGGTCGGAGTCAA CGGATTCATTC	C	T	F	
g10_19305239	ATTTTCTCTAAGGTC TCAAAGTT	ATTTTCTCTAAGGTCT CAAAGTC	ACTAGAGTCGATTTTC TCTAAGGTCTCAAAGT	A	G	R	
g2-7680441	CTGAGCGACCTCCA GGGGTCTTCACC	CTGAGCGACCTCCAG GGGTTCTTCACT	GCGAAGAAGCAGCTC GATTTTCGAC	G	A	R	亚油酸 相关位点
g6_14807619	ATAATTAAACTCTGA ATGTGCAGC	ATAATTAAACTCTGAA TGTGCAGT	GGAAGAGAGAGAAAT AAGATAAGTAGG	G	A	R	KASP 引物
g6_14817525	CTATCGGTACTAAA ATCAGTAAC	CTATCGGTACTAAAAT CAGTAAT	TAGTGGTGGYTGGGAC TAGGTAGCTATG	C	T	F	
g6_14817586	CATGGTTTCGATAGT TCTATGGTTCG	CATGGTTTCGATAGTT CTATGGTTCA	ATCATAGCTACCTAGTC CCA	C	T	R	
g6_14817602	TCGCTACTCACATG GTTTCG	GTCGCTACTCACATG GTTTCT	TCAGTAACATCATAGC TACCTAGTCCCAAC	C	A	R	
g6_14817782	TCCACTATATATATG GTTAGGAA	TCCACTATATATATGG TTAGGAT	TCGCATACACACATCA AGCTAAGTCTAAG	T	A	R	
g6_14817808	CTTCCTAACCATATA TATAGTGATCAC	CTTCCTAACCATATAT ATAGTGGATCAT	GATAGTCCTTGTGGTG TTCTTGCAGT	C	T	F	
g6_14817812	AGCTCATGATTGATT GTGCAAGTGG	AGCTCATGATTGATTG TGCAGTGT	CAACACATATCGCATA CACACATC	C	A	R	
g6-19208888	ACGGGTTACTGTTG TTCT	GCTAAAGGGAGTTCA TAAGA	TCTTATGAACTCCCTTT AGC	C	T	F	
g6_25701813	TCATAATATCAITTTAT TAAT	TCATAATATCAITTTATT AAC	CAATTGCACATCATATC ACTAACT	T	C	F	
g9_22580423	ATGTACATTTGTAAT TTTTTT	ATGTACATTTGTAATT TTTTA	CCGGATGTTTAAATTTGT TTTCATTCCC	T	A	F	
g9_22867151	CTTCATCTAATTCCT TAG	CTTCATCTAATTCCTT AA	CGTCTTGATTGTTGCTT GCGTCTAG	C	T	R	
g9_22870988	AAGTGAATGCATA TATAGGTGGA	AAGTGAATGCATAT ATAGGTGGT	ATTTCGTCATCATCAG ACC	A	T	F	
g9_18053455	AGGGATTTCAGAGTC GTCCTGGGT	AGGGATTTCAGAGTCG TCCTGGGA	CTTACTATCCAAGAAG CAAGCTG	T	A	F	
g9_18336172	ATCATAATCAAAA ATTCCGGG	ATCATAATCAAAAAT TCGGA	CATGCGATATAACATTC ATTGG	G	A	F	
g9-14900088	AGTGAAAGGACTGG AATAC	AGTGAAAGGACTGG AATAA	AGTTGAGGGTAGTTGG TG	C	A	F	
g10_19305845	AATTCCTTTGTGAA AA	AATTCCTTTGTGAA AC	CGTACCGCCTTATG CACATTCCACATCCTC CAAAATGC	A	C	F	
g10_20397204	TTTACTACTATTACA TAACAATGATTAA	TTTACTACTATTACAT AACAATGATTAT	CAATGGAGTTTTTGAC AGTTGCAGAGGC	A	T	F	
g11_15965129	GGCTTTTCAGTCGT TCTTTTTC	GCTTTTCAGTCGTTCT TTTTG	GGGACTATGTAATGTT TATGGGAG	C	G	F	
g11_18501275	ACGGCCTCATTTGA GTTACTAGGTA	TCATTTGAGTTACTAG GTG	TGGTATTGGAATTGAG AGTTTGG	A	G	F	
g11_18642313	ACAACCATATCCCC ACA	ACAACCATATCCCCA CT	ATGCACACTAGTGAGC CGCTCGCAG	T	A	R	
g12_12041745	CAAATACAAAAATA GAAATTTCA	CAAATACAAAAATAG AAATTCT	CTGATTCATCAAGCTAT AAAAAATAAGA	A	T	F	
g13_23649585	AGCAACTCTCTCAA TTAGAAT	AGCAACTCTCTCAAT TAGAAC	CACGTGGAGAAGAAA GCTC	T	C	F	
g13_23667211	GTCCCATCATTCCTC TGTTTTT	GTCCCATCATTCCTCT GTTTTC	TAAGGCTCGTAGAAGT CAACTC	A	G	R	

表2(续)

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等位位点 FAM allele	HEX等位位点 HEX allele	方向 Direction	备注 Remarks
g13_25323287	CATTATCAAAACCAT CCCTAT	CATTATCAAAACCATC CCTAC	GCCAGAGTCAATGTTT ATCTCAGTA	A	G	R	
g13_25336617	GTATAGTCCATCTCC TCTTA	GTATAGTCCATCTCCT CTTG	GGAAGTATGCCAAGGA TTAG	A	G	F	
g13_25343930	GTGTTTATGGTTCTG GACTTT	GTGTTTATGGTTCTGG ACTTA	GCACATTTATCATTTCAT TGCAATAC	A	T	R	
g13_25345695	AATAGTCCAAACAC TAGCTTAT	AATAGTCCAAACACT AGCTTAG	GATTTAGTATCCATCCT AGG	T	G	F	
g13_25345705	CACTAGCTTATCATA ACTACA	CACTAGCTTATCATAA CTACG	TGATTTAGTATCCATCC TAGGT	A	G	F	
g13_29116425	ATCCTGTCCCCTTTC TTTATT	ATCCTGTCCCCTTTTCT TTATG	CCATATCGTGGTGTAT CGTG	T	G	F	
g15_2018584	AACAAAAAATCTA AAATATTAC	AACAAAAAATCTAA AATATTAT	TAGGTTGTGACGCAGA AATTATA	G	A	R	
g15_2018606	ATGTTTCTCTCTAGT TCGCATTATTGA	ATGTTTCTCTCTAGTT CGCATTATTGG	TGACGATATGCCTATAA GTAGTAA	T	C	R	
g15_2050725	CTTCCCAACATTAGT GACC	CTTCCCAACATTAGT GACF	CGTCTTTCGTGGTACA GTTG	C	T	F	
g15-22369840	CATTGTTGGGTGAA GAACCCCTGG	CATTGTTGGGTGAAG AACCCCTGA	TACCAGAAAGATCATG TGAAATTACC	G	A	F	

方向F表示FAM引物或HEX引物为正向引物;方向R表示FAM引物或HEX引物为反向引物

Deriction F means FAM primers or HEX primers are forward primers; Deriction R means FAM primers or HEX primers are reverse primers

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3种颜色在高低亚麻酸表型、高低亚油酸表型中的分布情况。

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3个亚麻酸和4个亚油酸相关SNP位点进行高通量测序。获取这些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(表3)。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4)。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。

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中,每个种质资源材料的亚麻酸、亚油酸含量有所不同,其平均值、标准差和变异系数等统计分析结果详见 <http://>

doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220727002,附表1。在246份资源材料中,8号(CH-89)和254号(CI637PI91037)材料的亚油酸含量高于亚麻酸含量,为高亚油酸低亚麻酸材料,亚油酸含量平均值分别在51.2%和61.5%,变异系数分别为12.7%和6.5%。其余的244份材料,其亚麻酸含量均比亚油酸含量高,亚麻酸平均含量在46.4%~62.8%之间,变异系数为3.6%~38.8%之间。对于亚麻酸和亚油酸含量而言,有些资源材料受环境条件影响较大,而有些资源材料受环境影响较小,后者可作为KASP验证研究的试验材料。

5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(CH-89)和254号(CI637PI91037)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。

在 49 份高亚麻酸材料和 36 份高亚油酸材料中 10 份材料为重合, 即高亚麻酸、低亚油酸类型(图 1)。

表 3 用于 SNP 位点高通量测序的引物序列

Table 3 Primers used in high throughput sequencing of SNP sites

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence		引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	
	上游引物 Forwardr primer	下游引物 Reverse primer		上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
g6-6229142	<u>ACACAGAATCTCTAA</u> ACGAAAGCGAG	<u>GAGCTGAAGAGTTGAAGG</u> AGATAGCAA	g9-14900088	<u>AGATGTACAGTGAAA</u> GGACTGGAATAC	<u>CCGACAACAGTTGAG</u> GGTAGTTGGTG
g6-19208888	<u>CGACACACACGGGTT</u> ACTGTTGTCT	<u>GCTCGGTATCTTATGAACT</u> CCCTTACG	g10-19305239	<u>TCTTCACAGGGCGTGA</u> TTTGATTAGA	<u>TGGAACAACCAAGAC</u> AGTAACAGGAAT
g9-18961021	<u>ACACGACCTCACGAT</u> GCTGACTCTT	<u>ACAGATTCCAACCTGGAGC</u> AGAAGAAT			

下划线部分为标签序列, 下同

Underlined were tag sequences, the same as below

表 4 用于 *FAD3a* 基因和 *FAD3b* 基因的分段 PCR 扩增的引物序列

Table 4 Primers for PCR amplification of *FAD3a* gene and *FAD3b* gene fragments

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence		备注 Remarks	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence		备注 Remarks
	上游引物 Upper primer	下游引物 Down primer			上游引物 Upper primer	下游引物 Down primer	
fad3a_286	<u>ACAGCAGAGCACGA</u> CCAAACTATGAGC	<u>ATCCTGTAGAACAAA</u> GACTGCCAGAAC	用于 <i>FAD3a</i>	fad3b_185	<u>CCGAAGTAGCAGGA</u> CCAAACTATGAGC	<u>GGAGAACATGAGCA</u> ACCCAGTAAAGAGG	用于 <i>FAD3b</i>
fad3a_474	<u>GCCACATATCAGTA</u> CGTCTGAGAGA	<u>CACCTTCGAGAGGATT</u> GAGGAATGGAGT	基因的 分段 PCR 扩增的 引物	fad3b_445	<u>GTGTTCTAGGCTCT</u> TTACTGGTTGCT	<u>TGGCTTCAGTCTTG</u> TGGCTAATTCT	基因的 分段 PCR 扩增的 引物
fad3a_714	<u>ACTATGCAGCTTCT</u> AGACAGTTGGTTGT	<u>AGAGTCAACATCTTT</u> CTCCACATTGCCG		fad3b_723	<u>TCCGTCTATTCAGCT</u> GAAGAATCCA	<u>TGAAGAGATGGGAG</u> AGGAATGGTGAAC	
fad3a_888	<u>AGATCGCACACAAGA</u> CCCATCACCAGA	<u>CGCATAACGAGTCA</u> ACCAAACCAGGT		fad3b_971	<u>CCTAATCCACCAGC</u> ACTAAGTTCATGA	<u>CCATCCTCCTAGATA</u> TTTCTGTTGAT	
fad3a_1160	<u>CAATGGAAAAGTAGG</u> AATAATGACA	<u>CGAACTTAGAATTAC</u> CCGATTCAGT		fad3b_1201	<u>TAGGATGAGATTACG</u> GAATATGTATCA	<u>ATTGGCTCGAATATC</u> CATCGGGGTAAGA	
fad3a_1324	<u>AGCAGGAATCGGAAT</u> ATGTATCAACAGA	<u>CAACCACAAAATGC</u> ATGACAGTAGTGT		fad3b_1441	<u>GAGTTAGCATCTAG</u> AATGGGTCCA	<u>GAACAGGCGACGC</u> GGAAAACGACACCT	
fad3a_1574	<u>CTGGCATAAGTATCTAG</u> TGGAATTATTGGA	<u>CCGTGAGAACCGTT</u> GACCTGTATATTATCA		fad3b_1694	<u>CGGATTGCGTCACTA</u> GTTAATGTACA	<u>AGGCTAATTGAGG</u> ACCGGAGCGAAG	
fad3a_1796	<u>CAAGGAGCGAACTG</u> GACACATATGAC	<u>GAATCTGATGGTCTGA</u> GAATTAGGCGGT		fad3b_1987	<u>AATCCGCTTACTCC</u> TCTGCTACTCATCG	<u>GTCGTAGATTACC</u> GCTTCCACAAGGT	
fad3a_1982	<u>CATACCAACTCCAAA</u> CCGCACAAA	<u>GATAGACAGGACTTC</u> TCCTCCACTGTT		fad3b_2245	<u>CACCTTACCCTCAA</u> ATGCCACACTATCAC	<u>AGCACCTCTCTCA</u> ACGCAGGTCAAAG	
fad3a_2157	<u>TTCACGCAGAATCGG</u> TATACCTCGTCA	<u>GATGAATCCTGCTCG</u> TACCCGTGGTGGTGA		fad3b_2513	<u>ATAGCGACCAAGAA</u> GTTTCTCGATCA	<u>CCTCTATCCAAATGT</u> GTGTACTAAGTAT	
fad3a_2389	<u>GCGAGTAATCATCTA</u> CGGCTTCCTTCC	<u>CTCAATGACAAGAC</u> CTCCTTACCGCTT		fad3b_2743	<u>AGCCATGCCTATACT</u> AAGTGCTGTAC	<u>ATCATTCCCAAGTAC</u> CCAAACAAGTG	
fad3a_2652	<u>TGGTGGTAGAAGCGG</u> TAAGGAGGTCT	<u>CGACTGGACGGCTA</u> GGGTGATCATGT		fad3b_3011	<u>TATCAGCAACAGAG</u> AGCCGAAGAAATCA	<u>GCTAACGAGGACAA</u> GATAACAGCCTGC	
fad3a_2855	<u>AGTCACTAGAAAATG</u> TCCTGAGCAGT	<u>CAGCGTTAAATCATG</u> TCTGTCTCTGA					
fad3a_3167	<u>AATGTTGCTTTCAGA</u> GACAAGACATGA	<u>AAGAGATCCAATATC</u> ATCAGCTAGA					

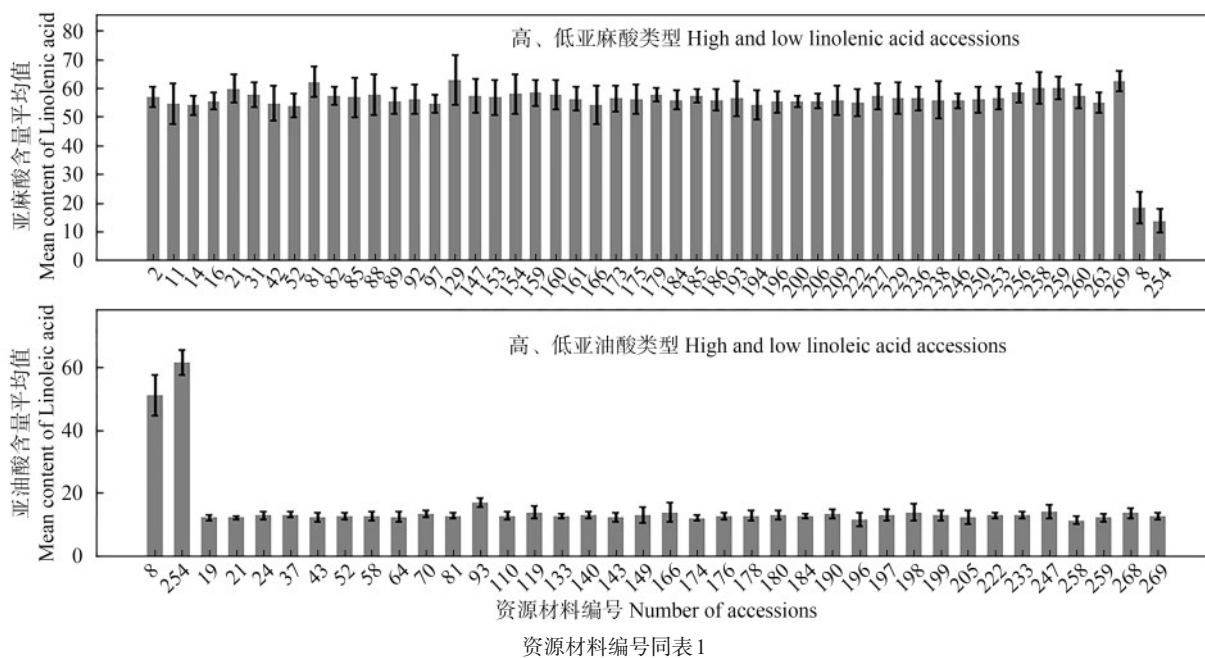
表5 胡麻脂肪酸成分之间的相关性

Table 5 Correlation between fatty acid components of flax

脂肪酸 Fatty acid	棕榈酸 Palmitic acid	硬脂酸 Stearic acid	油酸 Oleic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid
棕榈酸 Palmitic 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

**表示 $P < 0.01$ 水平上显著相关, *表示 $P < 0.05$ 水平上显著相关

**significantly correlated at $P < 0.01$ level, * significantly correlated at $P < 0.05$ level



资源材料编号同表1
Number of accessions is identical to table 1

图1 用于SNP KASP基因分型的资源材料亚麻酸、亚油酸含量百分比

Fig.1 Percentage of linolenic acid and linoleic acid in the 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 位点进行了基因分型检测。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 24 个亚麻酸相关 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;34 个亚油酸相关 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。

2.3 高通量测序分析 SNP 位点多样性及验证 KASP 分型结果

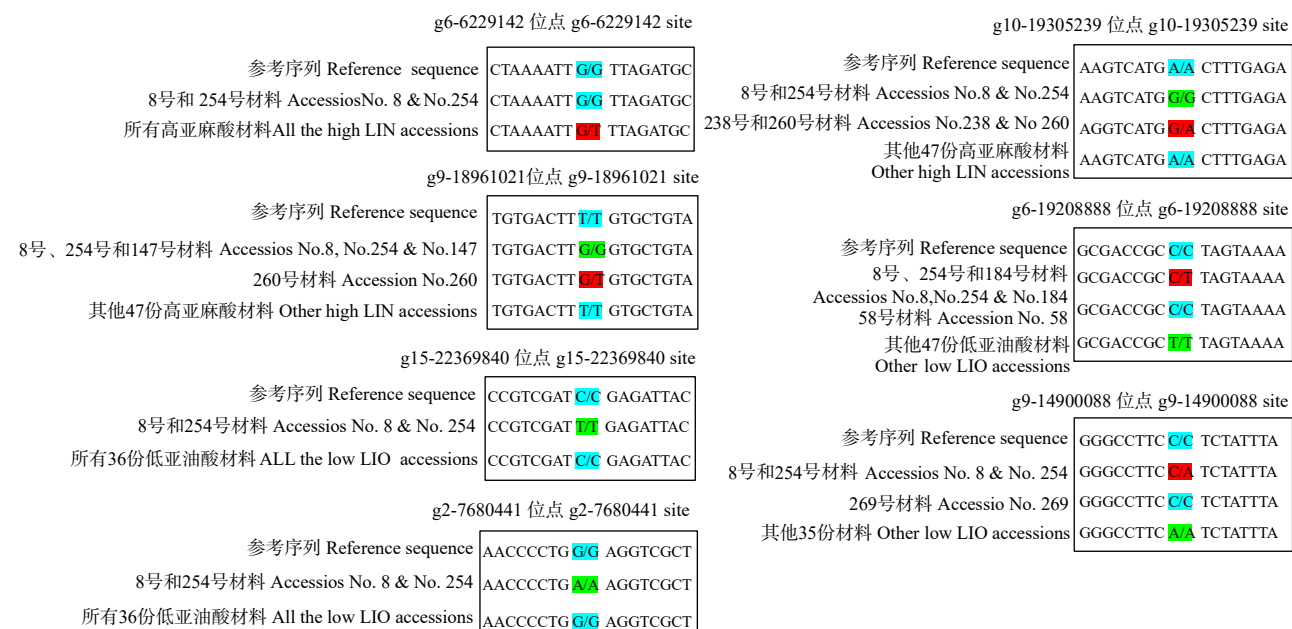
为了验证 KASP 基因分型结果的准确性,针对筛选得到的 7 个位点 g6-6229142、g10-19305239、g9-18961021、g6-19208888、g9-14900088、g15-22369840 和 g2-7680441,对用于基因分型的 77 份材料进行了高通量测序,测序结果与 KASP 基因分型结果完全一致(图 2)。

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

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49份高亚麻酸材料	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
g6_19208888		绿色	G/G	147	
		蓝色	T/T	其余47份高亚麻酸材料	
	低亚麻酸	绿色	G/G	8,254	100
	高亚油酸	红色	C/T	8,254	100
g9-14900088	低亚油酸	红色	C/T	184	97
		蓝色	C/C	58	
		绿色	T/T	其余34份低亚麻酸材料	
g15-22369840	高亚油酸	红色	C/A	8,254	100
	低亚油酸	蓝色	C/C	269	97
g2-7680441	高亚油酸	绿色	A/A	其余35份低亚麻酸材料	
	低亚油酸	蓝色	CC	8,254	100
g15-22369840	高亚油酸	绿色	TT	8,254	100
	低亚油酸	蓝色	CC	所有36份低亚油酸材料	100
g2-7680441	高亚油酸	绿色	AA	8,254	100
	低亚油酸	蓝色	GG	所有36份低亚油酸材料	100



蓝色: 参考序列基因型或与参考序列相同的基因型; 绿色: 突变型纯合基因型; 红色: 杂合性基因型

blue: Reference genotype or genotype similar to reference genotype; green: Homozygous mutant genotype; red: Heterozygous genotype

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

(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。g15-22369840 SNP位点位于 *FAD3a* 基因第5个外显子。在8号(CH-89)和254号(CI637PI91037)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1个外显子。在8号(CH-89)和254号(CI637PI91037)材料中该位点的碱基由G变

成A,遗传密码由TGG变成TGA,氨基酸由色氨酸(W)变成终止密码子(图2)。所有的低亚油酸材料中,2个位点未发生变异。而在8号(CH-89)和254号(CI637PI91037)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。

3 讨论

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。随着下一代测序技术的发展,越来越多的SNP标记应用到农作物分子标记辅助选择过程中。胡麻中SNP标记用于遗传多样性分析、遗传图谱构建和QTL定位、全基因组关联分析等方面^[31]。通过KASP基因分型技术,针对选定的品质性状相关SNP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。KASP技术在多种农作物的分子标记辅助选择育种中得到了广泛的应用^[32],但其在胡麻中的应用鲜有报道。

3.1 高品质胡麻种质资源为高效育种提供种质基础

胡麻品种选育以优质、高产、抗逆性强为主要目标。本研究收集国内外胡麻种质资源材料246份,通过多年多点(共8个环境)脂肪酸检测数据,筛选出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,这些种质资源材料可以作为胡麻品质育种的候选亲本进行研究。

3.2 只有少数的SNP位点得到验证

在58个亚麻酸、亚油酸相关的SNP位点中,只有7个SNP位点得到了验证,验证率仅为12%。其原因可能有2个:(1)部分SNP位点在设计KASP引物时被淘汰。有些SNP位点距离近,选择相邻SNP位点的其中1个进行引物设计;有些SNP位点周围的碱基序列不适合设计KASP引物。(2)在前期工作中使用的群体比较小(F_2 群体100个个体^[28],GWAS分析136份材料^[30])、参考基因组组装质量不高(scaffold水平),表型数据也可能存在一定的误差,

因此前期获得的SNP位点的假阳性较高。

3.3 SNP位点区域的遗传背景需要进一步的深入研究

本研究通过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。通过高通量测序发现,g15_22369840和g2_7680441分别位于脂肪酸脱氢酶基因*FAD3a*和*FAD3b*的外显子当中。在8号(CH-89)和254号(CI637PI91037)2个高亚油酸材料中,该2个位点同时发生了无义突变,影响了酶的活性,因此将其作为功能性分子标记利用。而其他5个SNP位点区域的遗传背景尚不清楚,SNP位点与目标基因之间的距离、与目标性状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。

本研究利用筛选构建的自然群体中58个与亚麻酸、亚油酸相关的SNP位,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,可用于胡麻分子标记辅助选择过程中。如何将这些SNP标记用于胡麻品质育种过程中,需要在育种实践中进一步深入研究。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 C S. Research progress 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). 国家卫生计生委疾控局发布. 中国妇幼健康研究, 2016, 27(5): 670
“Dietary guideline for Chinese residents (2016)”. Released by Disease Control Bureau of the National Health and Family Planning Commission. 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

- 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(5): 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] 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
- [9] 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, 10(8): 1047-1064
- [10] 陈思平. 基于 KASP 的水稻基因组 SNP 标记开发及其育种应用. 广州: 华南农业大学, 2017
- Chen S P. Development of rice SNP marker based KASP technology and its application in breeding. Guangzhou: 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, 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*, 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 (Oxford)*, 2020, 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
- [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, 2022, 23(2): 493-504
- Zhang W J, Zhao J J, He J S, Hao C Y, Wang X L, Kang L, Zhang F G, Zhang X Y, Chen D S. Detection and validation of grain weight related genes using KASP assays in Ningxia wheat germplasm. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(2): 493-504
- [16] 王蕊, 施龙建, 田红丽, 易红梅, 杨扬, 葛建铭, 范亚明, 任洁, 王璐, 陆大雷, 赵久然, 王风格. 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 R, 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, 王风格, 赵涵. 基于高通量测序开发玉米高效 KASP 分子标记. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 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. 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): 3295-3307
- 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 *B3* disease resistance genes in pepper. Molecular Breeding, 2015, DOI: <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, 2016, 11(2): e048513
- [26] 孙逸敏. 利用SPSS软件分析变量间的相关性. 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. 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): 465-477
Gao F Y, SIQIN B T, 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): 465-477
- [29] 伊六喜, 胡麻产量和品质相关性状的全基因组关联分析. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018
Yi L X. Genome-wide association analysis of yield and quality related traits in flax. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018
- [30] 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
- [31] 姜慧, 潘根, 常丽, 黄思齐, 唐慧娟, 李德芳, 赵立宁, 李建军, 伍叶娜, 陈安国. 亚麻分子标记辅助育种研究进展. 植物遗传资源学报, 2021, 22(4): 910-920
Jiang H, Pan G, Chang L, Huang S Q, Tang H J, Li D F, Zhao L N, Li J J, Wu Y N, Chen A G. Advances in molecular marker assisted breeding of flax. Journal of Plant Genetic Resources, 2021, 22(4): 910-920
- [32] 杨青青, 唐家琪, 张昌泉, 高继平, 刘巧泉. KASP标记技术在主要农作物中的应用及展望. 生物技术通报, 2022, 38(4): 58-71
YANG Q Q, TANG J Q, ZHANG C Q, GAO J P, LIU Q Q. Application and prospect of KASP marker technology in main crops. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(4): 58-71

附表 1 胡麻种质资源亚油酸、亚麻酸含量平均值、标准差和变异系数统计分析

Table S1 Statistical analysis of linoleic acid and linolenic acid mean, standard deviation and coefficient of variation of flax germplasm resources

编号 NO.	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV		编号 NO.	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV		编号 NO.	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV	
	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid		亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid		亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid
1	15.7±1.6	53.9±5.3	10.2	9.8	25	16.4±1.8	52.5±5.7	11	10.9	50	14.1±1.3	49.8±6.5	9.2	13.1
2	15.5±1.7	56.9±3.5	11	6.2	26	15.4±1.6	49.9±5.5	10.4	11	51	13.8±0.9	52.6±5.3	6.5	10.1
3	15.5±1.2	53.9±4.6	7.7	8.5	27	14.2±1.7	51.6±4.3	12	8.3	52	12.4±1.1	55.6±10.8	8.9	19.4
4	14.3±1.7	49.4±6.7	11.9	13.6	28	14.2±1.4	53.9±7	9.9	13	52	13.3±1.6	53.9±4.1	12	7.6
5	13.7±1.2	50.6±6.1	8.8	12.1	29	15±1.6	48.6±6.5	10.7	13.4	53	14.9±2.1	50±6.6	14.1	13.2
6	14.3±1.5	52.7±7	10.5	13.3	30	17.9±1.3	46.4±5.1	7.3	11	54	15.3±2	52.5±6.2	13.1	11.8
7	14.8±1.5	53.4±5.5	10.1	10.3	31	13.2±1.4	57.7±4.5	10.6	7.8	55	14.2±1.8	54±6.3	12.7	11.7
8	51.2±6.5	18.3±5.5	12.7	30.1	32	14.7±0.9	52.7±5.6	6.1	10.6	57	14.1±0.8	52.1±4.7	5.7	9
9	14.4±1.7	52.2±5	11.8	9.6	33	15.1±0.9	50.8±4.9	6	9.6	58	12.5±1.6	57.6±7	12.8	12.2
10	16.2±1.6	53.8±7.3	9.9	13.6	34	14.6±2.2	51.6±4	15.1	7.8	59	13.5±1.2	56±7.5	8.9	13.4
11	14.9±1.6	54.6±7.1	10.7	13	35	13.4±2.3	52.7±3.2	17.2	6.1	60	14.5±1.6	55±6.1	11	11.1
12	14.1±1.9	55.2±7.3	13.5	13.2	36	12.7±1.7	51.2±4.3	13.4	8.4	61	16.2±1.8	50.5±7.3	11.1	14.5
13	14±1.1	50±3.9	7.9	7.8	37	13±0.9	53.4±4.5	6.9	8.4	62	13.1±1.4	55.8±7.1	10.7	12.7
14	15.9±1.5	54±3.4	9.4	6.3	38	13.3±1.4	52.6±5.5	10.5	10.5	63	16.5±1.7	55.2±6.7	10.3	12.1
15	13.2±2	54.1±2.9	15.2	5.4	39	14±1	52.3±4.4	7.1	8.4	64	12.3±1.6	53.8±5.3	13	9.9
16	15.8±0.7	55.5±3	4.4	5.4	40	15±0.9	50.8±3.9	6	7.7	65	15.9±1.9	54.3±5.7	11.9	10.5
17	14.8±1.1	48.3±3.9	7.4	8.1	41	15±0.7	52.4±5.3	4.7	10.1	66	14.4±1.6	50.4±6.9	11.1	13.7
18	15.9±0.8	54.2±3.9	5	7.2	42	14±0.9	54.7±6	6.4	11	67	13.9±1.4	51.2±4	10.1	7.8
19	12±0.8	50.2±5.7	6.7	11.4	43	12.2±1.5	52±5.3	12.3	10.2	68	14.1±1.8	50.8±5.3	12.8	10.4
20	13.8±0.9	53.3±3.8	6.5	7.1	44	14.1±2.4	53.2±6.8	17	12.8	69	14.5±1.8	53.7±5.5	12.4	10.2
21	12±0.6	59.8±4.8	5	8	45	14±0.7	48.7±7.8	5	16	70	13.3±1	56±5.5	7.5	9.8
22	15.7±0.6	53.6±4.8	3.8	9	47	14.1±1.1	48.6±7.8	7.8	16	71	13.9±1.3	54±7.9	9.4	14.6
23	13±1.1	50.8±5.6	8.5	11	48	13.4±2.1	52±4.5	15.7	8.7	72	16.3±1.6	54.4±4	9.8	7.4
24	12.7±1.2	50.2±5.6	9.4	11.2	49	14±1.1	51.2±5.8	7.9	11.3	73	13.5±1	51.6±4.9	7.4	9.5

附表 1 (续)

编号 NO.	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV		编号 NO.	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV		编号 NO.	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV			
	亚油酸	亚麻酸	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid		亚油酸	亚麻酸	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid		亚油酸	亚麻酸	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid
	Linoleic	Linolenic				Linoleic	Linolenic				Linoleic	Linolenic				
74	13.5±1.4	51.4±7.7	10.4	15	98	15±1.5	53±7.4	10	14	123	15.7±2.1	51.2±5.9	13.4	11.5		
75	14.5±0.8	52.6±4.1	5.5	7.8	99	15.8±1.6	53.6±6.2	10.1	11.6	124	13.6±2.4	53.1±7	17.6	13.2		
76	14.9±0.9	52.4±5.2	6	9.9	100	15.7±1.3	53.4±4.4	8.3	8.2	125	14.9±1.4	52.2±6.2	9.4	11.9		
77	14.3±1.2	52.9±8.1	8.4	15.3	101	16±1.8	52.4±6	11.2	11.5	126	15±2.3	53.7±6.5	15.3	12.1		
78	15.6±2	49.6±5.9	12.8	11.9	102	13±1.3	54.4±5.5	10	10.1	127	15.9±1.9	54.4±5.6	11.9	10.3		
79	14.9±1.4	53.1±9.6	9.4	18.1	103	13.4±2	53.4±8.6	14.9	16.1	128	15.7±2.3	54.2±6.1	14.6	11.3		
80	15±1.7	54±6.4	11.3	11.9	104	16.1±1.8	54.2±6.5	11.2	12	129	13.9±2	62.8±8.7	14.4	13.9		
81	12.5±0.9	62.1±5.4	7.2	8.7	105	14.9±1.2	48.9±4.5	8.1	9.2	130	15±2.5	54.4±6.3	16.7	11.6		
82	14.6±1.4	57.3±3.3	9.6	5.8	106	13.9±0.9	50.3±5.5	6.5	10.9	131	14.7±2.3	52.2±5.1	15.6	9.8		
83	14±1.4	51.6±7.6	10	14.7	107	16.4±1.6	55.4±5.4	9.8	9.7	132	13.6±1.6	53.7±6.9	11.8	12.8		
84	15.8±1.5	51.5±5.3	9.5	10.3	108	13.3±1.8	53.1±6.6	13.5	12.4	133	12.5±0.8	60.8±11	6.4	18.1		
85	16.1±1.6	56.7±6.9	9.9	12.2	109	14.4±1.5	52.6±6.8	10.4	12.9	134	15.7±1.9	50.6±6.3	12.1	12.5		
86	14.4±1.8	53.3±5.8	12.5	10.9	110	12.6±1.2	51.4±5.7	9.5	11.1	135	17.7±1.9	53.4±6.1	10.7	11.4		
87	14.8±1	57.9±5.3	6.8	9.2	111	13.8±1.2	52.6±6.5	8.7	12.4	136	13.8±1.5	52.9±7	10.9	13.2		
88	16.2±1.6	57.6±7	9.9	12.2	112	14.4±0.7	49.4±6.6	4.9	13.4	137	12.8±1.3	52.9±6.7	10.2	12.7		
89	15.7±1.3	55.4±4.6	8.3	8.3	113	14.7±1.8	54.3±7.3	12.2	13.4	138	18.1±2.9	50.5±7.6	16	15		
90	15.1±1.5	52±6.9	9.9	13.3	114	15.4±1.6	52±6.9	10.4	13.3	139	14.4±1.4	55.1±6.6	9.7	12		
91	14.3±0.9	49.8±2.6	6.3	5.2	116	13.6±1.5	53.4±7.5	11	14	140	12.7±1.1	52.6±4.4	8.7	8.4		
92	16.6±1.4	56.2±5.1	8.4	9.1	117	14.3±1.3	52.8±6.1	9.1	11.6	141	12.4±1.6	53.8±7.8	12.9	14.5		
93	16.7±1.5	56.8±5.6	9	9.9	118	14.4±1.9	51.6±7.6	13.2	14.7	142	15.3±2.5	51.8±7.3	16.3	14.1		
94	15.6±0.7	50.4±4.4	4.5	8.7	119	13.7±2	53.2±7.2	14.6	13.5	143	12.2±1.4	53.9±7.4	11.5	13.7		
95	17±4.1	49±5.7	24.1	11.6	120	13.8±1.2	54.7±5.7	8.7	10.4	144	13.3±2.1	55.9±8.8	15.8	15.7		
96	15.9±2.3	51.1±6.6	14.5	12.9	121	17.1±1.8	53.7±5.5	10.5	10.2	146	14.3±1.8	55.1±5.9	12.6	10.7		
97	13.8±0.6	54.5±3.1	4.3	5.7	122	17.2±1.7	54.8±5.6	9.9	10.2	147	12.8±2.9	57.4±5.9	22.7	10.3		

附表 1 (续)

编号 NO.	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV		编号 NO.	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV		编号 NO.	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV	
	亚油酸	亚麻酸	亚油酸	亚麻酸		亚油酸	亚麻酸	亚油酸	亚麻酸		亚油酸	亚麻酸	亚油酸	亚麻酸
	Linoleic acid	Linolenic acid	Linoleic acid	Linolenic acid		Linoleic acid	Linolenic acid	Linoleic acid	Linolenic acid		Linoleic acid	Linolenic acid	Linoleic acid	Linolenic acid
149	12.8±2.5	52.4±7.8	19.5	14.9	177	14.7±1	50.8±4.7	6.8	9.3	212	14.7±2.1	49.5±6.1	14.3	12.3
150	16.8±2.5	55.4±6.1	14.9	11	178	12.6±1.6	55.1±5.3	12.7	9.6	213	14.2±2.9	52.8±5	20.4	9.5
151	17.3±3	55.1±6.1	17.3	11.1	179	14.2±2.3	57.7±2.5	16.2	4.3	215	13.7±2.6	51.1±3.7	19	7.2
152	15±1.4	54.9±5.2	9.3	9.5	180	12.9±1.4	53.9±6.6	10.9	12.2	216	14.2±2.3	52±4.3	16.2	8.3
153	15±1.3	56.8±6.1	8.7	10.7	184	12.5±0.7	55.9±3.5	5.6	6.3	218	13.8±1.3	51.7±4.2	9.4	8.1
154	14.7±0.9	57.9±7	6.1	12.1	185	15±2.2	57.3±2.3	14.7	4	220	15.9±1.8	55±4.8	11.3	8.7
155	14.6±1.6	55.9±7.5	11	13.4	186	15±2	55.8±3.7	13.3	6.6	221	14.8±1.8	46.6±5.9	12.2	12.7
156	16.1±1.4	54.8±4.5	8.7	8.2	190	13.2±1.3	55.7±5.3	9.8	9.5	222	12.7±1	54.8±4.7	7.9	8.6
157	15.7±1.7	50.1±4.3	10.8	8.6	191	14.6±1.2	53.5±5.5	8.2	10.3	223	14.2±2.3	54±6.1	16.2	11.3
158	14.7±1.3	52.8±6.4	8.8	12.1	192	13.9±1.1	52±6.5	7.9	12.5	224	14±1.3	53.9±4.4	9.3	8.2
159	14.5±1.2	58.3±4.6	8.3	7.9	193	16±3.2	56.4±6.2	20	11	225	13.9±0.8	53.5±4.9	5.8	9.2
160	16.7±1.3	57.8±5.1	7.8	8.8	194	15.5±2.4	54.2±5.2	15.5	9.6	226	13.7±1.3	53.6±5.7	9.5	10.6
161	14.4±2	56.2±4.1	13.9	7.3	195	15.4±1.5	55.4±5.5	9.7	9.9	227	14.5±1.2	57.1±4.4	8.3	7.7
163	14.7±2.4	55.3±4.6	16.3	8.3	196	11.3±2.2	55.2±3.7	19.5	6.7	228	14.2±1.5	52.7±5.1	10.6	9.7
165	16±2.4	51.9±4.5	15	8.7	197	13±1.8	53±6	13.8	11.3	229	14.2±1.4	56.6±5.6	9.9	9.9
166	13.7±3	54.2±6.6	21.9	12.2	198	13.7±2.6	55.5±5.4	19	9.7	230	14.6±1.1	51.2±3.3	7.5	6.4
168	14.7±2.1	50.2±6	14.3	12	199	12.7±1.7	53.2±4.2	13.4	7.9	232	14.8±2.4	53.9±4.7	16.2	8.7
169	14.8±1.3	51.6±6	8.8	11.6	200	15.2±2	55.4±2	13.2	3.6	233	12.9±1	55.8±7.1	7.8	12.7
171	14.6±1.1	52.8±5.4	7.5	10.2	201	13.9±1.8	54.5±3.7	12.9	6.8	234	14.1±2.9	53.1±5.6	20.6	10.5
172	15.3±1.4	53±5.9	9.2	11.1	202	14.8±1.2	54±5.2	8.1	9.6	235	14.5±2.1	52.9±6.9	14.5	13
173	13.9±0.7	56.3±4.4	5	7.8	205	12.2±2.1	53.8±4.5	17.2	8.4	236	13.9±1.1	56.4±4.1	7.9	7.3
174	11.9±0.8	50±6.5	6.7	13	206	15.9±3.4	55.5±2.4	21.4	4.3	237	13.2±1.4	57.3±4.8	10.6	8.4
175	14.9±1.5	56±5.2	10.1	9.3	209	15.6±2.1	55.6±5.2	13.5	9.4	238	14.3±1.7	55.8±6.5	11.9	11.6
176	12.5±1.1	53.3±4.5	8.8	8.4	210	15±2.2	54.2±3.8	14.7	7	239	14.2±0.9	50.3±2.5	6.3	5

附表 1 (续)

编号	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV		编号	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV		编号	均值±标准差 Mean±STD		变异系数 (%) CV	
	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid		亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid		亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid	亚油酸 Linoleic acid	亚麻酸 Linolenic acid
240	14.3±1.2	51.6±4.3	8.4	8.3	250	16.7±2.6	56±4.6	15.6	8.2	261	14.4±1.2	53.9±5.1	8.3	9.5
241	13.8±1.4	52.4±4.8	10.1	9.2	251	25±19.4	49.7±19.3	77.6	38.8	262	13.7±0.6	53.3±4.7	4.4	8.8
242	13.8±1	52.2±4.8	7.2	9.2	253	16.5±1.2	56.5±4.1	7.3	7.3	263	14.1±2.9	54.8±3.5	20.6	6.4
243	15.5±1.6	53.3±2.6	10.3	4.9	254	61.5±4	13.7±4.1	6.5	29.9	264	14.1±1.1	52.3±3.7	7.8	7.1
244	15±1.7	56.2±4.4	11.3	7.8	255	16.7±0.6	54.4±3.8	3.6	7	265	14±1.4	55.2±3.6	10	6.5
245	12.3±2.3	55.7±5.8	18.7	10.4	256	17.3±3.4	58.4±3.4	19.7	5.8	266	16.2±1.7	47.3±5.9	10.5	12.5
246	15.1±1.2	55.6±2.5	7.9	4.5	257	16.3±2.2	54.4±5.4	13.5	9.9	267	14.2±1	52.8±4.2	7	8
247	13.8±2.2	54±4.8	15.9	8.9	258	11.2±1.2	60.2±5.5	10.7	9.1	268	13.4±1.6	56.7±4.8	11.9	8.5
248	14.3±1.5	51.4±3.8	10.5	7.4	259	12±1.2	60.1±4	10	6.7	269	12.5±1.1	62.3±3.5	8.8	5.6
249	13.5±1.8	55.5±6.6	13.3	11.9	260	14.2±2.2	57.1±4	15.5	7	270	15.8±1.6	50.9±5.2	10.1	10.2