



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110760608 B

(45)授权公告日 2020.07.14

(21)申请号 201911212000.7

C12N 15/11(2006.01)

(22)申请日 2019.12.02

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110760608 A

CN 105567856 B, 2018.11.13,

CN 107828908 A, 2018.03.23,

CN 101421406 B, 2016.08.31,

(43)申请公布日 2020.02.07

US 2017105380 A1, 2017.04.20,

(83)生物保藏信息

WO 2010150901 A1, 2010.12.29,

CCTCC NO:P201923 2019.12.02

WO 2012117256 A2, 2012.09.07,

(73)专利权人 浙江省农业科学院

吴新杰等. 甘蓝型油菜高油酸性状研究进展.《作物杂志》.2012,(第2期),第5-9页.

地址 310021 浙江省杭州市石桥路198号

Zhou, Y.等.Brassica napus fatty acid

(72)发明人 傅鹰 张尧锋 张冬青 余华胜
林宝刚

desaturase BnaA.FAD2.a gene, complete
cds.《GenBank Database》.2012,

(74)专利代理机构 杭州恒翌专利代理事务所
(特殊普通合伙) 33298

审查员 赵硕

代理人 王从友

(51)Int.Cl.

权利要求书2页 说明书16页

C12Q 1/6895(2018.01)

序列表6页 附图3页

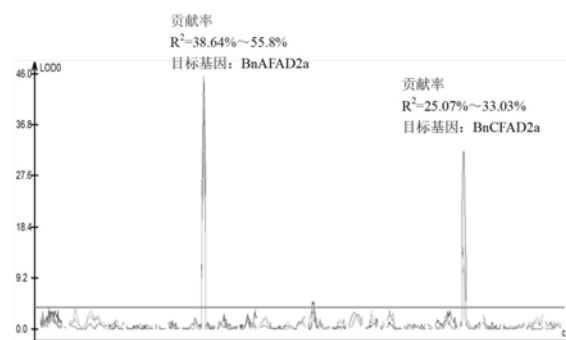
(54)发明名称

一种油菜BnFAD2基因高油酸等位突变及其
SNP标记引物的开发和应用

子标记的组合使用可以筛选得到油酸含量高达
88%的后代材料。

(57)摘要

本发明涉及一种油菜BnFAD2基因的新型的高油酸等位突变,并且涉及这类新型的高油酸等位变异SNP分子标记开发和分子标记辅助育种技术。本发明公开了甘蓝型油菜中BnFAD2基因的两对新型的高油酸等位突变(BnAfad2a和BnCfad2a)。所述基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1和ID NO:2所述。本发明还同时提供了可快速筛选这类新型高油酸等位突变位点的两对特异型的KASP分子标记KASP-421和KASP-1073,并利用该标记进行单株基因型鉴定和高油酸株系筛选。本发明提供的两对KASP分子标记均由油菜BnFAD2基因外显子区域SNP变异开发而来,筛选结果特异性更高,检测结果更为准确可靠。本发明提供的KASP分子标记只需PCR和荧光检测两个步骤,成本低、通量高,特别适用于育种群体后代高油酸基因型的分类筛选与鉴定。本发明两个分



1. 控制甘蓝型油菜种子油酸含量的BnFAD2基因其产生高油酸表型的突变基因,其特征在于,该突变基因为位于甘蓝型油菜C05染色体的BnCFAD2a核苷酸序列1073处发生了G至A的置换,即:G1073A,突变基因命名为BnCfad2a,所述基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所述。

2. 权利要求1所述的突变基因BnCfad2a编码的蛋白质,所述蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所述。

3. 权利要求1所述的突变基因BnCfad2a的连锁KASP分子标记,其特征为,所述分子标记为分子标记KASP-1073;分子标记KASP-1073的核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示,为:

5'-tctgttctccacgatgccgcattatcacgcgatggaagctaccaaggcgataaagccgatactgggagagtattatcagttcgcgatgggacgccggtggttaaggcgatgtgga[g/a]ggaggcgaaggagtgtatctatgtggaaccggacaggcaaggtgagaagaaaggtgtgttctgtgtacaacaataagttatga-3',且核酸序列自5'端起第114位碱基是SNP位点。

4. 权利要求3所述的连锁KASP分子标记用于确定生物样本中突变基因BnCfad2a的存在中的应用。

5. 权利要求3所述的连锁KASP分子标记的PCR特异性扩增引物,其特征为,分子标记KASP-1073的引物包括:

1) 两条特异性引物:

Primer_AlleleFAM:5'-gggtggttaaggcgatgtggag-3',如SEQ ID NO.10所示;

Primer_AlleleHEX:5'-cggtggttaaggcgatgtggaa-3',如SEQ ID NO.11所示;

2) 一条通用引物:

Primer_Common:5'-ccggttcacatagatacactcctt-3';如SEQ ID NO.12所示。

6. 一种用于确定生物样本中突变基因BnCfad2a存在的检测试剂盒,其特征为,该试剂盒至少包括权利要求5所述的PCR特异性扩增引物。

7. 一种判断目标生物样本中产生高油酸表型的方法,其特征为,该方法包括以下步骤:

1) 采用权利要求5所述的PCR特异性扩增引物和分子标记KASP-421的引物组对生物样本的基因组DNA进行PCR扩增;分子标记KASP-421的引物组包括:

1) 两条特异性引物:

Primer_AlleleFAM:5'-gttggaatggtggcgctcgatg-3',如SEQ ID NO.7所示;

Primer_AlleleHEX:5'-gtgttggaatggtggcgctcgata-3',如SEQ ID NO.8所示;

2) 一条通用引物:

Primer_Common:5'-ggacgacaccgtcggcctca-3';如SEQ ID NO.9所示;

2) 采用分子标记KASP-421引物组的判断目标SNP的基因型:如果检测到第+421位碱基只为T,则判定油菜样品的BnAFAD2a为高油酸等位基因,基因型定义为AA,若只为碱基C,则判定该位点为中低油酸等位基因,基因型定义为aa,若检测位点同时检测到T和C,则判定为杂合体,基因型定义为Aa;所述的BnAfad2a基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所述;

采用分子标记KASP-1073引物组的判断目标SNP的基因型:如果检测到第+1073位碱基只为A,则判定油菜样品的BnCFAD2a为高油酸等位基因,基因型定义为BB,若只为碱基G,则判定该位点为中低油酸等位基因,基因型定义为bb,若检测位点同时检测到A和G,则判定为

杂合体,基因型定义为Bb;

3)将KASP-421和KASP-1073结果结合,若检测样品基因型同时含有两个高油酸等位基因,基因型为AABB,则待测样品为超高油酸单株或株系。

8.根据权利要求7所述的方法,其特征在于,扩增体系均为:油菜样品DNA模板2.5 μ l,2 $\times$ KASPMastermix2.5 μ l,KASPAssayMix0.07 μ l;

PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C15min;94 $^{\circ}$ C20sec,61-55 $^{\circ}$ C1min,每个循环退火温度降低0.6 $^{\circ}$ C,共10个循环;94 $^{\circ}$ C20sec,55 $^{\circ}$ C1min,共26个循环;若扩增效果不理想可加循环,每次3个循环,最多可三次;反应完成后利用扫描仪Pherastar对KASP反应产物进行荧光数据读取,荧光扫描的结果会自动转化成图形;利用BMGPHERAstar仪器检测荧光信号并查看分型情况;若分型不充分,则继续扩增,每3个循环查看分型情况,直至分型完全。

9.一种获取种子中高油酸含量植株的方法,其特征在于,该方法将权利要求1所述的BnCfad2a导入一株植物中,或者,将突变基因BnAfad2a和权利要求1所述的BnCfad2a导入一株植物中,并采用权利要求7或8所述的方法检测目标生物样本;所述的BnAfad2a基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所述。

10.根据权利要求9所述的方法,其特征在于,目标生物样本为该植物或其细胞、植物组织或器官或子代。

11.根据权利要求10所述的方法,其特征在于,目标生物样本为种子。

一种油菜BnFAD2基因高油酸等位突变及其SNP标记引物的开发和应用

技术领域

[0001] 本申请涉及一种新型的油菜BnFAD2基因高油酸等位突变,并且涉及这类新型的高油酸等位变异SNP分子标记开发和分子标记辅助育种技术。

背景技术

[0002] 油菜是我国继水稻、小麦、玉米和大豆之后的第五大农作物,也是世界上最重要的油料作物之一。菜籽油中脂肪酸组分对其食用品质、营养价值、存储和加工品质、用途和最终的市场价值有着决定性的影响。菜籽油的脂肪酸组成主要有棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)、亚麻酸(C18:3)、廿碳烯酸(C20:1)、芥酸(C22:1)等。其中,油酸是油菜脂肪酸的重要成分,属于单不饱和脂肪酸。油酸含量的提升对于进一步改良菜籽油品质有着重大意义:(1)能够显著降低血浆中低密度脂蛋白胆固醇,预防人类动脉硬化等心血管疾病;(2)可以在对胰岛素分泌没有影响的前提下,显著提高胰岛素敏感性,从而对于治疗糖尿病起到积极作用;(3)因其不饱和程度低,在加工、储运和煎炸时对氧化不敏感,具有很好的热稳定性,能够满足如煎炸、糕点等食品加工行业的需要,并且可使菜籽油具有更长的货架期;(4)高油酸菜籽油因其甲酯化程度高,燃烧值高,更有利于生产生物柴油,并另外,油酸还可用于制备多种化工产品和口红、皂类、唇膏、防晒霜等生活用品和日用化妆品。

[0003] 分子标记因其准确、快速、高效已经成为作物育种一个强有力的工具,因其具有早期选择、不受环境影响以及准确快速高效的优势,该技术已在各种作物中开展了实质性利用。分子标记的种类很多,目前在作物中已经开展实质性利用的标记包括早期的RFLP(限制性片段长度多态性,Restriction Fragment Length Polymorphism,RFLP)、RAPD(随机扩增多态性,Random Amplified Polymorphism DNA,RAPD)、AFLP(扩增片段长度多态性,Amplified Fragment Length Polymorphism,AFLP),发展到目前使用的最为广泛的SSR(简单重复序列,Simple Sequence Repeat,SSR)、CAPS(酶切扩增多态性序列,Cleaved Amplified Polymorphic Sequence,CAPS)标记。但这些方法都存在低通量或高成本等局限性。KASP(竞争性等位基因特异性PCR,kompetitive allele specific PCR)是英国LGC(政府化学家实验室)公司提出的一种用于对基因组中SNPs和特定位点上InDels进行精准双等位基因判断的技术。KASP分子标记具有高稳定性、高准确性、低成本、快速、高效等优点,尤其在样本量大,SNP位点少时,KASP 的应用特点最为显著。

[0004] 近年来,在油菜种子高油酸含量的品系筛选及其分子定位方面取得了一定的进展。官春云等利用8~10伦琴⁶⁰Co射线辐射进行辐射育种和后代连续筛选,获得若干份高油酸材料,油酸含量在70%以上(官春云,等,作物学报,2006,32(11):1625-1629)。浦惠明等利用低剂量⁶⁰Co- γ 射线处理甘蓝型油菜萌动种子获得了油酸含量超过80%的高油酸新种质(中国专利,专利申请号201010513722.9)。周永明等,通过聚合杂交和小孢子培养,得到油酸大于78%的高油酸油菜选系和品种(中国专利,专利申请号200910273435.2)。尽管如

此,生产上高油酸种质的实际应用还不够广泛,主要是由于油菜高油酸性状的遗传机制较为复杂,遗传标志物(如:分子标记、核酸突变位点等)报道较少。尽管前期研究发现油菜油酸含量的提高主要由主效基因脂肪酸去饱和酶2(fatty acid desaturase 2,FAD2)的基因变异产生,并开发出了连锁的分子标记。例如,Yang等发现BnFAD2存在一个拷贝的变异,变异来源为一个4bp插入突变(Theor Appl Genet.2012;125(4):715-29),并利用该高油酸突变材料开发了特异的油菜高油酸共显性SCAR分子标记(中国专利,专利号CN 101824472B),一对连锁的SSR标记(中国专利,专利号CN 110305980A)和一对KASP标记(中国专利,专利号CN 110326532A)。官春云等发现高油酸突变体是由于BnFAD2其中一个拷贝的基因270位的碱基 G转换为碱基A,导致密码子由TGG转换为TGA(终止密码子),另外,在1044与1062的碱基突变也导致终止密码子的产生(官春云,等,作物学报,2006,32(11):1625-1629)。龙卫华等发现其高油酸突变体中存在BnFAD2的两个基因拷贝的变异,其中一个拷贝BnaA.FAD2a存在核苷酸序列316处G至A的置换,另一个拷贝BnaC.FAD2a核苷酸序列908处G至A的置换(中国专利,专利号CN 106282206A),并针对这两个宝贝的变异,开发了两对CAPS标记(中国专利,专利号CN 107828908A)。在中国专利中有以上几例可用于检测油菜BnFAD2基因突变位点的分子标记。遗憾的是,不同的高油酸突变材料,油菜含量表型有差异,多数高油酸突变体的油酸含量仅为76-77%。更为关键的是,不同的材料BnFAD2基因变异的拷贝数不相同,只有一个基因拷贝变异的分子标记无法在多拷贝变异的材料中同时检测多拷贝变异,并且即使是同一个基因位点,碱基变异位置也均不相同,这导致了这些位点特异的分子标记在不同材料间缺乏通用性。要解决以上瓶颈问题的关键在于充分挖掘油菜BnFAD2的高油酸复等位基因,并开发特异分子标记。此外,上述报道中公开的分子标记几乎均属于SCAR、SSR和CAPS 等标记类型,这些类型标记存在低通量或、高成本、过程繁杂等局限性。KASP分子标记具有高稳定性、高准确性、低成本、快速、高效等优点,尤其在样本量大,SNP位点少时,KASP 的应用特点最为显著,可弥补上述类型标记的不足。

发明内容

[0005] 本申请旨在弥补已有专利或技术的不足,本申请的一个目的是提供控制甘蓝型油菜种子油酸含量的BnFAD2基因其产生高油酸表型的新型的核苷酸突变位点,分别以位于油菜A05染色体的BnAFAD2a和C05染色体的BnCFAD2a为目标基因。通过对BnAFAD2a和BnCFAD2a的分离鉴定,提供了一种能在油菜中能够指示超高油酸性状(油酸含量>85%)的新型的两个等位基因,并且基于基因编码区的SNP变异开发了高效实用的KASP分子标记。KASP分子标记可以通过计算机记录并分析PCR过程中产生的荧光信号,实现对突变位点监测,检测结果与表现型一致性高;检测过程无需电泳,彻底杜绝了PCR产物的气溶胶污染、EB对环境的污染和对人体的危害。本申请首先指示了一种新型的油菜BnFAD2基因高油酸等位突变,并基于基因编码区的SNP变异开发了高效实用的KASP分子标记,可实现快速、精确检测上述新型的核苷酸突变位点为油菜高油酸品种选育提供一种准确快速有效的检测方法。

[0006] 为了实现本申请的第一个目的,本申请采用了以下的技术方案:

[0007] 控制甘蓝型油菜种子油酸含量的BnFAD2基因其产生高油酸表型的核苷酸突变位点,该核苷酸突变位点包括以下的一种或两种:

[0008] 1) 位于甘蓝型油菜A05染色体的BnAFAD2a核苷酸序列421处发生了C至T的置换,

即:C421T,突变基因命名为BnAfad2a,所述基因的核苷酸序列如SEQIDNO:1所述;

[0009] 2) 位于甘蓝型油菜C05染色体的BnAFAD2a核苷酸序列1073处发生了G至A的置换,即:G1073A,突变基因命名为BnCfad2a,所述基因的核苷酸序列如SEQIDNO:2所述。

[0010] 进一步,本申请还公开了所述的核苷酸突变位点BnAfad2a和BnCfad2a编码的蛋白质,所述蛋白质的氨基酸序列如SEQIDNO:3和IDNO:4所述。

[0011] 进一步,申请还公开了所述的核苷酸突变位点BnAfad2a和BnCfad2a的KASP分子标记,其特征在于,所述分子标记为分子标记KASP-421和分子标记KASP-1073;其中,分子标记KASP-421 的核苷酸序列如SEQIDNO.5所示,为:

[0012] 5'-gtgcggccaccacgccttcagcgactaccagtggtggacgacaccgctcggcctcatcttccactccttcct cctcgcccttactttctctggaagtacagt[c/t]atcgacgccaccattccaacactggctccctc gagagagacgaa gtgtttgtccccaagaagaagtcagacatcaagtggtagcggaagtacctcaacaaccctttg-3',且核酸序列自 5' 端起第104位碱基是SNP位点;

[0013] 分子标记KASP-1073的核苷酸序列如SEQIDNO.6所示,为:

[0014] 5'-tctgtttctccacgatgccgcattatcacgcgatggaagctaccaaggcgataaagccgatactgg gagagta ttatcagttcgatgggacgccggtggttaaggcgatgtgga[g/a]ggaggcgaaggagtgtatctat gtggaaccggac aggcaaggtgagaagaaaggtgtgttctgtgtacaacaataagttatga-3',且核酸序列自 5' 端起第114位碱基是SNP位点。

[0015] 进一步,申请还公开了所述的KASP分子标记用于确定生物样本中核苷酸突变位点BnAfad2a和BnCfad2a的存在中的方法。

[0016] 进一步,申请还公开了所述的KASP分子标记的PCR特异性扩增引物,本申请以SNP位点为中心提取两侧100bp侧翼序列设计多个引物组,经过多次多态性筛选获得,并在多个分离群体中经多次测试验证,标记KASP-421和KASP-1073扩增效果最佳,可以明显区分出野生型和高油酸突变型在BnAFAD2a和BnCFAD2a的SNP变异。

[0017] 分子标记KASP-421的引物包括:

[0018] 1) 两条特异性引物:

[0019] Primer_AlleleFAM:5'-gttggaaatggtggcgatcgatg-3',如SEQIDNO.7所示;

[0020] Primer_AlleleHEX:5'-gtgttggaaatggtggcgatcgata-3',如SEQIDNO.8所示;

[0021] 2) 一条通用引物:

[0022] Primer_Common:5'-ggacgacaccgctcggcctca-3';如SEQIDNO.9所示;

[0023] 分子标记KASP-1073的引物包括:

[0024] 1) 两条特异性引物:

[0025] Primer_AlleleFAM:5'-ggtgggttaaggcgatgtggag-3',如SEQIDNO.10所示;

[0026] Primer_AlleleHEX:5'-cggtgggttaaggcgatgtggaa-3',如SEQIDNO.11所示;

[0027] 2) 一条通用引物:

[0028] Primer_Common:5'-ccggttccacatagatacactcctt-3';如SEQIDNO.12所示。

[0029] 两对KASP标记均含有三条引物,分别包含两条针对关键位点碱基差异设计的特异性引物,一条通用引物,两条特异性引物3'末端为等位变异碱基,5'端连接英国LGC (Laboratory of the Government Chemist) 公司KASP反应试剂特定的FAM和HEX荧光接头序列。

[0030] 进一步,申请还公开了一种用于确定生物样本中核苷酸突变位点BnAfad2a和

BnCFad2a存在的检测试剂盒,该试剂盒至少包括所述的PCR特异性扩增引物。

[0031] 进一步,申请还公开了一种判断目标生物样本中产生高油酸表型的方法,该方法包括以下步骤:

[0032] 1) 采用所述的PCR特异性扩增引物对生物样本的基因组DNA进行PCR扩增;

[0033] 2) 采用分子标记KASP-421引物组的判断目标SNP的基因型:如果检测到第+421位碱基只为T,则判定油菜样品的BnAFAD2a为高油酸等位基因,基因型定义为AA,若只为碱基C,则判定该位点为中低油酸等位基因,基因型定义为aa,若检测位点同时检测到T和C,则判定为杂合体,基因型定义为Aa;

[0034] 采用分子标记KASP-1073引物组的判断目标SNP的基因型:如果检测到第+1073位碱基只为A,则判定油菜样品的BnCFAD2a为高油酸等位基因,基因型定义为BB,若只为碱基G,则判定该位点为中低油酸等位基因,基因型定义为bb,若检测位点同时检测到A和G,则判定为杂合体,基因型定义为Bb;

[0035] 3) 将KASP-421和KASP-1073结果结合,若检测样品基因型同时含有两个高油酸等位基因,基因型为AABB,则待测样品为超高油酸单株或株系。

[0036] 优选,所述的扩增体系均为:油菜样品DNA模板(20ng/ μ l) 2.5 μ l, 2 $\times$ KASP Master mix 2.5 μ l, KASP Assay Mix (F-HEX:F-FAM:R=2:2:5的摩尔浓度比) 0.07 μ l;

[0037] PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C 15min; 94 $^{\circ}$ C 20sec, 61-55 $^{\circ}$ C 1min, 每个循环退火温度降低0.6 $^{\circ}$ C, 共10个循环; 94 $^{\circ}$ C 20sec, 55 $^{\circ}$ C 1min, 共26个循环; 若扩增效果不理想可加循环, 每次3个循环, 最多可三次; 反应完成后利用扫描仪Pherastar对KASP反应产物进行荧光数据读取, 荧光扫描的结果会自动转化成图形; 利用BMG PHERAstar仪器检测荧光信号并查看分型情况; 若分型不充分, 则继续扩增, 每3个循环查看分型情况, 直至分型完全。

[0038] 进一步, 申请还公开了一种选育种子中高油酸含量植株的方法, 该方法将所述的核苷酸突变位点BnAfad2a和/或BnCFad2a导入一株植物中, 并采用所述的方法检测目标生物样本。优选, 所述的目标生物样本为该植物或其细胞、植物组织或器官、种子或子代。

[0039] 最优选, 将KASP-421和KASP-1073结果结合, 选择油酸含量大于85%, 基因型为AABB的高油酸材料为父本, 选择综合农艺性状优良的稳定品系为母本, 然后通过杂交、回交、自交, 结合KASP-421和KASP-1073标记辅助选择, 将上述两对新型的BnAfad2a和BnCFad2a复等位基因同时导入到综合农艺性状优良母本材料中。在对后代开展辅助选择育种中, 若检测样品基因型同时含有两个高油酸等位基因, 基因型为AABB, 则待测样品为超高油酸单株或株系, 继续自交后代也将表现持续稳定高油酸; 若测样品基因型为aabb, 自交后代则没有分离出高油酸株系的概率; 若出现某些株系综合农艺性状优良, 油酸含量处于中上水平(75%-80%), 两对分子标记鉴定表型为杂合型, 包括AaBB, Aabb, AaBb, AABb, aaBb, 在这些株系的自交后代中, 可按分离比例放大筛选群体, 可以选择到综合农艺性状优良, 油酸含量大于85% (AABB) 的优良品系。

[0040] 与现有技术相比, 本申请的有益效果:

[0041] 本申请所述的突变位点与已报道的变异位点相比是一类新型的高油酸位点; (2) 所述突变位点指示的油酸含量更高, 两位点同时存在时油酸最高可达88.57%, 超过以往公开的其它位点或分子标记对应的油酸含量; (3) 前期基于BnFAD2基因开发的分子标记, 多数属于与目的基因连锁的分子标记, 存在由于遗传交换而造成的错误鉴定, 本申请提供的

KASP分子标记是基于油菜BnAFAD2和BnCFAD2基因编码区突变位点设计而开发出的功能性标记,能直接反映等位基因,不存在由于遗传交换而造成的错误鉴定。(4) 本申请提供的分子标记能直接对油菜 BnAFAD2基因SNP突变位点的C或T碱基,和BnCFAD2基因SNP突变位点的G或A碱基进行特异的区分和检测。(5) 本申请提供的SNP分子标记的应用方法准确可靠,操作简便,无论从检测通量还是从检测精确度来讲,均优于传统的SSR,CAPS,SCAR等标记适用于油菜高油酸基因型的鉴定及辅助选择育种。(6) 本申请提供的分子标记在实际应用中,低成本、高通量。目前,检测SNP的方法有测序法、DNA芯片、质谱检测法等,而这些方法大多成本高,速度慢。本申请提供的分子标记只需PCR和荧光检测两个步骤,成本低、通量高、加上特异性高,特别适用于育种群体中不同抗性基因型的分类筛选与鉴定。

附图说明

[0042] 图1.本申请在F₂群体中油酸QTL的定位结果。附图标记说明:图3中显示了2016-2017年、2017-2018年、2018-2019年三个自然生产年(甘蓝型油菜为跨年作物)扫描的结果,分别用红、蓝、黑三色线表示,QTL扫描的LOD值阈值为2.5(以线标明);横坐标为甘蓝型油菜不同的染色体,纵坐标为LOD值。目标QTL的贡献率和目标基因信息在QTL峰图上方注明。

[0043] 图2.指示BnAFAD2基因高油酸等位基因与野生型等位基因在SNP变异位点的比较图。方框上面标识的数字为突变核苷酸在对应基因编码区的碱基位置,FC81和E183分别表示高油酸亲本和野生型亲本。

[0044] 图3.指示BnCFAD2基因高油酸等位基因与野生型等位基因在SNP变异位点的比较图。方框上面标识的数字为突变核苷酸在对应基因编码区的碱基位置,FC81和E183分别表示高油酸亲本和野生型亲本。

[0045] 图4.为本申请实施分子标记KASP-431的引物组对一个包含111个株系的F₂分离群体(♀FC81×♂E183)开展于BnAFAD2等位基因分型的散点图。

[0046] 图5.为本申请实施分子标记KASP-1073的引物组对一个包含111个株系的F₂分离群体(♀FC81×♂E183)开展于BnCFAD2等位基因分型的散点图。

[0047] 图6.为本申请实施分子标记KASP-431的引物组对一个包含90个株系的F₂分离群体(♀FC90×♂E121)开展于BnAFAD2等位基因分型的散点图。

[0048] 图7.为本申请实施分子标记KASP-1073的引物组对一个包含90个株系的F₂分离群体(♀FC90×♂E121)开展于BnCFAD2等位基因分型的散点图。

[0049] 生物保藏声明

[0050] 本申请涉及生物保藏,名称:甘蓝型油菜(*Brassica napus*) FC81高油酸株系,保藏编号:CCTCC NO:P201923,保藏时间:2019.12.2,保藏机构:中国典型培养物保藏中心,地址:中国武汉武汉大学。

具体实施方式

[0051] 实施例1、寻找并获得可用指示甘蓝型油菜高油酸性状的基于BnFAD2两个拷贝的新型等位突变。

[0052] (1)我们在前期研究中,以油酸含量87.67%的高油酸纯合株系(FC81,保藏日:

2019.12.2,保藏编号:CCTCC NO:P201923)为母本,以油酸含量63.56%的中低油酸纯合株系(E183,常规现有品种)为父本,杂交获得F₂分离群体。从上述F₂分离群体以及双亲的鲜嫩叶片中提取基因组DNA,具体制备方法参照李佳等(李佳等,一种有效提取油菜叶片总DNA的方法,华中农业大学学报,1994,13(5):521-523)报道的方法进行,用1%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,并用紫外分光光度计(型号:Pharmacia Biotech, Gene QuantII)检测DNA浓度。

[0053] (2) 油酸含量的测定:种子按单株收获后用气相色谱仪(HP6890, Germany),分析脂肪酸含量,亲本及后代混合样随机选取30-50粒饱满种子磨碎后倒入10ml试管,在试管中加入1ml乙醚、石油醚(体积比为1:1)混合液,然后再加入等体积的甲醇(含5% KOH)进行酯化反应,静置40分钟以上使其充分反应。最后加蒸馏水定容至10ml萃取,取上部醚层溶液取进样测定。脂肪酸成份用气相色谱法测定,色谱条件如下:

[0054] 色谱仪:Hewlett Packard (HP6890, Germany),氢火焰离子化检测器,手动进样,进样量 0.4ul (半粒分析进样量为0.8ul),分流比1:45;色谱柱HP-inowax19091N-133, 30m×0.25mm×0.25um毛细管柱;检测器和进样室温度分别为250℃和280℃;载气:N₂, 30ml/min,尾吹40ml/min;空气流速:300ml/min;H₂流速:30ml/min;炉温:持续升温, 180℃保持2分钟,之后以10℃/min升至220℃保持并保持7min。脂肪酸成份由峰所在位置的保留时间与标准品对比确定,含量则用面积百分比表示。对测定的数据进行分析 and 整理时考虑了7种主要脂肪酸,即棕榈酸(C16:0)、硬脂酸(C18:0)、油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)、亚麻酸(C18:3)、花生烯酸(C20:1)、芥酸(C22:1)。

[0055] (3) SNP芯片分析两亲本及F₂分离群体的基因型及连锁分析

[0056] 利用Illumina公司研制的60K油菜SNP芯片对油菜两亲本及F₂分离群体DNA样品进行分型。在亲本中筛选到有多态性的SNP位点后,分析其在F₂群体中的分布。通过在F₂代分离群体中的分布进行数据分析,根据连锁交换规律,利用群体基因型资料构建油菜的遗传图谱,所用软件为 Joinmap3.0,最小LOD值设为2.5,获得连锁图谱。将F₂群体的190个单株的油酸含量数据及SNP 基因型输入计算机,运行WinQTLcart4.0软件对数据进行QTL定位。将控制油酸含量的目标基因确定为位于油菜A05染色体的BnAFAD2a和C05染色体的BnCFAD2a(图1)。

[0057] (4) 利用引物对19TA11扩增分析双亲的基因组DNA

[0058] 利用引物对19TA11(引物对序列见表1)分别用于扩增两个亲本FC81和E183的位于油菜A05染色体的BnAFAD2a和C05染色体的BnCFAD2a。

[0059] PCR体系

	基因组 DNA	1 μ L
	10 $\times$ Buffer	5 μ L
	dNTP Mixture(10mM)	1 μ L
[0060]	Primer F(10 μ M)	1 μ L
	Primer R(10 μ M)	1 μ L
	KOD(1U/ μ L)	1 μ L
	ddH ₂ O	upto50 μ L

[0061] PCR程序

	94 $^{\circ}$ C	5min	
	98 $^{\circ}$ C	30sec	} 32
	56 $^{\circ}$ C	30sec	
[0062]	68 $^{\circ}$ C	3min	
	68 $^{\circ}$ C	5min	
	25 $^{\circ}$ C	1min	

[0063] 扩增产物在水平电泳槽上1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,使用1 $\times$ TAE缓冲液(0.04MTris-acetate, 0.001MEDTA,pH8.0),电压8V/cm,电泳35min。电泳完毕,凝胶成像系统(UVP)拍照保存。

[0064] 表1

	引物名称	序列(5' -3')
[0065]	19TA11-F	TCTCGAGCTTTCGCGAGCTCATGGGTGCAGGTGGAAGAAT
	19TA11-R	AGGTCGACTCTAGAGGATCCTCATAACTTATTGTTGTACCAG

[0066] (5) 回收、克隆双亲中的BnAFAD2a和BnCFAD2a

[0067] 回收上述步骤中获得的引物对19TA11在甘蓝型油菜亲本中扩增的DNA片段。操作程序按 Gen Clean柱式DNA胶回收试剂盒(购自上海捷瑞生物工程公司)说明书提供的方法:用刀片从 1.0%的琼脂糖胶上挖出扩增的DNA片段,放入1.5ml的离心管,按每100mg琼脂糖凝胶加入300 μ l Binding SolutionB,置于55 $^{\circ}$ C水浴中加热10min,每隔2min混匀一次;将融化的胶溶液转移至套在收集管内的Gen Clean Column中,室温放置2min,3,000rpm离心30sec;倒掉收集管中的废液,加入500 μ l Wash Solution,8,000rpm室温离心30sec,此步骤重复一次;倒掉收集管中的废液,将Gen Clean Column放入同一个收集管中,10,000rpm离心1min将Gen Clean Column放入一根新的1.5ml的离心管中,在柱子膜中央加30 μ l Elution Buffer,室温放置2min; 10,000rpm离心1min,离心管中的液体即为回收的DNA片段,可立即使用或保存于-20 $^{\circ}$ C备用。

[0068] 将回收的目标DNA片段连接在pMDT-18载体上(该载体购自TaKaRa公司,宝生物工程(大连)有限公司代理)。操作程序按该试剂盒的说明书介绍的方法:试剂在使用前先短

暂离心将其收集在管底部;在0.5ml的离心管中进行连接反应,连接反应体系为DNA2.0 μ l, pMDT-18载体0.5 μ l和Solution I 2.5 μ l。用移液管来回吸几次混匀,置4℃冰箱进行过夜连接反应;准备LB 液体培养基和LB固体培养基(含100mg/ml氨苄青霉素,24mg/ml的异丙基-硫代B-D-半乳糖苷和 20mg/ml的5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-半乳糖苷);从-70℃冰箱中取出感受态细胞放在冰上待它慢慢解冻(约5min);离心收集连接反应液,取2 μ l反应液加入到一个已经灭菌的1.5ml离心管(放在冰上预冷);用手指轻弹装有感受态细胞的管底以混匀,取50 μ l感受态细胞加入装有2 μ l连接反应液的1.5ml离心管,用手指轻弹混匀,放在冰上20min;在42℃水浴中热激90sec(勿摇动),然后在冰上放置5min;加500 μ l的LB液体培养基后在37℃振荡培养1h(150rpm/min);吸取振荡培养后的转化液200 μ l涂在无菌的LB固体培养基上,在37℃放置16-20h;进行蓝、白斑筛选,挑选24个阳性克隆进行编号,并在无菌的液体LB培养基(含50 μ g/ml的氨苄青霉素)振荡培养16-20h;取振荡培养后的菌液2 μ l作PCR模板,用M13作引物(正向引物:5'-CAGGGTTTTCCAGTCACGA-3';反向引物:5'-CGGATAACAATTTTCACACAGGA-3')扩增,PCR反应如上述步骤所述。扩增结果在1.0%的琼脂糖凝胶上检测。如果所得的DNA片段比目标DNA片段大200bp左右,说明转化成功,选8份转化成功的菌液各吸取100 μ l送华大基因科技股份有限公司进行序列测定。剩余400 μ l浑浊菌液加400 μ l 50%无菌的甘油在2ml无菌的离心管中于-70℃编号保存。

[0069] 本申请中,引物对19TA11在甘蓝型油菜两亲本中扩增的DNA片段进行各15次重复测序。引物对19TA11的扩增BnAFAD2a和BnCFAD2a基因编码序列长度均为1155bp。两亲本在位于甘蓝型油菜A05染色体的BnAFAD2a核苷酸序列421处发生了C至T的置换,即:C421T;在位于甘蓝型油菜C05染色体的BnAFAD2a核苷酸序列1073处发生了G至A的置换,即:G1073A。通过与前期研究中报道的BnFAD2基因进行序列比对,发现本申请提供的位于油菜A05染色体的BnAfad2a和C05 染色体的BnCfad2a的高油酸复等位基因为新型的变异,所述基因的核苷酸序列如SEQIDNO:1 和IDNO:2所述,蛋白质序列如SEQIDNO:3和IDNO:4。

[0070] 实施例2、开发了可用于检测油菜BnFAD2基因一类新型高油酸等位突变的SNP标记。

[0071] 以上述基因编码区的SNP位点为中心提取两侧100bp侧翼序列,并结合克隆获得的nAFAD2a 和BnCFAD2a的序列差异设计引物特异扩增BnAFAD2a和BnCFAD2a基因序列片段,用于排除同源基因序列对检测产生的干扰。实验设计多个引物组,每组引物由三条引物组成。经过多次多态性筛选获得,并在多个分离群体中经多次测试验证,标记KASP-421和KASP-1073扩增效果最佳,可以明显区分出野生型和高油酸突变型在BnAFAD2a和BnCFAD2a的SNP变异。两对KASP标记均含有三条引物,分别包含两条针对关键位点碱基差异设计的特异性引物,一条通用引物。KASP-421的两条特异性引物3'末端为等位变异碱基C/T,5'端连接英国LGC(Laboratory of the Government Chemist)公司KASP反应试剂特定的FAM和HEX荧光接头序列。KASP-1073的两条特异性引物3'末端为等位变异碱基G/A,5'端连接英国LGC(Laboratory of the Government Chemist)公司KASP反应试剂特定的FAM和HEX荧光接头序列。所有引物委托英国 LGC公司合成。本申请提供的KASP标记引物为以下特异性引物组合:

[0072] 分子标记KASP-421的引物包括:

[0073] 两条特异性引物:

- [0074] Primer_AlleleFAM:5' -gttggaatggtggcgtcgatg-3' ;
- [0075] Primer_AlleleHEX:5' -gtgttggaatggtggcgtcgata-3' ;
- [0076] 一条通用引物
- [0077] Primer_Common:5' -ggacgacaccgtcggcctca-3' ;
- [0078] 分子标记KASP-1073的引物包括:
- [0079] 两条特异性引物:
- [0080] Primer_AlleleFAM:5' -ggtgggttaaggcgatgtggag-3' ;
- [0081] Primer_AlleleHEX:5' -cggtgggttaaggcgatgtggaa-3' ;
- [0082] 一条通用引物
- [0083] Primer_Common:5' -ccggttccacatagatacactcctt-3' 。
- [0084] 实施例3:一种上述的可用于检测油菜BnFAD2基因一类新型高油酸等位突变的SNP标记体系的建立及在甘蓝型油菜高油酸性状辅助育种中的应用。
- [0085] 选取一个包含111个F₂分离株系的F₂群体(♀FC81×♂E183)和一个包含90个F₂分离株系的F₂群体(♀FC90×♂E121,FC90和E121均是常规品种,作为对比使用),利用上述设计的两组KASP引物KASP-421和KASP-1073,在LGCSNP line基因分型平台上进行分离群体初筛与验证。具体操作步骤如下:
- [0086] (1)用常规方法(CTAB法)提取待测材料的叶片基因组DNA;用琼脂糖电泳和Nanodrop2100分别检测所提取DNA的质量,琼脂糖电泳显示DNA条带单一,A260/280介于1.8-2.0之间,A260/230 介于2.0-2.2之间,这样的DNA样品符合质量要求,稀释DNA浓度为20ng/μL备用。
- [0087] (2)以步骤1提取的DNA为模板,采用实施例2开发的可用于检测油菜BnFAD2基因一类新型高油酸等位突变的SNP标记KASP-421和KASP-1073进行扩增PCR,得到扩增产物。
- [0088] KASP标记引物反应体系的配置:
- [0089] 油菜样品DNA模板(20ng/μl) 2.5μl,2×KASPMastermix2.5μl,KASP Assay Mix (F-HEX: F-FAM:R=2:2:5的摩尔浓度比) 0.07μl。
- [0090] PCR反应条件为:94℃15min;94℃20sec,61-55℃1min,每个循环退火温度降低0.6℃,共10个循环;94℃20sec,55℃1min,共26个循环。若扩增效果不理想可加循环,每次3个循环,最多可三次。反应完成后利用扫描仪Pherastar对KASP反应产物进行荧光数据读取,荧光扫描的结果会自动转化成图形。利用BMG PHERAstar仪器检测荧光信号并查看分型情况。若分型不充分,则继续扩增,每3个循环查看分型情况,直至分型完全。KASP-421检测结果中第+421 位碱基为T,则判定油菜样品的BnAFAD2a为高油酸等位基因,基因型定义为AA,若为碱基C,则判定该位点为中低油酸等位基因,基因型定义为aa,若检测位点同时检测到T和C,则判定为杂合体,基因型定义为Aa。采用分子标记KASP-1073引物组的判断目标SNP的基因型:如果检测到第+1073位碱基只为A,则判定油菜样品的BnCFAD2a为高油酸等位基因,基因型定义为 BB,若只为碱基G,则判定该位点为中低油酸等位基因,基因型定义为bb,若检测位点同时检测到A和G,则判定为杂合体,基因型定义为Bb。
- [0091] 表2KASP标记KASP-421和KASP-1073初筛分离群体分型结果

[0092]

序号	株系名称	群体来源	KASP-421	KASP-1073	油酸含量(%)
1	6-3	♀FC81×♂E183	Aa	bb	74.58
2	6-4	♀FC81×♂E183	aa	Bb	72.57
3	6-6	♀FC81×♂E183	Aa	BB	80.33
4	6-9	♀FC81×♂E183	AA	BB	86.68
5	6-12	♀FC81×♂E183	AA	BB	84.4
6	6-13	♀FC81×♂E183	aa	Bb	70.93
7	6-18	♀FC81×♂E183	aa	BB	78.5
8	6-22	♀FC81×♂E183	AA	BB	85.92
9	6-23	♀FC81×♂E183	Aa	BB	80.44
10	6-24	♀FC81×♂E183	AA	Bb	81.97
11	6-25	♀FC81×♂E183	Aa	BB	78.1
12	6-26	♀FC81×♂E183	aa	Bb	67.55
13	6-27	♀FC81×♂E183	AA	BB	85.41
14	6-34	♀FC81×♂E183	AA	Bb	83.2
15	6-35	♀FC81×♂E183	Aa	bb	67.59
16	6-38	♀FC81×♂E183	Aa	BB	80.94
17	6-43	♀FC81×♂E183	aa	bb	69.83
18	6-48	♀FC81×♂E183	Aa	Bb	77.68
19	6-49	♀FC81×♂E183	aa	Bb	74.14
20	6-50	♀FC81×♂E183	aa	bb	63.07
21	6-103	♀FC81×♂E183	Aa	bb	71.65

[0093]

22	6-104	♀FC81×♂E183	Aa	BB	82.9
23	6-106	♀FC81×♂E183	Aa	BB	80.09
24	6-107	♀FC81×♂E183	AA	Bb	83.22
25	6-108	♀FC81×♂E183	AA	BB	87.19
26	6-109	♀FC81×♂E183	AA	bb	78.51
27	6-112	♀FC81×♂E183	Aa	bb	75.67
28	6-114	♀FC81×♂E183	aa	bb	63.99
29	6-115	♀FC81×♂E183	Aa	BB	81.28
30	6-116	♀FC81×♂E183	aa	Bb	69.79
31	6-120	♀FC81×♂E183	Aa	bb	74.69
32	6-122	♀FC81×♂E183	AA	Bb	83.42
33	6-125	♀FC81×♂E183	aa	Bb	72.97
34	6-126	♀FC81×♂E183	Aa	bb	74.98
35	6-128	♀FC81×♂E183	AA	bb	79.31
36	6-131	♀FC81×♂E183	AA	Bb	82.83
37	6-132	♀FC81×♂E183	Aa	Bb	76.08
38	6-133	♀FC81×♂E183	AA	Bb	82.84
39	6-137	♀FC81×♂E183	aa	bb	71.87
40	6-139	♀FC81×♂E183	Aa	BB	80.44
41	6-141	♀FC81×♂E183	AA	Bb	82.16
42	6-142	♀FC81×♂E183	AA	Bb	82.58
43	6-143	♀FC81×♂E183	AA	Bb	82.61
44	6-146	♀FC81×♂E183	Aa	Bb	77.95
45	6-158	♀FC81×♂E183	AA	Bb	81.18
46	6-159	♀FC81×♂E183	AA	BB	87.13
47	6-160	♀FC81×♂E183	Aa	BB	77.79
48	6-166	♀FC81×♂E183	Aa	Bb	76.94
49	6-168	♀FC81×♂E183	Aa	BB	80.92
50	6-169	♀FC81×♂E183	AA	BB	87
51	6-171	♀FC81×♂E183	aa	Bb	68.53
52	6-178	♀FC81×♂E183	AA	BB	86.86
53	6-181	♀FC81×♂E183	Aa	BB	80.78
54	6-185	♀FC81×♂E183	AA	bb	81.23
55	6-188	♀FC81×♂E183	aa	bb	67.45
56	6-190	♀FC81×♂E183	Aa	BB	78.2
57	6-193	♀FC81×♂E183	AA	Bb	83.35

[0094]

58	6-196	♀FC81×♂E183	aa	bb	66.12
59	6-204	♀FC81×♂E183	aa	Bb	69.11
60	6-208	♀FC81×♂E183	Aa	bb	74.85
61	6-209	♀FC81×♂E183	aa	Bb	63.29
62	6-213	♀FC81×♂E183	AA	Bb	81.78
63	6-214	♀FC81×♂E183	Aa	Bb	77.59
64	6-216	♀FC81×♂E183	Aa	bb	72.31
65	6-217	♀FC81×♂E183	aa	Bb	69.3
66	6-221	♀FC81×♂E183	AA	Bb	83.2
67	6-222	♀FC81×♂E183	Aa	BB	81.27
68	6-224	♀FC81×♂E183	Aa	BB	80.29
69	6-225	♀FC81×♂E183	AA	Bb	82.99
70	6-226	♀FC81×♂E183	AA	Bb	81.17
71	6-227	♀FC81×♂E183	aa	bb	65.41
72	6-229	♀FC81×♂E183	aa	Bb	69.75
73	6-230	♀FC81×♂E183	Aa	BB	80.82
74	6-233	♀FC81×♂E183	Aa	Bb	73.53
75	6-236	♀FC81×♂E183	aa	bb	65.59
76	6-239	♀FC81×♂E183	aa	Bb	68.54
77	6-241	♀FC81×♂E183	Aa	Bb	75.87
78	6-243	♀FC81×♂E183	Aa	bb	69.16
79	6-250	♀FC81×♂E183	AA	Bb	83.54
80	6-251	♀FC81×♂E183	Aa	BB	83.27
81	6-252	♀FC81×♂E183	aa	Bb	68.57
82	6-256	♀FC81×♂E183	Aa	Bb	75.96
83	6-257	♀FC81×♂E183	Aa	BB	75.23
84	6-258	♀FC81×♂E183	AA	BB	86.77
85	6-260	♀FC81×♂E183	aa	Bb	66.79
86	6-261	♀FC81×♂E183	Aa	BB	78.14
87	6-262	♀FC81×♂E183	AA	Bb	83.03
88	6-269	♀FC81×♂E183	Aa	BB	81.58
89	6-271	♀FC81×♂E183	aa	bb	66.35
90	6-272	♀FC81×♂E183	AA	Bb	80.46
91	6-276	♀FC81×♂E183	AA	BB	86.91
92	6-277	♀FC81×♂E183	Aa	Bb	76.45
93	6-282	♀FC81×♂E183	Aa	bb	72.77

[0095]	94	6-287	♀FC81×♂E183	aa	bb	69.94
	95	6-292	♀FC81×♂E183	AA	Bb	82.92
	96	6-294	♀FC81×♂E183	Aa	BB	81.97
	97	6-301	♀FC81×♂E183	Aa	BB	63.2
	98	6-302	♀FC81×♂E183	aa	bb	65.99
	99	6-304	♀FC81×♂E183	aa	bb	59.39
	100	6-633	♀FC81×♂E183	AA	Bb	83.87
	101	6-636	♀FC81×♂E183	Aa	BB	81.93
	102	6-638	♀FC81×♂E183	AA	Bb	83.45
	103	6-642	♀FC81×♂E183	AA	Bb	84.37
	104	6-643	♀FC81×♂E183	aa	Bb	69.76
	105	6-647	♀FC81×♂E183	aa	Bb	71.39
	106	6-653	♀FC81×♂E183	AA	BB	87.18
	107	6-661	♀FC81×♂E183	AA	bb	75.49
	108	6-667	♀FC81×♂E183	AA	Bb	84.03
	109	6-679	♀FC81×♂E183	Aa	BB	82.91
	110	6-682	♀FC81×♂E183	AA	BB	88.57
	111	6-690	♀FC81×♂E183	Aa	BB	83.22
	112	4-11	♂E183	aa	bb	58.75
	113	4-16	♂E183	aa	bb	57.82
	114	4-28	♂E183	aa	bb	55.5
	115	5-2	♀FC81	AA	BB	88.03
	116	5-15	♀FC81	AA	BB	87.3
	117	5-18	♀FC81	AA	BB	86.29
	118	3-5	♀FC90×♂E121	aa	bb	69.66
	119	3-9	♀FC90×♂E121	aa	bb	64.31
	120	3-10	♀FC90×♂E121	aa	bb	68.2
	121	3-13	♀FC90×♂E121	AA	bb	81.74
	122	3-14	♀FC90×♂E121	aa	bb	71.66
	123	3-15	♀FC90×♂E121	Aa	bb	77.1
	124	3-17	♀FC90×♂E121	aa	bb	71.52
	125	3-21	♀FC90×♂E121	AA	bb	82.35
	126	3-23	♀FC90×♂E121	Aa	bb	76.99
	127	3-25	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.67
	128	3-26	♀FC90×♂E121	AA	bb	82.1
	129	3-29	♀FC90×♂E121	Aa	bb	75.31

[0096]

130	3-31	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.12
131	3-32	♀FC90×♂E121	AA	bb	81.51
132	3-33	♀FC90×♂E121	AA	bb	79.14
133	3-34	♀FC90×♂E121	Aa	bb	77.6
134	3-38	♀FC90×♂E121	aa	bb	65.07
135	3-40	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.54
136	3-43	♀FC90×♂E121	AA	bb	82.95
137	3-44	♀FC90×♂E121	Aa	bb	76.81
138	3-45	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.08
139	3-47	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.07
140	3-48	♀FC90×♂E121	AA	bb	81.21
141	3-49	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.23
142	3-50	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.01
143	3-84	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.91
144	3-104	♀FC90×♂E121	Aa	bb	76.49
145	3-106	♀FC90×♂E121	Aa	bb	77.41
146	3-107	♀FC90×♂E121	AA	bb	81.02
147	3-112	♀FC90×♂E121	AA	bb	81.45
148	3-116	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.49
149	3-117	♀FC90×♂E121	Aa	bb	75.17
150	3-119	♀FC90×♂E121	aa	bb	64.47
151	3-121	♀FC90×♂E121	AA	bb	82.06
152	3-124	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.88
153	3-129	♀FC90×♂E121	aa	bb	71.24
154	3-132	♀FC90×♂E121	Aa	bb	76.6
155	3-134	♀FC90×♂E121	Aa	bb	77.69
156	3-137	♀FC90×♂E121	Aa	bb	75.95
157	3-138	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.09
158	3-141	♀FC90×♂E121	AA	bb	77.49
159	3-143	♀FC90×♂E121	AA	bb	77.27
160	3-147	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.46
161	3-150	♀FC90×♂E121	Aa	bb	77.96
162	3-151	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.12
163	3-154	♀FC90×♂E121	Aa	bb	76.26
164	3-158	♀FC90×♂E121	AA	bb	81.07
165	3-163	♀FC90×♂E121	aa	bb	67.22

[0097]

166	3-173	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.78
167	3-177	♀FC90×♂E121	aa	bb	69.58
168	3-179	♀FC90×♂E121	aa	bb	63.56
169	3-180	♀FC90×♂E121	aa	bb	66.79
170	3-184	♀FC90×♂E121	aa	bb	68.07
171	3-185	♀FC90×♂E121	Aa	bb	74.62
172	3-189	♀FC90×♂E121	aa	bb	69.9
173	3-198	♀FC90×♂E121	Aa	bb	73.91
174	3-202	♀FC90×♂E121	AA	bb	77.21
175	3-203	♀FC90×♂E121	aa	bb	61.63
176	3-204	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.37
177	3-205	♀FC90×♂E121	Aa	bb	75.54
178	3-207	♀FC90×♂E121	Aa	bb	74.08
179	3-208	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.77
180	3-213	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.77
181	3-217	♀FC90×♂E121	AA	bb	82.21
182	3-218	♀FC90×♂E121	Aa	bb	76.42
183	3-220	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.26
184	3-221	♀FC90×♂E121	aa	bb	71.4
185	3-228	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.78
186	3-230	♀FC90×♂E121	AA	bb	81.86
187	3-232	♀FC90×♂E121	aa	bb	70.35
188	3-239	♀FC90×♂E121	Aa	bb	75.72
189	3-233	♀FC90×♂E121	AA	bb	76.53
190	3-240	♀FC90×♂E121	aa	bb	69.02
191	3-242	♀FC90×♂E121	Aa	bb	75.22
192	3-248	♀FC90×♂E121	Aa	bb	74.93
193	3-252	♀FC90×♂E121	AA	bb	81.18
194	3-253	♀FC90×♂E121	AA	bb	80.42
195	3-255	♀FC90×♂E121	Aa	bb	76.18
196	3-260	♀FC90×♂E121	AA	bb	77.51
197	3-262	♀FC90×♂E121	Aa	bb	75.36
198	3-263	♀FC90×♂E121	Aa	bb	75.12
199	3-265	♀FC90×♂E121	Aa	bb	73.98
200	3-269	♀FC90×♂E121	aa	bb	71.02
201	3-270	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.6

[0098]	202	3-271	♀FC90×♂E121	Aa	bb	76.33
	203	3-272	♀FC90×♂E121	Aa	bb	75.76
	204	3-275	♀FC90×♂E121	AA	bb	79.81
	205	3-277	♀FC90×♂E121	Aa	bb	76.68
	206	3-278	♀FC90×♂E121	AA	bb	78.28
	207	3-279	♀FC90×♂E121	aa	bb	70.13

[0099] 表3两个F₂群体中KASP421和KASP1073的基因型与油酸含量

	群体	基因型	株系数目(个)	平均油酸 含量(%)	最高油 酸含量	最小油 酸含量
					含量 (%)	含量 (%)
[0100]	♀FC81×♂ E183+	AABB	12	86.75	88.57	84.4
		AABb	23	82.9	84.37	80.46
		AAbb	4	78.64	81.23	75.49
		AaBB	24	79.84	83.27	63.2
		AaBb	9	76.45	77.95	73.53
		Aabb	11	73.34	78.5	67.59
	♀FC90×♂ E121	aaBb	16	69.94	74.14	66.79
		aabb	15	66	69.94	59.39
		AAbb	42	79.89	82.95	76.53
		Aabb	28	75.97	77.96	73.91
		aabb	20	68.24	71.66	61.63

[0101] 由以上数据可知,标记KASP-421和KASP-1073能够用于精准检测这类新型的高油酸等位变异,后代基因型扩增分型效果良好,具有KASP-421这个位点中的T碱基的等位基因以及 KASP-1073这个位点中的A碱基的等位基因,属于高油酸等位基因,如果材料同时聚合KASP-421 这个位点中的T碱基和KASP-1073这个点中的A碱基,油酸含量表型为超高油酸含量,表型值可超过88%。

[0102] 以上为对本申请实施例的描述,通过对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本申请。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的。本文中所定义的一般原理可以在不脱离本申请的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本申请将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖点相一致的最宽的范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 浙江省农业科学院
- [0003] <120> 一种新型的油菜BnFAD2基因高油酸等位突变及其SNP标记引物的开发和应用
- [0004] <160> 12
- [0005] <170> SIP0SequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 1155
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 甘蓝型油菜 (*Brassica napus*)
- [0010] <400> 1
- [0011] atgggtgcag gtggaagaat gcaagtgtct cctccctcca aaaagtctga aaccgacaac 60
- [0012] atcaagcgcg taccctgcga gacaccgccc ttactgtcg gagaactcaa gaaagcaatc 120
- [0013] ccaccgcaact gtttcaaacg ctgatccct cgctctttct cctacctcat ctgggacatc 180
- [0014] atcatagcct cctgcttcta ctacgtcgcc accacttact tccctctcct ccctcaccct 240
- [0015] ctctcctact tcgcctggcc tctctactgg gcctgccagg gctgcgtcct aaccggcgtc 300
- [0016] tgggtcatag cccacgagtg cggccaccac gccttcagcg actaccagtg gctggacgac 360
- [0017] accgtcggcc tcacttcca ctcttctc ctcgtccctt acttctctg gaagtacagt 420
- [0018] tatcgacgcc accattccaa cactggctcc ctgagagag acgaagtgtt tgtccccaag 480
- [0019] aagaagtcag acatcaagtg gtacggcaag tacctcaaca accctttggg acgcaccgtg 540
- [0020] atgttaacgg ttcagttcac tctcggtcgg cttttgtact tagccttcaa cgtctcgggg 600
- [0021] agaccttacg acggcggtt cgcttgccat ttccaccca acgtcccat ctacaacgac 660
- [0022] cgtgagcgtc tccagatata catctccgac gctggcatcc tcgccgtctg ctacggtctc 720
- [0023] taccgtacg ctgctgtcca aggagtggc tcgatggctt gcttctacgg agttcctctt 780
- [0024] ctgattgtca acgggttctt agttttgatc acttacttgc agcacacgca tccttccctg 840
- [0025] cctcactatg actcgtctga gtgggattgg ttgaggggag ctttgccac cgttgacaga 900
- [0026] gactacggaa tcttgaacaa ggtcttccac aatatcacgg acacgcacgt ggcgcatcac 960
- [0027] ctgttctcga ccatgccgca ttatcatgcg atggaagcta cgaaggcgat aaagccgata 1020
- [0028] ctgggagagt attatcagtt cgatgggacg ccggtggtta aggcgatgtg gagggaggcg 1080
- [0029] aaggagtgtg tctatgtgga accggacagg caaggtgaga agaaaggtgt gttctgttac 1140
- [0030] aacaataagt tatga 1155
- [0031] <210> 2
- [0032] <211> 1155
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 甘蓝型油菜 (*Brassica napus*)
- [0035] <400> 2
- [0036] atgggtgcag gtggaagaat gcaagtgtct cctccctcca agaagtctga aaccgacacc 60
- [0037] atcaagcgcg taccctgcga gacaccgccc ttactgtcg gagaactcaa gaaagcaatc 120
- [0038] ccaccgcaact gtttcaaacg ctgatccct cgctctttct cctacctcat ctgggacatc 180
- [0039] atcatagcct cctgcttcta ctacgtcgcc accacttact tccctctcct ccctcaccct 240
- [0040] ctctcctact tcgcctggcc tctctactgg gcctgccaag ggtgcgtcct aaccggcgtc 300
- [0041] tgggtcatag cccacgagtg cggccaccac gccttcagcg actaccagtg gcttgacgac 360

[0042]	accgtcggtc tcattttcca ctctttctc ctctccctt acttctctg gaagtacagt 420
[0043]	catcgacgcc accattccaa cactggctcc ctgagagag acgaagtgt tgtccccaag 480
[0044]	aagaagtcag acatcaagt gtacggcaag tacctcaaca accctttggg acgcaccgtg 540
[0045]	atgttaacgg ttcagttcac tctcggtgg ccgttggtact tagccttcaa cgtctcggga 600
[0046]	agaccttacg acggcggtt cgcttgccat ttccaccca acgtcccat ctacaacgac 660
[0047]	cgcgagcgtc tccagatata catctccgac gctggcatcc tcgccgtctg ctacggtctc 720
[0048]	ttccgttacg ccgccgcga gggagtggc tcgatggtct gcttctacgg agtcccgtt 780
[0049]	ctgattgtca atggtttct cgtgttgatc acttacttgc agcacacgca tctttccctg 840
[0050]	cctcactacg attcgtccga gtgggattgg ttgagggag ctttggtac cgttgacaga 900
[0051]	gactacggaa tctgaacaa ggtcttcac aatattaccg acacgcacgt ggcgcatcat 960
[0052]	ctgttttcca cgatgccga ttatcacgc atggaagcta ccaaggcga aaagccgata 1020
[0053]	ctgggagagt attatcagtt cgatgggacg ccggtggta aggcgatgtg gaaggaggcg 1080
[0054]	aaggagtgt tctatgtga accggacagg caagtgaga agaaaggtgt gttctgtac 1140
[0055]	aacaataagt tatga 1155
[0056]	<210> 3
[0057]	<211> 384
[0058]	<212> PRT
[0059]	<213> 甘蓝型油菜(Brassica napus)
[0060]	<400> 3
[0061]	Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Gln Val Ser Pro Pro Ser Lys Lys Ser
[0062]	1 5 10 15
[0063]	Glu Thr Asp Asn Ile Lys Arg Val Pro Cys Glu Thr Pro Pro Phe Thr
[0064]	20 25 30
[0065]	Val Gly Glu Leu Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser
[0066]	35 40 45
[0067]	Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Trp Asp Ile Ile Ile Ala Ser
[0068]	50 55 60
[0069]	Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Thr Tyr Phe Pro Leu Leu Pro His Pro
[0070]	65 70 75 80
[0071]	Leu Ser Tyr Phe Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val
[0072]	85 90 95
[0073]	Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe
[0074]	100 105 110
[0075]	Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser
[0076]	115 120 125
[0077]	Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser Tyr Arg Arg His
[0078]	130 135 140
[0079]	His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys
[0080]	145 150 155 160
[0081]	Lys Lys Ser Asp Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu
[0082]	165 170 175
[0083]	Gly Arg Thr Val Met Leu Thr Val Gln Phe Thr Leu Gly Trp Pro Leu

[0084]	180	185	190
[0085]	Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Gly Gly Phe Ala		
[0086]	195	200	205
[0087]	Cys His Phe His Pro Asn Ala Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu		
[0088]	210	215	220
[0089]	Gln Ile Tyr Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu		
[0090]	225	230	235
[0091]	Tyr Arg Tyr Ala Ala Val Gln Gly Val Ala Ser Met Val Cys Phe Tyr		
[0092]	245	250	255
[0093]	Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr		
[0094]	260	265	270
[0095]	Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp		
[0096]	275	280	285
[0097]	Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile		
[0098]	290	295	300
[0099]	Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His		
[0100]	305	310	315
[0101]	Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala		
[0102]	325	330	335
[0103]	Ile Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Val		
[0104]	340	345	350
[0105]	Val Lys Ala Met Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro		
[0106]	355	360	365
[0107]	Asp Arg Gln Gly Glu Lys Lys Gly Val Phe Trp Tyr Asn Asn Lys Leu		
[0108]	370	375	380
[0109]	<210> 4		
[0110]	<211> 384		
[0111]	<212> PRT		
[0112]	<213> 甘蓝型油菜(Brassica napus)		
[0113]	<400> 4		
[0114]	Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Gln Val Ser Pro Pro Ser Lys Lys Ser		
[0115]	1	5	10
[0116]	Glu Thr Asp Thr Ile Lys Arg Val Pro Cys Glu Thr Pro Pro Phe Thr		
[0117]	20	25	30
[0118]	Val Gly Glu Leu Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Lys Arg Ser		
[0119]	35	40	45
[0120]	Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Ile Trp Asp Ile Ile Ile Ala Ser		
[0121]	50	55	60
[0122]	Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Thr Tyr Phe Pro Leu Leu Pro His Pro		
[0123]	65	70	75
[0124]	Leu Ser Tyr Phe Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Ala Cys Gln Gly Cys Val		
[0125]	85	90	95

[0126]	Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala Phe		
[0127]	100	105	110
[0128]	Ser Asp Tyr Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Ile Phe His Ser		
[0129]	115	120	125
[0130]	Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg His		
[0131]	130	135	140
[0132]	His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro Lys		
[0133]	145	150	155
[0134]	Lys Lys Ser Asp Ile Lys Trp Tyr Gly Lys Tyr Leu Asn Asn Pro Leu		
[0135]	165	170	175
[0136]	Gly Arg Thr Val Met Leu Thr Val Gln Phe Thr Leu Gly Trp Pro Leu		
[0137]	180	185	190
[0138]	Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Gly Gly Phe Ala		
[0139]	195	200	205
[0140]	Cys His Phe His Pro Asn Ala Pro Ile Tyr Asn Asp Arg Glu Arg Leu		
[0141]	210	215	220
[0142]	Gln Ile Tyr Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu		
[0143]	225	230	235
[0144]	Phe Arg Tyr Ala Ala Ala Gln Gly Val Ala Ser Met Val Cys Phe Tyr		
[0145]	245	250	255
[0146]	Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Tyr		
[0147]	260	265	270
[0148]	Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Ser Glu Trp		
[0149]	275	280	285
[0150]	Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Ala Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile		
[0151]	290	295	300
[0152]	Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His		
[0153]	305	310	315
[0154]	Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Ala		
[0155]	325	330	335
[0156]	Ile Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Val		
[0157]	340	345	350
[0158]	Val Lys Ala Met Trp Lys Glu Ala Lys Glu Cys Ile Tyr Val Glu Pro		
[0159]	355	360	365
[0160]	Asp Arg Gln Gly Glu Lys Lys Gly Val Phe Trp Tyr Asn Asn Lys Leu		
[0161]	370	375	380
[0162]	<210> 5		
[0163]	<211> 211		
[0164]	<212> DNA		
[0165]	<213> 甘蓝型油菜 (Brassica napus)		
[0166]	<220>		
[0167]	<221> mutation		

- [0168] <222> (104) .. (104)
- [0169] <223> c为t
- [0170] <400> 5
- [0171] gtgcggccac cacgccttca gcgactacca gtggctggac gacaccgtcg gcctcatctt 60
- [0172] ccactccttc ctctcgtcc ctactcttc ctggaagtac agtcacgac gccaccattc 120
- [0173] caacactggc tccctcgaga gagacgaagt gttgtcccc aagaagaagt cagacatcaa 180
- [0174] gtggtacggc aagtacctca acaaccctt g 211
- [0175] <210> 6
- [0176] <211> 196
- [0177] <212> DNA
- [0178] <213> 甘蓝型油菜 (Brassica napus)
- [0179] <220>
- [0180] <221> mutation
- [0181] <222> (114) .. (114)
- [0182] <223> g为a
- [0183] <400> 6
- [0184] tctgttctcc acgatgccgc attatcacgc gatggaagct accaaggcga taaagccgat 60
- [0185] actgggagag tattatcagt tcgatgggac gccggtggtt aaggcgatgt ggagggaggc 120
- [0186] gaaggagtgt atctatgtgg aaccggacag gcaaggtgag aagaaagggtg tgttcttgta 180
- [0187] caacaataag ttatga 196
- [0188] <210> 7
- [0189] <211> 21
- [0190] <212> DNA
- [0191] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0192] <400> 7
- [0193] gttggaatgg tggcgtcgat g 21
- [0194] <210> 8
- [0195] <211> 23
- [0196] <212> DNA
- [0197] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0198] <400> 8
- [0199] gtgttggaat ggtggcgtcg ata 23
- [0200] <210> 9
- [0201] <211> 20
- [0202] <212> DNA
- [0203] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
- [0204] <400> 9
- [0205] ggacgacacc gtcggcctca 20
- [0206] <210> 10
- [0207] <211> 21
- [0208] <212> DNA
- [0209] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

[0210]	<400> 10
[0211]	ggtggttaag gcgatgtgga g 21
[0212]	<210> 11
[0213]	<211> 22
[0214]	<212> DNA
[0215]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0216]	<400> 11
[0217]	cgggtggttaa ggcgatgtgg aa 22
[0218]	<210> 12
[0219]	<211> 25
[0220]	<212> DNA
[0221]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
[0222]	<400> 12
[0223]	ccggttcac atagatacac tcctt 25

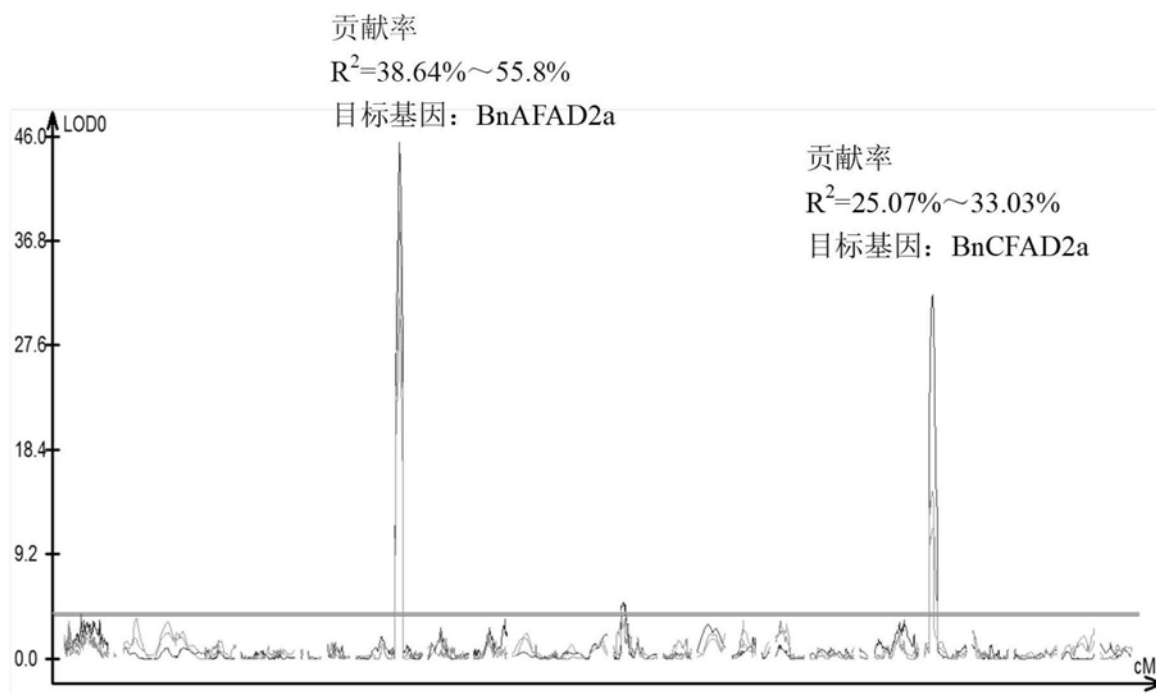


图1

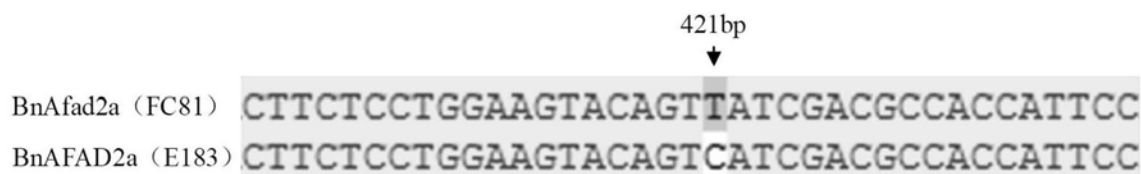


图2

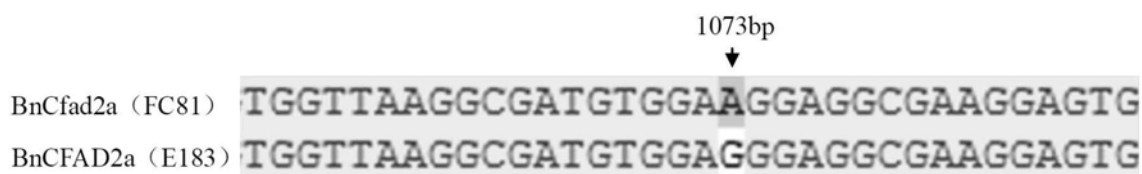


图3

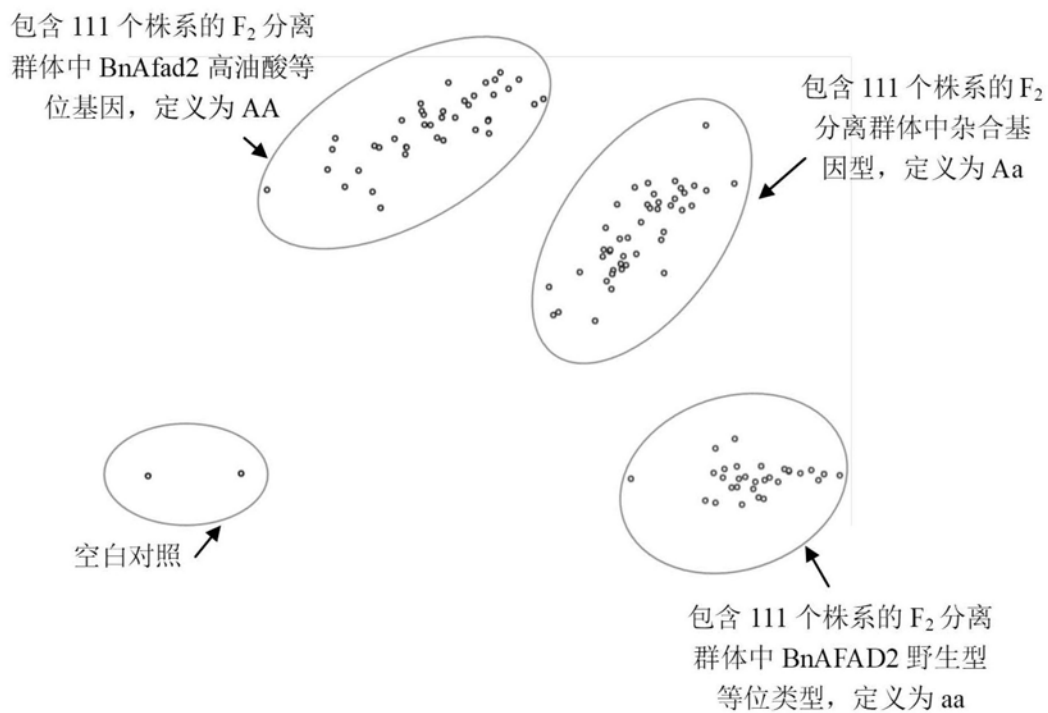


图4

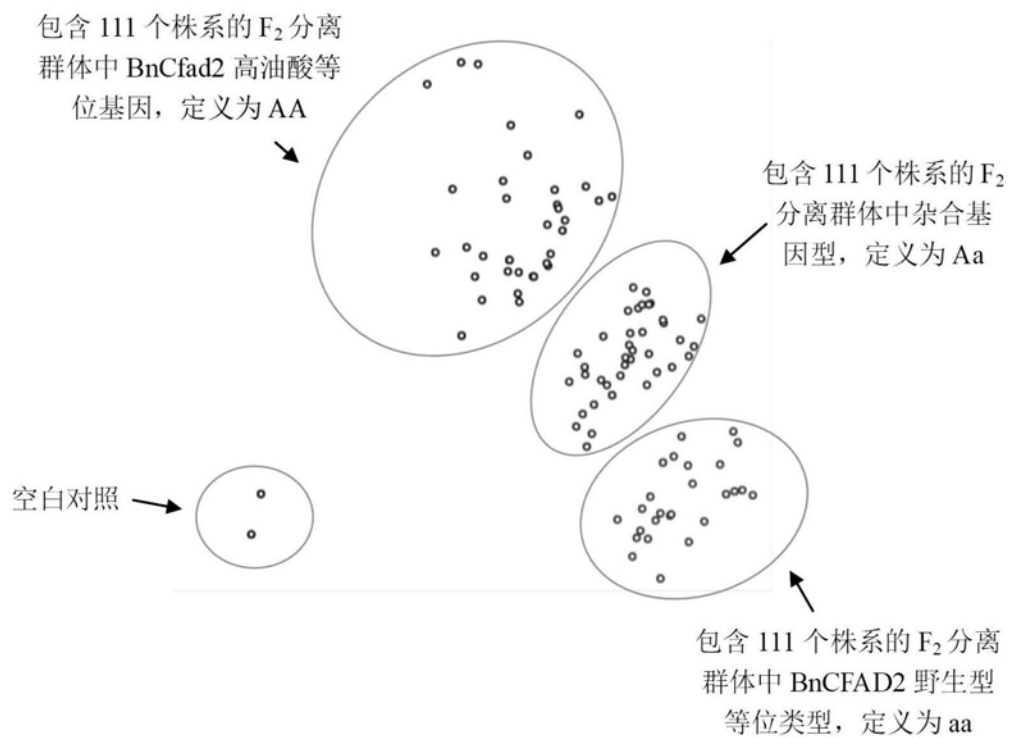


图5

包含 90 个株系的 F_2 分离群体
中 BnAfad2 高油酸等位
类型，定义为 BB

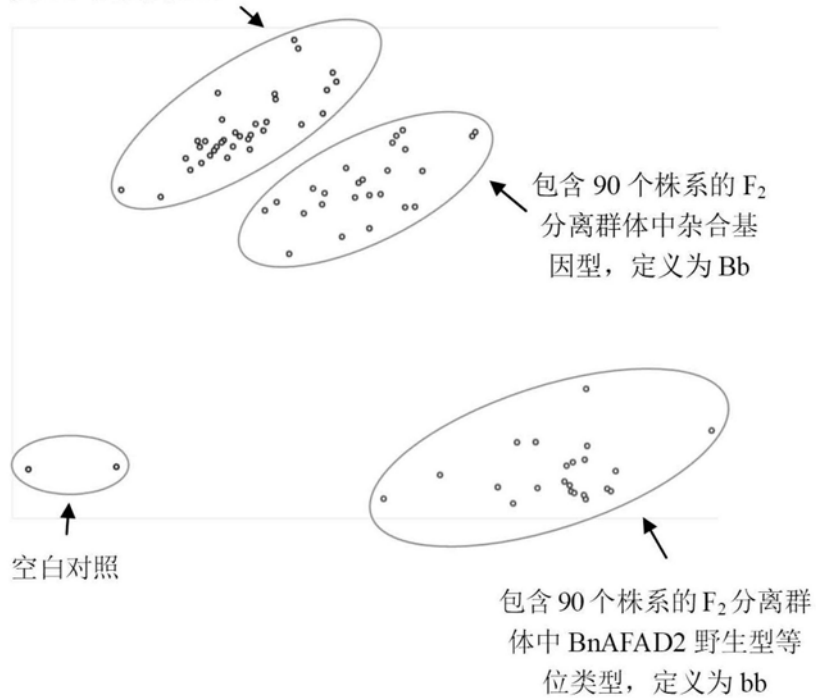


图6

包含 90 个株系的 F_2 分离群体
BnCfad2 高油酸等位类型的对照
亲本，定义为 BB

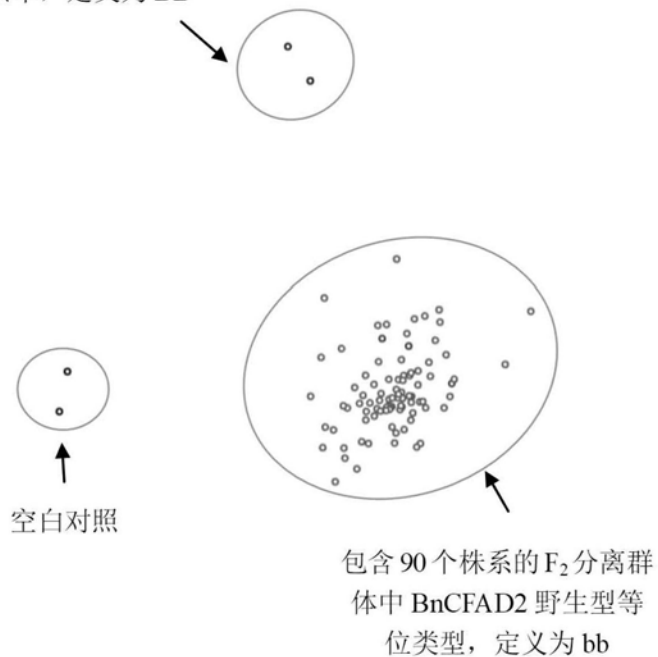


图7