



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106676102 A

(43)申请公布日 2017.05.17

(21)申请号 201710100732.1

(22)申请日 2017.02.23

(71)申请人 中国林业科学研究院亚热带林业研究所

地址 311400 浙江省杭州市富阳区大桥路73号

(72)发明人 林萍 王开良 姚小华 曹永庆

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种与油茶种子油脂中花生烯酸含量相关的SNP分子标记及其应用

(57)摘要

本发明提供一种与油茶种子油脂中花生烯酸含量相关的SNP分子标记及其应用。本发明的SNP分子标记通过核苷酸序列如SEQ ID NO.1-2所示的引物扩增得到,扩增产物含有位于Cofad2-1A基因开放阅读框的573bp处的位点,该位点的多态性为T/G。利用该分子标记对油茶育种材料进行检测,可在苗期预测油茶种子油脂中花生烯酸含量的高低,大大提高了油茶油脂品质育种的选择效率。

1. 一种与油茶种子油脂中花生烯酸含量相关的SNP分子标记,其特征在于,Cofad2-1A基因开放阅读框的573bp处的位点,该位点的多态性为T/G。
2. 如权利要求1所述的SNP分子标记,其特征在于,由核苷酸序列如SEQ ID NO.1-2所示的引物对以油茶基因组DNA为模板经PCR扩增获得。
3. 权利要求1或2所述的SNP分子标记在检测花生烯酸含量高低的油茶中的应用,若该位点的基因型为T/T或T/G,则待鉴定油茶为低花生烯酸含量油茶或候选低花生烯酸含量油茶;若该位点的基因型为G/G,则待鉴定油茶为高花生烯酸含量油茶或候选高花生烯酸含量油茶。
4. 权利要求1或2所述的SNP分子标记在油茶种质资源改良中的应用。
5. 权利要求1或2所述的SNP分子标记在油茶种子油脂品质早期预测中的应用。
6. 用于检测权利要求1或2所述SNP分子标记的基因型的引物对,其特征在于,其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.1-2所示。
7. 含有权利要求6所述引物对的试剂盒。
8. 权利要求6所述的引物对或权利要求7所述的试剂盒在鉴定高含量花生烯酸油茶中的应用。
9. 如权利要求8所述的应用,其特征在于,扩增产物的第573位碱基,若基因型为G/G时,则待鉴定油茶为高含量花生烯酸油茶。

一种与油茶种子油脂中花生烯酸含量相关的SNP分子标记及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,属于油茶分子生物学及遗传育种技术领域,具体涉及一种油茶种子油脂中花生烯酸含量筛选的SNP分子标记,同时还涉及该分子标记在油茶种子油品质育种中的应用。

背景技术

[0002] 油茶(*Camellia oleifera* Abel.),隶属山茶科(Theaceae)山茶属(*Camellia* L.),是我国特有的木本油料树种,也是我国南方重要的木本食用油料物种。油茶籽油营养价值较高,其品质可与橄榄油相媲美,是一种优质的食用油,其不饱和脂肪酸含量达90%以上,以油酸(80%以上)和亚油酸(约8%)为主,且具有抗肿瘤、降血脂等功效。近十年来,在国家政策引导和扶持下,我国油茶产业得到了长足发展,全国种植面积已达6000多万亩,年产油60多万吨。根据《全国油茶产业发展规划(2009~2020)》,至2020年,我国油茶种植面积将达到9300万亩,因此油茶良种苗木需求量很大。目前,油茶育种以选择和杂交育种为主要手段、以产果量为主要育种目的,并已取得了重要进展,但以改良油茶籽油品质为目的的育种研究开展较少。同时,由于油茶童期长的生物特性导致油茶育种年限较长,新品种选育缓慢,良种选育速度还不能满足产业发展的需求,已成为阻碍油茶产业发展的重要因素之一。应用分子标记辅助(MAS)育种手段可从苗期开始选择,大幅缩短育种的进程,对以果实为主要目的的经济林育种优势尤其明显。因此,开展油茶籽油品质MAS育种将有效缩短油茶育种周期,且具有巨大的应用潜力。

[0003] 油茶的分子标记辅助育种研究已有几十年的历史,包括RAPD、ISSR、SRAP等多种分子标记技术,取得了一定的成果。但这些技术均表现出一定的弊端,所获得的多态性标记位点很难真正用于油茶辅助育种。主要弊端包括:1、这些标记均属于显性标记,无法准确的体现多态性位点的基因型;2、这些标记技术对实验操作人员及环境要求较高,实验结果不稳定;3、这些标记技术均是对整个基因组序列进行分析,工作量大,无法将多态性位点精准定位,亦很难筛选到与目的性状紧密连锁的标记;4、传统的数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)作图需要具有亲缘关系的作图群体,油茶童期长的生物特性,使得创建大规模的油茶杂交作图群体耗时长,难度大且需占用大面积林地。因此,以自然群体为研究对象,采用共显性SNPs标记,通过连锁不平衡作图开发与油茶种子油花生烯酸含量关联的多态性位点,筛选可稳定用于早期辅助选择的标记,成为油茶有效的分子标记辅助育种策略。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供了一个与油茶种子油脂中花生烯酸含量极显著关联的分子标记。该标记位于油茶Cofad2-1A基因开放阅读框内,属于共显性的SNP标记,因而可靠且使用方便,这为油茶高品质品系选育提供了极大的便利。

[0005] 本发明的另一个目的是提供了一个与油茶种子油花生烯酸含量显著关联的分子

标记在油茶品质育种中的应用。申请人利用该标记对有性油茶群体进行了辅助选择,结果表明,该位点为T/G或T/T的单株中,60.95%的个体其花生烯酸含量低于群体花生烯酸含量平均值,而基因型为G/G的单株中,75.03%的个体其花生烯酸含量高于群体花生烯酸含量平均值。这表明该标记用于辅助选择是切实有效的。

[0006] 与油茶种子油脂肪酸含量关联位点的开发方法,其原理是油茶是典型的异交物种,连锁不平衡(LD)通常在一个基因范围内迅速消减,因此可以开展重要性状关键基因内的LD作图。油茶优于其他油料的主要特点在于不饱和脂肪酸含量达90%以上,其中油酸含量在74%~87%,亚油酸含量为7%~14%。调控油茶不饱和脂肪酸含量的关键基因已经被分离,作为本发明标记开发的主要区域。在具备产生了大量明显的遗传变异的油茶自然群体的前提下,可有效开展与不饱和脂肪酸含量变异显著相关的标记开发。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术措施:

[0008] (1)在油茶全分布区内广泛收集油茶种质资源,建立种子油脂肪酸含量广泛分离的油茶自然群体,作为关联群体。

[0009] (2)采用KAC法(TaKaRa试剂盒Code No.9768)提取自然群体500个单株的嫩叶总DNA,并用0.8%~1%的琼脂糖凝胶电泳及核酸测定仪测定提取DNA的质量,要求DNA无降解,无蛋白质、多糖等杂质污染,浓度达100ng/ μ L以上。

[0010] (3)采集关联群体500份油茶种质的完全成熟种子,用气象色谱法测定成熟种子油脂的脂肪酸成分含量,包括硬脂酸、软脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、花生烯酸,具体方法按照GB/T 17376《动植物油脂脂肪酸甲酯制备》和GB/T 17377《动植物油脂脂肪酸甲酯的气相色谱分析》执行。

[0011] (4)根据油茶Cofad2-1A基因序列,合成引物P1和P2,序列分别为:5'-ATGGGTGCTGGTGGACGAATG-3'(SEQ ID NO.1)和5'-TTGCATCAGAATCAATACGTG-3'(SEQ ID NO.2),并对样本DNA进行PCR扩增,该扩增产物长度为1160 \pm 3bp。扩增产物琼脂糖凝胶回收后,采用一代测序技术测定核苷酸序列。过程中用到软件包primer5(<http://www.Premier5BioSoft.com>)是免费公开的;主要试剂包括Taq酶、dNTP、琼脂糖、AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒。

[0012] (5)采用多序列比对法,依据最少基因型频率 \geq 5%的原则,筛选序列内的SNP位点,分析测序峰图确定SNP位点基因型。

[0013] (6)将群体的基因型数据输入Structure 2.3.4(<http://pritchardlab.stanford.edu/structure.html>)软件,进行群体遗传结构分析。

[0014] (7)将群体的基因型数据、遗传结构数据、脂肪酸成分含量的表型数据以及Kinship矩阵数据输入TASSEL 5.0(<http://www.maizegenetics.net/tassel>)软件中,采用统一混合模型方法(MLM)分析SNPs标记和脂肪酸含量性状的连锁不平衡性,共检测到了3个与脂肪酸含量显著关联的SNPs。其中SNP01573位点与油茶种子油中花生烯酸含量显著关联(采用Bonferroni多重检验校正, $P < 2.75 \times 10^{-4}$),对表型变异的贡献率为12.36%。

[0015] 利用上述技术措施,本发明最终获得了与油茶种子油花生烯酸含量显著关联的分子标记SNP01573,该标记位于油茶Cofad2-1A基因开放阅读框573bp处,碱基为T/T、T/G或G/G。若假设G/G基因型的基因效应为0,针对油茶种子油花生烯酸含量性状,T/T、T/G的基因效应分别为 -7.4508×10^{-3} 和 -4.202×10^{-3} 。

[0016] 进一步地,本发明的与油茶种子油脂中花生烯酸含量相关的SNP分子标记可以由核苷酸序列如SEQ ID NO.1-2所示的引物对以油茶基因组DNA为模板经PCR扩增获得。

[0017] 本发明提供了上述SNP分子标记在检测花生烯酸含量高低的油茶中的应用,若该位点的基因型为T/T或T/G,则待鉴定油茶为低花生烯酸含量油茶或候选低花生烯酸含量油茶;若该位点的基因型为G/G,则待鉴定油茶为高花生烯酸含量油茶或候选高花生烯酸含量油茶。

[0018] 具体方法为:

[0019] (1) 将待鉴定油茶材料嫩叶提取基因组DNA,采用P1和P2引物对进行PCR扩增,通过琼脂糖凝胶电泳检测并回收所得到的PCR产物;

[0020] (2) 测定PCR产物的碱基序列,并鉴定SNP01573位点的基因型,若该位点的基因型为T/T或T/G,则待鉴定油茶为低花生烯酸含量油茶或候选低花生烯酸含量油茶;若该位点的基因型为G/G,则待鉴定油茶为高花生烯酸含量油茶或候选高花生烯酸含量油茶。

[0021] 所述待鉴定油茶可以为任何育种材料,包括自然群体个体和有性群体个体。

[0022] 上述方法中,提取油茶基因组DNA采用KAC法(TaKaRa试剂盒Code NO.9768)。

[0023] 上述方法中,所述PCR程序为:95℃,3min,1个循环预变性;95℃,15s变性,68℃,45s延伸,40个循环;68℃,5min,1个循环彻底延伸。

[0024] 所述琼脂糖凝胶电泳中,琼脂糖凝胶的浓度为1.2%。胶回收使用AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒。

[0025] 上述方法测定PCR产物的碱基序列,以P1为测序引物,采用一代测序技术。

[0026] 本发明提供了上述SNP分子标记在油茶种质资源改良中的应用。

[0027] 本发明提供了上述SNP分子标记在油茶种子油脂品质早期预测中的应用。

[0028] 本发明提供了用于检测上述SNP分子标记的基因型的引物对,其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.1-2所示。

[0029] 含有SEQ ID NO.1-2所示引物对的试剂盒属于本发明的保护范围。

[0030] 本发明提供了SEQ ID NO.1-2所示的引物对或含有该引物对的试剂盒在鉴定高花生烯酸含量的油茶中的应用。

[0031] 上述应用是采用PCR检测待测油茶基因组DNA,扩增产物(核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示)的第573位碱基,若基因型为G/G时,则待鉴定油茶为高花生烯酸含量的油茶。

[0032] 上述应用中,PCR的反应程序为:95℃3min;95℃15s,68℃45s,共40个循环;68℃5min,1个循环彻底延伸。

[0033] 本发明首次开发了一个与油茶花生烯酸含量关联的SNP位点,可以解释12.36%的花生烯酸含量表型方差。在油茶常规选择育种中,种子油脂成分性状的鉴定需要幼苗造林5-6年才能鉴定,费时费力。本发明中的SNP位点位置明确,检测方法方便快捷,不受环境影响,目的性更强,工作量小,效率更高,成本低。因此,通过检测该SNP位点,可在苗期进行鉴定和辅助筛选,大大节约生产成本和提高选择效率。

附图说明

[0034] 图1油茶自然群体种子油中花生烯酸含量分布图(横坐标表示油茶种子油脂中花生烯酸含量(%),纵坐标表示样品个体数)。结果表明油茶种子油中花生烯酸含量表型呈正

态分布,属于数量性状。

[0035] 图2提取嫩叶总DNA电泳图,每个泳道为一个样品,可见所提取的DNA样品无降解,无蛋白质、多糖等杂质污染,质量较高,可用于后续实验。

[0036] 图3扩增产物测序峰图,由于油茶属于异交物种,杂合度较高,很多位点属于杂合位点,本发明中检测到的SNP位点亦为杂合位点。虚线框内部分即为检测位点,从左至右分别为T/T、T/G(杂合位点)和G/G基因型。

[0037] 图4样本亚群群体结构效应示意图,结果表明本发明所用自然群体所有个体,根据其核苷酸多态性可分为4个亚群。

具体实施方式

[0038] 以下实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的范围。

[0039] 本研究中所用的自然群体材料500份单株,均由中国林业科学研究院亚热带林业研究所木本油料研究组收集、评价,并保存于浙江金华婺城区东方红林场种质资源圃。

[0040] 若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0041] 实施例1油茶种子油脂脂肪酸成分含量分离群体的构建及性状测定

[0042] 本实施例中使用的普通油茶资源收集圃内500份种质资源的自然群体,其起源地涵盖我国油茶主产区的大部分,包括浙江省、湖南省、江西省、广西区、福建省、广东省等。500个体待果实完全成熟后(5%果实开裂),采集种子,提取油脂测定脂肪酸成分及含量。其操作步骤如下:

[0043] (1) 适量油茶种子用烤箱80℃烘烤过夜至恒重,剥去硬种皮。

[0044] (2) 种仁用粉碎机粉碎后,用中速滤纸包好,加入适量乙醚浸泡抽提过夜。

[0045] (3) 待乙醚完全挥发后,利用Agilent6890N气相色谱仪按照GB/T17376-2008、GB/T17377-2008方法测定脂肪酸成分及含量。

[0046] 脂肪酸成分含量测定结果表明:自然群体种子油中花生烯酸含量呈正态分布(图1),说明这个性状具有数量性状特点。

[0047] 实施例2 Cofad2-1A基因片段扩增

[0048] 1、叶片总DNA提取:

[0049] 利用TaKaRa MiniBEST Plant Genomic DNA Extraction Kit中富含多糖、多酚及油脂植物材料裂解系统提取叶片总DNA,具体步骤如下:

[0050] (1) 首先在1.5ml离心管中加入500 μ l的Buffer HS II。取0.1g新鲜叶片加入液氮充分研磨,迅速将研磨好的叶片粉末加入到离心管中充分混匀,然后加入10 μ l的RNaseA(10mg/ml),充分振荡混匀,于56℃水浴温浴10分钟;

[0051] (2) 加入62.5 μ l的Buffer KAC,充分混匀。冰上放置5分钟,12000rpm离心5分钟。取上清,加入与上清液等体积的Buffer GB,充分混匀。

[0052] (3) 将Spin Column安置于收集管上,溶液移至Spin Column中(溶液过多,可分两次过柱,每次过柱的体积量不要超过700 μ l),12000rpm离心1分钟,弃滤液。

[0053] (4) 将500 μ l的Buffer WA加入至Spin Column中,12000rpm离心1分钟,弃滤液。

[0054] (5) 将700 μ l的Buffer WB加入至Spin Column中,12000rpm离心1分钟,弃滤液。

[0055] (6) 重复操作步骤(5)。

[0056] (7) 将Spin Column安置于收集管上,12000rpm离心2分钟。

[0057] (8) 将Spin Column放置于新的1.5ml的离心管上,在Spin Column膜的中央处加入30~50 μ l的Elution Buffer,室温静置5分钟,12000rpm离心2分钟洗脱DNA。用紫外分光光度计测定DNA浓度,于-20 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用(图2)。

[0058] 2、引物的开发和合成:

[0059] 所用引物是根据谭晓风等(谭晓风,陈鸿鹏,张党权等,油茶FAD2基因全长cDNA的克隆和序列分析,林业科学,2008,44(3):70-75)已克隆的油茶Cofad2-1A基因的cDNA序列设计的。具体的开发方法是根据该基因的cDNA序列利用Primer5软件(<http://www.Premier5BioSoft.com>)在起始密码子和终止密码子附近分别设计引物P1(5'-ATGGGTGCTGGTGGACGAATG-3')和P2(5'-TTGCATCAGAATCAATACGTG-3'),以群体个体DNA为模板,扩增Cofad2-1A基因的基因组序列。

[0060] 3、Cofad2-1A基因片段扩增,其流程如下:

[0061] 以提取的所有个体DNA为模板,P1和P2为扩增引物,进行PCR扩增,反应体系:

成分	体积
油茶总 DNA (50ng/ μ l)	2 μ l
P1 (10 mmol/L)	1.6 μ l
P2 (10 mmol/L)	1.6 μ l
2 \times 高保真扩增酶预混液	25 μ l
ddH ₂ O	19.8 μ l
Total	50 μ l

[0064] PCR扩增程序为:

[0065] 95 $^{\circ}$ C, 3min 1个循环 预变性;
 95 $^{\circ}$ C, 15s 变性 }
 68 $^{\circ}$ C, 45s 延伸 } 40个循环
 68 $^{\circ}$ C, 5min 1个循环 彻底延伸。

[0066] 4、扩增片段的凝胶检测和纯化回收并测序、基因分型,按照AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒说明书进行,其流程如下:

[0067] (1) 配制1.2%的琼脂糖凝胶,将50 μ l扩增产物全部上样,电泳电压为5V/cm,电泳约20分钟至上样缓冲液中二甲苯青达到距离凝胶前端1cm处时停止电泳。

[0068] (2) 在紫外灯下切下含有目的DNA的琼脂糖凝胶,用纸巾吸尽凝胶表面的液体并切碎。计算凝胶重量,该重量作为一个凝胶体积(例如100mg=100 μ l体积)。

[0069] (3) 加入3个凝胶体积的Buffer DE-A,混合均匀后于75 $^{\circ}$ C加热,每2~3分钟间断混

合,直至凝胶块完全熔化。

[0070] (4) 加入0.5个Buffer DE-A体积的Buffer DE-B,混合均匀。

[0071] (5) 将上述溶液转移到DNA制备管中,12000rpm离心1分钟,弃滤液。

[0072] (6) 加入500 μ l Buffer W1,12000rpm离心30秒,弃滤液。

[0073] (7) 加入700 μ l Buffer W2,12000rpm离心30秒,弃滤液。以同样的方法再用700 μ l Buffer W2洗涤一次,12000rpm离心1分钟,弃滤液。

[0074] (8) 将制备管放回离心管中,12000rpm离心1分钟。

[0075] (9) 将制备管置于洁净的1.5ml离心管中,在制备膜中央加25~30 μ l去离子水,室温静置1分钟。12000rpm离心1分钟洗脱DNA。

[0076] (10) 凝胶回收DNA,以P1和P2为测序引物,采用一代测序测定扩增产物核苷酸序列。用Chromas软件判读测序峰图上每个SNP位点的基因型(图3)

[0077] 实施例3与油茶种子油脂肪酸含量相关的SNP位点的筛选

[0078] 群体结构分析和连锁不平衡分析,其步骤如下:

[0079] (1) 将所有样本的SNPs位点数据导入Structure2.3.4软件中,设置K=2~9,每K值运行5次,burnin5000次,重复50000次。当LnP(D)和 α 值均保持稳定,且 $\alpha < 0.2$ 时,确定群体结构的K值(图4),本发明中K=4,并确定各个样本的K(4)个亚群效应值(表1)。

[0080] 表1自然群体部分个体的4个亚群效应值

[0081]

样本号	亚群1效应值	亚群2效应值	亚群3效应值	亚群4效应值	样本号	亚群1效应值	亚群2效应值	亚群3效应值	亚群4效应值
1	0.709	0.064	0.15	0.077	232	0.016	0.957	0.012	0.016
2	0.073	0.816	0.084	0.028	233	0.525	0.174	0.271	0.03
3	0.857	0.017	0.09	0.037	252	0.908	0.031	0.022	0.039
4	0.091	0.182	0.013	0.714	297	0.024	0.925	0.014	0.037
8	0.643	0.041	0.224	0.092	298	0.023	0.077	0.071	0.829
9	0.026	0.342	0.608	0.023	299	0.029	0.343	0.166	0.462
10	0.015	0.952	0.017	0.016	300	0.92	0.025	0.031	0.024
11	0.013	0.966	0.007	0.014	501	0.697	0.023	0.104	0.177
12	0.015	0.964	0.007	0.013	530	0.013	0.946	0.022	0.02
15	0.756	0.069	0.076	0.099	531	0.418	0.123	0.366	0.093
16	0.029	0.627	0.008	0.337	534	0.046	0.133	0.03	0.792
17	0.022	0.016	0.024	0.939	536	0.534	0.227	0.075	0.164
18	0.037	0.54	0.061	0.362	539	0.064	0.102	0.143	0.691
19	0.032	0.895	0.054	0.02	540	0.046	0.531	0.37	0.054

[0082]

20	0.01	0.015	0.054	0.92	543	0.446	0.478	0.043	0.034
21	0.013	0.968	0.005	0.014	545	0.054	0.115	0.318	0.514
22	0.543	0.055	0.35	0.052	547	0.046	0.308	0.545	0.101
23	0.008	0.979	0.005	0.008	548	0.019	0.387	0.574	0.02
24	0.624	0.076	0.006	0.294	559	0.032	0.922	0.025	0.02
26	0.019	0.924	0.034	0.022	561	0.047	0.783	0.143	0.027
27	0.045	0.91	0.009	0.035	563	0.011	0.011	0.967	0.011
28	0.904	0.029	0.044	0.023	564	0.012	0.039	0.476	0.473
29	0.01	0.971	0.006	0.013	3001	0.008	0.018	0.018	0.956
30	0.012	0.964	0.005	0.019	3003	0.274	0.48	0.156	0.09
31	0.018	0.902	0.014	0.066	3007	0.013	0.943	0.02	0.024
32	0.022	0.098	0.246	0.635	3009	0.011	0.949	0.015	0.025
40	0.052	0.14	0.045	0.763	3011	0.592	0.143	0.233	0.031
42	0.009	0.806	0.163	0.022	3012	0.027	0.906	0.054	0.013
43	0.02	0.02	0.006	0.954	3014	0.824	0.102	0.021	0.053
44	0.779	0.086	0.089	0.046	3038	0.02	0.194	0.066	0.719
45	0.067	0.072	0.069	0.791	164-1	0.008	0.978	0.005	0.009
46	0.107	0.826	0.011	0.056	213-1	0.735	0.122	0.007	0.137
49	0.013	0.966	0.005	0.016	fy1	0.012	0.026	0.011	0.951
52	0.013	0.971	0.006	0.009	fy2	0.026	0.158	0.049	0.767
53	0.067	0.883	0.011	0.038	fy5	0.011	0.03	0.021	0.938
54	0.508	0.023	0.011	0.458	fy7	0.011	0.953	0.013	0.023
55	0.008	0.023	0.007	0.962	fy9	0.251	0.077	0.566	0.106
56	0.763	0.181	0.017	0.04	bendiCK	0.033	0.681	0.118	0.168
58	0.887	0.084	0.006	0.023	de1	0.516	0.03	0.049	0.405
59	0.015	0.102	0.851	0.032	gan1	0.392	0.183	0.064	0.361
60	0.955	0.031	0.006	0.008	gan12	0.054	0.164	0.145	0.637
61	0.813	0.061	0.031	0.096	gan2	0.015	0.074	0.838	0.073
63	0.911	0.067	0.008	0.013	gan3	0.145	0.087	0.318	0.451
64	0.019	0.011	0.962	0.007	gan5	0.035	0.353	0.595	0.017
65	0.017	0.123	0.839	0.022	gan9	0.033	0.111	0.82	0.036
66	0.008	0.005	0.983	0.004	ganwu2	0.031	0.656	0.175	0.138
67	0.793	0.177	0.017	0.012	gui1	0.036	0.011	0.935	0.017
70	0.409	0.496	0.006	0.089	gui2	0.542	0.05	0.366	0.042
71	0.371	0.032	0.009	0.588	gui3	0.033	0.012	0.937	0.018
73	0.009	0.02	0.007	0.965	gui4	0.052	0.095	0.014	0.839
76	0.014	0.926	0.047	0.013	guiruan2	0.07	0.134	0.738	0.058

[0083]

78	0.492	0.487	0.007	0.015	guiruan23	0.022	0.056	0.079	0.843
81	0.013	0.026	0.01	0.951	guiruan3	0.029	0.905	0.046	0.02
82	0.035	0.853	0.012	0.1	jiangxi23	0.04	0.278	0.098	0.584
86	0.938	0.035	0.013	0.014	min43	0.051	0.651	0.283	0.015
87	0.013	0.622	0.347	0.017	min48	0.011	0.934	0.032	0.023
88	0.238	0.726	0.027	0.009	min60	0.01	0.942	0.03	0.019
90	0.579	0.396	0.011	0.014	minyou1	0.042	0.91	0.031	0.018
91	0.019	0.949	0.015	0.017	minyou10	0.731	0.062	0.074	0.133
94	0.015	0.959	0.006	0.021	minyou11	0.343	0.051	0.298	0.308
95	0.055	0.923	0.007	0.015	minyou2	0.017	0.885	0.042	0.056
96	0.597	0.031	0.083	0.289	minyou3	0.741	0.046	0.057	0.155
97	0.903	0.029	0.008	0.06	minyou4	0.457	0.237	0.251	0.056
98	0.553	0.016	0.007	0.424	minyou43	0.36	0.022	0.577	0.041
99	0.015	0.017	0.006	0.962	minyou48	0.019	0.479	0.384	0.118
100	0.126	0.057	0.019	0.798	minyou5	0.03	0.022	0.42	0.528
101	0.028	0.918	0.016	0.038	minyou6	0.019	0.043	0.022	0.916
106	0.021	0.402	0.007	0.571	minyou60	0.04	0.765	0.032	0.163
114	0.015	0.927	0.029	0.03	minyou7	0.495	0.279	0.206	0.021
119	0.011	0.227	0.012	0.751	minyou8	0.017	0.91	0.024	0.049
145	0.064	0.033	0.485	0.419	minyou9	0.022	0.644	0.114	0.22
151	0.017	0.044	0.007	0.932	tong10	0.875	0.036	0.039	0.05
152	0.016	0.957	0.006	0.02	tong11	0.745	0.094	0.112	0.049
153	0.015	0.02	0.006	0.958	tong12	0.914	0.034	0.025	0.028
155	0.69	0.269	0.026	0.014	tong18	0.044	0.179	0.602	0.175
160	0.341	0.355	0.158	0.146	tong29	0.946	0.02	0.014	0.02
161	0.916	0.058	0.008	0.018	tong3	0.259	0.646	0.032	0.063
162	0.175	0.063	0.241	0.522	tong30	0.881	0.021	0.068	0.03
163	0.138	0.294	0.015	0.553	tong532	0.082	0.556	0.26	0.102
164	0.595	0.26	0.017	0.128	tong38	0.194	0.038	0.099	0.669
165	0.966	0.015	0.007	0.013	tong39	0.083	0.195	0.071	0.65
166	0.563	0.01	0.006	0.422	tong4	0.917	0.021	0.027	0.036
167	0.404	0.016	0.01	0.57	tong40	0.954	0.022	0.013	0.012
168	0.018	0.949	0.006	0.027	tong41	0.034	0.756	0.064	0.146
170	0.564	0.133	0.103	0.199	tong6	0.345	0.016	0.058	0.581
172	0.012	0.753	0.224	0.012	tong9	0.011	0.045	0.03	0.915
173	0.016	0.037	0.008	0.939	wu1	0.048	0.905	0.031	0.016
174	0.034	0.887	0.063	0.016	wu5-2	0.019	0.031	0.015	0.935

[0084]

175	0.007	0.979	0.005	0.01	wupai5	0.026	0.164	0.046	0.765
176	0.019	0.087	0.032	0.863	wuyiwu2	0.024	0.833	0.066	0.078
177	0.028	0.054	0.042	0.876	xiang3	0.017	0.936	0.031	0.017
178	0.012	0.951	0.005	0.032	xiang4	0.011	0.951	0.017	0.021
180	0.093	0.016	0.865	0.026	xiang47	0.087	0.241	0.19	0.482
182	0.012	0.836	0.006	0.146	xiang5	0.126	0.094	0.61	0.171
185	0.444	0.044	0.007	0.505	xiang50	0.015	0.951	0.016	0.018
186	0.338	0.067	0.556	0.039	xiang6	0.052	0.087	0.039	0.822
191	0.018	0.896	0.032	0.055	xiang7	0.082	0.12	0.016	0.782
212	0.037	0.937	0.007	0.02	xiang8	0.138	0.241	0.27	0.351
213	0.556	0.084	0.005	0.355	xiang9	0.056	0.821	0.048	0.075
214	0.1	0.066	0.01	0.824	yajia2	0.019	0.015	0.943	0.023
217	0.693	0.235	0.006	0.066	yajia6	0.375	0.372	0.225	0.027
219	0.051	0.491	0.024	0.434	yajia8	0.412	0.344	0.084	0.159
220	0.052	0.044	0.008	0.896	yawu1	0.033	0.869	0.08	0.018
222	0.01	0.972	0.004	0.013	yawu2	0.018	0.926	0.023	0.033
226	0.013	0.92	0.01	0.058	yawu4	0.016	0.863	0.072	0.049
227	0.301	0.653	0.014	0.032	yawu5-1	0.018	0.937	0.023	0.021
228	0.022	0.613	0.008	0.357	yawu6	0.098	0.031	0.856	0.015
229	0.304	0.657	0.012	0.026	yawu7	0.817	0.034	0.116	0.033

[0085] (2) 将所有样本的SNPs位点数据、K个亚群效应值数据、表型数据(见实施例1)及Kinship矩阵数据导入TASSEL5.0软件中,采用MLM法分析SNPs和脂肪酸含量表型性状之间的相关性,分析SNPs与脂肪酸含量的连锁不平衡性,筛选与不饱和脂肪酸含量显著关联的分子标记,采用Bonferroni多重检验校正,检测到了一个跟花生烯酸含量存在显著关联的位点SNP01573。该标记与花生烯酸含量关联F检验的P值为 1.06×10^{-4} ,对花生烯酸含量差异的贡献率为12.36%。

[0086] 实施例4分子标记SNP01573在高花生烯酸含量油茶育种中的应用

[0087] (1) 选择一个油茶杂交F1代家系群体为材料,采集嫩叶提取总DNA(见实施例2)。

[0088] (2) 利用P1和P2引物对总DNA进行PCR扩增(见实施例2)。

[0089] (3) PCR扩增产物进行凝胶回收纯化和测序分析(见实施例2)。

[0090] (4) 鉴定所有个体SNP01573位点的基因型。若该位点的基因型为T/T或T/G,则油茶个体为低花生烯酸含量油茶或候选低花生烯酸含量油茶;若该位点的基因型为G/G,则油茶个体为高花生烯酸含量油茶或候选高花生烯酸含量油茶。

[0091] (5) 采集所有F1代个体完全成熟种子,测定其种子油的脂肪酸成分和含量(见实施例1)。结果表明(表2),该位点为T/T或T/G的单株中,60.95%的个体其花生烯酸含量低于群体花生烯酸含量平均值(0.50%),而基因型为G/G的单株中,75.03%的个体其花生烯酸含量高于群体花生烯酸含量平均值(0.50%)。这表明该标记用于辅助选择是切实有效的,可用于早期鉴别或辅助鉴别,可大大节约生产成本,提高选择效率,加快油茶茶油品质育种进

程。

[0092] 表2利用SNP01573位点辅助选择得到的F1单株的花生烯酸含量数据

F1 单株 编号	SNP01573 基因型	花生烯酸 C20:1 (%)
1	G/G	0.34
2	G/G	0.37
3	G/G	0.40
4	G/G	0.44
5	G/G	0.47
6	G/G	0.50
7	G/G	0.50
8	G/G	0.50
9	G/G	0.50
10	G/G	0.50
11	G/G	0.50
12	G/G	0.5
13	G/G	0.53
14	G/G	0.53
15	G/G	0.53
16	G/G	0.53
17	G/G	0.55
18	G/G	0.55
19	G/G	0.57
20	G/G	0.60
21	G/G	0.60

[0093]

[0094]

[0095] 虽然,上文已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做出一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的

SEQUENCE LISTING

<110>	中国林科院亚热带林业研究所	
<120>	一种与油茶种子油脂中花生烯酸含量相关的SNP分子标记	
<130>	KHP171110821.2	
<160>	3	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	1	
	atgggtgctg gtggacgaat g	21
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	ttgcatcaga atcaatacgt g	21
<210>	3	
<211>	1160	
<212>	DNA	
<213>	油茶	
<400>	3	
	atgggtgctg gtggacgaat gcctgtccca gcaacaaac atgaacagca gattaccccc	60
	cacagggccc ctcaactcaa gccaccattc actctcgggtg aatcaagaa agccatccca	120
	ccccactgct ttgaacgttc tctcctccgc tcattctect acattgttta tgacttctct	180
	ctcgtctttc ttttctacta cgtcaccacc tttacatcc acctccttcc acagcacttc	240
	cgttatcttg tgtggcccat ctactgggca cttcaagggt gtgtcctcac tgggtgtgtgg	300
	gtcattgctc atgaatgtgg tcaccatgca ttcagtgatt accaatgggt cgatgacacg	360
	gttggtctca tccttcaact caccctttta gtteectact tctcatggaa atacagtca	420
	cgccgtcacc actccaacac cagtteectt gageatgatg aagtttttgt cccgaaacce	480
	aaatccaac tcgcatggta ttccaaatac ttgaacaacc cgggtgggtcg tgttgtcaca	540
	cttgtgatca cactcaactt tggetggecc tettaettgg cttcaatgt atcagggaga	600
	ccttatgate gttttgcatg tcaactacgac ccatatggcc cgatctaca caaccgtgaa	660
	aggetccaga ttacatctc tgatgttgggt atcatcaacta tagtttatgt tctctgtegc	720
	cttgcctttg caaaagggtt ggettggett gtttgtgttt atggggttcc gttactgatt	780
	gtgaacgggt tccttgtctt gatcacattc ctgcagcaca ctcatctgc tctgectcat	840
	tatgactcat cggaatggga ctggctgagg ggagctctgt caaccatgga tagggattat	900

ggagtgctga	acaaggtggt	ccataatatac	acagatactc	atgttgetca	ccacctcttc	960
tctacaatgc	cacattacca	tgcaatggag	gccacaaagg	cgattaagcc	tattctcggg	1020
gagtattacc	tgtttgatgg	tactgcattt	tacaaggcga	tgtggaggga	ggcaagagag	1080
tgtctctacg	tggaatcaga	tgacgatacc	accaccaaag	gtgtatthttg	gtataaaaac	1140
acgtattgat	tctgatgcaa					1160

花生烯酸含量分布图

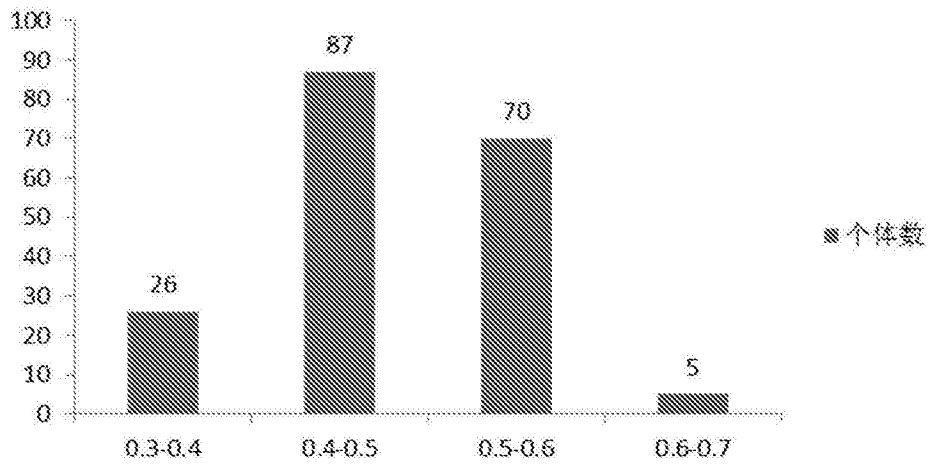


图1

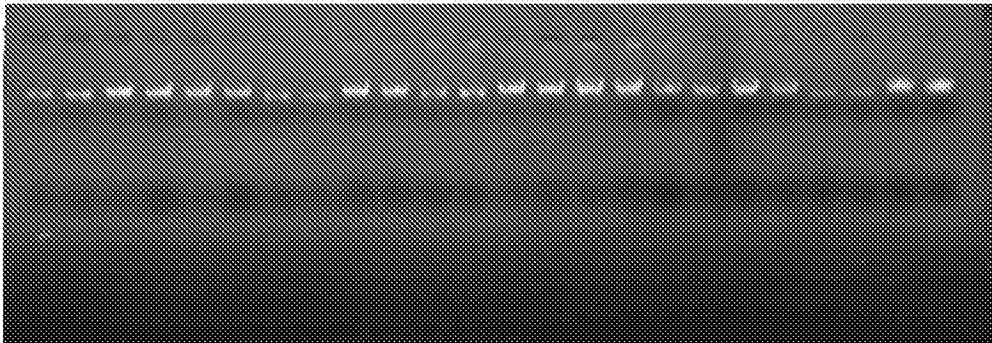


图2

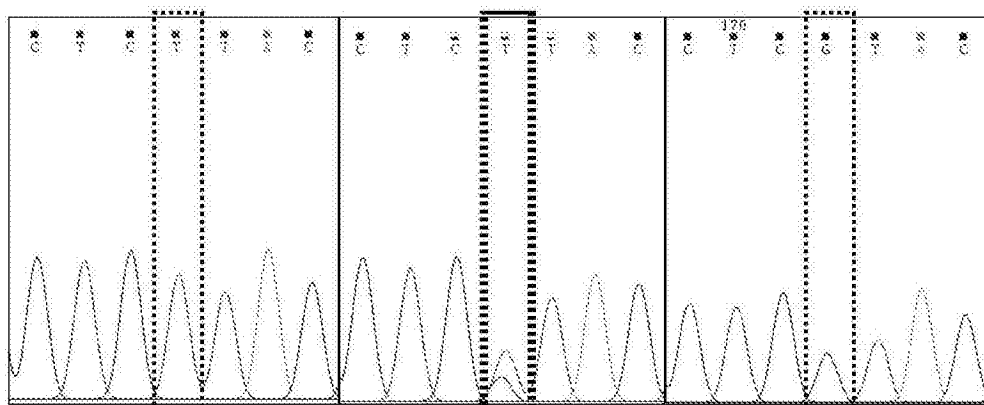


图3

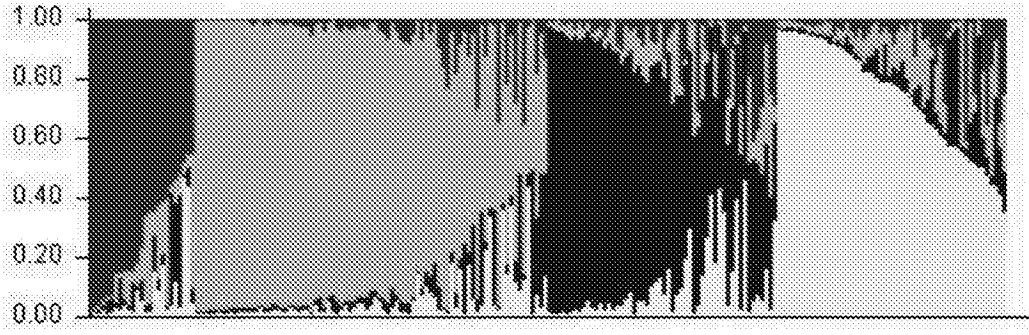


图4