

胡柚新品种01-7的AS-PCR 和dCAPS标记开发与应用

吴伊静¹, 张慧艺¹, 苗长久², 汪丽霞³, 杨兴良³, 陈文博², 徐昌杰^{1,2*}, 陈昆松^{1,2}

(¹浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 杭州 310058; ²浙江省全省园艺作物品质调控重点实验室, 杭州 310058; ³常山县农业特色产业发展中心, 浙江常山 324200)

摘要:【目的】挖掘胡柚新品种01-7和普通胡柚间的差异单核苷酸多态性(SNP),据此开发可区分01-7与其他胡柚的分子标记。**方法**对01-7a和普通胡柚ZZ(祖宗树)进行全基因组重测序,利用生物信息学分析方法挖掘两份材料间的纯合SNP。采用PCR、克隆结合Sanger测序对SNP的正确性进行验证,进而开发等位基因特异PCR(AS-PCR)和衍生酶切扩增多态性(dCAPS)分子标记体系,最后应用12份胡柚材料就AS-PCR和dCAPS分子标记的普适性进行评估。**结果**对01-7a和普通胡柚ZZ重测序原始数据进行过滤,共获得高质量碱基数36.06 Gb。利用生物信息学手段挖掘出一个纯合SNP:Chr1_7111834_G/A。01-7a和普通胡柚ZZ在该SNP位点的基因型分别是A/A和G/G,这一结果得到了经典的基因克隆-Sanger测序确认。基于此SNP开发了AS-PCR和dCAPS分子标记,经对12份胡柚材料测试,表现符合预期:AS-PCR-F1在所有4份01-7中扩增出特异条带,而在其他胡柚材料中无扩增;AS-PCR-F2在01-7中无扩增,在其他胡柚材料(脆红除外)中扩增出特异条带;所有4份01-7材料在dCAPS分析中出现酶切条带,而在其他胡柚材料(脆红除外)中不被酶切。脆红因突变产生天然的酶切识别位点而被酶切。经典的基因克隆-Sanger测序结果确认两种标记正确区分了基因型,并发现脆红有着不同于其他胡柚的分子标记条带是由于它在该SNP位点侧翼还有额外的序列变异。**结论**基于全基因组重测序数据挖掘出01-7a胡柚和普通胡柚ZZ间的一个纯合SNP,据此开发了AS-PCR和dCAPS分子标记,该两标记可区分01-7、脆红、夏红和其他胡柚。

关键词:胡柚;全基因组重测序;SNP;AS-PCR;dCAPS

中图分类号:S666.3

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2024)07-1310-12

Development and application of AS-PCR and dCAPS markers for discriminating new cultivar 01-7 Huyou (*Citrus changshanensis*)

WU Yijing¹, ZHANG Huiyi¹, MIAO Changjiu², WANG Lixia³, YANG Xingliang³, CHEN Wenbo², XU Changjie^{1,2*}, CHEN Kunsong^{1,2}

(¹Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; ²Zhejiang Key Laboratory of Horticultural Crop Quality Improvement, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; ³Changshan Agricultural Characteristic Industry Development Center, Changshan 324200, Zhejiang, China)

Abstract:【Objective】Huyou (*Citrus changshanensis* K. S. Chen et C. X. Fu) is a local characteristic citrus species in China with a history of over a hundred years, and its main production area is in Changshan county, Quzhou City, Zhejiang province. After a long process of propagation by seeds and selection by seedlings, new cultivars/lines such as Cuihong, Hongrou huyou, Xiaohong, Huyou elite plant a, Huyou elite plant b and 01-7 were obtained from the ordinary huyou population. Among them, 01-7 has become the main huyou cultivar to be extended because of its strong cold resistance, as well as long storage longevity and slight-but-special bitter flavor in the fruit. However, there is a high degree of simi-

收稿日期:2024-03-20 接受日期:2024-04-29

基金项目:浙江省“三农九方”科技协作计划项目(2022SNJF083);浙江大学全国农业科技现代化先行县(常山)建设项目(588970-Y12202);衢州市科技计划项目(2022K25)

作者简介:吴伊静,女,在读硕士研究生,研究方向为果树资源与育种。Tel:0571-88982223,E-mail:22116040@zju.edu.cn

*通信作者 Author for correspondence. Tel:0571-88982289,E-mail:chjxu@zju.edu.cn

larity between different accessions of huyou, and it is difficult to distinguish among them with naked eyes in terms of sapling morphology. With the progresses in techniques on genome sequencing and associated single nucleotide polymorphism (SNP) analysis, SNP mining and marker development are becoming an efficient and accurate way to discriminate close cultivars. However, to date, there has been no study on SNP based molecular markers for discriminating huyou accessions. The aim of this study was to mine homozygous SNP(s) present between 01-7 and ordinary huyou, and to develop efficient and accurate molecular markers for identifying 01-7. **【Methods】** Whole genome resequencing was performed on 01-7a and ordinary huyou ZZ (ancestral tree), and after obtaining high quality sequencing data, bioinformatics analysis tools were utilized to identify homozygous SNPs between these two accessions. The authenticity of SNPs predicted *in silico* was verified by PCR, cloning combined with Sanger sequencing. Then allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) and derived cleaved amplified polymorphic sequences (dCAPS) molecular markers were developed based on the obtained SNP information, and finally, the applicability of molecular markers was evaluated by the performance of AS-PCR and dCAPS molecular markers in 12 huyou accessions covering main production bases and main cultivars/lines/plants. **【Results】** After removal of adaptor sequences, contamination and low-quality reads from raw reads, a total of 120.21 M of high-quality reads were obtained, and 36.06 Gb of high-quality bases were obtained. The average scores of Q20 and Q30 were 96.55% and 89.97%, respectively, indicating a high quality of data. After mapping reads to the pummelo reference genome, the average mapping rate was 98.54%, and the 1× genome coverage was above 95%, which was close to the whole genome coverage. A homozygous SNP, *i.e.*, Chr1_7111834_G/A, was identified through bioinformatics analysis. The genotype of 01-7a at this SNP site was A/A, while that of the ordinary huyou ZZ was G/G, which was consistent with the results obtained by traditional gene cloning and Sanger sequencing. Based on this SNP, AS-PCR and dCAPS molecular markers were designed, and the performance of these two markers in 12 huyou accessions was evaluated. As expected, for AS-PCR marker, with AS-PCR-F1 primer, a specific band of 205 bp in size was amplified in all four 01-7 accessions, while no band was amplified in the other huyou accessions; with AS-PCR-F2 primer, no band was amplified in neither of four 01-7 accessions, while the amplification of the specific band of 205 bp was successfully seen in other huyou accessions except for Cuihong. The result indicated that both pairs of allele-specific primers could identify 01-7. However, an exception occurred where Cuihong did not show amplification bands with both pairs of allele-specific primers, and the Sanger sequencing results of SNP flanking sequence showed that the above phenomenon was due to the presence of three nucleotide mutations in the forward primer region of Cuihong, which resulted in tremendous loss of complementarity for the primers to pair with the DNA template. For dCAPS marker, PCR product of 176 bp can be amplified from all four 01-7 accessions and can be cleaved by restriction endonuclease *Fsp*BI into 24 bp and 152 bp bands, while that from the other huyou accessions, except for Cuihong, can be amplified but cannot be cleaved by the enzyme. For Cuihong dCAPS, the PCR product was cleaved into 62 bp and 117 bp bands due to a mutation that created a natural cleavage recognition site as revealed by the Sanger sequencing. The results of Sanger sequencing of 12 huyou accessions further demonstrated that the genotype prediction by the two markers was correct. **【Conclusion】** In this study, using the whole-genome resequencing data obtained from 01-7a huyou and ordinary huyou ZZ, we identified a homozygous SNP, *i.e.*, Chr1_7111834_G/A, with the genotype A/A for 01-7 and G/G for the ordinary huyou. Subsequently, based on this SNP, AS-PCR and dCAPS markers were developed. These markers can not only distinguish 01-7 from ordinary huyou but also differentiate it from Huyou elite plant a, Huyou elite plant b,

Cuihong and Xiaohong, demonstrating stable performance. The application of these molecular markers enables the authentication of 01-7 saplings, ensures sapling purity and thereby supports the extension of 01-7.

Key words: Huyou; Whole genome resequencing; SNP; AS-PCR; dCAPS

胡柚(*Citrus changshanensis* K. S. Chen et C. X. Fu)又名金柚,是一种主产于浙江省衢州市的地方特色柑橘^[1-3]。胡柚花型较大、果皮较厚、囊衣稍厚、果肉微苦、部分种子具单胚性,具有柚的特征;同时,与柚相比,胡柚翼叶小、果型小、果肉软而多汁、部分种子具有多胚性,又不同于柚^[1-3]。早在1987年,吴耕民^[3]通过形态特征比较,提出胡柚可能是由柚与甜橙自然杂交而来。随着分子标记技术的发展,学者们先后应用随机扩增多态性DNA(RAPD)和简单序列重复区间扩增多态性(ISSR)等分子标记进行分析,认为胡柚起源与柚和甜橙密切相关^[4-5]。在柑橘类中,起源于柚和甜橙的杂种只有葡萄柚。但胡柚抗寒性明显强于葡萄柚,这表明胡柚可能并不起源于柚和甜橙的杂交。先前笔者基于内转录间隔区(ITS)序列分析,发现柚和酸橙最有可能是胡柚的亲本^[6],这与新近基于基因组分析提出的胡柚具有酸橙和柚的遗传背景^[7]这一结论一致。柑橘易发生种间杂交^[8],但目前为止,源于柚与酸橙杂交的就只有胡柚一种,使得胡柚成为一种独特的杂柑。胡柚耐寒、耐贮、具独特微苦风味,鲜食、加工(如用于双柚汁)和入药(作为衢枳壳^[9])兼用,深受消费者欢迎,给当地带来了可观的经济收益,成为中国国家地理标志产品和浙江省重点开发与推广应用的名特优产品。

胡柚栽培历史悠久,位于常山县青石镇澄潭村的祖宗树是现存最古老的实生胡柚树,树龄接近120 a(年)。胡柚在良种选育过程中经历了较长的零星种植和实生繁殖时期^[10],从普通胡柚中实生选育了脆红、红肉胡柚、夏红橘柚(也称红皮胡柚)、胡柚优株a、胡柚优株b和01-7等品种/优系/优株,其中01-7因风味浓、耐贮藏、抗性强等特点成为目前胡柚产业的主导推广品种。然而,不同胡柚间在苗木形态上具有高度相似性,肉眼难以区分。

相较于形态学、细胞学和同工酶等鉴别技术,分子标记具有数量丰富、多态性高、不受环境因素的影响等优点,因而被广泛用于果树品种鉴别,包括随机扩增多态性DNA(RAPD)、扩增片段长度多态性

(AFLP)、简单序列重复(SSR)、序列相关扩增多态性(SRAP)、单核苷酸多态性(SNP)等在内的各种分子标记得到发展和应用^[10-13]。近十余年来随着测序技术的发展,SNP因具有高通量、分布广、二等位性等特点,成为最具应用潜力的第三代分子标记,被广泛应用于果树分子标记辅助育种^[14-18]。在品种鉴定方面,SNP已同SSR一起作为国内《植物品种鉴定DNA指纹方法总则》(NY/T 2594—2016)推荐的分子标记方法。迄今,出现了基于各种原理的SNP分型方法,如等位基因特异PCR(AS-PCR)、酶切扩增多态性序列(CAPS)、衍生酶切扩增多态性(dCAPS)、高分辨熔解曲线分析(HRMA)、竞争性等位基因特异PCR(KASP)等^[19]。在这些SNP分型方法中,最便利和普适的当属AS-PCR和dCAPS。

AS-PCR是根据SNPs位点的野生型和突变型等位基因序列设计引物,通过等位基因特异引物和模板DNA的结合情况对SNP进行基因分型。相较于其他分型方法,AS-PCR具有对设备要求不高、成本低、操作易等优点。dCAPS标记是一种CAPS标记变型,通过人为引入错配碱基制造酶切位点,从而突破SNP需出现在限制性内切酶识别位点这一限制,且具有共显性、操作简单、适用性强等特点。因此,开始应用AS-PCR和dCAPS标记鉴别果树品种。如Heo等^[20]以宫川温州蜜柑及其新突变体Araunshiu为试材,将存在于两者间的纯合SNP开发成AS-PCR标记,成功地将突变体、宫川温州蜜柑和其他柑橘进行区分。又如Peng等^[21]基于桃液泡膜糖转运载体基因(*PpTST1*)第三外显子的一个SNP开发了dCAPS标记,成功地对18份桃材料进行了分型。虽然基于SNP的分子标记在果树品种鉴别中的应用已经开始普及,但在胡柚上仍是空白。因此,急需开发基于DNA水平的分子标记,建立品种/优系/优株鉴定体系,以保障苗木的准确性和纯度,促进产业发展。

笔者在本研究中旨在利用全基因组重测序技术对01-7a胡柚和普通胡柚ZZ(祖宗树)进行重测序,挖掘出两个材料之间的差异SNP,通过将SNP转化

成AS-PCR和dCAPS标记,以期区分01-7与其他胡柚,填补胡柚分子鉴别研究上的空白,解决胡柚苗木混杂问题,为产业上实施新品种种苗鉴别提供技术保障。

1 材料和方法

1.1 试验材料

用于重测序的普通胡柚ZZ(祖宗树)幼嫩叶片

采摘于浙江省衢州市常山县青石镇澄潭村,用于重测序的01-7a幼嫩叶片采摘于浙江大学(常山)现代发展研究中心试验示范基地。用于标记应用检验的12份胡柚材料覆盖主产区主要基地和主要类型,具体包括取自4个基地的01-7(01-7a、01-7b、01-7c、01-7d)、3个基地的普通胡柚(HYa、HYb、HYc)、2个胡柚优株(HYYa、HYYb)、脆红(CH)、红肉胡柚(HR)和夏红橘柚(又名红皮胡柚,XH)(表1)。

表1 用于标记应用检验的12份胡柚资源信息表

Table 1 Information of 12 huyou accessions involved in marker application evaluation

编号 No.	材料名称 Name	缩写 Abbreviation	来源 Source
1	01-7a	01-7a	浙江大学(常山)现代发展研究中心试验示范基地 Experimental Station of Zhejiang University (Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center
2	01-7b	01-7b	常山县球川镇馒头山村 Mantoushan Village, Qiuchuan Town, Changshan County
3	01-7c	01-7c	常山县同弓乡同心村 Tongxin Village, Tonggong Town, Changshan County
4	01-7d	01-7d	常山县白石镇新安村 Xinan Village, Baishi Town, Changshan County
5	普通胡柚 a Huyou a	HYa	浙江大学(常山)现代发展研究中心试验示范基地 Experimental Station of Zhejiang University (Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center
6	普通胡柚 b Huyou b	HYb	常山县同弓乡中和村 Zhonghe Village, Tonggong Town, Changshan County
7	普通胡柚 c Huyou c	HYc	常山县大桥镇袁青口村 Yuanqingkou Village, Daqiao Town, Changshan County
8	胡柚优株 a Huyou elite plant a	HYYa	浙江大学(常山)现代发展研究中心试验示范基地 Experimental Station of Zhejiang University (Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center
9	胡柚优株 b Huyou elite plant b	HYYb	浙江大学(常山)现代发展研究中心试验示范基地 Experimental Station of Zhejiang University (Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center
10	脆红 Cuihong	CH	浙江大学(常山)现代发展研究中心试验示范基地 Experimental Station of Zhejiang University (Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center
11	红肉胡柚 Hongrou huyou	HR	浙江大学(常山)现代发展研究中心试验示范基地 Experimental Station of Zhejiang University (Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center
12	夏红橘柚 Xiahong	XH	衢州市龙游县团石村 Tuanshi Village, Longyou County, Quzhou City

1.2 DNA提取

用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[22]提取胡柚基因组DNA,将DNA稀释至100 ng·μL⁻¹备用。

1.3 全基因组重测序分析

采集01-7a和普通胡柚ZZ幼嫩叶片,委托深圳华大基因科技有限公司进行全基因组重测序。使用DNBSEQ-T7测序仪,采用PCR-free文库构建方法,测序读长为PE150。利用fastqc对原始数据进行过滤,用trimmomatics v0.39去除接头和低质量数据。以晚白柚基因组(http://citrus.hzau.edu.cn/data/Genome_info/HWB.v1.0/HWB.v1.0.genome.fa)为参考基因组建立索引,利用BWA-MEM v0.7.17^[23]将测序

片段比对到参考基因组上,利用shell脚本去掉mapping质量值小于30的片段。使用PICARD(<http://broadinstitute.github.io/picard/>)去除重复和冗余片段。使用BCFtools v1.9^[24]和GATK v3.6^[25]进行SNP-calling,取交集位点做后续分析。

1.4 纯合SNP挖掘

从检测到的全基因组变异中挖掘纯合SNP,方法和参数如下:(1)使用vcftools软件初次过滤,去除碱基质量值小于30、测序深度大于60或小于10的位点,筛选出二等位位点;(2)使用GATK软件的VariantFiltration模块进行二次过滤,过滤条件为“QUAL<30.0 || QD<2.0 || MQ<40.0 || FS>60.0 ||

SOR>3.0”。在以上过滤条件下得到高质量的 SNP 集合, 筛出集合中 01-7a 和普通胡柚 ZZ 之间的纯合差异 SNP, 最后结合 IGV 基因组浏览器检查这些位点在 bam 文件中的信息, 筛选等位基因频率大于 90% 的 SNP, 选择其中一个 SNP 用于序列验证及后续分子标记开发。

1.5 含 SNP 片段的克隆与测序验证

采用基因克隆和 Sanger 测序进行 SNP 验证。根据 vcf 文件中的定位信息从参考基因组提取 SNP 上下游各 600 bp 序列, 使用 Primer3web version 4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>) 在 SNP 两侧设计引物, 上游引物 Chr1_7111834_G/A-F 序列为: 5'-TGTCT-GGGTCGTTGTAATCA-3', 下游引物 Chr1_7111834_G/A-R 序列为: 5'-CTCCAAAAGTCCAG-CACAGG-3'。以 01-7a 和普通胡柚 ZZ 基因组 DNA 为模板, 使用诺唯赞高保真 DNA 聚合酶产品 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase (P505) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 1 μL Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, 25 μL 2 × Phanta Max Buffer, 1 μL dNTP Mix, 2 μL 10 μmol·L⁻¹ 引物(上游引物和下游引物各 2 μL), 0.1 μg 模板 DNA, 补足 ddH₂O 至 50 μL。PCR 循环程序为: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 57 °C 15 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。部分 PCR 产物直接进行 Sanger 测序, 另外部分 PCR 产物进行常规基因克隆操作, 选择阳性克隆进行 Sanger 测序。采用相同的方法对用于标记应用的 12 份胡柚材料的 SNP 基因型进行验证。

1.6 AS-PCR 反应

应用 BatchPrimer3 v1.0 (<https://wheat.pw.usda.gov/demos/BatchPrimer3/>) 网站上的工具设计 AS-PCR 共用引物(下游引物)和 2 条等位基因特异引物(上游引物), 2 条等位基因特异引物的差异在于 3' 末端最后一位碱基, 它们分别与 SNP 的两个等位碱基互补配对。上游等位基因特异引物 AS-PCR-F1 和 AS-PCR-F2 的序列为: 5'-GCAGAGAAATCGCCTT-GCCTTGTC-3' 和 5'-GCAGAGAAATCGCCTT-GTCG-3', 下游共用引物 AS-PCR-R 的序列为: 5'-CGTGTGGTCTCCAAAAGTCC-3'。试验确定的最佳反应体系为: 3 μL 2 × Taq Master Mix, 0.8 μL 10 μmol·L⁻¹ 引物(上游引物和下游引物各 0.8 μL), 30 ng 模板 DNA, 补足 ddH₂O 至 10 μL。PCR 反应程

序为: 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C 5 s, 30 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。采用 1.5% 琼脂糖凝胶, 在 110 V 稳压电泳 25 min 后对凝胶进行 GelRed 染色, 置于凝胶成像系统中成像。

1.7 dCAPS 扩增与酶切

利用 dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>) 进行 dCAPS 内切酶选择和上游引物设计, 引物 dCAPS-F 的序列为: 5'-GAGTCG-CAGAGAAATCGCCTT-GCT-3'。应用 Primer3 4.1.0 设计下游引物 dCAPS-R, 序列为: 5'-CTGT-GAAGTTCAATTGGCCCATTA-3'。PCR 反应体系为: 25 μL 2 × Taq Master Mix, 2 μL 10 μmol·L⁻¹ 引物(上游引物和下游引物各 2 μL), 160 ng 模板 DNA, 补足 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应程序为 95 °C 10 min; 95 °C 10 s, 58 °C 15 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。扩增产物经纯化回收后用于酶切, DNA 纯化使用杭州新景生物试剂开发有限公司的凝胶 DNA 回收试剂盒 & DNA 纯化试剂盒。酶切反应体系为: 2 μL 10× FastDigest Green Buffer, 2.6 μL FspB I , 0.5 μg PCR 纯化产物, 补足 ddH₂O 至 20 μL。酶切反应条件为: 37 °C, 4 h。采用 3% 琼脂糖凝胶, 在 110 V 稳压电泳 30 min, 之后凝胶经 GelRed 染色后成像。

2 结果与分析

2.1 全基因组重测序分析

通过对 01-7a 胡柚和普通胡柚 ZZ 原始数据进行去污染、去接头及去低质量数据后, 共获得高质量片段数 120.21 M, 高质量碱基数 36.06 Gb。Q20 和 Q30 的平均得分分别为 96.55% 和 89.97%, 可知数据质量较高。将测序片段与晚白柚参考基因组进行比对, 平均碱基比对率达 98.54%, 1× 基因组覆盖率达 95%, 表明可以以晚白柚作为参考基因组进行胡柚分析。平均测序深度达到 46.75×, 可以用于亲缘关系相近样本的重测序分析。测序数据质量评估统计结果如表 2 所示。

2.2 SNP 检测和验证

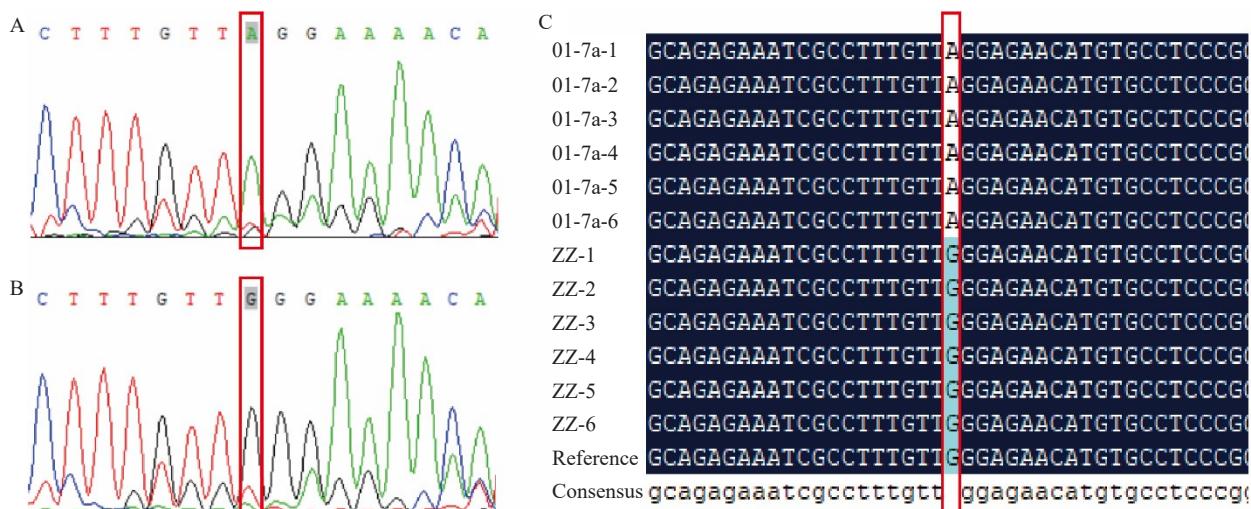
比较 01-7a 和普通胡柚 ZZ 的基因型, 得到 530 286 个候选 SNP。筛选质量值大于 30、测序深度在 10 到 60 之间等的高置信度 SNP, 得到 96 114 个, 在此基础上筛选 01-7a 和普通胡柚 ZZ 之间的纯合 SNP, 得到 23 个。利用 IGV 基因组浏览器检查 bam

表2 测序数据质量评估统计
Table 2 Statistics of quality evaluation of sequencing data

样品 Sample	高质量片段 Clean reads	高质量碱基 Clean base/bp	Q20/%	Q30/%	GC/%	平均测序深度 Average depth/(x)	1×覆盖率 1×Cover ratio/%	10×覆盖率 10×Cover ratio/%	碱基比对率 Mapping rate/%
01-7a	60 151 675	18 045 502 500	96.79	90.60	37	47.30	95.10	87.70	98.48
普通胡柚 ZZ Ordinary huyou ZZ	60 055 719	18 016 715 700	96.31	89.34	37	46.20	95.20	87.80	98.60

文件中23个SNP位点测序片段的碱基分布情况,筛选出9个等位基因频率大于90%的纯合SNP,选择其中一个位于1号染色体上第7 111 834个碱基位上的SNP(命名为Chr1_7111834_G/A)用于序列验证。检查该SNP所在位点的注释信息,发现其位于基因间区域。

在该SNP两侧设计了一对PCR引物用于测序验证,PCR扩增得到预期长度为498 bp的条带,且无论是PCR产物直接Sanger测序还是经连接转化后的质粒Sanger测序,都表明01-7a在这个位点的基因型是A/A,而普通胡柚ZZ是G/G(图1),与生信挖掘出的基因型一致,表明该纯合SNP真实存在。



A. 01-7a 胡柚的PCR产物测序图谱;B. 普通胡柚ZZ的PCR产物测序图谱;C. 01-7a 和普通胡柚ZZ各6个重组质粒测序结果比对图,竖框所示的是SNP(Chr1_7111834_G/A)位点。

A. Sequencing electropherogram of the PCR product of 01-7a; B. Sequencing electropherogram of the PCR product of the ordinary huyou ZZ; C. Comparison of the sequencing results of the recombinant plasmids harboring the PCR product from either 01-7a or the ordinary huyou ZZ; The boxed area indicates the SNP (Chr1_7111834_G/A) locus.

图1 01-7a 和普通胡柚ZZ间SNP的Sanger测序验证

Fig. 1 Sanger sequencing validation of the SNP between 01-7a huyou and ordinary huyou ZZ

2.3 AS-PCR和dCAPS引物设计

鉴于01-7a和普通胡柚ZZ在Chr1_7111834_G/A位点处具有一个纯合SNP,笔者在本研究中旨在基于此SNP开发能够鉴别两个胡柚材料的AS-PCR和dCAPS引物。

由于AS-PCR引物3'末端碱基的不配对并不能完全抑制引物和模板的结合延伸,因此在等位基因特异引物的3'末端倒数第二位引入1个碱基的额外错配(图2)。研究设计了两对AS-PCR引物,其中下游引物共用,而上游引物具有等位基因特异性:AS-

PCR-F1和AS-PCR-F2引物的3'末端碱基分别与01-7a和普通胡柚ZZ相同(图2)。预期使用AS-PCR-F1只能从01-7a扩增出的条带,同理AS-PCR-F2只能从普通胡柚ZZ中扩增出条带,条带长度为205 bp。

因SNP位点不是限制性内切酶的识别位点,不能直接开发酶切扩增多态性(CAPS)标记。基于SNP侧翼序列,通过人为引入如图2所示的错配碱基C,其中一个等位基因的PCR扩增产物就拥有FspB I酶切位点,因而开发了一对dCAPS标记引物(图2)。该标记的预期结果是:以两个胡柚材料

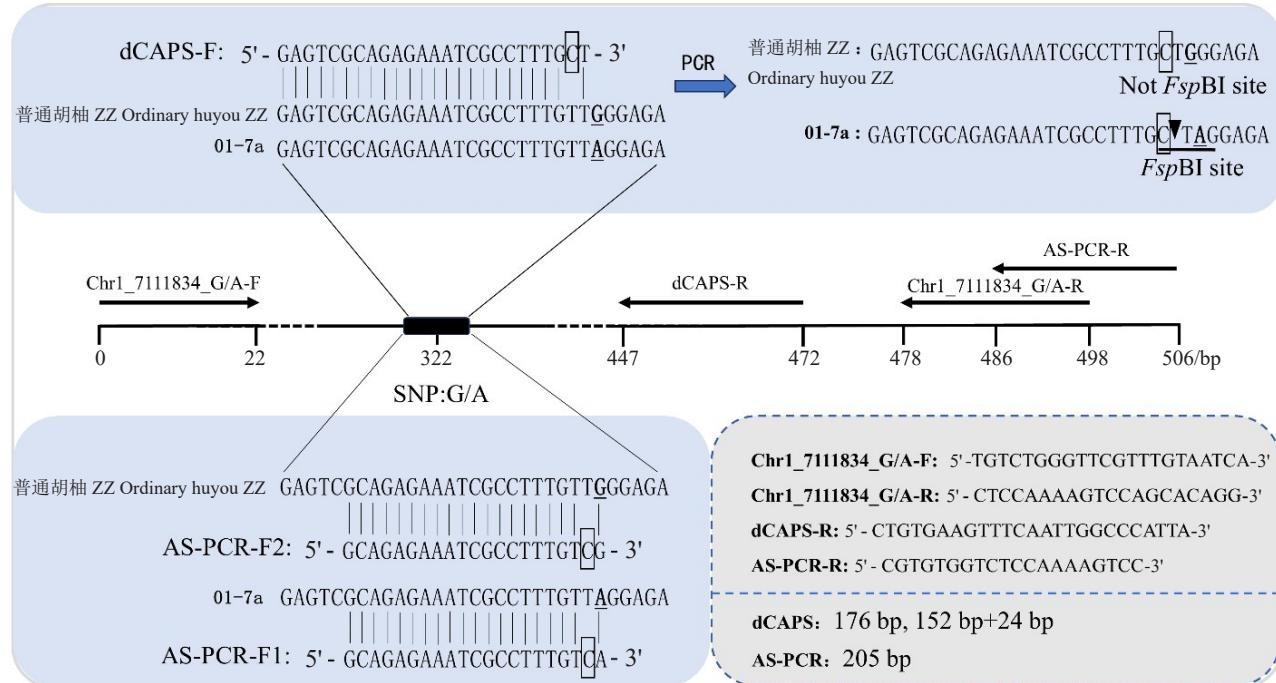


图 2 AS-PCR 和 dCAPS 分子标记引物

Fig. 2 Schematic diagram representing the primers for AS-PCR and dCAPS molecular marker

DNA为模板时均可扩增出长为176 bp的条带,但只有当以01-7a胡柚DNA为模板时,所扩增的条带可以被*Fsp*B I酶切成长度分别为152 bp和24 bp的条带(图2)。

2.4 AS-PCR 和 dCAPS 标记开发

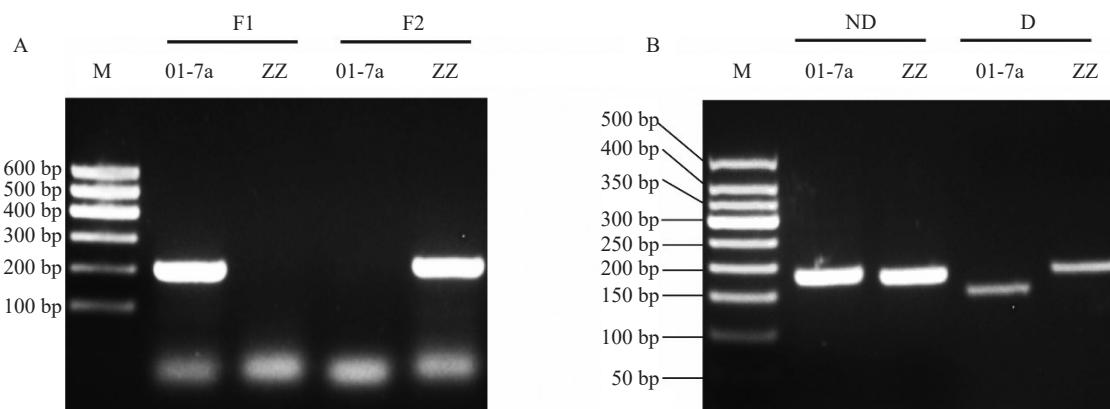
应用所设计的两对 AS-PCR 引物,以 01-7a 和普通胡柚 ZZ 的 DNA 为模板,PCR 扩增结果如图 3-A 所示。对 01-7a 使用 AS-PCR-F1 为上游引物时可扩增出与预期长度 205 bp 相符的条带,而以 AS-PCR-F2 为上游引物时则没有扩增,由此判断 01-7a 在 Chr1_7111834_G/A 位点的基因型为 A/A;以普通胡柚 ZZ DNA 为模板时,扩增结果则和 01-7a 正好相反,即以 AS-PCR-F2 为上游引物时可扩增得到与预期长度 205 bp 相符的条带而以 AS-PCR-F1 为上游引物时则没有扩增,判断普通胡柚 ZZ 的基因型是 G/G。AS-PCR 扩增结果与预期结果一致,表明该 AS-PCR 标记正确有效。

应用所设计的一对 dCAPS 引物,以 01-7a 胡柚和普通胡柚 ZZ DNA 为模板,PCR 扩增结果如图 3-B 所示,均获得与预期长度 176 bp 相符的条带。但只有以 01-7a 胡柚 DNA 为模板时,PCR 产物可被酶切成

两条长度分别为 152 bp 和 24 bp 的条带,由此判断 01-7a 在 Chr1_7111834_G/A 位点的基因型为 A/A;以普通胡柚 ZZ DNA 为模板时,PCR 产物不会被酶切,表明普通胡柚 ZZ 的基因型不是 A/A。dCAPS 分析结果与预期结果一致,表明该 dCAPS 标记正确有效。

2.5 AS-PCR 和 dCAPS 标记在 12 份胡柚材料鉴别中的应用

为进一步验证 AS-PCR 标记和 dCAPS 标记的有效性, 将标记应用于 12 份胡柚材料的鉴别。这 12 份胡柚材料覆盖主产区的主要基地和主要品种, 包括 01-7 胡柚 4 份、其他胡柚 8 份(表 1)。结果表明, AS-PCR-F1 特异引物在所有 4 份 01-7 胡柚材料中均扩增出预期长度的条带, 而在其他胡柚材料中均未得到扩增(图 4-A); AS-PCR-F2 则在所有 4 份 01-7 材料和脆红中不出现扩增条带, 而在其余胡柚中均出现条带(图 4-B)。dCAPS 标记分析表明, 所有胡柚材料均扩增出 176 bp 的条带(图 5-A)没有差异, 但在使用限制性内切酶酶切后, 4 份 01-7 胡柚材料均出现 152 bp 的酶切产物, 而 3 份普通胡柚、胡柚优株 a、胡柚优株 b、红肉胡柚、夏红中条带未被酶切(图 5-B)。除脆红外, 以上结果均符合预期。脆红在两种

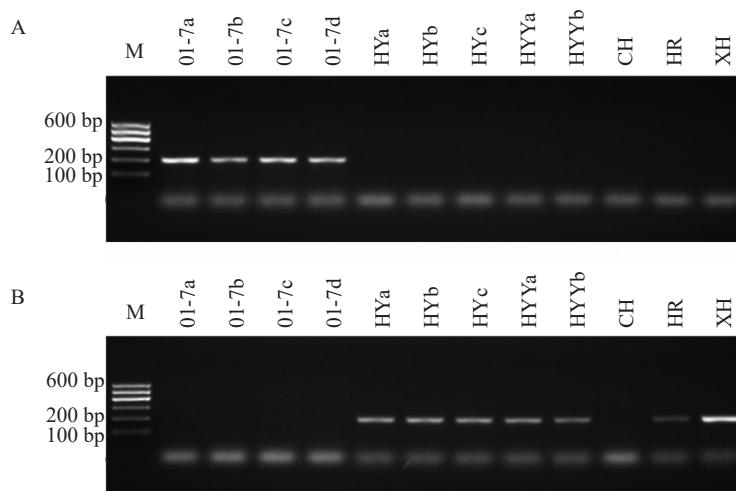


A. AS-PCR 反应, F1 和 F2 分别为 AS-PCR-F1 和 AS-PCR-F2 引物对; B. dCAPS 反应, ND 和 D 分别指不酶切对照和酶切反应; ZZ 指代普通胡柚 ZZ。M. DNA 长度标记。

A. AS-PCR reaction, F1 and F2 represent for the AS-PCR-F1 and AS-PCR-F2 primer pairs, respectively; B. dCAPS reaction, ND and D refer to the non-digested control and digestion reaction, respectively; ZZ stands for ordinary huyou ZZ. M. DNA Marker.

图 3 01-7a 和普通胡柚 ZZ 的 AS-PCR 和 dCAPS 反应

Fig. 3 AS-PCR and dCAPS reactions for 01-7a huyou and ordinary huyou ZZ



A. AS-PCR-F1 引物对; B. AS-PCR-F2 引物对。12 份材料信息见表 1。M. DNA 长度标记。

A. AS-PCR-F1 primer pairs; B. AS-PCR-F2 primer pairs. Refer to Table 1 for the information on 12 accessions. M. DNA Marker.

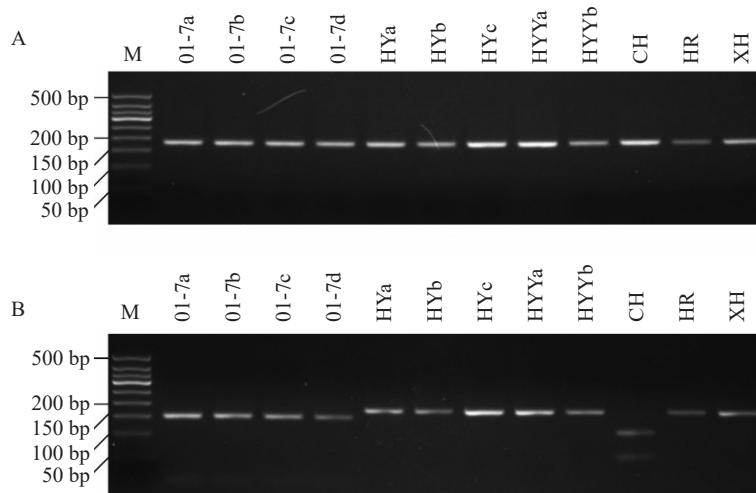
图 4 AS-PCR 分子标记在 12 份胡柚材料鉴别中的应用

Fig. 4 Application of AS-PCR molecular markers in discrimination of 12 huyou accessions

标记分析时均表现出非预期的情况,表现为在两个 AS-PCR 反应中均未能扩增出条带,在 dCAPS 分析时经酶切产生长度既非 152 bp 也非 176 bp 的片段。笔者在后文中通过分析 Sanger 测序结果对此现象作出了解释。

为确认两种标记在这些胡柚材料中对 Chr1_7111834_G/A 位点基因分型表现的可靠性,对 12 份材料的这一 SNP 位点侧翼序列进行了 PCR 扩增、克隆和 Sanger 测序验证。测序比对结果表明,所有 4 份 01-7 材料在这个 SNP 位点的基因型都是 A/A,而

其他胡柚基因型都是 G/G(图 6 坚框所示),与 AS-PCR 和 dCAPS 分析结果一致。同时,测序结果解释了为何脆红在两个 AS-PCR 反应中均不能扩增出条带,是因为脆红在等位基因特异引物处有额外的 3 个碱基突变(图 6 左横框所示),导致引物结合模板 DNA 的能力被大大削弱。而在 dCAPS 分析时脆红出现非预期酶切片段则是因为在这段序列中脆红存在天然的 *FspB I* 识别位点 CTAG(图 6 右横框所示)。值得一提的是,脆红中存在的天然 *FspB I* 识别位点与人为设计 dCAPS 标记时针对 01-7 引入的



A. 酶切前; B. 酶切后。12 份材料信息见表 1。M. DNA 长度标记。

A. Before digestion; B. After digestion. Refer to Table 1 for the information on 12 accessions. M. DNA Marker.

图 5 dCAPS 分子标记在 12 份胡柚材料鉴别中的应用

Fig. 5 Application of dCAPS molecular marker in discrimination of 12 huyou accessions

01-7a	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
01-7b	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
01-7c	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
01-7d	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
HYa	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
HYb	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
HYc	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
HYYa	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
HYYb	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
CH	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
HR	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
XH	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
Reference	TGGGTTTGCTCCCCAGTTCGAGTCGCAGAGAAATTCGCCTTGTGTTGGAGAACATGTGCCTCCGGTTCGAGCGGGAGATTTCATAATCTT
Consensus	tgggtttgctc cca ttcgagtcgcag aa tcgccttgggtt ggagaac tggcctcccggttcgagcgg ga ttcta tct

竖框所示的是 SNP 位点;左边横框所示的是脆红在 AS-PCR 引物处的 3 个额外突变,右边横框所示的是脆红上的一个碱基突变形成天然的 *FspB* I 识别位点。

The vertical box outlines the SNP site; the left horizontal box outlines the three extra mutations in Cuihong at the AS-PCR primer location, and the right horizontal box outlines the natural *FspB* I restriction site formed by one base mutation.

图 6 12 份胡柚材料 SNP (Chr1_7111834_G/A) 位点测序结果

Fig. 6 Sequencing results of 12 huyou accessions at the SNP (Chr1_7111834_G/A) site

FspB I 识别位点并不重合,而是相距 38 bp,因而,脆红 PCR 产物被 *FspB* I 酶切成 62 bp 和 117 bp 这两条片段,与 01-7 不同。因此,综合运用这两种标记不仅可以鉴别出 01-7 胡柚,还可以鉴别出脆红。

3 讨 论

品种分子鉴别通常更倾向于使用基于 PCR 的分子标记,但这些方法中有些复杂耗时,有些则可靠度不高,如 RAPD 标记鉴定的特异性不强且重复性较差^[26], SSR 标记很难区分遗传十分相似的品

种^[27]。随着下一代测序技术的兴起,SNPs 因数量丰富、可遗传、突变频率较低、二等位性等特点已成为应用最广泛的基因分型标记^[28]。全基因组重测序作为一种高通量测序技术,拥有成熟的测序平台、多样的测序策略、丰富的生信分析工具和数据处理流程,并且因其具有较高的全基因组分辨率,使其非常适合用于基因分型^[29]。随着测序成本日益降低,全基因组重测序技术越来越成为挖掘 SNP 的重要手段。Pei 等^[30]对巨峰、乍娜及其早熟芽变丰早和 90-1 分别进行了全基因组重测序分析,发现早熟芽变品

种中存在丰富的遗传变异,通过Sanger测序验证了巨峰和丰早中的5个SNP;Guan等^[31]利用360份桃种质的全基因组重测序数据筛选并构建了由775个SNP组成的微阵列芯片。Serra等^[32]对Rocha梨的8个无性系进行了基因组重测序,经过变异检测和注释,挖掘了位于编码序列上的216个SNP。笔者在本研究中对01-7a和代表普通胡柚的祖宗树开展了全基因组重测序,对SNP进行了挖掘。为便于后续分子标记开发和应用,试验出挖掘纯合SNP的生物信息学分析参数,并成功获得一个纯合SNP,开发了相应的AS-PCR和dCAPS标记,填补了胡柚上的研究空白,也可为其他果树开展类似工作提供参考。

AS-PCR标记和dCAPS标记都是基于PCR的SNP分型方法,有着操作简单、效率高等优点。同时,两者也存在各自缺点。AS-PCR标记相较于dCAPS标记而言更加经济,但其对PCR反应体系和程序更加敏感,并且较容易出现假阳性^[33],因而对PCR体系中各组分比例、Tm值、PCR循环数等都有更加严格的要求,需要通过设置梯度试验解决^[34]。dCAPS标记相较于AS-PCR标记更稳定,但由于有些内切酶较昂贵,在一定程度上增加了dCAPS分析的成本。同时,dCAPS需要试验适宜的酶切时间,既要保障充分酶切又要避免“星活性”^[35],以免影响基因型判断。此外,也并非每个SNP位点都能通过改变一个碱基序列引入酶切识别位点,即有些SNP无法用于dCAPS标记开发。因此,两种标记方法各有所长,可结合使用。

笔者在本研究中开发的AS-PCR和dCAPS标记单独应用即可区分01-7胡柚、脆红与其他胡柚。分子标记分析以及对SNP侧翼序列测序结果均表明脆红与其他胡柚存在较大差异,推测其在起源上略有不同,这值得后续进一步研究。夏红橘柚一直存在同物异名现象,它又被称为红皮胡柚。根据SNP侧翼序列,夏红橘柚与01-7胡柚、普通胡柚、胡柚优株a、胡柚优株b、红肉胡柚基本一致(同源率高达99.6%),因此,宜称其为红皮胡柚。笔者在本研究中开发的标记尚不能区分除01-7胡柚和脆红之外的其他胡柚材料,后续可验证更多的纯合SNP位点并开发相应的标记。

4 结 论

利用01-7a和普通胡柚ZZ(祖宗树)的全基因组

重测序数据,找到了一个纯合SNP(Chr1_7111834_G/A),01-7a和普通胡柚ZZ的基因型分别为A/A和G/G。进一步将该SNP开发成AS-PCR和dCAPS标记,在12份胡柚材料中的应用表明,两个标记单独应用即可将01-7和其他胡柚区分。由于脆红在SNP侧翼序列中存在额外变异,导致这两种分子标记还可以将脆红从其他胡柚中鉴别出来。笔者在本研究中开发了能鉴别胡柚品种的分子标记,所开发的分子标记可应用于01-7胡柚、脆红的苗木真伪鉴别,利于苗木纯度保障,从而助力新优品种的推广种植。基于SNP侧翼序列,发现脆红与其他胡柚的亲缘关系相对较远,夏红橘柚与除脆红外的10份胡柚材料的序列同源率高达99.6%,表明属于胡柚而非橘柚,应称为红皮胡柚。

参考文献 References:

- [1] 张韵冰.中国柑桔属植物一新种[J].植物研究,1991,11(2):5-7.
ZHANG Yunbing. A new species of genus citrus from China[J]. Bulletin of Botanical Research, 1991, 11(2):5-7.
- [2] 贝增明,叶杏元.常山胡柚特性及栽培技术[M].北京:中国科学技术出版社,2003:15-17.
BEI Zengming, YE Xingyuan. Characteristics and cultivation techniques of *Citrus changshan-Huyou*[M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2003: 15-17.
- [3] 吴耕民.金柚特性及其栽培技术要点[J].中国柑桔,1987,16(1):16-18.
WU Gengmin. The characteristics and cultivation technology points of golden pomelo[J]. South China Fruits, 1987, 16(1): 16-18.
- [4] 陈力耕,胡西琴,赵四清.关于胡柚起源的分子研究[J].园艺学报,2002,29(3):276-277.
CHEN Ligeng, HU Xiqin, ZHAO Siqing. Molecular research on Huyou origin[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29(3): 276-277.
- [5] 陈士超,杨红,郑勇平,陈跃磊,邱英雄.分子标记鉴定常山胡柚优良基因型的初步研究[J].分子细胞生物学报,2006,39(6):502-508.
CHEN Shichao, YANG Hong, ZHENG Yongping, CHEN Yuelei, QIU Yingxiong. Preliminary identification of *Citrus changshan-* Huyou elite genotypes by molecular markers[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2006, 39(6):502-508.
- [6] XU C J, BAO L, ZHANG B, BEI Z M, YE X Y, ZHANG S L, CHEN K S. Parentage analysis of Huyou (*Citrus changshanensis*) based on internal transcribed spacer sequences[J]. Plant Breeding, 2006, 125(5):519-522.
- [7] 毛桑隐,汪丽霞,宋剑锋,刘胜军,王伦,徐强.基于全基因组信

- 息的常山胡柚遗传鉴定[J]. 果树学报, 2023, 40(1):25-34.
- MAO Sangyin, WANG Lixia, SONG Jianfeng, LIU Shengjun, WANG Lun, XU Qiang. Genetic identification of Changshan Huyou based on whole genome information[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(1):25-34.
- [8] VELASCO R, LICCIARDELLO C. A genealogy of the citrus family[J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(7):640-642.
- [9] 赵维良, 黄琴伟, 张文婷, 岳超, 宋剑锋. 中药材衢枳壳的基源植物研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13):1652-1655.
- ZHAO Weiliang, HUANG Qinwei, ZHANG Wenting, YUE Chao, SONG Jianfeng. Research for the original plant of Chinese medicinal materials Qu Aurantii fructus[J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2019, 36(13):1652-1655.
- [10] 俞日梁, 陈新建, 叶杏元, 杨兴良, 贝增明, 郑国民. 常山胡柚品种起源及栽培研究进展[J]. 浙江林业科技, 2006, 26(3):83-86.
- YU Riliang, CHEN Xinjian, YE Xingyuan, YANG Xingliang, BEI Zengming, ZHENG Guomin. Study on origin and cultivation of *Citrus Changshan-Huyou*[J]. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 2006, 26(3):83-86.
- [11] 林晓洁, 丁弘扬, 叶镔姬, 王超, 廖汝玉, 李永裕. 果树分子标记技术研究进展及在棕育种上的应用展望[J]. 东南园艺, 2022, 10(3):220-227.
- LIN Xiaojie, DING Hongyang, YE Binji, WANG Chao, LIAO Ruyu, LI Yongyu. Research progress of molecular marker technology in fruit trees and its application prospect in Nai plum (*Prunus salicina*) breeding[J]. Southeast Horticulture, 2022, 10 (3):220-227.
- [12] 吴仕蔓, 娄兵海, 陈传武, 唐艳, 邓崇岭, 武晓晓. 应用 SSR 荧光标记法构建 22 个柚类品种的分子身份证[J]. 果树学报, 2023, 40(4):605-614.
- WU Shiman, LOU Binghai, CHEN Chuanwu, TANG Yan, DENG Chongling, WU Xiaoxiao. Establishment of molecular identity of 22 pomelo varieties using fluorescent labeled SSR markers[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(4):605-614.
- [13] 吉爽秋, 王力荣, 李勇, 朱更瑞, 曹珂, 方伟超, 陈昌文, 王新卫, 张琦, 吴金龙. 桃花花型(铃形/蔷薇形)基因型鉴定、分子标记开发与利用[J]. 果树学报, 2023, 40(3):422-431.
- JI Shuangqiu, WANG Lirong, LI Yong, ZHU Gengrui, CAO Ke, FANG Weichao, CHEN Changwen, WANG Xinwei, ZHANG Qi, WU Jinlong. Identification of peach flower genotype (non-showy/showy), development of flower-type related molecular markers[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(3):422-431.
- [14] 唐海霞, 高瑞, 王中堂, 张琼. 基于 SNP 标记的枣高密度遗传连锁图谱重新构建[J]. 园艺学报, 2021, 48(11):2275-2285.
- TANG Haixia, GAO Rui, WANG Zhongtang, ZHANG Qiong. High-density genetic linkage map reconstruction in jujube using SNP markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(11): 2275-2285.
- [15] FONG S K, KAWASH J, WANG Y F, JOHNSON-CICALESE J, POLASHOCK J, VORSA N. A low malic acid trait in cranberry fruit: Genetics, molecular mapping, and interaction with a citric acid locus[J]. Tree Genetics & Genomes, 2021, 17(1):4.
- [16] WANG L, ZHANG S L, JIAO C, LI Z, LIU C H, WANG X P. QTL-seq analysis of the seed size trait in grape provides new molecular insights on seedlessness[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2022, 21(10):2910-2925.
- [17] DE MORI G, CIPRIANI G. Marker-assisted selection in breeding for fruit trait improvement: A review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(10):8984.
- [18] HIRAKAWA Y, FERRANTE S P, WU G A, FEDERICI C T, ROOSE M L. Development and assessment of SNP genotyping arrays for *Citrus* and its close relatives[J]. Plants, 2024, 13(5): 691.
- [19] YOU Q, YANG X P, PENG Z, XU L P, WANG J P. Development and applications of a high throughput genotyping tool for polyploid crops: Single nucleotide polymorphism (SNP) array[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9:104.
- [20] HEO J M, EUN C H, KIM I J. Identification of late ripening citrus mutant, Ara-unshiu (*Citrus unshiu*), and its selectable marker[J]. Plants, 2023, 12(19):3355.
- [21] PENG Q, WANG L, OGUTU C, LIU J J, LIU L, MOLLAH M D A, HAN Y P. Functional analysis reveals the regulatory role of *PpTST1* encoding tonoplast sugar transporter in sugar accumulation of peach fruit[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3):1112.
- [22] 陈昆松, 李方, 徐昌杰, 张上隆, 傅承新. 改良 CTAB 法用于多年生植物组织基因组 DNA 的大量提取[J]. 遗传, 2004, 26(4): 529-531.
- CHEN Kunsong, LI Fang, XU Changjie, ZHANG Shanglong, FU Chengxin. An efficient macro-method of genomic DNA isolation from *Actinidia chinensis* leaves[J]. Hereditas (Beijing), 2004, 26(4):529-531.
- [23] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [24] LI H, HANDSAKER B, WYSOKER A, FENNELL T, RUAN J, HOMER N, MARTIN G, ABECASIS G, DURBIN R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The sequence alignment/map format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, 25 (16):2078-2079.
- [25] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, SIVACHENKO A, CIBULSKIS K, KERNYTSKY A, GARIMELLA K, ALTSCHULER D, GABRIEL S, DALY M, DEPRISTO M A. The Genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. Genome Research, 2010, 20 (9):1297-1303.
- [26] 焦峰, 楼程富. RAPD 技术应用中的一些问题及对策[J]. 西北农业学报, 2000, 9(4):98-102.
- JIAO Feng, LOU Chengfu. Problems and its counter measure in

- application of RAPD[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2000, 9(4):98-102.
- [27] HONG J H, CHAE C W, CHOI K J, KWON Y S. A database of simple sequence repeat (SSR) marker-based DNA profiles of citrus and related cultivars and germplasm[J]. *Horticultural Science and Technology*, 2016, 34(1):142-153.
- [28] FLANAGAN S P, JONES A G. The future of parentage analysis: From microsatellites to SNPs and beyond[J]. *Molecular Ecology*, 2019, 28(3):544-567.
- [29] SCHEBEN A, BATLEY J, EDWARDS D. Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes: Choosing the right tool for the right application[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, 15(2):149-161.
- [30] PEI M S, LIU H N, WEI T L, YU Y H, GUO D L. Detection and characterization of genome-wide genetic variation associated with the early-ripening phenotype of grape mutants[J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 285:110195.
- [31] GUAN L P, XU Q, CAO K, LI Y, ZHU G R, FANG W C, WANG X W, CHEN C W, GUO J, WANG Q, ZHAO Y L, WANG L R. Development of a 775 SNP array for peach based on whole-genome resequencing data, and assessment of the potential of its application[J]. *Scientia Horticulturae*, 2021, 276:109760.
- [32] SERRA O, DE SOUSA R M, GUIMARÃES J B, MATOS J, VICENTE P, DE SOUSA M L, SIMÕES F. Genome-wide clonal variability in European pear ‘Rocha’ using high-throughput sequencing[J]. *Horticulture Research*, 2022, 9:uhac111.
- [33] 罗梅, 阴伟晓, 罗朝喜. 桃褐腐病菌对多菌灵抗性的 AS-PCR 检测技术[J]. *植物保护*, 2020, 46(6):136-143.
- LUO Mei, YIN Weixiao, LUO Chaoxi. An allele-specific PCR for detecting the carbendazim resistance in *Monilinia fructicola*[J]. *Plant Protection*, 2020, 46(6):136-143.
- [34] 杨苓, 付燕, 王永清, 陶炼, 邓群仙, 范建新, 邓仁菊. 枇杷 AS-PCR 反应体系的建立和优化[J]. *果树学报*, 2013, 30(1):62-68.
- YANG Qin, FU Yan, WANG Yongqing, TAO Lian, DENG Qunxian, FAN Jianxin, DENG Renju. Establishment and optimization of AS-PCR reaction system for *Eriobotrya*[J]. *Journal of Fruit Science*, 2013, 30(1):62-68.
- [35] CONLAN L H, JOSÉ T J, THORNTON K C, DUPUREUR C M. Modulating restriction endonuclease activities and specificities using neutral detergents[J]. *BioTechniques*, 1999, 27(5):955-960.