

## 利用 InDel 标记鉴定不同橘柚品种<sup>1</sup>

余 歆<sup>1</sup>, 郭 意<sup>2</sup>, 刘小丰<sup>1</sup>, 万润楚<sup>1</sup>, 江 东<sup>1</sup>, 曹 立<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>西南大学柑桔研究所, 重庆 400712; <sup>2</sup>四川东坡中国泡菜产业技术研究院, 四川眉山 620036)

**摘 要:**【目的】橘柚 (tangelo) 是一类含有橘 (mandarin, *Citrus reticulata* Blanco) 和柚 [pummelo, *C. maxima* (Burm.) Merr.] 血统的杂种柑橘。旨在挖掘能快速有效区分和鉴定不同橘柚品种的插入缺失 (InDel) 分子标记。【方法】利用第二代测序技术对两种橘柚 (阳光 1 号和阳光 2 号) 及其亲本 (爱媛 28 号和春香) 进行全基因组重测序, 通过生物信息学分析和琼脂糖凝胶电泳检测, 挖掘、筛选和确定大于 30 bp 或小于 -30 bp 的 InDel 标记, 使用这些标记鉴定和区分 10 种不同橘柚品种, 并对共 51 份柑橘种质资源进行基因分型及遗传多样性分析。【结果】在 4 种柑橘的基因组共鉴定到 607 376 个 InDel 位点, 产生 657 414 种变异方式, 并进一步筛选出 48 个大于 30 bp 或小于 -30 bp 的 InDel 标记。他们适用于普通琼脂糖凝胶电泳检测, 操作简单, 省力省时, 成本低。这些 InDel 标记能够对 10 种橘柚进行基因分型, 区别和鉴定不同橘柚品种, 在 51 份柑橘种质资源中具有遗传多样性, 其中 I3\_744、I7\_170、I8\_516、I8\_533、I9\_669 等 InDel 标记具有高多态信息含量 (PIC) 和期望杂合度 (He) 及低最大等位基因频率 (MAF) 的特点。基于这 48 个 InDel 标记基因分型的主坐标分析 (PCoA) 展示了 51 种柑橘的遗传距离, 他们在 PCoA 二维散点图的分布与已知的柑橘类型划分总体一致。【结论】笔者发掘的 48 个适合普通琼脂糖电泳检测的 InDel 标记能准确快速区分和鉴定不同橘柚品种, 也有助于对柑橘作物的遗传多样性和群体进行分类分析。

**关键词:** 柑橘; 橘柚; InDel; 分子标记; 遗传多样性

中图分类号: S666 文献标志码: A 文章编号: 1009-9980(2024)08-0001-08

## Identification of various tangelo varieties with InDel markers

YU Xin<sup>1</sup>, GUO Yi<sup>2</sup>, LIU Xiaofeng<sup>1</sup>, WAN Runchu<sup>1</sup>, JIANG Dong<sup>1</sup>, CAO Li<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China; <sup>2</sup>Sichuan Dongpo Chinese Paocai Industrial Technology Research Institute, Meishan 620036, Sichuan, China)

**Abstract:** 【Objective】Tangelo is a type of citrus hybrid that has mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and pummelo (*C. maxima* (Burm.) Merr.) pedigrees. Owing to the characteristic blended flavors of mandarin and pummelo, tangelo is increasingly favoured by consumers, and receiving attentions from citrus breeders. Besides the conventional tangelos such as Sweet Spring and Haruka, previously we have developed two elite tangelo varieties called Yanggaung No. 1 and Yanggaung No. 2 derived from a crossing of Ehime Kashi No. 28 and Haruka. At present, the cultivated area of Yanggaung No. 1 is expanding. Precise and efficient variety identification is crucial for enforcing plant variety rights. Molecular markers, for example SNP, SSR and InDel, have been broadly applied for genotyping, variety identification, genetic diversity analysis and

收稿日期: 2024-01-16

接受日期: 2024-04-26

基金项目: 柑橘种质资源精准鉴定项目 (19230691); 抚州市“揭榜挂帅”项目 (XMBH00091)

作者简介: 余歆, 副研究员, 博士, 从事柑橘种质资源研究。Tel: 13101326453, E-mail: xin@cric.cn

\*通信作者 Author for correspondence. E-mail: caoli@cric.cn

breeding in various crops. This study aims to discover whole-genome InDels by comparison of whole-genome sequencing data of Yangguang No. 1, Yangguang No. 2 and their parents, and developed agarose gel-resolved InDel markers for genotyping and discriminating different tangelo varieties. Furthermore, the application of the selected InDel markers for genetic analysis of a wider range of citrus germplasm resources is investigated. **【Methods】** The plant materials for whole genome re-sequencing were the healthy leaves of Yangguang No. 1 and Yangguang No. 2 tangelos, and their seed parent Ehime Kashi No. 28 and pollen parent Haruka. Ten tangelo varieties were tested for the genotyping, discrimination and identification with the select InDel markers. Altogether, 20 mandarins, 10 tangelos, 2 pummelos, 5 sweet oranges (*C. sinensis* (L.) Osbeck), 2 citrons (*C. medica* L.), 3 lemons (*C. limon* (L.) Burm. f.), 2 yuzu (*C. junos* Siebold. ex Tanaka), 2 grapefruits (*C. paradisi* Macf.), 2 kumquats (*Fortunella* spp.), 3 trifoliolate oranges (*Poncirus trifoliata* Raf.) were used for genetic diversity analysis. The whole-genome re-sequencing was carried out with NovaSeq 6000 Sequencer (Illumina Inc., San Diego, USA) in Biomarker Technologies (Beijing, China). The clean reads were mapped against the genome of clementine mandarin (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) by using BWA; GATK was used to call and filter InDels; and SnpEff was applied for variant annotation. Primers for detecting the InDels were designed with BatchPrimer3 according to the flanking sequences. Population genetic parameters including major allele frequency (MAF) number of alleles (Na), number of genotypes (Ng), effective number of alleles (Ne), expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho) and polymorphic information contents (PIC) were calculated by using PowerMarker V3.25. PCoA was conducted by using “ade4” package of R program, and then the scatter plot was performed by using “ggplot2” package. **【Results】** The four varieties each generated > 10 million clean paired-end reads with > 3 billion base, Q20 and Q30 of > 96% and 92%, properly mapped ratio of > 85%, 1× and 5× coverage ratio of > 89.9% and 67.95% and average depth of > 7×. A total of 285757, 338510, 320991 and 296648 InDels in 281458, 330079, 314081 and 289508 loci were called in the genomes of Ehime Kashi No.28, Haruka, Yangguang No. 1 and Yangguang No. 2, respectively. Clearly, InDels and InDel loci in the genome of Haruka was more than that of Ehime Kashi No. 28. Indeed, it is reasonable to deduce that Ehime Kashi No. 28 (Nanko × Amakusa), whose seed parent Nanko has half clementine mandarin pedigree, should show more identity to clementine mandarin than the other three. Moreover, it was not surprising that their hybrid offspring, Yangguang No. 1 and Yangguang No. 2 had the intermediate amounts of InDels and InDel loci compared to their parents. After removing the common InDels among the different varieties, we identified 607376 InDel loci (657414 variants) with an average density of 1.08 InDel/locus. Most (92.5%, 561914) of the loci had one InDel, and 41112, 4127, 220 and 3 loci had two, three, four and five InDels, respectively. The majority (488369, 80.4%) of InDel loci were intergenic, whereas only 19.6% (119007) were intragenic. Most of the InDel were mononucleotide, followed by dinucleotide. Notably, we observed that 5315 (2.1%), 6402 (2.2%), 6226 (2.2%) and 5766 (2.3%) InDels were > 30 or <

-30 bp in length. They could be potentially used as InDel markers that can be detected through simple agarose gel electrophoresis. With the genomic DNA of the 10 tangelos and Ehime Kashi No. 28 as templates, PCR products corresponding to the 48 InDels were successfully amplified, and the bands could be separated by 2.5% agarose gel electrophoresis. The genotypes of the tested tangelos and Ehime Kashi No. 28 could be unambiguously and easily discriminative with these InDel markers. Moreover, a total of 51 citrus germplasm resources were further genotyped with these InDel markers. The PICs of these 48 markers in the total 51 citrus germplasms were ranged from 0.055 to 0.450 with an average of 0.281; the MAFs ranged from 0.510 to 0.971 with an average of 0.739; the Ho and He were in the range of 0.039 to 0.647 and 0.059 to 0.546 with averages of 0.306 and 0.350, respectively. Some markers with higher He, PIC and lower MAFs, for example I3\_744, I7\_170, I8\_516, I8\_533 and I9\_669, showing high genetic diversity, were potentially important for the genetic diversity analysis for citrus crops. In addition, we built a PCoA plot to illustrate the genetic distances among all the 51 varieties. The different varieties in same types generally tend to cluster close, fitting the conventional citrus taxonomic system, although the mandarin and kumquat groups were relatively scattering, which could be explained by interspecific or intergenetic hybrids. However, the precise genetic relations among these citrus germplasms could not be inferred from the PCoA. 【Conclusions】 The genome-wide InDels from two novel tangelos and their parents are characterised. Forty-eight InDels ( $> 30$  or  $< -30$  bp) are useful for the effective discrimination and identification of various tangelos through low-cost agarose gel electrophoresis. They are also applicable for genetic diversity and classification of true citrus fruit tree group.

**Key words:** citrus; tangelo; InDel; molecular marker; genetic diversity analysis

柑橘是我国和世界第一大果树作物, 属芸香科 (*Rutaceae*) 真正柑橘果树组 (true citrus fruit tree group) [1]。常见的柑橘作物分布于柑橘属 (*Citrus*)、枳属 (*Poncirus*) 和金柑属 (*Fortunella*) [2]。柑橘是蜜源植物, 缺乏种间甚至属间的生殖隔离, 通过自然或人工授粉易产生种间甚至属间杂交种。橘柚 (tangelo) 属于一类杂种宽皮柑橘。一些橘柚是葡萄柚 (*C. paradisi* Macf.) 或柚 [*C. maxima* (Burm.) Merr.] 和橘 (*C. reticulata* Blanco) 的杂种[3], 例如奥兰多 (Orlando) 和明尼奥拉 (Minneola) 橘柚就是邓肯 (Duncan) 葡萄柚和丹西 (Dancy) 红橘的杂种后代。广义上, 具有橘柚风味特征的橘柚杂种后代, 例如费尔柴尔德 [Fairchild, 奥兰多橘柚与克里曼丁橘 (Clementine) 的杂种], 都可被认为是橘柚。此外, 日本杂柑春香 (Haruka) 也被认为是橘柚, 这是因为春香是日向夏 (Yuganatsu, *C. tamurana* hort. ex Tanaka) 和夏蜜柑 (Natsudaidai, *C. natsudaidai* Hayata) 的杂种后代[4], 其父本夏蜜柑在柑橘斯文格 (Swingle) 分类系统中属于柚类。由于橘柚兼具橘和柚的特征, 风味独特, 较易剥皮, 近年来越来越受到消费者的欢迎和柑橘育种工作者的重视。

中国的橘柚育种工作起步晚, 但目前已有所突破。笔者所在的研究团队在爱媛 28 号 [Ehime Kashi No. 28, 为南香 (Nanko) 与天草 (Amakusa) 橘橙的杂交后代] 与春香橘柚的杂交后代中, 筛选出了两个性状优良、具有商业价值的株系, 分别命名为阳光 1 号和阳光 2

号橘柚，其中阳光 1 号已获得植物新品种权，目前在中国的栽培面积约为 3300 hm<sup>2</sup>，并正在迅速推广。

分子标记 (molecular marker) 是植物基因分型 (genotyping)、品种鉴定、遗传多样性分析和辅助育种的重要工具<sup>[5-8]</sup>。在柑橘研究中，除了广泛应用的 SSR (simple sequence repeats)<sup>[9-24]</sup>和 SNP (single nucleotide polymorphism)<sup>[18, 24-30]</sup>标记之外，InDel (insertion-deletion) 因其含量丰富且具共显性的特点，也受到了人们的关注。在较早的研究中，Garcia-Lor 等<sup>[24]</sup>对 45 种真正柑橘果树组植物的 27 个基因进行桑格 (Sanger) 测序，获得了 50 个 InDel 标记，结合 SSR 和 SNP，他们可有效应用于对真正柑橘果树组植物的系统发育和种间遗传结构分析。Fang 等<sup>[31]</sup>根据已公布的多种柑橘的全基因组测序数据，共挖掘到 1958 个 InDel 标记，其中 268 个为 30~200 bp 的大片段 InDel，这些标记可区分柑橘属、枳属和金柑属植物。日本学者 Noda 等<sup>[32]</sup>利用 119 个适用于琼脂糖凝胶电泳检测的 InDel，成功地将温州蜜柑 (satsuma) 的合子胚从珠心胚群体中筛选出来；后又从中筛选了 28 个标记成功地区分了 31 种杂种柑橘<sup>[33]</sup>。汤雨晴等<sup>[34]</sup>鉴定了金兰柚的全基因组 InDel，并筛选出 2 个能将金兰柚与其他 47 种柚类区分的 InDel 标记。

笔者首先对阳光 1 号和阳光 2 号橘柚及其亲本爱媛 28 号和春香进行全基因重测序，从中发掘出 48 个适用于普通琼脂糖电泳检测的 InDel 标记，并进一步评价了这些 InDel 在 51 种柑橘种质资源中的遗传多样性，用主坐标分析 (PCoA) 展示了他们的遗传距离。基于这 48 个 InDel 标记的基因分型是区分和鉴定橘柚品种的有效简易方法，也可应用于真正柑橘果树组植物的遗传多样性和群体分类分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

本研究共使用 51 份柑橘种质资源，包括 2 种枸橼 (*C. medica* L., 普通枸橼和佛手)、2 种金柑 (*Fortunella* spp., 宁波罗浮和四季橘)、20 种橘类 (立花橘、汕头酸橘、武隆酸橘、克里曼丁橘、尾张、宫川早生、粗皮狗屎柑、邱山野橘、芦柑、椪柑、大红袍、清见、春见、砂糖橘、中柑所 5 号、无核纪州柑、本地早、伊予柑、药香柑和爱媛 28 号)、10 种橘柚 (*C. reticulata* Blanco, 春香、阳光 1 号、阳光 2 号、奥兰多、明尼奥拉、甜春、科肯、诺瓦、费尔柴尔德和清峰)、3 种柠檬 [*C. limon* (L.) Burm. f., 里斯本、尤力克和北京柠檬]、2 种葡萄柚 (马叙和胡柚)、5 种甜橙 [*C. sinensis* (L.) Osbeck, 塔罗科、北碚 447、纽荷尔、哈姆林和伏令夏橙]、2 种香橙 (*C. junos* Siebold. ex Tanaka, 资阳香橙和蟹橙)、2 种柚 (强得勒和琯溪蜜柚) 和 3 种枳 (*P. trifoliata* Raf., 孝感枳、湖北早实枳和飞龙枳)，其中阳光 1 号和阳光 2 号橘柚来自重庆奔象果业有限公司，其他种质资源来自国家柑橘种质资源圃。

### 1.2 基因组 DNA 提取

使用 RaPure Plant DNA Kit (美基生物, 广州) 提取健康成熟叶片的基因组 DNA。使用 Nanodrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific, 美国) 检测所提取 DNA 浓度和质量。当 DNA

浓度大于  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  且  $\text{OD}_{260/280}$  和  $\text{OD}_{260/230}$  在 1.8~2.1 时,可用于后续试验的建库测序和 PCR 扩增。

### 1.3 全基因组重测序及 InDel 挖掘

用 Bioruptor Pico 系统 (Diagenode, 比利时) 对所提基因组 DNA 进行剪切, 形成约 350 bp 的片段。使用 TrueLib DNA Library Rapid Prep Kit (依科赛生物, 深圳) 建库, 用 NovaSeq 6000 Sequencer (Illumina, 美国) 进行平均深度为 10× 的双端测序。滤去低质量 (N 比例大于 10% 或 Phred < 10 的比例小于 50%) 的读长 (read) 后, 用 BWA<sup>[35]</sup> 与克里曼丁橘的基因组序列 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 比对, 用 GATK<sup>[36]</sup> 获取和过滤 InDel。过滤标准为 (1) 滤去 10 bp 内的相邻 InDel; (2) 变异位点的质量值 (QUAL) 大于 30; (3) 变异质量值与覆盖深度得到的比值 (QD) 大于 2.0; (4) 比对质量值的均方根 (MQ) 大于 40; (5) 费舍尔精确检验 (Fisher's exact test) 正负链偏差 (FS) 小于 60; (6) 其他 GATK 设定的默认值。所得变异用 SnpEff<sup>[37]</sup> 进行注释。

### 1.4 引物设计和 PCR 扩增

使用 BatchPrimer3<sup>[38]</sup>, 对变异长度大于 30 bp 或小于 -30 bp 的 InDel 的两端设计引物, PCR 产物长度约为 200 bp, 引物信息见表 1。用 MonAmp™ 2× Taq Mix (莫奈生物, 上海) 进行 PCR, 反应程序为 94 °C 3 min, 然后 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环, 最后 72 °C 反应 2 min。PCR 产物用含 1/10 000 AidRed (艾得莱, 北京) 的 2.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 在紫外灯下拍照记录。

表 1 用于检测 48 个 InDel 标记的引物

Table 1 Primers for detecting 48 InDel markers

名称 Name	片段框 架 Scaffold	位置 Position	引物序列 <sup>a</sup> Sequence	PCR 产物长 度 (参考) <sup>b</sup> PCR product size (reference)	PCR 产物长 度 (变异) <sup>c</sup> PCR product size (variant)
I1_767	1	74767	A ACTAAACAGCCCCGATTT AGCCATTTCAAGAGGAAGTAGAA	187	220
I1_191	1	19397191	A AAGCCACGAGAGTTACAGCAA TTTCAACGACAAACACCTCCT	183	153
I1_846	1	21522846	T TTCCAGGCTCAAGTTACAGC GCACAATAGCGTTTACAATAATCA	223	183
I1_400	1	27287400	C GCAACAGCGAATACCTCAGA CTTATGGTGGCGAGTTTCCT	174	232
I1_184	1	28202184	T TACATTGCGTCTGTCTTGG GCATCAACATCTCCATAAACGA	213	178
I1_639	1	28494639	G GCAAGTTCAGGTCATCTCCAG TCAAGCAGCAGACATTCAGTT	208	176
I2_691	2	3793691	C CGTACCCTGGCAAATCTA GCAAATCCAAGTATCACGAAAA	192	231
I2_248	2	17711248	T TCCACGAGTAAGGCTAAGGAA GGGGAATGGGTAATGTTTAC	186	140
I2_815	2	28696815	T TGGGGTTAGGTTTCAATTTG TCCTGTTTTCCGATTATGTCAA	221	190
I2_137	2	35384137	T TAAGAGCAAAGGCAACAAGC TTCACCAGAAAGATGATTGGA	234	270
I3_744	3	173744	C CTGTTTTGTCACTGCCCGTA TACACCCCGAACCCCACT	180	256
I3_068	3	879068	A AATTCCTCCTGCAGCAACC TTCAACTGAAGCATTGCCGG	257	217
I3_321	3	17751321	T TCTGAACAGGCAATGATGAGC AGGAGATTTCTGGTGCAAAGC	208	157
I3_311	3	20566311	A ACTTTGCTTGTGTGCTCACT CGTTCGAAGCCTAGACCTCT	175	208

I3_326	3	20885326	GCGGGAATATTTGAACTCACCA GGTCATTGCTGCCATTTC	273	231
I3_890	3	31542890	CCGAGCAGCACAGAACAT CACGACGGGGAGAGAATAAA	210	169
I3_175	3	42136175	CAGGGTGATTGCTTGCCCTC GAGAAATTGGCTCCATGAATTGC	185	155
I4_604	4	764604	TGTCAAATTCGCTATGCTCGT CCGAGATGCACAAAATTGAACC	259	206
I4_690	4	1095690	TGGGCAGTTTTGGTTGTGTG TCCCGCGATAACAGATACCT	192	239
I4_085	4	7106085	GATTGGCTCAACAGGTCCAC TGACAAGCAAACCTCGAATCTGA	241	289
I4_513	4	9625513	CGGAGATTGACACAGGAGTG AGATTGGTGGGTTGAGAAGC	237	175
I4_457	4	23930457	ACTGGTCCCTGTGATGCTAA ACCCAAAGTCTATCGAGCCC	237	201
I5_453	5	1369453	AAACCGCCCTGGATTTGT GCAACCCTGATTTCTTCCTG	207	175
I5_676	5	2274676	GGCAGCAAAGGCAATAAAAAC TGGTCTACAGGAGGTGTCCA	250	287
I5_322	5	29398322	CTCATTGCGTCCCTTCAAC GCTTCTGTTCCAGCCCTAA	235	193
I5_445	5	43058445	TCCACTTACCCTTCTTCCAAC AACTTCACCACCCCAGACAG	229	189
I6_283	6	2190283	GAGAGAGAGAGAGGGGAGAGAAT GA	238	275
I6_552	6	7580552	ACCTTGGGATTGTTGTGTCA GAACTTTGACCATTTTCCCGTA	276	235
I6_309	6	9762309	CTTCCCATTTTGCCTGAG AAGAGGCGAGGAGCAGTTG	233	288
I6_502	6	10107502	TGTTGTTTTGTTGGCTATTTCC GTGGTTGTGAATAAGGGCATT	221	182
I6_890	6	17090890	CGGACCCAAACGAATCTAAA GAGCAAGGAGCCATTTGAG	226	260
I6_401	6	20009401	GCCATCTTCTACACCAAGCA CGTGTATGCTCTCAAAGTCTCAA	204	170
I6_280	6	20088280	GATGGAAACCCGATTACGAA TCATGCTCTCCAAACTCTCCA	244	208
I6_681	6	25481681	GGATTGGCATTATATCCACCA CCGCAAAACACGCAAAAA	262	210
I7_101	7	468101	AGAAGTAACAATGACAGGACACG AAACCTCTCCAACCTTTCATCG	235	203
I7_449	7	963449	GTCGGCTTTTGGCTTCTCAT TGTGTTACGGCAGGTATGGT	269	331
I7_272	7	2253272	TGCGTCTCCAGTTCTATGAGG TCCCAGTCCCCATAAGTAA	231	201
I7_826	7	2259826	AATCCGCAACAAATGAGAGG TTTGCAGTGAAGGAACAGT	264	224
I7_845	7	2627845	CCATCATTGGCTCCCACA GAGAGCATTGTTTGGGGGTA	244	193
I7_170	7	19369170	GGGAGTCGCAGAACCTTGTA TCAGTGTGTTGGGCTTGAGAA	256	287
I8_554	8	949554	GATAGATTAGTTGATGTGTGGCGT A	219	189
I8_516	8	18035516	GCCAACGAGAGAAGAAGGAT CATTGCTGCCTGGTGAGTT	217	273
I8_533	8	20194533	AACCAATCTAAAAACCCAGCA AGGAGCAAACCTGCTTGTGT	177	146
I9_200	9	955200	TCTCTGAACCAATAATCACTACCG ATGCTTCTTCTGCCAAGTCT	161	192
I9_272	9	3463272	TCACCGAAACATCATAACCTTCA TTTACCCGCTTGATGTTCA	231	201
I9_459	9	6543459	TTCTACCAACCTTATCCCAACTG TCTGCTACACTTATCCCCTACGA	185	231
I9_669	9	14389669	GAAAAAGGGGCACGGATT GCAAGGGGCTGAAAGACTAC	255	211
I9_386	9	24807386	GGCTGAGAGATGAGGGAGTTC CGAAATAACAAAAGGCACCAA	223	187
			ACTTGGAGTTGCTGGATGCT TTAGCGGTGCTCATTTCCTC		

注：a. 第一行和第二行分别为上游引物序列和下游引物序列；b. 通过克里曼丁橘参考基因组计算 PCR 产物的理论长度；c. 以 InDel 变异基因组为模板的 PCR 产物的理论长度。

Note: a. the first and second row indicated the upstream and downstream prime sequence; b. the theoretical PCR size from Clementine reference genome; c. the theoretical PCR size from the genome of InDel variant.

### 1.5 遗传多样性分析和主坐标分析 (PCoA)

使用 PowerMarker (V3.25) 计算群体遗传学参数, 包括基因型数量 ( $N_g$ )、等位基因数量 ( $N_a$ )、有效等位位点数量 ( $N_e$ )、最大等位基因频率 (MAF)、 $H_e$  (期望杂合度)、 $H_o$  (观

测杂合度) 和 PIC (多态信息含量)。主坐标分析基于多份柑橘种质资源的欧氏遗传距离, 使用 R 语言 ade4 程序包, 用 ggplot2 程序包绘制散点图。

## 2 结果与分析

### 2.1 全基因组 InDel 的挖掘

阳光 1 号、阳光 2 号、爱媛 28 号和春香的基因组重测序原始数据 (fastq 格式) 已上传

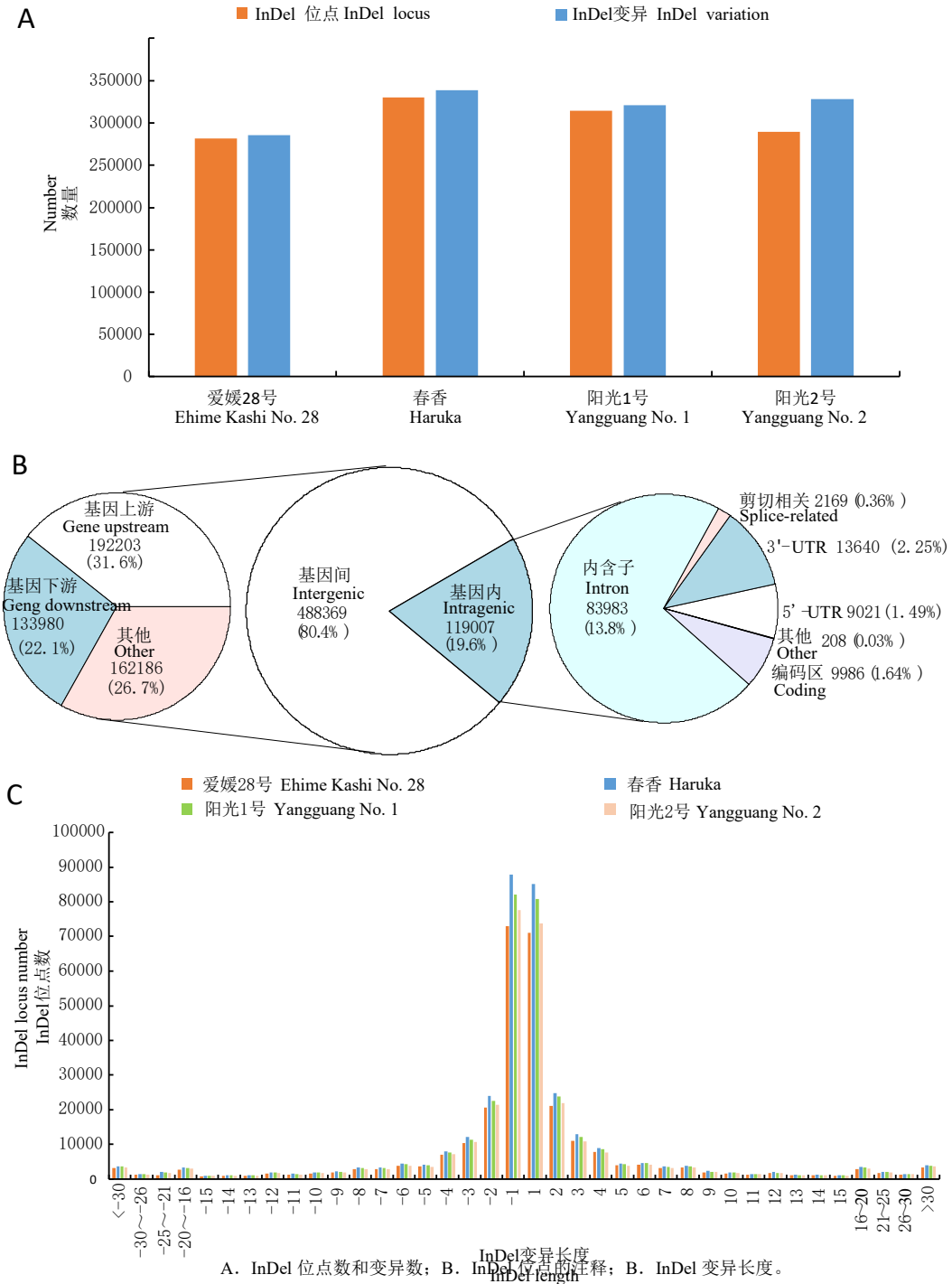
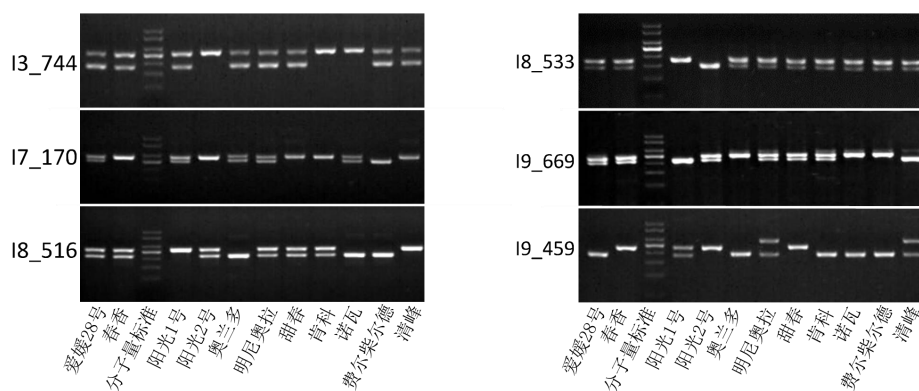


图 1 两种橘柚 (阳光 1 号和阳光 2 号) 及其亲本 (爱媛 28 号和春香) 的全基因组 InDel  
**Fig. 1 Whole-genome InDel of the two tangelos (Yangguang No. 1 and Yangguang No. 2) and their parents (Ehime Kashi No. 28 and Haruka)**

至中国国家基因库(<https://db.cngb.org>, 项目号 CNP0001863)。每一个品种都产生了超过 1000 万个高质量读长 (read) 和 30 亿个碱基, Q20 和 Q30 均分别大于 96%和 92%, 正确定位到克里曼丁橘参考基因组的读长比例均大于 85%, 1×基因组覆盖度均超过 89.9%, 5×基因组覆盖度超过 67.95%, 平均深度超过 7×。以上结果表明, 测序数据质量良好, 可用于后续的变异检测及相关分析。

通过与克里曼丁橘的基因组对比以及 GATK 软件对变异的提取和过滤, 笔者在 4 个品种的基因组中分别获得了 285 757 (爱媛 28 号)、338 510 (春香)、320 991 (阳光 1 号) 和 296 648 个 (阳光 2 号) InDel 位点 (图 1-A)。作为杂交后代, 阳光 1 号和阳光 2 号的 InDel 位点数目介于两个亲本之间。爱媛 28 号的 InDel 数目明显低于春香, 这是因为爱媛 28 号是南香 (Nanko) 和天草 (Amakusa) 的杂交后代, 而南香的母本正是克里曼丁橘, 即与春香相比, 爱媛 28 号与克里曼丁橘有更近的亲缘关系。在剔除 4 个品种共有的相同 InDel 后, 鉴定到 607 376 个 InDel 位点, 共有 657 414 种变异方式。绝大多数 (92.5%, 561 914 个) 位点只有一种变异方式, 其余 41 112、4127、220 和 3 个位点则存在 2、3、4、5 种变异。其中 19.6% (119 007 个) 的 InDel 位点位于基因内, 其余 (80.4%, 488 369 个) 位于基因间。前者有 192 203 和 133 980 个处于分别基因上游和下游 5 kb 以内; 后者有 83 983 个 (70.6%) 位于内含子, 其余 35 024 个 (29.4%, 占总 InDel 位点的 5.77%) 与基因编码相关, 包括编码区 (1.64%, 9986 个)、剪切相关区 (0.36%, 2169 个)、5'-UTR (1.49%, 9021 个)、3'-UTR (2.25%, 13 640 个) (图 1-B)。变异长度为 1 或 2 的 InDel 最为丰富, 而大片的 InDel 较少 (图 1-C), 其中有 2.1%~2.3% (5312~6402 个) 的 InDel 片段大于 30 bp 或小于 -30 bp。这些大片的 InDel 有潜力适用于琼脂糖凝胶电泳检测的分子标记的开发。位于非编码区以及变异长度短的 InDel 数量比例低, 反映这些 InDel 对基因功能的影响较小, 承受较小的选择压力。

## 2.2 适用于琼脂糖凝胶电泳检测的 InDel 分子标记的开发

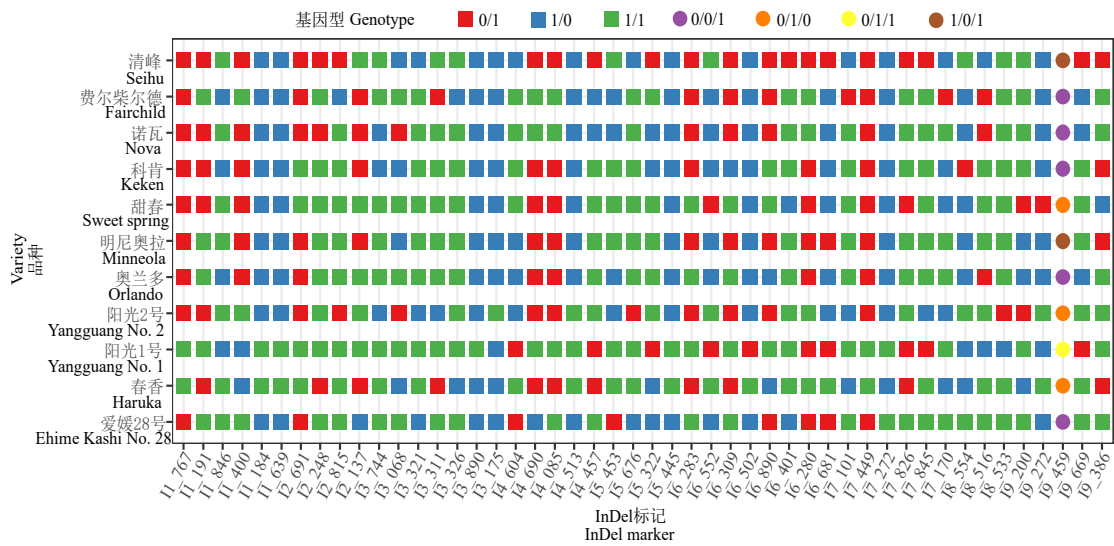


PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖电泳分离。较亮 DNA 分子量标准带为 250 bp, 上下邻近的条带分别 400 bp 和 300 bp。  
 PCR products of the 48 InDel markers were separated by 2.5% agarose electrophoresis. The brightest band of the DNA marker (M) was 250 bp, whose neighboring bands were 300 and 400 bp above and 200 and 150 bp below.

图 2 对爱媛 28 号和 10 种橘柚的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplification for 10 tangelo varieties and Ehime Kashi No. 28





将 PCR 产物条带的存在或缺失记为 1 或 0，从大至小记为 InDel 的基因分型。

The presence or absence of the PCR product bands were recorded with 1 or 0, and the combination from long to short bands indicated the InDel genotype.

图 3 用 48 个 InDel 分子标记对爱媛 28 号和 10 种橘柚的基因分型

Fig. 3 Genotyping 10 tangelo varieties and Ehime Kashi No. 28 based on the 48 InDel markers

根据上述大于 30 bp 或小于 -30 bp 的 InDel 位点的旁邻序列，笔者共设计 60 对 InDel 引物，分散在基因组的 9 个片段框架 (scaffold) 中，其中有 48 对引物可对这 10 种橘柚和爱媛 28 号的基因组扩增出 97 条清晰条带。其中多数标记只产生两条带，说明只有一种变异方式，其条带位置与通过重测序数据和引物位置计算的理论值一致；而 I9\_459 在明尼奥拉和清峰[清见(Kiyomi)橘橙×明尼奥拉]中出现了第三条带，说明很可能产生除理论值之外的第 2 种 InDel 变异方式。图 2 展示了 I3\_744、I7\_170、I8\_516、I8\_533、I9\_669 和 I9\_459 的 PCR 扩增电泳图谱，扩增条带清晰可见，多态性明显。图 3 概括了由所有 48 个标记所产生的基因型，能有效对这 10 个橘柚品种以及爱媛 28 号进行区分和鉴定。其中奥兰多和明尼奥拉最为接近，在 12 个位点上有 15 条带的差异；阳光 1 号和阳光 2 号差别最大，在 42 个位点上有 47 条带的差异。奥兰多和明尼奥拉皆为邓肯葡萄柚和丹西红橘的杂种姐妹系，遗传关系近，基因型较为接近。虽然阳光 1 号和阳光 2 号也是姐妹系，但是笔者对 InDel 位点的选择并非完全随机，偏向选择在阳光 1 号、阳光 2 号、爱媛 28 号和春香相互之间具有差异的位点，因而差异较大的基因型并不能反映阳光 1 号和阳光 2 号之间真实的遗传距离。

### 2.3 对 48 个 InDel 标记在 51 份柑橘种质资源中的遗传多样性分析

鉴于这些 InDel 标记可有效对上述 10 种橘柚和爱媛 28 号进行基因分型和区分鉴定的事实，笔者将研究范围扩大到 51 份柑橘种质资源，包括 10 种橘柚、20 种橘、5 种甜橙、3 种柠檬、3 种枳、2 种柚、2 种葡萄柚、2 种枸橼、2 种香橙、2 种金柑。InDel 标记在这 51 份柑橘种质资源中遗传多样性分析结果可参见表 2。其 PIC 介于 0.055 (I1\_639、I1\_767 和 I7\_449) 和 0.450 (I8\_516) 之间，平均 0.281；MAF 介于 0.510 (I6\_401) 和 0.971 (I1\_639) 之间，

平均 0.739;  $H_o$  介于 0.039 (I1\_184、I5\_445、I6\_502 和 I6\_681) 和 0.647 (I1\_846) 之间, 平均 0.306;  $H_e$  介于 0.059 (I1\_767、I1\_639 和 I7\_449) 和 0.546 (I8\_516) 之间, 平均 0.350。一些标记 (例如 I3\_744、I7\_170、I8\_516、I8\_533 和 I9\_669) 具有较高的  $H_e$ /PIC 和低 MAF, 表明他们在群体中有较高的遗传多样性, 对柑橘作物的遗传多样性分析较为重要。

表 2 48 个 InDel 标记在 51 份柑橘种质资源中的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of the 48 InDel markers in the 51 *C. germplasm* resources

InDel 标记 InDel Marker	最大等位基 因频率 MAF	基因型数量 Ng	期望杂合度 He	观测杂合度 Ho	多态信息含量 PIC
I1_767	0.971	2	0.057	0.059	0.055
I1_191	0.863	2	0.237	0.275	0.209
I1_846	0.676	2	0.438	0.647	0.342
I1_400	0.627	3	0.468	0.314	0.358
I1_184	0.961	3	0.075	0.039	0.073
I1_639	0.971	2	0.057	0.059	0.055
I2_691	0.667	3	0.444	0.353	0.346
I2_248	0.618	3	0.472	0.412	0.361
I2_815	0.647	3	0.457	0.392	0.352
I2_137	0.804	3	0.315	0.353	0.266
I3_744	0.598	5	0.496	0.549	0.391
I3_068	0.647	3	0.457	0.510	0.352
I3_321	0.716	3	0.407	0.451	0.324
I3_311	0.657	3	0.451	0.333	0.349
I3_326	0.657	3	0.451	0.529	0.349
I3_890	0.824	2	0.291	0.353	0.248
I3_175	0.931	3	0.128	0.098	0.120
I4_604	0.784	3	0.338	0.275	0.281
I4_690	0.745	3	0.380	0.196	0.308
I4_085	0.853	2	0.251	0.294	0.219
I4_513	0.951	3	0.093	0.059	0.089
I4_457	0.745	3	0.380	0.157	0.308
I5_453	0.775	3	0.349	0.255	0.288
I5_676	0.618	3	0.472	0.412	0.361
I5_322	0.608	3	0.477	0.588	0.363
I5_445	0.961	3	0.075	0.039	0.073
I6_283	0.804	3	0.315	0.275	0.266
I6_552	0.755	3	0.370	0.216	0.302
I6_309	0.657	3	0.451	0.451	0.349
I6_502	0.961	3	0.075	0.039	0.073
I6_890	0.667	3	0.444	0.275	0.346
I6_401	0.510	6	0.535	0.373	0.428
I6_280	0.627	3	0.468	0.078	0.358
I6_681	0.745	3	0.380	0.039	0.308
I7_101	0.755	3	0.370	0.451	0.302
I7_449	0.971	2	0.057	0.059	0.055
I7_272	0.931	3	0.128	0.098	0.120
I7_826	0.578	3	0.488	0.373	0.369
I7_845	0.676	3	0.438	0.451	0.342
I7_170	0.549	3	0.495	0.549	0.373
I8_554	0.784	3	0.338	0.353	0.281
I8_516	0.539	4	0.546	0.471	0.450
I8_533	0.520	3	0.499	0.569	0.375
I9_200	0.667	3	0.444	0.353	0.346
I9_272	0.912	3	0.161	0.137	0.148
I9_459	0.647	5	0.481	0.333	0.397
I9_669	0.569	3	0.491	0.392	0.370
I9_386	0.794	3	0.327	0.373	0.274
平均值	0.739	3.021	0.350	0.306	0.281

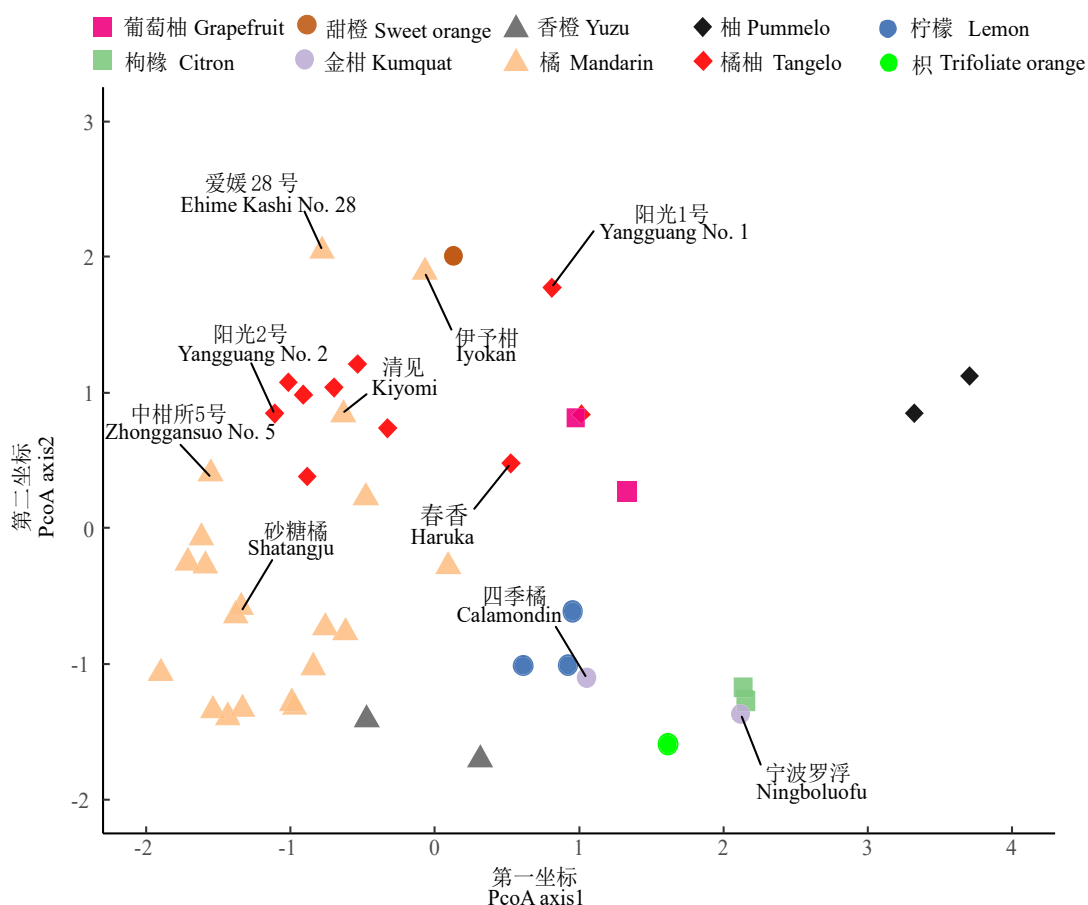


图 4 基于 48 个 InDel 标记基因分型的 51 份柑橘种质资源的 PCoA

Fig. 4 PCoA of 51 *C. germplasm* resources based on the genotypes with the 48 InDel markers

此外，基于这些 InDel 标记的基因分型，笔者进一步用 PCoA 分析这 51 份柑橘种质资源的遗传距离。PCoA 第一坐标和第二坐标可分别解释 18.29%和 15.72%的总变异。在 PCoA 二维散点图中（图 4），相同类型的柑橘聚集在一起，其中 5 种甜橙或 3 种枳只呈现出单点，说明这些甜橙或枳品种的基因型完全一致，不同类型的柑橘则距离较远。两种柚类（强得勒和琯溪蜜柚）第一坐标方向远离其他柑橘，反映他们较少的来自其他柑橘类型的基因渗入。枸橼、枳、金柑、柠檬分布于散点图的偏右下侧。2 种金柑（四季橘和宁波罗浮）相距较远，这是因为四季橘是有宽皮柑橘血统的金柑。相比于宁波罗浮，四季橘在散点图中更靠近橘类。橘类总体位于左下侧，但分布较为离散，这是由于一些橘类渗入其他类型柑橘的血统，例如伊予柑（酸橙×丹西红橘<sup>[4]</sup>）、中柑所 5 号（爱媛 28 号×砂糖橘）、清见（温州蜜柑×甜橙<sup>[4]</sup>），导致在第二坐标方向上与橘柚和甜橙类靠近。橘柚主要分布于散点图的左侧中上部，在第一坐标方向上与橘类一致，第二坐标方向上则与柚和葡萄柚接近。总体上，基于这 48 个 InDel 标记的 PCoA 清楚地展示了这 51 份柑橘种质资源的遗传距离，他们在二维散点图的分布结果与已知的柑橘类型划分总体一致。

### 3 讨论

橘柚风味独特, 日益受到消费者欢迎, 已经得到柑橘育种工作者的重视。准确的品种鉴定不仅是新品种保护的前提, 也有利于苗木真实性鉴别。基于形态特征的 DUS[特异性 (distinctness)、一致性 (uniformity)、稳定性 (stability)]测试仍然是新品种鉴定的公认方法<sup>[39]</sup>, 但在果树作物中存在周期长、近似品种难筛选的挑战。分子标记技术能准确确定品种的遗传特征, 是品种鉴定的重要手段<sup>[5-8]</sup>。InDel 标记有密度大、多态性丰富、准确性高、变异稳定性和检测简便等优点, 已经在柑橘中有所发掘。现有的柑橘 InDel 标记主要应用于真正柑橘果树组植物的整体系统发育和遗传多样性分析<sup>[25-31]</sup>, 或仅针对柚类<sup>[34]</sup>、温州蜜柑<sup>[32]</sup>和某些特定杂柑<sup>[33]</sup>的品种鉴定, 很难直接应用于对橘柚品种的区别和鉴定。笔者通过对两个新橘柚品种及其亲本的全基因组重测序, 针对性地发掘和筛选适合琼脂糖电泳检测的大片段 InDel 标记。基于这些 InDel 标记的基因型不仅能有效区分和鉴定橘柚, 而且操作简单, 辨识度高, 成本低。此外, 如果将这些 InDel 标记联合形态特征鉴定, 不仅能提高鉴定的精确度, 也可适用于其他柑橘的鉴定。笔者利用其中 33 个 InDel 标记, 结合部分 DUS 测试, 成功地将 5 个未知品种鉴定为无核金诺<sup>[40]</sup>。

早期的 InDel 挖掘来自于对部分基因的低通量测序, 通过对 45 种真正柑橘组植物的 27 个基因的桑格测序, Garcia-Lor 等<sup>[24]</sup>获得了 50 个 InDel 标记。第二代测序技术的发展使得高密度、全基因组范围的 InDel 发掘成为可能。植物基因组中的 InDel 含量丰富, 仅次于 SNP。笔者在 4 种柑橘基因组中共发掘到 20~30 万的 InDel 位点, 其总量与金兰柚<sup>[33]</sup>、茶叶<sup>[41]</sup>和鹰嘴豆<sup>[42]</sup>相似, 其密度为每 1.7~2.4 个/kb, 远远高于水稻的 15.8~21.2 个/Mb<sup>[43]</sup>和茶叶的 84.5 个/Mb<sup>[41]</sup>。InDel 的产生频率、测试品种与参考基因组品种的亲缘关系、测序深度和数据过滤标准都直接影响所挖掘的 InDel 密度。本研究较大的 InDel 密度可能反映了这 4 种柑橘与参考物种克林曼丁橘有相对较远的血缘关系。阳光 1 号和阳光 2 号的母本爱媛 28 号 (天草×清见) 具有葡萄柚和甜橙的血缘, 而其父本春香为日向夏和夏蜜柑的杂种后代<sup>[4]</sup>, 他们与克林曼丁橘都属不同物种。

在主坐标分析中, 不同类型的柑橘总体分布于不同区间。然而, 他们的遗传距离并不完全符合主流的柑橘分类观点<sup>[1]</sup>, 例如金柑和枳分别属于金柑属和枳属, 在主坐标分析中, 两者却与柑橘属的枸橼靠近, 但又与柑橘属的柚类和葡萄柚相距较远, 即并未呈现出与其他柑橘异属的特征。其主要原因可能有: (1) 笔者选择的 InDel 标记需要优先区别和鉴定阳光 1 号、阳光 2 号、春香和爱媛 28 号, 具有偏向性; (2) 考虑到真正柑橘果树组植物复杂的遗传背景 (跨属、多物种、存在种间和属间杂种), 48 个 InDel 标记在数量上不足以分析精确的遗传关系。在多种类型的柑橘基因组中随机挖掘数量充足的大片段 InDel 标记有助于更加精确地分析柑橘的分类和遗传进化。

## 4 结论

通过全基因组重测序数据, 笔者发掘了 48 个适合普通琼脂糖电泳检测的 InDel 标记, 能清晰地对 10 个橘柚品种进行基因分型, 可准确快速区分和鉴定不同橘柚品种, 且操作简单,

辨识度高,成本低。在 51 种柑橘种质资源中,一些高 PIC 和 *He*、低 MAF 的 InDel 标记(例如 I3\_744、I7\_170、I8\_516、I8\_533、I9-669)具有较丰富的遗传多样性。基于这 48 个 InDel 的基因分型,主坐标分析展示了不同柑橘品种的遗传距离,其结果总体符合已知的不同类型的柑橘分类,但不足以分析其精确的遗传关系。

致谢:感谢袁高鹏博士对本文的修改和宝贵意见。

#### 参考文献 References:

- [1] 周开隆, 叶荫民. 中国果树志: 柑橘卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 2010.  
ZHOU Kailong, YE Yinmin. Fruit trees in China: Volume citrus[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2010.
- [2] 周常勇. 柑橘: 中国果树科学与实践[M]. 西安: 陕西新华出版传媒集团, 2020.  
ZHOU Changyong. Citrus: Fruit science and practice in China[M]. Xi'an: Shaanxi Xinhua Publishing and Media Group, 2020.
- [3] OUESLATI A, SALHI-HANNACHI A, LURO F, VIGNES H, MOURNET P, OLLITRAULT P. Genotyping by sequencing reveals the interspecific *C. maxima/C. reticulata* admixture along the genomes of modern citrus varieties of mandarins, tangors, tangelos, orangelos and grapefruits[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0185618.
- [4] SHIMIZU T, KITAJIMA A, NONAKA K, YOSHIOKA T, OHTA S, GOTO S, TOYODAA, FUJIYAMA A, MOCHIZUKI T, NAGASAKI H, KAMINUMA E, NAKAMURA Y. Hybrid origins of citrus varieties inferred from DNA marker analysis of nuclear and organelle genomes[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166969.
- [5] SORIANO J M. Molecular marker technology for crop improvement[J]. Agronomy, 2020, 10(10): 1462.
- [6] AHMAD R, ANJUM M A, BALAL R M. From markers to genome based breeding in horticultural crops: an overview[J]. Phyton, 2020, 89(2): 183-204.
- [7] 陈星, 高子厚. DNA 分子标记技术的研究与应用[J]. 分子植物育种, 2019, 17(6): 1970-1977.  
CHEN Xing, GAO Zihou. The study and application of DNA molecular marker technique[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(6): 1970-1977.
- [8] AHMAD R, ANJUM M A, NAZ S, BALAL R M. Applications of molecular markers in fruit crops for breeding programs: A review[J]. Phyton, 2021, 90(1): 17-34.
- [9] 张连峰, 何建, 冯焱, 刘利, 郭启高, 梁国鲁. 金柑属及其近缘属植物亲缘关系的 SSR 分析[J]. 果树学报, 2006, 23(3): 335-338.  
ZHANG Lianfeng, HE Jian, FENG Yan, LIU Li, GUO Qigao, LIANG Guolu. Phylogenetic relationships among *Fortunella* and its relatives as revealed by SSR markers[J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(3): 335-338.
- [10] 杨海健, 周心智, 谭平, 张云贵, 弓亚林, 杨世勇, 钟昭林. 利用 SSR 和 SRAP 标记分析香橙资源的遗传多样性[J]. 西南农业学报, 2014, 27(4): 1678-1681.  
YANG Haijian, ZHOU Xinzhi, TAN Ping, ZHANG Yungui, GONG Yalin, YANG Shiyong, ZHONG Zhaolin. Genetic diversity analysis of junos by SRAP and SSR markers[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2014, 27(4): 1678-1681.
- [11] 徐静, 谭李梅, 符红艳, 朱志媚, 龙栋冰, 胡哲, 马先锋, 邓子牛. 利用分子标记对 14 份枸橼种质进行多样性分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(14): 4726-4737.  
XU Jing, TAN Limei, FU Hongyan, ZHU Zhimei, LONG Libing, HU Zhe, MA Xianfeng, DENG Ziniu. Genetic

- diversity analysis of 14 citron genotypes based on molecular markers[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(14): 4726-4737.
- [12] 向素琼, 何建, 何波, 汪卫星, 李晓林, 郭启高, 何桥, 梁国鲁. 沙田柚多倍体遗传差异的 SSR 分析[J]. *果树学报*, 2009, 26(3): 382-385.
- XIANG Suqiong, HE Jian, HE Bo, WANG Weixing, LI Xiaolin, GUO Qigao, HE Qiao, LIANG Guolu. Genetic diversity of polyploids of Shatianyou pomelo by SSR markers[J]. *Journal of Fruit Science*, 2009, 26(3): 382-385.
- [13] 王旭, 彭洁, 朱延松, 杨胜男, 张晓楠, 余洪, 江东, 梁大成. 基于 SSR 分子标记的 68 份柚类种质资源亲缘关系分析[J]. *安徽农业科学*, 2021, 49(4): 100-103.
- WANG Xu, PENG Jie, ZHU Yansong, YANG Shengnan, ZHANG Xiaonan, YU Hong, JIANG Dong, LIANG Dachen. Analysis of genetic relationship of 68 pummelo germplasm resources based on SSR molecular marker[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49(4): 100-103.
- [14] 庞晓明, 胡春根, 邓秀新. 用 SSR 标记研究柑橘属及其近缘属植物的亲缘关系[J]. *遗传学报*, 2003, 30(1): 81-87.
- PANG Xiaoming, HU Chungeng, DENG Xiuxin. Phylogenetic relationships among *Citrus* and its relatives as revealed by SSR markers[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2003, 30(1): 81-87.
- [15] 刘勇, 吴波, 刘德春, 孙中海. 江西柑橘地方品种资源及野生近缘种 SSR 分子标记[J]. *江西农业大学学报*, 2005, 27(4): 486-490.
- LIU Yong, WU Bo, LIU Dechun, SUN Zhonghai. On genetic diversity of Jiangxi native citrus and its wild varieties based on SSR markers[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2005, 27(4): 486-490.
- [16] 陈焱, 余歆, 曹立, 雷天刚, 周雪, 张晓勇, 彭良志, 陆智明. 杂柑新品种“中柑所 5 号”的 SSR 分子标记鉴定[J]. *中国南方果树*, 2018, 47(3): 1-4.
- CHEN Yan, YU Xin, CAO Li, LEI Tiangang, ZHOU Xue, ZHANG Xiaoyong, PENG Liangzhi, LU Zhiming. Identification of CRIC 5 by using SSR molecular markers[J]. *South China Fruits*, 2018, 47(3): 1-4.
- [17] BISWAS M K, CHAI L J, AMAR M H, ZHANG X L, DENG X X. Comparative analysis of genetic diversity in *Citrus* germplasm collection using AFLP, SSAP, SAMPL and SSR markers[J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 129(4): 798-803.
- [18] AMAR M H, BISWAS M K, ZHANG Z W, GUO W W. Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of *Citrus* germplasm collection[J]. *Scientia Horticulturae*, 2011, 128(3): 220-227.
- [19] BISWAS M K, CHAI L J, MAYER C, XU Q, GUO W W, DENG X X. Exploiting BAC-end sequences for the mining, characterization and utility of new short sequences repeat (SSR) markers in citrus[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(5): 5373-5386.
- [20] NALIATH R, KUMAR K, ARORA P K, KAUR S, KAUR D, SINGH K. Genetic identification and inference on genetic relationships of important *Citrus rootstocks* with microsatellite markers[J]. *Fruits*, 2017, 72(6): 350-362.
- [21] SÜLÜ G, AKA KAÇAR Y, POLAT İ, KİTAPCI A, TURGUTOĞLU E, ŞİMŞEK Ö, SATAR G. Identification of genetic diversity among mutant lemon and mandarin varieties using different molecular markers[J]. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 2020, 44(5): 465-478.
- [22] LURO F L, COSTANTINO G, TEROL J, ARGOUT X, ALLARIO T, WINCKER P, TALON M, OLLITRAULT P, MORILLON R. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping[J]. *BMC*

- Genomics, 2008, 9: 287.
- [23] GARCÍA-LOR A, LURO F, NAVARRO L, OLLITRAULT P. Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity : a perspective for genetic association studies[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2012, 287(1): 77-94.
- [24] GARCIA-LOR A, CURK F, SNOUSSI-TRIFA H, MORILLON R, ANCILLO G, LURO F, NAVARRO L, OLLITRAULT P. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the 'true citrus fruit trees' group (Citrinae, Rutaceae) and the origin of cultivated species[J]. Annals of Botany, 2013, 111(1): 1-19.
- [25] GARCIA-LOR A, ANCILLO G, NAVARRO L, OLLITRAULT P. Citrus (Rutaceae) SNP markers based on competitive allele-specific PCR; transferability across the Aurantioideae subfamily[J]. Applications in Plant Sciences, 2013, 1(4): apps.1200406.
- [26] YU Y, CHEN C X, HUANG M, YU Q B, DU D L, MATTIA M R, JR GMITTER F G. Genetic diversity and population structure analysis of citrus germplasm with single nucleotide polymorphism markers[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2018, 143(6): 399-408.
- [27] JIANG D, YE Q L, WANG F S, CAO L. The mining of citrus EST-SNP and its application in cultivar discrimination[J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(2): 179-190.
- [28] OLLITRAULT P, TEROL J, GARCIA-LOR A, BÉRARD A, CHAUVEAU A, FROELICHER Y, BELZILE C, MORILLON R, NAVARRO L, BRUNEL D, TALON M. SNP mining in *C. clementina* BAC end sequences ; transferability in the *Citrus* genus (Rutaceae), phylogenetic inferences and perspectives for genetic mapping[J]. BMC Genomics, 2012, 13: 13.
- [29] 雷天刚, 何永睿, 彭爱红, 许兰珍, 刘小丰, 姚利晓, 邹修平, 江东, 陈善春. 柑橘 CAPS 标记和 AS-PCR 引物的开发[J]. 园艺学报, 2012, 39(6): 1027-1034.
- LEI Tiangang, HE Yongrui, PENG Aihong, XU Lanzhen, LIU Xiaofeng, YAO Lixiao, ZOU Xiuping, JIANG Dong, CHEN Shanchun. Development of CAPS markers and allele-specific PCR primers in *Citrus*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(6): 1027-1034.
- [30] 吴波, 杨润婷, 朱世平, 钟云, 姜波, 曾继吾, 钟广炎. 宽皮柑橘单核苷酸多态性的高分辨率熔解曲线分型[J]. 园艺学报, 2012, 39(4): 777-782.
- WU Bo, YANG Runting, ZHU Shiping, ZHONG Yun, JIANG Bo, ZENG Jiwu, ZHONG Guangyan. Genotyping single nucleotide polymorphisms in mandarin cultivars using high resolution melting analysis[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(4): 777-782.
- [31] FANG Q Y, WANG L, YU H W, HUANG Y, JIANG X L, DENG X X, XU Q. Development of species-specific InDel markers in *Citrus*[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2018, 36(4): 653-662.
- [32] NODA T, DAIYOU K, MIHARA T, NAGANO Y. Development of Indel markers for the selection of *Satsuma* mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) hybrids that can be used for low-cost genotyping with agarose gels[J]. Euphytica, 2020, 216(7): 115.
- [33] NODA T, DAIYOU K R, MIHARA T, NAGANO Y. Potential application of simple easy-to-use insertion-deletion (InDel) markers in citrus cultivar identification[J]. Breeding Science, 2021, 71(5): 601-608.
- [34] 汤雨晴, 杨惠栋, 闫承璞, 王斯妤, 王雨亭, 胡钟东, 朱方红. 基于重测序的'金兰柚'基因组 InDel 标记的开发及应用[J]. 园艺学报, 2023, 50(1): 15-26.
- TANG Yuqing, YANG Huidong, YAN Chengpu, WANG Siyu, WANG Yuting, HU Zhongdong, ZHU Fanghong. Development and application of Jinlan pummelo (*Citrus maxima*) InDel markers based on genome

- re-sequencing[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2023, 50(1): 15-26.
- [35] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [36] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, SIVACHENKO A, CIBULSKIS K, KERNYTSKY A, GARIMELLA K, ALTSHULER 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.
- [37] CINGOLANI P, PLATTS A, WANG L L, COON M, NGUYEN T, WANG L, LAND S J, LU X Y, RUDEN D M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3[J]. *Fly*, 2012, 6(2): 80-92.
- [38] YOU F M, HUO N X, GU Y Q, LUO M C, MA Y Q, HANE D, LAZO G R, DVORAK J, ANDERSON O D. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 253.
- [39] 王燕, 田泰, 马艳, 杨佳铭, 陈隆隆, 廖翊雯, 罗雪文, 周小杰, 王小蓉. 中国果树新品种保护与 DUS 测试研究进展[J]. *江苏农业学报*, 2022, 38(3): 849-864.
- WANG Yan, TIAN Tai, MA Yan, YANG Jiaming, CHEN Longlong, LIAO Yiwen, LUO Xuewen, ZHOU Xiaojie, WANG Xiaorong. Research progress of plant variety protection and test for distinctness, uniformity and stability of fruit trees in China[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 38(3): 849-864.
- [40] 刘小丰, 王洪, 刘梦雨, 朱世平, 江东, 曹立, 余歆. 性状鉴别联合 InDel 标记检测快速鉴定柑桔品种[J]. *中国南方果树*, 2024, 53(1): 1-8.
- LIU Xiaofeng, WANG Hong, LIU Mengyu, ZHU Shiping, JIANG Dong, CAO Li, YU Xin. Rapid identification of *Citrus* varieties using DUS testing combined with InDel marker[J]. *South China Fruits*, 2024, 53(1): 1-8.
- [41] LIU S R, AN Y L, TONG W, QIN X J, SAMARINA L, GUO R, XIA X B, WEI C L. Characterization of genome-wide genetic variations between two varieties of tea plant (*Camellia sinensis*) and development of InDel markers for genetic research[J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 935.
- [42] JAIN A, ROORKIWAL M, KALE S, GARG V, YADALA R, VARSHNEY R K. InDel markers: an extended marker resource for molecular breeding in chickpea[J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e0213999.
- [43] WU D H, WU H P, WANG C S, TSENG H Y, HWU K K. Genome-wide InDel marker system for application in rice breeding and mapping studies[J]. *Euphytica*, 2013, 192(1): 131-143.