

# 胡柚新品种‘01-7’的AS-PCR和dCAPS标记开发与应用<sup>1</sup>

吴伊静<sup>1</sup>, 张慧艺<sup>1</sup>, 苗长久<sup>2</sup>, 汪丽霞<sup>3</sup>, 杨兴良<sup>3</sup>, 陈文博<sup>2</sup>, 徐昌杰<sup>1,2\*</sup>, 陈昆松<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>浙江大学农业与生物技术学院园艺系, 杭州 310058; <sup>2</sup>全省园艺作物品质调控重点实验室, 杭州 310058; <sup>3</sup>常山县农业特色产业发展中心, 浙江衢州 324000

**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)07-0001-08

## Development of AS-PCR and dCAPS markers for discriminating new cultivar ‘01-7’ huyou (*Citrus changshanensis*)

WU Yijing<sup>1</sup>, ZHANG Huiyi<sup>1</sup>, MIAO Changjiu<sup>2</sup>, WANG Lixia<sup>3</sup>, YANG Xingliang<sup>3</sup>, CHEN Wenbo<sup>2</sup>, XU Changjie<sup>1,2\*</sup>, CHEN Kunsong<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticulture, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

<sup>2</sup>Zhejiang Key Laboratory of Horticultural Crop Quality Improvement, Hangzhou 310058, China;

<sup>3</sup>Changshan Agricultural Characteristic Industry Development Center, Quzhou 324000, Zhejiang, China)

**Abstract:** 【Objective】Huyou (*Citrus changshanensis* K. S. Chen et C. X. Fu) is a local characteristic citrus in China with a history of over a hundred years, and its main production area is Changshan County, Quzhou City,

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

Zhejiang Province. After a long process of propagation by seeds and selection by seedlings, new cultivars/lines such as ‘Cuihong’, Hongrou huyou, ‘Xiahong’, Huyou elite line a, Huyou elite line b, and ‘01-7’ were obtained from the ordinary huyou. Among them, ‘01-7’ has become the main huyou cultivar to be extended because of its strong cold resistance for the tree, as well as long storage longevity and slight-but-special bitter flavor for the fruit. However, there is a high degree of similarity between different accessions of huyou, and it is difficult to distinguish between 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 related to 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 was 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.

**【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 the data. After mapping reads to the reference pummelo 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 successful 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 is 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 sequence. For dCAPS marker, PCR product of 176 bp can be amplified from all four ‘01-7’ accessions and can be cleaved by restriction endonuclease *FspBI* 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 were 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 not only distinguish ‘01-7’ from ordinary huyou but also differentiate it from Huyou elite line a, Huyou elite line b, ‘Cuihong’, and ‘Xiahong’, demonstrating stable performance. The application of these molecular markers enables the authentication of ‘01-7’ saplings, ensures sapling purity and thereby supporting 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<sup>[1-3]</sup>。胡柚花形较大、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、果形小、果肉软而多汁、部分种子具有多胚性, 又不同于柚<sup>[1-3]</sup>。早在 1987 年, 吴耕民先生通过形态特征比较, 提出胡柚可能是由柚与甜橙自然杂交而来<sup>[3]</sup>。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, 分析认为胡柚起源与柚和甜橙密切相关<sup>[4-5]</sup>。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亲本<sup>[6]</sup>, 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<sup>[7]</sup>这一结论一致。柑橘易发生种间杂交<sup>[8]</sup>, 但到目前为止, 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<sup>[9]</sup>) 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 年。由于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<sup>[10]</sup>, 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’ 因其风味浓、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<sup>[10-13]</sup>。近十余年来随着测序技术的发展, SNP 因其有着高通量、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<sup>[14-18]</sup>。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)、高分辨溶解曲线分析 (HRMA)、竞争性等位基因特异性聚合酶链式反应 (KASP) 等<sup>[19]</sup>。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，AS-PCR 和 dCAPS 标记在果树品种鉴别上开始得到应用。如 Heo 等以‘宫川’温州蜜柑及其新突变体‘Ara-unshiu’为试材，将存在于两者间的纯合 SNP 开发成 AS-PCR 标记，成功地将突变体与‘宫川’温州蜜柑和其他柑橘进行区分<sup>[20]</sup>。又如 Peng 等人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<sup>[21]</sup>。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，以保障苗木正确性和纯度，促进产业发展。

因此，本研究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，挖掘出这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)、两个胡柚优株 (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  | 材料名               | 缩写           | 来源 Source  |
|-----|-------------------|--------------|--|
| No. | Name              | Abbreviation |  |
| 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<br>Experimental Station of Zhejiang University<br>(Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center |
| 2   | 01-7b             | 01-7b        | 常山县球川镇馒头山村<br>Man Tou Shan Village, Qiu Chuan Town, Changshan County   |
| 3   | 01-7c             | 01-7c        | 常山县同弓乡同心村<br>Tong Xin Village, Tong gong Town, Changshan County  |
| 4   | 01-7d             | 01-7d        | 常山县白石镇新安村<br>Xin An Village, Bai Shi Town, Changshan County  |
| 5   | 普通胡柚 a<br>Huyou a | HYa          | 浙江大学（常山）现代发展研究中心试验示范基地<br>Experimental Station of Zhejiang University<br>(Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center |
| 6   | 普通胡柚 b            | HYb          | 常山县同弓乡中和村<br>Zhong He Village, Tong gong Town, Changshan County  |

|    |             |      |   |
|----|-------------|------|---|
|    | Huyou b     |      |   |
| 7  | 普通胡柚 c      | HYc  | 常山县大桥镇袁青口村 Yuan Qing Kou Village, Da Qiao Town, Changshan County  |
|    | Huyou c     |      |   |
| 8  | 胡柚优株 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<br>(Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center |
|    | Huyou elite |      |   |
|    | line a      |      |   |
| 9  | 胡柚优株 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<br>(Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center |
|    | Huyou elite |      |   |
|    | line b      |      |   |
| 10 | 脆红          | 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<br>(Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center |
|    | Cuihong     |      |   |
| 11 | 红肉胡柚        | 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<br>(Changshan) Modern Agricultural Research & Development Center |
|    | Hongrou     |      |   |
|    | huyou       |      |   |
| 12 | 夏红橘柚        | XH   | 衢州市龙游县团石村 Tuan Shi Village, Longyou County, Quzhou City   |
|    | Xiahong     |      |   |

## 1.2 DNA 提取

用十六烷基三乙基溴化铵（CTAB）法<sup>[22]</sup>提取胡柚基因组 DNA，将 DNA 稀释至 100 ng/μL 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/orange/download/index.php>) 为参考基因组建立索引，利用 BWA-MEM v0.7.17<sup>[23]</sup> 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://picard.sourceforge.net>) 去除重复和冗余片段。同时使用 BCFtools v1.9<sup>[24]</sup> 和 GATK-HaplotypeCaller v3.6<sup>[25]</sup> 模块进行 SNP-calling，取两个软件的交集位点作后续分析。

## 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”。通过以上过滤条件得到高质量的 SNP 集合，筛出集合中‘01-7a’和普通胡柚 ZZ 之间基因型不同且纯合的差异 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，上游引物序列为 Chr1\_7111834\_G/A-F: 5'-TGTCTGGGTTTCGTTTGTAAATCA-3'，下游引物序列为 Chr1\_7111834\_G/A-R: 5'-CTCCAAAAGTCCAGCACAGG-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  $\mu\text{L}$  Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, 25  $\mu\text{L}$  2  $\times$  Phanta Max Buffer, 1  $\mu\text{L}$  dNTP Mix, 2  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物(上游引物和下游引物各 2  $\mu\text{L}$ )，0.1  $\mu\text{g}$  模板 DNA，补足 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 循环程序为：95 $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  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 公用引物(下游引物)和两条等位基因特异引物(上游引物)，两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 的序列分别为：5'-GCAGAGAAATCGCCTTTGTCA-3' 和 5'-GCAGAGAAATCGCCTTTGTCG-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  $\mu\text{L}$  2 $\times$  Taq Master Mix, 0.8  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物(上游引物和下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ )，30 ng 模板 DNA，补足 ddH<sub>2</sub>O 至 10  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  5 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  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'-GAGTCGCAGAGAAATCGCCTTTGCT-3'。应用 Primer3 4.1.0 设计下游引物 dCAPS-R，序列为：5'-CTGTGAAGTTTCAATTGGCCATTA-3'。PCR 反应体系为：25  $\mu\text{L}$  2 $\times$  Taq Master Mix, 2  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物(上游引物和下游引物各 2  $\mu\text{L}$ )，160 ng 模板 DNA，补足 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  20 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  10 $\times$  FastDigest Green Buffer, 2.6  $\mu\text{L}$  *Fsp*BI, 0.5  $\mu\text{g}$  PCR 纯化产物，补足 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu\text{L}$ 。酶切反应条件为：37 $^{\circ}\text{C}$ ，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。

表 2 测序数据质量评估统计

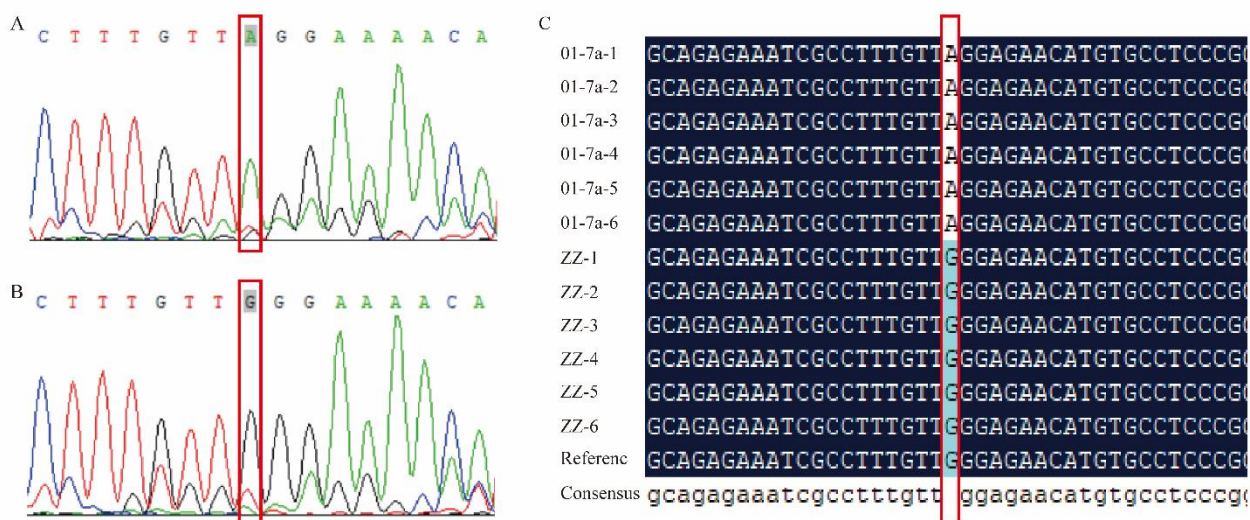
Table 2 Statistics of quality evaluation of sequencing data

| 样品       | 高质量片段           | 高质量碱基          | Q20   | Q30   | GC  | 平均测序深度 (×)        | 1×覆盖率 (%)        | 10×覆盖率 (%)         | 碱基比对率 (%)        |
|----------|-----------------|----------------|-------|-------|-----|-------------------|------------------|--------------------|------------------|
| Sample   | Clean reads     | (bp)           | (%)   | (%)   | (%) | Average depth (×) | 1×Cover ratio(%) | 10×Cover ratio (%) | Mapping rate (%) |
|          | Clean base (bp) |                |       |       |     |                   |                  |                    |                  |
| 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  | 60,055,719      | 18,016,715,700 | 96.31 | 89.34 | 37  | 46.20             | 95.20            | 87.80              | 98.60            |
| Ordinary |                 |                |       |       |     |                   |                  |                    |                  |
| huyou ZZ |                 |                |       |       |     |                   |                  |                    |                  |

## 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 文件中这 23 个 SNP 位点测序片段的碱基分布情况，筛选出了 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 (ZZ) 的 PCR 产物测序图谱；C. ‘01-7a’和普通胡柚 ZZ (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 (ZZ); C. Comparison of the sequencing results of the recombinant plasmids harboring the PCR product from either '01-7a' or the ordinary huyou ZZ (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**

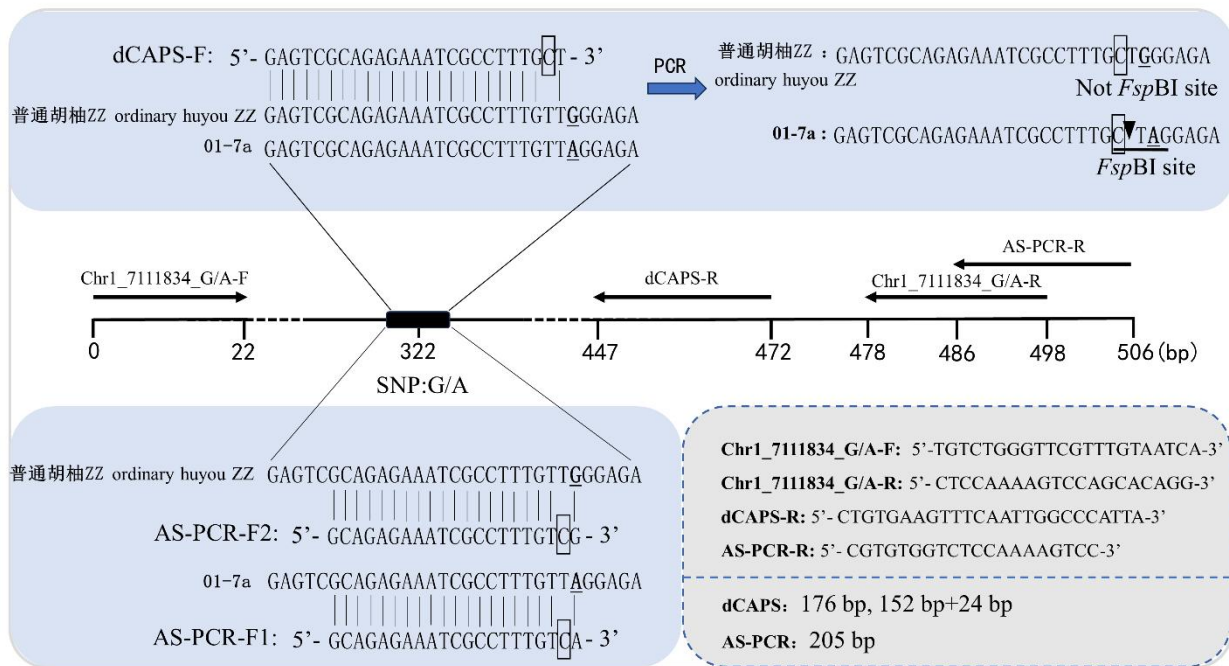
### 2.3 AS-PCR 和 dCAPS 引物设计

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，本研究旨在基于此 SNP 开发能够鉴别这两个胡柚材料的 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 *FspBI* 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：两个胡柚材料 DNA 为模板时均可扩增出长为 176 bp 的条带，但只有当 '01-7a' 胡柚 DNA 为模板时，所扩增的条带可以被 *FspBI* 酶切成长度分别为 152 bp 和 24 bp 的条带 (图 2)。





带框的碱基 C 是人为引入的错配碱基，加下划线的是 SNP (Chr1\_7111834\_G/A) 位点组成碱基

The artificial mismatch base C was boxed and the SNP (Chr1\_7111834\_G/A) comprising bases are underlined

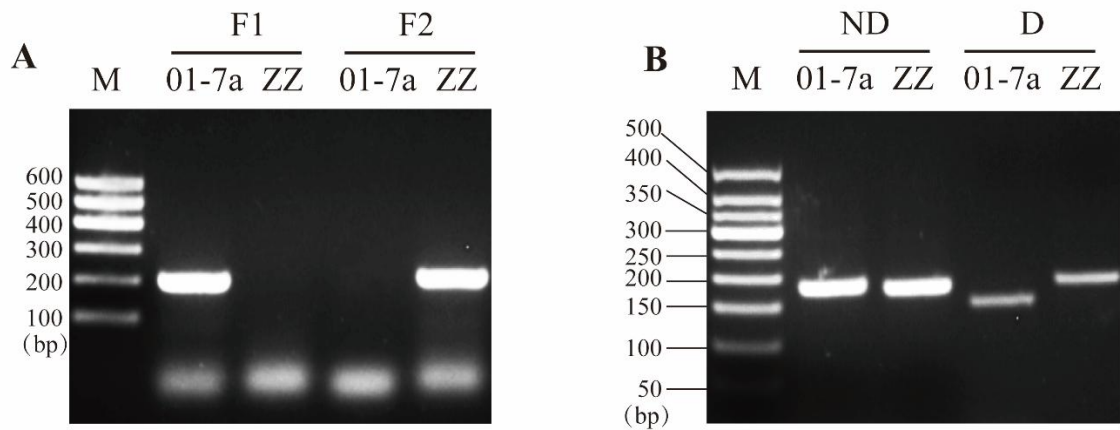
图 2 AS-PCR 和 dCAPS 分子标记引物示意图

Figure 2 Schematic diagram representing the primers for AS-PCR and dCAPS molecular markers

#### 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 3A 所示。对于 ‘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 3B 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。



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

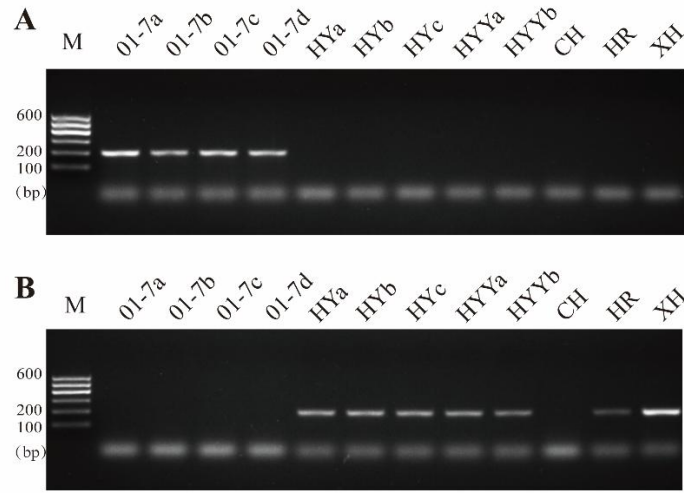
A. AS-PCR reaction, F1 and F2 represent for the AS-PCR-F1 and AS-PCR-F2 primer pairs, respectively; B. dCAPS reaction, ND and D refer to the non-digested control and digestion reaction, respectively; ZZ stands for ordinary huyou ZZ

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

## 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’胡柚材料上均扩增出预期长度的条带，而在其他胡柚材料上均未得到扩增(图 4A)；AS-PCR-F2 则在所有 4 份‘01-7’材料和‘脆红’上不出现扩增条带，而在其余胡柚中均出现条带(图 4B)。dCAPS 标记分析表明，所有胡柚材料均扩增出 176 bp 的条带(图 5A)，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 5B)。除‘脆红’外，以上结果均符合预期。‘脆红’在两种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。后文介绍 Sanger 测序分析结果对此现象作出了解释。

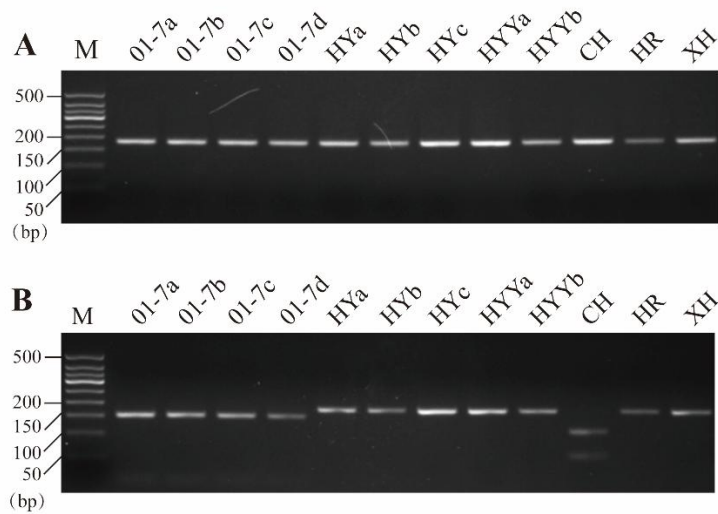


A. AS-PCR-F1 引物对; B. AS-PCR-F2 引物对; 12 份材料信息见表 1

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

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**



A. 酶切前; B. 酶切后; 12 份材料信息见表 1

A. Before digestion; B. After digestion; refer to Table 1 for the information on 12 accessions

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**

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, 对这 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 竖框所示), 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*FspBI*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*FspBI*识别位点与人为设计dCAPS标记时针对‘01-7’引入的*FspBI*识别位点并不重合,而是相距38bp,因而,‘脆红’PCR产物被*FspBI*酶切成62bp和117bp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’。



竖框所示的是SNP位点;左边横框所示的是‘脆红’在AS-PCR引物处有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的天然的*FspBI*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 *FspBI* 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

### 3.讨论

在品种分子鉴别上,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<sup>[26]</sup>,SSR标记很难区分遗传十分相似的品种<sup>[27]</sup>。随着下一代测序技术的兴起,SNPs因其数量丰富、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<sup>[28]</sup>。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<sup>[29]</sup>。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的丰富的遗传变异,通过Sanger测序验证了‘巨峰’和‘丰早’中的5个SNP<sup>[30]</sup>;Guan等利用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<sup>[31]</sup>。Serra等对‘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<sup>[32]</sup>。本研究对‘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, 也可为其它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<sup>[33]</sup>, 因而对 PCR 体系中各组分比例、T<sub>m</sub> 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<sup>[34]</sup>。dCAPS 标记相较于 AS-PCR 标记更稳定, 但由于有些内切酶较昂贵, 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”<sup>[35]</sup>, 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。

本研究开发的 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(同源性高达 99.6%), 因此, 宣称其为红皮胡柚。本研究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

本研究利用‘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。进一步将这个 SNP 开发成 AS-PCR 和 dCAPS 标记, 在 12 份胡柚材料中的应用发现, 这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。本研究开发了能鉴别胡柚品种 of 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’与其它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性高达 99.6%, 表明属于胡柚而非橘柚, 应称为红皮胡柚为宜。

## 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.  
CHANG Yinbin. A new species of 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, (1): 16-18.  
WU Gengmin. The characteristics and cultivation technology points of golden pomelo[J]. China Citrus, 1987, (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(英文)[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, 王沧, 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, CHENG 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, 叶缤姬, 王超, 廖汝玉, 李永裕. 果树分子标记技术研究进展及在榛育种上的应用展望[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 marker[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: 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] Mori G D, Cipriani G. Marker-assisted selection in breeding for fruit trait improvement: a review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(10): 8984.

- [18] Hiraoka 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: 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, Marth 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, 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.
- [26] 焦锋, 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]. *Korean Journal of Horticultural Science & 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, Guimaraes J B, Matos J, Vicente P, de Sousa M L, Simoes 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+154.
- 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+154.

[34] 杨琴, 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.