

# 脐橙与粗柠檬体细胞杂种果实类胡萝卜素、糖酸遗传的亲本偏向性

郑蓓蓓, 谢宗周, 郭文武\*

(华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 采用高效液相色谱测定柑橘种间体细胞杂种[‘朋娜’脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck) + 粗柠檬 (*C. jambhiri* Lush)]和其两个融合亲本果实的类胡萝卜素含量, 气相色谱测定可溶性糖及有机酸含量, 并检测代谢过程中关键基因的表达, 比较分析体细胞杂种果实品质遗传及基因表达特点。结果表明, 体细胞杂种类胡萝卜素成分及含量均偏向粗柠檬亲本, 柠檬酸、苹果酸积累量也偏向粗柠檬; 而蔗糖含量处在中亲值; 实时定量 PCR 技术检测类胡萝卜素代谢途径中的 7 个基因, 其中 4 个基因在‘朋娜’脐橙中的表达量高于粗柠檬, 环化途径中番茄红素  $\epsilon$  环化酶基因 (*CitLcy-e*)、玉米黄质环氧酶基因 (*CitZep*) 在体细胞杂种中表达量偏向粗柠檬亲本, 显著低于‘朋娜’脐橙。可见粗柠檬遗传物质的表达在体细胞杂种中占主导地位。

**关键词:** 柑橘; 体细胞杂种; 类胡萝卜素; 可溶性糖; 有机酸

**中图分类号:** S 666

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 07-1262-07

## Parental Dominant Inheritance of Fruit Carotenoids, Sugars and Organic Acids in a Citrus Interspecific Allotetraploid Somatic Hybrid Between Bonnaza Navel Orange and Rough Lemon

ZHENG Bei-bei, XIE Zong-zhou, and GUO Wen-wu\*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology of Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Carotenoid compounds in the fruit pulp of somatic hybrid [‘Bonnaza’ navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck) + rough lemon (*C. jambhiri* Lush)] and both parental species were quantitatively evaluated by HPLC, sugars and organic acids content were investigated by GC, and Real-time RT-PCR was used to detect expression levels of key genes involved in the carotenoid, sugars and organic acids biosynthetic pathways. Results revealed that strong dominance of rough lemon was found for citric acid, malic acid and carotenoid compound in somatic hybrid fruit, while sucrose content showed mid-parent value. Gene expression was higher in navel orange than in rough lemon for four of seven genes analyzed involved in carotenoid biosynthetic pathway. Rough lemon dominance was observed for expression of

**收稿日期:** 2013-03-04; **修回日期:** 2013-06-07

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31272133); 教育部博士点基金优先发展领域课题 (20120146130004); 农业部行业科研专项 (200903044)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: guoww@mail.hzau.edu.cn)

*CitCrt*, *CitLcy-e* and *CitZep*. These results indicated that rough lemon played a dominant role in inheritance of fruit quality characteristics and gene expression in the somatic hybrid.

**Key words:** *Citrus*; somatic hybrid; carotenoid; sugar; organic acid

原生质体融合技术能有效克服柑橘有性杂交不亲和、性器官败育和珠心胚干扰等问题, 实现核基因组及胞质基因组的重组 (Guo et al., 2008)。目前通过原生质体融合已获得 250 余例属间、种间体细胞/胞质杂种 (郭文武和邓秀新, 2000; Cai et al., 2007; Fu et al., 2011)。这些新创制的种质极大地丰富了柑橘资源库, 为柑橘砧木育种、无核品种培育提供了宝贵的材料 (Grosser & Gmitter, 2011)。多倍体化过程是促进植物进化的重要进程, 染色体加倍过程中基因沉默、基因剂量效应及基因亚功能化等现象导致多倍体中基因表达并非简单的加和效应 (Wang et al., 2006; Grover et al., 2012; Moshe et al., 2012; Osabe et al., 2012)。由此, 在多倍体中出现新的基因表达模式从而产生新的形态特征。柑橘体细胞杂种融合了两亲本的遗传物质, 是研究柑橘果实品质遗传特性的理想材料。对柳叶橘分别与甜橙、葡萄柚及柠檬体细胞杂种叶片香气成分的分析显示, 体细胞杂种香气成分及含量均偏向柳叶橘亲本 (Gancel et al., 2003; Tusa et al., 2007)。柳叶橘与尤力克柠檬体细胞杂种成熟期果实品质分析显示, 体细胞杂种在有机酸含量、蔗糖、葡萄糖含量偏向柠檬亲本, 而果糖、香气物质则偏向柳叶橘; 体细胞杂种含有柳叶橘类胡萝卜素的各种成分, 但含量较低 (Fanciullino et al., 2006; Bassene et al., 2009a)。这些结果表明, 体细胞杂种果实品质特性的遗传不是两亲本的简单加和效应, 而是有一定的亲本偏向性。

本课题组通过电融合获得‘朋娜’脐橙胚性愈伤悬浮系原生质体与粗柠檬叶肉原生质体的异源四倍体体细胞杂种, 经鉴定其核基因组为两亲本的加和, 叶绿体基因组随机遗传而线粒体基因组为两亲本的重组 (郭文武和邓秀新, 2000; Guo et al., 2008)。本研究中以‘朋娜’脐橙、粗柠檬及体细胞杂种成熟期果实为试材, 通过气相色谱、液相色谱测定果实可溶性糖有机酸、类胡萝卜素含量; 并通过 Real-time RT-PCR 测定其代谢途径中关键基因的表达量, 以期更深入地理解柑橘体细胞杂种的果实品质遗传特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为‘朋娜’脐橙 (*Citrus sinensis* Osbeck)、粗柠檬 (*C. jambhiri* Lush) 及二者的体细胞杂种, 均种植于华中农业大学柑橘育种中心资源圃。2011 年该体细胞杂种及两个融合亲本均稳定开花结果, 果实成熟期从植株的 4 个方向选取有代表性的完整果实, 每个品种均从 3 棵树上取果实样品, 盛花期后 180 d 开始根据果实着色程度取样, 每隔 15 d 取样 1 次, 通过可溶性固形物及可滴定酸测定计算固酸比, 最终在盛花期后约 220 d, 固酸比值较稳定, 确定果实完全成熟。制作样品混合池。液氮速冻, -20 °C 冰箱保存备用。

### 1.2 可溶性糖和有机酸提取及 GC 测定

可溶性糖和有机酸的提取方法参照顾建芹 (2007) 的报道: 称取冷冻果肉各 3 g, 重复 3 次。加入 4 °C 预冷冻的 80% 甲醇, 75 °C 水浴 15 min, 冷却至室温后, 超声波萃取 45 min, 重复该步骤 3 次。收集上清液并入 50 mL 的容量瓶中, 加 1 mL 的内标液, 80% 的甲醇定容。取 1 mL 溶液于 1.5 mL 的离心管并离心后取 0.5 mL 至 1.5 mL 离心管中于旋转蒸发仪中蒸发至干, 向蒸发至干的 1.5 mL 离心管中加入 0.8 mL 盐酸羟胺溶液, 旋上盖子, 放入烘箱内 75 °C 反应 1 h。取出冷却至室温后,

依次加六甲基二硅胺烷 0.4 mL, 三甲基氯硅烷 0.2 mL, 75 °C 反应 2 h。冷却后取 0.5 mL 上清液至 2 mL 的气相色谱进样瓶中, 用于 GC 分析。

### 1.3 类胡萝卜素提取及 HPLC 测定

参照刘庆 (2008) 的方法: 称取冷冻果肉 3 g, 3 次重复, 用于类胡萝卜素的提取。将待测样品用液氮研磨成粉末, 加入 15 mL 类胡萝卜素提取液 (正己烷: 丙酮: 无水酒精 = 2: 1: 1, 含 0.01% BHT), 超声波清洗仪 (Fisher, USA) 振荡 30 min 后 4 °C, 4 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 吸取含类胡萝卜素的上层液至新的离心管, 沉淀用 15 mL 类胡萝卜素提取液重复提取两次至无色。合并上清液, 并用饱和的 NaCl 水溶液将上清液洗 3 次至中性。上清液旋转蒸发, 溶于 2 mL MTBE (含 0.1% BHT), 加入 2 mL 10% KOH - 甲醇溶液 (含 0.1% BHT) 避光条件下皂化 10 h。加 4 mL 饱和 NaCl 水溶液和 2 mL MTBE (含 0.1% BHT) 使之更好分层, 洗走水层。再加 3 次 5 mL 饱和 NaCl 水溶液水洗至中性。将上清液旋转蒸发后用 1 mL MTBE (含 0.1% BHT) 溶解定容。高效液相色谱检测类胡萝卜素。色谱分析采用 Waters 公司的反相高效液相色谱仪, 泵的型号为 600E, 2996 二极管阵列监测器和 717 自动进样器, Empower 色谱管理软件。色谱柱为 YMC (Wilmington, NC, USA) C30 类胡萝卜素专用色谱柱。HPLC 洗脱条件参见刘庆 (2008)。

### 1.4 总 RNA 提取及 Real-time RT-PCR 检测

果实成熟期 RNA 提取参见刘庆 (2008) 的方法。用 Real-time PCR 技术检测糖酸及类胡萝卜素代谢途径关键基因表达量。检测所用模板为总 RNA 用 ReertAid<sup>TM</sup> M-MuLV 试剂盒 (MBI, Lithuania) 反转录合成的第一链 cDNA, 引物序列见刘庆 (2008) 的文献。采用 ABI 7500 实时定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, CA, USA) 进行 Real-time PCR 扩增。将待检测基因和内参基因的特异引物与 SYBER<sup>®</sup> GREEN Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) 混合, 然后加入到含有模板的反应管中, 反应体系为 10 μL。反应程序为: 50 °C 2 min, 95 °C 1 min, (95 °C 15 s, 60 °C 1 min) 40 个循环。数据经 Sequence Detector Version 1.3.1 软件 (Applied Biosystems, CA, USA) 转化后用 Excel 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 体细胞杂种类胡萝卜素含量及关键基因表达量遗传特性

从果实横纵切面图看, ‘朋娜’ 脐橙呈亮黄色, 而粗柠檬为淡黄色, 体细胞杂种色泽处于两亲本之间 (图 1)。体细胞杂种及两亲本类胡萝卜素 HPLC 测定结果 (表 1) 显示, 主要成分均为花药黄质、紫黄质和 α - 胡萝卜素, ‘朋娜’ 脐橙还有少量叶黄素, 而花药黄质的含量在两亲本及体细胞杂种中均占主导地位; 3 种材料的 α - 胡萝卜素含量无显著差异; 体细胞杂种中紫黄质、花药黄质和叶黄素含量偏向柠檬亲本。表明体细胞杂种在类胡萝卜素种类及含量上均偏向柠檬亲本。

表 1 二倍体亲本与体细胞杂种色素含量

基因型 Genotype	紫黄质 Violaxanthin	花药黄质 Antheraxanthin	叶黄素 Lutein	α - 胡萝卜素 α-carotene
‘朋娜’ 脐橙 ‘Bonanza’ navel orange	0.633 ± 0.054 a	6.426 ± 0.504 a	0.079 ± 0.011	0.089 ± 0.001 a
体细胞杂种 Somatic hybrid	0.202 ± 0.005 b	2.265 ± 0.158 b	—	0.094 ± 0.001 a
粗柠檬 Rough lemon	0.175 ± 0.011 b	1.571 ± 0.184 b	—	0.090 ± 0.003 a

*P* = 0.05.

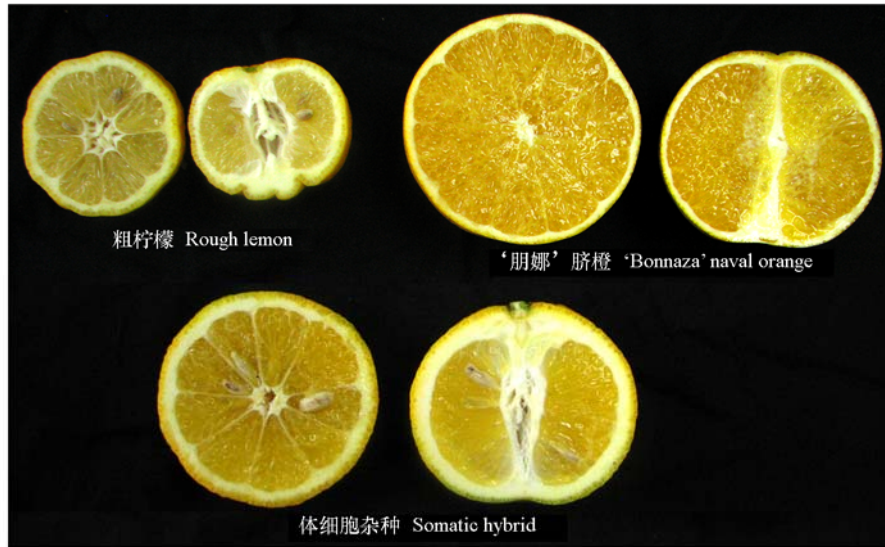


图 1 果实横纵切面

Fig. 1 Horizontal and vertical sections of fruits

从类胡萝卜素合成途径关键基因表达情况看，体细胞杂种中八氢番茄红素合成酶基因 (*CitPsy*) 表达量高于两亲本，胡萝卜素脱氢酶基因 (*CitZds*) 表达量低于两亲本；类胡萝卜素异构酶基因 (*CitCrt*)，表达量偏向粗柠檬亲本；而八氢番茄红素脱氢酶基因 (*CitPds*) 在‘朋娜’脐橙中表达显著高于粗柠檬，体细胞杂种处于中亲值。以上 4 个基因均处于类胡萝卜素代谢上游，促进番茄红素形成。番茄红素进一步通过环化途径形成花药黄质、紫黄质等。在环化分支途径中，番茄红素  $\epsilon$  环化酶基因 (*CitLcy-e*)，玉米黄质环氧酶 (*CitZep*) 在‘朋娜’脐橙中表达量显著高于粗柠檬，体细胞杂种中表达量接近粗柠檬；而番茄红素  $\beta$  环化酶基因 (*CitLcy-b*) 在两亲本和体细胞杂种中的表达量没有显著差异 (图 2)。

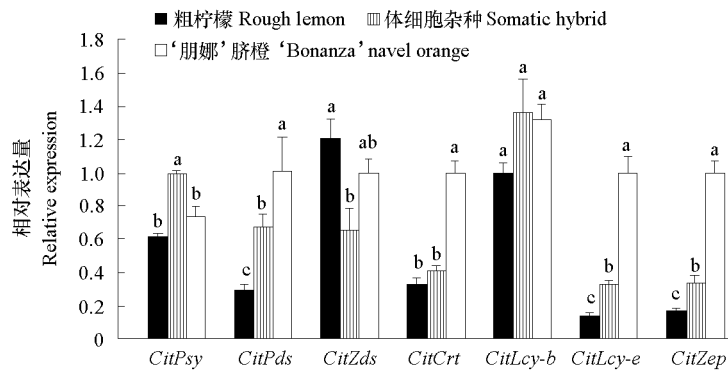


图 2 类胡萝卜素代谢途径关键基因表达

Fig. 2 Expression of genes involved in carotenoid biosynthetic pathway

## 2.2 体细胞杂种可溶性糖和有机酸含量及关键基因表达量遗传特性

体细胞杂种可滴定酸度偏向粗柠檬亲本，其可溶性固形物含量基本为两亲本的中亲值 (表 2)。体细胞杂种中果糖及葡萄糖含量与粗柠檬亲本相似，均显著高于‘朋娜’脐橙；蔗糖含量基本为中亲值。从有机酸含量看，柠檬酸含量在体细胞杂种及亲本中均占主导地位，且体细胞杂种中柠檬酸和苹果酸含量均偏向粗柠檬；奎宁酸积累量较少，且在体细胞杂种及两亲本没有显著差异 (表 3)。

表 2 成熟度判定

Table 2 Characterization of mature stage

基因型 Genotype	可溶性固形物 SSC	可滴定酸/% TA	固酸比 SSC/TA
‘朋娜’脐橙 ‘Bonanza’ navel orange	11.0 ± 0.06 a	0.915 ± 0.018 c	12.02
体细胞杂种 Somatic hybrid	9.6 ± 0.07 b	2.970 ± 0.006 b	3.23
粗柠檬 Rough lemon	8.8 ± 0.03 c	3.600 ± 0.003 a	2.44

$P = 0.05$ .

表 3 二倍体亲本与体细胞杂种可溶性糖及有机酸含量

Table 3 Sugars and organic acid content of fruit flesh in two diploid species and their allotetraploid somatic hybrid  $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ 

基因型 Genotype	果糖 Fructose	葡萄糖 Glucose	蔗糖 Sucrose	苹果酸 Malic acid	柠檬酸 Citric acid	奎宁酸 Quinic acid
‘朋娜’脐橙 ‘Bonanza’ navel orange	42.98 ± 1.01b	31.71 ± 0.55b	35.27 ± 1.04a	0.96 ± 0.02b	3.67 ± 0.28b	0.23 ± 0.02a
体细胞杂种 Somatic hybrid	46.20 ± 0.17a	36.59 ± 0.41a	22.12 ± 0.18b	1.54 ± 0.04a	13.74 ± 0.81a	0.22 ± 0.01a
粗柠檬 Rough lemon	44.97 ± 0.26ab	36.81 ± 0.22a	15.35 ± 0.40c	1.71 ± 0.11a	14.01 ± 0.27a	0.19 ± 0.00a

$P = 0.05$ .

从可溶性糖基有机酸代谢途径中关键基因的表达量看（图 3），体细胞杂种中蔗糖合成酶基因（*CitSs*）和顺乌头酸合成酶基因（*CitAcon*）的表达量均低于表达量较低的亲本。体细胞杂种中异柠檬脱氢酶基因（*Citldh*）的表达量偏向粗柠檬亲本；体细胞杂种中柠檬酸合成酶基因（*CitS*）和苹果酸脱氢酶基因（*CitMdh*）表达量均处于中亲值，只有顺乌头酸合成酶基因（*CitAcon*）的表达量低于中亲值。

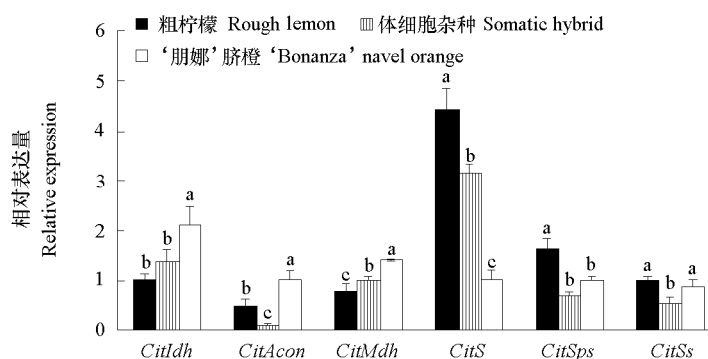


图 3 可溶性糖及有机酸代谢途径关键基因表达

Fig. 3 Expression of genes involved in sugars and organic acid biosynthetic pathway

### 3 讨论

‘朋娜’脐橙、粗柠檬的类胡萝卜素成分相似，但粗柠檬各成分含量显著低于‘朋娜’脐橙，且‘朋娜’脐橙特有叶黄素（表 1），这一结果与前人报道（Kato et al., 2004; Bassene et al., 2009b）一致。体细胞杂种融合了‘朋娜’脐橙、粗柠檬的遗传物质，拥有‘朋娜’脐橙合成类胡萝卜素的基因，其类胡萝卜素成分及含量均偏向粗柠檬亲本，也没有在体细胞杂种中检测到‘朋娜’脐橙特有的叶黄素。导致这种现象的可能原因：1，体细胞杂种中两亲本染色体融合，导致相应基因沉默或产生新的功能；2，体细胞杂种拥有合成叶黄素的能力，但含量低于液相色谱的检测阈值。而柳叶橘 + 尤力克柠檬体细胞杂种在类胡萝卜素种类上偏向柳叶橘亲本，但含量偏向柠檬亲本。表明其拥有柳叶橘合成各种类胡萝卜素的能力，而类胡萝卜素合成途径关键基因的表达不是两个亲本简单的加和效应，表现出一定的基因组印迹效应，即多倍体中同源基因的表达偏向某一亲本（Bassene et al., 2009b; Schnable et al., 2011）。这些结果证实了在柑橘体细胞杂种中也存在基因组印迹、基因新功能化、亚功能化以及基因剂量效应等在其它多倍体植物中广泛存在的现象（Birchler, 2012; Clark et al., 2012）。

结合类胡萝卜素含量及其代谢途径中基因表达量分析, *CitPds* 在‘朋娜’脐橙中表达量显著高于粗柠檬, 而体细胞杂种处于两者之间。*CitPds* 为类胡萝卜素合成途径上游的关键基因, 这一特点能在一定程度上解释‘朋娜’脐橙、粗柠檬及体细胞杂种类胡萝卜素总量的差异, 表明类胡萝卜素的积累与代谢途径中基因表达量有直接联系, 该观点与前人研究结果 (Kato et al., 2004; Bassene et al., 2009b) 一致。*CitPsy* 催化八氢番茄红素, 再经过 *CitPds*、*CitZds* 和 *CitCrt* 酶的共同作用形成番茄红素。番茄红素在 *CitLcy-b* 单独作用下形成  $\beta$ -胡萝卜素, 而在 *CitLcy-b* 和 *CitLcy-e* 共同作用下形成  $\beta$ -环和  $\epsilon$ -环, 即为  $\alpha$ -胡萝卜素, 进而通过系列反应形成叶黄素;  $\beta$ -胡萝卜素和  $\alpha$ -胡萝卜素均能在 *CitZep* 的作用下形成花药黄质和紫黄质 (刘庆, 2008)。在环化分支途径中, *CitLcy-e* 和 *CitZep* 在‘朋娜’脐橙中表达量显著高于体细胞杂种以及粗柠檬, 而 *CitLcy-b* 在 3 个品种中的表达量没有显著差异; 基因表达特性与‘朋娜’脐橙中紫黄质和花药黄质显著高于体细胞杂种以及粗柠檬的表型相符 (图 2, 表 1)。在柳叶橘 + 尤力克柠檬体细胞杂种中也有类似报道, 类胡萝卜素代谢上游 3 个关键基因 (*CitPds*、*CitZds* 和 *CitCrt*) 在体细胞杂种中表达量均较低且偏向柠檬亲本, 导致其类胡萝卜素含量偏向柠檬亲本 (Bassene et al., 2009b)。

可溶性糖及有机酸积累量及关键基因的表达量分析, 粗柠檬中 *CitSs* 和 *CitSps* 表达量均高于‘朋娜’脐橙, 而蔗糖含量显著低于‘朋娜’脐橙 (图 3)。梨果实的糖积累量及蔗糖代谢相关酶活性研究表明, 果实蔗糖含量与糖磷酸化合成酶活性正相关 (陈露露等, 2011); 因此, 推测粗柠檬中蔗糖合成相关基因受到了转录后调控的影响 (甲基化、small RNA 等), 导致基因表达与酶活性的差异; 体细胞杂种遗传了粗柠檬亲本的这一特性。体细胞杂种及两亲本的有机酸含量中, 柠檬酸均占主导地位, 且粗柠檬中的含量显著高于‘朋娜’脐橙, 体细胞杂种偏向粗柠檬 (表 3)。*CitS* 在粗柠檬及体细胞杂种中的表达量显著高于‘朋娜’脐橙, 柠檬酸继续转化的相关基因在‘朋娜’脐橙中表达量较高, 而体细胞杂种中此类基因的表达量处于中亲值 (图 3)。基因表达的特征在一定程度上解释了‘朋娜’脐橙中柠檬酸含量低于粗柠檬和体细胞杂种的现象, 表明柑橘果实可溶性糖及有机酸代谢途径中关键酶基因的表达与其积累量有直接的关系 (刘庆, 2008)。

从柑橘种间进化的角度看, 橙类被认为是柚  $\times$  橘的有性杂种, 而粗柠檬为枸橼  $\times$  橘的有性杂种 (Nicolosi et al., 2000)。因此, ‘朋娜’脐橙与粗柠檬共用了橘的遗传物质, 在长期进化过程中橙类、粗柠檬中两种不同来源的遗传物质重新分配功能而维持遗传的稳定性。体细胞杂种融合了两亲本所有的遗传物质, 两套遗传物质并非简单加和, 而是在相互作用、相互影响的过程中达到基因组平衡, 即在新产生的多倍体中, 同一代谢途径中同源基因的表达受到基因剂量效应的影响, 从剂量上选择性表达两亲本的同源基因, 最终形成多倍体中特殊的基因表达模式而实现两套遗传物质的共存 (Birchler, 2012; Birchler & Veitia, 2012)。综合体细胞杂种中类胡萝卜素、可溶性糖和有机酸积累量以及代谢途径中关键基因表达量的分析结果, 表明该体细胞杂种果实品质遗传特性偏向粗柠檬亲本, 粗柠檬遗传物质的表达在体细胞杂种两套遗传物质的平衡过程中占主导地位。

## References

- Bassene J B, Berti L, Costantino G, Carcouet E, Kamiri M, Tomi F, Dambier D, Ollitraul T P, Froelicher Y. 2009a. Inheritance of characters involved in fruit quality in a citrus interspecific allotetraploid somatic hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (11): 5065 - 5070.
- Bassene J B, Froelicher Y, Dhuique-Mayer C, Mouhaya W, Ferrer R M, Ancillo G, Morillon R, Navarro L, Ollitraul P. 2009b. Non-additive phenotype and transcriptomic inheritance in a citrus allotetraploid somatic hybrid between *C. reticulata* and *C. limon*: The case of pulp carotenoid biosynthesis pathway. *Plant Cell Reports*, 28 (11): 1689 - 1697.
- Birchler J A. 2012. Insights from paleogenomic and population studies into the consequences of dosage sensitive gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 15 (5): 544 - 548.
- Birchler J A, Veitia R A. 2012. Gene balance hypothesis: Connecting issues of dosage sensitivity across biological disciplines. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences, USA, 109 (37): 14746 - 14753.
- Cai X D Fu J, Deng X X, Guo W W. 2007. Production and molecular characterization of potential seedless cybrid plants between pollen sterile Satsuma mandarin and two seedy *Citrus* cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 90 (3): 275 - 283.
- Chen Lu-lu, Wang Tao, Huang Xue-yan, Lu Cai-yu, Liu Dong-feng, Zheng Xiao-yan, Teng Yuan-wen. 2011. Study on enzyme activities involved in sugar accumulation and sucrose metabolization in Guiguan pear under plastic tunnel culture. *Journal of Fruit Science*, 28 (3): 400 - 405. (in Chinese)  
陈露露, 王涛, 黄雪燕, 卢彩玉, 刘冬峰, 郑小艳, 滕元文. 2011. 大棚翠冠梨果实糖积累及蔗糖代谢相关酶活性研究. *果树学报*, 28 (3): 400 - 405.
- Clark N L, Alani E, Aquadro C F. 2012. Evolutionary rate covariation reveals shared functionality and coexpression of genes. *Genome Research*, 22 (4): 714 - 720.
- Fanciullino A L, Dhuique-Mayer C, Luro F, Casanova J, Morillon R, Ollitrault P. 2006. Carotenoid diversity in cultivated citrus is highly influenced by genetic factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (12): 4397 - 4406.
- Fu J, Peng Z J, Cai X D, Guo W W. 2011. Regeneration and molecular characterization of interspecific somatic hybrids between Satsuma mandarin and two seedy sweet oranges for scion improvement. *Plant Breeding*, 130 (2): 287 - 290.
- Guo Wen-wu, Deng Xiu-xin. 2000. Two interspecific somatic hybrid plants regenerated via protoplast electro-fusion. *Chinese Journal of Biotechnology*, 16 (2): 179 - 182. (in Chinese)  
郭文武, 邓秀新. 2000. 柑桔细胞电融合再生两个种间体细胞杂种. *生物工程学报*, 16 (2): 179 - 182.
- Gancel A L, Ollitrault P, Froelicher Y, Tomi F, Jacquemond C, Luro F, Brillouet J M. 2003. Leaf volatile compounds of seven citrus somatic tetraploid hybrids sharing willow leaf mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) as their common parent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (20): 6006 - 6013.
- Gu Jian-qin. 2007. Changing of sugar and acid contents of Anliu sweet orange and its mutant red Anliu sweet orange during fruit development [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agriculture University. (in Chinese)  
顾建芹. 2007. 暗柳橙及其突变体红暗柳橙果实发育过程中糖酸组分的变化[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Guo W W, Wu R C, Fan G E, Cheng Y J. 2008. Analysis of mitochondrial genomes in *Citrus* interspecific somatic hybrids produced by protoplast fusion. *Botanical Studies*, 49 (4): 295 - 300.
- Grosser J W, Gmitter F G Jr. 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: Applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104 (3): 343 - 357.
- Grover C E, Gallagher J P, Szadkowski E P, Yoo M J, Flagel L E, Wendel J F. 2012. Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploid. *New Phytologist*, 196 (4): 966 - 971.
- Kato M, Ikoma Y, Matsumoto H, Sugiura M, Hyodo H, Yano M. 2004. Accumulation of carotenoids and expression of carotenoid biosynthetic genes during maturation in citrus fruit. *Plant Physiology*, 134 (2): 824 - 837.
- Liu Qing. 2008. Molecular mechanism for the altered traits of the red flesh bud sport of 'Anliu' sweet orange [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agriculture University. (in Chinese)  
刘庆. 2008. '暗柳'甜橙红色突变体形状形成的分子机理研究[博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Moshe F, Avraham A L, Tzion F, Abraham K. 2012. Genomic asymmetry in allopolyploid plants: Wheat as a model. *Journal of Experimental Botany*, 63 (14): 5045 - 5049.
- Nicolosi E, Deng Z N, Gentile A, Malfa S L, Continella G, Tribulato E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor Appl Genet*, 100 (8): 1155 - 1166.
- Osabe K, Kawanabe T, Sasaki T, Ishikawa R, Okazaki K, Dennis E S, Kazama T, Fujimoto R. 2012. Multiple mechanisms and challenges for the application of allopolyploidy in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (7): 8696 - 8721.
- Schnable J C, Springer N M, Freeling M. 2011. Differentiation of the maize subgenomes by genome dominance and both ancient and ongoing gene loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 108 (10): 4069 - 4074.
- Tusa N, Abbate L, Renda A, Ruberto G. 2007. Ployphenols distribution in juices from *Citrus* allotetraploid somatic hybrids and their sexual hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (22): 9089 - 9094.
- Wang J L, Tian L, Lee H S, Wei N E, Jiang H M, Watson B, Madlung A, Osborn T C, Doerge R W, Comai L, Chen Z J. 2006. Genomewide nonadditive gene duplication gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploid. *Genetics*, 172 (1): 507 - 517.