

利用重测序 - BSA 分析鉴定金柑油胞发育相关基因

刘梦雨, 刘小丰, 江 东, 朱世平, 申晚霞, 余 歆, 薛 杨, 赵晓春*

(西南大学柑桔研究所, 中国农业科学院柑桔研究所, 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712)

摘 要: 为了鉴定与金柑油胞发育相关的基因, 用多油胞的罗纹金柑 [*Fortunella japonica* (Thunb.) Swingle, 母本] 和少油胞的滑皮金柑 (*Fortunella crassifolia* Swingle ‘Huapi’, 父本) 进行杂交构建了 F₁ 代分离群体, 从 159 个 F₁ 代单株中挑选出高油胞密度和低油胞密度的单株各 30 株, 分别构建两个极端性状的 DNA 混池用于基因组重测序。利用重测序数据结合混合分组分析法 (Bulked Segregant Analysis, BSA) 进行遗传关联性分析, 将控制油胞数量性状的位点定位在第 9 条染色体的 25 980 001 ~ 29 160 001 bp 的区域内。该区域包含 511 个有效的 SNP, 分布在 301 个基因位点上。同源性功能分析后获得 11 个与细胞程序性死亡、细胞壁功能和结构及细胞伸长和膨大等生理过程相关的候选基因 (*Ciclev10005243m.g*、*Ciclev10005288m.g*、*Ciclev10005338m.g*、*Ciclev10005441m.g*、*Ciclev10006448m.g*、*Ciclev10005804m.g*、*Ciclev10004719m.g*、*Ciclev10005888m.g*、*Ciclev10006502m.g*、*Ciclev10005197m.g* 和 *Ciclev10004431m.g*) , 这些基因可能在柑橘油胞的发育过程中起重要作用。

关键词: 金柑; 油胞发育; 重测序 - BSA 分析; 同源分析; 功能注释

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 05-0841-14

Identification of Genes Related to Oil Gland Development in Kumquat by Using BSA-Seq

LIU Mengyu, LIU Xiaofeng, JIANG Dong, ZHU Shiping, SHEN Wanxia, YU Xin, XUE Yang, and ZHAO Xiaochun*

(Citrus Research Institute, Southwest University, Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China)

Abstract: The density of oil gland is an important factor to determine the content of essential oil in citrus. To understand the genetic control of oil gland development, a segregation population of 159 F₁ individuals was constructed by crossing Luowen kumquat [*Fortunella japonica* (Thunb.) Swingle] with Huapi kumquat (*F. crassifolia* Swingle ‘Huapi’), a low oil gland density mutation variety. Thirty individuals of each extreme phenotype group with either high-density or low-density oil glands were chosen and their DNA were pooled to construct two DNA pools for genomic re-sequencing to identify

收稿日期: 2019 - 04 - 21; **修回日期:** 2019 - 05 - 09

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-27); 重庆市现代山地特色高效农业技术体系创新团队建设计划项目; 西南大学双一流学科建设项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhaoxiaochun@cric.cn)

candidate genes associated with oil gland development. The results of Bulk Segregant Analysis (BSA) indicated that the 25 980 001 - 29 160 001 bp region of chromosome 9 is highly correlated to the density of oil glands. Through analysis of recombination frequency of SNP, 511 SNP loci distributed in 301 genes were found to be possibly associated with the density of oil glands. The homology function analysis suggested that 11 of these genes (*Ciclev10005243m.g*, *Ciclev10005288m.g*, *Ciclev10005338m.g*, *Ciclev10005441m.g*, *Ciclev10006448m.g*, *Ciclev10005804m.g*, *Ciclev10004719m.g*, *Ciclev10005888m.g*, *Ciclev10006502m.g*, *Ciclev10005197m.g* and *Ciclev10004431m.g*) involving in cell programmed death, the function and construction of cell wall, and cell elongation and expansion may be the important genetic factors controlling the development of oil gland.

Keywords: kumquat; oil gland development; re-sequencing and BSA; homologous analysis; functional annotation

柑橘精油是一类重要的植物精油，主要成分为挥发性单萜、倍半萜及其氧化衍生物，其色泽透明，气味清新，具有天然花果香，同时有良好的抑菌和抗氧化活性，被广泛应用于食品、医药和化工行业 (Shahidi & Zhong, 2005; Tranchida et al., 2012)。

柑橘精油主要由位于果实、叶片、茎段的表皮组织的油胞合成并贮存 (Thomson et al., 1976; Voo et al., 2012)。油胞在植物各组织形成的早期即有发生。油胞的发育过程大致分为两个阶段，第一阶段是细胞团的形成与结构分化，第 2 个阶段是细胞团中央细胞间分离、细胞解体形成油腔 (Knight et al., 2001; Rafiei & Rajaei, 2007; Zheng et al., 2014)。油胞发育涉及到多个生理过程，并在时空上受到相关酶的调节。Liang 等 (2009) 研究发现，油胞组织细胞内的果胶酶和纤维素酶先后在胞间分离与细胞壁降解过程中起作用。Chen 和 Wu (2010) 研究证实在油胞中分泌细胞的溶解过程有细胞程序性死亡机制的参与。Liu 等 (2012) 研究发现 Caspase 蛋白酶参与油胞内分泌细胞的细胞核裂解、DNA 断裂以及染色质浓缩和边缘化等过程，属于细胞程序性死亡的典型特征。Zheng 等 (2014) 认为柑橘油胞内分泌细胞的 Ca^{2+} 由细胞壁向细胞核内转移而引起的 Ca^{2+} 浓度激增是导致细胞程序性死亡的重要因素之一。为进一步研究油胞组织中特异表达的基因，Voo 等 (2012) 在葡萄柚果皮油胞大量形成的中期和后期对果皮油胞组织和白皮层的薄壁细胞组织进行了基因表达对比分析，分别筛选到 4 079 个和 3 082 个显著差异表达的基因，包括 2 657 个共同差异基因，其中最显著的两个生物学过程 (Biological Process) 分别为“苯丙烷代谢过程” (GO:0009698) 和“类异戊二烯代谢过程” (GO:0006720)，可见次生代谢产物合成与油胞的发育有关。该项研究从分子生物学层面确认了油胞是精油等次生代谢产物合成的场所，但对油胞形成的分子机制未有提及。目前对于柑橘油胞发育的细胞学和生物化学过程有较多的研究，但对其遗传调控机制的研究报道较少。

混合分组分析法 (Bulk Segregant Analysis, BSA) 是一种快速简单的目标性状定位方法，该方法最大的特点是不需要检测所有子代个体，而是将两种极端性状的子代进行混池分析。Michelmore 等 (1991) 建立了该方法并将一个叶用莴苣霜霉病抗性基因定位在 25 cM 的染色体区域。早期的 BSA 应用多建立在 RFLP、RAPD 和 SSR 等分子标记的基础之上 (van der Lee et al., 2001; Morlais & Severson, 2001)。随着高通量测序技术的广泛应用，基于芯片、转录组测序和基因组重测序所获得的大量 SNP 和 Indel 标记，使得利用 BSA 法快速定位植物的重要表型性状位点和基因更加便利，如花生的分枝习性控制位点 (Kayam et al., 2017)、柑橘的多胚性状位点 (Wang et al., 2017)、梨果

皮的颜色性状位点 (Xue et al., 2017) 和西瓜的矮化基因 (Dong et al., 2018) 等许多植物的重要农艺性状位点和基因都被精细定位或克隆出来。

金柑属 (*Fortunella Swingle*) 为柑橘属 (*Citrus*) 的近缘属 (叶荫民, 1983)。本研究中利用少油胞的滑皮金柑 (杨科, 1985) 与多油胞的罗纹金柑杂交构建的遗传分离群体, 通过对亲本和两个极端表型子代混池进行基于基因组重测序的 BSA 分析, 以期定位和筛选与调控柑橘油胞形成与发育过程相关的基因。

1 材料与方法

1.1 材料来源

杂交群体的母本为罗纹金柑 [*F. japonica* (Thunb.) Swingle], 在果皮、叶片、花瓣、茎等组织上都有密集的油胞; 父本为滑皮金柑 (*Fortunella crassifolia Swingle* ‘Huapi’), 是融安金柑的突变体品种, 仅在果皮上有少量油胞; 其叶片、花瓣和茎的表皮上均无可见的油胞。杂交群体为 F₁ 代分离群体, 于 2016 年 1 月分别嫁接在枳 (*Poncirus trifoliata*) 砧木上。材料均种植于国家果树种质重庆柑橘圃中。

1.2 分子标记分析

分子标记引物序列全部来自文献, 包括 86 对 SSR 引物 (张连峰 等, 2006; Luro et al., 2012; 雷天刚 等, 2015; 高恒锦, 2016), 60 对 COS 引物 (王炯, 2017; 王炯 等, 2017)。引物由华大基因有限公司合成或由以上作者馈赠。

2016 年 6 月, 采取新鲜的金柑叶片, 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305, 天根生化科技有限公司) 提取 DNA, NanoDrop 2000 分光光度计 (Thermo Scientific) 测量 DNA 浓度并统一稀释成 50 ng · μL⁻¹ 备用。PCR 反应体系为 15 μL, 其中 2 × Taq PCR MasterMix (PC0902, 北京艾德莱生物科技有限公司) 7.5 μL, 正、反向引物 (10 μmol · L⁻¹) 各 0.3 μL, DNA 样品 25 ng, 用 ddH₂O 补足至 15 μL。PCR 反应程序为 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 20 s, 退火 20 s, 退火温度根据不同引物相应改变, 72 °C 延伸 20 s, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。扩增产物采用 4% 琼脂糖凝胶电泳检测。

对扩增后清晰可辨的条带在同一迁移位置有无条带分别标记为 “1” 或 “0” 进行统计, 建立样品标记矩阵。采用 Nei’s 公式计算每两份材料间的遗传相似系数 (Genetic Similarities, GS)。利用 NTSYSpc Version 2.1 软件, 按照非加权类平均法 (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Means, UPGMA) 进行聚类分析, 构建系统进化树。

1.3 金柑叶片油胞观察与计数

2017 年 5 月下旬, 在两个亲本和每个金柑杂交后代的春梢上选取 5 片完全展开的鲜嫩叶片, 用 HP Scanjet 4050 扫描仪扫描叶片, 用 ImageJ 1.50i 计算叶片面积 (S)。

用打孔器在叶片主脉左右两侧对称位置分别获取 3 个直径约 0.5 cm 的叶圆片, 置于 2 mL 的离心管中, 加入 5% NaOH 浸泡, 65 °C 水浴处理 1 ~ 2 h 以除去表面蜡质层并脱去叶绿素, 清水漂净, 放入新的离心管, 加入含 10% 甘油的双蒸水, 4 °C 保存。

将保存的叶圆片用清水漂净, 做水装片, 用 Olympus IX73 倒置光学显微镜进行观察、拍照, 拍

摄区域面积为 s 。利用 Photoshop CS6 软件对拍摄区域内的油胞进行计数 (n)，并记录油胞特征。计算叶片油胞密度 ($D = n/s$) 和叶片油胞数量 ($N = SD$)。

1.4 重测序 - BSA 分析

在 F_1 代中分别选取叶片多油胞或少油胞的植株各 30 株，组成两个极端性状材料混池（多油胞植株混池为 HD pool，少油胞植株混池为 LD pool），连同 2 个亲本，委托广州基迪奥生物科技有限公司进行基因组重测序，全部样品的测序深度均为 $25\times$ 。参考基因组为克里曼丁橘 (http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!info?alias=Org_Cclementina)。

挑选两个亲本中一个为纯合，另一个为杂合的 SNP 位点，以纯合亲本作为参考，计算子代混池中该 SNP 分离位点的突变频率，即 SNP-index。采用滑动窗口策略，选择 1 Mb 为窗口，20 kb 为步长，对窗口内的 SNP 数 5 个以上的区域计算分离位点的均值，取分离位点在子代两个极端池中的基因频率差值 (Δ SNP-index) 的绝对值，绘制两个子代混池 SNP-index 图。选取两个阈值作为筛选的阈值 top1 (窗口 $|\Delta$ SNP-index| 前 1%) 和 top5 (窗口 $|\Delta$ SNP-index| 前 5%)，超过阈值外的区域为潜在 QTL 候选区域。

通过对候选区域内 SNP 的碱基类型与参考基因组相应位置碱基的比对，统计亲本以及多油胞和少油胞植株混池材料中的碱基突变类型，筛选出亲本和与之近似的混池材料中碱基突变类型相一致的候选基因。利用 NR (Non-Redundant Protein Sequence)、GO (Gene Ontology) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库注释对候选基因进行初步筛选，同时采用 Phytozome 数据库 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) 和华中农业大学甜橙基因组数据库 (<http://citrus.hzau.edu.cn/orange/index.php>) 对目的基因进行同源性分析和功能预测。

2 结果与分析

2.1 金柑杂交 F_1 代群体表型性状分析与遗传分离的分子标记鉴定

对嫁接成活的 177 株疑似杂种植株的叶尖端形状和叶片油胞分布进行观察发现：部分植株叶尖端形状近似父本滑皮金柑，部分近似母本罗纹金柑；绝大多数植株的叶片油胞密度和分布近似于母本，少数植株的叶片油胞稀疏细小，但未发现与父本完全相同的叶片无油胞植株 (图 1)。

根据初步观察结果，挑选 8 株疑似金柑杂交植株，包括 2 株叶尖端形态近似父本、2 株叶尖端形态近似母本、2 株叶片油胞细小和 2 株叶片油胞近似母本的植株，连同 2 个亲本，用 146 对分子标记引物进行检测。共获得 27 对条带清晰、在子代间有明显带型分离的分子标记，其中 SSR 引物 18 对，COS 引物 9 对。

利用上述 27 对引物对所有疑似金柑杂交植株进行分子标记鉴定，检测出 159 株真杂种，真杂种率为 89.83%。其中，COS 引物 C5-8 的鉴定效率最高，达到 83.62%，其检出的真杂种后代均具有父本专有的条带 (图 2)。

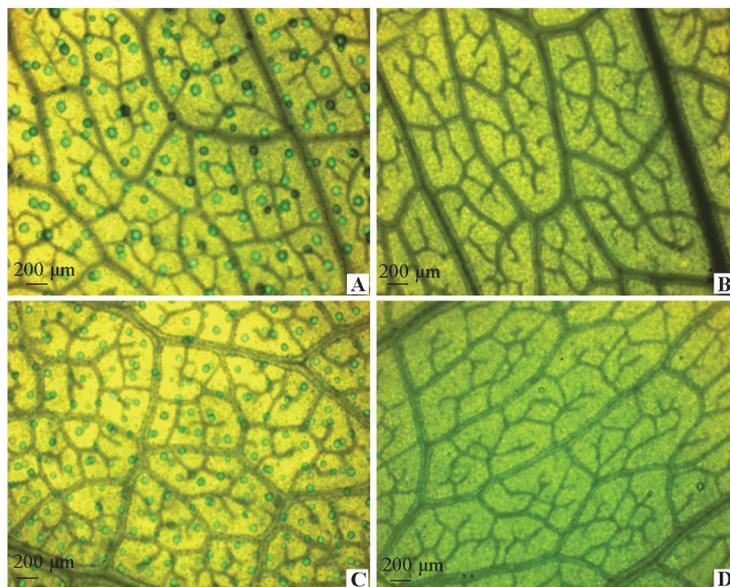


图 1 亲本与杂交 F₁ 代株系的叶片油胞形态与分布

A: 罗纹金柑 (♀); B: 滑皮金柑 (♂); C: No. 214 (叶片多油胞 F₁ 代植株); D: No. 21 (叶片少油胞 F₁ 代植株)。

Fig. 1 Morphology and distribution of oil glands in the leaf of parents and hybrid F₁ lines

A: Luowen (♀); B: Huapi (♂); C: No. 214 (F₁ individual with high density oil glands in leaf);
 D: No. 21 (F₁ individual with low density oil glands in leaf) .

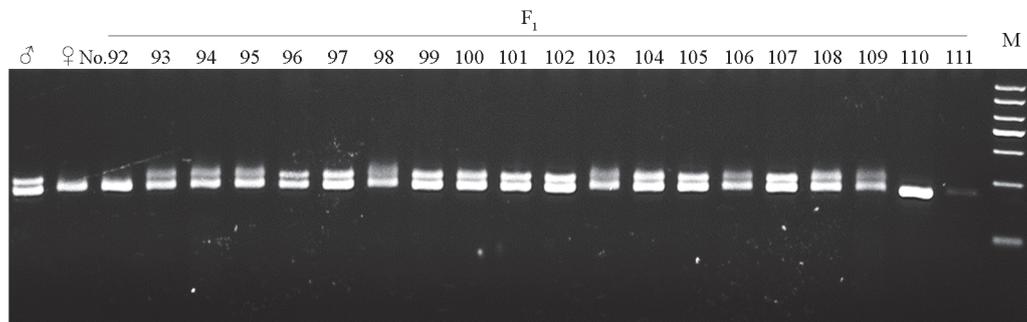


图 2 COS 引物 C5-8 的 PCR 扩增结果 (部分)

M: Marker DL1000; ♂: 滑皮金柑; ♀: 罗纹金柑; No. 92、110、111: 假杂种植株。

Fig. 2 PCR fragments with COS primer C5-8 (partial results)

M: Marker DL1000; ♂: Huapi; ♀: Luowen; No. 92, 110, 111: Fake hybrid lines.

27 对分子标记引物在两个亲本和 159 份 F₁ 代材料中共扩增出 68 个多态性位点, 每对 SSR 引物可检测的等位基因数平均为 2.52 个, 其中 SSR 引物 mest101 和 COS 引物 C4-9 可检测到 4 个多态性位点。27 对引物检测到的基因的多态信息量在 0.1097 ~ 0.6954 之间, 平均值为 0.4359, 其中引物 COSC5-8 的多态性信息量最低, 引物 CSSR41 的多态性最高。

根据遗传相似性系数矩阵, 利用 UPGMA 方法构建了 161 份金柑的聚类图。在遗传相似系数为 0.65 的水平上, 可以明显地将 159 份金柑杂交株系划分至 3 个类群 (图 3)。第 I 类与滑皮金柑聚为一类, 有 77 株, 占 48.43%; 第 II 类与罗纹金柑聚为一类, 有 74 株, 占 46.54%; 第 III 类有 8 株, 占 5.03%。其中第 I 类和第 II 类所占比例相当, 表明该群体不表现出偏性遗传, 适合进一步遗传分析。

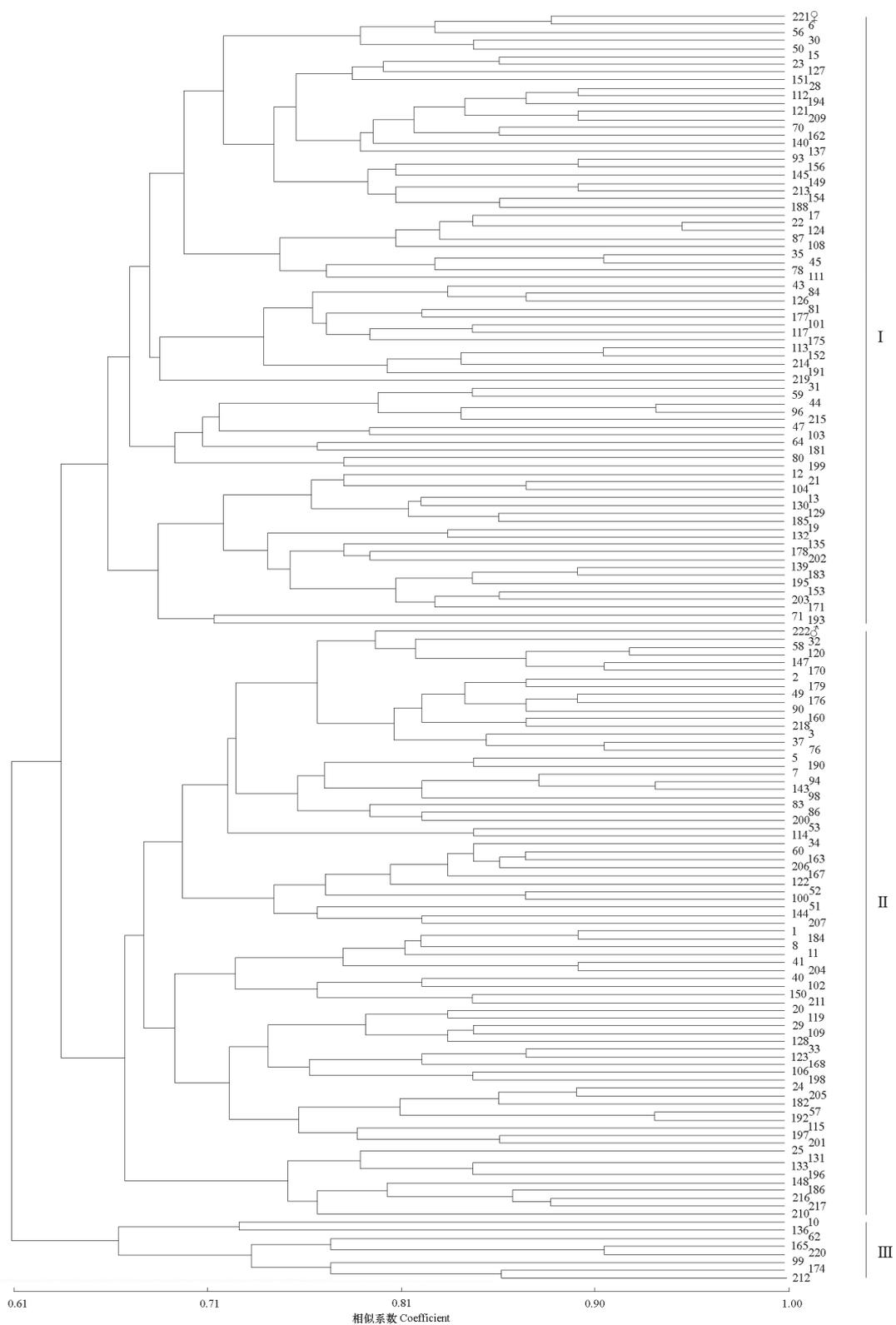


图3 161份金柑株系聚类图

221: 罗纹金柑 (♀); 222: 滑皮金柑 (♂); 其余数字为 159 份杂交 F₁ 代株系编号。

Fig. 3 Dendrogram derived from UPGMA cluster analysis based on SSR analysis of 161 kumquat lines

221: Luowen (♀); 222: Huapi (♂); the rest numbers were the codes of 159 hybrid F₁ lines.

统计分析两个亲本和 159 份真杂种植株叶片的油胞数, 从中挑选构建多油胞和少油胞群体混池的极端性状材料。其中母本罗纹金柑平均单叶油胞数为 25 033.66 个, 父本中无可见油胞, 金柑杂交 F₁ 代群体混池中各单株叶片油胞数在 1 516.15 ~ 40 179.08 个之间, 平均单叶油胞数为 20 797.19 个, 变异系数为 45.72%。单因素方差分析测验表明叶片油胞数在两个群体混池间存在显著差异 ($F = 1 229.14$, $P = 0.000$) (表 1)。

表 1 亲本与杂交 F₁ 代株系的叶片油胞数量统计
Table 1 Number of oil glands in the leaf of parents and hybrid F₁ lines

样本名称 Sample	单叶油胞数量 Oil gland number
罗纹金柑 Luowen	25 033.66 ± 8 408.74 b
滑皮金柑 Huapi	0 d
多油胞群体混池 HD pool	33 158.10 ± 3 160.92 a
少油胞群体混池 LD pool	6 251.36 ± 2 771.07 c

2.2 测序数据分析

4 个样本池中获得的过滤后的有效碱基数在 9 842 ~ 12 570 Mb 之间, 测序数据质量较高 ($Q20 \geq 95.64\%$ 、 $Q30 \geq 90.72\%$), GC 含量在 41.18% ~ 41.86% 之间。基因组平均覆盖深度在 26.82 ~ 34.25× 之间。有效读长数在 66 395 590 ~ 84 855 862 bp 之间, 占总读长的比率 $\geq 97.04\%$ 。总比对读长率在 88.87% ~ 90.34% 之间, 特异性比对读长率在 73.06% ~ 73.86% 之间, 完全匹配比对读长率在 49.12% ~ 50.97% 之间 (表 2)。以上数据表明测序数据充足, 质量合格, 可用于下一步分析。

表 2 测序质控数据与参考基因组匹配情况
Table 2 Matching of sequencing quality control data with reference genome

测序信息 Sequencing information	罗纹金柑 Luowen	滑皮金柑 Huapi	多油胞群体混池 HD pool	少油胞群体混池 LD pool
有效碱基数 (bp) HQ clean data	12 570 135 842	11 313 327 014	11 115 600 900	9 842 210 848
Q20 (%)	12 048 257 924 (95.85%)	10 856 250 024 (95.96%)	10 630 934 374 (95.64%)	9 450 640 419 (96.02%)
Q30 (%)	11 451 821 288 (91.10%)	10 334 404 014 (91.35%)	10 084 581 175 (90.72%)	8 994 942 757 (91.39%)
过滤后 GC 碱基数目比对及比例 (%) GC num	5 262 150 866 (41.86%)	4 687 047 724 (41.43%)	4 620 092 655 (41.56%)	4 053 221 862 (41.18%)
有效读长数及比例 (%) HQ clean reads num	84 855 862 (97.74%)	76 607 168 (97.55%)	75 227 842 (97.04%)	66 395 590 (97.84%)
总比对读长数及比例 (%) Total mapped	76 070 998 (89.65%)	68 080 026 (88.87%)	67 945 741 (90.32%)	59 983 972 (90.34%)
特异性比对读长数及比例 (%) Unique mapped	62 293 940 (73.41%)	55 965 582 (73.06%)	55 504 384 (73.78%)	49 039 008 (73.86%)
完全匹配比对读长数及比例 (%) Perfect mapped	42 473 883 (50.05%)	37 629 157 (49.12%)	37 554 456 (49.92%)	33 841 348 (50.97%)

2.3 SNP 分析

SNP 分析结果显示, 4 个样本共获得 12 056 400 个 SNP 位点, 其中滑皮金柑最少, 罗纹金柑和两个混池材料的数相当。

SNP 位置和编码信息统计显示, 材料间相同类型的 SNP 数和比率大体相当 (表 3)。SNP 杂合信息统计显示, 纯合 SNP 位点明显较杂合 SNP 位点多, 是杂合位点的 1.98 ~ 3.34 倍。其中滑皮金柑纯合 SNP 位点比率最高, 为 76.94%, 其次为罗纹金柑, 为 71.03%。

两个杂交群体混池样本中纯合基因型比率较低, 多油胞混池为 66.41%, 少油胞混池为 68.15%。表明杂交增加了子代的杂合 SNP 率。

表 3 变异位点注释情况统计表
Table 3 Information of variation sites

变异位点信息 Variation sites information	罗纹金柑 Luowen	滑皮金柑 Huapi	多油胞植株混池 HD pool	少油胞植株混池 LD pool
外显子 Exonic	300 812	287 056	319 790	314 211
内含子 Intronic	459 699	438 984	486 650	478 581
外显子中剪切位点 Exonic; Splicing	45	43	49	47
基因间区 Intergenic	1 642 263	1 553 538	1 655 944	1 642 925
剪切位点 Splicing	921	879	992	952
基因上游 Upstream	243 484	230 707	246 013	247 719
基因下游 Downstream	213 518	202 639	219 745	218 414
基因上游; 基因下游 Upstream; Downstream	35 405	33 394	36 397	36 318
5'非翻译区 UTR5'	45 246	43 123	47 710	46 909
3'非翻译区 UTR3'	80 077	76 215	84 718	83 372
5'非翻译区; 3'非翻译区 UTR5', UTR3'	221	205	243	227
终止子提前 Stopgain	1 729	1 632	1 852	1 831
终止子丢失 Stoploss	363	354	385	374
同义突变 Synonymous SNV	144 227	138 002	153 213	150 722
非同义突变 Nonsynonymous SNV	154 538	147 111	164 389	161 331
转换 Ts	1 878 522	1 782 692	1 922 511	1 902 181
颠换 Tv	1 143 169	1 084 091	1 175 740	1 167 494
转换/颠换 Ts/Tv	1.6433	1.6444	1.6351	1.6293
纯合基因型 Hom	2 146 449	2 205 839	2 057 628	2 091 938
杂合基因型 Het	875 242	660 944	1 040 623	977 737
SNP 合计 Total SNP	3 021 691	2 866 783	3 098 251	3 069 675

2.4 BSA 分析与候选基因的筛选

对两个极端子代混池的 SNP-index 在染色体上的分布情况进行统计, 计算两个子代混池的 $|\Delta\text{SNP-index}|$, 通过设定 Top 1% 的阈值, 筛选到第 9 条染色体中的 25 980 001 ~ 29 160 001 bp 区域为候选区域 (图 4)。该区域内共包含 6 896 个 SNP 多态性位点, 去除少油胞植株池以及滑皮金柑与参考基因组、多油胞植株池和罗纹金柑间无差异的位点, 获得可能与目标性状相关的有效 SNP 位点 511 个, 这些 SNP 位点分布在 301 个基因位点上。对基因的 NR、GO 和 KEGG 注释结果进行候选基因筛选, 结果显示, GO 注释中候选基因参与的生物学过程 (Biological process) 多为代谢途径以及细胞壁的生物合成, 如单个有机体代谢过程 (Single-organism metabolic process, GO:0044699)、磷代谢过程 (Phosphorus metabolic process, GO:0006793) 和外部封装结构组织 (External encapsulating structure organization, GO:0045229)。它们所处的细胞位置 (Cellular Component) 大多位于质膜和细胞壁, 如膜的固有成分 (Intrinsic component of membrane, GO:0031224) 和细胞壁 (Cell wall, GO:0005618)。同时候选基因的分子功能 (Molecular function) 集中于蛋白酶的催化活性与结合上, 如氧化还原酶 (Oxidoreductase activity, GO:0016491), 过氧化物酶活性 (Peroxidase activity, GO:0004601), 嘌呤核苷的结合 (Purine nucleoside binding, GO:0001883)。最终筛选出 11 个与油胞发育相关的基因, 包含 16 个 SNP, 其中有 7 个非同义 SNP (表 4)。

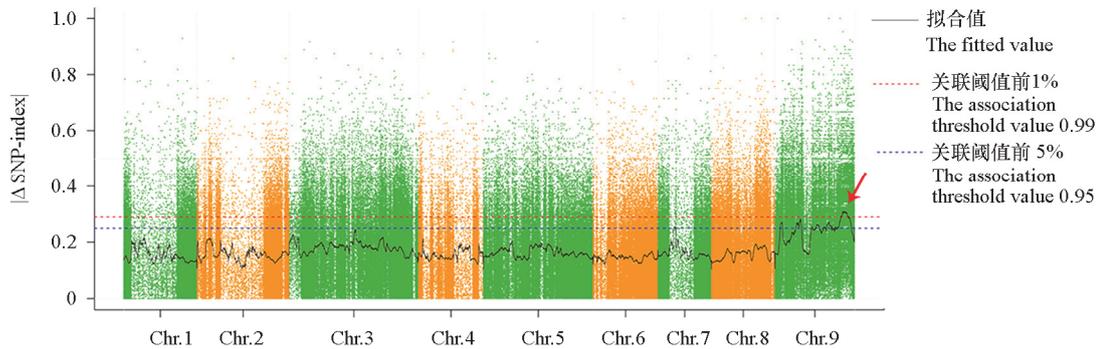


图 4 金柑多油胞和少油胞材料混池变异位点|ΔSNP-index|分布情况

红色箭头: 关联阈值前 1% 以上的候选区域 (25 980 001 ~ 29 160 001 bp) 在金柑第 9 条染色体上。

Fig. 4 Distribution of |ΔSNP-index| in variation site of HD pool and LD pool

The Top 1% candidate regions (region 25 980 001 - 29 160 001 bp) above the association threshold value (0.99) were marked with red arrow on kumquat chromosome 9.

表 4 第 9 条染色体上候选基因在金柑亲本及其混池材料中的变异位点情况统计

Table 4 SNPs of candidate genes among Huapi, Luowen and their LD pool and HD pool on chromosome 9

SNP 位点 SNP loci	参考碱基 Reference base (<i>C. clementina</i>)	突变 碱基 Altered base	碱基类型 Base type				突变类型 Mutation type	基因 ID Gene ID
			滑皮 金柑 Huapi	罗纹 金柑 Luowen	少油胞 植株混池 LD pool	多油胞 植株混池 HD pool		
26 233 568	G	A	1 1	0 1	1 1	0 1	非同义 SNV Nonsynonymous SNV	<i>Ciclev10005243m.g</i>
28 643 032	G	T	1 1	0 1	1 1	0 1	同义 SNV Synonymous SNV	<i>Ciclev10005288m.g</i>
28 268 082	T	C	1 1	0 1	1 1	0 1	同义 SNV Synonymous SNV	<i>Ciclev10005338m.g</i>
28 268 200	T	C	1 1	0 1	1 1	0 1	非同义 SNV Nonsynonymous SNV	<i>Ciclev10005338m.g</i>
28 310 879	C	G	0 1	0 0	0 1	0 0	非同义 SNV Nonsynonymous SNV	<i>Ciclev10005441m.g</i>
28 440 457	A	T	1 1	0 1	1 1	0 1	非同义 SNV Nonsynonymous SNV	<i>Ciclev10006448m.g</i>
28 440 475	T	A	1 1	0 1	1 1	0 1	非同义 SNV Nonsynonymous SNV	<i>Ciclev10006448m.g</i>
27 159 887	T	A	1 1	0 1	1 1	0 1	同义 SNV Synonymous SNV	<i>Ciclev10005804m.g</i>
27 159 893	T	G	1 1	0 1	1 1	0 1	同义 SNV Synonymous SNV	<i>Ciclev10005804m.g</i>
27 542 671	T	A	1 1	0 1	1 1	0 1	非同义 SNV Nonsynonymous SNV	<i>Ciclev10004719m.g</i>
27 633 718	C	T	1 1	0 1	1 1	0 1	非同义 SNV Nonsynonymous SNV	<i>Ciclev10005888m.g</i>
27 656 581	C	T	1 1	0 1	1 1	0 1	同义 SNV Synonymous SNV	<i>Ciclev10006502m.g</i>
26 688 805	C	A	1 1	0 1	1 1	0 1	同义 SNV Synonymous SNV	<i>Ciclev10005197m.g</i>
27 466 446	C	T	1 1	0 1	1 1	0 1	同义 SNV Synonymous SNV	<i>Ciclev10004431m.g</i>
27 466 481	G	T	1 1	0 1	1 1	0 1	同义 SNV Synonymous SNV	<i>Ciclev10004431m.g</i>
27 466 511	G	A	1 1	0 1	1 1	0 1	同义 SNV Synonymous SNV	<i>Ciclev10004431m.g</i>

注: 碱基类型中, 1|1 代表纯合突变, 0|1 代表杂合突变, 0|0 代表与参考碱基一致。

Note: Among these base types, 1|1 represents homozygous mutation, 0|1 represents heterozygous mutation, and 0|0 is consistent with the reference base.

2.5 油胞发育相关基因的同源性及功能分析

通过对 11 个候选基因进行同源性分析发现,除了 *Ciclev10006502m.g* 不存在于杨树 (*Populus trichocarpa*) 和甜橙 (*Citrus sinensis*) 基因组中,其余基因在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、杨树和甜橙中均具有对应的同源基因(表 5)。*Ciclev10005288m.g* 属于 BAG(BCL-2-associated athanogene) 家族成员,该家族部分基因参与植物生长发育或病原菌侵染过程中的细胞程序性死亡途径。此外,其家族成员 *BAG6* 和 *BAG7* 受乙烯诱导,通过提高表达水平来拮抗盐胁迫导致的细胞程序性死亡,从而保持细胞活性 (Pan et al., 2016)。*Ciclev10005197m.g* 属于 RhoGTP 酶激活蛋白 (Rho GTPase-activating protein, RhoGAP) 家族成员,其家族成员 *SPIN6* 作为泛素蛋白酶体系统 (Ubiquitin proteasome system) 中的一个效应因子,通过与 E3 泛素连接酶相互作用,对细胞程序性死亡中的泛素化途径进行负调控,以维持植物生长发育中活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 的平衡和抑制抗性相关基因在植物抗性反应中的过度表达 (Liu et al., 2015)。*Ciclev10005338m.g* 和 *Ciclev10005441m.g* 为羧酸酯酶基因家族成员,同样被证实间接参与到植物生长发育或病原菌侵染过程中的细胞程序性死亡途径 (Marshall et al., 2003; Cummins et al., 2007)。*Ciclev10004719m.g*、*Ciclev10005888m.g* 和 *Ciclev10006502m.g* 为果胶甲酯酶抑制子超家族成员,该基因编码的蛋白对于维持植物在逆境和生物胁迫下细胞壁功能和结构的完整性具有重要作用 (Lionetti et al., 2017)。*Ciclev10004431m.g* 为细胞壁相关激酶家族基因,该家族成员参与植物防御反应中对病原菌的响应过程,同时影响细胞的伸长和膨大 (Verica & He, 2002),并且该家族成员 *WAK11* 能够通过降低水稻细胞壁的甲酯化程度增强对金属离子胁迫的耐性 (Xia et al., 2018)。过氧化物酶基因 *Ciclev10006448m.g* 和 *Ciclev10005804m.g* 与过氧化物酶体的产生和增加有关,参与植物体内多种新陈代谢活动 (Orth et al., 2007),以及 α/β -水解酶超家族蛋白基因 *Ciclev10005243m.g*,参与植物多种初级代谢和次生代谢过程中的催化反应,但均无明确的生物学功能报道 (Mindrebo et al., 2016)。以上候选基因对金柑油胞形成和发育的影响将在后续的工作中进行验证。

表 5 BSA-seq 鉴定的候选基因信息表
 Table 5 Information of candidate genes identified by BSA-seq

候选基因 ID Gene ID	基因功能注释 Annotated function	拟南芥 <i>A. thaliana</i>		杨树 <i>P. trichocarpa</i>		甜橙 <i>C. sinensis</i>	
		同源基因 Homologous gene	功能注释 Annotated function	同源基因 Homologous gene	功能注释 Annotated function	同源基因 Homologous gene	功能注释 Annotated function
<i>Ciclev10005243m.g</i>	α/β -水解酶超家族蛋白 α/β -hydrolases superfamily protein	<i>AT5G51180.2</i>	α/β -水解酶超家族蛋白 α/β -hydrolases superfamily protein	<i>Potri.003G151300.2</i>	α/β -水解酶超家族蛋白 α/β -hydrolases superfamily protein	<i>Cs9g15780.2</i>	假定含有 α/β -水解酶折叠蛋白的丝氨酸酯酶型酶 Putative serine esterase type enzyme with an α/β -hydrolase fold-containing protein
<i>Ciclev10005288m.g</i>	BCL-2 相关永生基因 1 BCL-2-associated athanogene 1	<i>At5g52060.1</i>	BCL-2 相关永生基因 1 BCL-2-associated athanogene 1	<i>Potri.015G135500.1</i>	BAG 家族分子伴侣相关调节因子 2 BAG family molecular chaperone regulator 2-related	<i>Cs9g16880.1</i>	BAG 家族分子伴侣调节因子 1 BAG family molecular chaperone regulator 1
<i>Ciclev10005338m.g</i>	羧酸酯酶 20 Carboxyesterase 20	<i>AT5G62180.1</i>	羧酸酯酶 20 Carboxyesterase 20	<i>Potri.015G137100.1</i>	羧酸酯酶 20 Carboxyesterase 20	<i>Cs9g16450.1</i>	羧酸酯酶 1 Carboxyesterase 1

续表 5

候选基因 ID Gene ID	基因功能注释 Annotated function	拟南芥 <i>A. thaliana</i>		杨树 <i>P. trichocarpa</i>		甜橙 <i>C. sinensis</i>	
		同源基因 Homologous gene	功能注释 Annotated function	同源基因 Homologous gene	功能注释 Annotated function	同源基因 Homologous gene	功能注释 Annotated function
<i>Ciclev10005441m.g</i>	羧酸酯酶 20 Carboxyesterase 20	<i>AT5G62180.1</i>	羧酸酯酶 20 Carboxyesterase 20	<i>Potri.015G137100.1</i>	羧酸酯酶 20 Carboxyesterase 20	<i>Cs9g16480.1</i>	羧酸酯酶 1 Carboxyesterase 1
<i>Ciclev10006448m.g</i>	过氧化物酶超 家族蛋白 Peroxidase superfamily protein	<i>AT5G51890.1</i>	过氧化物酶超 家族蛋白 Peroxidase superfamily protein	<i>Potri.005G108900.1</i>	过氧化物酶 64 Peroxidase 64	<i>Cs9g16590.1</i>	过氧化物酶 66 Peroxidase 66
<i>Ciclev10005804m.g</i>	过氧化物酶体 生成蛋白 11B Peroxin 11B	<i>AT3G47430.1</i>	过氧化物酶体 生成蛋白 11B Peroxin 11B	<i>Potri.001G124400.1</i>	过氧化物酶体 生物发生因子 11 家族蛋白 Peroxisomal biogenesis factor 11 family protein	<i>Cs9g14740.1</i>	过氧化物酶体膜 蛋白 11 Peroxisomal membrane protein 11
<i>Ciclev10004719m.g</i>	植物转化酶/ 果胶甲酯酶 抑制子超家族 蛋白 Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	<i>AT3G47400.1</i>	植物转化酶/ 果胶甲酯酶 抑制子超家族 蛋白 Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	<i>Potri.015G127800.1</i>	假定果胶甲 酯酶 Putative pectin methylesterase	<i>Cs9g14440.1</i>	假定果胶酯酶/果胶 酯酶抑制子 33 Probable pectinesterase/ pectinesterase inhibitor 33
<i>Ciclev10005888m.g</i>	植物转化酶/ 果胶甲酯酶抑 制子超家族 蛋白 Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	<i>AT4G25250.1</i>	植物转化酶/ 果胶甲酯酶抑 制子超家族 蛋白 Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	<i>Potri.012G127400.1</i>	植物转化酶/果 胶甲酯酶抑制 子超家族蛋白 Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	<i>Cs9g14330.1</i>	假定果胶酯酶/ 果胶酯酶抑制子 13 Probable pectinesterase/ pectinesterase inhibitor 13
<i>Ciclev10006502m.g</i>	植物转化酶/ 果胶甲酯酶抑 制子超家族蛋 白 Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	<i>AT4G25260.1</i>	植物转化酶/ 果胶甲酯酶抑 制子超家族蛋 白 Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein				
<i>Ciclev10005197m.g</i>	小 G 蛋白家族 蛋白/RhoGAP 家族蛋白 Small G protein family protein / RhoGAP family protein	<i>AT5G61530.1</i>	小 G 蛋白家族 蛋白/RhoGAP 家族蛋白 Small G protein family protein/RhoG AP family protein	<i>Potri.004G233400.1</i>	Rho/Rac/Cdc GTP 酶激活 蛋白 Rho/Rac/Cdc GTPase-activating protein	<i>Cs9g15310.1</i>	Rho GTP 酶激活 蛋白 5 Rho GTPase-activating protein 5
<i>Ciclev10004431m.g</i>	细胞壁相关激 酶家族蛋白 Wall-associated kinase family protein	<i>AT1G16130.1</i>	细胞壁相关 激酶 2 Wall associated kinase-like 2	<i>Potri.001G038300.1</i>	与半乳糖醛酸 结合的的细胞 壁相关受体激 酶 Wall-associated receptor kinase galacturonan- binding	<i>Cs9g14510.1</i>	细胞壁相关受体激 酶 8 Wall-associated receptor kinase-like 8

3 讨论

对于控制植物表型性状的基因进行准确定位需要开发和筛选大量的分子标记, 低密度的标记会影响定位的准确性。柑橘的遗传背景复杂, 种子多为多胚且童期较长, 不利于通过多代杂交或自交建立分离群体, 因此限制了利用分离群体开展遗传关联性的研究。此前在柑橘中, Chavez 和 Chaparro (2011) 利用 BSA 法将南丰蜜橘中的无核性状在基因组中的目标区域进行了定位; Wang 等 (2017) 通过 BSA 法定位了控制柑橘多胚性状基因的候选区域; 余惠文 (2018) 通过相同的分析方法定位并克隆了柚叶片渐绿性状基因 *Chl660*, 以上研究都是基于柑橘杂交 F₁ 代群体并利用 BSA 法定位与目标性状关联的位点, 表明 BSA 法可快速有效地用于柑橘性状的定位或基因分离。目前, 国内外虽然对柑橘油胞发育的形态学及生理生化过程有一些研究, 但对控制柑橘油胞发育的遗传机制鲜有报道。本研究中利用融安金柑实生变异选育的少油胞品种滑皮金柑为父本, 构建了杂交 F₁ 代分离群体, 采用重测序结合 BSA 法分析极端性状多油胞和少油胞材料间的遗传差异, 对控制油胞发育的数量性状位点进行了初步定位, 筛选到 11 个与油胞发育相关的候选基因。

植物在进化过程中为了保持其性状的稳定遗传, 对密码子中碱基的选择具有偏向性, 以此维持 mRNA 的稳定性以及剪切和翻译的效率和准确性, 同时保持蛋白质的构象稳定。通过对候选基因 SNP 位点的突变类型进行统计分析发现, 在筛选的候选基因当中, 部分的编码区域中存在非同义 SNP 突变位点, 可能会直接导致基因编码蛋白的构象发生改变, 从而影响其功能。而同义突变的 SNP 虽然不会引起氨基酸序列的改变, 但可能对基因的表达产生影响 (Clement et al., 2017)。因此, 在编码序列区域具有同义突变 SNP 位点的基因 *Ciclev10005288m.g*、*Ciclev10005804m.g*、*Ciclev10006502m.g*、*Ciclev10005197m.g*、*Ciclev10004431m.g*, 以及部分发生同义突变的基因 *Ciclev10005338m.g* 可能因此受到相应 SNP 的影响, 引起蛋白质结构与数量上的改变, 对酶的活性产生影响, 进而影响到相关的油胞发育过程, 并可能引起油胞发育终止。但同义突变 SNP 位点是否对以上基因造成实质性的改变, 仍需要进一步的验证。

利用模式植物的基因数据库对候选基因进行同源性及功能分析后, 可推测候选基因的功能与其同源基因相似, 可能参与到油胞发育过程中的细胞程序性死亡过程以及与细胞壁功能相关的代谢途径, 直接或间接影响油胞的发育。BAG 基因 *Ciclev10005288m.g* 可能参与到柑橘油胞形成过程中的细胞程序性死亡过程, 同时可能与精油积累过程中鞘细胞在精油刺激下的活性以及油胞结构的完整性相关。而细胞壁相关激酶基因 *Ciclev10004431m.g* 和果胶甲酯酶抑制子基因 *Ciclev10004719m.g*、*Ciclev10005888m.g*、*Ciclev10006502m.g* 可能也参与精油刺激下鞘细胞壁功能和结构完整性的维持。RhoGTP 酶激活蛋白基因 *Ciclev10005197m.g* 可能同样在柑橘油胞发育过程中以效应因子的方式参与泛素化途径, 以协调细胞程序性死亡的起始与终止。而羧酸酯酶基因 *Ciclev10005338m.g*、*Ciclev10005441m.g*, 过氧化物酶基因 *Ciclev10006448m.g*、*Ciclev10005804m.g*, 以及 α/β -水解酶超家族蛋白基因 *Ciclev10005243m.g* 则可能通过调控相应的代谢途径间接参与到柑橘油胞发育过程中的细胞程序性死亡途径。以上候选基因的功能及其参与的代谢途径均与油胞发育的两个阶段相关, 其中一些基因的变异造成的功能变化有可能终止油胞的发育, 使突变体相关组织中出现少或无油胞的现象。油胞的形成和发育是一个复杂的生理过程, 目前尚缺乏遗传调控方面的研究, 本研究中通过基于基因组重测序的 BSA 分析找到了一些与油胞发育相关的基因, 对于这些基因是否是调控油胞发育的关键基因, 以及如何影响油胞的发育将在后续工作中通过 qRT-PCR 和转基因等技术进行分析和验证。

References

- Chavez D J, Chaparro J X. 2011. Identification of markers linked to seedlessness in *Citrus kinokuni* hort. ex Tanaka and its progeny using bulked segregant analysis. *HortScience*, 46 (5): 693 - 697.
- Chen Y, Wu H. 2010. Programmed cell death involved in the schizolysigenous formation of the secretory cavity in *Citrus sinensis* L. (Osbeck) . *Chinese Science Bulletin*, 55 (20): 2160 - 2168.
- Clement Y, Sarah G, Holtz Y, Homa F, Pointet S, Contreras S, Nabholz B, Sabot F, Saune L, Ardisson M, Bacilieri R, Besnard G, Berger A, Cardi C, De Bellis F, Fouet O, Jourda C, Khadari B, Lanaud C, Leroy T, Pot D, Sauvage C, Scarcelli N, Tregear J, Vigouroux Y, Yahiaoui N, Ruiz M, Santoni S, Labouisse J P, Pham J L, David J, Glemin S. 2017. Evolutionary forces affecting synonymous variations in plant genomes. *PLoS Genetics*, 13 (5): e1006799.
- Cummins I, Landrum M, Steel P G, Edwards R. 2007. Structure activity studies with xenobiotic substrates using carboxylesterases isolated from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 68 (6): 811 - 818.
- Dong W, Wu D, Li G, Wu D, Wang Z. 2018. Next-generation sequencing from bulked segregant analysis identifies a dwarfism gene in watermelon. *Scientific Report*, 8 (1): 2908.
- Gao Heng-jin. 2016. Study on genetic diversity of citrus germplasm based on the molecular markers[M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
高恒锦. 2016. 基于分子标记柑橘遗传多样性研究[硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- Kayam G, Brand Y, Faigenboim-Doron A, Patil A, Hedvat I, Hovav R. 2017. Fine-mapping the branching habit trait in cultivated peanut by combining bulked segregant analysis and high-throughput sequencing. *Frontiers in Plant Science*, doi: 10.3389/fpls.2017.00467.
- Knight T G, Klieber A, Sedgley M. 2001. The relationship between oil gland and fruit development in Washington Navel orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) . *Annual Botany London*, 88 (6): 1039 - 1047.
- Lei Tian-gang, Zou Xiu-ping, He Yong-rui, Yao Li-xiao, Peng Ai-hong, Li Qiang, Xu Lan-zhen, Chen Shan-chun. 2015. Genetic background analysis of several guizhou local citrus varieties based on SSR markers. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 37 (11): 30 - 35. (in Chinese)
雷天刚, 邹修平, 何永睿, 姚利晓, 彭爱红, 李 强, 许兰珍, 陈善春. 2015. 贵州部分柑橘地方品种遗传背景的 SSR 分析. *西南大学学报 (自然科学版)*, 37 (11): 30 - 35.
- Liang S J, Wang H Y, Yang M, Wu H. 2009. Sequential actions of pectinases and cellulases during secretory cavity formation in *Citrus* fruits. *Trees*, 23 (1): 19 - 27.
- Lionetti V, Fabri E, Caroli M D, Hansen A R, Willats W G T, Piro G, Bellincampi D. 2017. Three pectin methyl esterase inhibitors protect cell wall integrity for immunity to *Botrytis*. *Plant Physiology*, 173 (3): 1844 - 1863.
- Liu J L, Park C H, He F, Nagano M, Wang M, Bellizzi M, Zhang K, Zeng X S, Liu W D, Ning Y S, Kawano Y, Wang G L. 2015. The RhoGAP SPIN6 associates with SPL11 and OsRac1 and negatively regulates programmed cell death and innate immunity in rice. *PLoS Pathogens*, 11 (2): e1004629.
- Liu P, Liang S, Yao N, Wu H. 2012. Programmed cell death of secretory cavity cells in fruits of *Citrus grandis* cv. Tomentosa is associated with activation of caspase 3-like protease. *Trees*, 26 (6): 1821 - 1835.
- Luro F, Venturini N, Costantino G, Paolini J, Ollitrault P, Costa J. 2012. Genetic and chemical diversity of citron (*Citrus medica* L.) based on nuclear and cytoplasmic markers and leaf essential oil composition. *Phytochemistry*, 77: 186 - 196.
- Marshall S D, Putterill J J, Plummer K M, Newcomb R D. 2003. The carboxylesterase gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Evolution*, 57 (5): 487 - 500.
- Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88 (21): 9828 - 9832.
- Mindrebo J T, Nartey C M, Seto Y, Burkart M D, Noel J P. 2016. Unveiling the functional diversity of the alpha/beta hydrolase superfamily in the plant kingdom. *Current Opinion in Structural Biology*, 41: 233 - 246.

- Morlais I, Severson D W. 2001. Identification of a polymorphic mucin-like gene expressed in the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*, using an integrated bulked segregant and differential display analysis. *Genetics*, 158 (3): 1125 - 1136.
- Orth T, Reumann S, Zhang X, Fan J, Wenzel D, Quan S, Hu J. 2007. The PEROXIN11 protein family controls peroxisome proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 19 (1): 333 - 350.
- Pan Y J, Liu L, Lin Y C, Zu Y G, Li L P, Tang Z H. 2016. Ethylene antagonizes salt-induced growth retardation and cell death process via transcriptional controlling of ethylene-, BAG- and senescence-associated genes in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 696.
- Rafei M., Rajaei H. 2007. Structural and developmental studies on oil producing reproductive organs in lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Journal of Biological Sciences*, 7 (6): 848 - 853.
- Shahidi F, Zhong Y. 2005. Citrus oils and essences//Shadihi F. Bailey's industrial oil and fat products. USA: Wiley-Interscience.
- Thomson W W, Plattaloia K A, Endress A G. 1976. Ultrastructure of oil gland development in leaf of *Citrus sinensis* L. *Botanical Gazette*, 137 (4): 330 - 340.
- Tranchida P Q, Bonaccorsi I, Dugo P, Mondello L, Dugo G. 2012. Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27 (2): 98 - 123.
- van der Lee T, Robold A, Testa A, van't Klooster J W, Govers F. 2001. Mapping of avirulence genes in *Phytophthora infestans* with amplified fragment length polymorphism markers selected by bulked segregant analysis. *Genetics*, 157 (3): 949 - 956.
- Verica J A, He Z H. 2002. The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family. *Plant Physiology*, 129 (2): 455 - 459.
- Voo S S, Grimes H D, Lange B M. 2012. Assessing the biosynthetic capabilities of secretory glands in *Citrus* peel. *Plant Physiology*, 159 (1): 81 - 94.
- Wang Jiong. 2017. Citrus linkage map construction based on COS marker and photosynthetic characteristics research of the mapping population [M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 王 炯. 2017. 基于 COS Marker 构建柑橘连锁图谱及作图群体的光合特性研究[硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- Wang Jiong, Gong Gui-zhi, Peng Zhu-chun, Li Yi-bing, Wang Yan-jie, Hong Qi-bin. 2017. Genetic and phylogenetic relationships among *Citrus* and its close and distant relatives based on COS Marker. *Scientia Agricultura Sinica*, 50 (2): 320 - 331. (in Chinese)
- 王 炯, 龚桂芝, 彭祝春, 李一兵, 王艳杰, 洪棋斌. 2017. 基于 COS Marker 分析柑橘属及其近缘、远缘属植物的遗传与进化. *中国农业科学*, 50 (2): 320 - 331.
- Wang X, Xu Y, Zhang S, Cao L, Huang Y, Cheng J, Wu G, Tian S, Chen C, Liu Y. 2017. Genomic analyses of primitive, wild and cultivated citrus provide insights into asexual reproduction. *Nature Genetics*, 49 (5): 765 - 772.
- Xia Y, Yin S J, Zhang K L, Shi X T, Lian C L, Zhang H S, Hu Z B, Shen Z G. 2018. OsWAK11, a rice wall-associated kinase, regulates Cu detoxification by alteration the immobilization of Cu in cell walls. *Environmental and Experimental Botany*, 150: 99 - 105.
- Xue H B, Shi T, Wang F F, Zhou H K, Yang J, Wang L, Wang S, Su Y L, Zhang Z, Qiao Y S, Li X G. 2017. Interval mapping for red/green skin color in Asian pears using a modified QTL-seq method. *Horticulture Research*, doi: 10.1038/hortres.2017.53.
- Yang Ke. 1985. Chang'an kumquat new strain - Huapi kumquat. *Zhejiang Citrus*, (2): 38 - 39. (in Chinese)
- 杨 科. 1985. 长安金柑新品系——滑皮金柑. *浙江柑橘*, (2): 38 - 39.
- Ye Yin-min. 1983. Germplasm resources of Chinese kumquat. *Crop Germplasm*, (4): 2 - 5. (in Chinese)
- 叶荫民. 1983. 中国金柑种质资源. *作物品种资源*, (4): 2 - 5.
- Yu Hui-wen. 2018. Investigation on the genetic diversity and leaf slow-greening mutation of pummelo [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 余惠文. 2018. 柚遗传多样性及叶片渐绿性状突变研究[博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Zhang Lian-feng, He Jian, Feng Yan, Liu Li, Guo Qi-gao, Liang Guo-lu. 2006. Phylogenetic relationships among *Fortunella* and its relatives as revealed by SSR markers. *Journal of Fruit Science*, 23 (3): 335 - 338. (in Chinese)
- 张连峰, 何 建, 冯 焱, 刘 利, 郭启高, 梁国鲁. 2006. 金柑属及其近缘属植物亲缘关系的 SSR 分析. *果树学报*, 23 (3): 335 - 338.
- Zheng P, Bai M, Chen Y, Liu P W, Gao L, Liang S J, Wu H. 2014. Programmed cell death of secretory cavity cells of citrus fruits is associated with Ca²⁺ accumulation in the nucleus. *Trees*, 28 (4): 1137 - 1144.