

基于重测序的杨梅种质资源 InDel 分布及育种标记 筛选

焦云^{1,2}, 高中山³, 汪国云⁴, 陈方永⁵, 姚小映⁶, 周超超⁵

(¹宁波市特色园艺作物品质调控与抗性育种重点实验室, 浙江宁波 315040; ²宁波市农业科学研究院林业研究所, 浙江宁波 315040; ³浙江大学果树科学研究所, 杭州 310058; ⁴余姚市农业技术推广服务总站, 浙江余姚 315400; ⁵浙江省柑桔研究所, 黄岩 318026; ⁶宁波市江西南珍水果专业合作社, 浙江宁波 315037)

摘要: InDel 标记已广泛用于果树分子标记辅助育种等研究领域, 然而针对我国传统特色果树——杨梅中的相关研究报道甚少。本研究通过 103 份杨梅核心种质全基因组重测序及生物信息学分析, 共获得了大小分布在 1~50 bp 范围内的 25831 个 InDels。不同染色体上的 InDel 变异频率范围为 8903~11297bp; 其中, CM025856.1 染色体上发生 InDel 变异频率最高。通过注释分析发现有 1312 个 InDels 分布在基因外显子区域, 另有 21055 和 6659 个 InDels 分别分布与基因间区和内含子区域。经 GO 注释, 上述 InDels 分子功能主要包括结合 (binding) 和催化活性 (catalytic activity); 生物过程主要涉及细胞过程 (cellular process) 和代谢过程 (metabolic process)。经 KEGG 通路分析发现, InDels 所在的基因区域的功能主要与次生代谢、碳代谢和核质运输等。通过全基因组关联分析结果获得 20 个杨梅果实成熟期性状显著性关联的 InDels, 其功能注释主要涉及线粒体、质体结构基因, 三磷酸核苷水解酶和细胞分裂素信号蛋白等。进一步验证分析从中筛选出 InDel EP-18 标记的杨梅果实成熟期性状鉴定准确率较高, 达 89.25%; 通过基因预测结果发现该位点注释为早期结瘤素家族 (Early nodulin) 基因。总之, 本研究筛选获得的 InDel EP-18 标记将为杨梅分子辅助育种提供重要的理论依据。

关键词: 杨梅; InDel; 重测序; 关联分析; 成熟期

Insertion and deletion (InDel) distribution and selection of breeding markers of Chinese bayberry germplasm resources based on resequencing

JIAO Yun^{1,2}, GAO Zhongshan³, WANG Guoyun⁴, CHEN Fangyong⁵, YAO Xiaoying⁶, ZHOU Chaochao⁵

(¹Ningbo Key Laboratory of Characteristic Horticultural Crops in Quality Adjustment and Resistance Breeding, Ningbo 315040, Zhejiang;

²Institute of Forestry, Ningbo Academy of Agricultural Science, Ningbo 315040, Zhejiang; ³Institute of Fruit Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058; ⁴

Yuyao Characteristic Fruit Research Institute, Yuyao 315400, Zhejiang; ⁵Zhejiang Citrus Research Institute, Huangyan 318026; ⁶Ningbo Jiangbei Nanzhen

Fruit Professional Cooperative, Ningbo 315037, Zhejiang)

Abstract: The InDel markers have been widely used in the research fields of molecular marker-assisted breeding of fruit trees. However, there are few reports on the related studies of Chinese traditional characteristic fruit trees “Chinese bayberry”. In this study, a total of 25831 InDels with a size distribution ranging from 1 to 50 bp were obtained through whole genome resequencing and bioinformatics analysis of 103 Chinese bayberry core germplasm. The frequency of InDel variation on different chromosomes ranged from 8903 to 11297 bp. Among them, the frequency of InDel mutation was the highest on chromosome CM025856.1. Annotation analysis showed that 1312 InDels were distributed in the gene exon region, and another 21055 and 6659 InDels were distributed in the

收稿日期: 2024-06-25

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为果树分子遗传育种与栽培技术, E-mail: jydyx@163.com

基金项目: 宁波市现代种业专项 (2021Z008); 宁波市特色园艺作物品质调控与抗性育种重点实验室开放课题基金 (NBYYL2023002)

Foundation projects: The Modern Seed Industry Special Project in Ningbo (2021Z008); The Open Project of Ningbo Key Laboratory of Characteristic Horticultural Crops in Quality Adjustment and Resistance Breeding (NBYYL2023002).

intergenic region and intron region, respectively. Through GO annotation, the functions of the above InDels molecules mainly include binding and catalytic activity. Biological processes mainly involve cellular processes and metabolic processes. KEGG pathway analysis showed that the function of InDels gene region mainly include secondary metabolism, carbon metabolism and nucleocytoplasmic transport. The results of genome-wide association analysis were used to obtain 20 InDels that were significantly associated with mature-stage traits of Chinese bayberry fruits. Their functional annotations mainly involved mitochondria, plastid structural genes, riboside triphosphate hydrolase and cytokinin signaling proteins. Further verification and analysis screened out the InDel EP-18 labeled Chinese bayberry fruit maturity traits identification accuracy was higher, up to 89.25%; Through gene prediction results, it was found that this locus annotation was an Early nodulin family gene. In conclusion, InDel EP-18 markers obtained in this study will provide an important theoretical basis for molecular assisted breeding of Chinese bayberry.

Key words: Chinese bayberry; InDel; resequencing; correlation analysis; mature stage

杨梅(*Morella rubra*, 原名*Myrica rubra* Sieb. and Zucc.) 为杨梅科杨梅属常绿乔木, 果实结构独特, 富含花色苷, 是我国特产果树^[1-3], 其中浙江省栽培面积及产量均位居国内第一省份。当前杨梅主栽品种均为中晚熟品种, 早熟和极晚熟品种匮乏, 其成熟期集中于梅雨季节, 造成市场饱和及商品果率低的产业瓶颈。利用分子标记辅助筛选育种手段加快选育早熟和极晚熟杨梅优良品种, 对提高当前杨梅生产经济效益具有极其重要的指导意义。InDel (Insertion/Deletion) 标记是根据不同个体基因组间同源序列发生的核苷酸片段插入或缺失开发而成, 具有基因组内分布广、密度高、变异稳定、可重复性好及便于分型检测等优点, 广泛应用于种质资源分析与分子辅助遗传育种、群体遗传分析等研究领域^[4-8]。杨梅遗传基础研究相对薄弱, 项目组前期研究主要集中于SSR分子标记开发及评价杨梅种质资源的遗传背景及群体结构组成^[9-12], 首次阐明了杨梅雌雄决定的遗传模式为雌性杂合型(ZW), 并开发了高效的性别连锁分子标记用于育种筛选^[2,13]。然而, 杨梅果实重要经济性状高效遗传分子标记相关的报道较少。随着测序技术的发展以及杨梅参考基因组的公布, 其InDel标记开发的成本和难度也随之降低。张淑文等^[14]以10份杨梅种质资源为试验材料进行了果实性状统计及关联分析, 鉴定获得24个InDel标记关联到22个性状和77个位点, 主要为单果重、果形、可食率和硬度等性状指标, 但是尚未涉及成熟期数量性状。近年来, 课题组前期研究结果已公布了杨梅第二代基因组^[2], 这为后续挖掘杨梅基因组InDel标记以及基因资源挖掘提供了重要参考。在此, 我们选用103份杨梅核心种质材料进行全基因组重测序, 统计分析其InDel的分布及相关功能注释; 另外, 将杨梅果实成熟期性状与重测序产生的InDel位点进行关联分析, 筛选出与成熟期性状显著关联的InDel标记, 并利用杨梅群体对其进行验证分析, 以期后续杨梅早熟品种的选育及相关分子育种研究提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2021年，采集103份杨梅核心种质开展基因组重测序（表1）。每份材料随机选取适量嫩叶，使用柱式植物基因组DNA抽提试剂盒（EZ-10 Spin Column Plant Genomic DNA Purification Kit，上海生工生物工程股份有限公司）提取杨梅叶片基因组DNA，具体操作步骤参照其说明书。利用凝胶成像系统Bio Doc Analyze (BDA) Digita（德国耶拿）和Nanodrop 2000（Thermo Scientific）分光光度计检测DNA的完整性和纯度，并确保每份样品DNA终浓度高于50 ng/μL，总量大于2 μg，置于-80 °C保存备用。

1.2 全基因组重测序

103份杨梅核心种质DNA交由上海生工生物工程股份有限公司完成建库及重测序：将2 ug DNA样品用Covaris S220随机打断成长度为400 bp的片段^[15]，使用TruSeq Library Construction Kit并参照其说明书进行建库，DNA片段经末端修复、加polyA尾以及测序接头、纯化、PCR扩增等步骤完成测序文库制备^[16]。随后在Novaseq 6000平台上进行PE150双末端测序，每个样品测序深度大于25×，原始测序数据过滤利用Q30标准对序列质量进行评估及过滤获得Clean Reads。

1.3 InDel位点挖掘与统计

基于杨梅参考基因组序列Mr_u_ZJU_2(Bio Project: PRJNA398601)，使用BWA^[17]对过滤后的Clean Reads数据进行比对。通过SAMTOOLS 软件^[18]去重复；采用GATK3.8 软件的UnifiedGenotyper 模块进行Indel的检测，使用VariantFiltration 进行过滤接、局部比对和碱基质量值校正等处理，获得可靠的InDel位点^[19]。利用Snpeff 4.3软件统计分析基因组中InDel位点数量、变异频率、分布位置等^[20]。

1.4 InDel 注释及功能分析

参照拟南芥基因组注释信息(TAIR10, <http://www.arabidopsis.org>)，并利用CLC Genomics Workbench 12.0软件中的BLAST组件建立杨梅全基因组的GO注释文件（E值为1e-5）^[21]。通过已知Indel位点的基因组起始位置信息提取相应的基因编号，并利用OmicShare在线分析云平台(<https://www.omicshare.com/tools/>)进行GO和KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)分析。

1.5 成熟期性状关联位点的获得与筛选

首先使用CLC Genomics Workbench 12.0软件过滤低频率InDel变异位点，将群体样本中InDel变异频率阈值设置为5 %（即剔除群体中样本数量低于5 %的InDel位点）。其次，依据杨梅测试指南^[22]进行果实成熟期性状评价与记录，从中选择代表性品种并划分为两个差异组，即早熟和中晚熟组（对照），每组含3份样品的重测序结果。基于上述软件Variants Comparison模块并经过费希尔精确检验（ $p \leq 0.05$ ）筛查两组群体中显著关联的InDel位点。为便于后续分子辅助育种标记开发，在上述结果中首先剔除单个碱基等简单重复序列构成的InDel位点，然后筛选出6~50 bp长度范围内的纯合型InDel位点，并优先考虑基因组上序列长度较长且连续性位置的InDel位点用于后续引物设计。

1.6 引物设计、分型检测及验证

基于上述InDel位点,参照扩增阻滞突变系统PCR (ARMS-PCR, Amplification Refractory Mutation System PCR的引物设计原理^[23],在反向引物的3'端引入一个错配碱基后进行特异性引物设计,委托生工生物工程上海股份有限公司合成。PCR反应体系如下:20 ng/ μ L的样品基因组DNA 2.0 μ L, 2 \times SG Fast qPCR Master Mix 5 μ L, 10 μ M的正向引物0.5 μ L, 10 μ M的反向引物0.5 μ L, ddH₂O补足至10 μ L即可;PCR扩增为两步法程序,即95 $^{\circ}$ C 3 min, 然后95 $^{\circ}$ C 3 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s进行30个循环。采用ABI Q6 Flex实时荧光定量PCR系统平台 Genotyping功能模块自动分析,加入已知为“早熟”的杨梅种质样本作为内参,分型结果与结果期实际成熟期表型进行核对,以确定分子标记的检测准确率。

2 结果与分析

2.1 杨梅基因组重测序与Indel分布

本研究共采集了103份杨梅核心种质嫩叶(表1),经过全基因组测序总共产生了约751G测序原始数据。经过质控及Q30标准过滤后的Clean reads 占93.07%。GC 含量平均值为40.22%。经鉴定后获得所有基因组InDels位点信息,共计30244个,包括17006个插入变异和13238个缺失变异;总体上InDels出现频率为10234 bp;筛选出长度为1~50 bp的InDels位点共计25831个,以小片段(6-10 bp)分布为主,并且插入变异位点数量均大于缺失变异位点数量(图1)。随着InDel 碱基数增加,Indel 数量呈现出明显减少趋势。其次,在不同染色体上的InDel分布比较均匀,其数量在3078~3723个之间,不同染色体的InDel变异频率范围为8903~11297 bp;其中,CM025856.1染色体上发生InDel变异频率最高,即8903 bp会出现一个InDel变异体(图2)。

表 1 本研究中 103 份杨梅种质资源果实成熟期性状

Table 1 The mature stage traits of 103 Chinese bayberry germplasm resources in this study

名称 Name	成熟期 Mature stage	来源 Source	名称 Name	成熟期 Mature stage	来源 Source
台州杨梅 2 号 Taizhou NO.2	晚	浙江台州	温岭本梅 Wenlingbenmei	中	浙江温岭
NKY030 NKY030	中	宁波	Y2012-82 Y2012-82	中	宁波
纽叶梅 Niuyemei	中	湖南	梅湖早 Meihuzao	早	宁波
荸荠变 1 号 Biqibian 1	早	宁波	白杨梅(大果) Baiyangmei (Big)	中	浙江绍兴
YY12 YY12	晚	江苏	特早 2 号 Tezao No.2	早	云南
冬瓜梅 Dongguamei	中	湖南	NKY009 NKY009	中	宁波
甬早梅 2 号 Yongzao No.2	早	宁波	大红袍 Dahongpao	中	浙江湖州
NKY083 NKY083	中	宁波	春江杨梅 1 号 Chunjiangyangmei No.1	中	湖南
梅早变 1 号 Meizaobian No.1	中	宁波	白杨梅 6 号 Baiyangmei No.6	中	浙江绍兴
NKY010 NKY010	中	宁波	荸荠变 5 号 Biqibian No.5	中	宁波
大黑炭 Daheitan	中	浙江温州	陈早变 2 号 Chenzaobian No.2	早	云南
软丝 Ruansi	早	福建	白杨梅 7 号 Baiyangmei No.7	中	浙江绍兴
广东大梅 Guangdongamei	中	广东	陈公早梅 Chengongzaomei	早	宁波
三夹岙乌梅 Sanjiaowumei	中	宁波	HCl HCl	中	福建

早梅 CX05 Zaomei CX05	早	宁波	春江杨梅 2 号 Chunjiangyangmei No.2	中	湖南
梅早变 2 号 Meizaobian No.2	早	宁波	早小种 Zaoxiaozhong	早	宁波
NKY004 NKY004	中	宁波	月粒盘 Yuelipan	中	宁波
乌酥核 Wusuhe	中	广东	乌西梅 Wuximei	中	广东
广东早梅 Guangdongzaomei	早	广东	丁岙 Dingao	早	浙江温州
荸荠变 2 号 Biqibian No.2	中	宁波	水晶 Shuijing	中	浙江绍兴
早大种 Zadazhong	早	宁波	特早 1 号 Tezao No.1	早	福建
大果晚 Daguowan	晚	宁波	白东魁 Baidongkui	中	福建
早荠蜜梅 Zaoqimimei	早	宁波	余姚早 Yuyaozao	早	宁波
白杨梅 (小果) Baiyangmei (small)	中	浙江绍兴	晚荠蜜梅 Wanqimimei	中	宁波
陈早变 1 号 Chenzaobian No.1	早	宁波	大果红 Daguohong	中	宁波
NKY094 NKY094	中	宁波	花岙白梅 Huaaobaimei	中	贵州
隔山 Geshan	中	福建	早水晶 Zaoshuijing	早	浙江绍兴
广东大黑-Guangdongdahei	晚	广东	东魁 Dongkui	晚	浙江台州
风欢 Fenghuan	晚	宁波	普早 2 Puzao No.2	早	福建
白杨梅 2 号 Baiyangmei NO.2	中	宁波	HC3 HC3	中	福建
安海片早生 Anhaipianzaosheng	早	福建	大叶细蒂 Dayexidi	中	江苏
Y2012-47 Y2012-47	中	宁波	大叶梅 Dayemei	中	湖南
YY03 YY03	晚	宁波	YY42 YY42	中	宁波
早佳 Zaojia	早	浙江兰溪	大叶光 Dayeguang	早	江苏
松浆梅 Songjiangmei	中	宁波	王子安海 Wangzianhai	早	福建
YY20 YY20	中	宁波	瑞旭 Ruixu	晚	宁波
木洞 Mudong	中	湖南	普早 1 号 Puzao No.1	早	云南
早梅-16 Zaomei-16	早	浙江温岭	HC2 HC2	中	福建
蜡杨梅 Morella cerifera	-	美国	余姚早大 Yuyaozaoda	早	宁波
夏至红 Xiazhihong	中	宁波	太波梅 Taibomei	中	湖南
黑晶 Heijing	中	浙江温岭	温岭早梅 Wenlingzaomei	早	浙江温岭
台州杨梅 1 号 Taizhou No.1	晚	浙江台州	银红梅 Yinhongmei	中	湖南
荸荠变 3 号 Biqibian No.3	中	宁波	黑大 Heida	中	宁波
荸荠变 4 号 Biqibian No.4	中	宁波	迟色 Chise	中	浙江杭州
红尖花 Hongjianhua	中	宁波	KYZ1 KYZ1	早	宁波
Y2012-52 Y2012-52	中	宁波	小叶细蒂 Xiaoyexidi	中	江苏
HC4 HC4	中	福建	东魁变 1 号 Dongkuibian No.1	晚	浙江台州
硬丝 2 号 Yingsi No.2	早	福建	东魁变 2 号 Dongkuibian No.1	晚	浙江台州
晚稻杨梅 Wandaoyangmei	晚	浙江舟山	台州本梅 Taizhoubenmei	中	浙江台州
NKY011 NKY011	中	宁波	白杨梅 Baiyangmei	中	浙江绍兴
YY37 YY37	晚	宁波	YYZ YYZ	早	宁波
Y2012-83 Y2012-83	中	宁波			

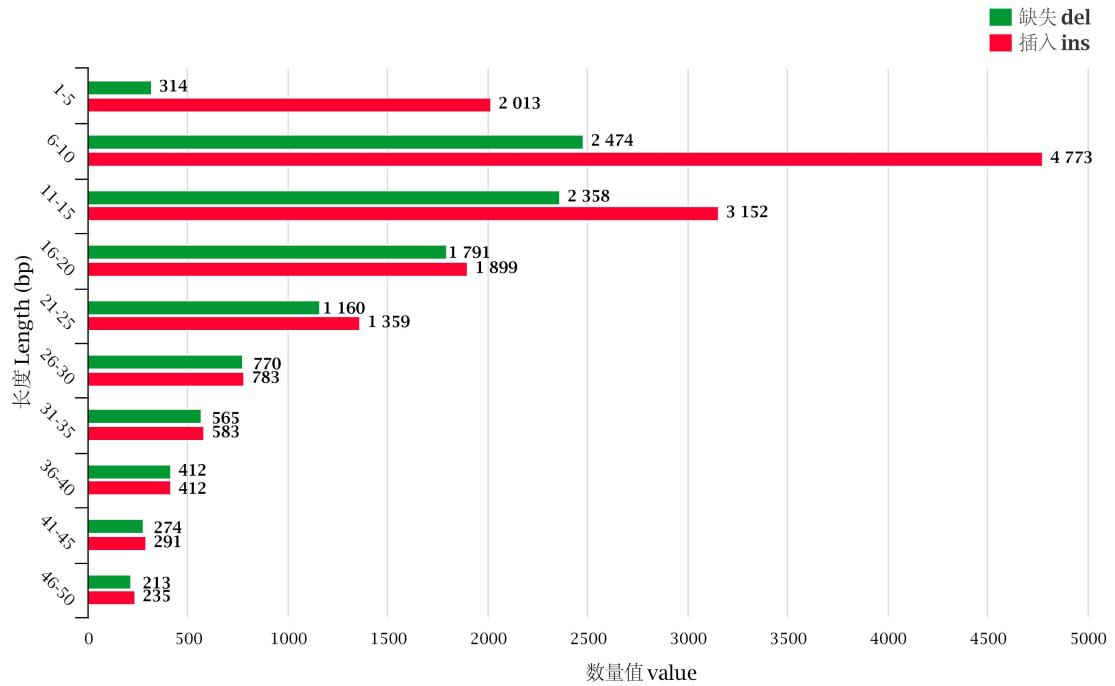


图1 不同长度InDel在杨梅基因组上的分布情况

Fig. 1 The distribution of different size InDel in Chinese bayberry genome

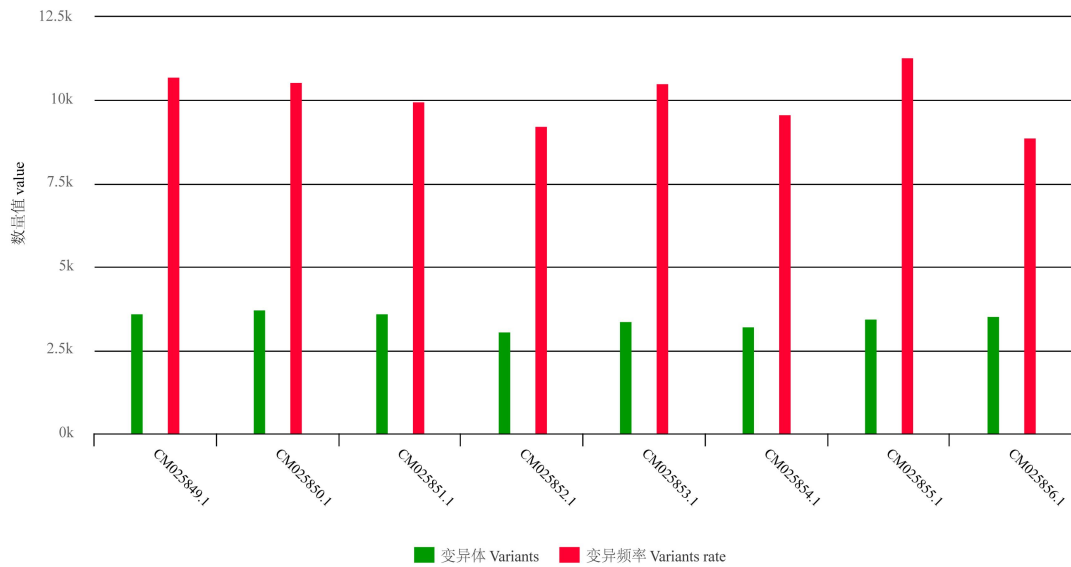


图2 杨梅染色体上分布的InDels数目与变异频率

Fig. 2 The number of InDels and Variants rate on each chromosome in Chinese bayberry

2.2 GO 注释及KEGG 通路分析

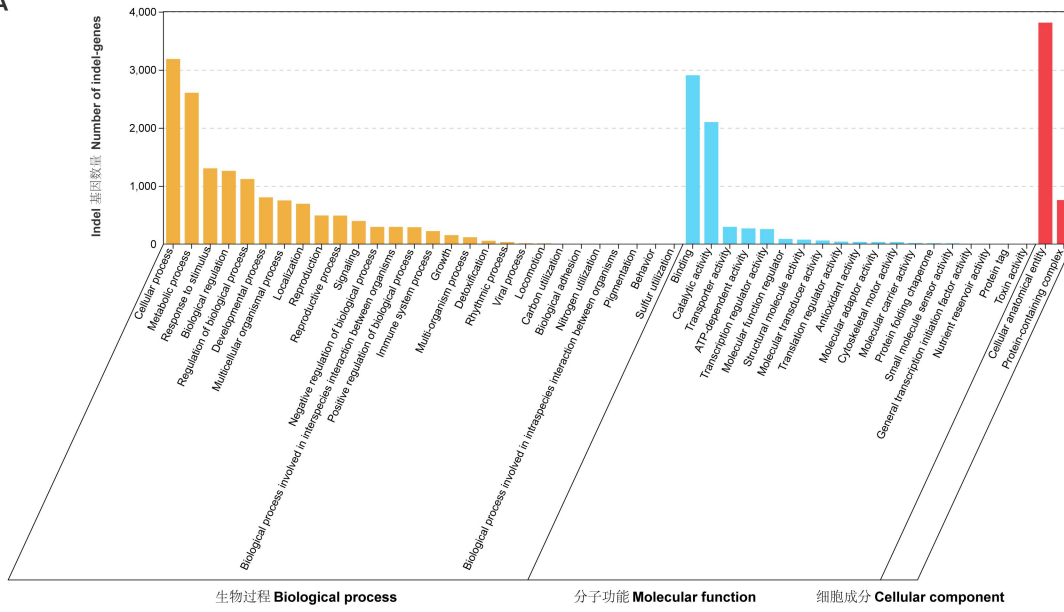
基于杨梅全基因组序列注释信息，通过相关软件获得所有InDels的位置信息。其中，分布在外显子区域的InDels有1312个，远低于内含子区域分布数量（6659个）。5'和3'端非翻译区域（UTR）内有分别有724个和436个InDels。基因上游或/和下游1kb 范围内分别有2507个和2173个InDels。其次，仅有152个InDels 存在于剪切位点区域（表2）。

表2 杨梅基因组InDel区域的功能分类概况**Table 2** The functional classification of InDels in Chinese bayberry

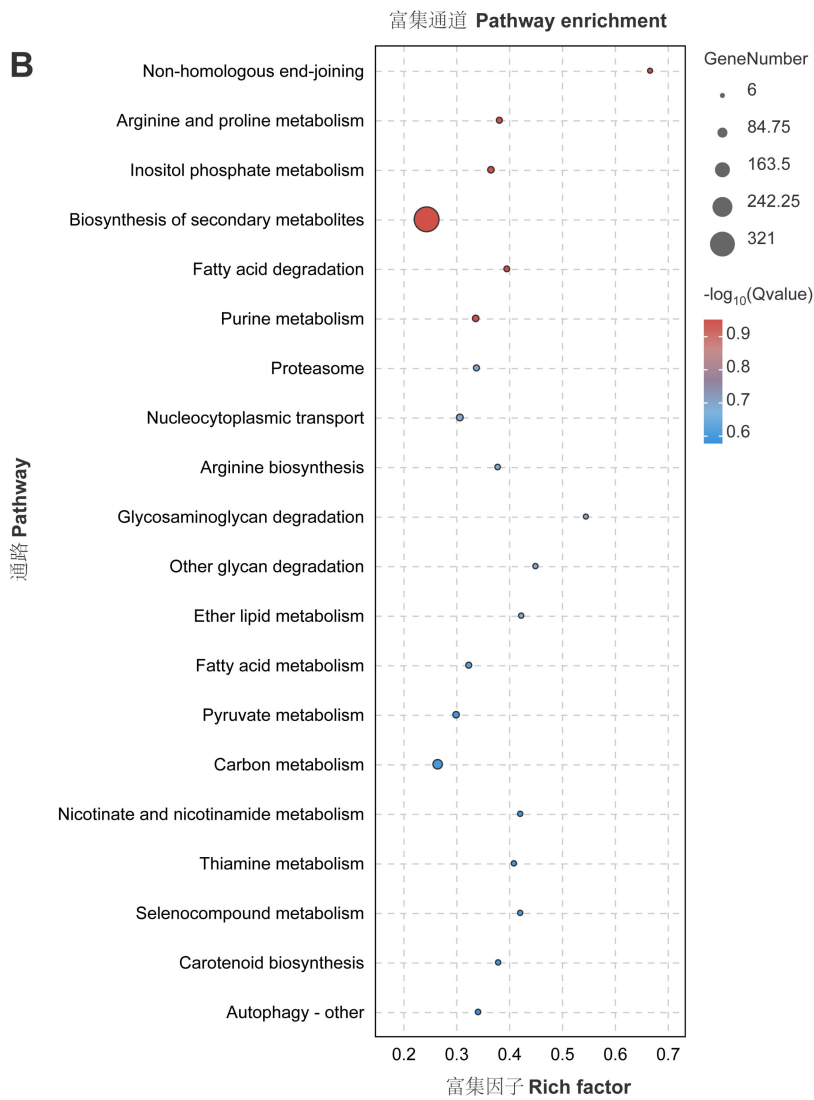
类型 Type	总数 Count	比例 Percent
内含子区域 Intron	6659	18.96%
外显子区域 Ex on	1312	3.74%
基因间区 Intergenic	21055	59.95%
剪接位点受体 Splice_site_acceptor	27	0.08%
剪接位点供体 Splice_site_donor	27	0.08%
剪接位点区域 Splice_site_region	152	0.43%
基因上游区域 Upstream	2507	7.14%
基因下游区域 Downstream	2173	6.19%
3'UTR 区域 Utr_3_prime	436	1.24%
5'UTR 区域 Utr_5_prime	724	2.06%

此外，对InDels所在DNA区域序列片段进行GO功能注释分析，结果表明生物过程（Biological process）中占比例最多的是细胞过程（Cellular process），包括3186个含InDels的基因区域，代谢过程（Metabolic process）次之（图3A），包括2604个InDels区域。在分子功能（Molecular Function）类目中，蛋白结合（Binding）最高，包括2906个InDels区域。催化活性（Catalytic activity）次之，包括2100个InDels的基因区域。值得注意的是，在细胞组分（Cellular component）中仅包含两类功能，即细胞结构组件（Cellular anatomical entity）及含蛋白质的复合物（Protein-containing complex），分别含有3812个和756个InDels的基因区域。再者，通过对InDels序列进行KEGG注释分析，结果显著富集到24个基因通路信息（ $P < 0.05$ ）。其中，TOP20通路中大部分与各类代谢通路相关（图3B），最多的是次生代谢物的生物合成（Biosynthesis of secondary metabolites），其次是碳代谢（Carbon metabolism）和核质运输（Nucleocytoplasmic transport）。

A



B



A为InDels的GO注释结果；B为InDels的KEGG分析；圆点所在的位置和形状大小分别代表着富集的条目和差异基因的数量
A, GO annotation of InDels; B, KEGG pathway analysis of InDels; The location and size of the dots represent the number of enriched entries and the number of different genes, respectively

图3 杨梅基因组InDels位点基因功能注释分析

Fig. 3 Functional annotation analysis of InDels locus gene in Chinese bayberry genome

2.3 InDel与成熟期性状的关联分析

通过成熟期性状极端差异群体的全基因组关联分析共计发现118个显著性InDel位点，优选其中非重复序列结构组成的位点进行引物设计，获得InDel EP-1~InDel EP-20共计20个InDel标记组合，其PCR扩增长度范围为84~120 bp（表3），主要来源为CM025849.1、CM025855.1和CM025856.1染色体。其次，根据 InDel标记物理位置，预测到相关基因的功能信息：与线粒体、质体结构基因关联的InDel EP-1、InDel EP-19、InDel EP-20和InDel EP-13等；InDel EP-2关联的位点是三磷酸核苷水解酶(Nucleoside triphosphate hydrolase)结构基因；与InDel EP-18关联的基因位点是Early nodulin-93-like，是早期结瘤素家族(Early nodulin)基因；与InDel EP-14关联的基因位点是AT5G61680.1，然而其具体功能尚不清楚；与InDel EP-15关联的基因位点是ARR14-like，是细胞分裂素信号蛋白ARR (Arabidopsis response regulator)家族基因；与InDel EP-17关联的基因位点是Disease resistance protein RPV1，是欧洲葡萄抗霜霉病家族基因*Rpv* (Resistance to *Plasmopara viticola*)。

表3 杨梅果实成熟期性状显著性关联的InDels及注释信息

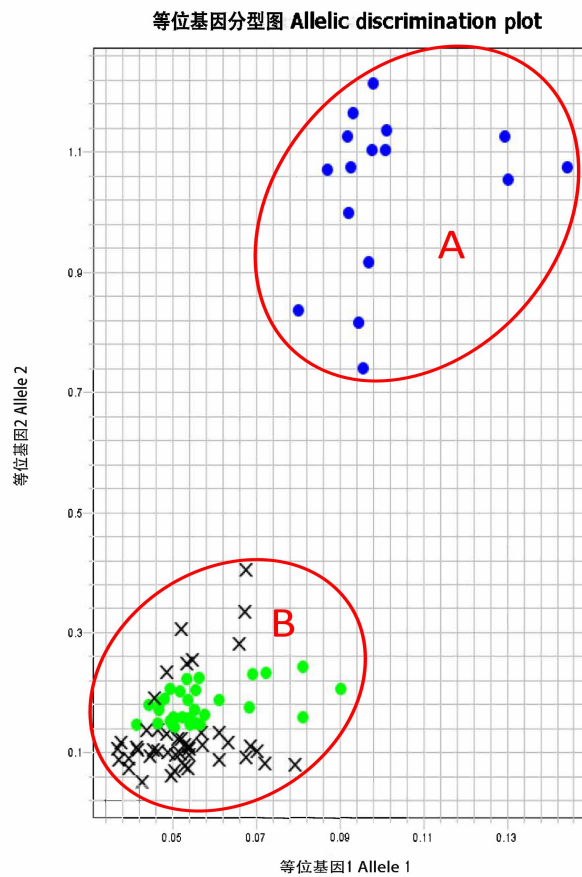
Table 3 The InDels and annotation information of the significant association of ripening traits in Chinese bayberry fruits

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	长度 Length	InDel 位置 Position	功能注释 Functional annotation
InDel EP-1	F:CGTACACGCAGTGCAGTTGTCAGTTATC R:GACTACCACGTATACGGGAGGAGTACCTGGTTT	104	CM025855.1:31401090	Organelle: mitochondrion
InDel EP-2	F:GAGCTTTTAGTCCACTGGCAGCGGCAAAC R:GAATTAGAACACCTTGCTCGCAAAGGTGAGG	108	CM025855.1:19247811	Nucleoside triphosphate hydrolase
InDel EP-3	F:GAGCTTTTAGTCCACTGGCAGCGGCAAAC R:GTCTGGACTTGCAAGGCTCGTCAAGTCTCTG	86	CM025855.1:30530049	Triosephosphate isomerase
InDel EP-4	F:GTAGCTTGACTCCTAAAGTGACACGGT R:GCGGATGATAGAGTGTCTAAGATATGTACTC	116	CM025855.1:34429328	Ring finger protein 170
InDel EP-5	F:TGGGACACATACTCATCTTTAACTCG R:CTATGGGGCAAGGGAGTTTTCAAAACT	81	CM025855.1:18454904	Nucleotidyltransferase
InDel EP-6	F:GACCGGAGGAGTTATAATCACTACCT R:GACATTGTGTGTTGATTTAGATGGAGCTTAAAC	120	CM025855.1:33525190	CAMS1 (Camelliol C synthase 1)
InDel EP-7	F:AAGATGTACTCGACATCTTACTGTGAAAT R:CGGCAGCCAGGTATACTCTCCAACAGGGA	100	CM025856.1:13735052	Arogenatedehydrogenase 2
InDel EP-8	F:GTGGTTCAGTGCCATGAACCTTGATATAAAATG R:CCACGTCATTGACACTGTCTGCGCTTGTGTTG	101	CM025856.1:27376500	Nucleolar factor 1
InDel EP-9	F:CGTGGTACAGGTATGGTGTGGGATCTCTCG R:GCCTCATTTCTCATTGCCGACGCACTTTTGAC	96	CM025856.1:8373043	SUMO-activating_enzyme_1B
InDel EP-10	F:AAAAAATTTACTACTTAACTTATGTC R:CGAATAGATTCATCTAGTTTTAAATCTCTG	107	CM025856.1:2670173	Degradation periplasmic_proteins_15
InDel EP-11	F:TCCACCAGTCGACTTCATCCCCTGCATG R:CGTGAAGTGGTGTAAATGGCGACCGATTCT	86	CM025856.1:20600810	Low PSII accumulation 2
InDel EP-12	F:TCTCATGATAAGTAGATCTCAITTTTTG R:CGAGCTCTTAGAGAACAGTGTGTGAACCAACA	92	CM025856.1:8045075	Glucosyltransferase-like

InDel	F:GGTCCCATTAATCTCCGAGGTGTCTC			
EP-13	R:CACACTGTCTCCAGAGAGAACCATTTCAT	95	CM025856.1:17276262	Plastid movement impaired 1-like
InDel	GTATTTGTTTCCAATGATCGAATGGTATGTATTG			
EP-14	GCGTTACTGAAACAATCGATCGTCTA	108	CM025856.1:14509789	AT5G61680.1, unknown
InDel	F:CGGTTTTAAGGTTTTGCAGATAGTAGGC			
EP-15	R:ATATTTATATAGGTGCCAAGCAAATAGATGTGA	108	CM025856.1:26896700	Response regulator ARR14-like
InDel	F:AGAATTATCAAGTCAATAATTGCGCGACT			
EP-16	R:CGAAATCTTAAATCCAAACTTACTCGTAGA	106	CM025852.1:3230972	WD repeat-containing protein 61
InDel	F:CCAAAAACCATTAGCTGGAATATACACTG			
EP-17	R:CTTAGGTGCACAAAGGACTAAGGGTAGC	113	CM025849.1:30724568	Disease resistance protein RPV1
InDel	F:GCCACCTACACCTACACCGTTAAGGGCAAAAACTA			
EP-18	R:GAGTCCAATATGAATGCAAGTTAACCAAG	84	CM025849.1:30722625	Early nodulin-93-like
InDel	F:TGAAGAATTTAAGTGGTTCAGTCAAG			
EP-19	R:TCTAAGGAATGTGGTTCCTATGTGATTTG	105	CM025849.1:30721660	Mitochondrial protein AtMg00810
InDel	F:GAGAAACAAAAGCTACGACACAACAGATTG			
EP-20	R:GCTGTTCTTGTGCTGCCAACCTACAAGTC	96	CM025849.1:30721838	Mitochondrial protein AtMg00810

2.5 成熟期性状InDel标记的分型结果验证

将表3中InDel标记合成相关引物后，随机选择93份杨梅种质的自然群体（表1）进行分型验证，以筛选可用于杨梅果实成熟期性状早期鉴定的育种标记。基于田间成熟期性状调查结果，仅发现InDel EP-18的杨梅果实成熟期性状鉴定准确率较高，达89.25 %（图4），可将杨梅试材清晰的划分为两个簇（A簇和B簇），分别代表早熟与中晚熟种质群体；然而，其余的InDel标记分型结果与果实成熟期没有发现明显的关联规律。因此，InDel EP-18标记可适于杨梅果实成熟期的快速鉴定。

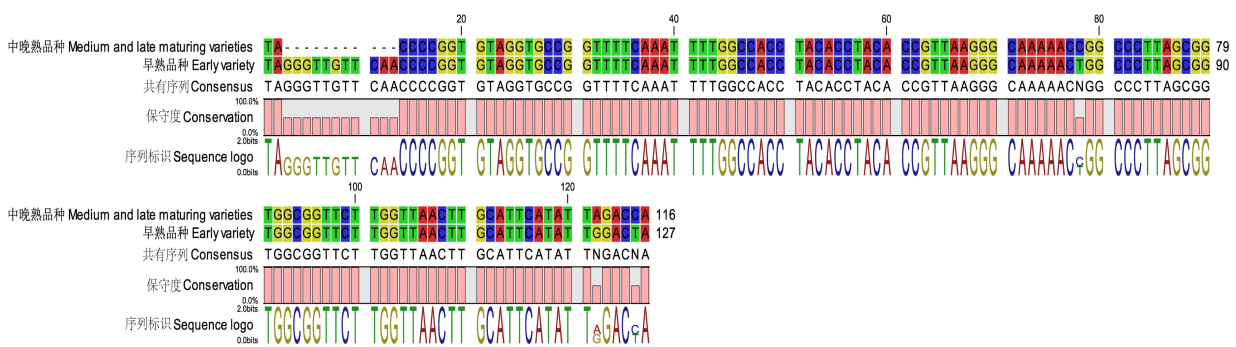


✕: 未检测到扩增产物; 不同的等位基因类别用不同颜色加以区分; A 簇为早熟杨梅种质群体 (蓝色)。B 簇为中晚熟杨梅种质群体 (绿色和黑色)。
 ✕: No amplification products were detected; Different allelic classes are distinguished by different colors; Cluster A was the early arbutus germplasm population (blue). Cluster B was the middle and late maturing Chinese bayberry germplasm population (green and black).

图4 基于实时荧光定量PCR扩增平台的InDel EP-18标记分型结果

Fig. 4 The results of InDel EP-18 labeling based on real-time fluorescence quantitative PCR amplification platform

另外, 对InDel EP-18位点部分DNA序列进行比对分析 (图5), 以确定不同成熟期品种基因型差异类型。结果表明, 与早熟品种相比, 中晚熟品种基因型则存在长度大小为11 bp的缺失位点; 同时, 中晚熟品种序列中第67 bp、111 bp和115 bp存在SNP位点, 对应的碱基为C、A和C, 早熟品种序列的上述位点对应的碱基替换为T、G和T, 且突变位点均在其编码序列区域, 并且均为非同义突变。根据基因注释, 该基因为*Early nodulin*家族基因, 参与植物根瘤的形成、开花、花粉管与柱头的识别及生殖发育等多种生物学过程^[24-25]。



早熟品种为‘早大种’重测序结果; 中晚熟品种为‘荸荠种’和‘瑞旭’重测序结果。不同的碱基以不同颜色标识; 保守度以柱状图展示, 越高意味着碱基越保守, 反之则越不保守

The precocious varieties were "Zaodazhong" resequencing results; The middle and late maturing varieties were 'Biqizhong' and 'Ruixu'. Different bases are identified by different colors; The degree of conservation is shown in a bar chart, with higher values indicating more conservative bases and less conservative bases

图5 不同成熟期杨梅种质InDelEP-18位点部分DNA序列比对

Fig. 5 Alignment of partial DNA sequences at InDel EP-18 sites on Chinese bayberry germplasm at different maturity stages

3 讨论

InDel标记在基因组内分布的丰富性仅次于SNP, 且远高于SSR; 基于PCR技术进行InDel标记分型评价, 其检测难度相较于SNP更为简单便捷, 具有准确性高、稳定性强等特点^[26-28]。本研究通过103份杨梅种质重测序数据与参考基因组比对及质控, 共计获得了30244个InDel位点。与其相比, 陈正杰等^[29]选取18份大豆种质资源进行全基因组重测序分析共获得201384个InDel位点, 远高于本研究中杨梅基因组的InDel位点; 同时, 高于橄榄果实转录组中的18548个InDel位点^[30]。由此可见, 不同植物中InDel的位点数量存在较大差异, 这可能是由物种遗传背景、采样群体大小以及InDel过滤阈值等原因所导致的。与前期相关研究报道类似, 杨梅InDel位点主要分布于基因间区及内含子区域, 仅有3.74%的InDel位于外显子区域低于茄子(4.1%)^[31]。同时, 桑葚转录组序列中Indel片段的长度以1~3 bp为主, 而长度超过10 bp的缺失突变数量远大于插入突变数量。与其不同的是, 本研究中杨梅Indel片段的长度主要为6~10 bp, 并且插入类型的Indel位点数量大

于缺失类型，此结果与花生类似^[4]。因此，不同的植物种类其InDel位点类型比例差异亦是明显的，究其原因目前还不清楚。

另外，InDels可能会导致蛋白质结构和功能的改变，从而影响生物体的性状^[32-33]。为明确InDels突变可能引起的基因功能变化，本研究将鉴定获得的InDels进行GO和KEGG功能注释分析。与相关研究有一定差异，杨梅基因组的InDels在分子功能（Molecular Function）中蛋白结合（binding）类别的InDels的数量最多，催化活性（Catalytic activity）次之（图3A），而花生简化基因组测序InDel位点GO注释分析结果恰与其相反^[4]。事实上，上述蛋白结合（binding）和催化活性（Catalytic activity）两类功能在植物生长发育、响应胁迫转录组测序分析结果中均有类似的体现，其所含的差异表达基因数量通常亦多于其他分类^[34-38]。这暗示着基因组中丰富的InDel位点可能是构成基因转录水平差异变化的重要来源，两者之间的调控关系错综复杂，尚需后续大量实践进行探索及验证。此外，KEGG注释分析结果TOP20通路中最多的是次生代谢物的生物合成（Biosynthesis of secondary metabolites），其次是碳代谢（Carbon metabolism）（图3B），这与花生中的InDel位点研究结果一致；类似的，吴磊等^[39]发现拟斯卑尔脱山羊草InDel位点也主要涉及到蛋白质结合、催化以及次生代谢等过程，这些InDels主要相关的基因功能是植物体内重要性状形成的基础。植物中次生代谢物通常具有特殊生物活性及功能，不仅能够帮助其适应特殊环境、抵御病虫害；而且对农业、医药和工业生产均具有极其重要的价值，为人类提供了丰富的药物，香料及工业原料^[40-43]。因此，解析植物InDel位点与次生代谢物的生物合成途径以及遗传机制对于改良重要经济性状和植物次生代谢物产业化应用至关重要。

一般认为果实成熟期属于复杂的数量性状，受到多个位点协同调控^[44]。本研究中杨梅果实成熟期性状与重测序获得的InDel位点进行关联分析获得的InDel EP-18的杨梅果实成熟期性状鉴定准确率为89.25%（图4），并未达到100%。由此认为杨梅果实成熟期亦是可能由多个基因控制，而非仅受单一基因位点制约。目前，果树领域关于果实成熟期的分子标记开发相关研究取得了一些进展。例如葡萄叶酸转运蛋白基因VvFBT编码区域鉴定出多个SNPs与早熟系谱群体具有极显著关联性（ $P < 0.0001$ ），其在葡萄浆果发育过程中特异性高表达，该基因为早熟葡萄品种的分子标记辅助育种提供了重要参考^[45]。再者，Branchereau等^[46]将甜樱桃早花期QTL定位于第4连锁群，并转化4个高度关联开花时间的KASP（竞争性等位基因特异性PCR，Kompetitive allele specific PCR）标记用于辅助筛选育种。然而，本研究结果中并未发现与上述基因相关的InDel位点。因此，果实成熟期的调控机理错综复杂，不同物种的成熟期基因组关联位点差异较大。本研究结果获得的早熟性状显著性关联位点InDel EP-18存在早期结瘤素基因*ENOD* (*Early nodulin*) 93，其可能在杨梅果实早熟性状调控过程中发挥重要作用。相关研究表明，拟南芥*ENOD MtN21*家族基因突变体在长日照条件下开花时间提早于野生型^[25]；同时，*ENOD*是一个多功能基因，参与根瘤的形成、开花、花粉管与柱头的识别及生殖发育等多种生物学过程^[24]。值得注意的是，杨梅（属于壳斗目）是极少数分布在热带，亚热带的放线菌结瘤果树之一^[47]，根部能与放线菌共生产生根瘤，对于氮素在果树生长发育过程中的作用不言而喻。

喻。然而，杨梅早熟性状关联位点扫描到的早期结瘤素基因ENOD93是否参与到杨梅果实成熟期调控途径还有待验证。

综上所述，当前基因组InDel相关研究重点主要集中在变异特征分析及种质资源的遗传多样性分子标记开发方面^[48-50]，而对其功能倾向性研究和验证分析还存在较大不足。本研究基于杨梅重测序数据鉴定全基因组的InDel位点特征及功能预测，力图探索其与重要经济性状之间的联系，为后续核心种质分子鉴定及重要性状的基因定位等工作奠定前期基础。因此，InDel EP-18所涉及的ENOD93基因具体功能验证将作为下一步研究重点，以确认其在杨梅功能基因中的重要作用，为杨梅种质资源研究及遗传改良提供重要参考。

参考文献

- [1] Chen K S, Xu C J, Zhang B, Ferguson I B. Red bayberry: botany and horticulture. *Horticultural Reviews*, 2004, 30(83): 114
- [2] Jia H M, Jia H J, Cai Q L, Wang Y, Zhao H B, Yang W F, Wang G Y, Li Y H, Zhan D L, Shen Y T, Niu Q F, Chang L, Qiu J, Zhao L, Xie H B, Fu W Y, Jin J, Li X W, Jiao Y, Zhou C C, Tu T, Chai C Y, Gao J L, Fan L J, van de Weg, Wang J Y, Gao Z S. The red bayberry genome and genetic basis of sex determination. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(2): 397-409
- [3] 焦云, 柴春燕, 马炜炜, 舒巧云. 不同质地杨梅果实肉柱细微构造与细胞壁组分及相关酶活性分析. *江西农业学报*, 2018, 30(5): 12-17
Jiao Y, Chai C Y, Ma W W, Shu Q Y. Study on microstructure, cell wall components and related enzymes activity in carnosous column of different Texture of Chinese bayberry fruits. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2018, 30(5): 12-17
- [4] 王娟, 刘宇, 李春娟, 闫彩霞, 赵小波, 单世华. 基于简化基因组的花生 InDel 标记开发和功能解析. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(1): 179-187
Wang J, Liu Y, Li C J, Yan C X, Zhao X B, Shan S H. Development and functional analysis of Peanut insertion and deletion (InDel) markers based on genotyping-by-sequencing (GBS). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(1): 179-187
- [5] 王珏, 王燕, 张静, 陈涛, 王磊, 陈清, 汤浩茹, 王小蓉. 中国樱桃 InDel 标记开发及其在蔷薇科果树中通用性评价. *园艺学报*, 2020, 47(1): 98-110
Wang J, Wang Y, Zhang J, Chen T, Wang L, Chen Q, Tang H R, Wang X R. Development of insertion-deletion (InDel) markers based on wholegenome sequencing data in Chinese cherry and their transferability in Rosaceae fruit trees, 2020, 47(1): 98-110
- [6] 韩健, 夏文文, 杨贵兵, 罗旭钊, 蒋松良, 李先信, 邓子牛, 马先鋒. 沙田柚×枳杂交群体创建与 InDel 标记鉴定. *果树学报*, 2023, 40(2): 223-229
Han J, Xia W W, Yang G B, Luo X Z, Jiang S L, Li X X, Deng Z N, Ma X F. Establishment of shatian pomelo×*P. trifoliata* hybrid population and InDel marker identification. *Journal of Fruit Science*, 2023, 40(2): 223-229
- [7] 王晖, 谢岩, 高玉军, 李季生, 王彬彬, 高妍夏. 桑葚转录组 SNP/Indel 位点的挖掘及功能注释. *石河子大学学报: 自然科学版*, 2020, 38(3): 325-330
Wang H, Xie Y, Gao Y J, Li J S, Wang B B, Gao Y X. Detection SNP /Indel and function annotation of mulberry fruit transcriptome. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2020, 38(3): 325-330
- [8] 宋谢天, 田啸宇, 王楠, 周银, 谢源源, 谢宗周, 柴利军, 叶俊丽, 邓秀新. 利用 InDel 标记筛选多胚山金柑珠心苗后代. *果树学报*, 2023, 40(7): 1312-1317
Song X T, Tian X Y, Wang N, Zhou Y, Xie Y Y, Xie Z Z, Chai L J, Ye J L, Deng X X. InDel marker-assisted selection of nucellar seedlings in polyembryonic *Fortunella hindsii*. *Journal of Fruit Science*, 2023, 40(7): 1312-1317
- [9] Jiao Y, Jia H M, Li X W, Chai M L, Jia H J, Chen Z, Wang G Y, Chai C Y, van de W E, Gao Z S. Development of simple sequence repeat

- (SSR) markers from a genome survey of Chinese bayberry (*Myrica rubra*). BMC Genomics, 2012, 13: 1-16
- [10] Jia H M, Shen Y T, Jiao Y, Wang G Y, Dong X, Jia H J, Du F, Liang S M; Zhou C C; Mao, W H; Gao Z S. Development of 107 SSR markers from whole genome shotgun sequences of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) and their application in seedling identification. Journal of Zhejiang University-Science B, 2014, 15(11): 997-1005
- [11] 焦云, 柴春燕, 舒巧云. 基于 SSR 分子标记的早熟杨梅优株遗传多样性分析. 中国南方果树, 2019, 48(4): 4
- Jiao Y, Chai C Y, Shu Q Y. Genetic diversity analysis of early-maturing bayberry superior strains based on SSR molecular markers. South China Fruits, 2019, 48(4): 4
- [12] 巨鹏举, 朱奕凡, 赵岚, 汪国云, 周超超, 颜丽菊, 柴春燕, 焦云, 陈金辉, 郭秀珠, 高中山. 杨梅品种特异性荧光 SSR 分子标记数据库构建. 农业生物技术学报, 2023, 31(10): 2209-2220
- Ju P J, Zhu Y F, Zhao L, Wang G Y, Zhou C, Yan L J, Chai C Y, Jiao Y, Chen J H, Guo X Z, Gao Z S. Construction of specific fluorescent-labeled SSR marker database of Chinese bayberry (*Morella rubra*) Varieties. Journal of Agricultural Biotechnology, 2023, 31(10): 2209~2220
- [13] Jia H M, Jiao Y, Wang G Y, Li Y H, Jia H J, Wu H X, Chai C Y, Dong X, Guo Y P, Zhang L P, Gao QK, Chen W, Song L J, van de Weg E and Gao Z S. Genetic diversity of male and female Chinese bayberry (*Myrica rubra*) populations and identification of sex-associated markers. BMC Genomics, 2015, 16: 394
- [14] 张淑文, 俞浙萍, 孙鹏, 武祥瑞, 梁森苗, 郑锡良, 戚行江. 基于重测序的杨梅 InDel 标记开发与果实性状关联分析. 分子植物育种, 2022, 20(6): 1890-1900
- Zhang S W, Yu Z P, Sun L, Wu X Q, Liang S M, Zheng X L, Qi X J. Development of InDel markers and association analysis of fruit traits in Chinese bayberry based on resequencing. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(6): 1890-1900
- [15] 张媛媛, 黄冬梅, 邓班, 李丹静, 张玉, 缪颖. 植物叶片染色质免疫共沉淀方法的优化. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2018, 47(3): 329-335
- Zhang Y Y, Huang D M, Deng B, Li D J, Zhang Y, Miao Y. Optimization of chromatin immunoprecipitation assay in plant leaves. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2018, 47(3): 329-335
- [16] 张格格, 柳海东, 杜德志. 甘蓝型油菜恢复系的群体结构解析及核心种质构建. 中国油料作物学报, 2023, 45(2): 231-239
- Zhang G G, Liu H D, Du D Z. Population structure analysis and core germplasm construction of *Brassica napus* restorer lines. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2023, 45(2): 231-239
- [17] Abuín J M, Pichel J C, Pena T F, Amigo J. BigBWA: approaching the Burrows–Wheeler aligner to Big Data technologies. Bioinformatics, 2015, 31(24): 4003-4005
- [18] 施肖堃, 蔡志欣, 郭仲杰, 卢园萍, 陈美元, 廖剑华. 18 个双孢蘑菇核心种质的重测序初步分析. 福建农业学报, 2019, 34(10): 1167-1172
- Shi X K, Cai Z X, Guo Z J, Lu Y P, Chen M Y, Liao J H. A Preliminary Report on Resequencing 18 Representative Strains of *Agaricus bisporus*. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2019, 34(10): 1167-1172
- [19] 刘伟, 张倩倩, 舒芳, 蔡英丽, 马晓龙, 边银丙. 梯棱羊肚菌全基因组 SNP/Indel 分析及基于 Indel 标记的遗传连锁图谱构建. 菌物学报, 2019, 38(12): 2195-2204
- Liu W, Zhang Q Q, Shu F, Cai Y L, Ma X L, Bian Y Bing. Genome-wide SNP/Indel analysis and the construction of genetic linkage maps based on Indel markers of *Morchella importuna*. Mycosystema, 2019, 38(12): 2195-2204
- [20] 叶春雷, 王炜, 陈军, 陈琛, 罗俊杰, 王一, 张建平. 基于 BSA-Seq 技术初步鉴定油用亚麻抗白粉病候选基因. 作物杂志, 2023, 39(6): 69-78

- Ye C L, Wang W, Chen J, Chen C, Luo J J, Wang Y, Zhang J P. Preliminary identification of candidate genes with resistance to powdery mildew in oil flax based on BSA-seq. *Crops*, 2023, 39(6): 69-78
- [21] Jiao Y, Sha C L, Xie R J, Shu Q Y. Comparative analysis of the potential physiological and molecular mechanisms involved in the response to root zone hypoxia in two rootstock seedlings of the Chinese bayberry via transcriptomic analysis. *Functional & Integrative Genomics*, 2023, 23(1): 11
- [22] NY/T 2761-2015. 植物新品种特异性, 一致性和稳定性测试指南 杨梅
NY/T 2761-2015, Guidelines for testing specificity, consistency and stability of new plant varieties Chinese bayberry
- [23] 耿天天, 王雅乐, 罗莉妍, 申邦, 方瑞, 胡敏, 赵俊龙, 周艳琴. 应用四引物扩增阻滞突变体系 PCR 技术检测柔嫩艾美耳球虫二氢蝶酸合酶 N377D 突变. *中国兽医学报*, 2023, 43 (01): 93-97
Geng T T, Wang Y L, Luo L Y, Shen B, Fang R, Hu M, Zhao J L, Zhou Y Q. Development of an amplification refractory mutation system-PCR technique to detect the N377D mutation of *Eimeria tenella* dihydropteroate synthase. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43 (01): 93-97
- [24] 李国梓, 刘群恩, 陈代波, 于萍. 水稻 ENOD93 基因家族的全基因组鉴定与生物信息学分析. *中国农学通报*, 2023, 39(27): 95-102
Li G Z, Liu Q E, Chen D B, Yu P. Genome-wide identification and bioinformatic analysis of *ENOD93* gene family in rice. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2023, 39(27): 95-102
- [25] Ranocha P, Denancé N, Vanholme R, Freydier A, Martinez Y, Hoffmann L, Köhler L, Pouzet C, Renou J-P, Sundberg B, Boerjan W, Goffner D. *Walls are thin 1 (WAT1)*, an Arabidopsis homolog of *Medicago truncatula NODULIN21*, is a tonoplast - localized protein required for secondary wall formation in fibers. *The Plant Journal*, 2010, 63(3): 469-483
- [26] 洪晓如, 吴智明, 陈汉才, 黎庭耀, 沈卓, 张艳. 基于重测序的芥蓝(*Brassica alboglabra*)全基因组 InDel 标记开发. *分子植物育种*, 2021, 19 (04): 1190-1201
Hong X R, Wu Z M, Chen H C, Li T Y, Shen Z, Zhang Y. Development of InDel markers for *Brassica alboglabra* based on whole-genome re-sequencing data. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19 (04): 1190-1201
- [27] 初志战, 郭海滨, 曾栋昌, 刘耀光. 籼粳稻基因组 295 个 InDel 标记的开发. *作物学报*, 2016, 42 (06): 932-941
Chu Z Z, Guo H B, Zeng D C, Liu Y G. Development of 295 InDel markers for *Indica* and *Japanica* rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42(6): 932-941
- [28] 徐婷婷, 汪巧玲, 邹淑琼, 狄佳春, 杨欣, 朱银, 赵涵, 颜伟. 基于高通量测序的大麦 InDel 标记开发及应用[J]. *作物学报*, 2020, 46(9): 1340-1350
Xu T T, Wang Q L, Zou S Q, Di J C, Yang X, Zhu Y, Zhao H, Yan W. Development and application of InDel markers based on high throughput sequencing in barley. *Acta Agronomica Sinica*, 2020, 46(9): 1340-1350
- [29] 陈正杰, 宛永璐, 钟文娟, 陈四维, 周永航, 石盛佳, 蒋理, 戢沛城, 杨泽湖, 毛正轩, 牟方生. 基于大豆基因组重测序的 InDel 标记开发及应用. *植物遗传资源学报*, 2021, 22 (03): 815-833
Chen Z J, Wan Y L, Zhong W J, Chen S W, Zhou Y H, Shi S J, Jang L, Ji P C, Yang Z H, Mao Z X, Mou F S. Development and application of soybean InDel markers based on whole-genome resequencing datasets. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22 (03): 815-833
- [30] 赖瑞联, 沈朝贵, 冯新, 陈义挺, 韦晓霞, 吴如健. 橄榄果实转录组 SSR 和 SNP/InDel 位点特征. *热带作物学报*, 2023, 44 (04): 681-688
Lai R L, Shen C G, Feng X, Chen Y T, Wei X X, Wu R J. SSR and SNP/InDel characteristics of fruit transcriptomic data of *Canarium album*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, 44(4): 681-688
- [31] 吉康娜, 郅俊杰, 林丹妮, 颜爽爽, 田时炳, 曹必好, 邱正坤. 基于茄子基因组重测序的 InDel 标记开发及应用. *植物遗传资源学报*, 2019, 20(5):

1278-1288

Ji K N, Zhi J J, Lin D N, Yan S S, Tian S B, Cao B H, Qiu Z K. Development and application of eggplant InDel markers based on whole genome re-sequencing datasets. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2019, 20(5): 1278-1288

- [32] 尹明智, 胡燕. 基于 BSA-Seq 法的油菜野芥胞质雄性不育恢复基因的分析. *西北植物学报*, 2020, 40(7): 1148-1156
- Yin M Z, Hu Y. Location analysis of restorer gene of *sinapis arvensis* cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* based on BSA-Seq method. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 40(7): 1148-1156
- [33] 程明星, 童超波, 程晓晖, 刘越英, 刘立江, 柴国华, 黄军艳, 刘胜毅. 甘蓝型油菜作图群体亲本基因组及性状 QTL 密集区变异特点. *中国油料作物学报*, 2017, 39(4): 427-436
- Cheng M X, Tong C B, Cheng X H, Liu Y Y, Liu L J, Chai G H, Huang J Y, Liu S Y. Characterization of genome-wide variation in mapping population parents and dense QTL region in *Brassica napus*. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2017, 39(4): 427-436
- [34] 王建格, 周婵, 刘译朗, 杜丽. 香樟 *CcCBFc* 基因抗寒功能验证及分析. *农业生物技术学报*, 2021, 29(2): 268-278
- Wang J G, Zhou C, Liu Y L, Du L. Verification and analysis of cold resistance of *CcCBFc* gene from *Cinnamomum camphora*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(02): 268~278
- [35] 周晶, 陈思齐, 史文娇, 阳伏林, 林辉, 林占焯. 巨菌草幼叶及根转录组功能基因测序及分析. *草业学报*, 2021, 30(2): 143-155
- Zhou J, Chen S Q, Shi W J, Yang F L, Lin H, Lin Z X. Transcriptome analyses of functional genes in young leaves and roots of Giant Juncao. *Acta Prataculturae Sinica*, 2021, 30(2): 143-155
- [36] 王腾辉, 葛雯冬, 罗雅方, 范震宇, 王玉书. 基于极端混合池 (BSA) 全基因组重测序的羽衣甘蓝白色叶基因定位. *生物技术通报*, 2023, 39(9): 176-182
- Wang T H, Ge W D, Luo Y F, Fan Z Y, Wang Y S. Gene mapping of kale white leaves based on whole genome re-sequencing of extreme mixed pool (BSA). *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(9): 176-182
- [37] 田帅, 邱发发, 葛聪聪, 黄桂香, 王国全. 沃柑果皮响应柑橘锈螨危害的转录组分析. *果树学报*, 2021, 38(9): 1569-1578
- Tian S, Qiu F F, Ge C C, Huang G X, Wang G Q. Transcriptome analysis of citrus rustmite damage to the peel of Orah fruits. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(9): 1569-1578
- [38] 刘传和, 刘传和, 贺涵, 何秀古, 赖秋勤, 刘开, 邵雪花, 赖多, 匡石滋, 肖维强. 转录组与代谢组联合分析菠萝网纱覆盖防寒机制. *生物技术通报*, 2022, 38(11): 58-69
- Liu C H, He H, He X G, Lai Q Q, Liu K, Shao X H, Lai D, Kuang S Z, Xiao W Q. Unveiling the Mechanisms of Pineapple Responding to Anti-chilling by Gauze Covering in Winter via Transcriptome and Metabolome Profiling. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(11): 58-69
- [39] 吴磊, 王丹, 苏文悦, 郭长虹, 束永俊. 利用比较基因组学开发山羊草属 InDel 分子标记. *作物学报*, 2012, 38(7): 1334-1338
- Wu L, Wang D, Su W Y, Guo C H, Shu Y J. Developing InDel markers from *Aegilops* genus based on comparative genomics. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38(7): 1334-1338
- [40] 于忻滢, 张国良, 范松, 黄志炜, 张叶. 植物源农药研究进展. *黑龙江农业科学*, 2021, 7: 123-129
- Yu X Y, Zhang G L, Fan S, Huang Z W, Zhang Y. Research progress of Botanical pesticides. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2021, 7: 123-129
- [41] Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 2018, 13(1): 12-23

- [42] 朱璐, 袁冲, 刘义飞. 植物次生代谢产物生物合成基因簇研究进展. 植物学报, 2024, 59(1): 134
- Zhu L, Yuan C, Liu Y F. Research Progress on Plant Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Clusters. Chinese Bulletin of Botany, 2024, 59(1): 134-143
- [43] 马莹, 蔡媛, 马晓晶, 崔光红, 唐金富, 曾雯, 张水寒, 郭娟, 黄璐琦. 药用植物活性成分生物合成中 P450 的研究进展. 药学报, 2020, 55(7): 1573-1589
- Ma Y, Cai Y, Ma X J, Cui G H, Tang J F, Zeng W, Zhang S H, Guo J, Huang L Q. Research progress of P450 in the biosynthesis of bioactive compound of medicinal plants. Acta Pharmaceutica Sinica, 2020, 55(7): 1573-1589
- [44] 曾文芳, 王志强, 牛良, 潘磊, 丁义峰, 鲁振华, 崔国朝. 桃果实肉质研究进展. 果树学报, 2017, 34(11): 1475-1482
- Zeng W F, Wang Z Q, Niu L, Pan L, Ding Y F, Lu Z H, Cui G C. Research process on peach fruit flesh texture. Journal of Fruit Science, 2017, 34(11): 1475-1482
- [45] He G Q, Huang X X, Pei M S, Jin H Y, Cheng Y Z, Wei T L, Liu H N, Yu Y H, Guo D L. Dissection of the Pearl of Csaba pedigree identifies key genomic segments related to early ripening in grape. Plant Physiology, 2023, 191(2): 1153-1166
- [46] Branchereau C, Quero-García J, Zaracho-Echagüe NH, Lambelin L, Fouché M, Wenden B, Donkpegan A, Dantec LL, Barreneche T, Alletru D, Parmentier J, Dirlwanger E. New insights into flowering date in *Prunus*: fine map of a major QTL in sweet cherry. Horticulture Research, 2022, 9: uhac042
- [47] 柴春燕, 徐绍清, 周和锋. 杨梅高效生态栽培技术. 宁波: 宁波出版社, 2012: 12
- Chai C Y, Xu S Q, Zhou H F. Efficient ecological cultivation technology of Chinese bayberry. Ningbo: Ningbo Publishing House, 2012: 12
- [48] 尤园园, 王帅, 方莹莹, 齐诚, 李淑培, 张映, 陈钰辉, 刘伟, 刘富中, 舒金帅. 茄子全基因组 InDel 变异特征及分子标记开发和应用. 园艺学报, 2024, 51 (03): 520-532
- You Y Y, Wang S, Fang Y Y, Qi C, Li S P, Zhang Y, Chen Y H, Liu W, Liu F Z, Shu J S. Variation Characteristics of Insertion-Deletion (InDel) and Molecular Markers Development and Application in Eggplant Based on Whole Genome Re-sequencing Data. Acta Horticulturae Sinica, 2024, 51 (03): 520-532
- [49] 齐兰, 杨耀东, 黄丽云, 杨玉娟, 尹永梅. 基于重测序的槟榔 InDel 标记开发及应用. 分子植物育种, 2024, 22 (05): 1501-1507.
- Qi L, Yang Y D, Huang L Y, Yang Y J, Yin Y M. Development and application of Arecanut indel markers based on whole-genome resequencing datasets. Molecular Plant Breeding, 2024, 51 (03): 520-532
- [50] 阚云霞, 师海林, 张丹丹, 游茜, 尤园园, 舒金帅, 王帅, 毛秀杰. 基于农艺性状和 InDel 标记的矮生番茄种质资源遗传多样性分析. 农业生物技术学报, 2023, 31 (06): 1122-1132
- Kan Y X, Shi H L, Zhang D D, You X, You Y Y, Shu J S, Wang S, Mao X J. Genetic diversity analysis of dwarf tomato germplasm resources based on agronomic traits and InDel markers. Journal of Agricultural Biotechnology, 2023, 31 (06): 1122-1132