

# 杨梅种质资源 InDel 标记开发及与熟期的关联分析

焦云<sup>1,2</sup>, 高中山<sup>3</sup>, 汪国云<sup>4</sup>, 陈方永<sup>5</sup>, 姚小映<sup>6</sup>, 周超超<sup>5</sup>

<sup>1</sup>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; <sup>2</sup>宁波市农业科学研究院林业研究所, 浙江宁波 315040;

<sup>3</sup>浙江大学果树科学研究所, 杭州 310058; <sup>4</sup>余姚市农业技术推广服务总站, 浙江余姚 315400; <sup>5</sup>浙江省柑桔研究所, 黄岩 318026;

<sup>6</sup>宁波市江北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 InDel。不同染色体上的 InDel 变异频率介于 1/11297~1/8903; 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 InDel 分布在基因外显子区域, 另有 21055 和 6659 个 InDel 分别分布在基因间区和内含子区域。经 GO 注释, 上述 InDel 生物过程主要涉及细胞过程 (Cellular process) 和代谢过程 (Metabolic process); 分子功能主要包括结合 (Binding) 和催化活性 (Catalytic activity)。经 KEGG 通路分析发现, InDel 所在的基因区域的功能主要为次生代谢、碳代谢和核质运输等。通过全基因组关联分析, 获得 20 个与杨梅果实成熟期性状显著关联的 InDel, 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。进一步验证显示 InDel EP-18 标记对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。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

## Development of Insertion and Deletion (InDel) Markers in Germplasm Resources of Chinese Bayberry and Correlation Analysis with Mature Stage

JIAO Yun<sup>1,2</sup>, GAO Zhongshan<sup>3</sup>, WANG Guoyun<sup>4</sup>, CHEN Fangyong<sup>5</sup>, YAO Xiaoying<sup>6</sup>, ZHOU Chaochao<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Ningbo Key Laboratory of Characteristic Horticultural Crops in Quality Adjustment and Resistance Breeding, Ningbo 315040, Zhejiang;

<sup>2</sup>Institute of Forestry, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, Zhejiang; <sup>3</sup>Institute of Fruit Science, Zhejiang University,

Hangzhou 310058; <sup>4</sup>Yuyao Agricultural Technology Extension Service Station, Yuyao 315400, Zhejiang; <sup>5</sup>Zhejiang Citrus Research Institute,

Huangyan 318026; <sup>6</sup>Ningbo Jiangbei Nanzhen Fruit Professional Cooperative, Ningbo 315037, Zhejiang)

**Abstract:** The InDel markers have been extensively used in molecular marker-assisted breeding for fruit trees. However, limited studies have been conducted on their application in Chinese bayberry (*Morella rubra*), a traditional Chinese fruit tree. This study identified 25831 InDels, ranging from 1 to 50 bp in size, through whole-genome resequencing and bioinformatics analysis of 103 Chinese bayberry core germplasm accessions. The frequency of InDel variation across different chromosomes ranged from 1/11297 to 1/8903, with chromosome CM025856.1 exhibiting the highest frequency of InDel mutation. Annotation analysis showed that 1312 InDels were located in gene exon regions, while 21055 and 6659 InDels were distributed in the intergenic and intron regions, respectively. Gene Ontology (GO) analysis indicated that these InDels were primarily associated with for cellular processes and metabolic processes in biological processes, and with binding and

收稿日期: 2024-06-26 网络出版日期: 2024-11-27

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240626001>

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)

catalytic activity in molecular functions. KEGG pathway analysis demonstrated that the InDel-containing genes were predominantly involved in secondary metabolism, carbon metabolism and nucleocytoplasmic transport. Genome-wide association analysis identified 20 InDels significantly associated with fruit maturity traits. Functional annotations of these InDels revealed associations with mitochondrial and plastid structural genes, riboside triphosphate hydrolase, and cytokinin signaling proteins. Further validation and analysis identified the InDel EP-18 marker as having the highest accuracy (89.25%) for identifying fruit maturity traits. Gene prediction analysis indicated that this locus encodes an early nodulin family gene. In conclusion, the InDel EP-18 marker identified in this study provides 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*, Sieb. et Zucc.) 为杨梅科杨梅属常绿乔木, 果实结构独特, 富含花色素苷, 是我国特产果树<sup>[1-3]</sup>, 其中浙江省的栽培面积及产量均位居国内第一。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。利用分子标记辅助育种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意义。InDel (Insertion/Deletion) 标记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<sup>[4-8]</sup>。杨梅遗传基础研究相对薄弱, 本课题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<sup>[9-12]</sup>, 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<sup>[2, 13]</sup>。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<sup>[14]</sup>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, 本课题组已公布了杨梅第二代基因组<sup>[2]</sup>, 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。在此基础上, 本研究选用 103 份杨梅核心种质材料进行全基因组重测序, 开发 InDel 标记并分析其功能注释; 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

103 份杨梅核心种质来自中国浙江 69 份、福建 12 份、湖南 8 份、广东 5 份、江苏 4 份、云南 3 份、贵州 1 份、美国 1 份, 由宁波市农业科学研究院杨梅种质资源圃保存 (表 1)。

### 1.2 全基因组重测序

杨梅核心种质资源圃种植株行距为 4 m×6 m, 树龄 10 年生, 于 2021 年随机适量选取每份材料春梢顶端嫩叶, 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 (Analytik Jena AG, Jena, Germany) 和 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) 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。

将 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: 2 μg DNA 样品用 Covaris S220 (Covaris, Massachusetts, USA) 随机打断成长度为 400 bp 的片段<sup>[15]</sup>, 使用 TruSeq Library Construction Kit (Illumina, San Diego, CA) 并参照其说明书进行建库, DNA 片段经末端修复、加 ployA 尾以及测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成测序文库制备<sup>[16]</sup>。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。

表 1 103 份杨梅种质资源的来源信息和果实成熟期性状

Table 1 The passport information and fruit maturity traits of 103 Chinese bayberry germplasm accessions

名称 Name	成熟期 Mature stage	来源 Source	名称 Name	成熟期 Mature stage	来源 Source
台州梅 2 号 Taizhoumei No.2	晚	中国浙江台州	早梅-16 Zaomei-16	早	中国浙江温岭
NKY030	中	中国浙江宁波	蜡杨梅 <i>Morella cerifera</i>	晚	美国
纽叶梅 Niuyemei	中	中国湖南怀化	夏至红 Xiazhihong	中	中国浙江宁波
荸荠变 1 号 Biqibian No.1	早	中国浙江宁波	黑晶 Heijing	中	中国浙江温岭
YY12	晚	中国江苏苏州	台州梅 1 号 Taizhoumei No.1	晚	中国浙江台州
冬瓜梅 Dongguamei	中	中国湖南怀化	荸荠变 3 号 Biqibian No.3	中	中国浙江宁波
甬早梅 2 号 Yongzao No.2	早	中国浙江宁波	荸荠变 4 号 Biqibian No.4	中	中国浙江宁波
NKY083	中	中国浙江宁波	红尖花 Hongjianhua	中	中国浙江宁波
梅早变 1 号 Meizaobian No.1	中	中国浙江宁波	Y2012-52	中	中国浙江宁波
NKY010	中	中国浙江宁波	HC4	中	中国福建漳州
大黑炭 Daheitan	中	中国浙江温州	硬丝 2 号 Yingsi No.2	早	中国福建漳州
软丝 Ruansi	早	中国福建漳州	晚稻杨梅 Wandaoyangmei	晚	中国浙江舟山
广东大梅 Guangdongdamei	中	中国广东广州	NKY011	中	中国浙江宁波
三夹岙乌梅 Sanjiaowumei	中	中国浙江宁波	YY37	晚	中国浙江宁波
早梅 CX05 Zaomei CX05	早	中国浙江宁波	Y2012-83	中	中国浙江宁波
梅早变 2 号 Meizaobian No.2	早	中国浙江宁波	温岭本梅 Wenlingbenmei	中	中国浙江温岭
NKY004	中	中国浙江宁波	Y2012-82	中	中国浙江宁波
乌酥核 Wusuhe	中	中国广东广州	梅湖早 Meihuzao	早	中国浙江宁波
广东早梅 Guangdongzaomei	早	中国广东广州	白杨梅(大果) Baiyangmei (Big)	中	中国浙江绍兴
荸荠变 2 号 Biqibian No.2	中	中国浙江宁波	特早 2 号 Tezao No.2	早	中国云南红河
早大种 Zadazhong	早	中国浙江宁波	NKY009	中	中国浙江宁波
大果晚 Daguowan	晚	中国浙江宁波	大红袍 Dahongpao	中	中国浙江湖州
早茅蜜梅 Zaoqimimei	早	中国浙江宁波	春江杨梅 1 号 Chunjiangyangmei No.1	中	中国湖南怀化
白杨梅(小果) Baiyangmei (small)	中	中国浙江绍兴	白杨梅 6 号 Baiyangmei No.6	中	中国浙江绍兴
陈早变 1 号 Chenzaobian No.1	早	中国浙江宁波	荸荠变 5 号 Biqibian No.5	中	中国浙江宁波
NKY094	中	中国浙江宁波	陈早变 2 号 Chenzaobian No.2	早	中国云南红河
隔山 Geshan	中	中国福建漳州	白杨梅 7 号 Baiyangmei No.7	中	中国浙江绍兴
广东大黑 Guangdongahei	晚	中国广东广州	陈公早梅 Chengongzaomei	早	中国浙江宁波
风欢 Fenghuan	晚	中国浙江宁波	HC1	中	中国福建漳州
白杨梅 2 号 Baiyangmei No.2	中	中国浙江宁波	春江杨梅 2 号 Chunjiangyangmei No.2	中	中国湖南怀化
安海片早生 Anhaipianzaosheng	早	中国福建漳州	早小种 Zaoxiaozhong	早	中国浙江宁波
Y2012-47	中	中国浙江宁波	月粒盘 Yuelipan	中	中国浙江宁波
YY03	晚	中国浙江宁波	乌西梅 Wuximei	中	中国广东广州
早佳 Zaojia	早	中国浙江兰溪	丁岙 Dingao	早	中国浙江温州
松浆梅 Songjiangmei	中	中国浙江宁波	水晶 Shuijing	中	中国浙江绍兴
YY20	中	中国浙江宁波	特早 1 号 Tezao No.1	早	中国福建漳州
木洞 Mudong	中	中国湖南怀化	白东魁 Baidongkui	中	中国福建漳州

表1(续)

名称 Name	成熟期 Mature stage	来源 Source	名称 Name	成熟期 Mature stage	来源 Source
余姚早 Yuyaozao	早	中国浙江宁波	HC2	中	中国福建漳州
晚芥蜜梅 Wanqimimei	中	中国浙江宁波	余姚早大 Yuyaozaoda	早	中国浙江宁波
大果红 Daguohong	中	中国浙江宁波	太波梅 Taibomei	中	中国湖南怀化
花乔白梅 Huaaobaimei	中	中国贵州贵阳	温岭早梅 Wenlingzaomei	早	中国浙江温岭
早水晶 Zaoshuijing	早	中国浙江绍兴	银红梅 Yinhongmei	中	中国湖南怀化
东魁 Dongkui	晚	中国浙江台州	黑大 Heida	中	中国浙江宁波
普早2号 Puzao No.2	早	中国福建漳州	迟色 Chise	中	中国浙江杭州
HC3	中	中国福建漳州	KYZ1	早	中国浙江宁波
大叶细蒂 Dayexidi	中	中国江苏苏州	小叶细蒂 Xiaoyexidi	中	中国江苏苏州
大叶梅 Dayemei	中	中国湖南怀化	东魁变1号 Dongkuibian No.1	晚	中国浙江台州
YY42	中	中国浙江宁波	东魁变2号 Dongkuibian No.2	晚	中国浙江台州
大叶光 Dayeguang	早	中国江苏苏州	台州本梅 Taizhoubenmei	中	中国浙江台州
王子安海 Wangzianhai	早	中国福建漳州	白杨梅 Baiyangmei	中	中国浙江绍兴
瑞旭 Ruixu	晚	中国浙江宁波	YYZ	早	中国浙江宁波
普早1号 Puzao No.1	早	中国云南红河			

### 1.3 InDel位点挖掘与统计

基于杨梅参考基因组序列 Mru\_ZJU\_2 (Bio Project: PRJNA398601, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA398601/>), 使用BWA<sup>[17]</sup>对过滤后的 Clean reads 数据进行比对。通过SAMTOOLS 软件<sup>[18]</sup>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<sup>[19]</sup>。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<sup>[20]</sup>。

### 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  $1e-5$ )<sup>[21]</sup>。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 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 位点, 将群体样本中 InDel 出现频率阈值设置为 5% (即剔除群体中样本数量低于 5%

的 InDel 位点)。其次, 依据 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》<sup>[22]</sup> 进行果实成熟期评价与记录, 从中随机选择不同成熟期杨梅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 个品种的重测序结果。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, 进一步剔除由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 引物设计及验证 InDel 标记准确率

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<sup>[23]</sup>, 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相关引物。采用 ABI Q6 Flex 实时荧光定量 PCR 系统平台中的 Genotyping 功能模块分析验证 InDel 标记准确率。PCR 反应体系如下: 20 ng/ $\mu$ L 的样品基因组 DNA 2.0  $\mu$ L, 2 $\times$ SG Fast qPCR Master Mix 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 的正反向引物各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足至 10  $\mu$ L。PCR 扩增为两步法程序, 即预变性和循环扩增, 具体为:

95 °C 3 min; 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 30 个循环。最后将上述 PCR 反应的分型检测结果与表型进行核对, 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, 经过全基因组测序总共产生了约 751 G 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 InDel 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 InDel 出现频率为 10234 bp/个; 筛选出长度为 1~50 bp 的 InDel 位点共计 25831 个, 以小片段(6~10 bp)分布为主(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 出现频率介于 1/11297~1/8903; 其中, CM025856.1 染色体上 InDel 出现频率最高, 即 8903 bp 会出现 1 个 InDel(图 2)。

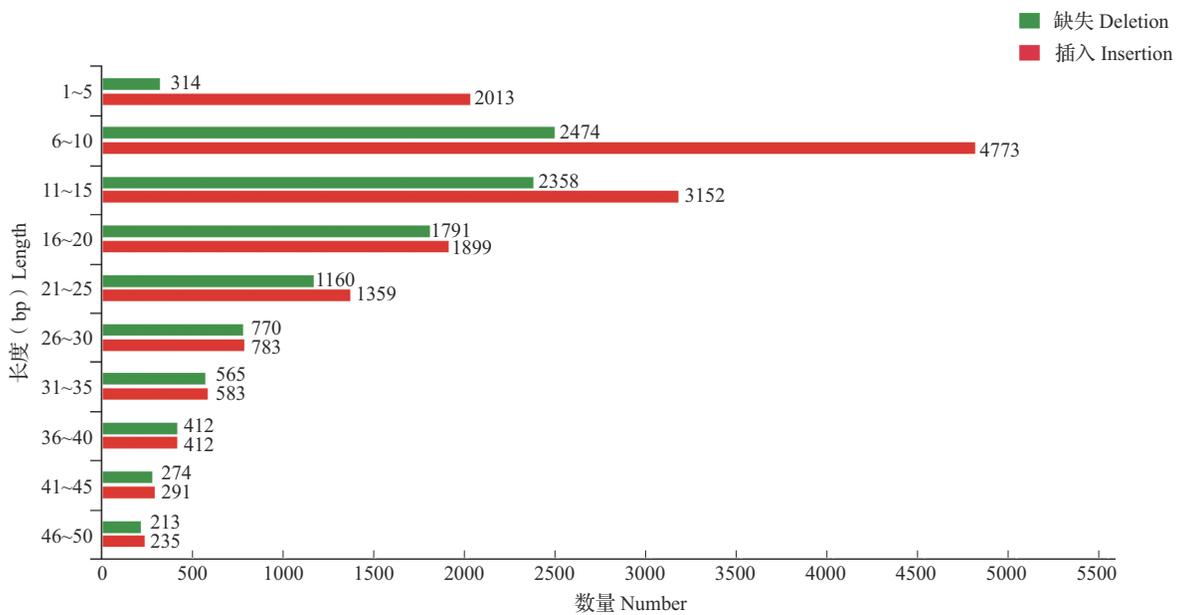


图 1 不同长度 InDel 在杨梅基因组上的分布情况

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

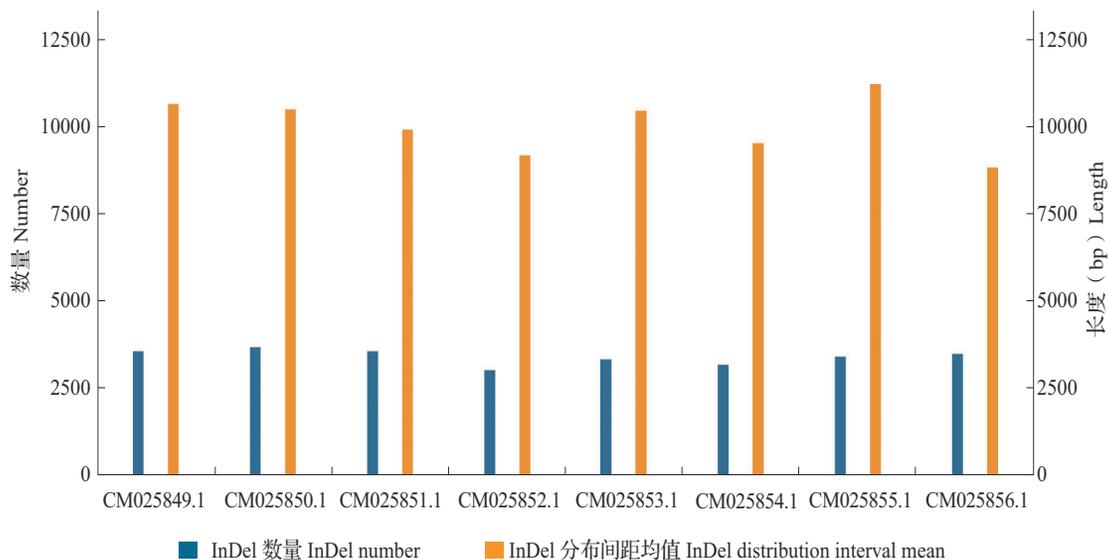


图 2 杨梅染色体上 InDel 的数量与分布频率

Fig. 2 The number of InDel and distributed frequency 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 InDel 的位置信息。其中,分布在外显子区域的 InDel 有 1312 个,远低于内含子区域分布数量(6659 个)。5' 和 3' 端非翻译区域内有分别有 724 个和 436 个 InDel。基因上游和下游 1 kb 范围内区域分别有 2507 个和 2173 个 InDel。其次,仅有 152 个 InDel 存在于剪接位点区域(表 2)。

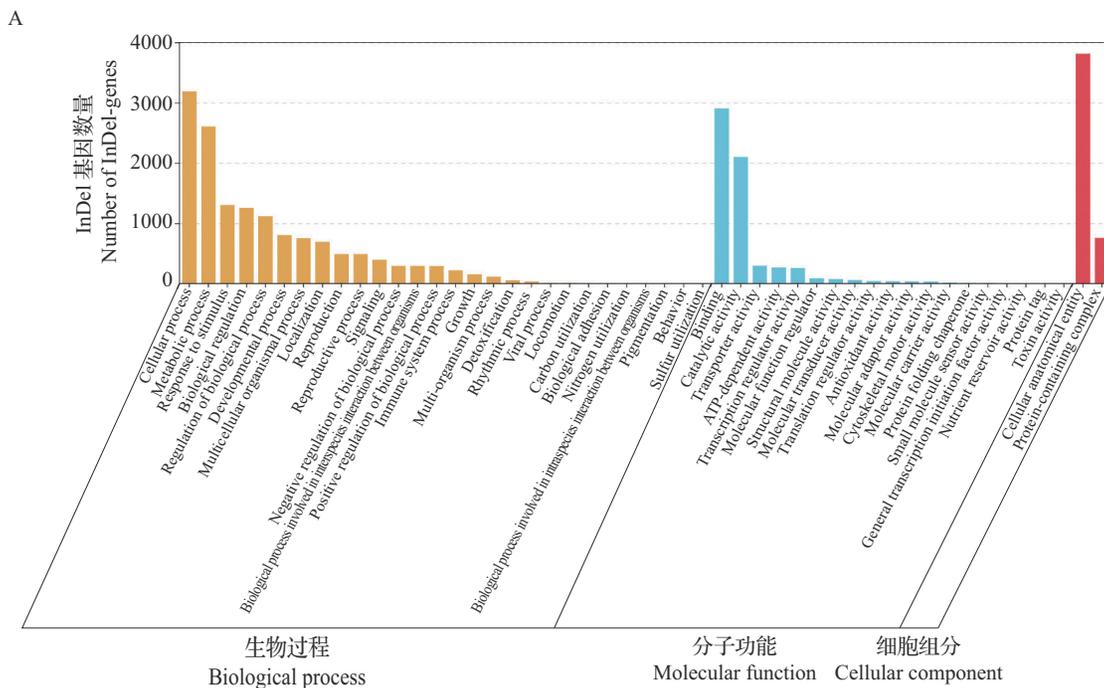
此外,对 InDel 所在 DNA 区域序列片段进行 GO 功能注释分析,结果表明生物过程(Biological process)中占比例最多的是细胞过程(Cellular process),包含有 3186 个含 InDel 的基因区域;代谢过程(Metabolic process)则次之,包含有 2604 个 InDel(图 3A)。在分子功能(Molecular function)类目中,蛋白结合(Binding)最高,包含 2906 个 InDels,催化活性(Catalytic activity)次之,包含 2100 个 InDels。在细胞组分(Cellular component)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。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( $P \leq 0.05$ )。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)。

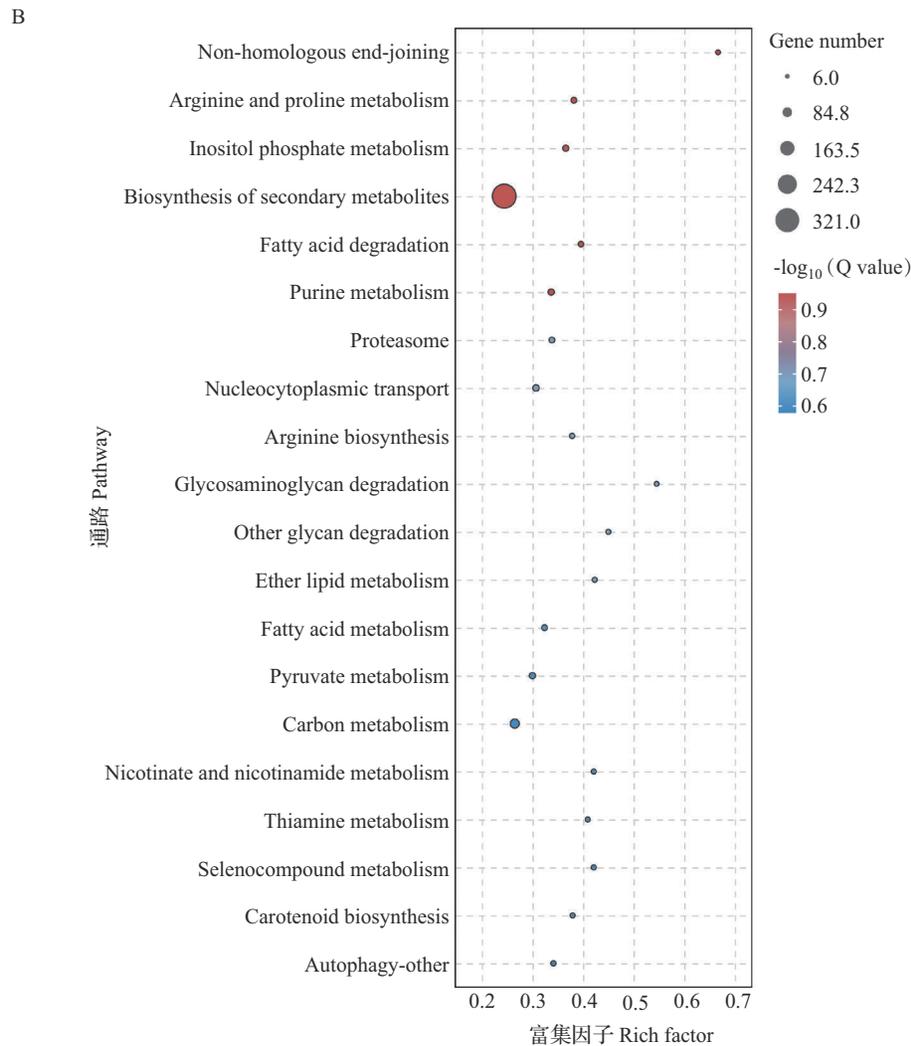
表 2 杨梅基因组 InDel 区域的功能分类概况

Table 2 The functional classification of InDel in Chinese bayberry

类型 Type	总数 Totality	比例 (%) Percent
内含子区域 Intron region	6659	18.96
外显子区域 Exon region	1312	3.74
基因间区 Intergenic region	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 1 kb 区域 Gene upstream 1 kb region	2507	7.14
基因下游 1 kb 区域 Gene downstream 1 kb region	2173	6.19
3' 端非翻译区域 3' untranslated regions	436	1.24
5' 端非翻译区域 5' untranslated regions	724	2.06



(图 3)



A: InDel 的 GO 注释结果; B: InDel 的 KEGG 分析

A: GO annotation of InDel; B: KEGG pathway analysis of InDel

图 3 杨梅基因组 InDel 位点基因功能注释分析

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

### 2.3 InDel 与成熟期性状的关联分析

通过对成熟期极端差异群体的全基因组关联分析, 共计发现 118 个显著性 ( $P \leq 0.05$ ) 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), 主要来源于 CM025849.1、CM025855.1 和 CM025856.1 染色体。其次, 根据 InDel 标记物理位置, 预测了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 关联的位点是早期结瘤素家族基因 *Early nodulin-93-like*; 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 关联的基因位点是细胞分裂素信号蛋白家族基因 *ARR14-like*; 与 InDel EP-17 关联的基因位点是欧洲葡萄抗霜霉病家族基因 *Disease resistance protein RPV1*。

表3 杨梅果实成熟期显著性关联的 InDel 及注释信息

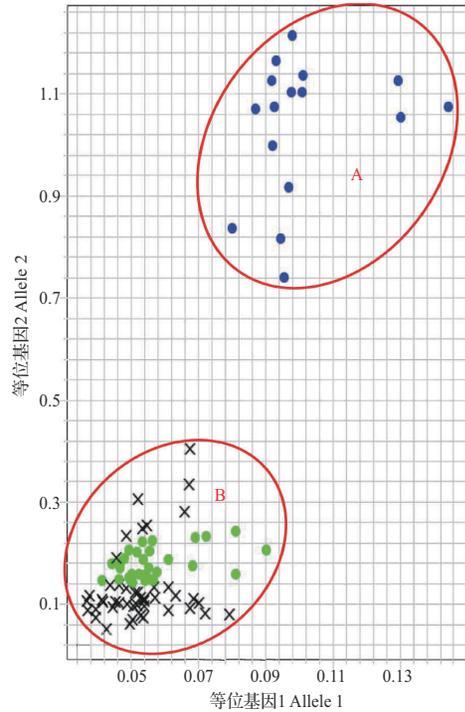
Table 3 The InDel and annotation information of the significant association of ripening traits in Chinese bayberry fruits

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	长度(bp) Length	InDel 位置 Position	功能注释 Functional annotation
InDel EP-1	F:CGTACACGCAGTGCAGTTGTCAGTTATC R:GACTACCACGTATACGGGAGGAGTACCTGGTTT	104	CM025855.1: 31401090	线粒体结构基因
InDel EP-2	F:GAGCTTTTAGTCCACTGGCAGCGGCAAAC R:GAATTAGAACACCTTGCTCGCAAGGTGAGG	108	CM025855.1: 19247811	三磷酸核苷水解酶结构基因
InDel EP-3	F:GAGCTTTTAGTCCACTGGCAGCGGCAAAC R:GTCTGGACTTGCAAGGCTCGTCAAGTCTCTG	86	CM025855.1: 30530049	磷酸丙糖异构酶基因
InDel EP-4	F:GTAGCTTGGACTCCTAAAGTGACACGGT R:GCGGATGATAGAGTGTCTAAGATATGTACTC	116	CM025855.1: 34429328	RING 结构域蛋白质 170
InDel EP-5	F:TGGGACACATACTCATCTTAACTCG R:CTATGGGGCAAGGGAGTTTTCAAACCT	81	CM025855.1: 18454904	核苷酸转移酶
InDel EP-6	F:GACCGGAGGAGTTATAATCACTACCCT R:GACATTGTGTGTTTGATTAGATGGAGCTTAAAC	120	CM025855.1: 33525190	植物钙调素依赖性 蛋白合成酶
InDel EP-7	F:AAGATGTACTCGACATCTTACTGTGAAAT R:CGGCAGCCAGGTATACTCTCCAACAGGGA	100	CM025856.1: 13735052	芳香酸脱氢酶 2
InDel EP-8	F:GTGGTTCAGTGCCATGAAGTATATAAAATG R:CCACGTCATTGACACTGTCTGCGCTTGTTTG	101	CM025856.1: 27376500	核仁因子 1
InDel EP-9	F:CGTGGTACAGGTATGGTGTGGGATCTCTCG R:GCCTCATTTCTCATTGCGACGCACTTTTGAC	96	CM025856.1: 8373043	小泛素样修饰蛋白激活酶 1B
InDel EP-10	F:AAAAAATTTACTACTTAACTTATGTC R:CGAATAGATTCATCTAGTTTTAAATCTCTG	107	CM025856.1: 2670173	Degradation periplasmic_ proteins_15
InDel EP-11	F:TCCACCAGTCGACTTCATCCCCTGCATG R:CGTGAAGTGGTGTAAATGGCGACCGATTG	86	CM025856.1: 20600810	Low PSII accumulation 2
InDel EP-12	F:TCTCATGATAAGTAGATCTCATTTTTG R:CGAGCTCTTAGAGAACAGTGTGTAACCAACA	92	CM025856.1: 8045075	糖基转移酶家族基因
InDel EP-13	F:GGTTCCTACTACTCTCCGAGGTGTCTC R:CACACTGTCTCCAGAGAGAACCGATTTCAT	95	CM025856.1: 17276262	质体结构基因
InDel EP-14	F:GTATTTGTTTCCAATGATCGAATGGTATGTATTG R:GCGTTACTGAAACAATCGATCGTCTA	108	CM025856.1: 14509789	未知功能的基因 <i>AT5G61680.1</i>
InDel EP-15	F:CGGTTTTAAGGTTTTGCAGATAGTAGGC R:ATATTTATATAGGTGCCAAGCAAATAGATGTGA	108	CM025856.1: 26896700	细胞分裂素信号蛋白家族 基因 <i>ARR14-like</i>
InDel EP-16	F:AGAAATATCAAGTCAATAATTGCGCGACT R:CGAAATCTTAAATCCAACTTACTCGTAGA	106	CM025852.1: 3230972	WD 重复膜蛋白 61
InDel EP-17	F:CCAAAAACCATTTAGCTGGAATATACACTG R:CTTAGGTGCACAAAGGACTAAGGGTAGC	113	CM025849.1: 30724568	欧洲葡萄抗霜霉病家族基因 <i>RPV1</i>
InDel EP-18	F:GCCACCTACACCTACAGTAAAGGGCAAAAACCTA R:GAGTCCAATATGAATGCAAGTTAACCAAG	84	CM025849.1: 30722625	早期结瘤素家族基因 <i>Early nodulin-93-like</i>
InDel EP-19	F:TGAAGAATTAAGGTGGTTCAGTCAAG R:TCTAAGGAATGTGGTTCCTATGTGATTTG	105	CM025849.1: 30721660	线粒体结构基因 <i>AtMg00810</i>
InDel EP-20	F:GAGAAACAAAGCTACGACACAACAGATTG R:GCTGTTCTGTGCTGCCAACCTACAAGTC	96	CM025849.1: 30721838	线粒体结构基因 <i>AtMg00810</i>

### 2.4 成熟期 InDel 标记的分型结果验证

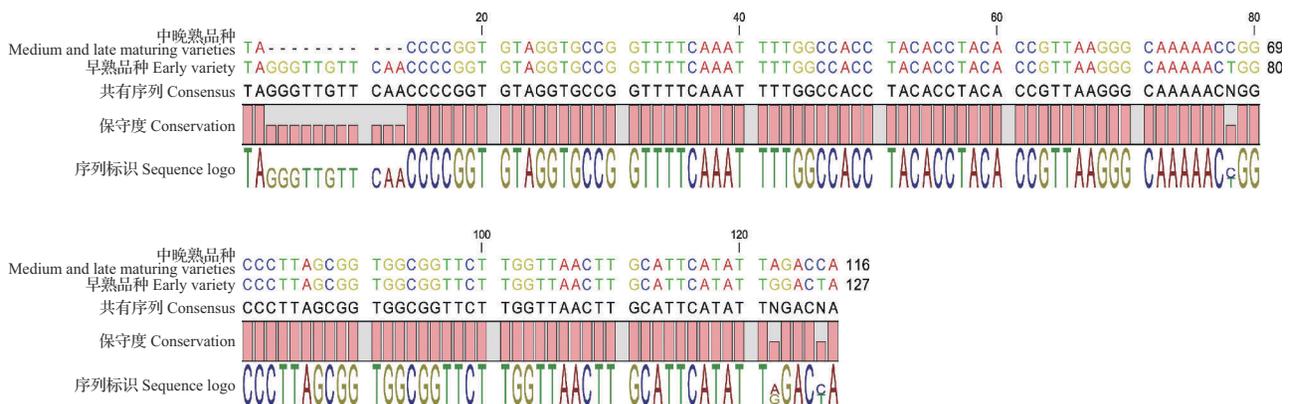
用表 3 中 InDel 标记对由随机选择 93 份杨梅种质组成的自然群体进行分型验证, 以筛选可用于杨梅果实成熟期早期鉴定的育种标记。基于田间成熟期调查结果, 仅发现 InDel EP-18 的杨梅果实成熟期鉴定准确率较高, 达 89.25 % (图 4), 可将杨梅种质清晰地划分为两个簇 (A 簇和 B 簇), 分别代表早熟与中晚熟种质群体; 因此, InDel EP-18 标记可适用于杨梅果实成熟期的快速鉴定。而其他 InDel 标记分型结果与果实成熟期没有发现明显的关联规律。

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, 中晚熟品种基因型存在长度有 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, 突变位点均在其编码序列区域, 且均为非同义突变。根据基因注释, 该基因为早期结瘤素家族 (Early nodulin) 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]。



×: 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); 红色圆圈代表不同的簇  
 ×: 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); The red circles represent different clusters

图 4 基于 qRT-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 qRT-PCR amplification platform



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 variety was “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, less conservative bases, conversely

图 5 不同成熟期杨梅种质 InDel EP-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<sup>[26-28]</sup>。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<sup>[29]</sup>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<sup>[30]</sup>。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 过滤阈值等原因造成的。与前期相关报道类似,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%)<sup>[31]</sup>。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。与桑葚不同的是,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<sup>[4]</sup>。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,InDel 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<sup>[32-33]</sup>。为明确 InDel 突变可能引起的基因功能变化,本研究将鉴定获得的 InDel 进行 GO 和 KEGG 功能注释分析。分析结果与相关研究有一定差异,杨梅基因组的 InDel 在分子功能中蛋白结合类别的 InDel 的数量最多,催化活性次之,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<sup>[4]</sup>。上述蛋白结合和催化活性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也多于其他分类<sup>[34-38]</sup>。这表明基因组中丰富的 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,其次是碳代谢,这与花生中的 InDel 位点研究结果一致<sup>[4]</sup>;类似地,吴磊等<sup>[39]</sup>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 InDel 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<sup>[40-43]</sup>。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<sup>[44]</sup>。本研究中,杨梅果实成熟期与重测序获得的 InDel 位点进行关联分析获得的 InDel EP-18 对杨梅果实成熟期的鉴定准确率为 89.25%,并未达到 100%。因此认为杨梅果实成熟期也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 *VvFMT* 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<sup>[45]</sup>。Branchereau 等<sup>[46]</sup>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 标记用于辅助育种。然而,本研究中并未发现与上述基因相关的 InDel 位点。可见,果实成熟期的调控机理错综复杂,不同物种的成熟期基因关联位点差异较大。本研究结果获得的早熟性状显著性关联位点 InDel EP-18 注释为早期结瘤素家族基因 *Early nodulin-93-like*,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 *Early nodulin 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<sup>[25]</sup>;同时,*Early nodulin* 是一个多功能基因家族,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<sup>[24]</sup>。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<sup>[47]</sup>,根部能与放线菌共生产生根瘤从而发挥固氮作用。然而,杨梅早熟性状关联位点注释结果中存在的早期结瘤素家族基因 *Early nodulin-93-like* 是否参与到杨梅果实成熟期调控途径还有待进一步验证。

综上所述,当前基因组 InDel 相关研究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<sup>[48-50]</sup>,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 位点特征并进行功能预

测,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。InDel EP-18 所涉及的 *Early nodulin-93-like* 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 W, 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微观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. *Acta Horticulturae Sinica*, 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,马先锋.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, 13:201
- [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良株遗传多样性分析. *中国南方果树*, 2019, 48(4):42-45  
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):42-45
- [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 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 Q K, Chen W, Song L J, van de Weg E, 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,武祥琪,梁森苗,郑锡良,臧行江.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 B. 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, 王伟, 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] 中华人民共和国农业部. NY/T 2761-2015 植物新品种特异性一致性测试指南—杨梅. 北京: 中国农业出版社, 2015  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. NY/T 2761-2015 Guidelines for testing specificity, consistency and stability of new plant varieties Chinese bayberry. Beijing: China Agriculture Press, 2015
- [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(1): 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(1): 93-97
- [24] 李固梓, 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, Freyrier 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(4): 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(4): 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(6): 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. 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(3): 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(3): 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

- (4):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, 鄧俊杰, 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(2):268-278
- [35] 周晶, 陈思齐, 史文娇, 阳伏林, 林辉, 林占熺. 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, 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):134-143  
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 N H, Lambelin L, Fouché M, Wenden B, Donkpegan A, Dantec L L, 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(3): 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(3): 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(5): 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(3): 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(6): 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(6): 1122-1132