

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2022.10047

张成磊, 周锐, 谢善鹏, 解凯东, 夏强明, 伍小萌, 郭文武. 山金柑实生后代四倍体发掘及形态和代谢评价[J]. 植物科学学报, 2022, 40(1): 47~53

Zhang CL, Zhou R, Xie SP, Xie KD, Xia QM, Wu XM, Guo WW. Exploration and evaluation of morphological traits and primary metabolites of tetraploid seedlings from Hongkong kumquat (*Fortunella hindsii* Swingle) [J]. Plant Science Journal, 2022, 40(1): 47~53

山金柑实生后代四倍体发掘及形态和代谢评价

张成磊¹, 周锐², 谢善鹏², 解凯东², 夏强明², 伍小萌², 郭文武^{2*}

(1. 台州科技职业学院, 台州市园艺生物技术重点实验室, 浙江台州 318020;

2. 华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 以多胚系山金柑(*Fortunella hindsii* Swingle)为材料, 采用“观根辨叶看油胞”形态初选法, 从1289株实生后代筛选出疑似四倍体(双二倍体)8株, 流式细胞仪检测和SSR分子鉴定表明它们均为同源四倍体, 初选准确率100%, 群体自然发生率0.62%。对其形态和初生代谢物进行检测, 结果显示: 山金柑四倍体株高、茎粗、节间数、节间长、气孔密度均显著低于二倍体, 而叶片厚度、气孔大小显著高于二倍体; GC-MS分析鉴定到24种初生代谢物, 四倍体叶片奎宁酸含量显著高于二倍体, 肌醇、4-氨基丁酸和1-棕榈酸单甘油酯含量显著低于二倍体。

关键词: 山金柑; 多倍体; 流式细胞仪; SSR分子标记; 初生代谢

中图分类号: S666.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)01-0047-07

Exploration and evaluation of morphological traits and primary metabolites of tetraploid seedlings from Hongkong kumquat (*Fortunella hindsii* Swingle)

Zhang Cheng-Lei¹, Zhou Rui², Xie Shan-Peng², Xie Kai-Dong², Xia Qiang-Ming², Wu Xiao-Meng², Guo Wen-Wu^{2*}

(1. Taizhou Vocational College of Science & Technology, Taizhou Key Laboratory of Horticultural Biotechnology, Taizhou, Zhejiang 318020, China; 2. Key Laboratory of Horticultural Plant Biology of Ministry of Education/College of Horticulture & Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To explore tetraploid seedlings from polyembryonic Hongkong kumquat (*Fortunella hindsii* Swingle), we screened eight putative tetraploids (doubled diploids) from 1289 seedlings based on root, leaf, and oil gland morphology. Flow cytometry and molecular identification showed that these tetraploids were all autotetraploids, with a screening accuracy of 100% and natural occurrence rate of 0.62%. Compared with diploids, the tetraploids of Hongkong kumquat showed significantly lower plant height, stem diameter, internode number, internode length, and stomatal density, but higher leaf thickness and stomatal size. In addition, leaf primary metabolites between the tetraploids and corresponding diploids were

收稿日期: 2021-09-13, 修回日期: 2021-11-10。

基金项目: 国家自然科学基金(32172525); 广东省科技计划(2018B020202009); 湖北省科技计划(2020BBA036, 2021DFE016)。

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (32172525), Science and Technology Innovation Strategy Special Fund of Guangdong Province (2018B020202009), and Key Research and Development Program of Hubei Province (2020BBA036, 2021DFE016).

作者简介: 张成磊(1987-), 男, 硕士, 实验师, 研究方向为柑橘种质资源发掘与利用(E-mail: zcl_mail@yeah.net)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: guoww@mail.hzau.edu.cn)。

analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Among the 24 detected primary metabolites, the content of quinic acid in the tetraploid leaves was significantly higher than that in the diploid leaves, while the contents of inositol, 4-aminobutyric acid, and 1-monopalmitin were significantly lower.

Key words: *Fortunella hindsii*; Polyploidy; Flow cytometry; Simple sequence repeat; Primary metabolites

山金柑 (*Fortunella hindsii* Swingle), 又名金豆、山金橘、香港金橘, 属于芸香科 (Rutaceae) 金柑属 (*Fortunella*)^[1], 树体带刺, 果实小而酸涩、不具鲜食价值, 但其株型矮小, 一年多次开花结实, 果粒成熟时呈金黄色, 用作盆景极具观赏性。此外, 山金柑具有早花、短童期、矮化等特性, 可作为柑橘遗传育种和功能基因组研究的模式材料^[2]。我国野生山金柑资源丰富, 湖南、福建、浙江等地均有分布, 多数地区的山金柑种子为多胚。在野外山金柑资源调查过程中, 发掘到极其稀有的单胚山金柑资源, 利用该材料已获得 373.6 Mb 山金柑参考基因组, 并建立了其遗传转化和 CRISPR-Cas9 基因编辑体系^[3]。

与二倍体相比, 四倍体柑橘的根、茎、叶等器官均表现出多倍体特征, 周锐等^[4]将其形态筛选总结为“观根辨叶看油胞”。柑橘属及其近缘属植物中, 柚、宜昌橙和枸橼为单胚, 其余多数种类和品种的种子一般为多胚^[5]。基于柑橘珠心细胞存在一定概率的基因组自然加倍现象, 实生幼苗形态筛选结合流式细胞仪倍性分析是获得柑橘多胚品种四倍体(双二倍体)的主要方法。利用该方法, 枳 (*Poncirus trifoliata* Raf)^[6]、枳橙 (*P. trifoliata* Raf × *Citrus sinensis* Osbeck)^[7]、衢州香橙 (*C. junos* Sieb. ex Tan)^[8] 等柑橘砧木类型, 默科特橘橙 (*C. reticulata* Blanco × *C. sinensis* L. Osbeck)^[9]、贡柑 (*C. reticulata* Blanco)^[4] 等优异接穗品种和地方特色品种资源的四倍体均已成功获得。本文以多胚系山金柑为材料, 基于实生幼苗形态初选结合倍性快速鉴定, 从实生群体后代发掘山金柑四倍体新种质, 进而评价基因组加倍对山金柑植株形态、初生代谢物等方面的影响, 以期为柑橘无核、矮化和抗逆育种及相关机理研究提供多倍体资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料及实生幼苗形态初选

山金柑多胚株系的成熟果实采自浙江省台州科技职业学院现代农业生产实训基地。该多胚株系由台州地区的野生山金柑实生树移栽而来, 树龄 10 年以上。

种子催芽播种、实生幼苗形态学初选参考周锐等^[4]的方法。将种子剥出, 清水洗净后, 置于 1 mol/L NaOH 溶液浸泡 15 min 去除果胶。剥去外种皮后, 将种子均匀铺于垫有湿滤纸的培养皿中, 置于 28°C 恒温箱(暗培养)催芽。胚根萌发后, 将其播种于营养钵, 每钵约 100 粒种子, 置于生长室中进行培养(温度 25°C ± 1°C; 光照 16 h/d)。幼苗长至出现 3 ~ 4 片真叶时, 利用“观根辨叶看油胞”法筛选疑似四倍体。

1.2 倍性鉴定

疑似四倍体植株的倍性鉴定采用流式细胞仪检测和根尖染色体计数法。流式细胞仪 (Cyflow space, Sysmex, Japan) 倍性检测参考解凯东等^[10]的方法, 用 CyStain DNA 一步法试剂盒 (Sysmex, Japan) 进行细胞裂解和细胞核 DAPI 染色, 样品 DNA 含量图由 FloMax 软件自动生成。

根尖染色体计数参考夏强明^[11]的方法。取四倍体及其二倍体亲本生长旺盛的根尖, 用饱和对二氯苯溶液室温下预处理 3 h 后, 用新鲜的卡诺固定液(乙醇:乙酸 = 3 : 1(V/V))固定 24 h, 最后转移至 75% 乙醇溶液 4°C 保存备用。根尖用酶液(含 1% (V/V) 果胶酶、2% (W/V) 纤维素酶 ‘Onozuka’ R-10 和 1% (W/V) 果胶酶 Y-23) 37°C 水浴处理 90 min 后, 用火焰干燥法进行染色体制片, 并用荧光显微镜 (Imager. M2, Zeiss, Germany) 镜检, 染色体图像用 ZEN 软件采集。

四倍体群体发生频率 = 四倍体植株数 / 群体

植株总数 $\times 100\%$ 。

1.3 植株移栽

倍性分析完成后, 将四倍体及其二倍体亲本实生幼苗分别移栽至装有营养土(泥炭土: 基质土: 蝇石: 珍珠岩 = 4: 4: 1: 1)的营养钵, 继续置于生长室培养。待幼苗长至 7~8 片真叶大小时, 将其转移至温室, 期间正常水肥管理。

1.4 山金柑四倍体株高、茎和叶等形态指标测定

以山金柑二倍体为对照, 测量相同发育时期(移栽后约 15 个月)的四倍体植株形态指标, 包括株高、茎粗、节间数、节间长、叶片厚度、叶长、叶宽。株高(根颈以上长度)和节间长用直尺测量, 茎粗(根颈 1 cm 处)、叶长、叶宽、叶片厚度(从下至上第 7~10 片叶片)用游标卡尺测量, 二倍体、四倍体各测量 6 株, 取平均值。

气孔形态采用指甲油涂片法进行观察。将透明指甲油涂至叶片下表皮, 风干后撕下平铺至滴有清水的载玻片。用万能显微镜于 20 倍物镜采集 20 个视野用于统计气孔密度, 于 40 倍物镜采集 10 个视野用于测量气孔大小, 用 Image Pro Plus 软件测量气孔长(Stomatal length, SL)、宽(Stomatal width, SD), 并用公式计算气孔大小($SS = 1/4 \times SL \times SD \times \pi$)。二倍体、四倍体各统计 6 个叶片, 每个叶片统计 50 个以上气孔。

1.5 SSR 分子鉴定

基因组 DNA 提取和 SSR 分子标记分析分别参考 Cheng 等^[12] 和周锐等^[4] 的方法。8 对多态性 SSR 引物(表 1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系 10 μL : 2 \times PCR mix 5 μL , 正、反向引物各 0.25 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), DNA 模板 1 μL , 无菌水 3.5 μL 。PCR 反应在 ProFlex PCR 仪(ABI, USA)进行, 扩增程序为: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 10 s, 35 个循环, 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存。PCR 产物由全自动毛细管电泳系统(QIAxcel Advanced, QIAGEN)电泳分离。

1.6 初生代谢物提取和测定

初生代谢物提取和衍生化过程参考宋鑫等^[18] 的方法。山金柑二倍体 3 株为 1 个生物学重复; 四倍体 2~3 株为 1 个重复, 共设置 3 个重复。每个重复取 0.15 g 叶片研磨后的粉末用于初生代谢物

表 1 SSR 引物序列
Table 1 Sequences of SSR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5' - 3') Primer sequence	来源 Reference
Ma2_1825	F: AATCAAAACCCACCCAGCAAC; R: GGAAATCCGCTGCATAAAGA	[13]
MEST121	F: CAATAATGTAGGCTGGATGGA; R: TCCCTATCATCGGCAACTTC	[14]
MEST1	F: AGTTCTTGCTGGCTCAGGC; R: CAAGCCTCTCTCTTAGCCCCA	[15]
MEST46	F: GGTGAGCATCTGGACGACTT; R: GAACCAGAACATCAGAACCGGA	[15]
MEST104	F: TAAAAAGATGGGGCCTGTG; R: CCTTATCTTCATCACCTCCGTC	[15]
mCrCl03D12a	F: CCCACAACCATCACC; R: GCCATAAGCCCTTCT	[16]
mCrCIR02D09	F: ACCCATCACAAAACAGA; R: AATGATGAGGGTAAAGATG	[17]
mCrCIR07D05	F: TCGTTCTGCTTTCCAC; R: GAATCAAACCTACCCCTCCAAT	[17]

提取和衍生化。用气相色谱质谱联用仪(GC-MS)(ThermoFisher, ISQ II)对样品进行测定。色谱质谱条件: DB-5MS 毛细管柱(30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm , Agilent Technologies), 扫描范围 45~600 m/z, 进样口温度 230°C, 传输线温度 250°C, 载气为高纯氦气(99.999%), 载气流量 1.2 mL/min; 程序升温: 100°C 开始, 保持 1 min, 以 3°C/min 升温至 184°C, 0.5°C/min 升至 190°C 保持 1 min, 15°C/min 升至 280°C 保持 5 min; 分流比为 10:1; 自动上样, 进样量 1 μL 。将获得的质谱图与 NIST2008 和 Wiley Registry 数据库中的标准谱图进行比对, 对代谢物进行定性, 采用核糖醇内标法进行相对定量。

2 结果与分析

2.1 形态学初选结合倍性分析发掘山金柑四倍体

将 1272 粒山金柑种子催芽播种, 获得 1289 株实生幼苗。依据多倍体形态特征(根粗、须根少; 叶片厚、颜色深、叶形指数小; 油胞密度低等), 筛选获得 8 株疑似多倍体。用流式细胞仪和根尖染色体计数对疑似多倍体进行倍性鉴定, 发现 8 株均为四倍体(图 1)。基于山金柑形态初选四倍体准确率为 100%, 四倍体群体发生频率为 0.62%。

2.2 SSR 分子鉴定

利用从 38 对 SSR 引物中筛选获得的 8 对扩增

效果好的 SSR 引物, 对四倍体植株进行分子鉴定。结果表明, 山金柑所有四倍体的带型与其二倍体亲本完全相同, 表现出高度一致的遗传背景(图 2), 即这些四倍体可能为二倍体亲本珠心细胞自然加倍形成的双二倍体。

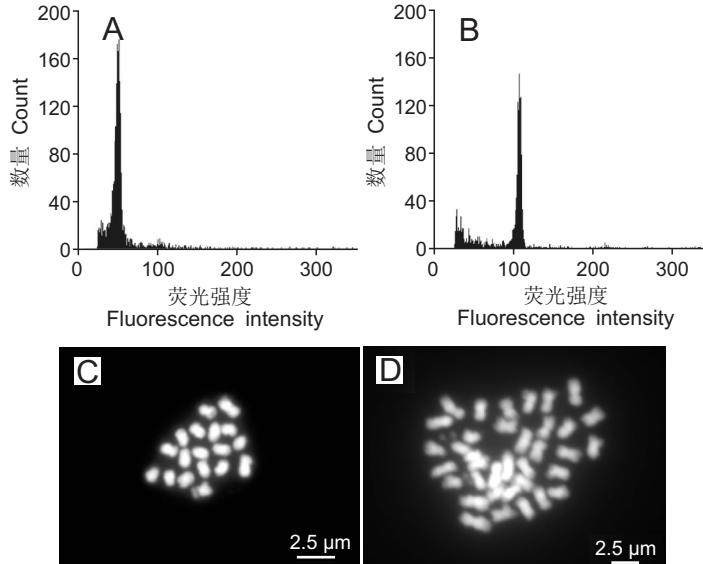
2.3 山金柑四倍体与二倍体株高、叶片和气孔形态差异明显

对获得的四倍体及相应二倍体植株的株高、节间长、叶片和气孔形态进行测量, 结果发现, 与二倍体山金柑相比, 四倍体植株明显

矮化、茎变细、节间数减少、节间长变短(表 2; 图 3: A、B); 叶片显著增厚, 而叶形指数没有显著差异(表 2, 图 3: C)。下表皮气孔形态观察表明, 山金柑四倍体气孔显著大于二倍体, 是二倍体的 1.85 倍; 而气孔密度显著小于二倍体, 仅为二倍体的 49%(表 2; 图 3: D、E)。

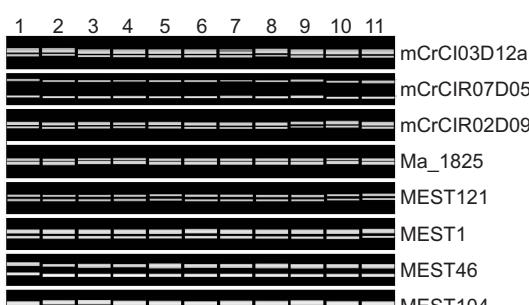
2.4 初生代谢变化分析

为比较基因组加倍对山金柑初生代谢的影响, 利用 GC-MS 对山金柑四倍体及其二倍体亲本叶片



A 和 B: 流式细胞仪倍性鉴定(A: 二倍体; B: 四倍体); C 和 D: 根尖染色体计数(C: 二倍体, $2n = 2x = 18$; D: 四倍体, $2n = 4x = 36$)。
A and B: Ploidy histograms of diploid and tetraploid plants determined by flow cytometry (A: diploid; B: tetraploid); C and D: Shoot tip chromosome counting (C: diploid, $2n = 2x = 18$; D: tetraploid, $2n = 4x = 36$).

图 1 流式细胞仪和根尖染色体压片鉴定山金柑疑似四倍体植株倍性
Fig. 1 Ploidy analysis of putative tetraploid Hongkong kumquat plants using flow cytometry and shoot tip chromosome counting



1 ~ 3: 二倍体; 4 ~ 11: 四倍体。
1 ~ 3: Diploid parents; 4 ~ 11: Tetraploid progenies.
图 2 山金柑二倍体和四倍体 SSR 分子鉴定
Fig. 2 SSR profiles of diploids and tetraploids of Hongkong kumquat

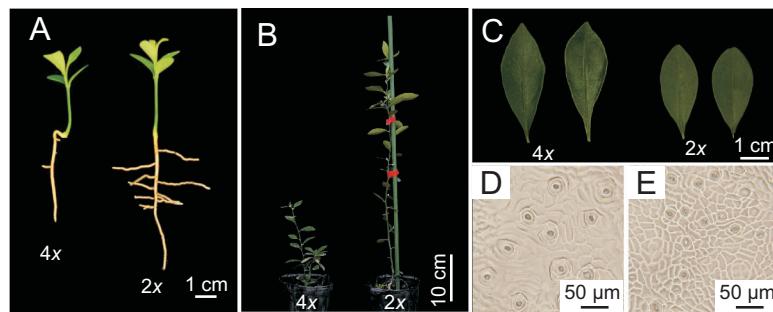
的初生代谢物进行测定, 共鉴定到 24 种初生代谢物, 包括 7 种糖、6 种有机酸、5 种氨基酸、4 种脂肪酸和 2 种醇类物质。进一步分析发现, 山金柑叶片以积累蔗糖和葡萄糖为主, 除肌醇外, 其余糖类物质在二倍体及四倍体的含量差异不显著(表 3)。有机酸类以奎宁酸为主, 且四倍体叶片奎宁酸含量显著高于二倍体, 是二倍体的 3.4 倍; 其余酸(除 4-氨基丁酸)在四倍体和二倍体差异不显著。检测到的 5 种氨基酸和 4 种脂肪酸类物质, 除 1-棕榈酸单甘油酯在四倍体显著低于二倍体外, 其余物质无显著差异(表 3)。

表 2 山金柑四倍体及其二倍体植株形态比较
Table 2 Morphological comparison between tetraploids and diploids of Hongkong kumquat

倍性 Ploidy	株高 / cm Plant height	茎粗 / mm Stem diameter	节数 No. nodes	节间长 / mm Internode length	叶片厚度 / mm Leaf thickness	叶形指数 Leaf Shape Index	气孔大小 / μm^2 Stomata size	气孔密度 / No./mm ² Stomata density
四倍体 Tetraploid	12.34 ± 1.62	1.83 ± 0.39	16.17 ± 3.54	9.11 ± 1.70	0.31 ± 0.02 **	2.50 ± 0.20	455.8 ± 55.2 **	165.0 ± 7.5
二倍体 Diploid	34.52 ± 4.44 **	2.08 ± 0.27 *	25.50 ± 2.35 **	18.63 ± 3.10 **	0.25 ± 0.02	2.49 ± 0.14	242.5 ± 37.6	337.8 ± 38.9 **

注: * 和 ** 分别表示二倍体和四倍体之间差异显著和极显著(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)。

Note: * and ** indicate significant and very significant differences, respectively, between diploids and tetraploids (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).



A: 幼苗形态; B: 植株形态; C: 叶片形态; D: 四倍体气孔; E: 二倍体气孔。

A: Seedling morphology; B: Plant morphology; C: Leaf morphology; D: Stoma of tetraploid; E: Stoma of diploid.

图 3 山金柑四倍体和二倍体植株形态及叶片下表皮气孔形态

Fig. 3 Comparison of plant morphology and stomata between tetraploids and diploids of Hongkong kumquat

表 3 山金柑四倍体及其二倍体亲本叶片初生代谢物含量比较

Table 3 Primary metabolite profiling data comparison between 4x and 2x Hongkong kumquat

化合物名称 Compound name	二倍体含量 / $\mu\text{g/g FW}$ Content in 2x	四倍体含量 / $\mu\text{g/g FW}$ Content in 4x	4x / 2x 倍数 4x / 2x Fold change	P 值 P-value
糖类 Sugars				
蔗糖 Sucrose	2606.5 ± 39.0	1973.5 ± 119.1	0.8	0.057
葡萄糖 Glucose	1692.0 ± 39.1	1832.8 ± 57.6	1.1	0.059
果糖 Fructose	107.9 ± 17.5	111.0 ± 15.6	1.0	0.252
甘露糖 Mannopyranose	115.8 ± 19.9	122.5 ± 5.7	1.1	0.623
麦芽糖 Maltose	687.0 ± 197.2	450.2 ± 18.8	0.7	0.365
d-吡喃葡萄糖 d-Glucopyranose	195.1 ± 15.3	194.0 ± 16.7	1.0	0.450
肌醇 Inositol	466.4 ± 49.1	394.9 ± 52.5	0.8	0.021
有机酸类 Organic acids				
柠檬酸 Citric acid	86.2 ± 29.1	61.9 ± 34.6	0.7	0.685
苹果酸 Malic acid	276.6 ± 3.0	206.2 ± 27.9	0.7	0.129
2-酮戊二酸 2-Ketoglutaric acid	61.7 ± 26.0	31.0 ± 3.7	0.5	0.303
奎宁酸 Quinic acid	375.6 ± 230.9	1286.3 ± 268.7	3.4	0.019
4-氨基丁酸 GABA	334.6 ± 57.9	167.3 ± 62.6	0.5	0.013
三羟基丁酸 2,3,4-Trihydroxybutyric acid	82.0 ± 0.7	47.6 ± 5.2	0.6	0.058
氨基酸类 Amino acids				
脯氨酸 Proline	161.8 ± 60.9	62.8 ± 40.4	0.4	0.093
丝氨酸 Serine	95.1 ± 46.8	34.7 ± 10.0	0.4	0.259
甘氨酸 Glycine	82.3 ± 6.2	26.9 ± 3.7	0.3	0.080
精氨酸 Arginine	42.8 ± 3.8	80.2 ± 20.9	1.9	0.200
谷氨酸 Glutamic acid	70.6 ± 2.3	56.8 ± 42.0	0.8	0.710
脂肪酸类 Fatty acids				
硬脂酸 Stearic acid	100.3 ± 26.0	100.5 ± 13.7	1.0	0.980
1-棕榈酸单甘油酯 1-Monopalmitin	176.2 ± 4.8	82.6 ± 3.4	0.5	0.007
单硬脂酸甘油酯 Glycerol monostearate	125.7 ± 3.7	72.6 ± 8.6	0.6	0.103
棕榈酸 Palmitic acid	203.9 ± 51.3	164.7 ± 35.3	0.8	0.179
其他 Others				
甘油 Glycerol	217.5 ± 10.9	166.6 ± 26.3	0.8	0.303
乙醇 Ethanol	69.2 ± 3.2	64.7 ± 8.3	0.9	0.428

3 讨论

本研究以多胚系山金柑为材料, 从 1289 株实生幼苗发掘出 8 株四倍体, 初选准确率 100%, 四倍体群体自然发生率 0.62%。蒋景龙等^[8]报道衢州香橙四倍体发掘初选率为 23.08%。本文发掘山金柑四倍体初选准确率较高的原因是本课题组先前已发掘无酸甜橙 (*C. sinensis* L. Osbeck)、红江橙 (*C. sinensis* L. Osbeck)、滑皮金柑 (*F. crassifolia* Swingle) 等 6 个多胚柑橘品种的四倍体^[4], 发现了从实生后代筛选四倍体的规律, 总结形成了“观根辨叶看油胞”的幼苗初选方法^[4]; 本研究再次证明了基于幼苗形态进行初选的有效性。进一步利用 8 对 SSR 引物对所有四倍体进行遗传鉴定, 四倍体带型与二倍体亲本完全相同, 表明山金柑四倍体是由珠心细胞染色体自然加倍而来, 与前人研究结果一致^[6, 7]。

本文从植株形态特征、叶片、气孔形态以及叶片初生代谢物等方面对发掘的四倍体及其二倍体亲本进行初步评价, 丰富了对柑橘多倍体及其形成机理的认识。蒋景龙等^[8]以衢州香橙为材料及彭灌等^[7]以枳橙为材料的研究均表明, 与二倍体相比, 四倍体株高、叶形指数、气孔密度均显著减小, 而气孔则显著增大, 与本研究中山金柑四倍体植株变矮、气孔密度减小、气孔增大的结果一致, 而叶形指数没有显著变化可能与基因型差异或不同节位叶片发育成熟度不同有关。初生代谢物为植物生长、发育和适应环境所必需^[19], 基因组加倍对植物初生代谢有着显著的影响。前人的研究表明, 资阳香橙同源四倍体能够较二倍体积累更多与胁迫相关的初生代谢产物(蔗糖、脯氨酸和 4-氨基丁酸等), 有利于提高机体对逆境胁迫的适应性^[20]。本研究发现, 金柑四倍体较二倍体积累更多的葡萄糖、甘露糖、奎宁酸、精氨酸等初生代谢物, 而其他初生代谢产物较二倍体少, 这可能与基因型有关。

本研究发掘的山金柑四倍体现已陆续开花结果, 其花果性状特征有待进一步观察评价。这些山金柑四倍体为柑橘多倍体抗逆和矮化机理等基础研究提供了难得的种质资源, 同时也可作为亲本与二倍体金柑杂交创制无核三倍体, 还可直接用于观赏果树进行开发利用。

参考文献:

- [1] 邓秀新. 中国柑橘品种 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [2] 郭文武, 叶俊丽, 邓秀新. 新中国果树科学研究 70 年——柑橘 [J]. 果树学报, 2019, 36(10): 1264–1272.
Guo WW, Ye JL, Deng XX. Fruit scientific research in New China in the past 70 years: *Citrus* [J]. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(10): 1264–1272.
- [3] Zhu CQ, Zheng XJ, Huang Y, Ye JL, Chen P, et al. Genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing of an early flowering Mini-Citrus (*Fortunella hindsii*) [J]. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 2199–2210.
- [4] 周锐, 解凯东, 王伟, 彭珺, 谢善鹏, 等. 依据多倍体形态特征快速高效发掘柑橘四倍体 [J]. 园艺学报, 2020, 47(12): 2451–2458.
Zhou R, Xie KD, Wang W, Peng J, Xie SP, et al. Efficient identification of tetraploid plants from seedling populations of apomictic citrus genotypes based on morphological characteristics [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(12): 2451–2458.
- [5] 张斯淇, 徐强, 邓秀新. 无融合生殖与柑橘多胚现象的研究进展 [J]. 植物科学学报, 2014, 32(1): 88–96.
Zhang SQ, Xu Q, Deng XX. Advances in apomixis and polyembryony research in *Citrus* plants [J]. *Plant Science Journal*, 2014, 32(1): 88–96.
- [6] 梁武军, 解凯东, 郭大勇, 谢宗周, 伊华林, 郭文武. 10 个柑橘砧木类型同源四倍体的发掘与 SSR 鉴定 [J]. 果树学报, 2014, 31(1): 1–6.
Liang WJ, Xie KD, Guo DY, Xie ZZ, Yi HL, Guo WW. Spontaneous generation and SSR molecular characterization of autotetraploids in ten citrus rootstocks [J]. *Journal of Fruit Science*, 2014, 31(1): 1–6.
- [7] 彭灌, 李晓妍, 肖璇. 柑橘多胚性砧木枳橙同源四倍体的发掘与 SSR 鉴定 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(4): 1211–1215.
Peng Y, Li XY, Xiao X. Excavation and SSR identification of autotetraploids in citrus polyembryonic rootstock citrange [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(4): 1211–1215.
- [8] 蒋景龙, 阳妮, 李丽, 秦公伟, 邓家锐, 等. 衢州香橙四倍体种质发掘及形态特征性评价 [J]. 果树学报, 2021, 38(5): 655–663.
Jiang JL, Yang N, Li L, Qin GW, Deng JR, et al. Identification and characterization of tetraploids from seedlings of *Citrus junos* ‘Quzhou xiangcheng’ [J]. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(5): 655–663.
- [9] 梁武军, 解凯东, 郭大勇, 谢宗周, 徐强, 等. 柑橘 10 个品种实生后代多倍体的发掘及 SSR 鉴定 [J]. 园艺学报, 2014, 41(3): 409–416.
Liang WJ, Xie KD, Guo DY, Xie ZZ, Xu Q, et al. Sponta-

- neous generation and SSR characterization of polyploids from ten citrus cultivars [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(3): 409–416.
- [10] 解凯东, 彭珺, 袁东亚, 强瑞瑞, 谢善鹏, 等. 以本地早橘和慢橘为母本倍性杂交制柑橘三倍体[J]. 中国农业科学, 2020, 53(23): 4961–4968.
- Xie KD, Peng J, Yuan DY, Qiang RR, Xie SP, et al. Production of citrus triploids based on interploidy crossing with Bendizao and Man tangerines as female parents[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(23): 4961–4968.
- [11] 夏强明. 基于 $2n$ 雌配子有性群体定位柑橘着丝粒及其序列特征分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020: 23.
- [12] Cheng YJ, Guo WW, Yi HL, Pang XM, Deng XX. An efficient protocol for genomic DNA extraction from *Citrus* species[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2003, 21(2): 177–178.
- [13] Xu Q, Chen LL, Ruan XA, Chen DJ, Zhu AD, et al. The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*) [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(1): 59–66.
- [14] Luro FL, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, et al. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 287.
- [15] García-Ior A, Luro F, Navarro L, Ollitrault P. Comparative use of InDel and SSR markers in deciphering the interspecific structure of cultivated citrus genetic diversity: a perspective for genetic association studies [J]. *Mol Genet Genomics*, 2012, 287(1): 77–94.
- [16] Aleza P, Froelicher Y, Schwarz S, Agustí M, Hernández M, et al. Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment [J]. *Ann Bot*, 2011, 108(1): 37–50.
- [17] Cuenca J, Froelicher Y, Aleza P, Juárez J, Navarro L, Ollitrault P. Multilocus half-tetrad analysis and centromere mapping in citrus: evidence of SDR mechanism for $2n$ megagametophyte production and partial chiasma interference in mandarin cv ‘Fortune’ [J]. *Heredity*, 2011, 107(5): 462–470.
- [18] 宋鑫, 谭丰全, 张苗, 蔡元康, 郭大勇, 等. ‘纽荷尔’脐橙与‘尤力克’柠檬种间体细胞杂种的代谢特征分析[J]. 园艺学报, 2019, 46(1): 37–46.
- Song X, Tan FQ, Zhang M, Cai YK, Guo DY, et al. Metabolic characteristics of interspecific allotetraploid somatic hybrid between ‘Newhall’ navel orange and ‘Eureka’ lemon[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(1): 37–46.
- [19] Neilson EH, Goodger JQ, Woodrow IE, Moller BL. Plant chemical defense: at what cost? [J]. *Trends Plant Sci*, 2013, 18(5): 250–258.
- [20] Tan FQ, Tu H, Liang WJ, Long JM, Wu XM, et al. Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement [J]. *BMC Plant Biol*, 2015, 15(1): 89.

(责任编辑: 李惠英)