中国科学: 生命科学 2026 年 第 56 卷 第 3 期: 657 ~ 670
SCIENTIA SINICA Vitae lifecn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS
论 文

柑橘杂交群体的细胞质遗传分析

孙晓峰[1,2,3], 王小涵[1,2,3], 岳红丽[1,2,3], 李明祝[1,2,3], 王福生[1,2,3], 江东[1,2,3], 朱世平[1,2,3*]

1. 西南大学柑桔研究所, 重庆 400712
2. 中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712
3. 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712
* 联系人: E-mail: zhu0411@swu.edu.cn

收稿日期: 2025-08-19; 接受日期: 2025-12-26; 网络版发表日期: 2026-03-13
国家重点研发计划(批准号: 2023YFD1200103)、国家柑橘产业体系(批准号: CARS-Citrus)和中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: SWU-XDJH202308)资助

摘要 柑橘是世界第一大水果, 通常认为其细胞质遵循母系遗传规律. 但最近研究发现, 柑橘杂交后代的细胞质并非完全遗传自母系亲本, 目前柑橘杂交群体的细胞质遗传规律尚不清楚. 本研究从自然群体材料细胞器基因组系统发育关系分析中发现了柑橘细胞器基因组的多样性、核质进化冲突以及柑橘杂交过程中细胞器基因组存在非典型现象. 为进一步探究柑橘杂交群体的细胞质遗传规律, 本研究以宽皮柑橘"CR038"(*Citrus reticulata*)为母本, 枳"Pt005"(*C. trifoliata*)为父本创制了柑橘F_1杂交群体. 利用HiFi数据组装了群体亲本的完整细胞器基因组(mitogenome和chlorogenome), 并利用重测序数据组装了杂交后代的细胞器基因组草图. 通过分析和鉴定杂交群体细胞器基因组的群体结构和重组事件, 将柑橘杂交群体的细胞质遗传方式划分为母系遗传、双亲遗传和类父系遗传3种类型. 本研究基于全基因组分析首次揭示了柑橘杂交群体的细胞质遗传规律, 为柑橘细胞质研究提供了新的视角, 对柑橘遗传育种具有重要意义.

关键词 柑橘, 细胞器基因组, 杂交群体, 核质进化冲突, 细胞质遗传

细胞器基因组是真核生物区别于原核生物的标志性特征, 在植物中通常指线粒体基因组(mtDNA)和叶绿体基因组(cpDNA). Margulis[1]提出mtDNA和cpDNA分别由原始真核细胞(proto-eukaryotic cell)吞噬的α变形菌(Alphaproteobacterium)和蓝藻进化而来. 在多数被子植物和动物中, 细胞器基因组与遵循孟德尔遗传规律的核基因组(nDNA)不同, 前者表现典型的单亲遗传, 通常为母系遗传[2], 如烟草[3]和水稻[4]等模式植物. 这一遗传模式被认为可以减少胞质基因组的重组损伤和有害突变[5], 从进化生物学角度来看, 这种严格的单亲遗传也可能源于核质遗传冲突, 以避免双亲遗传情况下, 两个不同来源的细胞器基因组在合子内共存并竞争复制, 导致"自私基因"(selfish gene)的堆积, 从而引发基因冲突造成对宿主细胞的损伤[6]. 然而, 随着大规模基因组数据的公布与分析, 在许多物种, 尤其是在远缘杂交种中发现细胞器基因组并不完全来自母本[7], 即存在父系泄漏和双亲遗传等非典型模式, 并且在组织细胞水平还观察到个体内细胞器基因组的异

引用格式: 孙晓峰, 王小涵, 岳红丽, 等. 柑橘杂交群体的细胞质遗传分析. 中国科学: 生命科学, 2026, 56: 657–670
Sun X F, Wang X H, Yue H L, et al. Cytoplasmic inheritance analysis of citrus hybrid populations (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2026, 56: 657–670, doi: 10.1360/SSV-2025-0276

© 2026《中国科学》杂志社 www.scichina.com
https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

质性[8]. 在天竺葵(*Pelargonium inquinans* L.)的杂交后代中观测到几乎均等的双亲叶绿体遗传, 造成杂种后代斑驳叶斑[9]; 在葫芦科黄瓜(*Cucumis sativus* L.)等作物中甚至存在罕见的混合单亲遗传模式, 即叶绿体为母系遗传, 线粒体为父系遗传[10]. 哺乳动物杂交过程中也同样存在父系泄漏现象. 有研究表明, 哺乳动物在受精过程中存在识别和破坏父系线粒体的机制, 当该机制被干扰时会产生父系泄漏[11]. 然而植物杂交过程中细胞器基因组是如何进行母系遗传, 或者如何意外进行双亲遗传或父系遗传, 目前尚无明确机制.

细胞器基因组的父系泄漏和父系遗传之间存在本质的生物学差异, 前者指细胞器基因组主要由母系遗传, 父系胞质只贡献很小一部分, 为不同种质之间的细胞质成分交换提供机会; 后者与母系遗传相似, 指来自不同亲本的细胞器基因组没有出现重组行为, 子代的细胞器基因组为父系来源. 这意味着父系泄漏允许打破细胞器基因组核苷酸之间的连锁不平衡, 从而促进有益变异的积累; 同时有助于形成不同的核质互作组合, 以摆脱不利的核质冲突环境, 从而在自然选择下得以保留, 促进物种进化和品种改良.

柑橘为芸香科(Rutaceae)柑橘亚科(Aurantioideae)柑橘属(*Citrus* L.)植物. 中国是柑橘重要起源中心, 拥有丰富的野生、半野生和近缘属等种质资源, 如枳(*C. trifoliata* L.)、金柑(*C. japonica* S.)和九里香(*Murraya paniculata* L.)等. 柑橘属种类繁多, 包括橘、柚、枸橼、柑、橙、枳、金柑等类型[12], 且种间杂交亲和性较好, 因此产生了很多天然杂种, 导致遗传背景十分复杂[13]. 此外, 柑橘属的橘、枳、金柑等大部分种质存在珠心多胚现象, 在杂交过程中由于珠心胚的干扰, 导致合子胚发育提前终止或死亡, 因此杂交育种只能选择少数单胚种质为亲本以提高杂交效率. 然而综合性状优良的单胚品种数量十分有限, 尤其在砧木育种中, 为了最大限度地保持砧木遗传背景一致性和性状稳定性, 不得不选择综合性状优良的多胚品种为亲本进行杂交, 通过胚挽救技术获得较多的杂交后代, 这使得柑橘砧木育种更加困难[14]. 与核基因组相比, 柑橘细胞器基因组种内遗传多样性较低、进化相对缓慢且保守, 常用于柑橘品种起源和亲本溯源研究[15]. 此外, 许多研究表明, 柑橘细胞器基因在影响柑橘发育[16]、果实品质形成[17]和抵御病菌侵害[18]等方面发挥重要作用. 柑橘属植物的细胞器基因组通常认为是母系遗传, 因此常用于自然杂交种质的亲本鉴定[19]. 但目前有研究显示, 自然杂交群体的核基因组与胞质基因组的系统发育拓扑关系不一致, 这可能与mtDNA父系泄漏导致的异质性有关[16]. 研究还发现, 柑橘杂交后代的cpDNA保持严格的母系遗传, 而mtDNA存在父系泄漏[16]. 在原生质体融合获得的胞质杂种中, 也观测到cpDNA和mtDNA遗传自不同亲本的现象[20]. 在柑橘自然杂交种中, 细胞器基因组通常表现出强烈的母系遗传倾向, 但仍存在线粒体父系泄漏现象从而引入少量变异, 使部分个体表现线粒体杂合. 目前关于柑橘细胞器基因组的研究多数是基于自然杂交种质, 且发现非典型遗传行为频率非常低[16,21]. 然而, 在柑橘人工创制的有性杂交群体中, 其细胞器基因组遗传规律如何目前尚无相关报道.

本研究以自然群体种质和有性杂交后代群体为材料, 对柑橘杂交过程中的细胞质遗传规律进行系统分析, 进一步结合基因组分析、分子标记等策略, 鉴定在柑橘杂交后代群体中的细胞质遗传类型和发生频率, 揭示柑橘细胞器基因组遗传规律, 对新品种选育和优化柑橘遗传育种具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 实验材料

以多胚宽皮柑橘“CR038”(*C. reticulata*)为母本, 多胚枳“Pt005”(*C. trifoliata*)为父本进行杂交, 通过分胚培养技术[22]获得柑橘砧木F_1群体. 由于枳的三出复叶性状是显性遗传[23,24], 因此根据子代出现三出复叶性状的叶形鉴定为有性杂种并进行繁殖. 亲本及有性杂交后代均栽植于柑橘砧木评价与育种基地同一区域内, 采集亲本和200株杂交后代进行DNA提取和基因组重测序.

同时还从国家柑橘种质资源圃(重庆)采集了192份来自不同地区的种质资源作为自然群体, 进行DNA提取和测序. 这些种质包括橘、柚、宜昌橙、酸橙、甜橙、香橙、枸橼、柠檬、金柑、枳及其杂交后代. 此外, 还从NCBI数据库下载了4份欧洲枸橼和1份欧洲枳的重测序数据加入自然群体数据库(项目ID: PRJNA414519)[25].

本研究还分别从NCBI和Zenodo平台(https://zenodo.org/records/5826754)收集了已发表的甜橙

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

(NC_037463.1)[26]、柚、橘、枳和金柑完整组装的线粒体基因组[16].

1.2 基因组DNA提取

采集新鲜叶片使用本中心改良的CTAB法提取基因组DNA, 用NanoDrop分光光度计对DNA质量评估后再用0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测完整性. 检测合格的自然群体样本于Illumina Novoseq 6000平台, 有性杂交群体样本于DNBSEQ-T7平台进行全基因组重测序. 亲本“Pt005”和“CR038”幼嫩叶片用于Pacbio SequelⅡ平台生成HiFi长读长数据.

1.3 细胞器基因组组装和注释

亲本的HiFi数据分别输入默认参数的Oatk软件[27]进行线粒体和叶绿体基因组组装. 群体重测序数据经fastp以默认参数质量过滤后, 使用GetOrangelle软件[28]进行自然群体叶绿体基因组组装, 选取完全成环的叶绿体基因组用于后续分析. 杂交群体重测序数据同样使用GetOrangelle组装叶绿体和线粒体基因组草图. 为避免因不同解环位置造成不必要的分析偏差, 完整组装的线性叶绿体基因组首先按照“LSC-IRb-SSC-IRa”顺序进行对齐. 为了确保分析过程中所有基因组注释的一致性, 使用在线工具PMGA(http://www.1kmpg.cn/pmga/)[29]对新组装和下载的线粒体基因组进行注释. 对于叶绿体基因组, 使用CPGAVAS2软件[30]以NCBI数据库的枳叶绿体基因组为参考进行批量注释, CPGView[31]检测叶绿体基因组的注释错误. 分别使用Circos, PMGmap和Chloroplot在线工具[32]对线粒体和叶绿体基因组进行可视化.

1.4 比较基因组分析

Minimap2用于线粒体基因组比对(-ax asm5 - -eqx)[33], 比对结果使用NGenomeSyn进行格式转换和可视化[34]. bcftools用于从minimap2输出的sam文中获取SNP信息[35].

使用Python脚本从叶绿体基因组注释gb文件中提取所有基因ID和对应的CDS序列, 并生成每个样本的基因存在缺失变异(presence-absence variation, PAV), 使用R/heatmap绘制热图. 使用mafft v7.526[36]对各自物种中LSC和SSC单拷贝区间内每个基因对应的CDS序列进行多序列比对, 以输入的第一条CDS序列为参考计算Pi值, 使用R/ggplot2绘制各物种每个保守基因的多样性.

1.5 系统发育分析

分别以剔除了细胞器基因组序列的核基因组与细胞器基因组作为参考基因. 将收集和测序得到的Illumina平台测序数据使用fastp[37]进行质控和过滤, 随后BWA-mem2[38]将clean reads比对至参考基因组, samtools[35]用于格式转换和排序, 然后按照GATK[39]标准流程进行SNP calling, VCF2Dis软件[40]构建系统发育树.

1.6 重组信号检测

根据亲本重测序数据设计InDel引物(长度30~50 bp), 使用在亲本间具有差异条带的引物鉴定杂交后代来源.

使用MISA软件[41]识别父本线粒体和叶绿体基因组中的SSR位点, 参数设置为“1-10 2-6 3-5 4-5 5-5 6-5”. 基于获得的线粒体和叶绿体SSR序列, 利用Primer3[42]设计mtSSR和cpSSR引物. 使用自编脚本检测引物对在父本核基因组以及初步组装的母本细胞器基因组中是否存在重合条带, 最终选择只在父本细胞器中有特异条带的SSR引物. 然后以亲本和子代DNA为模板, 进行PCR扩增和PAGE电泳, 比较亲本和子代个体的带型, 鉴定子代细胞器基因组来源.

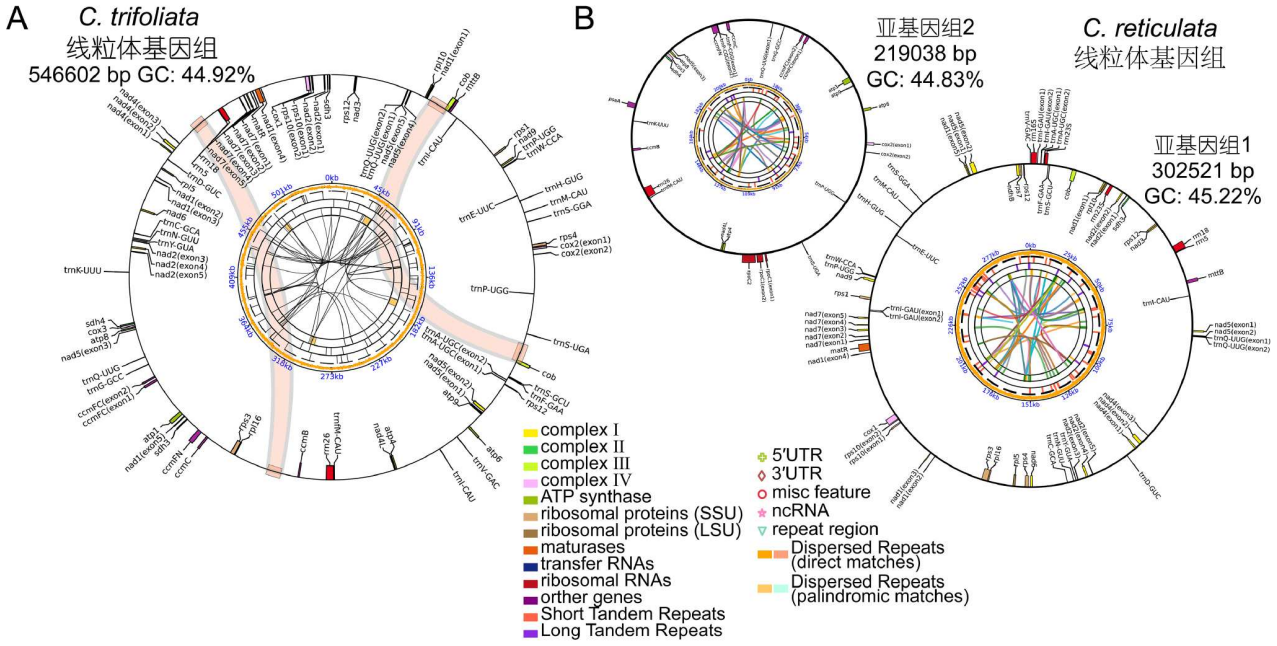
使用Vcftools[43]从经GATK过滤后的vcf文件中提取不同Group对应样本及亲本的变异信息, SimPlot软件[44]以默认参数进行重组事件检测.

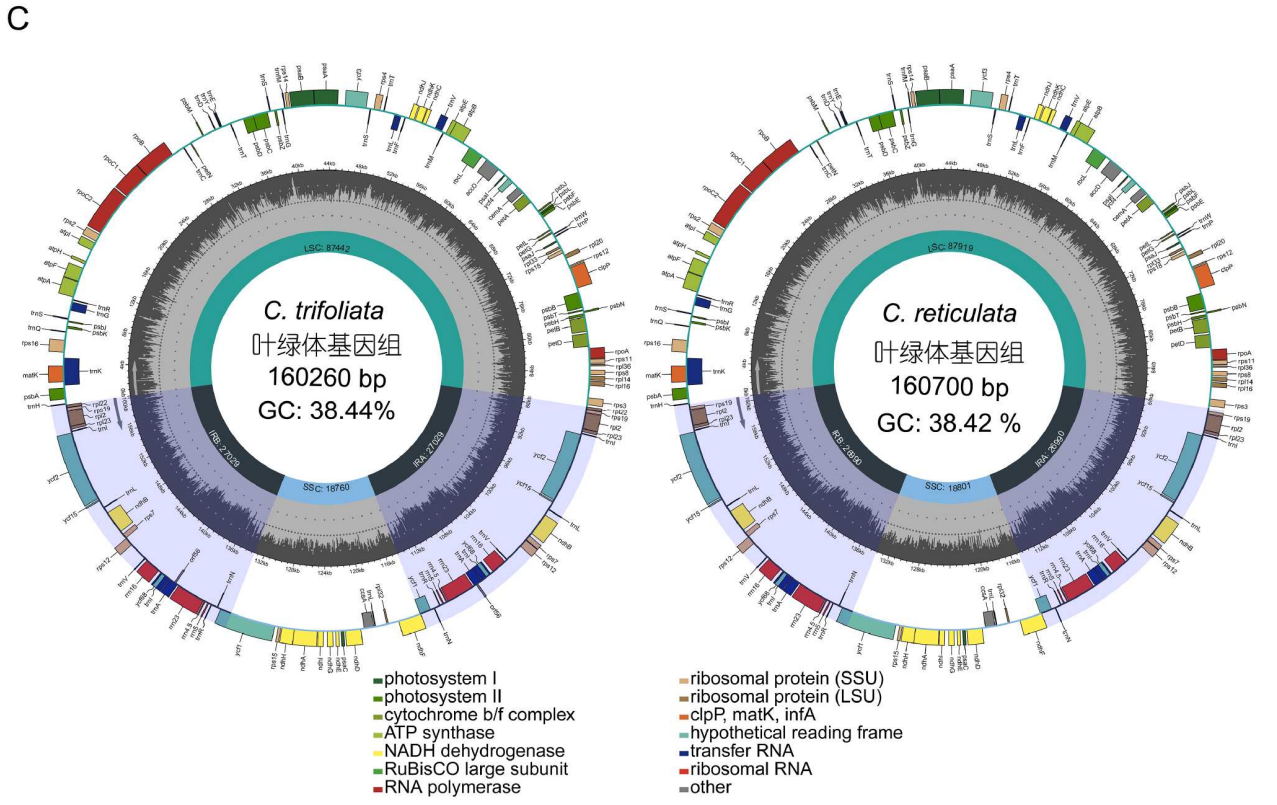
2 结果与分析

2.1 柑橘线粒体和叶绿体基因组特征

分别组装了父本“Pt005”和母本“CR038”完整成环的线粒体和叶绿体基因组(图1A~C). 父本的线粒体基因组为1个完整的环状基因组, 总长546.6 kb, GC含量44.92%; 叶绿体基因组总长160.3 kb, GC含量38.44%. 线粒体基因组共注释到63个基因(包括37个蛋白编码基因、23个tRNA和3个rRNA). 母本的线粒体基因组组装成两个环状亚基因组, 总长521.6 kb, 亚基因组大小分别为302.5和219.0 kb, 亚基因组GC含量较为一致(44.83%和45.22%), 共包含71个基因(包括40个蛋白编

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276





https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

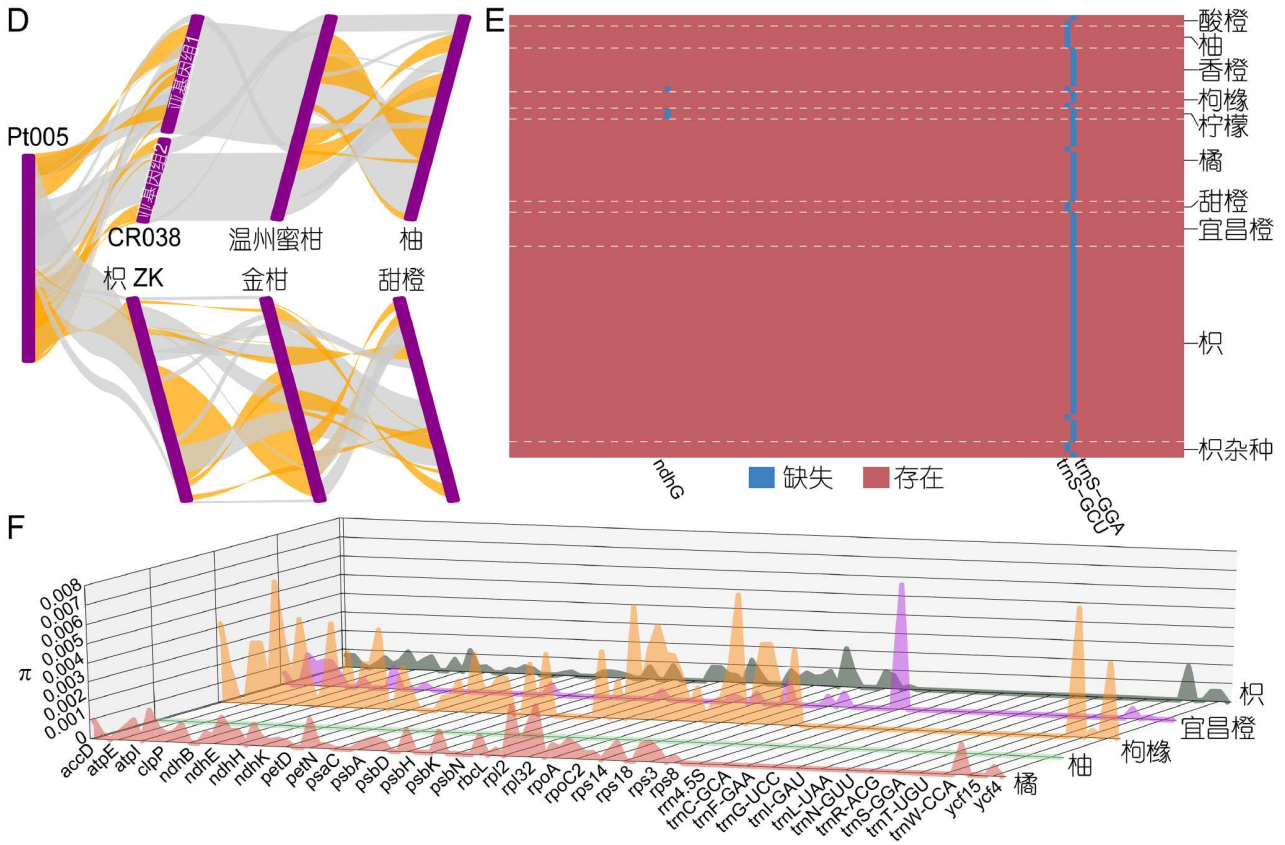


图 1　柑橘细胞器基因组及其多样性. A~C: 父本“Pt005”与母本“CR038”的线粒体基因组(A, B)和叶绿体基因组(C). 每个基因组圈图从外至内分别为正向链和反向链基因、GC含量分布; 线粒体基因组还显示了微卫星重复序列、串联重复序列和分散重复序列的分布, 圆形中心部分为分散重复序列之间的联系; D: 7个柑橘线粒体基因组共线性; E: 柑橘非冗余叶绿体保守基因PAV热图; F: 不同柑橘种质的叶绿体基因结构多样性. *x*轴为基因, 包括tRNA和rRNA基因, *y*轴为种名, *z*轴为多样性π

Figure 1　Citrus organelle genomes and diversity. A–C: Mitochondrial genomes (A, B) and chloroplast genomes (C) of the paternal parent “Pt005” and maternal parent “CR038”. In the circos plots of all genomes, the features from the outermost to the innermost layers are as follows: genes located on the positive strand and negative strand, the distribution of GC content, and mitochondria exhibiting the distribution of microsatellite repeats, tandem repeats, and dispersed repeat sequences. The innermost circle illustrates the connections between dispersed repeat sequences; D: the collinearity of the seven citrus mitochondrial genomes; E: gene PAV heatmap of non-redundant chloroplast genomes including citrus and its hybrids; F: the gene diversity of the chloroplast genomes of different citrus species. The *x*-axis is the gene name, including tRNA and rRNA genes, the *y*-axis is the species name, and the *z*-axis is the diversity value π

码基因、25个tRNA和6个rRNA). 叶绿体基因组总长160.7 kb, GC含量38.42%. 将新组装的两个线粒体基因组比对至已发表的柑橘线粒体基因组, 结果显示“CR038”与温州蜜柑的线粒体基因组具有良好的共线性(图1D), 但“Pt005”和“ZK”之间存在一段约200 kb的倒位, 将“Pt005”的HiFi数据比对至“ZK”基因组上, 在倒位两端均存在reads截断, 证明该倒位是真实存在的. 注释的保守基因数量和与其他基因组的共线性关系表明, 新组装的两个线粒体基因组质量较好. 此外, 与其他柑橘线粒体基因组的比对表明, 柑橘种间线粒体基因组存在大量结构变异(图1D). 根据自然群体的Illumina数据, 构建了父本“Pt005”的线粒体和叶绿体变异图谱, 分别包含47501和3621个SNP.

此外, 从197份自然群体的测序数据中组装了120个完整成环的叶绿体基因组, 通过全基因组序列比对排除序列完全一致的组装, 共获得82个非冗余的叶绿体基因组, 大小160.0~160.7 kb不等. 根据叶绿体基因组保守基因结构注释结果, 绘制了82个柑橘种质的基因PVA热图, 结果表明柑橘叶绿体基因构成高度保守(图1E). 值得注意的是, 在香橙和柠檬中出现*ndhG*基

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

因丢失, 这可能会影响质子泵送和质体醌(PQ)结合[45], 造成其抗氧化应激和耐高温干旱胁迫能力降低[21]. trnS-GGA和trnS-GCU两个丝氨酸转运RNA在种间存在不同的缺失, 这可能是进化过程中受到自然选择的结果. 本研究还统计了叶绿体基因的遗传多样性(图1F), 结果发现, 绝大多数rRNA和tRNA不存在变异, 但宜昌橙的trnC-GCA多样性异常高. 柚是柑橘属三大基本种之一, 其所有基因多样性均为0, 表明其基因结构高度保守, 而另一个基本种枸橼[13], 其基因多样性整体最高.

2.2 柑橘自然群体核质基因组进化冲突

分别以细胞核、线粒体和叶绿体基因组的SNP重建了不包含甜橙等杂交种的自然群体系统发育关系, 结果与Wang等人[16]的结果类似, 即不同种之间的核质基因组拓扑结构不一致(图2A). 就枳种群而言, 以核基因组为参考时其最先被分化出来, 这与其线粒体和叶绿体的进化地位相冲突. 此外, 枸橼种群也同样存在此类明显的进化冲突.

加入了杂交种群的细胞器基因组系统发育树表明, 甜橙、酸橙、柠檬和枳柚的mtDNA和cpDNA明显遗传自柚. 与mtDNA系统发育不同的是, 这些遗传自柚的杂交种群在叶绿体系统发育树中被紧密地聚集在一起(图2B). 本研究还发现, 枳柚杂种(以柚为母本)和一个枳橙杂种出现了异常的细胞器基因组聚集在枳分支上的个体, 推测这可能是由于大片段的父系泄漏所导致. 此外, 柠檬种群(酸橙和枸橼的杂交后代)的胞质基因组也出现类似的结果, 部分个体与柚遗传距离较近, 部分与橘聚集在一支上, 但并未在柠檬母系亲本酸橙(橘柚杂种)中发现这一现象.

2.3 柑橘有性杂交群体细胞器基因组遗传

从人工创制的“CR038”和“Pt005”的有性杂交后代群体中随机采集200株F_1个体进行全基因组重测序, 并分别以父本“Pt005”的线粒体和叶绿体基因组为参考构建了系统发育树. 结果表明, 基于叶绿体基因组可以将子代分为3个Group, 其中Group3(包括a和b)中178个子代和母本聚集在一起, 这与典型的母系遗传一致, 而Group1中的8个子代和Group2中的14个子代与父本遗传距离更近. 基于线粒体基因组将子代分为4个Group, 其中Group3b中80个子代遗传距离位于双亲之间但更靠近母本, 另外的Group1, Group2和Group3a(分别有8, 14和98个个体)和叶绿体的发育关系保持一致. 据此本研究认为, 父系泄漏事件确实存在于柑橘杂交过程, 且在线粒体中更容易发生(图3A).

为了确定发生严重泄漏事件的Group1和Group2个体是否严格属于“CR038”和“Pt005”杂交后代, 本研究根据两个亲本的全基因组数据开发了InDel标记, 结果显示在所有属于Group1和Group2的个体中均同时存在双亲特异条带(图3B), 说明它们确实是这两个亲本的杂交后代. 由于全基因组重测序以及比对过程中因重复序列的存在可能会引入错误, 为了验证基于叶绿体和线粒体基因组系统发育分析结果的可靠性, 分别利用“Pt005”的线粒体和叶绿体基因组开发了父本特异SSR标记. 结果显示, 8个F_1个体(Group1)的带型与父本相同, 但Group2内个体与母本带型一致(图3C和D). 为了进一步验证Gourp2的个体是否含有父本的细胞器基因组信息, 又设计了父本特异标记, 通过Sanger测序和电泳分别检测到与父本一致的基因型(图3E和F). 分子标记的结果同样支持基于细胞器基因组系统发育关系的正确性, 即Group1个体细胞器基因组存在明显的父系泄漏, 且比Group2泄漏区域更多.

利用SimPlot软件从vcf文件中检测杂交群体的线粒体和叶绿体基因组是否存在重组信号. 根据系统发育树划分的Group提取对应样本组的变异信息, 比对结果表明, 线粒体和叶绿体分别聚类的Group1子代与父本基因型保持高度一致, Group3a子代基因型与母本高度相似(图4A和B). 线粒体划分出的独特的Group3b子代则表现出确切的重组迹象, 大多数区域的基因型与母本一致, 但能够明显分辨出重组断点, 即父本泄漏区域. 值得注意的是, 在Group2子代中, 其与父母本的基因型相似度曲线表现非常混乱, 且存在一些区域与亲本的相似度接近0, 因此本研究推测: Group2可能是在杂交过程中由于严重的核质冲突或父本细胞器清除系统的致命漏洞[11]所致.

此外, 基于从头组装的杂交后代细胞器基因组草图, 本研究检视了所有可能发生重组或泄漏事件的区域(图4C). 通过基因组比对, 在亲本间共鉴定到118968个(叶绿体697, 约占0.43%基因组区域; 线粒体118271, 约占22.68%基因组区域)差异SNP位点, 并统计了Group1和Group2中每个样本的泄漏区. 结果表明, 与Group1相比, Group2个体携带的共有父本特异基因型

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

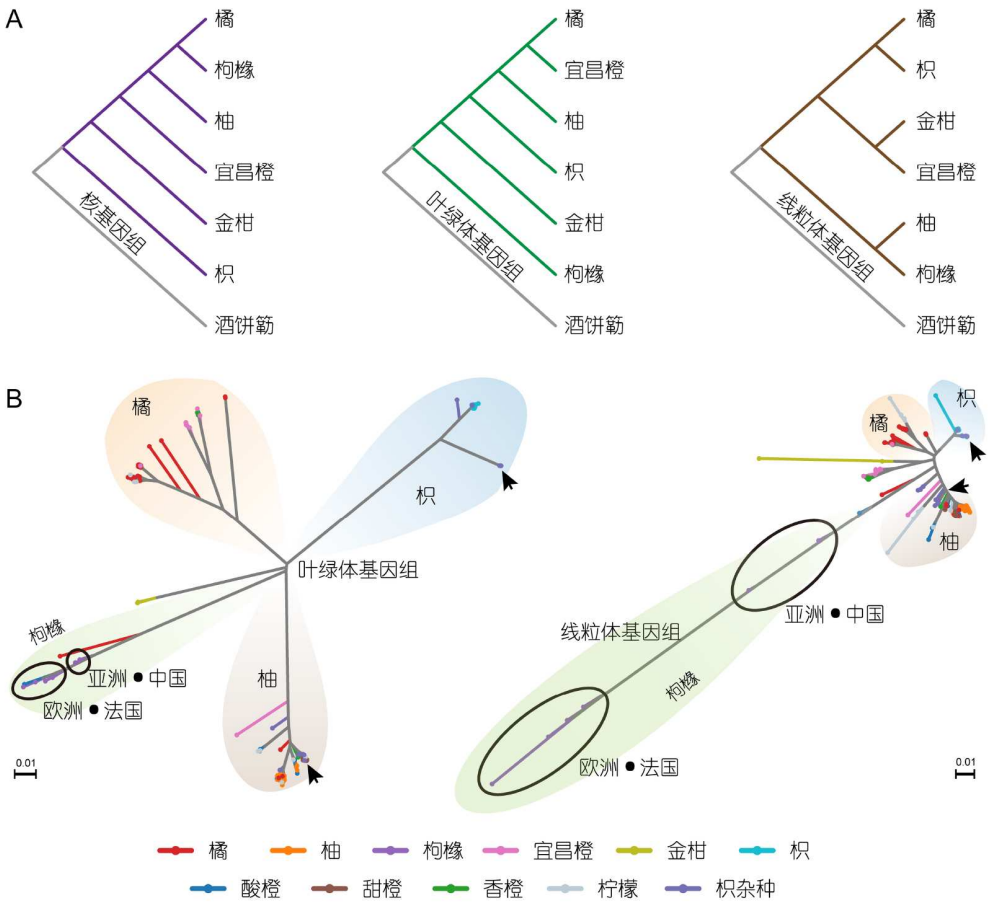


图 2　柑橘演化过程中的核质进化冲突与细胞器基因组系统发育. A: 以酒饼簕为外群构建的柑橘属6个种的核基因组(左)、叶绿体基因组(中)和线粒体基因组(右)系统发育; B: 加入5个杂交种群的叶绿体(左)和线粒体(右)系统发育树, 不同颜色代表不同的种群类型. 黑色箭头表示枳柚和枳橙的发育树位置

Figure 2　The nuclear-cytoplasmic evolution divergence during citrus evolution and cytoplasmic genome phylogeny. A: The phylogenetic relationships based on nuclear genome (left), chloroplast genome (middle), and mitochondrial genome (right) from six citrus species constructed with *Atalantia buxifolia* as the outgroup; B: the chloroplast (left) and mitochondrial (right) phylogenetic tree including five hybrid populations. Different colors represent different populations. The black arrows indicate the phylogenetic positions of citrumelos and citranges

数量显著减少(cpDNA 229个, 占Group1的33.24%; mtDNA 16842个, 占40.73%). Group1共同拥有689个叶绿体父本特异基因型, 占亲本差异位点数的98.85%, 其中的3个个体拥有与父本完全相同的基因型(图4D); Group1共同拥有41352个线粒体父本特异基因型, 占亲本差异位点数量的34.96%, 每个个体携带的特异基因型比例范围为34.96%~43.45%(图4D), 而Group2携带的共有基因型比例显著减少, 表明基因型泄漏在细胞器基因组上发生的位置并非完全固定. 但由于测序数据的限制, 子代线粒体基因组组装质量多数较差, 导致泄漏区域统计并不完整.

3　讨论

3.1　柑橘线粒体和叶绿体基因组的多样性

本研究组装了两个柑橘个体("Pt005"和"CR038")的完整细胞器基因组和82个非冗余的柑橘完整叶绿体基因组, 并以"Pt005"细胞器基因组为参考检测了197份自然群体种质的变异信息, 其中线粒体基因组SNP密度约为86.9个/kb, 远高于Wang等人[16]利用山金柑基因组检测的19.3个/kb, 这可能与所使用的参考基因组和群体组成不同有关.

通过比较不同柑橘种质的叶绿体基因组发现,

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

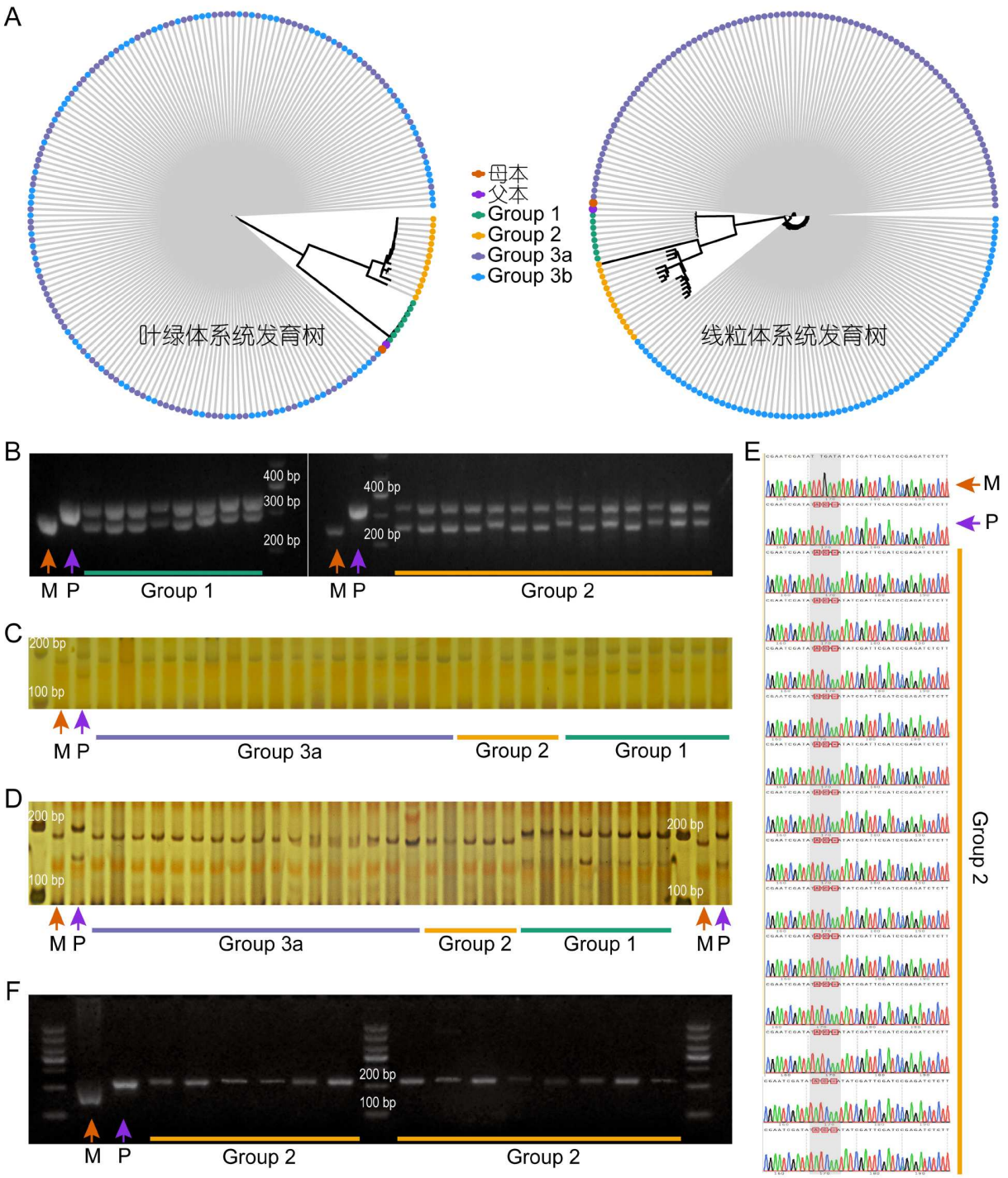


图 3 柑橘F_1杂交群体父系泄露. A: 杂交群体叶绿体(左)和线粒体(右)系统发育树. 不同颜色代表亲本和划分的不同子代类型; B: 核基因组InDel标记; C: 叶绿体SSR标记; D: 线粒体SSR标记. E: Group2叶绿体标记Sanger测序峰图; F: Group2线粒体InDel标记. M和P分别表示母本和父本

Figure 3 Paternal leakage of the citrus F_1 hybrid population. A: The chloroplast (left) and mitochondrial (right) phylogenetic tree of the hybrid population. Different colors represent the parents and their different offspring groups; B: nuclear InDel markers; C: chloroplast SSR markers; D: mitochondrial SSR markers; E: Sanger sequencing peak of chloroplast marker for Group2; F: mitochondrial InDel markers for Group2. M and P represent the maternal parent and paternal parent, respectively

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

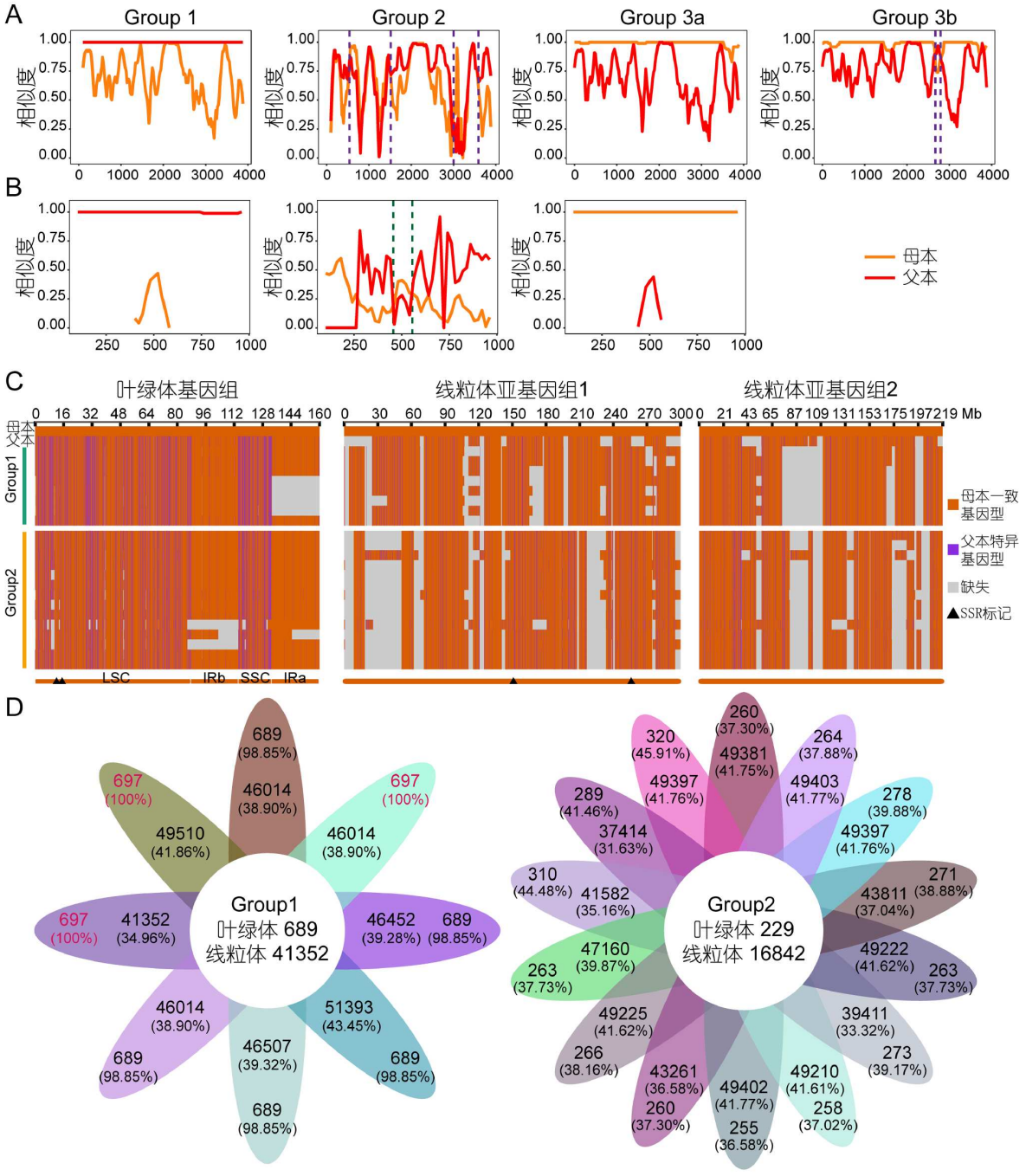


图 4　柑橘F_1杂交后代不同Group胞质基因组的重组检测. A: 以线粒体基因组划分的4个Group重组检测; B: 以叶绿体基因组划分的3个Group重组检测. 不同颜色代表不同亲本, 折线相交处为可能的重组断点, 用虚线标记; C: 基于子代细胞器基因组草图的基因型分布; D: Group1和Group2中个体泄漏基因型数量. 每个花瓣代表一个个体, 花瓣外侧数字表示叶绿体基因型泄漏数量, 内侧数字表示线粒体基因型泄露数量, 中心数字表示不同Group内共有的泄漏基因型数量

Figure 4　The recombination detection of different groups from the citrus F_1 hybrid offspring. A: The recombination detection of the four groups based on the mitochondrial genome; B: the recombination detection of the three groups based on the chloroplast genome. Different colors represent different parents, and the intersection of broken lines is the possible recombination breakpoints, which are marked as dotted lines; C: genotype distribution based on descendant organelle genome sketches; D: leaked genotypes number of Group1 and Group2 in organelle genomes. Each petal represents each offspring, the outer ring number of each petal indicates the number of leaked genotypes in chloroplasts, the inner one indicates that in mitochondria, and numbers in the center indicate the shared leaked genotype number of chloroplasts and mitochondria

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

*ndhG*基因在一些杂交个体，如柠檬中存在罕见缺失. 此外, 两个丝氨酸tRNA在不同柑橘中存在不同的选择性缺失, 该基因位点可用于柑橘种质鉴定. 橘、柚和枸橼，被认为是柑橘属的3个基本种，它们的核基因组多样性均处于极低水平, 通常来说, 其线粒体和叶绿体基因组也应高度保守, 但本研究的结果表明, 3份枸橼(两份欧洲种质[25]和一份云南种质)叶绿体基因组的保守基因存在更高的多样性，而橘和柚的多样性保持在较低水平. 杨晓明[46]通过SSR标记将36份枸橼种质划分为两个不同地域的类群，因此本研究推测枸橼的多样性更高可能是由于种质来源不同所导致.

来自核质的3个拓扑结构树更加直观地体现了柑橘核质系统发育的不一致, Wang等人[16]推测这一结果是低频父系泄漏导致的线粒体变异，但并未揭示叶绿体的进化水平差异. 本研究除了在已报道的柠檬中发现父系泄漏现象外，在枳柚、枳橙等杂种中同样发现存在不一致的遗传地位，因此我们推测：在柑橘杂交过程中由于亲本间核基因组和细胞器基因组均存在较大差异且mtDNA存在更多结构变异[12,25,47]，父系泄漏更容易发生(图5A).

3.2 柑橘杂交群体细胞质遗传类型

本研究利用人工创制的柑橘F_1杂交群体的全基因组重测序数据分别构建了线粒体和叶绿体系统发育树, 结果表明, 杂交子代的细胞器基因组不完全来源于母本. 子代细胞器基因组草图与双亲基因型比对结果显示，每个Group内个体携带的父本特异基因型数量近似(图4D). Group1的8个子代与父本叶绿体基因组高度相似，其中3个拥有与父本完全一致的基因型，而在Group2中，仅包含Group1中约1/3的泄露区域(以携带的父本特异基因型为参考), 说明在柑橘杂交过程中双亲的细胞器基因组同样出现了非典型的基因组重组事件. 整合系统发育树、mtDNA和cpDNA重组检测结果(图4)，将本群体出现的细胞器基因组遗传划分为3个类型——母系遗传、双亲遗传和类父系遗传(图5B). F_1子代中89%个体的cpDNA符合经典细胞质遗传类型，mtDNA虽有少数父系泄漏(约占子代数量的40%), 但基本符合经典单亲遗传，将其归为母系遗传；7%个体mtDNA和cpDNA基因型与亲本差异较大，子代基因组同时存在母本和父本双方基因型，推测其发生了重组行为，将其归为双亲遗传；另有4%个体mtDNA和cpDNA基因型与父本高度一致，但并未有确切证据证明父本的细胞器基因组完全替代母本进入子代细胞质, 因此将其归为类父系遗传.

根据以上结果，F_1代89%个体的cpDNA基因型与母本完全一致，高于其mtDNA与母本一致的比例(49%)，这表明mtDNA比cpDNA更容易发生父系泄漏，这就可以很好地解释为何此前的研究未能在柑橘有性杂交个体叶绿体中发现父系泄漏等特异遗传类型[16,48]. 此外，我们推测柑橘中cpDNA，mtDNA以及nDNA三者可能存在互相独立的遗传重组方式. Sodmergen[49]在大麦中通过DNA免疫电子显微技术已经发现, 生殖细胞向花粉转变过程中mtDNA和cpDNA在不同的时期被清除, 即两者之间互相独立.

双亲遗传是我们在本群体中发现的一种新的细胞质遗传模式. 虽然早在2002年就有学者在柑橘杂种中提出“mimics biparental inheritance of mtDNA”的概念[48]，但该结论是通过线粒体基因特异探针进行检测的, 结果表明在后代中仅检测到低丰度的信号, 其使用的探针基因位于NUMTs区间，因此我们认为这可能是父系泄漏或者是nDNA产生的信号干扰. 同时该研究也推测mtDNA片段向nDNA中的水平基因转移(HGT)事件可能是造成杂交后代出现父系特异信号的原因. 本研究结果通过群体细胞器基因组组装、比对和重组检测，排除了NUMTs和NUPTs产生影响的可能性，避免了HGT产生的检测误差，但我们并不否认HGT通过介导核质信号联系，进而影响细胞质遗传模式改变的可能性.

柑橘杂交出现不同细胞质遗传类型可能与父系mtDNA特异识别和清除受阻相关. 黄瓜是典型的mtDNA父系遗传类型植物，研究表明，当线粒体靶向核酸内切酶*MTI1*基因突变会导致mtDNA由父系遗传转变为双亲遗传[10]. 对线虫的研究同样表明，在胚胎发育早期，父系mtDNA会迅速被自噬体包裹并降解，如果出现自噬缺陷，或者父本mtDNA自身结构不能被自噬体识别则会逃避被降解的命运[50]. 以上结果表明，在不同的生物中均存在一套特异性识别mtDNA来源的系统，以避免在子代同时出现不同亲本的mtDNA，而柑橘出现非典型细胞质遗传可能与该系统有关.

本研究提出的类父系遗传类型，仅在基因组层面进行了研究. 虽然cpSSR和mtSSR标记均检测到父本片段，但关于Group1中的8个F_1个体的cpDNA和

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

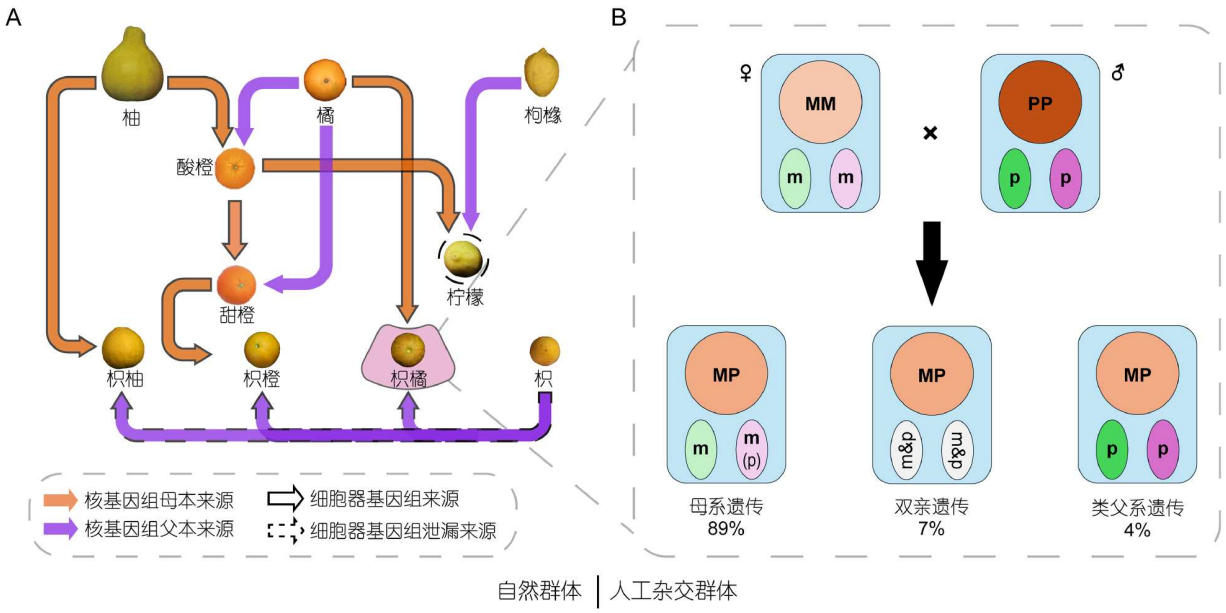


图 5　柑橘杂交群体细胞质遗传类型. A: 柑橘自然杂交群体细胞器基因组的父系泄漏; B: 柑橘人工杂交群体细胞器基因组遗传类型. 大圆形表示细胞核, 绿色和紫色椭圆形分别表示叶绿体和线粒体, M/m和P/p分别表示母本和父本携带的基因型

Figure 5　The cytoplasmic inheritance types in the citrus hybrid population. A: Paternal leakage of organelles in natural citrus hybrid population; B: the cytoplasmic inheritance types in artificial citrus hybrid population. The big circle represents the nucleus, the green and purple ovals represent chloroplasts and mitochondria, respectively. M/m and P/p represent the genotype of the maternal and paternal parent, respectively

mtDNA具体遗传来源和遗传方式(是重组导致基因型与父本相似, 或是完全由父本遗传而来), 后续需要开发特异荧光探针, 在细胞学水平检测花粉与卵细胞形成和受精卵发育过程中cpDNA和mtDNA是否存在, 并区分其确切来源才能确定遗传类型.

4　总结

本研究分别以柑橘自然群体和有性杂交群体材料为对象, 基于系统发育关系、特异SSR分子标记检验、重组断点检测和杂交群体细胞器基因组比对等策略, 证明柑橘杂交过程中mtDNA和cpDNA存在非典型遗传方式, 并将有性杂交群体的细胞质遗传分为3种不同的类型. 通过重组断点检测和基因组比对, 初步确定本杂交群体mtDNA的泄漏频率远高于cpDNA. 此外, 本研究提供了完整的柑橘线粒体和叶绿体变异图谱, 将有助于柑橘细胞质遗传机制的深入解析.

参考文献

1　Margulis L. Origin of Eukaryotic Cells: Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian Earth. New Haven: Yale University Press, 1970
2　Birky Jr C W. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. Annu Rev Genet, 2001, 35: 125–148
3　Wang S, Gao J, Chao H, et al. Comparative chloroplast genomes of *Nicotiana* species (Solanaceae): insights into the genetic variation, phylogenetic relationship, and polyploid speciation. Front Plant Sci, 2022, 13: 899252
4　Tong W, Kim T S, Park Y J. Rice chloroplast genome variation architecture and phylogenetic dissection in diverse *Oryza* species assessed by whole-genome resequencing. Rice, 2016, 9: 57
5　Sloan D B, Warren J M, Williams A M, et al. Cytonuclear integration and co-evolution. Nat Rev Genet, 2018, 19: 635–648
6　Murlas Cosmides L, Tooby J. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. J Theor Biol, 1981, 89: 83–129
7　Chung K P, Gonzalez-Duran E, Ruf S, et al. Control of plastid inheritance by environmental and genetic factors. Nat Plants, 2023, 9: 68–80

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

8 Levsen N, Bergero R, Charlesworth D, et al. Frequent, geographically structured heteroplasmy in the mitochondria of a flowering plant, ribwort plantain (*Plantago lanceolata*). Heredity, 2016, 117: 1–7
9 Weihe A, Apitz J, Pohlheim F, et al. Biparental inheritance of plastidial and mitochondrial DNA and hybrid variegation in *Pelargonium*. Mol Genet Genomics, 2009, 282: 587–593
10 Shen J, Lyu X, Xu X, et al. A nuclear-encoded endonuclease governs the paternal transmission of mitochondria in *Cucumis* plants. Nat Commun, 2025, 16: 4266
11 Zhang H, Zhu Y, Xue D. Moderate embryonic delay of paternal mitochondrial elimination impairs mating and cognition and alters behaviors of adult animals. Sci Adv, 2024, 10: eadp8351
12 Huang Y, He J, Xu Y, et al. Pangenome analysis provides insight into the evolution of the orange subfamily and a key gene for citric acid accumulation in citrus fruits. Nat Genet, 2023, 55: 1964–1975
13 Xu Q, Huang Y, Deng X X. The definition, classification and evolution of citrus based on whole genome sequence information (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 525–536 [徐强, 黄跃, 邓秀新. 基于全基因组信息的“柑”“橘”定义、分类与演化. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 525–536]
14 Xie K D, Wang X P, Wang H Q, et al. High efficient and extensive production of triploid citrus plants by crossing polyembryonic diploids with tetraploids (in Chinese). Acta Hortic Sin, 2014, 41: 613–620 [解凯东, 王晓培, 王惠芹, 等. 以柑橘多胚性二倍体母本倍性杂交培育三倍体. 园艺学报, 2014, 41: 613–620]
15 Yang C, Gong G Z, Peng Z C, et al. Genetic relationship among *Citrus* and its relatives as revealed by cpInDel and cpSSR marker (in Chinese). Sci Agric Sin, 2022, 55: 3210–3223 [杨程, 龚桂芝, 彭祝春, 等. 基于cpInDel标记和cpSSR标记的柑橘属及近缘属植物亲缘关系. 中国农业科学, 2022, 55: 3210–3223]
16 Wang N, Li C, Kuang L, et al. Pan-mitogenomics reveals the genetic basis of cytonuclear conflicts in citrus hybridization, domestication, and diversification. Proc Natl Acad Sci USA, 2022, 119: e2206076119
17 Li X, Chai Y, Yang H, et al. Isolation and comparative proteomic analysis of mitochondria from the pulp of ripening citrus fruit. Hortic Res, 2021, 8: 31
18 Chen Y, Zhao J, Wang J, et al. RepA protein of citrus chlorotic dwarf-associated virus impairs perinuclear chloroplast clustering induced by lemon chloroplast malate dehydrogenase. Mol Plant Pathol, 2025, 26: e70133
19 Liu S, Xu Y, Yang K, et al. Origin and *de novo* domestication of sweet orange. Nat Genet, 2025, 57: 754–762
20 Xie K D, Fang Y N, Wu X M, et al. A new seedless pummelo cultivar ‘Huayou 2’ (in Chinese). Acta Hortic Sin, 2020, 47: 2945–2946 [解凯东, 方燕妮, 伍小萌, 等. 无核柚新品种‘华柚2号’. 园艺学报, 2020, 47: 2945–2946]
21 Carbonell-Caballero J, Alonso R, Ibañez V, et al. A phylogenetic analysis of 34 chloroplast genomes elucidates the relationships between wild and domestic species within the genus *Citrus*. Mol Biol Evol, 2015, 32: 2015–2035
22 Zhu S, Wu B, Ma Y, et al. Obtaining citrus hybrids by *in vitro* culture of embryos from mature seeds and early identification of hybrid seedlings by allele-specific PCR. Sci Hortic, 2013, 161: 300–305
23 Tan M, Song J, Deng X. Production of two mandarin × trifoliate orange hybrid populations via embryo rescue with verification by SSR analysis. Euphytica, 2007, 157: 155–160
24 Dass H C, Singh A K, Vijayakumari N. Rootstock breeding—variations for leaf morphology in citrus rootstock hybrid progeny. Indian J Hortic, 1998, 55: 16–19
25 Wu G A, Terol J, Ibanez V, et al. Genomics of the origin and evolution of *Citrus*. Nature, 2018, 554: 311–316
26 Wu B, Yu Q, Deng Z, et al. A chromosome-level phased genome enabling allele-level studies in sweet orange: a case study on citrus Huanglongbing tolerance. Hortic Res, 2023, 10: uhac247
27 Zhou C, Brown M, Blaxter M, et al. Oatk: a *de novo* assembly tool for complex plant organelle genomes. Genome Biol, 2024, 26: 235
28 Jin J J, Yu W B, Yang J B, et al. GetOrganelle: a fast and versatile toolkit for accurate *de novo* assembly of organelle genomes. Genome Biol, 2020, 21: 241
29 Li J, Ni Y, Lu Q, et al. PMGA: a plant mitochondrial genome annotator. Plant Commun, 2025, 6: 101191
30 Shi L, Chen H, Jiang M, et al. CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer. Nucleic Acids Res, 2019, 47: W65–W73
31 Liu S, Ni Y, Li J, et al. CPGView: a package for visualizing detailed chloroplast genome structures. Mol Ecol Resour, 2023, 23: 694–704
32 Zheng S, Poczai P, Hyvönen J, et al. Chloroplot: an online program for the versatile plotting of organelle genomes. Front Genet, 2020, 11: 576124

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

33 Li H, Birol I. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. Bioinformatics, 2018, 34: 3094–3100

34 He W, Yang J, Jing Y, et al. NGenomeSyn: an easy-to-use and flexible tool for publication-ready visualization of syntenic relationships across multiple genomes. Bioinformatics, 2023, 39: btad121

35 Danecek P, Bonfield J K, Liddle J, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. GigaScience, 2021, 10: giab008

36 Rozewicki J, Li S, Amada K M, et al. MAFFT-DASH: integrated protein sequence and structural alignment. Nucleic Acids Res, 2019, 47: W5–W10

37 Chen S, Zhou Y, Chen Y, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics, 2018, 34: i884–i890

38 Vasimuddin M Misra S, Li H, et al. Efficient architecture-aware acceleration of BWA-MEM for multicore systems. In: 2019 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS). Rio de Janeiro. 2019. New York: IEEE, 2019. 314–324

39 DePristo M A, Banks E, Poplin R, et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. Nat Genet, 2011, 43: 491–498

40 Xu L, He W, Tai S, et al. VCF2Dis: an ultra-fast and efficient tool to calculate pairwise genetic distance and construct population phylogeny from VCF files. GigaScience, 2025, 14: giaf032

41 Beier S, Thiel T, Münch T, et al. MISA-web: a web server for microsatellite prediction. Bioinformatics, 2017, 33: 2583–2585

42 Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, et al. Primer3—new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res, 2012, 40: e115

43 Danecek P, Auton A, Abecasis G, et al. The variant call format and VCFtools. Bioinformatics, 2011, 27: 2156–2158

44 Lole K S, Bollinger R C, Paranjape R S, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. J Virol, 1999, 73: 152–160

45 Peng L, Yamamoto H, Shikanai T. Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. Biochim Biophys Acta, 2011, 1807: 945–953

46 Yang X M. The phylogenomic of aurantioideae and phylogeography of wild citron (*Citrus medica*) and ichang papeda (*Citrus ichangensis*) (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017 [杨晓明. 柑橘亚科植物系统发育基因组学及野生枸橼、宜昌橙谱系地理学研究. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2017]

47 Hou T, Xu Y, Dong Y, et al. The cytonuclear interactions during grapevine domestication. J Integr Plant Biol, 2025, 67: 2686–2703

48 Moreira C D, Gmitter Jr F G, Grosser J W, et al. Inheritance of organelle DNA sequences in a *Citrus-Poncirus* intergeneric cross. J Heredity, 2002, 93: 174–178

49 Sodmergen Q Z. Cytological evidence for preservation of mitochondrial and plastid DNA in the mature generative cells of *Chlorophytum* spp. (Liliaceae). Protoplasma, 2003, 221: 211–216

50 Wang Y, Zhang Y, Chen L, et al. Kinetics and specificity of paternal mitochondrial elimination in *Caenorhabditis elegans*. Nat Commun, 2016, 7: 12569

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276

Cytoplasmic inheritance analysis of citrus hybrid populations

SUN XiaoFeng[1,2,3], WANG XiaoHan[1,2,3], YUE HongLi[1,2,3], LI MingZhu[1,2,3], WANG FuSheng[1,2,3], JIANG Dong[1,2,3] & ZHU ShiPing[1,2,3*]

[1] *Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China*
[2] *Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China*
[3] *National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China*
* *Corresponding author, E-mail: zhu0411@swu.edu.cn*

Citrus is one of the most essential fruit crops worldwide, and it is generally considered that its cytoplasmic information is inherited from the maternal parent. Recent research has indicated that not all cytoplasmic genomes of citrus hybrids are derived from their female parent. However, the cytoplasmic inheritance pattern in citrus hybridization remains largely unexplored. In this study, we characterized the organelle genome diversity, nuclear-cytoplasmic evolutionary divergence and atypical genetic events in organelle genomes during hybridization in citrus by analyzing the phylogenetic relationship of organelle genomes in a natural citrus population. An F_1 population was created from the cross with "CR038" (*Citrus reticulata*) as the maternal parent and "Pt005" (*C. trifoliata*) as the paternal parent. The complete organellar genomes (mitochondria and chloroplasts) of the parents were assembled using HiFi reads, and the draft organellar genomes of the offspring were also assembled using resequencing data. According to the analysis and identification results on phylogenetic relationship, comparative genome and recombination events, the cytoplasmic inheritance pattern of citrus could be classified into three types: maternal inheritance, biparental inheritance, and pseudo-paternal inheritance. This study is the first to reveal the cytoplasmic inheritance pattern in citrus based on the whole genome sequence data, which provides a novel insight into the genetic breeding in citrus.

citrus, organellar genome, hybrid population, nuclear-cytoplasmic conflict, cytoplasmic inheritance

doi: 10.1360/SSV-2025-0276

https://www.sciengine.com/doi/10.1360/SSV-2025-0276