

桃的花型性状相关 SNP 位点 挖掘与候选基因分析

孟 歌, 朱更瑞, 方伟超, 陈昌文, 王新卫, 王力荣, 曹 珂

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要: 桃的花型分为铃型和蔷薇型, 铃型花朵小且边缘卷曲, 蔷薇型花朵大且完全展开, 蔷薇型重瓣花是观赏桃育种者追求的主要目标性状之一。目前, 与桃铃型/蔷薇型花型性状连锁的分子标记研究较少, 限制了桃的花型性状分子标记辅助育种进程。为了鉴定与桃花型关联的单核苷酸多态性 (SNP, single-nucleotide polymorphisms) 位点并挖掘候选基因, 本研究通过对 199 份桃品种进行重测序, 获得了 1042687 个 SNP。采用一般线性模型对桃花型性状进行全基因组关联分析 (GWAS, genome wide association study), 获得 7 个与目标性状显著关联的位点, 其中 2 个位于 2 号染色体, 5 个位于 8 号染色体。进而对 8 号染色体的 3 个 SNP 进行竞争性等位基因特异性 PCR (KASP, kompetitive allele-specific PCR) 分型, 在 5 个 F_1 群体中进行进一步验证。 χ^2 验证结果表明: Chr.8: 14484624 bp 与桃花型性状显著关联。5 个 F_1 群体基因型和表型的对应关系表明, Chr.8: 14484624 bp 准确率最高, 为 93.46%。组织特异表达结果显示, 在上述定位区间内的 6 个注释基因中, *Prupe.8G118100* 在花中特异表达, 将其视为桃花型性状的候选基因。本研究鉴定了桃铃型/蔷薇型花型性状关联位点, 并对候选基因进行了筛选, 以上结果可进一步转化为分子标记, 用于观赏桃分子标记辅助选择育种。

关键词: 观赏桃育种; 重测序; 单核苷酸多态性; 候选基因

Genome-wide Association Study Identified SNP Alleles and Candidate Genes for Flower Shape Trait in Peach (*Prunus persica*)

MENG Ge, ZHU Geng-rui, FANG Wei-chao, CHEN Chang-wen, WANG Xin-wei, WANG Li-rong, CAO Ke
(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009)

Abstract: The petals of blooming peach flowers can be large and showy, or small with curved edges (non-showy), while showy and double flower is desirable in terms of breeding ornamental peaches. Since few studies are conducted to detect the molecular markers linking with the non-showy/showy flower trait, that restricts the molecular breeding for this trait in peach. In the present study, by taking use of re-sequencing data generated from 199 peach varieties and 1042687 single-nucleotide polymorphisms (SNPs), we performed the genome-wide association scanning (GWAS) for the non-showy/showy flower trait. Using a general linear model (GLM), we thereby identified seven signals that were associated with the flower trait on Chr. 2 and Chr. 8. Three SNPs on Chr. 8 were validated using kompetitive allele-specific PCR (KASP) genotyping in five F_1 populations. The SNP on Chr. 8 at 14484624 bp was highly associated with the targeted trait based on the χ^2 test. Based on the correlation of the genotyping and phenotypic results of five F_1 populations, the highest accuracy was 93.46% at Chr. 8: 14484624 bp. RNA-seq analysis of different tissues and gene annotation enabled identifying one gene (*Prupe.*

收稿日期: 2021-08-19 修回日期: 2021-09-15 网络出版日期: 2021-10-08

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210819003>

第一作者研究方向为桃种质资源研究与新品种培育, E-mail: gemengcau@hotmail.com

通信作者: 曹珂, 研究方向为桃种质资源研究与新品种培育, E-mail: wyandck@126.com

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD1000200); 中国农业科学院创新工程项目 (Grant CAAS-ASTIP-2017-ZFRI-01)

Foundation projects: National Key R&D Program of China (2019YFD1000200), Agricultural Science and Technology Innovation Program (Grant CAAS-ASTIP-2017-ZFRI-01)

8G118100) that showed tissue-specific expression in flower. Collectively, this work identified one SNP which is highly associated with the non-showy/showy flower trait, and one candidate gene, which could facilitate marker-assisted selection for ornamental peaches.

Key words: ornamental peach breeding; re-sequencing; single nucleotide polymorphism; candidate gene

桃 (*Prunus persica* L.) 属于蔷薇科 (Rosaceae) 落叶小乔木, 是一种重要的经济果树。根据应用价值可以将桃划分为以食用果实为主的果桃及以观花为主的观赏桃^[1]。观赏桃以花型各异、花色众多、花期长、色泽艳丽等特点深受人们喜爱, 在城市景观美化、生态环境改善、风景名胜建设、观光农业中备受重视。目前对于观赏桃的研究主要集中在新品种选育、种质资源评价、品种的亲缘关系分析等方面^[1], 而对桃的花型性状的分子遗传机制研究较少。观赏桃的花型在观赏桃育种中是重要的参考性状, 研究其遗传基础对观赏桃育种至关重要。

桃铃型 / 蔷薇型花型性状受单基因 *Sh/sh* 控制, 铃型对蔷薇型为完全显性^[2]。Ogundiwin 等^[3]通过构建以罐桃品种 Dr. Davis 和鲜食桃品种 Georgia Belle 为亲本的 F₁ 群体, 获得了一个包含 211 个标记的遗传连锁图谱 Pop-DG。 *Sh* 被定位于 Pop-DG 8 号染色体的中间^[3], 然而, 8 号染色体上的标记密度较低, 无法确定控制 *Sh* 的候选基因。Micheletti 等^[4]对 1580 份桃进行铃型 / 蔷薇型花型调查和统计, 并利用 9K 单核苷酸多态性 (SNP, single-nucleotide polymorphisms) 芯片进行全基因组关联分析 (GWAS, genome wide association study), 获得 18 个与目标性状关联的 SNPs, 其中位点 Chr. 8: 13756987 bp 与铃型 / 蔷薇型花型性状显著关联。与 Micheletti 等^[4]的研究结果一致, Cao 等^[5]通过对 129 份桃品种重测序并进行关联分析, 获得一个与桃铃型 / 蔷薇型花型性状显著关联的位点 Chr. 8: 13740117 bp。

相对于前期研究结果, 本研究选取 199 份桃品种进行基因组重测序, 增加了群体样本数目以及群体中铃型花品种数目, 进而开展了桃铃型 / 蔷薇型的 GWAS 分析。随后利用 5 个 F₁ 群体对初步鉴定关联的 SNPs 中的 3 个位点: Chr. 8: 14484624 bp, Chr. 8: 13950754 bp 和 Chr. 8: 14487919 进行验证, 并通过组织特异性表达分析, 预测了花型性状的候选基因。本研究鉴定出的桃铃型 / 蔷薇型花型性状关联位点和发掘的候选基因, 将为观赏桃分子标记辅助育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

(1) GWAS 试验材料: 共 199 份桃品种, 其中铃型花型材料 18 个, 蔷薇型花型材料 181 个 (表 1)。铃型、蔷薇型花型性状见图 1。

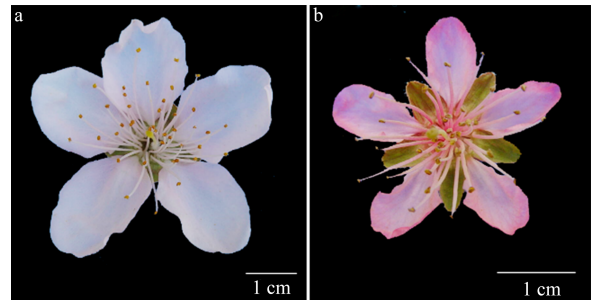


图 1 蔷薇型 (a) 和铃型 (b) 花型性状

Fig.1 Showy (a) and non-showy (b) flower types

(2) 竞争性等位基因特异性 PCR (KASP, kompetitive allele-specific PCR) 基因分型试验材料: 共 5 个 F₁ 群体, 包括红珊瑚 × (菊花桃 × 瑞光 2#) 的 36 个单株, Elegant × 07-4-45 的 14 个单株, 金世纪 × 橡皮桃的 26 个单株, 99-10-7 × Huang 07-4-40 的 39 个单株, 西尾金 × 橡皮桃的 38 个单株。关于这 5 个群体的详细信息见表 2。

(3) RNA-seq 的试验材料: 取光核桃 2010-138、山桃帚形山桃 1 号、甘肃桃红根甘肃桃 1 号、新疆桃喀什 1 号和普通桃 08-9-107 实生苗的不同部位的组织, 包括根、韧皮部、花芽、叶片、成熟果实和种子, 提取 RNA 用于 RNA-seq, 以检测候选基因的组织特异性表达。在春季桃树花芽萌发前分别取以上试验材料的花芽, 桃树叶片完全展开时取叶片、根及枝条的韧皮部, 桃树果实成熟期取成熟果实的果肉及桃核的种子。

以上所有试验材料均种植于中国农业科学院郑州果树研究所国家种质资源圃。

1.2 表型数据的调查

用于关联分析的 199 个桃品种和 KASP 基因分型的 5 个 F₁ 群体, 每个材料随机挑选 5 个花朵进行调查。评价标准参考桃种质资源描述规范和数据标准^[6]。

表 1 用于 GWAS 的 199 份桃品种
Table 1 199 peach varieties used in this study for GWAS

编号 Number	品种名称 Variety name	表型 Phenotype	编号 Number	品种名称 Variety name	表型 Phenotype	编号 Number	品种名称 Variety name	表型 Phenotype	编号 Number	品种名称 Variety name	表型 Phenotype
TG0823	安龙白桃	蔷薇型	TG1060	南山 1 号	蔷薇型	TG0941	红垂枝	蔷薇型	TG1169	望溪小米桃	蔷薇型
TG0474	阿姆肯	铃型	TG0920	Nectagrاند 4#	蔷薇型	TG0252	红垂枝(郑州)	蔷薇型	TG1492	万州酸桃	蔷薇型
TG0367	金童 5 号	铃型	TG1146	Nectaross	蔷薇型	TG0942	红花碧桃	蔷薇型	TG1496	微尖红肉	蔷薇型
TG0830	白单瓣	蔷薇型	TG0975	NJ271	蔷薇型	TG0953	红寿星	蔷薇型	TG1174	温州水蜜	蔷薇型
TG1310	白核桃	蔷薇型	TG0293	NJC108	铃型	TG0122	红桃	蔷薇型	TG1178	五宝桃	蔷薇型
TG0061	白离胡	蔷薇型	TG0769	NJC77	铃型	TG0957	红叶桃	蔷薇型	TG1175	乌达桃	蔷薇型
TG0448	白芒蟠桃	蔷薇型	TG0773	NJN80	铃型	TG0958	红叶桃芽变	蔷薇型	TG1340	五月白	蔷薇型
TG0066	白粘核	蔷薇型	TG1672	平顶油蟠桃	蔷薇型	TG0960	湖景蜜露	蔷薇型	TG0187	五月鲜	蔷薇型
TG1313	白粘胡	蔷薇型	TG1070	平永桃	蔷薇型	TG0963	沪油 003	蔷薇型	TG0185	武汉 2 号	蔷薇型
TG0063	白沙	蔷薇型	TG1072	齐桃	蔷薇型	TG0964	沪油 004	蔷薇型	TG1713	武汉大红袍	蔷薇型
TG1381	报春	蔷薇型	TG1460	齐嘴红肉	蔷薇型	TG0581	花玉露	蔷薇型	TG0184	吴江白	蔷薇型
TG0845	北农早熟	蔷薇型	TG1077	秦光	蔷薇型	TG0976	黄腊桃	蔷薇型	TG1184	西教 2 号	蔷薇型
TG0451	长生蟠桃	蔷薇型	TG1081	青毛子白花	蔷薇型	TG0482	黄李光	蔷薇型	TG1185	西教 3 号	蔷薇型
TG0076	长岭早玉露	蔷薇型	TG0152	青州红皮蜜桃	蔷薇型	TG0355	黄粘胡	蔷薇型	TG0194	西农水蜜	蔷薇型
TG1158	Cheonhong	蔷薇型	TG1079	秦岭冬桃	蔷薇型	TG0983	黄艳	蔷薇型	TG0200	霞晖 1 号	蔷薇型
TG0837	重瓣小花型	铃型	TG0154	秋白桃	蔷薇型	TG0125	火珠	蔷薇型	TG0422	香蕉桃	蔷薇型
TG0083	春蕾	蔷薇型	TG1065	Regina	铃型	TG0126	鸡嘴白	蔷薇型	TG1826	香桃	蔷薇型
TG1062	Croce del Sud	蔷薇型	TG1088	人面桃	蔷薇型	TG1428	尖嘴红肉	蔷薇型	TG0205	小白桃	蔷薇型
TG0377	Cullinan	铃型	TG0790	S9	蔷薇型	TG0998	绛桃	蔷薇型	TG0206	小红花	蔷薇型
TG0087	大红袍	蔷薇型	TG1537	洒红龙柱	蔷薇型	TG0994	江村 4 号	蔷薇型	TG1323	兴义白花桃	蔷薇型
TG0323	大金旦	蔷薇型	TG1124	洒红桃	蔷薇型	TG0457	嘉庆蟠桃	蔷薇型	TG1324	兴义五月桃	蔷薇型
TG0324	大离核黄肉	蔷薇型	TG1127	沙红桃	蔷薇型	TG0716	吉林 8701	蔷薇型	TG0625	新疆黄肉	蔷薇型
TG1636	大甜桃	蔷薇型	TG0167	上山大玉露	蔷薇型	TG0717	吉林 8801	蔷薇型	TG1216	新疆蟠桃	蔷薇型
TG0326	大赵黄桃	蔷薇型	TG0168	深州白蜜	蔷薇型	TG1447	荆门毛桃	蔷薇型	TG1215	新疆蟠桃 1 号	蔷薇型
TG0888	单瓣紫桃	蔷薇型	TG0169	深州离核水蜜	蔷薇型	TG1014	久仰青桃	蔷薇型	TG0219	阳桃	蔷薇型

表 1 (续)

编号 Number	品种名称 Variety name	表型 Phenotype	编号 Number	品种名称 Variety name	表型 Phenotype	编号 Number	品种名称 Variety name	表型 Phenotype	编号 Number	品种名称 Variety name	表型 Phenotype
TG0881	大王庄黄桃	蔷薇型	TG1134	石桃	蔷薇型	TG1015	桔山童桃	蔷薇型	TG1228	阳泉肉桃	蔷薇型
TG0328	Dicon	铃型	TG1701	石育白桃	蔷薇型	TG0992	Kanoiwa	蔷薇型	TG1227	扬州 531	蔷薇型
TG0094	敦煌冬桃	蔷薇型	TG1137	寿白	蔷薇型	TG0659	喀什 1 号	蔷薇型	TG0220	叶县冬桃	蔷薇型
TG0419	Early Crawford	蔷薇型	TG1138	寿粉	蔷薇型	TG0660	喀什 2 号	蔷薇型	TG1231	叶县黄肉桃	蔷薇型
TG0491	Early Red 2#	蔷薇型	TG1145	水白桃	蔷薇型	TG0661	喀什 3 号	蔷薇型	TG0221	一线红	蔷薇型
TG0894	二接白	蔷薇型	TG1221	Snow Queen	铃型	TG0662	喀什 4 号	蔷薇型	TG1233	伊型县黄肉桃	蔷薇型
TG0095	二早桃	蔷薇型	TG0793	Spring baby	蔷薇型	TG0864	川中岛白桃	蔷薇型	TG1237	迎春	蔷薇型
TG0330	Favolate 2#	铃型	TG0599	Stark Saturn	蔷薇型	TG0459	离核蟠桃	蔷薇型	TG0230	雨花露	蔷薇型
TG0103	肥城白里 17 号	蔷薇型	TG0176	酥红	蔷薇型	TG0380	连黄	蔷薇型	TG0468	玉露蟠桃	蔷薇型
TG0897	绯桃	蔷薇型	TG0486	酸李光	蔷薇型	TG0137	临白 10 号	蔷薇型	TG1523	元春	蔷薇型
TG1400	粉红碧桃	蔷薇型	TG0163	Sunago Wase	蔷薇型	TG1032	临白 3 号	蔷薇型	TG0234	园春白	蔷薇型
TG0335	丰黄	蔷薇型	TG1152	太白	蔷薇型	TG1034	临黄 1 号	铃型	TG1244	鸳鸯垂枝	蔷薇型
TG0453	奉化蟠桃	蔷薇型	TG0073	台农 2	蔷薇型	TG1033	临城桃	蔷薇型	TG1238	Yumyeong	蔷薇型
TG0339	Fertilia Morettini	蔷薇型	TG1154	探春	蔷薇型	TG0141	六月白	蔷薇型	TG1342	早春桃	蔷薇型
TG0905	Flordagold	蔷薇型	TG0805	Texstar	蔷薇型	TG1331	六月空	蔷薇型	TG1261	早红珠	铃型
TG0750	Flordaking	铃型	TG0487	甜李光	蔷薇型	TG1332	龙油蟠桃	蔷薇型	TG0241	早花露	蔷薇型
TG0341	Frederica	蔷薇型	TG0664	甜仁桃	蔷薇型	TG0594	龙华水蜜	蔷薇型	TG0429	早黄金	蔷薇型
TG0478	Fuzalode	蔷薇型	TG1160	铁 4-1	蔷薇型	TG0144	陆林水蜜	蔷薇型	TG1266	早美	蔷薇型
TG0917	高台 1 号	蔷薇型	TG1162	吐 -2	蔷薇型	TG1048	满天红	蔷薇型	TG0639	早霞露	蔷薇型
TG1322	古城春蕾	蔷薇型	TG1161	徒沟 1 号	蔷薇型	TG1664	满山 16 号	蔷薇型	TG1274	张白 2 号	蔷薇型
TG1410	贵州黄金蜜	铃型	TG0811	TX4B185LN	铃型	TG0598	Maravilha	蔷薇型	TG0247	张白 5 号	蔷薇型
TG0925	贵州水蜜	蔷薇型	TG0813	TX4C189LN	铃型	TG0612	Matsumori	蔷薇型	TG0249	张白甘	蔷薇型
TG0576	寒露蜜	蔷薇型	TG1369	TX4E169	蔷薇型	TG0762	May Glo	蔷薇型	TG1288	中油蟠 1 号	铃型
TG0930	Hardired	蔷薇型	TG0180	晚白	蔷薇型	TG1056	米扬山	蔷薇型	TG1291	朱粉垂枝	蔷薇型
TG0577	合阳油桃	蔷薇型	TG0464	晚蟠桃	蔷薇型	TG0392	墨玉 8 号	蔷薇型			

种质编号为中国农业科学院郑州果树研究所国家种质资源圃编号

The accession number is recorded at National Fruit Tree Germplasm Repository, Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences

表 2 5 个 F₁ 群体 KASP 基因分型结果

Table 2 The detailed KASP genotyping results of different SNPs in 5 F₁ populations

亲本 Parents	样品编号 Sample number	表型 Phenotype	KASP 基因分型			亲本 Parents	样品编号 Sample number	表型 Phenotype	KASP 基因分型		
			Genotyping results using KASP technology						Genotyping results using KASP technology		
			Chr. 8: 13950754 bp	Chr. 8: 14484624 bp	Chr. 8: 14487919 bp				Chr. 8: 13950754 bp	Chr. 8: 14484624 bp	Chr. 8: 14487919 bp
红珊瑚 × (菊花桃 × 瑞光 2#) Hong Shan Hu × (Ju Hua Tao × Rui Guang 2#)	1	蔷薇型	A	A	A	红珊瑚 × (菊花桃 × 瑞光 2#) Hong Shan Hu × (Ju Hua Tao × Rui Guang 2#)	24	蔷薇型	A	A	A
	2	蔷薇型	A	A	A		25	蔷薇型	A	A	A
	3	蔷薇型	A	A	A		26	铃型	H	H	B
	4	铃型	H	H	B		27	蔷薇型	A	A	A
	5	铃型	H	H	B		28	铃型	H	H	B
	6	蔷薇型	A	A	A		29	铃型	-	H	H
	7	铃型	H	H	B		30	蔷薇型	A	A	A
	8	蔷薇型	A	A	A		31	蔷薇型	A	A	A
	9	蔷薇型	A	A	A		32	蔷薇型	A	A	A
	10	蔷薇型	A	A	A		33	铃型	H	H	B
Elegant lady × 07-4-45	11	蔷薇型	A	A	A	Elegant lady × 07-4-45	34	蔷薇型	A	A	A
	12	铃型	A	H	H		35	铃型	H	H	B
	13	铃型	H	H	B		36	铃型	H	H	B
	14	蔷薇型	A	A	A		1	铃型	A	A	A
	15	铃型	H	A	A		2	铃型	B	H	-
	16	蔷薇型	A	A	A		3	铃型	B	H	B
	17	铃型	H	H	B		4	铃型	B	H	B
	18	铃型	H	H	B		5	铃型	B	B	B
	19	蔷薇型	A	A	A		6	蔷薇型	A	A	A
	20	铃型	H	H	B		7	铃型	B	B	B
	21	蔷薇型	A	A	A		8	铃型	H	H	-
	22	铃型	H	H	B		9	蔷薇型	A	A	A
	23	铃型	H	A	A		10	铃型	B	B	B

表 2 (续)

亲本 Parents	样品编号 Sample number	表型 Phenotype	KASP 基因分型			亲本 Parents	样品编号 Sample number	表型 Phenotype	KASP 基因分型		
			Chr. 8: 13950754 bp	Chr. 8: 14484624 bp	Chr. 8: 14487919 bp				Chr. 8: 13950754 bp	Chr. 8: 14484624 bp	Chr. 8: 14487919 bp
Elegant lady × 07-4-45	11	铃型	H	H	-	99-10-7 × Huang 07-4-40	1	铃型	B	H	B
	12	蔷薇型	H	A	-		2	蔷薇型	H	H	B
	13	蔷薇型	H	A	-		3	蔷薇型	H	A	A
	14	铃型	B	B	B		4	蔷薇型	H	A	A
金世纪 × 橡皮桃	1	蔷薇型	H	A	A	5	蔷薇型	A	A	A	
	2	铃型	H	H	H	6	铃型	B	H	B	
Jin Shi Ji × Xiang Pi Tao	3	蔷薇型	H	A	A	7	蔷薇型	H	A	A	
	4	蔷薇型	H	A	A	8	铃型	H	H	B	
	5	蔷薇型	H	A	A	9	铃型	H	H	B	
	6	蔷薇型	-	A	A	10	铃型	H	H	B	
	7	蔷薇型	A	A	A	11	铃型	H	H	B	
	8	蔷薇型	-	A	A	12	蔷薇型	H	A	A	
	9	蔷薇型	-	A	A	13	蔷薇型	H	A	A	
	10	蔷薇型	A	A	A	14	铃型	H	H	B	
	11	蔷薇型	A	A	A	15	蔷薇型	H	A	A	
	12	蔷薇型	B	H	H	16	铃型	A	H	B	
	13	蔷薇型	H	A	A	17	铃型	B	H	B	
	14	铃型	H	H	H	18	蔷薇型	H	A	B	
	15	铃型	H	H	H	19	蔷薇型	A	A	A	
	16	铃型	H	H	H	20	铃型	H	A	A	
	17	铃型	H	H	H	21	铃型	B	H	B	
	18	蔷薇型	H	A	A	22	蔷薇型	H	A	A	
	19	铃型	H	H	H	23	铃型	H	H	B	
	20	蔷薇型	A	A	A	24	铃型	B	H	B	
	21	蔷薇型	A	A	A	25	蔷薇型	H	A	A	
	22	蔷薇型	A	A	A	26	铃型	B	H	B	
	23	铃型	H	H	B	27	铃型	H	H	B	
	24	蔷薇型	A	A	A	28	铃型	H	H	B	
25	蔷薇型	H	A	A	29	蔷薇型	H	A	A		
26	蔷薇型	A	A	A	30	蔷薇型	H	A	A		

表 2 (续)

亲本 Parents	样品编号 Sample number	表型 Phenotype	KASP 基因分型			亲本 Parents	样品编号 Sample number	表型 Phenotype	KASP 基因分型			
			Chr. 8: 13950754 bp	Chr. 8: 14484624 bp	Chr. 8: 14487919 bp				Chr. 8: 13950754 bp	Chr. 8: 14484624 bp	Chr. 8: 14487919 bp	
99-10-7 × Huang 07-4-40	31	铃型	B	H	B	西尾金 × 橡皮桃 Xi Wei Gold × Xiang Pi Tao	16	蔷薇型	H	A	A	
	32	蔷薇型	H	A	A		17	铃型	H	H	B	
	33	蔷薇型	A	A	A		18	铃型	H	H	B	
	34	铃型	B	H	B		19	铃型	A	A	B	
	35	铃型	H	H	B		20	铃型	H	H	B	
	36	蔷薇型	A	A	A		21	铃型	H	H	B	
	37	蔷薇型	H	A	A		22	铃型	H	H	B	
	38	蔷薇型	A	A	A		23	铃型	H	H	B	
	39	蔷薇型	H	A	A		24	铃型	H	H	B	
	西尾金 × 橡皮桃 Xi Wei Gold × Xiang Pi Tao	1	蔷薇型	H	A		A	25	铃型	H	H	B
		2	蔷薇型	H	A		A	26	蔷薇型	H	A	A
		3	蔷薇型	A	A		A	27	蔷薇型	H	A	A
		4	蔷薇型	H	H		B	28	蔷薇型	H	A	A
		5	蔷薇型	A	A		A	29	蔷薇型	H	A	A
		6	蔷薇型	A	A		B	30	铃型	H	H	B
7		铃型	H	A	A	31	蔷薇型	H	A	A		
8		蔷薇型	H	A	B	32	铃型	H	H	B		
9		蔷薇型	H	A	A	33	蔷薇型	H	A	A		
10		蔷薇型	H	A	A	34	蔷薇型	A	A	A		
11		蔷薇型	H	A	A	35	蔷薇型	H	H	B		
12		蔷薇型	H	A	A	36	铃型	H	H	B		
13		蔷薇型	A	A	A	37	蔷薇型	H	A	A		
14	蔷薇型	H	A	A	38	铃型	H	H	B			
15	蔷薇型	A	A	A								

A: 纯合基因型 1; B: 纯合基因型 2; H: 杂合位点

A: Homozygous genotype 1, B: Homozygous genotype 2, H: Heterozygous loci

1.3 全基因组关联分析

全基因组 DNA 提取采用改良的 CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) 法^[7]。测序文库的构建及测序方法与 Meng 等^[8]相似。利用 Tassel 5.0^[9] 过滤最小等位基因频率 < 2%, 且缺失率 (Missing rate) \geq 20% 的数据, 获得高质量 SNPs 用于 GWAS 分析。采用全基因组复杂性状分析软件 (Genome-wide Complex Trait Analysis v1.25.3) 利用过滤后的 SNP 进行主成分分析 (PCA, principal component analysis)^[10]。采用 Admixture 1.3.0 软件进行群体结构分析^[11]。利用 Admixture 1.3.0 软件对每个可能的 K 值模拟运算, 用 K=2~5 做图。采用基于不考虑主成分分析的一般线性模型、考虑主成分分析的一般线性模型以及不考虑主成分分析的混合线性模型和考虑主成分分析的混合线性模型进行关联分析。以分位数 (QQ, Quantile-Quantile) 图来表示不

同模型的检测效力, 以实际的 *P* 值与期望 *P* 值最接近的模型为桃铃型 / 蔷薇型花型性状 GWAS 分析的最优模型。以曼哈顿 (Manhattan) 图显示关联分析检测到的与目标性状显著相关的标记位点。

1.4 KASP 基因分型

KASP 扩增体系: 5 μ L 2 \times KASP master mix (艾吉析科技有限公司, 上海, 中国), 5 μ L DNA 样品和共 0.14 μ L 引物。KASP 扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 15 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 61~55 $^{\circ}$ C 复性延伸 60 s, 10 个循环, 每个循环复性延伸温度降低 0.6 $^{\circ}$ C; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 复性延伸 60 s, 26 个循环。荧光数据读取和分析仪器为 Roche LC480 II (Roche Diagnostics, USA), 读取温度为 37 $^{\circ}$ C, 读取时间为 60 s, 所用荧光为羧基荧光素 (FAM, carboxy fluorescein) 和六氯荧光素 (HEX, hexachloro fluorescein)。KASP 引物序列信息见表 3。

表 3 KASP 基因分型所用引物信息

Table 3 Primer sequences used for the KASP genotyping

位点名称 Loci name	引物序列 Primer sequences		
	Primer_AlleleFAM	Primer_AlleleHEX	Primer_Common
Chr. 8: 13950754	TTATTCATGACATCGTTGAAGAGAITTCA	CATGACATCGTTGAAGAGATTTCG	GATCTGCCACAITAAAGGCAGTATCATTT
Chr. 8: 14484624	ACATATACGTGTACAATAGATAGTCCAA	CATATACGTGTACAATAGATAGTCCAC	TCTGTTGGGTAACACCTATGCAAAAATCAT
Chr. 8: 14487919	CCTTATGGAGAAGAATAAAAATCTAACG	CTCCTTATGGAGAAGAATAAAAATCTAACA	CCGATTTGGATAGCTTTCTGGTTCAATTT

1.5 候选基因表达分析

采用 RNA 提取试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司, 北京, 中国) 提取 RNA。安诺优达公司对 RNA 通过 HiSeq 2500 system (Illumina) 在双末端测序模式下对 100 bp 读长进行测序。用 100 bp 读长每个品种测两个重复, 获得超过 6 Gb 的数据。在软件 TopHat v2.1.0^[12] 中将筛选后的 reads 与桃的参考基因组 V2.0 (Prunus persica Whole Genome Assembly v2.0 & Annotation v2.1 (v2.0.a1) | GDR (rosaceae.org))^[13] 比对, 之后用 Cufflinks v2.1.1 计算基因的表达水平^[14]。

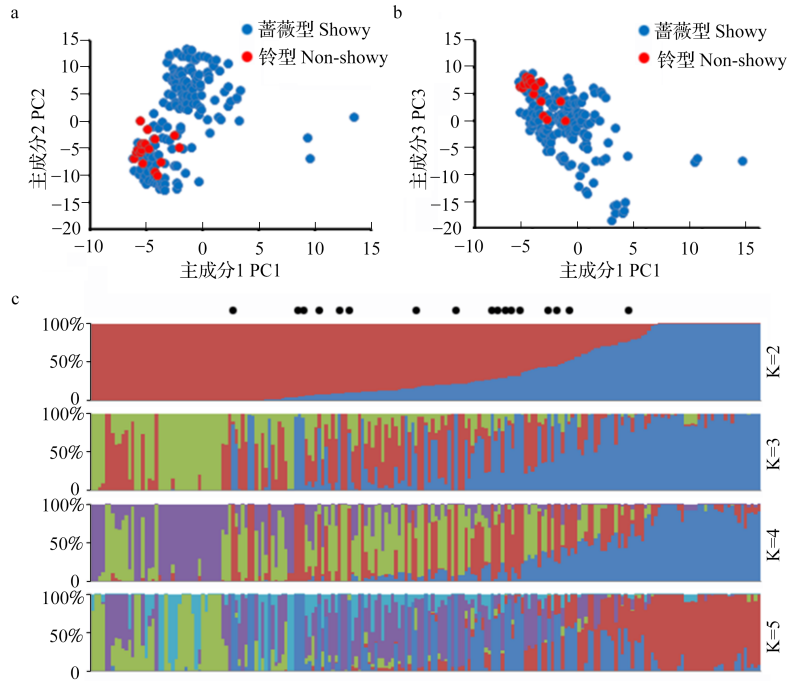
2 结果与分析

2.1 群体结构分析及关联分析最优统计模型选择

本研究通过对 199 份桃材料进行重测序, 获得 1042687 个高质量 SNPs 用于后续研究。对 199 份材料进行主成分分析, 结果表明铃型、蔷薇型材料均匀分布 (图 2a、b)。除此之外采用 ADMIXTURE v1.3.0 软件对 199 份材料群体结构进行分析。群体结构分析结果表明, 当 K=2 时, 199 份材料可以被

划分为两个大的亚群, 分别命名为亚群 1 和亚群 2, 亚群 1 包含大部分蔷薇型材料, 亚群 2 包含所有的铃型材料和部分蔷薇型材料 (图 2c)。因此需要对群体结构进行矫正, 以降低关联分析中假阳性结果。

为了筛选出最适的 GWAS 模型, 研究首先采用 4 种模型, 即基于不考虑主成分分析的一般线性模型、考虑主成分分析的一般线性模型, 不考虑主成分分析的混合线性模型和考虑主成分分析的混合线性模型进行分析。结果显示, 基于不考虑主成分分析的一般线性模型下检测到的标记的 *P* 值显著偏离期望的 *P* 值, 表明此模型条件下检测到的显著位点存在较大的假阳性; 考虑主成分分析的一般线性模型检测到的标记的 *P* 值和期望的 *P* 值基本一致, 说明考虑主成分分析的一般线性模型计算得到的显著标记更为可靠; 不考虑主成分分析的混合线性模型和考虑主成分分析的混合线性模型下矫正太过, 无法将显著性较高的真实位点检测出来 (图 3)。因此, 考虑主成分分析的一般线性模型是对桃铃型 / 蔷薇型花型性状进行关联分析的最适模型。

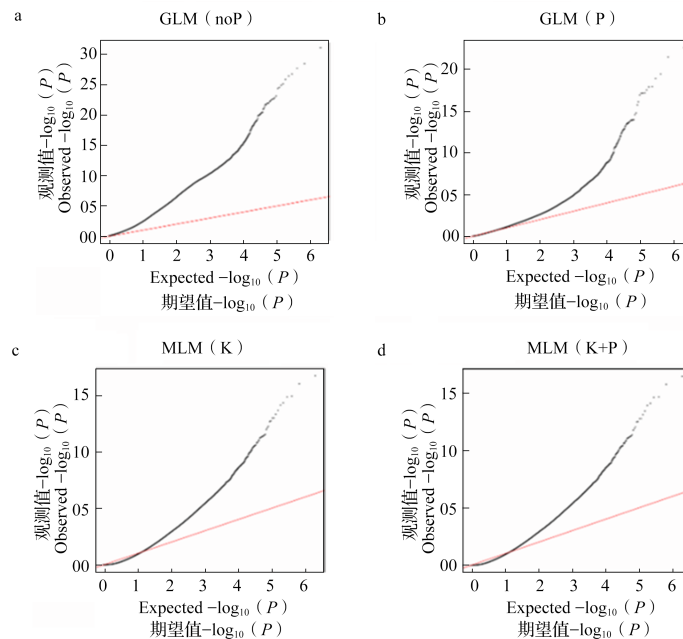


a、b: 199 份桃品种主成分分析; c: 根据 K 值分析, 不同颜色代表不同的亚群, 黑色圆点代表铃型材料

a, b: Principle component analysis of 199 peach varieties, c: Different colors represent different populations according to K (the number of subpopulations) value analysis, the black circle indicated varieties with non-showy flowers

图 2 199 份桃品种主成分分析及群体结构分析

Fig.2 Principal component analysis and population structure analysis of 199 peach varieties



红线和黑线分别代表期望 P 值和实际 P 值; GLM (noP): 不考虑主成分分析的一般线性模型; GLM (P): 考虑主成分分析的 GLM 模型; MLM (K): 不考虑主成分分析的混合线性模型; MLM (P+K): 考虑主成分分析的 MLM 模型

The red line and black line represent the expected P values and observed P values respectively, GLM (no P): GLM (general linear model) without considered PCA (principal component analysis), GLM (P): GLM considered PCA, MLM (K): MLM (mixed linear model) considered Kinship (K), MLM (K+P): MLM considered K and PCA simultaneously

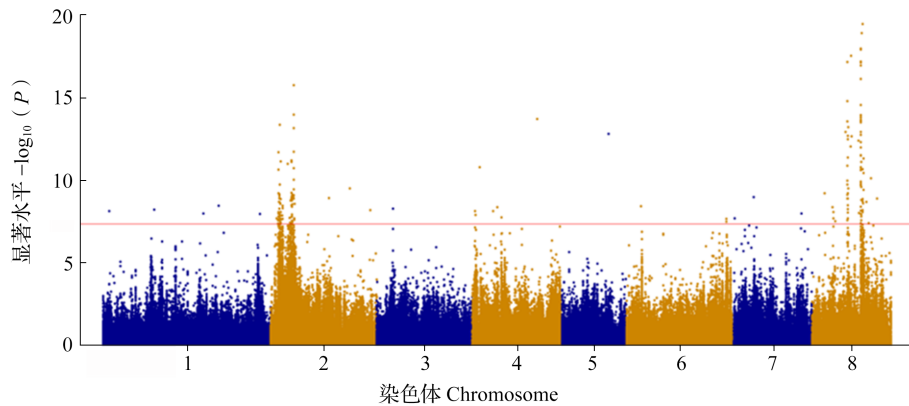
图 3 桃铃型 / 蔷薇型花型性状四种分析模型 QQ 图

Fig.3 Quantile-quantile plot of four analysis models for non-showy/showy flower shape in peach

2.2 桃铃型 / 蔷薇型花型性状全基因组关联分析

采用考虑主成分分析的一般线性模型对 199 份桃品种进行 GWAS。将显著关联的阈值设定为 $-\log_{10}(P=0.05/1042687)=7.32$, 将 $-\log_{10} P$ 超过此阈值的 SNP 视为与桃铃型 / 蔷薇型花型性状显著相关的 SNP 位点。结果显示, 有 7 个与目标性状显著相关的 SNP 位点, 其中 2 个位于 2 号染色体上, 5 个位于 8 号染色体上(图 4、表 4)。其中 8 号染色体上的位点 Chr8: 14484624 bp 的 $-\log_{10} P$ 值为 23.86, 最小等位基因频率为 0.15, 与目标性

状的关联性最强, 解释 34.92 % 的表型变异。8 号染色体上其他的 4 个位点: Chr. 8: 10134084 bp, Chr. 8: 12404655 bp, Chr. 8: 13950754 bp 和 Chr. 8: 14487919 bp 与目标形状的关联性均较强, 分别解释 32.54 %, 33.73 %, 27.01 % 和 32.35 % 的表型变异。2 号染色体上的 2 个位点: Chr. 2: 2697620 bp, Chr.2: 6626963 bp 与目标形状的关联性较弱, 分别解释 24.05 % 和 26.12 % 的表型变异。表明与桃的铃型 / 蔷薇型花型性状显著相关的位点位于 8 号染色体上。



红线代表显著关联的阈值 $-\log_{10}(P)$, $P=0.05/\text{SNP}$ 的数量

The red line represents significant association threshold $-\log_{10}(P)$, $P=0.05/\text{SNPs}$ number

图 4 GLM 模型下铃型 / 蔷薇型花型性状关联分析曼哈顿图

Fig.4 Manhattan plot of the association analysis of non-showy/showy flower trait using GLM

表 4 桃铃型 / 蔷薇型花型性状显著关联位点信息

Table 4 Information of significant association sites for flower type of non-showy/showy in peach

染色体 Chr.	显著关联 SNP 位置 (bp) Leading SNP position	$-\log_{10}(P)$ 值 $-\log_{10}(P)$	主要等位基因 Major allele	次要等位基因 Minor allele	最小等位基因频率 Minimum allele frequency	解释表型变异率 (%) Explain phenotypic variation rate
2	2697620	13.37	C	T	0.25	24.05
2	6626963	15.75	G	A	0.21	26.12
8	10134084	21.51	G	A	0.05	32.54
8	12404655	22.62	T	A	0.08	33.73
8	13950754	17.97	G	A	0.13	27.01
8	14484624	23.86	A	C	0.15	34.92
8	14487919	19.47	T	C	0.14	32.35

2.3 KASP 基因分型结果分析

在前人研究中, 控制桃铃型 / 蔷薇型花型性状的位点多定位于 8 号染色体上 (www. rosaceae.org)。此外, Micheletti 等^[4]将与桃铃型 / 蔷薇型花型性状显著相关的位点定位于 Chr8: 13756987 bp。本研究中, Chr. 8: 14484624 bp、Chr. 8: 13950754 bp 和 Chr. 8: 14487919 bp 与上述位点位置最接近。故

通过对包含 153 个单株的 5 个 F_1 群体进行竞争性等位基因特异性基因分型, 从而对这 3 个与目标性状显著相关的位点进行进一步验证。通过统计各位点基因分型结果和各个单株的表型数据, 与桃铃型 / 蔷薇型花型性状显著相关的位点为 8 号染色体上的 Chr. 8: 14484624 bp (χ^2 值为 115.10, $-\log_{10} P$ 值为 45.45) (表 5)。

表 5 用于 KASP 基因分型的显著关联 SNPs 及 χ^2 检测结果Table 5 Selected SNPs using for KASP genotyping and the result of χ^2 test

位点名称 Loci name	物理位置 (bp) Position	铃型等位基因 Alleles of non-showy			蔷薇型等位基因 Alleles of showy			χ^2 值 χ^2 value	$-\log_{10}(P)$ 值 $-\log_{10}(P)$ value	正确率 (%) Accuracy
		A	H	B	A	H	B			
Chr. 8: 13950754	13950754	4	47	15	40	42	1	40.57	10.08	66.67
Chr. 8: 14484624	14484624	6	57	4	82	4	0	115.10	45.45	93.46
Chr. 8: 14487919	14487919	5	8	51	77	1	6	103.38	37.75	90.85

A: 纯合基因型 1; B: 纯合基因型 2; H: 杂合位点

A: Homozygous genotype 1, B: Homozygous genotype 2, H: Heterozygous loci

2.4 桃铃型 / 蔷薇型花型性状相关候选基因鉴定

在 GWAS 和 KASP 基因分型结果的基础上, 将与性状显著关联的 SNP 位点 Chr. 8: 14484624 bp 的物理位置左右延伸 ± 25 kb^[15] 定义为定位区间, 在这个区间内包含 6 个注释基因, 分别为 *Prupe.8G117800*、*Prupe.8G117900*、*Prupe.8G118000*、*Prupe.8G118100*、*Prupe.8G118200* 和 *Prupe.8G118300*^[13]。组织特异性表达结果显示 *Prupe.8G117800*、*Prupe.8G117900*、*Prupe.8G118100*、*Prupe.8G118200* 和 *Prupe.8G118300*

在不同部位均有表达, 仅 *Prupe.8G118100* 在花中的表达量显著高于其他组织(图 5); 而 *Prupe.8G118000* 则在各个组织没有表达。同时基因功能注释表明: *Prupe.8G118100* 有植物特定的 B3-DNA 结合结构域。包含 B3 结构域的蛋白参与很多植物生命过程, 例如 ABI3/VP1 (Abscisic acid-insensitive3/VIVIPAROUS) 相关基因参与到植物的生长、发育和开花的过程^[16-18]。故 *Prupe.8G118100* 可能参与调控桃铃型 / 蔷薇型花型形成。

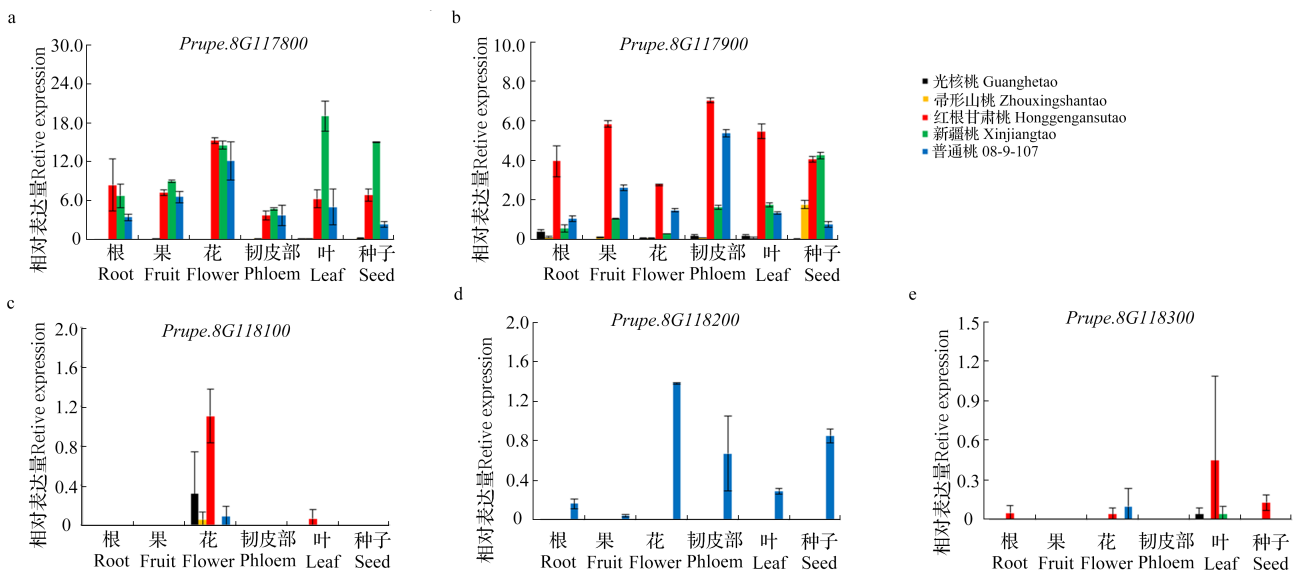


图 5 候选基因组织特定表达分析

Fig.5 Tissue-specific analysis of candidate genes

3 讨论

在农作物育种中, 了解其表型变异的遗传基础是至关重要的先决条件和主要任务^[19]。桃铃型 / 蔷薇型花型性状由单基因 *Sh/sh* 控制^[2], 且控制该性状的位点被定位到 8 号染色体上。Micheletti 等^[4] 通过对 1580 份桃进行关联分析将与桃铃

型 / 蔷薇型花型性状关联的信号定位于 Chr. 8: 13756987 bp, 但是没有进行候选基因预测分析。Cao 等^[5] 通过 129 份桃品种的 GWAS, 获得了与桃铃型 / 蔷薇型花型性状的显著关联位点, 定位于 Chr.8: 13740117 bp。与以上结果一致, 通过对 199 份桃品种进行重测序和关联分析, 获得 7 个与桃蔷薇型 / 铃型花型性状密切关联的信号, 其中 5 个位

于8号染色体上,2个位于2号染色体上。随后,通过竞争性等位基因特异性 PCR 基因分型在5个F₁群体中对所得的位点进行验证,结果表明位点Chr8:14484624 bp与桃铃型/蔷薇型花型性状显著关联,且该位点准确率最高。根据该位点在桃参考基因组上的物理位置,该位点前后25 kb共有6个基因。在NCBI数据库中比对,*Prupe.8G117900*包含亮氨酸重复(LRRs, leucine-rich repeats)和核苷酸结合位点(NBS, nucleotide-binding site)结构域。多数抗病基因编码的蛋白包含核苷酸结合位点和亮氨酸重复结构域^[20],因此这个基因可能参与桃的抗病通路。*Prupe.8G118000*含有参与细胞内信号传导的Toll白介素(TIR, Toll/interleukin-1 receptor)同源结构域^[21],多个参与植物抗病的受体中都包含Toll白介素类结构域^[22]。*Prupe.8G118100*和*Prupe.8G118300*都有植物特定的B3-DNA结合结构域。有5个基因家族包含B3-DNA结合结构域:生长素响应因子(ARF, auxin response factor)、脱落酸不敏感因子(ABI3, abscisic acid-insensitive3)、高糖表达诱导因子(HIS, high level expression of sugar inducible)、ABI3/VP1相关基因(RAV, related to ABI3/VP1)和生殖分生组织(REM, reproductive meristem)相关的因子^[23]。包含B3结构域的蛋白参与很多植物生命过程,例如ABI3/VP1相关基因参与到植物的生长、发育和开花的过程^[16-18]。此外,*Prupe.8G118100*包含一个Kelch保守结构域。含Kelch重复序列的F-box蛋白(KFB, kelch repeat-containing F-box protein)参与调控生物钟、光周期开花、植物生长和发育、植物次级代谢以及植物的防御反应^[24]。Jia等^[25]发现鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.)中的一个F-box基因*CarF-Box1*参与种子萌发和花发育过程。Li等^[26]在水稻中发现一个编码KFB的基因参与水稻穗构型的调控。RNA-seq结果显示*Prupe.8G118100*在花中特异表达。因此,我们预测这个基因参与调控桃的花形态建成。后续会通过过表达转基因技术及CRISPR/Cas9敲除技术对该基因的功能进行异源转化验证,进一步探索桃铃型/蔷薇型花型性状遗传机理。

在进行GWAS时,自然群体的选择至关重要,不恰当的群体结构易产生假阳性关联信号,需要进行矫正^[27]。本研究采用4种模型来探究群体结构对关联分析的影响。结果显示不考虑主成分分析的一般线性模型下检测到的标记的P值显著偏离期望的P值,表明此模型条件下检测到的显著位点存

在较大的假阳性;不考虑主成分分析的混合线性模型和考虑主成分分析的混合线性模型下矫正太过,无法将显著性较高的真实位点检测出来;考虑主成分分析的一般线性模型检测到的标记的P值和期望的P值基本一致,说明考虑主成分分析的一般线性模型计算得到的与桃铃型/蔷薇型花型性状相关的显著标记更为可靠。因此,选取考虑主成分分析的一般线性模型来进行关联分析。但是,由于桃铃型/蔷薇型花型性状由单基因*Sh/sh*控制,且前期的连锁分析表明控制桃铃型/蔷薇型花型性状的基因位于8号染色体上,故2号染色体上的2个显著位点推定为假阳性位点。这可能与本研究中选择材料仍然没有囊括该物种所有的遗传信息,以及该群体中铃型花数量较少有关。本研究通过对199份桃品种进行重测序和GWAS,获得了7个与桃铃型/蔷薇型花型性状关联的位点。此外,在5个F₁群体中通过竞争性等位基因特异性基因分型对所得的位点进行验证,结果表明位点Chr8:14484624 bp与桃铃型/蔷薇型花型性状显著关联。试验中鉴定到的桃铃型/蔷薇型花型性状关联位点可进一步转化为分子标记,用于分子标记辅助选择育种,对观赏桃育种时亲本和后代的选择以及种质资源的管理具有重要意义。

参考文献

- [1] 陈丽,薛良交,李淑娴.跳枝碧桃花色性状的GWAS.园艺学报,2021,48(3):13
Chen L, Xue L J, Li S X. Genome-wide association study of flower color trait in *Prunus persica* f.versicolor. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(3):13
- [2] Bailey J S, French A P. The inheritance of blossom type and blossom size in peach. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1942, 40: 248-250
- [3] Ogundiwin E A, Peace C P, Gradziel T M, Parfitt D E, Bliss F A, Crisosto C H. A fruit quality gene map of *Prunus*. BMC Genomics, 2009, 10: 587
- [4] Micheletti D, Dettori M T, Micali S, Aramini V, Pacheco I, Linge C D S, Foschi S, Banchi E, Barreneche T, Quilot-Turion B, Lambert P, Pascal T, Iglesias I, Carbó J, Wang L R, Ma R J, Li X W, Gao Z S, Nazzicari N, Troglio M, Bassi D, Rossini L, Verde I, Laurens F, Arús P, Aranzana M J. Whole-genome analysis of diversity and SNP-major gene association in peach germplasm. PLoS ONE, 2015, 10(9): e0136803
- [5] Cao K, Zhou Z, Wang Q, Guo J, Zhao P, Zhu G, Fang W, Chen C, Wang X, Wang X, Tian Z, Wang L. Genome-wide association study of 12 agronomic traits in peach. Nature Communications, 2016, 7: 13246
- [6] Wang L, Zhu G. Descriptors and data standard for peach.

- Beijing: China Agriculture Press, 2005: 113-114
- [7] Murray M G , Thompson W F . Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8 (19): 4321-4325
- [8] Meng G , Zhu G R , Fang W C , Chen C W , Wang X W , Wang L R , Cao K . Identification of loci for single/double flower trait by combining genome - wide association analysis and bulked segregant analysis in peach (*Prunus persica*). *Plant Breeding*, 2019, 138: 360-367
- [9] Bradbury P J , Zhang Z , Kroon D E , Casstevens T M , Ramdoss Y , Buckler E S . TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 2007, 23: 2633-2635
- [10] Yang J , Lee S H , Goddard M E , Visscher P M . GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis. *American Journal of Human Genetics*, 2011, 88: 76-82
- [11] Alexander D H , Novembre J , Lange K . Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Research*, 2009, 19: 1655-1664
- [12] Kim D , Pertea G , Trapnell C , Pimentel H , Kelley R , Salzberg S L . TopHat2: Accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, 2013, 14: 4
- [13] Verde I , Jenkins J , Dondini L , Micali S , Pagliarani G , Vendramin E , Paris R , Aramini V , Gazza L , Rossini L , Bassi D , Troglio M , Shu S , Grimwood J , Tartarini S , Dettori M T , Schmutz J . The Peach v2.0 release: High-resolution linkage mapping and deep resequencing improve chromosome-scale assembly and contiguity. *BMC Genomics*, 2017, 18: 225
- [14] Trapnell C , Williams B A , Pertea G , Mortazavi A , Kwan G , van Baren M J , Salzberg S L , Wold B J , Pachter L . Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature Biotechnology*, 2010, 28: 511-515
- [15] Cao K , Zheng Z , Wang L , Liu X , Zhu G , Fang W , Cheng S , Zeng P , Chen C , Wang X , Xie M , Zhong X , Wang X , Zhao P , Bian C , Zhu Y , Zhang J , Ma G , Chen C , Li Y , Hao F , Li Y , Huang G , Li Y , Li H , Guo J , Xu X , Wang J . Comparative population genomics reveals the domestication history of the peach, *Prunus persica*, and human influences on perennial fruit crops. *Genome Biology*, 2014, 15: 415
- [16] Hu Y X , Wang Y H , Liu X F , Li J Y . *Arabidopsis* RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Research*, 2004, 14: 8-15
- [17] Alvarez J P , Pekker I , Goldshmidt A , Blum E , Amsellem Z , Eshed Y . Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell*, 2006, 18: 1134-1151
- [18] Castillejo C , Pelaz S . The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Current Biology*, 2008, 18: 1338-1343
- [19] Jin L , Lu Y , Xiao P , Sun M , Corke H , Bao J . Genetic diversity and population structure of a diverse set of rice germplasm for association mapping. *Theoretical Applied Genetics*, 2010, 121 (3): 475-487
- [20] Liu J , Liu X , Dai L , Wang G . Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34: 765-776
- [21] Bonnett T P , Garka K E , Parnet P , Sonoda G , Testa J R , Sims J E . The cloning and characterization of human MyD88: A member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Letters*, 1997, 402 (1): 81-84
- [22] O'Neill L A , Dinarello C A . The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: Crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today*, 2000, 21: 206-209
- [23] Romanel E A , Schrago C G , Couñago R M , Russo C A , Alves-Ferreira M . Evolution of the B3 DNA binding superfamily: New insights into REM family gene diversification. *PLoS ONE*. 2009, 4 (6): e5791
- [24] Hassan M N , Zainal Z , Ismail I . Plant kelch containing F-box proteins: Structure, evolution and functions. *RSC Advances*, 2015, 5: 42808-42814
- [25] Jia Y , Gu H , Wang X , Chen Q , Shi S , Zhang J , Ma L , Zhang H , Ma H . Molecular cloning and characterization of an F-box family gene *CarF-box1* from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Biology Reports*, 2012, 39: 2337-2345
- [26] Li M , Tang D , Wang K , Wu X , Lu L , Yu H , Gu M , Yan C , Cheng Z . Mutations in the F - box gene *LARGER PANICLE* improve the panicle architecture and enhance the grain yield in rice. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9: 1002-1013
- [27] Larsson S J , Lipka A E , Buckler E S . Lessons from *Dwarf8* on the strengths and weaknesses of structured association mapping. *PLoS Genetics*, 2013, 9 (2): e1003246