

桃花花型(铃形/蔷薇形)基因型鉴定、 分子标记开发与利用

吉爽秋¹, 王力荣², 李 勇², 朱更瑞², 曹 珂²,
方伟超², 陈昌文², 王新卫², 张 琦^{1*}, 吴金龙^{2*}

(¹塔里木大学园艺与林学院, 新疆阿拉尔 843300; ²中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要:【目的】进一步完善桃花型基因型分类, 开发桃花型相关分子标记, 为观赏桃花的分子辅助育种提供理论支持。【方法】利用全基因组关联分析(genome-wide association study, GWAS)、IGV可视化软件分析, 以及竞争性等位基因特异性PCR(Kompetitive allele-specific PCR, KASP)技术, 在定位到的候选位点进行鉴定分析。【结果】GWAS定位分析在Pp08:14 518 604~14 521 291 bp存在一个ms179810转座子的缺失, χ^2 验证结果表明, 转座子的插入与缺失与花型性状无显著性关系。在转座子上游33 980 bp处鉴定到一个单碱基核苷酸(SNP)变异, 变异类型分为CC型、AC型、AA型3种, 比对结果显示基因型为CC型、AC型, 其表型为铃形, 基因型为AA型, 其表型为蔷薇形, 在145份桃自然群体中鉴定准确率为98.62%。但是通过表型比对发现, 基因型为CC时, 铃形花冠直径为(1.54 ± 0.46) cm, 同时, 基因型杂合的中蟠17号自交群体后代192株中基因型与表型准确率在98.44%。【结论】根据桃基因组中Pp08:14 484 624 bp处的变异类型以及桃花型的调查结果, 首次将铃形花基因型细分为纯合铃形和杂合铃形, 且开发了同时鉴定纯合铃形、杂合铃形及蔷薇形的分子标记。

关键词:桃; 花型; 全基因组关联分析(GWAS); IGV; 竞争性等位基因特异性PCR(KASP)

中图分类号: S662.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2023)03-0422-10

Identification of peach flower genotype (Non-showy/Showy), development of flower-type related molecular markers

Ji Shuangqiu¹, Wang Lirong², Li Yong², Zhu Gengrui², Cao Ke², Fang Weichao², Chen Changwen², Wang Xinwei², Zhang Qi^{1*}, Wu Jinlong^{2*}

(¹School of Horticulture and Forestry, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China; ²Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract: 【Objective】 The purpose of this study was to supplement the classification of peach flower types, identify the germplasm resources of homozygous non-showy flower patterns, and develop flower-type-related molecular markers in peach, in order to provide new experimental materials and theoretical support for marker assisted breeding of ornamental peach. 【Methods】 The peach phenotypes of flower types were first investigated, then the genome-wide association analysis (GWAS) based on the structure variations (SV) was performed to locate the key loci identified in 327 peach germplasm resources. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of transposons was performed in different populations, after the amplified PCR products were verified using 1% agarose gel electrophoresis. The coefficients of variation were calculated by chi-square test. The mining of the key variant loci was performed by the integrative genomics viewer (IGV) software to identify candidate intervals from 145 peach germplasm materials. The 192 inbreeding populations of Zhongpan 17 were used for kompetitive allele-specific PCR (KASP) experiments to verify the accuracy of genotypes and phenotypes. 【Results】 The flower-types

收稿日期: 2022-07-19 接受日期: 2022-10-10

基金项目: 新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目(XJ2022G246); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-ZZFR-01)

作者简介: 吉爽秋, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为桃种质资源与遗传育种。Tel: 18330344681, E-mail: 2423459066@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13627297510, E-mail: wujinlong@caas.cn

(d) of peach were mainly divided into Non-showy, Showy and Chrysanthemum-shapes, among which the Non-showy type was dominant to the Showy type. The data of flower type localization analysis carried out so far were SNP mutations, and the flower-type (d) candidate gene was locked in the range of 14-16 M on chromosome 8. However, GWAS results based on SNPs tended to locate larger intervals with more variant loci within the intervals, and it was still challenging to carry out key gene mining, while the SVs of variants could affect the function of genes over SNPs. A variant ms179 810 transposon was identified at Pp08: 14 518 604-14 521 291 bp, and GWAS localization analysis was performed by the identified SVs, using the resequencing results from 327 peach germplasm materials. The localization results showed that the transposon exhibited insertion in the non-showy locus? and deletion in the Showy locus? A total of 384 individuals concluding Ruiguang 39×08-9-106, Qinglang×Zhongyoupan 7 hybrid populations and the Zhongpan 17 inbreeding population were amplified to verify the accuracy of the transposons. The chi-square test showed that the insertion of transposons was not significantly associated with the floral traits. But this did not mean that the error of the localization interval? and did not exclude the existence of other loci with high phenotypic association in the vicinity of the transposon. The resequencing data of 145 peach germplasm materials were used to find the variant loci related to flower type at the range of 200 kb in the transposon, and finally, a SNP variant was identified at 33 980 bp upstream of the transposon. The exact location was Pp: 14 484 624 bp. The locus had three types of variants, including CC, AC and AA. When the flower phenotype was Non-showy, the genotype was CC or AC, and when the flower phenotype was Showy, the genotype was AA. The accuracy of genotypes and phenotypes was 98.62%. However, the phenotypic comparison showed that the corolla diameter of non-showy type CC was smaller than AC, and the Non-showy type might be incompletely dominant to the Showy type. To verify this hypothesis, the inbreeding population of Zhongpan 17 (heterozygous Non-showy) was used for identification, we found that the genotype and phenotype segregation ratio of the homozygous Non-showy: heterozygous non-showy: Showy types in the inbreeding population were close to 1:2:1, and the accuracy was 98.44%, which conformed to Mendel's law of genetic segregation. The corolla diameter of the homozygous non-showy type was similar to the sepal diameter, (1.54±0.46) cm, while the corolla diameter of the heterogeneous non-showy type was generally (2.61±0.4) cm and the corolla diameter of Showy type was greater than 3.7 cm. The subsequent cluster analysis of the diameter size also showed that the homozygous and heterozygous non-showy types were more closely related to each other and more distantly related to the Showy type, resulting in the difficulty to accord with a traditional classification that did not separate homozygous and heterozygous non-showy types. 【Conclusion】 The Non-showy flowers of peach we subdivided into homozygous and heterozygous Non-showy types for the first time, based on the variant type at Pp08:14 484 624 bp of the peach genome and the findings of the peach flower phenotype, and the molecular markers to identify homozygous non-showy, heterozygous Non-showy and Showy types were developed as well. The identification of homozygous non-showy germplasm resources would provide a clue for marker assisted selection for ornamental peach.

Key words: Peach; Flower type; Genome-wide association analysis (GWAS); Integrative genomics viewer (IGV); Kompetitive allele-specific PCR (KASP)

桃(*Prunus. persica* L.),蔷薇科,李属,多年生自花授粉落叶果树。因其染色体数目少($2n=16$),基因组小(227 Mb),童期短,被认为是蔷薇科果树研究的模式植物^[1]。中国是桃的起源中心,种质资源

遗传多样性丰富。观赏桃是桃种质资源的重要类型。其花型主要分为铃形、蔷薇形和菊花形(图1),在三大花型的基础上,通过育种技术的不断更新,花型、花色、树形、枝形和叶色的交叉组合,赋予桃花更



图1 桃花三大花型性状

Fig. 1 Three major flower type traits of peach flower

多的表现形式^[2-3]。

铃形和蔷薇形是一对等位基因控制的质量性状。铃形花冠直径小,花瓣细长,完全开放时形似铃铛;蔷薇形花冠直径大,花瓣肥硕,开放时花瓣展开,在外观上容易区分表型,且该性状属于质量性状,定位分析相对简单,因此前人对此做了大量的研究,例如,在2009年Ogundiwin等^[4]利用罐桃品种Dr. Davis和鲜食桃品种Georgia Belle的F₁群体,构建了一个包含211个标记的遗传连锁图谱Pop-DG,将铃形/蔷薇形关联位点定位于8号染色体34.4 cM处;2010年Fan等^[5]利用QTL定位将桃花铃形/蔷薇形定位在8号染色体上的CPPT006与PacC13两个标记之间。之后随着GWAS定位技术在果树分子育种上的发展,2015年Micheletti等^[6]基于9K SNP芯片对1580份桃种质资源进行GWAS分析,发现8号染色体18个SNP标记与铃形/蔷薇形关联紧密,范围大小为4.3 Mb;2016年Cao等^[7]利用129份桃种质材料,在8号染色体13 740 117 bp处发现的1个SNP位点与铃形/蔷薇形关联度较高;2021年孟歌等^[8]利用199份桃种质,将铃形/蔷薇形定位在8号染色体14 484 624 bp处,并开发了相应的分子标记;2022年Lian等^[9]利用黄水蜜×中油桃14杂交后代81株,在8号染色体PpB3-1基因启动子区发现了1个与表型关联度极高的SNP。目前开展的花型定位分析绝大多数利用的数据是SNP基因型,将控制桃花型的候选基因范围锁定在8号染色体14 Mb~16 Mb之间,但是基于SNP的GWAS结果定位区间往往较大,区间内的变异位点较多,开展关键基因挖掘工作仍具挑战性。而变异的SV(Structure Variations)较SNP而言,更能影响基因的功能^[10]。因此笔者利用本课题组前期发表的327份桃种质材料的重测序结果,利用鉴定到的SV位点进行全基因组关联分析

(GWAS),将候选基因的范围锁定在14.4 Mb~14.6 Mb之间,并挖掘到1个与表型相关性极高的SNP位点Pp08: 14 484 624 bp,利用KASP基因分型技术验证了该位点的准确性,同时在与表型的验证过程中首次提出纯合铃形/杂合铃形之分,为进一步克隆关键基因提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料

用于本试验GWAS分析的材料主要源于327份桃种质材料,具体品种参考Guo等^[11],用于转座子验证的材料主要来源于1个192株的自交群体,2个96株的杂交群体,自交群体为中蟠17号,杂交群体为瑞光39号×08-9-106和晴朗×中油蟠7号,用于IGV可视化分析的145份桃种质材料(表1),其中有59份为GWAS已有重测序数据,86份新增重测序数据。以上种质资源及自交和杂交群体后代均来自国家园艺种质资源库和中国农业科学院郑州果树研究所桃种质资源圃。

1.2 表型数据的调查

2022年3、4月对自然群体及杂交群体的表型进行调查。具体调查结果如表2所示。

1.3 DNA提取与测序

样品DNA的提取采用改良的CTAB法,具体方法参考张南南等^[12]的方法,DNA质量用NanoDrop 1000 spectrophotometer(Thermo Scientific)紫外分光光度仪检测。用于KASP基因分型的样品DNA质量浓度调整至50~100 ng·μL。用于GWAS定位分析的DNA纯化后构建文库和测序,文库大小为350 bp,测序平台选用Hiseq X Ten(Illumina),测序任务由安诺优达基因科技有限公司(北京)完成。经数据质控后(FastQC),每个样本产生至少5 Gb的数据^[11]。

表1 用于IGV比对的145份桃种质资源
Table 1 145 peach germplasm resources used for IGV comparison

| 编号 Number | 品种名称 Variety name | 表型 Phenotype | 花冠直径 Corolla diameter/ cm | 编号 Number | 品种名称 Variety name | 表型 Phenotype | 花冠直径 Corolla diameter/ cm |
|--------------|------------------------------|-----------------|------------------------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| 1 | 吊枝白 Diaozhibai | 蔷薇形 Showy | 3.6 | 43 | 黄金蟠桃 Huangjinpantao | 蔷薇形 Showy | 5.0 |
| 2 | 大雪桃 Daxuetao | 蔷薇形 Showy | 4.4 | 44 | 雨花露 Yuhualu | 蔷薇形 Showy | 3.9 |
| 3 | 黑布袋 Heibudai | 蔷薇形 Showy | 4.2 | 45 | 砂子早生 Shazizaosheng | 蔷薇形 Showy | 4.5 |
| 4 | 肥城红里6号 Feichenghongli 6 | 蔷薇形 Showy | 4.3 | 46 | 沙红桃 Shahongtao | 蔷薇形 Showy | 4.2 |
| 5 | 山东四月半 Shandongsiyueban | 蔷薇形 Showy | 3.0 | 47 | 龙华水蜜 Longhuashuimi | 蔷薇形 Showy | 4.0 |
| 6 | 青丝桃 Qingsitao | 蔷薇形 Showy | 4.0 | 48 | 有明白桃 Youmingbaitao | 蔷薇形 Showy | 5.1 |
| 7 | 晚湖景蜜露 Wanhujingmilu | 蔷薇形 Showy | 4.0 | 49 | 鸡嘴白 Jizuitao | 蔷薇形 Showy | 4.2 |
| 8 | 红李光 Hongliguang | 蔷薇形 Showy | 4.2 | 50 | 齐桃 Qitao | 蔷薇形 Showy | 3.9 |
| 9 | 金凤 Jinfeng | 蔷薇形 Showy | 4.0 | 51 | 深州离核水蜜 Shenzhouliheshuimi | 蔷薇形 Showy | 4.2 |
| 10 | 红叶桃 Hongyetao | 蔷薇形 Showy | 4.4 | 52 | 深州白蜜 Shenzhoubaimi | 蔷薇形 Showy | 4.4 |
| 11 | 帚形山桃 Zhouxingshantao | 蔷薇形 Showy | 3.7 | 53 | 阳泉肉桃 Yangquanroutao | 蔷薇形 Showy | 3.8 |
| 12 | 光核桃 Guanghetao | 蔷薇形 Showy | 3.8 | 54 | 青州红皮蜜桃 Qingzhouhongpimitao | 蔷薇形 Showy | 3.8 |
| 13 | 红花山桃 Honghuashantao | 蔷薇形 Showy | 3.7 | 55 | 叶县冬桃 Yexiandongtao | 蔷薇形 Showy | 3.2 |
| 14 | 甜仁桃 Tianrentao | 蔷薇形 Showy | 3.5 | 56 | 敦煌冬桃 Dunhuangdongtao | 蔷薇形 Showy | 4.2 |
| 15 | 青州白皮蜜桃 Qingzhoubaipimitao | 蔷薇形 Showy | 4.2 | 57 | 肥城白里17号 Feichengbaili 17 | 蔷薇形 Showy | 4.6 |
| 16 | 早熟黄甘 Zaoshuhuanggan | 蔷薇形 Showy | 4.1 | 58 | 张白5号 Zhangbai 5 | 蔷薇形 Showy | 4.5 |
| 17 | 肥城白里10号 Feichengbaili 10 | 蔷薇形 Showy | 3.4 | 59 | 临白3号 Linbai 3 | 蔷薇形 Showy | 5.1 |
| 18 | 南山甜桃 Nanshantiantao | 蔷薇形 Showy | 4.4 | 60 | 石桃 Shitao | 蔷薇形 Showy | 4.4 |
| 19 | 喀什1号 Kashi 1 | 蔷薇形 Showy | 4.6 | 61 | 五月白 Wuyuebai | 蔷薇形 Showy | 4.7 |
| 20 | 新疆蟠桃1号 Xinjiangpantao 1 | 蔷薇形 Showy | 4.7 | 62 | 卡里南 Cullinan | 铃形 Non-showy | 1.5 |
| 21 | 新疆蟠桃2号 Xinjiangpantao 2 | 蔷薇形 Showy | 4.6 | 63 | 早黄金 Zaohuangjin | 蔷薇形 Showy | 4.8 |
| 22 | 白花 Baihua | 蔷薇形 Showy | 4.5 | 64 | 丰黄 Fenghuang | 蔷薇形 Showy | 4.9 |
| 23 | 兴津油桃 Xingjinyoutao | 蔷薇形 Showy | 4.1 | 65 | 连黄 Lianhuang | 蔷薇形 Showy | 4.7 |
| 24 | 大久保 Dajiubao | 蔷薇形 Showy | 4.7 | 66 | 江村4号 Jiangcun 4 | 蔷薇形 Showy | 3.8 |
| 25 | 天津水蜜 Tianjinshuimi | 蔷薇形 Showy | 3.7 | 67 | 农神蟠桃 Nongshenpantao | 蔷薇形 Showy | 4.7 |
| 26 | 鹰嘴桃 Yingzuitao | 蔷薇形 Showy | 4.6 | 68 | 奉化蟠桃 Fenghuapantao | 蔷薇形 Showy | 4.8 |
| 27 | 扁桃 Biantao | 蔷薇形 Showy | 4.3 | 69 | 中油蟠1号 Zhongyoupan 1 | 铃形 Non-showy | 3.2 |
| 28 | 金塔油蟠桃 Jintayoupantao | 蔷薇形 Showy | 4.8 | 70 | 平顶油蟠桃 Pingdingyoupantao | 蔷薇形 Showy | 4.2 |
| 29 | 五月鲜扁干 Wuyuexianbiangan | 蔷薇形 Showy | 4.8 | 71 | 早红2号 Zaohong 2 | 蔷薇形 Showy | 5.1 |
| 30 | 肉蟠桃 Roupantao | 蔷薇形 Showy | 3.1 | 72 | 人面桃 Renmiantao | 蔷薇形 Showy | 5.3 |
| 31 | 青桃 Qingtao | 蔷薇形 Showy | 4.5 | 73 | 绛桃 Jiangtao | 蔷薇形 Showy | 5.3 |
| 32 | 晚白花 Wanbaihua | 蔷薇形 Showy | 4.4 | 74 | 黄李光 Huangliguang | 蔷薇形 Showy | 4.4 |
| 33 | 大红袍 Dahongpao | 蔷薇形 Showy | 4.2 | 75 | 粉红碧桃 Fenhongbitao | 蔷薇形 Showy | 6.1 |
| 34 | 乌黑鸡肉桃 Wuheijiroutao | 蔷薇形 Showy | 3.5 | 76 | 六月空 Liuyuekong | 蔷薇形 Showy | 4.8 |
| 35 | 石头桃 Shitoutao | 蔷薇形 Showy | 4.2 | 77 | 武汉大红袍 Wuhandahongpao | 蔷薇形 Showy | 4.2 |
| 36 | 曙光 Shuguang | 蔷薇形 Showy | 4.2 | 78 | 湖景蜜露 Hujingmilu | 蔷薇形 Showy | 4.0 |
| 37 | 丽格兰特 Legrand | 蔷薇形 Showy | 3.5 | 79 | 南方红花早 Nanfanghonghuazao | 蔷薇形 Showy | 4.2 |
| 38 | 瑞光2号 Ruiguang 2 | 铃形 Non-showy | 1.8 | 80 | 春蕾 Chunlei | 蔷薇形 Showy | 4.5 |
| 39 | 莺歌桃 Yinggetao | 蔷薇形 Showy | 4.5 | 81 | 春时 Springtime | 铃形 Non-showy | 2.6 |
| 40 | 洒红桃 Sahongtao | 蔷薇形 Showy | 5.8 | 82 | 朝晖 Zhaohui | 蔷薇形 Showy | 4.5 |
| 41 | 瑞光3号 Ruiguang 3 | 铃形 Non-showy | 2.1 | 83 | 玉露 Yulu | 蔷薇形 Showy | 4.5 |
| 42 | 麦黄蟠桃 Maihuangpantao | 蔷薇形 Showy | 3.9 | 84 | 秦王 Qinwang | 蔷薇形 Showy | 5.4 |
| | | | | 85 | 锦绣 Jinxiu | 蔷薇形 Showy | 4.2 |

表 1 (续) Table 1 (Continued)

| 编号 Num- ber | 品种名称 Variety name | 表型 Phenotype | 花冠直径 Corolla diameter/ cm | 编号 Num- ber | 品种名称 Variety name | 表型 Phenotype | 花冠直径 Corolla diameter/ cm |
|-------------------|---------------------------|-----------------|------------------------------------|-------------------|--------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| 86 | 西尾 Goldxiweigold | 蔷薇形 Showy | 4.5 | 117 | 美香 Mika | 蔷薇形 Showy | 5.3 |
| 87 | 郑黄 2 号 Zhenghuang 2 | 蔷薇形 Showy | 4.0 | 118 | 柳叶肥城桃 Liuyefeichengtao | 蔷薇形 Showy | 4.5 |
| 88 | Njc105 | 铃形 Non-showy | 2.2 | 119 | 春花 Chunhua | 蔷薇形 Showy | 4.2 |
| 89 | Njc83 | 蔷薇形 Showy | 4.0 | 120 | Honeyblaze | 蔷薇形 Showy | 4.1 |
| 90 | 金童 6 号 Babygold 6 | 铃形 Non-showy | 2.6 | 121 | 郑黄 4 号 Zhenghuang 4 | 蔷薇形 Showy | 4.4 |
| 91 | Njc47 | 铃形 Non-showy | 2.0 | 122 | 丰白 Fengbai | 蔷薇形 Showy | 4.1 |
| 92 | 明星 Myojo | 铃形 Non-showy | 2.4 | 123 | 双佛 Sunfre | 蔷薇形 Showy | 4.6 |
| 93 | 早露蟠桃 Zaolupantao | 蔷薇形 Showy | 4.2 | 124 | 仙桃 Xiantao | 蔷薇形 Showy | 4.7 |
| 94 | Njf10 | 蔷薇形 Showy | 4.5 | 125 | C17 | 蔷薇形 Showy | 4.5 |
| 95 | 苏联蟠桃 Sulianpantao | 蔷薇形 Showy | 4.2 | 126 | C18 | 蔷薇形 Showy | 4.2 |
| 96 | 千年红 Qiannianhong | 蔷薇形 Showy | 4.5 | 127 | 小白桃 Xiaobaitao | 蔷薇形 Showy | 4.4 |
| 97 | 艳光 Yanguang | 铃形 Non-showy | 2.8 | 128 | 银花露 Yinhualu | 蔷薇形 Showy | 4.5 |
| 98 | 金辉 Jinhui | 铃形 Non-showy | 2.7 | 129 | 张黄 9 号 Zhanghuang 9 | 蔷薇形 Showy | 4.4 |
| 99 | 瑞光 7 号 Ruiguang 7 | 蔷薇形 Showy | 4.7 | 130 | 铁桃 Tie Tao | 蔷薇形 Showy | 4.1 |
| 100 | Njn78 | 铃形 Non-showy | 2.1 | 131 | 中蟠 17 号 Zhongpan 17 | 铃形 Non-showy | 2.7 |
| 101 | 白凤 Hakuho | 蔷薇形 Showy | 4.4 | 132 | Njn76 | 铃形 Non-showy | 1.7 |
| 102 | 中油 8 号 Zhongyou 8 | 铃形 Non-showy | 2.2 | 133 | 白根甘肃桃 Baigengansutao | 蔷薇形 Showy | 4.5 |
| 103 | 北京晚蟠桃 Beijingwanpantao | 蔷薇形 Showy | 4.4 | 134 | 红根甘肃桃 Honggengansutao | 蔷薇形 Showy | 4.4 |
| 104 | 春蜜 Chunmi | 蔷薇形 Showy | 3.8 | 135 | 喀什黄肉李光 Kashihuangrouliguang | 蔷薇形 Showy | 4.3 |
| 105 | 锦香 Jinxiang | 蔷薇形 Showy | 4.0 | 136 | 上海水蜜 Chinesecling | 蔷薇形 Showy | 4.3 |
| 106 | 中蟠桃 10 号 Zhongpantao 10 | 蔷薇形 Showy | 4.0 | 137 | 京玉 Jingyu | 蔷薇形 Showy | 4.6 |
| 107 | 霞晖 1 号 Xiahui 1 | 蔷薇形 Showy | 4.5 | 138 | 中油 5 号 Zhongyou 5 | 铃形 Non-showy | 2.6 |
| 108 | 瑞蟠 4 号 Ruipan 4 | 蔷薇形 Showy | 4.2 | 139 | Njn80 | 铃形 Non-showy | 1.5 |
| 109 | 华玉 Huayu | 蔷薇形 Showy | 4.0 | 140 | 平顶秋桃 Pingdingqiutao | 蔷薇形 Showy | 4.2 |
| 110 | 08-9-107 | 蔷薇形 Showy | 4.0 | 141 | 瑞光 18 号 Ruiguang 18 | 铃形 Non-showy | 4.9 |
| 111 | 大果黑桃 Daguohetao | 蔷薇形 Showy | 3.7 | 142 | 美味 Flavortop | 铃形 Non-showy | 4.5 |
| 112 | 瑞光美玉 Ruiguangmeiyu | 蔷薇形 Showy | 4.2 | 143 | 瑞光 39 号 Ruiguang 39 | 蔷薇形 Showy | 4.6 |
| 113 | 晴朗 Qinglang | 蔷薇形 Showy | 5.0 | 144 | 砧 1-3 Zhen 1-3 | 铃形 Non-showy | 2.8 |
| 114 | 早玉 Zaoyu | 蔷薇形 Showy | 4.0 | 145 | 08-9-106 | 蔷薇形 Showy | 2.7 |
| 115 | 春美 Chunmei | 蔷薇形 Showy | 4.5 | | | | |
| 116 | 映霜红 Yingshuanghong | 蔷薇形 Showy | 4.2 | | | | |

表 2 桃花型表型调查结果

Table 2 Statistical of peach flower-type phenotype

| 表型 Phenotype | 种质资源 Germplasm | | 遗传群体 Genetic group | | |
|-----------------|-------------------|-----|--------------------|----|----|
| | GWAS | IGV | KASP | | |
| | | | Q1 | Q2 | Q3 |
| 铃形 Non-showy | 72 | 18 | 135 | 52 | 96 |
| 蔷薇形 Showy | 255 | 127 | 57 | 44 | 0 |
| 总计 Total | 327 | 145 | 192 | 96 | 96 |

注: Q1 为自交群体中蟠 17 号, Q2, Q3 分别为杂交群体瑞光 39 号×08-9-106, 晴朗×中油蟠 7 号。

Note: Q1 is the inbreeding population Zhongpan 17, Q2 and Q3 are respectively the hybrid population Ruiguang 39×08-9-106 and Qinglang×Zhongyoupan 7.

1.4 全基因组关联分析

利用 SV 数据开展 GWAS 分析, 最终产生 181 381 个变异位点, 定位出铃形/蔷薇形相关的变异位点, 并曼哈顿 (Manhattan) 图显示关联位点。

1.5 IGV 可视化分析

利用 IGV 可视化查看基因组重测序结果, 比对文件为下机的 bam 文件, 导入 IGV 的 bam 文件附加 samtools 文件, 生成 3 个相关的 tracks, Alignment Track, Coverage Track, Splice Junction Track, 对 145 份桃品种基因组序列进行比对。

1.6 KASP 标记分型

竞争性等位基因特异性 PCR (KASP) 扩增体

系:5 μL 2 \times KASP master mix(广州固德生物技术有限公司,广州,中国),1 μL DNA 样品,0.5 μL 混合引物以及3.5 μL 水,添加混合试剂前加入等体积石蜡油封体系。KASP 扩增程序如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,61~55 $^{\circ}\text{C}$ 复性延伸 60 s,10 个循环,每个循环复性延伸温度降低 0.6 $^{\circ}\text{C}$;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,

55 $^{\circ}\text{C}$ 复性延伸 60 s,32 个循环。荧光数据读取和分析仪器为 Roche LC96 II (Roche Diagnostics, USA), 读取温度为 37 $^{\circ}\text{C}$, 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, hexachlorouorescein)。KASP 引物序列信息见表 3。

表 3 KASP 分型所用引物序列信息

Table 3 Primer sequence information used for KASP typing

| 位点名称 Loci name | 引物名称 Prmer name | 引物序列 Primer sequences |
|-------------------|--------------------|---|
| Pp08:14484624 | Primer-FA M | GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATACGTGTACAATAGATAGTCCAC |
| | Primer-HEX | GAAGGTCCGAGTCAACGGATTATACGTGTACAATAGATAGTCCAA |
| | Primer-Common | CTACTGATTTGGTCTGTTGGGTAACACCT |

2 结果与分析

2.1 铃形/蔷薇形性状关键位点全基因组关联分析

笔者在本研究中通过对 327 份桃材料进行重测

序分析,利用 SV 变异定位铃形/蔷薇形候选区间,在桃全基因组中共获得 181 381 个高质量 SV 位点。GWAS 结果发现在 Pp08:14 518 604~14 521 291 处有一个 2866 bp 转座子(TE)与花型显著相关(图 2),

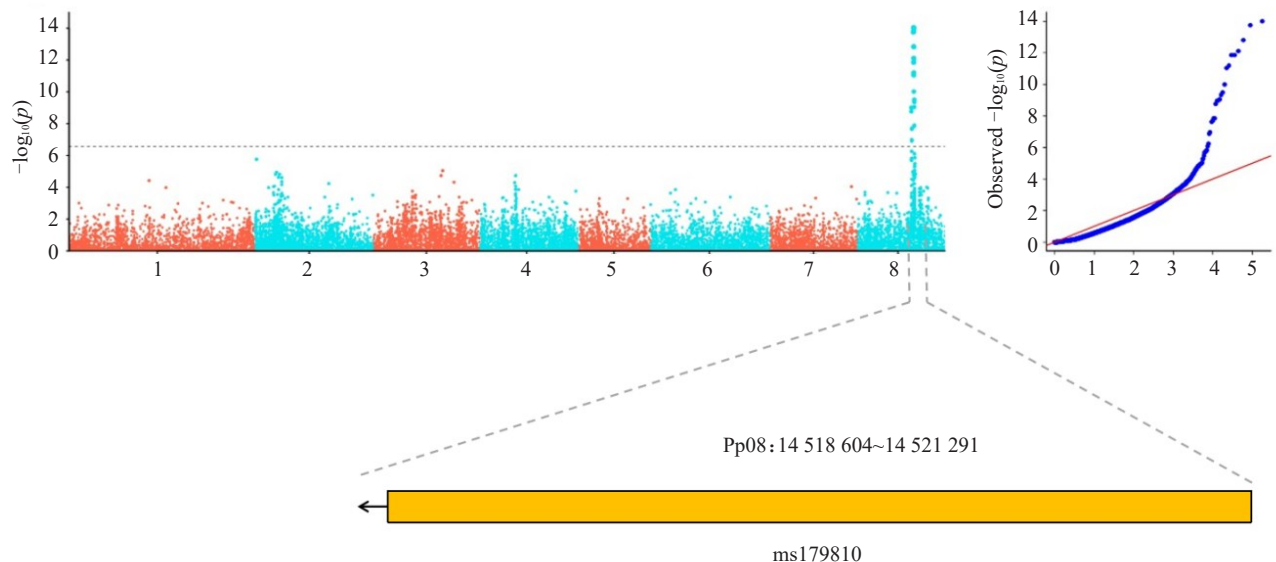


图 2 基于 CMLM 模型的铃形/蔷薇形花型性状 SV 关联分析曼哈顿图和 QQ-plot 图

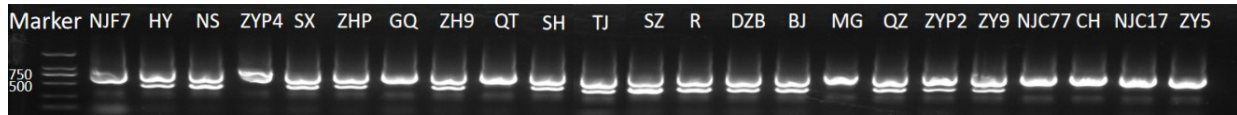
Fig. 2 Manhattan diagram and QQ-plot of SV-based GWAS of Showy/Non-showy flower shape traits using CMLM model

缩短了前人的定位区间。PCR 扩增该转座子后,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳在 23 份种质资源(图 3)和 384 份杂交群体后代中进行验证(表 4)。发现在 23 份桃种质中没有差异,在 384 份杂交群体后代中虽然存在分离,但 χ^2 检验结果却表明转座子的插入与缺失与花型无显著的相关性。

2.2 IGV 可视化分析挖掘变异关键位点

由于转座子的插入与花型之间没有显著性关系,且该定位区间附近基因数量较少,从而在原有的定位

基础上,扩大定位区间,在定位区间前后 100 kb 的范围内,利用 IGV 软件,以 *Prunus persica*-genome.v2.0.a1 作为参考基因组,在 145 份桃种质材料重测序数据中比对分析,发现在转座子上游 33 980 bp 处存在一个变异的 SNP(C \rightarrow A),该位点为 Pp08:14 484 624 bp,经比对发现,该位点存在 3 种变异类型,如图 4-a~c 所示,图 4-a 位点为 CC 时,表现为铃形花,图 4-b 位点为 AC 时,表现依然为铃形花,图 4-c 位点为 AA 时,表现为蔷薇形花。但是通过与表型比对发现,位点为 CC 时的



NJF7. NJF7(*Sh*); HY. 红叶桃(*Sh*); NS. 南山甜桃(*Sh*); ZYP4. 中油蟠 4 号(*sh*); SX. 双喜红(*sh*); ZHP. 早黄蟠桃(*Sh*); GQ. Golden Queen(*Sh*); ZH9. 张黄 9 号(*Sh*); QT. 青桃(*Sh*); SH. 上海水蜜(*Sh*); TJ. 天津水蜜(*Sh*); SZ. 深州水蜜(*Sh*); R. 肉蟠桃(*Sh*); DZB. 吊枝白(*Sh*); BJ. 北京晚蟠桃(*Sh*); MG. 美国蟠桃(*Sh*); QZ. 青州白皮蜜桃(*Sh*); ZYP2. 中油蟠 2 号(*sh*); ZY9. 中油 9 号(*sh*); NJC77(*sh*); CH. Grest Haven(*sh*); NJC17(*sh*); ZY5. 中油 5 号(*sh*).

NJF7(*Sh*); HY. Hongyetao(*Sh*); NS. Nanshantiantao(*Sh*); ZYP4. Zhongyoupan 4(*sh*); SX. Shuangxihong(*sh*); ZHP. Zaohuangpantao(*Sh*); GQ. Goldenqueen(*Sh*); ZH9. Zhang Huang 9(*Sh*); QT. Qingtao(*Sh*); SH. Chinese Cling(*Sh*); TJ. Tianjinshuimi(*Sh*); SZ. Shenzhoushuimi(*Sh*); R. roupantao(*Sh*); DZB. Diaozhibai(*Sh*); BJ. Beijingwanpantao(*Sh*); MG. Meiguopantao(*Sh*); QZ. Qingzhoubaipimitao(*Sh*); ZYP2. Zhongyoupan 2(*sh*); ZY9. Zhongyou 9(*sh*); NJC77(*sh*); GH. Grest Haven(*sh*); NJC17(*sh*); ZY5. Zhongyou 5(*sh*).

图 3 转座子鉴定的 23 份桃品种琼脂糖凝胶图

Fig. 3 Agarose gel result of 23 peach varieties identified by transposon

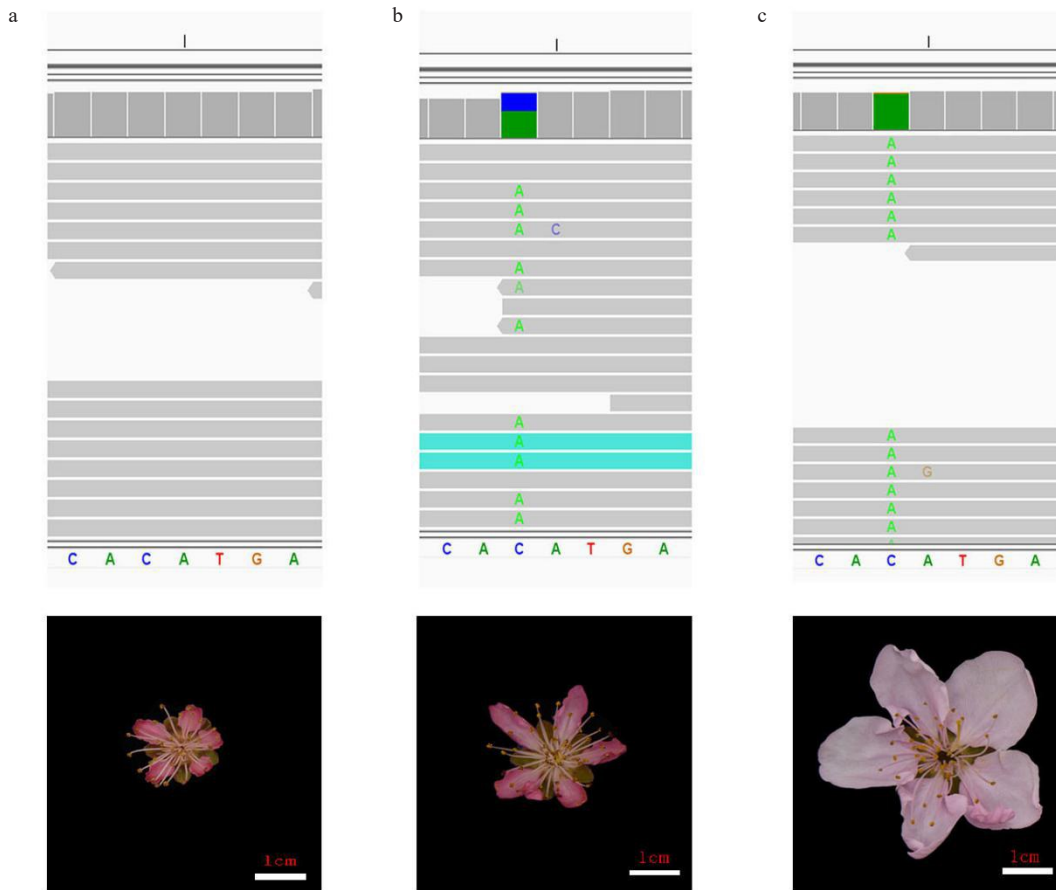
表 4 用于转座子鉴定的 384 份遗传群体及 χ^2 检验结果

Table 4 Results of χ^2 test and 384 genetic populations used for transposon identification

| 项目 Item | 位点信息 Loci name | 物理位置 Position | 铃形 Non-showy | 蔷薇形 Showy | χ^2 值 χ^2 value | $-\log_{10}(p)$ 值 $-\log_{10}(p)$ value | 正确率 Accuracy/% |
|----------|-------------------|-------------------------------|-----------------|--------------|------------------------------|--|-------------------|
| 数值 Value | ms179810 | Pp08:14 518 604~14 521 291 bp | 0 | 1 | 147.310 | 6.71 | 68.75 |

注: $\chi^2 < 0.05$, 表示具有显著相关性。下同。

Note: $\chi^2 < 0.05$, Indicates a significant correlation. The same below.



a. 纯合铃形比对结果; b. 杂合铃形比对结果; c. 蔷薇形比对结果。

a. Results of homozygous Non-showy alignment; b. Results of heterozygous Non-showy alignment; c. Results of Showy alignment.

图 4 145 份桃资源 IGV 比对结果

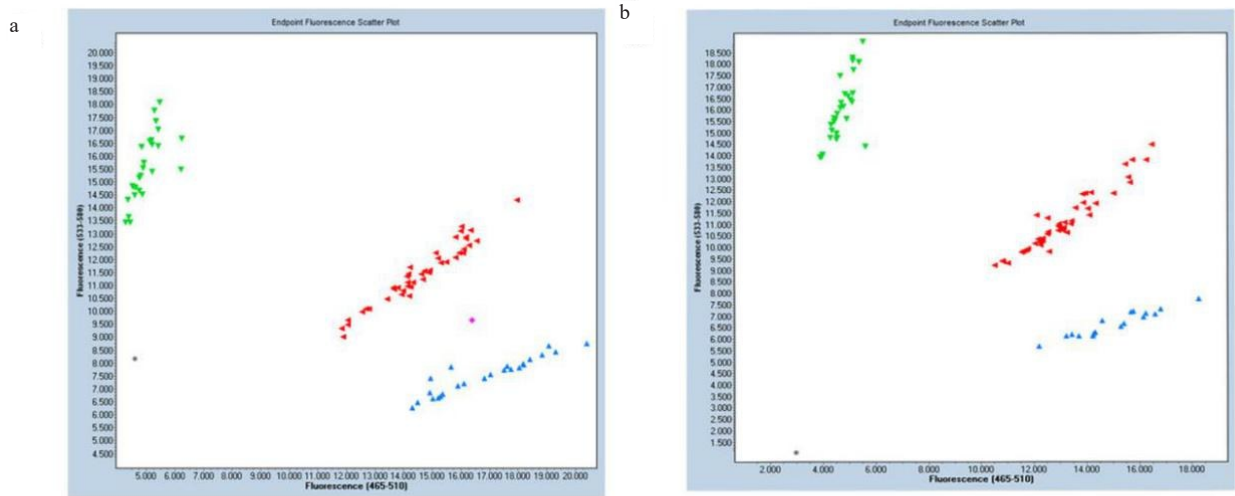
Fig. 4 IGV comparison results of 145 peach resources

铃形花冠直径比位点为AC的更小,位点为CC时花冠直径为(1.54±0.46) cm,位点为AC时花冠直径为(2.61±0.4) cm。因此笔者认为,在花型的分类中,铃形花又可以分为纯合铃形和杂合铃形。

2.3 KASP基因分型技术鉴定纯合铃形种质

由于铃形/蔷薇形是由一对等位基因控制的质量性状,根据孟德尔遗传规律,变异位点为AC的铃形花自交后代应该出现以上3种花型的分型。因此采用该

位点基因型为AC的中蟠17号,利用其自交群体后代192株,对Pp08:14 484 624 bp进行KASP基因分型验证,发现中蟠17号自交群体有3种基因型(图5),分离比为41:94:54,接近1:2:1。对中蟠17号自交群体的花冠直径进行了调查统计(图6),花冠直径被分为(1.54±0.46) cm、(2.61±0.4) cm、大于3.7 cm 3种类型,分别为纯合铃形、杂合铃形、蔷薇形,与基因型比对正确率在98.44%(表5)。对所得结果进行聚类分析(图7),发



绿色荧光代表蔷薇形(AA);红色荧光代表杂合铃形(AC);蓝色荧光代表纯合铃形(CC)。

Green fluorescence represents Showy(AA); Red fluorescence represents heterozygous Non-showy (AC); Blue fluorescence represents the homozygous Non-showy (CC).

图5 中蟠17号自交群体的KASP标记基因分型图

Fig. 5 Genotyping map of KASP marker in self-crossing population of Zhongpan 17

表5 基因型与表型比对结果

Table 5 Comparison of genotype and phenotype for flower type

| 位点信息 Loci name | 物理位置 Position | 纯合铃形 Non-showy(C) | 杂合铃形 Non-showy(Z) | 蔷薇形 Showy | χ^2 值 χ^2 value | p值 p value | 正确率 Accuracy/% |
|-------------------|------------------|----------------------|----------------------|--------------|------------------------------|---------------|-------------------|
| Pp08:14 484 624 | Pp08:14 484 624 | CC | AC | AA | 0.007 | 0.001 3 | 98.44% |

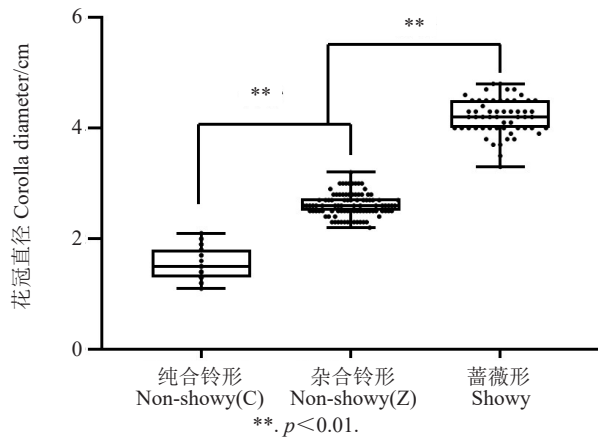


图6 中蟠17号自交群体花冠直径箱型图

Fig. 6 Box plot of flower diameter in the offsprings of Zhongpan 17

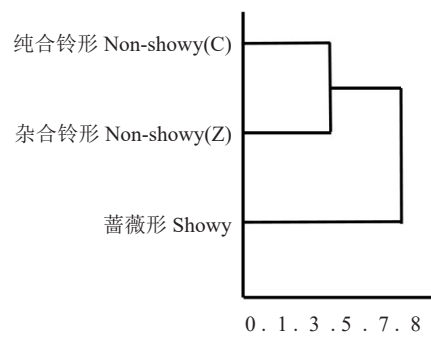


图7 中蟠17号自交群体花冠直径聚类分析

Fig. 7 Cluster analysis of flower diameter in offsprings of Zhongpan 17

现纯合铃形和杂合铃形关系更近,较蔷薇形关系较远。

3 讨 论

在花型分类中,育种家更倾向于培育花冠直径大且重瓣的蔷薇形花,比如:洒红龙柱、报春、迎春、满天红等^[13-16]。花冠直径大小也一直被认为是区分铃形/蔷薇形的标准之一,因此开发控制花型的分子标记,对观赏桃花分子育种具有重要指导意义。

有研究推断花的大小进化轨迹是从小花到大花,此过程要经过多年的遗传变异和自然选择^[17-18]。Landis等^[19]的研究发现,黄花菜种群的花从种质的起源到现在变大了2.5倍;Mojica等^[20]的研究发现,在自然变异中,大的菊花需要花费2000年的时间才能从小的菊花突变而来。花型是影响交配系统进化和繁殖成功的一个关键生态性状,传粉者、天敌和非生物环境是花型变异的驱动力,花型差异通常与不同的传粉者有关,形成传粉综合征^[21],花型一直被认为是操控传粉者的一种适应方式^[22-23],促进花型向着大花型的方向进化,更有利于传粉者授粉。但是一些物种花形态的差异往往不符合这一推断,有研究发现,自交群体的起源是和他们祖先非常接近的杂交群体,从异花授粉到自花授粉伴随着花的形态学向“自交综合征”的显著变化,其特征就是花的大小缩小,花的性状大多数变异是由群体遗传变异而来,但是花形态上的某些差异可能归因于一个单独的进化史^[24]。桃就是典型的自花授粉植物,虽然铃形对蔷薇形为显性,但是上海水蜜桃作为栽培桃的祖先^[25-26],其花型为蔷薇形,并且有研究报道GF677(蔷薇形)与红根甘肃桃1号(蔷薇形)杂交,后代出现了广泛的分离,F₁代出现了铃形花,因此铃形花可能是桃、扁桃与甘肃桃种间杂交而来的^[27]。综合桃花的发展和进化史,从而推断铃形花可能从蔷薇形花中突变而来。研究桃花型的进化史,首先需明确控制花型的关键基因,尽管此前对于铃形/蔷薇形的定位做了大量研究,将关键基因定位在8号染色体14 Mb~16 Mb之间,但具体位置一直存在差异。笔者在本研究中利用基于SV的GWAS分析,最显著的信号位于8号染色体ms179810转座子, χ^2 检验结果却表明转座子的插入与缺失与花型没有显著的相关性,但在该定位区间挖掘到一个与表型相关度极高的SNP(Pp08:14 484 624 bp),经查阅文献资料,

孟歌等^[8]利用199份桃资源,筛选到1 042 687个SNP标记,利用GWAS分析找到同样的位点,经鉴定与表型的准确率在93.46%。笔者通过改进引物、增加验证群体,提出并验证了纯合铃形的存在,因此该标记在桃自然群体中表型符合率在98.62%,在杂交群体中表型准确率在98.44%,证明该位点不仅可作为区分铃形/蔷薇形的分子标记,还可以作为区分纯合铃形/杂合铃形的分子标记。

4 结 论

笔者根据桃基因组Pp08:14 484 624 bp处的变异类型以及桃花型的调查结果,首次将铃形花细分为纯合铃形和杂合铃形,且开发了同时鉴定纯合铃形、杂合铃形及蔷薇形的分子标记。纯合铃形种质资源的鉴定,为鉴定与挖掘提供新的实验材料,推动了桃花型的研究进展。

参考文献 References:

- [1] 王力荣,王蛟,朱更瑞,方伟超,王新卫,陈昌文,曹珂. 桃若干重要特异性状的遗传趋向分析[J]. 园艺学报,2017,44(2):223-232.
WANG Lirong, WANG Jiao, ZHU Gengrui, FANG Weichao, WANG Xinwei, CHEN Changwen, CAO Ke. Genetic analysis of some special traits in peach[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017,44(2):223-232.
- [2] 王力荣. 我国桃产业现状与发展建议[J]. 中国果树,2021(10):1-5.
WANG Lirong. Current situation and development suggestions of peach industry in China[J]. China Fruits, 2021(10):1-5.
- [3] 张斌斌,蔡志翔,沈志军,严娟,马瑞娟,俞明亮. 观赏桃种质资源表型性状多样性评价[J]. 中国农业科学,2021,54(11):2406-2420.
ZHANG Binbin, CAI Zhixiang, SHEN Zhijun, YAN Juan, MA Ruijuan, YU Mingliang. Diversity analysis of phenotypic characters in germplasm resources of ornamental peaches[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021,54(11):2406-2420.
- [4] 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*[J]. BMC Genomics, 2009,10(1):587.
- [5] FAN S H, BIELENBERG D G, ZHEBENTYAYEVA T N, REIGHARD G L, OKIE W R, HOLLAND D, ABBOTT A G. Mapping quantitative trait loci associated with chilling requirement, heat requirement and bloom date in peach (*Prunus persica*)[J]. The New Phytologist, 2010,185(4):917-930.
- [6] 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, TROGGIO 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[J]. PLoS One, 2015, 10(9):e0136803.
- [7] CAO K, ZHOU Z K, WANG Q, GUO J, ZHAO P, ZHU G R, FANG W C, CHEN C W, WANG X W, WANG X L, TIAN Z X, WANF L R. Genome-wide association study of 12 agronomic traits in peach[J]. Nature Communications, 2016, 7(1): 13246.
- [8] 孟歌, 朱更瑞, 方伟超, 陈昌文, 王新卫, 王力荣, 曹珂. 桃的花型性状相关 SNP 位点挖掘与候选基因分析[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(2): 505-517.
- MENG Ge, ZHU Gengrui, FANG Weichao, CHEN Changwen, WANG Xinwei, WANG Lirong, CAO Ke. Genome-wide association study identified SNP alleles and candidate genes for flower shape trait in peach (*Prunus persica*)[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(2): 505-517.
- [9] LIAN X D, ZHANG H P, JIANG C, GAO F, YAN L, ZHENG X B, CHENG J, WANG W, WANG X B, YE X, LI J D, ZHANG L L, LI Z Q, TAN B, FENG J C. De novo chromosome-level genome of a semi-dwarf cultivar of *Prunus persica* identifies the aquaporin PpTIP2 as responsible for temperature-sensitive semi-dwarf trait and PpB3-1 for flflower type and size[J]. Plant Biotechnology Journal, 2022, 20(5): 886-902.
- [10] WANG X, GAO L, JIAO C, STRAVORAVDIS S, HOSMANI P S, SAHA S, ZHANG J, MAINIERO S, STRICKLER SR, CATALA C, MARTIN G B, MUELLER L A, VREBALOV J, GIOVANNONI J J, WU S, FEI Z J. Genome of *Solanum pimpinellifolium* provides insights into structural variants during tomato breeding[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 5817.
- [11] GUO J, CAO K, Cecilia D, LI Y, ZHU G R, FANG W C, CHEN C W, WANG X W, WU J L, GUAN L P, WU S, GUO W W, YAO J L, FEI Z J, WANG L R. An integrated peach genome structural variation map uncovers genes associated with fruit traits.[J]. Genome Biology, 2020, 21(1): 258.
- [12] 张南南, 牛良, 崔国朝, 曾文芳, 王志强, 鲁振华. 一种高通量提取桃 DNA 方法的建立与应用[J]. 中国农业科学, 2018, 51(13): 2614-2621.
- ZHANG Nannan, NIU Liang, CUI Guochao, ZENG Wenfang, WANG Zhiqiang, LU Zhenhua. Establishment and application of a high-throughout protocol for peach (*Prunus persica*) DNA extraction[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(13): 2614-2621.
- [13] 朱更瑞, 王力荣, 方伟超, 曹珂, 陈昌文, 冯义彬, 侯凯, 刘端明, 岳长平, 靳月笑. 观赏桃品种‘洒红龙柱桃’[C]//中国园艺学会桃分会第三届学术研讨会论文集. 2011: 27.
- ZHU Gengrui, WANG Lirong, FANG Weichao, CAO Ke, CHEN Changwen, FENG Yibin, HOU Kai, LIU Duanming, YUE Changping, JIN Yuexiao. Cultivation and promotion of a special ornamental peach variety ‘Sa Hong Longzhu’ [C]//Proceedings of the Third Academic Symposium of the Peach Branch of the Chinese Horticultural Society, Chinese Horticultural Society Peach Branch, 2011: 27.
- [14] 朱更瑞, 王力荣, 方伟超, 曹珂, 陈昌文, 李全红, 冯义彬, 凌国钧, 岳长平. 低需冷量早花观赏桃品种‘报春’[J]. 园艺学报, 2011, 38(10): 2035-2036.
- ZHU Gengrui, WANG Lirong, FANG Weichao, CAO Ke, CHEN Chaowen, LI Quanhong, FENG Yibin, LING Guojun, YUE Changping. A low chilling and early blooming ornamental peach cultivar ‘Baochun’ [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(10): 2035-2036.
- [15] 朱更瑞, 王力荣, 方伟超, 陈昌文, 曹珂, 王小丽, 王新卫. 低需冷量、早花观赏桃新品种‘迎春’的选育[J]. 果树学报, 2016, 33(6): 770-772.
- ZHU Gengrui, WANG Lirong, FANG Weichao, CHEN Changwen, CAO Ke, WANG Xiaoli, WANG Xinwei. A new low chilling requirement ornamental flower peach cultivar ‘Ying-chun’ [J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(6): 770-772.
- [16] 朱更瑞, 王力荣, 方伟超. 花果两用观赏桃新品种满天红的选育[J]. 果树学报, 2008, 25(3): 440-441.
- ZHU Gengrui, WANG Lirong, FANG Weichao. Selection and cultivation of a new peach variety Mantianhong both for ornamental and food[J]. Journal of Fruit Science, 2008, 25(3): 440-441.
- [17] ELIZABETH C. Flowers of evil: Proserpina’s venomous plants in Ruskin’s botany[J]. Pacific Coast Philology, 2009, 44(1): 114-128.
- [18] GALEN C. Molecular and immunologic pathology for the endoscopist: Special techniques[J]. Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America, 2000, 10(4): 573-593.
- [19] LANDIS J B, SOLTIS D E, SOLTIS P S. Comparative transcriptomic analysis of the evolution and development of flower size in *Saltugilia* (Polemoniaceae).[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 475.
- [20] MOJICA J P, KELLY J K. Viability selection prior to trait expression is an essential component of natural selection[J]. Proceedings of the Royal Society B, 2010, 277(1696): 2945-2950.
- [21] TAKAOKI N. Large flower size: Molecular basis and role of cytokinin[J]. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2012, 81(2): 129-139.
- [22] GONZALEZ N, VANHAEREN H, INZE D. Leaf size control: Complex coordination of cell division and expansion[J]. Trends in Plant Science, 2012, 17(6): 332-340.
- [23] KELLY J K, MOJICA J P. Interactions among flower-size QTL of *Mimulus guttatus* are abundant but highly variable in nature[J]. Botanical Gazette, 2011, 189(4): 1461-1471.
- [24] KRIZEK B A, ANDERSON J T. Control of flower size[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(6): 1427-1437.
- [25] 左覃元, 朱更瑞, 王力荣. 中国桃果产业的现状及展望[J]. 果树科学, 1997, 14(1): 61-63.
- ZUO Qingyuan, ZHU Gengrui, WANG Lirong. Current situation and prospects of China’s peach fruit industry[J]. Journal of Fruit Science, 1997, 14(1): 61-63.
- [26] CAO K, YANG X W, LI Y, ZHU G R, FANG W C, CHEN C W, WANG X W, WU J L, WANG L R. New high-quality peach (*Prunus persica* L. Batsch) genome assembly to analyze the molecular evolutionary mechanism of volatile compounds in peach fruits[J]. The Plant Journal, 2021, 108(1): 281-295.
- [27] 王力荣, 朱更瑞, 方伟超. 中国桃遗传资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- WANG Lirong, ZHU Gengrui, FANG Weichao. Peach genetic resource in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012.