

莴苣叶裂性状的遗传定位

袁焕然, 潘江鹏, 陈炯炯*

(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: 以叶片全缘 (entire) 莴苣 PI491070 和叶裂 (lobed) 莴苣 PI536760 为亲本构建 F₂ 代分离群体, F₂ 代性状分离调查结果显示叶裂性状为单基因显性性状。利用 BSR-seq 方法对莴苣叶裂性状进行快速遗传定位, 将控制叶裂性状的基因定位在 3 号染色体的 60 ~ 140 Mb 之间。通过 1 159 株 F₂ 群体的隐性单株进行分析最终将目的基因定位在 116.24 ~ 118.15 Mb 之间, 物理距离大约为 1.91 Mb。该区域包括 24 个候选基因, 其中基因 *LG3316063* 编码锌指蛋白, 在两亲本中有 1 个碱基的差异并导致了氨基酸的改变。从莴苣资源库中随机挑选 5 种叶裂植株检测该基因差异 SNP 位点都为 G, 7 种无叶裂植株该基因 SNP 都为 T, 推测该基因可能是控制叶裂形成的候选基因。

关键词: 莴苣; 叶裂; BSR-seq; 基因定位

中图分类号: S 636.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2017) 08-1496-09

Genetic Analysis and Mapping of Genes Controlling Lettuce Lobed Leaf

YUAN Huanran, PAN Jiangpeng, and CHEN Jiongjiong*

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: An F₂ population derived from a cross between lettuce PI491070 (entire leaf) and PI536760 (lobed leaf) was used to study the gene controlling leaf shape. The segregating ratio of lobed to non-lobed leaf showed that lobed leaf was controlled by a single dominant gene. Using the BSR-seq method, the gene controlling lobed leaf was mapped on Chr3, in the interval of 60 - 140 Mb. A large F₂ population with 1 159 recessive individuals was used to fine map the causal gene to the interval of Chr3: 116.24 - 118.15 Mb. Twenty-four genes were predicted in this region. One gene *LG3316063* encoding a zinc finger protein, has one base pair difference, leading to amino acid change between two parents. Five genotypes with lobed leaves randomly chosen from lettuce germplasm all have "G" at this SNP, while 7 genotypes with non-lobed leaves have nucleotide "T". Therefore, the gene *LG3316063* is predicted to be the candidate gene controlling the lettuce lobed leaf.

Keywords: *Lactuca sativa*; lobed leaf; BSR-seq; gene mapping

莴苣 (*Lactuca sativa*) 的叶形是构成其感观品质的重要因素。虽然莴苣不同栽培类型间具有丰富的叶形态多样性, 但是叶裂性状只存在于栽培类型的散叶莴苣 (Looseleaf) 和野生莴苣中, 其他

收稿日期: 2017-06-09; 修回日期: 2017-08-10

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (2662015PY098, 2014PY031)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jjchen@mail.hzau.edu.cn)

栽培形态类型 (morphotype), 如罗马 (Romaine)、奶油 (Butter head)、结球莴苣 (Crisp head or iceberg)、莴笋 (Stem) (de Vries, 1997; Mou, 2011) 中并无叶裂类型。因此, 通过克隆散叶莴苣中叶裂基因及阐明叶裂形成机制可为培育叶形多样性的莴苣提供理论基础。

叶片的形成机制较为复杂。在叶发育过程中, 叶缘区域会产生各种各样的类型: 平滑 (smooth)、锯齿 (serrate)、波浪 (undulate) 及不同程度的缺刻 (incision) 等。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和金鱼草 (*Antirrhinum majus*) 等模式植株中对叶片发育及叶边缘形成有大量的研究 (Nath et al., 2003; Hay et al., 2006; Koyama et al., 2010; Bar & Ori, 2014; Das Gupta et al., 2014)。叶缘性状受到很多基因的调控, 其中关键基因包括拟南芥中的生长素极性运输的 *PINI* 基因和转录因子 NAC 家族成员中的 *CUC2* 基因 (Kawamura et al., 2010; Bilsborough et al., 2011; Das Gupta et al., 2014)。此外, 拟南芥中同源盒基因 *RCO*, 黄瓜 (*Cucumis sativus*) 中 GATA3-type 转录因子的 *HAN*, 苜蓿 (*Medicago truncatula*) 中 *AGO7* 和锌指转录因子的 *PALMI* 等基因参与叶裂的形成 (Zhou et al., 2013; Sicard et al., 2014; Ding et al., 2015)。一些 microRNA 也会参与叶缘形成途径, 如拟南芥 miR319、miR164A 和 miR396 等超量表达会导致叶缘出现锯齿甚至是叶裂现象 (Palatnik et al., 2003; Nikovics et al., 2006; Mecchia et al., 2013)。由此可以看出, 不同植物中调控叶片发育及叶裂形成的分子机理复杂, 不同类型的基因和小 RNA 都有可能参与叶片形成。转录因子类基因可能在不同植物叶片发育及叶缘形成中起着重要作用, 如 MYB 相关基因家族的 *PHAN* 和 *ASI* 基因主要参与叶片形状和极性形成, 而锌指转录因子类的 *PALMI* 则调控苜蓿多裂叶的形成, 当 *PALMI* 基因失去功能时, 苜蓿的复叶从 3 小叶变成 5 小叶, 该基因主要通过降低小叶起始基因 *SGL1* 的表达, 从而影响多裂叶的形成 (Waites et al., 1998; Byrne et al., 2000; Hay et al., 2006)。虽然叶缘形成的许多基因已经被克隆, 但是关于莴苣叶形与叶缘调控的基因仍不清楚, 莴苣遗传变异丰富, 不同类型莴苣中可能存在着与上述不同叶发育的调控基因。

目前, 对于控制莴苣叶裂的基因及调控机理都不明确。本实验室以莴苣 PI536760 和 PI491070 为亲本构建 F₂ 分离群体, 对莴苣叶裂性状的遗传规律进行分析, 利用 BSR-seq (Bulk segregant RNA-Seq) 方法, 实现对叶裂性状基因的快速初定位, 并经进一步扩大群体后进行精细定位, 为克隆莴苣中叶裂基因和培育多种叶形的品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料和性状调查

用于构建 F₂ 代群体的试验材料为来源于美国种质资源库 (<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx>) 的叶片全缘散叶莴苣 PI491070 和叶片深裂的散叶莴苣 PI536760 (图 1)。

2013 年 5 月种植于华中农业大学国家蔬菜改良中心华中分中心蔬菜大棚内。以 PI491070 为母本, PI536760 为父本, 杂交获得 F₁ 代种子。2013 年 12 月种植 F₁ 代杂交种及两亲本, 由于母本为全缘叶片, F₁ 代植株中叶片出现叶裂性状 (父本性状) 的植株为真杂种, 收取真杂种的种子即为 F₂ 代。2014 年 7 月将 F₂ 代种子约 400 粒在玻璃培养皿中发芽, 1 周后移栽到 6 cm × 6 cm × 6 cm 的方形钵中, 约 2 个月后调查记录每一植株的叶表型。2015 年 9 月将 F₂ 代种子约 4 000 粒在多个玻璃培养皿中发芽, 1 周后将发芽的苗子种植于 72 孔穴盘, 1 月后去除叶裂植株, 留下无叶裂植株继续生长。



图 1 父本 PI536760 (左) 和母本 PI491070 (右) 叶形表型

Fig. 1 The leaf phenotype of male parent PI536760 (left) and female parent PI491070 (right)

用于候选基因关联分析的试验材料为 12 种莴苣, 包括野生莴苣、栽培莴苣和中间型莴苣 (intermediate, 即介于典型的栽培类型和野生莴苣之间)。2016 年 3 月, 选取约 2 月龄的 12 种莴苣, 进行有无叶裂性状的调查。被调查有无叶裂性状的栽培莴苣包括散叶、奶油、罗马、油用 (oilseed)。其中野生莴苣 W12 来源于贵阳, 野生莴苣 W23 (CGN10902) 来源于瓦格宁根大学的 CGN 资源库 (<https://cgngenis.wur.nl/>)。奶油莴苣 B23 (PI583360)、罗马莴苣 R13 (PI583360)、油用莴苣 W07 (PI251246)、中间型莴苣 X13 (PI49104) 和中间型莴苣 X14 (PI358015) 来源于美国种质资源库 (<https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/search.aspx>)。散叶莴苣 L17、L31 和 L35, 奶油莴苣 B24, 中间型莴苣 X04 为商品种。

1.2 叶裂性状 BSR-seq

挑选 F_2 代分离群体中长势相同的叶裂植株 30 株, 在叶片叶裂边缘处每株取等量组织, 混合成叶裂池 (lobed pool); 在 F_2 代分离群体中挑选 30 株无叶裂的植株, 在叶缘边缘处取样, 混合成无叶裂池 (non-lobed pool)。提取两个混合池的 RNA (Trizol 法), 送北京诺禾致源公司完成 Illumina 测序。

将去除低质量的数据和接头后得到的 RNA-seq 数据利用 Hisat2 软件 (Kim et al., 2015) 回贴到莴苣参考基因组上 (Reyes-Chin-Wo et al., 2017)。利用 SAMtools 软件 (Li et al., 2009) 获得两个池中的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 位点。分别计算两个池等位基因的 SNP 频率, 然后用无叶裂池的 SNP 频率减去叶裂池的 SNP 频率, 获得每个等位基因 SNP 位点的频率差异, 即 delta (SNP-index) (Takagi et al., 2013)。利用滑动窗口算法计算这些 delta, 得到平均 delta 值 (3 Mb 为窗口大小, 1 Mb 为步长)。以染色体位置为横坐标, 平均 delta 值为纵坐标作散点图, 鉴定 delta 值明显升高的区域, 即可能为目标位点所在的区域。

1.3 两亲本 PI536760 和 PI491070 基因组重测序

提取双亲叶片基因组 DNA, 送北京诺禾致源公司完成 Illumina 测序。即采用构建基因组重测序的双末端 (Paired-end, PE) DNA 文库, 利用 IlluminaHiSeq 2500 进行 PE 测序, 测序 reads 读长为 125 bp。去除低质量和带有接头的 reads 外, 亲本 PI491070 和 PI536760 测序分别产生 314 182 940 和 314 237 096 个 clean reads, 分别约为 39 Gb 数据, 平均覆盖基因组约 13 倍 (莴苣基因组约为 3 Gb (Reyes-Chin-Wo et al., 2017), 约为 85% 的 clean reads 可以回贴到莴苣基因组上。

1.4 叶裂群体的遗传定位与分析

根据 RNA-seq 数据分析确定与候选基因高度连锁的区域, 在该区域内设计开发了 8 对 CAPS 标记和 4 对 SNP 标记 (表 1)。利用上述标记对约 4 000 株 PI536760 (叶裂) × PI491070 (无叶裂) F₂ 大群体进行遗传分析和叶裂基因的精细定位。根据莴苣的参考基因组, 对定位区段的候选基因进行预测与分析。为了缩小目的基因区域, 2016 年 8 月 25 日进一步种植 2 200 株 F_{2:3} 群体 (在 F₂ 代分子标记筛选且均为杂合植株, 收获其自交种子), 再进行遗传分析和叶裂基因的精细定位。

莴苣基因组 DNA 的提取方法为 CTAB 法。PCR 体系 10 μL: DNA 模板 50 ng, 2× *EsTaq* Master Mix (Dye) 5 μL, 正反向引物各 0.5 μmol, 补 ddH₂O 至 10 μL。PCR 程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 根据引物退火温度 (T_m) ± 2 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物酶切体系 10 μL: PCR 产物 5 μL, 10× 缓冲液 1 μL, 限制性核酸内切酶 3 U, 补 ddH₂O 至 10 μL。酶切体系置于 37 °C 的培养箱内保存 12 h。酶切产物用 1.0% ~ 1.5% 的琼脂糖凝胶 5 V · cm⁻¹, 电泳 25 min, 统计结果。

表 1 叶裂基因定位所用引物
 Table 1 Primers for mapping lobed leaf gene

引物名称 Primer name	上游引物 (5' - 3') Forward primer	下游引物 (5' - 3') Reverse primer	限制性内切酶 Restriction enzyme
LG3_65.07	GGGCGATAAACTCACGTGT	CTTTGGCGAAAACCTGCTGGT	<i>Xho</i> I
LG3_95.80	TGCGCTTCATGAATCAGTGA	AGGGTAAATTCGGGTAGCTACA	<i>Xho</i> I
LG3_100.69	TCCATTCCAGTTCTGCCCCAT	TGGACCAAACTGCAATCCA	<i>Taq</i> I
LG3_108.57	GGACACAACAGTAAAGTTACAT	ATGCATCCTCCCTGAAGCTT	<i>Hind</i> III
LG3_116.24	TTTGTACGTTTCATCCCTACCATAC	TGTAAGGTTTTGTAGCTTGGACG	<i>Bsu</i> R I
LG3_116.90	TTCACTACGTCATCCACCCC	AAGGCGGGACTCTTGATTGT	—
LG3_117.30	ACATTGATTTCGGTCCCTCCCC	GTCCCAGCGCCATCATATA	—
LG3_117.706	CGCCATTGTGAGTTCAGTCG	GGCGGGACTGTACATACACA	—
LG3_118.15	TAGCACTAAGGAGCACATGTCTATC	CATCAAGTTAGATCTCAAGGGGTC	—
LG3_119.36	ATTGAGTGAGTGTAGCAACTAGC	ACCTCCCTTATCGATACTTTGAG	<i>Xho</i> I
LG3_123.31	AGGGTGCTTGAACAATCCAAAG	GTCAACAGTTCCTGGTCCAAAG	<i>Xba</i> I
LG3_132.44	GCTTCGCCACAAAACCCTAA	TCTCAAACCCTTTCAAACCCT	<i>Taq</i> I

2 结果与分析

2.1 莴苣叶裂性状的遗传分析

对 376 株 F₂ 群体进行表型调查, 发现 F₂ 群体中叶裂性状单株为 284 株, 无叶裂单株为 92 株。经卡方检验, 叶裂: 无叶裂 ≈ 3: 1 ($\chi^2 = 0.007$, $P > 0.05$), 该比例符合孟德尔遗传定律, 说明叶裂性状的有、无符合单基因显性遗传模式, 叶裂性状为显性性状。

2.2 利用 BSR-seq 方法快速定位控制叶裂位点

由于莴苣基因组较大 (近 3 G), 为了快速定位控制叶裂性状的位点, 利用 BSR-seq 方法进行基因的快速定位。首先, 分别提取叶裂池和无叶裂池 RNA 进行 RNA-seq 测序, 每个池大约获得了 6 G 的数据。其次, 将测序得到的 clean data 回贴到莴苣参考基因组上, 获得 57 011 个多态性 SNP, 并计算它们在两个混合池中的频率差异 delta (SNP-index)。通过分析平均 delta 值在不同染色体上的分布图, 鉴定等位基因在两个池中测序频率显著差异的 SNP 位点密集区域, 推测这些位点可能与候选基因 (控制叶裂基因) 高度连锁。由此确定控制叶裂的基因定位在 3 号染色体于 60 ~ 140 Mb 之间 (图 2), 将莴苣叶裂基因命名为 *Lslobed*。

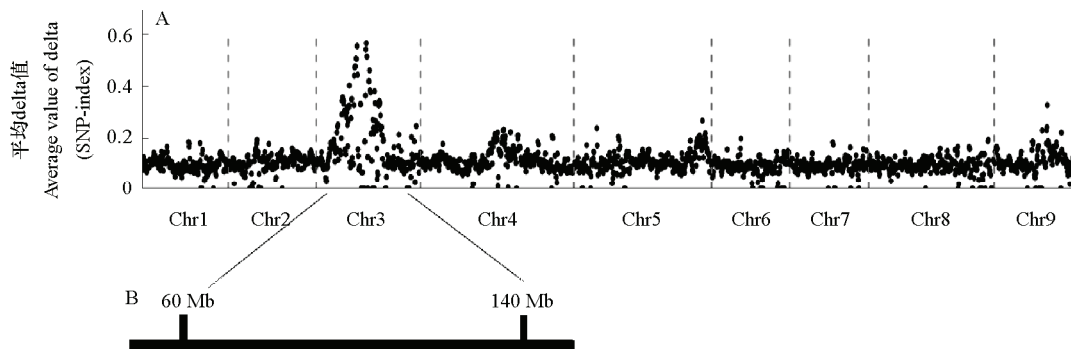


图2 莴苣叶裂与无叶裂基因池的平均 delta (SNP-index) 值在 9 条染色体上分布

A. 每个点代表两个池平均 delta 值 (3 Mb 为窗口大小, 1 Mb 为步长)。

B. 控制叶裂性状基因初定位在第 3 条染色体区域的 60~140 Mb。

Fig. 2 The average delta (SNP-index) value from lobed and non-lobed pools plotted along the 9 chromosomes of lettuce

A. Each dot represents average delta value from two pools by RNA-Seq using a window 3 Mb with a step size of 1 Mb.

B. The lobed trait was primarily mapped in the interval of chr3: 60 - 140 Mb.

2.3 叶裂基因的精确定位

根据 BSR-seq 分析的叶裂基因 *Lslobed* 初定位结果, 首先在 3 号染色体的 60 和 140 Mb 附近开发了两个多态性 CAPS 分子标记 LG3_65.07 和 LG3_132.44 (标记名称代表该标记在染色体上的物理位置 Mb, 下同), 从 376 株 F_2 群体中挑选 92 株隐性单株和 26 株显性单株进行性状与基因型分析, 发现标记 LG3_65.07 有 14 株发生交换, 标记 LG3_132.44 只有 4 株发生交换, 验证了 BSR-seq 方法快速定位控制叶裂位点的正确性。由于在标记 LG3_65.07 和 LG3_132.44 分别还存在交换单株, 进一步设计多态性标记, 其中左侧 CAPS 标记 LG3_65.07、LG3_95.80、LG3_100.69 和 LG3_108.57 检测到的重组单株数分别为 14、7、4 和 2 株。右侧 CAPS 标记 LG3_132.44、LG3_123.31 和 LG3_119.36 检测到的重组单株数分别为 4、3 和 2 株。而 CAPS 标记 LG3_116.24 则与表型共分离。所以, 基因初步定位在 LG3_108.57 和 LG3_119.36 之间, 即基因位于 3 号染色体 108.57~119.36 Mb 区域, 物理距离大约为 11 Mb。

为了精确定位叶裂基因, 对重新种植约 4 000 株 F_2 大群体进行遗传分析。为了更有效地获得重组单株信息, 利用隐性单株 (无叶裂) 进行精细定位。从 4 000 株植株中, 鉴定了 1 159 株无叶裂隐性植株, 并提取基因组 DNA。利用基因两个侧翼标记 LG3_108.57 和 LG3_119.36 进行筛选, 共筛选出 82 株重组单株, 其中标记 LG3_116.24 将左侧的 37 株重组单株缩小到 5 株。因 RNA-seq 数据在标记 LG3_116.2 和 LG3_119.36 之间两个池中无 SNP 差异, 对两个亲本进行基因组重测序, 开发了 3 个 SNP 标记。SNP 标记 LG3_118.15 则使右侧 45 株重组单株减少到 4 株。标记 LG3_117.30 和 LG3_117.706 与性状共分离 (图 3, A、B), 因此叶裂基因定位在 LG3_116.24、LG3_118.15 两标记之间, 即 3 号染色体 116.24~118.15 Mb 之间, 物理距离大约为 1.91 Mb。

对再次种植的约 2 200 株 $F_{2.3}$ 群体分析, 在 LG3_116.24 和 LG3_118.15 标记分别存在 18 株重组单株和 2 株重组单株。但在标记 LG3_116.90、LG3_117.30 和 LG3_117.706 则与表型共分离, 最终将叶裂基因区段定位在 116.24~118.15 Mb 之间。

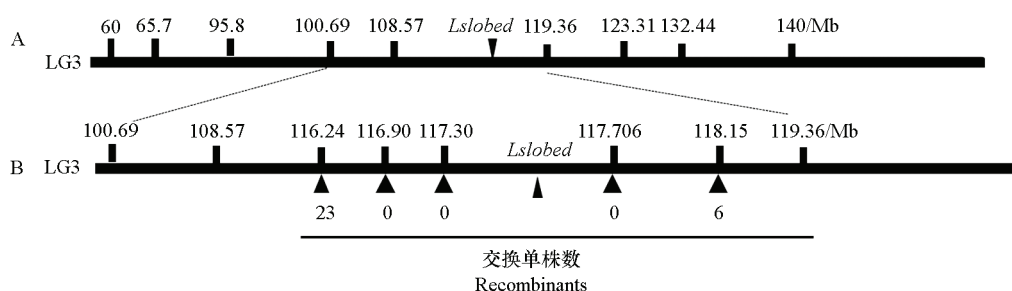


图3 莴苣叶裂基因 *Lslobed* 定位

A. 在 118 株莴苣单株中叶裂基因 *Lslobed* 定位; B. 莴苣 1 159 株 F_2 分离群体和 2 200 株 $F_{2,3}$ 群体叶裂基因 *Lslobed* 的精细定位。

Fig. 3 Map-based cloning of the *Lslobed* gene in lettuce

A. Using 118 segregating individuals to map the *Lslobed* gene;

B. Fine mapping the *Lslobed* gene using 1 159 F_2 and 2 200 $F_{2,3}$ segregating individuals.

2.4 叶裂候选基因确定

根据已经发表的莴苣基因组信息中预测、注释的基因模型, 在叶裂基因定位区段共有 24 个基因 (表 2)。

表 2 叶裂性状定位区段内的基因及功能注释

Table 2 Genes in the lobed leaf locus and their functional annotation

基因编号 Gene ID	同源基因 Homologous gene	功能注释 Functional annotation
LG3312608		—
LG3315107	葡萄 <i>Vitis vinifera</i> LOC10024840	U4/U6 小型细胞核核糖核蛋白 PRP3 U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein PRP3
LG3315115	水稻 <i>Oryza sativa</i> LOC4340344	丝氨酸羧肽酶 II -2 Serine carboxypeptidase II -2
LG3315125		—
LG3313740		—
LG3285417		—
LG3285421		—
LG3294978	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> AT1G66370	MYB113 转录因子 MYB113 transcription factor WD40 重复单元 B1 同源体
LG3294995		WD40 repeat-containing subunit B1 homology
LG3295005		—
LG3296214		MADS-box 转录因子 MADS-box transcription factor
LG3296210	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i> AT2G14210	—
LG3296206		—
LG3296202		—
LG3296192		—
LG3316067		—
LG3316063		锌指蛋白 4 Zinc finger protein 4
LG3316059		—
LG3316053		未知蛋白 Uncharacterized protein
LG3316049		—
LG3316012	葡萄 <i>Vitis vinifera</i> LOC100262252	转运蛋白 Protein transport protein SEC23
LG3257497	葡萄 <i>Vitis vinifera</i> LOC100248403	U4/U6 小型细胞核核糖核蛋白 PRP3 U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein PRP3
LG3257489	高粱 <i>Sorghum bicolor</i> SORBIDRAFT_03g001920	假定蛋白 Hypothetical protein
LG3257481		—

有功能注释的基因共 10 个, 包括 2 个 U4/U6 小型细胞核核糖核蛋白 PRP3、2 个未知蛋白、1 个丝氨酸羧肽酶、1 个转运蛋白和 4 个不同类型的转录因子, 包括 MYB、WD40、MADS-box 和锌指蛋白。其中基因 *LG3316063* 编码锌指蛋白, 最有可能参与叶裂形成的调控, 锌指蛋白在苜蓿中参与苜蓿多裂叶片的形成 (Chen et al., 2010)。分析 *LG3316063* 基因结构, 发现该基因只有一个外显子, 已经测序的野生型苜蓿基因组 (叶裂) 与栽培型基因组 (无叶裂) 之间存在一个碱基 (G/T) 的差异, 导致第 67 个编码氨基酸的改变, 从野生型的甘氨酸变成栽培型的缬氨酸。

在该基因的两侧设计 PCR 引物 LG3_117.5(F: TGCAACAAGTGACACCCTC/R: TTGCCATTGAT TATCCTACACG), 扩增该基因全长序列, 发现在亲本 PI536760 和 PI491070 中同样存在碱基 (G/T) 的差异。为了进一步确定该 SNP 位点与表型变化是否相关, 对 12 种苜蓿中进行 SNP 位点分析。其中, 叶裂表型植株 5 株, 无叶裂表型植株 7 株。测序结果显示该 SNP 位点与叶裂性状相关联, 即在 5 株叶裂植株中, 该 SNP 位点为 G, 与叶裂亲本 PI536760 一致, 在 7 株无叶裂植株中碱基为 T, 与亲本 PI491070 一致 (表 3)。因此, 推测基因 *LG3316063* 可能为控制苜蓿叶裂的候选基因。

表 3 叶裂与无叶裂苜蓿中 *LG3316063* 基因的碱基差异
Table 3 The SNP of *LG3316063* in lobed and non-lobed lettuces

编号 Name	苜蓿类型 Lettuce type	有无叶裂 Lobed or non-lobed	碱基差异位点 SNP
PI536760	散叶 Looseleaf	有叶裂 Lobed	G
W12	野生 Wild	有叶裂 Lobed	G
W23	野生 Wild	有叶裂 Lobed	G
X04	中间 Intermediate	有叶裂 Lobed	G
L31	散叶 Looseleaf	有叶裂 Lobed	G
L35	散叶 Looseleaf	有叶裂 Lobed	G
PI491070	散叶 Looseleaf	无叶裂 Non-lobed	T
R13	罗马 Romaine	无叶裂 Non-lobed	T
B23	奶油 Butterhead	无叶裂 Non-lobed	T
B24	奶油 Butterhead	无叶裂 Non-lobed	T
L17	散叶 Looseleaf	无叶裂 Non-lobed	T
W07	油用 Oilseed	无叶裂 Non-lobed	T
X13	中间 Intermediate	无叶裂 Non-lobed	T
X14	中间 Intermediate	无叶裂 Non-lobed	T

3 讨论

随着测序技术的发展, 第二代测序技术可以用来快速高效地鉴定不同基因型之间的 SNP, 开发高通量分子标记 (Davey et al., 2011)。结合 barcode 标记, 可以对分离群体的不同个体进行区分, 得到不同个体的序列信息, 从而快速构建高密度遗传图谱 (Baird et al., 2008), 快速确定目的性状的候选基因位点 (Catchen et al., 2013)。然而, 建立全基因组的遗传图谱对某一性状的基因研究意义不大。混合池分析法 (BSA) 可以高效完成对某一性状定位, 并大大减少工作量和所需费用 (Michelmore et al., 1991)。BSA 方法与二代测序相结合, 对两个混合池进行测序 (Hill et al., 2013), 比较每个 SNP 位点的等位基因在两个混合池中的频率变化。如果某一 SNP 位点的等位基因在两个池中频率存在显著差异, 则认为该 SNP 位点与控制这一性状的一个基因连锁 (Ramirez-Gonzalez et al., 2015; Huo et al., 2016; Pulido-Tamayo et al., 2016)。由于苜蓿基因组 (约 3G) 较大, 若采用分离群体个体的基因组 DNA 二代测序, 则大大增加研究成本。对两个性状的极端混池采用 RNA-seq, 获得的数据不仅可以用于 SNP 差异分析, 同时也能获得两个池中的差异表达基因。二代测序获得高

密度的 SNP 标记, 并把部分 SNP 标记转化成 CAPS 标记, 方便了后续定位工作, 减少了标记开发的工作量和费用。本研究中采用 BSR-seq 方法快速将目的基因初步定位在 3 号染色体的 60 ~ 140 Mb 之间, 之后仅用 400 株左右的群体缩小目的基因区间为 11 Mb, 大大节省图位克隆的时间。

本研究中种植了约 7 000 株分离群体用于叶裂基因的定位, 但是在候选基因所在的至少 800 kb 区域 (从 116.90 Mb 到 117.70 Mb) 范围内无重组单株, 可能该区段存在重组抑制现象。为了确定定位区段内可能的候选基因, 分析两个池中差异表达基因, 并未在候选基因所在区段找到差异表达基因。进一步对叶片发育过程中同一片叶片的叶裂和叶缘无叶裂处取样, 进行 RNA-seq, 也未在候选基因区段找到差异表达基因。因此推测, 控制叶裂形成基因表达量较低, 难以通过表达量分析获得候选基因。虽然叶裂基因的定位区段存在重组抑制及基因低表达, 但是该区段内已知功能候选基因较少, 通过功能预测及基因序列差异来确定候选基因。本研究中发现 *LG3316063* 基因在功能上最有可能参与叶裂的形成, 在基因编码区有一个 SNP 变化, 从而改变了氨基酸的编码。利用候选基因中 SNP 差异关联分析, 发现在 GWAS 群体中该 SNP 也与叶型连锁。本文中首次报道莴苣中叶裂性状的遗传分析, 为进一步揭示叶裂形成的分子机理提供研究基础。

References

- Baird N A, Etter P D, Atwood T S, Currey M C, Shiver A L, Lewis Z A, Selker E U, Cresko W A, Johnson E A. 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, 3: e3376.
- Bar M, Ori N. 2014. Leaf development and morphogenesis. *Development*, 141: 4219 - 4230.
- Bilsborough G D, Runions A, Barkoulas M, Jenkins H W, Hasson A, Galinha C, Laufs P, Hay A, Prusinkiewicz P, Tsiantis M. 2011. Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 3424 - 3429.
- Byrne M E, Barley R, Curtis M, Arroyo J M, Dunham M, Hudson A, Martienssen R A. 2000. Asymmetric leaves1 mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature*, 408: 967 - 971.
- Catchen J, Hohenlohe P A, Bassham S, Amores A, Cresko W A. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol Ecol*, 22: 3124 - 3140.
- Chen J, Yu J, Ge L, Wang H, Berbel A, Liu Y, Chen Y, Li G, Tadege M, Wen J, Cosson V, Mysore K S, Ratet P, Madueño F, Bai G, Chen R. 2010. Finger transcription factor in the model legume *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 10754 - 10759.
- Das Gupta M, Aggarwal P, Nath U. 2014. *CINCINNATA* in *Antirrhinum majus* directly modulates genes involved in cytokinin and auxin signaling. *New Phytol*, 204: 901 - 912.
- Davey J W, Hohenlohe P A, Etter P D, Boone J Q, Catchen J M, Blaxter M L. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat Rev Genet*, 12: 499 - 510.
- de Vries I M. 1997. Origin and domestication of *Lactuca sativa* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44: 165 - 174.
- Ding L, Yan S, Jiang L, Liu M, Zhang J, Zhao J, Zhao W, Han Y Y, Wang Q, Zhang X. 2015. HANABA TARANU regulates the shoot apical meristem and leaf development in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Exp Bot*, 66: 7075 - 7087.
- Hay A, Barkoulas M, Tsiantis M. 2006. ASYMMETRIC LEAVES1 and auxin activities converge to repress *BREVIPEDICELLUS* expression and promote leaf development in *Arabidopsis*. *Development*, 133: 3955 - 3961.
- Hill J T, Demarest B L, Bigrove B W, Gorski B, Su Y C, Yost H J. 2013. MMAPP: mutation mapping analysis pipeline for pooled RNA-seq. *Genome Res*, 23: 687 - 697.
- Huo H, Henry I M, Coppoolse E R, Verhoeve Post M, Schut J W, de Rooij H, Vogelaar A, Joosen R V, Woudenberg L, Comai L, Bradford K J. 2016. Rapid identification of lettuce seed germination mutants by bulked segregant analysis and whole genome sequencing. *Plant J*, 88: 345 - 360.
- Kawamura E, Horiguchi G, Tsukaya H. 2010. Mechanisms of leaf tooth formation in *Arabidopsis*. *Plant J*, 62: 429 - 441.

- Kim D, Langmead B, Salzberg S L. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*, 12: 357 - 360.
- Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M. 2010. TCP transcription factors regulate the activities of ASYMMETRIC LEAVES1 and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22: 3574 - 3588.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25 (16): 2078 - 2079.
- Mecchia M A, Debernardi J M, Rodriguez R E, Schommer C, Palatnik J F. 2013. MicroRNA miR396 and RDR6 synergistically regulate leaf development. *Mech Dev*, 130: 2 - 13.
- Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 9828 - 9832.
- Mou B. 2011. Mutations in lettuce improvement. *Int J Plant Genomics*, 2011: 723 - 518.
- Nath U, Crawford B C, Carpenter R, Coen E. 2003. Genetic control of surface curvature. *Science*, 299: 1404 - 1407.
- Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P. 2006. The balance between the *MIR164A* and *CUC2* genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 2929 - 2945.
- Palatnik J F, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington J C, Weigel D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425: 257 - 263.
- Pulido-Tamayo S, Duitama J, Marchal K. 2016. EXPLoRA-web: linkage analysis of quantitative trait loci using bulk segregant analysis. *Nucleic Acids Res*, 44: 142 - 146.
- Ramirez-Gonzalez R H, Segovia V, Bird N, Fenwick P, Holdgate S, Berry S, Jack P, Caccamo M, Uauy C. 2015. RNA-Seq bulked segregant analysis enables the identification of high-resolution genetic markers for breeding in hexaploid wheat. *Plant Biotechnol J*, 13: 613 - 624.
- Reyes-Chin-Wo S, Wang Z, Yang X, Kozik A, Arikat S, Song C, Xia L, Froenicke L, Lavelle D O, Truco M J, Xia R, Zhu S, Xu C, Xu H, Xu X, Cox K, Korff I, Meyers B C, Michelmore R W. 2017. Genome assembly with *in vitro* proximity ligation data and whole-genome triplication in lettuce. *Nat Commun*, 8: 14953.
- Sicard A, Thamm A, Marona C, Lee Y W, Wahl V, Stinchcombe J R, Wright S I, Kappel C, Lenhard M. 2014. Repeated evolutionary changes of leaf morphology caused by mutations to a homeobox gene. *Curr Biol*, 24: 1880 - 1886.
- Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S, Innan H, Cano L M, Kamoun S, Terauchi R. 2013. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *Plant J*, 74: 174 - 183.
- Waites R, Selvadurai H R, Oliver I R, Hudson A. 1998. The *PHANTASTICA* gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*. *Cell*, 93: 779 - 789.
- Zhou C, Han L, Fu C, Wen J, Cheng X, Nakashima J, Ma J, Tang Y, Tan Y, Tadege M, Mysore K S, Xia G, Wang Z Y. 2013. The trans-acting short interfering RNA3 pathway and no apical meristem antagonistically regulate leaf margin development and lateral organ separation, as revealed by analysis of an *argonaute7/lobed leaflet1* mutant in *Medicago truncatula*. *Plant Cell*, 25: 4845 - 4862.