

李雪微,郭超程,宋瑶,等.萝卜花叶性状的遗传分析及基因定位[J].华中农业大学学报,2022,41(3):139-145.  
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.03.016

## 萝卜花叶性状的遗传分析及基因定位

李雪微<sup>1</sup>,郭超程<sup>1</sup>,宋瑶<sup>1</sup>,高长斌<sup>2</sup>,张小康<sup>3</sup>,熊秋芳<sup>2</sup>,刘克德<sup>1</sup>

1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室,武汉 430070; 2. 武汉市农业科学院蔬菜研究所,武汉 430345;  
3. 武汉菜蔬农业科技有限公司,武汉 430345

**摘要** 为筛选控制萝卜花叶性状的候选基因,以萝卜花叶品种 J4 和板叶品种 WA 构建 F<sub>2</sub> 分离群体,在 F<sub>2</sub> 群体中,选择 20 个花叶和 20 个板叶单株,分别构成花叶和板叶 DNA 混合池,分析花叶性状的遗传规律。结果显示:萝卜花叶性状受 1 对基因控制,且花叶对板叶呈不完全显性;结合集团分离分析(bulked segregant analysis, BSA)与简化基因组测序基因型分析技术(genotyping by sequencing, GBS),将花叶基因定位在 R7 染色体 0.07~7.97 Mb 区间内;通过萝卜全基因组与甘蓝型油菜全基因组的共线性分析发现,萝卜候选区间内 0.87~1.32 Mb 与油菜 A10 染色体的 16.35~16.80 Mb 存在很好的共线性;对共线性区段进行基因功能注释确认 R:390250(899 863~901 651 bp)为萝卜花叶的候选基因;该基因编码 1 个 HD-Zip I (the class I homeodomain leucine zipper) 转录因子,其位于第二外显子的非同义突变位点 T425C 会导致 LZ(leucine zipper) 结构域内保守氨基酸的改变,可能是导致叶形变异的关键位点。

**关键词** 萝卜(*Raphanus sativus* L.); 花叶性状; BSA-Seq; 叶形变异; 候选基因; 共线性

**中图分类号** S631.103.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)03-0139-07

萝卜(*Raphanus sativus* L.)是十字花科萝卜属 1 年生或 2 年生草本植物,是我国秋、冬季的主要蔬菜之一。叶片是植物进行光合作用及蒸腾作用的主要场所。萝卜叶形各异,根据叶缘形状及裂刻深浅可大致分为花叶(羽状深裂或全裂)和板叶(全缘或叶缘浅裂)2 种类型<sup>[1-2]</sup>。研究表明,花叶透光性好,空气流通性强,可减轻病虫害危害,提高作物的品质与产量,是植物适应环境的重要表现<sup>[3-4]</sup>。因此,叶形是萝卜重要的产量性状。此外,萝卜花叶对板叶为显性,在生产上常作为指示性状用于杂种纯度鉴定,是萝卜育种的重要性状之一<sup>[5]</sup>。然而,目前关于萝卜花叶性状的遗传机制尚不明确。

近年来,随着萝卜参考基因组的公布及高通量测序技术的发展,萝卜重要性状的遗传及基因定位研究有了较大的进展,但多集中在根部性状如根部形态、色泽等,未见花叶基因的相关报道<sup>[6]</sup>。十字花科植物叶缘裂刻基因(花叶基因)的定位主要集中于芸薹属植物白菜(*Brassica rapa*)<sup>[7]</sup>、甘蓝型油菜(*B. napus*)<sup>[8-9]</sup>和甘蓝(*B. oleracea*)<sup>[10]</sup>。前人研究表明,萝

卜(2n=18,RR)与芸薹属植物亲缘关系近,萝卜基因组与拟南芥基因组(2n=10)及芸薹属物种基因组如白菜基因组(2n=20,AA)之间存在较好的共线性关系,这些共线性区块可为萝卜重要性状 QTLs 的候选基因鉴定提供帮助<sup>[11-13]</sup>。本研究以胞质雄性不育材料 WA(板叶)为母本、恢复系材料 J4(花叶)为父本构建 F<sub>2</sub> 叶形分离群体,利用 BSA 结合 GBS 的极端混池测序法(bulked segregant analysis sequencing, BSA-seq)对萝卜花叶基因进行初定位,通过将萝卜全基因组与甘蓝型油菜全基因组进行共线性比对,并结合基因功能注释确定萝卜花叶性状的候选基因,旨在为萝卜花叶基因克隆、叶形改良及辅助选育萝卜花叶品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以胞质雄性不育材料 WA(板叶)为母本,恢复系材料 J4(花叶)为父本,构建 F<sub>2</sub> 群体,用于花叶性状的遗传分析和基因定位研究。11 个萝卜栽培品种(7 个

收稿日期:2022-03-31

基金项目:湖北省重点研发计划(2021BBA097)

李雪微,E-mail:li\_xuewei2021@163.com

通信作者:熊秋芳,E-mail:6511311@qq.com

花叶品种与4个板叶品种)用于候选基因的序列分析。供试材料均由武汉市农业科学院蔬菜研究所萝卜育种室提供。

### 1.2 叶形性状调查及遗传分析

萝卜植株长至5~6片真叶时进行叶形调查。 $F_2$ 单株表型鉴定时要先对单株编号并挂牌,每个单株的表型分别调查3次,确保表型无误后计算 $F_2$ 群体的叶形分离比,并进行卡方检验。

### 1.3 基因组DNA的提取及Bulk池建立

按照挂牌顺序进行取样,每个单株约取0.25 g幼嫩叶片,放入96孔深孔板内。采用改良的CTAB法提取DNA,并用琼脂糖凝胶电泳检测所提DNA的质量。根据 $F_2$ 群体表型,随机选取20个花叶单株DNA和20个板叶单株DNA,经Qubit测定浓度后,将20个花叶单株的DNA和20个板叶单株的DNA分别等质量混合构成花叶DNA混池(Bulk 1, BK1)和板叶DNA混池(Bulk 2, BK2),并将终质量浓度调整至25 ng/ $\mu$ L。

### 1.4 简化基因组测序文库构建

用Chen等<sup>[14]</sup>的方法构建简化基因组测序文库。即用Sac I和Mse I对亲本和2个混池的基因组DNA分别进行双酶切,然后分别连接上含有不同标签序列的接头。将带有不同标签的连接产物混合成1个测序文库,经PCR产物回收试剂盒(Qiagen)纯化浓缩后在2%的琼脂糖凝胶上电泳分离,并用胶回收试剂盒(Qiagen)将220~500 bp的片段进行回收。利用PCR反应给每个混合测序文库引入与Illumina flow cell上固定的寡核苷酸互补配对的序列,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离后用胶回收试剂盒回收目标片段。构建好的测序文库在HiSeq 4000平台上进行测序。

### 1.5 测序数据分析

用FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)检测测序原始序列的质量,并用Trimmomatic<sup>[15]</sup>软件进行质量控制。质控后的数据经BWA比对到萝卜参考基因组(<http://radish-genome.org/>)上,再用GATK<sup>[16]</sup>提取全基因组变异信息,用ANNOVAR<sup>[17]</sup>对变异信息进行注释。BWA和Samtools分析均使用默认参数,GATK使用的过滤参数为“QUAL < 30.0 || QD < 4.0 || FS > 60.0 || MQ < 40.0”。

### 1.6 候选基因的初定位

以萝卜参考基因组作为参考,利用QTLseqr软

件<sup>[18]</sup>计算每个多态性位点在2个混池中的SNP-index及 $\Delta$ (SNP-index)。使用滑窗分析方法计算500 kb区段内SNP-index及 $\Delta$ (SNP-index)的均值,并对其在染色体上的分布作图,步长2 Mb。两池中差异较大的区段即为萝卜花叶基因的候选区段。

### 1.7 萝卜基因组与油菜基因组的共线性分析

利用MCScanX<sup>[19]</sup>分析萝卜基因组与甘蓝型油菜基因组的共线性关系。并对萝卜花叶基因定位区间内的共线性区段进行基因功能注释,预测萝卜花叶候选基因。

### 1.8 候选基因的序列分析

基于萝卜参考基因组,在Rs390250全长、上游1 kb和下游200 bp处共设计3对引物(Rs-1F/Rs-1R、Rs-2F/Rs-2R、Rs-3F/Rs-3R)分别对亲本进行PCR扩增。PCR产物直接进行测序,并利用Sequencher(GeneCodes, USA)软件进行测序序列的比对与变异位点检测。针对亲本序列间存在的664 bp插入变异(Indel664)开发成分子标记(Rs-3F/Rs-2R),扩增 $F_2$ 群体中表型为板叶(隐性)的单株,检测该候选基因是否与花叶性状共分离。引物序列见表1。

表1 Rs390250扩增引物

Table 1 Primers for Rs390250 amplification

引物 Markers	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')	用途 Function
Rs-1	tagagagggaagccatgttgc	aacgtgtctctctagacat	基因 克隆
Rs-2	ctttctaccgcatgctctc	gtgctctatcccactctcat	Gene clone
Rs-3	ccctategagtttctgtgttc	agtctgcttctctaacatt	
Rsa	cgcagtttcaagacagaatcaa	caacaagtagaagcaacacaca	RT- PCR
Actin	atcaggaaggactgtacgtaac	gctgagggaagcaagaatg- gaacc	

### 1.9 表达量分析

当植株长到5~6片真叶时,采用Trizol Reagent方法分别提取花叶与板叶亲本真叶的RNA,2%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量并用Nanodrop(Thermo Scientific, USA)检测RNA纯度。利用RevertAid First strand cDNA synthesis kit(Thermo Scientific, USA)合成cDNA的第一链作为模板,进行亲本的RT-PCR反应,检测候选基因Rs390250的表达水平。Rs390250基因特异性引物Rsa来自<https://biodb.swu.edu.cn/qprimerdb/><sup>[20]</sup>, Actin<sup>[6]</sup>作为对照基因(引物序列见表1)。

### 1.10 LMI1-like基因的序列比对与进化树构建

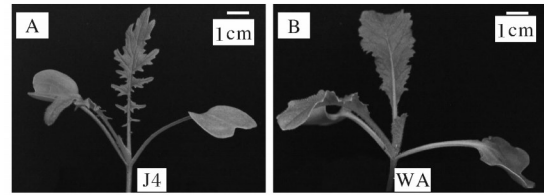
利用MEGA7软件对已报道的多个控制叶缘裂

刻的 *LMI1-like* 基因进行氨基酸序列比对,并对来自芸薹属植物和萝卜的基因序列进行系统发育分析。统计方法选用最大似然法,系统发育测验采用“Bootstrap”重复 1 000 次。*Rs390250* 的氨基酸序列在 <http://radish-genome.org/> 下载。来自拟南芥、白菜、甘蓝及甘蓝型油菜的基因序列在 <http://brassicadb.org/brad/> 下载,其余基因的序列在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 通过 Genbank 号 [*ChLMI1* (KF939590), *RCO* (*LMI1-like2*, KF939591), *LMI1-like3* (KF939592), *CaLMI1* (PHT71668), *CgRCO* (KM214233), *CrRCO* (KM214232)] 检索并下载。

## 2 结果与分析

### 2.1 花叶性状的遗传分析

亲本 J4 叶缘锯齿锐尖,部分裂刻直达中脉,表现为花叶;亲本 WA 叶缘有小齿近全缘,表现为板叶(图 1)。F<sub>1</sub> 植株全为花叶,裂刻深度介于双亲中间。F<sub>2</sub> 群体共 287 个单株,其中花叶有 219 株,板叶有 68 株,花叶与板叶的分离比为 3.22 : 1,符合预期的孟德尔分离比( $\chi^2=0.227 < 3.84$ ),表明花叶性状受 1 对基因控制,花叶对板叶呈不完全显性。



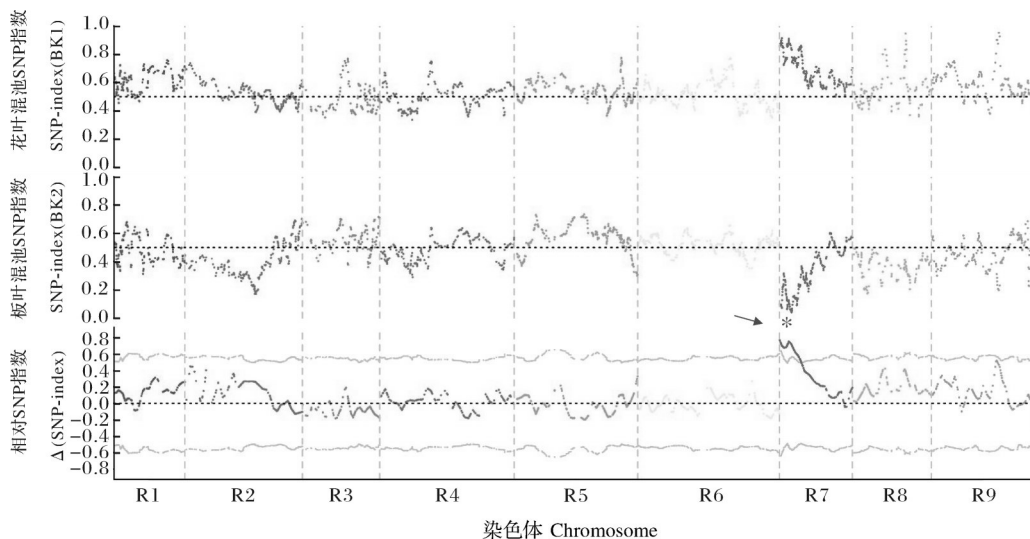
A: 花叶品种 J4; B: 板叶品种 WA。A: The lobed-leaf cultivar J4; B: The serrated-leaf cultivar WA.

图 1 萝卜叶形

Fig.1 The leaf shape of *Raphanus sativus* L.

### 2.2 混池测序与叶形基因初步定位

利用 BSA-seq<sup>[21]</sup> 分别对花叶和板叶亲本及 BK1 和 BK2 进行简化基因组测序。花叶亲本 J4 和板叶亲本 WA 分别获得 2 500 383 和 3 453 168 条双端序列,花叶混池 BK1 和板叶混池 BK2 分别得到 2 851 995 和 4 844 581 条序列。将亲本及 2 个混池的序列分别比对到萝卜参考基因组,经质量控制及亲本的基因型筛选后,共得到 4 543 个高质量多态性位点,包括 3 851 个 SNP (single nucleotide polymorphism) 位点和 692 个 Indel (Insertion/Deletion) 位点。利用 QTLseqr 软件分别计算 BK1 和 BK2 的 SNP-index 及  $\Delta$ (SNP-index) (移动窗口为 2 Mb) (图 2),结果显示在 R7 染色体 66 425~7 968 993 bp 区间内  $\Delta$ (SNP-index) 超过阈值 0.5 ( $P = 0.000 1$ ),表明萝卜花叶基因可能位于该区间内。



\*表示  $\Delta$ (SNP-index) 超过阈值 0.5 的区域。\* indicates the region where the value of  $\Delta$ (SNP-index) exceeds the threshold of 0.5.

图 2 BSA-seq 定位萝卜花叶基因

Fig.2 Genetic mapping of leaf shape gene by BSA-seq

### 2.3 共线性分析及萝卜花叶候选基因分析

通过将萝卜全基因组与甘蓝型油菜全基因组进行共线性分析,发现位于萝卜 R7 染色体花叶候选区间 0.87~1.32 Mb 与油菜 A10 染色体的 16.35~16.80

Mb 存在很好的共线性(图 3)。甘蓝型油菜中存在类似的花叶变异,油菜花叶基因 *BnLL1.LMI1* (*BnaA10g26320D*) 和 *BnA10.LMI1* (*BnaA10g26330D*) 都位于该共线性染色体区段<sup>[7-9]</sup>。根据萝卜参考基因组



对该区段内的70个基因进行注释分析发现, *Rs390250*(899 863~901 651 bp)与油菜花叶基因 *BnaA10g26320D*、*BnaA10g26330D* 及拟南芥 *AT5G03790*(*LM11*, *Late Meristem Identity1*)是直向同源基因, 都属于HD-Zip I家族, 编码HD-Zip I (the class I

homeodomain leucine-zipper)转录因子。在拟南芥叶发育调控网络中, *LM11*位于分生组织调节因子 *LFY* (Leafy)下游, 诱导 *CAL* (Cauliflower)基因表达, 影响拟南芥锯齿叶的形成<sup>[22]</sup>。因而, 我们推测 *Rs390250* 为控制萝卜花叶的候选基因。

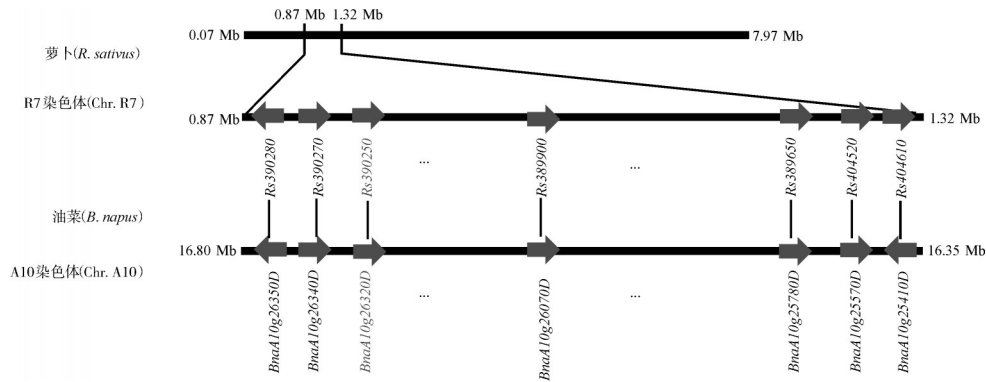


图3 萝卜花叶性状候选区间与甘蓝型油菜A10染色体的共线性区段。The co-linearity between the target region of lobed-leaf gene on chromosome R7 of *R. sativus* L. and chromosome A10 of *B. napus* L..

图3 萝卜花叶基因候选区间的共线性分析

Fig.3 The collinearity analysis in the candidate interval of the lobed-leaf gene

## 2.4 候选基因的序列比较分析

*Rs390250*基因全长1 789 bp,由3个外显子和2个内含子组成,编码220个氨基酸。根据萝卜参考基因组,分别扩增了亲本*Rs390250*翻译起始点(translation start site, TSS)上游1 kb及编码区序列,并进行PCR产物测序。序列比对发现,在基因的开放阅读框(open reading frame)内存在3个SNP(G84C、A177T和T425C)。其中,A177T为同义突变(synonymous mutation),而G84C和T425C是非同义突变(non-synonymous mutation)(图4A、B)。在启动子区,位于TTS上游-418 bp处,J4存在149 bp的插入序列,其中130 bp与插入位点后的130 bp序列重复。另外,在J4的第一内含子内还存在664 bp的插入序列(图4A)。该插入序列两侧存在9 bp目标信号复制(target sigte duplicate)序列GTTTTTAAA,插入序列两端存在4 bp的末端反向重复序列(GAGT-TATTCTTGGGTTACCCCCTAGGGT - GAACCTTTAGGTTACCC)。检索转座子数据库(<http://pmitte.hzau.edu.cn>)<sup>[23]</sup>,发现该664 bp的插入序列属于Mutator类转座子。

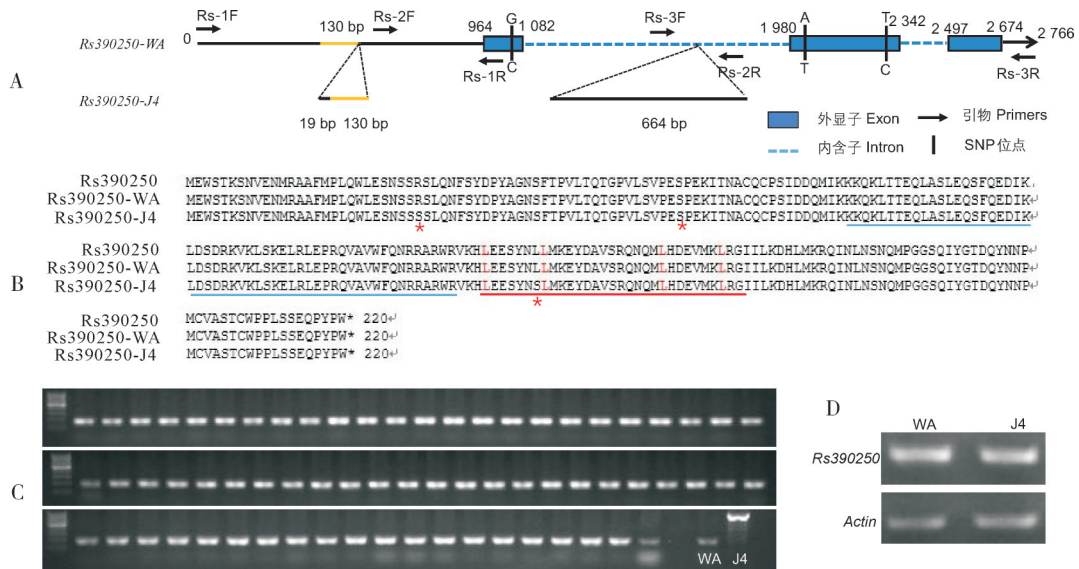
为了检测该转座子是否与花叶基因共分离,在664 bp插入序列两侧设计引物(Rs-3F/Rs-2R),扩增F<sub>2</sub>群体内的68个隐性单株(板叶表型),琼脂糖胶检测发现这68个单株的基因型同母本(WA)相同,且

比J4扩增片段小了约700 bp,即都不含有这664 bp的插入(图4C),这表明该基因在群体内同花叶性状共分离。RT-PCR分析发现,*Rs390250*的转录水平在WA和J4的真叶内无明显差异(图4D),表明叶形变异可能与启动子及内含子中的插入序列无关。

*Rs390250*编码HD-Zip I (the class I homeodomain leucine-zipper)转录因子。HD-Zip I蛋白由同源异型域(homeodomain, HD)与紧随其后的亮氨酸拉链(leucine zipper, LZ)结构域组成。LZ结构域具有多个亮氨酸,能形成二聚体结构帮助HD-Zip蛋白识别目标DNA,对HD-Zip I转录因子的功能发挥具有重要作用<sup>[24]</sup>。本研究中,位于*Rs390250*第3外显子的非同义突变位点T425C将导致该位点编码的丝氨酸(serine, S)变为亮氨酸(leucine, L),且该位点恰位于LZ结构域内(图4B)。这表明,该位点的突变可能破坏了LZ结构域的形成,进而对HD-Zip I转录因子的功能造成影响。为验证以上猜想,本研究对多个已报道的控制叶缘裂刻的*LM11-like*基因在LZ结构域上的氨基酸序列进行比对,并将*Rs390250*与拟南芥*LM11-like*基因及芸薹属物种报道的花叶基因进行系统发育分析。结果显示,所有花叶基因同*Rs390250*-J4在该位上都翻译为S,仅WA翻译为L,表明该位点的S为保守氨基酸(图5A),且该基因同*BnaA10g26320D*属于RCO(reduced complexity,

*LMII-like2*)类型(图 5B)。进一步对来自 11 个萝卜栽培品种的 *Rs390250* 序列进行扩增并进行 Sanger 测序,结果显示,所有板叶品种在该位点上基因型为

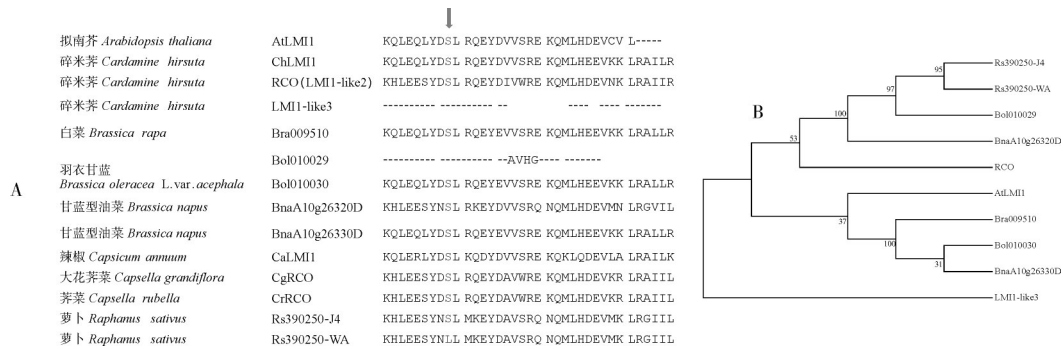
T/T,花叶材料在该位点上表现为 C/C 或 C/T (表 2)。综上,T425C 可能是导致萝卜叶形变异的关键位点。



A: WA 与 J4 的 *Rs390250* 基因结构; B: WA、J4 的 *Rs390250* 蛋白序列比对。\* 表示 3 个 SNP 引起的氨基酸变化,蓝色划线部分为 HD 结构域,红色划线部分是 ZIP 结构域。C:引物 Rs-3F/Rs-2R 扩增 664bp 的转座子序列。所有 68 个板叶单株都不含有该序列。D:*Rs390250* 在 WA、J4 内的表达量。A: The gene structure of *Rs390250*; B: Alignments of *Rs390250* amino acid sequences from WA and J4. \* indicates amino acid change; Blue lines indicate the homeobox and red lines indicate the homeobox-associated leucine domains. C: Primer Rs-3F/Rs-2R was used to detect the 664 bp transposon, and all the 68 serrated-leaf individuals do not contain it. D: The expression level of *Rs390250* in WA and J4.

图 4 *Rs390250* 的序列分析与表达量分析

Fig.4 Gene structure and expression level of *Rs390250*



A:对已报道的多个控制叶缘裂刻的 *LMII-like* 基因在 LZ 结构域的氨基酸序列进行比对; 箭头指示的是氨基酸发生变化的位点。B:芸薹属叶缘裂刻基因与 *Rs390250* 的系统发育分析。A: The alignment of amino acid sequences in the LZ domain of *LMII-like* genes which from different species with lobed leaf; The arrow indicates the position of the changed amino acid. B: Phylogenetic analysis between the *LMII-like* genes from *Brassica* family and *Rs390250* from radish.

图 5 *LMII-like* 基因保守结构域的序列比对与进化树构建

Fig.5 Comparison and phylogenetic analysis of the *LMII-like* genes

### 3 讨论

花叶是十字花科植物广泛存在的一种类型。*LMII* 是调控拟南芥叶缘发育的重要基因。近年来,十字花科芸薹属植物中定位到的控制叶缘裂刻的基因(花叶基因)有 *Bra009510* (*B. rapa*)、

*BnaA10g26320D* 和 *BnaA10g26330D* (*B. nupus*)、*Bol010029* 和 *Bol010030* (*B. oleracea* var. *acephala* DC.), 以上基因都是 *At5g03790* (*LMII*) 的同源基因, 这表明 *LMII-like* 基因在十字花科植物里主要控制叶缘裂刻的发生, 功能相对保守。

本研究通过将同属十字花科植物的萝卜参考基

表2 11个萝卜栽培品种的表型与基因型

Table 2 The genotype of the 425th nucleotide in the coding sequence of *Rs390250* from 11 radish varieties

材料 Variety	表型 Phenotype	基因型 Genotype at the 425th nucleotide
扇子白 SZB	浅裂 Serrated	T/T
武青 WQ	深裂 Lobed	C/C
春红1号 CH-No.1	浅裂 Serrated	T/T
汉白玉 HBY	深裂 Lobed	C/T
翘头青 QTQ	深裂 Lobed	C/T
汉白1号 HB-No.1	深裂 Lobed	C/T
萝卜7号 LB-No.7	浅裂 Serrated	T/T
镇江圆白 ZJYB	深裂 Lobed	C/C
黄州萝卜 HZLB	深裂 Lobed	C/T
夏抗 XK	浅裂 Serrated	T/T
汉青1号 HQ-No.1	深裂 Lobed	C/C
J4	花叶,深裂 Lobed	C/C
WA	板叶,浅裂 Serrated	T/T

基因组与甘蓝型油菜参考基因组进行共线性分析,在初定位区间内发现1个 *LM11-like* 基因 (*Rs390250*),注释分析和序列分析结果表明其可能是控制萝卜花叶的候选基因。系统发育分析结果表明 *Rs390250* 属于 *RCO* 类型,前人研究显示 *RCO* 控制复叶的小叶形成,将 *RCO* 导入拟南芥中,植株叶缘出现明显的裂刻<sup>[25-26]</sup>。萝卜和油菜的叶片都属于简单叶, *BnaA10g26320D* 已被证实是控制甘蓝型油菜裂叶的关键基因<sup>[8]</sup>,这表明 *RCO* 类基因在简单叶中也能控制叶缘的发育。此外,前人研究结果显示 *BnaA10g26320D* 在 Yuye87(裂叶亲本)和 Zheyou 50(浅裂亲本)中表达量差异很大;*BnaA10g26330D* 在以上材料中表达量较低且无明显变化,但在 HY(裂)和 J9707(浅裂)中差异显著<sup>[8-9]</sup>,这2个基因控制的叶形变异都被认为是因顺式调控引起的不同等位基因效应造成的。本研究中, *Rs390250* 在板叶和花叶亲本中的表达量无明显差异,而位于第二外显子的非同义突变位点 T425C 恰好位于 LZ 结构域内,且导致保守氨基酸的改变,这对 HD-ZIP 蛋白的功能可能造成影响。故本研究认为该位点的变异可能是造成萝卜叶形变异的关键原因。本研究结果可为进一步解析萝卜花叶性状的形成和 *RCO* 类基因的作用机制进而为叶形的改良及辅助选育萝卜花叶品种奠定基础。

## 参考文献 References

- [1] 张丽. 萝卜几个主要植物学性状的遗传[J]. 中国蔬菜, 2006, 1(10): 10-12. ZHANG L. The inheritance of several main botanical characters in radish (*Raphanus sativus* L.) [J]. China vegetables, 2006, 1(10): 10-12 (in Chinese with English abstract).
- [2] WANG F H, LI G Y, CHEN S C, et al. Characterization of a new leaf-compound radish mutant (*Raphanus sativus* L.) [J]. Journal of applied horticulture, 2015, 17(2): 115-120.
- [3] ZHU X G, LONG S P, ORT D R. Improving photosynthetic efficiency for greater yield [J]. Annual review of plant biology, 2010, 61: 235-261.
- [4] KIDNER C A, UMBREEN S. Why is leaf shape so variable? [J]. International journal of plant developmental biology, 2010, 4: 64-75.
- [5] 扈新民. 甘蓝与萝卜属间杂种的创建及鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009. HU X M. Creation and identification of intergeneric hybrids between *Brassica oleracea* and *Raphanus sativus* [D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2009 (in Chinese with English abstract).
- [6] ZOU Z W, ISHIDA M, LI F, et al. QTL analysis using SNP markers developed by next-generation sequencing for identification of candidate genes controlling 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate contents in roots of radish, *Raphanus sativus* L. [J/OL]. PLoS One, 2013, 8: e53541 [2022-03-31]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053541>.
- [7] NI X, HUANG J, ALI B, et al. Genetic analysis and fine mapping of the *LOBED-LEAF 1 (BnLL1)* gene in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Euphytica, 2015, 204(1): 29-38.
- [8] NI X, LIU H, HUANG J, et al. *LM11-like* genes involved in leaf margin development of *Brassica napus* [J]. Genetica, 2017, 145: 269-274.
- [9] HU L M, ZHANG H, YANG Q Y, et al. Promoter variations in a homeobox gene, *BnaA10.LM11*, determine lobed leaves in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. Theoretical and applied genetics, 2018, 131: 2699-2708.
- [10] REN J, LIU Z Y, DU J T, et al. Fine-mapping of a gene for the lobed leaf, *BoLL*, in ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala) [J/OL]. Molecular breeding, 2019, 39(3): 40 [2022-03-31]. <https://doi.org/10.1007/s11032-019-0944-0>.
- [11] KITASHIBA H, LI F, HIRAKAWA H, et al. Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome [J]. DNA research, 2014, 21(5): 481-490.
- [12] JEONG Y M, KIM N, AHN B O, et al. Elucidating the triplicated ancestral genome structure of radish based on chromosome-level comparison with the *Brassica* genomes [J]. Theoretical and applied genetics, 2016, 129: 1357-1372.
- [13] YU X N, CHOIS R, DHANDAPANI V, et al. Quantitative trait loci for morphological traits and their association with functional genes in *Raphanus sativus* [J/OL]. Frontiers in plant science, 2016, 7: 255 [2022-03-31]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00255>.
- [14] CHEN X, LI X M, ZHANG B, et al. Detection and genotyping of restriction fragment associated polymorphisms in polyploid crops with a pseudo-reference sequence: a case study in allotetraploid *Brassica napus* [J/OL]. BMC genomics, 2013, 14: 346 [2022-03-31]. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-346>.
- [15] BOLGER A M, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. Bioinformatics, 2014,

- 30:2114-2120.
- [16] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The genome analysis toolkit: a map reduce framework for analyzing next generation DNA sequencing data [J]. *Genome research*, 2010, 20(9): 1297-1303.
- [17] WANG K, LI M, HAKONARSON H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data [J/OL]. *Nucleic acids research*, 2010, 38(16): e164 [2022-03-31]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq603>.
- [18] MANSFELD B N, GRUMET R. QTLseqr: An R package for bulk segregant analysis with next-generation sequencing [J/OL]. *Plant genome*, 2018, 11(2): 30025013 [2022-03-31]. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2018.01.0006>.
- [19] WANG Y, TANG H, DEBARRY J D, et al. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity [J/OL]. *Nucleic acids research*, 2012, 40: e49 [2022-03-31]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1293>.
- [20] LU K, LI T, HE J, et al. qPrimerDB: a thermodynamics-based gene-specific qPCR primer database for 147 organisms [J]. *Nucleic acids research*, 2018(D1): D1229-D1236.
- [21] TAKAGI H, ABE A, YOSHIDA K, et al. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations [J]. *The plant journal*, 2013, 74: 174-183.
- [22] SADDIC L A. The *LEAFY* target *LMII* is a meristem identity regulator and acts together with *LEAFY* to regulate expression of *CAULIFLOWER* [J]. *Development*, 2006, 133: 1673-1682.
- [23] CHEN J J, HU Q, ZHANG Y, et al. P-MITE: a database for plant miniature inverted-repeat transposable elements [J]. *Nucleic acids research*, 2014, 42(D1): D1176-D1181.
- [24] TRON A E, WELCHEN E, GONZALEZ D H. Engineering the loop region of a homeodomain-leucine zipper protein promotes efficient binding to a monomeric DNA binding site [J]. *Biochemistry*, 2004, 43: 15845-15851.
- [25] SICARD A, THAMM A, MARONA C, et al. Repeated evolutionary changes of leaf morphology caused by mutations to a homeobox gene [J]. *Current biology*, 2014, 24: 1880-1886.
- [26] VLAD D, KIERZKOWSKI D, RAST M I, et al. Leaf shape evolution through duplication, regulatory diversification, and loss of a homeobox gene [J]. *Science*, 2014, 343: 780-783.

## Genetic analysis and gene mapping of lobed leaf trait in radish

LI Xuewei<sup>1</sup>, GUO Chaocheng<sup>1</sup>, SONG Yao<sup>1</sup>, GAO Changbin<sup>2</sup>,  
ZHANG Xiaokang<sup>3</sup>, XIONG Qiufang<sup>2</sup>, LIU Kede<sup>1</sup>

1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong  
Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Vegetable Research Institute, Wuhan Academy of Agricultural Science, Wuhan 430345, China;

3. Wuhan Laifu Agricultural Technology Co., Ltd, Wuhan 430345, China

**Abstract** A F<sub>2</sub> population of radish (*Raphanus sativus* L.) was constructed by crossing the lobed-leaf cultivar J4 with the serrated-leaf cultivar WA. Two bulk DNA samples consisted of equivalent amounts of DNA from 20 individuals with lobed-leaf and 20 individuals with serrated-leaf in the F<sub>2</sub> population were used to study the inheritance of the lobed-leaf in radish. The results showed that the leaf in radish was controlled by a single gene. The lobed-leaf is incomplete dominant over the serrated-leaf. The gene for lobed-leaf was initially mapped to the genomic region from 0.07 Mb to 7.97 Mb on chromosome R7 through bulked segregant analysis (BSA) and genotyping by sequencing (GBS). It was found that there is good collinearity between 0.87-1.32 Mb in the candidate interval of radish and 16.35-16.80 Mb of the A10 chromosome of rapeseed by analyzing the collinearity between the whole genome of radish and rapeseed (*Brassica napus*). Gene function annotation of the collinear segment confirmed that *Rs390250* (899 863-901 651 bp) is a candidate gene of lobed-leaf in radish. This candidate gene encodes a HD-Zip I (the class I homeodomain leucine-zipper) transcription factor. Its non-synonymous mutation site T425C located in the 2nd exon leads to changes in conserved amino acids in the LZ (leucine zipper) domain, indicating that it may be a key site for the variation of leaf morphology.

**Keywords** radish (*Raphanus sativus* L.); lobed-leaf; BSA-Seq; variation of leaf morphology; candidate gene; collinearity

(责任编辑:张志钰)