



王志强,杜慧莹,李程,郭松,田梅,于蓉. 基于BSA-seq和RNA-seq的西瓜裂刻叶候选基因挖掘[J]. 中国农业大学学报,2025,30(11):67-84.
WANG Zhiqiang, DU Huiying, LI Cheng, GUO Song, TIAN Mei, YU Rong. Candidate gene mining of watermelon lobed leaf based on BSA-seq and RNA-seq [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(11): 67-84.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.11.06

基于BSA-seq和RNA-seq的西瓜裂刻叶候选基因挖掘

王志强 杜慧莹 李程 郭松 田梅 于蓉

(宁夏农林科学院 园艺研究所, 银川 750002)

摘要 裂刻叶是植物适应环境的重要特征,挖掘西瓜裂刻叶相关基因对西瓜育种、遗传改良及叶缘形态发育的分子调控机制研究具有重要意义。首先以西瓜裂刻叶自交系SW246(P₁)与全缘叶自交系SW247(P₂)为亲本,通过杂交构建六世代遗传群体(P₁、P₂、F₁、F₂、BC₁P₁、BC₁P₂);后采用BSA-seq进行基因定位,并结合转录组测序RNA-seq数据进行关联分析,从而挖掘叶片裂刻关键调控基因。遗传分析结果表明:在后代群体中,F₁、BC₁P₁群体西瓜叶片均为裂刻叶,F₂群体裂刻叶和全缘叶的分离比符合3:1的孟德尔分离比例,BC₁P₂群体裂刻叶和全缘叶分离比符合1:1的理论比,说明裂刻叶和全缘叶性状符合单基因显性遗传模式,裂刻叶对全缘叶为显性。BSA-seq分析发现SNP和InDels关联交集位于4号染色体23164320—24976967 bp内,长度1.81 Mb,包含171个候选基因。其中在此区间亲本间存在非同义突变的SNP共22个,混池间存在非同义突变的SNP共16个;亲本间存在移码突变的InDel共3个,混池间存在移码突变的InDel共4个。联合BSA-seq与RNA-seq分析发现共有26个基因显著相关。此外,通过对BSA-seq和RNA-seq联合分析得到的4个候选基因及26个显著相关基因进行生物信息学分析、转录因子预测和基因注释,推测结果发现:1个编码PPR蛋白的基因(*Cla97C04G076940*),与HD-Zip、TCP、LOB、E2F-DP、TIFY等转录因子相关;另有1个与IAA-氨基酸水解和E3泛素连接酶相关的基因,该基因可能在叶缘性状的调控过程中发挥关键作用。本研究可为进一步精细定位西瓜裂刻叶调控基因奠定基础。

关键词 西瓜;裂刻叶;BSA-seq;RNA-seq;候选基因

中图分类号 S651

文章编号 1007-4333(2025)11-0067-18

文献标志码 A

Candidate gene mining of watermelon lobed leaf based on BSA-seq and RNA-seq

WANG Zhiqiang, DU Huiying, LI Cheng, GUO Song, TIAN Mei, YU Rong

(Institute of Horticulture, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry, Yinchuan 750002, China)

Abstract Lobed leaf is an important feature for plant to adapt environment, and the mining of watermelon lobe leaf-related genes is of great significance for watermelon breeding, genetic improvement and molecular regulatory mechanisms of leaf margin morphogenesis. Firstly, six generations of genetic populations (P₁, P₂, F₁, F₂, BC₁P₁ and BC₁P₂) were constructed by crossing the watermelon lobed leaf inbred line SW246 (P₁) with the entire leaf inbred line SW247 (P₂) as the parental parents. Later, gene localization was carried out by using BSA-seq and association analysis was conducted in combination with RNA-seq data from transcriptome sequencing. To excavate the key regulatory genes of leaf lobed. The key regulatory genes were analyzed by BSAseq and RNA-seq. The results of genetic analysis showed that in the progeny population, the watermelon leaves of F₁ and BC₁P₁ populations were all lobed leaves. The segregation ratio of lobed and entire leaves in

收稿日期: 2025-02-18

基金项目: 宁夏农林科学院农业高质量发展和生态保护科技创新示范项目(NGSB-2021-7-02)

第一作者: 王志强(ORCID:0000-0002-3918-9539),副研究员,主要从事西瓜栽培与育种研究,E-mail: wzq2003135@163.com

the F2 population conformed to the Mendelian segregation ratio of 3:1. In contrast, the segregation ratio of lobed and entire leaves in the BC1P2 population conformed to the theoretical ratio of 1:1, which indicated that the traits of lobed and entire leaves conformed to the single-gene dominant mode of inheritance. The lobed was dominant to entire leaves. BSA-seq analysis revealed that the SNPs and InDels association intersections were located within 23 164 320 to 24 976 967 bp of chromosome 4, with a length of 1.81 Mb, containing 171 candidate genes. Among them, there were 22 SNPs with non-synonymous mutations between parents and 16 SNPs with non-synonymous mutations between mixed pools; 3 InDels with shifted code mutations between parents and 4 InDels with shifted code mutations between mixed pools. Combining BSA-seq and RNA-seq analysis, it was revealed that a total of 26 genes were significantly associated. In addition, the bioinformatics analysis, transcription factor prediction, and gene annotation of the four candidate genes and 26 significantly related genes obtained from the combined BSA-seq and RNA-seq analyses resulted in the speculative discovery of one gene encoding a PPR protein (*Clat97C04G076940*), which is related to HD-Zip, TCP, LOB, E2F-DP, TIFY, and other transcription factors, and another gene is related to IAA-amino acid hydrolysis and E3 ubiquitin ligase, which may play a key role in the regulation of leaf margin traits. This study lays the foundation for further fine localization of watermelon leaf margin regulation genes.

Keywords watermelon; lobed leaf; BSA-seq; RNA-seq; candidate genes

西瓜 (*Citrullus lanatus*) 属于葫芦科西瓜属重要园艺作物,栽培历史悠久分布地域广泛,被誉为“夏季水果之王”^[1]。叶片作为植物光合作用和蒸腾作用的主要场所,不仅直接影响光合效率和水势平衡,还在植物对环境的适应性中发挥重要作用^[2]。合理的叶形能够增强植物叶片空间延展性和光源竞争力,提高光合效率,更适应密植^[3-4],能够优化叶面积指数,改善通风透气性^[5]。此外,合理叶形还能够提升耐高温、抗旱能力,并增强对水分胁迫和冷害的抵抗力^[6-7]。西瓜叶形因裂刻的有无,可分为裂刻叶和全缘叶(板叶)。裂刻做为西瓜叶片的重要的表型之一,在西瓜的生长发育和农艺性状方面发挥着重要作用^[8]。因此,研究西瓜裂刻叶有助于提升种质资源的利用效率,并对西瓜育种及叶缘形态发育的分子调控机制研究具有重要意义。

植物叶片形态的形成涉及多条复杂的调控网络,主要被认为参与叶缘裂刻形成的通路有3条:1)在 TCP-CUC-PIN1-Auxin 通路中,通过调控生长素的分布和梯度直接影响叶缘锯齿的发育。生长素的极性运输由 PIN1 (PIN-FORMED1) 调控^[9-10],例如拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 和苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 中, PIN1 基因的功能缺失会导致叶缘锯齿减少^[11-12]。此外,在拟南芥和番茄等作物中发现,转录因子 NAM (NO APICAL MERISTEM)/CUC (CUP-SHAPED COTYLEDON1) 是叶缘锯齿发育调控的重要节点。当

NAM/CUC 基因表达下调,叶缘锯齿程度减少^[9,13]。已有研究表明, TCP (TEOSINTE BRANCHED1/CYCLOIDEA/PCF) 转录因子的活性对于植物叶片形态和大小的形成至关重要^[14]。例如,在拟南芥中, TCP4 通过抑制 CUC 基因的表达进一步限制锯齿的形成^[15]; 2) 在 KNOX-GA/CK 通路中, KNOX (KNOTTED1-like homeobox) 基因通过调控激素平衡发挥作用,其正向调控细胞分裂素 (CK, cytokinins) 合成,负向调控赤霉素 (GA, gibberellin) 生物合成。GA 与 CK 具有拮抗作用, GA 降低叶形复杂度,使叶缘光滑, CK 促进小叶分化和复杂叶片形成^[16]; 3) 在 LMI1-like (RCO)-CK 通路中, RCO (REDUCED COMPLEXITY) 是调控小叶形成的关键基因,在复叶植物中通过延缓叶缘局部成熟进而促进叶形复杂化。例如,在碎米荠 (*Cardamine hirsute* L.) 中发现 RCO 通过调节与细胞分裂素相关的基因表达,增强小叶和叶缘锯齿的形成^[17],并且发现该通路在复叶植物陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 中尤为重要^[18],而在拟南芥中由于 RCO 基因缺失,叶片表现为单叶形态^[18]。

不同作物中裂刻叶性状相关基因的遗传分析和定位研究已取得重要进展。如:油菜 (*Brassica napus* L.) 叶缘裂刻性状由不完全显性基因 *BnLL1* 控制,该基因被精确定位于一个 36.7 kb 的基因区域^[20];棉花主要叶形基因 (*L*) 被定位于 15 号染色体短臂远端的一个 5.4 cM 区间,其中 2 个位于该区间内的 *LMI1-like* 基因被认为是最有可能的候

选基因^[21]。HD-Zip 转录因子 *GhLMI1-D1b* (*Gorai. 002G244000*) 在棉花叶片形状的形成过程中发挥了关键作用^[17]。Wei 等^[22]的研究将西瓜裂叶性状的关键位点定位于第 4 号染色体, 而 Xu 等^[23]在 4 号染色体的 0.7 Mb 区域初步定位到了全缘叶位点。

集群分离分析法 (Bulked Segregant Analysis, BSA) 是一种在生物信息学中广泛应用的基因定位方法^[24]。由于其具有快速、准确和低成本的优势, 已成为定位重要农艺性状基因的重要工具^[25-26]。RNA 测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 作为研究基因表达与功能的关键技术, 特别是在植物功能基因挖掘中, 具有广泛的应用前景。近年来, 多组学分析技术为挖掘相关候选基因提供了有力支持。

目前关于西瓜叶形的基因定位和关键基因挖掘研究尚少。因此, 为深入解析西瓜叶形发育的分子调控网络, 精准鉴定调控叶形性状的关键基因, 通过裂刻叶自交系 SW246 (P₁) 与全缘叶自交系 SW247 (P₂) 杂交构建 F₂ 代群体, 利用 BSA-seq 对亲本池和 F₂ 代 2 个极端表型池进行全基因组重测序, 利用 SNP 标记定位目标性状关联区域, 结合 RNA-seq 测序结果确定调控西瓜叶形的关键候选基因, 以期为进一步精细定位西瓜叶形关键调控基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用自交系 SW246 (P₁, 裂刻叶) 和自交系 SW247 (P₂, 全缘叶) 为亲本, 杂交获得 F₁ 代, 分别与双亲回交后获得 (BC₁P₁、BC₁P₂) 群体, F₁ 自交获得 F₂ 分离群体, 用 2 个不同叶片性状亲本, 构建六世代遗传群体。其中 SW246 和 SW247 来自宁夏农林科学院园艺研究所西瓜育种课题组, 2022 年获得 F₁ 代, 2023 年获得 BC₁P₁、BC₁P₂ 和 F₂ 代, 2024 年春季将 P₁、P₂、F₁、F₂、BC₁P₁、BC₁P₂ 植株种植于宁夏农林科学院农业试验基地。

1.2 BSA-seq 测序分析

1.2.1 DNA 混池构建

采用 BSA 法对西瓜裂刻叶性状进行基因定位。在 2 个亲本材料, 选取裂刻叶和全缘叶植株各 30

株, 其次在 F₂ 分离群体中, 各选取 30 株与亲本叶型相同的裂刻叶和全缘叶植株。分别取幼嫩叶片并保存在液氮中, 构建 4 个 DNA 混池。

1.2.2 DNA 提取、文库构建及测序

采用 CTAB 法提取全缘叶亲本 (PQ)、裂刻叶亲本 (PL) 以及 F₂ 分离群体中全缘植株和裂刻植株的 DNA^[27]。亲本及极端混合池重测序由北京百迈科生物技术公司完成。参考基因组版本信息: *Citrullus lanatus*. 97103_v2. genome. fa。

1.2.3 生物信息学分析

对原始片段 (Raw reads) 进行质量评估, 利用 BWA 软件将 4 个混池的过滤后的 clean reads 与西瓜 97103_V2 参考基因组序列进行比对^[28]。采用 GATK-pipeline 和 SnpEff 软件对单核苷酸多态性 (SNP) 以及插入和缺失 (InDel) 进行识别和注释^[29-30]。根据位点缺失率、深度和质量值等进行变异位点过滤, 得到高置信度的 SNP 和 InDel 位点。采用 ED 和 InDel-index 进行关联分析^[31-32]。

1.3 RNA-seq 测序分析

对全缘叶 FQ 和裂叶 FL 进行转录组测序。设置 3 个生物学重复, 共 6 个样品。转录组测序分析委托北京百迈客生物科技有限公司开展, 构建测序文库并进行质量检测, 利用 Illumina HiSeq™ 测序平台进行样品转录组测序。所测数据与西瓜 97103_V2 参考基因组进行比对, 差异表达基因通过 DESeq2-edgeR 软件进行筛选与检测, 筛选标准设定为: Fold Change ≥ 2 且 FDR < 0.01。使用 GO 和 KEGG 数据库对差异表达基因进行注释^[33]。

1.4 RT-qPCR 验证候选基因

选择与西瓜叶形相关的 9 个差异基因进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证 (表 1), 用植物 RNA 提取试剂盒 (物元吉因生物科技有限公司, 武汉, 中国) 提取植物 RNA。使用 RT Easy™ II (RT-01022/01023, FOREGENE, 成都, 中国) 反转录试剂盒进行 cDNA 合成。引物依照 NCBI 中检索到的序列在 primer5 或 BD 中设计合成。使用 SYBR qPCR SuperMix Plus (M00041, 岚云生物科技有限公司, 成都, 中国) 在 LightCycler 仪器上进行定量 PCR (qPCR) 分析。每个处理 3 个生物学重复, 3 个技术重复。基因表达量采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算^[34]。

表1 RT-qPCR引物序列
Table 1 Sequences of RT-qPCR primers

引物名称 Primer ID	上游引物序列 (5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物序列 (5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>Cla97C04G076610</i>	AGGTTTCGTCAGGAAAGAG	GGATCATCGGCACAAGTA
<i>Cla97C04G076940</i>	TGGACAGCAATTATAGGT	TACAATGCCACTCCTTAT
<i>Cla97C04G077080</i>	GCTATTCTCCTGTTTCATTAC	CTTTGTGTAGTCTCTTTCTG
<i>Cla97C04G077200</i>	AGCAGAAATAGAGAGGATGA	ACTTTAAGGAAGCCAGAATG
<i>Cla97C04G076510</i>	CACCACCACATTCTTCTT	TCGTCTCCATCACTGATT
<i>Cla97C04G069760</i>	ATGGTTGCTCATAAGAGG	TAGAAAGCGGAAGATGTG
<i>Cla97C04G079560</i>	TTCTTCGGTAGTCTCTTG	GCGTAATCTCCTTCAATG
<i>Cla97C03G052930</i>	GCTAGTTCGTGATCCAAA	CATCAACTATCCGACCAT
<i>Cla97C05G083220</i>	TTACCACAGAGCACTCAAGG	CGCCCATTTGTCCAATCTTC
18S	CAACCATAAACGATGCCGA	AGCCTTGCGACCATACTCC

2 结果与分析

2.1 西瓜裂刻叶的遗传分析

根据叶片的田间表型性状统计结果见表2。可见：F₁群体,西瓜叶片性状均表现为裂刻叶;F₂群体,性状出现分离,150株表现为裂刻叶,62株表现为全缘叶,分离比例经过卡方检验符合3:1的孟德尔分离比例

($\chi^2=2.04<\chi^2_{0.05}=3.841$);BC₁P₁群体植株叶片均表现为裂刻叶;BC₁P₂群体中裂刻叶和全缘叶株数分别为89株表现为裂刻叶,81株表现为全缘叶,分离比例符合1:1的理论比($\chi^2=0.37<\chi^2_{0.05}=3.841$)。遗传分析表明,西瓜裂刻叶与全缘叶性状是一对质量性状,其遗传受一对显性基因控制,且裂刻叶对全缘叶为显性。

表2 六世代群体植株分离情况统计
Table 2 Statistics of plant segregation in six generations of population

世代 Generation	植株总数 Number of total plants	裂刻叶 Lobed leaf	全缘叶 No-Lobed leaf	P 值 P value	卡方值 χ^2 value
P ₁	20	20			
P ₂	20		20		
F ₁	147	147			
F ₂	212	150	62	0.15	2.04
BC ₁ P ₁	185	185			
BC ₁ P ₂	170	89	81	0.54	0.37

注:P₁、P₂、F₁、F₂、BC₁P₁和BC₁P₂分别为裂刻叶亲本群体、全缘叶亲本群体、子一代群体、子二代群体、子一代与裂刻叶亲本回交群体和子一代与全缘叶亲本回交群体。下同。
Note: P₁, P₂, F₁, F₂, BC₁P₁ and BC₁P₂ are the lobed leaf parental population, the entire leaf parental population, the daughter population, the daughter-second generation population, the daughter population backcrossed with the cleaved-leaf parental population and the daughter population backcrossed with the entire-leaf parental population, respectively. The same below.

2.2 基于BSA-seq测序结果及分析

2.2.1 测序质量评估

通过对2个亲本池(PL、PQ)和2个混池(FL、FQ)进行了测序,结果见表3。共获得48.86 Gbp的

Clean reads,平均Q30达到了94.59%。与参考基因组的平均比对效率为99.28%,平均覆盖深度为32×,基因组覆盖率为99.59%。PL中有59 530 136条reads,PQ中有57 892 598条reads,FL

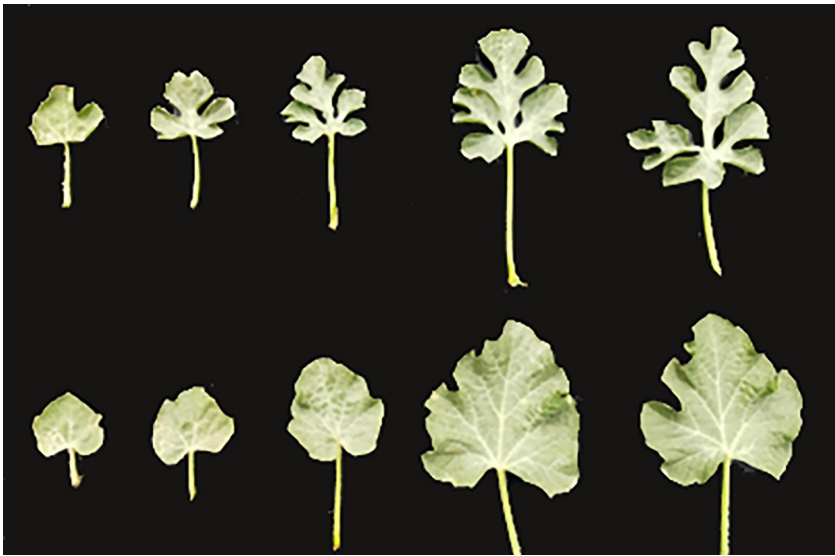


图 1 西瓜裂刻叶(上排)和全缘叶叶片表型(下排)

Fig. 1 Phenotypes of watermelon lobed leaves (upper row) and no-lobed leaves (lower row)

中有 103 496 546 条 reads, FQ 中有 107 385 168 条 reads, Clean reads 的平均 GC 含量为 36.36%, 并且

AT、CG 碱基基本未发生分离, 曲线较平缓, 测序结果正常, 适用于后续的下游分析。

表 3 样品与参考基因组比对结果和测序深度

Table 3 Sample and reference genome comparison results and sequencing depths

样品 Sample	过滤后片段数 Clean reads	过滤后碱基 长度/bp Clean base	Q20/%	Q30/%	比对率/% Mapped rate	平均测序深度/倍 Average depth	至少覆盖 1 个碱基位点比例/% Coverage at least one base group	GC 含量 % GC content
FL	103 496 546	15 433 546 073	98.01	94.61	99.30	41	99.73	36.53
FQ	107 385 168	15 886 820 068	98.28	95.28	99.42	42	99.79	34.97
PL	59 530 136	8 884 482 124	97.96	94.38	99.27	23	99.47	36.94
PQ	57 892 598	8 656 033 089	97.84	94.12	99.13	23	99.37	37.01

2.2.2 关联分析预测西瓜叶形候选基因

对 4 个样品进行重测序后, 在 FL、FQ、PL、PQ 分别检测到 288 631 和 91 033、289 634 和 937 87、226 459 和 66 226、220 230 和 62 974 个 SNP 和 InDel; 去除共有位点, 总 SNP 和 InDel 有 318 019 和 106 186 个, 引起非同义突变的 SNP 共 3 835 个(图 2)。对 SNP 和 InDel 进行过滤, 得到高质量可信 SNP 和 InDel 位点共 106 985 和 25 612 个。使用 ED 和 index 2 种算法对这些高质量 SNP 和 InDel 位点进行关联分析。利用两混池间基因型存在差异的 SNP 和 InDel 位点, 统计各个碱基在不同混池中的深度, 计算每个位点 ED 值, 并进行拟合, 取所有位点拟合值的 median+3×SD 作为分析的关联阈值^[35], 计算得 0.35 和 0.20。根据关联阈值

判定, SNP 和 InDel 的 ED 关联结果如图 3(a) 和 (b) 所示。选择阈值以上的区域作为与性状相关的区域。SNP 指数和 InDel 指数方法关联结果的分布如图 3(c) 和 (d) 所示。

将 2 种关联分析方法得到的 SNP 关联区域结果取交集, 最终确定了一个与性状相关的候选区域, 总长度为 1.88 Mb, 间隔内有 181 个基因。将 2 种关联分析方法得到的 InDel 关联区域结果取交集, 最终确定了 2 个与性状相关的候选区域, 总长度为 3.07 Mb。对 SNP 和 InDel 关联结果取交集, 共得到 1 个与性状相关的候选区域, 总长度为 1.81 Mb, 在此区间亲本间存在非同义突变的 SNP 共 22 个, 混池间存在非同义突变的 SNP 共 16 个, 亲

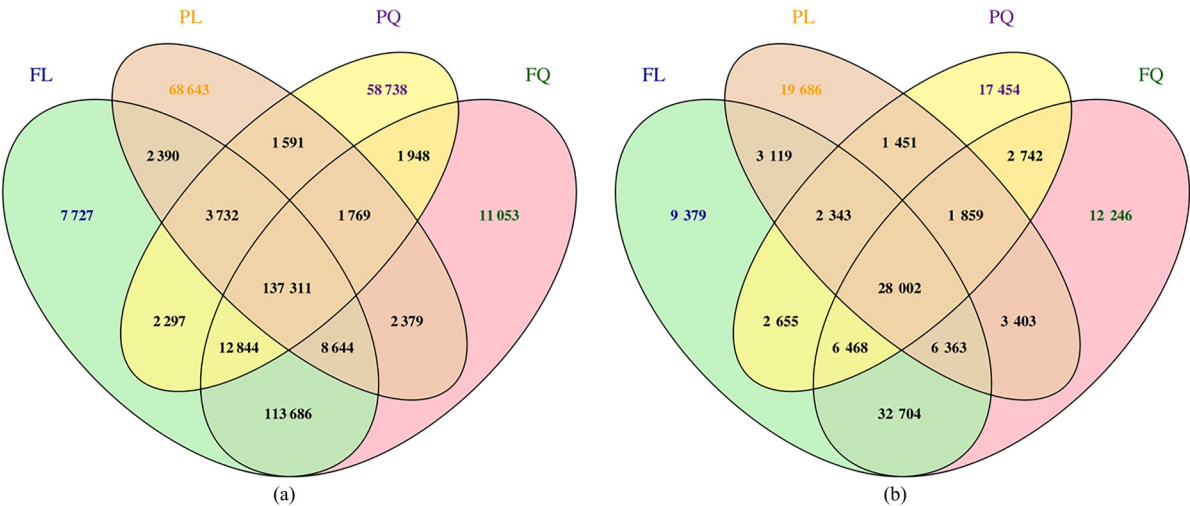
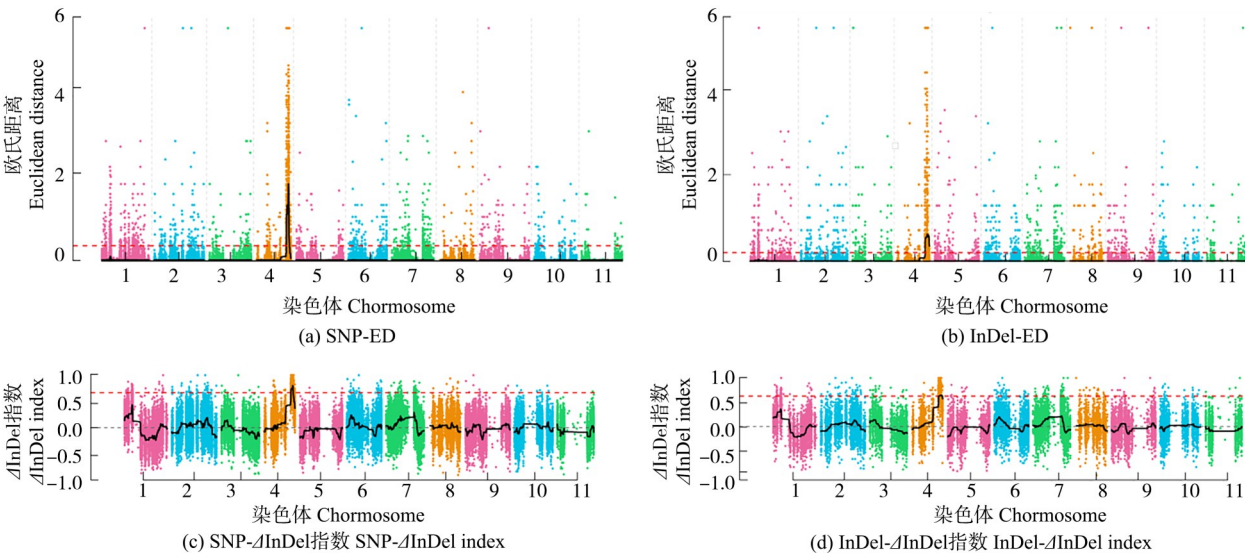


图2 SNP(a)和 InDel(b)在样本间差异的维恩图

Fig. 2 Venn plot of inter sample differences for SNP (a) and InDel (b)



黑线为拟合后的 ED 或 index 关联值;红色虚线代表显著性关联阈值。不同颜色的点表示不同染色体上筛选后的 SNP。
The black line is the fitted ED or index association value, and the red dotted line represents the threshold of significance association. Different colored dots represent SNPs screened on different chromosomes.

图3 SNP和 InDel的欧氏距离及指数关联分析结果

Fig. 3 Correlation analysis results of Euclidean distance (ED) and index for SNP and InDel

本间存在移码突变的 InDel 共 3 个,混池间存在移码突变的 InDel 共 4 个,候选区域内共 171 个基因(表 4)。将测序分析结果和关联分析结果可视化,并将样品的变异结果及 BSA 关联分析结果使用 circos 软件(<http://circos.ca/>)作图(图 4)。

此外,将非同义突变和移码突变的基因进行整合,去除冗余后,共得到 17 条基因。其中,有 3 条基因(*Cla97C04G077350*、*Cla97C04G076970*、*Cla97C04G076940*)与表 5 中的基因重复,故在此不再赘述。最

终,对剩下的 14 条基因进行了功能注释,结果如表 5 所示。注释结果显示,这些基因主要及苯丙氨酸代谢、核融合、细胞结构锚定、氮代谢、转录调控、糖基转移等过程。

2.3 基于 RNA-Seq 测序结果分析

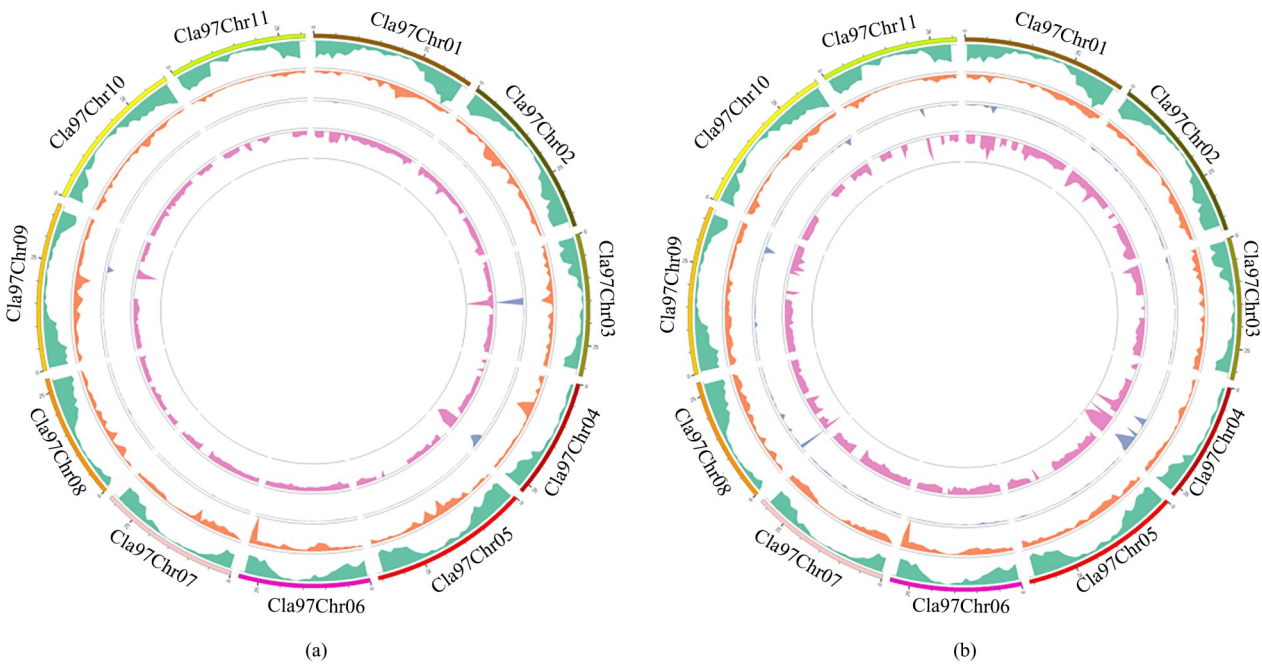
2.3.1 数据质控

对样品转录组 RNA-seq 测序,在滤除所有低质量序列和接头后,共获得 39.90 Gb Clean data,各样品 Clean data 均达到 6.45 Gb, Q30 碱基百分比在

表 4 SNP 和 InDel 分析结果利用 2 种方法在 4 号染色体获得关联区域

Table 4 Results of SNP and InDel analysis using 2 methods to obtain association regions on chromosome 4

关联分析类型 Association analysis type	起始位置 (bp) Start position	终止位置 (bp) Termination location	区间大小 /Mb Region size	区间内基因数量 Gene number in the regions
SNP 关联结果 SNP correlates result	23 097 580	24 976 967	1.88	181
InDel 关联结果 InDel correlates result	23 164 320	26 229 773	3.07	310
2 个关联结果交集 The intersection of the two association results	26 251 721	26 253 235	0.00	0
	23164320	24976967	1.81	171



从外到内依次为:第1圈:染色体坐标,第2圈:基因分布,第3圈:密度分布,第4圈:ED 值分布,第5圈:Aindex 值分布。

From outside to inside: Circle 1 is chromosome coordinates, circle 2 is gene distribution, circle 3 is density distribution, circle 4 is ED value distribution and circle 5 is Aindex value distribution.

图 4 SNP(a) 和 InDel(b) 在染色体上的可视化分布

Fig. 4 Visual distribution of SNPs (a) and InDel(b) on chromosomes

94.46% 及以上。将各样品的 Clean reads 与指定的参考基因组进行序列比对,比对效率在 95.50%~97.28%。结果见图 5。可知本研究方法的数据处理规范,数据的质量较高且分组差异显著,可进行后续转录组分析。

2.3.2 差异基因分析

使用 DESeq2 软件对基因表达数据进行差异分析,结果见图 6(a)。可见共筛选出 892 个差异表达基因,其中上调基因有 196 个,下调基因有 696 个。为了直观地展示不同分组中基因的表达差异以及

挖掘新的功能基因,对筛选出的所有差异表达基因进行层次聚类分析,结果见图 6(b)。可见同一组内基因表达模式相似。

2.3.3 差异基因的 GO 富集分析

对获得的 892 个差异基因,利用 GO (Gene Ontology) 数据库进行富集分析,结果发现这些基因分别被注释到三大功能领域,即生物学过程 (Biological Process)、细胞组分 (Cellular Component) 和分子功能 (Molecular Function)。针对每个领域富集程度最高的前 20 个 GO 条目绘制富集气泡图结果见

表5 14个基因的功能注释
Table 5 Functional annotation of 14 genes

基因名称 Gene ID	功能描述 Functional annotation
<i>Cla97C04G075860</i>	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase
<i>Cla97C04G076190</i>	核融合缺陷4样蛋白 4-like/protein nuclear fusion defective 4-like
<i>Cla97C04G076250</i>	锚定支架 Scaffold00068, anchoredscaffold00068
<i>Cla97C04G076270</i>	谷氨酰胺合成酶1型 Type-1 glutamine synthetase 1-like
<i>Cla97C04G076280</i>	谷氨酰胺合成酶1型 Type-1 glutamine synthetase 1-like
<i>Cla97C04G077010</i>	NAC结构域蛋白90样蛋白 NAC domain-containing protein 90-like
<i>Cla97C04G077040</i>	UDP-N-乙酰葡萄糖胺-肽 N-乙酰葡萄糖胺基转移酶 UDP-N-acetylglucosamine-peptide N-acetylglucosaminyltransferase
<i>Cla97C04G077060</i>	二氢黄酮醇4-还原酶 Dihydroflavonol 4-reductase/flavanone protein
<i>Cla97C04G077120</i>	肌球蛋白重链样蛋白 Myosin heavy chain-like protein
<i>Cla97C04G077130</i>	五肽重复序列 Pentatricopeptide repeat
<i>Cla97C04G077150</i>	五肽重复结构域蛋白 Pentatricopeptide repeat-containing protein
<i>Cla97C04G077260</i>	类似转录抑制因子 KAN1 Transcription repressor KAN1-like
<i>Cla97C04G076150</i>	α -碳酸酐酶7类似蛋白 Alpha carbonic anhydrase 7-like
<i>Cla97C04G076250</i>	锚定支架 Scaffold00068, anchoredscaffold00068

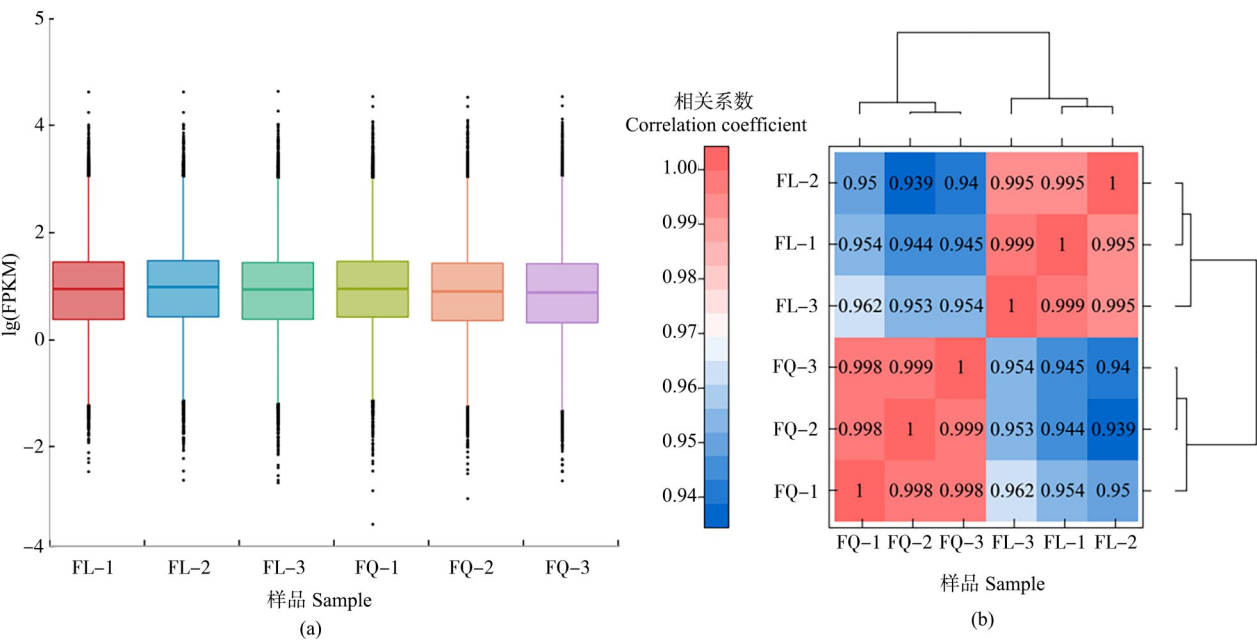


图5 各样品 FPKM 箱线图 (a) 及两两样品的表达量相关性热图 (b)

Fig. 4 Box line plot of FPKM for each sample (a), heat map of expression correlation between two and two samples (b)

图6(a)~(c)。由图7(a)可见在生物学过程中,差异基因主要富集于核转录 mRNA 降解(5个)、花器官发育(7个)、叶系发育(6个)和近轴/远轴的极性确定(2个)等条目;由图7(b)可见在细胞组分中,差异

基因集中于细胞核(117个)、细胞器(53个)、细胞内细胞器(53个)等条目;由图7(c)可见在分子功能中,差异基因显著富集于有机环状化合物结合(27个)、杂环化合物结合(27个)、锌离子跨膜转运活性

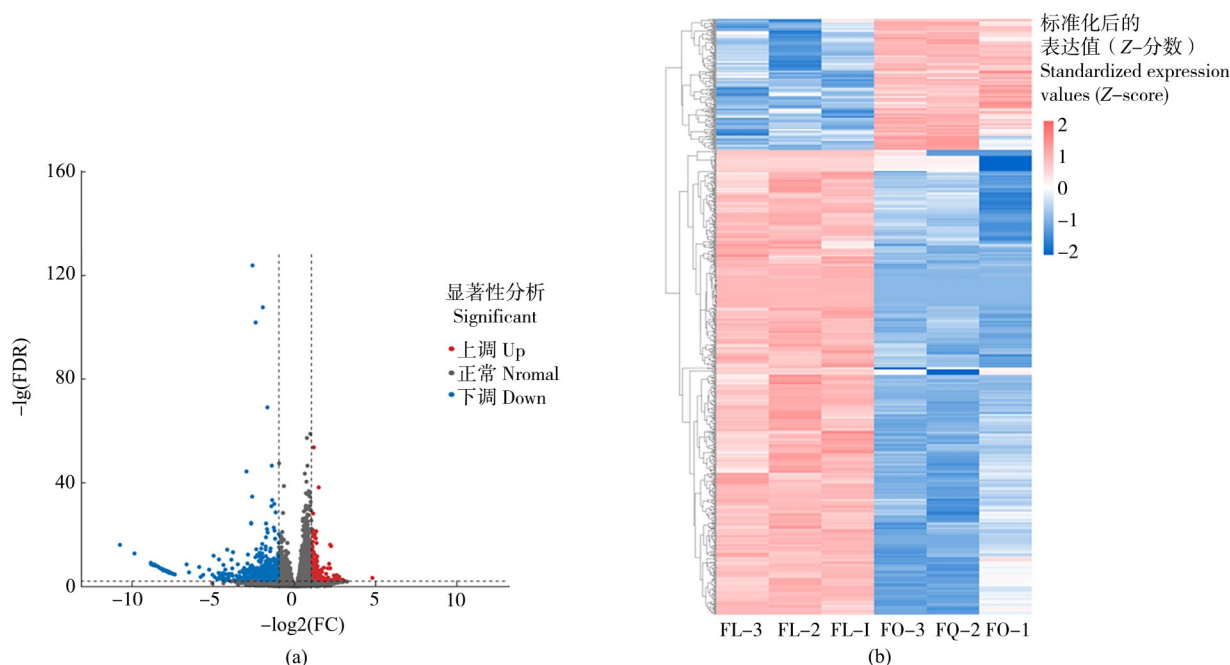


图 6 火山图差异表达分析(a)和差异表达基因聚类图(b)

Fig. 5 Volcano map differential expression analysis (a) and clustering of differentially expressed genes (b)

(3个)及序列特异性DNA结合(42个)等条目。

2.3.4 差异基因的KEGG富集分析

利用KEGG数据库对892个差异基因进行富集分析,结果显示这些基因被归入101条代谢通路。选择富集程度排名前20的代谢通路绘制气泡图结果见图7(d)。可见:差异基因主要集中在以下通路,植物-病原相互作用(40个)、脂肪酸延长(5个)、类固醇生物合成(4个)、倍半萜和三萜生物合成(4个)、植物昼夜节律(5个)、硫转运系统(2个)、糖磷脂酰肌醇(GPI)锚定物生物合成(4个)、MAPK信号传导通路(20个),胡萝卜素生物合成(5个)等。其中,植物-病原相互作用(ko04626)、脂肪酸延长(ko00062)、半萜和三萜生物合成(ko00909)以类固醇生物合成(ko00100)通路富集显著。

2.4 BSA-seq和RNA-seq联合分析

2.4.1 候选基因差异表达分析

针对BSA-seq分析鉴定出的171个候选基因,结合RNA-seq数据筛选这些基因的表达水平,绘制表达量热图结果见图8。可见所有候选基因中,*Cla97C04G076610*、*Cla97C04G077200*、*Cla97C04G076940*、*Cla97C04G077080*共计4个基因在F2群体的2种叶形试材中发生了显著的差异表达,且表达水平较高。4个差异表达的候选基因中:*Cla97C04*

*G076610*编码一个激酶家族蛋白,该蛋白在植物体内广泛存在,并参与多种生理过程。可作为信号转导的关键分子,能够响应外界刺激,并将信号转化为细胞内的生化反应。这些反应进一步调控细胞的增殖、分化、代谢等过程,从而维持植物的正常生长发育^[36];*Cla97C04G077200*编码一个类HVA22蛋白,该蛋白能够响应干旱、盐胁迫、低温等逆境条件,并通过调控细胞内的信号转导途径来增强植物的抗逆性^[37];*Cla97C04G077080*编码一个类毛状体双折射蛋白8(protein trichome birefringence-like 8, TBL8),该蛋白在植物细胞壁的形成、修饰和维持中发挥着重要作用^[38];*Cla97C04G076940*编码一个五肽重复序列(Pentatricopeptide repeat, PPR),该蛋白属于PPR基因家族。水稻研究结果表明,PPR蛋白主要定位于线粒体和叶绿体,并且某些PPR蛋白的突变会导致叶片形态异常、育性降低等表型。因此推测*Cla97C04G076940*可能是4个候选基因中导致叶形差异的关键基因^[39]。

2.4.2 叶形相关的基因调控网络构建

基于差异表达基因和候选基因表达量的相关性构建共表达网络,设置相关性阈值为0.8,显著性阈值为0.005,筛选出与候选基因最显著共表达基因,结果见图9。可见:19个候选基因与9个非

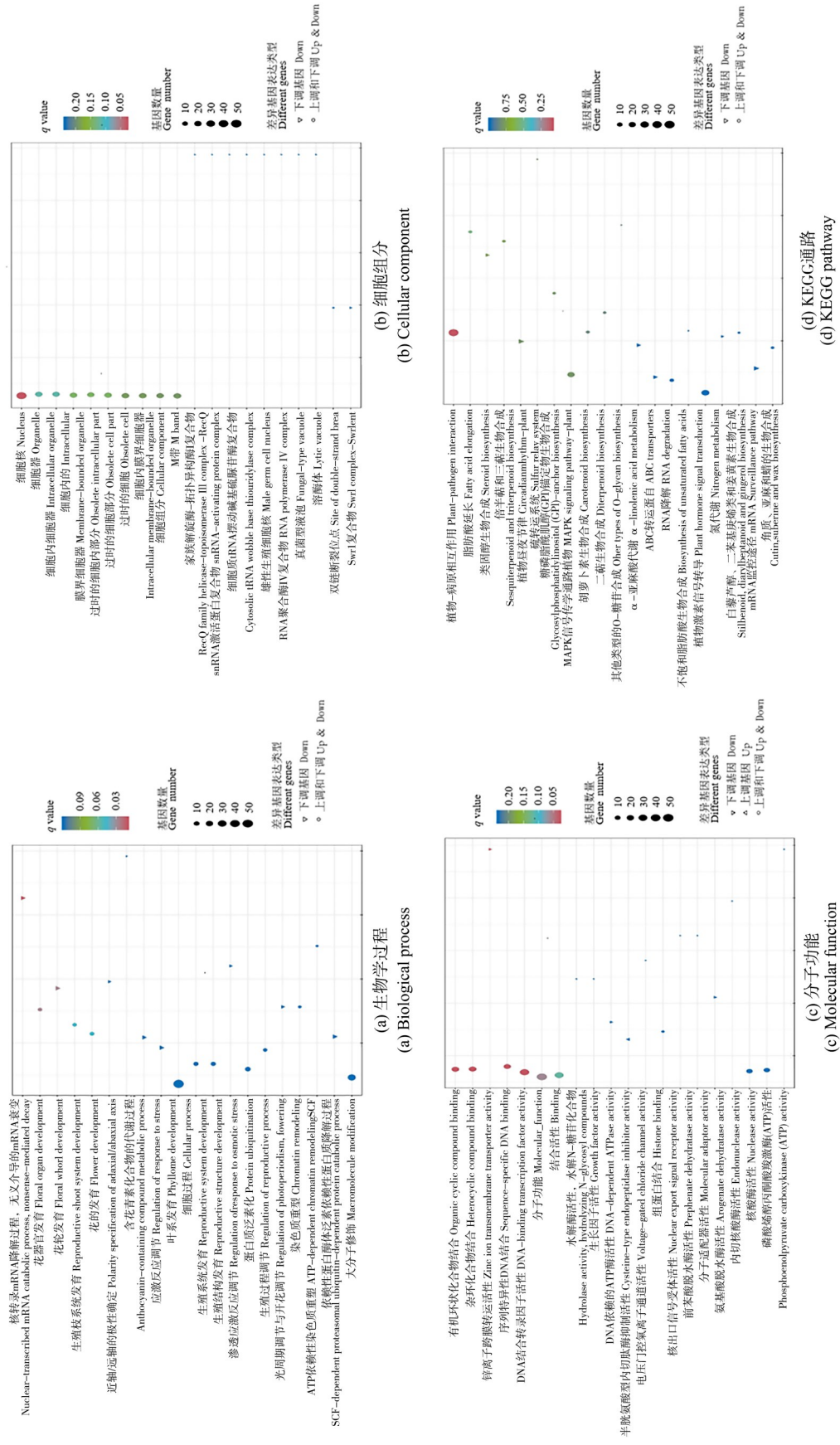
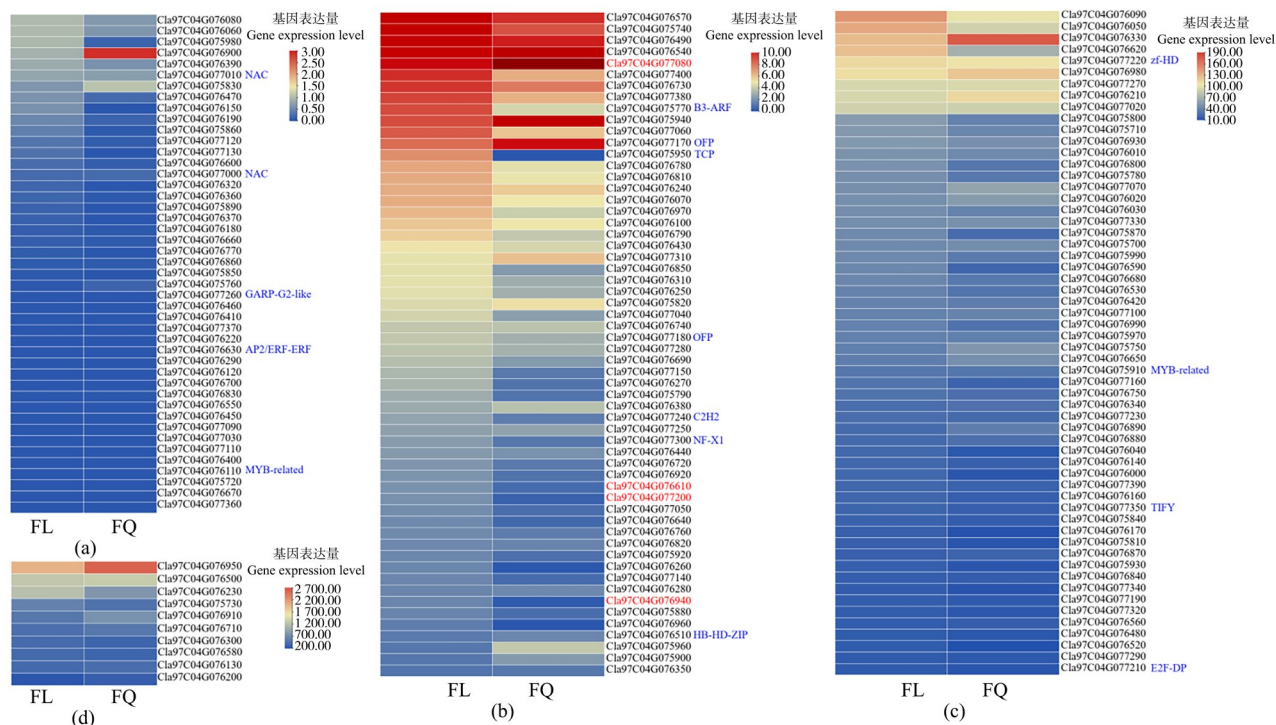


图 7 差异基因的 GO 与 KEGG 富集分析图

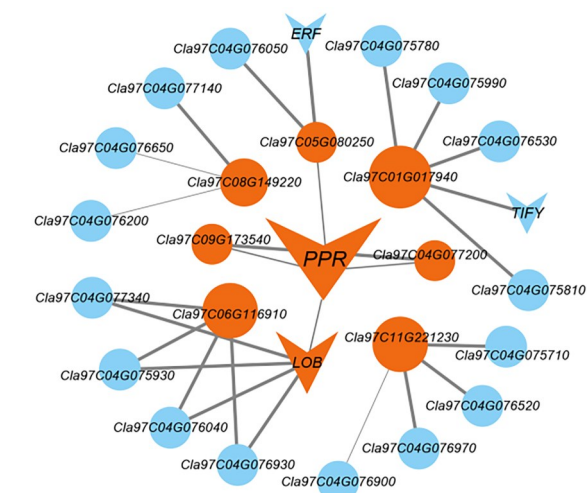
Figure 7 GO and KEGG enrichment analysis of differential genes



(a)、(b)、(c)和(d)模块表示基因表达量从低到高;红色基因表示在BSA-seq分析鉴定的候选基因和RNA-seq分析的差异基因共同出现的。
(a), (b), (c) and (d) represent gene expression levels from low to high. Genes represent candidate genes identified through BSA seq analysis and differentially expressed genes identified through RNA seq analysis.

图8 候选基因表达量热图

Fig. 8 Heat map of candidate gene expression



内圈为差异表达基因,图形越大表明关联基因越多;外圈为候选基因,其中Cla97C04G077200同时出现在2类基因中。箭头图形为转录因子。粗线表示显著正相关,细线表示显著负相关。

The inner circle represents differentially expressed genes, with larger graphs indicating more associated genes. The outer circle represents candidate genes, with Cla97C04G077200 appearing in both categories of genes. The arrow graphic represents transcription factors. The thick line indicates a significant positive correlation, while the thin line indicates a significant negative correlation.

图9 基于Pearson相关的共表达网络

Fig. 9 Co-expression network based on Pearson correlation

候选差异表达基因显著共表达,这些基因包括3个转录因子,Cla97C11G217260属于LOB家族转录因子,Cla97C04G077210属于E2F-DP家族转录因子,Cla97C04G077350属于TIFY家族转录因子;PPR(Cla97C04G076940)与4个DEGs存在高度表达相关,包括一个LOB转录因子,一个ABA响应蛋白HVA22(Cla97C04G077200)、一个胁迫响应NLP(Cla97C09G173540)基因和一个metalloendo-proteinase 4-MMP(Cla97C05G080250)基因,这些基因可能通过参与激素介导的细胞壁重塑、细胞增殖和分裂等过程,影响西瓜叶片形态发育。对这些显著共表达基因进行KEGG和GO富集分析结果见图10。可见这26个基因在GO数据库中仅富集于生物学过程功能领域,而在KEGG数据库中则显著富集于41条代谢通路。选择富集程度排名前10的代谢通路绘图,发现这些共表达基因主要集中在丙酮酸代谢、糖酵解、蛋白质合成和外泌体相关过程,同时还富集在“脂肪酸合成”和“蛋白质输出”等通路,这些功能可能间接影响叶片发育。

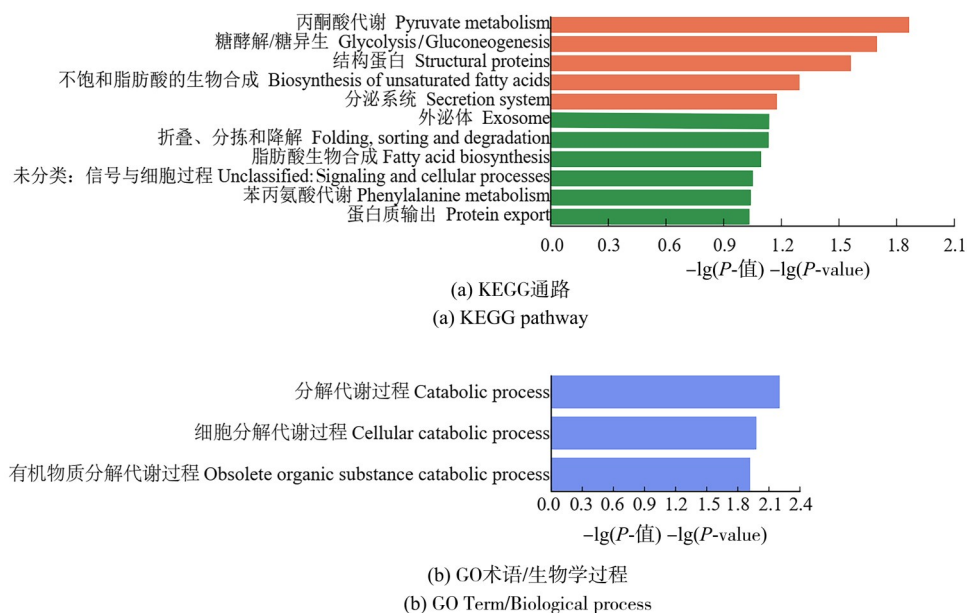


图10 显著相关基因的KEGG与GO富集分析图

Fig. 10 KEGG and GO enrichment analysis of significantly related genes

2.4.3 叶形相关基因的功能注释

为了进一步研究西瓜叶形的关键基因,将26个共表达基因与4个关键候选基因进行功能注释(去除冗余共29个),结果见表6。可见这些基因主要参与细胞活动调控、细胞壁形成与细胞连接、器官发育调控及激素响应,同时还涉及脱水和盐胁迫的应对等过程。

2.5 实时荧光定量PCR验证结果分析

选择9个候选区间内基因(*Cla97C04G076610*、*Cla97C04G076940*、*Cla97C04G077080*、*Cla97C04G077200*、*Cla97C04G076510*、*Cla97C04G069760*、*Cla97C04G079560*、*Cla97C03G052930*、*Cla97C05G083220*)进行qRT-PCR验证,结果见图11。可见:*Cla97C04G076610*、*Cla97C04G076940*、*Cla97C04G069760*3个基因在FL样品中相比FQ样品显著高度表达;*Cla97C04G079560*、*Cla97C03G052930*和*Cla97C05G083220*3个基因在FQ样品中高度表达。其中:*Cla97C04G076510*在FQ和FL样品中表达无显著差异,所有这7个基因qRT-PCR检测到的表达趋势与转录组中的结果一致;*Cla97C04G077080*和*Cla97C04G077200*在转录组中发生差异表达,而在qRT-PCR中表达无显著差异。

3 讨论

在葫芦科作物中,调控叶缘性状的相关基因也

有报道。在南瓜中,控制裂叶表型的是由显性等位基因*Lo-2*控制^[40],但在甜瓜中,研究发现叶缘裂刻性状由一个隐性单基因控制,并被定位于第3连锁群标记G69和784RS之间的14.6 kb区域内^[41]。本研究遗传分析结果表明,西瓜裂刻叶的形成是由单显性基因控制的性状,其中裂刻叶对全缘叶表现为显性。 F_2 和 BC_1P_2 群体的性状分离比例符合经典孟德尔分离比例,这一结果与柴兴荣^[42]研究结论一致。

利用BSA-seq分析,在西瓜4号染色体上定位出长度为1.81 Mb的SNP关联区域,并在该区域定位了与裂刻叶形成相关的候选基因,共筛选出171个候选基因。相关的研究中,有学者对莠苣的叶裂性状进行了基因定位,最终将目标基因精确定位于3号染色体的116.24—118.15 Mb区域,该区域包含24个候选基因^[43]。在对羽衣甘蓝叶裂性状进行基因定位时,不同研究的定位结果存在差异,表明裂叶性状可能是数量性状^[44-45]。在多种十字花科植物中发现,裂叶性状大多定位于HD-Zip I (Homeodomain-leucine zipper I)转录因子家族^[46-47]。众所周知,该转录因子在植物的形态发育、细胞分裂及组织分化等过程中发挥着重要作用^[48]。本研究对2个亲本进行RNA-seq分析,筛选出892个差异表达基因,并对其进行了功能富集分析。在GO富集的生物学过程中,发现叶系发育(Phyllome

表 6 29 个基因的功能注释

Table 6 Functional annotation of 29 genes

基因名称 Gene ID	功能描述 Functional annotation
<i>Cla97C01G017940</i>	推测环指蛋白 Ring finger protein, putative
<i>Cla97C05G080250</i>	金属内肽酶 4-MMP Metalloendoproteinase 4-MMP
<i>Cla97C06G116910</i>	环丙烷脂肪酰磷脂合酶家族蛋白 Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase family protein
<i>Cla97C08G149220</i>	酰基-[酰基载体蛋白]去饱和酶 Acyl-[acyl-carrier-protein] desaturase
<i>Cla97C09G173540</i>	类 NEP1 相互作用蛋白 1 NEP1-interacting protein-like 1
<i>Cla97C11G217260</i>	含 LOB 结构域蛋白 6 LOB domain-containing protein 6
<i>Cla97C11G221230</i>	RING 结构域的 E3 泛素连接酶 RING-type E3 ubiquitin transferase
<i>Cla97C04G075810</i>	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase
<i>Cla97C04G077350</i>	类 TIFY 6B 蛋白 Protein TIFY 6B-like
<i>Cla97C04G076530</i>	丙酮酸激酶 Pyruvate kinase
<i>Cla97C04G075990</i>	细胞分裂周期蛋白 48 同源物 Cell division cycle protein 48 homolog
<i>Cla97C04G075780</i>	类 CASP 蛋白 CASP-like protein
<i>Cla97C04G077210</i>	E2F-DP 转录因子 E2F-DP Transcription factor
<i>Cla97C04G076050</i>	类硫氧还蛋白 3-3 Thioredoxin-like 3-3
<i>Cla97C04G077140</i>	IAA-氨基酸水解酶 ILR1 IAA-amino acid hydrolase ILR1
<i>Cla97C04G076650</i>	RAB6 相互作用的 Golgin 蛋白 (DUF662) RAB6-interacting golgin (DUF662)
<i>Cla97C04G076200</i>	双特异性磷酸酶 Cdc25 dual specificity phosphatase Cdc25
<i>Cla97C04G077200</i>	类 HVA22 蛋白 HVA22-like protein
<i>Cla97C04G077340</i>	类受体激酶 1 Receptor-like kinase 1
<i>Cla97C04G075930</i>	激酶家族蛋白 Kinase family protein
<i>Cla97C04G076040</i>	类重金属相关异戊二烯化植物蛋白 3 Heavy metal-associated isoprenylated plant protein 3-like
<i>Cla97C04G076930</i>	信号识别颗粒 54 kU 蛋白 Signal recognition particle 54 kU protein
<i>Cla97C04G076900</i>	转录本 28859_610 转录的 RNA 序列 Transcript_28859_610 transcribed RNA sequence
<i>Cla97C04G076970</i>	长链醇氧化酶 Long-chain-alcohol oxidase
<i>Cla97C04G076520</i>	丙酮酸激酶 Pyruvate kinase
<i>Cla97C04G075710</i>	水通道蛋白 Aquaporin
<i>Cla97C04G077080</i>	类毛状体双折射蛋白 8 Protein trichome birefringence-like 8
<i>Cla97C04G076610</i>	激酶家族蛋白 Kinase family protein
<i>Cla97C04G076940</i>	五肽重复序列 Pentatricopeptide repeat

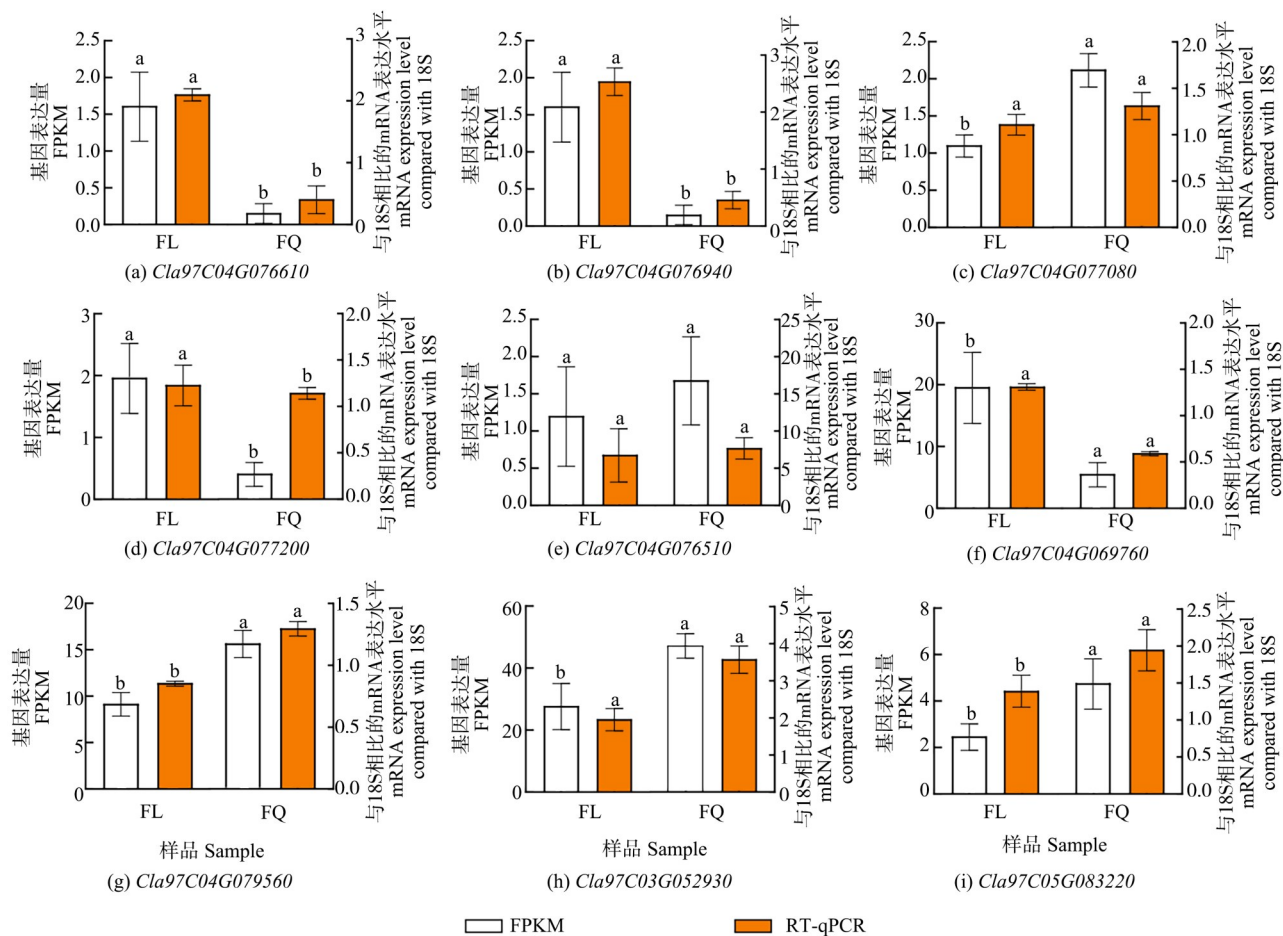


图 11 RT-qPCR 验证 9 个差异表达基因

Fig. 11 RT-qPCR confirmation of the differentially expressed genes

development) 和近轴-远轴极性确定 (polarity specification of adaxial/abaxial axis) 是叶缘性状调控的关键因素。在拟南芥和番茄研究中, 叶缘基从顶端分生组织边缘起始后, 迅速侧向扩展并进行发育与分化; 在生长后期, 近轴-远轴和非对称性的极性生长调控成为影响叶片形成与延伸的主要因素^[49]。并且在叶原基形成过程中, 植物会在三维空间轴 (近-远轴 (adaxial-abaxial axis)、基-顶轴 (proximal-distal axis) 和中-边轴 (central-lateral axis) 上确立极性, 这是形成具有独特形状和叶片大小的关键步骤^[50]。在 KEGG 富集分析中, 主要富集的通路包括植物昼夜节律和 MAPK 信号传导通路等, 这些通路在调控叶片形态和适应性方面发挥重要作用。

通过候选基因在转录组中的表达量, 本研究对 171 个候选基因进行转录因子预测, 发现有 16 个转录因子。其中 TCP 转录因子是植物叶片发育的重要调控因子^[51]。研究表明, II 类 CINCINNATA-

TCP 转录因子通过促进细胞分化调节叶片的形状和大小。许多 *tcp* 突变体表现出叶片大小和曲率的增加。在叶用莴苣中, 抑制 *LsTCP4* 的表达会导致叶缘变为锯齿状或卷曲^[52]。此外, 本研究也对 HD-Zip (*Cla97C04G076510*) 转录因子进行了实时荧光验证。结果显示, 该基因在 FQ 与 FL 样品间的表达水平未呈现出显著性差异; 然而, 在裂叶样品中, 其表达量相较于全缘叶样品显著升高。这一发现表明, 该基因可能在调控叶缘裂刻形态发育过程中扮演着关键角色。Wei 等^[22]的研究将西瓜裂叶性状的关键位点定位于第 4 号染色体的 127.6 kb 区间 (21 111 771~21 239 030 bp), 并提出了 2 个候选基因: *Cl97C04G076480* 和 *Cl97C04G076510*, 但与本研究定位的区间存在差别, 可能是品种等因素所致。本研究的定位结果中存在一个编码 PPR 蛋白的基因 *Cla97C04G076940*, 该基因在不同叶形的西瓜中发生显著的差异表达, 已有研究报道 PPR 蛋白

的突变会导致叶片形态异常、育性降低等^[41]。其在西瓜中的功能尚未得到验证。

本研究基于差异表达基因和候选基因构建了共表达网络,在 26 个基因中预测到了 3 个转录因子。LOB 家族转录因子的 Class IA 分支在植物地上部器官的发育中发挥重要作用,其成员功能涉及叶片形状与大小、叶柄发育、叶片向性运动以及光形态建成等过程^[53]。此外,在 GO 富集分析中, *Cl97C11G2126* (LOB 转录因子) 也被归类于近轴/远轴极性确定相关条目。E2F/DP 家族转录因子调控了一系列与细胞周期相关的生物学过程。在拟南芥中,过表达 *AtE2F6* 会导致转基因植株的根、子叶及叶片形态发生显著改变^[54]。TIFY 家族转录因子在植物茎、叶和花的发育调控中也具有重要功能。在拟南芥中, *AtTIFY4a* (PPD1) 和 *AtTIFY4b* (PPD2) 基因参与叶片发育的调节,主要表现为控制叶片大小并限制叶缘的弯曲程度^[55]。候选基因 PPR 同样存在于共表达网络中,与其表达量直接显著相关的几个基因通常被认为参与细胞壁修饰、细胞增殖等过程,这一结果进一步表明 PPR 可能是控制西瓜叶缘裂刻的关键基因。

在对共表达网络和差异表达的 29 个候选基因进行功能注释后发现 *Cl97C11G221230* 基因编码的蛋白属于 RING 结构域的 E3 泛素连接酶。在拟南芥中的研究表明, RING 结构域的 E3 泛素连接酶通过泛素化调节 *TIE1* (*TCP INTERACTOR-CONTAINING EAR MOTIF PROTEIN1*) 的稳定性或活性,间接影响 TCP 转录因子的功能,从而参与叶片锯齿的形成^[56-57]。 *Cl97C04G077140* 基因属于 IAA-氨基酸水解酶 ILR1 (Indole-3-Acetic Acid-Leucine-Resistant 1),其主要功能是将结合态的生长素水解,释放出游离的生长素。然而,激素在复叶发育和叶缘裂刻的形成中起着重要的作用,研究表明生长素 (Auxin)、细胞分裂素 (CK) 和赤霉素 (GA) 可以单独或其他激素、转录因子相互作用来影响叶形的发育。生长素协调叶序并调节小叶起始过程,对植物叶缘锯齿的形成具有重要的作用^[58]。因此,PPR 可能在复叶发育和叶缘裂刻形成过程中,通过包括 IAA、ABA 等在内的复杂激素串扰网络调控西瓜叶形发育。

4 结 论

为深入解析西瓜叶形发育的关键候选基因,本

研究以裂刻叶自交系 SW246 (P1) 与全缘叶自交系 SW247 (P2) 为研究对象,采用 BSA-seq 和 RNA-seq 测序,探究西瓜叶形发育的分子调控网络。主要结论如下:

1) 西瓜裂刻叶的形成是一种由单显性基因控制的性状;

2) 基于 BSA-seq 分析,目的基因被定位于 4 号染色体上的一个 1.81 Mb 区域内,共筛选出 171 个候选基因。同时, RNA-seq 分析共筛选出 892 个差异表达基因,这些基因显著富集于叶系发育、近轴-远轴极性、植物昼夜节律以及 MAPK 信号传导通路等,与叶片发育和形态调控密切相关;

3) 结合 BSA-seq 和 RNA-seq 的测序结果、生物信息学分析及基因功能注释,初步推断 HD-Zip、TCP、LOB、E2F-DP 和 TIFY 等转录因子相关基因,以及 IAA-氨基酸水解和 E3 泛素连接酶相关基因可能在叶缘性状的调控中发挥重要作用。一个编码 PPR 蛋白的基因 (*Cl97C04G076940*) 被认为是最可能控制叶缘裂刻形成的关键基因。

这些发现为揭示西瓜叶形态发育的分子机制提供了重要的理论依据,同时为候选基因的精细定位和功能验证奠定了基础,并为西瓜品种改良提供了潜在的分子标记资源。此外,鉴于候选基因功能阐释的精准性,应通过基因功能验证手段,以充分证实其生物学功能。

参考文献 References

- [1] 王志强, 杜慧莹, 李程, 郭松, 田梅, 杨万邦, 于蓉. 西瓜数量性状遗传距离及杂种优势分析[J]. 中国农学通报, 2022, 38(25): 47-51
Wang Z Q, Du H Y, Li C, Guo S, Tian M, Yang W B, Yu R. Genetic distance and heterosis of quantitative characters of watermelon[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(25): 47-51 (in Chinese)
- [2] 孙梅, 田昆, 张翼, 王行, 管东旭, 岳海潮. 植物叶片功能性状及其环境适应研究[J]. 植物科学学报, 2017, 35(6): 940-949
Sun M, Tian K, Zhang Y, Wang H, Guan D X, Yue H T. Research on leaf functional traits and their environmental adaptation[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(6): 940-949 (in Chinese)
- [3] 刘新月, 王立平, 刘春和, 孙艳丽, 魏晓帅, 徐铭泽, 韩聪, 田赞, 贾昕, 查天山. 北京百花山华北落叶松群落主要木本植物的叶性状变异及适应策略[J]. 林业科学, 2023, 59(7): 12-23
Liu X Y, Wang L P, Liu C H, Sun Y L, Wei X S, Xu M Z, Han C, Tian Y, Jia X, Zha T S. Variation and adaptation strategies in leaf traits of main woody plants in the *Larix principisrupprechtii* community in Baihua mountain, Beijing[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2023, 59(7): 12-23 (in Chinese)
- [4] 赵洪贤, 苏同, 王瑞福, 孙艳丽, 高永龙, 魏骥超, 李鑫豪, 田赞, 贾昕, 查天

- 山. 北京密云油松林下灌木小叶鼠李叶片资源利用效率季节变异及环境调控[J]. 林业科学, 2023, 59(7): 1-11
- Zhao H X, Su T, Wang R F, Sun Y L, Gao Y L, (Kui/Wei) J C, Li X H, Tian Y, Jia X, Zha T S. Seasonal variation and environmental control of leaf resource use efficiencies of an understory shrub, *Rhamnus parvifolia* in *Pinus tabulaeformis* forest in Miyun, Beijing[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2023, 59(7): 1-11(in Chinese)
- [5] 蔡继醇, 李兆佳, 周光益, 赵厚本, 王旭, 邱治军, 吴仲民. 增加光照对林下樟树苗木的影响及作用机理[J]. 中南林业科技大学学报, 2024, 44(7): 36-46
- Cai J C, Li Z J, Zhou G Y, Zhao H B, Wang X, Qiu Z J, Wu Z M. Effects and action mechanisms of increased light availability to understory *Cinnamomum camphora* seedlings[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2024, 44(7): 36-46(in Chinese)
- [6] 师睿, 李玮, 彭长青, 冯德枫. 云南松及林下主要灌木叶功能性状对林分退化的响应[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2024, 46(2): 355-365
- Shi R, Li W, Peng C Q, Feng D F. Response of leaf functional traits of *Pinus yunnanensis* and main understory shrubs to stand degradation[J]. *Journal of Yunnan University: Natural Sciences Edition*, 2024, 46(2): 355-365(in Chinese)
- [7] 马常钦, 黄海龙, 彭政淋, 吴纯泽, 韦庆钰, 贾红涛, 卫星. 水曲柳雌雄株复叶类型及光合功能对不同生境的响应[J]. 植物生态学报, 2023, 47(9): 1287-1297
- Ma C Q, Huang H L, Peng Z L, Wu C Z, Wei Q Y, Jia H T, Wei X. Response of compound leaf types and photosynthetic function of male and female *Fraxinus mandschurica* to different habitats[J]. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2023, 47(9): 1287-1297(in Chinese)
- [8] 陈鑫儿. 西瓜裂刻叶基因CILL1的精细定位及克隆[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2025
- Chen X. Fine mapping and cloning of gene cill1 (*citrullus lanatus lobed leaf 1*) in watermelon (*Citrullus lanatus*) [D]. Yangling: Northwest Agriculture and Forestry University, 2025(in Chinese)
- [9] Bilsborough G D, Runions A, Barkoulas M, Jenkins H W, Hasson A, Galinha C, Laufs P, Hay A, Prusinkiewicz P, Tsiantis M. Model for the regulation of *Arabidopsis thaliana* leaf margin development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(8): 3424-3429
- [10] Koenig D, Bayer E, Kang J L, Kuhlemeier C, Sinha N. Auxin patterns *Solanum lycopersicum* leaf morphogenesis[J]. *Development*, 2009, 136(17): 2997-3006
- [11] Kasprzewska A, Carter R, Swarup R, Bennett M, Monk N, Hobbs J K, Fleming A. Auxin influx importers modulate serration along the leaf margin[J]. *The Plant Journal*, 2015, 83(4): 705-718
- [12] Zhou C E, Han L, Hou C Y, Metelli A, Qi L Y, Tadege M, Mysore K S, Wang Z Y. Developmental analysis of a *Medicago truncatula* smooth leaf margin1 mutant reveals context-dependent effects on compound leaf development[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(6): 2106-2124
- [13] Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P. The balance between the MIR164A and CUC₂ genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2006, 18(11): 2929-2945
- [14] Rubio-Somoza I, Zhou C M, Confraria A, Martinho C, von Born P, Baena-Gonzalez E, Wang J W, Weigel D. Temporal control of leaf complexity by miRNA-regulated licensing of protein complexes[J]. *Current Biology*, 2014, 24(22): 2714-2719
- [15] Ori N, Cohen A R, Etzioni A, Brand A, Yanai O, Shleizer S, Menda N, Amsellem Z, Efroni I, Pekker I, Alvarez J P, Blum E, Zamir D, Eshed Y. Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato[J]. *Nature Genetics*, 2007, 39(6): 787-791
- [16] 郑健, 潘继红, 余卫霖, 宋云连, 毕珏, 凌铭蔚, 王跃全, 高贤玉, 张惠云, 罗心平. 植物叶缘锯齿调控的研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(4): 927-936
- Zheng J, Pan J H, Yu W L, Song Y L, Bi J, Ling M W, Wang Y Q, Gao X Y, Zhang H Y, Luo X P. Research progress on the regulation of leaf margin serration development in plants [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(4): 927-936(in Chinese)
- [17] Hajheidari M, Wang Y, Bhatia N, Vuolo F, Franco-Zorrilla J M, Karady M, Mentink R A, Wu A H, Oluwatobi B R, Müller B, Dello Ioio R, Laurent S, Ljung K, Huijser P, Gan X C, Tsiantis M. Autoregulation of RCO by low-affinity binding modulates cytokinin action and shapes leaf diversity[J]. *Current Biology*, 2019, 29(24): 4183-4192
- [18] Andres R J, Coneva V, Frank M H, Tuttle J R, Samayoa L F, Han S W, Kaur B, Zhu L, Fang H, Bowman D T, Rojas-Pierce M, Haigler C H, Jones D C, Holland J B, Chitwood D H, Kuraparth V. Modifications to a *LATE MERISTEM IDENTITY1* gene are responsible for the major leaf shapes of Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(1): 57-66
- [19] Vlad D, Kierzkowski D, Rast M I, Vuolo F, Dello Ioio R, Galinha C, Gan X C, Hajheidari M, Hay A, Smith R S, Huijser P, Bailey C D, Tsiantis M. Leaf shape evolution through duplication, regulatory diversification, and loss of a homeobox gene[J]. *Science*, 2014, 343(6172): 780-783
- [20] Ni X Y, Huang J X, Ali B, Zhou W J, Zhao J Y. Genetic analysis and fine mapping of the LOBED-LEAF 1 (*BnLL1*) gene in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Euphytica*, 2015, 204(1): 29-38
- [21] Andres R J, Bowman D T, Kaur B, Kuraparth V, Andres R J, Bowman D T, Kaur B, Kuraparth V. Mapping and genomic targeting of the major leaf shape gene (L) in Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics. Theoretical and Applied Genetics*, 2014, 127(1): 167-177
- [22] Wei C, Chen X, Wang Z, Liu Q, Li H, Zhang Y, Ma J, Yang J, Zhang X. Genetic mapping of the lobed leaf 1 (CILL1) gene to a 127.6-kb region in watermelon (*Citrullus lanatus* L.) [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180741
- [23] Xu M, Gao M L, Amanullah S, Guo Y, Bao X P, Duan Y R, Liu X J, Liu J X, Gao Y, Luan F S. Fine genetic mapping confers a major gene controlling leaf shape variation in watermelon[J]. *Euphytica*, 2023, 219(9): 92
- [24] Micheltore R W, Paran I, Kesseli R V. 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 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(21): 9828-9832
- [25] Gao Y B, Yuan Y H, Zhang X Y, Song H, Yang Q H, Yang P, Gao X L, Gao J F, Feng B L. Conuping BSA-seq and RNA-seq reveal the molecular pathway and genes associated with the plant height of foxtail millet (*Setaria italica*) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11824
- [26] Ye S H, Yan L, Ma X W, Chen Y P, Wu L M, Ma T T, Zhao L, Yi B, Ma C Z, Tu J X, Shen J X, Fu T D, Wen J. Combined BSA-seq based mapping and RNA-seq profiling reveal candidate genes associated with plant architecture in *Brassica napus* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(5): 2472
- [27] Doyle J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 1987, 19
- [28] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760

- [29] McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo M A. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. *Genome Research*, 2010, 20(9): 1297-1303
- [30] Cingolani P, Platts A, Wang L L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land S J, Lu X Y, Ruden D M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; *Iso-2*; *Iso-3*[J]. *Fly*, 2012, 6(2): 80-92
- [31] Hill J T, Demarest B L, Bisgrove B W, Gorski B, Su Y C, Yost H J. MMAPP: mutation mapping analysis pipeline for pooled RNA-seq[J]. *Genome Research*, 2013, 23(4): 687-697
- [32] Fekih R, Takagi H, Tamiru M, Abe A, Natsume S, Yaegashi H, Sharma S, Sharma S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Mitsuoka C, Utsushi H, Uemura A, Kanzaki E, Kosugi S, Yoshida K, Cano L, Kamoun S, Terauchi R. MutMap+: Genetic mapping and mutant identification without crossing in rice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68529
- [33] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550
- [34] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_T$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [35] McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo M A. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. *Genome Research*, 2010, 20(9): 1297-1303
- [36] Zhang M M, Zhang S Q. Mitogen-activated protein kinase cascades in plant signaling[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64(2): 301-341
- [37] Zhang H J, Yuan Y C, Xing H X, Xin M, Saeed M, Wu Q, Wu J, Zhuang T, Zhang X P, Mao L L, Sun X Z, Song X L, Wang Z W. Genome-wide identification and expression analysis of the HVA22 gene family in cotton and functional analysis of *GhHVA22EID* in drought and salt tolerance[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1139526
- [38] Tang J Y, Ling T H, Li H L, Fan C J. Genome-wide analysis and identification of the TBL gene family in *Eucalyptus grandis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1401298
- [39] 曹近哲, 许敏, 张新颖, 卜庆云, 管清杰, 王臻昱. 水稻 PPR 家族蛋白研究进展[J]. *土壤与作物*, 2023, 12(3): 235-246
- Cao J Z, Xu M, Zhang X Y, Bu Q Y, Guan Q J, Wang Z Y. Research progress of PPR family proteins in rice [J]. *Soils and Crops*, 2023, 12(3): 235-246 (in Chinese)
- [40] Dyutin K E. Spontaneous mutant of *Cucurbita maxima* Duch. squash with lobed leaves. Russian[J]. *Genetika*, 1980
- [41] Gao X W, Ning X F, Wang Y M, Wang X L, Yan W L, Zhang Z Q, Li G. Fine mapping of a gene that confers palmately lobed leaf (pll) in melon (*Cucumis melo* L.)[J]. *Euphytica*, 2014, 200(3): 337-347
- [42] 柴兴容, 王云鹤. 西瓜全缘叶型的遗传及其利用[J]. *中国果树*, 1983, (1): 27-31
- Chai X R, Wang Y H. Inheritance and utilization of whole leaf type of watermelon[J]. *China Fruits*, 1983(1): 27-31 (in Chinese)
- [43] 袁焕然, 潘江鹏, 陈炯炯. 莴苣叶裂性状的遗传定位[J]. *园艺学报*, 2017, 44(8): 1496-1504
- Yuan H R, Pan J P, Chen J J. Genetic analysis and mapping of genes controlling lettuce lobed leaf[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2017, 44(8): 1496-1504 (in Chinese)
- [44] Feng X, Li X, Yang X R, Zhu P F. Fine mapping and identification of the leaf shape gene BoFL in ornamental kale[J]. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 2020, 133(4): 1303-1312
- [45] Zhang B, Chen W D, Li X, Ren W J, Chen L, Han F Q, Fang Z Y, Yang L M, Zhuang M, Lv H H, Wang Y, Zhang Y Y. Map-based cloning and promoter variation analysis of the lobed leaf gene BoLM11a in ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var *acephala*) [J]. *BMC Plant Biology*, 2021, 21(1): 456
- [46] Heng S P, Huang H, Cui M D, Liu M F, Lv Q, Hu P Y, Ren S J, Li X, Fu T D, Wan Z J. Rapid identification of the BjRCO gene associated with lobed leaves in *Brassica juncea* via bulked segregant RNA-seq [J]. *Molecular Breeding*, 2020, 40(4): 42
- [47] Hu L M, Zhang H, Yang Q Y, Meng Q W, Han S Q, Nwafor C C, Khan M H U, Fan C C, Zhou Y M. Promoter variations in a homeobox gene, BnA10.LM11, determine lobed leaves in rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131(12): 2699-2708
- [48] 罗少, 唐翠明, 戴凡炜, 王振江, 冀宪领, 吴福安, 罗国庆. 植物转录因子 HD-Zip 基因家族参与逆境胁迫的研究进展[J]. *南方农业*, 2021, 15(35): 173-175
- Luo S, Tang C M, Dai F W, Wang Z J, Ji X L, Wu F A, Luo G Q. Research progress on the involvement of plant transcription factor HD-Zip gene family in stress and adversity [J]. *South China Agriculture*, 2021, 15(35): 173-175 (in Chinese)
- [49] Kessler S, Sinha N. Shaping up: The genetic control of leaf shape[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(1): 65-72
- [50] Satterlee J W, Scanlon M J. Coordination of leaf development across developmental axes[J]. *Plants*, 2019, 8(10): 433
- [51] Nicolas M, Cubas P. TCP factors: New kids on the signaling block[J]. *Current opinion in plant biology*, 2016, 33(6): 33-41
- [52] Seki K, Komatsu K, Tanaka K, Hiraga M, Kajiya-Kanegae H, Matsumura H, Uno Y. A CIN-like TCP transcription factor (LsTCP4) having retrotransposon insertion associates with a shift from Salinas type to empire type in crisphead lettuce (*Lactuca sativa* L.)[J]. *Horticulture Research*, 2020, (7): 15
- [53] 郑慧. 番茄质地相关转录因子 RIN 和 LOB1 对采后果实灰霉病抗性的作用机制[D]. 杭州: 浙江大学, 2021
- Zheng H. Mechanism of tomato texture-related transcription factors RIN and LOB1 on postharvest fruit gray mold resistance[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021 (in Chinese)
- [54] Sozzani R, Maggio C, Varotto S, Canova S, Bergounioux C, Albani D, Cella R. Interplay between Arabidopsis activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(4): 1355-1366
- [55] White, D W R. PEAPOD regulates Lamina size and curvature in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(35): 13238-13243
- [56] Tao Q, Guo D S, Wei B Y, Zhang F, Pang C X, Jiang H, Zhang J Z, Wei T, Gu H Y, Qu L J, Qin G J. The TIE1 transcriptional repressor links TCP transcription factors with TOPLESS/TOPLESS-RELATED corepressors and modulates leaf development in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(2): 421-437
- [57] Zhang J Z, Wei B Y, Yuan R R, Wang J H, Ding M X, Chen Z Y, Yu H, Qin G J. The *Arabidopsis* RING-type E3 ligase TEAR1 controls leaf development by targeting the TIE1 transcriptional repressor for degradation [J]. *The Plant Cell*, 2017, 29(2): 243-259
- [58] 石璐, 吕小龙, 张明方. 植物叶缘形态研究进展[J/OL]. *分子植物育种*, 2022:

- 1-10 (2022-04-07). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220406.1707.008.html>.
- Shi L, LV X L, Zhang M F. Research progress on leaf edge morphology of plants[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2022; 1-10 (2022-04-07). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220406.1707.008.html>. (in Chinese)
- [59] 张敬敬, 田鹏, 于洪春, 李冰, 高秀瑞, 刘伟, 吴楠, 赵鑫泽, 宋雪, 刘会茹, 潘秀清, 武彦荣. 基于BSA-seq和RNA-seq挖掘西瓜果皮硬度候选基因[J]. *华北农学报*, 2024, 39(5): 63-71
- Zhang J J, Tian P, Yu H C, Li B, Gao X R, Liu W, Wu N, Zhao X Z, Song X, Liu H R, Pan X Q, Wu Y R. mining candidate genes of rind hardness in watermelon by BSA-seq and RNA-seq[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2024, 39(5): 63-71 (in Chinese)
- [60] 曾维英, 赖振光, 孙祖东, 杨守臻, 陈怀珠, 唐向民. 基于BSA-Seq和RNA-Seq方法鉴定大豆抗豆卷叶螟候选基因[J]. *作物学报*, 2021, 47(8): 1460-1471
- Zeng W Y, Lai Z G, Sun Z D, Yang S Z, Chen H Z, Tang X M. Identification of the candidate genes of soybean resistance to bean pyralid (*Lamprosema in dicata Fabricius*) by BSA-Seq and RNA-Seq [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2021, 47 (8): 1460-1471 (in Chinese)
- [61] 李世宽, 洪慧龙, 付佳祺, 谷勇哲, 孙如建, 邱丽娟. BSA-Seq结合RNA-Seq技术挖掘大豆叶片提前黄化衰老基因[J]. *作物学报*, 2024, 50(2): 294-309
- Li S K, Hong H L, Fu J Q, Gu Y Z, Sun R J, Qiu L J. Mine the genes of premature yellowing and aging in soybean leaves by BSA-seq combined with RNA-seq technology[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2024, 50(2): 294-309 (in Chinese)

责任编辑: 杨爱东



第一作者简介: 王志强, 副研究员, 宁夏农林科学院园艺研究所。从事西瓜甜瓜育种和栽培等方面研究。主持宁夏自然科学基金和自治区重点研发项目等课题10余项;第一作者在《西北农业学报》、《东北农业大学学报》、《植物遗传资源学报》、*Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*等期刊发表学术论文20余篇。选育西瓜甜瓜品种获得非主要农作物品种登记9项,植物新品种权保护1项;参与出版学术专著3部;获得省部级奖项2项。