

娄丽娜, 羊杏平, 朱凌丽, 等. 基于 BSA-seq 技术定位黄瓜黄绿叶色突变基因[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(9): 1711-1718.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.09.015

基于 BSA-seq 技术定位黄瓜黄绿叶色突变基因

娄丽娜, 羊杏平, 朱凌丽, 姚协丰, 徐建, 张曼, 刘广, 侯茜, 刘金秋, 徐锦华
(江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为明确课题组从地方收集的黄瓜黄绿叶色突变体中黄绿叶色突变基因, 本研究利用绿叶(野生型)与黄绿叶色(突变体)黄瓜材料为亲本, 配制正反杂交一代及二代分离群体, 在分析黄绿叶色突变基因遗传规律的基础上, 利用 BSA-seq 技术对双亲及 F₂ 代叶色极端混池进行测序, 筛选黄瓜黄绿叶色突变性状的关联标记及候选基因。结果表明, 绿叶对黄绿叶色为完全显性, 黄绿叶色突变基因为隐性基因。突变性状关联分析(SNP-index 检测)得到 1 个与黄绿叶色突变相关的候选区域, 位于黄瓜 1 号染色体上, 总长度 18 484 bp。该候选区域共有 118 个与黄绿叶色突变相关的 SNP 位点; 候选区域共注释到 3 个基因, 其中 *CsaV3_IG032820* 基因为黄瓜黄绿叶色突变最可能相关基因。本研究结果可为黄瓜黄绿叶色突变基因克隆和分子标记辅助育种提供基础。

关键词: 黄瓜; 黄绿叶色突变体; BSA-seq; 基因定位

中图分类号: S642.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2024)09-1711-08

Mapping of cucumber virescent yellow leaf mutant gene based on BSA-seq technology

LOU Lina, YANG Xingping, ZHU Lingli, YAO Xiefeng, XU Jian, ZHANG Man, LIU Guang,
HOU Qian, LIU Jinqiu, XU Jinhua

(Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to clarify the virescent yellow leaf mutant gene in cucumber virescent yellow leaf mutant collected by the research group from the local area, this study used green leaf (wild type) and virescent yellow leaf (mutant) cucumber materials as parents to prepare a reciprocal hybrid generation and a second generation separation population. On the basis of analyzing the genetic law of virescent yellow leaf mutant genes, BSA-seq technology was used to sequence the extreme mixing pools of parents and F₂ generations, and to screen the associated markers and candidate genes of cucumber virescent yellow leaf mutant traits. The results showed that the green leaf color was completely dominant to virescent yellow leaf color, and the virescent yellow leaf color mutant gene was a recessive gene. A candidate region associated with virescent yellow leaf color mutation was obtained by SNP-index detection, which was located on chromosome 1 of cucumber, with a total length of 18 484 bp. A total of 118 SNP loci associated with virescent yellow leaf color mutation were found in this candidate region. Three genes were annotated in the candidate region, among which *CsaV3_IG032820* gene was the most likely related gene of cucumber virescent yellow leaf color mutation.

The results of this study can provide a basis for cucumber virescent yellow leaf color mutant gene cloning and molecular marker-assisted breeding.

Key words: cucumber; virescent yellow leaf mutant; BSA-seq; gene mapping

收稿日期: 2023-09-13

基金项目: 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目[JBGS(2021)018]

作者简介: 娄丽娜(1982-), 女, 河南濮阳人, 博士, 研究员, 主要从事瓜类作物遗传育种研究。(Tel) 025-84391221; (E-mail) linabeibei@163.com

通讯作者: 徐锦华, (Tel) 025-84390264; (E-mail) jinhuaxu@jaas.ac.cn

植物表型性状受基因型和生长环境共同制

约^[1]。植物生长过程中,外部环境因素和人工诱变措施均可导致植物基因的突变。其中,叶色突变体是研究植物叶绿素合成与代谢等过程的优良材料^[2],同时由于叶色容易识别,因此可以将其作为标记性状用于鉴定转育杂交种的纯度,提高良种繁育效率^[3]。黄瓜是一种世界范围内广泛种植的蔬菜。近年来,中国的黄瓜种植面积约为 1.0×10^5 hm²,年产量约在 6.0×10^6 t。随着生活质量的提高,消费者对优质农产品提出了更高的要求。因此,加强黄瓜叶色突变体的研究有助于提高黄瓜良种繁育水平,更好地满足人民不断提高的优质生活需求。

在拟南芥^[4-5]、水稻^[6]、番茄^[7]、烟草^[8]、甘蓝型油菜^[9]等作物叶色突变体的突变基因定位、克隆和利用等方面已有较多研究。在黄瓜叶色突变体的研究方面亦有初步开展,目前已有18个黄瓜叶色突变基因得到报道,包括2个黄叶类型基因(*yp*、*yl*)、4个致死型基因(*al*、*cd*、*gc*、*p*)及12个转绿型基因(*g*、*yc-1*、*yc-2*、*ygl*、*lg-1*、*lg-2*、*v*、*v-1*、*v-2*、*vi*、*vyl*、*yyl-1*)^[10-12]。基于图位克隆技术,目前有7个叶色突变体的突变基因得到了克隆。Miao等^[13]利用黄瓜叶色突变体9110gt鉴定出黄转绿表型突变体v-1的突变基因定位于6号染色体,并预测*CsaCNGCs*为候选基因,其编码1种环核苷酸通道蛋白;Gao等^[10]研究发现导致黄绿叶色突变体C528叶绿素a含量降低的基因是染色体6上的镁离子螯合酶基因*CsChl1*,其第3个外显子发生单核苷酸突变,碱基由G突变为A,进而导致相应编码位置的甘氨酸变为精氨酸。Song等^[14]鉴定了1个叶片黄转绿表型vyl突变体,突变基因定位于染色体4,最可能的候选基因为*Csa4G637110*;Ding等^[15]报道转绿型ygl突变体是串联13脂氧合酶(13-LOX)基因在一个簇中的突变导致的;Hu等^[16]研究结果表明yyl-1突变体的形成是由于*CsHD*基因中编码组氨酸和天冬氨酸结构域的碱基突变导致的;Zhang等^[11]鉴定了1个叶片黄转绿表型突变体v-2,突变基因定位于染色体3上36.0~39.7 Mb区间内,候选基因为*Csa3G890020*,编码的蛋白质为生长素F-box蛋白;Zha等^[12]通过EMS诱变鉴定到1个黄色叶片突变体(y1),通过BSA-seq及图位克隆技术,明确突变基因定位于3号染色体7 474~7 573 kb的区间内,连锁分析及等位基因检测与验证了突变体CsaV3_3G009150中的候选SNP(*cpFtsY*)与编码拟南芥叶绿体信号识别粒子基因(*cpSRP*)受体同源,为黄叶表型突变体y1的候选基因。

课题组从地方收集的材料中得到1株黄绿叶色突变体,经过多代自交纯化后,发现突变体叶色可稳定遗传。本研究利用该突变体与其野生型作为亲本进行杂交,构建F₁及F₂代群体,在F₂群体中,选择叶色极端绿色及黄绿色单株构建两个不同叶色的基因池,通过对双亲及两个基因池的BSA-seq全基因组重测序分析,初步筛选调控黄瓜叶片黄绿突变基因的候选区域,并对候选区域内的基因进行预测,明确调控黄瓜黄绿叶色突变的候选基因。本研究结果将对挖掘黄瓜叶色突变基因功能,探索叶色突变调控机制,加快分子标记辅助育种有重要意义和价值。

1 材料与方法

1.1 材料及表型观测

黄瓜材料为江苏省农业科学院蔬菜研究所收集的地方品种,经多代自交纯化后得到的高代自交系GR-89及其叶色突变体GR-89-1。为确保叶色突变体性状的稳定性,对突变体材料又进行了4代的自交纯化,发现其叶色可稳定遗传,因此于2022年春季配置突变体与野生型株系的正反杂交一代(F₁),2022年秋季,杂交一代自交得杂交二代(F₂),2023年春季,双亲、正反F₁以及F₂群体,种植于江苏省农业科学院六合试验基地。其中,F₂群体共种植154株。采用目视观察的方法记载各世代群体单株的叶色表型情况,通过卡方(χ^2)检验法验证叶色突变体是否符合隐性基因的遗传规律。

1.2 试验方法

在F₂群体中选取幼苗期叶片黄化突变株和绿色正常株各20株,采集突变株和正常株顶端幼嫩叶片,使用DNA提取试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司产品)进行DNA提取,并使用NanoDrop 2000c分光光度计(美国Thermo Scientific公司产品)测定DNA浓度。将黄化株20份DNA和绿色株20份DNA分别等量混合,构建黄化叶和绿色叶后代极端混池,亲本样品提取DNA后,送北京组学生物科技有限公司进行质量检验,检验合格后,用超声波将DNA片段化,然后对片段化的DNA进行纯化、末端修复、3'端加A、连接测序接头,接着用浓度3%~4%的琼脂糖凝胶电泳对DNA片段进行大小选择,最后进行PCR扩增形成测序文库并进行质量检验,质量检验合格的文库用Illumina HiSeq平台进行测序。

1.3 测序数据分析

测序数据分析的主要流程如下:(1)将下机得到

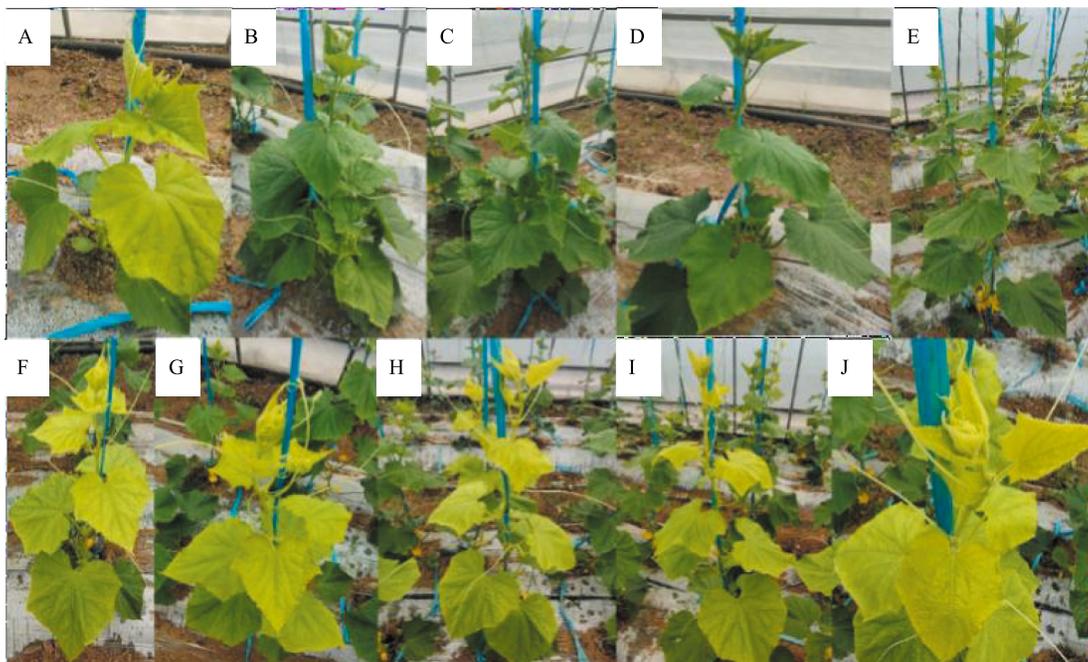
的原始数据(Raw data)通过质量控制过滤得到高质量数据(Clean data);(2)再利用BWA软件^[17]将Clean data比对到黄瓜(Chinese long)参考基因组Genome V3(<http://cucurbit.genomics.org/organism/20>)上;(3)根据比对结果,使用GATK^[18]和ANNOVAR^[19]等软件进行单核苷酸多态性(SNP)、短插入缺失标记(Small InDel)的检测及注释,利用绿叶混池与黄绿叶混池的基因型频率差异(SNP-index)进行关联分析^[20-21],以99%的置信区间确定基因突变位点的候选区域;(4)利用Blast软件^[22]筛选候选基因,利用NR(NCBI non-redundant protein sequences)、Swiss-Prot(a manually annotated and reviewed protein sequence database)、COG(Clusters of orthologous groups of proteins)、GO(Gene ontology)、KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)等数据库^[23-26]对候选区域进行候选区域的编码基因深度注释。

2 结果与分析

2.1 黄瓜叶色黄绿突变体基因的遗传分析

田间表型调查结果显示,黄瓜黄绿突变体与野

生型的叶色存在显著差异。从苗期到成株期,突变体呈现出新叶黄色,下部叶片逐渐恢复为黄绿色的变化特征(图1A),而野生型的叶片颜色始终为正常绿色(图1B),正交F₁植株(突变体×野生型)与反交F₁植株(野生型×突变体)的新叶始终表现为绿色(图1C、图1D)。而154株F₂群体中,有119株绿叶单株(图1E)和35株新叶黄色、下部叶片绿色的突变植株(图1F~图1J)。突变植株中,有10株幼苗期出现叶色黄化、植株矮小、瘦弱并最终死亡。成活144株F₂植株定植于大棚后,有少量突变体的新叶呈现出比黄绿叶色突变亲本更黄的颜色。定植后的植株在生长过程中,有部分F₂绿叶植株和黄绿叶色突变植株呈现出生长较慢,植株高度矮于其他植株的现象。通过双亲和正反F₁的叶色表型可以判定,叶色黄绿突变基因为隐性基因。对F₂群体绿叶植株119株,黄绿叶植株35株进行卡方检验,χ²为0.42,低于χ_{0.05}²(3.841),说明本研究得到的叶色黄绿突变性状受隐性基因控制,F₂群体叶色性状分离比满足3:1的规律。



A:黄绿叶色突变体亲本(P₁);B:绿叶野生型亲本(P₂);C:正交F₁(P₁×P₂);D:反交F₁(P₂×P₁);E:F₂群体中的绿叶单株;F~J:F₂群体中的黄绿叶单株。

图1 亲本、正反杂交一代(F₁)及杂交二代(F₂)群体中的典型植株表型

Fig.1 Typical plant phenotypes of parents, reciprocal hybrid first generation (F₁) and hybrid second generation (F₂) populations

2.2 测序数据质量评估

双亲及极端混池样本测序结果过滤后共获得碱基对 23.24 Gbp, G + C 碱基含量在 35.47%~37.03%, Q20 均在 96% 以上, Q30 均在 90% 以上(表 1), 说明测序数据质量较高。测序数据比对到黄瓜

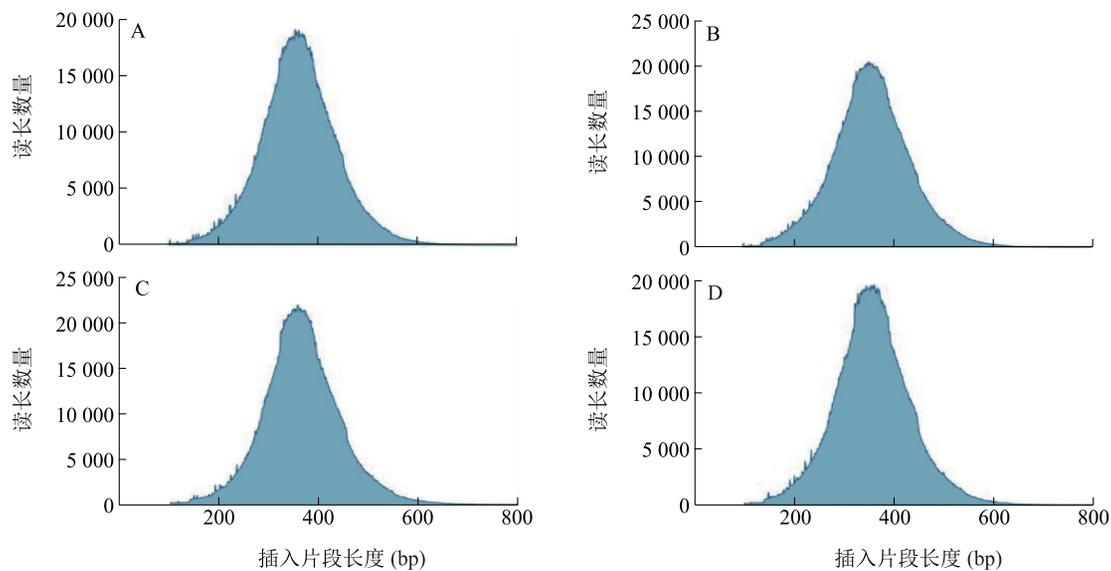
参考基因组 V3 上的比对效率为 96.49%~97.61%; 基因组覆盖深度为 8~15 X, 平均覆盖深度为 11 X, 1 X 覆盖率均超过 98%。插入片段大小符合正态分布(表 1、图 2)。上述结果说明样品测序正常, 随机性较好, 构建的文库可进行下一步的数据分析。

表 1 测序数据统计

Table 1 Statistics of sequencing data

样本	过滤后读长总数	过滤后碱基对 (bp)	Q20 (%)	Q30 (%)	G+C 含量 (%)	对比效率 (%)	样品平均覆盖深度 (X)	1 X 覆盖度 (%)
P ₁ -H	31 082 408	4 662 361 200	96.40	90.83	36.38	97.17	8	98.26
P ₂ -L	30 374 678	4 556 201 700	96.93	91.46	36.17	97.61	9	98.49
B-L	41 593 420	6 239 013 000	96.76	91.17	37.03	96.49	12	98.66
B-H	51 883 752	7 782 562 800	96.47	90.94	35.47	97.57	15	98.78

P₁-H: 突变体亲本 DNA 池; P₂-L: 野生型亲本 DNA 池; B-L: 绿叶 DNA 混池; B-H: 黄绿叶 DNA 混池。



A~D 分别为突变体亲本 DNA 池 (P₁-H)、野生型亲本 DNA 池 (P₂-L)、绿叶 DNA 混池 (B-L) 和黄绿叶 DNA 混池 (B-H)。

图 2 测序数据插入片段大小分布

Fig.2 The distribution of data insert size

2.3 SNP 和 Small InDel 检测和注释

双亲及极端混池的 SNP 和 Small InDel 注释结果如表 2 所示。从表中可以看出, 双亲共获得 405 934 个 SNP 位点和 118 473 个 Small InDel 位点; 混池共获得 453 248 个 SNP 位点和 131 665 个 Small InDel 位点; 非同义突变的 SNP 位点共 17 908 个(表 2)。SNP 位点分布在基因上游、基因下游、基因间区、内含子等 12 个已知区域; Small InDel 位点分布在 14 个区域, 其中基因间区、内含子、基因上游和基因下游分布较多。

2.4 黄瓜黄绿叶色突变性状关联分析及候选基因注释

本试验得到 1 个连锁区域, 位于黄瓜 1 号染色体 19 878 470~19 896 953 bp 区间, 全长 18 484 bp (图 3)。在该区域共鉴定到 118 个 SNP 突变位点, 主要发生在基因间区、内含子、基因上游和基因下游。此外, 外显子区和 3' 非编码区 (UTR3) 各有 1 个 SNP 突变位点, 其中, 外显子区的突变类型为同义突变(表 3)。

表 2 不同样品 SNP 和 Small InDel 注释结果统计

Table 2 Statistics of SNP and Small InDel annotation results of different samples

类型	SNP 数量				Small InDel 数量			
	P ₁ -H	P ₂ -L	B-H	B-L	P ₁ -H	P ₂ -L	B-H	B-L
基因上游	18 762	22 440	22 784	22 810	6 696	7 892	8 104	8 086
终止密码子获得	63	71	77	77	19	21	23	22
终止密码子丢失	12	16	16	15	1	2	2	2
剪接	37	51	50	50	28	32	34	35
同义突变	4 707	5 623	5 795	5 820	-	-	-	-
非同义突变	3 818	4 623	4 728	4 739	-	-	-	-
内含子	35 954	43 516	44 336	44 488	10 186	12 073	12 368	12 330
基因下游	14 605	17 529	17 974	18 055	5 301	6 270	6 425	6 447
基因上游/基因下游	3 373	3 981	4 070	4 047	1 282	1 533	1 561	1 558
基因间区	95 914	113 698	116 593	117 342	27 341	31 847	32 793	32 971
5'非编码区	2 870	3 409	3 524	3 529	1 346	1 564	1 619	1 630
3'非编码区	4 938	5 923	6 161	6 166	1 809	2 125	2 212	2 228
未知	0	1	1	1	-	-	-	-
非移码突变-插入	-	-	-	-	113	137	140	142
非移码突变-删除	-	-	-	-	111	126	130	130
移码突变-插入	-	-	-	-	128	143	145	143
移码突变-删除	-	-	-	-	161	186	194	191
合计	185 053	220 881	226 109	227 139	54 522	63 951	65 750	65 915

P₁-H、P₂-L、B-L、B-H 见表 1 注。

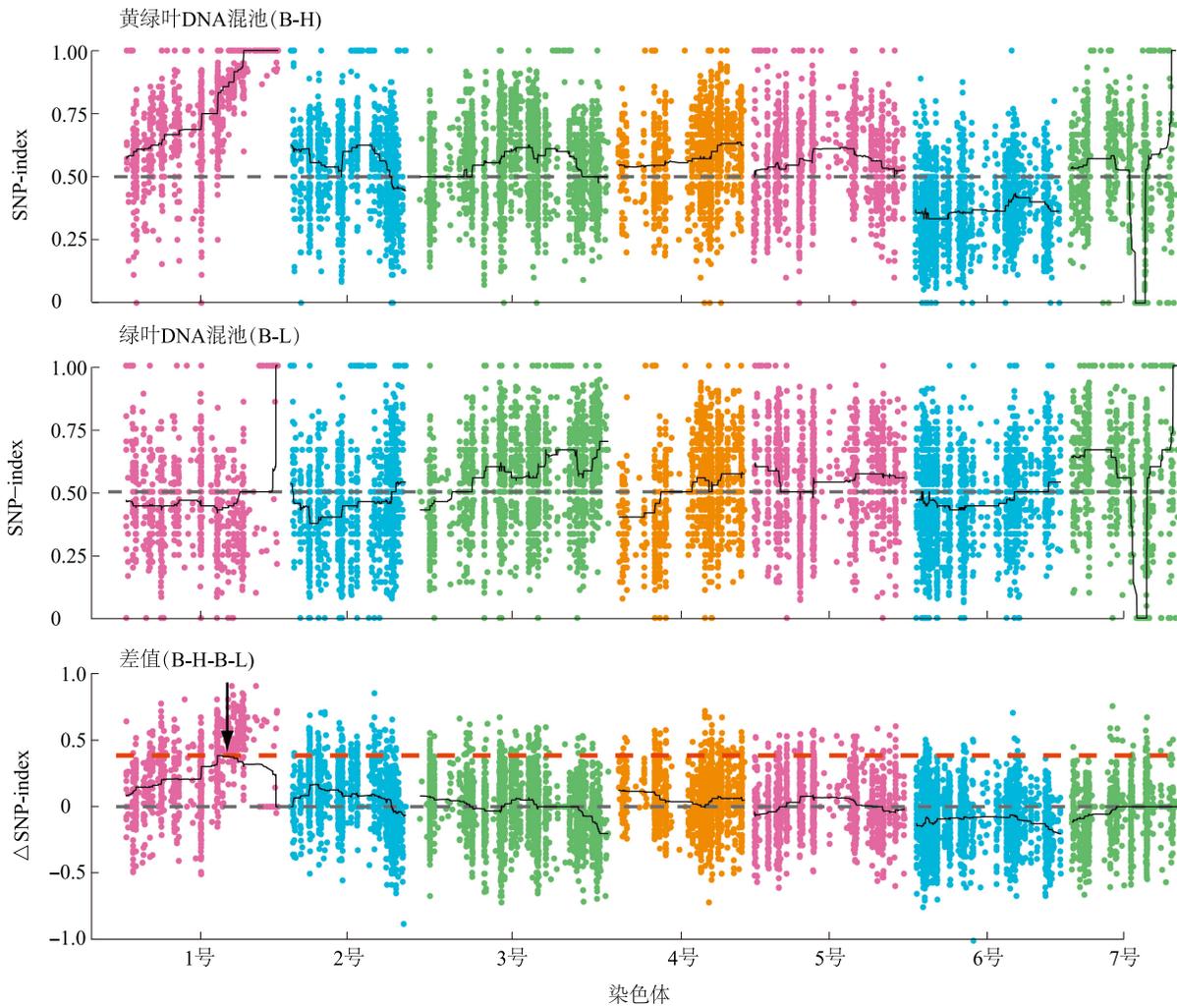
基于多个数据库对候选区间内的编码基因进行深度功能注释后,经过比对得到 3 个与变异相关的候选基因, *CsaV3_1G032810*、*CsaV3_1G032820* 及 *CsaV3_1G032830*。*CsaV3_1G032810* 属于未知蛋白, *CsaV3_1G032820* 为含有 SH3 结构域的蛋白质, *CsaV3_1G032830* 注释为真核细胞翻译起始因子 4E。其中, *CsaV3_1G032820* 基因在整个区域均被注释到,为黄瓜黄绿叶色突变最可能相关基因(表 3)。

3 讨论

叶色突变是植物中普遍存在且易于被鉴别的突变,叶色突变体已成为研究叶绿素合成和代谢等生理过程的优良材料^[27]。叶色突变体在植物种子纯化方面有着广泛的用途,利用隐性叶色突变性状进行筛选,不但高效,而且可有效避免其他基因的干扰。例如在辣椒育种中,利用叶色突变体作为特定标记,插入到杂交亲本中,在制种过程中可利用该标记,排除亲本的自交后代,从而简化制种程序,降低

制种成本^[28]。本试验利用 BSA-seq 方法挖掘黄瓜黄绿叶色突变相关候选基因,通过对野生型和突变体及 F₂ 群体中极端单株进行混池测序,最终将候选基因定位到黄瓜 1 号染色体 19 878 470~19 896 953 bp 处,总长度为 18 484 bp。候选区域内共检测到 118 个 SNP 突变位点,经过 NR、Swiss-Prot、COG、GO、KEGG 等数据库注释后,共得到 3 个基因,其中 *CsaV3_1G032820* 基因为黄瓜黄绿叶色突变体最可能相关基因,其注释信息为含有 SH3 结构域的蛋白质。

目前发现的叶色突变体遗传机制大多为单基因隐性细胞核遗传,但也存在少数叶色突变体受到显性基因的控制,突变性状相对于正常性状表现为完全显性或不完全显性。张泽民等^[29]筛选出 1 个 T-DNA 插入的由 1 对显性基因控制的水稻白化苗突变体;房贤涛等^[30]发现 1 个显性基因调控的水稻叶色突变体,属于白化转绿的突变类型;Smith^[31]筛选出一个由显性基因控制的小麦叶绿素缺乏突变体。



黑色箭头位置为连锁区域。

图3 黄绿叶 DNA 混池 (B-H) 和绿叶 DNA 混池 (B-L) 单核苷酸多态性指数 (SNP-index) 及其差值在染色体上的分布

Fig.3 The distribution of SNP-index and its difference between virescent yellow leaf DNA pool and green leaf NDA pool on chromosomes

表3 SNP 关联信息区域统计及候选区域内 SNP 中基因功能注释结果统计

Table 3 Statistics of SNP association information areas and gene function annotation results in SNP in candidate regions

染色体位置(bp)	变异位点的位置	变异位点数量	变异相关候选基因	候选基因的注释信息
19 878 470~19 878 714	基因间区	8	<i>CsaV3_IG032810</i>	未知蛋白
			<i>CsaV3_IG032820</i>	含有 SH3 结构域的蛋白质
19 878 795~ 19 879 640	基因上游	15	<i>CsaV3_IG032820</i>	含有 SH3 结构域的蛋白质
19 880 362~ 19 886 319	内含子	30	<i>CsaV3_IG032820</i>	含有 SH3 结构域的蛋白质
19 887 025	外显子	1	<i>CsaV3_IG032820</i>	含有 SH3 结构域的蛋白质
19 887 260~19 889 790	内含子	17	<i>CsaV3_IG032820</i>	含有 SH3 结构域的蛋白质
19 890 486	3'非编码区	1	<i>CsaV3_IG032820</i>	含有 SH3 结构域的蛋白质
19 890 742~ 19 891 540	基因下游	5	<i>CsaV3_IG032820</i>	含有 SH3 结构域的蛋白质
19 891 834~ 19 896 953	基因间区	41	<i>CsaV3_IG032820</i>	含有 SH3 结构域的蛋白质
			<i>CsaV3_IG032830</i>	真核细胞翻译起始因子 4E

曹莉^[32]发现的小麦高代自发黄化突变体属于不完全显性基因细胞核遗传,安旭尧^[33]研究发现,小麦黄绿叶色突变体 F₂代分离比约为1:2:1,也属于不完全显性遗传。目前对黄瓜叶色突变体的研究发现控制黄瓜叶色突变的基因大多为隐性单基因^[10-16]。通过双亲和 F₁代的表型性状,能确定本研究发现的黄瓜黄绿叶色突变基因为隐性基因。通过 F₂代表型分离比,按照单性状分离比(3:1)进行卡方检验,起初发现其不符合一对隐性基因控制的孟德尔遗传规律,原因是在幼苗期有10株黄绿色突变株出现了植株矮小、瘦弱且死亡的现象,当排除这10株进行卡方检验时,其不符合卡方检验,但当将这些死亡的黄绿突变株考虑进去,则符合卡方检验,符合一对隐性基因控制的孟德尔遗传规律。

前人已经克隆的黄瓜叶色突变基因定位于染色体3号^[11-12]、染色体4号^[14]和染色体6号^[10,13],而本研究得到的黄瓜黄绿叶色突变基因定位于染色体1号,这与前人的报道结果不同。以往研究中发现不同的基因突变均能引起叶片颜色变化,说明引起黄瓜叶片颜色变化的机制可能是多方面的。本研究筛选的与黄瓜黄绿叶色突变相关的候选基因编码的蛋白质为含有SH3结构域的蛋白质。拟南芥SH3蛋白家族包含SH3P1、SH3P2、SH3P3等3个同源蛋白,3者均含有1个SH3结构域,其中SH3P1和SH3P3可以在细胞内吞过程中发挥作用,而SH3P2在细胞自噬过程中发挥着重要的调控作用^[34-36]。本研究发现的黄瓜黄绿叶色突变候选基因,如何调控叶色变化还有待进一步分析和验证。后续将继续开展候选基因克隆及功能分析,并开发相应的分子标记,深入揭示黄瓜黄绿叶色突变的分子机制,促进分子标记辅助育种。

参考文献:

- [1] ESTEBAN R, FERNÁNDEZ-MARÍN B, BECERRIL J M, et al. Photoprotective implications of leaf variegation in *E. dens-canis* L. and *P. officinalis* L. [J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165 (12):1255-1263.
- [2] STERN D B, HANSON M R, BARKAN A. Genetics and genomics of chloroplast biogenesis: maize as a model system [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(6):293-301.
- [3] ZHAO Y, WANG M L, ZHANG Y Z, et al. A chlorophyll-reduced seeding mutant in oilseed rape, *Brassica napus*, for utilization in F₁ hybrid production [J]. Plant Breeding, 2000, 119(2):131-135.
- [4] NAGATA N, TANAKA R, SATOH S, et al. Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of prochlorococcus species [J]. Plant Cell, 2005, 17(1):233-240.
- [5] BEALE S I. Green genes gleaned [J]. Trends in Plant Science, 2005, 10(7):309-312.
- [6] WU Z M, ZHANG X, HE B, et al. A Chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis [J]. Plant Physiology, 2007, 145(1):29-40.
- [7] TERRY M J, KENDRICK R E. Feedback inhibition of chlorophyll synthesis in the phytochrome chromophore-deficient aurea and yellow-green-2 mutants of tomato [J]. Plant Physiology, 1999, 119(1):143-152.
- [8] MONDE R A, ZITO F, OLIVE J, et al. Post-transcriptional defects in tobacco chloroplast mutants lacking the cytochrome b₆/f complex [J]. Plant Journal, 2000, 21(1):61-72.
- [9] 胡远辉,王茂林,张年辉,等. 幼叶黄化油菜突变体 Cr3529 中 *Toc33* cDNA 的克隆和序列分析 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(8):1198-1202.
- [10] GAO M L, HU L L, LI Y H, et al. The chlorophyll-deficient *golden leaf* mutation in cucumber is due to a single nucleotide substitution in *CsChlI* for magnesium chelatase I subunit [J]. Theor Appl Genet, 2016, 129:1961-1973.
- [11] ZHANG K J, LI Y, ZHU W W, et al. Fine mapping and transcriptome analysis of virescent leaf gene *v-2* in Cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Front Plant Sci, 2020, 11:570817.
- [12] ZHA G H, YIN J, CHENG F, et al. Fine mapping of *CscpFtsY*, a gene conferring the yellow leaf phenotype in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. BMC Plant Biol, 2022, 22(1):570.
- [13] MIAO H, ZHANG S P, WANG M, et al. Fine mapping of virescent leaf gene *v-1* in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(10):1602.
- [14] SONG M F, WEI Q Z, WANG J, et al. Fine mapping of *CsVYL*, conferring virescent leaf through the regulation of chloroplast development in cucumber [J]. Front Plant Sci, 2018, 9:432.
- [15] DING Y, YANG W, SU C G, et al. Tandem 13-lipoxygenase genes in a cluster confers yellow-green leaf in Cucumber [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12):3102.
- [16] HU L L, ZHANG H Q, XIE C, et al. A mutation in *CsHD* encoding a histidine and aspartic acid domain-containing protein leads to yellow young leaf-1 (*yyl-1*) in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Plant Science, 2020, 293:110407.
- [17] LI H, DURBIN R. Fast and accurate short read alignment with burrows-Wheeler transform [J]. Bioinformatics, 2009, 25(14):1754-1760.
- [18] MCKENNA A, HANNA M, BANKS E, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data [J]. Genome Research, 2010, 20(9):1297-1303.
- [19] YANG H, WANG K. Genomic variant annotation and prioritization

- with ANNOVAR and wANNOVAR[J]. *Nature Protocols*, 2015, 10(10):1556-1566.
- [20] HILL J T, DEMAREST B L, BISGROVE B W, et al. MMAPP: mutation mapping analysis pipeline for pooled RNA-seq[J]. *Genome Research*, 2013, 23(4):687-697.
- [21] FEKIH R, TAKAGI H, TAMIRU M, et al. MutMap+: genetic mapping and mutant identification without crossing in rice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e68529.
- [22] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHÄFFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17):3389-3402.
- [23] 邓泱泱, 荔建琦, 吴松锋, 等. nr 数据库分析及其本地化[J]. *计算机工程*, 2006, 32(5):71-73, 76.
- [24] ASHBURNER M, BALL C A, BLAKE J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1):25-29.
- [25] KANEHISA M, GOTO S, KAWASHIMA S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(Database issue):D277-D280.
- [26] TATUSOV R L, GALPERIN M Y, NATALE D A, et al. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1):33-36.
- [27] STERN D B, HANSON M R, BARKAN A. Genetics and genomics of chloroplast biogenesis: maize as a model system[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(6):293-301.
- [28] 马志虎, 颜素芳, 沈晓昆, 等. 辣椒黄绿苗突变体叶色标记技术在种子生产中的作用[J]. *种子世界*, 2001(9):19-20.
- [29] 张泽民, 朱海涛, 王江, 等. T-DNA 插入产生的水稻白化苗突变的遗传分析[J]. *华南农业大学学报*, 2007, 28(3):1-5.
- [30] 房贤涛, 马洪丽, 赵福源, 等. 6 个水稻叶色白转绿光温敏核不育突变体的育种研究[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(1):45-51.
- [31] SMITH L. A rare dominant chlorophyll mutant in durum wheat; induced by atomic bomb irradiation[J]. *Journal of Heredity*, 1952, 43(3):125-128.
- [32] 曹莉. 一个新的小麦黄化突变体研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2007.
- [33] 安旭尧. 黄绿小麦近等基因系的鉴评及黄绿基因 *Ygl* 的分子标记定位[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2016.
- [34] LAM B C H, SAGE T L, BIANCHI F, et al. Role of SH3 domain-containing proteins in clathrin-mediated vesicle trafficking in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2001, 13(11):2499-2512.
- [35] ZHUANG X H, WANG H, LAM S K, et al. A BAR-domain protein SH3P2, which binds to phosphatidylinositol 3-phosphate and ATG8, regulates autophagosome formation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2013, 25(11):4596-4615.
- [36] 曾笑威, 刘翠翠, 韩凝, 等. 植物自噬的调控因子和受体蛋白研究进展[J]. *遗传*, 2016, 38(7):644-650.

(责任编辑:石春林)