

张朝阳, 程 瑞, 徐兵划, 等. BSA 联合转录组分析发掘西瓜叶片黄化候选基因[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(1): 165-173.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.01.018

BSA 联合转录组分析发掘西瓜叶片黄化候选基因

张朝阳, 程 瑞, 徐兵划, 顾 妍, 黄大跃, 孙玉东

(江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所/淮安市设施蔬菜重点实验室, 江苏 淮安 223001)

摘要: 叶片是植物重要的功能器官之一, 不仅是植株进行光合作用的主要场所, 也可作为重要的形态标记, 应用于育种中。叶片颜色作为形态标记, 不仅可用于苗期杂种的清除, 亦可用于种子纯度的测定。以西瓜全生育期叶片黄化突变体纯合自交系 ly104 为母本(P_1)、绿叶自交系 w3 为父本(P_2), 通过杂交创制 F_1 代、 F_2 代、 BC_1 代群体。遗传分析结果表明, 该突变体的叶片黄化由单隐性基因控制。采用混合分组分析(BSA)进行初定位, 通过简化基因组测序(RAD)开发全基因组单核苷酸多态性(SNP)标记构建西瓜高密度遗传图谱, 将西瓜叶片黄化基因定位于 2 号染色体 13 950 306~15 517 591 bp(大小约为 1.57 Mb)。以西瓜 97I03v2 为参考基因组, 该区间包含 24 个注释基因。对 P_1 (P1Y)、 P_2 (P2G) 和 F_2 代群体中黄叶(F2Y)、绿叶(F2G) 株系进行转录组水平分析, 结果表明, 目标区间内基因 *ClA97C02G035950*、*ClA97C02G036010*、*ClA97C02G036020*、*ClA97C02G036060* 在黄化叶片与正常绿叶材料中的表达量差异显著, 可能是西瓜叶片的黄化候选基因。研究结果可为进一步解析西瓜叶片黄化基因功能和生物学特性奠定重要基础。

关键词: 西瓜; 黄化; BSA; 遗传图谱; 基因定位

中图分类号: S651.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)01-0165-09

Identification of candidate genes for watermelon leaf yellowing based on BSA and transcriptome analysis

ZHANG Chao-yang, CHENG Rui, XU Bing-hua, GU Yan, HUANG Da-yue, SUN Yu-dong

(Huaiyin Institute of Agricultural Sciences of the Xuhuai District of Jiangsu Province/Huaian Key Laboratory for Facility Vegetables, Huaian 223001, China)

Abstract: The leaf is one of the important functional organs of plants. It is not only the main place for photosynthesis of plants, but also can be used as an important morphological marker in breeding. As a morphological marker, leaf color can be used not only for removing hybrids at the seedling stage, but also for determining seed purity. In this study, F_1 , F_2 , and BC_1 populations were created by hybridization, and the mutant homozygous inbred line ly104 in the whole growth period of watermelon was used as the female parent (P_1), and the green leaf inbred line w3 was used as the male parent (P_2). Genetic analysis showed that leaf yellowing was controlled by a single recessive gene. The bulked segregant analysis (BSA) was used for primary mapping, and genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) markers were developed by restriction-site associated DNA-sequencing (RAD) to construct a high-density genetic map of watermelon. The watermelon leaf yellowing gene was localized on chromosome 2 at 13 950 306-15 517 591 bp (about 1.57 Mb). Watermelon 97I03v2 was used as the reference genome and the inter-

interval contained 24 annotated genes. The transcriptome levels of P_1 (P1Y), P_2 (P2G) and yellow leaf (F2Y) and green leaf (F2G) lines in F_2 population were analyzed. The results showed that the expression levels of *ClA97C02G035950*, *ClA97C02G036010*, *ClA97C02G036020* and *ClA97C02G036060* in the target interval were significantly different between etiolated leaves and normal green leaves. These genes might be candidate genes for etiolation of watermelon leaves. The re-

收稿日期: 2022-11-28

基金项目: 淮安市农业科学研究院发展基金项目(HAN201714); 淮安市自然科学研究技术专项(HAB202079); 国家西甜瓜产业技术体系淮安综合试验站项目(CARS-25)

作者简介: 张朝阳(1982-), 男, 江苏连云港人, 硕士, 副研究员, 从事西甜瓜遗传育种研究。(E-mail) 287362703@qq.com。
程瑞为共同第一作者。

通讯作者: 孙玉东, (E-mail) sunyudong@jaas.ac.cn

sults of this study can lay an important foundation for further analysis of the function and biological characteristics of watermelon leaf yellowing genes.

Key words: watermelon; etiolation; BSA; genetic map; gene location

叶片是植物进行光合作用最主要的器官,对植物的生存具有重要意义,叶片颜色在很大程度上决定了植物的光合效率^[1]。植物叶色突变不仅是研究叶绿素相关基因功能及植物发育的重要材料^[2],也是优良的形态标记性状,在实际生产中常被用来进行品种纯度鉴定^[3]。关于水稻、大麦、小麦、玉米、棉花、大豆、蚕豆、番茄、拟南芥等多种植物叶色突变的研究已有报道^[4],叶色突变类型丰富多样,包括白化、黄化、黄绿等^[5-6]。植株叶色的形成不仅受到叶绿体生物合成途径、叶绿素降解途径、血红素代谢途径、类胡萝卜素代谢途径等与光合色素代谢途径相关基因的影响,受到与叶绿体发育相关基因的调控,还与光、温度、植物激素、矿物元素和金属离子等外界环境因素息息相关^[6-9]。目前,关于水稻、玉米、拟南芥等模式植物中叶色的研究较为深入,水稻、玉米中已报道的叶色突变体均超 200 个^[10-13],对拟南芥的研究发现,叶色突变以隐性遗传为主,目前已经发现 27 个编码 15 种叶绿素生物合成酶的核基因,它们的任何异常突变都会导致叶绿素缺乏,从而产生黄色突变^[14]。近年来,随着高通量测序技术的应用,关于辣椒、甜瓜和黄瓜等一些重要经济作物的叶色突变研究也逐渐展开^[15-19]。

西瓜是全球十大水果之一,中国西瓜栽培面积和消费量均居世界首位。随着杂交育种的发展,西瓜育种已基本实现杂种一代化,对制种纯度提出了更大挑战,叶形、叶色虽是重要的形态标记性状,但尚未应用于育种中。西瓜的遗传基础狭窄,自然突变率低,目前有关西瓜叶色突变的报道有斑驳突变类型^[20]、白化突变类型^[21-22]、不完全显性黄叶突变类型^[22]、后绿突变类型^[23]、黄化突变类型^[24-25]等,但研究主要集中于遗传规律、生理特性^[21-25]。西瓜基因组的公布和测序技术的快速发展为西瓜重要性状定位、关键基因功能研究奠定了重要生物学基础^[26-29]。Kidānēmarīam^[30]发现,西瓜后绿突变体 Houlv 中的 *C1CG03G010030* 基因存在 1 个单核苷酸多态性(SNP)变异,导致该基因编码的 FtsH 胞外蛋白酶序列中精氨酸突变为赖氨酸,FtsH 蛋白主要参与叶绿体早期发育,进而影响西瓜叶片颜色。Zhu 等^[25]对叶片黄化突变西瓜材料 w-yl 进行精细定位,

认为基因 *Cla97C02G036040*、*Cla97C02G036050* 和 *Cla97C02G036060* 可能是导致西瓜叶片黄化的主要基因。探索叶片颜色变异机制可为遗传改良提供理论依据,满足人们在生产、选种和育种等方面的需求;开发叶色形态标记,能够有效缩短育种周期,提高育种效率与制种纯度。本研究拟以全生育期叶片黄化西瓜材料 ly104 和绿叶西瓜材料 w3 为试验材料,通过混合分组分析(BSA)测序初步定位叶片黄化基因在染色体中的位置,进一步利用简化基因组(RAD)测序开发全基因组 SNP 分子标记,利用 F₂代群体构建高密度遗传图谱进行西瓜叶片黄化基因定位,结合转录组测序及基因功能注释锁定关键候选基因。本研究结果可为进一步全面解析西瓜叶片黄化基因及其生物学功能奠定重要基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2014 年,利用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变获得的稳定遗传的叶片黄化西瓜材料,经 5 代连续自交获得相对纯合的叶片黄化突变材料 ly104。本研究以 ly104 为母本(P₁),以正常绿叶西瓜材料 w3 为父本(P₂)构建 F₁代、F₂代、BC₁代群体,群体的构建与表型调查试验均于淮安市农业科学研究院科研创新基地进行,群体配制过程严格自交、杂交,整个生育期采取商品化管理。

1.2 形态观察与遗传规律分析

以第 1 张完全展开的真叶进行表型统计与分析,采用人工观察和便携式色差仪 RM200QC(爱色丽 X-Rite,美国)对叶片颜色指数进行测定,测定指标为亮度值(L*)、红绿值(a*)和黄蓝值(b*)3 个颜色参数。对 F₁代、F₂代、BC₁代群体分离表型进行统计,分析西瓜叶片黄化遗传规律,并进行卡方检验。

1.3 通过 BSA 测序进行叶片黄化初定位

BSA 测序即混合分组分析法,是一种简单快速的目标性状定位方法,已被广泛应用于多种园艺作物重要性状的基因定位^[31]。本研究从 F₂代西瓜群体中选取黄叶、绿叶极端表型植株各 20 株,采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[32]提取植株幼叶基

因组 DNA 并检测其浓度,通过等量混匀构建 2 个极端混池,利用亲本 DNA 构建亲本池进行测序分析,送至上海凌恩生物科技有限公司,利用 Illumina HiSeq 4000 进行测序,亲本测序深度为 10×,混池测序深度为 20×,测序读长为 150 bp。对原始序列 (Read) 进行过滤,去除接头,过滤掉包含未确定碱基 (N) > 15% 和低质量的 read (质量值 ≤ 20 的碱基数占整个 Read 的 10% 以上),将获得的干净序列 (Clean read) 用于后续分析。使用 BWA 软件^[33] 将高质量的 Clean read 映射到西瓜基因组 97103v2 (<http://cucurbitgenomics.org/organism/21>) 上。然后用 GATK^[34]、Snpeff^[35] 软件对突变位点进行检测和注释,用 SNP-index 算法进行关联分析,阈值为 0.5。

1.4 西瓜高密度遗传图谱的构建

为了更精确地定位获得西瓜叶片黄化突变位点,本研究根据 F₂ 代群体中黄叶、绿叶分离比选取共 100 份单株,分别提取基因组 DNA,采用 RAD 建库方式构建长度范围在 300~500 bp 的双端文库。将产物送至上海凌恩生物科技有限公司,利用 Illumina HiSeq 进行测序,测序读长为 150 bp。对原始 Read 采用以下标准进行质控:(1) 去除 Read 中的接头序列;(2) 修剪测序质量较低的 Read 末端(测序质量值小于 Q20);(3) 去除含 N 比例达到 10% 的 Read;(4) 舍弃接头及质量修剪后长度小于 100 bp 的小片段。用 BWA 软件将 Clean read 比对至参考基因组 97103v2,并对映射结果进行统计分析。用 GATK 软件进行变异位点检测获得 SNP。对获得的 SNP 按以下标准进行过滤:(1) 去除比对 Read 质量值小于 20 的位点,同时过滤掉缺失率大于 50% 的 SNP;(2) 删除无义 SNP 位点;(3) 用 joinmap 4.0 软件^[36] 对过滤后的 SNP 进行卡方测验,先后过滤掉 P < 0.01 和缺失率 30% 以上的标记,对于最终获得的 SNP,采用 joinmap 4.0 软件进行西瓜遗传图谱构建,选用 Kosambi's 参数。

1.5 转录组分析

从亲本及其 F₂ 代群体中取 ly04 和 w3 单株各 3 份,当第 1 张真叶完全展开后取样进行转录组分析。用 Plant RNA Purification Reagent 试剂盒(购自上海凌恩生物科技有限公司)提取植物总 RNA,并构建转录组测序文库。送至上海凌恩生物科技有限公司采用 Illumina HiSeq 进行测序,Read 长度为 150 bp。测序数据经质控过滤获得 Clean read,用 Hisat2 软件^[37] 将其映射到西瓜基因组 97103v2 上。用每个

基因在一个样本中所对应的基因转录本数 (FPKM) 计算基因表达水平。基于 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) 和 GO (<http://www.geneontology.org/>) 数据库进行基因注释和功能分析。差异表达基因以差异倍数 (Fold change) ≥ 1.5、P ≤ 0.005 为标准。

1.6 候选区域功能注释与候选基因筛选

结合遗传规律分析及 BSA,利用 RAD 测序开发全基因组 SNP 标记,加入叶色表型标记进行西瓜 2 号染色体图谱的构建,对西瓜叶片黄化基因进行定位。以 97103v2 为参考基因组对定位区间基因进行注释,通过基因序列分析及转录组测序差异表达情况分析进一步筛选并确定候选基因。

2 结果与分析

2.1 西瓜叶片黄化特性及遗传规律分析

经 EMS 诱变获得叶片黄化的西瓜材料,经 5 代连续自交后,获得遗传稳定的叶片黄化材料 ly104,该材料从子叶期至果实收获时的叶片均保持黄化状态(图 1A)。通过对 ly104、w3 的叶片颜色指标进行测定,发现叶片黄化西瓜材料与绿叶西瓜材料在叶片颜色指标上存在极显著差异(图 1B)。

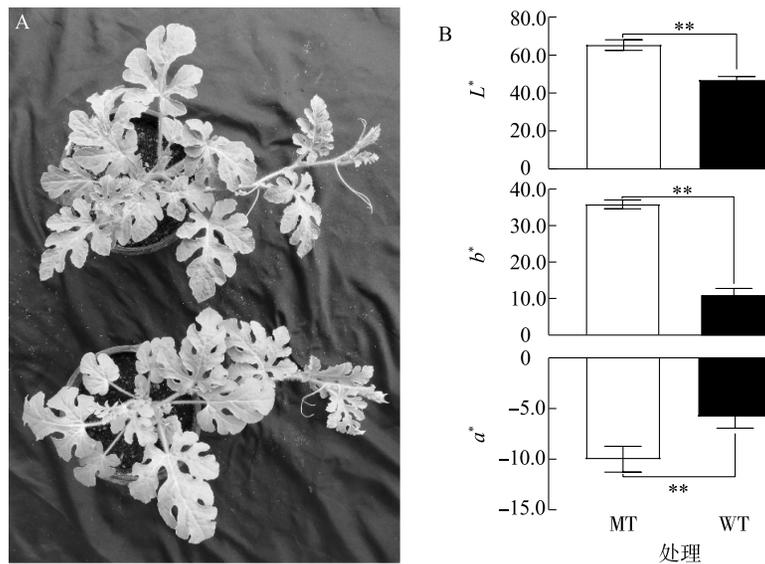
分析结果显示,ly104 和 w3 的杂交 F₁ 代所有植株叶片均呈绿色,表明控制黄色和绿色的基因是等位基因,黄色的突变基因为隐性遗传。F₂ 代群体中有 174 个单株为绿叶,63 个单株为黄叶(表 1)。在 F₁ 代与叶片黄化亲本 (P₁) 回交群体后代中,有 73 个单株为绿叶,63 个单株为黄叶。卡方检验发现,F₂ 代群体的分离比符合 3 : 1 的孟德尔分离比 [$\chi^2_{(1,n=237)} = 0.31646, P = 0.5737 > 0.0500, n$ 为群体样本数量], BC₁ 群体的分离模式符合 1 : 1 的孟德尔分离比 [$\chi^2_{(1,n=136)} = 0.73529, P = 0.3912 > 0.0500$] (表 1),说明西瓜叶片的黄色突变符合单基因控制的隐性遗传规律,叶片绿叶对黄色表现为显性遗传。

表 1 F₂ 代和 BC 群体中叶片黄化突变型与野生型的分离比

Table 1 Segregation ratio of yellow-leaf mutant and wild type in F₂ and BC populations

群体类型	群体数量	绿叶植株数量	黄叶植株数量	期望分离比	卡方检验值 (χ ²)
BC ₁	136	73	63	1 : 1	0.74
F ₂	237	174	63	3 : 1	0.32

χ² 检验采用 0.05 水平。



A:表型;B:颜色指数。 L^* :亮度(阈值0~100); a^* :红绿色范围(阈值-128~+127); b^* :黄蓝色范围(阈值-128~+127);MT:突变体叶片黄化材料;WT:野生型材料。**表示不同材料间差异极显著($P < 0.01$)。

图1 西瓜绿叶和黄叶突变体的表型及颜色指数

Fig.1 Phenotype and color index of watermelon green-leaf mutant and yellow-leaf mutant

2.2 西瓜叶片黄化基因的BSA初定位

原始Read经质控过滤,2个混池共获得12.4 Gb高质量Clean read, $Q30$ 在93.0%以上,与参考基因组97103v2的平均比对率在98.0%以上。使用GATK软件进行变异检测,共获得523 303个SNP,经过滤后用SNP-Index算法对性状相关候选区域进行选择,作图窗口大小为1 Mb,作图步移为10 kb,阈值为0.5,结果表明,西瓜叶色黄化基因定位于2号染色体8 490 001~26 410 000 bp(大小约为17.92 Mb)(图2A)。

2.3 高密度西瓜遗传图谱的构建与叶片黄化基因的定位

根据分离比,从 F_2 代群体中选取76株绿叶、24株黄叶西瓜单株进行RAD测序,共获得69.17 Gb高质量Clean read, $Q30$ 在91.3%以上,与参考基因组的平均比对率在97.6%以上。使用GATK软件进行变异检测,共获得229 704个SNP,经过滤筛选,最终确定4 273个SNP用于西瓜高密度遗传图谱的构建。西瓜遗传图谱总长度为1 602.44 cM,平均遗传距离为0.39 cM,最大间隔为7.38 cM(表2)。

为了进一步精确定位西瓜叶片黄化基因,用RAD测序结果对西瓜2号染色体上的SNP标记进行过滤筛选,剔除检测率低于40%的样品单株和标记,最终用91份单株(68份绿叶,23份黄叶)、286

个SNP标记进行叶片黄化基因定位,叶片颜色标记(Leafcolor)用绿叶(D)、黄叶(B)表示,用joinmap4进行西瓜叶片黄化基因的定位。结果显示,Leafcolor定位于Clas97Chr02-13950306与Clas97Chr02-15517591标记之间(大小约为1.567 Mb)(图2B),以西瓜97103v2为参考基因组,该区间包含24个注释基因(图2C、表3)。

表2 西瓜高密度遗传图谱构建结果

Table 2 Construction of high density genetic map of watermelon

基因组位置	标记数量	遗传长度(cM)	平均遗传距离(cM)	标记最大间隔(cM)
Lg01	437	161.15	0.37	2.62
Lg02	504	185.49	0.37	2.32
Lg03	109	60.13	0.55	3.16
Lg04	628	278.32	0.44	3.87
Lg05	314	114.81	0.37	2.87
Lg06	380	95.08	0.25	2.75
Lg07	481	186.90	0.39	2.82
Lg08	205	72.03	0.35	2.17
Lg09	437	147.52	0.34	2.21
Lg10	459	121.60	0.26	2.40
Lg11	319	179.41	0.56	7.38
合计	4 273	1 602.44	0.39	-

2.4 西瓜黄化叶片转录组分析及候选基因的筛选

RNA-seq 共检测 12 个样本,其中 P₁、P₂ 分别选取 3 个样本,F₂ 代群体中叶片黄化类型、绿叶类型分别选取 3 个样本,每个样本平均获得 6.4 Gb 高质量 Clean read 数据,Q30 在 92.0% 以上,平均基因组比对率为 91.4%。分别以 P2G(亲本绿叶)与 P1Y(亲本黄叶)和 F2G(F₂ 代绿叶)与 F2Y(F₂ 代黄叶)为对比组进行独立分析,其中 P2G 与 P1Y 对比组中共检测到 1 356 个差异表达基因,其中上调表达的基因 529 个,下调表达的基因 827 个;F2G 与 F2Y 对比组中共检测到

4 180 个差异表达基因,其中上调表达的基因 1 378 个,下调表达的基因 2 802 个(图 3A,图 3B)。P2G 与 P1Y 对比组和 F2G 与 F2Y 对比组中均显著下调表达的基因共有 327 个、均显著上调表达的基因共有 132 个(图 3A)。以上结果表明,亲本中黄叶和绿叶差异表达基因数量显著小于 F₂ 代群体,说明 P₁ 和 P₂ 已相对纯合;GO 和 KEGG 富集分析结果表明,差异表达基因富集通路多与光合、应激反应等有关,说明黄叶和绿叶西瓜植株在光合作用等方面存在较大差异。

表 3 候选区间注释基因

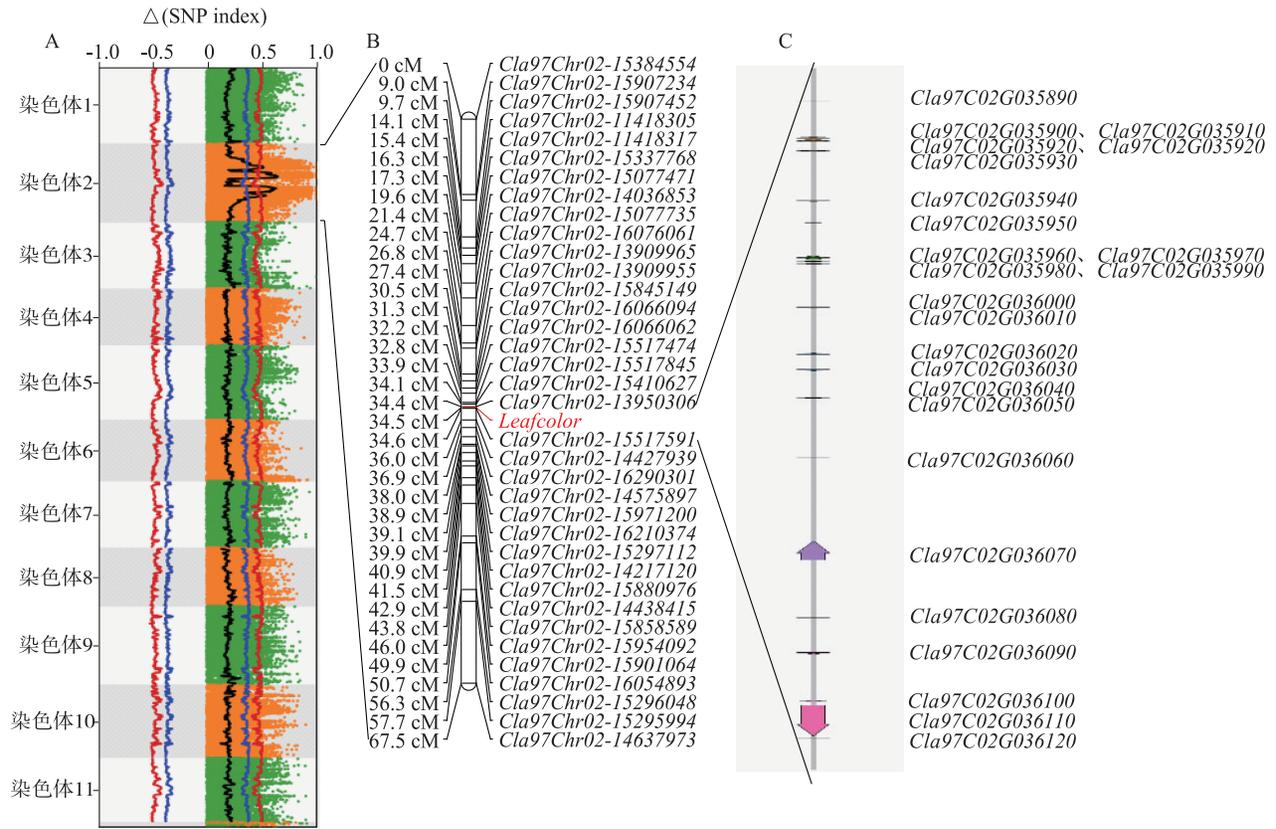
Table 3 Gene function annotation information in candidate interval

基因	染色体	起始位置(bp)	终止位置(bp)	基因方向	基因功能注释
<i>Cla97C02G035890</i>	染色体 2	13 956 417	13 957 327	-	acanthoscurrin-1-like
<i>Cla97C02G035900</i>	染色体 2	14 029 968	14 031 110	-	未知的蛋白质
<i>Cla97C02G035910</i>	染色体 2	14 031 202	14 032 265	-	acanthoscurrin-1-like
<i>Cla97C02G035920</i>	染色体 2	14 033 580	14 037 379	-	未知的蛋白质
<i>Cla97C02G035930</i>	染色体 2	14 055 676	14 057 378	-	含 BPTI/Kunitz 结构域的蛋白质 2 亚型 X2
<i>Cla97C02G035940</i>	染色体 2	14 157 122	14 158 310	+	未知的蛋白质
<i>Cla97C02G035950</i>	染色体 2	14 201 373	14 202 375	-	与 TMA7 相关的翻译机制蛋白质
<i>Cla97C02G035960</i>	染色体 2	14 267 310	14 270 809	-	B 类锌指蛋白质转录因子,包含 DUF1664 结构域
<i>Cla97C02G035970</i>	染色体 2	14 270 906	14 274 847	+	脂质结合血清糖蛋白
<i>Cla97C02G035980</i>	染色体 2	14 277 686	14 278 904	-	蛋白质核融合缺陷 6,叶绿体/线粒体样亚型 X1
<i>Cla97C02G035990</i>	染色体 2	14 283 047	14 283 329	+	未知的蛋白质
<i>Cla97C02G036000</i>	染色体 2	14 370 086	14 372 002	+	抗坏血酸氧化酶同源物
<i>Cla97C02G036010</i>	染色体 2	14 376 439	14 376 782	+	未知的蛋白质
<i>Cla97C02G036020</i>	染色体 2	14 461 376	14 464 307	-	双组分反应调节蛋白质
<i>Cla97C02G036030</i>	染色体 2	14 494 607	14 497 114	+	双组分反应调节蛋白质
<i>Cla97C02G036040</i>	染色体 2	14 549 765	14 550 425	+	包含 DUF679 结构域的蛋白质
<i>Cla97C02G036050</i>	染色体 2	14 550 626	14 551 935	-	DNAJ 同源亚家族 B 成员 13
<i>Cla97C02G036060</i>	染色体 2	14 670 693	14 671 707	+	蛋白质 Ycf2
<i>Cla97C02G036070</i>	染色体 2	14 837 219	14 875 277	-	U11/U12 小核糖核蛋白(相对分子质量 65 000)蛋白质亚型 X2
<i>Cla97C02G036080</i>	染色体 2	14 990 520	14 990 719	-	未知的蛋白质
<i>Cla97C02G036090</i>	染色体 2	15 059 899	15 063 209	+	环型 E3 泛素转移酶
<i>Cla97C02G036100</i>	染色体 2	15 155 209	15 157 456	+	含五肽重复的家族蛋白质
<i>Cla97C02G036110</i>	染色体 2	15 165 142	15 226 986	+	尼曼-匹克 C1 蛋白样亚型 X2
<i>Cla97C02G036120</i>	染色体 2	15 231 460	15 231 976	-	锌指家族蛋白质

“+”表示基因注释在染色体正链;“-”表示基因注释在染色体负链。

对西瓜 2 号染色体 13 950 306~15 517 591 bp(大约为 1.56 Mb)内的 24 个注释基因进行功能分析和

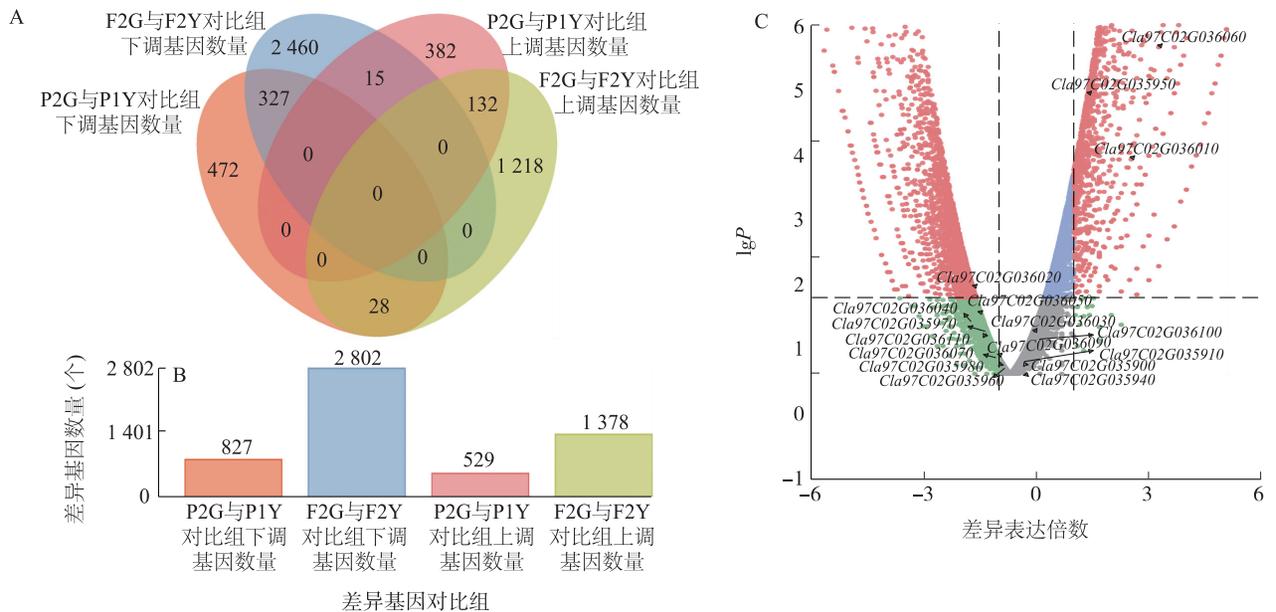
转录组表达差异分析,结果显示,24 个注释基因中有 17 个在植株叶片中表达,仅有基因 *Cla97C02G036060*、



A:BSA 定位结果。B:西瓜 2 号染色体遗传图谱及叶色黄化标记定位。C:根据西瓜参考基因组 97103v2 注释候选区域的基因。SNP index: 单核苷酸多态性指数。

图 2 西瓜叶片黄化基因精细定位

Fig.2 Fine mapping of leaf yellowing genes in watermelon



A:P2G 与 P1Y 对比组及 F2G 与 F2Y 对比组上调和下调基因数量 Venn 图;B:P2G 与 P1Y 对比组及 F2G 与 F2Y 对比组上调和下调基因数量柱形图;C:F2G 与 F2Y 对比组差异基因火山图,标注基因为候选区间基因。P1Y:亲本黄叶;P2G:亲本绿叶;F2G:F₂ 代绿叶;F2Y:F₂ 代黄叶。

图 3 西瓜黄叶与绿叶转录组差异表达基因分析

Fig.3 Analysis of differentially expressed genes in the transcriptome of watermelon yellow leaf and green leaf

Cla97C02G035950、*Cla97C02G036010*、*Cla97C02G036020* 在叶片黄化植株与绿叶植株中的表达存在显著差异, *Cla97C02G036060* 在 P2G 和 F2G 中均显著上调表达(图 3C),其注释功能为 Ycf2 蛋白编码基因,该编码基因为被子植物中最重要的质体基因,与植物光合作用有关。

3 讨论与结论

化学 EMS 诱变是人工创造突变体最常用的处理方式之一,叶片黄化是最常见的诱变表型^[22]。笔者所在课题组前期通过 EMS 诱变西瓜种子,获得稳定遗传的西瓜叶片黄化材料,其整个生育期均可保持黄化状态。植物叶片黄化突变,又称叶绿素缺乏突变,通常是由叶绿素合成或降解途径被破坏所致^[38]。目前,研究者已经在水稻^[39]、番茄^[40]、黄瓜^[19]、拟南芥^[41]等植物中发现了黄化突变体。有研究发现,不同类型的叶色突变的遗传规律差异较大,有些叶色突变可能是核遗传,也可能是细胞质遗传,水稻^[42]、玉米^[43]、小麦^[44]、黄瓜^[45]、番茄^[46]等都由 1 对或 2 对隐性核基因控制。Zhang 等^[21]研究证实,西瓜叶片白化突变是由 1 对隐性等位基因(*jaja*)控制的。Provvidenti^[20]发现,西瓜叶色斑驳突变由 1 对隐性基因(*slv*)控制。Kidanamariam 等^[30,47]发现,西瓜叶色后绿突变是由 1 个隐性基因(*dgdg*)控制的。Zhu 等^[25]研究发现,西瓜黄化突变体 *w-yl* 由 1 对隐性核基因控制,与本研究结果一致。

西瓜作为重要的园艺经济作物^[48-51],在中国的栽培面积和产量均居世界首位。经长期人工选择,栽培西瓜遗传背景狭窄,多态性分子标记开发受限,致使西瓜分子标记辅助育种及品种改良进展缓慢。高密度遗传图谱的构建不仅是开发西瓜重要农艺性状遗传基因/QTL 紧密连锁分子标记的重要手段,亦是深入挖掘和解析西瓜重要农艺性状基因的基础,通过遗传图谱构建进行基因/QTL 定位研究已经在西瓜多种性状研究中得到成熟应用^[52-53]。本研究基于 BSA 定位,将西瓜叶片黄化基因定位于 2 号染色体上,为了进一步获得可靠定位基因,本研究开发了 SNP 标记,用于构建高密度西瓜遗传图谱,并将西瓜叶片黄化基因定位到 2 号染色体 13 950 306~15 517 591 bp(大小约为 1.56 Mb),比对西瓜参考基因组 97103v2 发现,

在候选区段内包含 24 个注释基因,17 个基因在叶片中表达,4 个基因在黄叶与绿叶转录组分析中存在显著差异表达,其中基因 *Cla97C02G036060* 是 Ycf2 蛋白的编码基因,*Ycf2/FtsH* 调控的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸-苹果酸脱氢酶是叶绿体或非光合质体在黑暗中产生腺嘌呤核苷三磷酸的关键酶^[54],是光合生长必需的酶^[55]。目前,*Ycf2* 基因已被证实是被子植物中最重要的质体基因^[56],它在高等植物中发挥着重要功能^[57]。在本研究中,由于双亲重测序深度不高,候选区间注释基因编码区中未发现可靠突变,但转录组结果显示,*Ycf2* 在叶片黄化西瓜材料中的表达量显著下调,说明叶片黄化西瓜材料的光合作用系统可能与正常绿叶植株光合系统存在显著差异,相关机制需要进一步研究。本研究结果可为进一步挖掘叶片黄化植株光合作用机制奠定一定科学基础。

参考文献:

- [1] 陈婷婷,符卫蒙,余景,等. 彩色稻叶片光合特征及其与抗氧化酶活性、花青素含量的关系[J]. 中国农业科学,2022,55(3):467-478.
- [2] 徐明远,何鹏,赖伟,等. 植物叶色变异分子机制研究进展[J]. 分子植物育种,2021,19(10):3448-3455.
- [3] 马道承,王凌晖,梁机. 形态标记在植物中的应用研究进展[J]. 江苏农业科学,2022,50(8):55-62.
- [4] 杨小苗. 番茄 EMS 突变体库的构建及叶色黄化突变体的分析[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2017.
- [5] 刘忠学,张渝竣,刘林,等. 水稻黄绿叶突变体 *yellow-green leaf4* 的表型鉴定及候选基因定位和功能分析[J]. 南京农业大学学报,2022,45(4):627-636.
- [6] 徐薪璐,蔡鸥,秦敏,等. 植物叶色变异研究进展[J/OL]. 分子植物育种:1-8[2022-11-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220517.1326.020.html>.
- [7] ZHANG H T, LI J J, YOO J H, et al. Rice chlorine-1 and chlorine-9 encode ChlD and ChlI subunits of Mg-chelatase, a key enzyme for chlorophyll synthesis and chloroplast development[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 62(3):325-337.
- [8] SUGLIA M, ABDELKEFI H, KE H, et al. An ancient bacterial signaling pathway regulates chloroplast function to influence growth and development in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2016, 28:661-679.
- [9] 李素贞,杨文竹,陈茹梅. 水稻黄绿叶突变体研究进展[J]. 生物技术通报,2018,34(11):15-21.
- [10] 赵绍路,刘凯,宛柏杰,等. 水稻叶色突变研究进展[J]. 大麦与谷类科学,2018,35(6):1-6.
- [11] 张文慧,杨宜豪,陈铭蔚,等. 水稻一新黄绿叶突变体 *ycl10-2* (*t*) 的遗传分析与基因定位[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2019,40(1):1-7.

- [12] 陈桂华,王悦,熊跃东,等. 水稻叶色突变体 *xus* 的基因定位与育种利用[J]. 分子植物育种,2018,16(1):155-162.
- [13] 李秦,杜何为. 玉米叶色突变体研究进展[J]. 南方农业,2019,13(28):14-21,27.
- [14] 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.
- [15] 王萌,赵虎,赵曾菁,等. 辣椒彩色斑叶突变体叶片显微结构及超微结构研究[J]. 西北植物学报,2022,42(4):600-608.
- [16] 赖艳,付秋实,吕建春,等. 一个新的薄皮甜瓜叶色突变体的生理特性及超微结构分析[J]. 四川农业大学学报,2018,36(3):372-379.
- [17] 朱华玉,张凯歌,宋芄垚,等. 甜瓜黄绿叶色性状的遗传分析及其初步定位[J]. 河南农业大学学报,2019,53(6):855-860.
- [18] 陈远良,刘新宇,李树贤. 黄瓜黄绿色叶片颜色遗传规律研究[J]. 北方园艺,2000(5):3-4.
- [19] XIONG L R, DU H, ZHANG K Y, et al. A mutation in *CsYL2.1* encoding a plastid isoform of triose phosphate isomerase leads to *yellow leaf 2.1* (*yl2.1*) in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences,2020,22(1):322.
- [20] PROVVIDENTI R. Inheritance of a partial chlorophyll deficiency in watermelon activated by low temperatures at the seedling stage[J]. Horticulture Science,1994,29(9):1062-1063.
- [21] ZHANG X P, RHODES B B, BAIRD W V, et al. Development of genic male-sterile watermelon lines with delayed-green seedling marker[J]. Horticulture Science,1996,31(1):123-126.
- [22] 侯艳,朱子成,朱娜娜,等. EMS 诱变西瓜突变体库的构建及表型分析[J]. 西北植物学报,2016,36(12):2411-2420.
- [23] 徐铭,高美玲,郭宇,等. 西瓜后绿突变体光合特性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2022,50(3):91-96,106.
- [24] 任艺慈,朱迎春,孙德玺,等. 一个西瓜叶色黄化突变体的生理特性分析[J]. 果树学报,2020,37(4):565-573.
- [25] ZHU Y, YUAN G, WANG Y, et al. Mapping and functional verification of leaf yellowing genes in watermelon during whole growth period[J]. Frontiers in Plant Science,2022,13:1049114.
- [26] GUO S G, ZHANG J G, SUN H H, et al. The draft genome of watermelon (*Citrullus lanatus*) and resequencing of 20 diverse accessions[J]. Nature Genetics,2013,45:51-58.
- [27] GUO S G, ZHAO S J, SUN H H, et al. Resequencing of 414 cultivated and wild watermelon accessions identifies selection for fruit quality traits[J]. Nature Genetics,2019,51(11):1616-1623.
- [28] WU S, WANG X, REDDY U, et al. Genome of 'Charleston Gray', the principal American watermelon cultivar, and genetic characterization of 1 365 accessions in the U.S. National Plant Germplasm System watermelon collection[J]. Plant Biotechnology Journal,2019,17(12):2246-2258.
- [29] LILI M, QING W, YANYAN Z, et al. Cucurbitaceae genome evolution, gene function, and molecular breeding[J]. Horticulture Research,2022,9:uhab057.
- [30] KIDANEMARIAM H G. 西瓜叶色后绿和植株短蔓性状的遗传与分子机制研究[D]. 北京:中国农业科学院,2020.
- [31] 周雨晴,郭宇玲,伊然,等. 基于BSA-Seq的黄瓜重要园艺性状遗传定位研究进展[J/OL]. 分子植物育种:1-12[2023-10-10].http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220704.0904.002.html.
- [32] 张菊平,张长远,张树珍. 苦瓜基因组DNA提取和RAPD分析[J]. 广东农业科学,2002(4):18-20.
- [33] LI H. Aligning sequence reads, clone sequences, and assembly contigs with BWA-MEM[J]. arXiv,2013,1303.3997v2[q-bio.GN]. DOI:10.48550/ARXIV.1303.3997.
- [34] VAN DER AUWERA G A, CARNEIRO M O, HARTL C, et al. From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline[J]. Current Protocols in Bioinformatics,2013,43(1110):1-33.
- [35] CINGOLANI P, PLATTS A, WANG L L, et al. 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.
- [36] STAM P. Construction of integrated genetic linkage maps using a new computer package: JoinMap[J]. The Plant Journal,1993,3(5):739-744.
- [37] KIM D, PAGGI J M, PARK C, et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype[J]. Nature Biotechnology,2019,37(8):907-915.
- [38] 崔慧琳,李志远,方智远,等. 结球甘蓝自交系YL-1的高效遗传转化体系的建立及应用[J]. 园艺学报,2019,46(2):345-355.
- [39] 张天雨,周春雷,刘喜,等. 一个水稻温敏黄化突变体的表型分析和基因定位[J]. 作物学报,2017,43(10):1426-1433.
- [40] 姚建刚,张贺,许向阳,等. 番茄叶色突变体的弱光耐受性研究[J]. 中国蔬菜,2010(4):31-35.
- [41] SUN J L, TIAN Y Y, LIAN Q C, et al. Mutation of DELAYED GREENING impairs chloroplast RNA editing at elevated ambient temperature in *Arabidopsis*[J]. Journal of Genetics and Genomics,2020,47(4):201-212.
- [42] 孙立亭,林添资,王云龙,等. 水稻白条纹突变体st13的表型分析及基因定位[J]. 中国水稻科学,2017,31(4):355-363.
- [43] 王飞,段世名,李彤,等. 玉米叶色突变体遗传分析及基因定位[J]. 植物遗传资源学报,2018,19(6):1205-1209.
- [44] 蒋宏宝. 小麦叶绿素缺失突变体B23的鉴定及基因定位[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2018.
- [45] 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 the magnesium chelatase I subunit[J]. Theoretical and Applied Genetics,2016,129(10):1961-1973.
- [46] 郭丽杰. 番茄杂色叶基因 *vg* 的遗传定位分析[D]. 武汉:华中农业大学,2017.
- [47] RHODES B B. Genes affecting foliage color in watermelon[J].

- Journal of Heredity, 1986, 77(2): 134-135.
- [48] 秦涛,刘新社. 氮钾肥配施对土壤微生物与西瓜形态建成、品质、产量的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(16): 154-161.
- [49] 杨柳,况佳颖,任春梅,等. 江苏省主要葫芦科作物病毒种类及分布[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(1): 65-72.
- [50] 胡晨曦,张甜,陈刚,等. 不同嫁接方式对西瓜幼苗生长和生理的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(1): 139-143.
- [51] 何毅,解华云,陈东奎,等. 设施与露地兼用型优质西瓜新品种桂玲的选育[J]. 南方农业学报, 2023, 54(4): 1216-1223.
- [52] 高美玲,刘小松,刘秀杰,等. 基于GBS高密度遗传图谱初步定位西瓜种皮斑块基因[J]. 分子植物育种, 2022, 20(1): 186-192.
- [53] 李兵兵,刘文革,路绪强,等. 基于全基因组重测序构建西瓜高密度遗传图谱和果实相关性状的基因定位[J]. 中国瓜菜, 2019, 32(8): 164-165.
- [54] KIKUCHI S, ASAKURA Y, IMAI M, et al. A Ycf2-FtsHi heteromeric AAA-ATPase complex is required for chloroplast protein import[J]. Plant Cell, 2018, 30(11): 2677-2703.
- [55] PARKER N, WANG Y X, MEINKE D. Analysis of *Arabidopsis* accessions hypersensitive to a loss of chloroplast translation [J]. Plant Physiology, 2016, 172(3): 1862-1875.
- [56] HUANG J L, SUN G L, ZHANG D M. Molecular evolution and phylogeny of the angiosperm *ycf2* gene [J]. Journal of Systematics and Evolution, 2020, 48(4): 240-248.
- [57] DRESCHER A, RUF S, JR CALSA T, et al. The two largest chloroplast genome-encoded open reading frames of higher plants are essential genes [J]. Plant Journal, 2000, 22(2): 97-104.

(责任编辑:徐 艳)