

番茄叶色基因 *Sllc1* 精细定位及候选基因分析

阮美颖¹, 柴亚倩^{1,2}, 周国治¹, 王荣青¹, 叶青静¹, 万红建¹, 姚祝平¹, 李志邈¹, 程远¹

(¹浙江省农业科学院蔬菜研究所, 杭州 310021; ²石河子大学农学院, 新疆石河子 832003)

摘要: 叶色突变体作为厘清植物叶绿素生物合成及叶绿体发育机制的重要工具, 对于探究植物生长发育进程具有重要意义。本研究以绿色叶片番茄材料 CR11A 和浅黄色叶片番茄材料 CH09-805 为亲本, 通过构建遗传群体明确叶色的遗传规律; 对不同叶色植株开展叶片叶绿体超微结构观测及叶绿素含量测定, 并进一步利用 BSA-Seq 及分子标记进行叶色基因定位, 开展候选基因分析。研究结果表明, F₁ 植株叶片为绿色, F₂ 群体植株叶片出现 12(绿色):3(浅黄色):1(金黄色)的分离比, 说明番茄叶色性状受两对基因控制且存在显性上位效应; 通过叶绿体超微结构观测及叶绿素含量测定, 发现金黄色叶片叶绿体超微结构严重受损, 其叶绿素含量显著低于浅黄色叶片与绿色叶片; 利用 BSA-Seq 及分子标记将番茄叶色基因 *Sllc1* 定位于 7 号染色体 114.53 kb 的物理距离, 候选区间内包括 13 个注释基因, 结合基因注释信息及表达量鉴定, 推测 *Solyc07g053630* 与 *Solyc07g053640* 为 *Sllc1* 的候选基因。本研究获得番茄叶色的候选基因, 为番茄叶色形成分子机制解析奠定重要的材料基础及基因资源。

关键词: 番茄; 叶色; BSA-Seq; 分子标记; 候选基因

Fine-mapping and Candidate Gene Analysis of Tomato Leaf Color Gene *Sllc1*

RUAN Meiyong¹, CHAI Yaqian^{1,2}, ZHOU Guozhi¹, WANG Rongqing¹, YE Qingjing¹, WAN Hongjian¹, YAO Zhuping¹, LI Zhimiao¹, CHENG Yuan¹

(¹Institute of Vegetables, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021; ²College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang)

Abstract: Leaf color mutants are valuable tools for elucidating the mechanisms of chlorophyll biosynthesis and chloroplast development, and they play a significant role in understanding plant growth and development processes. In this study, green-leafed tomato material CR11A and yellow-leafed tomato material CH09-805 were used as parents to construct a genetic population to clarify the genetic rules of leaf color. Leaf chloroplast ultrastructure observation and chlorophyll content determination were performed on plants with different leaf colors. Furthermore, BSA-Seq and molecular marker screening were used for leaf color gene mapping and candidate gene analysis. The results showed that the F₁ plants had green leaves, and the F₂ population exhibited a segregation ratio of 12 (green) : 3 (yellow) : 1 (golden), indicating that tomato leaf color traits are controlled by two pairs of genes with dominant epistasis. Observation of chloroplast ultrastructure and determination of chlorophyll content revealed that the chloroplast ultrastructure of golden yellow leaves was severely damaged, and their chlorophyll content was significantly lower than that of pale yellow and green leaves. Using BSA-Seq

收稿日期: 2024-03-20 网络出版日期: 2024-11-07

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240320004>

第一作者研究方向为茄果类蔬菜新品种选育, E-mail: ruanmy@zaas.ac.cn; 柴亚倩为共同第一作者

通信作者: 程远, 研究方向为番茄、辣椒育种技术, E-mail: chengyuan@zaas.ac.cn

基金项目: 浙江省农业(蔬菜)新品种选育重大科技专项(2021C02065); 国家自然科学基金(32341044); 国家现代农业产业技术体系(CARS-23-G44); 浙江省重点研发计划项目(2024C02003, 2021C02052)

Foundation projects: Zhejiang Province Agricultural (Vegetable) New Varieties Breeding Major Science and Technology Project (2021C02065); National Natural Science Foundation of China (32341044); National Modern Agricultural Industry Technology System (CARS-23-G44); Zhejiang Key Research and Development Project (2024C02003, 2021C02052)

and molecular marker screening, the tomato leaf color gene *Sllc1* was mapped to a 114.53 kb physical distance on chromosome 7. The candidate interval included 13 annotated genes. Based on gene annotation information and expression identification, *Solyc07g053630* and *Solyc07g053640* were identified as candidate genes for *Sllc1*. This study identified candidate genes for tomato leaf color, providing important material and gene resources for elucidating the molecular mechanisms of tomato leaf color formation.

Key words: tomato; leaf color; BSA-Seq; molecular marker; candidate gene

叶片是植物光合作用的主要器官,直接影响光合效率,进而影响植物的生长发育与产量形成^[1]。叶色突变主要是由控制叶绿体发育与光合色素等合成相关基因突变而导致,这些基因的变异将直接或间接影响光合色素的合成与降解^[2]。叶色突变体可作为探讨叶绿体超微结构^[1]、光合色素合成与降解等相关基因表达与调控的重要材料^[3-4];也可用于杂交制种与种子纯度鉴定,降低生产成本^[5]。

目前,园艺作物叶色突变研究已取得较多进展。Su等^[6]利用BSA-Seq和RNA-Seq克隆到4个调控生菜叶色的基因,其中bHLH转录因子突变导致花青素代谢途径被阻断而产生绿色叶片;其他3个基因(*R2R3-MYB*、*R3-MYB*、*WD-40*)突变会促进花青素积累,进而表现出不同的叶片色泽。Zhang等^[7]利用正向遗传学克隆到控制莴苣叶色的基因*LsGLK*,发现其下游CACTA转座子插入导致可变剪切事件的发生,导致浅绿色莴苣的形成。黄瓜中存在一种叶色突变体*SC311Y*,与正常叶片相比,其叶片的叶绿体类囊体片层排列紊乱、数量少且层次不清,其内部有较多空小泡且无明显的淀粉粒;进一步定位到叶色突变基因*Csa3G042730*,推测出该基因可能通过调控叶绿体分裂相关蛋白影响叶绿体发育导致黄瓜黄色真叶形成^[8]。通过大白菜突变体库筛选出一种高光合效率、叶绿素积累及叶色更深的突变体,遗传分析发现该叶色深绿突变性状由单基因控制;结合MutMap明确该叶色突变基因为*BrFC2*,其保守结构域发生单碱基突变(*dBrFC2*),过表达该突变基因则出现叶色深绿表型且血红素和叶绿素含量同时提高^[9]。Liu等^[10]通过对辣椒光敏感突变体*yll*及其野生型6421在不同光照条件下的表型和生化分析,发现光照强度可影响类胡萝卜素生物合成,bHLH71-like转录因子在辣椒叶片黄化过程中发挥正向调控作用。园艺作物叶色突变研究可为深入解析叶色突变分子机制奠定理论基础,为园艺作物的遗传改良与品种选育提供新的策略。

作为园艺作物研究的模式植物,番茄(*Solanum*

lycopersicum)在世界范围内广泛栽培。目前,关于番茄色泽的研究集中于果实、叶脉及叶片。Liu等^[11]研究发现番茄中调控叶绿素合成和叶绿体发育的关键基因*SIRCM1*,该基因编码的蛋白质Lutescent1对番茄果实的叶绿素合成和叶绿体发育起着重要作用。Lu等^[12]综合运用全基因组关联分析和基因定位,锁定一个调控叶脉明暗的主要候选基因*Solyc05g054030*,采用CRISPR/Cas9技术及过表达验证该基因是在番茄叶脉中特异性表达且调控叶脉明暗的关键基因。关于番茄叶色的研究,有研究表明叶绿体结构受损、色素含量降低及低水平的活性氧清除能力是导致番茄叶片黄化突变的主要因素^[1];Song等^[13]鉴定到一个类囊体及光合作用表现缺陷的番茄斑叶突变体,经基因定位、表达量分析及CRISPR/Cas9技术确定vg基因的下调表达是导致番茄杂色叶表型出现的原因,vg在番茄叶绿体发育、叶绿素合成及光合作用中发挥重要作用。

本研究以绿色叶片及浅黄色叶片番茄为试验材料,通过构建遗传群体明确叶色基因的遗传规律;利用叶绿体超微结构观测及叶绿素含量分析明确番茄叶片颜色变异的生理生化机制;利用BSA-Seq及开发的分子标记定位番茄叶色基因,结合基因组注释信息及候选基因变异分析,明确*Sllc1*的候选基因。研究结果为后续基因功能验证及其分子机制解析奠定重要基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

分别以绿色叶片番茄材料CR11A为母本(P_1)、浅黄叶片番茄材料CH09-805为父本(P_2)构建 F_1 及 F_2 群体。将双亲及 F_1 与 F_2 群体于2022年春季种植于浙江省农业科学院杨渡科研创新基地,其中, F_2 群体为415株,株距为40 cm,行距为50 cm,每畦两行种植,采用常规管理方法进行田间管理。

1.2 番茄幼苗叶片叶绿素含量测定

于植株四叶一心期随机取双亲、 F_1 及 F_2 群体(绿色、浅黄色、金黄色)各3株,选取自上而下第3、4片叶

片(去除叶脉),称量约1.0 g于液氮中研磨至匀浆;利用10 mL无水乙醇抽提样品,样品变白后过滤,最终用无水乙醇定容至30 mL;以无水乙醇为空白对照,使用分光光度计在649 nm和655 nm下测定吸光值。

$$\text{叶绿素 a} = 0.03 \times (13.7D_{665} - 5.76D_{649})$$

$$\text{叶绿素 b} = 0.03 \times (25.8D_{649} - 7.6D_{665})$$

$$\text{总叶绿素} = 0.03 \times (\text{叶绿素 a} + \text{叶绿素 b})$$

其中,叶绿素a表示叶绿素a的含量;叶绿素b表示叶绿素b的含量;总叶绿素表示总叶绿素的含量。利用Microsoft Excel 2003进行数据整理,采用R 4.3.1进行数据分析,利用Origin 2023绘图。

1.3 番茄幼苗叶片叶绿体超微结构观测

各取3株四叶一心期 F_2 群体的绿色、浅黄色及金黄色叶片(自上而下第3、4片叶片),用2.5%(v/v)戊二醛溶液固定,0.1mol/L PBS缓冲液冲洗;1.0%(v/v)四氧化钨固定,再次用PBS缓冲液(0.1 mol/L)冲洗;最后乙醇分级脱水,Spurr试剂盒(Electron Microscopy Sciences, USA)进行包埋,70℃环氧树脂聚合。利用Leica UC6超微切片机(Leica, Wetzlar, Germany)切片,室温下,用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色,最后在H7650显微镜(HITACHI, Tokyo, Japan)下观察叶绿体超微结构。

1.4 番茄叶片颜色性状调查与统计

植株四片真叶期,对亲本及 F_2 群体中单株的叶色进行表型数据统计和拍照,经卡方检验,分析 F_2 群体中的叶片颜色分离比。

1.5 集团分离分析法(BSA, bulked segregant analysis)混池构建与测序

采用CTAB法从亲本及 F_2 植株的叶片中提取基因组DNA^[14]。从 F_2 群体中每个表型各取30株构建3个DNA混池,即绿色叶片池(F_2 -N)、浅黄色叶片池(F_2 -Y)和金黄色叶片池(F_2 -G)。取每个样本至少1 μg基因组DNA用于Illumina测序的文库构建。

根据说明使用Illumina TruSeq Nano DNA样品试剂盒(Illumina, San Diego, USA)构建大小约为450 bp DNA片段插入双末端测序文库。利用TBS380(Invitrogen, CA, USA)检测DNA质量,库的测序工作由南京集思慧远生物科技有限公司完成,使用Illumina Novaseq 6000平台进行双端150 bp的测序。

利用Trimmomatic默认参数对原始配对末端读数进行处理和质量控制^[15]。使用BWA软件将高质量的测序读数与番茄参考基因组进行比对^[16]。通过Picard工具去除PCR重复读数后,使用自定义Perl脚本计算测序深度和覆盖率。利用GATK软件对有效的BAM文件进行SNPs和InDels检测^[17]。随后,通过质量过滤生成变式调用格式(VCF)文件,使用VCFtools对VCF文件进行过滤^[18]。利用ANNOVAR对检测到的变异(SNP和InDels)进行注释^[19]。去除小于0.3或大于0.7的两个批量中的SNP-index和InDel-index后,使用自定义perl脚本计算 Δ SNP-index和 Δ InDel-index,并使用R脚本绘制曼哈顿图。使用10 kb滑动窗口,以超过1 Mb为间隔计算SNP-index和InDel-index。

1.6 候选基因的精细定位

1.6.1 SSR引物合成和PCR程序 为进一步缩小定位区间,在初定位区域内开发新的SSR分子标记(表1)。这些SSR分子标记首先在两个亲本池、 F_2 -N、 F_2 -Y和 F_2 -G之间进行筛选,选择具有多态性且呈现共分离的引物,然后对 F_2 群体的浅绿植株及金黄植株进行重组单株筛选。12 μL的PCR反应体系如下:2 μL模板DNA(50 ng/μL)、6 μL Taq 2×PCR Master(浙江易禾基因科技有限公司)、上下游引物(10 μmol/L)各0.5 μL、加灭菌ddH₂O至12 μL。PCR扩增程序:预变性94℃ 4 min;94℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 45 s,35个循环;72℃延伸10 min。

表1 用于定位目的基因的29对SSR引物

Table 1 29 pairs of SSR primers used to map target gene

| 引物名称 Primer name | 位置(bp) Position | 正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3') | 反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3') |
|---------------------|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| SSR-1 | 60456724 | TCAAACGGTTTAGGTCGTCA | AAAAACGCTGTGAAGCTGGCT |
| SSR-168 | 60747214 | TCATTGTGTTGTTCAAATGTCG | CCCAACTTTTACTCGGTCCA |
| SSR-193 | 60777491 | AGAAGTGCACATGGAGTTGC | TCAAATGACTTTCGAAAAATG |
| SSR-209 | 60805234 | CAAATGCGTATGATCCAAGG | GGGGCATATTTGACCCTTTT |
| SSR-250 | 60873273 | TGTTGTTTTTGCTTGCAAGATT | TAGATGTTGAACCCCTTCGC |
| SSR-313 | 60977651 | GGGGGTTCAATTACCCAAGT | TCCATGCTGGTTGCAAATAA |
| SSR-365 | 61048131 | TGGAATATTTATGTAAAGAAGCCCT | TTTTTCGACGATAGAAATCGC |

表 1 (续)

| 引物名称 Primer name | 位置 (bp) Position | 正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3') | 反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3') |
|---------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| SSR-431 | 61267542 | ATTTTGGCCAATGTTTCATCC | TGCAACGAAGATCCAGTTGA |
| SSR-502 | 61902146 | GGTTGAGAAGCAGAGGATGC | GCAGGAACACCAACTCCATT |
| SSR-504 | 61914340 | GGGTATGTCTGTCTTCAGTGCTT | GCATCCATGTGTCCAAAAGA |
| SSR-506 | 61916579 | TGATTGTTGGATGATTTTTGTTG | GAATTTGTGTACCTTAGCTTTGA |
| SSR-511 | 61923026 | GCTAGTTTCGGAGGAGTGGTT | TTTGGCCATATTTTAAATTCC |
| SSR-515 | 61926643 | AAGGTGGTCTGGACCATGAA | TGAAAATTGCAGGTCAATGAG |
| SSR-516 | 61926693 | AAGGTGGTCTGGACCATGAA | TGAAAATTGCAGGTCAATGAG |
| SSR-518 | 61942450 | CGGCACATTCATCCAATA | TTCTCTCTTTTGGCCGCTA |
| SSR-519 | 61947945 | TTGGGTATCTTCCGCTGTT | CCCTGAGCTAGTGGAACTG |
| SSR-524 | 61961804 | TGGCATTGGACCTCTATTCC | GCACAGAAATTCAGCAGCA |
| SSR-527 | 61988034 | TCGTTTCATGTATGCTTGCC | TAAATGAAGCCATCACGAA |
| SSR-530 | 62001178 | AAATGCTTTTTGAAAATTGAACAC | TCATGGTGATTTTGAATCC |
| SSR-532 | 62001486 | GGATTGCAAAATCACCATGA | CAAGAATGCTTTTGAATTTAAGG |
| SSR-538 | 62019471 | TCTCCGAAAAATACAACCACAA | TCTCGGAGAAATCATTGTTGC |
| SSR-547 | 62076329 | TGCCATGTCTTCTTAGCA | AAAAAGCACATCGGCAAACT |
| SSR-553 | 62093075 | CTTGATCTTAACCTTGCGCC | ACGAGAAAGTTTCAGCTGCC |
| SSR-554 | 62104577 | CAACTGCACGGAATTGTACG | AAGATTTCTGGGTCGGGTCT |
| SSR-555 | 62104666 | CAACTGCACGGAATTGTACG | AAGATTTCTGGGTCGGGTCT |
| SSR-557 | 62104795 | AGACCCGACCCAGAAATCTT | AGCTGCTGCTACTGCACCAT |
| SSR-571 | 62151829 | GCTATGAAAGGGACATAGCTGC | AAAAGGTGAGCGTTTCCAGA |
| SSR-602 | 63835056 | ACCAATTGGCACTTGTTCTT | GGGGAAGGGGTGAATTGTAG |
| SSR-603 | 63836393 | TTTAACTGCCAAAGGCCAC | TTGGTTCATCTTCACTCGCT |

1.6.2 非变性聚丙烯凝胶电泳 PCR扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶检测,电泳缓冲液为0.5×TBE,恒定电压300 V,电泳3 h,电泳结束后,先用去离子水清洗一遍凝胶,再用硝酸银溶液染色12 min,去离子水清洗一遍,然后加入氢氧化钠-甲醛溶液显色5 min,去离子水清洗一遍,最后使用保鲜膜包胶,拍照记录,统计条带。所用引物均由北京擎科生物科技有限公司(杭州分公司)合成。

1.6.3 荧光定量PCR(qRT-PCR) 利用Primer6设计候选基因的qRT-PCR特异性引物(表2),由北京擎科生物科技有限公司(杭州分公司)合成。PCR产物长度为150~300 bp,提取植株双亲及F₂各表型叶片的总RNA(天根植物RNA提取试剂盒)并反转

录(天根反转录试剂盒)得到cDNA后利用南京诺唯赞 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (High ROX Premixed)试剂盒与StepOne实时荧光定量PCR系统(ABI, Foster City, CA, USA)进行qRT-PCR,20 μL反应体系如下:2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix为10 μL,上下游引物各0.4 μL,cDNA为1 μL,加灭菌ddH₂O至20 μL。qRT-PCR扩增程序:95 °C预变性1 min;95 °C变性5 s,58 °C退火25 s;72 °C延伸18 s,50个循环;72 °C 10 min。各基因设置3个生物学重复,相对定量的最终值与内参基因Actin对照相比^[20],测试样本中基因表达的倍数变化,采用2^{-ΔΔCT}法分析候选基因的相对表达量。

表 2 qRT-PCR特异性引物序列

Table 2 qRT-PCR specific primer sequence

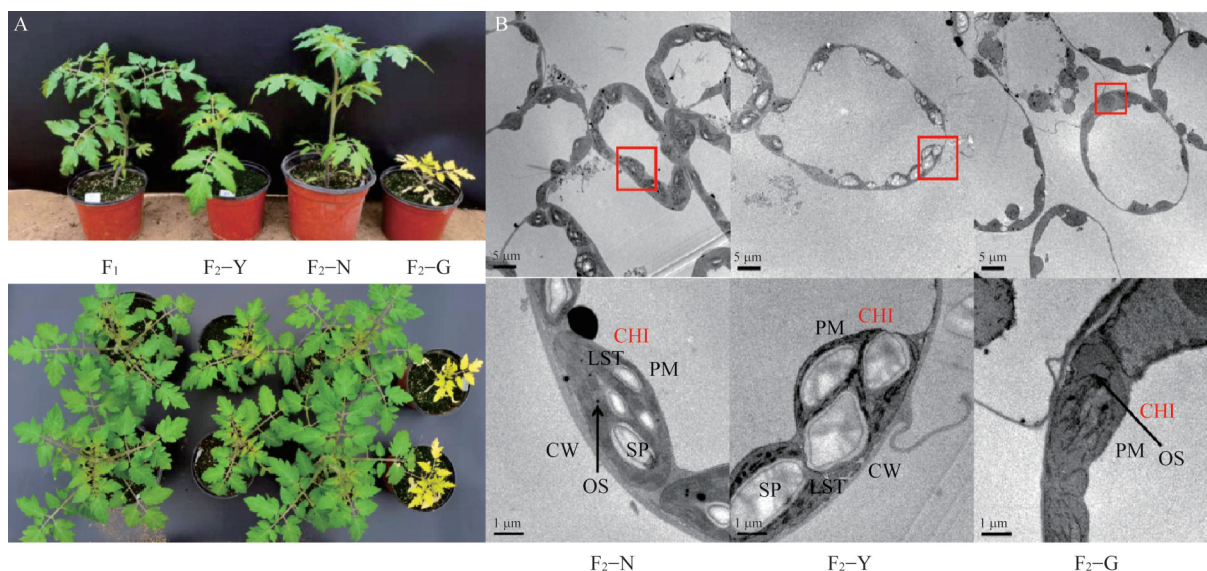
| 基因ID Gene ID | 正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3') | 反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3') |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Solyc07g053630 | GCATACCACCCGTATCGTCCG | GGACATACAGGATGAAAGTCGC |
| Solyc07g053640 | ATTGAAGCACCAGCACCCT | TGTAGGACTCGTCCGTGTTG |
| Solyc02g064700(Actin) | TTGGGAAGGTTCTGGGGACT | ATGGTTTCTGCTGTGTCGT |

2 结果与分析

2.1 幼苗叶片叶绿体超微结构观测

母本与父本的叶片颜色分别是绿色与浅黄色, F_1 的叶片颜色为绿色, F_2 群体中出现 3 种叶片颜色: 绿色、浅黄色与金黄色(图 1A)。对 F_2 群体中的绿

色、浅黄色及金黄色叶片进行叶绿体超微结构观察(图 1B), 发现绿色叶片叶绿体在细胞中最稳定, 其叶绿体数量较多、基粒结构清晰且排列紧密; 浅黄色叶片次之; 金黄色叶片叶绿体体积缩小、片层结构模糊不清、其超微结构严重受损。



F_1 是由 CR11A 与 CH09-805 杂交得到; F_2 -N、 F_2 -Y、 F_2 -G 分别代表 F_2 群体的绿色、浅黄色及金黄色植株; 图 B 中, 红色框内的结构为叶绿体; Chl: 叶绿体; PM: 质膜; CW: 细胞壁; SP: 淀粉粒; LST: 基粒片层; OS: 嗜饿颗粒; 下同

F_1 is a cross between CR11A and CH09-805; F_2 -N, F_2 -Y and F_2 -G were green, light yellow and golden yellow plants obtained from F_2 ; The structure in the red box is chloroplast in figure B; Chl: Chloroplast; PM: Plasma membrane; CW: Cell wall; SP: Starch granules; LST: Grain-based lamella; OS: Hungry granule; The same as below

图 1 F_2 群体中不同叶色的表型(A)与叶绿体超微结构(B)

Fig. 1 Phenotypes(A) and chloroplast ultrastructure(B) of different leaf colors in F_2 population

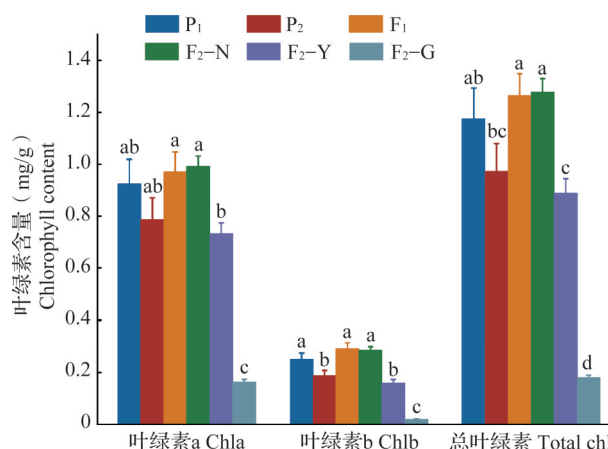
2.2 幼苗叶片叶绿素含量分析

通过测定双亲、 F_1 及 F_2 群体中绿色、浅黄色、金黄色叶片的叶绿素含量, 发现母本 CR11A 叶片的叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量分别为 0.924 mg/g、0.251 mg/g、1.175 mg/g; 父本 CH09-805 叶片的叶绿素 a、叶绿素 b 及总叶绿素含量分别为 0.787 mg/g、0.186 mg/g、1.058 mg/g; 母本叶片的各叶绿素含量分别比父本高 17.41%、34.95% 和 20.76%。 F_2 -N 叶片的叶绿素 a 含量分别比 F_2 -Y 与 F_2 -G 高 35.52%、516.15%; F_2 -N 叶片的叶绿素 b 含量分别比 F_2 -Y 与 F_2 -G 高 81.53%、1483.33%; F_2 -N 叶片的总叶绿素含量分别比 F_2 -Y 与 F_2 -G 高 43.92%、613.97%。 F_2 群体中不同颜色叶片的各叶绿素含量均差异显著, 且 F_2 -N 叶片的各叶绿素含量均与母本及 F_1 叶片的各叶绿素含量差异不显著(图 2)。

2.3 番茄幼苗叶片颜色遗传规律分析

对番茄幼苗叶片颜色表型调查发现, F_1 植株表现为正常绿色, F_2 群体中出现 3 种叶片颜色表型, 有

289 株绿色叶片植株, 100 株浅黄色叶片植株, 26 株金黄色叶片植株, 符合 12:3:1 的孟德尔遗传比例



P_1 表示母本; P_2 表示父本; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); 下同
 P_1 represents the mother; P_2 is the father; Different letters indicated significant difference ($P < 0.05$); The same as below

图 2 双亲及 F_1 与 F_2 群体中不同叶色叶片的叶绿素含量分析
Fig. 2 Chlorophyll content analysis of leaves in both parents and F_1 and F_2 populations with different leaf color

($\chi^2 = 7.92 < \chi^2_{0.01} = 9.21$)(表3)。表明番茄叶色性状受两对基因控制且存在显性上位效应,将两对基因

分别命名为 *Leaf color 1 (Sl1c1)* 和 *Leaf color 2 (Sl1c2)*。

表3 番茄叶片颜色性状的遗传分析

Table 3 Genetic analysis of tomato leaf color trait

| 群体 Population | 总株数 Total individuals | 绿叶株数 Individuals of green leaf | 浅黄叶株数 Individuals of yellow leaf | 金黄叶株数 Individuals of gold leaf | 预期比例 Expected ratio | χ^2 |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------|
| P ₁ (CR11A) | 30 | 30 | 0 | 0 | - | - |
| P ₂ (CH09-805) | 30 | 0 | 30 | 0 | - | - |
| F ₁ | 30 | 30 | 0 | 0 | - | - |
| F ₂ | 415 | 289 | 100 | 26 | 12:3:1 | 7.92 |

--:无数据;下同

--:No data; The same as below

2.4 测序质量评估与分析

对双亲进行测序,父母本 Clean reads 总数分别为 76717111 和 80366369;总碱基数分别为 23015133300 bp 和 24109910700 bp,平均测序深度分别为 27.40× 和 30.06×,基因组比对率≥93.31%(表4)。

对 F₂-N、F₂-Y 与 F₂-G 进行 BSA-Seq 测序, Clean

reads 总数在 42841416~114339444;各混池总碱基数为 12852424800~34301833200 bp,平均测序深度为 16.08×~42.59×,基因组比对率≥88.64%(表4)。说明所有样本测序质量合格,数据比对率高,有利于后续的变异检验及性状的基因定位。

表4 BSA-Seq 测序结果

Table 4 Results of BSA-Seq

| 样本 Samples | Clean reads 总数 Total number of clean reads | 总碱基数(bp) Total base number | 基因组对比率(%) Genome comparison ratio | 平均测序深度(×) Average sequencing depth |
|---------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| P ₁ (CR11A) | 76717111 | 23015133300 | 96.63 | 27.40 |
| P ₂ (CH09-805) | 80366369 | 24109910700 | 93.31 | 30.06 |
| F ₂ -N | 113292703 | 33987810900 | 97.81 | 42.51 |
| F ₂ -Y | 114339444 | 34301833200 | 97.73 | 42.59 |
| F ₂ -G | 42841416 | 12852424800 | 88.64 | 16.08 |

2.5 SNP 检测与注释

根据测序结果进行 SNP 位点分析,5 个样本中, F₂-N 中 SNP 位点最少,为 4309569 个,亲本 P₂ (CH09-805)中最多,为 4716390 个。5 个样本之间,

同一类型的 SNP 数量和比例大致相当。所有 SNP 变异中,已确定的位置信息包括 15 种类型,其中,位于基因区间的 SNP 位点最多,同义终止密码子突变类型的 SNP 最少(表5)。

表5 变异位点注释统计

Table 5 Statistical of annotation of variation sites

| 序号 No. | 变异位点信息 Variation site information | P ₁ (CR11A) | P ₂ (CH09-805) | F ₂ -N | F ₂ -Y | F ₂ -G |
|-----------|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 基因区间 | 3432243 | 3370798 | 3140542 | 3312463 | 3347080 |
| 2 | 基因上游区域(5 kb 以内) | 566535 | 673378 | 580352 | 624630 | 631286 |
| 3 | 基因下游区域(5 kb 以内) | 351287 | 395065 | 346526 | 370911 | 374632 |
| 4 | 剪切受体突变 | 274 | 298 | 276 | 285 | 282 |
| 5 | 剪切供体突变 | 249 | 269 | 242 | 251 | 261 |
| 6 | 内含子 | 139816 | 162224 | 143664 | 153315 | 153869 |
| 7 | 非同义编码突变 | 39287 | 45912 | 39889 | 42278 | 42619 |

表 5 (续)

| 序号 No. | 变异位点信息 Variation site information | P ₁ (CR11A) | P ₂ (CH09-805) | F ₂ -N | F ₂ -Y | F ₂ -G |
|-----------|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 8 | 同义编码突变 | 24786 | 31571 | 26750 | 28140 | 28422 |
| 9 | 同义终止密码子突变 | 87 | 109 | 91 | 99 | 100 |
| 10 | 起始密码子丢失 | 208 | 235 | 209 | 220 | 223 |
| 11 | 起始密码子获得 | 519 | 684 | 596 | 625 | 652 |
| 12 | 终止密码子丢失 | 344 | 376 | 341 | 356 | 355 |
| 13 | 终止密码子获得 | 1278 | 1326 | 1156 | 1283 | 1276 |
| 14 | 5'非翻译区 | 9977 | 13357 | 11282 | 12122 | 12318 |
| 15 | 3'非翻译区 | 14958 | 20214 | 17152 | 17885 | 18358 |
| 16 | 其他 | 478 | 574 | 501 | 510 | 513 |
| 17 | SNP 总数 | 4582326 | 4716390 | 4309569 | 4565373 | 4612246 |

2.6 BSA-Seq 及开发的分子标记对番茄叶色基因 *Sllc1* 精细定位

利用 F₂ 群体进行 BSA-Seq 测序, 分析 F₂ 群体 3 个混池的 Δ(SNP-index) 值分布, 对控制番茄叶色性状的基因进行定位。通过对 F₂-N 和 F₂-Y 进行分析, 将番茄叶色基因定位于 7 号染色体 60450305~63932942 bp 之间, 物理距离为 3.48 Mb; 通过对 F₂-N 和 F₂-G 进行分析, 将番茄叶色基因定位于 4 号染色体 2434439~2665624 bp 及 7 号染色体 60850272~63026879 bp 之间, 物理距离分别为 0.23 Mb 和 2.18 Mb (图 3A)。共同将番茄叶色基因定位在 7 号染色体 60850272~63026879 bp 之间, 物理距离为 2.18 Mb, 本研究对该定位区域进行进一步分析。

以亲本、F₁、F₂ (绿色、浅黄色、金黄色) 叶片的 DNA 为模板, 选取初定位区域进行 SSR 分子标记多态性筛选, 获得 29 对扩增效果好且呈现共分离的 SSR 分子标记 (表 1)。经重组单株的统计分析, 将叶色基因定位于 7 号染色体 SSR-502~SSR-571 (61902146~62151829 bp), 物理距离为 249.68 kb 的候选区间内 (图 3B); 进一步进行 SSR 筛选, 获得 16 对共分离 SSR 分子标记 (表 1), 对重组单株统计分析发现, 番茄叶色候选区间缩小至 SSR-524 与 SSR-547 之间, 标记位置为分别 61961804 bp 和 62076329 bp, 区间大小为 114.53 kb (图 3C)。

2.7 候选基因分析

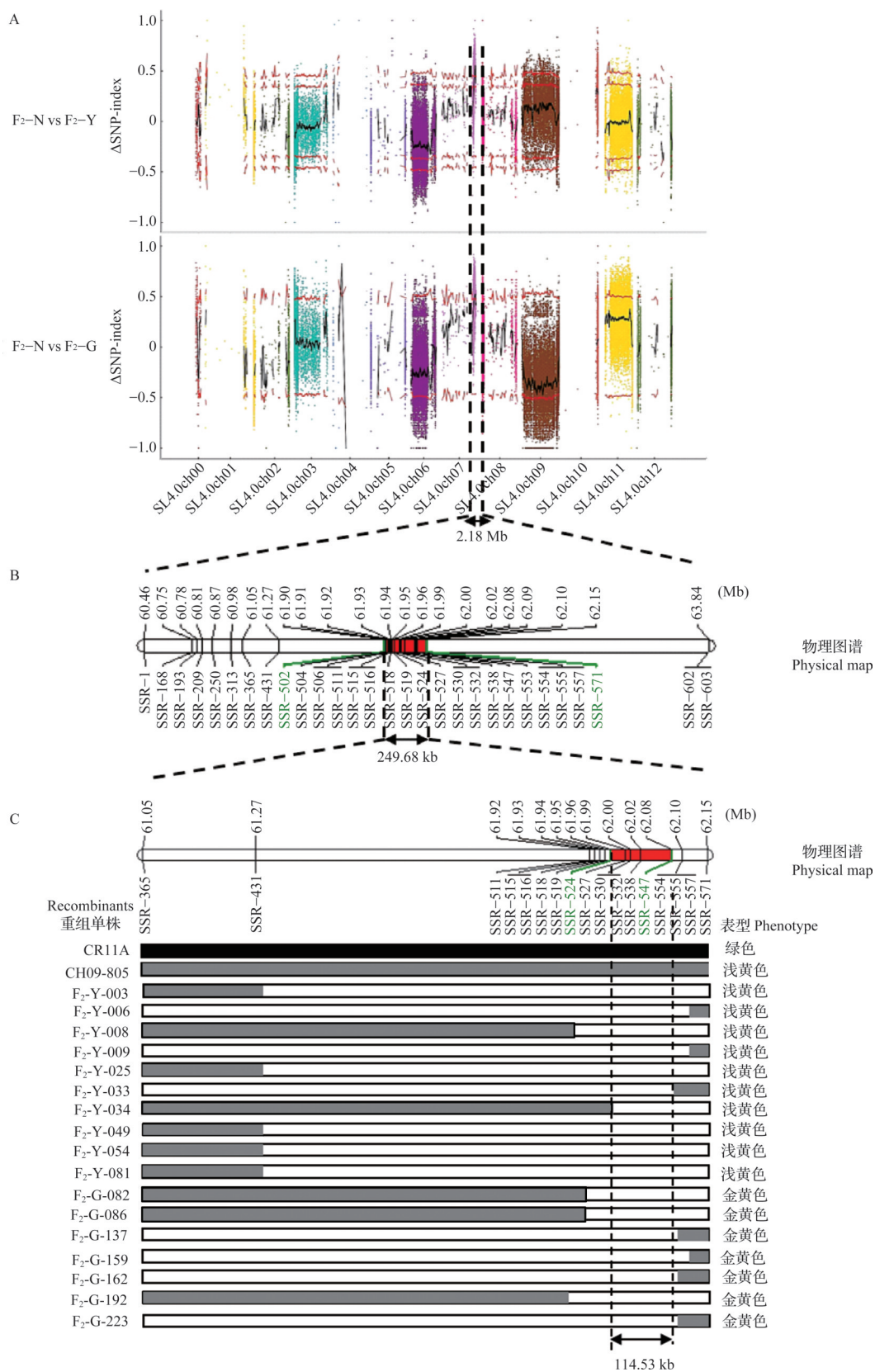
番茄基因组注释及全基因组测序数据表明 114.53 kb 的候选区间内共有 13 个基因, 包括 *Solyc07g053610* (编码含 homeobox-DDT 结构域的蛋白)、*Solyc07g053620* (编码类 DnaJ 蛋白)、*Solyc07g053630* (编码类 Golden1 蛋白)、*Solyc07g053640* (编码含 GATA 锌指结构域的

类蛋白 14)、*Solyc07g053650* (编码 26S 蛋白酶非 ATP 酶调节亚基 2 同源体 A)、*Solyc07g053660* (编码 DDB1 和 CUL4 相关因子 13 DDB1-and CUL4-associated factor 13)、*Solyc07g053670* (编码蛋白质核融合缺陷 6, 类叶绿体/线粒体异构体)、*Solyc07g053680* (编码含 NAC 结构域类蛋白 78)、*Solyc07g053690* (编码未特征化蛋白 At4g28440)、*Solyc07g053700* (编码网状体样蛋白 B17)、*Solyc07g053710* (编码类酪氨酸氨基转移酶)、*Solyc07g053720* (编码类 S-烷基硫代羧胺裂解酶) 及 *Solyc07g053730* (编码类核仁 GTP 结合蛋白) (表 6)。

候选区间内, *Solyc07g053640*、*Solyc07g053700*、*Solyc07g053710*、*Solyc07g053720* 发生非同义突变; *Solyc07g053630*、*Solyc07g053640*、*Solyc07g053700* 及 *Solyc07g053710* 发生同义突变; 变异发生在内含子区域的基因有: *Solyc07g053610*、*Solyc07g053630* 及 *Solyc07g053650*; 变异发生在基因上下游的基因有: *Solyc07g053620*、*Solyc07g053680*、*Solyc07g053690* 及 *Solyc07g053730*; 此外, *Solyc07g053660* 的变异发生在 3'非翻译区 (表 6)。结合基因注释信息及基因变异信息, 预测 *Solyc07g053630* 和 *Solyc07g053640* 为 *Sllc1* 的候选基因。

2.8 候选基因表达量分析

通过检测 *Solyc07g053630* 和 *Solyc07g053640* 在双亲及 F₂ 不同叶色植株中的表达量, 发现 *Solyc07g053630* 和 *Solyc07g053640* 在 P₁ 与 F₂ 的绿叶中的表达量均显著高于 P₂ 及 F₂ 的黄色与金黄色叶片, 2 个基因在 F₂ 的金黄色叶片中的表达量也显著低于 P₂ 与 F₂ 的浅黄色叶片。表明 *Solyc07g053630* 和 *Solyc07g053640* 均可能参与调控番茄叶片叶绿素合成或叶绿体发育过程。



A: *SlIc* 基因座的 BSA-seq 图谱; B, C: *SlIc* 基因座连锁图谱与精细定位; 绿色分子标记表示在该区间内可能存在 *SlIc* 基因

A: BSA-seq mapping of the *SlIc* locus; B, C: Linkage mapping of the *SlIc* locus and fine-mapping; The green molecular marker indicates that the *SlIc* gene may be present in this region

图3 利用BSA-Seq及分子标记多态性筛选对*SlIc1*精细定位

Fig. 3 Fine-mapping of *SlIc1* using BSA-Seq and molecular maker polymorphism screening

表 6 候选区间内基因的变异信息

Table 6 Variation information of genes in the candidate interval

| 基因 ID Gene ID | 位置 (bp) Position | 影响 Effects | 编码改变 Code-change | 注释 Annotation |
|-----------------------|---------------------|---------------|---------------------|-------------------------------|
| <i>Solyc07g053610</i> | 61961804 | 内含子 | EXON_ID=2 | 编码含 homeobox-DDT 结构域的蛋白 |
| <i>Solyc07g053610</i> | 61963709 | 内含子 | EXON_ID=2 | 编码含 homeobox-DDT 结构域的蛋白 |
| <i>Solyc07g053620</i> | - | 上游 | - | 编码类 DnaJ 蛋白 |
| <i>Solyc07g053630</i> | 61989906 | 内含子 | EXON_ID=5 | 编码类 Golden1 蛋白 |
| <i>Solyc07g053630</i> | 61990098 | 同义密码子编码 | taC/taT | 编码类 Golden1 蛋白 |
| <i>Solyc07g053640</i> | 62019388 | 非同义密码子编码 | Gtt/Ttt | 编码含 GATA 锌指结构域的一类蛋白 14 |
| <i>Solyc07g053640</i> | 62019396 | 同义密码子编码 | tcC/tcT | 编码含 GATA 锌指结构域的一类蛋白 14 |
| <i>Solyc07g053640</i> | 62019487 | 非同义密码子编码 | Gac/Aac | 编码含 GATA 锌指结构域的一类蛋白 14 |
| <i>Solyc07g053650</i> | 62028142 | 内含子 | EXON_ID=11 | 编码 26S 蛋白酶非 ATP 酶调节亚基 2 同源体 A |
| <i>Solyc07g053660</i> | 62040708 | 3'非翻译区 | - | 编码 DDB1 和 CUL4 相关因子 13 |
| <i>Solyc07g053670</i> | - | - | - | 编码蛋白质核融合缺陷 6, 类叶绿体/线粒体异构体 |
| <i>Solyc07g053680</i> | - | 上游 | - | 编码含 NAC 结构域的一类蛋白 78 |
| <i>Solyc07g053690</i> | - | 上游 | - | 编码未特征化蛋白 At4g28440 |
| <i>Solyc07g053700</i> | 62059249 | 同义密码子编码 | ctC/ctT | 编码网状体样蛋白 B17 |
| <i>Solyc07g053700</i> | 62059258 | 同义密码子编码 | gcT/gcC | 编码网状体样蛋白 B17 |
| <i>Solyc07g053700</i> | 62059262 | 非同义密码子编码 | aTt/aCt | 编码网状体样蛋白 B17 |
| <i>Solyc07g053710</i> | 62062266 | 非同义密码子编码 | Ttt/Att | 编码类酪氨酸氨基转移酶 |
| <i>Solyc07g053710</i> | 62063462 | 同义密码子编码 | ttG/ttA | 编码类酪氨酸氨基转移酶 |
| <i>Solyc07g053710</i> | 62064520 | 非同义密码子编码 | Aaa/Gaa | 编码类酪氨酸氨基转移酶 |
| <i>Solyc07g053720</i> | 62069951 | 非同义密码子编码 | cTg/cGg | 编码类 S-烷基硫代羟胺裂解酶 |
| <i>Solyc07g053730</i> | - | 上游 | - | 编码类核仁 GTP 结合蛋白 |
| <i>Solyc07g053730</i> | - | 下游 | - | 编码类核仁 GTP 结合蛋白 |

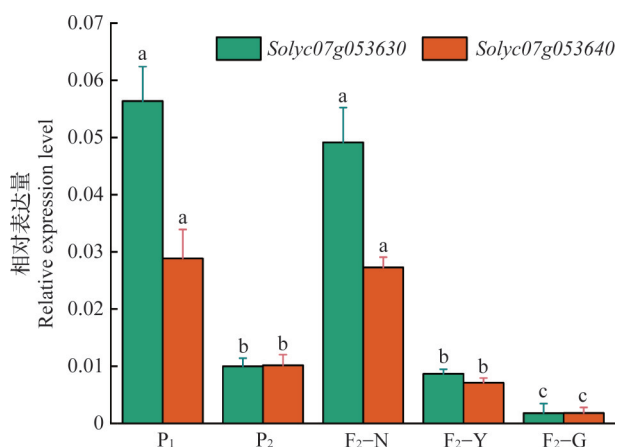


图 4 *Solyc07g053630* 和 *Solyc07g053640* 在双亲与 F₂ 群体叶片中的相对表达量鉴定
 Fig. 4 Identification of *Solyc07g053630* and *Solyc07g053640* relative expression levels in leaves of both parents and F₂ population

3 讨论

叶片是作物进行光合作用的重要组织器官,为植物生长发育提供营养基础与能量保障。叶片颜色等性状与作物光合作用效率直接相关,进而影响作物产量形成^[21]。叶绿体是植物光合作用的主要场所^[22],其结构、数量及叶绿素含量均与叶片颜色相关^[23]。研究发现,叶片黄化导致甜瓜叶绿体发育异常,使其光合色素含量及比例均发生变化^[24]。本研究对F₂不同颜色的叶片进行细胞学观测与叶绿素含量测定,发现金黄色叶片的叶绿体超微结构严重受损,而绿色叶片中叶绿体数量最多、基粒结构清晰且排列紧密;此外,金黄色叶片叶绿素含量也显著低于绿色叶片。据此看出,番茄黄化突变体形成可能是其叶绿体数目及其基粒片层结构等发育异常,进而使叶绿素合成受阻所致^[5]。

近年来,植物叶色性状的遗传模式受到大量研究者的广泛关注。叶色突变相关基因纷繁复杂,可能与细胞核基因有关,也可能与细胞质基因有关,其突变体有单基因控制的,也有多基因控制的,控制叶色突变体材料不同,遗传模式也存在差异^[5]。诸多研究提出控制番茄叶色突变的基因属于单基因隐性遗传^[25-27]。但本研究采用绿色叶片番茄材料CR11A为母本,浅黄色叶片番茄材料CH09-805为父本,构建F₁及F₂群体。F₂群体叶片颜色符合12:3:1的孟德尔遗传比例,初步证明番茄叶色遗传符合两个基因的显性上位互作模型。

GLK转录因子是植物中的一类重要调控蛋白,在叶绿体发育及叶绿素合成中起重要作用。GLK转录因子直接参与调控与光合作用相关基因的表达,缺乏或功能失活的GLK基因会导致叶绿体发育受损,叶绿素含量减少,光合作用效率下降,从而影响植物的生长发育^[27]。目前已在拟南芥^[28]、水稻^[29]、小麦^[30]及白桦树^[31]等植物中发现GLK参与作物叶绿体发育及叶绿素合成过程。本研究番茄叶色基因定位候选区间内也存在1个GLK基因: *Solyc07g053630*,该基因编码类Golden1蛋白,变异发生在内含子区域(EXON_ID=5)。该变异可能通过影响mRNA的加工、稳定性和运输等多个层面间接影响类Golden1蛋白的合成、结构和功能。

锌指在植物各组织的叶绿素代谢和叶绿体形态建成中扮演重要角色^[32]。研究发现番茄*OBV*基因的突变会引起叶脉变暗,该基因负责编码含C₂H₂锌指结构域的转录因子,在调控叶绿体的发育及光

合作用过程中起着至关重要的作用^[12]。通过对黄瓜绿色叶片与黄色叶片进行RNA-Seq分析发现,大多GATA(锌指同源结构域转录因子家族)在绿色叶片中上调表达,其中8个GATA基因在绿叶与黄叶间差异表达,推测它们与黄瓜叶片叶绿素合成有关^[33]。此外,在辣椒^[34]、拟南芥^[35]及西瓜^[36]等作物上也发现锌指参与调控植物叶绿素合成及叶绿体发育等生理过程。本研究中,*Solyc07g053640*即为编码含GATA锌指结构域类蛋白14的基因,可发生非同义突变(Gac/Aac)。

结合定位区间内基因组注释信息、表达量鉴定及相关文献报道,进一步将*Solyc07g053630*与*Solyc07g053640*预测为番茄叶色突变的候选基因,但后续仍需通过基因功能验证进一步确定其功能与调控机制。

参考文献

- [1] Cheng M Z, Meng F Y, Mo F L, Chen X L, Zhang H, Wang A X. Insights into the molecular basis of a yellow leaf color mutant (*ym*) in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Scientia Horticulturae*, 2022, 293: 110743
- [2] Lin N, Gao Y M, Zhou Q Y, Ping X K, Li J N, Liu L Z, Yin J M. Genetic mapping and physiological analysis of chlorophyll-deficient mutant in *Brassica napus* L.. *BMC Plant Biology*, 2022, 22(1): 244
- [3] Rong H, Tang Y Y, Zhang H, Wu P Z, Chen Y P, Li M R, Wu G J, Jiang H W. The Stay-Green Rice like (*SGRL*) gene regulates chlorophyll degradation in rice. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(15): 1367-1373
- [4] Zhao L, Yang Y L, Hu P Y, Qiao Q, Lv G G, Li J Q, Liu L, Wei J J, Dong Z D, Chen F. Genetic mapping and analysis of candidate leaf color genes in common winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*, 2023, 43(6): 48
- [5] 赖艳. 甜瓜叶色突变体的生理特性、遗传分析与基因初步定位. 成都: 四川农业大学, 2018
Lai Y. Physiological characteristics, genetic analysis and preliminary gene localization of melon leaf color mutants. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2018
- [6] Su W Q, Tao R, Liu W Y, Yu C C, Yue Z, He S P, Lavelle D, Zhang W Y, Zhang L, An G H, Zhang Y, Hu Q, Larkin R M, Michelmore R W, Kuang H H, Chen J J. Characterization of four polymorphic genes controlling red leaf colour in lettuce that have undergone disruptive selection since domestication. *Plant Biotechnology Journal*, 2020, 18(2): 479-490
- [7] Zhang L, Qian J L, Han Y T, Jia Y, Kuang H H, Chen J J. Alternative splicing triggered by the insertion of a CACTA transposon attenuates *LsGLK* and leads to the development of pale-green leaves in lettuce. *The Plant Journal*, 2022, 109(1):

- 182-195
- [8] Zhang T T, Dong X Y, Yuan X, Hong Y Y, Zhang L L, Zhang X, Chen S X. Identification and characterization of *CsSRP43*, a major gene controlling leaf yellowing in cucumber. *Horticulture Research*, 2022, 9:uhac212
- [9] Liu M Y, Ma W, Su X J, Zhang X M, Lu Y, Zhang S W, Yan J H, Feng D L, Ma L S, Taylor A, Ge Y J, Cheng Q, Xu K D, Wang Y H, Li N, Gu A X, Zhang J, Luo S X, Xuan S X, Chen X P, Scrutton N S, Li C W, Zhao J J, Shen S X. Mutation in a chlorophyll-binding motif of Brassica ferrochelatase enhances both heme and chlorophyll biosynthesis. *Cell Reports*, 2022, 41(10):111758
- [10] Liu Z B, Mao L Z, Yang B Z, Cui Q Z, Dai Y H, Li X Q, Chen Y S, Dai X Z, Zou X X, Ou L J, Yang S. A multi-omics approach identifies bHLH71-like as a positive regulator of yellowing leaf pepper mutants exposed to high-intensity light. *Horticulture Research*, 2023, 10(7):uhad098
- [11] Liu G Z, Yu H Y, Yuan L, Li C X, Ye J, Chen W F, Wang Y, Ge P F, Zhang J H, Ye Z B, Zhang Y Y. *SIRCM1*, which encodes tomato *Lutescent1*, is required for chlorophyll synthesis and chloroplast development in fruits. *Horticulture Research*, 2021, 8(1):128
- [12] Lu J H, Pan C Y, Li X, Huang Z J, Shu J S, Wang X X, Lu X X, Zhang H, Su W Y, Zhang M, Du Y C, Liu L, Guo Y M, Li J M. OBV (obscure vein), a C2H2 zinc finger transcription factor, positively regulates chloroplast development and bundle sheath extension formation in tomato (*Solanum lycopersicum*) leaf veins. *Horticulture Research*, 2021, 8(1):230
- [13] Song J W, Guo L J, Shang L L, Wang W Q, Yu C Y, Ye Z B, Zhang J H. VG, encoding a thylakoid formation protein, regulates the formation of variegated leaves in tomato. *Horticultural Plant Journal*, 2023, 9(1):98-108
- [14] Saghai-Marooif M A, Soliman K M, Jorgensen R A, Allard R. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81(24):8014-8018
- [15] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30(15):2114-2120
- [16] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 2009, 25(14):1754-1760
- [17] McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Stacey G, Daly M, DePristo M A. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 2010, 20(9):1297-1303
- [18] Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers C A, Banks E, DePristo M A, Handsaker R E, Lunter G, Marth G T, Sherry S T, McVean G, Durbin R. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 2011, 27(15):2156-2158
- [19] Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(16):e164
- [20] 黄少勇. 番茄核雄性不育基因 *ms-7* 的定位与功能分析. 乌鲁木齐:新疆农业大学, 2023
- Huang S Y. The mapping and functional analysis of genic male sterility *ms-7* in tomato. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2023
- [21] 宋丽华. 番茄黄叶基因 NV 的遗传定位及生理特性研究. 北京:中国农业科学院, 2016
- Song L H. Genetic localization and physiological characteristics of NV gene in tomato yellow leaves. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016
- [22] Zhang K J, Li Y, Zhu W W, Wei Y F, Njogu M K, Lou Q F, Li J, Chen J F. Fine mapping and transcriptome analysis of virescent leaf gene *v-2* in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11:570817
- [23] Miao H, Zhang S P, Wang M, Wang Y, Weng Y Q, Gu X F. Fine mapping of virescent leaf gene *v-1* in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(10):1602
- [24] 邵勤, 于泽源, 李兴国, 李为, 高艳娟. 叶色黄化突变体甜瓜叶片内部生理生化变化的研究. *中国蔬菜*, 2013(14):59-65
- Shao Q, Yu Z Y, Li X G, Li W, Gao Y J. Study on physiological and biochemical changes in leaf of muskmelon with yellowing mutant. *Chinese Vegetables*, 2013(14):59-65
- [25] 程漠桢. 番茄黄化突变体 *ym* 的黄化迟熟机制与关键基因 *Shym1* 鉴定. 黑龙江:东北农业大学, 2021
- Cheng M Z. Mechanism of yellowing late ripening and identification of key gene *Shym1* of tomato yellowing mutant *ym*. Heilongjiang: Northeast Agricultural University, 2021
- [26] 邹滔. 番茄苗期黄化突变体 *lmy1* 的表型鉴定与遗传分析. 杭州:浙江大学, 2021
- Zou T. Phenotypic identification and genetic analysis of tomato yellow mutant *lmy1* in seedling stage. Hangzhou: Zhejiang University, 2021
- [27] 张添棋. 番茄叶色突变体资源创制及基因定位. 上海:华东师范大学, 2022
- Zhang T Q. Resource creation and gene localization of tomato leaf color mutants. Shanghai: East China Normal University, 2022
- [28] Zhang D, Tan W, Yang F, Han Q, Deng X, Guo H, Lin H. A BIN2-GLK1 signaling module integrates brassinosteroid and light signaling to repress chloroplast development in the dark. *Developmental Cell*, 2021, 56(3):310-324
- [29] Zhang C, Zhang J X, Tang Y J, Liu K W, Liu Y, Tang J Q, Zhang T, Yu H X. DEEP GREEN PANICLE1 suppresses GOLDEN2-LIKE activity to reduce chlorophyll synthesis in rice glumes. *Plant Physiology*, 2021, 185(2):469-477
- [30] Yeh S Y, Lin H H, Chang Y M, Chang Y L, Chang C K, Huang Y C, Ho Y W, Lin C Y, Zheng J Z, Jane W N, Ng C

- Y, Lu M Y, Lai I L, To K Y, Li W H, Ku M S. Maize Golden2-like transcription factors boost rice chloroplast development, photosynthesis, and grain yield. *Plant Physiology*, 2022, 188(1): 442-459
- [31] Gang H, Li R, Zhao Y, Liu G, Chen S, Jiang J. Loss of GLK1 transcription factor function reveals new insights in chlorophyll biosynthesis and chloroplast development. *Journal of Experimental Botany*, 2019, 70(12):3125-3138
- [32] Schwechheimer C, Schröder P M, Blaby-Haas C E. Plant GATA factors: Their biology, phylogeny, and phylogenomics. *Annual Review of Plant Biology*, 2022, 73: 123-148
- [33] Zhang K J, Jia L, Yang D K, Hu Y C, Njogu M K, Wang P Q, Lu X M, Yan C S. Genome-wide identification, phylogenetic and expression pattern analysis of gata family genes in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plants*, 2021, 10(8): 1626
- [34] Borovsky Y, Monsonego N, Mohan V, Shabtai S, Kamara I, Faigenboim A, Hill T, Chen S Y, Stoffel K, Deynze A V, Paran I. The zinc-finger transcription factor CcLOL1 controls chloroplast development and immature pepper fruit color in *Capsicum chinense* and its function is conserved in tomato. *The Plant Journal*, 2019, 99(1):41-55
- [35] Zhang C J, Huang Y, Xiao Z Y, Yang H L, Hao Q N, Yuan S L, Chen H F, Chen L M, Chen S L, Zhou X N, Huang W J. A GATA transcription factor from soybean (*Glycine max*) regulates chlorophyll biosynthesis and suppresses growth in the transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plants*, 2020, 9(8):1036
- [36] Liu S, Gao Z Q, Wang X Z, Luan F S, Dai Z Y, Yang Z Z, Zhang, Q. Nucleotide variation in the phytoene synthase (CIPs1) gene contributes to golden flesh in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2022, 135:185-200