

网络出版时间:2020-11-26 09:11 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2021.05.011
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20201125.1135.008.html

长期施用马铃薯淀粉加工废水后土壤的 氮磷累积与分配特征

赵博超¹, 窦广玉¹, 王雪婷¹, 苑喜男¹, 朱克松¹, 刘刚², 王天宁³, 潘涔轩¹

(1 中国环境科学研究院, 北京 100012; 2 中国科学院 兰州化学物理研究所, 甘肃 兰州 730000;
3 宁夏农林科学院, 宁夏 银川 750000)

【摘要】【目的】研究长期施用马铃薯淀粉加工废水土壤的氮磷累积与分配特征, 为指导马铃薯淀粉加工废水科学还田提供依据。【方法】测定马铃薯淀粉加工废水中全氮、全磷和总有机碳含量, 并依据农田中废水施用量计算氮、磷和有机碳的年均投入量。采集连续施用 8 年马铃薯淀粉加工废水地块(还田地块)和未施用废水地块(对照地块)的土壤样品, 分析其垂直剖面水解氮、硝态氮、有效磷累积与分配特征及氮磷淋失风险。【结果】还田地块随马铃薯淀粉加工废水年均施入的氮(以 N 计)、磷(以 P_2O_5 计)分别高达 2 823 和 708 kg/hm², 分别是对照地块氮、磷投入量的 10.8 和 4.1 倍; 还田地块随马铃薯淀粉加工废水年均施入的总有机碳为 14.04 t/hm², 对照地块未投入有机碳。长期施用马铃薯淀粉加工废水后, 还田地块 0~250 cm 土层土壤水解氮、硝态氮、有效磷含量分别为 48.9~140.0, 37.6~53.0 和 0.8~35.4 mg/kg, 极显著高于对照地块的水解氮(10.8~73.2 mg/kg)、硝态氮(1.82~7.34 mg/kg)及有效磷(0.2~22.2 mg/kg)含量。还田地块和对照地块水解氮含量均随土壤剖面深度增加呈近似线性下降趋势; 还田地块土壤硝态氮和有效磷含量随土壤剖面深度增加呈缓慢下降趋势, 而对照地块土壤硝态氮和有效磷含量急剧下降至 40~60 cm 土层后缓慢下降。相比 0~20 cm 土层, 还田地块 200~250 cm 土层中水解氮、硝态氮和有效磷含量降幅分别为 65.07%, 29.06% 和 97.74%, 对照地块分别为 85.24%, 75.20% 和 99.10%。【结论】在宁夏固原气候条件下, 长期、大量施用马铃薯淀粉加工废水后, 农田土壤氮、磷淋失风险仍较小, 但造成了水、肥资源的严重浪费, 应根据《测土配方施肥技术规程》科学确定废水还田总量, 避免造成废水养分浪费及环境污染风险。

【关键词】食品加工废水; 废水还田; 氮磷累积与分配; 氮磷淋失; 农田土壤

【中图分类号】S273.5

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2021)05-0081-07

Accumulation and distribution of nitrogen and phosphorus in soil with long-term application of potato starch processing wastewater

ZHAO Bochao¹, DOU Guangyu¹, WANG Xueting¹, YUAN Xinan¹, ZHU Kesong¹,
LIU Gang², WANG Tianning³, Pan Cenxuan¹

(1 Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China;

2 Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou, Gansu 730000, China;

3 Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750000, China)

Abstract: 【Objective】This paper studied the accumulation and distribution characteristics of nitrogen and phosphorus in soil with long-term application of potato starch processing wastewater to provide basis for scientific return of potato starch processing wastewater to field. 【Method】Total nitrogen, total phosphorus and total organic carbon contents in potato starch processing wastewater were determined and aver-

【收稿日期】2020-05-26

【基金项目】国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017-ZX07602-001-005)

【作者简介】赵博超(1987—), 男, 黑龙江青冈人, 工程师, 硕士, 主要从事废弃物资源化利用研究。E-mail: phdzb0814@163.com

【通信作者】潘涔轩(1964—), 男, 重庆涪陵人, 研究员, 博士, 主要从事清洁生产技术与政策研究。E-mail: pancenx@sina.com

age annual inputs of nitrogen,phosphorus and organic carbon based on amount of wastewater applied in farmland were calculated. Soil samples from 8-year potato starch processing wastewater farmland (application) and non-application farmland (non-application) were collected to analyze vertical profiles of hydrolyzed nitrogen,nitrate nitrogen and available phosphorus accumulation,distribution characteristics and leaching risk of nitrogen and phosphorus. 【Result】 Nitrogen and phosphorus applied to farmland with wastewater were up to 2 823 and 708 kg/hm² per year,which were 10.8 and 4.1 times of the inputs to non-application farmland,respectively. The total organic carbon applied to farmland from wastewater was 14.04 t/hm² per year,while the control group had no organic carbon input. After long-term application,contents of hydrolyzed nitrogen,nitrate nitrogen and available phosphorus in 0—250 cm soil layer were 48.9 to 140.0,37.6 to 53.0 and 0.8 to 35.4 mg/kg,which were significantly higher than those of 10.8—73.2,1.82—7.34 and 0.2—22.2 mg/kg in non-application farmlands. The content of hydrolyzed nitrogen decreased linearly with the increase of soil depth in both application farmland and control farmland. The nitrate nitrogen and available phosphorus contents slowly decreased with the increase of soil depth in application farmland,while in control farmland it sharply decreased from surface to the layer of 40—60 cm and then decreased slowly. Compared with the 0—20 cm soil layer,contents of hydrolyzed nitrogen,nitrate nitrogen and available phosphorus in 200—250 cm soil layer of application farmland decreased by 65.07%,29.06% and 97.74%,while those of the control farmland were decreased by 85.24%,75.20% and 99.10%,respectively. 【Conclusion】 Under the local climatic conditions of Guyuan,Ningxia,the risk of nitrogen and phosphorus leaching from farmland was small after long-term application of potato starch processing wastewater,but it caused serious waste of water and fertilizers. The application of potato starch processing wastewater to field should be scientifically determined according to “Regulations for soil testing and formulated fertilization” to avoid waste of nutrients in wastewater and environmental pollution risks.

Key words: food processing wastewater;waste water return;N and P accumulation and distribution;N and P leaching;farmland soil

农业是人类衣食之源、生存之本。但是近年来,农业面源污染成为环境污染的重要来源,污染贡献率逐年增加,已成为制约农业可持续发展和实现农村现代化的主要瓶颈。氮磷淋失作为农业面源污染的一种重要形式,越来越受到国内外学者的关注。研究表明,化肥的不合理投入是造成氮磷淋失污染的主要原因^[1-3]。此外,肥料品类也是影响氮磷淋失规律的主要因素^[4-6]。有研究表明,施用有机肥或有机肥与化肥配施,可以显著降低农田中的氮磷淋失量^[7-10],同时改善土壤结构,增加土壤生物量,协调土壤中的水、肥、气、热,提高土壤肥力^[11-13];但过量施用同样存在土壤氮、磷淋失,以及随地表径流污染地表水和地下水的环境风险^[14-16]。

马铃薯淀粉加工废水产生于马铃薯原料清洗过程、马铃薯淀粉与细胞汁水分离过程及清洗过程,是一种富含小颗粒淀粉、多糖、蛋白、磷、钾等的有机废水^[17]。美国加州食品加工商联盟 2006 年出版的《食品加工/冲洗用水的土地处理操作手册》(Manual of Good Practice for Land Application of Food

Processing/Rinse Water)(第二版)中,详细说明了马铃薯淀粉加工废水等食品加工废水的土地利用与监管细则,经过多年监测尚未发现对土壤、农作物及环境有不良影响。在我国西北、华北的部分马铃薯淀粉主产区,马铃薯淀粉加工废水常被作为肥料长期大量还田施用,但其施用方式及施用量与美国有很大区别。国内对于马铃薯淀粉加工废水还田利用的相关研究较少^[18],尤其是长期大量施用马铃薯淀粉加工废水对土壤氮磷累积与淋失的影响尚未见报道。为此,本研究采集宁夏固原市某马铃薯淀粉企业流转农田(已连续施用马铃薯淀粉加工废水 8 年)的土壤样本,研究长期大量施用该废水对农田土壤氮、磷累积及淋失的影响,以期马铃薯淀粉加工废水的科学还田提供指导。

1 材料与方法

1.1 马铃薯淀粉加工废水还田地块的基本情况

马铃薯淀粉加工废水还田地块为宁夏回族自治区固原市原州区某马铃薯淀粉加工企业的流转农

田。当地地貌属于半湿润、半干旱黄土高原,海拔 1 870 m,年平均降水量 300~550 mm,年平均蒸发量 1 200~1 800 mm,土壤为黑垆土,土壤体积质量 1.37~1.48 g/cm³,土层深厚,地势平坦。该企业自 2010 年开始向该农田施用马铃薯淀粉加工废水,每年在马铃薯淀粉生产结束后(11—12 月),采用畦灌将马铃薯淀粉加工废水施用于作物收获后的空闲农田,于当年 12 月底前施用完成,施用量约 3 000 m³/hm²,至采样时该地块已连续施用马铃薯淀粉加工废水 8 年。施用马铃薯淀粉加工废水后的农田翌年种植青贮玉米、马铃薯等作物,种植时不再施用化肥或其他有机肥。

对照地块不施用马铃薯淀粉加工废水和有机肥,常规施肥,根据作物需求施用尿素、过磷酸钙、硫酸钾等氮、磷、钾化肥。对照地块与还田地块直线距离约 50 m,主要种植青贮玉米、马铃薯等作物,还田地块与对照地块均无灌溉设施。

1.2 样品采集与处理

在还田地块和对照地块按照梅花点法分别设置 9 个采样点(相距 30 m),用挖掘机挖出 1 m×1 m×3 m 的采样剖面,分别采集 0~20,40~60,80~100,100~150,200~250 cm 土层的土壤样品,每个样品量不少于 0.5 kg,将同一深度剖面的每 3 个采样点样品混合均匀,用自封袋封存,作为待检测样品。

1.3 分析指标及其检测方法

废水样品分析测定指标为 pH 及全氮、全磷、总有机碳含量,其中 pH 采用 GB/T 6920—1986《水质 pH 值的测定 玻璃电极法》,全氮、全磷和总有机碳含量分别采用 HJ 636—2012《水质总氮的测定 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法》,GB/T 11893—1989《水质 总磷的测定 钼酸铵分光光度

法》和 HJ 501—2009《水质 总有机碳的测定 燃烧氧化-非分散红外吸收法》。土壤样品分析测定指标为水解氮(H-N)、硝态氮(NO₃⁻-N)、有效磷(Ols-en-P)含量,其中水解氮含量采用 LY/T 1228—2015《森林土壤氮的测定》测定,硝态氮含量采用 HJ 634—2012《土壤 氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮的测定 氯化钾溶液提取-分光光度法》测定,有效磷含量采用 NY/T 1121.7—2014《土壤检测 第 7 部分:碳酸氢钠提取-钼酸铵分光光度法》测定。

1.4 数据处理

试验数据用“平均值±标准误(mean±SD)”表示。利用 Microsoft Excel 2019 软件、SPSS 21.0 数据分析软件进行试验数据的计算和统计检验,采用 Origin 9.0 绘图,采用最小显著性差异法分析不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 还田地块和对照地块全氮、全磷及有机碳的年投入量

经检测,还田地块长期施用的马铃薯淀粉加工废水 pH 为 6.72~7.43,近中性;总有机碳 4.68 g/L,全氮 941 mg/L,全磷 103 mg/L,具有一定的肥力。根据还田地块马铃薯淀粉加工废水施用量及其成分计算,还田地块随马铃薯淀粉加工废水施入的总有机碳、全氮、全磷总量和对照地块的化肥全氮、全磷施用总量见表 1。从表 1 可知,还田地块氮、磷投入总量远远超过对照地块,分别为对照地块的 10.8 和 4.1 倍。此外,还田地块随马铃薯淀粉加工废水施入的总有机碳为 14.04 t/hm²,而对照地块不施入有机碳(有机质)。

表 1 马铃薯淀粉加工废水还田地块和对照地块全氮、全磷、总有机碳的年均施用量
Table 1 Annual amounts of total N,P and C in potato starch processing wastewater application farmland and non-application farmland

处理 Treatments	全氮/(kg·hm ⁻²) TN	全磷/(kg·hm ⁻²) TP	总有机碳/(t·hm ⁻²) TOC
还田地块 Application	2 823	708	14.04
对照地块 Non-application	262	172	/

2.2 还田地块和对照地块土壤水解氮的累积特性

土壤水解氮为土壤中作物生长所需的生物有效性氮源。由表 2 可知,还田地块 0~250 cm 土层土壤水解氮含量为 48.9~140.0 mg/kg,对照地块为 10.8~73.2 mg/kg,还田地块各层土壤中水解氮含量均极显著高于对照地块。与对照地块相比,还田地块各层土壤水解氮含量的增幅自耕作层向下呈增

加趋势。还田地块每年施用大量(3 000 m³/hm²)马铃薯淀粉加工废水,废水中的氮随废水向下入渗,大幅提高了还田地块各层土壤的水解氮含量。本研究中,还田地块和对照地块土壤水解氮含量在各剖面土壤中的变化情况基本相同,均随剖面深度增加呈近似线性下降趋势。在 200~250 cm 土层,对照地块中水解氮含量已下降到 10.8 mg/kg,降幅为

85.24%;但还田地块中水解氮含量仍有 48.9 mg/kg,降幅为 65.07%,表明马铃薯淀粉加工废水

经过多年施用已渗入至农田 250 cm 土层以下。

表 2 马铃薯淀粉加工废水还田地块和对照地块土壤的水解氮含量

采样深度/cm Depth	水解氮/(mg·kg ⁻¹) H-N		还田地块/对照地块 Application/Non-application
	还田地块 Application	对照地块 Non-application	
0~20	140.0±7.4 A	73.2±3.0 B	1.9
40~60	114.0±4.1 A	58.8±2.6 B	1.9
80~100	101.0±4.1 A	56.0±0.9 B	1.8
100~150	83.6±3.3 A	34.0±2.3 B	2.5
200~250	48.9±2.7 A	10.8±0.6 B	4.5

注:同行数据后标不同大写字母表示不同处理间差异极显著($P<0.01$)。下同。

Note: The different capital letters in a row indicate significant differences among different treatments ($P<0.01$). The same below.

2.3 还田地块和对照地块土壤硝态氮的累积特性

硝态氮为土壤中供作物生长所需的速效氮源。

由表 3 可知,还田地块 0~250 cm 土层土壤硝态氮含量为 37.6~53.0 mg/kg,对照地块为 1.82~7.34

mg/kg,还田地块各层土壤硝态氮含量均极显著高于对照地块,但相较于对照地块的增幅自耕作层以下基本保持不变。

表 3 马铃薯淀粉加工废水还田地块和对照地块土壤的硝态氮含量

采样深度/cm Depth/cm	硝态氮/(mg·kg ⁻¹) NO ₃ ⁻ -N		还田地块/对照地块 Application/Non-application
	还田地块 Application	对照地块 Non-application	
0~20	53.0±3.56 A	7.34±0.23 B	7.2
40~60	40.0±2.94 A	1.96±0.20 B	20.4
80~100	38.6±1.87 A	1.91±0.11 B	20.2
100~150	37.8±2.16 A	1.83±0.10 B	20.6
200~250	37.6±1.59 A	1.82±0.12 B	20.6

土壤各层硝态氮含量与氮肥种类、施用量、降水和灌溉有很大关系。由表 3 可知,还田地块和对照地块各剖面土壤中硝态氮含量的变化情况略有不同,对照地块土壤硝态氮含量自表层的 7.34 mg/kg 向下急剧下降至 40~60 cm 土层的 1.96 mg/kg,之后缓慢下降,至 200~250 cm 土层,硝态氮含量为 1.82 mg/kg,相比表层硝态氮含量下降幅度达到 75.20%。还田地块土壤硝态氮含量自耕作层向下缓慢下降,至 200~250 cm 土层硝态氮含量仍达 37.6 mg/kg,相比表层土壤硝态氮含量下降幅度仅有 29.06%。宁夏固原市降水较少,研究地块无灌溉系统,导致由降雨及灌溉引起的硝态氮向下淋滤作用较小。对照地块只施用无机化肥,施到表层的氮肥(硝态氮)基本不会向下淋滤,故自表层向下硝态氮含量急剧降低。还田地块马铃薯淀粉加工废水施入对土壤硝态氮产生的影响可深至 250 cm 土层以下,废水中的有机态氮在土壤微生物作用下转化为无机态氮(硝态氮),故自耕作层向下硝态氮含量缓慢降低,这与还田地块各层土壤硝态氮含量较对照地块增加幅度(倍数)的变化趋势一致。

2.4 还田地块和对照地块土壤有效磷的累积特性

还田地块和对照地块农田土壤不同土层的有效磷累积量见表 4。由表 4 可知,还田地块 0~250 cm 土层土壤有效磷含量为 0.8~35.4 mg/kg,对照地块为 0.2~22.2 mg/kg,还田地块各层土壤有效磷含量均极显著高于对照地块。

表 4 马铃薯淀粉加工废水还田地块和对照地块土壤的有效磷含量

采样深度/cm Depth	有效磷/(mg·kg ⁻¹) Olsen-P		还田地块/对照地块 Application/Non-application
	还田地块 Application	对照地块 Non-application	
0~20	35.4±1.77 A	22.2±1.43 B	1.6
40~60	14.5±0.96 A	1.1±0.09 B	13.2
80~100	3.2±0.22 A	0.5±0.03 B	6.4
100~150	1.9±0.08 A	0.3±0.02 B	6.3
200~250	0.8±0.03 A	0.2±0.01 B	4.0

由表4还可知,还田地块和对照地块各剖面土壤中有效磷含量变化情况与硝态氮变化情况相似。对照地块土壤有效磷含量自表层的22.2 mg/kg急剧下降至40~60 cm土层的1.1 mg/kg(降低95%),然后再缓慢下降;至200~250 cm土层,对照地块有效磷含量仅为0.2 mg/kg,相比表层有效磷含量下降幅度达到99.10%。还田地块土壤有效磷含量下降趋势则相对平缓,但至200~250 cm土层,还田地块中有效磷含量也降至0.8 mg/kg,相比表层土壤有效磷含量下降幅度达到97.74%,与对照地块土壤有效磷含量的降幅相当。

3 讨 论

3.1 马铃薯淀粉加工废水施用与作物产量

水、肥是农业生产的关键要素,在农田空闲期或播种前进行灌溉,可以起到蓄水保墒的作用。各省根据当地气候条件制定了相应的灌溉定额,宁夏回族自治区在农田空闲期或播种前的灌溉定额(畦灌)一般为1 050 m³/hm²。据统计,2016年全国平均氮肥、磷肥的施用量分别为138.64和49.81 kg/hm²^[19]。还田地块马铃薯淀粉加工废水的施用量平均约3 000 m³/hm²,远远超过当地的灌水定额,而随废水平均施用量所带入的全氮约2 823 kg/hm²、全磷(以P₂O₅计)约708 kg/hm²,同样远远超过作物对氮、磷的需求量及全国平均氮肥、磷肥投入量。这主要是因为马铃薯淀粉加工废水是企业生产原淀粉过程中产生的废水,对企业无其他价值,且废水还田过程几乎没有成本,导致废水施用量没有约束。

经调研,2016、2017和2018年废水还田地块青贮玉米产量较对照地块分别增加6.85%(还田地块54.6 t/hm²,对照地块51.1 t/hm²),6.17%(还田地块48.2 t/hm²,对照地块45.4 t/hm²)和9.55%(还田地块58.5 t/hm²,对照地块53.4 t/hm²),平均增加7.52%。这说明农田连续多年施用马铃薯淀粉加工废水后青贮玉米产量略有增加,而且在保证作物产量的前提下,废水还田可以实现减施(不施)化肥的效果。按对照地块化肥施用标准计算,马铃薯淀粉加工废水还田后每公顷可减施氮肥(尿素,N含量46.4%)564 kg,磷肥(过磷酸钙,有效P₂O₅含量16%)1 075.5 kg。但同时也应注意,当地过量施用马铃薯淀粉加工废水以及畦灌的施用方式,不但造成氮、磷养分的严重浪费,还会增加氮、磷淋失的环境污染风险,因此应根据马铃薯淀粉加工废水的成

分特点,结合《测土配方施肥技术规范》,综合确定马铃薯淀粉加工废水及其他肥料的施用方案。

3.2 水肥施用与土壤氮磷淋失风险

硝态氮、有效磷含量是评价土壤氮、磷淋失的重要指标,对于相同土质的农田,肥料类型及施用量、降水与灌溉是影响氮、磷淋失的关键因素。研究表明,土壤氮、磷淋失量随施肥量及降水或灌溉量的增加而增加,减量施肥是降低氮、磷淋失的有效措施^[20-21]。与单独施用化肥相比,有机与无机肥配施可显著降低氮的淋失,但对降低磷流失的作用因试验条件不同而有不同的结论^[22-25]。本研究中马铃薯淀粉加工废水施用不同于一般的肥料施用和灌溉过程,近似水肥一体施用过程。马铃薯淀粉加工废水携带的氮、磷一边向下入渗,一边对已吸附在各层的氮磷向下淋滤。还田地块与对照地块各层土壤中硝态氮、有效磷含量自60 cm以下下降趋势较缓,说明当地降雨对氮、磷淋滤影响较小,这与当地干旱少雨的气候特征相符合^[26]。还田地块各层土壤中较高的硝态氮、有效磷含量主要由马铃薯淀粉加工废水入渗本身携带的氮、磷所致。

土壤本身对磷有很强的固定能力^[27],通过对比分析本研究中还田地块土壤硝态氮和有效磷含量的下降趋势、幅度也可证明,土壤对磷有更强的吸附固定作用。研究表明,土壤有效磷的淋失存在突变点,而突变点与土壤pH、有机质含量有显著关系^[28];当土壤有效磷淋失超过突变点时,导致通过淋溶流失的有效磷量急剧提高^[29-30]。有报道表明,有效磷突变点为63.7^[31],80.3^[32],47.8^[33]和53 mg/kg^[34]。本研究中还田地块耕作层有效磷含量为35.4 mg/kg,低于上述研究中土壤有效磷淋失的突变点,因此在特大降雨的情况下发生磷大量淋失的可能性较小,但仍需注意施用方式,避免施用过程本身造成有效磷淋失。

4 结 论

(1)当地马铃薯淀粉加工废水还田施用量过大,随废水引入的氮、磷远超作物生长所需,造成水、肥资源的严重浪费。

(2)相对于对照地块,还田地块土层中氮、磷累积量更高,存在一定的环境污染风险,但在当地干旱少雨的气候条件下,还田地块农田土层中氮、磷淋失的风险较小。

(3)马铃薯淀粉加工废水作为“水肥”施用时,有利于作物(青贮玉米)增产,同时可以达到减施(不

施)化肥的效果。

(4)应结合《测土配方施肥技术规范》确定马铃薯淀粉加工废水及其他肥料的施用总量,并结合土壤性质确定施用方式,控制渗入深度,避免废水渗入耕作层以下,造成资源浪费及环境污染风险。

[参考文献]

- [1] 韦高玲,卓慕宁,廖义善,等. 不同施肥水平下菜地耕作层土壤中氮磷淋溶损失特征 [J]. 生态环境学报, 2016, 25(6): 1023-1031.
Wei G L, Zhuo M N, Liao Y S, et al. Leaching characteristics of nitrogen and phosphorus in vegetable soils under different fertilization levels [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2016, 25(6): 1023-1031.
- [2] Liu G D, Wu W L, Zhang J, et al. Regional differentiation of non-point source pollution of agriculture-derived nitrate nitrogen in groundwater in northern China [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment, 2005, 107(2/3): 211-220.
- [3] 王 甜,黄志霖,曾立雄,等. 不同施肥处理对三峡库区柑橘园土壤氮磷淋失影响 [J]. 水土保持学报, 2018, 32(5): 53-57.
Wang T, Huang Z L, Zeng L X, et al. Effects of different fertilization on nitrogen and phosphorus leaching of citrus orchard soil in the three gorges reservoir area [J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2018, 32(5): 53-57.
- [4] 沈灵凤,白玲玉,曾希柏,等. 施肥对设施菜地土壤硝态氮累积及 pH 的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(7): 1350-1356.
Shen L F, Bai L Y, Zeng X B, et al. Effects of fertilization on NO_3^- -N accumulation in greenhouse soils [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2012, 31(7): 1350-1356.
- [5] 王 伟,梁 斌,康凌云,等. 氮素供应与秸秆还田对设施菜田土壤硝态氮淋溶的动态影响 [J]. 水土保持学报, 2015, 29(4): 61-65.
Wang W, Liang B, Kang L Y, et al. Impact of nitrogen supply and straw application on dynamics of soil nitrate leaching in greenhouse vegetable field [J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2015, 29(4): 61-65.
- [6] 高忠霞,杨学云,周建斌,等. 小麦-玉米轮作期间不同施肥处理氮素的淋溶形态及数量 [J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(8): 1624-1632.
Gao Z X, Yang X Y, Zhou J B, et al. Forms and amounts of nitrogen in leachates affected by different fertilizations after one wheat-maize rotation [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(8): 1624-1632.
- [7] 王 燕,庞 卓,贾 月,等. 生物炭对北京郊区砂土持水力和氮淋溶特性影响的柱模拟研究 [J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(9): 1820-1828.
Wang Y, Pang Z, Jia Y, et al. Effects of biochar on water holding capacity and nitrogen leaching of sandy soil column from a Beijing suburb [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2017, 36(9): 1820-1828.
- [8] 习 斌,翟丽梅,刘 申,等. 有机无机肥配施对玉米产量及土壤氮磷淋溶的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2015, 21(2): 326-335.
Xi B, Zhai L M, Liu S, et al. Effects of combination of organic and inorganic fertilization on maize yield and soil nitrogen and phosphorus leaching [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2015, 21(2): 326-335.
- [9] Szili-Kovács T, Török K, Tilston E, et al. Promoting microbial immobilization of soil nitrogen during restoration of abandoned agricultural fields by organic additions [J]. Bio and Fert Soils, 2007, 43(6): 823-828.
- [10] Wang Y, Li K Z, Tanaka T S T, et al. Soil nitrate accumulation and leaching to groundwater during the entire vegetable phase following conversion from paddy rice [J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2016, 106: 325-334.
- [11] 宁川川,王建武,蔡昆争. 有机肥对土壤肥力和土壤环境质量的影响研究进展 [J]. 生态环境学报, 2016, 25(1): 175-181.
Ning C C, Wang J W, Cai K Z. The effects of organic fertilizers on soil fertility and soil environmental quality: a review [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2016, 25(1): 175-181.
- [12] 魏 猛,张爱君,诸葛玉平,等. 长期不同施肥方式对黄潮土肥力特征的影响 [J]. 应用生态学报, 2017, 28(3): 838-846.
Wei M, Zhang A J, Zhuge Y P, et al. Effects of long-term fertilization on soil fertility in yellow fluvo-aquic soil [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2017, 28(3): 838-846.
- [13] 荣勤雷,梁国庆,周 卫,等. 不同有机肥对黄泥田土壤培肥效果及土壤酶活性的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(5): 1168-1177.
Rong Q L, Liang G Q, Zhou W, et al. Effects of different organic fertilization on fertility and enzyme activities of yellow clayey soil [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2014, 20(5): 1168-1177.
- [14] 王婷婷,王 俊,赵牧秋,等. 有机肥对设施菜地土壤磷素累积及有效性的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(1): 95-100.
Wang T T, Wang J, Zhao M Q, et al. Effects of organic manure on phosphorus accumulating and its availability in a greenhouse soil in Shenyang suburb [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(1): 95-100.
- [15] Schroeder P D, Radcliffe D E, Cabrera M L. Rainfall timing and poultry litter application rate effects on phosphorus loss in surface runoff [J]. J Environ Qual, 2004, 33(6): 2201-2208.
- [16] 张风华,廖文华,刘建玲. 连续过量施磷和有机肥的产量效应及环境风险评价 [J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(6): 1280-1287.
Zhang F H, Liao W H, Liu J L. Applications of phosphorus and organic fertilizers on yields of vegetables and their environmental impacts [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009, 15(6): 1280-1287.
- [17] 刘 凌,崔明学,吴 娜,等. 马铃薯淀粉工业废水的环境影响与资源化利用 [J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(8): 131-135.

- Liu L, Cui M X, Wu N, et al. The environmental impact and utilization of wastewater from potato starch industry [J]. Food and Fermentation Industries, 2011, 37(8): 131-135.
- [18] 方海军, 杨晓明, 刘秉义, 等. 宁夏南部山区马铃薯淀粉加工废水农业利用试验 [J]. 农业科学研究, 2010, 31(1): 36-43.
- Fang H J, Yang X M, Liu B Y, et al. Experiment of using the waste water from processing potato starch for agriculture in southern Ningxia [J]. Journal of Agricultural Sciences, 2010, 31(1): 36-43.
- [19] 高晶晶, 彭超, 史清华. 中国化肥高用量与小农户的施肥行为研究: 基于 1995—2016 年全国农村固定观察点数据的发现 [J]. 管理世界, 2019(10): 120-132.
- Gao J J, Peng C, Shi Q H. Study on the high use of chemical fertilizer and the fertilization behavior of small farmers in China: based on the findings of the data of fixed observation points in rural areas of China from 1995 to 2016 [J]. Management World, 2019(10): 120-132.
- [20] 陶虹蓉, 李银坤, 郭文忠, 等. 不同灌溉量对砂壤温室黄瓜土壤溶液氮浓度及氮淋洗的影响 [J]. 中国土壤与肥料, 2018(3): 175-180.
- Tao H R, Li Y K, Guo W Z, et al. Effects of different irrigation amount on nitrogen concentration in soil solution and nitrogen leaching of sandy loam greenhouse cucumber [J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2018(3): 175-180.
- [21] 薛亮, 马忠明, 杜少平, 等. 氮素用量对膜下滴灌甜瓜产量以及氮素平衡、硝态氮累积的影响 [J]. 中国农业科学, 2019, 52(4): 690-700.
- Xue L, Ma Z M, Du S P, et al. Effects of application of nitrogen on melon yield, nitrogen balance and soil nitrogen accumulation under plastic mulching with drip irrigation [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(4): 690-700.
- [22] 周炜, 孙国峰, 王鑫, 等. 沼液与有机肥配施条件下氮损失风险的研究 [J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(8): 1743-1750.
- Zhou W, Sun G F, Wang X, et al. Risk of nitrogen loss under the combined application of biogas slurry and organic fertilizer [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(8): 1743-1750.
- [23] 陆欣欣, 岳玉波, 赵峥, 等. 不同施肥处理稻田系统磷素输移特征研究 [J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(4): 394-400.
- Lu X X, Yue Y B, Zhao Z, et al. Phosphorus loss and migration characteristics in paddy fields under different fertilization treatments [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2014, 22(4): 394-400.
- [24] 卜晓莉, 汪浪浪, 马青林, 等. 稻壳炭施用对太湖滨岸灰潮土氮磷淋失及土壤性质的影响 [J]. 生态环境学报, 2019, 28(11): 2216-2222.
- Bu X L, Wang L L, Ma Q L, et al. Effects of rice husk biochar addition on nitrogen and phosphorus leaching and soil properties of gray fluvo-aquic soils in Taihu Lake Shore [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2019, 28(11): 2216-2222.
- [25] 龚静静, 靳玉婷, 胡宏祥, 等. 稻秸还田对油菜季径流氮磷及 COD 流失的影响 [J]. 水土保持学报, 2019, 33(4): 24-29.
- Gong J J, Jin Y T, Hu H X, et al. Effects of rice straw incorporation on nitrogen, phosphorus and COD Loss in rape seasonal runoff [J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2019, 33(4): 24-29.
- [26] 张娟, 李剑萍, 王誉, 等. 西北干旱地区气候变化及其对草地生产潜力的影响 [J]. 生态科学, 2020, 39(3): 182-192.
- Zhang J, Li J P, Wang Y, et al. Climate change in arid regions of Northwest China and its impact on potential grassland productivity [J]. Ecological Science, 2020, 39(3): 182-192.
- [27] DeJager P C, Claassens A S. Long-term phosphorus desorption kinetics of an acid sand clay soil from Mpumalanga, South Africa [J]. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 2005, 36: 309-319.
- [28] 赵小蓉, 钟晓英, 李贵桐, 等. 我国 23 个土壤磷素淋失风险评估: II. 淋失临界值与土壤理化性质和磷吸附特性的关系 [J]. 生态学报, 2016, 26(9): 3011-3017.
- Zhao X R, Zhong X Y, Li G T, et al. The evaluation of phosphorus leaching risk of 23 Chinese soils: II. The relationships between soil properties, P adsorption characteristics and the leaching criterion [J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 26(9): 3011-3017.
- [29] 陈子聪, 章明清, 陈防, 等. 氮肥对菜园土壤硝态氮淋溶流失的影响 [J]. 生态环境, 2008, 17(3): 1230-1234.
- Chen Z C, Zhang M Q, Chen F, et al. Effect of N fertilizer on nitrate-nitrogen loss from garden soils [J]. Ecology and Environment, 2008, 17(3): 1230-1234.
- [30] 章明清, 姚宝全, 李娟, 等. 福建菜田氮、磷积累状况及其淋失潜力研究 [J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(1): 148-155.
- Zhang M Q, Yao B Q, Li J, et al. N and P accumulation status and their leaching potential in vegetable fields in Fujian Province [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2014, 20(1): 148-155.
- [31] Mohsen J, Mahdi J. Assessment risk of phosphorus leaching from calcareous soils using soil test phosphorus [J]. Chemosphere, 2017, 171: 106-117.
- [32] Maguire R O, Sims J T. Soil testing to predict phosphorus leaching [J]. Environment Quality, 2002, 31: 1601-1609.
- [33] Wang Y T, Zhang T Q, O'Halloran I P, et al. Soil tests as risk indicators for leaching of dissolved phosphorus from agricultural soils in Ontario [J]. Soil Science Society of America Journal, 2012, 76(1): 220-229.
- [34] Horta M D C, Torrent J. The olsen P method as an agronomic and environmental test for predicting phosphate release from acid soils [J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2007, 77(3): 283-292.

网络出版时间:2020-11-25 16:54 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.05.012
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20201125.1136.009.html

黄瓜白化突变体分析与突变基因 *al* 的精细定位

牛玉倩,李 征

(西北农林科技大学 园艺学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】对黄瓜白化叶片突变体进行生理和遗传分析,并对该突变基因 *al* 进行精细定位,为阐明影响黄瓜叶绿体发育的重要代谢或调控机制提供参考。【方法】以 2 个不同背景的黄瓜材料 Gy14 和 9930 为亲本,分别与携带白化突变基因的杂合材料 649 构建 F_2 群体。对 F_2 群体中的野生型和白化突变体进行光合色素含量测定及叶绿体结构观察,同时筛选多态性分子标记引物,结合基因组重测序技术,对突变基因 *al* 进行精细定位。【结果】对 *al* 突变体进行表型观察,发现刚出土时其子叶颜色浅黄,之后逐渐白化,确定该白化突变为致死突变性状。与野生型相比,*al* 突变体光合色素含量均极显著低于野生型,且叶绿素 a、叶绿素 b 含量平均降低了 90% 以上。通过透射电镜对叶肉细胞内叶绿体结构进行观察发现,与野生型相比,*al* 突变体子叶叶肉细胞中几乎无法观察到叶绿体的存在。对 *al* 突变体进行遗传分析发现,该白化性状是由一对隐性核基因控制的质量性状。通过 BSA、分子标记定位、基因组重测序和染色体步移等方法,最终将 *al* 基因定位于黄瓜第 7 号染色体上约 66 kb 区间内。【结论】黄瓜白化突变的形成与叶绿体的形成密切相关,由单基因突变产生,定位于黄瓜第 7 号染色体上。

【关键词】 黄瓜育种;白化突变体;光合色素;叶绿体;精细定位

【中图分类号】 S642.203.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2021)05-0088-08

Characteristic and fine-mapping of *albino cotyledons* (*al*) mutant in cucumber (*Cucumis sativus* L.)

NIU Yuqian, LI Zheng

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】Physiological and genetic analysis as well as fine-mapping of a cucumber *albino cotyledons* (*al*) mutant were conducted to provide reference for elucidating important metabolic or regulatory mechanisms affecting chloroplast development. 【Method】Two cucumber materials Gy14 and 9930 with different backgrounds were used as parents to develop two F_2 populations with heterozygous material 649 carrying *al* mutant gene, respectively. Photosynthetic pigment content and chloroplast structure of wild-type and *al* mutants in the F_2 population were analyzed, and polymorphic molecular markers were screened for mapping. 【Result】Phenotypic observation of the *al* mutant showed that cotyledons were pale yellow and then gradually changed to albino before slowly withering and dying. The albino mutation was identified as a fatal mutation. Content of photosynthetic pigment of mutant was significantly lower than that of wild type, and contents of chlorophyll a and chlorophyll b decreased by more than 90% on average. The chloroplast structure in mesophyll cells was observed by transmission electron microscopy. Compared with wild type, chloroplast was hardly observed in cotyledon cells. Genetic analysis of the *al* mutant revealed that albino trait was a quality trait controlled by a pair of recessive nuclear genes. After BSA, ge-

【收稿日期】 2020-05-10

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31672150,31872111)

【作者简介】 牛玉倩(1995—),女,黑龙江大庆人,在读硕士,主要从事黄瓜育种研究。E-mail:316025894@qq.com

【通信作者】 李 征(1982—),男,辽宁朝阳人,教授,博士生导师,主要从事黄瓜育种研究。E-mail:lizheng82@nwsuaf.edu.cn

nome re-sequence, and chromosome walking, the *al* gene was finally located in a 66 kb interval in cucumber chromosome 7. 【Conclusion】 The formation of this cucumber albino mutation was closely related to formation of chloroplast, resulting in a single gene mutation located in chromosome 7.

Key words: cucumber breeding; albino mutation; photosynthetic pigment; chloroplast; fine mapping

经过长期的栽培与驯化,黄瓜(*Cucumis sativus* L.)已经成为最主要的蔬菜作物之一,广泛分布于世界各地。作为第一个进行基因组测序的蔬菜作物,黄瓜基因组较小,约为 367 Mb,是研究葫芦科的模式作物,也是研究叶色突变的理想植物。叶色突变在自然界普遍存在,由于叶色突变植株是研究叶绿素合成代谢、叶绿体发育结构及光合作用系统的理想材料,随着分子生物学的进一步发展,对于叶色突变体的研究日渐深入。

植物白化突变体的形成大多是因为叶绿素缺失、叶绿体发育受阻、叶绿体内部结构异常或光合作用受阻而产生的。突变体植株在缺乏叶绿素后不能进行正常的光合作用,导致苗期就表现出致死效应。目前,叶色白化突变体在许多植物中都有发现,如水稻^[1-2]、拟南芥^[3]等。黄瓜叶色突变体方面的报道甚少,迄今为止发现的叶色突变体的表现也不尽相同,其中已报道的致死突变体有 4 个:*al*、*cd*、*gc* 和 *p*^[4],非致死突变体有 8 个:*g*、*lg-1*、*lg-2*、*v*、*vvi*、*yc-1*、*yc-2* 和 *yp*^[5]。随着基因组学及分子育种的发展,我国关于黄瓜叶色突变体的研究也逐渐深入,如国艳梅等^[6]和苗晗^[7]在黄瓜雌性系 9110Gt 中发现了能够稳定遗传的黄色突变体。进一步研究发现该突变体中叶绿体发育异常且受温度影响较大,其由位于黄瓜 6 号染色体(Chr6)上的隐性位点 *v-1* 控制,最终将 *CsaCNGCs* 确定为候选基因^[6-8]。李万青等^[9]和 Gao 等^[10]利用 EMS 诱变获得黄瓜叶绿素缺陷突变体 C528,其叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素及叶绿素总量相对于野生型均显著降低,利用图谱克隆技术最终将 *CsChlI* 确定为候选基因。李燕^[11]发现的黄瓜黄绿叶色突变体 Z3t 的子叶表现为黄色,叶绿体结构异常,超氧化物歧化酶活性显著高于对照,并由隐性核基因 *yl* 控制。胡亮亮等^[12]对黄绿叶突变体 C777 进行光合特性分析发现,突变体的光合色素质量分数相对于野生型降低,导致其净光合速率显著降低。董翔宇^[13]通过 BSA 法结合分子标记技术将自然突变叶色突变体 *yf* 的候选基因定位在第 7 条染色体 *Cucs.a.099260* 基因上。

在前期研究中,本研究小组使用黄瓜野生型材料 649 经 EMS 诱变后获得携带白化基因的杂合突

变个体,在分别与黄瓜材料 Gy14 和 9930 构建的 2 个 F₂ 群体中均出现了白化致死突变个体。因其植株不能正常发育真叶,与已报道的黄瓜叶色突变体均不同,因此将其命名为白化 *albino cotyledons* (简称 *al*) 突变体。初步观察其表型发现突变植株子叶白化,苗期致死。本试验通过对白化突变体的研究,以期发现调控叶绿素合成和叶绿体建成的关键基因,为进一步阐明影响黄瓜叶绿体发育的重要代谢或调控机制及光合作用机理研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

黄瓜亲本材料 Gy14、9930 均来自西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组,黄瓜野生型材料 649 经 EMS 诱变后获得携带白化基因的杂合突变材料,与 Gy14、9930 分别构建 F₂ 群体。试验所用 Gy14×649、9930×649 的 F₁ 代种子来自西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组,2017 年秋季种植于温室中,用于自交并获得 F₂ 分离群体,进行生理和遗传分析。2018 年春季扩大 F₂ 群体种植,进行基因精细定位研究。

1.2 试验方法

1.2.1 光合色素含量的测定 光合色素含量的测定方法参照《植物生理生化实验原理与技术》(第 3 版)^[14]并略有更改。分别取 Gy14×649、9930×649 F₂ 群体子叶展平期 5 和 9 d 苗龄的野生型及 *al* 植株各 3 株,各称取新鲜叶片组织 0.2 g,加入约 5 mL 体积分数 80% 丙酮充分研磨,避光放置至叶片无色,过滤、定容至 10 mL,摇匀备用。以体积分数 80% 丙酮为空白对照,分别在 663 和 646 nm 波长下测定其 OD 值,重复 3 次。按下式对植株子叶所含光合色素含量进行计算^[15-16]:

$$C_a = (12.21A_{663} - 2.81A_{646}) \times V \times N \div (W \times 1\ 000);$$

$$C_b = (20.13A_{646} - 5.03A_{663}) \times V \times N \div (W \times 1\ 000);$$

$$C_{a+b} = C_a + C_b。$$

式中: A_{663} 、 A_{646} 分别为植物叶绿体色素提取液在 663 和 646 nm 波长下的 OD 值, C_a 、 C_b 分别为叶绿

素 a、叶绿素 b 的含量(mg/g), C_{a+b} 为总叶绿素含量(mg/g), V 为提取液体积(mL), N 为稀释倍数, W 为样品鲜质量(g)。

1.2.2 叶绿体结构的观察 分别选取 9930×649 F_2 群体野生型及突变体的子叶和真叶(突变体因无法长出真叶,故选取同时生长点处新生嫩芽),切取条状、截面约 1 mm×1 mm 且体积不大于 1 mm³ 的叶片组织,放置于预冷固定液(2.5%戊二醛磷酸缓冲液,4℃冰箱保存)中,抽真空 30 min,4℃保存备用。每组材料重复 3 次,固定 6 h 后可送制样。制样试剂和样品制备方法参考 Leica 公司提供的《常规生物透射电镜样品制备概要》(<http://www.leica-microsystems.com>)。用透射电镜对细胞中的叶绿体进行观察,透射电镜的操作方法由西北农林科技大学北校区公共实验平台提供。

1.2.3 黄瓜白化表型的遗传分析与精细定位 随机选取 Gy14×649、9930×649 F_2 群体扩繁的种子,统计白化个体和野生型个体数,并对统计结果进行 χ^2 分析。用 BSA 法对目标突变基因进行初步定位,在 Gy14×649、9930×649 F_2 分离群体中分别随机选取野生型和突变体表型植株各 10 株,用 CTAB 法提取 DNA 后稀释至 50 ng/ μ L,构建野生型基因

池和突变体基因池,利用这两个池进行黄瓜白化突变基因的初定位,同时对这两个基因池进行全基因组 Bulk-seq 测序,测序由诺禾致源生物科技有限公司完成。初定位所用黄瓜染色体引物由西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组提供。黄瓜染色体基因组 SSR 标记引物^[17-19] 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系为:2×Dining Mix (北京,Dining)5 μ L,ddH₂O 3 μ L,上、下游引物(10 ng/ μ L)各 0.5 μ L, DNA 模板(50 ng/ μ L)1 μ L。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 20 s,55℃退火 20 s,72℃延伸 20 s,28 个循环;72℃终延伸 5 min,终止温度 10℃保存。PCR 产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳银染显色后统计带型,从而进一步筛选多态性引物。

在 SSR 分子标记的基础上,基于黄瓜基因组数据库网站(<http://cucurbitgenomics.org/>)信息,结合重测序结果开发了单核苷酸多态性(SNP)和缺失/插入(InDel)标记。标记与目标基因的连锁分析使用 MAPMARKER/EXP 3.0 程序,应用 Kosambi 函数将其转化为遗传图距^[20]。本研究使用的 PCR 引物信息见表 1。

表 1 本研究用到的黄瓜基因定位 PCR 引物
Table 1 Cucumber gene mapping related primers used in this study

引物名称 Primer name	上游引物序列(5'→3') Forward primer sequence	下游引物序列(5'→3') Reverse primer sequence
SSR7016	GGTCTTCCTTTTCAAATCATTG	AAAAATTCCTAAGACGACGATCA
SSR7020	TCTCCGGCAGAAAGAAAAGA	TGCGTCTCCTTCTTCCTCAT
SSR7026	CGAGTGTGGACATTTTAGAGGG	TTGACTTTCCTCATTCTTTTAATGC
SSR7027	CGGCGCCACTCAGTTAGAT	AAAACCATTAAATTGGAATGATAAA
UW048441	GAGAGGACAGGCAAGTTGTTG	CCGTCCTATGTTTGTTCCATC
UW048446	TGATTTCCCTCTCAAACGCT	GGAAGGCAATGGAAATGAGA
UW048449	AAAATCGGTGGTTTGAGAA	TCTTATTCAAATGTGGTTTCGG
UW048465	CGAAGCAGAGTACGGTGACA	TGGATTTTTCTGGGTTTTCTG
UW048542	AATTTTGATTGCTATGGCGG	GGCTTGGGAGTGTGTTTGTT
UW048595	ACGTGGAATTTAGCTGACGC	GAGCCAAAAATGGAGGATGA
SNP4730918	TGTATGAAGGCAAAGGAGCA	CACTGTGCCGAGGTATTAGG
SNP4733568	ATACTTGAACGGACATAGGG	AAATGGGTGATTTCGTTGC
InDel5235596	AAGGAGTGAATGAGCTGATCATAAA	ATTTTAAATGGATAGTAAATGATAT
InDel5029382	ATTGTGACACCAAGGGATT	TTATGTCTTTCTTGGTGCTT
InDel5155588	CCAGTACAATCAAACCTTATAGCAT	AATAACCCAAATACACCAATACCA
InDel5177313	GAGACGAGTATTTAATTCCTTCA	CCAACCCATAAAGTGAATAAAC
InDel5044706	TTCAAAGAAATCATCGAATGTT	CCAACCCATAAAGTGAATAAAC
InDel5118521	AAGAGTTTAGTTATGGAGGGTT	GTCGTTACGTAGACTTTTCG

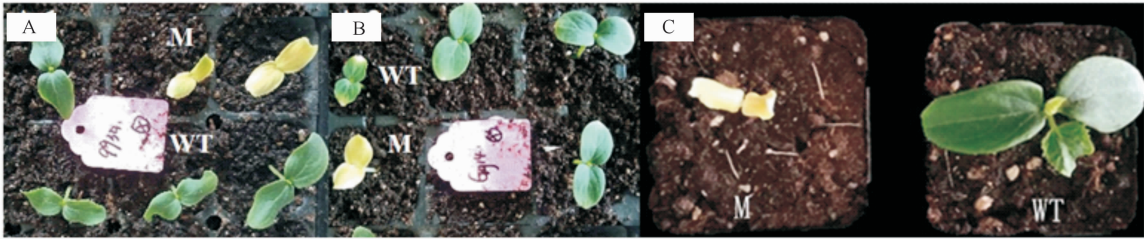
2 结果与分析

2.1 黄瓜 al 突变体的表型观察与分析

由于 al 突变体具有苗期致死性,因此最初该突

变体是从 Gy14×649 和 9930×649 F_2 分离群体中鉴定获得的。对黄瓜 al 突变体表型进行观察发现,与野生型相比,al 突变体刚出土时子叶颜色浅黄,之后逐渐白化(图 1-A,B)。突变体在子叶期正常生

长,在野生型进入真叶期的相同时段,突变体慢慢枯萎死亡(图 1-C)。对 *al* 突变体的观察表明,该突变为致死突变性状。



A,B. 分别为 9930×649、Gy14×649 F₂ 群体 *al* 突变体与野生型植株;C. 同时播种后野生型长出真叶时,
al 突变体逐渐萎蔫死亡。WT. 野生型;M. *al* 突变植株

A,B. *al* mutant plants and wild type in two F₂ populations of 9930×649, Gy14×649, respectively;B. At the first-leaf period, the *al* mutant wilted and died. WT. Wild-type plants;M. *al* mutant

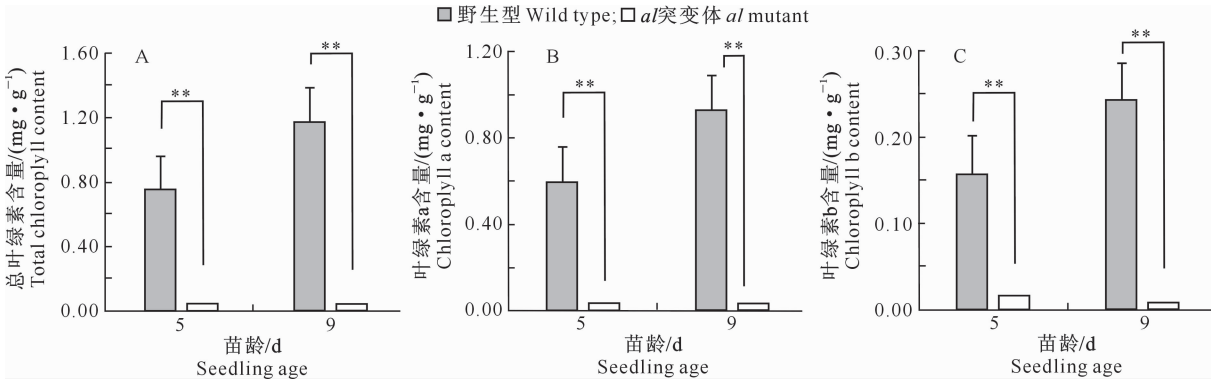
图 1 黄瓜 *al* 突变体与野生型植株的表型观察

Fig. 1 Observation of phenotypes of cucumber *al* mutant and wild type

2.2 黄瓜白化突变体光合色素含量的测定

与野生型相比,Gy14×649 和 9930×649 两个 F₂ 分离群体中的 *al* 突变体叶色呈浅黄或白色。分别对 5 和 9 d 苗龄的野生型及 *al* 突变体子叶的叶绿素含量进行测定,结果表明,9930×649 F₂ 群体中,*al* 突变体的总叶绿素含量极显著低于野生型植株

(图 2-A)。相较于野生型,5 d 苗龄(即子叶展平期)时,*al* 突变体叶绿素 a 含量降低了 94.18%,叶绿素 b 含量降低了 90.44%;9 d 苗龄时,*al* 突变体叶绿素 a 含量降低了 97.65%,叶绿素 b 含量降低了 92.01%(图 2-B 和图 2-C)。



* * 表示同一苗龄野生型与 *al* 突变体间差异极显著($P<0.01$)。下同

* * indicates significant difference between *al* mutant and wild type at same seedling age ($P<0.01$). The same below

图 2 不同苗龄下黄瓜 9930×649 F₂ 群体中 *al* 突变体子叶光合色素含量的变化

Fig. 2 Changes in photosynthetic pigment content in cotyledon of cucumber *al* mutant in 9930×649 F₂ populations at different seedling ages

在 Gy14×649 F₂ 群体中,*al* 突变体的总叶绿素含量均极显著低于野生型植株(图 3-A)。与野生型相比,5 d 苗龄时 *al* 突变体叶绿素 a 含量降低了 92.31%,叶绿素 b 含量降低了 88.13%;9 d 苗龄时 *al* 突变体叶绿素 a 含量降低了 98.93%,而叶绿素 b 含量几乎无法测到(图 3-B 和图 3-C)。

2.3 黄瓜白化突变体叶绿体结构的观察

利用透射电镜对野生型及 *al* 突变体子叶和真叶的叶绿体结构分别进行观察,结果发现野生型子

叶中的叶绿体形态正常,呈椭球形,有正常堆叠的基粒片层结构(图 4-A,B)。但 *al* 突变体子叶叶肉细胞中未观察到规则的叶绿体,偶尔会有几个呈细长条形的异常叶绿体结构(图 4-C,D)。野生型真叶中的叶绿体相对于子叶中的叶绿体发育更为完全,形状规则,排布整齐,可观察到正常堆叠的基粒片层、淀粉粒等完整结构(图 4-E,F)。在 *al* 突变体真叶(即同时期生长点处新生嫩芽)的叶肉细胞中几乎不能观察到叶绿体(图 4-G,H)。

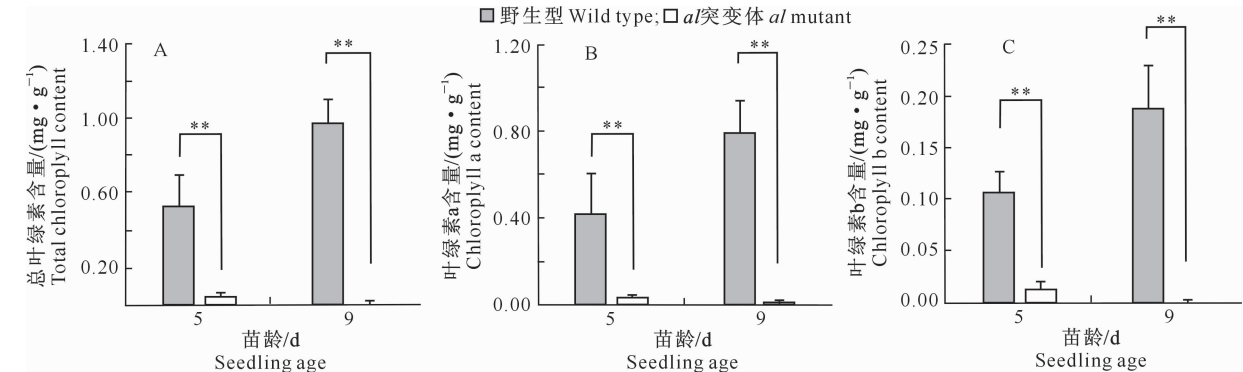
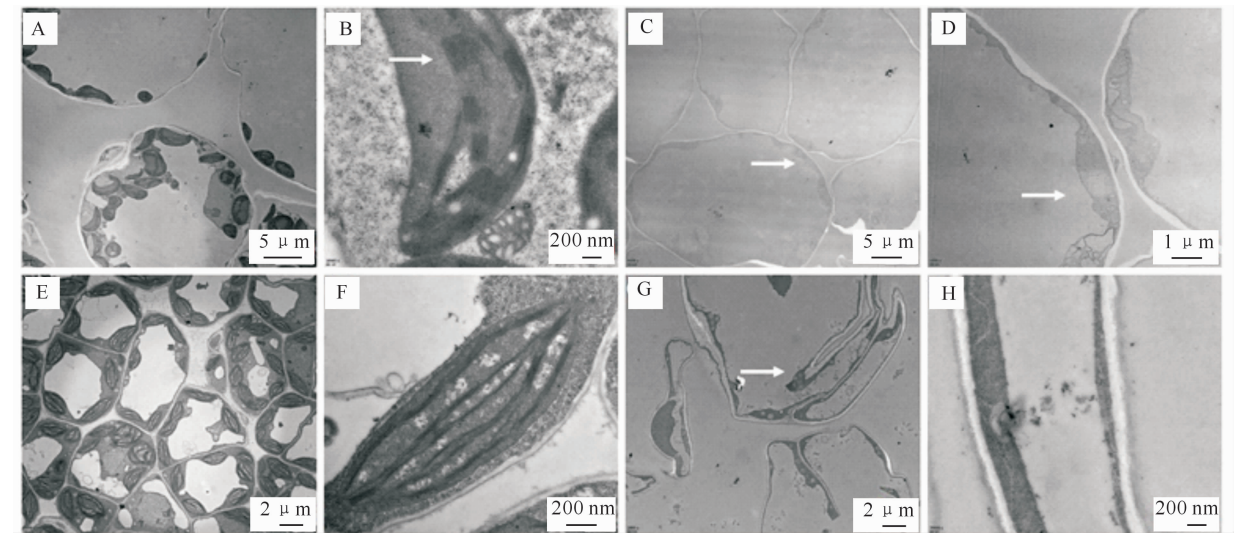


图 3 不同苗龄下黄瓜 Gy14×649 F₂ 群体中 *al* 突变体子叶光合色素含量的变化
Fig. 3 Changes in photosynthetic pigment content in cotyledon of cucumber *al* mutant in Gy14×649 F₂ populations at different seedling ages



A,B. 野生型子叶;C,D. *al* 突变体子叶; E,F. 野生型真叶;G,H. *al* 突变体真叶。箭头示叶绿体或叶绿体类囊体
A,B. Wild-type cotyledon;C,D. *al* mutant cotyledon;E,F. Wild-type true leaf;G,H. *al* mutant true leaf.
Arrows indicate chloroplasts or chloroplast thylakoids

图 4 黄瓜野生型和 *al* 突变体子叶及真叶的叶绿体形态观察

Fig. 4 Morphology of cucumber wild-type and *al* mutant cotyledons and true leaves

2.4 黄瓜白化表型的遗传分析与精细定位

对黄瓜 Gy14×649 和 9930×649 两个杂交组合的 F₁、F₂ 群体进行表型观察发现,F₁ 个体表型均正常。利用 Gy14×649、9930×649 F₂ 群体出现的分离表型进行遗传分析,发现Gy14×649、9930×

649 F₂ 群体中野生型与突变型植株数的比值分别为 76 : 25 和 69 : 21,χ² 测验结果 P>0.05(表 2),表明分离群体符合孟德尔遗传定律 3 : 1 分离比,即突变个体的表型是由单基因控制的隐性性状,因此可使用 F₂ 群体对 *al* 基因进行定位和克隆。

表 2 黄瓜 *al* 突变体 F₁ 和 F₂ 群体的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of cucumber *al* mutants in F₁ and F₂ populations

群体 Population	植株总数 Total plants	野生型与突变型的株数比值 Ratio of wild type to mutant type plants	期望值 Expected ratio	χ ²	P 值 Probability value
F ₁ (Gy14×649)	61	61 : 0	1 : 0	—	—
F ₁ (9930×649)	60	60 : 0	1 : 0	—	—
F ₂ (Gy14×649)	101	76 : 25	3 : 1	1.42	0.23
F ₂ (9930×649)	90	69 : 21	3 : 1	0.55	0.46

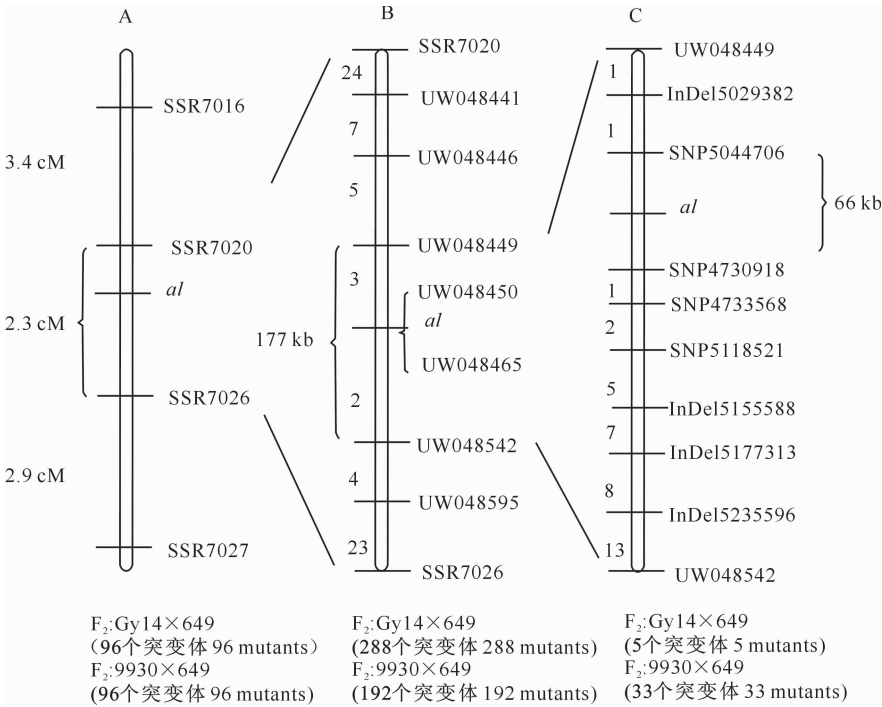
利用课题组原有的 7 条黄瓜染色体上的 SSR 分子标记,用 Gy14×649、9930×649 的 F₂ 分离群

体分别混合构建的野生型基因池(AL_)和突变型基因池(*alal*)进行筛选,以每对标记组合均能在两基

因池中扩增出相应的清晰主带为准,最终在 7 号染色体上筛选出连续多态性 SSR 标记 12 对 (SSR7001、SSR7011、SSR7012、SSR7013、SSR7014、SSR7016、SSR7020、SSR7025、SSR7026、SSR7027、SSR7029、SSR7031),故将目的基因初步定位于 7 号染色体上。

对 Gy14×649、9930×649 F₂ 分离群体中分别混合构建的野生型基因池 (AL₋) 和突变型基因池 (*alal*) 进行全基因组 Bulk-seq 测序。根据池间 ΔSNP index 的结果,在黄瓜 7 号染色体上发现一个潜在的差异连锁区间,与初定位结果相同,可在 7 号染色体上对目标基因 *al* 进行进一步定位。

选用 Gy14×649 F₂ 群体中的 96 个 *al* 突变体单株对目的基因进行进一步定位分析发现,SSR7016、SSR7026 距离目的基因位点最近,分居 *al* 两侧,两标记间距离约为 5.7 cM;同时选用 9930×649 F₂ 群体中 96 个 *al* 突变体单株进行定位,发现 SSR7020、SSR7027 距离目的基因位点最近,分居 *al* 两侧,两标记间距离约为 5.2 cM (图 5-A)。综合标记 SSR7016、SSR7026、SSR7020、SSR7027 在基因组上的位置分布及交换事件数量变化情况,将 *al* 基因定位于 SSR7020 和 SSR7026 之间,遗传距离约为 2.3 cM (图 5-A)。



A. 利用小群体将突变基因 *al* 初步定位于标记 SSR7020 与 SSR7026 之间;B. 扩大群体将突变基因 *al* 定位于标记 UW048449 与 UW048542 之间,而 UW048450 和 UW048465 与 *al* 共分离;C. 开发标记,最终将突变基因 *al* 定位于标记 SNP5044706 与 SNP4730918 之间
A. Using primary populations, *al* gene was mapped between marker SSR7020 and SSR7026; B. Using enlarged populations, *al* gene was mapped between marker UW048449 and UW048542, and co-segregated with UW048450 and UW048465;
C. After developing markers, *al* gene was finally mapped between marker SNP5044706 and SNP4730918

图 5 黄瓜白化突变基因 *al* 的精细定位

Fig. 5 Fine mapping of cucumber *al* gene

在初步定位的多态性标记 SSR7020 和 SSR7026 之间继续设计 SSR 分子标记,利用亲本 9930、Gy14 及 Gy14×649、9930×649 的 F₁ 杂合个体和 F₂ 突变个体的 DNA 对开发标记进行多态性筛选,发现 7 个 SSR 分子标记 (UW048441、UW048446、UW048449、UW048450、UW048465、UW048542、UW048595) 对 Gy14×649 F₂ 群体存在多态性,而 9930×649 F₂ 群体只有 1 个多态性分子

标记 UW048595。在 Gy14×649 F₂ 群体中,使用 *al* 基因两侧标记 SSR7016 和 SSR7026 筛选出 288 个交换株,并在上述 7 个多态性标记中进行分析,结合其表型观察,将包含 *al* 基因的物理区间缩小到 UW048449 与 UW048542 之间,约 177 kb 的区间内,包含 5 个交换单株,而标记 UW048450 和 UW048465 与 *al* 位点共分离。在 9930×649 F₂ 群体中,使用 *al* 基因两侧标记 SSR7020 和 SSR7027

筛选出 192 个交换单株,并用多态性标记 UW048595 分析交换单株,结合其表型最终将目的基因定位于 SSR7020 与 UW048595 之间,包含 33 个交换单株。因该群体定位区间远大于 $Gy14 \times 649$ F_2 群体定位区间,故以 UW048449 与 UW048542 定位区间为准(图 5-B)。

根据上述定位结果,由于标记 UW048450 和 UW048465 与 *al* 位点呈共分离,故根据黄瓜基因组数据库信息和全基因组 Bulk-seq 测序结果,在 UW048449 和 UW048542 两个 SSR 分子标记间继续开发具有多态性的 SNP 和 InDel 标记,用于进一步缩小目的区间。在 UW048542 侧继续向内开发标记,分别以两个 F_2 分离群体的突变体及 F_1 杂合个体为对照,在标记位置附近设计引物,扩增包含标记在内的序列,测序确定其是否具有多态性。用获得的多态性标记 InDel5235596 继续筛选 9930×649 F_2 群体的交换单株,将交换事件缩减至 13 个。以此标记为基础,继续开发多态性标记并对剩余群体的交换单株进行筛选,其中在 9930×649 F_2 群体中筛选出具有多态性的标记为 InDel5177313、InDel5155588、SNP5118521、SNP4733568、SNP4730918,在 $Gy14 \times 649$ F_2 群体中筛选出具有多态性的标记仅有 SNP4730918。经过筛选,在 9930×649 F_2 群体中,InDel5177313 标记获得 8 个交换单株,InDel5155588 标记筛选到 7 个交换单株,SNP5118521 标记筛选到 5 个交换单株,SNP4733568 标记筛选到 2 个交换单株;在 $Gy14 \times 649$ F_2 群体中,SNP4730918 标记筛选到 1 个交换单株。根据标记在基因组上所在位置以及不同标记上交换株的数目变化,可推断目的基因现定位于标记 SNP4730918 与 UW048449 之间。同时在 UW048449 侧筛选到多态性标记 InDel5029382 和 SNP5044706,以 F_2 群体突变体及 F_1 杂合个体为对照,在 2 个标记上各得到 1 个交换单株。根据标记间位置信息及交换数目,最终将 *al* 基因定位于 SNP5044706 与 SNP4730918 标记之间,区间大小为 66 kb(图 5-C)。

3 讨 论

已有研究表明,由于控制叶绿素生物合成或叶绿体发育的基因沉默或失活,直接或间接影响叶绿素的合成与降解,从而导致突变体叶片中的各色素含量发生变化,最终形成叶色突变体^[21]。除此之外,叶绿体结构发育异常也是形成叶色突变体的重

要因素,如水稻^[22-23]、小麦^[24]等。故对叶色突变体的研究可从叶绿素合成与降解途径、叶绿体结构等方面进行。

本试验对黄瓜 *al* 突变体和野生型的光合色素含量及叶绿体结构分别进行了测定与观察,结果表明 *al* 突变体的光合色素含量相对于野生型极显著降低,其叶绿体结构形态异常且数量大幅度减少,可以预测其候选基因与控制叶绿素合成或叶绿体结构发育相关。因白化突变体苗期致死,不能进行正常的生长发育,故本试验通过构建 $Gy14 \times 649$ 、 9930×649 两个 F_2 群体获得分离群体中的白化突变个体,从而保证了分子标记定位过程中隐性群体的数目。同时统计群体后代野生型与突变体数量进行遗传分析,结果表明该白化突变性状符合孟德尔遗传定律 3:1 分离比,证明该性状是由单隐性核基因控制的。本试验将两个分离群体 $Gy14 \times 649$ 、 9930×649 通过 BSA 混池法结合基因组重测序,准确地将黄瓜白化突变基因定位于 7 号染色体上。之后根据黄瓜基因组数据库预测信息及全基因组重测序结果,进一步开发标记并进行定位,最终将候选基因定位于 SNP5044706 与 SNP4730918 标记之间约 66 kb 的区间内。之后在此区间内继续扩大筛选突变个体数量,但不能筛选出更多的交换单株,可能是突变体基因组在这一区段发生交换重组事件的概率较低所致。

现有黄瓜叶色突变体相关报道表明,控制叶色突变性状的基因多参与编码叶绿素合成途径或与控制叶绿体结构的正常发育相关,如李万青等^[9]和 Gao 等^[10]发现,黄瓜叶绿素缺陷突变体 C528 的最终候选基因 *CsChlI* 参与编码 Mg-螯合酶的 CHLI 亚基;朱伟伟等^[25]研究认为,黄瓜芽黄突变体的形成与 CLpP 相关,且 CLpP 参与调控叶绿体发育、相关蛋白积累及光形态建成。故后期对定位区段内候选基因进行预测时,可以根据该基因功能是否与叶绿素合成、叶绿体结构相关进行分析确定。董翔宇^[13]研究发现,黄瓜叶黄突变体 *yf* 的形成,同负责编码与类囊体合成途经蛋白的基因 *CucsA*.099260 发生突变相关,该基因与本研究预测基因均位于黄瓜 7 号染色体上,但经过基因定位区间比对发现,该突变基因并不存在于本研究最终定位的 66 kb 区间内,说明本研究的目的基因与上述定位基因并非同一基因,后续试验需进一步对区间内候选基因功能进行分析,从而确定目的基因。

本试验利用共同亲本 649 与不同背景的两个黄

瓜测序品种 Gy14、9930 分别构建群体,同时对同一候选基因进行定位,可观察到在不同背景下获得的多态性标记不尽相同,且即使有相同的多态性标记,两群体在同一位点的交换单株数量也存在差异,这可能是亲本遗传背景不同导致的遗传效应不同,也有可能是等位基因间存在一定程度的互作效应,具体原因需进一步探究。在结合基因组位置信息的情况下,使用多背景材料进行基因定位,可以提供更多的多态性分子标记,有助于加快基因定位工作,具有较高的应用价值。

4 结 论

本试验对黄瓜白化 *al* 突变体进行了光合色素含量测定和叶绿体结构观察,发现 *al* 突变体叶绿素含量极显著降低,且叶肉细胞中几乎不能观察到叶绿体。通过构建 Gy14×649、9930×649 两个 F₂ 群体对突变体进行扩繁,同时利用 SSR 分子标记技术结合重测序结果开发标记对突变基因 *al* 进行精细定位,最终将候选基因定位于黄瓜第 7 号染色体上约 66 kb 的区间内。

[参考文献]

[1] Zhang T, Feng P, Li Y, et al. VIRESCENT-ALBINO LEAF 1 regulates leaf color development and cell division in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2018, 69(20): 4791-4804.

[2] Zheng H, Wang Z R, Tian Y L, et al. Rice albino 1, encoding a glycyl-tRNA synthetase, is involved in chloroplast development and establishment of the plastidic ribosome system in rice [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2019, 139: 495-503.

[3] 李南南. 拟南芥子叶白化突变体 *sca1* 的筛选及鉴定 [D]. 河南开封: 河南大学, 2019.

Li N N. Screening and identification of cotyledon albino mutant *sca1* in *Arabidopsis* [D]. Kaifeng, Henan: Henan University, 2019.

[4] Pierce L, Wehner T. Review of genes and linkage groups in cucumber [J]. Horticultural Science, 1990, 25(6): 605-615.

[5] Walters S A, Shetty N V, Wehner T C. Segregation and linkage of several genes in cucumber [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2001, 126(4): 442-450.

[6] 国艳梅, 顾兴芳, 张春霞, 等. 黄瓜叶色突变体遗传机制的研究 [J]. 园艺学报, 2003, 30(4): 409-412.

Guo Y M, Gu X F, Zhang C Z, et al. Genetic mechanism of the cucumber leaf mutant [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30(4): 409-412.

[7] 苗 晗. 黄瓜叶色突变体 9110Gt 转色机理研究 [C]//中国园艺学会, 中国工程院农业学部. 中国园艺学会十届二次理事会暨学术研讨会论文摘要集. 北京: 中国园艺学会, 2007: 168.

Miao H. Research on the mechanism of the leaf colour transformation of yellow leaf colour mutant 9110Gt in cucumber (*Cuc-*

umis sativus L.) [C]// Ministry of Agriculture, Chinese Horticulture Society and Chinese Academy of Engineering. Abstract of the paper of the second council and academic seminar of the 10th chinese horticultural society. Beijing: Chinese Horticultural Society, 2007: 168.

[8] Miao H, Zhang S, Wang M, et al. Fine mapping of virescent leaf gene *v-1* in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(10): 1602.

[9] 李万青, 高 波, 杨 俊, 等. 一个新的黄瓜叶色黄化突变体的生理特性分析 [J]. 西北农业学报, 2015, 24(7): 98-103.

Li W Q, Gao B, Yang J, et al. Physiological characteristic analysis of a new leaf color yellow mutant in cucumber [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2015, 24(7): 98-103.

[10] Gao M, Hu L, Li Y, 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129(10): 1-13.

[11] 李 燕. 黄瓜叶色突变体的生理生化及遗传特性研究 [D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2016.

Li Y. Physiological characteristics and genetic analysis of leaf color mutant in cucumber [D]. Ya'an, Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2016.

[12] 胡亮亮, 赵子瑶, 张海强, 等. 一个新的黄瓜叶色突变体的光合特性分析 [J]. 西北农业学报, 2018, 27(11): 1622-1628.

Hu L L, Zhao Z Y, Zhang H Q, et al. Analysis of photosynthetic characteristics of a new cucumber leaf color mutant [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2018, 27(11): 1622-1628.

[13] 董翔宇. 黄瓜叶色黄化突变基因 *yf* 的精细定位及候选基因分析 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2019.

Dong X Y. Fine mapping and candidate gene analysis of a cucumber leaf yellowing mutant gene *yf* [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2019.

[14] 王学奎, 黄见良. 植物生理生化实验原理和技术 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2015: 131-132.

Wang X K, Huang J L. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments [M]. 3rd edition. Beijing: Higher Education Press, 2015: 131-132.

[15] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in beta vulgaris [J]. Plant Physiology, 1949, 24(1): 1-15.

[16] 舒 展, 张晓素, 陈 娟, 等. 叶绿素含量测定的简化 [J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(4): 399-402.

Shu Z, Zhang X S, Chen J, et al. The simplification of chlorophyll content measurement [J]. Plant Physiology Communications, 2010, 46(4): 399-402.

[17] Cavagnaro P F, Senalik D A, Yang L, et al. Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 569.

[18] Ren Y, Zhang Z, Liu J, et al. An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome [J]. PLoS ONE, 2009, 4(6): e5795.

Lu X X,Guo W T,Sun Y,et al. Growth and physiological re-
sponse of tissue culture plantlets of *Limonium sinense* to NaCl
stress [J]. Northern Horticulture,2016(18):154-159.

[35] Dhanyalakshmi Â K H,Vijayalakshmi Â C,Boominathan Â R.
Evaluation of physiological and biochemical responses of rice
(*Oryza sativa* L.) varieties to salt stress [J]. Indian Journal
of Agricultural Research,2013,47(2):91-99.

[36] Zhu J K. Plant salt tolerance [J]. Trends in Plant Science,
2001,6(2):66-71.

[37] Mark T,Romola D. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in high-
er plants [J]. Annals of Botany,2003(5):5.

[38] Rivero R M,Mester T C,Mittler R,et al. The combined effect
of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemi-
cal and molecular response in tomato plants [J]. Plant Cell &
Environment,2014,37(5):1059-1073.

[39] Chakraborty K,Bose J,Shabala L,et al. Difference in root K⁺
retention ability and reduced sensitivity of K⁺-permeable
channels to reactive oxygen species confer differential salt tol-
erance in three *Brassica* species [J]. Journal of Experimental
Botany,2016,67(15):4611-4625.

[40] Flowers T J,Munns R,Colmer T D. Sodium chloride toxicity
and the cellular basis of salt tolerance in halophytes [J]. An-
nals of Botany,2015,115(3):419-431.

[41] Chen T,Wang W,Xu K,et al. K⁺ and Na⁺ transport contrib-
ute to K⁺/Na⁺ homeostasis in *Pyropia haitanensis* under hy-
persaline stress [J]. Algal Research,2019,40:101526.

[42] Abid M,Zhang Y J,Li Z,et al. Effect of salt stress on growth,
physiological and biochemical characters of four kiwifruit gen-
otypes [J]. Scientia Horticulturae,2020,271:109473.

[43] Eerahim F,Arzani A,Rahimmalek M,et al. Salinity tolerance
of wild barley *Hordeum vulgare* ssp. Spontaneum [J]. Plant
Breeding,2020,139(2):304-316.

(上接第 95 页)

[19] Yang L,Koo D H,Li Y,et al. Chromosome rearrangements
during domestication of cucumber as revealed by high-density
genetic mapping and draft genome assembly [J]. Plant Jour-
nal,2012,71(6):895-906.

[20] 李 征. 黄瓜单性花控制 *M/m* 基因的克隆与功能分析 [D].
上海:上海交通大学,2010.

Li Z. Cloning and characterization of unisexual flower-controlling
M/m gene in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [D].
Shanghai:Shanghai Jiaotong University,2010.

[21] Motohashi R,Ito T,Kobayashi M,et al. Functional analysis of
the 37 ku inner envelope membrane polypeptide in chloroplast
biogenesis using a Ds-tagged *Arabidopsis* pale-green mutant
[J]. Plant Journal,2003,34(5):719-731.

[22] 梁艳玲. 一个水稻白穗突变体 *w_p(t)* 的鉴定及基因定位 [D].
重庆:西南大学,2019.

Liang Y L. Identification and gene mapping of a white panicle
mutant *w_p(t)* in rice [D]. Chongqing:Southwest University,
2019.

[23] Qiu Z,Chen D,He L,et al. The rice white green leaf 2 gene
causes defects in chloroplast development and affects the plas-
tid ribosomal protein S9 [J]. Rice,2018,11(1):1-12.

[24] 蒋宏宝. 小麦叶绿素缺失突变体 *B23* 的鉴定及基因定位
[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2018.

Jiang H B. Identification and gene mapping of chlorophyll-de-
ficient mutant *B23* in wheat [D]. Yangling,Shaanxi:North-
west A&F University,2018.

[25] 朱伟伟,陈远良,陈 芳,等. 黄瓜芽黄突变相关基因 *ClpP* 克
隆及植物表达载体构建 [J]. 中国农学通报,2011,27(16):
146-150.

Zhu W W,Chen Y L,Chen F,et al. The clone of *ClpP* rela-
ting to virescent mutant in cucumber and the construction of
plant expression vector [J]. Chinese Agricultural Science Bul-
letin,2011,27(16):146-150.

(上接第 112 页)

[29] 要晓玮,梁银丽,曾 睿,等. 不同有机肥对辣椒品质和产量的
影响 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39
(10):157-162.

Yao X W,Liang Y L,Zeng R,et al. Effects of different organic
fertilizers on the yield and quality of pepper [J]. Journal of
Northwest A&F University(Nat Sci Ed),2011,39(10):157-
162.

[30] 辛 鑫,贾 琪,李 琦,等. 不同电导率的有机营养液种植番
茄效果分析 [J]. 西北农业学报,2019,28(10):1632-1638.

Xin X,Jia Q,Li Q,et al. Effect of organic nutrient solution
with different conductivity tomato growth and fruit quality
[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2019,28
(10):1632-1638.

[31] 范兵华,马乐乐,任瑞丹,等. 有机营养液灌溉频次和灌水量对
设施甜瓜产量、品质及肥水利用效率的影响 [J]. 应用生态学
报,2019,30(4):1261-1268.

Fan B H,Ma L L,Ren R D,et al. Effects of irrigation frequen-
cy of organic nutrient solution and irrigation amount on yield,
quality,fertilizer and water use efficiency of melon in facility
[J]. Chinese Journal of Applied Ecology,2019,30(4):1261-
1268.

[32] 辛 鑫,贾 琪,牟孙涛,等. 不同有机营养液水培番茄效果分
析 [J]. 西北农业学报,2019,28(8):1294-1301.

Xin X,Jia Q,Mou S T,et al. Effect analysis of hydroponic to-
mato with different organic nutrient solution [J]. Acta Agri-
culturae Boreali-occidentalis Sinica,2019,28(8):1294-1301.