

OsGSK2 与 OsGLK1 互作调控水稻叶绿素合成与叶绿体发育

赵楚瑄, 纪晓楠, 刘梦雨, 韩丹, 许可可, 刘喜
(淮阴师范学院生命科学学院, 江苏淮安 223300)

摘要: 叶绿素是水稻光合作用的重要色素, 叶绿素的合成决定光合作用的效率, 影响植物的产量和品质。在本研究中, 发现糖原合成酶激酶 OsGSK2 过表达植株 *Go-2* 成熟期呈现叶片深绿色的表型。相比野生型, *Go-2* 植株叶绿素 a、叶绿素 b 以及类胡萝卜素含量显著升高。透射电镜观察结果显示, 相比野生型, *Go-2* 植株叶绿体类囊体片层增多。酵母双杂交“一对一”实验证实 OsGSK2 与 Golden2-Like 转录因子 OsGLK1 存在互作, 并进一步通过双分子荧光互补实验确认 OsGSK2 与 OsGLK1 存在互作。在水稻原生质体中检测双荧光素酶活性发现, 相比单转 OsGLK1, OsGSK2 与 OsGLK1 共转显著提高下游靶基因的表达水平。荧光定量 PCR 结果表明, 相比野生型, 在 *Go-2* 植株中 OsGLK1 直接调控的靶基因 *OsPORB*、*OsCAO1*、*LHCB6* 等转录水平显著上调。研究结果初步揭示了 OsGSK2 与 OsGLK1 互作调控水稻叶绿素合成和叶绿体发育的分子机理, 进一步拓展了水稻糖原合成酶激酶的分子功能, 丰富了水稻叶色调控的分子网络, 为水稻高光合分子育种提供了理论依据。

关键词: 水稻; OsGSK2; OsGLK1; 叶绿素合成; 叶绿体发育

OsGSK2 Interacts with OsGLK1 to Regulate Chlorophyll Synthesis and Chloroplast Development in Rice

ZHAO Chuxuan, JI Xiaonan, LIU Mengyu, HAN Dan, XU Keke, LIU Xi
(School of Life Science, Huaiyin Normal University, Huai'an 223300, Jiangsu)

Abstract: Chlorophyll is an important pigment in rice photosynthesis, and its synthesis determines the efficiency of photosynthesis, ultimately affecting plant yield and quality. In this study, it was found that the glycogen synthase kinase OsGSK2 overexpressed *Go-2* plants exhibited a dark green leaf phenotype at heading date. Compared to the wild type, the contents of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids in *Go-2* plants significantly increased. The observation results of transmission electron microscopy showed that compared to the wild type, the chloroplast thylakoid layers of *Go-2* plants increased. Yeast two hybrid "one-to-one" experiment confirmed the interaction between OsGSK2 and the Golden2-Like transcription factor OsGLK1, and further confirmed the interaction between OsGSK2 and OsGLK1 through bimolecular fluorescence complementarity experiments. By detecting dual luciferase activity in rice protoplasts, it was found that compared to single transgenic OsGLK1, co transfection of OsGSK2 and OsGLK1 significantly increased the expression level of downstream target genes. The fluorescence quantitative PCR results showed that compared to the wild-type, the transcription levels of target genes (*OsPORB*, *OsCAO1*, *LHCB6*, etc) directly regulated by OsGLK1 were significantly up-regulated in *Go-2* plants. These results provided preliminarily insights on the molecular

收稿日期: 2023-08-21 修回日期: 2023-09-02 网络出版日期: 2023-11-07

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230821001>

第一作者研究方向为水稻分子育种, E-mail: 1847549271@qq.com

通信作者: 刘喜, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: 1240623244@qq.com

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK20191055); 江苏高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师; 江苏省大学生创新创业训练计划重点项目 (202210323029Z)

Foundation projects: Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20191055); Outstanding Backbone Young Teachers of Jiangsu Qinglan Project; Key Projects of Jiangsu Province College Student Innovation Training Program (202210323029Z)

mechanism of the interaction between OsGSK2 and OsGLK1 in regulating rice chlorophyll synthesis and chloroplast development, extending the molecular function of rice glycogen synthase kinase, enriching the regulation network of rice leaf color, and providing theoretical basis for high photosynthetic molecular breeding in rice.

Key words: rice; OsGSK2; OsGLK1; chlorophyll synthesis; chloroplast development

水稻是我国乃至世界上最重要的粮食作物之一,提供了全球近 50% 人口的食物来源。水稻增产对保障食物安全和人民生活水平具有极其重要的作用^[1]。稻米的营养价值高,含有碳水化合物、蛋白质、脂肪和灰分等成分。水稻可以适应多种生态环境并且是一种高产作物,它保障了粮食安全、农民收入、经济发展和社会稳定。

叶绿素在水稻中起着重要的调控作用,涉及到光合作用、生长发育和环境适应等方面^[2]。叶绿素是水稻光合作用的关键色素,能够吸收光能并转化为化学能以支持植物的生长和发育;叶绿素通过吸收光能来保护其他叶绿素和光合色素免受过量光能的损伤;叶绿素的合成和功能需要营养元素的支持,特别是氮、铁和镁等元素。叶绿素对这些元素的吸收、转运和利用起到调控作用,确保水稻植株的正常生长和光合作用的进行^[3-4]。以模式植物拟南芥为研究对象,科学家鉴定克隆了 27 个参与叶绿素合成的基因,揭示了从谷氨酰-tRNA 开始,最终合成叶绿素 a、b 的完整分子通路^[5]。叶绿素的合成和调控涉及多个基因的参与: *POR* (*Protochlorophyllide oxidoreductase*)、*CHLI*、*GGR* (*Geranylgeranyl reductase*)、*CAO* (*chlorophyll a oxygenase*) 等^[5-6]。*POR* 基因编码光合体中的一个关键酶,参与叶绿素 a 的合成过程,它催化光合体中的光合色素前体原叶绿素酸转化为叶绿素 a^[7]。*CHLI* 基因编码镁离子螯合酶复合物 I 亚基,参与叶绿素合成的第一个关键步骤^[8]。*GGR* 基因参与叶绿素合成途径中色素的前体还原^[9]。

OsGSK2 编码一个与拟南芥 BIN2 同源的类 GSK3/SHAGGY 激酶,广泛参与水稻油菜素内酯 (BR, brassinolide) 信号转导、株高、籽粒发育、种子萌发、抗病毒等多个细胞信号传导通路和生物学过程^[10-12]。在水稻中, *OsGSK2* 过表达植株 *Go-1*、*Go-2* 均表现出叶色深绿、矮化、叶片直立、分蘖减少、抽穗延迟等表型,而下调 *OsGSK2* 及其同源基因转基因植株表现出叶夹角增大、籽粒变大的表型^[13]。研究者通过生物化学、分子生物学等技术手段筛选到 10 余个 *OsGSK2* 的互作蛋白 (*DLT*、*RLA1/SMOS1*、

OML4、*OsBZR1* 等),揭示了 *OsGSK2* 在水稻株型、籽粒大小、抗病毒病等的调控机制^[14-15]。然而, *OsGSK2* 在水稻叶绿素合成和叶绿体发育过程中的作用机制仍是未知的。

相比 *Go-1*,在 *Go-2* 植株中 *OsGSK2* 的表达水平更高,叶色深绿表型更为显著^[13]。本研究拟通过 *OsGSK2* 过表达植株 *Go-2* 叶色表型观察、叶绿素含量测定、叶绿体透射电镜观察、*OsGSK2* 互作蛋白筛选、基因表达分析等方法明确 *OsGSK2* 在水稻叶绿素合成和叶绿体发育过程中的作用,初步揭示其调控叶色的分子机理,拓展了 *OsGSK2* 的分子功能,为水稻高光合育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

粳稻中花 11 和 *OsGSK2* 过表达植株 *Go-2*^[13],粳稻中花 11 由本实验室保存, *Go-2* 由中国农业科学院童红宁研究员赠与。所有水稻材料按照行距 20 cm、株距 13 cm 种植于淮阴师范学院生物科技园内,采用常规大田生产管理措施。

1.2 叶绿素含量测定与透射电镜观察

在成熟期,剪取野生型 WT (Wild type) 和过表达植株 *Go-2* 叶片各 0.1 g,置于 95% 无水乙醇中,黑暗放置 48 h,利用双通道紫外分光亮度计测定在 663、645、470 nm 波长下的吸光值,具体叶绿素含量测定方法参考许子怡等^[16],设置 3 个生物学重复。

在成熟期,取田间生长的野生型 WT 和过表达植株 *Go-2* 叶片,置于 2.5% 戊二醛固定液中,抽真空 2 h,而后置于 4 °C 保存。将固定好的样品避光送至青岛科创质量检测有限公司进行后续样品的处理和透射电镜观察。

1.3 酵母双杂交

设计引物 *OsGSK2*-BD-F/R、*OsGLK1*-AD-F/R 分别扩增基因 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 的全长编码区,PCR 体系如下: cDNA 2 μL,引物共 2 μL, KOD Mix 46 μL; PCR 程序如下: 在 98 °C 下变性 10 s,在 55 °C 下退火 30 s,在 68 °C 下延伸 90 s, 33 个循环。接着利用限制性内切酶 *EcoR* I/*Bam*HI 酶切结合结构域

载体BD(pGBKT7)与激活结构域载体AD(pGADT7)。限制性内切酶购自 Takara 生物公司, pGBKT7 与 pGADT7 载体由本实验室自行保存。利用南京诺唯赞生物科技股份有限公司的重组试剂盒(#C112-01)进行目的片段和载体融合,而后转化大肠杆菌,挑菌送安徽通用生物有限公司测序,测序结果利用软件 BioXM 2.6 进行序列比对,确定阳性克隆 OsGSK2-BD、OsGLK1-AD。具体操作参考试剂盒说明书。以 OsGSK2-BD+AD、BD+OsGLK1-AD 为对照组,OsGSK2-BD+OsGLK1-AD 为实验组。

将 OsGSK2-BD、OsGLK1-AD、AD、BD 等质粒进行组合,利用 Takara 酵母转化试剂盒分别转入酵母感受态细胞 AH109(实验室自行保存)中,涂布于酵母缺陷培养基(SD-Leu/-Trp),置于 30 °C 培养

2~3 d。每个组合挑选 3~5 个单克隆置于酵母筛选培养基(SD-Ade/-His/-Leu/-Trp)上 3~5 d,观察酵母生长情况。

1.4 双分子荧光互补(BiFC)

以粳稻中花 11 叶片 cDNA 为模板,设计引物 OsGSK2-nYFP-F/R、OsGLK1-cYFP-F/R,利用 KOD 高保真性聚合酶(TOYOBO, #KOD-201)分别扩增基因 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 的编码区(去除终止密码子),PCR 体系与程序同 1.3。用限制性内切酶 *Pac I* / *Spe I* 酶切载体 nYFP 与 cYFP(本实验室自行保存),片段与载体融合及转化如上所述,得到重组质粒 OsGSK2-nYFP、OsGLK1-cYFP。载体构建所用引用引物序列如表 1 所示。

表 1 构建载体所用引物

Table 1 Primers used in the construction of vectors

引物名称 Primer name	正向引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物 (5'-3') Revers primer (5'-3')
OsGLK1-AD	GGAGGCCAGTGAATTCATGCTTGCCGTGTCGCCG GC	CGAGCTCGATGGATCCATCCACACGCTGGAGG AA
OsGSK2-BD	CATGGAGGCCGAATTCATGGACCAGCCGGCGCCG GC	GCAGGTCGACGGATCCCTTAGCTCCCAGTATTGAA GA
OsGLK1-p2YC	CATTTACGAACGATAGTTAATTAATGCTTGCCGT GTCGCCGGC	CACTGCCACCTCCTCCACTAGTCCACACGCTGG AGGAA
OsGSK2-p2YN	CATTTACGAACGATAGTTAATTAATGGACCAGCC GGCGCCGGC	CACTGCCACCTCCTCCACTAGTCTCCCAGTATTG AAGAA
OsGLK1-pAN580	CGGAGCTAGCTCTAGAATGCTTGCCGTGTCGCCG GC	TGCTCACCATGGATCCCTCCACACGCTGGAGGAA
OsGSK2-pAN580	CGGAGCTAGCTCTAGAATGGACCAGCCGGCGCCG GC	TGCTCACCATGGATCCGCTCCCAGTATTGAAGA
OsHEMA-PRO-LUC	TTGATATCGAATTCCTGCAGCAACGGCGGAGAA AGGAAC	TAGAAGCTAGTGGATCCCAGATCAAGAAAGCACCA GC

下划线标出的碱基代表限制性内切酶位点

The underlined bases represent the restriction endonuclease site

将 OsGSK2-nYFP、OsGLK1-cYFP 等重组质粒转入农杆菌 EHA105(本实验室保存)中,进而侵染一月龄的烟草,放置 2~3 d,利用激光共聚焦显微镜观察拍照,以 OsGSK2-nYFP+cYFP、nYFP+OsGLK1-cYFP 为对照组,OsGSK2-nYFP+OsGLK1-cYFP 为实验组。BiFC 具体操作步骤参考 Lan 等^[17]。

1.5 转录激活活性分析

以粳稻中花 11 叶片 cDNA 为模板,设计引物(OsGLK1-pAN580-F/R、OsGSK2-pAN580-F/R)分别扩增基因 *OsGSK2*、*OsGLK1* 的编码区(去除终止密码子),PCR 与体系程序同 1.3。以粳稻中花 11

叶片 DNA 为模板,设计引物(OsHEMA-PRO-LUC-F/R)扩增基因 *OsHEMA* 的启动子。PCR 体系如下:DNA 2 μL,引物 2 μL,KOD Mix 46 μL;PCR 程序如下:在 98 °C 下变性 10 s,在 55 °C 下退火 30 s,在 68 °C 下延伸 2 min,33 个循环。利用限制性内切酶 *Xba I*/*BamH I* 酶切载体 pAN580(本实验室自行保存)以及用 *Pst I*/*Spe I* 酶切载体 pGreen II 0800-LUC(本实验室自行保存),片段与载体融合及转化如上所述,得到重组质粒 OsGLK1-pAN580、OsGSK2-pAN580。载体构建所用引物序列如表 1 所示。

OsGLK1-pAN580、OsGSK2-pAN580、pAN580 质粒与 LUC 报告载体质粒 OsHEMA-PRO-LUC 进行组合,转化水稻原生质体,利用普洛麦格(北京)生物技术有限公司双荧光素酶测定试剂盒检测荧光素酶(LUC, luciferase)活性,设置 3 个生物学重复。具体操作参考试剂盒说明书和 Zhang 等^[18]。

1.6 RNA 提取和荧光定量 PCR

在成熟期,取野生型 WT 和过表达植株 *Go-2* 叶片,液氮研磨,置于 2.0 mL 离心管中,利用天根生化科技(北京)有限公司生产的植物组织 RNA 快速提取试剂盒(RNA Easy Fast kit)提取 RNA,置于 -80 °C 保存备用。

表 2 基因表达水平分析所用引物

Table 2 Primers used for gene expression level analysis

基因名称 Gene name	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Revers primer(5'-3')
<i>UBQ</i>	ACCCTGGCTGACTACAACATC	AGTTGACAGCCCTAGGGTG
<i>LHCB2</i>	ACCATGCGCCGCACCGTCAA	ATAGCCCCGCCGTGTCCCAC
<i>LHCA3</i>	ACCAAGAGCGAGGCGGAGATGA	TGGAACCTTGAGGCTGGTGAGGATGT
<i>LHCA1</i>	TGCTGGCTTTTGTGGGTTTC	TCTCGGGATGATGATGTCGC
<i>LHCB6</i>	TGGCTCGCTCCCCGGTGA	CTCCACGCCTGCCCGACGAA
<i>LHCB4</i>	AGCGCTTCCGCGAGTGCGAGCTCAT	TACGACGACCCATCCACCAG
<i>LHCA2</i>	AGAGCTTGCAGGTGGAACGTG	GGATGCCGATCTTGGTCAGG

2 结果与分析

2.1 *OsGSK2* 过表达植株 *Go-2* 表型分析

与野生型相比, *Go-2* 在成熟期叶片深绿色(图 1A)。为进一步分析 *Go-2* 叶片深绿色的原因,在成熟期分别取野生型和 *Go-2* 的叶片,测定光合色素含量。如图 1B 所示,相比野生型,叶绿素 a、叶绿素 b 以及类胡萝卜素含量在过表达植株 *Go-2* 分别提高了 72.9%、52.3%、9.8%。

2.2 透射电镜观察叶绿体形态结构

如图 1 所示,激酶 *OsGSK2* 正调控水稻叶绿素合成。为了解 *OsGSK2* 基因是否影响水稻叶绿体发育,通过透射电镜观察成熟期野生型和过表达植株 *Go-2* 剑叶叶绿体超微结构。如图 2 所示,相比野生型, *OsGSK2* 过表达植株叶绿体类囊体增多,基粒片层结构增多。

2.3 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 互作

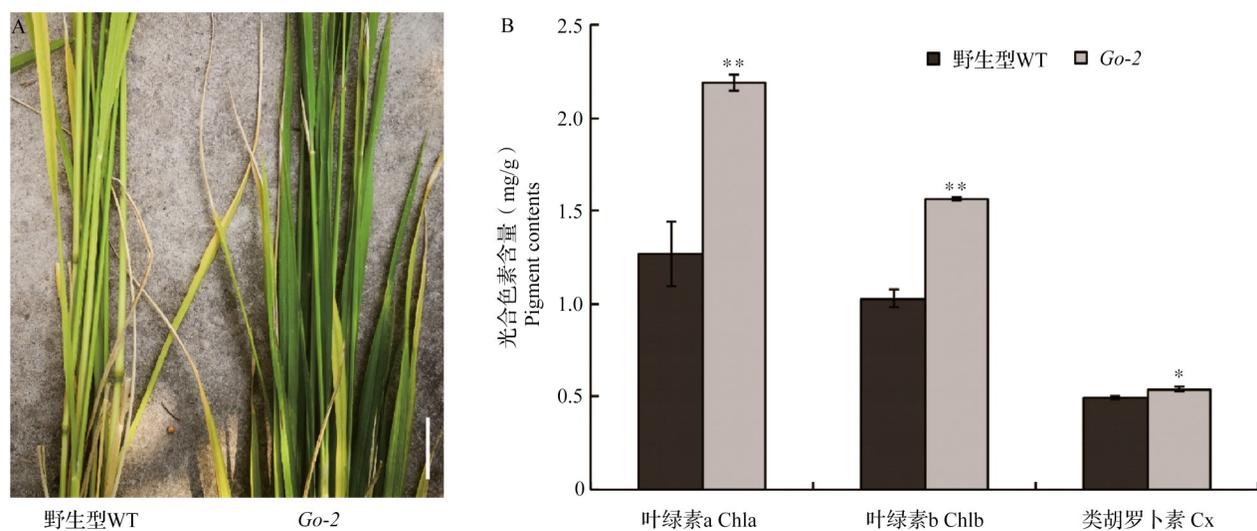
为深入解析 *OsGSK2* 调控水稻叶绿体发育和叶绿素合成的分子机理,利用酵母双杂交系统筛选 *OsGSK2* 的互作蛋白。如图 3 所示,转入 *OsGSK2*-

以野生型 WT 和过表达植株 *Go-2* 叶片 cDNA 为模板,利用 Takara 公司生产的 TB Green® Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) 试剂在伯乐 CFX96 荧光定量 PCR 仪进行荧光定量 PCR。PCR 体系: 8.8 μL cDNA, 1.2 μL 引物, 10 μL Mix; PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 15 s, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 共进行 40 次循环; 设置 3 个生物学重复。以水稻内参基因 *UBQ* (*LOC_Os03g_13170*) 作为对照, 基因表达所用引物如表 2 所示。叶绿素合成相关基因 (*OsHEMA*、*OsPORB*、*OsCAO1*) 与 6 个光捕获复合体亚基 (*LHCB6*、*LHCB2*、*LHCB4*、*LHCA1*、*LHCA2*、*LHCA3*) 的表达分析引物参考 Zhang^[18] 等和 Zeng 等^[19]。

BD+*OsGLK1*-AD 质粒的酵母细胞在酵母筛选培养基上生长良好, 而对照组不能正常生长。 *OsGLK1* 编码一个 Golden2-Like 转录因子, 参与控制叶绿体发育^[20]。

为进一步验证 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 互作关系的真实性, 构建了 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 双分子荧光互补载体, 侵染烟草, 通过激光共聚焦显微镜观察荧光信号, 从而确定 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 的互作。如图 4 所示, 在烟草细胞中, 可以观察到 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 组合的荧光信号, 而对照组没有荧光, 上述结果显示, *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 存在互作关系。

为进一步探究 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 互作的生物学意义, 在水稻原生质体中, 通过荧光素酶活性检测分析 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 互作对其转录活性的影响。如图 5 所示, 相比对照组, *OsGLK1* 可以显著激活 *OsHEMA* 的表达; 当 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 同时存在时, *OsHEMA* (转录活性) 的表达水平更高。上述结果表明, *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 互作增强 *OsGLK1* 的转录活性。

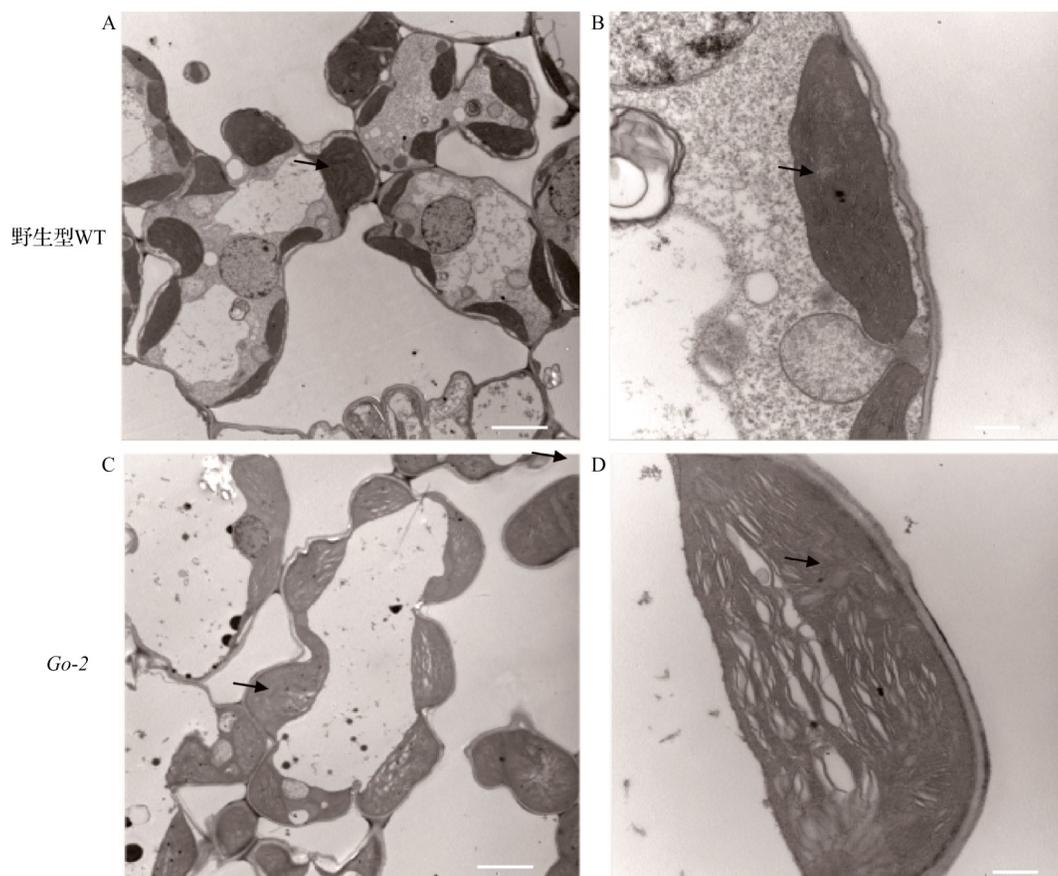


A: 成熟期野生型和 *Go-2* 植株表型, 比例尺为 5 cm; B: 成熟期野生型和 *Go-2* 植株叶绿素含量测定; *和**分别代表在 0.05 与 0.01 水平达到显著与极显著差异, 下同

A: At maturity, wild-type and *Go-2* plant phenotypes, Bars=5cm; B: Determination of chlorophyll content of wild type and *Go-2* plants at maturity; *and ** respectively represent significant and extremely significant differences at the 0.05 and 0.01 levels, the same as below

图 1 *OsGSK2* 过表达植株 *Go-2* 成熟期叶色表型

Fig.1 Leaf color phenotypes of *OsGSK2* overexpressed plant *Go-2* at maturity



A, B: 野生型的叶绿体透射电镜观察; C, D: *Go-2* 的叶绿体透射电镜观察; A, C 标尺为 5 μ m; B, D 标尺为 1 μ m; 黑色箭头指示叶绿体类囊体结构
A, B: Transmission electron microscope observation of wild-type chloroplasts; C, D: Chloroplast observation of *Go-2* by transmission electron microscope; Bars=5 μ m in A and C; Bars=1 μ m in B and D; Black arrows indicate chloroplast thylakoid structure

图 2 叶绿体透射电镜观察

Fig.2 Transmission electron microscopy observation of chloroplasts

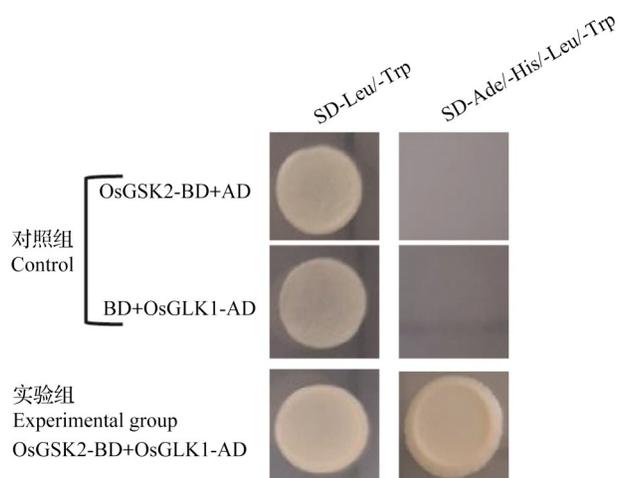


图3 酵母双杂交分析

Fig.3 Yeast two hybrid analysis

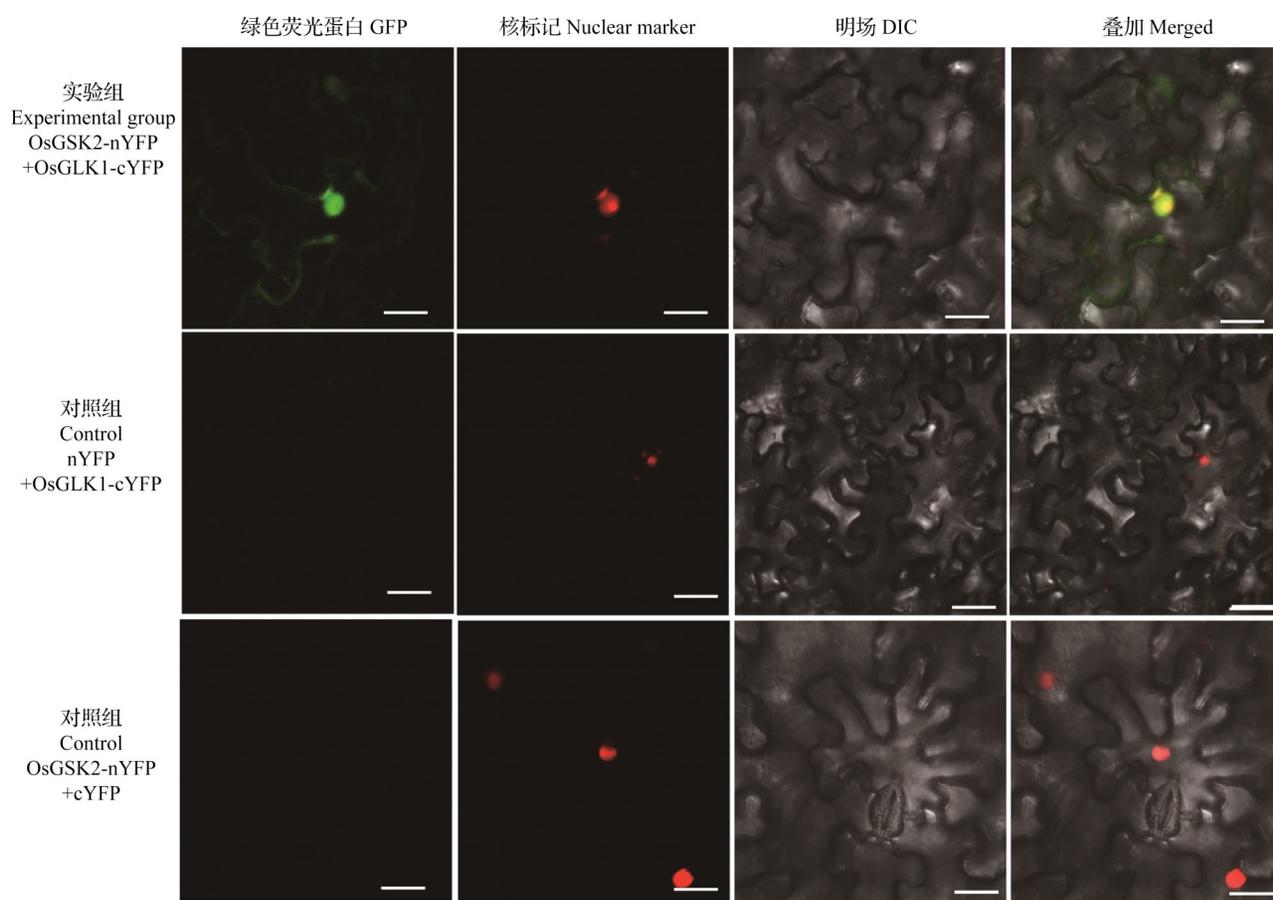
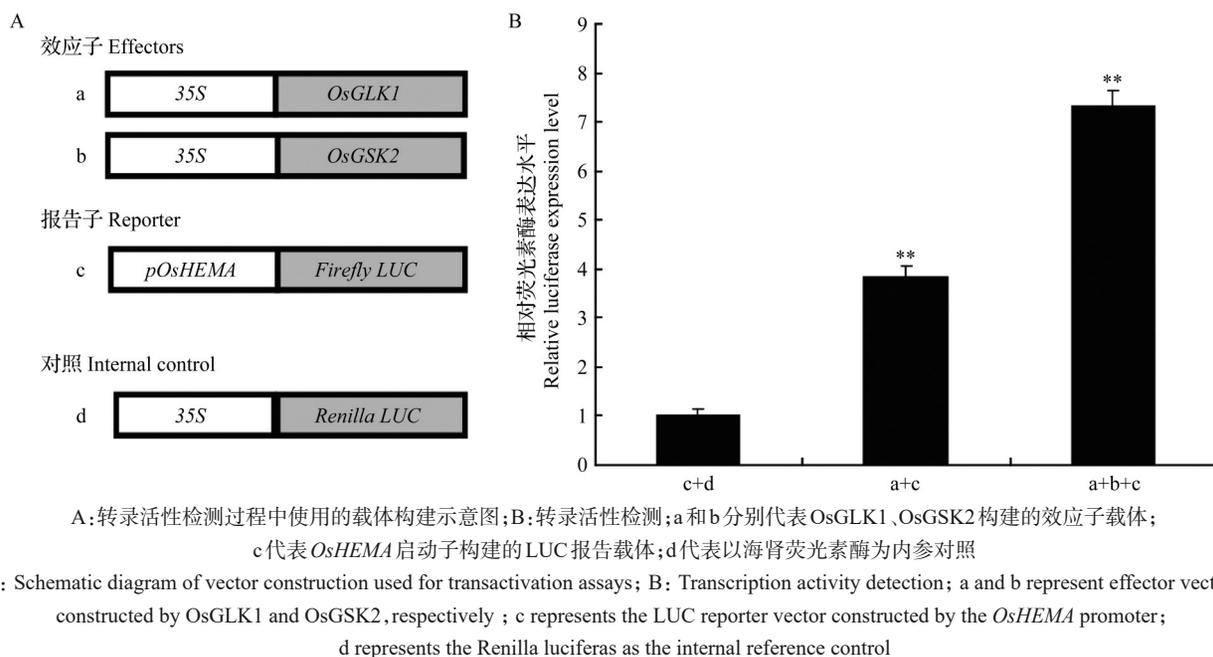
比例尺为 10 μm GFP: Green fluorescent protein ; DIC: Differential interference contrast; Bars=10 μm

图4 双分子荧光互补分析

Fig.4 Bimolecular fluorescence complementary analysis

图5 *OsGLK1* 转录活性分析Fig.5 *OsGLK1* transcription activity analysis

2.4 叶绿素合成基因表达分析

前期研究, *OsGLK1* 可以直接结合叶绿素合成基因 *OsPORB*、*OsCAOI* 的启动子, 进而正调控其表达^[21]。利用荧光定量PCR分析了叶绿素合成相关基因 *OsHEMA*、*OsPORB*、*OsCAOI* 在野生型和过表达植株 *Go-2* 中的表达水平。相比野生型,

OsHEMA、*OsPORB*、*OsCAOI* 的表达水平在过表达植株 *Go-2* 中显著升高(图6)。这与过表达植株 *Go-2* 光合色素含量升高的表型相一致的。上述结果表明, *OsGSK2* 过表达激活了叶绿素合成基因的表达。

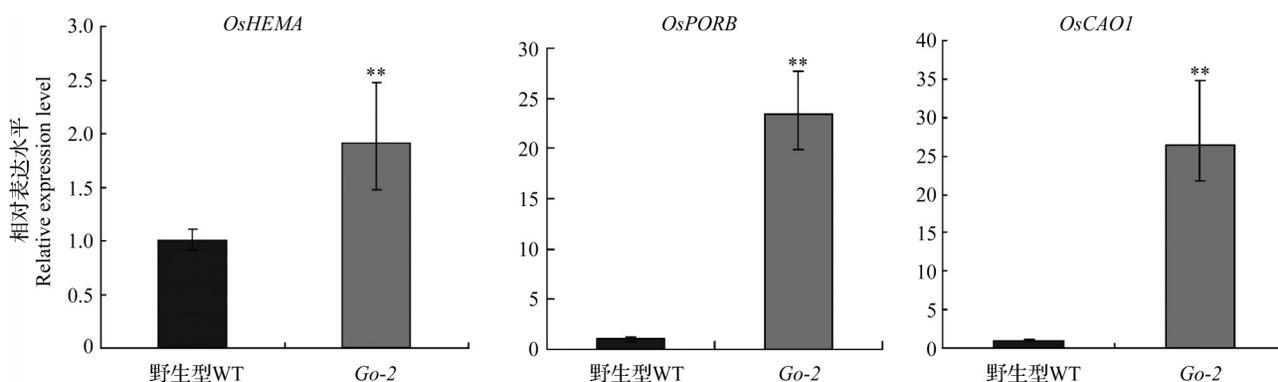


图6 叶绿素合成基因表达分析

Fig.6 The expression level of chlorophyll synthesis genes

2.5 光合作用相关基因表达分析

转录因子 *OsGLK1* 直接调控6个光捕获复合体亚基 (*LHCB6*、*LHCB2*、*LHCB4*、*LHCA1*、*LHCA2*、*LHCA3*) 的表达, 控制水稻叶绿体发育^[21]。相比野

生型, *LHCB6*、*LHCB4*、*LHCA2*、*LHCB2*、*LHCA3*、*LHCA1* 的表达水平在过表达植株 *Go-2* 中均显著提高(图7)。

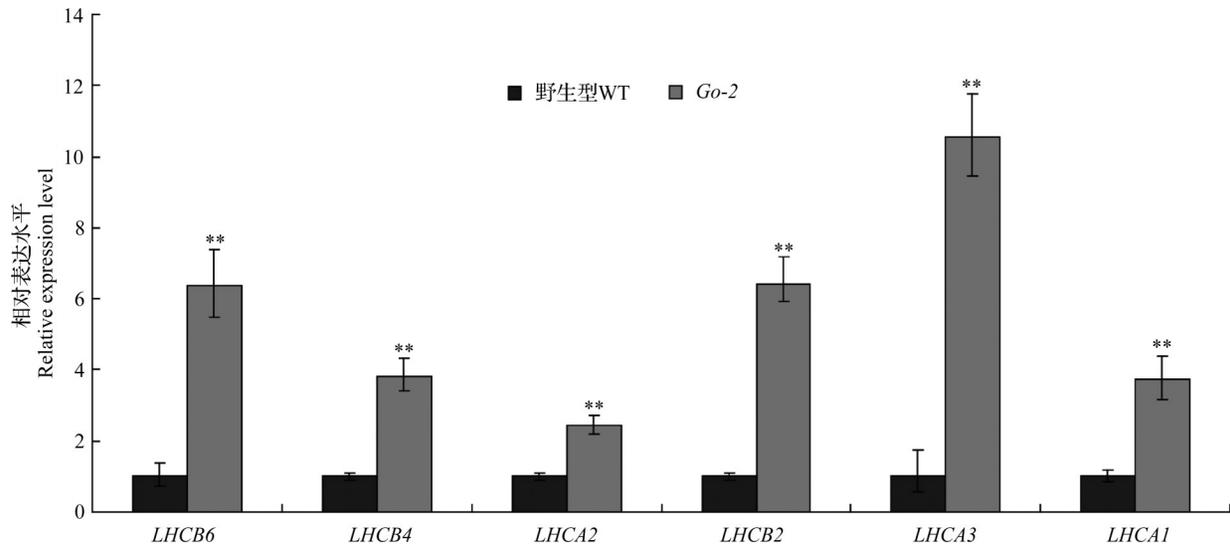


图7 光合作用相关基因表达分析

Fig.7 The expression level of genes related to photosynthesis

3 讨论

叶色相关突变体是研究水稻叶绿素合成和叶绿体发育的理想材料^[22-24]。目前,在水稻中已经克隆鉴定出超过120个叶色相关基因,初步揭示了水稻叶绿素合成和叶绿体发育的分子机制^[24-25]。前期研究表明,糖原合成酶激酶基因 *OsGSK2* 过表达植株叶片表现出深绿色的表型^[13]。*OsGSK2* 是水稻油菜素内酯信号途径的负调控因子,能够磷酸化下游底物蛋白,维持底物蛋白的稳定性或促进底物蛋白的降解,进而参与控制水稻生长发育^[14-15]。在拟南芥中,*OsGSK2* 同源蛋白 *BIN2* 与转录因子 *GLK1* 和 *GLK2* 互作,并磷酸化 *GLK1* 和 *GLK2*,影响 *GLK1* 蛋白稳定性和DNA结合能力,参与调控黑暗下叶绿体发育^[26]。然而,*OsGSK2* 参与调控水稻叶色的分子机理仍是未知的。

在本研究中,过表达植株 *Go-2* 成熟期叶片呈现深绿色,叶绿素含量显著升高,叶绿体类囊体片层结构增多,证明了 *OsGSK2* 正调控水稻叶绿素合成和叶绿体发育。酵母双杂交、双分子荧光互补以及荧光素酶活性检测实验证实 *OsGSK2* 与 Golden2-Like 转录因子 *OsGLK1* 互作,并增强 *OsGLK1* 的转录活性。此外,*OsGLK1* 下游靶基因(*OsPORB*、*OsCAO1*、*LHCB6*等)的转录水平在过表达植株 *Go-2* 体内显著上调。原叶绿素酸酯氧化还原酶 B (*OsPORB*, Protochlorophyllide Oxidoreductase B)催化叶绿素合成中的原叶绿素酸酯氧化还原成叶绿素酸酯,受高光诱导迅速上调表达,是维持依赖光的叶绿素合成所必需的^[27]。*OsPORB* 突变体叶呈淡绿色,叶绿素

a、b以及类胡萝卜素含量显著降低,株高矮化,提前衰老^[27]。*OsCAO1* 是叶绿素 a 加氧酶基因,催化叶绿素 a 合成叶绿素 b,其突变体表现出叶色变淡、株高变矮的表型^[28-29]。

在水稻中,Golden2-Like 转录因子有 *OsGLK1* 与 *OsGLK2*。本研究证实了 *OsGSK2* 与 *OsGLK1* 互作,但是 *OsGSK2* 与 *OsGLK2* 互作关系与 *OsGLK1* 与 *OsGLK2* 在调控叶绿体发育方面是否存在功能冗余是未知的。此外,*OsGSK2* 编码的产物是激酶,一般会磷酸化互作蛋白,*OsGLK1* 是否是 *OsGSK2* 直接磷酸化底物蛋白。这些问题都是我们下一步研究的重点。综上,*OsGSK2* 通过与 *OsGLK1* 互作,进而增强 *OsGLK1* 的转录激活活性,促进下游叶绿素合成和叶绿体发育相关基因的表达,进而调控水稻叶色。

参考文献

- [1] 黄欣乐,郑百龙.产量及面积视角的中国水稻生产变动.江苏农业科学,2020,48(2):311-316
Huang X L, Zheng B L. Changes in rice production in China from the perspective of yield and area. Jiangsu Agricultural Science, 2020, 48 (2): 311-316
- [2] 杨颜榕,黄纤纤,赵亚男,汤佳玉,刘喜.水稻叶色基因克隆与分子机制研究进展.植物遗传资源学报,2020,21(4):794-803
Yang Y R, Huang Q Q, Zhao Y N, Tang J Y, Liu X. Advances on gene isolation and molecular mechanism of rice leaf color genes. Journal of Plant Genetic Resources, 2020, 21 (4): 794-803
- [3] 李佳佳,于旭东,蔡泽坪,吴繁花,罗佳佳,郑李婷,楚文清.高等植物叶绿素生物合成研究进展.分子植物育种,2019,17

- (18):6013-6019
Li J J, Yu X D, Cai Z P, Wu F H, Luo J J, Zheng L T, Chu W Q. An overview of chlorophyll biosynthesis in higher plants. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(18):6013-6019
- [4] 于宇璇, 刘储睿, 唐文竹. 利用蛋白质组学技术探究叶绿素含量对植物生长的影响. *质谱学报*, 2023, 44(4):545-555
Yu Y X, Liu C R, Tang W Z. Exploring the effect of chlorophyll content on plant growth using proteomics techniques. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2023, 44(4):545-555
- [5] 董书琦, 陈达, 秦巧平, 吴国平, 张志国, 倪迪安. 高等植物叶绿素和类胡萝卜素代谢研究进展. *植物生理学报*, 2023, 59(5):793-802
Dong S Q, Chen D, Qin Q P, Wu G P, Zhang Z G, Ni D A. Advances in metabolism of chlorophylls and carotenoids in higher plants. *Plant Physiology Journal*, 2023, 59(5):793-802
- [6] 李根, 张成, 王强, 王科, 刘思汐, 杨勋, 吴继开, 卿秋静. 植物叶绿素代谢途径及其分子调控. *四川农业科技*, 2021(4):41-45
Li G, Zhang C, Wang Q, Wang K, Liu S X, Yang X, Wu J K, Qing Q J. Plant chlorophyll metabolism pathway and its molecular regulation. *Sichuan Agricultural Science and Technology*, 2021(4):41-45
- [7] Liang M, Gu D, Lie Z, Yang Y, Lu L, Dai G, Peng T, Deng L, Zheng F, Liu X. Regulation of chlorophyll biosynthesis by light-dependent acetylation of NADPH: protochlorophyll oxidoreductase A in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 2023, 330:111641
- [8] Ma Y Y, Shi J C, Wang D J, Liang X, Wei F, Gong C M, Qiu L J, Zhou H C, Folta K M, Wen Y Q, Feng J Y. A point mutation in the gene encoding magnesium chelatase I subunit influences strawberry leaf color and metabolism. *Plant Physiology*, 2023, 192(4):2737-2755
- [9] Zhou F, Wang C Y, Gutensohn M, Jiang L, Zhang P, Zhang D, Dudareva N, Lu S. A recruiting protein of geranylgeranyl diphosphate synthase controls metabolic flux toward chlorophyll biosynthesis in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(26):6866-6871
- [10] He Y, Hong G, Zhang H, Tan X, Li L, Kong Y, Sang T, Xie K, Wei J, Li J, Yan F, Wang P, Tong H, Chu C, Chen J, Sun Z. The OsGSK2 kinase integrates brassinosteroid and jasmonic acid signaling by interacting with OsJAZ4. *Plant Cell*, 2020, 32(9):2806-2822
- [11] Hu J, Huang J, Xu H, Wang Y, Li C, Wen P, You X, Zhang X, Pan G, Li Q, Zhang H, He J, Wu H, Jiang L, Wang H, Liu Y, Wan J. Rice stripe virus suppresses jasmonic acid-mediated resistance by hijacking brassinosteroid signaling pathway in rice. *PLoS Pathogens*, 2020, 16(8):e1008801
- [12] Mao J, Li W, Liu J, Li J. Versatile physiological functions of plant GSK3-like kinases. *Genes (Basel)*, 2021, 12(5):697
- [13] Tong H, Liu L, Jin Y, Du L, Yin Y, Qian Q, Zhu L, Chu C. DWARF AND LOW-TILLERING acts as a direct downstream target of a GSK3/SHAGGY-like kinase to mediate brassinosteroid responses in rice. *Plant Cell*, 2012, 24(6):2562-2577
- [14] Song Y, Wang Y, Yu Q, Sun Y, Zhang J, Zhan J, Ren M. Regulatory network of GSK3-like kinases and their role in plant stress response. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14:1123436
- [15] Youn J H, Kim T W. Functional insights of plant GSK3-like kinases: Multi-taskers in diverse cellular signal transduction pathways. *Molecular Plant*, 2015, 8(4):552-565
- [16] 许子怡, 程行, 沈奇, 赵亚男, 汤佳玉, 刘喜. 水稻黄绿叶突变体 *yg13* 的鉴定与基因功能分析. *中国农业科学*, 2021, 54(15):3149-3157
Xu Z Y, Cheng H, Shen Q, Zhao Y N, Tang J Y, Liu X. Identification and gene functional analysis of yellow green leaf mutant *yg13* in rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54(15):3149-3157
- [17] Lan J, Lin Q, Zhou C, Liu X, Miao R, Ma T, Chen Y, Mou C, Jing R, Feng M, Nguyen T, Ren Y, Cheng Z, Zhang X, Liu S, Jiang L, Wan J. *Young Leaf White Stripe* encodes a P-type PPR protein required for chloroplast development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(7):1687-1702
- [18] Zhang C, Zhang J, Tang Y, Liu K, Liu Y, Tang J, Zhang T, Yu H. DEEP GREEN PANICLE1 suppresses GOLDEN2-LIKE activity to reduce chlorophyll synthesis in rice glumes. *Plant Physiology*, 2021, 185(2):469-477
- [19] Zeng Z Q, Lin T Z, Zhao J Y, Zheng T H, Xu L F, Wang Y H, Liu L L, Jiang L, Chen S H, Wan J M. *OsHema* gene, encoding glutamyl-tRNA reductase (GluTR) is essential for chlorophyll biosynthesis in rice (*Oryza sativa*). *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19(3):612-623
- [20] Nakamura H, Muramatsu M, Hakata M, Ueno O, Nagamura Y, Hirochika H, Takano M, Ichikawa H. Ectopic overexpression of the transcription factor *OsGLK1* induces chloroplast development in non-green rice cells. *Plant Cell and Physiology*, 2009, 50(11):1933-1949
- [21] Sakuraba Y, Kim E Y, Han S H, Piao W, An G, Todaka D, Yamaguchi-Shinozaki K, Paek N C. Rice Phytochrome-Interacting Factor-Like1 (OsPIL1) is involved in the promotion of chlorophyll biosynthesis through feed-forward regulatory loops. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(15):4103-4114
- [22] Yu H, Hu M, Hu Z, Liu F, Yu H, Yang Q, Gao H, Xu C, Wang M, Zhang G, Wang Y, Xia T, Peng L, Wang Y. Insights into pectin dominated enhancements for elimination of toxic Cd and dye coupled with ethanol production in desirable lignocelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 286:119298
- [23] 文杜娟, 陈风波. 杂交水稻种植对社会经济的影响. *作物研究*, 2014, 28(4):402-405
Wen D J, Chen F B. The social and economic impact of hybrid rice planting. *Crop Research*, 2014, 28(4):402-405

- [24] 徐明远, 何鹏, 赖伟, 陈梁海, 戈伶俐, 刘世强, 杨寅桂. 植物叶色变异分子机制研究进展. 分子植物育种, 2021, 19(10):3448-3455
Xu M Y, He P, Lai W, Chen L H, Ge L L, Liu S Q, Yang Y G. Advances in molecular mechanism of plant leaf color variation. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(10):3448-3455
- [25] 戴若惠, 钱心妤, 孙静蕾, 芦涛, 贾绮玮, 陆天麒, 路梅, 饶玉春. 水稻叶色调控机制及相关基因研究进展. 植物学报, 2023, 58(5):1-14
Dai R H, Qian X Y, Sun J L, Lu T, Jia Q W, Lu T Q, Lu M, Rao Y C. Research progress on the mechanism of leaf color regulation and related genes in rice. *Chinese Bulletin of Botany*, 2023, 58(5):1-14
- [26] Zhang D, Tan W, Yang F, Han Q, Deng X, Guo H, Liu B, Yin Y, Lin H. A BIN2-GLK1 signaling module integrates brassinosteroid and light signaling to repress chloroplast development in the dark. *Development Cell*, 2021, 56(3):310-324
- [27] Kang S J, Fang Y X, Zou G X, Ruan B P, Zhao J, Dong G J, Yan M X, Gao Z Y, Zhu L. *White-Green Leaf Gene* encoding protochlorophyllide oxidoreductase B is involved in chlorophyll synthesis of rice. *Crop Science*, 2015, 55(1):284-293
- [28] Yang Y, Xu J, Huang L, Leng Y, Dai L, Rao Y, Chen L, Wang Y, Tu Z, Hu J, Ren D, Zhang G, Zhu L, Guo L, Qian Q, Zeng D. *PGL*, encoding chlorophyllide a oxygenase 1, impacts leaf senescence and indirectly affects grain yield and quality in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2016, 67(5):1297-310
- [29] Lee S, Kim J H, Yoo E S, Lee C H, Hirochika H, An G. Differential regulation of chlorophyll a oxygenase genes in rice. *Plant Molecular Biology*, 2005, 57(6):805-818