

甘蓝型油菜叶片白化分子机理研究

叶沈华, 马晓伟, 杨杰, 李嘉欣, 赵伦, 易斌, 马朝芝, 涂金星, 沈金雄, 傅廷栋, 文静

(华中农业大学植物科学技术学院, 国家油菜工程技术研究中心, 武汉 430070)

摘要: 叶色突变体是研究色素代谢和叶绿体发育机制的重要种质资源。为解析甘蓝型油菜温度敏感型白叶突变体形成的分子机制, 本研究对两个甘蓝型油菜人工合成种姊妹系绿叶株系 G7097 和白叶株系 W7105 进行了生理指标测定和转录组分析。在冬季低温条件下, W7105 白叶的叶绿素和类胡萝卜素含量显著减少, 叶绿体发育异常。与绿叶相比, 白叶的净光合速率 (P_n) 显著降低, 细胞间 CO_2 浓度 (C_i) 显著升高。在 3 个不同发育时期摘取 G7097 和 W7105 叶片进行转录组测序, 共检测到 1532 个与叶色相关的差异表达基因 (DEGs), 包括 540 个上调的差异表达基因和 992 个下调的差异表达基因。GO 和 KEGG 富集分析结果显示, W7105 白化叶片中上调的差异表达基因显著富集在蛋白酶体、翻译过程、碳水化合物和能量代谢途径; 而下调的差异表达基因则与叶绿体、光合作用和电子传递链显著相关。参与叶绿素和类胡萝卜素生物合成的多个基因在 W7105 白叶中下调表达, 证实白化叶片中叶绿素和类胡萝卜素代谢也受到了影响。研究结果为进一步定位和克隆甘蓝型油菜叶片白化关键基因以及阐述油菜白叶形成的分子机制提供了一定参考。

关键词: 白化; 甘蓝型油菜; 叶色; 叶绿体发育; 转录组

Molecular Mechanisms of Albino Leaves in *Brassica napus*

YE Shen-hua, MA Xiao-wei, YANG Jie, LI Jia-xin, ZHAO Lun, YI Bin, MA Chao-zhi, TU Jin-xing,
SHEN Jin-xiong, FU Ting-dong, WEN Jing

(College of Plant Science and Technology of Huazhong Agricultural University, National Research Center of Rapeseed Engineering and Technology, Wuhan 430070)

Abstract: Leaf-color mutants are crucial germplasms for deciphering the mechanisms of pigment metabolism and chloroplast development. In this study, to uncover the mechanisms of temperature-sensitive albino phenotype in *Brassica napus*, the physiological assessment and transcriptome analysis were performed in two resynthesized *B. napus* inbred lines, the white-leaf line W7105 and its green-leaf sibling line G7097. Under low temperature in field conditions, in albino leaves of W7105, the chlorophyll and carotenoid content were dramatically decreased and chloroplast structure was abnormal. Compared with green leaves, albino leaves showed significantly lower net photosynthetic rate (P_n) and significantly higher intercellular CO_2 concentration (C_i). Transcriptome analysis of leaves at three different developing stages was performed in G7097 and W7105 lines. After pairwise comparisons, a total of 1532 differentially expressed genes (DEGs) associated with leaf color phenotype were identified, including 540 and 992 genes that were up-regulated and down-regulated, respectively. GO and KEGG enrichment analysis showed that the up-regulated DEGs in albino leaves of W7105 were significantly enriched in proteasome, translation process, carbohydrate and energy metabolism pathways; while the down-regulated DEGs were significantly enriched in chloroplasts, photosynthesis and electron transport chain. Moreover, several DEGs in chlorophyll and carotenoid biosynthesis were significantly down-

收稿日期: 2022-12-13 修回日期: 2022-12-27 网络出版日期: 2023-01-21

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221215002>

第一作者研究方向为油菜遗传育种, E-mail: yeshenhua@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 文静, 研究方向为油菜遗传育种, E-mail: wenjing@mail.hzau.edu.cn

基金项目: 国家现代农业产业技术体系 (CARS-12); 国家重点研发计划项目 (2017YFD0101702)

Foundation projects: China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-12); National Key Research and Development Program of China (2017YFD0101702)

regulated in albino leaves, suggesting that chlorophyll and carotenoid metabolisms were also impaired. Collectively, these findings provide references for further delimiting the candidate genes and uncovering the molecular mechanisms of albino leaves in *B. napus*.

Key words: albinism; *B. napus*; leaf color; chloroplast development; transcriptome

叶绿素缺乏突变体是研究叶绿素代谢、叶绿体发育和光合作用机制的理想遗传资源。在很多物种中都有报道,如水稻^[1]、拟南芥^[2]、大豆^[3]和黄瓜^[4]等。突变体叶色包括白化、浅绿、深绿、黄绿、金黄和紫色等多种颜色^[5]。突变体的叶色表型可由细胞核基因、细胞质基因和核-质基因相互作用的不同方式控制^[6]。叶色突变体变异机制也比较复杂,主要是与叶绿素、类胡萝卜素和次生代谢物的合成、光合作用和叶绿体发育等生物过程有关。

通过对植物白叶突变体的研究,研究者们已经发现了许多影响叶绿体发育的重要基因。叶绿体是半自主细胞器,大约有3000种核编码的蛋白质通过叶绿体包膜中的TOC/TIC蛋白运输复合体被转运进入叶绿体^[7]。因此,TOC/TIC超级复合体对叶绿素的生物合成和叶绿体的发育至关重要。Bauer等^[8]和Kohler等^[9]分别研究了拟南芥苗期白化致死突变体*toc159*和*tic56*,证实了TOC/TIC复合体成员Toc159和Tic56在叶绿体发育中的重要作用。*Toc159*突变严重影响光合蛋白向叶绿体内的运输,形成的叶绿体缺乏类囊体和淀粉粒,最终表现白化表型^[8]。与*toc159*一样,*tic56-1*同样具有严重的白化表型,叶片中只含有少量叶绿素且缺乏成熟的叶绿体^[9]。核编码的RNA聚合酶(NEP)和质体编码的RNA聚合酶(PEP)是已知的控制叶绿体基因表达的两类调节因子^[10]。PEP复合体能否发挥正常的功能需要4个核心亚基、PEP关联蛋白和 σ 因子(SIGs)的配合^[11]。在拟南芥中,PEP关联蛋白类果糖激酶FLN1/FLN2与硫氧还蛋白TRXz相互作用,在调控PEP的转录活性中至关重要,其突变体均表现出叶片黄化以及叶绿体发育受到抑制的现象^[12-13]。最近,在水稻白化突变体*wlp2*中鉴定到1个新的PEP关联蛋白WLP2,它编码pfkB类的碳水化合物激酶,通过与TRXz结合共同调控PEP编码基因的转录,从而保证叶绿体正常发育和叶绿素积累^[14]。

温度敏感型白叶突变体是叶色突变体中的一种特殊类型,它在特定的环境条件或发育阶段下表现白叶,其他条件下保持比较正常的表型,因此能保证突变体可以正常结实并得以保存。通过对温

度敏感型叶绿素缺乏突变体的研究,一些低温条件下质体发育和植物生长所需的相关基因已经被克隆。例如,水稻*WLP1*基因编码1个50S核糖体L13蛋白,该基因受低温诱导表达,*wlp1*突变体在23℃低温条件下叶绿体结构异常,表现出白叶和白穗^[15]。*TCD11*基因编码核糖体S6小亚基蛋白,其突变导致水稻在20℃低温条件下叶绿体没有完整的内膜系统,叶绿素缺乏,从而表现出白叶致死表型^[16]。*GOLDEN2-LIKE*(GLK)转录因子参与从叶绿体到细胞核的逆向信号转导过程,其靶基因是光合作用相关核基因(PhANGs),这些基因主要涉及叶绿素生物合成,或是具有编码天线蛋白、光系统亚基和电子传递链组分等功能,因此GLK也是很多植物中调控叶绿体发育所必需的^[17]。在水稻和拟南芥中,*glk1glk2*双突变体叶绿素合成及光采集相关基因的转录和翻译水平降低,突变体的浅绿色表型也都伴随着缺陷的叶绿体生物合成和异常的叶绿体发育过程^[17]。最近的研究指出,叶绿体的发育及稳态不仅需要转录调控的密切配合,还涉及到一些翻译后过程的调节作用。额外的翻译后调节机制例如自噬过程和泛素-蛋白酶体系统(UPS)也都是调节叶绿体质量以应对环境胁迫的重要途径^[18-19]。尽管在水稻、小麦、玉米等作物中已经鉴定出一批与质体发育有关的关键基因,但叶绿体发育的分子机理和调控网络仍有待完善。

目前,已报道的甘蓝型油菜叶色突变体主要是黄化表型^[20],有关白化突变体的报道和相关研究很少。江莹芬等^[21]在甘蓝型油菜中发现了1个角果特异性白化种质,该材料在苗期发育正常,但从现蕾期开始,花蕾、花瓣和角果均呈现白化性状,最终不能结实。前期通过远缘杂交获得了1个甘蓝型油菜白叶株系W7105,该株系苗期表现为受低温诱导的白化性状,可少量结实,是研究甘蓝型油菜叶绿体发育机制的重要种质资源。为进一步研究该白化材料的生理特性,揭示白化性状产生的分子机理,本研究对甘蓝型油菜白叶系W7105及其姊妹绿叶系G7097不同发育时期的叶片进行了转录组测序分析,并结合叶绿体超微结构观测,光合色素含量以及光合特性测定,找到一些可能与叶片白化相关

的关键基因。研究结果为定位和克隆甘蓝型油菜白化性状的关键基因奠定了理论基础,也为阐明甘蓝型油菜白化表型形成的分子机制提供了新的信息。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本研究以人工合成甘蓝型油菜绿叶株系 G7097 和白叶株系 W7105 为材料。G7097 和 W7105 是由白菜型油菜和白羽衣甘蓝远缘杂交获得的 1 个绿叶甘蓝型油菜人工合成种,再经连续 10 代自交而分离出的两个叶色不同的稳定株系。这两个株系于 2018 年 10 月 4 日播种于华中农业大学校内油菜试验基地。2018 年 10–11 月,油菜苗生长前期气温较高,日最高温度可达 26 °C,从 12 月 6 日开始,日最低温度降低到 0 °C,此后,日最低温度在 -6~7 °C 之间,日最高温度为 0~16 °C,油菜在此阶段经历春化过程。至 2 月 18 日以后,日最低温度上升到 0° 以上,此后温度持续升高,至 2 月 28 日,日均温上升到 10 °C 以上。

1.2 叶绿素和类胡萝卜素含量测定

切取初花期 G7097 和 W7105 茎段叶片 0.2 g 放置于离心管,加入 10 mL 80% 的丙酮溶液,室温避光放置 24 h 后用玻璃棒捣碎,放置 24 h,期间多次混匀,直至叶片完全变白为止。之后在 5000 r/min 下离心 10 min,用紫外可见分光光度计分别测定 663 nm、646 nm 和 470 nm 波长下的吸光值。每个材料设置 3 个生物学重复。按 Lightenthaler^[22]的方法,计算单位鲜重叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量。

1.3 光合参数测定

初花期选取绿叶株系 G7097 和白叶株系 W7105 基部最后一叶完全展开叶,放置在 LI-6800 光合作用测量仪的叶室处进行测定。仪器参数设置为:二氧化碳浓度为 400 $\mu\text{mol}/\text{mol}$,温度为 20 °C,湿度为 50%,光强为 1500 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。于晴天清晨 8 点 30 分测定蒸腾速率(Tr)、净光合速率(Pn)、胞间 CO₂ 浓度(Ci)和气孔导度(Gs)。两个材料各设置 3 个生物学重复。

1.4 透射电镜观察

以 G7097 的绿叶,W7105 叶片边缘绿色部分以及 W7105 叶片白色部分为材料,将其切成小块,然后把小块固定在戊二醛固定液(2.5%)中,按照 Yi 等^[23]的方法,进行透射电镜观察。

1.5 RNA 提取

在植株的 3 个不同发育时期,切取绿叶株系 G7097 和白叶株系 W7105 的心叶或茎段新叶的部分叶片,提取 RNA。3 个时期分别为:苗期(7~8 叶期)简称 A 时期,此时 G7097 和 W7105 叶片均为绿色;现蕾期(9~11 叶期)简称 B 时期,此时 G7097 为绿叶,而 W7105 长出的新叶为白绿相间的斑驳叶片;初花期简称 C 时期,此时 G7097 仍为绿叶,而 W7105 全株叶片全部为白色,只在叶缘一周有少量绿色叶肉组织。每个样品设置 3 个生物学重复,每个重复由 3 个植株的叶片等量混合而成。田间取样后,迅速置于液氮中保存,利用植物总 RNA 快速提取试剂盒(百泰克)进行 RNA 提取,采用 Illumina Truseq RNA 试剂盒进行 mRNA 纯化。

1.6 转录组测序分析

RNA 样品送交武汉古奥基因科技有限公司进行 cDNA 文库构建,并利用 Illumina Novaseq 6000 测序仪对 2 个株系 3 个时期 3 次重复的 18 个样品进行测序。测序所得的 Raw reads 经过质量处理(去除短片段和低质量片段)后得到高质量 Clean reads。利用 Hisat2 软件将 Clean reads 与甘蓝型油菜参考基因组(<https://www.genoscope.cns.fr/brassicapapus/>)进行序列比对^[24-25]。使用 StringTie,通过 Mapped reads 在基因上的位置信息,对转录本和基因的表达水平进行定量^[25]。采用 DESeq2 对样品进行组间差异表达分析,将 Fold Change > 2 且 FDR < 0.01 作为差异表达基因筛选标准^[26]。筛选出差异表达基因后,对其进行 GO 和 KEGG 富集分析^[27-28]。

1.7 qRT-PCR 验证

cDNA 第一链的合成按照北京全式金生物技术有限公司 TransScript One-Step gDNA Remover and cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒说明书进行。利用 Primer5.0 在基因的 CDS 上设计特异引物用于 qRT-PCR 分析(表 1)^[29]。用 CFX96TM Real-time system (Bio-Rad)进行定量 PCR 的扩增。每个基因设置 3 个生物重复和 3 个技术重复,以 *Actin2* 作为内参基因,用 2^{- ΔCt} 法计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜白叶与绿叶株系表型鉴定及色素含量测定

连续 3 年田间表型调查发现,人工合成甘蓝型油菜绿叶株系 G7097 在整个生长期叶片表现为绿色,而白叶株系 W7105 叶片在苗期表现为正常的绿

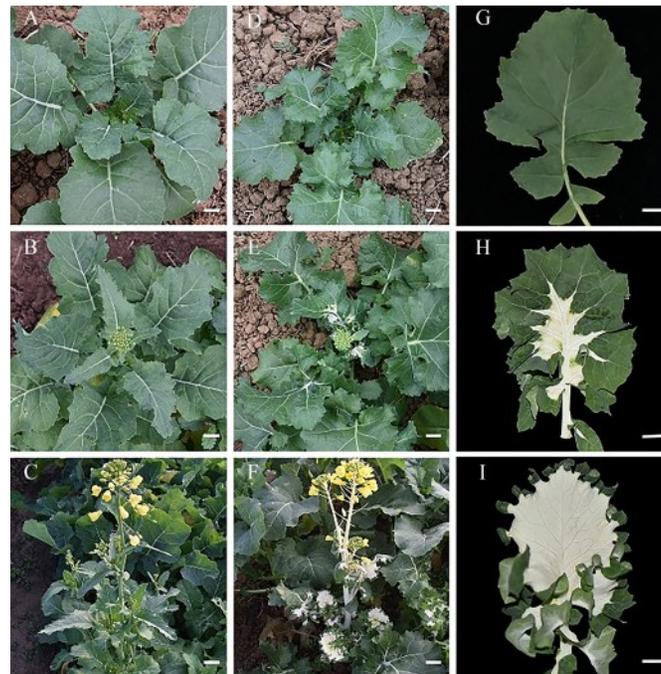
色,从现蕾期开始,新生叶片为白色叶片或白绿相间的杂色叶片,在初花期,老叶脱落后,全株叶片表现为白色,只在叶缘有少量绿色部分(图1)。将现蕾后白化的W7105移入22℃温室,白化的叶片逐渐恢复正常,说明白叶性状受到冬季低温诱导。初花期测定G7097和W7105叶片叶绿素和类胡萝卜

素含量(图2A~D),结果表明:与叶色表型一致,G7097的绿叶以及W7105白化叶片的绿色叶缘部分均含有较高的叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素和类胡萝卜素含量,这些色素的积累量在两者之间没有显著差异,而W7105白化叶片中白色部分几乎不含叶绿素和类胡萝卜素。

表1 qRT-PCR序列特异性引物

Table 1 Sequence-specific primers used for qRT-PCR

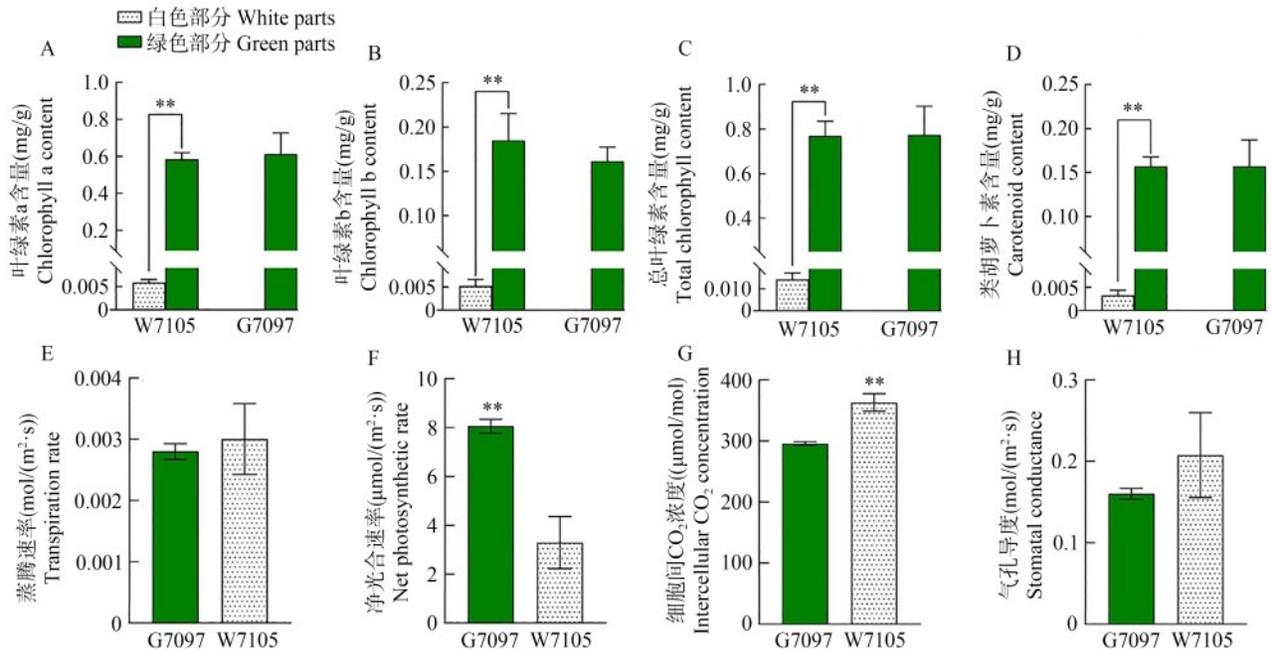
引物名称 Primer name	基因功能描述 Gene description	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>BnaC01g33900D</i>	肌动蛋白2	GCAAGTGATCACCATCGGTGCT	AGTGGTCCACCACACTGAGCAG
<i>BnaA01g14420D</i>	镁-原叶啉IX甲基转移酶	TAGACGTGCTCATACATTACCC	CTACATTGGAACCTGCTTCGATG
<i>BnaA01g19280D</i>	叶绿素合酶	TTGTAGCATCGTCTAGCCTAAG	AAGACATTCAAACAGAAACGGG
<i>BnaC08g05120D</i>	叶绿素a加氧酶	GAAACTGTACGAAGATGCCATC	TTTGCAAAAAGTAGACGTGTGAG
<i>BnaA10g08760D</i>	叶绿素a加氧酶	AACCATGGGTCATCTTTAGAGG	GCATCTTCGTACACTTTCCATC
<i>BnaC04g40260D</i>	脱落酸8'-羟化酶	GTGACTCCAATTTGAGCCAAAG	CAAAAGAAAAGGGGCCAAATTG
<i>BnaC03g08260D</i>	15-顺式八氢番茄红素/全反式八氢番茄红素合酶	GTTGGTGAAGATGCAAGAAGAG	TCTTAAGCTGCAGTCTCATGAA
<i>BnaA07g00410D</i>	GOLDEN2-LIKE1 转录因子	CCGTCACATCACATGGTATACA	TCTTTTGACGGATGTAAGTCCA
<i>BnaC02g42890D</i>	光系统I反应中心亚基	CAAACGCTCTTGACTTTCTGAA	CCAAACCCACTTTCTGGTTTAG
<i>BnaCnng46590D</i>	光系统II放氧增强蛋白2	GACTGTCTCCGACAATAAGGAT	TACCTTGTCTTGACCCTCAATC
<i>BnaCnng26710D</i>	质体蓝素	AGTTCACAATAGCGAAAGGAGA	CAGTAGAAGCTGTAAGTCCCAG
<i>BnaA09g13970D</i>	铁氧化还原蛋白	CGGCTTATCTACTTCTGATGT	GCAGCATGTTAATGGAGCTTTT
<i>BnaCnng11890D</i>	铁氧化还原蛋白	AAAGTTGTGTCTGGTTCTGTTG	CAAGTGAGAACAACCCCTTCAG
<i>BnaA01g23160D</i>	铁氧化还原蛋白	TCCTCTCAAGCACACAAAAATG	AACTTGACCTTGATGTAGCCA
<i>BnaA04g19020D</i>	蛋白酶体调节亚基N2	CAAAAAGCGTGCTCTATACTGAC	CTCGTCATCTGCTCAATCAAAG
<i>BnaA06g37370D</i>	26S蛋白酶体调节亚基N10	AAGGCTCAAAAAGAACAGTGTC	GGCTACCATCGTTGTTATTGAC
<i>BnaC04g43310D</i>	26S蛋白酶体调节亚基N2	GCTGCCTTCTCCTGATTATTG	GAAGTGTCTTCTACAATGCGTGT
<i>BnaA08g13550D</i>	26S蛋白酶体调节亚基T2	ATCAAGGACTATCTGCTGATGG	CGAAACAATCGCATGATTCTCA
<i>BnaA01g32030D</i>	细胞分裂周期蛋白48	GATGAGATTGACTCCATTGCAC	CAAACCTTCTCAAAGCTGGATC



A~C: G7097在苗期(A时期)、现蕾期(B时期)和初花期(C时期)的田间表型,比例尺为2 cm;D~F: W7105在A、B和C三个时期的田间表型,比例尺为2 cm;G~I: W7105在A、B和C三个时期的单个叶片,比例尺为1.5 cm
A-C: Phenotype of G7097 at the seedling (stage A), bud (stage B) and early flowering stages (stage C), bar=2 cm; D-F: Phenotype of W7105 at stage A, B and C, bar=2 cm; G-I: One leaf of W7105 at stage A, B and C, bar=1.5 cm

图1 人工合成甘蓝型油菜绿叶株系G7097和白叶株系W7105不同发育时期田间表型

Fig.1 Phenotype of resynthesized *B. napus* green-leaf line G7097 and white-leaf line W7105 at different developmental stages in the field



A~D: G7097和W7105初花期叶片中叶绿素和类胡萝卜素含量;E~H: G7097和W7105初花期叶片蒸腾速率、净光合速率、细胞间CO₂浓度和气孔导度的比较;**表示在0.01水平上显著差异(*t*检验)

A-D: Chlorophyll and carotenoid accumulation in leaves of G7097 and W7105 at the early flowering stage; E-H: Comparisons of transpiration rate, net photosynthetic rate, intercellular CO₂ concentration and stomatal conductance of G7097 and W7105 leaves at the early flowering stage;

** indicate significant differences at 0.01 level using student's *t*-test

图2 甘蓝型油菜绿叶株系G7097和白叶株系W7105光合色素和光合作用参数比较

Fig.2 Comparison of photosynthetic pigments and photosynthetic parameters in leaves of *B. napus* green-leaf line G7097 and white-leaf line W7105

2.2 甘蓝型油菜白叶和绿叶株系光合特性差异

在初花期测定G7097绿叶和W7105白叶的光合特性(图2E~H),结果显示:与G7097绿叶相比,W7105白叶的净光合速率(Pn)显著降低,细胞间CO₂浓度(Ci)显著升高,两个株系叶片的蒸腾速率(Tr)和气孔导度(Gs)没有显著差异。这些结果说明,光合色素的缺乏,使白叶株系W7105光合作用能力减弱。

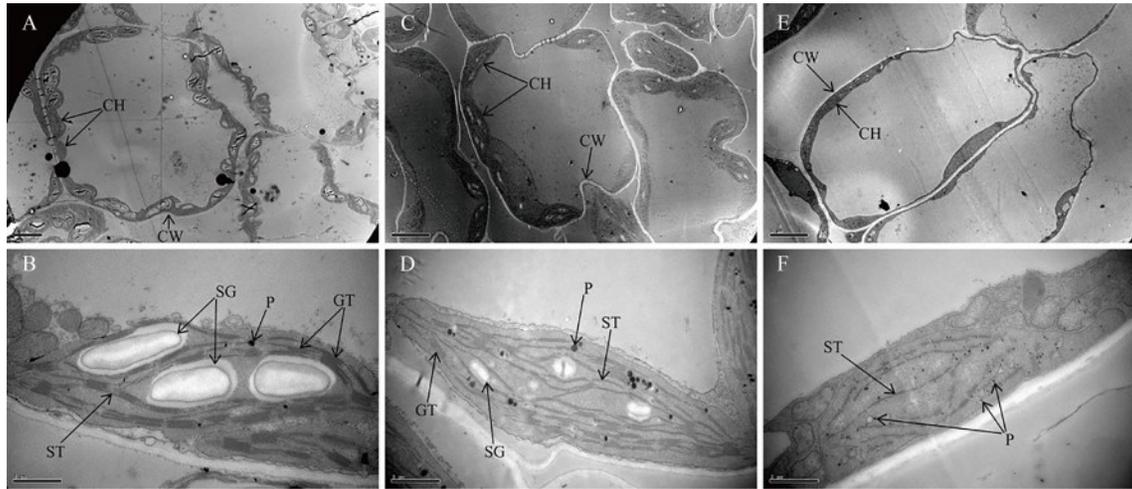
2.3 甘蓝型油菜白叶和绿叶株系叶绿体超微结构差异

利用透射电镜观察比较G7097和W7105初花期叶片中叶绿体的超微结构,结果表明:G7097绿叶的叶绿体基粒由典型的囊状结构堆叠而成,叶绿体内含有较大的淀粉颗粒和少量的质体小球(图3A、B)。同样地,W7105叶片边缘绿色部分的叶绿体超微结构也是正常的(图3C、D)。与此相反,W7105叶片白色部分的叶绿体有明显的发育缺陷,基粒类囊体的堆叠几乎消失,只有少许不规则分布的基质类囊体,有更多的质体小球,但几乎没有淀粉粒(图3E、F)。不发达的类囊体膜结构表明W7105白化叶片的叶绿体发育异常,说明W7105白化叶片中光合色

素积累减少是由叶绿体发育异常所导致的。

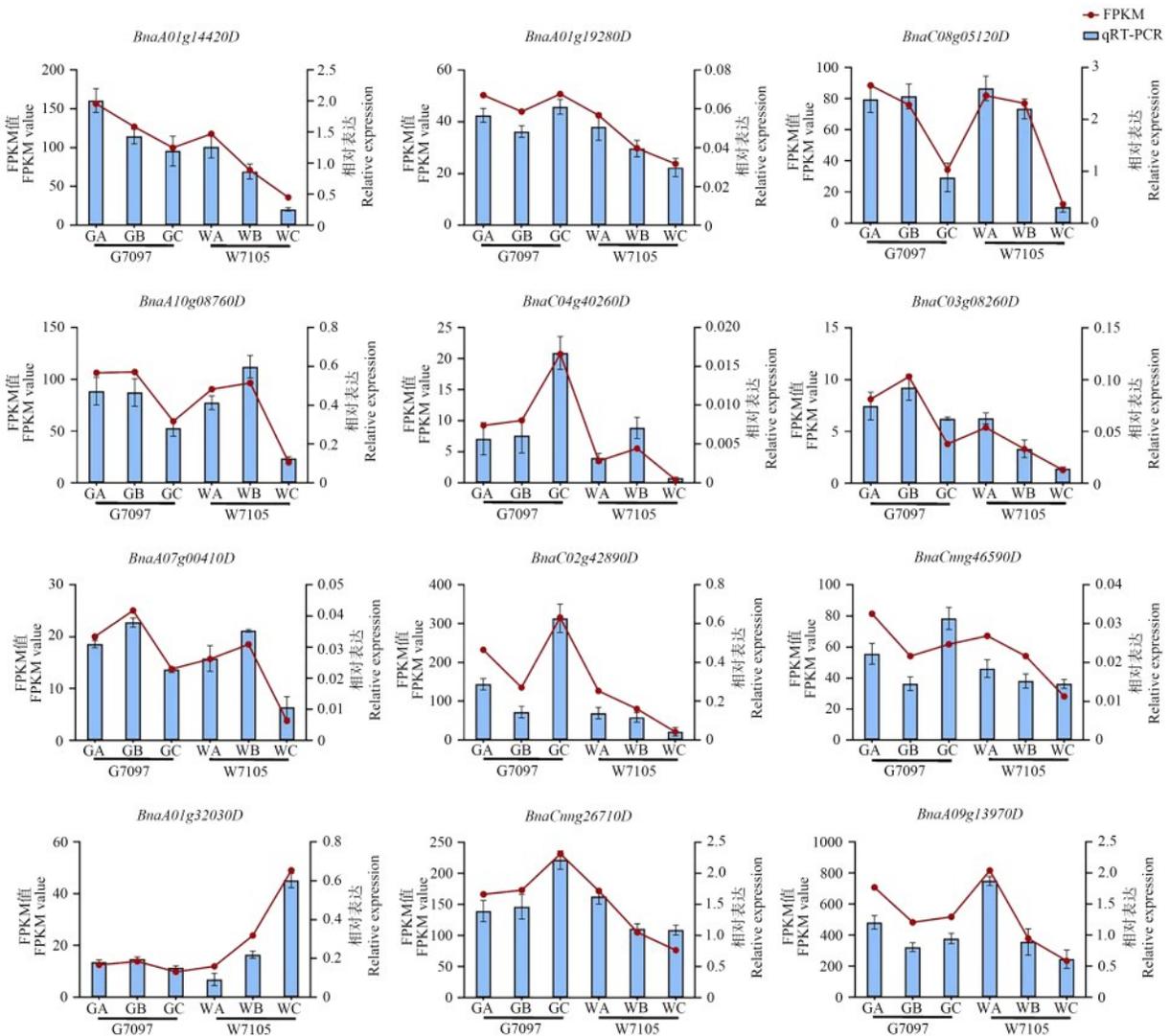
2.4 转录组测序质量与比对

对来源于两个株系3个发育时期叶片的18个RNA文库分别进行双端测序,共获得了116.68 Gb的原始数据。对原始数据进行质控后,从G7097和W7105每个样本中获得38,355,726~52,938,436个Clean Reads。每个样本中有79.44%~82.65%的Clean Reads比对到甘蓝型油菜参考基因组。G7097和W7105每个发育时期的3个生物重复之间相关性良好(详见<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20221215002>,附图1),说明测序数据质量较高,一致性好,可进行后续分析。为进一步评估转录组数据的可靠性,选取涉及叶绿素代谢、类胡萝卜素合成、光合作用、叶绿体到细胞核逆行信号传递和质量控制的18个差异表达基因,在6组样品中进行了qRT-PCR验证(图4),6组样品包括:G7097苗期绿叶(GA),G7097蕾期绿叶(GB),G7097初花期绿叶(GC),W7105苗期绿叶(WA),W7105蕾期斑驳白叶(WB)和W7105初花期白叶(WC)。qRT-PCR结果与转录组数据具有一致性,表明转录组数据结果是可靠的。

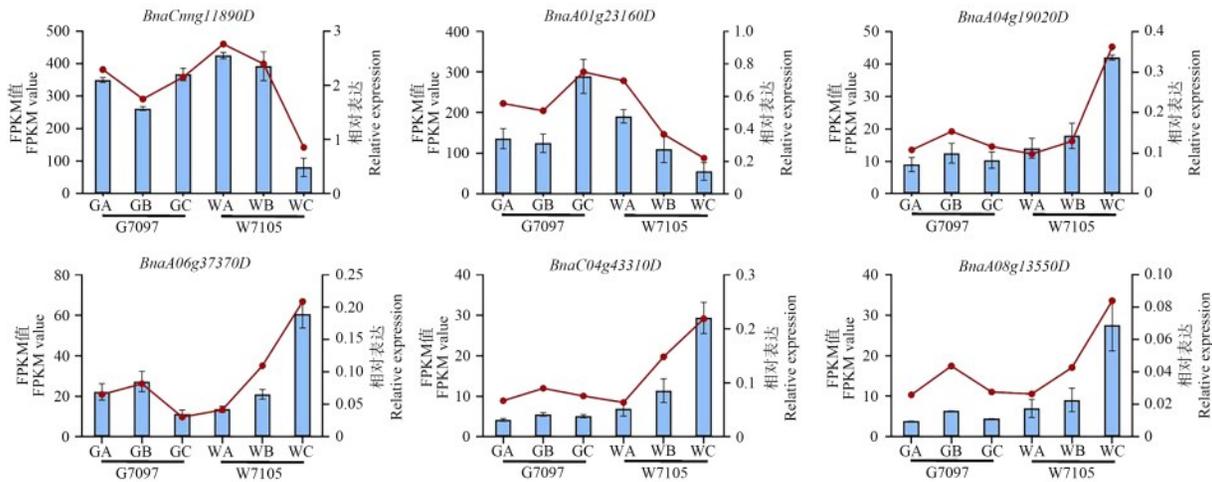


A, B: G7097绿叶中叶绿体超微结构; C, D: W7105叶片边缘绿色部分叶绿体超微结构; E, F: W7105叶片白色部分叶绿体超微结构; CH:叶绿体; CW:细胞壁; ST:基质类囊体; GT:基粒类囊体; SG:淀粉粒; P:质体小球。A、C、E:标尺为5 μm; B、D、F:标尺为1 μm
A, B: Chloroplast ultrastructure in the green leaves of G7097. C, D: Chloroplast ultrastructure in the green parts of W7105 leaves. E, F: Chloroplast ultrastructure in the white parts of W7105 leaves. CH: Chloroplasts; CW: Cell wall; ST: Stroma thylakoids; GT: Grana thylakoids; SG: Starch grains; P: Plastoglobulus; A, C, E: Scale bars represent 5 μm; B, D, F: Scale bars represent 1 μm

图3 G7097和W7105叶片叶绿体超微结构观察
Fig.3 Chloroplast ultrastructure of leaves from G7097 and W7105



(图4)



GA、GB和GC分别表示G7097苗期、蕾期和初花期的绿叶;WA、WB和WC分别表示W7105苗期绿叶、蕾期斑驳白叶和初花期白叶;下同
GA, GB and GC represents G7097 green leaves at seedling, bud and flowering stages, respectively; WA, WB and WC represents W7105 green leaves at seedling stage, variegated leaves at bud stage and albino leaves at flowering stage, respectively; The same as below

图4 差异表达基因的qRT-PCR验证

Fig.4 Validation of DEGs by qRT-PCR

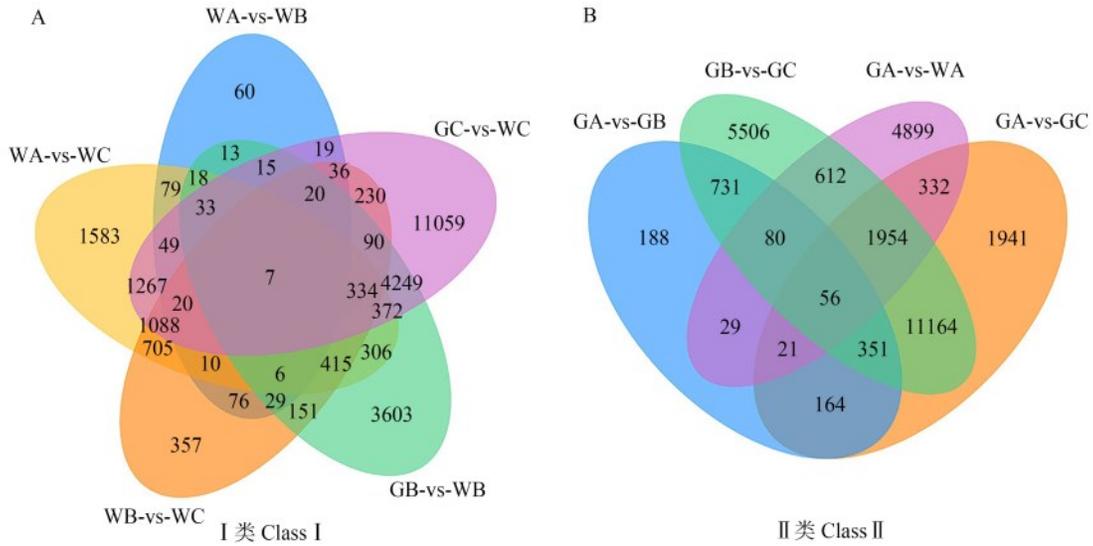
2.5 差异表达基因分析

在3个不同发育时期的叶片中,共检测到62300~65279个基因表达。根据差异表达基因筛选标准,筛选同一株系不同发育时期和不同株系相同发育时期的差异表达基因,在9个比较组合(G7097苗期绿叶与G7097蕾期绿叶相比(GA-vs-GB)、G7097苗期绿叶与G7097初花期绿叶相比(GA-vs-GC)、G7097蕾期绿叶与G7097初花期绿叶相比(GB-vs-GC)、W7105苗期绿叶与W7105蕾期斑驳白叶相比(WA-vs-WB)、W7105苗期绿叶与W7105初花期白叶相比(WA-vs-WC)、W7105蕾期斑驳白叶与W7105初花期白叶相比(WB-vs-WC)、G7097苗期绿叶与W7105苗期绿叶相比(GA-vs-WA)、G7097蕾期绿叶与W7105蕾期斑驳白叶相比(GB-vs-WB)、G7097初花期绿叶与W7105初花期白叶相比(GC-vs-WC)中共筛选出34549个差异表达基因。为获得与叶色表型有关的差异表达基因,对所有的差异表达基因作如下筛选(图5):首先,根据每个比较组合两个样本之间是否存在叶色差异,将所有比较组合分为两类(I类和II类)。I类比较组合主要涉及白叶和绿叶两种不同表型,如W7105苗期绿叶与W7105初花期白叶相比(WA-vs-WC)和G7097初花期绿叶与W7105初花期白叶相比(GC-vs-WC),而II类包括所有绿叶比较组合,它们的差异表达基因与白化表型很可能没有密切关系。然后,利用I类比较组合的并集差异表达基因与II类比较组合中所有差异表达基因的差集,进一步筛选到1532个差异表达基因,其中分别有540个上调表达

基因和992个下调表达基因,这些差异表达基因很可能与W7105叶片白化表型相关。

2.6 差异表达基因的GO和KEGG富集分析

对540个上调的差异表达基因进行GO分类和富集(图6),结果显示:在生物过程类别的前10位中,代表性最高的GO类别分别是蛋白酶体组装(GO:0043248)、核苷酸生物合成过程(GO:0009165)和碳水化合物代谢过程,如糖酵解过程(GO:0006096);在细胞组分类别下,差异表达基因大多定位在能够产生肽酶活性的蛋白复合物中,例如蛋白酶体复合物(GO:0000502)和核包膜(GO:0005635);在分子功能类别下,显著富集的GO亚类主要涉及氧化还原酶活性,例如甘油醛-3-磷酸脱氢酶(NADP+)(非磷酸化)活性(GO:0008886);裂解酶活性,例如碳氮裂解酶活性(GO:0016840)。另一方面,对992个下调的差异表达基因进行GO分类和富集,发现在生物过程类别中处于前10位的GO类别主要涉及光合作用,例如光合作用的光反应(GO:0019684)、光合作用(GO:0015979)和电子传递链(GO:0022900)等;细胞组分类别中显著富集的2个GO类别质体小球(GO:0010287)和叶绿体内膜(GO:0009706),也均与叶绿体有着直接或者间接的联系。KEGG的富集分析结果显示(图7),大部分上调的差异表达基因显著富集于真核生物中的蛋白酶体(ko03050)、氨酰-tRNA生物合成(ko00970)、核糖体生物发生(ko03008)等涉及遗传信息处理的代谢途径,而下调的差异表达基因仅显著富集于光合作用途径(ko00195)。

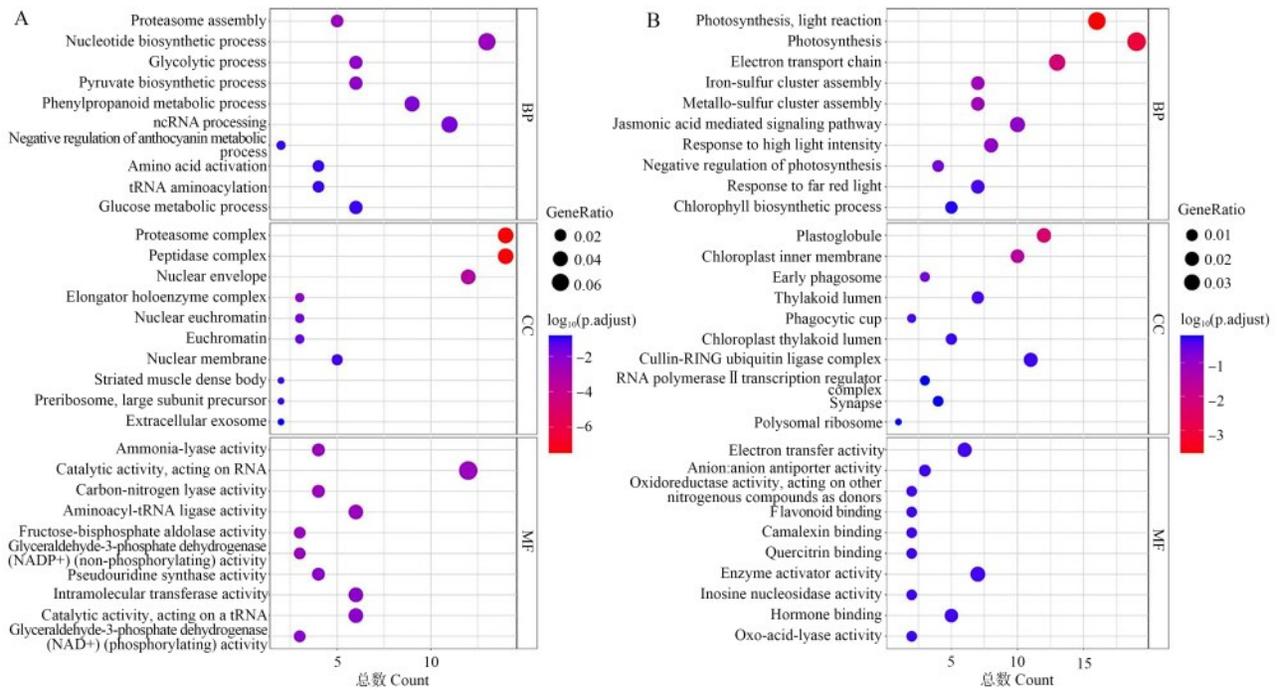


A: Venn图表示与叶色白化相关的比较组合间的差异表达基因数量; B: Venn图表示与叶色白化可能无关的比较组合间的差异表达基因数量; WA-vs-WC表示WA与WC相比; WA-vs-WB表示WA与WB相比; GC-vs-WC表示GC与WC相比; GB-vs-WB表示GB与WB相比; WB-vs-WC表示WB与WC相比; GA-vs-GB表示GA与GB相比; GB-vs-GC表示GB与GC相比; GA-vs-WA表示GA与WA相比; GA-vs-GC表示GA与GC相比; Venn图中的数字表示差异表达基因的数量

A: Venn diagram indicating the number of DEGs between comparative combinations associated with leaf color; B: Venn diagram indicating the number of DEGs between comparative combinations irrelevant with leaf color. WA-vs-WC represents comparison between WA and WC; WA-vs-WB represents comparison between WA and WB; GC-vs-WC represents comparison between GC and WC; GB-vs-WB represents comparison between GB and WB; WB-vs-WC represents comparison between WB and WC; GA-vs-GB represents comparison between GA and GB; GB-vs-GC represents comparison between GB and GC; GA-vs-WA represents comparison between GA and WA; GA-vs-GC represents comparison between GA and GC; The numbers in the Venn diagram represent the number of DEGs

图5 基于G7097和W7105 3个发育时期的叶片差异表达基因韦恩图

Fig.5 Distribution of differentially expressed genes (DEGs) based on leaf-color changes of two *B. napus* inbred lines at three stages



A: 上调差异表达基因的GO富集分析; B: 下调差异表达基因的GO富集分析; BP:生物过程; CC:细胞组分; MF:分子功能
A: GO enrichment of up-regulated DEGs; B: GO enrichment of down-regulated DEGs; BP: Biological process; CC: Cellular component; MF: Molecular function

图6 甘蓝型油菜白叶表型相关差异表达基因的GO分类富集分析(前10)

Fig.6 Statistics of the top 10 enriched GO terms of DEGs related to albino leaf color

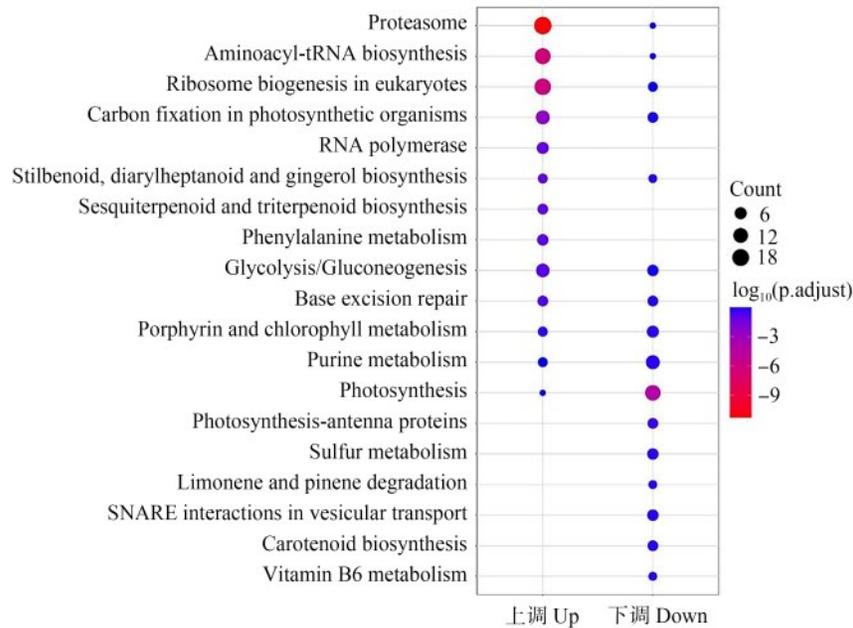


图7 甘蓝型油菜白叶表型相关差异表达基因的KEGG富集分析

Fig.7 KEGG enrichment of up- and down-regulated DEGs related to albino leaf color

综上所述,白叶中上调差异表达基因主要涉及蛋白酶体、翻译过程、碳水化合物和能量代谢,而下调差异表达基因大多涉及叶绿体形成、光合作用和电子传递链。结果表明,W7105白叶表型的形成可能与这些细胞组分和代谢途径内基因表达的变化有关。

2.7 与叶绿素代谢和类胡萝卜素合成有关的差异表达基因

对与白叶性状相关的1532个差异表达基因进行KEGG富集分析,结果显示被富集到叶绿素代谢途径差异表达基因有9个(图8A)。*BnaC08g05120D*和*BnaA10g08760D*编码叶绿素a氧化酶CAO,在白叶株系W7105的3个发育时期随着叶色逐渐由绿变白,这两个基因的表达量逐渐降低,在初花期,它们在白叶中的表达量显著低于绿叶中的表达量。在白叶中下调表达的差异表达基因还包括2个编码原卟啉IX甲基转移酶的*CHLM*基因(*BnaA03g47110D*和*BnaA01g14420D*)和1个编码叶绿素合成酶的*CHLG*基因(*BnaA01g19280D*),它们在绿叶发育的3个时期均显著高表达,而在白叶中几乎不表达。进一步分析发现4个在白叶W7105中显著下调表达的类胡萝卜素生物合成途径基因,分别为编码胡萝卜素异构酶(D27)的*BnaA09g51010D*,编码脱落酸8'-羟化酶(CYP707A2)的*BnaC04g40260D*,编码八氢番茄红素合成酶(PSY)的*BnaC03g08260D*和编码β-胡萝卜素3-羟化酶1(CHY1)的*BnaA01g14940D*

等,这4个基因均在绿叶发育的1~2个时期高表达,而在白叶的3个发育时期几乎不表达。白叶株系W7105中叶绿素和类胡萝卜素合成途径的重要基因显著下调,与白叶中极显著降低的色素含量结果一致,说明这些基因的表达变化可能是造成W7105白叶中几乎不积累叶绿素和类胡萝卜素的原因。

2.8 与光合作用途径相关的差异表达基因

与白叶表型可能相关的1532个差异表达基因中,有15个位于光合作用通路(图8B),其中1个基因(*BnaC02g42890D*)编码完全位于类囊体腔内的光系统I(PSI)的唯一亚基(PSAN),1个(*BnaC01g09730D*)编码PSI的E亚基(PSAE),2个(*BnaA01g19750D*和*BnaC02g48890D*)编码光系统II(PSII)的O亚基(PSBO),2个(*BnaCnng46590D*和*BnaA09g49810D*)编码PSII的P亚基(PSBP),1个(*BnaC01g09810D*)编码PSII反应中心的PSB28蛋白(PSB28)和1个(*BnaC04g41210D*)编码PSII反应中心的W蛋白(PSBW),1个(*BnaCnng20740D*)编码细胞色素b6/f复合物亚基IV(PETD),1个(*BnaCnng26710D*)编码质体蓝素(PETE)和3个(*BnaA09g13970D*、*BnaCnng11890D*和*BnaA01g23160D*)编码与光合作用的电子传递链有关的铁氧化还原蛋白(PETF),1个(*BnaCnng66500D*)编码ATP合酶D亚基(ATPD)和1个(*BnaC01g06270D*)编码ATP合酶F亚基(ATPF)。在3个发育时期中,除了*BnaC04g41210D*之外,其他14个下调的差异表达基因在G7097

和W7105叶片中都具有一致的表达趋势,即由苗期到蕾期再到初花期,它们在G7097中的表达量先下调再上调,但是在W7105中却保持持续下调。大量

光合途径中差异表达基因的下调表达可能是由于W7105白叶中的叶绿体发育异常,影响了其光合作用能力。

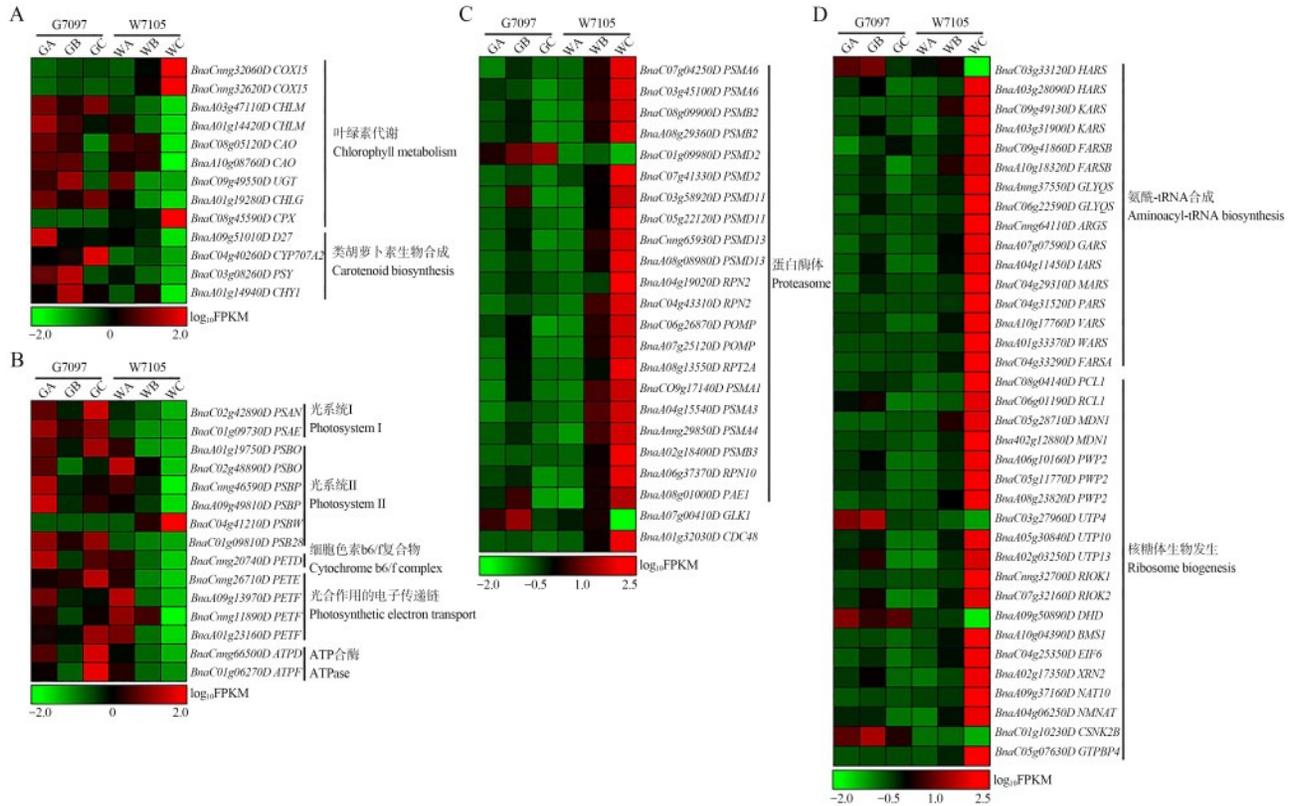


图8 参与叶绿素代谢和类胡萝卜素生物合成(A)、光合作用途径(B)、叶绿体逆向信号和质量控制(C)以及翻译过程(D)的差异表达基因在G7097和W7105中的表达量热图

Fig.8 Heatmaps of differentially expressed genes involved in chlorophyll metabolism and carotenoid biosynthesis (A), photosynthesis pathway (B), chloroplast retrograde signaling and quality control (C) and translation processes (D) between G7097 and W7105

2.9 与叶绿体逆向信号传递和质量控制有关的差异表达基因

GOLDEN2-LIKE1 (GLK1)转录因子参与核质逆向信号转导,调控光合作用相关核基因(PhANGs)的表达[30]。本研究中,编码GLK1的基因BnaA07g00410D在W7105的初花期白叶中显著下调(图8C),推测GLK1的下调表达可能与W7105白叶中异常的叶绿体发育有关。受逆向信号控制的泛素-蛋白酶体系统(UPS)可以通过促进对叶绿体蛋白质的周转,使得其数目和比例达到协调平衡,在翻译后水平的调节过程中发挥着控制叶绿体质量、维持其稳态的重要作用[31]。本研究中,KEGG富集分析结果显示,540个上调差异表达基因显著富集在蛋白酶体途径(ko03050)。大量编码26S蛋白酶体亚基的基因在G7097和W7105之间呈现出显著的差异表达,它们多在W7105中持续上调表

达,但在G7097中,先上调再下调表达(图8C)。同时,编码UPS主要组分CDC48的基因BnaA01g32030D也表现出与蛋白酶体相关差异表达基因相似的表达趋势,在W7105初花期的白叶中显著上调(图8C)。综上所述,这些与叶绿体蛋白降解相关基因在W7105中的上调表达可能是W7105白叶叶绿体发育异常的原因。

2.10 与翻译过程有关的差异表达基因

与翻译过程相关差异表达基因中,16个与氨酰-tRNA合成(ko00970)有关和20个与核糖体生物发生(ko03008)有关,它们均在白叶中显著上调表达(图8D)。它们中的大部分在W7105中都表现出与蛋白酶体相关差异表达基因相似的表达趋势,即随着叶色逐渐转白都呈现出逐渐增高的趋势。因此,推测这些差异表达基因表达水平的逐步提升也可能与W7105白叶异常的叶绿体发育有关。

3 讨论

近年来,叶绿素代谢路径的研究取得较大进展,已发现在高等植物中至少有15种酶(27个基因)参与了从谷氨酰-tRNA到Chl a和Chl b的生物合成^[32]。叶绿素合成酶(CHLG)催化叶绿素酸酯a的醇化作用,完成叶绿素a的合成。水稻中CHLG基因表达发生变化,会对Chl的合成能力造成巨大的影响^[33]。根据转录组数据结果,叶绿素合成酶基因CHLG在白叶株系W7105的3个发育时期表达量持续下调,与G7097不同,推测W7105中CHLG(*BnaA01g19280D*)表达水平的降低可能与白叶中叶绿素a含量的下降有关。此外,叶绿素a氧合酶(CAO)被认为是负责叶绿素b合成的关键调控酶^[34]。在叶绿素b缺失的拟南芥株系中过表达*AtCAO*,可以使叶绿素b大量积累^[35]。Lee等^[36]也证实了*OsCAO1*的异常表达能够影响叶绿素b合成,从而导致水稻表现出叶片苍绿、生长迟缓和分蘖少的表型。本研究推测CAO的两个拷贝(*BnaC08g05120D*和*BnaA10g08760D*)在W7105花期白叶中表达量显著下调,可能导致叶绿素a不能被CAO催化转变为叶绿素b,因此叶绿素b含量显著降低。qRT-PCR进一步证实了CHLG和CAO的表达量变化。综上所述,白化叶中CHLG和CAO的低水平表达可能是导致叶绿素水平降低的重要原因。类胡萝卜素生物合成途径中,限速酶八氢番茄红素合成酶(PSY)首先催化八氢番茄红素^[37]。研究表明,PSY表达量的增加可显著提高拟南芥和柑橘中的类胡萝卜素水平^[38-39]。本研究发现,编码PSY的基因*BnaC03g08260D*在绿叶株系G7097和白叶株系W7105中有着明显不同的表达趋势,其在W7105蕾期斑驳叶中就已经表现下调,至花期下降程度显著。qRT-PCR也得到了类似的结果。因此,PSY在W7105叶片白化的过程中对类胡萝卜素的生物合成极为重要,可能是造成类胡萝卜素含量减少的重要原因。

植物中叶绿体数量的减少以及缺陷的叶绿体发育会影响叶绿素等光合色素的合成,从而改变叶片的颜色。与叶色表型一致的是,拟南芥*wtg1*突变体的白化叶片具有白色体,而淡绿色叶片具有叶绿体发育前体,绿色叶片则具有成熟的叶绿体^[40]。甘蓝的白化突变体White Dove幼叶中含有内膜结构非常有限的无色原生体^[41]。水稻*swl1-v*突变体的叶绿体完全缺乏类囊体膜结构,并积累了大小不一的

囊泡^[1]。与前人的研究结果一致,本研究透射电镜结果表明,虽然白化叶绿色部位的叶绿体呈现出相对正常的结构,但白色部位的叶绿体数量极少,其中的类囊体内膜结构不完整,几乎没有堆叠正常的基粒类囊体,仅存在少量无规则分布的基质类囊体,说明W7105叶片白化是由于叶绿体发育缺陷造成。对利用转录组数据鉴定到的差异表达基因进行GO和KEGG富集分析,结果表明,W7105白叶中下调的差异表达基因中,与叶绿体、光合作用、电子传递链相关基因的数量所占比例较高。此外,本研究发现编码光系统I、光系统II、细胞色素b6/f复合物、电子传递链和ATP合酶相关亚基的14个基因在W7105初花期白叶中表达被显著抑制。这都与白叶叶绿体超微结构以及光合特性的异常变化结果相一致。这些结果表明,许多与光合作用相关的、在叶绿体中发挥作用的基因在W7105中转录不活跃,也可能是导致白化叶中的叶绿体发育受阻,光合作用受损的原因。类似地,转录组结果表明,黄绿叶冬小麦叶绿体中异常类囊体堆积可能与PSII蛋白复合物的急剧下调表达有关^[42]。因此推测白叶株系W7105中大量叶绿体蛋白编码基因的下调表达导致叶绿体发育出现异常,而异常的叶绿体结构又进一步影响了正常的色素积累和叶片光合作用能力,最终形成了甘蓝型油菜叶片的白化现象。

转录组结果表明,W7105白化叶中叶绿体的异常发育可能是受到了冷胁迫下ROS积累的影响。在W7105初花期的白叶中,泛素-蛋白酶体系统(UPS)的主要成分*CDC48*(*BnaA01g32030D*)和大量编码26S蛋白酶体亚基基因的过量表达表明由ROS介导的UPS可能加剧了白化叶中叶绿体蛋白的降解,其中缺陷的叶绿体发育可能与叶绿体蛋白的异常降解有关^[43]。W7105白化叶中大量上调的差异表达基因显著富集在一些与翻译过程相关的代谢途径,主要包括氨酰-tRNA合成和核糖体生物合成等代谢通路,表明在应对低温压力信号时,白化叶中的翻译活性可能有所增强^[44]。其次,在W7105中,大部分翻译过程相关差异表达基因都与前者有相似的表达趋势,推测这可能与叶绿体内蛋白质稳态的维持有关,在一定程度上也表明了叶绿体质量控制机制对叶绿体发育的调节行为^[43]。此外,白化叶中叶绿体内质体小球数量的增加,也表明了发育异常的叶绿体正在遭受着氧化胁迫^[45]。GLK1主要在转录水平上调控相关核基因的表达,以此来响应叶绿体信号,调控叶绿体发育^[46-47]。过

表达 *GLK* 基因可以提高植物体内与叶绿素、光合系统亚基合成相关基因的转录积累,提高叶绿素含量和促进叶绿体发育^[17],而抑制 *GLK1* 的表达则会导致相反的结果^[48]。本研究中,白化叶中 *GLK1* (*BnaA07g00410D*)以及叶绿素合成、光合作用相关靶基因的表达水平都显著低于绿叶,进一步的 qRT-PCR 也证实了这些结果。这些结果表明, *GLK1* (*BnaA07g00410D*)的下调表达也可能影响了白化叶中的叶绿体发育。综上所述,本研究推测白化叶中异常的叶绿体发育也与低温下的转录和翻译后水平的调控过程有关。

4 结论

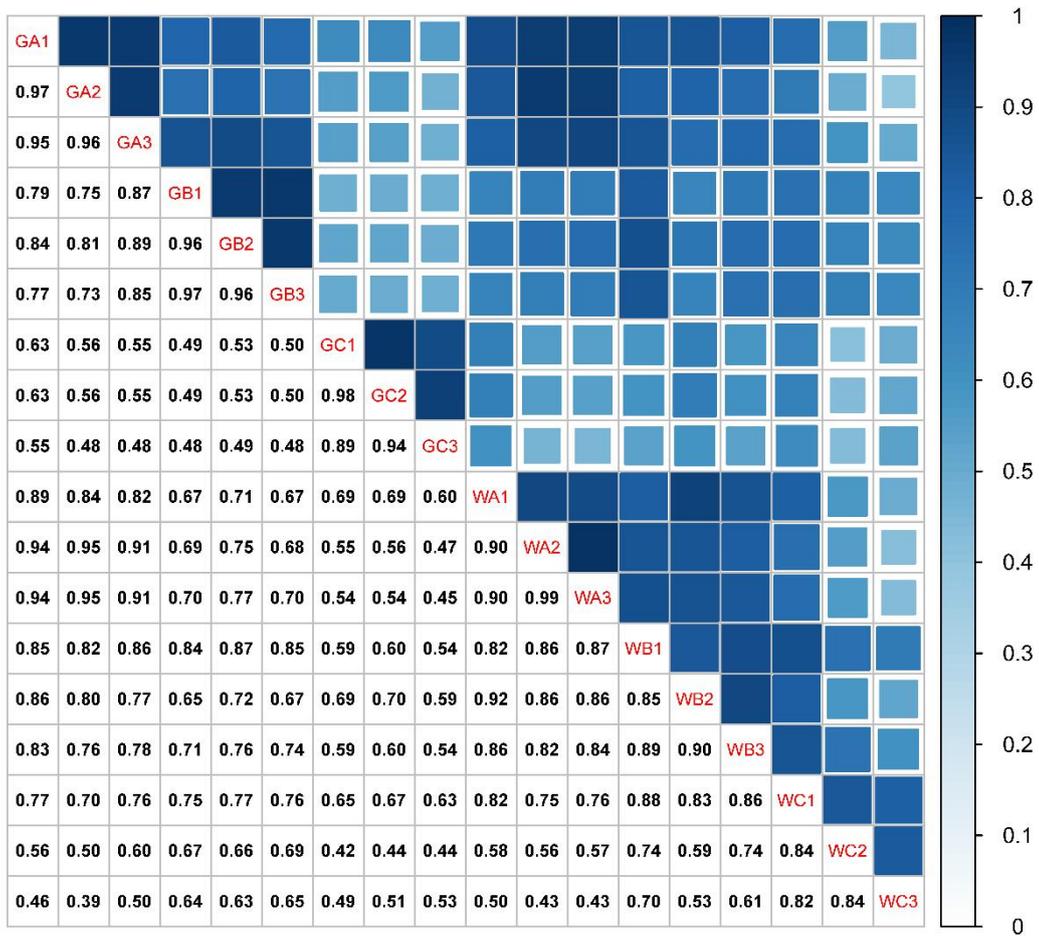
甘蓝型油菜自交系 W7105 在大田环境下于蕾期开始生长白化叶片,白化表型受低温影响。白化中异常的叶绿体超微结构同时伴随着叶绿素、类胡萝卜素含量的显著降低。转录组分析结果表明白化叶株系 W7105 中大量叶绿体蛋白编码基因的下调表达是导致叶绿体发育出现异常的原因,而异常的叶绿体结构又进一步影响了正常的色素积累和叶片光合作用能力,最终形成了甘蓝型油菜叶片的白化现象。

参考文献

- [1] Hayashi-Tsugane M, Takahara H, Ahmed N, Himi E, Takagi K, Iida S, Tsugane K, Maekawa M. A mutable albino allele in rice reveals that formation of thylakoid membranes requires the *SNOW-WHITE LEAF1* gene. *Plant and Cell Physiology*, 2014, 55: 3-15
- [2] Yu B, Gruber M Y, Khachatourians G G, Zhou R, Epp D J, Hegedus D D, Parkin I A, Welsch R, Hannoufa A. *Arabidopsis* cpSRP54 regulates carotenoid accumulation in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63: 5189-5202
- [3] Sandhu D, Atkinson T, Noll A, Johnson C, Espinosa K, Boelter J, Abel S, Dhatt B K, Barta T, Singaas E, Sepsenwol S, Goggi A S, Palmer R G. Soybean proteins GmTic110 and GmPsbP are crucial for chloroplast development and function. *Plant Science*, 2016, 252: 76-87
- [4] Gao M, Hu L, Li Y, Weng Y. The chlorophyll-deficient golden leaf mutation in cucumber is due to a single nucleotide substitution in *CsChll* for magnesium chelatase I subunit. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129: 1961-1973
- [5] Zhao M H, Li X, Zhang X X, Zhang H, Zhao X Y. Mutation mechanism of leaf color in plants: A review. *Forests*, 2020, 11: 851
- [6] Glick R E, Sears B B. Genetically programmed chloroplast dedifferentiation as a consequence of plastome-genome incompatibility in *Oenothera*. *Plant Physiology*, 1994, 106: 367-373
- [7] Chen L J, Li H M. Stable megadalton TOC-TIC supercomplexes as major mediators of protein import into chloroplasts. *Plant Journal*, 2017, 92: 178-188
- [8] Bauer J, Chen K, Hiltbunner A, Wehrli E, Eugster M, Schnell D, Kessler F. The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature*, 2000, 403: 203-207
- [9] Kohler D, Montandon C, Hause G, Majovsky P, Kessler F, Baginsky S, Agne B. Characterization of chloroplast protein import without Tic56, a component of the 1-megadalton translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts. *Plant Physiology*, 2015, 167: 972-990
- [10] Hedtke B, Börner T, Weihe A. Mitochondrial and chloroplast phage-type RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science*, 1997, 277: 809-811
- [11] Weihe A, Börner T. Transcription and the architecture of promoters in chloroplasts. *Trends in Plant Science*, 1999, 4: 169-170
- [12] Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustun S, Melzer M, Petersen K, Lein W, Bornke F. Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: Evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, 2010, 22: 1498-1515
- [13] Wimmelbacher M, Bornke F. Redox activity of thioredoxin z and fructokinase-like protein I is dispensable for autotrophic growth of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65: 2405-2413
- [14] Lv Y, Shao G, Qiu J, Jiao G, Sheng Z, Xie L, Wu Y, Tang S, Wei X, Hu P. *White Leaf and Panicle 2*, encoding a PEP-associated protein, is required for chloroplast biogenesis under heat stress in rice. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68: 5147-5160
- [15] Song J, Wei X, Shao G, Sheng Z, Chen D, Liu C, Jiao G, Xie L, Tang S, Hu P. The rice nuclear gene *WLP1* encoding a chloroplast ribosome L13 protein is needed for chloroplast development in rice grown under low temperature conditions. *Plant Molecular Biology*, 2014, 84: 301-314
- [16] Wang W J, Zheng K L, Gong X D, Xu J L, Huang J R, Lin D Z, Dong Y J. The rice *TCD11* encoding plastid ribosomal protein S6 is essential for chloroplast development at low temperature. *Plant Science*, 2017, 259: 1-11
- [17] Waters M T, Wang P, Korkaric M, Capper R G, Saunders N J, Langdale J A. GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 1109-1128
- [18] Woodson J D. Chloroplast quality control-balancing energy

- production and stress. *New Phytologist*, 2016, 212: 36-41
- [19] Woodson J D. Chloroplast stress signals: Regulation of cellular degradation and chloroplast turnover. *Current Opinion in Plant Biology*, 2019, 52: 30-37
- [20] Zhu L X, Yang Z H, Zeng X H, Gao J, Liu J, Yi B, Ma C Z, Shen J X, Tu J X, Fu T D, Wen J. Heme oxygenase 1 defects lead to reduced chlorophyll in *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*, 2017, 93:579-592
- [21] 江莹芬, 吴新杰, 费维新, 李强生, 荣松柏, 初明光, 陈凤祥. 甘蓝型油菜角果特异白化种质的遗传和生理特性. *植物遗传资源学报*, 2020, 21 (1): 113-120
- Jiang Y F, Wu X J, Fei W X, Li Q S, Rong S B, Chu M G, Chen F X. Genetic and physiological characteristics of *Brassica napus* germplasm resources showing albino silique. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (1): 113-120
- [22] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 1987, 148C: 350-382
- [23] Yi B, Zeng F, Lei S, Chen Y, Yao X, Zhu Y, Wen J, Shen J, Ma C, Tu J, Fu T. Two duplicate *CYP704B1*-homologous genes *BnMs1* and *BnMs2* are required for pollen exine formation and tapetal development in *Brassica napus*. *Plant Journal*, 2010, 63: 925-938
- [24] Sahraeian S M E, Mohiyuddin M, Sebra R, Tilgner H, Afshar P T, Au K F, Bani Asadi N, Gerstein M B, Wong W H, Snyder M P, Schadt E, Lam H Y K. Gaining comprehensive biological insight into the transcriptome by performing a broad-spectrum RNA-seq analysis. *Nature Communication*, 2017, 8: 59
- [25] Perteua M, Kim D, Perteua G M, Leek J T, Salzberg S L. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nature Protocols*, 2016, 11: 1650-1667
- [26] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014, 15: 550
- [27] Jones P, Binns D, Chang H Y, Fraser M, Li W, McAnulla C, McWilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G, Pesseat S, Quinn A F, Sangrador-Vegas A, Scheremetjew M, Yong S Y, Lopez R, Hunter S. InterProScan 5: Genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 2014, 30: 1236-1240
- [28] Yu G, Wang L G, Han Y, He Q Y. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics-A Journal of Integrative Biology*, 2012, 16: 284-287
- [29] Lu K, Li T, He J, Chang W, Zhang R, Liu M, Yu M, Fan Y, Ma J, Sun W, Qu C, Liu L, Li N, Liang Y, Wang R, Qian W, Tang Z, Xu X, Lei B, Zhang K, Li J. qPrimerDB: A thermodynamics-based gene-specific qPCR primer database for 147 organisms. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46: D1229-D1236
- [30] Li M, Lee K P, Liu T, Dogra V, Duan J, Li M, Xing W, Kim C. Antagonistic modules regulate photosynthesis-associated nuclear genes via GOLDEN2-LIKE transcription factors. *Plant Physiology*, 2022, 188: 2308-2324
- [31] Ling Q, Broad W, Trösch R, Töpel M, Demiral Sert T, Lymperopoulos P, Baldwin A, Jarvis R P. Ubiquitin-dependent chloroplast-associated protein degradation in plants. *Science*, 2019, 363: eaav4467
- [32] Beale S I. Green genes gleaned. *Trends in Plant Science*, 2005, 10: 309-312
- [33] Shalygo N, Czarnecki O, Peter E, Grimm B. Expression of chlorophyll synthase is also involved in feedback-control of chlorophyll biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 2009, 71: 425-436
- [34] Yamasato A, Nagata N, Tanaka R, Tanaka A. The N-terminal domain of chlorophyllide a oxygenase confers protein instability in response to chlorophyll B accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17: 1585-1597
- [35] Oster U, Tanaka R, Tanaka A, Rüdiger W. Cloning and functional expression of the gene encoding the key enzyme for chlorophyll b biosynthesis (CAO) from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 2000, 21: 305-310
- [36] 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: 805-818
- [37] Ruiz-Sola M A, Rodriguez-Concepcion M. Carotenoid biosynthesis in *Arabidopsis*: A colorful pathway. *Arabidopsis Book*, 2012, 10: e0158
- [38] Rodriguez-Villalon A, Gas E, Rodriguez-Concepcion M. Phytoene synthase activity controls the biosynthesis of carotenoids and the supply of their metabolic precursors in dark-grown *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal*, 2009, 60: 424-435
- [39] Zhang L, Ma G, Kato M, Yamawaki K, Takagi T, Kiriiwa Y, Ikoma Y, Matsumoto H, Yoshioka T, Nesumi H. Regulation of carotenoid accumulation and the expression of carotenoid metabolic genes in citrus juice sacs *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63: 871-886
- [40] Ma F, Hu Y, Ju Y, Jiang Q, Cheng Z, Zhang Q, Sodmergen. A novel tetratricopeptide repeat protein, WHITE TO GREEN1, is required for early chloroplast development and affects RNA editing in chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68: 5829-5843
- [41] Zhou S, Hu Z, Zhu M, Zhang B, Deng L, Pan Y, Chen G. Biochemical and molecular analysis of a temperature-sensitive albino mutant in kale named "White Dove". *Plant Growth Regulation*, 2013, 71: 281-294
- [42] Wu H, Shi N, An X, Liu C, Fu H, Cao L, Feng Y, Sun D, Zhang L. Candidate genes for yellow leaf color in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and major related metabolic

- pathways according to transcriptome profiling. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19: 1594
- [43] Yang X, Li Y, Qi M, Liu Y, Li T. Targeted control of chloroplast quality to improve plant acclimation: From protein import to degradation. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 958
- [44] Begue H, Mounier A, Rosnoblet C, Wendehenne D. Toward the understanding of the role of CDC48, a major component of the protein quality control, in plant immunity. *Plant Science*, 2019, 279: 34-44
- [45] Rottet S, Besagni C, Kessler F. The role of plastoglobules in thylakoid lipid remodeling during plant development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2015, 1847: 889-899
- [46] Hall L N, Rossini L, Cribb L, Langdale J A. *GOLDEN 2*: A novel transcriptional regulator of cellular differentiation in the maize leaf. *Plant Cell*, 1998, 10: 925-936
- [47] Tokumaru M, Adachi F, Toda M, Ito-Inaba Y, Yazu F, Hirokawa Y, Sakakibara Y, Suiko M, Kakizaki T, Inaba T, Ubiquitin-proteasome dependent regulation of the GOLDEN2-LIKE 1 transcription factor in response to plastid signals. *Plant Physiology*, 2017, 173(1): 524-535
- [48] 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: 3125-3138



GA、GB 和 GC 分别表示 G7097 苗期、蕾期和初花期的绿叶；WA、WB 和 WC 分别表示 W7105 苗期绿叶、蕾期斑驳白叶和初花期白叶。

GA、GB、GC、WA、WB 和 WC 后面的数字 1、2、3 代表生物重复

GA, GB and GC represents G7097 green leaves at seedling, bud and flowering stages, respectively; WA, WB and WC represents W7105 green leaves at seedling stage, variegated leaves at bud stage and albino leaves at flowering stage, respectively. Numbers 1, 2, 3 behind the GA, GB, GC, WA, WB and WC represent the biological replicates

附图 1 转录组生物重复间的皮尔逊相关系数

Fig. S1 Pearson correlation coefficient among biological replicates of transcriptome