

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 G7097 和白叶 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 (Pn) 显著降低，细胞间 CO₂ 浓度 (Ci) 显著升高。在三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 DEGs 和 992 个下调的 DEGs。GO 和 KEGG 富集分析结果显示，W7105 白化叶片中上调的 DEGs 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 DEGs 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奠定了理论基础。

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 Cao-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

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

URL:

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

通信作者：文静，研究方向为油菜作物遗传育种，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)

chloroplast structure was abnormal. Compared with green leaves, albino leaves showed significantly lower net photosynthetic rate (Pn) and significantly higher intercellular CO₂ concentration (Ci). 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-regulated in albino leaves, suggesting that chlorophyll and carotenoid metabolisms were also impaired. Collectively, these findings provided a foundation 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四个核心亚基、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

鉴定到一个新的 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得以保存。通过对温度敏感性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 *WLPI* 基因编码一个 50S 核糖体 L13 蛋白，该基因受低温诱导表达，*wlpI* 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]。*TCDII* 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]。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，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一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。前期我们通过远缘杂交获得了一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，找到了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叶羽衣甘蓝远缘杂交获得的一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，油菜生长期温度见附图 1。

1.2 叶绿素和类胡萝卜素含量测定

初花期切取 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 小时，期间多次混匀，直至叶片完全变白为止。之后在 5,000 rpm 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 次生物学重复。按 Lightenthaler 的方法^[22]，计算单位鲜重叶片中叶绿素 a、叶绿素 b 和 β-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 基部最后一片完全展开叶，放置在 LI-6800 光合叶室处进行测定。仪器参数设置为：二氧化碳浓度为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，温度为 20°C，湿度为 50%，光强为 1500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。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 次生物学重复。

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 等的方法^[23]，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 (图 1)，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。三个时期分别为：A 时期，现蕾前 (7-8 叶期)，此时 G7097 和 W7105 叶片均为绿色；B 时期，现蕾期 (9-11 叶期)，此时 G7097 为绿叶，而 W7105 长出的新叶为白绿相间的斑驳叶片；C 时期，初花期，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，每个重复由三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 样品送交古奥公司进行 cDNA 文库构建，并利用 Illumina Novaseq 6000 测序仪对 2 个株系三个时期三次重复的 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/brassicanapus/>）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 Term 和 KEGG Pathway 富集分析^[27,28]。

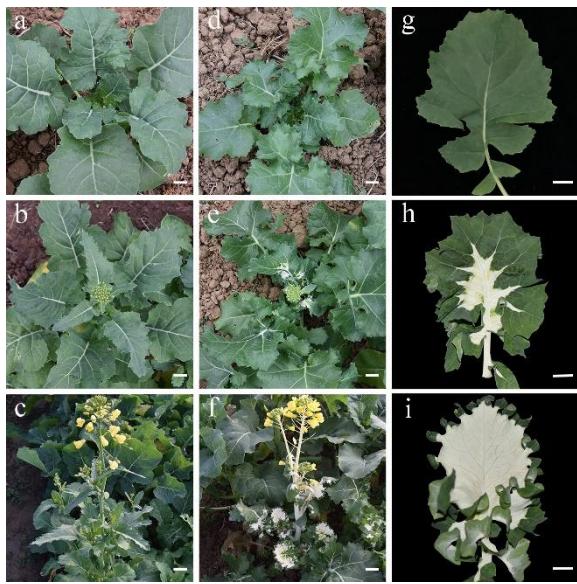
1.7 qRT-PCR 验证

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（附表 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 $2^{-\Delta Ct}$ 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

连续三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，说明 W7105 叶片白化主要是由于叶绿素缺乏导致的。

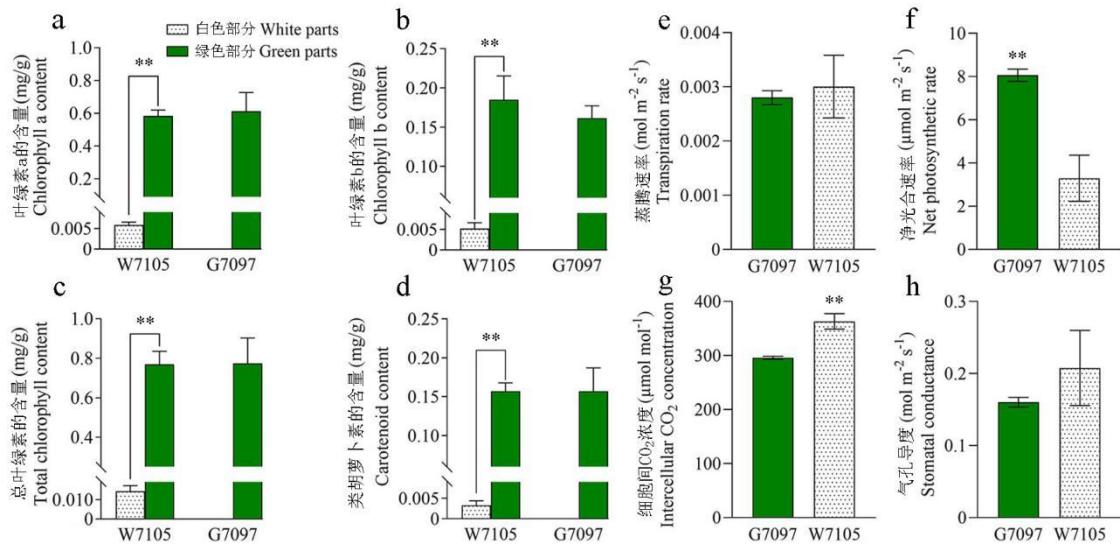


a-c: G7097 在苗期 (A 时期)、现蕾期 (B 时期) 和初花期 (C 时期) 的田间表型; d-f: W7105 在苗期、蕾期和初花期的田间表型; g-i: W7105 在 A、B 和 C 三个时期的单个叶片

a-c: Phenotype of G7097 at the seedling (stage A), bud (B) and early flowering stages (C); d-f: Phenotype of W7105 at the seedling (A), bud (B) and early flowering (C) stages; g-h: One leaf of W7105 at stage A, B and C

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 green-leaf line G7097 and white-leaf line W7105 at different developmental stages in the field



a-d: G7097 和 W7105 花期叶片中叶绿素和类胡萝卜素含量; e-h: G7097 和 W7105 花期叶片蒸腾速率、净光合速率、细胞间 CO_2 浓度和气孔导度的比较

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 CO_2 concentration and stomatal conductance of G7097 and W7105 leaves at the

early flowering stage

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

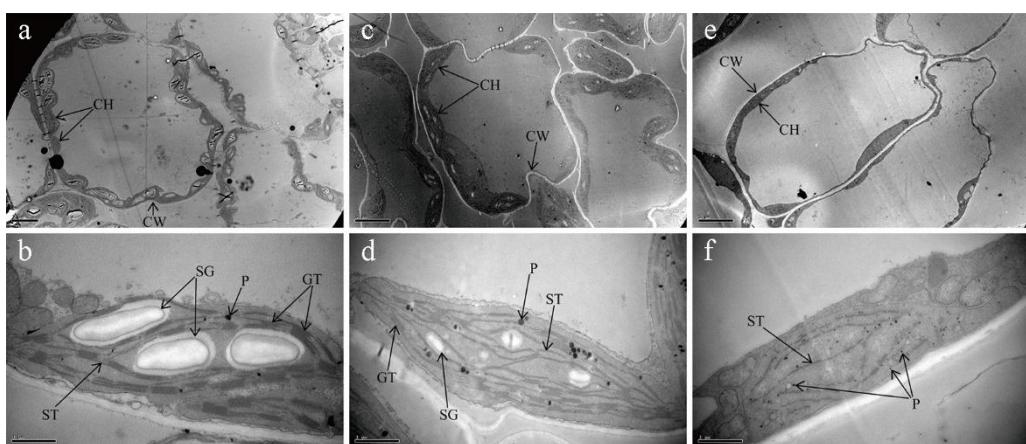
Fig. 2 Comparison of photosynthetic pigments and photosynthetic parameters in leaves of resynthesized *B. napus* green-leaf line G7097 and white-leaf line W7105

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，只有少许无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。



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）bar = 5μm；（b, d, f）bar = 1μm

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

2. 4 转录组测序质量与比对

对来源于两个株系三个发育时期叶片的 18 个 RNA 文库分别进行双端测序，共获得了 116.68G 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（附表 2）。G7097 和 W7105 每个发育时期的三个生物重复之间相关性良好（附图 2），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一共 18 个 DEGs，在 6 组样品（GA、GB、GC 和 WA、WB、WC）中对它们进行了 qRT-PCR 验证（附图 3）。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。

2. 5 DEGs 分析

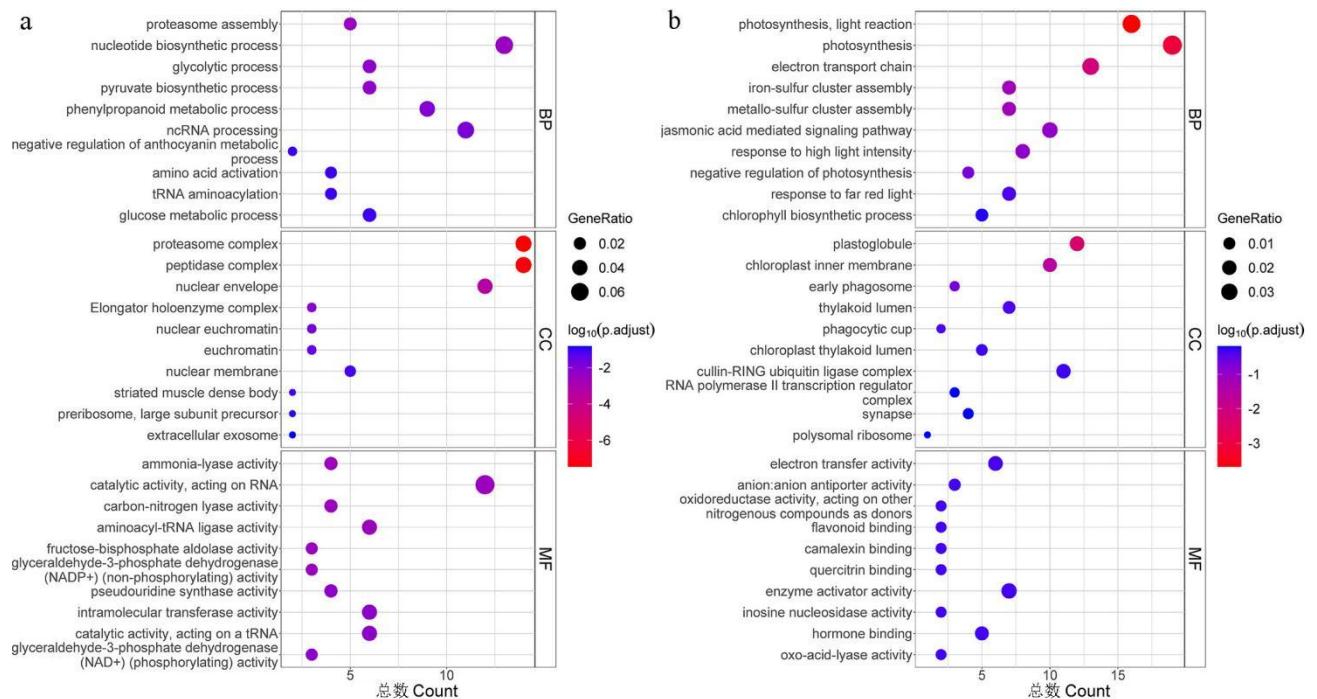
在三个不同发育时期的叶片中，共检测到 62300~65279 个基因表达。根据 DEGs 筛选标准，筛选同一株系不同发育时期、不同株系同一发育时期以及不同株系相同发育时期的差异表达基因，在 9 个比较组合（GA-vs-GB、GA-vs-GC、GB-vs-GC、WA-vs-WB、WA-vs-WC、WB-vs-WC、GA-vs-WA、GB-vs-WB、GC-vs-WC）中共筛选出 34,549 个 DEGs。为获得与叶色表型有关的 DEGs，对所有的 DEGs 作如下筛选（附图 4）：首先，根据每个比较组合两个样本之间是否存在叶色差异，将所有的比较组合分为两类（I 类和 II 类）。I 类比较组合主要涉及白叶和绿叶两种不同表型（如 WA-vs-WC 和 GC-vs-WC），而 II 类包括所有绿叶比较组合，它们的 DEGs 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 DEGs 与 II 类比较组合中所有 DEGs 的差集，进一步筛选到 1532 个 DEGs，其中分别有 540 个上调表达基因和 992 个下调表达基因，这些 DEGs 很可能与 W7105 叶片白化表型相关（附表 3）。

2. 6 DEGs 的 GO 和 KEGG 富集分析

对 540 个上调的 DEGs 进行 GO 分类和富集（图 4，附图 5），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）；在细胞成分类别下，DEGs 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, 我们发现包括了许多显著富集的 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 DEGs 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 5), 大部分上调的 DEGs 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 DEGs 仅显著富集于光合作用途径 (ko00195)。

综上所述, 白叶中上调 DEGs 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 DEGs 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。



a: GO enrichment of up-regulated DEGs; b: GO enrichment of down-regulated DEGs.

图 4 甘蓝型油菜白叶表型相关 DEGs 的 GO 分类富集分析

Fig. 4 Statistics of the top 10 enriched GO terms of DEGs related to and albino leaf color

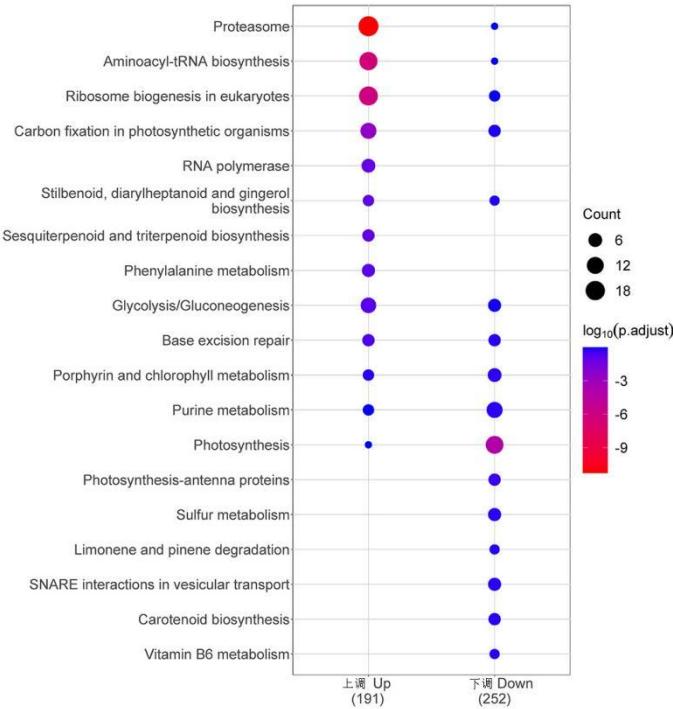
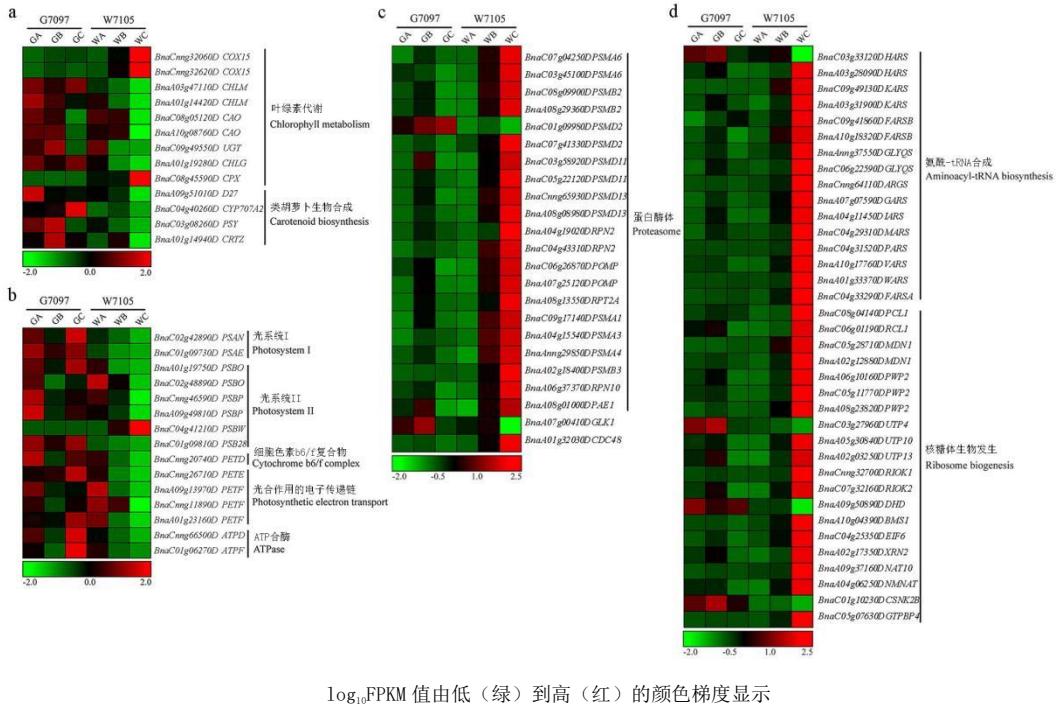


图 5 甘蓝型油菜白叶表型相关 DEGs 的 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment of up- and down-regulated DEGs related to albino leaf color

2.7 与叶绿素代谢和类胡萝卜素合成有关的 DEGs

对与白叶性状相关的 1532 个 DEGs 进行 KEGG 富集分析, 结果显示被富集到叶绿素代谢途径 DEGs 有 9 个(图 6a)。*BnaC08g05120D* 和 *BnaA10g08760D* 编码叶绿素 a 氧化酶 CAO, 在白叶株系 W7105 的三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, 在叶片发育的 C 时期, 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 DEGs 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*), 它们在绿叶发育的三个时期均显著高表达, 而在白叶中几乎不表达。我们进一步分析发现了 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, 如编码β-胡萝卜素 3-羟化酶 1 (CHY1) 的 *BnaA01g14940D* 和编码八氢番茄红素合成酶 (PSY) 的 *BnaC03g08260D* 等, 这四个基因均在绿叶发育的 1-2 个时期高表达, 而在白叶的三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。



log₁₀FPKM 值由低（绿）到高（红）的颜色梯度显示

Standardized FPKM values are displayed by a color gradient from low (blue) to high (red)

图 6 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 DEGs 在 G7097 和 W7105 中的表达量热图

Fig. 6 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

2.8 与光合作用途径相关的 DEGs

与白叶表型可能相关的 1532 个差异基因中，有 15 个位于光合作用通路（图 6b），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还蛋白 (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)。在三个发育时期中，除了 *BnaC04g41210D* 之外，其它 14 个下调的 DEGs 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。大量光合作用途径中 DEGs 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。

2.9 与叶绿体逆向信号传递和质量控制有关的 DEGs

GOLDEN 2-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 6c)，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 DEGs 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 6c)。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 DEGs 相似的表达趋势，在 W7105 初花期的白叶中显著上调 (图 6c)。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 DEGs

与翻译过程相关 DEGs 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 6d)。它们中的大部分在 W7105 中都表现出与蛋白酶体相关 DEGs 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，我们推测这些 DEGs 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 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 的三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^[36]。本研究中, 我们推测 *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^[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]。我们的研究发现, 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 蕊期斑驳叶中就已经表现下调, 至花期下降程度显著。qRT-PCR 实验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 *swII-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 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析, 结果表明, W7105 白叶中下调的 DEGs 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, 我们发现编码光系统 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 初花期白叶中的表达被显著抑制。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的类囊体堆积可能与 PSII 蛋白复合物的急剧下调表达有关^[42]。因此, 我们推测白叶株系 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。

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 DEGs 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 DEGs 都与前者有相似的表达趋势，我们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，我们推测白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。白叶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, Singsaas 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 *CsChlI* 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 1 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 (01): 113-120
Jiang Y F, Wu X J, Fei W X, Li Q S, Rong S B, Chu G M, Chen F X. Genetic and physiological characteristics of *Brassica napus* germplasm resources showing albino siliques. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2020, 21 (01): 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] Pertea M, Kim D, Pertea 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, Pesceat 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, Lympereopoulos P, Baldwin A, Jarvis RP. 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 CH, 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, Rosnoble 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] M. Tokumaru, F. Adachi, M. Toda, Y. Ito-Inaba, F. Yazu, Y. Hirosawa, Y. Sakakibara, M. Suiko, T. Kakizaki, T. Inaba, 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