

· 综 述 ·

植物 GLKs 生物学功能及分子作用机理研究进展

沈淑容, 袁俊杰, 许以灵, 马伯军, 陈析丰

浙江师范大学 化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

沈淑容, 袁俊杰, 许以灵, 马伯军, 陈析丰. 植物 GLKs 生物学功能及分子作用机理研究进展. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2700-2712.

SHEN SR, YUAN JJ, XU YL, MA BJ, CHEN XF. Biological function and molecular mechanism of the transcription factor GLKs in plants: a review. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2700-2712.

摘 要: GLKs (GOLDEN 2-LIKEs) 是一类植物特有的转录因子, 靶向调控光合作用相关基因的表达, 调控叶绿体的发育、分化并维持其机能, 并参与调节果实的营养积累、叶片衰老、免疫反应及逆境胁迫应答等。GLKs 受多种激素或环境因子的影响, 是植物细胞调控网络的关键节点, 也是改造作物光合能力的重要基因。基于国内外在植物 GLKs 研究中取得的众多进展, 文中全面阐述了 GLKs 基因的生物学功能、分子机制及其育种实践, 并构建 GLKs 介导的信号网络模型, 为后期 GLKs 的理论与应用研究提供借鉴。

关键词: 转录因子; GLKs; 生物学功能; 分子机理; 信号网络

Biological function and molecular mechanism of the transcription factor GLKs in plants: a review

SHEN Shurong, YUAN Junjie, XU Yiling, MA Bojun, CHEN Xifeng

College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang, China

Abstract: GLKs (GOLDEN 2-LIKEs) are a group of plant-specific transcription factors regulating the chloroplast biogenesis, differentiation and function maintains by triggering the expression of the photosynthesis-associated nuclear genes (*PhANGs*). The GLKs also play important roles in nutrient's accumulation in fruits, leaf senescence, immunity and abiotic stress response. The expression of *GLK* genes were affected by multiple hormones or environmental factors. Therefore, GLKs were considered

Received: February 11, 2022; **Accepted:** April 11, 2022; **Published online:** April 15, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31871605); National Natural Science Foundation of Zhejiang Province, China (LD19C130001)

Corresponding author: CHEN Xifeng. E-mail: xfchen@zjnu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31871605); 浙江省自然科学基金 (LD19C130001)

as the key nodes of regulatory network in plant cells, and potential candidates to improve the photosynthetic capacity of crops. Since numerous researches of GLKs have been reported in plants, the biological function, molecular mechanism of *GLKs* genes and its applications in breeding were summarized and a GLK-mediated signaling network model was developed. This review may facilitate future research and application of GLKs.

Keywords: transcription factor; GLKs; biological function; molecular mechanism; signaling network

叶绿体 (chloroplast) 是含有叶绿素 (chlorophyll) 的质体, 是绿色植物光合作用的基本功能单位, 是有机物合成的生物工厂, 也是植物激素与活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生物合成的重要场所, 参与调节植物的生长发育、抗逆应答、寄主-病原互作等^[1-2]。叶绿体是一个半自主的细胞器, 受核基因组与自身基因组两套遗传信息系统的控制, 细胞核对叶绿体发育、维持、降解起了主导作用, 而叶绿体也能发出逆向信号向细胞核反馈信息, 两类机制相互协调, 共同促成叶绿体的最佳发育及各项功能的

发挥^[3]。叶绿体的分子机理非常复杂, 目前尚不完全清楚。1926年, Jenkins^[4]在玉米中发现了一个叶绿体结构异常的叶色黄化突变体 *Golden 2*。70多年后, Hall等^[5]克隆了玉米 *Golden 2* 基因 (简称 *ZmG2*), 发现其编码蛋白是一类新型的转录因子。随后, 玉米 *ZmG2* 的同源基因 *ZmGLK1* (*Golden 2-like 1*) 被克隆^[6], 苔藓^[7]、拟南芥^[8]、水稻^[9]、番茄^[10]、辣椒^[11]、花生^[12]和油菜^[13]等多种植物的 *GLKs* 基因也相继被报道 (表 1), 为研究叶绿体的分子机理开启了一条新的途径。

表 1 植物中已报道的 *GLKs* 基因的信息及其生物学功能

Table 1 The biological functions of *GLKs* genes reported in plants

Species	Gene	^a Accession	^b CDS (bp)	^c Protein (aa)	Function reported	References
<i>Zea mays</i>	<i>ZmGLK1</i>	LOC541882	1 428	475	Chloroplast development;	[6]
	<i>ZmG2</i>	LOC542493	1 386	461	biomass and yield	[14]
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>PpGLK1</i>	LOC112284183	1 536	511	Chloroplast development	[7]
	<i>PpGLK2</i>	LOC112288619	1 554	517		
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsGLK1</i>	LOC4340977	1 368	455	Chloroplast development	[9]
<i>Japonica</i>	<i>OsGLK2</i>	LOC4326363	1 614	537		
<i>Capsicum annuum</i>	<i>CaGLK2</i>	LOC107845460	942	313	Chloroplast development;	[11]
					fruit quality	
<i>Arachis hypogaea</i>	<i>AhGLK1b</i>	MK952147	1 212	403	Disease resistance;	[12]
	<i>AhGLK1</i>	KX168636	1 212	403	drought resistance	[15]
<i>Brassica napus</i> L.	<i>BnaGLK1a</i>	BnaA07g00410D	1 353	450	Chloroplast development	[13]
	<i>BnaGLK1b</i>	BnaC07g00300D	1 341	446		
	<i>BnaGLK1c</i>	BnaC08g36330D	3 066	1 021		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtGLK1</i>	AT2G20570	1 263	420	Chloroplast development; ozone	[16-20]
	<i>AtGLK2</i>	AT5G44190	1 161	386	stress; hormone; senescence;	
					disease resistance	
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>SIGLK1</i>	Solyc07g053630.2.1	1 395	464	Chloroplast development; fruit	[21-22]
	<i>SIGLK2</i>	Solyc10g008160.2.1	933	310	quality; hormone	

(待续)

(续表 1)

Species	Gene	^a Accession	^b CDS (bp)	^c Protein (aa)	Function reported	References
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>NbGlk1</i>	Niben101 Scf06721g00011.1	1 209	402	Disease resistance	[23]
<i>Prunus persica</i>	<i>PpGLK1</i>	Prupe.3G127700	1 629	542	Chloroplast development	[24]
<i>Lactuca sativa</i>	<i>LsGLK</i>	MZ254626	1 266	421	Chloroplast development	[25]

^a: *GLKs* genes accessions of different species were from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) and *Brassica* database (<http://www.genoscope.cns.fr/brassicapapus/data/>), respectively.

^b: coding-sequence (CDS) length of the *GLKs* genes. ^c: amino-acid number of the protein encoded by *GLKs* genes.

目前, 研究表明 *GLKs* 基因只存在于陆地植物中^[26], 二倍体植物基因组中普遍存在两个直系同源的 *GLKs* 基因, 其编码蛋白属于 Myb 类的 GARP 超家族成员, 均包含一个 DBD (DNA-binding domain) 结构域和一个特有的 GCT-box 结构域^[27]。进化系统树分析显示, 单子叶、双子叶和苔藓各自拥有独立的 *GLKs* 进化分支, 表明 *GLKs* 基因在陆地植物分化之前就已经存在 (图 1)。大量的遗传、分子、生理生化研究证明 *GLKs* 基因是调控植物叶绿体发育及其机能维持的关键转录因子, 已成为植物光合机理研究领域的“明星”基因。最新研究发现, 借助生物技术利用 C₄ 植物的 *GLKs* 基因可以改造 C₃ 作物的光合能力, 使重要粮食作物水稻的光合效率显著增加, 增产率最高可达 70%^[14,28-29], 在作物高产育种中体现了巨大的应用价值。不仅如此, 近年来 *GLKs* 基因还被报道参与了果实营养物质的积累、叶片衰老及逆境胁迫应答等多个途径 (表 1), 很可能是植物细胞网络信号的关键节点, 因此解析 *GLKs* 分子机理具有重要的研究意义, 也有助于更好地指导作物光合能力提升的实践应用。目前, 对 *GLKs* 基因研究进展的综述已有零星报道^[27,30], 但是对其调控分子机理的阐述不够深入。本文基于国内外的 *GLKs* 研究及其最新进展, 重点介绍了 *GLKs* 基因发挥不同生物学功能的分子机理, 构建了 *GLKs* 介导的信号网络模型, 为 *GLKs*

机理的深入研究及其在提升作物光合作用中的应用提供借鉴。

1 调控植物叶绿体的发育与分化

植物 *GLKs* 基因在绿色组织中表达, 如拟南芥、水稻、玉米的 *GLKs* 基因都在叶中高表达, 在茎、花 (穗) 中低表达, 在根中不表达^[6,14,31], 说明 *GLKs* 主要就是参与光合作用相关基因 *PhANGs* (*photosynthesis-associated nuclear genes*) 的表达调控。对双子叶模式植物拟南芥研究发现, *atglk1* 或 *atglk2* 突变体的表型与野生型没有差异, 只有 *atglk1/atglk2* 双突变体才表现出叶片黄化、叶绿素含量下降、叶绿体变小且类囊体基粒减少, 而在 *atglk1/atglk2* 双突变体中表达 *AtGLK1* 或 *AtGLK2* 基因都可恢复其突变表型^[31-32]。有趣的是, 单子叶模式植物水稻的 *OsGLKs* 基因也存在功能冗余, *osglk1* 或 *osglk2* 突变体均无表型变化, *osglk1/osglk2* 双突变体则表现出与 *atglk1/atglk2* 双突变体相似的表型^[26], 说明植物的 *GLKs* 基因在调控叶绿体发育中普遍存在功能冗余的现象。过表达 *GLKs* 基因可导致转基因植株的叶片等光合组织更绿, 甚至还能使非光合组织 (如根) 形成具有功能的叶绿体^[18], 表明 *GLKs* 是控制叶绿体发育和形成的重要因子。

进一步研究发现, *GLKs* 也是调控 C₄ 植物叶绿体分化的关键因子。C₃ 植物只有一种类型的叶绿体, 而 C₄ 植物具有两种不同类型的叶绿

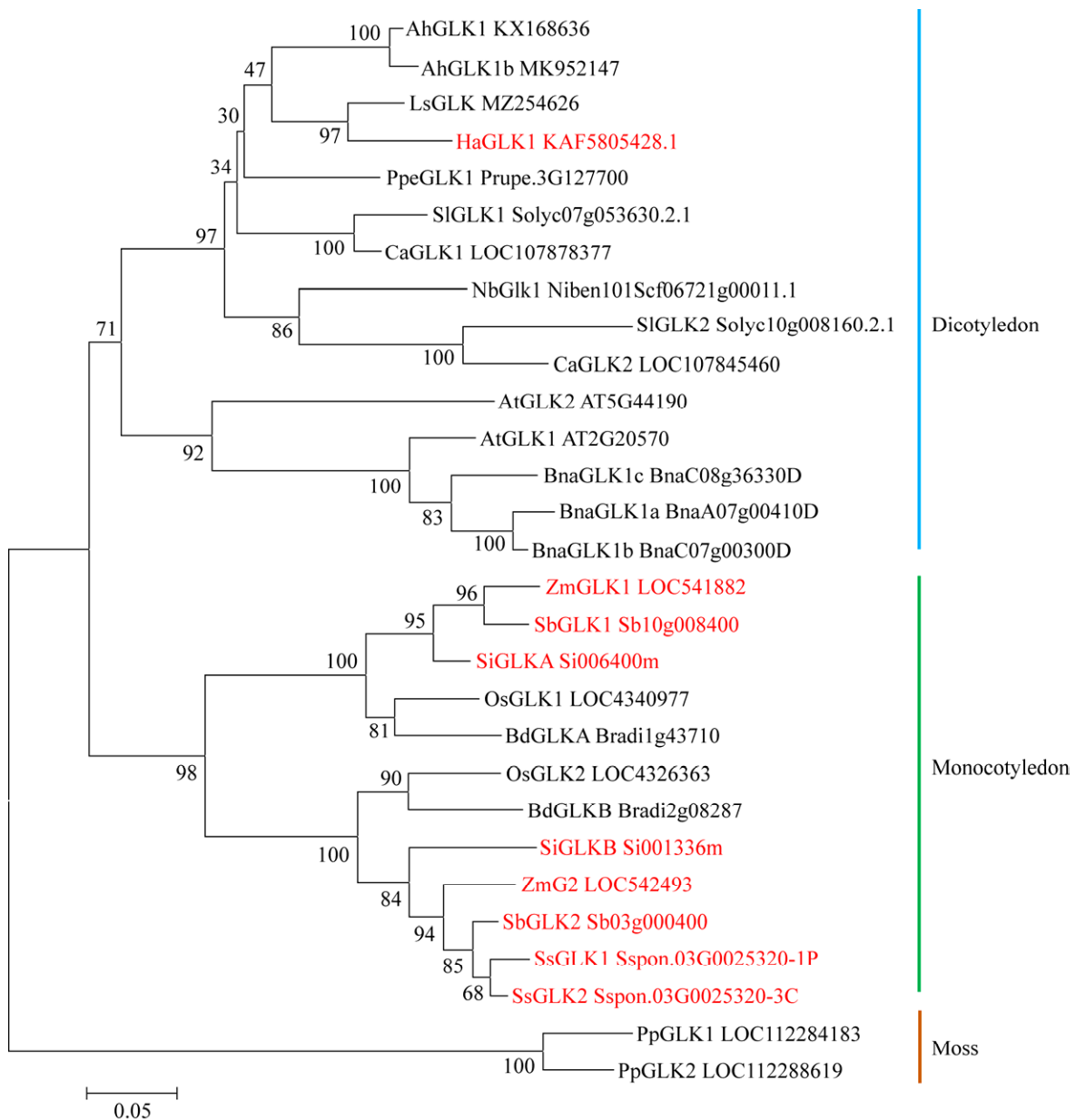


图 1 植物 GLKs 的系统进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of GLKs from plants. Protein sequences of GLKs were used for alignment by ClustalW, and the phylogenetic tree was developed by the method of neighbor-joining tested with bootstrap 1 000 using MEGA 7. Three independent evolutionary branches are marked with difference-color vertical lines indicated as dicotyledons (blue), monocotyledons (red) and moss (brown). The scientific names of species are abbreviated as: Ah: *Arachis hypogaea*; Ls: *Lactuca sativa*; Ha: *Helianthus annuus*; Ppe: *Prunus persica*; Sl: *Solanum lycopersicum*; Ca: *Capsicum annuum*; Nb: *Nicotiana benthamiana*; At: *Arabidopsis thaliana*; Bna: *Brassica napus*; Zm: *Zea mays*; Sb: *Sorghum bicolor*; Si: *Setaria italica*; Os: *Oryza sativa Japonica*; Bd: *Brachypodium distachyon*; Ss: *Saccharum spontaneum*; Pp: *Physcomitrella Patens*. Each accession is followed by the corresponding GLKs. The GLKs from C₃ plants are shown as black, while the ones from C₄ plants are shown as red.

体：叶肉细胞的有基粒叶绿体和维管束鞘细胞的缺乏基粒叶绿体。叶肉细胞将 CO_2 转化成 C_4 化合物，转运到维管束鞘细胞中进行卡尔文循环，其光合效率大大高于 C_3 植物^[33]。GLKs 基因在 C_4 植物的不同光合类型的细胞中表达具有明显的特异性，如玉米 *ZmGLK1* 基因、高粱 *SbGLK1* 基因在叶肉细胞中高表达，而玉米 *ZmG2* 基因、高粱 *SbGLK2* 基因则在 C_4 植物维管束鞘细胞中高表达^[14,26,34]。与水稻、拟南芥等 C_3 植物不同，玉米 *zmg2* 突变体就出现叶色黄化、叶绿体发育异常，而且只影响维管束鞘细胞的叶绿体发育^[6]。因此，植物 GLKs 基因既是叶绿体发育的普遍调节因子，又是叶绿体分化的特异调节因子^[6]，也有学者认为 GLKs 基因的功能分化可能是 C_4 植物进化的先决条件^[26]。

GLKs 是植物细胞核主导叶绿体发育的正向调控转录因子，主要转录激活两类 *PhANGs* 基因的表达 (图 2、3)：一类是编码叶绿素生物合成的一系列关键酶，包括 HEMA1、GUN4、CHLH、CHL27、POR 和 CAO 等；另一类是编码光系统 I、光系统 II、光电子传递复合体的各类亚基^[8-9,26-27]。Waters 等^[8]证实了 *AtGLKs* 可以直接与靶基因启动子中的 CCAATC 序列和 CACGTG (G-box) 序列结合。此外，GLKs 还参与叶绿体-核逆向信号的反馈调节。研究表明，当质体受损或生物合成减弱时会引发大量 *PhANGs* 基因表达下降^[35]，这很可能与 GLKs 的功能有关。因为用损伤叶绿体药剂 (norflurazon) 或光合抑制剂 (lincomycin) 处理拟南芥后，诱发质体损伤的信号会抑制 *AtGLK1* 基因的表达，而且依赖一个定位于叶绿体的逆信号蛋白 GUN1 (genomes uncoupled 1)，因为在 *gun1* 突变体中 *AtGLK1* 基因的表达不受质体信号的影响^[8,36-37]。进一步研究发现，在质体损伤处理的 *gun1* 突变

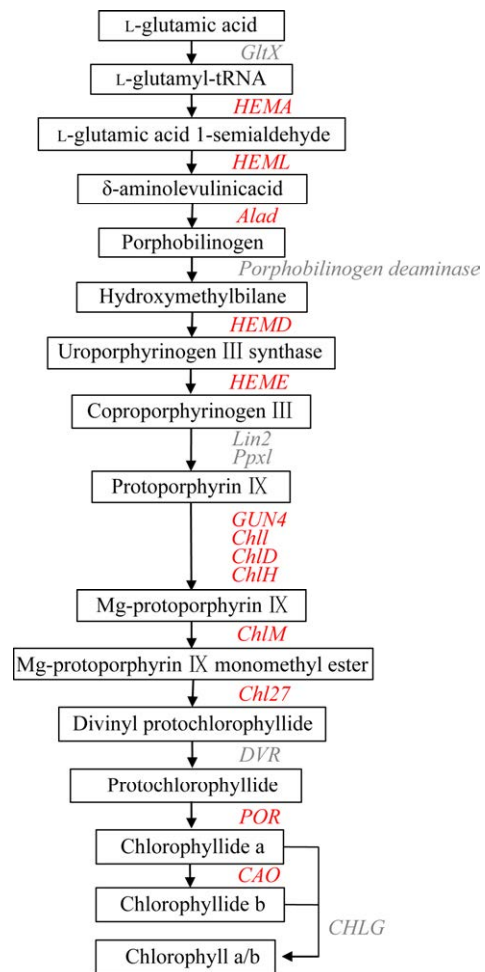


图 2 编码叶绿素生物合成途径中酶的 GLKs 靶基因^[8-9,26-27]

Figure 2 Genes encoding the enzymes in biosynthesis of chlorophyll targeted by GLKs^[8-9,26-27]. The GLKs-targeted genes are shown in red. Abbreviation annotation: *GltX*: glutamyl-tRNA synthetase; *HEMA*: glutamyl-tRNA reductase; *HEML*: glutamate-1-semialdehyde aminotransferase; *Alad*: delta-aminolevulinic acid dehydratase; *HEMD*: uroporphyrinogen III; *HEME*: uroporphyrinogen III; *Lin2*: coproporphyrinogen III oxidase; *Ppxl*: protoporphyrinogen; *ChlI*: magnesium-chelatase subunit chlI; *ChlD*: magnesium-chelatase subunit chlD; *ChlH*: magnesium-chelatase subunit chlH; *ChlM*: Magnesium-protoporphyrin O-methyltransferase; *Chl27*: magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester aerobic oxidative cyclase; *DVR*: 3,8-divinyl protochlorophyllide a 8-vinyl reductase; *POR*: protochlorophyllide oxidoreductase; *CAO*: chlorophyllide a oxygenase; *CHLG*: chlorophyll synthase.

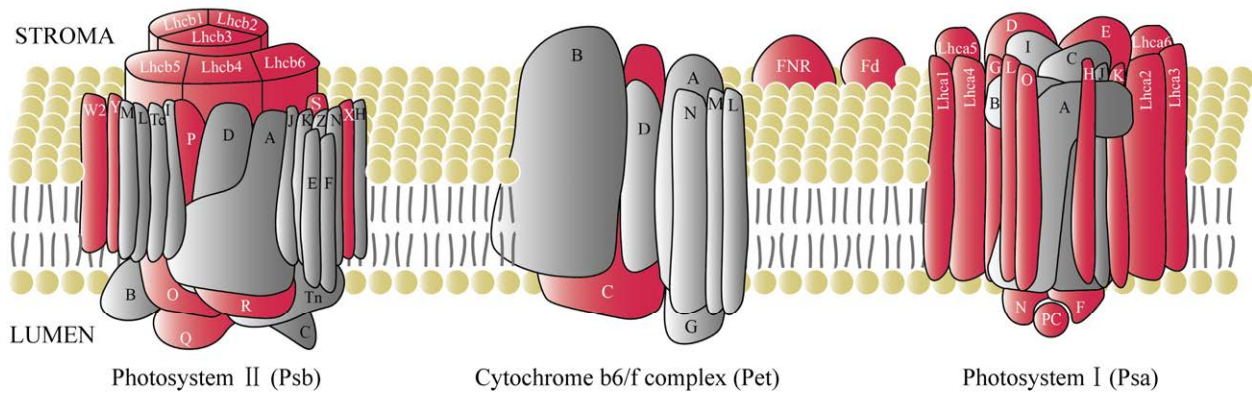


图 3 编码叶绿体光系统组分中的 GLKs 靶基因^[8-9,26-27]

Figure 3 Genes encoding the photosystem components in chloroplast targeted by GLKs^[8-9,26-27]. Pictorial representation of photosystem I complex (Psa), photosystem II complex (Psb), Cytochrome b6/f complex (Pet), and electron-transport components including plastocyanin (PC), ferredoxin-NADP⁺ reductase (FNR) and ferredoxin (Fd) on the thylakoid membrane. The subunits transcriptionally targeted by GLKs are highlighted in red.

体中, 尽管 *AtGLK1* 基因的 mRNA 水平没有下调, 但是 *AtGLK1* 蛋白水平却显著下降了, 表明质体信号也可通过不依赖 GUN1 的方式直接调节 *AtGLK1* 的蛋白水平, 并且蛋白酶体抑制剂 MG-32 处理可以导致 *AtGLK1* 蛋白积累, 且能部分互补由质体损失引发的 *AtGLK1* 蛋白下降, 说明泛素-蛋白酶体系统参与了质体信号对 *AtGLK1* 的降解^[38]。在番茄中, *SIGLK2* 与 *CUL4* 互作, 是 *CUL4*-*DDB1*-*DET* 泛素连接酶复合体的底物, *CUL4*、*DDB1* 或 *DET1* 基因突变都会减缓 26S 蛋白酶体对 *SIGLK2* 的降解^[39]。

2 影响果实的营养和品质

许多植物的果实在未成熟前呈现绿色, 叶绿体的数目和光合活性影响了果实的营养成分和风味^[40], 而 *GLKs* 基因在期间发挥了重要作用。番茄 *SIGLK1* 基因在叶片中高表达, 而 *SIGLK2* 基因在果实中高表达; 有趣的是, *SIGLK2* 基因在果实顶端的表达量最高, 随纬度梯度呈下降趋势, 果实底部的表达量最低, 果实表皮的绿色程度与 *SIGLK2* 基因表达量呈

明显正相关, 出现典型的“绿肩”表型^[10,21], 从而影响果实成熟的均一性和品质。辣椒 *CaGLK1*、*CaGLK2* 基因的表达模式与番茄 *SIGLK1*、*SIGLK2* 基因的表达模式也非常类似^[11]。这种组织表达的差异可能与基因启动子区域的组蛋白甲基化有关, 因为只在 *SIGLK1* 基因启动子区域存在 H3K4me3 修饰, 而在 *SIGLK2* 基因的启动子位置则没有发现^[21]。番茄 *slgk1* 突变体的果实无表型变化, 而 *slgk2* 突变体的果实为淡绿色且“绿肩”消失, 因此 *SIGLK2* 基因也称 *Uniform* (简称 *U*)^[21]; 过表达 *SIGLK1* 或 *SIGLK2* 基因的番茄果实则整个深绿、叶绿体数目增加一倍多, 绿色果实中更多、更大的叶绿体提高了淀粉、糖等光合产物^[10,21], 同时绿果中积累的叶绿素也为果实成熟后类胡萝卜素等合成提供了更多的前体, 进一步提高了果实营养和品质^[41]。异位表达猕猴桃的 *AchGLK* 基因也能提高番茄果实的叶绿体数目和营养物质^[42]。在红椒中过表达 *CaGLK2* 基因能使绿果的叶绿素、红果的类胡萝卜素等含量都显著提高^[11]。

在番茄 *SIGLKs* 信号途径的研究中发现, 生

长素 (indole-3-acetic acid, IAA) 可直接抑制 *SIGLK2* 基因的表达, 在不响应 IAA 信号的 *dgt* 突变体中 *SIGLK2* 基因表达不受 IAA 抑制^[43]。ARF (auxin responsive factor) 是植物响应 IAA 信号途径的关键转录因子^[44], 其中 SIARF4 和 SIARF10 分别对 *SIGLKs* 基因的转录起抑制和激活的作用^[45]。*SIGLK1* 基因启动子序列中含有 ARFs 的结合元件, ARF10 能直接结合 *SIGLK1* 基因启动子转录激活其表达^[45-46]。抑制 *SIARF4* 基因表达或过表达 *SIARF10* 转基因番茄的果实都为深绿色, 但是前者深绿的表型仅限于未成熟果实, 而后者深绿的表型在果实和叶片中都有出现, 表明 *SIARF4* 与 *SIARF10* 基因功能的发挥具有一定的组织特异性^[45-46]。此外, KNOX (knotted1-like homeobox) 型转录因子 TKN2、TKN4 也正调控 *SIGLK2* 基因表达^[22]。

3 协调植物的叶片衰老

植物衰老早期的特征是叶片开始退绿、光合作用效率显著下降^[47], 而叶绿体维持机能的丧失和叶绿素含量下降是其主要原因^[48]。拟南芥 *atglk1/atglk2* 双突变体除了植株黄化, 还出现叶片早衰的表型, 而 *AtGLK1* 或 *AtGLK2* 基因过表达植株的表型则恰好相反^[8]。在 *atglk1/atglk2* 双突变体中过表达 *AtGLK1* 或 *AtGLK2* 基因可互补其早衰表型^[32]。可见, *GLKs* 基因的功能也涉及了植物衰老, 并受到光、脱落酸 (abscisic acid, ABA)、油菜素内酯 (brassinolide, BR) 等信号途径的调控。光是叶绿体发育所必备的条件, 也与植物衰老密切相关, *AtGLKs* 基因的表达也受光诱导^[31]。光敏色素 (phytochrome, phyA/B) 是植物感受光信号的重要受体, 光敏色素结合蛋白 PIF (phytochrome interacting proteins) 可激活由年龄触发或黑暗诱导的叶片衰老^[49]。研究发现, PIF4 是 *AtGLKs* 基因的转录抑制子, 可直

接结合 *AtGLKs* 基因启动子从而抑制其表达^[50]。在光照条件下, 光受体 phyB 被激活后, 从细胞质进入细胞核与 PIFs 结合, 引起 PIFs 的泛素化蛋白酶解, 使得 *AtGLKs* 基因正常表达, 叶绿体的机能得以维持; 在黑暗条件下, 由于 PIFs 蛋白积累, 抑制了 *AtGLKs* 基因及其下游 *PhANGs* 基因的转录, 导致叶绿体的机能丧失, 引发叶片衰老^[51-52]。

ABA 也是诱发植物衰老的重要激素, ABA 可促进 NAC 类转录因子 ATAF1 (*Arabidopsis thaliana* activating factor 1) 直接抑制 *AtGLKs* 基因的转录; 同时 ATAF1 激活其靶基因 *ORE1* (*oresara 1*) 的表达, 而 *ORE1* 与 *AtGLKs* 蛋白互作, 进一步下调 *AtGLKs* 的转录活性, 最终抑制 *PhANGs* 表达, 从而促进叶片衰老^[19,53]。最新研究发现, 拟南芥的 *WRKY75* 与 *SIB1* (*sigma factor binding protein 1*)、*SIB2* 基因的表达都受 ABA 与叶片衰老的诱导, *WRKY75* 作为转录因子可结合 *AtGLKs* 基因的启动子抑制其转录, 促进叶片衰老^[54]; 而 *SIB1* 与 *SIB2* 是叶绿体基因组编码的质体 RNA 聚合酶 SIGs (*sigma factors*) 的互作蛋白, 同时含有叶绿体定位信号和核定位信号, 也是叶绿体-核逆信号的关键因子^[55], *SIB1* 或 *SIB2* 都能与 *WRKY75* 发生蛋白互作, 解除 *WRKY75* 对 *AtGLKs* 基因的转录抑制, *AtGLKs* 基因的表达在 *sib1*、*sib2* 突变体中均显著下调, 而在 *SIB1* 过表达株系中则刚好相反, 证明了 ABA 通过 *WRKY75* 与 *SIB1* (或 *SIB2*) 正、负调控 *AtGLKs* 基因的表达来调节叶片衰老^[54]。此外, *AtGLKs* 基因的表达还受 BR 信号转导途径的 *BZR1* 和 *BZR2* 抑制^[50,56]。

4 介导植物的逆境胁迫应答

病原菌侵染植物时, 叶绿体能感知并迅速地将信号传递给细胞核, 促使植物建立免疫防

御体系, 而 GLKs 可能在其中起了重要作用。在拟南芥中, 过表达 *AtGLK1* 基因能增强植株对真菌禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)^[20,57]、灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 的抗性^[16], 一些基础防御的基因表达显著上调^[20]; 而异位表达花生 *AhGLK1b* 基因的拟南芥对细菌 *Pst* DC3000 和青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 也表现出较强的抗性^[12]。*atglk1atglk2* 双突变体则更易感染黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus), 且受损更严重, *PR1*、*PR2*、*THI2.1*、*PDF1.2* 等水杨酸 (salicylic acid, SA) 与茉莉酸 (jasmonic acid, JA) 途径中的基因也被显著下调^[58]。芜菁花叶病毒 (turnip yellow mosaic virus) 的毒力蛋白 P69 能够与 AtGLKs 发生蛋白互作, 并抑制其对 *PhANGs* 基因的转录激活, 导致植物出现淡绿色表型, 影响植株正常生长^[59]。在烟草中, NbGLK1 能与病毒免疫关键因子 Rx1 结合并启动免疫反应^[23]。研究表明, GLKs 参与植物的抗病反应很可能与 SA 信号途径有关。SA 受体蛋白 NPR1 (nonexpresser of PR genes 1) 可诱导 *SIB1* 的表达启动防御应答, *sib1* 突变体对灰霉病菌的抗性减弱, 但过表达 *SIB1* 转基因植株则抗性增强^[60]。*SIB1* 在细胞核能与 GLKs 蛋白互作, 增强 GLKs 对核基因 *PhANGs* 的表达, 同时 *SIB1* 也能进入叶绿体与 SIG1 互作, 抑制质体基因 *PhAPGs* (*photosynthesis-associated plastid genes*) 的表达, 核-质体的光合相关基因不协调表达, 会引发光系统 II 的光抑制效应, 导致叶绿体积累 ROS (reactive oxygen species) 单线态氧 ($^1\text{O}_2$), 而 $^1\text{O}_2$ 能被叶绿体定位蛋白 EX1 (executer 1) 感知, 并产生质体-核逆信号转导, 引发 PCD (program cell death) 而启动防御反应^[61]。另外, SA 途径一个调控 PCD 的 LSD1 (lesion-simulating disease 1) 蛋白也可结合 GLKs,

并且抑制 GLKs 与靶基因启动子的结合活性, 使其转录活性下降, 过表达 *LSD1* 基因可抑制 *PhANGs* 基因表达和叶绿体发育, 而 *lsd1* 突变体则会增强这些基因的表达和抗病性^[62]。SA 诱导的 *SIB1* 蛋白则能扰乱 LSD1-GLKs 的互作, 竞争性结合 GLKs, 表明 *SIB1* 和 LSD1 蛋白在 GLKs 活性调控方面存在拮抗作用, 通过叶绿体精细调节 ROS 的产生, 参与防御应答^[61-62]。

此外, GLKs 还参与了植物耐寒、抗旱、耐臭氧等非生物胁迫的调控。在拟南芥中, 过表达棉花 *GhGLK1* 基因显著提高了植株对干旱、低温的抗性^[63]; 在 *atglk1/atglk2* 双突变体中异位表达花生 *AhGLK1* 基因, 能使植株在干旱恢复过程中 *PhANGs* 基因表达显著上调, 促进叶绿素的生物合成和光合作用, 帮助植株恢复正常的生长水平^[15]。另有研究表明, GLKs 可通过控制气孔开闭调节植物对臭氧的耐受性^[17], 在功能缺陷的拟南芥 *GLK1/2-SRDX* 突变体中出现气孔关闭表型和很强的臭氧耐受性, 而过表达 *AtGLK1* 或 *AtGLK2* 基因植株则出现气孔开放和对臭氧的更高敏感等表型; *GLK1-SRDX* 植株中 K^+ 通道活性降低, 造成气孔关闭, 从而应对臭氧胁迫。

5 提高作物产量的育种应用

提高植物绿色组织的光合效率是增加作物产量的有效手段^[64]。由于 C_4 植物的光合细胞具有高光合效率的特点, 学者们试图利用 C_4 植物的 GLKs 基因在 C_3 植株中构建 C_4 途径, 以提高 C_3 植物的光合能力。Wang 等^[26]在水稻中过表达玉米 *ZmGLKs* 基因可使其叶肉细胞的叶绿体增大、维管束鞘细胞的叶绿体发育, 在叶片结构层面上完成了由 C_3 向 C_4 转化的第一步^[28]; Li 等^[29]进一步证明, 过表达 *ZmGLK1* 或 *ZmG2* 基因的水稻植株由于叶绿素和色素蛋白质天线

复合体水平的增加从而提高了捕光效率,而叶黄素水平的增加则缓冲了在强光或波动光条件下光抑制的负面影响,整体光合能力的增强使转基因植株产生更多营养,其生物量和籽粒产量增加了30%–40%。Yeh等^[14]发现,在水稻中不论是采用玉米 *GLKs* 基因的自身启动子还是组成型启动子驱动 *ZmGLK1* 或 *ZmG2* 基因的表达,转基因植株均能提高叶片的叶绿素含量、核酮糖二磷酸缩化酶 (Rubisco) 的酶活性以及单位叶面积的光合速率,但是只有基因自身启动子 (*pZmG1::ZmG1*、*pZmG2::ZmG2*、*pZmG1::ZmG1/pZmG2::ZmG2*) 的转基因植株提高了产量 (51%、47%和 70%),研究者推测可能是由于高表达玉米 *ZmGLKs* 基因对水稻生长和种子发育存在负面影响。此外,异位表达 *GLKs* 基因可使非绿色器官产生有功能的叶绿体,增加了植株的光合面积,促进了植物对碳源的有效利用^[18],也可以作为一种高产育种的策略。

6 总结与展望

GLKs 作为一类植物特有的转录因子,是叶绿体发育与分化、维持细胞光合机构所必需的,通过核-质体双向信号通路共调节核、质体光合基因的表达,以优化不同环境和发育条件下的光合能力,调节光合代谢、同化的产物,在果实营养物质的积累、叶片衰老、免疫反应及逆境胁迫应答等多途径中发挥其生物学功能,*GLKs* 基因在转录水平、翻译水平和其编码蛋白的转录活性等多维度都受到正、负调控,涉及各类蛋白因子、植物激素和环境因子等等,其分子机理相当复杂。基于已有的研究结果,我们构建了一个植物 *GLKs* 的调控分子机理及

其信号网络模式图 (图 4),可见在各路信号途径中 *GLKs* 主要受负调控,我们从水稻中也鉴定到了两个负调控 *GLKs* 介导叶绿体发育的未知功能小肽 NRPC1 (negative regulator of photosynthesis and chloroplast development 1) 和 NRPC2^[65],目前 NRPCs-*GLKs* 的分子作用机理还在研究中。推测 *GLKs* 可能是植物细胞保持核 *PhANGs* 基因与质体 *PhAPGs* 基因的表达平衡、维持光合作用稳态的关键;这种平衡一旦被打破,可能会导致细胞紊乱或坏死^[62-63],其中质体-核逆信号可能是引发负调控的关键,但是其分子机理还不是很清楚。目前认为 *GLKs* 作为转录因子,其转录调控的靶基因主要是 *PhANGs*,这些基因编码叶绿素生物合成、光合系统复合体的亚基、质体发育因子等的关键酶或重要组分,均与叶绿体和光合作用直接相关^[7-8,32]。但是 *GLKs* 涉及的生物学途径很广,也有可能直接调控其他类型的基因,如在防御应答中 *AtGLKs* 介导了 JA 信号途径的基因^[16],在 ABA 响应中 *AtGLKs* 可靶向 *WRKY40* 基因的启动子^[66],过表达 *AtGLK1* 基因可上调花青素生物合成的相关基因表达^[67],*GLKs* 靶基因的进一步鉴定将有助于更全面地解析其分子机制。虽然 *C₃* 和 *C₄* 植物的 *GLKs* 在功能上存在明显的分化,但是从进化树分析中可以发现,*C₄* 植物 *GLKs* 没有独立的分支,而是与 *C₃* 植物的 *GLK1*、*GLK2* 都存在同源直系基因 (图 1),有学者推测 *GLKs* 可能起源于单个基因,基因复制促使亚功能出现,进而在 *C₄* 植物中促进双态叶绿体的发育^[26]。*GLKs* 机理的深入研究对揭示植物细胞信号网络具有重要的帮助,同时在提高作物产量的实践中可发挥巨大潜力,具有较好的应用前景。

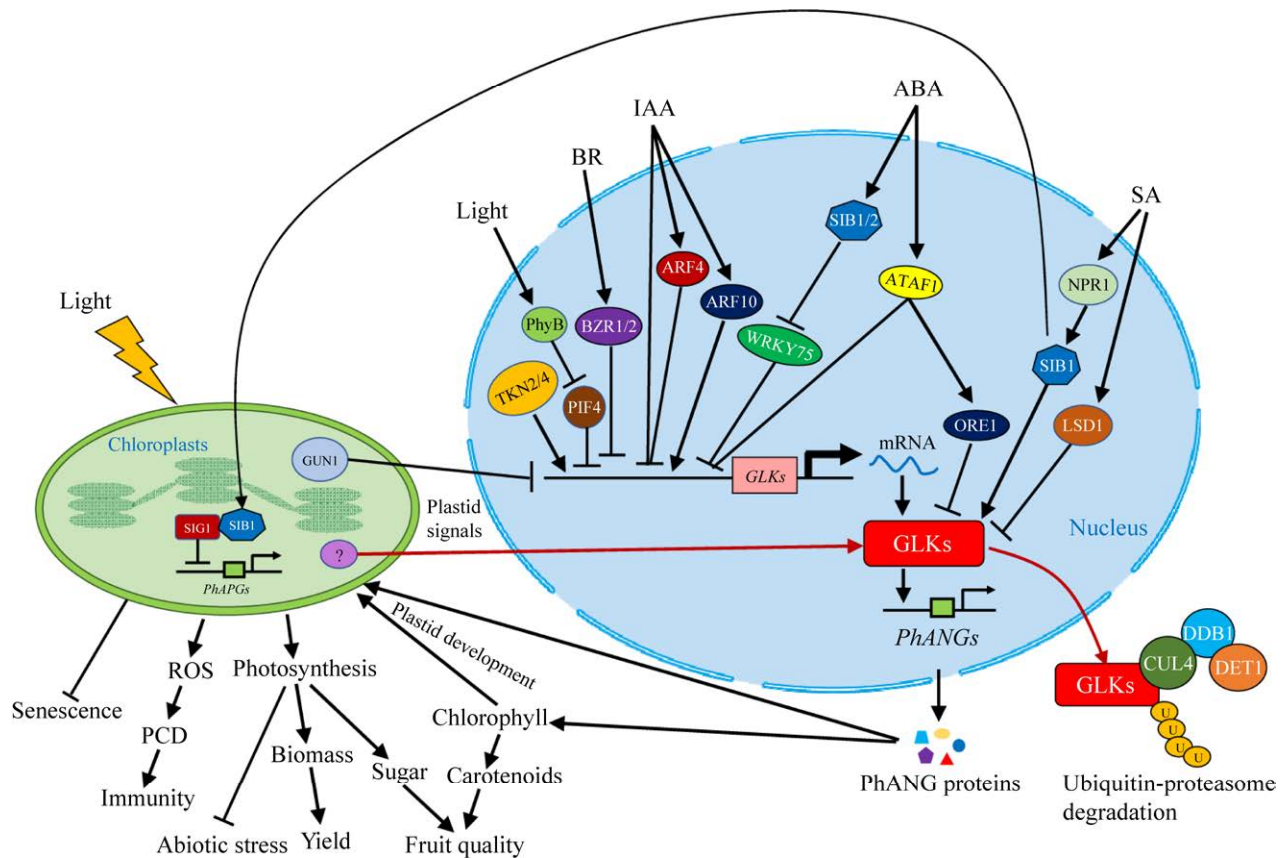


图 4 植物 GLKs 的调控信号网络模式图

Figure 4 A model of GLKs-mediated regulatory signaling network in plant. GLKs transcriptionally activate the expression of *PhANGs*, which encode proteins to improve the chlorophyll biosynthesis and chloroplast development. The enrichment of chlorophyll content provides more precursors for the synthesis of carotenoid and the function improvement of chloroplasts promotes the photosynthesis to produces more sugars, which together improve the fruit quality. Efficient photosynthesis also increases the biomass and yield, enhances the tolerance to abiotic stresses and delays the senescence of leaves. ROS released by chloroplasts can trigger the PCD for defense response. For leaf senescence, light-activated PhyB induces the degradation of PIF4 by proteasome, and then removes the inhibition of PIF4 to *GLKs* expressions; BZR1 and BZR2 in BR signaling negatively regulate *GLKs* expressions; SIB1/2 (SIB1, SIB2) are transcriptionally induced by ABA and interacts with WRKY75 to impact the inhibition of WRKY75 to *GLKs* expressions; ATAF1 is also induced by ABA, and directly inhibits *GLKs* expressions or indirectly inhibits *GLKs* transcriptional activities through the interaction between ORE1 and *GLKs*. For fruit quality, TKN2/4 (TKN2, TKN4) positively regulate *GLKs* expressions; IAA negatively regulates *GLKs* expressions, and also induces the expressions of *ARF4* and *ARF10* to transcriptionally inhibit or activate *GLKs*, respectively. For defense response, SA-activated NPR1 induces *SIB1* expression, and the interaction between *SIB1* and *GLKs* enhances *GLKs* transcriptional activity to *PhANGs*; meanwhile, *SIB1* enters the chloroplast and interacts with *SIG1* to inhibit *PhAPGs* expressions; SA-induced LSD1 competes with *SIB1* to bind *GLKs* and then inhibits *GLKs* transcriptional activity. By retrograde signaling from chloroplast, GUN1 inhibits *GLKs* expressions and an unknown factor mediates degradation of *GLKs* through ubiquitin-proteasome pathway, both inhibiting *PhANGs* expressions.

REFERENCES

- [1] Jarvis P, López-Juez E. Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(12): 787-802.
- [2] Fernandez JC, Burch-Smith TM. Chloroplasts as mediators of plant biotic interactions over short and long distances. *Curr Opin Plant Biol*, 2019, 50: 148-155.
- [3] 李保珠, 赵孝亮, 彭雷. 植物叶绿体发育及调控研究进展. *植物学报*, 2014, 49(3): 337-345.
Li BZ, Zhao XL, Peng L. Research advances in the development and regulation of plant chloroplasts. *Chin Bull Bot*, 2014, 49(3): 337-345 (in Chinese).
- [4] Jenkins MT. A second gene producing golden plant color in maize. *Am Nat*, 1926, 60(670): 484-488.
- [5] Hall LN, Rossini L, Cribb L, et al. Golden 2: a novel transcriptional regulator of cellular differentiation in the maize leaf. *Plant Cell*, 1998, 10(6): 925-936.
- [6] Rossini L, Cribb L, Martin DJ, et al. The maize golden 2 gene defines a novel class of transcriptional regulators in plants. *Plant Cell*, 2001, 13(5): 1231-1244.
- [7] Bravo-Garcia A, Yasumura Y, Langdale JA. Specialization of the golden 2-like regulatory pathway during land plant evolution. *New Phytol*, 2009, 183(1): 133-141.
- [8] Waters MT, Wang P, Korkaric M, et al. GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21(4): 1109-1128.
- [9] Nakamura H, Muramatsu M, Hakata M, et al. Ectopic overexpression of the transcription factor OsGLK1 induces chloroplast development in non-green rice cells. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(11): 1933-1949.
- [10] Powell ALT, Nguyen CV, Hill T, et al. Uniform ripening encodes a golden 2-like transcription factor regulating tomato fruit chloroplast development. *Science*, 2012, 336(6089): 1711-1715.
- [11] Brand A, Borovsky Y, Hill T, et al. CaGLK2 regulates natural variation of chlorophyll content and fruit color in pepper fruit. *Theor Appl Genet*, 2014, 127(10): 2139-2148.
- [12] Ali N, Chen H, Zhang C, et al. Ectopic expression of *AhGLK1b* (golden 2-like transcription factor) in *Arabidopsis* confers dual resistance to fungal and bacterial pathogens. *Genes*, 2020, 11(3): 343.
- [13] Pan YL, Pan Y, Qu CM, et al. Identification and cloning of Golden 2-like1 (GLK1), a transcription factor associated with chloroplast development in *Brassica napus* L.. *Genet Mol Res*, 2017, 16(1).
- [14] Yeh SY, Lin HH, Chang YM, et al. Maize golden 2-like transcription factors boost rice chloroplast development, photosynthesis, and grain yield. *Plant Physiol*, 2022, 188(1): 442-459.
- [15] Liu X, Li LM, Li MJ, et al. AhGLK1 affects chlorophyll biosynthesis and photosynthesis in peanut leaves during recovery from drought. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2250.
- [16] Murmu J, Wilton M, Allard G, et al. *Arabidopsis* golden 2-like (GLK) transcription factors activate jasmonic acid (JA)-dependent disease susceptibility to the biotrophic pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*, as well as JA-independent plant immunity against the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Pathol*, 2014, 15(2): 174-184.
- [17] Nagatoshi Y, Mitsuda N, Hayashi M, et al. Golden 2-like transcription factors for chloroplast development affect ozone tolerance through the regulation of stomatal movement. *PNAS*, 2016, 113(15): 4218-4223.
- [18] Kobayashi K, Baba S, Obayashi T, et al. Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2012, 24(3): 1081-1095.
- [19] Rauf M, Arif M, Dortay H, et al. ORE1 balances leaf senescence against maintenance by antagonizing G2-like-mediated transcription. *EMBO Rep*, 2013, 14(4): 382-388.
- [20] Savitch LV, Subramaniam R, Allard GC, et al. The GLK1 'regulon' encodes disease defense related proteins and confers resistance to *Fusarium graminearum* in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(2): 234-238.
- [21] Nguyen CV, Vrebalov JT, Gapper NE, et al. Tomato golden 2-like transcription factors reveal molecular gradients that function during fruit development and ripening. *Plant Cell*, 2014, 26(2): 585-601.
- [22] Nadakuduti SS, Holdsworth WL, Klein CL, et al. *KNOX* genes influence a gradient of fruit chloroplast development through regulation of golden 2-like expression in tomato. *Plant J*, 2014, 78(6): 1022-1033.
- [23] Townsend PD, Dixon CH, Sloatweg EJ, et al. The intracellular immune receptor Rx1 regulates the DNA-binding activity of a golden 2-like transcription factor. *J Biol Chem*, 2018, 293(9): 3218-3233.
- [24] Chen M, Liu X, Jiang SH, et al. Transcriptomic and functional analyses reveal that *PpGLK1* regulates chloroplast development in peach (*Prunus persica*).

- Front Plant Sci, 2018, 9: 34.
- [25] Zhang L, Qian JL, Han YT, et al. Alternative splicing triggered by the insertion of a CACTA transposon attenuates LsGLK and leads to the development of pale-green leaves in lettuce. *Plant J*, 2022, 109(1): 182-195.
- [26] Wang P, Fouracre J, Kelly S, et al. Evolution of *GOLDEN 2-LIKE* gene function in C(3) and C(4) plants. *Planta*, 2013, 237(2): 481-495.
- [27] Chen M, Ji ML, Wen BB, et al. Golden 2-like transcription factors of plants. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1509.
- [28] Wang P, Khoshravesh R, Karki S, et al. Re-creation of a key step in the evolutionary switch from C₃ to C₄ leaf anatomy. *Curr Biol*, 2017, 27(21): 3278-3287.e6.
- [29] Li X, Wang P, Li J, et al. Maize *GOLDEN 2-LIKE* genes enhance biomass and grain yields in rice by improving photosynthesis and reducing photoinhibition. *Commun Biol*, 2020, 3(1): 151.
- [30] 刘俊芳, 张佳, 李贺, 等. 植物 GOLDEN2-Like 转录因子研究进展. *分子植物育种*, 2017, 15(10): 3949-3956.
- Liu JF, Zhang J, Li H, et al. Research progress of plant golden 2-like transcription factor. *Mol Plant Breed*, 2017, 15(10): 3949-3956 (in Chinese).
- [31] Fitter DW, Martin DJ, Copley MJ, et al. *GLK* gene pairs regulate chloroplast development in diverse plant species. *Plant J*, 2002, 31(6): 713-727.
- [32] Waters MT, Moylan EC, Langdale JA. GLK transcription factors regulate chloroplast development in a cell-autonomous manner. *Plant J*, 2008, 56(3): 432-444.
- [33] Langdale JA. C₄ cycles: past, present, and future research on C₄ photosynthesis. *Plant Cell*, 2011, 23(11): 3879-3892.
- [34] Yasumura Y, Moylan EC, Langdale JA. A conserved transcription factor mediates nuclear control of organelle biogenesis in anciently diverged land plants. *Plant Cell*, 2005, 17(7): 1894-1907.
- [35] Fernández AP, Strand Å. Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(5): 509-513.
- [36] Kakizaki T, Matsumura H, Nakayama K, et al. Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Plant Physiol*, 2009, 151(3): 1339-1353.
- [37] Kakizaki T, Yazu F, Nakayama K, et al. Plastid signalling under multiple conditions is accompanied by a common defect in RNA editing in plastids. *J Exp Bot*, 2012, 63(1): 251-260.
- [38] Tokumaru M, Adachi F, Toda M, et al. Ubiquitin-proteasome dependent regulation of the golden 2-like 1 transcription factor in response to plastid signals. *Plant Physiol*, 2017, 173(1): 524-535.
- [39] Tang XF, Miao M, Niu XL, et al. Ubiquitin-conjugated degradation of golden 2-like transcription factor is mediated by CUL4-DDB1-based E3 ligase complex in tomato. *New Phytol*, 2016, 209(3): 1028-1039.
- [40] Carrara S, Pardossi A, Soldatini GF, et al. Photosynthetic activity of ripening tomato fruit. *Photosynthetica*, 2001, 39(1): 75-78.
- [41] Lu S, Li L. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation, and beyond. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50(7): 778-785.
- [42] Li GW, Chen DY, Tang XF, et al. Heterologous expression of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) golden 2-like homolog elevates chloroplast level and nutritional quality in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta*, 2018, 247(6): 1351-1362.
- [43] Lupi ACD, Lira BS, Gramegna G, et al. *Solanum lycopersicum* golden 2-like 2 transcription factor affects fruit quality in a light- and auxin-dependent manner. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0212224.
- [44] Ren ZX, Li ZG, Miao Q, et al. The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphogenesis. *J Exp Bot*, 2011, 62(8): 2815-2826.
- [45] Yuan YJ, Mei LH, Wu MB, et al. SIARF10, an auxin response factor, is involved in chlorophyll and sugar accumulation during tomato fruit development. *J Exp Bot*, 2018, 69(22): 5507-5518.
- [46] Sagar M, Chervin C, Mila I, et al. SIARF4, an auxin response factor involved in the control of sugar metabolism during tomato fruit development. *Plant Physiol*, 2013, 161(3): 1362-1374.
- [47] Hörtensteiner S, Feller U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J Exp Bot*, 2002, 53(370): 927-937.
- [48] Hensel LL, Grbić V, Baumgarten DA, et al. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1993, 5(5): 553-564.
- [49] Seaton DD, Smith RW, Song YH, et al. Linked circadian outputs control elongation growth and flowering in response to photoperiod and temperature.

- Mol Syst Biol, 2015, 11(1): 776.
- [50] Oh E, Zhu JY, Wang ZY. Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(8): 802-809.
- [51] Martín G, Leivar P, Ludevid D, et al. Phytochrome and retrograde signalling pathways converge to antagonistically regulate a light-induced transcriptional network. *Nat Commun*, 2016, 7: 11431.
- [52] Song Y, Yang CW, Gao S, et al. Age-triggered and dark-induced leaf senescence require the bHLH transcription factors PIF3, 4 and 5. *Mol Plant*, 2014, 7(12): 1776-1787.
- [53] Garapati P, Xue GP, Munné-Bosch S, et al. Transcription factor ATAF1 in *Arabidopsis* promotes senescence by direct regulation of key chloroplast maintenance and senescence transcriptional cascades. *Plant Physiol*, 2015, 168(3): 1122-1139.
- [54] Zhang HY, Zhang LP, Ji YR, et al. *Arabidopsis* sigma factor binding protein1 (SIB1) and SIB2 inhibit WRKY75 function in abscisic acid-mediated leaf senescence and seed germination. *J Exp Bot*, 2022, 73(1): 182-196.
- [55] Woodson JD, Perez-Ruiz JM, Schmitz RJ, et al. Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression. *Plant J*, 2013, 73(1): 1-13.
- [56] Yu XF, Li L, Zola J, et al. A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2011, 65(4): 634-646.
- [57] Schreiber KJ, Nasmith CG, Allard G, et al. Found in translation: high-throughput chemical screening in *Arabidopsis thaliana* identifies small molecules that reduce *Fusarium* head blight disease in wheat. *Mol Plant Microbe In*, 2011, 24(6): 640-648.
- [58] Han XY, Li PX, Zou LJ, et al. Golden 2-like transcription factors coordinate the tolerance to Cucumber mosaic virus in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 477(4): 626-632.
- [59] Ni FR, Wu L, Wang Q, et al. Turnip yellow mosaic virus P69 interacts with and suppresses GLK transcription factors to cause pale-green symptoms in *Arabidopsis*. *Mol Plant*, 2017, 10(5): 764-766.
- [60] Lai ZB, Li Y, Wang F, et al. *Arabidopsis* sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense. *Plant Cell*, 2011, 23(10): 3824-3841.
- [61] Lv RQ, Li ZH, Li MP, et al. Uncoupled expression of nuclear and plastid photosynthesis-associated genes contributes to cell death in a lesion mimic mutant. *Plant Cell*, 2019, 31(1): 210-230.
- [62] Li M, Lee KP, Liu T, et al. Antagonistic modules regulate photosynthesis-associated nuclear genes via golden 2-like transcription factors. *Plant Physiol*, 2021, kiab600.
- [63] Liu JN, Mehari TG, Xu YC, et al. *GhGLK1* a key candidate gene from *GARP* family enhances cold and drought stress tolerance in cotton. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 759312.
- [64] 张立新, 卢从明, 彭连伟, 等. 利用合成生物学原理提高光合作用效率的研究进展. *生物工程学报*, 2017, 33(3): 486-493.
- Zhang LX, Lu CM, Peng LW, et al. Progress in improving photosynthetic efficiency by synthetic biology. *Chin J Biotech*, 2017, 33(3): 486-493 (in Chinese).
- [65] 袁俊杰. 水稻高光效基因 *NRPC2* 的生物学功能研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2019.
- Yuan JJ. Study on the biological function of high photosynthetic gene *NRPC2* in rice[D]. Jinhua: Zhejiang Normal University, 2019 (in Chinese).
- [66] Ahmad R, Liu YT, Wang TJ, et al. Golden 2-like transcription factors regulate *WRKY40* expression in response to abscisic acid. *Plant Physiol*, 2019, 179(4): 1844-1860.
- [67] Zhao DM, Zheng YX, Yang LJ, et al. The transcription factor AtGLK1 acts upstream of *MYBL2* to genetically regulate sucrose-induced anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 2021, 21(1): 242.

(本文责编 陈宏宇)