

蓝光对拟南芥种子萌发的影响

赵小英¹, 唐冬英¹, 向静^{1,2}, 曾建新¹, 刘选明^{1,*}

¹湖南大学生命科学与技术研究院, 生物能源与材料研究中心, 长沙410082; ²长沙学院生物工程与环境科学系, 长沙410003

摘要: 通过检测分析不同蓝光条件下, 拟南芥野生型和蓝光受体突变体的种子萌发率发现, 蓝光诱导拟南芥种子萌发, 隐花素主要介导蓝光诱导拟南芥种子的早期(蓝光培养1~3 d)萌发, 并且与光照强度有关。施用GA生物合成抑制剂多效唑或啉啉醇的研究结果表明, 相同浓度的抑制剂对 *cry1cry2* 突变体种子萌发的抑制作用比野生型强, 并且解除抑制剂对 *cry1cry2* 突变体种子萌发所需的外源有生物活性的GA₃量也较野生型多。这些实验结果初步证实了隐花素介导蓝光诱导种子萌发, 并且可能与蓝光下种子萌发过程中有生物活性的GA合成增加有关。

关键词: 蓝光; 拟南芥; 种子萌发; 赤霉素

The Effect of Blue Light on Seed Germination of *Arabidopsis thaliana*

ZHAO Xiao-Ying¹, TANG Dong-Ying¹, XIANG Jing^{1,2}, ZENG Jian-Xin¹, LIU Xuan-Ming^{1,*}

¹Bioenergy and Biomaterial Research Center, Institute of Life Science and Technology, Hunan University, Changsha 410082, China; ²Department of Bioengineering and Environmental Science, Changsha University, Changsha 410003, China

Abstract: Seed germination of wild type (WT) and blue light receptor mutant of *Arabidopsis thaliana* under blue light was analyzed, our results indicated that *Arabidopsis* seed germination was induced by blue light, and Cryptochrome mediated blue light induction of early seed germination (seeds were grown under blue light for less than three days), and fluence rate dependent. Response of WT, *cry1* and *cry1cry2* mutant seed germination to GA inhibitor paclobutrazol and ancymidol was investigated, and *cry1cry2* mutant was more sensitive to GA inhibitor, and more GA₃ was needed to recover inhibition of *cry1cry2* by GA inhibitor. We concluded that cryptochrome-mediated increase of GAs synthesis might responsible for cryptochrome-dependent induction of seed germination in response to blue light.

Key words: blue light; *Arabidopsis thaliana*; seed germination; gibberellin

种子萌发是一个复杂的生理过程, 受多种内外因素影响(Koornneef等2002), 其中赤霉素(gibberellin, GA)是一个重要的因子。GA在促进拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子萌发过程中具有重要作用。许多GA缺失突变体如 *gal-3* 和 *ga2-1* 的种子不能正常萌发(Koornneef等1980)。GA生物合成抑制剂多效唑抑制种子萌发, 说明种子吸胀后胚根的出现需要新合成GA(Nambara等1991; Jacobsen和Olszewski 1993)。由此可见, GA的水平是决定种子萌发的关键因素。

外界环境因子如光是调节GA代谢和信号转导的主要因子。连续白光下吸胀的种子中GA₄的含量高于在暗中吸胀的种子(Derkx等1994)。红光处理后可降低诱导 *gal* 突变体以及抑制剂处理后的野生型种子萌发所需的外源GA的施用量(Yang等1995)。这些研究结果表明, 光可改变拟南芥种子萌发过程中GA的代谢和组织器官对GA的敏感

性。

近来研究发现, 隐花素介导蓝光调节大豆幼苗中GA的代谢(Foo等2006; Platten等2005)。基因芯片分析结果也发现, 隐花素介导蓝光调节拟南芥GA代谢酶基因的表达(Ma等2002; Folta等2003; Ohgishi等2004)。我们已有的研究结果表明, 隐花素至少部分通过抑制 *GA20ox* 和诱导 *GA2ox* 家族基因的表达, 降低拟南芥幼苗体内GA₄的含量, 从而抑制幼苗下胚轴的伸长(Zhao等2007a; b)。由于GA不仅影响植物的生长发育, 也影响种子萌发, 但关于蓝光是否影响种子萌发, 目前尚未有深入研究的报道。因此, 我们

收稿 2008-02-21 修定 2008-03-17

资助 国家自然科学基金(30600368, 30770200)和湖南省自然科学基金(05JJ30038)。

致谢 美国加州大学洛杉矶分校林辰涛教授对论文进行指导。

* 通讯作者(E-mail: sw_xml@hnu.cn; Tel: 0731-8821721)。

以拟南芥野生型和蓝光受体突变体 *cry1*、*cry2* 和 *cry1cry2* 为材料初步研究了蓝光对拟南芥种子萌发的影响。

材料与方法

拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] 哥伦比亚生态型野生型 (wild type, WT) *col-4* 和遗传背景为哥伦比亚生态型的 *cry1*、*cry2* 和 *cry1cry2* 突变体由美国加州大学洛杉矶分校林辰涛实验室赠送。蓝光光源为 LED-B (波长为 470 nm, 半幅宽为 30 nm)。蓝光的光照强度用 Li-250 量子光度计测量。试剂 GA₃ 购自中国医药集团上海化学试剂公司, 多效唑购自百灵威化学技术有限公司, 嘧啶醇购自 Sigma 公司。

测定拟南芥种子的萌发率时, 首先将种子用 70% 的乙醇表面灭菌 30 s, 0.1% 氯化汞灭菌 8 min, 用无菌水冲洗 4~5 次后将种子播在含 0.8% 琼脂的 MS 固体培养基上, 每处理播约 100 粒种子。播种后将其放入 4℃ 处理 4 d, 然后转入暗或不同光照强度的连续蓝光下培养, 温度均为 22~23℃。以是否形成子叶为准每天观察并统计种子的萌发率, 连续观察 6 d。

检测 GA 生物合成抑制剂多效唑和嘧啶醇的抑制效应时, 将抑制剂的母液用 70% 的乙醇配置, 母液浓度为最终使用浓度的 500 倍。在加 MS 培养基之前, 先将抑制剂加入培养皿中, 然后倒入预冷的培养基摇匀即可。把野生型和突变体种子分别播在含不同浓度抑制剂的培养基上, 4℃ 处理 4 d, 然后转入暗或不同光照强度的连续蓝光下培养, 培养第 3 天时观察并统计种子的萌发率。

为了检测 GA₃ 对多效唑和嘧啶醇处理后种子萌发的恢复作用, 在含有抑制剂多效唑 (10⁻² μmol·L⁻¹) 和嘧啶醇 (10⁻¹ μmol·L⁻¹) 的培养基中, 分别加入不同浓度的 GA₃, 把野生型和突变体种子播在上述培养基上, 4℃ 处理 4 d 后, 分别放入暗或不同光照强度的连续蓝光下进行培养, 培养第 3 天时观察并统计种子的萌发率。

实验结果

1 蓝光诱导拟南芥种子萌发

(1) 从图 1 可看出, 培养至第 2 天时, 野生型种子在暗培养条件下的萌发率约为 40%; 0.01

μmol·m⁻²·s⁻¹ 光照强度蓝光下种子萌发率约为 50%; 当蓝光光照强度为 1 μmol·m⁻²·s⁻¹ 或更高时, 种子萌发率约为 100%。这说明, 蓝光诱导种子萌发, 并且随光照强度的增加, 诱导作用增强。

(2) 暗培养、很低 (0.1 < μmol·m⁻²·s⁻¹) 或较高 (> 10 μmol·m⁻²·s⁻¹) 光照强度蓝光下野生型与蓝光受体突变体种子的萌发率无明显的差异 (图 1), 但当蓝光光照强度为 0.1~10 μmol·m⁻²·s⁻¹ 时, 1~3 d 内 *cry1* 和 *cry1cry2* 突变体种子的萌发率比野生型的要低, 尤其是培养至第 2 天时, *cry1* 和 *cry1cry2* 突变体种子的萌发率比野生型的约低 1 半 (图 1-a、b、d), 而 *cry2* 突变体的种子萌发率则与野生型的种子萌发率之间无明显差异 (图 1-c、d)。可见, 隐花素介导较弱光照强度 (0.1~10 μmol·m⁻²·s⁻¹) 蓝光诱导种子的早期 (蓝光培养 1~3 d) 萌发, 并且 CRY1 起主要作用。

2 蓝光下 GA 生物合成抑制剂对不同基因型拟南芥种子萌发的抑制

暗培养条件下, 当多效唑和嘧啶醇浓度分别为 10⁻² μmol·L⁻¹ (图 2-a) 和 10⁻¹ μmol·L⁻¹ (图 2-b) 时, 野生型和突变体种子的萌发完全被抑制。但是, 当培养在光照强度仅为 0.01 μmol·m⁻²·s⁻¹ 蓝光下时, 抑制剂对种子萌发的抑制作用就可得到部分解除 (图 2-a~c)。较低光照强度 (< 10 μmol·m⁻²·s⁻¹) 蓝光下, 多效唑浓度为 10⁻² μmol·L⁻¹ 时, 野生型种子的萌发率比未施用抑制剂的约低 1 半。较高光照强度 (> 10 μmol·m⁻²·s⁻¹) 蓝光下, 多效唑浓度为 10⁻² μmol·L⁻¹ 时, 野生型种子的萌发率也下降, 但与未施用抑制剂的相比其差异不明显 (图 2-a)。由此可见, 蓝光可在一定程度上解除抑制剂对种子萌发的抑制作用, 并且随光照强度增加解除作用越强。

相同浓度的抑制剂对突变体种子萌发的抑制作用比对野生型的要强, 较低光照强度 (< 10 μmol·m⁻²·s⁻¹) 蓝光下两者之间的差异更明显, 并且 *cry1cry2* 双突变体种子的萌发率比 *cry1* 单突变体更低 (图 2)。可见, 蓝光受体突变会增强种子对抑制剂的敏感性。

此外, 从图 1 和图 2 中还可看出, 未加 GA 生物合成抑制剂时, 暗中培养或蓝光培养第 3 天时野生型和突变体的种子萌发率无明显差异。当

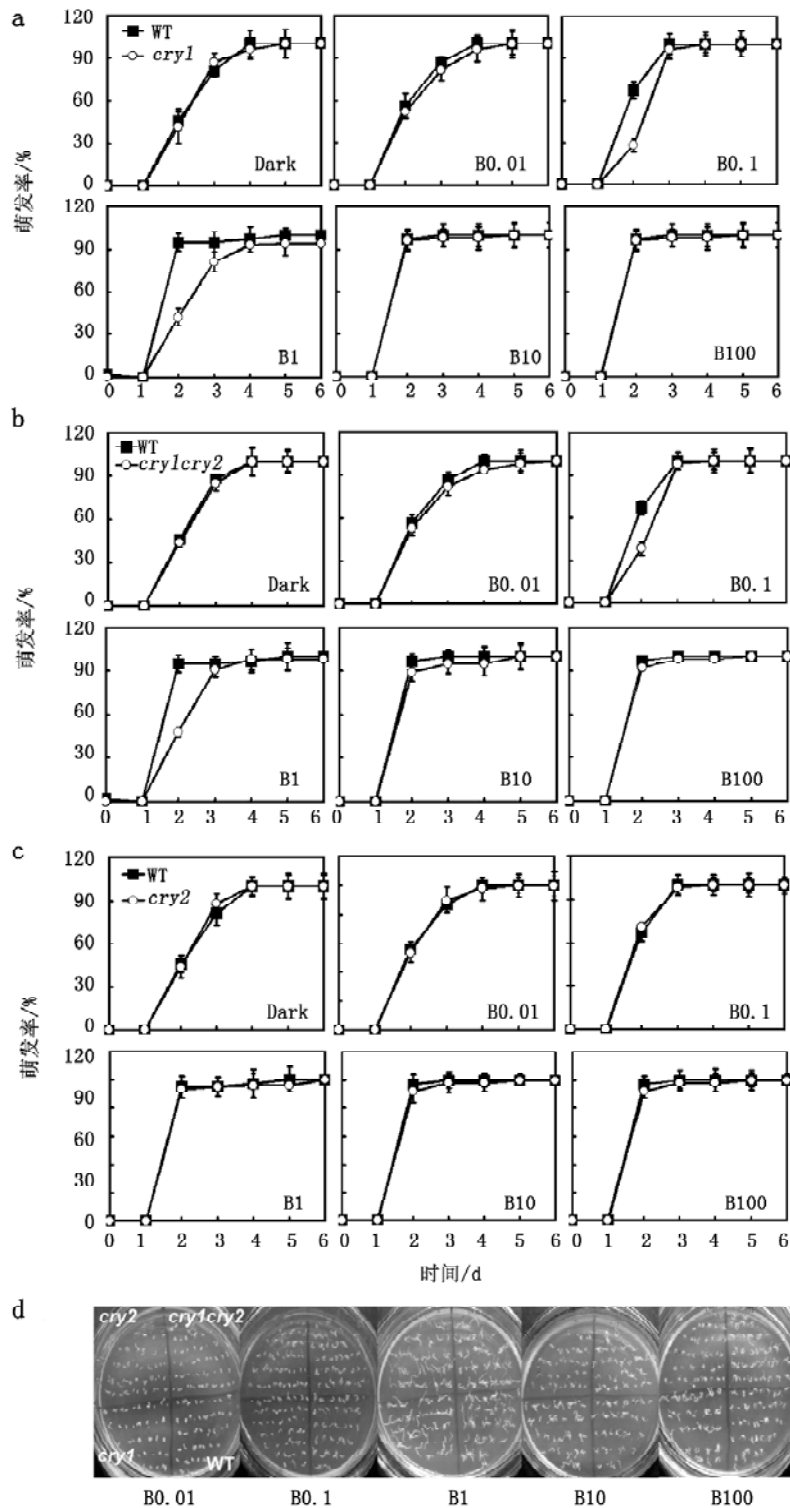


图1 蓝光诱导拟南芥种子萌发

Fig.1 Blue light induce *Arabidopsis* seed germination

a : 野生型与 *cry1* 突变体种子萌发率 ; b : 野生型与 *cry1cry2* 突变体种子萌发率 ; c : 野生型与 *cry2* 突变体种子萌发率 ; d : 不同光照强度蓝光下野生型与 *cry1*、*cry2* 和 *cry1cry2* 突变体培养第2天时的照片。B0.01、B0.1、B1、B10 和 B100 表示幼苗生长在光照强度分别为 0.01、0.1、1、10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的连续蓝光下。

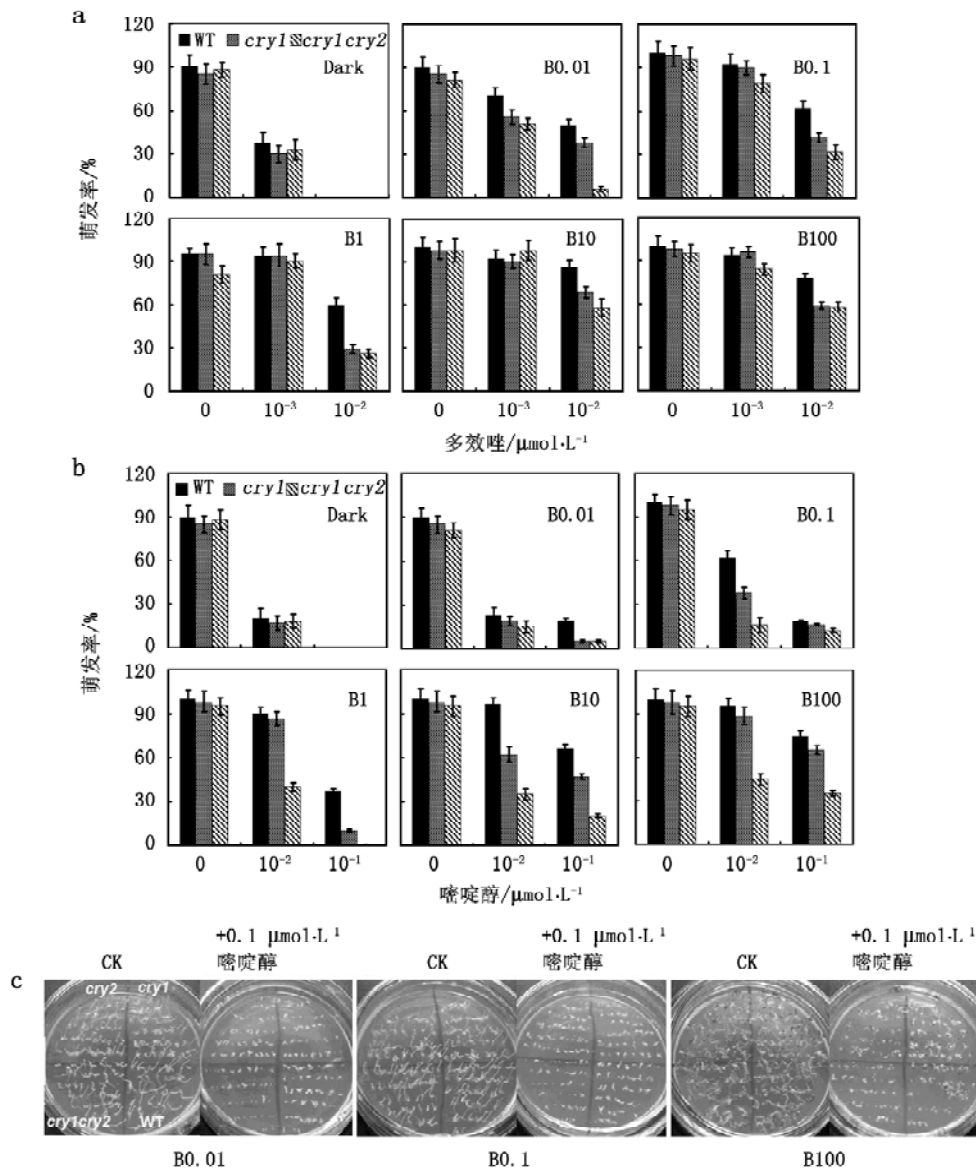


图2 蓝光下抑制剂多效唑(a)和啉啉醇(b、c)对拟南芥种子萌发的影响

Fig.2 Effects of GA inhibitor paclobutrazol (a) and ancyamidol (b, c) on *Arabidopsis* seed germination grown under blue light
B0.01、B0.1、B1、B10 和 B100 表示幼苗生长在光照强度分别为 0.01、0.1、1、10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的连续蓝光下。

加入相同浓度的抑制剂多效唑($10^{-2} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)或啉啉醇($10^{-1} \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)时, 暗培养下野生型种子的萌发率和 *cry1cry2* 突变体之间也无明显差异。但是, 蓝光下, 尤其是较低光照强度($<10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)蓝光下, *cry1cry2* 突变体种子的萌发率明显降低, 仅为野生型的 10%~50% (图 2)。这说明, 当不用任何 GA 生物合成抑制剂处理时, 可能蓝光培养 3 d 时, *cry1cry2* 突变体萌发种子中合成的有生物活性的 GA 虽然少, 但足以诱导种子萌发。当施用 GA 生物合成抑制剂时, 由于 *cry1cry2* 突变体中有生物活性的 GA 合成少, 而对抑制剂更加敏

感。因此, 蓝光培养第 3 天时, 隐花素对种子萌发的影响可能仅在用 GA 生物合成抑制剂处理时才会显示, 这还需要作进一步研究。

3 蓝光下外源 GA_3 对抑制剂处理后不同基因型拟南芥种子萌发的恢复

暗培养条件下, 当外源 GA_3 浓度为 $10^{-7} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 暗培养中的种子都没有萌发, 而 $0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 蓝光下的种子萌发率达 20%~40% (图 3-b)。不同光照强度蓝光下, 种子恢复萌发所需的外源 GA_3 浓度不一样。较低光照强度($<10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)蓝光下, 当外源 GA_3 加入量为 10^{-6}

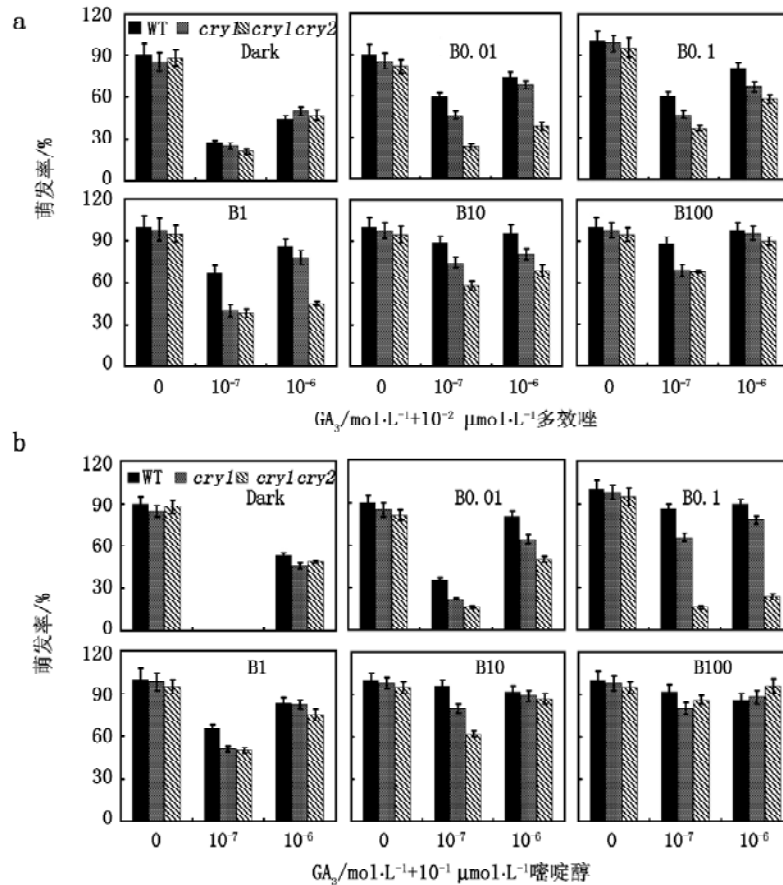


图3 蓝光下 GA_3 解除 GA 合成抑制剂多效唑(a)和噻啉醇(b)对种子萌发的抑制作用

Fig.3 GA_3 can recover inhibition of seed germination by GA inhibitor paclobutrazol (a) or ancymialol (b) under blue light. B0.01、B0.1、B1、B10 和 B100 表示幼苗生长在光照强度分别为 0.01、0.1、1、10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的连续蓝光下。

$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,野生型和突变体种子还没有完全恢复萌发;较高光照强度($>10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)蓝光下,当外源 GA_3 浓度为 $10^{-7} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,野生型种子就基本恢复萌发(图3)。可见,解除抑制剂对种子萌发的抑制作用所需的外源 GA_3 与蓝光光照强度有关,并随光照强度增加所需的外源 GA_3 减少。

相同光照条件下,解除抑制剂对 *cry1* 和 *cry1cry2* 种子萌发的抑制作用所需的 GA_3 量比野生型的要多。例如, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照强度蓝光下,当外源 GA_3 加入量为 $10^{-7} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时野生型种子基本恢复萌发,而 *cry1* 和 *cry1cry2* 种子恢复萌发所需的外源 GA_3 比野生型的要高 10 倍(图3),表明蓝光受体突变可能降低了萌发种子内源有生物活性 GA 的合成。

讨 论

上世纪 50 年代,通过莠苣种子萌发研究发现

了红光/远红光受体光敏素(Borthwick 等 1952)。此后不久 Ikuma 和 Thiman (1960)又发现光敏素可能通过促进 GA 积累而影响种子萌发,多年后的研究证实了光敏素介导红光诱导萌发种子中有生物活性的 GA_1 的积累(Toyomasu 等 1993)。但关于蓝光是否影响种子萌发,至今还未见报道。有研究表明光通常通过调控 GA 代谢而调节植物的生长和发育过程,包括种子萌发、去黄化作用、茎伸长、诱导开花(Olszewski 等 2002; Sun 和 Gubler 2004; Sullivan 和 Deng 2003)等,并且主要由红光受体光敏素和蓝光受体隐花素介导(Quail 2002; Lin 和 Shalitin 2003)。我们已有的研究结果表明,隐花素至少部分通过抑制 *GA20ox* 和诱导 *GA2ox* 家族基因的表达,降低拟南芥幼苗体内 GA_4 的含量,从而抑制幼苗下胚轴的伸长(Zhao 等 2007a, b)。因此,我们初步探讨了蓝光对种子萌发的影响及其作用机理。

我们的研究表明, 蓝光诱导拟南芥种子萌发, 并且随光照强度增加诱导作用也增强。当蓝光受体CRY1或CRY1和CRY2都缺失时, 较低光照强度蓝光下种子的萌发率降低, 并且cry1cry2双突变体的萌发率比cry1单突变体的萌发率更低(图1-a、b), 这说明CRY1和CRY2介导蓝光诱导种子萌发, 并且具有协同作用, 较高光照强度蓝光对种子萌发的诱导可能由其他蓝光受体介导(Klar等2007)。

此外, 我们发现蓝光可在一定程度上解除GA生物合成抑制剂多效唑或啞啉醇对种子萌发的抑制作用(图2), 并且可部分代替外源GA₃诱导种子萌发(图3), 但蓝光受体突变会增强种子对抑制剂的敏感性(图2), 解除抑制剂对cry1和cry1cry2种子萌发的抑制作用所需的GA₃量也比野生型的要多(图3)。这说明, 蓝光可能通过增加萌发种子中的GA合成而诱导种子萌发, 蓝光下cry1和cry1cry2突变体种子萌发率下降, 至少部分是由于种子萌发过程中GA合成下降所致(Plummer等1997), 但并不排除蓝光通过增强种子对GA₃的敏感性而诱导种子萌发(李凤玲等2000)。这需要通过直接测量萌发种子中有生物活性的GA含量以及从分子水平上进行验证(Yamaguchi等1998; Yamaguchi和Kamiya2002)。

参考文献

- 李凤玲, 陈季楚, 赵毓橘(2000). 赤霉素和光对拟南芥种子萌发和幼苗生长的影响. 植物生理学报, 26 (2): 101~104
- Borthwick HA, hendricks SB, Parker MW (1952). The reaction controlling floral initiation. Proc Natl Acad Sci USA, 38: 929~934
- Derkx MPM, Vermeer E, Karssen CM (1994). Gibberellins in seeds of *Arabidopsis thaliana*: biological activities, identification and effects of light and chilling on endogenous levels. J Plant Growth Regul, 15: 223~234
- Folta KM, Pontin MA, Karlin-Neumann G, Bottini R, Spalding EP (2003). Genomic and physiological studies of early cryptochrome 1 action demonstrate roles for auxin and gibberellin in the control of hypocotyl growth by blue light. Plant J, 36: 203~214
- Foo E, Platten JD, Weller JL, Reid JB (2006). PhyA and cry1 act redundantly to regulate gibberellin levels during de-etiolation in blue light. Physiol Plant, 127: 149~156
- Ikuma H, Thiman KV (1960). Action of gibberellic acid on lettuce seed germination. Plant Physiol, 35: 557~566
- Jacobsen SE, Olszewski NE (1993). Mutations at the SPINDLY locus of *Arabidopsis* alter gibberellin signal transduction. Plant Cell, 5 (8): 887~896
- Klar T, Pokorny R, Moldt J, Batschauer A, Essen LO (2007). Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. J Mol Biol, 366 (3): 954~964
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H (2002). Seed dormancy and germination. Curr Opin Plant Biol, 5 (1): 33~36
- Koornneef M, Rolff E, Spruit CJP (1980). Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.). Heynh Z Pflanzenphysiol, 100: 147~160
- Lin C, Shalitin D (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. Annu Rev Plant Biol, 54: 469~496
- Ma LG, Li JM, Qu LJ, Hager J, Chen ZL, Zhao H, Deng XW (2001). Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. Plant Cell, 13 (12): 2589~2607
- Nambara E, Akazawa T, McCourt P (1991). Effects of the gibberellin biosynthetic inhibitor uniconazole on mutants of *Arabidopsis*. Plant Physiol, 97: 736~738
- Ohgishi M, Saji K, Okada K, Sakai T (2004). Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 101: 2223~2228
- Olszewski N, Sun TP, Gubler F (2002). Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. Plant Cell, 14 (Suppl): S61~S80
- Platten JD, Foo E, Elliott RC, Hecht V, Reid JB, Weller JL (2005). Cryptochrome 1 contributes to blue-light sensing in pea. Plant Physiol, 139: 1472~1482
- Plummer JA, McChesney CJ, Bell DT (1997). Germination in photosensitive seeds: does phytochrome stimulate metabolism of GA19 and GA20 to GA1? Aust J Plant Physiol, 24 (3): 389~394
- Quail PH (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. Nat Rev Mol Cell Biol, 3: 85~93
- Sullivan JA, Deng XW (2003). From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. Dev Biol, 260: 289~297
- Sun TP, Gubler F (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. Annu Rev Plant Biol, 55: 197~223
- Toyomasu T, Tsuji H, Yamane H, Nakayama M, Yamaguchi I, Murofushi N, Takahashi N, Inoue Y (1993). Light effects on endogenous levels of gibberellins in photoblastic lettuce seeds. J Plant Growth Regul, 12: 85~90
- Yamaguchi S, Kamiya Y (2002). Gibberellins and light-stimulated seed germination. J Plant Growth Regul, 20: 369~376
- Yamaguchi S, Smith MW, Brown RGS, Kamiya Y, Sun TP (1998). Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3beta-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. Plant Cell, 10 (12): 2115~2126
- Yang YY, Nagatani A, Zhao YJ, Kang BJ, Kendrick RE, Kamiya Y (1995). Effects of gibberellins on seed germination of phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol, 36: 1205~1211
- Zhao XY, Yu XH, Liu XM, Lin CT (2007a). Light regulation of gibberellins metabolism in seedling development. J Integr Plant Biol, 49 (1): 21~27
- Zhao XY, Yu XH, Foo E, Symons GM, Lopez J, Bendhakkalu KT, Xiang J, Weller JL, Liu XM, Reid JB et al (2007b). A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated blue light inhibition of hypocotyl elongation. Plant Physiol, 145: 106~118