

密级: 内部一年



中国科学院大学
University of Chinese Academy of Sciences

博士学位论文

光调控拟南芥根生长和氮吸收的分子机制研究

作者姓名: 陈祥彬

指导教师: 傅向东 研究员

中国科学院遗传与发育生物学研究所

学位类别: 理学博士

学科专业: 遗传学

培养单位: 中国科学院遗传与发育生物学研究所

2014 年 04 月

申请博士学位论文

光照调控拟南芥根生长和氮吸收的分子机制 研究

研 究 生：陈祥彬（2009 级）

导 师：傅向东（研究员）

专 业：遗传学

中国科学院遗传与发育生物学研究所

二〇一 四 年 四 月

Regulation of light-responsive root growth and nitrate uptake in
Arabidopsis

By
Xiangbin Chen

A Dissertation Submitted to
The University of Chinese Academy of Sciences
In partial fulfillment of the requirement
For the degree of
Doctor of Natural Science

Institute of Genetics and Developmental Biology
Chinese Academy of Sciences

April, 2014

独创性声明

本人郑重声明：所呈交的博士学位论文“光调控拟南芥根生长和氮吸收的分子机制研究”，是本人在导师的指导下独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经加以标注和致谢的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品/研究成果，也不包含为获得任何教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本论文研究做出重要贡献的其他个人和集体均已在论文中以明确方式标明并表示谢意。申请学位的论文与资料若有不实之处，本人愿承担一切责任。

学位论文作者（需亲笔）签名：

日期： 年 月 日

光调控拟南芥根生长和氮吸收的分子机制研究

摘要

植物固着生长的特点决定了它们必须感知并适应多变的光照环境。人们虽然对光信号在植物细胞内传导的分子机制有了深入的认识,但对光信号在胞间传导以实现植物系统响应光照变化的了解还十分有限。研究胞间光信号传导,不仅有助于人们全面认识植物如何适应生长环境,而且对提高植物光能利用效率也具有指导意义。

光对地下根部生长及生理的调节,是光信号在胞间传递效应的重要方面。本研究以拟南芥为材料发现,不论是土培条件,还是在培养基上将根部遮光的条件,地上部的光照都能够通过增强根尖细胞分裂能力来促进根的生长。而地上部持续黑暗处理则会显著抑制根的生长,表明光对根生长的调控很大程度上依赖于植物地上部分。

去除茎尖或过量表达 *YUC1* 基因的方法改变地上部生长素含量并不影响根生长对地上光照的响应。而外源增加蔗糖不能解除黑暗处理对根生长的抑制,表明除光合产物蔗糖外的其他物质参与介导了光信号从地上部到根的传递。有意思的是,在光信号途径相关基因的功能缺陷突变体中, *hy5* 突变体的根尖分生能力持续保持较低水平且不再响应对地上光照的变化,暗示 *HY5* 基因参与介导光对根生长的调控过程。

进一步在组织特异表达 *HY5-GFP* 融合基因的植株中能够检测到 *HY5-GFP* 信号的异位分布,并且利用嫁接技术直接证实 *HY5* 蛋白能从地上部向根部长距离移动,而且我们进一步还发现来自地上部的 *HY5* 蛋白通过直接激活根部 *HY5* 基因表达从而促进根的生长。不仅如此, *HY5* 基因也介导根尖 *PIN2* 蛋白水平及其调控的根尖生长素运输对地上光照的系统性响应,同时 *HY5* 蛋白能够直接结合 *SHY2* 基因的启动子并抑制该基因的表达,结合对生长素极性运输的调控共同参与光对根生长的调节。

随着光强的增加,植物体内的总碳和总氮含量也会随之增多。我们发现野生型拟南芥的碳氮比值在不同光强下基本保持稳定,而 *HY5* 基因对于维持这种碳氮平衡非常重要。*HY5* 蛋白通过直接结合硝态氮高亲和力转运基因 *NRT2.1* 的启动子促进该基因的表达,同时,氮吸收速率实验证实 *HY5* 基因是地上光照促进根吸收硝态氮所必

需的。嫁接实验显示，地上部的 HY5 蛋白促进根部 *NRT2.1* 基因的表达并增加根系吸收氮的速率。此外，蔗糖诱导根部 *NRT2.1* 基因的表达依赖于 *HY5* 基因，ChIP 结果显示蔗糖处理增强了 HY5 蛋白对 *NRT2.1* 基因启动子的结合能力。

综上所述，HY5 蛋白的长距离移动参与介导光信号在胞间的传递并调控根生长以及维持植物碳氮平衡，对植物系统性适应光强变化起着重要作用。本研究不仅有助于我们深入认识植物如何系统性适应生存环境的变化，同时也为改造植物在特定光照环境下更好地利用光能提供可能的思路。

关键词：拟南芥，光，HY5 蛋白长距离移动，根生长，碳氮平衡

Regulation of light-responsive root growth and nitrate uptake in

Arabidopsis

Xiangbin Chen (Genetics)

Supervised by Xiangdong Fu

Abstract

As sessile organisms, plants have to adapt to changing light conditions. Although intracellular light signaling by cell-autonomous way has been deeply elucidated, the intercellular light signaling that is essential to whole plant adaptation to environment remains largely unknown. Here we focus on how above-ground light regulates root growth and physiology, a representative effect of intercellular light signaling, trying to reveal the molecular mechanism of light signal transmission between distant cells and organs.

We found above-ground light could promote root growth both in the greenhouse and on the medium covered by opaque box, through modulating the root meristem activity. Moreover, inhibition of root growth when shoots were kept in darkness suggested light-regulated root growth largely depended on the signal derived from shoot.

Changing auxin level of shoot by decapitation or overexpression of *YUC1* gene had no significant effect on the response of root to above-ground light status, indicating shoot-localized auxin played little role in intercellular light signaling. Meanwhile, sucrose couldn't relieve the inhibition of root meristem activity by darkness, which suggested that other molecules besides photosynthetic product mediated light signal transmission to root. Interestingly, root meristem activity of *hy5* mutant, a light signaling associated mutant, nearly had no more response to the light and maintained low level, which indicated *HY5* gene was essential to light-regulated root growth through intercellular light signaling.

Furthermore, ectopic distribution of HY5-GFP signals in tissue-specific expression of *HY5-GFP* fusion gene transgenic plants and grafting experiment proved that HY5 protein

could move long distance from shoot to root. Long-distance HY5 protein derived from shoot could directly activate local *HY5* gene expression, promoting root growth. Moreover, *HY5* gene mediated systemic light-regulated PIN2 protein level in root apex and root basipetal auxin transport. Combined with the regulation of auxin polar transport, direct suppression of *SHY2* gene by HY5 protein contributed to promotion of root meristem activity by light.

Most interestingly, the carbon to nitrogen ratio of wild type plants was shown generally stable under changing light quality conditions, and *HY5* gene was found playing important roles in maintaining the balance between carbon and nitrogen. HY5 protein could directly bind to the promoter of *NRT2.1* gene and promote its expression, leading to nitrate uptake accelerated by light. Convincingly, grafting experiment showed long-distance HY5 protein could promote *NRT2.1* gene expression in root and accelerate root nitrate uptake. Furthermore, *HY5* gene was also pivotal for the induction of *NRT2.1* expression by sucrose, and ChIP-qPCR analysis showed that sucrose increased the binding affinity of HY5 protein to the promoter of *NRT2.1* gene.

Above all, long-distance HY5 movement contributes to the intercellular light signaling, eventually promoting root growth by regulating auxin polar transport, and also maintaining carbon-nitrogen balance by modulating nitrate uptake.

Key words: *Arabidopsis*, light, HY5 long-distance movement, root growth, carbon-nitrogen balance

目录

第一章 引言	1
1.1 植物生长发育和生理活动对光照环境的响应	1
1.1.1 光在植物整个生命周期过程中发挥重要的调节功能	2
1.1.2 光对植物地上部形态建成及生理活动的调节	3
1.1.3 光对根生长及吸收营养的调节	3
1.2 植物胞内光信号的传导机制	5
1.3 植物胞间光信号传导的研究进展	8
1.4 植物地上部分与根的物质和信息的交流	10
1.5 选题依据与研究意义	11
第二章 材料与方法	13
2.1 实验材料与耗材	13
2.1.1 实验材料	13
2.1.2 菌株与载体	13
2.1.3 主要试剂	13
2.1.4 引物及探针	14
2.1.5 主要仪器	14
2.2 拟南芥的栽培及转基因	14
2.2.1 拟南芥的栽培	14
2.2.2 拟南芥的遗传转化	14
2.3 局部见光体系的建立	15
2.4 嫁接实验	15
2.5 RT-qPCR 分析基因表达量	15
2.5.1 总 RNA 的提取	15
2.5.2 反转录 cDNA 第一条链的合成	16
2.5.3 实时定量 PCR	16

2.6 Western blot 检测蛋白含量	17
2.6.1 植物总蛋白的提取	17
2.6.2 Western blot	18
2.7 染色质免疫共沉淀 (ChIP)	19
2.8 蛋白的原核表达及纯化	20
2.9 凝胶阻滞实验 (EMSA)	21
2.10 生长素极性运输能力的检测	22
2.11 不同施氮量的控制	22
2.12 根吸收 NO_3^- 速率的测定	22
2.13 叶绿素含量的测定	23
第三章 结果	24
3.1 地上光照调控根的生长发育	24
3.2 光依赖地上部调控根的生长发育	30
3.3 茎端合成的生长素不参与光信号从地上部到根的传导	31
3.4 COP1-HY5 信号模块对“胞间光信号”存在重要的贡献	35
3.5 COP1-HY5 信号模块具备“细胞非自主性”的功能	36
3.6 HY5 蛋白能从地上部移动至根部并调控主根的生长	40
3.7 HY5 蛋白在根部直接促进自身基因的表达	42
3.8 地上光照通过 HY5 调控根尖生长素极性运输进而调节根尖分生能力	46
3.9 地上光照依赖 HY5 调控根对氮的吸收并协调植物碳氮平衡	52
第四章 讨论与结论	62
4.1 讨论	62
4.1.1 光调控根的生长依赖于地上部的信号	62
4.1.2 HY5 蛋白是系统性光信号物质	63
4.1.3 生长素与根的系统性光照响应	64
4.1.4 HY5 基因在协调植物碳氮平衡适应光照变化过程中的作用	67
4.1.5 HY5, 光照与其它多种因素的整合因子	68
4.2 结论	70

参考文献	71
附录	88
作者简介	95
致谢	97

第一章 引言

地球上所有生物的生长都需要感知并适应其生存环境的变化,这一点对植物来讲表现得尤为明显。因为植物“固着生长”的特点决定了它们不可能像动物那样采用主动远离或逃避的方式来趋利避害,而是必须被动地面对其周围多变的生长环境以期获得更好的生存。植物对生长环境的适应主要表现在植物自身发育进程、形态建成、生理生化活动等多个方面的多样性变化,例如在常年定向高风速环境下生长的松树会顺着风向表现为旗帜状的生长特征、弱光下生长的芜菁的节间生长速度加快、高温会使拟南芥的莲座叶的叶柄变得很长等等,植物表型的这种可塑性的现象在大自然界中普遍存在(de Jong and Leyser, 2012; Palmer et al., 2001)。植物表型可塑性在很大程度上保证了植物能够顺应周围环境的变化,从而得以完成生命周期并繁衍后代。我们知道,植物的生长需要面对众多的环境因素,如光照、温度、湿度、土壤营养等条件的变化以及病虫害等各种生物胁迫,而作为依靠光合作用进行自养的植物,它们如何适应生存环境中的光照变化就显得尤为重要。

1.1 植物生长发育和生理活动对光照环境的响应

植物与光的关系人们并不陌生,光合作用被认为是地球上生物界最基本的物质代谢和能量代谢途径,陆地上的植物每年将照射到地球表面的 0.1%的太阳能通过光合作用转化为化学能并以碳水化合物的形式储存起来,为地球上其它生物提供了最基本的物质和能量来源(Rascher and Nedbal, 2006)。对植物来讲,光不仅是植物通过光合作用获得能量的物质基础,而且还是调控植物生长发育以及代谢活动等很多方面非常重要的信号物质(Fankhauser and Chory, 1997; Kami et al., 2010; Von Arnim and Deng, 1996)。植物生长发育进程较强的开放性使得光能够调控植物的生长发育,而这正是植物适应光照环境变化的基本实现条件。因此,我们对植物如何适应光照环境的变化从植物生长发育时期(从种子萌发到开花结实的完整生活周期)和植物整体存在空间(地上部分和根)这两大方面进行简要概述。

1.1.1 光在植物整个生命周期过程中发挥重要的调节功能

高等植物胚后生长发育的特点是在各个阶段总是不断有新生器官的形成，因此，这个相对开放的过程很容易受到环境因素变化的调节。如图 1.1 所示，光照影响了植物生命周期的诸多过程。概括地讲，光照在合适的湿度环境下能够促进植物种子的萌发(Lau and Deng, 2010)；种子萌发后形成的幼苗会根据光照环境选择不同的形态建成模式：在黑暗或弱光的情况下幼苗依靠种子储存的能量尽力伸长下胚轴以试图获得较多的光照，同时子叶黄化并闭合、胚轴顶端回钩以利于破土而出；一旦获得足够光照，下胚轴伸长速率显著被抑制，同时子叶变绿及角度张开等，保证幼苗可更充分地接收光能以进入自养状态(Arsoovski et al., 2012)；不仅如此，光还调控植物叶片发生的起始以及叶位的决定(Griffiths and Halliday, 2011)、分蘖(Deregibus et al., 1983)和分枝(Finlayson et al., 2010)等，也就是说，植物在不同光照环境下表现出不同的植株形态；植物从营养生长向生殖生长的转变同样也受到光照长度、光质以及光强的调节(Cerdan and Chory, 2003; Hayama and Coupland, 2003; Jackson, 2009; Munir et al., 2004)，以确保植物能在低温或霜冻到来前及时形成种子。

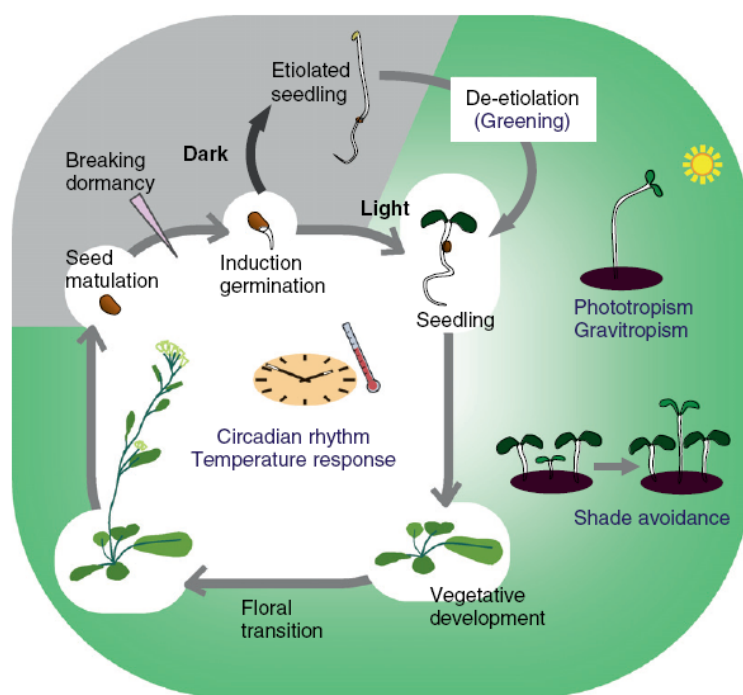


图 1.1 光调控的植物主要生长生理过程(Kami et al., 2010)。

Figure 1.1 Light-regulated plant growth and development (Kami et al., 2010).

1.1.2 光对植物地上部形态建成及生理活动的调节

对一株自然生长的植物来讲,地上部是最容易接触到光照的部分,所以光对地上部的调节可以说是植物适应光照环境变化的源头。在光调节地上部这方面,最重要的当属光照变化对光合作用的影响,光在将太阳能转化为植物可利用的化学能的光合作用过程中的重要性无需强调(Hohmann-Marriott and Blankenship, 2011)。而植物地上部对光照表现出的向性生长(Christie and Murphy, 2013)和避阴反应(Casal, 2012),最终目的都还是使植物尽可能地获得较多光能进行光合作用。同时,光照(特别是光强)还调控叶片的发育(Fan et al., 2013; Weston et al., 2000)、气孔的发育和运动(Chen et al., 2012a; Shimazaki et al., 2007)、叶绿素的合成(Hallik and Kull, 2008)等最终影响地上部的光合作用。同时,光强变化调控叶片发育和气孔运动也最终影响了植物的蒸腾作用(von Caemmerer and Baker, 2007)。

叶片感受外界光照长度除了控制植物的开花时间之外,还使细胞的生物钟主动保持与昼夜交替节律同步化。研究表明,与昼夜节律保持同步的植物具有更强的生长优势,表现为合成更多的叶绿素、固定更多的碳及更耐受环境胁迫等(Dodd et al., 2005; McClung, 2006)。有意思的是,植物地上部的抗病或抗虫反应也受到光照的影响(Griebel and Zeier, 2008; Roberts and Paul, 2006)。当然,人们在生理、生化及分子水平上对光调控植物地上部很多活动都做了相当多的研究,在此不一而足。

1.1.3 光对根生长及吸收营养的调节

通常来讲,根作为陆生植物地下生长的器官是不容易直接接触到光照的。但不容忽视的是,在过去的几十年间,人们在实验室对模式植物拟南芥的根的研究基本都是在透明培养基上“根直接见光”的生长环境下进行的。根直接见光这一培养条件,不符合植物的自然生长状态,使得对根的一些研究结果很可能并不能真实反映自然状况(Yokawa et al., 2013; Yokawa et al., 2011)。

除去某些物种的根具有繁殖功能外,植物的根还是主要发挥固着和支撑地上部,以及从土壤中吸收水分和营养元素等供给生长的功能。因此,我们下面从光调控根的生长和根吸收营养这两个方面进行概述。

目前认为, 根的持续生长主要是靠根尖细胞不断分裂来维持的。根据不同位置细胞的分裂或分化状态的不同, 根尖被划分为根冠区、细胞分裂旺盛的分生区、细胞快速伸长的伸长区及细胞达到稳定状态的成熟区(Verbelen et al., 2006)。根部几乎所有类型的细胞基本都是来自于根尖干细胞, 根尖干细胞产生的子细胞在根尖分生区经过多次不同但有固定规律的垂周分裂及平周分裂, 一旦这些短暂增殖的细胞进入到伸长分化区 (elongation/differentiation zone, EDZ) 就立即停止分裂, 并快速伸长最终分化成具有组织特性的成熟细胞(Aichinger et al., 2012; Cederholm et al., 2012; Dinneny and Benfey, 2008; Perilli et al., 2012)。根尖分生区处于分裂的细胞与离开分生区进行伸长和分化的细胞间的平衡决定了根尖分生组织的大小并决定了根的生长潜能(Beemster and Baskin, 1998; Dello Ioio et al., 2008)。

研究表明, 光照对生长在透明培养基上的小麦、水稻及玉米根的生长具有显著的抑制作用(Wilkins et al., 1974; Wilkins and Wain, 1974), 而对同样见光的铁树、拟南芥根的生长则起到明显的促进作用(Kurata and Yamamoto, 1997; Vinterhalter et al., 1990), 不仅如此, 还有报道称光对白菜、烟草的根的生长则并不存在显著的影响(Kurata and Yamamoto, 1997)。由此可见, 光照对不同物种根生长的调控很可能并不存在统一的规律。其实早在 1952 年, 美国植物学家 John G. Torrey 就对早期发现的光照调控不同物种根生长存在相互矛盾的这种现象给出了较为合理的解释, 他认为不同物种的根部生长素的本底水平差异以及不同物种对生长素敏感程度的差异, 很可能直接影响了光对根生长调控在不同物种中存在的很大差别(Feldman and Hirsch, 1994; Torrey, 1952)。因此, 对于地上光照调控根生长的分子机制, 即自然状态下植物根的生长如何响应地上光照的变化还有待于人们优化实验体系进行深入研究。

此外, 根的非常重要的功能是从土壤吸收水分和营养元素等。生理研究表明, 根吸收营养元素 (特别是氮、磷和钾) 的速率与植物的蒸腾速率存在着较好的线性关系(Novák and Vidovič, 2003), 既然光强的变化能够显著影响植物的蒸腾作用, 那么这暗示着, 根从土壤吸收营养元素这个过程也理当受到光照特别是光强变化的影响。

人们研究表明, 植物的根系主要依赖对应的转运体蛋白从土壤吸收相应的营养元素(Amtmann and Blatt, 2009; Maathuis, 2009)。对于氮 (N) 来讲, 土壤中可被根吸收的主要是 NO_3^- 和 NH_4^+ 两种形式, 一般来说, 根在低 pH 和还原性的土壤中倾向于吸

收 NH_4^+ ,而在较高 pH 和氧气充足的土壤则更多地吸收 NO_3^- (Miller and Cramer, 2005)。而拟南芥的根则主要以吸收 NO_3^- 的形式获取氮源,目前在拟南芥中已发现多个编码转运体吸收 NO_3^- 的基因,其中负责高亲和力转运吸收 NO_3^- 的 *NRT2.1* 基因发挥了非常重要的功能(Filleur et al., 2001; Li et al., 2007; Remans et al., 2006b);而在根尖相对高水平表达的低亲和力转运基因 *NRT1.1* 则被认为是根部对土壤 NO_3^- 浓度的感应器(Ho et al., 2009; Remans et al., 2006a; Wang et al., 2012)。此外,与氮素不同的是,只有少量且依赖土壤酸碱度的磷(P)元素能够以 PO_4^{3-} 形式被根吸收(Maathuis, 2009),目前发现的植物磷转运蛋白家族主要分为 PHT1、PHT2 和 PHT3 三类,而 PHT1 家族对根吸收 PO_4^{3-} 起主要作用(Misson et al., 2004)。而与 NO_3^- 相似的是,吸收钾(K)的转运系统也有高低亲和力之分,目前发现的负责高亲和力 K^+ 转运体的基因主要分为 3 个基因家族: *KT/HAK/KUP* (编码 K^+/H^+ 共转运体)、*HKT/Trk* (编码 K^+/Na^+ 共转运体)以及 *CHX* (编码阳离子- H^+ 交换体)(Gierth and Maser, 2007; Zhao et al., 2008)。有报道称植物细胞中上述这些负责根吸收转运营养元素的基因的表达是受到光照调控的,暗示着根吸收营养元素这个过程也是受光照调节的(Amtmann and Blatt, 2009)。Lejay 等人以拟南芥为材料研究光照以及蔗糖处理对氮、磷和钾离子转运基因表达的调控,发现光照的强度增加能够显著诱导根部氮转运基因的表达和增加根吸收 NO_3^- 的速率(Lejay et al., 2003)。虽然 Lejay 等人发现代表光合作用产物的蔗糖在光调控根部离子转运基因表达的调控过程中起到了非常重要的作用,但对其中具体的分子机制并不是很清楚(Lejay et al., 2003)。

1.2 植物胞内光信号的传导机制

人们对植物生长发育响应光照变化的研究有文字记录的可以追溯到 18 世纪或是更早,早在 1772 年英国化学家 Priestley 就用巧妙的实验发现绿色植物可以利用光作为能源产生氧气(Priestley, 1772),1864 年德国科学家 Sachs 的实验证明了可见光使植物向光性生长的光谱区域(Sachs, 1864),1881 年达尔文和他的儿子在研究一种草本植物胚芽鞘的向光弯曲生长时发现了生长素(Darwin and Darwin, 1881),1910 年德国化学家 Klebs 综合前人的研究结果首次较为详细地描述了光对植物生长发育的影响(Klebs, 1910)。虽然这个时期的人们已经从科学的角度认识和描绘了光对植物的重要

性,但限于当时的科技水平,对光调控植物生长发育的认识大多还只能停留在生理现象观察和假设性猜想的层面上,对植物感受光信号的发生机制并不清楚。光敏色素的发现是人类研究植物响应光信号的历史上一个里程碑的事件,美国 Beltsville 农业研究中心的 Borthwick 和 Hendricks 两位科学家于 1952 年在研究玉米幼苗吸收光谱时首次发现植物光敏色素,这一发现使得人们对植物响应光信号的研究不再局限于生理学水平,而能够在更为接近机制的层面上进行深入探索(Furuya, 2005)。随着 20 世纪中期分子生物学理论和技术的突破和迅猛发展,加上 70 年代拟南芥被选作模式生物供植物科学研究以及后来的大规模基因组测序、人工突变体的大规模筛选和图位克隆等遗传学技术的发展和完善,人们有条件从分子水平上较为全面和深入地研究和理解植物如何响应光信号成为现实(Jander et al., 2002; Keller, 1990; Koornneef and Meinke, 2010; Page and Grossniklaus, 2002; Somerville and Koornneef, 2002)。

我们知道,光对植物的影响会因天气、季节及地理位置等因素的变化而产生不同的影响,主要表现为光质(light quality)、光强(light quantity)、光照方向(light direction)和光照长度(photoperiod)几个方面。因此,为了感应如此复杂的光照环境,植物细胞一般也同时拥有复杂的感光系统,目前在拟南芥中发现以下几类主要光受体:最大限度吸收红光和远红光的光敏色素(包括 phyA、phyB、phyC、phyD 和 phyE)、主要吸收蓝光和紫外线-A 的隐花色素(包括 cry1 和 cry2)、向光素(包括 phot1 和 phot2)、Zeitlupes 蛋白(包括 ZTL, FKF1 和 LKP2)以及感应紫外线-B 的 UVR8(Chaves et al., 2011; Christie, 2007; Christie et al., 2012; Demarsy and Fankhauser, 2009; Franklin and Quail, 2010; Somers and Fujiwara, 2009)。

截至目前,科学家们已经在过去短短二十余年时间里通过遗传学、分子生物学和生物化学等手段从植物特别是拟南芥中鉴定出了大量的参与或决定植物细胞光信号传导的基因和组分(Casal and Yanovsky, 2005; Fuglevand et al., 1996; Gyula et al., 2003; Jiao et al., 2007)。为了叙述的简便但又不失代表性,我们这里只概述植物细胞中光信号通路的分子机制模型(图 1.2)。一般地,植物细胞处于黑暗时,光敏色素在细胞质中处于钝化状态(Pr),而未活化的隐花色素 CRY1 蛋白二聚体与 COP1 蛋白结合并将其限制在细胞核中,COP1 蛋白与 COP9 的亚基蛋白 CSN、COP10/DET1/DDB1 (CDD)在细胞核内形成复合体导致 HY5 蛋白被泛素化修饰。泛素化的 HY5 蛋白随

后很快被 26S 蛋白酶体降解 (Osterlund et al., 2000; Yi and Deng, 2005), HY5 蛋白的降解使得植物光形态建成显著受到抑制(Chattopadhyay et al., 1998; Lee et al., 2007; Zhang et al., 2011); 同时, 负责植物暗形态建成的 PIF 蛋白在黑暗中则比较稳定(Leivar and Quail, 2011), 因此, HY5 的降解以及 PIF 功能的稳定发挥最终导致植物表现出暗形态建成特征或暗反应 (图 1.2A)。而植物见光后, 红光使细胞质中光敏色素从钝化状态转变为活化状态 (Pfr), Pfr 进入细胞核与 PIF3 蛋白结合, 结合光敏色素的 PIF3 随之被磷酸化, 磷酸化的 PIF3 很容易被泛素化修饰并最终被 26S 蛋白酶体降解 (图 2B); 同时, 蓝光激活隐花色素受体 CRY1, 活化的 CRY1 结合 COP1 蛋白使其脱离 CDD 复合体, 并从细胞核转移至细胞质中, 而且光下 HY5 的去磷酸化提高 HY5 活性的同时也减弱了 COP1 与 HY5 的结合(Hardtke et al., 2000), 这都使得核内 HY5 因避免被降解而得以积累 (图 2B)。因此, 光下细胞中 PIF3 的降解及 HY5 的富集导致光诱导的大量基因得以表达, 最终使植物表现出光形态建成及其它与光信号相关的生理反应(Bae and Choi, 2008; Chaves et al., 2011; Waters and Langdale, 2009)。

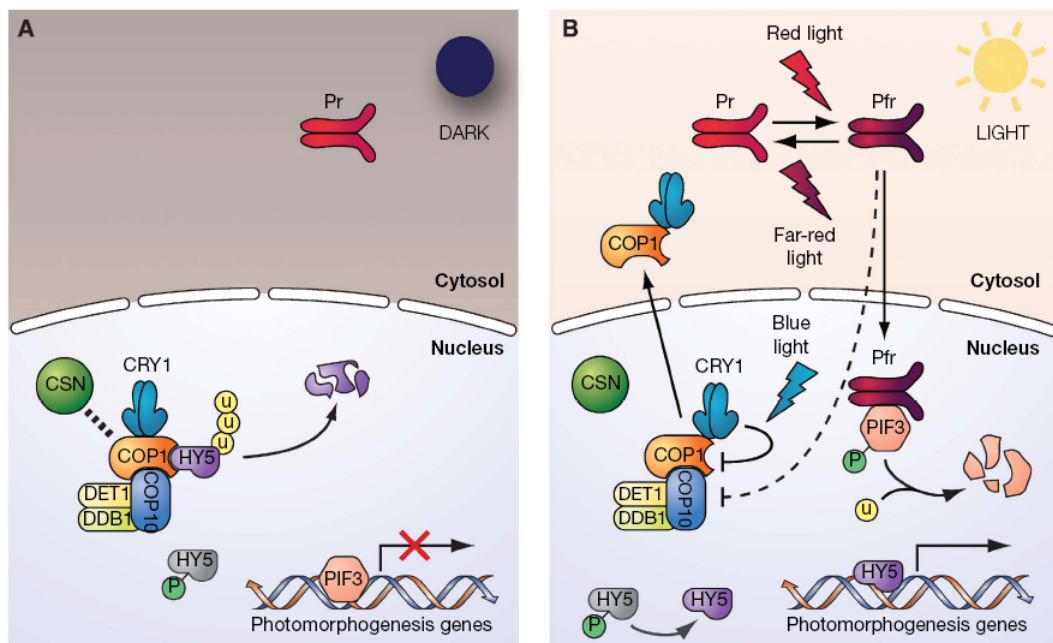


图 1.2 植物细胞内光信号传导途径的分子模型(Waters and Langdale, 2009)。

Figure 1.2 A general model of light signalling in plant cell (Waters and Langdale, 2009).

1.3 植物胞间光信号传导的研究进展

光受体并不是存在于植物的所有的组织器官,而且植物个体也不是所有的部位都可以直接接触到光照(Goosey et al., 1997; Sakamoto and Briggs, 2002)。而实际上,植物适应光照环境的变化是以一个有机整体的存在形式来进行的(Bou-Torrent et al., 2008; Montgomery, 2008),这就要求除了在直接接触光照的部位发生胞内光信号转导途径(Intracellular light signaling),同时也存在着胞间光信号途径(Intercellular light signaling),以实现光信号如何从直接见光的细胞或器官传递到其它未见直接光的细胞或器官,从而保证植物整体对环境的适应。

早在上世纪 70 年代,科学家们就已经观察到光对植物细胞发挥的调控功能在不同器官间存在扩散的生理现象。例如,Black 和 Shuttleworth 两位科学家用不透光的铝箔纸遮盖住黄瓜幼苗的下胚轴,然后用红光照射黄瓜幼苗的子叶,一段时间后发现并没有直接见光的下胚轴的伸长明显受到抑制,这个巧妙的实验暗示着产生于子叶部位的依赖光敏色素的某种信号物质能够传递至下胚轴部位并调控下胚轴的伸长(Black and Shuttleworth, 1974)。之后,Lechamy 发现藜科植物仅叶片见光时,其节间的伸长也受到控制(Lechamy, 1979)。此外,Tanaka 等人用远红光定点照射拟南芥的子叶发现下胚轴处的报告基因表达也受到调控(Tanaka et al., 2002),与之相符的是,Warnasooriya 和 Montgomery 采用组织特异性钝化光敏色素的方法也发现拟南芥子叶接收到的远红光可以控制下胚轴的伸长活动(Warnasooriya and Montgomery, 2009)。不仅如此,Lake 等人还发现用弱光照射拟南芥的成熟叶片能够使同一棵植株上的暴露在强光下的幼叶的气孔导度变小,暗示着很可能存在着某系统信号介导气孔活动对光照的响应(Lake et al., 2001)。非常值得一提的是,1936 年俄国植物学家 Chailakhyan 根据 Sachs 及 Knott 等人早期实验结果提出“成花激素”(florigen)的概念,认为茎尖因被叶片包被并不能感应光照长度,而叶片感受光照长度后产生的成花激素从叶片移动到茎尖并促进开花。科学家们多年来致力于“成花激素”的研究终于在近些年取得突破,发现 *FT* 基因作为“成花激素”的重要组分调控植物开花时间对外界光照长度的响应(Corbesier et al., 2007; Kobayashi and Weigel, 2007; Li et al., 2011a; Lu et al., 2012; Tamaki et al., 2007; Taoka et al., 2013; Turck et al., 2008)。有意思的是,还有研究

表明 *FT* 在水稻里的同源基因 *Hd3a* 还能做为“块茎形成素”(tuberigen) 介导马铃薯地下块茎形成对日照长度的感应(Navarro et al., 2011)。

Bou-Torrent 等根据前人的研究提出, 光信号在植物个体中的传导一般需至少经历胞内信号途径和胞间信号途径两大步骤(Bou-Torrent et al., 2008)。叶部直接见光的细胞中光受体感光后诱发的光信号传导属于胞内光信号途径(图 1.2), 它是细胞自主性的活动, 调控的事件主要包括基因表达、蛋白稳定性、细胞器的运动、细胞骨架排列以及细胞扩张等诸多方面。而胞内光信号途径的胞外输出则通过很多早期实验就暗示存在的胞间信号分子(Intercellular signal)或器官间信号分子(Interorgan signal)移动至相邻细胞或者器官, 胞间光信号途径介导光信号在植株水平上的传导(图 1.3)。

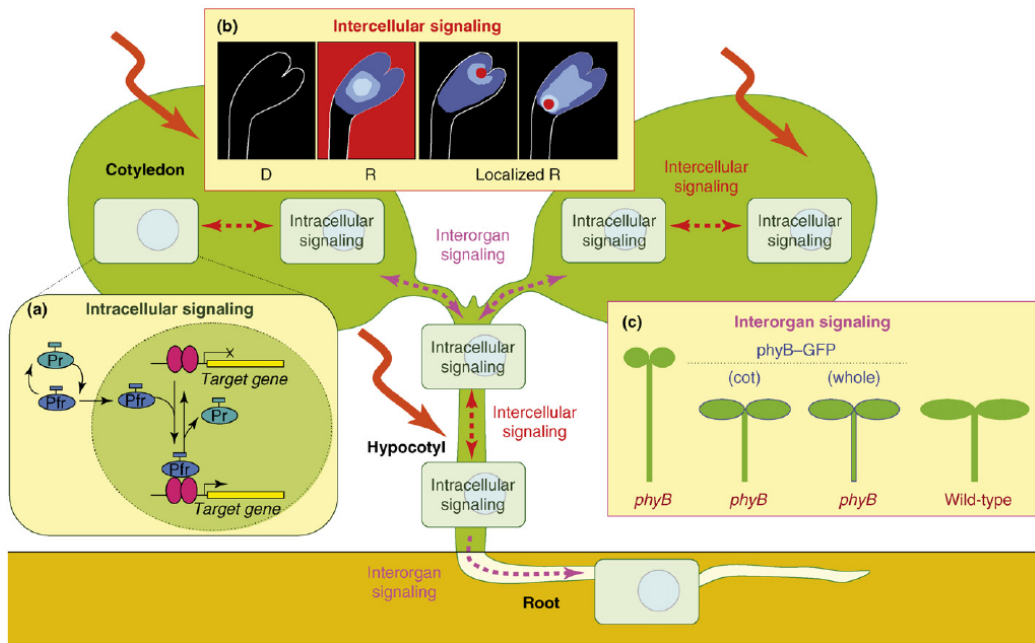


图 1.3 植物的胞内信号传导和胞间信号传导示意图(Bou-Torrent et al., 2008)。

Figure 1.3 Model representing the web of interactions following light perception in the context of the whole seedling (Bou-Torrent et al., 2008).

人们的大量研究已经在植物中发现主要包括植物激素、蛋白、mRNA 或 microRNA 等分子充当系统信号实现多种信号反应的胞间或器官间传递(Jackson, 2001; Kim and Pai, 2009; Van Norman et al., 2011)。相比于植物胞内光信号传导途径的研究成果, 人们目前对植物胞间光信号传导途径研究的进展依然较为滞后(Casal, 2013; Chory, 2010; Gyula et al., 2003)。关于 *FT* 基因作为“成花激素”以及“块茎形成素”介导植物感

应日照长度变化调控生殖生长的研究是人们在探索植物胞间光信号（光照长度）传导机制方面非常成功的案例(Corbesier et al., 2007; Li et al., 2011a; Navarro et al., 2011; Tamaki et al., 2007), 但是植物需要面对光照环境在光质、光强、光照长度和光照方向等多方面的变化, 目前人们对这方面的认识还有很多未知的东西, 有待于做更多的研究(Bou-Torrent et al., 2008; Kami et al., 2010; Montgomery, 2008)。

1.4 植物地上部分与根的物质和信息的交流

埋在地下的根响应地上光照变化是胞间或器官间光信号传导效应的重要组成部分, 而植物根部与其地上部之间的物质和信息交流在此过程中必不可少。人们对植物地上部和根部协调互作的认识由来已久, 早在 18 世纪英国生理学家 Hales 就用实验证明根从土壤吸收水分及营养元素供应地上部的需求(Hales, 1727), 而提出植物地上部与根之间存在更微观交流的想法是在法国科学家 du Monceau 去除植物顶端影响根生长的实验之后(du Monceau, 1758)。现在我们知道, 植物激素在协调地上部与根的生长方面发挥着十分重要的作用。茎端合成的生长素通过一系列的内运蛋白（如 AUX1 等）和外运蛋白（如 PIN 家族和 PGP 家族）运输到根部并调控根的生长发育(Blakeslee et al., 2005; Geisler and Murphy, 2006)。研究表明, 生长素在主根生长和侧根发生等方面都发挥非常关键的调节功能(Overvoorde et al., 2010; Saini et al., 2013)。此外, 细胞分裂素通过木质部从根部向植物的地上部长距离运输并调节腋芽生长和叶片扩张等生长活动(Chen et al., 1985; Li and Bangerth, 2003; Rahayu et al., 2005; Sachs and Thimann, 1967), 而新发现的植物激素独脚金内酯（strigolactones）在根部合成却能影响地上部分枝的形成(Xie et al., 2010)。

另外, 光合作用产物蔗糖由叶片长距离转运至包括根在内的库(Aoki et al., 2012), 蔗糖除了为细胞提供能量, 还对根的生长乃至营养吸收等多个方面都有显著的调节作用(Kircher and Schopfer, 2012; Lejay et al., 2003; Rolland et al., 2002), 因此, 蔗糖也是植物地上部与根进行物质和信息交流的重要组成部分。同时人们也发现, 根吸收氮的过程不仅受土壤氮浓度的影响, 还受地上部对氮元素的需求以及光合作用相关的系统性调控(Alvarez et al., 2012; Clarkson and Lüttge, 1991; Forde, 2002a; Gansel et al., 2001; Orsel et al., 2002)。而根对其它营养元素如磷(Burleigh and Harrison, 1999)、铁(Grusak

and Pezeshgi, 1996)和硫(Lappartient et al., 1999)等的吸收也受地上部的系统调控, 但即便如此, 很多实验暗示着不同元素可能具有各自不同的机制(Forde, 2002b; Liu et al., 2009; Martin et al., 2000)。

植物地上部和根的生物钟节律也存在调节的关系(Mas and Yanovsky, 2009), 拟南芥地上部细胞的生物钟中心元件基因 *TOC1* 的表达是有节律性的, 但在根部该基因则丧失节律性表达的特征, 而且根生物钟被来自地上部与光合作用相关的某种信号物质所同步化(James et al., 2008; Mas and Yanovsky, 2009)。根与地上部协同调节植物生物钟节律, 保证植物整体适应生存环境的变化以达到更好的生长态势(Green et al., 2002; Hartwell, 2005; Ruts et al., 2012)。

当然, 根与植物地上部分交流的物质和信息是多方面的, 除上面提及的, 水分、氨基酸、多肽类、信使 RNA、小分子 RNA 等很多因子都存在植物地上与地下之间的传递(Jackson, 2001; Jackson, 2002; Puig et al., 2012; Van Norman et al., 2011; Yoo et al., 2004)。虽然根与地上部分的这些物质和信息交流的发生机制不尽一样, 但目的都是使植物的生长发育和生理代谢等适应生存环境的变化。

1.5 选题依据与研究意义

光不仅是保证植物光合作用的能源物质, 还且还是调控植物生长发育的重要信号物质。虽然目前人们对植物胞内光信号通路的分子机制研究得比较清楚, 但是对胞间或器官间的光信号传导的机制目前尚不够明确, 而植物的根响应地上光照的变化则是光信号在植物胞间或器官间传导发生效应的很重要的方面。虽然关于光照调控拟南芥根生长目前已有不少的研究和报道(De Simone et al., 2000; Dyachok et al., 2011; Kiss et al., 2003a; Kiss et al., 2003b; Kurata and Yamamoto, 1997), 但这些研究基本上都是建立在“根直接见光”的实验条件基础之上的, 而最近几年有研究也发现“根直接见光”这种实验条件给关于根的研究, 特别是根与光信号相关的研究, 可能带来一些问题(如活性氧干扰)(Roycewicz and Malamy, 2012; Yokawa et al., 2013; Yokawa et al., 2011)。因此, 建立在“根直接见光”条件上的一些研究结果很可能未必能真实反映根生长活动对地上光照变化的响应, 更无从谈起光调控根生长活动这个过程当中的胞间光信号传导的分子机制。基于此种情形, 我们拟从模拟植物根不见光的生长状态开始, 对植物

根部的生长和营养吸收在黑暗中如何响应地上光照强度的变化进行探索，试图从中解析植物胞间光信号传导的分子机制。

对地上光照调控根生长生理活动的研究，不仅有助于揭示植物胞间或器官间光信号传导的分子机制，而且对于全面理解植物如何系统适应生存环境的变化具有非常重要的科学理论意义。此外，对根生长及生理活动受地上光照调控的分子机制的研究，对于我们今后在农业生产中有目的地改造地下根系生理（如营养利用效率等）活动对地上光照环境的依赖性具有实际的指导意义。

第二章 材料与方法

2.1 实验材料与耗材

2.1.1 实验材料

野生型拟南芥 (Col-0、Ws 和 Ler)、突变体 *wei2*、*tir-t*、*axr2*、*phyA phyB*、*cry1 cry2*、*pif3* 和 *pif-Q* (*pif1 pif3 pif4 pif5*) 种子由本实验室保存。35S:*YUC1*、35S:*YUC3*、*yuc3 yuc5 yuc7 yuc8 yuc9* 由加州大学圣地亚哥分校赵云德教授、中国科学院植物研究所程佑发研究员惠赠，突变体 *hy5* (Col)、*hyh-1* (Ws)、*hy5 hyh* (Ws) 由耶鲁大学邓兴旺教授惠赠。

2.1.2 菌株与载体

大肠杆菌 Trans 5 α 、Trans BL21 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司，农杆菌菌株 GV3101 由本实验室保存。克隆载体 *pBluescript II KS*、原核表达载体 *pMALTM-c2X*、植物表达载体 *pCAMBIA1300* 与 *pCAMBIA2300* 由本实验室保存，克隆载体 *pMD18-T* 购自宝生物工程（大连）有限公司（TaKaRa）、人工 microRNA 质粒模板 *pRS300* 由 Detlef Weigel 教授赠送。

2.1.3 主要试剂

DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Phusion 高保真 DNA 聚合酶均购自 NEB 公司，DNA 回收试剂盒购自北京博迈德科技发展有限公司，M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司，RNA 酶抑制剂 (RRI) 购自宝生物工程（大连）有限公司（TaKaRa），qPCR SYBR Green Mix 购自北京全式金生物技术有限公司，化学发光法凝胶阻滞试剂盒 (LightShift Chemiluminescent EMSA Kit) 购自 Thermo 公司，蛋白酶 K 购自 Sigma 公司，蛋白预染 Marser III 购自北京康润诚业生物科技有限公司（GenStar）。MS 固体盐购自 Duchefa Biochemie 公司，琼脂粉购自北京鼎国公司。

2.1.4 引物及探针

所用引物的合成以及生物素标记探针的合成均在北京英骏公司（Invitrogen）完成。相关引物及探针的序列请见本文附录部分。

2.1.5 主要仪器

TES-1332A 照度计购自台湾泰仕电子工业股份有限公司（TES），激光共聚焦显微镜为 Carl Zeiss 公司，体视镜、荧光显微镜、全自动冷冻切片机 VT1200S 均为 Leica 公司，超声破碎仪为宁波新芝生物科技股份有限公司，定量 PCR 仪为 Eppendorf 公司。

2.2 拟南芥的栽培及转基因

2.2.1 拟南芥的栽培

（1）用 2.6% 的次氯酸钠（用前加适量的 Tween-20）将种子浸泡 10 min，再用灭菌水漂洗 3 遍，然后置于 4℃ 放置 3 天。

（2）将种子均匀铺到 1/2MS 固体培养基上，置于培养室中 16 h 光照/8 h 黑暗、温度 23℃ 的条件下进行培养。

（3）幼苗生长至 6 天苗龄时，将幼苗移栽至温室中 16 h 光照/8 h 黑暗、温度 23℃ 的条件下继续培养。基质为腐殖质土壤与蛭石等比例混合或是纯蛭石，底肥和追肥均使用以色列海法保利丰牌硝酸钾型肥料。移栽初期最好用透光性较好的盖子罩住以保持适当湿度。

2.2.2 拟南芥的遗传转化

（1）提前将主花序的顶端剪掉，数日后进行下面的操作。

（2）转化操作前 1 天用水将材料浇透。转化后要控制浇水或营养液。

（3）农杆菌的准备在转化前一天进行：挑取适量的阳性克隆农杆菌放入含相应抗生素的 10 mL YEP 液体培养基（每升含有 10 g 胰蛋白胨、10 g 酵母提取物以及 5 g NaCl）

中，28℃ 200 rpm 振荡培养过夜。第二天取其中 1 mL 菌液加到 100 mL 含有相应抗生素的 YEP 液体培养基中，28℃ 200 rpm 振荡培养约 6 h。准备收集菌体以用于转化拟南芥。

(4) 28℃ 5500 rpm 离心 5~8 min 收集菌体，倒掉上清液，紧接着用浸染液（5%蔗糖，0.02% Silwet L-77）悬浮菌体。

(5) 将拟南芥的花序没到浸染液中 10 s 左右。然后将浸染后的拟南芥遮黑处理并覆上薄膜以保持湿度，一天后取出。

(6) 继续正常培养，等待收获种子。

2.3 局部见光体系的建立

在培养皿底部事先放入无菌处理过的不透光黑纸（尽量与培养皿底部等大小），倒入灭菌处理过的但未凝固的 MS 固体培养基至适当厚度。等培养基彻底凝固后，将待处理的拟南芥小苗放置在培养基的表面，用锡箔纸做成的无菌暗室遮盖住小苗的相应部位（地上部或者根部），以达到拟南芥在培养皿中局部见光的效果。

2.4 嫁接实验

(1) 选取下胚轴比较直的 3~4 天苗龄幼苗，用刀片在下胚轴的中上部位垂直横切以获得接穗和砧木。为了保证嫁接愈合的效果，切口应尽量平整，嫁接过程中应尽量避免切口失水变形。

(2) 取半劈开的 20 μ L 枪头尖凹面朝上放置在培养基的表面，在凹槽中将接穗与砧木的下胚轴切口尽可能地无缝对接，完成嫁接操作。

(3) 之后继续在培养皿中垂直培养 1 周左右，然后挑选嫁接成功的植株。

2.5 RT-qPCR 分析基因表达量

2.5.1 总 RNA 的提取

(1) 将材料在液氮中研磨均匀后转至 1 mL 的 Trizol 试剂中（材料体积 $\leq$ Trizol 体积的 10%）。漩涡震荡混匀，15~30℃ 静置 5 min。

- (2) 4℃, 12000 rpm 离心 10 min, 取上清。
- (3) 加入 200 μL 的氯仿, 充分摇晃混匀 15 s, 15~30℃ 静置 3 min。
- (4) 4℃, 12000 rpm 离心 15 min, 取无色水相。
- (5) 加入等体积的预冷的异丙醇, 颠倒混匀, 15~30℃ 静置 10 min。
- (6) 4℃, 12000 rpm 离心 10 min, 弃去上清。
- (7) 加入 1 mL 冰预冷的 75%乙醇, 漩涡震荡。4℃ 12000 rpm 离心 5 min。
- (8) 吸除乙醇, 37℃干燥 10 min。
- (9) 加适量体积的 DEPC-ddH₂O (一般为 20 μL), 如需较长时间保存, 置于-70℃。

2.5.2 反转录 cDNA 第一条链的合成

电泳检测总 RNA 完整性良好后, 取 2 μg 总 RNA, 加入 Oligo d(T)₁₈ 引物 1 μg , 补加 DEPC-ddH₂O 至 10 μL , 70℃变性 5 min, 立即置于冰浴中 5 min, 然后稍微离心。按下表在冰浴中依次加入各种成分:

Total RNA + Oligo d(T) ₁₈	10 μL
5× M-MLV RT buffer	5.0 μL
dNTP mix (10 mM)	2.0 μL
RNasin Ribonuclease Inhibitor	0.5 μL
M-MLV RT	1.0 μL
DEPC-ddH ₂ O	7.5 μL
总体积	25 μL

轻轻混匀, 42℃水浴 90 min, 反应结束后在 85℃水浴中放置 15 min 以灭活反转录酶, 保存于-20℃备用。

2.5.3 实时定量 PCR

通过系列浓度梯度稀释反转录获得的 cDNA 做 PCR 扩增曲线, 确定 cDNA 适当的稀释倍数, 保证模板初始浓度处于线性扩增范围。

按下表制备定量 PCR 反应体系:

2×SYBR [®] Premix	10 μL
Forward primer (5μM)	2.0 μL
Reverse primer (5μM)	2.0 μL
Diluted cDNA	5.0 μL
ddH ₂ O	1.0 μL
总体积	20 μL

实时定量 PCR 的反应程序为 95℃ 2 min 预变性, ① 95℃变性 20 s, ② 60℃退火 10 s, ③ 72℃退火 10 s, ④ 机器采集荧光信号, ①—④ 循环 40 次。之后从 65℃ 每隔 0.5℃采集一次荧光信号直至 95℃做溶解曲线分析, 检测引物扩增的特异性。

获得 Ct 值后采用 $\Delta\Delta C_t$ 算法计算基因的相对表达量。

2.6 Western blot 检测蛋白含量

2.6.1 植物总蛋白的提取

- (1) 取适量的样品用液氮研磨至均匀粉末。
- (2) 迅速将粉末转至 200 μL 的植物细胞裂解液 (冰预冷) 中, 1 g 粉末最好溶解在 1 mL 的裂解液中。
- (3) 旋涡振荡, 4℃ 13000 rpm 离心 10 min。
- (4) 取上清, 4℃ 13000 rpm 离心 10 min。
- (5) 小心地吸取上清至新的离心管中, 即获得蛋白粗提液。

植物细胞裂解液配方如下表:

1 M Tris HCl (pH=7.5)	10 mL
5 M NaCl	6.0 mL
1 M MgCl ₂	2.0 mL
0.5 M EDTA	400 μL
Glycerol	20 mL
NP-40	200 μL
总体积	200 mL

注：上述植物细胞裂解液使用前应加入 $1\times$ 蛋白酶抑制剂 (Protease inhibitor complete, Roche)。

2.6.2 Western blot

(1) 配制 SDS-PAGE 胶

先灌制分离胶 (10%)，配方如下：

4×Desolving buffer	1.75 mL
30% Acrylamide/Bis	2.3 mL
10% AP	70 μ L
TEMED	7 μ L
ddH ₂ O	2.88 mL
总体积	约 7 mL

用无水乙醇压平液面，待分离胶凝固完全以后，彻底除掉无水乙醇，然后按照下表灌制浓缩胶：

4×Stacking buffer	1.5 mL
30% Acrylamide/Bis	960 μ L
10% AP	60 μ L
TEMED	10 μ L
ddH ₂ O	3.48 mL
总体积	约 6 mL

倒入浓缩胶后立即插上梳子，待浓缩胶凝固完全后备用。

(2) 将蛋白粗提液与适量的上样缓冲液混合，充分混匀后置于沸水浴中煮沸 10 min，之后迅速冰上冷却。短暂离心后点样于上样孔中，90 V 电压进行电泳，电泳时间根据目的蛋白分子量大小或实验的需要确定。

(3) 电泳结束后，弃去浓缩胶，将分离胶在转膜缓冲液中平衡 15 min 后进行转膜操作。转膜时依次按阴极板、3 层浸润滤纸、分离胶、NC 膜、3 层浸润滤纸、阳极板的顺序进行叠放对齐，叠放的每一步都要去除气泡。90 V 电泳冰上转膜，转膜时间依据目的蛋白的分子大小确定。一般地，25~80 kDa 大小的蛋白从 10% 的分离胶转膜

进行 1~1.5 h 为宜。

(4) 转膜结束后, 将膜取出并置于 PBST 溶液中漂洗一下, 加入 PBST 溶液配制的 5%脱脂奶粉封闭液, 平稳摇动, 室温封闭 2 h。

(5) 弃掉封闭液, 用 PBST 溶液漂洗膜 3 次, 每次 5 min。

(6) 将一抗用 PBST 溶液按照合适比例进行稀释, 将膜完全置于其中, 室温 4~6 h (或 4℃过夜)。

(7) 弃掉一抗, 用 PBST 溶液洗膜 5 min, 重复进行 3 次。

(8) 将二抗用 PBST 溶液按照合适比例进行稀释, 将膜完全置于其中, 室温 1~2 h。

(9) 弃掉二抗, 用 PBST 溶液洗膜 5 min, 重复进行 3 次。

(10) ECL 显影, X 光片曝光。

相关溶液配方:

① 4×Desolving buffer: 称取 18.2 g Tris-base 溶于 100 mL ddH₂O 中, 用浓盐酸调节 pH 至 8.8, 之后加入 0.4 g SDS。

② 4×Stacking buffer: 称取 6.05 g Tris-base 溶于 100 mL ddH₂O 中, 用浓盐酸调节 pH 至 6.8, 之后加入 0.4 g SDS。

③ 6×上样缓冲液: 50 mM Tris-HCl (pH=6.8), 2% SDS, 10% Glycerol, 0.02%溴酚蓝和 0.7%巯基乙醇。

④ 10×电泳缓冲液: 先称取 30.2 g 的 Tris-base 溶于 500 mL ddH₂O 中, 再加入 188 g 的甘氨酸, 可加热助溶, 调节 pH 至 8.3; 然后加入 100 mL 的 10% SDS, 最后定容至 1 L。

⑤ 1×转膜缓冲液: 称取 5.8 g 甘氨酸、15 g Tris-base 溶于 700 mL ddH₂O 中, 然后加入 3.7 mL 的 10% SDS、200 mL 甲醇, 最后定容至 1 L。

⑥ 1×PBST 溶液: 称取 8 g NaCl、0.2 g KCl、1.44 g Na₂HPO₄、0.24 g KH₂PO₄ 溶于 800 mL ddH₂O 中, 用 NaOH 将 pH 调节至 7.4, 然后加入 500 μL Tween-20, 最后定容至 1 L。

2.7 染色质免疫共沉淀 (ChIP)

染色质免疫共沉淀实验按照 Gendrel 等人的方法(Gendrel et al., 2005)进行。

2.8 蛋白的原核表达及纯化

(1) 将基因的开放阅读框架对应的序列构建至 *pMAL-c2X* 载体的表达框中, 转化大肠杆菌 BL21, 菌落 PCR 筛选并提取质粒鉴定阳性克隆。同时转化 *pMAL-c2X* 空载体表达对照蛋白用。

(2) 挑取阳性单克隆至 10 mL 的含氨苄抗性的 LB 液体培养基 (每升含有 10 g 胰蛋白胍、5 g 酵母提取物以及 10 g NaCl) 中, 37°C 200 rpm 摇菌过夜。

(3) 将上述 10 mL 菌液加入至 1 L 富营养培养基 (每升含有 10 g 胰蛋白胍、5 g 酵母提取物、5 g NaCl 以及 2 g 葡萄糖, 100 µg/mL 氨苄霉素), 37°C 200 rpm 培养至菌液 OD₆₀₀ ≈ 0.5, 加入 0.2 mM IPTG, 20°C 200 rpm 培养 12 h 左右。

(4) 4°C 6500 rpm 离心 20 min 收集菌体, 弃上清液。用 Column 缓冲液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA 以及可选择添加的 1 mM 叠氮化钠、10 mM β-巯基乙醇或者 1 mM 二硫苏糖醇) 悬浮菌体。1 g 菌体 (湿重) 一般用 10 mL 的 Column 缓冲液悬浮。

(5) 将悬浮后的菌液置于 -20°C 中过夜。

(6) 从 -20°C 中取出菌体, 置于冷水中融化。

(7) 冰上对菌液进行超声处理 2 min 左右。

(8) 4°C, 9700 rpm 离心 30 min, 取上清液 (蛋白粗提液), 用 Column 缓冲液将该蛋白粗提液稀释 5 倍, 置于冰浴中待纯化。

(9) 向 2.5 × 10 cm Column 管中倒入约 2 mL 直链淀粉树脂 (Amylose Resin, 1 mL Amylose Resin 一般结合 3 mg 目的蛋白), 用 8 倍于 Column 管体积的 Column 缓冲液漂洗。

(10) 加入蛋白粗提液使其缓慢通过 Column 管中的直链淀粉树脂, 蛋白粗提液的流速最好控制在 1 mL/min。注意中间切忌直链淀粉树脂变干。

(11) 再用 12 倍于 Column 管体积的 Column 缓冲液漂洗。

(12) 加入含 10 mM 麦芽糖的 Column 缓冲液进行洗脱, 分管收集蛋白, 最后挑选出目的蛋白浓度较高的管。

2.9 凝胶阻滞实验 (EMSA)

(1) 配制 6%非变性聚丙烯酰胺胶 (长×宽×厚=8 cm × 7 cm × 1.5 mm):

5×TBE	1 mL
30% Acrylamide/Bis	2 mL
80% Glycerol	312 μL
10% AP	150 μL
TEMED	10 μL
ddH ₂ O	6.688 mL
总体积	10 mL

5×TBE 缓冲液: 450 mM Tris, 450 mM 硼酸, 10 mM EDTA, pH=8.3。

(2) 将凝固好的胶放入 0.5×TBE 缓冲液中, 反复吹洗上样孔以冲掉未聚合好的聚丙烯酰胺, 之后 100V 电压室温预电泳 30~60 min。

(3) 预电泳期间配制反应液, 体系如下:

管号	#1	#2	#3	#4~#n
ddH ₂ O	13 μL	12 μL	12 μL	~ μL
10×binding buffer	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
50% Glycerol	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
100 mM MgCl ₂	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
1 μg/μL Poly(dI dC)	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
10% NP-40	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
冷探针	0	0	0	~ μL
对照蛋白 (6 μg/μL)	0	1 μL	0	0
样品蛋白 (6 μg/μL)	0	0	1 μL	1 μL
0.01μM 标记探针	1 μL	1 μL	1 μL	1 μL
总体积	20 μL	20 μL	20 μL	20 μL

上述反应液在室温下静置 20 min。

- (4) 向上述各反应液中加入 5 μ L 5 $\times$ 上样缓冲液，轻柔混匀，切勿涡旋或剧烈振荡！
- (5) 停止预电泳，点样，室温 100V 电压电泳，待溴酚蓝至胶的下缘约 2/3 或 3/4 处时停止电泳。
- (6) 电泳结束前，提前将尼龙膜 (Positively charged nylon membrane) 在 0.5 $\times$ TBE 缓冲液中浸泡至少 10 min。
- (7) 取出胶体，紧接着转膜操作。依次按阴极板-2 层浸润滤纸-分离胶-尼龙膜-2 层浸润滤纸-阳极板的顺序进行叠放对齐，叠放的每一步都要去除气泡。380 mA 电流冰上进行转膜，转膜时间一般控制在 30~60 min。
- (8) 转膜结束后，用镊子夹住膜的一角垂放于吸水纸上 1 min 左右，以保证将膜表面的缓冲液吸收进膜中，注意此过程中切勿使膜变干。快速进入下一步。
- (9) 在紫外灯下交联 10 min 左右。交联完成后，可直接进入显影操作，也可在室温干燥保持若干天后（期间不要再将膜变湿）再进行显影操作。
- (10) 显影操作按照 Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (89880)试剂盒的方法进行。

2.10 生长素极性运输能力的检测

拟南芥根尖生长素极性运输检测参照 Lewis 的方法(Lewis and Muday, 2009)进行。

2.11 不同施氮量的控制

不同浓度 NO_3^- 的固体培养基的成分参照 Krouk 等人的方法(Krouk et al., 2010)，由 0.5 mM CaSO_4 ，0.5 mM MgCl_2 ，1 mM KH_2PO_4 ，2.5 mM MES (pH 5.8)，50 μ M NaFeEDTA ，50 μ M H_3BO_3 ，12 μ M MnCl_2 ，1 μ M CuCl_2 ，1 μ M ZnCl_2 ，0.03 μ M NH_4MoO_4 成分组成基础培养基，向基础培养基中加入不同量的 KNO_3 。

2.12 根吸收 NO_3^- 速率的测定

测定方法参照 Merigout 等人(Merigout et al., 2008)和 Orsel 等人(Orsel et al., 2004)的操作。将根置于 0.1 mM CaSO_4 溶液中浸泡 1 min，然后转至含有 0.2 mM K^{15}NO_3

(atom% ^{15}N : 99%) 的全营养培养液中浸泡 5 min, 再置于 0.1 mM CaSO_4 溶液中浸泡 1 min。将上述处理过的根立即从地上部减掉, 用吸水纸稍微吸干后置于液氮中。将根充分研磨成均匀粉末, 放于 80℃烘箱中彻底烘干。对获得的干粉进行 ^{15}N 含量的分析, 计算根吸收 NO_3^- 的速率。

含 ^{15}N 的全营养培养基成分为: 1 mM MgSO_4 、1 mM KH_2PO_4 、2.5 mM K_2SO_4 、2.2 mM CaCl_2 、10 μM MnSO_4 、24 μM H_3BO_3 、3 μM ZnSO_4 、0.9 μM CuSO_4 、0.04 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 、10 mg/L Fe-EDTA 和 0.2 mM K^{15}NO_3 (atom % ^{15}N : 99%)。

2.13 叶绿素含量的测定

叶绿素含量测定按照 Ni 等人的方法进行(Ni et al., 2009)。

第三章 结果

3.1 地上光照调控根的生长发育

太阳的照射强度会随着天气、气候、地理纬度等因素的影响而存在显著的变化 (Huxley, 1969), 为了研究植物生长如何适应外界光照强度的变化, 我们以模式植物拟南芥为研究对象, 观察不同光强对其生长的影响。如图 3.1A 所示, 在一定光强范围内, 随光强的增加, 拟南芥 (Col-0) 的叶片随之变大。而当光强达到一定值后, 叶片不再继续变大而主要表现为叶色加绿, 同时拟南芥提早开花, 与前人报道的光促进光合作用使植物同化更多的有机物从而促进生长的结果相一致 (Downes, 1970; PEAT, 1970)。同时我们还发现, 地上部光照强度的增加很明显地促进了拟南芥地下根系的发育 (图 3.1B)。但在较强的光照 ($>75 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) 条件下, 光强的增加对根系结构的改变并不明显。上述结果说明地上光照强度的变化可以调控拟南芥地下根系的生长发育。

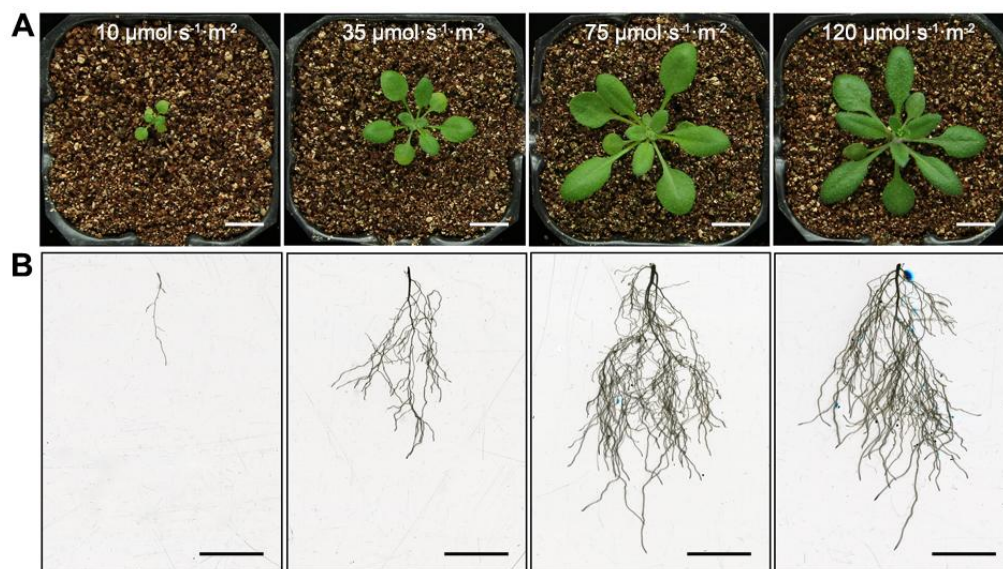


图 3.1 拟南芥地上部和根生长协同响应地上光强的变化。

Figure 3.1 Coordinated regulation of root and shoot growth by light quantity.

Soil-grown wild type *Arabidopsis* under variable light quantities in greenhouse for 21 days, photos of shoot (A) and root (B) were shown as above. Scale bar, 1cm.

为了解决在固体培养基上培养拟南芥根部直接见光的问题，如图 3.2 所示，我们建立基于 MS 固体培养基的植物无菌幼苗局部见光体系，以尽量模拟植物自然生长过程中根部不直接见光的状态。通过检测暗盒中拟南芥幼苗的暗形态建成反应的完成情况，如图 3.8 中地上部单独处于暗盒中的幼苗的下胚轴伸长程度，证实我们的上述的无菌幼苗局部见光体系是完全有效的。以此见光体系为基础，后续开展关于光调控根生长及生理活动的研究。

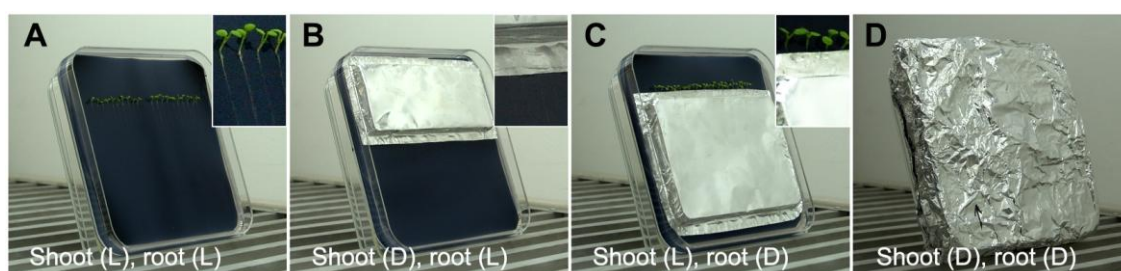


图 3.2 基于固体培养基的局部见光体系的实物图。

Figure 3.2 Local light treatment of shoots or roots of young seedlings in petri dish.

L, light; D, dark.

首先根据土培条件下光对地下根生长发育的调控的结果（图 3.1B），需要在上述无菌幼苗局部见光体系的条件下进一步证实地上光照确实可以调控根的生长发育。将 3 天苗龄的野生型拟南芥的根持续置于黑暗中，期间给予地上部不同强度的光照，3 天后检测根的长度及根尖分生区和根尖干细胞状况。结果显示，3 天后一直处于黑暗中的主根的伸长随着地上光照的增强而显著增加（图 3.3A），主根伸长与外界光强变化之间的这种正相关性与 Kurata 等人较早期利用拟南芥幼苗在全部见光的实验条件下进行不同光强处理得到的实验结果基本上一致的(Kurata and Yamamoto, 1997)。这说明地下黑暗中根的生长确实可以受到地上光照强度变化的调节。

我们知道，根尖分生区的大小、根尖分生细胞数目的多少一般情况下都反映了根尖细胞的分裂与分化之间的相对能力，并最终决定了植物根的生长能力(Dello Ioio et al., 2008)。如图 3.3B 所示，地上光照的增强显著促进了幼苗主根伸长的同时，也明显促进了根尖分生细胞数目的增多，这表明黑暗中根尖的分生能力也受到地上光照的调控。同时，我们还可以看到根尖柱状细胞的大小和排列不同光强下并不存在显著的变化（图 3.3B）。

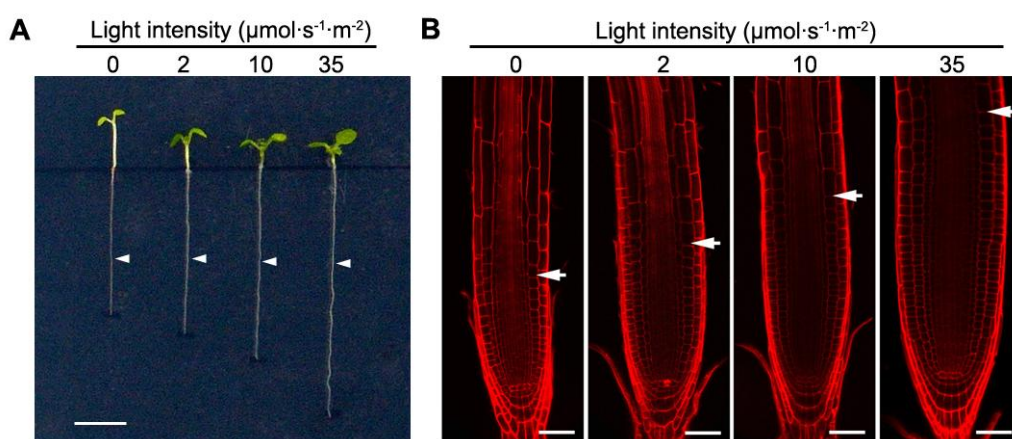


图 3.3 地上光照对拟南芥主根伸长及根尖分生区大小的调控。

Figure 3.3 Light stimulus received by shoots promotes primary root growth.

Shoots of 3 dpg light-grown wild type seedlings were exposed to different intensities of light for another 3 d, while roots were kept in dark, then primary root growth (A) and root meristem cell number (B) were detected. (A) Arrowheads indicate the position of primary root tip of 3 dpg seedlings, scale bar, 1 cm. (B) Confocal images of root tip of 6 dpg wild type seedlings. Arrows indicate the cortex TZ, scale bar, 50 μm .

进一步分析发现，光强调控根生长与根尖分生区大小之间存在一定的正相关性（图 3.4），这也暗示光照很可能通过调控植物根尖的分生能力进而调节根的生长。

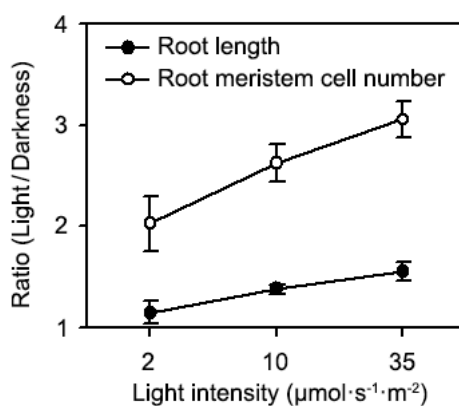


图 3.4 光强调控的根的生长与根尖分生区大小之间的相关性。

Figure 3.4 Light-regulated root growth is associated to root meristem cell number.

Shoots of 3 dpg light-grown wild type seedlings were exposed to different intensities of light for another 3 d, while roots were kept in the darkness. Ratio means primary root growth or root meristem cell number under light relative to that in the darkness.

在根的生长发育过程中，根尖干细胞对维持主根持续的分生能力具有至关重要的作用(Aichinger et al., 2012; Petricka et al., 2012)，我们前面也发现根尖干细胞的状态并不受地上光强变化的影响（图 3.3B），为了进一步说明这点，我们利用碘染淀粉粒以及标记基因的表达来进一步检测根尖干细胞对光照的反应。如图 3.5 所示，碘染实验表明根尖干细胞分化成的淀粉粒细胞没有受到光照的显著影响，同时，负责根尖干细胞微环境稳定的一些关键基因如 *WOX5*、*SHR*、*SCR*、*PLT1* 及 *PLT2* 各自在光下和暗中的表达都不存在显著的差异，这些结果都说明光照并不会对植物根尖干细胞的命运产生决定性影响。

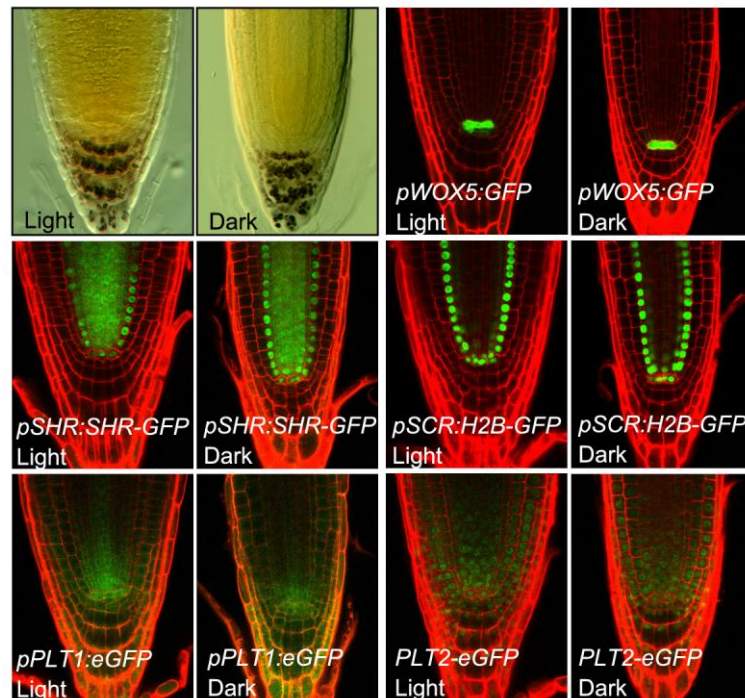


图 3.5 光照对拟南芥根尖干细胞活性不存在显著的影响。

Figure 3.5 Root stem cell niche is not affected by light.

3 dpg light-grown wild type seedlings were treated by light or dark for another 3 d, then status of root columella cells and expression pattern of root stem cell niche marker genes were analyzed.

基于局部见光体系，我们还发现光不仅能够促进拟南芥主根的生长（图 3.3A，图 3.6），而且也能够较为明显地诱导侧根的发生（图 3.6），这与土培条件下光强变化调控地下根系生长发育的结果也是非常一致的（图 3.1B）。

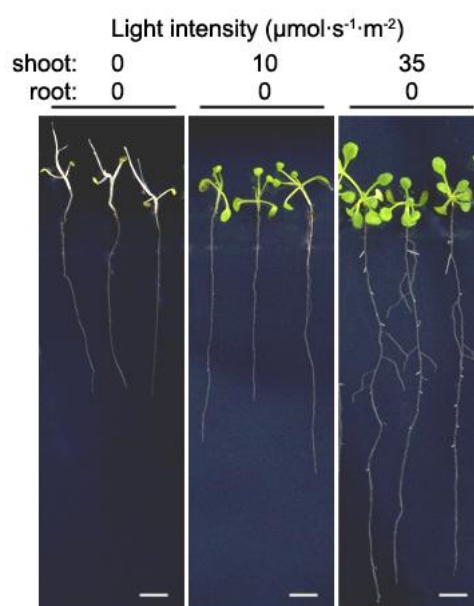


图 3.6 地上光照促进拟南芥侧根的发生。

Figure 3.6 Shoot derived light promotes lateral root development.

3 dpg light-grown wild type seedlings were exposed to variable light quantities for another 10 d, while roots were kept in dark all the time. Scale bar, 1 cm.

上述结果都说明，地上光照确实可以不通过直接接触根部而对根的生长发育产生显著的促进作用。

而这里有一点特别值得我们注意的是，光是植物进行光合作用的物质和能量基础，地上光照强度在一定范围内的增加会增强植物的光合作用，从而使得植物同化合成更多的有机物，保证光合作用能够为植物的生长发育提供必需的物质和能量基础。既然我们前面发现光能够显著促进根的生长发育，那么这个过程是否是依赖于光合作用的产物（如蔗糖）呢？

Kircher 等人最近报道了拟南芥幼苗的子叶进行光合作用产生的蔗糖运输至根部促进主根的伸长，他们发现蔗糖的这种作用只明显发生在子叶期，而且蔗糖对侧根的发生并不存在显著的影响，这暗示着除了蔗糖之外，叶片接受光照后会产生某种信号物质对根的生长发育产生系统性影响(Kircher and Schopfer, 2012)。也就是说，这个信号物质很可能代表了我们之前提到的胞间光信号物质，从而介导光照对根的生长生理活动的调节。因此，我们有必要进一步检测，蔗糖在光照调控根的生长过程中到底是否起到关键的调控作用。

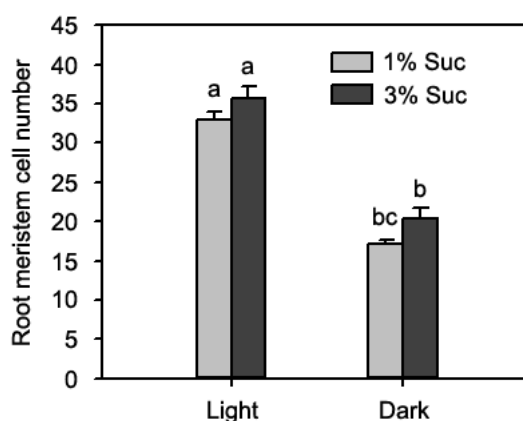


图 3.7 蔗糖不能缓解缺失光照对根尖分生能力的抑制。

Figure 3.7 The inhibitory effect of root meristem activity by dark couldn't be compensated by sucrose in petri dish.

3 dpg light-grown wild type seedlings were transferred to 1% or 3% sucrose contained MS medium and simultaneously treated by light or dark for another 3 d, then root meristem cell numbers were detected. Values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at the 95% confidence level, $n > 20$ seedlings.

为了进一步检验地上光照对根生长的调控是否依赖蔗糖之外的信号物质，我们在培养基中提高蔗糖浓度检测是否能够弥补缺失光照对根生长的抑制。结果如图 3.7 所示，外源蔗糖的增加并没有使黑暗中拟南芥根尖分生细胞的数目显著增多，这说明光合产物蔗糖的增多并没有弥补植物因缺乏光照导致的根尖分生能力的减弱。事实上，Xiong 等人最近的实验证实了在培养皿中， CO_2 供应的不充足会导致拟南芥的光合作用产物（糖）的生成在很大程度上被阻止(Xiong et al., 2013)，也就是说光照通过光合作用为植物提供能量和有机物的这部分作用基本上被培养基中的葡萄糖或蔗糖所代替。因此，我们在培养基中增多蔗糖对于生长在本来就很充足蔗糖或葡萄糖的培养基上的幼苗是没有多大意义的，也侧面暗示着黑暗下根生长的抑制并不是因为蔗糖水平的变化，而是由于缺乏某种光信号物质。

因此，基于上述结果，我们确定地上光照对根生长发育的调控是依赖于蔗糖以外的某种信号物质的。

3.2 光依赖地上部调控根的生长发育

既然地上光照能够调控根的生长发育，而自然状态下植物直接接触光线的部位是地上部分。因此，为了检测光调控根生长发育对植物地上部分的依赖程度，我们对拟南芥幼苗的地上部分和根部分别给予光照或黑暗的不同组合处理。

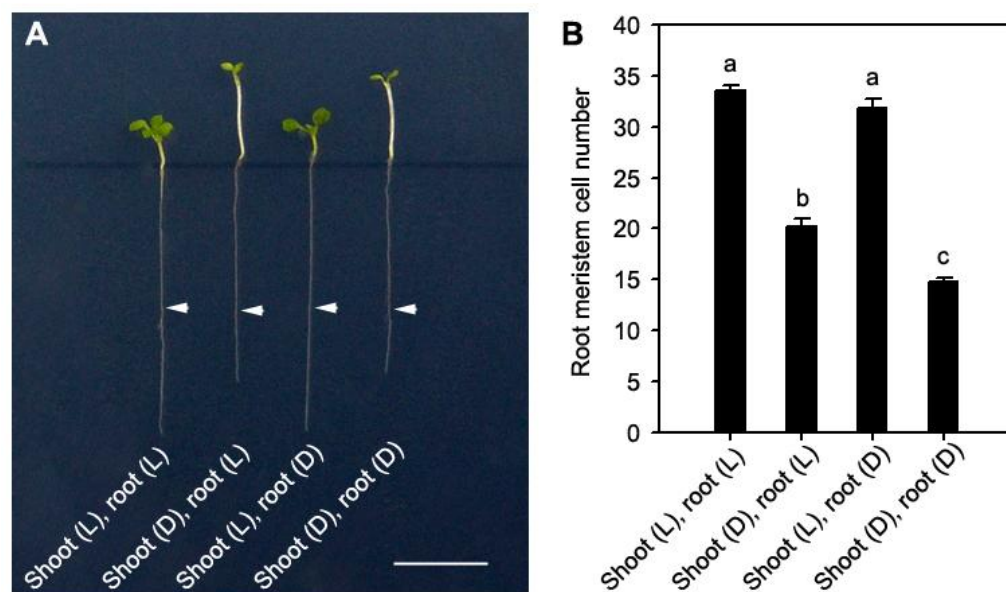


图 3.8 光调控根的生长依赖于地上部。

Figure 3.8 Shoot is essential to light-regulated primary root growth.

3 dpg light-grown wild type seedlings were treated by local light for another 3 d, then primary root length (A) and root meristem cell number (B) were detected. (A) Arrowheads indicate the position of primary root tip of 3 dpg seedlings, scale bar, 1 cm. (B) Root meristem cell number of 6 dpg seedlings. Values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at the 95% confidence level, $n > 20$ seedlings.

对地上部分和根部分别给予光照或黑暗的不同组合持续处理 3 天后，检测根的伸长和根尖分生细胞数目。结果如图 3.8 所示，当地上部被持续黑暗处理后，即使此期间幼苗的根部一直被暴露在光下，主根的生长也明显受到抑制，同时根尖分生细胞数目也显著减少。进一步横向比较发现，地上部处于持续黑暗状态而同时根部直接见光的拟南芥的生长表型与地上部和根部全都持续处于黑暗中的幼苗的生长表型十分相似（图 3.8），这暗示着光对根生长的调控是依赖于植物的地上部作用的。

不仅如此，我们还发现地上部对光调控拟南芥侧根的发生同样至关重要。将上述这种处理的时间延长至 7 天后，同样去检测根伸长及根尖分生细胞的数目。结果如图 3.9 所示，即使幼苗的根部直接见光，地上部的持续黑暗也非常明显地抑制了侧根的发生。

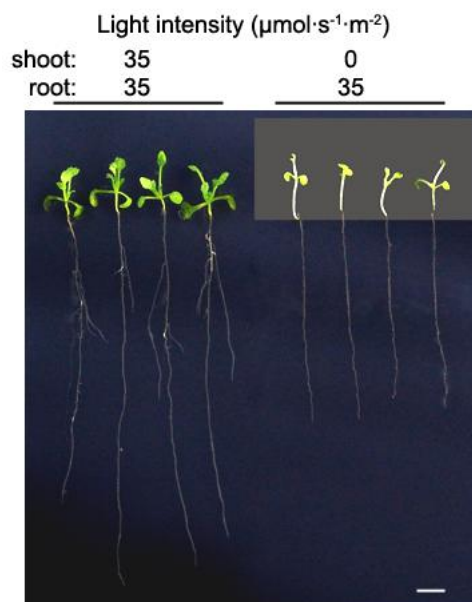


图 3.9 光调控的侧根的发生与地上部光照状态的关系。

Figure 3.9 Shoot-derived light is essential to light-regulated lateral root development.

Roots of 3 dpg light-grown wild type seedlings were kept under light for another 7 d, simultaneously shoot was exposed to light or not. Scale bar, 1 cm.

上述这部分结果都说明，直接照射根部对光调控根的生长发育并不起主要作用，而光调控根的生长发育需要来自于地上部的胞间光信号或器官间光信号从地上部向根部长距离传导的参与。

3.3 茎端合成的生长素不参与光信号从地上部到根的传导

既然光调控根的生长需要来自植物地上部的胞间光信号或器官间光信号的传导，我们拟根据“光促进拟南芥根的生长需要地上部见光”这个特点进行胞间光信号物质的筛选。

寻找负责该过程的胞间光信号物质所采用的具体策略如图 3.10 所示。简单地讲，对于野生型来说，地上部见光后会产生胞间光信号物质，该信号物质移动至根部促进

主根的生长（图 3.10A）；而当地上部处于黑暗中的时候，这种光信号物质则不能产生，导致根因接收不到该信号使其生长受到抑制（图 3.10B）。但对于丧失产生该信号物质能力的植物来讲，地上部不论是见光还是处在黑暗中，根部都接收不到来自地上部的该信号，主根的生长同样都受到抑制（图 3.10C, D）。因此，当我们找到主根生长对地上光照或黑暗处理都不再敏感的材料时，那么该材料对应缺失的物质就应该是光调控根生长这个过程当中的胞间光信号物质或是参与其组成的重要成分。

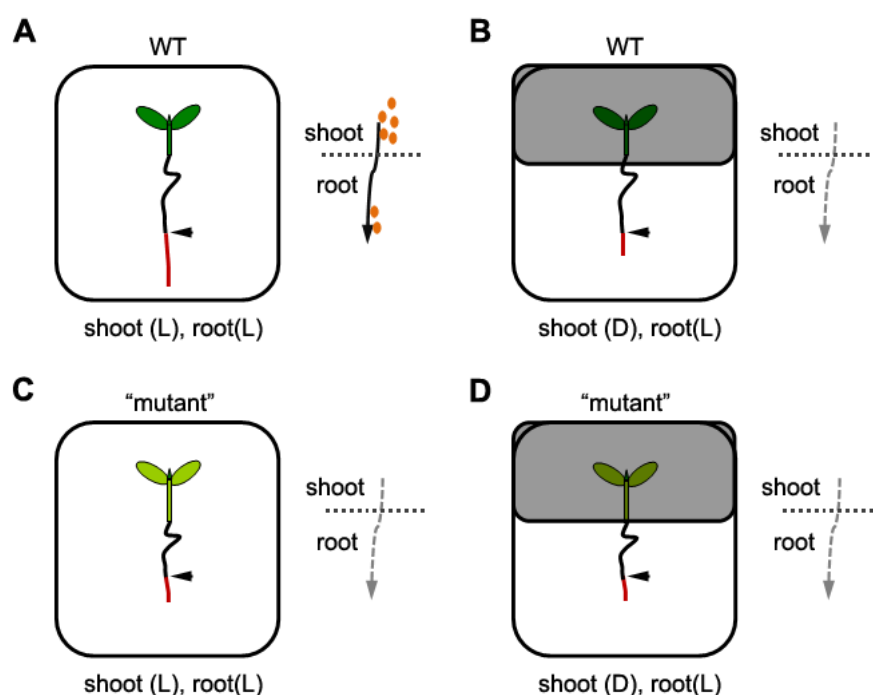


图 3.10 筛选参与光调控根生长的胞间信号所采用策略的示意图。

Figure 3.10 Strategy for identifying intercellular signal responsible for light regulated root growth.

For wild type, (A) when shoot is exposed to light, intercellular light signals accumulate in shoot and then move to root to promote root growth, (B) while in dark condition there is few light signal accumulated, because root can't receive light signal from shoot, root growth is inhibited. (C and D) For mutants that lose the ability to produce intercellular light signal, inhibition of root growth occurs no matter what status of shoot is.

我们知道，茎端合成的生长素能够长距离运输至根部，而且生长素本身在根的生长发育过程中起到了关键的作用(Friml, 2003; van Berkel et al., 2013)。因此，茎端合成的生长素是不是就是或者参与组成负责光调控根生长发育的胞间光信号物质呢？

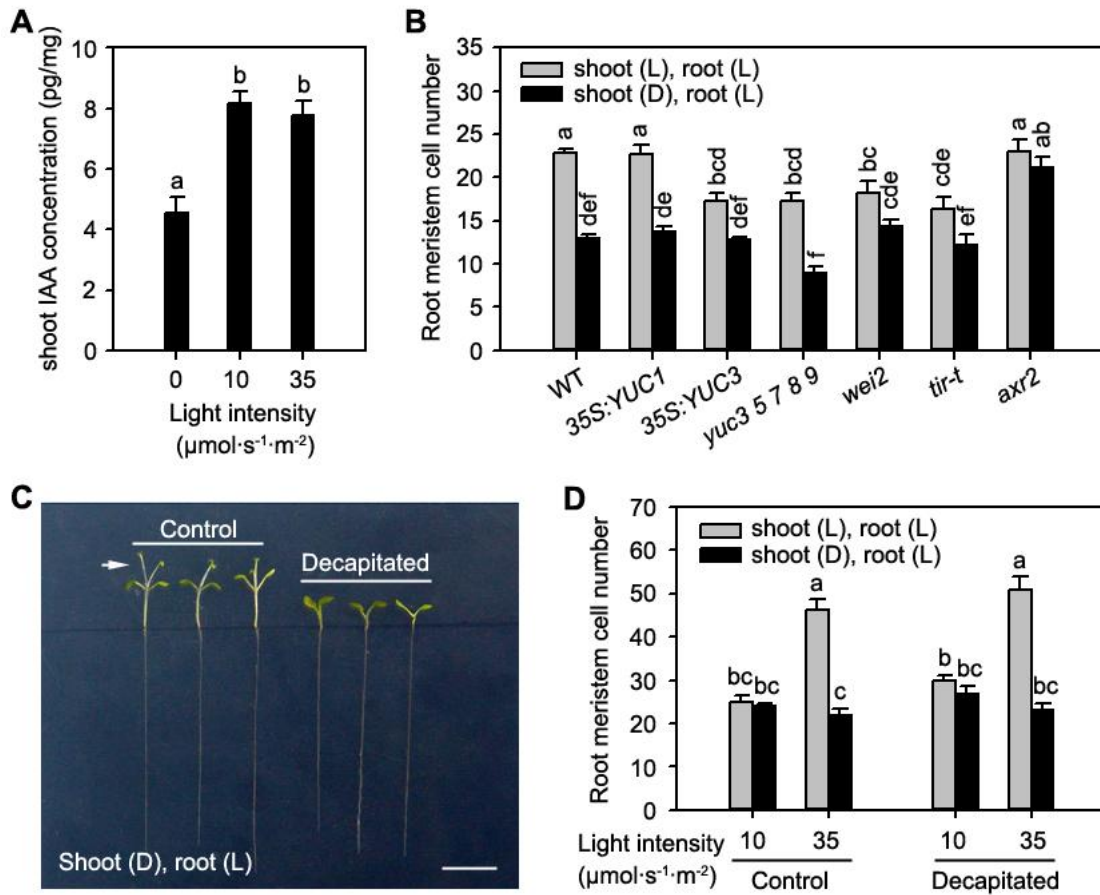


图 3.11 茎端合成的生长素不参与胞间信号对光调控根生长的介导。

Figure 3.11 Shoot localized auxin isn't intercellular signal essential to light-regulated root growth.

(A) Response of free IAA level in shoot to the changes of light quantity. 10 d light-grown wild type seedlings were treated by different intensities of light for another 4 d, free IAA content in the shoot was measured. (B) Root meristem cell numbers of auxin-associated transgenic or mutant plants regulated by light received by shoots. Root of 3 dpg light-grown wild type seedlings were kept under light for another 3 d, simultaneously shoots were exposed to light or not, root meristem cell number was then analyzed. (C) Photo of decapitated and intact wild type seedlings. 5 dpg light-grown wild type seedlings were decapitated or not, 2 d later decapitated seedlings and intact seedlings were both treated by light or dark for another 3 d. Arrowhead indicates the new leaf. Scale bar, 1 cm. (D) Decapitation has no effect on the response of root growth to the aboveground light conditions. Decapitation method was the same to that described in (C), and root meristem cell numbers were analyzed after 3d-light treatment. Values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at the 95% confidence level, $n > 20$ seedlings.

我们首先检测了地上部的生长素水平是否能够反映外界光照的强弱。结果如图 3.11A 所示，黑暗中地上部的生长素水平确实要低于光下，但是地上部生长素的水平并没有随着光强的增加而增加。这暗示着接收光照的地上部，其中的生长素水平并不能反映外界光照的强度。

不仅如此，虽然去除茎尖（decapitation）可以除去或显著减少茎端生长素的合成 (Arite et al., 2007; Brewer et al., 2009; Domagalska and Leyser, 2011; Foo et al., 2005; Hayward et al., 2009; Johnson et al., 2006)，但是我们发现去除了茎尖的拟南芥，其主根的生长对地上光照或黑暗处理的反应与野生型幼苗的表现并无显著差异(图 3.11C, D)，这暗示着茎端合成生长素的缺失并不会对光信号从植物地上部向根部的传导产生明显影响。

进一步，我们还发现增加幼苗地上部的生长素水平也不会对光调控根的生长产生显著影响（图 3.11B）。我们知道，编码黄素单加氧酶的 *YUCCA* (*YUC*) 基因在赖氨酸的生长素合成途径中发挥了关键的作用 (Mano and Nemoto, 2012; Zhao, 2012)，*YUC1*、*YUC2*、*YUC4* 和 *YUC6* 基因对地上部生长素的合成发挥主要贡献，而 *YUC3*、*YUC5*、*YUC7*、*YUC8* 和 *YUC9* 基因则负责生长素在根部的合成 (Won et al., 2011; Zhao, 2012)，因此这些基因表达的改变会直接影响生长素在植物地上部或根部合成的多少。如图 3.11B 所示，对于地上部生长素合成增多的 *35S:YUC1* 转基因拟南芥，其地上部处于持续黑暗时根尖分生细胞数目的减少与野生型受到同样处理时的表现并不存在显著的差异，这说明生长素在地上部含量的增多也不会对光调控根生长发育这个过程产生很大的影响。

但我们同时也发现，对于生长素在根部合成增多的 *35S:YUC3* 转基因拟南芥，其根尖分生能力在地上部处于光照时的表现与地上部处于持续黑暗时并不存在显著差异（图 3.11B），而且影响生长素合成的突变体 *wei2* (Niyogi and Fink, 1992; Radwanski and Last, 1995)、生长素受体四突变体 *tir-t* (Calderon Villalobos et al., 2012) 以及生长素信号途径 Aux/IAA 蛋白家族成员突变体 *axr2* (Nagpal et al., 2000) 的根尖分生能力对地上光照环境变化都基本上失去了响应（图 3.11B），这些结果暗示着光照调控主根的生长最终依然受制于根尖本地的生长素。而负责根部生长素合成的 *YUC3*、*YUC5*、*YUC7*、*YUC8* 和 *YUC9* 基因的功能缺失五突变体的根尖分生区的活动仍然对地上光照

环境的变化保持较为显著的响应（图 3.11B），这可能是由于地上部合成的生长素经长距离运输在某种程度上维持了根部的生长素信号途径。

以上结果都说明，茎端合成的生长素并不直接参与光信号对根生长的调控。也就是说，茎端合成的生长素虽然具有从地上部向根部长距离运输并调节根生长发育的功能，但是它并不参与胞间光信号向根部的传导。

3.4 COP1-HY5 信号模块对“胞间光信号”存在重要的贡献

近些年来在植物中已经发现具有胞间运输特性的蛋白、RNA 等物质(Jackson, 2001; Kim and Pai, 2009)，因此，植物胞内光信号途径中的组分很有可能在介导光信号的空间传导过程中起到了重要的功能。

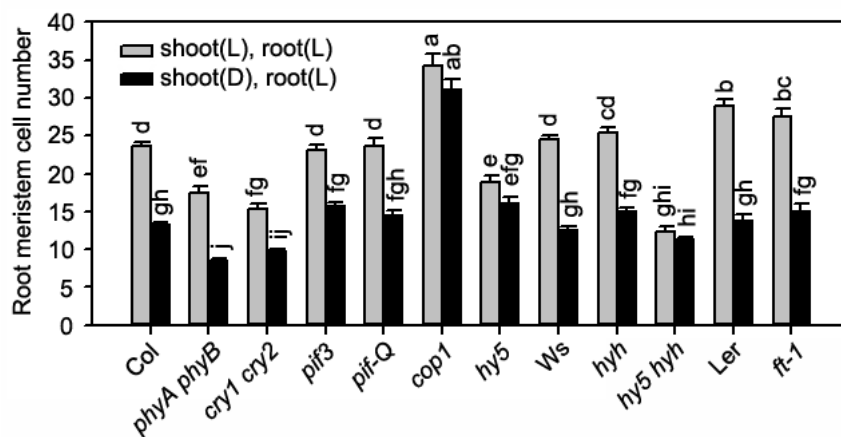


图 3.12 光信号途径相关突变体的根尖分生能力对地上部光照状态的反应。

Figure 3.12 Root meristem activities of light signalling associated mutants regulated by light stimulus received by shoot.

Roots of 3 dpg light-grown seedlings were kept under light for 3 d, simultaneously shoots were given light or not, root meristem cell numbers were analyzed. Values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at 95% confidence level, $n > 20$ seedlings.

成花激素是系统性介导光照长度调控植物开花的关键，*FT* 基因已经被很多研究证明是成花激素的主要组分(Turck et al., 2008)，而且 Navarro 等人最近在马铃薯中发现 *FT* 基因介导光照长度调控块茎的诱导(Navarro et al., 2011)。因此，系统信号 *FT* 基因是否介导光调控根的生长发育值得我们去研究。如图 3.12 所示，功能缺陷型突变

体 *ft-1* 的根尖分生细胞数目在地上部持续黑暗处理时显著减少, 与野生型的表现并无显著差异, 说明 *FT* 基因对系统性光信号调控根的生长发育并无明显贡献。

此外, 依照本文寻找系统性光信号的策略, 光受体突变体 *phyA phyB*、*cry1 cry2* 的根尖分生能力对地上光照状态的反应虽有所下降, 但还保持着显著的幅度 (图 3.12), 暗示着光受体对系统性光信号调控根尖生长并不起主要贡献。而 *pif3* 突变体和 *pif1 pif3 pif4 pif5* 四突变体 (*pif-Q*) 的根尖依然维持正常的系统性光反应, 与野生型也不存在显著差异 (图 3.11), 说明 *PIF* 转录因子也不参与介导地上光照对根生长发育的调控。

有意思的是, 不论是在光下还是暗处, *cop1-4* 突变体根尖分生细胞都保持相同的数目 (图 3.11), 这说明 *COP1* 基因参与光信号对根生长发育的调控; 而相对于野生型, *cop1-4* 突变体在光下和暗处其根尖较强的分生能力则暗示着作为正调控因子的系统性光信号物质很可能处于 *COP1* 基因的下游。与此同时, *hy5-1* 突变体以及 *hy5 hyh* 双突变体的根尖分生细胞数目相比野生型都显著减少, 而且对地上部光照还是持续黑暗几乎都不再响应 (图 3.11), 这说明 *HY5* 基因对地上光照调控根的生长发育发挥了非常关键的功能。而 *HY5* 基因的同源基因 *HYH* (Holm et al., 2002) 单独突变则不能够影响根尖分生能力对地上光照的响应 (图 3.11)。这些结果说明 *COP1-HY5* 信号模块对植物胞间光信号调节根的生长起到了非常重要的作用。

3.5 *COP1-HY5* 信号模块具备“细胞非自主性”的功能

COP1-HY5 信号模块究竟能否代表植物的胞间光信号呢? 我们知道, 胞间信号 (系统性信号) 在植物生长发育过程中一般都可以表现出“细胞非自主性” (Non-Cell-Autonomous) 的功能 (Green et al., 2002; Jorgensen and Lucas, 2006; Maizel, 2006)。因此, 我们分别用组织特异性启动子分别表达 *COP1* 或 *HY5* 基因, 检测它们是否具有细胞非自主性的作用。选用的组织特异性启动子包括在根特异表达的 *At3g25820* 基因 (Chen et al., 2004)、在地上部特异表达的 *CAB3* 基因 (Warnasooriya and Montgomery, 2009) 以及在茎尖特异表达的 *UFO* 基因 (Eckardt, 2008) 对应的启动子。

(注: 获得组织特异性表达 *COP1*、*HY5* 转基因拟南芥的这一部分工作由本实验室的姚琴芳同学完成。)

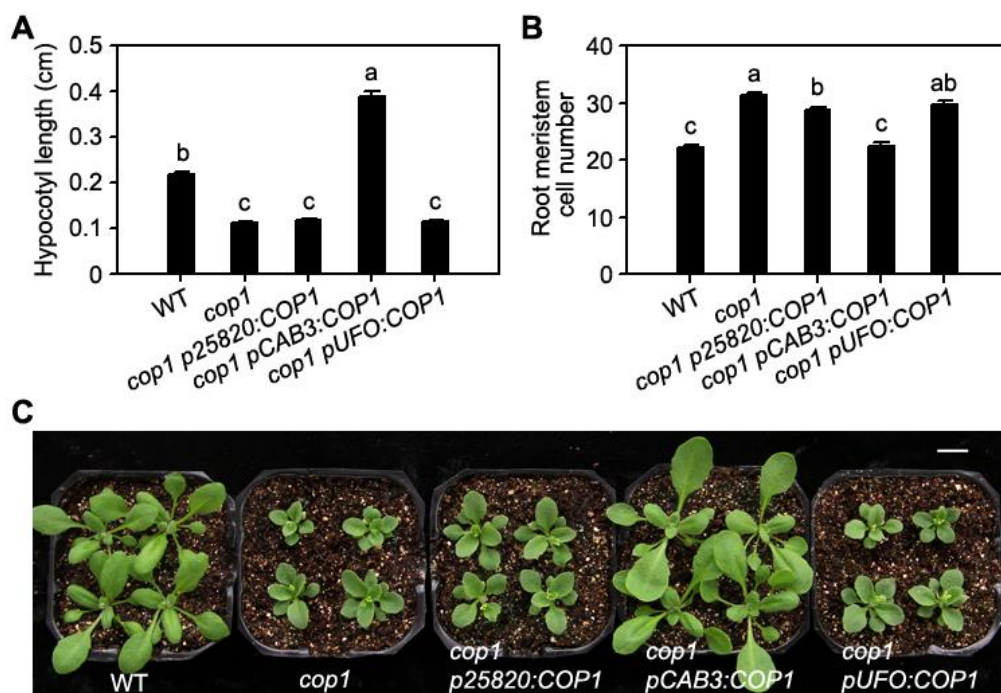


图 3.13 *COP1* 基因的细胞非自主性表现。

Figure 3.13 Non-cell-autonomous function of *COP1* gene.

Hypocotyl length(A) and root meristem cell number(B) of 6 d light-grown tissue specific promoter driving *COP1* gene transgenic lines, values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at 95% confidence level, $n > 20$ seedlings. (C) 18 dpg plants in greenhouse. Scale bar, 1 cm. Sequence of primers to amplify promoters is shown in Appendix.1.

cop1-4 突变体的下胚轴相比野生型是显著变短的。如图 3.13A, 对于下胚轴长度, *COP1* 在地上部特异表达能明显恢复甚至超过野生表型, 但在根或茎尖特异表达则不能恢复表型。而 *COP1* 对成苗期叶片表型的作用(图 3.12C)也类似于下胚轴, 即 *COP1* 基因对地上部可能并不具备“细胞非自主性”功能。但是, 这并不能否定该基因对光信号的胞间传导的贡献, 因为地上部本身就是光信号胞间传导的源头或者起始点。

而对于调节光信号从叶片(源)到根(库)的传导, *COP1* 基因则具有明显的“细胞非自主性”的功能, 因为 *COP1* 基因在地上部特异表达能使 *cop1-4* 的根尖分生细胞数目恢复至野生型水平(图 3.13B)。而在茎尖特异表达 *COP1* 基因则不能恢复根尖的表型(图 3.13B), 这符合光信号的源头主要是叶片而不是茎尖这一事实。不仅如此, *COP1* 基因在根特异表达却只能部分地恢复 *cop1-4* 突变体根尖的表型(图 3.13B), 这与本文前面发现的光依赖地上部调控根的生长(图 3.8)相当吻合。

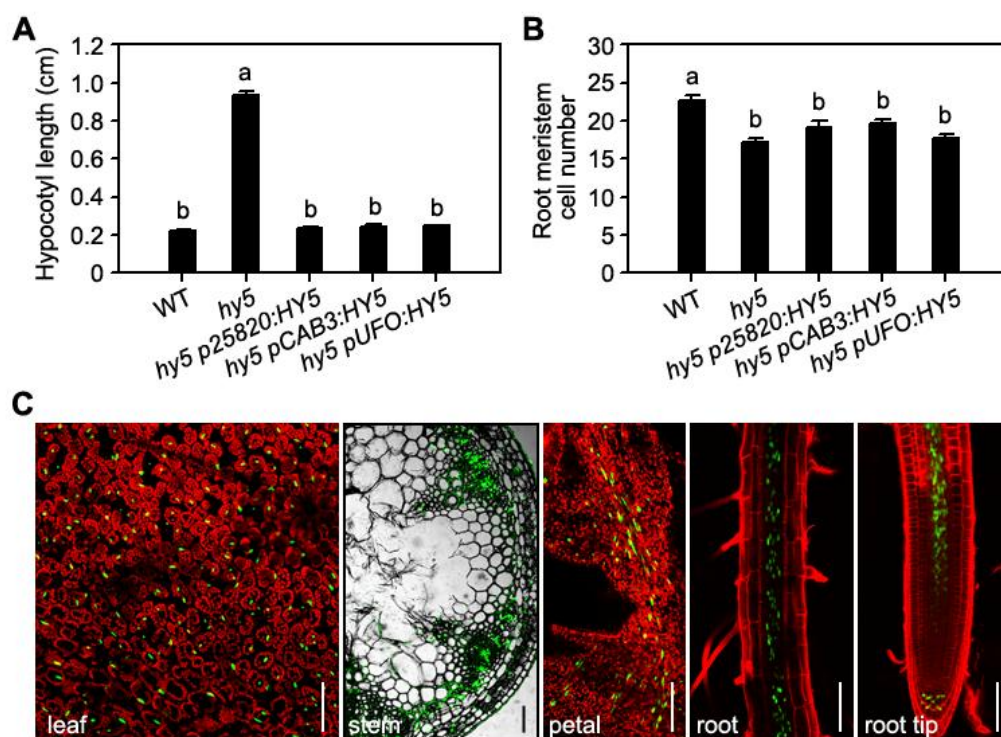


图 3.14 *HY5* 基因的细胞非自主性表现。

Figure 3.14 Non-cell-autonomous function of *HY5* gene.

Hypocotyl length(A) and root meristem cell number(B) of 6 d light-grown tissue specific promoter driving *HY5* gene transgenic lines, values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at the 95% confidence level, $n > 20$ seedlings. (C) Ectopic distribution of *HY5*-GFP signal in transgenic lines expressing *HY5*-GFP in shoot specifically, scale bar, 100 μ m. The sequence of primers to amplify promoters is shown in Appendix.1.

作为 COP1 蛋白调节的下游组分，*HY5* 基因是否也对根的生长具有“细胞非自主性”的功能呢？我们发现 *HY5* 基因在地上部、茎尖、根特异表达都能完全恢复 *hy5* 突变体的下胚轴长度表型（图 3.14A），这说明 *HY5* 基因在调控下胚轴长度方面具备细胞非自主性的能力。但是，我们同时也发现 *HY5* 基因在地上部、茎尖、根特异表达均不能完全恢复 *hy5* 突变体的根尖分生细胞数目的表型（图 3.14B），这暗示着在 *hy5* 突变体的背景下 *HY5* 基因在调控根尖表型方面很可能并不具备细胞非自主性的能力。然而，情况并非如此简单，我们在组织特异性表达 *HY5*-GFP 的转基因拟南芥中检测到 *HY5*-GFP 蛋白的异位分布，如图 3.14C，以在地上部特异表达 *HY5*-GFP 融合

基因的 *hy5 pCAB3:HY5-GFP* 转基因拟南芥为例，我们不仅可以在叶肉细胞中检测到 HY5-GFP 信号，而且在根（包括根尖），乃至花瓣细胞这些所谓的“库”中也检测到非常明显的信号。此外，HY5-GFP 信号在茎中主要分布在韧皮部处（图 3.14C），这也暗示着 HY5-GFP 信号很可能通过维管系统发生长距离运输。

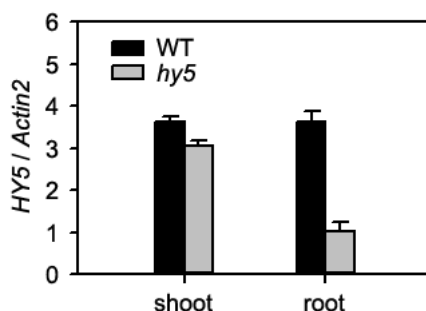


图 3.15 HY5 突变对自身转录水平的影响。

Figure 3.15 Effect of loss of HY5 function on the transcription of *HY5* gene in shoots and roots.

Total RNA were isolated from shoots and roots of 7 dpg shoot (L)/root (D) growing seedlings, RT-qPCR was subsequently made to analyze gene expression, qPCR results were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. The sequence of primers used in qPCR is shown in Appendix.2.

既然地上部表达的 HY5 蛋白可以异位至根部（图 3.14C），为何 HY5 基因只在地上部发挥细胞非自主性功能（图 3.14A），而在根尖没有表现出非自主性的功能呢（图 3.14B）？这很可能是由于 HY5 基因在地上部和根部表达受到的调控存在着差别所引起的。因为我们进一步研究发现在 *hy5* 突变体中，HY5 基因的转录水平在根中相比野生型显著地降低，而地上部则没有显著的变化（图 3.15）。需要注意的是，我们此处用到的 *hy5* 突变体的碱基突变形式是第 2 个密码子由 CGA 突变为 TGA 导致翻译终止，结合上述 HY5 基因在该突变体中的空间差异（图 3.15），说明 HY5 基因在根部的表达依赖于 HY5 蛋白的正常功能。而本文组织特异表达 HY5 基因是以 *hy5* 突变体为背景的，这很可能阻止了 HY5 基因的“细胞非自主性功能”在根部的发挥（图 3.14B），对此我们将在本文的 3.7 部分展开阐述。

总之，结合根尖分生活动对地上光照状态的反应（图 3.12）以及“细胞非自主性”表型的检测（图 3.13 和 3.14），这暗示着 COP1 蛋白下游的组分 HY5 基因很可能参与组成光调控根生长这个过程的“胞间光信号”。

3.6 HY5 蛋白能从地上部移动至根部并调控主根的生长

因为光调控根生长这个过程的“胞间光信号”具备系统性信号的特征，即可以在较远的细胞或器官间进行穿梭，所以为了检测 *HY5* 基因的产物究竟是否具备系统信号可移动的特征，我们将维管束特异表达 *HY5-GFP* 融合基因的转基因拟南芥 *hy5 pSUC2:HY5-GFP* 幼苗的地上部作为接穗，嫁接到作为砧木的 *hy5* 突变体的根上（图 3.16A），通过检测能否在 *hy5* 根中观察到 *HY5-GFP* 信号来检测 *HY5* 基因产物是否存在细胞间穿梭性。

结果显示，我们不仅在接穗的叶片中检测到 *HY5-GFP* 信号（图 3.16B），而且还在砧木 *hy5* 突变体的根中也观察到明显的信号（图 3.16D 和 F），而同时对照嫁接组合（*hy5/hy5*）的砧木中并没有检测到该信号的存在（图 3.16C 和 E）。*HY5-GFP* 信号的上述表现符合系统性信号可移动的特征。进一步 RT-qPCR 分析发现，相当于突变体的阴性对照中 *HY5-GFP* mRNA 被计算出的水平，我们在观察到 *HY5-GFP* 信号的砧木 *hy5* 根中并没有检测到 *HY5-GFP* mRNA 的存在（图 3.16G），这说明是 *HY5-GFP* 蛋白具有从地上部长距离移动至根部的能力。

此外，从图 3.16D 可以看出，长距离移动过程的 *HY5-GFP* 蛋白主要分布在维管束中近似韧皮部的位置，暗示着 *HY5* 蛋白在拟南芥体内很可能主要是通过维管系统的韧皮部作为通道进行细胞间的长距离移动。

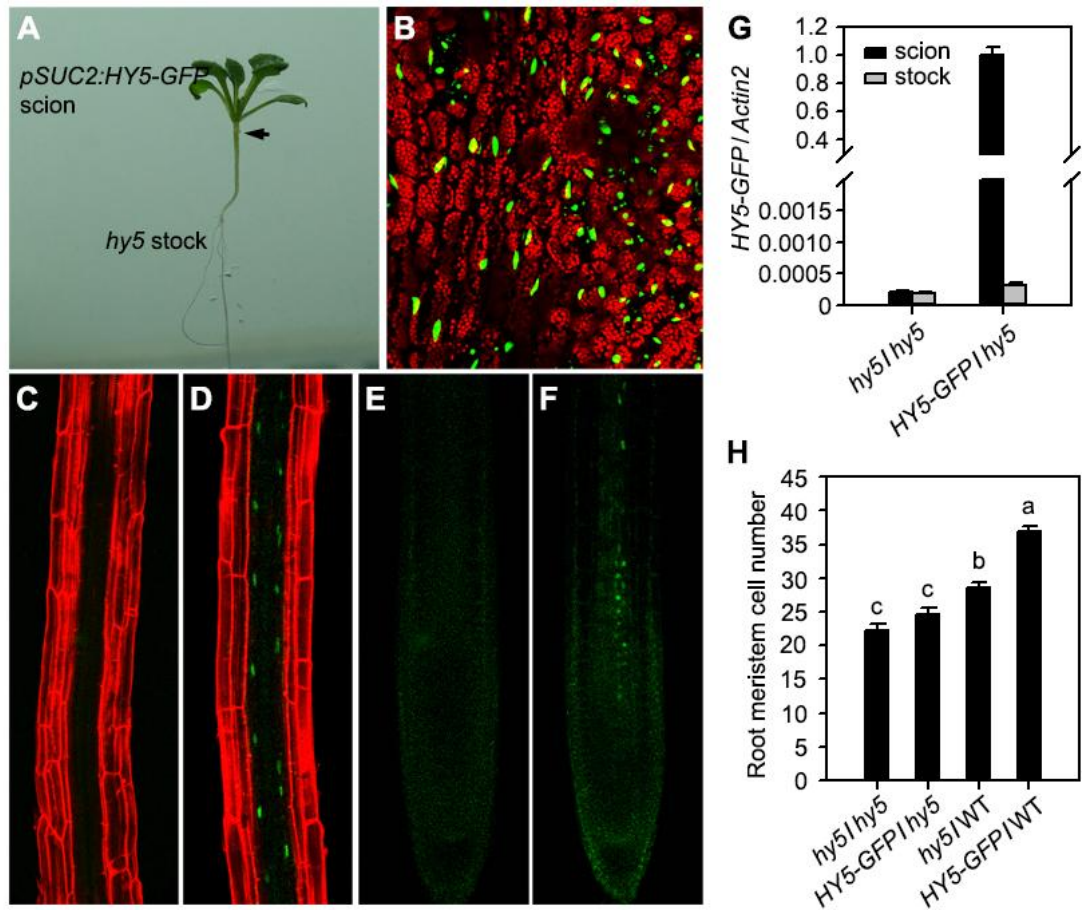


图 3.16 HY5 蛋白能够从地上部长距离移动至根部，并依赖于根部 *HY5* 基因来促进主根的生长。

Figure 3.16 HY5 protein moves long distance from shoot to root to promote primary root growth in a root-*HY5*-dependent manner.

(A) Grafting experiment using 3 dpg *hy5* *pSUC2:HY5-GFP* transgenic plant as scion and *hy5* mutant as stock (*hy5pSUC2:HY5-GFP/hy5*), and *hy5/hy5* graft as negative control. Arrowhead indicates junction of scion and stock. (B-G) *HY5-GFP* protein shows long-distance movement. For *hy5pSUC2:HY5-GFP/hy5*, *HY5-GFP* signal was not only detected in leaf of scion (B), but also obviously found in root (D) and root tip (F) of stock. Meanwhile, no signal found in *hy5/hy5* stock (C and E). (G) RT-qPCR analysis of the level of *HY5-GFP* mRNA. Results were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method, and the sequence of primers used in qPCR is shown in Appendix.2. (H) Root meristem activity of grafting chimera. Grafting experiment was conducted using 3 dpg *hy5* *pSUC2:HY5-GFP* transgenic plant or *hy5* separately as scion, with *hy5* or wild type as stock. 7 d later successful graft chimeras were selected to measure the primary root length. Values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at the 95% confidence level, $n > 15$ seedlings.

前面我们发现胞间光信号促进了地下根部的生长(图 3.3),既然我们要检测 HY5 蛋白是否参与组成光调控根生长这个过程的“胞间光信号”,那么从地上部长距离移动下来的 HY5 蛋白是否能够促进根的生长呢?我们依然采用嫁接的方法检测地上部的 HY5 蛋白是否对根生长起到调控作用。结果如图 3.16H 所示,当以 *hy5* 突变体的根作为砧木进行嫁接后,接穗 *hy5 pSUC2: HY5-GFP* 转基因地上部相比于接穗 *hy5* 突变体并没有对砧木的根的分生能力起到明显的促进作用,同时对根的伸长也没有显著促进(数据未显示)。而有意思的是,当以野生型拟南芥的根作为砧木时,接穗 *hy5 pSUC2: HY5-GFP* 转基因相比于接穗 *hy5* 突变体则显著增加了根尖分生细胞数目(图 3.16H),同时对根的伸长也起到显著的促进作用(数据未显示)。上述结果说明来自地上部的 HY5 蛋白对根生长的调控必须依赖于根部 HY5 基因的正常功能。这种依赖性可以解释我们前面发现的在 *hy5* 突变体背景下地上部的 HY5 基因对根生长不具备细胞非自主性的现象(图 3.14B)。

HY5 蛋白表现出的胞间穿梭的长距离可移动性,以及来自地上部的 HY5 蛋白在根部 HY5 基因正常的情况下可以促进根的生长(图 3.14),都暗示着 HY5 蛋白参与组成了负责光调控地下根生长的“胞间光信号”。

3.7 HY5 蛋白在根部直接促进自身基因的表达

接着我们关注的是,地上部的 HY5 蛋白究竟是以一种怎样的作用方式依赖于根部 HY5 基因介导地上光照对根生长的调控的呢?与这个问题同样需要解释的是,既然野生型拟南芥的 HY5 基因在黑暗的根中是有较高水平表达的,与之在地上部的表达水平基本持平(图 3.15),那么植物为什么还需要 HY5 蛋白从地上部长距离移动至黑暗的根中呢?

我们发现, HY5 基因在地下根中的表达是以地上部见光为前提的,如图 3.17 所示,当野生型背景的 *pHY5:GFP* 转基因拟南芥地上部处于黑暗时,黑暗中根 GFP 信号相比于地上部见光时的水平显著降低。而将该 *pHY5:GFP* 杂交到 *hy5* 背景以后,发现 *hy5 pHY5:GFP* 拟南芥的根中 GFP 信号显著减弱,并且对地上部见光状态的变化也不再存在响应,持续维持在较低水平(图 3.17)。上述结果说明 HY5 蛋白对于植物依据地上光照状态决定在根部是否表达 HY5 基因起到非常关键的作用。

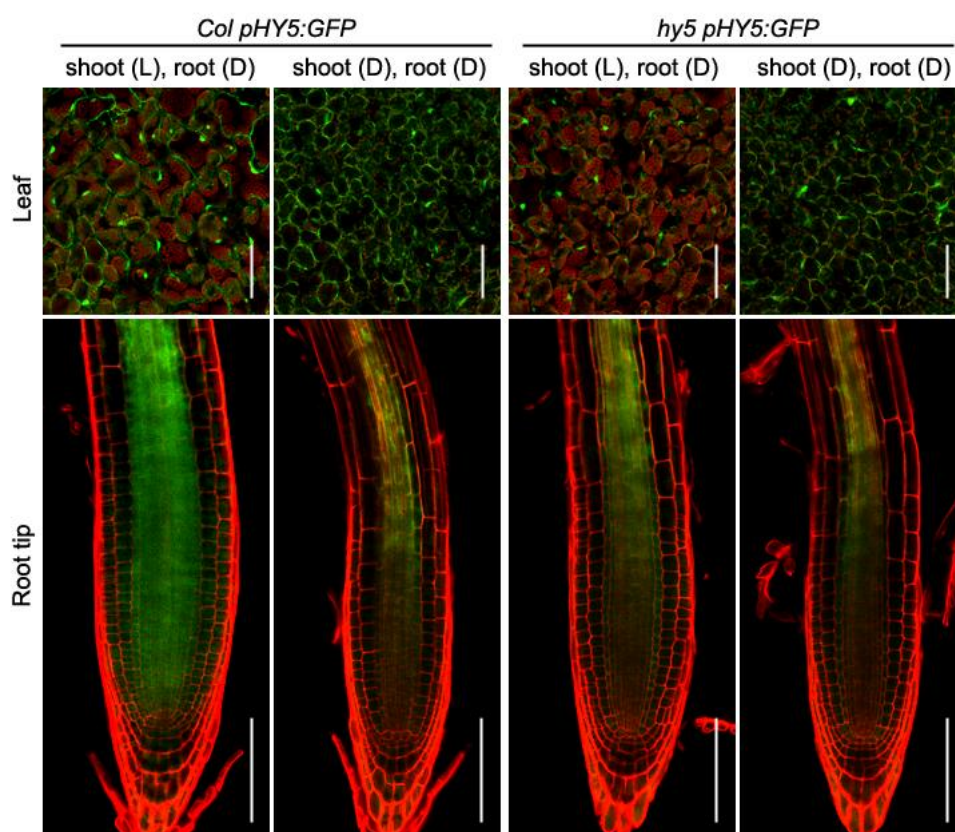


图 3.17 *HY5* 基因功能是其自身在根尖转录所必需的。

Figure 3.17 *HY5* gene function is essential for its own transcription in root.

Wild type background *pHY5:GFP* transgenic plant was crossed into *hy5* mutant to obtain *hy5 pHY5:GFP*. 3 dpg light-grown *pHY5:GFP* and *hy5 pHY5:GFP* seedlings were given light associated treatment shown as figure for another 3 d, then the GFP protein abundance of shoot or root was detected by confocal analysis. Scale bar, 100 μm .

地上部见光的状态下, *hy5 pHY5:GFP* 拟南芥根中 GFP 信号相比于野生型背景的显著减弱 (图 3.17), 这与本文前面 RT-qPCR 得到的数据是十分吻合的 (图 3.15), 二者都说明 *HY5* 基因在根部的转录依赖于有功能的 *HY5* 蛋白。

进一步通过嫁接实验, 我们发现来自地上部的 *HY5* 蛋白能够提高根部 *HY5* 基因的转录水平 (图 3.18), 也就是说, *HY5* 基因在根部的转录表达依赖来自于地上部的 *HY5* 蛋白。

上述结果说明, 地下根部 *HY5* 基因的表达是依赖于地上部见光状态的, 而这主要依靠地上部 *HY5* 蛋白长距离移动至根部激活当地 *HY5* 基因的转录来完成的。

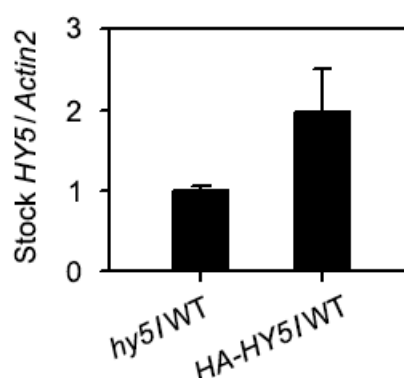


图 3.18 地上部的 HY5 蛋白促进根部 HY5 基因的表达。

Figure 3.18 HY5 protein derived from shoot promotes the expression of HY5 gene in root.

Total RNA were isolated from the stock part of different chimeras, *hy5* or *hy5 35S:HA-HY5* grafted to wild type seedlings, RT-qPCR was subsequently made to analyze gene expression, qPCR results were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method and the sequence of primers used in qPCR is shown in Appendix.2.

那么 HY5 蛋白对 *HY5* 基因的这种促进作用是直接的还是间接的呢？我们用染色质免疫共沉淀（ChIP）的方法检测 HY5 蛋白能否结合 *HY5* 基因的启动子区域。结果如图 3.19B 所示，在 *HY5* 基因转录起始位点上游特别是 -257~-58 区域，即如图 3.19A 所示的 6 号区域能够被 HY5 蛋白所大量富集。为了进一步确证该实验结果，我们使用 ChIP-qPCR 的 11 对引物分别扩增 ChIP 实验的起始材料 *hy5* 突变体和 *hy5 pCAB3:myc-HY5* 转基因的基因组 DNA，进行拷贝数比较。结果如图 3.19C，这些引物扩增的转基因植株与突变体的比值在各个区段（1~11 区段）基本上都接近 1，这个结果表明 ChIP-qPCR 扩增的只是内源 *HY5* 基因片段，并没有受外源插入 *HY5* 序列的影响。因此，我们的 ChIP-qPCR 的结果说明 HY5 蛋白确实可以结合自身基因的启动子区域。

进一步，凝胶阻滞实验（EMSA）结果显示，HY5 蛋白能够在体外直接结合 *HY5* 基因转录起始位点上游 -257~-58 区域中含有 G-box 元件的 DNA 片段（图 3.19D）。因此，结合 ChIP-qPCR 的结果（图 3.19B, C）以及 *HY5* 基因表达所受调控模式（图 3.18, 图 3.15），EMSA 实验的结果说明 *HY5* 基因的表达是受 HY5 蛋白直接靶向结合调控的，即 HY5 蛋白直接促进 *HY5* 基因的转录。

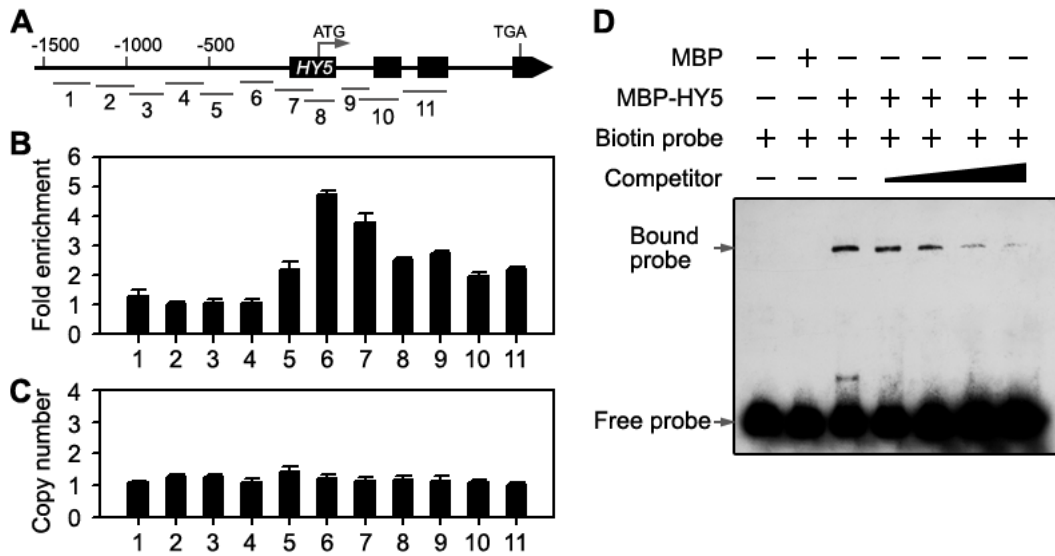


图 3.19 HY5 蛋白直接结合 *HY5* 基因的启动子区域。

Figure 3.19 HY5 protein directly binds to the promoter region of *HY5* gene.

(A) Schematic representation of *HY5* gene architecture. Thick and thin lines correspond to coding and noncoding regions, respectively. Bars with numbers indicate the DNA fragments tested by ChIP-qPCR. (B) Analysis of myc-HY5 enrichment in different regions of *HY5* promoter. Anti-myc was used to immunoprecipitate myc-HY5 protein and the amount of *Actin2* gene from the ChIP samples was quantified by qPCR to normalize the results between the control and test samples. (C) Analysis of the copy numbers of each indicated region of *HY5* promoter tested in the ChIP-qPCR. The sequence of primers used in qPCR is shown in Appendix.3. (D) EMSA experiment to confirm HY5 protein directly binds to the promoter region of *HY5* gene, and the sequence of probe is shown in Appendix.4.

此外，通过激光共聚焦显微镜观察 *hy5 pHY5:HY5-GFP* 转基因幼苗的根部，我们发现 HY5-GFP 蛋白其实在根尖各层细胞都是有分布的（图 3.20A）。虽然 HY5 蛋白能从地上部移动至根部（图 3.16），但移动至根部的 HY5-GFP 蛋白相对较少且只在根维管束细胞中能够被检测到（图 3.16D，3.20B），我们用图 3.20C 示意了从地上部长距离移动下来的 HY5 蛋白和根尖本地表达的 HY5 蛋白的空间分布。来自于地上部的 HY5 蛋白在根部激活本地 *HY5* 基因的转录表达这一现象的发现（图 3.15，图 3.17 和图 3.18），正好可以解释长距离 HY5 蛋白和根尖本地 HY5 蛋白的关系，即 HY5 蛋白作为胞间光信号移动至根部，通过“自我激活表达”的方式来放大胞间信号的作用，从而介导地上光照对根生长活动的调控。

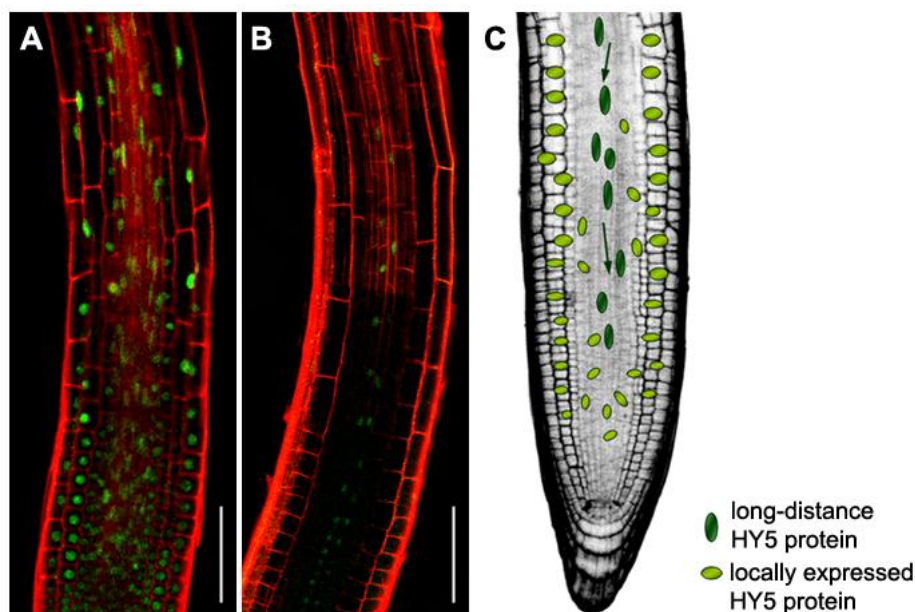


图 3.20 根尖本地表达的 HY5 蛋白与长距离移动至根部的 HY5 蛋白在根尖分布的比较。

Figure 3.20 Distribution of local HY5 protein and HY5 protein derived from shoot in root tip.

(A) HY5-GFP signal in root of *hy5 pHY5:HY5-GFP* transgenic plant. (B) HY5-GFP signal detected in the stock root of *hy5pSUC2:HY5-GFP/WT* graft chimera. (C) Model displaying the distribution of local HY5 protein and long-distance HY5 protein in root tip.

3.8 地上光照通过 HY5 调控根尖生长素极性运输进而调节根尖分生能力

我们的结果说明 HY5 蛋白能够参与胞间光信号介导光调控根的生长，那么 *HY5* 基因是如何调控根尖的分生能力进而调控根的生长的呢？我们在本文结果 3.3 中提到，虽然茎端合成的生长素并不参与胞间光信号对根尖分生能力的调控，但是生长素合成突变体 *wei2*、受体突变体 *tir-t* 以及信号途径组分 *axr2* 突变体的根尖分生活动对地上光照状态的变化并不敏感（图 3.11B），这说明地上光照对根生长发育的调控依然离不开根尖本地生长素的作用。

前人的研究表明，由 PIN 蛋白介导生长素极性运输所建立起来的生长素在根尖顶端至基部的梯度分布对于根尖分生组织的活动具有很强的导向作用(Blilou et al., 2005; Grieneisen et al., 2007; Osterlund et al., 1999; Sabatini et al., 1999)。既然地上光照对根生长的调控依然离不开根尖本地生长素的作用，那么 *HY5* 基因在根尖是否通过调控生长素的运输或分布来实现光对根生长的系统调控呢？

PIN1 蛋白对生长素在根尖向顶端的运输具有非常重要的作用,如图 3.21A 所示,我们发现 *pPIN1:PIN1-GFP* 的根部暴露在光下时,地上部的光照状态不会影响 PIN1-GFP 在根尖的水平 and 质膜定位;而当其根部处于持续黑暗时,相当一部分 PIN1-GFP 由质膜进入到液泡样囊泡中,根部 PIN1 蛋白在暗处中的表现跟地上部见光与否也不存在显著的相关性。虽然早在 2008 年 Laxmi 等人就报道了黑暗能够削弱根部 PIN1 蛋白的质膜定位并促进其被内吞囊泡循环至液泡样膜中(Laxmi et al., 2008),但我们的上述结果则更进一步说明地上光照并不对根尖 PIN1 蛋白质膜的定位存在系统性调控。同时, *hy5 hyh* 突变体背景下 PIN1 蛋白在根尖的水平 and 亚细胞定位对光的反应与野生型也不存在显著差异(图 3.21A)。

有意思的是,我们发现介导生长素在根尖向基部极性运输的 PIN2 蛋白对地上光照存在着明显的系统性反应,如图 3.21B 所示,当 *pPIN2:PIN2-GFP* 的地上部被持续黑暗处理一段时间后,一直见光的根尖其中的 PIN2-GFP 的水平会显著降低,表明根尖 PIN2 蛋白含量对光的反应是依赖于地上部的。不仅如此,我们还发现对处在黑暗中的根尖来说,其中的 PIN2-GFP 在地上见光时的水平显著高于地上处于持续黑暗时的水平(图 3.21B),表明地上光照确实可以调控根尖 PIN2 蛋白的水平。同时,我们也发现地上光照对根尖 PIN2 蛋白水平的调控是依赖于胞间光信号 HY5 蛋白的作用的,因为 *HY5* 及其同源基因 *HYH* 基因的突变使得 PIN2-GFP 在根尖中的含量始终维持在较低的水平,丧失了野生型原有的对地上光照状态变化的反应(图 3.21B)。

此外,我们还发现光照不仅影响根尖 PIN2 蛋白的含量,而且还影响其亚细胞定位状态(图 3.21B),这与 Laxmi 等人之前的关于光信号调控拟南芥根尖 PIN2 蛋白水平和亚细胞定位的报道是一致的(Laxmi et al., 2008),即黑暗状态下 PIN2 蛋白在根尖细胞中除了定位于质膜以外,还有相当一部分定位于液泡样的囊泡中(图 3.21B)。重要的是,我们同时也发现,与光调控根尖 PIN2 蛋白水平依赖地上部有所不同,光信号促进根尖 PIN2 蛋白的质膜定位是以根直接见光为前提条件的,而并不受地上光照状态的影响(图 3.21B)。这暗示着在正常生长的植物的根尖部位, PIN2 蛋白的亚细胞定位很有可能并不受光信号刺激的调控,而亚细胞定位的动态变化可能受与光照相关的其他间接因素(比如生物钟节律等)调节。关于根尖 PIN1 蛋白及 PIN2 蛋白在质膜与囊泡定位动态平衡对光照的适应,我们将在本文第四章作以讨论。

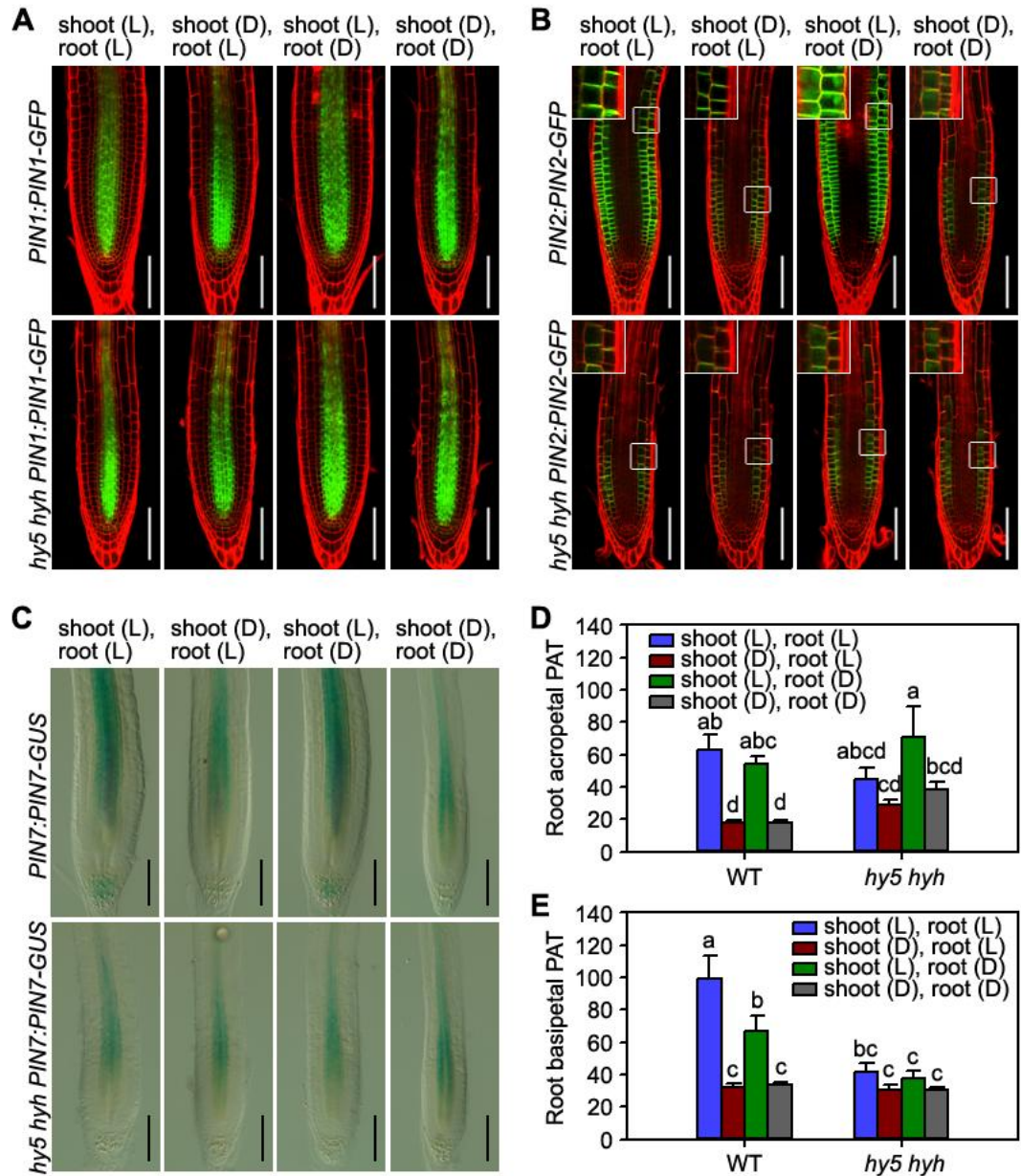


图 3.21 *HY5* 基因及其同源基因介导地上光照对根尖生长素极性运输的调控。

Figure 3.21 *HY5* and its homolog mediated root local auxin transport regulated by light.

(A-C) *HY5* mediated response of PIN1 (A), PIN2 (B) and PIN7(C) in root to light stimulus. 3 dpv light-grown seedlings were treated by light or dark as shown, distribution of each protein fused with GFP or GUS reporter in root tip was analyzed, scale bar, 100 μ m. (D and E) *HY5* mediated regulation of polar auxin transport by light systemically or locally. 3 dpv light-grown seedlings were locally treated by light or dark shown as figure, then root acropetal polar auxin transport (D) and root basipetal polar auxin transport (E) were analyzed. Values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at the 95% confidence level, $n > 15$ seedlings.

与此同时，对生长素极性运输同样发挥重要作用的 PIN7 在根尖的水平对光照的反应与 PIN2 蛋白表现得十分类似（图 3.21B, C）。概括地讲，根尖 PIN7 蛋白含量对光的反应很大程度上依赖于地上部的光照状态，而且 HY5 基因及其同源基因在此过程中也同样发挥了非常重要的功能（图 3.21C）。

既然对根尖生长素极性运输发挥关键作用的 PIN 蛋白的水平受到 HY5 基因介导的光信号的调节，那么根尖生长素的极性运输究竟是否因此受到相对应的调节呢？我们以同位素 ^3H 标记的吲哚乙酸（ ^3H -IAA）为外源生长素施加到待检测幼苗的相应的部位，检测幼苗根尖生长素的极性运输能力（Polar Auxin Transport, PAT）。结果显示，光信号调控根尖生长素的极性运输是依赖于植物地上部分的，因为地上部处于持续黑暗状态时根尖生长素的向顶端极性运输（图 3.21D）和向基部极性运输（图 3.21E）都显著受到了抑制，而且地上部见光能够使得黑暗中根尖生长素的两种极性运输能力维持在较高水平（图 3.21D, E）。

根尖生长素的向基部极性运输能力对植物受光状态的响应与 PIN2 蛋白水平的适应性变化是完全相对应的（图 3.21B, E），表明地上光照至少是部分通过根尖 PIN2 蛋白水平的变化调控了生长素的极性运输能力，进而调节根尖的分生能力。同时，HY5 基因及其同源基因 HYH 在上述过程起到了非常关键的作用，如同 PIN2 蛋白水平在 *hy5 hyh* 突变体背景下的表现（图 3.21B），根尖生长素的向基部极性运输能力在 *hy5 hyh* 突变体背景下对光照反应的敏感性显著降低，几乎丧失了对地上光照变化的反应（图 3.21E）。

而生长素在根尖的向顶端极性运输在此过程中与 HY5 基因的关系则并不像向基部运输那样明朗，因为 *hy5 hyh* 突变体根尖的向顶端极性运输能力依然像野生型一样对植物受光状态变化保持着较强的响应（图 3.21D）。虽然介导生长素在根尖向顶端运输的 PIN7 蛋白水平对地上光照状态的响应与 PIN2 十分相似，但是可能因为 PIN1 蛋白的干扰，使得向顶端极性运输对 HY5 基因的依赖性并不那么明显，对此还需要更深入的研究。

此外，我们发现 HY5 在转录水平上增加了根尖 PIN2 和 PIN3 基因的表达，而在此水平上对 PIN1 和 PIN7 的表达不存在调控（图 3.22），暗示着 HY5 介导的光照对根尖 PIN7 蛋白水平的增加很可能发生在转录后水平上。虽然 HY5 促进了 PIN2 基因

的转录，但我们通过染色质免疫共沉淀在 *PIN2* 基因启动子上游近 2kb 中并未检测到被 HY5 蛋白富集的区域（数据未显示）。

结合 COP1-HY5 信号模块对光照调控根尖分生组织的介导（图 3.11），本节上述的结果表明，地上光照通过系统信号 HY5 调控了由根尖 PIN 蛋白介导的生长素极性运输，并进而调节根尖分生组织的大小。

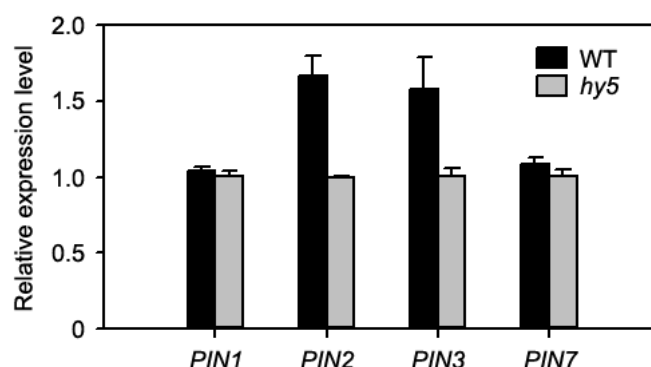


图 3.22 *HY5* 基因对根尖 *PIN* 基因表达的影响。

Figure 3.22 Effect of *HY5* gene on root *PIN* gene expression.

Root tip (approximate 5 mm) of 6 dpg light-grown wild type and *hy5* were used to analyze the expression of respective *PIN* gene by RT-qPCR. Results were calculated using $\Delta\Delta C_t$ method and *Actin2* gene was used to normalize the data. The sequence of primers used in qPCR is shown in Appendix.2.

另外, Dello Ioio 等人报道生长素信号途径的 *IAA3*/*SHY2* (*SHORT HYPOCOTYL 2*) 基因通过调节 *PIN* 基因的表达调控根尖细胞的分生、分化过程并最终影响根尖分生组织的大小(Dello Ioio et al., 2008; Tian et al., 2002)。因此，同样是通过 PIN 调节根尖分生能力的 HY5 与 SHY2 是否存在关系呢？

我们通过 RT-qPCR 分析发现，*SHY2* 基因在 *hy5* 突变体根尖中的表达量是显著高于野生型（图 3.23A），表明 *HY5* 在根尖抑制 *SHY2* 基因的转录，这与 Tian 等人报道的光照抑制 *SHY2* 基因表达的结果是一致的(Tian et al., 2002)。不仅如此，我们进一步研究发现 *HY5* 对 *SHY2* 基因表达的调控是一种直接的作用方式，因为 ChIP-qPCR 分析表明 *SHY2* 基因转录起始位点上游约 200bp 区域被 *HY5* 蛋白大量富集（图 3.23C, D），而且 EMSA 实验也证明 *HY5* 蛋白在体外能直接结合该区域中含 G-box 的 DNA 片段（图 3.23E）。

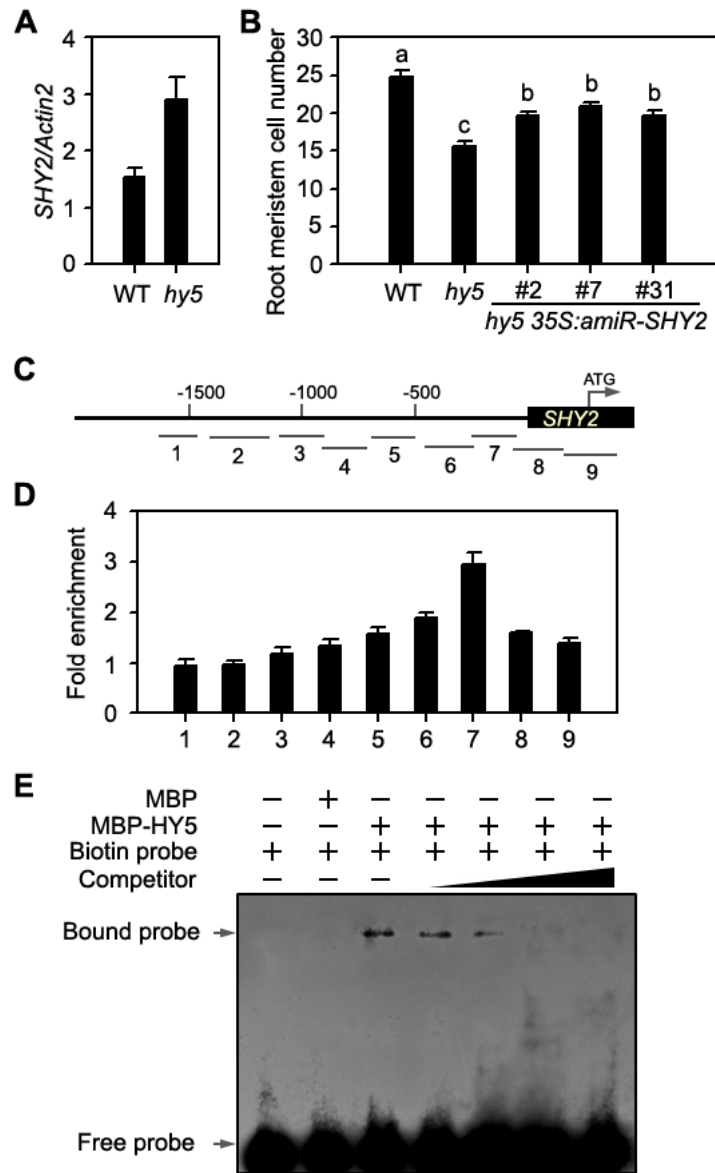


图 3.23 HY5 在根尖直接抑制 *SHY2* 基因的表达并调节根尖分生组织。

Figure 3.23 Direct suppression of *SHY2* gene by HY5 protein regulates root meristem activity.

(A) *SHY2* expression level increases in *hy5* mutant root tip. Root tip (approximate 5 mm) of 6 dpv light-grown wild type or *hy5* on the MS medium were used to analyze the expression of *SHY2* gene by RT-qPCR. Results were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method, and *Actin2* gene was used to normalize the data. The sequence of primers used in qPCR is shown in Appendix.2. (B) Downregulation of endogenous *SHY2* expression partially rescues the root meristem phenotype of *hy5* mutant. Values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at the 95% confidence level. (C) Schematic representation of *SHY2* gene promoter region. Thick and thin lines

correspond to coding and noncoding regions, respectively. Bars with numbers indicate the DNA fragments tested by ChIP-qPCR. (D) Analysis of myc-HY5 enrichment in different regions of *SHY2* promoter. Anti-myc was used to immunoprecipitate myc-HY5 protein and the amount of *Actin2* gene from the ChIP samples was quantified by qPCR to normalize the results between the control and test samples. The sequence of primers used in qPCR is shown in Appendix.3. (E) EMSA experiment conducted to confirm HY5 protein directly binds *SHY2* gene promoter region, and the sequence of probe is shown in Appendix.4.

SHY2 通过调控 *PIN* 介导的生长素极性运输来抑制细胞分裂、促进细胞分化，最终减少根尖分生细胞的数目(Dello Ioio et al., 2008)，而我们发现相比野生型，*hy5* 突变体的根尖分生细胞数目在光下变少并且其根尖 *SHY2* 基因的表达水平显著升高（图 3.13，图 3.23A），那么 *HY5* 基因对于根尖分生组织的调控是否依赖于 *SHY2* 呢？

“人工 micorRNA”（artificial microRNA）技术可有效地降低靶基因的表达水平(Ossowski et al., 2008; Schwab et al., 2006)。因此，我们在 *hy5* 突变体中转入能在转录后水平上特异减少内源 *SHY2* 成熟 mRNA 含量的人工 microRNA 载体（载体设计自在线软件 <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>），获得 *hy5 35S:amiR-SHY2* 转基因拟南芥，分析 *SHY2* 基因水平的降低对 *hy5* 突变体根尖分生能力的恢复情况。结果如图 3.23B 所示，*hy5 35S:amiR-SHY2* 转基因幼苗的根尖分生细胞数目相比 *hy5* 突变体显著增多，但并没完全恢复至野生型水平，这表明 *HY5* 基因很可能只是部分通过调控根尖 *SHY2* 基因的表达来调节根尖分生组织的活动。

3.9 地上光照依赖 HY5 调控根对氮的吸收并协调植物碳氮平衡

一般来讲，光照的增强可以促进植物的光合作用(Eberhard et al., 2008; Sargent, 1940)。而以光合作用产物蔗糖为代表的碳（C）与植物大量需求的元素氮（N）之间的平衡是植物正常生长发育所必需的(Stitt and Krapp, 1999; Zheng, 2009)，因此，地下根系从土壤中获取氮源与地上部通过光合作用固定碳这两个过程，二者维持协调的平衡状态是植物系统适应光照变化的重要条件。

事实上，人们早就在很多种植物中发现根从土壤吸收氮的过程是受到光照促进的(Bot and Kirkby, 1992; Hansen, 1980; Scaife and Schloemer, 1994)。在较高 pH、氧气充

足的土壤环境下,拟南芥的根会更多地吸收 NO_3^- 以获取氮源,而并非 NH_4^+ (Miller and Cramer, 2005)。我们在拟南芥中也发现根吸收氮 (NO_3^-) 的速率也随着外界光强的增加而增大 (图 3.24)。而有意思的是, *hy5* 突变体根吸收 NO_3^- 的速率对地上光照的变化几乎不再存在响应 (图 3.24), 这说明光信号依赖 *HY5* 基因实现对拟南芥的根吸收氮的调节。

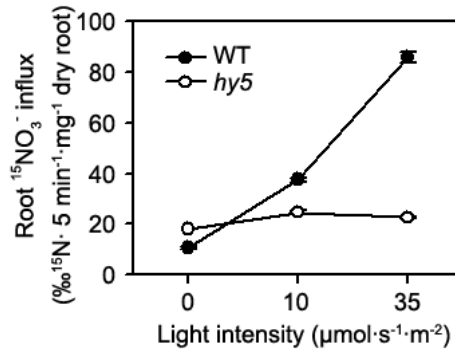


图 3.24 光照依赖 *HY5* 基因促进根系对氮的吸收。

Figure 3.24 *HY5* gene is essential for light to promote nitrate uptake by root in *Arabidopsis*.

Light-grown 10 dpg wild type and *hy5* mutant seedlings were given variable light quantities for another 4 d, root nitrate influx was measured simultaneously.

目前认为,植物从土壤中获取矿质元素主要是通过根中一系列的转运蛋白实现的 (Amtmann and Blatt, 2009; Gojon et al., 2009),拟南芥根部负责吸收 NO_3^- 的主要是 *NRT* 基因家族编码的转运蛋白 (Wang et al., 2012)。我们发现,特别是在较强的光照范围内 ($10 \sim 35 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, 培养皿),根中 *NRT* 主要基因的表达随着地上光照的增强而增加 (图 3.25A),这与我们的根吸收 NO_3^- 的速率随着地上光强的增加而增大的结果是非常吻合的 (图 3.24)。之前的研究发现编码高亲和力硝态氮转运蛋白的 *NRT2.1* 基因对拟南芥根吸收 NO_3^- 起到了主要的贡献 (Remans et al., 2006b),我们这里与 *hy5* 的根吸收 NO_3^- 对光强变化丧失反应相一致的是, *NRT2.1* 基因的表达在 *hy5* 突变体根中也持续保持较低的水平 (图 3.25A),这也说明地上光照对根中 *NRT2.1* 表达的促进依赖于胞间光信号 *HY5* 蛋白的功能。对于被认为更多地发挥氮浓度感应器 (sensor) 作用的 *NRT1.1* 基因 (Ho et al., 2009),它在根中随着地上光强变化的表达趋势虽然类似于 *NRT2.1* 基因,但调控幅度以及对 *HY5* 的依赖程度明显不够 (图 3.25A)。而同样编码高亲和力转运蛋白的 *NRT3.1* 基因的表达对光强的变化并不是特别敏感 (图 3.25A),

这暗示着地上光照很可能并不主要通过调控 *NRT3.1* 基因的表达来调节根对 NO_3^- 的吸收过程。

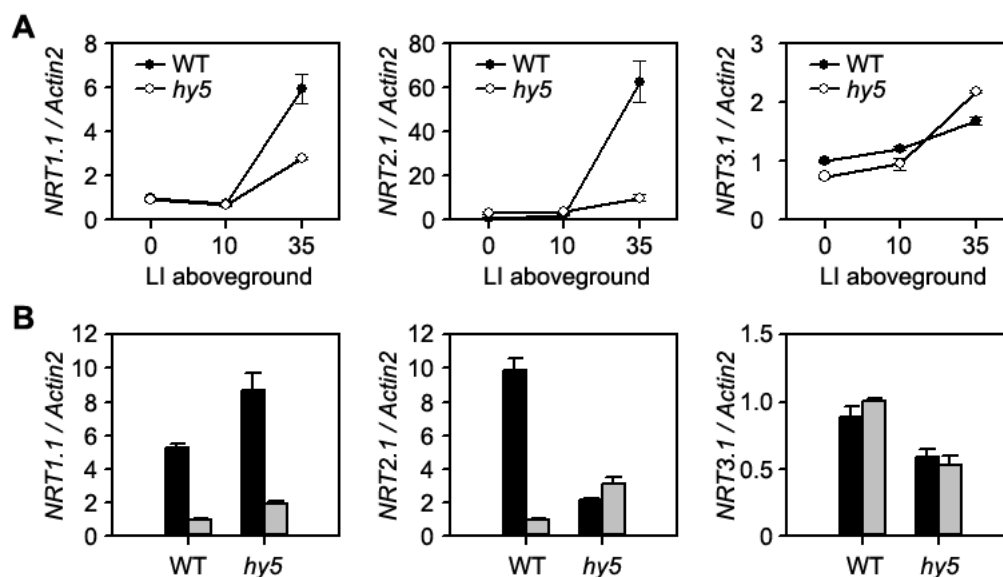


图 3.25 地上光照通过 *HY5* 调控 *NRT2.1* 基因的表达。

Figure 3.25 *HY5* mediates light aboveground promoted *NRT2.1* gene expression in root.

(A) Response of root nitrate transporter genes expression to light aboveground. Shoot of 3 dpg light-grown wild type and *hy5* mutant seedlings were exposed to different intensities of light for another 3 d, while roots were kept in dark simultaneously. Then total RNA were isolated from nearly all root part, RT-qPCR was subsequently made to analyze the expression of uptake genes for nitrate. LI indicates light intensity aboveground (light intensity, $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). (B) Contribution of shoot derived light to the expression of genes for nitrate uptake. Root of 3 dpg light-grown wild type and *hy5* mutant seedlings were exposed to light for another 3 d, simultaneously shoots were given light or not. Then total RNA was isolated from nearly all root part, RT-qPCR was subsequently made to analyze the expression of genes. Results were calculated using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method, and *Actin2* gene was used to normalize the data. The sequence of primers used in qPCR is shown in Appendix.2. Dark column indicates shoot (L), root (L), and grey column indicates shoot (D), root (L). L, light; D, dark.

不仅如此，我们还发现在根直接见光的情况下，地上部的持续黑暗处理使得根部 *NRT1.1* 基因和 *NRT2.1* 基因的表达都显著下调（图 3.25B），暗示着地上光照依赖于地上部产生信号调控根对氮的吸收，这与科学家们之前的关于拟南芥根内 *NRT2.1* 基因

的转录受到地上部某种系统性信号的调控的推测可谓是不谋而合(Forde, 2002a)。重要的是，我们发现系统信号 HY5 蛋白是实现地上光照调控氮吸收过程的关键，因为实验结果显示在 *hy5* 突变体根中 *NRT2.1* 基因表达水平的高低与地上光照状态并不存在显著的相关性（图 3.25B）。而对于此过程中 *NRT1.1* 基因的表达变化趋势，*hy5* 突变体并未表现出与野生型明显的不同（图 3.25B）。

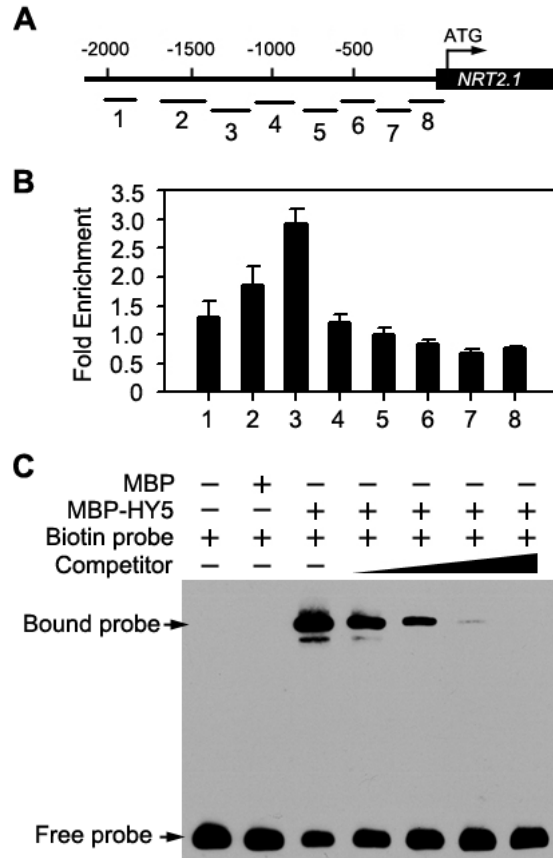


图 2.26 HY5 蛋白直接结合 *NRT2.1* 基因的启动子。

Figure 3.26 HY5 protein directly binds to the promoter region of *NRT2.1* gene.

(A) Schematic representation of *NRT2.1* gene promoter. Thick and thin lines correspond to coding and noncoding regions, respectively. Bars with numbers indicate the DNA fragments tested by ChIP-qPCR. (B) Analysis of myc-HY5 enrichment in different regions of *NRT2.1* promoter. Anti-myc antibody was used to immunoprecipitate myc-HY5 protein and the amount of *Actin2* gene from the ChIP samples was quantified by qPCR to normalize the results between the control and test samples. The sequence of primers used in qPCR is shown in Appendix.3. (D) EMSA to confirm HY5 protein directly binds to the promoter region of *NRT2.1* gene, and the sequence of probe is shown in Appendix.4.

上述结果表明,地上光照依赖系统信号 HY5 蛋白的作用调控 *NRT2.1* 基因的表达进而调节根吸收氮的过程。那么 HY5 蛋白在根部是如何调控 *NRT2.1* 基因表达的呢? ChIP-qPCR 的结果显示 *NRT2.1* 基因转录起始位点上游约 1300bp 的区段 DNA 能被 HY5 蛋白大量富集(图 3.26A, B),同时, EMSA 的结果也表明 HY5 蛋白可以在体外直接结合该段区域的 DNA(图 3.26C)。因此,这些结果表明 HY5 蛋白在体内结合 *NRT2.1* 基因相应的启动子区域,直接促进 *NRT2.1* 基因的表达。

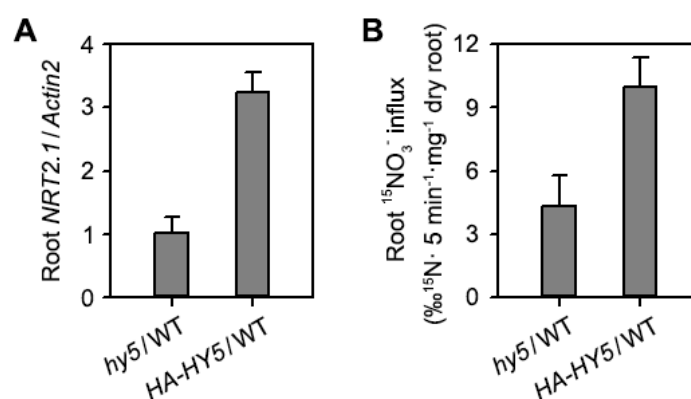


图 2.27 地上部 HY5 蛋白促进根部 *NRT2.1* 基因的表达并提高根吸收氮的速率。

Figure 2.27 HY5 protein derived from shoot could promote the expression of *NRT2.1* gene and increase the uptake of nitrate of root.

Shoots of *hy5* mutant and *hy5 35S:HA-HY5* seedlings were grafted to root part of wild type seedlings respectively, roots of survival chimeras were used to isolate RNA to analyze gene expression (A) and simultaneously used to detect root nitrate influx (B). Sequence of primers used is shown in Appendix.2.

重要的是,我们的嫁接实验结果表明,来自于地上部的 HY5 蛋白能够显著促进根部 *NRT2.1* 基因的表达(图 2.27A)并且能够明显地提高根部对的 NO_3^- 的吸收速率(图 2.27B)。这说明 HY5 蛋白作为胞间光信号的重要组分不仅参与地上光照对根生长的调控,而且还对介导地上光照调控根部的营养吸收(我们这里特指氮元素)起到了至关重要的作用。

研究表明,氮在一定范围内能够增加植物生物量(Khoshgoftarmanesh et al., 2011; Kohls and Baker, 1989; Traore and Maranville, 1999)。我们发现,在培养基中 NO_3^- 浓度不超过 25 mM 的范围内,野生型拟南芥的鲜重以及干重都随着 NO_3^- 浓度的提高而显著增加(图 3.28A, B);而 *hy5* 突变体的鲜重在 NO_3^- 浓度为 5 mM 时就已经达到最高

峰，特别是干重在不同的 NO_3^- 浓度条件下近乎处于保持不变的状态（图 3.28A, B），这很可能是因为 *hy5* 根中较低水平的 *NRT2.1* 蛋白导致 *hy5* 突变体的根转运 NO_3^- 的能力在外界较少 NO_3^- 含量的条件下基本上就已经达到饱和。

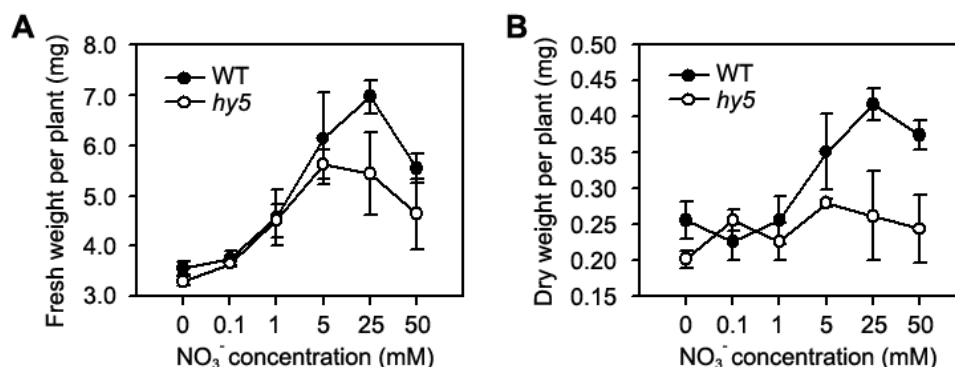


图 3.28 *HY5* 基因调节氮素浓度对拟南芥生物量的影响。

Figure 3.28 *HY5* gene affects plant biomass in variable nitrogen concentration in petri dish.

3 dpg light-grown wild type and *hy5* mutant seedlings were transferred to the medium containing different concentration of nitrate respectively for another 10 d, fresh weight(A) and dry weight(B) of seedlings were analyzed, $n > 50$ seedlings.

光强的增加不仅促进植物的光合作用，我们的实验结果表明，地上光照的增强也同时促进根对氮的吸收，而且 *HY5* 蛋白作为系统信号通过直接调控 *NRT2.1* 基因的表达介导了地上光照对根吸收氮的调控。地上部光合固碳（C）与根部吸收氮（N）保持协调状态是植物实现整体碳氮（C/N ratio）平衡的必要条件，有研究表明 *NRT2.1* 基因对于协调拟南芥碳氮响应发挥了重要的功能(Little et al., 2005)。既然 *HY5* 蛋白对根部 *NRT2.1* 基因的表达具有直接的调控作用，那么我们想知道 *HY5* 基因在植物整体 C/N 平衡以适应光照变化的过程中是否发挥协调作用呢？

碳氮平衡模型（CNBM，也称“环境约束假说”）认为植物体内的 C/N 状态基本上决定了植物在特定生存环境条件下的生长态势(Bryant et al., 1983; Tuomi et al., 1988)，根据该模型，C/N 保持平衡是植物适应生存环境变化的物质基础。我们分析温室土培条件下在不同光强中生长的拟南芥地上部的 C/N 比值，结果显示野生型拟南芥地上部的 C/N 比值在外界光强变化时基本上保持稳定（图 3.29），而同时 *hy5* 突变体的 C/N 比值随着光强的增加而持续变大（图 3.29），表明 *HY5* 基因功能的缺失已

经不能保证拟南芥在光照变化的生存条件下维持碳氮平衡。对于 *hy5* 突变体地上部在强光下 C/N 比值的增加,最可能原因是 *hy5* 突变体的根部并不能随环境的变化吸收更多的氮而导致了植物碳氮状态的失调。

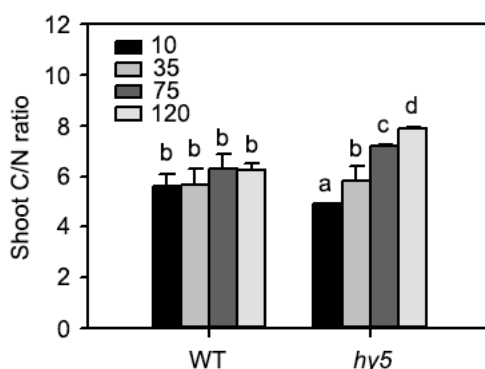


图 3.29 拟南芥地上部 C/N 值对外界光照强度变化的反应。

Figure 3.29 Response of plant C/N balance to changing light quantity.

21 dpg wild type and *hy5* mutant seedlings grown under different light quantities in greenhouse were dried thoroughly to measure C/N ratio. Values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at the 95% confidence level. $n > 30$ seedlings.

HY5 基因究竟是如何实现协调 C/N 平衡保证植物适应环境中光强变化的呢? 之前有报道称 *hy5* 突变体根中叶绿体数量和叶绿素含量降低(Oyama et al., 1997), 我们也发现 *hy5* 地上部的叶绿素含量相比野生型显著减少(图 3.30A)。叶绿素含量的减少会在一定程度上影响地上部的光合作用(Fleischer, 1935; Hallik and Kull, 2008; Mauzerall, 1976), 作为光合产物主要形式的蔗糖的含量也理应受到影响(Everson et al., 1967)。有研究表明, 催化海藻糖-6-磷酸酯酶(T6P)合成的 *TPS1* 基因的表达水平可以定量反映碳水化合物的含量, 特别是蔗糖含量的高低(Wahl et al., 2013), 我们发现 *TPS1* 基因在 *hy5* 地上部的表达水平相比野生型显著下降(图 3.30B), 这暗示着 *HY5* 基因也在拟南芥地上部介导了光照对碳水化合物(主要是蔗糖)的水平调控。

不仅如此, *SWEET* 基因家族对光合产物蔗糖从合成部位叶肉细胞转运到韧皮部发挥了关键的作用(Chen et al., 2012b), 我们发现 *SWEET* 基因家族中的很多成员的表达也在 *hy5* 突变体地上部相比于野生型显著下调(图 3.30C), 表明 *HY5* 基因对光合产物蔗糖自合成部位的外运起到正调控作用。这暗示着以蔗糖为代表的碳源(C)在植物体内的源和库之间的分配在某种程度上也很可能受到 *HY5* 基因的调控。

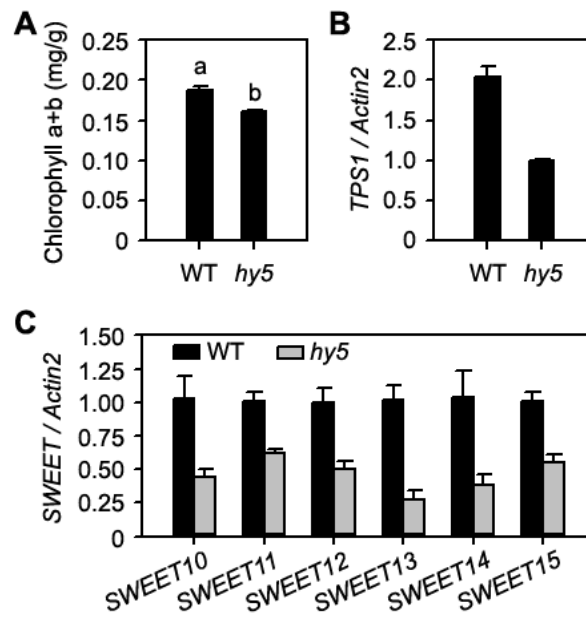


图 3.30 *HY5* 基因对地上部碳水化合物状态的影响。

Figure 3.30 Carbonhydrates status of shoot influenced by *HY5* gene.

(A) *HY5* gene regulates chlorophyll content of shoot. Shoots of 7 dpg light-grown wild type and *hy5* mutant seedlings were used to detect the content of chlorophyll a+b, values (means $\pm$ SE) with different letters were significantly different as determined by Tukey's tests at the 95% confidence level, $n > 20$. (B) *HY5* promotes the expression of *TPS1* gene in shoot. (C) Expression of *SWEET* genes for sucrose efflux in shoot is also regulated by *HY5*. Shoots of 7 dpg light-grown wild type and *hy5* mutant seedlings were used to isolate total RNA to analyze gene expression by RT-qPCR. The qPCR results were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method and *Actin2* gene was selected to normalize the data. The sequence of primers used in qPCR is shown in Appendix.2.

最近几年在小麦、水稻中有报道称施加外源蔗糖能够促进根部对 NO_3^- 离子的吸收 (Li et al., 2013; Zhou et al., 2009), 这其实也是对植物维持 C/N 平衡的一个很好的例证。我们发现蔗糖能够促进野生型拟南芥根中 *NRT2.1* 基因的表达 (图 3.31A), 而更为有意思的是, 在 *hy5* 突变体中外源蔗糖几乎失去了诱导根部 *NRT2.1* 基因表达的能力 (图 3.31A), 说明蔗糖诱导根中 *NRT2.1* 基因的表达依赖于 *HY5* 基因的功能。*HY5* 基因对于蔗糖诱导氮转运基因表达的必要性, 能够从分子水平上解释我们前面发现的 *HY5* 基因保证植物在光强变化条件下维持碳氮平衡这一现象 (图 3.29)。

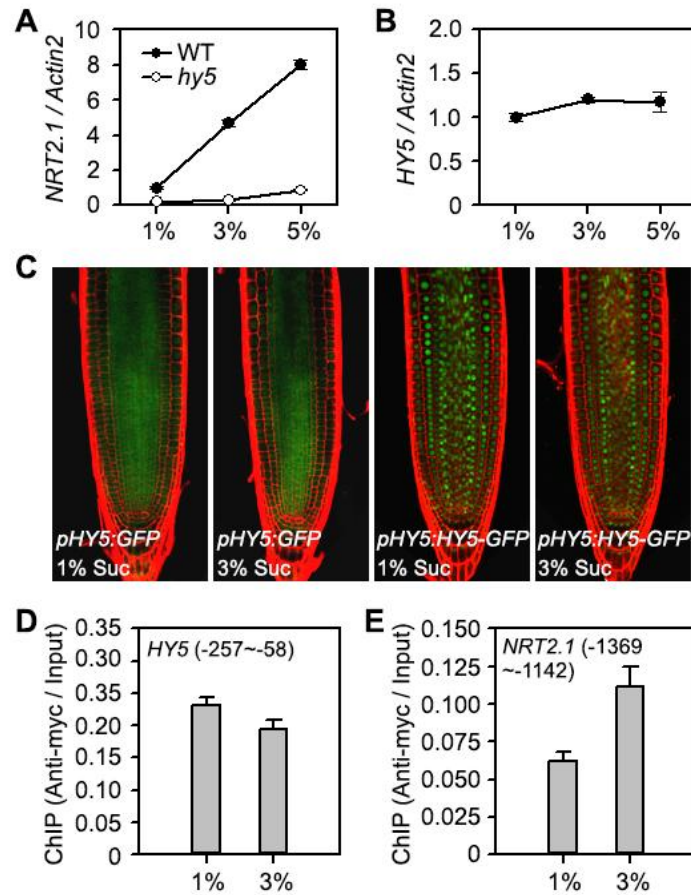


图 3.31 蔗糖对 *NRT2.1* 基因表达的诱导依赖于 *HY5* 蛋白的结合能力。

Figure 3.31 HY5 binding affinity is critical for sucrose promoting *NRT2.1* gene expression.

(A) 3 dpg light-grown seedlings were transferred to different concentration (1%, 3% and 5%) of sucrose contained MS medium for another 3 d; roots were isolated to analyze gene expression by RT-qPCR. (B) Sucrose does not affect the transcription of *HY5* gene in root. The qPCR results were calculated using $\Delta\Delta Ct$ method and *Actin2* gene was used to normalize the data. The sequence of primers used is shown in Appendix.2. (C) GFP abundance of *pHY5:GFP* and *pHY5:HY5-GFP* transgenic plant in WT background have no significant response to the increase of sucrose in medium. (D) Sucrose does not increase the binding affinity of *HY5* protein to the promoter region of *HY5* gene. (E) Sucrose significantly increases the binding affinity of *HY5* protein to *NRT2.1* promoter region. ChIP experiment was conducted using plant grown on different concentrations of sucrose contained MS medium. Anti-myc antibody was used to immunoprecipitate the *HY5* associated chromatin, and Input DNA obtained in ChIP procedure was used to normalize the results from samples grown on different sucrose environment.

蔗糖在根中是如何通过 *HY5* 基因来发挥诱导 *NRT2.1* 基因表达的作用呢？我们通过 RT-qPCR 分析发现外源蔗糖并没有明显影响拟南芥根中 *HY5* 基因的表达（图 3.31B），而且外源蔗糖处理也没有显著增加 *pHY5:GFP* 转基因拟南芥根中 GFP 信号的强度（图 3.31C），表明蔗糖并不影响 *HY5* 基因在根中的转录水平。此外，蔗糖处理也并没有改变根中 *HY5* 蛋白的稳定性（图 3.31C），也就是说，蔗糖也不是通过影响根中 *HY5* 蛋白的水平发挥作用。而本文前面证明了 *HY5* 蛋白通过直接结合 *NRT2.1* 基因的启动子来调控 *NRT2.1* 基因的转录（图 3.26），因此，蔗糖是否是影响了 *HY5* 蛋白对 *NRT2.1* 基因启动子的结合呢？

ChIP-qPCR 结果表明，蔗糖浓度的提高并没有增多 *HY5* 蛋白对自身基因启动子片段的富集（图 3.31D），但却使得 *HY5* 蛋白对 *NRT2.1* 基因启动子片段的富集显著增加（图 3.31E）。这个结果是与蔗糖并不促进根中 *HY5* 基因的表达（图 3.31B, C），但显著促进 *NRT2.1* 基因的转录（图 3.31A）是十分吻合的。而对于蔗糖如何区分对待 *HY5* 蛋白结合不同的靶基因，还有待于做进一步的研究。

上述结果说明，系统信号 *HY5* 蛋白不仅能够在拟南芥地上部调节碳水化合物的水平，同时也能够在地下直接介导地上光照以及光合产物蔗糖对根吸收氮过程的调节，这对于植物实现主动协调自身维持碳氮平衡以适应光照环境的变化具有非常重要的意义。

第四章 讨论与结论

4.1 讨论

4.1.1 光调控根的生长依赖于地上部的信号

根响应地上光照变化是植物整体适应环境的重要组成部分。虽然关于光对根生长发育的调节其实在很多种植物中已经有很多的研究和报道(Dyachok et al., 2011; Kurata and Yamamoto, 1997; Lake and Slack, 1961; Macdonald, 1976; Torrey, 1952; Vinterhalter et al., 1990; Wilkins et al., 1974), 但是这些研究大都是在透明培养基上进行的, 透明培养基给人们的研究带来便利的同时, 也会因为根被直接暴露在光下导致根向性生长(Macdonald, 1976)、根尖产生活性氧(Yokawa et al., 2011)等等使得人们的研究并不一定能真实反映根处于地下对地上光照的响应。

事实上, 根直接暴露在光下给研究带来的问题已经引起了不少科学家的注意(Roycewicz and Malamy, 2012; Xu et al., 2013; Yokawa et al., 2013; Yokawa et al., 2011)。本文中我们基于 MS 固体培养基建立了无菌局部见光体系(图 3.2), 以尽量模拟植物的根处在黑暗的自然状态。结合土培实验以及无菌局部见光实验, 我们以拟南芥为材料发现地上光照的增强能够促进黑暗中根的生长发育(图 3.1, 图 3.3 和图 3.6)。因此, 以黑暗中根的生长发育如何响应地上光强的改变为研究切入点, 不仅有助于我们全面认识植物如何适应生存环境, 而且还为我们寻找介导光调控根生长活动的胞间光信号物质提供可能。

局部见光处理的实验结果告诉我们光照对拟南芥根生长的促进依赖于地上部见光产生的某种信号物质(本文称为胞间光信号, 或系统性光信号)(图 3.8), 而改变茎端生长素含量、提高蔗糖含量都对根生长响应光照没有产生显著影响, 表明茎端生长素和蔗糖以外的信号物质参与介导地上光照对根生长的调控(图 3.7, 图 3.11)。最近也有研究表明光合产物蔗糖之外的某种未知信号物质在光调控拟南芥主根的伸长过程中可能发挥功能(Kircher and Schopfer, 2012), 而实际上, 培养皿中相对缺乏的 CO_2 使得拟南芥的光合作用有机产物几乎完全被培养基中的蔗糖所替代(Xiong et al.,

2013), 所以蔗糖不再成为我们研究体系中黑暗影响根生长的主要因素。不仅如此, 有嫁接实验表明来自拟南芥地上部的生长素并不能恢复因根部生长素合成受阻导致的根尖分生区变小和主根长度变短的表型(Chen and Xiong, 2009a, b), 也支持我们发现的茎端合成的生长素并不介导地上光照对主根生长的调控(图 3.11)。

4.1.2 HY5 蛋白是系统性光信号物质

系统性反应是生物个体实现不同细胞、组织或是器官之间信息传递的必要方式, 它的重要功能体现在植物生命过程中的方方面面, 其中包括植物正常的形态发育建成(Jackson, 2001; Kim and Pai, 2009)、植物抵抗生存环境中的病虫害侵袭(Heil and Ton, 2008; Shah, 2009)、植物承受非生物逆境胁迫(Hahn et al., 2013)以及植物适应周围天气或气候的变化(Gorsuch et al., 2010; Kangasjarvi et al., 2009; Rossel et al., 2007)等等。本文我们发现植物的根生长发育及吸收氮的过程都对地上光照的变化存在系统性反应(图 3.3, 图 3.24)。

介导植物完成系统性反应的信号物质主要包括激素、蛋白、mRNA、非编码 RNA 以及脂质等等(Benning et al., 2012; Jackson, 2001; Kehr, 2009; Kim and Pai, 2009; Yoo et al., 2004)。我们发现 COP1-HY5 信号模块在根生长对地上光照的系统性反应中发挥重要的作用(图 3.12), 进一步发现 COP1-HY5 信号模块具有“细胞非自主性”的功能(图 3.13, 图 3.14)并直接证明了 HY5 蛋白具备长距离移动的特征, 通过韧皮部从植物地上部运输至根部(图 3.16)。不仅如此, 地上光照诱导根部 HY5 基因的表达直接依赖于来自地上部的 HY5 蛋白的激活(图 3.17, 图 3.18), 表明地上部受光诱导的 HY5 蛋白的长距离移动至地下根部的必要性。因此, 这些结果都表明 HY5 蛋白作为胞间光信号的重要组分, 参与介导地下根对地上光照的系统性反应。

研究表明, 蛋白在生物体内的移动主要分为无目的性移动(nontargeted movement)和目的性移动(targeted movement)。无目的性移动一般都与蛋白的细胞质定位状态密切相关而且受制于蛋白的分子量(Crawford and Zambryski, 2000), 而 HY5 蛋白作为细胞核定位的转录因子(Lee et al., 2007; Oyama et al., 1997), 暗示 HY5 蛋白在拟南芥中的移动并不是消极扩散行为。而事实上, 目前在植物中发现的具有细胞间移动能力的转录因子蛋白并不在少数(Jackson, 2007; Kurata et al., 2005; Maizel,

2006; Xu and Jackson, 2012), 如 KN1 (KNOTTED1) 蛋白(Kim et al., 2003; Lucas et al., 1995)、SHR (SHORT ROOT) 蛋白(Nakajima et al., 2001) 、LFY (LEAFY) 蛋白(Sessions et al., 2000)等。而蛋白有目的的移动可能主要由蛋白序列特征决定(Jackson, 2007), 研究表明 KN1 蛋白的核定位信号不但没有成为 KN1 蛋白在细胞间移动的阻力, 反而是该蛋白移动发生所必需的(Lucas et al., 1995)。不仅如此, 点突变导致不能细胞核定位的 SHR 蛋白则会丢失原有的移动特性(Gallagher et al., 2004), 而给突变的 SHR 蛋白加上核定位信号又能恢复其移动性(Gallagher and Benfey, 2009)。因此, 核定位信号或许是转录因子移动所共有的发生机制, 而回答系统信号 HY5 蛋白如何实现细胞间的移动则需要我们做更深入的研究。

需要明确指出的是, 虽然我们证明 HY5 蛋白作为胞间光信号的重要组分介导了根对地上光照的反应, 但 HY5 蛋白很可能并不是参与介导植物系统性传导光信号(胞间光信号途径)的唯一物质。因为我们的实验结果显示, HY5 蛋白除对根部氮转运基因响应地上光照发挥不可或缺的功能外, 对其它元素(如磷、钾、硫)的转运基因的表达对光照的响应并无明显的贡献(数据未显示), 当然这还需要我们从生理学方面进行进一步的验证。还有一点值得注意的是, 地上光照促进侧根的发生(图 3.1, 图 3.6 和图 3.9), 而代表着丢失了这个过程中的胞间光信号的 *hy5* 突变体的侧根数目反而明显增多(数据显示), 我们推测这可能与 *hy5* 根部 *NRT2.1* 基因较低的表达水平有关(图 3.25), 因为有研究表明 *NRT2.1* 除了发挥转运 NO_3^- 的功能, 还起到抑制侧根发生的作用(Little et al., 2005)。

4.1.3 生长素与根的系统性光照响应

生长素作为可移动的植物激素, 不仅在植物生长发育进程的很多方面包括细胞分裂分化、组织模式形成、器官发生等占据中心决定地位(Woodward and Bartel, 2005), 而且对整合环境信号以调节植物生长活动也具有非常关键的作用(Teale et al., 2008; Vanneste and Friml, 2009)。很多研究都表明生长素活动是植物在不同光照环境下形态可塑性赖以发生的基础(Halliday et al., 2009)。我们发现, 在有光的条件下拟南芥地上部(主要是茎尖和叶片)中生长素含量没有受到光强变化的影响(图 3.11A), 这与红光增强并不影响番茄幼苗子叶和茎尖中生长素水平的报道基本是一致的(Liu et al.,

2011)。此外，去除茎端生长素合成的主要来源（茎尖和新生幼叶）也并不改变主根根尖分生能力对地上光照的响应（图 3.11D）。这说明虽然生长素是植物生长进程中非常重要的一种系统性信号物质(Jackson, 2001)，但对直接介导根生长响应地上光照的系统信号并无太大贡献。尽管如此，生长素作为整合因子对根生长发育乃至生理活动中的功能绝对不可忽视(Overvoorde et al., 2010)，我们发现生长素信号传导受损（如 *tir-t* 和 *axr2*）会使得主根根尖分生活动几乎不再对地上光照做出明显响应(图 3.11B)，暗示着根尖分生能力对地上光照的反应最终还是依赖于根尖本地的生长素信号途径。

由 PIN 蛋白介导的根部生长素极性运输对根尖细胞的分裂分化活动发挥很强的导向功能(Blilou et al., 2005; Grieneisen et al., 2007)，Sassi 等人最近报道了 COP1 蛋白通过调控依赖 PIN1 及 PIN2 的生长素极性运输来协调光照对拟南芥地上部和根生长的调控，他们认为 COP1 介导光照调节地上部合成的生长素向根运输的数量，从而调控了主根的生长(Sassi et al., 2012)。但是，我们认为关于 COP1 蛋白的这种解释并不足以说明问题。首先，茎端生长素并不能够恢复根部生长素合成受阻所导致的根生长缺陷表型(Chen and Xiong, 2009a, b)，即通过 PIN 等介导的向根部长距离运输的茎端生长素对主根的生长很可能并不起主要作用。再者，COP1 蛋白在黑暗中根部细胞中的定位是持续在细胞核内的(von Arnim and Deng, 1994)，这种情况下植物很难依靠 COP1 蛋白实现根据地上光照去调控 PIN 介导的生长素在根尖的极性运输。

本文我们发现根尖 PIN 蛋白，特别是 PIN2 蛋白和 PIN7 蛋白的水平依赖于间接光照（即从地上部经过胞间光信号传导至根部的“光照”）的作用，而 HY5 蛋白作为可长距离移动的系统信号在此过程中发挥了非常重要的作用（图 3.19B, C）。结果是，HY5 基因及其同源基因介导了依赖于 PIN 的根尖生长素极性运输对地上光照的系统性反应（图 3.21E），生长素极性运输的改变进而调控了根尖分生区细胞分裂分化活动(Blilou et al., 2005; Grieneisen et al., 2007)。同时，HY5 蛋白对根尖 SHY2 基因表达的直接抑制也部分参与调节了根尖分生区的活动（图 3.23），虽然细胞分裂素在根尖通过 SHY2 蛋白抑制生长素外运基因 PIN 的表达，导致根尖分生区细胞的分化受到促进而细胞分裂被抑制(Dello Ioio et al., 2008)。但是 HY5 蛋白介导的光照对根尖 SHY2 基因表达的调控与细胞分裂素对 SHY2 的调控，这两种调控通路在根尖分生区域存在多大程度上的重叠和异化尚值得做深入的研究。

更为有意思的是, PIN1 蛋白在根尖细胞中的定位对地上光照(间接光照)的反应似乎有别于之前在透明培养基生长条件下观察到的情况。在透明培养基生长的条件下, PIN1 在直接见光的根尖中柱细胞中主要以质膜定位的方式存在(Blilou et al., 2005; Galweiler et al., 1998)(图 4.1A), 而当拟南芥以更接近自然状态生长时(即根部持续维持在黑暗中同时地上部处于可见光状态), 根尖接受“间接光照”后, 中柱细胞中 PIN1 的定位呈现区域性差异: 伸长区区段的 PIN1 非常明显地定位于液泡样囊泡中, 而接近 QC 区段的 PIN1 则更多地维持在质膜定位的状态(图 4.1B)。虽然人们早已经知道 PIN1 在同一细胞中的定位是处于质膜与囊泡循环状态(时相变化)的(Geldner et al., 2001), 但在同一组织的不同区域同时存在两种不同的定位状态(空间变化)尚鲜有报道。而当地上部处于黑暗时, PIN1 在根尖细胞中绝大多数都定位在液泡样囊泡中(图 4.1C)。因为 PIN1 的囊泡定位并不利于生长素的极性运输(Muday and Murphy, 2002), 所以图 4.1 的结果暗示着在植物自然的生长过程中, 地上光照很可能使得根尖本地的生长素向顶端的极性运输存在“区段管制”现象, 或者说根尖生长素的极性运输很可能存在“振荡中心”。

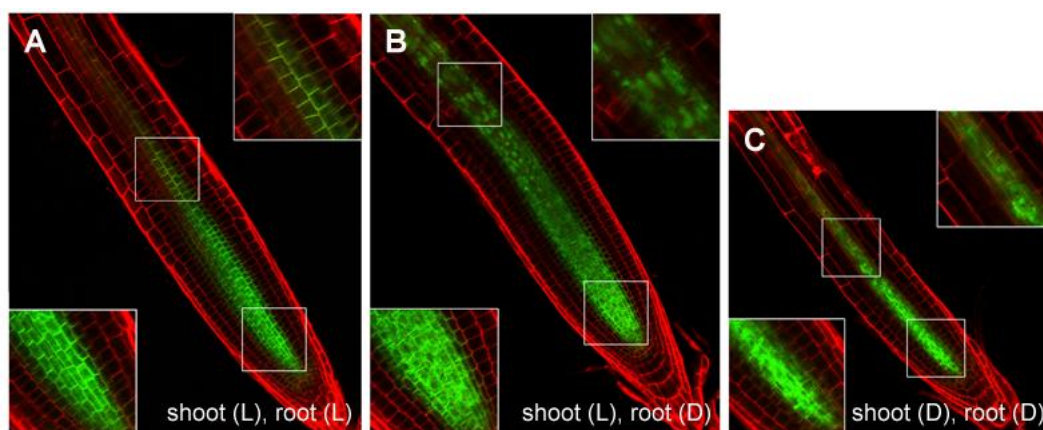


图 4.1 直接光照和间接光照对根部 PIN1-GFP 蛋白亚细胞定位的影响。

Figure 4.1 Respective effect of direct light and indirect light on the subcellular location of PIN1-GFP in the region of root tip.

事实上, 在根尖的基部分生区与伸长区存在着表现为生长素报告启动子 DR5 节律性表达的“振荡区”(oscillation zone), DR5 的节律性表达说明生长素的水平在这个区域内是呈周期性变化的(Moreno-Risueno and Benfey, 2011; Moreno-Risueno et al., 2010; Van Norman et al., 2011)。虽然我们目前并不清楚 PIN1 蛋白定位的区域性差异

(图 4.1B) 与根尖生长素水平的周期性变化是否存在一定的因果关系, 但有报道称包括 *PIN* 基因表达在内的生长素信号途径是受生物钟调节的(Covington and Harmer, 2007)。不仅如此, 根部细胞的生物钟受制于地上部输出的与光有关的某种未知信号的调控(James et al., 2008; Mas and Yanovsky, 2009), 而很多研究都表明 *HY5* 基因与植物生物钟密切相关, *HY5* 蛋白不仅可以与生物钟中心元件 *CCA1* 蛋白相互作用, 而且还能直接结合生物钟中心元件基因 *LHY/CCA1* 的启动子调控该基因的表达, 进而参与调节植物生物钟的活动(Andronis et al., 2008; Li et al., 2011b; Maxwell et al., 2003)。这是否暗示着系统信号 *HY5* 蛋白可能参与组成介导地上部与根部生物钟节律的信号物质非常值得我们去深入的研究。尽管我们没有观察到 *HY5* 基因对根尖 *PIN1* 蛋白亚细胞定位响应地上光照的影响(图 4.1A), 这可能需要在一天之内更多的时间点或者更为细致的时空条件去观察, 以检验根尖生长素极性运输究竟是否同样存在“振荡区”以及 *HY5* 基因在其中可能发挥的功能。

4.1.4 *HY5* 基因在协调植物碳氮平衡适应光照变化过程中的作用

地上光照的变化必然会影响到植物地上部的光合作用, 而细胞内部的碳、氮代谢必须保持协调平衡, 这不仅对生物个体的正常生长发育非常关键, 而且对整个生态系统响应日益凸显的以温室效应为代表的环境变化也至关重要(Lara and Andreo, 2011; Nunes-Nesi et al., 2010; Zheng, 2009)。研究表明, 氮转运关键蛋白 *NRT2.1* 在协调植物碳氮平衡过程中发挥重要的功能(Little et al., 2005; Zheng, 2009)。我们发现 *HY5* 蛋白在拟南芥根部直接调控 *NRT2.1* 基因的表达, 从而介导地上光照对根吸收硝态氮过程的调节(图 3.24, 图 3.25 和图 3.26); 不仅如此, *HY5* 基因在拟南芥地上部通过影响叶绿素含量干预光合作用而且调控 *SWEET* 基因的表达调节光合产物碳水化合物的分配状态等(图 3.30), 因此, 这很可能使得 *HY5* 作为介导地上光照的系统信号影响了植物适应光强变化过程中碳氮平衡的调节(图 3.29)。

HY5 蛋白充当系统信号对植物地上部光合固碳(C)和根部吸收氮(N)的同时调控, 我们大可以将由此影响的碳氮平衡称之为空间上的间接碳氮互作。而植物体内实际上也是存在直接的碳氮互作的, 我们都知道地上部的光合产物蔗糖可以通过维管系统运输至根部, 而人们发现外源施加蔗糖处理能够调节根对 NO_3^- 的吸收(Lejay et al.,

2003; Li et al., 2013; Zhou et al., 2009), 这暗示着植物根部的碳 (C) 状态可以直接影响根对氮 (N) 吸收。Lejay 等人早在十年前就发现拟南芥根中蔗糖含量随着光强的增加而显著增加, 而且培养基中提高外源蔗糖浓度可以诱导根部 *NRT2.1* 基因的表达, 他们的实验结果表明蔗糖对 *NRT2.1* 基因表达的诱导与己糖激酶 (HKX) 催化的糖代谢相关的某信号转导途径有关 (Lejay et al., 2003)。有意思的是, 我们发现蔗糖对 *NRT2.1* 基因表达的诱导几乎依赖于 HY5 的功能 (图 3.31A), 即蔗糖很可能完全通过 HY5 蛋白调控 *NRT2.1* 基因的表达, 这也同时暗示着 HY5 基因与 HKX 相关的糖信号途径存在作用上的某种上下游关系。我们进一步的研究表明蔗糖并不影响拟南芥根部 HY5 基因的转录及 HY5 蛋白的稳定性 (图 3.31B, C), 而是提高了 HY5 蛋白对 *NRT2.1* 基因启动子的结合能力 (图 3.31E), 从而诱导 *NRT2.1* 基因表达水平的提高。但同时令人不解的是, 蔗糖并不改变 HY5 蛋白对自身基因启动子的结合能力 (图 3.31D), 这事实上是与蔗糖不影响根部 HY5 基因的表达是相符的 (图 3.31B, C), 而蔗糖有选择地促进 HY5 蛋白靶向顺式元件的发生机制还有待于更深入的研究。

实际上, 植物碳氮平衡的协调是非常复杂的调节过程, 这其中包括碳代谢和氮的吸收、同化以及分配等诸多方面的问题。虽然人们在细胞水平上对植物碳氮平衡已经做了大量的研究 (Nunes-Nesi et al., 2010; Sang et al., 2012), 但对于多细胞的植物个体来讲, 我们的这一部分研究阐述了植物如何维持整体的碳氮平衡以适应环境的变化。

4.1.5 HY5, 光照与其它多种因素的整合因子

HY5 基因自被科学家首次分离以来就占据着植物胞内光信号传导途径中非常关键的地位 (Ang and Deng, 1994; Lau and Deng, 2012), 不仅如此, 人们研究发现 *HY5* 基因在光照与植物激素 (Alabadi and Blazquez, 2008; Cluis et al., 2004; Jia et al., 2013; Lau and Deng, 2010)、光照与温度 (Catal á et al., 2011) 相互作用影响植物的过程中都扮演着很重要的“整合因子”的角色。我们的研究暗示着, *HY5* 蛋白作为系统性光信号很可能更好地在植株水平上将光照与外界其他环境因子 (如温度、土壤环境中的营养等)、光照与植物内源的调节因子 (如植物激素、糖信号、生物钟等) 的相互作用进行整合, 从而保证植物整体协调适应外界环境的变化。

当然，植物整体适应光照环境的变化是体现在多个方面的，其中之一就是植物自身地上和地下的不同的空间属性以及各种复杂的生理代谢过程，再者就是包括光质、光照长度、光量子密度在内的多种光照参数等等。因此，植物如何实现全面地适应光照与其他环境因子相互作用还有待于人们做更为深入的研究，而我们本文关于 HY5 蛋白介导根尖分生能力、根吸收氮乃至植株整体的碳氮平衡对地上光照变化反应的探索无疑是给以后对上述问题的研究提供了良好的理论基础。而且本文同时也是对 HY5 基因作为光照与其他多种因素的“整合因子”从光信号系统性传导的角度进行了展望，这对于人们全面认识植物如何实现积极主动地适应环境的变化具有非常重要的理论意义。

4.2 结论

地上部见光时，积累的 HY5 蛋白长距离移动至根部并激活根部 HY5 基因的表达。HY5 基因在根尖通过调控 PIN 介导的生长素极性运输来影响根尖分生区细胞的分裂分化的走向，同时 HY5 蛋白在根部直接促进氮高效转运基因 *NRT2.1* 的表达，从而实现地上光照对根生长和吸收氮过程的调节。不仅如此，HY5 基因还影响植物地上部的碳水化合物的状态并在根部完全介导蔗糖对根吸收氮的控制，进而保证植物维持碳氮平衡。我们以图 4.2 对上述结论进行描述，以示意 HY5 蛋白如何作为胞间光信号的重要组分（系统信号）介导植物对地上光照的响应。

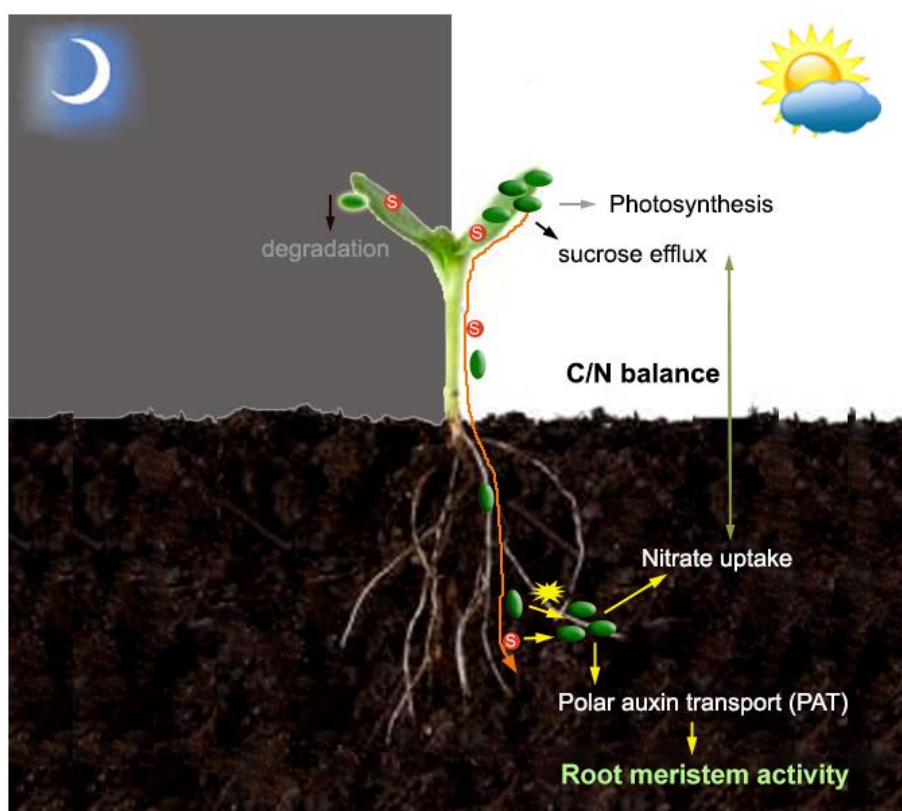


图 4.2 地上光照对根生长和根吸收氮过程的调控机制模型。

图中红圈代表蔗糖，绿色椭圆代表 HY5 蛋白。

Figure 4.2 Model of root growth and nitrate uptake regulated by light aboveground.

Red circles indicate sucrose and green ellipses indicate HY5 protein.

参考文献

- Aichinger, E., Kornet, N., Friedrich, T., and Laux, T. (2012). Plant stem cell niches. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 615-636.
- Alabadi, D., and Blazquez, M.A. (2008). Integration of light and hormone signals. *Plant Signal Behav.* 3, 448-449.
- Alvarez, J.M., Vidal, E.A., and Gutierrez, R.A. (2012). Integration of local and systemic signaling pathways for plant N responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 185-191.
- Amtmann, A., and Blatt, M.R. (2009). Regulation of macronutrient transport. *New Phytol.* 181, 35-52.
- Andronis, C., Barak, S., Knowles, S.M., Sugano, S., and Tobin, E.M. (2008). The clock protein CCA1 and the bZIP transcription factor HY5 physically interact to regulate gene expression in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 1, 58-67.
- Ang, L.H., and Deng, X.W. (1994). Regulatory hierarchy of photomorphogenic loci: allele-specific and light-dependent interaction between the HY5 and COP1 loci. *Plant Cell* 6, 613-628.
- Aoki, N., Hirose, T., and Furbank, R. (2012). Sucrose Transport in Higher Plants: From Source to Sink. In *Photosynthesis*, J.J. Eaton-Rye, B.C. Tripathy, and T.D. Sharkey, eds. (Springer Netherlands), pp. 703-729.
- Arite, T., Iwata, H., Ohshima, K., Maekawa, M., Nakajima, M., Kojima, M., Sakakibara, H., and Kyoizuka, J. (2007). DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J.* 51, 1019-1029.
- Arsovski, A.A., Galstyan, A., Guseman, J.M., and Nemhauser, J.L. (2012). Photomorphogenesis. *Arabidopsis Book* 10, e0147.
- Bae, G., and Choi, G. (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 281-311.
- Beemster, G.T., and Baskin, T.I. (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 116, 1515-1526.
- Benning, U.F., Tamot, B., Guelette, B.S., and Hoffmann-Benning, S. (2012). New aspects of Phloem-mediated long-distance lipid signaling in plants. *Front Plant Sci.* 3, 53.
- Black, M., and Shuttleworth, J. (1974). The role of the cotyledons in the photocontrol of hypocotyl extension in *Cucumis sativus* L. *Planta* 117, 57-66.
- Blakeslee, J.J., Peer, W.A., and Murphy, A.S. (2005). Auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 494-500.

- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433, 39-44.
- Bot, J.L., and Kirkby, E.A. (1992). Diurnal uptake of nitrate and potassium during the vegetative growth of tomato plants. *J. Plant Nutr.* 15, 247-264.
- Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., and Martinez-Garcia, J.F. (2008). Light signaling: back to space. *Trends Plant Sci.* 13, 108-114.
- Brewer, P.B., Dun, E.A., Ferguson, B.J., Rameau, C., and Beveridge, C.A. (2009). Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 150, 482-493.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S., and Klein, D.R. (1983). Carbon/Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. *Oikos* 40, 357-368.
- Burleigh, S.H., and Harrison, M.J. (1999). The down-regulation of *Mt4*-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiol.* 119, 241-248.
- Calderon Villalobos, L.I., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L.B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., *et al.* (2012). A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat. Chem. Biol.* 8, 477-485.
- Casal, J.J. (2012). Shade avoidance. *Arabidopsis Book* 10, e0157.
- Casal, J.J. (2013). Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 403-427.
- Casal, J.J., and Yanovsky, M.J. (2005). Regulation of gene expression by light. *Int. J. Dev. Biol.* 49, 501-511.
- Catal ́ R., Medina, J., and Salinas, J. (2011). Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16475-16480.
- Cederholm, H.M., Iyer-Pascuzzi, A.S., and Benfey, P.N. (2012). Patterning the primary root in *Arabidopsis*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Dev. Cell* 1, 675-691.
- Cerdan, P.D., and Chory, J. (2003). Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 423, 881-885.
- Chattopadhyay, S., Ang, L.H., Puente, P., Deng, X.W., and Wei, N. (1998). *Arabidopsis* bZIP protein HY5 directly interacts with light-responsive promoters in mediating light control of gene expression. *Plant Cell* 10, 673-683.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.O., van der Horst, G.T., Batschauer, A., and Ahmad, M. (2011). The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 335-364.
- Chen, C., Xiao, Y.-G., Li, X., and Ni, M. (2012a). Light-Regulated Stomatal Aperture in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 5, 566-572.

- Chen, C.M., Ertl, J.R., Leisner, S.M., and Chang, C.C. (1985). Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plants and carrot roots. *Plant Physiol.* 78, 510-513.
- Chen, F., Ro, D.K., Petri, J., Gershenzon, J., Bohlmann, J., Pichersky, E., and Tholl, D. (2004). Characterization of a root-specific *Arabidopsis* terpene synthase responsible for the formation of the volatile monoterpene 1,8-cineole. *Plant Physiol.* 135, 1956-1966.
- Chen, H., and Xiong, L. (2009a). Localized auxin biosynthesis and postembryonic root development in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 4, 752-754.
- Chen, H., and Xiong, L. (2009b). The short-rooted vitamin B6-deficient mutant *pdx1* has impaired local auxin biosynthesis. *Planta* 229, 1303-1310.
- Chen, L.Q., Qu, X.Q., Hou, B.H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A.R., and Frommer, W.B. (2012b). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335, 207-211.
- Chory, J. (2010). Light signal transduction: an infinite spectrum of possibilities. *Plant J.* 61, 982-991.
- Christie, J.M. (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 21-45.
- Christie, J.M., Arvai, A.S., Baxter, K.J., Heilmann, M., Pratt, A.J., O'Hara, A., Kelly, S.M., Hothorn, M., Smith, B.O., Hitomi, K., *et al.* (2012). Plant UVR8 photoreceptor senses UV-B by tryptophan-mediated disruption of cross-dimer salt bridges. *Science* 335, 1492-1496.
- Christie, J.M., and Murphy, A.S. (2013). Shoot phototropism in higher plants: new light through old concepts. *Am. J. Bot.* 100, 35-46.
- Clarkson, D., and Lüttge, U. (1991). Mineral Nutrition: Inducible and Repressible Nutrient Transport Systems. In *Progress in Botany*, H.D. Behnke, K. Esser, K. Kubitzki, M. Runge, and H. Ziegler, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 61-83.
- C Luis, C.P., Mouchel, C.F., and Hardtke, C.S. (2004). The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *Plant J.* 38, 332-347.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., *et al.* (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316, 1030-1033.
- Covington, M.F., and Harmer, S.L. (2007). The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 5, e222.
- Crawford, K.M., and Zambryski, P.C. (2000). Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr. Biol.* 10, 1032-1040.
- Darwin, C., and Darwin, F. (1881). *The power of movement in plants*. Appleton, London.
- de Jong, M., and Leyser, O. (2012). Developmental plasticity in plants. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 77, 63-73.
- De Simone, S., Oka, Y., and Inoue, Y. (2000). Effect of Light on Root Hair Formation in *Arabidopsis thaliana* Phytochrome-Deficient Mutants. *J. Plant Res.* 113, 63-69.

- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M.T., Aoyama, T., Costantino, P., and Sabatini, S. (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 322, 1380-1384.
- Demarsy, E., and Fankhauser, C. (2009). Higher plants use LOV to perceive blue light. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 69-74.
- Deregibus, V.A., Sanchez, R.A., and Casal, J.J. (1983). Effects of Light Quality on Tiller Production in *Lolium* spp. *Plant Physiol.* 72, 900-902.
- Dinneny, J.R., and Benfey, P.N. (2008). Plant stem cell niches: standing the test of time. *Cell* 132, 553-557.
- Dodd, A.N., Salathia, N., Hall, A., Kevei, E., Toth, R., Nagy, F., Hibberd, J.M., Millar, A.J., and Webb, A.A. (2005). Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage. *Science* 309, 630-633.
- Domagalska, M.A., and Leyser, O. (2011). Signal integration in the control of shoot branching. *Nat Rev Mol. Cell Biol.* 12, 211-221.
- Downes, R. (1970). Effect of Light Intensity and Leaf Temperature on Photosynthesis and Transpiration in Wheat and Sorghum. *Aust. J. Biol. Sci.* 23, 775-782.
- du Monceau, D. (1758). *La physique des arbres*. Paris: HL Gu érin & LF Delatour I.
- Dyachok, J., Zhu, L., Liao, F., He, J., Huq, E., and Blancaflor, E.B. (2011). SCAR mediates light-induced root elongation in *Arabidopsis* through photoreceptors and proteasomes. *Plant Cell* 23, 3610-3626.
- Eberhard, S., Finazzi, G., and Wollman, F.A. (2008). The dynamics of photosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 42, 463-515.
- Eckardt, N.A. (2008). DOT/UFO emerges as a key factor in inflorescence patterning. *Plant Cell* 20, 2003-2005.
- Everson, R.G., Cockburn, W., and Gibbs, M. (1967). Sucrose as a product of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 42, 840-844.
- Fan, X.-X., Xu, Z.-G., Liu, X.-Y., Tang, C.-M., Wang, L.-W., and Han, X.-l. (2013). Effects of light intensity on the growth and leaf development of young tomato plants grown under a combination of red and blue light. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 153, 50-55.
- Fankhauser, C., and Chory, J. (1997). Light control of plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 203-229.
- Feldman, L., and Hirsch, A. (1994). John Gordon Torrey (1921–1993). *Protoplasma* 183, 1-4.
- Filleur, S., Dorbe, M.F., Cerezo, M., Orsel, M., Granier, F., Gojon, A., and Daniel-Vedele, F. (2001). An *arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS Lett.* 489, 220-224.

- Finlayson, S.A., Krishnareddy, S.R., Kebrom, T.H., and Casal, J.J. (2010). Phytochrome regulation of branching in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152, 1914-1927.
- Fleischer, W.E. (1935). THE RELATION BETWEEN CHLOROPHYLL CONTENT AND RATE OF PHOTOSYNTHESIS. *J. Gen. Physiol.* 18, 573-597.
- Foo, E., Bullier, E., Gousset, M., Foucher, F., Rameau, C., and Beveridge, C.A. (2005). The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *Plant Cell* 17, 464-474.
- Forde, B.G. (2002a). Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 203-224.
- Forde, B.G. (2002b). The role of long-distance signalling in plant responses to nitrate and other nutrients. *J. Exp. Bot.* 53, 39-43.
- Franklin, K.A., and Quail, P.H. (2010). Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *J. Exp. Bot.* 61, 11-24.
- Friml, J. (2003). Auxin transport — shaping the plant. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 7-12.
- Fuglevand, G., Jackson, J.A., and Jenkins, G.I. (1996). UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8, 2347-2357.
- Furuya, M. (2005). History and Insights. In *Light Sensing in Plants*, M. Wada, K.-i. Shimazaki, and M. Iino, eds. (Springer Japan), pp. 3-18.
- Gallagher, K.L., and Benfey, P.N. (2009). Both the conserved GRAS domain and nuclear localization are required for SHORT-ROOT movement. *Plant J.* 57, 785-797.
- Gallagher, K.L., Paquette, A.J., Nakajima, K., and Benfey, P.N. (2004). Mechanisms regulating SHORT-ROOT intercellular movement. *Curr. Biol.* 14, 1847-1851.
- Galweiler, L., Guan, C., Muller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., and Palme, K. (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282, 2226-2230.
- Gansel, X., Munos, S., Tillard, P., and Gojon, A. (2001). Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. *Plant J.* 26, 143-155.
- Geisler, M., and Murphy, A.S. (2006). The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett.* 580, 1094-1102.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jurgens, G., and Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413, 425-428.
- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Martienssen, R., and Colot, V. (2005). Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. *Nat. Methods* 2, 213-218.
- Gierth, M., and Maser, P. (2007). Potassium transporters in plants--involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Lett.* 581, 2348-2356.

- Gojon, A., Nacry, P., and Davidian, J.C. (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 328-338.
- Goosey, L., Palecanda, L., and Sharrock, R.A. (1997). Differential patterns of expression of the *Arabidopsis* *PHYB*, *PHYD*, and *PHYE* phytochrome genes. *Plant Physiol.* 115, 959-969.
- Gorsuch, P.A., Sargeant, A.W., Penfield, S.D., Quick, W.P., and Atkin, O.K. (2010). Systemic low temperature signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 51, 1488-1498.
- Green, R.M., Tingay, S., Wang, Z.Y., and Tobin, E.M. (2002). Circadian rhythms confer a higher level of fitness to *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* 129, 576-584.
- Griebel, T., and Zeier, J. (2008). Light regulation and daytime dependency of inducible plant defenses in *Arabidopsis*: phytochrome signaling controls systemic acquired resistance rather than local defense. *Plant Physiol.* 147, 790-801.
- Grieneisen, V.A., Xu, J., Maree, A.F., Hogeweg, P., and Scheres, B. (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449, 1008-1013.
- Griffiths, J., and Halliday, K. (2011). Plant development: light exposure directs meristem fate. *Curr. Biol.* 21, R817-819.
- Grusak, M.A., and Pezeshgi, S. (1996). Shoot-to-Root Signal Transmission Regulates Root Fe(III) Reductase Activity in the dgl Mutant of Pea. *Plant Physiol.* 110, 329-334.
- Gyula, P., Schafer, E., and Nagy, F. (2003). Light perception and signalling in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 446-452.
- Hahn, A., Kilian, J., Mohrholz, A., Ladwig, F., Peschke, F., Dautel, R., Harter, K., Berendzen, K.W., and Wanke, D. (2013). Plant Core Environmental Stress Response Genes Are Systemically Coordinated during Abiotic Stresses. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 7617-7641.
- Hales, S. (1727). *Vegetable Staticks*. LondonReprint:London macdonaid.
- Halliday, K.J., Martinez-Garcia, J.F., and Josse, E.M. (2009). Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001586.
- Hallik, L., and Kull, O. (2008). Light Acclimation of Leaf Chlorophyll Content. In *Photosynthesis Energy from the Sun*, J. Allen, E. Gantt, J. Golbeck, and B. Osmond, eds. (Springer Netherlands), pp. 1295-1298.
- Hansen, G.K. (1980). Diurnal variation of root respiration rates and nitrate uptake as influenced by nitrogen supply. *Physiol. Plant* 48, 421-427.
- Hardtke, C.S., Gohda, K., Osterlund, M.T., Oyama, T., Okada, K., and Deng, X.W. (2000). HY5 stability and activity in *arabidopsis* is regulated by phosphorylation in its COP1 binding domain. *EMBO J.* 19, 4997-5006.
- Hartwell, J. (2005). The co-ordination of central plant metabolism by the circadian clock. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 945-948.

- Hayama, R., and Coupland, G. (2003). Shedding light on the circadian clock and the photoperiodic control of flowering. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 13-19.
- Hayward, A., Stirnberg, P., Beveridge, C., and Leyser, O. (2009). Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiol.* 151, 400-412.
- Heil, M., and Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends Plant Sci.* 13, 264-272.
- Ho, C.H., Lin, S.H., Hu, H.C., and Tsay, Y.F. (2009). CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138, 1184-1194.
- Hohmann-Marriott, M.F., and Blankenship, R.E. (2011). Evolution of photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62, 515-548.
- Holm, M., Ma, L.G., Qu, L.J., and Deng, X.W. (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 16, 1247-1259.
- Huxley, P.A. (1969). The Effect of Fluctuating Light Intensity on Plant Growth. *J Appl Ecol* 6, 273-276.
- Jackson, D. (2001). Systemic Signalling in Plant Development. In eLS (John Wiley & Sons, Ltd).
- Jackson, D. (2007). Transcription Factor Movement Through Plasmodesmata. In *Plasmodesmata* (Blackwell Publishing Ltd), pp. 113-134.
- Jackson, M.B. (2002). Long-distance signalling from roots to shoots assessed: the flooding story. *J. Exp. Bot.* 53, 175-181.
- Jackson, S.D. (2009). Plant responses to photoperiod. *New Phytol.* 181, 517-531.
- James, A.B., Monreal, J.A., Nimmo, G.A., Kelly, C.L., Herzyk, P., Jenkins, G.I., and Nimmo, H.G. (2008). The circadian clock in *Arabidopsis* roots is a simplified slave version of the clock in shoots. *Science* 322, 1832-1835.
- Jander, G., Norris, S.R., Rounsley, S.D., Bush, D.F., Levin, I.M., and Last, R.L. (2002). *Arabidopsis* map-based cloning in the post-genome era. *Plant Physiol.* 129, 440-450.
- Jia, K.-P., Luo, Q., He, S.-B., Lu, X.-D., and Yang, H.-Q. (2014). Strigolactone-Regulated Hypocotyl Elongation Is Dependent on Cryptochrome and Phytochrome Signaling Pathways in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 7, 528-540.
- Jiao, Y., Lau, O.S., and Deng, X.W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat. Rev. Genet.* 8, 217-230.
- Johnson, X., Bricch, T., Dun, E.A., Goussot, M., Haurogne, K., Beveridge, C.A., and Rameau, C. (2006). Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol.* 142, 1014-1026.
- Jorgensen, R.A., and Lucas, W.J. (2006). Teaching resources. Movement of macromolecules in plant cells through plasmodesmata. *Sci. STKE* 2006, tr2.

- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., and Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 91, 29-66.
- Kangasjarvi, S., Nurmi, M., Tikkanen, M., and Aro, E.M. (2009). Cell-specific mechanisms and systemic signalling as emerging themes in light acclimation of C3 plants. *Plant Cell Environ.* 32, 1230-1240.
- Kehr, J. (2009). Long-distance transport of macromolecules through the phloem. *F.1000 Biol. Rep.* 1, 31.
- Keller, E. (1990). Physics and the emergence of molecular biology: A history of cognitive and political synergy. *J. Hist. Biol.* 23, 389-409.
- Khoshgoftarmanesh, A.H., Hosseini, F., and Afyuni, M. (2011). Nickel supplementation effect on the growth, urease activity and urea and nitrate concentrations in lettuce supplied with different nitrogen sources. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 130, 381-385.
- Kim, I., and Pai, H.-S. (2009). Mobile Macromolecules in Plant Development. *Singmul Hakhoe chi.* 52, 186-192.
- Kim, J.Y., Yuan, Z., and Jackson, D. (2003). Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in *Arabidopsis*. *Development* 130, 4351-4362.
- Kircher, S., and Schopfer, P. (2012). Photosynthetic sucrose acts as cotyledon-derived long-distance signal to control root growth during early seedling development in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 11217-11221.
- Kiss, J.Z., Correll, M.J., Mullen, J.L., Hangarter, R.P., and Edelman, R.E. (2003a). Root phototropism: how light and gravity interact in shaping plant form. *Gravit. Space. Biol. Bull.* 16, 55-60.
- Kiss, J.Z., Mullen, J.L., Correll, M.J., and Hangarter, R.P. (2003b). Phytochromes A and B mediate red-light-induced positive phototropism in roots. *Plant Physiol.* 131, 1411-1417.
- Klebs, G. (1910). Alterations in the development and forms of plants as a result of environment. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 82, 547-558.
- Kobayashi, Y., and Weigel, D. (2007). Move on up, it's time for change--mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes Dev.* 21, 2371-2384.
- Kohls, S., and Baker, D. (1989). Effects of substrate nitrate concentration on symbiotic nodule formation in actinorhizal plants. *Plant Soil* 118, 171-179.
- Koornneef, M., and Meinke, D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J.* 61, 909-921.
- Krouk, G., Lacombe, B., Bielach, A., Perrine-Walker, F., Malinska, K., Mounier, E., Hoyerova, K., Tillard, P., Leon, S., Ljung, K., *et al.* (2010). Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Dev. Cell* 18, 927-937.
- Kurata, T., Okada, K., and Wada, T. (2005). Intercellular movement of transcription factors. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 8, 600-605.

- Kurata, T., and Yamamoto, K.T. (1997). Light-stimulated root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol.* *151*, 346-351.
- Lake, J.A., Quick, W.P., Beerling, D.J., and Woodward, F.I. (2001). Plant development. Signals from mature to new leaves. *Nature* *411*, 154.
- Lake, J.V., and Slack, G. (1961). Dependence on Light of Geotropism in Plant Roots. *Nature* *191*, 300-302.
- Lappartient, A.G., Vidmar, J.J., Leustek, T., Glass, A.D., and Touraine, B. (1999). Inter-organ signaling in plants: regulation of ATP sulfurylase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compound. *Plant J.* *18*, 89-95.
- Lara, M.V., and Andreo, C.S. (2011). C4 Plants Adaptation to High Levels of CO₂ and to Drought Environments. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*
- Lau, O.S., and Deng, X.W. (2010). Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Curr. Opin. Plant Biol.* *13*, 571-577.
- Lau, O.S., and Deng, X.W. (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci.* *17*, 584-593.
- Laxmi, A., Pan, J., Morsy, M., and Chen, R. (2008). Light Plays an Essential Role in Intracellular Distribution of Auxin Efflux Carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* *3*, e1510.
- Lechamy, A. (1979). Phytochrome and internode elongation in *Chenopodium polyspermum* L. sites of photoreception. *Planta* *145*, 405-409.
- Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I., and Deng, X.W. (2007). Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* *19*, 731-749.
- Leivar, P., and Quail, P.H. (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Sci.* *16*, 19-28.
- Lejay, L., Gansel, X., Cerezo, M., Tillard, P., Muller, C., Krapp, A., von Wiren, N., Daniel-Vedele, F., and Gojon, A. (2003). Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. *Plant Cell* *15*, 2218-2232.
- Lewis, D.R., and Muday, G.K. (2009). Measurement of auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Protoc.* *4*, 437-451.
- Li, C., and Bangerth, F. (2003). Stimulatory effect of cytokinins and interaction with IAA on the release of lateral buds of pea plants from apical dominance. *J. Plant Physiol.* *160*, 1059-1063.
- Li, C., Gu, M., Shi, N., Zhang, H., Yang, X., Osman, T., Liu, Y., Wang, H., Vatish, M., Jackson, S., *et al.* (2011a). Mobile FT mRNA contributes to the systemic florigen signalling in floral induction. *Sci. Rep.* *1*, 73.

- Li, G., Siddiqui, H., Teng, Y., Lin, R., Wan, X.Y., Li, J., Lau, O.S., Ouyang, X., Dai, M., Wan, J., *et al.* (2011b). Coordinated transcriptional regulation underlying the circadian clock in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* **13**, 616-622.
- Li, J.Z., He, G.Y., and Cram, W.J. (2013). Identifying sucrose as a signal for nitrate uptake by wheat roots. *Russ. J. Plant Physiol.* **60**, 84-90.
- Li, W., Wang, Y., Okamoto, M., Crawford, N.M., Siddiqui, M.Y., and Glass, A.D. (2007). Dissection of the *AtNRT2.1:AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant Physiol.* **143**, 425-433.
- Little, D.Y., Rao, H., Oliva, S., Daniel-Vedele, F., Krapp, A., and Malamy, J.E. (2005). The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13693-13698.
- Liu, T.Y., Chang, C.Y., and Chiou, T.J. (2009). The long-distance signaling of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 312-319.
- Liu, X., Cohen, J.D., and Gardner, G. (2011). Low-fluence red light increases the transport and biosynthesis of auxin. *Plant Physiol.* **157**, 891-904.
- Lu, K.J., Huang, N.C., Liu, Y.S., Lu, C.A., and Yu, T.S. (2012). Long-distance movement of *Arabidopsis* FLOWERING LOCUS T RNA participates in systemic floral regulation. *RNA Biol.* **9**, 653-662.
- Lucas, W.J., Bouche-Pillon, S., Jackson, D.P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B., and Hake, S. (1995). Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* **270**, 1980-1983.
- Maathuis, F.J. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 250-258.
- Macdonald, I.R. (1976). Gravity counteracts light-induced inhibition of root growth. *Nature* **263**, 584-585.
- Maizel, A. (2006). Transcription factor movement in plants. *J. Soc. Biol.* **200**, 221-227.
- Mano, Y., and Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* **63**, 2853-2872.
- Martin, A.C., del Pozo, J.C., Iglesias, J., Rubio, V., Solano, R., de La Pena, A., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2000). Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* **24**, 559-567.
- Mas, P., and Yanovsky, M.J. (2009). Time for circadian rhythms: plants get synchronized. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 574-579.
- Mauzerall, D. (1976). Chlorophyll and Photosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* **273**, 287-294.

- Maxwell, B.B., Andersson, C.R., Poole, D.S., Kay, S.A., and Chory, J. (2003). HY5, Circadian Clock-Associated 1, and a cis-element, DET1 dark response element, mediate DET1 regulation of chlorophyll a/b-binding protein 2 expression. *Plant Physiol.* 133, 1565-1577.
- McClung, C.R. (2006). Plant circadian rhythms. *Plant Cell* 18, 792-803.
- Merigout, P., Lelandais, M., Bitton, F., Renou, J.P., Briand, X., Meyer, C., and Daniel-Vedele, F. (2008). Physiological and transcriptomic aspects of urea uptake and assimilation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol.* 147, 1225-1238.
- Miller, A.J., and Cramer, M.D. (2005). Root nitrogen acquisition and assimilation. In *Root Physiology: from Gene to Function*, H. Lambers, and T. Colmer, eds. (Springer Netherlands), pp. 1-36.
- Misson, J., Thibaud, M.C., Bechtold, N., Raghothama, K., and Nussaume, L. (2004). Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1;4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol. Biol.* 55, 727-741.
- Montgomery, B.L. (2008). Right place, right time: Spatiotemporal light regulation of plant growth and development. *Plant Signal. Behav.* 3, 1053-1060.
- Moreno-Risueno, M.A., and Benfey, P.N. (2011). Time-based patterning in development: The role of oscillating gene expression. *Transcription* 2, 124-129.
- Moreno-Risueno, M.A., Van Norman, J.M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S.E., and Benfey, P.N. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science* 329, 1306-1311.
- Muday, G.K., and Murphy, A.S. (2002). An emerging model of auxin transport regulation. *Plant Cell* 14, 293-299.
- Munir, M., Jamil, M., Baloch, J.-u.-d., and Khattak, K. (2004). Impact of light intensity on flowering time and plant quality of *Antirrhinum majus* L. cultivar Chimes White. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 5, 400-405.
- Nagpal, P., Walker, L.M., Young, J.C., Sonawala, A., Timppte, C., Estelle, M., and Reed, J.W. (2000). AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiol.* 123, 563-574.
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., and Benfey, P.N. (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413, 307-311.
- Navarro, C., Abelenda, J.A., Cruz-Oro, E., Cuellar, C.A., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K., and Prat, S. (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature* 478, 119-122.
- Ni, Z., Kim, E.-D., and Chen, Z.J. (2009). Chlorophyll and starch assays. *Protocol Exchange*
- Niyogi, K.K., and Fink, G.R. (1992). Two anthranilate synthase genes in *Arabidopsis*: defense-related regulation of the tryptophan pathway. *Plant Cell* 4, 721-733.
- Novák, V., and Vidovič, J. (2003). Transpiration and nutrient uptake dynamics in maize (*Zea mays* L.). *Ecological Modelling* 166, 99-107.

- Nunes-Nesi, A., Fernie, A.R., and Stitt, M. (2010). Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Mol. Plant* 3, 973-996.
- Orsel, M., Eulenburg, K., Krapp, A., and Daniel-Vedele, F. (2004). Disruption of the nitrate transporter genes *AtNRT2.1* and *AtNRT2.2* restricts growth at low external nitrate concentration. *Planta* 219, 714-721.
- Orsel, M., Filleur, S., Fraissier, V., and Daniel-Vedele, F. (2002). Nitrate transport in plants: which gene and which control? *J. Exp. Bot.* 53, 825-833.
- Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D. (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J.* 53, 674-690.
- Osterlund, M.T., Ang, L.-H., and Deng, X.W. (1999). The role of COP1 in repression of *Arabidopsis* photomorphogenic development. *Trends Cell Biol.* 9, 113-118.
- Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., and Deng, X.W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405, 462-466.
- Overvoorde, P., Fukaki, H., and Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001537.
- Oyama, T., Shimura, Y., and Okada, K. (1997). The *Arabidopsis* *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.* 11, 2983-2995.
- Page, D.R., and Grossniklaus, U. (2002). The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Rev. Genet.* 3, 124-136.
- Palmer, C.M., Bush, S.M., and Maloof, J.N. (2001). Phenotypic and Developmental Plasticity in Plants. In *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd).
- PEAT, W.E. (1970). Relationships between Photosynthesis and Light Intensity in the Tomato. *Ann. Bot.* 34, 319-328.
- Perilli, S., Di Mambro, R., and Sabatini, S. (2012). Growth and development of the root apical meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 17-23.
- Petricka, J.J., Winter, C.M., and Benfey, P.N. (2012). Control of *Arabidopsis* root development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 563-590.
- Priestley, J. (1772). Observations on different kinds of air. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 62, 147-264.
- Puig, J., Pauluzzi, G., Guiderdoni, E., and Gantet, P. (2012). Regulation of shoot and root development through mutual signaling. *Mol. Plant* 5, 974-983.
- Radwanski, E.R., and Last, R.L. (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *Plant Cell* 7, 921-934.
- Rahayu, Y.S., Walch-Liu, P., Neumann, G., Romheld, V., von Wiren, N., and Bangerth, F. (2005). Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃--induced stimulation of leaf growth. *J. Exp. Bot.* 56, 1143-1152.

- Rascher, U., and Nedbal, L. (2006). Dynamics of photosynthesis in fluctuating light. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 671-678.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., Tillard, P., Forde, B.G., and Gojon, A. (2006a). The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19206-19211.
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M., and Gojon, A. (2006b). A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140, 909-921.
- Roberts, M.R., and Paul, N.D. (2006). Seduced by the dark side: integrating molecular and ecological perspectives on the influence of light on plant defence against pests and pathogens. *New Phytol.* 170, 677-699.
- Rolland, F., Moore, B., and Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14 Suppl, S185-205.
- Rossel, J.B., Wilson, P.B., Hussain, D., Woo, N.S., Gordon, M.J., Mewett, O.P., Howell, K.A., Whelan, J., Kazan, K., and Pogson, B.J. (2007). Systemic and intracellular responses to photooxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 4091-4110.
- Roycewicz, P., and Malamy, J.E. (2012). Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on *Arabidopsis* root and shoot system growth in laboratory assays. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367, 1489-1500.
- Ruts, T., Matsubara, S., Wiese-Klinkenberg, A., and Walter, A. (2012). Aberrant temporal growth pattern and morphology of root and shoot caused by a defective circadian clock in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 72, 154-161.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., *et al.* (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99, 463-472.
- Sachs, J. (1864). Wirkungen farbigen Lichts auf Pflanzen. *Bot. Z.* 22, 353-372.
- Sachs, T., and Thimann, K.V. (1967). The Role of Auxins and Cytokinins in the Release of Buds From Dominance. *Am. J. Bot.* 54, 136-144.
- Saini, S., Sharma, I., Kaur, N., and Pati, P. (2013). Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Rep.* 32, 741-757.
- Sakamoto, K., and Briggs, W.R. (2002). Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* 14, 1723-1735.
- Sang, Y., Sun, W., and Yang, Z. (2012). Signaling mechanisms integrating carbon and nitrogen utilization in plants. *Frontiers in Biology* 7, 548-556.
- Sargent, M.C. (1940). EFFECT OF LIGHT INTENSITY ON THE DEVELOPMENT OF THE PHOTOSYNTHETIC MECHANISM. *Plant Physiol.* 15, 275-290.

- Sassi, M., Lu, Y., Zhang, Y., Wang, J., Dhonukshe, P., Blilou, I., Dai, M., Li, J., Gong, X., Jaillais, Y., *et al.* (2012). COP1 mediates the coordination of root and shoot growth by light through modulation of PIN1- and PIN2-dependent auxin transport in *Arabidopsis*. *Development* 139, 3402-3412.
- Scaife, A., and Schloemer, S. (1994). The Diurnal Pattern of Nitrate Uptake and Reduction by Spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Ann. Bot.* 73, 337-343.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 1121-1133.
- Sessions, A., Yanofsky, M.F., and Weigel, D. (2000). Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. *Science* 289, 779-782.
- Shah, J. (2009). Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 459-464.
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S.M., and Kinoshita, T. (2007). Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58, 219-247.
- Somers, D.E., and Fujiwara, S. (2009). Thinking outside the F-box: novel ligands for novel receptors. *Trends Plant Sci.* 14, 206-213.
- Somerville, C., and Koornneef, M. (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat. Rev. Genet.* 3, 883-889.
- Stitt, M., and Krapp, A. (1999). The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: the physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* 22, 583-621.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S., and Shimamoto, K. (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* 316, 1033-1036.
- Tanaka, S., Nakamura, S., Mochizuki, N., and Nagatani, A. (2002). Phytochrome in cotyledons regulates the expression of genes in the hypocotyl through auxin-dependent and -independent pathways. *Plant Cell Physiol.* 43, 1171-1181.
- Taoka, K., Ohki, I., Tsuji, H., Kojima, C., and Shimamoto, K. (2013). Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends Plant Sci.* 18, 287-294.
- Teale, W.D., Ditengou, F.A., Dovzhenko, A.D., Li, X., Molendijk, A.M., Ruperti, B., Paponov, I., and Palme, K. (2008). Auxin as a model for the integration of hormonal signal processing and transduction. *Mol. Plant* 1, 229-237.
- Tian, Q., Uhler, N.J., and Reed, J.W. (2002). *Arabidopsis* SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 14, 301-319.
- Torrey, J.G. (1952). EFFECTS OF LIGHT ON ELONGATION AND BRANCHING IN PEA ROOTS. *Plant Physiol.* 27, 591-602.
- Traore, A., and Maranville, J.W. (1999). Effect of nitrate/ammonium ratio on biomass production, nitrogen accumulation, and use efficiency in sorghums of different origin. *J. Plant Nutr.* 22, 813-825.

- Tuomi, J., Niemelä P., Stuart Chapin, F., III, Bryant, J., and Sirén, S. (1988). Defensive Responses of Trees in Relation to Their Carbon/Nutrient Balance. In *Mechanisms of Woody Plant Defenses Against Insects*, W. Mattson, J. Levieux, and C. Bernard-Dagan, eds. (Springer New York), pp. 57-72.
- Turck, F., Fornara, F., and Coupland, G. (2008). Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 573-594.
- van Berkel, K., de Boer, R.J., Scheres, B., and ten Tusscher, K. (2013). Polar auxin transport: models and mechanisms. *Development* 140, 2253-2268.
- Van Norman, J.M., Breakfield, N.W., and Benfey, P.N. (2011). Intercellular communication during plant development. *Plant Cell* 23, 855-864.
- Vanneste, S., and Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136, 1005-1016.
- Verbelen, J.P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., and Baluska, F. (2006). The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signal Behav.* 1, 296-304.
- Vinterhalter, D., Grubišić, D., Vinterhalter, B., and Konjević, R. (1990). Light-controlled root elongation in in vitro cultures of *Dracaena fragrans* Ker-Gawl. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 22, 1-6.
- Von Arnim, A., and Deng, X.W. (1996). LIGHT CONTROL OF SEEDLING DEVELOPMENT. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 47, 215-243.
- von Arnim, A.G., and Deng, X.W. (1994). Light inactivation of *Arabidopsis* photomorphogenic repressor COP1 involves a cell-specific regulation of its nucleocytoplasmic partitioning. *Cell* 79, 1035-1045.
- von Caemmerer, S., and Baker, N. (2007). The Biology of Transpiration. From Guard Cells to Globe. *Plant Physiol.* 143, 3.
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., Feil, R., Lunn, J.E., Stitt, M., and Schmid, M. (2013). Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 339, 704-707.
- Wang, Y.Y., Hsu, P.K., and Tsay, Y.F. (2012). Uptake, allocation and signaling of nitrate. *Trends Plant Sci.* 17, 458-467.
- Warnasooriya, S.N., and Montgomery, B.L. (2009). Detection of spatial-specific phytochrome responses using targeted expression of biliverdin reductase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149, 424-433.
- Waters, M.T., and Langdale, J.A. (2009). The making of a chloroplast. *EMBO J.* 28, 2861-2873.
- Weston, E., Thorogood, K., Vinti, G., and Lopez-Juez, E. (2000). Light quantity controls leaf-cell and chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* wild type and blue-light-perception mutants. *Planta* 211, 807-815.
- Wilkins, H., Larque-Saavedra, A., and Wain, R.L. (1974). Control of Zea root elongation by light and the action of 3,5-diiodo-4-hydroxybenzoic acid. *Nature* 248, 449-450.

- Wilkins, H., and Wain, R.L. (1974). The root cap and control of root elongation in *Zea mays* L. seedlings exposed to white light. *Planta* 121, 1-8.
- Won, C., Shen, X., Mashiguchi, K., Zheng, Z., Dai, X., Cheng, Y., Kasahara, H., Kamiya, Y., Chory, J., and Zhao, Y. (2011). Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 18518-18523.
- Woodward, A.W., and Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95, 707-735.
- Xie, X., Yoneyama, K., and Yoneyama, K. (2010). The strigolactone story. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48, 93-117.
- Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiang, C., and Sheen, J. (2013). Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496, 181-186.
- Xu, W., Ding, G., Yokawa, K., Baluska, F., Li, Q.F., Liu, Y., Shi, W., Liang, J., and Zhang, J. (2013). An improved agar-plate method for studying root growth and response of *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 3, 1273.
- Xu, X., and Jackson, D. (2012). Cell-to-Cell Movement of Homeodomain Transcription Factors: Yesterday, Today and Tomorrow. In *Short and Long Distance Signaling*, F. Kragler, and M. Hülskamp, eds. (Springer New York), pp. 87-98.
- Yi, C., and Deng, X.W. (2005). COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* 15, 618-625.
- Yokawa, K., Kagenishi, T., and Baluska, F. (2013). Root photomorphogenesis in laboratory-maintained *Arabidopsis* seedlings. *Trends Plant Sci.* 18, 117-119.
- Yokawa, K., Kagenishi, T., Kawano, T., Mancuso, S., and Baluska, F. (2011). Illumination of *Arabidopsis* roots induces immediate burst of ROS production. *Plant Signal Behav.* 6, 1460-1464.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., and Lucas, W.J. (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* 16, 1979-2000.
- Zhang, H., He, H., Wang, X., Wang, X., Yang, X., Li, L., and Deng, X.W. (2011). Genome-wide mapping of the *HY5*-mediated gene networks in *Arabidopsis* that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation. *Plant J.* 65, 346-358.
- Zhao, J., Cheng, N.H., Motes, C.M., Blancaflor, E.B., Moore, M., Gonzales, N., Padmanaban, S., Sze, H., Ward, J.M., and Hirschi, K.D. (2008). AtCHX13 is a plasma membrane K⁺ transporter. *Plant Physiol.* 148, 796-807.
- Zhao, Y. (2012). Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Mol. Plant* 5, 334-338.
- Zheng, Z.L. (2009). Carbon and nitrogen nutrient balance signaling in plants. *Plant Signal Behav.* 4, 584-591.

Zhou, S., Gao, X., Wang, C., Yang, G., Cram, W.J., and He, G. (2009). Identification of sugar signals controlling the nitrate uptake by rice roots using a noninvasive technique. *Z. Naturforsch C.* 64, 697-703.

附录

附录 1. 载体构建所用引物的序列

Appendix.1. Sequence of primers for vector construction

引物名称	引物序列 (5' to 3')
<i>pHY5-F</i>	CTTCGTCGTCAGGATTAT
<i>pHY5-R</i>	TTTCTTACTCTTTGAAGATC
<i>pAt3g25820-F</i>	CGTCTAGATGTCAATTTTCATGGCACATCGAG
<i>pAt3g25820-R</i>	GGACTAGTGATTTAGTAGACTATTCTCTTATTCGTG
<i>pCAB3-F</i>	CGTCTAGAAATCAAGAGAAAATGTGATTCTCGG
<i>pCAB3-R</i>	GCACTAGTGAAACTTTTTGTGTTTTTTTTTTTTTTTT
<i>pUFO-F</i>	ACTTGTCGACGAATTCTCTGTTTTTAATTGCCCCA
<i>pUFO-R</i>	GCTCTAGATTTAGCTGAAAAATGAAAAGATTG
<i>pSUC2-F</i>	ACTTGTCGACTTTGTGCATACATTATTTGCCACAAG
<i>pSUC2-R</i>	GCTCTAGATTTGACAAACCAAGAAAGTAAGAAAA
<i>HY5-FXb</i>	CGTCTAGAATGCAGGAACAAGCGACTAG
<i>HY5-RSal</i>	CAGTCGACAAGGCTTGCATCAGCATTAG
<i>GFP-FSal</i>	CAGTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
<i>GFP-RPst</i>	GACTGCAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
<i>HY5-Fxb(HA)</i>	GTCTAGAATGGCTTACCCATACGATGTTCCAGATTA CGCTGCGATGCAGGAACAAGCG
<i>HY5-Rsal(stop)</i>	AGTCGACTCAAAGGCTTGCATCAGC
<i>I miR-SHY2</i>	gaTCATACATTATCTGTTCGCGGtctctctttgtattcc
<i>II miR-SHY2</i>	gaCCGCGAACAGATAATGTATGAtcaaagagaatcaatga

<i>III miR-SHY2</i>	gaCCACGAACAGATATTGTATGTtcacaggctcgatg
<i>IV miR-SHY2</i>	gaACATACAATATCTGTTTCGTGGtctacatatatcct

附录 2. 定量 PCR 所用引物的序列
Appendix.2. Sequence of primers for RT-qPCR

基因名称	定量 PCR 引物序列 (5' to 3')
<i>Actin2</i>	CTGGATCGGTGGTTCCATTC CCTGGACCTGCCTCATCATAC
<i>HY5</i>	GAACGAGAACCAGATGCTTAGAC TGCAATATTAGCTCTCACATCCC
<i>HY5-GFP</i>	CAGAACGAGAACCAGATGCTTAG CAGATGAACTTCAGGGTCAGC
<i>PIN1</i>	GGCATGGCTATGTTTCAGTCTTGGG GCCAACGGCATAAGAAGCAACG
<i>PIN2</i>	TCACGACAACCTCGCTACTAAAGC TGCCCATGTAAGGTGACTTTCCC
<i>PIN3</i>	GGAGCACCTGACAACGATCAAG CTTGCTGGATGAGCTACAGCTTTG
<i>PIN7</i>	TGCCTAACGGACTACACAAGC GCCACATCCCACCTGAAAGC
<i>SHY2</i>	GGGCAAGATCTATGTTTCATTGG ACCTTTTGCCCTGTTTCTGA
<i>AMT1;1</i>	GGGGACTAATATTCACGGCTCT CCAACCCGTGATCACAATG

<i>AMT1;2</i>	ATGGGACCGTTGTTTTATGG CTCGTTTGGGACCACTCAAT
<i>AMT1;3</i>	CCTCAAAAGGCTCAATCTGC TAGCTGATCGAGGGAAAGGA
<i>NRT1.1</i>	TCTAAGACCGCTTCAACGGATCG ACTGTTGGACCATGAGCGTGTG
<i>NRT2.1</i>	AACAAGGGCTAACGTGGATG CTGCTTCTCCTGCTCATTCC
<i>NRT3.1</i>	GGCCATGAAGTTGCCTATG TCTTGGCCTTCCTCTTCTCA
<i>TPS1</i>	GGTCATTTCTTGGGGAAGGA TCTCCTGATGATGACTTGGC
<i>SWEET10</i>	TTGGTGCCACAAGACAGTGC GATGACGCTGATCAGACCCAAAT
<i>SWEET11</i>	GCGAACAAGTGTACCTGCGG ACCAACCACCACGTGTACCC
<i>SWEET12</i>	TCGTCCGATCGGTGAACACA ACTAGTACACGTGGACAATGGTGA
<i>SWEET13</i>	AACGACCGTCATACCCGGTG CGGATCGGTCATGTTCTGGC
<i>SWEET14</i>	AAGCCCAAAACGGTGTCGGA CTGGTCCTCTAAGTCACCACCA
<i>SWEET15</i>	AAGCGCCGTTATGTGGTTCG GGTCCACCGATTCCGTCACA

附录 3. ChIP-qPCR 所用引物的序列
Appendix.3. Sequence of primers for ChIP-qPCR

基因片段名称	定量 PCR 引物序列 (5' to 3')
<i>HY5</i> fragment 1	GGCAGCTTAAAAGACTGGCTT ATCACAACAAAACCATCCGTTATC
<i>HY5</i> fragment 2	TTAAAAATCTGGCAGCTGAGGTT CTTTTACTTTTTTCCTTAGGTTTCGAC
<i>HY5</i> fragment 3	AGATGTTGTGGTCGAACCTAAGG GTGAGATAGAGCATTCAAGTAACATAG
<i>HY5</i> fragment 4	GTTTGATGATGCTGTGAATAGAATG TGACGACAATGTTGATGAGTTTCT
<i>HY5</i> fragment 5	CAGAACTCATCAACATTGTCGTC CCGCCATAAACCAAACAAAGT
<i>HY5</i> fragment 6	TTCACGACACTTTTGAAAGCACTGCC CAAGGATCCAAAGGCAATTGAG
<i>HY5</i> fragment 7	ATTCACTCTCGATATCCGTTTCG AGAGAGAGAGGGAAAGATTTGTTG
<i>HY5</i> fragment 8	TTTCCCTCTCTCTCTCGCCTGA TGGAGCAGAGCTTGATGACCT
<i>HY5</i> fragment 9	CATATCTTCTCCCAACGAGTGAT TTCTGGGGGAGACTAAAAGTTGT
<i>HY5</i> fragment 10	TCACAACTTTTAGTCTCCCCCA CCTCGCTTCCTTTGACTTTCT
<i>HY5</i> fragment 11	ACAAGCGGCTGAAGAGGTGT

	CCAAGTCTTTCACCTCTGTTTTCC
<i>SHY2</i> fragment 1	AGTTGTTGTAGCTAAGACATTGTCA GCATGAATATCCGCAGGCT
<i>SHY2</i> fragment 2	TTATCTTACGTTCCACTGACGG AACATTCTCTTCTTGGTTCAGTCAT
<i>SHY2</i> fragment 3	GCGTGATGAGTACTGAGTAG AAAGAGTTGTTAAGAACTTATGTTATAACTT
<i>SHY2</i> fragment 4	CTTAACAACCTCTTTGCATAGTACCGAT GCTGTCTTTGTTTATGTTACAGCGTG
<i>SHY2</i> fragment 5	CTCAGGTTCCAAAACAAAACACTACAAG GTTAAAGCCCACAACCTTTTGTCTC
<i>SHY2</i> fragment 6	GTTTTTGGCTCTTCAACACCC CTTTTCTTACCAAGAACAACAACCG
<i>SHY2</i> fragment 7	GTAAGAAAAGATTATGAGCTTACGATCC ACTTTCTTTTTCTCCCATCTGTCC
<i>SHY2</i> fragment 8	GGAGAAAAAGAAAGTGTCCCCAC CTGATGATGAAGATGAGAGGCTT
<i>SHY2</i> fragment 9	AGCAGCTTCTCTATATCTCTCCTCT GATTCAATCTCCTTCTCAGTATCAG
<i>NRT2.1</i> fragment 1	TTACAAAGTGGTTCCTTCACGA CCAACAAATTAAGGATCTTCGG
<i>NRT2.1</i> fragment 2	CTGGATGACATTAAAGTTCATACTTC GTACCGGACAAAAGAGAATCCT
<i>NRT2.1</i> fragment 3	GAGAAAAGATAATGAGCTCATCGAA

	GTGCGGTGGATTGATATGTAGA
<i>NRT2.1</i> fragment 4	AAATTCAGATCCGCTAGCTACTAC CGTATGTCAATGTATATGTGATGG
<i>NRT2.1</i> fragment 5	CGATTTC AATTTTTCACACCGA AGTATTCACAAAAGGGGAAGATG
<i>NRT2.1</i> fragment 6	ACAGTTACAATGACAAAGATAACCC CTTAAGGTTTAAAAGTTTGGTCCTC
<i>NRT2.1</i> fragment 7	TTAGCCTATCCTGTATCACTGTATG AGGTTGCCGATATCCTTCCA
<i>NRT2.1</i> fragment 8	TTGGTGATAAGCGAGAGACTAGG TCTTTGCAAGTTTGAGATTTGATTC

附录 4. EMSA 探针的序列

Appendix.4. Sequence of probes for EMSA

探针名称	探针序列 (5' to 3')
<i>HY5</i> probe	GCTAACCAGATCTAACGGCTAAAATCCACCCAC GTTCCAATCTCAATTGCCTTTGGATCCTTGTAT
<i>SHY2</i> probe	ATAGAGAGAGGTGATATGCCCATATGGCATAACCA CATGTGGTGGGGGATTCTGAAGATTTGATCTGGA CCGTC
<i>NRT2.1</i> probe	TTATCAAATCCCAACTTGTTGGAAATTTGACACG TCAGCGAGATTGATCGATACGCACTTAGTCGT

作者简历

姓名：陈祥彬

性别：男

出生年月：1985 年 10 月

籍贯：山东省枣庄市

学习经历：

2003.09-2007.07 山东农业大学生命科学学院 生物技术专业 理学学士学位

2007.09-2009.07 山东农业大学生命科学学院 发育生物学专业 理学硕士学位

2009.09 至今 中国科学院遗传与发育生物学研究所 遗传学专业 攻读博士学位

所获奖励：

博士研究生国家奖学金

中国科学院大学 2012-2013 学年“三好学生标兵”

博士在读期间发表论文：

Chen, X., et al., Fu, X. HY5 protein movement contributes to long-range signaling in control of the balance between carbon and nitrogen nutrients in *Arabidopsis*. (Manuscript in preparation)

致谢

本研究是在傅向东研究员的指导下完成的，在近五年的求学时光里，傅老师在课题研究及日常生活都给予了我很多的关怀和帮助，值此论文完成之际，向傅老师致以感谢和敬意。

感谢中国科学院植物研究所刘春明研究员和李师鹏博士在拟南芥嫁接技术方面给予的大力指导。

感谢刘学英老师一直以来给予我的鼓励和支持，感谢高秀华老师、张敬老师、刘倩老师在实验方面提供的便利，感谢四位老师在实验室管理、组织文体活动等诸多方面做出的奉献，让我们这些身在异乡的学子体会到家的温暖。

感谢实验室的兄弟姐妹们，和你们共同度过的每一天，像一首老歌，像一杯浓酒，值得去回味。特别要感谢已毕业的张成伟师姐在我最困难的时候给予我的帮助，感谢韩瑞玺、田永航给我兄弟般的情谊，感谢王玉娟、马延飞两位好邻居带给我的感动，感谢姚琴芳、孙雪源、段学清、王静在该课题中所做出的贡献，感谢徐昊、姚涛两位拟南芥课题组的干将给予过的实验方面的帮助。

感谢刘学英老师、高秀华老师、刘倩老师、韩瑞玺、王玉娟、张建晴、徐昊、姚涛、王拴锁和王静在本论文写作的修改指正方面给予的大力帮助。

感谢我的舍友王洪俊和陈亮亮，宿舍融洽和谐的氛围让我感到快乐。

感谢我的女友梁雪同学八年来给予我们聚少离多的爱情的信任和坚持，感谢你一直以来给予我生活上无微不至的体贴和照顾。

感谢我亲爱的父母和姐姐们，你们给予我的三十年来无私的爱和包容，让我感到力量，在漂泊的岁月，让我坚强。

雄关漫道真如铁，而今迈步从头越。感谢所有帮助过我的可爱的人们，谢谢你们，祝福你们！

陈祥彬

2014 年 04 月