

· 研究报告 ·

PHOT2介导拟南芥下胚轴向光弯曲调节子的筛选与鉴定

赵翔, 王琳丹, 李园园, 赵青平, 张骁*

棉花生物学国家重点实验室/植物逆境生物学重点实验室/河南大学生命科学学院, 开封 475004

摘要 向光素(PHOT1和PHOT2)功能冗余调节单侧强蓝光诱导的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)黄化苗下胚轴向光弯曲表现功能冗余, 限制了人们对PHOT2信号转导机制的深入研究。通过化学诱变剂甲基磺酸乙酯(EMS)诱变拟南芥*phot1*突变体, 避开PHOT1基因的干扰, 寻找PHOT2下游信号分子。研究结果表明, 已成功筛选到1株遗传稳定的下胚轴向蓝光不弯曲突变体。遗传分析结果显示, 该突变体可能是PHOT2下游信号分子突变, 将其命名为。用100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 强蓝光单侧照射, *phot1p2sa1*下胚轴向光弯曲缺失, 呈现*phot1phot2*双突变的表型, 然而*phot1p2sa1*在强蓝光下叶绿体避光正常, 明显不同于*phot1phot2*。实验证实P2SA1可能位于PHOT2的下游, 参与调节PHOT2介导的拟南芥下胚轴向光弯曲反应。

关键词 拟南芥, 蓝光, 下胚轴向光弯曲, 突变体筛选

赵翔, 王琳丹, 李园园, 赵青平, 张骁 (2014). PHOT2介导拟南芥下胚轴向光弯曲调节子的筛选与鉴定. 植物学报 49, 254–261.

光是一个重要的环境因子, 其对固生植物调控主要体现在作为能量源参与植物光合作用和作为信号被植物所感受以调控植物的生长周期和优化光捕获等(de Carbonnel et al., 2010)。其中, 单侧蓝光诱导的向光弯曲可优化植物茎叶的最佳生长取向, 捕获合适的光源, 这一现象已引起植物学家的广泛关注(Takemiya et al., 2005)。蓝光受体向光素(phototropin)的发现为深入认识蓝光依赖向光弯曲的信号转导机制提供了新的途径。该受体蛋白(PHOT1和PHOT2)的C末端含有Ser/Thr蛋白激酶区域(Huala et al., 1997), N端含有与FMN结合且对光照、氧气及电压差敏感的2个LOV (light, oxygen, voltage)区(调节激酶活性)(Demarsy and Fankhauser, 2009)。PHOT1和PHOT2不仅调节植物的向光弯曲(Sakai et al., 2001), 而且调节气孔运动(Kinoshita et al., 2001)、叶绿体移动反应(Kagawa et al., 2001)以及叶片伸展(de Carbonnel et al., 2010)等诸多生理过程, 以增加光捕获或降低光伤害, 优化植物在极弱或极强光逆境下的生长(Kasahara et al., 2002; Takemiya et al., 2005)。但其调控作用的分子机制并不清楚。

遗传分析显示, PHOT1和PHOT2对蓝光诱导的植物诸多生理反应的调节表现出功能冗余的特性(Inoue et al., 2010), 但有些生理反应仅受PHOT1或PHOT2单独调节。如PHOT1对高光下LHCb和RBCL等基因转录的特异性调节(Folta and Kaufman, 2003); PHOT2对叶绿体避光运动的调节(Kagawa et al., 2001)。目前, 关于PHOT1和PHOT2共同或专一介导蓝光诱导的植物诸多生理反应的机制并不清楚。蓝光引起PHOT1或PHOT2丝氨酸残基自磷酸化是开启植物蓝光反应的普遍步骤(Inoue et al., 2008; Sullivan et al., 2008)。推测植物可能通过不同组织或细胞表达不同向光素激酶底物或存在与向光素互作蛋白, 以实现其对不同生理反应的差异调控。然而, 目前仅有2个向光素激酶底物、生长素转运蛋白(ATP-BINDING CAS-SETTE B19, ABCB19)和光敏色素作用激酶底物(PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE, PKS4)被鉴定。磷酸化已被证实可导致底物ABCB19和PKS4钝化(Christie et al., 2011; Demarsy et al., 2012)。

PHOT1 和 PHOT2 调节植物向光弯曲, 其中

收稿日期: 2013-03-29; 接受日期: 2013-09-29

基金项目: 国家自然科学基金(No.31170271, No.31101023)

* 通讯作者。E-mail: xzhang@henu.edu.cn

PHOT1 可调节较宽范围的蓝光引起的拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 下胚轴向光弯曲; 而PHOT2仅介导强蓝光诱导的下胚轴向光弯曲(Sakai et al., 2001)。该现象既体现PHOT1和PHOT2功能冗余性, 又表现其作用的特异性。目前, 关于PHOT1介导弱蓝光引起的下胚轴弯曲较为明确, 即PHOT1感受弱蓝光后, 与其下游的信号蛋白NPH3(Motchoulski and Liscum, 1999)、RPT2(Inada et al., 2004)和PKS1(Lariguet et al., 2006)相互作用, 调控生长素输入载体PIN1和输出载体AUX1(Blakeslee et al., 2004; Stone et al., 2008)的活性及定位, 引起生长素在下胚轴中不对称分布, 导致植物向光弯曲。虽已证明NPH3和RPT2也参与PHOT2介导强蓝光诱导的下胚轴向光弯曲调节(Sakai et al., 2000; Inada et al., 2004), 但并未检测到NPH3和RPT2与PHOT2发生体内互作(Inada et al., 2004; Lariguet et al., 2006)。Tseng 和 Briggs(2010)发现RCN1(蛋白磷酸酶2A的A1亚基)可与PHOT2蛋白特异互作, 负调节PHOT2介导的向光弯曲, 但并不与PHOT1互作。由此推测, PHOT1和PHOT2可能采用不同的信号传递载体实现其功能互补。由于这种功能互补性, 限制了人们对PHOT2信号转导的研究。Ohgishi等(2004)采用基因芯片技术分析发现PHOT2蛋白引起6个基因表达上调。因此, 进行强蓝光下PHOT2下游基因的筛选与功能鉴定, 将为揭示PHOT2调节强蓝光诱导的下胚轴弯曲机理提供有价值的信息。

1 材料与方法

1.1 植物材料的诱变和培养

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)生态型除用于图位克隆的Landsberg(Ler)野生型外, 其余均为Columbia-0生态型(*gl1*), 作为野生型对照。拟南芥突变体(*phot1* (*phot1-5*)、*phot2*(*phot2-1*)和*phot1phot2* (*phot1-5phot2-1*))种子由Shimazaki(日本九州大学)惠赠(Kagawa et al., 2001; Doi et al., 2004)。

以拟南芥*phot1*突变体为材料进行诱变。称取1.5 g (约70 000粒)*phot1*种子, 用双蒸水浸泡6~8小时, 放入含0.4%(v/v)甲基磺酸乙酯(EMS)的100 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH7.5)中, 封口后在水浴(25 °C)振荡器上振荡8小时。用双蒸水漂洗种子10~15次, 每次10

分钟。将洗净的拟南芥种子(M1)放在滤纸上进行干燥处理, 然后点种于0.6%MS培养基, 置于4°C春化3天, 在22°C、光暗周期为16小时光照/8小时黑暗、光照强度为90 μmol·m⁻²·s⁻¹的温室中培养2周, 再均匀移栽于混有蛭石的营养土中(蛭石与营养土的体积比为3:1)。每株周缘间隔大约1 cm。在温室(18~22°C, 光照强度为100 μmol·m⁻²·s⁻¹, 光暗周期为16小时光照/8小时黑暗, 相对湿度为65%)中继续培养。大约8周后, 用直径为0.5 mm的小孔筛子对成熟的种子(M2)进行采收, 干燥2周后备用。

1.2 突变体的筛选及遗传分析

将拟南芥M2种子点种于0.6%MS培养基, 4°C春化3天, 进行暗处理黄化4天。将拟南芥黄化幼苗移入0.8% MS培养基中, 使其下胚轴与根都紧贴在培养基的表面, 排成2行, 进行强蓝光(100 μmol·m⁻²·s⁻¹)单侧处理。通过观察处理后的M2幼苗下胚轴向光弯曲情况, 筛选出下胚轴向光不弯曲的疑似突变体, 将其移出并继续培养, 待单株收获种子后进行遗传和生理分析。

突变体遗传分析参照赵孝亮等(2011)的方法。以*phot1p2sa1*突变体为母本, 分别与*phot1*父本和WT(Landsberg生态型)父本进行回交和杂交得到F₁代, F₁代自交后产生群体F₂。将F₂点种在含有0.6%琼脂的MS培养基上, 4°C春化3天后暗处理黄化4天, 将其移入0.8%MS培养基中, 进行强蓝光(100 μmol·m⁻²·s⁻¹)单侧处理。观察下胚轴向光弯曲与不弯曲的比例, 以确定其遗传特性。

1.3 下胚轴向光弯曲度测量

下胚轴向光弯曲度的测量参照Zhao等(2013)的方法。取黄化4天、长约5~8 mm的拟南芥幼苗, 用镊子小心移入0.8%MS培养基中, 排成2行, 使下胚轴与根部都紧贴在培养基表面, 垂直放于23°C暗室, 水平单侧蓝光或红光处理12小时。用数码相机照相。用电子软件E-尺测量弯曲度数。实验重复3~5次, 统计数据的平均值。实验数据用t检验进行差异显著性分析。

1.4 远红外成像分析

远红外成像分析参照刘浩等(2010)的方法。远红外热成像仪(Therma CAM SC3000, 美国)配备320×240 PtSi探测器, 在室温下温度分辨率小于0.03°C, 安装

在距叶片35–45 cm的高度，同时与监视器连接，以获得可视的植物热成像。用远红外热成像仪对生长2周的拟南芥 $gl1$ 、 $phot1$ 、 $phot1p2sa1$ 和 $phot1phot2$ 幼苗进行叶面温度检测。拍摄的热成像图保存在PMCA存储卡中。通过计算机用仪器所配热成像处理程序对热成像、面积和温度频度分布直方图进行分析处理。

1.5 叶绿体避光运动测定

取生长3–4周的 $gl1$ 、 $phot1$ 、 $phot1p2sa1$ 和 $phot1phot2$ 未抽薹的幼苗，进行充分暗处理12小时。取叶片放入装有缓冲液的小盘中。以黑暗处理为对照，用 $800 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 强光照射叶片30分钟后，放入装有3 mL蒸馏水的注射器，反复抽真空，以除去叶肉细胞间隙的空气，直至叶片呈半透明状态(Doi et al., 2004)。将撕去下表皮后的叶片制成临时装片，在 10×40 倍倒置显微镜下观察、拍照叶肉细胞中的叶绿体。

2 结果与讨论

2.1 PHOT2介导拟南芥下胚轴向光弯曲下游调节子筛选条件的确立

用不同强度的单侧蓝光照射12小时，野生型 $gl1$ 和 $phot1$ 、 $phot2$ 、 $phot1phot2$ 突变体下胚轴弯曲度变化如图1所示。结果显示，随着光照强度的增加，野生型 $gl1$ 和 $phot2$ 弯曲度无明显差异。而在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 单侧蓝光照射下， $phot1$ 下胚轴的弯曲度仅为 18° ，几乎不弯曲，但随光照强度的增加，弯曲度逐渐增加，在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 蓝光照射时，达到最大值，此时， $phot1$ 弯曲度明显大于野生型 $gl1$ 和 $phot2$ 突变体($P<0.01$)。 $phot1phot2$ 双突变体表现为对蓝光不敏感。

除光照强度对下胚轴向光弯曲有影响外，实验结果显示，随着蓝光照射时间的延长， $phot1$ 突变体向光弯曲角度也随之增大(图2)。用单侧 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 蓝光照射4小时， $phot1$ 黄化苗下胚轴向光弯曲度并无明显变化；持续照射8小时，其平均弯曲度为 72.11° 。而当用单侧蓝光持续照射 $phot1$ 黄化苗12小时后，其下胚轴向光弯曲度最为明显，平均弯曲度为 87.48° 。继续增加光照时间，黄化苗下胚轴向光弯曲度不再增加。

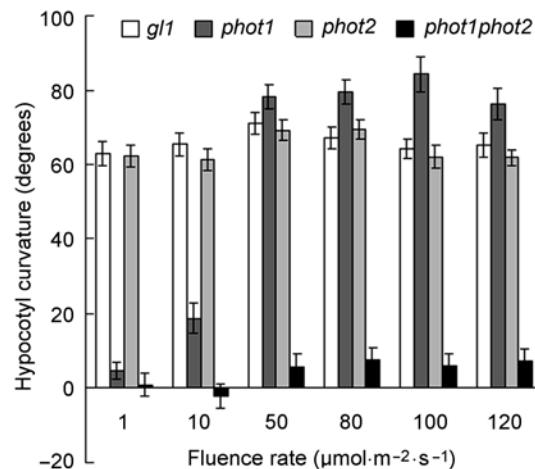


图1 单侧蓝光照射下拟南芥 $gl1$ 、 $phot1$ 、 $phot2$ 和 $phot1phot2$ 下胚轴向光弯曲度

Figure 1 Analysis of hypocotyl phototropic curvature of *Arabidopsis gl1*, *phot1*, *phot2*, and *phot1phot2* in response to unilateral blue light at the indicated fluence rates

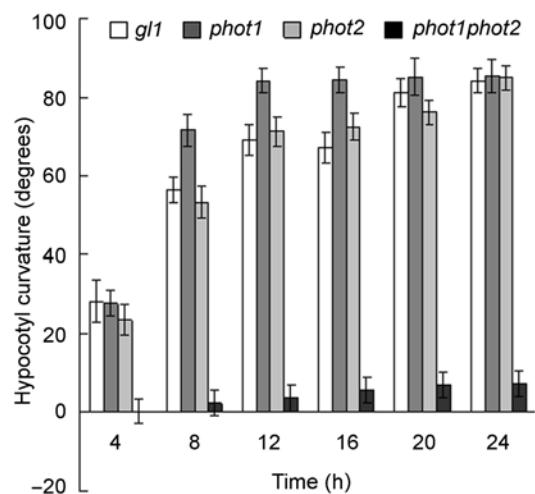


图2 单侧蓝光($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)照射拟南芥 $gl1$ 、 $phot1$ 、 $phot2$ 和 $phot1phot2$ 下胚轴向光弯曲度的时间依赖性

Figure 2 Analysis of hypocotyl phototropic curvature of *Arabidopsis gl1*, *phot1*, *phot2*, and *phot1phot2* exposed to unilateral $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ blue light in different time

基于此，我们以光照强度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的单侧蓝光、持续照射12小时为拟南芥黄化苗下胚轴向光弯曲缺失突变体的筛选条件。

2.2 PHOT2介导拟南芥下胚轴向光弯曲下游调节子的筛选与鉴定

筛选条件确立后,考虑到PHOT1和PHOT2功能冗余调节拟南芥下胚轴向光弯曲生长,为避开PHOT1基因的干扰,寻找PHOT2下游信号分子,我们以 $phot1$ 突变体(遗传背景为Columbia生态型)为材料,利用0.3%EMS(甲基磺酸乙酯)诱变种子,种下自交一代后得到M₂代。从约80 000粒M₂代种子中初步筛选出在100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 单侧蓝光照射12小时下弯曲情况与 $phot1$ 存在明显不同的突变体1株(图3A)。随后将其单株收种,再次进行表型验证,依然表现出对强蓝光刺激黄化苗下胚轴向光不弯曲的表型(图3B)。

将疑似突变体与 $phot1$ 回交, F₂出现下胚轴弯曲和不弯曲表型分离比为3.04:1(接近3:1)。而与WT(Landsberg生态型)杂交,F₂出现表型分离比为8.65:1(接近9:1)(表1)。暗示该突变体向强蓝光不弯曲,可能是除PHOT1基因突变外,由单基因隐性突变引起。该基因可能位于PHOT2下游参与调节拟南芥下胚轴向光弯曲反应。该突变体被命名为 $p2sa1$ (phototropin2 signaling associated1)。鉴于该突变体是在 $phot1$ 突变体背景下筛选获得,因此更名为 $phot1p2sa1$ 。

2.3 突变体 $phot1p2sa1$ 下胚轴向光弯曲验证及叶绿体运动表型分析

强蓝光(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)单侧照射下胚轴向光弯曲度比较结果显示, $phot1$ 黄化苗下胚轴向光弯曲正常, $phot1p2sa1$ 双突变体下胚轴向光不弯曲,呈现 $phot1phot2$ 双突变的表型(图4)。然而 $phot1p2sa1$ 强蓝光刺激叶绿体避光正常(图5C),类似于野生型和 $phot1$ (图5A, B),明显不同于 $phot1phot2$ (图5D)。以上结果暗示突变基因并非PHOT2基因,可能位于PHOT2的下游调节子,特异调节拟南芥黄化苗下胚轴向光弯曲反应。

2.4 突变体 $phot1p2sa1$ 远红外叶温成像分析

将突变体 $phot1$ 、 $phot1p2sa1$ 、 $phot1phot2$ 与野生型($gl1$)一同播种于正常的MS培养基上。待幼苗长出4~6片真叶时,将二者移栽到同一个盘中,待生长2周后进行远红外成像观察(图6)。远红外成像(图6B)显示,

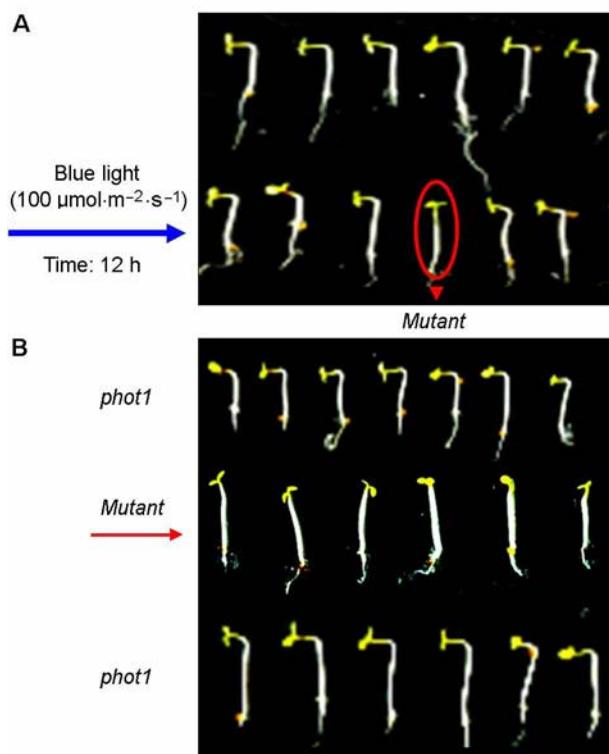


图3 PHOT2介导拟南芥下胚轴向光弯曲下游调节子的筛选
(A) 初步筛选; **(B)** 遗传分析

Figure 3 Isolation of regulator involved in PHOT2-mediated phototropism of hypocotyls in Arabidopsis
(A) Preliminary isolation; **(B)** Genetic analysis

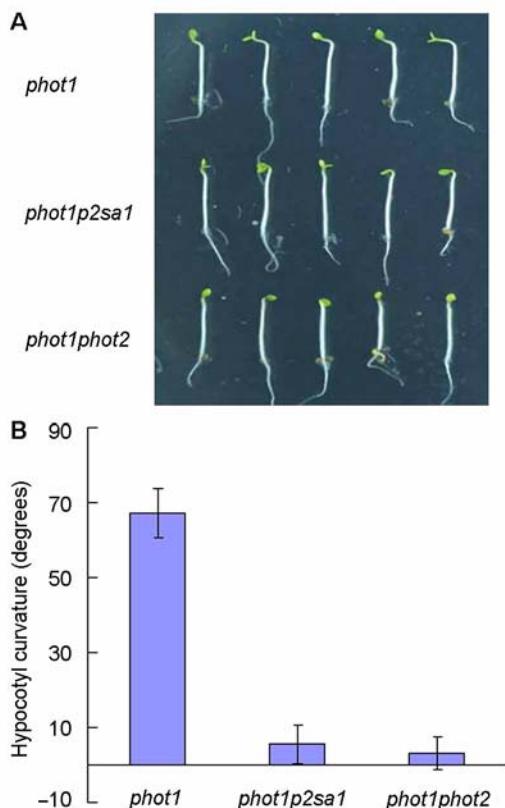
突变体 $phot1p2sa1$ 的叶面温度明显低于 $phot1$ 、 $phot1phot2$ 与 $gl1$,比 $phot1$ 和 $phot1phot2$ 低1°C。

2.5 讨论

植物向光弯曲反应可保证植物以最佳方式获得光源,而向光素所介导的蓝光反应起重要作用,但其信号转导机制及新的信号成分的确定亟待破解。特别是向光素(PHOT1和PHOT2)调节蓝光诱导的拟南芥下胚轴向光弯曲、气孔运动和抑制胚轴生长等生理过程表现功能冗余,PHOT1可能促进了PHOT2调节的PLC途径,引起叶肉细胞内Ca²⁺浓度增加(Harada and Shimazaki, 2007),而PHOT2部分地抑制PHOT1介导的拟南芥叶片延展生长(Carbonnel et al., 2010)。目前,虽已证明向光素PHOT1可能通过桥联蛋白NPH3、RPT2与PKS1(Lariguet et al., 2006)相互作用,影响

表1 突变体杂交遗传分析**Table 1** Genetic analysis of mutant

Cross	F_1		F_2		Total	χ^2
	WT	Mutant	WT	Mutant		
<i>phot1</i> × mutant	443	0	663	218	881	0.06
WT × mutant	379	0	925	107	1 032	0.15

**图4** 拟南芥*phot1*、*phot1p2sa1*和*phot1phot2*突变体下胚轴的向光弯曲性

(A) 生长3天的*phot1*、*phot1p2sa1*和*phot1phot2*黄化苗, 用强蓝光($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)照射12小时的弯曲生长表型; (B) 弯曲度的测量统计结果, 数据来自3次独立实验, 统计30–50个苗

Figure 4 Analysis of hypocotyl phototropic curvature in *phot1*, *phot1p2sa1*, and *phot1phot2* mutants of *Arabidopsis*

(A) Pictures were taken from 3-day-old etiolated seedlings of *phot1*, *phot1p2sa1* and *phot1phot2* grown on same vertical plates and exposed to blue light (BL) illumination at a fluence rate of $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ for 12 h; (B) Phototropic curvature was measured as a change in hypocotyl angle as determined from analysis of stacked images captured. The values are the average of three independent experiments (30–50 measurements each) with SDs.

生长素输入载体PIN1和输出载体AUX1的再定位, 促使生长素不对称分布(Liscum and Reed, 2002; Tamatsu et al., 2004; Esmen et al., 2006), 但其具体作用机制并不清楚。ABCB19(生长素外流转运子)基因的发现, 可能搭起了联系向光素与生长素之间的桥梁(Christie et al., 2011)。但遗憾的是, 该蛋白作为向光素的作用底物仅受PHOT1磷酸化调节, 不能解释PHOT2调节下胚轴向光弯曲的机制。虽已证明在强蓝光下NPH3、RCN1参与PHOT2介导的下胚轴向光弯曲调节, 但是由于PHOT1和PHOT2功能存在互补性, 限制了人们对PHOT2下游信号分子及其转导途径的认识。

为此, 我们以拟南芥*phot1*突变体为材料, 通过EMS诱变筛选PHOT2下游调节因子, 避开PHOT1基因的干扰。在*phot1*突变体的背景下, 我们成功筛选到1个下胚轴对强蓝光单侧刺激不敏感突变体(图3A), 通过连续多代种植确定其能够稳定遗传(图3B)。该突变体在强蓝光($100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)单侧照射下, 其黄化苗下胚轴向光不弯曲, 呈现*phot1phot2*双突变的表型(图4), 然而其强蓝光刺激诱导的叶绿体避光运动正常(图5C), 类似于野生型和*phot1*(图5A, B), 明显不同于*phot1phot2*(图5D)。暗示该突变体并非PHOT2基因突变, 可能是位于PHOT2的下游调节子发生突变, 该调节子参与调节拟南芥黄化苗下胚轴向光弯曲反应, 被命名为*p2sa1*(*phototropin2 signaling associated1*)。鉴于该突变体是在*phot1*突变体的背景下获得, 因此更名为*phot1p2sa1*。随后, 利用远红外成像技术, 分析不同突变体叶面温度以衡量其蒸腾速率, 发现突变体*phot1p2sa1*的叶面温度明显低于*phot1*、*phot1phot2*与*gl1*, 比*phot1*和*phot1phot2*低 1°C (图6B)。暗示基因P2SA1除参与拟南芥下胚轴向光弯曲生长调节外, 可能也参与对气孔运动的调节。

本研究成功克隆P2SA基因, 并鉴定了该基因和蛋白的结构与功能, 进一步探讨其响应PHOT1和

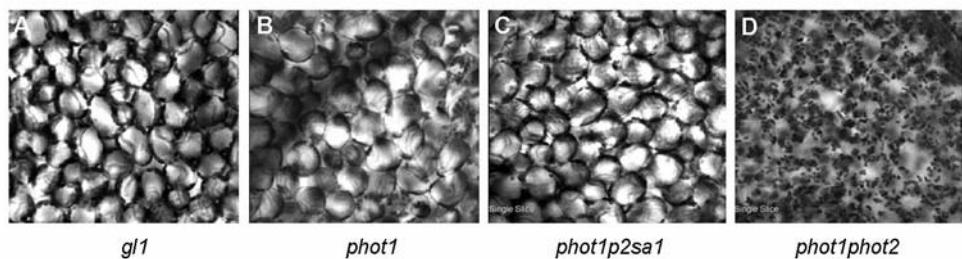


图5 向光素介导的拟南芥叶绿体运动

(A)、(B)、(C)和(D)分别显示野生型(*gl1*)及*phot1*、*phot1p2sa1*和*phot1phot2*突变体叶绿体在叶肉细胞的分布情况

Figure 5 Distribution of chloroplasts in mesophyll cells mediated by phototropins

(A), (B), (C) and (D) showed the distribution of chloroplasts in mesophyll cells of wild type (*gl1*), *phot1*, *phot1p2sa1*, and *phot1phot2* leaves, respectively

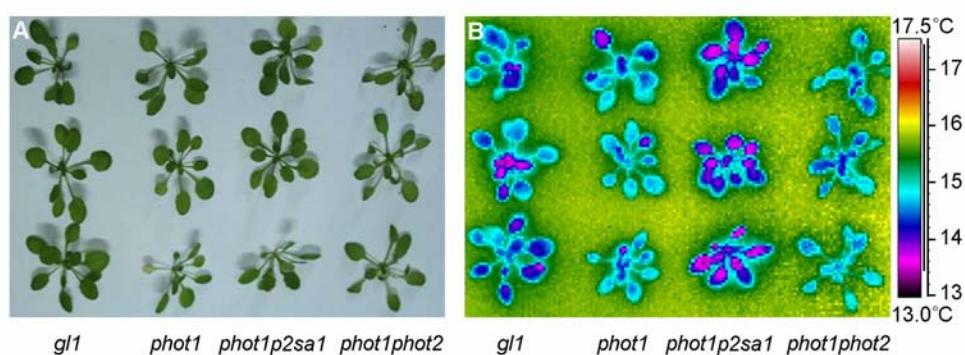


图6 拟南芥突变体*phot1p2sa1*的红外成像

(A) 突变体*phot1*、*phot1p2sa1*、*phot1phot2*与野生型(*gl1*)幼苗的生长状况; (B) 远红外热图显示突变体*phot1p2sa1*叶面温度低于*phot1*、*phot1phot2*与*gl1*, 比*phot1*和*phot1phot2*低1°C

Figure 6 Analysis of thermal picture in *Arabidopsis phot1p2sa1* mutant

(A) Growing state of *phot1*, *phot1p2sa1*, *phot1phot2*, and wild type (*gl1*); (B) Thermal picture showed *phot1p2sa1* had lower leaf temperature than *phot1*, *phot1phot2*, and *gl1*, about 1°C lower than that of *phot1* and *phot1phot2*

PHOT2差异机制, 构建PHOT2调节拟南芥下胚轴向光弯曲信号转导模式。这将为揭示植物适应高光环境的分子机制提供重要的理论基础。

参考文献

- 刘浩, 王棚涛, 安国勇, 周云, 樊丽娜 (2010). 拟南芥干旱相关突变体的远红外筛选及基因克隆. 植物学报 **45**, 220–225.
- 赵孝亮, 安国勇, 王鹏程, 白玲, 宋纯鹏 (2011). 拟南芥根生长缺陷突变体*rei1*的分离和鉴定. 植物学报 **46**, 498–505.
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Peer WA, Makam SN, Murphy AS (2004). Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol* **134**, 28–31.

Physiol **134**, 28–31.

Christie JM, Yang HB, Richter GL, Sullivan S, Thomson CE, Lin JS, Titapiwatanakun B, Ennis M, Kaiserli E, Lee OR, Adamec J, Peer WA, Murphy AS (2011). *phot1* inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism. *PLoS Biol* **9**, e1001076.

de Carbonnel M, Davis P, Roelfsema MRG, Inoue S, Schepens I, Lariguet P, Geisler M, Shimazaki K, Hangerter R, Fankhauser C (2010). The *Arabidopsis* PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiol* **152**, 1391–1405.

Demarsy E, Fankhauser C (2009). Higher plants use LOV to perceive blue light. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 69–74.

- Demarsy E, Schepens I, Okajima K, Hersch M, Bergmann S, Christie J, Shimazaki K, Tokutomi S, Fankhauser C** (2012). Phytochrome kinase substrate 4 is phosphorylated by the phototropin 1 photoreceptor. *EMBO J* **31**, 3457–3467.
- Doi M, Shigenaga A, Emi T, Kinoshita T, Shimazaki K** (2004). A transgene encoding a blue-light receptor, phot1, restores blue-light responses in the *Arabidopsis* *phot1 phot2* double mutant. *J Exp Bot* **55**, 517–523.
- Esmon CA, Tinsley AG, Ljung K, Sandberg G, Hearne LB, Liscum E** (2006). A gradient of auxin and auxin-independent transcription precedes tropic growth responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 236–241.
- Folta KM, Kaufman LS** (2003). Phototropin 1 is required for high-fluence blue light-mediated mRNA destabilization. *Plant Mol Biol* **51**, 609–618.
- Harada A, Shimazaki K** (2007). Phototropins and blue light-dependent calcium signaling in higher plants. *Photochem Photobiol* **83**, 102–111.
- Huala E, Oeller PW, Liscum E, Han IS, Larsen E, Briggs WR** (1997). *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120–2123.
- Inada S, Ohgishi M, Mayama T, Okada K, Sakai T** (2004). RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 887–896.
- Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, Nakayama KI, Doi M, Shimazaki K** (2008). Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 5626–5631.
- Inoue S, Takemiya A, Shimazaki K** (2010). Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 587–593.
- Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M** (2001). *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**, 2138–2141.
- Kasahara M, Kagawa T, Oikawa K, Suetsugu N, Miyao M, Wada M** (2002). Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* **420**, 829–832.
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K** (2001). *phot1* and *phot2* mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**, 656–660.
- Lariguet P, Schepens I, Hodgson D, Pedmale UV, Trevisan M, Kami C, de Carbonnel M, Alonso JM, Ecker JR, Liscum E, Fankhauser C** (2006). PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin1 binding protein required for phototropism. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 10134–10139.
- Liscum E, Reed JW** (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol* **49**, 387–400.
- Motchoulski A, Liscum E** (1999). *Arabidopsis* NPH3: a NPH1 photoreceptor-interacting protein essential for phototropism. *Science* **286**, 961–964.
- Ohgishi M, Saji K, Okada K, Sakai T** (2004). Functional analysis of each blue light receptor, *cry1*, *cry2*, *phot1*, and *phot2*, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 2223–2228.
- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M, Okada K** (2001). *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 6969–6974.
- Sakai T, Wada T, Ishiguro S, Okada K** (2000). RPT2: a signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 225–236.
- Stone BB, Stowe-Evans EL, Harper RM, Celaya RB, Ljung K, Sandberg G, Liscum E** (2008). Disruptions in AUX1-dependent auxin influx alter hypocotyl phototropism in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **1**, 129–144.
- Sullivan S, Thomson CE, Lamont DJ, Jones MA, Christie JM** (2008). *In vivo* phosphorylation site mapping and functional characterization of *Arabidopsis* phototropin 1. *Mol Plant* **1**, 178–194.
- Takemiya A, Inoue S, Doi M, Kinoshita T, Shimazaki K** (2005). Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* **17**, 1120–1127.
- Tatematsu K, Kumagai S, Muto H, Sato A, Watahiki MK, Harper RM, Liscum E, Yamamoto KT** (2004). MAS-SUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 379–393.
- Tseng TS, Briggs WR** (2010). The *Arabidopsis* *rcn1-1* mutation impairs dephosphorylation of *phot2*, resulting in enhanced blue light responses. *Plant Cell* **22**, 392–402.
- Zhao X, Wang YL, Qiao XR, Wang J, Wang LD, Xu CS, Zhang X** (2013). Phototropins function in high-intensity blue light-induced hypocotyl phototropism in *Arabidopsis* by altering cytosolic calcium. *Plant Physiol* **162**, 1539–1551.

Isolation and Characterization of Regulators Involved in PHOT2-mediated Phototropism of Hypocotyls in *Arabidopsis*

Xiang Zhao, Lindan Wang, Yuanyuan Li, Qingping Zhao, Xiao Zhang^{*}

State Key Laboratory of Cotton Biology, Key Laboratory of Plant Stress Biology, College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China

Abstract Previous research suggested that phototropins (PHOT1 and PHOT2) contribute redundantly to high-intensity blue light (HBL)-induced phototropic curvature of hypocotyls in *Arabidopsis thaliana*, which restricts our understanding of the mechanism of PHOT2 signal transduction. We used the *phot1* mutant of *A. thaliana* with an ethylmethane sulphonate mutation to screen HBL-insensitive mutants, avoiding the disruption of PHOT1 activity, and successfully isolated the mutant *p2sa1* (*phototropin2 signaling associated1*). Genetic analysis revealed that the mutant is controlled by a single recessive nuclear gene. Compared with *phot1*, the *phot1p2sa1* mutant lost phototropism on irradiation with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ unilateral blue light, which was consistent with *phot1phot2*. However, *phot1p2sa1* showed chloroplast avoidance of HBL, which was not consistent with *phot1phot2*. P2SA1 may be located downstream of PHOT2 and involved in the regulation of the hypocotyl bending response to HBL.

Key words *Arabidopsis thaliana*, blue light, phototropism of hypocotyls, mutant screening

Zhao X, Wang LD, Li YY, Zhao QP, Zhang X (2014). Isolation and characterization of regulators involved in PHOT2-mediated phototropism of hypocotyls in *Arabidopsis*. *Chin Bull Bot* **49, 254–261.**

* Author for correspondence. E-mail: xzhang@henu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)