

· 研究报告 ·

## 拟南芥光敏色素突变体种子萌发的光温敏感性

罗燕, 刘奇源, 吕元兵, 吴越, 田耀宇, 安田, 李振华\*

贵州大学农学院, 贵州省粮油作物分子育种重点实验室, 贵州省高等学校功能农业重点实验室, 贵阳 550025

**摘要** 为阐明光敏色素家族基因突变对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)种子萌发时环境适应性的影响, 以野生型(Col-0)种子为对照, 对比了*phyA*、*phyB*、*phyC*、*phyD*和*phyE*单突变体种子在12种光温环境下萌发率的差异。结果表明, *phyA*突变体种子适应在红光下萌发, 而不适应在远红光和高温(35°C)下萌发。*phyB*突变体种子适应在白光和远红光背景下的低温(15°C)和适温(25°C)下萌发; 而不适应在高温(35°C)下萌发。*phyC*突变体种子适应在除白光35°C以外的11种光温环境下萌发。*phyD*或*phyE*突变体种子适应在低温(15°C)和适温(25°C)下萌发, 而不适应在高温(35°C)下萌发; 适应在红光和白光下萌发, 而不适应在黑暗和远红光下萌发。5个成员中, *phyB*、*phyC*和*phyD*的突变体种子可能丧失光温整合能力, 而*phyA*和*phyE*的突变体种子未丧失光温整合能力。综上, 光敏色素家族基因突变导致种子萌发对光、温和光×温的适应性改变, 通过靶向修饰光敏色素家族基因可提升种子萌发对不同生态环境的适应性。

**关键词** 光敏色素, 拟南芥, 种子萌发, 光质, 温度, 生态适应性

罗燕, 刘奇源, 吕元兵, 吴越, 田耀宇, 安田, 李振华 (2024). 拟南芥光敏色素突变体种子萌发的光温敏感性. 植物学报 59, 752–762.

我国春季气温普遍偏低, 3月全国气温均值为3–13°C, 4月为9–20°C, 5月为14–25°C, 月均温普遍低于作物种子萌发的适宜温度(temperature, T) 25–30°C, 因此温度是限制春播作物种子萌发的主要环境因子。对于喜光性种子, 当播种深度在2 cm以上时, 由于可见光难以穿过土层, 除温度外, 光亦影响种子萌发, 且光温存在交互作用。因此, 研究光温信号调控种子萌发对于指导光敏性种子播种具有重要意义。

光敏色素(phytochrome, Phy)是植物体内一类重要的光受体, 主要响应红光(red light, 以下简称R)和远红光(far-red light, 以下简称FR)的变化, 能够感受光信号并参与调控植物的多种生理过程(杨立文等, 2019)。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中, 光敏色素家族基因包括5个成员(*phyA*–*phyE*), 可划分为4个亚家族: (I) *phyA*; (II) *phyB*和*phyD*; (III) *phyC*; (IV) *phyE* (Alba et al., 2000; Sharrock et al., 2003)。在依赖光调控的种子萌发中, 光敏色素基因*phyA*和*phyB*

起关键作用(Shinomura et al., 1994, 1996); 此外, *phyC*、*phyD*和*phyE*也参与调控种子萌发(Hennig et al., 2002; Franklin et al., 2003; Dechaine et al., 2009; Strasser et al., 2010)。在依赖温度调控的种子萌发中, *phyA*促进温暖环境下的种子萌发, *phyE*促进寒冷环境下的种子萌发; 而*phyB*对温度的要求范围较为宽泛(Heschel et al., 2007)。近年来, 研究发现*phyB*亦可感知高温信号, 抑制拟南芥种子萌发(Piskurewicz et al., 2009)。

光和温度是两个重要的环境因子。2016年, *Science* “背靠背”论文报道了光敏色素是光温双受体。在拟南芥中, 已有研究表明*phyB*整合光温信号调控种子萌发, 在变温(昼夜温差)和黑暗(darkness, 以下简称D)条件下吸胀的种子中, *phyB*调节植物激素和生物钟基因, 进而促进种子萌发(Arana et al., 2017)。在烟草(*Nicotiana tabacum*)中, 20°C低温条件下光照能加速种子萌发, 在D条件下30°C高温明显抑制种子萌发(招启柏等, 2001)。*NtPHYB1*整合光周期

收稿日期: 2024-01-15; 接受日期: 2024-07-14

基金项目: 国家自然科学基金(No.32060512, No.31860420)、贵州省科技计划(No.黔科合平台人才[2018]5781号)、贵州省粮油作物分子育种重点实验室项目(No.黔科合中引地[2023]008)和贵州省高等学校功能农业重点实验室项目(No.黔教技[2023]007号)

\* 通讯作者。E-mail: lixing\_19841014@126.com

和温度信号, 精准调控烟草种子萌发, 在低温区间 (<15°C), 温度抑制种子萌发, 光信号的作用微乎其微; 在适温(约25°C)区间, 温度可以主导烟草种子萌发, 而光信号的作用并非必需; 在高温区间(>30°C), 种子萌发强烈依赖于光信号的参与(李振华等, 2022)。然而, 光敏色素家族其它成员是否亦整合光温信号调控种子萌发仍不清楚。

光敏色素蛋白一般以二聚体的形式存在, 其活性水平受光和温度调控, Pfr-Pfr具有活性, 而Pfr-Pr和Pr-Pr均不具备活性, R和FR可迅速逆转其活性的转变; 而温度调控Pfr-Pfr到Pfr-Pr的转变比较缓慢, 调控Pfr-Pr到Pr-Pr的转变比较迅速(Klose et al., 2015; Halliday and Davis, 2016)。光敏色素5个成员的活性水平受光温环境的影响存在差异。例如, 在高温D条件下phyE的活性水平较高, 而phyD的活性水平较低。phyB在R下活性水平较高, 而在FR下活性水平较低。此外, 光敏色素家族成员间可形成异二聚体, 如phyB/phyC、phyB/phyD或phyB/phyE, 且在缺少phyB的情况下, phyC的热稳定性下降(Viczián et al., 2021)。近年来, Chen等(2022)研究发现, phyB通过独立于Pfr到Pr构象转变的机制感知温度信号。

综上, 光敏色素家族成员的功能十分复杂, 仅通过分子生物学和遗传学实验难以揭示光敏色素家族各成员整合光温信号调控种子萌发的功能差异。因此, 本研究借助多因素方差分析, 以拟南芥野生型及phyA、phyB、phyC、phyD和phyE突变体种子为实验材料, 对比其在12种光温环境下萌发率的差异, 其中选择D、白光(white light, 以下简称W)、FR和R四种光质可模拟种子在不同避光条件下的萌发情况, 进而揭示种子对光信号的感知和响应(Casal and Jorge, 2013)。选择15°C、25°C和35°C 3种温度可模拟种子在春季、夏季和秋季等不同季节下的萌发温度(Footitt et al., 2013), 进而研究种子对萌发温度的响应和适应。通过多因素方差分析phys各成员感知和整合光温信号调控种子萌发的功能差异, 旨在揭示光敏色素家族基因突变对拟南芥种子萌发光温适应性的影响。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

本研究所用的植物材料拟南芥(*Arabidopsis thaliana*

L.), 包含野生型(wild type, WT) Col-0 (Columbia-0) 与phyA-phyE单突变体材料, phyA (基因编号: At1-g09570; 突变体编号: SALK\_020360C)、phyB (基因编号: At2g18790; 突变体编号: SALK\_022035C)、phyC (基因编号: At5g35840; 突变体编号: SALK\_057517C)、phyD (基因编号: At4g16250; 突变体编号: SALK\_027956C)和phyE (基因编号: At4g18130; 突变体编号: SALK\_092529C)均由福州爱若莎生物科技有限公司提供。所有单突变体材料均经PCR鉴定确认为纯合突变体(附图1)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 试验设计

为研究基因型、光质和温度对拟南芥种子萌发的影响以及它们之间的相互作用, 设计3因素试验, 基因型为6水平, 分别为WT及phyA、phyB、phyC、phyD和phyE突变体种子; 光质处理包括4水平, 分别为W、D、FR和R; 温度处理包括3水平, 分别为15°C、25°C和35°C。通过比较6种基因型种子在12种光温条件下的萌发差异, 分析其基因型效应、温度效应、光质效应以及它们之间的互作效应。

#### 1.2.2 萌发试验

萌发试验参考本课题组前期已发表的方法(李振华等, 2022)。统一批次收获成熟一致的种子, 将新采收种子在4°C条件下层积处理, 待休眠打破后, 于超净台上用0.5%硫酸铜溶液对种子进行15分钟的消毒处理, 用蒸馏水反复冲洗, 去除残留的消毒液。然后用无菌滤纸吸干种子表面的水分, 备用。配制0.8%的琼脂溶液, 并进行高温高压灭菌。将灭菌后的溶液倒入直径为9 cm的培养皿中, 制作琼脂发芽床。为了保证实验的可靠性, 每个处理设3次重复。每次重复使用100粒种子, 并以10 × 10粒的模式均匀地点播在琼脂床表面。然后, 将培养皿放置在人工气候室中, 利用仪器Heliospectra RX30 (Heliospectra, 瑞典)设置不同的光质, 相对湿度为80%。光质和温度的具体设置根据实验设计确定。不同光质的波长和光强: W为全光谱, 光强范围为201.6–235.9  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; R的波长为660 nm, 光强范围68.08–97.60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; FR的波长为735 nm, 光强范围1.67–2.33  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 。在之后的7天中, 统计种子的萌发情况, 每个培养皿

统计的过程不超过1分钟,且在相对应的光质下进行统计。种子萌发的判断标准是胚根突破胚乳并且种子露白。分别以第4天和第7天的数据进行统计分析,以获得更全面的结果。

### 1.3 数据处理

用Excel软件整理数据,利用IBM SPSS Statistics 25软件进行统计分析。因变量是种子萌发率,自变量包括基因型、光质和温度。为了评估基因型、光质和温度以及它们之间的互作对种子萌发的影响,我们采用一般线性模型(general linear model, GLM)中的全因子模型,并使用III型平方和进行多因素方差分析。其中,基因型、温度和光质以及它们之间所有可能的互作将被视为固定效应。采用Duncan's多重比较法分析6种基因型在12种环境下的萌发率差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 PHYs感知光温信号调控种子萌发的功能多样性

研究表明, *phyA*突变体种子在W (15°C、25°C和35°C)和R (25°C和35°C)下萌发率显著高于野生型,在FR (15°C和35°C)下萌发率显著低于野生型(图1A, C, D)。 *phyB*突变体种子在35°C (W和D)下显著高于野生型,而在15°C (W和D)下萌发率显著低于野生型(图1A, B);在FR (15°C、25°C和35°C)下萌发率显著高于野生型(图1D)。上述结果表明, *phyA*缺失导致种子在FR (15°C和35°C)下的萌发率降低,而 *phyB*缺失导致种子在FR (15°C、25°C和35°C)下的萌发率升高;在35°C W下, *phyA*或 *phyB*缺失导致种子萌发率升高;在15°C W下, *phyA*缺失导致种子萌发率升高,而 *phyB*缺失导致种子萌发率降低。 *phyB*缺失导致种子在35°C D下萌发率升高,而在15°C D下萌发率降低。

*phyC*突变体种子在W (15°C和25°C)、D (15°C、25°C和35°C)、R (15°C、25°C和35°C)和FR (15°C、25°C和35°C)下的萌发率显著高于野生型,而在35°C W下的萌发率与野生型无显著差异(图1A–D)。 *phyD*突变体种子在25°C (W、D、FR和R)、15°C (W和D)和35°C (D和FR)下的萌发率显著高于野生型(图1A–D)。 *phyE*突变体种子在25°C (W、R和FR)和15°C R条件下的萌发率显著高于野生型,在35°C FR下的

萌发率显著低于野生型(图1A–D)。表明 *phyC*缺失导致种子在11种光温条件(除35°C W)下的萌发率升高。 *phyD*缺失导致种子在25°C (W、D、R和FR)下的萌发率升高;而 *phyE*缺失导致种子在25°C (W、R和FR)条件下的萌发率升高。

### 2.2 PHYs突变体种子萌发的生态适应性

研究表明,在12种光温环境下种子萌发的组间均值表现为 *phyA*和 *phyB*与野生型无显著差异,但它们均显著小于 *phyC*、 *phyD*和 *phyE* ( $P < 0.001$  或  $P < 0.05$ ) (表1),说明 *phyC*、 *phyD*和 *phyE*突变对种子萌发的生态适应性影响较大,而 *phyA*和 *phyB*突变对种子萌发的生态适应性影响不如 *phyC*、 *phyD*和 *phyE*显著, *phyC*的影响又显著大于 *phyD*和 *phyE*,说明本试验的6个材料中 *phyC*突变体种子的生态适应性最高。

野生型(Col-0)种子的萌发率在15°C (W、D或R)和25°C (W)环境下出现极大值,而在35°C (W、D、R或FR)环境下出现极小值(表2)。上述结果表明,野生型(Col-0)不适应35°C (D、W、R和FR)环境,更适应15°C (W、D和R)和25°C (W)环境。

*phyA*突变体种子的萌发率在W (15°C、25°C或35°C)和R (25°C或35°C)环境下显著高于野生型,而在FR (15°C或35°C)环境下显著低于野生型。且在15°C (W或R)和25°C (W或R)环境下出现极大值,而在35°C (W、D或FR)和25°C (FR)环境下出现极小值(表2),表明 *phyA*突变体适应R (15°C、25°C和35°C)环境,不适应FR (15°C、25°C和35°C)环境;适应W (15°C和25°C),不适应W (35°C)和D (35°C)。

*phyB*突变体种子的萌发率在FR (15°C、25°C或35°C)和35°C (W或D)环境下显著高于野生型,而在15°C (W/D)环境下显著低于野生型。且在15°C (W、D或R)和25°C (W)环境下出现极大值,而在35°C (W、D、R或FR)环境下出现极小值(表2)。上述结果表明, *phyB*突变体更适应15°C (W、D、FR和R)和25°C (FR和W)环境,不适应35°C (W、D、FR和R)环境。

*phyC*突变体种子的萌发率在D/R/FR (15°C、25°C或35°C)和W (15°C或25°C)环境下显著高于野生型。且在15°C (W或R)和25°C (W或R)环境下出现极大值,而在35°C (W、D、R或FR)环境下出现极小值。以上结果说明 *phyC*突变体更适应除35°C W以外的光温环境。

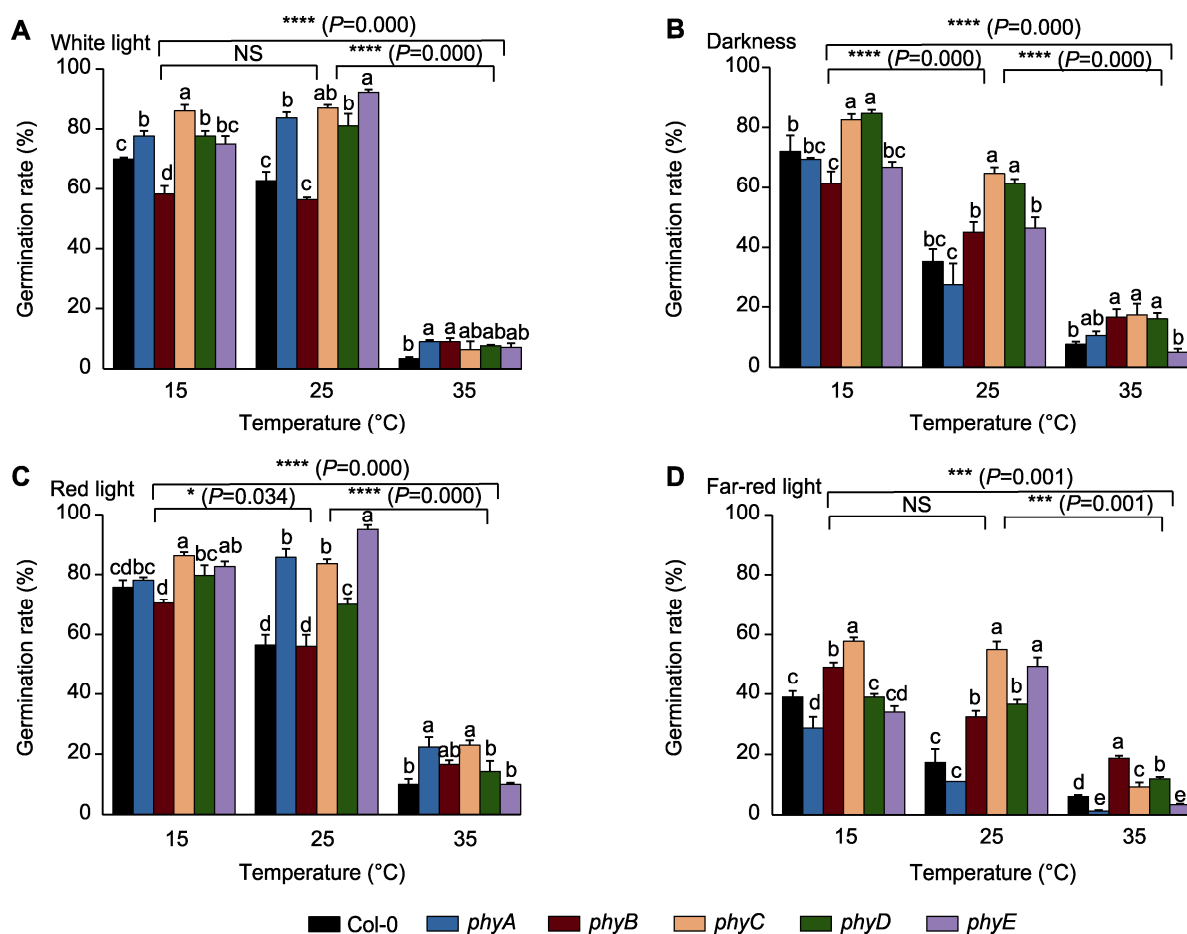


图1 基因型、光质、温度及其互作对拟南芥种子萌发的影响

NS表示无显著差异; \*、\*\*\*和\*\*\*\*分别表示在0.05、0.001和0.0001水平上差异显著。不同小写字母表示各处理间差异显著( $P < 0.05$ )。

**Figure 1** Effects of genotype, light, temperature and their interactions on seed germination in *Arabidopsis thaliana*. NS indicates no significant difference; \*, \*\*\* and \*\*\*\* indicate significant differences at 0.05, 0.001, and 0.0001 level, respectively. Different lowercase letters indicate significant differences among the treatments ( $P < 0.05$ ).

*phyD*突变体种子的萌发率在25°C (W、D、R或FR)、15°C (W或D)和35°C (D或FR)环境下显著高于野生型。且在15°C (W、D或R)和25°C (W)环境下出现极大值,而在35°C (W、D、R或FR)环境下出现极小值(表2)。以上结果说明*phyD*突变体不适应35°C (D、W、R和FR)、更适应15°C (D、W和R)和25°C (D、W和R)环境。

*phyE*突变体种子的萌发率在25°C (W、R或FR)和15°C (R)环境下显著高于野生型,而在FR (35°C)环境下显著低于野生型。且在15°C (W或R)和25°C (W或R)环境下出现极大值,而在35°C (W、D、R或FR)环境下出现极小值(表2)。以上结果说明*phyE*突变体不适应35°C (D、W、R和FR)环境,适应15°C (W

和R)和25°C (W、R和FR)环境(表2)。

综上所述, *phyA*缺失导致种子对R环境的生态适应性增强,对FR环境的生态适应性减弱; *phyB*缺失导致种子在冷凉(15°C)和常温(25°C)下FR和W环境中的生态适应性增强。在高温下, *phyA*和*phyB*的生态适应性普遍较差。 *phyC*缺失导致种子适应除W 35°C以外的光温环境。 *phyD*和*phyE*缺失导致种子在冷凉(15°C)和常温(25°C)环境中的生态适应性普遍增强,在高温(35°C)环境中的生态适应性降低。

在4类光处理下, 6种基因型种子萌发的组间均值表现为R和W无显著差异,但它们均显著高于FR和D条件。在4类光处理下, 6种基因型种子萌发的组间均值表现为15°C条件下显著高于25°C和35°C。表明

表1 基因型、光照和温度处理均值的组内差值比较

Table 1 Comparisons of mean difference within the genotype, light, and temperature treatment

Source	I	J	Mean difference (I-J)	P-value	Standard deviation
Genotype	Col-0	<i>phyA</i>	-4.12	0.069	30.15
		<i>phyB</i>	-2.87	0.104	24.32
		<i>phyC</i>	-16.98	0.000***	30.61
		<i>phyD</i>	-10.42	0.000***	28.95
		<i>phyE</i>	-9.28	0.000***	31.18
	<i>phyA</i>	<i>phyB</i>	1.25	0.682	27.13
		<i>phyC</i>	-12.86	0.000***	32.44
		<i>phyD</i>	-6.3	0.01**	31.10
		<i>phyE</i>	-5.16	0.03*	33.22
		<i>phyB</i>	<i>phyC</i>	-14.11	0.000***
	<i>phyB</i>	<i>phyD</i>	-7.55	0.000***	25.60
		<i>phyE</i>	-6.41	0.046*	28.13
		<i>phyC</i>	<i>phyD</i>	6.56	0.000***
	<i>phyC</i>	<i>phyE</i>	7.69	0.000***	32.73
		<i>phyD</i>	<i>phyE</i>	1.14	0.060
Temperature	15°C	25°C	8.75	0.000***	29.72
		35°C	55.76	0.000***	29.99
	25°C	35°C	47.01	0.000***	29.21
Light	Darkness	White light	-8.89	0.000***	29.79
		Red light	-12.55	0.000***	29.99
		Far-red light	16.13	0.230	30.11
	White light	Red light	-3.66	0.272	30.18
		Far-red light	25.02	0.034*	29.67
	Red light	Far-red light	28.68	0.000***	28.79

\*, \*\*和\*\*\*分别表示在0.05、0.01和0.001水平差异显著。

\*, \*\*, and \*\*\* indicate significant differences at 0.05, 0.01, and 0.001 level, respectively.

拟南芥种子普遍表现为在W和R下较D和FR下更适宜萌发；在冷凉下较温暖和酷热环境下更适宜萌发。在35°C高温环境下，温度对种子萌发的影响较光照更显著。不同突变体种子在高温(35°C)或FR环境下，萌发率均显著降低，说明拟南芥种子不适宜在35°C或FR条件下萌发，且在极端环境下，光照、温度和基因型对种子萌发的影响存在主次效应之分。

### 2.3 PHYs突变体种子整合光温信号的特点

研究表明，*phyA*突变体与野生型种子萌发率呈极显著差异( $P<0.001$ )，且受光和温度信号强烈影响( $P<0.001$ )，三者存在交互作用( $P<0.05$ )。与*phyA*突变体类似，*phyE*突变体与野生型种子萌发率呈极显著差异( $P<0.001$ )，且受光和温度信号的强烈影响( $P<$

0.001)，三者存在交互作用( $P<0.05$ )。与*phyA*和*phyE*突变体不同，*phyB*、*phyC*和*phyD*突变体种子萌发率虽然与野生型存在差异( $P<0.001$ 或 $P<0.05$ )，但基因型与光温信号三者互作无显著互作效应。此外，*phyC*突变体种子与温度存在互作( $P<0.001$ )，但与光无互作效应(表3)。

上述结果表明，*phyA*和*phyE*基因突变可能并不影响种子整合光温信号，而*phyB*、*phyC*或*phyD*突变将影响种子的光温整合能力，尤其是*phyC*突变后，种子萌发时不仅不具有光温整合能力，而且与光的互作也丧失。

### 2.4 讨论与结论

种子萌发始于吸水止于胚根突出(Finch-Savage and

表2 *phys*响应光照和温度信号调控种子萌发Table 2 *phys* regulates seed germination in response to signals of light and temperature

Germination ratio among different genotype (G)	Environmental combinations of light and temperature
Significantly higher than wild type	<i>phyA</i> : WT <sub>15</sub> , WT <sub>25</sub> , WT <sub>35</sub> , RT <sub>25</sub> , and RT <sub>35</sub> <i>phyB</i> : DT <sub>35</sub> , WT <sub>35</sub> , FRT <sub>15</sub> , FRT <sub>25</sub> , and FRT <sub>35</sub> <i>phyC</i> : WT <sub>15</sub> , WT <sub>25</sub> , DT <sub>15</sub> , DT <sub>25</sub> , DT <sub>35</sub> , RT <sub>15</sub> , RT <sub>25</sub> , RT <sub>35</sub> , FRT <sub>15</sub> , FRT <sub>25</sub> , and FRT <sub>35</sub> <i>phyD</i> : WT <sub>15</sub> , WT <sub>25</sub> , DT <sub>15</sub> , DT <sub>25</sub> , DT <sub>35</sub> , RT <sub>25</sub> , FRT <sub>25</sub> , and FRT <sub>35</sub> <i>phyE</i> : WT <sub>25</sub> , RT <sub>15</sub> , RT <sub>25</sub> , and FRT <sub>25</sub>
Significantly lower than wild type	<i>phyA</i> : FRT <sub>15</sub> , and FRT <sub>35</sub> <i>phyB</i> : WT <sub>15</sub> , and DT <sub>15</sub> <i>phyE</i> : FRT <sub>35</sub>
No significant difference	<i>phyA</i> : DT <sub>15</sub> , DT <sub>25</sub> , DT <sub>35</sub> , RT <sub>15</sub> , and FRT <sub>25</sub> <i>phyB</i> : WT <sub>25</sub> , DT <sub>25</sub> , RT <sub>15</sub> , RT <sub>25</sub> , and RT <sub>35</sub> <i>phyC</i> : WT <sub>35</sub> <i>phyD</i> : WT <sub>35</sub> , RT <sub>15</sub> , RT <sub>35</sub> , and FRT <sub>15</sub> <i>phyE</i> : DT <sub>15</sub> , DT <sub>25</sub> , DT <sub>35</sub> , WT <sub>15</sub> , WT <sub>35</sub> , RT <sub>35</sub> , and FRT <sub>15</sub>
Maximum	<i>phyA</i> : WT <sub>15</sub> , RT <sub>15</sub> , WT <sub>25</sub> , and RT <sub>25</sub> <i>phyB</i> : DT <sub>15</sub> , WT <sub>15</sub> , RT <sub>15</sub> , and WT <sub>25</sub> <i>phyC</i> : WT <sub>15</sub> , RT <sub>15</sub> , WT <sub>25</sub> , and RT <sub>25</sub> <i>phyD</i> : DT <sub>15</sub> , WT <sub>15</sub> , RT <sub>15</sub> , and WT <sub>25</sub> <i>phyE</i> : WT <sub>15</sub> , RT <sub>15</sub> , WT <sub>25</sub> , and RT <sub>25</sub> Col-0: DT <sub>15</sub> , WT <sub>15</sub> , RT <sub>15</sub> , and WT <sub>25</sub>
Minimum	<i>phyA</i> : FRT <sub>25</sub> , FRT <sub>35</sub> , DT <sub>35</sub> , and WT <sub>35</sub> <i>phyB</i> : DT <sub>35</sub> , WT <sub>35</sub> , RT <sub>35</sub> , and FRT <sub>35</sub> <i>phyC</i> : DT <sub>35</sub> , WT <sub>35</sub> , RT <sub>35</sub> , and FRT <sub>35</sub> <i>phyD</i> : DT <sub>35</sub> , WT <sub>35</sub> , RT <sub>35</sub> , and FRT <sub>35</sub> <i>phyE</i> : DT <sub>35</sub> , WT <sub>35</sub> , RT <sub>35</sub> , and FRT <sub>35</sub> Col-0: DT <sub>35</sub> , WT <sub>35</sub> , RT <sub>35</sub> , and FRT <sub>35</sub>

温度(T)的下标数字表示温度条件; 黑暗(D)、白光(W)、红光(R)和远红光(FR)分别表示光质条件。

The subscript numbers of temperature (T) indicate the temperature conditions; darkness (D), white light (W), red light (R), and far-red light (FR) represent the light quality conditions.

Leubner-Metzger, 2006; 赵晓亭等, 2021), 是高等植物生命周期的开始(蔡淑钰等, 2023)。光和温度是两个重要的环境因子, 在莴苣(*Lactuca sativa*)、烟草和拟南芥中均发现了光温互作调控种子萌发的现象(Borthwick et al., 1952; Arana et al., 2017; 李振华等, 2022)。莴苣种子萌发适宜的温度范围是15–20°C (Wei et al., 2020)。在20°C、D条件下莴苣种子萌发率接近100%, 但在>27°C、D条件下莴苣种子萌发受到抑制, 5分钟单束R照射将解除该热抑制作用, 但在32°C时单束R照射对热抑制作用的改变不再明显, 但可通过反复照射R将热抑制解除提升到34°C (Saini et al., 1989)。烟草种子萌发的适宜温度范围是25–30°C (王玉芳等, 2009), 最低温度为8°C, 最高温度为40°C (王树会和黄成江, 2008; 王树会等2009)。在20°C条件下W能加速烟草种子萌发, 而在D条件下30°C的温度明显抑制烟草种子萌发(招启柏等, 2001)。拟南芥种子适宜萌发的温度范围是

22–28°C (Qian et al., 2023), 最低温度为10°C (张海波等, 2007), 超过40°C时拟南芥种子将不能萌发(Qian et al., 2023)。15°C/23°C交替温度处理可增强拟南芥种子萌发对光的响应(Arana et al., 2017)。本研究亦发现低温协同D有助于拟南芥种子萌发, 但与前人研究不同的是, 12小时周期性W或R照射未解除35°C高温对拟南芥种子萌发的抑制作用, 其差异有待进一步研究。

R和(或)低温处理和(或)交替温度处理对种子萌发有促进作用, 而FR和D高温将抑制种子萌发(Wilson et al., 2014; Arana et al., 2017)。本研究也发现, 拟南芥种子普遍表现为在W和R下较D和FR下更适宜萌发; 在冷凉下较温暖和酷热环境下更适宜萌发。不同突变体种子在高温(35°C)D或FR环境下, 萌发率均显著降低, 说明拟南芥种子不适宜在D高温(35°C)或FR条件下萌发, 但低温可以减轻D条件对拟南芥种子萌发的抑制。光敏色素蛋白一般以二聚体

**表3** 基因型、光照和温度对拟南芥种子萌发率影响的多因素方差分析**Table 3** Multi-factor variance analysis of the interactions among genotype, light, and temperature in the regulation of seed germination in *Arabidopsis*

	Source	III class sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F	Significance
<i>phyA</i>	Light	15567	3	5189	209.187	0.000***
	Temperature	38280.25	2	19140.125	771.606	0.000***
	Genotype	304.222	1	304.222	12.264	0.001***
	Light × temperature	7754.083	6	1292.347	52.099	0.000***
	Genotype × light	1510.111	3	503.37	20.293	0.000***
	Genotype × temperature	285.194	2	142.597	5.749	0.006**
	Light × temperature × genotype	598.472	6	99.745	4.021	0.002**
<i>phyB</i>	Light	4195.819	3	1398.606	65.051	0.000***
	Temperature	32368.583	2	16184.292	752.758	0.000***
	Genotype	147.347	1	147.347	6.853	0.012*
	Light × temperature	3413.972	6	568.995	26.465	0.000***
	Genotype × light	670.597	3	223.532	10.397	0.000***
	Genotype × temperature	524.694	2	262.347	12.202	0.000***
	Light × temperature × genotype	239.861	6	39.977	1.859	0.107
<i>phyC</i>	Light	6708.819	3	2236.273	118.217	0.000***
	Temperature	48960.194	2	24480.097	1294.102	0.000***
	Genotype	5185.014	1	5185.014	274.098	0.000***
	Light × temperature	3795.139	6	632.523	33.437	0.000***
	Genotype × light	1587.028	2	793.514	41.948	0.000***
	Genotype × temperature	67.819	3	22.606	1.195	0.322
	Light × temperature × genotype	259.639	6	43.273	2.288	0.051
<i>phyD</i>	Light	8161.597	3	2720.532	138.137	0.000***
	Temperature	42934.194	2	21467.097	1090.008	0.000***
	Genotype	1953.125	1	1953.125	99.171	0.000***
	Light × temperature	5383.361	6	897.227	45.557	0.000***
	Genotype × light	181.708	3	60.569	3.075	0.036*
	Genotype × temperature	715.75	2	357.875	18.171	0.000***
	Light × temperature × genotype	80.25	6	13.375	0.679	0.667
<i>phyE</i>	Light	10177.944	3	3392.648	183.662	0.000***
	Temperature	47446.583	2	23723.292	1284.268	0.000***
	Genotype	1549.389	1	1549.389	83.877	0.000***
	Light × temperature	5985.306	6	997.551	54.003	0.000***
	Genotype × light	528.611	3	176.204	9.539	0.000***
	Genotype × temperature	3100.861	2	1550.431	83.933	0.000***
	Light × temperature × genotype	334.139	6	55.69	3.015	0.014*

\*, \*\*和\*\*\*分别表示在0.05、0.01和0.001水平差异显著。

\*, \*\*, and \*\*\* indicate significant differences at 0.05, 0.01, and 0.001 levels, respectively.

形式存在, 其活性水平受光和温度调控, Pfr-Pfr具有活性, 而Pfr-Pr和Pr-Pr均不具备活性, R和FR可迅速逆转其活性的转变; 而温度调控Pfr-Pfr到Pfr-Pr的转

变比较缓慢, 调控Pfr-Pr到Pr-Pr的转变比较迅速。因此推测光温互作调控种子萌发的现象可能依赖于光敏色素活性转变实现。

在模式植物拟南芥中, *phyA*和*phyB*均在D下积累, 其中以*phyB*的积累最为明显。光照可以改变*phyA*和*phyB*的形态和核质定位从而影响植物光响应。*phyB*高丰度积累后在R条件下促进种子萌发, 而*phyA*高丰度积累后在FR条件下促进种子萌发(Shinomura et al., 1994, 1996; Vaistij et al., 2018)。温暖环境下*phyA*促进种子萌发, 寒冷环境下*phyE*正调控种子萌发; 而*phyB*对温度的要求范围较为宽泛(Heschel et al., 2007)。在此基础上, 本研究发现*phyA*缺失导致种子在FR下的低温和高温条件下萌发率降低, *phyB*缺失导致种子在FR下的低温、中温和高温条件下萌发率升高, 说明FR下*phyA*促进种子萌发而*phyB*抑制种子萌发, R下*phyB*促进种子萌发存在适应的温度区间。除*phyA*和*phyB*之外, 光敏色素其它成员*phyC*、*phyD*和*phyE*也在种子萌发中发挥作用(Hennig et al., 2002; Dechaine et al., 2009; Arana et al., 2014)。例如, *phyC*单突变体在整个Pfr/Pr比率范围内萌发率普遍高于野生型, 暗示*phyC*响应光负向调节种子萌发(Arana et al., 2014)。本研究也发现*phyC*缺失导致种子在11种光温条件(除35°C W)下的萌发率升高, 说明*phyC*负调控种子萌发存在适应的光温区间。可见, *phys*成员丰富了种子萌发对不同光温环境的适应性, 更有利于植物适应复杂多变的环境。

自发现光敏色素是光温双受体以来, 已有研究表明*phyB*整合光温信号调控拟南芥种子萌发(Arana et al., 2017), *NtPHYB1*与光周期和温度互作调控烟草种子萌发(李振华等, 2022)。然而, 除*phyB*外, 光敏色素家族其它成员是否亦可整合光温信号调控种子萌发仍知之甚少。本研究发现*phyA*和*phyE*突变体种子萌发率与野生型存在显著差异, 种子萌发受光和温度信号强烈影响( $P<0.001$ ), 基因型与光温三者存在交互作用。与*phyA*和*phyE*突变体不同, *phyB*、*phyC*和*phyD*突变体种子萌发率虽然与野生型存在差异, 但基因型与光温信号三者无显著互作效应。此外, *phyC*突变体种子与温度存在互作( $P<0.001$ ), 但与光无互作效应。可见, 光敏色素家族基因突变可能改变了拟南芥种子萌发时整合光温信号的能力, 但具体哪些家族成员具备光温整合能力尚需遗传学和分子生物学实验进一步证实。

光敏色素、光质和温度在调控拟南芥种子萌发时

存在交互作用, 通过修饰光敏色素成员类型和改善播种光温环境均可显著提高拟南芥种子的萌发率。在农业生产中, 可通过改变植物光敏色素类型来提高种子萌发阶段对特定环境的适应性, 亦可通过改善环境, 如增温补光来提高种子的萌发率。反之, 通过调节光照和温度条件来改善种子的保存效果, 延长种子的保存期限, 确保种子的质量和活力, 从而提高种子萌发率和种植成功率。了解光敏色素如何调节种子对气候变化的响应, 有助于培育更具抗逆性和适应性的作物品种, 提高种子的环境生存能力。

光敏色素家族成员整合光温信号调控种子萌发呈现功能多样性。*phyA*突变体种子在FR下萌发率普遍降低, 而在W (15°C和35°C)下萌发率升高; *phyA*缺失导致种子萌发更适应R环境, 而不适应FR环境; *phyA*突变不影响种子整合光温信号的能力。*phyB*突变体种子在FR和35°C (W或D)下萌发率普遍升高, 而在15°C (W或D)下萌发率降低; *phyB*缺失导致种子萌发对FR的适应性增强; *phyB*突变种子整合光温信号的能力丧失。*phyC*突变体种子在11种光温条件(除35°C W)下的萌发率均升高; 其突变导致种子萌发对绝大多数光温环境适应性提高; *phyC*突变后, 种子不仅不具有光温整合能力, 而且与光的互作也丧失。*phyD*和*phyE*突变体种子在25°C不同光质(R、FR和W)下的萌发率普遍升高; *phyD*或*phyE*缺失导致种子在冷凉(15°C)和常温(25°C)环境中的生态适应性普遍增强, 而在高温(35°C)环境中的生态适应性降低; *phyD*突变影响种子整合光温信号的能力, 而*phyE*突变不影响种子整合光温信号的能力。可见, 光敏色素家族成员在不同光温环境下发挥差异化作用, 且在某些特定条件下光照、温度和基因型对种子萌发的影响存在主次效应。例如, 在35°C高温环境下, 温度较光照在种子萌发上发挥主要作用; 在35°C、FR环境下, 光照和温度发挥主要作用, 基因型次之。因此, 了解光敏色素家族成员的功能多样性有助于创制适应复杂多变自然环境的作物品种。

## 作者贡献声明

罗燕: 实施研究过程, 采集整理数据并撰写论文; 刘奇源: 分析数据并参与论文修改; 吕元兵、吴越、田耀宇和安田: 参与实施研究过程; 李振华: 提出研究选题, 设计研究方案并提供支持。

## 参考文献

- Alba R, Kelmenson PM, Cordonnier-Pratt MM, Pratt LH (2000). The phytochrome gene family in tomato and the rapid differential evolution of this family in angiosperms. *Mol Biol Evol* **17**, 362–373.
- Arana MV, Sánchez-Lamas M, Strasser B, Ibarra SE, Cerdán PD, Botto JF, Sánchez RA (2014). Functional diversity of phytochrome family in the control of light and gibberellin-mediated germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ* **37**, 2014–2023.
- Arana MV, Tognacca RS, Estravis-Barcalá M, Sánchez RA, Botto JF (2017). Physiological and molecular mechanisms underlying the integration of light and temperature cues in *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Environ* **40**, 3113–3121.
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK (1952). A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc Natl Acad Sci USA* **38**, 662–666.
- Cai SY, Liu JX, Wang GF, Wu LY, Song JP (2023). Regulatory mechanism of melatonin on tomato seed germination under Cd<sup>2+</sup> stress. *Chin Bull Bot* **58**, 720–732. (in Chinese)
- 蔡淑钰, 刘建新, 王国夫, 吴丽元, 宋江平 (2023). 褪黑素促进镉胁迫下番茄种子萌发的调控机理. *植物学报* **58**, 720–732.
- Casal JJ (2013). Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annu Rev Plant Biol* **64**, 403–427.
- Chen D, Lyu M, Kou XX, Li J, Yang ZX, Gao LL, Li Y, Fan LM, Shi H, Zhong SW (2022). Integration of light and temperature sensing by liquid-liquid phase separation of phytochrome B. *Mol Cell* **82**, 3015–3029.
- Dechaine JM, Gardner G, Weinig C (2009). Phytochromes differentially regulate seed germination responses to light quality and temperature cues during seed maturation. *Plant Cell Environ* **32**, 1297–1309.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* **171**, 501–523.
- Footitt S, Huang ZY, Clay HA, Mead A, Finch-Savage WE (2013). Temperature, light and nitrate sensing coordinate *Arabidopsis* seed dormancy cycling, resulting in winter and summer annual phenotypes. *Plant J* **74**, 1003–1015.
- Franklin KA, Praekelt U, Stoddart WM, Billingham OE, Halliday KJ, Whitelam GC (2003). Phytochromes B, D, and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**, 1340–1346.
- Halliday KJ, Davis SJ (2016). Light-sensing phytochromes feel the heat. *Science* **354**, 832–833.
- Hennig L, Stoddart WM, Dieterle M, Whitelam GC, Schäfer E (2002). Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **128**, 194–200.
- Heschel MS, Selby J, Butler C, Whitelam GC, Sharrock RA, Donohue K (2007). A new role for phytochromes in temperature-dependent germination. *New Phytol* **174**, 735–741.
- Klose C, Venezia F, Hussong A, Kircher S, Schäfer E, Fleck C (2015). Systematic analysis of how phytochrome B dimerization determines its specificity. *Nat Plants* **1**, 15090.
- Li ZH, Wang XY, Liu YL, Zhao JH (2022). *NtPHYB1* interacts with light and temperature signal to regulate seed germination in *Nicotiana tabacum* L. *Acta Agron Sin* **48**, 99–107. (in Chinese)
- 李振华, 王显亚, 刘一灵, 赵杰宏 (2022). *NtPHYB1*与光温信号互作调控烟草种子萌发. *作物学报* **48**, 99–107.
- Piskurewicz U, Turečková V, Lacombe E, Lopez-Molina L (2009). Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *EMBO J* **28**, 2259–2271.
- Qian WJ, Zhu YX, Chen QS, Wang SY, Chen LL, Liu T, Tang HR, Yao HY (2023). Comprehensive metabolomic and lipidomic alterations in response to heat stress during seed germination and seedling growth of *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **14**, 1132881.
- Saini HS, Consolacion ED, Bassi PK, Spencer MS (1989). Control processes in the induction and relief of thermoinhibition of lettuce seed germination: actions of phytochrome and endogenous ethylene. *Plant Physiol* **90**, 311–315.
- Sharrock RA, Clack T, Goosey L (2003). Differential activities of the *Arabidopsis* phyB/D/E phytochromes in complementing *phyB* mutant phenotypes. *Plant Mol Biol* **52**, 135–142.
- Shinomura T, Nagatani A, Chory J, Furuya M (1994). The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A. *Plant Physiol* **104**, 363–371.
- Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M (1996). Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8129–8133.
- Strasser B, Sánchez-Lamas M, Yanovsky MJ, Casal JJ, Cerdán PD (2010). *Arabidopsis thaliana* life without phytochromes. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 4776–4781.

- Vaistij FE, Barros-Galvão T, Cole AF, Gilday AD, He ZS, Li Y, Harvey D, Larson TR, Graham IA** (2018). *MOTHER-OF-FT-AND-TFL1* represses seed germination under far-red light by modulating phytohormone responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**, 8442–8447.
- Viczián A, Klose C, Hiltbrunner A, Nagy F** (2021). Editorial: plant phytochromes: from structure to signaling and beyond. *Front Plant Sci* **12**, 811379.
- Wang SH, Huang CJ** (2008). Effect of low temperature on tobacco seed germination. *China Seed Ind* (5), 48–49. (in Chinese)
- 王树会, 黄成江 (2008). 低温对烟草种子萌发的影响. 中国种业 (5), 48–49.
- Wang SH, Zhao GK, Yang ZQ, Zhang HY** (2009). The impact of extreme temperature on seed germination of tobacco. *China Seed Ind* (9), 52–53. (in Chinese)
- 王树会, 赵高坤, 杨志强, 张红艳 (2009). 极端高温对烟草种子萌发的影响. 中国种业 (9), 52–53.
- Wang YF, He HX, Zhang MS, Peng SW, Xu L, Yang XR, Zhai X** (2009). Effects of light, temperature and salt stress on seed germination of Hongda (a tobacco variety). *Seed* **28**(12), 19–22. (in Chinese)
- 王玉芳, 贺化祥, 张明生, 彭斯文, 徐利, 杨小蕊, 翟欣 (2009). 光照、温度和盐胁迫对红花大金元种子萌发的影响. 种子 **28**(12), 19–22.
- Wei SW, Yang X, Huo GT, Ge GJ, Liu HY, Luo LJ, Hu JG, Huang DF, Long P** (2020). Distinct metabolome changes during seed germination of lettuce (*Lactuca sativa* L.) in response to thermal stress as revealed by untargeted metabolomics analysis. *Int J Mol Sci* **21**, 1481.
- Wilson RL, Kim H, Bakshi A, Binder BM** (2014). The ethylene receptors ETHYLENE RESPONSE1 and ETHYLENE RESPONSE2 have contrasting roles in seed germination of *Arabidopsis* during salt stress. *Plant Physiol* **165**, 1353–1366.
- Yang LW, Liu SR, Lin RC** (2019). Advances in light and hormones in regulating seed dormancy and germination. *Chin Bull Bot* **54**, 569–581. (in Chinese)
- 杨立文, 刘双荣, 林荣呈 (2019). 光信号与激素调控种子休眠和萌发研究进展. 植物学报 **54**, 569–581.
- Zhang HB, Liu P, Liu LH, Lan HY, Zhang FC** (2007). Seed germination characteristics and ecological adaptability of *Arabidopsis pumila*, a Xinjiang-originated ephemeral plant species. *Acta Ecol Sin* **27**, 4310–4316. (in Chinese)
- 张海波, 刘彭, 刘立鸿, 兰海燕, 张富春 (2007). 新疆短命植物小拟南芥(*Arabidopsis pumila*)种子萌发特性及其生态适应性. 生态学报 **27**, 4310–4316.
- Zhao QB, Song P, Wang GZ, Lü B, Cao XZ** (2001). Effect of light, temperature and phytohormone on seed germination and seedling growth of *Nicotiana tabacum*. *Acta Tabacaria Sin* **4**, 29–32. (in Chinese)
- 招启柏, 宋平, 王广志, 吕冰, 曹显祖 (2001). 光、温、激素对烟草种子萌发和幼苗生长的影响. 中国烟草学报 **4**, 29–32.
- Zhao XT, Mao KT, Xu JH, Zheng C, Luo XF, Shu K** (2021). Protein phosphorylation and its regulatory roles in seed dormancy and germination. *Chin Bull Bot* **56**, 488–499. (in Chinese)
- 赵晓亭, 毛凯涛, 徐佳慧, 郑钊, 罗晓峰, 舒凯 (2021). 蛋白质磷酸化修饰与种子休眠及萌发调控. 植物学报 **56**, 488–499.

## Photothermal Sensitivity of Phytochrome Mutants During Seed Germination in *Arabidopsis thaliana*

Yan Luo, Qiyuan Liu, Yuanbing Lü, Yue Wu, Yaoyu Tian, Tian An, Zhenhua Li\*

Key Laboratory of Functional Agriculture of Guizhou Provincial Higher Education Institutions, Key Laboratory of Molecular Breeding for Grain and Oil Crops in Guizhou Province, College of Agronomy, Guizhou University, Guiyang 550025, China

**Abstract** The phytochrome gene family play a critical role in mediating photothermal responses during *Arabidopsis thaliana* seed germination. Here we evaluated the germination rates of *phyA*, *phyB*, *phyC*, *phyD*, and *phyE* single mutants under 12 different light and temperature regimes, using wild-type (Col-0) seeds as controls. Our results indicate that *phyA* mutant seeds germinate under red light but are inhibited under far-red light and high temperatures (35°C). *phyB* mutant seeds germinate at low (15°C) and moderate (25°C) temperatures under both white light and far-red light, but not at high temperatures (35°C). *phyC* mutant seeds show consistent germination across all conditions except under white light at high temperature (35°C). Both *phyD* and *phyE* mutant seeds germinate at low (15°C) and moderate (25°C) temperatures, and under red and white light, but not at high (35°C) temperature, darkness or far-red light. These observations suggest that *phyB*, *phyC*, and *phyD* mutants may have impaired integration of light and temperature cues, whereas *phyA* and *phyE* mutants appear to maintain this integrative function. Overall, our findings demonstrate that mutations in phytochrome genes can modify seed germination adaptability to varying environmental conditions.

**Key words** phytochrome, *Arabidopsis*, seed germination, light quality, temperature, ecological adaptability

Luo Y, Liu QY, Lü YB, Wu Y, Tian YY, An T, Li ZH (2024). Photothermal sensitivity of phytochrome mutants during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Chin Bull Bot* **59**, 752–762.

\* Author for correspondence. E-mail: lixing\_19841014@126.com

(责任编辑: 朱亚娜)

**附图1** 拟南芥T-DNA插入突变体PCR鉴定结果

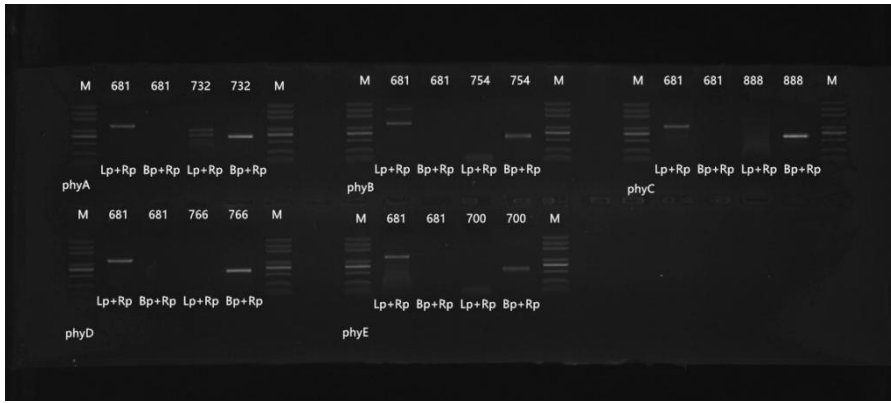
**Appendix figure 1** PCR identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis*

<https://www.chinbullbotany.com/fileup/1674-3466/PDF/24-008-1.pdf>

### 通讯作者简介



**李振华**, 男, 1984年10月生, 博士, 教授/博导。目前在贵州大学农学院任教。兼任中国植物学会种子科学与技术专业委员会委员, 中国作物学会种子科学知识传播专家, 国家技术转移专业人员中级技术经纪人, 国家自然科学基金通讯评审专家, 人力资源和社会保障部服务基层重点联系专家。担任《中国农业科学》和《山地农业生物学报》青年编委。获得全国优秀博士后, 贵州省优秀青年科技人才, 扬州市创业领军人才, 贵阳市高层次创业人才等荣誉称号; 荣获首届全国博士后创新创业大赛银奖和贵州省科技进步二等奖等奖项。指导学生获“第十三届挑战杯”创业计划竞赛国家铜奖, 省赛金奖, 互联网+创业计划省赛一等奖, 第三届全国种艺大赛国赛特等奖等。现主持国家自然科学基金2项, 贵州省优秀青年科技人才项目1项, 国家高新技术企业横向项目3项。以第一作者或通讯作者在 *Trends in Food Science and Technology*、*Environmental and Experimental Botany*、*中国农业科学* 和 *作物学报* 等国内外期刊上发表论文50多篇。获得发明专利8项, 实用新型专利5项。



附图 1 拟南芥 T-DNA 插入突变体 PCR 鉴定结果

Appendix figure 1 PCR identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis*

附表 1 PCR 引物序列

Appendix table 1 PCR primer sequences

Gene name	Gene number	SALK number	Primer LP	Primer RP
PhyA	At1g09570	SALK_020360C	AGGTGGCAAGTATGTGGAGTG	CCATGGACCGTAAACATTAGC
PhyB	At2g18790	SALK_022035C	CATCATCAGCATCATGTCACC	TTCACGAAGGCAAAGAGTTG
PhyC	At5g35840	SALK_057517C	TTAGGCTTACGTAGCTTCCCC	GATGGAGCTGAGCATAGAACG
PhyD	At4g16250	SALK_027956C	AACCCGGTAGAATCAGAATGG	ATCGGTTACAGTGAAAATGCG
PhyE	At4g18130	SALK_092529C	AAAGAGGCGGTCTAGTTCAGC	TATCAGTGGTTAAACCCGTCG
Primer BP	LBb1.3: ATTTTGCCGATTTTCGGAAC			

注: LBb1.3 为官方推荐的最佳引物

Note: LBb 1.3 is the best officially recommended primer

附表 2 PCR 反应体系

Appendix table 2: PCR reaction system

Reagent	Consumption ( $\mu$ L)
金牌 mix	45
引物 F	2
引物 R	2
DNA	1

附表 3 PCR 反应程序

Appendix table 3 The PCR reaction procedure

Temperature ( $^{\circ}$ C)	Time	
98	2 min	
98	10 s	} 35 cycles
56	10 s	
72	10 s/kb	
72	2min	
4	Hold	