

文章编号: 1671-4229(2024)02-0026-11

小肽 GLV2 参与调控拟南芥叶片形态建成

李佳璇¹, 杨佳圆², 吴良凡³, 和黎明³, 黎家^{1,3}, 李小鹏^{1*}

(1. 广州大学 生命科学学院, 广东 广州 510006; 2. 成都市盐道街小学 528 校区, 四川 成都 610011;
3. 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730030)

摘要: 在植物中, 小肽激素在调控植株生长发育及环境适应等过程中发挥着不可替代的作用, 其中, GLVs 家族被证明参与根尖分生组织发育与维持、根向地性、侧根发生及植物抗病等过程, 而该家族成员是否参与调控地上部分的生长发育尚不清楚。本研究从分析 GLVs 小肽基因家族的组织表达出发, 发现部分 GLVs 在叶中有表达, 其中, GLV2 表达丰度最高。利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术, 本研究获得了 *glv2* 突变体并对其表型进行了分析。结果显示, 相较于野生型, *glv2* 突变体莲座叶展现出叶片尖端及两侧边缘下卷、叶片狭长的表型。组织切片和扫描电镜观察表明, *glv2* 叶片卷曲主要由海绵组织细胞发育异常造成。现有研究认为, 小肽 GLVs 家族主要作为受体激酶 RGIs 家族的配体发挥功能。本研究通过表达模式分析发现, 大部分 RGIs 家族成员在叶中有表达, 并且 RGIs 家族五重缺失突变体展现 *glv2* 类似的叶片形态表型。进一步的 qRT-PCR 分析显示, *glv2* 叶片中生长素相关基因出现上调表达, 暗示着 *glv2* 中生长素信号被一定程度地激活, 进而造成叶片形态变化。综上, 本研究证明 GLV2 可能被 RGIs 感知后, 通过调控生长素信号影响植物叶肉细胞发育, 进而调控叶片形态建成。

关键词: 植物小肽; GLVs; RGIs; 生长素; 叶片形态

中图分类号: Q945.45 **文献标志码:** A

Peptide GLV2 is involved in regulating leaf morphogenesis in *Arabidopsis*

LI Jia-xuan¹, YANG Jia-yuan², WU Liang-fan³, HE Li-ming³, LI Jia^{1,3}, LI Xiao-peng^{1*}

(1. School of Life Science, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 2. Chengdu Yandaojie Primary School 528 Campus, Chengdu 610011, China; 3. School of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

Abstract: Peptide hormones play indispensable roles in regulating plant growth, development, and environmental adaptation. GLVs peptide family has been demonstrated to participate in regulating various processes such as root meristem development, root gravitropism, lateral root initiation, and plant immunity. However, it remains unclear whether members of GLVs family are also involved in regulating the development of aerial parts of a plant. We examined the expression patterns of all 11 GLV genes, and found that some members are expressed in leaves, with GLV2 showing more expression than other GLVs. Using a CRISPR-Cas9 gene editing approach, we generated a *glv2* mutant. Compared to the wild type, *glv2* exhibited curled and elongated leaf phenotypes. Detailed examinations via histological sections and scanning electron microscopy analyses revealed that leaf curling in the *glv2* mutant primarily resulted from the abnormal development of the spongy tissues. Existing researches demonstrate that GLV family members act primarily as the ligands of the receptor kinase family, RGIs. We also found that most RGI family members are expressed in leaves. A quintuple mutant of

收稿日期: 2023-12-29; 修回日期: 2024-01-21

基金项目: 教育部重点实验室开放基金资助项目(lzujbky-2022-kb03); 广州市基础与应用基础研究专题—青年博士“启航”资助项目(2024A0453252)

作者简介: 李佳璇(1997—), 女, 硕士研究生. E-mail: jxli163@193.com

* 通信作者. E-mail: lixp@gzhu.edu.cn

引文格式: 李佳璇, 杨佳圆, 吴良凡, 等. 小肽 GLV2 参与调控拟南芥叶片形态建成[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2024, 23(2): 26-36.

RGIs exhibited abnormal leaf curl phenotype similar to *glv2*. qRT-PCR analysis identified a number of auxin-related genes which are up-regulated in *glv2* leaves, suggesting the potential activation of auxin signaling as a contributing factor to the altered leaf morphology in the *glv2* mutant. In summary, our results suggest that GLV2, likely perceived by *RGIs*, modulates plant leaf mesophyll cell development by regulating auxin signaling, thereby influencing leaf morphogenesis.

Key words: peptides; GLVs; *RGIs*; auxin; leaf morphogenesis

小肽一般指 5 ~ 60 个氨基酸组成的肽段,在植物中,有时也宽泛地指长度小于 100 个氨基酸的蛋白质^[1-2]。自 1991 年科学家在番茄中首次报道植物小肽-系统素参与调控植物抗病虫害以来,已报道发现了几十种的植物小肽参与到植物的生长发育调控及环境适应中^[3-7]。与传统植物激素一样,植物小肽起作用的浓度很低,有些甚至可以在飞摩尔浓度级别发挥功能。小肽通常是作为信号分子被受体识别,进而通过信号传导发挥功能。基于小肽的作用机制与激素相似,现科学界也将植物小肽称为“多肽激素”^[8]。

植物小肽 GLV/RGF/CLEL 家族是一组分泌型翻译后修饰多肽,文献[9]最早发现其家族成员参与调控根尖近端分生组织发育、根的向地性反应和侧根发生等根发育过程。在 2010 年, Yoshikatsu Matsubayashi 实验室首次鉴定到一组含有 9 个成员的多肽类激素,并通过一系列遗传生化实验证明,这类具有磺酸化修饰的多肽在维持拟南芥根尖干细胞稳态过程中承担着重要功能,也由此将其命名为根分生组织生长因子 ROOT GROWTH FACTOR(RGF)^[10]。随后, Pierre Hilson 实验室在研究中过表达这个家族中的 3 个成员时,发现过表达植株的根呈波浪卷曲的表型,基于此又将这类多肽命名为 GOLVEN(GLV),并进一步经全基因组同源序列分析,鉴定到这类多肽家族有 11 个成员^[11]。同时, Sheng Luan 实验室也发现该家族部分成员参与到根生长及侧根发生中,并将该家族命名为 CLV3/ESR-related peptide-Like(CLEL)^[12]。3 家实验室从不同角度解析了该家族的功能,也分别进行了命名,本研究采用 GLVs 表示该小肽家族。

具有生物学活性的 GLVs 小肽是由含 86 ~ 163 个氨基酸残基的前体蛋白经酶解切割及翻译后修饰而形成^[9]。11 个 GLVs 成员的前体蛋白结构组成相似,包含一段可变的中间区域分别连接两端的保守区域。可变的中间区在不同的 GLVs 成员间同源性低,蛋白序列高度变化;N 端包含信

号肽结构,引导前体蛋白进入有序分泌途径;C 端包含所有 GLVs 成员中保守的基序,此基序定义了功能性分泌的成熟多肽家族,一般含 10 ~ 20 个氨基酸残基,并携带两种类型的翻译后修饰:酪氨酸残基磺酸化及脯氨酸残基羟基化^[13-14]。成熟的 GLVs 小肽分泌到胞外后,经受体识别后进行信号传导及基因表达变化,实现对植物生长发育及环境适应的调控^[15]。

2016 年,3 个团队通过不同的实验手段独立鉴定到 GLV11(RGF1)的受体^[16-18]。日本名古屋大学 Yoshikatsu Matsubayashi 实验室利用光亲和标记筛选到能够与小肽 RGF1 结合的 3 个受体激酶,并将它们命名为 RGF Receptors(RGFRs);清华大学柴继杰课题组从结构生物学出发,鉴定到了同一家族的 5 个受体激酶作为 RGF1 的受体;兰州大学/广州大学黎家教授团队通过正向遗传筛选,鉴定到了对 RGF1 完全不敏感的 *LRR-RLK* 家族五重缺失突变体,并将其命名为 RGF1 Insensitives(RGIs)。随后,进一步研究证明, SERKs 作为共受体与 *RGIs* 共同感知 RGF1,并通过磷酸化将信号传递到细胞内^[16,19]。RGF1 被 *RGIs*/SERKs 受体复合体感知后,通过 YODA-MKK4/5-MPK3/6 途径将信号传递到细胞内,最终通过调控 AP2 家族转录因子 *PLETHORA1/2(PLT1/2)* 的转录与蛋白稳定性,实现对根尖干细胞稳态平衡的调控^[20-21]。

RGF1 受体的发现极大地促进了 GLVs 家族功能的解析。在侧根发育过程中, GLV6/10 被受体 *RG11/4/5* 感知,随后通过抑制下游 MPK3/6 的功能而改变侧根起始过程中侧根原基细胞的不对称分裂和主根中生长素的分布,从而影响侧根的起始发育^[22-23]。在植物免疫反应过程中, *GLV7* 基因在叶片中会受到病原菌的诱导表达,增加的 *GLV7* 小肽可被其受体复合体 *RG14/5-BAK1/SERK4* 感知,进而进一步诱导拟南芥免疫应答并增强其对病原菌的抗性^[24]。此外,近期也有研究显示, *GLV2* 作为植物细胞因子,被受体 *RGIs* 识别后,可

促进 RGI 与 PTI 膜上受体 FLS2 的结合,促进植物的免疫反应,进而提高植物的抗病能力^[25]。除了上述功能外,GLVs 的异常表达也会造成植物根向地性及根毛发育的异常^[26]。这些研究表明,小肽 GLVs 家族在植物根的可塑性生长及植物免疫反应过程中不可或缺。然而,生物信息学分析及组织表达分析显示,GLVs 小肽基因家族多个成员在地上部分也有表达^[26],表明小肽 GLVs 家族可能也会影响植物地上部分的生长发育,但其调控机制还不清楚。

本研究从 GLVs 小肽家族基因的表达模式分析出发,分析显示 *GLV2* 在植物叶片中大量表达;随后利用 CRISPR-Cas9 基因编辑系统构建得到 *glv2* 突变体;比较观察发现,相较于野生型,*glv2* 的莲座叶叶片形态异常;进一步分析发现,RGI 五重缺失突变体存在 *glv2* 类似地叶片卷曲狭长表型;利用 qRT-PCR 检测分析显示,*glv2* 中生长素相关因子出现差异表达。这些结果表明,小肽 GLV2 可能通过 RGI 信号通路影响叶片中生长素信号,进而调控植物叶片形态建成。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

本研究中所用到的野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L. Columbia)、大肠杆菌 DH5 α 和根瘤农杆菌 GV3101 感受态细胞、载体 pDONR/zeo、pBIB-BASTA-GWR-GUS 与 pBIB-BASTA-GWR-NLS-YFP 载体均为本实验室保存。Crispr-Cas9 基因编辑系统所用载体 pCBC-DT1T2 和 pHEE401E 由中国农业大学陈其军教授分享^[27-29]。

1.2 *GLV2* 组织表达分析

以拟南芥野生型基因组为模板,使用旁翼带有部分 attB1 和 attB2 序列的 *GLV2* 启动子特异性引物和 attB1 和 attB2 完整序列引物(表 1)进行巢氏 PCR 扩增,并利用胶回收试剂盒(Vazyme)纯化目标片段。目标片段在 BP 酶(Invitrogen)作用下重组至 pDONR/zeo 后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经菌落鉴定、摇培和质粒提取得到入门载体,并送至测序公司进行一代测序。测序正确的入门载体经 LR 酶(Invitrogen)作用下与 pBIB-BASTA-GWR-GUS 及 pBIB-BASTA-GWR-NLS-YFP 反应后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,菌落

鉴定、摇培和质粒提取得到终载体。终载体经热激法转化农杆菌 GV3101 感受态细胞,利用花序浸染法转化拟南芥野生型,T1 代幼苗通过除草剂筛选获得阳性植株。

获得的 *pGLV2-GUS* 及 *pGLV2-NLS-YFP* 转基因 T3 代纯合植株经 1% NaClO 消毒后点于 1/2 MS 平板上生长 5 d。*pGLV2-GUS* 植株先于 90% 丙酮中固定,再置换成 GUS 染色液(50 mM PBS 溶液(pH 7.2)、0.5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 、0.5 mM $K_4Fe(CN)_6$ 、34.2 mM Na_2HPO_4 及 5.8 mM NaH_2PO_4 、2 mM X-Gluc),37 °C 暗下染色 6 h。染色材料经 75% 乙醇长时间脱色后,利用体式显微镜(ZEISS Axio Zoom.V16)观察并记录图像。*pGLV2-NLS-YFP* 幼苗叶片置于含 70 μ L 水的载玻片上压片,根置于含 70 μ L 25 ng/mL 的碘化丙啶溶液的载玻片上压片,随后在激光共聚焦显微镜(ZEISS LSM 980)下观察并记录图像。

1.3 基于 Crispr-Cas9 系统的 *glv2* 突变体构建与鉴定

借助 CRISPR 靶点设计网站 CRISPR-LANT(<https://www.genome.arizona.edu/crispr/CRISPRsearch.html>)筛选两个合适的靶点(表 1)。将一个 19-nt 靶点序列替换引物 DT1-BsF/DT1-F0(表 1)中的 19-nt N,另一个 19-nt 靶点的反向互补序列替换 DT2-BsR/DT2-R0(表 1)。以 pCBC-DT1DT2 为模板,通过巢式 PCR 扩增得到 gRNA 结构单元部分元件。随后利用 Bsa I 内切酶,将获得的片段通过 Golden Gate 组装法导入 pHEE401E,获得完整的 CRISPR-Cas9 基因编辑系统,并进行一代测序确认靶点信息无误。测序正确的载体通过热激法转化农杆菌,利用花序浸染法转化拟南芥野生型,T1 代幼苗通过潮霉素平板筛选获得阳性幼苗,随后移至培养土中。

在两个靶点的两侧设计一对引物 *glv2-GT-F/R*(表 1)。通过快提法提取拟南芥叶片基因组,利用普通 taq 酶(Vazyme)进行 PCR 扩增,琼脂糖电泳检测产物大小。将相较于野生型,条带大小明显差异的送至测序公司进行一代测序,确定 *glv2* 的基因编辑情况。得到的纯合编辑突变体与野生型进行回交,F2 代植株利用引物 *glv2-GT-F/R* 和 Cas9-GT-F/R(表 1)进行 PCR 鉴定,获得 *GLV2* 基因组序列发生编辑、载体已分离的突变体植株进行后续的试验。

表 1 研究中所用引物序列
Table 1 Primers used in the study

引物名称	引物序列(5' - 3')
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT- GGGT
pGLV2-attB1-F	¹ AAAAAGCAGGCTTCCAAGCTTGTGCG- GAAATTATAGGTG
pGLV2-attB2-R	² AGAAAGCTGGGCTTTTTG- GAAGAGAGTTTTTTTTCTTTG
GLV2-DT1-BsF	ATATATGGTCTCGATTG
GLV2-DT1-FO	TG ³ AAGCTTACGAGAAGTAGTAGTTT- TAGAGCTAGAAATAGC
GLV2-DT2-R0	AAC ⁴ TATCCATCAATCCATCAAC CAATCTCTTAGTCGACTCTAC
GLV2-DT2-BsR	ATTATTGGTCTCGAAAC ⁴ TATCCATCAATCCATCAACC
glv2-GT-F	CTCGGGATATCTTTGGATCTCAGG
glv2-GT-R	ACAAGTCTTTCTCGTCGCA
Cas9-GT-F	CCGTGATCACCGACGAGTACAAG
Cas9-GT-R	TCATGTGGGCCAGAGCGAG
ACT2-qRT-F	CGCTCTTTCTTTCCAAGCTCA
ACT2-qRT-R	GCCTACCAACAACACTGGGA
GH3.3-qRT-F	TCCTCACAAGCTCTGGGACA
GH3.3-qRT-R	AAAAGCTGACGTCGGTCCAT
GH3.5-qRT-F	TAACGCCGACCAAGTCCAAA
GH3.5-qRT-R	CGTGTCCGCTGAGATACTCC
GH3.6-qRT-F	CAGTCTTCCAAAAGCACTCACTG
GH3.6-qRT-R	CTGTACTCTGTAAGCCGACGA
YUC1-qRT-F	AGCTGAAAAATGTCACCGGC
YUC1-qRT-R	CACCTGAATCATGCCGATCT
YUC3-qRT-F	CCGAAGGCAGCGACATTTTC
YUC3-qRT-R	CAGCAACGGCTAGACCTGAT
YUC5-qRT-F	CCGTAGCAACGTCCCATCAT
YUC5-qRT-R	TGAATCCAGCCGCTAAAAGT
YUC7-qRT-F	ACACCGCAGGTAATAACTCCC
YUC7-qRT-R	GACCTTTCCCGACCAAACT
YUC8-qRT-F	CGATGAGACCAAGTGGCTTGT
YUC8-qRT-R	TTTTCTCCCGTAGCCACCAC
YUC9-qRT-F	GGCGATGTGTTTGGGTCAAC
YUC9-qRT-R	CTCGACCACAACGAATGGGA
ARF2-qRT-F	GCGAGTTCGGAGGTTCAATGAAA
ARF2-qRT-R	TCTGTAAAGAGCAGCCTCAGGGTCC
ARF3-qRT-F	CGCCTACTCAATAACCGATCATC
ARF3-qRT-R	ACGGCCACACCAAATGTT
ARF4-qRT-F	CGCTTAAATCATTCCCGCAAT
ARF4-qRT-R	ACTGTGGCTTGGTAAGCAAAG

注:表格中下划线部分:¹为部分 attB1 序列,²为部分 attB2 序列,³为 GLV2 第一个靶点序列,⁴为 GLV2 第二个靶点的反向互补序列。

1.4 突变体叶片形态学观察

在此实验中,为观察突变体与野生型植株叶型差异,在植株 2~3 周期时,选择同一生长环境和同一生长时间的幼苗进行观察并拍照记录。对于 3 周龄幼苗,量其第六及第七片真叶叶基到叶尖的长度及自然状态下中部的宽度。最后通过 Graphpad Prism 9.0 软件作图并进行统计分析。

为进一步细化观察叶片表型,将 3 周龄幼苗叶片的第六或第七片真叶中部进行徒手纵切,观察并拍照。随后通过半薄切片进行叶片叶肉细胞形态的细致观察。具体步骤为首先将徒手切片所得材料置于 50% FAA(50% 无水乙醇、5% 乙酸、3.7% 甲醛)固定液中抽真空固定过夜,随后用 50%、60%、70%、80%、90%、100% 乙醇及 100% 乙醇 + 0.01% (w/v) Eosin Y 溶液常温下各 1 h 进行脱水,再置换成 100% 乙醇/Technovit 7100 树脂基础液 = 1:1 的混合液常温浸泡 2 h,后置换成浸透液(100 mL Technovit 7100 树脂基础液溶解 1 g Hardener I 的比例配置适量)常温过夜,最后将样品置于包埋板的包埋液(浸透液:Hardener II = 15:1)中。凝固后用莱卡切片机进行切片,获得的成片用 0.2% 的甲苯胺蓝染色液染色,冲洗晾干后树脂封片观察。

为了观察叶片表层细胞形态,截取野生型及突变体第六或第七片真叶多处区域,液氮速冻后置于扫描电镜(Hitachi TM4000II)下进行扫描观察并记录图像。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测生长素相关因子表达量

取 0.1 g 生长到 3 周大小的幼苗叶片,用植物总 RNA 提取试剂盒(Vazyme)进行拟南芥 RNA 提取,通过试剂盒(Yeasen)反转录得到 cDNA。以获得的 cDNA 为模板,使用从拟南芥信息资源网站(TAIR)上查找的基因 cDNA 序列所设计的 qRT-PCR 引物(表 1),采用翌圣生物公司的 Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 检测。此实验选用 ACTIN2 作为内参基因。实验进行 3 次生物学重复。

2 结果与分析

2.1 GLV2 小肽基因家族在叶片中广泛表达

黎家实验室长期关注亮氨酸富集型受体激酶

(Leucine-rich Repeat Receptor-Like Kinase, LRR-RLK)生物学功能的解析。前期的研究分析了所有 LRR-RLK 的组织表达模式^[30],并证明了部分 LRR-RLK 的生物学功能,其中包括确定 RGI 为小肽 RGF1 (GLV11)的受体^[18]。为进一步分析 RGI 家族及其配体 GLVs 家族的生物学功能,本研究仔细分析了 GLVs 小肽基因家族的表达模式,并大量分析了拟南芥顺式调控元件,结果表明,启动子上游 0.25 ~ 0.5 kb 区域可以有效地驱动大多数基因的转录^[31]。实验室前期已分析了所有 LRR-RLK 的表达模式。本次研究克隆了拟南芥中 GLVs 小肽基因家族所有成员上游约 1.5 kb 的启动子,通过 gateway 基因重组克隆技术,融合报告基因 β -葡萄糖苷酸酶基因 (β -glucuronidase, GUS) 和核定

位黄色荧光蛋白基因 (*yellow fluorescent protein contain a nuclear localization signal domain*, NLS-YFP), 随后将构建好的载体通过浸花法转化到拟南芥野生型 Col-0 中,筛选得到至少 4 个独立的株系。

通过对 *pGLVs-GUS* 及 *pGLVs-NLS-YFP* 的染色观察和共聚焦荧光观察,发现 GLVs 家族大部分成员在根中表达,小部分在叶中表达(结果未展示)。在叶中表达的 GLVs 小肽基因中, *GLV2* 的表达最强且最为广泛(图 1)。*pGLV2-GUS* 及 *pGLV2-NLS-YFP* 的 GUS 染色和激光共聚焦观察显示, *GLV2* 在根尖中几乎不表达,而在地上部分,尤其是叶中,在所有叶片细胞中均有表达。这一结果暗示着, *GLV2* 可能在植物叶形态建成中发挥着重要的功能。

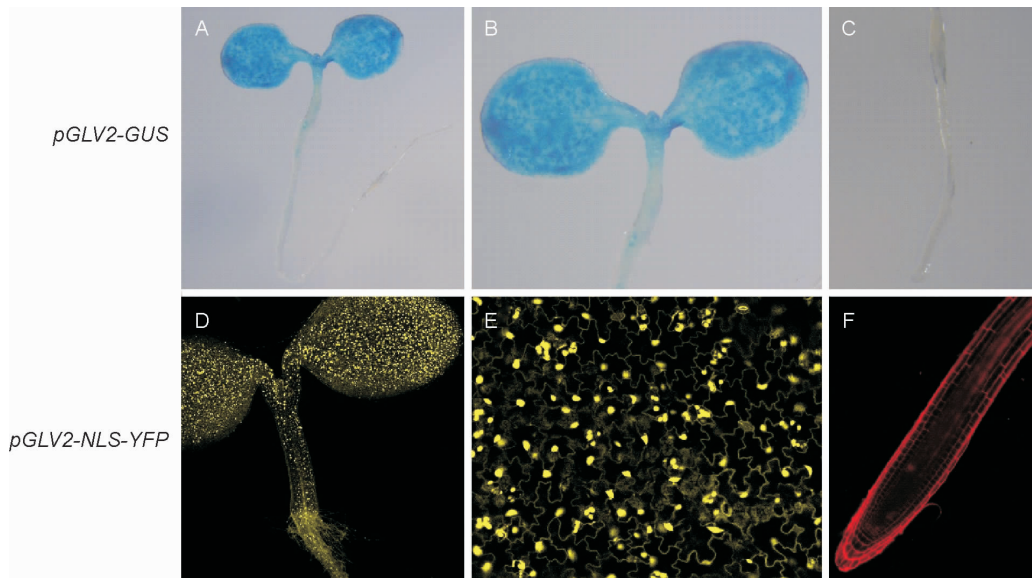


图 1 *GLV2* 在叶中广泛表达

Fig. 1 *GLV2* is widely expressed in leaves

注: A ~ C 表示 *pGLV2-GUS* 材料幼苗 GUS 染色结果; D ~ F 表示 *pGLV2-NLS-YFP* 材料幼苗激光共聚焦显微镜观察结果。

2.2 *glv2* 展现叶片卷曲的表型

为进一步解析 *GLV2* 的生物学功能,本研究利用 CRISPR-Cas9 系统对拟南芥野生型 Col-0 的 *GLV2* 进行了基因编辑,以获得突变体。*GLVs* 小肽的成熟功能区主要在其氨基酸序列的 C 端,所以在 *GLV2* 基因组序列中的 C 端设计了两个靶点(图 2A),通过 Cas9 核酸酶的切割和植物的非同源末端连接修复,获得 *GLV2* 功能区丢失 95 bp 脱氧核糖核苷酸,并提前终止的突变体(图 2A)。随后将突变体与野生型进行回交,通过自交分离外源载体。在靶点两侧各 200 bp 左右设计引物对

glv2 进行 PCR 扩增鉴定显示, *glv2* 突变体扩增出一条明显偏小的条带(图 2B)。此外,对野生型和突变体进行 Cas9 核酸酶的 PCR 鉴定,均未扩出特异条带(图 2C),表明最终获得的突变体为 *GLV2* 发生了编辑,载体已分离的植株。

获得突变体后,通过种植并观察发现,幼苗 3 周龄时,相较于野生型 Col-0, *glv2* 展现明显的叶片形态差异(图 3A 和图 3B)。具体表现为 *glv2* 突变体莲座叶的叶片尖端及两侧边缘下卷、叶片狭长,这种表型在发育早期尤其明显。将植物莲座叶依次排开, *glv2* 叶片表型差异更为显著(图 3C 和图

3E)。取植物第三对真叶进行徒手横切可观察到,野生型叶片呈弧形的情况下, *glv2* 叶片几乎卷成闭合环状(图 3D 和图 3F)。为数据化表征 *glv2* 的叶片表型,对 Col-0 和 *glv2* 幼苗 2 周、3 周和 4 周苗叶片的长宽进行了测量统计,其中,长度测量为叶

基至叶尖,宽度测量为叶片自然状态下中间最窄区域。统计结果显示,相较于野生型, *glv2* 叶片显著窄,长宽比也相应增加(图 3G 和图 3H)。该表型在 3 周和 4 周时最为明显。

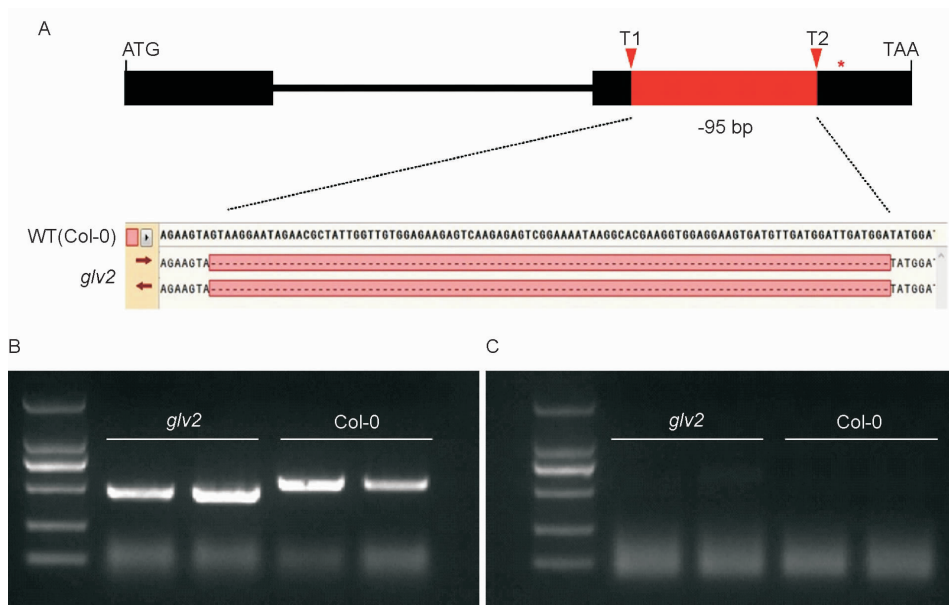


图 2 *glv2* 为第二个外显子基因片段删除的突变体

Fig. 2 *glv2* is a mutant with deletion in the second exon of *GLV2*

注:图中,A 为 *GLV2* 基因编辑靶点及基因编辑情况示意图;B 为 *glv2* 突变体基因编辑 PCR 鉴定结果电泳图;C 为 *glv2* 突变体中基因编辑系统载体上核酸酶 Cas9 的 PCR 鉴定结果电泳图。

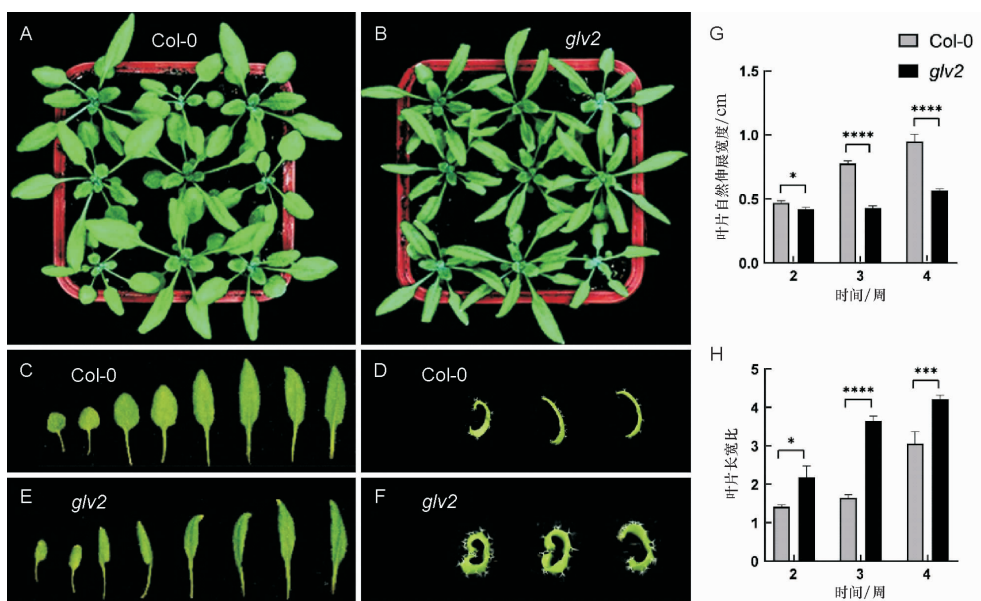


图 3 *glv2* 突变体叶片呈现狭长且卷曲

Fig. 3 *glv2* mutant showed a long and curly leaf phenotype

注:图中,A ~ B 为 Col-0 与 *glv2* 3 周苗;C ~ F 为 Col-0 与 *glv2* 3 周苗所有叶片展示及第三对真叶的徒手横切图;G ~ H 为 Col-0 和 *glv2* 幼苗 2 周、3 周和 4 周苗叶片宽度及长宽比统计分析。

2.3 *glv2* 叶片卷曲可能由海绵组织细胞生长差异造成

为分析 *glv2* 叶片卷曲形成的原因,本研究对 Col-0 和 *glv2* 的叶片进行扫描电镜观察和半薄切片观察。电子扫描电镜结果显示,Col-0 和 *glv2* 叶片的近轴面(腹面)和远轴面(背面)的细胞形态无明显差异(图 4A ~ 图 4D),表明 *glv2* 叶片卷曲

形态主要由叶片内部结构差异造成。基于此,对 Col-0 和 *glv2* 的叶片进行了半薄横向切片,选取叶片中段靠边缘处进行观察。结果显示,Col-0 和 *glv2* 叶片的海绵组织层存在较大差别(图 4E ~ 图 4H),表征着 GLV2 可能通过影响海绵组织细胞的发育,进而影响植物叶片形态建成。

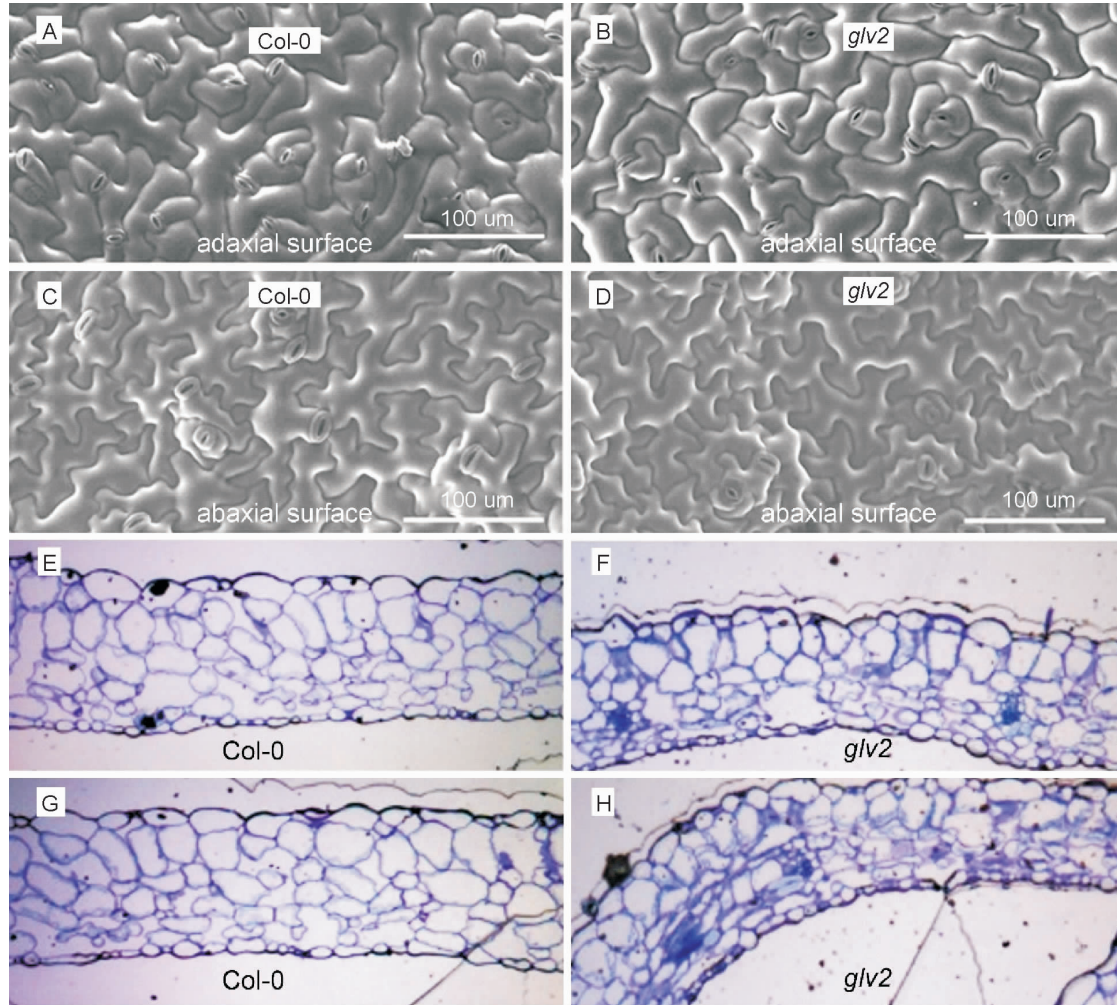


图4 *glv2* 叶片卷曲主要由海绵组织细胞异常造成

Fig. 4 Leaf curl phenotype of *glv2* was mainly caused by abnormal development of spongy tissue cells

注:图中,A~D为Col-0与*glv2*3周苗叶片腹面及背面的扫描电镜观察图;E~H为Col-0与*glv2*3周苗叶片半薄切片结果图。

2.4 *RGLs* 家族多重缺失突变体存在 *glv2* 类似的叶片卷曲表型

小肽 GLVs 家族中 RGF1 (GLV11) 的受体首先被鉴定到为亮氨酸富集型受体激酶 *RGLs* 家族。随后的研究显示,GLVs 家族中其他成员的受体也为 *RGLs* 家族。基于这些现有研究,本研究大胆猜测,GLV2 调控叶片形态建成的受体也有可能是

RGLs 家族。为证明这一猜想,首先观察了 *RGLs* 家族在叶片的表达情况。GUS 染色结果显示,*RGL4* 和 *RGL5* 在叶中大量表达,*RGL3* 较为特异的在叶脉中表达,而 *RGL1* 和 *RGL2* 在叶中几乎不表达(图 5)。随后,本研究也观察了 *rgi1, 2, 3, 4, 5* 的叶片形态,发现相较于野生型,*rgi1, 2, 3, 4, 5* 和 *glv2* 的 2 周和 3 周幼苗均明显展现叶片变窄及尖端弯曲

的表型(图 6A 和图 6B)。对 3 周幼苗的叶子平铺展示能更为明显的展示 *rgi1,2,3,4,5* 和 *glv2* 与野

生型的差异(图 6C)。这些结果暗示, *GLV2* 极有可能作为 RGLs 的配体参与到叶片的形态建成中。

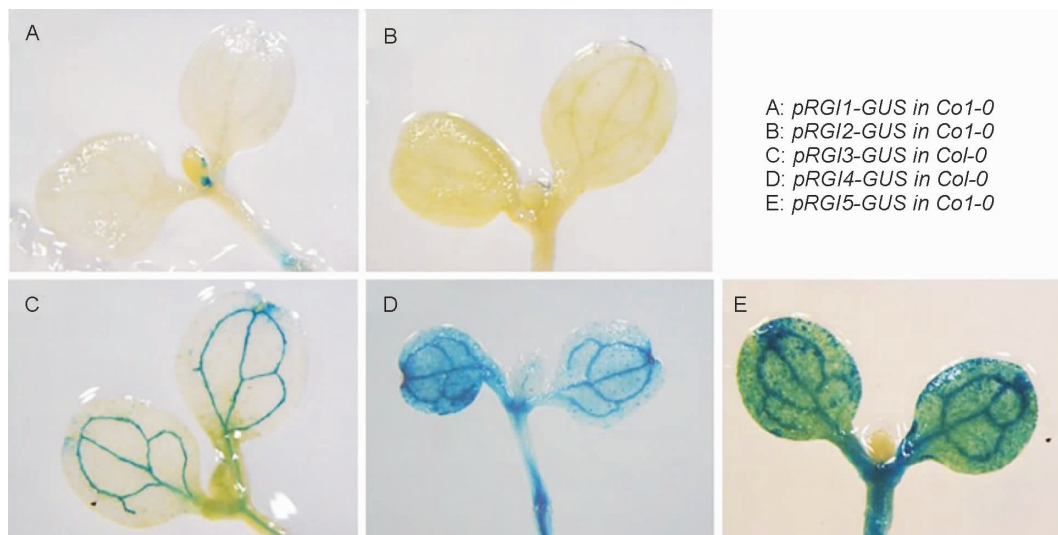


图 5 部分 RGLs 家族成员在叶中有表达

Fig. 5 Some members of the RGLs family are expressed in leaves

注:图中, A ~ E 为 *pRGLs-GUS* 幼苗地上部分 GUS 染色结果图。

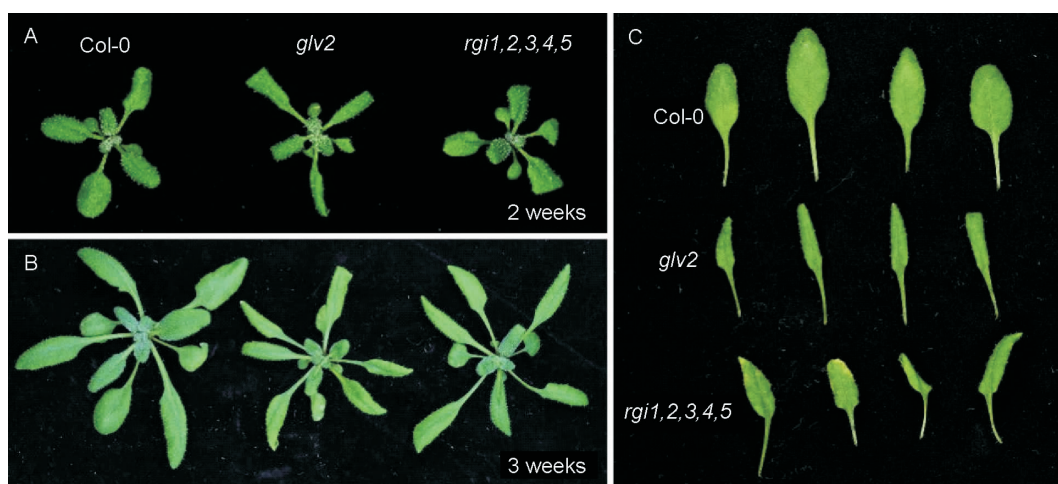


图 6 *rgi1,2,3,4,5* 展现 *glv2* 类似的叶片表型

Fig. 6 *rgi1,2,3,4,5* showed similar leaf phenotypes to *glv2*

2.5 *glv2* 中生长素相关因子存在差异表达

植物叶片的生长发育主要可以分为两个阶段,即叶片的起始与极性的建立阶段和叶片的扩展阶段。这两个阶段中,生长素都发挥着不可或缺的作用。为分析 *glv2* 中生长素的变化,本研究检测了 *glv2* 中生长素相关基因的表达情况。含黄素单加氧酶 YUCCAs(YUC)家族是生长素合成过程中的限速酶;酰胺合成酶 GRETCHEN HAGEN 3s(GH3s)家族是生长素的代谢酶,也是生长素早

期响应因子; AUXIN RESPONSE FACTORS(ARFs)蛋白则是生长素下游信号的核心转录因子。这 3 类蛋白家族编码基因的 mRNA 变化情况通常能反映植物体内生长素信号的变化。基于此,本研究检测了 *glv2* 幼苗叶片中 YUCs、GH3s 及 ARFs 的转录情况。qRT-PCR 结果显示, YUCs、GH3s 及 ARFs 家族中大部分成员在 *glv2* 中出现了上调表达(图 7),表征着 *glv2* 中生长素信号被一定程度的激活,这可能会影响生长素对叶片生长发育的稳态调

控,进而造成叶片形态变化。

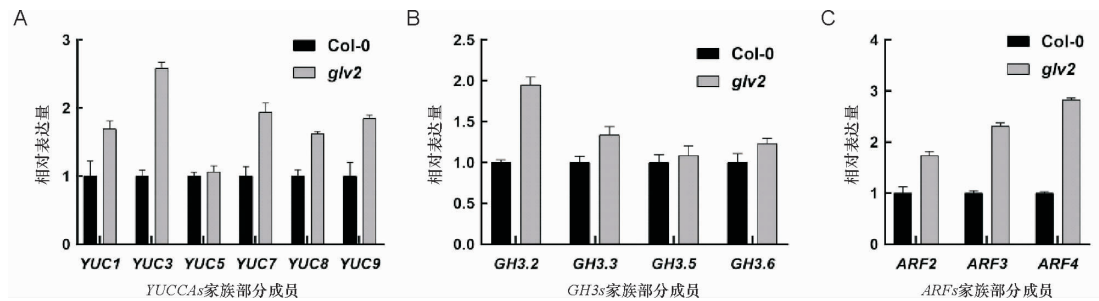


图 7 *glv2* 叶片中生长素相关因子表达上调

Fig. 7 Expression of auxin related factors in *glv2* leaves was up-regulated

3 讨论

在生物体中,细胞与细胞间时刻都进行着信号交流,其中,小肽激素作为重要的信号分子在胞间发挥着不可替代的作用。不同于植物激素合成需通过复杂的代谢途径,小肽由蛋白质直接切割后经一定的翻译后修饰即为功能分子,具有形成机制相对简单、速度快等优势。近年来,植物小肽得到了广泛关注和功能解析,已然成为植物学研究的热点。本研究中发现 *GLV2* 在叶片中表达丰度极高。利用基于 *Crispr-Cas9* 系统的基因编辑技术,获得了主要功能区删除的 *glv2* 突变体。对比观察分析拟南芥野生型和 *glv2* 突变体的生长发育情况发现,*GLV2* 的缺失会导致莲座叶叶片海绵组织细胞发育异常,进而表现出卷曲狭长。

现有的研究认为,小肽 *GLVs* 家族小肽大部分成员发挥功能的受体为受体激酶 *RGLs* 家族,所以本研究也观察分析了 *RGLs* 家族的叶片表达和突变体叶片发育情况。结果显示,*RGLs* 家族五重缺失突变体叶片展现与 *glv2* 类似的狭长表型,而 *RGLs* 家族四重缺失突变体及其他低阶突变体并未展现出类似的表现(结果未展示),表明 *RGLs* 家族中 5 个成员对叶片的发育均有贡献。虽然 *RGLs* 家族中并不是所有成员均在叶片中有表达,但是受体激酶 *RLKs* 某些家族中一些成员的编码基因发生突变时,会引起其他成员的表达出现扩展,进而降低突变带来的影响。例如在植物茎顶端分生组织中,受体激酶 *CLV1* 的缺失会引起 *CLV1* 同源基因 *BAMs* 的异位表达,从而部分补偿 *CLV1* 缺失的影响^[32-33]。所以,后续需系统分析 *RGLs* 家族突变

体中各个 *RGLs* 成员的表达情况,以进一步解析 *RGLs* 在叶片形态发育中的功能。

小肽激素发挥功能一般需被膜上受体感知,随后受体将胞外信号转成胞内信号,最后调控相关基因表达,实现对某一生物学过程的调控。本研究初步实验证明,*GLV2* 可能是 *RGLs* 家族调控叶片形态发育的配体。后续需进一步证明 *GLV2* 可以与 *RGLs* 家族成员的胞外域能结合,且 *GLV2* 能诱导受体 *RGLs* 家族成员被磷酸化等翻译后修饰,进而将信号传递至胞内,实现对叶肉细胞发育的调控。

小肽 *GLVs* 的信号与生长素信号存在着密切的联系。*GLVs* 家族基因大部分成员的超表达会引起根呈波浪形生长,这是根向地性异常的表现。机理分析显示,*GLV3* 超表达植株中或者 *GLV3* 小肽直接处理拟南芥幼苗,*PIN2* 在根表皮细胞中运输会加快,在细胞膜上的蛋白水平会增高;此外,小肽 *GLV11* 处理幼苗会引起 *PIN2* 磷酸化水平增高,并且这一过程依赖于受体 *RGLs*。这些研究表明,小肽 *GLVs* 家族会影响生长素的分布及信号转导过程。本研究 qRT-PCR 的结果显示,*glv2* 中生长素信号出现了异常,但具体的机制还需进一步探究。

叶片形态是很多蔬菜作物,特别是叶菜类作物的园艺性状指标,极大地影响着消费者对该类蔬菜的选择。现有的诸多研究表明,植物叶片发育及形态建成是一个信号通路交错的复杂网络。本研究证明了小肽激素 *GLV2* 对植物叶片形态建成有贡献,这丰富了人们对叶片形态建成调控机制的理解,也为蔬菜育种提供了一个新的角度。

参考文献:

- [1] Tavormina P, De Coninck B, Nikonorova N, et al. The plant peptidome: An expanding repertoire of structural features and biological functions[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(8): 2095-2118.
- [2] Hsu P Y, Benfey P N. Small but mighty: Functional peptides encoded by small ORFs in plants[J]. *Proteomics*, 2018, 18(10): 1700038.
- [3] 吕倩雯, 杨永芳. 植物小肽信号生物学功能及其在作物改良中研究进展[J]. *遗传*, 2023, 45(9): 813-828.
- [4] Pearce G, Strydom D, Johnson S, et al. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins[J]. *Science*, 1991, 253(5022): 895-897.
- [5] Takahashi F, Hanada K, Kondo T, et al. Hormone-like peptides and small coding genes in plant stress signaling and development[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2019, 51: 88-95.
- [6] Chen Y L, Fan K T, Hung S C, et al. The role of peptides cleaved from protein precursors in eliciting plant stress reactions [J]. *New Phytologist*, 2020, 225(6): 2267-2282.
- [7] 孙翔, 程丽军, 刘志文, 等. 小肽激素调控植物生殖发育的研究进展[J]. *自然杂志*, 2021, 43(2): 105-111.
- [8] 黎家, 李传友. 新中国成立 70 年来植物激素研究进展[J]. *中国科学:生命科学*, 2019, 49(10): 1227-1281.
- [9] Fernandez A, Hilson P, Beeckman T. GOLVEN peptides as important regulatory signalling molecules of plant development [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(17): 5263-5268.
- [10] Matsuzaki Y, Ogawa-Ohnishi M, Mori A, et al. Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2010, 329(5995): 1065-1067.
- [11] Whitford R, Fernandez A, Tejos R, et al. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses[J]. *Developmental Cell*, 2012, 22(3): 678-685.
- [12] Meng L, Buchanan B B, Feldman L J, et al. CLE-like (CLEL) peptides control the pattern of root growth and lateral root development in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(5): 1760-1765.
- [13] Stührwohldt N, Schaller A. Regulation of plant peptide hormones and growth factors by post-translational modification[J]. *Plant Biology*, 2019, 21(S1): 49-63.
- [14] Matsubayashi Y. Posttranslationally modified small-peptide signals in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65(1): 385-413.
- [15] Song W, Han Z F, Wang J Z, et al. Structural insights into ligand recognition and activation of plant receptor kinases[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2017, 43: 18-27.
- [16] Song W, Liu L, Wang J Z, et al. Signature motif-guided identification of receptors for peptide hormones essential for root meristem growth[J]. *Cell Research*, 2016, 26(6): 674-685.
- [17] Shinohara H, Mori A, Yasue N, et al. Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(14): 3897-3902.
- [18] Ou Y, Lu X T, Zi Q E, et al. RGF1 INSENSITIVE 1 to 5, a group of LRR receptor-like kinases, are essential for the perception of root meristem growth factor 1 in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Cell Research*, 2016, 26(6): 686-698.
- [19] Ou Y, Tao B Q, Wu Y J, et al. Essential roles of SERKs in the ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR-mediated signaling pathway[J]. *Plant Physiology*, 2022, 189(1): 165-177.
- [20] Lu X T, Shi H Y, Ou Y, et al. RGF1-RGI1, a peptide-receptor complex, regulates arabidopsis root meristem development via an MAPK signaling cascade[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(11): 1594-1607.
- [21] Shao Y M, Yu X X, Xu X W, et al. The YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 cascade functions downstream of the RGF1-RGI1 ligand-receptor pair in regulating mitotic activity in root apical meristem[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(11): 1608-1623.
- [22] Fernandez A I, Vangheluwe N, Xu K, et al. GOLVEN peptide signalling through RGI receptors and MPK6 restricts asym-

- metric cell division during lateral root initiation[J]. *Nature Plants*, 2020, 6(5): 533-543.
- [23] Jourquin J, Fernandez A I, Wang Q, et al. GOLVEN peptides regulate lateral root spacing as part of a negative feedback loop on the establishment of auxin maxima[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, 74(14): 4031-4049.
- [24] Wang X Y, Zhang N, Zhang L N, et al. Perception of the pathogen-induced peptide RGF7 by the receptor-like kinases RGI4 and RGI5 triggers innate immunity in *Arabidopsis thaliana*[J]. *The New Phytologist*, 2021, 230(3): 1110-1125.
- [25] Stegmann M, Zecua-Ramirez P, Ludwig C, et al. RGI-GOLVEN signaling promotes cell surface immune receptor abundance to regulate plant immunity[J]. *EMBO Reports*, 2022, 23(5): e53281.
- [26] Fernandez A, Drozdzecki A, Hoogewijs K, et al. Transcriptional and functional classification of the GLOVEN/ROOT GROWTH FACTOR/CLE-like signaling peptides reveals their role in lateral root and hair formation1 [J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(2): 954-970.
- [27] Zhong S, Liu M L, Wang Z J, et al. Cysteine-rich peptides promote interspecific genetic isolation in *Arabidopsis*[J]. *Science*, 2019, 364(6443): eaau9564.
- [28] Wang Z P, Xing H L, Dong L, et al. Egg cell-specific promoter-controlled CRISPR/Cas9 efficiently generates homozygous mutants for multiple target genes in *Arabidopsis* in a single generation[J]. *Genome Biology*, 2015, 16(1): 144.
- [29] Xing H L, Dong L, Wang Z P, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 327.
- [30] Wu Y Z, Xun Q Q, Guo Y, et al. Genome-wide expression pattern analyses of the *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases[J]. *Molecular Plant*, 2016, 9(2): 289-300.
- [31] Korkuc P, Schippers J H M, Walther D. Characterization and identification of cis-regulatory elements in *Arabidopsis* based on single-nucleotide polymorphism information[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(1): 181-200.
- [32] Shinohara H, Matsubayashi Y. Reevaluation of the CLV3-receptor interaction in the shoot apical meristem: Dissection of the CLV3 signaling pathway from a direct ligand-binding point of view[J]. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2015, 82(2): 328-336.
- [33] Gou X P, Hu C. Mechanisms regulating apical meristem homeostasis by peptides and receptor kinases[J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2017, 47(8): 808-817.

【责任编辑:卓祯雨】