

## A类CLE多肽调节拟南芥根尖韧皮部的发育

吴云飞<sup>1,2</sup>, 储黄伟<sup>2</sup>, 周志刚<sup>1</sup>, 梁婉琪<sup>2</sup>, 张大兵<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>上海海洋大学水产与生命学院, 上海201306; <sup>2</sup>上海交通大学生命科学技术学院, 上海200240

**摘要:** CLE多肽是一类通过细胞间通讯来调节干细胞命运的多肽类激素信号分子。之前的研究表明CLE类多肽可以调节初生木质部发育, 然而CLE类多肽是否影响韧皮部发育还不清楚。本研究发现A类CLE多肽可以控制拟南芥根部初生韧皮部的形成, 用23种A类CLE多肽进行外源处理可以有效地抑制伸长区韧皮部前体细胞的形成。而且不同于控制初生木质部的形成机制, CLE多肽影响韧皮部发育并不依赖于细胞分裂素信号途径。这些结果表明原形成层细胞发育成初生木质部和初生韧皮部是通过两条不同的途径, 为研究CLE类基因对根维管束的形成和发育提供了新的见解。

**关键词:** CLE; 根; 维管组织; 韧皮部

## A-Type CLE Peptides Regulate the Phloem Development in *Arabidopsis* Root Tip

WU Yun-Fei<sup>1,2</sup>, CHU Huang-Wei<sup>2</sup>, ZHOU Zhi-Gang<sup>1</sup>, LIANG Wan-Qi<sup>2</sup>, ZHANG Da-Ding<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; <sup>2</sup>School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION (CLE)-related peptides function as intercellular signaling molecules in regulating stem cell fates during plant development. Recently, increasing evidence suggests the role of CLE peptides in protoxylem development; however, the CLE molecule plays a role in phloem formation remains elusive. Here, we revealed an unknown function of A-type CLE peptides in modulating root protophloem patterning in *Arabidopsis thaliana*. Treatment of 23 A-type CLE peptides, including CLE40p, caused the inhibition of the differentiation of phloem precursor cells in root elongation zone. Furthermore, we showed that the inhibition of phloem formation by CLE40p may act through a cytokinin independent signaling pathway, which are responsible for the suppression of protoxylem vessel formation. These findings suggest that distinct signaling components are involved in controlling the differentiation of procambial cells into protoxylem and phloem in *Arabidopsis* roots. This work provides new insights into CLEs function in root vascular development.

**Key words:** CLE; root; vascular; phloem

干细胞是一类具有全能性的未分化细胞。在高等植物中, 干细胞主要分布在3个部位: 茎顶端分生组织(shoot apical meristem, SAM)、根尖分生组织(root apical meristem, RAM)和维管束形成层干细胞(vascular cambium) (Weigel和Jürgens 2002; Laux 2003; Simon和Stahl 2006)。大量的研究表明, CLE (CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION)多肽在干细胞的增殖和分化的平衡过程中起着重要的调节作用(Fiers等2007; Betsuyaku等2011)。

拟南芥基因组中有32个CLE基因, 编码26个不同的CLE多肽蛋白, 依据功能特点可以分为A类和B类两大类(Ito等2006; Whitford等2008)。CLAVATA3 (CLV3)属于A类CLE基因, CLV3蛋白通过与

CLV1、CLV2、BAM1 (BARELY ANY MERISTEM 1)、BAM2、RPK2 (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2)和CRN/SOL2 (CORYNE/SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF LLP-2)等跨膜受体蛋白或受体激酶形成不同的复合体来传递信号, 并通过与WUS (WUSCHEL)基因组成一个负反馈调控通路共同调控茎顶端分生组织干细胞的数目(Clark等1997; Jeong等1999; Fletcher等

收稿 2014-06-05 修定 2014-08-20

资助 国家自然科学基金激素重大研究计划项目(90717109)。

致谢 Ykä Helariutta教授馈赠 $APLpro::GUS$ 植株, ABRC (*Arabidopsis* Biological Resource Center)提供SALK\_058085C (*ahp6-4*)种子。

\* 通讯作者(E-mail: zhangdb@sjtu.edu.cn; Tel: 021-34205073)。

1999; Brand等2000; Schoof等2000; Bleckmann等2010; Guo等2010; Zhu等2010; Kinoshita等2010)。在根尖中,另一种A类多肽CLE40通过与受体激酶ACR4 (*Arabidopsis* CRINKLY4)结合抑制WOX5 (*WUSCHEL-related homeobox 5*)的表达,从而调控RAM干细胞的增殖与分化(Stahl等2009; Kondo等2011; Jun等2010)。水稻中的CLE多肽具有相似的调节分生组织稳态的功能,在水稻茎尖分生组织中由CLV3同源FCP1 (*FON2-LIKE CLE PROTEIN 1*)和WUS同源WOX4构成一个类似的负反馈环调节营养分生组织的维持(Ohmori等2013),而在根尖中另一个CLE成员FCP2通过与WOX5的同源QHB (*QUIESCENT-CENTER-SPECIFIC HOMEBOX*)的相互抑制来维持RAM正常的干细胞区域(Chu等2013)。最近的研究工作指出,低氮胁迫诱导CLE1、CLE3、CLE4、CLE7在根中柱鞘中表达,产生的多肽分泌到胞外与位于韧皮部伴胞上的CLV1结合,启动下游信号途径抑制侧根原基的产生(Araya等2014)。另一项研究发现在豆科植物百脉根固氮过程中,受固氮菌侵染诱导产生的糖基化修饰的CLE类多肽(CLE-RS2)从根中转运到地上部分,与LRR类受体激酶(HAR1)结合激活另一个长距离运输的自调控信号,该信号可从地上部分输送到根中抑制根瘤产生从而实现根瘤数目的控制(Okamoto等2013)。与A类CLE多肽不同,B类CLE多肽不影响SAM和RAM形成和维持,但能够调节维管束发育。拟南芥中B类基因CLE41和CLE44基因编码的蛋白C末端12个氨基酸序列与百日草中发现的抑制导管分化的多肽TDIF (TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR)序列相同,功能也相似(Fukuda和Komamine 1980; Ito等2006; Fisher和Turner 2007)。CLE41/TDIF特异地在韧皮部中表达,由韧皮部分泌到相邻的形成层细胞中,与受体激酶TDR/PXY (TDIF RECEPTOR/PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM)结合后,通过激活WOX4和WOX14的表达,促进原形成层细胞增殖,并抑制原形成层细胞分化为木质部(Hirakawa等2008; Ji等2010; Etchells等2013)。

植物维管组织由木质部、韧皮部和形成层细胞组成,木质部主要运输水分和无机盐,而韧皮部

则主要运输糖、RNA、蛋白质和其他有机成分(Ye 2002)。初生木质部和初生韧皮部是由原形成层细胞分化产生,而次生木质部和次生韧皮部则由形成层分化而来(Shininger 1979; Sachs 1981)。根尖中的干细胞可以分为两个部分,近端分生组织和远端分生组织,近端分生组织控制维管组织以及皮层发育,远端分生组织控制根冠的发育(Scheres等2002)。近来有文献报道,在拟南芥根中有14个CLE基因可以特异地在根尖和维管束中表达,其中CLE40通过ACR4和WOX5共同控制远端分生组织分化(Fiers等2007; Meng等2010; Replogle等2011)。另外Kondo等(2011)的研究结果表明,CLE9/CLE10通过加强根尖细胞分裂素信号来抑制初生木质部的分化,这一过程是通过受体蛋白CLV2介导的,clv2的初生木质部对于CLE9/CLE10多肽激素处理不敏感。本文以A类CLE多肽激素对根尖维管束韧皮部的作用为中心,进一步研究了CLE多肽激素在根维管组织分化和形成中的作用。

## 材料与方法

### 1 拟南芥培养

*APLpro::GUS*种子由Ykä Helariutta教授提供。拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)种子用70%的酒精浸泡10 min后用无菌水冲洗3~4次,置于4 °C春化处理1 d。春化后移至1 μmol·L<sup>-1</sup>多肽的1/2MS固体培养基上,置于22 °C培养7 d。对于短期处理,春化后拟南芥种子移至1/2MS固体培养基上,置于22 °C培养5 d,转移到含有1 μmol·L<sup>-1</sup>多肽的1/2MS培养基上继续培养2 d。每种多肽每次处理6个单株,重复3次。本实验使用的多肽由上海吉尔生化公司合成。培养基成分:1/2MS (荷兰Duchefa Biochemie B.V.公司),1% (W/V)蔗糖,0.05%肌醇,pH=5.8,1.5% (W/V)琼脂。

### 2 拟南芥组织观察

拟南芥根经FAA固定液固定后,用Technovit 7100 resin (Heraeus Kulzer)试剂盒脱水、包埋,使用RM2245 (Leica Microsystems)半薄切片机切片,厚度为5 μm。切片后用甲苯胺蓝染色液[0.05% (W/V),溶于pH 7.0的磷酸缓冲液中]染色40 min,封片后使用NikonDXM1200显微镜观察拍照。

### 3 GUS染色方法

GUS染色依据Schoof等(2000)的方法, 将 *APLpro::GUS* 植株浸泡在GUS染色液中, 37 °C 温育 2 h。GUS染色后材料经透明剂(水合氯醛:甘油:水=8:1:3)处理后, 使用NikonDXM1200显微镜观察并拍照。

## 实验结果

### 1 A类CLE多肽抑制 *APLpro::GUS* 在根尖伸长区中的表达

拟南芥 *APL* (*ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT*) 基因编码一个MYB类转录因子, 是调节筛管发育的重要调控因子, *APL* 基因发生功能缺失导致拟南芥根变短且筛管消失(Bonke等2003)。*APL* 在初生韧皮部筛管细胞、次生韧皮部筛管和伴胞细胞中表达, 这种在多个韧皮部发育时期及组成细胞中表达的特征使得 *APLpro::GUS* 成为一个被普遍使用的韧皮部标记(Caño-Delgado等2010)。为了解CLE多肽对根中韧皮部发育的影响, 我们用人工合成的26种CLE多肽对携带有 *APLpro::GUS* 的拟南芥转基因幼苗进行了外源添加处理和染色观察。

观察发现A类CLE多肽可以有效地抑制根尖 *APL* 表达, 不同多肽处理后 *APLpro::GUS* 的表达区域出现不同程度的缩小, 靠近根尖分生组织区域的表达消失, 表达区域前端到根尖静止中心(quiescent center, QC)的距离加大(图1-A1~A4、B2)。除了CLE1~7外, 其他多肽处理7 d后的幼苗根长都显著变短, 说明这些多肽影响了根尖分生组织的活性(图1-B1), 这与之前的报道一致(Fiers等2005; Miwa等2008)。为排除根尖分生组织的影响, 又用这些多肽进行了短时间的处理, 将在正常培养基上生长5 d后的幼苗移到含有多肽的培养基上继续培养2 d。与未处理组相比, 多肽处理幼苗的根长与未处理幼苗相比无显著变化, 而在新生根区域不同多肽处理对 *APLpro::GUS* 表达的影响与7 d处理的幼苗类似(图1-A1~A4、表1)。在A类CLE多肽中CLE2、CLE8、CLE9/10、CLE11~CLE14、CLE16~CLE22、CLE25~CLE27可以显著地抑制根尖 *APLpro::GUS* 的表达(图1-A3、表1), 而CLE1/3/4、CLE5/6和CLE7抑制强度较弱(图

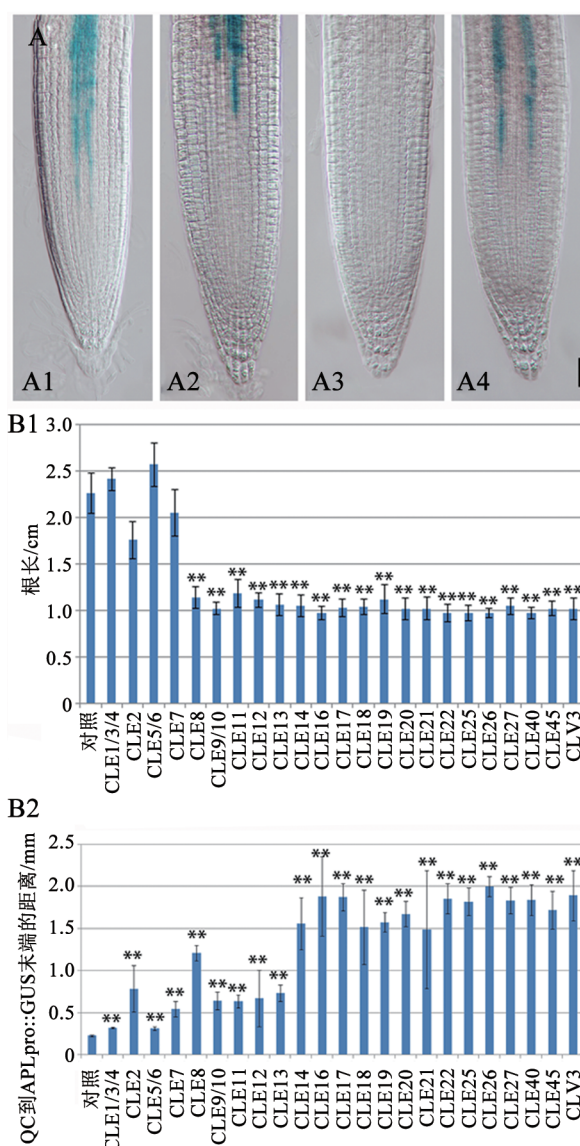


图1 A类CLE类多肽激素抑制拟南芥根尖 *APL* 表达

Fig.1 A-type CLE peptides inhibit *APL* expression level in root tip of *Arabidopsis*

A: *APLpro::GUS* 转基因拟南芥根尖中的GUS表达模式, 比例尺: 20  $\mu\text{m}$ 。A1: *APLpro::GUS* 在1/2MS培养基上培养7 d后的GUS表达模式; A2: *APLpro::GUS* 在1/2MS培养基上培养5 d后移入含有  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  A类CLE多肽的1/2MS培养基上培养2 d的GUS表达模式——弱表型(对应表1中的+); A3: *APLpro::GUS* 在1/2MS培养基上培养5 d后移入含有  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  A类CLE多肽的1/2MS培养基上培养2 d的GUS表达变化——强表型(对应表1中的++); A4: *APLpro::GUS* 在1/2MS培养基上培养5 d后移入含有  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  B类CLE多肽的1/2MS培养基上培养2 d的GUS表达变化。B1: *APLpro::GUS* 植株在含有  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLE多肽的1/2MS培养基上培养7 d后的根长 ( $n=6$ ); “\*\*\*”表示极显著差异。B2: *APLpro::GUS* 植株在含有  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLE多肽的1/2MS培养基上培养7 d后根尖QC细胞到筛管细胞的距离 ( $n=6$ ); “\*\*\*”表示极显著差异。



表 1 CLE多肽对拟南芥根生长的影响

Table 1 Effect of CLE peptides on *Arabidopsis* root growth

CLE多肽	根伸长受抑制程度	初生木质部受抑制程度	初生韧皮部受抑制程度
CLE1/3/4*	-	-	+
CLE2	-	-	++
CLE5/6*	-	-	+
CLE7	-	-	+
CLE8	+	+	++
CLE9/10*	+	+	++
CLE11	+	+	++
CLE12	+	+	++
CLE13	+	+	++
CLE14	+	+	++
CLE16	+	+	++
CLE17	+	+	++
CLE18	+	+	++
CLE19	+	+	++
CLE20	+	+	++
CLE21	+	+	++
CLE22	+	+	++
CLE27	+	+	++
CLE25	+	-	++
CLE26	+	-	++
CLE40	+	+	++
CLE45	+	+	++
CLV3	+	+	++
CLE41/44*	-	-	-
CLE42	-	-	-
CLE46	-	-	-

“\*”表示多肽序列相同的基因;“+”表示有效地抑制拟南芥根发育;“++”表示高效地抑制拟南芥根发育;“-”表示没有作用。

1-A2、表1)。但在多肽处理前形成的韧皮部中 *APLpro::GUS* 的表达区域和强度均没有发生变化,说明新生区域 *APL* 表达消失可能是由于该区域韧皮部特征细胞无法形成造成的,而不是 *APL* 的表达受到 CLE 多肽的直接抑制。外源处理结果表明 A 类 CLE 多肽激素不仅可以抑制根尖分生组织干细胞的活力,还可以抑制初生韧皮部细胞的发育。在相同条件下用 B 类 CLE 多肽,包括 CLE41/44、CLE42 和 CLE46,处理后 *APLpro::GUS* 的表达区域没有发生变化,说明 B 类 CLE 多肽激素不影响根尖中韧皮部的形成(图 1-A4)。

## 2 CLE40 多肽调节根尖韧皮部细胞分裂方式

外源添加 A 类 CLE 多肽处理可以抑制筛管特异表达基因 *APL* 的表达。为进一步确定处理后细胞学水平的变化,选取 2 种 A 类多肽 CLV3、CLE40 和 B 类多肽 TDIF 处理 7 d 后的根进行了切片观察。

拟南芥根中初生韧皮部来源于 QC 旁侧的根近端分生组织,根近端分生组织进一步分化为根尖原形成层细胞,最后原形成层细胞通过平周细胞分裂形成筛管(sieve element, SE)和伴胞(companion cell, CC) (图 2-A)。半薄切片观察发现,与 *APLpro::GUS* 的表达变化相一致,用  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLE40 或  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLV3 处理后,根尖伸长区的初生韧皮部位置,横向细胞分裂消失,原本应该发育成筛管的细胞,形态上发生了异常(图 2-B、C)。而用  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TDIF 激素处理拟南芥幼苗,初生韧皮部的细胞分裂方式没有发生变化,原形成层细胞横向分裂没有受到影响,筛管和伴胞可以正常形成(图 2-D)。半薄切片观察的结果表明, A 类 CLE 多肽激素抑制了原形成层细胞的横向细胞分裂的过程,从而抑制了韧皮部筛管和伴胞细胞的形成。

### 3 细胞分裂素信号通路不影响拟南芥根中初生韧皮部的发育

之前的研究结果显示, 细胞分裂素在维管发育起到重要的调节作用, 可以促进(原)形成层的细胞扩增, 抑制初生木质部的分化和形成。细胞分裂素受体激酶突变体 $cre1/wol/ahk4$  (CYTOKININ RESPONSE 1/WOODEN LEG/ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 4)和下游信号因子三突变体 $arr1arr10arr12$ 表现出初生木质部增强(Mähönen等2000; Ishida等2008)。组氨酸磷酸转运因子AHP (*Arabidopsis* histidine phosphotransfer protein)是细胞分裂素受体AHK的下游信号组分, 通过转运磷酸基团实现信号转导。拟南芥中有5个活性的AHP蛋白, 而与AHP1~5高度同源的AHP6缺少功能性的组氨酸残基, 可通过干扰AHK和AHP之间的磷酸基团转运负调控细胞分裂素信号(Mähönen等2006)。 $ahp6-4$ 突变体表现出初生木质部的发育受到抑制, 这和外源CLE9/10多肽处理的结果类似(Kondo等2011; Mähönen等2006)。

为确定细胞分裂素途径对韧皮部发育的影响, 使用不同浓度的细胞分裂素对 $APLpro::GUS$ 幼苗进行了处理。野生型拟南芥根维管束在发育过程中, 首先在外侧形成初生木质部, 接着在内侧形成次生木质部(图3-A)。细胞分裂素途径抑制因子 $ahp6-4$ 突变体表现出初生木质部发育受到明显抑制(图3-A1), 但通过对其根尖横切面观察发现初生韧皮部的发育没有受到影响(图3-C)。通过使用0.1和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞分裂素(6-BA)处理萌发5 d的拟南芥幼苗2 d, 根的表型和 $ahp6-4$ 表型类似(图3-B、

B1)。与此不同的是用0.1和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA处理 $APLpro::GUS$ 转基因植株后,  $APLpro::GUS$ 的表达没有受到显著影响, 表明细胞分裂素不会抑制初生韧皮部的发育(图3-E、H)。而将0.1或 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLV3或者CLE40多肽进行混合处理后, 筛管标记基因 $APL$ 的表达受到显著的抑制(图3-F、G、I、J)。与此一致的是, 外源施加 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLV3或者CLE40多肽可以抑制 $ahp6-4$ 突变体中初生韧皮部的形成(图3-D)。这些结果表明, A类CLE可以通过加强细胞分裂素信号抑制初生木质部的发育, 而对初生韧皮部的影响可能是通过其他的信号途径。

## 讨 论

植物维管组织作为重要的输导器官进行物质和信号传递, 而它自身的发育受到多种信号分子的控制。之前的研究表明, CLE类多肽激素是影响维管中分生组织分裂分化的重要调控因子。在植物不同器官中, CLE多肽在控制维管发育过程中表现出不同的特点。在拟南芥地上部分B类CLE多肽CLE41/44具有促进原形成层细胞增殖、抑制原形成层细胞分化成导管分子的作用(Hirakawa等2008; Whitford等2008)。过表达CLE41/44导致原形成层细胞过度分裂, 使得维管区域明显增大、导管束发生断裂(Hirakawa等2008; Whitford等2008)。而在根中, CLE41/44并不影响(原)形成层组织的分裂分化过程, 外源施加CLE41/44并不影响根中维管组织的形成和发育(Hirakawa等2008)。与B类CLE多肽不同, A类CLE多肽在茎顶

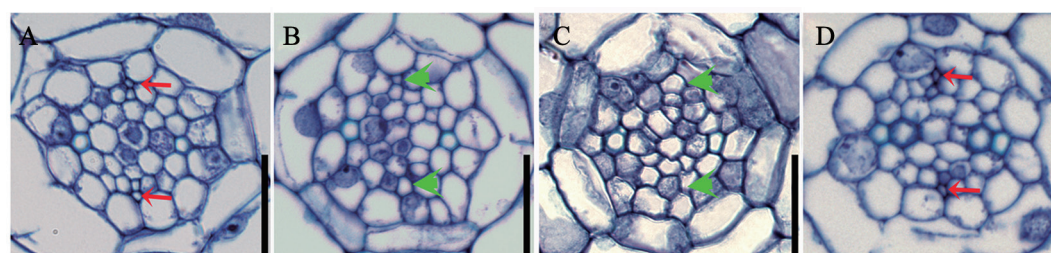


图2 CLE40、CLV3和TDIF多肽处理对拟南芥根韧皮部发育的作用

Fig.2 Effects of CLE40p, CLV3p and TDIFp on the phloem development in roots of *Arabidopsis*

A: 野生型拟南芥幼苗在1/2MS培养基上培养7 d后的根横切图; B: 野生型拟南芥幼苗在含有 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLE40多肽的1/2MS培养基上培养7 d后的根横切图; C: 野生型拟南芥幼苗在含有 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLV3多肽的1/2MS培养基上培养7 d后的根横切图; D: 野生型拟南芥幼苗在含有 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  TDIF多肽的1/2MS培养基上培养7 d后的根横切图。红色箭头表示正常的韧皮部细胞, 绿色箭头表示异常的韧皮部细胞; 比例尺:  $100 \mu\text{m}$ 。

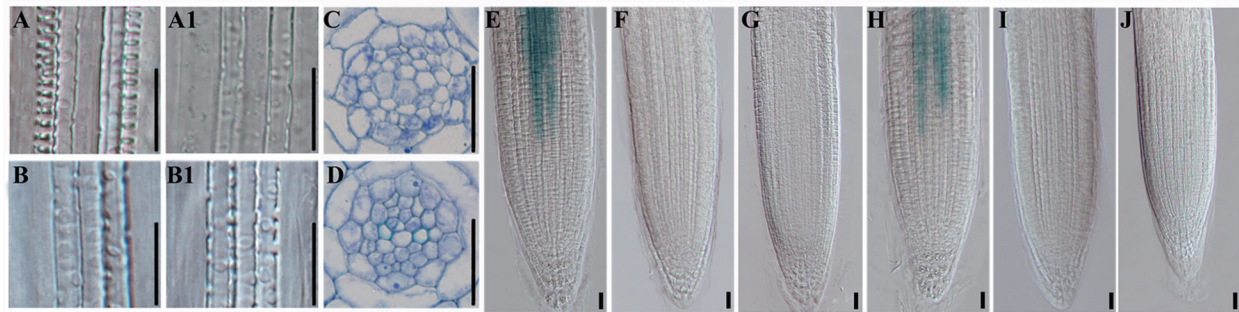


图3 细胞分裂素对拟南芥根维管组织发育的影响

Fig.3 Effects of cytokinin on vascular development in roots of *Arabidopsis*

A: 野生型拟南芥幼苗(萌发后7 d)的根尖; A1: 拟南芥 $ahp6-4$ 突变体(萌发后7 d)的根尖; B:  $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA处理2 d后的野生型拟南芥根尖; B1:  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA处理2 d后的拟南芥根尖; C: 拟南芥 $ahp6-4$ 突变体幼苗根的横切图; D: 拟南芥 $ahp6-4$ 突变体幼苗在含有 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLE40多肽的1/2MS培养基上培养7 d后的根横切图; E:  $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA处理2 d后的 $APLpro::GUS$ 根尖; F:  $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLE40多肽混合处理拟南芥 $APLpro::GUS$ 根2 d的表型; G:  $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLV3多肽混合处理拟南芥 $APLpro::GUS$ 根2 d的表型; H:  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA处理2 d后的 $APLpro::GUS$ 根尖; I:  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLE40多肽混合处理2 d后的 $APLpro::GUS$ 根尖; J:  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  6-BA和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CLV3多肽混合处理2 d后的 $APLpro::GUS$ 根尖; 比例尺A、A1、B、B1:  $100 \mu\text{m}$ , C、D:  $200 \mu\text{m}$ , E~J:  $20 \mu\text{m}$ 。

端和根尖分生组织的干细胞增殖与分化的平衡中起到重要作用,但对地上维管组织的发育没有显著的调节作用。最近的研究发现拟南芥部分A类CLE多肽在根中具有抑制初生木质部形成的作用,外源施加A类CLE多肽使根中的初生木质部消失(Kondo等2011)。本研究发现A类CLE多肽不仅能够抑制初生木质部的形成,还能抑制初生韧皮部的形成,而且所有的A类CLE成员都具有这种作用。当外源添加A类CLE多肽时,初生韧皮部的形成受到抑制。细胞学观察发现原形成层细胞分裂受到抑制,不能形成初生韧皮部细胞。外源施加CLE1~7等A类成员不影响根尖分生组织的维持(图1-B1),但对于初生韧皮部的形成均具有一定的抑制作用,说明A类CLE多肽抑制初生韧皮部形成是独立于根尖分生组织维持的另一功能。

A类和B类多肽都具有保守的第9位脯氨酸, B类CLE第4和第7位都是脯氨酸,在A类CLE中这两个位置上不同成员间存在差异;另外A类CLE多肽都具有保守的第1位精氨酸和第11位组氨酸, A和B类CLE的这些氨基酸差异可能影响到多肽配体与受体之间的相互识别和结合,从而决定了这些多肽激素的下游作用途径。A类CLE多肽均表现出对韧皮部发育的抑制可能是由于该类CLE多肽结构的相似性引起,而在体内该过程可能是由特异地韧皮部中表达的CLE多肽控制的。最近的一

项研究指出CLE45在根的初生韧皮部中表达,可以通过与受体激酶BAM3的相互作用抑制初生韧皮部的分化(Depuydt等2013)。但目前并没有CLE45突变体的报道,而BAM3同时影响了RAM和根中韧皮部的发育过程,因此不能排除有其他CLE成员参与这个过程,如和CLE45十分相似的CLE25和CLE26多肽。另外CLE45的作用局限在根中,在地上部分是否有其他CLE成员参与韧皮部的发育过程也还有待进一步分析。

之前的研究指出根中木质部的发育受到细胞分裂素的调节(Mähönen等2006),而CLE9/10通过调节细胞分裂素信号途径来控制初生木质部的形成(Kondo等2011)。当细胞分裂素信号传递缺失后,会导致根尖只有初生木质部,而过量的细胞分裂素则会使初生木质部发育受到抑制,表现出只余下次生木质部(Mähönen等2006; Kondo等2011)。在维管组织中表达的CLE9/10可以抑制细胞分裂素途径负调控因子ARR5和ARR6的表达,使细胞分裂素信号加强从而抑制初生木质部的发育。我们的研究发现细胞分裂素含量以及信号途径的变化并不影响根中初生韧皮部的形成,无论是在负调控因子AHP6-4的突变体中还是外源施加高水平的细胞分裂素都没有观察到初生韧皮部的变化。上述研究结果说明A类CLE多肽可能是通过一个独立于细胞分裂素的途径来调节初生韧皮



部发育的。这些分析显示了植物体对维管组织形成层的增殖和分化过程调节的复杂性和多样性。本研究工作揭示了A类CLE多肽在拟南芥根维管组织形成中的新的调节作用,同时建立了一个以*APLpro::GUS*作为筛管细胞的标记基因快速检测CLE多肽功能的体系,为后续进一步筛选根中韧皮部发育的调节因子提供了便利。

### 参考文献

- Araya T, Miyamoto M, Wibowo J, Suzuki A, Kojima S, Tsuchiya YN, Sawa S, Fukuda H, von Wirén N, Takahashi H (2014). CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 (5): 2029~2034
- Betsuyaku S, Sawa S, Yamada M (2011). The function of the CLE peptides in plant development and plant-microbe interactions. *Arabidopsis Book*, 9: e0149. doi: 10.1199/tab.0149
- Bleckmann A, Weidtkamp-Peters S, Seidel CAM, Simon R (2010). Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiol*, 152: 166~176
- Bonke M, Thitamadee S, Mähönen AP, Hauser MT, Helariutta Y (2003). APL regulates vascular tissue identity in *Arabidopsis*. *Nature*, 426: 181~186
- Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM, Simon R (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science*, 289: 617~619
- Caño-Delgado A, Lee JY, Demura T (2010). Regulatory mechanisms for specification and patterning of plant vascular tissues. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26: 605~637
- Chu H, Liang W, Li J, Hong F, Wu Y, Wang L, Wang J, Wu P, Liu C, Zhang Q, Xu J, Zhang D (2013). A CLE-WOX signaling module regulates root meristem maintenance and vascular tissue development in rice. *J Exp Bot*, 64 (17): 5359~5369
- Clark SE, Williams RW, Meyerowitz EM (1997). The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, 89 (4): 575~585
- Depuydt S, Rodriguez-Villalon A, Santuari L, Wyser-Rmili C, Ragni L, Hardtke CS (2013). Suppression of *Arabidopsis* protophloem differentiation and root meristem growth by CLE45 requires the receptor-like kinase BAM3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110 (17): 7074~7079
- Etchells JP, Provost CM, Mishra L, Turner SR (2013). *WOX4* and *WOX14* act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Development*, 140 (10): 2224~2234
- Fiers M, Ku KL, Liu CM (2007). CLE peptide ligands and their roles in establishing meristems. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 39~43
- Fiers M, Golemic E, Xu J, van der Geest L, Heidstra R, Stiekema W, Liu CM (2005). The 14-amino acid CLV3, CLE19, and CLE40 peptides trigger consumption of the root meristem in *Arabidopsis* through a *CLAVATA2*-dependent pathway. *Plant Cell*, 17 (9): 2542~2553
- Fisher K, Turner S (2007). PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development. *Curr Biol*, 17: 1061~1066
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science*, 283 (5409): 1911~1914
- Fukuda H, Komamine A (1980). Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol*, 65 (1): 57~60
- Guo Y, Han L, Hymes M, Denver R, Clark SE (2010). *CLAVATA2* forms a distinct CLE-binding receptor complex regulating *Arabidopsis* stem cell specification. *Plant J*, 63: 889~900
- Hirakawa Y, Shinohara H, Kondo Y, Inoue A, Nakanomyo I, Ogawa M, Sawa S, Ohashi-Ito K, Matsubayashi Y, Fukuda H (2008). Non-cell-autonomous control of vascular stem cell fate by a CLE peptide/receptor system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (39): 15208~15213
- Ishida K, Yamashino T, Yokoyama A, Mizuno T (2008). Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, 49: 47~57
- Ito Y, Nakanomyo I, Motose H, Iwamoto K, Sawa S, Dohmae N, Fukuda H (2006). Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell differentiation. *Science*, 313 (5788): 842~845
- Jeong S, Trotochaud AE, Clark SE (1999). The *Arabidopsis CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell*, 11 (10): 1925~1934
- Ji J, Strable J, Shimizu R, Koenig D, Sinha N, Scanlon MJ (2010). *WOX4* promotes procambial development. *Plant Physiol*, 152: 1346~1356
- Jun JH, Fiume E, Roeder AH, Meng L, Sharma VK, Osmont KS, Baker C, Ha CM, Meyerowitz EM, Feldman LJ, Fletcher JC (2010). Comprehensive analysis of *CLE* polypeptide signaling gene expression and overexpression activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 154: 1721~1736
- Kinoshita A, Betsuyaku S, Osakabe Y, Mizuno S, Nagawa S, Stahl Y, Simon R, Yamaguchi-Shinozaki K, Fukuda H, Sawa S (2010). RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in *Arabidopsis*. *Development*, 137: 3911~3920
- Kondo Y, Hirakawa Y, Kieber Joseph J, Fukuda H (2011). CLE peptides can negatively regulate protoxylem vessel formation via cytokinin signaling. *Plant Cell Physiol*, 52: 37~48
- Laux T (2003). The stem cell concept in plants: a matter of debate. *Cell*, 113 (3): 281~283
- Mähönen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Törmäkangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y (2006). Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*, 311 (5757): 94~98
- Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y (2000). A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes*

- Dev, 23: 2938~2943
- Meng L, Ruth KC, Fletcher JC, Feldman L (2010). The roles of different CLE domains in *Arabidopsis* CLE polypeptide activity and functional specificity. *Mol Plant*, 4: 760~772
- Miwa H, Betsuyaku S, Iwamoto K, Kinoshita A, Fukuda H, Sawa S (2008). The receptor-like kinase SOL2 mediates CLE signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 49 (11): 1752~1757
- Ohmori Y, Tanaka W, Kojima M, Sakakibara H, Hirano HY (2013). *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the CLE gene *FCPI* in rice. *Plant Cell*, 25 (1): 229~241
- Okamoto S, Shinohara H, Mori T, Matsubayashi Y, Kawaguchi M (2013). Root-derived CLE glycopeptides control nodulation by direct binding to HAR1 receptor kinase. *Nat Commun*, 4: 2191
- Replogle A, Wang J, Bleckmann A, Hussey RS, Baum TJ, Sawa S, Davis EL, Wang X, Simon R, Mitchum MG (2011). Nematode CLE signaling in *Arabidopsis* requires CLAVATA2 and CORYNE. *Plant J*, 65: 430~440
- Sachs T (1981). The control of the patterned differentiation of vascular tissues. *Adv Bot Res*, 9: 151~262
- Scheres B, Benfey P, Dolan L (2002). Root development. *Arabidopsis Book*, 1: e0101. doi:10.1199/tab.0101
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jurgens G, Laux T (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell*, 100: 635~644
- Shininger TL (1979). Xylem and nonxylem cell formation in cytokinin-stimulated root tissue: quantitative analysis of temperature effects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 1921~1923
- Simon R, Stahl Y (2006). Plant cells leave their way to differentiation. *Science*, 313: 773~774
- Stahl Y, Wink RH, Ingram GC, Simon R (2009). A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr Biol*, 19: 909~914
- Weigel D, Jürgens G (2002). Stem cells that make stems. *Nature*, 415: 751~754
- Whitford R, Fernandez A, De Groot R, Ortega E, Hilson P (2008). Plant CLE peptides from two distinct functional classes synergistically induce division of vascular cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105: 18625~18630
- Ye ZH (2002). Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 183~202
- Zhu Y, Wang Y, Li R, Song X, Wang Q, Huang S, Jin JB, Liu CM, Lin J (2010). Analysis of interactions among the CLAVATA3 receptors reveals a direct interaction between CLAVATA2 and CORYNE in *Arabidopsis*. *Plant J*, 61: 223~233