

AS1/AS2 基因在叶形态建成中的作用研究进展

张 菊^{1,2}, 陈 璨², 罗 蕾¹, 李俐俐², 申书兴¹, 李成伟³, 赵建军¹, 陈雪平¹

(¹ 河北农业大学园艺学院 / 河北省蔬菜种质创新与利用重点实验室 / 河北省蔬菜产业协同创新中心, 保定 071001; ² 周口师范学院植物遗传与分子育种重点实验室 / 河南省作物分子育种生物反应器重点实验室, 周口 466001; ³ 河南工业大学生物工程学院, 郑州 450001)

摘要: 植物叶片背-腹轴极性建立是叶片形态建成的重要过程之一。ASYMMETRIC LEAVES1/ASYMMETRIC LEAVES2 (AS1/AS2) 是植物叶片发育中背-腹面极性关键的转录因子, 直接或间接与多个蛋白或 miRNAs 相互协作, 共同调控植物叶片发育与形成过程。本文主要综述了拟南芥、大白菜等植物 AS1/AS2 保守结构特征及其参与叶片侧生器官形成的启动、叶片背腹极性建立的调控等功能, 总结了 AS2 参与植物生长激素的运输及分布、植物育性及花器官发育、植物抗病反应等生物学功能, 并对今后 AS1/AS2 调控植物发育机制中的具体研究方向进行了展望。本文对 AS1/AS2 在植物发育过程功能的总结与展望, 将为深入揭示 AS1/AS2 生物学功能的分子机制提供思路, 为叶类蔬菜的新种质资源创新提供重要的理论依据。

关键词: 极性建成; AS1/AS2; 叶片发育

Research Progress in the Role of AS1/AS2 Genes in Leaf Morphogenesis

ZHANG Ju^{1,2}, CHEN Can², LUO Lei¹, Li Li-li², SHEN Shu-xing¹,

Li Cheng-wei³, ZHAO Jian-jun¹, CHEN Xue-ping¹

(¹ College of Horticulture, Agricultural University of Hebei/Key Laboratory for Vegetable Germplasm Enhancement and Utilization of Hebei/Collaborative Innovation Center of Vegetable Industry in Hebei, Baoding 071001;

² Key Laboratory of Plant Genetics and Molecular Breeding, Zhoukou Normal University/Henan Key Laboratory of Crop Molecular Breeding and Bioreactor, Zhoukou 466001;

³ College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001)

Abstract: The establishment of Adaxial-Abaxial polarity of plant leaves is one of the important processes in leaf morphogenesis. ASYMMETRIC LEAVES1/ASYMMETRIC LEAVES2 (AS1/AS2) are key transcription factors that modulate the Adaxial-Abaxial polarity in plant leaf development. These factors directly or indirectly cooperate with multiple proteins or miRNAs to co-regulating the development and formation of plant leaves. This review summarized the conserved structural features of AS1/AS2 in *Arabidopsis thaliana* and Chinese cabbage, and their regulatory functions involved in the initiation of leaf lateral organ formation and the establishment of leaf Adaxial-Abaxial polarity.

收稿日期: 2022-04-26 修回日期: 2022-05-17 网络出版日期: 2022-06-10

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220426003>

第一作者研究方向为蔬菜分子生物学, E-mail: zjzt603@126.com

通信作者: 赵建军, 研究方向为蔬菜学, E-mail: jjz1971@aliyun.com

陈雪平, 研究方向为蔬菜学, E-mail: chenxueping@hebau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32002062); 河南省科技攻关项目 (202102110189, 212102110423, 212102110142); 河北省研究生创新资助项目 (CXZZBS2019100, CXZZBS2019098); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划 (2021GGJS139); 河南省高等学校重点科研项目 (20A180034)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation Project (32002062); The Key Scientific and Technological Project of Henan Province (202102110189, 212102110423, 212102110142); Graduate Innovation Funding Project of Hebei Province (CXZZBS2019100, CXZZBS2019098); The Training Plan for Young Backbone Teachers in Colleges and Universities of Henan Province (2021GGJS139); Key Research Project of Higher Education Institutions in Henan Province (20A180034)

Then, the specific research directions of *AS1/AS2* regulation mechanisms of plant development in the future is also prospected. The summary and prospect of *AS1/AS2* functions in plant development in this paper will provide ideas for further revealing the molecular mechanism of *AS1/AS2* biological functions, and provide an important theoretical basis for the innovation of new germplasm resources of leafy vegetables.

Key words: polarity formation; *ASYMMETRIC LEAVES1/ASYMMETRIC LEAVES 2*; leaf development

植物叶片发育过程受遗传、激素及环境等因子综合调控,其中遗传因子是叶片发育的内在因素,对叶片发育起着至关重要的作用^[1]。参与叶片发育的遗传因子通常是与 3 个极性轴建立相关的基因:即背-腹轴、基-顶轴和中-侧轴的调控基因^[2-3]。叶片背腹轴极性建立是叶片发育中非常重要的过程之一^[2-3],叶片背面(Abaxial)和腹面(Adaxial)分别由决定背性和腹性两类不同极性的基因控制。这些参与叶片极性调控的基因并不相互独立,而是相互协同或者相互拮抗,共同形成了一个复杂的调控网络,基因的相互竞争性表达决定了叶片的背腹特性^[4]。Cheng 等^[5]在结球的大白菜和甘蓝中,分别发现了 19 个和 16 个参与叶球形成的关键基因位点,概述了芸薹属植物中这些基因调控网络模式图,主要包含 3 个调控途径:(1) *TAS3*—ta-siRNA—

ARF3/ARF4 途径;(2) miR165/166—*HD-ZIP III* 途径;(3) *AS1/AS2*—*KANADIs* 途径。

这 3 条途径的阐述,也是对多年来国内外众多关于植物叶片发育研究成果的精辟概述。在这个过程中,植物叶片腹面极性决定基因包括来自 3 个转录因子家族的基因: *ARP* (*AS1*)、*LOB* (*AS2*) 和 *HD-ZIP III* (*REV*、*PHB*、*PHV*),背面极性决定基因包括来自两个转录因子家族的基因: *KANADI* (*KAN1*、*KAN2*、*KAN3*、*KAN4*) 和 *AFR* 家族 (*ARF3*、*ARF4*)^[6-7] (表 1)。而在这些调节途径中, *AS1/AS2* 蛋白起到了关键节点的调节作用。本文根据近期研究结果主要概述拟南芥、大白菜等植物 *AS1/AS2* 蛋白在叶片发育中的功能调控网络,包含叶发育的启动、边界确定、背腹极性建立等,及其在花器官发育和抗病反应中的生物学功能^[8]。

表 1 拟南芥、大白菜中参与背腹轴极性建成的基因

Table 1 Adaxial-Abaxial patterning genes identified in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa*

背腹性 分组	基因家 族分组	基因名称 Gene	拟南芥基因 编号	大白菜 Chiifu		大白菜 A03 基因号	大白菜亚 基因组	大白菜 染色体
				<i>Brassica rapa</i> cv. Chiifu				
				V1.5	V3.5 基因号			
				基因号	V3.5 gene ID			
Adaxial- Abaxial group	Family group		<i>Arabidopsis thaliana</i> gene ID	V1.5 gene ID		<i>Brassica rapa</i> cv. A03 gene ID	<i>Brassica rapa</i> subgenome	<i>Brassica rapa</i> chromosome
腹轴极性 决定性因 子 Adaxial regulators	HD-ZIP Ⅲ	<i>REV</i>	<i>AT5G60690</i>	<i>Bra002458</i>	<i>BraA10g018510.3.5C</i>	<i>BAA10g18520.1</i>	LF	A10
		(<i>REVOLUTA</i>)		<i>Bra020236</i>	<i>BraA02g010380.3.5C</i>	<i>BAA02g10930.1</i>	MF2	A02
		<i>PHB</i>	<i>AT2G34710</i>	<i>Bra005398</i>	<i>BraA05g010300.3.5C</i>	<i>BAA05g10670.1</i>	LF	A05
		(<i>PHABULOSA</i>)		<i>Bra021926</i>	<i>BraA04g025970.3.5C</i>	<i>BAA04g25090.1</i>	MF1	A04
		<i>PHV</i>	<i>AT1G30490</i>	<i>Bra032394</i>	<i>BraA09g036060.3.5C</i>	<i>BAA09g35760.1</i>	LF	A09
		(<i>PHAVOLUTA</i>)						
		<i>ATHB8</i>	<i>AT4G32880</i>	<i>Bra011392</i>	<i>BraA01g005190.3.5C</i>	<i>BAA01g05560.1</i>	LF	A01
		(<i>HOMEODOMAIN GENE 8</i>)		<i>Bra034539</i>	<i>BraA08g017300.3.5C</i>	<i>BAA08g17080.1</i>	MF2	A08
		<i>ATHB15/CNA</i>	<i>AT1G52150</i>	<i>Bra018948</i>	<i>BraA06g002250.3.5C</i>	<i>BAA06g02330.1</i>	LF	A06
		(<i>CORONA</i>)			<i>BraA06g002260.3.5C</i> <i>BraA06g002270.3.5C</i>			
				<i>Bra014315</i>	<i>BraA08g002290.3.5C</i>	<i>BAA08g02290.1</i>	MF1	A08
	ARP	<i>ASI</i>	<i>AT2G37630</i>	<i>Bra005177</i>	<i>BraA05g007760.3.5C</i>	<i>BAA05g08220.1</i>	LF	A05
		(<i>ASYMMETRIC LEAVES1</i>)		<i>Bra000011</i>	<i>BraA03g019560.3.5C</i>	<i>BAA03g20680.1</i>	MF2	A03
	LOB	<i>AS2</i>	<i>AT1G65620</i>	<i>Bra039733</i>	<i>BraA02g017210.3.5C</i>	<i>BAA02g17890.1</i>	MF1	A02
		(<i>ASYMMETRIC LEAVES2</i>)						

表 1(续)

背腹性 分组	基因家 族分组	基因名称 Gene	拟南芥基因 编号 <i>Arabidopsis thaliana</i> gene ID	大白菜 Chiifu <i>Brassica rapa</i> cv. Chiifu		大白菜 A03	大白菜亚	大白菜
						基因号	基因组	染色体
				V1.5 基因号	V3.5 基因号 V3.5 gene ID	<i>Brassica rapa</i> cv. A03 gene ID	<i>Brassica rapa</i> subgenome	<i>Brassica rapa</i> chromosome
Adaxial- Abaxial group	Family group	KAN1 (KANADI 1)	AT5G16560	Bra008613	BraA10g023290.3.5C	BAA10g23570.1	LF	A10
				—	BraA03g007580.3.5C	BAA03g07990.1	MF1	A03
				—	BraA02g006590.3.5C	BAA02g06990.1	MF2	A02
			AT1G32240	Bra023254	BraA09g034220.3.5C	BAA09g33930.1	LF	A09
				Bra033844	BraA05g024090.3.5C	BAA05g23890.1	MF2	A05
				Bra040176	BraA01g009370.3.5C	BAA01g10180.1	LF	A01
		KAN2 (KANADI 2)	AT4G17695	Bra021038	BraA08g013100.3.5C	BAA08g12590.1	MF2	A08
				Bra035311	BraA02g031000.3.5C	BAA02g32400.1	MF1	A02
		KAN3 (KANADI 3)	AT5G42630					
Abaxial regulators	ARF	ARF3 (AUXIN RESPONSE FACTOR 3)	AT2G33860	Bra005465	BraA05g011060.3.5C	BAA05g11480.1	LF	A05
				Bra021885	BraA04g025570.3.5C	BAA04g24700.1	MF1	A04
		ARF4 (AUXIN RESPONSE FACTOR 4)	AT5G60450	Bra002479	BraA10g018270.3.5C	BAA10g18280.1	LF	A10
				Bra020243	BraA02g010510.3.5C	BAA02g11090.1	MF2	A02

大白菜 Chiifu V1.5 和 V3.5 基因编号来自网站 <http://brassicadb.cn/>, 大白菜 A03 基因编号来自网站 <http://www.bioinformaticslab.cn/EMSmutation/home/>
Brassica rapa cv. Chiifu V1.5 和 V3.5 genes IDs are from <http://brassicadb.cn/>, *Brassica rapa* cv. A03 gene IDs are from <http://www.bioinformaticslab.cn/EMSmutation/home/>

1 AS1/AS2 保守结构特征分析

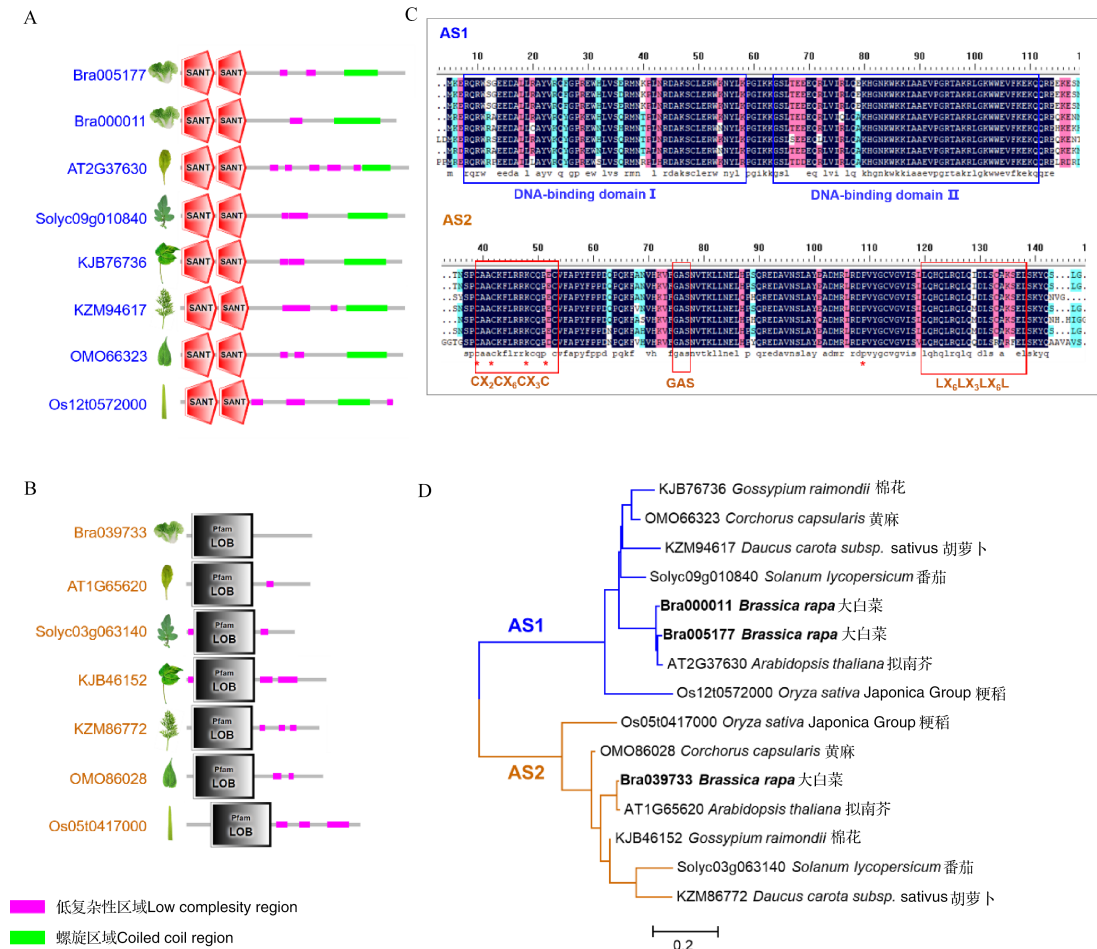
1.1 转录因子 AS1 的 SANT 结构域

MYB 超家族是植物中最丰富的转录因子家族之一,在拟南芥中目前已知的大约有 190 个成员。MYB 蛋白包括高度保守的 N-端 MYB 重复序列(1R、R2R3、3R 和非典型)和多样性的 C-端序列,其中 C-端序列的多样性决定了 MYB 家族蛋白的功能多样性。AS1 属于 MYB-R2R3 型,通过蛋白 GET6 结合 *ASI* 启动子区域介导组蛋白乙酰化来激活 *ASI* 的表达^[9-10]。在大白菜中 *ASI* 有两个同源基因 *Bra005177* 和 *Bra000011*^[7](图 1A、D 和表 1)。根据保守结构域和进化树的分析,在不同叶形的高等植物大白菜、拟南芥、番茄、棉花、胡萝卜、黄麻、水稻中 AS1 的 N 端都具有两个串联的高度保守 SANT 结构域,即 MYB 区(图 1A),每个 SANT 结构域都有 1 个 DNA 结合区(图 1C)。这两个 DNA 结合区是 AS1 调控下游基因的重要结合位点^[8,11]。

1.2 AS2 典型保守的 LOB 结构域

LBD 家族蛋白是一类以高度保守的 LOB 结构域为特征的植物特异性转录因子,是植物发育

的关键调控因子^[12]。拟南芥中 *AS2* 和 *ASL4*(*AS2-LIKE4*)是最早发现的编码 LBD 家族蛋白的基因^[12-13]。*AS2* 编码 LOB 家族的第 6 个成员,即 LBD6 (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN6),属于 Class I LBD 家族蛋白,在大白菜中 *AS2* 为 *Bra039733* 基因^[7]。在不同叶形的高等植物,如大白菜、拟南芥、番茄、棉花、胡萝卜、黄麻和水稻中的 *AS2* 转录因子都含有 1 个典型特征的 LOB 结构域(图 1B),它包括 1 个 C 区,该 C 区包含 4 个间隔的半胱氨酸(CX₂CX₆CX₃C,即 ZF 基序),1 个 GAS 区(Gly-Ala-Ser,即 ICG 区域)和 1 个负责蛋白质二聚的类亮氨酸拉链的螺旋基序(LX₆LX₃LX₆L,即 LZL 区域),其中 ZF 基序是 *AS2* 蛋白结合 DNA 活性所必需的(图 1C),且 ZF 基序在 *AS2* 小体的形成中也发挥作用,ICG 和 LZL 区域是 *AS2* 核定位的必要区域^[12-17]。35S::*AS2* 造成转基因拟南芥植株的子叶、叶向近轴面卷曲;组织切片表明,转基因植株的叶肉组织近-远轴极性发生变化,维管束发育异常^[18]。通过进化树分析,在大白菜、拟南芥、番茄、棉花、胡萝卜、黄麻和水稻中,大白菜 *AS1* 和 *AS2* 序列均与拟南芥的同源关系最近(图 1D)。



A: 转录因子 AS1 保守结构域预测; B: 转录因子 AS2 保守结构域预测; C: AS1、AS2 保守的功能位点和活性位点; 蓝色方框标出转录因子 AS1 的 DNA 结合区, * 表示保守的 Cys 和 Pro 残基, 红色方框分别标出 LOB 结构域中保守的 C 区 (CX₂CX₆CX₃C)、GAS 区和类亮氨酸拉链的螺旋基序 (LX₆LX₃LX₆L); D: 不同叶形植物中 AS1、AS2 的进化树分析; 大白菜; 拟南芥; 番茄; 棉花; 胡萝卜; 黄麻; 梗稻

A: Conserved domain prediction of transcription factor AS1; B: Conserved domain prediction of transcription factor AS2; C: Conserved functional sites and active sites of AS1/AS2. Binding region of transcription factor AS1 was showed by blue boxes. Cys and Pro residues were indicated by Asterisks. The conserved C region (CX₂CX₆CX₃C), GAS region, and spiral motif of leucine-like zipper (LX₆LX₃LX₆L) were marked by red boxes; D: Phylogenetic tree analysis of AS1 and AS2 proteins in several plants with various leaf shapes; : *Brassica rapa*; : *Arabidopsis thaliana*; : *Solanum lycopersicum*; : *Gossypium raimondii*; : *Daucus carota* subsp. sativus; : *Corchorus capsularis*; : *Oryza sativa* Japonica Group

图 1 不同叶形植物中 AS1 和 AS2 结构与进化树分析

Fig.1 Phylogenetic tree and proteins structure analysis of AS1 and AS2 proteins in several plants with various leaf shapes

2 AS1/AS2 在植物叶片发育中的作用概述

2.1 促进叶器官形成的启动

顶端分生组织 (SAM, shoot apical meristems) 包括未分化的干细胞及其衍干细胞, 其中含有侧生器官的原始干细胞, 例如叶原基等。叶原基在分生组织 (含茎尖) 干细胞周围形成, 沿基-顶轴、背-腹轴、中-外轴三轴生长, 发育为背-腹轴极性的扁平的对称的叶片^[5]。AS1/AS2 主要通过影响叶背-腹轴的极化来调控叶片发育, 其调控机制主要表现为两个方面: AS1/AS2 可能通过直接抑制 SAM 中

KNOX I (KNOTTED1-LIKE HOMEODOMAIN I) 基因的表达, 促使 SAM 向叶原基发育^[19]; AS1/AS2 通过调控叶原基的背腹轴发育, 促进叶器官形成的启动^[20]。

2.1.1 AS1/AS2 复合物直接或间接抑制 *KNOX I* 基因的表达 *KNOX I* 家族蛋白促进干细胞活性, 维持 SAM 未分化状态, *KNOX I* 必须被抑制才能形成特定的侧生器官^[19]。转录因子 AS1 和 AS2 相互作用, 直接或间接的形成 AS1/AS2 复合物。AS1/AS2 复合物与调控基序 CWGTTD 和 KMKTGTAHW 结合, 这两个基序分别位于 *KNOX I* 家族的 *BP* 基因和 *KNAT2* 基因的启动子位点^[21-22]。AS1 与 AS2 复合物结合在这些位点上抑制 BP

所必需的,并且这两个结合位点起着非冗余的作用。启动子缺失分析进一步表明,叶片中 BP 表达所需要的增强子元件就位于 AS1/AS2 复合物结合位点之间。AS1/AS2 复合物相互作用,在 KNOX 启动子中形成一个循环,并可能通过 HIRA 的招募,形成一种抑制染色质状态,在器官发生过程中阻断增强子活性,达到沉默 *KNOX I* 基因的活性。通过 AS1 与 AS2 形成异二聚体来限制 KNOX 的表达,在器官启动和模式形成中发挥着关键作用^[23]。

Chang 等^[24]研究发现,AS1/AS2 复合物抑制 *KNAT1* (即 *BP*) 表达,而 *KNAT1* 的表达则促进双子叶植物由单叶裂向复叶的转变,并且也证明了在与基因 *LMI1-like* (*LATE MERISTEM IDENTITY 1-like*) 协同作用下,*as1/as2* 棉花突变体的表型为由单叶裂向复叶转变,这种抑制作用可能是控制棉花叶片由单叶裂向复叶转变的原因。Li 等^[23]研究发现 AS1、AS2 均与 LHP1 互作,其中 LHP1 与 AS1 相互作用更为强烈,AS1/AS2 复合物招募 LHP1,并帮助 LHP1 建立 H3K27me₃,使得 LHP1 靶标 *KNOX I* 基因并抑制其表达。

2.1.2 JLO-AS1 介导侧生器官形成的启动和模式的调控网络 JLO (JAGGED LATERAL ORGANS) 属于 LBD 家族蛋白,是植物发育过程中关于细胞规格和器官模式的通用调控因子^[25-26]。在拟南芥中 AS2 与 JLO 发生相互作用,招募 AS1 形成三聚体蛋白复合物。因此,AS2 充当连接器,介导 JLO 和 AS1 间接的发生相互作用。拟南芥 AS1、AS2 和 JLO 蛋白三者之间相互作用,通过负调控 *KNOX I* 基因表达,参与器官边界的建立^[25,27]。拟南芥 *jlo* 突变体表型类似于在生长素转运和信号传导缺陷突变体中观察到的异常表型^[27]。JLO 功能的丧失导致幼苗早期发育受阻,甚至导致胚胎死亡,而 JLO 活性的降低则影响叶片和花的器官分化启动和形态特征。功能获得型的 *jlo-d* 等位基因突变体最初显示了依赖 JLO 调控侧生器官发育^[25-26]。JLO 对植物发育的调节呈现剂量效应,KNOX I 家族基因 (如 *STM* 和 *BP*) 在多个 *jlo* 等位基因拟南芥突变体中的叶原基上表现出表达增强和表达分布更广^[27]。

这种调控机制可能在单子叶植物和双子叶植物的单叶物种中是非常保守,AS1/AS2 靶标在 *KNOX I* 基因启动子区域,直接或间接抑制 *KNOX I* 基因的表达,启动叶原基发育成叶片^[23]。

2.2 叶原基早期 AS1/AS2 复合物对叶背腹极性基因的作用

植物叶片的轴向发育和极性确定需要转录因子

蛋白等多个蛋白、若干 miRNAs 和植物激素共同形成的调控作用^[4-6]。

2.2.1 JLO 和 AS2 共同调控植物生长激素的运输及分布 单独的 JLO 或 JLO/AS2 互作复合体,调控几个 PIN 蛋白的表达,包括促进 PIN1、PIN3 和 PIN7 的表达,同时抑制 PIN4 的表达,这些 PIN 蛋白是促进生长素在植物中流动的关键因子。多个 JLO 复合体促进 PIN4、PIN7 的表达,多个 AS2 复合体则促进 PIN7 的表达^[27]。在植物发育中 JLO 可能是通过多效性作用方式参与调控生长素的分布和信号传递。AS2 与 JLO 相互作用形成复合体或多个 AS2 复合体调控这些 PIN 家族蛋白来影响生长素的极性运输与分布^[28]。

2.2.2 AS1/AS2 在叶片背腹极性建立过程作用 植物叶片极性建成的基因研究最早见于金鱼草 (*Antirrhinum majus* L.) 的 *phan* (*phantastica*) 缺失突变体研究。Byrne 等^[29]发现 *PHAN* 在拟南芥中的同源基因是 *AS1*。研究表明 *AS1/AS2* 是叶片背腹极性建立过程中决定叶片腹面极性的关键基因。Chen 等^[30]发现 AS2 的表达不仅在空间上受到控制,而且在数量上也受到控制,以保证正确的叶片轴向排列,在叶片形成过程中,AS2 表达水平的定量控制可能涉及表观遗传调控。AS1/AS2 复合体通过直接抑制 KNOX I 家族基因 (*BP*、*KNAT2* 等) 来调控近端和远端叶片长度,这些基因表达于叶原基下的分生组织周围。背-腹极性确定涉及到背面极性基因和腹面极性基因之间的相互拮抗作用,包括 AS1 和 AS2 对两个领域的发展调控。一方面,AS1/AS2 中的 AS1 直接结合靶基因启动子区域来抑制下游背面极性基因 *ARF3*,同时也可以诱导 miR390 和 *tasiR-ARF* 间接抑制 *ETT/ARF3* 和 *ARF4*^[31]。*as1* 和 *as2* 突变体中叶背面极性关键基因 *ETT/ARF3*、*KAN2*、*YAB5* 的转录水平明显升高,而叶腹面极性关键基因 *HD-ZIP III* 的转录水平没有变化。AS1/AS2 及其修饰物协同抑制 ARFs 和 KNOX I。抑制 ARFs 对于建立背腹极性至关重要。另一方面,HD-ZIP IIIs 和 AS1/AS2 是腹面极性关键因子,AS1/AS2 促进 HD-ZIP IIIs 的表达。KANADIs 和 YABBYs 是背面极性关键调节因子,KANADIs 激活 YABBYs 的表达。同时,背面极性因子 KANADIs (KAN1 和 KAN2) 直接抑制 AS2 的表达,进而促进叶片背侧 (Abaxial) 发育^[4,32-35]。总之,叶片相对上下两表面由腹面极性和背面极性共同调节维持。

2.2.3 AS1/AS2 复合体间接调控小 RNAs 影响叶片发育 在水稻叶片发育过程中, Xu 等^[36]发现 *RDR6-SGS3-AGO7* 通路与 *AS1-AS2* 通路存在遗传性互作关系, 在转录水平 *AS1/AS2* 蛋白复合体可能抑制 *RDR6-SGS3-AGO7* 通路, 导致转录后水平 *RDR6-SGS3-AGO7* 通路被抑制。由于 *RDR6-SGS3-AGO7* 通路参与了 ta-siRNA 介导的基因沉默, 而 ta-siRNA 下游的基因可能调控叶片的形态建成。因此, *AS1/AS2* 蛋白复合体可能间接地调控小 RNA 来调控植物叶片的形态建成。

另外, miRNAs 间接调控多个基因影响叶片发育建成。早期胚胎发育涉及多个 miRNAs 的功能, 如 miR156、miR160、miR164、miR165/miR166 和 miR390 等^[37]。*ARF10*、*ARF16* 和 *ARF17* 是 miR160 的靶基因, 它们是维持分生组织局部生长素峰值和莲座叶序的必需物质^[38]。表达 miR160 来抑制 *ARF10* 或 *ARF17* 基因的拟南芥转基因植株呈现出多效性表型, 包括子叶数量和位置的异常, 以及向上卷曲的、高度锯齿状的莲座, 这表明 miR160 和 ARFs 是叶片形成的关键因子。此外, miR165/166 调节与维护 SAM 稳定性^[39]。AGO10 能够抑制 miR165/166 水平, 从而保护 *HD-ZIP III* 转录本不被降解。AGO10 与 AGO1 竞争, 将 miR165/166 加载

到 AGO1 介导的 RISC 复合体中。这种去阻遏作用利于 HD-ZIP III 家族基因的表达, 从而有助于 SAM 的稳定性^[40]。功能获得型 *ag10* 突变体表现出不同程度的叶片偏低性和锯齿性, 而功能丧失功能型 *ag10* 突变体则导致针尖顶端甚至无顶端形成^[41]。miR160 和 miR165/166 之间的相互作用通过激活 LEC2 介导的生长素生物发生途径, 促进体细胞胚胎发生^[42]。它们的靶标基因 *ARFs* 和 *HD-ZIP III*s 可能通过负反馈循环相互作用, 进一步调节 LEC2 的表达^[42]。HD-ZIP III 蛋白家族的 PHV、*ARF10*/*ARF16* 激活 LEC2 表达, 从而诱导生长素合成途径的几个关键基因上调, 最终引发吲哚-3-乙酸 (IAA) 积累^[42]。这些发现提供了关于 miR160-*ARF*、miR165/166-*HDZIP III* 节点如何控制体细胞胚胎发生、分生组织维持和叶片起始的详细见解。TCP3 直接激活 miR164、*AS1*、*IAA3/SHY2*、*SAUR* 的表达, 但它们协同抑制 *CUC* 基因的表达, 从而影响芽分生组织的形成^[43]。

综合上述植物叶片发育分子机制研究进展, 绘制了 *AS1/AS2* 参与拟南芥叶片发育分子调控网络模式简图 (图 2), 一些小 RNAs、基因、植物激素通过协助、拮抗作用等形成了复杂网络, 共同参与叶片发育过程。

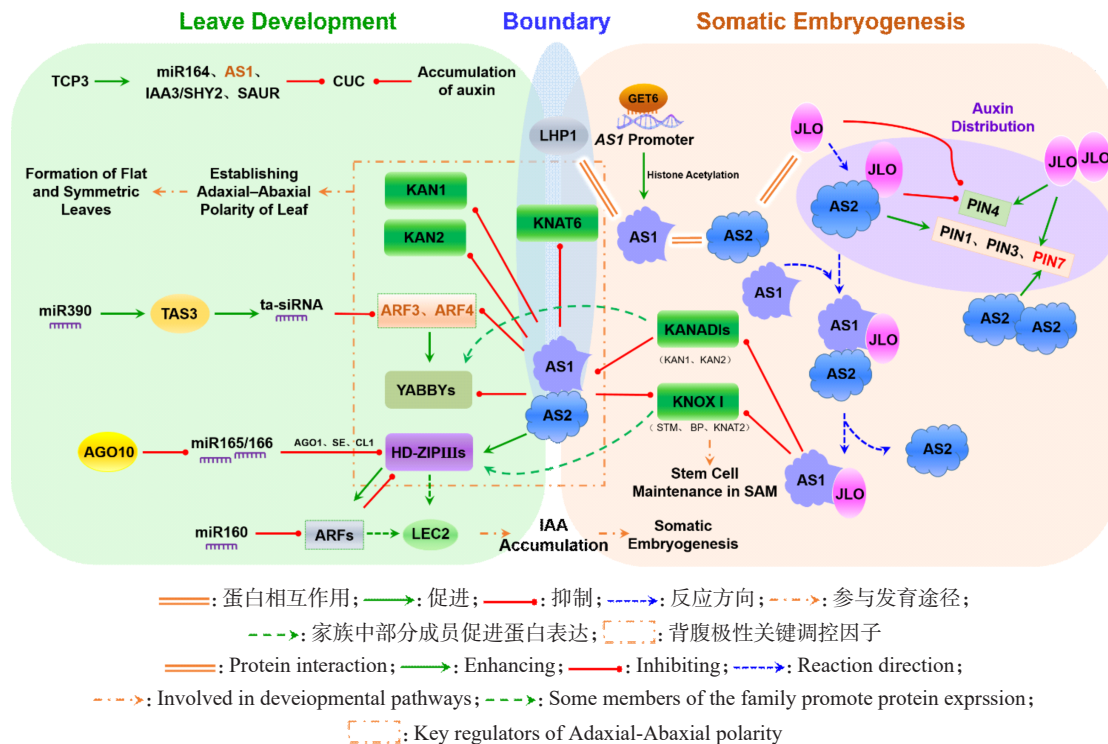


图 2 *AS1/AS2* 参与拟南芥叶片发育分子调控网络模式简图

Fig.2 *AS1/AS2* participates in the molecular regulatory network pattern of Leaf development in *Arabidopsis thaliana*

3 其他生物学功能

3.1 AS2 在植物育性及花器官发育中的作用

AS2 受到 miR156/SPL2 通路的调控,拟南芥的 SPL2 (SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE) 蛋白能够直接绑定在 AS2 的 5'UTR,从而直接调控 AS2。AS2 通过该代谢通路影响拟南芥花的发育以及植物育性。在 *as2* 突变体中,花瓣和萼片都显著变小,其中萼片只有野生型的 66%。*as2* 突变体比野生型的长角果长度减小了 20%~30%,不育率为 37.28%^[44-45]。

3.2 AS2 是植物抗病毒反应中负调因子

在 RNAi 介导的植物抗病毒机制中,病毒侵染植物时,在受感染的植物细胞中病毒的 dsRNAs 被植物 DCL 核酸酶加工成干扰小 RNA (siRNA),通过转录后基因沉默 (PTGS) 介导病毒 RNA 的裂解,从而阻断病毒的增殖。Ye 等^[46]确定 AS2 作为植物 P 体复合物的 1 个新的组成部分,介导 mRNA 的剥落和降解。并发现 AS2 可以促进 DCP2 的活性,加速 mRNA 的转化率,抑制 siRNA 的积累,是 PTGS 的内源性抑制因子,削弱植物的 RNAi,促进病毒侵染植物。同时,*as2* 突变株表现出对病毒感染具有抗性,而过表达株则对病毒敏感。双粒病毒核穿梭蛋白 BV1 在细胞核和细胞质之间穿梭,诱导 AS2 表达,使 AS2 排出核外激活 DCP2 的剥膜活性,受感染植物对病毒更加敏感。这种原理可能被病毒病原体用来削弱宿主植物的抗病毒防御^[46-47]。

4 总结与展望

AS1/AS2 是在植物叶片发育分子调控网络中的一个关键调节因子,AS1/AS2 蛋白参与了叶片极性特化过程中的重要调控途径。首先,在 SAM 中,KANADIs 抑制了 AS1/AS2 的表达,这可能保持了 *KNOX I* 基因的表达水平,进而维持分生组织状态。但在生长素等其他因素的协作下,AS1/AS2 直接或间接抑制了 *KNOX* 基因的表达^[19, 22, 48],这可能启动 SAM 区域侧生器官分化,然后 AS1/AS2 直接或间接抑制背面极性基因 *ARF3*、*ARF4*、*KANI*、*KAN2* 等的表达,与其他基因和 mRNAs 一起调控叶片发育成平展对称的叶^[49]。在这个复杂的基因、蛋白、miRNAs 和激素调控网络中,关于 AS1/AS2 如何直接或间接抑制下游靶基因 *KNOX* 的表达研究最为透彻,但是 AS1/AS2 是如何与其他基因相互作用调

节下游基因或被其他上游基因或 miRNAs 调控,如何影响叶片发育,目前这些研究均不够详细具体,还有待进一步深入探索。另外,除了参与叶片发育外,AS2 还对植物花器官发育以及植物育性起着调控作用,因此 AS1/AS2 在植物发育过程中还存在哪些新的调控机制及生理功能值得深入探索,这将会是其生物功能作用的新突破。AS1/AS2 在植物发育过程功能的探索可为叶类蔬菜的新种质资源创新提供重要的理论基础,具有重要的潜在的应用价值与经济价值。

参考文献

- [1] Ichihashi Y, Tsukaya H. Behavior of leaf meristems and their modification. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1060
- [2] Du F, Guan C, Jiao Y. Molecular mechanisms of leaf morphogenesis. *Molecular Plant*, 2018, 11 (9): 1117-1134
- [3] Conklin P A, Strable J, Li S, Scanlon M J. On the mechanisms of development in monocot and eudicot leaves. *The New Phytologist*, 2019, 221 (2): 706-724
- [4] Bar M, Ori N. Leaf development and morphogenesis. *Development*, 2014, 141 (22): 4219-4230
- [5] Cheng F, Sun R, Hou X, Zheng H, Zhang F, Zhang Y, Liu B, Liang J, Zhuang M, Liu Y, Liu D, Wang X, Li P, Liu Y, Lin K, Bucher J, Zhang N, Wang Y, Wang H, Deng J, Liao Y, Wei K, Zhang X, Fu L, Hu Y, Liu J, Cai C, Zhang S, Zhang S, Li F, Zhang H, Zhang J, Guo N, Liu Z, Liu J, Sun C, Ma Y, Zhang H, Cui Y, Freeling M R, Borm T, Bonnema G, Wu J, Wang X. Subgenome parallel selection is associated with morphotype diversification and convergent crop domestication in *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Nature Genetics*, 2016, 48 (10): 1218-1224
- [6] Mereño P, Paredes E B, Heisler M G, Wenkel S. The shady side of leaf development: The role of the REVOLUTA/KANADI1 module in leaf patterning and auxin-mediated growth promotion. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017, 35: 111-116
- [7] Liang J L, Liu B, Wu J, Cheng F, Wang X W. Genetic variation and divergence of genes involved in leaf adaxial-abaxial polarity establishment in *Brassica rapa*. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 94
- [8] Sun Y, Zhou Q, Zhang W, Fu Y, Huang H. *ASYMMETRIC LEAVES1*, an *Arabidopsis* gene that is involved in the control of cell differentiation in leaves. *Planta*, 2002, 214 (5): 694-702
- [9] Takahashi H, Iwakawa H, Ishibashi N, Kojima S, Matsumura Y, Prananingrum P, Iwasaki M, Takahashi A, Ikezaki M, Luo L, Kobayashi T, Machida Y, Machida C. Meta-analyses of microarrays of *Arabidopsis asymmetric leaves1 (asl)*, *asl* and their modifying mutants reveal a critical role for the ETT pathway in stabilization of adaxial-abaxial patterning and cell division during leaf development. *Plant and Cell Physiology*, 2013, 54 (3): 418-431
- [10] Chua Y L, Channelière S, Mott E, Gray J C. The bromodomain protein GTE6 controls leaf development in *Arabidopsis* by histone acetylation at *ASYMMETRIC LEAVES1*. *Genes and Development*, 2005, 19 (18): 2245-2254

- [11] Li W, Liu Y, Zhao J, Zhen X, Guo C, Shu Y. Genome-wide identification and characterization of R2R3 MYB genes in *Medicago truncatula*. *Genetics and Molecular Biology*, 2019, 42(3): 611-623
- [12] Iwakawa H, Ueno Y, Semiarti E, Onouchi H, Kojima S, Tsukaya H, Hasebe M, Soma T, Ikezaki M, Machida C, Machida Y. The *ASYMMETRIC LEAVES2* gene of *Arabidopsis thaliana*, required for formation of a symmetric flat leaf lamina, encodes a member of a novel family of proteins characterized by cysteine repeats and a leucine zipper. *The Plant Cell Physiol*, 2002, 43: 467-478
- [13] Shuai B, Reynaga-Peña C G, Springer P S. The lateral organ boundaries gene defines a novel plant-specific gene family. *Plant Physiology*, 2002, 129: 747-761
- [14] Lee H W, Kim M J, Park M Y, Han K H, Kim J. The conserved proline residue in the LOB domain of LBD18 is critical for DNA-binding and biological function. *Molecular Plant*, 2013, 6(5): 1722-1725
- [15] Majer C, Hochholdinger F. Defining the boundaries: Structure and function of LOB domain proteins. *Trends Plant Science*, 2011, 16(1): 47-52
- [16] Luo L, Ando S, Sakamoto Y, Suzuki T, Takahashi H, Ishibashi N, Kojima S, Kurihara D, Higashiyama T, Yamamoto K T, Matsunaga S, Machida C, Sasabe M, Machida Y. The formation of perinucleolar bodies is important for normal leaf development and requires the zinc-finger DNA-binding motif in *Arabidopsis* *ASYMMETRIC LEAVES2*. *Plant Journal*, 2020, 101(5): 1118-1134
- [17] Zhang Y, Li Z, Ma B, Hou Q, Wan X. Phylogeny and functions of LOB domain proteins in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(7): 2278
- [18] Guo B J, Wang J, Lin S, Tian Z, Zhou K, Luan H Y, Lyu C, Zhang X Z, Xu R G. A genome-wide analysis of the *ASYMMETRIC LEAVES2/LATERAL ORGAN BOUNDARIES (AS2/LOB)* gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Zhejiang University Science*, 2016, 17(10): 763-774
- [19] Ori N, Eshed Y, Chuck G, Bowman J L, Hake S. Mechanisms that control KNOX gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development*, 2000, 127(24): 5523-5532
- [20] Shi J, Dong J, Xue J, Wang H, Yang Z, Jiao Y, Xu L, Huang H. Model for the role of auxin polar transport in patterning of the leaf adaxial-abaxial axis. *Plant Journal*, 2017, 92(3): 469-480
- [21] Lin Y, Hou H, Zhang Y, Hou X. Overexpression of a pak choi gene, *BcAS2*, causes leaf curvature in *Arabidopsis thaliana*. *Genes*, 2021, 12(1): 102
- [22] Guo M, Thomas J, Collins G, Timmermans M C. Direct repression of KNOX loci by the *ASYMMETRIC LEAVES1* complex of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2008, 20(1): 48-58
- [23] Li Z, Li B, Liu J, Guo Z, Liu Y, Li Y, Shen W, Huang Y, Huang H, Zhang Y, Dong A. Transcription factors AS1 and AS2 interact with LHP1 to repress *KNOX* genes in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2016, 58(12): 959-970
- [24] Chang L, Mei G, Hu Y, Deng J, Zhang T. *LM11-like* and *KNOX1* genes coordinately regulate plant leaf development in dicotyledons. *Plant Molecular Biology*, 2019, 99: 449-460
- [25] Borghi L, Bureau M, Simon R. *Arabidopsis* *JAGGED LATERAL ORGANS* is expressed in boundaries and coordinates *KNOX* and *PIN* activity. *The Plant Cell*, 2007, 19(6): 1795-1808
- [26] Rast-Somssich M I, Žádníková P, Schmid S, Kieffer M, Kepinski S, Simon R. The *Arabidopsis* *JAGGED LATERAL ORGANS (JLO)* gene sensitizes plants to auxin. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(11): 2741-2755
- [27] Rast M I, Simon R. *Arabidopsis* *JAGGED LATERAL ORGANS* acts with *ASYMMETRIC LEAVES2* to coordinate *KNOX* and *PIN* expression in shoot and root meristems. *The Plant Cell*, 2012, 24(7): 2917-2933
- [28] Bureau M, Rast M I, Ilmer J, Simon R. *JAGGED LATERAL ORGAN (JLO)* controls auxin dependent patterning during development of the *Arabidopsis* embryo and root. *Plant Molecular Biology*, 2010, 74: 479-491
- [29] Byrne M E, Barley R, Curtis M, Arroyo J M, Dunham M, Hudson A, Martienssen R A. *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis*. *Nature*, 2000, 408(6815): 967-971
- [30] Chen X F, Wang H, Li J Q, Huang H, Xu L. Quantitative control of *ASYMMETRIC LEAVES2* expression is critical for leaf axial patterning in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(16): 4895-4905
- [31] Matsumura Y, Ohbayashi I, Takahashi H, Kojima S, Ishibashi N, Keta S, Nakagawa A, Hayashi R, Saéz-Vásquez J, Echeverria M, Sugiyama M, Nakamura K, Machida C, Machida Y. A genetic link between epigenetic repressor AS1-AS2 and a putative small subunit processome in leaf polarity establishment of *Arabidopsis*. *Biology Open*, 2016, 5(7): 942-954
- [32] Husbands A Y, Benkovics A H, Nogueira F T, Lodha M, Timmermans M C. The *ASYMMETRIC LEAVES* complex employs multiple modes of regulation to affect Adaxial-Abaxial patterning and leaf complexity. *The Plant Cell*, 2015, 27(12): 3321-3335
- [33] Machida C, Nakagawa A, Kojima S, Takahashi H, Machida Y. The complex of *ASYMMETRIC LEAVES (AS)* proteins plays a central role in antagonistic interactions of genes for leaf polarity specification in *Arabidopsis*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2015, 4(6): 655-671
- [34] Vial-Pradel S, Keta S, Nomoto M, Takahashi H, Suzuki M, Yokoyama Y, Sasabe M, Kojima S, Tada Y, Machida Y, Machida C. *Arabidopsis* zinc-finger-like protein *ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)* and two nucleolar proteins maintain gene body DNA methylation in the leaf polarity gene *ETTIN (ARF3)*. *Plant and Cell Physiology*, 2018, 59(7): 1385-1397
- [35] Iwakawa H, Takahashi H, Machida Y, Machida C. Roles of *ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)* and nucleolar proteins in the Adaxial-Abaxial polarity specification at the perinucleolar region in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19): 7314
- [36] Xu L, Yang L, Pi L, Liu Q, Ling Q, Wang H, Poethig R S, Huang H. Genetic interaction between the *AS1-AS2* and *RDR6-SGS3-AGO7* pathways for leaf morphogenesis. *Plant Cell Physiology*, 2006, 47(7): 853-863
- [37] Armenta-Medina A, Lepe-Soltero D, Xiang D Q, Datla R,

- Abreu-Goodger C, Gillmor C S. *Arabidopsis thaliana* miRNAs promote embryo pattern formation beginning in the zygote. *Developmental Biology*, 2017, 431: 145-151
- [38] Pulido A, Laufs P. Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61 (5): 1277-1291
- [39] Mallory A C, Bartel D P, Bartel B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *The Plant Cell*, 2005, 17: 1360-1375
- [40] Zhu H, Hu F, Wang R, Zhou X, Sze S H, Liou L W, Barefoot A, Dickman M, Zhang X. *Arabidopsis* Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development. *Cell*, 2011, 145: 242-256
- [41] Roodbarkelari F, Du F, Truernit E, Laux T. *ZLL/AGO10* maintains shoot meristem stem cells during *Arabidopsis* embryogenesis by downregulating ARF2-mediated auxin response. *BMC Biology*, 2015, 13: 74
- [42] Wójcik A M, Nodine M D, Gaj M D. miR160 and miR166/165 contribute to the LEC2-mediated auxin response involved in the somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2024
- [43] Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M. TCP transcription factors regulate the activities of *ASYMMETRIC LEAVES1* and miR164, as well as the auxin response, during differentiation of leaves in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2010, 22 (11): 3574-3588
- [44] Gubert C M, Christy M E, Ward D L, Groner W D, Liljegren S J. *ASYMMETRIC LEAVES1* regulates abscission zone placement in *Arabidopsis* flowers. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 195
- [45] Wang Z, Wang Y, Kohalmi S E, Amyot L, Hannoufa A. *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 2* controls floral organ development and plant fertility by activating *ASYMMETRIC LEAVES 2* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 2016, 92 (6): 661-674
- [46] Ye J, Yang J Y, Sun Y W, Zhao P Z, Gao S Q, Jung C, Qu J, Fang R X, Chua N H. Geminivirus activates *ASYMMETRIC LEAVES 2* to accelerate cytoplasmic DCP2-mediated mRNA turnover and weakens RNA silencing in *Arabidopsis*. *PLoS Pathogens*, 2015, 11 (10): e1005196
- [47] Mäkinen K, Löhmus A, Pollari M. Plant RNA regulatory network and RNA granules in virus infection. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2093
- [48] Li Z, Li B, Shen W H, Huang H, Dong A. TCP transcription factors interact with AS2 in the repression of class-I *KNOX* genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2012, 71 (1): 99-107
- [49] Machida Y, Suzuki T, Sasabe M, Iwakawa H, Kojima S, Machida C. *Arabidopsis ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)*: Roles in plant morphogenesis, cell division, and pathogenesis. *Journal of Plant Research*, 2022, 135: 3-14