

## 综述 Reviews

## 植物根尖干细胞的特化、维持和再生

张航, 皮利民\*

武汉大学高等研究院, 武汉430072

**摘要:** 位于分生组织中的根尖干细胞在植物整个生命周期都维持多能性, 并且持续不断地分裂, 为根的生长提供新的细胞。干细胞自我更新和分化之间的平衡受复杂的基因调控网络控制。在这篇综述中, 我们将讨论近期主要在拟南芥中所获得的有关根尖干细胞在胚胎确立、胚后维持和损伤后再生机制研究的进展。我们着重论述植物激素、关键转录因子、微小RNA和小肽在根尖干细胞中的调控作用。

**关键词:** 根分生组织; 干细胞; 多能性; 静止; 再生

根通常位于地表之下, 是传统意义上高等植物的六大器官之一。对于大多数植物来说, 根提供了可靠且必要的支持力和附着能力, 同时又负责了水分、矿物吸收和营养物质储存等与外界环境进行物质交流的功能。自19世纪中叶开始, 植物学家从组织学、生理学、细胞学和遗传学等层面对不同植物的根进行了持续近200年的研究。在此过程中发现了位于根尖的分生组织是根生长发育的细胞源泉(Galun 2007)。通过对实验室模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)根尖的细胞谱系分析发现, 与动物类似, 植物也存在不同类型的干细胞(Dolan和Scheres 1993; Kidner等2000)。近30年来, 研究者利用遗传学、分子生物学、多重组学和显微成像等手段对根尖干细胞进行了比较详尽的研究, 分离和鉴定了一批关键的根尖干细胞命运决定因子, 并以此为基础搭建了根尖干细胞的分子调控网络。本文将总结近年来主要以拟南芥根尖为对象开展的根尖干细胞研究的进展, 讨论已有的调控模型和存在的问题, 着重阐述包括转录因子、激素、微小RNA (microRNA)和多肽等在内的可移动信号分子在干细胞特化和维持中的作用。此外, 本文还将论述近年来我们对植物根尖干细胞再生分子调控机制的认识。

## 1 根尖分生组织与干细胞

许多植物都拥有漫长的生活史, 在这或许可达数百年甚至更长的生存期内, 植物从一粒微小的种子不断生长, 最终发育成一个复杂的多细胞

个体。这一过程体现出植物不同寻常的生长与自我更新的能力。得益于19世纪中叶细胞学说的建立与流行, 植物学家们开始从细胞水平对植物的生长发育进行研究。1846年, 瑞士植物学家Nägeli和德国植物学家Hofmeister基于生理实验和解剖研究的成果提出了顶端细胞学说, 发现了根尖和茎尖是植物生长的基础(Schel 1989)。Nägeli (1858)在其著作中描述和定义了分生组织, 指出这种位于植物顶端的组织是植物生长和发育所必需的。分生组织(meristem)是植物在胚胎时期即建立的具有分生能力的细胞群, 位于茎尖和根尖生长点的分别称为茎尖分生组织(shoot apical meristem, SAM)和根尖分生组织(root apical meristem, RAM)。

干细胞(stem cell)是加拿大医学家McCulloch和Till (1960)通过小鼠辐射实验提出的概念。他们在接受骨髓移植的辐射小鼠脾脏中发现了一类拥有持续自我更新能力, 且能分化产生其他细胞类群的细胞, 这类细胞依据它们的特殊功能被命名为干细胞。虽然干细胞概念最先在动物发育领域研究中被提出, 但实际上更早的时候植物学家在研究分生组织结构时就意识到了具有类似干细胞性质的细胞群的存在。Brumfield (1943)等人用X射线诱导产生染色体异常以标记细胞谱系的研究方法在蚕豆(*Vicia faba*)等植物的根尖发现了结构不同但功能相似的细胞类群。这些细胞类群在

收稿 2020-04-28 修定 2020-06-12

资助 国家自然科学基金(31830057和31770320)。

\* 通讯作者(limin.pi@whu.edu.cn)。

Clowes (1958)等人的研究中被命名为原分生组织(promeristem)。它可以不断分裂分化,且被证明是形成整个根所必需的。

自上世纪90年代初开始,通过对实验室模式植物拟南芥根的显微观察和克隆分析,研究人员描绘出一幅清晰的根尖组织结构和细胞谱系图。这为植物根形态发生的发育遗传学研究奠定了坚实的基础。位于根分生组织底部中心的4个细胞极少分裂,因此被称为静止中心(quiescent center, QC)。与QC细胞相邻的周围一层细胞被称为起始细胞或者干细胞。干细胞发生一次不对称性分裂产生两个子细胞,与QC相接触的细胞仍旧保留为一个新的干细胞。远离QC的子细胞开始分化,形成不同的细胞类型,由外而内依次是表皮、皮层、内皮层、中柱鞘和中柱。根冠由侧根冠和小柱细胞(columella cell, CC)构成,位于根的最尖端,保护着整个分生组织。小柱细胞由小柱干细胞(columella stem cell, CSC)分化而来,是植物感知重力的重要部位(Dolan和Scheres 1993)。van den Berg等(1997)利用激光消融的手段破坏QC细胞后发现周围的干细胞不再持续性分裂,并且开始显现细胞分化的特征。据此,他们认为QC提供了一种短距离作用的信号,维持了周围干细胞未分化的状态。通过对细胞谱系的追踪发现, QC细胞分裂后能替换受

损的起始细胞。因此, QC细胞也被认为是一类长期干细胞(Kidner等2000)。与动物类似,植物干细胞多能性的维持需要周围细胞提供一种特殊微环境。这种微环境也被称之为干细胞巢(stem cell niche, SCN)。QC和周围干细胞组成了广义上的干细胞巢,对调控根的形态发生起到了至关重要的作用。

## 2 干细胞在胚胎期的特化

多细胞生物胚后的发育是胚胎发育的延续。Natesh等人的研究表明,在大多数被子植物中根尖分生组织在胚胎建成时即已经建立(Johri和Ambe-gaokar 1984)。Dolan等(1993)通过细胞谱系追踪将胚胎发育时期的细胞与胚后的根分生组织一一对应了起来,证实了根尖干细胞巢在胚胎发育过程中已确立。胚根原(hypophysis)由与早期原胚相邻的最顶部胚柄细胞特化而来(图1-A)。它不仅是QC和小柱细胞的起始细胞,更是植物建立整个根分生组织所必需的。

生长素(auxin)是调控植物生长发育最重要的激素之一,在植物胚胎模式形成调控中具有关键作用。胚根原的特化需要生长素响应因子MONOPTEROS (MP/ARF5)和生长素抑制因子BODENLOS (BDL/IAA12)。这两个基因突变后产生非常相似的表现型,即胚根原不能正常形成和分裂,从而导致胚

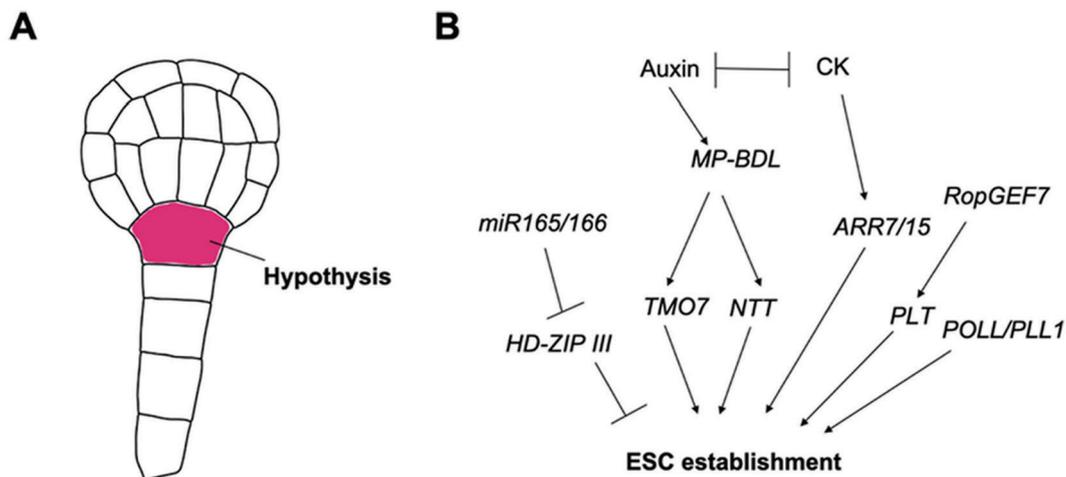


图1 植物胚胎干细胞结构(A)和控制其建立的基因调节网络(B)

Fig. 1 The structure of plant embryonic stem cell (A) and the gene regulation network that controls its establishment (B)

Hypophysis: 胚根原; ESC: 胚胎干细胞。

根和主根发育严重受损(Przemeck等1996; Hardtke等1998; Hamann等1999; Hamann等2002)。MP和BDL均在原维管束中强烈表达,但在胚根原中检测不到表达。BDL可以直接结合MP蛋白,从而抑制MP的转录调节活性。生长素在原维管束中降解BDL蛋白,从而解除BDL对MP的抑制作用。MP促进了生长素外运蛋白如PIN1的表达,使得生长素从原维管束细胞转运到底部细胞中,促进胚根原的形成(Weijers等2006)。这个模型一定程度上解释了MP-BDL以非细胞自主性的方式决定胚根原命运的机制。随后通过转录组学的分析手段又进一步鉴定了一批MP调节的下游基因。其中两个bHLH转录因子TARGET OF MP 5 (TMO5)和TMO7能被MP在原维管束中直接激活。有趣的是, TMO7的mRNA只分布在原维管束中,而其蛋白质在原维管束和胚根原都可以检测到。因此推断, TMO7蛋白能从原维管束细胞移动到胚根原中(Schlereth等2010)。这种移动依赖于TMO7自身的特定基序和其可能的磷酸化位点,并且这种运输很可能是通过胞间连丝进行的(Lu等2018)。基因敲低和异位表达实验表明, TMO5和TMO7部分介导了MP以非细胞自主性的方式对胚根原的控制(Schlereth等2010)。NO TRANSMITTING TRACT (NTT)编码了一个含锌指结构域的转录因子。敲除NTT及其最同源的两个基因后,三突变体(*nww*)出现非常严重的发育缺陷。野生型胚根原经过一次不对称性分裂产生两个子细胞,顶部透镜状细胞发育成QC,另外一个细胞发育成小柱干细胞系统。*nww*三突变体与*mp*突变体表型非常类似,其胚根原的不对称性分裂不能正常进行,故而导致胚后主根缺失。在*mp*突变体的胚根原细胞中检测不到NTT的表达。进一步利用染色质免疫功能沉淀检测发现MP能直接结合NTT启动子上一个与另外两个同源基因都保守的生长素响应元件,进而直接激活NTT的表达。此外,异位表达NTT能使胚胎顶部产生生长素响应的积累,类似基部胚根原的特性,胚后能将茎顶端转化为根。由此可见,MP-NWW定义了一条控制胚胎干细胞系统建立的重要途径。

除生长素外,细胞分裂素是控制植物生长发育的另外一类重要激素,通常情况下与生长素的

作用相拮抗。细胞分裂素响应标记pTCS: GFP的表达模式显示,分裂前的胚根源细胞拥有较高的细胞分裂素响应水平。在分裂完成后,底部细胞积累较高的生长素水平,诱导出细胞分裂素响应抑制因子ARR7及ARR15,从而将高水平的细胞分裂素响应限定在顶部透镜状细胞内。同时,降低ARR7和ARR15的转录水平,或者在基部细胞持续性激活细胞分裂素信号通路都可以导致胚根原命运决定和分裂异常。这些证据表明生长素和细胞分裂素之间的瞬时拮抗介导了胚胎发生过程中根尖干细胞巢的建立(Muller等2008)。

除激素外,其他发育调控因子如受microRNA 165/166调控的HD-ZIP III和PLETHORA (PLT)也在胚胎根干细胞系统建立中发挥了重要作用。参与miRNA生物合成的基因SERRATE (SE)突变后,HD-ZIP III家族的PHABULOSA (PHB)异位表达在原胚的基部,导致根干细胞巢不能正确建立。而如果在*se*突变体背景下对*phbphv*基因进行敲除,其胚根和主根的缺陷就能得到部分回复。这些证据表明根尖干细胞系统在胚胎发生过程中的正常建立需要抑制HD-ZIP III的活性(Grigg等2009)。PLT是一类AP2转录因子家族成员,在胚根原及周围细胞中强烈表达。对*plt1 plt2*双突变植株胚胎的观察可以发现其胚根源细胞出现异常分裂,且干细胞巢的分子标记QC25和QC46也无法在相应位置被检测到,这说明PLT1/2参与了胚胎干细胞的特化(Aida等2004)。虽然PLT异位表达在胚胎顶部可以抑制HD-ZIP III家族基因的表达,但PLT是否在原位具有同样的功能,进而促进胚胎干细胞巢建立还需进一步的实验证据支持。此外,胚胎干细胞的建立还受到一些其他经典信号通路的调节,诸如去磷酸酶和小G蛋白介导的信号途径。POLTERGEIST (POL)和PLL1编码了一对同源性很高的2C型蛋白磷酸酶。*pol pll1*双突变植株的胚胎干细胞巢细胞组织结构出现异常,最后造成胚根和主根缺失。该项研究表明, POL/PLL1介导的去磷酸化调控了胚根原的不对称性分裂(Song等2008)。RopGEF7是拟南芥小G蛋白AtRAC1的激活子,特异地表达在胚胎的QC前体细胞中。使用RNAi技术在拟南芥中敲低RopGEF7基因表达之后,该植株

出现了胚根原不能正常分裂的现象, 以及*PLT*的表达量显著下降与*QC*分子标记消失等表型。*ROPGEF7*的表达受外源生长素的诱导, 反过来*ROPGEF7*也能促进生长素的运输和响应(Chen等2011)。鉴定*POL/PLL1*和*ROPGEF7-AtRAC1*的靶标蛋白将非常有助于解析这两条信号通路调控胚胎干细胞巢建立的机制。综上所述, 近年来的工作已为植物根尖干细胞在胚胎中建立搭建起基本的分子框架(图1-B), 但各调控通路之间特别是与*MP-BDL*这一核心通路的互作机制还需深入的研究。

### 3 干细胞的维持

植物种子萌发后的生长伴随着根尖干细胞群(图2-A)的重新激活, 此阶段分生组织进入快速分裂状态, 主根开始伸长。与动物干细胞相对短的活动周期不同, 植物的干细胞可以在其或长达数千年的生命周期中长期保持高活性, 以此支撑植物持续不断的器官发生。为执行这一功能, 根尖干细胞的命运和活性必然受到复杂而精妙的调控。

#### 3.1 干细胞多能性

干细胞具有分化为不同功能性细胞的潜能, 这种能力被称为多能性(pluripotency)。皮层/内皮层起始细胞(cortex-endodermis initial, CEI)分裂一次产生两个子细胞(CEID)。远离*QC*的子细胞再发生一次平周分裂, 产生的两个子细胞分别分裂分化为皮层和内皮层(Dolan和Scheres 1993)。

*SCARECROW (SCR)*和*SHORT ROOT (SHR)*同属GRAS转录因子家族成员。二者的基因功能缺失突变体拥有相似的表型, 如内皮层不能正常特化, 根尖干细胞分化, 最终导致植物根长变短(Di Laurenzio等1996; Helariutta等2000)。*SHR*在中柱细胞中表达, 其蛋白质通过胞间连丝移动到内皮层和*QC*细胞中, 进而激活*SCR*的表达。反过来, *SCR*蛋白与*SHR*结合。一方面, 形成*SCR-SHR*蛋白复合体阻止了*SHR*进一步移动到外层细胞(Nakajima等2001; Cui等2007); 另一方面该复合体通过调节下游基因表达决定了皮层和*QC*的细胞命运。*SCR*和*SHR*的互作模式不仅定义了一条重要的维持根尖干细胞多能性的通路, 而且参与了干细胞巢位置确定的过程(Sabatini等2003; Cui等2007)。近年来, 关于*SHR-SCR*如何控制干细胞的命运和行为的相关研究取得了诸多进展。Sabatinin研究组的工作表明*SCR*在*QC*细胞中直接抑制了B型细胞分裂素响应基因*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1 (ARR1)*的表达, 从而避免了*ARR1*对生长素生物合成途径限速酶基因*ANTHRANILATE SYNTHESIS BETA SUBUNIT 1 (ASB1)*的促进作用。*ASB1*蛋白表达量增加会提高生长素水平, 从而导致干细胞巢分化(Moubayidin等2013)。Sozanni等(2010)通过细胞类型特异转录组分析和染色质免疫-DNA芯片分析, 系统地鉴定了*SHR*和*SCR*共调节的下游基因网络。他们发现*SHR-SCR*蛋白复合体能直接结合D

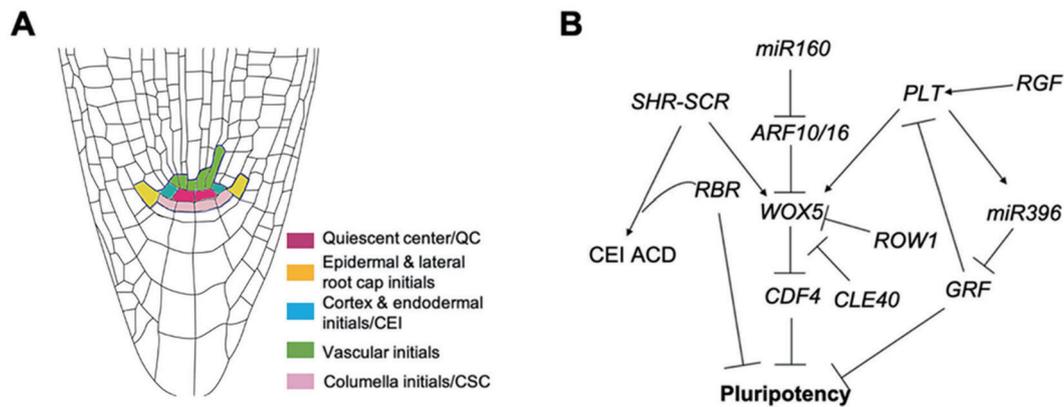


图2 根尖干细胞巢组织结构(A)和维持干细胞多能性的基因调节网络(B)

Fig.2 The structure of root tip stem cell nest (A) and the gene regulatory network to maintain stem cell pluripotency (B)

A: 不同颜色代表不同类型的干细胞。Pluripotency: 多能性。

型细胞周期因子CYCD6;1的启动子, 激活CYCD6;1在皮层-内皮层起始细胞及子细胞(CEI/CEID)中的表达。与野生型相比, *cycd6;1*突变体的CEI细胞数目显著增多。这表明受SHR-SCR复合体激活的CYCD6;1促进了干细胞的不对称性分裂。RETI-NOBLASTOMA-RELATED (RBR)是哺乳动物RB基因在拟南芥中的唯一同源基因。在拟南芥中敲低RBR基因的表达会造成根远端干细胞过度增殖, 而过量表达RBR会使干细胞巢细胞开始分化。由此可见, RBR在干细胞维持过程中起到了至关重要的作用(Wildwater等2005)。除此之外, Scheres研究组的进一步研究表明, RBR还参与SHR-SCR-CYCD6;1介导的CEI/CEID细胞的不对称性细胞分裂(asymmetric cell division, ACD)过程。他们提出一个双稳态调控模型来解释ACD的开启和关闭机制。在这个模型中, SHR-SCR复合体与高浓度的生长素共同作用, 促进了CYCD6;1在CEI/CEID中表达, 从而激活ACD。CYCD6又与CDK形成蛋白复合体磷酸化RBR, 解除了RBR对SHR-SCR复合体转录活性的抑制, 确保ACD的进行。ACD发生后, 一方面子细胞远离SCN, 生长素响应较低, 无法重建高浓度的SHR-SCR, 因此CYCD6;1表达受到抑制; 另一方面由于缺乏CYCD6-CDK, 未被磷酸化修饰的RBR结合SCR, 进一步抑制了包括CYCD6;1在内的下游基因表达, 从而终止了内皮层细胞再次进行ACD (Cruz-Ramirez等2012)。PLT蛋白含量在根尖干细胞巢处最高, 在周围细胞中逐次降低, 呈一种浓度梯度分布模式。在PLT1/2/3三突变的根中干细胞不能维持, 分生组织不能建立, 最终导致主根缺失。相反, 短时间诱导过量表达PLT会推迟分生组织细胞向成熟分化细胞的转化, 导致根尖分生组织变长。长时间过量表达PLT可彻底改变茎顶端分生组织的命运, 转换成根分生组织的属性。由此可见, PLT是根尖干细胞命运的决定因子(Aida等2004)。与PLT的表达模式类似, 生长素的分布/响应也是在干细胞巢处最大并向四周扩散呈梯度模式。虽然PLT的表达依赖于生长素, 然而PLT并非生长素直接作用的靶标, 它较为缓慢地响应生长素的变化, 进而控制根尖包括干细胞巢在内的细胞区域化(zonation), 最终调节根的生长发

育(Mähönen等2014)。WUSCHEL-RELATED HOMEBOX (WOX)基因是一类含有同源异型盒的转录因子家族, 在特化植物各种不同类型的干细胞上都有关键的作用(Aichinger等2012)。WOX5是WOX家族基因的成员, 在QC中特异表达。*wox5*突变体的QC身份不能正常维持, 小柱干细胞分化为小柱细胞。此外, *wox5*还能增强*shr*、*scr*和*plt1 plt2*突变体在近端分生组织的缺陷。过量表达WOX5则能把高度分化的小柱细胞重编程成小柱干细胞。这些证据表明, WOX5对根尖干细胞的维持非常重要(Sarkar等2007)。进一步的研究发现虽然WOX5只在QC表达, 但其蛋白质能移动到小柱干细胞中。WOX5蛋白在干细胞中招募TOPLESS-HISTONE DEACETYLATES 19 (TPL-HDA19)复合体, 降低细胞分化因子CYCLING DOF FACTOR 4 (CDF4)启动子上组蛋白H3的乙酰化修饰水平, 从而抑制了CDF4的表达, 维持了干细胞的多能性(Pi等2015)。先前通过激光消融实验推断, 有一源自QC的未知信号在维持相邻干细胞干性(van den Berg等1997), 而能胞间移动的WOX5蛋白至少部分解释了QC信号的本质。至于是否还有其他未知信号分子与WOX5蛋白协同作用还有待进一步的研究。鉴于WOX5基因的功能, 解析其特异表达在QC的调控机制十分有助于我们理解干细胞巢是如何定位的。REPRESSOR OF WUSCHEL (ROW1/At-BARD1)除了具有其在真核生物中保守地参与DNA修复的功能外, 还能与WOX5启动子上特定区间的组蛋白修饰H3K4me3结合, 直接抑制WOX5在分生组织近端表达。*row1*突变体的根非常短小, 但在其与*wox5*的双突变体植株中这一缺陷能很大程度上得到恢复。这说明ROW1对WOX5表达的限制是根分生组织维持正常发育所必需的(Zhang 2015)。最新的研究发现, 植物特有的teosinte-branched cycloidea PCNA (TCP)转录因子TCP20/21能和SCR和PLT同时结合, SCR-TCP-PLT复合体通过PLT结合到WOX5启动子上, 从而促进WOX5的表达。将SCR和PLT二者表达模式重叠后发现, SCR-PLT的活性在QC处最高。这也进一步支持了SCR-TCP-PLT限制WOX5在QC特异表达的模型(Shimotohno等2018)。

microRNA是一类长约22 nt的非编码RNA, 在调控生物体生长发育方面发挥重要的作用。它通过碱基互补配对的原则靶向mRNA, 剪切或者抑制其翻译, 从而抑制基因的表达(Jones-Rhoades等2006)。miR160靶基因是一类生长素响应因子(AUXIN RESPONSE FACTOR) *ARF10/16/17*。 *arf10 arf16*双突变的小柱细胞不能正常分化, 造成具有干细胞性质的细胞过度积累, 根失去向重性(Wang等2005)。进一步的研究发现, *arf10 arf16*双突变的根冠细胞中有*WOX5*的错位表达, 而且*wox5*突变体能很大程度上回复*arf10 arf16*双突变的表型。由此可见, *ARF10/16*通过抑制*WOX5*在根冠中的表达, 促进小柱细胞的分化(Ding和Friml 2010)。*miR396*是另一个与根尖干细胞巢密切相关的microRNA。在拟南芥中过量表达*miR396*会造成包括*PLT*在内的众多与干细胞巢有关的基因表达范围扩大。相反, 过量表达抗*miR396*的靶标基因*ROOT GROWTH FACTOR (RGF)*会导致干细胞巢细胞排布紊乱。现有的模型认为一方面*miR396*被*PLT*诱导表达后, 在干细胞巢处降解了*GRFs*, 维持了干细胞的活性; 另一方面*GRFs*也可以通过抑制*PLT*的活性促进干细胞向快速增殖的子细胞转换(Rodriguez等2015)。

分泌型多肽常作为胞间信号分子参与细胞功能的协调和特化。拟南芥*TYROSYLPROTEIN SULFOTRANSFERASE (TPST)*编码了一个酪氨酸磺基转移酶。Matsubayashi研究组通过生化手段纯化到该酶, 并用体外实验证实TPST蛋白能催化PSY1和PSK两个多肽的酪氨酸硫酸盐化。*tpst*突变体表现包括根生长停滞在内的严重多效表型(Komori等2009)。Li研究组通过正向遗传学的方法也独立克隆到该基因。两个研究组的工作表明TPST在维持根尖干细胞方面具有重要的作用(Komori等2009; Zhou等2010)。进一步的研究发现, TPST还能催化另外一类多肽*ROOT MERISTEM GROWTH FACTOR (RGF)*。敲除多个*RGF*基因后, 植物具有类似*tpst*突变体的表型, 根尖干细胞巢活性降低, 分生组织变短。而对*tpst*突变体外源施加*RGF*多肽能部分回复其分生组织变短的表型。*RGFs*在干细胞巢表达, 之后成熟的多肽扩散到四

周分生组织细胞, 在转录和转录后水平促进*PLT*的表达水平和分布模式的建立, 从而维持干细胞和整个分生组织的活性(Matsuzaki等2010)。此外, *RGFs*的受体*ROOT GROWTH FACTOR RECEPTOR (RGFRs)*也被鉴定出来。*RGFRs*编码了一类含有三个富含亮氨酸重复的受体激酶(LRR-RKs) (Ou等2016; Shinohara等2016)。*RGFs*信号如何通过*RGFRs*传递到核内调控*PLTs*活性还有待进一步研究。这条信号通路的解析将为干细胞多能性的维持机制提供新的见解。*CLAVATA3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION-RELATED (CLEs)*也是一类多肽, 其家族中第一个被发现的成员*CLV3*在茎顶端干细胞调控中发挥至关重要的作用(Somssich 2016)。*CLE40*是*CLEs*多肽家族的另外一个成员, 表达在根的小柱细胞中。*CLE40*敲除后, 细胞分化延迟, 导致小柱干细胞增殖。相反地, 过量表达*CLE40*会导致干细胞巢活性降低和小柱干细胞分化, 这说明*CLE40*是根尖干细胞巢的抑制因子。进一步研究发现, *CLE40*可能通过类受体激酶*ARABIDOPSIS CRINKLY (ACR4)*抑制*WOX5*的表达来促进小柱细胞分化(Stahl等2009)。有趣的是, 水稻中也发现*CLE*多肽家族的一个成员同样在根尖抑制了*WOX5*的同源基因*QUIESCENT-CENTER-SPECIFIC-HOMEOBOX (QHB)* (Kamiya等2003; Chu等2013)。由此可见, 与干细胞维持相关的*CLE-WOX*信号通路在单双子叶植物中都可能具有高度的保守性。通过多年的研究, 鉴定了众多的干细胞调控因子。这些因子相互之间形成了一个由多回路交织的复杂调控网络, 确保了对干细胞多能性的稳定维持(图2-B)。

### 3.2 干细胞静止

作为长期干细胞的QC通常保持分裂停滞的状态, 但其在外部因素的刺激下可以重新进入细胞周期开始分裂。根据早期在玉米中的研究报道, 与周围快速分裂的短期干细胞相比, QC处在一种氧化程度较高的环境中, 高氧化的细胞环境有利于QC保持静止(Jiang等2003)。近期在拟南芥中的工作也证明活性氧(ROS)介导的氧化环境维持了QC的静止, ROS含量的降低会导致QC分裂显著加快(Yu等2016; Kong等2018)。通过正向遗传学的

手段, Dolan研究组鉴定到拟南芥第一例QC分裂加快的突变体*ethylene overproducer 1 (eto1)*。*ETO1*编码了一个E3连接酶, 促进乙烯生物合成途径中的一个关键酶ANE CARBOXYLIC ACID SYNTHASE 5 (ACS5)的降解, 降低乙烯合成量。由此可知, 乙烯加速QC的分裂(Ortega-Martínez等2007)。油菜素内酯(brassinosteroid, BR)在促进QC分裂方面有非常重要的作用(Planas-Riverola等2019)。无论是外源施加BR还是BR响应激活的突变体都可以观察到QC的频繁分裂。研究人员通过细胞内型特异转录组的分析鉴定到一个受BR抑制的*R2R3-MYB*转录因子(*BRASSINOSTEROIDS AT VACUOLAR AND ORGANIZING CENTER, BRAVO*)。当根尖处BR响应减弱或消失时, *BRAVO*会表达在根尖干细胞巢中, 抑制QC的分裂。当BR活性增强时, 典型的BR信号通路被激活, 非磷酸化的BR响应因子(BRI-EMS SUPPRESSOR 1, BES1)进入核内, 在转录水平直接抑制*BRAVO*的表达, 促进QC分裂。此外BES1还能与*BRAVO*结合抑制其转录自激活的活性。*BRAVO*也能抑制BES1的转录调控功能。BES1和*BRAVO*之间的互作模式定义了一种干细胞静止的调控机制(Vilarrasa-Blasi等2014)。有丝分裂后期促进复合体(ANAPHASE PROMOTING COMPLEX/CYCLOSOME-CELL CYCLE SWITCH 52, APC/C<sup>CCS52</sup>)被报道在根干细胞的维持和对QC分裂的抑制等过程中发挥着重要作用。这项研究将细胞周期与干细胞命运调控直接联结起来(Vans-traelen等2009)。后续工作发现E3连接酶的底物之一APC/C<sup>CCS52</sup>是ETHYLENE RESPONSE FACTOR 115 (ERF115)。与*ccs52a2*突变体类似, 过量表达*ERF115*也表现出QC分裂频率提高。这与APC/C<sup>CCS52</sup>促进ERF115蛋白降解的功能相一致。*ERF115*受BR的诱导, 特异表达在分裂的QC细胞中。进一步通过组学分析的手段, 研究人员发现*ERF115*能直接促进*PHYTOSULFOKINE PRECURSOR 5 (PSK5)*的表达, 并且*ERF115*促进QC分裂依赖于*PSK*信号途径。总之, *ERF115*在转录水平和翻译后水平分别受APC/C<sup>CCS52</sup>和BR这两种拮抗因素机制调控, 确保了QC正常情况下保持静止, 而在受外界刺激的时候分裂(Heyman等2013)。*ERF115*表达除受BR调节外还能

被MYC2介导的茉莉酸(jasmonate, JA)直接诱导, 在生物和非生物胁迫造成的QC分裂、干细胞损伤修复和再生过程中发挥关键作用(Zhou等2019)。此外, 其他植物激素如细胞分裂素(cytokinin, CK)和脱落酸(abscisic acid, ABA)也具有促进QC分裂的功能(Zhang等2013a, b)。除了激素外, 干细胞命运决定因子RBR、SCR和WOX5也参与QC静止的维持过程。在QC沉默*RBR*的表达可以诱导QC细胞的ACD。*RBR*这种维持QC静止的作用依赖于与SCR蛋白的结合。*RBR-SCR*介导的QC分裂停滞可能对植物应付干细胞的DNA损伤有重要的意义(Cruz-Ramírez等2013)。*WOX5*基因失活后, 除在突变体中观察到CSC分化的表型外, 另外一个显著的变化是QC开始频繁分裂。与野生型相比, *wox5* QC中的D型细胞周期蛋白*CYCD3;3*表达量显著上升。同时, 在QC中过量表达*CYCD3;3*可以模拟*wox5*的表型, 而在*wox5*突变体中对*cycd3;3*进行突变可以抑制QC的异常分裂。因此可推断出, *WOX5*通过直接抑制*CYCD3;3*的转录维持了QC静止(Forzani等2014)。虽然我们对QC静止的机制有了很大程度的理解, 但这些已知的途径, 特别是几条激素作用途径是如何有机整合在一起去控制QC的分裂还有待深入研究。

### 3.3 干细胞和再生

植物遭受损伤后能再生出新的器官。Xu等人用激光消融的手段破坏QC, 再通过连续时间点的观测记录根尖干细胞巢重新建立过程中的分子和细胞行为的动态变化, 最后提出了一个干细胞巢再生模型: QC损伤后生长素运输途径被破坏, 生长素向上端细胞积累, 诱导了*PLT*基因的表达并同时抑制了生长素外运蛋白*PIN-FORMED (PINs)*的表达。之后*PLT*促进了*SHR*蛋白的核定位, 后者激活了*SCR*转录。最终在*PLT/SHR-SCR*和被重构的*PINs*运输途径的作用下再生新的干细胞巢(Wisniewska等2006)。对动物来说, 干细胞是器官损伤修复的基础, 然而在植物中, 干细胞对器官再生似乎并不是必需的。通过拟南芥根尖切除再生系统, 研究人员发现干细胞突变体*plt1 plt2*和*scr*都能像野生型那样有效地再生根尖。此外, 再生需要的类似干细胞的属性分布在整个分生组织, 而不是

局限于干细胞巢。因此,他们认为植物的器官再生并不需要一个有功能的干细胞巢(Sena等2009)。利用单细胞测序技术,研究者对根尖再生过程中每个细胞的转录组进行了测定分析。转录组和细胞谱系追踪分析揭示,再生过程中重建的干细胞群来源于多种不同类型的成熟细胞,而且在干细胞程序激活之前还经历了一个类似由生长素和细胞分裂素瞬时互作控制胚胎模式形成的命运决定过程(Efroni等2016)。

植物体演化出一套复杂的机制来应对内源代谢氧化物和环境胁迫对DNA造成的损伤。Sablo-wsky研究组首次报道了根尖干细胞比其他细胞更容易发生DNA损伤诱导的死亡。这种诱导性细胞死亡不同于细胞凋亡,具有自溶特征且依赖于DNA损伤修复中的ATM/ATR信号途径。这种细胞死亡可能有利于避免干细胞积累DNA突变,保护了干细胞及其子代细胞基因组的完整性(Fulcher和Sablowski 2009)。干细胞被诱导死亡后的再生对植物继续正常生长是非常重要的。研究发现QC分裂对干细胞再生是不可或缺的。前面论述的控制QC分裂的关键因子如RBR-SCR、ERF115-PAT1和BRAVO-BES1都在这一干细胞再生过程中发挥关键作用(Cruz-Ramírez等2013; Heyman等2013; Vilarrasa-Blasi等2014)。这也再次凸显出QC作为细胞组织中心控制分生组织功能的核心作用。

#### 4 展望

动植物在进化过程中都独立演化出其特有的干细胞系统,为机体的生长发育源源不断地提供新细胞。迄今为止,我们在细胞和分子水平对干细胞的理 解都有了巨大的进步。基于近年来在干细胞领域的大量研究所取得的成果,学界中形成了一个共识,即干细胞的多能性是细胞分化程序受到抑制后所获得的一种特性(Aichinger等2012)。然而各种不同的干细胞类型在分子层面是否有共同的特征,以及各种干细胞的形成和维持是否符合相同的调控逻辑,这些问题还有待解答。过去的研究表明,*CLE-WOX*是植物茎顶端干细胞、根尖干细胞和维管束干细胞三大类干细胞类型共有的调控模块(Aichinger等2012)。就根分生组织而

言,*CLE-WOX*对远端干细胞/小柱干细胞的调控作用已明确,但对其他类型的干细胞是否也适用还不得而知。由于缺少合适的分子标记,根尖各类型的干细胞还无法一一分离,这很大程度上妨碍了我们在分子水平上比较它们的异同,进一步解析植物细胞多能性的分子基础。随着包括RNA测序在内的单细胞技术在植物中的发展和成熟(Denyser等2019; Ryu等2019; Shulse等2019; Zhang等2019),我们将有望更加深入地理解干细胞干性的本质。

根尖干细胞巢始终处在一个细胞不断分裂的动态环境中。干细胞在根模式的建成过程中如何与周围细胞交流通讯,并借此确定其相对恒定的位置,对此我们仍旧知之甚少。得益于技术的发展,各类活细胞显微成像技术(live cell imaging)使得我们可以长时间同时追踪多个分子标记,观察分子动态变化和干细胞行为之间的耦合。此外,计算机辅助建模(computational modeling)在生物学中的应用也能帮助我们模拟和预测干细胞因子之间的互作,更深入地理解细胞如何实现从基因型到表型的转换。

#### 参考文献(References)

- Aichinger E, Kornet N, Friedrich T, et al (2012). Plant stem cell niches. *Annu Rev Plant Biol*, 63 (1): 615–636
- Aida M, Beis D, Heidstra R, et al (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*, 119 (1): 109–120
- Brumfield R (1943). Cell-lineage studies in root meristems by means of chromosome rearrangements induced by X-Rays. *Amer J Bot*, 30 (2): 101–110
- Chen Q, Sun J, Zhai Q, et al (2011). The basic helix-loop-helix transcription factor MYC2 directly represses *PLETHORA* expression during jasmonate-mediated modulation of the root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23 (9): 3335–3352
- Chu H, Liang W, Li J, et al (2013). A CLE-WOX signalling module regulates root meristem maintenance and vascular tissue development in rice. *J Exp Bot*, 64 (17): 5359–5369
- Clowes FA (1958). Development of quiescent centres in root meristems. *New Phytol*, 57 (1): 85–88
- Cruz-Ramírez A, Diaz-Trivino S, Blilou I, et al (2012). A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell*, 150 (5): 1002–1015

- Cruz-Ramírez A, Diaz-Trivino S, Wachsmann G, et al (2013). A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the *Arabidopsis* root stem cell organizer. *PLOS Biol*, 11 (11): e1001724
- Cui H, Levesque M, Vernoux T, et al (2007). An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science*, 316 (5823): 421–425
- Denyer T, Ma X, Klesen S, et al (2019). Spatiotemporal developmental trajectories in the *Arabidopsis* root revealed using high-throughput single-cell RNA sequencing. *Dev Cell*, 48 (6): 840–852
- Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, et al (1996). The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell*, 86 (3): 423–433
- Ding Z, Friml J (2010). Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (26): 12046–12051
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, et al (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119 (1): 71–84
- Efroni I, Mello A, Nawy T, et al (2016). Root regeneration triggers an embryo-like sequence guided by hormonal interactions. *Cell*, 165 (7): 1721–1733
- Forzani C, Aichinger E, Sornay E, et al (2014). *WOX5* suppresses *CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr Biol*, 24 (16): 1939–1944
- Fulcher N, Sablowski R (2009). Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (49): 20984–20988
- Galun E (2007). *Plant Patterning: Structural and Molecular Genetic Aspects*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pty. Ltd., 32–33
- Grigg SP, Galinha C, Kornet N, et al (2009). Repression of apical homeobox genes is required for embryonic root development in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 19 (17): 1485–1490
- Hamann T, Benkova E, Bäurle I, et al (2002). The *Arabidopsis BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes Dev*, 16 (13): 1610–1615
- Hamann T, Mayer U, Jürgens G (1999). The auxin-insensitive bodenlos mutation affects primary root formation and apical-basal patterning in the *Arabidopsis* embryo. *Development*, 126 (7): 1387–1395
- Hardtke CS, Berleth T (1998). The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J*, 17 (5): 1405–1411
- Helariutta Y, Fukaki H, Wysocka-Diller J, et al (2000). The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell*, 101 (5): 555–567
- Heyman J, Cools T, Vandenbussche F, et al (2013). ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science*, 342 (6160): 860–863
- Jiang K, Meng YL, Feldman LJ (2003). Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development*, 130 (7): 1429–1438
- Johri BM, Ambegaokar KB (1984). Some unusual features in the embryology of Angiosperms. *Proc Plant Sci*, 93 (3): 413–427
- Jones-Rhoades M, Bartel DP, Bartel B (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 57 (1): 19–53
- Kamiya N, Itoh J, Morikami A, et al (2003). The *SCARECROW* gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants. *Plant J*, 36 (1): 45–54
- Kidner C, Sundaresan V, Roberts K, et al (2000). Clonal analysis of the *Arabidopsis* root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta*, 211 (2): 191–199
- Komori R, Amano Y, Ogawa-Ohnishi M, et al (2009). Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (35): 15067–15072
- Kong X, Tian H, Yu Q, et al (2018). PHB3 maintains root stem cell niche identity through ROS-Responsive AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis*. *Cell Rep*, 22 (5): 1350–1363
- Lu K, de Rybel B, van Mourik H, et al (2018). Regulation of intercellular TARGET OF MONOPTEROS 7 protein transport in the *Arabidopsis* root. *Development*, 145 (2): dev152892
- Mähönen AP, Tusscher K, Siligato R, et al (2014). PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature*, 515 (7525): 125–129
- Matsuzaki Y, Ogawa-Ohnishi M, Mori A, et al (2010). Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science*, 329 (5995): 1065–1067
- Mcculloch EA, Till JE (1960). The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res*, 13 (1): 115–125
- Moubayidin L, di Mambro R, Sozzani R, et al (2013). Spatial coordination between stem cell activity and cell differentiation in the root meristem. *Dev Cell*, 26 (4): 405–415
- Müller B, Sheen J (2008). Cytokinin and auxin interaction in

- root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, 453 (7198): 1094–1097
- Nägeli C (1858). Beiträge zur Wissenschaftlichen Botanik, Leipzig: Engelmann, 109–110
- Nakajima K, Sena G, Nawy T, et al (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature*, 413 (6853): 307–311
- Ortega-Martínez O, Pernas M, Carol R, et al (2007). Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science*, 317 (5837): 507–510
- Ou Y, Lu X, Zi Q, et al (2016). 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*. *Cell Res*, 26 (6): 686–698
- Pi L, Aichinger E, van der Graaff E, et al (2015). Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of *CDF4* expression. *Dev Cell*, 33 (5): 576–588
- Planas-Riverola A, Gupta A, Betegón-Putze I, et al (2019). Brassinosteroid signaling in plant development and adaptation to stress. *Development*, 146 (5): 151894
- Przemeck GKH, Mattsson J, Hardtke CS, et al (1996). Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta*, 200 (2): 229–237
- Rodríguez RE, Ercoli MF, Debernardi JM, et al (2015). MicroRNA miR396 regulates the switch between stem cells and transit-amplifying cells in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 27 (12): 3354–3366
- Ryu KH, Huang L, Kang HM, et al (2019). Single-cell RNA sequencing resolves molecular relationships among individual plant cells. *Plant Physiol*, 179 (4): 1444–1456
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, et al (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev*, 17 (3): 354–358
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, et al (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature*, 446 (7137): 811–814
- Schel JHN (1989). Plant cell biology 150 years after Matthias Schleiden. *Sex Plant Reprod*, 2 (1): 59–64
- Schlereth A, Möller B, Liu W, et al (2010). MONOPTEROS controls embryonic root initiation by regulating a mobile transcription factor. *Nature*, 464 (7290): 913–916
- Sena G, Wang X, Liu HY, et al (2009). Organ regeneration does not require a functional stem cell niche in plants. *Nature*, 457 (7223): 1150–1153
- Shimotombo A, Heidstra R, Blilou I, et al (2018). Root stem cell niche organizer specification by molecular convergence of PLETHORA and SCARECROW transcription factor modules. *Genes Dev*, 32 (15–16): 1085–1100
- Shinohara H, Mori A, Yasue N, et al (2016). Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113 (14): 3897–3902
- Shulse C, Cole B, Ciobanu D, et al (2019). High-throughput single-cell transcriptome profiling of plant cell types. *Cell Rep*, 27 (7): 2241–2247
- Somssich M, Je B, Simon R, et al (2016). CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development*, 143 (18): 3238–3248
- Song SK, Hofhuis H, Lee MM, et al (2008). Key divisions in the early *Arabidopsis* embryo require POL and PLL1 phosphatases to establish the root stem cell organizer and vascular axis. *Dev Cell*, 15 (1): 98–109
- Sozzani R, Cui H, Moreno-Risueno M, et al (2010). Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature*, 466 (7302): 128–132
- Stahl Y, Wink RH, Ingram GC, et al (2009). A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Curr Biol*, 19 (11): 909–914
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, et al (1997). Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature*, 390 (976): 287–289
- Vanstraelen M, Balaban M, Da Ines O, et al (2009). APC/C<sup>CCS52A</sup> complexes control meristem maintenance in the *Arabidopsis* root. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106 (28): 11806–11811
- Vilarrasa-Blasi J, Gonzalez-Garcia M, Frigola D, et al (2014). Regulation of plant stem cell quiescence by a brassinosteroid signaling module. *Dev Cell*, 30 (1): 36–47
- Wang J, Wang L, Mao Y, et al (2005). Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17 (8): 2204–2216
- Weijers D, Schlereth A, Ehrismann JS, et al (2006). Auxin triggers transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis. *Dev Cell*, 10 (2): 265–270
- Wildwater M, Campilho A, Perez-Perez JM, et al (2005). The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell*, 123 (7): 1337–1349
- Wisniewska J, Xu J, Seifertová D, et al (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312 (5775): 883–883
- Yu TY, Shi DQ, Jia PF, et al (2016). The *Arabidopsis* receptor kinase ZAR1 is required for zygote asymmetric division and its daughter cell fate. *PLOS Genet*, 12 (3): e1005933
- Zhang H, Han W, De Smet I, et al (2010). ABA promotes quiescence of the quiescent centre and suppresses stem cell differentiation in the *Arabidopsis* primary root meristem.

- Plant J, 64 (5): 764–774
- Zhang T, Xu Z, Shang G, et al (2019). A single-cell RNA sequencing profiles the developmental landscape of *Arabidopsis* root. Mol Plant, 12 (5): 648–660
- Zhang W, Swarup R, Bennett M, et al (2013). Cytokinin induces cell division in the quiescent center of the *Arabidopsis* root apical meristem. Curr Biol, 23 (20): 1979–1989
- Zhang Y, Jiao Y, Liu Z, et al (2015). ROW1 maintains quiescent centre identity by confining *WOX5* expression to specific cells. Nat Commun, 5 (1): 6003–6003
- Zhou W, Lozano-Torres J, Blilou I, et al (2019). A jasmonate signaling network activates root stem cells and promotes regeneration. Cell, 177 (4): 942–956
- Zhou W, Wei L, Xu J, et al (2010). *Arabidopsis* tyrosylprotein sulfotransferase acts in the auxin/PLETHORA pathway in regulating postembryonic maintenance of the root stem cell niche. Plant Cell, 22 (11): 3692–3709

## Specialization, maintenance and regeneration of plant stem cells in root

ZHANG Hang, PI Limin\*

*The Institute for Advanced Studies of Wuhan University, Wuhan 430072, China*

**Abstract:** Root stem cells situated in meristem are kept pluripotent and divide continuously to provide new cells for root growth throughout a plant's life. The balance between stem cell self-renewal and differentiation is controlled by complex gene regulatory networks. In this review, we discuss recent advances on the mechanisms underlying stem cell establishment in embryo, maintenance in post embryo and regeneration after damage mainly in *Arabidopsis* root, with a focus on the roles of hormone, key transcription factor, microRNA and small peptide in stem cell regulation.

**Key words:** root meristem; stem cell; pluripotency; quiescence; regeneration

---

Received 2020-04-28 Accepted 2020-06-12

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31830057 and 31770320).

\*Corresponding author (limin.pi@whu.edu.cn).