

苔藓植物的再生

孙越*

华东师范大学生命科学学院, 上海200241

摘要: 再生是植物适应外界伤害的重要策略之一, 也是植物生物学研究的重要领域。通过对种子植物的研究, 在新生组织器官的发生机理以及生长素和细胞分裂素对于再生的调控作用等方面已经取得了多项引人瞩目的成果。苔藓是最原始的高等植物, 小立碗藓(*Physcomitrella patens*)属于藓类植物的葫芦藓科, 可以很方便地开展遗传操作, 通过同源重组以及CRISPR的方法达到基因敲入和敲除的目的。由于小立碗藓不需要外源施加植物生长调节物质就能发生再生, 非常利于从细胞水平上开展再生的起始调控研究。本文对于近年来苔藓植物的再生特点和重要研究进展进行了介绍。

关键词: 苔藓; 小立碗藓; 再生

1 小立碗藓再生研究的背景

再生是普遍存在于多细胞生物体的生物学现象。当受到外界刺激或者创伤的时候, 在刺激或者创伤发生的部位会有一些细胞改变当时的生存状态, 开始分裂, 并且子细胞形成新的干细胞或者干细胞龛, 从而在该位置实现组织修复或者新的组织器官的发生。由于不能够随便移动, 再生成为植物适应外界伤害的重要策略之一。农业生产及园艺等相关领域中常用的嫁接、扦插和无性繁殖等与再生现象关系密切。由于植物细胞具有细胞壁, 组织器官中细胞排列有明显的规律性, 其组织发生过程与动物细胞也有明显不同, 尽管对于动物组织器官的再生已有较为深入的研究, 植物的再生调控机理依然是植物生物学研究的重要领域。

最近以来, 在模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中对于再生的研究取得了一系列重要进展。这些研究成果主要集中于调控新生组织器官的发生以及生长素和细胞分裂素等植物激素在再生发生过程中的作用(Ikeuchi等2016; Hu和Xu 2016; Sugimoto等2019)。然而, 还有一些关于再生的问题研究相对很少, 例如再生起始过程中, 最初发生再生的细胞命运改变的调控, 植物细胞与动物细胞再生发生是否有相同的调控机理等。这些问题的研究需要在更简单原始、能够直接进行细胞跟踪观察的研究体系中进行。

苔藓植物位于植物进化树的基部, 是最原始的高等植物, 主要包括苔类植物门、藓类植物门

和角苔植物门(Shaw等2011)。它们在发育过程中都会经历简单的单层多细胞结构阶段(Schuster 1983)。其再生不需要外源施加植物生长调节物质, 非常利于从细胞水平上开展再生的起始调控研究(Ishikawa等2011; Nishihama等2015)。而它们较为原始的进化地位也能为研究再生调控的进化提供重要参考。

小立碗藓(*Physcomitrella patens*)属于藓类植物门, 葫芦藓科, 可以用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体吸收DNA的方法进行遗传转化, 并且通过同源重组的方法达到基因敲除的目的(Cove 2005)。在2008年其基因组信息完成测序后(Rensing等2008), 由于建立了比较完善的研究方法(Schaefer和Zryd 1997; Kubo等2013; Collonnier等2017)和方便的基因资源(Zimmer等2013), 小立碗藓被越来越多地应用于重要植物学基础问题的研究。本文将对苔藓植物的再生特点和研究进展进行介绍。

2 小立碗藓的生长和繁殖

苔藓植物具有单倍体为主的世代交替, 其主要营养生长过程都是单倍体。小立碗藓的营养生长时期主要有原丝体和茎叶体两种结构形式(Cove 2005)。原丝体是孢子萌发后生长出来的一系列首尾

收稿 2019-11-12 修定 2020-04-09

资助 国家自然科学基金(31270332)和华东师范大学先导基金。

* 通讯作者(ysun@bio.ecnu.edu.cn)。

相接的柱状细胞。此时仅有其顶端细胞是干细胞,因此原丝体的生长方式也被称为顶端生长。当原丝体生长到一定阶段,在远离顶端细胞的位置有部分细胞会发生分裂,产生新的顶端细胞,并进一步分裂生长,形成原丝体分支(Kofuji和Hasebe 2014)。藓类植物的原丝体一般具有两种形态。最初从孢子萌发中产生的原丝体是绿丝体,主要特征为叶绿体分布多,且细胞相接处的细胞壁垂直于原丝体伸长方向。绿丝体经过一定时间生长后,细胞开始变长,而叶绿体含量较少,两细胞之间的细胞壁倾斜于原丝体的伸长方向,此时的原丝体被称为轴丝体。原丝体发育到一定阶段后,一个非顶端细胞会发生连续多次分裂,在分支的位置形成一个细胞团的结构,被称为芽。芽会进一步发育分化并形成具有茎叶结构分化的茎叶体。从茎叶体的基部和中部会长出没有叶绿体的类似于原丝体的单列细胞结构,被称为假根。在苔藓植物的有性生殖阶段,产生卵子的颈卵器和产生精子的精子器从茎叶体上生长出来。精子器中的精子游到颈卵器中与卵细胞结合生成合子。合子进一步分裂分化形成二倍体的孢蒴。在孢蒴发育的后期,孢蒴中的孢子母细胞发生减数分裂,产生大量的孢子,并在孢蒴成熟后被释放出来(Cove 2005; Kofuji和Hasebe 2014)。

根据最终形成的组织不同,苔藓植物的干细胞被分成8种,分别是绿丝体干细胞、轴丝体干细胞、茎叶体干细胞、假根干细胞、颈卵器干细胞、精子器干细胞、孢蒴干细胞和孢子干细胞。在种子植物中,干细胞仅存在于二倍体的孢子体阶段。在陆生植物的祖先绿藻中,干细胞只存在于配子体阶段。基于这种干细胞的分布与植物进化程度的关系使得一些研究者认为,植物孢子体中干细胞的调控机制也是从配子体的干细胞调控机制进化发展而来的(Kofuji和Hasebe 2014)。例如在种子植物中调控根毛发育的*AtRHD6*和*AtRSL1*基因在小立碗藓中的同源基因*PpRSL1*和*PpRSL2*也对原丝体的干细胞分化起决定性作用(Menand等2007; Tam等2015)。当然,一些干细胞调控机制会在进化过程中缺失,例如在地钱(*Marchantia polymorpha*)中,负向调控其根毛发育相关基因*MpRSL1*的

MpFRH1 (FEW RHIZOIDS1) microRNA (miRNA) 仅在苔类植物中存在,而在其他已知基因信息的陆生植物中没有找到(Honkanen等2018)。在种子植物的进化过程中,新的干细胞调控机制也会伴随着一些新的组织发育模式出现。例如*class I KNOX*基因在拟南芥中对于顶端分生组织的维持具有重要调控作用,但是在小立碗藓中它们的功能与干细胞或分生组织调控无关(Sakakibara等2008)。

小立碗藓的叶片仅由单层透明细胞组成,非常便于显微观察。而且,从茎叶体上撕下的叶片可以在没有任何外源激素的条件下再生出绿丝体(Ishikawa等2011),这一点与拟南芥离体叶片再生出根有类似之处,而且比后者结构更加简单,更容易观察,是研究植物再生和干细胞调控的好材料。

3 苔藓中的再生及干细胞发生特点

在一定环境条件下,植物细胞会发生命运转变,成为干细胞。但是,并不是所有处于该条件下的细胞都会成为干细胞,仅有部分细胞能够成功转变为干细胞。在球子蕨(*Onoclea sensibilis*)的原叶体的发育过程中,会有一个茎尖干细胞分化出来。当这个干细胞被杀死后,仅有一个原叶体细胞会转化成为茎干细胞(Tilney等1990)。因此,有一个假设认为当干细胞缺失的时候,剩下的所有细胞都有成为干细胞的可能,而最早出现的干细胞会抑制其他细胞的命运转变(Korn 1993; Holloway和Lantin 2002)。当原叶体中的任意细胞通过针刺杀死周围细胞并从原叶体中被分离出来后都会转变为干细胞。这个细胞离原叶体中原有干细胞越远,转化成新的干细胞越快(Korn 1993; Holloway和Lantin 2002)。与之类似,当单个小立碗藓叶细胞与叶上其他细胞分开后,依然能够自动再生成原丝体干细胞。当相邻两个细胞一起被分离的时候,再生的发生率明显降低,大部分再生都是仅有一个细胞能够再生的情况;在这个过程中,2个细胞的细胞核都出现了膨胀,但仅有一个细胞核内出现了DNA合成。而2个细胞中间如果有一个死细胞相隔的话,再生的发生效率与单个细胞再生基本一样(Sato等2017)。

小立碗藓的原生质体再生过程中首先产生新的细胞壁,之后再分裂,产生原丝体干细胞并形成绿丝体。这个过程与孢子萌发过程比较类似。对小立碗藓原生质体再生过程中的磷酸化蛋白质组的分析结果表明,小立碗藓原生质体再生过程与种子植物的胚后发育的情况类似(Wang等2014)。

在苔藓植物中还有一些不同组织间互相转换的现象。例如,小立碗藓的绿丝体顶端细胞在分裂一定次数后子细胞会变成轴丝体干细胞,而在轴丝体细胞形成的分支细胞中,有87%又会形成绿丝体干细胞,仅有5%会继续形成轴丝体干细胞,另外还有5%形成茎叶体干细胞,而有3%的细胞会停止分裂(Cove和Knight 1993)。施加生长素(NAA)能够促进轴丝体的产生,而施加细胞分裂素能够促进茎叶体的发生(Decker等2006; von Schwartzenberg等2007, 2015; Thelander等2017),因此,生长素与细胞分裂素的动态平衡可能是导致轴丝体分支起始细胞不同分化命运的决定因素。

在泥炭藓(*Sphagnum squarrosum*)中丝状原丝体上有分支细胞或顶端细胞会分化成叶状原丝体干细胞,而在叶状原丝体基部又会有新的丝状原丝体形成,发生两种组织交替循环发育而达到营养繁殖的效果(Zhao等2019)。这些现象与小立碗藓中的绿丝体顶端细胞的子细胞可能会有不同命运分化的现象有一定类似之处。具体调控机制尚需要进一步解析。

4 决定干细胞表观修饰改变的开关

最近在*Nature Plant*上发表的论文揭示了属于植物特有的AP2/ERF转录调控因子家族——小立碗藓的STEMIN能够通过降低植物细胞内相关基因的H3K27的表观遗传修饰来调控单个细胞的命运转变,使之成为干细胞,并开始分裂进入再生状态(Ishikawa等2019)。在叶切除24 h后,STEMIN在伤口处有明显表达;当新的绿丝体细胞发生两轮细胞分裂后,STEMIN的表达消失(Ishikawa等2019)。STEMIN基因的过量表达能够使小立碗藓的叶片在不经创伤或化学刺激的条件下自主发生再生。该基因与另外两个同源基因STEMIN2和STEMIN3的三敲除突变体的离体叶的再生率明显下降。此

外,STEMIN1~3基因对于原丝体非顶端细胞发生分裂、产生新的侧枝顶端细胞也有类似的调控作用(Ishikawa等2019)。

拟南芥中的H3K27甲基化主要由PRC2 (Polycomb Recruiting Complex2)完成(Nekrasov等2005; Yuan等2012), PRC2属于polycomb group protein (PcG)蛋白复合体(Goodrich等1997; Grossniklaus等1998; Luo等1999; Ohad等1999)。其中FIE (FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM)存在于所有的PcG复合体当中(Ohad等1999)。在拟南芥中, FIE-PcG复合体的作用主要在于调控雌性配子体向孢子体的转变(Goodrich等1997; Köhler等2003; Guitton等2004)。而在小立碗藓中的FIE基因仅在茎叶体的顶端细胞或者正在进行命运转变的细胞中表达(Mosquna等2009)。缺失FIE基因的小立碗藓茎叶体顶端细胞会过量增生,不能进一步生长且无法进入有性生殖阶段(Mosquna等2009)。拟南芥的FIE基因能够部分恢复小立碗藓*fie*突变体的这些表型。而另一方面,小立碗藓的FIE基因也能够部分恢复拟南芥*fie*突变体的表型(Mosquna等2009)。因此,这种FIE参与调控的干细胞命运改变机制在植物进化历程中是比较保守的调控机制,在植物登陆的早期就已经具备了(Mosquna等2009)。

5 生长素与小立碗藓干细胞调控

基因组序列分析和比对结果表明,小立碗藓中具有种子植物中大部分生长素合成、代谢、信号转导和极性运输等相关基因,只是数目较少(Rensing等2008)。且部分基因已经被证明与种子植物中相关基因有相似的功能(Eklund等2010; Prigge等2010; Viaene等2014; Coudert等2015; Mittag等2015; Tao和Estelle 2018)。例如小立碗藓中的*PpPIN4*是种子植物中的生长素的极性运输载体PIN家族基因的同源基因,而且具有膜定位、生长素极性运输的功能(Viaene等2014);小立碗藓中敲除*GH3*基因导致内源生长素含量升高(Mittag等2015);小立碗藓中*SHI*基因参与调控生长素合成(Eklund等2010);小立碗藓中*AUX/IAA*基因参与生长素信号转导等(Prigge等2010)。但是,关于生长素在小立碗藓中

的具体生理功能研究较少。一般认为,生长素能够促进轴丝体和假根的产生。

生长素广泛参与种子植物再生过程的调控早有报道。也有研究结果间接证明,生长素在调控小立碗藓原丝体细胞再生过程中起作用(Aoyama等2012)。植物特有的AP2型转录调控因子因为具有AP2/ERF DNA结合结构域而得名(Kim等2005)。在拟南芥的这个基因家族的*AINTEGUMENTA* (*ANT*)亚家族中有8个基因,分别为*ANT*、*AIL* (*AINTEGUMENTA-LIKE*)、*PLT1* (*PLETHORA 1*)、*PLT2*、*PLT3*、*PLT5*、*PLT7*和*BBM* (*BABY BOOM*)基因,这些基因都与干细胞的产生和维持有关(Galinha等2007)。其中*PLT1/2*基因与根尖干细胞龕的形成以及干细胞维持密切相关(Aida等2004)。*ANT*在生长素信号系统中的细胞增加和器官生长中起作用(Mizukami和Fischer 2000),*BBM*过量表达能够诱导体细胞胚产生(Boutilier等2002)。在小立碗藓中,*ANT*亚家族有4个成员,分别为*APB1~4*。这四个*APB*基因都在茎叶体顶端干细胞中持续表达。其中*APB1*、3、4在轴丝体的分支起始细胞和其亲本细胞中都有表达,而*APB2*仅在轴丝体分支起始细胞中表达。*apb4*突变体的轴丝体侧枝细胞没有茎叶体分化,过量表达*APB4*能够提高轴丝体侧枝起始细胞分化为茎叶体的比例。并且,生长素能够诱导4个*APB*基因的表达。因此,小立碗藓*APB*基因的持续表达是茎叶体干细胞分化的必要条件(Aoyama等2012)。

6 植物细胞与动物细胞干细胞调控的保守机制

哺乳动物细胞中能够诱导全能干细胞形成的Lin28 (Yu等2007)属于冷激蛋白(cold-shock domain proteins, CSPs)。CSPs基因最早发现在冷胁迫下的细菌中表达,后来又被发现与拟南芥和小麦低温诱导开花相关,其中的冷激结构域(cold-shock domain CDS)在细菌、陆生植物和后生动物中高度保守(Nakaminami等2006)。

小立碗藓中的PpCSP1 (*physcomitrella patens* cold-shock domain protein1)与Lin28具有非常相似的氨基酸序列以及蛋白质结构域, *Lin28*是哺乳动

物中与*PpCSP1*同源度最高的基因(Li等2017)。*PpCSP1*基因在正常生长的绿丝体和轴丝体顶端干细胞以及新出现的侧枝顶端细胞中表达强烈,暗示它可能与维持干细胞的状态有关。当把叶从茎叶体上切下单独培养时,*PpSCPI*在离体叶伤口处细胞中的表达剧烈升高,该基因的过量表达可提高离体叶再生细胞的出现比例,而它和2个同源基因(*PpCSP2*和*PpCSP3*)都被敲除的三突变体中,离体叶的再生受到了明显抑制(Li等2017)。

苔藓植物细胞命运转变调控具有与动物细胞同源的调控机制,这使我们对于植物细胞再生过程的调控与动物细胞的相似之处有了新的认识。动物细胞中的诱导多能性干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)基因能够诱导细胞转变为全能干细胞;植物细胞有同源基因,也有植物特有基因,两套途径相对独立。种子植物中是两者并存还是以后者为主值得深入研究。

7 苔藓干细胞与种子植物再生的异同

再生过程的一个重要事件是细胞重新进入分裂周期,从而获得新的细胞命运。在种子植物中,非分裂状态的细胞一般都停止在细胞分裂的G1期(den Boer和Murray 2000)。在糖和激素等其他物质的诱导下,*CYCD* (*D-type cyclin*)表达,与CDKA (*A-type cyclin-dependent kinase*)结合形成CDKA/CYCD复合体。这个复合体的活性状态能够偶联调控E2F (E2 promoter binding factor)、RBR (retinoblastoma-related)和DP (dimerization partner)这三个细胞周期调控因子,使分化细胞从G1期进入到S期(Inzé和Veylder 2006)。虽然种种迹象表明,RBR和CDKA很可能对种子植物中细胞周期改变和其他S期特征基因的表达起到协调作用(Borghesi等2010; Gaam-ouche等2010),但由于拟南芥分生组织细胞众多,难以有针对性地连续观察,这个推测很难证实。

研究发现,在小立碗藓茎叶体的小叶中,细胞停止在S期的末期,此时叶细胞已经完成了遗传物质的复制(Ishikawa等2011)。这一点与种子植物细胞周期停止在G1期有很大不同。因此在施加DNA合成抑制剂的条件下,小立碗藓离体叶伤口处再生细胞顶端生长和原丝体标记基因的表达不受到

抑制。而抑制CDK的功能或者抑制*CDKA*的表达, 会同时抑制细胞周期和再生细胞的原丝体标记基因表达。因此CDKA是小立碗藓叶细胞再生过程中协调细胞周期和细胞命运两项重要事件的核心调控因子(Ishikawa等2011)。

种子植物的再生有时会经过一个形成愈伤组织的过程, 特别是在人工诱导再生的过程中, 愈伤组织更容易出现。在创伤诱导的苔藓植物的再生过程中, 尚未观察到愈伤组织的形成, 而且也不需要外源的植物生长调节物质处理。那么苔藓植物的再生与种子植物是否不同呢? 在种子植物再生的发生和发育过程中, *WOX* (*WUS-related homeobox*) 家族基因对细胞的维持至关重要。拟南芥中*WOX* 家族基因的进化树可以被分成3个主要分支: 古老支、中间支和现代支(Nardmann等2009; van der Graaff等2009)。现代支仅存在于种子植物中, 其中*WUSCHEL* (*WUS*) (Laux等1996; Mayer等1998; Leibfried等2005)、*WOX5* (Kamiya等2003; Sarkar等2007; Kong等2015)、*WOX3* (Shimizu等2009)和*WOX4* (Ji等2010)分别在茎尖、根尖、叶和维管束发育过程对分生组织干细胞的维持起作用。同时, *WUS*和*WOX5*也在分化细胞重新形成分生组织和体细胞胚的过程中起作用(Zuo等2002; Haecker等2004; Sugimoto等2010)。中间支存在于包括卷柏在内的维管植物中。其中的*WOX9*和*WOX8*在合子发育和胚的轴向决定过程中起作用(Wu等2005; Breuninger等2008; Ueda等2011), *WOX11*和*WOX12* (Liu等2014; Hu和Xu 2016)在不定根从离体叶片上再生的起始和过程中起作用。古老支存在于包括苔藓在内的所有高等植物中。*WOX13*属于该分支, 与苔藓和轮藻中的*WOX*基因进化距离较近。它们参与调控种子植物胎座发育、育性、开花时间和侧根形成等功能(Deveaux等2008; Romera-Branchat等2013)。小立碗藓中有3个*WOX*基因, 它们都与拟南芥的*WOX13*聚在一起(van der Graaff等2009)。其中, *PpWOX13LA*和*PpWOX13LB*在所有组织的细胞中表达(Sakakibara等2014)。值得注意的是, 它们在原丝体顶端细胞中的表达明显比顶端下面的细胞更强, 在卵细胞和合子中也比周围细胞中强。特别是当叶片被从茎上切除时, 伤口

处的表达瞬时增强。这三个基因的单敲除突变体都没有明显表型, 但是*PpWOX13LA/B*双突变体的合子发育和胚的形成明显异常(Sakakibara等2014)。离体叶片伤口处再生出原丝体的概率明显降低, 而细胞分裂和原丝体标记基因的表达比例与野生型没有显著差异。在高渗环境中, 原生质体再生以及新原丝体侧枝形成明显推迟, 但是在正常渗透条件下, 双突变体的原丝体侧枝发育与野生型没有差别。原丝体再生和离体叶再生时双突变体有12个能够促进细胞壁松弛的酶的基因表达水平明显低于野生型(Sakakibara等2014)。

8 小结

小立碗藓的再生过程非常简单, 从伤口处的个别细胞发生命运转变开始, 表达原丝体特有基因, 形成原丝体顶端干细胞, 进而开始分裂并形成新的原丝体。该过程不涉及后续的组织器官分化, 基本上相当于种子植物再生的最初阶段。如果说植物的再生过程是一幅美丽长卷的话, 苔藓植物的再生仅仅是开头部分。正因为如此, 相对于种子植物而言该过程进展非常缓慢。因此, 利用苔藓开展植物再生调控机理的研究, 能够跟踪特定细胞在再生过程中的变化细节, 可以观察到种子植物中难以监测到的再生现象并获得新的调控机制。这些结果一方面为种子植物的再生研究提供重要的参考, 另一方面为植物的再生调控机制进化过程提供重要的信息支撑。

参考文献(References)

- Aida M, Beis D, Heidstra R, et al (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem cell niche. *Cell*, 119: 109–120
- Aoyama T, Hiwatashi Y, Shigyo M, et al (2012). AP2-type transcription factors determine stem cell identity in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*, 139: 3120–3129
- Borghi L, Gutzat R, Fütterer J, et al (2010). *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED is required for stem cell maintenance, cell differentiation, and lateral organ production. *Plant Cell*, 22: 1792–1811
- Boutillier K, Offringa R, Sharma VK, et al (2002). Ectopic expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from

- vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*, 14: 1737–1749
- Breuninger H, Rikirsch E, Hermann M, et al (2008). Differential expression of *WOX* genes mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo. *Dev Cell*, 14: 867–876
- Collonnier C, Epert A, Mara K, et al (2017). CRISPR-Cas9-mediated efficient directed mutagenesis and RAD51-dependent and RAD51-independent gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Biol J*, 15: 122–131
- Coudert Y, Palubicki W, Ljung K, et al (2015). Three ancient hormonal cues co-ordinate shoot branching in a moss. *eLife*, 4: e06808
- Cove D (2005). The moss *Physcomitrella patens*. *Ann Rev Gene*, 39: 339–358
- Cove DJ, Knight CD (1993). The moss *physcomitrella patens*, a model system with potential for the study of plant reproduction. *Plant Cell*, 5: 1483–1488
- Decker EL, Frank W, Sarnighausen E, et al (2006). Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biol*, 8: 397–406
- den Boer BGW, Murray JAH (2000). Triggering the cell cycle in plants. *Trends Cell Biol*, 10: 245–250
- Deveaux Y, Toffano-Nioche C, Claisse G, et al (2008). Genes of the most conserved WOX clade in plants affect root and flower development in *Arabidopsis*. *BMC Evol Biol*, 8: 291–309
- Eklund DM, Thelander M, Landberg K, et al (2010). Homologues of the *Arabidopsis thaliana* *SHI/STY/LRP1* genes control auxin biosynthesis and affect growth and development in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*, 137: 1275–1284
- Gaamouche T, Manes CLO, Kwiatkowska D, et al (2010). Cyclin-dependent kinase activity maintains the shoot apical meristem cells in an undifferentiated state. *Plant J*, 64: 26–37
- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, et al (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature*, 449: 1053–1057
- Goodrich J, Puangsomlee P, Martin M, et al (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature*, 386: 44–51
- Grossniklaus U, Vielle-Calzada J-P, Hoepfner MA, et al (1998). Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a *Polycomb* group gene in *Arabidopsis*. *Science*, 280: 446–450
- Guittou A-E, Page DR, Chambrier P, et al (2004). Identification of new members of fertilization independent seed Polycomb Group pathway involved in the control of seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131: 2971–2981
- Haecker A, Groß-Hardt R, Geiges B, et al (2004). Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131: 657–668
- Holloway DM, Lantin M (2002). Maintaining apical dominance in the fern gametophyte. *Ann Bot*, 89: 409–417
- Honkanen S, Thamm A, Arteaga-Vazquez MA, et al (2018). Negative regulation of conserved *RSL* class I bHLH transcription factors evolved independently among land plants. *eLife*, 7: e38529
- Hu X, Xu L (2016). Transcription factors WOX11/12 directly activate *WOX5/7* to promote root primordia initiation and organogenesis. *Plant Physiol*, 172: 2363–2373
- Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, et al (2016). Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. *Development*, 143: 1442–1451
- Inzé D, Veylder LD (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Ann Rev Gene*, 40: 77–105
- Ishikawa M, Morishita M, Higuchi Y, et al (2019). *Physcomitrella* STEMIN transcription factor induces stem cell formation with epigenetic reprogramming. *Nat Plants*, 5: 681–690
- Ishikawa M, Murata T, Sato Y, et al (2011). *Physcomitrella* cyclin-dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *Plant Cell*, 23: 2924–2938
- Ji J, Strable J, Shimizu R, et al (2010). WOX4 promotes procambial development. *Plant Physiol*, 152: 1346–1356
- Kamiya N, Nagasaki H, Morikami A, et al (2003). Isolation and characterization of a rice *WUSCHEL*-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant J*, 35: 429–441
- Kim S, Soltis PS, Wall K, et al (2005). Phylogeny and domain evolution in the *APETALA2*-like gene family. *Mol Biol Evol*, 23: 107–120
- Kofuji R, Hasebe M (2014). Eight types of stem cells in the life cycle of the moss *Physcomitrella patens*. *Cur Opin Plant Biol*, 17: 13–21
- Köhler C, Hennig L, Bouveret R, et al (2003). *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE *Polycomb* group complex and required for seed development. *EMBO J*, 22: 4804–4814
- Kong X, Lu S, Tian H, et al (2015). WOX5 is shining in the root stem cell niche. *Trends Plant Sci*, 20: 601–603
- Korn RW (1993). Apical cells as meristems. *Acta Biotheor*, 41 (3): 175–189
- Kubo M, Imai A, Nishiyama T, et al (2013). System for stable

- β -estradiol-inducible gene expression in the moss *Physcomitrella patens*. PLOS One, 8: e77356
- Laux T, Mayer KFX, Berger J, et al (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. Development, 122: 87–96
- Leibfried A, To JPC, Busch W, et al (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. Nature, 438: 1172–1175
- Li C, Sako Y, Imai A, et al (2017). A Lin28 homologue reprograms differentiated cells to stem cells in the moss *Physcomitrella patens*. Nat Commun, 8: 14242
- Liu J, Sheng L, Xu Y, et al (2014). *WOX11* and *12* are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. Plant Cell, 26: 1081–1093
- Luo M, Bilodeau P, Koltunow A, et al (1999). Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 296–301
- Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, et al (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. Cell, 95: 805–815
- Menand B, Yi K, Jouannic S, et al (2007). An ancient mechanism controls the development of cells with a rooting function in land plants. Science, 316: 1477–1480
- Mittag J, Gabrielyan A, Ludwig-Müller J (2015). Knockout of *GH3* genes in the moss *Physcomitrella patens* leads to increased IAA levels at elevated temperature and in darkness. Plant Physiol Biol, 97: 339–349
- Mizukami Y, Fischer RL (2000). Plant organ size control: *AIN-TEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 942–947
- Mosquna A, Katz A, Decker EL, et al (2009). Regulation of stem cell maintenance by the Polycomb protein FIE has been conserved during land plant evolution. Development, 136: 2433–2444
- Nakaminami K, Karlson DT, Imai R (2006). Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 10122–10127
- Nardmann J, Reisewitz P, Werr W (2009). Discrete shoot and root stem cell-promoting *WUS/WOX5* functions are an evolutionary innovation of angiosperms. Mol Biol Evol, 26: 1745–1755
- Nekrasov M, Wild B, Müller J (2005). Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of *Drosophila* PRC2. EMBO Rep, 6: 348–353
- Nishihama R, Ishizaki K, Hosaka M, et al (2015). Phytochrome-mediated regulation of cell division and growth during regeneration and sporophyte development in the liverwort *Marchantia polymorpha*. J Plant Res, 128: 407–421
- Ohad N, Yadegari R, Margossian L, et al (1999). Mutations in *FIE*, a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. Plant Cell, 11: 407–415
- Prigge MJ, Lavy M, Ashton NW, et al (2010). *Physcomitrella patens* auxin-resistant mutants affect conserved elements of an auxin-signaling pathway. Curr Biol, 20: 1907–1912
- Rensing SA, Lang D, Zimmer AD, et al (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. Science, 319: 64–69
- Romera-Branchat M, Ripoll JJ, Yanofsky MF, et al (2013). The *WOX13* homeobox gene promotes replum formation in the *Arabidopsis thaliana* fruit. Plant J, 73: 37–49
- Sakakibara K, Nishiyama T, Deguchi H, et al (2008). Class 1 *KNOX* genes are not involved in shoot development in the moss *Physcomitrella patens* but do function in sporophyte development. Evol Dev, 10: 555–566
- Sakakibara K, Reisewitz P, Aoyama T, et al (2014). *WOX13*-like genes are required for reprogramming of leaf and protoplast cells into stem cells in the moss *Physcomitrella patens*. Development, 141: 1660–1670
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, et al (2007). Conserved factors regulate signaling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. Nature, 446: 811–814
- Sato Y, Sugimoto N, Hirai T, et al (2017). Cells reprogramming to stem cells inhibit the reprogramming of adjacent cells in the moss *Physcomitrella patens*. Sci Rep, 7: 1909
- Schaefer DG, Zrýd JP (1997). Efficient gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. Plant J, 11: 1195–1206
- Schuster RM (1983). New Manual of Bryology. Nichinan, Miyazaki, Japan: The Hattori Botanical Laboratory
- Shaw AJ, Szövényi P, Shaw B (2011). Bryophyte diversity and evolution: windows into the early evolution of land plants. Am J Bot, 98: 352–369
- Shimizu R, Ji J, Kelsey E, et al (2009). Tissue specificity and evolution of meristematic *WOX3* function. Plant Physiol, 149: 841–850
- Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM (2010). *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. Dev Cell, 18: 463–471
- Sugimoto K, Temman H, Kadokura S, et al (2019). To regenerate or not to regenerate: factors that drive plant regeneration. Curr Opin Plant Biol, 47: 138–150
- Tam THY, Catarino B, Dolan L (2015). Conserved regulatory mechanism controls the development of cells with rooting functions in land plants. Proc Natl Acad Sci USA, 112: E3959–E3968
- Tao S, Estelle M (2018). Mutational studies of the Aux/IAA proteins in *Physcomitrella* reveal novel insights into their

- function. *New Phytol*, 218: 1534–1542
- Thelander M, Landberg K, Sundberg E (2017). Auxin-mediated developmental control in the moss *Physcomitrella patens*. *J Exp Bot*, 69: 277–290
- Tilney L, Cooke T, Connelly P, et al (1990). The distribution of plasmodesmata and its relationship to morphogenesis in fern gametophytes. *Development*, 110 (4): 1209–1221
- Ueda M, Zhang Z, Laux T (2011). Transcriptional activation of *Arabidopsis* axis patterning genes *WOX8/9* links zygote polarity to embryo development. *Dev Cell*, 20: 264–270
- van der Graaff E, Laux T, Rensing SA (2009). The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Gen Biol*, 10: 248
- Viaene T, Landberg K, Thelander M, et al (2014). Directional auxin transport mechanisms in early diverging land plants. *Curr Opin Biol*, 24: 2786–2791
- von Schwartzenberg K, Lindner AC, Gruhn N, et al (2015). CHASE domain-containing receptors play an essential role in the cytokinin response of the moss *Physcomitrella patens*. *J Exp Bot*, 67: 667–679
- von Schwartzenberg K, Núñez MF, Blaschke H, et al (2007). Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses of activity, distribution, and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiol*, 145: 786–800
- Wang X, Qi M, Li J, et al (2014). The phosphoproteome in regenerating protoplasts from *Physcomitrella patens* protonemata shows changes paralleling postembryonic development in higher plants. *J Exp Bot*, 65: 2093–2106
- Wu X, Dabi T, Weigel D (2005). Requirement of homeobox gene *STIMPY/WOX9* for *Arabidopsis* meristem growth and maintenance. *Curr Opin Plant Biol*, 15: 436–440
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318: 1917–1920
- Yuan W, Wu T, Fu H, et al (2012). Dense chromatin activates Polycomb repressive complex 2 to regulate H3 lysine 27 methylation. *Science*, 337: 971–975
- Zhao W, Li Z, Hu Y, et al (2019). Development of a method for protonema proliferation of peat moss (*Sphagnum squarrosum*) through regeneration analysis. *New Phytol*, 221: 1160–1171
- Zimmer AD, Lang D, Buchta K, et al (2013). Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions. *BMC Genomics*, 14: 498
- Zuo J, Niu QW, Frugis G, et al (2002). The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 30: 349–359

Regeneration of bryophyte

SUN Yue*

School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200241, China

Abstract: Regeneration is one of the important strategies for plants to adapt to external injuries as well as an important biological question for plant science. Many remarkable results have been achieved in seed plants, mainly involving the mechanism of new tissues and organs regeneration and the regulation of auxin, cytokinin and other plant hormones in those processes. Bryophytes are the most primitive higher plants. It is easy to carry out genetic modification and achieve the goal of gene knock-in and knockout by homologous recombination in *Physcomitrella patens* which belongs to Funariaceae. Since the regeneration of *Physcomitrella* can occur without exogenous hormones, it is very convenient to study the regulation of regeneration at the cell level. In recent years, some important research results have been published on the regeneration of *Physcomitrella*. In this paper, the regeneration characteristics and important research progress of *Physcomitrella* are introduced.

Key words: moss; *Physcomitrella patens*; regeneration

Received 2019-11-12 Accepted 2020-04-09

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31270332), and the Forerunner Fouding of East China Normal University.

*Corresponding author (ysun@bio.ecnu.edu.cn).