

• 综 述 •

拟南芥茎尖干细胞调控机制的研究进展

崔玉超, 陈 亮*

(厦门大学 生命科学学院, 厦门市植物遗传重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 植物茎尖干细胞是位于植物顶端一团具有无限增殖能力的细胞,它是植物整个地上部分发育的源泉.干细胞分裂产生的子细胞一部分用来保持自我更替,另一部分形成器官原基,进而使其处于一种动态平衡状态,来维持植物甚至可长达千年的生长周期.现代分子生物学与遗传学表明这种动态平衡的维持受到来自干细胞微环境的各种因素的精确调控.其中起核心作用的是由 *WUSCHEL* (*WUS*) 基因与 *CLAVATA* (*CLV*) 基因之间形成的负反馈调节环,而其他生物学因素如细胞分裂素、可以移动的小 RNAs 和表观遗传作用等最终都作用于这一负反馈调节环,另外与 *WUS-CLV* 信号通路相平行的 *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) 信号通路在干细胞维持中也发挥着积极的作用.在此主要综述了模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 茎尖干细胞维持分子机制的最新研究进展.

关键词: 茎尖干细胞; *WUS-CLV*; 细胞分裂素; 小 RNAs; 表观遗传; *STM*

中图分类号: Q 356.1

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2016)06-0781-12

植物地上部分的胚后发育主要依赖于茎尖分生组织 (shoot apical meristem, SAM). SAM 通常是指最小叶原基上方的茎端区域 (图 1(a)), 相当于经典植物学中的初生分生组织或茎顶端分生组织狭义概念所涵盖的内容.在以拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为代表的双子叶植物中, SAM 的作用是形成叶片和花, 维持茎干的生长和保持自身的位置、大小及结构.另外, 在树木的地上部分发育中, 维管的环状形成层 (ring-shaped cambium) 和软木形成层 (phellogen cambium) 分生组织对于茎的长粗具有重要作用.

SAM 在细胞水平可分为顶端中央区域 (central zone, CZ)、侧旁围绕 CZ 分布的外围区域 (peripheral zone, PZ) 和 CZ 基部的肋状区域 (rib zone, RZ)^[1-2], 如图 1(b) 所示.植物茎尖干细胞位于 CZ, 通过缓慢的细胞分裂实现自我更新并维持在未分化状态, 它们是新器官和组织发育的来源; PZ 细胞分裂较快, 进而分化成不同的器官原基; RZ 细胞同 PZ 细胞一样分裂也较快, 它保证了植物能够向上生长^[1-2].在 CZ 下方有一团细胞称为组织中心区域 (organizing center, OC), 这里的细胞决定了其上方干细胞的命运和数量, 对于干细

胞的维持起着决定性作用.

根据 CZ 干细胞的克隆特性又可将 SAM 分成三层, 即外层的 L1, 表皮下的 L2 和内部的 L3^[3] (图 1(a)). 干细胞一次分裂后产生的两个子细胞一个留在原位成为新的干细胞, 而另一个移向其他区域成为待分化的细胞, 这种截然不同的命运是由其所在位置决定的^[4-5].在分裂形式上, L1 与 L2 的干细胞都进行垂周分裂, 即新形成的细胞壁垂直于外表面, 这样在每一层面上干细胞分裂后产生的两个子细胞中一个保持在原位, 另一个则移向 PZ, 进而保证了 L1 与 L2 分别属于不同的层次. L3 细胞既可进行垂周分裂也可以平周分裂, 由此位于顶端的子细胞留在原位而另一个子细胞移向 PZ 或 RZ. 由于干细胞具有多能性, 所以每一层茎尖干细胞的子细胞都可以发展成为这一层中的各种细胞类型. 最终, L1 细胞发育成为表皮组织, L2 发育成为皮下组织, 而 L3 发育成为髓和维管组织^[3, 6-9].

在植物生长发育过程中, SAM 的干细胞处于动态平衡中, 其分裂产生的细胞一方面进行自我更新, 另一方面为侧翼器官原基的发育提供源泉. 动态平衡

收稿日期: 2016-04-13 录用日期: 2016-06-20

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0100903); 国家自然科学基金 (31560297)

* 通信作者: chenlg@xmu.edu.cn

引文格式: 崔玉超, 陈亮. 拟南芥茎尖干细胞调控机制的研究进展 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2016, 55(6): 781-792.

Citation: CUI Y C, CHEN L. Research progresses of the regulatory mechanism of the shoot apical stem cell in *Arabidopsis* [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2016, 55(6): 781-792. (in Chinese)



的维持来自于干细胞周围不同信号因子之间的协同调控作用(图 1(b)),干细胞所处的这种环境称为干细胞微环境.在干细胞微环境中核心信号通路是在 OC 表达的 *WUSCHEL* (*WUS*) 基因与干细胞基因 *CLAVATA* (*CLV*) 之间形成的负反馈调节环,即 *WUS* 基因表达后决定了其顶部细胞发育成干细胞并在此处转录激活 *CLV3* 基因的表达,*CLV3* 基因又会反过来抑制 *WUS* 基因的表达,由此形成了“走走停停”的调控模式.其他信号因子如细胞分裂素(cytokinin,CK)、可以移动的小 RNAs 和表观遗传调控因子,最终都作用于这条信号通路来实现对干细胞动态平衡的调节.与 *WUS-CLV* 相平行的 *SHOOT-MERISTEMLESS* (*STM*) 信号通路可以抑制干细胞的分化并促进 PZ 细胞在形成器官原基前的分裂.

1 *WUS-CLV* 负反馈调节环

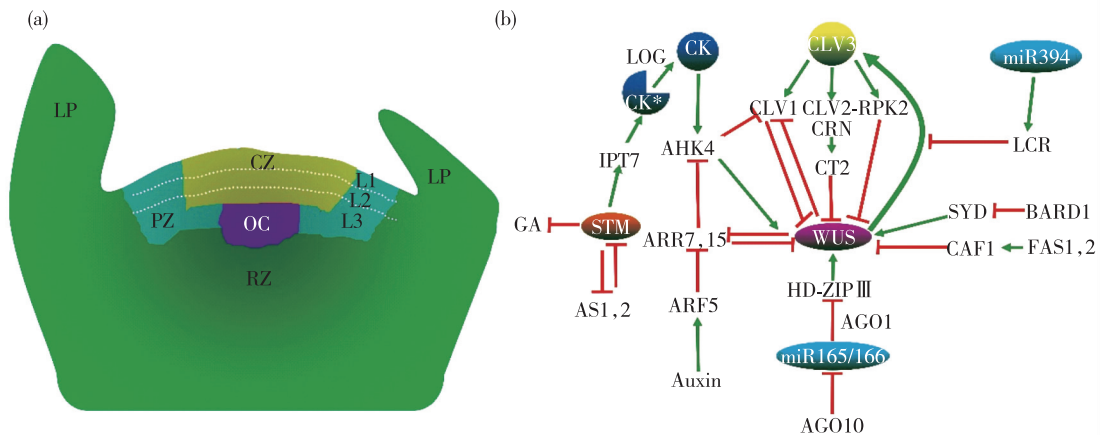
WUS 基因编码植物中特有的同源异型转录因子(transcription factor,TF),它是 *WUSCHEL-related homeobox* (*WOX*) 基因家族的基础成员^[10].*WUS* 的表达起始于胚胎的 16 细胞时期,表达范围位于胚胎顶部内层的 4 个细胞,并且随着顶部细胞不断地进行纵向与横向分裂,*WUS* 的表达区域逐渐下移到达 SAM 的中央.苗期时 *WUS* 在 OC 表达.花序分生组织(in-florescence meristem,IM)中 *WUS* 表达区域同苗期一样,然而在花分生组织(floral meristem,FM)中 *WUS* 的表达会上移到 L3,说明 SAM 与 FM 的组织形式存在差异^[11].*wus* 突变体在苗期时没有类似于野生型穹顶状的 SAM,并且在干细胞区域出现一定程度已经分化的细胞,在 IM 中也表现出同样的缺陷,说明 *WUS* 可以阻止干细胞的分化^[11-12].在过表达 *WUS* 时不仅导致 SAM 增大,还可以诱导异位干细胞产生,表明 *WUS* 可以决定干细胞的属性^[13-15].

CLV3 基因编码具有 96 个氨基酸的蛋白,其属于 32 个 *CLV3/EMBRYO SURROUNDING REGION* (*CLE*)蛋白家族的一员.它在 N 端具有 18 个氨基酸长度的信号肽而 C 端含有一个同其他 *CLE* 家族蛋白相似的 14 个氨基酸长度的 *CLE* 保守结构域,此结构域在翻译后被加工成有活性的小分子多肽 *CLEp* (*CLE peptide*)^[16-18].许多其他 *CLE* 基因在 *CLV3* 启动子的启动表达下可以恢复 *clv3* 突变体的表型,这表明 *CLV3* 与这些 *CLE* 基因存在功能上的冗余^[19].在植物体中 *CLV3* 前体蛋白分别在 Arg⁷⁰ 与 His⁸¹ 或者 Arg⁷⁰ 与 His⁸² 位点处通过细胞外水解作用而剪切成为具有

12 或 13 个氨基酸长度的 *CLEp*^[20-21].在 *CLEp* 的 Pro⁷ 位点还需要进一步发生羟基化和 3 个树胶醛糖化修饰使其成为有功能活性的肽段^[21].*CLV3* 的表达模式在 SAM 顶端成楔形结构,此区域大体与干细胞一致.因为在 L3 表达 *CLV3* 的细胞数量明显少于 L1,所以在每层干细胞数量相当时,*CLV3* 的表达区域并不完全等同于干细胞所在区域.*clv3* 突变体的 SAM 和 FM 明显增大,并且与野生型相比产生更多器官^[22],这说明 *CLV3* 对干细胞的维持起负调控作用.

研究发现在 *clv3* 中 SAM 增大是由于 *WUS* 表达区域扩大所致^[15];相反地,在过表达 *CLV3* 时又抑制 *WUS* 的表达,并表现出 *wus* 的表型^[23-24].另一方面,在 *wus* 中 *CLV3* 表达消失;而在过表达 *WUS* 时,*CLV3* 表达区域扩散^[13,15].由此建立了一个反馈抑制通路,即 *WUS* 在 OC 表达后决定并促进上方相邻细胞成为干细胞,干细胞表达 *CLV3*,而后 *CLV3* 又抑制 *WUS* 表达使其保持在适当水平并稳定在 OC,通过这种方式维持干细胞的动态平衡(图 1(b)).

建立在突变体研究基础上的 *WUS-CLV* 反馈调节途径只展示了基因突变后所导致的最终结果,并不能清楚地阐释在干细胞动态平衡的维持中 *CLV3* 和 *WUS* 基因的具体作用机制.由此,Reddy 等^[25] 和 Yadav 等^[26] 分别在 2005 年和 2010 年报道了诱导性沉默或过表达基因后茎尖瞬时变化的结果.研究发现 *CLV3* 的功能是防止紧邻 CZ 的 PZ 干细胞的子细胞脱分化重新形成干细胞,并且通过抑制 PZ 细胞的有丝分裂速率来维持 SAM 的大小^[25];而 *WUS* 在 CZ 过表达时能促进整个 PZ 细胞转化成为干细胞,提高 PZ 细胞的有丝分裂速率,并控制 PZ 细胞参与分化和保持不分化的比例^[26].由此,*CLV3* 和 *WUS* 采用对立的机制在 PZ 与 CZ 细胞的相互转化、PZ 细胞的分裂速率和 PZ 细胞的分化比例这 3 个层面维持 SAM 的动态平衡.随后,这其中部分工作得到了分子水平的阐释.Yadav 等^[27] 证明大部分受 *WUS* 激活的基因在 SAM 的 CZ 表达,而受 *WUS* 抑制的大部分基因在 PZ 表达,且受 *WUS* 抑制的基因中很多是促进细胞分化的转录因子,其中已经报道的有 37 个,包括在叶的极性建立及分化中起作用的基因 *KANADI1*、*KANADI2*、*ASYMMETRIC LEAVES 2* (*AS2*) 和 *YABBY3*,以及在 PZ 与 RZ 表达而有可能对细胞命运特化及 IM 干细胞分化起作用的 *KNAT1/BREVIPEDICELLUS* (*BP*)、*BLH5*、*BHLH093* 和 *ANAC083*.*WUS* 对促进分化的转录因子的抑制作用是其参与维持 SAM 稳定的一个重要方面.与之类似,Busch 等^[28] 通过用不同遗



(a) 拟南芥茎尖分生组织模式图,LP(leaf primordium)表示叶原基,虚线表示 L1,L2 与 L3 层之间的分界面;
(b) 茎尖分生组织中的信号通路,CK* 表示无活性的细胞分裂素。

图 1 茎尖分生组织及其维持的分子信号通路

Fig. 1 The shoot apical meristem and its maintenance pathway

传背景下的植物(*wus* 和诱导性过表达 *WUS* 的转基因植株)进行表达谱分析,发现受 *WUS* 响应的基因有 667 个之多;随后在全基因组水平进行 *WUS* 的 ChIP-chip 实验,发现 *WUS* 可以直接结合在 118 个靶基因的启动子上,而且这种结合至少需要每个启动子上 2 个不同的元件参与,这些靶基因主要在 CK、生长素(auxin)、茉莉酸(jasmonate)几种激素信号途径以及发育过程和代谢过程中发挥作用。

在 *WUS* 对于干细胞的决定方向上,Yadav 等^[29]发现 *WUS* 蛋白可以移动到干细胞区域并激活 *CLV3* 的表达。在他们的研究中,IM 中的 eGFP-*WUS* 融合蛋白(*pWUS::eGFP-WUS*)可以扩散至 L1,而其 mRNA 仍然在 OC,并且 *pWUS::eGFP-WUS* 可以恢复 *wus*;相比之下,2 × eGFP-*WUS* (增加蛋白的大小)或者 NLS-eGFP-*WUS* 蛋白(将融合蛋白进行核定位)在 IM 中的移动性和对 *wus* 的恢复能力则明显减弱,证明 *WUS* 具有移动性并且这种移动对 SAM 的维持发挥重要作用;随后又证明了 *WUS* 移动到 CZ 后会直接与 *CLV3* 启动子结合进而启动其表达^[29-30]。值得注意的是,*WUS* 蛋白在 FM 中的移动性比较复杂,eGFP-*WUS*、2 × eGFP-*WUS* 和 NLS-eGFP-*WUS* 蛋白在 FM 发育早期都能在 L1 检测到,而在后期 2 × eGFP-*WUS* 和 NLS-eGFP-*WUS* 则定位于 OC^[29]。对于 eGFP-*WUS* 有可能产生的偏差,Daum 等^[31]用免疫组织化学的方法进一步确认了内源 *WUS* 蛋白的移动性,并进而证明了 *WUS* 这种细胞与细胞间的移动需要借助于起细胞沟通桥梁作用的胞间连丝(plas-

modesmata,PD),在干细胞区域诱导性表达胼胝质合成酶时(胼胝质合成酶可以在 PD 周围堆积胼胝质使细胞壁加厚从而减小 PD 的直径而减弱其功能),受 *WUS* 启动子表达的 *WUS-linker-GFP* 融合蛋白不能移动到 L1 并且干细胞出现分化。*WUS* 蛋白的同源异型结构域(homeodomain,HD)对其移动有促进作用,而 HD 与 *WUS-Box* 功能域之间的非保守区域对其移动起限制作用,这种不同区域间的相互作用保证 *WUS* 向上呈楔形移动而不是移向 SAM 外围区域进而诱导形成干细胞;此外还发现非保守区域介导 *WUS* 形成二聚体,推测 *WUS* 的二聚化可能对其移动性有影响^[31]。已有研究表明 STM 蛋白(详见后文 STM 信号途径)依赖于 PD 的移动需要分子伴侣 CCT8 的参与^[32],然而在 *cct8* 突变体中 *WUS* 的移动并未受到影响^[31],说明这些关键蛋白的移动机制并不具有普遍性。

CLV3 对 *WUS* 的反馈调节过程中,成熟的 *CLV3p* 从干细胞区域向下方移动,被多种富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat,LRR)的受体接收从而抑制 OC 细胞中 *WUS* 的表达^[33](图 1(b))。在这些受体中第 1 种就是 *CLV1*。*CLV1* 编码 LRR 受体激酶,其主要在 RZ 表达,也会出现在 OC 和 CZ 的 L3^[34],已有研究证明 *CLV3p* 可以直接结合在 *CLV1* 的 LRR 结构域上^[35],但 *clv1* 的表型要比 *clv3* 弱很多,造成这种现象的原因是 *BARELY ANY MERISTEM 1,2* 和 3 (*BAM1,2* 和 3)基因的参与。*BAM* 基因编码具有 LRR 功能结构域的受体激酶,然而其功能与 *CLV1* 刚

好相反, *bam1 bam2 bam3* 三突变体中 SAM 明显变小^[36-37]. 正常情况下, 由于 *CLV1* 基因在 RZ 的表达从而抑制 *BAM* 基因在此区域的表达; 当 *CLV1* 基因突变时, *BAM* 恢复在 RZ 的表达也进而抑制 SAM 的扩增, 由此可以解释单纯 *clv1* 突变体表型较弱, 而 *clv1 bam1 bam2 bam3* 四突变体表型显著增强的原因^[38]. 第 2 种受体是 CLV2-CORYNE (CRN) 复合物受体. CLV2 也是类似 LRR 受体的跨膜蛋白但其不含细胞内的激酶功能域; CRN 具有类似于 CLV1 的跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶活性但缺少细胞外 LRR 功能域^[39-40], 其与 CLV2 形成异源二聚体独立于 CLV1 作为 CLV3p 的另一受体^[41]. 然而 Nimchuk 等^[42]发现 CRN 不能自我磷酸化, 它的功能发挥类似于动物中的假激酶(pseudokinases), 并不依靠激酶活性, 而是起脚手架的作用. 第 3 种受体是 RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 (RPK2). *rpk2* 的表型相较于 *clv1* 与 *clv2* 要弱, 但也会导致干细胞扩散, 并且 *clv1 clv2 rpk2* 三突变体的表型更接近于 *clv3*, 说明 RPK2 在 CLV3 主导的信号通路中发挥次要作用但又独立于 CLV1 与 CLV2-CRN 受体^[43].

LRR 受体都是膜蛋白, 在其接受来自干细胞分泌的配体 CLV3p 后如何将此信号传导进入细胞内部一直以来并不清楚. 最近这一作用机制在玉米(*zea mays*) 的相关研究中获得了进展^[44]: 玉米 COMPACT PLANT 2 (CT2) 基因编码异源三聚体 GTP 结合蛋白的 α 亚单位, 它可以直接结合玉米的跨膜蛋白受体 FASCIATED EAR (FEA, CLV2 的同源蛋白). 异源三聚体 GTP 结合蛋白是与之相联系的膜蛋白进行信号传导的分子开关, 它通常是受 7 个跨膜蛋白接收配体后激活^[45], 而在玉米的研究中一个这样的跨膜受体 FEA 就足以激活. 玉米 *ct2* 突变体的 SAM 表型同拟南芥中 *clv* 突变体类似, 用 CLV3p 处理野生型时会抑制 SAM 的生长而处理 *ct2* 则不会. 尽管如此, 信号由胞外传递到胞内后最终又是如何抑制 WUS 表达的分子机制尚待研究.

CLV3p 对 WUS 的抑制作用存在一个平衡, 因为过量的 CLV3p 或者仅在 L1 过表达 CLV3 都会完全抑制 WUS 的表达, 出现 *wus* 的表型^[23-24]. 现在就这个问题存在 2 种对立的观点: 1) CLV1 受体通过直接结合屏蔽 CLV3p 使其不能进入 WUS 的表达区域 OC. 这个模型建立在对 CLV3-GFP 融合蛋白的观察发现其主要向侧边移动, 而很少向正下方 OC 移动^[24], 并且在这个过程中 CLV2 会辅助 CLV1 以提高其稳定性, 随后的研究证实 CLV3p 可以直接结合 CLV1 也

支持这一模型^[21,35]. 2) CLV1 的存在依赖于 CLV3p 的剂量性调控. 在这种模型中, CLV1 在 *clv3* 背景下于细胞质膜中得到积累, 当 CLV3p 存在时, CLV1 被转运至溶酶体中被降解, CLV3p 的数量决定了 CLV1 的量, 进而决定了信号的传导^[46], 据此可以解释为什么 SAM 承受 CLV3 表达水平 10 倍以上的变化时并不引起表型的改变和 WUS 表达水平先降低而后又得到恢复^[47]. 此外, WUS 本身也可以通过抑制 CLV1 的表达进而降低 CLV3p 的抑制效应进行自救, 通过直接结合在 CLV1 启动子上距离转录起始位点 600 bp 的位置而抑制 CLV1 的表达^[28]. 再者, CLV 信号通路下游存在 POLTERGEIST (POL) 和 POLTERGEIST-LIKE1 (PLL1) 基因, 它们可以促进 WUS 的转录, 而其又受 CLV 信号通路抑制^[48-49]. POL 和 PLL1 编码 2C 型蛋白磷酸酶, 它们在功能上冗余, 可以通过乙酰化而定位于细胞质膜的内表面, 而 CLV3 的几种受体蛋白也都定位于细胞质膜上, 它们之间或许存在着联系进而调控 WUS-CLV 信号通路的动态平衡^[50].

2 CK 信号通路

在 SAM 中合成的 CK 并没有活性, 它需要 CK 激活酶的激活. 在水稻中 LONGLYGUY (LOG)^[51] 编码 CK 激活酶, 其作用于 CK 合成过程的最后一步, 将未激活的核苷转变成有生物活性的碱基(图 1(b)). LOG 在 SAM 的最顶端 2~3 层细胞表达, 包含干细胞区域. 水稻 *log* 在营养生长期 SAM 体积减小, 在生殖生长过程中产生较少的分支并且形成不完整的花, 发育较早终止^[51]. 在拟南芥中有 9 个 LOG 同源基因, 其中 LOG7 对 SAM 的维持贡献最大^[52], 另外 Chickarmane 等^[53]发现 LOG4 在 SAM 的 L1 表达, LOG 在 SAM 顶端表达, 这样就使有活性的 CK 从干细胞区域向下扩散至 RZ 并在此区间形成一个浓度梯度, 这对于 OC 中干细胞的维持及其保持未分化状态有重要作用.

在 OC 中, WUS 的活性与 CK 的功能有着紧密的联系. 通过观察与 GFP 相融合的 CK 感应因子 TCP 的表达, 发现 OC 是 SAM 中 CK 响应区域. CK 受体 ARA-BIDOPSIS HISTIDINE KINASE 4 (AHK4)/WOODENLEG 的表达覆盖整个 OC, 在这里 AHK4 诱导 WUS 的表达并且抑制 WUS 的拮抗基因 CLV1 的表达^[54]. WUS 又可以直接抑制细胞内的 CK 负调控因子 ARR7 和 ARR15 的表达, 降低 ARR7 和 ARR15 的表达水平会使 SAM 增大, 而过表达 ARR7 时呈现 *wus* 的表

型^[39].同时,受生长素激活的 *AUXIN RESPONSE FACTOR 5/MONOPTEROUS* (*ARF5/MP*) 转录因子也会直接抑制 *ARR7* 和 *ARR15* 的表达^[55].由此在 OC 形成高水平的 CK 浓度,进而诱导并稳固了 *WUS* 的表达,*WUS* 又抑制 *ARR7* 和 *ARR15* 的表达,于是构建成一个正反馈调控途径(图 1(b)).另外,在 RZ 还存在 CK 降解酶 *CYTOKININ OXIDASES 3* (*CKX3*) 来平衡 CK 的水平^[56-57].总之,*WUS* 介导了细胞内 CK 的信号传导途径,OC 细胞在 SAM 中接收并传导 CK 信号又进一步增强了 *WUS* 的表达.

3 可移动的小 RNAs

HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER III (*HD-ZIP III*) 家族基因的部分功能是调控胚胎顶部模式发生和胚胎发育时期 SAM 的形成^[58].在拟南芥中存在 5 个 *HD-ZIP III* 基因,分别是 *PHABULOSA* (*PHB*)^[59]、*PHAVOLUTA* (*PHV*)^[59]、*REVOLUTA* (*REC*)、*ARABIDOPSIS HOMEODOMAIN GENE 8* (*ATHB8*) 和 *ATHB15/CORONA* (*CNA*)^[60].*HD-ZIP III* 基因的突变会导致 SAM 终止^[61-62],而提高其表达水平又可以导致 SAM 增大或者 SAM 异位再生^[59].尽管现在并不清楚 *HD-ZIP III* 基因家族在调控 SAM 方面的分子机制,但知道 *HD-ZIP III* 基因本身受多种非编码小 RNAs 的调控^[63],在 SAM 中主要是 *microRNA165/166* 的靶基因^[64].

MicroRNA165/166 对 *HD-ZIP III* 基因的攻击受 *ARGONAUTE1* (*AGO1*) 与 *ZWILLE* (*ZLL*)/*PIN-HEAD* (*PNH*)/*AGO10*^[65-67] 的精确调控. *ARGONAUTE* 蛋白是 RNA 沉默复合体中的关键因子. *AGO1* 与 *AGO10* 蛋白序列相似度很高,其中包括 2 个重要的功能区域 PAZ 与 MID,而且 PAZ 功能域可以在 2 个蛋白间互换,但是它们的功能却是截然相反的^[68].*microRNA165/166* 在 *AGO1* 的介导下降解 SAM 中 *HD-ZIP III* 基因的 mRNA,使其表达水平下降;而 *microRNA165/166* 与 *AGO10* 特异性结合后 *AGO10* 不会发挥其催化降解活性;生化实验证明 *AGO10* 与 *microRNA165/166* 的结合能力强于 *AGO1*,所以 *AGO10* 的功能就是沉默体内 *microRNA165/166*,使其不能与 *AGO1* 结合,从而稳固 *HD-ZIP III* 基因的表达^[69].因此 *microRNA165/166* 信号因子类似于一种分子开关,其通过“偏向”不同的两侧而起到截然相反的效果(图 1(b)).在 *zll/pnh/ago10* 突变体中表现出胚胎发育后期 SAM 不能维持

的表型,分子水平上 *microRNA165/166* 上升,*HD-ZIP III* 基因的转录本下降;而在 SAM 中增加 *HD-ZIP III* 基因的表达水平或者降低 *microRNA165/166* 的水平时又可以部分恢复 *zll/pnh/ago10* 的异常表型^[64].

拟南芥中 *microRNA165/166* 家族基因中有 9 个成员,他们中的 5 个在胚胎中的表达模式非常保守,都在胚胎基部的外围区域表达^[70].*MicroRNA165/166* 在胚胎中具有移动性,通过移动降解分布于整个胚胎中的 *PHB* mRNA 最终使其只在胚胎中央的顶部表达^[64].*AGO10* 基因在围绕 SAM 的原形成层处表达,可能正是因为 *AGO10* 的这种表达模式为 SAM 提供了一层保护屏障,通过沉默 *microRNA165/166* 使 SAM 原基免受干扰;深入研究发现仅在 OC 正下方的维管组织区域表达 *AGO10* 就可以恢复其突变体的表型,说明这个区域对于 SAM 的维持具有特殊的作用^[69,71].

与 *microRNA165/166* 表达模式基本上相反的是 *microRNA394*,在胚胎时期它仅在 SAM 的 L1 特异性表达.*MicroRNA394* 也具有移动性,通过移向 SAM 内部从而使干细胞维持在未分化状态且对 *CLV3* 在 CZ 表达发挥重要作用(图 1(b)).*MicroRNA394* 的靶基因是 *LEAF CURLING RESPONSIVENESS* (*LCR*),其编码的 F-Box 蛋白是干细胞抑制因子,可以介导生长素信号通路并促进叶的发育^[72].尽管 *microRNA394* 在 L1 表达,但 L1 并不需要它的作用,因此 Knauer 等^[73]认为 *microRNA394* 的这种表达规律和作用方式正是干细胞在经过细胞分裂和生长而始终处于 SAM 的原因,其作用类似于 LOG.

4 表观遗传作用

表观遗传现象是指在 DNA 序列没有改变的情况下,基因功能出现可逆、可遗传的改变.在植物的生长发育过程中,细胞核基因组中等位基因尤其是有时空表达特性的基因会受某种因素影响而被选择性地开启或者关闭,从而引起表观遗传现象.这些因素主要包括:核小体组装、ATP 依赖型的染色质重塑、组蛋白修饰及 DNA 甲基化^[74].它们对 SAM 的维持作用最主要是通过通过对 *WUS* 基因的转录调控来实现的.

在参与核小体的组装中有 2 个进化上保守的蛋白 *CHROMATIN ASSEMBLY FACTOR 1* (*CAF-1*) 和 *NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN 1* (*NAP1*),它们分别负责将组蛋白 H3/H4 亚基和 H2A/H2B 亚基包

装入核小体^[74]. *FASCIATA 1* (*FAS1*) 和 *FAS2* 编码 CAF-1 蛋白复合体的 2 个核心亚基, 它们在 SAM 及叶原基中表达, 在 *fas1* 与 *fas2* 中 SAM 变得扁平肥大, *WUS* 的表达区域明显扩散^[75], 说明 CAF-1 可以抑制 *WUS* 的表达. *BRUSHY1* (*BRU1*)/*MGOUN3* (*MGO3*)/*TONSOKU* (*TSK*) 编码的蛋白对 DNA 复制或者修复后的结构起到稳定作用, 其突变后的表型同 *fas1* 和 *fas2* 非常相近^[76-78].

在植物生长发育过程中, 组蛋白与 DNA 之间相互作用会发生重新调整进而改变染色质的结构与活性, 从而调节基因的表达, 即为染色质重塑. ATP 依赖型的染色质重塑蛋白复合体在这一过程中具有重要作用, 这些复合体的核心成员是 ATP 酶^[74]. *SPLAYED* (*SYD*) 编码一种 SWI/SNF 型 ATP 酶, 它可以直接结合于 *WUS* 的启动子上 (−435 ~ −70 bp), 并控制 *WUS* 的表达水平. 在 *syd* 中, *WUS* 的表达水平和 SAM 的大小全都降低^[79-80]. *BRCA1-associated RING domain 1* (*BARD1*) 也可以抑制 *WUS* 的表达, 并且可以结合在 *SYD* 上, *BARD1* 可能是通过抑制 *SYD* 的活性进而抑制 *WUS* 的表达. *BARD1* 蛋白具有 *BRCA1 C-terminal* (*BRCT*) 与 *RING* 2 个前后相连的功能域, 其可以直接结合于 *WUS* 的启动子上 (−260 ~ −206 bp). 在 *bard1-3* 中, *WUS* mRNA 表达上调 238 倍, 其表达区域扩散至 L1 ~ L3; 而在过表达 *BARD1* 时又表现出 *wus* 的表型^[79,81].

组蛋白修饰的方式有多种, 包括甲基化、乙酰化、磷酸化和泛素化, 在现有的研究中参与 SAM 调控的主要是组蛋白赖氨酸甲基化修饰 (histone lysine methylation modification). 组蛋白 H3 的 N 端 4 个赖氨酸修饰位点对于基因的表达至关重要, 它们分别是 H3K4、H3K9、H3K27 和 H3K36 位点, 而在赖氨酸上有 3 个可以被甲基化修饰的化学键, 因此又可以分为一、二和三甲基化修饰 (me1, me2, me3). 一般认为 H3K4 和 H3K36 的甲基化修饰促进基因表达, 而 H3K9 和 H3K27 的甲基化修饰则导致异染色质化和基因沉默. 赖氨酸甲基化修饰需要甲基转移酶 (lysine methyltransferase, KMT) 的参与, 它通常含有一个约 130 个氨基酸组成的 SET 结构域^[74] (甲基转移的催化中心). 拟南芥中有 47 个编码 SET 结构域的蛋白, 而参与对 SAM 维持的主要有 Trithorax group (TrxG) 与 Polycomb group (PcG) 两类. TrxG 负责 H3K4me3 修饰, 能够激活基因的表达; 而 PcG 的功能则与之相反, 通过直接结合于 DNA 的可识别区域进而诱导

H3K27me3 修饰, 使基因处于沉默状态^[79].

5 STM 信号途径

在 SAM 的维持中存在着与 *WUS-CLV* 反馈调节通路相平行的另一条信号通路, 而这条信号通路中核心成员是 *STM*^[14,82-85]. *STM* 编码同源异型结构域转录因子, 属于 *KNOTTED1-like homeobox* (*KNOX*) 基因家族成员^[86]. *STM* 在玉米中的直系同源基因是 *KNOTTED1* (*KN1*), *KN1* 是 *KNOX* 基因家族的基础成员也是在植物中发现的第一个能够调控干细胞的基因^[87]. *stm-1* 突变体在胚胎发育时期即没有 SAM 形成, 在胚胎后发育时期同样没有 SAM 并且子叶叶柄基部融合, 大部分 *stm* 不会形成其他器官即老化, 偶尔能够发育的植株叶片基部也会部分融合, 在花发育过程中总是以未成熟的异位器官原基融合在一起的形式终止^[84]. *STM* 在胚胎发育球形期开始表达, 并且在胚后发育的 SAM 和 FM 中未分化的细胞中表达, 在分生组织邻近的器官或者花器官原基中没有表达^[86]. 通过突变体表型和在生长过程中的表达变化说明 *STM* 有两大功能: 其一为防止干细胞分化, 其二为促进干细胞的子细胞在形成器官前的增殖^[14,84,86,88].

STM 和 *WUS* 的缺失都可以引起 SAM 的终止, 但其机制有所不同. 在 *stm* 中没有可以识别的 SAM^[84], 而在 *wus* 中尽管 SAM 终止, 但其仍然存在并且变得扁平肥大, 说明 CZ 细胞仍然存在只是没有功能^[12]. 随后的研究表明 *STM* 与 *WUS* 的功能是相互独立的. 分别异位表达 *WUS* 与 *STM* 能够诱导不同的下游基因表达. *WUS* 的功能主要是特化 CZ 的细胞成为干细胞, 而 *STM* 的功能是抑制干细胞的分化和促进干细胞子细胞的增殖^[14].

像 *WUS* 一样, *STM* 也可以在 SAM 中借助于 PD 进行移动, 并且对于 *STM* 的可移动性研究要比 *WUS* 更早更深入. 早在 1994 年就发现 *KN1* 蛋白的表达范围超出其 mRNA 的表达区域^[89], 随后通过显微注射的方式证实了 *KN1* 借助于 PD 移动, 其可以增大 PD 的排阻极限 (size exclusion limit, SEL), 还可以介导 *KN1* 正义链 mRNA 借助于 PD 进行移动^[90]. GFP-*KN1* 可以在叶片与 SAM 中移动^[91], 并且这种移动有其特殊调控方式. 在叶片中 GFP-*KN1* 可以从叶肉细胞向表皮细胞移动, 但反方向不可以; 而在 SAM 中, GFP-*KN1* 与 GFP-*STM* 可以从 L1 向内层移动, 并且在 L1 特异性表达 *KN1* 可以部分恢复 *stm-11* (强表型突变体)^[92]. *KNOX* 家族的异型结构域对于其蛋白与

mRNA 的移动是必须的^[93].最近的研究发现 KN1 与 STM 的移动还需要伴侣蛋白 CCT8 的参与(细胞质内二型分子伴侣复合物的亚单位),在敲除 CCT8 基因后表现出 *stm* 突变体的强表型.CCT8 的另一个作用就是在 STM 移向的目的细胞中可以将 STM 重新折叠成有活性的蛋白^[32].现在并不清楚 STM 或者 KN1 蛋白移动的意义,有可能是为在 SAM 中形成一定的蛋白浓度梯度.

STM 通过在 SAM 的 CZ 抑制器官形成基因 *AS1* 和 *AS2* 的表达进而阻止干细胞的分化^[94].*AS1* 是金鱼草(*Antirrhinum majus* L.)中 *PHAN* 和玉米中 *ROUGH SHEATH2 (RS2)* 的同源基因,它编码一个具有 MYB 功能域的转录因子,而 *AS2* 编码具有 LATERAL ORGEN BOUNDARY (LOB) 功能域的蛋白^[95-97].在每个物种中,这些基因都参与侧生器官的起始.STM 及其他 KNOX 家族蛋白(KNAT1/BP, KNAT2 和 KNAT6)抑制 *AS1*、*AS2* 在 SAM 中心区域的表达,而 *AS1*、*AS2* 反过来也会抑制 KNOX 基因在发育中的器官原基处的表达^[95-96, 98-100].STM 的表达模式也反映了这种调控关系,其在 SAM 中的表达贯穿整个 CZ,而在器官原基发育位置却有明显的下降^[95].*AS1*、*AS2* 与组蛋白分子伴侣 HIRA 形成转录抑制复合体进而结合于 KNOX 家族基因的顺式作用元件上来抑制 KNOX 的转录^[101-102].

另一方面 STM 可以通过调节 CK 与赤霉素(gibberellin, GA)信号通路来维持 SAM. CK 可以通过激活细胞周期蛋白 D(cyclin D)的表达进而促进细胞分裂^[103],其本身对 SAM 的维持起着重要作用;而 GAs 包含一大类二萜类化合物,它们可以促进器官增大与植物形态发生^[104].

STM 在 SAM 中直接激活 CK 合成酶基因 *ISO-PENTENYL TRANSFERASE 7 (IPT7)* 与 CK 响应因子 *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 5 (ARR5)* 的表达,当施用外源 CK 或者用 STM 启动子表达 *IPT7* 都可以部分恢复 *stm* 的表型,而在过表达 STM 时则可导致体内 CK 水平上升和诱导异位分生组织形成^[105-106].可见 STM 对 *IPT7* 的激活在 SAM 维持中起关键作用(图 1(b)).在过表达其他 KNOX 家族基因如 *KNAT1/BP* 时也会导致产生高水平的 CK,这说明其他 KNOX 基因家族成员有同 STM 类似的功能^[105, 107].

在对 GA 水平的调控上, KNOX 家族转录因子 *Nicotiana tabacum homeobox 15 (NTH15)* 在 CZ 直接结合在 GA 合成酶基因 *GA 20-oxidase* (在 GA 合

成过程的倒数第二步发挥作用)的第一个内含子上抑制其表达^[108-109],从而阻断了 GA 的生物合成,并且在表达模式上 *GA 20-oxidase* 与 STM 基本一致^[110].然而仅通过这种方式还是不够的,因为在叶原基合成的 GA 可以扩散到 SAM 中. STM 通过激活 GA 分解代谢基因 *GA 2-oxidase* 的表达使流入 SAM 的 GA 失活, *GA 2-oxidase* 在 SAM 基部和发育中的叶原基表达除受 STM 调控外, CK 信号对于其激活也是必要的^[105].由此通过 KNOX 家族蛋白在 SAM 中建立起高水平 CK 活性和低水平 GA 活性的激素环境,这对于 SAM 的维持起着非常重要的作用.

6 小结与展望

近 20 年来对于植物 SAM 维持分子机制的研究取得了卓越的成绩,发现了 SAM 维持中最核心的信号调节通路,并以此为基础搭建了分子调控的信号网络.越来越多的生物学因素被发现参与 SAM 的维持,主要包括植物激素,小 RNAs 和表观遗传作用,也由此说明 SAM 的调控机制极其复杂.加之 SAM 处在一个高度联系并且非常稳定的调控网络之中,在时间与空间上都为研究带来诸多不便.到目前为止在 WUS-CLV 信号途径中还不清楚 WUS 决定干细胞和 CLV 途径抑制 WUS 的具体作用机制.通过激光共聚焦技术实时观察 SAM 的变化并经过计算机建模是近几年发展起来的解决这一科研难题的方法.

早在 2007 年通过在根尖中收集不同细胞类型进行了根尖干细胞的基因表达谱分析^[111-112],该方法相较于对整个根尖分生组织的转录本进行检测具有更高的灵敏度,可以检测到一些表达丰度低或者只在根尖分生组织表达的基因.2009 年 Yadav 等^[56]对 SAM 也开展了同样的工作,并且在 2014 年又对这种不同细胞类型的取样进行了优化,细胞分类更加细化^[113].通过表达谱分析发现有大量在 SAM 特异性表达的基因,然而这些基因的功能现在尚不清楚;另外受 WUS 激活与抑制又或者可以直接结合的基因也有很多,它们是否参与对 SAM 的维持作用也不清楚.因此 SAM 的分子机制研究工作任重而道远.

参考文献:

- [1] STEEVES T A, SUSSEX I M. Patterns in plant development [M]. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 1989: 46-228.
- [2] MEYEROWITZ E M. Genetic control of cell division pat-

- terns in developing plants[J]. *Cell*, 1997, 88(3):299-308.
- [3] SATINA S, BLAKESLEE A F, AVERY A G. Demonstration of the three germ layers in the shoot apex of *Datura* by means of induced polyploidy in periclinal chimeras[J]. *American Journal of Botany*, 1940, 27(10): 895-905.
- [4] LAUX T. The stem cell concept in plants: a matter of debate[J]. *Cell*, 2003, 113(3):281-283.
- [5] SPRADLING A, DRUMMOND-BARBOSA D, KAI T. Stem cells find their niche[J]. *Nature*, 2001, 414(6859): 98-104.
- [6] SATINA S, BLAKESLEE A F. Periclinal chimeras in *Datura stramonium* in relation to development of leaf and flower[J]. *American Journal of Botany*, 1941, 28(10): 862-871.
- [7] FURNER I J, PUMFREY J E. Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Development*, 1992, 115(3):755-764.
- [8] IRISH V F, SUSSEX I M. A fate map of the *Arabidopsis* embryonic shoot apical meristem[J]. *Development*, 1992, 115(3):745-753.
- [9] STEWART R N, DERMEN H. Flexibility in ontogeny as shown by the contribution of the shoot apical layers to leaves of periclinal chimeras[J]. *American Journal of Botany*, 1975, 62(9):935-947.
- [10] VAN DER GRAAFF E, LAUX T, RENSING S A. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family[J]. *Genome Biol*, 2009, 10(12):248.
- [11] MAYER K F, SCHOOF H, HAECKER A, et al. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem[J]. *Cell*, 1998, 95(6):805-815.
- [12] LAUX T, MAYER K F, BERGER J, et al. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*[J]. *Development*, 1996, 122(1): 87-96.
- [13] BRAND U, GRUNEWALD M, HOBE M, et al. Regulation of *CLV3* expression by two homeobox genes in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2002, 129(2):565-575.
- [14] LENHARD M, JURGENS G, LAUX T. The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in *Arabidopsis* shoot meristem regulation[J]. *Development*, 2002, 129(13): 3195-3206.
- [15] SCHOOF H, LENHARD M, HAECKER A, et al. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes[J]. *Cell*, 2000, 100(6):635-644.
- [16] COCK J M, MCCORMICK S. A large family of genes that share homology with *CLAVATA3* [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(3):939-942.
- [17] FLETCHER J C, BRAND U, RUNNING M P, et al. Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems[J]. *Science*, 1999, 283(5409): 1911-1914.
- [18] ITO Y, NAKANOMYO I, MOTOSE H, et al. Dodecapeptides as suppressors of plant stem cell differentiation[J]. *Science*, 2006, 313(5788):842-845.
- [19] NI J, CLARK S E. Evidence for functional conservation, sufficiency, and proteolytic processing of the *CLAVATA3* CLE domain[J]. *Plant Physiol*, 2006, 140(2):726-733.
- [20] KONDO T, SAWA S, KINOSHITA A, et al. A plant peptide encoded by *CLV3* identified by *in situ* MALDI-TOF MS analysis[J]. *Science*, 2006, 313(5788):845-848.
- [21] OHYAMA K, SHINOHARA H, OGAWA-OHNISHI M, et al. A glycopeptide regulating stem cell fate in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nat Chem Biol*, 2009, 5(8): 578-580.
- [22] CLARK S E, RUNNING M P, MEYEROWITZ E M. *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*[J]. *Development*, 1995, 121(7):2057-2067.
- [23] BRAND U, FLETCHER J C, HOBE M, et al. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity[J]. *Science*, 2000, 289(5479):617-619.
- [24] LENHARD M, LAUX T. Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of *CLAVATA3* and its sequestration by *CLAVATA1* [J]. *Development*, 2003, 130(14): 3163-3173.
- [25] REDDY G V, MEYEROWITZ E M. Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the *Arabidopsis* shoot apex[J]. *Science*, 2005, 310(5748): 663-667.
- [26] YADAV R K, TAVAKKOLI M, REDDY G V. WUSCHEL mediates stem cell homeostasis by regulating stem cell number and patterns of cell division and differentiation of stem cell progenitors [J]. *Development*, 2010, 137(21):3581-3589.
- [27] YADAV R K, PERALES M, GRUEL J, et al. Plant stem cell maintenance involves direct transcriptional repression of differentiation program[J]. *Mol Syst Biol*, 2013, 9(1):654.
- [28] BUSCH W, MIOTK A, ARIEL F D, et al. Transcriptional control of a plant stem cell niche[J]. *Dev Cell*, 2010, 18(5):849-861.

- [29] YADAV R K, PERALES M, GRUEL J, et al. WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex[J]. *Genes Dev*, 2011, 25(19):2025-2030.
- [30] HOLT A L, VAN HAPEREN J M, GROOT E P, et al. Signaling in shoot and flower meristems of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2014, 17(1):96-102.
- [31] DAUM G, MEDZIHRADSKY A, SUZAKI T, et al. A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in Arabidopsis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(40):14619-14624.
- [32] XU X M, WANG J, XUAN Z, et al. Chaperonins facilitate KNOTTED1 cell-to-cell trafficking and stem cell function[J]. *Science*, 2011, 333(6046):1141-1144.
- [33] KATSIR L, DAVIES K A, BERGMANN D C, et al. Peptide signaling in plant development[J]. *Curr Biol*, 2011, 21(9):356-364.
- [34] CLARK S E, WILLIAMS R W, MEYEROWITZ E M. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis[J]. *Cell*, 1997, 89(4):575-585.
- [35] OGAWA M, SHINOHARA H, SAKAGAMI Y, et al. Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain[J]. *Science*, 2008, 319(5861):294.
- [36] DEYOUNG B J, BICKLE K L, SCHRAGE K J, et al. The *CLAVATA1*-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for meristem function in Arabidopsis[J]. *Plant J*, 2006, 45(1):1-16.
- [37] DEYOUNG B J, CLARK S E. BAM receptors regulate stem cell specification and organ development through complex interactions with *CLAVATA* signaling [J]. *Genetics*, 2008, 180(2):895-904.
- [38] NIMCHUK Z L, ZHOU Y, TARR P T, et al. Plant stem cell maintenance by transcriptional cross-regulation of related receptor kinases[J]. *Development*, 2015, 142(6):1043-1049.
- [39] LEIBFRIED A, TO J P, BUSCH W, et al. WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators[J]. *Nature*, 2005, 438(7071):1172-1175.
- [40] KAYES J M, CLARK S E. *CLAVATA2*, a regulator of meristem and organ development in Arabidopsis [J]. *Development*, 1998, 125(19):3843-3851.
- [41] GUO Y, HAN L, HYMES M, et al. *CLAVATA2* forms a distinct CLE-binding receptor complex regulating Arabidopsis stem cell specification[J]. *Plant J*, 2010, 63(6):889-900.
- [42] NIMCHUK Z L, TARR P T, MEYEROWITZ E M. An evolutionarily conserved pseudokinase mediates stem cell production in plants[J]. *Plant Cell*, 2011, 23(3):851-854.
- [43] KINOSHITA A, BETSUYAKU S, OSAKABE Y, et al. RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in Arabidopsis[J]. *Development*, 2010, 137(22):3911-3920.
- [44] BOMMERT P, JE B I, GOLDSCHMIDT A, et al. The maize *Ga* gene *COMPACT PLANT 2* functions in *CLAVATA* signalling to control shoot meristem size [J]. *Nature*, 2013, 502(7472):555-558.
- [45] ASSMANN S M. G proteins Go green: a plant G protein signaling FAQ sheet [J]. *Science*, 2005, 310(5745):71-73.
- [46] NIMCHUK Z L, TARR P T, OHNO C, et al. Plant stem cell signaling involves ligand-dependent trafficking of the *CLAVATA1* receptor kinase[J]. *Curr Biol*, 2011, 21(5):345-352.
- [47] MULLER R, BORCHI L, KWIATKOWSKA D, et al. Dynamic and compensatory responses of Arabidopsis shoot and floral meristems to CLV3 signaling[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(5):1188-1198.
- [48] SONG S K, CLARK S E. POL and related phosphatases are dosage-sensitive regulators of meristem and organ development in Arabidopsis[J]. *Dev Biol*, 2005, 285(1):272-284.
- [49] SONG S K, LEE M M, CLARK S E. POL and PLL1 phosphatases are *CLAVATA1* signaling intermediates required for Arabidopsis shoot and floral stem cells[J]. *Development*, 2006, 133(23):4691-4698.
- [50] GAGNE J M, CLARK S E. The Arabidopsis stem cell factor POLTERGEIST is membrane localized and phospholipid stimulated[J]. *Plant Cell*, 2010, 22(3):729-743.
- [51] KURAKAWA T, UEDA N, MAEKAWA M, et al. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme[J]. *Nature*, 2007, 445(7128):652-655.
- [52] TOKUNAGA H, KOJIMA M, KUROHA T, et al. Arabidopsis lonely guy (LOG) multiple mutants reveal a central role of the LOG-dependent pathway in cytokinin activation[J]. *Plant J*, 2012, 69(2):355-365.
- [53] CHICKARMANE V S, GORDON S P, TARR P T, et al. Cytokinin signaling as a positional cue for patterning the apical-basal axis of the growing Arabidopsis shoot meristem[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(10):4002-4007.
- [54] GORDON S P, CHICKARMANE V S, OHNO C, et al. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the Arabidopsis shoot meristem[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(38):10000-10005.

- 16529-16534.
- [55] ZHAO Z, ANDERSEN S U, LJUNG K, et al. Hormonal control of the shoot stem-cell niche[J]. *Nature*, 2010, 465 (7301): 1089-1092.
- [56] YADAV R K, GIRKE T, PASALA S, et al. Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (12): 4941-4946.
- [57] BARTRINA I, OTTO E, STRNAD M, et al. Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(1): 69-80.
- [58] PRIGGE M J, OTSUGA D, ALONSO J M, et al. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in Arabidopsis development[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(1): 61-76.
- [59] MCCONNELL J R, EMERY J, ESHED Y, et al. Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning in shoots[J]. *Nature*, 2001, 411(6838): 709-713.
- [60] GREEN K A, PRIGGE M J, KATZMAN R B, et al. CORONA, a member of the class III homeodomain leucine zipper gene family in Arabidopsis, regulates stem cell specification and organogenesis[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(3): 691-704.
- [61] EMERY J F, FLOYD S K, ALVAREZ J, et al. Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes [J]. *Curr Biol*, 2003, 13 (20): 1768-1774.
- [62] WILLIAMS L, FLETCHER J C. Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8(6): 582-586.
- [63] MALLORY A C, REINHART B J, JONES-RHOADES M W, et al. MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region[J]. *EMBO J*, 2004, 23(16): 3356-3364.
- [64] LIU Q, YAO X, PI L, et al. The ARGONAUTE10 gene modulates shoot apical meristem maintenance and establishment of leaf polarity by repressing miR165/166 in Arabidopsis[J]. *Plant J*, 2009, 58(1): 27-40.
- [65] MOUSSIAN B, SCHOOF H, HAECKER A, et al. Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis [J]. *EMBO J*, 1998, 17(6): 1799-1809.
- [66] LYNN K, FERNANDEZ A, AIDA M, et al. The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in Arabidopsis development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene [J]. *Development*, 1999, 126 (3): 469-481.
- [67] MCCONNELL J R, BARTON M K. Effects of mutations in the PINHEAD gene of Arabidopsis on the formation of shoot apical meristems [J]. *Developmental Genetics*, 1995, 16(4): 358-366.
- [68] MALLORY A C, HINZE A, TUCKER M R, et al. Redundant and specific roles of the ARGONAUTE proteins AGO1 and ZLL in development and small RNA-directed gene silencing [J]. *PLoS Genet*, 2009, 5 (9): e1000646.
- [69] ZHU H, HU F, WANG R, et al. Arabidopsis Argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development [J]. *Cell*, 2011, 145(2): 242-256.
- [70] MIYASHIMA S, HONDA M, HASHIMOTO K, et al. A comprehensive expression analysis of the Arabidopsis MICRORNA165/6 gene family during embryogenesis reveals a conserved role in meristem specification and a non-cell-autonomous function [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(3): 375-384.
- [71] TUCKER M R, HINZE A, TUCKER E J, et al. Vascular signalling mediated by ZWILLE potentiates WUSCHEL function during shoot meristem stem cell development in the Arabidopsis embryo [J]. *Development*, 2008, 135 (17): 2839-2843.
- [72] SONG J B, HUANG S Q, DALMAY T, et al. Regulation of leaf morphology by microRNA394 and its target LEAF CURLING RESPONSIVENESS [J]. *Plant Cell Physiol*, 2012, 53(7): 1283-1294.
- [73] KNAUER S, HOLT A L, RUBIO-SOMOZA I, et al. A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the Arabidopsis shoot meristem [J]. *Dev Cell*, 2013, 24(2): 125-132.
- [74] 陈晓亚, 薛红卫. 植物生理与分子生物学 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2012: 424-439.
- [75] KAYA H, SHIBAHARA K I, TAOKA K I, et al. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in Arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems [J]. *Cell*, 2001, 104(1): 131-142.
- [76] TAKEDA S, TADELE Z, HOFMANN I, et al. BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in Arabidopsis [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(7): 782-793.
- [77] GUYOMARC'H S, VERNOUX T, TRAAS J, et al. MGOUN3, an Arabidopsis gene with tetratricopeptide-repeat-related motifs, regulates meristem cellular organization [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55(397): 673-684.
- [78] SUZUKI T, INAGAKI S, NAKAJIMA S, et al. A novel

- Arabidopsis gene *TONSOKU* is required for proper cell arrangement in root and shoot apical meristems[J]. Plant J, 2004, 38(4): 673-684.
- [79] SHEN W H, XU L. Chromatin remodeling in stem cell maintenance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Plant, 2009, 2(4): 600-609.
- [80] KWON C S, CHEN C, WAGNER D. WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by *SPLAYED* in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis* [J]. Genes Dev, 2005, 19(8): 992-1003.
- [81] HAN P, LI Q, ZHU Y X. Mutation of *Arabidopsis BARD1* causes meristem defects by failing to confine *WUSCHEL* expression to the organizing center [J]. Plant Cell, 2008, 20(6): 1482-1493.
- [82] CLARK S E, JACOBSEN S E, LEVIN J Z, et al. The *CLAVATA* and *SHOOT MERISTEMLESS* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis* [J]. Development, 1996, 122(5): 1567-1575.
- [83] BARTON M K, POETHIG R S. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant [J]. Development, 1993, 119(3): 823-831.
- [84] ENDRIZZI K, MOUSSIAN B, HAECKER A, et al. The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE* [J]. Plant J, 1996, 10(6): 967-979.
- [85] GALLOIS J L, WOODWARD C, REDDY G V, et al. Combined *SHOOT MERISTEMLESS* and *WUSCHEL* trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis* [J]. Development, 2002, 129(13): 3207-3217.
- [86] LONG J A, MOAN E I, MEDFORD J I, et al. A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis* [J]. Nature, 1996, 379(6560): 66-69.
- [87] HAKE S, VOLLBRECHT E, FREELING M. Cloning *Knotted*, the dominant morphological mutant in maize using *Ds2* as a transposon tag [J]. EMBO J, 1989, 8(1): 15-22.
- [88] LONG J A, BARTON M K. The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis* [J]. Development, 1998, 125(16): 3027-3035.
- [89] LINCOLN C, LONG J, YAMAGUCHI J, et al. A *knotted1*-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants [J]. Plant Cell, 1994, 6(12): 1859-1876.
- [90] LUCAS W J, BOUCHE-PILLON S, JACKSON D P, et al. Selective trafficking of *KNOTTED1* homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata [J]. Science, 1995, 270(5244): 1980-1983.
- [91] KIM J Y, YUAN Z, CILIA M, et al. Intercellular trafficking of a *KNOTTED1* green fluorescent protein fusion in the leaf and shoot meristem of *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(6): 4103-4108.
- [92] KIM J Y, YUAN Z, JACKSON D. Developmental regulation and significance of *KNOX* protein trafficking in *Arabidopsis* [J]. Development, 2003, 130(18): 4351-4362.
- [93] KIM J Y, RIM Y, WANG J, et al. A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the *KNOX* homeodomain is necessary and sufficient for intercellular protein and mRNA trafficking [J]. Genes Dev, 2005, 19(7): 788-793.
- [94] LEE C. A *WUSCHEL*-independent stem cell specification pathway is repressed by *PHB*, *PHV* and *CNA* in *Arabidopsis* [D]. Ann Arbor: University of Michigan, 2014: 10-11.
- [95] BYRNE M E, BARLEY R, CURTIS M, et al. *Asymmetric leaves1* mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis* [J]. Nature, 2000, 408(6815): 967-971.
- [96] BYRNE M E, SIMOROWSKI J, MARTIENSSEN R A. *ASYMMETRIC LEAVES 1* reveals *knox* gene redundancy in *Arabidopsis* [J]. Development, 2002, 129(8): 1957-1965.
- [97] IWAKAWA H, UENO Y, SEMIARTI E, et al. The *ASYMMETRIC LEAVES 2* 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 [J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43(5): 467-478.
- [98] ORI N, ESHED Y, CHUCK G, et al. Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot [J]. Development, 2000, 127(24): 5523-5532.
- [99] SEMIARTI E, UENO Y, TSUKAYA H, et al. The *ASYMMETRIC LEAVES 2* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates formation of a symmetric lamina, establishment of venation and repression of meristem-related homeobox genes in leaves [J]. Development, 2001, 128(10): 1771-1783.
- [100] XU L, XU Y, DONG A, et al. Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES 1* and *2* and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity [J]. Development, 2003, 130(17): 4097-4107.
- [101] HA C M, JUN J H, FLETCHER J C. Shoot apical me-

- ristem form and function[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 91(99):103-140.
- [102] PHELPS-DURR T L, THOMAS J, VAHAB P, et al. Maize rough sheath 2 and its Arabidopsis orthologue ASYMMETRIC LEAVES 1 interact with HIRA, a predicted histone chaperone, to maintain *knox* gene silencing and determinacy during organogenesis[J]. *Plant Cell*, 2005, 17(11):2886-2898.
- [103] RIOU-KHAMLICHI C, HUNTLEY R, JACQMARD A, et al. Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin[J]. *Science*, 1999, 283(5407):1541-1544.
- [104] RICHARDS D E, KING K E, AIT-ALI T, et al. How gibberellin regulates plant growth and development; a molecular genetic analysis of gibberellin signaling[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52(4):67-88.
- [105] JASINSKI S, PIAZZA P, CRAFT J, et al. KNOX action in Arabidopsis is mediated by coordinate regulation of cytokinin and gibberellin activities[J]. *Curr Biol*, 2005, 15(17):1560-1565.
- [106] YANAI O, SHANI E, DOLEZAL K, et al. Arabidopsis KNOX1 proteins activate cytokinin biosynthesis[J]. *Curr Biol*, 2005, 15(17):1566-1571.
- [107] FRUGIS G, GIANNINO D, MELE G, et al. Overexpression of *KNAT1* in lettuce shifts leaf determinate growth to a shoot-like indeterminate growth associated with an accumulation of isopentenyl-type cytokinins[J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(4):1370-1380.
- [108] CHEN H, BANERJEE A K, HANNAPEL D J. The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of *ga20ox1* [J]. *Plant J*, 2004, 38(2):276-284.
- [109] SAKAMOTO T, KAMIYA N, UEGUCHI-TANAKA M, et al. KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem[J]. *Genes Dev*, 2001, 15(5):581-590.
- [110] HAY A, KAUR H, PHILLIPS A, et al. The gibberellin pathway mediates KNOTTED1-type homeobox function in plants with different body plans [J]. *Curr Biol*, 2002, 12(18):1557-1565.
- [111] BIRNBAUM K, SHASHA D E, WANG J Y, et al. A gene expression map of the Arabidopsis root [J]. *Science*, 2003, 302(5652):1956-1960.
- [112] BRADY S M, ORLANDO D A, LEE J Y, et al. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns [J]. *Science*, 2007, 318(5851):801-806.
- [113] YADAV R K, TAVAKKOLI M, XIE M, et al. A high-resolution gene expression map of the Arabidopsis shoot meristem stem cell niche[J]. *Development*, 2014, 141(13):2735-2744.

Research Progresses of the Regulatory Mechanism of the Shoot Apical Stem Cell in Arabidopsis

CUI Yuchao, CHEN Liang*

(Xiamen Key Laboratory for Plant Genetics, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: The shoot apical stem cell is a pool of pluripotent cell in the apex of the plant, which is the source of the whole parts above the ground. The stem cell divides to produce two daughter cells. One can renew itself, and the other can form the organ promordia for proliferation. At last the stem cell stabilizes in homeostasis, which can maintain plant development even up to a thousand years. Modern molecular biology and genetics have indicated that the homeostasis is regulated exactly by various factors from stem cell niche. The key pathway among the network is the negative feedback loop between the *WUSCHEL* (*WUS*) gene and the *CLAVATA* (*CLV*) gene. Other biological factors, such as cytokinin, the moved small RNAs and the epigenetics effects, play a role on this loop eventually. Besides, the *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) signaling pathway, which is parallel to the *WUS-CLV* loop, plays a positive role in stem cell maintenance. This article mainly reviewed the latest research progresses on the molecular mechanism of stem cell maintenance in model plant Arabidopsis.

Key words: stem cell maintenance; *WUS-CLV*; cytokinin; small RNAs; epigenetics; *STM*