

· 专题论坛 ·

## WOX蛋白家族调控干细胞发育分子机制的研究进展

于燕杰, 张大兵, 袁政\*

上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240

**摘要** WOX蛋白家族是植物特有的一类转录因子家族, 是植物胚胎建成、干细胞维持和器官发生等发育过程中的重要调控因子。越来越多的研究表明, 作为干细胞维持的关键因子之一, WOX蛋白家族通过相似或特异的调控网络参与植物初生分生组织(茎尖和根尖分生组织)和次生分生组织(维管分生组织)等各级干细胞的维持和分化。该文综述了近年来WOX蛋白家族调控干细胞发育分子机制的研究进展, 并对其在单、双子叶植物中功能的保守性进行了比较和分析。

**关键词** 分生组织, 干细胞维持, WOX, CLE-WOX调控途径

于燕杰, 张大兵, 袁政 (2016). WOX蛋白家族调控干细胞发育分子机制的研究进展. 植物学报 51, 565–574.

植物体器官是不同分生组织细胞通过不断分裂分化形成的。茎尖分生组织细胞分化产生茎、叶和花; 根尖分生组织分化形成地下根系统; 形成层分生组织的不断分化使植物体壁变厚、茎变粗 (Scheres, 2007)。植物干细胞是存在于植物分生组织中未分化的细胞, 它分裂产生的子细胞, 一部分用于干细胞的自我维持, 另一部分参与植物体器官的发生 (Aichinger et al., 2012)。越来越多的实验证明, 干细胞的自我维持和多向分化的动态平衡过程受一系列具有时空特异性表达特征的干细胞发育调控基因的精细调控 (Perales and Reddy, 2012)。生长素和细胞分裂素等植物激素信号, 以及 *STM* (*SHOOT MERISTEMLESS*)、*PLT* (*PLETHORA*) 和 *WUS* (*WUSCHEL*) 等几类转录因子均在调控体内干细胞分裂和分化的平衡过程中起重要作用 (Schoof et al., 2000; Dinneny and Benfey, 2008; Veit, 2009)。

WOX (*WUSCHEL RELATED-HOMEOBOX*) 蛋白家族是真核生物转录因子同源框 (*homeobox*) 大家族中植物特有的1个亚支, 含有1个保守的由65个氨基酸组成的DNA结合域, 即同源异型结构域 (*homeodomain*) (van der Graaff et al., 2009)。生物信息学分析表明, 卷柏属 (*Selaginella*) 植物、苔藓植物 (*Bryophyta*) 和绿藻 (*Chlorophyta*) 的基因组中都含有WOX家族同源序列, 但在红藻 (*Rhodophyta*) 基因

组中未发现WOX成员的存在, 说明WOX家族可能起源于绿藻 (Mukherjee et al., 2009; Lian et al., 2014)。Haecker等 (2004) 通过对拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、矮牵牛 (*Petunia hybrida*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 4个物种中含有WOX家族特有同源异型结构域的序列进行系统进化分析, 发现WOX家族分为3支。进化支/WUS支包括WUS和WOX1–WOX7; 中间支包括WOX8、WOX9、WOX11和WOX12; 古老支包括WOX10、WOX13和WOX14 (Haecker et al., 2004)。Lian等 (2014) 通过对50种植物中350个WOX基因的生物信息学分析发现, 低等植物中的WOX成员仅来自古老支; 进化支的WOX成员仅存在于高等植物中; 中间支在维管植物中开始出现。该研究暗示中间支和进化支可能是经过古老支成员复制和分化形成的。对WOX成员结构特征的研究显示, 进化支成员含有特异的WUS盒 (T-L-X-L-F-P-X-X, 其中X代表任意一个氨基酸) (Haecker et al., 2004)。WUS盒是WUS调控茎尖分生组织干细胞平衡和参与花分生组织形态建成必不可少的元件 (Ikeda et al., 2009)。在WUS、WOX5和WOX7蛋白的C末端存在EAR域 ([LVI]-X-[LVI]-X-[LVI], 其中X代表任意一个氨基酸), 它可能行使转录因子对目标基因的转录抑制功能 (van der Graaff et al., 2009)。生物信息学分析显示, 拟南芥基因组中有15个WOX家族成

收稿日期: 2015-08-03; 接受日期: 2015-10-13

基金项目: 国家自然科学基金 (No.31470397, No.J1210047, No.91417311)、上海市科委基础研究重大重点项目 (No.14JC1403901) 和上海市教育委员会科研创新项目 (No.13ZZ018)

\* 通讯作者。E-mail: zyuan@sjtu.edu.cn

员, 水稻基因组中含有13个WOX家族成员(Haecker et al., 2004; van der Graaff et al., 2009; Zhang et al., 2010)。对WOX家族基因功能的研究起始于对拟南芥茎发育突变体的筛选。研究者从2个隐性等位突变体 *wus-1* 和 *wus-2* 中克隆到 *WUS* 基因, 突变体 *wus-1* 在营养生长阶段茎的生长延迟, 在生殖生长阶段花器官内轮只产生1个花药(Laux et al., 1996)。同类表型突变体的筛选和基因功能研究显示, WOX家族基因除了参与茎尖分生组织干细胞的维持, 还参与高等植物根尖分生组织和维管分生组织中干细胞的维持。本文阐述了WOX家族基因参与调控植物不同分生组织的分子机制, 通过对比拟南芥和水稻中WOX功能的异同来阐明WOX功能的保守性, 以期为进一步揭示WOX的功能和植物干细胞调控的分子机制提供思路。

## 1 WOX家族基因调控茎尖分生组织的发育

茎尖分生组织在胚胎建成过程中形成, 与子叶、下胚轴和胚根一起共同构成植物体的基本结构, 是植物体

地上器官发育的源泉(Jürgens et al., 1994)。根据细胞衍生关系, 细胞组织学说将茎尖分生组织分为3个区域: 位于最顶端的中央区、中央区正下方的肋区和分生组织两侧的周围组织区(图1A) (Steeves and Sussex, 1989)。中央区主要由干细胞组成, 干细胞经分裂产生的子细胞除用于自我维持外, 一部分向周围组织区域运输, 发育成叶或花原基; 另一部分向下运输进入肋区, 为茎生长提供细胞支持(Laux et al., 1996)。

近19年的遗传学和分子生物学研究证实, 拟南芥茎尖分生组织干细胞维持和分化的动态平衡主要是通过WUSCHEL-CLAVATA反馈环来调控(图1B) (Schoof et al., 2000)。CLAVATA (包括CLV1、CLV2和CLV3)基因在植物中起到促进干细胞分化和器官起始的作用。CLV基因突变会导致干细胞的积累、茎尖分生组织一定程度的膨大和侧生器官起始的延迟。CLV1编码1个受体激酶, 在整个中央区均有表达(Andrianov et al., 1993)。CLV2编码1个带亮氨酸重复却缺乏激酶域的受体类蛋白, 在茎尖分生组织各区域中均有表达(Jeong et al., 1999)。CLV3编码1个分泌的多肽分子, 其成熟片段含有12或13个氨基酸, 它

图1 WOX家族基因参与调控拟南芥和水稻茎尖及根尖分生组织发育的分子网络示意图(改自Gailloch et al., 2015)

(A) 植物茎尖分生组织结构; (B) 拟南芥茎尖分生组织调控网络: *WUS*在组织中心特异表达, *WUS*蛋白经过胞间连丝结构运输到中央区直接与CLV3启动子或者调控元件结合促进CLV3的表达; CLV3在中央区特异表达, CLV3小肽主要通过受体激酶CLV1和BAM1结合传递信号, 抑制WUS表达, CLV3小肽也可以通过受体激酶RPK2结合传递信号, 抑制WUS表达; (C) 水稻茎尖分生组织调控网络: *FCP1*和*OsWOX4*在茎尖分生组织中表达区域重合, *FCP1*分泌的小肽可能通过未知的受体传递信号, 抑制*OsWOX4*的表达; (D) 植物根尖分生组织结构; (E) 拟南芥根尖分生组织调控网络(左): 在远端中柱细胞特异表达的*CLE40*分泌的小肽通过与在远端中柱细胞起始细胞(根尖干细胞)特异表达的受体激酶ACR4结合传递信号, 抑制静止中心标志基因*WOX5*的表达; 拟南芥静止中心调控(右): ROW1可直接与*WOX5*启动子结合抑制其表达, *WOX5*通过直接与细胞分裂蛋白CYCDs的启动子结合, 抑制细胞分裂蛋白活性, 来维持静止中心较低的分裂速率; (F) 水稻*FCP2*在根尖表达, *FCP2*分泌的小肽可能通过一种未知的受体传递信号, 抑制静止中心标志基因*OsWOX9*的表达

Figure 1 Regulatory networks of WOX family in shoot and root apical meristems of Arabidopsis and rice (modified from Gailloch et al., 2015)

(A) The structure of shoot apical meristem (SAM); (B) The WUSCHEL-CLAVATA feedback loop in Arabidopsis: *WUS* expresses in the organizing center, and *WUS* protein moves symplastically through plasmodesmata to the overlying domain to determinate stem cell fate, *WUS* directly promotes the expression of *CLV3*, which encodes a small secreted peptide that signals through intracellular signal transduction pathways, inducing signaling transduction of CLV1, BAM1 and RPK2 to restrict the expression of *WUS*; (C) *FCP1* and *OsWOX4* express in the SAM, and *FCP1* represses the expression of *OsWOX4* in an unknown pathway; (D) The structure of root apical meristem (RAM); (E) *CLE40* expresses in the columella, then this small secreted peptide combines with ACR4 in the columella to transfer signal and repress the expression of *WOX5*, which expresses specifically in the quiescent center (QC) (left); and involves in the maintenance of the QC (right): in QC, ROW1 specifically binds in the promoter of *WOX5* to repress its transcription, and *WOX5* suppresses QC divisions that are otherwise promoted by CYCDs, in part by represses CYCD's expression directly; (F) *OsWOX9* expresses specifically in the QC and its expression is specially repressed by *FCP2*.

特异地在茎尖分生组织的L1-L3层细胞表达, 是干细胞的标志基因(Fletcher et al., 1999; Lenhard and Laux, 2003)。遗传学和分子生物学分析发现, 在组织中心特异表达的WUS基因通过一种非细胞自主的方式抑制CLV3的表达, 从而控制干细胞属性(Schoof et al., 2000; Lenhard and Laux, 2003)。为探明WUS通过何种机制促进信号肽CLV3在中央区的表达, 研究人员利用带有GFP标记的WUS蛋白进行定位分析, 发现WUS蛋白合成后主要向中央区运输, 但带有核定位信号标记的不能向外运输的WUS蛋白不能互补

wus-1的表型(Yadav et al., 2011)。这表明WUS蛋白在组织中心合成后运输到中央区行使功能。在研究植物特有结构胞间连丝在茎尖干细胞维持中的功能时, 发现WUS蛋白不是通过内吞或者外排的形式完成细胞间的移动, 而是在相关转运蛋白的帮助下主要通过胞间连丝结构完成从组织中心到干细胞区域的移动来维持干细胞的属性, 促进CLV3的表达(Daum et al., 2014)。移动到中央区的WUS蛋白又是如何诱导CLV3的表达呢? 为了回答这一问题, 研究者利用WUS抗体进行ChIP和EMSA实验, 发现WUS可以特

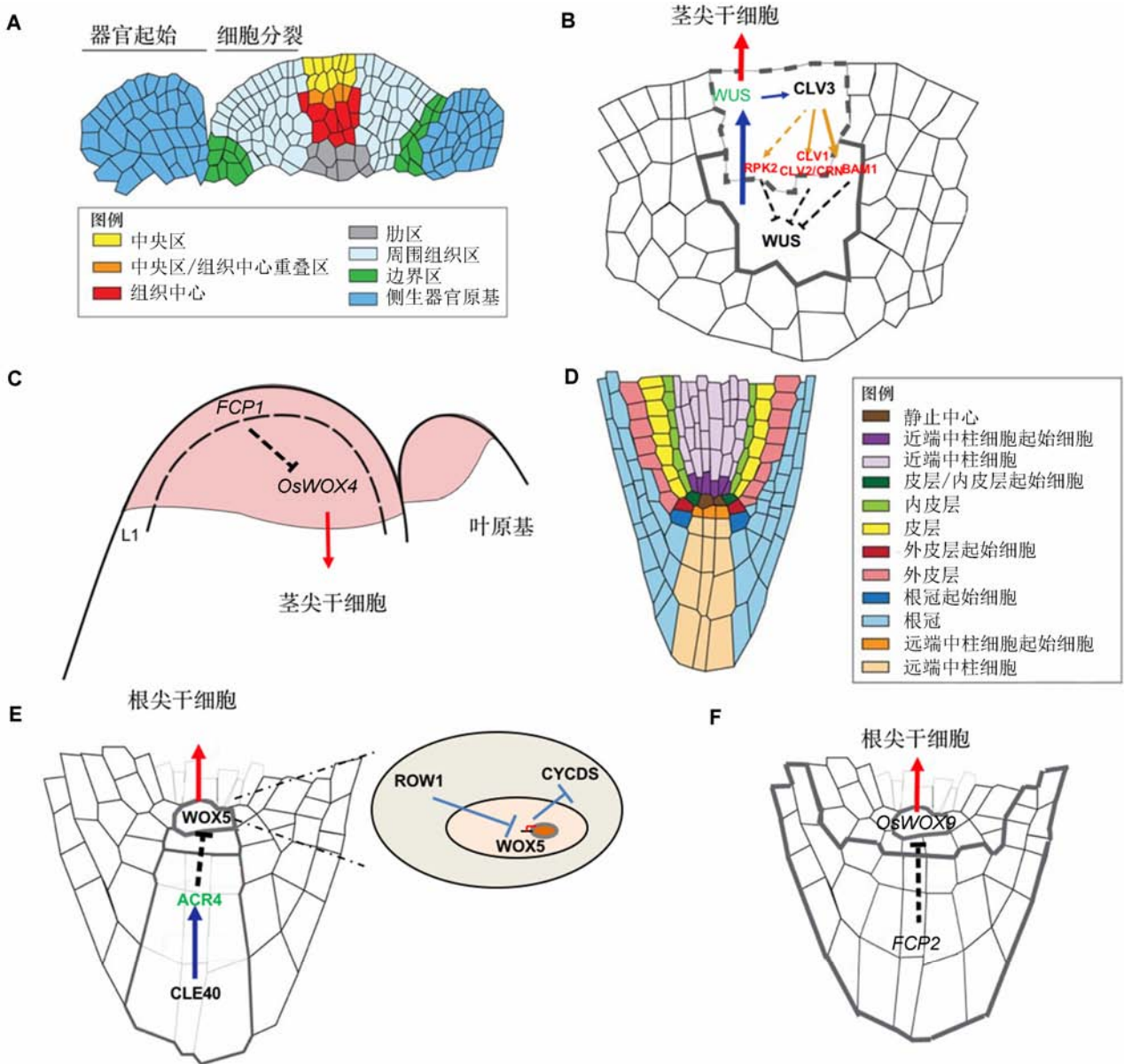


图1  
Figure 1

异地与 *CLV3* 基因序列中3个含有TAAT序列的区域(2段位于 *CLV3* 启动子区, 1段位于 *CLV3* 编码区之后)结合, 激活 *CLV3* 的表达(Yadav et al., 2011)。该研究证明转录因子 *WUS* 可通过直接与 *CLV3* 的启动子或调控区结合进而诱导 *CLV3* 的表达。

另一方面, *WUS* 基因的表达也受到 *CLV3* 基因的负反馈调节(Schoof et al., 2000)。 *CLV3* 分泌产生的信号肽蛋白主要通过3种不同的方式抑制 *WUS* 的表达。(1) 直接与受体激酶 *CLV1* 结合传递信号抑制 *WUS* 的表达(Ogawa et al., 2008)。(2) 缺乏激酶域的 *CLV2* 通过与跨膜激酶 *CORYNE* (*CRN*) 互作形成异源二聚体来传递信号(Bleckmann et al., 2010)。后续研究表明 *CRN* 是一种假激酶, 并不能独立参与多肽的信号传递(Nimchuk et al., 2011)。 *CLV2* 可能仍是通过与 *CLV1* 互作来传递信号。(3) 一种新发现的受体激酶 *RPK2* 可直接与 *CLV3* 信号肽结合来传递信号, 从而抑制 *WUS* 的表达(Kinoshita et al., 2010)。最新研究表明, *CLV2/CRN* 复合物和 *RPK* 不是小肽激素 *CLV3* 的直接下游, 受体激酶 *BAM1* (*BARELY ANY MERISTEM 1*) 和 *CLV1* 可直接与 *CLV3* 结合, 对 *CLV* 信号的传递起主导作用(Shinohara and Matsubayashi, 2015)。以上几种通路并行作用, 保证了 *CLV3* 信号的传递效率及精细调控干细胞调控因子 *WUS* 表达的时空特异性。但信号通路中受体复合物的直接下游还未找到。该下游靶标的寻找有助于详细阐释 *CLE* (*CLAVATA3/Embryo surrounding region-related*) 蛋白如何通过信号肽与 *WUS* 共同作用维持体内干细胞的平衡。

与双子叶模式植物拟南芥相比, 单子叶模式植物水稻的茎尖分生组织具有相似的结构, 由 *L1-L3* 三层干细胞(其中 *L1* 和 *L2* 为原套层, *L3* 为原体层)组成(Zhang and Yuan, 2014)。水稻 *FON1* (*FLORAL ORGAN NUMBER 1*) 与 *CLV1* 直系同源, *FON4/2* 与 *CLV3* 直系同源, *fon1* 和 *fon2/4* 突变体具有与 *clv* 类突变体相似的表型, 表现为水稻花分生组织增大和花器官数目增多(Suzaki et al., 2004, 2006; Chu et al., 2006), 表明 *CLV* 信号途径在单、双子叶植物中的功能是保守的。为了进一步探明水稻中与 *WUS* 同源的 *OsWUS* 是否具有保守性, 研究人员发现水稻中与 *WUS* 同源的基因是 *OsWOX1*, 营养生殖阶段在叶原基中表达, 生殖生长阶段在花序分生组织的 *L1* 层表达(Nardmann and Werr, 2006)。最新研究表明,

*OsWUS* 参与腋芽的形成(Lu et al., 2015)。 *OsWOX4* 是水稻 *WOX* 家族进化支中的一员, 在茎尖分生组织中表达。在 *RNAi* 干扰 *OsWOX4* 的转基因植株中, 干细胞标志基因 *OSH1* 和 *FON4* 的表达下调, 分生组织分化提前终止(Ohmori et al., 2013)。这表明 *OsWOX4* 参与水稻茎尖干细胞分裂和分化平衡的维持。 *FCP1* (*FON2-like CLE PROTEIN1*) 和 *FCP2* 属于 *CLE* 家族, 过量表达 *FCP1* 转基因植株的表型和干扰 *OsWOX4* 的转基因植株表型类似, 且在 *FCP1* 过表达和 *RNAi* 干扰转基因植株中分别检测到 *OsWOX4* 表达的下调和上调(Ohmori et al., 2013), 表明在水稻茎尖分生组织中很可能存在类似的 *CLE-WOX* 调控途径。 *OsWOX4* 正调控茎尖分生组织干细胞属性, 其表达受到 *CLE* 家族 *FCP1/FCP2* 的负调控(图1C)。但是这一调控途径与拟南芥中的 *CLV-WUS* 反馈环又不完全相同: (1) 水稻中 *OsWOX4* 与 *FCP1* 在茎尖分生组织的表达区域重合, 与 *CLV3*、*WUS* 分别在不同部位表达不同; (2) 在 *RNAi* 干扰 *FCP1/2* 的转基因植株中并没有观察到茎尖分生组织的膨大; (3) *RNAi* 干扰 *FCP1/2* 的转基因植株中叶原基的起始受到影响, 突变体 *clv3* 没有类似的表型。由此可见, 水稻中存在的 *CLE-WOX* 调控途径与拟南芥中的 *CLV-WUS* 反馈环功能不完全相同。对水稻茎尖干细胞维持的分子调控机制的进一步研究将有助于揭示 *WOX* 家族在单、双子叶植物中调控茎尖分生组织的异同。

## 2 *WOX5* 家族基因调控根尖分生组织的发育

与茎尖分生组织不同, 根尖分生组织并不位于根的最前端, 而是由前端的根冠包裹, 它向植物体截然相反的2个方向分裂: 向地部分形成新的根冠细胞, 在根穿过土壤时起保护作用; 背地部分进入伸长区, 使根伸长(van den Berg et al., 1997; Laux, 2003)。根尖分生组织位于根部的分生区, 静止中心位于分生组织的中心, 静止中心外包裹1层根尖干细胞, 排列紧密、分裂活性低且细胞周期长, 是根部所有器官组织的来源, 具有细胞全能性(图1D) (Sarkar et al., 2007)。正是根尖分生组织的不断分裂分化才使得植物的根不断伸长和加粗。

拟南芥 *WOX5* 基因突变导致拟南芥根静止中心

和末端(干)细胞膨大, 干细胞活性丧失(Sarkar et al., 2007)。WOX5和WUS同属于WOX家族进化支, 具有相似的结构和功能域, 但WOX5特异地在根静止中心表达, 抑制根尖干细胞的分化, 维持干细胞的数目恒定(Sarkar et al., 2007)。异位表达WOX5和WUS可分别互补突变体*wus-1*和*wox5-1*中茎尖分生组织和根尖分生组织的缺陷(Sarkar et al., 2007), 表明拟南芥根尖和茎尖分生组织有着相似的分子调控机制。

研究表明, CLE蛋白家族中的CLE40参与根尖分生组织的调控。已检测到CLE40在球状胚中表达, 在成熟根的中柱细胞和末端干细胞中表达, *cle40-2*突变体根变短, 根尖呈现不规则的形状, 远端干细胞分化延迟(Stahl et al., 2009)。ACR4在中柱干细胞特异表达, 是一种受体类激酶(De Smet et al., 2008), *acr4*突变体远端干细胞分化延迟。在突变体*cle40-2*和*acr4*中均检测到WOX5的表达区域增大, 暗示CLE40和ACR4可能在一条调控通路上抑制WOX5的表达。对*acr4*突变体外源施加CLE40蛋白, 其干细胞延迟发育有轻微改善, 暗示ACR4可能作为CLE40的受体参与其信号转导。外源施加CLE40蛋白的野生型植株中, ACR4的表达明显上调, WOX5的表达位置也发生偏移, 表明CLE40分泌的多肽可以通过受体ACR4进行转导, 进而抑制WOX5的表达, 促进干细胞分化(图1E) (Stahl et al., 2009)。由此可见, 拟南芥根中同样存在CLE-WOX调控途径。与CLV3在干细胞层表达不同, CLE40在分化的中柱细胞中表达, 说明尽管茎尖分生组织和根尖分生组织存在类似的调控通路, 但是其作用的分子机制不尽相同。

除了维持根尖干细胞的属性, WOX5还参与静止中心的形成和维持(Forzani et al., 2014; Zhang et al., 2015)。最新研究表明, 2种D型细胞周期蛋白CYCD3;3和CYCD1;1与WOX5一起促进细胞分裂, 抑制干细胞的分化, 参与根尖干细胞的调控。在静止中心, WOX5通过与CYCDs基因启动子结合, 抑制CYCDs的表达, 来保持静止中心较低的分裂速率(Forzani et al., 2014)。在研究茎尖分生组织的调控网络时发现ROW1 (REPRESSOR OF WUSCHEL1)主要作为WUS的抑制子行使功能(Han and Zhu, 2009)。随后的分析表明, *row1-3*突变体产生极短的根, 静止中心标志基因SCR (SCARECROW)不在根

中表达, 表明该突变体中的静止中心缺失。*wox5-1row1-3*双突变互补了*row1-3*的表型。在突变体*row1-3*中干扰WOX5的表达, 同样修复了*row1-3*的表型, 表明WOX5处于ROW1的遗传上位。ROW1在静止中心的异位表达可抑制WOX5的表达, 导致类*wox5-1*突变体的表型。ChIP实验进一步证明, ROW1可以与WOX5的启动子结合来抑制其表达, 维持静止中心的属性(Zhang et al., 2015)。由此可见, WOX5通过抑制细胞分裂蛋白CYCDs的活性来维持静止中心属性, 同时又受ROW1的调控。在拟南芥静止中心的维持过程中, 存在着ROW1-WOX5-CYCDs调控通路(图1E)。

与拟南芥相比, 水稻根尖分生组织具有类似的组织结构, 水稻中是否有WOX成员参与根尖分生组织的调控尚不清楚。研究表明, 与AtWOX5直系同源的基因QHB (*OsWOX9/QUIESCENT-CENTER-SPECIFIC HOMEBOX*)保守地在水稻中维持根尖干细胞的平衡(Kamiya et al., 2003; Chu et al., 2013)。在水稻中过表达*OsWOX9*和*AtWUS*均导致不能形成根冠, 而能形成多茎和畸形叶。表达模式分析显示, *OsWOX9*特异地在静止中心表达, 参与根尖干细胞的特化和平衡维持。在研究CLE多肽类激素调控干细胞发育的过程中, 发现CLE家族中的FCP2p (*FON2-LIKE CLE PROTEIN2*)在根尖特异表达(Ohmori et al., 2013)。外源施加FCP2p蛋白或FCP2的过表达均导致水稻根尖分生组织分化提前终止, 此时*OsWOX9*的表达量下降(Chu et al., 2013)。而*OsWOX9*的过表达植株则对FCP2蛋白处理不敏感。这些证据表明FCP2通过负调控*OsWOX9*的表达参与调控根尖分生组织, 水稻根尖分生组织的调控也存在CLE-WOX调控途径(图1F)。但水稻根中这一调控通路的证据还很少, CLE蛋白是通过哪种受体传递信号还需要进一步研究。对其分子机制的揭示有利于我们进一步理解根尖分生组织和茎尖分生组织中干细胞分子调控机制的异同。

### 3 WOX家族基因调控维管分生组织的发育

侧生分生组织(维管分生组织)在植物体的二次发育中起到至关重要的作用。草本植物的维管束由外向内依次由韧皮部、维管分生组织和木质部组成(图2), 它不

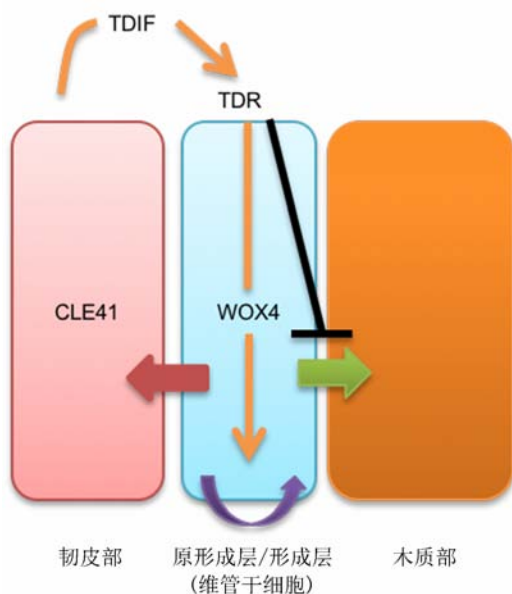


图2 WOX4参与拟南芥维管分生组织的调控(改自Hirakawa et al., 2010)

Figure 2 WOX4 is involved in the regulation of vascular meristem in Arabidopsis (modified from Hirakawa et al., 2010)

仅为植物提供了物理支撑,还负责植物体内水分、养料和信号分子的传输。研究表明,在维管分生组织干细胞分裂分化的平衡调控中同样存在CLE-WOX调控途径。WOX4与WUS和WOX5一样同属于进化支。GUS染色和原位杂交实验表明,WOX4主要在维管分生组织中表达。在拟南芥中,WOX4的RNAi干扰转基因植株矮小,韧皮部和木质部萎缩,未分化的组织增多。在番茄中过表达*SlWOX4*导致韧皮部和木质部增多。这表明WOX4具有促进维管干细胞分裂分化的功能(Hirakawa et al., 2010; Ji et al., 2010)。CLE41是CLE家族成员,其分泌蛋白TDIF (tracheary element differentiation inhibitory factor)与受体激酶PXY (PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM)互作形成的蛋白复合体会促进WOX4的表达,进而促进干细胞的分裂分化(Hirakawa et al., 2010)。最新研究显示,与CLE41同一个家族的CLE44也可以分泌TDIF蛋白并行使同样的功能(Ito et al., 2006; Etchells et al., 2013)。WOX家族的WOX14和WOX4均是TDIF-PXY通路的下游靶标,冗余地调控维管干细胞的分裂分化

(Etchells et al., 2013),形成CLE41/CLE44-PXY-WOX4/WOX14调控通路(图2)。进一步研究表明,在外源施加TDIF蛋白的突变体*wox4-1*中观察到几乎与野生型一样的间断的木质部条带,但是在突变体*tdr-1*或者*tdr-1wox4-1*中外源施加TDIF蛋白只观察到连续的木质部条带,表明WOX4并没有抑制维管分生组织向木质部的分化,只是影响了干细胞的分裂。在TDIF-PXY调控通路下游出现分支,一条通路通过WOX4促进维管干细胞分裂;另一条通路则通过一种未知途径抑制干细胞向木质部的分化(Hirakawa et al., 2010)。

尽管单子叶模式植物水稻维管束中没有像双子叶植物中那样明显的(原)形成层/维管分生组织,但是与*AtWOX4*直系同源的*OsWOX4*在木质部和韧皮部交界处特异表达(Yoo et al., 2013)。WOX4类基因在维持维管分生组织分裂分化平衡中可能存在类似的调控网络。进一步探索*OsWOX4*在水稻维管分生组织中的作用机制将有利于阐释WOX4类基因在植物维管组织中是否存在保守的功能。

#### 4 研究展望

植物特有的WOX蛋白家族在植物体生长发育过程中的作用不可或缺,WOX成员通过特化干细胞属性维持分生组织动态平衡来参与植物体发育的各个过程,这些功能都与它促进细胞分裂和(或)抑制细胞分化密切相关。现有的研究显示,在植物各级分生组织干细胞维持方面,存在相对保守的CLE-WOX调控途径,但又有所不同。(1)在茎尖分生组织中,CLE-WOX调控是在组织中心和未分化的干细胞之间进行;在根尖和维管分生组织中,CLE-WOX调控则是在分化的中柱细胞(韧皮部细胞)和干细胞之间进行;(2)在维管分生组织中,WOX4受到CLE蛋白的正调控,而在茎尖分生组织和根尖分生组织中,WUS (WOX5)受到CLE蛋白的负调控。在维持干细胞体内平衡方面,WOX家族和CLE蛋白家族功能都是非常保守的。在各级分生组织中,CLE-WOX调控途径的差异是由于各分生组织结构上的差异还是WOX家族和CLE蛋白家族成员功能的分化还需进一步研究。

除了参与各级分生组织的调控,WOX家族成员在植物胚胎建成和器官形成等方面也均起到重要的

表1 水稻中WOX家族基因的功能总结

Table 1 The summary of WOX gene family function in rice

基因	编号	分支	在已发表文章中 的命名(别名)	其它物种中的 同源基因	表达区域	主要功能	参考文献
OsWOX1	LOC_Os04 g56780	进化支	MOC3	拟南芥WUS	主要在地上部分、 愈伤组织和幼穗 中表达, 在成熟 器官中表达较低	对腋芽的形成是必 需的, 并与细胞分裂 素有着复杂的关系	Lu et al., 2015
OsWOX2	LOC_Os05 g02730	进化支	WOX3; GLR1; OsWOX3B; NUDA/GL	玉米NS1 ( <i>nar- row sheath 1</i> )、 NS2和拟南芥 PRS ( <i>PRESSED FLOWER</i> )	叶原基、幼叶和 生殖器官	叶毛发育	Dai et al., 2007; Li et al., 2012; Zhang et al., 2012
OsWOX3	LOC_Os11 g01130 LOC_Os12 g01120	进化支	NAL2/3; OsWOX3A		在叶片和叶鞘的 大小维管束鞘(尤 其是韧皮组织)、 茎基部以及根的 维管柱中表达	叶片的横轴生长和 维管束形成, 小穗的 内外稃形态建成以 及分蘖和侧根发育 及根毛形成	Cho et al., 2013; Yoo et al., 2013
OsWOX4	LOC_Os04 g55590	进化支	无	拟南芥WOX4	在地上各分生组 织中广泛表达	营养生长阶段茎尖 分生组织的维持; 与 细胞分裂素作用相 关	Ohmori et al., 2013
OsWOX5	LOC_Os01 g62310	进化支	无	未知	未知	未知	
OsWOX6	LOC_Os03 g20910	中间支	无	未知	未知	未知	
OsWOX7	LOC_Os01 g47710	中间支	DWT1	未知	在幼穗中强表达	参与分蘖发育; 与穗 型相关	Wang et al., 2013, 2014
OsWOX8	LOC_Os01 g60270	古老支	无	未知	未知	未知	
OsWOX9	LOC_Os01 g63510	进化支	QHB	拟南芥WOX5	特异地在根尖组 织中心表达	根尖分生组织的维 持	Kamiya et al., 2003; Chu et al., 2013
OsWOX9C	LOC_Os05 g48990	中间支	无	未知	未知	未知	
OsWOX10	LOC_Os08 g14400	中间支	无	未知	未知	未知	
OsWOX11	LOC_Os07 g48560	中间支	无	未知	冠根萌发时表达; 成熟根的分裂区	在冠根发育时期直 接抑制RR2, 以调节 细胞增殖	Zhao et al., 2009

调控作用。在拟南芥中, WOX2参与胚顶部细胞的特化(Haecker et al., 2004); WOX8在合子的极性分裂中行使功能(Haecker et al., 2004); WOX3参与调控花侧生器官的生长(Matsumoto and Okada, 2001; Shimizu et al., 2009)。水稻WOX成员的功能详见表1。OsWOX11与水稻不定根形成相关(Dai et al., 2007); OsWOX7参与调控水稻居间分生组织(Wang et al., 2014)。在矮牵牛中, MAW (MAEWEST)参与花瓣、

心皮融合和侧生叶子的生长。由此拟南芥中与其同源的AtWOX1的功能也被揭示: 和AtWOX3一起冗余地调控侧生器官生长(Vandenbussche et al., 2009)。在蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中, WOX家族成员STF (STENOFOLIA)在叶缘通过招募共抑制子Mt-TPL (TOPLESS)家族成员抑制Mt-AS2 (ASYMMETRIC LEAVES2)的表达, 促进叶片生长; 在WUS支, STF盒和WUS盒在WOX成员行使抑制功能时共

同起作用, WOX-TPL共抑制机制可能是一种非常保守的机制(Zhang et al., 2014)。在白杨(*Populus tomentosa*)中, 与 *OsWOX11* 同源的 *PeWOX11a* 及 *PeWOX11b* 与不定根形成相关。拟南芥中并不存在不定根, 与 *OsWOX11* 同源的 *AtWOX11* 和 *AtWOX12* 的功能需要进一步研究。对未知WOX成员功能的研究将丰富我们对WOX家族功能的认识。

综上所述, 不同物种的WOX成员在进化过程中出现了不同程度的亚功能化和新功能化, 这与物种间不同的组织结构和内部环境有关, 对不同物种间同种基因的功能进行深入研究是非常必要的。TALEN和CRISPR等定点敲除技术的出现大大加快了构建突变体的速度, 也使得我们对不同物种间同源基因功能进行研究更加便捷。可以预见, 在新技术的帮助下, 通过不同物种间WOX成员功能的比较, 我们会在不久的将来对WOX家族成员的功能、保守性和进化机制有一个更全面清晰的认识。

## 参考文献

- Aichinger E, Kornet N, Friedrich T, Laux T (2012). Plant stem cell niches. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 615–636.
- Andrianov GN, Akoev GN, Braun HA, Ryzhova IV, Voigt KH, Sherman NO (1993). Actions of dalargin upon single unit activity in the ampullae of Lorenzini of the skate *Raja clavata*. *Neuroreport* **4**, 53–54.
- Bleckmann A, Weidtkamp-Peters S, Seidel CA, Simon R (2010). Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiol* **152**, 166–176.
- Cho SH, Yoo SC, Zhang H, Pandeya D, Koh HJ, Hwang JY, Kim GT, Paek NC (2013). The rice *narrow leaf2* and *narrow leaf3* loci encode WUSCHEL-related homeobox 3A (*OsWOX3A*) and function in leaf, spikelet, tiller and lateral root development. *New Phytol* **198**, 1071–1084.
- Chu H, Liang W, Li J, Hong F, Wu Y, Wang L, Wang J, Wu P, Liu C, Zhang Q, Xu J, Zhang D (2013). A CLE-WOX signaling module regulates root meristem maintenance and vascular tissue development in rice. *J Exp Bot* **64**, 5359–5369.
- Chu H, Qian Q, Liang W, Yin C, Tan H, Yao X, Yuan Z, Yang J, Huang H, Luo D, Ma H, Zhang D (2006). The *FLORAL ORGAN NUMBER4* gene encoding a putative ortholog of Arabidopsis *CLAVATA3* regulates apical meristem size in rice. *Plant Physiol* **142**, 1039–1052.
- Dai M, Hu Y, Zhao Y, Liu H, Zhou DX (2007). A WUSCHEL-LIKE HOMEBOX gene represses a YABBY gene expression required for rice leaf development. *Plant Physiol* **144**, 380–390.
- Daum G, Medzihradzky A, Suzaki T, Lohmann JU (2014). A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 14619–14624.
- De Smet I, Vassileva V, De Rybel B, Levesque MP, Grunewald W, Van Damme D, Van Noorden G, Naudts M, Van Isterdael G, De Clercq R, Wang JY, Meuli N, Vanneste S, Friml J, Hilson P, Jurgens G, Ingram GC, Inze D, Benfey PN, Beeckman T (2008). Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the Arabidopsis root. *Science* **322**, 594–597.
- Dinneny JR, Benfey PN (2008). Plant stem cell niches: standing the test of time. *Cell* **132**, 553–557.
- Etchells JP, Provost CM, Mishra L, Turner SR (2013). WOX4 and WOX14 act downstream of the PXY receptor kinase to regulate plant vascular proliferation independently of any role in vascular organisation. *Development* **140**, 2224–2234.
- Fletcher JC, Brand U, Running MP, Simon R, Meyerowitz EM (1999). Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in Arabidopsis shoot meristems. *Science* **283**, 1911–1914.
- Forzani C, Aichinger E, Sornay E, Willemsen V, Laux T, Dewitte W, Murray JA (2014). WOX5 suppresses *CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr Biol* **24**, 1939–1944.
- Haecker A, Gross-Hardt R, Geiges B, Sarkar A, Breuninger H, Herrmann M, Laux T (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**, 657–668.
- Han P, Zhu YX (2009). BARD1 may be renamed ROW1 because it functions mainly as a REPRESSOR OF WUSCHEL1. *Plant Signal Behav* **4**, 52–54.
- Hirakawa Y, Kondo Y, Fukuda H (2010). TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**, 2618–2629.
- Ikeda M, Mitsuda N, Ohme-Takagi M (2009). Arabidopsis WUSCHEL is a bifunctional transcription factor that acts as a repressor in stem cell regulation and as an activator in floral patterning. *Plant Cell* **21**, 3493–3505.
- Ito Y, Nakanomyo I, Motose H, Iwamoto K, Sawa S, Dohmae N, Fukuda H (2006). Dodeca-CLE peptides as

- suppressors of plant stem cell differentiation. *Science* **313**, 842–845.
- Jeong S, Trotochaud AE, Clark SE** (1999). The Arabidopsis *CLAVATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the *CLAVATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* **11**, 1925–1934.
- Ji J, Strable J, Shimizu R, Koenig D, Sinha N, Scanlon MJ** (2010). WOX4 promotes procambial development. *Plant Physiol* **152**, 1346–1356.
- Jürgens G, Torres-Ruiz R, Laux T, Mayer U, Berleth T** (1994). Early events in the apical-basal pattern formation in Arabidopsis. *Nato Asi Series H Cell Biol* **81**, 95–103.
- Kamiya N, Nagasaki H, Morikami A, Sato Y, Matsuoka M** (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.
- Kinoshita A, Betsuyaku S, Osakabe Y, Mizuno S, Nagawa S, Stahl Y, Simon R, Yamaguchi-Shinozaki K, Fukuda H, Sawa S** (2010). RPK2 is an essential receptor-like kinase that transmits the CLV3 signal in Arabidopsis. *Development* **137**, 3911–3920.
- Laux T** (2003). The stem cell concept in plants: a matter of debate. *Cell* **113**, 281–283.
- Laux T, Mayer KF, Berger J, Jürgens G** (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**, 87–96.
- Lenhard M, Laux T** (2003). Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of *CLAVATA3* and its sequestration by *CLAVATA1*. *Development* **130**, 3163–3173.
- Li J, Yuan Y, Lu Z, Yang L, Gao R, Lu J, Xiong G** (2012). *Glabrous Rice 1*, encoding a homeodomain protein, regulates trichome development in rice. *Rice* **5**, 32.
- Lian G, Ding Z, Wang Q, Zhang D, Xu J** (2014). Origins and evolution of *WUSCHEL*-related homeobox protein family in plant kingdom. *Scientific World J* **2014**, 534140.
- Lu Z, Shao G, Xiong J, Jiao Y, Wang J, Liu G, Meng X, Liang Y, Xiong G, Wang Y, Li J** (2015). *MONOCULM 3*, an ortholog of *WUSCHEL* in rice, is required for tiller bud formation. *J Genet Genomics* **42**, 71–78.
- Matsumoto N, Okada K** (2001). A homeobox gene, *PRESSED FLOWER*, regulates lateral axis-dependent development of Arabidopsis flowers. *Genes Dev* **15**, 3355–3364.
- Mukherjee K, Brocchieri L, Burglin TR** (2009). A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Mol Biol Evol* **26**, 2775–2794.
- Nardmann J, Werr W** (2006). The shoot stem cell niche in angiosperms: expression patterns of *WUS* orthologues in rice and maize imply major modifications in the course of mono- and dicot evolution. *Mol Biol Evol* **23**, 2492–2504.
- Nimchuk ZL, Tarr PT, Meyerowitz EM** (2011). An evolutionarily conserved pseudokinase mediates stem cell production in plants. *Plant Cell* **23**, 851–854.
- Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y, Matsubayashi Y** (2008). Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* **319**, 294.
- Ohmori Y, Tanaka W, Kojima M, Sakakibara H, Hirano HY** (2013). *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4* is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the *CLE* gene *FCP1* in rice. *Plant Cell* **25**, 229–241.
- Perales M, Reddy GV** (2012). Stem cell maintenance in shoot apical meristems. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 10–16.
- Sarkar AK, Luijten M, Miyashima S, Lenhard M, Hashimoto T, Nakajima K, Scheres B, Heidstra R, Laux T** (2007). Conserved factors regulate signaling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811–814.
- Scheres B** (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 345–354.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jurgens G, Laux T** (2000). The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* **100**, 635–644.
- Shimizu R, Ji J, Kelsey E, Ohtsu K, Schnable PS, Scanlon MJ** (2009). Tissue specificity and evolution of meristematic WOX3 function. *Plant Physiol* **149**, 841–850.
- Shinohara H, Matsubayashi Y** (2015). Reevaluation of the CLV3-receptor interaction in the shoot apical meristem: dissection of the CLV3 signaling pathway from a direct ligand-binding point of view. *Plant J* **82**, 328–336.
- Stahl Y, Wink RH, Ingram GC, Simon R** (2009). A signaling module controlling the stem cell niche in Arabidopsis root meristems. *Curr Biol* **19**, 909–914.
- Steeves TA, Sussex IM** (1989). *Patterns in Plant Development*, 2nd edn. Cambridge & New York: Cambridge University Press.
- Suzaki T, Sato M, Ashikari M, Miyoshi M, Nagato Y, Hirano HY** (2004). The gene *FLORAL ORGAN NUMBER1* regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to Arabidopsis *CLAVATA1*. *Development* **131**, 5649–5657.

- Suzaki T, Toriba T, Fujimoto M, Tsutsumi N, Kitano H, Hirano HY** (2006). Conservation and diversification of meristem maintenance mechanism in *Oryza sativa*: function of the *FLORAL ORGAN NUMBER2* gene. *Plant Cell Physiol* **47**, 1591–1602.
- van den Berg C, Willemsen V, Hendriks G, Weisbeek P, Scheres B** (1997). Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* **390**, 287–289.
- van der Graaff E, Laux T, Rensing SA** (2009). The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biol* **10**, 248.
- Vandenbussche M, Horstman A, Zethof J, Koes R, Rijpkema AS, Gerats T** (2009). Differential recruitment of WOX transcription factors for lateral development and organ fusion in *Petunia* and Arabidopsis. *Plant Cell* **21**, 2269–2283.
- Veit B** (2009). Hormone mediated regulation of the shoot apical meristem. *Plant Mol Biol* **69**, 397–408.
- Wang W, Chu H, Zhang D, Liang W** (2013). Fine mapping and analysis of *DWARF TILLER1* in controlling rice architecture. *J Genet Genomics* **40**, 493–495.
- Wang W, Li G, Zhao J, Chu H, Lin W, Zhang D, Wang Z, Liang W** (2014). *DWARF TILLER1*, a WUSCHEL-related homeobox transcription factor, is required for tiller growth in rice. *PLoS Genet* **10**, e1004154.
- Yadav RK, Perales M, Gruel J, Girke T, Jonsson H, Reddy GV** (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes Dev* **25**, 2025–2030.
- Yoo SC, Cho SH, Paek NC** (2013). Rice WUSCHEL-related homeobox 3A (OsWOX3A) modulates auxin-transport gene expression in lateral root and root hair development. *Plant Signal Behav* **8**, e25929.
- Zhang D, Yuan Z** (2014). Molecular control of grass inflorescence development. *Annu Rev Plant Biol* **65**, 553–578.
- Zhang F, Wang Y, Li G, Tang Y, Kramer EM, Tadege M** (2014). STENOFOLIA recruits TOPLESS to repress *ASYMMETRIC LEAVES2* at the leaf margin and promote leaf blade outgrowth in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **26**, 650–664.
- Zhang H, Wu K, Wang Y, Peng Y, Hu F, Wen L, Han B, Qian Q, Teng S** (2012). A WUSCHEL-like homeobox gene, *OsWOX3B* responds to *NUDA/GL-1* locus in rice. *Rice* **5**, 30.
- Zhang X, Zong J, Liu J, Yin J, Zhang D** (2010). Genome-wide analysis of WOX gene family in rice, sorghum, maize, Arabidopsis and poplar. *J Integr Plant Biol* **52**, 1016–1026.
- Zhang Y, Jiao Y, Liu Z, Zhu YX** (2015). ROW1 maintains quiescent centre identity by confining WOX5 expression to specific cells. *Nat Commun* **6**, 6003.
- Zhao Y, Hu Y, Dai M, Huang L, Zhou DX** (2009). The WUSCHEL-related homeobox gene *WOX11* is required to activate shoot-borne crown root development in rice. *Plant Cell* **21**, 736–748.

## The Updated Functional Study of WOX Protein Family in Regulating Stem Cell Development

Yanjie Yu, Dabing Zhang, Zheng Yuan\*

School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract** The WUSCHEL RELATED-HOMEBOX (WOX) protein family consists of plant-specific transcription factors and plays an important role in embryonic patterning, stem-cell maintenance and organogenesis. As one of key regulators in stem-cell maintenance, WOX genes regulate the development of shoot apical meristem, root apical meristem and vascular meristem in a similar and specific regulatory network. Here, we reviewed the progress in research of the molecular mechanism of WOX family in regulating stem cell development, especially by comparing their function in Arabidopsis and rice.

**Key words** meristem, stem cell maintenance, WOX, CLE-WOX regulatory pathway

**Yu YJ, Zhang DB, Yuan Z** (2016). The updated functional study of WOX protein family in regulating stem cell development. *Chin Bull Bot* **51**, 565–574.

\* Author for correspondence. E-mail: zyuan@sjtu.edu.cn

(责任编辑: 白羽红)