

DOI: 10.13376/j.cbls/2016080

文章编号: 1004-0374(2015)06-0623-07



王佳伟, 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所研究员、所长助理。中组部青年千人计划, 上海市浦江人才计划, 上海市优秀学术带头人、国家自然科学基金委优秀青年基金、国家杰出青年基金获得者。2016 年获中国青年科技奖。现任中国遗传学会第九届理事会表观遗传专业委员会委员, *eLife* 杂志 early career researcher board member, 《中国科学: 生命科学》、《植物学报》编委。近年来围绕“植物年龄途径的分子基础”这一科学问题开展了系统性研究, 在小分子 RNA 调控植物年龄进程的分子机制方面取得了突出成绩。建立了以弯曲碎米荠为模式的多次开花多年生草本植物研究体系, 发现年龄途径关键调控分子 miR156 与温度途径协同调控弯曲碎米荠多年生生活习性的建立; 发现光合作用产物糖通过调控 miR156 的表达控制植物幼年期至成年期的时相转换; 通过对 miR156 靶基因 SPL 类转录因子下游调控网络的深入研究, 发现 miR156-SPL 年龄模块具有多效性, 调控了包括开花、叶片复杂度和再生等一系列时序性发育过程。相关研究成果发表在 *Science*、*eLife*、*Plant Cell* 和 *Current Biology* 等杂志上。近年来负责承担或完成了国家自然科学基金重点项目、重大研究计划集成项目和上海市科委等多项科研项目, 作为研究骨干参加一项“973”课题。

## microRNA调控植物细胞全能性与再生

刘晔彤<sup>1</sup>, 张天奇<sup>2,3</sup>, 高 健<sup>2,3</sup>, 王佳伟<sup>2\*</sup>

(1 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; 2 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032; 3 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘 要:** 细胞全能性是指在多细胞生物体中, 细胞经分裂和分化后仍具有形成完整有机体的潜能或特性。与动物相比, 离体植物细胞在一定激素配比的培养基上即可表现出全能性。植物细胞全能性是实现植物再生和植物组织培养的理论基础。microRNA 是植物中普遍存在的小分子非编码 RNA, 在植物的各项生命活动中发挥着重要作用。作为基因表达的重要调控因子, 其在调控植物细胞全能性、细胞分化与再生过程中扮演着至关重要的角色。着重介绍已知的参与植物全能性的 miRNA 以及它们对植物再生过程的调控作用。

**关键词:** 再生; miRNA; 植物激素

中图分类号: Q522; Q942 文献标志码: A

## The role of microRNAs in plant cell totipotency and regeneration

LIU Ye-Tong<sup>1</sup>, ZHANG Tian-Qi<sup>2,3</sup>, GAO Jian<sup>2,3</sup>, WANG Jia-Wei<sup>2\*</sup>

(1 College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2 National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Shanghai 200032, China; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

收稿日期: 2016-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31525004, 31430013)

\*通信作者: E-mail: jwwang@sibs.ac.cn

**Abstract:** Plant cells are totipotent and competent to regenerate from differentiated organs through somatic embryogenesis and *de novo* organogenesis. *De novo* organogenesis refers to the *in vitro* formation of shoots or roots from culture explants. It is well known that shoot regeneration is dependent on phytohormone perception, acquisition of organogenetic competence, cell division progression, stem cell commitment and organ initiation. microRNA (miRNAs) are 21-24 nt noncoding gene regulators involved in many aspects of plant development. Here, we summarize the role of miRNAs in the acquisition of plant cell totipotency and *de novo* organogenesis.

**Key words:** regeneration; miRNA; phytohormone

microRNA (miRNA) 是一类长度约为 20~24 nt 的非编码的 RNA, 在真核生物基因表达调控过程起到关键性的作用。最早发现的 miRNA 是 1993 年在线虫体内发现的 *lin-4*<sup>[1]</sup>。miRNA 可以在转录水平与转录后水平调控基因表达, 其主要作用方式是通过碱基互补配对的方式识别靶 mRNA, 通过剪切靶 mRNA 促使其降解或抑制其翻译, 从而抑制靶基因表达<sup>[2]</sup>。近年来的研究表明, miRNA 在植物生长发育、激素调节、时相转换以及应对环境压力等各种方面发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。随着分子生物学研究迅速发展, 人们对 miRNA 功能的认识不断加深, 近几年来的研究揭示了 miRNA 在调控植物细胞全能性方面的重要性。

细胞全能性 (totipotency) 是指在多细胞生物体中, 每个细胞都具有发育成完整新个体的潜能。1902 年, Haberlandt 首次提出植物细胞全能性理论。1958 年, 植物学家 Steward 等将高度分化的胡萝卜根的韧皮部细胞进行培养, 获得了完整植株, 首次证实了植物细胞的全能性。植物细胞全能性是细胞工程等研究领域的重要理论基础, 对于其分子机制的研究一直是发育生物学和分子生物学研究的热点。本文将综述植物 miRNA 对植物细胞全能性和再生过程的调控作用。

## 1 植物细胞全能性与再生

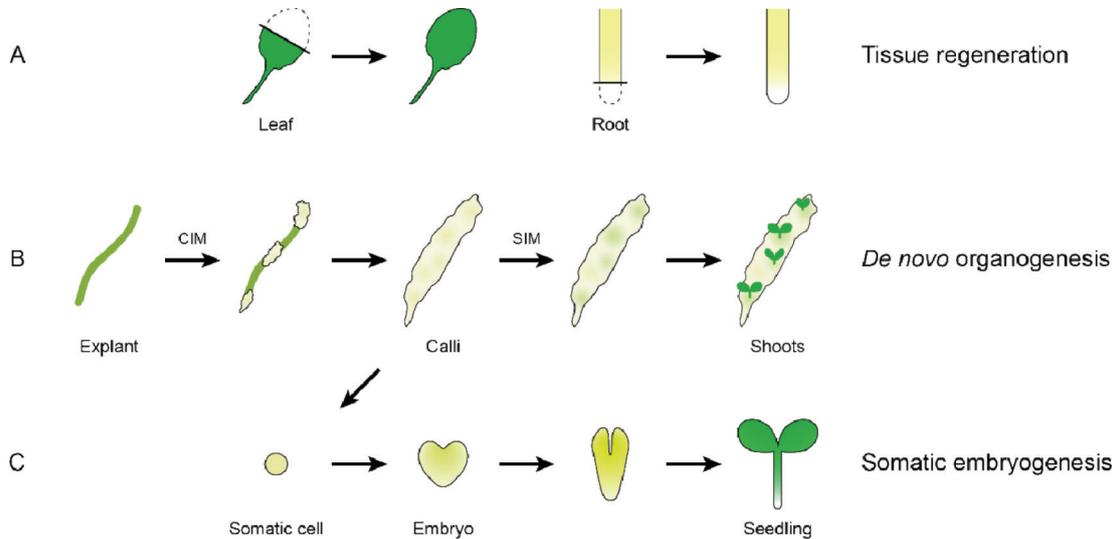
细胞的全能性是实现再生的生物学基础, 再生过程是细胞全能性的重要体现。再生是指生物体对于已失去结构和组织自我修复或替代的过程。这种能力是生物面对自然选择进化出的一种生存策略, 对于生存和繁衍都具有重要意义。再生现象在植物和动物中都普遍存在, 在动物中, 再生往往指的是组织或器官在受到损伤后的修复; 然而在植物中, 再生还包括离体的细胞、组织或器官经过诱导再生出完整植株<sup>[5-6]</sup>。

植物的发育具有无限性, 能在其整个生命周期中不断发育形成新的侧生器官<sup>[7]</sup>。这是由于植物经

过胚胎发育建立起茎尖分生组织 (shoot apical meristem, SAM) 与根尖分生组织 (root apical meristem, RAM), 这两个分生组织具有持续分裂分化的能力, 从而可以不断产生新的侧生器官。

高等植物再生可分为三种: 组织再生、体细胞胚再生 (somatic embryogenesis) 和器官从头再生 (*de novo* organogenesis) (图 1)。组织再生是指组织或器官在损伤或缺失后, 可以修复或重新生长出能够替代原来组织器官行使功能的结构。体细胞胚再生是指离体的已分化的细胞在一定培养条件下重新具备分化能力, 并且可以经过类似胚胎发育的过程形成完整植株<sup>[8]</sup>。植物器官从头再生是指受伤或离体的植物组织长出不定根或不定芽的过程<sup>[9]</sup>。器官从头再生是植物再生的重要方式, 与体细胞胚再生不同, 植物器官从头再生的过程仅需诱导外植体形成 SAM 和 RAM, 无需经过类似胚胎发育的过程。生长素与细胞分裂素作为植物器官从头再生过程中启动细胞分裂与分化的关键性激素, 决定了植物分化发育的方向: 生长素诱导根的分化, 细胞分裂素诱导芽的分化<sup>[10]</sup>。

植物组织培养的理论基础是器官从头再生。在此过程中, 首先利用高浓度外源生长素诱导外植体 (explant, 即离体组织或器官) 形成愈伤组织 (callus); 愈伤组织再经过进一步诱导形成不定根 (高生长素 / 细胞分裂素配比) 或不定芽 (高细胞分裂素 / 生长素配比)。一直以来, 愈伤组织被认为是未分化的多能性细胞团。近年来, 人们发现愈伤组织来源于根中柱鞘细胞<sup>[11]</sup>。在诱导愈伤组织形成的过程中, 只有根中柱鞘细胞进入分裂增殖进程; 愈伤组织的形成过程也与侧根发育过程相似, 在模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 侧根发育突变体 *aberrant lateral root formation4(alf4)* 中无法诱导产生愈伤组织<sup>[5]</sup>。最新研究显示, 叶片再生愈伤组织的过程与根从头再生过程极为相似, 因而认为愈伤组织的本质是一团在外源激素刺激下无序分裂的根原基<sup>[12]</sup>。生长素诱导愈伤组织产生的分子机制至今仍未破



(A-C)分别显示组织再生(tissue regeneration)、器官从头再生(*de novo* organogenesis)和体细胞发生(somatic embryogenesis)。CIM: callus-induction media, 伤组织诱导培养基; SIM: shoot-induction media, 诱导培养基。

图1 植物再生的三种主要形式

解。中国科学院植物研究所胡玉欣课题组发现 *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN16 (LBD16)* 及其同源基因可能从中发挥了重要的调控功能<sup>[13]</sup>。诱导 *LBD16* 过量表达可以在没有外源生长素的条件下诱导外植体产生愈伤组织。

生长素和细胞分裂素如何诱导愈伤组织分化产生不定根与不定芽一直是植物再生领域的前沿问题。*WUSCHEL-related homeobox(WOX)* 是植物中特有的基因家族,在胚胎发育、干细胞维持以及器官形成等方面发挥重要作用,是控制干细胞龛(stem cell niche)的核心基因<sup>[14]</sup>。中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所徐麟课题组率先建立了根从头再生的研究体系。他们发现,拟南芥离体器官(例如叶片、茎)在不添加外源激素的B5培养基中可以再生出不定根<sup>[12, 15]</sup>。进一步研究发现,离体叶片中内源生长素会迅速聚集到伤口附近的原形成层细胞(procambium)中,并进而激活 *WOX11* 的表达,导致叶原形成层细胞转变为根母细胞(root founder cell); *WOX11* 又通过诱导 *LBD* 基因的表达,使根母细胞转变为根原基细胞(root primordium),从而实现根的再生<sup>[12]</sup>。这一系列研究成果揭示了植物根从头再生过程中的分子与细胞学框架。

与根从头再生相比,芽从头再生过程的分子机制仍不清晰。*WUSCHEL(WUS)* 是芽从头再生的重要调控因子。*WUS* 是第一个被发现的 *WOX* 基因,它在 SAM 干细胞龛的组织中心(organizer center,

OC)表达,对于维持 SAM 干细胞活性至关重要<sup>[16-17]</sup>。*CLAVATA3(CLV3)* 在茎尖干细胞(stem cell)中表达,是 *WUS* 的直接下游靶基因。*CLV3* 可以通过 *CLV1-CLV2* 受体激酶通路抑制 *WUS* 的表达,形成 *WUS-CLV3* 反馈抑制通路,使得 *WUS* 的表达局限在 OC 区域<sup>[18]</sup>。*CLV-WUS* 这一反馈调控机制在促进细胞分化进程与维持 SAM 干细胞分裂及分化的平衡等方面发挥了重要作用。研究发现, *wus* 突变体完全丧失芽再生能力,表明 *WUS* 也是调控芽再生的关键因子<sup>[19]</sup>。有趣的是,细胞分裂素在 OC 处高度积累<sup>[20]</sup>,提示细胞分裂素可能直接通过激活 *WUS* 的表达建立 SAM。

## 2 植物miRNA的产生和作用机理

植物 miRNA 基因是由 RNA 聚合酶 II 转录的,最初的转录产物被称为 miRNA 的初级转录产物(pri-miRNA)。与蛋白质编码基因类似, pri-miRNA 具有 3' 多聚腺苷酸(polyA)和 5' 帽子结构<sup>[21]</sup>。pri-miRNA 能够形成发夹形状的茎环结构,在包含 DICER-LIKE I(DCL1)、HYPOPLASTIC LEAVES1(HYL1)和 SERRATE(SE)等蛋白的亚细胞小体(dicing bodies, D 小体)中剪切加工形成成熟的 miRNA。植物 miRNA 在被剪切成成熟的双聚体(miRNA:miRNA\*)以后,还需要有一步甲基化的过程<sup>[22]</sup>。拟南芥中 HUA ENHANCER1(HEN1)是 miRNA 甲基转移酶。miRNA 甲基化提高了 miRNA 在体内

的稳定性,防止其被3'-5'核酸外切酶降解。成熟的miRNA会从细胞核转运到细胞质中,与RNA介导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)结合,对靶基因mRNA进行剪切或翻译抑制。虽然miRNA经历相似的加工过程,但是它们通过靶标不同的下游基因在调控植物细胞全能性上表现出迥然不同的作用。

### 3 再生过程中miRNA表达谱的研究

2006年,中山大学屈良鹞和陈月琴课题组系统研究了水稻体细胞胚再生过程中miRNA的表达规律。通过比较分化与未分化的胚性愈伤组织,获得了31个差异表达的miRNA。其中,miR397仅在未分化的胚性愈伤组织中表达,其表达量随着分化进程而逐渐降低;miR156的表达则呈现相反的趋势,在进入分化状态后明显上升<sup>[23]</sup>。2012年,山东大学向凤宁课题组通过类似的方法鉴定了15个可能调控拟南芥再生能力的miRNA。其中miR397、miR398、miR774、miR843和miR859在胚性愈伤组织中的表达量高于非胚性组织,而miR157、miR159、miR160、miR165、miR166、miR167、miR319、miR390、miR393和miR394在非胚性愈伤组织中表达量高于胚性愈伤组织<sup>[24]</sup>。进一步研究发现,在芽从头再生过程中,miR397a表达量增加,而miR160a、miR394a、miR393a与miR159b表达量降低,暗示这些miRNA可能参与芽从头再生过程;与此类似,在根从头再生过程中,miR159a、miR165a、miR398、miR774与miR859表达量增加,提示它们可能参与了根从头再生过程;在愈伤组织诱导过程中,miR166a表达量增加,表示其可能参与调控细胞增殖;在愈伤组织预诱导中,miR157a、miR166b与miR319a/b含量增加,说明它们可能调控细胞的脱分化过程。

十几年来,人们对于miRNA调控植物细胞全能性和再生的研究遍及杨树、金合欢(*Acacia crassicarpa*)、龙眼(*Dimocarpus longan*)、日本落叶松(*Larix leptolepis*)以及甜橙等植物<sup>[25-29]</sup>。通过比较全能性细胞与非全能性细胞,鉴定了一批具有差异表达特征的miRNA,这些研究成果为下一步相关的功能研究奠定了良好的基础。

### 4 miR156介导年龄途径调节植物细胞全能性与再生率

生命体再生能力随年龄增加而逐渐降低是自然

界普遍存在的现象。对模式动物斑马鱼的研究表明,斑马鱼的尾鳍损伤后的修复能力随着年龄的增加而降低<sup>[30]</sup>。出生1d的小鼠的心脏在被切除局部后可以进行再生,而出生7d的小鼠则不能,说明哺乳动物心脏只在出生后的短暂时间里具有再生能力<sup>[31]</sup>。和动物一样,植物的再生能力也随年龄增长而降低。

miR156是植物年龄途径的关键调控因子。miR156在幼苗中高度积累,过表达miR156会延长植物的幼年期,使植物呈现幼态化,反之则会加速植物由幼年期向成年期的转变<sup>[32-33]</sup>。这一现象在高山南芥(*Arabis alpina*)、弯曲碎米荠(*Cardamine flexuosa*)、烟草、水稻、玉米、杨树、白菜与番茄等植物中均得到证实<sup>[3]</sup>。随着植物年龄增加,miR156的含量逐渐降低,进而导致其靶基因*SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)*类转录因子含量上升。最近的研究发现,植物的芽再生能力随年龄增长而降低,而提高细胞分裂素浓度可以使成年期植物叶片再生能力下降的缺陷得以恢复<sup>[34]</sup>。这一现象与miR156的含量密切相关。在拟南芥和烟草中过量表达miR156均表现出芽再生率的显著提高。miR156的靶基因蛋白SPL类转录因子可以通过与细胞分裂素信号途径的关键转录因子B-type *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (B-type ARR)*结合,抑制B-type ARR的转录激活活性,降低植物对细胞分裂素的敏感性,进而导致芽再生能力的下降。这一发现提示,miR156介导的年龄途径通过影响细胞分裂素调控芽再生能力,同时,表明年龄是植物细胞全能性的一个重要因素。

### 5 miR160通过生长素响应因子调控植物再生

生长素响应因子(auxin response factor, ARF)是一类在生长素信号途径中调控生长素基因表达的转录因子。拟南芥中有23个ARF基因,它们可以通过激活或抑制生长素响应基因的表达,在植物生长发育过程中发挥作用<sup>[35]</sup>。其中,ARF10、ARF16和ARF17是miR160的靶基因,而ARF6与ARF8是miR167的靶基因<sup>[36]</sup>。

山东大学向凤宁课题组发现,过表达miR160会抑制芽再生能力,而在表达抗miR160剪切的ARF10(*mARF10*)转基因植物中,外植体再生能力明显提高,说明ARF10是芽再生过程的正调因子,而miR160通过抑制ARF10表达进而抑制植物芽再生能力<sup>[24, 37]</sup>。ARF10的表达呈现动态性,在诱导愈伤组织时,ARF10表达量下降;而在再生芽过程中,

其表达量呈现显著上升;在芽再生培养基上培养 14 d 后, *ARF10* 在再生芽部位特异表达。进一步研究发现, 在 *mARF10* 突变体植物中, *WUS* 与 *CLV3* 的表达量与表达活性远高于野生型、过表达 *miR160* 以及过表达 *ARF10* 的植物, 暗示 *ARF10* 可能通过正调 *WUS* 与 *CLV3* 来促进芽的从头再生。

## 6 miR165/6影响SAM与RAM的建立与维持

*miR165/6* 通过调控其靶基因 *HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER III (HD-ZIP III)* 类转录因子的表达影响干细胞分裂分化以及 SAM 与 RAM 的形成与维持, 进而在器官从头再生过程中发挥重要作用。*HD-ZIP III* 是调控拟南芥顶端分生组织的重要基因家族, 包括 *PHABULOSA (PHB)*、*PHAVOLUTA (PHV)*、*REVOLUTA (REV)*、*CORONA/INCURVATA4 (CNA)* 与 *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN GENE8 (ATHB8)*<sup>[38]</sup>。*HD-ZIP III* 对于不同的顶端分生组织有不同的作用。茎顶端分生组织需要较高的 *HD-ZIP III* 蛋白活性, 而高浓度的 *HD-ZIP III* 会抑制根的发育<sup>[38-39]</sup>。拟南芥 *rev phb phv* 突变体无法形成 SAM; 而异位表达 *HD-ZIP III* 会造成 RAM 向 SAM 的转变, 这表明 *HD-ZIP III* 可以促进 SAM 的形成<sup>[40]</sup>。与这些研究相吻合, 在芽从头再生过程中, *REV* 在外植体 SAM 处表达量增加, 而 *miR165a* 仅在初生芽形成后有微弱的表达, 提示 *miR165/6* 可能在芽从头再生过程中发挥了重要功能<sup>[41]</sup>。

## 7 miR164影响SAM的从头建立

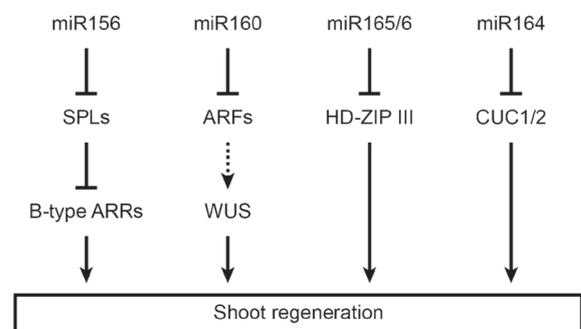
*CUC1* 和 *CUC2* 是 *NAM/ATAF/CUC(NAC)* 类转录因子, 参与胚胎时期 SAM 的建立。*cuc1 cuc2* 突变体在胚胎发育阶段即表现出 SAM 的缺失<sup>[42]</sup>。研究发现, 包括 *CUC1* 和 *CUC2* 在内的 *NAC* 类转录因子受到 *miR164* 的调控<sup>[43]</sup>。在离体培养愈伤组织诱导再生芽的过程中, *CUC2* 持续高表达, 且表达区域与 SAM 祖细胞 (progenitor cell) 重合<sup>[44]</sup>。这些结果表明, *miR164-CUC2* 信号模块参与了 SAM 的从头建立, 是决定芽从头再生的早期决定因子之一。

## 8 总结与展望

植物细胞全能性理论的证实与植物离体再生的实现推动了植物组织培养等技术领域的迅速发展, 在保护濒危植物以及农业生产等领域得到广泛应用。植物细胞全能性是植物实现再生的生物学基础, 也是细胞工程等研究领域的重要理论基础, 对于其

分子机制的研究一直是发育生物学和分子生物学研究的热点。近些年, 随着植物细胞全能性与再生过程分子机理研究的逐渐深入, 人们认识到根从头再生的分子与细胞学框架, 明确了再生过程中愈伤组织的细胞学本质, 修正了传统认知上的错误。然而, 与根再生过程相比, 芽从头再生的分子机制仍不清晰。研究细胞分裂素调控植物芽再生的途径以及阐明 *WUS* 在芽从头再生过程中的作用将有助于从分子层面上解析芽从头再生过程。

*miRNA* 的发现使人们开始关注其在植物细胞全能性与再生过程中的重要调控作用 (图 2)。通过比较 *miRNA* 在全能性细胞与非全能性细胞中的差异表达特征, 已经鉴定出一批可能参与调控再生过程的 *miRNA*。其中一部分 *miRNA* 的功能已经得到解析, 比如 *miR156* 介导年龄途径调节植物细胞全能性与再生率, 以及 *miR160* 通过生长素响应因子调控植物再生等。还有一部分 *miRNA*, 虽然已经被证实参与植物再生过程, 但其作用机制仍不明确, 比如 *miR164* 和 *miR165/6*。此外, 还有一些 *miRNA* 在植物再生过程中是否发挥调控作用尚未确认, 例如调控不定根形成的 *miR167*, 维持 SAM 干细胞稳定的 *miR394*。总之, 描绘 *miRNA* 在再生过程中的时空表达特征, 鉴定 *miRNA* 靶基因调控 SAM 和 RAM 建立的分子机制将大大丰富人们对植物细胞全能性的理解, 为人为实现植物细胞的定向分化提供理论基础。



*miR156*、*miR160*、*miR165/6*和*miR164*通过靶标各自下游靶基因参与芽再生过程。虚线代表间接作用。

图2 参与植物芽再生的*miRNA*

### [参考文献]

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75: 843-54

- [2] Voinnet O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, 2009, 136: 669-87
- [3] Yu S, Lian H, Wang JW. Plant developmental transitions: the role of microRNAs and sugars. *Curr Opin Plant Biol*, 2015, 27: 1-7
- [4] Wu G. Plant microRNAs and development. *J Genet Genomics*, 2013, 40: 217-30
- [5] Sugimoto K, Jiao Y, Meyerowitz EM. *Arabidopsis* regeneration from multiple tissues occurs via a root development pathway. *Dev Cell*, 2010, 18: 463-71
- [6] Birnbaum KD, Sanchez Alvarado A. Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell*, 2008, 132: 697-710
- [7] Goldberg RB. Plants: novel developmental processes. *Science*, 1988, 240: 1460-7
- [8] Zimmerman JL. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 1993, 5: 1411-23
- [9] Duclercq J, Assoumou Ndong YP, Guerineau F, et al. *Arabidopsis* shoot organogenesis is enhanced by an amino acid change in the ATHB15 transcription factor. *Plant Biol (Stuttg)*, 2011, 13: 317-24
- [10] Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp Soc Exp Biol*, 1957, 11: 118-30
- [11] Che P, Lall S, Howell SH. Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta*, 2007, 226: 1183-94
- [12] Liu J, Sheng L, Xu Y, et al. WOX11 and 12 are involved in the first-step cell fate transition during *de novo* root organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2014, 26: 1081-93
- [13] Fan M, Xu C, Xu K, et al. LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Res*, 2012, 22: 1169-80
- [14] van der Graaff E, Laux T, Rensing SA. The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biol*, 2009, 10: 248
- [15] Chen X, Qu Y, Sheng L, et al. A simple method suitable to study *de novo* root organogenesis. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 208
- [16] Mayer KF, Schoof H, Haecker A, et al. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 1998, 95: 805-15
- [17] Laux T, Mayer KF, Berger J, et al. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 1996, 122: 87-96
- [18] 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. *Cell*, 2000, 100: 635-44
- [19] Chatfield SP, Capron R, Severino A, et al. Incipient stem cell niche conversion in tissue culture: using a systems approach to probe early events in WUSCHEL-dependent conversion of lateral root primordia into shoot meristems. *Plant J*, 2013, 73: 798-813
- [20] Werner T, Schmulling T. Cytokinin action in plant development. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12: 527-38
- [21] Xie Z, Allen E, Fahlgren N, et al. Expression of *Arabidopsis* miRNA genes. *Plant Physiol*, 2005, 138: 2145-54
- [22] Rogers K, Chen X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. *Plant Cell*, 2013, 25: 2383-99
- [23] Luo YC, Zhou H, Li Y, et al. Rice embryogenic calli express a unique set of microRNAs, suggesting regulatory roles of microRNAs in plant post-embryonic development. *FEBS Lett*, 2006, 580: 5111-6
- [24] Qiao M, Zhao Z, Song Y, et al. Proper regeneration from *in vitro* cultured *Arabidopsis thaliana* requires the microRNA-directed action of an auxin response factor. *Plant J*, 2012, 71: 14-22
- [25] Zhang S, Zhou J, Han S, et al. Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398: 355-60
- [26] Liu W, Yu W, Hou L, et al. Analysis of miRNAs and their targets during adventitious shoot organogenesis of *Acacia crassicarpa*. *PLoS One*, 2014, 9: e93438
- [27] Li T, Chen J, Qiu S, et al. Deep sequencing and microarray hybridization identify conserved and species-specific microRNAs during somatic embryogenesis in hybrid yellow poplar. *PLoS One*, 2012, 7: e43451
- [28] Lin Y, Lai Z. Comparative analysis reveals dynamic changes in miRNAs and their targets and expression during somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *PLoS One*, 2013, 8: e60337
- [29] Wu XM, Liu MY, Ge XX, et al. Stage and tissue-specific modulation of ten conserved miRNAs and their targets during somatic embryogenesis of Valencia sweet orange. *Planta*, 2011, 233: 495-505
- [30] Anachelin M, Murcia L, Alcaraz-Perez F, et al. Behaviour of telomere and telomerase during aging and regeneration in zebrafish. *PLoS One*, 2011, 6: e16955
- [31] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*, 2011, 331: 1078-80
- [32] Wang JW, Czech B, Weigel D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 2009, 138: 738-49
- [33] Wu G, Park MY, Conway SR, et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 2009, 138: 750-9
- [34] Zhang TQ, Lian H, Tang H, et al. An intrinsic microRNA timer regulates progressive decline in shoot regenerative capacity in plants. *Plant Cell*, 2015, 27: 349-60
- [35] Liscum E, Reed JW. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol Biol*, 2002, 49: 387-400
- [36] Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, et al. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 2002, 110: 513-20
- [37] Qiao M, Xiang F. A set of *Arabidopsis thaliana* miRNAs involve shoot regeneration *in vitro*. *Plant Signal Behav*,

- 2013, 8: e23479
- [38] Prigge MJ, Otsuga D, Alonso JM, et al. Class III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 2005, 17: 61-76
- [39] Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, et al. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, 2011, 465: 316-21
- [40] Smith ZR, Long JA. Control of *Arabidopsis* apical-basal embryo polarity by antagonistic transcription factors. *Nature*, 2010, 464: 423-6
- [41] Liu Z, Xin W, Ji D, et al. GUS activity for miR165a/166b, REV, and WUS/CLV3 in *in vitro* direct *Arabidopsis thaliana* shoot regeneration. *Protoplasma*, 2013, 250: 1213-8
- [42] Aida M, Ishida T, Fukaki H, et al. Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*, 1997, 9: 841-57
- [43] Laufs P, Peaucelle A, Morin H, et al. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development*, 2004, 131: 4311-22
- [44] Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, et al. Pattern formation during *de novo* assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development*, 2007, 134: 3539-48