

• 综 述 •

植物干细胞培养研究进展

刘连, 王义, 史植元, 张美萍, 孙春玉

吉林农业大学 生命科学学院 人参基因资源开发与利用工程研究中心, 吉林 长春 130118

刘连, 王义, 史植元, 等. 植物干细胞培养研究进展. 生物工程学报, 2018, 34(11): 1734–1741.

Liu L, Wang Y, Shi ZY, et al. Advances in plant stem cell culture. Chin J Biotech, 2018, 34(11): 1734–1741.

摘 要: 植物干细胞位于分生组织, 是处于未分化状态的细胞, 液泡化程度低, 具有较高的线粒体活性, 遗传稳定, 具有很强的自我更新和再生能力。植物干细胞培养在下游制药和功能性食品以及化妆品行业具有广泛的应用潜质。文中综述了植物干细胞的基本培养技术、鉴别技术, 为该领域的深入研究提供参考。

关键词: 植物, 干细胞, 分生组织, 茎尖, 根尖, 培养

Advances in plant stem cell culture

Lian Liu, Yi Wang, Zhiyuan Shi, Meiping Zhang, and Chunyu Sun

Research Center for Ginseng Genetic Resources Development and Utilization, College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

Abstract: Plant stem cells are the cells that are located in meristems and are kept in a state of undifferentiation. Plant stem cell possesses lower vacuolization, higher mitochondrial activity, more genetic stability and stronger self-renewal capacity compared with calli. Plant stem cell culture has a wide application in pharmaceutical, functional food as well as cosmetic industries. Here we describe the procedure of induction, isolation and identification of plant stem cells, to provide a reference for further research in this field.

Keywords: plant, stem cell, meristem, shoot apical, root apical, culture

随着我国制药工业及功能性食品行业的迅速发展, 对植物中活性成分的需求日益增长。植物中的活性成分具有抗衰老、提高免疫力及保护心脑血管等的作用^[1], 但其质量受环境因素和收获条件的影响, 活性物质产量低^[2-3], 有些植物的活性成分仅限于特定的组织部位或生长阶段合成^[4-5]。

对于结构复杂、人工合成困难的活性成分, 传统的愈伤组织培养方式虽然可以在短时间内生产有价值的产品^[6], 节约了资源, 但是经历脱分化的愈伤组织液泡化程度高, 常常增加了细胞的异质性, 对振荡培养的剪切力敏感, 经多次有丝分裂后, 容易产生 DNA 甲基化^[7]以及转座子被激活^[8]

Received: January 31, 2018; **Accepted:** April 25, 2018

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2013AA102604-3).

Corresponding author: Chunyu Sun. Tel: +86-431-84531640; E-mail: s_ch_y@126.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2013AA102604-3) 资助。

网络出版时间: 2018-05-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180516.1027.002.html>

等变异现象,导致培养过程不稳定,天然产物的产量、性质不稳定等缺点,难以适应现代工业生产需求^[9]。

干细胞的概念起源于 20 世纪 60 年代的动物胚胎学研究,其含义“具有自我更新复制能力和分化潜能的细胞”。与此相对应,植物干细胞实为传统植物解剖学范畴中的分生组织,包括茎尖分生组织 (Shoot apical meristem)、根尖分生组织 (Root apical meristem)、侧生分生组织^[10]以及部分髓射线细胞,其具有产生所有分化细胞类型的能力^[11]以及旺盛的分裂能力和较高的遗传稳定性。植物干细胞具有多个小液泡、线粒体活性高、聚集度低^[12-13]、细胞壁无木质素沉积^[14-15]等特点,低温保藏后仍维持较高的细胞活性,在悬浮培养过程中大部分以单细胞形式存在,对剪切力不敏感,能维持稳定的增殖速度,可以长期稳定培养。2010 年, Lee 等在 *Nature Biotechnology* 上成功报道了红豆杉形成层干细胞的分离及 3 t 生物反应器培养研究^[16],随后越来越多种植物的干细胞研究被报道,本研究在总结上述研究结果的基础上,对当前植物干细胞的分离、培养、鉴别及应用情况进行综述,并对植物干细胞培养的前景进行了展望,为该领域的深入研究提供参考。

1 植物干细胞培养

植物干细胞处于未分化状态,其分离方法是建立在传统的组织培养基础上,具体步骤包括:

1) 含分生组织的外植体消毒处理; 2) 干细胞的诱导; 3) 分离并收集干细胞; 4) 干细胞的鉴定。目前关于植物干细胞的诱导和大规模培养等研究报道较少,植物干细胞培养仅见于形成层干细胞、茎尖干细胞及根尖干细胞培养。

1.1 植物贮藏根形成层干细胞的分离及培养

目前关于贮藏根形成层的培养,仅见于胡萝卜、人参及当归。具体包括:外植体的消毒、抗

褐化培养、渗透处理以及诱导培养获得形成层干细胞系。在实际培养过程中渗透处理对形成层干细胞系的获得尤为重要,所选用的渗透剂以及渗透剂的浓度至关重要,实际操作过程中 0.6 mol/L 蔗糖效果最佳,使对渗透压敏感的非形成层组织坏死,而对渗透压不敏感的干细胞保持活性。处理后的外植体置于诱导培养基上,一段时间后,所得细胞系即为干细胞系^[17]。渗透剂一般为蔗糖溶液,也有用 KCl、甘露醇等作为渗透剂的报道^[18-19]。干细胞诱导之初对植物激素的要求相对严格,有报道表明诱导初期用 IBA 或 IAA,而其他激素无效果,继代培养基中一般添加 2,4-D 即可。基于上述方法,人参、胡萝卜以及当归细胞系均已成功培养^[17,20],并且建立了当归和人参细胞的气升式反应器,人参形成层细胞与愈伤组织相比,倍增时间为 3-6 d,而愈伤组织的倍增时间为 28 d,生长速度提高了 5-9 倍,人参皂苷的含量(Re、Rb1、Rb2 和 Rd)尤其是在野山参中达到了 3%。该细胞系提取物可以抗肿瘤、提高免疫力,并且还具有抗氧化、抑制皱纹产生的效果^[17]。当归干细胞悬浮培养 21 d 后,鲜重增长为 2.83 倍,愈伤组织为 1.67 倍,同时当归干细胞合成次级代谢产物活性较强,干细胞阿魏酸含量为 9.118 mg/kg,而在愈伤组织中未检测到阿魏酸^[20]。

笔者在实验过程中发现进行人参形成层干细胞的分离时有的材料自带内生菌,会对实验过程造成干扰,需要在实际的分离过程中选择合适的消毒方法以及培养条件,一般选择在干细胞诱导培养基中加入抗生素处理;另外,可能由于品种不同,形成层干细胞诱导的条件不同,实验过程中需要针对特定的品种摸索具体的实验条件,才能保证成功获得干细胞系。

1.2 木本及草本植物形成层干细胞的培养

采集的枝条置于抗坏血酸溶液中防止氧化,外植体常规消毒后,尽量去除韧皮部等非形成层

组织,将含有形成层的组织切分后置于含有 IAA 或 NAA 的诱导培养基上,一段时间后形成层细胞自然分层,收集细胞继代培养。研究者们利用上述方法成功获得了银杏及红豆杉干细胞系^[21-22],所获得的干细胞系建立了大规模的悬浮培养体系,银杏干细胞最终建立了 250 L 的气升式反应器,且干细胞干重达到了 11.7 g/L,其提取物可以清除自由基,具有强烈的抗氧化作用,在制药、功能性食品领域具有较强的工业实用性。在红豆杉干细胞悬浮培养方面,气升式反应器中干细胞增长明显优于愈伤组织,3 L 生物反应器中培养 4 个月后,来自针叶和胚胎的愈伤组织 (Callus) 干重分别为 3.33 g 和 5.08 g,而干细胞 (Stem cell) 干重为 3 819.44 g。并且 3 L 反应器中,加入诱导子 50 mg/L 壳聚糖和 100 μ mol/L 茉莉酮酸甲酯,以及 0.1 mmol/L 的前体苯丙氨酸处理后的愈伤组织紫杉醇含量分别达到了 11 mg/kg 和 13 mg/kg,而干细胞中紫杉醇含量达到了 98 mg/kg,明显高于愈伤组织中紫杉醇含量,经过研究人员对培养参数的筛选和优化,建立了 3 t 红豆杉干细胞生物反应器,实现了大规模工业生产^[16]。

除此之外草本植物干细胞也有相关报道,韩国建国大学 Moon 等基于上述方法建立了长春花干细胞系^[23],结果表明,含有 1.5 mg/L NAA 和 0.5 mg/L KT 的 B5 培养基中长春碱含量达到最大值 (0.794 mg/g),含有 1.5 mg/L NAA 和 1.5 mg/L KT 的 B5 培养基中长春新碱的含量达到最大值 (0.279 mg/g)。不仅如此,韩国云火公司的 Lee 和 Jin 等已经成功获得了番茄和菊花以及艾蒿干细胞,并建立了气升式生物反应器,3 L 反应器中,番茄干细胞的生长速率达到了 6.3 倍,而愈伤组织的生长速率只有 1.9 倍,在 250 L 的气升式反应器中干细胞的干重达到了 12.6 g/L,番茄干细胞的提取物可以促进原胶原的形成,抑制胶原分解酶的形成,起到了抑制皱纹的作用^[24]。菊花干细胞在 3 L 反应器中培养 14 d

后,细胞由最初的 4.1 g/L 增长到了 11.8 g/L,干细胞系提取物不仅具有抑制由脂多糖处理引起的 NO 产生的效果,而且还具有抑制环氧化酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 表达的效果,因此该细胞系可用于生产消炎药及功能性饮料^[25]。

1.3 茎尖干细胞培养

关于茎尖干细胞的分离培养仅见于拟南芥茎尖干细胞和芦荟茎尖干细胞。不同于其他草本植物,芦荟干细胞挑选幼嫩的茎尖作为外植体。常规消毒后,切取茎尖,置于含有 NAA 和 6-BA 的诱导培养基中培养。获得的细胞团用 0.25% 的纤维素酶和 0.25% 的果胶酶进行酶解,所得到的细胞即为干细胞^[26],该细胞系冻干粉中芦荟苷含量达到了 150.80 mg/g,显著增加了芦荟苷的含量。

干细胞系的获得,除了常规诱导方面,也有通过转入抗性筛选基因进行干细胞系建立报道,厦门大学沈宏通过该方法建立了拟南芥茎尖干细胞系^[27]。

1.4 根尖干细胞培养

根尖干细胞的诱导:首先将去除根冠的根组织切分成 1 mm 大小,置于含有 2,4-D 的诱导培养基上,暗培养一段时间后,静止中心细胞继代于含有 2,4-D 的培养基上扩增,利用该方法获得了水稻干细胞^[28]。在此基础上暨南大学的王一飞等建立了铁皮石斛的干细胞系,并建立了 10 L 的悬浮培养体系,利用超低温冷冻、超声波破碎以及真空干燥等方法制备了铁皮石斛干细胞冻干粉,铁皮石斛干细胞提取物具有较高的 POD (Peroxidase)、SOD (Superoxide dismutase) 以及 CAT (Catalase) 酶活性,具有较强的抗氧化作用,干细胞冻干粉对成纤维细胞的光老化具有抑制作用,提高了其 SOD 酶活性,其制备的眼霜还具去除眼袋和淡化黑眼圈的效果^[29]。

2 植物干细胞的鉴别

植物干细胞具有多个小液泡、线粒体活性高^[12-13]以及细胞壁不含木质素^[14-15,23]等特点,在干细胞鉴别方面,主要依据其自身特点对一些特定的细胞器进行染色观察,以此区别于愈伤组织等非干细胞系。目前常用的染色方法有如下几种:1) 中性红液泡系染色;2) 间苯三酚木质素染色;3) Janus green B 线粒体染色。除此之外,与愈伤组织相比,在干细胞中存在特异表达或高表达的基因。

2.1 中性红染色

中性红是液泡特殊的活体染色剂,由于液泡呈酸性,进入液泡的中性红解离出大量阳离子而呈现樱桃红色,所以通过液泡染色可以区别干细胞系。

韩国云火公司 Lee 等诱导培养红豆杉形成层细胞后,对干细胞进行了中性红染色,结果表明,形成层细胞内具有多个被染色的红色小液泡,而愈伤组织细胞内呈现出一个中央大液泡^[16],在人参以及菊花干细胞中也观察到具有多个小液泡的现象。实际操作中发现在干细胞组织学染色过程中,中性红染色使用 PBS (Phosphate-buffered saline)比 Ringer 溶液 (Ringer's solution)染色效果好。

2.2 间苯三酚染色

间苯三酚反应是确定木质化细胞壁最常用的方法,间苯三酚在酸性环境下与细胞壁中的木质素发生樱桃红色或紫红色反应。

Moon 等将诱导出来的长春花形成层细胞与愈伤组织细胞进行间苯三酚染色,结果表明,形成层细胞无盐酸-间苯三酚染色反应,而愈伤组织细胞发生紫红色染色反应。这一结果表明,愈伤组织细胞的细胞壁有木质素沉积,形成层细胞无木质素沉积为初生壁^[23]。笔者在实际操作过程中

发现间苯三酚染色过程中,盐酸的浓度对染色效果影响很大,研究发现低浓度盐酸显色效果欠佳,0.5 mol/L 以上盐酸浓度显色效果较好。

2.3 线粒体染色

Janus green B 对线粒体专一性染色,由于线粒体中的细胞色素氧化酶的作用,使 Janus green B 始终保持氧化状态呈蓝绿色,而在周围的细胞质中染料被还原成无色。干细胞具有较高的线粒体活性,所以经 Janus green B 染色可以区别干细胞系。研究者利用 Janus green B 对银杏和番茄形成层细胞线粒体进行染色,银杏细胞线粒体染色结果显示愈伤组织线粒体较少,而形成层细胞短棒状线粒体较多,可以为细胞的增殖和分化提供能量^[21,24]。笔者在试验过程中发现,针对线粒体的染色常规的操作是将材料完全浸没在染液当中,而对于干细胞系来说,这样的处理结果并不理想,进行少量多次滴加染液效果更好。

3 植物干细胞中特异表达基因的研究

在植物干细胞中,存在一些特异表达或高表达的基因。*ATHB-8 (ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 8)* 被认为是原形成层细胞的分子标记,在形成层细胞特异表达,可以保护原形成层前体细胞不受极性生长素流 (AUXIN flow) 的干扰而保持形成层细胞的稳定性^[30-31]。*WOX4 (WUSCHEL HOMEBOX RELATED 4)* 基因主要在形成层中表达,形成层中存在 TDIF (Tracheary element differentiation inhibitory factor) 多肽,具有抑制形成层细胞分化并且促进细胞增殖的功能,与受体激酶 PXY (Phloem intercalated with xylem) 胞外结构域特异结合形成 TDIF-PXY 通路促进 *WOX4* 的表达^[32],并且在形成层分生组织中还存在 *PIN1 (PIN-FORMED1)* 以及 *HAM4 (HAIRY MERISTEM4)* 等上调表达基因^[32-34]。最近研究表明,维管形成层分生组织中 *AVB (ABNORMAL*

VASCULAR BUNDLES) 基因参与维持侧生原基发育中的正常细胞分裂模式, 是形成层细胞所必需的^[35]。

CLV3 (CLAVATA3) 作为茎尖干细胞分子标志基因, 在分生组织细胞表达, 可促进分生组织细胞增殖, WUS 蛋白通过胞间连丝运输到干细胞区域^[36], 直接与 CLV3 启动子结合, 抑制 CLV3 的表达, 从而抑制干细胞的增殖, 二者构成 CLV-WUS 负反馈调节通路^[37], 以维持干细胞的数量稳定。最新研究发现 CIKs (CLAVATA 3 INSENSITIVE RECEPTOR KINASES) 受体激酶作为受体通过磷酸化传递 CLV3 的信号, 抑制 WUS 的表达, 从而维持茎尖分生组织的平衡^[38]。

WOX5 (WUS RELATED-HOMEODOMAIN 5) 特异性地在根尖静止中心细胞中表达, 抑制干细胞的分化, 在根尖中 CLE40 (CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION40) 蛋白在干细胞和中柱细胞中表达, 通过 ACR4 (ARABIDOPSIS CRINKLY 4) 受体传导 CLE40 的信号, 抑制 WOX5 的表达, 促进干细胞的分化, 以维持根尖干细胞的稳定^[39-41]。在根尖干细胞中还存在 QC25 (Quiescent center) 以及 QC46^[42-43] 等特异表达的基因, 近年研究表明在根尖干细胞中存在 RGF (Root meristem growth factor) 小肽^[44], RGF 的受体 RGFRs (RGF receptors) 和 RGI (RGF1 INSENSITIVES) 能够响应 RGF 信号, 促进 PLT (PLETHORA) 转录因子的表达, PLT 可促进分生组织细胞的分裂, 以维持根尖分生组织稳定^[45-47]。

早在 2003 年研究者开始对根尖干细胞的表达谱进行了分析, 结果表明在根尖干细胞区域存在差异表达基因^[48], 韩国的 Lee 等通过基因表达谱比较了红豆杉形成层细胞和愈伤组织细胞的差异, 确定了 563 个基因在形成层细胞中表达不同, 其中 296 个基因呈现正调控^[16]。Yadav 等对茎尖干细胞的表达谱也进行了分析, 结果表明茎尖干

细胞中, 在 CLV3 表达区域还存在 AIL5、AIL6 (AINTÉGUMENTA-LIKE) 等特异表达的基因, 但这些基因的功能有待进一步研究^[49-50]。

4 植物干细胞应用及展望

植物干细胞培养克服了传统组织培养中培养物对剪切力敏感、次生代谢产物低、遗传不稳定等问题。与愈伤组织相比, 植物干细胞在长期培养条件下可以维持稳定的增殖速度, 在食品、药品及化妆品行业具有更广阔的应用前景。研究表明经干细胞培养后提取的有效成分在治疗艾滋病、抑制黑色素瘤、治疗肝炎、抗氧化和抗衰老、抑制异常的细胞凋亡、杀伤癌细胞等方面都具有很好的疗效^[22-23,51-56]。

韩国在植物干细胞诱导及培养方面积累了丰富的经验, 已报道了人参及野山参、长春花、红豆杉、银杏、菊花等药用植物形成层干细胞的诱导、培养、鉴定、大规模发酵培养、培养物活性成分分析等^[16-17,21,23,25]。我国的科学家们在该领域的研究也取得了丰硕的成果: 严春燕等分离并培养了当归干细胞^[20]; 厦门大学沈宏等分离培养了拟南芥茎尖干细胞^[27]; 暨南大学王一飞等用铁皮石斛干细胞冻干粉生产的眼霜具有明显的抗衰老效果^[29]; 曾宪卓等通过分离并培养芦荟茎间干细胞, 测得芦荟干细胞冻干粉中芦荟苷的含量显著提高, 达到了 150.80 mg/g, 为医疗、化妆品和功能性食品行业提供了良好的基础^[26]; 功能性食品方面, 陈海佳等制备的苹果干细胞冻干粉可以作为胃肠道保健食品^[57]; 林淑芳等利用番茄干细胞冻干粉制备了口服液、饮料和白酒, 研究结果表明, 其制备的产品具有抗氧化、预防癌症、降血压、降低胆固醇以及调节免疫力的效果^[58]。

植物细胞不受动物病原体的污染, 生产成本较低, 并且植物干细胞培养具有诸多优势, 利用基因工程手段, 以植物干细胞作为受体生产抗体、

疫苗以及其他蛋白药物也将会在生物药物生产中被广泛应用。在实际培养中关于植物干细胞分离和鉴别方面还存在很多不足,外植体诱导出细胞后,如何精确分离干细胞,保证干细胞的纯度,以及建立规范的鉴定体系是目前干细胞培养面临的主要问题。

REFERENCES

- [1] McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, 2007, 68(14): 2015–2022.
- [2] Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*, 2001, 161(5): 839–851.
- [3] Horner JD, Gosz JR, Cates RG. The role of carbon-based plant secondary metabolites in decomposition in terrestrial ecosystems. *Am Nat*, 1988, 132(6): 869–883.
- [4] Wang LX, Hou HH, Sun CC. Taxol content in different parts of Fujian taxus at the different time of the year. *China Food Addit*, 2017(3): 117–121 (in Chinese).
王丽霞, 侯会会, 孙辰晨. 不同月份的福建红豆杉中各部位紫杉醇含量分布研究. *中国食品添加剂*, 2017(3): 117–121.
- [5] Zhou P, Xie CQ, Chen JW, et al. Comparison of three kinds of flavonoids and total flavonoids contents in different organs of *Scutellaria baicalensis* geogi and its callus. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*, 2016, 32(2): 191–194 (in Chinese).
周萍, 谢晨琼, 陈建伟, 等. 黄芩不同器官及愈伤组织中3种黄酮类成分和总黄酮的含量比较. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(2): 191–194.
- [6] Roberts SC. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(7): 387–395.
- [7] Li XL, Chen HC, Fang Q, et al. Epigenetic variation of clonal lines of somatic cells of *Puccinellia tenuiflora* based on DNA methylation. *Chin J Grassl*, 2016, 38(2): 26–33 (in Chinese).
李晓玲, 陈浩川, 房强, 等. 星星草体细胞无性系基于DNA甲基化的表观遗传变异研究. *中国草地学报*, 2016, 38(2): 26–33.
- [8] Xu HD. The study on transposon activation in long-term subcultured *Citrus calli*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
许海丹. 长期继代的柑橘愈伤组织中转座子激活研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [9] Kim BJ, Gibson DM, Shuler ML. Effect of subculture and elicitation on instability of taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures. *Biotechnol Prog*, 2004, 20(6): 1666–1673.
- [10] Scheres B. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(5): 345–354.
- [11] Scheres B. Stem cells: a plant biology perspective. *Cell*, 2005, 122(4): 499–504.
- [12] Laux T. The stem cell concept in plants: a matter of debate. *Cell*, 2003, 113(3): 281–283.
- [13] Jin YW, Lee EK. Isolated population of plant single cells and method of preparing the same: US, 8053238. 2011-11-08.
- [14] Doblin MS, Pettolino F, Bacic A. Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Funct Plant Biol*, 2010, 37(5): 357–381.
- [15] Zhong R, Ye ZH. Secondary cell walls: biosynthesis, patterned deposition and transcriptional regulation. *Plant Cell Physiol*, 2015, 56(2): 195–214.
- [16] Lee EK, Jin YW, Park JH, et al. Cultured cambial meristematic cells as a source of plant natural products. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(11): 1213–1217.
- [17] Jang MO, Lee EK, Jin YW. Plant stem cell line derived from cambium of herbaceous plant with storage root and method for isolating the same: US, 8247230. 2012-08-21.
- [18] Zhang PF. Research on the osmotic dehydration and combined drying technology of peach cylinders[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016 (in Chinese).
张鹏飞. 桃片渗透脱水及联合干燥技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- [19] Shen HL, Gao XX, Yang L. Effects of mannitol, sucrose and cold pretreatment on somatic embryogenesis of *Sorbus pohuashanensis* (hance) hedl. *Plant Physiol Commun*, 2008, 44(4): 677–681 (in Chinese).

- 沈海龙, 高翔翔, 杨玲. 甘露醇、蔗糖和低温预处理对花楸体细胞胚诱导的影响. 植物生理学报, 2008, 44(4): 677–681.
- [20] Yan CY, Ding N, Han LJ. When the plant home plant storage root cambium stem cell preparation and culture methods: CN, 104531606. 2015-04-22 (in Chinese).
严春艳, 丁楠, 韩丽娟. 当归属植物贮藏根形成层的植物干细胞及其制备和培养方法: 中国, 104531606. 2015-04-22.
- [21] Hong NJ, Jin YW, Lee EK, et al. Plant stem cell derived from cambium of family ginkgoaceae and method for the isolation thereof: EP, 2436758. 2012-04-04.
- [22] Park JH, Lim MJ, Oh IS, et al. Anticancer composition comprising plant stem cell line derived from *Taxus* cambium or procambium: WO, 2009/048306. 2009-04-16.
- [23] Moon SH, Venkatesh J, Yu JW, et al. Differential induction of meristematic stem cells of *Catharanthus roseus* and their characterization. C R Biol, 2015, 338(11): 745–756.
- [24] Yu YM, Kim SY, Jin YW, et al. Plant stem cell derived from cambium of family solanaceae, and method for isolating and culturing same: EP, 2436759. 2012-04-04.
- [25] Kim IS, Paek JS, Jin YW, et al. Plant stem cell derived from cambium of family asteraceae and method for the isolated culturing thereof: EP, 2436757. 2012-04-04.
- [26] Zeng XZ, Zhang Z. *Aloe* stem cell lyophilized powder as well as preparation method and application thereof: CN, 105852125. 2016-08-17 (in Chinese).
曾宪卓, 张哲. 芦荟干细胞冻干粉及其制备方法和应用: 中国, 105852125. 2016-08-17.
- [27] Shen H. The isolation and cultivation of stem cell from shoot apical meristem of *Arabidopsis*[D]. Xiamen: Xiamen University, 2013 (in Chinese).
沈弘. 拟南芥茎尖干细胞的分离培养[D]. 厦门: 厦门大学, 2013.
- [28] Yu YM, Lee EK, Hong SM, et al. Plant stem cell line derived from quiescent center and method for isolating the same: WO, 2009/038416. 2009-03-26.
- [29] Wang YF, Liao XF, Zhuo CQ. Preparation method of *Dendrobium officinale* stem cell freeze-dried powder and application thereof: CN, 104928229. 2015-09-23 (in Chinese).
王一飞, 廖晓凤, 卓翠琴. 一种铁皮石斛干细胞冻干粉的制备方法及其用途: 中国, 104928229. 2015-09-23.
- [30] Ji J, Strable J, Shimizu R, et al. WOX4 promotes procambial development. Plant Physiol, 2010, 152(3): 1346–1356.
- [31] Donner TJ, Scarpella E. Auxin-transport-dependent leaf vein formation. Botany, 2009, 87(7): 678–684.
- [32] Hirakawa Y, Kondo Y, Fukuda H. TDIF peptide signaling regulates vascular stem cell proliferation via the WOX4 homeobox gene in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2010, 22(8): 2618–2629.
- [33] Miyashima S, Sebastian J, Lee JY, et al. Stem cell function during plant vascular development. EMBO J, 2013, 32(2): 178–193.
- [34] Zhou Y, Liu X, Engstrom EM, et al. Control of plant stem cell function by conserved interacting transcriptional regulators. Nature, 2015, 517(7534): 377–380.
- [35] Ma L, Sang XC, Zhang T, et al. ABNORMAL VASCULAR BUNDLES regulates cell proliferation and procambium cell establishment during aerial organ development in rice. New Phytol, 2017, 213(1): 275–286.
- [36] Daum G, Medzihradszky A, Suzuki T, et al. A mechanistic framework for noncell autonomous stemcell induction in *Arabidopsis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(40): 14619–14624.
- [37] Yadav RK, Perales M, Gruel J, et al. WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. Genes Dev, 2011, 25(19): 2025–2030.
- [38] Hu C, Zhu YF, Cui YW, et al. A group of receptor kinases are essential for CLAVATA signalling to maintain stem cell homeostasis. Nat Plants, 2018, 4(4): 205–211.
- [39] Stahl Y, Wink RH, Ingram GC, et al. A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. Curr Biol, 2009, 19(11): 909–914.
- [40] de Smet I, Vassileva V, de Rybel B, et al. Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell

- divisions in the *Arabidopsis* root. *Science*, 2008, 322(5901): 594–597.
- [41] Stahl Y, Grabowski S, Bleckmann A, et al. Moderation of *Arabidopsis* root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr Biol*, 2013, 23(5): 362–371.
- [42] Forzani C, Aichinger E, Sornay E, et al. WOX5 suppresses *CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr Biol*, 2014, 24(16): 1939–1944.
- [43] Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, et al. SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev*, 2003, 17(3): 354–358.
- [44] Matsuzaki Y, Ogawa-Ohnishi M, Mori A, et al. Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Science*, 2010, 329(5995): 1065–1067.
- [45] Shinohara H, Mori A, Yasue N, et al. Identification of three LRR-RKs involved in perception of root meristem growth factor in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(14): 3897–3902.
- [46] Song W, Liu L, Wang JZ, et al. Signature motif-guided identification of receptors for peptide hormones essential for root meristem growth. *Cell Res*, 2016, 26(6): 674–685.
- [47] Ou Y, Lu XT, Zi QE, et al. RGF1 INSENSITIVE 1 to 5, a group of LRR receptor-like kinases, are essential for the perception of root meristem growth factor 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Res*, 2016, 26(6): 686–698.
- [48] Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, et al. A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science*, 2003, 302(5652): 1956–1960.
- [49] Yadav RK, Girke T, Pasala S, et al. Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(12): 4941–4946.
- [50] Yadav RK, Tavakkoli M, Xie MT, et al. A high-resolution gene expression map of the *Arabidopsis* shoot meristem stem cell niche. *Development*, 2014, 141(13): 2735–2744.
- [51] Hong SM, Lee EK, Jin YW. Composition for preventing or treating AIDS containing plant stem cell line derived from cambium of *Panax ginseng* including wild ginseng or ginseng as active ingredient: US, 9415081. 2016-08-16.
- [52] Kim SJ, Choi HS, Cho HI, et al. Protective effect of wild ginseng cambial meristematic cells on D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *J Ginseng Res*, 2015, 39(4): 376–383.
- [53] Jang AY, Song EJ, Shin SH, et al. Potentiation of natural killer (NK) cell activity by methanol extract of cultured cambial meristematic cells of wild ginseng and its mechanism. *Life Sci*, 2015, 135(9): 138–146.
- [54] Jin YW, Lee EK, Lim MJ. Composition for preventing or treating liver diseases, containing plant stem cell lines derived from the cambium of *Panax ginseng* including mountain ginseng or ginseng as active ingredient: US, 9289457. 2016-03-22.
- [55] Jin YW, Lee EK. Composition for cancer prevention or treatment containing as active ingredient plant stem cell line derived from cambium of *Panax ginseng* including wild ginseng or ginseng: US, 9314492. 2016-04-19.
- [56] Jang MO, Lim MJ, Oh IS, et al. Anti-aging or antioxidant composition containing plant stem cell line derived from cambium of *Panax ginseng*: US, 2011097310. 2011-04-28.
- [57] Chen HJ, Wang YF, Ge XH, et al. Apple stem cell culture method and apple stem cells cultured by method: CN, 104711215. 2015-06-17 (in Chinese). 陈海佳, 王一飞, 葛啸虎, 等. 一种苹果干细胞的培养方法及培养的苹果干细胞: 中国, 104711215. 2015-06-17.
- [58] Lin SF. Isolated culture and extraction of plant stem cells of tomato and preparation method of oral liquids, beverages and white spirit: CN, 103320379. 2013-09-25 (in Chinese). 林树芳. 番茄植物干细胞分离培养提取与口服液、饮料和白酒的制备方法: 中国, 103320379. 2013-09-25.

(本文责编 陈宏宇)