

领域前沿·中国



孙蒙祥, 武汉大学教授、博士生导师。1982年本科毕业于华中师范大学。1987年、1994年先后于武汉大学获得硕士和博士学位。1995年后分别在荷兰Wageningen University、意大利Siena University、德国University of Hamburg等从事博士后研究。主要研究领域为植物生殖发育, 具体方向为被子植物受精与早期胚胎发生的分子机制。近年, 先后揭示了植物如何防止多精入卵、父母亲本基因相互作用调控根的分化、杂交后父本基因组激活的时间进程、父母亲本对杂种胚胎转录组的贡献、种子发育中胚乳的独立性等一系列重要机制。在*Nature*、*Nat Plants*、*Dev Cell*、*PNAS*、*Curr Biol*、*Nat Commun*、*Plant Cell*和*Mol Plant*等期刊上发表论文120余篇。



程天河, 武汉大学博士后。2014年本科毕业于安庆师范大学。2020年于武汉大学获得博士学位。博士毕业至今在武汉大学从事博士后和合作研究。主要研究领域为植物生殖发育, 具体方向为父母本起源基因在早期胚胎发生中的作用。近年来, 先后揭示父母亲本起源基因如何相互作用确保胚胎正常发育和胚胎早期表达基因如何调控晚期胚胎中油脂积累等重要机制。相关成果发表在*Nature*、*New Phytol*期刊上。

父母亲本起源基因互作调控胚根干细胞龛分化

程天河 孙蒙祥*

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

摘要 受精卵整合了父母亲本的遗传信息后启动胚胎发生。关于父母亲本对子代胚胎的贡献问题已讨论了数十年, 已有的数据表明父母双方都参与调控了植物早期胚胎发生。遗憾的是, 父本对胚胎发育的具体调控作用, 以及相关的分子调控途径迄今仍知之甚少, 对父母亲本基因如何相互作用更是不甚了解。武汉大学有性生殖团队最新研究揭示, *TREE1*和它的同源物*DAZ3*作为父本起源基因在受精卵中通过直接抑制母本起源基因*RKD2*的转录, 解除*RKD2*对根干细胞龛分化的有害影响, 从而确保胚胎正常发育和胚后根的正常发生。这一研究结果阐明了精子的遗传缺陷如何对特定植物器官分化施加持久的父本影响, 以及父母亲本基因如何相互作用以确保正常的胚胎发生。这项工作还提出了植物器官形成的先天性调控的新途径。

关键词 精细胞; 卵细胞; 受精作用; 父母亲本起源基因; 胚根原; 根干细胞龛; 拟南芥

国家自然科学基金(批准号: 32130031、31991201)和中国博士后科学基金(批准号: 2021M702524)资助的课题

*通信作者。Tel: 027-68756170, E-mail: mxsun@whu.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32130031, 31991201), and the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2021M702524)

*Corresponding author. Tel: +86-27-68756170, E-mail: mxsun@whu.edu.cn

Interaction of Parental-of-Origin Genes Regulates Root Stem Cell Niche Differentiation

CHENG Tianhe, SUN Mengxiang*

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract The fertilization integrates genetic information from both parents and initiates embryogenesis. The involvement of parental contributions in embryo development has been a hot topic for decades. Available data suggest that both parents play roles in early embryogenesis. However, the specific processes and associated molecular pathways involved in paternal contribution to early embryogenesis and plant development is poorly understood, not to mention how the parental-of-origin genes interaction. Recently, researchers from Wuhan University reveal that *TREE1* and its homolog *DAZ3* as paternal-of-origin genes can directly inhibit the transcription of a maternal-of-origin gene *RKD2* in fertilized egg cell, so that counteract the *RKD2* maternal detrimental effects to ensure normal embryogenesis and root organogenesis. These findings shed light on how genetic abnormalities in sperm can have long-lasting paternal effects on specific plant organ differentiation, as well as how interactions between parental-of-origin genes ensure normal embryogenesis. This work also introduces a new concept regarding how plant organogenesis can be influenced by gamete quality.

Keywords sperm cell; egg cell; fertilization; parental-of-origin gene; hypophysis; stem cell niche; *Arabidopsis*

被子植物受精后,单倍体的卵细胞与精细胞融合,产生二倍体的合子,随后启动胚胎发生,形成新一代孢子体,以此繁衍后代^[1-2]。这一过程是植物世代交替的关键环节,也是杂交育种赖以进行的生理基础^[3]。因此,自上世纪以来,受精和早期胚胎发生一直备受研究者关注。植物受精后,父母亲本双方的遗传信息合为一处,成为胚胎启动发生的遗传信息基础。由此就引发了几个基本的科学问题,即来自父母亲本的遗传信息何时开始作用,有何作用,如何作用?特别是哪些来自父母亲本的遗传信息对胚胎发生的启动和模式建成是至关重要的?父母亲本在胚胎发育具体的发育事件中扮演了何种不同的角色?显然,回答这些问题是深入理解胚胎发生调控机制的必备基础^[4-5]。为此,学术界开展了持续30年的广泛讨论。要回答上述问题,必然要关注父母亲本起源基因(parental-of-origin genes)的表达与作用^[6-9]。所谓父母亲本起源基因是指在胚胎中单亲表达的基因,即只有父本或母本表达的基因^[6]。然而,植物的精卵细胞发育、受精过程与早期胚胎发生过程短暂,且精卵细胞又深埋于层层母体组织之中,分离细胞不易且难以避免污染,研究难度大,以至于父母亲本基因研究长期迟滞。迄

今为止,配子携带的父母亲本起源基因表达产物调控早期胚胎发生的报道很少。其中*SSP*(*SHORT SUSPENSOR*)是一个编码白细胞介素受体相关激酶*IRAK*(interleukin-1 receptor-associated kinase)/粒样激酶的基因,在精细胞中转录,但不翻译成蛋白质,受精后,在受精卵中翻译成蛋白,调控合子的伸长和第一次不均等分裂^[8]。另外,在水稻中,*BBMI*(*BABY BOOM1*)基因编码一个AP2型转录因子,也只在精细胞中表达,卵细胞中不表达,*BBM*蛋白通过受精作用传递到受精卵中,调控胚胎发生,其在卵细胞异位表达可以启动孤雌生殖^[9-10]。基于父本起源基因在受精和早期胚胎发生中的重要作用,挖掘新的父本起源基因的任务仍任重道远。

1 *TREE1*和*DAZ3*确系父本起源基因

为了挖掘新的父本起源基因,基于实验室建立的精细胞、卵细胞和早期胚胎数据库,我们筛选出符合父本起源基因表达特点即在精细胞中表达,卵细胞中不表达,基因表达产物可以传递到早期胚胎中的一系列候选基因^[11-14]。其中,一个转录抑制因子*TREE1*和其同源基因*DAZ3*为关注的重点。为了验证*TREE1*(transcriptional repressor of EIN3-depen-

dent ethylene-response 1)和 $DAZ3$ (*duo1-activated zinc finger 3*)是否为父本起源基因, 我们设计了一系列的实验。首先, 我们使用RT-qPCR技术证实, $TREE1$ 和 $DAZ3$ 只在生殖相关组织中表达, 而不在营养组织中表达, 为证明 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 的细胞表达特异性, 我们分别构建了 $TREE1$ -GFP和 $DAZ3$ -GFP的融合蛋白植株。基于 $TREE1$ -GFP和 $DAZ3$ -GFP融合蛋白的观察, 确证了 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 只在精细胞中表达, 不在卵细胞中表达。通过融合蛋白株系和野生型正反交实验证明 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 可以通过受精作用传递到早期胚胎中, 并且随着受精卵分裂启动胚胎发生而逐步降解, 到八细胞胚胎时期其蛋白完全消失。提取去雄24小时后的胚珠总RNA, 通过RT-qPCR实验以母本起源基因 $ECS1$ 为阳性对照, 父本起源基因 SSP 为阴性对照, 再次证明 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 不在卵细胞中表达^[15]。综上, $TREE1$ 和 $DAZ3$ 确系父本起源基因。

2 $TREE1$ 参与调控根干细胞命运决定

为了研究 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 在受精和胚胎发育过程中的功能, 我们通过基因编辑技术分别创建 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 的单突变体, 分别将其命名为 $tree1-L1$ 、 $tree1-L2$ 、 $daz3-L1$ 和 $daz3-L2$ ^[16]。观察 $tree1$ 和 $daz3$ 的表型发现, 其营养生长和生殖发育过程与野生型没有区别。考虑到 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 存在极其相似的表达模式和氨基酸序列, 以及 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 在同一染色体小臂上, 杂交很难获得 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 的双突变体, 我们以 $daz3-L1$ 植株为背景, 再次编辑 $TREE1$ 基因, 获得了 $tree1-L1 daz3-L1$ 和 $tree1-L2 daz3-L1$ 独立的突变体株系。通过DAPI染色分析发现, $tree1 daz3$ 的雄性生殖单位相较于野生型没有差异; 将 $tree1 daz3$ 与精细胞标记基因 $HTR10$ 的融合蛋白株系杂交发现, $tree1 daz3$ 植株精细胞数目、形态都正常; 限量授粉实验表明, $tree1 daz3$ 的精细胞受精能力也正常, 受精后受精卵可进行正常的不均等分裂^[17-18]。有意思的是, 在双突变体中, 胚根原细胞不能进行正常的横分裂, 其分裂面倾斜, 继而胚根原子代细胞形态和位置出现异常, 最终导致根干细胞命运决定紊乱^[19]。胚根原标记基因 $WOX5$ 信号在 $tree1-L1 daz3-L1$ 球形胚的部分基底细胞中缺失, 在心形胚的静止中心和根干细胞中的范围扩大^[20]。根据前人的报道, 胚

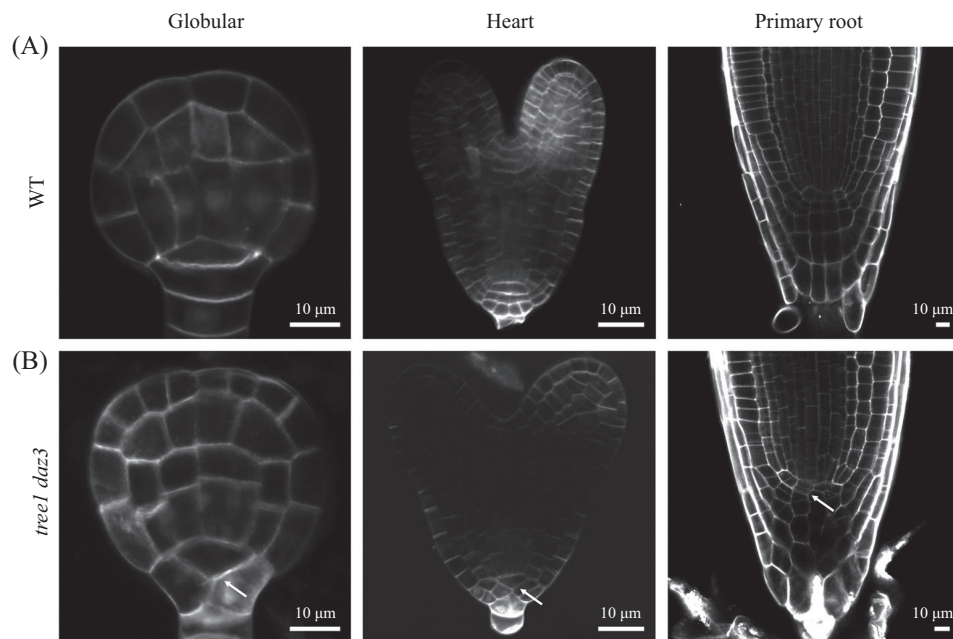
根原细胞命运的特化与生长素响应有关, 因此, 我们用生长素响应报告基因 $DR5$ 来指示 $tree1 daz3$ 中生长素响应^[21], 结果表明在异常分裂的胚根原和初生根中生长素响应明显异常。综上, 两个精细胞特异表达的父本起源基因 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 编码的两个转录抑制因子, 参与了胚根干细胞命运的决定。

3 精子遗传缺陷导致根干细胞发育异常

为了更加清晰地揭示 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 如何调控胚根原命运的确立, 我们通过 $tree1 daz3$ 和野生型正反交实验证明, 胚根原分裂异常只发生在 $tree1 daz3$ 作为父本, 野生型作为母本时的胚胎中。此结果表明 $tree1 daz3$ 中胚胎的缺陷具有父本效应。进一步观察发现 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 只在精细胞中表达, 蛋白通过受精作用传递到早期胚胎中, 并在受精卵分裂几次后(八细胞胚胎之前)完全降解, 即胚根原出现异常分裂之前蛋白早已消失。这表明早期胚胎中的蛋白行使功能的效应对晚期胚胎和胚后器官发育具有长期影响。运用胚胎晚期启动子 $ABI3$ 驱动 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 分别回补 $tree1 daz3$, 通过转基因胚胎表型观察发现, 从二细胞胚胎时期起始表达 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 无法拯救缺陷的胚根原、初生根和根损伤后根尖再生的能力^[22]。这表明是精细胞中缺失了 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 蛋白, 导致了胚后根器官发育异常(图1)。由此揭示了目前尚未引起关注的配子质量在后代特定器官形成中的重要调控作用。

4 $TREE1$ 与母本起源基因 $RKD2$ 直接相互作用

为了更好揭示 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 如何行使功能, 我们找到了一系列和 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 相互作用的候选基因, 这些基因都满足在卵细胞中高表达且受精后快速被抑制的特点^[12]。通过启动子活性分析, 我们发现其中一个候选基因 $RKD2$ 为母本起源基因, 特异表达在卵细胞中, 受精之后快速被抑制转录^[23-24]。通过RT-qPCR实验检测发现, 与野生型相比受精后突变体胚胎中 $RKD2$ 表达水平显著性上调, 即 $RKD2$ 转录失去了抑制。另外, 将 $RKD2$ 启动子活性株系与 $tree1 daz3$ 进行正反交实验, 在 $tree1 daz3$ 为父本的杂交胚胎中 $RKD2$ 的表达量上调。以上实验都表明在 $TREE1$ 和 $DAZ3$ 蛋白突变后, $RKD2$ 的表达不受抑制。在 $RKD2$ 启动子活性报告植株中, 运用胚囊特异启动



A: 野生型中, 正常发育的球形胚时期、心形胚时期胚胎和初生根; B: 在 *tree1 daz3* 胚胎中, 胚根原分裂异常和初生根尖发育异常。

A: the photographs exhibited normal development of globular-stage embryo, heart-stage embryo and primary root, in wild type; B: in *tree1 daz3* embryo, the hypophysis division and development of primary root tip are abnormal.

图1 TREE1调控胚根原正常分裂和根的正常发育 (根据参考文献[7]修改)

Fig.1 TREE1 regulates normal hypophysis division and normal root development (modified from reference [7])

子驱动 *TREE1* 和 *DAZ3* 异位表达, 表明单独在胚囊中表达 *TREE1* 或 *DAZ3* 都能抑制 *RKD2* 的转录^[25]。在前人研究中, 我们发现 *RKD2* 启动子上有 *TREE1* 的结合位点 AGCTAAAG。我们对其进行突变, 在该结合位点突变了 *RKD2*-GFP 融合蛋白植株中, 卵细胞中 *RKD2* 的表达不受影响, 受精后 *RKD2* 的表达也没有下调, 且在八细胞胚胎时期仍然能观测到 *RKD2*-GFP 存在^[26]。综上, 父本起源的 *TREE1* 和 *DAZ3* 与母本起源基因 *RKD2* 相互作用, 通过在受精后抑制 *RKD2* 在早期胚胎中的表达而调控胚根原发育。

5 母本起源基因 *RKD2* 延时表达对胚胎具有损害作用

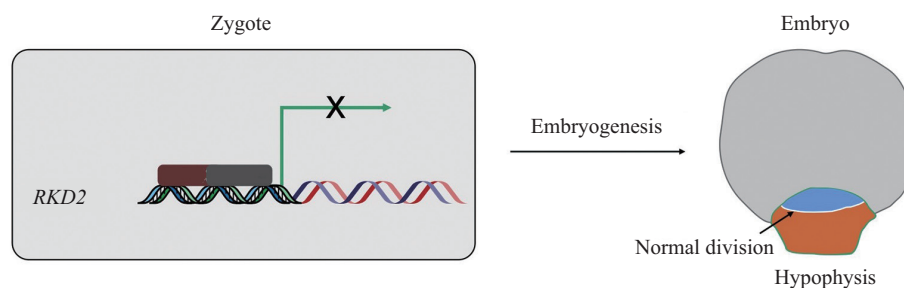
为了探究 *RKD2* 受精后为什么要被及时地抑制, 我们用受精卵起始表达的启动子 *ZC2* 来驱动 *RKD2* 在早期胚胎中的表达^[12], 发现胚根原出现了异常分裂的表型。通过报告基因 *WOX5* 的指示, 我们发现在异位表达植物中胚根原的命运确立出现异常, 最终导致初生根中根干细胞龛的范围和命运确立出现异常。进一步, 通过报告基因 *DR5* 的指示, 我们发现在异位表达植物中, 生长素的响应也出现异常。以上结果解释了为什么 *RKD2* 受精后要被及时地抑制, 如

其不能被抑制将损害胚胎发育和胚后根发育。这一结果也揭示了受精作用新的内涵。

6 展望

本研究强调了精子质量和父本效应在植物胚胎发育和器官形成中的重要作用。它提供了一个清楚的例子, 说明父系遗传因子对植物发育的持续影响。同样, 由于精子中 *TREE1* 和 *DAZ3* 基因突变而导致的幼苗根部干细胞龛异常, 呈现一种精子起源的先天性缺陷^[27-30], 凸显了迄今为止尚不知晓的根干细胞龛建立的新机制 (图2)。

精细胞和卵细胞融合后, 沉寂状态的卵细胞被激活, 在这个过程中一系列基因被激活, 表观修饰进行重新编程。因此, 几十年来, 植物生殖生物学家一直关注卵细胞的激活机制, 而忽略了卵细胞中一些对胚胎发育有害的基因需要被关闭。我们的研究表明, 精子携带的父本起源基因 *TREE1* 及其同源基因 *DAZ3* 在受精后被传递到卵细胞, 抑制受精卵携带的母本起源基因 *RKD2* 转录, 解除 *RKD2* 对早期胚胎的毒害。从而确保胚胎和幼苗中根干细胞龛的正确建立。这也为相关科研工作者提供了参考, 即卵细胞基因组的激活和母本有害基因的表达抑制同等重



精子携带的TREE1和DAZ3通过受精作用传递到卵细胞中, 抑制受精卵中*RKD2*的表达, 从而促进胚根原的正确分裂、根干细胞命运确立和初生根的正常发育。

In the wild type, TREE1 and DAZ3 from sperm cell transmitted to egg cell through fertilization and inhibited the expression of *RKD2* to guarantee normal division of the hypophysis founder cell and subsequent cell fate specification of the stem cell niche for normal root tip development.

图2 TREE1和DAZ3工作模型(根据参考文献[7]修改)

Fig.2 Working model of TREE1 and DAZ3 (modified from reference [7])

要, 这一领域值得关注。

另一值得思考的问题是 TREE1 只存在早期胚胎中, 在胚根原异常分裂之前 TREE1 蛋白早已完全降解, 因此, TREE1 如何跨越时空调控根的发育也是一个极其有趣又充满挑战的课题。或许时空组学能提供有益的线索揭示受精后 TREE1 下游级联反应, 以及胚胎晚期根干细胞发育的调控网络。

参考文献 (References)

- [1] ANDERSON S N, JOHNSON C S, CHESNUT J, et al. The zygotic transition is initiated in unicellular plant zygotes with asymmetric activation of parental genomes [J]. *Dev Cell*, 2017, 43(3): 349-58,e4.
- [2] AUTRAN D, BAROUX C, RAISSIG MICHAEL T, et al. Maternal epigenetic pathways control parental contributions to arabidopsis early embryogenesis [J]. *Cell*, 2011, 145(5): 707-19.
- [3] NODINE M D, BARTEL D P. Maternal and paternal genomes contribute equally to the transcriptome of early plant embryos [J]. *Nature*, 2012, 482(7383): 94-7.
- [4] HUANG X, ZHAO P, PENG X, et al. Seed development in *Arabidopsis*: what we have learnt in the past 30 years [J]. *Seed Biol*, 2023, doi.org/10.48130/SeedBio-2023-0006.
- [5] SHI C, LUO P, DU Y T, et al. Maternal control of suspensor programmed cell death via gibberellin signaling [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3484.
- [6] LUO A, SHI C, ZHANG L, et al. The expression and roles of parent-of-origin genes in early embryogenesis of angiosperms [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 729.
- [7] CHENG T, LIU Z, LI H, et al. Sperm-origin paternal effects on root stem cell niche differentiation [J]. *Nature*, 2024, doi: 10.1038/s41586-024-07885-0.
- [8] BAYER M, NAWY T, GIGLIONE C, et al. Paternal control of embryonic patterning in arabidopsis thaliana [J]. *Science*, 2009, 323: 1485-8.
- [9] KHANDAY I, SKINNER D, YANG B, et al. A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds [J]. *Nature*, 2019, 565(7737): 91-5.
- [10] CHEN B, MAAS L, FIGUEIREDO D, et al. BABY BOOM regulates early embryo and endosperm development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(25): e2201761119.
- [11] ZHAO P, SHI C, WANG L, et al. The parental contributions to early plant embryogenesis and the concept of maternal-to-zygotic transition in plants [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2022, 65: 102144.
- [12] ZHAO P, ZHOU X, SHEN K, et al. Two-step maternal-to-zygotic transition with two-phase parental genome contributions [J]. *Dev Cell*, 2019, 49(6): 882-93,e5.
- [13] ZHOU X, LIU Z, SHEN K, et al. Cell lineage-specific transcriptome analysis for interpreting cell fate specification of preembryos [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1366.
- [14] HUANG X, SUN M X. H3K27 methylation regulates the fate of two cell lineages in male gametophytes [J]. *Plant Cell*, 2022, 34(8): 2989-3005.
- [15] YU X, ZHANG X, ZHAO P, et al. Fertilized egg cells secrete endopeptidases to avoid polytubey [J]. *Nature*, 2021, 592: 433-7.
- [16] YAN L, WEI S, WU Y, et al. High-efficiency genome editing in arabidopsis using YAO promoter-driven CRISPR/Cas9 system [J]. *Mol Plant*, 2015, 8(12): 1820-3.
- [17] INGOUFF M, HAMAMURA Y, GOURGUES M, et al. Distinct dynamics of HISTONE3 variants between the two fertilization products in plants [J]. *Curr Biol*, 2007, 17(12): 1032-7.
- [18] BORG M, RUTLEY N, KAGALE S, et al. An EAR-dependent regulatory module promotes male germ cell division and sperm fertility in arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2014, 26(5): 2098-113.
- [19] ZHOU W, LOZANO-TORRES J L, BLILOU I, et al. A jasmonate signaling network activates root stem cells and promotes regeneration [J]. *Cell*, 2019, 177(4): 942-56,e14.
- [20] XU J, HOFHUIS H, HEIDSTRA R, et al. A molecular framework for plant regeneration [J]. *Science*, 2006, 311: 385-8.
- [21] FRIML J, VIETEN A, SAUER M, et al. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2003, 426: 147-53.
- [22] NG D W, CHANDRASEKHARAN M B, HALL T C. The 5' UTR negatively regulates quantitative and spatial expression from the ABI3 promoter [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54: 25-38.
- [23] TEDESCHI F, RIZZO P, RUTTEN T, et al. RWP-RK domain-containing transcription factors control cell differentiation during female gametophyte development in *Arabidopsis* [J]. *New Phy*

- tol, 2017, 213(4): 1909-24.
- [24] KOSZEGI D, JOHNSTON A J, RUTTEN T, et al. Members of the RKD transcription factor family induce an egg cell-like gene expression program [J]. *Plant J*, 2011, 67(2): 280-91.
- [25] SUN Y, WANG X, PAN L, et al. Plant egg cell fate determination depends on its exact position in female gametophyte [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(8): e2017488118.
- [26] WANG L, KO E E, TRAN J, et al. TREE1-EIN3-mediated transcriptional repression inhibits shoot growth in response to ethylene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(46): 29178-89.
- [27] PERLMAN R L, GOVINDARAJU D R. Archibald E. Garrod: the father of precision medicine [J]. *Genet Med*, 2016, 18(11): 1088-9.
- [28] CLAUSNITZER M, CHO J H, COLLINS R, et al. A brief history of human disease genetics [J]. *Nature*, 2020, 577(7789): 179-89.
- [29] SIKLENKA K, ERKEK S, GODMANN M, et al. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally [J]. *Science*, 2015, 350(6261): aab2006.
- [30] RANDO O J, SIMMONS R A. I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism [J]. *Cell*, 2015, 161(1): 93-105.