



武汉大学植物生殖研究的两个四十年

彭雄波, 赵鹏, 孙蒙祥*

武汉大学生命科学学院, 武汉 430072

*联系人, E-mail: mxsun@whu.edu.cn

收稿日期: 2022-03-25; 接受日期: 2022-06-02; 网络版发表日期: 2022-09-07

摘要 武汉大学有性生殖研究由杨弘远院士和周嫦教授开创, 经过四十年的努力, 在未受精子房培养和性细胞离体操作等方面取得了突出的成果, 形成了鲜明的实验生殖生物学的研究特色. 这些成果集中收录在《植物有性生殖实验研究四十年》论文集中, 成为武汉大学, 乃至我国植物生殖生物学从描述性研究转向实验性研究的一个标志性例证. 师从杨弘远先生的孙蒙祥教授在武汉大学继续从事植物生殖发育研究, 迄今也有四十年之久. 其间, 适逢国际上该领域从植物生殖生物学向植物生殖发育生物学的快速转变期. 该时期的研究特点是基于分子生物学和细胞生物学基本技术, 按照发育生物学理念思考、探讨植物生殖过程的分子调控机理. 该团队经过十余年的痛苦转型, 跟上了国际发展大势, 并在继承武汉大学植物有性生殖研究特色的基础上, 在拓展研究思路和深度等方面进行了不懈的努力. 本文试图对这两个相互交叠的四十年的研究进行大致梳理与反思, 以期反映武汉大学植物有性生殖研究在不同时期发展的一个侧面. 谨以此文祝贺武汉大学生命科学学院百年院庆.

关键词 植物有性生殖, 受精, 胚胎发生, 武汉大学

我国第一届植物生殖生物学学术讨论会于1985年10月在武汉召开, 在这之前以王伏雄先生、胡适宜先生为首的植物生殖生物学家们已经成立了中国植物学会生殖生物学专业委员会, 标志着我国植物生殖生物学研究进入了一个快速发展时期. 20世纪80年代的植物生殖生物学脱胎于植物胚胎学, 而传统胚胎学属于形态学的范畴, 大部分研究者仍然从事描述性胚胎学研究, 开展对各种植物的大、小孢子发生, 雌、雄配子体发育, 受精与种子发育过程的观察. 受国际上新的发展方向的影响, 杨弘远先生、胡适宜先生等研究团队率先在国内开展了性细胞的分离和离体研究, 推动了我国植物实验生殖生物学的发展, 并在国际

上产生了较大的影响. 此后, 随着分子生物学研究的兴起, 植物生殖生物学逐渐向植物生殖发育生物学深化, 并在近20年历经了第二个快速发展时期. 经过两代人的努力, 当代中国植物生殖生物学研究已远非昔日可比, 在很多方面已跻身国际前沿, 成为国际上该领域中一支不可忽视的力量. 在此期间, 武汉大学植物生殖生物学研究团队始终参与其中. 杨弘远、周嫦两位先生编纂的《植物有性生殖实验研究四十年》集中反映了武汉大学研究团队参与第一个生殖生物学快速发展时期的研究历程^[1]. 此后, 师从杨弘远先生的孙蒙祥教授及其研究团队继续在该领域不断探索, 又积极参与了第二个快速发展时期, 迄今, 也有四十年的历程.

引用格式: 彭雄波, 赵鹏, 孙蒙祥. 武汉大学植物生殖研究的两个四十年. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 1315–1325

Peng X B, Zhao P, Sun M X. Two forty-years for researches on sexual plant reproduction in Wuhan University (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 1315–1325, doi: 10.1360/SSV-2022-0050

值武汉大学生命科学学院百年院庆之际, 本文试图记录与评述这两个团队的工作, 藉此反映半个多世纪以来武汉大学植物生殖生物学研究的发展, 特别是在新时期发展的某些侧面。回顾发展历程, 追溯科研轨迹, 成败得失兼有, 梳理当时对一些研究方向的思考与选择, 虽曲直对错已无计更改, 或可对年轻学者有所裨益。

1 武汉大学植物实验生殖生物学研究: 杨弘远先生团队四十年的实践与思考

武汉大学植物生殖生物学研究是杨弘远、周端两位先生开创的, 并坚持了四十年之久。杨弘远先生于1954年于武汉大学生物系毕业后留系工作。从20世纪50年代开始, 杨弘远先生研究被子植物胚胎学, 开设植物胚胎学课程, 成为我国这一领域研究与教学的开拓者之一。这期间, 杨先生先后在《植物学报》、《遗传学集刊》等刊物发表了多篇论文, 重点研究植物授粉受精过程, 受到国内学术界的重视。“文革”期间, 相关研究被迫中断, 但杨弘远先生忍辱负重, 以惊人的毅力坚持学习, 以阅读英文版《毛泽东选集》的形式学习英语, 并努力了解国际科研动态, 为日后恢复科研奠定了很好的基础, 是“文革”后我国为数不多的率先将学术影响由国内扩大到国际的科学家之一。

20世纪70年代末, 杨弘远、周端两位先生在水稻花药培养实验中, 意外观察到子房中出现了异常的变化, 他们抓住这一偶然发现, 由未传粉子房中培养出单倍体植株, 并于1980年在《遗传学报》上发表了这一研究成果^[2]。他们敏感地意识到这是一片未开垦之地, 果断地作了研究战略的“大转移”, 放弃了传统描述性工作, 由此开始了长达十余年的关于离体雌核发育的实验研究。他们先后在多种植物中通过未传粉子房与胚珠培养诱导出单倍体植株, 并进而揭示了“离体孤雌生殖”与“离体无配子生殖”两种类型无融合生殖单倍体的发生与发育规律。1981年, 在国际刊物*Plant Science Letters*发表了这方面的第一篇英文论文^[3]; 1982年, 在*Theoretical and Applied Genetics*上又发表了首篇关于这方面的综述^[4], 其研究深度和广度都超过了当时国际同行的工作, 引起了广泛关注。

此后, 杨弘远先生审时度势, 倡导多学科交叉, 推陈出新, 推动我国实验胚胎学迈向实验生殖生物学。在

子房培养成功的基础上, 受一篇俄文文献的启发, 他们开始探索子房内的胚囊的分离。胚囊是被子植物的雌配子体, 是受精和胚胎发生的场所。胚囊的分离不仅提供了一种整体、原位观察胚囊成员细胞的手段, 而且提供了直接人工操作生活胚囊的可能性。1982年, 杨弘远先生和周端先生合作, 创建了由经过化学固定的胚珠中分离出胚囊的技术。他们采用酶处理辅以机械振荡的方法首次分离出了完整的胚囊, 由此可以清楚地观察到胚囊内部所有成员细胞的三维形态与相对位置。这对当时只能用大量切片才能看到残缺不全的胚囊内部结构的生殖生物学研究者来说, 是个相当大的鼓舞。该成果发表在当时的国内权威杂志《植物学报》上^[5]。很快, 他们又于1985年在国际刊物*Planta*上发表了首篇生活胚囊分离的论文^[6]。此后, 国内外不少单位都相继开展了分离胚囊的研究。北京大学胡适宜先生团队独辟蹊径, 首次分离出了生活的卵细胞^[7]。这些开创性的工作引领了国际上后来如火如荼的性细胞操作的热潮, 开创了植物有性生殖实验研究的崭新时代。1992年, 杨弘远先生在*American Journal of Botany*上以特邀论文形式发表了《植物实验生殖生物学与生殖细胞操作: 现在与未来》一文^[8]。他认为植物生殖生物学研究可以向实验生殖生物学研究和生殖工程研究两个方向拓展。这一战略思考引导了他们将后续工作的重点都放在了性细胞离体实验操作方面。

此后, 他们的主要研究兴趣又由雌性细胞向雄性细胞扩展, 系统而扎实地开展了一系列别开生面的研究, 并在雌性与雄性生殖系统两个方面都形成了自己的研究特色。20世纪80年代末90年代初, 分子生物学在国内已现端倪, 但大多数生殖生物学研究者都还没有接触到分子生物学。杨弘远先生擅长超微结构研究, 而周端先生专长于组织培养。因而, 团队很自然地将性细胞体外操作研究思路向超微结构观察和体外培养实验两个方向上拓展, 形成了他们实验生殖生物学的特色。他们相继开展了大量精细胞、花粉原生质体的分离、培养与超微结构观察研究, 取得了一系列成果。发现精细胞已然高度特化, 且在离体培养条件下很难脱分化, 其全能性迄今仍未能证实。花粉原生质体的体外培养也发现有趣的结果, 去掉花粉壁的原生质体也可以产生花粉管样的结构。似乎外壁上的萌发孔并不是花粉管伸出的必要条件。考虑到花粉与柱头识别很可能是基于外壁蛋白的作用, 去除花粉的外壁

有可能是一项克服杂交过程中花粉-柱头不亲和障碍的技术. 因而, 这一发现很可能比诱导花粉原生质体成苗具有更重要的实践意义. 上述研究独树一帜, 为当时国际生殖生物学研究领域开辟了一片新天地.

杨弘远、周嫦两位先生的系列工作是我国描述性胚胎学研究走向实验生殖生物学研究的极具代表性的范例, 诠释了武汉大学植物生殖生物学研究的鲜明特色. 实际上也是我国“文革”后植物生殖生物学研究从恢复到兴起, 再到形成自己特色这一不平凡发展历程的一个缩影. 他们的系列成果已具体呈现于两位先生所编纂的《植物有性生殖实验研究四十年》一书中^[1], 其中体现出的勤于思考与勇于创新的精神是支持武汉大学植物生殖生物学研究不断发展的宝贵财富.

2 武汉大学植物生殖发育生物学研究: 孙蒙祥教授团队四十年的继承与发展

孙蒙祥教授1982年作为植物学教师参加工作, 开始接触植物有性生殖, 迄今也已届四十年. 早期曾先后开展了山明桐育性、水稻反足细胞发育以及水稻无融合生殖现象的研究. 他通过这些工作积累了对植物生殖过程的认识与研究经验. 当时, 国内该领域较有新意的工作大致有三个方面: 一是结合超微结构观察技术的工作, 因为需要电子显微镜和专门的经验与技术, 做起来费时费力, 但很容易发文章; 二是结合组织培养技术的工作, 当时植物器官的离体培养方兴未艾, 给传统描述性工作增加了实验和人工调控的理念, 吸引了一大批学者; 三是性细胞分离的工作, 武汉大学周嫦先生率先尝试了酶法分离胚囊, 北京大学胡适宜先生首次分离了生活卵细胞, 这些工作走在了国际同行前面, 是该领域最引人瞩目的亮点, 对于每天埋头石蜡切片的年轻人有很大的吸引力. 但由于这些技术尚是初创, 重复的难度很大, 令人望而却步. 分析这些领域内的发展趋势, 如何选择学术上的主攻方向, 是一件很困难的事. 孙蒙祥教授早年最终选择了到杨弘远先生实验室学习, 开展性细胞操作相关研究, 并被安排主攻离体受精. 由此, 进入到集中探讨植物受精生物学的研究阶段. 基于杨弘远先生团队的前期工作, 如何保持原有特色、坚持发展和不断创新是武汉大学植物生殖生物学研究要考虑的首要问题. 几十年来, 孙蒙祥教授团队将研究兴趣集中到受精与早期胚胎发生

过程(图1), 并用自己不懈的努力承前启后, 开创了植物生殖发育研究的新局面. 上述努力集中体现在以下几个方面

2.1 关于植物受精机制的探索

受精过程的研究是孙蒙祥教授团队关注最久的课题. 真正投入精力开展专门的研究是从植物体外受精系统的建立开始. 这在当时是一个创新性极强的题目, 也是一个到今天看来都极具挑战性的课题. 实现植物体外受精是当时几代植物学家的梦想. 完成体外受精有三个基本技术要突破: 首先是卵细胞分离技术, 其次是精卵融合技术, 然后是单细胞培养技术. 建立了稳定的、可重复操作的这三项技术, 才有可能开展体外受精的后续相关研究. 该团队首先选择烟草为材料开展工作. 因为烟草细胞经过培养最容易再生植株, 这对于融合产物的培养无疑是非常有利的. 鉴于一般认为单细胞培养可能是最难的一关, 当时对烟草材料的选择不能说是有误, 但始料不及的是烟草胚珠很小, 很容易氧化变色, 因而使得酶解胚珠分离卵细胞的工作异常艰难. 经过一年多的时间才先后解决了去氧化、酶解、解剖、识别等具体障碍, 利用低渗膨胀原理使胚囊从胚珠中释放出来, 再通过解剖得到准确无误的卵细胞. 这一工作进行了很长的时间, 但在操作细节上积累了宝贵的经验, 以致后来分离玉米、水稻等具有大胚珠植物的卵细胞时就非常容易了(图2). 精卵细胞体外融合技术虽然依旧困难, 但较之卵细胞分离相对简单. 当时已有两种用于原生质体融合的技术可以参考: 一是电融合技术, 二是化学融合技术. 但这两种技术都无法做到一对一的定向融合. 该项目竞争者德国团队采用了前一种技术, 用计算机控制的步进马达操控微量移液系统, 可在电场中仅放置一对细胞,



图1 植物有性生殖的中心过程: 配子发生, 受精, 早期胚胎发生

Figure 1 The central process of sexual plant reproduction: gametogenesis, fertilization and early embryogenesis

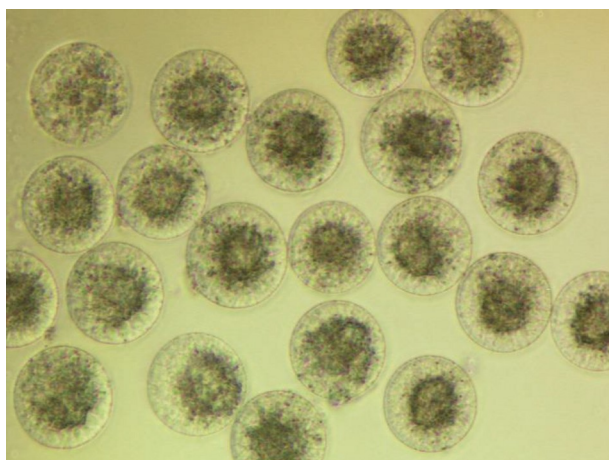


图2 酶解-解剖法分离的玉米卵细胞群体

Figure 2 Maize egg cell population isolated by enzymolysis-dissection method

再利用铂金丝制作的微电极释放电脉冲使精卵细胞融合。武汉大学当时不仅没有经费购买这一套设备,甚至连计算机都没有。为推进研究的进展,孙蒙祥教授团队土法上马,将聚乙二醇(PEG)诱导的原生质体小规模融合改进为单对细胞融合法。通过手工操作,在PEG的微滴中投入单对细胞,也可以很快实现单对细胞的融合。这一简易办法解决了精卵融合的一项关键技术,重要的是价格很优惠,有可操作性。该技术不仅可以诱导精卵融合,也可以介导一个叶绿体融合到一个没有叶绿体的细胞中去,为胞外自主细胞器的母性遗传研究提供了新思路。至此,武汉大学实验室实际上已经能够做精卵细胞的离体融合了。当时,德国研究人员已在玉米中首次实现了植物的离体受精。武汉大学的相关工作虽然经过几年奋力拼搏,已有长足进展,但已然落后了。此时,该团队通过几年的实践已经意识到,离体受精虽然有非常重要的细胞工程意义,但作为受精机理的研究系统有很大的局限性,无法排除人为操作的影响。这与原来的预期有很大差距。因此,最终决定放弃继续攻克融合产物的培养技术,转向利用该技术探讨一些感兴趣的科学问题。因为建立该系统的初衷还是希望能解决原来体内研究无法解决的困难,能看到体内看不到或看不清楚的发育过程。因而,接下来的几年,孙蒙祥教授的工作重点放在了探讨受精过程的一些基本现象,如受精前后卵细胞质的运动状态、细胞核的融合动态和时间进程、细胞体积对细胞融合的影响、精卵融合过程中细胞膜的变化等。这

些现象在体内是无法观察到的,也凸显了体外受精的独特优势。当时利用体外融合技术观察到的一些现象至今仍觉得十分有趣,如发现融合的两个细胞体积差别很大时,不仅融合可以很快完成,融合成功率也很高,使得融合过程受各种不利因素影响的可能性大大降低。这可能解释了为什么进化过程中植物有性生殖方式的演化进入到卵式生殖阶段后精子和卵细胞的体积由原来的基本相似演变成差别巨大的原因。这些工作后来都总结在胡适宜、杨弘远两位先生主编的《被子植物生殖生物学》一书,以及孙蒙祥教授撰写的一篇综述中^[9]。此外,博士生彭雄波等人^[10]在此期间建立了更加接近体内微环境条件的体外受精技术,博士生房克凤等人^[11]发现卵细胞、中央细胞膜表面糖蛋白存在极性分布。受精卵的单细胞培养工作也有了进展,博士生何玉池等人^[12]成功地将受精卵培养成一个完整可育的植株。同时,考虑到国际上该领域的发展趋势,实验室积极准备条件开展分子生物学研究。通过各种渠道积累经费,购置PCR仪、离心机等基本仪器,并在2000~2002年陆续建立了单细胞PCR技术、单个胚囊的突变体表型筛选技术、单细胞荧光标记技术、单个胚胎和单个花粉的基因表达动态观察技术等。这些技术为少量性细胞发育的分子机制研究奠定了技术基础。由于没有足够的经费支持,工作不能全面铺开,这方面进展非常缓慢。直到2002年后,孙蒙祥教授获得国家杰出青年科学基金项目资助的80万元,才开始了有组织、有计划地探讨一些思考了很久的有关受精过程的重要科学问题。这一阶段的工作继承了杨弘远、周端两位先生在受精领域利用离体操作技术开展研究的特色,细化、改进了相关技术,并为向植物生殖发育研究方向的转型奠定了基础。

2.2 关于父母亲本起源基因作用的研究

思考受精过程时首先遇到的一个重要科学问题是精子和卵融合后除了使单倍体世代转入二倍体世代,完成世代交替外,还有什么其他的发育生物学意义?特别是精细胞的融入带来了什么信息?这些信息起了什么作用?因为正常发育情况下的未受精卵细胞是不能启动胚胎发育的,其在受精后才能被激活并启动胚胎发生。所以,首先能想到的是精细胞信息的激活作用。那么,精细胞携带的激活因子是什么?这些因子激活了卵细胞内哪些途径才启动胚胎发生?这些问题无

疑是研究受精机制首先要回答的基本科学问题。要回答这些问题, 一个可行的途径是首先明确受精前后基因表达的差异, 以便找出卵细胞不表达的, 受精时由精子带来的, 因而只在受精卵中才出现的某些因子。然而, 考察动物受精相关研究发现, 受精后早期胚胎发育过程中, 精细胞携带来的父本基因实际上不起作用, 而是由卵细胞中业已表达或储存的蛋白或转录本控制着早期胚胎发生, 即早期胚胎发育实际上是母本控制的。胚胎发育到多细胞囊胚时才转入由父母双方基因组合并而成的合子基因组控制。这一过程被称为胚胎发生的母本控制向合子基因组控制的转换(maternal-zygotic transition)。植物中是否也是这样, 当时不得而知。第一篇相关报道于2000年在*Nature*发表, 认为植物与动物一样, 受精后发育早期也是母本控制的, 父本基因在早期胚胎不表达。这一观点成为此后二十年的主流观点。但若果真如此, 则想要筛查受精前后卵细胞基因表达差异以便探讨卵细胞激活因子的技术思路就不会取得预期的结果。因此, 孙蒙祥教授团队基于卵细胞分离和少量细胞PCR技术, 首先检测了受精卵中是否有精细胞特异基因表达。结果发现, 受精后在合子发育期间父本基因就已经开始转录了。反复验证, 结果皆如此。由此, 开启了该团队长达二十年的父母亲本起源基因在受精与胚胎发生中的作用的思考与探讨, 以及与国际权威意见的持续争论。这些研究涉及几个有趣的科学问题, 即受精后父本基因组何时表达或合子基因组何时激活(zygotic genome activation)? 受精后发育中母本控制向合子基因组控制的转换是何时发生的? 在不同的合子与早期胚胎发育阶段父母亲本基因组是否都有相同的贡献? 受精过程中雌雄配子带来了哪些遗传调控信息? 这些遗传调控信息的具体作用是什么? 显然, 这些问题都是理解受精与胚胎发生机制的核心问题, 也是非常基本的发育生物学问题。不先了解这些基本知识, 就无法回答更深层次的科学问题, 如胚胎发生的发育途径是如何选择和限定的等。

孙蒙祥教授团队博士生宁珏从烟草精、卵细胞的分离做起, 先后收集了卵细胞与受精卵, 用当时刚刚出现的Suppression subtractive hybridization (SSH)和Mirror orientation selection (MOS)相结合的技术筛选出受精前后差异表达的基因, 并用半定量PCR进一步验证了这些差异基因。结果证实了原先的想法, 合子基因组在合子分裂前已经被激活。这一工作在今天看来仍

是非常严谨而可靠的。不仅用MOS技术消除了SSH可能的背景与非特异性扩增, 而且在分离细胞时用了RNA合成抑制剂, 很大程度上避免了在细胞分离过程中机械刺激与环境胁迫诱导的基因表达。因此, 结果是可信的。因为是首次在单细胞转录谱水平揭示了父本基因在合子中的表达, 该结果无疑具有明显的创新性。但遗憾的是这一结论与当时如日中天的权威及其众多追随者意见相悖, 文章投出去屡屡受挫。最后, 在同意修改结论、修改文章题目的情况下, 才以一个简报的形式发表^[13]。考虑到此前的研究都是基于有限数量的基因在受精后的表达情况分析父母亲本等位基因的转录本出现与否, 并不适合于对整个基因组活动的情况予以客观地评价, 因此, 少量基因的表达行为能否代表整个基因组的活动规律仍是疑问。为了彻底明确地回答合子基因组激活的时间问题, 博士生辛海平等在彭雄波博士的帮助下决心不畏权威, 在当时很困难的条件下开展了单细胞转录组的工作, 分离、收集了159个卵细胞、143个合子、149个二胞原胚、4200对精细胞, 构建cDNA文库。通过表达序列标签(expressed sequence tag)比对, 转录本存在的验证, 发现受精后一方面卵细胞原有的转录本在受精后逐渐降解, 另一方面新的转录本会逐渐出现。在烟草合子中优势表达的15个聚类中, 有9个在卵细胞与精细胞中均无表达, 说明它们是受精后重新转录生成的。这些结果进一步证实了合子基因激活始于合子时期。不仅如此, 博士生赵婧同样花了很大精力开展了单细胞培养研究, 采用过去建立的合子离体培养系统, 结合转录抑制剂处理, 证实了受精后新转录本的产生是合子发育与胚胎发生必需的。这一工作至今仍是该领域研究的前沿技术。但这一结果仍遭受到强烈的反对, 经过几番抗争才发表在当时较有影响的植物领域的刊物*Plant Journal*上^[14], 但较之前受到的待遇还是有所改善。通过这些工作, 孙蒙祥教授团队在单细胞的分离、培养、基因表达分析, 乃至转录组分析方面逐渐积累了经验, 成熟了技术。最重要的是, 用了十余年的时间, 实现了从主要从事描述性胚胎学的实验室转型为可以开展细胞生物学、分子生物学、单细胞显微操作等技术较全面的实验室。同时, 研究者们对科学问题的认识也明显前进了一步^[15], 为后面探讨一些生殖发育的重要科学问题奠定了基础。

鉴于当时分子生物学的主流工作都是基于模式植

物拟南芥, 孙蒙祥教授团队之前的研究都是用烟草为材料, 两种模式植物的胚胎发生调控机制是否完全一致也是个疑问。于是, 该团队在拟南芥中重新建立了所有技术体系。拟南芥的胚珠较烟草更小, 分离卵细胞的困难可想而知, 同时, 随着时代进步, 对分离细胞的质量要求更高。团队的研究者们克服了诸多技术瓶颈, 终于在拟南芥中完成了转录组分析。赵鹏博士等人^[16]以详细的分析明确无误地确定了在合子分裂前合子基因组已经激活, 证实植物与动物不同, 父本基因参与了胚胎发生早期过程, 说明母本基因组控制向合子基因组控制的转换在合子分裂前已经启动。这些结论对于认识杂交后父母亲本的作用、解析远源杂交不育等基本问题的研究有重要的指导意义, 相关文章发表在*Developmental Cell*上。对这一问题的讨论过程表明, 科学研究领域里的公平待遇也是需要努力争取的, 正确的认识终会被公认。研究者本身需要做的只能是更努力、更严谨、更实事求是。

此后, 在上述工作基础上, 周雪妹博士、赵鹏博士进一步证实了不仅在胚胎细胞的转录组中父母亲本的贡献是同等的, 在由合子衍生的胚柄细胞的转录组中父母亲本也有同等贡献, 明确了胚柄细胞的存在不可能是前人得出“胚胎早期发育由母本控制”这一错误结论的原因^[17]。周雪妹博士等人^[18]同时发现尽管父母亲本对转录组的贡献是相等的, 但胚柄的发育具有明显的母本特征, 表明父母亲本对转录组的贡献不等于对发育的同等控制。这个结果纠正了该领域的一个认识误区, 为下一步的研究指明了方向。上述工作使植物生殖生物学界对胚胎发生的母本控制向合子基因组控制的转换的概念和与植物发育的关系有了较为清楚的认识。孙蒙祥教授团队^[19,20]陆续提出了对该问题的明确看法, 纠正了过去的错误认识。

通过上述讨论, 孙蒙祥教授团队也意识到今后研究的重点应该放在父母亲本起源基因对受精与胚胎发生的实际贡献上。有了明确的指导思想, 该团队基于业已获得的转录组信息, 很快筛查出一系列精、卵细胞特异表达的基因, 以及受精后合子基因组表达的基因, 开始重点探讨父母亲本的具体作用, 以及胚胎发生启动的机理。这一战略调整使团队的工作进入了一个新的发展阶段。博士生邬建军^[21]的工作已经表明卵细胞内部建立的一些独特机制很可能对受精后发育是必须的, 而要明确受精本身及受精后发育的调控机理, 探讨

精、卵细胞特异表达的基因功能很可能是个有效切入点。目前, 这一领域几近空白。孙蒙祥教授团队最近的研究进一步确定了这一选择思路。博士后禹小波、博士生张雪成和赵鹏博士等人^[22]发现两个在卵细胞特异表达的基因, 不仅对防止多精入卵, 保持植物遗传稳定性有重要作用, 而且对胚胎发育具有长远的影响。有趣的是, 该蛋白在合子分裂后就完全降解, 但其对发育的调控有持续的影响, 提示了探讨胚胎发生调控机制的新思路。这些工作为武汉大学在受精研究领域研究带来了新的面貌。

2.3 有性生殖过程中细胞命运决定机制的研究

研究植物有性生殖的过程中, 特别是关注受精机制的探讨, 不可避免地会注意到细胞命运决定的问题, 如在小孢子中一次有丝分裂怎么就形成了两个发育命运截然不同的精细胞和营养细胞, 而在胚囊里, 卵器的三个细胞中, 卵细胞的命运如何确定, 以及它和其余两个助细胞彼此如何分化为两种不同类型的细胞等基本问题。此外, 精卵融合后, 合子一次分裂会产生两个发育命运截然不同的顶细胞与基细胞, 顶细胞发育为胚胎, 而基细胞则主要发育为胚柄。顶细胞与基细胞又是如何分化的? 孙蒙祥教授团队在关于早期胚胎发生的研究中始终关注着这些问题。对这些问题的研究并非易事, 因为缺乏合适的切入点, 长期以来相关研究进展甚微。受兴趣的驱使, 该团队二十年来陆续开展了一系列探索性工作。

较之配子发育命运的决定机制, 二胞原胚可能是一个更适于研究细胞分化的模型。因为合子是二倍体世代的第一个细胞, 一次分裂形成了两个发育命运不同的子细胞。这是新一代孢子体细胞分化的起点, 推测在相对短的时间里分化程度有限, 分析起来会较为简单。而且观察方便, 特别是细胞分离相对容易, 可以在转录组水平考察顶、基细胞基因表达的差异及合子分裂前后的变化, 也可以借助单细胞培养技术考察其发育动态。基于上述考虑, 该团队先从二胞原胚做起, 进行了一些探索。实际上, 对于顶、基细胞发育命运的决定机制历史上早就有过种种假说, 较有影响的有: (1) 位置假说, 认为基细胞与母体组织相接, 而顶细胞被悬于胚囊中, 这种位置的差别导致了其发育命运的差别; (2) 细胞命运决定子假说, 认为合子中存在细胞命运的决定因子, 合子分裂后, 不同的决定子被分配到

不同的子细胞, 引导不同的发育命运; (3) 核质比假说, 认为顶、基细胞的核质比有明显差别, 可能是其发育命运不同的原因. 这些假说迄今都没有任何证据支持. 基于过去对二胞原胚的观察, 博士生何宇清通过超微结构研究发现烟草合子的细胞壁是不均匀的, 顶端薄而基端厚. 而合子分裂时决定分裂面的细胞核位置恰好位于两种细胞壁的交界处. 由此, 推测细胞壁的机械力有可能是决定细胞分裂面的因子, 进而决定子细胞的核质比或细胞质组分的分配. 博士生何玉池等人^[12]通过合子离体培养也发现合子细胞壁的存在与否的确影响细胞分裂的模式. 于是, 博士生曲良焕等人^[23]利用一个精巧的单细胞活体观察系统测试了机械力对细胞核位置的调控作用, 结果发现细胞核对外施机械力非常敏感且反应迅速. 由于无法改变体内合子的细胞壁状态, 因而无法进一步单因子验证细胞壁对合子分裂和细胞命运决定的作用, 该团队又选择了一个类比系统, 即小孢子胚胎发生系统, 开展了进一步的研究. 烟草和油菜的小孢子可以在培养条件下经胚胎发生途径发育为完整的植株. 20世纪80年代该技术就已经比较成熟了. 为了能有效地用于早期胚胎的实验, 硕士生田辉等人^[24]进一步提高了诱导频率以便于后期对小孢子分裂的观察. 因为那时还没有任何标记基因可用, 博士生汤行春等人^[25]尝试了各种可能鉴别细胞命运变化的标记方法, 做了尽可能的技术准备. 在小孢子培养过程中观察到一个很有趣的现象: 如果小孢子壁是完整的, 则小孢子分裂是均等的, 直接发育成球形胚; 如果小孢子外壁破裂, 则出现不均等分裂, 并可以观察到胚柄的分化. 这与合子胚胎发生过程非常相似. 考虑到可以很容易地获得大量小孢子, 这一系统可能是一个探讨顶、基细胞系的发育命运决定的难得的替代系统. 因此, 汤行春等人^[26]又改进了裂外壁小孢子的制备和培养技术, 特别是建立了一套可以定点追踪单个小孢子发育的观察技术. 细心观察在不同程度裂外壁的小孢子中细胞分裂面的位置, 细胞极性与胚柄分化的关系, 有两个重要发现: 一是小孢子分裂是否均等取决于裂外壁的程度, 表明外壁的机械压力参与调控了细胞分裂面的位置; 二是小孢子裂外壁的过程诱导细胞产生了明显的极性, 即便是均等分裂, 也会产生胚柄的分化. 这些结果暗示了极性的建立, 而非细胞不均等分裂, 是导致不同细胞命运更本质的因素^[26]. 这一认识对于考察细胞不等分裂后

的细胞命运决定有重要的启示作用.

严格意义上, 小孢子胚胎发生是一个合子胚胎发生的替代系统, 已有的认知与设想是否可以诠释体内的发育调控规律, 还是要回到体内合子胚胎发生过程加以检验. 孙蒙祥教授团队进一步从两个方面布局, 展开了基于体内系统的探讨. 一方面建立了顶细胞、基细胞分离技术, 这是一项非常精细的工作^[27]. 在此基础上, 进行了顶、基细胞差异基因的筛查. 解析最初是哪些分子机制参与了顶、基细胞不同发育命运的调控^[28]. 另一方面, 筛查在合子中特异表达的, 参与合子分裂面调控的重要基因. 这是一项费时费力的工作, 常常劳而无功, 但筛查到的基因都有重要作用. 博士生赵晶等人^[29]发现细胞分裂面所在位置的改变的确可以改变顶基细胞的发育命运, 甚至调低某些基因的表达可以让合子分裂面由横向转为纵向, 由此导致裂生双胚, 而且来自一个合子的两个胚胎都有正常的极性. 这些结果支持了极性的建立较之分裂面的位置选择对于细胞分化更为重要的想法, 而且提示了这一过程似乎与核质比没有关系. 然而, 继续研究遇到两个必须要回答的问题. 一是极性建立的根本标志是什么, 怎样检测极性对细胞命运决定的作用. 博士生宁瑛曾花了相当长的时间建立了单细胞原位杂交技术, 并看到的确有在合子中极性分布的RNA. 这是一个非常好的结果, 但重复性较差, 至今仍未拿出去发表. 迄今, 国际上也没见到类似的报道. 二是无法确定合子分裂后顶、基细胞发育命运是否就已经决定了. 尽管顶、基细胞后来发育成了不同的结构, 但没有任何证据表明细胞命运在何时决定的. 一个有趣的实验启发我们认识到顶、基细胞不是孤立的, 而是相互关联的. 博士生李世升等人^[30]构建了一个光诱导基因表达系统用以观察胚胎发生过程中的细胞谱系. 结果发现某些蛋白可以在顶-基细胞间穿行. 这说明两者间的联系很可能参与了其发育命运的决定. 发育生物学中有个判断细胞发育命运决定的规则, 即一个细胞的发育命运如已经决定了, 那么将这一细胞从原位取出后, 它仍能按照原来体内的发育途径继续发育. 而且, 在体内该细胞发育的原有结构会缺失, 不能被其他细胞替代. 这就是所谓细胞发育命运的自主特化(*autonomous cell fate specification*). 按照这一思路, 博士生曲良焕等人^[31]经过艰苦努力建立了一套活细胞激光切割技术, 可将二胞原胚无损伤地分离开来, 并分别单独培养, 定

点追踪观察其发育动态, 结果发现离体的基细胞可以发育为和体内一样的胚柄, 形态和细胞数目都相似. 前提是必须保持原有的细胞壁. 说明合子分裂后, 基细胞的发育命运已经自主决定了. 进而, 博士生刘媛等人^[32]在胚珠体内用激光原位切割胚胎细胞, 发现胚柄最上一个细胞仍然可以具有胚胎发生能力, 再生出新的胚胎(图3). 验证了顶细胞来源的胚胎有抑制胚柄细胞胚胎发生能力的假说, 也表明胚柄细胞具有条件细胞命运特化(*conditional cell fate specification*)的能力. 这些工作揭示, 胚胎细胞命运决定的机制远比我们想象的复杂. 细胞的遗传基础、细胞间的相互作用等多因素共同制约着细胞的发育方向, 而且能随微环境的变化而调整, 从而确保生殖的成功与后代的延续.

基细胞发育而来的胚柄是植物胚胎发生与动物胚胎发生最大的不同. 胚柄细胞命运决定的另一个特点是胚胎尚在幼胚(32个细胞)阶段就开始细胞死亡并最终降解. 胚柄在功能上类似哺乳动物的脐带, 为胚胎运输营养和激素. 胚柄为什么要在胚胎早期就降解, 这一发育命运是如何决定? 这也是植物胚胎学中一个老大难问题, 苦于没有可行的切入点, 一直无法探究. 博士生赵鹏等人^[33]在顶基细胞差异表达基因的筛查中发现一个只在基细胞中表达的基因, 而且只在胚柄降解前高表达. 该基因编码一个半胱氨酸蛋白酶抑制剂. 通过该蛋白的功能分析, 发现该蛋白和其直接底物蛋白酶形成了一个双分子开关调控胚柄细胞程序性死亡的起始. 这一工作为探讨胚柄细胞命运决定提供了切实可行的切入点. 进一步, 博士生史册、罗盼等人^[34]揭示了胚柄的死亡信号实际上是赤霉素(GA), 而决定胚柄死亡命运的实际上是其相邻的母体组织. 通过紧邻胚柄的珠心组织内GA的瞬时升高, 触发了胚柄细胞程序性死亡信号途径. 这一系列工作不仅为一个长期未能解答的问题提供了较为完整的答案, 也为parent-offspring conflict理论提供了更有趣的例证. 这一工作的创新性与可靠性, 技术的精巧与细致集中体现了该团队科研工作的特色及长期以来的追求. 通过这一工作的开展, 研究者对细胞命运决定机制的认识和研究技术均提高了一大步. 由此展开, 该团队又开始关注精细胞、卵细胞命运的决定机制. 最近, 博士生孙扬等人^[35]通过细致的观察发现, 卵细胞在胚囊内的精确位置对其卵细胞的命运决定至关重要, 提示了位置信息在配子分化中的作用. 通过调整位置, 可以使助细

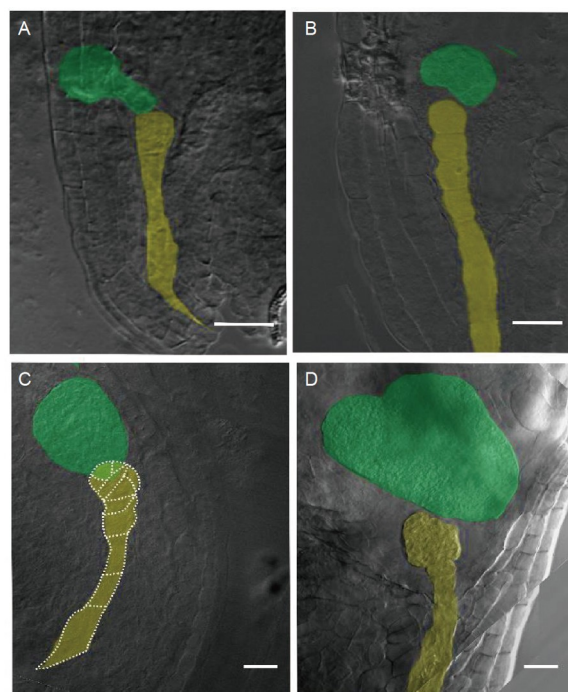


图3 胚柄细胞仍具有胚胎发生能力. A: 激光切割后, 胚柄顶端细胞开始分裂; B: 如果切割位点在最顶端的胚柄细胞, 则胚根原不能形成; C: 胚柄细胞形成的胚胎分裂模式常不规则; D: 切割时保留顶端胚柄细胞时胚胎可以保持顶-基轴向的分化

Figure 3 Suspensor cells have the potential for embryogenesis. A: After laser ablation, the cell at the top of the suspensor begins to divide. B: If the cutting site is in the apical suspensor cell, the hypophysis cannot be formed. C: The pattern of embryo division formed by suspensor cells is often irregular. D: When the apical suspensor cells are retained during cutting, the embryo can maintain apical-basal axial differentiation

胞变成第二个卵细胞. 两个卵细胞都可以受精并发育为胚胎. 黄小荣博士等人^[36]则发现在精细胞发育命运决定中组蛋白的甲基化状态至关重要. 组蛋白H3的27位赖氨酸三甲基化(H3K27me3)是维持营养细胞发育与功能特化必需的, 在营养细胞中擦除H3K27me3使已经分化的营养细胞可以向精细胞转变, 表明这是引导营养细胞和精细胞走向不同发育命运的调控节点. 孙蒙祥教授团队近年对这些传统难点问题的探索展示了这一领域的无穷魅力, 也进一步突出了武汉大学在植物生殖发育中的研究特色.

3 总结与展望

回顾武汉大学有关研究团队两个相互交叠的四十年的研究历程, 有可喜的收获, 也有诸多教训. 两个阶

段的研究分别适逢我国植物实验生殖生物学和植物生殖发育生物学的兴起, 反映了不同时代武汉大学研究者所面临的不同困境与努力. 秉承不因循守旧, 不断创新的精神, 杨弘远、周嫦两位先生开拓了植物实验生殖学的新局面并赋予武汉大学在该领域研究的鲜明特色. 随着国际上该领域的快速发展, 孙蒙祥教授团队历经痛苦的转型, 在继承传统研究特色的基础上, 推动了实验生殖生物学研究跃迁到全面结合细胞生物学、分子生物学、单细胞离体操作等多学科技术的生殖发育生物学研究, 跟上了国际发展大势, 并谱写了新的篇章. 关注科学问题与不断创新, 是两个阶段工作始终坚持的共同理念. 在条件艰苦的年代, 超前选择了需要刻苦攻关才能回答的科学问题作为研究主题, 而不是单纯追求发表论文, 也是两个阶段研究的共同特点. 正是因为能继承和发展, 两代人持之以恒地不断探索, 武汉大学植物生殖领域相关研究才能从落后到竞争再到平视国际同行, 并有能力思考国际同行尚未触及的科学问题. 这一发展历程正是我国植物科学现代发展

历程的一个缩影和例证. 今天, 武汉大学的年轻学者们的拼搏精神, 尤其是其科学素养与眼界, 尤胜前辈. 继承不断创新的精神, 再奋斗四十年, 届时植物生殖发育生物学的发展将是怎样的一个面貌, 着实令人神往.

未来植物生殖发育的研究无疑将进入围绕核心科学问题的更深、更细、更全面的新阶段, 需要更多学科的交叉融合. 可以预见, 动态的甚至是瞬时的、局部性的考察分子机制的实际作用将逐渐成为必备的手段. 因此, 研究者也将面临新一轮快速的研究理念与技术的更新和挑战. 同时, 以前轻细胞重分子的现象也将成为过去, 基于理解单个分子作用机制的形态发生与细胞发育调控规律将在更综合、更整体的层次上展开讨论. 涉及形态结构、单细胞操作、组织培养、细胞生物学、分子生物学、多组学与大数据分析技术以及可视化与建模分析技术将成为迎接新挑战不可或缺的基础与优势. 历史的经验表明, 只要潜心研究, 发挥自己的优势, 坚持自己的特色, 不为急功近利所惑, 植物生殖发育研究领域必将迎来新的辉煌, 未来可期.

参考文献

- 1 Yang H Y, Zhou C. Forty-Year Researches on Experimental Sexual Plant Reproduction (in Chinese). Wuhan: Wuhan University Press, 2001 [杨弘远, 周嫦. 植物有性生殖实验研究四十年. 武汉: 武汉大学出版社, 2001]
- 2 Zhou C, Yang H Y. *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza sativa* (in Chinese). *Acta Genet Sin*, 1980, 7: 287–288 [周嫦, 杨弘远. 从水稻未授粉的幼嫩子房培养出单倍体小植株. *遗传学报*, 1980, 7: 287–288]
- 3 Zhou C, Yang H Y. Induction of haploid rice plantlets by ovary culture. *Plant Sci Lett*, 1981, 20: 231–237
- 4 Yang H Y, Zhou C. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. *Theoret Appl Genet*, 1982, 63: 97–104
- 5 Zhou C, Yang H Y. Enzymatic isolation of embryo sacs in angiosperms: isolation and microscopical observation on fixed materials (in Chinese). *J Integrat Plant Biol*, 1982, 24: 403–407 [周嫦, 杨弘远. 被子植物胚囊酶法分离的研究: 固定材料的分离技术与显微观察. *植物学报*, 1982, 24: 403–407]
- 6 Zhou C, Yang H Y. Observations on enzymatically isolated, living and fixed embryo sacs in several angiosperm species. *Planta*, 1985, 165: 225–231
- 7 Hu S Y, Li L G, Zhu C. Isolation of Viable Embryo Sacs and Their Protoplasts of *Nicotiana tabacum* (in Chinese). *J Integrat Plant Biol*, 1985, 27: 337–344 [胡适宜, 李乐功, 朱微. 烟草生活胚囊及胚囊原生质体的分离. *植物学报*, 1985, 27: 337–344]
- 8 Yang Y, Zhou C. Experimental plant reproductive biology and reproductive cell manipulation in higher plants: now and the future. *Am J Bot*, 1992, 79: 354–363
- 9 Sun M X, Yang H Y. *In vitro* fertilization of angiosperms—10-year effort in China. *Acta Bot Sin*, 2002, 44: 1011–1020
- 10 Peng X B, Sun M X, Yang H Y. A novel *in vitro* system for gamete fusion in maize. *Cell Res*, 2005, 15: 734–738
- 11 Fang K F, Yang T T, Sun M X. Mosaicism in the organization of Con A binding sites on the membrane surface of female cells of *Nicotiana tabacum*. *New Phytol*, 2005, 167: 743–750
- 12 He Y C, He Y Q, Qu L H, et al. Tobacco zygotic embryogenesis *in vitro*: the original cell wall of the zygote is essential for maintenance of cell polarity, the apical-basal axis and typical suspensor formation. *Plant J*, 2007, 49: 515–527
- 13 Ning J, Peng X B, Qu L H, et al. Differential gene expression in egg cells and zygotes suggests that the transcriptome is restructured before the first

- p>zygotic division in tobacco.
- [FEBS Lett](#)
- , 2006, 580: 1747–1752
- 14 Zhao J, Xin H, Qu L, et al. Dynamic changes of transcript profiles after fertilization are associated with *de novo* transcription and maternal elimination in tobacco zygote, and mark the onset of the maternal-to-zygotic transition. [Plant J](#), 2011, 65: 131–145
 - 15 Xin H P, Zhao J, Sun M X. The maternal-to-zygotic transition in higher plants. [J Integrat Plant Biol](#), 2012, 54: 610–615
 - 16 Zhao P, Zhou X, Shen K, et al. Two-step maternal-to-zygotic transition with two-phase parental genome contributions. [Dev Cell](#), 2019, 49: 882–893.e5
 - 17 Zhou X, Liu Z, Shen K, et al. Cell lineage-specific transcriptome analysis for interpreting cell fate specification of proembryos. [Nat Commun](#), 2020, 11: 1366
 - 18 Zhao P, Zhou X, Zheng Y, et al. Equal parental contribution to the transcriptome is not equal control of embryogenesis. [Nat Plants](#), 2020, 6: 1354–1364
 - 19 Zhao P, Sun M X. The maternal-to-zygotic transition in higher plants: available approaches, critical limitations, and technical requirements. [Curr Top Dev Biol](#), 2015, 113: 373–398
 - 20 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. [Curr Opin Plant Biol](#), 2022, 65: 102144
 - 21 Wu J J, Peng X B, Li W W, et al. Mitochondrial GCD1 dysfunction reveals reciprocal cell-to-cell signaling during the maturation of *Arabidopsis* female gametes. [Dev Cell](#), 2012, 23: 1043–1058
 - 22 Yu X, Zhang X, Zhao P, et al. Fertilized egg cells secrete endopeptidases to avoid polytubey. [Nature](#), 2021, 592: 433–437
 - 23 Qu L H, Sun M X. The plant cell nucleus is constantly alert and highly sensitive to repetitive local mechanical stimulations. [Plant Cell Rep](#), 2007, 26: 1187–1193
 - 24 Tian H, Yao C Y, Sun M X. High frequency conversion of microspore-derived embryos of *Brassica napus* cv. Topas by supplemental calcium and vitamins. [Plant Cell Tissue Organ Culture](#), 2004, 76: 159–165
 - 25 Tang X C, He Y Q, Wang Y, et al. The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. [J Exp Bot](#), 2006, 57: 2639–2650
 - 26 Tang X, Liu Y, He Y, et al. Exine dehiscing induces rape microspore polarity, which results in different daughter cell fate and fixes the apical-basal axis of the embryo. [J Exp Bot](#), 2013, 64: 215–228
 - 27 Zhou X, Shi C, Zhao P, et al. Isolation of living apical and basal cell lineages of early proembryos for transcriptome analysis. [Plant Reprod](#), 2019, 32: 105–111
 - 28 Ma L, Xin H, Qu L, et al. Transcription profile analysis reveals that zygotic division results in uneven distribution of specific transcripts in apical/basal cells of tobacco. [PLoS ONE](#), 2011, 6: e15971
 - 29 Zhao J, Xin H, Cao L, et al. NtDRP is necessary for accurate zygotic division orientation and differentiation of basal cell lineage toward suspensor formation. [New Phytol](#), 2016, 212: 598–612
 - 30 Li S, He Y, Zhao J, et al. Polar protein transport between apical and basal cells during tobacco early embryogenesis. [Plant Cell Rep](#), 2013, 32: 285–291
 - 31 Qu L H, Zhou X, Li X, et al. The autonomous cell fate specification of basal cell lineage: the initial round of cell fate specification occurs at the two-celled proembryo stage. [Plant J](#), 2017, 91: 1051–1063
 - 32 Liu Y, Li X, Zhao J, et al. Direct evidence that suspensor cells have embryogenic potential that is suppressed by the embryo proper during normal embryogenesis. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2015, 112: 12432–12437
 - 33 Zhao P, Zhou X, Zhang L, et al. A bipartite molecular module controls cell death activation in the basal cell lineage of plant embryos. [PLoS Biol](#), 2013, 11: e1001655
 - 34 Shi C, Luo P, Du Y T, et al. Maternal control of suspensor programmed cell death via gibberellin signaling. [Nat Commun](#), 2019, 10: 3484
 - 35 Sun Y, Wang X, Pan L, et al. Plant egg cell fate determination depends on its exact position in female gametophyte. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2021, 118: e2017488118
 - 36 Huang X, Sun M X. H3K27 methylation regulates the fate of two cell lineages in male gametophytes. [Plant Cell](#), 2022, 34: 2989–3005

Two forty-years for researches on sexual plant reproduction in Wuhan University

PENG XiongBo, ZHAO Peng & SUN Meng-Xiang

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

Investigations on sexual plant reproduction in Wuhan University was promoted by Prof. Hong-Yuan Yang and Prof. Chang Zhou. After forty-years' effort remarkable progress has been made in experimental sexual reproductive biology, especially in the field of unfertilized ovule culture and *in vitro* sexual cell manipulation. Their contributions in this field have been summarized in a Prof. Yang-edited book named "forty-year researches on experimental sexual plant reproduction", which is a remarkable indicator of the transition from traditional descriptive sexual plant reproduction to experimental sexual plant reproduction in China. As a student of Prof. Yang, Prof. Meng-xiang Sun has been also working in this field for forty years and experienced a quick transition from sexual plant reproductive biology to developmental biology of sexual plant reproduction, in which regulatory mechanism of sexual reproduction process is deeply investigated under the guidance of basic theory of developmental biology and based on the combination of molecular and cell biological techniques. After years' effort they finally catch up with the moving frontier of the field and add new pages in the book of sexual plant reproduction research in Wuhan University. This paper summarizes what they experienced, what they thought and what they did in the two overlapped forty-years respectively, to present some aspects of the researches in Wuhan University.

sexual plant reproduction, fertilization, embryogenesis, Wuhan University

doi: [10.1360/SSV-2022-0050](https://doi.org/10.1360/SSV-2022-0050)