2020 年度陈嘉庚科学奖专辑

陈嘉庚青年科学奖——生命科学奖获奖人

王克剑

中国水稻研究所研究员, 主要从事育种前沿技术的探索, 实现了杂交稻无融合生殖从 0 到 1 的原创性突破, 开辟了无融合生殖固定杂种优势的研究方向。

相关成果名称: 利用基因组编辑技术建立杂交水稻无融合生殖体系

无融合生殖是一种植物通过克隆种子进行无性繁殖的生殖方式。在水稻等主要作物中引入无融合生殖特性, 实现杂种优势固定在农业领域长期被誉为“圣杯”。世界各国围绕无融合生殖进行了大量的研究, 但是由于其发生机制的高度复杂性, 一直未能取得突破。王克剑及其团队在深入解析水稻有性生殖分子机理和研发多基因编辑技术体系的基础上, 通过精准编辑有性生殖过程多个涉及不同步骤的关键基因, 成功获得了杂交水稻的克隆种子, 实现了杂交水稻无融合生殖从 0 到 1 的原创性突破, 开辟了无融合生殖固定杂种优势研究以及作物育种发展的新方向, 为未来杂种优势固定作物的研发与应用奠定了坚实基础。Nat Biotechnol 评论认为“这项种子克隆技术将显著降低作物的生产成本、保障粮食安全”。

人工创制植物无融合生殖的研究进展

张燕, 王春, 王克剑*

中国水稻研究所, 水稻生物学重点实验室, 杭州 310006

* 联系人, E-mail: wangkejian@caas.cn

2020-03-01 收稿, 2020-04-16 修回, 2020-04-16 接受, 2020-04-20 网络版发表

中国农业科学院科技创新工程项目资助

摘要 无融合生殖(apomixis)是指植物绕过正常减数分裂与受精过程形成克隆种子的一种无性生殖方式. 无融合生殖具有固定杂种优势的潜力, 长期以来一直是研究的热点. 但是, 由于其形成机制复杂一直未能取得突破. 在深入研究植物有性生殖机制的基础上, 通过人工设计创制无融合生殖有望成为实现杂种优势固定的一个可能途径. 研究发现, 同步突变多个减数分裂关键基因可以将减数分裂过程转换为类似有丝分裂过程, 产生与母本遗传背景完全一致的克隆配子(*mitosis instead of meiosis, MiMe*); 在*MiMe*背景下引入特殊的基因组消除系或编辑诱导孤雌生殖的关键基因能够成功实现无融合生殖. 本文对无融合生殖技术的研究进展进行了总结, 并对今后无融合生殖技术的改良以及将其在作物育种中的应用进行了讨论.

关键词 水稻, 无融合生殖, 杂种优势, 减数分裂, 克隆种子

杂种优势(heterosis)是指杂种一代在生长发育、抗逆以及环境适应性等方面都优于双亲的现象^[1]. 长久以来, 杂种优势在农业上被广泛利用, 为世界粮食安全作出了重大贡献. 然而, 由于有性生殖过程中遗传信息发生重组使得杂种优势在后代中因发生分离而无法得到保持, 因此育种学家以及种子公司必须每年耗费大量的人力、物力以及土地资源进行制种. 若能实现农作物杂种优势固定, 将大大简化种子选育生产过程, 具有重要的经济及社会效益.

20世纪30年代, Navashin等人先后提出利用无融合生殖(apomixis)固定杂种优势的设想. 最初无融合生殖主要指植物不发生核融合的无性生殖过程, 所指范围不仅包括雌配子体不经受精产生孢子体(孤雌生殖), 还包括各种营养体的营养繁殖以及体细胞胚的不定胚繁殖方式^[2]. 目前, 无融合生殖主要是指雌雄配子不经过减数分裂和核融合而形成胚或种子的一种特殊生殖方式^[3]. 为统一无融合生殖名称的使用, 综合近年相关领

域的研究进展, 本文所提及的无融合生殖特指植物绕过正常减数分裂与受精过程并形成克隆种子的一种无性生殖方式. 自然界中拥有无融合生殖性状的植物并不少见, 目前已报道拥有无融合生殖特性的植物已超400种, 如胡桃科、柑橘属以及苹果属等^[4]. 若能将无融合生殖性状成功引入至主要农作物中, 实现农作物杂种优势固定, 将大大降低农作物的制种成本并使育种效率得到提高^[4,5]. 基于无融合生殖对农业生产的重要性, 培育无融合生殖作物长期以来被誉为农业研究领域的“圣杯”^[6,7]. 1987年, 袁隆平^[8]提出杂交水稻育种可以分为“三系法”、“两系法”和“一系法”三个战略发展阶段. 其中“一系法”即为利用无融合生殖固定杂种优势的育种方法, 被认为是杂交水稻育种的最高目标. 同年, 我国正式启动了国家高技术研究发展计划(“863”计划), 其中“水稻无融合生殖研究”被确立为第一批立项的重大研究课题, 由袁隆平等知名专家牵头进行联合攻关. 2014年, 美国、澳大利亚和德国等多国科学家

引用格式: 张燕, 王春, 王克剑. 人工创制植物无融合生殖的研究进展. 科学通报, 2020, 65: 2998–3007

Zhang Y, Wang C, Wang K J. Research advances on plant synthetic apomixis (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 2998–3007, doi: 10.1360/TB-2020-0209

联合实施启动“杂种优势捕获计划(Capturing Heterosis Project)”, 比尔·盖茨和梅琳达基金会第一期投入1450万美元用于支持无融合生殖的联合攻关。虽然国内外科学家们在无融合生殖领域进行了大量探索, 但是一直未能成功地将无融合生殖性状稳定引入至水稻等主要作物中。

长期以来, 研究人员试图通过收集自然界无融合生殖资源、分析其生物学特性以及遗传机理, 将其中关键基因导入农作物中加以利用, 以实现农作物无融合生殖。目前, 利用突变体以及分子标记辅助方法在狼尾草、拟南芥以及油菜等多个植物物种中已经挖掘出了一些相关基因, 如参与诱导植物体细胞胚发生的 *SERK* 类基因^[9,10]、*LEC* 类基因^[11,12]、*BBM* 基因^[13]与 *PGA6/WUS* 基因^[14], 参与胚乳发育的 *FIS* 类基因^[15-17]与 *MSI1* 基因^[18,19], 参与减数分裂过程维持姐妹染色单体着丝粒凝聚力与二价体形成的 *SWI1* 基因^[20]以及参与孢原细胞分化启动初生孢子的 *SPL/NZZ* 基因^[21-23]等。但由于物种及其所属无融合生殖类型的多样性, 以及无融合生殖发生过程与形成机制的复杂性, 利用传统的方法挖掘并克隆相关基因变得极度艰难且缓慢, 更别提在作物中应用这些基因实现无融合生殖了。

因此, 进行人工创制无融合生殖可能是实现杂种优势固定的另一有效途径^[5,24-26]。本文主要针对实现无融合生殖两个必备条件的相关研究进行总结, 系统阐述人工创制无融合生殖的研究进展与相关应用, 并对应用过程中遇到的问题以及无融合生殖体系在农业领域中未来的发展进行了讨论。

1 人工诱导产生克隆配子

人工创制无融合生殖必须满足以下两个必备条件: (1) 生殖细胞不经历减数分裂期间发生的遗传重组形成可育的克隆配子; (2) 未经减数分裂的雌雄配子不发生核融合即可发育形成胚或种子。减数分裂是生物细胞染色体数目减半的分裂方式, 与有丝分裂存在差异。减数分裂共包括两次分裂, 第一次分裂时发生同源染色体的配对、重组和交换, 随后同源染色体分离非同源染色体自由组合并均匀向两极移动产生子细胞, 随后子细胞会再度进行第二次细胞分裂, 此时姐妹染色单体分离并形成单倍体配子。因此, 为了成功获得克隆配子, 生殖细胞的减数分裂过程中染色体不能发生遗传重组, 减数分裂 I 后期姐妹染色单体需提前分离并均匀向两极移动, 并且不能够再发生第二次分裂。

1.1 同源染色体不发生遗传重组

在减数分裂 I 前期同源染色体发生配对, DNA 双链断裂(DNA double-strand breaks, DSB)使得同源染色体的非姊妹染色单体之间发生交叉互换。其中, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* H.)中 *SPO11* 蛋白被发现在该过程中具有催化DNA双链发生断裂、触发染色体发生遗传重组行为的功能^[27]。由于该基因相对比较保守, 同源比对发现, 模式植物拟南芥中至少存在3个 *SPO11* 基因(*SPO11-1*、*SPO11-2*和*SPO11-3*)。遗传学证据表明, *SPO11-1*与*SPO11-2*在调控减数分裂遗传重组过程中都具有重要功能, *SPO11-3*则主要参与调控拟南芥体细胞有丝分裂增殖过程中的核内再复制周期^[28-30]。另外, PRD1(putative recombination initiation defect 1)、PRD2、DFO(DSB formation)、CRC1(central region component 1)、P31^{content}以及MTOPVIB(meiotic topoisomerase V-like)等在后续研究中被报道具有参与调控DNA双链断裂的类似功能^[31-35]。此外, 水稻 *PAIR1* (*pairing aberration in rice meiosis 1*)基因被认为参与调控水稻生殖细胞减数分裂 I 前期同源染色体的配对过程。 *pair1* 突变体在减数分裂 I 期染色体配对失败, 减数分裂 I 后期又因染色体分配不均匀导致产生配子异常^[36]。

1.2 第一次减数分裂后期姊妹染色单体提前分离

第一次减数分裂后期姊妹染色单体会进行定向向极移动, 在此行为中保持着丝粒黏着尤为重要。小鼠中 *REC8* 蛋白被发现在此过程中起关键作用, *REC8* 基因缺失会导致姊妹染色单体提前分离^[37]。 *REC8* 蛋白是减数分裂特异的黏连蛋白, 在拟南芥与水稻减数分裂过程中由于 *REC8* 基因的缺失导致染色体着丝粒凝聚力下降, 姊妹染色单体在减数分裂 I 后期提前分离, 最终由于染色体的不平衡分配导致后代发生败育^[38,39]。另一个黏连蛋白 *SCC3* 缺失同样会造成着丝粒在减数分裂 I 后期提前解聚, 但由于 *SCC3* 蛋白同时还参与了细胞有丝分裂过程, 其缺失还会影响有丝分裂行为并最终导致后代不正常地生长发育^[40]。

1.3 消除减数分裂的第二次分裂

减数分裂不同时期皆存在关键调控因子以确保细胞分裂的正常进行。拟南芥中 *OSD1* (*omission of second division*)是细胞从减数分裂 I 期向减数分裂 II 期转变的关键基因, 缺失该基因能够引发植物产生遗传信息

未减半的二倍体配子,并在自交后产生四倍体后代^[41,42]。研究发现,水稻中缺失*OSD1*同样能够造成第二次减数分裂的丧失^[42]。此外,当拟南芥TAM(*tardy asynchronous meiosis*)氨基酸序列中第283个异亮氨酸替换为苏氨酸后,拟南芥生殖细胞的减数分裂进程被显著减缓^[43,44],*tam*功能缺失型突变体无法从减数分裂I期向减数分裂II期进行转换^[45]。*TDM1/MS5*(*three division mutant 1/male sterile 5*)被认为是调控细胞在完成减数分裂II期后退出减数分裂进程的重要基因,*tdm1*显性突变促使减数分裂不发生第二次细胞分裂,最终产生二倍体配子^[46]。

1.4 克隆配子的产生

进一步研究发现,当拟南芥中同时缺失*SPO11-1*与*REC8*基因后,细胞减数分裂I期会被类似于有丝分裂行为所替代,促使减数分裂II后期染色体分配不均匀,产生的配子严重败育^[40]。但是,若在*spo11-1rec8*双突变背景下继续突变*OSD1*、*TAM*或*TDM*基因,*spo11-1rec8*双突变体的染色体不平衡分配会被有效抑制并最终产生与母本遗传信息完全一致的可育克隆配子^[41,45,46](图1)。这种发生减数分裂被类似有丝分裂行为替代并产生克隆配子的突变体被命名为“*MiMe*(mitosis instead of

meiosis)”。研究人员在水稻中同时聚合*PAIR1*、*REC8*和*OSD1*三个基因的突变,成功地将*MiMe*策略引入到水稻中并产生克隆配子,但是*MiMe*植株的结实率与野生型相比显著下降^[42]。

2 人工诱导单倍体

利用*MiMe*策略成功地使植物产生了与亲本倍性一致的功能性克隆配子,但是后续经历正常受精过程后所产生的后代植株倍性将会加倍^[41,42]。因此,要想得到与亲本遗传信息完全一致的克隆种子,还需要防止正常受精后染色体加倍。自然界中大多数高等生物都是以有性生殖的方式进行后代繁殖,在一些低等植物或动物中会出现生殖过程中并不涉及精细胞,仅通过卵细胞便能发育成完整胚胎或个体的现象,这种现象称为孤雌生殖(*parthenogenesis*)。孤雌生殖可以分为两种类型:(1)在发育过程中完全不涉及精细胞的孤雌生殖;(2)精细胞正常进入并激活卵细胞,但只有卵细胞核参与后期胚胎发育的过程。在作物育种过程中,运用孤雌生殖技术能够快速获得可稳定遗传的后代。

2.1 着丝粒特异组蛋白*cenH3*突变系诱导单倍体

为了实现无融合生殖获得克隆种子,其中一种有

图1 *MiMe*减数分裂染色体变化示意图。野生型中同源染色体在减数分裂I前期发生联会配对并进行同源重组,减数分裂II后期姐妹染色单体发生分离并分别向纺锤体两极移动,最终产生具有重组遗传信息的单倍体配子; *MiMe*中由于*SPO11-1*与*REC8*基因的缺失导致同源染色体在减数分裂I前期不发生重组,姐妹染色单体在减数分裂I后期提前发生分离。同时由于*OSD1*的缺失,阻止了第二次减数分裂的发生,最终产生了二倍体的克隆配子

Figure 1 Schematic illustration of chromosomal changes during meiosis in *MiMe*. Homologous chromosomes undergo pairing and recombination at prophase of meiosis I in the wild type. During anaphase of meiosis II, the sister chromatids separate and move to the spindle poles respectively, finally haploid gametes with homologous recombination are generated. Because of the absences of *SPO11-1* and *REC8* in *MiMe*, pairing and recombination between homologous chromosomes are disrupted at prophase of meiosis I and sister chromatids segregate prematurely at anaphase of meiosis I. In addition, the presence of the *osd1* mutation prevents the second meiotic division from occurring, and then clonal diploid gametes without homologous recombination are produced finally

效方法就是通过消除来自父母双方任一染色体组以确保后代倍性保持不变。着丝粒是染色体上一个功能比较保守的区域。着丝粒特异组蛋白CENH3蛋白能够与其他着丝粒蛋白形成复合体共同参与调控着丝粒的组装以及与纺锤丝的连接,对确保染色体在有丝分裂与减数分裂过程中正确分离与移动具有重要作用。将拟南芥中CENH3进行序列替换转化至*cenh3*突变体后与野生型植株进行杂交能够诱导后代产生单倍体,并且所产生的单倍体只含有野生型基因组并不包含修饰后*cenh3*突变体的基因组^[47]。除拟南芥外,研究人员通过改造玉米中CENH3基因也同样低效率地获得了只包含野生型基因组的单倍体植株^[48]。由于CENH3在植物中普遍存在且功能较为保守,在更多物种中建立与应用CENH3介导的单倍体诱导技术具有一定的可行性。

2.2 异位表达BBM1诱导孤雌生殖

目前,对于植物诱导孤雌生殖的相关机制研究尚少,其中属于AP2/ERF家族的BABY BOOM(BBM)类转录因子是少数明确能够控制孤雌生殖的几个基因之一。BBM被发现在最初发育的胚胎和种子中表达,很可能参与胚胎发生的起始过程^[49]。在拟南芥中异位表达BBM1基因能够使拟南芥幼苗自发形成体细胞胚,这暗示BBM1在胚胎发育过程中具有重要作用^[13]。无孢子生殖特性常常与孤雌生殖相连锁。研究发现,在无孢子生殖的狼尾草(*Pennisetum squamulatum*)中存在一个与孤雌生殖性状共分离的无孢子生殖专化基因组区域(apospory-specific genomic region, ASGR),该区域内存在多拷贝PsASGR-BBML基因^[50,51]。将PsASGR-BBML基因在受精前的卵细胞中表达能够诱导孤雌生殖并产生单倍体后代^[52]。进一步利用卵细胞特异表达启动子调控PsASGR-BBML的表达,在玉米和水稻中同样成功实现了孤雌生殖^[53]。水稻中BBM1基因是能够触发胚胎发育的开关,在卵细胞中异位表达BBM1基因能够成功绕过受精过程诱导孤雌生殖并形成单倍体^[54]。

2.3 基因编辑MTL诱导孤雌生殖

在玉米育种中,利用双单倍体(double haploid, DH)进行自交系选育已经是一种常规的育种方法。利用秋水仙碱等化学物质对单倍体进行加倍形成DH能够减少育种时间并快速地获得稳定自交系。自1959年发现玉米单倍体诱导系stock6以来,研究人员对其进行了一系列优化并衍生出一系列单倍体诱导系用于DH育种,

而对于其中控制诱导率的关键基因研究一直未能有所突破。直到近期,研究人员发现玉米单倍体诱导系stock6之所以能够诱导单倍体是由花粉特异性磷脂酶MTL(matrilineal)/ZmPLA1基因第四外显子处插入了4 bp并导致氨基酸移码突变造成的^[55~58]。在水稻中通过同源比对找到了玉米MTL同源基因OsMATL,对其利用基因编辑技术进行功能敲除同样诱导产生了水稻单倍体,但与玉米中类似,其诱导效率与结实率偏低^[59]。

3 人工创制无融合生殖

利用MiMe策略能够成功产生功能性克隆配子,若将它产生的克隆配子与单倍体诱导技术相结合,就有可能实现有性生殖植物的无性克隆繁殖,对杂交育种具有重要意义。最初,研究人员通过将拟南芥*cenh3*基因组消除系与拟南芥MiMe材料进行杂交,成功获得了约34%的克隆种子^[60]。利用基因组消除系诱导单倍体在拟南芥中应用相对比较成熟,除在玉米^[48]中运用能产生少量克隆种子外,在其他作物中的成功应用还相对较少。另外,该方法的实行还依赖于授粉过程,很大程度上限制了后续克隆种子的商业化生产与推广。

基于卵细胞中异位表达BBM1基因可以诱导植物发生孤雌生殖并获得单倍体。研究人员在水稻常规品种中利用卵细胞特异启动子特异表达BBM1基因能够诱导水稻发生孤雌生殖,并在此基础上进一步利用基因编辑技术敲除了3个与减数分裂相关的基因(PAIR1、REC8与OSD1),最终使水稻完成无融合生殖过程并产生克隆种子,实现了在水稻中完成无性繁殖的可能性^[54]。

为了利用人工创制无融合生殖技术实现水稻杂种优势的固定。我们通过筛选最终选用了具有明显杂种优势且双亲具有丰富DNA多态性的粳籼杂交稻春优84(浙审稻2013020,吴明国、林建荣等培育)作为模式品种,利用多基因编辑技术体系对PAIR1、REC8与OSD1基因同时进行敲除,成功获得了生长形态、发育时期以及结实率均与野生型表现一致的MiMe材料^[61]。其次,利用基因编辑技术对杂交稻背景下的MTL基因进行定点突变,通过细胞倍性和分子标记检测,成功地在mtl自交后代中鉴定出了发生遗传重组的单倍体植株^[61]。因此,通过进一步对杂交稻中PAIR1、REC8、OSD1与MTL基因进行同时敲除,获得了4个基因同时缺失的突变体(fixation of hybrids, Fix)。通过细胞倍性检测以及全基因组重测序,在Fix植株后代中获得了细胞倍性为二倍体且基因型与亲本完全一致的植株(图2),这些二倍

体植株也表现出与亲本相似的田间表型。综上所述,利用该固定策略我们成功地在杂交稻背景下建立了无融合生殖体系,获得了杂交稻克隆种子,实现了杂合基因型的固定。除此之外,程祝宽团队^[62]也通过基因编辑技术在常规水稻盐稻8号中同步敲除了*SPO11-1*、*REC8*、*OSD1*以及*MATL*四个基因,同样获得了类似的细胞学表型结果,这暗示了这些基因的同时敲除也有可能实现杂合基因型的固定。

4 总结与展望

目前,通过利用现有的人工合成策略我们已将无融合生殖成功应用于杂交水稻中,并实现了杂合基因型与基因组倍性的固定,为水稻“一系法”育种的实现奠定了强有力的基础,同时也为在其他作物中实现杂种优势固定提供了参考。然而,由于目前的策略还存在一些问题,需要在后续研究中进行优化并最终解决。

首先是结实率偏低的问题。杂交稻背景下*MiMe*结实率与野生型并无明显差别,而*mtl*突变体虽然能诱导单倍体却造成结实率显著降低,说明*mtl*是导致最终*Fix*结实率降低的主要原因。对玉米*mtl*突变体的研究认为*mtl*诱导产生单倍体是由减数分裂后配子中染色体不断发生断裂造成的,碎片化的染色体使父母本之间遗传

信息不平衡最终导致植株结实率严重下降^[57]。通过筛选*mtl*背景下恢复突变株或者MTL互作蛋白等手段,对*mtl*诱导单倍体形成机制进行进一步研究,这很有可能对提高该策略结实率有一定的帮助。此外,植物中涉及胚胎与胚乳发育的基因也已逐渐被挖掘研究,未来若能将胚乳自主发生机制与当前的无融合生殖技术进行结合,也许能够很好地解决无融合生殖植株结实率低的问题。当然,针对那些对结实率要求不高的植物物种(蔬菜、草本植物等),理论上该固定策略是可以借鉴并加以应用的。

此外,目前的无融合生殖体系还存在诱导效率偏低的问题,导致所产生后代中同时存在正常有性生殖产生的种子以及克隆种子。之前有研究表明,参与减数分裂的基因在不同的背景下行使功能强弱存在差异^[63,64],*MTL*的诱导效率甚至结实率是否在不同背景下也存在差异还需要进一步的研究。另一方面,通过观察二倍体与四倍体各个生长阶段的差异,特别是种子或幼苗阶段,建立能够快速从后代中准确鉴别出克隆种子的方法与技术,这将在很大程度上促进无融合生殖体系在农业上的推广与应用。

近期有研究报道,表观遗传转录调控在杂种优势中起着关键作用^[65,66]。基于该固定策略人工获得的无

图2 人工创制水稻无融合生殖的示意图。在正常减数分裂过程中,同源染色体发生配对与重组并最终产生了遗传信息发生过重组的单倍体配子,并在经历正常受精后形成二倍体种子,后代植株性状发生分离;*MiMe*植株生殖细胞的减数分裂过程被类似有丝分裂行为替代并产生二倍体克隆配子,进一步利用卵细胞中异位表达*BBM1*或敲除*MTL*基因诱导植株孤雌生殖实现植物无融合生殖,最终产生克隆种子且后代植株表型与亲本相似

Figure 2 Schematic illustration of synthetic apomixis in rice. Because homologous chromosomes undergo pairing and recombination during normal meiosis, haploid gametes with homologous recombination are generated. After normal fertilization, the chromosome number of embryos returns to the same as their parents and the morphological characters are widely separated in the progeny. The process of meiosis in *MiMe* is completely replaced by a mitotic-like division and finally clonal diploid gametes are produced. Combination of *MiMe* with *BBM1*- or *MTL*-induced parthenogenesis resulted in apomixis in plants and the generation of clonal seeds has the same phenotypic characters as parents

融合杂交稻与亲本基因组的田间表型相对比较一致,且自交繁殖后代的田间表型比较稳定,这意味着水稻无融合生殖后代的表现遗传修饰水平很有可能与野生型相似,需要对该固定策略下无融合生殖植株多代自我繁殖后代的分子水平稳定性进行进一步探讨。

有性繁殖在减数分裂期发生遗传重组是自然界遗传多样性的最主要来源,而无性繁殖则可能会引起遗传多样性减少从而带来生态隐患。例如,世界四大水果之一的香蕉就是经历长期杂交育种形成的三倍体产物。由于在香蕉中实现无性繁殖较为艰难,目前市场被少数的几个品种所占有,而这些香蕉主要通过无性繁殖进行扩繁,因此遗传多样性极为有限,一旦遭遇某种严重生物/非生物胁迫,将导致商业化种植的香蕉减产甚至死亡,造成严重的经济损失。如今,利用无融合生殖

技术可简单、快速地在不同遗传背景的香蕉品种中实现无性繁殖,提高商业化香蕉品种的多样性。此外,利用无融合生殖技术对濒临灭绝的珍稀植物进行挽救,将在很大程度上增加整个植物界的生物多样性。

水稻育种由最初的常规育种到后续的“三系法”、“两系法”杂种优势利用育种,我国水稻育种正一步步地向着由繁到简、效率越来越高的方向发展。现今,我们刚建立了杂交水稻无融合生殖体系,虽然目前还不能够应用于商业化育种,但是该工作为未来进行杂种优势固定研究奠定了基础。由于有性生殖过程在不同植物中高度保守,而该策略中关键基因也存在较高的保守性,因此后续可以在玉米、小麦、大豆、高粱等其他重要农作物中研究创造丰富的无融合种质资源,推动新一轮农业“绿色革命”。

参考文献

- Birchler J A, Yao H, Chudalayandi S, et al. Heterosis. *Plant Cell*, 2010, 22: 2105–2112
- Winkler H. Über parthenogenesis und apogamie im pflanzenreiche. *Progr Rei Bot*, 1908, 2: 293–454
- Nogler G A, Gametophytic apomixis. In: Johri B M, ed. *Embryology of Angiosperms*. Berlin: Springer Verlag, 1984. 475–518
- Grossniklaus U, Nogler G A, van Dijk P J. How to avoid sex: The genetic control of gametophytic apomixis. *Plant Cell*, 2001, 13: 1491–1498
- van Dijk P, van Damme J. Apomixis technology and the paradox of sex. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 81–84
- Sailer C, Schmid B, Grossniklaus U. Apomixis allows the transgenerational fixation of phenotypes in hybrid plants. *Curr Biol*, 2016, 26: 331–337
- Vielle Calzada J P, Crane C F, Stelly D M. Apomixis—the asexual revolution. *Science*, 1996, 274: 1322–1323
- Yuan L P. The strategic vision of hybrid rice breeding (in Chinese). *Hybrid Rice*, 1987, (1): 1–3 [袁隆平. 杂交水稻育种的战略设想. *杂交水稻*, 1987, (1): 1–3]
- Hecht V, Vielle-Calzada J P, Hartog M V, et al. The *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol*, 2001, 127: 803–816
- de Oliveira Santos M, Romano E, Yotoko K S C, et al. Characterisation of the cacao *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE (SERK)* gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Sci*, 2005, 168: 723–729
- Kwong R W, Bui A Q, Lee H, et al. LEAFY COTYLEDON1-LIKE defines a class of regulators essential for embryo development. *Plant Cell*, 2003, 15: 5–18
- Lotan T, Ohto M, Yee K M, et al. *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 1998, 93: 1195–1205
- Boutillier K, Offringa R, Sharma V K, et al. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*, 2002, 14: 1737–1749
- Zuo J, Niu Q W, Frugis G, et al. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2002, 30: 349–359
- Luo M, Bilodeau P, Koltunow A, et al. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 296–301
- Yadegari R, Kinoshita T, Lotan O, et al. Mutations in the *FIE* and *MEA* genes that encode interacting polycomb proteins cause parent-of-origin effects on seed development by distinct mechanisms. *Plant Cell*, 2000, 12: 2367–2381
- Köhler C. The polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADs-box gene *PHERES1*. *Genes Dev*, 2003, 17: 1540–1553
- Köhler C. *Arabidopsis* MSII is a component of the MEA/FIE polycomb group complex and required for seed development. *EMBO J*, 2003, 22: 4804–4814
- Guittou A E, Berger F. Loss of function of MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 produces nonviable parthenogenetic embryos in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2005, 15: 750–754
- Mercier R. SWITCH1 (SWI1): A novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis.

- [Genes Dev](#), 2001, 15: 1859–1871
- 21 Yang W C, Ye D, Xu J, et al. The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. [Genes Dev](#), 1999, 13: 2108–2117
 - 22 Schiefthaler U, Balasubramanian S, Sieber P, et al. Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 1999, 96: 11664–11669
 - 23 Balasubramanian S, Schneitz K. *NOZZLE* regulates proximal-distal pattern formation, cell proliferation and early sporogenesis during ovule development in *Arabidopsis thaliana*. [Development](#), 2000, 127: 4227–4238
 - 24 Spillane C, Curtis M D, Grossniklaus U. Apomixis technology development-virgin births in farmers' fields? [Nat Biotechnol](#), 2004, 22: 687–691
 - 25 Grossniklaus U, Koltunow A, van Lookeren Campagne M. A bright future for apomixis. [Trends Plant Sci](#), 1998, 3: 415–416
 - 26 Barcaccia G, Albertini E. Apomixis in plant reproduction: A novel perspective on an old dilemma. [Plant Reprod](#), 2013, 26: 159–179
 - 27 Keeney S, Giroux C N, Kleckner N. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by SPO11, a member of a widely conserved protein family. [Cell](#), 1997, 88: 375–384
 - 28 Grelon M. AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. [EMBO J](#), 2001, 20: 589–600
 - 29 Stacey N J, Kuromori T, Azumi Y, et al. *Arabidopsis* SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. [Plant J](#), 2006, 48: 206–216
 - 30 Hartung F, Angelis K J, Meister A, et al. An archaeobacterial topoisomerase homolog not present in other eukaryotes is indispensable for cell proliferation of plants. [Curr Biol](#), 2002, 12: 1787–1791
 - 31 de Muylt A, Vezon D, Gendrot G, et al. AtPRD1 is required for meiotic double strand break formation in *Arabidopsis thaliana*. [EMBO J](#), 2007, 26: 4126–4137
 - 32 Zhang C, Song Y, Cheng Z, et al. The *Arabidopsis thaliana* DSB formation (*AtDFO*) gene is required for meiotic double-strand break formation. [Plant J](#), 2012, 72: 271–281
 - 33 Miao C, Tang D, Zhang H, et al. CENTRAL REGION COMPONENT1, a novel synaptonemal complex component, is essential for meiotic recombination initiation in rice. [Plant Cell](#), 2013, 25: 2998–3009
 - 34 Ji J, Tang D, Shen Y, et al. P31^{comet}, a member of the synaptonemal complex, participates in meiotic DSB formation in rice. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2016, 113: 10577–10582
 - 35 Tang Y, Yin Z, Zeng Y, et al. MTOPVIB interacts with AtPRD1 and plays important roles in formation of meiotic DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. [Sci Rep](#), 2017, 7: 10007
 - 36 Nonomura K I, Nakano M, Fukuda T, et al. The novel gene *HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS1* of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. [Plant Cell](#), 2004, 16: 1008–1020
 - 37 Bannister L A, Reinholdt L G, Munroe R J, et al. Positional cloning and characterization of mouse *mei8*, a disrupted allele of the meiotic cohesin *Rec8*. [Genesis](#), 2004, 40: 184–194
 - 38 Bhatt A M, Lister C, Page T, et al. The *DIF1* gene of *Arabidopsis* is required for meiotic chromosome segregation and belongs to the *REC8/RAD21* cohesin gene family. [Plant J](#), 1999, 19: 463–472
 - 39 Shao T, Tang D, Wang K, et al. OsREC8 is essential for chromatid cohesion and metaphase I monopolar orientation in rice meiosis. [Plant Physiol](#), 2011, 156: 1386–1396
 - 40 Chelysheva L. AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. [J Cell Sci](#), 2005, 118: 4621–4632
 - 41 d'Erfurth I, Jolivet S, Froger N, et al. Turning meiosis into mitosis. [PLoS Biol](#), 2009, 7: e1000124
 - 42 Mieulet D, Jolivet S, Rivard M, et al. Turning rice meiosis into mitosis. [Cell Res](#), 2016, 26: 1242–1254
 - 43 Magnard J L, Yang M, Chen Y C S, et al. The *Arabidopsis* gene *Tardy Asynchronous Meiosis* is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis. [Plant Physiol](#), 2001, 127: 1157–1166
 - 44 Wang Y, Magnard J L, McCormick S, et al. Progression through meiosis I and meiosis II in *Arabidopsis anthers* is regulated by an a-type cyclin predominately expressed in prophase I. [Plant Physiol](#), 2004, 136: 4127–4135
 - 45 d'Erfurth I, Cromer L, Jolivet S, et al. The cyclin-A CYCA2/TAM is required for the meiosis I to meiosis II transition and cooperates with OSD1 for the prophase to first meiotic division transition. [PLoS Genet](#), 2010, 6: e1000989
 - 46 Cifuentes M, Jolivet S, Cromer L, et al. TDM1 regulation determines the number of meiotic divisions. [PLoS Genet](#), 2016, 12: e1005856
 - 47 Ravi M, Chan S W L. Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. [Nature](#), 2010, 464: 615–618
 - 48 Kelliher T, Starr D, Wang W, et al. Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize. [Front Plant Sci](#), 2016, 7: 414
 - 49 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. [Dev Cell](#), 2017, 43: 349–358.e4
 - 50 Ozias-Akins P, Roche D, Hanna W W. Tight clustering and hemizygosity of apomixis-linked molecular markers in *Pennisetum squamulatum*

- implies genetic control of apospory by a divergent locus that may have no allelic form in sexual genotypes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5127–5132
- 51 Gualtieri G, Conner J A, Morishige D T, et al. A segment of the apospory-specific genomic region is highly microsyntenic not only between the apomicts *Pennisetum squamulatum* and buffelgrass, but also with a rice chromosome 11 centromeric-proximal genomic region. *Plant Physiol*, 2006, 140: 963–971
- 52 Conner J A, Mookkan M, Huo H, et al. A parthenogenesis gene of apomict origin elicits embryo formation from unfertilized eggs in a sexual plant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 11205–11210
- 53 Conner J A, Podio M, Ozias-Akins P. Haploid embryo production in rice and maize induced by *PsASGR-BBML* transgenes. *Plant Reprod*, 2017, 30: 41–52
- 54 Khanday I, Skinner D, Yang B, et al. A male-expressed rice embryogenic trigger redirected for asexual propagation through seeds. *Nature*, 2019, 565: 91–95
- 55 Kelliher T, Starr D, Richbourg L, et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction. *Nature*, 2017, 542: 105–109
- 56 Liu C, Li X, Meng D, et al. A 4-bp insertion at *ZmPLAI* encoding a putative phospholipase a generates haploid induction in maize. *Mol Plant*, 2017, 10: 520–522
- 57 Li X, Meng D, Chen S, et al. Single nucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction. *Nat Commun*, 2017, 8: 991
- 58 Gilles L M, Khaled A, Laffare J B, et al. Loss of pollen-specific phospholipase NOT LIKE DAD triggers gynogenesis in maize. *EMBO J*, 2017, 36: 707–717
- 59 Yao L, Zhang Y, Liu C, et al. *OsMATL* mutation induces haploid seed formation in *indica* rice. *Nat Plants*, 2018, 4: 530–533
- 60 Marimuthu M P A, Jolivet S, Ravi M, et al. Synthetic clonal reproduction through seeds. *Science*, 2011, 331: 876
- 61 Wang C, Liu Q, Shen Y, et al. Clonal seeds from hybrid rice by simultaneous genome engineering of meiosis and fertilization genes. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 283–286
- 62 Xie E, Li Y, Tang D, et al. A strategy for generating rice apomixis by gene editing. *J Integr Plant Biol*, 2019, 61: 911–916
- 63 Crismani W, Girard C, Froger N, et al. FANCM limits meiotic crossovers. *Science*, 2012, 336: 1588–1590
- 64 Girard C, Chelysheva L, Choinard S, et al. AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and helicase FANCM antagonize meiotic crossovers by distinct mechanisms. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005369
- 65 Chen Z J. Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. *Nat Rev Genet*, 2013, 14: 471–482
- 66 Dapp M, Reinders J, Bédée A, et al. Heterosis and inbreeding depression of epigenetic *Arabidopsis* hybrids. *Nat Plants*, 2015, 1: 15092

Summary for “人工创制植物无融合生殖的研究进展”

Research advances on plant synthetic apomixis

Yan Zhang, Chun Wang & Kejian Wang^{*}

State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

^{*} Corresponding author, E-mail: wangkejian@caas.cn

Heterosis, a phenomenon in which hybrid offspring shows better performance in many aspects than either of their homozygous parents, has been widely applied for improving crop productivity and adaptability. However, progenies generated via sexual reproduction are diverse owing to the genetic recombination during meiosis, which is not conducive to the application of heterosis. Apomixis is a type of asexual reproduction through which plants can produce clonal seeds without undergoing normal meiosis and fertilization. Therefore, apomixis has been a research hotspot for a long time because of its potential in fixing heterosis. Over 400 plant species exhibit apomictic phenomena in nature, and many genes linked with apomictic loci have been discovered in various species. These genes are involved in distinct regulatory mechanisms of apomixis. Even after decades of effort, these genes have not been successfully applied for crop apomixis because of complexity of the underlying mechanisms and lack of apomictic crops in nature. Due to the apomixis of plants also can be induced artificially by allowing plants to undergo unusual meiosis and fertilization, synthetic apomixis based on reproductive mechanisms has been proposed to fix heterosis. In *MiMe* (*mitosis instead of meiosis*), meiotic division is completely replaced by a mitotic-like division and diploid gametes that are genetically identical to their mother are produced. *MiMe* is induced by the absence of genes required for the pairing and recombination of homologous chromosomes, maintenance of sister chromatid cohesion as well as for the transition of germ cells from meiosis I to II. Following normal fertilization of clonal diploid gametes, the ploidy of offspring is doubled in each generation. To achieve synthetic apomixis and obtain clonal seeds, chromosome doubling following normal fertilization must be prevented. An effective way for this prevention is the elimination of one set of chromosomes from either parent. When a plant with altered CENH3 (centromere-specific histone H3) protein is crossed with a wild-type plant, haploid progenies are induced through the elimination of chromosomes from the *cenh3* mutant. Furthermore, combining *MiMe* plants with a genome elimination line via crossing is an effective strategy to produce clonal seeds. In addition, upon expression of BBM1 (BABY BOOM 1), which plays an important role in the initiation of embryogenesis, in the egg cell, haploid progenies are generated that produce seeds with haploid embryos following self-fertilization. Moreover, MTL (matrilineal) disruption in plants using CRISPR/Cas9 gene editing technology also can generate haploid progenies. Therefore, the combination of *MiMe* with *BBM1*- or *MTL*-induced production of haploid progenies can achieve synthetic apomixis in plants and produce clonal seeds. In this review, we summarize advances in synthetic apomixis at the molecular level and discuss the improvement of synthetic apomixis as well as its potential application in crop breeding.

rice, apomixis, heterosis, meiosis, clonal seeds

doi: [10.1360/TB-2020-0209](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0209)