

作物育种关键技术发展态势

梁翰文¹, 吕慧颖¹, 葛毅强², 魏 珣², 邓向东¹, 杨维才¹, 田志喜¹

(¹中国科学院遗传与发育生物学研究所/种子创新研究院, 北京 100101; ²中国农村技术开发中心, 北京 100045)

摘要:传统遗传育种方法是建立在有性杂交的基础上, 通过遗传重组和表型选择进行新品种选培。随着所用品种遗传多样性逐步减少, 传统育种瓶颈效应愈来愈为明显, 利用常规育种技术已经很难育成突破性新品种。生物技术的创新极大地推动了现代育种的发展。随着分子生物学、基因组学、系统生物学、合成生物学等学科的发展和生物技术的不断进步, 多学科联合催生了设计育种技术的革新。2017 年生物技术发展迅猛, 各项技术得到了空前的发展, 尤其是基因组编辑技术、单倍体育种、分子设计育种技术的发展, 正孕育着一场新的育种技术革命。

关键词: 育种技术; 分子设计育种; 基因组编辑

Development of Key Breeding Technology

LIANG Han-wen¹, LV Hui-ying¹, GE Yi-qiang², WEI Xun²,
DENG Xiang-dong¹, YANG Wei-cai¹, TIAN Zhi-xi¹

(¹Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences/Innovative Academy of Seed Design, Beijing 100101; ²China Rural Technology Development Center, Beijing 100045)

Abstract: Traditional breeding is a method to develop new varieties through genetic recombination and phenotype selection based on sexual hybridization. With the gradual reduction of genetic diversity of the varieties used, the bottleneck of traditional breeding becomes more and more obvious, and it is difficult to develop a breakthrough variety with conventional breeding technology. The innovation of biotechnology has greatly promoted the development of modern breeding. The rapid progress in multiple biological disciplines, including molecular biology, genomics, systems biology and synthetic biology, has led to the innovation of design breeding. In 2017, breeding technology developed rapidly, particularly in genome, haploid breeding and molecular design breeding technology, which will bring a new revolution for breeding technology.

Key words: breeding technology; molecular design breeding; genome editing

1 作物育种关键技术论文分析

1.1 远缘杂交

在 SCIE 数据库共获得 176 篇远缘杂交技术相关的研究论文。中国发文量最多, 为 80 篇, 接近该领域发文总量的一半; 美国发文 16 篇, 排名第 2 位; 日本发文 14 篇, 排名第 3 位。印度、俄罗斯和韩国紧随其后, 发文量分别是 13 篇、5 篇和 5 篇(表 1)。

表 1 远缘杂交领域主要发文国家

Table 1 Publications in field of distant hybridization

排序	国家	发文量
Rank	Country	No. of publications
1	中国 China	80
2	美国 USA	16
3	日本 Japan	14
4	印度 India	13
5	俄罗斯 Russia	5
6	韩国 South Korea	5

收稿日期: 2018-03-06 修回日期: 2018-04-09 网络出版日期: 2018-04-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180417.1007.006.html>

基金项目: 中国农村技术开发中心“农作物育种行业动态专题研究”项目

第一作者主要从事科研项目与农业科技领域创新管理工作。E-mail: hwhiang@genetics.ac.cn

通信作者: 田志喜, 主要从事大豆遗传研究。E-mail: zxtian@genetics.ac.cn

发文数量在 5 篇及以上的机构有 6 个,其中有 5 个机构来自中国。扬州大学发文 8 篇,排名第 1 位;四

川农业大学和中国农业科学院各发文 7 篇,排名第 2 位;印度农业研究理事会发文 6 篇,排名第 3 位(图 1)。

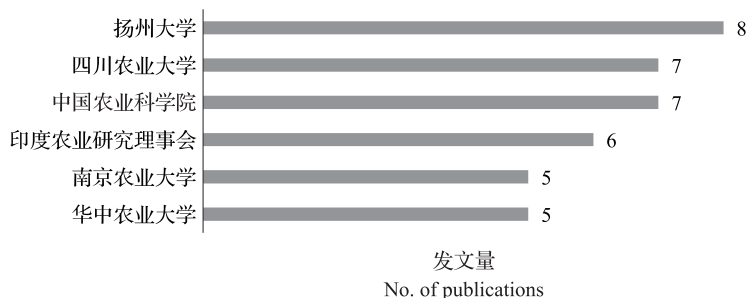


图 1 远缘杂交领域主要发文机构

Fig. 1 Institutions who published papers in field of distant hybridization

1.2 自交不亲和

利用相关检索式,从数据库中检索到 8 篇自交不亲和和相关论文。其中美国发表 4 篇,中国发表 3 篇,英国发表 1 篇。中国科学院和美国科罗拉多州立大学各发表 2 篇文献。

1.3 杂种优势利用

在 SCIE 数据库共获得 227 篇作物杂种优势利用相关的研究论文。中国发文量最多,为 116 篇,占该领域发文总量的一半多;美国发文 23 篇,排名第 2 位;印度发文 17 篇,排名第 3 位;德国、巴西和澳大利亚紧随其后,分别发文 10 篇、8 篇和 7 篇(表 2)。

发文数量在 5 篇及以上的机构有 6 个,其中有 5 个机构来自中国。华中农业大学发文 13 篇,排名第 1 位;中国农业大学发文 11 篇,排名第 2 位;西北

表 2 杂种优势利用领域主要发文国家

Table 2 Publications in field of utilization of hybrid vigor

排序 Rank	国家 Country	发文量 No. of publications
1	中国 China	116
2	美国 USA	23
3	印度 India	17
4	德国 Germany	10
5	巴西 Brazil	8
6	澳大利亚 Australia	7

农林科技大学发文 8 篇,排名第 3 位;上海交通大学和印度农业研究理事会各发文 6 篇,排名第 4 位;沈阳农业大学发文 5 篇,排名第 5 位(图 2)。

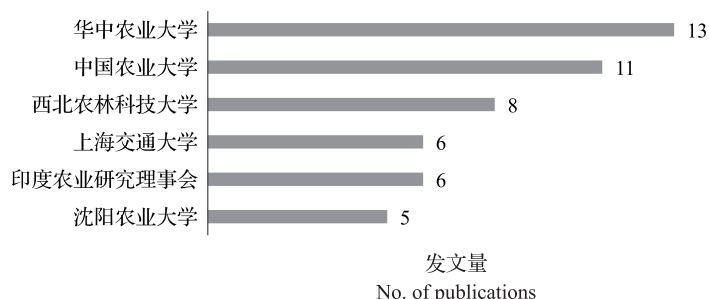


图 2 杂种优势利用主要发文机构

Fig. 2 Institutions who published papers in utilization of hybrid vigor

1.4 单倍体育种

在 SCIE 数据库共获得 90 篇单倍体技术相关的研究论文。中国发文量最多,为 24 篇;美国发文 17 篇,排名第 2 位;加拿大发文 7 篇,排名第 3 位;澳大利亚和印度紧随其后,分别发文 6 篇和 5 篇。发文机构统计结果如下:中国农业大学、华中农业大学和美国农业部各自发文 4 篇;印度农业研究理事会和

爱荷华州立大学各自发文 3 篇。

1.5 多倍体育种

在 SCIE 数据库共获得 30 篇多倍体技术相关的研究论文。中国发文 13 篇,排名第 1 位;巴基斯坦发文 4 篇,澳大利亚、印度和日本各发文 2 篇。发文较多的机构包括中国农科院、西北农林科技大学、四川农业大学,各发文 2 篇。

1.6 基因组编辑

在 SCIE 数据库共获得 71 篇基因编辑技术相关的研究论文。中国发文量最多,发文 21 篇;美国发文 19 篇,排名第 2 位;日本发文 7 篇,排名第 3 位;德国发文 4 篇,排名第 4 位。主要发文机构发文数量如下:中国农科院和中国科学院各发文 4 篇;乌干达国家农业研究组织发文 3 篇。

1.7 全基因组选择

在 SCIE 数据库共获得 66 篇全基因组选择育种相关的研究论文。美国发文量最多,发文 20 篇;德国发文 8 篇,排名第 2 位;墨西哥发文 7 篇,排名第 3 位;澳大利亚和中国发文 5 篇,排名第 4 位。其中,康奈尔大学、莱布尼茨植物遗传与作物研究中心和霍恩海姆大学各发文 4 篇;国际玉米小麦改良中心发文 3 篇,为主要发文机构。

1.8 分子设计育种

在 SCIE 数据库共获得 836 篇分子设计育种相关的研究论文。中国发文量最多,为 300 篇,接近该领域发文总量的 36%;美国发文 147 篇,排名第 2 位;印度发文 53 篇,排名第 3 位;日本发文 45 篇,排名第 4 位;德国发文 28 篇,排名第 5 位;韩国、加拿大、法国、澳大利亚和菲律宾紧随其后(表 3)。

表 3 分子设计育种领域主要发文国家

Table 3 Publications in breeding by molecular design

排序 Rank	国家 Country	发文量 No. of publications
1	中国 China	300
2	美国 USA	147
3	印度 India	53
4	日本 Japan	45
5	德国 Germany	28
6	韩国 South Korea	25
7	加拿大 Canada	24
8	法国 France	20
9	澳大利亚 Australia	19
10	菲律宾 Philippines	19

发文数量在 10 篇及以上的机构有 15 个,其中有 8 个机构来自中国。华中农业大学发文 27 篇,排名第 1 位;西北农林科技大学和中国农业大学各发文 22 篇,排名第 2 位;国际玉米小麦改良中心发文 21 篇,排名第 3 位;美国农业部、印度农业研究理事会等机构紧随其后(图 3)。



图 3 分子设计育种研究领域主要发文机构

Fig. 3 Institutions who published papers in breeding by molecular design

1.9 转基因育种

在 SCIE 数据库共获得 558 篇转基因育种相关的研究论文。中国发文量最多,为 227 篇,接近该领域发文总量的 40%;美国发文 55 篇,排名第 2 位;

印度发文 34 篇,排名第 3 位;韩国发文 32 篇,排名第 4 位;巴西发文 24 篇,排名第 5 位(表 4)。

发文数量在 6 篇及以上的机构有 10 个,其中有 8 个机构来自中国。中国农科院发文 23 篇,排名第

表 4 转基因育种研究领域主要发文国家

Table 4 Publications in transgenic breeding

排序 Rank	国家 Country	发文量 No. of publications
1	中国 China	227
2	美国 USA	55
3	印度 India	34
4	韩国 South Korea	32
5	巴西 Brazil	24
6	日本 Japan	14
7	巴基斯坦 Pakistan	12
8	德国 Germany	10
9	加拿大 Canada	9
10	意大利 Italy	9
11	荷兰 Netherlands	9
12	波兰 Poland	9

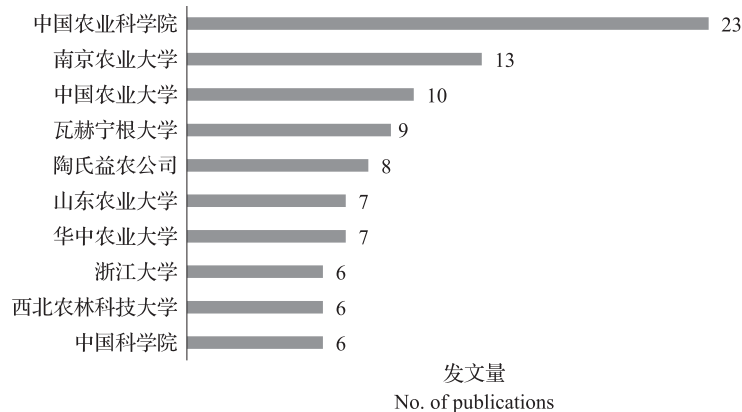


图 4 转基因育种研究领域主要发文机构

Fig. 4 Institutions who published papers in transgenic breeding

中国科学院上海生命科学研究院朱健康课题组在水稻中利用大鼠 APOBEC1 系统开发了一种单碱基置换方法。类似于哺乳动物“碱基编辑”系统,该研究小组合成了大鼠 APOBEC1,并利用非结构化的 16 残基肽 XTEN 作为接头,将其融合到 Cas9 (D10A) 的 N 末端。将一种核定位信号 (NLS) 肽添加到 Cas9 (D10A) 的 C 末端。半主动式的 Cas9 可切割非编辑的链,并通过诱导碱基切除修复,增加碱基编辑的效率。然后,在玉米泛素启动子 (UBI) 的控制下,这个 APOBEC1-XTEN-Cas9 (D10A) 融合序列被构建成一个双元载体。研究人员在水稻上对两个重要的基因 *NRT1.1B* 和 *SLR1* 进行了编辑,数据表明,采用这种改进的 CRISPR/Cas9 系统,可以有效地产生 C→T 和 C→G (G→A 和 G→C) 的替换^[1]。同期,中国农业科学院作物科学研究所夏兰琴研究组与华中农业大学“千人计划”引进人才、美国加州

1 位;南京农业大学发文 13 篇,排名第 2 位;中国农业大学发文 10 篇,排名第 3 位;瓦赫宁根大学和陶氏益农分列第 4、5 位(图 4)。

2 育种关键技术发展

2.1 基因组编辑技术

基因组编辑是生命科学新兴的颠覆性技术,特别是基于 CRISPR-Cas9 系统的基因组编辑工具近几年迅猛发展。在过去的一年里,基因组编辑技术得到空前发展。

2.1.1 作物基因组单碱基编辑方法的建立 在作物育种中,通过简单的方法将遗传变异引入到现代优异品种中是加速遗传改良、推进育种进程的重要手段。在过去的一年里,不同课题组分别建立了单碱基编辑方法,并在不同作物中进行了尝试。

大学圣地亚哥分校赵云德教授实验室合作,也报道了利用改造后 CRISPR/Cas9 系统,成功在水稻中实现靶标基因高效单碱基定点替换^[2]。

日本神户大学及筑波大学的 3 个研究团队通过借鉴哺乳动物单碱基编辑方法,成功在水稻及番茄中建立了 Target-AID 单碱基定点编辑技术体系。Target-AID 系统由海七鳃鳗胞苷脱氨酶基因 *PmCDA1* (petromyzon marinus cytidine deaminase) 和两种 Cas 蛋白变体 nCas9 (nickase CRISPR/Cas9) 或 dCas9 (nuclease-deficient Cas9) 及 sgRNAs 融合而成。研究人员首先通过 EGFP 报告系统成功实现 C 至 T 碱基的替换, dCas9Os-PmCDA1At 和 nCas9Os-PmCDA1At 处理的效率分别为 4.3% 和 18.3%; 继而以水稻中的除草剂靶标乙酰乳酸合成酶基因 (*ALS*, acetolactate synthase) 作为编辑的目标, dCas9Os-PmCDA1At 和 nCas9Os-PmCDA1At 均可创

造 287 位点上 C→T 的碱基突变 (A96V 的氨基酸替换), 从而获得对除草剂甲氧咪草烟的抗性, 效率分别为 1.56% 和 3.41%; 进一步的研究发现该系统可实现 3 个位点 (靶向两个基因 *FTIP1e* 和 *ALS*) 的同时单碱基编辑。该系统在双子叶植物番茄中也实现了高效的编辑。研究人员选取与激素信号相关的内源基因 *DELLA* 和 *ETR*, 利用未经过密码子优化的 PmCDA1 载体 nCas9At-PmCDA1Hs 以及通过拟南芥密码子优化的 PmCDA1 载体 nCas9At-PmCDA1At 均可实现单碱基编辑并最终获得了单碱基突变可稳定遗传且 marker-free 的番茄突变体。另外, 在 T₀ 代编辑的植物中发现有部分非预期的基因片段缺失或插入还有一些 C 至 G 突变类型^[3]。

中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞课题组在前期工作基础上, 借鉴哺乳动物单碱基编辑方法, 利用 Cas9 变体 (nCas9-D10A) 融合大鼠胞嘧啶脱氨酶 (rAPOBEC1) 和尿嘧啶糖基化酶 (UGI), 构成了高效的植物单碱基编辑系统 nCas9-PBE, 成功地在三大重要农作物 (小麦、水稻和玉米) 基因组中实现高效、精确的单碱基定点突变。通过在原生质体中对报告基因 *BFP* 以及 3 种作物中 5 个内源基因 7 个位点突变结果的详细分析, 发现 nCas9-PBE 可实现对靶位点 DNA 的 C 至 T 替换, C 碱基脱氨化的窗口覆盖靶序列的 7 个核苷酸 (距离 PAM 远端的第 3~9 位); 其中单个 C 的替换效率为 0.39%~7.07%, 多个 C 的替换效率高达 12.48%。通过遗传转化, 利用该体系获得了靶标区域单碱基替换的小麦、水稻和玉米突变植株, 突变效率最高可达 43.48%。该技术无需在基因组的靶位点产生 DNA 双链断裂 (DSB), 也无需供体 DNA 的参与, 具有简单、广适、高效的特点。nCas9-PBE 单碱基编辑系统成功建立和应用, 为高效和大规模创制单碱基突变体提供了一个可靠方案, 为作物遗传改良和新品种培育提供了重要技术支撑^[4]。

这些研究成果不仅丰富了单碱基编辑的技术手段, 而且为现代作物育种提供了前景广阔的现代育种新方法。

2.1.2 基因组编辑效率与精度的改良 如何提高 Cas9 编辑效率和避免脱靶是目前限制其发挥巨大潜力的最主要问题, 提高该系统的效率和特异性一直是基因组编辑方法研究的焦点。

中国农业科学院水稻研究所王克剑课题组和中科院遗传所李家洋课题组合作, 通过优化 sgRNA 的结构以及使用水稻内源性启动子来驱动 Cas9-

VQR 变体的表达, 成功将 CRISPR-Cas9-VQR 系统的编辑效率提高到了原有系统的 3~7 倍^[5]。

中国科学院—马普计算生物学研究所杨力研究组与上海科技大学陈佳研究组、杨贝副研究员开展合作研究, 利用共表达尿嘧啶糖苷酶抑制剂 (UGI, uracil DNA glycosylase inhibitor) 的方法, 开发了一种基于碱基编辑器 3 (BE3, base editor 3) 的增强型碱基编辑器 (eBE, enhanced base editor), 实现了更高准确度的基因组单碱基编辑^[6]。

通过蛋白质工程的方法, 美国两个课题组前期分别对 Cas9 蛋白进行定向改造, 获得了 3 种特异性显著提高的 Cas9 蛋白变体: eSpCas9 (1.0)、eSpCas9 (1.1) 和 SpCas9-HF1。中国科学院遗传与发育生物学研究所高彩霞课题组近期的研究发现, 这 3 种高保真的 SpCas9 核酸酶的基因组编辑活性会严格受到 sgRNA 向导序列 (guide sequence) 长度的影响。将向导序列设为与靶位点精确匹配的 20 个碱基, 是确保 3 种高保真 SpCas9 核酸酶活性的重要前提。为此, 高彩霞研究团队将水稻 tRNAGlu 序列融合到 U3 启动子和 sgRNA 之间, 利用细胞内源的 RNase P 和 RNase Z 将未成熟的 sgRNA 中的向导序列加工成为与靶序列精确匹配的 20 个碱基, 通过这一策略能够将 eSpCas9 (1.0)、eSpCas9 (1.1) 和 SpCas9-HF1 的活性保持在与野生型 SpCas9 相当的水平, 并且还保持其特异性^[7]。

丰富的遗传变异和高效的筛选体系是限制作物育种的主要因素。基因组编辑技术开创了作物遗传改良的新途径。得益于功能基因组学的研究成果, 基因组编辑技术已在控制作物质量性状的功能基因改良中得到应用。与功能基因丰富的遗传变异不同对调控功能基因表达模式的顺式调控序列的自然变异研究有限。挖掘和创制顺式调控序列的遗传变异, 不仅有助于阐明数量性状的调控模式, 而且对于作物遗传改良意义重大。冷泉港实验室的番茄育种家 Lippman 研究组通过系统的试验证实: (1) 通过 CRISPR/Cas9 靶向顺式调控基序能够重建人工驯化的数量性状位点; (2) 多重 gRNA 介导的 CRISPR/Cas9 对启动子区域进行编辑能够创制出新的、连续的性状变异; (3) 跨代 CRISPR/Cas9 驱动的遗传编辑体系能够高效地筛选和评价数量性状变异; (4) 新创制的顺式调控序列等位变异能够在非转基因后代中得到固定; (5) 顺式调控序列保守区的变异及其对转录的影响不可以通过表型差异来预测^[8]。

利用人工转录因子同时激活生物体内多个基因是一种强大的生物工程和系统生物学工具。转录激活因子 VP64 与 dCas9 融合可以促进靶向基因的表达,但只能较小程度地提高转录水平。目前报道的 3 种基于 dCas9 技术的转录激活系统(VPR、SAM 和 SunTag)在动物细胞中得到很好的应用,但在植物中还没有一种有效的转录激活系统。中山大学李剑峰教授研究团队报道了一种植物中的高效的转录激活系统 dCas9-TV,与 dCas9-VP64 相比,dCas9-TV 在单基因或者多基因的激活方面都表现比较强的激活效率,另外研究表明,该系统同样适用动物细胞^[9]。

几乎同时,美国马里兰大学戚益平实验室和中国电子科技大学张勇实验室合作开发了两套分别基于 CRISPR-Cas9 和 TALE 的高效植物转录激活系统。第一套转录激活体系基于 CRISPR-Cas9 系统。通过在拟南芥和水稻中测试转录激活的多种策略,研究发现通过 dCas9 和经修饰的 gRNA 支架 gRNA2.0 (CRISPR-Act2.0) 同时富集转录激活因子 VP64,要比同实验室之前报道的第一代 dCas9-VP64 具有更强的转录激活效应。CRISPR-Act2.0 系统成功的在水稻细胞中进行多基因激活,表明该系统在植物基因调控中具有很好的应用前景。第二套的转录激活体系是一个多重转录激活剂样效应物激活 mTALE-Act 系统,用于植物中多重转录激活。该系统允许将多达 4 个 TALE-VP64 基因快速装配成单个 T-DNA 载体,以同时激活植物中多达 4 个基因。通过在拟南芥中打靶 *PAP1*,作者证实 mTALE-act 要比 CRISPR-Act2.0 更有效地激活内源基因表达。因此,这个 mTALE-Act 系统是一个强大的转录激活系统,可同时上调植物中的多个基因^[10]。

2.1.3 高通量基因组编辑库的建立 在植物中,利用 CRISPR/Cas9/Cpf1 系统进行基因编辑的步骤主要包括了特异性靶点的选择,sgRNA 表达盒的设计,转化载体的构建与转化,以及后续对突变体的靶点突变的序列分析。

华南农业大学生命科学学院刘耀光研究组对已经开发的“DSD 简并序列解码法”及其在线软件工具 DSDecode 进行了改良,增加了配套的软件工具,并对网站硬件做了全面系统的升级,推出了一站式服务的在线基因组编辑工具软件包-CRISPR-GE (<http://skl.scau.edu.cn/>)。该软件包由一系列功能联动的多个子程序构成,包括特异性靶点的设计 (tarDesign)、潜在脱靶位点评估 (offTarget)、构建 sgRNA 表达盒和扩增与测定靶点序列的引物设计

(primerDesign),以及对目标靶点突变的分析 (DS-DecodeM) 等。这些功能涵盖了植物基因组编辑实验中的主要步骤,可以极大地帮助研究人员高效利用 CRISPR 系统进行基因组编辑的设计和结果分析。另外,该软件包还提供了一个方便下载参考基因组特定区间序列的工具 (seqDownload),用户只需输入目标基因号或小段标记序列,指定要下载的基因(标记)上下游序列的长度,即可下载对应的基因组片段序列。该软件包还支持对若干个动物基因组编辑的靶点设计和基因组片段序列的下载^[11]。

水稻突变体是进行水稻功能基因组学基础研究和水稻分子设计育种的重要材料。常规的水稻突变体来源于自发突变或化学、物理及生物的诱变,具有很大的随机性和局限性,不能满足大规模的水稻功能基因组学研究和水稻分子设计育种的需求。利用高效便捷的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术和高通量的寡核苷酸芯片合成技术可以大规模地对水稻全基因组进行编辑,实现水稻突变体的高通量构建和功能筛选。中国科学院遗传与发育生物学研究所李家洋研究组和高彩霞研究组合作,通过农杆菌介导的水稻遗传转化法,以水稻中花 11 作为受体材料,对水稻茎基部和穗部高表达的 12802 个基因进行高通量的基因组编辑,获得了 14000 余个独立的 T₀ 代株系,并对它们的后代进行了部分表型和基因型分析鉴定^[12]。同期,百格基因公司研究团队也公布了他们利用 CRISPR/Cas9 系统构建水稻突变体库的研究进展,获得了 8.4 万个突变植株,随机抽取部分转基因植株分析后表明,突变频率可以达到 80% 以上^[13]。

这些研究表明,利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术大规模构建水稻突变体库并进行功能筛选是高效便捷获得水稻重要突变体和快速克隆对应基因的有效方法,同时能够为水稻分子设计育种提供重要的供体材料。

2.1.4 育种公司对基因组编辑技术的关注 2017 年 1 月 4 日,孟山都宣布与哈佛大学—麻省理工学院的 Broad 研究院就新型的 CRISPR-Cpf1 基因组编辑技术在农业中的应用达成全球许可协议。新的 CRISPR-Cpf1 系统与 CRISPR-Cas9 系统相比,在针对性的改善细胞 DNA 方面有望变得更加简单和精确,是基因编辑技术领域的重大进展。研究人员认为 CRISPR-Cpf1 系统相较于 CRISPR-Cas9,在改善农业产品方面具有更多优点,例如编辑方式以及编辑发生位点更加灵活;CRISPR-Cpf1 系统体积更小,

能够更加灵活的运用于多种作物。CRISPR-Cpf1 系统的专利独立于 CRISPR-Cas 专利,这个新的系统将 为孟山都在基因编辑这个迅速发展的科学领域提供 另一个更有价值的工具。

2017 年 7 月, Evogene 宣布发现镰刀菌抗性基 因,目前表现最好的一部分基因已在孟山都的玉米 产品研发线上进行测试。同时, Evogene 宣布完成 了玉米和大豆产量及非生物胁迫逆境性状候选基因 的筛选,发现了约 4000 个与作物性状相关的基因。 同年 9 月, Evogene 公司宣布利用基因组编辑技术改 良的抗黑叶斑病香蕉获得成功。两年的田间试验结 果证实,该基因编辑香蕉品种能够提高对黑叶斑病 的抗性,并预计于 2018 年底开展第 3 年田间试验。

2017 年 8 月 16 日,孟山都宣布和 ToolGen 公 司就 CRISPR 技术平台在农业领域的应用达成全球许 可协议。ToolGen 是一家专注于基因编辑的生物技 术公司,是基因编辑研究领域的先驱。上述许可协 议的签署,授权孟山都在植物应用领域使用 ToolGen 全套 CRISPR 知识产权保护技术。

2.2 单倍体育种机理研究

单倍体诱导也具有巨大的商业育种价值,最近 几十年,单倍体育种已经广泛应用于玉米育种中,利 用单倍体诱导产生单倍体然后加倍产生纯合的二倍 体,可以大大加快育种进程,解析单倍体诱导形成的 机制将有利于进一步提高诱导率,助力作物的遗传 改良。

尽管双受精是开花植物所特有的生殖方式,但 现在越来越多的植物育种者试图“绕过”这一过 程,而是通过对诱导的单倍体采用药剂处理从而产 生双单倍体来完成开花植物的繁衍。由于产生的双 单倍体自交系能够直接稳定单倍体所携带的遗传变 异,从而可以加速育种进程。植物组织培养目前已 普遍应用于作物育种,但以种子生产为目标的双单 倍体育种体系还很少有研究以及大规模成功应用。 Stock6 是玉米中发现的第一个孤雌生殖诱导系,于 1956 年被首次报道,并在随后几十年的玉米单倍体 诱导中广为应用。但有关玉米 Stock6 及其衍生系 诱导单倍体的分子机理并不十分清楚。先正达公司 的 Kelliher 等通过图位克隆、基因组重测序、遗传互 补以及基因编辑等方法,证实玉米中单倍体诱导是 由一个花粉特异表达的磷酸酯酶基因 *MATRILIN- EAL* (*MTL*) 移码突变造成的。通过基因编辑获得的 *mil* 突变体可以达到 6.7% 的单倍体诱导率。*MTL* 定位于花粉母细胞质中,并且通过对花粉转录组

RNA-seq 分析表明,在单倍体诱导过程中,一系列花 粉特异表达的基因均显著上调,这些过表达基因很 可能部分参与了单倍体种子的形成。该研究成果表 明雄配子细胞质成分对于有性生殖过程的顺利完成 以及雄配子所携带染色体组在后代中的稳定传递均 起了重要的作用^[14]。值得一提的是,2017 年 2 月 4 日,中国科学家(中国农业大学陈绍江教授、金危 危教授及华中农大的严建兵教授团队)联合在 *Molecular Plant* 上同样也报道了该诱导基因(基因命名 为 *ZMPLA1*)^[15]。鉴于 *MTL* 基因在农作物中的保守 性,这一发现有助于在其他农作物中发展单倍体诱 导体系来加速育种进程。

玉米中存在天然单倍体诱导系:当诱导系与 普通玉米材料杂交之后,后代有一定几率产生仅含 有普通玉米材料染色体的单倍体个体。剖析单倍体 诱导过程对理解染色体行为及遗传稳定与物种进化 的关系有重要价值。华中农业大学玉米团队严建兵 课题组与中国农业大学金危危课题组合作利用单核 测序技术,初步解析了玉米单倍体诱导的机制。该 研究首先利用显微观察证明诱导系花粉减数分裂过 程中染色体行为并无异常,进而利用单细胞单核测 序技术发现诱导系成熟花粉的精核中存在高频的染 色体片段化,这些结果表明发生于花粉有丝分裂时 期的精子染色体片段化是造成受精后染色体消除及 单倍体诱导的直接原因^[16]。该研究结果为进一步 研究单倍体诱导的分子机制提供理论支持,有利于 进一步提高诱导率,助力作物的遗传改良。

2.3 转基因技术进展

发展高效、安全新型遗传转化方法,一直是基 因工程、分子生物学和遗传育种等领域的研究热点 之一。传统植物转基因方法,通常需要比较繁杂的 组织培养等植物再生程序,才能获得转基因植株,尤 其像诸如棉花等难再生作物的转基因植物制备更加 困难。中国农业科学院环发所崔海信研究员领衔的 “多功能纳米材料及农业应用”创新团队同生物所 的“作物分子育种技术”创新团队合作在纳米生物 技术研究方面取得重要突破。合作团队通过利用磁 性纳米粒子作为基因载体,创立了一种高通量、操作 便捷和用途广泛的植物遗传转化新方法。此次研发 的基于磁性纳米颗粒基因载体的花粉磁转化植物遗 传修饰方法,可以利用 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒作为载 体,在外加磁场介导下将外源基因输送至花粉内部, 通过人工授粉利用自然生殖过程直接获得转化种 子,然后再经过选育获得稳定遗传的转基因后代。

该方法将纳米磁转化和花粉介导法相结合,克服了传统转基因方法组织再生培养和寄主适应性等方面的瓶颈问题,可以提高遗传转化效率,缩短转基因植物培育周期,实现高通量与多基因协同并转化,适用范围与用途非常广泛,对于加速转基因生物新品种培育具有重要意义,并在作物遗传学、合成生物学和生物反应器等领域也具有广泛应用前景^[17]。该研究推动纳米载体基因输送与遗传介导系统研究取得了重要进展,开辟了纳米生物技术研究的新方向。

2017年6月15日,美环保署首次批准了孟山都以RNA干扰技术为基础研发的一种特殊杀虫剂-DvSnf7双链RNA(dsRNA)。DvSnf7双链RNA作为杀虫剂产品将会添加到SmartStax Pro转基因玉米中,当西方玉米根虫开始取食植物时,这种植物自己产生的DvSnf7双链RNA能够干扰玉米根虫一个重要的基因,进而杀死害虫。孟山都预计这款RNAi转基因玉米将于2020年上市。

2.4 分子模块设计育种的发展

不同团队分别在不同作物上开展了分子模块设计育种的探索,在过去的一年里,分子设计育种取得了较好的进展。以中国科学院遗传与发育生物学研究所李家洋团队为例,与中国农科院水稻研究所、深圳农业基因组研究所钱前研究组联合,经过精心设计,以超高产但综合品质差的品种特青作为受体,以蒸煮和外观品质具有良好特性的品种日本晴和93-11为供体,对涉及水稻产量、稻米外观品质、蒸煮食味品质和生态适应性的28个目标基因进行优化组合,经过8年多的努力,利用杂交、回交与分子标记定向选择等技术,成功将优质目标基因的优异等位聚合到受体材料,并充分保留了“特青”的高产特性。这些优异的“品种设计”材料,在高产的基础上,稻米外观品质、蒸煮食味品质、口感和风味等方面均有显著改良,并且以其配组的杂交稻稻米品质也显著提高。这项研究结果将极大推动作物传统育种向高效、精准、定向的分子设计育种转变^[18]。最近,其研究团队与浙江省嘉兴市农业科学院合作,运用“分子模块设计”技术育成的水稻新品种“嘉优中科系列新品种”获得了丰收,种植嘉优中科1号水稻品种的两块田实收测产表明,平均每667 m²产量分别为913 kg和909.5 kg,比当地主栽品种增产200 kg以上。

不同复杂性状间的耦合是分子设计育种的关键科学问题。作物的产量、品质等大都是多基因控制的复杂性状,由于受到一因多效和遗传连锁

累赘的影响,某些性状在不同材料和育种后代中协同变化,呈现耦合性相关。解析复杂性状间耦合的遗传调控网络,明确关键调控单元,对分子设计育种具有重要意义。中国科学院遗传与发育生物学研究所田志喜研究员联合王国栋研究员、朱保葛研究员、华盛顿州立大学张志武研究员等多家研究团队深入解析了大豆84个农艺性状间的遗传调控网络,揭示了不同性状间相互耦合的遗传基础,发现其中重要节点基因对不同性状的形成起到关键调控作用^[19]。该研究为大豆的分子设计育种提供了重要的理论基础,对于提高大豆的品质和产量具有非常重要的意义,同时也为其他作物性状耦合研究提供了借鉴。

目前,大批水稻、小麦、玉米和大豆分子模块育种品系正在区域性生产评比试验中,对作物新品种培育起到了重要推动作用。

2.5 大数据育种的发展

大数据正快速发展为发现新知识、创造新价值、提升新能力的新一代信息技术和服务业态,已成为基础性战略资源。各个国家和各大育种公司也在大力推进大数据育种。2017年主要动态如下:

NRGene是一家全球领先的基因组大数据公司,该公司开发的GenoMAGICTM平台能够分析海量的基因组数据,鉴别出广泛的序列多态性和单体型,使基因组选择和性状定位更加高效。目前,该软件被全球多家种子公司以及学术研究团队广泛采用,大数据的加速使用使育种的年限和成本都得到大幅的缩减。

2017年1月5日,先正达宣布与NRGene进一步加强合作,选择使用基于云计算的软件GenoMAGICTM,以加快性状开发和作物育种的进度。此前,先正达与NRGene已开展了为期两年的合作,并对GenoMAGIC软件进行测试,评估分析了该软件所带来的好处。这次两家公司开展进一步的合作,以期更全面广泛地评估GenoMagic在整个育种过程的收益。

2017年1月12日,孟山都与NRGene公司就先进基因组分析技术达成了全球性多年的、非排他专利许可协议。该合作将有助于孟山都研发人员从其海量的遗传学、基因组和性状信息数据库,更好地预测、比较并筛选出最佳的遗传修饰,进一步提升孟山都在基因组筛选、性状发现以及基因组改造领域的研发能力。

2017年6月14日,孟山都宣布与Atomwise公

司达成合作,利用 Atomwise 旗下人工智能技术 AtomNet 加速挖掘和开发新的作物保护产品。补充了该公司对作物保护发现的独特合作方式。Atomwise 公司开创性的 AtomNet 技术能够通过强大的深度学习算法和超级计算机来分析百万个潜在的作物保护产品分子,预测哪些分子可能对控制疾病和害虫产生积极影响,缩短前期研发时间。目前,孟山都是农业界首家与 Atomwise 合作的公司,并计划将 AtomNet 这一人工智能系统与其公司旗下育种、生物技术、作物保护、农业生物学和数据科学平台几大业务进行有效结合,缩短新产品的研发时间,及时推出能帮助农民获得更高种植收益的新产品。

可以预见,随着大数据的发展,作物数量遗传学、全基因组关联分析、作物基因组编辑技术将不断突破和改进,通过定点编辑、定点修饰顺式调控序列、定点激活基因表达实现对数量性状的精准操控,必将引领新一轮的育种技术革命。

2.6 未来育种技术发展

性状的形成同时受到基因型和环境的影响。即使生物体本身也是一个复杂的整体,是多模块互作的系统。涉及多尺度、多过程、多层次的调控。复杂性状多维控制是育种的巨大挑战。大数据、人工智能和基因组编辑技术的发展为未来育种带来机遇,一些颠覆性的技术也正在孕育。未来育种技术的发展应该会向精准、高效、智能方向发展。

致谢:文中“作物育种关键技术论文分析”由中国科学院文献中心提供。

参考文献

- [1] Lu Y M, Zhu J K. Precise editing of a target base in the rice genome using a modified CRISPR/Cas9 system [J]. *Mol Plant*, 2017, 10(3):523-525
- [2] Li J Y, Sun Y W, Du J L, et al. Generation of targeted point mutations in rice by a modified CRISPR/Cas9 system [J]. *Mol Plant*, 2017, 10(3):526-529
- [3] Shimatani Z, Kashojiya S, Takayama M, et al. Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5):441-443
- [4] Zong Y, Wang Y P, Li C, et al. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(5):438-440
- [5] Hu X, Meng X, Liu Q, et al. Increasing the efficiency of CRISPR-Cas9-VQR precise genome editing in rice [J]. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16(1):292-297
- [6] Wang L J, Xue W, Yan L, et al. Enhanced base editing by co-expression of free uracil DNA glycosylase inhibitor. *Cell Res*, 2017, 27(10):1289-1292
- [7] Zhang D B, Zhang H W, Li T D, et al. Perfectly matched 20-nucleotide guide RNA sequences enable robust genome editing using high-fidelity SpCas9 nucleases [J]. *Genome Biol*, 2017, 18:191
- [8] Rodriguez-Leal D, Lemmon Z H, Man J, et al. Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing [J]. *Cell*, 2017, 171(2):470-480
- [9] Li Z X, Zhang D D, Xiong X Y, et al. A potent Cas9-derived gene activator for plant and mammalian cells [J]. *Nat Plants*, 2017, 3(12):930-936
- [10] Lowder L G, Zhou J, Zhang Y, et al. Robust transcriptional activation in plants using multiplexed CRISPR-Act2.0 and mTALE-Act systems [J]. *Mol Plant*, 2017, <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.11.010>
- [11] Xie X, Ma X, Zhu Q, et al. CRISPR-GE: A convenient software toolkit for CRISPR-Based genome editing [J]. *Mol Plant*, 2017, 10(9):1246-1249
- [12] Meng X, Yu H, Zhang Y, et al. Construction of a gGenome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9 [J]. *Mol Plant*, 2017, 10(9):1238-1241
- [13] Lu Y M, Ye X, Guo R M, et al. Genome-wide targeted mutagenesis in rice using the CRISPR/Cas9 system [J]. *Mol Plant*, 2017, 10(9):1242-1245
- [14] Kelliher T, Starr D, Richbourg L, et al. MATRILINEAL, a sperm-specific phospholipase, triggers maize haploid induction [J]. *Nature*, 2017, 542(7639):105-109
- [15] Liu C X, Li X, Meng D X, et al. A 4-bp Insertion at *ZmPLA1* encoding a putative phospholipase A generates haploid induction in maize [J]. *Mol Plant*, 2017, 10(3):520-522
- [16] Li X, Meng D, Chen S, et al. Singlenucleus sequencing reveals spermatid chromosome fragmentation as a possible cause of maize haploid induction [J]. *Nat Commun*, 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00969-8
- [17] Zhao X, Meng Z G, Wang Y, et al. Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers [J]. *Nat Plants*, 2017, 3(12):956-964
- [18] Zeng D L, Tian Z X, Rao Y C, et al. Rational design of high-yield and superior-quality rice [J]. *Nat Plants*, 2017, 3(4):17031
- [19] Fang C, Ma Y M, Wu S W, et al. Genome-wide association studies dissect the genetic networks underlying agronomical traits in soybean [J]. *Genome Biol*, 2017, 18:161