

植物无融合生殖研究的新进展

马三梅¹, 王永飞¹, 叶秀琳², 梁承邨²

(1. 暨南大学生物工程学系, 广东广州 510632; 2. 中国科学院华南植物园, 广东广州 510650)

摘要: 植物无融合生殖是指不经过雌雄配子融合而产生种子的一种特殊生殖方式, 能使基因型的杂合性得以保持, 从而可固定杂种优势。对近几年来植物无融合生殖的研究进展及发展动态作一综述, 列举了新发现的具有无融合生殖特性的植物种类; 总结了控制无融合生殖的遗传机理; 指出该研究领域存在的问题; 展望了该领域的发展前景。

关键词: 植物; 无融合生殖; 遗传机制

中图分类号: Q944.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)05-0477-05

Recent Advances in the Study on Apomixis in Plants

MA San-mei¹, WANG Yong-fei¹, YE Xiu-lin², LIANG Cheng-ye²

(1. Department of Bioengineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Apomixis provides a unique opportunity to fix and utilize hybrid vigor. A number of research programs around the world have tried to use apomixis as an important plant-breeding tool. This paper presents a brief review of the current status of knowledge in the main fields of apomixis research. New apomictic plants are enumerated. Genetic mechanism is summarized. The problems in this field and development prospects are discussed.

Key words: Plant; Apomixis; Genetic mechanism

随着遗传学和分子生物学的发展, 无融合生殖已成为生物学中较为活跃的研究领域之一, 受到了国内外科学家的重视。植物无融合生殖能使基因型的杂合性得以保持, 从而可固定杂种优势或者控制转基因植物中外源基因的扩散, 因此在农业生产上具有重要的意义和潜力^[1]。我们曾对植物无融合生殖的遗传机理和分子机理、人工创造植物无融合生殖、植物无融合生殖鉴定方法等方面的研究进展做了综述^[2-5]。近几年无融合生殖研究又取得了新的进展: 如新培育的优良草坪草“Liberator”(草地早熟禾), 无融合生殖的频率平均可达 93%^[6]。本文结合我们的研究对植物无融合生殖几年来的研究进展及发展动态作一综述。

1 新的具有无融合生殖特性的种质资源

过去人们曾认为在裸子植物中不存在无融合

生殖的现象^[7]。但是, 2001 年在裸子植物地中海柏树 (*Cupressus drupreziana*) 中发现了无融合生殖的现象, 而且是父本无融合生殖, 该研究结果已发表在《Nature》上^[7]。近几年来报道的一些具有无融合生殖特性的植物种类有:

1.1 地中海柏树

地中海柏树是分布在阿尔及利亚 Tassili N' Ajjer 沙漠中的一种高度濒危植物, 全世界仅有 231 株。Pichot 等^[7]首先发现地中海柏树的生殖器官有一些异常现象: 花粉是二倍体, 胚的同工酶和母本不同。在裸子植物中, 胚乳一般来自雌配子体, 为单倍体, 而地中海柏树的胚乳不是单倍体。意大利柏 (*Cupressus sempervirens*) (作母本) 和地中海柏树 (作父本) 进行杂交得到 6 株 F₁, 生长 15 a 后, 植株的枝条朝一个方向伸展, 雌球果小, 饱满种子的比率很低, 花粉直径 38 μm, 胚乳染色体为 2n、4n、6n 等,

收稿日期: 2003-05-30 接受日期: 2003-07-11

基金项目: 暨南大学引进人才启动基金(692017 和 692016)资助

这些特征均和父本地中海柏树相同。但是裸子植物的胚乳形成无需受精,故一般为单倍体。如果该杂种胚乳与父本地中海柏树相同,那么它一定来源于地中海柏树受精后的取代发育,这样它应看作为“双受精”发育的起始特征。进一步利用 7 种同工酶(Fest, Idh, Lap, 6Pgd, Pgi, Pgm, Skdh)和 RAPD (OPA-08, OPA-15, OPA-18 和 OPR-07 作为引物)对意大利柏和地中海柏树的杂交后代、父本和母本进行研究。结果显示:杂种胚的同工酶和母本不一致;杂种的 RAPD 带型与父本相同,证实了地中海柏树的花粉发育不经过减数分裂,产生的是二倍体花粉,而且花粉可以进行无融合生殖,产生未经受精的胚,意大利柏仅仅做了地中海柏树的代理母亲。这是首次在裸子植物中发现有无融合生殖的现象,而且是父本无融合生殖^[7]。从胚胎学的角度看,这是典型的“雄核发育(Androgenesis)”,属于无融合生殖中的一种类型。该类型虽然很少见,但此前已有报道^[2]。过去认为绝大多数植物无融合生殖产生的后代与母本一致,而裸子植物地中海柏树的父本无融合生殖特性,产生的后代与父本相同。这个新发现把无融合生殖的范围扩展到裸子植物中,加深了我们对无融合生殖现象的理解,为植物生殖生物学的研究增加了很好的资料。

1.2 金丝桃属、柃子属和蔷薇属植物

金丝桃科金丝桃属的一个新种 *Hypericum carpaticum* 具有无融合生殖特性,它可能是由 *H. maculatum* 和贯叶金丝桃(*H. perforatum*)杂交得到的,推测它是从父本贯叶金丝桃获得了无融合生殖特性^[8]。柃子属的 *Cotoneasters brickellii*, *C. latifolius*, *C. purpurascens*, *C. vandelaarrii*, *C. thimphuensis*, *C. huiliensis*, *C. ignescens*, *C. lancasteri*, *C. kingdonii*, *C. shannanensis* 和 *C. yui* 都是新发现的植物种类,都能进行无融合生殖^[9]。蔷薇属大蔷薇组(*Rosa* section *Caninae*)的植物均是多倍体,可以进行无融合生殖^[10]。

2 遗传机制的研究

目前有关植物无融合生殖的遗传学机理,主要有 2 种观点:一种认为植物无融合生殖是由单基因控制的;另一种认为植物无融合生殖是由多基因控制的^[3]。近几年的研究进一步证实了不同植物中控制无融合生殖的基因数目不同。

2.1 单基因控制理论

Caceres 等^[11]利用细胞光度计对雀稗属 *Paspalum simplex* 有性生殖和无融合生殖杂交后获得的杂种进行研究,认为有性生殖杂种产生减数的 8 核胚囊,而无融合生殖杂种产生未减数的 8 核胚囊。有性生殖胚乳的遗传成分是 2 母:1 父,无融合生殖胚乳的遗传成分是 4 母:1 父。因此他们推断,无孢子生殖、孤雌生殖、假受精作为一个遗传单位向后代传递^[11]。我们认为他们得出这样的结论是由于受材料的限制而未能从无融合生殖胚胎起源细胞发生的部位和发育方式的差异来说明问题,有不太妥当的地方。因为他们混淆了“无孢子生殖”、“孤雌生殖”和“假受精”几个概念的含义。“假受精”是指在无融合生殖过程中,虽然胚的发育不需要雌雄配子的融合,但在多数情况下还需要进行受粉,胚和胚乳才能正常发育,但这种受粉的作用与一般有性生殖不同,可能是起到一个刺激胚和胚乳发育的启动作用。而“无孢子生殖”和“孤雌生殖”是根据无性幼胚起源细胞发生的部位和幼胚的发育方式来区分的 2 种植物无融合生殖类型。即“无孢子生殖”是由胚珠中不同位置的体细胞发育成为未减数的胚囊,由未减数胚囊进一步发育为具有胚和胚乳的种子。“孤雌生殖”是由卵细胞不经过受精而发育成胚的生殖方式,卵细胞本身虽然没有受精而发育成单倍体的胚,但是它的极核细胞却必须经过受精才能发育成胚乳,因此,受粉仍是必要的条件^[12]。

用四倍体有性生殖和无融合生殖的 *Paspalum simplex* 进行杂交和连续回交,发现无融合生殖是由单基因控制的显性性状,是由一段染色体区域控制的,该区域与水稻 12 号染色体长臂端粒区域具有同源性^[13]。以前认为百喜草(*Paspalum notatum*)的无孢子生殖是由几个隐性基因控制^[3],现在的研究发现:百喜草无融合生殖是由 1 个显性基因控制的。利用有性生殖的百喜草和无融合生殖的父本杂交,后代表现无融合生殖特性。无融合基因具有多效性,不完全表达,有致死效应^[14]。说明雀稗属中这两种植物的无融合生殖是由一个显性基因控制的。

2.2 多基因控制理论

在玉米(*Zea mays*)和摩擦禾(*Tripsacum dactyloides*)的杂种中随着玉米遗传成分的增加,有性生殖的后代也增加;而且控制二倍体孢子形成和孤雌生殖的基因是互相独立的,分别由不同的基因控制。随着玉

米染色体的增加,孤雌生殖的表达下降^[15]。对草地早熟禾(*Poa pratensis*) F₁群体的研究发现,F₁有一半是孤雌生殖,频率为1.44%–92.9%,在非孤雌生殖的植株中发现无孢子生殖,说明无孢子生殖和孤雌生殖是由不同的遗传因子控制的,两者并不偶联。这说明在摩擦禾和草地早熟禾的无融合生殖是由不同基因控制的^[16]。

3 分子水平的研究

近年来由于RAPD、RFLP和差异显示等技术的应用,一系列与无融合生殖有关的特异cDNA片段的发现和测序,为定位和克隆植物无融合生殖基因,以及利用遗传工程来改变植物的生殖方式积累了必要的理论基础。

3.1 无融合生殖相关基因的报道

通过Northern杂交和原位杂交对苜蓿(*Medicago sativa*)的无融合生殖突变体的研究发现: β -微管蛋白基因在野生型高度表达,在无融合突变体的表达程度很低;Mob1基因在突变体减数分裂前后的表达明显不同。这两个基因可能与无融合生殖有关,两基因的序列已经被GenBank收录^[17]。

雀稗属百喜草是亚热带的一种牧草,有的植株进行有性生殖,有的进行无孢子生殖。利用有性生殖作为母本和无融合生殖的父本进行杂交,获得两种类型的后代,一种进行无融合生殖,一种进行有性生殖。通过胚胎学研究区分两种类型的后代,进行mRNA差异显示的结果表明:apo417, apo398, apo396出现在无融合生殖的后代中,序列分析表明它们有高度的同源性。RT-PCR杂交显示这3种mRNA在无融合生殖中的表达是有性生殖的30倍,推测apo417, apo398, apo396可能与大孢子的早期发育有关。利用apo417进行Southern杂交,母本和F₁出现了4–5条带,序列比较显示与已知的基因序列无同源性,它编码的蛋白质3'端的氨基酸序列与cdc2细胞骨架调节蛋白中的KSP(赖氨酸-丝氨酸-脯氨酸, Lys-Ser-Pro)多磷酸化结构域有同源性^[18]。

3.2 无融合生殖的鉴定

分别对亚洲东南部、马达加斯加、印度洋中的Reunion岛屿的悬钩子属四倍体植物*Rubus alceifolius*进行扩增片段长度多态性(Amplified

fragment length polymorphisms, AFLP)和微卫星标记研究,结果显示:亚洲东南部的植株进行有性生殖;马达加斯加的进行兼性无融合生殖;印度洋中Reunion岛屿的进行无融合生殖^[19]。利用AFLP研究认为偏生早熟禾(*Poa secunda*)是进行兼性无融合生殖^[20]。

对3个无融合生殖的同源四倍体大黍(*Panicum maximum*),有性生殖的四倍体大黍和二倍体大黍各1个、以及3个三倍体的杂种进行RAPD研究,结果发现,在所用的16个引物中,8个可以明显区分无融合生殖和有性生殖的植株;三倍体杂种的RAPD带型一致,说明它们进行无融合生殖;细胞学的结果也证实它们确实进行无融合生殖。这就表明RAPD可以区分大黍的有性生殖和无融合生殖^[21]。对贯叶金丝桃的A、B、C、D4个品系的研究证实,在260个RAPD引物中,127个可以在A、B品系间具有多态性,53个引物无多态性;利用其中3个引物,发现A×B的22个后代,B×A的9个后代,D×C的10个后代均进行无融合生殖;在C×D的45个后代中有6个为有性生殖^[22]。利用2个序列特异性扩增区域(Sequenced characterized amplified regions, SCAR)标记引物可以区分草地早熟禾有性生殖和无孢子生殖^[23]。

3.3 胚和胚乳发育的研究

大多数有性生殖植物的胚乳是由2极核与1精子受精后发育而成的;而大多数进行无融合生殖植物(假受精)的卵细胞不经过受精就发育成胚,而胚乳经过受精才产生。但是在自主无融合生殖植物中,胚和胚乳的发育都不经过受精。在拟南芥*fie*突变体中发现,在低甲基化的珠心细胞中,胚乳可以自发产生^[24]。利用含有肌动蛋白-GUS基因的玉米花粉和四倍体摩擦禾杂交,授粉后发现GUS基因在胚乳中表达,在胚中没有表达。而在玉米种内杂交的种子中发现,GUS基因在胚和胚乳都可以表达^[25]。

4 细胞水平的研究

马三梅等认为水蔗草(*Apluda mutica* L.)进行兼性无融合生殖^[26],其胚囊发育有两种类型即有性生殖的蓼型和无孢子生殖的大黍型,产生无融合生殖胚囊的频率为60.74%。在大孢子母细胞发育至四分体后,珠孔端的3个大孢子解体,合点端的大孢子未解体时,邻近大孢子的一个珠心细胞开始特化,

形成无融合生殖的原始细胞,并发育形成有一个卵细胞、一个助细胞和两个极核的四核胚囊^[26]。在功能大孢子时期,珠孔端的 1-3 个珠心细胞开始特化,发育成胚珠附器;同时,有些胚珠出现无孢子生殖原始细胞;有性生殖和无孢子生殖的胚囊中均有胚珠附器的存在;但在无孢子生殖的胚囊中,胚珠附器一般很大,长约是宽的 1-3 倍;而有性生殖胚囊的胚珠附器的长约是宽的 1-2 倍;和有性生殖胚囊相比,无孢子生殖胚囊的胚珠附器更加发达;存在发达的胚珠附器是水蔗草无孢子生殖胚囊的特点之一^[27]。

雀稗属百喜草进行兼性无融合生殖。在开花时和开花后,用 Herr's 透明液透明百喜草的子房,用微分干涉显微镜对多胚种子产生机制进行研究,结果表明开花时珠孔端具有胚囊的频率是 92.5%-100%,其他位置具有胚囊的频率是 40.4%-86.0%;开花后珠孔端胚囊分裂;开花 4 d 后,珠孔端具有胚囊的频率为 56%-87%,其他位置有胚囊的频率是 4%-17%,但没有胚乳,珠孔端胚囊发育良好且占据了珠心的整个空间,其他位置的胚囊与之共存。说明在多胚的珠心中,珠孔端的胚囊在位置上具有受精和发育的优越性,其它位置胚囊的卵细胞受到靠近珠孔端胚囊中胚乳的刺激,开始分裂,形成胚。这就是双胚苗、三胚苗、四胚苗出现的原因^[28]。

摩擦禾进行二倍体孢子生殖,可以作为孤雌生殖研究的模式植物。它具有蝶须型 (Antennaria) 胚囊,其无融合生殖包括孤雌生殖和假受精两个过程,利用细胞光度计研究,认为四倍体成熟种子无融合生殖的频率是 92%(包括双胚苗),双胚苗的频率是 13%^[29]。

珊状臂形草 (*Brachiaria brizantha*) “Marandu” 是在巴西广泛种植的四倍体牧草,它进行无融合生殖。开花前去除柱头后,不能结实,说明必须经过受精才能形成种子;珊状臂形草种子的胚由卵细胞进行孤雌生殖产生的,胚乳必须经过受精才能产生,花粉是 3 核花粉,育性达 88%,授粉后 10 h,精子释放出来,发生单精受精,胚乳发育属核型,而且与胚的存在有关;授粉 2 d 后,胚乳发生细胞化;8 d 后胚乳成熟^[30]。

对木薯 (*Manihot esculenta*)、木薯和萨拉橡皮树 (*M. glaziovii*) 的 F₃ 代、*M. neusana* 和木薯的 F₁ 代、F₂ 代杂种和 *M. neusana* 进行子房透明观察,发现木薯和萨拉橡皮树的 F₃ 代、*M. neusana* 和木薯的 F₂ 杂

种、*M. neusana* 能进行无融合生殖,而且在 *M. neusana* 和木薯的 F₂ 杂种的珠心中有 2 个胚囊^[31]。

辛化伟等^[32]将水稻悬浮细胞分离出来的原生质体和大黍的原生质体经 PEG 或电融合处理后,获得的杂种细胞能进行持续的分裂,而且形成愈伤组织,并分化出完整的再生植株,通过细胞学研究发现,该再生植株具有无孢子生殖的特性。

5 展望

随着分子生物学的发展,无融合生殖的研究已经进入到了分子水平,而且取得了令人可喜的研究成果:例如应用携带 *GUS* 基因的植株作为父本和无融合生殖植株进行杂交,可以对无融合生殖胚和胚乳形成进行直接的研究,也可以直观地鉴定无融合生殖。目前虽然发现了一些特异的 cDNA 片段并且已经测序,但是无融合生殖基因仍然没有分离出来。所以,继续寻找优良的无融合生殖种质资源;对一些有争议的或者重要的无融合生殖材料进行 RAPD 等分子生物学研究,进一步提供简单的鉴定方法;发现与无融合生殖有关的特异片段,进而克隆出无融合生殖基因;利用克隆出来的基因进行基因功能研究,从而达到把无融合生殖基因转入农作物中,达到固定杂种优势的目的,或者控制转基因植物中外源基因向其它植物中传递等将是今后无融合生殖研究的重点。

参考文献

- [1] Henry D. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops [J]. Natl Biotechnol, 2002, 20:581-586.
- [2] Ma S M (马三梅), Wang Y F (王永飞), Ye X L (叶秀麟), et al. Progress in apomixis in monocotyledons [J]. Chin Bull Bot (植物学通报), 2002, 19(5):530-537. (in Chinese)
- [3] Ma S M (马三梅), Wang Y F (王永飞), Ye X L (叶秀麟), et al. Genetic mechanism and molecular basis of apomixis in plant [J]. Hereditas (遗传), 2002, 24(2):197-199. (in Chinese)
- [4] Ma S M (马三梅), Wang Y F (王永飞), Ye X L (叶秀麟), et al. Progress in transferring apomixis to crop plants and induction of apomixis [J]. J Northwest Sci-techn Univ Agri For (西北农林科技大学学报), 2002, 30(5):131-135. (in Chinese)
- [5] Ma S M (马三梅), Wang Y F (王永飞), Ye X L (叶秀麟), et al. The methods for identification of apomixis in plant [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin (西北植物学报), 2002, 22(4):985-993. (in Chinese)
- [6] Brede A D. Registration of 'Liberator' kentucky bluegrass [J]. Crop Sci, 2001, 41(2):583-584.
- [7] Pichot C, EL-Maataoui M, Raddi S, et al. Surrogate mother for

- endangered *Cupressus* [J]. *Nature*, 2001, 412(6842):39.
- [8] Martonfi P. New species of the genus *Hypericum* sect. *Hypericum* (Guttiferae) from Slovakia [J]. *Folia Geobot*, 2001, 36(4):371–384.
- [9] Fryer J, Hylmo B. Captivating *Cotoneasters* [J]. *New Plantsman*, 2001, 8(4):227–238.
- [10] Werlemark G. Genetic variability and reproductive strategies in Nordic dogroses, *Rosa* section *Caninae* [J]. *Acta Univ Agri Suec Agrar*, 2000, 257:133–142.
- [11] Caceres M E, Matzk F, Busti A, et al. Apomixis and sexuality in *Paspalum simplex*: characterization of the mode of reproduction in segregating progenies by different methods [J]. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14(4):201–206.
- [12] Cai D T (蔡得田), Chen D L (陈冬玲). A new strategy of rice breeding in the 21st century — combining apomixis, allopolyploidization and somatic hybridization [J]. *J Hubei Univ (Nat Sci)* (湖北大学学报自然科学版), 1999, 21(5):88–92. (in Chinese)
- [13] Pupilli F, Labombarda P, Caceres M E, et al. The chromosome segment related to apomixis in *Paspalum simplex* is homologous to the telomeric region of the long arm of rice chromosome 12 [J]. *Mol Breed*, 2001, 8(1):53–61.
- [14] Martinez E J, Urbani M H, Quarin C L, et al. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum* [J]. *Hereditas*, 2001, 135(1):19–25.
- [15] Sokolov V A. Independent inheritance and expression of apomeiosis and parthenogenesis in maize-gama grass hybrids [J]. *Doklady Biochem*, 2000, 374(1/6):407–499.
- [16] Albertini E, Porceddu A, Ferranti F, et al. Apospory and parthenogenesis may be uncoupled in *Poa pratensis*: a cytological investigation [J]. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14(4):213–217.
- [17] Barcaccia G, Varotto S, Meneghetti S, et al. Analysis of gene expression during flowering in apomeiotic mutants of *Medicago* ssp.: cloning of ESTs and candidate genes for 2n eggs [J]. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14(4):233–238.
- [18] Pessino S C, Espinoza F, Martinez E J, et al. Isolation of cDNA clones differentially expressed in flowers of apomictic and sexual *Paspalum notatum* [J]. *Hereditas*, 2001, 134(1):35–42.
- [19] Amsellem L, Noyer J L, Hossaert-mckey M. Evidence for a switch in the reproductive biology of *Rubus alceifolius* (Rosaceae) towards apomixes, between its native range and its area of introduction [J]. *Amer J Bot*, 2001, 88(12):2243–2251.
- [20] Larson S R, Waldron B L, Monsen S B, et al. AFLP variation in agamosperous and dioecious bluegrasses of Western North America [J]. *Crop Sci*, 2001, 41(4):1300–1305.
- [21] Ebina M, Nakagawa H. RAPD analysis of apomictic and sexual lines in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) [J]. *Grassland Sci*, 2001, 47(3):251–255.
- [22] Steck N, Messmer M, Schaffner W, et al. Molecular markers as a tool to verify sexual and apomictic offspring of intraspecific crosses in *Hypericum perforatum* [J]. *Planta Med*, 2001, 67(4):384–385.
- [23] Albertini E, Barcaccia G, Porceddu A, et al. Mode of reproduction is detected by *Parh1* and *Sex1* SCAR markers in a wild range of facultative apomictic Kentucky bluegrass varieties [J]. *Mol Breed*, 2001, 7(4):293–300.
- [24] Vinkenoog R, Scott R J. Autonomous endosperm development in flowering plants: how to overcome the imprinting problem? [J]. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14(4):189–194.
- [25] Bantin J, Matzk F, Dresselhaus T. *Tripsacum dactyloides* (Poaceae): a natural model system to study parthenogenesis [J]. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14(4):219–226.
- [26] Ma S M, Ye X L, Zhao N X, et al. Embryological studies on facultative apomixis in *Apluda mutica* (Gramineae) [J]. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(3):259–263.
- [27] Ma S M, Wang Y F, Ye X L, et al. The embellum in *Apluda mutica* [J]. *Chin Bull Bot*, 2003, 20(1):90–93.
- [28] Chen L Z, Guan L M, Kojima A, et al. The mechanism of polyembryonic seed set in *Paspalum notatum* [J]. *Cytologia*, 2001, 66(2):157–165.
- [29] Bantin J, Matzk F, Dresselhaus T. *Tripsacum dactyloides* (Poaceae): a natural model system to study parthenogenesis [J]. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14(4):219–226.
- [30] Alves E R, Carneiro V T C, Araujo A C G. Direct evidence of pseudogamy in apomictic *Brachiaria brizantha* (Poaceae) [J]. *Sex Plant Reprod*, 2001, 14(4):207–212.
- [31] Sousa E, Dos S De. Apomixis in *Manihot esculenta* and in its interspecific hybrids [J]. *Pesq Agropec Bras*, 2001, 36(9):1191–1197.
- [32] Xin H W (辛化伟), Sun J S (孙敬三), Yan Q S (颜秋生), et al. Plant regeneration from asymmetric somatic hybrids of *Oryza sativa* and *Panicum maximum* [J]. *Acta Bot Sin (植物学报)*, 1997, 39(8):717–724. (in Chinese)