

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.01328

杂交群体动物基因聚合

徐凌洋, 赵福平, 任航行, 陆健, 张莉, 魏彩虹, 杜立新

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

摘要: 基因聚合是通过优化设计杂交方案, 选择利用目标基因或与其紧密连锁的分子标记, 通过世代选择实现将来源于多个不同群体的优势目标基因或基因型聚合到同一个理想个体中, 进而达到生产出超级经济性状个体的目的。针对聚合不同目标基因个数, 设计 4 类杂交方案——两群体、三群体、四群体级联、四群体对称。在相同的杂交方案中, 比较基因型选择和表型选择策略, 分析不同杂交组合、性状遗传力、初始基因频率、基础群体规模对聚合设计的影响, 并筛选出最佳的聚合方案。研究表明, 在较大的基础群体规模和较高初始群体基因频率下, 获得聚合多个目标基因的理想个体的可能性较大。在四群体杂交方案中, 亲本的杂交次序对于级联杂交比对称杂交的影响较大。模拟结果表明, 运用基因型选择进行聚合育种优于表型选择。文章所开发的聚合模拟育种的统计分析方法和相应软件为指导杂交育种方案和选择策略的设计提供理论参考, 同时, 为进一步设计开发聚合设计模拟育种平台奠定基础。

关键词: 基因聚合; 优化设计; 杂交群体; 群体哈密距离

Animal gene pyramiding in cross populations

XU Ling-Ying, ZHAO Fu-Ping, REN Hang-Xing, LU Jian, ZHANG Li, WEI Cai-Hong, DU Li-Xin

Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Gene pyramiding aims at producing individuals with one superior economic trait according to the optimal breeding scheme involving selection of favorable target alleles or linked markers after crossing basal populations and pyramiding them into a single individual. In consideration of animal traditional cross program along with the features of animal segregating population, four types of cross programs and two types of selection strategies for gene pyramiding are performed from practice perspective of view, two population cross for pyramiding two genes (denoted II), three populations cascading cross for pyramiding three genes (denoted III), four population symmetrical (denoted IV-S) and cascading cross for pyramiding four genes (denoted IV-C), and various schemes (denoted cross program-A-E) were designed for each cross program with different levels of initial favorable allele frequencies, basal population sizes, and trait heritabilities. The process of gene pyramiding for various schemes were simulated and compared based on the population hamming distance, av-

收稿日期: 2012-03-05; 修回日期: 2012-06-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30972094)和国家现代农业产业技术体系肉羊体系岗位科学家经费项目资助

作者简介: 徐凌洋, 博士, 研究方向: 分子数量遗传学。Tel: 010-62816002; E-mail: xulingyang@163.com

通讯作者: 杜立新, 博士, 教授, 研究方向: 动物遗传育种。E-mail: lxdu@263.net

网络出版时间: 2012-8-24 01:40:57

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120824.1340.002.html>

erage superior genotype frequencies, and average phenotypic values. By simulation, the results showed that larger base population size and higher initial favorite allele frequency resulted in higher efficiency of gene pyramiding. The order of parent crossing was shown to be the most important factor in cascading cross, but had no significant influence on the symmetric cross. The results also showed that genotypic selection strategy was superior to phenotypic selection in accelerating gene pyramiding. The method and corresponding software would be used to compare different cross schemes and selection strategies. Moreover, our study would help to build the optimal gene pyramiding simulation platform.

Keywords: gene pyramiding; optimal design; hybrid population; population hamming distance

基因聚合通过世代选择, 向一个个体中聚合来源不同群体的多个目标基因型, 进而实现获得超级经济性状的目标。近年来, 为了研究植物农艺性状和动物经济性状的分子遗传机制, 国内外科研人员关于复杂性状的分子剖析进行了大量研究^[1,2], 由此, 许多数量性状位点和与性状紧密连锁的标记由此被确定, 为动植物生产育种实践中运用标记辅助选择带来了机遇^[3]。

标记辅助基因聚合育种是标记辅助选择育种的一个重要分支。2004 年, Sevin 等^[4]首次对植物基因聚合理论进行研究。他们提出, 如果一系列优秀基因位点已经知道, 选择的问题可以简化为“积木块”问题, 通过计算在每一个节点获得理想基因型个体的基因传递的概率与最小群体大小来衡量基因聚合效率。Zhao 等^[5]将这一理论推广到动物上, 提出在动物基因聚合中如何计算每个聚合方案下得到一个理想个体所需要的最小群体大小, 并结合世代数比较不同的基因聚合方案优劣。后来 Zhao 等^[6]采用标记辅助选择的方法模拟研究在不同的影响因素(选择策略、留种率、目标基因之间的重组率和交配方式)下基因聚合效率的影响。但是在上述研究中都没有考虑基础群体的初始基因频率对基因聚合的影响。该因素对基因聚合效率的影响也非常关键。虽然, 动物标记辅助基因聚合的理论研究刚刚开始, 但是在植物中, 利用基因聚合技术培育新品种或品系已有一些成功的例子。Ashikar 等^[7]利用分别来自印度和日本的两个不同品种的水稻将半矮小基因 *sd1* (semi-dwarf 1 gene) 和控制谷粒数目的 *Gn1* (grain number 1) 基因聚合到在一起, 不仅提高了产量和降低了植株的高度, 这一成果发表在 2005 年国际顶尖杂志 *Science* 上。其中研究报道中最成功的例子主要在抗病基因聚合上^[8-12]。另外 Jiang 等^[13]利用模式动

物果蝇中将 4 个分属于不同品系的 4 个目标基因——白眼、黄体、残肢和黑檀体基因通过杂交聚合到一个品种中。这为推动动物基因聚合理论进一步的研究起到了积极的作用。

本研究设计了 4 种杂交方案和两种选择策略。首先, 比较不同起始基因频率和群体规模大小下聚合育种进展, 以优势等位基因频率作为衡量聚合育种进展的主要指标。其次, 比较基因型选择策略和表型选择策略, 以聚合世代数为衡量指标。最后, 比较三亲本群体和四亲本群体情况下, 不同杂交亲本次序对基因聚合育种进展的影响。

1 材料和方法

1.1 基因聚合育种概念

标记辅助基因聚合是通过优化设计杂交方案, 选择利用与目标基因精密连锁的分子标记, 实现将来源于多个不同群体的目标基因, 在世代选择过程聚合到同一个理想个体中, 进而达到生产出超级经济性状个体的目地。Servin 等^[4]提出基因聚合育种包括两个基本的步骤: I、聚合步, II、固定步。本研究设计 4 种杂交育种方案, 在基因聚合步(图 1), 将来源不同群体的目标基因首先通过杂交积聚到同一杂交群体中。其次, 在基因固定步, 选择杂交亲本通过横交, 固定多个目标基因到同一个理想个体中。

1.2 群体与个体基因型的模拟

动物大多数重要经济性状是由多个基因控制的数量性状。本研究假定基因聚合设计是在聚合育种中寻找最优基因型组合的过程, 目标性状由几个主要效应的基因共同控制。个体基因型是通过 0、1 字符模拟。两个 0、1 字符模拟一个位点的基因型, 一系列的字符串个体组成的群体表示群体的基因型。

初始基础群体由 $N \times M$ 矩阵表示(N 代表群体中个体数目, $M/2$ 代表研究个体所考虑的位点数目)。

基础群体为随机群体(各位点基因频率随机产生)或者是特定基因频率的群体(各位点基因频率特别设定)。在每一世代, 模拟的个体通过基因型得分和表型值进行衡量。假理想群体中所有的个体中每一个位点均携带优秀的基因型, 比如: 模拟 4 个位点, 理想基因型是 11-11-11-11, 是基因聚合育种中的目标基因型。实验假定包含最优的基因型组合的群体由 $N \times M$ 的 1 矩阵编码。亲本运用离散重组的遗传操作方法产生新的后代, 在位点间随机产生单个和多个的交叉点, 用于实现不同等位基因的交叉互换。离散重组(即自由组合)的策略使得每一位点作为一个潜在的交叉位点。离散重组使用交叉掩码, 交叉掩码指示交叉的位点, 同样长度的个体结构可以随意创建, 在字符串中掩码表示亲代提供子代等位基因信息的位点, 在此位点实现交叉互换产生新的基因型组合个体。

1.3 个体表型值的生成

本研究假定每个基础群体存在一个控制同一性状的主效基因的有利等位基因, 并且这些基因之间具有可加性。个体的表型值由下面的模型(1)产生:

$$y_i = \mu + \sum_{j=1}^n g_{ij} + \xi_i \quad (1)$$

其中, y_i 表示第 i 个个体的表型值, μ 表示群体均值, n 表示聚合的目标基因数, g_{ij} 表示第 i 个个体第 j 个位点的基因效应, 每个位点上的基因型 11、10、00 数值编码分别对应 5、4、1, ξ_i 表示第 i 个个体的剩余残差且服从正态分布 $N(0, \sigma_\xi^2)$ 。该性状遗传力可以用下面公式(2)得到:

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \sigma_\xi^2} \quad (2)$$

同时, 对于给定的遗传力, 剩余残差方差由下面公式(3)估计:

$$\sigma_\xi^2 = \frac{\sigma_g^2}{h^2} - \sigma_g^2 \quad (3)$$

1.4 基因型选择与表型选择策略

基因型选择将标记给予一定的加权值而形成指数, 而后根据这个指数的大小选留种畜, 这种选

择方法称为标记得分选择, 标记得分的计算公式为:

$$MS = \sum_{i=1}^n P(M_i) \quad (4)$$

其中, n 表示聚合的目标基因数, 如果第 i 个目标基因的有利等位基因个数为 2、1 和 0 时, 则 P_i 的值分别为 5、4 和 1。基因型选择的得分为个体各位点上基因型的得分的加和值, 并作为下一世代的选择标准。

在表型选择策略中, 个体表型值是通过个体基因型值预测, 见公式(1)。

1.5 杂交方案设计与聚合育种

4 种类型的杂交方案, 分别用符号 II、III、III.C 和 -S 符号代表, 具体见图 1。

方案 II 代表分别将来源于群体 PopA 和 PopB 中两个目标基因聚合, 个体基因型编码为 $xxyy$, 其中 xx 代表来源供亲 PopA 的目标优势基因型, 其基因频率设为 $p(a)$, yy 代表供亲 PopB 的目标优势基因型, 其基因频率设为 $p(b)$ 。N 为基础群体大小。基础群体规模分别设定为 500、1 000、2 000。群体起始基因频率分别设定为 0、0.25、0.5。群体 PopA 和群体 PopB 杂交产生群体 PopAB, 假设每一对亲本有 4 个后代, 后代性别比例是 1:1。PopAB 的选择是基于基因型得分。基因得分前 500 的个体被选做下一世代的杂交亲本, 选择的亲本通过随机交配产生下一世代的个体, 杂交群体 PopAB 横交, 在多世代固定优势基因, 直到两个目标基因型完全聚合到同一理想个体中。

方案 III 代表分别将来源于群体 PopA、PopB 和 PopC 中 3 个目标基因聚合。个体基因型编码为 $xxyyzz$, 基础群体 PopA 和 PopB 的规模分别设定为 500、1000。在每一个位点的起始基因频率分别设定为 $p(a)$ 、 $p(b)$ 、 $p(c)$ 。PopA 和 PopB 杂交产生 PopAB, 假设每一对亲本有 4 个后代, 后代的性别比例是 1:1。起始群体 PopC 规模设定为 $2 \times N$, 然后群体 PopAB 和 PopC 杂交产生群体 PopABC。杂交群体 PopABC 的选择是基于基因型得分。同样, 基因得分前 500 的个体被选做下一世代杂交亲本, 选择的亲本通过随机交配产生下一世代的个体, 杂交群体 PopABC 横交, 固定优势基因, 直到 3 个目标基因型完全聚合到同一理想个体中。

方案 代表分别将来源于群体 PopA、PopB、

PopC 和 PopD 中 4 个目标基因聚合。个体基因型编码为 $xxyyzzww$, 基础群体 PopA 和 PopB 的规模设定分别为 500、1000。四群体级联杂交方案(-C), PopA、PopB、PopC、PopD 的群体大小分别设为 N 、 N 、 $2 \times N$ 、 $4 \times N$, 在对称四群体杂交方案(-S)中群体规模分别为 N 、 N 、 N 和 N 。在每一个位点的起始基因频率分别设定为 $p(a)$ 、 $p(b)$ 、 $p(c)$ 、 $p(d)$ 。PopA 和 PopB 杂交产生 PopAB, PopA 和 PopB 杂交产生 PopCD, 下一世代, PopAB 和 PopCD 杂交产生 PopABCD。假设每一对亲本有 4 个后代, 后代的性别比例是 1:1。杂交群体 PopAB、PopCD、PopABCD 的选择是基于基因型得分。基因得分前 500 的个体被选做下一世代杂的亲本, 选择的亲本通过随机交配产生下一世代的个体, 混合群体 PopABCD 通过横交, 固定优势基因, 直到 4 个目标基因型完全聚合到同一理想个体中。

本研究设计的 4 种杂交策略, 每一基因聚合育种方案均设定不同的基础群体规模大小和初始基因频率, 在表型选择中同时还考虑性状遗传力, 基因聚合的世代数和优势基因型频率作为育种进程和选择策略的主要衡量指标。同时, 运用蒙特卡洛方法模拟, 各育种方案模拟次数为 1 000 次。

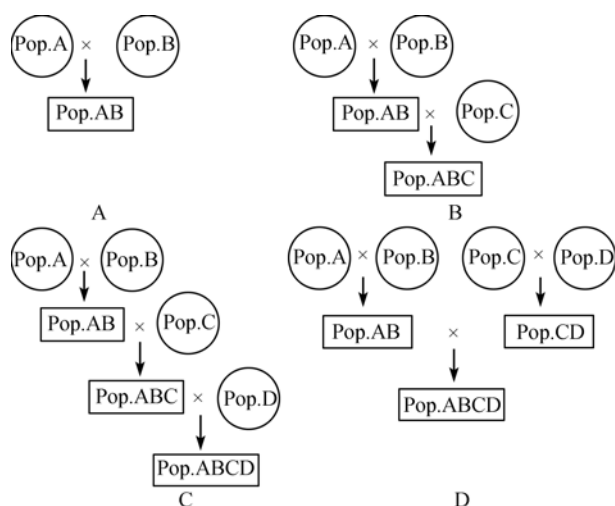


图 1 聚合步骤 4 种类型的杂交方案

A: 聚合两基因的两群体杂交; B: 聚合 3 基因的三群体杂交; C: 聚合 4 基因的四群体级联杂交; D: 聚合 4 基因的四群体对称杂交。

2 结果与分析

2.1 两基因聚合

在两个亲本的杂交育种中, 初始基因频率分别

设定为 0.5、0.25、0, $p(a)$ 和 $p(b)$ 表示杂交亲本的等位基因频率。在相同的基因频率下, 遗传力大的性状, 平均表型值较快的达到最大值。例如, 杂交策略 II-A, 遗传力 0.6 (II-A-0.6), 两个目标基因在第 8 世代通过表型选择实现聚合, 然而, 运用基因型选择在第 6 世代即可实现两个的聚合(II-A-G)。在策略 II-B, 遗传力 0.6 时, 表型选择在第 6 世代两个基因聚合, 相比基因型选择, 两个基因在第 5 世代聚合(图 2)。基因型选择两个基因聚合在第 5 世代(II-B-G), 分别比较其他遗传力情况下 0.6(方案 II-B-0.6)、0.4(方案 II-B-0.4)、0.2(方案 II-0.2), 优势基因型的平均频率分别为 0.82、0.44、0.41。同时, 设计方案 II-C, 两位点的基因频率设定为非零。设定 $p(a)$ 等于 0.5/0.25, $p(b)$ 等于 0.25/0.5, 假定遗传力 0.6, 通过目标基因聚合世代(TGPG)数分别是 7 世代, 基因型选择则在 5 世代实现聚合。比较 3 种策略下的基因型选择, TGPG 分别为世代 8(II-A-G)、世代 6 (II-B-G)、世代 5(II-C-G)。

2.2 三基因聚合

模拟研究来源 3 个群体的 3 个目标基因, 当性状遗传力和初始基因频率均较低时, 3 个目标基因则很难在世代 10 聚合, 例如杂交方案 III-A-0.2、III-B-0.2、III-A-0.4、III-B-0.4。当性状遗传力 0.6, 运用表型选择方案 III-A-0.6、III-B-0.6、III-C-0.6 聚合世代 9、世代 8 和世代 7, 运用基因型选择基因聚合的世代数分别是世代 8(III-A-G)、世代 7(III-B-G)、世代 6(III-C-G)。

比较杂交方案 III-B [$p(a)=0.25/0/0$, $p(b)=0/0.25/0$, $p(c)=0/0/0.5$]和方案 III-C [$p(a)=0.25/0/0$, $p(b)=0/0.5/0$, $p(c)=0/0/0.25$]。研究表明, 作为第 3 杂交亲本育种基因频率 0.5(III-C)和 0.25(III-D), 聚合育种进程相似。研究也表明来源于群体 A(Pop_a)第 1 位点和来源于群体 B(Pop_b)第 2 位点的基因型 11 增长趋势相同。来源第 3 亲本的第 3 位点增长趋势大于第 1、2 两个位点。当 3 个位点基因频率增加时, 目标基因可以在较早世代实现聚合(图 3)。

2.3 四基因聚合

研究设计了两种类型的四基因聚合方案, 级联杂交和对称杂交。相同初始基因频率和性状遗传力下, 研究比较方案 -C 与方案 -S。结果显示级联

杂交和对称杂交聚合进展相近,但是在聚合步,对称杂交需要较小的群体规模,同时,对称杂交聚合步骤需要两世代,比级联杂交策略少一个世代。比较方案 -C-A-G、-C-B-G、-C-C-G 和 -S-A-G、-S-B-G、-S-C-G,四基因聚合世代分别为 9、10、9 和 8、9、9,在这种情况下,对称杂交比级联杂交略显优势(图 4)。

在对称杂交中,表型选择群体 A(PopA)和群体 B(PopB)中优势基因型 11 具有相同的生长趋势。同样,群体 C(PopC)和群体 D(PopD)的生长趋势一致(图 5)。但是,在级联方案中,群体 C 和群体 D 作为第 3、第 4 杂交亲本,来源于第 3、第 4 群体的第 3 位点与第 4 位点的优势基因型增长趋势大于来源于第 1、2 群体的第 1 位点和第 2 位点上的优势基因型(图 4)。模拟结果表明,亲本杂交次序影响级联杂交聚合的进展。较高基因频率的基础群体作为第三、四杂交亲本时,对于遗传力低的性状,优势基因型增长趋势比较低频率的群体快,比如策略 -C-E 比策略 -C-C 和 -C-D 略优。但是,对于遗传力较高的性状,3 个策略之间的差异并不显著。

2.4 基因型和表型选择策略的平均表型进展

本研究比较基因型选择策略和不同遗传力下表型选择策略的平均表型值进展。群体规模大于 500,首先,找出由基因型选择目标基因聚合的世代 $G(t)$ 。在得到的世代 t ,考虑不同遗传力下,表型选择下的平均表型进展。在杂交策略 II、III、下,基因型选择策略在促进基因聚合方面优于表型选择,当性状遗传力为 0.6 时,表型选择策略近似于基因型(表 1)。本研究比较方案 -C 和 -S, $G(t)$ 和平均表型值的结果显示,方案 -C-C 略优于方案 -C-D 和 -C-E。

3 讨论

在表型选择策略中,本研究首先设计了聚合两个基因的方案。在杂交群体中两个位点的基因型 11 频率同时计算,由于两个基础群体中初始基因频率一致,在第 1 世代,两位点同时在混合群体计算,所以两位点上的优势基因型频率表现趋势一致(图 1)。本研究考虑的因素有基础群体规模大小与两位点初始基因频率,性状的遗传力。聚合 3 个基因的困难

程度较大于两个基因聚合。需要较大基础群体规模和较高初始基因频率以保证 3 个目标基因在较短世代实现聚合。当然,在通过 3 个群体设计 3 个基因聚合时,需要考虑的一个重要问题是杂交亲本顺序。哪一个杂交亲本更适应做第 3 杂交亲本。然而,模拟结果表明,3 个群体杂交聚合 3 基因时,亲本杂交次序在后续世代对基因聚合影响并不显著,只是对前几世代有微弱的影响。在四基因聚合的两种方案中,级联杂交需要 3 世代完成聚合步(图 1c)获得混合群体 PopABCD,而对称杂交需要两世代(图 1d),同时级联杂交的第 3、4 群体需要 2 倍、4 倍大的群体规模以实现聚合,从这方面考虑,对称杂交策略优于级联杂交。在四基因聚合策略中,平均表型值与初始基因频率和性状遗传力相关,这点与前面讨论的 2 个基因和 3 个基因的聚合策略一致。另外在对称杂交方案中,不用考虑杂交亲本顺序,而在级联杂交方案中,不同的亲本杂交顺序对基因聚合效率的影响比较大。同时,平均表型值用来比较不同的选择策略和杂交策略,基因型选择策略优于表型选择策略。

Servin 等^[4]基于概率统计理论设计了标记辅助基因聚合的算法。计算基因在系谱中传递概率,推断获得理想个体的最小群体规模。然后,以聚合 3 个和 4 个目标基因为例比较几种方案的优劣。但是这仅局限于作物育种,并不适合动物基因聚合育种研究。本研究考虑到杂交群体中目标基因的有利基因频率和选择策略两个因素研究基因聚合的影响。将动物基因聚合育种当作不同基因型最优组合,通过设定不同的参数,模拟聚合育种进程,并通过聚合世代和优势基因型频率衡量聚合方案。这为动物基因聚合育种提供了相对简单的模拟平台,在该平台,可以灵活地模拟特定基础群体大小、初始基因频率下基因型选择和表型选择的聚合育种过程,为实际进行基因聚合提供一定的理论参考。下一步的研究工作主要是充分利用高通量全基因组技术挖掘的有效信息,构建更为精确的贴近实际的选择模型,开发完善的模拟平台进而指导育种实践。

聚合育种方案应该考虑基础群体规模,初始基因频率和性状遗传力。对于高遗传力的性状,表型选择进行聚合设计,需要的世代较少,而对于低遗传力性状,将需要更多的世代。因此,为了保证聚合

表 1 比较基因型选择和表型选择的平均表型进展[&]

杂交方案	世代数 (t)	表型选择			基因型 选择
		0.2	0.4	0.6	
II-A	7 [*]	0.34 ^{&1}	0.72 ^{&2}	0.88 ^{&3}	0.87 ^{&G}
II-B	6	0.34	0.67	0.82	0.94
II-C	5	0.31	0.58	0.73	0.81
III-A	9	0.43	0.92	1.12	1.17
III-B	8	0.51	0.98	1.14	1.15
III-C	9	0.42	0.88	1.07	1.10
III-D	9	0.44	0.92	1.10	1.13
IV-C-A	11	0.46	1.04	1.27	1.32
IV-C-B	10	0.49	1.04	1.27	1.32
IV-C-C	10	0.46	1.03	1.29	1.37
IV-C-D	11	0.49	1.03	1.24	1.27
IV-C-E	11	0.46	0.99	1.20	1.23
IV-S-A	11	0.49	1.06	1.28	1.32
IV-S-B	9	0.52	1.10	1.36	1.46
IV-S-C	10	0.50	1.07	1.07	1.38
IV-S-D	10	0.50	1.31	1.32	1.38

注：& 平均表型进展由公式 $[p(t)-p(1)]/t$ 计算， $p(t)$ 表示世代 t 的平均表型值， $p(1)$ 表示世代1的平均表型值；* 基因型选择基因聚合世代；^{&1}性状遗传力 0.2，表型选择 t 世代的表型进展；^{&2}性状遗传力 0.4，表型选择 t 世代的表型进展；^{&3}性状遗传力 0.6，表型选择 t 世代的表型进展；^{&G}基因型选择的平均表型进展。

的有效性，可以通过增加基础群体的初始基因频率，以减少聚合需要的世代数。当然，进行聚合设计的最理想情形是，选择聚合具有控制高性状遗传力的基因，且初始基因频率较高的群体为基础群体。

参考文献(References):

- [1] Doerge RW. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(1): 43–52. [DOI](#)
- [2] Chen M, Kendzierski C. A statistical framework for expression quantitative trait loci mapping. *Genetics* 2007, 177(2): 761–771. [DOI](#)
- [3] Fadiel A, Anidi I, Eichenbaum KD. Farm animal genomics and informatics: an update. *Nucl Acids Res*, 2005, 33(19): 6308–6318. [DOI](#)
- [4] Servin B, Martin OC, Mézard M, Hospital F. Toward a theory of marker-assisted gene pyramiding. *Genetics*, 2004, 168(1): 513–523. [DOI](#)
- [5] Zhao FP, Jiang L, Gao H, Ding XD, Zhang Q. Design and comparison of gene-pyramiding schemes in animals. *Animal*, 2009, 3(8): 1075–1084. [DOI](#)
- [6] Zhao FP, Zhang Q. Stimulation study of gene pyramiding in animals by marker-assisted selection. *J Integr Agric*, 2012, 11: in press. [DOI](#)
- [7] Ashikari M, Sakakibara H, Lin SY, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Qian Q, Kitano H, Matsuoka M. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 2005, 309(5735): 741–745. [DOI](#)
- [8] Singh S, Sidhu JS, Huang N, Vikal Y, Li Z, Brar DS, Dhaliwal H, Khush GS. Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106. *Theor Appl Genet*, 2001, 102(6–7): 1011–1015. [DOI](#)
- [9] Jiang GH, Xu CG, Tu JM, Li XH, He YQ, Zhang QF. Pyramiding of insect-and disease-resistance genes into an elite indica, cytoplasm male sterile restorer line of rice, 'Minghui 63'. *Plant Breed*, 2004, 123(2): 112–116. [DOI](#)
- [10] Huang N, Angeles ER, Domingo J, Magpantay G, Singh S, Zhang G, Kumaravadevel N, Bennett J, Khush G: Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice. marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor Appl Genet*, 1997, 95(3): 313–320. [DOI](#)
- [11] Maroof MAS, Jeong SC, Gunduz I, Tucker DM, Buss GR, Tolun SA. Pyramiding of soybean mosaic virus resistance genes by marker-assisted selection. *Crop Sci*, 2008, 48(2): 517–526. [DOI](#)
- [12] Wang XY, Chen P, Zhang SZ. Pyramiding and marker-assisted selection for powdery mildew resistance genes in common wheat. *Acta Genet Sin*, 2001, 28(7): 640–646. [DOI](#)
- [13] Jiang L, Zhao FP, Zhang Q. Simulation of gene pyramiding in *Drosophila melanogaster*. *J Genet Genomics*, 2008, 35(12): 737–742. [DOI](#)