

文章编号:1001-1498(2003)06-0754-06

植物近等基因系培育及在林木遗传改良上的应用探讨

诸葛强, 张 博, 黄敏仁, 王明麻

(南京林业大学林木遗传和基因工程重点实验室, 江苏 南京 210037)

摘要:近等基因系是分子遗传图谱构建、数量性状基因定位及分子标记辅助育种的重要基础。近等基因系选育主要有连续多次回交选育法、从突变体中分离获得、结合分子标记技术检测连续回交选育法、杂交高世代群体材料中分离选育等方法。本文介绍了主要农作物近等基因系构建及应用的研究进展,并结合林木植物的特点,提出了选择生长周期较短的木本植物柳树为材料,构建近等基因系,在此基础上形成林木遗传学研究模式树种的观点。

关键词:近等基因系;培育;林木遗传改良;模式植物

中图分类号:S722.7 **文献标识码:**A

近等基因系(near isogenic lines, NIL)是指一组遗传背景相同或相近,只在个别染色体区段上存在差异的株系,是经过一系列回交过程的产物^[1]。在育种实践中,就是将带有标记基因的供体亲本与轮回亲本进行杂交,并多次回交,且每代只选择目标基因个体与轮回亲本回交,从而获得除目标基因外,其他遗传背景与轮回亲本相同的品系^[2]。

在植物育种中,如某一优良品种缺少一二个优良性状时,经常采用多次回交的方法将优良性状从外源种质中转移到该品种中去。用于多次回交的亲本是目标性状的接受者称为轮回亲本或受体亲本;而只在第一次杂交时应用的亲本是目标性状的提供者称为非轮回亲本或供体亲本。其回交过程一直持续到新培育的目标品系在理论上除了含有目标性状基因的染色体区段外,与轮回亲本几乎等基因时为止^[3]。

近等基因系是基因水平上开展遗传研究的理想材料。利用近等基因系,可较准确地筛选到与目标性状连锁的分子标记,有利于构建分子遗传图谱,并可与传统的遗传图谱对应整合^[4]。只要利用近等基因系、供体亲本和轮回亲本基因型通过分子标记技术即可检测目的基因与分子标记间的连锁关系,近等基因系有助于鉴别目标性状基因的染色体片段,并对目标基因进行较精密定位,目标基因分子定位结果有助于开展高效育种工作。因此,近等基因系的构建是分子遗传图谱构建、数量性状基因定位及分子标记辅助育种的重要基础之一,具有重要的理论意义和应用价值。

收稿日期:2003-07-02

基金项目:2002—2004年国家自然科学基金海外杰出青年合作项目“林木遗传学研究”(30128017)资助

作者简介:诸葛强(1959—),男,江苏江阴人,副教授,从事林木遗传育种工作。

1 植物近等基因系培育研究

近年来,农作物优良基因近等基因系的研究已成为遗传育种研究领域的热点课题之一。例如,已选育出水稻(*Oryza sativa* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、玉米(*Zea mays* L.)、棉花(*Gossypium hirsutum* L.)、大豆(*Glycine max* L.)、油菜(*Brassica napus* L.)、烟草(*Nicotiana tabacum* L.)等一系列优良基因近等基因系,并加以利用,使这些农作物育种研究达到了一个新的水平。培育植物近等基因系主要有下述选育方法^[5]:

(1) 多次回交选育法。就是以轮回亲本连续回交,一般需回交6代以上。即转移目标性状基因,使育成材料除目标性状存在差异外,其遗传背景逐步接近轮回亲本,因而两者成为近等基因系,该方法是近等基因系培育中最常用的方法,如农作物抗病性近等基因系的构建。

(2) 从突变体中分离获得。一般1个位点的突变并不引起其他位点的变异。即诱变获得的突变体与原品种(系)除突变位点差异外,其他位点基本一致,则可从中选育出近等基因系。

(3) 结合分子标记技术检测连续回交选育法。一般先开展若干代回交试验,在建立多次回交群体的基础上,选择可与目标性状连锁的分子标记进行检测,选育近等基因系。随着分子标记技术的不断完善,这一方法正在成为近等基因系选育的有效方法之一。

(4) 杂交高世代群体材料中分离选育。因为在杂交高世代群体中,控制大多数性状的基因趋于纯合,仅少数基因处于杂合状态,在此基础上从中选育具有相对性状差异的品系构建近等基因系。

水稻近等基因系培育研究开展最为活跃。据报道已选育出一系列如抗病、矮秆、早熟、糯质、育性恢复和广亲和性等近等基因系^[6]。稻瘟病、白叶枯病是水稻的重要病害,Wang等^[7]利用IR24、Toyonishiki和密阳23分别为轮回亲本培育出了3套各具各自遗传背景和含12个抗白叶枯病基因的近等基因系。MacKilg等^[8]采用4个水稻品种作为抗病基因的供体,培育出了一套C039为遗传育种的抗稻瘟病的近等基因系。Ogawa等选育出了一套携有不同抗白叶枯病基因水稻近等基因系,用于鉴定、检测生理小种和新的抗病基因,可直接作为育种供体;章琦等^[9]选育出抗白叶枯病基因(Xa-3、Xa-4和Xa-12)粳稻NILs(CBB3、CBB4、CBB12),作为基因聚合杂交育种的亲本材料。此外,在育性、产量等性状上也培育出了一批近等基因系。Shen等用⁵⁰Co⁻射线处理干种子获得T24与亲本组成一对育性恢复基因NILs,为细胞质雄性不育分子遗传研究提供材料。用NILs对育性恢复基因Rf-3进行基因定位,Rf-1基因与分子标记OS-RRF密切连锁距离为3.7~1.1 cM,该标记可用于杂交种子纯度和恢复系、保持系研究。李建雄等^[10]以水稻珍汕97/明恢63的一个含234个重组自交系的F_{6,7}群体为材料,通过以性状和分子标记为基础的方法在该群体中分离了每穗实粒数和千粒质量这两个性状的近等基因系及对这两个性状有效应的QTLs和两两互作位点的近等基因系。

除水稻外,刘秉华^[11]利用“中国春小麦”获得涉及Ms2与Rht10基因分别表现高秆不育、高秆可育、矮秆不育和矮秆可育的近等基因系,即矮败小麦近等基因系。沈银柱等^[12]利用亲本濮农3665/农3039的F₁经花药培养,得到愈伤组织后,再经诱变、筛选、分化得到4个小麦耐盐近等基因系H8706-34、H8706-44、RH8706-48、RH8706-49。张洁夫等^[5]利用高代群体分离法,培育了2对无花瓣油菜近等基因系NIL-PL01和NIL-APL01及NIL-PL02和NIL-APL02。近等基因系间除花瓣存在差异外,其他主要农艺性状基本一致,NIL-PL02和NIL-APL02具有浅紫色叶

片和茎秆标记。唐灿明等^[13]利用常规棉品种(系)作轮回亲本与转 *Bt* 基因抗虫棉品种(系)杂交后代中分离出的抗虫植株回交,选育出了7个转 *Bt* 基因抗虫棉近等基因系。*Bt* 基因转入陆地棉基因组后,对棉花的衣分、铃质量、单株铃数无明显影响,部分组合的抗虫植株产量高于感虫植株,对绒长、整齐度、比强度、伸长率、麦克隆值等品质指标亦无明显影响。通过回交可将 *Bt* 基因转育到优良品种的遗传背景上,实现抗虫性状与高产、优质等性状的结合。

2 近等基因系与分子标记辅助选择

近等基因系的构建需要连续多次回交,而轮回亲本的选择成为近等基因系培育的关键。近等基因系由杂交和多代回交分离而获得。除目标基因外,其余遗传背景应与轮回亲本基本一致。利用近等基因系 NIL 寻找与目标基因连锁的分子标记的基本策略是比较轮回亲本、NIL 及供体亲本三者的标记基因型,当 NIL 与供体亲本具有相同的标记基因型,但与轮回亲本的标记基因型不同时,则该标记就可能与目标基因连锁^[14]。在目标基因所在的染色体区域附近,检测到 DNA 标记的几率大小取决于被导入的染色体片段的长度及轮回亲本和供体亲本基因之间 DNA 多态性的程度。检测几率随培育 NIL 中回交次数的增加而降低。当轮回亲本和供体亲本分别属于栽培种和野生种时,更有可能发现多态性的分子标记。相反,轮回亲本和供体亲本的亲缘关系越密切,其多态性的分子标记就越少。

大量研究表明,利用近等基因系 NIL 方法对寻找与目标基因紧密连锁的分子标记是十分有效的,这类紧密连锁的 DNA 标记不仅适合于标记辅助选择,对利用图位克隆目标基因也是十分有用的。Tanksley 等^[15]通过连续回交,将番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 抗烟草花叶病毒病 (TMV) 抗病基因 *Tmr2*, 转移到不同的栽培品种中,从而得到了一系列不同轮回亲本的 NIL。这些 NIL 所拥有的包含 *Tmr2* 片段的长度在 4 ~ 51 cM 之间。利用这些 NIL,他们找到了与 *Tmr2* 相距不到 0.5 cM 的 DNA 标记。Martin 等采用 RAPD 方法与 NIL 技术相结合,快速鉴定了与番茄青枯病 (*Pseudomonas* sp.) 抗性基因 *Pto* 相连锁的 DNA 标记。利用 144 个随机引物对第 5 染色体上 *Pto* 基因有差异的一对 NIL 进行筛选,获得了 7 个有多态性的扩增产物,对其中 4 个扩增产物作进一步分析,有 3 个被证实与 *Pto* 基因连锁。郭北海等^[16]采用 RAPD 技术,以 4 个小麦株高基因近等基因系(分别含有 *Rht*、*Rht1*、*Rht2*、*Rht3*)为材料,对 296 个单一随机引物(10 个核苷酸)进行了筛选。发现 25 个引物的扩增产物在近等基因系间表现出特异性。其特异扩增片段 OPAM011860 可以作为 *Rht* 基因的 RAPD 标记。夏军红等^[17]利用多种分子标记开展 *Rf3* 近等基因系的辅助选择 (MAS) 研究,在 HSBC1F1 群体中,通过标记辅助选择,可育单株遗传背景与轮回亲本最高相似程度达到 83.9%,并且单侧连锁累赘的长度被控制在 8.9 cM 以内。在 MYBC3F1 群体中通过一代表型选择和两代 MAS,可育单株遗传背景与轮回亲本最高相似程度达到 98%,单侧连锁累赘的长度被控制在 2.29 cM 以内。

王泽立等^[18]用 RAPD 标记分析证明了玉米 CMS - S 型育性恢复基因 *Rf3* 基因近等基因系创建的回交次数为 4 次,即可达到与目标连锁片段的有效渗入。谭震波等^[19]将携带抗病基因 *Xa-14* 的粳稻近等基因系 CBB14 为亲本配制杂交组合,根据对 F₂ 群体中选择的 99 个单株进行的 RFLP 分析的结果,构建了水稻第 4 连锁群的分子图谱,并把抗病基因 *Xa-14* 定位于 RG620 和 C282 之间。章琦等^[9]报道利用水稻近等基因系 CBB23 构建了 JG30/CBB23 组合的 F₂ 分离群体,通过 SSR 标记筛选,将 *Xa23* 定位于水稻第 11 号染色体。

近等基因系群体是数量性状位点的精确作图必不可少的,并通过位点克隆来获得单个 QTL 基因。但可检出的各性状 QTL 数目仍较少,尤其是对一些遗传效率低、贡献率较小的 QTL 的检测是很不可靠的。QTL 定位的精确性与定位的群体类型有关,目前作物 QTL 定位的群体有 F₂ 群体、回交群体 (BC₁)、回交自交系群体 (BL)、双单倍体群体 (DH)、重组自交系群体 (RL)、染色体代换系和近等基因系 (NL),尤其以近等基因系用于 QTL 定位效果最佳,这是因为近等基因系群体不仅是永久性群体,而且具有定位的准确度高等优点。

近等基因系分析法是进行快速基因定位的有效方法。近等基因系几乎仅在目标性状上存有差异,因此,一般凡是能在近等基因系间揭示多态性的分子标记,就极可能位于目标基因的两翼附近。目前,利用近等基因系和比较基因组作图等基因组研究的新技术以及高信息量的分子标记技术,使能够在目标基因的侧翼得到连锁非常紧密的标记。然后由这些标记去筛选大片段 DNA 文库 (YACs 或 BACs),鉴定出与标记有关的克隆,继之以亚克隆和染色体步查获得含目的基因的克隆片段,再辅之以转化和互补测验加以确证。

3 近等基因系在林木遗传改良研究中的应用前景

自 80 年代中期开始,拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) 被广泛用于植物遗传学、发育生物学和分子生物学等研究。作为一种模式植物,拟南芥许多近等基因系的研究正在为生物学的几乎所有方面提供了有价值的信息。因此,通过研究拟南芥获得相关知识,将大大加速我们对其他植物相应过程的了解,并为遗传改良提供理论基础。拟南芥基因组也是第一个开展全基因组测序的高等植物,也为我们深入了解植物的各种遗传机制提供了可能,而这种了解不仅对植物生物学而且对未来的作物育种都将产生重大影响。

林木是最重要的陆地生态植物。森林系统为人类提供了丰富的生物资源,栖息着大量物种,携带着形形色色的基因,为人工造林提供了物种和基因资源。为了有效地经营现有的森林资源及加速林木的改良过程,迫切需要对林木生长、发育及基因表达、调控等机制进行深入的研究。但是,林木具有世代长、杂合度高、遗传负荷大等生物学特性,极大地限制了林木遗传学的研究。为此,林木遗传改良迫切需要有新的突破,其中与林木遗传改良相关的遗传基础研究和育种理论方法的创新成为林木遗传改良研究领域的关键。要实现这样的新突破,应结合林木遗传学的特点,主要从两个方面入手:一是常规育种技术的改进和创新,二是现代生物技术定向改良育种技术的研究开发应用。

但长期以来,国内外林木遗传改良的应用理论与方法滞后,常规育种与高新技术脱节,缺乏群体遗传和分子遗传的配合研究,对选种目标的数量性状一般采用数量遗传学方法,将控制数量性状的基因统归为一个整体(基因型)加以研究,即将育种材料通过适当的试验设计和统计模型,估算出均值、方差、遗传力等各种遗传参数,评价与选育育种材料。即使 20 世纪 90 年代以来,利用分子标记构建林木遗传图谱,促进了林木遗传研究的发展,但是由于作图群体的遗传组成是高度杂合的,谱系不清,连锁相未知,同时使用的分子标记大都是显性标记,因而构建的遗传图谱质量低,精度差,难于进一步构建物理图谱以及目标基因的定位^[20,21]。因此,培育林木近等基因系是林木遗传研究取得突破性进展的关键之一。

林木植物有其固定的特点,林木最显著的差别就是木材即次生木质部的形成,既可为树木高大的结构提供支撑,其次生生组织又是林木生长发育所必需。因此,对于与林木次生木质

部形成相关等方面的研究采用树木以外的植物如拟南芥作为模式植物,可能会存在许多局限。此外,林木其生长、休眠的机制极其复杂,如芽的萌发涉及一系列环境信号(包括生长和温度)与植物信号传递途径之间的相互作用。类似还有如林木开花的年龄也差异较大,柳树(*Salix* spp.) 1 a,杨树(*Populus* spp.) 6 a,栎树(*Quercus* spp.) 60 a。

杨树作为世界上北半球分布最广的重要树种之一,近年来把它作为林木的模式树种加以研究。其原因是:(1)2002年2月开始启动了杨树基因组序列测定,这是第一个开始全基因组测序的树种;(2)与其它树种比较,杨属(*Populus* L.)基因组相对较小(450~550 Mbp)^[22,23];(3)利用分子标记技术,构建了密度较高的分子遗传图谱^[24,25];(4)遗传转化容易,杨树是第一个遗传转化的木本植物;(5)可无性繁殖,即能获得大量无性繁殖材料进行实验。

柳属(*Salix* L.)植物共有230多个种,广泛分布于北半球。柳属可分为32个系列,包括乔木型柳树和灌木型柳树。乔木型柳树可作为纸浆用材、农田防护林以及风景林;灌木型柳树用于营造柳编林、防风固沙林和饲料林。部分柳属植物无论是种子繁殖还是扦插繁殖都能一年开花,相对于多数林木物种其世代短,因此可在短时间内建立林木的近等位基因系,并对林木的重要性状进行多世代育种。目前林木中研究较多的杨树需要5~6a完成一个世代,这也是今后其研究的一个“瓶颈”。作为杨树的近缘种,柳树与杨树具有相似的遗传学特点,如都具有相同的染色体数目($2n=38$),基因组大小也相似(约500 Mbp)等。目前杨树基因组全序列测定计划已经开始,1~2a内就将完成。其叶绿体基因组已经完成测序。大量的杨树遗传信息也可用于柳树的研究中。所以如利用柳树其世代短、后代目标性状差异显著等特点,并结合多种分子标记技术(如RAPD、AFLP、SSR等),在分子水平上检测回交后代其遗传背景与轮回亲本相似程度,进行表型选择与分子标记辅助选择的相关性分析,培育其重要性状的近等基因系。在此基础上利用高度保守的分子标记如EST(表达序列标签)等构建其遗传图谱。同时开展功能基因组研究,使基因组比较研究和标记辅助选择在林木育种中的应用成为可能。使其成为林木遗传学研究的模式树种。

参考文献:

- [1] Young N D, Zamir D, Ganai M W, et al. Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the TM2a gene in tomato [J]. *Genetics*, 1988, 120:579~582
- [2] Muclmore G J, Specht J E, Thomas-Compton M A, et al. Near-isogenic lines ——a potential resource in the integration of conventional and linkage maps [J]. *Crop Science*, 1988, 28:279~735
- [3] Stam P, Zeven A C. The theoretical proportion of the donor genome in near isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing [J]. *Euphytica*, 1981, 30:227~238
- [4] Tanksley H P. Mapping in plant breeding [J]. *Biotechnology*, 1999, 7:257~268
- [5] 张浩夫, 缚寿仲, 戚存和, 等. 甘蓝型油菜无花瓣近等基因系的选育研究初报 [J]. *中国油料作物学报*, 2002, 24(2):14~21
- [6] 曾亚文. 水稻优良基因近等基因系的研究与利用操作 [J]. *种子*, 1998, 6(99):70~73
- [7] Wang A M, Mackill D J, Bonman J M. Inheritance of partial resistance to blast in indica rice cultivars [J]. *Crop Science*, 1989, 29:848~853
- [8] Mckill D J, Bonman J M. Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice [J]. *Phytopathology*, 1992, 82:746~749
- [9] 章琦, 王春莲, 赵开军, 等. 携有抗白叶枯病新基因 X23 水稻近等基因系的构建及应用 [J]. *中国水稻科学*, 2002, 16(3):206~210
- [10] 李建雄, 余四斌, 徐才国, 等. 以性状和分子标记为基础的水稻近等基因系的分离 [J]. *作物学报*, 2000, 26(5):627~630

- [11] 刘秉华,王山荭,杨丽. 中国春小麦株高、育性近等基因系的建立及应用[J]. 遗传, 1999, 21(4):31~33
- [12] 沈银柱,刘枯义,何聪芬,等. 小麦花粉愈伤组织及其再生植株抗菌性变异的研究[J]. 遗传, 1997,19(6):7~11
- [13] 唐灿明,袁小玲,张天真. 转 Bt 基因抗虫棉近等基因系的研究[J]. 棉花学报, 2002,14(50):277~279
- [14] Pilar Antonio. Development of SCARs by direct sequencing of RAPD product: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat[J]. Molecular Breeding, 1999,5:245~253
- [15] Tanksley S D, Grandilb S, Fulton T M, et al. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium* [J]. Theor Appl Genet, 1996,92:213~224
- [16] 郭北海,张艳敏,李洪杰,等. 小麦株高近等基因系的 RAPD 标记研究[J]. 华北农学报, 2000,15(1):7~11
- [17] 夏军红,郑用琰. 玉米 Rf3 基因近等基因系的分子标记辅助图回交选育与效益分析 [J]. 作物学报, 2002,28(3):339~344
- [18] 王泽立,戴罗瑞,王斌,等. 玉米 Rf3 基因近等基因系(NIL)的构建及 RAPD 验证[J]. 农业生物技术学报, 2000,8(3):294~296
- [19] 谭震波,章琦,朱立煌,等. 水稻抗白叶枯病基因 X-14 在分子标记连锁图上的定位[J]. 遗传, 1998,20(6):30~33
- [20] Bradshaw H D, Ceulemans R, Dacis J, et al. Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2000,19:306~313
- [21] Cerbera M T, Storne V, Ivens B, et al. Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers[J]. Genetics, 2001,158:787~809
- [22] Bradshaw H D, Stettler R F. Molecular genetics of growth and development in *Populus* 2. Segregation distortion due to genetic load [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994,89:551~558
- [23] Wu R L, Han Y F, Hu J J, et al. An integrated genetic map of *Populus* based on amplified fragment length polymorphisms[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000,100:743~749
- [24] Wu R L. Genetic mapping of QTLs affecting tree growth and architecture in *Populus*: implication for ideotype breeding[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998,96:447~457
- [25] Yin T M, Zhang X Y, Huang M R, et al. Molecular linkage maps of the *Populus* genome[J]. Genome, 2002,45:541~555

Progress in the Selection of Plant Near Isogenic Lines and Its Application in the Genetic Improvement of Forest Trees

ZHUGE Qiang, ZHANG Bo, HUANG Mir ren, WANG Ming-xiu

(Laboratory of Forest Genetics and Gene Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: Near isogenic lines were important base for the construction of molecular genetic maps, QTLs location and molecular markers-assisted breeding. There were several methods for the selection of near isogenic lines including selection by multiple continuous backcross, isolation from mutants, selection in the multiple continuous backcross combined with molecular markers and selection from the materials of higher generation. Progress on the selection and application of near isogenic lines of the important crops was described. Moreover, combined with characters of forest trees, an idea was put forward which was that plants of *Salix* with short cycle of growth should be selected for the establishment of near isogenic lines and would become a model species for the genetic improvement of forest trees on the base of the near isogenic lines of *Salix*.

Key words: near isogenic lines; selection; genetic and improvement of forest trees; model plant