

大豆核不育基因 *ms6* 功能性分子标记的开发与验证

张颖^{1,2}, 赵国龙², 林春晶², 贾顺耕^{1,2}, 郭凤兰^{1,2}, 赵丽梅², 张春宝^{1,2}

(¹ 吉林农业大学农学院, 长春 130118; ² 吉林省农业科学院大豆研究所 / 大豆国家工程研究中心, 长春 130033)

摘要: 杂种优势利用是提高作物产量的有效手段之一。随着第三代“智能不育杂交育种技术”的兴起,核不育基因被广泛应用于作物杂交育种中。在大豆中,*ms6* 作为重要的核不育基因被广泛应用于轮回选择育种,但在杂交育种中鲜有报道。本研究利用大豆 *ms6* 基因上的突变位点开发了 12 个 dCAPS 标记进行分析验证,其中 3 个 dCAPS 标记 *ms6*-dCAPS-1、*ms6*-dCAPS-2 和 *ms6*-dCAPS-3 的扩增产物酶切后出现明显多态性条带。经进一步验证,明确 *ms6*-dCAPS-3 标记稳定且重复性好,其扩增产物经限制性内切酶 *Hind* III 酶切后,可将 *ms6* 后代分离群体中纯合可育、杂合可育和纯合不育单株准确区分。为 *ms6* 核不育基因在杂交大豆育种中的应用提供了有效的技术支持。

关键词: 大豆; 隐性核不育; dCAPS 标记; 多态性; 筛选

Development and Validation of Functional Molecular Markers of Nuclear Sterility Gene *ms6* in Soybean

ZHANG Ying^{1,2}, ZHAO Guo-long², LIN Chun-jing², JIA Shun-geng^{1,2}, GUO Feng-lan^{1,2},
ZHAO Li-mei², ZHANG Chun-bao^{1,2}

(¹ College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; ² Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences/ The National Engineering Research Center for Soybean, Changchun 130033)

Abstract: Heterosis utilization is one of the effective means to raise the crop yield. With the rise of the third generation of “intelligent sterility hybrid breeding technology”, nuclear sterility gene has been widely used in crop cross breeding. In soybean, *ms6* as an important gene of nuclear sterility has been widely used in recurrent selection breeding, but it is rarely reported in hybridization breeding. In this study, 12 dCAPS markers were developed using SNP mutation site of soybean *ms6* gene. Three dCAPS markers *ms6*-dCAPS-1, *ms6*-dCAPS-2 and *ms6*-dCAPS-3 were identified by restriction endonuclease digestion. Further verification showed that the *ms6*-dCAPS-3 marker was stable and reproducible. After restriction endonuclease *Hind* III digestion, the amplified products could accurately distinguish homozygous fertile, heterozygous fertile and homozygous sterile single strains in the isolated population of *ms6* offspring. This provides an effective technical support for the application of nuclear sterile gene *ms6* in hybrid soybean breeding.

Key words: *Glycine max* (L.) Merr.; recessive genic male sterility; dCAPS marker; polymorphism; screening

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 是重要的经济作物,具有蛋白和油脂含量高、氨基酸种类平衡、营养价值丰富的特点,在农产品贸易中占有重要地

位^[1]。我国大豆供不应求,主要依赖于进口,提高大豆产量尤为重要^[2-3]。杂种优势利用是提高作物产量的有效手段之一,而雄性不育系统是杂种优势

收稿日期: 2020-10-23 修回日期: 2020-11-28 网络出版日期: 2021-01-08

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20201023001>

第一作者研究方向为大豆杂种优势基础与应用研究, E-mail: yzhang0512@126.com

通信作者: 张春宝,研究方向为大豆杂种优势基础与应用研究, E-mail: cbzhang@cjaas.com

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20190101007JH); 吉林省农业科技创新工程 (CXGC2017JQ004, c92070422)

Foundation projects: Jilin Province Science and Technology Development Plan Project (20190101007JH), Jilin Province Agricultural Science and Technology Innovation Project (CXGC2017JQ004, c92070422)

利用的重要工具^[4-5]。

近年来,对植物雄性不育相关基因和分子机理的研究是植物分子生物学的热点之一^[6]。雄性不育是高等植物中普遍存在的一种遗传现象,表现为雄蕊缺失或畸形,雄性器官雌性化,花药开裂不正常,小孢子发育异常形成没有活力的花粉或者不能形成花粉等多种不育形式^[7-8]。植物雄性不育分为 2 种类型:细胞核雄性不育(GMS, genic male sterility)和细胞质雄性不育(CMS, cytoplasmic male sterility)。GMS 由核基因控制,分为显性核不育和隐性核不育,大多数的 GMS 均是隐性核不育,受 1 对隐性基因(*ms*)控制,当纯合体(*msms*)出现时产生雄性不育,因为其能被显性基因 *MS* 恢复,所以大部分可育材料都是它的恢复系,但此不育类型没有对应的保持系,因而在杂种优势利用中受到限制。CMS 分为孢子体不育和配子体不育,其可实现“三系”配套,在杂交育种中应用较为广泛^[9]。

迄今为止,杂交育种经历了 3 代技术革新。第 1 代技术是基于细胞质雄性不育的“三系”育种法,其对农业发展贡献极大,但这一方法配套复杂,操作要求高,育种时间长。后来出现了基于光温敏核不育的第 2 代技术,即“两系法”,利用核基因对环境的敏感性来繁殖不育系、保持系与杂交种制种,方法简单,解决了第 1 代恢保关系的限制,但这种敏感性也使得育性不稳定,难以控制。随着杂交育种技术的不断创新,在水稻上率先实现了基于“智能核不育系统”的第 3 代杂交育种技术^[10]。该技术改进了前两代技术的缺点,利用核不育基因,构建了一个稳定可控的智能不育体系,其在杂交水稻和小麦上的成功应用为自花授粉作物的杂交育种提供了很好的范例^[11-12]。

大豆杂种优势利用起步较晚,自 1993 年世界上第 1 个大豆细胞质雄性不育系育成以来^[13],一直采用第 1 代杂交育种技术通过“三系法”进行大豆杂交种选育。但由于“三系”亲本选择范围受限且遗传基础狭窄,获得的杂交组合数量少、亲缘关系近,很难育成强优势杂交种,限制了大豆杂交种的推广应用。而第 3 代杂交育种技术的兴起,为大豆杂交育种开辟了一条新途径。目前,在大豆中已有 14 个核不育基因被定位到染色体的特定区段上^[14-21],即 *ms1*~*ms9*、*ms12*、*msp*、*msMOS*、*mst-M* 和 *msNJ*。*ms1* 基因被广泛的应用于轮回选择育种,河北省农林科学院在国内最早开展相关工作,成功育成了冀豆 19、冀豆 20 和冀豆 21 等多个大豆品种^[22-24],其中冀豆 19 是我国以轮回选择方法育成的第 1 个高油大豆新品种,该品种适应性非

常广,并于 2019 年通过了国审;*ms4* 基因也于 2019 年被成功克隆,该基因为大豆 *Glyma.02G243200* 第 3 个外显子上发生了单个碱基的插入,形成了移码突变,使其蛋白 C 端缺少了 PHD 结构域,最终导致 *ms4* 突变体产生雄性不育^[25]。

分子标记辅助育种是利用分子标记与目标基因紧密连锁的特点,通过检测分子标记来鉴定目的基因,实现快速准确选择目标性状,从而达到提高育种效率的目的。该方法在杂种优势利用水平较高的农作物上,被广泛应用于杂交亲本的快速选育,例如徐雪等^[26]开发了 *Rf6* 基因的功能性分子标记,实现了红莲型杂交水稻恢复系的辅助选育;金名捺等^[27]利用 *tms5* 基因特异位点,开发了基于高分辨率溶解曲线分析检测的特异性分子标记,为水稻温敏核不育系的辅助选育提供了便捷有效的途径;宋伟等^[28]利用回交转育结合 SSR 分子标记辅助选择,仅回交 3 代就获得了受体遗传背景的 S 型细胞质雄性不育材料,大幅提高了玉米选育效率;张俊英等^[29]利用分子标记 BE10 实现了甘蓝型油菜显性核不育系的辅助选育,还从育性表现为 3:1 的自交系中筛选出纯合型不育株,有效提高了全不育系的纯度;汪志伟等^[30]应用 RAPD 标记技术筛选了与萝卜 9802A 细胞质雄性不育恢复基因连锁的分子标记,为定位萝卜的育性恢复基因提供了依据;徐小万等^[31]开发了 SCAR 分子标记技术用于筛选含恢复基因的材料,为辣椒恢复系的快速选育提供了技术支撑。本团队在前期通过图位克隆法成功克隆了大豆隐性核不育 *ms6* 基因(待发表),并找到了其发生突变的单核苷酸多态性(SNP, single nucleotide polymorphism)位点,本研究将以此突变位点为研究对象,开发衍生限制性内切酶多态性(dCAPS, derived cleaved amplified polymorphic sequences)标记,用以鉴定含有隐性核不育基因 *ms6* 的大豆基因型,以期实现 *ms6* 基因型不育系的分子标记辅助选育,为其在杂交大豆育种中的快速高效应用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 本研究以含有大豆隐性核不育基因 *ms6* 的 BC₃F₂ 分离群体获得的育性分离单株为基础材料。所用试验材料由吉林省农业科学院杂交大豆研究团队提供。

1.1.2 所用分子标记 本研究基于 *ms6* 基因突变位点设计了 12 个 dCAPS 分子标记(表 1、表 2)。

表 1 本研究所用 dCAPS 分子标记
Table 1 dCAPS molecular markers used in this study

标记名称 Marker	引物序列 (5'-3') Primer sequence	退火温度 (℃) Annealing temperature	产物大小 (bp) Product size
<i>ms6</i> -SNP	F: ATAATTCAGTCAGTCCTTCT R: GCAACATAAACCAACAAA	53	823
<i>ms6</i> -dCAPS-1	F: CATATTGCATCACCATTACA R: AGCCTGCAGCTTTTACCACACCTCTTA	58	354
<i>ms6</i> -dCAPS-2	F: CATATTGCATCACCATTACA R: ATCTTAGCCTGCAGCTTTTACCACACCTGGCA	54	362
<i>ms6</i> -dCAPS-3	F: TCTTTTCTGAACTTGTTGCAAAGC R: GCTGTTACATAGTTGGCACATTTT	58	641
<i>ms6</i> -dCAPS-4	F: CATATTGCATCACCATTACA R: AGCCTGCAGCTTTTACCACACCTGCTA	52	354
<i>ms6</i> -dCAPS-5	F: CATATTGCATCACCATTACA R: AGCCTGCAGCTTTTACCACACCTGTTG	58	354
<i>ms6</i> -dCAPS-6	F: CATATTGCATCACCATTACA R: AGCCTGCAGCTTTTACCACACCTTTAA	58	354
<i>ms6</i> -dCAPS-7	F: CATATTGCATCACCATTACA R: AGCCTGCAGCTTTTACCACACCTGTGC	53	354
<i>ms6</i> -dCAPS-8	F: CATATTGCATCACCATTACA R: AGCCTGCAGCTTTTACCACACCTCTGA	58	354
<i>ms6</i> -dCAPS-9	F: CATATTGCATCACCATTACA R: AGCCTGCAGCTTTTACCACACCTTATA	58	354
<i>ms6</i> -dCAPS-10	F: CATATTGCATCACCATTACA R: TAGCCTGCAGCTTTTACCACACCTGGCT	54	355
<i>ms6</i> -dCAPS-11	F: CATATTGCATCACCATTACA R: CTTAGCCTGCAGCTTTTACCACACCAGATC	58	360
<i>ms6</i> -dCAPS-12	F: CATATTGCATCACCATTACA R: CTTAGCCTGCAGCTTTTACCACACCTCTCG	58	360

表 2 特异性 dCAPS 标记信息
Table 2 Information of specific dCAPS markers

标记名称 Marker	限制性内切酶 Restriction endonuclease	酶切位点 Restriction site	酶切条件 Reaction condition	酶切后片段长度 (bp) Fragment length
<i>ms6</i> -dCAPS-1	<i>Afl</i> II	C^TTAAG	37 ℃ 20 min	326 /28 326 /354 /28 354
<i>ms6</i> -dCAPS-2	<i>Sph</i> I	GCATG^C	37 ℃ 60 min	362 362 /332 /30 332 /30
<i>ms6</i> -dCAPS-3	<i>Hind</i> III	A^AGCTT	37 ℃ 60 min	613 /28 613 /641 /28 641

酶切后片段大小从上至下材料依次为: 纯合可育单株、杂合可育单株和纯合不育单株, 数值为各特异片段对应的理论长度。经限制性内切酶酶切后 ≤ 30 bp 的特异片段, 与主要特异片段相距较远, 故不作为电泳中的特异性片段统计

From top to bottom, the sequence of fragment size was homozygous fertile plant, heterozygous fertile plant and homozygous sterile plant, and the value was the theoretical base length of each specific fragment. The specific fragments ≤ 30 bp after restriction endonuclease digestion is far away from the main specific fragment, hence is not used as the specific segment for statistics in electrophoresis

1.2 试验方法

1.2.1 群体 DNA 提取和 SNP 位点验证 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒(康为世纪)提取大豆隐性核不育基因 *ms6* 的 BC₃F₂ 分离群体中各个单株的基因组 DNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。基于本团队前期已经克隆验证的 *ms6* 基因序列,在其 SNP 突变位点前后各取 500 bp 设计特异性标记 *ms6*-SNP,选取对照单株(Williams82)、可育单株(*MS6MS6*)和不育单株(*ms6ms6*)进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 25 μ L,包含 12.5 μ L 2 $\times$ Es Taq Master mix(Dye)(康为世纪),1 μ L 上游引物,1 μ L 下游引物,2 μ L 待测基因组 DNA,8.5 μ L ddH₂O。PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、53 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s、32 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,将获得特异目的片段的 PCR 产物送至北京华大基因科技有限公司进行双向测序。使用 Vector NTI 8.0 软件比对分析 PCR 产物测序结果以验证 SNP 位点。

1.2.2 dCAPS 标记开发 针对 *ms6* 编码区第 227 个碱基(由 T 突变为 A)前后各取 30 bp,利用在线软件 dCAPS Finder2.0(<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)结合 Primer Premier 5.0 软件,开发特异性 dCAPS 标记^[32]。共开发了 12 个 dCAPS 标记,开发标记原则为引物长度 20~30 bp,错配碱基数不超过 3 个,目标条带长度 300~700 bp,以减少错配杂带。

1.2.3 dCAPS 标记筛选 利用开发的标记对在分离群体中选取的 6 个代表性单株,其中包含 2 个纯合可育(*MS6MS6*)单株,2 个杂合可育(*MS6ms6*)单株和 2 个纯合不育(*ms6ms6*)单株进行 PCR 扩增,扩增体系和程序如 1.2.1 所述,各标记引物序列、退火温度和目的片段长度等见表 1。通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增片段是否符合预期大小。对代表性单株的 PCR 产物进行酶切反应,所用限制性内切酶、酶切反应条件和酶切后片段大小等见表 2。酶切反应体系为 10 μ L,其中包含 5 μ L PCR 扩增产物,1 μ L CutSmart Buffer/NE Buffer,0.5 μ L 20 U/ μ L 限制性内切酶,3.5 μ L ddH₂O。用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果,检测条件为 15 V/cm,出现明显多态性即可。

1.2.4 dCAPS 标记可靠性验证 在分离群体中随机选取 24 个单株,其中包含 8 个纯合可育(*MS6MS6*)单株、8 个杂合可育(*MS6ms6*)单株和 8

个纯合不育(*ms6ms6*)单株。使用筛选出的 dCAPS 标记对选取的材料进行 PCR 扩增,经相应限制性内切酶酶切后,使用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果,检测条件为 15 V/cm,验证标记是否具有稳定性和重复性。

2 结果与分析

2.1 SNP 位点验证

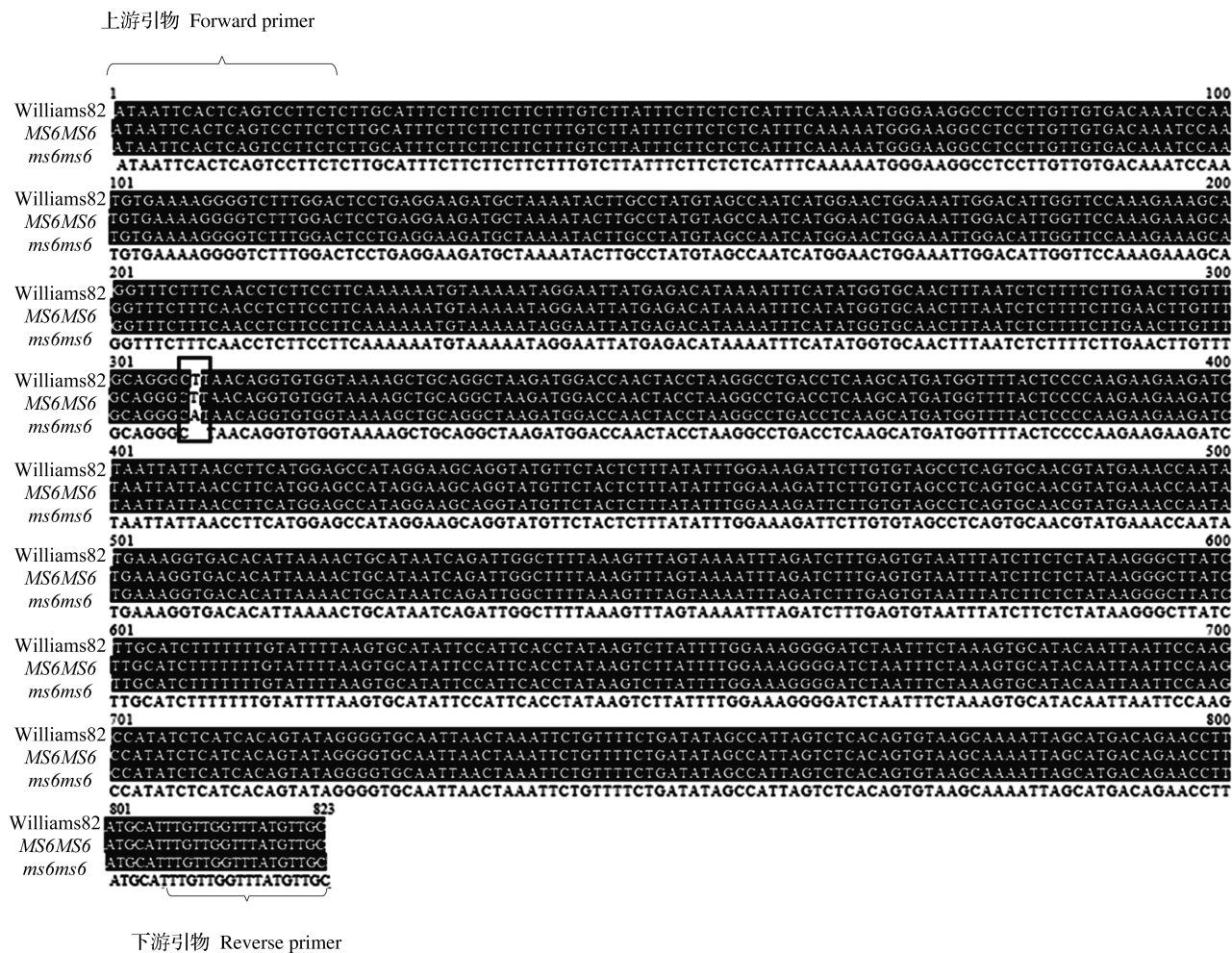
以大豆隐性核不育 *ms6* 基因中 SNP 位点为中心设计特异性引物,选对照单株(Williams82)、可育单株(*MS6MS6*)和不育单株(*ms6ms6*)进行 PCR 扩增,将获得的单一目的片段进行一代测序。利用 Vector NTI 8.0 软件比对测序结果,验证了 *ms6* 基因中由 T 突变为 A 的 SNP 位点(图 1)。

2.2 dCAPS 标记开发及筛选

经初步筛选,有 3 个 dCAPS 标记的 PCR 扩增产物片段符合预期大小且无多余杂带,通过相应的限制性内切酶酶切,出现了明显的多态性。分别命名为 *ms6*-dCAPS-1、*ms6*-dCAPS-2 和 *ms6*-dCAPS-3。

ms6-dCAPS-1 标记扩增的 PCR 产物经限制性内切酶 *Afl* II 酶切后得到多态性条带(图 2)。其中纯合可育单株可被切出明显可见的 326 bp 特异带型;但由于在 PCR 扩增过程中出现了 DNA 片段校正,使人为引入的错配碱基被部分修复,无法准确识别酶切位点,导致杂合可育单株和纯合不育单株都能被切出 2 条明显可见带型,其中杂合可育单株的 2 条明显带型中 354 bp 的大片段比 326 bp 的小片段略暗;而纯合不育单株的 2 条带型中 326 bp 的小片段比 354 bp 的大片段略暗。

ms6-dCAPS-2 标记扩增的 PCR 产物经限制性内切酶 *Sph* I 酶切后得到多态性条带(图 3)。由于可育单株中 SNP 位点是 T,不是酶切识别位点,所以酶切后仍为 362 bp 的单一带型;杂合可育单株和纯合不育单株依旧无法明显区分,出现与 *ms6*-dCAPS-1 标记类似的 2 条明显可见带型,其中杂合可育单株的 2 条带型中 332 bp 的小片段比 362 bp 的大片段略暗;而纯合不育单株的 2 条带型中 362 bp 的大片段比 332 bp 的小片段略暗。纯合不育单株应该被完全切开为 332 bp 的单一带型,但是却出现了和杂合可育单株一样的带型,这可能是由于开发的标记不够稳定,导致纯合不育基因片段不能被完全切开,从而出现 2 条明显带型的现象。

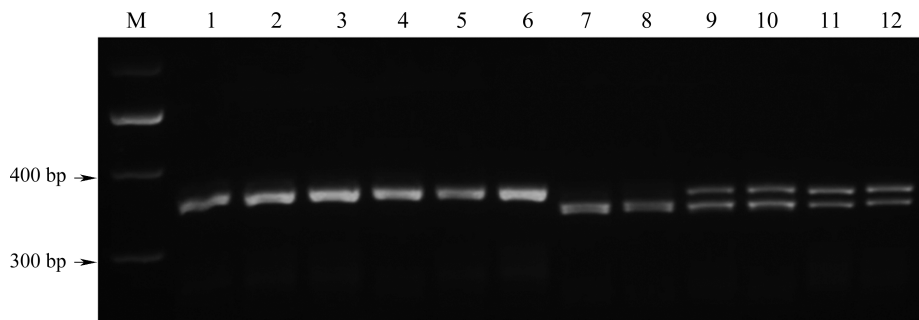


图中 1~823 代表碱基长度

1-823 in the figure represents the length of bases

图 1 大豆隐性核不育 *ms6* 基因中发生突变的 SNP 位点

Fig.1 SNP site of mutation in recessive genic male sterility gene *ms6* of soybean

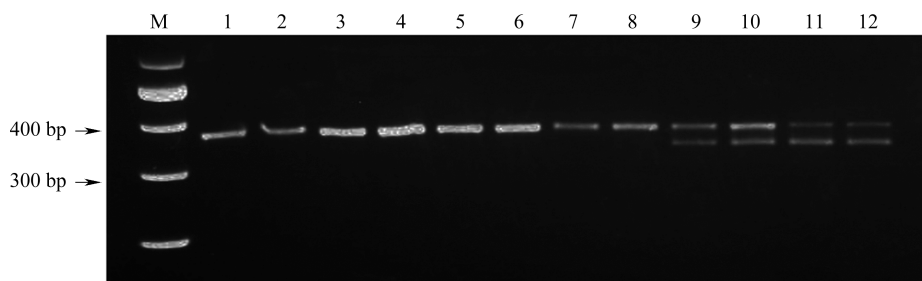


M: 100 bp DNA Ladder; 1~2: 纯合可育单株的 PCR 产物条带; 3~4: 杂合可育单株的 PCR 产物条带; 5~6: 纯合不育单株的 PCR 产物条带; 7~8: 纯合可育单株的酶切条带; 9~10: 杂合可育单株的酶切条带; 11~12: 纯合不育单株的酶切条带。下同

M: 100 bp DNA Ladder, 1-2: PCR product bands of homozygous fertile individual plants, 3-4: PCR product bands of heterozygous fertile individual plants, 5-6: PCR product bands of homozygous sterile individual plants, 7-8: Enzyme cutting bands of homozygous fertile individual plants, 9-10: Enzyme cutting bands of homozygous fertile individual plants, 11-12: Enzyme cutting bands of homozygous sterile individual plants. The same as below

图 2 限制性内切酶 *Afl II* 酶切得到的多态性条带

Fig.2 Polymorphic bands of restriction endonuclease *Afl II*

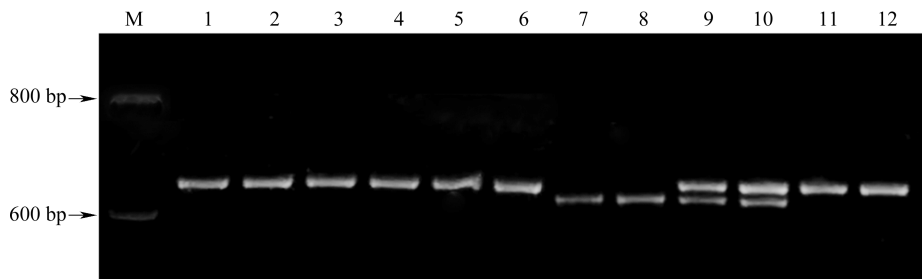
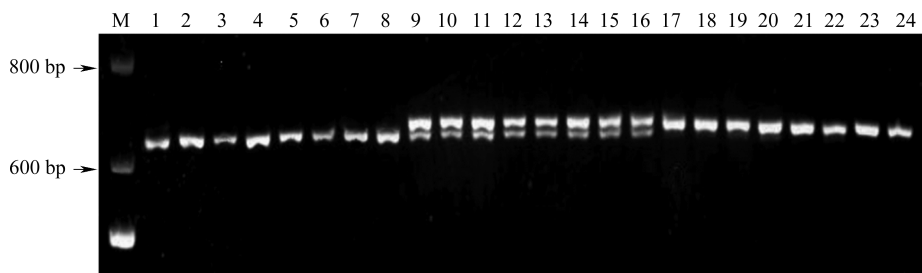
图3 限制性内切酶 *Sph I* 酶切得到的多态性条带Fig.3 Polymorphic bands of restriction endonuclease *Sph I*

ms6-dCAPS-3 标记是在距离 SNP 位点 3 bp 和 4 bp 处引入的错配碱基,其 PCR 扩增的产物经限制性内切酶 *Hind III* 酶切后得到明显的多态性条带,可将分离群体中的可育单株和不育单株完全区分开(图 4)。纯合可育单株能被切出一条明显的 613 bp 特异带型;杂合可育单株被切开为 2 条明显带型,且 613 bp 的小片段比 641 bp 的大片段暗;纯合不育单株不能被切开,仍为 641 bp 的单一带型。*ms6*-dCAPS-3 标记与前 2 个标记相比,酶切后呈现的多态性效果最好,可清晰地区分不同基因型

单株。

2.3 dCAPS 标记可靠性验证

用筛选出的 *ms6*-dCAPS-3 标记,对分离群体中随机选取的 24 个单株(8 个纯合可育单株、8 个杂合可育单株和 8 个纯合不育单株)的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,经限制性内切酶 *Hind III* 酶切后,用 3% 的琼脂糖凝胶电泳检测,得到的多态性条带清晰明确,且与预计结果一致,如图 5 所示。证实了该标记稳定和重复性较好,可以准确检测含有核不育 *ms6* 基因的大豆基因型。

图4 限制性内切酶 *Hind III* 酶切得到的多态性条带Fig.4 Polymorphic bands of restriction endonuclease *Hind III*

M: 100 bp DNA Ladder; 1~8: 纯合可育单株的酶切条带; 9~16: 杂合可育单株的酶切条带; 17~24: 纯合不育单株的酶切条带

M: 100 bp DNA Ladder, 1-8: Enzyme cutting bands of homozygous fertile individual plants, 9-16: Enzyme cutting bands of heterozygous fertile individual plants, 17-24: Enzyme cutting bands of homozygous sterile individual plants

图5 分离群体中 24 个单株经限制性内切酶 *Hind III* 酶切后得到的多态性条带Fig.5 Polymorphic bands of restriction endonuclease *Hind III* of 24 individual plants

3 讨论

大豆原产于中国,具有 5000 多年的栽培历史,是重要的粮油兼用作物,然而我国大豆单产却低于

世界平均水平^[33],因此,提高我国大豆产量是一项迫在眉睫的工作。杂种优势的利用可以快速有效的提高大豆单产,但大豆是自花授粉作物,且花器官较

小,常由于人工去雄和授粉不便而影响杂交存活率。大豆雄性不育系的发现和利用极大地推进了育种的进程,解决了人工去雄的难题。在大豆不育系中,细胞核不育的发现和利用比较早,其中 *ms1* 基因在轮回选择育种中应用比较广泛^[34],*ms4* 基因虽已被克隆^[25],但尚未被应用于大豆杂交育种中。

本团队前期成功克隆了大豆核不育基因 *ms6*,为利用 *ms6* 开展大豆杂交育种提供了新的供体基因源。但本团队在实际应用 *ms6* 基因进行新不育系的回交转育过程中发现,由于含 *ms6* 的植株在开花前期与正常植株表型无异,无法通过田间观察分辨,并且 *ms6* 为隐性基因型,在开花期即使通过 I₂-KI 染色法对转育后代进行花粉育性检测,也只能鉴定出其中的纯合隐性基因型单株,无法分辨纯合显性和杂合型单株;而只有明确了后代单株的基因型,才能有选择性的进行下一轮回交,这不仅增加了回交育种的工作量,还延长了不育系的育成周期。为了提高含 *ms6* 基因不育系的选育效率,本研究开发了基于 *ms6* 基因 SNP 突变位点的功能性 dCAPS 标记,实现了含 *ms6* 不育系的分子标记辅助选育。这使得育种家可以在播种前对上一代种子或在开花前取植株叶片提取 DNA 进行含 *ms6* 基因型材料的快速鉴定,有针对性和有目的地进行含 *ms6* 不育系的回交转育,为 *ms6* 核不育基因快速应用于大豆杂交育种提供了重要的技术支撑。

本研究基于大豆隐性核不育 *ms6* 基因中的单碱基突变位点,成功转化了 3 个特异性 dCAPS 标记。其中 *ms6*-dCAPS-3 经过验证重复性好且稳定,证实该标记可以鉴定含有隐性核不育基因 *ms6* 的大豆基因型,这为今后利用 *ms6* 基因进行分子标记辅助选育,提供了快速有效的技术手段。

参考文献

- [1] 赵国萍,李迎秋. 大豆球蛋白碱性亚基的分离纯化、特性及应用研究进展. 中国食品添加剂, 2016(5): 164-167
Zhao G P, Li Y Q. Research progress on purification, characteristics and application of basic subunit glycinin. China Food Additives, 2016(5): 164-167
- [2] 姜继龙,孙玉婷. 转基因大豆对我国大豆产业冲击度的调查报告——以哈尔滨市及所辖区域为例. 黑龙江粮食, 2011(1): 26-30
Jiang J L, Sun Y T. Investigation report on the impact of genetically modified soybean on soybean industry in China—take Harbin city and its region as an example. Heilongjiang Grain, 2011(1): 26-30
- [3] 姚林. 中美贸易摩擦下的中国大豆产业现状与发展趋势. 中国油脂, 2020, 45(2): 10-14
- [4] Yao L. Current situation and development trend of China's soybean industry under Sino-US trade friction. China Oils and Fats, 2020, 45(2): 10-14
- [5] 赵国龙,林春晶,金东淳,张春宝. 主要农作物细胞质雄性不育系育性恢复基因研究进展. 生物技术通报, 2020, 36(1): 116-125
Zhao G L, Lin C J, Jin D C, Zhang C B. Advances in restorer genes for fertility on cytoplasmic male sterility in major crops. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(1): 116-125
- [6] Chen L F, Ding X L, Zhang H, He T T, Li Y W, Wang T L, Li X Q, Jin L, Song Q J, Yang S P, Gai J Y. Comparative analysis of circular RNAs between soybean cytoplasmic male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B by high-throughput sequencing. BMC Genomics, 2018, 19(1): 663
- [7] Goldberg R B, Beals T P, Sanders P M. Anther development: basic principles and practical applications. The Plant Cell, 1993, 5(10): 1217-1229
- [8] 杨莉芳,刁现民. 植物细胞核雄性不育基因研究进展. 植物遗传资源学报, 2013, 14(6): 1108-1117
Yang L F, Diao X M. Progress in identification of plant male sterility related nuclear genes. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(6): 1108-1117
- [9] Zhao D Z, Ma H. Male fertility: a case of enzyme identity. Current Biology, 2000, 10(24): 904-907
- [10] 曹芳,李志刚,李旭新,于德彬. 大豆雄性不育及杂种优势利用研究进展. 安徽农业科学, 2016, 44(34): 23-25
Cao F, Li Z G, Li X X, Yu D B. Research progress of soybean male-sterility and utilizing heterosis. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(34): 23-25
- [11] 邓兴旺,王海洋,唐晓艳,周君莉,陈浩东,何光明,陈良碧,许智宏. 杂交水稻育种将迎来新时代. 中国科学: 生命科学, 2013, 43(10): 864-868
Deng X W, Wang H Y, Tang X Y, Zhou J L, Chen H D, He G M, Chen L B, Xu Z H. Hybrid rice breeding welcomes a new era of molecular crop design. Scientia Sinica: Vitae, 2013, 43(10): 864-868
- [12] 于洋. 杂交小麦育种新突破. 中国经济报告, 2017(12): 114-115
Yu Y. New breakthrough in hybrid wheat breeding. China Policy Review, 2017(12): 114-115
- [13] Song S F, Wang T K, Li Y X, Hu J, Kan R F, Qiu M D, Deng Y D, Liu P X, Zhang L C, Dong H, Li C X, Yu D, Li X Q, Yuan D Y, Yuan L P, Li L. A novel strategy for creating a new system of third-generation hybrid rice technology using a cytoplasmic sterility gene and a genic male-sterile gene. Plant Biotechnology Journal, DOI: 10.1111/pbi.13457
- [14] Sun H, Zhao L M, Huang M. Studies on cytoplasmic-nuclear male sterile soybean. Chinese Science Bulletin, 1994, 39(2): 175-176
- [15] Zhao Q S, Tong Y, Yang C Y, Yang Y Q, Zhang M C. Identification and mapping of a new soybean male-sterile gene, *mst-M*. Frontiers in Plant Science, 2019, 94(10): 1-9
- [16] Nie Z X, Zhao T J, Liu M F, Dai J Y, Gai J Y. Molecular mapping of a novel male-sterile gene *msNJ* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Plant Reproduction, 2019, 32(4): 371-380
- [17] Ott A, Yang Y, Bhattacharyya M, Horner H T, Palmer R G, Sandhu D. Molecular mapping of D1, D2 and *ms5* revealed

- linkage between the cotyledon color locus D2 and the male-sterile locus *ms5* in soybean. *Plants*, 2013, 2(3): 441-454
- [17] Jin W, Palmer R G, Horner H T, Shoemaker R C. Molecular mapping of a male-sterile gene in soybean. *Crop Science*, 1998, 38(6): 1681-1685
- [18] Cervantes-Martinez I, Sandhu D, Xu M, Ortiz-Pérez E, Kato K K, Horner H T, Palmer R G. The male sterility locus *ms3* is present in a fertility controlling gene cluster in soybean. *Journal of Heredity*, 2009, 100(5): 565
- [19] Cervantes-Martinez I, Xu M, Zhang L, Huang Z, Kato K K, Horner H T, Palmer R G. Molecular mapping of male-sterility loci *ms2* and *ms9* in soybean. *Crop Science*, 2007, 47(1): 374-379
- [20] Frasc R M, Courtney W, Perez P T, Palmer R G, Sandhu D. Molecular mapping of 2 environmentally sensitive male-sterile mutants in soybean. *Journal of Heredity*, 2011, 102(1): 11-16
- [21] Yang Y, Speth B D, Boonyoo N, Baumert E, Atkinson T R, Palmer R G, Sandhu D. Molecular mapping of three male-sterile, female-fertile mutants and generation of a comprehensive map of all known male sterility genes in soybean. *Genome*, 2014, 57(3): 155-160
- [22] 赵双进, 张孟臣, 杨春燕, 蒋春志, 刘兵强. 高油大豆新品种冀豆 19 的选育及栽培要点. *作物杂志*, 2010(1): 128
Zhao S J, Zhang M C, Yang C Y, Jiang C Z, Liu B Q. Breeding and cultivation of a new high oil soybean variety Jidou 19. *Crops*, 2010(1): 128
- [23] 赵双进, 张孟臣, 杨春燕, 蒋春志, 刘兵强. 高蛋白大豆新品种冀豆 20 的选育及栽培要点. *农业科技通讯*, 2010(1): 145-146
Zhao S J, Zhang M C, Yang C Y, Jiang C Z, Liu B Q. Breeding and cultivation of a new high protein soybean variety Jidou 20. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 2010(1): 145-146
- [24] 赵双进, 刘兵强, 杨春燕, 张孟臣. 高蛋白大豆新品种冀豆 21 的选育及栽培要点. *农业科技通讯*, 2011(6): 184-185
Zhao S J, Liu B Q, Yang C Y, Zhang M C. Breeding and cultivation of a new high protein soybean variety Jidou 21. *Bulletin of Agricultural Science and Technology*, 2011(6): 184-185
- [25] Thu S W, Rai K M, Sandhu D, Rajangam A, Balasubramanian V K, Palmer R G, Mendu V. Mutation in a PHD-finger protein MS4 causes male sterility in soybean. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(378): 1-12
- [26] 徐雪, 王英, 邹礼平, 魏朗, 彭方, 黄文超, 段俊枝, 姚国新. 水稻细胞质雄性不育恢复基因 *Rf6* 功能标记开发及微核心种质中 *Rf6* 基因的筛选. *河南农业科学*, 2017, 46(2): 12-15
XU X, Wang Y, Zou L P, Wei L, Peng F, Huang W C, Duan J Z, Yao G X. Functional markers development of restore gene *Rf6* in rice and screening of *Rf6* in micro-core collections. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2017, 46(2): 12-15
- [27] 金名捺, 丘式浚, 严维, 谢刚, 邓汉超, 唐晓艳. 水稻温敏雄性核不育基因 *tms5* 功能分子标记的开发与应用. *分子植物育种*, 2018, 16(17): 5644-5652
Jin M N, Qiu S J, Yan W, Xie G, Deng H C, Tang X Y. Development and application of functional molecular marker for thermo-sensitive genic male sterile gene *tms5* in rice. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(17): 5644-5652
- [28] 宋伟, 苏爱国, 邢锦丰, 吴金凤, 赵久然. 京 724 玉米自交系 S 型细胞质雄性不育系分子标记辅助选育研究. *玉米科学*, 2016, 24(1): 33-36, 42
Song W, Su A G, Xing J F, Wu J F, Zhao J R. Study on breeding of new S-type cytoplasmic male sterile material from maize inbred line Jing724 with molecular marker assisted selection. *Journal of Maize Sciences*, 2016, 24(1): 33-36, 42
- [29] 张俊英, 蒋美艳, 江建霞, 李延莉, 王伟荣, 孙超才, 杨立勇, 周熙荣. 甘蓝型油菜显性核不育系的分子标记辅助选择. *核农学报*, 2018, 32(11): 2119-2125
Zhang J Y, Jiang M Y, Jiang J X, Li Y L, Wang W R, Sun C C, Yang L Y, Zhou X R. Marker assisted selection of dominant genic male sterility lines in *Brassica napus* L. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(11): 2119-2125
- [30] 汪志伟, 向长萍, 梅时勇, 黄来春. 萝卜细胞质雄性不育恢复基因的 RAPD 标记. *植物遗传资源学报*, 2004, 5(2): 153-155
Wang Z W, Xiang C P, Mei S Y, Huang L C. RAPD marker of restorer gene for cytoplasmic male sterility in radish. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2004, 5(2): 153-155
- [31] 徐小万, 黄旺平, 吴智明, 李涛, 李颖, 王恒明. 应用分子标记筛选辣椒雄性不育恢复系研究. *广东农业科学*, 2015, 42(23): 139-144
Xu X W, Huang W P, Wu Z M, Li T, Li Y, Wang H M. Screening of male sterile restorer line of pepper by molecular marker. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(23): 139-144
- [32] Neff M M, Turk E, Kalishman M. Web-based primer design for single nucleotide polymorphism analysis. *Trends in Genetics*, 2002, 18(12): 613-615
- [33] 邱丽娟, 常汝镇, 袁翠平, 关荣霞, 刘章雄, 李英慧. 国外大豆种质资源的基因挖掘利用现状与展望. *植物遗传资源学报*, 2006, 7(1): 1-6
Qiu L J, Chang R Z, Yuan C P, Guan R X, Liu Z X, Li Y H. Prospect and present status of gene discovery and utilization for introduced soybean germplasm. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2006, 7(1): 1-6
- [34] 赵双进, 张孟臣, 蒋春志, 杨春燕, 刘兵强, 崔珏. 大豆 *ms1* 轮回群体品质改良效应与分离特性研究. *西南农业学报*, 2005(5): 45-49
Zhao S J, Zhang M C, Jiang C Z, Yang C Y, Liu B Q, Cui Y. Studies on quality improvement effect and separate character of soybean male sterile (*ms1*) recurrent selection population. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2005(5): 45-49