

大豆细胞核雄性不育基因 *MS6* 的功能验证及不育新种质创制

张万年^{1,2}, 杨 静³, 杨绪磊², 高萌萌², 林春晶², 刘 鹏¹, 李志刚¹, 杨向东³, 张春宝^{1,2}

(¹ 内蒙古民族大学农学院, 通辽 028042; ² 吉林省农业科学院大豆研究所, 长春 130033; ³ 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033)

摘要: 基于细胞核雄性不育基因的第三代作物杂交育种技术与传统杂交育种技术相比, 具有制种安全、组合自由、杂交种育性稳定等优点, 已在玉米、水稻等作物中广泛应用, 这对大豆杂种优势利用提供了新思路。我们前期在大豆中图位克隆了一个编码 R2R3-MYB 转录因子的核不育基因 *MS6*, 本研究将在此基础上, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在大豆中对 *MS6* 基因进行敲除; 进一步通过对转基因后代植株的表型观察、花粉及育性鉴定、基因敲除位点分析, 验证 *MS6* 基因功能, 最终获得稳定遗传的核不育新种质。这为进一步建立基于 *MS6* 基因的大豆第三代杂交育种技术系统, 提供了理论和技术支撑。

关键词: 大豆; 细胞核雄性不育; 不育基因; 基因编辑; 杂交育种

Functional Identification of A Nuclear Male Sterility Gene *MS6* and Creation of New Sterile Germplasms in Soybean

ZHANG Wan-nian^{1,2}, YANG Jing³, YANG Xu-lei², GAO Meng-meng², LIN Chun-jing², LIU Peng¹, LI Zhi-gang¹,

YANG Xiang-dong³, ZHANG Chun-bao^{1,2}

(¹ College of Agriculture, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028042; ² Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; ³ Institute of Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033)

Abstract: In contrast to the traditional hybrid breeding technology, the third generation crop hybrid breeding technology based on the nuclear male sterility gene has layers of advantages such as safety on seed production, flexibility on bi-parental combinations, and stability on hybrid fertility. This technology has been widely used in maize, rice and other crops, and provides a possibility in future use of soybean heterosis. We previously mapped by positional cloning approach a nucleic male sterility gene *MS6* that encodes an R2R3-MYB transcription factor in soybean. In this study, we deployed CRISPR/Cas9 gene editing technology to knock out the *MS6* gene in soybean. The transgenic plants carrying edited *MS6* alleles were subjected for phenotype observation, pollen and fertility identification, thus approving the causal mechanism of this gene. A new germplasm showing stable male sterility was obtained. This provides theoretical and technical support for further establishing the third generation soybean hybrid breeding technology system based on *MS6* gene.

Keywords: soybean; nuclear male sterility; sterile gene; gene editing; hybrid breeding

杂种优势是指遗传基础有差异的亲本杂交生成的杂合子在生长势、生物量、抗逆性和适应性等方面优于亲本的现象^[1]。与传统育种相比, 种植杂交种显著提高了水稻、玉米和油菜等作物的产量, 可达 15%~50%

收稿日期: 2022-10-30

修回日期: 2022-11-13

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为大豆杂种优势利用, E-mail: 826156864@qq.com

通讯作者: 张春宝, 研究方向为: 大豆杂种优势利用, E-mail: cbzhang@cjaas.com

杨向东, 研究方向为: 大豆生物技术, E-mail: xdyang020918@126.com

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20210302005NC); 国家大豆产业技术体系建设专项(CARS-04); 吉林省农业科技创新工程(CXGC2021ZD002, CXGC2022RCY010)

Foundation projects: Science and Technology Development Plan Project of Jilin Province (20210302005NC), Earmarked Fund for China Agriculture Research System(CARS-04), Agricultural Science and Technology Innovation Project of Jilin Province (CXGC2021ZD002, CXGC2022RCY010)

左右^[2]。大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 是我国重要的粮、油和饲用作物，同样存在较强的杂种优势。1993 年，孙寰等^[3]育成了世界上第一个大豆细胞质雄性不育系，1995 年实现“三系”配套。基于“三系法”于 2002 年在吉林省审定了第一个大豆杂交种“杂交豆 1 号”^[4]。经过了 30 多年的发展，目前全国审定的大豆杂交种已经达 30 余个^[5]，但受限亲本种质资源利用范围狭窄、不育系转育周期长、杂交种育性易受环境条件影响等瓶颈，尚未实现产业化推广。

基于细胞核雄性不育基因的第三代杂交育种技术，由于拓宽了亲本的选择范围，且不受环境条件制约，做为作物杂种优势利用的新途径，在玉米^[6]和水稻^[7,8]等作物中成功建立并实现育种应用，这为在大豆上开展相关研究和应用提供了理论和技术支撑。目前，在大豆中已克隆的细胞核雄性不育基因有 *MS1*、*MS3* 和 *MS4*。其中，*MS1* 基因编码一个定位于细胞核的驱动蛋白 (Kinesin)，在花药减数分裂末期参与细胞板的形成；通过对 CRISPR/Cas9 基因敲除材料的表型分析发现，突变体的花粉粒变大并呈败育表型^[9-11]。*MS3* 基因则编码一个 PHD-finger 蛋白，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对 *MS3* 进行敲除，T₂ 代转基因阳性植株表现出完全不育特征；进一步对不同纬度及短日照处理的 *ms3* 突变株的结荚表型进行鉴定发现，在长日照条件下，*ms3* 突变株育性得到恢复，表明 *MS3* 可能是一个光敏核不育基因^[12]。*MS4* 基因同样编码一个 PHD-finger 蛋白，其在花芽分化阶段具有更高的表达量，可以互补拟南芥 *mmd1* 不育突变体，使其形成正常可育的花粉和种子^[13]。

前期，我们通过构建高代回交群体，通过 BSA 测序及 SSR 分子标记分析，将大豆核不育基因 *MS6* 定位于 13 号染色体的 SSR 标记 BARCSOYSSR_13_0257 和 BARCSOYSSR_13_0259 之间的 255 Kb 区域内，通过编码序列比对分析推断 *Glyma.13G066600* 为大豆 *MS6* 候选基因^[14]。*MS6* 基因在大豆花药中高表达，其编码一个 R2R3-MYB 转录因子，在 N 端的第 39~146 位氨基酸残基之间分别包含一个 R2-MYB 和 R3-MYB 保守结构域，该转录因子与拟南芥绒毡层发育基因 *AtTDF1* 为同源基因；通过对 *MS6* 候选基因的生化分析及在拟南芥 *attf1* 突变体中的互补试验验证，明确了 *Glyma.13G066600* 为大豆细胞核雄性不育基因 *MS6*^[15]。本研究将在此基础上，利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在大豆中对 *MS6* 基因进行敲除，通过对转基因后代植株的表型观察、花粉育性鉴定及基因敲除位点分析，验证 *MS6* 基因功能，并获得稳定遗传的大豆 *ms6* 核不育新种质，为进一步建立以 *MS6* 基因为核心元件的大豆第三代杂交育种技术系统，提供理论和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料与试剂

大豆材料 Williams 82、Nucleon Plant Genomic DNA Kit 试剂盒、pEASY-T1 Cloning Kit 试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 EHA101、Cas9 载体 pYLCRISPR/Cas9P35S-B、gRNA 载体 pYLsgRNA-AtU3b、pYLsgRNA-AtU6-1、*Bsa* I、T4 DNA ligase、卡那霉素等为本实验室保存和提供。

1.2 CRISPR/Cas9-*MS6* 载体构建

1.2.1 gRNA 靶位点的选择 利用在线软件 MMEJ-KO (<http://skl.scau.edu.cn/mmejko/>)，进行靶位点的选择，筛选出两个打靶效率高的靶点，分别位于 *MS6* 基因的第一和第二外显子，命名为 ms-T1 和 ms-T2。ms-T1 的 snRNA 启动子选用 AtU3b，ms-T2 的 snRNA 启动子选用 AtU6-1。同时设计启动子接头的两对引物，引

物命名为 MS6T1 和 MS6T2。

1.2.2 sgRNA 表达盒的构建及连接 参照 Ma 等^[16]和曾栋昌等^[17]方法进行载体构建及连接。

1.2.3 连接产物的转化 取上述连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞，提取质粒并将质粒制成甘油菌，将制好的甘油菌命名为 CRISPR/Cas9-MS6，在-80 °C 冰箱中保存备用。

1.3 获得基因编辑大豆

参照杨静等^[18]方法进行农杆菌介导的遗传大豆转化及基因编辑材料培养。

1.4 转基因植株鉴定

对获得的转基因植株进行除草剂抗性筛选，配置浓度为 135 mg/L 的草丁膦除草剂，涂抹叶片的一半并使用记号笔进行标记，持续培养一周后，观察叶片变化情况。筛选对草丁膦无影响的阳性植株，继续培养，至 T₀ 代种子收获，并继续种植 T₀ 代种子。参照郭凤兰等^[19]方法对 T₀ 代及 T₁ 代植株进行花粉检测。

1.5 MS6 基因编辑位点检测

选取 T₀ 代和 T₁ 代植株叶片，使用 Nuclean Plant Genomic DNA Kit 试剂盒提取基因组 DNA，利用引物 MS6-1 进行 PCR 扩增。扩增产物利用 pEASY-T1 Cloning Kit 试剂盒进行亚克隆，在 PCR 产物与载体链接后，将菌液涂在培养基上在 37 °C 过夜培养。挑出阳性菌落接种于液体培养基中，37 °C 振荡培养 12 h 左右，利用菌液提取质粒，利用 M13 引物进行鉴定，阳性质粒送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primer sequences in this study

引物名称	引物序列(5'-3')
Primer name	Primer sequence (5'-3')
MS6T1-F	gtcaCTTGCCTATGTAGCCAATCA
MS6T1-R	aaacTGATTGGCTACATAGGCAAG
MS6T2-F	attGATCTAATTATTAACCTTCA
MS6T2-R	aaacTGAAGGTTAATAATTAGAT
MS6-1-F	CTCAGTCCTTCTCTTGCAAT
MS6-1-R	GCTTCCTATGGCTCCATGA
U-F	CTCCGTTTTACCTGTGGAATCG
gRNA-R	CGGAGGAAAATTCCATCCAC
Pps-GGL	TTCAGAggtctcTctcgACTAGTATGGAATCGGCAGCAAAGG
Pgs-GGR	AGCGTGggtctcGaccgACGCGTATCCATCCACTCCAAGCTC
Pgs-GG2-R	AGCGTGggtctcGtcaggTCCATCCACTCCAAGCTC
Pps-GG2-F	TTCAGAggtctcTctgacacTGGAATCGGCAGCAAAGG

ACTAGT 和 ACGCGT: *Spe* I 和 *Mlu* I 的酶切位点

ACTAGT and ACGCGT: Enzyme digestion site of *Spe* I and *Mlu* I

2 结果

2.1 大豆 MS6 基因编辑靶点设计及表达载体构建

MS6 基因全长 1814 bp，cDNA 全长 1125 bp，包含 3 个外显子和 2 个内含子，在第一外显子 165 bp、第二外显子 418 bp 处设计两个靶点，每个靶点 23 bp，靶点位置及 gRNA 序列如图 1 所示。通过 sgRNA 表达盒的构建及与 pYLCRISPR/Cas9 表达载体连接，成功构建了 CRISPR/Cas9-MS6 编辑载体。

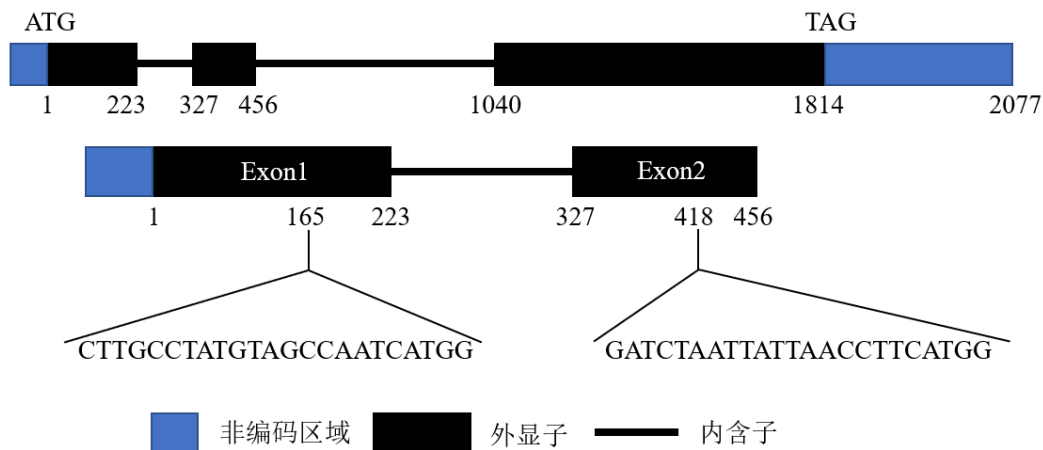


图1 *MS6* 基因结构及靶点位置

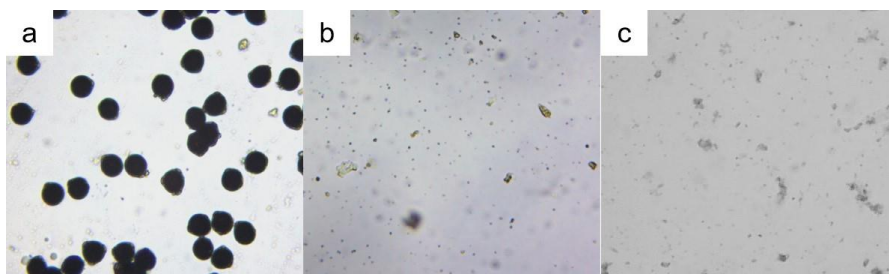
Fig.1 Gene structure and target location of *MS6*

2.2 T_0 转基因植株鉴定

利用农杆菌介导的大豆转基因方法，将 *MS6* 基因编辑载体转化至大豆材料 Williams 82。 T_0 代植株叶片进行草丁膦涂抹，阳性植株与对照无明显差别，其他涂抹草丁膦的株系叶片出现泛黄、萎蔫直至脱落。由此初步判断，对草丁膦无明显反应植株 CRISPR/Cas9-*MS6* 编辑载体转入成功，共获得 4 株独立的 T_0 代阳性转化株系。利用引物 *MS6*-1 对 T_0 代阳性植株进行 PCR 扩增及扩增产物的测序分析发现，4 株阳性材料的测序峰图均在两个靶点内出现套峰，表明上述株系的编辑位点为杂合型。另外，对上述材料进行花粉染色观察发现，阳性植株均可检测到花粉粒，并可染成黑色或深褐色，与野生型转化受体 Williams 82 一致，且成熟期均可正常结实。

2.3 T_1 代 *ms6* 隐性纯合编辑株系筛选与鉴定

对 4 株 T_0 代阳性株系后代开展进一步分析，每个株系种植 10 株 T_1 代植株，在盛花期取成熟花苞进行花粉检测。通过观察发现，野生型及部分 T_1 代单株花药释放的花粉粒呈圆形，可被染成黑色或深褐色；而每个株系中均有约四分之一 T_1 代植株在显微镜的视野中没有观察到花粉粒存在，无法进行染色，这与前期用于基因定位的 *ms6* 突变体花粉育性鉴定表型一致，如图 2 所示。表明上述 T_0 代杂合型株系均产生了有效的基因编辑， T_1 代均分离出与 *ms6* 纯合隐性突变体一致的无花粉型植株，其中花粉正常:无花粉 \approx 3:1。



a: 野生型植株; b: T_1 代无花粉型植株; c: 用于基因定位的 *ms6* 突变体

a: Wild type plants; b: T_1 pollen-free plants; c: *ms6* mutant for gene mapping

图2 不同类型植株花粉检测结果

Fig.2 Pollen detection results of different types of plants

进一步对成熟期的野生型转化受体和无花粉型突变体进行农艺性状观察发现，突变体与野生型相比，表现出非常明显的不育特征，其在植株高度上略有增加，茎秆持绿，无法形成正常的豆荚；而野生型则茎秆干枯，正常成熟结荚，二者植株表型对比如图 3 所示。



a: T₁ 代不育突变体植株; b: 野生型转化受体植株

a: T₁ sterile mutant plants; b: Wild type transformation acceptor plants

图 3 T₁ 代不育突变体植株与野生型植株成熟期表型对比结果

Fig.3 Comparison of mature period phenotype between T₁ sterile mutant and wild type plants

2.4 MS6 基因编辑位点检测

分别在 4 个分离出无花粉型植株的 T₁ 代株行中，各选取三株不育植株，提取叶片基因组 DNA，利用引物 MS6-1 进行 PCR 扩增及产物测序。测序结果通过 Vevtor NTI 8.0 软件进行分析。在 MS6 纯合编辑 T₁ 代植株中检测到两种突变方式，全部为片段缺失。其中检测到 *ms6cr-1* 在靶点 ms-T1 位置发生了碱基 A 缺失，同时在靶点 ms-T2 位置发生了碱基 T 缺失。*ms6cr-2* 在靶点 ms-T1 位置发生了 5 个碱基缺失，同时在靶点 ms-T2 位置发生了碱基 T 缺失，如图 4 所示。其中，*ms6cr-1* 由于 MS6 编码区第 183 位碱基 A 缺失，导致第 61 位后的编码氨基酸发生变化，并在第 85 位终止翻译；*ms6cr-2* 由于 MS6 编码区第 178~182 位碱基 GCCAA 缺失，导致第 60 位后的氨基酸发生变化，并在第 75 位终止翻译；由于上述两种在 ms-T1 靶点发生的编辑，造成了 MS6 基因移码突变，在 ms-T2 靶点前，转录就已提前终止，如图 5 所示。上述两种通过基因编辑创造的不育突变体，均导致 MS6 基因编码的 R2-MYB 结构域不完整及 R3-MYB 结构域缺失，导致 R2R3-MYB 转录因子功能异常，无法正常参与花粉形成，最终导致不育表型。以上结果表明，本研究创制出不同于前期作为基因定位亲本的 MS6 等位核不育突变体，获得了 *ms6cr-1* 和 *ms6cr-2* 两个大豆核不育新种质。

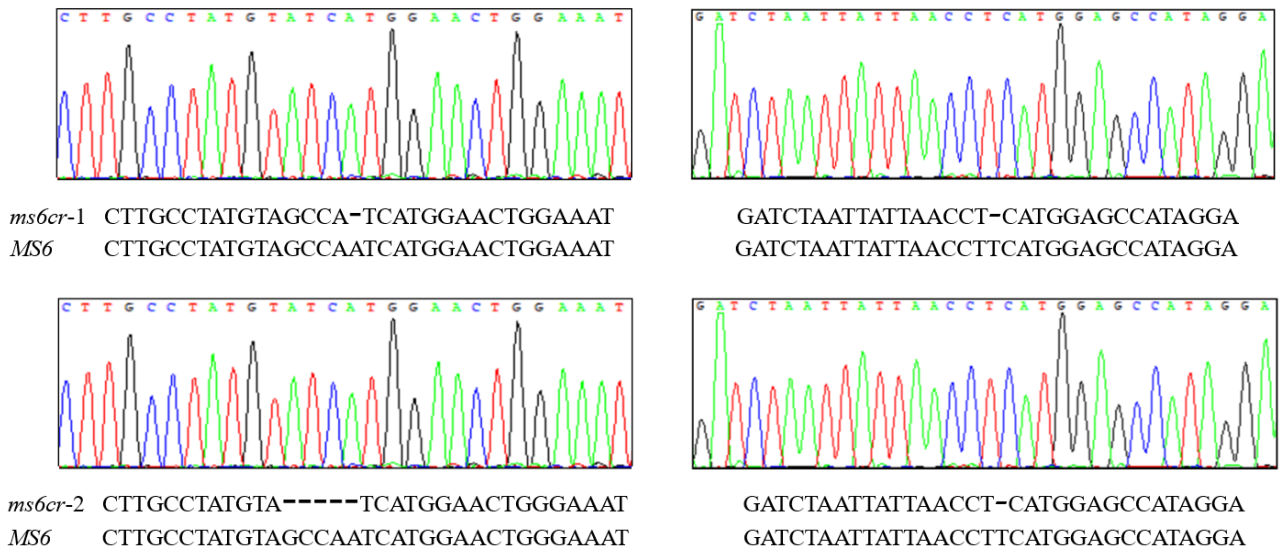
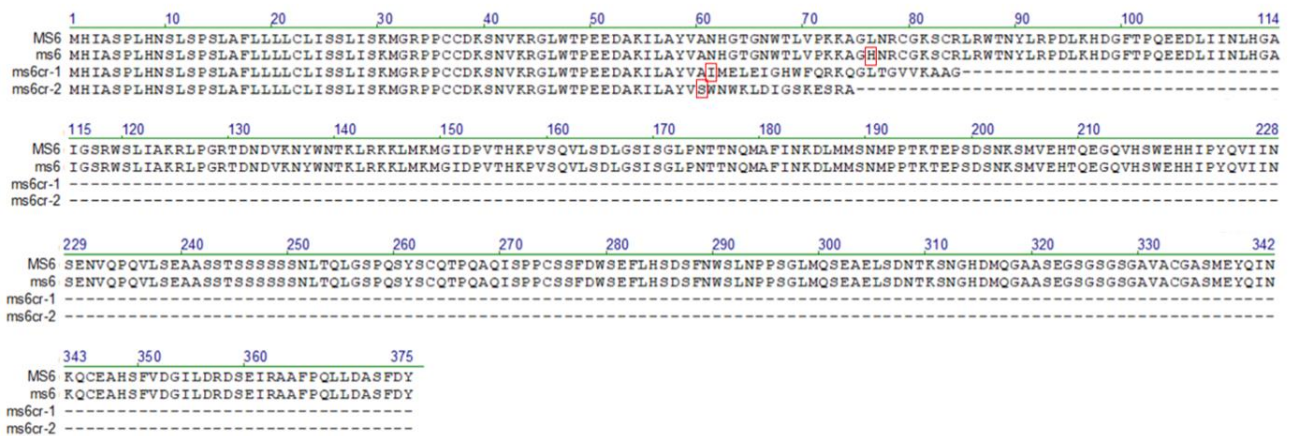


图4 T₁代突变植株碱基突变位点

Fig.4 Base mutation sites of T₁ generation mutant plants



ms6 的第 76 位氨基酸由亮氨酸 (Leu) 突变为组氨酸 (His)，导致编码的氨基酸发生了替换；ms6cr-1 的碱基缺失导致第 61 位后的氨基酸发生变化，并在第 85 位终止翻译；ms6cr-2 的碱基缺失导致第 60 位后的氨基酸发生变化，并在第 75 位终止翻译

The 76th amino acid at position ms6 is mutated from leucine (Leu) to histidine (His), resulting in the substitution of the encoded amino acid; The base loss of ms6cr-1 leads to a change in amino acids after position 61 and terminates translation at position 85; The base loss of ms6cr-2 leads to a change in amino acids after position 60 and terminates translation at position 75

图5 野生型和突变型蛋白序列对比结果

Fig.5 Comparison of wild type and mutant protein sequences

3 讨论

传统的获得不育系的方法主要依靠回交选育，一般要经过 5~6 代左右的回交。虽然可以利用不育基因突变位点开发分子标记进行有针对性的辅助选育^[20]，但转育周期仍然较长。而利用化学诱变、物理诱变等方法，存在突变位点随机且不受控制，在第一代获得的突变在后续杂交中容易丢失等问题，需要耗费大量的人力物力去筛选，所以这两种传统方法都有很大的局限性。随着现代生物学技术的发展，CRISPR/Cas9 基因编辑技术应运而生，因其具有简便的操作程序、较高的编辑效率及较短的获取周期等优点，被广泛应

用于大豆重要性状改良^[21,22]和新种质创制^[23,24]。在大豆不育基因鉴定和不育突变体创制上, CRISPR/Cas9 技术同样适用, 如 Jiang 等^[9]、Nadeem 等^[10]和 Fang 等^[11]分别利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术鉴定了大豆核不育基因 *MS1*, 并创制了 *MS1* 敲除不育突变体。Hou 等^[12]图位克隆了大豆核不育基因 *MS3*, 同样利用该技术对其进行功能鉴定, 并创制出光敏核不育突变体。由于 *MS6* 基因的不育表型是由其纯合隐性基因控制, 且不受环境条件影响, 遗传模式简单。因此, 本研究同样借助 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 在大豆中实现了 *MS6* 基因的功能验证, 并快速创制出两种不同单倍型的 *ms6* 隐性核不育材料。这种快速创制不育稳定且败育彻底的新型核不育系, 作为母本用于与任意可育材料进行杂交组合配制, 可极大缩短了不育系的选育周期和效率。

第三代作物杂交育种系统的研发成功, 不仅解决了核不育系扩繁的问题, 实现了利用核不育系进行杂交种生产的可能性, 同时也拓宽了亲本的选择范围, 且不受环境条件制约。这其中败育彻底且不育稳定的不育系, 对于该系统的有效应用至关重要。大豆核不育基因 *MS6* 编码一个 R2R3-MYB 转录因子, 前期研究认为其 R2 区域 76 位 (L76H) 的组氨酸残基取代亮氨酸引起的错义突变导致大豆雄性不育^[15]。在本研究中验证了 *MS6* 基因编码蛋白被截短, 同样可以导致其功能丧失, *ms6* 突变体不产生花粉。这与 *ms1* 突变体和 *ms3* 突变体后代可产生少量花粉, 甚至部分可被染色的表型不同^[11,12], 其败育更为彻底, 不会出现因环境影响导致不育突变体部分恢复育性而产生自交莢的情况, 这表明大豆核不育基因 *MS6* 是用做第三代杂交育种系统的理想功能元件。本研究不仅通过基因编辑技术验证了 *MS6* 基因的在大豆中调控育性功能, 同时创制出不产生花粉、败育彻底的 *ms6* 核不育突变体, 这为今后用其创制智能多控保持系, 建立基于 *MS6* 基因的大豆第三代智能多控杂交育种系统提供了理论和技术支撑。

参考文献

- [1] 朱红艳, 赵兴俊, 张永久. 作物遗传育种. 重庆大学出版社, 2016.
Zhu H Y, Zhao X J, Zhang Y J. Crop genetics breeding. Chongqing University Press, 2016.
- [2] Fu D H, Xiao M, Hayward A, Fu Y, Liu G, Jiang G J, Zhang H H. Utilization of crop heterosis: a review. Euphytica, 2014, 197(2):161-173.
- [3] 孙寰, 赵丽梅, 黄梅. 大豆质-核互作不育系研究. 科学通报, 1993, 38(16):1535-1536.
Sun H, Zhao L M, Huan M. Research of nucleo-cytoplasmic male sterile in soybean. Bulletin of Science and Technology, 1993, 38(16):1535-1536.
- [4] 赵丽梅, 孙寰, 王曙明, 王跃强, 黄梅, 李建平. 大豆杂交种杂交豆 1 号选育报告. 中国油料作物学报, 2004, 26(3):15-17.
Zhao L M, Sun H, Wang S M, Wang Y Q, Huan M, Li J P. Breeding of hybrid soybean HybSoy1. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(3):15-17.
- [5] 孙妍妍, 赵丽梅, 张伟, 张春宝. 大豆杂种优势利用研究进展. 大豆科技, 2021, 6:26-35.
Sun Y Y, Zhao L M, Zhang W, Zhang C B. Research Progress on Utilization of Soybean Heterosis. Soybean Science & Technology, 2021, 6:26-35.
- [6] Albertsen M C, Fox T W, Hershey H P. Nucleotide sequences mediating plant male fertility and method of using same. Patent No. WO2007002267, 2006.
- [7] Chang Z Y, Chen, Z F, Wang N, Xie G, Lu J W, Yan W, Zhou J L, Tang X Y, Deng X W. Construction of a male sterility system for hybrid rice breeding and seed production using a nuclear male sterility gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113:14145-14150.
- [8] 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, Yu 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, 2020, 19(2):251-260.
- [9] Jiang B J, Chen L, Yang C Y, Wu T T, Yuan S, Wu C X, Zhang M C, Gai J Y, Han T F, Hou W S, Sun S. The cloning and CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of a male sterility gene *MS1* of soybean. Plant Biotechnology Journal, 2021, 19(6):1098-1100.
- [10] Nadeem M, Chen A D, Hong H L, Li D D, Li J J, Zhao D, Wang W, Wang X B, Qiu L J. *GmMs1* encodes a kinesin-like protein essential for male fertility in soybean(*Glycine max* L.). Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(6):1054-1064.
- [11] Fang X L, Sun X Y, Yang X D, Li Q, Lin C J, Xu J, Gong W J, Wang Y F, Liu L, Zhao L M, Liu B H, Qin J, Zhang M C, Zhang C B, Kong F J, Li M N. *MS1*

is essential for male fertility by regulating the microsporocyte cell plate expansion in soybean. *Science China Life Sciences*, 2021, 64(9):1533-1545.

- [12] Hou J J, Fan W W, Ma R R, Li B, Yuan Z H, Huang W X, Wu Y Y, Hu Q, Lin C J, Zhao X Q, Peng B, Zhao L M, Zhang C B, Sun L J. *MALE STERILITY 3* encodes a PHD-finger protein for male fertility in soybean. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2022, 64:1076-1086.
- [13] 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(1):378.
- [14] 张颖. 大豆核不育基因 *ms6* 的定位、克隆及功能性分子标记开发. 吉林农业大学, 2021.
- Zhang Y. Mapping, cloning and development of functional molecular markers of nuclear sterility gene *ms6* in soybean. Jilin Agricultural University, 2021.
- [15] Yu J P, Zhao G L, Li W, Zhang Y, Wang P, Fu A G, Zhao L M, Zhang C B, Xu M. A single nucleotide polymorphism in an R2R3 MYB transcription factor gene triggers the male sterility in soybean *ms6(Ames1)*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2021, 134(11):3661-3674.
- [16] Ma X L, Zhang Q Y, Zhu Q L, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z F, Li H E, Lin Y R, Xie Y Y, Shen R X, Chen S F, Wang Z, Chen Y L, Guo J X, Chen L T, Zhao X C, Dong Z C, Liu Y G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot-plants. *Molecular Plant*, 2015, 8(8):1274-1284.
- [17] 曾栋昌, 马兴亮, 谢先荣, 祝钦泷, 刘耀光. 植物 CRISPR/Cas9 多基因编辑构建和突变分析的操作方法. *中国科学:生命科学*, 2018, 48(7):783-794.
- Zeng D C, Ma X L, Xie X R, Zhu Q L, Liu Y G. A protocol for CRISPR/Cas9-based multi-gene editing and sequence decoding of mutant sites in plants. *Scientia Sinica Vitae*, 2018, 48(7):783-794.
- [18] 杨静, 邢国杰, 杜茜, 隋丽, 郭东全, 牛陆, 杨向东. 不同大豆基因型对大豆遗传转化效率的影响及外源 T-DNA 插入分析. *大豆科学*, 2016, 35(4):562-567.
- Yang J, Xing G J, Du Q, Sui L, Guo D Q, Niu L, Yang X D. Effects of Different Soybean Genotypes on the Transformation Efficiency of Soy-bean and Analysis of the T-DNA Insertions in the Soybean Genome. *Soybean Science*, 2016, 35(4):562-567.
- [19] 郭凤兰, 林春晶, 王鹏年, 杨绪磊, 吴铮, 彭宝, 赵丽梅, 张春宝. 大豆细胞质雄性不育恢复基因 *GmRfl* 的精细定位. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(2):518-526.
- Guo F L, Lin C J, Wang P N, Yang X L, Wu Z, Peng B, Zhao L M, Zhang C B. Fine Mapping of a Restorer-of-fertility Gene *GmRfl* for the Cytoplasmic Male Sterility in Soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(2):518-526.
- [20] 张颖, 赵国龙, 林春晶, 贾顺耕, 郭凤兰, 赵丽梅, 张春宝. 大豆核不育基因 *ms6* 功能性分子标记的开发与验证. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(3):807-814.
- Zhang Y, Zhao G L, Lin C J, Jia S G, Guo F L, Zhao L M, Zhang C B. Development and validation of functional molecular markers of nuclear sterility gene *ms6* in soybean, *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(3):807-814.
- [21] Zhang Z H, Wang J, Kuang H Q, Hou Z H, Gong P P, Bai M Y, Zhou S D, Yao X L, Song S K, Yan L, Guan Y F. Elimination of an unfavorable allele conferring pod shattering in an elite soybean cultivar by CRISPR/Cas9. *aBIOTECH*, 2022, 3:110-114.
- [22] 侯智红, 吴艳, 程群, 董利东, 芦思佳, 南海洋, 甘卓然, 刘宝辉. 利用 CRISPR/Cas9 技术创制大豆高油酸突变系. *作物学报*, 2019, 45(6):839-847.
- Hou Z H, Wu Y, Cheng Q, Dong L D, Lu S J, Nan H Y, Gan Z R, Liu B H. Creation of high oleic acid soybean mutation plants by CRISPR/Cas9. *Acta Agronomica Sinica*, 2019, 45(6):839-847.
- [23] Cai Y P, Chen L, Liu X J, Chen G, Sun S, Wu C X, Jiang B J, Han T F, Hou W S. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmFT2a* delays flowering time in soybean. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16:176-185.
- [24] Bao A L, Chen H F, Chen L M, Chen S L, Hao Q N, Guo W, Qiu D Z, Shan Z H, Yang Z L, Yuan S L, Zhang C J, Zhang X J, Liu B H, Kong F J, Li X, Zhou X A, Tran L P, Cao D. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmSPL9* genes alters plant architecture in soybean. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1):131.