

大豆 CMS 育性恢复基因 *GmRf1* 的初步鉴定及功能性标记开发杨绪磊<sup>1,2</sup>, 郭凤兰<sup>1,2</sup>, 高萌萌<sup>1,2</sup>, 张泽东<sup>1,2</sup>, 林春晶<sup>2</sup>, 孙妍妍<sup>2</sup>, 张井勇<sup>2</sup>, 彭宝<sup>2</sup>, 赵丽梅<sup>1,2</sup>, 张春宝<sup>1,2</sup><sup>1</sup>吉林农业大学农学院, 长春 130118; <sup>2</sup>吉林省农业科学院大豆研究所/农业农村部杂交大豆育种重点实验室, 长春 130033)

**摘要:** 在大豆杂种优势利用中, 主要基于“三系”法进行杂交大豆品种选育。恢复系作为杂交种的父本, 其所含的育性恢复 (*restorer-of-fertility*, *Rf*) 基因起决定作用。前期, 我们对大豆 RN (Ru Nan) 型细胞质雄性不育恢复系的育性恢复基因 *GmRf1* 进行了精细定位。本研究在此基础上, 对 *GmRf1* 定位区间内的候选基因进行功能注释、亚细胞定位预测、序列比对和差异表达分析, 明确了 *Glyma.16G161900* 基因在恢复系 JLR230 中所编码的一个 576 个氨基酸的 PPR (pentatricopeptide repeats) 蛋白为 *GmRf1*。进一步对含有 *GmRf1* 的对照材料 Williams82 与母本不育系 JLCMS204A 进行测交及 F<sub>1</sub> 代植株花粉育性鉴定, 验证了 *GmRf1* 可以恢复 CMS-RN 型不育系育性。最后利用 *GmRf1* 在亲本间存在的单核苷酸突变位点, 开发了功能性分子标记 Rf1-dCAPS-2 和 Rf1-dCAPS-3。上述研究将为今后通过分子标记筛选或辅助选育含 *GmRf1* 基因型材料, 以及通过基因工程手段创制新型恢复系奠定了理论和技术基础。

**关键词:** 大豆; 细胞质雄性不育; 育性恢复基因; 分子标记辅助选育

## Preliminary Identification and Functional Marker Development of a CMS *restorer-of-fertility* Gene *GmRf1* in Soybean

YANG Xu-lei<sup>1,2</sup>, GUO Feng-lan<sup>1,2</sup>, GAO Meng-meng<sup>1,2</sup>, ZHANG Ze-dong<sup>1,2</sup>, LIN Chun-jing<sup>2</sup>, SUN Yan-yan<sup>2</sup>, ZHANG Jing-yong<sup>2</sup>, PENG Bao<sup>2</sup>, ZHAO Li-mei<sup>1,2</sup>, ZHANG Chun-bao<sup>1,2</sup><sup>1</sup> College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; <sup>2</sup> Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences/Key

Laboratory of Hybrid Soybean Breeding of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Changchun 130033)

**Abstract:** The breeding of hybrid soybean varieties is mainly based on the ‘three-line’ method (based on cytoplasmic male sterility). As the male parent of the hybrid, the *restorer-of-fertility* (*Rf*) gene in the restorer line plays a decisive role. In the former study, we mapped the *Rf* gene *GmRf1* for the soybean RN (Ru Nan) type cytoplasmic male sterile line. This study conducted functional annotation, subcellular location prediction, sequence alignment and differential expression analysis of candidate genes in the physical interval of *GmRf1*. We identified that the PPR (pentatricopeptide repeats) gene *Glyma.16G161900* encoding for 576 amino

收稿日期: 2022-11-24

修回日期: 2022-12-21

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:1628612318@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

**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, CXGC2021RCY009)

**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, CXGC2021RCY009)

acids encoded in male restorer line JLR230 is *GmRf1*. By crossing Williams82 containing *GmRf1* with the female sterile line JLCMS204A, the pollen fertility of F<sub>1</sub> plants was identified demonstrating that *GmRf1* could restore the fertility of CMS-RN sterile lines. Wu further developed functional molecular markers Rf1-dCAPS-2 and Rf1-dCAPS-3 based on the single nucleotide mutation sites of *GmRf1* between female and male parents. Collectively, this study laid a theoretical and technical foundation for the future marker-assisted selection of *GmRf1*, as well as the creation of new restorer lines through genetic engineering.

**Keywords:** soybean; cytoplasmic male sterility; restorer-of-fertility gene; molecular markers assisted selection

大豆是我国重要的粮油饲兼用作物。近年来大豆缺口一直在 8000 万吨以上，供给压力逐年增大。因此，如何提高国产大豆的产量一直都是科研工作者的重点研究方向。杂种优势利用是大幅度提高大豆产量的有效途径之一，如 2002 年审定的世界上第一个大豆杂交种“杂交豆 1 号”，其区域试验两年平均产量比对照品种增产 21.9%<sup>[1]</sup>；2017 年审定的首个优质“双高”杂交种“吉育 612”，区试平均产量也比对照增产 16.0%<sup>[2]</sup>。目前，大豆杂种优势利用主要基于细胞质雄性不育（cytoplasmic male sterility, CMS）系统，其由不育系、保持系和恢复系构成。恢复系作为杂交种的父本，其所含育性恢复（restorer-of-fertility, *Rf*）基因起着决定作用，不同的恢复系材料中含有的恢复基因的恢复能力不同，导致杂交种育性恢复效果也不尽相同。因此，强恢复系的选育是强优势杂交种创制的基础。然而强恢复系的传统选育方式非常繁琐，需与不育系测交，通过观察子代花粉育性来进行鉴定，既耗时又费力。而对现有恢复系进行改造和恢复基因聚合，若通过传统方法选育，很难对杂交后代的不同基因型进行快速、准确的选择，导致具有良好农艺性状的品系往往不含恢复基因，极大地限制了新型恢复系的快速有效创制。

为此，研究人员利用不同细胞质类型不育系与配套恢复系杂交，构建分离群体，开展育性恢复基因的定位与克隆工作，以期建立恢复系分子标记辅助育种体系或利用生物工程技术创制新型恢复系。早在 2007 年，赵丽梅等<sup>[3]</sup>首次以 CMS-RN 型不育系 YA 为母本，恢复系 167 为父本进行杂交获得的 F<sub>2</sub> 分离群体，将 CMS-RN 型不育系对应的基因成功定位于 16 号染色体的 Satt547 附近。Wang 等<sup>[4]</sup>进一步将该 *Rf* 基因精细定位至 Sctt\_011 和 Satt547 之间。之后，任良真<sup>[5]</sup>和王鹏年<sup>[6]</sup>均以 RN 型 CMS 材料为亲本对 *Rf* 基因进行了精细定位，并将 *Rf* 基因定位至 500 Kb 左右的物理区间，其中有 8 个具有典型 *Rf* 基因特征的 PPR（pentatricopeptide repeats）蛋白家族基因。Yang 等<sup>[7]</sup>利用 SSR 标记对 CMS-N8855 型不育系 NJCMS1A 与恢复系中豆 5 号杂交获得的 F<sub>2</sub> 分离群体进行分析发现，位于 7 号染色体上的 Satt626 和 5 号染色体上的 Satt300 与 *Rf* 基因连锁，遗传距离分别为 9.75 cM 和 11.18 cM。Wang<sup>[8]</sup>等进一步以 NJCMS1A 与恢复系 NJCMS1C 杂交后代分离群体为材料，将 *Rf* 基因定位于 16 号染色体上 SSR 标记 BARCSOYSSR\_16\_1067 和 BARCSOYSSR\_16\_1078 之间，遗传距离分别为 1.1 cM 和 1.4 cM，并通过基因编辑技术及相关分析鉴定 *GmPPR576* 为 CMS-N8855 型不育系的 *Rf* 基因，汤复跃等<sup>[9]</sup>以 CMS-M 型不育系 W931A 和恢复系 WR16 构建分离群体，利用 SSR 分子标记技术将 CMS-M 型不育系对应的 *Rf* 基因定位到 5 号染色体上的 Satt276 和 Satt545 之间。然而

在 2016 年, Wang 等<sup>[10]</sup>利用同样利用 W931A×WR16 的后代分离群体对 *Rf* 基因进行了精细定位, 但将其定位于 16 号染色体 GmSSR1602 和 GmSSR1610 之间的 162.4kb 的区段内。焦东燕<sup>[11]</sup>则以两个 CMS-ZD 型不育系阜 CMS5A 和 W931A 与恢复系阜恢 6 号杂交构建的 F<sub>2</sub> 和 F<sub>2:3</sub> 群体为材料, 将 CMS-ZD 型不育系对应的 *Rf* 基因定位在 BARCSOYSSR\_16\_1040 和 Satt547 之间。之后 Dong 等<sup>[12]</sup>等进一步将 CMS-ZD 型 *Rf* 基因定位在 16 号染色体 SSR 分子标记 BARCSOYSSR\_16\_1064 和 BARCSOYSSR\_16\_1082 之间, 遗传距离分别为 0.59 cM 和 0.83 cM。贾顺耕等<sup>[13]</sup>在以 CMS-RN 型不育系 JLCMS82A 为母本和恢复系 JLR1 为父本构建的 F<sub>2</sub> 分离群体进行分子标记定位, 发现了一个新恢复基因位点 *Rf3*, 将其定位于 9 号染色体的分子标记 BARCSOYSSR\_09\_1151 和 BARCSOYSSR\_09\_1183 之间, 遗传距离分别为 0.6 cM 和 0.5 cM。Sun 等<sup>[14]</sup>则利用 CMS-RN 型不育系 JLCMS5A 为母本和恢复系 JLR2 为父本构建的 F<sub>2</sub> 分离群体, 将 *Rf3* 基因精细定位至 9 号染色体 86.43Kb 区间之内, 并初步鉴定 *Glyma.09G171200* 可能是 *Rf3* 基因。

我们在前期以大豆 CMS-RN 型不育系 JLCMS204A 与恢复系 JLR230 杂交获得的 F<sub>2</sub> 代分离群体为试验材料, 将 CMS-RN 型育性恢复基因 *GmRfl* 精细定位在 16 号染色体上的分子标记 dCAPS-1 和 BARCSOYSSR\_16\_1076 之间, 遗传距离分别为 0.1 cM 和 0.3 cM<sup>[15]</sup>。本研究在此基础上对精细定位区间的基因进行分析, 初步鉴定 *GmRfl* 基因; 并开发功能性分子标记用于含 *GmRfl* 基因型恢复系的筛选和辅助选育。

## 1. 材料与方法

### 1.1 试验材料

大豆 CMS-RN 型不育系 JLCMS204A、恢复系 JLR230、对照品种 Williams82 均由吉林省农业科学院杂交大豆研究团队保存并提供, 种植于吉林省长春市范家屯镇杂交大豆核心育种基地 (124°83'E, 43°43'N)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 *GmRfl* 候选基因预测

以 Williams82.a2.v1 ([https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Gmax\\_Wm82\\_a2\\_v1](https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Gmax_Wm82_a2_v1)) 为参考基因组, 对 *GmRfl* 定位区间进行分析, 初步筛选候选基因; 在 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上查询相关基因的功能注释, 初步预测 *GmRfl* 候选基因。根据候选基因的编码序列, 设计基因特异性引物, 利用 2×Super Pfx Master Mix 酶进行 PCR 扩增, 扩增后将得到单一的目的条带片段克隆至 pEASY-T1 Blunt 载体上, 进行涂板培养, 经过蓝白斑筛选后挑取 5 个白色克隆进行阳性克隆鉴定, 之后选取 3 个阳性克隆样品进行测序和序列比对分析。

#### 1.2.2 *GmRfl* 候选基因差异表达分析

利用 NCBI 网站中的 Primer-BLAST 程序设计实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 引物并合成, 利用 EasyPure Plant RNA Kit (北京全式金) 试剂盒在盛花期 (R2) 提取 JLCMS204A 和 JLR230

顶端花序旁侧叶片总 RNA，以 HiFiScript cDNA Synthesis Kit（康为试剂）试剂盒合成 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。在扩增过程中，利用荧光信号检测定位区间内基因的表达量，选择 *cons4*（Genbank 登录号：BU578186）作为内参基因，每个样品设置三个重复。

### 1.2.3 *GmRfl* 蛋白质结构预测分析

使用 Vector NTI 8.0 软件分析基因序列，运用 NCBI 中的 ORF Finder 查找基因的开放阅读框，使用 ExPASy 平台（<https://web.expasy.org/protparam/>）将目的基因的编码框翻译成蛋白质，并分析其理化性质，等电点，疏水性，跨膜结构域。使用 SignalP 6.0（<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>）预测蛋白质信号肽，使用 NCBI conserved domains 预测蛋白质亚细胞定位位置。在 PRABI(<http://www.prabi.fr>) 和 SWISS-MODEL 平台（<https://swissmodel.expasy.org/>）预测蛋白质的二级和三级结构。

### 1.2.4 含 *GmRfl* 基因材料的测交鉴定

以含 *GmRfl* 候选基因的大豆品种 Williams82 与 CMS-RN 型不育系 JLCMS204A 进行测交，收获 F<sub>1</sub> 种子种植于温室花盆，盛花期（R<sub>2</sub>）取成熟花苞，参照郭凤兰等<sup>[15]</sup>方法对 F<sub>1</sub> 代植株进行花粉育性鉴定。

### 1.2.5 功能性分子标记开发与验证

根据 *GmRfl* 基因上的突变位点设计衍生的酶切扩增多态性序列（derived cleaved amplified polymorphic Sequences, dCAPS）分子标记，利用亲本及半不育单株 DNA 进行 PCR 扩增和多态性筛选；进一步利用特异性 dCAPS 标记对前期用于进行 *GmRfl* 基因定位的 F<sub>2</sub> 分离群体典型单株进行进行酶切扩增多态性检测，验证 dCAPS 标记准确性。

## 2. 结果与分析

### 2.1 候选基因的预测和筛选

通过对大豆参考基因组中前期定位的恢复基因 *GmRfl* 候选区间进行检索，发现该区间内含有 27 个基因，对其进行功能注释。根据已知文献报导，除水稻 *Rf2* 基因、*Rf17* 基因和玉米 *Rf2* 基因等特殊情况下，所有恢复基因均属 PPR 家族基因。该家族基因编码的 PPR 蛋白是一个简并串联的蛋白，由自身携带的线粒体信号肽引导进入线粒体，通过剪接、编辑转录本或者改变 CMS 基因翻译产物的积累量，致使杂种 F<sub>1</sub> 代育性恢复。因此，我们根据 27 个基因的功能注释，发现中有 7 个为 PPR 蛋白家族基因，见表 1；进一步通过亚细胞定位预测发现 *Glyma.16G161800*、*Glyma.16G162700*、*Glyma.16G162800* 这 3 个 PPR 基因位于叶绿体中，而 *Glyma.16G161900*、*Glyma.16G162000*、*Glyma.16G162100*、*Glyma.16G163100* 这 4 个 PPR 基因位于线粒体中，因此，初步预测这 4 个基因为 *GmRfl* 候选基因。

表 1 恢复基因 *GmRfl* 定位区间内所有 PPR 家族基因及注释信息

Table.1 All PPR family genes and annotation information within the location range of the *Rf* gene *GmRfl*

基因名称 Gene name	基因描述 Gene description	亚细胞定位预测 Prediction of subcellular localization	编码区全长/bp Length of coding DNA sequence	基因位置/bp Gene location
<i>Glyma.16G161800</i>	TPR/PPR 家族蛋白	叶绿体	1749	32 105 638-32 107 509
<i>Glyma.16G161900</i>	PPR 家族蛋白	线粒体	1731	32 108 807-32 115 361
<i>Glyma.16G162000</i>	PPR 家族蛋白	线粒体	1173	32 113 025-32 114 514
<i>Glyma.16G162100</i>	PPR 家族蛋白	线粒体	1659	32 118 958-32 120 616
<i>Glyma.16G162700</i>	PPR 家族蛋白	叶绿体	1518	32 157 331-32 159 914
<i>Glyma.16G162800</i>	PPR 家族蛋白	叶绿体	1569	32 167 100-32 168 668
<i>Glyma.16G163100</i>	PPR 家族蛋白	线粒体	1698	32 180 450-32 183 435

## 2.2 候选基因编码序列比对分析

以父本 JLR230、母本 JLCMS204A 和对照品种 Williams82 为模板，对具有恢复基因典型特征的 4 个 PPR 蛋白家族基因 *Glyma.16G161900*、*Glyma.16G162000*、*Glyma.16G162100* 和 *Glyma.16G163100* 进行克隆和测序，所用引物信息见表 2。

表 2 *GmRfl* 候选基因扩增所用引物信息

Table.2 Primers information for amplification of *GmRfl* candidate gene

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	退火温度/°C Temperature	产物大小/bp Product size
<i>16G161900</i>	F:TATGTCATTAGTCTCTTTCTCTCAATTTTATTGTT R:CGGAACGCACAATCCGG	60	2357
<i>16G162000</i>	F:ATGATTATTCCACAGTGCCTATAACA R:TTACTTCATGGCCAAAGCTTCA	60	1490
<i>16G162100</i>	F: ATGTCATTCTCATTCTCATTGTCAAG R: CTACAATAGGCCTTAGCAATCATT	62	1659
<i>16G163100</i>	F:ATGTCATTCTCGAGAAGGTTAAGCT R:TCACAATAACTTATTTGTAAGTGGAGA	60	1698

利用 Vector NTI 8.0 软件对上述测序结果进行比对，分析各基因中亲本间的编码序列差异。通过序列比对分析发现，*Glyma.16G161900* 的编码区发生 3 处单核苷酸变异，导致编码的氨基酸发生了变化；*Glyma.16G162000* 的编码区发生 2 处变异，导致氨基酸发生变化移码突变，氨基酸翻译提前结束；*Glyma.16G162100* 的编码区没有发生变异；*Glyma.16G163100* 的编码区发生 20 处变异，其中有 8 处发生同义突变，12 处为非同义突变，同样导致编码的氨基酸发生了变化。从序列差异比对情况分析判断，*Glyma.16G162100* 可能不是 *GmRfl* 基因。

## 2.3 候选基因表达量分析

进一步利用 qRT-PCR 检测 *Glyma.16G161900*、*Glyma.16G162000* 和 *Glyma.16G163100* 在 JLR230 和 JLCMS204A 中的相对表达量。结果表明，3 个基因在亲本间均有表达，*Glyma.16G161900* 和 *Glyma.16G163100* 均在恢复系 JLR230 中表达量较高，其中 *Glyma.16G161900* 在亲本间的表达量差异最为显著，如图 2 所示。

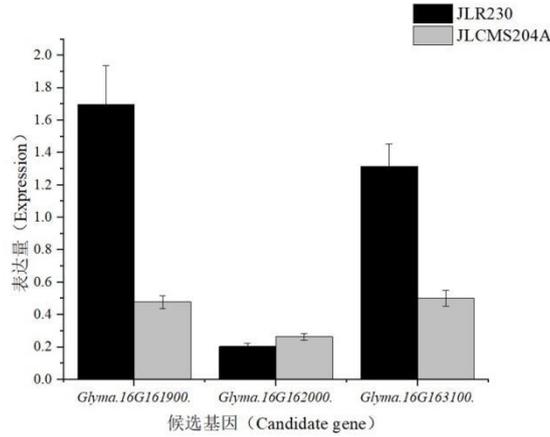
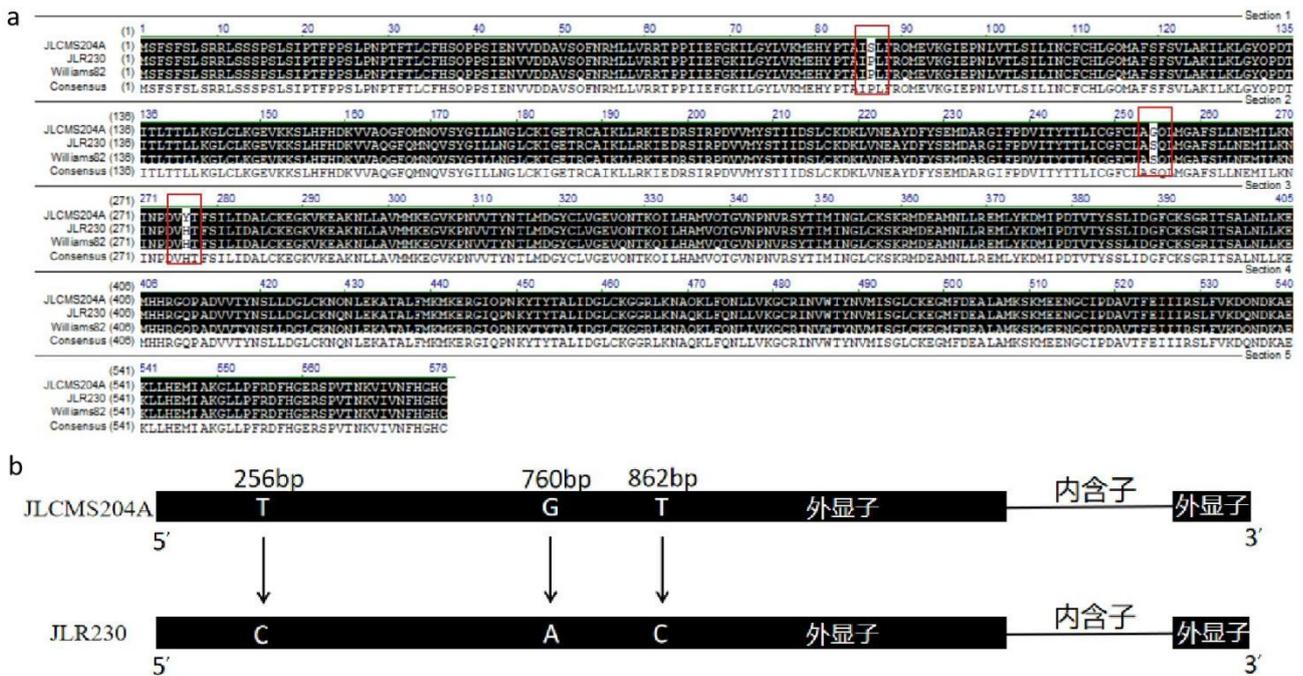


图 1 *GmRfl* 候选基因表达量分析

Fig.1 Expression analysis of *GmRfl* candidate gene

## 2.4 *Glyma.16G161900* 编码序列比对分析

*Glyma.16G161900* 基因由两个外显子和一个内含子构成，通过对亲本间该基因编码序列的比对分析发现，恢复系 JLR230 在第一个外显子 256 bp 的碱基由 T 突变为 C，翻译的氨基酸由丝氨酸（Ser）变为脯氨酸（Pro）；760 bp 的碱基由 G 突变为 A，翻译的氨基酸由甘氨酸（Gly）变为丝氨酸（Ser），在 826 bp 处碱基也由 T 突变为 C，氨基酸由酪氨酸（Tyr）变为组氨酸（His），如图 2 所示。上述 3 处碱基突变均导致氨基酸序列发生了变化，推测 *Glyma.16G161900* 基因因此发生了功能获得型变异，其编码的 576 个氨基酸的线粒体靶向蛋白可以影响不育基因转录或翻译产物的积累，从而使 CMS-RN 型不育系恢复育性。该结果与近日 Wang<sup>[8]</sup>等发现 *Glyma.16G161900* 为 CMS-N885 型不育系配套的恢复系 NJCMS1C 的恢复基因的结果互相印证，明确了 *Glyma.16G161900* 为大豆 CMS 恢复基因 *GmRfl*。



a -CDS 氨基酸序列比对, b-基因结构和碱基序列差异比对

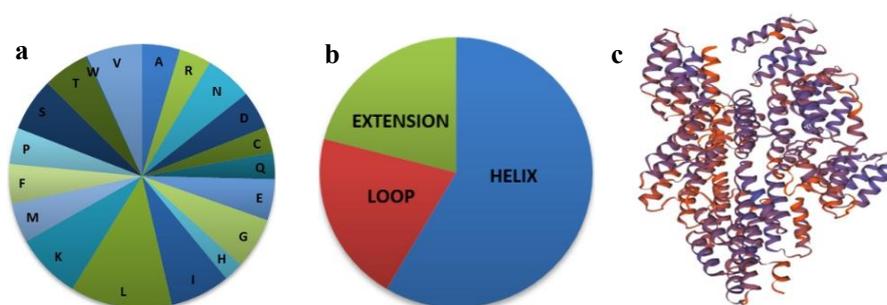
a- amino acid sequence alignment in coding region, b- differential alignment of gene structure and base sequence

图 2 *GmRfl* 的 CDS 碱基序列和氨基酸比对

Fig. 2 base sequence and amino acid alignment of CDS of *GmRfl*

## 2.5 *GmRfl* 基因的蛋白质结构预测分析

使用 ExPASy 对 *GmRfl* 蛋白的一级结构进行预测, 结果显示该蛋白质的分子式是  $C_{2896}H_{4662}N_{764}O_{819}S_{46}$ , 编码 576 个氨基酸(图 3a), 亲水平均值 0.48, 蛋白质不稳定系数为 30.14, 等电点 8.85, 表明该 *GmRfl* 为稳定的碱性蛋白。利用 PRABI 进行蛋白质二级结构预测显示, 该基因的  $\alpha$  螺旋、延伸链和无规则卷曲的氨基酸残基数分别 337、59 和 118, 占比分别为 58.51%、21%和 20.49% (图 3b)。根据 SWISS 蛋白质三级结构预测结果显示, 其为五肽重复蛋白(图 3c)。



a: 氨基酸组成; b: 蛋白质二级结构预测 c: 蛋白质三级结构预测

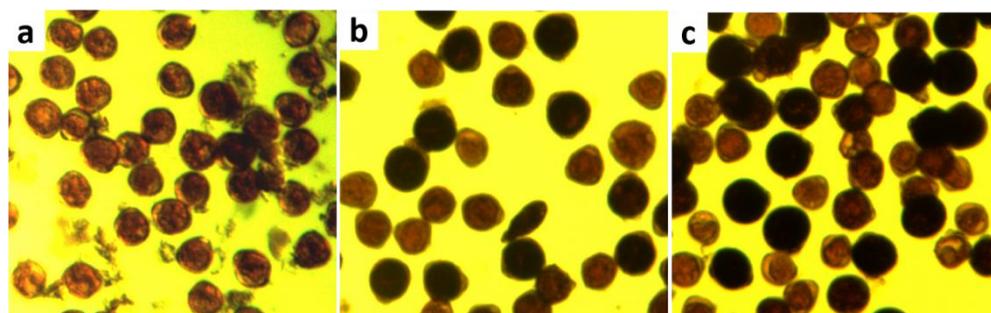
a:Amino Acid Composition b:Protein Secondary Structure Prediction c:Protein Tertiary Structure Prediction

图 3 *GmRfl* 基因的蛋白质结构预测

Fig.3 Protein structure prediction of *GmRfl* gene

## 2.6 *GmRfl* 基因功能的辅助验证

通过对照品种 Williams82 和恢复系 JLR230 序列比对分析 (图 2a) 发现, 二者 *Glyma.16G161900* 碱基序列相同, 因此, 推测 Williams82 同样含有恢复基因 *GmRfl*。为了进一步验证 *GmRfl* 的功能, 我们以 CMS-RN 型不育系 JLCMS204A 为母本, Williams82 为父本进行杂交, 对  $F_1$  植株的成熟花苞进行花粉育性鉴定, 花粉染色结果如图 4 所示, 杂种  $F_1$  花粉育性结果为典型半不育, 与 JLCMS204A 与 JLR230 杂种  $F_1$  花粉育性鉴定结果一致, 进一步间接证明了 *Glyma.16G161900* 具有育性恢复功能, 为 CMS-RN 型不育系的恢复基因。



a: JLCMS204A 的花粉染色情况; b: (JLCMS204A  $\times$  Williams82)  $F_1$  的花粉染色情况; c: (JLCMS204A  $\times$  JLR230)  $F_1$  的花粉染色情况

a: Pollen staining of JLCMS204A; b: Pollen staining of (JLCMS204A  $\times$  Williams 82)  $F_1$ ; c: pollen staining of (JLCMS204A  $\times$  JLR230)  $F_1$

图 4 不同材料花粉育性鉴定结果

Fig.4 Identification results of pollen fertility of different materials

2.7 *GmRfl* 基因功能性分子标记开发

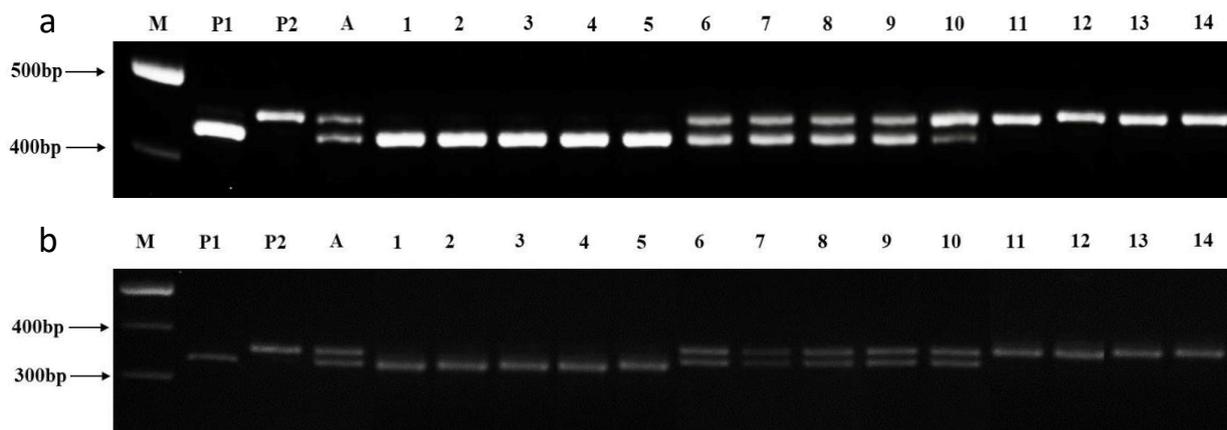
根据 *GmRfl* 基因上的 3 个突变位点，每个位点设计 2 个 dCAPS 标记，共计 6 个，详见表 3。对亲本及半不育单株进行多态性筛选发现，Rfl-dCAPS-2 和 Rfl-dCAPS-3 具有显著多态性。两个标记的退火温度均为 60 °C，扩增产物单一无杂带，且大小相符。经过对应的限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Mbo* I 酶切，均可明显切出特异性条带。

表 3 多态性 dCAPS 分子标记序列信息

Tab. 3 Polymorphic dCAPS molecular marker sequence information

dCAPS 标记 dCAPS marker	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	限制性内切酶 Restriction endonuclease	突变位置/ bp Positions/ bp	产物大小/ bp Product size/ bp
Rfl-dCAPS-1	F: GATGGAGCATTATCCTACTGGCATG R: TCTGTCTTCAATCCTTCTCAGCAAC	<i>Sph</i> I	256	367
Rfl-dCAPS-2	F: GATGGAGCATTATCCTACTGGAATT R: AAAAAATCATAAGCCTCGTTTACAAG	<i>EcoR</i> I	256	452
Rfl-dCAPS-3	F: ATTGAAGAACATCAACCCGGATGAT R: ACTGTATGTCACTGTATCAGGAATC	<i>Mbo</i> I	826	352
Rfl-dCAPS-4	F: GCATCAATCAATATACTAAAGGTTC R: CCATAACCTTGACTACACTCTGA	<i>Taq</i> I	826	448
Rfl-dCAPS-5	F: TCTAATATGTGGCTTTTDCCTTCTC R: ACCATTCTCTCCATTTTGGACTTC	<i>Dde</i> I	760	811
Rfl-dCAPS-6	F: TCTAAATGTGGCTTTTGCCTTTCG R: CTGGTTGACCTCTGTGGTCCATCTC	<i>Taq</i> I	760	503

利用 Rfl-dCAPS-2 和 Rfl-dCAPS-3 对 *GmRfl* 基因定位群体部分单株进行验证。其中，Rfl-dCAPS-2 经 PCR 扩增得到的扩增产物大小为 452 bp，经过限制性内切酶 *EcoR* I 酶切后得到特异性条带。其中，恢复系父本可以被切开一条带，片段大小为 427 bp，不育系母本不能被切开，仍为 452 bp，纯合可育单株可以被切开，带型与父本一致，杂合型单株出现 427 bp 和 452 bp 两条带，如图 5a 所示。而 Rfl-dCAPS-3 标记的扩增产物经过限制性内切酶 *Mbo* I 酶切后，父本与纯合可育单株可以被切开一条 327 bp 的条带，不育单株无法被切开，仍为 352 bp，而杂合单株可以被切开为 327 bp 和 352 bp 两条明显的条带，如图 5b 所示。这表明 Rfl-dCAPS-2 和 Rfl-dCAPS-3 均可利用琼脂糖凝胶电泳明显区分纯合可育单株 (*RfRf*)、杂合半不育单株 (*Rf/rf*) 和纯合不育单株 (*rrff*) 的基因型，未来可用于含 *GmRfl* 恢复系材料的筛选和分子标记辅助选育。



a: Rfl-dCAPS-2 扩增产物经 *EcoRI* 酶切后的条带; b: Rfl-dCAPS-3 扩增产物经 *MboI* 酶切后的条带

M-100 bp DNA ladder, P1-父本, P2-母本, A-半不育单株, 1~5-纯合可育基因型单株, 6~10-杂合基因型单株, 11~14-纯合不育基因型单株。

a:The bands of amplified products of Rfl-dCAPS-2 digested by *EcoRI*; b:The bands of amplified products of Rfl-dCAPS-3 digested by *MboI*

M-100 bp DNA ladder, P1 male parent, P2 female parent, A semi sterile plant, 1~5-homozygous fertile plants, 6~10-heterozygous plants, 11~14-homozygous sterile plants.

图 5 限制性内切酶酶切得到的特异性条带

Fig.5 Specific bands obtained by restriction endonuclease digestion

### 3. 讨论

大多数植物的 CMS 与线粒体内调控能量代谢的基因转录异常有关, 线粒体由于自身能量代谢紊乱, 而花药发育需要大量能量供给, 紊乱的能量代谢使得生殖细胞发育直接或间接受到影响, 最终出现败育<sup>[20]</sup>。而很多 PPR 蛋白的靶点作用位点均在线粒体上, 可以对线粒体内的 RNA 进行转录前或转录后的调控<sup>[16]</sup>。因此, 很多学者认为 *Rf* 基因可能是由 PPR 蛋白进化而来的, 能对很多 RNA 的异常转录进行调控, 从而使育性得到恢复<sup>[17]</sup>。但是, 也有极个别的 *Rf* 基因不是 PPR 蛋白, 如水稻 *Rf2* 基因, *Rf17* 基因<sup>[18]</sup>和玉米 *Rf2* 基因<sup>[19]</sup>。本研究鉴定的大豆 CMS-RN 型不育系的育性恢复基因 *GmRf1*, 可能是由于编码区出现的 3 个单碱基突变导致其编码氨基酸发生替换而形成新功能, 通过自身的线粒体靶向肽引导进入线粒体影响不育基因转录或翻译产物的积累, 从而使与不育系杂交的 F<sub>1</sub> 代植株恢复育性。前期 Wang 等<sup>[7]</sup>研究证实, *Glyma.16G161900* 所编码的相同蛋白, 也可以恢复 CMS-N8855 型不育系杂交 F<sub>1</sub> 的育性。这表明 *GmRf1* 是一个适用于不同 CMS 类型不育系的广谱恢复基因。

虽然目前已有 30 余个大豆杂交种通过审定, 但均由“三系”法育成。可用不育系均为配子体遗传模式, 这导致其及与恢复系杂交育成的杂交种均易受环境影响, 导致育性不稳定, 这与恢复系的恢复能力有很大关系。在杂交水稻品种选育中, “明恢 63”是应用最广泛, 也是杂交组配最稳定的 CMS 恢复系, 这可能与“明恢 63”中含有两个恢复基因 *Rf3* 和 *Rf1B* 有关<sup>[21]</sup>。蔡健等<sup>[22]</sup>对水稻 CMS 恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4* 进行了聚合效应分析发现, 双聚合片段系可以提高 F<sub>1</sub> 杂种植株的花粉育性。Huang 等<sup>[23]</sup>研究也发现, 同时具有 *Rf5* 和 *Rf6* 基因的杂种 F<sub>1</sub> 代的花粉 75% 为正常可育, 而不是单个恢复基因 50%。这表明同时聚合多个恢复基因

可以提高恢复系的恢复能力，进而保证杂种 F<sub>1</sub> 代植株的育性稳定性。在大豆中目前已有 *GmRf1* 和 *GmRf3* 被成功克隆，Sun 等<sup>[13]</sup>已开发了一个与 *GmRf3* 共分离的 CAPS 标记。而本研究则开发了两个与 *GmRf1* 紧密连锁的 dCAPS 标记并验证可用。这对今后利用上述功能性分子标记，进行不同基因型恢复系的筛选鉴定及多个 *Rf* 基因聚合恢复系的辅助选育和创制，加速杂交大豆品种选育和应用进程提供理论和技术支撑。

#### 参考文献

- [1] 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):16-18.
- Zhao L M, Sun H, Wang S M, Wang Y Q, Huang M, Li J P. Breeding report of Soybean Hybrid No. 1. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(3):16-18.
- [2] 彭宝, 张春宝, 张伟, 张井勇, 闫昊, 林春晶, 王鹏年, 赵丽梅. “双高”大豆杂交种吉育 612 创制及高产制种技术研. 大豆科学, 2019 38(3):501-502.
- Peng B, Zhang C B, Zhang W, Zhang J Y, Yan H, Lin C J, Wang P N, Zhao L M. The Creation and High-yield Seed Production Technology of ‘Double High’ Soybean Hybrid Jiyu 612. Soybean Science, 2019, 38(3):501-503.
- [3] 赵丽梅, 王玉民, 孙寰, 赵洪锬, 程延喜, 彭宝, 王曙明, 张伟龙, 董英山. 大豆细胞质雄性不育恢复基因的 SSR 标记. 大豆科学, 2007, 26(6):835-839.
- Zhao L M, Wang Y M, Sun H, Zhao H K, Cheng Y X, Wang S M, Zhang W L, Dong Y S. Identification of SSR makers linked to the fertility restorer gene for the CMS in soybean. Soybean Science, 2007, 26(6):835-839.
- [4] Wang Y M, Zhao L M, Wang X Z, Sun H. Molecular mapping of a fertility restorer gene for cytoplasmic male sterility in soybean. Plant Breeding, 2010, 129(29):9-12.
- [5] 任良真. 大豆细胞质雄性不育恢复基因的 SSR 标记. 长春: 吉林大学, 2012.
- Ren L Z. SSR makers of cytoplasmic male sterility gene in soybean. Changchun: Jilin University, 2012.
- [6] 王鹏年. RN 型大豆细胞质雄性不育恢复基因的精确定位. 长春: 吉林农业大学, 2016.
- Wang P N. Fine mapping of restorer genes for cytoplasmic male sterility in RN soybean. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016.
- [7] Yang S P, Duan M P, Meng Q C, Qiu J, Fan J M, Zhao T J, Yu D Y and Gai J Y. Inheritance and gene tagging of male fertility restoration of cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS1A in soybean. Plant Breeding, 2007, 26:302-305.
- [8] Wang T L, He T T, Ding X L, Zhang Q Q, Yang L S, Nie Z X, Zhao T J, Gai J Y, Yang S P. Confirmation of *GmPPR576* as a fertility restorer gene of cytoplasmic male sterility in soybean. Journal of Experimental Botany 2021, 72(22):7729-7742.
- [9] 汤复跃, 周立人, 程潇, 张磊, 陈培, 江莹芬. 大豆 M 型细胞质雄性不育恢复基因 SSR 标记初步定位. 大豆科学, 2008, 27(3):383-386.
- Tang F Y, Zhou L R, Cheng X, Zhang L, Chen P, Jiang Y F. Preliminary mapping of SSR markers for restorer gene of soybean M-type cytoplasmic male sterility. Soybean Science, 2008, 27(3):383-386.

- [10] Wang D G, Zhang L, Li J K, Hu Q, Jiang H Y, Huang Z P. The restorer gene for soybean M-type cytoplasmic male sterility, *Rf-m* is located in a PPR gene-rich region on chromosome 16. *Plant Breeding*, 2016, 135(3):342-348.
- [11] 焦东燕. 大豆杂种优势及细胞质雄性不育恢复基因的定位. 石家庄: 河北师范大学, 2011.  
Jiao D Y. Mapping of heterosis and cytoplasmic male sterility restorer genes in soybean. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2011.
- [12] Dong D K, Li Z, Yuan F J, Zhu S L, Chen P, Yu W, Yang Q H, Fu X J, Yu X M, Li B Q, Zhu D H. Inheritance and fine mapping of a restorer-of-fertility gene for the cytoplasmic male sterility in soybean. *Plant Science*, 2012, 188:36-40.
- [13] 贾顺耕, 郭凤兰, 林春晶, 孙妍妍, 张颖, 雷蕾, 彭宝, 赵丽梅, 张春宝. 大豆细胞质雄性不育性恢复基因 *Rf3* 的定位. *植物遗传资源学报*, 2021, 22(5):1411-1417.  
Jia S G, Guo F L, Lin C J, Sun Y Y, Zhang Y, Lei L, Peng B, Zhao L M, Zhang C B. Mapping of fertility restoring gene *Rf3* for cytoplasmic male sterility in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2021, 22(5):1411-1417.
- [14] Sun Y Y, Zhang Y, Jia S G, Lin C J, Zhang J Y, Yan H, Peng B, Zhao L M, Zhang W, Zhang C B. Identification of a Candidate restorer-of-fertility Gene *Rf3* Encoding a Pentatricopeptide Repeat Protein for the Cytoplasmic Male Sterility in Soybean. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, 23(10):5388.
- [15] 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 *GmRf1* 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 *GmRf1* for the Cytoplasmic Male Sterility in Soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2022, 23(2):518-526.
- [16] Bentolila S, Alfonso A A, Hanson M R. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(16):10887-10892.
- [17] 李鹏. 玉米 S 型细胞质雄性不育恢复基因 *Rf3* 的精细定位及其功能验证. 山东农业大学, 2014.  
Li P. Fine-mapping and functional verification of the restorer *Rf3* of CMS-S in maize. Shandong Agricultural University, 2014.
- [18] Itabashi E, Iwata N, Fujii S, Kazama T, Toriyama K. The fertility restorer gene, *Rf2*, for Lead Rice-type cytoplasmic male sterility of rice encodes a mitochondrial glycine-rich protein. *The Plant Journal*, 2011, 65(3):359-367.
- [19] Cui X Q, Wise R P, Schnable P S. The *rf2* nuclear restore gene of Male-sterile T-cytoplasm maize. *Science*, 1996, 272:1334-1336.
- [20] 燕厚兴, 林春晶, 范亚军, 张春宝. 植物细胞质雄性不育基因克隆及分子机制研究进展. *植物生理学报*, 2022, 58(1):61-76.  
Yan H X, Lin C J, Fan Y J, Zhang C B. Research progress on cloning and molecular mechanism of cytoplasmic male sterility genes in plants. *Plant Physiology Journal*, 2022, 58(1):61-76
- [21] 吴方喜, 蔡秋华, 朱永生, 张建福, 谢华安. 籼型杂交稻恢复系明恢 63 的利用与创新. *福建农业学报*, 2011, 26(6):1101-1112.  
Wu F X, Cai Q H, Zhu Y S, Zhang J F, Jian H A. Application of *indica* restorer line, Minghui 63, for rice hybridization. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 26(6):1101-1112.

[22] 蔡健, 范海燕, 廖秋平, 马同富, 张桂权. 水稻恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4* 聚合效应分析. 南京农业大学学报, 2014, 37(3):20-26.

Cai J, Fan H Y, Liao Q P, Ma T F, Zhang G Q. Analysis of pyramiding effect of the *Rf3* and *Rf4* genes on fertility restoration in rice with cytoplasmic male sterility. Journal of Nanjing Agricultural University, 2014, 37(3):20-26.

[23] Huang W, Hu J, Yu C, Huang Q, Wan L, Wang L, Qin X, Ji Y, Zhu R, Li S, Zhu Y. Two non-allelic nuclear gene restore fertility in a gametophytic pattern and enhance abiotic stress tolerance in the hybrid rice plant. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 124(5):799-807.