

大豆细胞质雄性不育遗传基础与育种应用

张春宝, 孙妍妍, 赵丽梅

(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: 杂种优势利用是显著提高作物产量的主要途径, 有助于解决日益增长的人口数量与有限耕地之间的矛盾。大豆作为世界上重要的粮油饲兼用作物, 其开展杂种优势利用已有30余年。其中, 基于细胞质雄性不育的三系法杂交育种系统是大豆杂种优势利用的主要途径。目前, 已有40余个杂交大豆品种通过审定并在生产上推广应用, 杂交大豆正处于由中试向产业化推进阶段。本文对大豆细胞质雄性不育遗传基础与育种应用进行了综述, 系统阐述了各类型细胞质雄性不育系的发现及利用、不育性状的遗传和分子机制、育性恢复基因和恢复抑制基因的定位和克隆等方面的研究进展。基于大豆杂种优势利用研究现状论述和分析, 提出了三系法杂交大豆育种中存在的问题、挑战及解决路径, 并对三系法杂交大豆育种技术的创新进行了展望, 旨在为大豆杂种优势分子基础和应用研究提供新方法、新思路。

关键词: 大豆; 杂交种; 细胞质雄性不育; 遗传基础; 分子机制

Genetic Basis and Breeding Application of Cytoplasmic Male Sterility in Soybean

ZHANG Chunbao, SUN Yanyan, ZHAO Limei

(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: Heterosis utilization is the main way to significantly improve crop yield, which helps to solve the contradiction between the increasing population and limited arable land. Soybean, which identified as an important grain, oil and feed crop in the world, the utilization of heterosis in it has been used for more than 30 years. Among them, the three-line hybrid breeding system based on cytoplasmic male sterility is the main way to utilize the heterosis in soybean. At present, more than 40 hybrid soybean varieties have been approved and popularized in production. Furthermore, hybrid soybean is in the stage of advancing from pilot to industrialization. Therefore, this paper reviewed the genetic basis and breeding application of cytoplasmic male sterility in soybean. The discovery and utilization of various cytoplasmic male sterility lines, the genetic and molecular mechanism of sterility traits, the map-based clone of restorer-of-fertility gene and inhibitor of fertility restorer genes were systematically described. Based on the description and analysis of current situation, the challenges and solutions of three-line hybrid soybean breeding were put forward, and the innovation of three-line hybrid soybean technology was prospected, aiming to provide new methods and new ideas for the molecular basic and application research of soybean heterosis.

Key words: soybean; hybrid; cytoplasmic male sterility; genetic basis; molecular mechanism

收稿日期: 2024-01-13 网络出版日期: 2024-01-26

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240113001>

第一作者研究方向为大豆杂种优势利用与遗传基础, E-mail: cbzhang@cjaas.com

通信作者: 赵丽梅, 研究方向为大豆杂种优势利用, E-mail: lmzhao@cjaas.com

基金项目: 国家自然科学基金(32372149, 32101766); 国家现代农业产业技术体系建设项目(CARS-04); 中国博士后基金面上项目(2022MD713754); 基本科研经费项目(KYJF2023JJ101)

Foundation projects: National Natural Science Foundation of China (32372149, 32101766); Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-04); China Postdoctoral Fund General Project (2022MD713754); Basic Research Funding Project (KYJF2023JJ101)

大豆是重要的粮油饲兼用作物,原产于中国,古称菽,在中国各地均有栽培,同时广泛种植于世界各地。中国作为全球主要的大豆进口国,2015-2022年连续8年进口量超过8000万吨,其中2020年的进口量突破1亿吨^[1]。2023年中央一号文件明确提出“加力扩种大豆油料”,这使得我国2023年大豆种植面积达到1.57亿亩(1046.67万公顷),创下了自1958年以来新高,但进口量仍维持在9000万吨以上^[1]。尽管大豆总消费量一直在快速增长,但与水稻、小麦和玉米等其他作物相比,单位面积产量较低且提升缓慢。2013-2023年大豆公顷产量仅提升230.61 kg^[1]。

杂种优势利用可以大幅提高作物单位面积产量,已在水稻、玉米和油菜等作物中成功应用。目前作物杂种优势利用的途径主要为基于细胞质雄性不育(CMS, cytoplasmic male sterility)系统的三系法和细胞核雄性不育(GMS, genic male sterility)系统的两系法。大豆同样具有较强的杂种优势^[2],高亲优势率在20.0%~101.6%之间^[3]。我国在大豆杂种优势利用方面处于国际领先水平,不仅育成了世界第一个可利用的大豆细胞质雄性不育系^[4],还审定了世界首个大豆杂交种^[5]。至2023年底,已利用三系法育成并审定大豆杂交种45个。随着规模化制种技术体系的不断优化,杂交大豆正在由中试走向产业化初级阶段。为此,本文全面对大豆细胞质雄性不育系的发现和利用,以及细胞质雄性不育和育性恢复的遗传和分子机制进行综述,并对杂交大豆三系法育种进行展望,以期通过基础与应用研究有机结合,高效推进杂交大豆产业化进程。

1 大豆细胞质雄性不育系的发现及利用

自Rhoades^[6]发现玉米的细胞质雄性不育现象以后,多个作物的细胞质雄性不育现象也被相继发现。1954年,Sampath等^[7]报道了第一例引起水稻雄性不育的细胞质雄性不育资源。Ogura^[8]在1个日本萝卜群体中发现了一种天然的雄性不育材料,后被称为Ogu CMS。大豆细胞质雄性不育的研究起步较晚,20世纪70-80年代,美国先后授权了5项相关专利^[9-13],其中,Davis^[11]在1985年的专利中首次报道了大豆细胞质雄性不育现象,此后国外未再现相关研究。从20世纪80年代起,国内也开启了大豆细胞质雄性不育胞质的挖掘工作,并相继育成了CMS-RN、CMS-ZD和CMS-N等细胞质雄性不育系材料。

1.1 CMS-RN型不育系的发现及利用

1983年,Sun等^[4]横跨我国19个纬度,建立6个杂交圃,进行大豆远缘杂交工作;1985年发现以栽培大豆汝南天鹅蛋为母本,野生大豆5090035为父本,获得的F₁杂交种表现为高度不育,正反交试验表明汝南天鹅蛋中含有不育细胞质。此后,经五代核置换回交,于1993年育成了世界首个实际可用的大豆细胞质雄性不育系OA,称之为RN型细胞质雄性不育系(CMS-RN)。随后,通过回交早代OABC₃与众多栽培大豆品种的测交,在伊川绿大豆中发现了保持基因。经过五代回交,在1995年育成了栽培大豆不育系YA和保持系YB,同时找到了恢复系,实现了三系配套;并于2002年育成世界上第1个大豆杂交种杂交豆1号,2001-2002年吉林省中晚熟组区域试验较对照增产21.9%^[5]。截止到2024年,已育成适宜不同生态区的300多个CMS-RN型不育系,并利用该类型不育系审定37个杂交大豆品种(表1)。37个品种中有33个为吉林省农业科学院独立或联合选育,主要在北方春播区应用;此外,山西农业大学(山西省农业科学院)利用该类型不育系审定杂交大豆品种4个(晋豆48、优势豆-A-5、晋豆52和晋豆53),部分可在黄淮夏播区种植。利用CMS-RN型不育系选育的杂交大豆品种在蛋白质含量、脂肪含量和产量等方面均表现出明显优势,37个品种中,6个品种的蛋白含量超过42%;18个品种的脂肪含量超过21.5%;4个品种蛋脂含量合计超过63%;24个品种在区域试验中较对照平均增产超过12%,其中杂交豆1号和杂交豆2号较对照平均增产均超过20%;吉育645表现最为出众,同时兼有高油、高蛋白和高产特性。

1.2 CMS-ZD型不育系的发现及利用

1994年,Peng等^[14]以大豆品种中油89B分别为母本与父本进行正反交,发现正交高度不育,反交正常可育,认为中油89B携带不育细胞质,与显性核不育基因结合,产生质核互作雄性不育。1995年,李磊等^[15]发现8908和8912两个组合的F₁或更高世代花粉高度不育,反交育性正常,认为这种不育是由遗传原因造成的,属于质核互作不育。赵丽梅等^[16]以保持系YB为父本,与ZD8319进行测交,育成稳定的以ZD8319细胞质为遗传背景的栽培大豆细胞质雄性不育系ZA,再次证明ZD8319具有不育细胞质。张磊等^[17]用中油89B作母本,分别与W₂₀₃、W₂₀₆、W₂₀₇3个品种杂交,在F₁发现不育株;通过连续4-5代核置换回交,获得育性较稳定的3个不育系

表 1 利用 CMS-RN 型不育系育成的杂交大豆品种

Table 1 Hybrid soybean varieties developed used CMS-RN type sterile lines

序号 No.	品种名 Name	审定年份 Year of variety approval	母本 Female parent	父本 Male parent	脂肪含量 (%) Oil content	蛋白质 含量 (%) Protein content	蛋脂含 量(%) Oil and protein content	区域试验较 对照增产(%) Yield increase compared with CK in regional test	生产试验较 对照增产(%) Yield increase compared with CK in production test
1	杂交豆1号	2002	JLCMS9A	JLR1	21.09	39.19	60.28	21.9	20.8
2	杂交豆2号	2006	JLCMS47A	JLR2	20.54	40.75	61.29	22.7	14.3
3	杂交豆3号	2009	JLCMS8A	JLR9	20.84	40.54	61.38	6.4	2.8
4	杂交豆4号	2010	JLCMS47A	JLR83	19.57	40.48	60.05	12.3	6.1
5	杂交豆5号	2011	JLCMS84A	JLR1	22.25	38.79	61.04	12.2	19.7
6	吉育606	2013	JLCMS47A	JLR100	21.51	40.11	61.62	9.6	13.5
7	吉育607	2013	JLCMS14A	JLR83	22.22	39.30	61.52	12.2	5.1
8	吉育608	2014	JLCMS84A	JLR113	23.04	37.22	60.26	11.1	3.8
9	晋豆48	2014	PZMS-1-1	ZH-21-B-5	19.89	36.99	56.88	14.0	15.2
10	吉育609	2015	JLCMS103A	JLR102	22.54	37.52	60.06	17.0	2.2
11	吉育610	2016	JLCMS128A	JLR98	21.15	37.32	58.47	18.7	9.4
12	吉育611	2016	JLCMS147A	JLR113	21.47	38.67	60.14	10.7	15.0
13	吉育612	2017	JLCMS57A	JLR9	20.92	42.07	62.99	16.7	4.4
14	吉育626	2019	JLCMS230A	JLR9	20.19	40.68	60.87	13.9	11.4
15	吉育627	2019	JLCMS179A	JLR9	20.74	40.97	61.71	13.4	7.8
16	吉育635	2019	JLCMS34A	JLR300	22.71	36.27	58.98	11.5	14.8
17	吉育639	2019	JLCMS191A	JLR403	23.78	37.04	60.82	13.1	13.1
18	佳吉1号	2019	JLCMS178A	JLR124	22.15	40.46	62.61	15.3	16.0
19	优势豆-A-5	2019	JLXCMS1	中119-99	20.96	42.10	63.06	13.5	12.1
20	吉育637	2020	JLCMS210A	JLR209	20.19	41.70	61.89	11.8	8.3
21	吉育641	2020	JLCMS191A	JLR158	22.43	38.58	61.01	17.4	3.3
22	吉育643	2020	JLCMS212A	JLR346	21.69	38.14	59.83	15.3	11.2
23	吉育647	2020	JLCMS5A	JLR2	19.12	42.52	61.64	14.5	18.3
24	吉农H1	2020	JLCMS254A	JLR192	21.93	38.17	60.10	17.8	18.2
25	吉育633	2020	JLCMS204A	JLR230	20.44	42.78	63.22	12.9	14.0
26	吉育653	2021	JLCMS242A	JLR300	22.89	37.68	60.57	11.3	9.6
27	吉育654	2021	JLCMS234A	JLR13	22.75	36.64	59.39	14.7	9.2
28	吉育660	2021	JLCMS204A	JLR419	21.42	41.39	62.81	8.4	8.0
29	吉育645	2021	JLCMS234A	JLR9	20.12	44.77	64.89	15.4	11.6
30	吉农H2	2021	JLCMS212A	JLR414	22.91	38.86	61.77	17.8	9.6
31	晋豆52	2021	H3A	老品种4号	19.92	43.64	63.56	9.2	11.9
32	吉育649	2022	JLCMS209A	JLR158	22.04	37.53	59.57	8.1	12.5
33	吉育667	2022	JLCMS164A	JLR227	21.08	39.76	60.84	11.4	6.4
34	吉育668	2022	JLCMS247A	JLR227	22.94	35.39	58.33	11.8	12.7
35	晋豆53	2022	SXCMS13A	TH46	19.37	41.12	60.49	9.8	14.8
36	吉育613	2023	JLCMS179A	JLR306	21.99	39.14	61.13	14.2	8.6
37	吉育671	2023	JLCMS18A	JLR306	23.05	38.26	61.31	13.5	7.4

W_{931A}、W_{936A}、W_{933A}, 这些不育系是栽培大豆与栽培大豆杂交后获得的, 因此命名为M型。由于中油89B的细胞质源于ZD8319, 即中豆19, 因此将上述来源的不育系统称为CMS-ZD型。目前CMS-ZD型不育胞质已育成了数10个适宜黄淮夏播区种植的不育系, 其中安徽省农业科学院育成杂优豆1号、杂优豆2号、杂优豆3号和皖杂豆5号等4个杂交种; 阜阳市农业科学院育成了阜杂交豆1号、阜杂交豆2号、阜豆123等3个杂交种^[18]。在黄淮夏大豆地区育成的杂交种在蛋白质含量上存在显著优势, 7个品种的蛋白质含量均超过42%, 阜杂交豆2号的蛋白质含量高达46.86%, 蛋脂含量合计高达65.85%。此外, 杂优豆1号和阜杂交豆1号在区域试验中较对照增产均超过15%^[18]。但受制于亲本来源和数量的限制, 杂种优势还未能充分发挥, 近年来品种审定试验中的增产幅度均不足10%。

1.3 CMS-N型不育系的发现及利用

1995年, Gai等^[19]发现杂交组合N8855×N2899的F₁高度不育, 经反复验证和正反交试验, 确认N8855携带不育细胞质。随后, Ding等^[20]通过杂交组合N8855×N2899的F₁与回交亲本N2899的多代回交获得了细胞质雄性不育系NJCMS1A和配套保持系NJCMS1B。由于N8855贡献了细胞质基因, 因此该不育系被称为CMS-N8855。2006年, Zhao等^[21]通过N21566和N21249杂交获得不育系NJCMS3A和配套保持系NJCMS3B, 该不育系的细胞学特征与CMS-N8855型不同, 因此将其命名为CMS-N21566。2017年, Nie等^[22]从N23661×N23658的杂交组合中获得不育系NJCMS4A, 线粒体标记和基因组序列分析表明, N23661雄性不育细胞质与CMS-RN、CMS-ZD、CMS-N8855和CMS-N21566均不相同, 因此被命名为CMS-N23661。2021年, 首个利用CMS-N型不育系NJCMS3A为母本的大豆杂交种晋豆51号由山西农业大学(山西省农业科学院)育成^[23], 该品种在区域试验和生产试验中均较对照增产12%以上, 适宜在山西省大豆春播中晚熟区和南部夏播区种植。

2 大豆细胞质雄性不育的遗传与分子机制

细胞质雄性不育可分为孢子体不育和配子体不育两种类型。孢子体不育的育性受孢子体即植株本身的基因型控制, 与花粉基因型无关。败育多发生在四分体时期至单核花粉时期, 败育时期较

早。若以孢子体不育胞质为母本, 含1对恢复基因的恢复系为父本, 其F₁植株全部表现为可育, F₂中可育株和不育株的分离比为3:1, 符合孟德尔遗传分离规律^[24]。孢子体不育类型的不育性状稳定, 不育系的育性不易受外界环境条件影响。常见作物中, 玉米CMS-T型和CMS-C型^[25-26]、水稻CMS-WA型^[27]、小麦CMS-T型和CMS-V型^[28-29]、油菜CMS-Pol型^[30]和CMS-Ogura型^[31-32]等均为孢子体不育。配子体不育类型的育性受雄配子即花粉的基因型控制, 败育时期晚于孢子体不育类型, 多发生在雄配子体发育时期。若以配子体不育胞质为母本, 含1对恢复基因的恢复系为父本, 其F₁植株全部表现为半不育但可正常结实, F₂中可育株和半不育株的分离比为1:1, 不产生完全不育株^[24]。配子体不育类型的不育性状稳定性较差, 对外界环境条件反应敏感。玉米CMS-S型^[25-26]、水稻CMS-HL型^[33]和玉米CMS-BT型^[34]、小麦CMS-K型^[29]等均为此类型不育。在大豆中同样发现了上述两种不育类型。

2.1 大豆细胞质雄性不育的遗传分析

赵丽梅^[35]组配了167×YB、YA×167、YA×Y12R、ZD8319×ZB和ZA×ZD8319五个杂交组合, 发现所有组合的F₁花粉均表现为半不育, 这是单基因配子体不育的典型特征之一。进一步通过对以上组合F₂群体的育性分离结果进行调查, 并对5个三交组合YA×(167×YB)、YA×(YB×167)、(YA×167)×YB、ZA×(ZD8319×ZB)和ZA×(ZB×ZD8319)的F₁进行育性统计, 证明 rf (restorer-of-fertility)基因位点不能通过雄配子传递, 这是配子体不育的另一个典型遗传特征, 根据上述结果, 确定CMS-RN型和CMS-ZD型大豆细胞质雄性不育系为单基因配子体不育。Bai等^[36]对CMS-N8855型不育系进行遗传分析, 发现不育系NJCMS1A及其恢复系杂交获得的F₁表现为可育; 杂交组合NJCMS1A×N23601和NJCMS1A×N23683的F₂群体中可育株数和不育株数的分离比为15:1, 两个杂交组合的F_{2,3}中非分离系、3:1分离系和15:1分离系的数目符合7:4:4的基因型分离比, 且NJCMS1A和NJCMS1B的BC₁F₁群体呈现出3:1的分离比, 由此推断, 不育系NJCMS1A为孢子体不育, 其育性恢复由2对重复显性基因控制。Zhao等^[21]对CMS-N21566型不育系NJCMS3A及其恢复系NJCMS3B后代的花粉萌发率进行统计, 发现其F₁的花粉萌发率约为恢复系的一半(75.6%~95.7%); F₂和F_{2,3}植株除个别杂交年份有个别例外外, 基本表现为可育; 3个F₁(NJCMS3A×恢

复系)×NJCMS3B杂交获得的F₁群体育性分离比符合1:1,其对应的雄性可育F_{1,2}衍生系均表现为可育。由此推断,NJCMS3A的细胞质为配子体不育类型。

2.2 大豆细胞质雄性不育的分子机制

细胞质雄性不育是质核基因相互作用的结果,特定的细胞核基因处于对应的细胞质环境下即可产生不育。目前在水稻^[37]、油菜^[38]和玉米^[39-40]等许多作物中均有细胞质雄性不育基因被克隆鉴定。大豆细胞质雄性不育分子机制研究起步较晚,但得益于组学技术的快速发展,已在基因组、转录组、蛋白组、代谢组、非编码RNA及DNA甲基化等方面开展了多维度的研究。

2.2.1 CMS-RN型不育机制研究

早期研究人员主要开展CMS-RN型不育系和保持系的分子标记多态性分析,以期找到二者差异片段,挖掘不育候选基因。于铁^[41]运用扩增片段长度多态性(AFLP, amplified fragment length polymorphism)分子标记对CMS-RN型不育系及保持系进行分析,获得7条可能与细胞质雄性不育相关的条带。唐月异^[42]应用21对随机扩增片段长度多态性DNA(RAPD, randomly amplified polymorphic DNA)分子标记对CMS-RN型不育系及其对应保持系的线粒体DNA(mtDNA)进行多态性分析,构建了不育系及保持系线粒体DNA指纹图谱,找到了不育系与保持系线粒体基因组间的差异,并且采用24个RAPD引物成功将不育系与保持系完全区分。黄福龙^[43]以62对CMS-RN型不育系及相应保持系为材料,采用RAPD分子标记对mtDNA进行多态性分析,推测大豆线粒体基因组中*CoxI*基因编码区上游一段71 bp特异序列的插入可能是导致大豆细胞质雄性不育的原因之一。刘海军等^[44]以不育系JLCMS9A及其对应的保持系JLCMS9B为材料,比较了大豆线粒体基因*atp1*、*atp6*、*atp9*、*coxII*、*coxIII*和*cob*的编辑位点与细胞质雄性不育的关系,结果表明仅*atp6*在JLCMS9A中比JLCMS9B多3个编辑位点,其中2个位点导致了氨基酸变化,导致预测的蛋白结构发生变化;推测这种改变很可能影响JLCMS9A中*atp6*基因的正常功能,引起细胞质雄性不育。Lin等^[45]同样利用不育系JLCMS9A及其保持系JLCMS9B进行了叶绿体基因组测序和比较分析,并开发4个分子标记,可以区分CMS-RN型可育和不育细胞质。在此基础上,林春晶等^[46]还发现了不育系JLCMS9A叶绿体基因组中特有的位于基因区和

非编码区的SNP,推测不育系叶绿体*matK*基因中的SNP可能会对大豆育性产生影响。

不仅在分子遗传层面,表观遗传层面的差异同样可能对细胞质雄性不育产生影响^[47-48]。Lin等^[49]对3个不同细胞质来源且具有相同核背景的不育系JLCMS9A、JLCMSZ9A和JLCMSPI9A及其同型保持系JLCMS9B的细胞核甲基化水平进行分析,发现保持系的胞嘧啶甲基化水平低于不育系,且不育系和保持系差异甲基化区的相关基因和启动子区域的数量明显不同,认为不同细胞质类型对DNA甲基化的影响有显著差异。Zhang等^[50]鉴定了CMS-RN型不育系JLCMS9A及其保持系JLCMS9B中的miRNAs及其靶点,并利用RNA-seq数据鉴定了生殖发育过程中的差异表达基因,发现不育系与保持系之间存在差异表达的靶基因具有转录调控、分生组织维持、分生组织发生、细胞分化、生长素信号激活、胚珠发育和花药发育等功能,其中*miR169*可能通过调节相关基因的表达参与大豆细胞质雄性不育调控网络。Bai等^[51]对不育系SXCMS5A和其保持系SXCMS5B进行了转录组分析,发现线粒体基因组基因*ORF178*和*ORF103c*在不育系中上调表达,并具有跨膜结构域,可能是SXCMS5A的细胞质雄性不育候选基因。

2.2.2 CMS-ZD型不育机制研究

CMS-ZD型不育机制的研究较少,陈培等^[52-53]对不育系W931A及其保持系W931B的差异蛋白质进行比较分析,认为雄性不育基因表达具有时空和器官特异性,与育性有关的蛋白主要在花药中表达;推测不育可能与淀粉合成受抑制、能量代谢紊乱和细胞凋亡有关。Wang等^[54]对不育系W931A及其保持系W931B的单核小孢子和双核花粉时期的花药进行了细胞学、转录组学和蛋白质组学的比较分析,发现不育系W931A花粉粒萎缩或降解,内皮层不规则增厚,淀粉积累减少;获得了差异表达基因和差异表达蛋白,认为这些基因和蛋白的下调表达可能导致了W931A的败育。

2.2.3 CMS-N型不育机制研究

CMS-N型的不育机制研究比较全面,在基因组、转录组、蛋白组和代谢组等多个层面上均有相关报道。早期研究人员从线粒体基因入手,韩利涛等^[55]对不育系NJCMS1A及其保持系NJCMS1B *atp6*基因的RNA编辑进行研究,结果发现*atp6-1*、*atp6-2*和*atp6-3*的表达在不育系与保持系间均存在明显差异,这可能引起整个ATP亚基6结构和功能的变化,ATP合成

酶的功能受到影响,从而导致不育系中的能量供应比保持系中少而引起雄性不育。Jiang等^[56]从不育系 NJCMS2A 及其保持系 NJCMS2B 中克隆出 1 个与能量供应密切相关的线粒体功能基因 *Atp9*, 发现不育系的 *Atp9* 基因未检测到 RNA 编辑, 而在保持系中检测到 *Atp9* 基因保守区 2 个核苷酸位点(C 到 U)的 RNA 编辑, 这导致亲水性丝氨酸转化为疏水性亮氨酸, 认为 NJCMS2A 中没有 RNA 编辑导致 *Atp9* 功能不全, 引起 ATP 合酶功能障碍, 从而导致雄性不育。He 等^[57]利用 2 个不育系(NJCMS1A 和 NJCMS4A)和 3 个保持系(NJCMS1B、NJCMS4B 和 NJCMS5B)进行线粒体测序, 比较分析表明不育系与保持系线粒体基因组序列长度和重复拷贝数存在差异。不育系的线粒体基因组较保持系小, 基因高度保守, 保守序列和独特序列在基因组中共存; 其中, *orf178* 和 *orf261* 具有其他作物中报道的不育基因的序列特征, 可以在细胞质雄性不育系中转录, 但不能在保持系中转录, 推测它们可能是细胞质雄性不育的候选基因。

在转录水平上, Li 等^[58]对大豆细胞质雄性不育系 NJCMS1A 及其近等基因保持系 NJCMS1B 进行转录组分析, 认为其不育可能与参与碳水化合物和能量代谢、转录因子、花粉发育调控、活性氧(ROS, reactive oxygen species)消除、细胞信号转导和程序性细胞死亡(PCD, programmed cell death)等关键基因的功能和代谢途径受到干扰有关。在蛋白及代谢水平上, 曾维英等^[59-60]对不育系 NJCMS1A、NJCMS2A 及它们的保持系 NJCMS1B、NJCMS2B 的二胞花粉期花药进行差异蛋白质组学研究, 推测不育系 NJCMS1A 雄性不育性可能与能量代谢紊乱、细胞程序化死亡、乙烯过度合成、淀粉合成受抑制和花器官发育调节基因作用失控等有关。杨龙树等^[61]对不育系 NJCMS1A 及其保持系 NJCMS1B 的生理生化特性进行比较分析, 推测与能量代谢或胁迫响应等相关的物质或酶活性在不育系 NJCMS1A 中的亏损现象可能是 NJCMS1A 花粉败育的主要原因。Ding 等^[62]比较了大豆 N8855 来源的不育系及其保持系的花蕾代谢物含量和抗氧化酶活性, 认为该类型不育系中缺乏酶促和非酶促活性氧清除系统, 不能有效清除花药中的活性氧, 活性氧的过度积累引发细胞程序性死亡, 最终导致花粉败育。

在表观遗传水平上, CMS-N 型同样开展了大量不育机制的研究。在 DNA 甲基化方面, Li 等^[63]获

得了大豆不育系 NJCMS5A 及其保持系 NJCMS5B 的全基因组 DNA 甲基化谱, 并进一步鉴定了 8 个参与花粉和花发育的特异性差异甲基化基因(DMGs, differentially methylated genes), 认为它们可能与大豆细胞质雄性不育有关。Han 等^[64]比较了不育系 NJCMS1A 及其保持系 NJCMS1B 的全基因组 DNA 甲基化, 认为 NJCMS1A 的不育可能与 DNA 甲基化改变和一些关键 DMGs 代谢途径紊乱有关, 涉及碳水化合物和能量代谢、转录调控、雄配子体发育、线粒体编码蛋白等。在非编码 RNA 方面, Chen 等^[65]发现不育系 NJCMS1A 及其保持系 NJCMS1B 花蕾中的差异环状 RNA(circRNAs)主要参与代谢、生物调控和生殖等生物学过程, 与花粉发育和雄性育性密切相关。Ding 等^[66-68]首次鉴定了不育系 NJCMS1A 及其保持系 NJCMS1B 花蕾中的小 RNA(miRNAs)及其靶点, 认为 miRNAs 与其靶点之间存在一定的相互作用, 可能会影响花蕾或花粉的发育。随后, 通过小 RNA 测序、转录组和 qRT-PCR 比较分析, 构建了 *gma-miR156b/GmSPL9* 和 *gma-miR4413b/GmPPR* 对大豆细胞质雄性不育花苞发育的调控网络, 推测 miR156/SPL 模块可能作为 *LBD22*、*LBD36*、*AGL30* 和 *AGL104* 的上游调控基因调控大豆花器官发育。Ding 等^[69]对 *gma-miR2119b* 及其靶基因 *GmADH1.3b* 进行了鉴定, 发现其在大豆不育系及其保持系花蕾中高表达; 过表达 *gma-miR2119b* 的转基因拟南芥植株表现出花粉育性和发芽率下降, 推测 *gma-miR2119b* 通过调控 *ADH1*、高温诱导和 ROS 消除基因的表达, 对雄性育性起到负调控作用。

3 大豆细胞质雄性不育育性恢复基因的研究

在植物进化过程中, 恢复基因和不育基因是相辅相成的。根据两者的关系, 不育基因能够被多个恢复(*Rf*, restorer-of-fertility)基因恢复, 而 *Rf* 基因只能作用于不育基因, 这有利于植物的进化和生存。因此, 明确大豆细胞质雄性不育育性恢复基因的类型及数量是选育强恢复力恢复系的前提。

3.1 CMS-RN 型恢复基因的定位和克隆

CMS-RN 是世界上第一个被发现的大豆细胞质雄性不育胞质类型, 属于典型的配子体不育, 可育为显性性状, 仅 1 对显性 *Rf* 基因即可调控细胞质雄性不育性恢复。赵丽梅等^[70]以 CMS-RN 型不育系 JLCMS82A 和恢复系 JLR1 杂交构建的 F₂ 分离群

体为材料,首次获得了与 *Rf* 基因紧密连锁的 SSR 标记 Satt547, 遗传距离为 7.56 cM, 将恢复基因定位于 16 号染色体。随后, Wang 等^[71] 利用该群体的 103 个单株将 *Rf* 基因进一步限定在标记 Scct011 和 Satt547 之间, 遗传距离分别为 3.6 cM 和 5.4 cM。郭凤兰等^[72] 将 *Rf* 基因精细定位在 16 号染色体上的 dCAPS-1 和 BARCSOYSSR_16_1076 标记之间, 遗传距离分别为 0.1 cM 和 0.3 cM, 命名为 *Rf1*。杨绪磊等^[73] 对上述区间内的候选基因进行鉴定, 明确了 1 个编码 576 个氨基酸的 PPR 蛋白家族成员, 即为 CMS-RN 型育性恢复基因 *Rf1*。另外, 贾顺耕等^[74] 对以 CMS-RN 型不育系 JLCMS82A 为母本和恢复系 JLR1 为父本构建的 F₂ 分离群体进行集群分离分析法 (BSA, bulked segregant analysis) 测序和分子标记定位, 发现了 1 个 CMS-RN 胞质的新恢复基因位点 *Rf3*, 将其定位于第 9 号染色体的分子标记 BARCSOYSSR_09_1151 和 BARCSOYSSR_09_1183 之间。Sun 等^[75] 进一步将 *Rf3* 基因精细定位至标记 dCAPs09-2 和 SSR1170 之间的 86.44 Kb 范围内, 其中 *Glyma.09G171200* 基因编码 PPR 蛋白并定位于线粒体, 与已克隆的其他作物多数 *Rf* 基因特征相符, 推测其为 *Rf3* 基因。

3.2 CMS-ZD 型恢复基因的定位和克隆

CMS-ZD 型也属于配子体不育类型。汤复跃等^[76-77] 以不育系 W931A 和恢复系 WR016 构建的 F₂ 分离群体为材料, 利用集群分离分析法结合 SSR 标记技术将 CMS-ZD 型 *Rf* 基因定位在第 5 号染色体上的 Satt276 和 Satt545 标记之间, 遗传距离分别为 10.7 cM 和 14.1 cM。Dong 等^[78] 利用不育系 FuCMS5A 和恢复系 FuHui9 杂交获得的 F₂ 群体建立了高密度遗传连锁图谱, 将 *Rf* 基因定位在 16 号染色体连锁标记 BARCSOYSSR_16_1064 和 BARCSOYSSR_16_1082 之间, 遗传距离分别为 0.59 cM 和 0.83 cM。随后, Wang 等^[79] 对汤复跃等^[76-77] 的定位结果进行了修正, 利用 W931A×WR016 构建的 F₂ 分离群体, 将 *Rf* 基因定位在 16 号染色体, 命名为 *Rf-m*, 并获得了 *Rf-m* 两侧最近的标记 GmSSR1602 和 GmSSR1610, 遗传距离分别为 0.11 cM 和 0.25 cM, 物理距离为 162.4 kb, 区间内包含 19 个开放阅读框 (ORF, open reading frame), 其中 7 个属于 PPR 家族基因。Wang 等^[80] 还对上述基因进行了 qRT-PCR 分析, 推测 *Glyma.16G161900* 可能为 *Rf-m* 的候选基因。

3.3 CMS-N 型恢复基因的定位和克隆

Yang 等^[81] 以母本 NJCMS1A 和父本中豆 5 号杂

交获得的 F₂ 群体为定位材料, 从 664 对 SSR 引物中筛选到 2 个与目标基因连锁的多态性标记, 分别为位于第 5 号染色体上的 Satt300 和位于第 7 号染色体上的 Satt626, 与目标基因的遗传距离分别为 11.18 cM 和 9.75 cM。董建生等^[82] 发现中豆 5 号中含有 2 对存在叠加效应的 *Rf* 基因, 并以母本 NJCMS2A 和父本中豆 5 号杂交获得的 F₂ 群体为材料, 从 903 对 SSR 引物中筛选获得 1 个 SSR 连锁标记 Satt135, 与目标基因的遗传距离为 11.47 cM, 该标记位于 17 号染色体。李曙光等^[83] 以 N21566×N21249 杂交获得的 F₂ 群体为定位材料, 在 10 号染色体上获得 1 个 *Rf* 基因位点, 并将其定位在标记 Satt311 和 Satt477 之间, 遗传距离分别为 10.4 cM 和 19.2 cM。陶银^[84] 以不育系 NJCMS1A 为母本、恢复系南农 19-15 为父本构建 F₂ 分离群体, 将 *Rf* 基因定位在第 3 号染色体上标记 Sat_084 和 Sat_208 之间, 两标记间的遗传距离为 2.9 cM, 物理距离为 11.5 Mb。Wang 等^[85] 以 NJCMS1A 与恢复系 NJCMS1C 杂交获得的 F₂ 分离群体为材料, 将 *Rf* 基因定位在 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, 并通过基因敲除及其他生化分析, 认为 *GmPPR576* 即为 *Rf* 基因, 该基因与 CMS-RN 型恢复基因 *Rf1* 为同一个基因。

3.4 大豆细胞质雄性不育恢复抑制基因的发现

研究人员在利用大豆 CMS/*Rf* 系统配制杂交组合时发现, 部分拥有优良性状的不育系与恢复系杂交后, 其杂种 F₁ 的育性不能被 *Rf* 基因恢复, 出现 F₁ 高度不育的现象。因此, 认为在大豆细胞质雄性不育系中可能存在影响育性恢复的抑制基因^[86]。李永宽等^[87] 以可能存在抑制基因的大豆 CMS-RN 型不育系 JLCMS89A 与恢复系 JLR92 为亲本, 利用其 F₁ 和 BC₁ 群体对恢复抑制基因位点进行遗传分析, 发现恢复抑制性状受存在于不育系核基因组中的显性单基因控制, 将该基因位点命名为 *Rf-I*。同时以 BC₁ 群体为定位材料, 利用 BSA-Seq 和 SSR 分子标记分析, 将 *Rf-I* 位点初步定位于第 9 号染色体 38.387 Mb~39.890 Mb 区间内。*Rf-I* 基因的发现对利用大豆 CMS/*Rf* 系统进行杂交组合的有效配制具有指导作用。

4 展望

目前关于大豆细胞质雄性不育的遗传基础和育种应用都取得了显著的进展, 但与玉米、水稻、小

麦、油菜等作物相比,仍存在一定差距。丰富的亲本资源是基于细胞质雄性不育开展三系杂交育种的基础,这其中母本不育系和杂种 F_1 的育性稳定性至关重要。目前已发现的大豆细胞质雄性不育胞质中仅N8855型为孢子体不育^[36],RN型、ZD型和N21566型均为配子体不育^[21,35],而配子体不育的育性易受环境影响,在极端情况下有减产风险。因此,挖掘更多的孢子体不育类型材料,对于杂交大豆三系法育种具有重要的现实意义。此外,不育系异交结实率在杂交制种中起着重要作用,高异交率大豆细胞质雄性不育系将有效降低其繁种和杂交制种的生产成本。目前研究认为,大豆的异交率与多方面因素相关,Zhang等^[88]发现花蜜分泌量与异交率呈极显著正相关;Yan等^[89]认为农艺性状与异交率相关,发现株枝数较少、开花时间较早、枝与主茎夹角较大、植株形态分化较大的植株异交率最高;Lin等^[90]认为类黄酮生物合成途径可能间接影响大豆细胞质雄性不育系的异交率;李蓉等^[91]在参与类黄酮生物合成途径的差异表达基因中筛选到影响花色的基因*FLS1*,推测除了类黄酮生物合成代谢相关基因外,花色也会影响昆虫对花粉的传播,从而影响异交率。因此在今后大豆细胞质雄性不育系选育过程中应同时兼顾提高异交率。

父本恢复系恢复能力的强弱直接影响杂种 F_1 的育性稳定性。保证杂种 F_1 可育的前提是恢复系中的恢复基因类型及数量。目前,在大豆中仅有恢复基因*Rf1*(*PPR576*)被图位克隆和鉴定^[73,85],然而该基因恢复能力中等,含有*Rf1*基因的恢复系,无法单独恢复所有不育系。因此,挖掘新型恢复基因并创制多个恢复基因聚合的强恢复力恢复系是实现杂交大豆规模化稳定应用的另一重要基础。另外,三系亲本的规模和遗传进度同样制约着大豆杂种优势潜力的充分挖掘。目前,育种家除了利用国内外优异资源及品种进行广泛测交筛选恢复系和保持系外,还利用恢×恢、保×保、恢×优异材料及保×优异材料等多种方式,进行三系改良与创新,以提高亲本的遗传进度和遗传多样性。同时开展了大豆杂种优势群的研究,将已有的核心亲本划分为2大类群和4个亚群^[92],这不仅为优异三系亲本的创制指明了方向,还为强优势杂交组合的选配及产量优势预测提供了理论指导。

近年来,随着生物技术领域的不断突破,有望加速三系法育种技术的创新,尤其是基因编辑和单倍体诱导技术在其中表现出众。2019年,Kazama

等^[93]利用靶向线粒体的TALEN技术(mitoTALEN)分别敲除了水稻和油菜细胞质雄性不育材料中的特定线粒体基因,恢复了它们的育性;通过自交以及和其他品种的正、反杂交,证明了修饰过的线粒体基因组可通过母系遗传的方式传递到下一代。2023年,Forner等^[94]同样利用TALEN技术敲除了烟草线粒体呼吸链复合物I的*nad9*基因,发现敲除突变株表现出不育表型,证明了使用核基因组编辑方法研究线粒体基因功能的可行性,也为工程化创制细胞质雄性不育系提供了重要的基础。另外,Law等^[95]还通过整合碳纳米管技术、Cytcox线粒体靶向序列和KH9阳离子肽,建立了植物线粒体的DNA递送系统,实现了线粒体基因组的直接稳定转化,这同样为新型细胞质雄性不育系的创制提供了路径。2020年,Lv等^[96]创新性地设计了一对gRNA,只在着丝粒组蛋白CENH3 N端引入回码突变,实现了7%的小麦父本单倍体诱导率;基于父本单倍体技术开发了一步胞质不育系转育技术,可以将细胞质雄性不育系创制从原来需要的3年时间(7代)缩短到1年时间(2代)内。近日,Wang等^[97]在大豆中同样发现1个单拷贝的功能性CENH3蛋白,并发现其缺失对基因组稳定性的影响与保守甘氨酸位点以及亲本遗传背景有关,证明了大豆中*CENH3*的敲除具有诱导染色体消除的潜力,这为基于大豆*CENH3*基因的单倍体诱导系快速创制细胞质雄性不育系提供了可能。以上述新兴生物育种技术为基础,基于细胞质雄性不育的遗传基础与育种应用将被推向一个崭新的阶段和更高的水平,从而加速杂交大豆产业化应用进程。

参考文献

- [1] 国家统计局. 年度数据. [2024-01-12]. <https://data.stats.gov.cn/easyquery.htm?cn=C01>
National Bureau of Statistics. National data. [2024-01-12]. <https://data.stats.gov.cn/easyquery.htm?cn=C01>
- [2] Palmer R G, Gai J Y, Sun H, Burton J W. Production and evaluation of hybrid soybean. *Plant Breeding Review*, 2001, 21:263-307
- [3] 王曙明, 孙寰, 王跃强, 赵丽梅, 李楠, 付连舜, 李卫东, 齐宁, 邢邯, 李磊. 大豆杂种优势及其高优势组合选配的研究 I. F_1 代子粒产量的杂种优势与高优势组合选配. *大豆科学*, 2002, 21(3):161-167
Wang S M, Sun H, Wang Y Q, Zhao L M, Li N, Fu L S, Li W D, Qi N, Xing H, Li L. Research on soybean heterosis and selection of high heterosis combinations I. The selection of hybrid and high heterosis combinations for F_1 generation grain

- yield. *Soybean Science*, 2002, 21(3):161-167
- [4] Sun H, Zhao L M, Huang M. Studies on cytoplasmic-nuclear male sterile soybeans. *Chinese Science Bulletin*, 1994, 38: 175-176
- [5] 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, Huang M, Li J P. Breeding report of soybean hybrid No. 1. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2004, 26(3):15-17
- [6] Rhoades M. Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays*. *Science*, 1931, 73:340-341
- [7] Sampath S, Mohanty H. Cytology of semi-sterile rice hybrids. *Current Science*, 1954, 23:182-183
- [8] Ogura H. Studies on the new male sterility in Japanese Radish with special references to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seed. *Memoirs of the Faculty of Agriculture Kagoshima University*, 1968, 6(2): 39-78
- [9] Bradner N R. Hybrid soybean production. USA Patent, 3903645, 1975-09-09
- [10] Bradner N R. Hybridization of soybean via the leaf-cutter bee. USA Patent, 4077157, 1978-03-07
- [11] Davis W H. Route to hybrid soybean production. USA Patent, 4545146, 1985-10-08
- [12] Davis W H. Process for forming seeds capable of growing hybrid soybean plants. USA Patent, 4648204, 1987-03-10
- [13] Davis W H. Process for forming substantially uniform seed assemblages capable of growing F₁ hybrid and restorer soybean plants. USA Patent, 4763441, 1988-08-16
- [14] Peng Y H, Yang G, Yuan J. Genetic analysis of a new type of a male-sterile soybean // Banpot Napompeth. World soybean research conference V abstract. Bangkok, Thailand: Funny Publishing Limited Partnership, 1994: 90
- [15] 李磊, 杨庆芳, 胡亚敏, 祝利海, 葛浩新. 栽培大豆双亲基因互作型不育材料的发现及其遗传推断. *安徽农业科学*, 1995, 23(4): 304-306
Li L, Yang Q F, Hu Y M, Zhu L H, Ge H X. Discovery and genetic inference of parent-gene interaction type sterility materials in cultivated soybean. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 1995, 23(4):304-306
- [16] 赵丽梅, 孙寰, 黄梅. 大豆细胞质雄性不育系ZA的选育和初步研究. *大豆科学*, 1998, 17(3):268-270
Zhao L M, Sun H, Huang M. The development and preliminary studies on cytoplasmic male sterile soybean line ZA. *Soybean Science*, 1998, 17(3): 268-270
- [17] 张磊, 戴瓯和, 黄志平, 李杰坤. 大豆质核互作M型雄性不育系的选育及其育性表现. *中国农业科学*, 1999, 32(4): 34-38
Zhang L, Dai O H, Huang Z P, Li J K. Selection of soybean male sterile line of nucleo-cytoplasmic interaction and its fertility. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32(4):34-38
- [18] 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, 175(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, 175(6):26-35
- [19] Gai J Y, Cui Z L, Ji D F, Ren Z J, Ding D R. A report on the nuclear cytoplasmic male sterility from a cross between two soybean cultivars. *Soybean Newsletter*, 1995, 22:55-58
- [20] Ding D, Gai J, Cui Z, Qiu J. Development of a cytoplasmic-nuclear male-sterile line of soybean. *Euphytica*, 2002, 124: 85-91
- [21] Zhao T J, Gai J Y. Discovery of new male-sterile cytoplasm sources and development of a new cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS3A in soybean. *Euphytica*, 2006, 152: 387-396
- [22] Nie Z, Zhao T, Yang S, Gai J, Singh R. Development of a cytoplasmic male - sterile line NJCMS4A for hybrid soybean production. *Plant Breeding*, 2017, 136(4): 516-525
- [23] Fang X, Sun Y, Li J, Li M, Zhang C. Male sterility and hybrid breeding in soybean. *Molecular Breeding*, 2023, 43:47
- [24] 周天理. 第二讲 孢子体不育和配子体不育. *福建农业科技*, 1986, 5:33-34
Zhou T L. Sporophytic sterility and gametophytic sterility. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 1986, 5:33-34
- [25] 郑用璠. 若干玉米细胞质雄性不育类型(CMS)育性机理的研究. *华中农学院学报*, 1982, 1:44-68
Zheng Y L. Study on the mechanism of the fertility about several types of cytoplasmic male-sterility in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Huazhong Agricultural College*, 1982, 1:44-68
- [26] 张怀胜, 张晓祥, 王平喜, 进茜宁, 吴向远. 玉米细胞质雄性不育与恢复基因研究进展. *广东农业科学*, 2022, 49(5):1-9
Zhang H H, Zhang X X, Wang P X, Jin X N, Wu X Y. Research advances on cytoplasmic male sterility and restorer genes in maize. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2022, 49(5):1-9
- [27] 高明尉. 野败型杂交籼稻基因型的初步分析. *遗传学报*, 1981, 8(1):66-74
Gao M W. A preliminary analysis of the genotypes of hybrid shen rice with wild rice cytoplasm. *Acta Genetica Sinica*, 1981, 8(1):66-74
- [28] Wilson J, Ross W. Male sterility interaction of the *Triticum aestivum* nucleus and *Triticum timopheevi* cytoplasm. *Wheat Information Service*, 1962, 14:29-30
- [29] Mukai Y, Tsunewaki K. Basic studies on hybrid wheat breeding: VIII. A new male sterility fertility restoration system in common wheat utilizing the cytoplasm of *Aegilops kotschy* and *Aegilops variabilis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1979, 54:153-160
- [30] Singh M, Brown G G. Characterization of expression of a mitochondrial gene region associated with the *Brassica* "Polima" CMS: Developmental influences. *Current Genetics*, 1993, 24:316-322
- [31] Bannerot H, Boulidard L, Cauderon Y, Tempe J. Transfer of

- cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to *Brassica oleracea*. Proceedings of the Eucarpia Meeting on Cruciferae, 1974, 25:52-54
- [32] Kirti P B, Banga S S, Prakash S, Chopra V L. Transfer of *Ogu* cytoplasmic male sterility to *Brassica juncea* and improvement of the male sterile line through somatic cell fusion. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91:517-521
- [33] Liu X, Xu X, Tan Y, Li S, Hu J, Huang J, Yang D, Li Y, Zhu Y. Inheritance and molecular mapping of two fertility-restoring loci for Honglian gametophytic cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.). Molecular Genetics & Genomics, 2004, 271(5):586
- [34] Shinjyo C. Cytoplasmic-genetic male sterility in cultivated rice, *Oryza sativa* L. . The Japanese Journal of Genetics, 1969, 44(3):149-156
- [35] 赵丽梅. 大豆细胞质雄性不育的遗传和分子基础研究. 长春: 东北师范大学, 2005
Zhao L M. Genetic and molecular basis of the cytoplasmic male sterility in soybean. Changchun: Northeast Normal University, 2005
- [36] Bai Y N, Gai J Y. Inheritance of male fertility restoration of the cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS1A of soybean [*Glycine max* (L) Merr.]. Euphytica, 2005, 145:25-32
- [37] Wang K, Peng X, Ji Y, Yang P, Zhu Y, Li S. Gene, protein, and network of male sterility in rice. Frontiers in Plant Science, 2013, 4:1-10
- [38] Wang B, Farooq Z, Chu L, Liu J, Wang H, Guo J, Tu J, Ma C, Dai C, Wen J, Shen J, Fu T, Yi B. High-generation near-isogenic lines combined with multi-omics to study the mechanism of polima cytoplasmic male sterility. BMC Plant Biology, 2021, 21:130
- [39] Yang H, Xue Y, Li B, Lin Y, Li H, Guo Z, Li W, Fu Z, Ding D, Tang J. The chimeric gene *atp6c* confers cytoplasmic male sterility in maize by impairing the assembly of the mitochondrial ATP synthase complex. Molecular Plant, 2022, 15(5):872-886
- [40] Xiao S, Zang J, Pei Y, Liu J, Liu J, Song W, Shi Z, Su A, Zhao J, Chen H. Activation of mitochondrial *orf355* gene expression by a nuclear-encoded DREB transcription factor causes cytoplasmic male sterility in maize. Molecular Plant, 2020, 13(9):1270-1283
- [41] 于铁. 大豆细胞质雄性不育系与保持系线粒体DNA的APLP分析. 长春: 吉林农业大学, 2005
Yu T. AFLP analysis on mitochondrial DNA of cytoplasmic male sterilities and its holdings. Changchun: Jilin Agricultural University, 2005
- [42] 唐月昇. 大豆不育系及保持系线粒体DNA指纹图谱的构建. 长春: 吉林农业大学, 2006
Tang Y Y. Establishment of mtDNA fingerprinting of CMS lines and maintainer lines of soybean by RAPD. Changchun: Jilin Agricultural University, 2006
- [43] 黄福龙. 大豆(*Glycine max*)细胞质雄性不育系线粒体基因组的RAPD分析. 长春: 东北师范大学, 2007
Huang F L. RAPD analysis of soybean cytoplasmic male sterility mitochondrial genome. Changchun: Northeast Normal University, 2007
- [44] 刘海军, 赵丽梅, 董英山, 石瑛, 张春宝. 大豆细胞质雄性不育系及其保持系线粒体基因的RNA编辑位点研究. 分子植物育种, 2014, 12(4):694-700
Liu H J, Zhao L M, Dong Y S, Shi Y, Zhang C B. RNA editing analysis of mitochondrial gene in cytoplasmic male sterile line and maintainer line in soybean. Molecular Plant Breeding, 2014, 12(4):694-700
- [45] Lin C, Zhang C, Zhao H, Xing S, Wang Y, Liu X, Yuan C, Zhao L, Dong Y. Sequencing of the chloroplast genomes of cytoplasmic male-sterile and male-fertile lines of soybean and identification of polymorphic markers. Plant Science, 2014, 229:208-214
- [46] 林春晶, 张春宝, 赵洪锟, 董英山, 赵丽梅. 同核异质大豆叶绿体DNA的SNP分析. 吉林农业大学学报, 2017, 39(2):134-138
Lin C J, Zhang C B, Zhao H K, Dong Y S, Zhao L M. SNP analysis of chloroplast DNA in isonuclear alloplasmic soybean. Journal of Jilin Agricultural University, 2017, 39(2):134-138
- [47] Fan Y, Yang J, Mathioni S M, Yu J, Shen J, Yang X, Wang L, Zhang Q, Cai Z, Xu C, Li X, Xiao J, Meyers B C, Zhang Q. *PMSIT*, producing phased small-interfering RNAs, regulates photoperiod-sensitive male sterility in rice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(52):15144-15149
- [48] Zhang M, Ma X, Wang C, Li Q, Meyers B C, Springer N M, Walbot V. CHH DNA methylation increases at 24-PHAS loci depend on 24-nt phased small interfering RNAs in maize meiotic anthers. New Phytologist, 2020, 229(5):2984-2997
- [49] Lin C J, Peng B, Li Y, Wang P N, Zhao G L, Ding X Y, Li R, Zhao L M, Zhang C B. Cytoplasm types affect DNA methylation among different cytoplasmic male sterility lines and their maintainer line in soybean (*Glycine max* L.). Plants, 2020, 9:385
- [50] Zhang C B, Fu F Y, Lin C J, Ding X Y, Zhang J Y, Yan H, Wang P N, Zhang W, Peng B, Zhao L M. MicroRNAs involved in regulatory cytoplasmic male sterility by analysis RNA-seq and small RNA-seq in soybean. Frontiers in Genetics, 2021, 12:654146
- [51] Bai Z, Ding X, Zhang R, Yang Y, Wei B, Yang S, Gai J. Transcriptome analysis reveals the genes related to pollen abortion in a cytoplasmic male-sterile soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(20):12227
- [52] 陈培, 张磊. 大豆质核互作雄性不育系W931A及其保持系不同器官的可溶性蛋白的电泳分析. 种子, 2009, 28(10):33-35
Chen P, Zhang L. Electrophoretic analysis of soluble proteins in different organs of soybean cytoplasmic nuclear interaction

- male sterile line W931A and its maintainer line. *Seed*, 2009, 28(10):33-35
- [53] 陈培, 张磊, 邱丽娟, 陆柏. 大豆质核互作雄性不育系 W931A 及其保持系的差异蛋白质组学比较分析. *作物杂志*, 2009(6):17-21
Chen P, Zhang L, Qiu L J, Lu B. Comparative analysis of differential proteomics between soybean cytoplasmic nuclear interaction male sterile line W931A and its maintainer line. *Crops*, 2009(6):17-21
- [54] Wang D, Wang Y, Zhang L, Yang Y, Wu Q, Hu G, Wang W, Li J, Huang Z. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of a cytoplasmic male sterility line and associated maintainer line in soybean. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14:1098125
- [55] 韩利涛, 杨守萍, 喻德跃, 盖钧镒. 大豆细胞质雄性不育系与保持系 *atp6* 基因的 RNA 编辑比较研究. *大豆科学*, 2010, 29(3):361-365
Han L T, Yang S P, Yu D Y, Gai J Y. Comparative study on RNA editing of ATP6 gene between soybean cytoplasmic male sterile line and maintaining line. *Soybean Science*, 2010, 29(3):361-365
- [56] Jiang W, Yang S, Yu D, Gai J. A comparative study of ATPase subunit 9 (*Atp9*) gene between cytoplasmic male sterile line and its maintainer line in soybeans. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(51):10387-10392
- [57] He T, Ding X, Zhang H, Li Y, Chen L, Wang T, Yang L, Nie Z, Song Q, Gai J, Yang S. Comparative analysis of mitochondrial genomes of soybean cytoplasmic male-sterile lines and their maintainer lines. *Functional and Integrative Genomics*, 2021, 21(1):43-57
- [58] Li J, Han S, Ding X, He T, Dai J, Yang S, Gai J. Comparative transcriptome analysis between the cytoplasmic male sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *PLoS ONE*, 2015, 10(5): e0126771
- [59] 曾维英, 杨守萍, 盖钧镒, 喻德跃. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 及其保持系的花药差异蛋白质组学研究. *中国农业科学*, 2007, 40(12):2679-2687
Zeng W Y, Yang S P, Gai J Y, Yu D Y. Differential proteomic analysis of anthers in soybean cytoplasmic nuclear interaction male sterile line NJCMS1A and its maintainer line. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(12):2679-2687
- [60] 曾维英, 杨守萍, 喻德跃, 盖钧镒. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS2A 及其保持系的花药蛋白质组比较研究. *作物学报*, 2007, 33(10):1637-1643
Zeng W Y, Yang S P, Yu D Y, Gai J Y. Comparative study on the anther proteome of soybean cytoplasmic nuclear interaction male sterile line NJCMS2A and its maintainer line. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(10):1637-1643
- [61] 杨龙树, 李佳佳, 贺亭亭, 丁先龙, 张浩, 韩少怀, 盖钧镒, 杨守萍. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 与其保持系 NJCMS1B 的生理生化特性比较分析. *大豆科学*, 2017, 36(3):391-398
Yang L S, Li J J, He T T, Ding X L, Zhang H, Han S H, Gai J Y, Yang S P. Comparative analysis of physiological and biochemical characteristics between soybean cytoplasmic nuclear interaction male sterile line NJCMS1A and its maintainer line NJCMS1B. *Soybean Science*, 2017, 36(3):391-398
- [62] Ding X, Wang X, Li Q, Yu L, Song Q, Gai J, Yang S. Metabolomics studies on cytoplasmic male sterility during flower bud development in soybean. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(12):2869
- [63] Li Y, Ding X, Wang X, He T, Zhang H, Yang L, Wang T, Chen L, Gai J, Yang S. Genome-wide comparative analysis of DNA methylation between soybean cytoplasmic male-sterile line NJCMS5A and its maintainer NJCMS5B. *BMC Genomics*, 2017, 18(1):596
- [64] Han S, Li Y, Li J, Zhang H, Ding X, He T, Gai J, Yang S. Genome-wide analysis of DNA methylation to identify genes and pathways associated with male sterility in soybean. *Molecular Breeding*, 2018, 38(10):118
- [65] Chen L, Ding X, Zhang H, He T, Li Y, Wang T, Li X, Jin L, Song Q, Yang S, Gai J. 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
- [66] Ding X, Li J, Zhang H, He T, Han S, Li Y, Yang S, Gai J. Identification of miRNAs and their targets by high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile line NJCMS1A and its maintainer NJCMS1B of soybean. *BMC Genomics*, 2016, 17:24
- [67] Ding X, Zhang H, Ruan H, Li Y, Chen L, Wang T, Jin L, Li X, Yang S, Gai J. Exploration of miRNA-mediated fertility regulation network of cytoplasmic male sterility during flower bud development in soybean. *3 Biotech*, 2019, 9(1):22
- [68] Ding X, Ruan H, Yu L, Li Q, Song Q, Yang S, Gai J. *miR156b* from soybean CMS line modulates floral organ development. *Journal of Plant Biology*, 2020, 63(2):141-153
- [69] Ding X, Chen L, Guo J, Gai J, Yang S. A small RNA of *miR2119b* from soybean CMS line acts as a negative regulator of male fertility in transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 167:210-221
- [70] 赵丽梅, 王玉民, 孙寰, 赵洪锟, 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, Peng B, Wang S M, Zhang W L, Dong Y S. Identification of SSR markers linked to the fertility restorer gene for the CMS in soybean. *Soybean Science*, 2007, 26(6):835-839
- [71] Wang Y, Zhao L, Wang X, Sun H. Molecular mapping of a fertility restorer gene for cytoplasmic male sterility in soybean. *Plant Breeding*, 2010, 129(1):9-12
- [72] 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
- [73] 杨绪磊, 郭凤兰, 高萌萌, 张泽东, 林春晶, 孙妍妍, 张井勇, 彭宝, 赵丽梅, 张春宝. 大豆 CMS-RN 型不育系育性恢复基因 *GmRf1* 的初步鉴定及其分子标记开发. 植物遗传资源学报, 2023, 24(4):1186-1193
- Yang X L, Guo F L, Gao M M, Zhang Z D, Lin C J, Sun Y Y, Zhang J Y, Peng B, Zhao L M, Zhang C B. Preliminary identification and molecular marker development of the restorer-of-fertility gene *GmRf1* in soybean CMS-RN type male sterile lines. Journal of Plant Genetic Resources, 2023, 24(4):1186-1193
- [74] 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
- [75] Sun Y, Zhang Y, Jia S, Lin C, Zhang J, Yan H, Peng B, Zhao L, Zhang W, Zhang C. 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
- [76] 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
- [77] 汤复跃, 张磊, 陈培, 陈渊, 梁江. 大豆 M 型细胞质雄性不育恢复基因标记定位. 大豆科学, 2009, 28(4):578-582
- Tang F Y, Zhang L, Chen P, Chen Y, Liang J. Mapping of markers for restoring M-type cytoplasmic male sterility in soybean. Soybean Science, 2009, 28(4):578-582
- [78] 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 (*Rf*) gene for the cytoplasmic male sterility in soybean. Plant Science, 2012, 188-189:36-40
- [79] Wang D, Zhang L, Li J, Hu G, Wu Q, Jiang H, Huang Z. 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
- [80] Wang D, Chen S, Li J, Wu Q, Hu G, Huang Z. Molecular cloning and expression analysis of the *Rf-m* candidate genes encoding pentatricopeptide repeat proteins in soybean. Oil Crop Science, 2021, 6(3):128-136
- [81] Yang S, Duan M, Meng Q, Qiu J, Fan J, Zhao T, Yu D, Gai J. Inheritance and gene tagging of male fertility restoration of cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS1A in soybean. Plant Breeding, 2007, 126(3):302-305
- [82] 董建生, 杨守萍, 喻德跃, 盖钧镒. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS2A 的育性恢复性遗传和育性恢复基因的 SSR 标记. 大豆科学, 2008, 27(2):181-185
- Dong J S, Yang S P, Yu D Y, Gai J Y. Inheritance of fertility restoration and SSR markers of fertility restoration genes in soybean cytoplasmic nuclear interaction male sterile line NJCMS2A. Soybean Science, 2008, 27(2):181-185
- [83] 李曙光, 赵团结, 盖钧镒. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS3A 双亲雄性育性基因的 SSR 标记. 作物学报, 2010, 36(7):1061-1066
- Li S G, Zhao T J, Gai J Y. SSR markers of parental male fertility genes in soybean cytoplasmic nuclear interaction male sterile line NJCMS3A. Acta Agronomica Sinica, 2010, 36(7):1061-1066
- [84] 陶银. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 育性恢复基因的 SSR 标记定位研究. 南京: 南京农业大学, 2012
- Tao Y. SSR marker mapping of fertility restoration genes in soybean cytoplasmic nuclear interaction male sterile line NJCMS1A. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [85] Wang T, He T, Ding X, Zhang Q, Yang L, Nie Z, Zhao T, Gai J, Yang S. Confirmation of *GmPPR576* as a fertility restorer gene of cytoplasmic male sterility in soybean. Journal of Experimental Botany, 2021, 72(22):7729-7742
- [86] 张井勇, 孙寰, 赵丽梅, 彭宝, 张伟龙, 李曙光, 赵晓明. 大豆 RN 不育胞质不育与恢复类型的研究. 大豆科学, 2010, 29(4):559-564
- Zhang J Y, Sun H, Zhao L M, Peng B, Zhang W L, Li S G, Zhao X M. A study on the cytoplasmic sterility and restoration types of soybean RN sterility. Soybean Science, 2010, 29(4):559-564
- [87] 李永宽, 张井勇, 赵国龙, 李蓉, 林春晶, 赵丽梅, 彭宝, 张春宝. 大豆 RN 型细胞质雄性不育育性恢复抑制基因 *Rf-I* 的遗传分析与定位. 农业生物技术学报, 2020, 28(5):761-770
- Li Y K, Zhang J Y, Zhao G L, Li R, Lin C J, Zhao L M, Peng B, Zhang C B. Genetic analysis and mapping of *Rf-I*, an inhibitor of fertility restorer gene for CMS-RN in soybean (*Glycine max*). Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(5):761-770
- [88] Zhang J Y, Sun H, Zhao L M, Zhang C B, Yan H, Peng B, Li W B. Nectar secretion of RN-type cytoplasmic male sterility three lines in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(5):1085-1092
- [89] Yan H, Zhang J Y, Zhang C B, Peng B, Zhang W L, Wang P N, Ding X Y, Liu B H, Feng X Z, Zhao L M. Genetic effects and plant architecture influences on outcrossing rate in soybean. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(9):1971-1979
- [90] Lin C J, Duan Y D, Li R, Wang P N, Sun Y Y, Ding X Y,

- Zhang J Y, Yan H, Zhang W, Peng B, Zhao L M, Zhang C B. Flavonoid biosynthesis pathway may indirectly affect outcrossing rate of cytoplasmic male-sterile lines of soybean. *Plants*, 2023, 12:3461
- [91] 李蓉, 林春晶, 彭宝, 丁孝羊, 李永宽, 赵国龙, 赵丽梅, 张春宝. 不同异交率大豆细胞质雄性不育系的转录组分析. *中国油料作物学报*, 2019, 41(5):696-704
- Li R, Lin C J, Peng B, Ding X Y, Li Y K, Zhao G L, Zhao L M, Zhang C B. Transcriptomic analysis of soybean cytoplasmic male sterile lines with different outcrossing rate. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2019, 41(5):696-704
- [92] 韩博文, 姜楠, 杨绪磊, 林春晶, 彭宝, 赵丽梅, 吴松权, 张春宝. 基于 SRAP 分子标记的春大豆杂交种核心亲本杂种优势群划分. *中国农业大学学报*, 2023, 28(10):38-49
- Han B W, Jiang N, Yang X L, Lin C J, Peng B, Zhao L M, Wu S Q, Zhang C B. Division of the heterotic groups of core parents in spring soybean hybrids based on SRAP molecular markers. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(10):38-49
- [93] Kazama T, Okuno M, Watari Y, Yanase S, Koizuka C, Tsuruta Y, Sugaya H, Toyoda A, Itoh T, Tsutsumi N, Toriyama K, Koizuka N, Arimura S I. Curing cytoplasmic male sterility via TALEN-mediated mitochondrial genome editing. *Nature Plants*, 2019, 5(7):722-730
- [94] Forner J, Kleinschmidt D, MeForner J, Kleinschmidt D, Meyer E H, Gremmels J, Morbitzer R, Lahaye T, Schöttler M A, Bock R. Targeted knockout of a conserved plant mitochondrial gene by genome editing. *Nature Plants*, 2023, 9(11):1818-1831
- [95] Law S S Y, Liou G, Nagai Y, Giménez-Dejóz J, Tateishi A, Tsuchiya K, Kodama Y, Fujigaya T, Numata K. Polymer-coated carbon nanotube hybrids with functional peptides for gene delivery into plant mitochondria. *Nature Communications*, 2022, 13(1):2417
- [96] Lv J, Yu K, Wei J, Gui H, Liu C, Liang D, Wang Y, Zhou H, Carlin R, Rich R, Lu T, Que Q, Wang W C, Zhang X, Kelliher T. Generation of paternal haploids in wheat by genome editing of the centromeric histone *CENH3*. *Nature Biotechnology*, 2020, 38(12):1397-1401
- [97] Wang J, Wang X F, Yang W C, Li H J. Loss of function of *CENH3* causes genome instability in soybean. *Seed Biology*, 2023, 2:24