

大豆细胞质雄性不育恢复基因 *GmRf1* 的精细定位

郭凤兰^{1,2}, 林春晶², 王鹏年², 杨绪磊^{1,2}, 吴铮^{1,2}, 彭宝², 赵丽梅^{1,2}, 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: 目前大豆杂交育种主要依赖于以细胞质雄性不育(CMS, cytoplasmic male sterility)为基础的“三系”法, 这其中恢复系的选育至关重要。恢复基因的有无和恢复能力的强弱主要通过被测恢复系与不育系测交后代F₁的育性确定, 既耗时又费力。若能定位和克隆恢复基因(*Rf*, restorer-of-fertility)用于恢复系的鉴定或辅助选育, 将大幅提高选育效率。本研究以大豆CMS-RN型不育系JLCMS204A为母本与含有未知*Rf*基因的恢复系父本JLR230进行杂交获得的F₂分离群体为材料, 通过花粉育性鉴定, 明确了该恢复系所含恢复基因受一对显性单基因控制, 符合单基因配子体遗传模式; 利用集群分离分析法(BSA, bulked segregant analysis)对双亲、可育和半不育池进行测序分析, 发现该基因位点位于16号染色体上; 利用简单重复序列(SSR, simple sequence repeat)分子标记进行多态性分析, 初步将该基因定位于标记BARCSOYSSR_16_1069和BARCSOYSSR_16_1076之间, 命名为*GmRf1*。利用酶切扩增多态性序列(dCAPS, derived cleaved amplified polymorphic sequences)标记、插入缺失(InDel, insertion-deletion)标记和序列标签位点(STS, sequence tag site)标记, 进一步精细定位, 最终将*GmRf1*定位在标记dCAPS-1和BARCSOYSSR_16_1076之间, 遗传距离分别为0.1 cM和0.3 cM。与ZH13 v2.0参考基因组进行比对发现, *GmRf1*位于16号染色体32 708 896~32 932 950 bp之间, 物理距离约为224.1 kb。本研究为今后分子标记辅助选育含*GmRf1*基因位点的恢复系和克隆*GmRf1*基因奠定了基础。

关键词: 大豆; 细胞质雄性不育; 恢复基因; 分子标记

Fine Mapping of a Restorer-of-fertility Gene *GmRf1* for the Cytoplasmic Male Sterility in Soybean

GUO Feng-lan^{1,2}, LIN Chun-jing², WANG Peng-nian², YANG Xu-lei^{1,2}, WU Zheng^{1,2}, PENG Bao²,
ZHAO Li-mei^{1,2}, ZHANG Chun-bao^{1,2}

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

Abstract: The hybrid breeding in soybean (*Glycine max*) mainly relies on the three-lines system derived from cytoplasmic male sterility. Identification of optimal restorer lines is therefore of importance. Since checking the fertility of F₁ hybrids derived from the tested restorer lines crossing with sterile lines is time-consuming and laborious, genetic identification of the strong restorer-of-fertility (*Rf*) gene(s) and its use for marker-assisted selection (MAS) will greatly improve the efficiency of breeding. In this study, the F₂ segregation population derived from the CMS-RN type sterile line JLCMS204A (female parent) and the restorer line

收稿日期: 2021-08-27 修回日期: 2021-09-10 网络出版日期: 2021-09-28

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20210827002>

第一作者研究方向为大豆杂种优势基础与应用研究, E-mail: 927607165@qq.com

通信作者: 赵丽梅, 研究方向为大豆杂种优势利用, E-mail: l_mzhao@126.com

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: 吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2021ZD002, CXGC2021RCY003); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04)

Foundation projects: Jilin Province Agricultural Science and Technology Innovation Project (CXGC2021ZD002, CXGC2021RCY003), China Agriculture Research System (CARS-04)

JLR230 (male parent, containing the unknown *Rf* gene) was investigated. Through examining pollen fertility the *Rf* gene in the restorer line was controlled by a pair of dominant single gene. Based on the bulked segregant analysis (BSA) of both parents and two pools (fertile and semi-sterile), the genetic locus named *GmRfl* was allocated on chromosome 16 flanked by simple sequence repeat (SSR) markers BARCSOYSSR_16_1069 and BARCSOYSSR_16_1076. By taking use of enzyme digestion amplified polymorphic sequences (dCAPS) makers, insertion deletion (InDel) makers and sequence tag site (STS) makers, *GmRfl* was finally delimited between the marker dCAPS-1 and BARCSOYSSR_16_1076, in which the genetic distance were 0.1 cM and 0.3 cM, respectively. On the basis of the ZH13 v2.0 reference genome, *GmRfl* was located between 32 708 896 bp and 32 932 950 bp with a physical distance of 224.1 kb. This study will lay the foundation for molecular marker assisted breeding of the restorer lines containing *GmRfl* locus and the isolation of the *GmRfl* gene.

Key words: soybean; cytoplasmic male sterility; restorer-of-fertility gene; molecular marker

细胞质雄性不育 (CMS, cytoplasmic male sterility), 也称质核互作雄性不育, 是由细胞质不育基因与对应细胞核基因共同控制的雄性不育类型, 这类不育系可被核恢复基因 (*Rf*, restorer-of-fertility) 恢复育性^[1-4], 由其衍生的 CMS/*Rf* 系统, 被广泛应用于玉米^[5]、水稻^[6]、油菜^[7]、棉花^[8-11] 等作物的杂种优势利用。相比之下, 大豆 CMS 发现和利用较晚, 但发展较快^[12-13]。自 1995 年我国在世界上首次实现栽培大豆 CMS “三系” 配套起^[14], 至 2021 年, 已利用大豆 CMS/*Rf* 系统育成并审定了 39 个杂交大豆品种, 为提升我国大豆单产水平提供了有力支撑。

虽然杂交大豆品种的选育步伐较快, 但高配合力、高恢复力优良恢复系的选育仍然停留在常规育种水平, 恢复基因的有无和强弱需待测材料与不育系进行测交鉴定, 耗费大量人力和时间。若能定位和克隆恢复基因, 实现恢复系的分子标记辅助选育或创制, 可加快强优势恢复系的选育进程, 实现杂交大豆的高效育种。目前, 大豆中发现的 CMS 主要类型有 CMS-RN、CMS-M、CMS-ZD 和 CMS-N 等, 其中前三种类型已在生产上大范围应用。研究者对它们配套恢复系的 *Rf* 基因也进行了分子标记定位研究, 发现 *Rf* 基因分别位于 3、5、7、9、10、16、17 号染色体上。2007 年, 赵丽梅等^[15] 首次利用 CMS-RN 型不育系和恢复系杂交的 F₂ 分离群体, 采用简单重复序列 (SSR, simple sequence repeat) 标记将 *Rf* 基因定位至 16 号染色体上, 获得了与恢复基因连锁比较紧密的标记 Satt547, 遗传距离为 7.56 cM。在此基础上, Wang 等^[1] 扩大 F₂ 分离群体, 利用 SSR 标记将 *Rf* 基因进一步定位到 Satt_011 和 Satt547 标记之间, 遗传距离分别为 3.6 cM 和 5.4 cM。随后, 王鹏年^[16] 也利用 CMS-

RN 亲本材料构建的 F₂ 分离群体, 将 *Rf* 基因缩小至 16 号染色体上 SSR 标记 BARCSOYSSR_16_1065 和 BARCSOYSSR_16_1095 之间, 遗传距离分别为 2.3 cM 和 1.3 cM。另外, 雷梦林等^[17] 也对 CMS-RN 型恢复系的 *Rf* 基因进行了 SSR 标记定位, 但定位区间较大。最近, 贾顺耕等^[18] 利用 CMS-RN 型不育系和恢复系杂交的 F₂ 分离群体在 9 号染色体上 SSR 标记 BARCSOYSSR_09_1151 和 BARCSOYSSR_09_1183 之间, 定位了一个新的 *Rf* 基因位点。在 CMS-M 型恢复系中也开展了 *Rf* 基因定位研究。如汤复跃等^[19] 利用 CMS-M 型不育系和恢复系杂交的 F₂ 分离群体, 采用 SSR 标记将 CMS-M 型恢复系的 *Rf* 基因定位在 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。Wang 等^[20] 同样利用 CMS-M 型不育系和恢复系杂交的 F₂ 分离群体结合自行开发的 SSR 标记将 *Rf* 基因定位在 16 号染色体 GmSSR1602 和 GmSSR1610 标记之间, 遗传距离分别为 0.11 cM 和 0.25 cM。在 CMS-ZD 型恢复系 *Rf* 基因定位方面, 焦东燕^[13] 利用 F₂ 分离群体, 通过 SSR 标记将 *Rf* 基因定位在 BARCSOYSSR_16_1040 和 Satt547 标记之间, 遗传距离分别为 6.5 cM 和 12.3 cM。Dong 等^[21] 进一步将 CMS-ZD 型 *Rf* 基因定位在 SSR 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。除此之外, 研究者也对 CMS-N 型恢复系进行了 *Rf* 基因定位, 且定位到的染色体较广。Yang 等^[22] 利用 F₂ 分离群体结合 SSR 标记对 CMS-N 的 *Rf* 基因进行了定位, 发现在 5 号和 7 号染色体上均存在连锁标记, 分别为 Satt626 和 Satt300, 与 *Rf* 基因的遗传距离分别为 9.75 cM 和 11.18 cM。董建生等^[23] 利用 F₂ 分离群体, 将 CMS-N 的 *Rf* 基因定位在 17 号染色体

上 SSR 标记 Satt135 附近,遗传距离为 11.47 cM。李曙光等^[24]利用 F₂ 和 BC₁F₁ 两套分离群体对 CMS-N 的 *Rf* 基因开展了定位,发现在 10 号染色体上的 SSR 标记 Satt331 和 Satt477 与 *Rf* 基因连锁,遗传距离分别为 8.1 cM 和 13.3 cM。陶银^[25]同样利用 F₂ 分离群体将 *Rf* 基因定位在 3 号染色体 SSR 标记 Sat_084 和 Sat_208 之间,遗传距离分别为 1.2 cM 和 1.7 cM。上述研究中,所有 *Rf* 基因的定位均利用了 SSR 标记,但由于在大豆染色体上 SSR 标记分布的密度较低,即使开发了新的 SSR 标记加密,所定位的 *Rf* 基因候选区间仍然较大,无法在其中准确预测和克隆候选 *Rf* 基因。因此,通过高通量重测序技术开发密度更大的新型分子标记用于精细定位,将是快速锁定恢复基因的重要途径。

本研究将利用集群分离分析法结合分子标记开发,获得与恢复基因紧密连锁的新型分子标记,实现恢复基因精细定位。为今后恢复系的分子标记辅助选育提供技术支撑,也为后续恢复基因的克隆及恢复系的人工创制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究以大豆 CMS-RN 型不育系 JLCMS204A 为母本,与含有未知 *Rf* 基因的恢复系 JLR230 为父本进行杂交,获得 F₁ 杂交种,通过自交获得 F₂ 分离群体作为试验材料,群体材料于 2019 年种植于吉林省农业科学院范家屯杂交大豆试验基地,行长 450 cm,穴距 20 cm,双粒点播,40~45 粒一行,蛇形排布,始花期进行田间调查,共计 243 株。

1.2 试验方法

1.2.1 花粉育性鉴定 对 F₂ 分离群体单株进行编号标记,在盛花期取成熟花苞放入固定液(75%的乙醇)中固定 1 h 以上,充分固定后取出花苞,用镊子挑出花药,置于载玻片上,滴加 I₂-KI 溶液进行染色,碾压使花粉粒充分释放,在 10× 光学显微镜下观察每株花粉粒染色情况,进行育性评估。计算不同视野下观察到的不育与可育花粉粒数量,统计花粉败育率并进行记录。

1.2.2 基因组 DNA 提取 取 F₂ 群体单株叶片,利用 NuClean Plant Genomic DNA Kit(康为世纪)提取叶片基因组 DNA,并用微量分光光度计(Nano Drop2000, Thermo)和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测各分离群体单株 DNA 浓度和质量,确

定各个单株 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 之间,且 DNA 浓度均在 200 ng/μL 左右,表明 DNA 质量较好,可用于后续试验,将其置于 -20 °C 冰箱。

1.2.3 BSA 测序及候选区间预测 根据镜检结果随机挑选出可育与半不育单株各 30 株的基因组 DNA 分别等浓度混合,构建可育池和半不育池,送北京诺禾致源进行集群分离分析法。以大豆品种中黄 13 的基因组为参考基因组(ZH13 v2.0, <https://ngdc.cncb.ac.cn/gwh/Assembly/652/show>),进行比对与质控检测。已测所有样本的比对率在 99.48%~99.67% 之间,对参考基因组的平均覆盖深度在 8.04~24.55× 之间,1× 覆盖度在 95.32% 以上。确定比对结果正常,可用于后续的变异检测及相关分析。采用 GATK3.8 软件检测单核苷酸多态性(SNP, single nucleotide polymorphism)和插入缺失(InDel, insertion-deletion)变异位点,确定恢复基因所在染色体和变异区间。根据计算两个子代全部差异位点差值和平均值,结合群体类型和子代混池个数,进行 1000 次置换检测,选取 95% 和 99% 置信水平作为阈值线,置信水平以上的窗口为候选区间。

1.2.4 恢复基因定位 结合集群分离分析法测序分析结果,确定目的基因的变异区间,查找 Soybase(<https://www.soybase.org/>)网站上的 SSR 分子标记,选用 41 对 SSR 标记筛选多态性,共筛选得到 25 对 SSR 具有多态性的标记,具体引物序列如表 1 所示。引物由北京华大基因合成,使用前稀释 10 倍。利用亲本、可育池与半不育池进行 PCR 扩增,扩增反应体系为 25 μL,包括 2× Es Taq MasterMix for PAGE(康为世纪)12.5 μL,正反向引物各 1 μL,模板 DNA 2 μL, ddH₂O 8.5 μL。反应程序:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,退火温度为 48~55 °C,72 °C 延伸 1 min,32 个循环,72 °C 终延伸 5 min,12 °C 保存。使用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,1300 V 恒定电压 2 h 左右完成电泳进行银染,拍照记录分析多态性。根据多态性引物筛选 F₂ 分离群体交换单株,统计并记录交换单株编号。在初步筛选基础上,开发衍生的酶切扩增多态性序列(dCAPS, derived cleaved amplified polymorphic Sequences)标记、插入缺失(InDel, insertion-deletion)标记和序列标签位点(STS, sequence tag site)标记,进一步缩小区间范围,绘制恢复基因连锁定位图谱。

表 1 多态性 SSR 分子标记序列信息

Table 1 Sequence information of polymorphic SSR molecular markers

SSR 分子标记 Molecular marker	上游引物序列 (5'-3') Forward primer sequence	下游引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence
BARCSOYSSR_16_1053	AAGAAATAAACAGAAAAAGAAAACAGAA	GGGGTACGCGTAAACAGAAA
BARCSOYSSR_16_1055	GGGGGCACTTAAGTAGAGCA	GAGCCACTCTCACATCACCA
BARCSOYSSR_16_1056	TTGCAATAGCTCATCTGGACA	CTTCTTGCCAGTCTCAAGC
BARCSOYSSR_16_1059	CCAATGAAAAGTAATTTGTAATCAAG	CAACCGACAGCGAACTCATA
BARCSOYSSR_16_1062	TTCTTTGTTTATGTGTCTTGGA	TGCCAAGCAGTAAAAATCGTT
BARCSOYSSR_16_1064	CGCGTGCCTTGATTTTATTT	GCTCAGCTAGCGGTTCCCTT
BARCSOYSSR_16_1068	GTTTCGTGTGCATGCAATCAT	GGGGAGGAAGAAAATGTTAAAAA
BARCSOYSSR_16_1069	CCAATTTTATATGAACTCGCACA	CTGCTTTGTGCGCAATTGTA
BARCSOYSSR_16_1070	GGCTGCAGTCACATCAGCTA	CCCCTCTCTGGATCTGTTTG
BARCSOYSSR_16_1071	CTCGGTGACTCGTTATGCAC	TGAAGTACAAAATTTTACAAAAACACA
BARCSOYSSR_16_1072	GACACGGTTGAAATTCGCTT	AACACAAAACCTTCCGTC
BARCSOYSSR_16_1073	CTCCGTTGCTGAT	TAAGCTGAATTAGTAAAA
BARCSOYSSR_16_1074	GGCCTTCAATTTTGTCTGTC	CCCTGTCAAGACAGCACTGA
BARCSOYSSR_16_1075	TTAGAAATGTTGGCCGAAA	GCAGAAAACACGGGAAAAGT
BARCSOYSSR_16_1076	CCCCAAACAATGGACAACAT	CGTTAAGATTTTTACATTATCAACGAA
BARCSOYSSR_16_1077	CAAAATAGGCGGCTTCAGAG	TGGGATGGTAAAGTGTGCGT
BARCSOYSSR_16_1082	CAATGGTTGGATGGTTGGAT	TGGACCACACCTTTTGAACA
BARCSOYSSR_16_1085	AACTTCGAACGCATGTATTGT	CCCATTATAAATCATGATAAGTGTGAC
BARCSOYSSR_16_1090	GCAGCTTGCTCAGAACATCA	AAACCCTAACGCCGTTTCTT
BARCSOYSSR_16_1095	CACCAATTTAAAGTTTGATGGTC	TCCCACCACTTATTGGTTTCA
BARCSOYSSR_16_1102	TTGCTTGTGACTCGAGAAAA	CGTGATTGCATATGACTGTTCA
BARCSOYSSR_16_1115	CCAATGAATTTATCAAGTTGGGA	ATCGCTCCAATGCAAAATAGG
BARCSOYSSR_16_1123	AGAAAAGAAATATATTTCCCAGATAA	ACAATGTTAAAGTCATCCAATTATACA
BARCSOYSSR_16_1151	GCGCCCCATATGTTAAATATATGGAG	GCGATGGGGATATTTCTTTATTATCAG
BARCSOYSSR_16_1165	GCGCTATCCGATCCATATGTG	TGATTTGCTAGGTAAAATCA

2 结果与分析

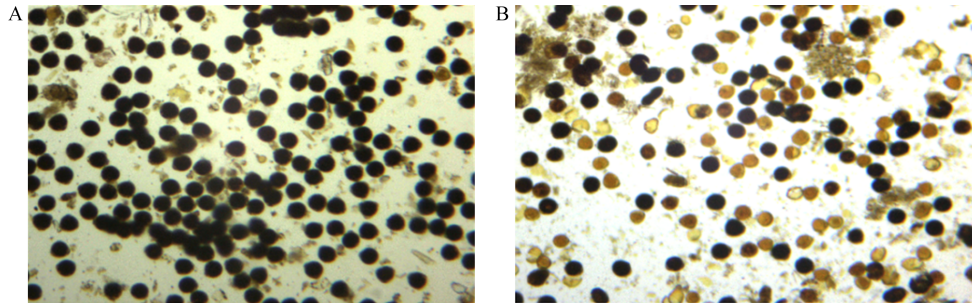
2.1 花粉育性鉴定

在显微镜下观察可育花粉粒大而饱满,染色呈黑或深棕色且着色均匀,不育花粉粒染色较浅且形状不规则。观察中发现可育单株花粉粒全部为可育(图 1A),半不育单株花粉则 50% 左右为可育,50% 左右为不育(图 1B)。根据镜检结果统计分离群体,可育单株为 119 株,半不育单株为 124 株。经卡方检验,两者分离比符合 1:1 分离比例,说明该

不育系统符合单基因配子体不育遗传模式。

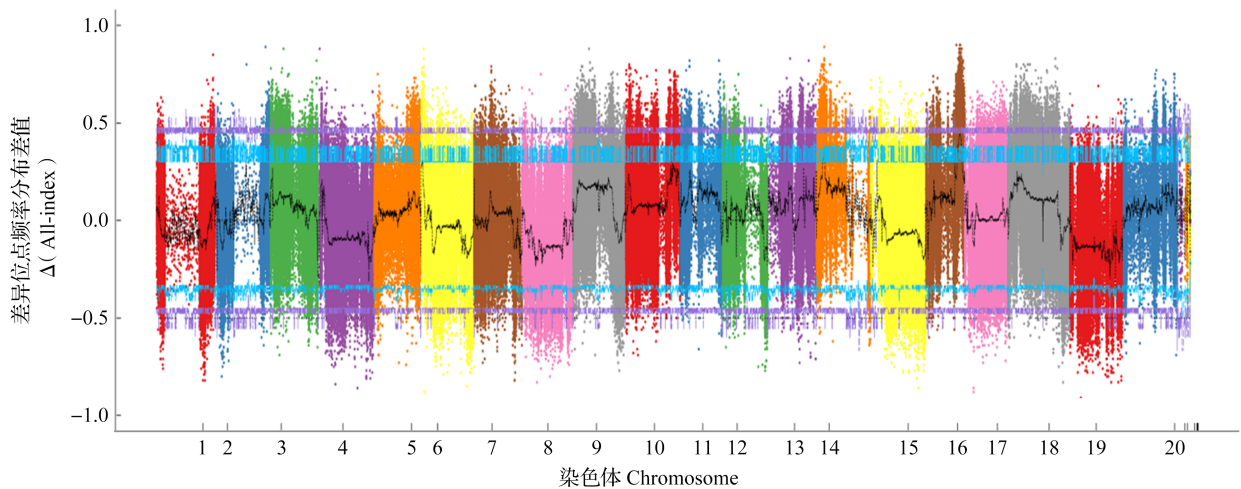
2.2 恢复基因候选区间预测

对可育池、半不育池连同亲本进行集群分离分析法^[26],筛选出多个 SNPs 和 InDels 位点用于计算子代样本中的 SNPs 和 InDels 的频率分布情况并绘制曼哈顿图。由图 2 可知,在 16 号染色体上存在变异集峰值,根据子代在 16 号染色体上的全部差异位点频率分布情况,将恢复基因定位于 16 号染色体 31.0~36.4 Mb 区间内。



A: 可育花粉粒; B: 半不育花粉粒

A: Fertile pollen grains, B: Semi-sterile pollen grains

图 1 F₂ 分离群体花粉镜检结果Fig.1 F₂ segregation pollen microscopy results

图中黑色的实线是 All-index 均值线, 蓝色的线为 95% 阈值线, 紫色的线为 99% 阈值线, 需要关注的是均值线超过阈值线的区域; 横坐标刻度所在位置为两个子代全部差异位点频率的中间值; 横坐标中“20”之后的短杠为参考基因组的 scaffolds, 本文暂不考虑

The black solid line in the figure is the All-index average line, the blue line is the 95% threshold line, and the purple line is the 99% threshold line. What needs attention is the area where the average line exceeds the threshold line. The abscissa scale is the median value of All-index. The short bars after “20” in the abscissa are scaffolds of the reference genome, which will not be considered in this paper

图 2 两个子代全部差异位点频率分布差值在染色体上的分布

Fig.2 The manhattan distribution of two offspring Δ (All-index) on chromosomes

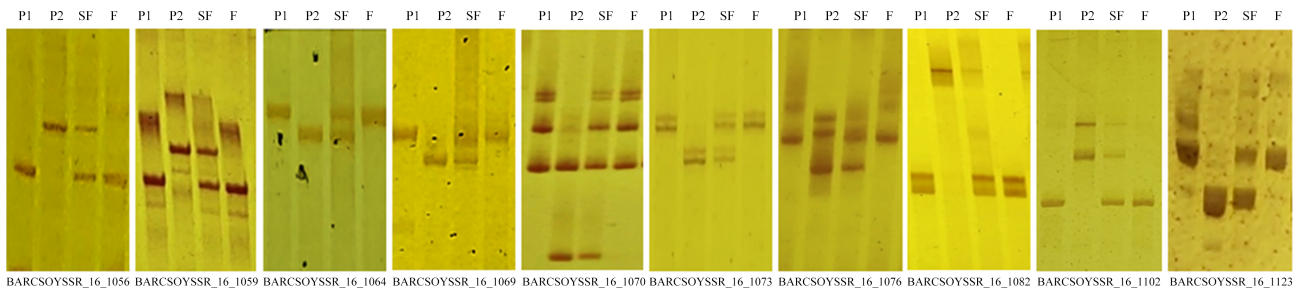
2.3 基于 SSR 标记的 *Rf* 基因定位

2.3.1 SSR 标记筛选 根据恢复基因预测区间, 利用 SoyBase 数据库下载并合成 41 对 SSR 标记, 以父本 JLR230、母本 JLCMS204A、半不育池和可育池为一组模板, 利用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 41 个 SSR 标记的多态性, 共得到 25 个多态性标记, 部分标记的电泳结果如图 3 所示。进一步利用多态性标记筛选 F₂ 分离群体单株, 检测到 13 株重组单株, 分别为 J9-23、J9-34、J9-40、J9-61、J9-65、J9-84、J9-86、J9-106、J9-136、J9-157、J9-170、J9-219、J9-232。统计筛选结果并初步绘制 SSR 标记与恢复基因遗传和物理定位图(图 4), 结果表明, 恢复系 JLR230 所含恢复基因位于 16 号染色体 SSR 标记 BARCSOYSSR_16_1069 和

BARCSOYSSR_16_1076 之间, 遗传距离分别为 0.4 cM 和 0.3 cM, 将该位点命名为 *GmRf1*。

2.3.2 基于 SNP、InDel 及 STS 标记的 *Rf* 基因精细定位

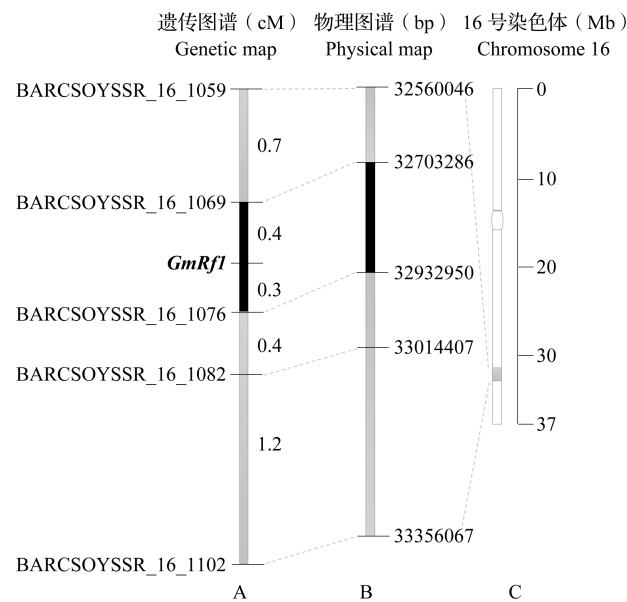
依据集群分离分析法测序数据, 在 SSR 标记定位区间内, 筛选其中 SNP 位点设计 10 个 dCAPS 标记。筛选确定其中 dCAPS-1 标记 PCR 扩增产物经过限制性内切酶 SphI 酶切后可产生多态性条带, 进一步利用 dCAPS-1 标记筛选重组单株, 发现重组单株 J9-157 发生了连锁交换, 进一步缩小了 *GmRf1* 定位区间。由于在 SSR 标记定位区间内无 InDel 变异位点, 因此, 扩大区间设计 InDel 标记和 STS 标记用于验证 SSR 标记定位的区间可靠性。一共设计 9 对 InDel 标记和 24 对 STS 标记, 经检测发现有 3 对 InDel 标记具有多态性, 分别为 Indel-2、



P1: 可育亲本 JLR230; P2: 不育亲本 JLCMS204A; SF: 半不育混池; F: 可育混池
 P1: Fertile parent JLR230, P2: Sterile parent JLCMS204A, SF: Semi-sterile mixed pool, F: Fertile mixed pool

图 3 部分多态性 SSR 标记电泳图谱

Fig. 3 Electrophoretic maps of some polymorphic SSR markers



A: *GmRfl* 位点的遗传图谱,图中左侧列出的是 SSR 标记,右侧显示各个标记之间的遗传距离;

B: 大豆参考基因组 (ZH13 v2.0) SSR 标记在 16 号染色体上的物理位置,黑色的暗条代表 *GmRfl* 位点的遗传和物理区域;

C: 16 号染色体物理图形,其中浅灰色区域为 SSR 标记定位 *GmRfl* 位点所在位置,椭圆形区域代表 16 号染色体着丝粒位置

A: The genetic map of the *GmRfl* locus, the SSR markers are listed on the left and the genetic distance between each marker is shown on the right,

B: The physical location of SSR markers on chromosome 16 of soybean reference genome (ZH13 v2.0), the black bars represent the genetic and physical regions of the *GmRfl* locus, C: The physical pattern of chromosome 16, where the light gray area is the location of *GmRfl* locus located by

SSR marker, the elliptic region represents the centromere position of chromosome 16

图 4 *GmRfl* 位点的遗传和物理定位图

Fig. 4 Genetic and physical maps of the *GmRfl* locus

Indel-4、Indel-9; STS 标记有 4 对具有多态性,分别为 STS-1、STS-10、STS-14、STS-18; 两类标记对 F₂ 分离群体单株验证结果与 SSR 标记一致,验证了 SSR 标记和 dCAPS-1 标记定位区间的准确性,具体多态性标记信息见表 2。

2.3.3 *GmRfl* 基因的遗传连锁图谱构建 依据 SSR、SNP、InDel 及 STS 标记对 F₂ 单株的多态性筛选结果,绘制各标记与 *GmRfl* 位点精细定位图谱(图 5)。最终将 *GmRfl* 定位于分子标记 dCAPS-1 和 BARCSOYSSR_16_1076 之间,遗传距

离分别为 0.1 cM 和 0.3 cM,整合至参考基因组的物理区间约为 224.1 kb。

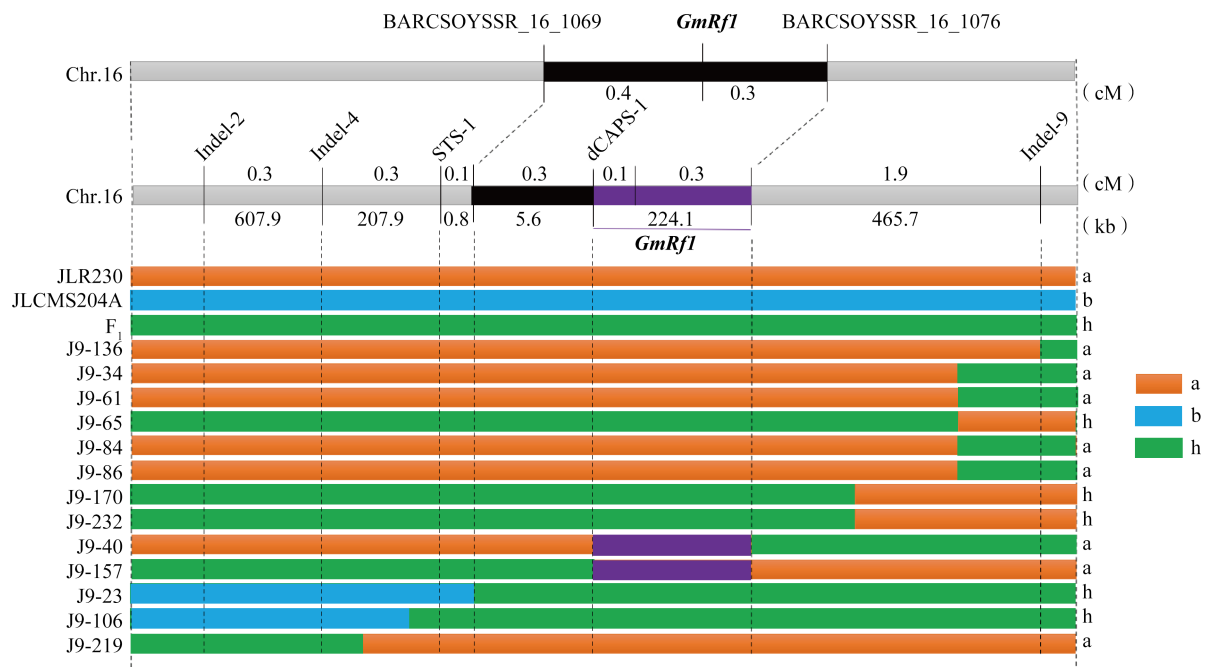
3 讨论

本研究利用大豆 CMS-RN 型不育系 JLCMS204A 和恢复系 JLR230 构建的 F₂ 分离群体为试验材料,经过开花期花粉育性鉴定,明确了不育系育性恢复受一对显性单基因控制,与前人研究结果一致^[14,17]。大豆恢复基因定位研究中通常直接利用 20 条染色体上的 SSR 标记进行盲目筛选,耗费大量人

表 2 多态性分子标记信息

Table 2 Polymorphic molecular marker information

分子标记 Molecular marker	上游引物 (5'-3') Forward primer sequence	下游引物 ((5'-3') Reverse primer sequence
dCAPS-1	TTAAAATTATTTTAAAGTTTGCAT	GCAATGCCACCAACACTATCTCGT
Indel -2	TCTCCTTCATCCAAACA	GAGGAAATCAAATTACCAGTAC
Indel -4	TGAGACCCACATCAATTA	ATCTAACCATCTCAGCAT
Indel -9	GTCTCCCGAGTCCATCTA	ACATCCAATCGCTACAAA
STS -1	CAATTGTAAACCTTGACGAGCTA	GAAGAAAATGTTAAAAAAGAGAGA
STS -10	GAGAAGGAAAAAGAGAAAACGAAA	AGAATGCAAATGGAAGATCAGAAG
STS -14	AACAACAAAGAGAAAACCTACCAAT	TCCTATGCACAATACAAAGACCTA
STS -18	ACTTTTGTACACTCCTGGTCTCC	TCCTCTATTCTCTCATTGTTCTT



图中最上侧是由 SSR 标记初步定位得到的 *GmRfl* 基因的遗传区域。中间是根据开发 SNP 标记、InDel 标记、STS 标记并参照 ZH13 v2.0 参考基因组对 *GmRfl* 基因精细作图得到的遗传距离和物理距离，紫色条表示 *GmRfl* 基因精细定位得到的区域。最下边的彩色条带表示各分子标记筛选 F_2 群体单株检测到的重组单株的基因型，左侧为重组单株编号，JLR230 表示父本纯合可育单株，JLCMS204A 表示母本纯合不育单株， F_1 表示亲本杂交 F_1 单株，其他为 F_2 分离群体重组单株。右侧为重组单株原有表型，a 表示纯合可育，b 表示纯合不育，h 表示杂合型

At the top of the figure is the genetic region of *GmRfl* gene preliminarily located by SSR markers. In the middle is the genetic distance and physical distance obtained from the detailed mapping of *GmRfl* gene based on the development of SNP, InDel and STS markers and the reference genome ZH13 v2.0. The purple bars represent the fine-mapped regions of the *GmRfl* gene. The color band at the bottom represents the genotype of the single recombinant plant detected by each molecular marker in F_2 population screening, and the number of the single recombinant plant is on the left. JLR230 represents the homozygous fertile single plant of the male parent, JLCMS204A represents the homozygous sterile single plant of the female parent, F_1 represents the F_1 hybrid single plant of the parent, and the others are F_2 isolated population recombination single plant. On the right is the original phenotype of the recombination plant, a represents homozygous fertile, b represents homozygous sterile, and h represents heterozygous

图 5 *GmRfl* 位点的精细定位Fig. 5 Fine mapping of the *GmRfl* locus

力、物力和时间,也极易造成定位染色体和区间的偏差。如汤复跃等^[19]最早利用 SSR 标记将恢复系 WR016 的恢复基因定位在 5 号染色体,而后续 Wang 等^[20]将该基因最终定位到了 16 号染色体。随着二代和三代测序技术的不断发展,近年来多个大豆品种的参考基因组完成测序和高质量组装,并公布于公共数据库中。这为本研究利用高通量测序结合新开发的分子标记,对恢复基因进行快速准确的定位奠定了基础。本研究首先依据 BSA 测序结果,利用已知的 SSR 标记对预测区间进行了验证和恢复基因初步定位。但由于 SSR 标记大多数只能检测不同材料之间在内含子上存在的差异,且分布不够密集;因此进一步通过高通量测序所获得的亲本间变异位点,开发了分布更密集的 dCAPS、InDel 和 STS 标记,实现了 *GmRfl* 的精准定位。

通过对 F₂ 分离群体单株的多态性分析,最终将恢复基因 *GmRfl* 定位于 16 号染色体分子标记 dCAPS-1 和 BARCSOYSSR_16_1076 之间,遗传距离分别为 0.1 cM 和 0.3 cM,物理区间约 224.1 kb,含有 27 个已知基因。由于目前已定位并克隆的其他作物的恢复基因大多数为 PPR 蛋白家族基因,而 27 个基因中有 7 个属于 PPR 蛋白家族基因,这对于 *GmRfl* 候选基因的筛选和最终鉴定仍然存在困难。由于 F₂ 杂合型交换单株在其后代中发生育性分离,可以增大重组率,因此我们将针对杂合型交换单株的后代继续进行重组个体的筛选;同时针对定位区间内的基因进行一代测序分析,开发基因上的特异性分子标记,以期进一步缩小精细定位区间,为后续克隆恢复基因 *GmRfl* 奠定基础。

参考文献

- [1] 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
- [2] 石子, 宋伟, 赵久然. 雄性不育在作物杂种优势中的应用途径分析. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(1): 126-134
Shi Z, Song W, Zhao J R. Analysis of application pathway of male sterility in crop heterosis. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2018, 38(1): 126-134
- [3] 周小利, 杨诗怡, 陈志芸, 索文龙, 牛永志, 马文广, 廖菊够, 顾菁, 陈穗云. 植物细胞质雄性不育和育性恢复基因调控机制研究进展. *农学学报*, 2018, 8(7): 62-67
Zhou X L, Yang S Y, Chen Z Y, Suo W L, Niu Y Z, Ma W G, Liao J G, Gu J, Chen S Y. Advances in the regulation mechanism of cytoplasmic male sterility and fertility restoration genes in plants. *Journal of Agronomy*, 2018, 8(7): 62-67
- [4] 肖鑫辉, 肖鑫丽, 王明, 叶剑秋. 植物雄性不育分子机理及相关基因研究进展. *热带农业工程*, 2017, 41(Z1): 1-8
- Xiao X H, Xiao X L, Wang M, Ye J Q. Research progress on molecular mechanism and related genes of plant male sterility. *Tropical Agricultural Engineering*, 2017, 41(Z1): 1-8
- [5] 苏爱国, 宋伟, 王帅帅, 赵久然. 玉米细胞质雄性不育及其育性恢复基因的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2018, 38(1): 108-114
Su A G, Song W, Wang S S, Zhao J R. Research progress on cytoplasmic male sterility and fertility restoration genes in maize. *Chinese Journal of Bioengineering*, 2018, 38(1): 108-114
- [6] 刘石锋, 陈倩, 洪广成, 胡骏, 秦小健. 水稻细胞质雄性不育及育性恢复研究进展. *植物生理学报*, 2018, 54(1): 1-9
Liu S F, Chen Q, Hong G C, Hu J, Qin X J. Research progress on cytoplasmic male sterility and fertility restoration in rice. *Journal of Plant Physiology*, 2018, 54(1): 1-9
- [7] 尹明智, 胡燕, 张瑜, 杨胜洁, 杨露. 油菜细胞质雄性不育恢复基因分子标记的研究进展. *江西农业*, 2020(12): 105-107
Yin M Z, Hu Y, Zhang Y, Yang S J, Yang L. Research progress on molecular markers of cytoplasmic male sterility restoring genes in rape. *Jiangxi Agriculture*, 2020(12): 105-107
- [8] 刘利彩, 邢朝柱, 吴建勇, 郭立平, 戚庭香, 王海林, 乔秀琴, 唐会妮, 张学贤. 棉花 CMS 及其育性恢复基因的研究现状. *安徽农业科学*, 2015, 43(5): 1-3, 6
Liu L C, Xing C Z, Wu J Y, Guo L P, Qi T X, Wang H L, Qiao X Q, Tang H N, Zhang X X. Research status of CMS and fertility restoration genes in cotton. *Anhui Agricultural Science*, 2015, 43(5): 1-3, 6
- [9] Feng J J, Zhang X X, Zhang M, Guo L P, Qi T X, Tang H N, Zhu H Y, Wang H L, Qiao X Q, Xing C Z, Wu J Y. Physical mapping and Indel marker development for the restorer gene *Rf2* in cytoplasmic male sterile CMS-D8 cotton. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 24
- [10] Zhao C P, Zhao G Y, Zhao G, Zhao X W, Wang K H, Liu S, Zhang H S, Guo B S, Gen J Y. Physical mapping and candidate gene prediction of fertility restorer gene of cytoplasmic male sterility in cotton. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 6
- [11] 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. Research progress on fertility restoring genes of cytoplasmic male sterile lines in main crops. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(1): 116-125
- [12] Chen L T, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65(1): 579-606
- [13] 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
- [14] 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): 79-81
Zhao L M, Sun H, Huang M. Breeding and preliminary study on soybean cytoplasmic male sterile line ZA. *Soybean Science*, 1998, 17(3): 79-81
- [15] 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. SSR markers of restoring genes for cytoplasmic male sterility in soybean. *Soybean Science*, 2007, 26(6): 835-839
- [16] 王鹏年. RN 型大豆细胞质雄性不育恢复基因的精细定位. 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
- [17] 雷梦林, 连世超. 大豆细胞质雄性不育恢复基因的 SSR 标记定位. *山西农业科学*, 2017, 45(7): 1053-1055, 1074
Lei M L, Lian S C. SSR marker mapping of cytoplasmic male sterility restorer gene in soybean. *Shanxi Agricultural Science*, 2017, 45(7): 1053-1055, 1074
- [18] 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
- [19] 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
- [20] Wang D G, Zhang L, Li J K, Hu Q, Jiang H Y, Huang Z P, Hovav R. 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
- [21] 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
- [22] Yang S P, Duan M P, Meng Q C, Qiu J, Fan J M, Zhao T J, Yu D Y, Gai J Y. Inheritance and gene tagging of male fertility restoration of cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS1A in soybean. *Plant Breeding*, 2007, 126(3): 302-305
- [23] 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. Fertility restoring inheritance and SSR markers of fertility restoring genes of soybean cytoplasmic nuclear interaction male sterile line NJCMS2A. *Soybean Science*, 2008, 27(2): 181-185
- [24] 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 of soybean cytoplasmic nuclear interaction male sterile line NJCMS3A. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(7): 1061-1066
- [25] 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 restoring gene of soybean cytoplasmic nuclear interaction male sterile line NJCMS1A. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [26] Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. *The Plant Journal*, 2013, 74(1): 174-183