

大豆 CMS 恢复基因 *Rf2* 功能性分子标记开发及恢复系新种质创制

赵天宇^{1,2}, 杨绪磊^{1,2}, 王孟磊^{1,2}, 韩忠旭^{1,2}, 王铭钰², 林春晶²,
张井勇², 张春宝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/农业农村部杂交大豆育种重点实验室, 长春 130033)

摘要: 恢复系所含恢复基因的组成及数量直接决定恢复能力的强弱, 从而影响通过“三系”法育成杂交大豆的育性稳定性。*Rf1* 基因广泛存在于大豆细胞质雄性不育恢复系中, 而 *Rf2* 作为新发现的强恢复基因仅在极少数恢复系中存在。为此, 本研究通过开发 *Rf2* 基因功能性分子标记, 利用常规杂交育种结合分子标记辅助选育技术, 聚合恢复基因 *Rf1* 和 *Rf2*, 创制具有强恢复能力和优良农艺性状的大豆细胞质雄性不育恢复系新种质。结果表明, *Rf1* 和 *Rf2* 分子标记相结合能够快速、准确的筛选目标恢复基因类型, 显著提高基因聚合恢复系新种质的育种效率。同时, 创制出的恢复系新种质在单株荚数、粒数及百粒重等农艺性状上表现优异。本研究为“三系”杂交大豆育种提供了优异的恢复系新种质, 也为今后更多强恢复系的高效选育提供了技术支持。

关键词: 大豆; 细胞质雄性不育; 恢复系; 不育系; 分子标记辅助选择

Development of Functional Molecular Markers for Soybean CMS Restorer-of-fertility Gene *Rf2* and Creation of New Germplasm for Restorer Lines

ZHAO Tianyu^{1,2}, YANG Xulei^{1,2}, WANG Menglei^{1,2}, Han Zhongxu^{1,2}, WANG mingyu²,
LIN Chunjing², ZHANG Jingyong², ZHANG Chunbao²

(¹College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; ²Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Hybrid Soybean Breeding of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Changchun 130033)

收稿日期: 2025-03-08 网络出版日期:

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20250308002>

第一作者研究方向为大豆杂种优势利用, E-mail: 892288416@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@jaas.com.cn

基金项目: 基本科研经费项目 (KYJF2023JJ101); 吉林省科技发展计划项目 (20240101214JC); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-04); 吉林省农业科技创新工程项目 (CXGC2024RCY008)

Foundation projects: Basic Research Funding Project (KYJF2023JJ101), Science and Technology Development Plan Project of Jilin Province (20240101214JC), Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-04), Agricultural Science and Technology Innovation Project of Jilin Province (CXGC2024RCY008)

Abstract: The composition and quantity of *Restorer-of-fertility* genes contained in the restorer line directly determine the strength of the restoration ability, thereby affecting the fertility stability of hybrid soybeans bred through the "three line" method. The *Rf1* gene is widely present in soybean cytoplasmic male sterile restorer lines, while *Rf2*, as a newly discovered strong *Restorer-of-fertility* gene, only exists in a very small number of restorer lines. To this end, this study developed functional molecular marker for the *Rf2* gene and used conventional hybrid breeding combined with molecular marker-assisted breeding techniques to aggregate the *Restorer-of-fertility* genes *Rf1* and *Rf2*, creating a new germplasm of soybean cytoplasmic male sterile restorer lines with strong restoration ability and excellent agronomic traits. The results indicate that the combination of *Rf1* and *Rf2* molecular markers can quickly and accurately screen target *Restorer-of-fertility* gene types, significantly improving the breeding efficiency of new germplasm of gene aggregation restorer lines. At the same time, the newly created restorer germplasm showed excellent performance in agronomic traits such as pod number per plant, grain number, and 100-seed weight. This study provides excellent new germplasm for the breeding of "three line" hybrid soybeans, and also provides technical support for the efficient breeding of more strong restorer lines in the future

Keywords: soybean;cytoplasmic male sterility; restorer line; sterile line; molecular marker-assisted selection

大豆 (*Glycine max* (L.) Merr.) 是豆科大豆属一年生草本植物, 是重要的粮油饲兼用作物, 在中国已有五千多年种植历史。大豆在国民食物供给体系中占据重要地位, 近年来需求量一直处于高位, 但相较于玉米、水稻等作物, 大豆单位面积产量低且经济效益不好, 导致农民种植意愿不强。据国家统计局数据, 2024 年我国大豆进口量为 10503 万吨^[1], 创历史新高。在目前耕地有限的情况下, 提高大豆单产是有效增加大豆总产的主要策略。

杂种优势是提高农作物单产的有效途径之一, 玉米、水稻等作物的杂交种应用, 大幅提高了单产和总产, 保障了世界粮食安全。中国首创的杂交大豆同样可以大幅提高单产, 育成品种区域试验比对照平均增产 13% 左右, 最高可达 22.7%^[2]。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) 的“三系”法, 除细胞质雄性不育系作为异交传粉的受本外, 其花粉供体恢复系的育性恢复能力直接决定杂种 F₁ 的育性和结实能力, 因此选择合适的恢复系显得尤为重要^[2-3]。恢复系作为“三系”杂交种的父本, 其中所含有的恢复基因 (*Rf*, *restorer-of-fertility*) 类型和数量直接决定了恢复能力的强弱, 这就导致部分杂交种育性恢复过程中存在恢复效果不理想的阻碍^[3-4]。“三系”杂交水稻恢复系“明恢 63”被广泛应用, 其除了一般配合力优异以外, 还与其同时含有恢复基因 *Rf3* 和 *Rf1B* 有关^[4-5]。蔡健等^[6]同样发现, 恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4* 的双聚合片段系可以提高水稻杂种 F₁ 的花粉育性。Huang 等^[7]研究也发现, 同时具有 *Rf5* 和 *Rf6* 基因的水稻杂种 F₁ 代植株在受到胁迫

迫时表现出更稳定的结实率。恢复系作为“三系”配套的关键亲本，除了要保证恢复较强的能力，还要具有优良的农艺性状，配制杂交组合时才具有较强的杂种优势。因此，创制强恢复力、农艺性状优良的恢复系具有重要意义。然而强恢复系的传统选育方式十分繁琐，耗时费力的同时，也无法准确的选择杂交后代的不同基因型。近年来，分子标记辅助选择（MAS，marker-assisted selection）育种技术的发展为恢复系的选育提供了可靠路径。博静^[8]通过开发水稻 CMS-HL 型恢复基因 *Rf6* 的特异性分子标记 Rf6JD，在含有 *Rf6* 基因材料中可扩增出一条约 750 bp 的条带，而在含有 *rf6* 的材料中仅可以扩增出长度约 400 bp 的条带，由此证明该标记可以用于含有恢复基因 *Rf6* 的恢复系筛选与鉴定。徐雪等^[9]同样利用 *Rf6* 与其等位基因进行序列比对分析，并根据序列间差异开发了恢复基因 *Rf6* 的特异性功能标记 YRf6，利用该标记可以针对恢复基因 *Rf6* 扩增出大小分别为 763 bp 和 439 bp 的特异性片段，可用于恢复基因 *Rf6* 的鉴定和辅助选育。Prasad 等^[10]利用 2 对 SSR 标记 RM10313 和 RM6100 分别对 72 份不同基因型的水稻亲本进行筛选发现，两个标记均与恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4* 紧密连锁，可有效应用于含有恢复基因 *Rf3* 和 *Rf4* 的恢复系鉴定。张鲁刚等^[11-12]开发了三种大白菜 Pol CMS 恢复基因的鉴定方法，分别是通过 SRAP 标记、InDel78 标记和特异性 PCR 引物，快速检测到含恢复基因的大白菜材料。张华敏^[13]克隆了大白菜 Pol CMS 恢复基因 *BrRfp1* 并开发了与之共分离的标记 SC718，该标记可用于辅助选育和大白菜种质资源中新恢复系的筛选。龙卫华等^[14]开发了一种检测甘蓝型油菜 MI CMS 系统恢复基因 *Rfm* 的分子标记，利用该标记可以进行恢复系的辅助选育。Kang^[15]等通过检测 444 个分子标记在辣椒不稳定育性恢复基因 *Rfu* 位点上的作用效果后，认为联合使用标记 G16-SCAR 和标记 Co1Mod1-CAPS 可以较高精度地区分不同基因型，可大幅提高恢复系辅助选育的准确性。Zhang^[16]等将辣椒 CMS 育性恢复候选基因 *CaRfm* 确定为 *CaPPR6*，并开发了与 *CaRfm* 相邻的分子标记 S1597 和 S1609 用于恢复系分子标记辅助选育。

近年来，大豆 *Rf* 基因研究取得显著进展，*Rf1* 基因^[17-18]和 *Rf2* 基因^[19-20]相继被克隆和鉴定，这为 *Rf* 基因聚合强恢复系的分子标记辅助选育提供了可能。为此，本研究对经鉴定分别含有 *Rf1* 和 *Rf2* 两个优异恢复系进行恢复能力评价，同时配制杂交组合，通过开发 *Rf2* 基因功能性分子标记，与 *Rf1* 基因的分子标记相结合，对杂交分离后代进行逐代辅助选育，对 *Rf* 基因聚合稳定新种质进行农艺性状综合评价，创制出恢复能力强且农艺性状好的恢复系新种质，为杂交大豆强恢复系的快速选育提供了有效策略及材料支撑。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

本研究所用大豆材料包括含 *Rf1* 基因恢复系 Williams 82 (*Rf1Rf1rf2rf2*)、含 *Rf2* 基因恢复系 JLR500 (*rf1rf1Rf2Rf2*)；含恢复抑制基因 (*Inhibitor of Restorer-of-fertility*, *Rf-I*) 的不育系 JLCMS89A (*rf1rf1rf2rf2*, *Rf-IRf-I*) 及易被恢复不育系 JLCMS9A (*rf1rf1rf2rf2*, *rf-irf-i*)。所有大豆材料均由吉林省农业科学院杂交大豆研究团队选育或鉴定保存。

1.2 试验方法

1.2.1 杂交 F₁ 植株花粉育性检测 将恢复系 Williams 82 与 JLR500 分别与不育系材料 JLCMS9A 和 JLCMS89A 进行杂交获得的 F₁ 代单株，在盛花期 (R₂) 采用碘化钾 (I₂-KI) 染色法进行花粉育性检测，具体步骤如下：选取将露白的新鲜花苞，并使用 70%酒精溶液固定 1 h；在光学显微镜 (CX33, 奥林巴斯) 下，用镊子小心分离出花苞中的花药，置于载玻片上；向花药上加入 100 μL 的 2% I₂-KI 溶液，用镊子背面压碎花药充分释放其中的花粉粒，使用 10×目镜白光条件下进行观察，记录花粉粒的染色情况和形态特征。

1.2.2 *Rf* 基因聚合恢复系材料选育流程 2019 年，利用分别含有 *Rf1* 和 *Rf2* 基因的恢复系 Williams 82 和 JLR500 杂交获得的 F₁ 种子；2020 年，F₁ 自交收获的种子；于 2021 年种植大田，利用 MAS 技术在 F₂ 分离群体中筛选出同时携带 *Rf1Rf1* 和 *Rf2Rf2* 基因型的单株进行摘荚；通过单粒传方法，在 2024 年选择田间表现优异的 F₅ 代株行秋季进行考种鉴定。上述材料均种植于在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)，行长 4.5 m，行距 65 cm，株距 15 cm，双粒点播。

1.2.3 *Rf2* 基因型分子标记开发及鉴定 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (康为世纪) 提取 JLR500 和 JLCMS9A 基因组 DNA。设计开发 InDel 分子标记 *Rf2*-Indel-2 (表 1)，理论上利用 12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测后，纯合显性 *Rf2Rf2* 由于碱基缺失而导致电泳条带靠下，可见片段大小为 201 bp，纯合隐性 *rf2rf2* 材料条带靠上，片段大小为 210 bp，杂合型 *Rf2rf2* 材料同时可见 210 bp 和 201 bp 条带。采用 *Rf2*-Indel-2 标记 (表 1) 检测 *Rf2* 基因型。

表 1 用于检测 *Rf2* 不同基因型的特异性分子标记

Table 1 Specific molecular markers for detecting different genotypes of *Rf2*

标记名称 Marker name	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')	特异性条带大小 (bp) Specific band size (bp)		
			<i>Rf2Rf2</i>	<i>Rf2rf2</i>	<i>rf2rf2</i>
<i>Rf2</i> -Indel-2	TGCCTCTCTAATCGGAGAAA	TCATGCCTCTCTAATCGGAGC	201	210 和 201	210

1.2.4 *Rf1* 基因型分子标记鉴定 采用杨绪磊等^[18]开发的 *Rf1*-dCAPS-2 分子标记及检测方法

鉴定 *Rfl* 基因型。理论上 PCR 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，通过 2%琼脂糖凝胶电泳检测，含纯合显性 *Rf1Rf1* 材料扩增产物可被切开，可见片段大小为 427 bp，纯合隐性 *rflrfl* 材料的扩增产物无法被切开，仍为 452 bp，杂合型 *Rf1rfl* 材料可见 427 bp 和 452 bp 两种条带（表 2）。

表 2 用于检测 *Rfl* 不同基因型的特异性分子标记
Table 2 Specific molecular markers for detecting different genotypes of *Rfl*

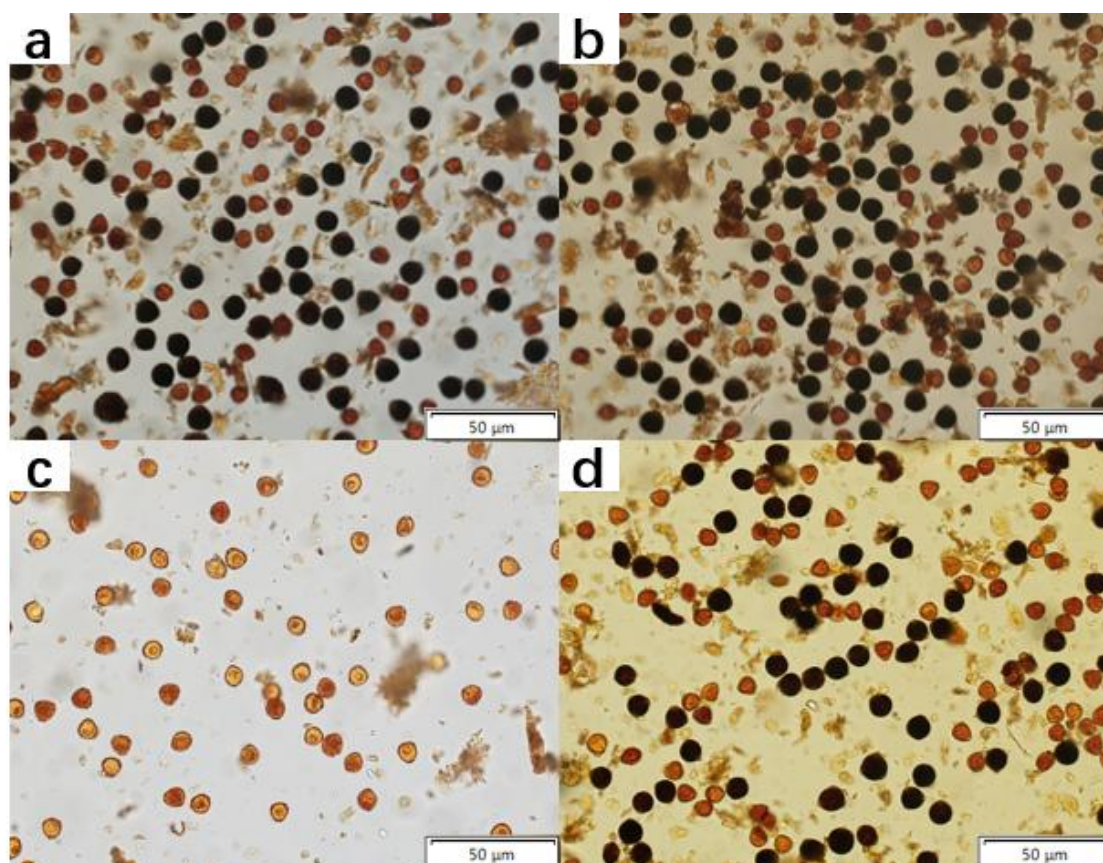
标记名称	正向引物序列（5′-3′）	反向引物序列（5′-3′）	特异性条带大小（bp）		
			Specific band size		
Marker name	Forward primer sequence（5′-3′）	Reverse primer sequence（5′-3′）	<i>Rf1Rf1</i>	<i>Rf1rfl</i>	<i>rflrfl</i>
<i>Rfl</i> -dCAPS-2	GATGGAGCATTATCCTACTG GAATT	AAAAATCATAAGCCTCGTTT ACAAG	427	427 和 452	452

1.2.5 *Rf* 基因聚合材料农艺性状测定 在恢复基因聚合 F₅ 株行材料成熟后进行收获和考种，分别测定株高、节数、单株荚数、单株粒数、百粒重、总重等性状，其中农艺性状指标测定方法参考《大豆种质资源描述规范和数据标准》^[21]。

2 结果与分析

2.1 不同 *Rf* 基因恢复系恢复能力评估

花粉镜检结果显示，分别携带 *Rf1* 基因的 Williams 82 和携带 *Rf2* 基因的 JLR500 与不育系 JLCMS9A 的杂交 F₁ 均表现为半不育；而 Williams 82 与含有恢复抑制基因 *Rf-I* 的不育系 JLCMS89A 的杂交 F₁ 则完全不育，不能恢复其育性，植株呈现不育表型；JLR500 与不育系 JLCMS89A 的杂交 F₁ 则可表现为半不育（图 1），可恢复其育性，植株呈现可育表型。表明 *Rf2* 基因可不受 *Rf-I* 基因的影响，恢复能力强于 *Rf1*。



a- (JLCMS9A×Williams 82) F₁ 花粉呈半不育; b- (JLCMS9A×JLR500) F₁ 花粉呈半不育; c- (JLCMS89A×Williams 82) F₁ 花粉呈完全不育; d- (JLCMS89A×JLR500) F₁ 花粉呈半不育

图 1 不同 *Rf* 基因恢复系与不育系杂交 F₁ 花粉育性检测结果

Fig.1 Pollen fertility test results of hybrid F₁ of different *Rf* genes restorer and sterile lines

2.2 *Rf* 基因型鉴定分子标记开发

团队前期对 *Rf*2 基因进行序列分析时发现, *Rf*2 相较于 *rf*2 在 CDS 区 15~23 bp 存在 9 个碱基的缺失^[9]。为此, 本研究利用该位点开发了 Indel 标记 *Rf*2-indel-2, 经多态性检测证实其扩增产物清晰无杂带, 含纯合显性 *Rf*2 基因的恢复系 JLR500 扩增电泳条带与 DNA maker 的 200 bp 指示条带基本齐平, 约为 201 bp; 不育系 JLCMS9A 条带略靠上, 大小约为 210 bp (图 2)。上述结果与预期相符, 表明分子标记 *Rf*2-indel-2 可用于鉴定含 *Rf*2 基因型的材料。

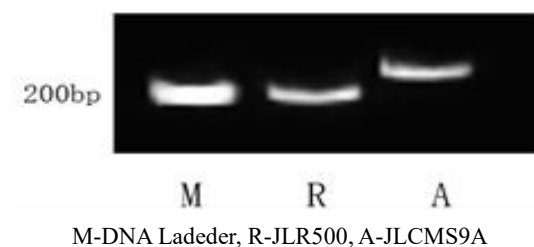
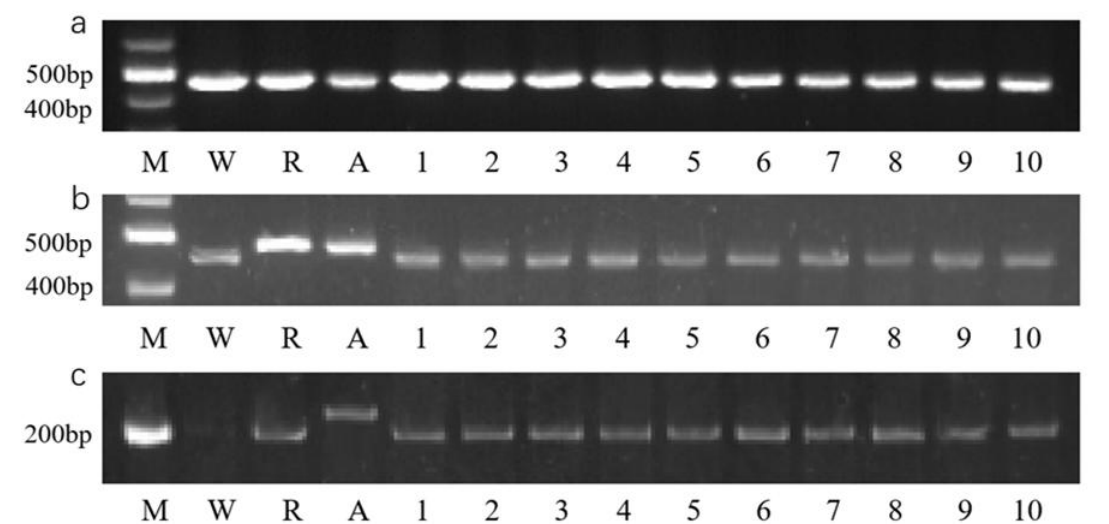


图 2 分子标记 *Rf*2-indel-2 检测 *Rf*2 基因型电泳结果

Fig.2 The electrophoresis results of the *Rf*2-indel-2 molecular marker for detecting the *Rf*2 genotype

2.3 *Rf* 基因聚合新种质分子标记辅助选育

本研究采用“恢×恢”的恢复系选育模式^[2]，结合 MAS 进行 *Rf1* 和 *Rf2* 基因聚合恢复系材料的选育。其中在 F₂ 代分离群体单株中利用前期开发的 *Rf1* 基因型鉴定标记 *Rf1*-dCAPS-2 和本研究开发的 *Rf2* 基因型鉴定标记 *Rf2*-Indel-2 进行检测，选择同时含有 *Rf1* 和 *Rf2* 纯合显性基因型的单株摘荚进行单粒传法育种；在 F₃~F₄ 代均通过上述标记进行单株基因型鉴定，确定基因型稳定遗传；在种植的 F₅ 代株行中随机选择综合表现优异的单株再次进行分子标记鉴定。从 10 份代表性单株材料检测结果中可以看出，利用 *Rf1*-dCAPS-2 标记进行扩增的 PCR 扩增产物大小为 452 bp（图 3a）；经过限制性内切酶 *EcoR*I 酶切后均可得到一条与阳性对照 Williams 82 相同的 427 bp 左右的单一条带，而阴性对照 JLCMS9A 无法被切开，仍为 452 bp（图 3b）。利用 *Rf2*-Indel-2 标记进一步检测 10 份材料的 *Rf2* 基因型，发现上述材料均呈现与阳性对照 JLR500 一致的条带长度，约为 201 bp，略短于阴性对照 JLCMS9A 的 210 bp（图 3c）。上述验证结果表明，*Rf1* 和 *Rf2* 纯合显性基因已稳定聚合至 F₅ 代单株中。



a-标记 *Rf1*-dCAPS-2 扩增 PCR 产物电泳检测结果，b-酶切产物琼电泳检测结果，c-标记 *Rf2*-indel-2 电泳检测结果；M-DNA Ladder，W-Willimas 82，R-JLR500，A-JLCMS9A，1~10-F₅ 代代表性单株

a- Agarose gel detection diagram of PCR products amplified by the *Rf1*-dCAPS-2 marker;b- Agarose gel detection diagram of enzyme-digested products;c- Polyacrylamide gel electrophoresis detection diagram for the *Rf2*-indel-2 marker;M-DNA Ladder, W-Williams 82, R-JLR500, A-JLCMS9A, 1-10-F₅ representative plants

图 3 *Rf* 基因聚合 F₅ 代表性单株分子标记检测结果

Fig.3 Molecular marker detection results of representative plants of the F₅ generation for the *Rf* gene

2.4 *Rf* 基因聚合新种质农艺性状分析

田间观察并选取综合表现较好的 10 个 F₅ 代株行，每行随机拔出 5 株长势一致的单株进行考种，综合农艺性状表现，见表 3。其中，RR980 在株高、百粒重和总重等方面表现较好，但在单株荚数和粒数方面相对较低。相比之下，RR995 在单株荚数和粒数上具有优势，但其百粒重稍低于 RR980。这 2 份新种质不仅聚合了双亲恢复基因，还在部分农艺性状和产

量表现上均优于双亲。进一步观察 10 份种质材料的种脐色，发现其中 9 份材料种脐色同 Williams82 一致或接近为黑色，仅有 RR980 种脐色为黄色与 JLR500 相同（图 4）。

表 3 *Rf* 基因聚合新种质农艺性状比较分析

Table 3 Comparative analysis of agronomic traits of *Rf* gene aggregated new germplasm

新种质 Germplasm materials	株高（cm） Plant Height	节数 Number of Nodes	分支数 Number of Branches	单株荚数 Number of Pods per Plant	单株粒数 Number of Seeds per Plant	百粒重（g） 100-Seed Weight	总重（g） Total Weight
RR980	141.2±21.86a	25.2±2.28a	5.4±2.41 ^a	125.2±39.56 ^a	303.4±100.78 ^a	23.78±2.1 ^a	71.82±23.0a
RR982	121.2±12.99ac	19.2±1.79bc	2.4±1.14a	88.2±20.29a	208.6±41.59 ^a	18.8±1.49b	39.52±9.63a
RR985	141.4±10.6a	26±1a	5.2±3.27 ^a	140.6±45.08 ^a	275.8±98.98 ^a	23.76±2.72a	63.58±17.61a
RR986	158.4±14.72ad	25.4±1.95a	3.2±1.48 ^a	112±40.64 ^a	219±73.31 ^a	21.24±1.46a	46.68±16.23a
RR987	154.8±18.94a	23.8±2.39a	4±1.58 ^a	101.4±69.07a	205.2±126.51 ^a	20.1±0.99b	41.9±27.78a
RR988	165.2±18.49ad	25.6±0.89a	3±0.71 ^a	84.6±21.61a	186.6±43.43a	20.12±0.67b	37.72±10.06a
RR989	167.6±30.18ad	24±2.74a	3.8±0.45 ^a	98.8±17.08a	218.8±35.85 ^a	20.38±1.19a	44.56±7.74a
RR990	158.2±14.52ad	25.6±2.07a	2.8±1.48 ^a	134.4±57.91 ^a	295.6±122.68 ^a	18.58±2.41b	56.74±27.99a
RR993	147.6±7.86a	26.6±2.3a	4±2.24 ^a	113.8±30.78 ^a	232.2±51.78 ^a	20.58±1.7a	47.82±11.48a
RR995	154.6±8.62a	24.4±1.95a	4.8±1.48 ^a	167.8±52.3 ^{ab}	318.8±113.06 ^a	19.76±1.67b	64.14±27.52a
Williams 82	149.6±14.6a	22.6±2c	3.8±2 ^a	140.6±56.6a	250.8±100.6a	20.9±1.84a	51.4±20.16a
JLR500	102.6±9.6b	19.4±4.4b	1.8±0.8a	69.4±16.4ac	166.6±24.6a	21.14±2.24a	35.4±8.24 ^{da}

注：同列数据肩标字母不同表示差异显著（P<0.05）

Note: Different shoulder letters in the same column indicate significant difference (P<0.05)



图 4 亲本与 *Rf* 基因聚合新种质种子外观比较

Fig. 4 Comparison of appearance between parents and *Rf* gene aggregated new germplasm seeds

2.5 *Rf* 基因聚合新种质农艺性状主成分分析

通过对 *Rf* 基因聚合种质材料的农艺性状进行主成分分析（表 4），得到的第一主成分（PC1）解释了 60.355%的总方差。该主成分主要由分支、单株荚数、单株粒数和总重等性状主导。负荷值较高的性状主要包括总重、单株粒数和单株荚数，表明这些性状在上述材料的生长发育和产量形成中起主导作用。具体而言，单株荚数和单株粒数的增加直接推动了总产量的提升，而总重则反映了整体生长量的综合影响，因此这些性状对于农艺性状的主要贡

献不可忽视。而第二主成分（PC2）则解释了 19.816%的方差。它主要由株高、百粒重和分支性状主导，株高和百粒重的影响较为显著。

表 4 *Rf* 基因聚合新种质农艺性状主成分分析

Table 4 Principal component analysis of agronomic traits of *Rf* gene aggregated new germplasm

性状 Trait	主成分 Principal component	
	PC1	PC2
株高 Plant height	0.484	0.819
节数 Number of sections	0.726	0.457
分支 Branch	0.898	-0.16
单株荚数 Number of pods per plant	0.876	0.037
单株粒数 Number of grains per plant	0.895	-0.074
百粒重 100 grain weight	0.469	-0.632
总重 Total weight	0.933	-0.273
特征值 Eigenvalue	4.225	1.387
方差贡献率 Variance contribution rate/%	60.355	19.816
累计方差贡献率 Cumulative variance contribution rate/%	60.355	80.171

2.6 *Rf* 基因聚合新种质农艺性状综合评价

根据表 4 数据，通过对各成分得分系数的分析，得到了主成分的函数表达式（F1 和 F2 的得分公式）：

$$F1=0.484X1+0.726X2+0.898X3+0.876X4+0.895X5+0.469X6+0.933X7$$

$$F2=0.819X1+0.457X2+(-0.16)X3+0.037X4+(-0.074)X5+(-0.632)X6+(-0.273)X7$$

其中，F1 和 F2 分别代表主成分 1 和主成分 2 的得分，X1 至 X7 分别代表株高、节数、分支、单株荚数、单株粒数、百粒重、总重的标准化数值。

通过隶属函数对考种材料进行综合排名（表 5）可以看出，RR995 的综合得分最高，排名第一，表明其在多个农艺性状上的综合优势。其在 F1 上的得分为 5.16，表明其在生长特

性和产量相关性状上具有突出表现。RR980 排名第二，综合得分为 5.71，表明其在农艺性状上也表现优异，尤其是 F1 得分较高。

表 5 *Rf* 基因聚合新种质农艺性状综合排名

Table 5 Comprehensive ranking of agronomic traits of *Rf* gene aggregated new germplasm

种质材料 Germplasm materials	F1	F2	F	排名 Ranking
RR995	5.16	0.27	10.44	1
RR980	5.71	-2.03	10.28	2
RR985	5.09	-1.58	9.93	3
RR990	1.59	1.56	8.07	4
RR993	0.64	0.61	7.12	5
Williams 82	0.9	-0.22	7.11	6
RR986	-0.28	0.76	6.47	7
RR989	-0.8	1.18	6.18	8
RR987	-1.49	0.75	5.55	9
RR988	-2.7	1.79	4.90	10
RR982	-5.95	-0.81	1.81	11
JLR500	-7.87	-2.28	0.00	12

3 讨论

本团队前期研究发现，多数恢复系仅含有 *Rf1* 基因，但该类型恢复系与 JLCMS89A 及 JLCMS31A 等含有恢复抑制基因 *Rf-I* 的不育系杂交后，F₁ 育性无法被恢复，仍呈现不育表型^[22]。本研究利用含有 *Rf1* 基因的恢复系 Williams 82 与 JLCMS89A 杂交，对其 F₁ 单株进行花粉育性染色鉴定证实了上述结论，表明含 *Rf1* 基因的恢复系恢复谱不够广泛且恢复能力不强，这将直接影响利用该类型恢复系育成杂交大豆的育性稳定性，极端环境或气候条件下可能会有减产风险，从而阻碍杂交大豆的推广应用进程。*Rf2* 作为新鉴定的恢复基因，仅在 JLR500 等极少数恢复系中存在，其可正常恢复 JLCMS89A 育性，表明其不受 *Rf-I* 基因影响，恢复能力较强。根据水稻等其他作物的经验^[5-7]，若能聚合多个 *Rf* 基因至 1 个恢复系中，将有效提升其恢复能力和作为父本育成杂交种的育性稳定性。

本研究通过利用 *Rf2* 基因的 InDel 突变位点，开发鉴定 *Rf2* 基因型的分子标记 *Rf2*-Indel-2，结合本团队前期开发的 *Rf1* 基因型鉴定分子标记 *Rf1*-dCAPS-2^[19]，建立了 *Rf* 基因聚合的分子标记辅助选育技术，成功创制了综合农艺性状优良恢复系新种质，显著提高了恢复系新种质的育种效率和精准性。通过恢复基因 *Rf1* 和 *Rf2* 的联合效应，也将有效地增强了恢复系新

种质的恢复能力和配制杂交种的育性稳定性。本研究中,对创制的恢复系新种质及其亲本在本地生产田播种密度和栽培条件下进行种植和农艺性状分析,发现部分新种质在株高、单株荚数、粒数及百粒重等农艺性状上优于双亲,这为“三系”杂交大豆育种提供了优异的父本材料。因大豆株高、分枝数等性状与群体结构密切相关,上述新种质在适当密植情况下,能否还具备优于双亲的表现,尚需后续在育种实践中加以证实。另外,本研究研发的 *Rf* 基因聚合强恢复系分子标记辅助选育方法,还可用于经测交鉴定为非恢非保,但配合力较好的中间类型材料快速和针对性改良,以及新的未知恢保关系资源材料的初步鉴定。这将有效突破“三系”法中恢复系资源少,可用率低的瓶颈,为鉴定和选育更多的优异恢复系材料,用于强优势杂交大豆新品种创制提供有效支撑。

4 结论

本研究开发了大豆细胞质雄性不育恢复基因 *Rf2* 基因型鉴定的分子标记 *Rf2*-Indel-2, 结合 *Rf1* 基因型鉴定分子标记 *Rf1*-dCAPS-2, 实现了 *Rf1* 和 *Rf2* 基因聚合恢复系材料的分子标记辅助选育,成功创制了 *Rf* 基因聚合且综合农艺性状优良的恢复系新种质 RR995 和 RR980, 为“三系”杂交大豆育种提供了优异的恢复系材料,也为今后 *Rf* 基因聚合恢复系的快速选育和精准鉴定提供了技术支撑。

参考文献

- [1] 国家统计局. 年度数据. [2025-03-08]. <https://data.stats.gov.cn/easyquery.htm?cn=C01&zb=A060701&sj=2024>
- National Bureau of Statistics. National data. [2025-03-08]. <https://data.stats.gov.cn/easyquery.htm?cn=C01&zb=A060701&sj=2024>
- [2] 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
- [3] 张春宝, 孙妍妍, 赵丽梅. 大豆细胞质雄性不育遗传基础与育种应用. 植物遗传资源学报, 2024, 25(6):857-869
- Zhang C B, Sun Y Y, Zhao L M. Genetic basis and breeding application of cytoplasmic male sterility in soybean. Journal of Plant Genetic Resource. 2024, 25(6):857-869
- [4] 郑名敏, 黄强, 张鹏, 刘孝伟, 赵卓凡, 易洪杨, 荣廷昭, 曹墨菊. 玉米细胞质雄性不育及育性恢复研究进展. 植物学报, 2024, 59(6):999-1006
- Zheng M M, Huang Q, Zhang P, Liu X W, Zhao Z F, Yi H Y, Rong T Z, Cao M J. Research progress on cytoplasmic male sterility and fertility restoration in maize. Chinese Bulletin of Botany, 2024, 59(6):999-1006
- [5] 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, Xie H A. Application of indica restorer line, minghui 63, for rice hybridization. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 26(6):1101-1112
- [6] 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
- [7] Huang W C, Hu J, Yu C C, Huang Q, Wan L, Wang L L, Qin X J, Zhu R S, Li S Q, Zhu Y G. Two non-allelic nuclear genes 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
- [8] 傅静. 水稻 HL-CMS 育性恢复基因 *Rf6* 的初步研究. 湖北:中南民族大学, 2015
- Fu J. The preliminary study on the fertility restorer gene *Rf6* of rice HL-CMS. HuBei:South-Central Minzu University, 2015
- [9] 徐雪, 王英, 邹礼平, 魏朗, 彭方, 黄文超, 段俊枝, 姚国新. 水稻细胞质雄性不育恢复基因 *Rf6* 功能标记开发及微核心种质中 *Rf6* 基因的筛选. *河南农业科学*, 2017, 46(2):12-15
- Xu X, Wang Y, Zou L P, Wei L, Peng F, Huang W C, Duan J Z, Yao G X. Functional markers development of restore gene *Rf6* in rice and screening of *Rf6* in micro-core collections. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2017, 46(2):12-15
- [10] Prasad, K.R. Screening of lines for restoring fertility genes *Rf3* and *Rf4* with SSR markers in rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2017, 5(4):647-650
- [11] 张鲁刚, 许小勇, 张玉. 大白菜细胞质雄性不育育性恢复基因的分子标记及应用. 中国专利, CN201410165808.5. 2016-08-17
- Zhang L G, Xu X Y, Zhang Y. Molecular markers of cytoplasmic male sterility and fertility restoration genes in chinese cabbage and their applications. Chinese Patent, CN201410165808.5, 2016-08-17
- [12] 张鲁刚, 张华敏, 吴俊清. 一个大白菜 polCMS 育性恢复基因及其检测方法和应用. 中国专利, CN20161107150.9. 2022-02-08.
- Zhang L G, Zhang H M, Wu J Q. A gene for fertility restoration in polcms of chinese cabbage and its detection method and application. Chinese Patent, CN20161107150.9, 2022-02-08
- [13] 张华敏, 大白菜 pol CMS 恢复基因 *BrRfp1* 的图位克隆和不同恢复基因位点恢复机理的研究. 陕西:西北农林科技大学, 2017
- Zhang H M. The Study on the Map-Based Cloning of the Pol CMS Restorer Gene *BrRfp1* in chinese cabbage and the restoration mechanisms of different restorer gene loci. Shaanxi:Northwest A&F University, 2017
- [14] 龙卫华, 浦惠明, 高建芹, 胡茂龙, 张洁夫, 陈松. 甘蓝型油菜 MI CMS 系统恢复基因 *Rfm* 的分子标记及其应用. 江苏省农业科学院, 2021
- Long W H, Pu H M, Gao J Q, Hu M L, Zhang J F, Chen S. Molecular markers of the fertility restoration gene *Rfm* in the cabbage-type *brassica napus* MI CMS system and its application. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, 2021
- [15] Kang M C, Kang H J, Jung S Y, Lee H Y, Kang B C. The Unstable *Restorer-of-fertility* locus in pepper (*Capsicum annuum* L) is

- delimited to a genomic region containing *PPR* genes. *Theoretical & Applied Genetics*. 2022, 135:1923-1937
- [16] Zhang Z, An D, Cao Y, Yu H, Zhu Y, Mei Y, Zhang B, Wang L. Development and application of KASP markers associated with Restorer-of-fertility gene in *Capsicum annuum* L. *Physiology & Molecular Biology of Plants*. 2021, 27(12):2757-2765
- [17] 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
- [18] 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* of CMS-RN type sterile lines in soybean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(4):1186-1193
- [19] 赵国龙. 大豆细胞质雄性不育恢复基因 *Rf2* 的精细定位及候选基因克隆. 吉林:延边大学, 2020
- Zhao G L. Fine mapping and candidate gene cloning of soybean cytoplasmic male sterility *restorer-of-fertility* gene *Rf2*. Jilin:Yanbian University, 2020
- [20] 张春宝, 孔凡江, 赵国龙, 程群, 杨向东, 孔令平, 杨绪磊, 林春晶, 赵丽梅. 大豆细胞质雄性不育育性恢复基因 *GmPPR565* 及其应用. 中国专利, CN202210190020.4, 2023-09-05
- Zhang C B, Kong F J, Zhao G L, Cheng Q, Yang X D, Kong L P, Yang X L, Lin C J, Zhao L M. Soybean cytoplasmic male sterility fertility restoration gene *GmPPR565* and its application. Chinese Patent, CN202210190020.4, 2023-09-05
- [21] 邱丽娟, 常汝镇. 大豆种质资源描述规范和数据标准. 北京:中国农业出版社, 2006
- Qiu L J, Chang R Z. Soybean germplasm resource description standards and data standards. Beijing:China Agricultural Press, 2006
- [22] 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