

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.01061

## 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS3A 双亲雄性育性基因的 SSR 标记

李曙光 赵团结\* 盖钧镒\*

南京农业大学大豆研究所 / 国家大豆改良中心 / 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏南京 210095

**摘要:** 利用大豆质核互作雄性不育系 NJCMS3A 的质、核供体亲本 N21566 和 N21249 构建 F<sub>2</sub> 和 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 育性分离群体进行雄性育性的遗传分析与基因定位。结果表明, F<sub>1</sub> 正反交可育, F<sub>2</sub> 和 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 的可育株与不育株分离比例经  $\chi^2$  测验分别符合 3:1 和 1:1, 表明 NJCMS3A 供体亲本雄性育性由一对基因控制, 可育等位基因为显性。该基因可能是 NJCMS3A 的一个恢复基因。选用 793 对 SSR 引物对 F<sub>2</sub> 和 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 群体分别进行育性基因定位, 发现该育性基因位于 O 连锁群上, 在 Satt331 和 Satt477 标记之间, 与 Satt331、CSSR133 和 Satt477 标记距离的次序一致, 分别为 8.1~10.4、11.4~16.4 和 13.3~19.2 cM。

**关键词:** 大豆; 质核互作雄性不育; 雄性育性遗传; 基因定位

## Mapping Male Fertility Gene with SSR Markers in Parents of Cytoplasmic-Nuclear Male-Sterile Line NJCMS3A in Soybean

LI Shu-Guang, ZHAO Tuan-Jie\*, and GAI Jun-Yi\*

Soybean Research Institute of Nanjing Agricultural University / National Center for Soybean Improvement / National Key Laboratory for Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China

**Abstract:** Utilization of the three lines [cytoplasmic-nuclear male-sterile (CMS) line, maintainer line, and restorer line] in producing hybrids with heterosis has been very successful in a number of crops including soybean. The soybean CMS line NJCMS3A was developed through six consecutive backcross generations with N21566 as cytoplasm source and N21249 as nuclear donor. The objective of our study was to reveal the genetic mechanism and mapping the male fertility gene in the two parents of the CMS line NJCMS3A, i.e. N21566 and N21249. The male fertility of (N21566×N21249) F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> showed that the segregation ratio of fertile to sterile plants fitted the expected ratios of 3:1 and 1:1, respectively, indicating one pair of gene conferring male fertility in the parents of NJCMS3A with dominance allele in N21249 being male fertile. This gene might be one of the restorer genes for the male sterility of NJCMS3A. The mapping results on BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> showed that out of the 793 randomly selected SSR markers, Satt331, CSSR133 and Satt477 on linkage group O were linked to the male fertility gene *Rf* with their genetic distances of 8.1–10.4, 11.4–16.4, and 13.3–19.2 cM, respectively, in a same order and its location between Satt331 and Satt477.

**Keywords:** Soybean; Cytoplasmic-nuclear male sterility; Fertility inheritance; Gene mapping

植物质核互作雄性不育(cytoplasmic-nuclear male sterility), 简称细胞质雄性不育(CMS), 是由线粒体基因组的变异或特异的线粒体基因表达导致的, 而细胞核恢复基因(*Rf*)抑制线粒体基因组特定 CMS 基因的表达, 恢复雄性育性功能<sup>[1-3]</sup>。细胞质雄性不育系、保持系以及恢复系“三系”配套是作物杂种优势生产利用的主要途径, 已在玉米、油菜、水稻、高粱等农作物中广泛用于生产杂交种子, 提高了作物

单产。大豆质核互作雄性不育的发现首先见于 Davis 申请的美国专利<sup>[4]</sup>, 该专利已到期, 未见该发现进一步应用的报道。我国吉林省农业科学院<sup>[5-6]</sup>、南京农业大学<sup>[7-10]</sup>、安徽省农业科学院<sup>[11-13]</sup>和阜阳市农业科学研究所<sup>[14]</sup>已经育成数十个质核互作雄性不育系, 并实现了“三系”配套。利用质核互作雄性不育系统, 已经育成并审定了大豆杂种品种<sup>[15-17]</sup>。

优良恢复系是利用 CMS 系统配制杂交种的基

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2009AA101106, 2006AA100104), 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB125906, 2009CB118404, 2006CB101708), 国家自然科学基金项目(30671314)和高等学校创新引智计划(B08025)资助。

\* 通讯作者(Corresponding authors): 赵团结, 盖钧镒, E-mail: sri@njau.edu.cn; Tel: 025-84395405

Received(收稿日期): 2010-01-18; Accepted(接受日期): 2010-04-20.

础, 但育性恢复性是数量性状, 易受环境影响, 并且需通过测交才能确定。定位恢复基因, 利用分子标记对恢复基因进行标记辅助选择, 可提高育种效率。许占友等<sup>[18]</sup>对 2 个不育系(阜 CMS1A 和阜 CMS2A) 和 5 个恢复系的核基因池进行多态性筛选, 发现 3 个特异 SSR 引物 Satt143、Satt168 和 Satt441。赵丽梅等<sup>[19]</sup>利用(YA/167) F<sub>2</sub> 群体及(YA//YB/167) 群体进行引物筛选, 获得 2 对与恢复基因有关的位于 J 连锁群上引物 Satt414/16.4 cM 和 Satt596/14.6 cM; 利用(JLCMS82A×吉恢 1 号) F<sub>2</sub> 分离群体, 发现 J 连锁群上的 SSR 标记 Sctt011、Satt547 与恢复基因连锁, 遗传距离分别为 3.6 cM、5.4 cM<sup>[20]</sup>。Yang 等<sup>[21]</sup>将 NJCMS1A 的 2 个恢复基因定位在 M 和 A1 连锁群, SSR 标记 Satt626、Satt300 与恢复基因的距离分别为 9.75 cM 和 11.18 cM。董建生等<sup>[22]</sup>发现位于 D2 连锁群上的 Satt135 与 NJCMS2A 恢复基因相连锁, 遗传距离为 11.47 cM。汤复跃等<sup>[23]</sup>根据可育、不育、半不育基因池多态性的表现, 将大豆 M-CMS 恢复系 WR016 的恢复基因定位在 A 连锁群上。不同研究所得结果不同, 可能与研究材料、方法不同有关, 也反映了大豆现有 CMS 系统的遗传基础比较复杂。

大豆质核互作雄性不育系 NJCMS3A 为南京农业大学利用新不育细胞质亲本 N21566 (湖北地方品种) 与安徽品种 N21249 杂交和连续回交获得, 遗传研究表明其具配子体不育特性, 但其亲本 N21566、N21249 与孢子体不育的 NJCMS1A 的亲本 N8855、N2899 杂交表现复杂的遗传关系, 推测 NJCMS3A 可能受多对基因控制<sup>[10]</sup>。本文利用大豆质核互作雄性不育系 NJCMS3A 细胞质、核供体亲本构建分离群体, 对育性基因进行遗传和定位分析, 以期获得与雄性育性基因紧密连锁的分子标记, 为大豆细胞质雄性不育三系的选育与利用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

大豆质核互作雄性不育系 NJCMS3A 的细胞质、核供体亲本 N21566 和 N21249, 杂交组合(N21566×N21249) F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>, 反交组合(N21249×N21566) F<sub>1</sub>、[N21566/N21249//N21249] BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 群体。供试材料均由国家大豆改良中心提供, 田间试验在国家大豆改良中心江浦试验站进行。

### 1.2 大豆雄性育性的鉴定方法

在盛花期, 目测判别其花药的外观形态(散粉或

不散粉), 并利用醋酸洋红染色等方法显微镜检查花粉育性(染色或不染色), 鉴定植株育性。成熟期可育植株能够正常成熟, 无不实肉荚, 荚成熟时整株均呈黄色, 叶片完全脱落, 具有大量结实荚; 不育株在成熟期整株仍呈浓绿色, 叶片肥厚不脱落, 茎秆粗壮, 结有大量未受精的, 长约 0.3~1.2 cm 的幼嫩不实荚(小肉荚)。综合盛花期和成熟期鉴定结果将植株分为不育和可育两类, 分离结果采用  $\chi^2$  适合性测验。

### 1.3 DNA 的提取

在大豆 V3 期, 从 N21566、N21249, 二者杂交 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 及 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (N21566/N21249//N21249) 群体植株上分单株摘取叶片, 在 -70℃ 超低温冰箱中保存备用。采用 CTAB 法<sup>[24]</sup> (略加改进) 提取叶片 DNA, 并检测其浓度和质量。

### 1.4 基因池的构建

利用混合分组分析法<sup>[25]</sup> (bulked segregate analysis, BSA), 在 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 群体中, 随机选取 10 株不育株, 取等量 DNA 混合构成不育基因池, 简称 S 池; 随机选取 10 株可育株, 取等量 DNA 混合构成可育基因池, 简称 F 池。

### 1.5 SSR 标记分析

从 Song 等<sup>[26]</sup>整合的大豆公共遗传图谱, 随机选取 787 对 SSR 引物, 引物序列来自 SoyBase (<http://129.186.26.94/ssr.html>); 从 Xia 等<sup>[27]</sup>构建的大豆遗传图谱(O 连锁群) 选取 6 对 SSR 引物; 所有引物由上海英骏(Invitrogen) 生物技术有限公司合成。PCR 体系(10  $\mu$ L) 含 3.0  $\mu$ L 模板 DNA (10 ng  $\mu$ L<sup>-1</sup>), 3  $\mu$ L Primer (2 pmol  $\mu$ L<sup>-1</sup>), 1.5  $\mu$ L 10×buffer (free MgCl<sub>2</sub>), 0.24  $\mu$ L dNTP Mix (2.5 mmol L<sup>-1</sup>), 0.8  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mmol L<sup>-1</sup>), 0.14  $\mu$ L Taq polymerase (5 U  $\mu$ L<sup>-1</sup>), 1.4  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O。PCR 程序为 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 40 s, 46~55℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 50 s, 共进行 30 次循环; 72℃ 延伸 8 min, 4℃ 保存。每对 SSR 引物具有特定的退火温度, PCR 扩增程序根据引物实际  $T_m$  (退火温度) 值设定, 其他程序不变。PCR 在 EDC-810 型基因扩增仪中进行, 将扩增产物置 4℃ 冰箱中备用。扩增产物加入指示剂后, 经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染, 利用美国 Bio-Rad 公司 VersaDoc 4000 型高分辨率凝胶成像系统进行凝胶图像扫描, 记录实验结果。

### 1.6 数据处理与分析

根据 PCR 扩增产物电泳后显示的谱带, 按以下方法赋值, 与亲本 N21566 带型一致者记录为“A”,

与亲本 N21249 带型一致者记录为“B”, 数据缺失记录为“-”, 杂合型记录为“H”, 将结果输入计算机。

采用 JoinMap 3.0 作图软件分析标记之间及其与育性基因间的连锁, 构建分子遗传图谱, 采用 Kosambi 函数计算遗传图距。

## 2 结果与分析

### 2.1 NJCMS3A 供体亲本杂交后代雄性育性的遗传

2007 年 N21249 和 N21566 的正反交组合  $F_1$  在成熟期表现正常可育。2008 年  $F_2$ 、 $BC_1F_1$  群体育性发生分离, 在盛花期采用醋酸洋红染色法进行花粉育性鉴定, 单株花粉可育性从 0 到 100%, 但表现明显的双峰分布。结合收获期植株育性表现, 确定以花粉可育率 10% 为界,  $\leq 10\%$  为不育株,  $>10\%$  为可育株(表 1)。在收获期, 根据生长势、结荚情况、肉荚有无、叶片衰老程度等综合判定植株育性, 收获期植株育性与盛花期花粉育性保持一致。

从表 2 可见,  $F_2$  雄性可育与不可育株的比例为 82 : 24, 符合 3 : 1 的表型分离比例( $\chi^2 = 0.20$ ,  $P =$

0.65), 并且收获期植株育性与盛花期花粉育性保持一致, 育性分离表现孢子体遗传特点。 $BC_1F_1$  雄性可育与不可育株的比例为 25 : 27, 符合 1 : 1 的分离比例( $\chi^2 = 0.02$ ,  $P = 0.89$ ),  $BC_1F_1$  的基因型分离结果支持  $F_2$  表型分离的结果, 该组合雄性育性分离受一对基因控制。

鉴于 NJCMS3A 的细胞质、核亲本 N21566 和 N21249 之间有 1 对育性基因差异, 可以推测 NJCMS3A 的细胞质亲本 N21566 的基因型为  $S(RfRf)$ , 细胞核亲本 N21249 的基因型为  $N(rfirf)$ , S 代表具有不育基因的细胞质, N 代表细胞质具有正常可育基因。(N21566 $\times$ N21249)  $F_1$  的基因型为  $S(Rfirf)$ , [N21566/N21249//N21249]  $BC_1F_1$  群体基因型为  $1/2 S(RfRf)$  与  $1/2 S(rfirf)$ 。基因型为  $S(Rfirf)$  的植株表现可育, 而基因型  $S(rfirf)$  表现不育, 因此  $BC_1F_1$  群体中可育与不育株的比例为 1 : 1。 $F_2$  基因型分离为  $1/4 S(RfRf)$ 、 $2/4 S(Rfirf)$  和  $1/4 S(rfirf)$ 。基因型为  $S(RfRf)$  与  $S(Rfirf)$  的植株均表现可育, 而基因型  $S(rfirf)$  表现不育,  $F_2$  群体中可育与不育株的比例为 3 : 1。因而 NJCMS3A 雄性育性的基因型应为  $S(rfirf)$ 。

表 1  $F_2$  与  $BC_1F_1$  群体花粉育性的次数分布  
Table 1 Frequency distribution of pollen fertility in  $F_2$  and  $BC_1F_1$  (%)

世代 Generation	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100	合计 Sum
$F_2$	24	0	0	3	4	16	9	10	32	32	106
$BC_1F_1$	27	2	4	2	1	4	2	0	7	7	52

表 2  $F_2$  与  $BC_1F_1$  植株育性适合性测验  
Table 2 Chi-square tests of fertility performance of  $F_2$  and  $BC_1F_1$  populations

世代 Generation	可育 Fertile plant	不育 Sterile plant	总数 Total	理论比例 Expected ratio	$\chi^2_c$	$P$
$F_2$	82	24	106	3:1	0.20	0.65
$BC_1F_1$	25	27	52	1:1	0.02	0.89

### 2.2 NJCMS3A 供体亲本雄性育性基因的定位

用分布于 20 条连锁群的 793 对 SSR 引物对亲本 N21566 和 N21249 进行检测, 其中 413 对在亲本间表现多态性, 多态性频率为 52.08%。进一步利用这 413 对引物对[N21566/N21249//N21249]  $BC_1F_1$  群体构建的可育基因池和不育基因池进行分析, 结果显示, 18 对 SSR 引物在基因池之间表现多态性。利用这 18 对 SSR 引物对 2 个亲本(N21566 和 N21249)、可育池(F 池)与不育池(S 池)进行扩增, 结果表明位于 O 连锁群上的 Satt153、Satt243、Satt331、Satt477 与 CSSR133 等 5 对引物表现出多态性。

利用上述 5 对 SSR 引物, 对  $BC_1F_1$  群体进行 SSR-PCR 扩增, 对扩增结果进行卡方检验, 这 5 对

引物计算  $\chi^2$  值均小于  $\chi_{0.05,1}^2 = 3.84$ , 说明在 5% 水平上这些标记的分离符合 1 : 1 的期望分离比例(表 3)。结合该群体各单株的育性表型数据, 采用 JoinMap 3.0 作图软件, 对 5 个标记位点及 1 个育性基因位点(暂定为  $Rf$ )进行作图分析, 结果表明该育性基因位点与 Satt331、CSSR133 和 Satt477 遗传距离较近, 分别为 10.4、16.4 和 19.2 cM(图 1-A)。

进一步在 O 连锁群上选取 Satt331、Satt153、Satt243、CSSR133、Satt477 和 Satt123 等 6 对 SSR 引物, 在  $F_2$  分离群体上进行 SSR-PCR 扩增, 结果表明这 6 对引物均符合 1 : 2 : 1 的分离比例(表 4)。采用 JoinMap 3.0 作图软件, 对这 6 个标记位点及 1 个育性基因位点进行作图分析, 同样发现该育性基因

表 3 具有多态性的 SSR 标记在 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 群体中的分离情况  
Table 3 Segregation of five polymorphic SSR markers in BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> population

引物 Primer	杂合型 Heterozygous type	父本型 Paternal type	总数 Total	$\chi^2_{c(1:1)}$	<i>P</i>
Satt331	27	25	52	0.02	0.8897
Satt153	26	26	52	0.02	0.8897
Satt243	27	25	52	0.02	0.8897
CSSR133	25	27	52	0.02	0.8897
Satt477	26	26	52	0.02	0.8897

表 4 具有多态性的 SSR 标记在 F<sub>2</sub> 群体中的分离情况  
Table 4 Segregation of six polymorphic SSR markers in F<sub>2</sub> population

引物 Primer	母本型 Maternal type	杂合型 Heterozygous type	父本型 Paternal type	总数 Total	$\chi^2(1:2:1)$	<i>P</i>
Satt331	22	57	27	106	1.08	0.5841
Satt153	23	56	27	106	0.64	0.7256
Satt243	24	54	28	106	0.34	0.8438
CSSR133	22	57	27	106	1.08	0.5841
Satt477	26	54	26	106	0.04	0.9813
Satt123	30	46	30	106	1.84	0.3967

位点与 Satt331、CSSR133 和 Satt477 连锁距离较近, 分别为 8.1、11.4 和 13.3 cM (图 1-B)。

Satt331、CSSR133 和 Satt477 标记距离的次序一致, 依次为 8.1~10.4、11.4~16.4 和 13.3~19.2 cM。

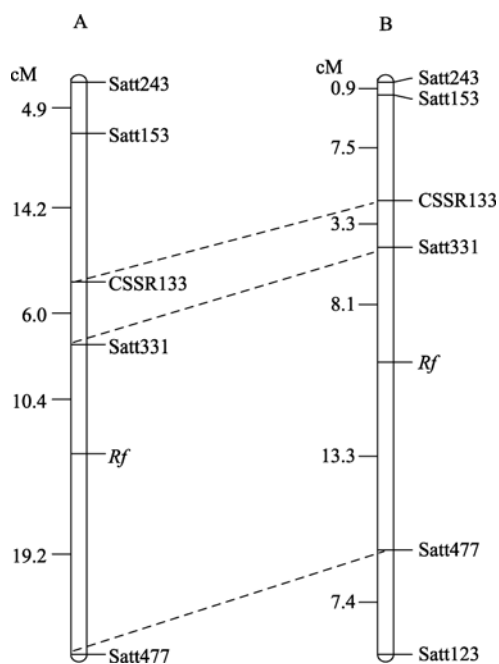


图 1 NJCMS3A 雄性育性基因 *Rf* 的遗传连锁图谱  
Fig. 1 Linkage map between male fertility gene *Rf* and SSR markers in NJCMS3A

A: 利用 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 群体构建的连锁图谱; B: 利用 F<sub>2</sub> 群体构建的连锁图谱。

A: location of *Rf* on linkage map from BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> population; B: location of *Rf* on linkage map from F<sub>2</sub> population.

综合以上实验, 从同一组合的 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 和 F<sub>2</sub> 两个群体分别进行雄性育性基因定位获得一致结果, 该基因位于 O 连锁群 Satt331 和 Satt477 之间(图 1), 离

### 3 讨论

育性鉴定、划分标准是细胞质雄性不育及其恢复性遗传研究的前提条件, 准确鉴定分离群体的单株育性, 对于试验研究结果至关重要。在大豆雄性不育研究中, 常用 3 种方法确定雄性育性。一是肉眼观察花药散粉情况。可育植株的花药开裂、大量散花粉, 且形态为鲜黄色、饱满; 而不育植株花药瘦小、发白、花药不开裂, 或花药虽开裂但不散粉, 该法简便但较粗放。二是显微镜检测花粉败育率。包括以 1% 醋酸洋红染色、I<sub>2</sub>-KI 染色以及花粉萌发试验鉴定花粉育性, 由于大豆花期较长、开放花朵在植株上分布相对分散, 单朵花受环境影响较大, 需检测较多花朵才能反映实际育性, 因而较费时费力。三是成熟期整株的形态特征。典型不育植株成熟时延迟落叶, 叶片浓绿肥厚, 茎秆粗壮, 着生大量未受精的不实肉荚, 一般情况下容易识别。但在一定条件下, 由于存在天然昆虫传粉, 某些不育株也大量结荚, 甚至不能区分可育和不育株。本研究为降低非遗传因素对植株育性的影响, 在大豆育性鉴定工作中, 综合运用了 3 种方法, 并以成熟期植株育性判断结果为准。大豆为严格的自花受粉作物, 天然异交率低。在南京夏大豆开花期天气多雨潮湿, 对不育系结实影响大, 一般不育株结荚不足可育株的 5%<sup>[28]</sup>, 因此本文所采用的育性鉴定方法是可行的。

相对于质核互作雄性不育系, 其恢复系的细胞核中含有恢复基因, 利用[不育系//保持系/恢复系]三交  $F_1$  分离群体可进行质核互作雄性不育系的恢复基因定位。由于 NJCMS3A 的细胞质亲本 N21566 具有不育细胞质, 细胞核中育性基因(恢复基因)正常; 而其细胞核亲本即保持系 N21249 细胞质基因正常, 细胞核中含有不育基因, 不育细胞质与不育细胞核两者结合, 选育出质核互作雄性不育系 NJCMS3A。相比于不育系, 用原始核质供体材料做亲本可追踪该不育系育性基因的传递, 更好地了解育性遗传基础。本研究利用 NJCMS3A 的雄性育性完全正常的质核供体亲本 N21566、N21249 构建  $F_2$  和  $BC_1F_1$  群体, 发现 N21566 和 N21249 之间存在一对控制雄性育性的核基因, 其中可育等位基因显性, 而与之对应的不育等位基因隐性, 这与 Zhao 等<sup>[10]</sup> 研究结果一致。但本研究(N21566×N21249)  $F_2$  出现较多的不育株, 育性分离表现为孢子体不育, 而由该组合衍生的 NJCMS3A 却表现配子体不育。已报道的一些大豆细胞质雄性不育系, 其选育的早代 ( $F_1$  和  $BC_1F_1$ ) 也表现与稳定不育系不同的遗传分离<sup>[11-14]</sup>。研究表明 NJCMS3A 雄性不育性可能受多对表现复杂互作关系的基因控制<sup>[10]</sup>, 本研究所定位的供体亲本核育性基因应该是 NJCMS3A 三系遗传体系的一个重要位点, 它与其他基因位点的关系有待进一步研究。

大豆质核互作雄性不育恢复基因的标记定位有待深入。许占友等<sup>[18]</sup>、赵丽梅等<sup>[19]</sup>、Wang 等<sup>[20]</sup>、Yang 等<sup>[21]</sup>、董建生等<sup>[22]</sup>和汤复跃等<sup>[23]</sup>利用不同的材料组合, 把恢复基因分别标记定位于(L、B2 与 K)、J、(M 与 A1)、D、A1 连锁群(参照 Song 等<sup>[26]</sup>构建的连锁群)。其中, 许占友等<sup>[18]</sup>与汤复跃等<sup>[23]</sup>所利用不育系的不育细胞质供体亲本相同, 均为 ZD8319, 但是恢复基因分别定位在不同连锁群上, 推测这是因为核遗传背景不同, 造成育性恢复修饰基因差异; 同时由于雄性育性受环境条件影响以及育性划分标准不同, 最终导致育性恢复基因标记定位结果不一致。本研究利用(N21566×N21249)  $BC_1F_1$  群体发现位于 O 连锁群上的 Satt331、CSSR133 和 Satt477 与雄性不育基因相连锁, 并利用该组合  $F_2$  群体进行验证。虽然与 NJCMS3A 育性基因连锁的 3 个 SSR 标记与育性基因的遗传距离较大, 但目前大豆公共遗传图谱 SSR 标记数量已经达到 1 015 个<sup>[26]</sup>, 利用 Williams 82 全基因组信息也可开发大量新标记, 这

些初定位结果将为进一步寻找与恢复基因更紧密连锁的分子标记奠定基础。

#### 4 结论

大豆质核互作雄性不育系 NJCMS3A 细胞质与核供体亲本 N21566、N21249 之间有 1 对育性基因存在差异, 可育等位基因为显性。该基因在 O 连锁群上, 位于 Satt331 和 Satt477 之间, 距离 Satt331、CSSR133 和 Satt477 标记分别为 8.1~10.4、11.4~16.4 和 13.3~19.2 cM。

#### References

- [1] Bentolila S, Alfonso A A, Hanson M R. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 10887-10892
- [2] Schnable P S, Wise R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 175-180
- [3] Wise R P, Pring D R. Nuclear-mediated mitochondrial gene regulation and male fertility in higher plants: light at the end of the tunnel? *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 10240-10242
- [4] Davis W H. Route to hybrid soybean production. United States Patent. 1985, US 4545146
- [5] Sun H(孙寰), Zhao L-M(赵丽梅), Huang M(黄梅). Studies on cytoplasmic-nuclear male sterile soybean. *Chin Sci Bull*, 1993, 38: 1535-1536 (in Chinese)
- [6] Zhao L-M(赵丽梅), Sun H(孙寰), Huang M(黄梅). The development and preliminary studies on cytoplasmic male sterile soybean line ZA. *Soybean Sci (大豆科学)*, 1998, 17(3): 268-270 (in Chinese with English abstract)
- [7] 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 Genet Newslett*, 1995, 22: 55-58
- [8] Ding D R, Gai J Y, Cui Z L, Qiu J X. Development of a cytoplasmic-nuclear male-sterile line of soybean. *Euphytica*, 2002, 124: 85-91
- [9] Bai Y-N(白羊年), Gai J-Y(盖钧镒). Development of soybean cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS2A and restorability of its male fertility. *Sci Agric Sin (中国农业科学)*, 2003, 36(7): 740-745 (in Chinese with English abstract)
- [10] 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
- [11] Zhang L(张磊), Dai O-H(戴昶和). Selection and breeding of nucleo-cytoplasmic male sterile line W931A in soybean. *Sci Agric Sin (中国农业科学)*, 1997, 30(6): 90-91 (in Chinese with English abstract)
- [12] Zhang L(张磊), Dai O-H(戴昶和), Zhang L-Y(张丽亚). Breed-

- ing of soybean male sterile line of nucleo-cytoplasmic interaction. *Soybean Sci* (大豆科学), 1999, 18(4): 327–330 (in Chinese with English abstract)
- [13] Zhang L(张磊), Dai O-H(戴瓯和), Huang Z-P(黄志平), Li J-Q(李杰坤). Selection of soybean male sterile line of nucleo-cytoplasmic interaction and its fertility. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1999, 32(4): 34–38 (in Chinese with English abstract)
- [14] Xu Z-Y(许占友), Li L(李磊), Chang R-Z(常汝镇), Qiu L-J(邱丽娟), Wang M-B(汪茂斌), Li Z(李智), Yu W(于伟), Li X-H(李向华). Genetic analysis of nuclear male sterile genes of soybean cytoplasmic male sterile lines. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1999, (suppl): 1–8 (in Chinese with English abstract)
- [15] Zhao L-M(赵丽梅), Sun H(孙寰), Wang S-M(王曙明), Wang Y-Q(王跃强), Huang M(黄梅), Li J-P(李建平). Breeding of hybrid soybean HybSoy 1. *Chin J Oil Crop Sci* (中国油料作物学报), 2004, 26(3): 15–17 (in Chinese with English abstract)
- [16] Peng B(彭宝), Zhao L-M(赵丽梅), Wang S-M(王曙明), Cheng Y-X(程砚喜), Sun H(孙寰), Wang Y-Q(王跃强), Li J-P(李建平), Zhang W-L(张伟龙). Studies on breeding of “HybSoy 2” soybean and high yield. *J Jilin Agric Sci* (吉林农业科学), 2008, 33(2): 3–4 (in Chinese with English abstract)
- [17] Zhang L(张磊), Dai O-H(戴瓯和), Huang Z-P(黄志平), Li J-Q(李杰坤), Zhang L-Y(张丽亚), Hu C(胡晨). Breeding of hybrid soybean Zayoudou 1. *Soybean Bull* (大豆通报), 2007, (2): 14–16 (in Chinese)
- [18] Xu Z-Y(许占友), Li L(李磊), Qiu L-J(邱丽娟), Chang R-Z(常汝镇), Wang M-B(汪茂斌), Li Z(李智), Guo B(郭蓓). Selection of three lines and localization of the restorer genes in soybean using SSR markers. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1999, 32(2): 32–38 (in Chinese with English abstract)
- [19] Zhao L-M(赵丽梅), Wang Y-M(王玉民), Sun H(孙寰), Zhao H-K(赵洪锟), Cheng Y-X(程延喜), Peng B(彭宝), Wang S-M(王曙明), Zhang W-L(张伟龙), Dong Y-S(董英山). Identification of SSR markers linked to the fertility restorer gene for the CMS in soybean. *Soybean Sci* (大豆科学), 2007, 26(6): 835–939 (in Chinese with English abstract)
- [20] Wang Y, Zhao L, Wang X, Sun H. Molecular mapping of a fertility restorer gene for cytoplasmic male sterility in soybean. *Plant Breed*, 2010, 129: 9–12
- [21] 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 of cytoplasmic-nuclear male-sterile line NJCMS1A in soybean. *Plant Breed*, 2007, 126: 302–305
- [22] Dong J-S(董建生), Yang S-P(杨守萍), Yu D-Y(喻德跃), Gai J-Y(盖钧镒). Inheritance and gene tagging of male fertility restoration of cytoplasmic-nuclear male sterile line NJCMS2A in soybean. *Soybean Sci* (大豆科学), 2008, 27(2): 181–185 (in Chinese with English abstract)
- [23] Tang F-Y(汤复跃), Zhou L-R(周立人), Cheng X(程潇), Zhang L(张磊), Chen P(陈培), Jiang Y-F(江莹芬). SSR marker location for fertility restorer gene of M-cytoplasmic male sterility in soybean. *Soybean Sci* (大豆科学), 2008, 27(3): 383–386 (in Chinese with English abstract)
- [24] Keim P, Olson T C, Shoemaker R C. A rapid protocol for isolating soybean DNA. *Soybean Genet Newslett*, 1988, 15: 150–152
- [25] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregate analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 9828–9832
- [26] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C, Lark K G, Concibido V C, Delannay X, Specht J E, Cregan P B. A new integrated genetic linkage map of the soybean. *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 122–128
- [27] Xia Z, Tsubokura Y, Hoshi M, Hanawa M, Yano C, Okamura K, Ahmed T A, Anai T, Watanabe S, Hayashi M, Kawai T, Hossain K G, Masaki H, Asai K, Yamanaka N, Kubo N, Kadowaki K, Nagamura Y, Yano M, Sasaki T, Harada K. An integrated high-density linkage map of soybean with RFLP, SSR, STS, and AFLP markers using a single F<sub>2</sub> population. *DNA Res*, 2007, 14: 257–269
- [28] Ding D-R(丁德荣), Gai J-Y(盖钧镒). Pollinating insects and natural outcrossing amount of soybean male sterile materials in southern china. *Soybean Sci* (大豆科学), 2000, 19(1): 74–79 (in Chinese with English abstract)