

水稻野败型三系杂交种纯度检测功能标记的开发与应用

张梦柯^{1, #} 陆佳雨^{2, #} 何金³ 许学² 吴爽² 王沛然² 陈若凡² 金青^{1, *} 汪秀峰^{2, *}

(¹ 安徽农业大学, 生命科学学院, 合肥 230036; ² 安徽省农业科学院 水稻研究所/农业农村部农作物生态环境安全检验检测中心(合肥), 合肥 230031;

³ 六安市农业科学研究所, 安徽 六安 237000; #共同第一作者; *通信作者, email: qingjin@ahau.edu.cn; xiufengwang66@sohu.com)

Development and Application of Functional Markers for Purity Identification of Wild-abortive Three-line Hybrid Rice

ZHANG Mengke^{1, #}, LU Jiayu^{2, #}, HE Jin³, XU Xue², WU Shuang², WANG Peiran², CHEN Ruofan², JIN Qing^{1, *}, WANG Xiufeng^{2, *}

(¹ School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; ² Rice Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences/Crop Ecological Environment Safety Inspection and Testing Center (Hefei), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hefei 230031, China; ³ Lu'an Academy of Agricultural Sciences, Lu'an 237000, China; #These authors contributed equally to this work; *Corresponding author, email: qingjin@ahau.edu.cn; xiufengwang66@sohu.com)

Abstract: 【Objective】Developing stable, efficient, and reliable markers for purity testing of three-line hybrid seeds is crucial for current hybrid rice seed production. 【Method】Based on the specific sequences of the wild abortive-type sterility gene *WA352*, the major fertility-restoring gene *Rf4*, and the internal reference gene *Actin*, multiple single-gene detection markers were designed. PCR amplification was then performed by optimizing the primer mixture ratio. 【Result】A mixture of primers WA352-2, Rf4-3, and Actin-3 in a ratio of 1:11:3 enabled simultaneous detection of the genotypes of *WA352*, *Rf4*, and *Actin* in a single PCR reaction, allowing differentiation among wild abortive-type CMS lines, restorer lines, maintainer lines, and hybrids. 【Conclusion】The detection method established in this study is simple to perform and yields stable and reliable results. It can not only identify genotypes in wild-abortive three-line rice but also serve as an effective tool for molecular marker-assisted breeding. By improving the accuracy of purity assessment during breeding, this method provides strong support for achieving high-yield and high-quality rice breeding objectives in China.

Keywords: rice; wild-abortive; three-line; detection marker; PCR

摘要: 【目的】开发稳定、高效、可靠的三系杂交种纯度检测标记, 对于当前三系水稻制种而言至关重要。【方法】根据野败型不育基因*WA352*、主效恢复基因*Rf4*和内参基因*Actin*的特异性序列, 设计了多对单基因检测标记, 并通过调整引物混合比例, 进行PCR扩增。【结果】引物WA352-2、Rf4-3和Actin-3按照1:11:3的比例混合可实现单次PCR扩增同时检测*WA352*、*Rf4*和*Actin*的基因类型, 区分野败型不育系、恢复系、保持系和杂交种。【结论】本研究开发的检测标记操作方法简便, 结果稳定可靠, 不仅能够检测野败型三系水稻的基因型, 还可以作为分子标记辅助育种的有效工具, 提高育种过程中纯度检测结果的准确性, 从而为我国水稻高产优质育种目标的实现提供有力支持。

关键词: 水稻; 野败; 三系; 检测标记; PCR

水稻是我国的主要粮食作物之一, 全国一半以上的人口以水稻为主食。水稻高产稳产是我国长期的育种目标, 然而, 随着耕地面积不断减少、极端天气频发等不利因素的出现, 我国粮食安全面临着前所未有的挑战^[1]。

三系杂交水稻的成功选育, 使水稻杂种优势利用取得重要突破和成功, 显著提高了水稻产量, 解决了近20%人口的粮食短缺问题, 保障了国家粮食安全^[2-3]。三系杂交水稻包含多种类型, 如野败型(Wild Abortive type, CMS-WA)、红莲型(Hong Lian

收稿日期: 2025-02-14; 修改稿收到日期: 2025-07-15。

基金项目: 安徽省科技攻坚计划项目(重大项目, 202423m10050002); 水稻种质创新与分子改良安徽省重点实验室开放基金资助项目(SDKF-2024-05)。

type, CMS-HL)、包台型(Boro II type, CMS-BT)、印水型(Indonesia 6 type, CMS-ID)、冈型(Gambica type, CMS-GA)等, 其中, 野败型三系在杂交水稻制种过程中应用最为广泛, 在三系杂交稻审定品种中, 野败型水稻杂交种占比为 50.59%, 并且其雄性不育和育性恢复的机理研究也相对清晰^[4-5]。野败型不育系的不育性是由线粒体嵌合基因 *WA352* 控制, 该基因编码的蛋白在花药绒毡层中特异性积累, 并进一步与核基因编码的线粒体定位蛋白 *OsCOX11* 互作, 抑制 *OsCOX11* 在过氧化氢代谢中的作用, 造成细胞内活性氧积累, 诱发花药绒毡层早熟程序性细胞死亡, 导致花粉败育, 不育系无法通过自交产生后代, 但雌配子发育正常, 可以通过异花授粉产生杂交种^[6]。相较野败基因, 恢复系的恢复基因有多个, 如 *Rf3*、*Rf4*。野败型配套的恢复系包含的主效恢复基因是 *Rf4*, 该基因编码的 PPR 蛋白可通过降解 *WA352* 的转录本从而恢复野败型不育系的育性^[7]。陈乐天等^[8]发现 *Rf4* 基因座位存在多种单倍型, 并且该座位还存在拷贝数变异和序列变异, 这也是后续 *Rf4* 特异性分子标记设计的基础。保持系具有与不育系相同的核基因组, 但不携带 *WA352* 基因, 故其花粉正常可育, 与不育系杂交时, 其后代仍保持雄性不育特性, 从而为三系杂交稻的制种提供稳定的母本来源^[9]。

三系法是我国水稻杂交种制种的主要模式之一, 市场对高产量、高品质、多抗性等优质的杂交水稻需求仍旧旺盛。基于此, 国家对于杂交种制种及售卖的标准也更加严格。然而, 在三系制种过程中, 由于机械混杂、人为掺杂以及多种环境因素的综合影响, 杂交种纯度显著下降, 严重影响田间种植后的杂交水稻产量^[10-11]。因此, 高效稳定的杂交种纯度检测体系的建立, 可以最大程度减轻对农户和种子企业的影响。目前, 水稻杂交种纯度鉴定的方法包括田间小区种植鉴定、DNA 分子标记检测等, 田间表型和分子标记鉴定均合格的杂交种才允许进行市场销售。田间小区种植鉴定主要按照国家标准 GB/T3543.5—2025 中的规定实施, 通过统计同一种子样品种植小区内本品种典型个体或杂株数量, 并观察其形态特征特性, 确定其品种纯度。田间表型观测是最为直观, 也是最贴近农业生产的检测方法^[12]。DNA 分子标记鉴定杂交种纯度, 相较田间表型考察要求更加严格。根据《粮食作物种子第 1 部分: 禾谷类》(GB 4404.1—2024)中的规定, 生产销售的水稻杂交种(大田用种)品种纯度不得低于 97%,

提高了 1 个百分点, 这对种子纯度检测机构的检测水平及检测技术要求更加严格。DNA 分子标记纯度检测主要是利用标准 NY/T 3748—2020 和 GB/T 39917—2021 中公布的检测引物, 按照规范的检测流程对待测杂交种进行苗期纯度检测。然而, 在长期的杂交种纯度检测实践过程中, 发现国家标准中的引物随机分布于水稻基因组不同位置, 其检测结果仅能反映该引物所在区域的片段类型, 与不育基因或恢复基因并不连锁, 导致在室内检测结果中识别了大量母本条带, 而田间表型检测却非不育系表型, 降低了室内检测结果的准确性和可靠性。以 *TMS5* 为温敏不育基因的两系杂交种纯度检测过程中, 针对异常的杂交种纯度检测结果, 可增加 *TMS5* 基因的特异性检测引物进一步验证, 作为一种辅助判断的方法, 增加纯度检测结果的准确性^[13]。然而, 目前三系杂交稻纯度检测尚缺少功能基因的鉴定标记, 主要归因于三系的不育性和恢复性为多基因调控, 且基因的挖掘和功能解析仍然存在很多未知^[14-16]。基于前人的研究, 我们对野败型三系水稻不同材料携带的野败基因和恢复基因情况进行分析: 不育系携带 *WA352* 基因而不携带主效恢复基因 *Rf4*; 恢复系不携带 *WA352* 基因而携带主效恢复基因 *Rf4*; 保持系既不携带 *WA352* 基因也不携带主效恢复基因 *Rf4*; 杂交种既携带 *WA352* 基因也携带主效恢复基因 *Rf4*。我们对已克隆的野败不育基因 *WA352* 和主效恢复基因 *Rf4*, 开发了野败型三系水稻杂交种纯度检测的功能基因分子标记 WRA-F/R。WRA-F/R 混合了 6 条特异性引物, 分别标记 *WA352*、*Rf4* 和 *Actin*(内参)3 个基因, 在最优的引物配比下, 可以实现同时区分野败型三系的不育系、恢复系、保持系和杂交种。因此, WRA-F/R 功能标记的开发可以大幅提高野败型三系水稻杂交种纯度检测结果的准确性, 保障田间检测和标记检测的一致性, 有望在野败型三系水稻杂交种纯度鉴定中推广应用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试水稻材料包含 28 份市面上常见的水稻品种, 并已确定其基因型, 其名称及基因型见附表 1。

1.2 水稻 DNA 的提取

参考 Murray 和 Thompson 的 CTAB 法提取水

表 1 PCR 扩增引物序列信息

Table 1. Sequence of PCR amplification primers

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	目标基因 Target gene	目的条带大小 Target band size(bp)
WA352-1	F: GTGCTTAAATCACTACAGGAGCG R: CCCTGGAAGCGGTTGATTGA	<i>WA352</i>	528
WA352-2	F: GAGGATTTTGCTCCCTCC R: GGTGCAACCTAGCCAAGTCT	<i>WA352</i>	604
WA352-3	F: GCTTACGCTATGGAGAACCCT R: TTCCCCGTGCTTTCTTGA	<i>WA352</i>	93
Rf4-1	F: CTTTAGTTCAATAATTAGCGATCT R: TGACATTGGGCTTCACACCA	<i>Rf4</i>	101
Rf4-2	F: CTTTAGTTCAATAATTAGCGATCT R: ACCAGCTAAGCAGCATCCAT	<i>Rf4</i>	142
Rf4-3	F: CTTTAGTTCAATAATTAGCGATCT R: ACTAACGCGTCTTCCATCCT	<i>Rf4</i>	267
Actin-1	F: GCTCCTGAGGAACATCCAATTT R: AGCCACATACATTGCTGGTG	<i>Actin</i>	117
Actin-2	F: GGTTTGATTCTTATACCATTGTCCA R: GGGCATCATCACCAGCAAAA	<i>Actin</i>	115
Actin-3	F: GAGGAACATCCAATTTTGCTGA R: CACATACATTGCTGGTGCATT	<i>Actin</i>	108

稻幼芽的 DNA^[17], 具体操作方法如下: 1)取新鲜的水稻组织若干, 加入 600 μL CTAB 缓冲液和钢珠在研磨仪中研磨; 2)在 65℃水浴锅中水浴 30~60 min, 期间上下颠倒数次; 3)室温 12000 r/min 下离心 10 min, 吸取 400 μL 上清液于新的离心管中; 4)加入等体积的异丙醇, 上下颠倒混匀, 于-20℃冰箱中冷冻 30 min 以上; 5)室温 12000 r/min 下离心 10 min, 弃上清; 6)加入 1 mL 75%乙醇, 并上下颠倒数次, 离心弃上清; 7)室温静置晾干, 加入 200 μL ddH₂O, 室温溶解后, 保存于 4℃冰箱用于后续实验。

1.3 引物设计

基于 *WA352* 基因的非同源区域和 *Rf4* 功能型特有的碱基区域, 以及水稻内参基因 *Actin* 的保守区域序列, 利用 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的 Primer-BLAST 设计了多对特异性扩增引物, 用于后续的标记筛选及组合, 各基因引物序列信息见表 1。

1.4 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳

以上述提取的水稻 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 其产物经 2%琼脂糖凝胶电泳分离后放置于凝胶成像仪上观察并获取图像。具体的 PCR 体系包括 2 μL 5× Go Taq Flexi 缓冲液, 0.6 μL MgCl₂ 溶液(25 mmol/L), 0.8 μL dNTPs, 0.8 μL 上下游引物(10 μmol/L), 0.05 μL Go Taq 酶, 1.2 μL DNA 模板, 4.55 μL ddH₂O。扩增程序: 94℃下预变性 5 min;

94℃下变性 30 s, 58℃下退火 30 s, 72℃下延伸 30 s, 34 个循环; 72℃下延伸 7 min; 12℃下冷却 20 min。

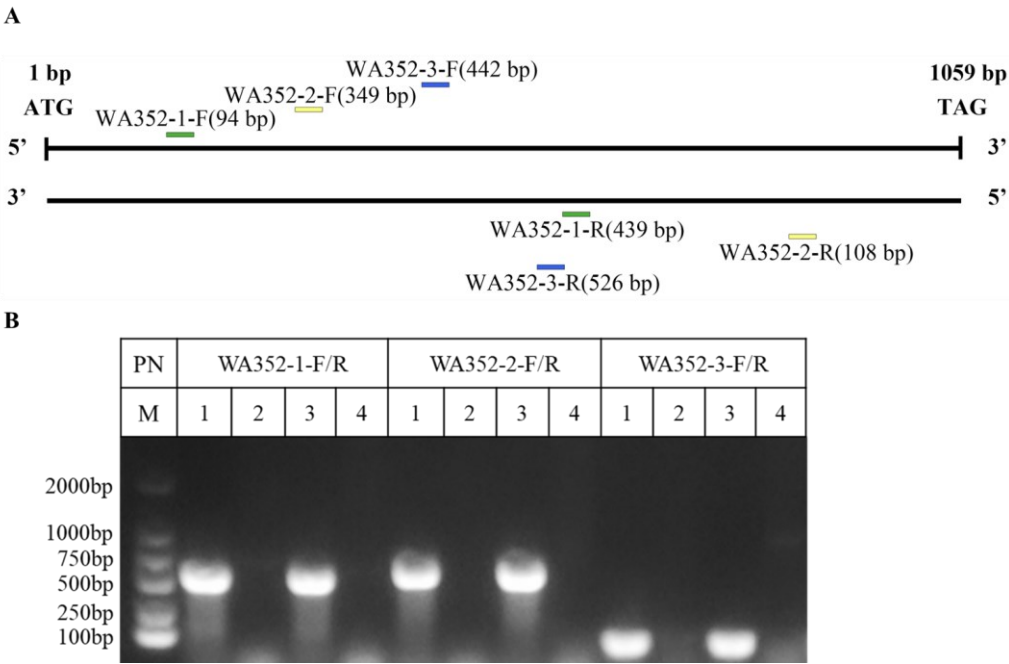
2 结果与分析

2.1 野败基因 *WA352* 分子标记的开发

WA352 是一个由多个线粒体基因片段重组而成的新基因, 只存在于野败型不育系(图 1-A)。因此, 根据同源序列比对, 设计了三对特异性引物 WA352-1、WA352-2、WA352-3。结合野败型三系水稻父母本和杂交种的 DNA, 进行 PCR 扩增, 经电泳检测发现三对引物均能稳定检测出不育系和杂交种中所携带的 *WA352* 基因, 而恢复系和保持系则无检测条带, 说明三对引物均能特异性检测 *WA352* 基因, 其中, 引物 WA352-2 的目的条带最亮且清晰无杂带, 其片段大小为 604 bp, 将其作为 *WA352* 基因的检测引物(图 1-B)。

2.2 主效恢复基因 *Rf4* 分子标记的开发

前人研究发现, 功能型的 *Rf4* 相较无功能的 *rf4*, 存在多处变异, 导致氨基酸改变。基于恢复系中功能型 *Rf4* 和日本晴中无功能的 *rf4* 之间序列差异比对(图 2-A), 设计了三对能够特异性扩增的引物 Rf4-1、Rf4-2、Rf4-3。结合野败型三系水稻父母本和杂交种的 DNA, 进行 PCR 扩增, 经电泳检测发现引

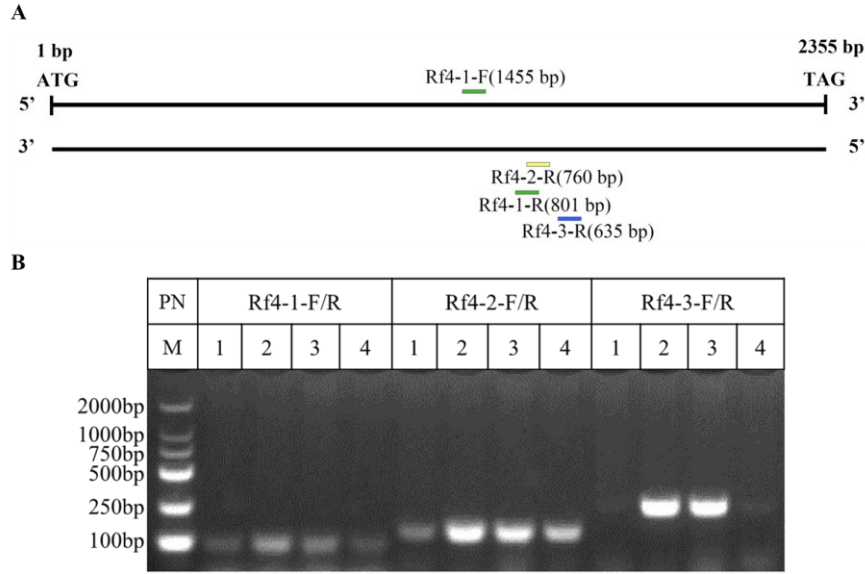


A 为目的基因 *WA352* 上引物结合位点，括号中数字是以 DNA 序列 5'端第 1 个碱基为起点，引物在基因组序列上的坐标； B 为 *WA352* 引物的扩增结果，1: 不育系恒丰 A； 2: 恢复系银占 3 号； 3: 杂交种茎优丝苗； 4: 保持系沪早 7B； PN: 引物名； M: DL2000 DNA 标记(100~2000 bp)。

A, Primer binding sites on the target gene *WA352*. The numbers in parentheses represent the coordinates of the primers on the genomic sequence, with the first base at the 5' end of the DNA sequence as the starting point; B, Amplification results of *WA352* primers. 1, CMS line Hengfeng A; 2, Restorer line Yinzhao 3; 3, Hybrid variety Quanyousimiao; 4, Maintainer line Huhan7 B; PN, Primer name; M, DL2000 DNA marker (100~2000 bp).

图 1 目的基因 *WA352* 上引物结合位点及 *WA352* 引物扩增结果

Fig. 1. Schematic diagram of primer binding sites on the target gene *WA352* and *WA352* primer amplification results

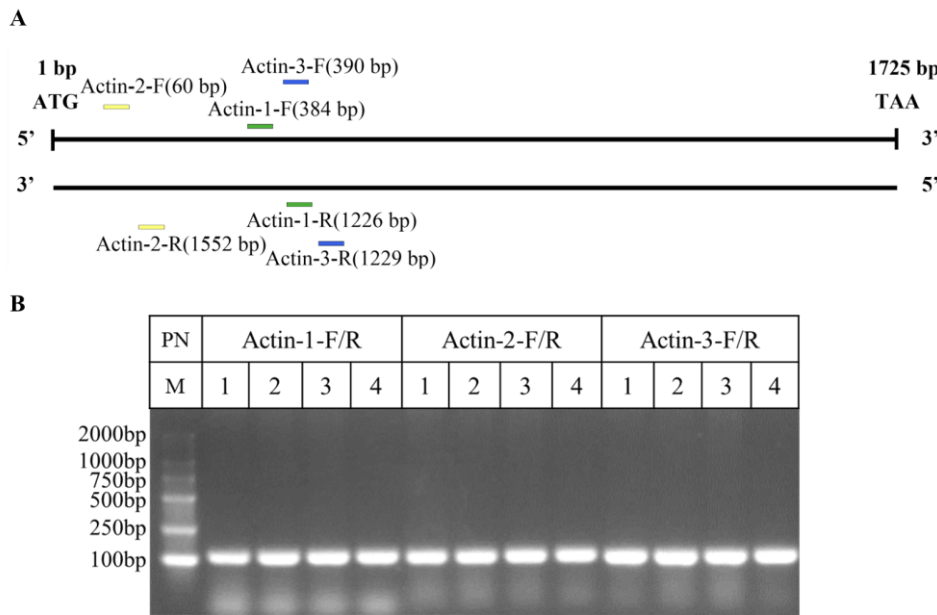


A: 目的基因 *Rf4* 上引物结合位点，括号中数字是以 DNA 序列 5'端第 1 个碱基为起点，引物在基因组序列上的坐标，针对 *Rf4* 的三条特异性引物均采用相同的 F 端引物； B: *Rf4* 引物扩增结果。1: 不育系恒丰 A； 2: 恢复系银占 3 号； 3: 杂交种茎优丝苗； 4: 保持系沪早 7B； PN: 引物名； M: DL2000 DNA 标记 (100~2000 bp)。

A, Primer binding sites on the target gene *Rf4*. The numbers in parentheses represent the coordinates of the primers on the genomic sequence, with the first base at the 5' end of the DNA sequence as the starting point. The three specific primers for *Rf4* adopt the same F-primer; B, Amplification results of *Rf4* primers; 1, CMS line Hengfeng A; 2, Restorer line Yinzhao 3; 3, Hybrid variety Quanyousimiao; 4, Maintainer line Huhan 7B; PN, Primer name; M, DL2000 DNA marker (100~2000 bp).

图 2 目的基因 *Rf4* 上引物结合位点以及 *Rf4* 引物扩增结果

Fig. 2. Schematic diagram of primer binding sites on the target gene *Rf4* and *Rf4* primer amplification results



A: 目的基因 *Actin* 上引物结合位点示意图, 括号中数字是以 DNA 序列 5'端第 1 个碱基为起点, 引物在基因组序列上的坐标; B: *Actin* 引物扩增结果; 1: 不育系恒丰 A; 2: 恢复系银占 3 号; 3: 杂交种茎优丝苗; 4: 保持系沪旱 7B。PN: 引物名; M: DL2000 DNA 标记(100~2000 bp)。

A, Primer binding sites on the target gene *Rf4*. The numbers in parentheses represent the coordinates of the primers on the genomic sequence, with the first base at the 5' end of the DNA sequence as the starting point; B, Amplification results of *Actin* primers; 1, CMS line Hengfeng A; 2, Restorer line Yinzhan 3; 3, Hybrid variety Quanyousimiao; 4, Maintainer line Huhan 7B; PN, Primer name; M, DL2000 DNA marker (100~2000 bp).

图 3 目的基因 *Actin* 上引物结合位点及 *Actin* 引物扩增结果

Fig. 3. Schematic diagram of primer binding sites on the target gene *Actin* and amplification results of *Actin* primers

物 Rf4-3 能稳定检测出恢复系和杂交种中所携带的 *Rf4* 基因, 而不育系和保持系则无检测条带, 说明 Rf4-3 引物能特异性检测 *Rf4* 基因, Rf4-3 引物扩增片段大小为 267 bp, 将其作为 *Rf4* 基因的检测引物(图 2-B)。

2.3 水稻内参基因 *Actin* 分子标记的开发

由于保持系中既不含野败基因, 也不含有恢复基因, 为了避免由于 DNA 质量等问题导致保持系的误判, 本研究引入了内参基因以检测 PCR 扩增条件是否符合检测要求。基于水稻内参基因 *Actin* 的保守区域设计了三对特异性扩增引物 Actin-1、Actin-2、Actin-3(图 3-A)。结合野败型三系水稻父母本和杂交种的 DNA, 进行 PCR 扩增, 经电泳检测发现三对引物均能稳定检测出不育系、恢复系、保持系和杂交种中所携带的内参基因, 挑选扩增片段大小为 108 bp 的引物 Actin-3 作为后续实验的内参引物(图 3-B)。

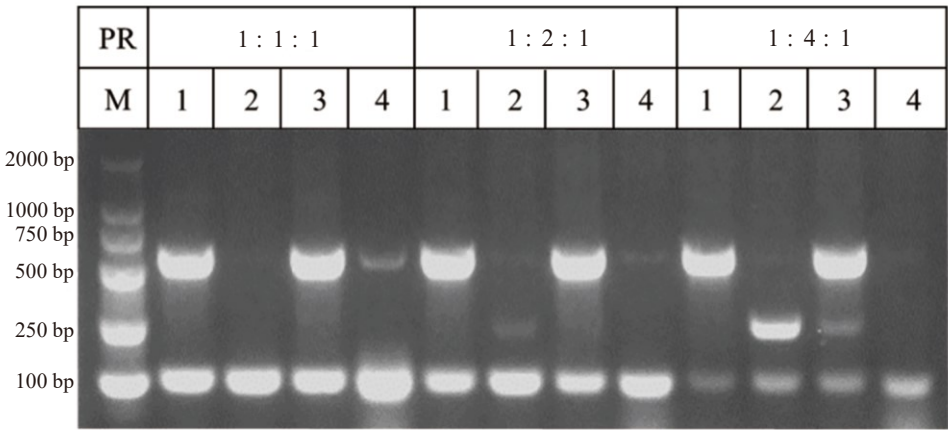
2.4 检测引物混合扩增特异性

根据上述结果, 对筛选出的 WA352-2、Rf4-3、Actin-3 三对引物的扩增效率进行评估, 通过改变引物的添加比例, 以降低三对引物混合扩增产生的干扰。在初次引物混合扩增实验中, 将 WA352-2、Rf4-3、Actin-3 引物按照 1:1:1、1:2:1 和 1:4:1

的比例进行混合。结合野败型三系水稻父母本和杂交种的 DNA, 进行 PCR 扩增, 电泳结果显示引物 WA352-2、Rf4-3、Actin-3 的体积比为 1:4:1 符合预期, 在不育系中扩增出 604 bp 和 108 bp 两条带, 代表携带野败基因和内参基因, 恢复系中扩增出 267 bp 和 108 bp 两条带, 代表携带恢复基因和内参基因, 杂交种中扩增出 604 bp、267 bp、108 bp 三条带, 代表同时携带野败基因、恢复基因和内参基因, 而保持系中只扩增出 108 bp 一条带, 代表只携带内参基因, 说明该比例已可以根据片段大小及数量区分这四种不同的水稻材料(图 4)。

2.5 引物组合的优化

初步实验结果证实 WA352-2、Rf4-3、Actin-3 的体积比为 1:4:1 的引物比例符合预期, 为实现条带亮度均等, 对引物组合的添加比例进行进一步优化。根据 1:4:1 的引物比例所扩增出的不同片段的亮度, 按照 1:8:4、1:9:3、1:8:8、1:12:12、1:10:5、1:6:4 这六种比例, 结合野败型三系水稻父母本和杂交种的 DNA, 进行 PCR 扩增检测, 结果发现引物 WA352-2、Rf4-3、Actin-3 的体积比为 1:8:4 和 1:9:3 的情况下, 能够稳定且相对均一地检测不同材料的基因型。然而, 这两个引物混合比例中的内参基因 *Actin* 的电泳条带亮

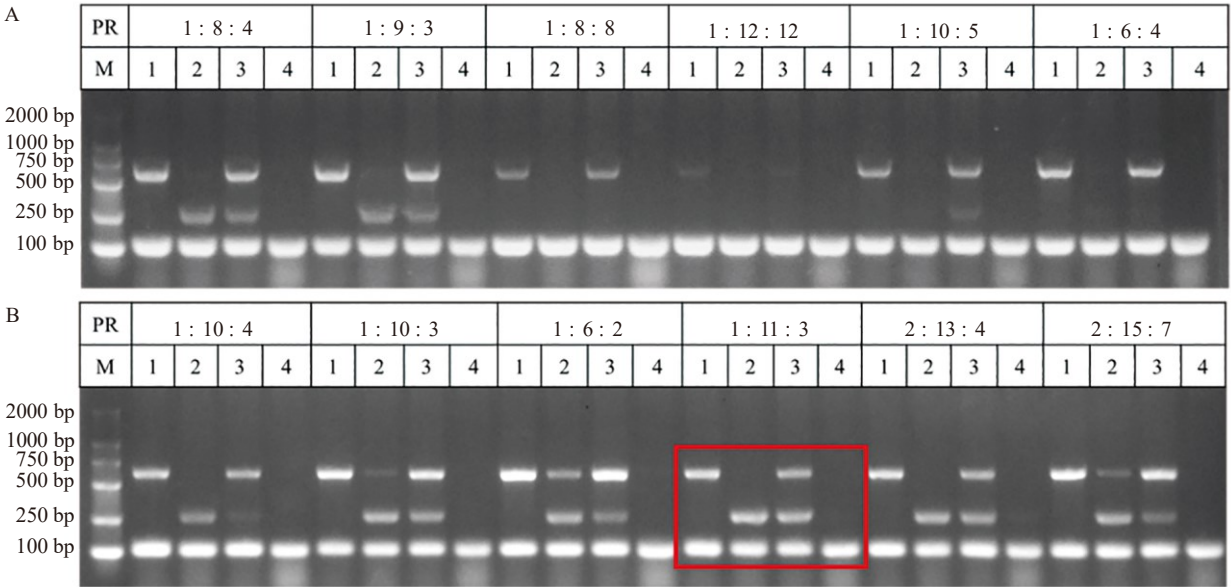


1: 不育系恒丰 A; 2: 恢复系银占 3 号; 3: 杂交种茎优丝苗; 4: 保持系沪旱 7B; PR: 引物 WA352-2、Rf4-3、Actin-3 的比例; M: DL2000 DNA 标记 (100~2000 bp)。

1, CMS line Hengfeng A; 2, Restorer line Yinzhan 3; 3, Hybrid Quanyousimiao; 4, Maintainer line Huhan 7B; PR, Primer ratio of WA352-2, Rf4-3 and Actin-3; M, DL2000 DNA marker (100-2000 bp).

图 4 引物组合的初次筛选结果

Fig. 4. Initial screening results of primer combinations



A: 第一次引物组合比例优化结果; B: 第二次引物组合比例优化结果, 1: 不育系恒丰 A; 2: 恢复系银占 3 号; 3: 杂交种茎优丝苗; 4: 保持系沪旱 7B; PR: 引物 WA352-2: Rf4-3: Actin-3, M-DL2000 DNA 标记(100-2000 bp)。

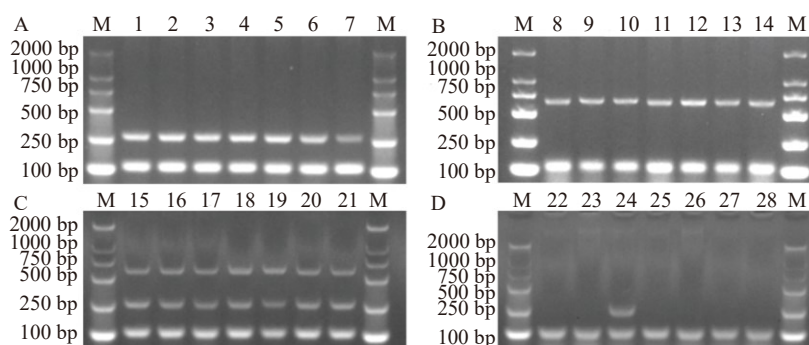
A, First primer combination ratio optimization results; B, Second primer combination ratio optimization results, 1, CMS line Hengfeng A; 2, Restorer line Yinzhan 3; 3, Hybrid Quanyousimiao; 4, Maintainer line Huhan 7B; PR, Primer ratio of WA352-2, Rf4-3 and Actin-3; M, DL2000 DNA marker (100-2000 bp).

图 5 引物组合的方法优化结果

Fig. 5. Optimization results of primer combinations

度仍过强, *Rf4* 的电泳条带亮度较弱。因此, 在 1 : 8 : 4 和 1 : 9 : 3 的比例基础上, 进一步升高引物 Rf4-3 的添加量, 降低引物 Actin-3 的添加量, 检测结果将会得到进一步优化(图 5-A)。因此, 按照 1 : 10 : 4、1 : 10 : 3、1 : 6 : 2、1 : 11 : 3、2 : 13 : 4、2 : 15 : 7 六种引物组合比例, 继续进行 PCR 扩增检测, 结果发现引物 WA352-2、Rf4-3、Actin-3 的

体积比为 1 : 11 : 3 和 2 : 13 : 4 时, 可以在不育系中扩增出 604 bp 和 108 bp 两条带, 恢复系中扩增出 267 bp 和 108 bp 两条带, 杂交种中扩增出 604 bp、267 bp、108 bp 三条带, 而保持系中只扩增出 108 bp 一条带, 且条带清晰、亮度均等, 符合预期(图 5-B)。引物 WA352-2 : Rf4-3 : Actin-3=1 : 11 : 3 这一组合的表现略优于 2 : 13 : 4, 因此, 本研究最终将



A: 以恢复系水稻基因组 DNA 为模板。泳道 1: 银占 3 号; 2: 岳恢 9712; 3: 乐占; 4: 美香新占; 5: R2117; 6: 绿丝苗; 7: 粤禾丝苗; B: 以不育系水稻基因组 DNA 为模板。其中, 泳道 8: 恒丰 A; 9: 沪早 7A; 10: 龙特甫 A; 11: 荷丰 A; 编号 12, 明太 A; 编号 13, 五丰 A; 编号 14, 广 8A; C: 以杂交种水稻基因组 DNA 为模板, 其中泳道编号 15, 荃广优 4 号; 16: 荃优丝苗; 17: 深优粤禾丝苗; 18: 五优晶丝苗; 19: 宜优粤禾丝苗; 20: 筑优 110; 21: 荃早优丝苗; D: 以常规水稻基因组 DNA 为模板。其中, 泳道 22, 中花 11; 23: 广陆矮 4 号; 24: 蜀恢 498; 25: 日本晴; 26: 9311; 27: 台中 65; 28: 南京 11; 24: 蜀恢 498 为恢复系; M: DL2000 DNA Marker (100-2000 bp)。

A, Using genomic DNA from restorer line rice as the template. Lane 1, Yizhan 3; Lane 2, Yuehui 9712; Lane 3, Yuezhao; Lane 4, Meixiangxinzhao; Lane 5, R2117; Lane 6, Lvshimiao; Lane 7, Yuehesimiao; B: Using genomic DNA from CMS line rice as the template. Lane 8 is Hengfeng A; Lane 9, Huhuan7A; Lane 10, Longtefu A; Lane 11, Hefeng A; Lane 12, Mingtai A; Lane 13, Wufeng A; Lane 14, Guang8A; C, Using genomic DNA from hybrid rice as the template, lane Lane 15, Quanguangyou 4; Lane 16, Quanyousimiao; Lane 17, Shenyoyuehesimiao; Lane 18, Wuyoujingsimiao; Lane 19, Yiyoyuehesimiao; Lane 20, Zhuyou 110; Lane 21, Quanzaoyousimiao; D, Using genomic DNA from conventional rice as the template, Lane 22 is Zhonghua11; Lane 23, Guangluai4; Lane 24, Shuhui498; Lane 25, *Nipponbare*; Lane 26, 9311; Lane 27, Taizhong 65; Lane 28, Nanjing 11, where Shuhui 498 is the restorer line, M, DL2000 DNA marker (100-2000 bp).

图 6 WRA-F/R 引物在不同水稻材料中的扩增情况

Fig. 6. Amplification results of WRA-F/R primers in different rice materials

WA352-2 : Rf4-3 : Actin-3=1 : 11 : 3 的引物组合作为检测水稻野败型三系的父母本及杂交种的功能分子标记, 并将该引物组合命名为 WRA-F/R。

2.6 WRA-F/R 引物的验证

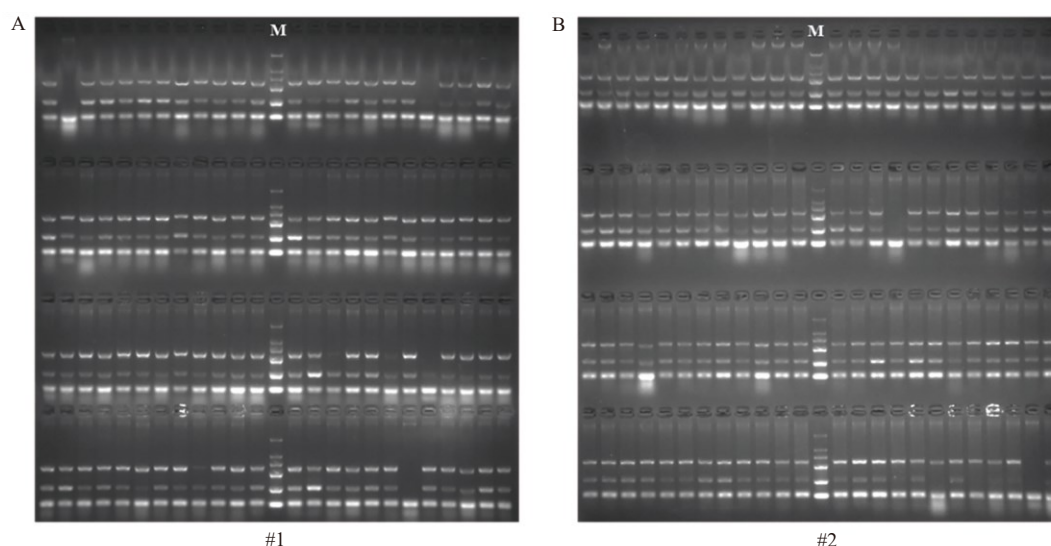
为了进一步验证 WRA-F/R 引物的实用性和结果的准确性, 利用 WRA-F/R 引物对 28 份野败型三系水稻父母本和杂交种材料进行 PCR 扩增检测, 结果显示 28 份水稻样品检测结果准确可靠, 与预期的结果完全吻合, 说明本研究开发的 WRA-F/R 引物标记完全适用于水稻野败型三系父母本和杂交种基因型检测(图 6)。

2.7 WRA-F/R 引物在野败型三系水稻杂交种纯度鉴定中的应用

随后, 为了验证该标记的实用性, 我们针对随机抽取的两份野败型三系水稻杂交种样品#1 和 #2 进行纯度鉴定, WRA-F/R 标记检测结果表明, 在样品#1 和样品#2 中各检测出 4 个非杂交种条带, 品种纯度百分率为 95.8%, 均不符合国家标准 GB 4404.1-2024 中水稻杂交种(大田用种)规定的 97% 的纯度要求。该结果进一步证实了 WRA-F/R 标记在实际应用中的有效性, 能够为杂交种的纯度鉴定提供一种快速、准确且可靠的方法, 从而为种子质量控制和品种鉴定提供有力支持(图 7)。

3 讨论与结论

随着全球人口的不断增加和耕地面积的减少, 提高单位面积的水稻产量对保障全球粮食安全至关重要, 这也是科学家们长期以来关注和研究的重点领域。自杂交水稻培育成功, 其以明显的产量优势迅速在我国得到大面积推广应用, 解决了我国面临的粮食危机。然而, 水稻杂交种的纯度直接影响产量, 据统计, 种子纯度下降 1%, 则稻谷产量下降约 100 kg/hm²[18-19]。因此, 随着全国杂交水稻种植面积比重逐年增大, 对水稻杂交种子的质量(主要是真实性和纯度)检测和监督就显得尤为重要。目前, 鉴定三系水稻杂交种纯度的方法主要有田间小区种植鉴定法、蛋白质电泳法和 DNA 分子标记鉴定法等。其中 DNA 分子标记主要有 RFLP、AFLP、RAPD、SCAR、SSR 等[20-21]。已有研究报道, RAPD、SCAR 和 SSR 等多种标记均可用于检测水稻杂交种纯度及真实性[22-24]。本研究以野败型三系水稻父母本和杂交种为研究材料, 在 *W4352* 基因非同源区域和 *Rf4* 的功能型特有碱基区域设计多对引物, 通过引物筛选以及组合验证, 鉴定出 WRA-F/R 引物可以在不同品系水稻中特异性扩增出清晰且明亮的



A: 每条泳道对应的 DNA 均来自样品 1 育苗后随机抽取的 192 株幼苗中的一株; B: 每条泳道对应的 DNA 均来自样品 2 随机抽取的 192 株幼苗的一株; M: DL2000 DNA 标记 (100~2000 bp)。

A, DNA profile of Sample #1, with each lane corresponding to DNA extracted from one of 192 randomly selected rice seedlings post-nursery cultivation. B, DNA profile of Sample #2, with each lane corresponding to DNA extracted from one of 192 randomly selected rice seedlings. M, DL2000 DNA marker (100-2000 bp).

图 7 WRA-F/R 引物对野败型三系水稻杂交种样品的单株琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig. 7. Detection results of WRA-F/R primers on single-plant agarose gel electrophoresis of the wild-abortive three-line hybrid rice samples

条带, 根据条带数目和位置, 能够清楚直观地区分出野败型三系中的不育系、恢复系、保持系以及杂交种这四种水稻材料, 同时用 28 份市面上常见的水稻品种对该引物进行验证, 发现验证结果稳定无误。随后, 利用 WRA-F/R 引物对两份野败型水稻杂交种样品进行纯度鉴定, 结果显示其能够有效区分杂交种和亲本基因型, 实现鉴定品种纯度的目的。因此, 本研究开发的引物适用于鉴定野败型三系水稻杂交种纯度, 是一种快速、准确的技术手段, 为相关育种工作提供了有力的支持, 具有重要的科研和应用价值。

目前, 田间小区种植鉴定法仍是鉴定杂交种纯度最直观、应用最广泛的方法之一, 该方法是基于植株的表型特征进行观察与评估, 无法直接反映植株的基因型信息, 导致在实际应用中难以区分亲缘关系较近的品种或品系, 而分子标记技术基于 DNA 分子水平对不同个体间进行检测, 直接反映了个体间基因型差异, 为杂交种纯度鉴定提供更为准确的依据^[25]。因此, 田间小区种植与 DNA 分子标记技术是相辅相成的, 两者结合可以进一步提高杂交种纯度鉴定的真实性和准确性^[26-27]。此外, 本研究开发的标记针对野败型三系水稻杂交种的纯度鉴定, 而对于其他不育系, 如包台型和红莲型等, 其含有的雄性不育基因与野败型不育系不同, 因此该标记并不适用。由于包台型和红莲型等不育系也是杂交水稻育种中应用较多的细胞质雄性不育类型, 但目

前尚未开发出用于其杂交种纯度鉴定的功能基因标记, 因此, 本研究也为其他三系杂交种的功能基因标记开发提供了重要的思路和参考。未来, 随着分子生物学技术的不断进步和应用, 利用分子标记辅助育种有望在提高杂交种纯度鉴定的准确性、加速育种进程、提升种质资源利用效率等方面发挥更大的作用, 为杂交水稻等作物的育种和生产提供更全面的技术保障。

谢辞: 感谢安徽省农业科学院水稻研究所平台的所有建设和研究人员。

在线辅助信息: 附表 1 请见《中国水稻科学》网站([http:// www.ricesci.cn](http://www.ricesci.cn))。

参考文献:

- [1] Fukagawa N K, Ziska L H. Rice: Importance for global nutrition[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2019, 65(Suppl.): S2-S3.
- [2] 杨紫涵, 安增旭, 吴殿星, 张宁. 水稻雄性不育的研究和应用进展[J]. *核农学报*, 2025, 39(3): 531-545.
Yang Z H, An Z X, Wu D X, Zhang N. Research and application progress on male sterility of rice[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2025, 39(3): 531-545. (in Chinese with English abstract)
- [3] Zheng W J, Ma Z B, Zhao M Z, Xiao M M, Zhao J M, Wang C H, Gao H, Bai Y J, Wang H, Sui G M. Research and development strategies for hybrid japonica rice[J]. *Rice*, 2020, 13(1): 36.
- [4] Chen L T, Liu Y G. Male sterility and fertility restoration in crops[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2014, 65(1): 579-606.

- [5] 李伟, 徐霞, 边莹, 张晓波, 范炯炯, 程本义, 杨仕华, 吴建利, 魏鑫, 曾波, 龚俊义. 5460个三系杂交稻品种的不育系细胞质来源分析[J]. 中国水稻科学, 2024, 38(6): 653-664.
Li W, Xu X, Bian Y, Zhang X B, Fan J J, Cheng B Y, Yang S H, Wu J L, Wei X, Zeng B, Gong J Y. Cytoplasmic source analysis of sterile lines from 5460 three-line hybrid rice varieties[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2024, 38(6): 653-664. (in Chinese with English abstract)
- [6] Luo D P, Xu H, Liu Z L, Guo J X, Li H Y, Chen L T, Fang C, Zhang Q Y, Bai M, Yao N, Wu H, Wu H, Ji C H, Zheng H Q, Chen Y L, Ye S, Li X Y, Zhao X C, Li R Q, Liu Y G. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(5): 573-577.
- [7] Tang H, Luo D, Zhou D, Zhang Q Y, Tian D S, Zheng X M, Chen L T, Liu Y G. The rice restorer *Rf4* for wild-abortive cytoplasmic male sterility encodes a mitochondrial-localized PPR protein that functions in reduction of *WA352* transcripts[J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(9): 1497-1500.
- [8] Zhao Z, Ding Z, Huang J, Meng H J, Zhang Z X, Gou X, Tang H W, Xie X R, Ping J Y, Xiao F M, Liu Y G, Xie Y Y, Chen L T. Copy number variation of the restorer *Rf4* underlies human selection of three-line hybrid rice breeding[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 7333.
- [9] Chen Z, Wu J, Deng X W, Tang X Y. Establishment and advances of third-generation hybrid rice technology: A review[J]. *Rice*, 2023, 16(1): 56.
- [10] 黄伟, 丁举高, 刘怡, 曹玉洪. 水稻田块出现“纯度问题”的调查与思考[J]. 中国种业, 2020(3): 38-40.
Huang W, Ding J G, Liu Y, Cao Y H. Investigation and reflection on “purity problem” in rice field[J]. *China Seed Industry*, 2020(3): 38-40. (in Chinese)
- [11] Waza S A. Maintenance of genetic purity within the cms lines of rice hybrids using molecular markers[J]. *Trends in Biosciences*, 2015, 8(12): 3029-3030.
- [12] 宋丰顺, 倪大虎, 倪金龙, 李莉杨, 剑波. 杂交水稻种子纯度检测方法综述[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 6-11.
Song F S, Ni D H, Ni J L, Li L Y, Jian B. Study on detection methods of seed purity of hybrid rice: a review[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44(6): 6-11. (in Chinese)
- [13] 金名捺, 丘式浚, 严维, 谢刚, 邓汉超, 唐晓艳. 水稻温敏雄性核不育基因 *tms5* 功能分子标记的开发与应用[J]. 分子植物育种, 2018, 16(17): 5644-5652.
Jin M N, Qiu S J, Yan W, Xie G, Deng H C, Tang X Y. Development and application of functional molecular marker for thermo-sensitive genic male sterile gene *tms5* in rice[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(17): 5644-5652. (in Chinese with English abstract)
- [14] Zhang H G, Li X X, Xu Z P, Zhao X Q, Wan Z H, Cheng X J, Liu Q Q, Gu M H, Tang S Z. The effects of *Rf4* and the genetic mechanism behind fertility restoration of wild abortive cytoplasmic male sterility (WA-CMS) in *japonica* rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*)[J]. *Rice*, 2022, 15(1): 59.
- [15] Zhang H G, Che J L, Ge Y S, Pei Y, Zhang L J, Liu Q Q, Gu M H, Tang S Z. Ability of *Rf5* and *Rf6* to restore fertility of Chinsurah Boro II-type cytoplasmic male sterile *Oryza sativa* (ssp. *japonica*) lines[J]. *Rice*, 2017, 10(1): 2.
- [16] Zhang H G, Wang R X, Xu Z P, Zhao X Q, Gao H L, Liu Q Q, Tang S Z. The effects of *Rf5* and *Rf6* on fertility restoration in Honglian-type cytoplasmic male sterile (CMS) lines of *japonica* rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)[J]. *Molecular Breeding*, 2021, 41(10): 64.
- [17] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [18] Su N, Hu M L, Wu D X, Wu F Q, Fei G L, Lan Y, Chen X L, Shu X L, Zhang X, Guo X P, Cheng Z J, Lei C L, Qi C K, Jiang L, Wang H Y, Wan J M. Disruption of a rice pentatricopeptide repeat protein causes a seedling-specific albino phenotype and its utilization to enhance seed purity in hybrid rice production[J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(1): 227-238.
- [19] Keasinee T, Sriprapai C, Numphet S, Thiwawan W, Natjaree P, Khanittha D, Kannika S, Supaporn J, Suniyom T, Chuanchom D, Amorntip M. Development of high yielding two-line hybrid rice in Thailand[J]. *ScienceAsia*, 2021, 47: 153-161.
- [20] 陈星, 高子厚. DNA 分子标记技术的研究与应用[J]. 分子植物育种, 2019, 17(6): 1970-1977.
Chen X, Gao Z H. The study and application of DNA molecular marker technique[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(6): 1970-1977. (in Chinese with English abstract)
- [21] Hasan N, Choudhary S, Naaz N, Sharma N, Laskar R A. Recent advancements in molecular marker-assisted selection and applications in plant breeding programmes[J]. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 2021, 19(1): 128.
- [22] 徐颖, 郑炜, 吴薇, 荣德福. RAPD 技术在泰国香米品种纯度检测中的应用[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 1939-1941+1946.
Xu Y, Zheng W, Wu W, Rong D F. The application of RAPD technology in the purity detection of Thai fragrant rice varieties[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(4): 1939-1941+1946. (in Chinese with English abstract)
- [23] 黄成志, 雷树凡, 胡景涛, 吕直文, 黄文章, 严明建, 冉彦秀. 利用优化的 SSR 分子标记技术检测杂交水稻万优 481 纯度[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(22): 7321-7322.
Huang C Z, Lei S F, Hu J T, Lv Z W, Huang W Z, Yan M J, Ran Y X. Identification and purity test of hybrid rice wanyou481 with optimized SSR markers[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2014, 42(22): 7321-7322. (in Chinese with English abstract)
- [24] Lu C, Liu J, Jiang J, Caleb M B, Tan H L, Masahiko I, Hong D L. Development and application of SCAR markers for discriminating cytoplasmic male sterile lines from their cognate maintainer lines in Indica rice[J]. *Rice Science*, 2013, 20(3): 191-199.
- [25] 田海燕, 张海娜, 王永强, 周永萍, 张莹璐. SNP 分子标记及其在作物品种鉴定中的应用[J]. 中国农学通报, 2024, 40(6): 115-121.
Tian H Y, Zhang H N, Wang Y Q, Zhou Y P, Zhang Y L. SNP Molecular markers: research and its application in crop variety identification[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2024, 40(6): 115-121. (in Chinese with English abstract)
- [26] Anjana B, Ray P C, Veena P, Asit B M. Assessment of genetic purity in rice (*Oryza sativa* L.) hybrids using microsatellite markers[J]. *3 Biotech*, 2016, 6(1): 50.
- [27] 孙统庆, 陈斌, 汤义华, 邵培珺, 陈永梅, 吴连勇, 喻俊杰. 浅谈江苏杂交水稻种子纯度海南田间种植鉴定[J]. 中国稻米, 2020, 26(2): 60-62.
Sun T Q, Chen B, Tang Y H, Shao P J, Chen Y M, Wu L Y, Yu J J. Talking about field planting identification of Jiangsu hybrid rice seed purity in Hainan[J]. *China Rice*, 2020, 26(2): 60-62. (in Chinese with English abstract)