

分子标记辅助构建同质同核近等基因恢复系 L-Rf5

李威涛 田泽 王春台 刘学群 谭艳平

中南民族大学生物技术国家民委重点实验室/

武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 武汉 430074

摘要 红莲型水稻恢复系 9311 中有 2 个红莲型恢复基因 *Rf5* 和 *Rf6*, 不育系 YTA 中有 2 个不育基因 *orfH79* 和 *orf216*; 为了研究 2 个恢复基因与 2 个不育基因之间的互作关系, 将红莲型水稻不育系 YTA 与恢复系 9311 杂交, 杂种后代再以 YTA 为轮回亲本回交 8 代; 根据 *Rf5* 基因序列设计特异分子标记, 并对 L-Rf5 进行检测, 结合花粉镜检结果, 筛选出只含 *Rf5* 的纯合株系, 多代自交后其表型一致, 说明纯合株系 L-Rf5 构建成功; 对近等基因恢复系的不育基因 *orfH79* 和 *orf216* 的表达量进行分析, 结果显示: L-Rf5 中 *orfH79* 的表达量较 YTA 明显下降; 纯合的 L-Rf5 比杂合的 L-Rf5 不育基因 *orfH79* 的表达量稍低; L-Rf5 中 *orf216* 的表达量较 YTA 下降并不明显。同时克隆了 YTA、9311、近等基因恢复系中 *Rf1B* 序列, 发现它们之间没有差异。

关键词 水稻; 细胞质雄性不育; 近等基因系; 恢复基因; 不育基因

中图分类号 S 511.053 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)06-0001-07

在很多开花植物中发现, 不能产生活性功能花粉的细胞质雄性不育属于母系遗传^[1]。线粒体基因的重组会造成部分功能性基因的缺失和紊乱, 导致花粉发育不正常^[2]。在植物中, 已经被鉴定超过 50 个线粒体基因与细胞质雄性不育相关^[3-6]。

水稻是重要的粮食作物, 为世界上半以上的人口提供食物来源。根据细胞学和遗传学特征将水稻 CMS 主要分为野败型(WA)、包台型(BT)和红莲型(HL)三大类。HL 型水稻中 *atp6-orfH79* 的共表达干扰 F0F1-ATPase 的组装^[7-8]。近年来的研究主要集中在嵌合基因 *orfH79* 上。HL 型水稻中的 *orfH79* 编码一个毒性蛋白, 影响雄性配子及根的发育^[9-10]。HL 型水稻中的 2 个恢复基因 *Rf5* 和 *Rf6* 能够恢复不育表型^[11]。*Rf5* 已经被克隆, 它编码的 PPR 蛋白与 GPR162 形成复合物, 剪切 *atp6-orfH79* 转录本使育性得到恢复^[12]。*Rf5* 和 GRP162 组装成的育性恢复复合物(RFC)约为 400~500 ku^[12], 最近的研究表明, 育性恢复复合物的组装还需要 DUF1620 和 WD40 类似蛋白的参与^[13]。另一个恢复基因 *Rf6* 编码的 PPR 蛋白与 OsHXK6 形成复合物, 剪切 *atp6-orfH79* 转录本促

使花粉正常发育和育性恢复^[14]。刘学群等^[15]克隆了一个与 HL-CMS 相关的基因片段 HL-*sp1*。李丕顺^[16]利用 TAIL-PCR 获得包含 HL-*sp1* 在内的线粒体 DNA 序列 6.7 kb, 并克隆了编码 216 个氨基酸的开放阅读框 *orf216*。陈为等^[17]将 *orf216* 遗传转化到保持系 YTB 中, *orf216* 的表达能导致花粉部分败育。

恢复基因 *Rf1A* 和 *Rf1B* 都可以使包台型细胞质雄性不育的花粉育性得以恢复, 但具有不同的育性恢复机制。*Rf1A* 是剪切 *orf79* 的转录本, 而 *Rf1B* 是降解 *orf79* 的 mRNA, 在二者同时存在时, *Rf1A* 对 *Rf1B* 具有上位性^[18]。BT 中的 *Rf1A* 和红莲型水稻中的 *Rf5* 的序列相同, *Rf5* 对 BT 和 HL 不育系都有恢复作用^[12, 18]。然而, BT 中的 *Rf1B* 是否对 HL 不育基因 *orfH79* 有作用是一个值得探讨的问题。

笔者所在课题组将红莲型水稻不育系 YTA 与恢复系 9311 杂交, 杂种后代再以 YTA 为轮回亲本回交 8 代, 构建了与 HL-CMS 不育系 YTA 同质同核的近等基因(NIL)恢复系 L-Rf5, 同时对红莲型细胞质雄性不育水稻不育系 YTA、保持系 YTB、恢

收稿日期: 2017-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170296)

李威涛, 硕士研究生。研究方向: 水稻功能基因。E-mail: 965301631@qq.com

通信作者: 谭艳平, 博士, 副教授。研究方向: 水稻功能基因。E-mail: yanptan@mail.scuec.edu.cn

复系 9311、近等基因恢复系 *L-Rf5*、*L-Rf6* 中 *Rf1B* 进行克隆、测序,旨在为研究 *Rf5* 和 *orf216* 及 *orfH79* 的互作机制提供材料,并为深入研究 *Rf1B* 的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

红莲型细胞质雄性不育水稻不育系 YTA、保持系 YTB、恢复系 9311、近等基因恢复系 *L-Rf5*、*L-Rf6*、籼型恢复系 MingHui63(MH63)均由中南民族大学武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室提供。引物合成及测序均由昆泰锐(武汉)生物技术有限责任公司完成。

1.2 基因组 DNA 的提取及 PCR 检测

取供试水稻植株约 5 cm 长的叶片并剪碎,装入 1.5 mL EP 管中,灌满液氮,用研磨棒研磨成粉末,用 CTAB 法提取基因组 DNA。根据易平等^[19]发表的 *orfH79* 序列设计引物 H79F/H79R;根据中南

民族大学生物技术国家民委重点实验室克隆的 *orf216* 序列设计引物 *orf216F/orf216R*; *Rf5F/Rf5R*、*Rf6F/Rf6R*、*rf5F/rf5R*、*Rf1BF/Rf1BR* 为中南民族大学生物技术国家民委重点实验室自行开发设计,所有引物均送昆泰锐(武汉)生物技术有限责任公司合成。提取的各基因组 DNA 用 40 μ L TE 溶解,取 1 μ L 稀释 30 倍作为 PCR 模板,用设计的相关引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.3 水稻材料的构建

用红莲型水稻不育系 YTA 与恢复系 9311 杂交, F_1 与 YTA 回交得到 BC_1F_1 。以 *Rf5* 和 *Rf6* 基因序列设计特异引物,PCR 扩增筛选 BC_1F_1 群体中仅含 *Rf5* 的分离单株作为父本,以 YTA 为轮回母本连续回交 8 代,筛选基因型为 *Rf5rf5* 的植株套袋自交,通过育性分析,最终构建了纯合的与不育系 YTA 同质同核的近等基因恢复系 *L-Rf5*(图 1)。以纯合 *L-Rf5* 为母本(人工去雄),YTB 为父本杂

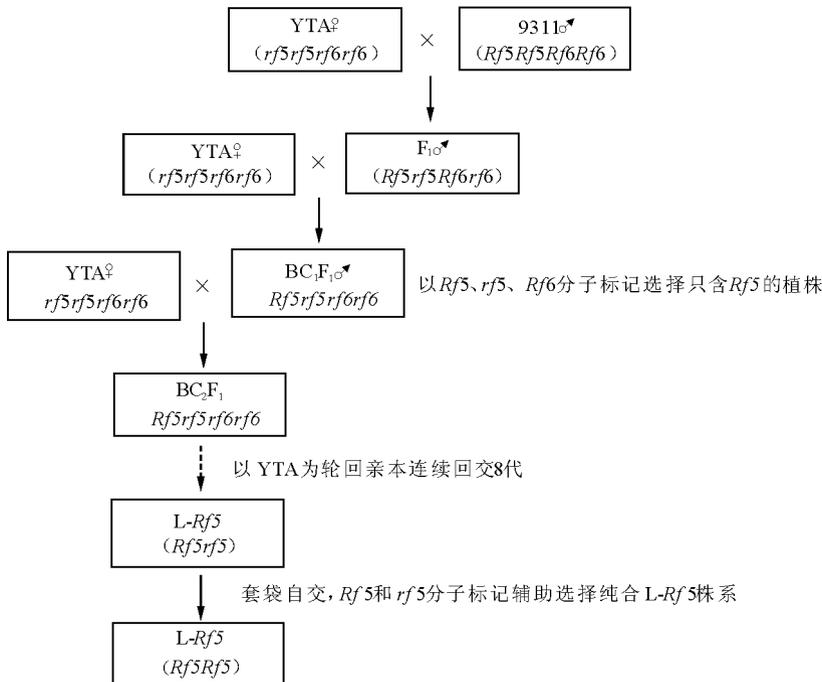


图 1 *L-Rf5* 的构建

Fig.1 Construction of *L-Rf5*

交得到杂合 *L-Rf5*。

1.4 花粉育性及结实率的统计

在 YTA 和 *L-Rf5* 植株开花时期取其顶端待开花穗做花粉育性镜检,取其花药放在 1% 的 I_2 -KI 溶液的载玻片上,用镊子捣碎,在显微镜下观察,圆黑色实心花粉为可育花粉,其余均为不育花粉,对花粉

育性进行观察统计。在开花之前对基因型正确的部分植株小穗套袋自交,20 d 后统计套袋结实率。

1.5 不育基因表达量分析

取 YTA 和 *L-Rf5* 植株二核期小穗和剑叶,提取总 RNA 然后反转录成 cDNA,以线粒体基因 *cob* 作内参,用 Real-time PCR 检测 *orfH79* 和 *orf216*

的表达量。

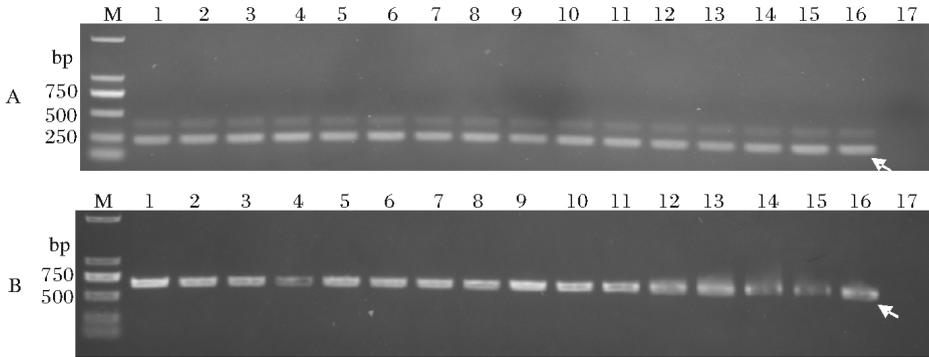
2 结果与分析

2.1 同质同核近等基因系 L-Rf5 的构建

用红莲型水稻不育系 YTA 与恢复系 9311 杂交，F₁ 与 YTA 回交得到 BC₁F₁。以 Rf5 和 Rf6 基因序列设计特异引物，PCR 扩增筛选 BC₁F₁ 中仅含 Rf5 的分离单株作为父本，以 YTA 为轮回母本连续回交 8 代得到 BC₇F₁，然后套袋自交，根据花粉育性结合分子标记辅助选择筛选 Rf5 纯合植株(图 1)。

2.2 近等基因恢复系 L-Rf5 的分子鉴定

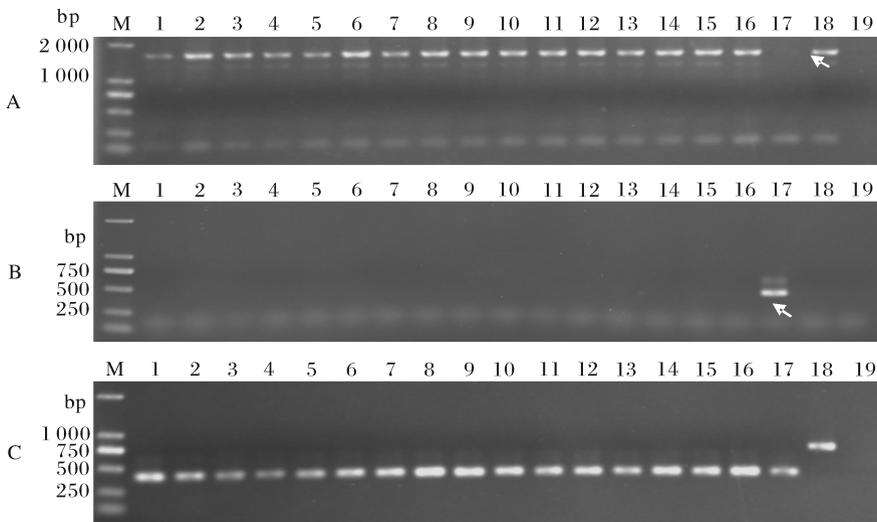
对已构建的近等基因恢复系 L-Rf5，利用 Rf5、Rf6、orf216 及 orfH79 特异的分子标记检测单株基因组 DNA。在 L-Rf5 株系中随机地选取单株，提取叶片基因组 DNA，用特异性引物对其进行 PCR 扩增，电泳结果显示：该株系基因组 DNA 中可以检测到 orfH79 和 orf216 不育基因的目的条带(图 2)；L-Rf5 中恢复基因仅检测到 Rf5 和 rf6 条带，没有检测到 rf5 和 Rf6 目的条带(图 3)。



1~15:L-Rf5 单株; 16:YTA; 17:YTB; A.PCR 扩增 orfH79; B.PCR 扩增 orf216; 白色箭头所示为目的条带; M:DL2000 marker。 1~15:L-Rf5 plant; 16:YTA; 17:YTB; A.PCR amplification for orfH79; B.PCR amplification for orf216; The white arrow indicates the target band; M:DL2000 marker.

图 2 L-Rf5 中不育基因 orfH79 和 orf216 的 PCR 检测

Fig.2 PCR amplification for orfH79 and orf216 in L-Rf5



1~16:L-Rf5 单株; 17:YTA; 18:9311; 19:水; A.PCR 扩增 Rf5; B.PCR 扩增 rf5; C.PCR 扩增 Rf6,Rf6 750 bp,rf6 440 bp; 白色箭头所示的为目的条带; M:DL2000 marker。 1-16:L-Rf5 plant; 17:YTA; 18:9311; 19:Water; A.PCR amplification for Rf5; B.PCR amplification for rf5; C.PCR amplification for Rf6,Rf6 750 bp,rf6 440 bp.The white arrow indicates target band; M:DL2000 marker.

图 3 L-Rf5 中恢复基因 Rf5 和 Rf6 的 PCR 扩增

Fig.3 PCR amplification for Rf5 and Rf6 in L-Rf5

2.3 近等基因恢复系及 YTA、9311 中 *Rf1B* 的克隆

提取 YTA、9311、L-*Rf5*、L-*Rf6*、MH63 苗期叶片 DNA, 用 *Rf1BF/Rf1BR* 引物扩增(图 4), 将 YTA、9311、L-*Rf5*、L-*Rf6* 的 PCR 产物送公司测序。测序结果与公布的 MH63、ZS97 序列进行比对, 发现 MH63、ZS97、YTA、9311、L-*Rf5*、L-*Rf6* 中 *Rf1B* 的序列相同。

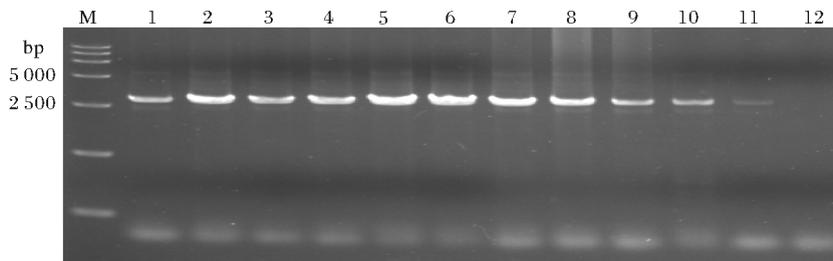
2.4 近等基因恢复系 L-*Rf5* 植株育性鉴定

在 YTA 和 L-*Rf5* 植株开花时期取其顶端待开花穗做花粉育性镜检, 观察结果显示 YTA 植株花粉为不育花粉(图 5A), 而 L-*Rf5* 中植株花粉均为部分可育花粉, *Rf5* 纯合的 L-*Rf5* 的花粉明显比杂合 L-*Rf5* 的花粉育性高(图 5B、C)。统计结果显示, 杂合的 L-*Rf5* 的花粉育性为 $40.5\% \pm 2.1\%$, 套袋结实率为 $48.5\% \pm 2.9\%$; 纯合 L-*Rf5* 的花粉育性为

$86.5\% \pm 3.8\%$, 套袋结实率为 $61.2\% \pm 2.8\%$ 。

2.5 不育基因 *orfH79* 和 *orf216* 在同质同核近等基因恢复系 L-*Rf5* 中表达量的初步分析

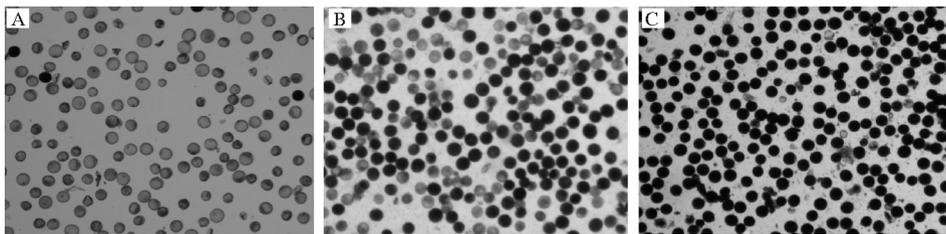
有研究表明, 红莲型水稻细胞质雄性不育属于配子体不育类型, 小孢子败育时期较迟, 多发生在二核期^[20]。在同一时间段取 L-*Rf5*、YTA 和 YTB 植株二核期的穗和剑叶, Trizol 法提取总 RNA 然后反转录成 cDNA, 以线粒体基因 *cob* 做内参, 用 Real-time PCR 检测植株中 *orfH79* 和 *orf216* 的表达量。结果显示: 与 YTA 中不育基因 *orfH79* 的表达量相比, L-*Rf5* 植株中表达量明显下降。纯合的 L-*Rf5* 比杂合的 L-*Rf5* 中稍低, 但差异不明显(图 6A、B)。不论纯合还是杂合的 L-*Rf5* 中 *orf216* 的表达量较 YTA 都下降不明显(图 6C、D)。



1~4:L-*Rf5* 单株; 5~8:L-*Rf6* 单株; 9:9311; 10:YTA; 11:MH63; 12:水; M:DL15000 marker。1-4:L-*Rf5* plant; 5-8:L-*Rf6* plant; 9:9311; 10:YTA; 11:MH63; 12:Water; M:DL15000 marker.

图 4 PCR 扩增 *Rf1B*

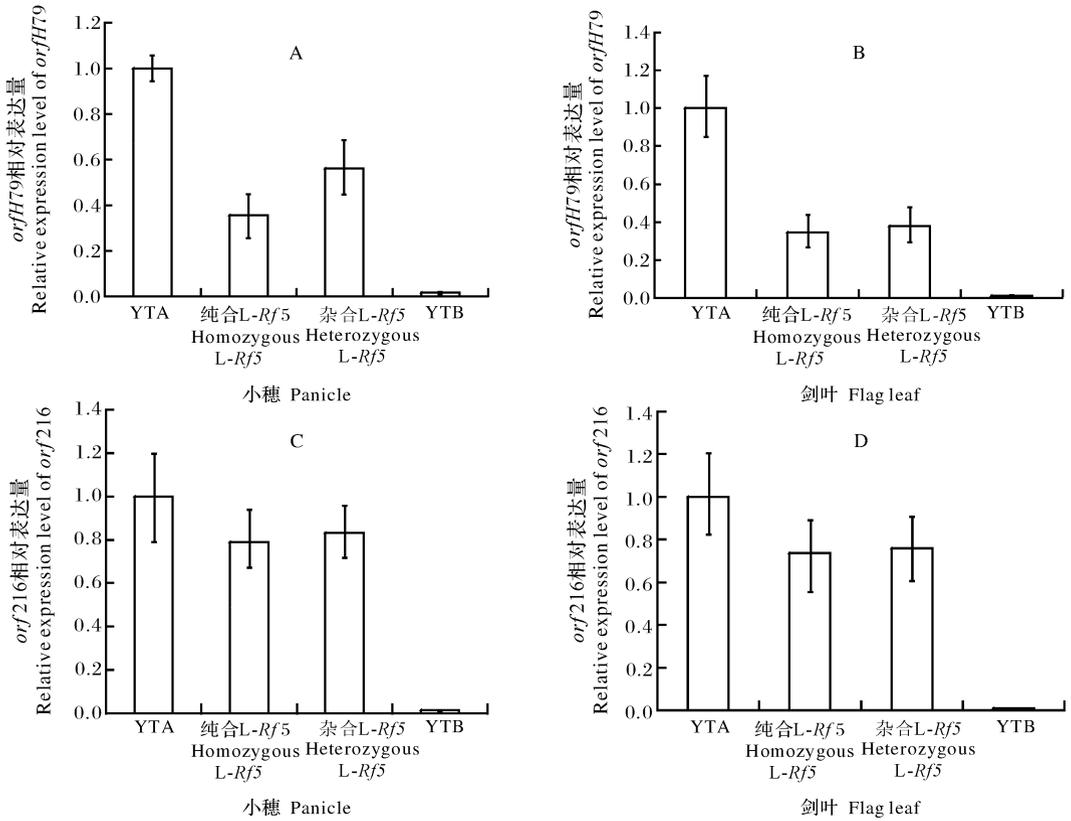
Fig.4 PCR amplification for *Rf1B*



A.YTA 花粉镜检; B.杂合 L-*Rf5* 花粉镜检; C.纯合 L-*Rf5* 花粉镜检。A.The pollen microscopic examination of YTA; B.The pollen microscopic examination of heterozygous L-*Rf5*; C.The pollen microscopic examination of homozygous L-*Rf5*.

图 5 YTA 和杂合及纯合 L-*Rf5* 植株花粉镜检

Fig.5 The pollen microscopic examination for YTA, heterozygous L-*Rf5*, homozygous L-*Rf5*



A. 稻穗中 *orfH79* 的相对表达量；B. 同时期剑叶中 *orfH79* 的相对表达量；C. 稻穗中 *orf216* 的相对表达量；D. 同时期剑叶中 *orf216* 的相对表达量。A. The relative expression level of *orfH79* in panicle; B. The relative expression level of *orfH79* in flag leaf at the same time; C. The relative expression level of *orf216* in panicle; D. The relative expression level of *orf216* in flag leaf at the same time.

图 6 YTA、YTB、L-Rf5 中 *orfH79* 和 *orf216* 表达量分析

Fig.6 The expression analysis of *orfH79* and *orf216* in YTA, YTB, L-Rf5 by qRT-PCR

3 讨论

红莲型(HL)水稻中已经发现 2 个恢复基因 *Rf5*、*Rf6* 和 2 个不育基因 *orfH79* 和 *orf216*。*RF5* 和 *RF6* 均为典型的 PPR 蛋白，*rf6* 与 *Rf6* 在 DNA 序列上差异明显，*rf6* 缺少了一段 310 bp DNA 序列，因此，可以在缺失片段两端设计 1 对特异引物鉴定 *Rf6* 的纯合或杂合。在已有的研究结果中，*rf5* 只是在第 912 个核苷酸位置发生了 T 到 A 的突变，造成密码子 TAT 变成 TAA，引起了原开放阅读框的提前终止^[12]。为了开发 *rf5* 的分子标记，本研究克隆了 YTA 中包括 *rf5* 及上下游 4.2 kb 的片段，*Rf5* 与 *rf5* 的序列比对显示，二者在起始密码上游 -866 bp 的转录调控区有 6 个碱基的缺失。在 ORF 内部存在很多 SNP 位点，以此为基础，设计了可用于鉴定的 *rf5* 和 *Rf5* 基因的分子标

记。从分子水平上鉴定 *Rf5* 纯合或杂合需要用到 2 对引物，本研究通过分子标记辅助选择并结合遗传学原理筛选得到纯合的 L-Rf5 株系。

HL-CMS 属于配子体不育类型，雄配子(花粉)发育是否正常是由自身基因型决定的，含恢复基因的花粉正常发育，不含恢复基因的则败育，这与孢子体 CMS 不同。HL-CMS 在二核期败育，花粉表型很容易鉴定，败育花粉碘染不着色，可育花粉碘染为黑色。根据遗传学原理，基因型为 *Rf5Rf5* 的 L-Rf5 植株，其花粉可育度在理论上应为 100%，而基因型为 *Rf5rf5* 的 L-Rf5 的花粉可育度在理论上为 50%，可以依此判断纯合及杂合的 L-Rf5 植株，从镜检结果来看，纯合 L-Rf5 和杂合 L-Rf5 可育花粉差别很大，很容易做出判断。结合 *Rf5* 和 *rf5* 的分子标记，筛选出纯合和杂合的 L-Rf5 用于后续试验。L-Rf5 中 *orfH79* 的表达量检测发现 *Rf5*

确实作用于 *orfH79* 的转录本,使 *orfH79* 的表达量下降。纯合 L-*Rf5* 比杂合 L-*Rf5* 中的 *orfH79* 的表达量稍低。然而 L-*Rf5* 中 *orf216* 的表达量较 YTA 并没有明显的下降,推测 *Rf5* 恢复基因的存在对 *orf216* 的表达作用不大。

近等基因系的构建是一项长期的工作。近等性的好坏与很多因素有关,比如双亲的遗传差异、回交的代数、构建近等基因系采用的方法及鉴定的方法等。本研究构建的 L-*Rf5* 以及前期已经构建的 L-*Rf6* 近等基因系^[21] 在株高、分蘖数、结实率等农艺性状方面都基本一致。纯合的植株套袋自交几代后,后代遗传稳定,没有出现遗传分离现象,可以作为后续研究材料。

BT 型水稻有 *Rf1A* 和 *Rf1B* 两个恢复基因,且都在 10 号染色体上,两者之间的物理距离约为 109 kb,这 2 个恢复基因都可以作用于 *orf79* 的转录本,使育性得到恢复^[17]。BT 的 *Rf1A* 和 HL 中的 *Rf5* 其实是同一个基因,这个基因可以恢复 BT 和 HL 不育系的育性^[12,18]。而 *Rf1B* 是否可以恢复 HL 不育系 YTA 的育性未见报道。对比红莲型不育系 YTA、恢复系 9311、近等基因恢复系中 L-*Rf5*、L-*Rf6* 中 *Rf1B* 基因序列,发现它们中的 *Rf1B* 序列一致,但是不育系 YTA 中的花粉育性并没有恢复,YTA 中仅检测到 *Rf1B* 的存在,其他育性恢复复合成分并未检测,推测育性未恢复可能是 YTA 中缺少和 RF1B 蛋白一同发挥核心作用的蛋白。

参 考 文 献

- [1] WISE R P, PRING D R. Nuclear-mediated mitochondrial gene regulation and male fertility in higher plants: light at the end of the tunnel? [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2002, 99(16): 10240-10242.
- [2] CHASE C D, BABAY-LAUGHNAN S. Cytoplasmic male sterility and fertility restoration by nuclear genes [M]// DANIELL H, CHASE C D. Molecular biology and biotechnology of plant organelles. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2004: 593-621.
- [3] UNSELD M, MARIENFELD J R, BRANDT P, et al. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides [J]. Nature genetics, 1997, 15(1): 57-61.
- [4] 王灿洁, 李德超, 袁贞贞, 等. 新型叶用芥菜 hau 细胞质雄性不育杂种组合的加工模式 [J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(3): 17-23.
- [5] NOTSU Y, MASOOD S, NISHIKAWA T, et al. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants [J]. Molecular genetics and genomics, 2002, 268(4): 434-445.
- [6] SUGIYAMA Y, WATASE Y, NAGASE M, et al. The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants [J]. Molecular genetics and genomics, 2005, 272(6): 603-615.
- [7] ZHANG H, LI S, YI P, et al. A Honglian CMS line of rice displays aberrant F₀, of F₀F₁-ATPase [J]. Plant cell reports, 2007, 26(7): 1065-1071.
- [8] WAN C, LI S, WEN L, et al. Damage of oxidative stress on mitochondria during microspores development in Honglian CMS line of rice [J]. Plant cell reports, 2007, 26(3): 373-382.
- [9] PENG X, LI F, LI S, et al. Expression of a mitochondrial gene *orfH79*, from the CMS-Honglian rice inhibits *Saccharomyces cerevisiae*, growth and causes excessive ROS accumulation and decrease in ATP [J]. Biotechnology letters, 2009, 31(3): 409-414.
- [10] PENG X, WANG K, HU C, et al. The mitochondrial gene *orfH79* plays a critical role in impairing both male gametophyte development and root growth in CMS-Honglian rice [J]. BMC plant biology, 2010, 10(1): 125.
- [11] HUANG W, HU J, YU C, et al. Two non-allelic nuclear genes restore fertility in a gametophytic pattern and enhance abiotic stress tolerance in the hybrid rice plant [J]. Theoretical and applied genetics, 2012, 124(5): 799-807.
- [12] HU J, WANG K, HUANG W, et al. The rice pentatricopeptide repeat protein RF5 restores fertility in Honglian cytoplasmic male-sterile lines via a complex with the glycine-rich protein GRP162 [J]. Plant cell, 2012, 24(1): 109-122.
- [13] QIN X, HUANG Q, XIAO H, et al. The rice DUF1620-containing and WD40-like repeat protein is required for the assembly of the restoration of fertility complex [J]. New phytologist, 2016, 210(3): 934-945.
- [14] HUANG W, YU C, HU J, et al. Pentatricopeptide-repeat family protein RF6 functions with hexokinase 6 to rescue rice cytoplasmic male sterility. [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2015, 112(48): 14984-14989.
- [15] 刘学群. 水稻红莲型细胞质雄性不育候选基因的筛选与恢复基因的精细定位 [D]. 武汉: 武汉大学, 2004.
- [16] 李丕顺. HL-CMS 不育候选基因 *orf216* 的克隆及稻瘟病抗性基因 Pi36 的功能研究 [D]. 武汉: 中南民族大学, 2008.
- [17] 陈为, 周杰, 谭艳平, 等. 水稻 HL-CMS 中 2 个雄性不育候选基因表达模式的初步研究 [J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4): 394-397.

- [18] WANG Z, ZOU Y, LI X, et al. Cytoplasmic male sterility of rice with boro ii cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing[J]. *Plant cell*, 2006, 18(3): 676-687.
- [19] 易平, 汪莉. 红莲型细胞质雄性不育线粒体相关嵌合基因的表达[J]. *科学通报*, 2002, 47(2): 130-133.
- [20] 朱英国. 水稻雄性不育生物学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 2000: 104-112.
- [21] 刘杰, 李威涛, 王春台, 等. HL-CMS 同质异核近等基因恢复系 'L-Rf6' 的构建[J]. *中国农学通报*, 2016, 32(17): 20-24.

Construction of near-isogenic restore line L-Rf5 with isonucleus and isocyttoplasmic through marker-assisted

LI Weitao TIAN Ze WANG Chuntai LIU Xuequn TAN Yanping

Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission for Biological Technology/
Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application
of Special Plants in Wuling Area of China, South-Central
University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract There are two fertility restorer genes, *Rf5* and *Rf6* in 9311 and two sterility genes *orfH79* and *orf216* in YTA. To study the interaction between two restorer genes and two CMS genes in Honglian (HL) rice, HL-CMS line YTA was crossed with the restore line 9311. Then, F1 was back-crossed repeatedly as the male parent with the YTA as recurrent male parent for more than eight generations. Based on the sequences of *Rf5*, we designed the specific primers and tested the restorer gene in L-Rf5. Combining with the pollen fertility, we did not find genetic divergence in self-crossed progenies. It suggested that the homozygous L-Rf5 was constructed successfully. By analyzing the expression level of HL-CMS gene *orfH79* and *orf216* in L-Rf5, we found that the expression level of *orfH79* in L-Rf5 decreased distinctly than that in YTA. There is no obvious difference between the homozygous L-Rf5 and the heterozygous L-Rf5. However, the expression of *orf216* in L-Rf5 was not significantly decreased compared with YTA. Meanwhile, the *Rf1B* sequences of YTA, 9311, near isogenic lines were cloned, and we found no difference in these materials. This study laid the foundation for molecular analysis of the restoration of fertility gene *Rf1B*.

Keywords rice; cytoplasmic male sterile (CMS); near-isogenic line (NIL); restorer of fertility gene (*rf*); sterility gene

(责任编辑: 张志钰)