

水稻线粒体基因 *orf290* 功能的初步研究

杨梦醒 姜 慧 田 泽 刘学群 谭艳平 王春台

中南民族大学生命科学院/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 从红莲型不育系粤泰 A(YTA)线粒体基因组中克隆并鉴定了一个 6.7 kb 的 CMS 相关片段 HL-*sp1*, 序列预测发现了 2 个 *orf*, 其中一个编码 290 个氨基酸, 暂命名为 *orf290*。构建带有线粒体信号肽的超表达载体 35S::*Rf1b5'*::*orf290*, 通过农杆菌介导转化受体保持系粤泰 B(YTB), 以水稻的单拷贝基因蔗糖磷酸合成酶基因(*SPS*)作为内参基因, 以潮霉素抗性基因(*hpt*)作为目的检测基因, 基于实时荧光定量 PCR 鉴定转基因 T₀代植株中外源基因的拷贝数, 并对阳性植株进行花粉镜检和结实率统计。结果显示获得了 2 株单拷贝转 35S::*Rf1b5'*::*orf290* 植株, 并且都有 *orf290* 的表达。单拷贝超表达 *orf290* 植株的平均花粉可育度 30.8%, 平均套袋结实率 41.6%。这些结果初步证实, 线粒体基因 *orf290* 可能与水稻细胞质雄性不育相关。

关键词 水稻; 细胞质雄性不育; 线粒体; *orf290*; 超表达

中图分类号 S 511.053 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)06-0001-06

植物雄性不育是指不能产生花粉或产生的花粉缺乏功能, 而雌性系统发育正常的现象。按照遗传方式可分为核雄性不育 (genic male sterility, GMS) 和细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS)^[1], 前者符合孟德尔遗传规律, 后者属于母性遗传。已在超过 150 多种开花植物中观察到 CMS 现象^[2]。植物 CMS 与线粒体有着密切的关系, 线粒体基因组与细胞核基因组相互之间不协调会引起 CMS 现象的发生^[3-4]。植物细胞质雄性不育基因大多来源于线粒体基因的重排或与未知 DNA 序列构成嵌合体^[5], 嵌合基因编码毒性蛋白导致花粉母细胞发育异常最终死亡。如水稻中的 *orfH79*、*WA352*, 玉米中的 *orf355*, 小麦的 *orf256*^[6-8]等。水稻包台型 (Baotai, BT 型) 不育系是由线粒体功能基因 *atp6* 和 *orf79* 的部分序列与未知功能的基因序列形成嵌合基因编码毒性蛋白而最终导致其出现 CMS 现象^[9]。

笔者所在实验室以红莲型不育系粤泰 A (YTA) 为材料, 克隆并鉴定了红莲型细胞质雄性不育 (Honglian, HL-CMS) 相关线粒体序列 HL-*sp1* 共 6.7 kb^[10-12], 根据序列预测含 2 个 *orf*, 其中一个

orf 编码 290 个氨基酸, 暂命名为 *orf290*。本研究构建带有线粒体信号肽的线粒体基因 *orf290* 的超表达载体, 通过农杆菌介导转化红莲型保持系粤泰 B(YTB), 对转基因 T₀代植株进行育性观察, 以期探明线粒体基因 *orf290* 在水稻 CMS 中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻粤泰 A (YTA)、粤泰 B (YTB)、明恢 63 (MH63) 种子, 大肠杆菌菌株 DH5 α 、农杆菌菌株 EHA105, 载体 pCAMBIA1305.1 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。ExTaq、pMD18-T TA 克隆试剂盒、DNA 分子质量 Marker 购自 TaKaRa 公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 限制性内切酶及 T4 连接酶购自 NEB 公司; 其余试剂均为国产分析纯产品; DNA 测序及引物合成由武汉擎科生物技术有限公司完成。本研究所用的引物序列及用途如表 1。

1.2 线粒体基因 *orf290* 超表达载体的构建

1) 利用引物 (290F-*Bgl* II、290R-*Bst* E II) 以水稻 YTA gDNA 为模板进行 PCR 扩增。10 μ L PCR

收稿日期: 2018-04-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31170296)

杨梦醒, 硕士研究生. 研究方向: 植物分子生物学. E-mail: 1182867670@qq.com

通信作者: 王春台, 博士, 教授. 研究方向: 水稻分子生物学. E-mail: wangchuntai@mail.scuec.edu.cn

表 1 本研究所用的引物序列及用途
Table 1 The sequences of the primers in this study

名称 Name	用途 Usage	序列(5' to 3') Sequence
290F- <i>Bgl</i> II	<i>orf290 Bgl</i> II 扩增	GAAGATCTATGCTGCGCTTCGAACGTA
290R- <i>Bst</i> E II	<i>orf290 Bgl</i> II amplification	GGCGGTAACCTCAGGAGGCTGAGTTTTGATCC
XHF <i>Nco</i> I	<i>Rf1b</i> 5' 扩增	CCATGGCAGCCGCGCTCGCTG
XHR <i>Bgl</i> II	<i>Rf1b</i> 5' amplification	GTTAGATCTGTCTAAGCGGCCCGCACTGCA
XHF1	<i>Rf1b</i> 全长扩增	ATTCTTTCGCGCGCTGGTTA GT
XHR1	Full length amplification of <i>Rf1b</i>	TTAGCATGCAGGAGTCGACACAG
CamF	转基因植株阳性鉴定	GCGTTACCCAACCTAATCGC
290R- <i>Bst</i> E II	Identification of positive transgenic plants	GGCGGTAACCTCAGGAGGCTGAGTTTTGATCC
SPS-qHG-F	拷贝数鉴定	CCTCTTCTAGCATCGAGGTCAC
SPS-qHG-R	Identification of copy number	CTCCCCGACGATCAGATACATG
hpt-qHG-F	拷贝数鉴定	GATGCAAAGGCAGGCTCTCG
hpt-qHG-R	Identification of copy number	GATGTAGGAGGGCGTGGATATG
Q290F	定量 PCR Quantitative RT-PCR	GGAAGACTTGGCTAGGTTGC
Q290R		CGTAAGCGGACTCTTTCGAC
<i>Actin</i> F	内参基因	TGCTATGTACGTCGCCATCCA
<i>Actin</i> R	Reference gene	AATGAGTAACCACGCTCCGTC

注:下划线标注的为酶切位点。Note: Underlined sequences is cleavage sites.

反应体系含 $10\times$ ExTaq buffer $1\ \mu\text{L}$ 、 $2.5\ \text{mmol}/\mu\text{L}$ dNTPs $0.8\ \mu\text{L}$ 、ExTaq $0.1\ \mu\text{L}$ 、 $10\ \text{mmol}/\text{L}$ 的正反向引物各 $0.2\ \mu\text{L}$ 、 $50\ \text{ng}/\mu\text{L}$ DNA 模板 $1\ \mu\text{L}$ 。PCR 扩增程序为: $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $4\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 $40\ \text{s}$, $58\ ^\circ\text{C}$ 退火 $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $1\ \text{min}$, 34 个循环; $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $5\ \text{min}$ 。对 PCR 产物切胶回收后进行 TA 克隆, 并进行质粒 PCR 检测。对 PCR 鉴定正确(产物预期大小为 $873\ \text{bp}$)的菌株测序并保存。

2) 利用引物(XHF1、XHR1)以 MH63 gDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系及程序同本文“1.2.1)”, 除体系内含 DMSO、退火温度 $62\ ^\circ\text{C}$ 、延伸时间 $30\ \text{s}$ 以外。以得到的 PCR 产物稀释后作为模板, 引物为 XHF*Nco* I、XHR*Bgl* II 进行 PCR 扩增, 反应程序及体系同本文“1.2.1)”。得到线粒体信号肽序列 *Rf1b* 5' 片段后, 用 *Nco* I、*Bgl* II 对目的片段和载体 pCAMBIA1305.1 进行双酶切, 回收后将载体与 *Rf1b* 5' 片段进行连接、转化, 对 PCR 鉴定正确的菌株进行测序并保存。

3) 将保存的阳性菌 pMD18-T-*orf290 Bgl* II 及 pCAMBIA1305.1-*Rf1b* 5' 活化、扩大培养后提取质粒 DNA, 使用限制性内切酶 *Bst* E II、*Bgl* II 进行双酶切。酶切反应体系同本文“1.2.1)”, 酶切产物电泳后切胶回收。将连接产物进行转化, 对 PCR 鉴定正确的菌株测序并保存。

1.3 水稻遗传转化

取适量 YTB 种子, 去壳后用 1.2% 次氯酸钠溶液表面消毒 $15\ \text{min}$; 用灭菌后的蒸馏水漂洗 $6\sim 8$

次。接入 MS 诱导培养基中, 将长势良好的愈伤组织接入继代培养基继代后, 预培养 $3\ \text{d}$ 。将愈伤与含有重组质粒的农杆菌的共培养培养基混合, 侵染约 $5\ \text{min}$ 后洗净, 接入共培养培养基暗室培养 $36\sim 48\ \text{h}$ 。用无菌水洗净愈伤, 接入 MS 筛选培养基中, 暗室培养 $20\ \text{d}$ 左右。待抗性愈伤长出后转入分化培养基中, 直至绿点长出。在分化培养基上挑选出长势良好的幼苗, 接到 MS 生根培养基上, $25\ ^\circ\text{C}$ 光照培养。炼苗后移栽到土壤中。

1.4 转基因植株的阳性鉴定及拷贝数分析

CTAB 法提取水稻叶片 DNA, 并利用设计好的特异性引物(CamF、290R*Bst* E II)进行 PCR 检测, 反应体系同本文“1.2.1)”。反应程序为: $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $4\ \text{min}$; $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 $40\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}$ 退火 $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $2\ \text{min}$, 34 个循环; $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $5\ \text{min}$ 。

利用实时荧光定量 PCR 法测定水稻外源基因的拷贝数。SPS-qHG-F 和 SPS-qHG-R 为内参引物, 潮霉素引物 hpt-qHG-F 和 hpt-qHG-R 为目的基因引物(表 1), 以待检测植株基因组 DNA 为模板。 $20\ \mu\text{L}$ 实时荧光定量 PCR 反应体系组成为: SYBR Premix Ex TaqTM ($2\times$) $10\ \mu\text{L}$, PCR 上下游引物 ($10\ \mu\text{mol}/\text{L}$) 各 $0.3\ \mu\text{L}$, gDNA 模板 ($20\ \text{ng}/\mu\text{L}$) $2\ \mu\text{L}$ 。反应程序为 $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $30\ \text{s}$; $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 $3\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}$ 退火延伸 $30\ \text{s}$, 同时在退火过程中检测荧光信号变化, 40 个循环。重复 3 次。

1.5 转基因植株表达量检测

Trizol 法提取水稻嫩叶总 RNA, 并反转录成

cDNA, 将 cDNA 稀释 3 倍后作为模板, 以 *Actin* 作为内参, 用 5 μ L 水、7.5 μ L 的 SYBR Premix Ex Taq™ (2 \times)、1 μ L 引物 Mix 和 1.5 μ L 的 cDNA 样品构成 15 μ L 反应体系, 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 3 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 40 个循环; 用相对定量的方式检测 *orf290* 的表达量, 每个样品设置 3 个重复。

1.6 转基因植株花粉育性及结实率统计

在植株开花期取其顶端待开花穗进行花粉育性镜检, 将花药放在滴有 1% 的 I₂-KI 溶液的载玻片上, 捣碎, 在显微镜下观察, 黑体实心花粉为可育花粉, 其余均为不育花粉。在开花之前对基因型正确的部分植株小穗套袋自交, 统计套袋结实率。

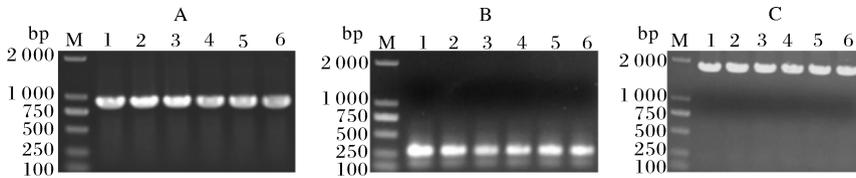
2 结果与分析

2.1 线粒体基因 *orf290* 超表达载体的构建

以 YTA gDNA 为模板, 利用特异引物 PCR 扩增线粒体基因 *orf290* 的全长 ORF 后进行 TA 克隆, 并进行转化, 挑取单菌落后扩大培养, 37 $^{\circ}$ C 12 h 后提取质粒用引物 290F-*Bgl* II、290R-*Bst* E II 进行质粒 PCR 检测, 与预期大小 (873 bp) 基本符合 (图 1A)。

由于 *orf290* 为线粒体基因, 而农杆菌介导的遗传转化只能将外源基因插入到受体的核 DNA 中, 为了让 *orf290* 表达的蛋白在线粒体中发挥作用, 在 *orf290*-5' 端加上线粒体信号肽序列, 本研究利用恢复基因 *Rf1b* 的信号序列, 以 MH63 gDNA 为模板 PCR 扩增 *Rf1b* ORF 全长, 再通过 PCR 扩增出线粒体信号肽序列 *Rf1b5'*。利用 *Nco* I 和 *Bgl* II 酶切位点将 *Rf1b5'* 端与植物双元表达载体 pCAMBIA1305.1 连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒后用引物 XHFNco I、XHRBgl II 进行 PCR 鉴定, 在 320 bp 左右出现目的片段 (图 1B), 经过测序和序列比对, 水稻线粒体信号肽序列载体 pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'* 构建成功。

用 *Bst* E II 和 *Bgl* II 双酶切 pMD18-T-*orf290* *Bgl* II 和 pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'*, 回收目的片段后用 T4 DNA 连接酶进行连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒后用引物 CamF、290R*Bst* E II 进行 PCR 鉴定, 在 1800 bp 左右出现目的条带 (图 1C)。经过测序及序列比对, 带有信号肽的水稻线粒体基因 *orf290* 的超表达载体 pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'*-*orf290* 构建成功。



A: pMD18-T-*orf290*; B: pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'*; C: pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'*-*orf290*; M: DL2000; 1~6: 不同的单克隆。
1-6: Different clones.

图 1 线粒体基因 *orf290* 的超表达载体 PCR 鉴定

Fig.1 Identification of over-expression vectors of mitochondrial gene *orf290* by PCR

2.2 超表达载体 pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'*-*orf290* 的遗传转化

将含有重组质粒 pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'*-

orf290 的农杆菌感染受体 YTB 的愈伤组织, 经过共培养后, 将愈伤组织转入筛选培养基中, 挑取新的抗性愈伤经过分化、生根得到转基因苗 (图 2)。

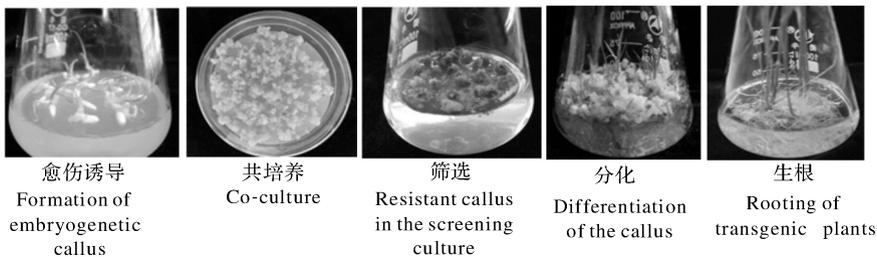
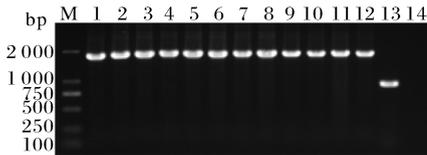


图 2 农杆菌介导的水稻遗传转化过程流程图

Fig.2 The flow chart of genetic transformation by *Agrobacterium*-mediated

2.3 转基因 T₀代植株的阳性鉴定及拷贝数分析

超表达载体 pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'*-*orf290* 通过农杆菌介导转入受体品种 YTB 中,得到转基因 T₀代植株,利用目的基因特异性引物(CamF、290RBstE II)对转基因植株进行阳性鉴定。以受体品种 YTB 为阴性对照,同时以不育系 YTA 作为对照,YTB、YTA 扩增引物为 290F-*Bgl* II、290R-*Bst*E II,共得到 12 株 pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'*-*orf290* 转基因植株(图 3)。



M: DL2000; 1~12 为不同转基因植株,1: 1; 2: 3; 3: 4; 4: 5; 5: 6; 6: 8; 7: 9; 8: 12; 9: 16; 10: 20; 11: 21; 12: 22; 13: YTA; 14: YTB。1-12: Different transgenic plants, 1: 1; 2: 3; 3: 4; 4: 5; 5: 6; 6: 8; 7: 9; 8: 12; 9: 16; 10: 20; 11: 21; 12: 22; 13: YTA; 14: YTB.

图 3 pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'*-*orf290* 转基因植株阳性鉴定

Fig.3 The identification of positive transgenic plants with pCAMBIA1305.1-*Rf1b5'*-*orf290*

以基因组 DNA 为模板,利用实时荧光定量 PCR 法初步鉴定水稻外源基因的拷贝数。选择水稻中的单拷贝基因蔗糖磷酸合成酶基因(*SPS*)作为内参基因,以潮霉素抗性基因(*hpt*)为目的基因进行拷贝数估算。将基因组 DNA 统一稀释到 20 ng/ μ L 作为实时荧光定量 PCR 的模板,以已经确认的一个单拷贝转基因纯合体水稻基因组 DNA 作为对照,相对表达量为 1,且对照样品为纯合二倍体,试验组的相对表达量 ≈ 0.5 的为单拷贝。结果(图 4)显示:8 号与 22 号植株可能为单拷贝,20、4、9 为双拷贝,5 和 12 可能是单拷贝也可能是双拷贝,其余的样品可能为多拷贝。

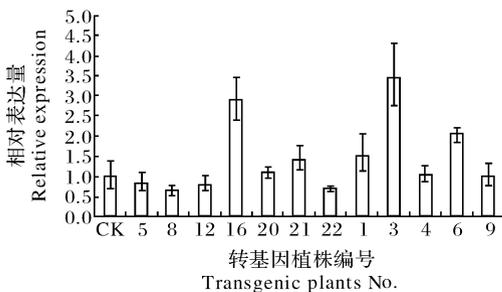
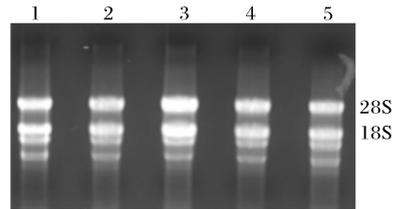


图 4 转基因植株拷贝数鉴定

Fig.4 The identification of the copy number in transgenic plants

2.4 转基因植株相对表达量检测结果

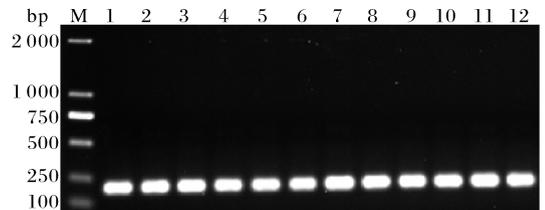
提取转基因植株的总 RNA,经测定其 D_{260}/D_{280} 为 1.90~2.00, D_{260}/D_{230} 为 1.90~2.35,电泳检测条带清晰(图 5),*Actin* 的 PCR 扩增结果说明,cDNA 质量良好,无基因组 DNA 污染(图 6)。对转基因植株进行 *orf290* 表达量的检测,结果显示:除 16 和 9 的表达量较低外,其余转基因植株中 *orf290* 都有明显表达(图 7)(受体品种 YTB 中没有 *orf290*)。



1: 1; 2: 3; 3: 8; 4: 16; 5: 20.

图 5 总 RNA 质量检测

Fig.5 Testing of total RNA quality



M: DL2000 1: 1; 2: 3; 3: 4; 4: 5; 5: 6; 6: 8; 7: 9; 8: 12; 9: 16; 10: 20; 11: 21; 12: 22.

图 6 cDNA 质量的 *Actin* PCR 检测

Fig.6 The detection of cDNA quality by *Actin* PCR

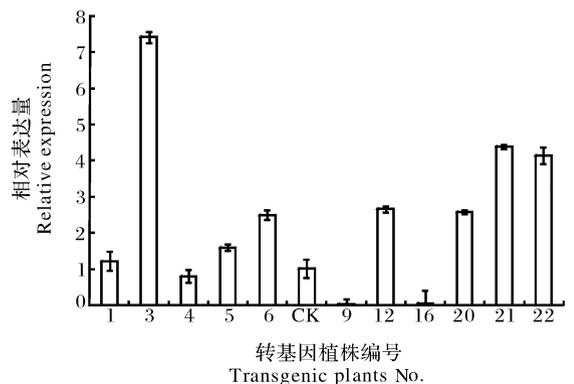


图 7 转基因植株 *orf290* 相对表达量分析

Fig.7 The analysis of relative expression of *orf290* in transgenic plants

2.5 转基因植株花粉育性及结实率统计分析

在植株抽穗后对每株花粉进行 I₂-KI 染色检查,以 YTA 为阴性对照,YTB 为阳性对照,超表达

orf290 植株的花粉可育度为 18.3%，套袋结实率为 37.3% (表 2)。单拷贝植株 8 号和 22 号花粉可育度分别为 32.4% 和 29.2%，平均 30.8%；套袋结实率分别为 51.2% 和 32.05%，平均 41.6%。对 *orf290* 相对表达量在 3 以内的 1、4、5、6、8 (CK)、12 和 20 号转基因植株进行表达量与套袋结实率及花粉可育度的相关性分析，结果 (图 8) 显示 *orf290* 相对表达量与套袋结实率相关性较高，相关系数为 -0.755 6，而与花粉可育度相关性较低，相关系数为 -0.325 4，这些结果表明水稻线粒体基因 *orf290* 的表达可能与雄性不育有关。

表 2 转基因植株 pCAMBIA1305-*Rf1b5'*-*orf290* 育性统计
Table 2 Statistics of fertility in transgenic plants with pCAMBIA1305-*Rf1b5'*-*orf290*

转基因植株编号 Transgenic plants No.	套袋结实率/% Seed set rate	花粉可育度/% Pollen fertility
1	85.0	25.5
3	37.5	25.0
4	42.0	6.8
5	42.2	33.0
6	10.0	0.0
8	51.2	32.4
9	26.0	14.0
12	10.0	26.0
16	25.5	9.8
20	27.1	7.8
21	59.3	10.0
22	32.0	29.2
平均 Mean	37.3	18.3

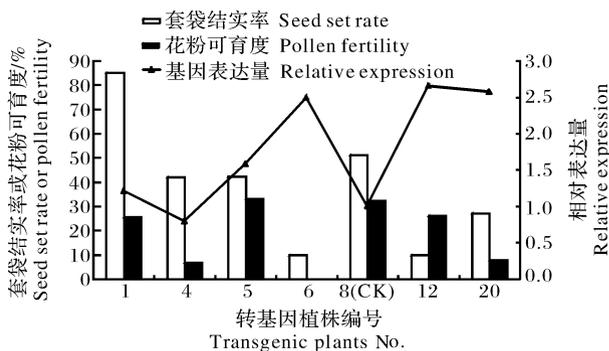


图 8 育性与 *orf290* 相对表达量相关性分析

Fig.8 The correlation analysis between the fertility and the relative expression of *orf290* in transgenic plants

3 讨论

orf290 是从红莲型不育系 YTA 线粒体基因组中克隆的一个育性相关基因，生物信息学分析表

明其编码的蛋白与线粒体有关，并具有二次跨膜结构，是一种未见报道的 ATP 酶嵌合蛋白，并且笔者所在实验室已经证实了 *orf290* 对大肠杆菌和酵母具有毒性，会抑制它们的生长 (结果未发表)。由于该基因为线粒体编码基因，因此，本研究构建带有线粒体信号肽的超表达载体 35S :: *Rf1b5'*:*orf290* 并转入受体品种保持系 YTB 中，利用线粒体信号肽使目的基因 *orf290* 表达形成的蛋白可以在线粒体中发挥其功能，转基因植株的结实率和花粉育性分析结果表明，*orf290* 的表达与 CMS 相关。

拷贝数的鉴定是转基因植株进行表达分析的重要前提。本研究采用的基于实时荧光定量 PCR 法计算水稻外源基因的拷贝数只能进行粗略的估算，并不能精准确定基因拷贝数，今后将利用 Southern-blot 的方法对转基因植株进行拷贝数的鉴定。由于受体品种 YTB 中不存在 *orf290* (图 3)，因此，转基因植株中如果能检测到 *orf290* 的表达，也可以证明是阳性植株；而检测不到表达的阳性植株可能是基因沉默引起的。

参 考 文 献

[1] KAUL M L H. Male sterility in higher plants[J]. Monoger theoretical and applied genetics, 1988, 10:775-795.

[2] BENTOLILA S, ALFONSO A A, HANSON M R. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2002, 99 (16): 10887-10892.

[3] BUDAR F, TOUZET P, DE PAEPE R. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited[J]. Genetica, 2003, 117(1):3-16.

[4] KAZAMA T, ITABASHI E, FUJII S, et al. Mitochondrial ORF79 levels determine pollen abortion in cytoplasmic male sterile rice[J]. The plant journal, 2016, 85(6):707-716.

[5] TUTEJA R, SAXENA R K, DAVILA J, et al. Cytoplasmic male sterility-associated chimeric open reading frames identified by mitochondrial genome sequencing of four *Cajanus* genotypes[J]. DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes, 2013, 20: 485-495.

[6] GUALBERTO J M, NEWTON K J. Plant mitochondrial genomes: dynamics and mechanisms of mutation[J]. Annual review of plant biology, 2017, 68:225-252.

[7] 雷彬彬,李双双,刘国政,等.高等植物线粒体基因组进化分析[J].分子植物育种,2012,10(4):490-500.

[8] 李威涛,田泽,王春台,等.分子标记辅助构建同质同核近等基因恢复系 L-Rf5[J].华中农业大学学报,2017,36(6):1-7.

- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] TAN Y P, XU X, WANG C T, et al. Molecular characterization and application of a novel cytoplasmic male sterility-associated mitochondrial sequence in rice [J]. *BMC Genetics*, 2015, 16(1): 1-10.

Function of mitochondrial gene *orf290* in rice

YANG Mengxing JIANG Hui TIAN Ze LIU Xuequn TAN Yanping WANG Chuntai

*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/College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities,
Wuhan 430074, China*

Abstract HL-*sp1*, a 6.7 kb HL-CMS-related fragment, was cloned from the mitochondrial genome of HL-CMS sterile line YTA. One of the two ORFs predicted encodes 290 amino acids and is tentatively named *orf290*. One overexpression vector 35S :: *Rf1b5'* :: *orf290* with a mitochondrial signal peptide was constructed and transformed by *Agrobacterium* into YTB, a HL-CMS maintain line. The copy numbers of the exogenous gene in the 35S :: *Rf1b5'* :: *orf290* transgenic T₀ plants were estimated according the ratio of hygromycin B phosphotransferase (*hpt*) gene and the single copy sucrose phosphate synthase (*SPS*) gene in rice with qPCR based on DNA. The pollen fertility and the seed set rate of the T₀ positive transgenic plants were investigated. The results showed that two transgenic plants with single copy of 35S :: *Rf1b5'* :: *orf290* were obtained and the expression level of *orf290* in the T₀ positive transgenic plants were detected with qPCR. The average pollen fertility was 30.8% and the average seed set rate was 41.6% in the single copy transgenic lines. It is indicated that mitochondrial gene *orf290* may be related to cytoplasmic male sterility in rice.

Keywords rice (*Oryza sativa* L.); CMS; mitochondria; *orf290*; over-expression

(责任编辑:张志钰)