

# 水稻红莲型细胞质雄性不育基因 *orfH79* 的表达对细菌生长的抑制

彭晓珏<sup>1,2</sup> 张 健<sup>1</sup> 朱友林<sup>1</sup> 王 坤<sup>2</sup> 李绍波<sup>1</sup> 李绍清<sup>2</sup> 朱英国<sup>2</sup>

(1. 南昌大学 生命科学与食品工程学院/分子生物学与基因工程实验室,江西 南昌 330031; 2. 武汉大学 生命科学学院/植物遗传发育学教育部重点实验室,湖北 武汉 430072)

**摘要:** *orfH79* 是水稻红莲型细胞质的雄性不育基因。为了进一步研究其分子机理,在大肠杆菌中分别构建水稻红莲型细胞质雄性不育基因 *orfH79* 的原核表达载体 *pET-28a-orfH79* 和 *pGEX5x-2-orfH79*。分别转化大肠杆菌菌株 *BL21 (DE3)* 后利用 IPTG 诱导分析其表达产物对细菌生长的影响,结果表明 *PET-28a-orfH79* 重组子诱导表达的微量的 ORFH79 天然蛋白强烈的抑制了细菌的生长,而 *pGEX5x-2-orfH79* 重组子诱导表达的在 ORFH79 蛋白 N 端带 GST 标签的融合蛋白对细菌的生长影响却并不明显。这一结果为思考水稻红莲型细胞质雄性不育的分子机理提供了研究线索。

**关键词:** 水稻; 细胞质雄性不育; *orfH79*; 原核表达; 细菌生长

中图分类号: Q943; S511 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)03-0578-06

## Expression of a Mitochondrial Gene *orfH79* from the CMS-Honglian Rice Inhibiting the Growth of *Escherichia coli*

PENG Xiao-jue<sup>1,2</sup>, ZHANG Jian<sup>1</sup>, ZHU You-lin<sup>1</sup>,  
WANG Kun<sup>2</sup>, LI Shao-bo<sup>1</sup>, LI Shao-qing<sup>2</sup>, ZHU Ying-guo<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Molecular Biology and Gene Engineering, College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 2. Key MOE for Plant Developmental Biology, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** *orfH79* is a mitochondrial gene responsible for the cytoplasmic male sterility of Honglian rice. To study the molecular mechanism of this gene, the sequence of *orfH79* gene was cloned into *pET-28a* and *pGEX5x-2* vectors respectively, and then expressed in *BL21 (DE3)* strain. The results showed that weakly expressed native ORFH79 protein that induced from the recombinant *PET-28a-orfH79* strongly inhibits the growth of *E. coli*. However, the expression recombinant ORFH79 protein which fuses a GST protein in N-terminal in *Escherichia coli* doesn't impair the growth of *E. coli*. These results may provide a clue to get some information about the mechanism on cytoplasmic male sterility of Honglian rice.

**Key words:** rice; cytoplasmic male sterility; *orfH79*; prokaryotic expression; growth of *E. coli*

细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)普遍存在于高等植物中,是受细胞核与细胞质遗传物质双重控制的一种母性遗传性状,主要表现为雄性生殖系统不能产生有功能的正常花粉,而雌性系

收稿日期:2010-10-19 修回日期:2011-03-04

基金项目:国家重大基础研究 973 项目(2007CB109005)和江西省教育厅青年科学基金项目(CJJ10044)

作者简介:彭晓珏(1979—),女,讲师,博士,主要从事植物发育遗传学方向研究, E-mail: xiaojuepeng@163.com。

统的发育正常<sup>[1]</sup>。CMS 是生产上广泛利用杂种优势的基础,国内外大量研究结果表明,CMS 与线粒体基因组的突变有直接关系。线粒体基因组分子内或者分子间频繁的重组所形成的异常嵌合基因被认为是 CMS 产生的分子基础。截至目前为止,约有 14 个 CMS 相关的基因被鉴定于线粒体<sup>[2]</sup>。

研究发现一些经转基因验证的能够导致植物雄性不育的基因,其原核表达产物大多对细菌的生长有致死作用,但深入开展研究其分子机理的报道并不多。迄今为止,只有 T 型玉米的雄性不育基因 *Urf13* 表达产物对细菌的抑制机理已经有比较深入的分析。当 *Urf13* 基因转入大肠杆菌中进行表达时,发现其表达产物 13 ku 蛋白结合于细菌的细胞膜上,在细菌的培养物中加入 BmT - 毒素、methomyl 时,细菌的呼吸立即受到抑制,细胞膜膨胀,膜的通透性增加,胞内离子外泻,最终导致细菌死亡,细菌这一表型与 T 型玉米的离体线粒体加入 BmT - 毒素、methomyl 时的表型一致<sup>[3]</sup>。此外,与萝卜雄性不育相关基因 *orf138*<sup>[4]</sup>,包台型水稻雄性不育相关的 *orf79*<sup>[5]</sup>,以及与向日葵的雄性不育相关基因 *orf522*<sup>[6]</sup>,在细菌中表达的时候,也发现了其表达产物对细菌的生长有抑制或者致死作用,但是,其分子机理并没有进一步的展开深入研究。

水稻红莲型 CMS 是国内外公认的一类新的不育类型,因其不育系开花习性好,繁殖制种产量高而成为当前超级杂交组合选育的优质种质资源之一。易平等<sup>[7]</sup>研究发现在红莲型不育系线粒体 *atp6* 基因下游存在一个 *orfH79* 的嵌合基因,由 *coxI* 基因部分编码部分编码序列以及一段未知来源的序列构成。将 *orfH79* 基因转入了具有正常细胞质的水稻保持系中,结果表明 *orfH79* 基因能够导致水稻的雄性不育<sup>[8]</sup>。那么,水稻红莲型细胞质雄性不育基因 *orfH79* 基因的表达产物是否与其它雄性不育相关基因类似,能够影响细菌的生长呢?为此,笔者将 *orfH79* 基因进行原核表达,分析了其产物对细菌生长的影响。以期深入思考水稻红莲型细胞质雄性不育的分子机理提供线索。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

原核表达载体 *pET-28a*、*pGEX5x-2*、大肠杆菌菌株 *DH5α* 和 *BL21(DE3)* 均由本实验室保存。

### 1.2 主要试剂及工具酶

T4 - DNA 构连接酶和限制性内切酶购自 Takara 公司;凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒分别购自 X-gene 和赛百胜公司。

### 1.3 PCR 扩增目的片段

设计 *orfH79* 的引物,分别引入 *NcoI* 和 *BamHI* 和 *BamHI* 和 *XhoI* 两组酶切位点,PCR 扩出基因:

*NcoI*: 5'GCC CCA TGG CAA ATC TGC TCC GAT GGC TC 3'; *BamHI*: 5'GCC GGATCCATGACA AATCTGCTCCGATGGCTC3'; *BamHI*: 5'GCCGGATCCATGACA AATCTGCTCCGATGGCTC3'; *XhoI*: 5'GC-CCTCGAGTTACTTAGGAAAGACACG3'。

采用 25 μL 体系进行反应,各反应产物浓度如下: dNTP 0.5 μL, 储液浓度为 10 mmol/L, 终浓度 200 μL/L; 10 × Buffer 2.5 μL; *Taq* 酶 0.2 μL, 储液浓度 5 μ/L, 共 1 μL; 正反引物各加 1 μL, 储液浓度 10 μmol/L; 模板 1 μL; ddH<sub>2</sub>O 18.8 μL。反应条件为 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。10 g/L 琼脂糖电泳鉴定 PCR 产物, 溴化乙淀染色, 紫外灯下观察电泳结果。PCR 扩增产物经回收纯化, 并用相应的内切酶酶切 5 h, 纯化回收。

### 1.4 原核表达载体的构建

用 *NcoI* 和 *BamHI* 酶切 *pET-28a* 载体, 利用 T4 连接酶将 *orfH79* 基因连接到 *pET-28a* 载体上。用 *BamHI* 和 *XhoI* 酶切 *pGEX5x-2* 载体, 利用 T4 连接酶将 *orfH79* 片段连接到 *pGEX5x-2* 载体上。转化 *DH5α* 感受态细胞, 涂平板, 37 °C 过夜培养。挑选阳性克隆, 进行菌落 PCR 验证。有阳性结果的样品碱裂解法提取质粒, 酶切后验证并测序。

### 1.5 重组蛋白的原核表达

用重组质粒 *pET-28a-orfH79*、*pGEX5x-2-orfH79* 转化 *BL21(DE3)* 菌株, 将含有重组质粒的 *BL21(DE3)* 宿主菌液 5 μL 接种到 5 mL 含有 Kan 或 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C 摇床培养过夜。按 1:100 的比例取(约 1 mL) 过夜培养物转入 20 mL 含有相应抗生素的 LB 液体培养基中, 于 37 °C 活化 2

~3 h。当  $OD_{600}$  值达到 0.6 左右时 按 1:100 的比例加入 1 mol/L IPTG, 使终浓度达 1 mmol/L, 在加入 IPTG 以前取 1 mL 至 Eppendoff 管中。37 °C 培养 4 h 后每 2 h 取培养物 1 mL 至一新的 Eppendoff 管中。与此同时, 设置含有 *pET-28a* 空载体的 *BL21(DE3)* 菌株作为空白对照。

### 1.6 SDS - PAGE 分析

在各个取样中分别加入蛋白质上样缓冲液, 100 °C 沸水中煮 10 min。制备 15% 的丙烯酰胺凝胶, 稳流 20 mA 电泳 3.5 h 后用配制好的染色液染色 1~2 h, 脱色液脱色至出现清晰可见的蛋白质带。

### 1.7 表达蛋白的可溶性分析

目的蛋白诱导表达 6 h 后, 超声波破碎细胞。分别取沉淀和上清进行 SDS - PAGE 电泳分析, 判断目的蛋白所在成分。

### 1.8 Western - blot 分析

ORFH79 抗体由 San Antonio (Tex, USA) 公司商业合成。SDS - PAGE 电泳完成后, 将蛋白条带转移至醋酸纤维膜, 之后用含质量浓度为 5% 脱脂奶粉的 PBS (pH7.4) 将滤膜封闭于室温下摇动温育 1 h 进行封闭, 封闭后的滤膜在室温下用一抗平缓的摇动温育 2 h, 用 PBS 洗膜 3 次, 每次 10 min, 接着用碱性磷酸酶标记的二抗将滤膜在室温下温育 1 h, 再用 TBS 漂洗滤膜 3 次, 每次 10 min, 然后用 NBT/BCIP 对滤膜进行显色检测。

### 1.9 细菌生长曲线的测定

经 IPTG 诱导和未经 IPTG 诱导的 *pET-28a-orfH79* 重组子, 以及克隆 *s* 基因 和 *pET-28a* 空载体的 4 组大肠杆菌重组子同时置于液体 LB 中培养 (Kan<sup>+</sup>)。于 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6 h 检测 600 nm 的吸光度 绘制大肠杆菌生长曲线。经 IPTG 诱导和未经 IPTG 诱导的 *pGEX5x-2-orfH79* 重组子以及 *pGEX-5x-2* 空载体同时置于液体 LB 中培养 (Amp) 生长曲线的绘制方法同 *pET-28a-orfH79* 重组子。

## 2 结果与分析

### 2.1 原核表达载体的构建

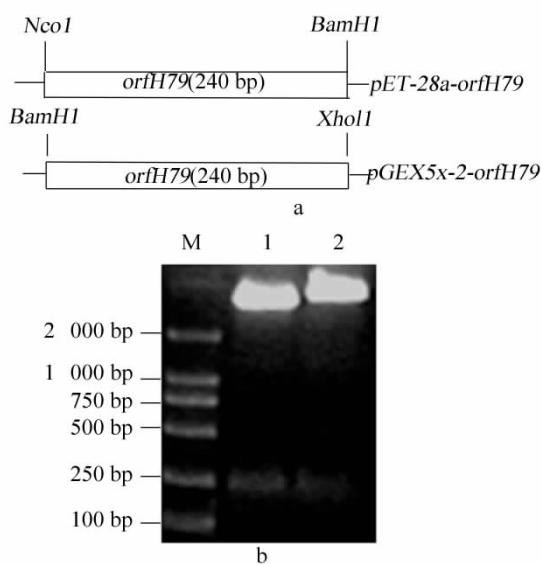
通过 *NcoI* 和 *BamHI* 以及 *BamHI* 和 *XhoI* 酶切位点将 *orfH79* 基因分别克隆到原核表达载体 *pET-28a* 和 *pGEX5x-2* 上, 成功的构建了阳性重组表达质粒(图 1)。

### 2.2 SDS - PAGE 检测表达蛋白以及表达蛋白的可溶性检测

将阳性重组质粒分别转化 *BL21(DE3)* 菌株, 经 IPTG 诱导后, 用 SDS - PAGE 检测表达产物。结果表明 *orfH79* 基因在 *pGEX5x-2* 系统中得到了高效表达(图 2a), 而在 *pET-28a* 表达系统中, 利用考马斯亮蓝染色, 没有检测到 ORFH79 蛋白产物。将诱导表达后的 *pGEX5x-2-orfH79* 细菌进行超声波破碎(图 2b), 结果表明重组蛋白大量存在于沉淀中。

### 2.3 Western blot

进一步用 Western - blot 验证了表达的蛋白 结果见图 3, IPTG 诱导后的 *pET-28a-orfH79*(图 3a) 和 *pGEX5x-2-orfH79*(图 3b) 菌体均有杂交信号。另外, 对 *pGEX5x-2-orfH79* 细菌进行超声波破碎后的上清液也进行了 Western - blot 检测,



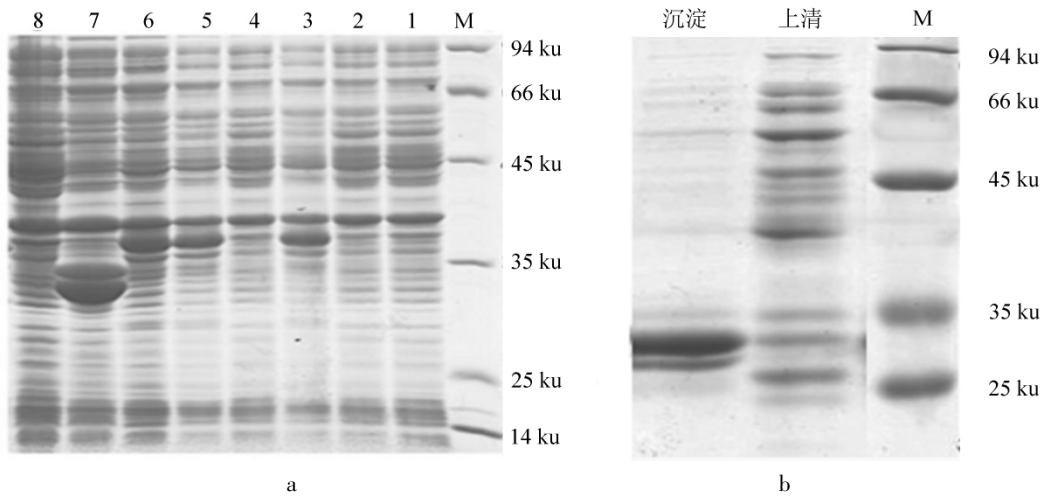
a: 原核表达载体构建示意图; b: 原核表达载体构建酶切验证; M: DNA 标准分子量; 1: 酶切验证 *pET-28a-orfH79* 阳性克隆; 2: 酶切验证 *pGEX5x-2-orfH79* 克隆。

a: Construction of recombinant prokaryotic expression vectors b: Verifications of positive prokaryotic expression vectors M. Marker 1: Verification of positive *pET-28a-orfH79* clone by enzyme digestion; 2: Verification of positive *pGEX5x-2-orfH79* clone by enzyme digestion.

图 1 原核表达载体的构建

Fig. 1 Construction of prokaryotic expression vector

发现在上清中也检测到了杂交信号(图 3c) 这一结果表明,虽然 N 端融合了 GST 的 ORFH79 蛋白以包涵体的形式存在于大肠杆菌中,但上清液中也有微量可溶性 GST - ORFH79 蛋白存在。

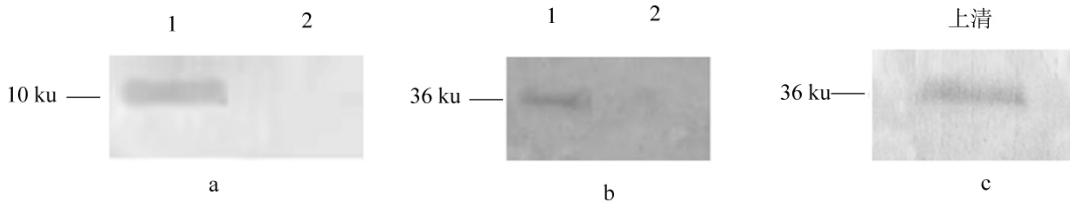


a: 重组质粒 *pGEX5x-2-orfH79* 在 *BL21* 中的表达; M: 蛋白质标准分子量; 1: 未诱导的 *BL21( DE3)* 菌体; 2: IPTG 诱导的 *BL21( DE3)* 菌体; 3 5 6: IPTG 诱导的含重组质粒 *pEGX5x-orfH79* 的 *BL21( DE3)* 菌体; 4: 未诱导的含重组质粒 *pEGX5x-orfH79* 的 *BL21( DE3)* 菌体; 7: IPTG 诱导的含空质粒 *pGEX5x-2* 的 *BL21( DE3)* 菌体; 8: 未诱导的含空质粒 *pGEX5x-2* 的 *BL21( DE3)* 菌体 *pGEX5x-2-orfH79* 的诱导表达; b: 表达蛋白的可溶性分析。

a: Expression of the *pGEX5x-2-orfH79* transformant in *BL21* strain ,M: Maker ,1: *BL21( DE3)* strain; 2: TPTG induced *BL21( DE3)* strain; 3 5 6: IPTG induced *pGEX5x-2-orfH79* transformant ,7: IPTG induced empty plasmid *pGEX5x-2* in *BL21( DE3)* strain 8: Control plasmid *pGEX5x-2* in *BL21( DE3)* strain ,b: Solubility analysis of the recombinant protein: 1 ,precipitate; 2 ,supernant.

图 2 重组质粒 *pGEX5x-2-orfH79* 在 *BL21* 中的表达及表达蛋白的可溶性检测

Fig. 2 Induced expression of fused ORFH79 protein and the solubility analysis



a: Western blot 分析 *pET-28a-orfH79* 的 *BL21( DE3)* 菌体; 1: IPTG 诱导 6 h 的 *pET-28a-orfH79* 的 *BL21( DE3)* 菌体; 2: IPTG 诱导 6 h 的含空质粒 *BL21( DE3)* 菌体; b: Western blot *pGEX5x-2-79* 的 *BL21( DE3)* 菌体; 1: IPTG 诱导 6 h 的 *pGEX5x-2-orfH79* 的 *BL21( DE3)* 菌体; 2: IPTG 诱导 6 h 的含空质粒 *BL21( DE3)* 菌体; c: Western blot 分析 *pGEX5x-2-orfH79* 重组菌体超声破碎后的上清。

a: Western blot analysis the expression of *pET-28a-orfH79* transformant in *BL21( DE3)* strain. 1: *pET-28a-orfH79* transformant induced for 6 h with IPTG ,2: Empty plasmid *pET-28a* induced for 6 h with IPTG. b Western blot analysis the expression of *pGEX5x-2-orfH79* transformant in *BL21( DE3)* . 1: *pGEX5x-2-orfH79* transformant induced for 6 h with IPTG ,2: Empty plasmid *pGEX5x-2* induced for 6 h with IPTG ,c: Western blot analysis the supernatant of *pGEX5x-2-orfH79* recombinant after ultrasonication.

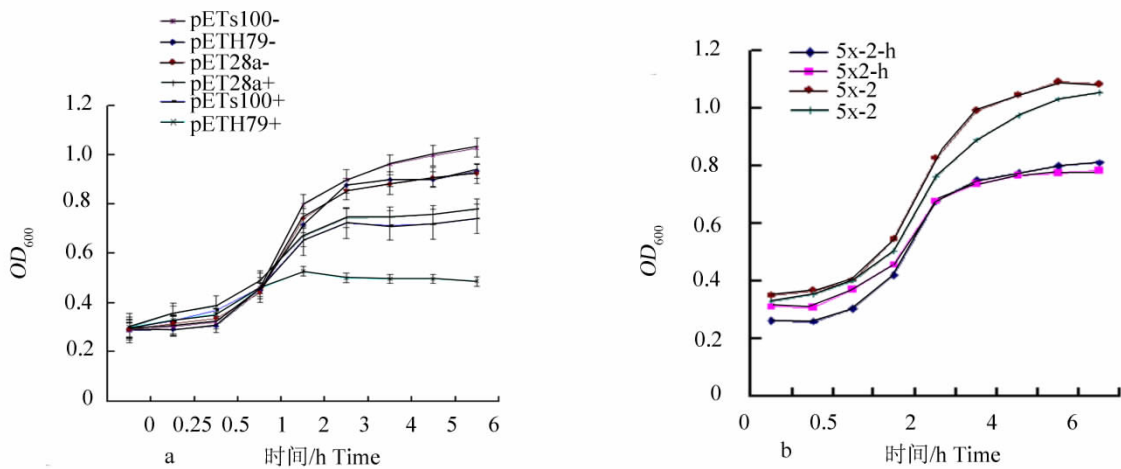
图 3 Western blot 分析表达的 ORFH79 融合蛋白

Fig. 3 Western blot assay the fused ORFH79 protein

### 2.4 ORFH79 蛋白的表达抑制了细菌的生长

在诱导 *pET-28a-orfH79* 重组质粒进行原核表达的过程中,笔者发现细菌的生长比较缓慢,于是绘制了各个表达菌株的生长曲线(图 4a),IPTG 诱导的 *pET-28a-orfH79* 质粒转化菌株生长没有明显的对数生长期,而且,经 IPTG 诱导的 *pET-28a-orfH79* 质粒转化菌株生长与其他的对照相比明显的缓慢。而对照空质粒 *pET-28a* 转化菌株,以及经过证实的可以大量表达 S100 蛋白的 *pET-28a-s100* 质

粒转化菌株 经过 IPTG 诱导和未经 IPTG 诱导的生长差异并不显著 对数期的生长也很正常 这一结果表明外源蛋白的大量表达在 *pET28a* 表达体系中不会影响表达菌株的生长。同时 笔者也检测了 *pGEX5x-2-orfH79* 质粒的转化株的生长曲线 笔者发现加 IPTG 诱导和未加 IPTG 诱导的细菌的生长差异并不显著 (图 4b)。这一结果表明 N 端融合了 GST 蛋白后的 ORFH79 蛋白对细菌生长的影响已经消失。



a: *pET-28a* 构建的原核表达载体转化株的生长曲线; b: *pGEX-5x-2* 构建的原核表达载体转化株的生长曲线; *pETs100*: *pET-28a-s100*, *pETH79*: *pET-28a-orfH79*, *5x-2-h*: *pGEX5x-2-orfH79*; +: IPTG 诱导; -: 未加 IPTG 诱导。

a: Growth curve of *pET-28a-orfH79* transformants. b: Growth curve of *pGEX5x-2-orfH79* transformants; +: Induced with IPTG; -: Without IPTG.

图 4 原核表达载体转化株的生长曲线

Fig. 4 Growth curve of *orfH79* transformants

### 3 讨 论

近年来 已经有一系列的雄性不育相关基因被陆续的报道 这些基因在序列上几乎没有相似性 但是研究结果却表明这些线粒体嵌合基因的表达产物对细菌的生长都具有抑制或是致死作用。线粒体内共生学说认为线粒体起源于原始真核细胞中的内共生细菌 而与细胞质雄性不育相关的基因都为线粒体里的嵌合基因 并且线粒体基因的表达模式与细菌基因的表达模式具有很大的相似性 因此 不育基因对线粒体的伤害机制有及可能与其表达产物对细菌的伤害相似<sup>[9-10]</sup>。Dewey 等利用大肠杆菌这一体系研究了 T 型玉米雄性不育的相关基因、*URF13* 这也是迄今为止功能研究最为详细的不育基因。他们首先将 *Urf13-T* 基因表达的 13 ku 蛋白结合于细菌的细胞膜上 当在细菌的培养物中加入 BmT-毒素 methomyl 时 细菌的呼吸立即受到抑制 细胞膜膨胀 膜的通透性增加 胞内离子外泻 这和对 CMS-T 型玉米的离体线粒体进行类似处理时观察到的结果相同<sup>[11-12]</sup>。Nakai 等<sup>[4]</sup>和 Duroc 等<sup>[6]</sup>也发现向日葵的雄性不育相关基因 *ORF522* 和萝卜的雄性不育相关基因 *Orf138* 的表达产物也抑制了细菌的生长。刘耀光等<sup>[5]</sup>把包台型雄性不育的水稻的雄性不育相关基因 *orf79* 基因转入大肠杆菌中表达时 发现 ORF79 对细菌的生长有致死作用。在本研究中 笔者利用 *Nco1* 酶切位点 切除了 *PET-28a* 上的 *His* 融合标签 使得 *OrfH79* 能够表达成为不带任何标签蛋白的天然多肽。虽然通过考马斯亮蓝染色难以在 *pET-28a-orfH7* 的细菌转化子中检测到 ORFH79 蛋白 但是通过 Western blot 检测到了信号。与此同时 发现 *pET-28a-orfH79* 细菌转化子的生长明显的受了抑制 这一结果表明 ORFH79 对细菌的生长是具有毒性的 极其微量的蛋白就可以对细菌的生长造成极大的危害。这一结果与刘耀光等<sup>[5]</sup>报道的水稻包台型细胞质雄性不育相关基因 *orf79* 以及玉米 T 型细胞质雄性不育基因 *ufr13* 的结果有所不同 *orf79* 在细菌中的表达产物并没有对细菌的生长有致死作用 而是对细菌的生长具有抑制作用。从生长曲线上观察 发现 *pET-28a-orfH79* 的细菌转化子生长没有明显的对数生长期。细菌的对数生长期是细菌以最大的速率生长和分裂的时期。在这段时期 细菌对能量的消耗以及代谢活性也是最高的 当

能量的供给或者代谢的活性受到抑制的时候,细菌的生长速率也将受到抑制。本实验室的大量研究结果表明水稻红莲型细胞质雄性不育系的小孢子的发育过程是一个能量供给不足的过程<sup>[13-14]</sup>,而 *orfH79* 转基因植株的生理生化分析结果也表明,当 ORFH79 蛋白被导入线粒体后,转基因植株的线粒体的功能与野生型的相比是不正常的,在转基因植株中,其线粒体 ATP 的含量低于野生型的对照植株<sup>[8]</sup>。结合细菌的结果分析,不难发现 *orfH79* 基因对线粒体的伤害机制有可能与其表达产物对细菌的伤害机制具有相似性,因此,可以利用细菌这一类似于植物线粒体的体系来研究水稻雄性不育基因 *orfH79* 的功能,及通过研究 *orfH79* 的表达产物对细菌生长的伤害机制来初步揭示红莲型水稻细胞质雄性不育的机理。

另一方面,在 *pGEX* 原核表达的体系中,当 ORFH79 蛋白的 N 端融合的 GST 蛋白后,虽然 GST-ORFH79 融合蛋白以包涵体的形式大量存在于大肠杆菌中,但通过 Western-blot 分析,上清液中也有微量可溶性 GST-ORFH79 蛋白存在,但融合蛋白对细菌的生长却没有明显的影响。这一结果表明 ORFH79 蛋白的 N 端融合 GST 后,失去了对细菌生长的抑制作用。与此类似的是,刘耀光等<sup>[5]</sup>的研究结果表明 *orfH79* 的同源基因,包台型雄性不育基因 *orf79* 的 C 端缺失 5 个氨基酸将会丧失 ORFH79 蛋白对细菌的毒性,而笔者结果显示着 ORFH79 的 N 端序列对于 ORFH79 蛋白的活性可能有重要的作用,其机理还需要进一步的研究。

#### 参考文献:

- [1] Kaul M. Male sterility in higher plants [J]. *Theor Appl Genet*, 1988, 10: 15-95.
- [2] Linke B, Borner T. Mitochondrial effects on flower and pollen development [J]. *Mitochondrion*, 2005, 5: 389-402.
- [3] Dewey R E, Siedow J N, Timothy D H, et al. A 13-kilodalton maize mitochondrial protein in *E. coli* confers sensitivity to *Bipolaris maydis* toxin [J]. *Science*, 1988, 239: 293-295.
- [4] Duroc Y, Gaillard C, Hiard S, et al. Biochemical and functional characterization of ORF138, a mitochondrial protein responsible for *Ogura cytoplasmic* male sterility in Brassicaceae [J]. *Biochimie*, 2005, 87: 1089-1100.
- [5] 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: 676-687.
- [6] Nakai S, Noda D, Kondo M. High-level expression of a mitochondrial *orf522* gene from the male-sterile sunflower is lethal to *E. coli*. Terachi [J]. *T Breed Sci*, 1995, 45: 233-236.
- [7] Yi P, Wang L, Sun Q, et al. Discovery of mitochondrial chimeric gene associated with male sterility of HL-rice [J]. *Chinese Sci Bull*, 2002, 47: 744-747.
- [8] 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: 125.
- [9] Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development [J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 54-169.
- [10] Longo E B, Laun P V D, Pichova A, et al. Cytoplasmic male sterility: A window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions [J]. *Trends Genet*, 2007, 23: 81-90.
- [11] Dewey R E, Timothy D H, Levings C S. Chimeric mitochondrial genes expressed in the C male-sterile cytoplasm of maize [J]. *Curr Genet*, 1991, 20: 475-482.
- [12] Levings C, Siedow J. Molecular basis of disease susceptibility in the Texas line of maize [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 19: 135-147.
- [13] Wan C, Li S, Wen L, et al. Damage of oxidative stress on mitochondria during microspores development in Honglian CMS line of rice. *Plant Cell Rep* [J]. 2007, 26: 373-382.
- [14] Li S, Wan C, Kong J. Programmed cell death during microgenesis in a Honglian CMS line of rice is correlated with oxidative stress in mitochondria [J]. *Funct Plant Biol*, 2004, 31: 369-376.