

玉米CMS-C不育系及其保持系线粒体膜通透性的比较分析

汪静, 徐浩, 王继玥, 张艳花, 荣廷昭, 曹墨菊*

四川农业大学玉米研究所/农业部西南玉米生物学与遗传育种重点实验室, 成都611130

摘要: 为了解玉米CMS-C相关不同育性材料雄穗线粒体膜通透性表现特征, 本文以玉米细胞质雄性不育系C48-2、保持系N48-2和育性恢复F₁ (C48-2×18-599白)雄穗为材料, 测定了线粒体膜相关生理指标。结果发现, 从花粉母细胞时期到双核期C48-2雄穗线粒体膜吸光度、膜电位荧光强度、Ca²⁺含量和Cyt c/a比值下降, MDA含量上升, 且各指标均在单核期和双核期与N48-2和F₁ (C48-2×18-599白)有显著差异。

关键词: 玉米; CMS; 线粒体; 膜通透性

Comparative Analysis of Mitochondrial Membrane Permeability between Maize CMS-C Sterile Line and Its Maintainer Line

WANG Jing, XU Hao, WANG Ji-Yue, ZHANG Yan-Hua, RONG Ting-Zhao, CAO Mo-Ju*

Maize Research Institute of Sichuan Agricultural University/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Maize in Southwest Region, Ministry of Agriculture, Chengdu 611130, China

Abstract: In this study, in order to investigate the performance characteristic of mitochondrial membrane permeability in different fertility materials related to maize CMS-C, the physiological indexes of mitochondrial membrane were determined by using the tassels of sterile line C48-2, maintainer line N48-2 and fertility restored F₁ (C48-2×18-599 white) as materials. The results indicated that membrane absorbance, membrane potential fluorescence intensity, Ca²⁺ content and Cyt c/a ratio decreased, but MDA content increased in the mitochondria of C48-2 tassels, and these indexes were significantly different with those of N48-2 and F₁ (C48-2×18-599 white) at uninucleate stage and binucleate stage.

Key words: maize; CMS (cytoplasmic male sterility); mitochondrion; membrane permeability

玉米是最早利用杂种优势的农作物之一。为了更好地发挥玉米雄性不育在杂种优势中的作用, 弄清细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)的机理具有重要理论和现实意义。线粒体作为细胞中重要的能量和物质代谢细胞器, 与CMS有着密切的关系(Budar和Pelletier 2001; Carlsson等2008; Chase等2010; Luo等2013)。线粒体可通过参与细胞代谢和多种信号传导途径, 调控细胞凋亡和基因表达等(Mackenzize和McIntosh 1999; Green和Kroemer 2004; Carlsson等2008; Luo等2013)。当线粒体出现生理功能上的缺陷时, 细胞就会出现相应的生理缺陷, 从而影响细胞的正常生理功能, 线粒体的退化也是花粉败育中最早发生的现象之一。Horner等(1993)发现在玉米CMS-T中当线粒体功能和ATP水平不足以支持组织发育, 尤其是绒毡层的发育时, 会导致细胞死亡。Wan等(2007)对水稻HL-CMS的研究发现, ATP供应的改变和过量活性氧产生可以诱导细胞死亡, 导致败育。Li等

(2013)对红辣椒CMS的研究得出, ATP酶活性降低和ATP含量的减少会影响到花粉的发育最终导致不育。研究显示, 高等植物线粒体DNA中重复序列所引起的重组事件, 导致了基因组结构的改变或基因表达调控模式的改变, 可能与细胞质雄性不育的形成相关。认为CMS相关的嵌合基因可以导致线粒体功能的紊乱, 它主要通过破坏线粒体膜, 影响ATP合成酶和其他蛋白的功能来实现(Hanson 1991; Arrieta-Montiel和Mackenzie 2011)。如水稻HL-CMS的嵌合基因*orfH79*编码一种细胞毒肽, 可使小孢子中活性氧过度积累, ATP/ADP比率下降, 线粒体膜电位下降, 引起细胞死亡, 从而导致花粉败育(Li等2004; Wan等2007; Peng等2010)。玉米CMS-T的嵌合基因*urf13*编码的URF13

收稿 2014-01-03 修定 2014-04-09

资助 四川农业大学学科建设双支计划。

* 通讯作者(E-mail: caomj@sicau.edu.cn; Tel: 15680813291)。

蛋白引起线粒体内膜结构发生改变,使其产生某种特殊物质,再与URF13互作,使线粒体内膜通透性增大,导致线粒体功能紊乱和细胞死亡(Wise等1999)。因此,线粒体功能的异常,尤其是线粒体膜功能的异常,与CMS密切相关。

本课题组前期研究发现,线粒体膜通透性相关蛋白VDAC1在玉米CMS-C中异常表达(许珂等2008)。因此,本研究以玉米不育系C48-2、保持系N48-2和育性恢复F₁(C48-2×18-599白)发育到花粉母细胞时期、四分体时期、单核期和双核期的雄穗为材料,测定了线粒体膜相关生理指标,旨在了解玉米CMS-C相关不同育性材料雄穗线粒体膜通透性表现特征。

材料与方法

1 实验材料

供试材料为玉米(*Zea mays* L.) C型细胞质雄性不育系C48-2、保持系N48-2及育性恢复F₁(C48-2×18-599白)。供试材料于2012年4月初分别播种于四川省雅安市多营农场,每材料分3期播种,每期种植3行,每行7穴,每穴2株,田间精细管理。

2 实验方法

2.1 雄穗线粒体的提取

对发育至花粉母细胞时期、四分体时期、单核期和双核期的供试材料随机取多个单株的雄穗提取线粒体。线粒体提取参照张晨(2012)的方法进行。线粒体用悬浮液(0.4 mol·L⁻¹蔗糖、0.05 mol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.4)悬浮,线粒体浓度以线粒体蛋白含量(mg·mL⁻¹)表示,蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法。

2.2 线粒体膜吸光度的测定

参照詹洁等(2009)的方法,将分离的线粒体用线粒体悬浮液悬浮,并调整悬浮液蛋白质浓度至0.3 mg·mL⁻¹,于20 °C保温2 min,用紫外分光光度计测定悬浮液540 nm处的吸光度。

2.3 线粒体MDA含量的测定

参照詹洁等(2009)的方法,线粒体用线粒体悬浮液悬浮,取0.4 mL线粒体悬液(对照取0.4 mL蒸馏水)于试管,加入2 mL 0.6%的硫代巴比妥酸(TBA),沸水浴15 min,冷却后1 500×g离心10 min,分别测定处理样品在532、600和450 nm的吸光值,并按下列公式计算样品中MDA的含量。

$$\text{MDA含量} = [6.45(\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) - 0.56\text{OD}_{450}] \times V \times a / W$$

其中, V为反应液总体积(mL), a为稀释倍数, MDA单位是mmol·μg⁻¹(蛋白)。 W为测定所用线粒体悬浮液的蛋白质浓度(mg·mL⁻¹)。

2.4 线粒体膜电位的测定

参照Braidot等(1998)的方法,将分离的线粒体用线粒体悬浮液悬浮,并调整悬浮液蛋白质浓度至0.3 mg·mL⁻¹,然后按每毫升10 μg比例加入罗丹明123 (Rhodamine 123, Rh123),在25 °C下孵育30 min,再用线粒体悬浮液洗3次。在荧光分光光度计上检测激发波长为505 nm、发射波长为534 nm时线粒体悬液的荧光强度。

2.5 线粒体Ca²⁺含量的测定

参照隋小芳等(2010)的方法,线粒体用线粒体悬浮液悬浮,取线粒体悬浮液1.5 mL,置于10 mL加盖刻度试管中,加入浓硝酸5 mL,阴暗处消化1周,然后烘箱加热,使硝酸尽量分解蒸发,再加入1%氯化镧至10 mL,混匀,用火焰原子分光光度计测定Ca²⁺吸光值,由标准曲线计算浓度。Ca²⁺标准曲线的制作:以CaCO₃配制2、4、6、8和10 pg·mL⁻¹的标液,以OD和浓度作Ca²⁺标准曲线。线粒体Ca²⁺含量单位是μg·μg⁻¹(蛋白)。

2.6 线粒体Cyt c/a比值的测定

参照Tonshin等(2003)的方法,分离的线粒体沉淀用0.2% (W/V) BSA悬浮,并调整悬浮液所含线粒体蛋白质浓度约为0.5 mg·mL⁻¹。紫外分光光度计检测550和630 nm处的吸收值,2种波长的吸收值之比即为Cyt c/a比值。

2.7 数据分析

供试材料小孢子发育至花粉母细胞时期、四分体时期、单核期和双核期4个时期雄穗线粒体各指标测定数据用Microsoft Excel进行整理,采用DPS软件二因素完全随机方差多重比较法进行统计分析。

实验结果

1 不同玉米雄穗线粒体膜吸光度的变化

由表1可知, N48-2雄穗线粒体膜吸光度逐渐上升, F₁(C48-2×18-599白)膜吸光度变化无规律,各发育时期两可育材料间差异均不显著。C48-2雄穗线粒体膜吸光度从花粉母细胞时期至双核

表1 不同发育时期的玉米雄穗线粒体膜吸光度多重比较
Table 1 Multiple comparison of the mitochondrial membrane absorbance of maize tassels at different development stages

发育时期	膜吸光度(OD值)		
	C48-2	N48-2	F ₁ (C48-2×18-599白)
花粉母细胞时期	0.0507 ^{a(a)}	0.0576 ^{a(a)}	0.0688 ^{a(a)}
四分体时期	0.0474 ^{a(a)}	0.0601 ^{a(a)}	0.0586 ^{a(a)}
单核期	0.0423 ^{a(B)}	0.0646 ^{a(A)}	0.0685 ^{a(A)}
双核期	0.0375 ^{a(B)}	0.0694 ^{a(A)}	0.0641 ^{a(A)}

不同大小写字母表示0.01和0.05水平差异极显著和显著。括号外字母表示纵列中同一材料不同发育时期数据的比较, 括号内字母表示横排中同一发育时期不同材料数据的比较。下表同此。

期呈逐渐下降趋势, 在花粉母细胞时期和四分体时期与N48-2和F₁ (C48-2×18-599白)间无显著差异, 但在单核期和双核期极显著低于N48-2和F₁ (C48-2×18-599白)。由此可见, 可育材料雄穗线粒体膜吸光度在各时期表现相对稳定, 而不育材料膜吸光度逐渐下降, 在单核期和双核期极显著低于可育材料。说明小孢子发育时C48-2雄穗线粒体膜通透性增大, 膜结构变化, 导致吸光度下降。

2 不同玉米雄穗线粒体MDA含量的变化

由表2可知, N48-2雄穗线粒体MDA含量先升高后降低, 各时期差异不显著, 而F₁ (C48-2×18-599白) MDA含量在单核期和双核期极显著降低。在花粉母细胞时期, 两可育材料间MDA含量差异极显著, 但在四分体时期、单核期和双核期差异表现不显著。C48-2随着花粉发育的推进, 雄穗线粒体MDA含量呈明显升高的趋势, 在双核期与最初相比达到极显著差异。在四分体时期C48-2的MDA含量显著低于N48-2和F₁ (C48-2×18-599白), 而在双核期上升至极显著高于N48-2和F₁ (C48-2×

表2 不同发育时期的玉米雄穗线粒体MDA含量多重比较
Table 2 Multiple comparison of the mitochondrial MDA contents of maize tassels at different development stages

发育时期	MDA含量/mmol·μg ⁻¹ (蛋白)		
	C48-2	N48-2	F ₁ (C48-2×18-599白)
花粉母细胞时期	0.0200 ^{A(B)}	0.0341 ^{a(B)}	0.1104 ^{B(A)}
四分体时期	0.0321 ^{AB(b)}	0.0630 ^{a(a)}	0.0720 ^{B(a)}
单核期	0.0522 ^{AB(a)}	0.0258 ^{a(a)}	0.0264 ^{A(a)}
双核期	0.0764 ^{B(A)}	0.0293 ^{a(B)}	0.0238 ^{A(B)}

18-599白)。由此可见, 可育材料雄穗线粒体MDA含量从四分体时期开始表现趋于一致, 而不育材料发育各个时期MDA含量变化与可育材料相反, 极显著升高, 在单核期和双核期均高于可育材料。MDA是膜脂过氧化的最终分解产物, 其含量可以反映植物受伤害的程度。C48-2雄穗线粒体MDA含量极显著升高, 说明小孢子发育时线粒体膜脂开始氧化。

3 不同玉米雄穗线粒体膜电位荧光强度的变化

由表3可知, N48-2雄穗线粒体膜电位荧光强度在单核期显著升高到峰值后显著降低, F₁ (C48-2×18-599白)膜电位荧光强度逐渐升高, 也是在单核期达到最高, 然后有所降低, 但各时期差异不显著。N48-2和F₁ (C48-2×18-599白)在花粉母细胞时期和四分体时期分别表现出显著和极显著的差异, 而在单核期和双核期差异不显著。C48-2雄穗线粒体膜电位荧光强度, 从花粉母细胞时期到四分体时期有所上升, 单核期开始逐渐下降, 各时期差异也不显著。在花粉母细胞时期和四分体时期C48-2膜电位荧光强度与N48-2基本一致, 但分别显著和极显著低于F₁ (C48-2×18-599白), 在单核期、双核期较N48-2和可育F₁ (C48-2×18-599白)显著和极显著下降。由此可见, 可育材料雄穗线粒体膜电位荧光强度从单核期开始表现趋于一致, 不育材料膜电位荧光强度在单核期和双核期显著低于可育材料。C48-2雄穗线粒体膜电位荧光强度显著下降, 说明线粒体膜受损, 膜电位开始降低。

4 不同玉米雄穗线粒体Ca²⁺含量的变化

由表4可知, N48-2和F₁ (C48-2×18-599白)雄穗线粒体Ca²⁺含量先逐渐升高后降低, 各时期差异均

表3 不同发育时期的玉米雄穗线粒体膜电位荧光强度多重比较

Table 3 Multiple comparison of the mitochondrial membrane potential fluorescence intensities of maize tassels at different development stages

发育时期	膜电位荧光强度		
	C48-2	N48-2	F ₁ (C48-2×18-599白)
花粉母细胞时期	0.0750 ^{a(b)}	0.1000 ^{b(b)}	0.1900 ^{a(a)}
四分体时期	0.1633 ^{a(B)}	0.1667 ^{b(B)}	0.2333 ^{a(A)}
单核期	0.0333 ^{a(B)}	0.2000 ^{a(A)}	0.2433 ^{a(A)}
双核期	0.0267 ^{a(b)}	0.1200 ^{b(a)}	0.1700 ^{a(a)}

表4 不同发育时期的玉米雄穗线粒体Ca²⁺含量多重比较
Table 4 Multiple comparison of the mitochondrial Ca²⁺ contents of maize tassels at different development stages

发育时期	Ca ²⁺ 含量/μg·μg ⁻¹ (蛋白)		
	C48-2	N48-2	F ₁ (C48-2×18-599白)
花粉母细胞时期	0.3919 ^{a(a)}	0.4043 ^{a(a)}	0.3086 ^{a(a)}
四分体时期	0.3739 ^{a(a)}	0.4112 ^{a(a)}	0.3290 ^{a(a)}
单核期	0.2636 ^{a(a)}	0.3859 ^{a(a)}	0.3528 ^{a(a)}
双核期	0.2464 ^{a(a)}	0.3773 ^{a(a)}	0.3354 ^{a(a)}

不显著, 两可育材料间在各时期差异也不显著。C48-2雄穗线粒体Ca²⁺含量从花粉母细胞时期到双核期逐渐降低, 差异也不显著, 在花粉母细胞时期和四分体时期虽然低于N48-2却高于F₁ (C48-2×18-599白), 在单核期和双核期Ca²⁺含量比2个可育材料都低, 但各时期与N48-2和F₁ (C48-2×18-599白)差异均不显著。由此可见, 可育材料雄穗线粒体Ca²⁺含量各个时期表现基本一致, 不育材料Ca²⁺含量逐渐下降, 在单核期和双核期低于两可育材料。C48-2雄穗线粒体Ca²⁺含量减少, 推测作为第二信号的Ca²⁺, 在线粒体膜受损时, 线粒体内Ca²⁺进入细胞质, 造成胞质Ca²⁺超载, 可诱导细胞凋亡因子释放。

5 不同玉米雄穗线粒体Cyt c/a比值的变化

由表5可知, N48-2和F₁ (C48-2×18-599白)雄穗线粒体Cyt c/a比值在各个时期变化无规律, 差异不显著, 且N48-2和F₁ (C48-2×18-599白)之间各时期差异也不显著。而C48-2雄穗线粒体Cyt c/a比值呈下降趋势, 虽然在花粉母细胞时期和四分体时期与N48-2和F₁ (C48-2×18-599白)相比没有明显差异, 但是到了单核期和双核期C48-2线粒体Cyt c/a却显著低于两可育材料。由此可见, 可育材料雄穗线粒体Cyt c/a比值各个时期表现基本一致, 不育材料Cyt c/a比值逐渐下降, 在单核期和双核期显著低于

表5 不同发育时期的玉米雄穗线粒体Cyt c/a比值多重比较
Table 5 Multiple comparison of the mitochondrial Cyt c/a ratios of maize tassels at different development stages

发育时期	Cyt c/a比值		
	C48-2	N48-2	F ₁ (C48-2×18-599白)
花粉母细胞时期	1.3062 ^{A(a)}	1.3046 ^{a(a)}	1.3045 ^{a(a)}
四分体时期	1.2924 ^{A(a)}	1.2795 ^{a(a)}	1.2907 ^{a(a)}
单核期	1.2423 ^{B(B)}	1.2731 ^{a(A_B)}	1.2974 ^{a(A)}
双核期	1.2352 ^{B(b)}	1.2737 ^{a(a)}	1.2882 ^{a(a)}

可育材料。C48-2雄穗线粒体Cyt c/a比值显著降低, 说明线粒体膜严重受损, 线粒体渗透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 过度开放, 细胞色素c (cytochrome c, cyt c)开始脱落释放, 从而诱导细胞凋亡。

讨 论

线粒体是植物细胞的能量中心, 其功能的失常或缺陷都将导致植物体的不正常表现。线粒体膜是呼吸链的载体, 其异常将可能导致线粒体功能的丧失。线粒体膜功能异常可表现为内膜和外膜发生了不同程度的改变。外膜通透性改变引起Cyt c、AIF等膜间蛋白的释放, 引发凋亡过程; 内膜通透性改变导致线粒体跨膜电位降低, 基质渗透性膨胀, 进而引起外膜破裂, 膜间蛋白释放从而引发凋亡(安冉和董强2009)。因此本文从两方面检测了线粒体膜吸光度、MDA含量、膜电位荧光强度、Ca²⁺含量以及Cyt c/a比值, 反映出线粒体膜的功能变化。

本文研究发现, 从花粉母细胞时期至双核期C48-2雄穗线粒体膜吸光度、Ca²⁺含量、膜电位荧光强度和Cyt c/a比值下降, MDA含量上升。可见, C48-2雄穗线粒体膜通透性增加, MPTP过度开放, 线粒体功能开始失常, 不育系植株可能会产生大量ROS直接攻击膜系统, 膜脂开始遭到破坏, MDA含量升高, 膜电位开始消失, 电子传递链功能受损。同时由于膜完整性受损, 一方面线粒体内膜上的Ca²⁺-ATPase活性下降, 从而导致运输调控Ca²⁺能力降低, 这样Ca²⁺从通道中进入到细胞质增多, 造成了细胞质内Ca²⁺含量的超载, 可诱导AIF等凋亡因子释放, 引发细胞凋亡; 另一方面Cyt c从线粒体内膜上脱落下来, 释放到细胞质中, 可能诱发细胞程序性死亡, 并最终导致花粉败育。线粒体膜相关各指标异常表现与前人花生铝胁迫根尖线粒体膜的研究结果一致(寇瑞杰等2009), 且各生理指标的异常发生似乎是同时并进, 相互促成, 说明不育材料雄穗线粒体膜已经开始遭到严重破坏, 线粒体趋于解体的状态。从研究结果还可以看出, 在单核期和双核期, 可育材料各指标始终会趋于一致表现, 而不育材料各指标与可育材料相比均表现出显著差异, 说明不育材料雄穗线粒体膜异常发生从单核期就开始了。此外, 2个可育材料组

胞质来源并不相同, F_1 (C48-2×18-599白)的胞质来源于不育系C48-2, 但表现却与可育系N48-2一致, 说明该 F_1 的核基因中可能含有来自18-599白且能使C胞质育性恢复的基因。

本课题组前期发现, 玉米CMS-C线粒体膜通透性相关蛋白VDAC1高表达可能与花粉败育有关(许珂等2008)。VDAC是线粒体外膜上可形成孔道的蛋白, 是NADH和ATP等小分子和离子跨线粒体外膜运输的通道(Zizi等1994; Rostovtseva和Bezrukov 1998), 其的过度开放可能会改变线粒体膜的通透性, 与细胞程序性死亡密切相关(Shoshan-Baratz等2006)。植物雄性不育主要发生在花粉发育时期, 有研究表明花粉败育也是一种细胞凋亡现象, CMS可能与特定的细胞凋亡有关(穆蕊等2006; Li等2004; Flores-Rentería等2013)。水稻HL-CMS VDAC系统性的研究表明, VDAC编码基因的过度表达会引起线粒体膜功能紊乱, 导致线粒体膜通透性增加, 膜电位降低, 从而诱导凋亡的发生, 推测该基因与水稻红莲型细胞质雄性不育可能有很大的相关性(夏春皎2006; 江晨2010; 罗凤燕2010; 秦圣光2011; 熊杰2011)。

综上, 不育材料雄穗线粒体膜相关生理指标在由四分体到单核期的转变阶段相比可育材料表现出显著的差异, 这与前期研究发现的玉米CMS-C线粒体膜通透性相关蛋白VDAC1异常表达相吻合, 而小孢子发育的单核期也正是玉米CMS-C的花粉败育主要时期, 推测其可能通过VDAC调控线粒体膜通透性, 从而影响线粒体的功能, 引发细胞凋亡, 最终影响雄花的育性表现。

参考文献

- 安冉, 董强(2009). 凋亡过程中线粒体膜透化的常用检测方法. 中华脑血管病杂志, 3 (1): 33~37
- 江晨(2010). 水稻两个 $osvdac$ 基因干涉载体的构建及其遗传转化[学位论文]. 武汉: 中南民族大学
- 詹洁, 寇瑞杰, 李创珍, 何虎翼, 何龙飞(2009). 铝胁迫对花生根尖线粒体膜生理特性的影响. 作物学报, 35 (6): 1059~1067
- 罗凤燕(2010). 水稻 $vdac$ 、 ant 及 $HL-spl$ 基因的表达研究[学位论文]. 武汉: 中南民族大学
- 穆蕊, 张祖新, 张方东, 郑用璠(2006). 玉米CMS-S小孢子败育过程中的细胞程序性死亡. 作物学报, 32 (5): 666~670
- 秦圣光(2011). 两个 $osvdac$ 基因的原核表达及其对水稻的遗传转化[学位论文]. 武汉: 中南民族大学
- 隋小芳, 范巧菊, 陈桂芝(2010). 缺血预处理对大鼠局灶性脑损伤后线粒体 Ca^{2+} 、细胞色素C的影响. 中国实验诊断学, 14 (7): 994~996
- 夏春皎(2006). 水稻MPT的鉴定及PTP相关基因的系统发育研究[学位论文]. 武汉: 中南民族大学
- 熊杰(2012). 3个水稻 $osvdac$ 基因的原核和真核表达研究[学位论文]. 武汉: 中南民族大学
- 许珂, 曹墨菊, 朱英国, 潘光堂, 荣廷昭(2008). 玉米C型细胞质雄性不育系C48-2及其保持系线粒体差异蛋白分析. 作物学报, 34 (2): 232~237
- 张晨(2012). 玉米CMS同核异质、同质异核材料的DNA甲基化分析[学位论文]. 成都: 四川农业大学
- Arrieta-Montiel MP, Mackenzie SA (2011). Plant Mitochondrial Genomes and Recombination. In: Kempken F (ed). Plant Mitochondria. Springer New York Press, 65~82
- Braidot E, Petrusa E, Macri F, Vianello A (1998). Plant mitochondrial electrical potential monitored by fluorescence quenching of rhodamine 123. Biol Plant, 41 (2): 193~201
- Budar F, Pelletier G (2001). Male sterility in plants: occurrence, determination, significance and use. CR Acad Sci, Ser III, 324 (6): 543~550
- Carlsson J, Leino M, Sohlberg J, Sundström JF, Glimelius K (2008). Mitochondrial regulation of flower development. Mitochondrion, 8 (1): 74~86
- Chase CD, Ribarits A, Heberle-Bors E (2010). Male Sterility. In: Pua EC, Davey MR (eds). Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Press, 437~457
- Flores-Rentería L, Orozco-Arroyo G, Cruz-García F, García-Campusano F, Alfaro I, Vázquez-Santana S (2013). Programmed cell death promotes male sterility in the functional dioecious *Opuntia stenopetala* (Cactaceae). Ann Bot, 112 (5): 789~800
- Green DR, Kroemer G (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. Science, 305 (5684): 626~629
- Hanson MR (1991). Plant mitochondrial mutations and male sterility. Ann Rev Genet, 25: 461~486
- Horner HT, Hall VL, Vargas-Olvera MA (1993). Isolation, sorting, and characterization of uni- and binucleate tapetal protoplasts from anthers of normal and Texas cytoplasmic male-sterile *Zea mays* L. Protoplasma, 173 (1-2): 48~57
- Li JJ, Pandeya D, Jo YD, Liu WY, Kang BC (2013). Reduced activity of ATP synthase in mitochondria causes cytoplasmic male sterility in chili pepper. Planta, 237 (4): 1097~1109
- Li SQ, Wan CX, Kong J, Zhang ZJ, Li YS, Zhu YG (2004). Programmed cell death during microgenesis in a Honglian CMS line of rice correlated with oxidative stress in mitochondria. Funct Plant Biol, 31 (4): 369~376
- Luo DP, Xu H, Liu ZL, Guo JX, Li HY, Chen LT, Fang C, Zhang QY, Bai M, Yao N et al (2013). A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice. Nat Genet, 45: 573~577
- Mackenzie S, McIntosh L (1999). Higher plant mitochondria. Plant Cell, 11 (4): 571~586
- Peng XJ, Wang K, Hu CF, Zhu YL, Wang T, Yang J, Tong JP, Li SQ, Zhu YG (2010). The mitochondrial gene *orfH79* plays a critical role in impairing both male gametophyte development and root

- growth in CMS-Honglian rice. *BMC Plant Biol*, 10:125
- Rostovtseva TK, Bezrukov SM (1998). ATP transport through a single mitochondrial channel, VDAC, studied by current fluctuation analysis. *Biophys J*, 74 (5): 2365~2373
- Shoshan-Barmatz V, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS (2006). The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signaling, cell life and cell death. *Curr Pharm Design*, 12 (18): 2249~2270
- Tonshin AA, Saprunova VB, Solodovnikova IM, Bekeeva LE, Yaguzhinsky LS (2003). Functional activity and ultrastructure of mitochondrial isolated from myocardial apoptotic tissue. *Biochemistry*, 68 (8): 875~881
- Wan CX, Li SQ, Wen L, Kong J, Wang K, Zhu YG (2007). Damage of oxidative stress on mitochondria during microspores development in Honglian CMS line of rice. *Plant Cell Rep*, 26 (3): 373~382
- Wise RP, Gobelman-Werner K, Pei D, Dill CL, Schnable PS (1999). Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in T-cytoplasm maize. *J Hered*, 90 (3): 380~385
- Zizi M, Forte M, Blachly-Dyson E, Colombini M (1994). NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel. *J Biol Chem*, 269 (3): 1614~1616