

玉米黄叶基因 *ZmNPPR5* 的克隆

刘胜坤, 孙世磊, 董鲁鹏, 李平华, 刘保申, 张永中

(山东农业大学农学院/作物生物学国家重点实验室, 泰安 271018)

摘要: 叶色突变体往往伴随着叶绿素含量变化及叶绿体结构异常, 是研究叶绿体发育与光合作用相关基因功能的重要材料。本研究鉴定了一个玉米叶片黄化的自然突变体 74101, 该突变体整个生育期均表现为叶片黄化, 总叶绿素含量比野生型下降 53.38%, 净光合速率下降 25.63%。透射电子显微镜结果显示, 74101 中叶绿体类囊体结构紊乱, 基质片层排列稀疏, 无基粒结构。遗传分析与精细定位结果表明 74101 突变表型受 1 对隐性核基因控制, 位于玉米第 5 号染色体长臂的标记 K-138 和 K-27 之间约 76.05Kb 物理区间内。对该区间 4 个候选基因测序分析发现, 编码 PPR 蛋白的 *ZmNPPR5* (*Zm00001eb252430*) 基因第 1126 位核苷酸碱基发生突变 (C-T)。与 EMS 突变体等位性分析进一步验证 *ZmNPPR5* 基因控制叶片黄化表型, 亚细胞定位显示其在细胞核中表达。本项研究揭示 *ZmNPPR5* 具有影响叶绿素合成的重要功能, 为深入研究核定位的 PPR 蛋白调控叶绿体发育和叶绿素合成奠定重要基础。

关键词: 玉米; 叶绿素合成; 遗传分析; 图位克隆; PPR

Cloning of A New Yellow Leaf Gene *ZmNPPR5* in Maize

LIU Sheng-kun, SUN Shi-lei, DONG Lu-peng, LI Ping-hua, LIU Bao-shen, ZHANG Yong-zhong

(College of Agronomy, Shandong Agricultural University / State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an 271018)

Abstract: Leaf color mutants are often accompanied by changes in chlorophyll content and abnormal chloroplast structure. They are important materials to decipher the functions of genes in chloroplast development and photosynthesis. In this study, a naturally occurring mutant 74101 showing etiolated leaves was identified in maize. The mutant showed etiolation throughout the growth period. Compared with the wild type, the total chlorophyll content decreased by 53.38%, and the net photosynthetic rate decreased by 25.63%. Transmission electron microscopy revealed the disordered chloroplast thylakoid structure, with loose matrix lamella and no grana structure. Genetic analysis and fine mapping results showed that the 74101 mutant phenotype was controlled by a pair of recessive nuclear gene, which was delimited in the 76.05kb physical interval between the markers *k-138* and *k-27* on the long arm of maize chromosome 5. By sequencing and analyzing four candidate genes in this interval, a C to T mutation at 1126 site of the gene *ZmNPPR5* (*Zm00001eb252430*) encoding PPR protein was identified. Tests for allelism with EMS mutants approved the *ZmNPPR5* gene as the causal agent of leaf etiolation phenotype. The subcellular localization suggested that it was expressed in the nucleus. Collectively, this study revealed that *ZmNPPR5* has an important function affecting chlorophyll synthesis, which laid a foundation for deciphering the nuclear-localized PPR protein on the regulation of chloroplast development and chlorophyll synthesis.

Key words: Corn; Chlorophyll synthesis; Genetic analysis; Map cloning; PPR

叶绿体是植物光合作用和能量传递的细胞器, 对植物生长发育至关重要, 然而调控叶绿体发育的分子机制仍不明确。叶绿体是半自主的细胞器, 可编码 60~200 种蛋白质, 其发育过程受到核基因和质体基因

收稿日期: 2022-09-18

修回日期: 2022-10-29

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为玉米分子遗传育种, E-mail: lsk20163111@163.com

通讯作者: 张永中, 研究方向为玉米遗传育种, E-mail: zhangyz@sdaau.edu.cn

刘保申, 研究方向为玉米遗传育种, E-mail: liubs@sdaau.edu.cn

基金项目:

Foundation project:

的共同调控^[1]。其中，核基因编码聚合酶（NEP）和质体基因编码聚合酶（PEPvc）是负责质体基因转录的必要酶，对叶绿体生物发生具有重要影响^[2-4]。此外，叶绿体基因表达受一系列转录后过程的调控，包括 C-to-U RNA 编辑、内含子剪接和 5'或 3'末端成熟^[5]等，这些调控基因的突变体通常会导致叶片颜色变化^[6-8]。

五肽重复序列（PPR）蛋白是由若干个高度退化的 35 个氨基酸组成的基序串联而成，该蛋白广泛存在于植物中，并在细胞器代谢中发挥着多种功能^[9]。根据其串联基序，PPR 蛋白分为 P 型和 PLS 型两个亚家族，而 PLS 型蛋白根据其不同 C 末端进一步分为 E、E+ 和 DYW 亚群^[10]。植物 PPR 蛋白大部分成员被定位在线粒体和叶绿体^[11-13]，主要参与细胞器基因的转录后调控，包括 RNA 剪接、RNA 稳定、RNA 切割、RNA 翻译和 RNA 编辑^[9]。

线粒体中的 PPR 蛋白功能突变通常导致植物生长延迟、胚胎发育异常、叶片形状异常、叶片早衰和种子产量降低等^[14-19]。叶绿体中的 PPR 蛋白影响叶绿体的发育，进而调控植物的叶色变化。例如：*ZmPPR4* 参与 *rps12* 的内含子剪接，缺少 *ZmPPR4* 可能导致白化苗致死表型^[20]；*atpA-1148* 的编辑需要 *ZmPPR26*，其功能丧失导致玉米苗期白化死亡^[21]；PPR 蛋白 THA8 的等位基因在玉米中幼苗致死，在拟南芥中胚胎致死^[22]；*OsWLS4* 影响叶绿体 RNA 第二组内含子的剪接，在叶片早期发育过程中至关重要^[23]。目前关于定位在细胞核中的 PPR 蛋白报道较少，仅知水稻中 *OsNPPR1*^[11]、拟南芥中的 *GRP23*^[12] 和 *PNM1*^[24] 在细胞核中表达，这些 PPR 蛋白通常会影响线粒体或叶绿体的功能。

本研究利用图位克隆技术对发现的玉米叶片黄化突变体 74101 进行基因定位，将目的基因定位在 5 号染色体上，该基因编码新的细胞核中的 PPR 蛋白，依据定位染色体、基因注释和蛋白表达位置将该基因命名为 *ZmNPPR5*。*ZmNPPR5* 基因第 1126 位核苷酸碱基发生突变（C-T）使蛋白表达提前终止，进而影响叶绿体发育，导致叶绿素含量下降、叶片黄化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验材料是育种材料中发现的一株叶片黄化突变体，经自交黄化表型均能稳定遗传，以育种编号 74101 命名该突变体。将突变体 74101 与 B73 自交系杂交，构建 F₂、BC₁ 群体，用于遗传分析与基因定位。

1.2 实验方法

1.2.1 叶绿素含量测定 在玉米三叶期选取野生型和突变体 74101 玉米植株，分别测定其叶绿素含量。取玉米植株新鲜的第三片叶中上部，去中脉，剪成 3×1 mm 的细丝，称取 0.1 g 装入 10 mL 离心管，加入抽提缓冲液（无水乙醇：丙酮=1:1）10 mL，避光抽提 12~24 h，期间定期摇晃震荡，使叶片与抽提缓冲液充分接触，10000 rpm 离心 5 min，保留上清。以抽提缓冲液为空白对照，用紫外分光光度计 UV-2802 分别测定 470 nm、645 nm 和 663 nm 三个波长下的吸光度值。每个样品进行三次生物学重复。参考 Arnon^[25] 的方法计算光合色素中各成分含量。

1.2.2 光合速率相关指数测定 在小喇叭口期，随机选取长势一致的野生型和突变体 74101 植株各 6 株，用便携式光合/荧光测定仪 CIRAS-3 测定植株第六片叶中上部位的净光合速率（A）、胞间二氧化碳浓度（Ci）、气孔导度（Gs）、蒸腾速率（E）。分析野生型和突变体 74101 的光合速率相关指数的差异显著性。

1.2.3 叶绿体超微结构观察 随机选取三叶期野生型和突变体 74101 的第三片叶，切成 2 mm×2 mm 的叶片，

经 4% 戊二醛和 1% 银酸双重固定，用梯度浓度乙醇逐级脱水，再利用树脂包埋，经切片、醋酸双氧铀和柠檬酸铅液染色后，透射电镜观察叶片细胞中叶绿体超微结构。电镜观察在山东农业大学作物生物学国家重点实验室平台进行。

1.2.4 遗传分析与基因定位 以黄叶突变体 74101 与 B73 自交系为亲本，做正交和反交得 F₁ 代，自交得 F₂ 代，以 F₁ 代为母本与黄叶突变体 74101 杂交得到 BC₁，观察 F₂ 和 BC₁ 中的表型并统计分离比，对其进行遗传分析，并利用 R 软件完成卡方检验。本实验采取十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）抽提法^[26]从样本中提取基因组 DNA，用图位克隆技术定位目的基因^[27]。

1.2.5 ZmNPPR5 亚细胞定位 利用在线软件 SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 预测 ZmNPPR5 蛋白质的潜在信号肽。

将 ZmNPPR5 基因 CDS 克隆到瞬时表达载体 PC1300 中，构建由 CaMv 35S 启动子驱动的融合基因 ZmNPPR5-GFP，再将 ZmNPPR5-GFP 融合基因导入玉米原生质体。荧光信号使用徕卡 TCS SP5 II (德国徕卡) 激光扫描共焦显微镜检测。

2 结果与分析

2.1 74101 突变体表型分析

74101 突变体从出芽开始就表现出黄化性状(图 1A)，植株植株生长过程中始终处于黄化状态(图 1B~C)，且生长较慢、发育迟缓、植株矮小。



图 1 野生型与突变体 74101 的表型

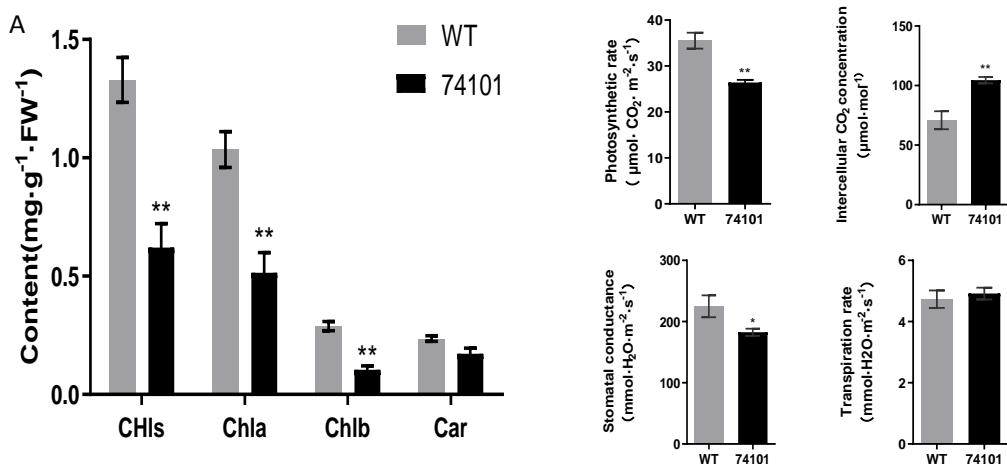
Fig.1 Phenotypic of the wild type WT and the 74101 mutant

2.2 74101 突变体叶绿素含量与光合速率变化分析

为探究突变体 74101 黄化表型是否与叶片的叶绿素含量有关，我们比较了野生型和突变体 74101 在三叶期的叶绿素含量。突变体 74101 的总叶绿素 (Chls)、叶绿素 a (Chla) 和叶绿素 b (Chlb) 的含量分别比野生型下降 53.38%、50.37% 和 63.68%，而类胡萝卜素 (Car) 含量无显著性差异 (图 2A)。结果表明 74101 黄化表型与叶绿素含量极显著降低有关。

为进一步探究叶片光合色素含量变化对光合速率的影响，测定了 6 叶期野生型和突变体 74101 的光合作用相关指数。结果显示，突变体 74101 的净光合速率 (A)、气孔导度 (Gs) 分别下降 25.63%、18.89%，胞间二氧化碳浓度 (Ci) 升高 47.45%，蒸腾速率 (E) 无显著性差异 (图 2B,C,D,E)。这说明突变体 74101 中

叶绿素含量的降低抑制叶片光合作用，导致净光合速率显著下降、胞间二氧化碳浓度显著升高。



A:三叶期叶片光合色素含量; B:叶片净光合作用速率; C:叶片胞间二氧化碳浓度; D: 气孔导度; E:蒸腾速率. *和**分别表示在 0.05 和 0.01 水平差异显著.

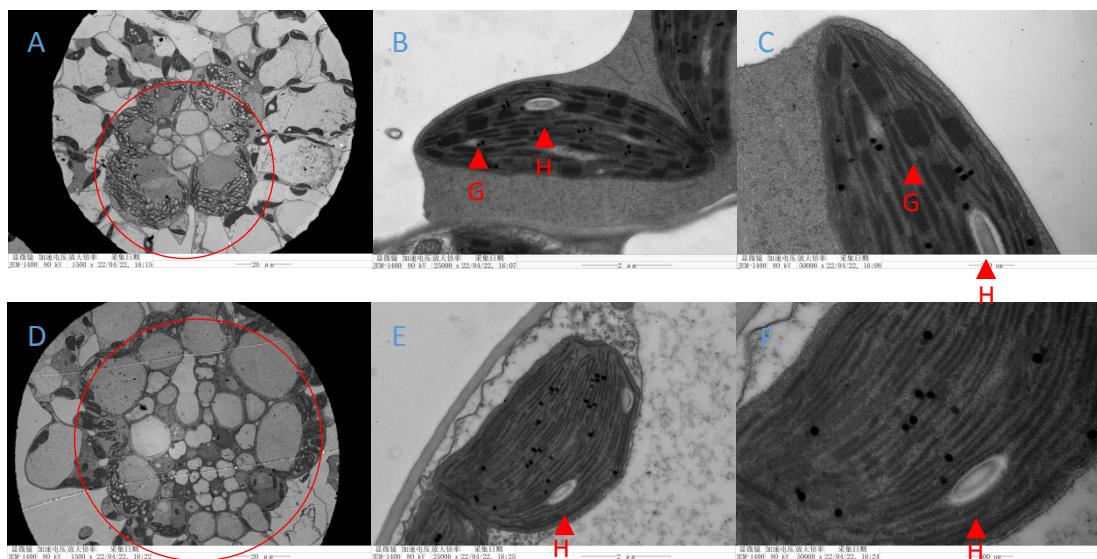
A: Photosynthetic pigment content of the leaves at three leaf stage; B: Net photosynthetic rate of leaves; C: Leaf intercellular carbon dioxide concentration; D: Stomatal conductance; E: Transpiration rate. * and ** indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

图 2 野生型与突变体 74101 叶片光合色素含量和光合作用相关指数

Fig.2 Photosynthetic pigment content and photosynthetic correlation index in leaves of Wild-Type and Mutant 74101

2.3 叶绿体超微结构观察

为进一步探究突变体 74101 黄化表型是否与叶绿体结构变异有关，用透射电镜观察野生型和 74101 三叶期的玉米叶片叶绿体结构。结果表明，野生型叶绿体花环结构清晰，叶绿体内部类囊体基粒片层结构明显，排列整齐紧凑(图 3A, B, C); 而突变体 74101 花环结构比野生型大，类囊体结构紊乱，基质片层排列稀疏，无基粒结构(图 3D, E, F)。这说明 74101 的突变表型与叶绿体的异常发育有关。



A: WT 花环结构; B C: WT 叶肉细胞叶绿体; D: 74101 花环结构; E F: 74101 叶肉细胞叶绿体; G: 类囊体基粒; H: 淀粉粒

A: WT wreath structure; B C: WT mesophyll cell chloroplast; D: 74101 wreath structure; E F: 74101 mesophyll cell chloroplast; G: Thylakoid grana; H: Starch granule

图 3 野生型 WT 和突变体 74101 花环结构和叶肉细胞透射电镜观察

Fig.3 Observation of wreath structure and mesophyll cells of wild-type WT and mutant 74101 by transmission electron microscope

2.4 遗传分析与基因定位

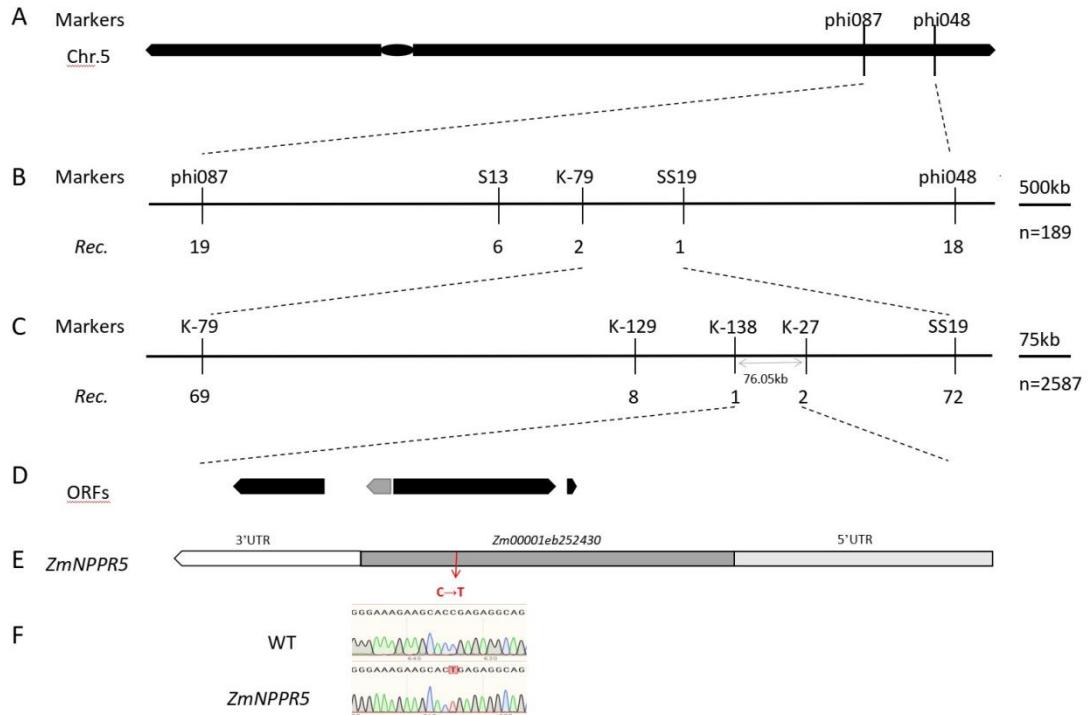
叶色突变体 74101 经过多代自交后, 用自交系 B73 与其组配遗传分离群体。 F_1 代表型正常, F_2 代和 BC_1 群体发生性状分离, F_2 代植株野生型和突变体株数的比例符合 3:1 ($\chi^2_c < \chi^2_{0.05,1}$), BC_1 代植株野生型和突变体株数的比例符合 1:1 ($\chi^2_c < \chi^2_{0.05,1}$), 表明该叶色突变体由一对单隐性核基因控制 (表 2)。

表 1 突变体 F_2 和 BC_1 群体的遗传分析

Table 1 Genetic analysis of F_2 and BC_1 populations

组合	F ₂ 和 BC ₁ 群体株数 population number of F ₂ and BC ₁			$\chi^2_{0.05}$
	野生型株数	突变体株数	总株数	
74101 x B73	892	284	1176	0.45351
(74101 x B73)x 74101	198	189	387	0.25476

利用 208 对均匀分布在 10 条染色体上的 SSR 标记筛选出 61 个多态性标记, 将 4 个黄叶表型的基因混池进行连锁分析, 32 个 F_2 群体中黄叶表型个体进行验证, 初步将突变位点定位于第 5 号染色体 *phi087* 和 *phi048* 之间。通过对 198 个突变 BC_1 个体进行基因定位, 加密 3 个 SSR 多态性标记, 将目的基因定位在 *K-79* 和 *SSI9* 之间约 865Kb 的物理距离内。另外使用 2587 个 F_2 突变个体和 3 个新设计的 SSR 多态性标记, 最终将目的基因定位在 *K-138* 和 *K-27* 之间约 76.05Kb 的物理区间内。玉米基因组数据库网站 (maizeGDB, <https://www.maizegdb.org/>) 预测该区域有四个开放阅读框 (ORF), 包括 *Zm00001eb252420*、*Zm00001eb252430*、*Zm00001eb252440* 和 *Zm00001eb252450*。测序比对发现 *Zm00001eb252430* 基因发生点突变, 该基因编码区第 1126 位核苷酸碱基 C 突变为 T (图 4), 致使密码子 CGA 突变成 TGA, 造成蛋白翻译提前终止。*Zm00001eb252430* 基因编码 PPR 蛋白, 前人研究表明, PPR 蛋白突变常会导致植物叶色或者籽粒性状的改变, 因此我们推测 *Zm00001eb252430* 基因可能为目的基因。



A: 74101 初定位于玉米 5 号染色体长臂 *phi087* 和 *phi048* 之间; B: BC₁ 突变个体将其缩小至 *K-79* 和 *SS19* 之间; C: F₂ 突变个体将其限定在 *K-138* 和 *K-27* 之间约 76Kb 物理距离内; D: 在 76Kb 定位区域内共有 4 个开放阅读框 (ORF)，灰色部分表示突变基因所在的 ORF; E: *ZmNPPR5* 基因在编码区外显子发生突变 (浅灰色方框代表 5 UTR，深灰色方框代表外显子，白色区域代表 3 UTR); F: 74101 在野生型和突变体间的测序结果峰图。

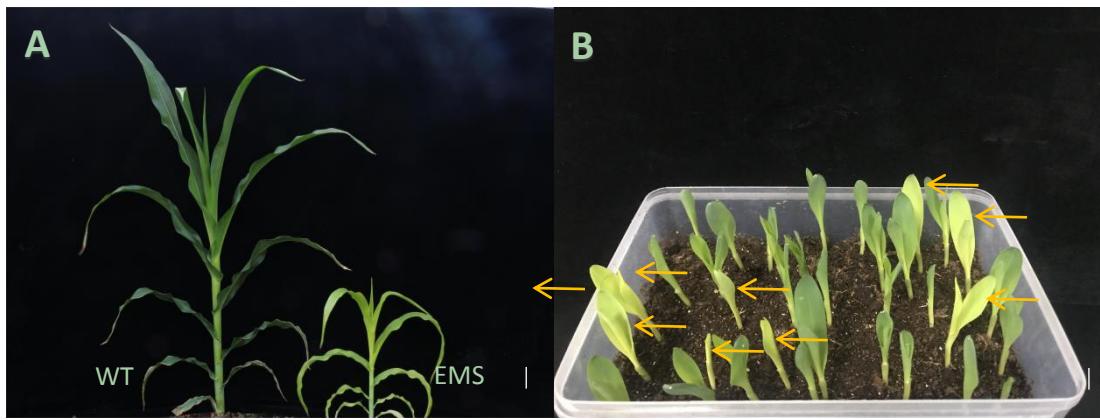
A: 74101 was initially located between *phi087* and *phi048* on the long arm of chromosome 5; B: Then it was narrowed to a region between *K-79* and *SS19* using BC₁ mutants; C: Then it was narrowed to a physical distance of about 76kb between *k-138* and *k-27* using F₂ mutants; D: There are four open reading frames (ORFs) in the 76kb region, and the gray part represents the ORF of the mutant gene; E: Gene *ZmNPPR5* is mutated in exon of coding region (light gray box represents 5 UTR, dark gray box represents exon, and white area represents 3 UTR); F: Peak diagram of sequencing results of 74101 between wild type and mutant.

图 4 玉米 *ZmNPPR5* 的精细定位

Fig.4 Fine positioning of maize *ZmNPPR5*

2.5 EMS 突变体等位性分析

从齐鲁师范学院购买 *Zm00001eb252430* 基因编码提前终止的 EMS 突变体，2021 年海南鉴定拥有纯合位点的 EMS 突变体植株叶片黄化（图 5A），74101（杂合位点）与 EMS（杂合位点）突变体等位性分析，后代中野生型 26 株、突变体 8 株（图 5B），比例符合 3:1 ($\chi^2_c < \chi^2_{0.05,1}$)，这为候选基因对突变表型的控制提供了证据。



A: EMS 突变体表型(bar=10cm); B: 74101 突变体和 EMS 突变体等位性验证后代表型(bar=0.5cm)
A: EMS mutant phenotype(bar=10cm); B: 74101 mutant and EMS mutant were represented after allelic verification(bar=0.5cm).

图 5 EMS 突变体验证

Fig.5 EMS mutation experience certificate

2.6 ZmNPPR5 亚细胞定位

在线软件 SignalP (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>) 预测 ZmNPPR5 蛋白没有信号肽、导肽和转运肽，因此 ZmNPPR5 蛋白可能在细胞核中表达。将含有 CaMv 35S 启动子的 *ZmNPPR5-GFP* 载体转化到玉米原生质体中，*ZmNPPR5-GFP* 与细胞核共定位（图 6），表明 ZmNPPR5 是细胞核定位蛋白。

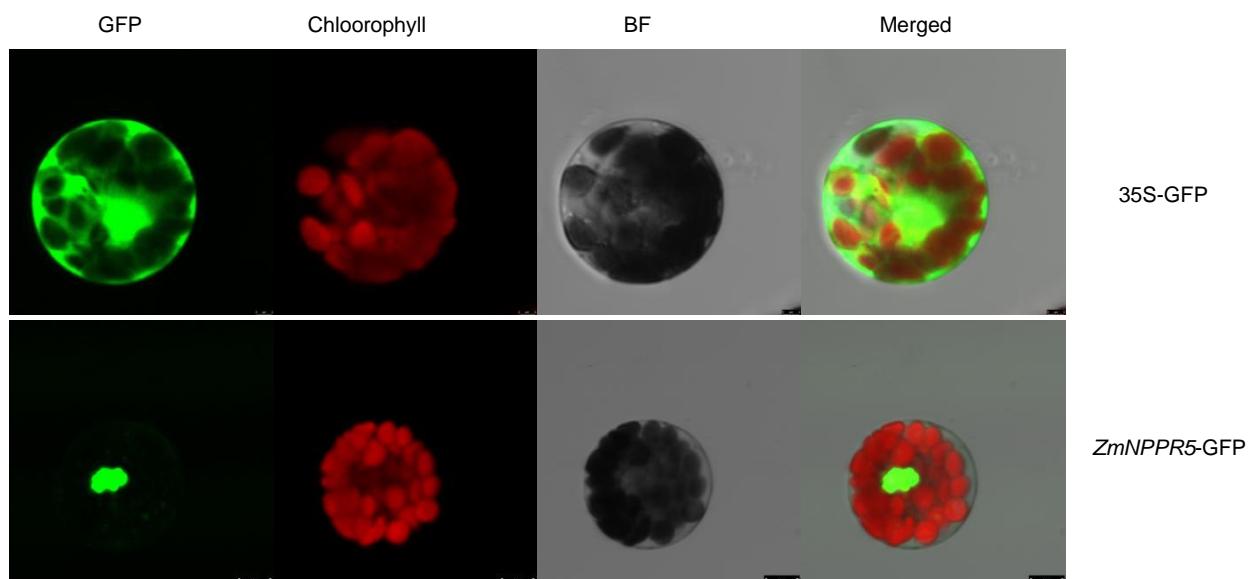


图 6 ZmNPPR5 蛋白的亚细胞定位。(bar=8μm)

Fig. 6 Subcellular localization of ZmNPPR5 protein. (bar = 8μm)

3 结论与讨论

玉米中有数百种 PPR 蛋白，但只有少数被鉴定出来。PPR 蛋白突变体表现出不同的表型，例如叶片发育不全、生长受限、光合色素缺乏以及胚胎或种子发育缺陷^[17,28-31]。本研究利用田间发现的自然黄化突变体 74101，通过图位克隆的方法将目的基因定位到 5 号染色体长臂的 76.05Kb 物理区间内，对该区间内 4 个候选基因测序分析发现 *ZmNPPR5* 基因外显子第 1126 位核苷酸碱基 C 突变为 T，造成编码蛋白提前终止，EMS

突变体等位性分析证明 *ZmNPPR5* 为目基因，该基因编码 PPR 蛋白，亚细胞定位显示该基因在细胞核中表达。

研究表明，PPR 蛋白多数定位在线粒体或叶绿体中，有少部分在核质中共定位，极少数定位在细胞核中。水稻中 *OsNPPR1* 编码一种核定位 PPR 蛋白，该蛋白与细胞核基因 RNA 的 CUCAC 基序结合参与调节线粒体发育和胚乳发育^[11]。*GRP23* 在拟南芥中编码一种具有 Leu 拉链结构域、N 端九个 PPR 和具有不寻常 WQQ 重复的富含 Gln 的 C 端结构域的多肽，定位于细胞核中，在细胞核中该蛋白通过与 RNA 聚合酶 II 亚单位 III 发生物理相互作用进而影响拟南芥早期胚胎发育^[12]。共定位于拟南芥细胞核和线粒体中的 PPR 蛋白 *PNM1*，该蛋白与核小体组装蛋白 *NAP1* 和转录因子 *TCP8* 相互作用，进而可能参与调节其自身在细胞核中的基因表达，因此可能在线粒体和细胞核之间的基因表达调节中发挥作用^[24]。我们推测 *ZmNPPR5* 可能影响细胞核中参与叶绿体发育和叶绿素合成的基因，进而影响叶绿体发育导致叶色变黄。

目前在玉米中还没有发现定位于细胞核中的 PPR 蛋白，本研究利用玉米黄化突变体 74101 定位得到细胞核中表达的 *ZmNPPR5* 基因，为研究核定位的 PPR 蛋白在光合作用中的重要功能提供了新的遗传材料，后续将进一步探索该基因影响叶绿体发育和光合作用的机制，为核定位 PPR 蛋白功能解析提供理论基础。

参考文献

- [1] Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjolander K, Grussem W, Baginsky S. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biology*, 2004, 14 (5), 354-62.
- [2] Hedtke B, Boerner T, Weihe A. Mitochondrial and Chloroplast Phage-Type RNA Polymerases in *Arabidopsis*. *Science*, 1997, 227: 809-811.
- [3] Pogson B J, Albrecht V. Genetic dissection of chloroplast biogenesis and development: An overview. *Plant Physiology*, 2011, 155 (4): 1545-1551.
- [4] Yu Q B, Huang C, Yang Z N. Nuclear-encoded factors associated with the chloroplast transcription machinery of higher plants. *Front Plant Science*, 2014, 5, 316.
- [5] del Campo E M. Post-Transcriptional Control of Chloroplast Gene Expression. *Gene Regulation and Systems Biology*, 2009 3: 31-47.
- [6] Kusumi K, Yara A, Mitsui N, Tozawa Y, Iba K. Characterization of a Rice Nuclear-Encoded Plastid RNA Polymerase Gene *OsRpoTp*. *Plant And Cell Physiology*, 2004:1194-1201.
- [7] Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrie R E, Williams-Voelker P M, Kroeger T S, Vichas A, Barkan A. A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast rps12 pre-mRNA. *Plant Cell*, 2006, 18 (10): 2650-2663.
- [8] Beick S, Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Jensen B, Barkan A. The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts. *Molecular And Cellular Biology*, 2008, 28(17): 5337-47.
- [9] Barkan A, Small I. Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annual Review Of Plant Biology*, 2014 65, 415-420.
- [10] Cheng S, Gutmann B, Zhong X, Ye Y, Fisher M F, Bai F, Castleden I, Song Y, Song B, Huang J, Liu X, Xu X, Lim B L, Bond C S, Yiu S M, Small I. Redefining the structural motifs that determine RNA binding and RNA editing by penta-tripeptide repeat proteins in land plants. *Plant Journal*, 2016, 85(4): 532-547.
- [11] Ding Y H, Liu N Y, Tang Z S, Liu J, Yang W C. *Arabidopsis GLUTAMINE-RICH PROTEIN23* is essential for early embryogenesis and encodes a novel nuclear PPR motif protein that interacts with RNA polymerase II subunit III. *Plant Cell*, 2006, 18(4): 815-830.
- [12] Hammani K, Gobert A, Hleibieh K, Choulier L, Small I, Giege P. An *Arabidopsis* dual-localized pentatricopeptide repeat protein interacts with nuclear proteins involved in gene expression regulation. *Plant Cell*, 2011, 23(2): 730-40.
- [13] Colcombet J, Lopez-Obando M, Heurtevin L, Bernard C, Martin K, Berthome R, Lurin C. Systematic study of subcellular localization of *Arabidopsis* PPR proteins confirms a massive targeting to organelles. *RNA Biology*, 2013, 10(9): 1557-1575.
- [14] Haili N, Planchard N, Arnal N, Quadrado M, Vrielynck N, Dahan J, des Frans-Small C C, Mireau H. The MTL1 Pen-tatricopeptide Repeat Protein Is Required for Both Translation and Splicing of the Mitochondrial NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT7 mRNA in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2016, 170(1): 354-366.
- [15] Wang G, Zhong M, Shuai B, Song J, Zhang J, Han L, Ling H, Tang Y, Wang G, Song R. E+ subgroup PPR protein defective kernel 36 is required for multiple mitochondrial transcripts editing and seed development in maize and *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 2017, 214 (4): 1563-1578.
- [16] Ren R C, Lu X, Zhao Y J, Wei Y M, Wang L L, Zhang L, Zhang W T, Zhang C, Zhang X S, Zhao X Y. Pentatricopeptide repeat protein DEK40 is required

- for mitochondrial function and kernel development in maize. *Journal Of Experimental Botany*, 2019, 70 (21): 6163-6179.
- [17] Ren R C, Wang L L, Zhang L, Zhao Y J, Wu J W, Wei Y M, Zhang X S, Zhao X Y. DEK43 is a P-type pentatricopeptide repeat (PPR) protein responsible for the Cis-splicing of nad4 in maize mitochondria. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62 (3): 299-313.
- [18] Wang X, Yang Z, Zhang Y, Zhou W, Zhang A, Lu C. Pentatricopeptide repeat protein PHOTOSYSTEM I BIOGENESIS FACTOR2 is required for splicing of *ycf3*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62 (11): 1741-1761.
- [19] Xu C, Song S, Yang Y Z, Lu F, Zhang M D, Sun F, Jia R, Song R, Tan B C. DEK46 performs C-to-U editing of a specific site in mitochondrial *nad7* introns that is critical for intron splicing and seed development in maize. *Plant Journal*, 2020, 103 (5): 1767-1782.
- [20] Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrie R E, Williams-Voelker P M, Kroeger T S, Vichas A, Barkan A. A pentatricopeptide repeat protein facilitates the trans-splicing of the maize chloroplast *rps12* pre-mRNA. *Plant Cell*, 2006, 18 (10): 2650-2663.
- [21] Liu X Y, Jiang R C, Wang Y, Tang J J, Sun F, Yang Y Z, Tan B C. ZmPPR26, a DYW-type pentatricopeptide repeat protein, is required for C-to-U RNA editing at *atpA-1148* in maize chloroplasts. *Journal Of Experimental Botany*, 2021, 72(13): 4809-4821.
- [22] Khrouchtchova A, Monde R A, Barkan A. A short PPR protein required for the splicing of specific group II introns in angiosperm chloroplasts. *RNA*, 2012, 18 (6): 1197-209.
- [23] Wang Y, Ren Y L, Zhou K N, Liu L L, Wang J L, Xu Y, Zhang H, Zhang L, Feng Z M, Wang L W, Ma W W, Wang Y L, Guo X P, Zhang X, Lei C L, Cheng Z J, Wan J M. WHITE STRIPE LEAF4 Encodes a Novel P-Type PPR Protein Required for Chloroplast Biogenesis during Early Leaf Development. *Front Plant Science*, 2017, 8, 1116.
- [24] Hao Y Y, Wang Y L, Wu M M, Zhu X P, Teng X, Sun Y L, Zhu J P, Zhang Y Y, Jing R N, Lei J, Li J F, Bao X H, Wang C M, Wang Y H, Wan J M. The nuclear-localized PPR protein OsNPPR1 is important for mitochondrial function and endosperm development in rice. *Journal Of Experimental Botany*, 2019, 70(18): 4705-4720.
- [25] Arnon D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. *Plant Physiology*, 1949, 24(1): 1-15.
- [26] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8, (19): 4321-4325.
- [27] Xie K, Wu S W, Li Z W, Zhou Y, Zhang D F, Dong Z Y, An X L, Zhu T T, Zhang S M, Liu S S, Li J P, Wan X Y. Map-based cloning and characterization of *Zea mays male sterility33* (*ZmMs33*) gene, encoding a glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Theoretical and Applied Genetics*, 2018, 131,(6):1363-1378.
- [28] Takenaka M, Zehrmann A, Verbitskiy D, Kugelmann M, Hartel B, Brennicke A. Multiple organellar RNA editing factor (MORF) family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2012, 109, (13):5104-5109.
- [29] Igarashi K, Kazama T, Toriyama K. A Gene Encoding Pentatricopeptide Repeat Protein Partially Restores Fertility in RT98-Type Cytoplasmic Male-Sterile Rice. *Plant Cell Physiology*, 2016, 57, (10):2187-2193.
- [30] Thyssen G N, Fang D D, Zeng L, Song X, Delhom C D, Condon T L, Li P, Kim H J. The Immature Fiber Mutant Phe-notype of Cotton (*Gossypium hirsutum*) Is Linked to a 22-bp Frame-Shift Deletion in a Mitochondria Targeted Pentatricopeptide Repeat Gene. *G3-Genes Genomes Genetics*, 2016, 6, (6):1627-1633.
- [31] Schallenberg-Rudinger M, Oldenkott B, Hiss M, Trinh P L, Knoop V, Rensing S A. A Single-Target Mitochondrial RNA Editing Factor of *Funaria hygrometrica* Can Fully Reconstitute RNA Editing at Two Sites in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell Physiology*, 2017, 58, (3): 496-507.