

# 玉米黄叶基因 *ZmNPPR5* 的克隆

刘胜坤, 孙世磊, 董鲁朋, 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 (*74101*-WT) 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 76.05 kb 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。本研究成功克隆了玉米新的黄化基因 *ZmNPPR5*, 为进一步研究 PPR 蛋白调控叶绿体发育和叶绿素合成奠定了基础。

**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 76.05 kb 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

收稿日期: 2022-09-18 修回日期: 2022-10-29 网络出版日期: 2022-11-22

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220918002>

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

通信作者: 张永中, 研究方向为玉米遗传育种, E-mail: zhangyz@sdau.edu.cn

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

**基金项目:** 山东省重点研发计划(农业良种工程)(2022LZGCQY017); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程(2021TSGC1210)

**Foundation projects:** Key Research and Development Program of Shandong (Improved Variety Program)(2022LZGCQY017); Shandong Province Science and Technology SMEs Innovation Capacity Improvement Project(2021TSGC1210)

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的共同调控<sup>[1]</sup>。其中,核基因编码聚合酶(NEP, nuclear gene encoding polymerase)和质体基因编码聚合酶(PEPvc, plastid gene encoding polymerase)主要负责质体基因转录,对叶绿体具有重要影响<sup>[2-4]</sup>。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<sup>[5]</sup>等,这些调控基因的突变通常会导致叶片颜色变化<sup>[6-8]</sup>。

五肽重复序列(PPR, pentapeptide repeat)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<sup>[9]</sup>。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<sup>[10]</sup>。植物 PPR 蛋白大部分成员被定位于线粒体和叶绿体<sup>[11-13]</sup>,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<sup>[9]</sup>。

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<sup>[14-19]</sup>。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<sup>[20]</sup>; *atpA-1148* 的编辑需要 *ZmPPR26*, 其功能丧失导致玉米苗期白化死亡<sup>[21]</sup>; PPR 家族的 *THA8* 等位基因编码蛋白在玉米中表达导致幼苗致死,在拟南芥中表达导致胚胎致死<sup>[22]</sup>; *OsWLS4* 基因编码蛋白影响叶绿体 RNA 第二组内含子的剪接,在叶片早期发育过程中至关重要<sup>[23]</sup>。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*<sup>[11]</sup>、拟南芥中的 *GRP23*<sup>[12]</sup> 和 *PNM1*<sup>[24]</sup> 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,将黄叶突变基因定位在 5 号染色体上,该基因编码 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 试验材料

试验材料是育种材料 74101(野生型)中发现的叶片黄化突变体,经自交黄化表型能稳定遗传,以田间编号 74101 命名该突变体。将突变体 74101 与 B73 自交系杂交,构建 F<sub>2</sub>、BC<sub>1</sub> 群体,用于遗传分析与基因定位。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 叶绿素含量测定** 在玉米三叶期选取野生型(74101-WT, 正常植株)和突变体 74101(黄化植株)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 mm×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 r/min 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 3 个波长下的吸光度值。每个样品进行 3 次生物学重复。参考 Arnon<sup>[25]</sup> 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植株各 6 株,用便携式光合/荧光测定仪 CIRAS-3 测定植株第 6 片叶中上部位的净光合速率、胞间二氧化碳浓度、气孔导度、蒸腾速率。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 3 片叶,切成 2 mm×2 mm 的叶片,经 4% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定,采用 45%、55%、70%、85%、95%、100% 的乙醇逐级脱水,再利用树脂包埋,经切片、醋酸双氧铀和柠檬酸铅液染色后,使用透射电镜观察叶片细胞中叶绿体超微结构。

**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,正交和反交得到 F<sub>1</sub>,自交得 F<sub>2</sub>,以 F<sub>1</sub> 为母本与黄叶突变体 74101 杂交得到 BC<sub>1</sub>,观察 F<sub>2</sub> 和 BC<sub>1</sub> 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。采取十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)抽提法<sup>[26]</sup>从样本中提取基因组 DNA,用图位克隆技术定位目的基因<sup>[27]</sup>。精细定位所用引物见表 1。

**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)激光扫描共聚焦显微镜检测。

表1 精细定位所用引物

Table 1 Primer sequences of molecular markers for fine mapping

引物名称 Primer name	正向引物(5'-3') Forward primer (5'-3')	反向引物(5'-3') Reverse primer (5'-3')
<i>phi087</i>	GAGAGGAGGTGTTGTTTGACACAC	ACAACCGGACAAGTCAGCAGATTG
<i>phi048</i>	GCAAACCTTGCATGAACCCGATTGT	CAAGCGTCCAGCTCGATGATTTC
<i>S13</i>	CTTCCTCCAGTCCCCGCAC	TTGGTGGGTTGCGGAAGAT
<i>SS19</i>	CCTGCCATCACCTCGCCT	AACTGGACGCCAAAGCAC
<i>K-27</i>	TACTAATGCTGACGATGATGGATC	TCTCTTGTTGGTTTCTCTCTCT
<i>K-79</i>	ATCAGCGTCGTCGGCATTATG	GATTGGGACCTCGGACTACACT
<i>K-129</i>	GCAACAACAGCAGGCACACT	GATTACGGCTCGCAAGACATCC
<i>K-138</i>	ACCCTACCCTAACTTGCTTGA	GGACAGCATTGAGTTTCAGTGA

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体74101叶绿素含量与光合速率变化分析

突变体74101从芽开始就表现出黄化性状(图1A),植株生长过程中始终保持黄化状态(图1B~C),且生长较慢、发育迟缓、植株矮小。为

探究突变体74101黄化表型是否与叶片的叶绿素含量有关,对野生型和突变体74101在三叶期的叶片光合色素含量进行比较。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显著降低有关。



A: 幼芽期植株, bar=0.5 cm; B: 三叶期植株, bar=2 cm; C: 九叶期植株, bar=12 cm

A: Phenotypic of maize plant at budding stage, bar=0.5 cm; B: Phenotypic of maize plant at three leaf stage, bar=2 cm; C: Phenotypic of maize plant at nine leaf stage, bar=12 cm

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

为进一步探究叶片光合色素含量变化对光合速率的影响,测定了六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、气孔导度分别下降25.63%、18.89%,胞间二氧化碳浓度升高47.45%,蒸腾速率无显著性差异(图2B~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。

### 2.2 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

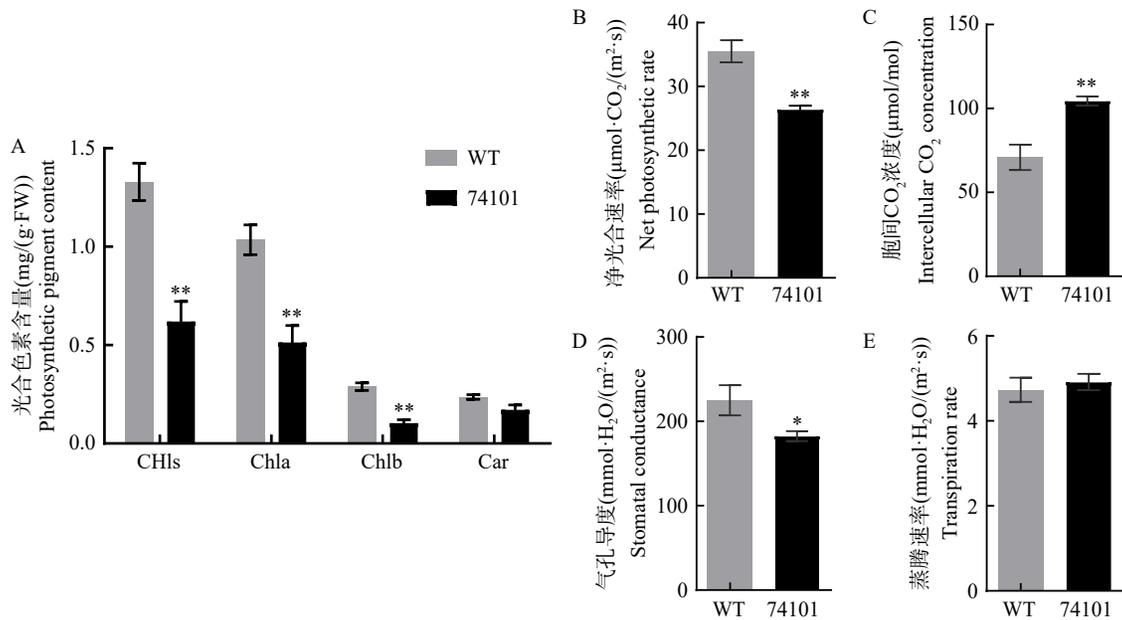
绿体结构变异有关,用透射电镜观察野生型和74101三叶期的玉米叶片叶绿体结构。结果表明,野生型叶绿体花环结构清晰,叶绿体内部类囊体基粒片层结构明显,排列整齐紧凑(图3A~C);而突变体74101花环结构比野生型大,类囊体结构紊乱,基质片层排列稀疏,无基粒结构(图3D~F)。这说明74101的突变表型与叶绿体的异常发育有关。

### 2.3 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。正交和反交的后代表

型一致,说明该材料属于细胞核遗传且基因位于常染色体上。 $F_1$  表型正常, $F_2$  和  $BC_1$  群体发生性状分离, $F_2$  正常植株和黄化植株的比例符合 3:1 ( $\chi^2 <$

$\chi^2_{0.05,1}$ ),  $BC_1$  正常植株和黄化植株的比例符合 1:1 ( $\chi^2 <$   $\chi^2_{0.05,1}$ ), 表明该黄化突变体由一对单隐性核基因控制(表 2)。

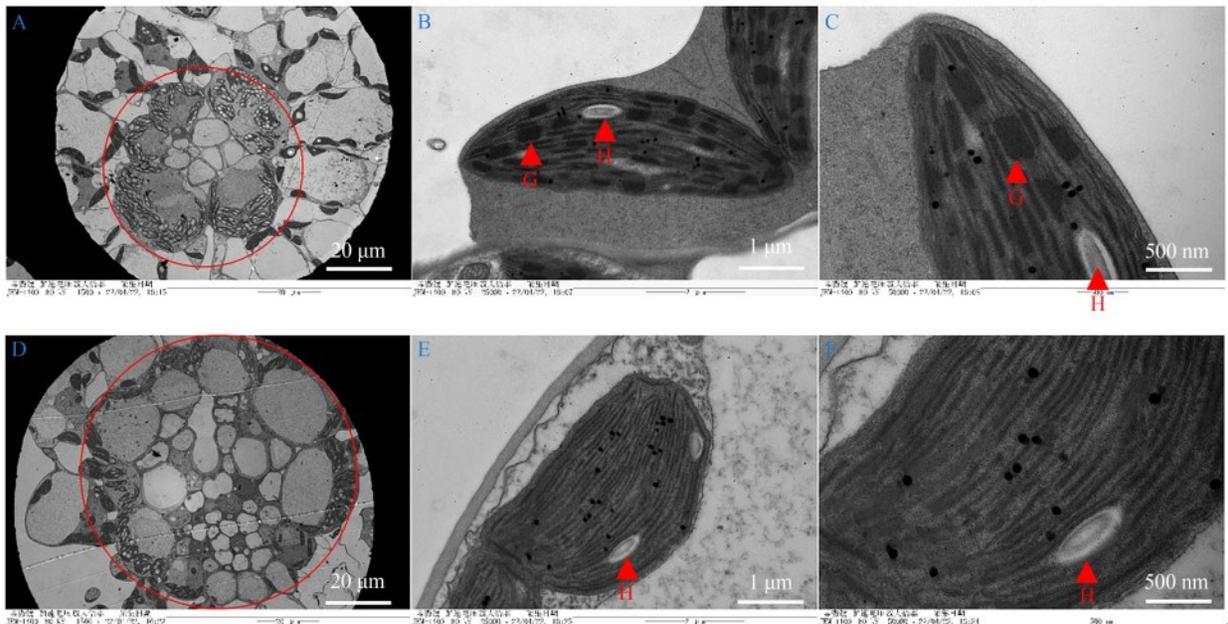


A: 三叶期叶片光合色素含量; B: 叶片净光合作用速率; C: 叶片胞间二氧化碳浓度; D: 气孔导度; E: 蒸腾速率。\*和\*\*分别表示在  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  水平上差异显著

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  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  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



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

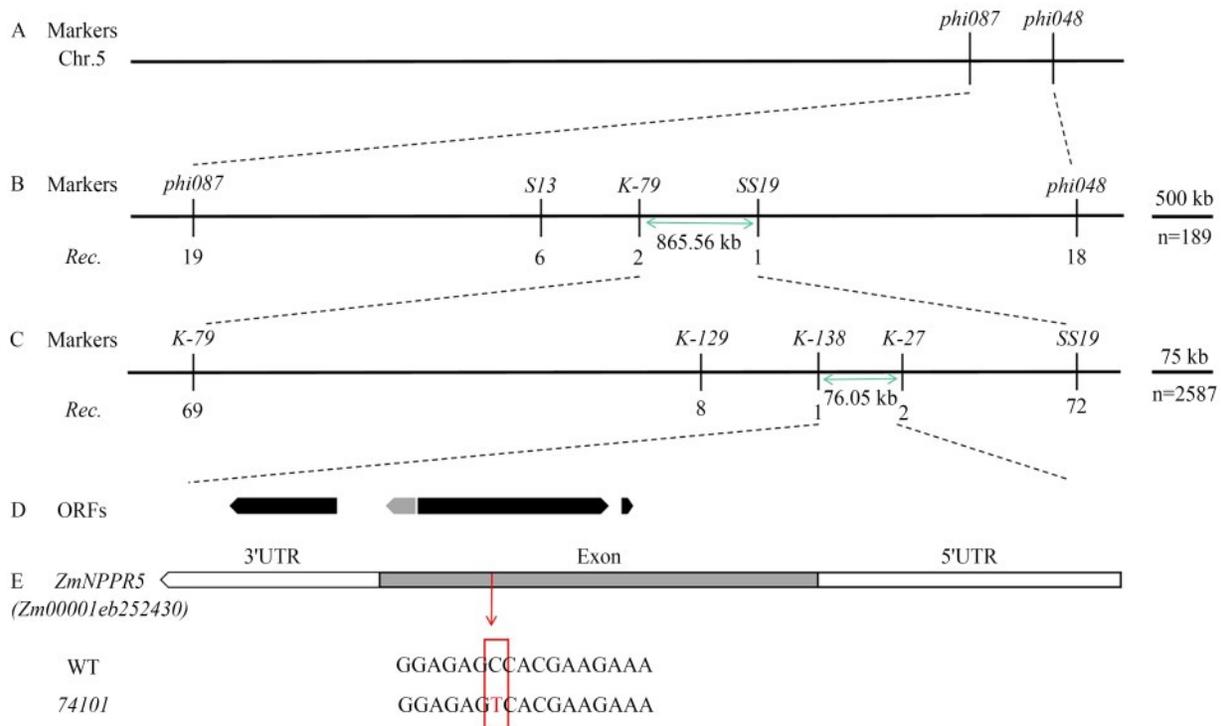
Fig.3 Observation of wreath structure and mesophyll cells of wild-type and mutant 74101 by transmission electron microscope

表2 突变体F<sub>2</sub>和BC<sub>1</sub>群体的遗传分析Table 2 Genetic analysis of F<sub>2</sub> and BC<sub>1</sub> populations

群体 Populations	株数 Number			$\chi^2_{0.05}$
	正常表型 Normal phenotype plants	黄化表型 Etiolation phenotype plants	总计 Total	
74101 × B73	892	284	1176	0.45351
(74101 × B73) × 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BC<sub>1</sub>群体中每4个黄叶表型的基因混池进行连锁分析,进一步利用F<sub>2</sub>群体中32株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 $\phi hi087$ 和 $\phi hi048$ 之间。通过BC<sub>1</sub>群体中189个黄化表型进行基因精细定位,加密3个SSR多态性标记,将目的基因定位在K-79和SS19之间约865kb的物理距离内。另外使用2587个F<sub>2</sub>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4个开放阅读框(ORF, open reading frame),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;其他3个基因测序比对突变体和野生型无差异。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,因此推测Zm00001eb252430基因可能为目的基因。



A: 初定位于玉米5号染色体长臂 $\phi hi087$ 和 $\phi hi048$ 之间;B: BC<sub>1</sub>突变个体将其缩小至K-79和SS19之间;C: F<sub>2</sub>突变个体将其限定在K-138和K-27之间约76 kb物理距离内;D: 在76 kb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,深灰色方框代表外显子

A: Initially located between  $\phi hi087$  and  $\phi hi048$  on the long arm of chromosome 5; B: Then it was narrowed to a region between K-79 and SS19 using BC<sub>1</sub> mutants; C: Then it was narrowed to a physical distance of about 76 kb between k-138 and k-27 using F<sub>2</sub> mutants; D: There are four open reading frames (ORFs) in the 76 kb region, and the gray part represents the ORF of the mutant gene; E: Gene ZmNPPR5 is mutated in exon of coding region, dark gray box represents exon

图4 玉米ZmNPPR5的精细定位及测序分析

Fig.4 Fine mapping and sequencing analysis of ZmNPPR5 in maize

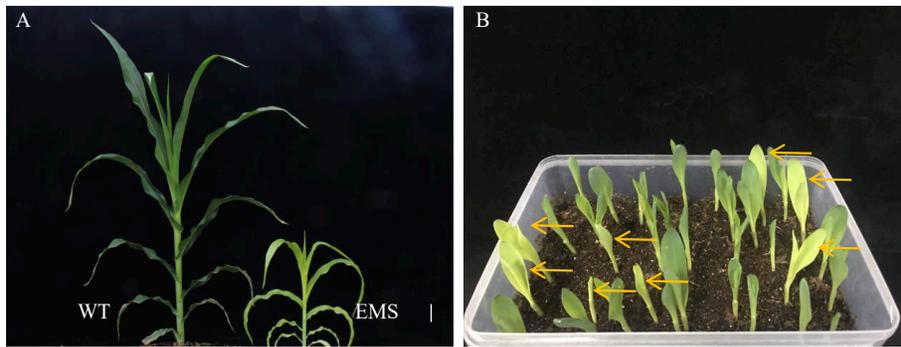
## 2.4 EMS突变体等位性分析

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,经目的基因连锁标记鉴定)与EMS突变体(杂合位点)等位性分析,后代中正常植株26株、

黄化植株8株(图5B),比例符合3:1( $\chi^2 < \chi^2_{0.05,1}$ ),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=10 cm; B: 突变体74101和EMS突变体等位性验证后代表型, bar=0.5 cm

A: EMS mutant phenotype, bar=10 cm; B: Mutant 74101 and EMS mutant were represented after allelic verification, bar=0.5 cm

图5 EMS突变体验证

Fig.5 EMS mutation experience certificate

### 2.5 *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。

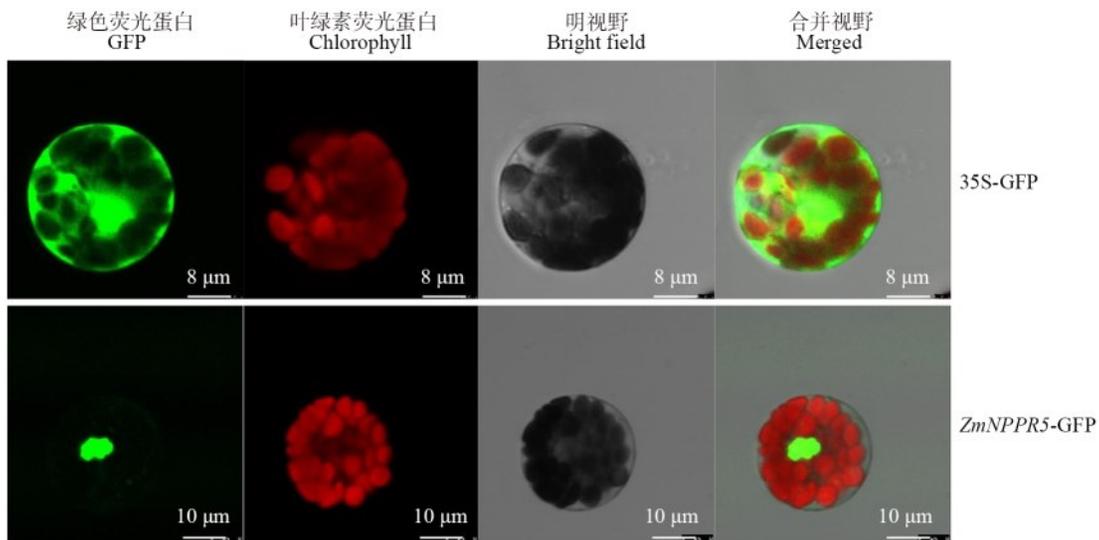


图6 *ZmNPPR5* 蛋白的亚细胞定位

Fig.6 Subcellular localization of *ZmNPPR5* protein

## 3 讨论

PPR 家族蛋白是陆生植物特有的,大多数位于叶绿体或线粒体中。玉米是植物中第一个发现存在 PPR 蛋白,已报道有数百种,但只有少数被鉴定出来<sup>[28]</sup>。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,目前玉米中已克隆的 PPR 家族基因与叶色相关的相对较少<sup>[17,29-33]</sup>。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 *ZmNPPR5* 目的基因定位到5号染色体,该基因编码 PPR 蛋白。亚细胞定位显示 *ZmNPPR5* 在细胞核中表达。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,例如水稻中 *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<sup>[11]</sup>。 *GRP23* 编码蛋白定位于细胞核中,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<sup>[12]</sup>。

线粒体定位的PPR蛋白突变通常导致植物生长障碍。*Emp18*基因的突变在玉米早期阻止胚胎和胚乳发育,最终导致胚胎致死<sup>[34]</sup>。拟南芥和玉米中的*DEK36*基因编码PLS型PPR蛋白,其突变影响线粒体蛋白转运和种子发育<sup>[15]</sup>。共定位于拟南芥细胞核和线粒体中的PPR蛋白PNM1,可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<sup>[24]</sup>。本研究中*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,具体的分子机制有待后续进一步研究。

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参考。

#### 参考文献

- [1] Kleffmann T, Russenberger D, von Zychlinski A, Christopher W, Sjolander K, Gruissem W, Baginsky S. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biology*, 2004, 14(5): 354-362
- [2] Hedtke B, Börner 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, 45(9): 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-Carrie 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): 5337-5347
- [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 pentatricopeptide 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 Francs-Small C C, Mireau H. The MTL1 pentatricopeptide 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): 1197-1209
- [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. *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] Barkan A, Small I. Pentatricopeptide repeat proteins in plants. *Annual review of plant biology*, 2014, 65: 415-442
- [29] Zhao Y, Xu W, Zhang Y, Sun S, Wang L, Zhong S, Zhao X, Liu B. PPR647 protein is required for chloroplast RNA editing, splicing and chloroplast development in maize. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22: 11162
- [30] 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 of the United States of America*, 2012, 109(13): 5104-5109
- [31] 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
- [32] 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 Phenotype of cotton (*Gossypium hirsutum*) is linked to a 22-bp Frame-shift deletion in a mitochondria targeted pentatricopeptide repeat gene. *Genes Genomes Genetics*, 2016, 6(6): 1627-1633
- [33] 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
- [34] Li X L, Huang W L, Yang H H, Jiang R C, Sun F, Wang H C, Zhao J, Xu C H, Tan B C. EMP18 functions in mitochondrial *atp6* and *cox2* transcript editing and is essential to seed development in maize. *The New Phytologist*, 2019, 221: 896-907