

## 鸟苷酸激酶 OsGK1 对水稻种子发育至关重要

李景芳<sup>1</sup> 田云录<sup>1</sup> 刘喜<sup>1</sup> 刘世家<sup>1</sup> 陈亮明<sup>1</sup> 江玲<sup>1</sup> 张文伟<sup>1</sup> 徐大勇<sup>2</sup> 王益华<sup>1,\*</sup>  
万建民<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学 作物遗传与种质创新国家重点实验室/农业部长江中下游粳稻生物学与遗传育种重点实验室/长江流域杂交水稻协同创新中心/江苏省现代作物生产中心, 南京 210095; <sup>2</sup>连云港市农业科学院 江苏 连云港 222000; \*通讯联系人, E-mail: yihuawang@njau.edu.cn)

### The Guanylate Kinase OsGK1 is Essential for Seed Development in Rice

LI Jingfang<sup>1</sup>, TIAN Yunlu<sup>1</sup>, LIU Xi<sup>1</sup>, LIU Shijia<sup>1</sup>, CHEN Liangming<sup>1</sup>, JIANG Ling<sup>1</sup>, ZHANG Wenwei<sup>1</sup>, XU Dayong<sup>2</sup>, WANG Yihua<sup>1,\*</sup>, WAN Jianmin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Biology, Genetics and Breeding of japonica Rice in Mid-lower Yangtze River, Ministry of Agriculture/The Yangtze River Valley Hybrid Rice Collaboration Innovation Center/Jiangsu Collaboration Innovation Center for Modern Crop Production, Nanjing 210095, China; <sup>2</sup>Lianyungang Academy of Agricultural Science, Lianyungang 222000, China; \*Corresponding author, E-mail: yihuawang@njau.edu.cn)

**Abstract:** 【Objective】In this study, the phenotype of the floury and shrunken endosperm mutant *fse2* was analyzed. Isolation of the responsible gene will lay a foundation for elucidating the mechanism underlying starch synthesis and embryo development in rice. 【Method】*fse2* was obtained from the mutant library of *japonica* cultivar Dianjingyou 1 induced with N-Nitroso-N-methylurea. In this study, the physiochemical properties of *fse2* endosperm were investigated and the structure of starch grains was observed. An F<sub>2</sub> population derived from *fse2* and N22 was constructed, then the underlying gene was determined by map-based cloning and complementation tests. qRT-PCR and GUS staining were used to analyze the expression of *FSE2*. Western blotting was performed to analyze the protein levels of starch synthesis related genes and mitochondrial genes in the mutant. 【Result】Compared with the transparent endosperm of wild type, *fse2* displayed a floury and shrunken endosperm, significantly declined 1000-grain weight, smaller and loosely packed irregular compound starch grains. Total starch and amylose content decreased significantly, while the lipid content increased obviously in *fse2*, and the gelatinization characteristics of *fse2* were changed notably. *FSE2* encodes a guanylate kinase named OsGK1, which is dual-targeted to both mitochondria and plastids. *OsGK1* was constitutively expressed in various organs with the highest level in developing endosperm at 6th day after flowering. The protein levels of most of the starch synthesis related genes in the mutant endosperm were significantly decreased, especially AGPS2b and PHOI. In addition, the homozygous seeds of *fse2* were lethal and the development of *fse2* embryos was severely arrested. The accumulation of mitochondria AOX was notably elevated, while almost undetectable in the wild type, indicating the mitochondrial respiratory chain was impaired. 【Conclusion】Due to the functional defects of OsGK1, the development of mitochondria and amyloplasts are abnormal, leading to the embryo lethality and a floury and shrunken endosperm.

**Key words:** rice (*Oryza sativa* L.); floury and shrunken endosperm; guanylate kinase; seed development; starch synthesis

**摘要:** 【目的】对水稻粉质皱缩突变体 *fse2* 进行表型分析及基因克隆, 为阐明水稻淀粉合成机制以及胚的发育奠定基础。【方法】*fse2* 来自粳稻品种滇粳优 1 号的 MNU(N-甲基-N-亚硝基脲)诱变突变体库。本研究考查了突变体 *fse2* 籽粒的理化性状, 利用扫描电镜和半薄切片观察了淀粉颗粒的结构; 构建了 *fse2* 与 N22 的 F<sub>2</sub> 群体, 通过图位克隆及转基因互补验证确定目标基因; 通过 qRT-PCR 以及 GUS 活性染色对 *FSE2* 进行组织表达分析; 免疫印迹分析了突变体中淀粉合成相关基因以及线粒体基因的蛋白变化。【结果】*fse2* 籽粒粉质皱缩, 千粒重显著下降; 胚乳中淀粉颗粒变小变圆, 排列松散, 不能形成正常的复合淀粉颗粒; 突变体中总淀粉、直链淀粉含量均显著下降, 脂肪含量显著上升, 突变体淀粉的糊化特性发生明显改变。*FSE2* 编码一个线粒体和质体双定位的鸟苷酸激酶(guanylate kinase), 命名为 OsGK1。*OsGK1* 在各器官中组成型表达, 并在花后 6 d 的胚乳中表达水平最高。突变体胚乳中淀粉合成相关蛋白水平显著降低, 尤其是 AGPS2b 和 PHOI。此外, 突变体 *fse2* 的胚发育严重

收稿日期: 2018-01-15; 修改稿收到日期: 2018-03-17。

基金项目: 国家重点研发项目七大农作物育种专项(2016YFD0100101-08); 江苏省科技支撑计划资助项目(BE2015363, BE2017368); 江苏省农业科技自主创新资金资助项目[CX(16)1029]。

受损,导致种子纯合致死;线粒体定位的 AOX 积累显著增强,而野生型中几乎检测不到,表明线粒体呼吸途径受损。【结论】由于 OsGK1 的功能缺陷,导致水稻种子中线粒体和造粉体发育异常,进而产生了胚致死以及胚乳粉质皱缩的表型,因此 OsGK1 对水稻种子的发育至关重要。

关键词:水稻;粉质皱缩胚乳;鸟苷酸激酶;种子发育;淀粉合成

中图分类号:Q343.5;S511.01

文献标识码:A

文章编号:1001-7216(2018)05-0415-12

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界一半以上人口的主要食物,提高水稻产量和品质是水稻遗传改良最主要的目标<sup>[1]</sup>。胚乳作为水稻籽粒的可食用部分,其发育直接影响稻米的产量和品质。水稻成熟胚乳中主要含有淀粉、贮藏蛋白、脂质等成分,其中,淀粉含量最高,约占胚乳干质量的 70%。因此,淀粉的合成量很大程度上决定了稻米的产量,同时淀粉含量、组成和结构对稻米的品质起着决定性作用。因此,深入研究淀粉的合成及其调控机制对提高稻米产量、改良稻米品质具有重要的意义<sup>[2-4]</sup>。

谷类作物中淀粉在胚乳造粉体(一种特化的质体)中合成<sup>[5]</sup>。稻米中的淀粉分为直链淀粉和支链淀粉。直链淀粉是由  $\alpha$ -1,4-糖苷键连接组成的线性分子,而支链淀粉是线性链上具有高度分支的  $\alpha$ -1,6-糖苷键的葡聚糖分子。支链淀粉分子具有明显的簇状结构,占储存淀粉的 65%~85%<sup>[6]</sup>。高等植物中淀粉的生物合成主要通过 4 类酶:ADP 葡萄糖焦磷酸化酶(ADP glucose pyrophosphorylase, AGPase)、淀粉合酶(starch synthase, SS)、淀粉分支酶(starch branching enzyme, SBE)以及淀粉脱分支酶(debranching enzyme, DBE)<sup>[6-8]</sup>。此外,有证据表明歧化酶(disproportionating enzyme, DPE)<sup>[9-11]</sup>和  $\alpha$ -葡聚糖磷酸化酶( $\alpha$ -glucan phosphorylase, PHO)<sup>[12,13]</sup>也参与了该过程。

鸟嘌呤核苷酸(guanosine monophosphate, GMP)是许多化学反应的主要能源,也是 DNA、RNA 和一些信号分子如环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的结构单元,cGMP 是多种激素诱导的胞内第二信使,参与调解许多生化反应过程,如通过控制细菌的活动来调解植物的免疫响应<sup>[14,15]</sup>。高等植物中 GMP 的生物合成通过两种途径实现:一种是利用氨基酸和其他小分子的从头合成途径;另一种是通过预先形成的鸟嘌呤和鸟苷的补救途径。合成的 GMP 随后可以被磷酸化为鸟苷二磷酸(guanosine diphosphate, GDP)和鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP)。GDP 和 GTP 是植物进化过程中保守的重要能量分子,驱动细胞中许多重要的酶促反应。在蛋白质合成过程中尤为重要,多肽链上每添加 1 个氨基酸需要消耗 2 分子 GTP,因此 GTP 在细胞分裂旺盛的部位分布较高<sup>[16-19]</sup>。虽

然高等植物中 GMP 的合成过程与动物及微生物相似,但高等植物中上述途径的调控网络比动物中更加复杂。这种增加的复杂性源自植物细胞中多种质体的存在,其可以分化成各种类型的细胞器,例如叶绿体、造粉体和有色体等<sup>[15,20]</sup>。

鸟苷酸激酶(guanylate kinase, GK)是鸟嘌呤代谢通路中的关键酶,催化(脱氧)GMP 磷酸化形成(脱氧)GDP。GK 在第二信使 cGMP(cGMP→GMP→GDP→GTP→cGMP)的循环中也起重要作用,调节鸟嘌呤核苷酸在信号转导途径中各组分的供应<sup>[21]</sup>。目前,对动物和微生物中 GK 的生物化学、遗传学的调控已经开展了许多研究<sup>[22-27]</sup>。人类 GK 在用于治疗癌症和病毒感染的作用引起了极大关注<sup>[22,23]</sup>。同样地,高等植物中 GK 的功能也引起了研究者的关注<sup>[20,28-31]</sup>。水稻 GK 突变体 *virescent-2(v2)* 具有温度依赖性,在 20℃ 时叶片中不含有叶绿体而表现白化,而在 30℃ 时叶色正常。*V2* 编码一个包含 285 个氨基酸的蛋白,同时定位于质体和线粒体。*v2* 中基因的突变导致第 162 位缬氨酸被异亮氨酸代替,从而抑制了早期质体遗传系统中质体转录本的翻译,导致叶绿体分化受阻。因此,OsGK1/*V2* 在叶片早期发育过程中调控质体翻译体系的建立<sup>[30]</sup>。细菌和动物中的研究表明 GK 定位于细胞质中,能够为许多基本的细胞学过程提供所需的鸟嘌呤。但植物中同样存在这种胞质定位的鸟苷酸激酶(cytoplasm guanylate kinase, cGK),对拟南芥 cGK 的 RNA 干扰植株进行表型分析表明,cGK 对植物生长发育不可或缺,但并非叶绿体发育所必需<sup>[31]</sup>。上述研究表明植物系统中存在两种类型的 GK,在水稻中只有 *pt/mt*(plastid target/ mitochondria target) GK 是叶绿体分化所必需,但 GK 与水稻胚乳中的质体-造粉体的关系未见报道。

本研究以从粳稻品种滇梗优 1 号的甲基亚硝基脲(1-methyl-1-nitrosourea, MNU)处理突变体库中筛选到的粉质胚乳突变体 *fse2* 为材料,对其籽粒的理化性状进行测定,并对胚乳淀粉结构进行观察。通过图位克隆及转基因互补发现,*FSE2* 编码 OsGK1 蛋白。借助细胞学、生物信息学手段,以及免疫印迹等实验,阐述 OsGK1 与造粉体发育的关系。为深入解析水稻胚乳中淀粉合成及胚发育提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*fse2* 是在粳稻品种滇梗优 1 号 MNU 突变体库中筛选得到的一份稳定遗传的粉质皱缩胚乳(floury and shrunken endosperm)突变体。选择杂合单株与粳稻品种 N22 配制杂交组合用于基因的图位克隆。材料种植于南京农业大学实验基地。

### 1.2 扫描电镜观察

参照 Kang 等<sup>[32]</sup>的方法, 用刀片将成熟的种子横向截断, 后续样品的制备由南京农业大学生命科学学院电镜实验室完成, 采用日立 S-3000N 电子扫描显微镜观察和拍照记录。

### 1.3 胚乳半薄切片观察

取灌浆 10 d 的胚乳, 参照 Peng 等<sup>[33]</sup>所述方法切成 1  $\mu\text{m}$  厚度的薄片。切片用 0.05%  $\text{I}_2$ -KI 溶液染色后, 在 Zeiss AX10 荧光显微镜下观察和拍照。

### 1.4 成熟种子理化指标测定

成熟种子去壳后磨成糙米粉并过筛(孔径为 0.15 mm), 50℃ 下烘干至恒重。总淀粉含量使用 Megazyme 总淀粉测定试剂盒测定; 直链淀粉含量按照农业部标准 NY147—88 测定; 总脂肪含量使用 FOSS 公司 Soxtec 2050 全自动脂肪测定仪测定。每个样品重复 3 次, 取平均值。支链淀粉链长分布的测定参照 Satoh 等<sup>[13]</sup>的方法进行。

配制 0~9 mol/L 梯度浓度的尿素溶液, 用乙酸调节 pH 值至 6.0。在 1.5 mL 离心管中准确称取 20 mg 糙米粉, 分别加入 1 mL 上述尿素溶液, 涡旋振荡均匀后室温放置 24 h。随后 8 000 $\times$ g 下离心 20 min, 静置 1 h 之后计算各离心管中可溶部分的体积, 淀粉颗粒的膨胀体积=总体积(1 mL)—可溶部分体积。每个样品重复 3 次, 取平均值。

准确称取 3.0 g 烘干的米粉, 加入 25 mL 蒸馏水混合均匀, 使用 RVA (Rapid Visco Analyzer, 瑞典波通公司)快速黏度分析仪测定黏度特性。

### 1.5 FSE2 基因的图位克隆

分单株收取 *fse2*/N22  $F_1$  植株上的  $F_2$  种子, 并从中选取与突变体表型一致的粉质皱缩籽粒。由于种子纯合致死, 将极端个体浸水 24 h 后利用 CTAB 法提取种子 DNA, 用于基因定位。InDel 标记来自 RiceVarMap (<http://ricevarmap.ncpgr.cn/>)。PCR 体系包括 DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , 前后引物(2  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , dNTPs(10 mmol/L) 0.03  $\mu\text{L}$ , *rTaq* 0.1  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ 缓冲液 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 5.9  $\mu\text{L}$ 。产物用 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳, 0.1% AgNO<sub>3</sub> 染色, 0.4% 甲醛溶液(v/v)显色。

突变体种子纯合致死, 无法诱导出愈伤组织, 因此利用杂合植株分离的透明种子进行转基因互补试验。提取  $T_0$  代转基因植株叶片的 DNA, 分别进行杂合位点和转基因阳性(前引物位于基因编码区, 后引物位于载体序列, 片段大小为 883 bp)的 PCR 检测。收获杂合背景的转基因阳性植株上的种子( $T_1$  代), 单粒播种, 发芽长苗后提取幼苗 DNA 检测突变位点(引物 F/R, 野生型为 429 bp, 突变体为 359 bp), 当突变位点纯合而种子表现透明视为互补。

### 1.6 RNA 提取以及 qRT-PCR

使用 TIANGEN 公司的植物总 RNA 提取试剂盒, 提取不同组织的总 RNA。反转录得到 cDNA 后, 使用 SYBR Premix Ex *Taq*<sup>TM</sup> (TaKaRa), 在 ABI PRISM 7500HT 仪器上扩增, 进行 qRT-PCR 分析, 以水稻 *Ubiquitin* 基因作为内参。反应体系包括 cDNA 模板 8.0  $\mu\text{L}$ (约 50 ng), 2 $\times$ SYBR Premix Ex *Taq* II 10  $\mu\text{L}$ , 前后引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.8  $\mu\text{L}$ , 50 $\times$ ROX 参比染料 0.4  $\mu\text{L}$ 。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法进行计算。

### 1.7 氨基酸序列比对等生物信息分析

在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索并下载不同物种鸟苷酸激酶的同源蛋白, 使用 MEGA 5.0 软件进行氨基酸序列的比对和分析。利用 SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 和 TargetP 1.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)进行 OsGK1 定位信号预测。

### 1.8 GUS 染色

GUS 工作液含 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.2), 0.1% Triton X-100, 2 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mmol/L K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] $\cdot$ 3H<sub>2</sub>O, 10 mmol/L EDTA, 2 mmol/L X-Gluc。加入适量配制好的 GUS 染液于 15 mL 离心管中, 将待测转基因样品浸入, 放入 37℃ 培养箱过夜后用 100%乙醇脱色 5 h, 然后拍照记录。

### 1.9 TTC 染色

取种子 20 粒, 去除颖壳, 30℃ 清水浸种 24 h 后, 用吸水纸除去籽粒表面水分, 放入 10 mL 试管中, 加入 10 mL 5% TTC 染液(TTC 粉末溶解于 pH=7.0 磷酸缓冲液中), 35℃ 黑暗下 2 h 染色完毕, 用蒸馏水冲洗 3 次。野生型和突变体各 3 个重复。

### 1.10 SDS-PAGE 及 Western blotting

提取成熟种子胚乳总蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电泳结束后利用湿转设备(Bio-Rad 公司)将蛋白转印到孔径为 0.45  $\mu\text{m}$  的聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF 膜), 然后将 PVDF 膜在 5%脱脂牛奶(PBST 溶解)中封闭 1 h; 再移至新的封闭液中加入一抗(1:1000)孵育 2 h; PBST 漂洗

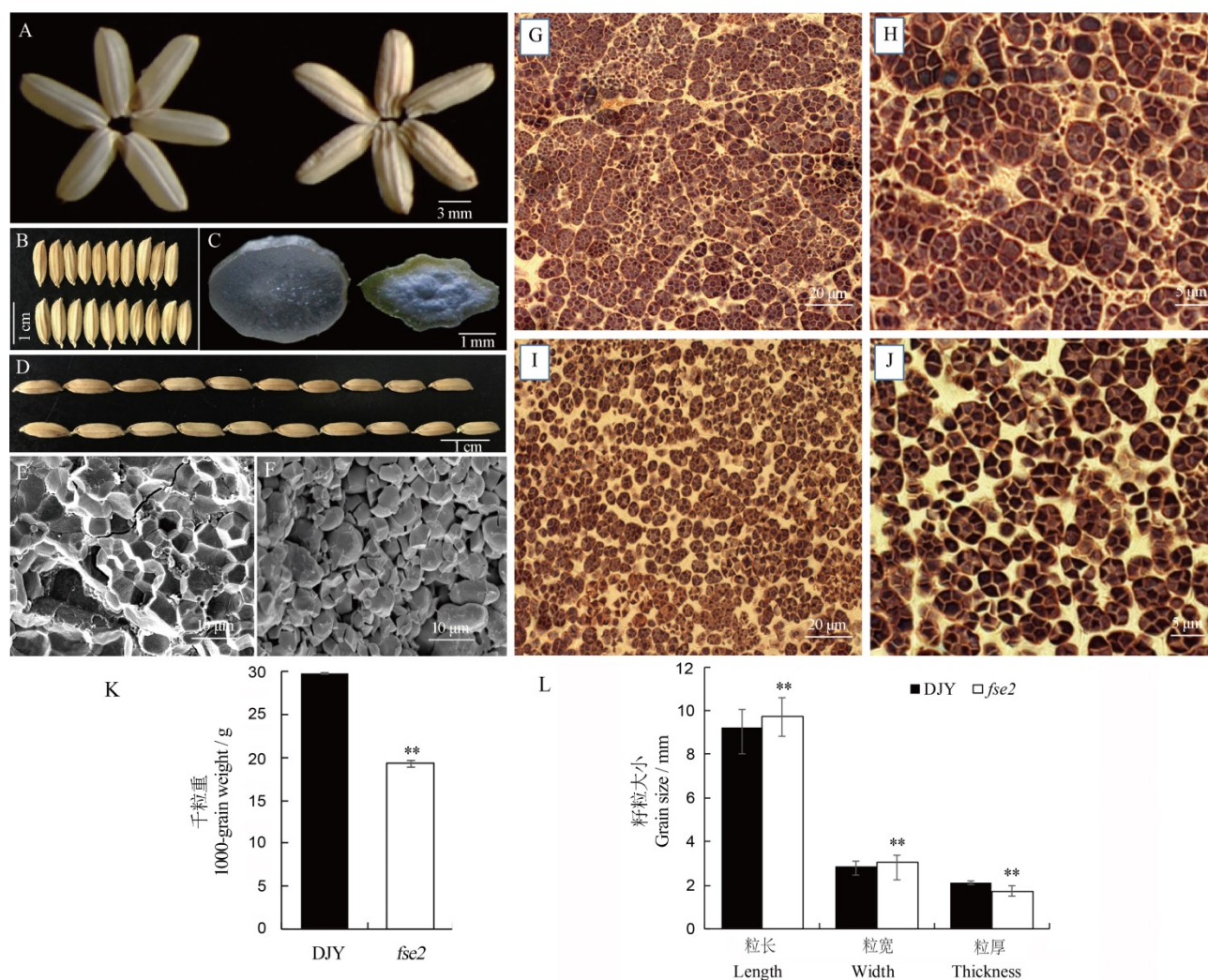
PVDF膜3次,每次5 min;将PVDF膜转移至封闭液稀释的二抗溶液(1:5000)中孵育1 h;PBST漂洗PVDF膜5次,每次5 min。采用化学发光法(ECL)曝光。内参抗体为ACTIN单克隆抗体(Sigma公司)。

## 2 结果与分析

### 2.1 *fse2* 突变体的表型分析

与野生型相比,突变体 *fse2* 胚乳表现为粉质、皱缩。对成熟种子横切面观察发现突变体不透明部分主要是内胚乳(图 1-A~C)。利用扫描电镜对种子

内胚乳横截面观察,野生型中淀粉颗粒充实度高,排列紧密,相互挤压呈规则的多面体晶体形状(图 1-E),而突变体中淀粉颗粒排列松散,变圆变小(图 1-F)。制备半薄切片并且通过 I<sub>2</sub>-KI 染色观察发育胚乳中复合淀粉粒的形态,在野生型花后 10 d 的胚乳中,每个造粉体内部能产生多个独立的淀粉颗粒(starch granule),这是水稻典型的复合淀粉粒结构(compound starch grain)(图 1-G~H)。而突变体 *fse2* 中,复合淀粉粒变小,其中的淀粉颗粒数目显著降低;还存在许多小的、零散分布的单粒淀粉粒(图 1-I~J)。因此, *FSE2* 对于水稻的造粉体发育具有重



A, B, D—滇粳优 1 号(DJY)与 *fse2* 的成熟种子的外观表型; A, DJY(左), *fse2*(右)。B 和 D, DJY(上), *fse2*(下)。C—DJY(左)与 *fse2*(右)种子的横切面。E, F—DJY(E)和 *fse2*(F)成熟种子横切面的 SEM 观察。G~J—花后 10 d I<sub>2</sub>-KI 染色的 DJY(G, H)和 *fse2*(I, J)胚乳半薄切片。K—DJY 和 *fse2* 的千粒重比较,  $n=3$ ; L—DJY 和 *fse2* 的粒长、粒宽和粒厚,  $n=20$ 。所有数值为平均值 $\pm$ 标准差; \*\*野生型与突变体间的差异达 0.01 显著水平( $t$  测验)。

A, B, D, Mature seeds of Dianjingyou 1 (DJY) and *fse2*. A, DJY (left), *fse2* (right). B, D, DJY (upper), *fse2* (lower). C, Cross-sections of mature seeds of DJY (left) and *fse2* (right). E, F, Scanning electron microscopic (SEM) analysis of cross-sections of mature seeds of DJY (E) and *fse2* (F). G~J, Semi-thin sections of DJY (G, H) and *fse2* (I, J) endosperm at 10 days after pollination (DAP) stained with I<sub>2</sub>-KI. K, The 1000-grain weight of DJY and *fse2*.  $n=3$ . L, Grain length, width and thickness in DJY and *fse2*.  $n=20$ . All values are expressed as mean $\pm$ SD. \*\*means significant difference at 0.01 level (Student's  $t$ -test).

图 1 野生型与突变体 *fse2* 成熟种子表型比较

Fig. 1. Phenotypic comparison of mature seeds of wild type and *fse2* mutant.



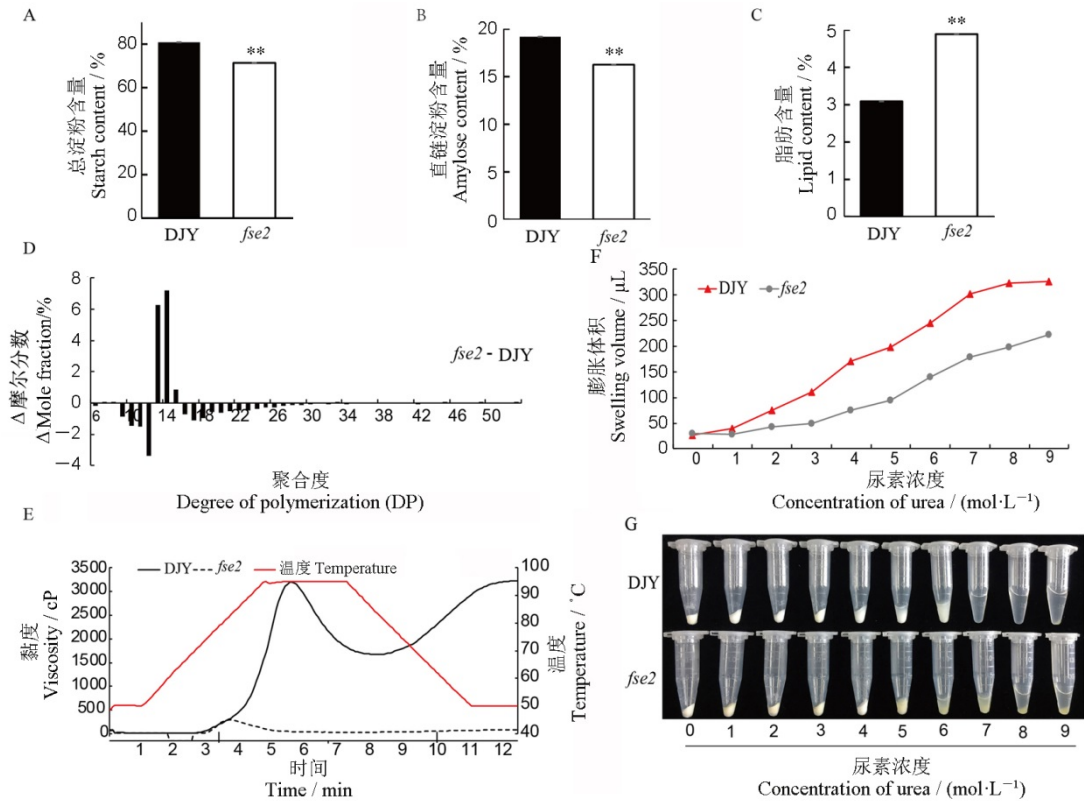
要作用。此外, 与野生型相比, *fse2* 成熟种子的千粒重降低了约 35.3%(图 1-K), 同时, *fse2* 的粒长和粒宽均较野生型极显著增加, 而粒厚则极显著减小(图 1-B、D、L)。

2.2 *fse2* 与野生型种子理化特性的比较

相对于野生型, 突变体 *fse2* 成熟籽粒中总淀粉含量和直链淀粉含量显著降低, 分别下降 11.67%、15.28%(图 2-A、B), 而脂肪含量增加 58.25%(图 2-C)。此外, *fse2* 胚乳淀粉中支链淀粉链长分布发生明显改变, 其聚合度(degree of polymerization, DP)为 9~12 和 16~29 的链长比例明显下降, 而 DP

为 13~15 的链长比例显著升高(图 2-D)。RVA 谱分析发现, 突变体 *fse2* 淀粉的黏度曲线与野生型具有极显著差异(图 2-E)。突变体 *fse2* 淀粉的最高黏度(peak viscosity, PKV)出现的时间早于野生型, 其崩解值(breakdown viscosity, BDV)、消减值(setback viscosity, SBV)、冷胶黏度(cool pasting viscosity, CPV)等都极显著低于野生型(表 1)。

对野生型和突变体米粉的凝胶特性测定表明, 突变体米粉较野生型米粉更难溶于尿素(图 2-F、G)。野生型米粉在 4 mol/L 尿素中明显开始溶解, 而 *fse2* 米粉几乎无变化, 直至 5 mol/L 时 *fse2* 米粉



A~C—滇梗优 1 号(DJY)和 *fse2* 胚乳中总淀粉(A)、直链淀粉(B)和脂肪(C)含量的测定,  $n=3$ , 取平均值 $\pm$ 标准差, 采用  $t$  测验,  $**P<0.01$ ; D—DJY 和 *fse2* 支链淀粉链长分布; E—DJY 和 *fse2* 淀粉的 RVA 谱分析; F—DJY 与 *fse2* 米粉的膨胀体积比较( $n=3$ ); G—DJY 与 *fse2* 的尿素膨胀。

A~C, The contents of total starch (A), amylose (B), and lipid (C) in the endosperm of Dianjingyou(DJY) and *fse2*.  $n=3$ , Values are means $\pm$ SD, Student's  $t$ -test,  $**P<0.01$ . D, Amylopectin chain length distributions of DJY and *fse2*. E, Analysis of RVA characteristic of starch in DJY and *fse2*. F, The swollen volume of DJY and *fse2* starch in urea solution ( $n=3$ ). G, Starch expansion of DJY and *fse2* in urea solutions.

图 2 野生型与突变体 *fse2* 成熟种子理化特性分析

Fig. 2. Physicochemical characteristics of mature seeds of *fse2* and its wild type.

表 1 野生型和突变体 *fse2* 淀粉的 RVA 谱特征分析

Table 1. Analysis of RVA characteristic values of starch in wild type and *fse2* mutant.

试材 Test material	最高黏度 Peak viscosity	热浆黏度 Hot pasting viscosity	崩解值 Breakdown viscosity	冷胶黏度 Cool pasting viscosity	消减值 Setback viscosity	峰值时间 Peak time / min	糊化温度 Gelatinization temperature / $^{\circ}$ C
DJY	3197	1677	1520	3225	28	5.67	76.00
<i>fse2</i>	293	34	259	83	-210	3.80	75.95

表2 *fse2* 遗传分析Table 2. Genetic analysis of *fse2*.

年份 Year	透明种子数 Number of normal seeds	粉质皱缩种子数 Number of floury and shrunken seeds	$\chi^2(3:1)$
2017	681	208	1.508
2016	573	172	1.612

才出现轻微的溶解。当尿素浓度达到 9 mol/L 时野生型米粉已接近完全溶解,而 *fse2* 米粉膨胀体积与野生型在 6 mol/L 尿素中的膨胀体积相当(图 2-F、G),说明 *fse2* 的支链淀粉结构发生了显著变化。综上所述,*fse2* 突变显著改变了胚乳淀粉的理化性质。

### 2.3 *FSE2* 基因的图位克隆

*fse2* 种子纯合致死,杂合植株上所结种子透明胚乳与粉质胚乳分离比符合 3:1( $\chi^2 < 3.84$ )(表 2),表明 *fse2* 由一对隐性核基因控制。从 *fse2* 与 N22 配制的杂交组合的 F<sub>2</sub> 种子中,挑选出 350 个与 *fse2* 突变体表型一致的隐性极端个体进行基因定位,将 *FSE2* 定位于第 3 染色体短臂的标记 LJF3-16 与 LJF3-17 之间约 106 kb 区域内(图 3-A)。利用水稻数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)查询该区间,预测存在 11 个开放读码框(open reading frame, ORF)。对这 11 个 ORF 的基因组测序发现,突变体中 *Os03g0320900* 第 1 外显子上存在 3 个 SNP,并且包含 70 bp 的缺失(图 3-B、C)。实时 PCR 检测发现, *fse2* 花后 10 d 种子中 *Os03g0320900* 的表达水平约为野生型的 13.33%(图 3-E)。*Os03g0320900* 基因组全长 3608 bp,包含 4 个外显子和 3 个内含子(图 3-B),编码序列长 858 bp,编码一个含有 285 个氨基酸的鸟苷酸激酶, C 端包含一个 GuKc 功能结构域(图 3-D),我们将该基因命名为 *OsGK1*。通过数据库比对发现,不同植物中的鸟苷酸激酶均含有 GuKc 结构域,并具有较高的蛋白序列相似性,且均含有鸟苷酸激酶催化位点(图 4)。在突变体 *fse2* 中,由于 70 bp 缺失导致蛋白翻译提前终止,编码一个仅有 68 个氨基酸的短肽,但只有 N 端 20 个氨基酸与野生型一致(图 3-D),缺失了 GuKc 结构域及其催化位点(图 3-D),因此 *fse2* 很可能是 *OsGK1* 的功能丧失突变体。

为进一步确定 *Os03g0320900* 就是 *fse2* 的突变基因,将构建好的 CaMV 35S 启动子驱动 *Os03g0320900* 全长 cDNA 的载体,转化杂合体植株分离出的透明种子愈伤。对转基因阳性且背景杂合的 T<sub>0</sub> 代植株上的透明种子(T<sub>1</sub>)发苗提取 DNA 并进行 PCR 鉴定。从图 3-F~H 中可以看出,在转基因杂合家系 CP-1 的#3 和#4 种子及 CP-2 的#3 和#7

种子,具有纯合的突变体背景,且为转基因阳性,说明它们是转基因互补的种子。综上所述 *Os03g0320900* 基因的突变导致了 *fse2* 的突变表型。

### 2.4 *FSE2* 的组织表达分析

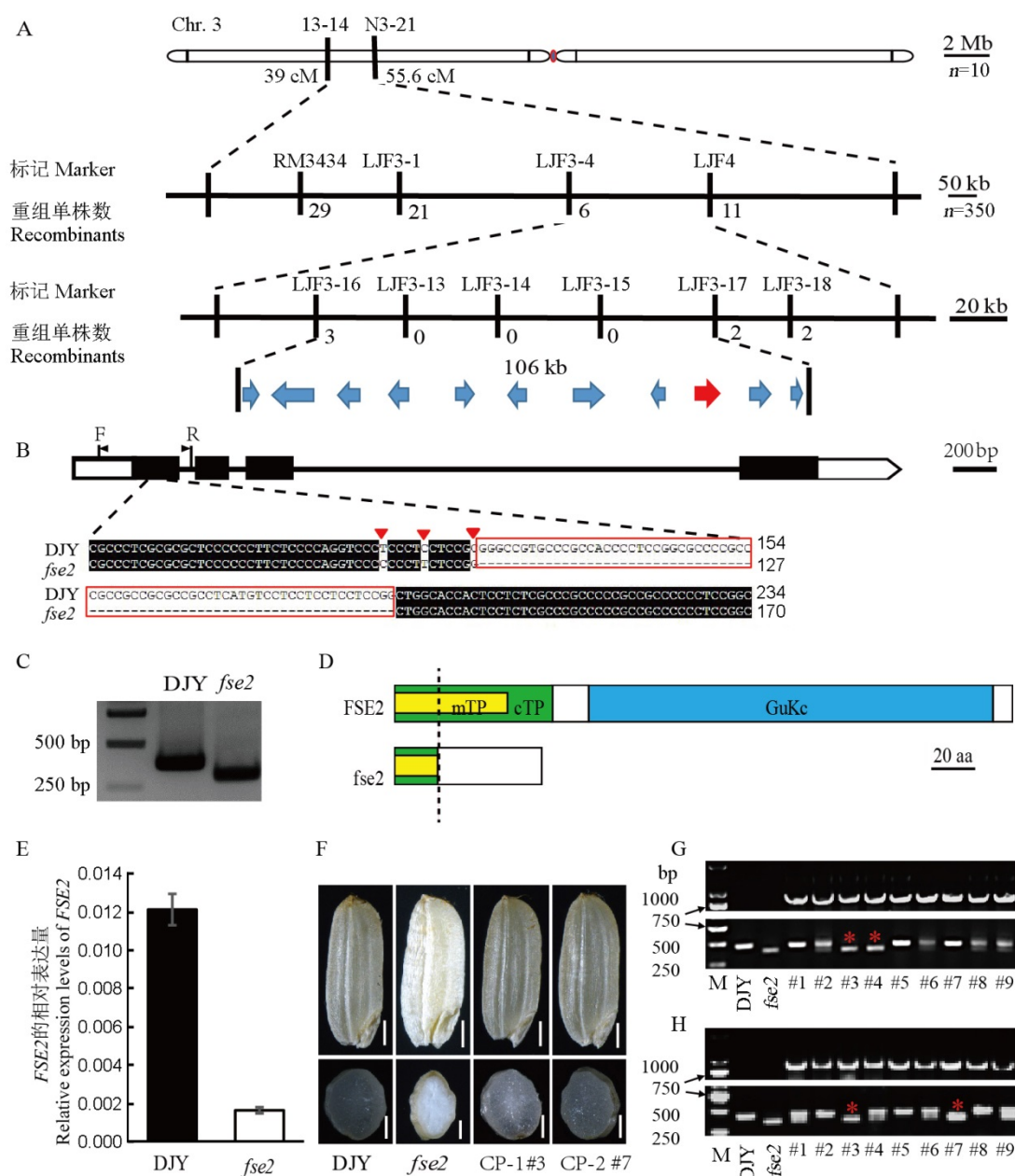
实时荧光定量 PCR 显示, *FSE2* 在各器官中呈组成型表达,在叶片和叶鞘中表达量较高(图 5-A)。此外, *FSE2* 在胚乳发育的整个过程中也有表达,并且在花后 6 d 达到峰值(图 5-B)。同时,我们构建了 *FSE2* 启动子驱动 *GUS* 基因的表达载体转化到日本晴中,对转基因阳性植株不同组织的 *GUS* 染色发现,在根、叶、叶鞘、小花均能检测到 *GUS* 活性(图 5-C~F),同时发育种子中也能检测到 *GUS* 的活性,且在花后 6 d 表达量最高。这些与荧光定量的结果相吻合(图 5-G~L)。

### 2.5 *FSE2* 突变影响了胚的正常发育

种子的萌发实验表明,野生型的种子吸胀后胚能正常萌发生长,而突变体几乎不能萌发(图 6-A)。进一步利用 TTC 法测定种子活力发现,野生型的胚能够染成红色,而突变体种子的胚几乎不能着色(图 6-F),推断突变体胚的正常发育受到了影响。因此,我们切开吸胀后的胚发现,突变体的胚无明显的结构分化,而野生型中结构分化明显,显示 *fse2* 中胚发育的缺陷(图 6-B、C)。同时,发育中期种子胚的横切面也观察到了相同的结果(图 6-D、E)。蛋白结构分析表明,在 *OsGK1* 的 N 端包含线粒体和叶绿体的定位信号,且前人的研究已经证实该蛋白能够在线粒体和质体双定位<sup>[31]</sup>。因此,我们推测 *fse2* 的线粒体中缺乏有功能的 *OsGK1* 蛋白,导致线粒体功能障碍引起胚致死。因此,对突变体种子中线粒体蛋白进行了免疫印迹分析,结果表明 *fse2* 中线粒体 CytC(cytochrome c biogenesis C)和 COX2(cytochrome c oxidase subunit 2)的积累量超过野生型,而 AOX(alternative oxidase)则在突变体中严重过量积累。此外,线粒体 NADH9(NADH dehydrogenase subunit 9)亚基的蛋白水平略有下降(图 6-G)。上述结果表明突变体中线粒体的正常功能受损,这可能是导致胚发育缺陷的原因。

### 2.6 *FSE2* 突变影响了淀粉的合成

由于突变体种子皱缩,具有明显的淀粉合成缺

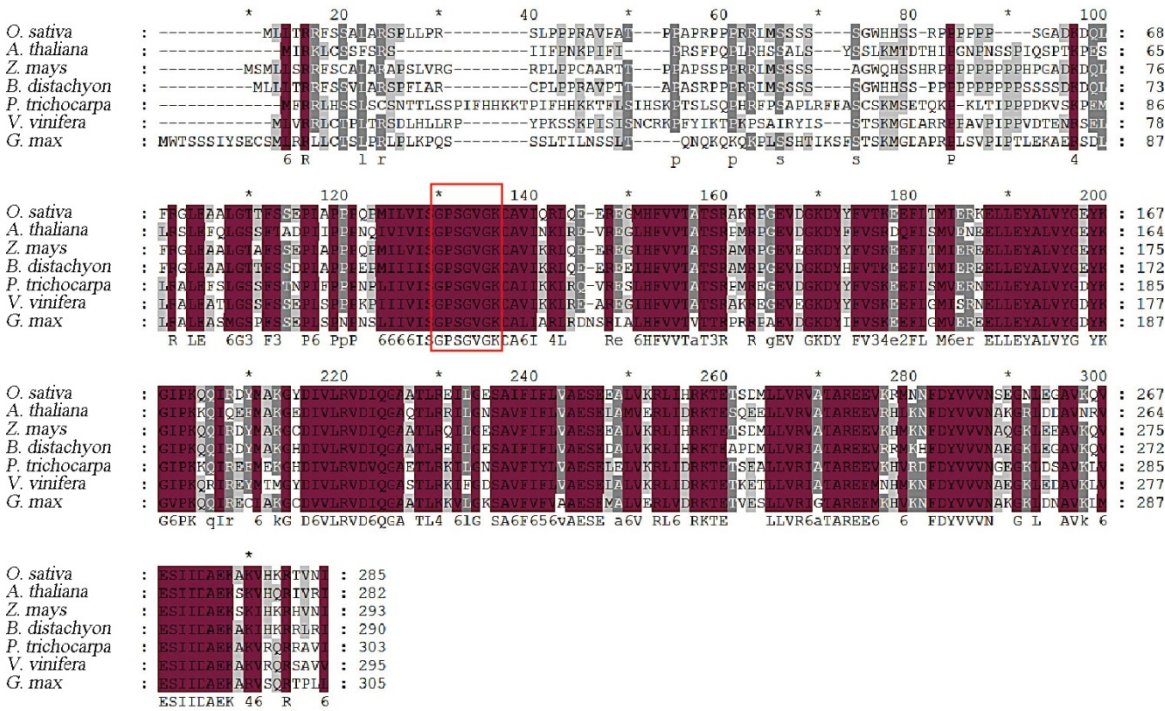


**图 3** *FSE2* 的图位克隆

**Fig. 3.** Map-based cloning of *FSE2*.

A, Map-based cloning of the *FSE2* locus. The *FSE2* locus was mapped to a 106 kb region by markers LJF3-16 and LJF3-17 on the short arm of chromosome 3, which contains 11 predicted open reading frames (ORFs). B, The structure of *Os03g0320900* and the mutation site. Three nucleotide substitutions (red triangles) and a 70 bp deletion (red box) in the sequence are indicated. The genetic background was identified with the primer pair F/R in transgenic lines. C, PCR analysis of the 70 bp deletion in the genomic region of *Os03g0320900*. D, Target peptides and functional domain of FSE2 protein. A total of 68 amino acids in *fse2*, and only the first 20 amino acids in the N-terminus are consistent with the wild type (left of the dotted line). mTP, Mitochondrial transit peptide; cTP, Chloroplast transit peptide; aa, amino acids. E, The relative expression levels of developing seeds (10 days post-pollination) in DJY and *fse2*. F, Positive transgenic seeds with homozygous *fse2* background (CP-1 #3 and CP-2 #7) showed transparent endosperm. CP-1 and CP-2 are two positive transgenic lines with heterozygous background. Bar=1 cm. G-H, PCR analyses of the transparent seeds from CP-1 and CP-2 lines. The upper panels in G and H represent positive transgenic individuals. The lower panels of G and H show the backgrounds of these positive transgenic individuals. The red asterisks indicate the positive transgenic seeds with homozygous *fse2* background. DJY, Dianjingyou 1.

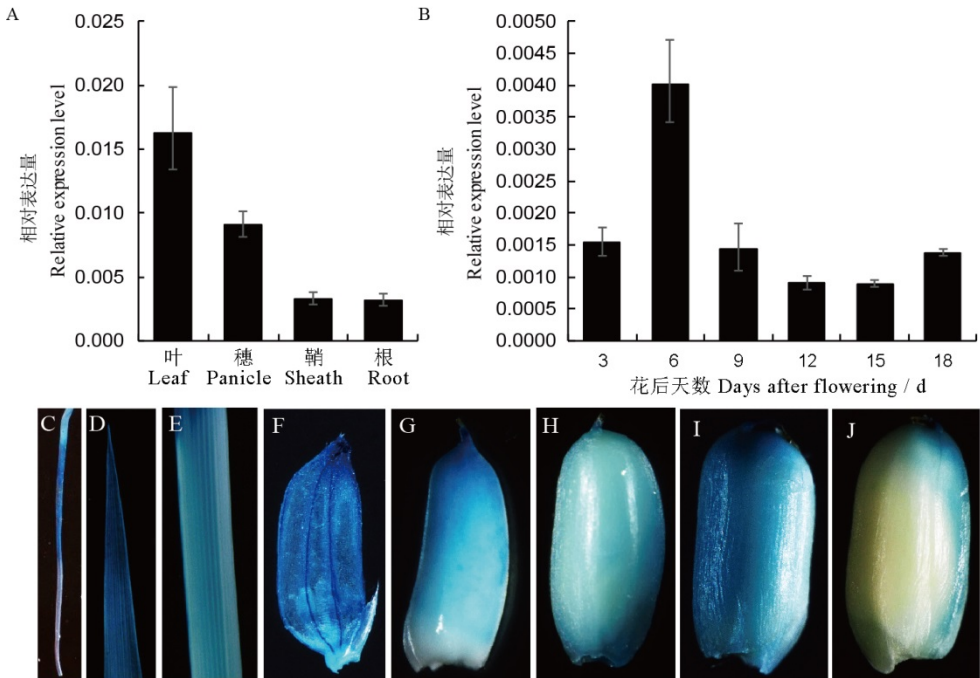




红色方框区域代表鸟苷酸酶催化位点; GenBank 蛋白质登录号: 水稻, XP\_051628708.1; 拟南芥, NP\_566276.1; 玉米, NP\_001149581.1; 二穗短柄草, XP\_003561683.1; 毛果杨, XP\_006380050.1; 葡萄, XP\_002279802.1; 大豆, XP\_003542897.2。  
The red box indicates the catalytic site of GK; GenBank protein accession number are as follows *O. sativa*, XP\_051628708.1; *A. thaliana*, NP\_566276.1; *Z. mays*, NP\_001149581.1; *B. distachyon*, XP\_003561683.1; *P. trichocarpa*, XP\_006380050.1; *V. vinifera*, XP\_002279802.1; *G. max*, XP\_003542897.2.

图 4 FSE2 及其同源蛋白序列比对

Fig. 4. Protein sequence alignment of FSE2 and its homologs.



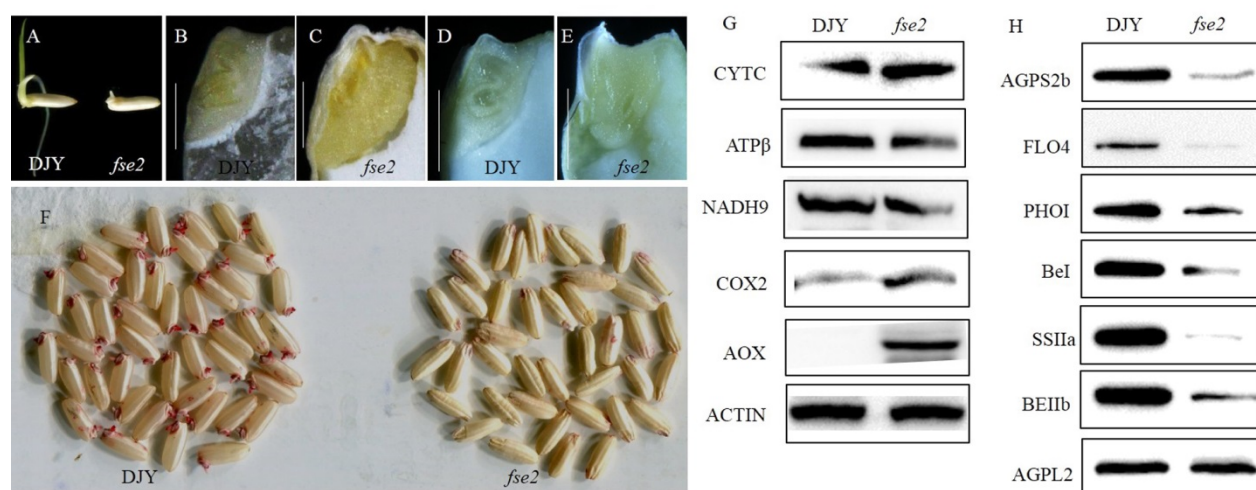
A—FSE2 在叶、穗子、鞘、根中的表达量; B—FSE2 在花后 3、6、9、12、15 和 18 d 的发育胚乳中的表达量; C—F—根(C)、叶(D)、鞘(E)、小花(F)的 GUS 染色; G—J—开花后 6(G)、9(H)、12(I)和 15 d(J)的发育胚乳的 GUS 染色。

A, Expression levels of FSE2 in leaf, panicle, sheath and root of wild type. B, Expression levels of FSE2 in the developing endosperms of 3, 6, 9, 12, 15 and 18 days after flowering. C-F, GUS staining patterns in root (C), leaf (D), sheath (E) and panicle (F); G-J, GUS staining patterns in developing endosperm of 6 (G), 9 (H), 12 (I) and 15 days after flowering (J).

图 5 FSE2 的表达模式

Fig. 5. The expression patterns of FSE2.





A—野生型和突变体 *fse2* 种子萌发后 2 d 的表型; B, C—野生型和突变体 *fse2* 种子吸胀后的胚(30℃下吸胀 9 h), 比例尺为 1 mm; D, E—花后 15 d 野生型和突变体的胚, 比例尺为 1 mm; F—TTC 法测定种子活力; G—Western blotting 检测野生型和突变体成熟种子中的线粒体相关蛋白含量。CytC—细胞色素 c 合成酶 C; COX2—细胞色素 c 氧化酶亚基 2; NADH9—NADH 脱氢酶亚基 9; ATPβ—ATP 合酶  $F_0$  亚基 6; AOX—交替氧化酶; H—Western blotting 检测野生型和突变体成熟种子中淀粉合成相关酶蛋白含量, AGPL2—腺苷葡萄糖焦磷酸化酶大亚基 2; AGPS2b—腺苷葡萄糖焦磷酸化酶小亚基 2b; PPDKB—胞质丙酮酸磷酸双激酶 B; PHO I—质体磷酸化酶 I; BE I—淀粉分支酶 I; BE II b—淀粉分支酶 II b; SS II a—淀粉合酶 II a; G, H 中以 ACTIN 作为内参。DJY—滇梗优 1 号。

A, Comparison of the seed of wild type and *fse2* after germinating for two days. B, C, Embryos of wild type and *fse2* mutant seeds after imbibition (30°C, 9 h). Bars=1 mm. D, E, Developing embryos of 15 DAP seeds of wild type and *fse2*. Bars=1 mm. F, The determination of seed viability by TTC staining. G, Western blotting analysis of mitochondrial proteins in mature seeds of wild type and mutant. CytC, Cytochrome c biogenesis C; COX2, Cytochrome c oxidase subunit 2; NADH9, NADH dehydrogenase subunit 9; ATPβ, ATP synthase  $F_0$  subunit 6; AOX, Alternative oxidase. H, Western blotting analysis of starch synthesis enzymes in mature seeds of wild type and mutant. AGPL2, ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit 2; AGPS2b, ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit 2b; PPDKB, Cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase B; PHO I, Plastid phosphorylase I; BE I, Starch-branching enzyme; BE II b, Starch-branching enzyme II b; SS II a, Starch synthase II a. ACTIN antibody was used as a loading control in G and H. DJY, Dianjingyou 1.

图 6 突变体 *fse2* 的胚和胚乳发育异常

Fig. 6. The abnormal development of embryo and endosperm in the *fse2* mutant.

陷。因此,对胚乳中淀粉合成相关蛋白进行了免疫印迹分析。突变体中胞质 AGPase 亚基(AGPS2b)蛋白水平显著降低,大量研究表明 AGPS2b 的突变会产生粉质皱缩的胚乳<sup>[34-36]</sup>。质体磷酸化酶(PHO I)的蛋白水平也明显下降,PHO I 水平降低会产生不同程度的粉质胚乳,其中包括种子皱缩<sup>[13]</sup>。同时,3 个支链淀粉合成相关基因(*SS IIa*, *BE I*, *BE IIb*)及胞质 PPDKB 的蛋白水平也均显著低于野生型(图 6-H)。这些结果表明胚乳中的淀粉合成发生了明显改变。因此, *FSE2* 突变同样引起了质体(造粉体)的功能缺陷,显著降低了部分淀粉合成相关蛋白的积累,导致淀粉合成剧减,造成种子皱缩表型。

### 3 讨论

淀粉是人类和畜牧业最主要的能量来源之一,同时也是重要的工业原料。水稻种子中积累了大量的淀粉,其主要功能是为种子萌发和幼苗生长提供能量,同时这些数量可观的淀粉也成为人类日常饮

食的主要初级能量来源。水稻中淀粉积累水平直接影响水稻产量,同时种子中直链淀粉和支链淀粉的结构和比例决定了稻米的品质。因此,深入研究水稻淀粉合成的关键基因及调控网络,对种子的生长发育具有重要的生物学意义与育种应用价值。通过物理和化学等诱变方法,人们已经筛选获得了大量水稻胚乳异常突变体,主要有暗胚乳(dull endosperm)、糯性(waxy)、粉质(floury)、皱缩(shrunken)等表型,它们是解析胚乳发育过程中淀粉合成调控路径的优良材料。本研究通过筛选滇梗优 1 号 MNU 突变体库,获得一份粉质皱缩突变体 *fse2*,通过图位克隆及转基因互补证明 *V2/OsGK1* 基因的突变导致了种子的粉质表型。

前人研究表明 *V2/OsGK1* 是叶绿体和线粒体双定位的蛋白,参与叶绿体分化过程中质体向核信号转导的过程。*virescent-2(v2)* 表现出叶片淡绿,在早期的叶片发育过程中, *V2* 的突变并不影响 NEP(Nuclear-encoded plastid RNA polymerase)途径,而是主要影响叶片发育后期的质体基因的表

达, 质体中的*psbA*、*rbcl*、*atpB*的转录水平受到强烈抑制, 从而影响了水稻质体的发育, 进而导致叶色变异<sup>[24,30]</sup>。但是对于OsGK1/V2在水稻种子发育中所扮演的角色还未有报道。

在突变体*fse2*中, 由于蛋白翻译的提前终止, 仅正确翻译 20 个氨基酸, 突变蛋白不仅丧失了鸟苷酸激酶的功能结构域 GuKc, 导致突变体中的鸟苷酸激酶的酶活性的丧失, 而且突变蛋白的叶绿体和线粒体的定位信号也都出现不同程度的缺失, 可能丧失了植株体内的正确定位。因此, *fse2* 极有可能是鸟苷酸激酶功能丧失突变体。线粒体为植物生长代谢提供了主要的能量来源, 线粒体的功能障碍会影响种子的正常生长发育。在本研究中, TTC 染色表明突变体的种子活力大大降低, 并且纯合致死。突变体中 AOX 过量积累, 在野生型中则基本没有积累。AOX 属于末端氧化酶, 催化抗氰呼吸, 说明突变体中交替途径(alternative pathway)增强。线粒体交替呼吸途径不经过线粒体复合体III和复合体IV, 不产生 ATP 或产生 1 个 ATP, 其余能量以热能形式散失, P/O 比为 1, 而细胞色素途径 P/O 比为 2 或 3。细胞色素氧化酶的略微增加可能是由于主呼吸链受到抑制而出现的反馈机制<sup>[37-39]</sup>。线粒体 NADH9 也有所降低, 这些都表明突变体中线粒体功能受损, 影响了胚的发育, 导致种子萌发过程受阻。对胚乳中淀粉合成关键基因的蛋白印迹分析表明, 突变体中 PHOI、BEI、SSIIa、BEIIb(质体定位)的蛋白水平均显著下降, 而 PHOI 和 BEIIb 功能的削弱都能导致籽粒粉质皱缩<sup>[13]</sup>; *AGPS2b* 突变体胚乳严重粉质皱缩<sup>[34-36]</sup>, *fse2* 中 *AGPS2b* 的含量也明显降低。因此, 我们推测由于突变蛋白不能正确靶向到胚乳造粉体以及其酶活性的丧失, 导致了造粉体发育的异常, 产生粉质皱缩的胚乳。

此外, 由于线粒体功能障碍将导致能量供应不足, 进而影响突变体胚和胚乳的发育。如玉米 *smk1* 突变体种子胚致死或者苗期致死、种子皱缩、籽粒变小, *SMK1* 编码一个 PPR(pentatricopeptide repeat) 蛋白, 通过影响线粒体 *nad7* 的正常编辑引起线粒体功能障碍, 使玉米胚和胚乳的发育受到影响。其在水稻中的同源基因 *OsSMK1(LOC\_Os11g10740)* 的突变体(*Os\_smk1-1*)籽粒变小、垩白、种皮皱缩, 种子的生长发育极其缓慢, 甚至产生致死表型<sup>[40]</sup>。因此线粒体的正常功能对种子发育极其重要。

种子胚发育的缺陷大多伴随着胚乳发育的异常, 如玉米 *emp5*、*emp9*、*emp10* 和 *emp11* 突变体中胚和胚乳的发育都有缺陷且纯合种子致死<sup>[41-44]</sup>;

水稻中缺少 OsWDR5a 胚和胚乳发育出现缺陷, 表型为胚胎发生终止, 突变体种子纯合致死, 种子皱缩<sup>[45]</sup>。但在水稻 MPK1 功能丧失突变体中, 成熟种胚变小且纯合致死, 种子胚乳却表现为透明<sup>[46]</sup>。因此, 种子胚和胚乳之间的发育可能不存在必然的联系。Huang 等<sup>[47]</sup>指出 *OsGCD1* 基因突变导致胚胎早期发育模式异常, 早期胚乳中游离核数目减少, 糊粉层分化受到影响, 造成种子纯合致死, 胚乳出现垩白, 且 *OsGCD1* 在胚和胚乳中都有表达, 共同调控二者的早期发育。本研究中 *FSE2/OsGK1* 经网站 (RiceXPro) 预测在胚和胚乳中都有表达, 推测该基因可能同时影响了胚和胚乳的正常发育, 但二者的具体调控机制还需要进一步的实验探究。

综上所述, *FSE2/OsGK1* 的突变导致种子中胚和胚乳的发育都受到了严重的阻碍, 说明鸟苷酸激酶对植物体的生长发育至关重要, 能够调控胚和胚乳的正常生长发育。

谢辞: 感谢农业部长江中下游粳稻生物学与遗传育种重点实验室/长江流域杂交水稻协同创新中心/江苏省现代作物生产中心对本研究给予资助。

#### 参考文献:

- [1] Khush G S. What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol Biol*, 2005, 59(1): 1-6.
- [2] Zhou Z, Robards K, Heliwell S, Blanchard C. Composition and functional properties of rice. *Int J Food Sci Technol*, 2002, 37(8): 849-868.
- [3] Demirkesen I, Sumnu G, Sahin S. Image analysis of gluten-free breads prepared with chestnut and rice flour and baked in different ovens. *Food Bioprocess Technol*, 2013, 6(7): 1749-1758.
- [4] Patindol J, Wang Y J. Fine structures and physicochemical properties of starches from chalky and translucent rice kernels. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(9): 2777-2784.
- [5] Martin C, Smith A M. Starch biosynthesis. *Plant Cell*, 1995, 7(7): 971-985.
- [6] Nakamura Y. Towards a better understanding of the metabolic system for amylopectin biosynthesis in plants: Rice endosperm as a model tissue. *Plant & Cell Physiol*, 2002, 43(7): 718-725.
- [7] Hirose T, Terao T. A comprehensive expression analysis of the starch synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 2004, 220(1): 9-16.
- [8] Ball S G, Morell M K. From bacterial glycogen to starch: Understanding the biogenesis of the plant starch granule. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54(1): 207-233.
- [9] Colleoni C, Dauvillée D, Mouille G, Morell M, Samuel M, Slomiany M C, Lienard L, Wattedled F, d'Hulst C, Ball S. Biochemical characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii*  $\alpha$ -1,4 glucanotransferase supports a direct function in amylopectin biosynthesis.

- Plant Physiol*, 1999, 120(4): 1005-1014.
- [10] Dauvillée D, Chochois V, Steup M, Haebel S, Eckermann N, Ritte G, Ral J P, Colleoni C, Hicks G, Wattedled F O, Deschamps P, d'Hulst C O, Liénard L, Cournac L O, Putaux J L O, Dupeyre D, Ball S G O. Plastidial phosphorylase is required for normal starch synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 2006, 48(2): 274-285.
  - [11] Dong X, Zhang D, Liu J, Liu Q Q, Liu H, Tian L, Jiang L, Qu le Q. Plastidial disproportionating enzyme participates in starch synthesis in rice endosperm by transferring maltooligosyl groups from amylose and amylopectin to amylopectin. *Plant Physiol*, 2015, 169(4): 2496-2512.
  - [12] Schupp N, Ziegler P. The relation of starch phosphorylases to starch metabolism in wheat. *Plant & Cell Physiol*, 2004, 45(10): 1471-1484.
  - [13] Satoh H, Shibahara K, Tokunaga T, Nishi A, Tasaki M, Hwang S K, Okita T W, Kaneko N, Fujita N, Yoshida M, Hosaka Y, Sato A, Utsumi Y, Ohdan T, Nakamura Y. Mutation of the plastidial  $\alpha$ -glucan phosphorylase gene in rice affects the synthesis and structure of starch in the endosperm. *Plant Cell*, 2008, 20(7): 1833-1849.
  - [14] Pfeilmeier S, Saur I M, Rathjen J P, Zipfel C, Malone J G. High levels of cyclic-di-GMP in plant-associated *Pseudomonas* correlate with evasion of plant immunity. *Mol Plant Pathol*, 2016, 17(4): 521-531.
  - [15] Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, Boldt R. Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 805-836.
  - [16] Green R, Noller H F. Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66: 679-716.
  - [17] Sumita K, Lo Y H, Takeuchi K, Senda M, Kofuj S, Ikeda Y, Terakawa J, Sasaki M, Yoshino H, Majd N, Zheng Y X, Kahoud E R, Yokota T, Emerling B M, Asara J M, Ishida T, Locasale J W, Daikoku T, Anastasiou D, Senda T, Sasaki A T. The lipid kinase PI5P4K $\beta$  is an intracellular GTP sensor for metabolism and tumorigenesis. *Mol Cell*, 2016, 61(2): 187-198.
  - [18] Caro L G, Palade G E. Protein synthesis, storage, and discharge in the pancreatic exocrine cell. An autoradiographic study. *J Cell Biol*, 1946, 20(3): 473-495.
  - [19] Havel P J. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: Leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol*, 2002, 13(1): 51-59.
  - [20] Stasolla C, Katahira R, Thorpe T A, Ashihara H. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J Plant Physiol*, 2003, 160(11): 1271-1295.
  - [21] Gaidarov I O, Suslov O N, Abdulaev N G. Enzymes of the cyclic GMP metabolism in *Bovine retina*: I. Cloning and expression of the gene for guanylate kinase. *FEBS Lett*, 1993, 335(1): 81-84.
  - [22] Brady W A, Kokoris M S, Fitzgibbon M, Black M E. Cloning, characterization, and modeling of mouse and human guanylate kinases. *J Biol Chem*, 1996, 271(28): 16734-16740.
  - [23] Stolworthy T S, Krabbenhoft E, Black M E. A novel *Escherichia coli* strain allows functional analysis of guanylate kinase drug resistance and sensitivity. *Anal Biochem*, 2003, 322(1): 40-47.
  - [24] Beck B J, Huelsmeyer M, Paul S, Downs D M. A mutation in the essential gene *gmk* (encoding guanylate kinase) generates a requirement for adenine at low temperature in *Salmonella enteric*. *J Bacteriol*, 2003, 185(22): 6732-6735.
  - [25] Gentry D, Bengra C, Ikehara K, Cashel M. Guanylate kinase of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem*, 1993, 268(19): 14316-14321.
  - [26] Konrad M. Cloning and expression of the essential gene for guanylate kinase from yeast. *J Biol Chem*, 1992, 267(36): 25652-25655.
  - [27] Ray B D, Jarori G K, Raghunathan V, Yan H, Rao B D N. Conformations of nucleotides bound to wild type and Y78 F mutant yeast guanylate kinase: Proton two-dimensional transferred NOESY measurements. *Biochemistry*, 2005, 44(42): 13762-13770.
  - [28] Kumar V. Cloning and sequence analysis of lily and tobacco guanylate kinases. *Mol Biol Rep*, 2000, 27(1): 45-49.
  - [29] Kumar V, Spangenberg O, Konrad M. Cloning of the guanylate kinase homologues AGK-1 and AGK-2 from *Arabidopsis thaliana* and characterization of AGK-1. *Eur J Biochem*, 2000, 267(2): 606-615.
  - [30] Sugimoto H, Kusumi K, Tozawa Y, Yazaki H, Kishimoto N, Kikuchi S, Iba K. The *virescent-2* mutation inhibits translation of plastid transcripts for the plastid genetic system at an early stage of chloroplast differentiation. *Plant & Cell Physiol*, 2004, 45(8): 985-996.
  - [31] Sugimoto H, Kusumi K, Noguchi K, Yano M, Yoshimura A, Iba K. The rice nuclear gene, *VIRESCENT 2*, is essential for chloroplast development and encodes a novel type of guanylate kinase targeted to plastids and mitochondria. *Plant J*, 2007, 52(3): 512-527.
  - [32] Kang H G, Park S, Matsuoka M, An G. White-core endosperm *floury endosperm-4* in rice is generated by knockout mutations in the C-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (OsPPDKB). *Plant J*, 2005, 42(6): 901-911.
  - [33] Peng C, Wang Y, Liu F, Ren Y, Zhou K, Lv J, Zheng M, Zhao M, Zhao S, Zhang L, Wang C, Jiang L, Zhang X, Guo X, Wan J M. *FLOURY ENDOSPERM 6* encodes a CBM48 domain-containing protein involved in compound granule formation and starch synthesis in rice endosperm. *Plant J*, 2014, 77(6): 917-930.
  - [34] Nishi A, Nakamura Y, Tanaka N, Satoh H. Biochemical and genetic analysis of the effects of *Amylose-Extender* mutation in rice endosperm. *Plant Physiol*, 2001, 127(2): 459-472.
  - [35] Ohdan T, Francisco P B Jr, Sawada T, Hirose T, Saltoh H, Nakamura Y. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *J Exp Bot*, 2005, 56(422): 3229-3244.
  - [36] Akihiro T, Mizuno K, Fujimura T. Gene expression of ADP-glucose pyrophosphorylase and starch contents in rice cultured cells are cooperatively regulated by sucrose and ABA. *Plant & Cell Physiol*, 2005, 46(6): 937-946.
  - [37] Finnegan P M, Soole K L, Umbach A L. Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants. //Day D A, Millar A H, Whelan J. *Plant Mitochondria: From Genome to Function*. The Netherlands: Springer, 2004: 163-230.

- [38] Selinshi J, Hartmann A, Kordes A, Deckers-Hebestreit G, Whelan J, Scheibe R. Analysis of post-translational activation of alternative oxidase isoforms. *Plant Physiol*, 2017, 174(4): 2113-2127.
- [39] Zhang Y F, Suzuki M, Sun F, Tan B C. The mitochondrion-targeted PENTATRICOPEPTIDE REPEAT78 protein is required for *nad5* mature mRNA stability and seed development in maize. *Mol Plant*, 2017, 10(10): 1321-1333
- [40] Li X J, Zhang Y F, Hou M M, Sun F, Shen Y, Xiu Z H, Wang X, Chen Z L, Sun S S, Small I, Tan B C. *Small kernel 1* encodes a pentatricopeptide repeat protein required for mitochondrial *nad7* transcript editing and seed development in maize (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). *Plant J*, 2014, 79(5): 797-809.
- [41] Liu Y J, Xiu Z H, Meeley R, Tan B C. *Empty Pericarp5* encodes a pentatricopeptide repeat protein that is required for mitochondrial RNA editing and seed development in maize. *Plant Cell*, 2013, 25(3): 868-883.
- [42] Yang Y Z, Ding S, Wang H C, Sun F, Huang W L, Song S, Xu C, Tan B C. The pentatricopeptide repeat protein EMP9 is required for mitochondrial *ccmB* and *rps4* transcript editing, mitochondrial complex biogenesis and seed development in maize. *New Phytol*, 2017, 214(2): 782-795.
- [43] Cai M J, Li S Z, Sun F, Sun Q, Zhao H, Ren X, Zhao Y, Tan B C, Zhang Z, Qiu F. *Emp10* encodes a mitochondrial PPR protein that affects the *cis*-splicing of *nad2* intron 1 and seed development in maize. *Plant J*, 2017, 91(1): 132-144.
- [44] Ren X M, Pan Z Y, Zhao H L, Zhao J L, Cai M J, Li J, Zhang Z X, Qiu F Z. EMPTY PERICARP11 serves as a factor for splicing of mitochondrial *nad1* intron and is required to ensure proper seed development in maize. *J Exp Bot*, 2017, 68(16): 4571-4581.
- [45] Jiang P F, Wang S L, Jiang H Y, Cheng B J, Wu K Q, Ding Y. The COMPASS-like complex promotes flowering and panicle branching in rice. *Plant Physiol*, 176(4): 01749.2017. DOI:10.1104/pp.17.01749.
- [46] Minkenberg B, Xie K, Yang Y N. Discovery of rice essential genes by characterizing a CRISPR-edited mutation of closely related rice MAP kinase genes. *Plant J*, 2017, 89(3): 636-648.
- [47] Huang X, Peng X, Sun M X. OsGCD1 is essential for rice fertility and required for embryo dorsal-ventral pattern formation and endosperm development. *New Phytol*, 2017, 215(9): 1039-1058.