



## 水稻早衰突变体LS-es1的基因定位及候选基因分析

周纯<sup>1</sup>, 焦然<sup>1</sup>, 胡萍<sup>2</sup>, 林晗<sup>1</sup>, 胡娟<sup>1</sup>, 徐娜<sup>1</sup>, 吴先美<sup>2</sup>, 饶玉春<sup>1\*</sup>, 王跃星<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004; <sup>2</sup>中国水稻研究所水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006

**摘要** 衰老是植物发育末期自主发生且不可逆的适应性反应, 叶片早衰相关分子机制研究对水稻(*Oryza sativa*)遗传改良以及抗衰老品种培育有重要意义。LS-es1是通过EMS诱变粳稻品种TP309获得的稳定遗传的早衰突变体。对LS-es1及其野生型的表型观察和生理生化分析表明, LS-es1叶片中积累了大量活性氧且细胞死亡更多, 同时LS-es1与产量相关的农艺性状均显著下降, 这也验证了LS-es1早衰的特征。对LS-es1及其野生型幼苗进行外源激素处理, 结果表明LS-es1对水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)和茉莉酸甲酯(MeJA)更敏感。用图位克隆方法将LS-es1基因定位在水稻第7号染色体长臂46.2 kb区间内, 该区间共包括8个开放阅读框(ORF)。对该区间内的基因进行生物信息学分析, 结果发现Os07g0275300和Os07g0276000两个候选功能基因与早衰途径相关, 并且这2个基因的表达量在野生型和突变体中差异较大。研究结果为进一步克隆LS-es1基因并深入研究其生物学功能奠定了基础。

**关键词** 水稻, 早衰, 生理特征, 精细定位, 候选基因

周纯, 焦然, 胡萍, 林晗, 胡娟, 徐娜, 吴先美, 饶玉春, 王跃星 (2019). 水稻早衰突变体LS-es1的基因定位及候选基因分析. 植物学报 54, 606–619.

衰老是植物发育末期自主发生且不可逆的适应性反应机制, 也是植物发育过程中的必经阶段。这一阶段植物细胞发生程序性死亡(programmed cell death, PCD), 器官逐渐退化, 导致植株整体的生物学功能和生命活动衰退。植物衰老的发生是受多种因素共同调控的复杂过程(Yoshida, 2003; Gan and Hörttensteiner, 2013; 徐娜等, 2017), 主要包括内部(遗传、基因调控和激素水平)和外部因素(温度、光照、水分和病虫害等)。水稻(*Oryza sativa*)叶片是植株进行光合作用的主要器官和重要场所, 为植株提供生长发育需要的大部分能量和有机物质, 而叶片衰老会使植株的光合作用减弱, 从而使供给植株的能量和有机物不足, 进而导致结实率下降、千粒重降低, 最终影响水稻产量和品质(Navabpour et al., 2003)。衰老通常涉及叶绿体的发育和降解、激素水平的变化和自由基代谢等途径(Rao et al., 2015), 影响叶片衰老的诸多因素组成复杂的调控网络起作用。水稻早衰相关基因的克隆是研究水稻早衰机制的基础, 也是构建水稻早衰调控网络的依据, 对水稻遗传育种具有重要意义。

随着水稻基因组测序的完成和分子生物技术的完善和发展, 前人对水稻衰老的调控机制进行了深入研究, 通过辐射诱变、化学诱变、转座子插入以及T-DNA插入等技术对水稻种子进行处理, 得到大量水稻叶片衰老相关突变体, 并进一步利用这些突变体定位或克隆了叶片衰老相关基因(senescence-associated genes, SAGs)。综合前人的研究, 衰老相关基因主要包括3种: 第1种是下调基因, 目前发现的大多数SAGs都属于下调基因, 此类基因的mRNA水平在衰老的叶片中显著降低, 且其表达受到抑制; 第2种为I型SAG, 这类基因具有衰老特异性, 仅在衰老时期表达; 第3种基因为II型SAG, 这类基因的转录水平在衰老启动前后会大幅度升高(Gan and Amasino, 1997)。根据功能、代谢途径和信号通路, 目前叶片衰老相关基因又可分为叶绿体发育和叶绿素降解相关基因(如SGR、OsPAO、Ygl1、OsLMS、Ospse1、PSL2、SUR1、NYC1、NYC3、NYC4、RLS1、Osh69和OSRCCR1)(张丽霞, 2000; Lee et al., 2004; Jiang et al., 2007; Kusaba et al., 2007; Morita et al.,

收稿日期: 2019-03-20; 接受日期: 2019-06-20

基金项目: 国家重大科技专项(No.2016ZX08009003-003-008)、浙江省粮食新品种选育专项(No.2016C02050-1)、浙江省科协育才工程(No.2017YCGC008)和水稻生物学国家重点实验室开放项目(No.160106)

\* 通讯作者。E-mail: ryc@zjnu.cn; wangyuxing@caas.cn

2010; Tang et al., 2011; Jiao et al., 2012; Undan et al., 2012; 孙玉莹, 2013; Wu et al., 2013; Yamatani et al., 2013); 蛋白质合成、降解及转运途径相关基因(如 *GnT1*、*OsSAG12-1* 和 *OsSWEET5*) (Fanata et al., 2013; Singh et al., 2013; Zhou et al., 2014); 激素途径相关基因(如 *OsDos*、*OsSAMS1* 和 *OsHox33*) (Kong et al., 2006; Chen et al., 2013b; Luan et al., 2013); PCD 途径相关基因(如 *SPL28*、*SPL33* 和 *OsCATC*) (Qiao et al., 2010; Lin et al., 2012; Wang et al., 2017); 以及其它途径相关基因(如 *psd128*、*RLS3*、*Os2* 和 *YGL1*) (Ansari et al., 2005; Wu et al., 2007; Lin et al., 2016; Huang et al., 2016)。水稻第7号染色体上已定位和克隆的早衰相关基因有 *LC7*、*LLB* 和 *OsSIK2*。其中, *LC7* 编码一个依赖于铁氧还蛋白的谷氨酸合酶(*Fd-GOGAT1*), 其突变体叶片叶绿体体积减小、数目减少, 且叶绿素合成途径有缺陷, 导致植株的光合作用效率低下。在表型上, 该突变体在四叶期叶片变黄并具有褐色条纹, 随后扩展到整个叶片表面(Chen et al., 2016)。*LLB* 编码一个亮氨酸羧基甲基转移酶, 其突变体相比野生型出现叶色变淡、类病斑、叶倾角增大及叶片叶绿素含量降低等表型。该基因主要在叶绿体中发挥功能, 可以直接或间接抑制茉莉酸和油菜素内酯介导的反应, 进而影响水稻的防卫反应和生长应答(Tamiru et al., 2016); *OsSIK2* 是一个依赖  $Mn^{2+}$  的蛋白激酶, *OsSIK2* 可增强水稻非生物胁迫抗性并延缓黑暗诱导的叶片衰老, 通过整合发育过程中的胁迫信号使植物在不利环境条件下进行适应性生长。*OsSIK2* 的表达受盐、干旱、冷和 ABA 诱导, 且在各组织中都有表达, 但在叶片和叶鞘中表达较强(Chen et al., 2013a)。通过对衰老相关基因进行研究, 人们对植物衰老的调控途径和分子机理已有初步了解。McCabe等(2001)将CK合成的限速酶异戊烯基转移酶(*isopentenyl transferase*, IPT)转入水稻, 其后代植株的衰老得到延缓, 结实率和千粒重也有改善, 但株高显著降低。此外, 衰老过程中还存在一系列生理生化变化, 叶片的衰老往往不是由单个基因调控, 而是由多个基因共同作用, 并且很多衰老相关基因也会受细胞内转录因子以及环境因素的调节。

本研究中, *LS-es1* 是经 EMS 诱变 TP309 获得的早衰突变体。表型观察表明, 该突变体与已克隆的早衰相关基因调控的表型有很大差异, 而且在我们已经确

定的 QTL 区间内尚未有早衰相关基因的报道, 故推测 *LS-es1* 是一个新的早衰相关基因。通过对突变体进行遗传分析、生理指标测定以及基因定位, 发现精细定位的候选区间内共有 8 个 ORFs, 对该区间内的候选基因进行分析, 不仅为该基因的克隆和功能分析奠定基础, 而且有助于解析水稻叶片的衰老相关机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

利用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变粳稻(*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*)品种 TP309, 进一步筛选得到早衰突变体 *LS-es1* (刘翔, 2014), 多代自交后性状稳定遗传。将突变体 *LS-es1* 与常规籼稻(*O. sativa* L. subsp. *indica*) TN1(台农1号)、浙辐802进行杂交, 鉴定  $F_1$  代和  $F_2$  代的表型及分离比, 进行遗传分析。同时, 在  $F_2$  群体中选择早衰表型的隐性植株提取 DNA, 然后进行基因定位。2016–2019 年, 将材料种植于浙江省金华市浙江师范大学试验田、中国水稻研究所杭州试验基地以及海南陵水试验基地, 单株种植, 大田常规管理。在成熟期随机选取突变体与野生型植株各 10 株, 对分蘖数、株高和结实率等农艺性状进行统计。

### 1.2 细胞组织化学分析

#### 1.2.1 $H_2O_2$ 积累检测

使用二氨基联苯胺(diamino benzidine, DAB)对水稻叶片进行染色, 能直观地反映出叶片中  $H_2O_2$  的积累程度。DAB 染色主要参考 Kariola 等(2005)的方法, 实验前取 0.1 g DAB 染料, 用 100 mL 磷酸缓冲液溶解, 配制成  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  DAB 染液。在抽穗期取 *LS-es1* 以及 TP309 倒二叶叶片完全浸没在配制好的 DAB 染液中。抽真空, 并在真空状态维持 5 分钟后缓慢释放, 重复此操作 3 次后黑暗处理过夜(10 小时), 用蒸馏水将样品冲洗干净后置于 95% 乙醇中, 加热脱色至叶绿素脱净后拍照。

#### 1.2.2 氧自由基含量检测

使用氯化硝基四氮唑蓝液(nitrotetrazolium blue chloride, NBT)对水稻叶片进行染色可以反映细胞内的氧自由基含量。NBT 染色主要参考 Mahalingam 等(2006)的方法, 实验前取 0.05 g NBT 染料, 用 100 mL 磷酸缓冲液进行溶解, 配制成  $0.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  NBT 染

液。在抽穗期取LS-es1和TP309倒二叶叶片完全浸没在配制好的NBT染液中。抽真空,并在真空状态维持5分钟后缓慢释放,重复此操作3次后黑暗处理过夜(10小时),用蒸馏水将样品冲洗干净后置于95%乙醇中,加热脱色至叶绿素脱净后拍照。

### 1.2.3 细胞凋亡检测

利用TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)方法检测细胞凋亡。操作步骤主要参考Huang等(2007)的方法,取样前先配制FAA固定液,在2 mL离心管中加入固定液。在LS-es1叶片出现早衰表型时期,取衰老的叶片组织,剪成块状放入FAA固定液2/3位置固定,抽真空直至样本沉至底部,用封口膜封口并于4°C冰箱保存,然后使用TUNEL凋亡检测试剂盒(Roche, Cat No.1684817)检测样品。

### 1.3 光合速率及叶绿素相对含量测定

在植株抽穗期,于晴天上午9:30–11:30,在大田中随机选取LS-es1和野生型TP309植株,利用LI-6400光合测定仪测定植株剑叶中上部分的光合速率(Schippers et al., 2015)。光合测定仪参数设置:红蓝光源;开放气路;光量子密度 $1\ 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ;流速 $500\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ 。共测定6次,取平均值,用t检验分析野生型和突变体光合速率的差异显著性。使用MINOLTA公司的SPAD-502 PLUS型手持便携式叶绿素测定仪测定水稻叶片的叶绿素相对含量(SPAD值)。在水稻分蘖盛期,随机选取长势一致的突变体LS-es1和野生型TP309植株,每株测3片剑叶,测10个单株作为重复,取平均值分析野生型和突变体叶绿素相对含量的差异显著性。

### 1.4 衰老相关指标与酶活性测定

衰老相关生理指标与酶活性的测定包括丙二醛(malondialdehyde, MDA)和过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )的含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)活性。取抽穗期野生型和突变体的剑叶,采用南京建成科技有限公司试剂盒:丙二醛试剂盒(TBA法, Cat No.A003-1-2)、过氧化氢试剂盒(比色法, Cat No.A064-1-1)、超氧化物歧化酶试剂盒(WST-1法, Cat No.A001-3-2)、过氧化氢酶试剂盒(比色法, Cat

No.A007-1-1)、过氧化物酶试剂盒(可见光法, Cat No.A084-3-1),按使用说明书进行测定。

## 1.5 水稻叶片及籽粒电镜观察

### 1.5.1 叶片透射电镜观察

随机选取始穗期野生型TP309和突变体LS-es1剑叶相对应部位的新鲜叶片,剪成 $1\ \text{mm}\times 2\ \text{mm}$ 的块状并迅速置于2.5%戊二醛固定液中,抽真空约1小时使样品下沉。参照冷语佳(2013)的方法,4°C固定24小时后进行漂洗、脱水和渗透包埋,然后切片和醋酸铀染色,制作好的样品在Hitachi H-7650型透射电镜下观察和拍照(在浙江大学电镜中心进行)。

### 1.5.2 叶片及籽粒扫描电镜观察

随机选取始穗期野生型TP309和突变体LS-es1剑叶相对应部位的新鲜叶片,剪成 $2\ \text{mm}\times 5\ \text{mm}$ 的小块并迅速置于2.5%戊二醛固定液中,抽真空约1小时使样品下沉。参照冷雨佳(2013)的方法,4°C固定24小时,漂洗、脱水、临界点干燥镀膜和喷金处理,制作好的样品在Hitachi TM-1000型扫描电镜下观察。在成熟期取野生型TP309和突变体LS-es1种子,在Hitachi TM-1000型扫描电镜下观察,并拍照。上述工作在浙江大学电镜中心进行。

## 1.6 幼苗外源激素处理

提前配制含有外源激素的1/2MS培养基(外源激素浓度梯度分别为:0、0.5和 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸(SA);0、1和 $1.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 脱落酸(ABA);0、2.5和 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 茉莉酸甲酯(MeJA)。选取TP309和LS-es1饱满成熟种子,机器去壳后用70%乙醇浸泡消毒2分钟,然后用30%次氯酸钠溶液浸泡,在摇床中震荡消毒30分钟后接种于1/2MS培养基上,在人工气候培养箱中培养7天后统计根长和株高并拍照(Leng et al., 2017)。培养箱设置参数:光周期为14小时光照/10小时黑暗,温度28°C。

## 1.7 遗传分析

以LS-es1为母本、籼稻台农1号为父本进行杂交,获得 $F_1$ 代, $F_1$ 代自交获得 $F_2$ 分离群体。观察 $F_2$ 群体中的分离情况并对群体中有早衰表型的突变体和正常单株进行统计。此外,以LS-es1为母本,籼稻浙辐802

为父本进行杂交, 对 $F_1$ 、 $F_2$ 代进行表型观察和分离统计, 利用SAS软件进行卡方检验。

## 1.8 基因定位

以*LS-es1*为母本, 与籼稻台农1号进行杂交得到 $F_1$ 代,  $F_1$ 代自交得到 $F_2$ 代定位群体。在群体中取有早衰性状的669个隐性单株叶片, 用CTAB法提取DNA (陈昆松等, 2004)。使用本实验室保存的、分布在水稻全基因组上的268对SSR标记, 在*LS-es1*、籼稻品种台农1号和 $F_1$ 中进行多态性筛选。共获得在父本和母本间有多态性的127对标记, 然后随机选取21个隐性单株DNA混合构建突变体基因混池, 利用具有多态性的分子标记对该混池进行基因型分析并筛选出连锁标记, 最后用筛选到的连锁标记对随机的93株隐性单株DNA进行分析, 完成目的基因初定位。从Gramene网站(<http://www.gramene.org>)下载籼稻在控制突变性状基因对应染色体上的DNA序列, 通过BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)搜索粳稻日本晴序列数据库(<http://www.rice.genomics.org.cn>)。根据初定位区间, 将下载的籼稻DNA序列与粳稻日本晴序列比对, 寻找该区段内DNA序列的差异, 运用Primer3.0在线设计引物网站(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)设计出候选的STS标记引物(表1), 用设计的并且呈现多态性的STS标记对669个隐性单株DNA进行分析, 对目的基因进行精细定位, 构建目的基因所在位置的精细连锁图谱。PCR扩增使用2×*Taq* PCR Mix酶(杭州擎科生物技术有限公司, Cat No. TSE030), PCR反应体系: 5 μL 2×*Taq* PCR Mix, 2 μL DNA模板、1 μL引物( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , F+R), 3 μL PCR  $\text{H}_2\text{O}$ 。PCR反应程序如下: 94°C3分钟; 94°C30秒, 55°C30秒, 72°C30秒, 35个循环; 72°C10分钟。PCR

产物用5%琼脂糖凝胶电泳检测。候选基因的功能分析主要参考水稻基因组数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)。

## 1.9 基因表达量分析

取抽穗期TP309和*LS-es1*的新鲜叶片, 使用RNAprep Pure Plant Kit (Cat No.DP441)提取RNA, 按照说明书操作。将提取的RNA用ReverTra-Plus-反转录试剂盒(Cat No.FSQ-301)进行反转录后备用。采用实时荧光定量PCR (qRT-PCR)对衰老相关基因表达量进行检测, 以基因*OsActin*作为内参(GenBank登录号: NM\_001058705)。反应体系为: 2 μL cDNA模板、10 μL 2×SYBR qPCR mix、正反引物( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各0.8 μL、ddH<sub>2</sub>O补足至20 μL。反应程序为95°C30秒; 95°C5秒, 55°C10秒; 72°C5秒, 40个循环。每个反应做3次重复, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算早衰相关基因的相对表达量(Livak and Schmittgen, 2001)。实时PCR仪器为德国耶拿荧光定量基因扩增仪qTOWER3G。采用PSS19.0软件和Excel分析数据, 采用t测验进行差异显著性分析。qRT-PCR所用引物见表1。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *LS-es1*表型分析

粳稻材料TP309经EMS诱变处理得到突变体*LS-es1*, 从苗期到分蘖初期, *LS-es1*与TP309相比没有明显差异(图1A); 分蘖盛期, *LS-es1*叶鞘首先出现黄化衰老的表型(图1B); 至抽穗期, 衰老范围逐渐扩大; 成熟期后*LS-es1*早衰明显(图1C)。突变体早衰导致植株的光合效率降低, 进而影响突变体的生长发育, 同时还伴随着株高的降低。通过对*LS-es1*和TP309的农艺性

表1 基因定位及qRT-PCR所用引物序列

Table 1 Primers used for gene mapping and qRT-PCR

Primer name	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
InDel-1	AGCGGGGATGGAGATGATG	CTTGCCTCACACCAGATCTG
InDel-2	GGCGCCTTTGTTCCATAGTT	GAGGAGCCAGTGGTAGCAG
InDel-3	CGTTTTTACAACCAATTTTGAA	CCATCTTCTACCTCCGGACA
InDel-4	GATTGGATTGGTTGCTCGCT	AACAGCGAATCGAGATGCAC
InDel-5	TTACTGCTGCCGTTGTTTCA	TTGTGGACCTCCAGGATCAG
SGR	AGGGGTGGTACAACAAGCTG	GCTCCTTGCGGAAGATGTAG
<i>Osh36</i>	GCACGGAGGCGAACGA	TTGAGCGGTAGCACCCATT
<i>OsI85</i>	GAGCAACGGCGTGGAGA	GCGGCGGTAGAGGAGATG
<i>OsNAP</i>	CAAGAAGCCGAACGGTTC	GTTAGAGTGAGCAGCAT
<i>Actin</i>	CAGGCCGTCTCTCTGTGA	AAGGATAGCATGGGGGAGAG

状(表2)进行考察,发现 $LS-es1$ 穗长、株高、一次枝梗数、每穗粒数以及千粒重与野生型相比均显著下降,分别下降了33.91% (图2A)、5.96% (图2B)、24.59% (图2C)、25.94% (表2)和23.90% (图2D)。这表明, $LS-es1$ 的早衰会严重降低植株产量和籽粒质量。

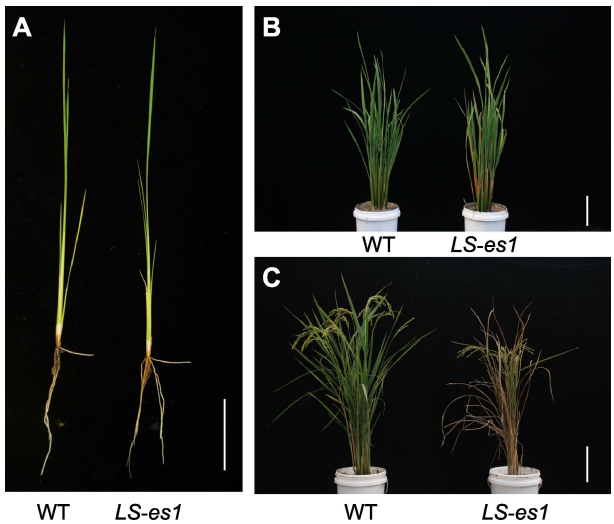


图1 水稻野生型(WT) TP309和突变体 $LS-es1$ 的表型特征 (A) 苗期表型; (B) 分蘖期表型; (C) 成熟期表型。Bars=6 cm

Figure 1 Phenotypes of rice wild type (WT) TP309 and mutant  $LS-es1$  (A) Phenotypes at seedling stage; (B) Phenotypes at tillering stage; (C) Phenotypes at maturity stage. Bars=6 cm

2.2 细胞组织化学分析

叶片衰老会伴随着细胞死亡,导致叶肉细胞内积累大量的活性氧(ROS)。 $H_2O_2$ 与DAB反应生成棕红色的多聚产物,可以直观地表征细胞内 $H_2O_2$ 水平。与野生型相比, $LS-es1$ 叶片被染成棕红色(图3A),表明突变体叶片细胞中的 $H_2O_2$ 含量更高。在氧自由基的作用下,NBT被还原生成不溶于水的蓝色二甲胍,因此NBT染色是细胞内氧自由基含量的重要指标之一。与野生型相比, $LS-es1$ 叶片的组织细胞部分被染成蓝色(图3B),表明突变体叶片细胞中有大量氧自由基。细胞凋亡伴随着染色体DNA的断裂,TUNEL实验是利用断裂的DNA暴露出来的3'-OH末端,在酶的作用下与相关物质聚合成衍生物标记连接到DNA末端,从而进行凋亡细胞检测。与野生型相比,突变体叶片组织

细胞中荧光较强(图3C-F),表明 $LS-es1$ 叶片中存在大量染色体DNA断裂,进而说明细胞死亡在突变体中大量发生。上述研究结果表明, $LS-es1$ 叶片中细胞大量死亡并且积累了较多的氧自由基和 $H_2O_2$ ,这些都是植株早衰的特征。

表2 水稻野生型TP309和突变体 $LS-es1$ 的农艺性状比较

Table 2 The comparison of agronomic traits between rice wild type TP309 and mutant  $LS-es1$

Agronomic traits	TP309	$LS-es1$
Effective number of panicle	13.40±5.41	8.20±0.84
Flag leaf length (cm)	39.46±8.16	35.68±4.08
Secondary branch number	29.80±6.87	18.00±4.47*
Tiller number	16.40±5.46	11.40±2.70
Filled grain number per panicle	169.60±8.08	125.60±24.83**
Seed-setting rate (%)	81.01±6.98	64.76±17.23

数据为平均值±标准差( $n=10$ )。\*和\*\*分别表示TP309与 $LS-es1$ 在0.05和0.01水平上差异显著。

Data are means±SD ( $n=10$ ). \* and \*\* indicate significant differences between TP309 and  $LS-es1$  at 0.05 and 0.01 level, respectively.

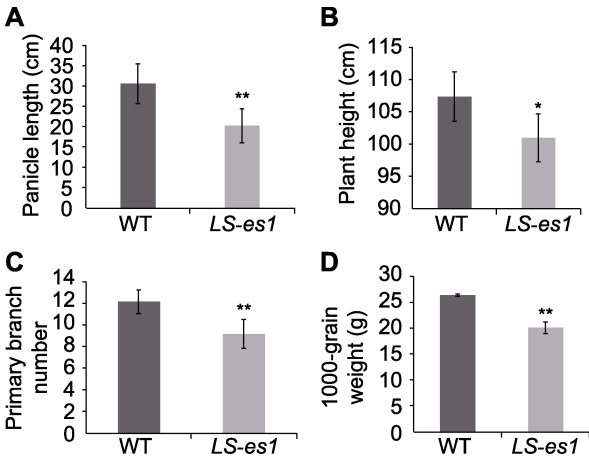
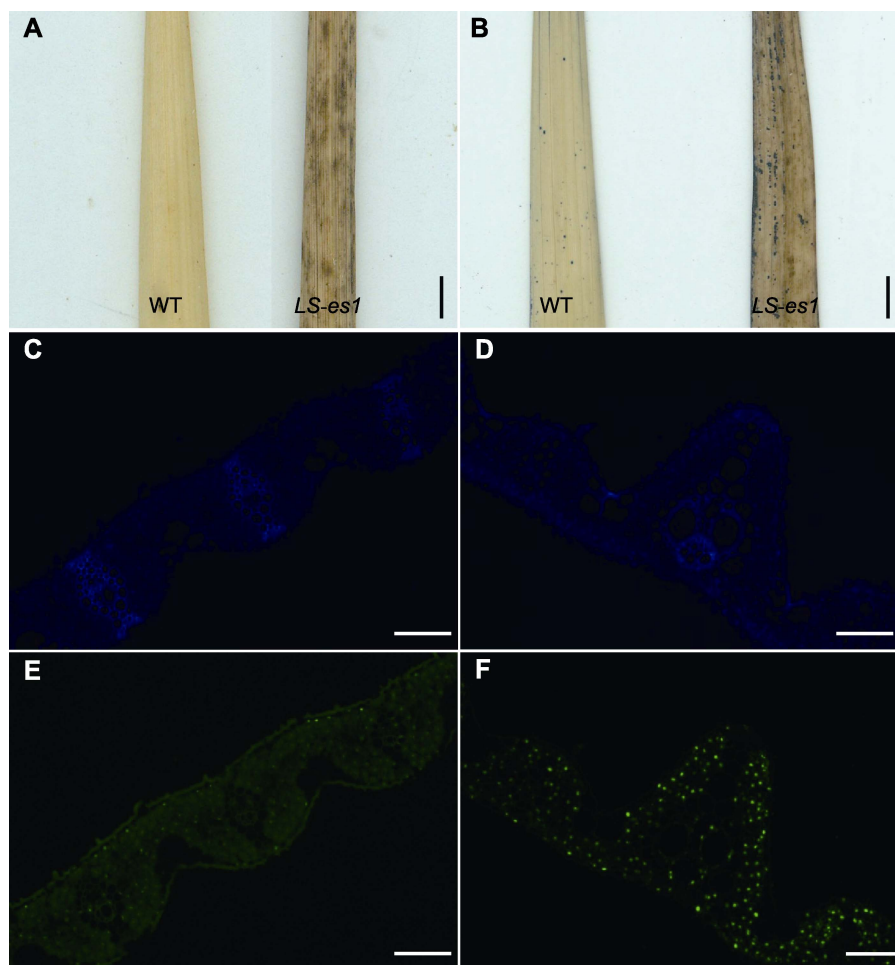


图2 水稻野生型(WT) TP309和突变体 $LS-es1$ 的农艺性状比较 (A) 穗长; (B) 株高; (C) 一次枝梗数; (D) 千粒重。\*和\*\*分别表示TP309与 $LS-es1$ 在0.05和0.01水平上差异显著。

Figure 2 The comparison of agronomic traits between rice wild type (WT) TP309 and mutant  $LS-es1$

(A) Panicle length; (B) Plant height; (C) Primary branch number; (D) 1000-grain weight. \* and \*\* indicate significant differences between TP309 and  $LS-es1$  at 0.05 and 0.01 level, respectively.



**图3** 水稻野生型(WT) TP309和突变体 $LS-es1$ 的叶片组织细胞化学分析

(A) 野生型和突变体叶片的DAB染色(Bar=2 cm); (B) 野生型和突变体叶片的NBT染色(Bar=2 cm); (C), (E) 野生型TP309叶片Tunel检测(Bar=100  $\mu$ m); (D), (F) 突变体 $LS-es1$ 叶片Tunel检测(Bar=100  $\mu$ m)

**Figure 3** Histochemical analysis of rice wild type (WT) TP309 and mutant  $LS-es1$  leaves

(A) DAB staining of wild-type and  $LS-es1$  leaves (Bar=2 cm); (B) NBT staining of wild-type and  $LS-es1$  leaves (Bar=2 cm); (C), (E) TUNEL detection of wild-type leaves (Bar=100  $\mu$ m); (D), (F) TUNEL detection of  $LS-es1$  leaves (Bar=100  $\mu$ m).

### 2.3 酶活性和衰老相关参数

为了进一步验证 $LS-es1$ 的早衰特性,我们在抽穗期对TP309和 $LS-es1$ 剑叶的CAT、POD和SOD活性以及 $H_2O_2$ 和MDA含量进行测定。结果表明,突变体的CAT和POD活性分别比野生型降低了68.3%和7.8%,且差异显著(图4A, B),而突变体叶片的SOD活性、MDA和 $H_2O_2$ 含量分别比野生型增加了109.7%、742.2%和274.1%(图4C-E)。以上结果表明,在抽穗期 $LS-es1$ 中积累了更多活性氧,氧迸发导致细胞程序性死亡,进而加速植株衰老。

### 2.4 光合速率及叶绿素相对含量

植物光合作用所积累的有机物与植物的净光合速率成正比,因此植物净光合速率值越大,植物衰老的程度越低;气孔导度的变化会直接导致细胞间隙 $CO_2$ 浓度的变化,从而影响植物的光合作用、呼吸作用和蒸腾作用。与野生型相比, $LS-es1$ 的净光合速率降低、胞间 $CO_2$ 浓度极显著升高,气孔导度和蒸腾速率极显著下降(表3),表明 $LS-es1$ 的衰老导致其光合速率降低。突变体的叶绿素相对含量(SPAD值)相比野生型极显著降低(表3),说明 $LS-es1$ 在衰老的同时伴随着叶绿素降解。



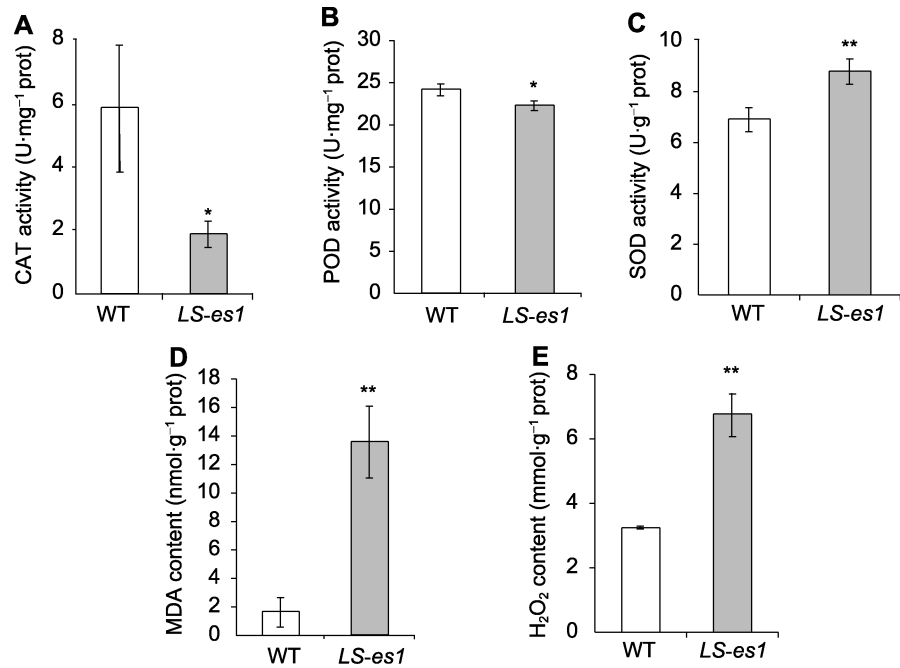


图4 抽穗期水稻突变体LS-es1及其野生型(WT)叶片的过氧化氢酶(CAT) (A)、过氧化物酶(POD) (B)和超氧化物歧化酶(SOD) (C)活性以及丙二醛(MDA) (D)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (E)含量

\*和\*\*分别表示TP309与LS-es1在0.05和0.01水平上差异显著。

Figure 4 Catalase (CAT) (A), peroxidase (POD) (B), and superoxide dismutase (SOD) (C) activities and malondialdehyde (MDA) (D) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E) contents of LS-es1 and wild type (WT) at heading stage of rice

\* and \*\* indicate significant differences between TP309 and LS-es1 at 0.05 and 0.01 level, respectively.

表3 水稻野生型TP309和突变体LS-es1的叶绿素相对含量(SPAD值)和光合速率比较

Table 3 The comparison of SPAD value and photosynthetic rate between rice TP309 and LS-es1

	Net photosynthetic rate	Stomatal conductance	Intercellular CO <sub>2</sub> concentration	Transpiration rate	SPAD
TP309	9.4±0.961	0.110±0.01	263±3	4.63±0.289	40.633±1.206
LS-es1	2.225±1.407**	0.0403±0.007**	312.5±10.606**	2.3±0.283**	27.65±2.333**

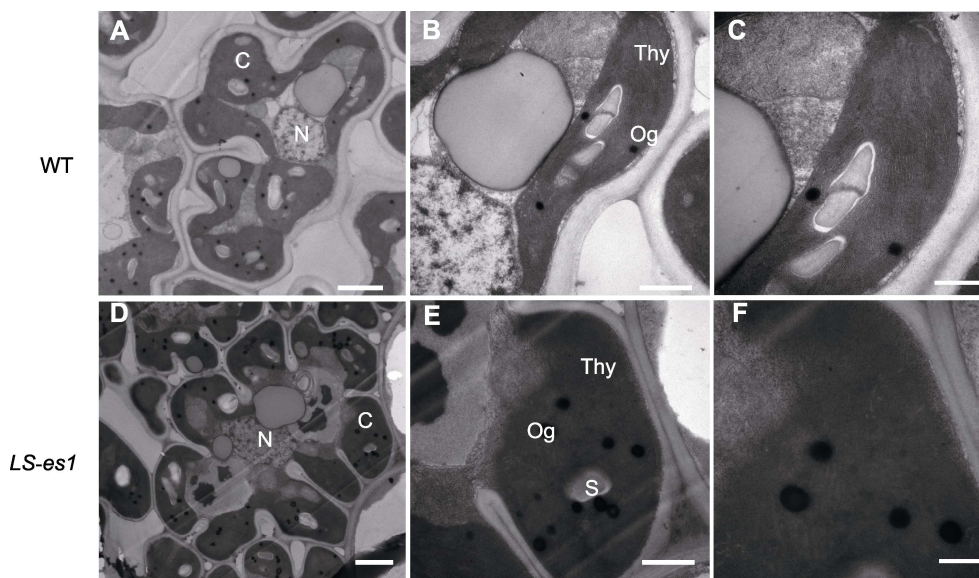
\*\* 表示TP309与LS-es1在0.01水平上差异显著。 \*\* indicate significant differences at 0.01 level between TP309 and LS-es1.

## 2.5 LS-es1突变导致水稻叶绿体降解

在生长发育正常的叶片中,叶绿体内的类囊体排列整齐,片层结构清晰,基粒堆叠致密,嗜银颗粒较少,淀粉粒数量和大小正常。在TP309和LS-es1始穗期,取植株倒二叶相同部位叶片进行透射电镜观察,结果显示,TP309叶片组织细胞中的叶绿体发育正常(图5A-C),而LS-es1叶片叶绿体的类囊体排列疏松,基粒片层变得杂乱甚至模糊不清(图5D-F),因此影响植株光合效率。同时,突变体中嗜银颗粒数量增加,体积变大,这也进一步证实突变体植株早衰(Sun et al., 2017)。

## 2.6 水稻籽粒扫描电镜观察

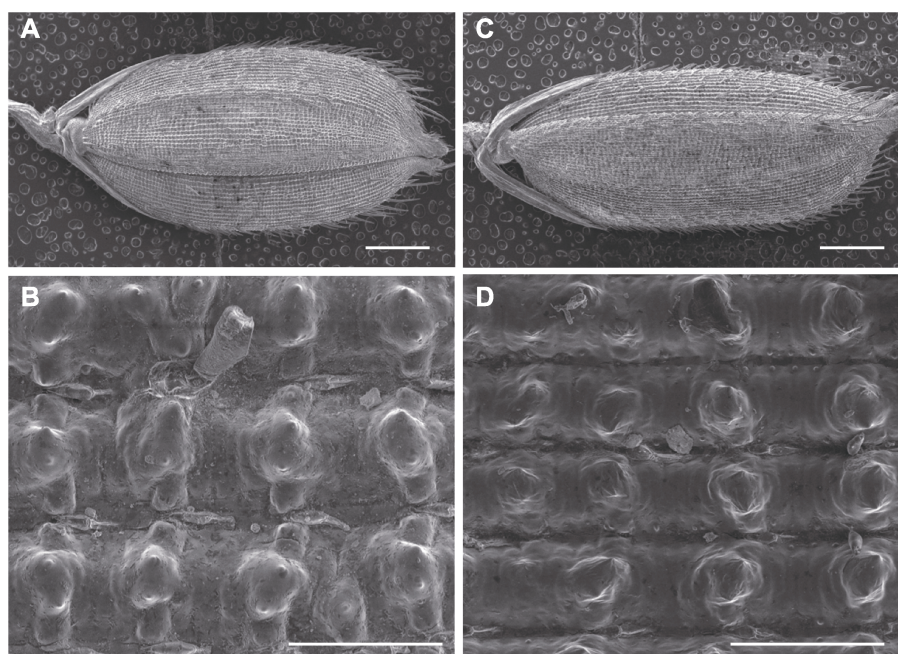
在TP309和LS-es1始穗期,取植株倒二叶相同部位的叶片用扫描电镜观察叶片表面气孔排布和结构,结果显示野生型和突变体的气孔排布无明显差异。待植株完全成熟后,取TP309和突变体LS-es1饱满的种子进行扫描电镜观察,突变体LS-es1相比野生型表现出粒细长、表面多毛且较光滑,凸起的地方形状不规则且粗糙,排列稀疏,轮廓清晰,硅质化明显(图6A-D)。而硅质细胞的大小和含量会影响植株的根系及后期生长发育(邓接楼等, 2011)。



**图5** 水稻野生型(WT) TP309和突变体*LS-es1*叶片的透射电镜(TEM)观察

(A) TP309叶片细胞, 6000X; (B) TP309叶片细胞, 25000X; (C) TP309叶片细胞, 40000X; (D) *LS-es1*叶片细胞, 6000X; (E) *LS-es1*叶片细胞, 25000X; (F) *LS-es1*叶片细胞, 40000X。N: 细胞核; C: 叶绿体; Thy: 类囊体; S: 淀粉颗粒; Og: 嗜钺小体。Bars=1 μm

**Figure 5** Transmission electron microscopy (TEM) analysis of chloroplast in rice wild type (WT) TP309 and mutant *LS-es1* (A) TP309 leaf cells in 6000X; (B) TP309 leaf cells in 25000X; (C) TP309 leaf cells in 40000X; (D) *LS-es1* leaf cells in 6000X; (E) *LS-es1* leaf cells in 25000X; (F) *LS-es1* leaf cells in 40000X. N: Cell nucleus; C: Chloroplast; Thy: Thylakoid; S: Starch granule; Og: Eosinophil. Bars=1 μm



**图6** 水稻野生型TP309和突变体*LS-es1*籽粒的扫描电镜(SEM)观察

(A), (B) TP309籽粒; (C), (D) *LS-es1*籽粒。(A), (C) Bars=1 mm; (B), (D) Bars=100 μm

**Figure 6** Scanning electron microscopy (SEM) analysis of seeds in rice wild type TP309 and mutant *LS-es1* (A), (B) TP309 seed; (C), (D) *LS-es1* seed. (A), (C) Bars=1 mm; (B), (D) Bars=100 μm



## 2.7 外源激素处理对水稻幼苗生长的抑制作用

ABA是在高等植物中广泛分布的植物激素,除促进叶片脱落外也可以使芽进入休眠状态,对细胞的伸长也有抑制作用;MeJA是与植物防御相关的激素,外源MeJA可以激发植株自身的防御反应;SA是植物在逆境中诱导产生的一种激素,是植株应激过程中重要的信号分子。为探明TP309和LS-es1种子对这3种植物激素响应的差异,首先对野生型和突变体种子进行发芽激素处理,然后比较种子的芽长与根长,结果(图7A–C)表明,LS-es1的种子只有在较高浓度的SA处理后,芽长和根长的增加才会被抑制,与野生型相比差异很大;突变体种子在2种浓度的ABA处理下,芽和根的生长都受到抑制,且差异极显著;而在2种浓度的MeJA处理下,突变体发芽后的种子与野生型相比仅根长明显受到抑制,芽长无明显变化。

## 2.8 遗传分析

LS-es1与籼稻台农1号杂交, F<sub>1</sub>代植株叶片表型正常, F<sub>1</sub>代自交产生F<sub>2</sub>群体, 群体中出现早衰性状分离。F<sub>2</sub>群体共1 852株, 其中正常表型1 381株, 早衰表型471株, 经卡方( $\chi^2$ )测验符合3:1的分离比(表4)。此外, 以LS-es1为母本, 浙辐802为父本, 杂交F<sub>1</sub>代均为正常表型, F<sub>2</sub>群体同样出现性状分离, 群体总共704株, 正常表型526株, 早衰表现178株, 经卡方( $\chi^2$ )测验符合3:1的分离比(表4), 表明LS-es1早衰性状由1对隐性核基因控制。

## 2.9 基因定位及候选基因分析

以LS-es1为母本, 与籼稻台农1号进行杂交获得F<sub>1</sub>代, F<sub>1</sub>代自交获得F<sub>2</sub>群体, 利用F<sub>2</sub>群体进行初定位。对本实验室保存的、均匀分布于水稻12条染色体上的268对SSR标记进行多态性筛选, 然后使用呈现多态性的

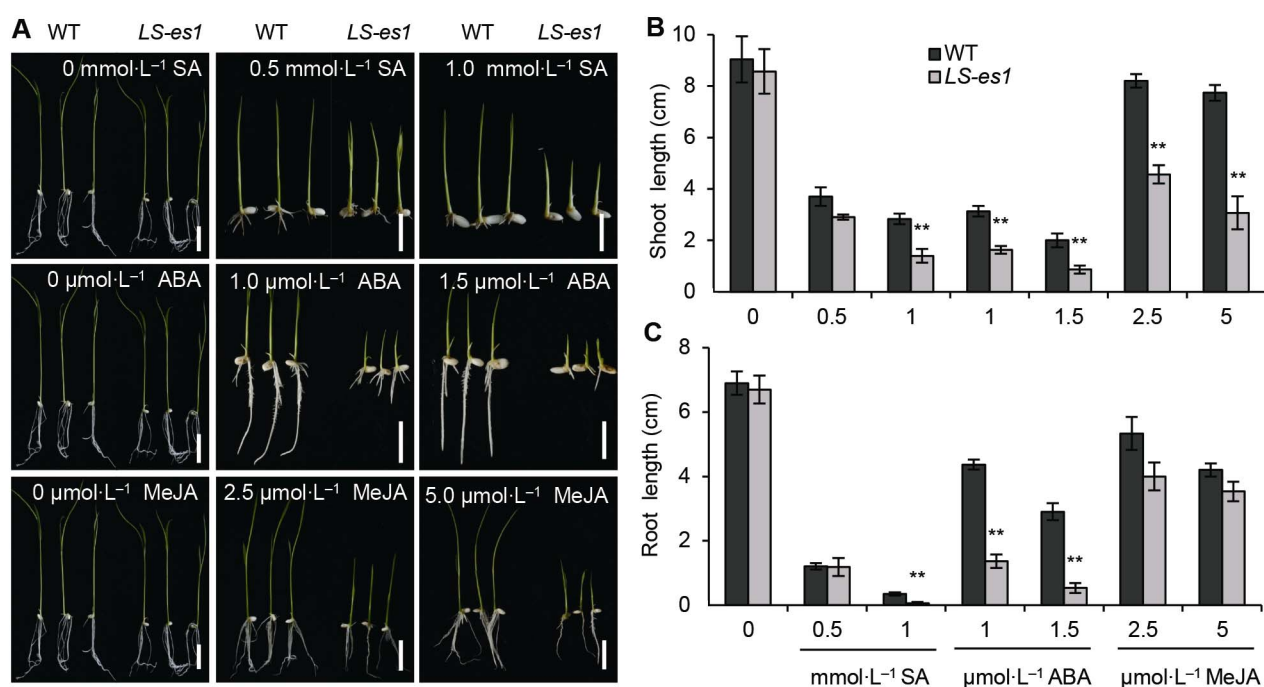


图7 外源激素处理对水稻野生型(WT) TP309和突变体LS-es1幼苗生长的抑制作用

(A) 水杨酸(SA)处理(上), 脱落酸(ABA)处理(中), 茉莉酸甲酯(MeJA)处理(下) (Bars=2 cm); (B) 激素处理后芽长的比较; (C) 激素处理后根长的比较。\*\* 表示TP309与LS-es1在0.01水平上差异显著。

**Figure 7** Inhibition of exogenous hormone treatment on the growth of seedlings in rice wild type (WT) TP309 and mutant LS-es1 (A) Salicylic acid (SA) (top), abscisic acid (ABA) (middle), methyl jasmonate (MeJA) (bottom) (Bars=2 cm); (B) Comparison of shoot length of TP309 and LS-es1 seedlings treated with hormones; (C) Comparison of root length of TP309 and LS-es1 seedlings treated with hormones. \*\* indicate significant differences at 0.01 level between TP309 and LS-es1.

127对分子标记对随机抽取的突变体混池基因型进行分析, 结果发现7号染色体的标记RM6574和RM3755与早衰表型连锁, 再用这2个连锁标记对随机选取的93个隐性单株的基因型进行分析, 初步将基因定位在RM6574–RM3755标记之间。然后在2个标记之间, 新设计5对多态性较好的InDel引物(表1), 对目的基因进行精细定位, 通过分析所有669个隐性单株的基因型, 最终将目的基因定位于InDel-4与InDel-5之间约46.2 kb物理距离内(图8)。查询水稻基因组数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)后发现, 在确定的区间中有8个开放阅读框, 其中有3个表达蛋白、1个反转座子蛋白、2个假定蛋白以及2个功能基因, 该区间内暂无已发表的与水稻叶片衰老相关的基因。在候选功能基因中, *Os07g0275300*编码1个锌指结构域, 其在叶片早衰途径中可能发挥重要作用; *Os07g0276000*编码1个含有LRR结构的F-box结构域, 它可能与水稻叶片早衰相关。对候选功能基因在野生型和突变体中的表达量进行分析, 结果显示 *Os07g0275300*和*Os07g0276000*在突变体*LS-es1*中的表达量都明显升高(图9), 推测这2个基因可能是*LS-es1*突变体的

突变候选基因。

2.10 衰老相关基因的表达分析

衰老相关基因在水稻衰老过程中会不同程度地被诱导表达。*Osh36*编码一个与植株衰老相关的氨基酸转移酶; *OsI85*编码异柠檬酸裂解酶, 是水稻叶片衰老的标志基因(Lee et al., 2001); *OsNAP*是联系ABA和叶片衰老的重要纽带, 参与调控水稻衰老(Liang et al., 2014), 同时*OsNAP*的表达与衰老途径紧密相关, 通过茉莉酸通路来实现对叶片衰老的调控(Zhou et al., 2013); *SGR*编码叶绿体转运肽蛋白, 参与调控叶绿体合成及降解过程。在始穗期分别取野生型TP309和突变体*LS-es1*新鲜叶片, 提取RNA后用qRT-PCR对衰老相关基因在野生型和突变体中的表达量进行分析。结果表明, *LS-es1*中衰老相关基因*Osh36*、*OsI85*和*OsNAP*极显著上调, 其中水稻叶片衰老标志基因*Osh36*和*OsI85*的表达量分别上调2.1和20.4倍(图9); 叶片衰老的正调控基因*OsNAP*表达量上调了2.6倍; 同时叶绿素降解相关基因*SGR*也显著上调了9.7倍(图9), 表明*LS-es1*突变体发生严重早衰并伴随叶绿体的降解。

表4 水稻早衰突变体*LS-es1*的遗传分析

Table 4 Genetic analysis of rice early senescence phenotypes of *LS-es1*

Hybrid combination (male/female)	F <sub>1</sub> phenotype	Number of F <sub>2</sub> normal phenotype	Number of F <sub>2</sub> mutant phenotype	Number of F <sub>2</sub> population	$\chi^2$ (3:1)
<i>LS-es1</i> /TN1	Normal	1381	471	1852	0.1842
<i>LS-es1</i> /ZF802	Normal	526	178	704	0.0303

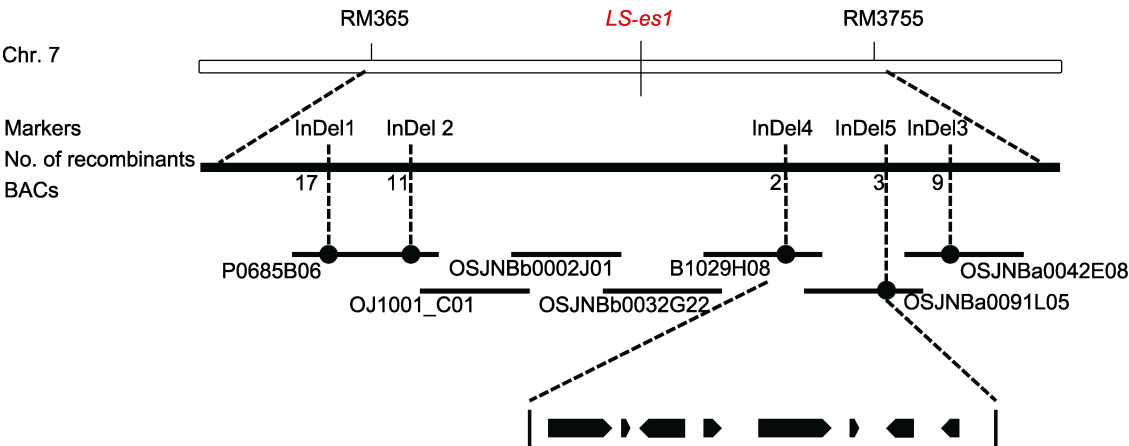


图8 水稻突变体*LS-es1*的突变基因精细定位

Figure 8 Fine mapping of rice mutant *LS-es1* genes

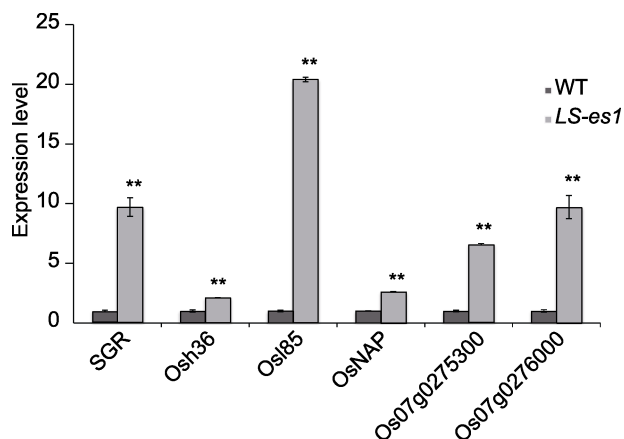


图9 水稻早衰突变体LS-es1候选基因及衰老相关基因的表达量  
\*\* 表示TP309和LS-es1在0.01水平上差异显著。

Figure 9 Expression of LS-es1 candidate genes and senescence-related genes in rice

\*\* indicate significant differences at 0.01 level.

## 2.11 讨论

叶片衰老是植株生长过程中必经的不可逆阶段。衰老叶片的叶绿素含量、光合效率以及细胞组织成分均有不同程度的改变(Lim et al., 2007)。叶片衰老的直观表现是黄化、衰老直至枯死,内在变化是叶绿体超微结构的变化甚至是叶绿体的严重降解。水稻叶片早衰会导致植株的光合效率降低,从而影响水稻的产量和品质,对水稻早衰相关突变体进行深入研究可以明确早衰性状对水稻的不利影响,从而为阐明水稻早衰机制、预防早衰的发生或通过延长叶片功能期来延缓衰老奠定基础。

本研究中,水稻早衰突变体LS-es1苗期表型与野生型基本一致,分蘖盛期叶鞘开始衰老,大部分叶片在抽穗期已经衰老枯黄,至灌浆期,全部叶片枯萎凋零。研究发现突变体叶片细胞中的叶绿体严重降解,而叶绿体是植物ROS形成的重要部位,随着叶绿体的降解,叶绿体中的电子传递过程受到阻碍,导致H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和O<sup>2-</sup>大量形成(Hideg et al., 2006)。同时ROS的大量积累导致MDA含量急剧增加,从而使膜受到严重损伤,此外,ROS还通过细胞氧化应激反应诱导细胞凋亡甚至坏死(华春和王仁雷, 2003)。

通过图位克隆,我们将LS-es1基因定位在水稻第7号染色体长臂42.6 kb区间内,其间共有8个开放阅读框(ORF),其中包括3个表达蛋白、1个反转座子

蛋白、2个假定蛋白以及2个功能蛋白。目前,水稻7号染色体上已定位和克隆的基因有LC7、LLB和OsSIK2等,但均不在本研究中的突变体LS-es1的定位区间中,且定位区间内没有已被克隆的叶色或者早衰基因,因此推测LS-es1是1个新的突变基因。对定位区间内的候选基因进行表达分析,结果发现Os07g0275300和Os07g0276000两个基因的表达量在突变体中明显上调,对这2个候选基因进行功能分析,发现Os07g0275300编码1个锌指结构域蛋白,该蛋白影响水稻的抗逆性,在一定程度上可能参与调控植株的衰老。此外,Os07g0276000编码1个含有LRR结构的F-box结构域,它可能通过调控泛素化降解相关途径影响植株叶片衰老相关蛋白的合成与降解,进而控制叶片衰老。

植物的衰老受到复杂网络的调控,单个基因的突变可能会导致植株多个性状变化,水稻早衰突变体LS-es1不仅叶片细胞中的叶绿体发生降解,而且株高、分蘖和结实率相比野生型TP309均显著降低,同时突变体种子对ABA、SA和MeJA三种外源植物激素更加敏感,在生理上还表现出抗氧化保护酶活性显著下降,光合速率降低的同时伴随着各种营养物质和代谢产物成分的变化。植株过早衰老会导致作物产量和品质下降(段俊等, 1997)。因此水稻早衰相关基因的定位与克隆对进一步完善水稻早衰调控网络有重要作用,也为深入探索水稻叶片衰老的分子机制奠定了基础,同时对水稻品种的改良也有重要意义。本研究完成了对LS-es1的精细定位,后续将通过遗传互补实现对LS-es1基因的确定,并进一步探索该基因影响衰老的途径及机制。

## 参考文献

- 陈昆松, 李方, 徐昌杰, 张上隆, 傅承新 (2004). 改良CTAB法用于多年生植物组织基因组DNA的大量提取. 遗传 26, 529–531.
- 邓接楼, 王艾平, 何长水, 王爱斌, 徐芬芬 (2011). 硅肥对水稻生长发育及产量品质的影响. 广东农业科学 38(12), 58–61.
- 段俊, 梁承邺, 黄毓文 (1997). 杂交水稻开花结实期间叶片衰老. 植物生理学报 23, 139–144.
- 华春, 王仁雷 (2003). 杂交稻及其三系叶片衰老过程中SOD、CAT活性和MDA含量的变化. 西北植物学报 23, 406–409.

- 冷语佳 (2013). 水稻早衰基因 *ES10* 的遗传分析与基因定位. 硕士论文. 北京: 中国农业科学院. pp. 16–17.
- 刘翔 (2014). EMS 诱变技术在植物育种中的研究进展. 激光生物学报 23, 197–201.
- 孙玉莹 (2013). 水稻叶片早衰基因 *PSL2* 的图位克隆及功能初步分析. 硕士论文. 北京: 中国农业科学院. pp. 17–65.
- 徐娜, 徐江民, 蒋玲欢, 饶玉春 (2017). 水稻叶片早衰成因及分子机理研究进展. 植物学报 52, 102–112.
- 张丽霞 (2000). 水稻叶片衰老相关基因的分离. 硕士论文. 福州: 福建农林大学. pp. 20–54.
- Ansari MI, Lee RH, Chen SCG (2005). A novel senescence-associated gene encoding  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA): pyruvate transaminase is upregulated during rice leaf senescence. *Physiol Plant* 123, 1–8.
- Chen HL, Li CR, Liu LP, Zhao JY, Cheng XZ, Jiang GH, Zhai WX (2016). The Fd-GOGAT1 mutant gene *lc7* confers resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Sci Rep* 6, 26411.
- Chen LJ, Wuriyanghan H, Zhang YQ, Duan KX, Chen HW, Li QT, Lu X, He SJ, Ma B, Zhang WK, Lin Q, Chen SY, Zhang JS (2013a). An S-domain receptor-like kinase, OsSIK2, confers abiotic stress tolerance and delays dark-induced leaf senescence in rice. *Plant Physiol* 163, 1752–1765.
- Chen Y, Xu YY, Luo W, Li WX, Chen N, Zhang DJ, Chong K (2013b). The F-box protein OsFBK12 targets OsSAMS1 for degradation and affects pleiotropic phenotypes including leaf senescence in rice. *Plant Physiol* 163, 1673–1685.
- Fanata WID, Lee KH, Son BH, Yoo JY, Harmoko R, Ko KS, Ramasamy NK, Kim KH, Oh DB, Jung HS, Kim JY, Lee SY, Lee KO (2013). N-glycan maturation is crucial for cytokinin-mediated development and cellulose synthesis in *Oryza sativa*. *Plant J* 73, 966–979.
- Gan S, Amasino RM (1997). Making sense of senescence: molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiol* 113, 313–319.
- Gan SS, Hörtensteiner S (2013). Frontiers in plant senescence research: from bench to bank. *Plant Mol Biol* 82, 503–504.
- Hideg E, Kálai T, Kós PB, Asada K, Hideg K (2006). Singlet oxygen in plants—its significance and possible detection with double (fluorescent and spin) indicator reagents. *Photochem Photobiol* 82, 1211–1218.
- Huang LM, Sun QW, Qin FJ, Li C, Zhao Y, Zhou DX (2007). Down-regulation of a *SILENT INFORMATION REGULATOR2*-related histone deacetylase gene, *OsS-RT1*, induces DNA fragmentation and cell death in rice. *Plant Physiol* 144, 1508–1519.
- Huang QN, Shi YF, Zhang XB, Song LX, Feng BH, Wang HM, Xu X, Li XH, Guo D, Wu JL (2016). Single base substitution in *OsCDC48* is responsible for premature senescence and death phenotype in rice. *J Integr Plant Biol* 58, 12–28.
- Jiang HW, Li MR, Liang NT, Yan HB, Wei YB, Xu XL, Liu J, Xu ZF, Chen F, Wu GJ (2007). Molecular cloning and function analysis of the *stay green* gene in rice. *Plant J* 52, 197–209.
- Jiao BB, Wang JJ, Zhu XD, Zeng LJ, Li Q, He ZH (2012). A novel protein RLS1 with NB-ARM domains is involved in chloroplast degradation during leaf senescence in rice. *Mol Plant* 5, 205–217.
- Kariola T, Brader G, Li J, Palva ET (2005). Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *Plant Cell* 17, 282–294.
- Kong ZS, Li MN, Yang WY, Xu WY, Xue YB (2006). A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiol* 141, 1376–1388.
- Kusaba M, Ito H, Morita R, Iida S, Sato Y, Fujimoto M, Kawasaki S, Tanaka R, Hirochika H, Nishimura M, Tanaka A (2007). Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell* 19, 1362–1375.
- Lee RH, Lin MC, Chen SC (2004). A novel alkaline  $\alpha$ -galactosidase gene is involved in rice leaf senescence. *Plant Mol Biol* 55, 281–295.
- Lee RH, Wang CH, Huang LT, Chen SCG (2001). Leaf senescence in rice plants: cloning and characterization of senescence up-regulated genes. *J Exp Bot* 52, 1117–1121.
- Leng YJ, Yang YL, Ren DY, Huang LC, Dai LP, Wang YQ, Chen L, Tu ZJ, Gao YH, Li XY, Zhu L, Hu J, Zhang GH, Gao ZY, Guo LB, Kong ZS, Lin YJ, Qian Q, Zeng DL (2017). A rice *PECTATE LYASE-LIKE* gene is required for plant growth and leaf senescence. *Plant Physiol* 174, 1151–1166.
- Liang CZ, Wang YQ, Zhu YN, Tang JY, Hu B, Liu LC, Ou SJ, Wu HK, Sun XH, Chu JF, Chu CC (2014). OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 10013–10018.
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG (2007). Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* 58, 115–136.

- Lin AH, Wang YQ, Tang JY, Xue P, Li CL, Liu LC, Hu B, Yang FQ, Loake GJ, Chu CC (2012). Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. *Plant Physiol* **158**, 451–464.
- Lin YH, Tan LB, Zhao L, Sun XY, Sun CQ (2016). RLS3, a protein with AAA+ domain localized in chloroplast, sustains leaf longevity in rice. *J Integr Plant Biol* **58**, 971–982.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* **25**, 402–408.
- Luan WJ, Shen A, Jin ZP, Song SS, Li ZL, Sha AH (2013). Knockdown of *OsHox33*, a member of the class III homeodomain-leucine zipper gene family, accelerates leaf senescence in rice. *Sci China Life Sci* **56**, 1113–1123.
- Mahalingam R, Jambunathan N, Gunjan SK, Faustin E, Weng H, Ayoubi P (2006). Analysis of oxidative signaling induced by ozone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* **29**, 1357–1371.
- McCabe MS, Garratt LC, Schepers F, Jordi WJRM, Stoopen GM, Davelaar E, van Rhijn JHA, Power JB, Davey MR (2001). Effects of *P<sub>SAG12</sub>-IPT* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol* **127**, 505–516.
- Morita R, Sato Y, Masuda Y, Nishimura M, Kusaba M (2010). Defect in non-yellow coloring 3, an  $\alpha/\beta$  hydrolase-fold family protein, causes a stay-green phenotype during leaf senescence in rice. *Plant J* **59**, 940–952.
- Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, A-H- Mackerness S, Buchanan-Wollaston V (2003). Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. *J Exp Bot* **54**, 2285–2292.
- Qiao YL, Jiang WZ, Lee J, Park BS, Choi MS, Piao RH, Woo MO, Roh JH, Han LZ, Paek NC, Seo HS, Koh HJ (2010). *SPL28* encodes a clathrin-associated adaptor protein complex 1, medium subunit  $\mu 1$  (AP1M1) and is responsible for spotted leaf and early senescence in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol* **185**, 258–274.
- Rao YC, Yang YL, Xu J, Li XJ, Leng YJ, Dai LP, Huang LC, Shao GS, Ren DY, Hu J, Guo LB, Pan JW, Zeng DL (2015). *EARLY SENESCENCE1* encodes a SCAR-LIKE PROTEIN2 that affects water loss in rice. *Plant Physiol* **169**, 1225–1239.
- Schippers JH, Schmidt R, Wagstaff C, Jing HC (2015). Living to die and dying to live: the survival strategy behind leaf senescence. *Plant Physiol* **169**, 914–930.
- Singh S, Giri MK, Singh PK, Siddiqui A, Nandi AK (2013). Down-regulation of *OsSAG12-1* results in enhanced senescence and pathogen-induced cell death in transgenic rice plants. *J Biosci* **38**, 583–592.
- Sun LT, Wang YH, Liu LL, Wang CM, Gan T, Zhang ZY, Wang YL, Wang D, Niu M, Long WH, Li XH, Zheng M, Jiang L, Wan JM (2017). Isolation and characterization of a *spotted leaf 32* mutant with early leaf senescence and enhanced defense response in rice. *Sci Rep* **7**, 41846.
- Tamiru M, Takagi H, Abe A, Yokota T, Kanzaki H, Okamoto H, Saitoh H, Takahashi H, Fujisaki K, Oikawa K, Uemura A, Natsume S, Jikumaru Y, Matsuura H, Umemura K, Terry MJ, Terauchi R (2016). A chloroplast-localized protein LESION AND LAMINA BENDING affects defence and growth responses in rice. *New Phytol* **210**, 1282–1297.
- Tang YY, Li MR, Chen YP, Wu PZ, Wu GJ, Jiang HW (2011). Knockdown of *OsPAO* and *OsRCCR1* cause different plant death phenotypes in rice. *J Plant Physiol* **168**, 1952–1959.
- Undan JR, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Takagi H, Yoshida K, Kanzaki H, Saitoh H, Fekih R, Sharma S, Undan J, Yano M, Terauchi R (2012). Mutation in *OsLMS*, a gene encoding a protein with two double-stranded RNA binding motifs, causes lesion mimic phenotype and early senescence in rice (*Oryza sativa* L.). *Genes Genet Syst* **87**, 169–179.
- Wang S, Lei CL, Wang JL, Ma J, Tang S, Wang CL, Zhao KJ, Tian P, Zhang H, Qi CY, Cheng ZJ, Zhang X, Guo XP, Liu LL, Wu CY, Wan JM (2017). *SPL33*, encoding an eEF1A-like protein, negatively regulates cell death and defense responses in rice. *J Exp Bot* **68**, 899–913.
- Wu HB, Wang B, Chen YL, Liu YG, Chen LT (2013). Characterization and fine mapping of the rice premature senescence mutant *ospse1*. *Theor Appl Genet* **126**, 1897–1907.
- Wu ZM, Zhang X, He B, Diao LP, Sheng SL, Wang JL, Guo XP, Su N, Wang LF, Jiang L, Wang CM, Zhai HQ, Wan JM (2007). A chlorophyll-deficient rice mutant with impaired chlorophyllide esterification in chlorophyll biosynthesis. *Plant Physiol* **145**, 29–40.
- Yamatani H, Sato Y, Masuda Y, Kato Y, Morita R, Fukunaga K, Nagamura Y, Nishimura M, Sakamoto W, Tanaka A, Kusaba M (2013). *Nyc4*, the rice ortholog of *Arabidopsis THF1*, is involved in the degradation of chlorophyll-protein complexes during leaf senescence. *Plant J* **74**, 652–662.



Yoshida S (2003). Molecular regulation of leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol* 6, 79–84.

Zhou Y, Huang WF, Liu L, Chen TY, Zhou F, Lin YJ (2013). Identification and functional characterization of a rice NAC gene involved in the regulation of leaf senescence.

*BMC Plant Biol* 13, 132.

Zhou Y, Liu L, Huang WF, Yuan M, Zhou F, Li XH, Lin YJ (2014). Overexpression of *OsSWEET5* in rice causes growth retardation and precocious senescence. *PLoS One* 9, e94210.

## Gene Mapping and Candidate Gene Analysis of Rice Early Senescence Mutant *LS-es1*

Chun Zhou<sup>1</sup>, Ran Jiao<sup>1</sup>, Ping Hu<sup>2</sup>, Han Lin<sup>1</sup>, Juan Hu<sup>1</sup>, Na Xu<sup>1</sup>, Xianmei Wu<sup>2</sup>,  
Yuchun Rao<sup>1\*</sup>, Yuexing Wang<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China

**Abstract** Senescence is an autonomous and irreversible adaptive response at the end of plant development. The molecular mechanism related to premature senescence of leaves is important for rice genetic improvement and breeding of anti-aging varieties. *LS-es1* is a stable hereditary premature early senescence mutant obtained by EMS mutagenesis of *indica* variety TP309. Phenotypic observation, physiological and biochemical analysis of *LS-es1* and its wild type TP309 found that *LS-es1* accumulated a large amount of reactive oxygen species and more cell death, while the yield-related agronomic traits of *LS-es1* were significantly decreased compared to wild type TP309, which also verified the early senescence characteristics of *LS-es1*. Exogenous hormone treatment of *LS-es1* and TP309 seedlings showed that *LS-es1* was more sensitive to salicylic acid (SA), abscisic acid (ABA) and methyl jasmonate (MeJA). The *LS-es1* gene was mapped to the 46.2 kb region of the long arm of rice chromosome 7 by map-based cloning, which included 8 open reading frames (ORFs). Bioinformatics analysis of the genes in this interval revealed that two candidate functional genes, *Os07g0275300* and *Os07g0276000*, were associated with the early senescence pathway, and the expression levels of these two genes were significantly different between wild type and mutant. The results laid the foundation for further cloning of the *LS-es1* gene and in-depth study of its biological function.

**Key words** rice, early senescence, physiological characteristics, fine mapping, candidate genes

Zhou C, Jiao R, Hu P, Lin H, Hu J, Xu N, Wu XM, Rao YC, Wang YX (2019). Gene mapping and candidate gene analysis of rice early senescence mutant *LS-es1*. *Chin Bull Bot* 54, 606–619.

\* Authors for correspondence. E-mail: ryc@zjnu.cn; wangyuexing@caas.cn

(责任编辑: 朱亚娜)