

水稻叶片早衰突变体 *wss1* 的性状鉴定及基因定位

徐飞飞¹, 纪志远¹, 徐江民¹, 王福军^{1,2}, 唐永超¹, 郑凯丽¹, 王春连¹, 赵开军¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081;

²广东省农业科学院水稻研究所, 广州 510640)

摘要: 叶片早衰直接降低作物产量, 了解控制作物早衰的分子机制对实现作物的高产稳产具有重要的意义。本研究利用 EMS 诱变水稻品种金刚 30, 获得稳定遗传的叶片早衰突变体 *wss1*, 其在分蘖盛期叶片开始出现水浸状斑点, 并发展至孕穗期叶片出现坏死症状。与野生型相比, 突变体 *wss1* 株高降低 30%、结实率降低 22%、穗粒数减少 50%。生理分析发现 *wss1* 产生水浸状斑点后, 叶片叶绿素含量显著低于野生型。台盼蓝细胞组织化学染色显示, *wss1* 叶片细胞膜系统被破坏。在 *wss1* 叶片中衰老标志基因明显上调表达, 对水稻白叶枯病菌 PXO99^A 的抗性显著减弱。*wss1* 表型受 1 对隐性基因控制, 该基因被定位在水稻第 11 染色体长臂着丝粒区附近 1200 kb 范围内, 为进一步克隆 *Oswss1* 基因及深入研究其功能奠定了基础。

关键词: 水稻; 突变体 *wss1*; 早衰; 分子标记定位

Identification and Molecular Mapping of Water-soaked Spot Leaf Early Senescence Mutant *wss1* in Rice

XU Fei-fei¹, JI Zhi-yuan¹, XU Jiang-min¹, WANG Fu-jun^{1,2}, TANG Yong-chao¹,
ZHENG Kai-li¹, WANG Chun-lian¹, ZHAO Kai-jun¹

(¹Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/ National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Beijing 100081; ²Rice Research Institute of the Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640)

Abstract: Leaf early senescence can directly reduce photosynthesis and crop yield. Unlocking the mechanism of leaf early senescence becomes important via building up the strategy to achieve high and stable rice yield. A water-soaked spot mutant (termed *wss1*) was identified in the population derived from EMS-treated seeds of the *indica* rice variety JG30. At the tillering stage, the leaves of *wss1* showed premature senescence, including the appearance of water-soaked spots, which further developed to the leaf necrosis. In relative to the parental line JG30, *wss1* mutant showed 30%, 22% and 50% reduction on the plant height, seed setting rate and number of grains per panicle, respectively. The chlorophyll content in the water-soaked spot leaves of *wss1* was significantly lower than that of the wild-type plants. By trypan blue cell histochemical staining, the cell membrane of *wss1* on leaves was destroyed. Genetic analysis showed that *wss1* was controlled by a recessive gene (*wss1*), which was mapped in a 1200 kb region between markers Ch11-33 and Ch11-123. Thus, these results will benefit future molecular cloning and functional characterization of the underlying gene of *Oswss1*.

Key words: rice; water-soaked spot; leaf early senescence; molecular mapping

收稿日期: 2018-12-23 修回日期: 2019-06-05 网络出版日期: 2019-01-23

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181223002>

第一作者研究方向为水稻基因挖掘与利用, E-mail: xvfeifei61@163.com; 纪志远为共同第一作者

通信作者: 王春连, 研究方向为水稻抗病分子生物学及遗传育种, E-mail: wangchunlian@caas.cn

基金项目: 国家重点研发计划“七大农作物育种”(2017YFD0100202)

Foundation project: The National Priority Program-Breeding New Rice Varieties for Southwest China Areas (2017YFD0100202)

叶片衰老是植物发育进程中的最终阶段,也是植物在长期自然进化过程中形成的环境适应性。正常的叶片衰老是由植物本身高度程序化调控的过程,将叶片中光合作用的产物进行分解并转运至生长旺盛的果实或种子中^[1]。因此,植物叶片的衰老进程在保障作物的产量及品质方面起着决定性作用。叶片发生衰老时会伴随着很多复杂的生理生化反应和细胞结构变化。叶绿体解体;核酸与蛋白质的降解;营养物质的循环;降解活性氧的相关酶:超氧化物歧化酶(SOD, superoxide dismutase)、过氧化物酶(POD, peroxidase)和过氧化氢酶(CAT, catalase)减少,导致活性氧大量积累进而氧化功能蛋白、核酸和膜脂,引发膜脂过氧化;同时丙二醛(MDA, malondialdehyde)含量增加,最终造成植株体内的多数组织及细胞受到严重损害,这是叶片出现衰老进程加快的重要原因^[2]。叶片衰老的进程是由一系列内部自身遗传因素和外部环境胁迫因素共同调控的,内部因素主要是植物内源激素和库源关系^[3-4];外部因素主要有栽培因素、非生物和生物胁迫^[5]。叶片早衰造成水稻叶片功能期缩短,可利用营养物质缺乏并严重影响籽粒的发育。水稻叶片早衰是通过降低光合作用效率和减少叶片中光合同化物的积累,从而对水稻产量及质量造成极大的损失和影响^[6-8]。相反,适当地延缓水稻叶片的衰老进程,可增加功能叶片的寿命,增加光合同化物的积累及提高转运效率,最终提高水稻的产量和质量^[9-10]。水稻是将近 30 亿人赖以生存的粮食作物^[11],因此,探究控制水稻早衰的分子机制对提高水稻产量与品质,满足日益增长人口的食物需求具有重要的意义。

植株的衰老过程由一个精细复杂的遗传网络所调控。在叶片衰老过程中,有些基因的表达会下调,也有些基因的表达会上调,这些在 RNA 或者蛋白表达水平上发生明显变化的基因称为衰老相关基因(SAGs, senescence-associated genes)。近年来,研究人员为了阐明水稻叶片衰老的分子机制,克隆了许多衰老相关基因,这些基因主要参与了叶绿体发育及叶绿素降解途径^[12-15];蛋白酶及物质转运代谢途径^[16-19];激素合成与响应途径^[20-24]等生命过程。

本课题组利用 EMS (Ethyl Methyl Sulfone) 诱变水稻籼稻品种金刚 30 (JG30) 获得了 1 份叶片水浸状斑点早衰突变体,暂命名为 *wss1* (*water-soaked spot 1*); 该突变体在分蘖盛期叶片出现水浸

状斑点表型,之后水浸状斑点的叶片开始坏死,最终叶片枯死。本研究分析了突变体 *wss1* 的表型特征、叶片细胞形态、叶片组织化学染色、叶片中控制早衰性状的基因表达及基因定位等,为进一步克隆目标基因及揭示水稻早衰的分子和生理机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

本实验室前期用 EMS 诱变水稻籼稻品种 JG30,在诱变群体 M₂ 中鉴定出了一个在分蘖期叶片表现出水浸状、孕穗期叶片表现出早衰的突变体 *wss1*,连续多代自交突变性状能够稳定遗传。广亲和水稻材料 02428、突变体 *wss1* 及其杂交后代 F₁ 和 F₂ 分离群体材料,在不同年份种植于中国农业科学院作物科学研究所网室(北京)、北京顺义基地和海南三亚南滨农场中国农业科学院作物科学研究所南繁基地,常规水肥管理。

1.2 光合色素含量测定

分别在苗期和分蘖期测定突变体 *wss1* 与野生型 JG30 叶片的叶绿素含量,测定时自上而下选取 4 片叶片混合测定。具体步骤如下:去除叶片的主脉,剪成 2~3 mm 的小块,浸于 25 mL 丙酮:乙醇(1:1, v/v)混合液中,黑暗处理 24~48 h。用紫外分光光度计(DU640)测定提取液在 645 nm 和 663 nm 2 个波长下的 OD 值,重复 3 次。根据 Lichtenthaler^[25]改进的 Arnon 计算方法,分别算出叶绿素 a 和叶绿素 b 含量。公式如下:

$$\text{叶绿素 a (Chl. a) 含量 (mg/g)} = (12.7\text{OD}_{663} - 2.69\text{OD}_{645})V/1000W;$$

$$\text{叶绿素 b (Chl. b) 含量 (mg/g)} = (22.9\text{OD}_{663} - 4.68\text{OD}_{645})V/1000W。$$

1.3 细胞形态观察

在水稻分蘖盛期,分别观察突变体 *wss1* 的水浸状叶片和野生型 JG30 的正常叶片的细胞形态,参照龙海馨^[26]的方法。选取突变体 *wss1* 的水浸状叶片和野生型 JG30 的正常叶片用 FAA 固定液(38% 甲醛 5 mL、冰醋酸 5 mL、70% 酒精 90 mL)固定 24 h,然后分别用 40%、60%、80% 与 100% 浓度的酒精逐级脱水各 50 min,将脱水完毕的叶片放于 1.25 g/mL 的水合氯醛溶液中,96 °C 水浴 60 min。刮除叶片上表皮组织,将透明的下表皮细胞置于 BX43 (Olymps, Tokyo, Japan) 光学显微镜下观察细胞形态并照相。

1.4 细胞组织化学染色

台盼蓝染色可以检测细胞膜的完整性,台盼蓝染色参照 Yin 等^[27]的方法。取突变体 *wss1* 表现出水浸状的叶片与野生型 JG30 的正常叶片,剪成 3~5 cm 长浸泡在台盼蓝染液(2.5 g 台盼蓝、0.25 g 乳酸、230 μ L 水溶苯酚、250 μ L 甘油、520 μ L ddH₂O)中,沸水浴染色 2 min,自然冷却后室温染色过夜,于 1.25 g/mL 水合氯醛脱色 3 d,每天换 1 次脱色液。光学显微镜 BX43 (Olymps, Tokyo, Japan) 观察细胞染色情况并拍照记录。

1.5 水稻衰老相关基因实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

在水稻分蘖盛期,采用 Trizol 法 (Invitrogen) 提取野生型与突变体叶片总 RNA。根据反转录试剂盒 (KR106, 天根生化科技(北京)有限公司) 说明书要求,将 RNA 反转录成 cDNA。水稻基因 *Osh69*^[28]、*Os185*^[29]、*SGR*^[30] 和 *RCCRI*^[31] 与水稻衰老相关,因此利用 qRT-PCR 分析这 4 个衰老基因在野生型及突变体中的表达情况,扩增引物见表 1。qRT-PCR 分析采用 ABI 7500/7500 Fast Real-Time PCR System 仪器,相对表达量参考 Livak 等^[32] 报道的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法,用水稻泛素基因 (*OsUbi*) 做为标准化内参,扩增引物见表 1。按照 SYBR[®] Premix ExTaq[™] II 试剂盒的说明进行操作(大连宝生生物公司)。每个样品设置 3 个重复。qRT-PCR 体系(20 μ L) 含 2 μ L cDNA、0.8 μ L 引物、10 μ L SYBR Green PCR Master Mix、7.2 μ L ddH₂O。PCR 程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers for qRT-PCR

引物 Primer	正向引物序列 Forward primer sequence	反向引物序列 Reverse primer sequence
<i>Osh69</i>	CCACAACACGGATAACTT	GGTGAACACTATGGAACA
<i>Os185</i>	GAGCAACGGCGTGGAGA	GCGGCGGTAGAGGAGATG
<i>SGR</i>	AGGGGTGTACAACAAGCTG	GCTCCTTGCAGGAAGATGTAG
<i>RCCRI</i>	CGCAITTCCTCATGGAATTT	CTTCTCACGCTGTTTGCCA
<i>OsUbi</i>	GCTCCGTGGCGGTATCAT	CGGCAGTTGACAGCCCTAG

1.6 水稻白叶枯病菌及接种鉴定

用水稻白叶枯病菌接种鉴定水稻对白叶枯病的抗性,白叶枯病菌接种及鉴定参照 Wang 等^[33]的方法。本研究采用的水稻白叶枯病菌为国际鉴别小种 PXO99^A,接种前从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱取出,在 TSA 固体

培养基(10 g 胰蛋白胨、10 g 蔗糖、1 g 谷氨酸、15 g 琼脂粉、1 L ddH₂O)上复壮,28 $^{\circ}$ C 培养 48 h,用无菌水洗脱,浓度调至 OD₆₀₀=1.0。在分蘖期分别选取 10 株野生型和 10 株突变体,每株选取 3 片完全展开叶片用剪刀蘸取菌液后进行剪叶接种,接种 15 d 后测量病斑长度。

1.7 分子标记定位

以粳稻品种 02428 为母本与突变体 *wss1* 杂交, F₁ 自交收种,在海南种植成 F₂ 作图群体。选择 F₂ 中的突变体表型单株进行基因定位。采用 BSA (Bulked Segregant Analysis) 法,分别取 F₂ 中正常表型植株和突变表型植株各 10 株的 DNA 等量混合,构成正常基因池和突变基因池。利用本实验室开发的均匀分布于水稻 12 条染色体上的 240 对 InDel 分子标记,对两个亲本(02428 和 *wss1*) 进行多态性筛选,用筛选到的多态性标记对两个 DNA 混池进行多态性分析,寻找与目标基因连锁的标记,部分标记见表 2。PCR 体系为 10 μ L,包括 0.5 μ L 模板 DNA、0.4 μ L 10 μ mol/L 引物、5 μ L 2 \times Taq Master Mix 和 4.1 μ L ddH₂O。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环;再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染显色后,观察记录扩增条带并照相。

表 2 本研究使用的 InDel 分子标记

Table 2 InDel makers used in this study

分子标记 Marker	正向引物序列 Forward primer sequence	反向引物序列 Reverse primer sequence
Ch11-10	ACAATCCGTACTGCGGTG	GCTAGCTACTCCGTACCAAAA
Ch11-24	TCGGTCCCGTCTAGACAATC	ATGATCGATCCGATCCAAAG
Ch11-33	GCTTTCGGTGAGGAGTTTGA	GCCCTTTTAAGCACATGGAG
Ch11-34	TTTGTATACGTGGGAACGTC	TCTCTCTCGTCTTTCCAT
CH11-11	ATGCAAAACCAGCTGCAACC	TCCTGCAAATGTAAGCCTGT
Ch11-38	CAAGCAGGTGGTGAATGGG	AAGAACCAAGTGCTCAACCG
CH11-42	AGGCAACAACCAACAATG	CATGACATGTGCAGCAGAAA
CH11-123	GGGAAACGGATCAAGTCTAGC	CAAACATAGATGACGGACTGCA
CH11-141	GCGGATATGGATGTGGATA	GAATTAGGCCATTGGATGGA
CH11-12	TGGTTGTTCTACTGCCATCA	GGGGAAGTTGGAGATGACCAG

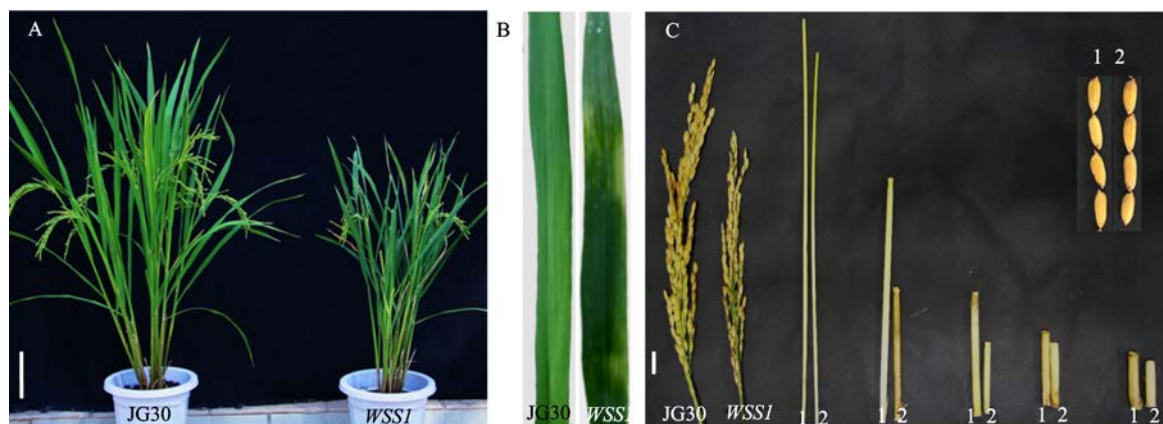
2 结果与分析

2.1 突变体 *wss1* 的表型及主要农艺性状

本研究在用 EMS 诱变水稻籼稻品种 JG30 时,发现从出苗到分蘖前期叶片表现正常但植株较矮

的突变体,到分蘖期以后叶片的一些部位逐渐表现出浅绿色的水浸状斑点(图 1B),孕穗期水浸状叶片部位逐渐枯死从而导致叶片出现早衰表型,而野生型在相同时期叶片均表现正常且未出现早衰症状(图 1A、B)。在成熟期分别随机选取野生型与 *wss1* 各 10 株,考查株高、节间长度、分蘖数、有效穗和结实率等主要农艺性状。结果表明,与野生型相比,

wss1 突变体株高降低近 30%,其主茎穗长及第 I、II、III、IV 和 V 茎节长度分别缩短了 27.8%、22.6%、30.2%、33.8%、22.5% 和 32.8%(图 1C,表 3);突变体的穗粒数比野生型减少了 50%(表 3);野生型结实率为 90.7%,突变体只有 70.7%。野生型与突变体的籽粒形状和籽粒大小无明显变化(图 1C),分蘖数也无显著差别(表 3)。



A: 抽穗期 JG30 和 *wss1* 的表型, Bar=10 cm; B: 分蘖期 JG30 和 *wss1* 的叶片表型; C: JG30 和 *wss1* 的穗、茎、节间和粒型的表型, Bar=10 cm, 1: JG30; 2: *wss1*

A: Phenotype of JG30 and mutant *wss1* at the heading stage, Bar=10 cm. B: Leaf phenotype of JG30 and *wss1* at the tillering stage.

C: Panicle, stem, internodes and grain shape phenotype of JG30 and *wss1*, Bar=10 cm. 1: JG30, 2: *wss1*

图 1 JG30 与突变体 *wss1* 的表型特征

Fig.1 Phenotype of JG30 and mutant *wss1*

表 3 野生型 JG30 与突变体 *wss1* 的农艺性状分析

Table 3 Agronomic characters of JG30 and *wss1*

性状 Traits	野生型 Wild type	突变体 Mutant
株高 (cm) Plant height	75.01 ± 4.56	51.7 ± 2.85**
分蘖数 Tiller number	5.90 ± 0.54	5.40 ± 0.66
穗粒数 Grain number/panicle	125.60 ± 6.33	64.12 ± 6.68**
结实率 (%) Seed setting rate	90.7	70.7
穗长 (cm) The length of panicle	18.74 ± 1.32	14.21 ± 1.22**
第 1 节间长度 (cm) The length of first internodes	22.12 ± 1.61	17.11 ± 1.68**
第 2 节间长度 (cm) The length of second internodes	12.99 ± 0.85	7.679 ± 0.85**
第 3 节间长度 (cm) The length of third internodes	7.11 ± 0.83	4.71 ± 0.72**
第 4 节间长度 (cm) The length of fourth internodes	4.35 ± 0.46	3.37 ± 0.38**
第 5 节间长度 (cm) The length of fifth internodes	2.56 ± 0.22	1.72 ± 0.18**

*表示野生型与突变体在 0.05 水平差异显著;**表示野生型与突变体在 0.01 水平差异显著

* Represents significant difference between the mutant and wild type at the 0.05 probability level

** Represents significant difference between the mutant and wild type at the 0.01 probability level. The same as below

2.2 突变体叶绿素含量测定

在苗期即在没有出现突变体表型前,对野生型 JG30 和突变体 *wss1* 的叶绿素含量进行测定,叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量在二者之间都没有明显差异。在分蘖盛期突变体 *wss1* 出现水浸状后,测定叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量,结果发现与野生型 JG30 相比,突变体 *wss1* 叶片中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量均显著降低(图 2)。说明突变体 *wss1* 叶片出现水浸状表型导致其光合色素含量降低,影响其正常的生长发育。

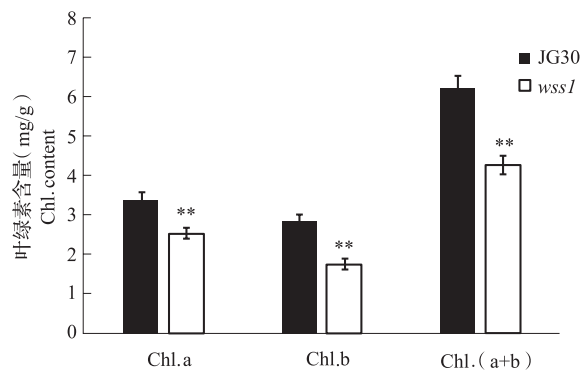
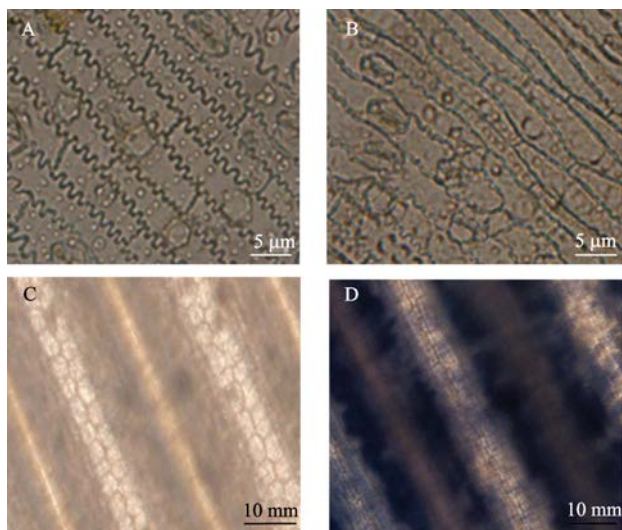


图 2 分蘖盛期 *wss1* 和 JG30 叶片的叶绿素含量
Fig.2 Chlorophyll content of leaves in *wss1* and JG30 plants at tillering stage

2.3 突变体 *wss1* 的下表皮细胞观察

将突变体 *wss1* 的水浸状叶片部位与野生型 JG30 正常叶片部位的上表皮细胞刮除,在光学显微镜下观察二者的下表皮细胞。野生型下表皮叶片细胞呈现规则的长方形形状、排列紧密且具有完整的细胞结构。而 *wss1* 叶片部位的下表皮细胞发生了明显的形态变化,表现为细胞形状不规则,细胞的排列疏松,细胞结构发生了明显的变化(图 3A、B)。



A: JG30 叶片下表皮细胞; B: 突变体叶片下表皮细胞; C: JG30 叶片台盼蓝染色结果; D: *wss1* 水浸状部位叶片台盼蓝染色结果

A: The leaf epidermal cell of JG30, B: The leaf epidermal cell of *wss1*, C: Trypan staining of JG30 leaf, D: Trypan staining of *wss1* leaf

图 3 *wss1* 叶片细胞形态观察

Fig.3 The leaf cell morphology of *wss1*

2.4 叶片组织化学染色

将突变体 *wss1* 水浸状部位叶片与野生型 JG30 的叶片浸泡在台盼蓝染液中染色,然后在光学显微镜下观察。突变体水浸状部位的叶片被台盼蓝染液染为蓝色,野生型叶片没有被台盼蓝染液染上蓝色(图 3C、D)。结果表明,突变体水浸状部位叶片的细胞膜透性变大,使得台盼蓝染液进入细胞内将细胞染为蓝色。

2.5 衰老相关基因实时荧光定量 PCR 分析

由于本研究发现的突变体在表型上出现早衰的症状,因此在分蘖盛期利用 qRT-PCR 分析突变体 *wss1* 与野生型中衰老相关基因的表达情况。*Osh69* 和 *OsI85* 分别编码种子休眠蛋白和异柠檬酸裂解酶,是水稻叶片衰老的标志基因;*SGR* 和 *RCCR1* 分别编码叶绿体转运肽蛋白和红色叶绿素代谢产物还原酶与叶绿体降解相关。qRT-PCR 分析结果显示,

与野生型相比,突变体 *wss1* 中衰老相关基因 *SGR*、*RCCR1*、*Osh69* 和 *OsI85* 都出现显著上调,2 个衰老的标志基因 *Osh69* 和 *OsI85* 表达量分别上调 6.28 和 2.14 倍,叶绿素降解相关基因 *SGR* 和 *RCCR1* 表达量分别上调 2.14 和 2.44 倍(图 4)。

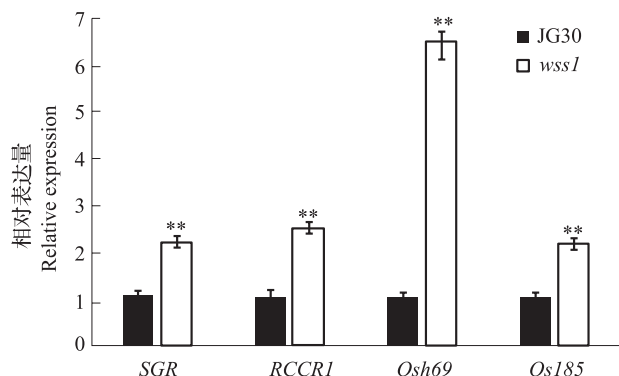


图 4 衰老及光合作用相关基因表达量分析

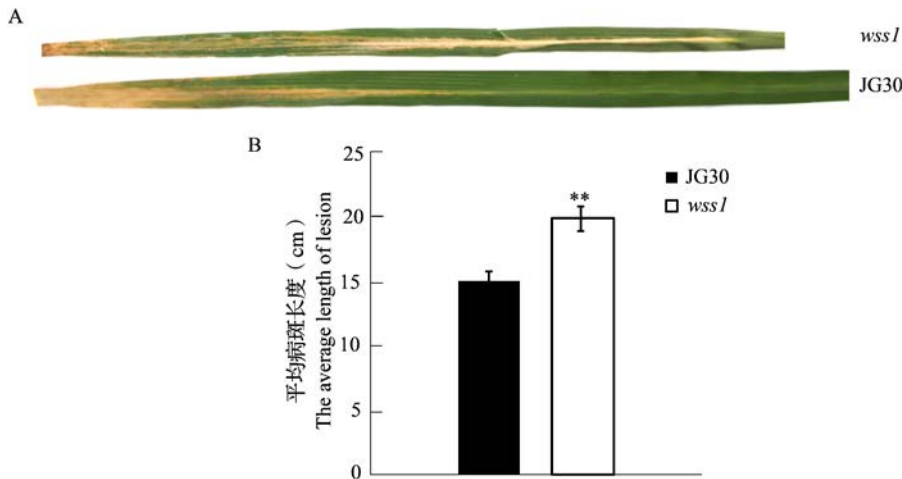
Fig.4 qRT-PCR analysis of senescence and photosynthesis associated genes

2.6 突变体 *wss1* 对白叶枯病菌的抗性鉴定

野生型 JG30 是一个广谱感白叶枯病材料,对国内外的白叶枯病菌都有不同程度的感病,为了探明突变体在抗性上是否发生变化,因此用白叶枯病菌 PXO99^A 进行剪叶接种鉴定。接种 15d 后调查发现,突变体 *wss1* 的发病程度比野生型 JG30 更严重,病斑长度明显长于野生型(图 5A、B)。

2.7 突变体 *wss1* 的遗传分析及目的基因定位

粳稻品种 02428 与突变体 *wss1* 杂交, F₁ 植株均表现正常,在 F₂ 群体中出现正常叶片植株与水浸状斑点叶片植株的性状分离,说明该突变性状受隐性基因控制。在 F₂ 群体中有 3340 株植株,其中检测到 787 株突变体植株,经卡方(χ^2)检测验证($\chi^2=3.60 < \chi^2=3.84$),符合 3:1 分离比,表示 *wss1* 叶片早衰性状由 1 对隐性基因控制。选取平均分布于 12 条染色体上的 240 对 InDel 标记,对父本(突变体 *wss1*)、母本(02428)进行多态性分析,共检测到 233 对在双亲间有多态性的标记。利用筛选到的多态性标记对突变体 DNA 池和正常植株 DNA 池又进行了筛选。结果发现只有 3 对标记 Ch11-10、Ch11-11、Ch11-12 在突变体 DNA 池与正常植株 DNA 池之间有多态,这 3 个标记均位于第 11 染色体长臂上(表 2)。用这 3 个多态标记对 F₂ 群体中的突变单株进行筛选,结果显示 3 个标记 Ch11-10、Ch11-11 和 Ch11-12 分别筛选到 13 株、0 株和 6 株交换单株。其中 Ch11-10 位于基因的一侧,Ch11-12



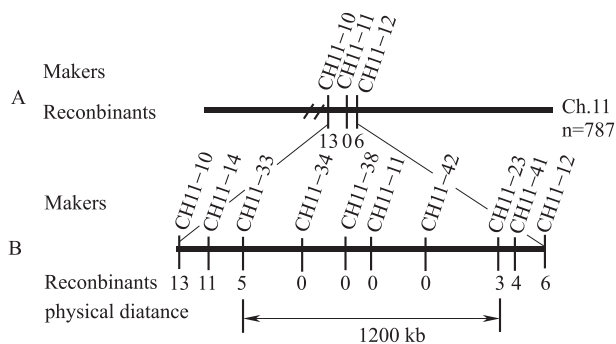
A: 野生型 JG30 与突变体 *wss1* 病斑对比图; B: 野生型 JG30 与突变体 *wss1* 病斑长度统计直方图
A: JG30 and *wss1* exhibited different lesion lengths, B: Histogram of lesion length of JG30 and *wss1*

图 5 *wss1* 的抗病鉴定

Fig.5 The resistance identification of *wss1*

位于基因的另一侧(图 6A),根据标记所在染色体的位置,初步将 *Oswss1* 基因定位在水稻第 11 染色体长臂着丝粒区附近,标记 Ch11-10 与标记 Ch11-12 之间约 2330 kb。

为了进一步精确定位 *Oswss1* 基因,在标记 Ch11-10 与 Ch11-12 开发了 24 对 InDel 标记,其中有 14 对在双亲与突变体 DNA 混池间存在多态性(表 2),通过筛选 F₂ 单株,有 4 个标记 Ch11-24、Ch11-33、Ch11-123 和 Ch11-141 分别出现了 11 株、5 株、3 株、4 株交换单株(图 6B),而位于 Ch11-33、Ch11-123 两个标记之间的 10 个标记虽然在双亲与池间均存在多态性,但未发现交换植株(图 6B)。根据各标记在染色体上的位置,将 *Oswss1* 基因定位在标记 Ch11-33 和 Ch11-123 之间大约 1200 kb 的区域内(图 6)。



A: *Oswss1* 与标记 Ch11-10、Ch11-11 和 Ch11-12 连锁;

B: 利用 787 个分离单株将 *Oswss1* 定位到 1200 kb 的区间内

A: *Oswss1* was linked with makers Ch11-10, Ch11-11 and Ch11-12,

B: *Oswss1* was located in 1200 kb region based on 787 segregated plants

图 6 *Oswss1* 的基因定位图

Fig.6 Location of gene *Oswss1*

3 讨论

目前已报道的早衰突变体 *psl1*^[34] 表现为苗期早衰、*pse(t)*^[35] 为斑点衰老、*sms1*^[36] 为褐色斑点早衰和 *es-t*^[37] 为铁锈斑点早衰,这些突变体的表型与本研究报道的早衰突变体 *wss1* 的表型明显不同。*wss1* 突变体在分蘖盛期叶片出现水浸状斑点,此时突变体叶片内的叶绿素含量相比野生型下降 30%,其叶片的细胞结构被破坏,叶片表现出坏死的症状。到孕穗期,叶片出现枯萎,早衰表型十分明显。农艺性状调查发现突变体 *wss1* 的株高、穗粒数和结实率等重要产量性状出现明显降低。对突变体及野生型进行水稻白叶枯病抗性鉴定发现,突变体病斑长度明显长于野生型。突变体感病性增强的原因有可能是叶片出现水浸状后细胞结构被破坏,使其抵御外来病原菌入侵的能力下降。研究还发现 *wss1* 叶片中促进衰老的基因 *Osh69*、*Osl85* 及叶绿素降解相关基因 *SGR*、*RCCR1* 表达量出现明显上调。因此,推测 *OsWSS1* 基因的突变导致早衰相关基因的表达和叶绿体降解相关基因的激活促使叶片中叶绿体降解速率加快,叶绿素含量降低,造成突变体 *wss1* 叶片出现早衰表型,降低了主要的产量农艺性状。

通过对水稻叶片衰老调控基因的克隆和功能研究,揭示其遗传调控网络,可为提高水稻的光合能力和光合物质的转运奠定理论基础,从而有助于水稻的高产及稳产。目前在水稻中有 50 多个早衰相关基因被克隆,已克隆的基因在除第 1、第 8 和第 12 染色体外的其他 9 条染色体上均有分布^[38]。其

中在第 11 染色体上克隆的早衰相关基因有 *Lad* 和 *LS1*, 在染色体上分别位于 21130952~21916830 bp 和 2529744~2532695 bp 的位置^[39-40]。*lad* 早衰突变体的表型特征是叶尖出现明显早衰。*ls1* 突变体是在高温高光条件下叶片表现出细胞凋亡和叶片萎缩的表型, 图位克隆结果表明 *LS1* 基因编码一个水稻核糖核酸酶 H2 大亚基 A (RNaseH2A)。而本研究鉴定的突变体 *wss1*, 不论是表型还是在染色体上的位置都与 *lad* 和 *ls1* 不同。经遗传分析和基因初步定位表明, *wss1* 受一对隐性基因控制, 位于第 11 染色体着丝粒附近约 1200 kb 范围内。目前该区域内尚未有衰老相关基因的报道, 表明 *OsWSS1* 是一个新的早衰调控基因。该基因距离着丝粒约 1 Mb, 而着丝粒是一个大的区域, 该区域附近发生交换的概率较小, 在定位群体中虽然有 787 株突变体类型, 但对于此区域来说, 突变体植株相对较少, 导致精细定位时发生交换的植株数目少, 定位的区间距离较大。后期将运用不同遗传背景的材料, 或采用直接测序法进行精细定位。

目前有报道的水浸状性状仅仅表现在叶片受冻害后细胞膜结构被破坏, 导致作物细胞液外渗到组织间隙从而使叶片表现出水浸状^[41]。*wss1* 在分蘖盛期叶片表现出水浸状时并未受到明显的冷胁迫, 推测 *wss1* 叶片表现出水浸状是由于细胞膜结构被破坏导致细胞液外渗造成的, 细胞膜结构的破坏导致叶片坏死, 叶绿素含量降低和光合作用效率降低从而影响作物的产量。因此控制 *wss1* 早衰的基因可能是与细胞膜的结构与稳定性相关的基因。本研究获得的结果为克隆该基因以及深入研究该基因的功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Lim P O, Kim H J, Nam H G. Leaf senescence. Annual Review of Plant Biology, 2007, 58: 115-136
- [2] Huang Q N, Shi Y F, Zhang X B, Song L X, Feng B H, Wang H M, Xu X, Li X H, Guo D, Wu J L. Single base substitution in *OsCDC48* is responsible for premature senescence and death phenotype in rice. Journal of Integrative Plant Biology, 2016, 58(1): 12-28
- [3] Jibrán R, Hunter D, Dijkwel P. Hormonal regulation of leaf senescence through integration of developmental and stress signals. Plant Molecular Biology, 2013, 82(6): 547-561
- [4] Koyama T. A hidden link between leaf development and senescence. Plant Science, 2018, 276: 105-110
- [5] Park B S, Yao T, Seo J S, Wong E C C, Mitsuda N, Huang C H, Chua N H. Arabidopsis NITROGEN LIMITATION ADAPTATION regulates ORE1 homeostasis during senescence induced by nitrogen deficiency. Nature Plants, 2018, 4(11): 898-903
- [6] Mitchell P, Sheehy J. Supercharging rice photosynthesis to increase yield. New Phytologist, 2006, 171(4): 688-693
- [7] Gregersen P L, Culetic A, Boschian L, Krupinska K. Plant senescence and crop productivity. Plant Molecular Biology, 2013, 82(6): 603-622
- [8] Yang Y L, Xu J, Huang L C, Leng Y J, Dai L P, Rao Y C, Chen L, Wang Y Q, Tu Z J, Hu J, Ren D Y, Zhang G H, Zhu L, Guo L B, Qian Q, Zeng D L. *PGL*, encoding chlorophyllide a oxygenase 1, impacts leaf senescence and indirectly affects grain yield and quality in rice. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(5): 1297-1310
- [9] Guo Y F, Gan S S. Translational researches on leaf senescence for enhancing plant productivity and quality. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(14): 3901-3913
- [10] Carmo-Silva E, Andraloic P, Scales J, Driever S, Mead A, Lawson T, Raines C, Parry M. Phenotyping of field-grown wheat in the UK highlights contribution of light response of photosynthesis and flag leaf longevity to grain yield. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(13): 3473-3486
- [11] 姜树坤, 张喜娟, 王嘉宇, 张凤鸣. 水稻幼穗-颖花发育的研究进展. 植物遗传资源学报, 2012, 13(6): 1018-1022
Jiang S K, Zhang X J, Wang J Y, Zhang F M. Research advancement on development of uoung panicle and spikelet in rice. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(6): 1018-1022
- [12] Morita R, Sato Y, Masuda Y, Nishimura M, Kusaba M. Defect in non-yellow coloring 3, an alpha/beta hydrolase-fold family protein, causes a stay-green phenotype during leaf senescence in rice. The Plant Journal, 2009, 59(6): 940-952
- [13] Jiang H W, Chen Y P, Li M R, Xu X L, Wu G J. Overexpression of *SGR* results in oxidative stress and lesion-mimic cell death in rice seedlings. Journal of Integrative Plant Biology, 2011, 53(5): 375-387
- [14] Jiao B B, Wang J J, Zhu X D, Zeng L J, Li Q, He Z H. A novel protein RLS1 with NB-ARM domains is involved in chloroplast degradation during leaf senescence in rice. Molecular Plant, 2012, 5(1): 205-217
- [15] Hudson D, Guevara D R, Hand A J, Xu Z, Hao L, Chen X, Zhu T, Bi Y, Rothstein S J. Rice cytokinin GATA transcription factor1 regulates chloroplast development and plant architecture. Plant Physiology, 2013, 162(1): 132-144
- [16] Wang M, Zhang T, Peng H, Luo S, Tan J J, Jiang K F, Heng Y Q, Zhang X, Guo X P, Zheng J K, Cheng Z J. Rice *Premature Leaf Senescence 2*, encoding a glycosyltransferase (GT), is involved in leaf senescence. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 560
- [17] Lee R H, Lin M C, Chen S C. A novel alkaline α -galactosidase gene is involved in rice leaf senescence. Plant Molecular Biology, 2004, 55(2): 281-295
- [18] Rao Y C, Yang Y L, Xu J, Li X J, Leng L P, Dai L P, Huang L C, Shao G S, Ren D Y, Hu J, Guo L B, Pan J W, Zeng D L. *EARLY SENESCENCE1* encodes a SCAR-LIKE PROTEIN2 that affects water loss in rice. Plant Physiology, 2015, 169(2): 1225-1239
- [19] Leng Y, Yang Y, Ren D, Huang L C, Dai L P, Wang Y Q, Chen L, Tu Z J, Gao Y H, Li X Y, Zhu L, Hu J, Zhang G H, Gao Z Y, Guo L B, Kong Z S, Lin Y J, Qian Q, Zeng D L. A rice *PECTATE LYASE-LIKE* gene is required for plant growth and leaf

- senescence. *Plant Physiology*, 2017, 174(2): 1151-1166
- [20] Kong Z S, Li M, Yang W Q, Xu W Y, Xue Y B. A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiology*, 2006, 141(4): 1376-1388
- [21] Liang C Z, Wang Y Q, Zhu Y N, Tang J Y, Hu B, Liu L C, Ou S J, Wu H K, Sun X H, Chu J F, Chu C C. OsNAP connects abscisic acid and leaf senescence by fine-tuning abscisic acid biosynthesis and directly targeting senescence-associated genes in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(27): 10013-10018
- [22] Kim H J, Nam H G, Lim P O. Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, 33: 48-56
- [23] Zhao Y, Chan Z L, Gao J H, Xing L, Cao M J, Yu C M, Hu Y L, You J, Shi H, Zhu Y F, Gong Y H, Mu Z X, Wang H Q, Deng X, Wang P C, Bressan R A, Zhu J K. ABA receptor PYL9 promotes drought resistance and leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(7): 1949-1954
- [24] Hong Y B, Zhang Y X, Sinumporn S, Yu N, Zhan X D, Shen X H, Chen D B, Yu P, Wu W X, Liu Q N, Cao Z Y, Zhao C D, Cheng S H, Cao L Y. Premature leaf senescence 3, encoding a methyltransferase, is required for melatonin biosynthesis in rice. *The Plant Journal*, 2018, doi: 10.1111/tpj.13995
- [25] Lichtenthaler H K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol*, 1987, 148: 350-382
- [26] 龙海馨. 两类水稻窄叶突变体的基因克隆与功能研究. 北京: 中国农业科学院, 2016
Long H X. Map-based gene cloning and functional analysis of two types of rice narrow-leaf mutants. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2016
- [27] Yin Z C, Chen J, Zeng L R, Goh M, Leung H, Khush G S, Wang G L. Characterizing rice lesion mimic mutants and identifying a mutant with broad-spectrum resistance to rice blast and bacterial blight. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(8): 869-876
- [28] Lee R H, Lin M C, Chen S C. A novel alkaline α -galactosidase gene is involved in rice leaf senescence. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(2): 281-295
- [29] Lee R H, Wang C H, Huang L T, Chen S C. Leaf senescence in rice plants: Cloning and characterization of senescence up-regulated genes. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52(358): 1117-1121
- [30] Jiang H W, Li M R, Liang N T, Yan H B, Wei Y B, Xu X L, Liu J, Xu Z F, Chen F, Wu G J. Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice. *The Plant Journal*, 2007, 52(2): 197-209
- [31] Tang Y Y, Li M R, Chen Y P, Wu P Z, Wu G J, Jiang H W. Knockdown of *OsPAO* and *OsRCCR1* cause different plant death phenotypes in rice. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(16): 1952-1959
- [32] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [33] Wang C L, Qin T F, Yu H M, Zhang X P, Che J Y, Gao Y, Zheng C K, Yang B, Zhao K J. The broad bacterial blight resistance of rice line CBB23 is triggered by a novel transcription activator-like (TAL) effector of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15(4): 333-341
- [34] Wang J, Wu S J, Zhou Y, Zhou L H, Xu J F, Hu J, Fang Y X, Gu M H, Liang G H. Genetic analysis and molecular mapping of a presenescent leaf gene *ps11* in rice (*Oryza sativa* L.). *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(24): 2986-2992
- [35] Li F Z, Hu G C, Fu Y P, Si H M, Bai X M, Sun Z X. Genetic analysis and high-resolution mapping of premature senescence gene *Pse(t)* in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 2005, 48(4): 738-746
- [36] Yan W Y, Ye S, Jin Q S, Zeng L J, Peng Y, Yan D W, Yang W B, Yang D I, He Z H, Dong Y J, Zhang X M. Characterization and mapping of a novel mutant *sms1* (*senescence and male sterility 1*) in rice. *Journal of Genetics and Genomics*, 2010, 37(1): 47-55
- [37] Yang Y L, Rao Y C, Liu H J, Fang Y X, Dong G J, Huang L C, Leng Y J, Guo L B, Zhang G H, Hu J, Gao Z Y, Qian Q, Zeng D L. Characterization and fine mapping of an early senescence mutant (*es-t*) in *Oryza sativa* L.. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(23): 2437-2443
- [38] 王备芳, 陈玉宇, 张迎信, 刘群恩, 孙滨, 向小娇, 曹永润, 程式华, 曹立勇. 水稻早衰突变体 *es5* 的鉴定及其突变基因的精细定位. *中国农业科学*, 2018, 51(4): 613-625
Wang B F, Chen Y Y, Zhang Y X, Liu Q E, Sun B, Xiang X J, Cao Y R, Cheng S H, Cao L Y. Identification and fine mapping of an early senescent leaf mutant *es5* in *Oryza sativa* L.. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(4): 613-625
- [39] 杜青, 方立魁, 桑贤春, 凌英华, 李云峰, 杨正林, 何光华, 赵芳明. 水稻叶尖早衰突变体 *lad* 的形态、生理分析与基因定位. *作物学报*, 2012, 38(1): 168-173
Du Q, Fang L K, Sang X C, Ling Y H, Li Y F, Yang Z L, He G H, Zhao F M. Analysis of phenotype and physiology of leaf apex dead mutant (*lad*) in rice and mapping of mutant gene. *Acta Agronomica Sinica*, 2012, 38(1): 168-173
- [40] Qiu Z N, Zhu L, He L, Chen D D, Zeng D L, Chen G, Hu J, Zhang G H, Ren D Y, Dong G J, Gao Z Y, Shen L, Zhang Q, Guo L B, Qian Q. DNA damage and reactive oxygen species cause cell death in the rice *local lesions 1* mutant under high light and high temperature. *New Phytologist*, 2018, doi: 10.1111/nph
- [41] Wright M, Simon E W. Chilling injury in cucumber leaves. *Journal of Experimental Botany*, 1973, 24(2): 400-411