水稻早衰突变体w14的生理学特性分析及其基因的精细定位

朱永生^{1,2,3}, 蒋家煊^{2,3}, 蔡秋华^{2,3}, 郑燕梅^{2,3}, 何炜^{2,3}, 陈丽萍^{2,3}, 魏毅东^{2,3}, 王爱荣^{1*}, 张建福^{1,2,3*}

1. 福建农林大学植物保护学院, 福州 350002;

2. 福建省农业科学院水稻研究所, 福州 350019;

3. 农业农村部华南杂交水稻种质创新与分子育种重点实验室/国家水稻改良中心福州分中心/福建省作物分子育种工程实验室/福建省水稻分子育种重点实验室/福建省作物种质创新与分子育种省部共建国家重点实验室培育基地/杂交水稻国家重点实验室华南研究基地/水稻国家工程实验室, 福州 350003

* 联系人, E-mail: arxg3000@163.com; jianfzhang@163.com

2021-04-07 收稿, 2021-05-17 修回, 2021-05-26 接受, 2021-05-27 网络版发表

国家重点研发计划(2016YFD0101800)、福建省自然科学基金(2018J01039, 2020J011352)和福建省科技重大专项(2020NZ08016)资助

摘要 水稻叶片早衰对水稻的产量及品质均有重要影响, 研究早衰的机理对于延缓衰老和选育良种具有重要意义. 本文以甲基磺酸乙酯(ethylmethanethiosulfonate, EMS)诱变野生型粳稻品种云引(Yunyin, YY)获得的水稻早衰突变体w14为材料, 研究了早衰突变体全生育期的生理及组织亚显微结构的变化. 研究表明, 突变体从分蘖盛期开始表现出生长势弱, 生长速度慢, 抽穗期出现明显的叶片早衰症状, 最终突变体整株呈现衰老枯萎. 亚显微结构观察表明, 突变体出现明显衰老表型后, 叶片表面泡状细胞破损, 细胞结构排列松散, 完整性降低, 突变体细胞中细胞核数目明显减少, 胞内细胞核降解. 分别在衰老症状出现前后(苗期和成株期)对突变体和野生型的可溶性蛋白、叶绿素、脂质过氧化物(lipid peroxidation, LPO)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量和过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及过氧化氢酶(catalase, CAT)活性进行了系统检测, 表明突变体的衰老症状可能主要是由于组织CAT的活性下降导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的累积引起. 通过图位克隆方法将目的基因w14定位于水稻3号染色体上, 位于InDel标记3-7和3-9之间大约76 kb的物理区间内. 该区间内共包含8个候选基因, 为该突变性状基因w14的克隆、功能研究和深入了解该突变体早衰的机制奠定了基础.

关键词 水稻, 早衰, 生理特性, 显微结构, 基因定位

叶片是植物进行光合作用合成有机物质的主要场所, 是植物的源器官. 正常的叶片衰老是植物适应环境的一种自然表现^[1]. 而叶片发生早衰则会对农作物的光合效率、产量及品质等造成较大的影响^[2]. 水稻产量的95%来自叶片^[3], 水稻等禾谷类作物的功能叶在灌浆的中后期若出现早衰, 将影响种子形成过程中的糖类物质积累, 进而影响水稻的产量^[4]. 有研究报道, 水稻灌

浆期功能叶推迟1 d衰老, 理论产量可以增加2%左右, 实际上也能够增产1%左右^[5]. 此外, 延缓衰老对改善稻米品质也有重要的意义^[6].

植物叶片的衰老是一个包含程序性细胞凋亡的复杂过程, 受到遗传因素的调控和环境压力的双重影响^[7]. 关于植物叶片衰老的原因, 许多学者从不同的角度提出了多种重要的学术观点或理论假说, 主要包括

引用格式: 朱永生, 蒋家煊, 蔡秋华, 等. 水稻早衰突变体w14的生理学特性分析及其基因的精细定位. 科学通报, 2021, 66: 4144–4156

Zhu Y S, Jiang J H, Cai Q H, et al. Analysis of physiological characteristics of early leaf senescence mutant w14 and its gene mapping for rice (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 4144–4156, doi: [10.1360/TB-2021-0012](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0012)

基因调控说、营养胁迫说、自由基损伤说、光碳失衡说以及激素平衡说等^[8]。近年来,国内外对植物叶片早衰的研究已有诸多报道,主要包括早衰植株后期的叶片形态结构变化、生理生化特征以及衰老相关基因的精细定位、克隆和功能研究等方面^[9]。研究者基于突变体策略,至今已从水稻中克隆并经遗传转化验证或者T-DNA插入验证的叶片衰老相关基因有27个。按照功能可将其大致分成6类,主要有转录因子,包括*OsHox33*^[10]、*OsDOS*^[11]、*OsNAP*^[12]、*OsTZF1*^[13]、*Cgal*^[14]和*SUB1A*^[15]等;与合成、代谢相关的基因,包括*OsAkGal*^[16]、*OsI2*^[17]、*OsRCCRI*^[18]、*OsPAO*^[18]、*NYC3*^[19]、*nyc1*^[20]、*NYC4*^[21]、*SGR*^[22,23]、*SGRL*^[24]、*GDCH*^[25]、*RLSI*^[26]、*noli*^[27]和*AI2*^[28];蛋白酶或激酶基因,包括*OsSAG12-1*^[29]、*OsSIK2*^[30]、*Osh69*^[31]和*OsABC1-2*^[32]等;RNA或GTP结合蛋白基因*OsLMS*^[33]和*OsRab7B3*^[34];生物合成相关基因*ygl1*^[35]以及物质转运相关基因*SPL28*^[36]。由此可见,植物衰老涉及的调控基因较多,代谢网络错综复杂,是一个极其复杂和重要的生命过程。截至目前,限于对衰老调控基因功能和机制的认识,尚未能构建完整、清晰地解析植物衰老的系统网络。

本研究利用甲基磺酸乙酯(ethylmethylsulfone, EMS)化学诱变梗稻品种YY,通过两代自交和表型鉴定后获得一个稳定的叶片早衰的突变体*w14*。该突变体从分蘖盛期开始至抽穗、灌浆期逐步从倒二、三叶出现早衰,至成熟期突变体整株衰老枯死,出现明显的早衰终末。鉴于水稻衰老对农业生产的重要性和早衰机制的复杂性,本研究以早衰突变体*w14*和野生型YY为研究材料,从农艺性状、生理指标、叶片的组织化学染色和切片观察等方面进行了分析,并对目标基因进行了遗传学研究和精细定位。结果表明,该突变体的早衰表型受一个隐性核基因控制,暂命名为*w14*。对该基因的精细定位区间进行生物信息学分析发现,该基因为一个新的与叶片衰老相关的基因。本研究为该突变体早衰基因*w14*的克隆和功能研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

梗稻品种YY引自云南省农业科学院,由福建省农业科学院水稻研究所繁殖和保存。突变体*w14*由野生型品种YY经0.8% EMS诱变后经多代筛选、鉴定及自交稳定获得。

1.2 方法

1.2.1 田间种植和农艺性状调查

从EMS化学诱变梗稻品种YY的后代中获得叶片早衰的突变体*w14*,经福建省沙县夏茂镇福建省农业科学院水稻研究所水稻育种基地和海南省三亚市福建省南繁育种基地穿梭选择,多代表型鉴定和自交获得稳定遗传的株系。田间种植选取肥力中等偏上,进行常规的大田水、肥和病、虫害管理,田间种植规格为20 cm×22 cm,单本插5行,每行7株,突变体和野生型相邻种植,各重复种3个小区。待水稻成熟期取样,每小区取样10株,综合考察生育期、株高、穗粒数、千粒重、单株有效穗数、结实率等主要的农艺性状。

1.2.2 可溶性蛋白提取和浓度测定

分别于苗期(25 d)和成株期(约移栽后2个月)同时取野生型YY和突变体*w14*的叶片,液氮速冻后碾磨,按照1:9的比例,即每1 g组织加入9 mL磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.0),充分混匀后10000 r/min离心10 min,吸取上清,置-80℃保存备用。总蛋白浓度使用碧云天BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型,产品编号:P0010)进行测定,具体步骤按照说明书操作。

1.2.3 抗氧化系统指标检测

分别于苗期(25 d)和成株期(约移栽后2个月)对突变体和野生型的叶片叶绿素含量、CAT(试剂盒:A007-1-1)、SOD(试剂盒:A001-3-1)、POD(试剂盒:A084-3-1)、LPO(试剂盒:A106-1-2)和MDA(试剂盒:A003-3-1)的浓度(活性)进行测定,具体步骤均按照购自南京建成生物工程研究所的相关试剂盒说明书操作。每个指标测3次重复。

1.2.4 组织化学染色和TUNEL法检测细胞凋亡

氯化硝基四氮唑蓝(nitroblue tetrazolium chloride, NBT)染色和二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)染色方法参照Kaur等人^[37]的方法进行。TUNEL(TdT-mediated dUTP nick-end labeling)检测用Abcam的TUNEL Assay试剂盒-FITC(fluorescein isothiocyanate, FITC)荧光(ab66108)进行。

1.2.5 石蜡切片与显微观察

待突变体植株出现衰老表型后,与相同生育期野生型取剑叶相同部位的组织放入甲醛-乙酸-乙醇(formalin-aceto-alcohol, FAA)固定液中并抽真空,静置2~3 d。参照Liu等人^[38]的方法,用不同浓度酒精(70%、

50%、25%)逐级复水,每个浓度处理30 min后,再置于苏木精染色液(由冰醋酸与50%的无水乙醇和2%的苏木精按照1:1:2的体积配制)染色2 d.再经梯度浓度酒精(30%、50%、70%、85%、95%、100%)逐步脱水,每个浓度处理2 h,再置于番红染色液(3%番红与无水乙醇按照2:1的体积比配制).然后,样品经石蜡包埋成块后用切片机(美康HM315,德国)切片,切片厚度设置为5 μm ,最终将样品固定于玻璃片上置于电子显微镜下(奥林巴斯BX53,日本)观察拍照.

1.2.6 遗传分析群体的构建

以突变体*w14*与日本晴杂交, F_1 套袋自交获得 F_2 .以 F_2 为基因定位群体,并随机收集分离群体的一个种植区域(1000个单株),根据突变体和野生型的表型,统计正常单株和突变单株数量,用于叶片早衰性状的遗传学分析.

1.2.7 基因定位

采用分离群体分组分析法(bulked segregate analysis, BSA),分别从早衰突变体*w14*与日本晴杂交的 F_2 代中选出10株典型早衰症状的单株和10株野生型表型单株的DNA等量混合,构建突变体基因池和野生型基因池.利用简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)标记和插入缺失(insertion-deletion, InDel)标记分别对亲本进行多态性分析,再将多态性标记对两个基因池间的多态性进行分析,找出可能与目标基因连锁的标记(表1).

水稻基因组DNA的提取采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法. PCR反

应体系为:模板1 μL , 10 $\times$ PCR缓冲液1 μL , 25 mol/L的 MgCl_2 1 μL , 2 mol/L dNTPs 1 μL , 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 引物1 μL , *Taq*酶0.25 U, 加ddH₂O补足至10 μL .

PCR反应条件如下:在95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s, 55~60 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s(温度因引物不同而异), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s, 扩增35个循环;最后在72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存. PCR产物在8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,染色后在凝胶成像仪上拍照.

2 结果与分析

2.1 突变体*w14*的早衰表型及其农艺性状

在幼苗5叶期之前,突变体*w14*和YY的叶片状态及整株表型均无显著差异(图1(a)).进入分蘖盛期后,突变体开始表现出生长势弱,生长较慢,叶片从倒1叶开始干枯死亡,并逐渐往上部叶片延伸,出现明显的衰老特征(图1(b)),而野生型相同部位的叶片无明显的衰老症状.随着水稻生育期进程的推进,突变体*w14*在接近成熟期时,所有叶片衰老、整株枯死(图1(c), (d)).突变体的农艺性状除生育期与野生型无显著差异外,在分蘖数、株高、结实率和千粒重等均比野生型YY有着显著的下降(图1(e)~(h)).

2.2 突变体*w14*与野生型的生理学特征

2.2.1 叶绿素含量

分别于苗期(5叶期)和成株期测定野生型YY和突变体*w14*的叶片叶绿素含量.结果表明,在苗期野生型

表1 基因定位所用的引物序列

Table 1 Primers used for gene mapping

标记	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
T85	TACTCTATCCTGCCATGGC	TGTAGTAGACGAGAGGCCGG
D75	TGTCATCGTTGCATGTTTGTT	CAGCAGTTCTCGCATAGTCCT
D73	TGGGCTATTATTGGGCTTTG	CGTGGGATAAAACCACCAAG
GH7	CTGGACAAATGTCACGTGGT	TGGCAATGTGTTTATTTACCC
GH17	GCCATTGGCAATTAATGAGG	TGGTAATCCAAAAGGAACCTGA
GH27	AGCTATTTTGCTGCTGCTC	AAAGCACCCACGTTTGTAGG
3-4	ACTCACCCGTAGCAGCTCAT	TAGGAGGGGGTCAGTCACAC
3-7	AGGCGATTCCCAATTGCTTGC	AGCAGCGAGGAGGGAGAAGAGG
3-9	TCTCCCACTTCACCTCCTCACC	ATCCACCTAACCAACCAAGTTGC
3-10	TTGCCCCGATAATGTGACTG	AAGACTGGAGACTTGGGAGGTG
3-11	TCCACGTGTTATCCTCTCTTTC	CCAGATTCTCGCTTGTACAGG

图1 (网络版彩色)野生型YY和突变体w14苗期和成熟期表型及主要农艺性状。(a) 苗期; (b) 分蘖期; (c) 成熟期; (d) 成熟后期; (e) 分蘖数; (f) 株高; (g) 结实率; (h) 千粒重。标尺为15 cm。*和**分别表示在0.05和0.01水平上的显著性差异

Figure 1 (Color online) Phenotype and main agronomic traits of wild type YY and mutant w14 at seedling and mature stage. (a) Seedling stage; (b) tillering stage; (c) mature stage; (d) later maturity; (e) tiller number; (f) plant height; (g) seed-setting rate; (h) 1000-grain weight. Bar=15 cm. * and ** showed significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively

和突变体的叶绿素a、叶绿素b及类胡萝卜素含量均无显著差异,但在成株期,突变体中叶绿素a、叶绿素b及类胡萝卜素含量均显著低于野生型,分别下降15.5%、37.6%、10.3%,叶绿素总含量下降20.6%(图2)。

2.2.2 抗氧化系统及其生理指标的变化

前人的研究结果显示,植物早衰往往是由于抗氧化系统的破坏,导致植物体内过氧化物的累积引起细胞死亡。鉴于此,本研究系统分析了野生型YY和突变体w14叶片抗氧化系统生理指标的变化,主要包括过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化脂质(lipid peroxidation, LPO)等。结果表明,POD活性分析结果由图3(a)可知,苗期突变体w14叶片POD活性显著($P<0.05$)低于野生型YY,下降了7.42%;成株期突变体叶片POD活性与野生型相比下降9.52%,差异显著($P<0.05$)。过氧化物酶在苗期和成株期均显著下降,说明POD活性的下降对突变体的早衰症状造成了一定的影响。SOD活性分析结果如图3(b)显示,苗期突变体w14叶片SOD活性显著($P<0.05$)高于野生型YY,增加了15.5%;而成株期野生型和突变体叶片SOD活性无显著差异。SOD是植物

体延缓衰老的重要物质之一,突变体衰老后期SOD活性无显著降低,说明其衰老不是因为SOD活性下降引起。CAT活性分析结果由图3(c)表明,苗期突变体叶片w14的CAT活性与野生型YY无显著差异;而成株期突变体w14叶片的CAT活性则显著($P<0.01$)低于野生型

图2 野生型和突变体在苗期和成株期的叶片叶绿素含量。*和**分别表示在0.05和0.01水平上的显著性差异; YY-S和w14-S分别表示野生型YY和突变体w14的苗期样品; YY-M和w14-M分别表示野生型YY和突变体w14的成株期样品

Figure 2 Leaf chlorophyll content of wild type YY and mutant w14 at seedling and adult stage. * and ** showed significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively. YY-S and w14-S are seedling samples of wild type YY and mutant w14, respectively; YY-M and w14-M are adult samples of wild type YY and mutant w14, respectively

图3 野生型YY与早衰突变体w14的生理指标和可溶性蛋白含量。(a)~(f)分别为过氧化物酶活性、超氧化物歧化酶活性、过氧化氢酶活性、丙二醛含量、过氧化脂质和可溶性蛋白含量。*和**分别表示在0.05和0.01水平上的显著性差异

Figure 3 Determination of physiological indexes and soluble protein of wild-type YY and mutant w14. (a)~(f) Indicated POD activity, SOD activity, CAT activity, MDA content, LPO and soluble protein content, respectively. * and ** showed significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively

YY, 下降70.7%, 是所有抗氧化系统指标中下降最多的一种。CAT是催化 H_2O_2 分解成氧和水的酶, 存在于植物细胞的过氧化物体内。过氧化氢酶是过氧化物酶体的标志酶, 约占过氧化物酶体酶总量的40%, 其含量的大量下降, 导致了植物细胞中 H_2O_2 等过氧化物的过量积累, 从而导致植物细胞的衰老和死亡。MDA含量是植物细胞膜脂质过氧化程度的体现, MDA含量升高, 说明植物细胞膜脂质过氧化程度加剧, 这与突变体后期出现严重的衰老表型一致。MDA含量分析结果由图3(d)可见, 苗期突变体w14叶片的MDA含量与野生型YY

无显著差异, 而成株期突变体中MDA的含量则迅速上升了37.4%, 达到极显著水平($P < 0.01$)。LPO是植物体内细胞膜结构中的多价不饱和脂肪酸受到氧自由基的作用生成的脂质过氧化, 膜脂质的过氧化使膜结构和细胞功能受损而引起植物细胞的多种异常状态。LPO含量分析结果由图3(e)可知, 苗期和成株期突变体w14叶片的LPO含量均显著($P < 0.05$)高于野生型, 分别升高19.2%和20.6%。

2.2.3 可溶性蛋白含量

用蛋白标准品绘制标准曲线, 由测得的样品可溶

性蛋白含量的结果可知, 突变体和野生型在苗期提取叶片可溶性蛋白的含量无显著差异, 但在成株期, 突变体的可溶性蛋白含量则显著低于野生型($P<0.05$), 下降17.7%(图3(f)), 推测突变体出现衰老表型后, 可能由于部分抗氧化的酶类物质活性下降和部分细胞的死亡、胞内物质的外渗, 再加上某些可溶性蛋白的降解, 从而导致其含量迅速下降。

2.2.4 叶片的组织化学染色和细胞凋亡分析

为了验证上述测定的抗氧化系统生理指标的变化, 也更直观地了解突变体早衰后内在结构的变化情况, 系统观察了衰老表型出现后对植株的组织结构及亚细胞结构造成的影响和变化。本研究分别利用组织化学和切片观察等对野生型YY和早衰突变体w14进行了研究。

通过NBT染色, 从图4(a)的染色结果可见, 突变体w14叶片的深蓝色区域显著多于野生型, 说明突变体叶片中的超氧阴离子(O_2^-)数量显著多于野生型。这些过多的超氧阴离子可能对细胞的结构和完整性造成严重的破坏, 从而导致水稻叶片细胞的衰老和死亡, 引起叶片早衰。结合DAB染色, 从图4(b)的染色结果可见, 突变体w14有较多明显的斑点, 该表型是因叶片中累积了过氧化物所造成。根据上述抗氧化系统指标的检测结果可知, 该斑点应主要由 H_2O_2 的累积造成, 是植物叶片早衰的典型症状。

为了进一步验证早衰突变体w14的衰老是否由于大量细胞的凋亡造成, 即与野生型相比, 突变体w14的细胞死亡是否增多。我们在移栽后70 d左右, 即突变体开始出现明显的叶片衰老时, 取突变体w14和野生型YY相同部位的叶片组织, 进行TUNEL检测分析。细胞在发生凋亡时, 将激活某些核酸内切酶对核小体间的基因组DNA进行酶解和切割, 而当基因组DNA发生断

裂时, 暴露出来的3'-OH可以经过一系列反应, 添加上一个可以观察的荧光标记, 可在荧光显微镜下呈现细胞凋亡和DNA断裂损伤的状态。

本研究中TUNEL检测结果显示, 在分蘖期, 开始出现早衰症状后, 早衰突变体w14中的细胞就有较多的绿点出现(图5(h)); 到灌浆期, w14发生了更为明显的叶片衰老, 其叶片组织中绿色点状信号更强(图5(k)), 呈现大量的TUNEL阳性结果, 说明w14突变体在灌浆期比分蘖期细胞内DNA的断裂发生更为严重, 出现了更多的细胞凋亡。相比较而言, 在野生型YY中, 无论是分蘖期(图5(b))还是灌浆期(图5(e)), 细胞凋亡的数量均显著低于突变体w14, 只能观察到极少数的绿色点状荧光信号, 说明野生型YY中大部分细胞都处于正常的生命状态。因此, 从刚开始出现早衰症状的分蘖期到出现典型衰老症状的灌浆期, w14的细胞凋亡数目大量增加, 细胞凋亡加剧。

2.2.5 叶片的超微结构观察

在水稻的成株期, 分别对相同生育期的野生型和突变体的剑叶进行了石蜡切片观察。由图6可知, 野生型的叶脉横切面的机械组织细胞较为完整, 气腔细胞轮廓清晰、完整, 黑色点状的细胞核较多且清晰可见(图6(a)); 野生型叶片的横切面细胞结构完整, 细胞排列紧密有序, 泡状细胞完整, 机械组织细胞完整紧密(图6(b)); 而突变体叶脉横切面的机械组织细胞破损较多, 气腔细胞轮廓不清晰, 细胞不完整, 胞内细胞核多数降解(图6(c)); 突变体叶片横切面的细胞排列较为松散, 机械组织细胞破损较为严重, 细胞排列不紧密, 泡状细胞破裂严重(图6(d))。

基粒类囊体堆叠在一起形成叶绿体基粒, 是植物叶绿体的基本构成单元之一。

图4 (网络版彩色)野生型YY和早衰突变体w14进行NBT和DAB染色的结果。(a) NBT染色结果;(b) DAB染色结果。标尺为1 cm
Figure 4 (Color online) NBT and DAB staining results of wild type YY and mutant w14. (a) NBT staining; (b) DAB staining. Bar=1 cm

图5 用TUNEL检测野生型YY和突变体 $w14$ 分蘖期和灌浆期的细胞凋亡. 蓝色表示DAPI染色信号, 绿色代表阳性结果. (a, d, g, j) DAPI染色结果; (b, e, h, k) TUNEL荧光信号; (c, f, i, l) 分别为(a)/(b)、(d)/(e)、(g)/(h)和(j)/(k)的合并结果; 标尺为50 μm

Figure 5 TUNEL assay of wild type YY and mutant $w14$ at the tillering and filling stage. Blue signal represents DAPI, green color represents positive result. (a, d, g, j) DAPI staining; (b, e, h, k) TUNEL signal; (c, f, i, l) merged images of (a)/(b), (d)/(e), (g)/(h) and (j)/(k), respectively. Bar=50 μm

通过透射电子显微镜观察孕穗期叶片叶肉细胞结果表明(图7), 在相同倍数下, 野生型YY的叶绿体(Cp)占据了细胞的大部分区域, 形状较为规则、饱满, 而突变体 $w14$ 中的叶绿体占据细胞空间的容积明显较小, 叶绿体分布不均匀, 呈现皱缩的状态(图7(d)). 在放大倍数观察后发现, 野生型YY叶绿体内部的类囊体丰富且排列整齐, 分布均匀(图7(b)), 突变体 $w14$ 中类囊体大小不一, 排列不规则, 数目也比野生型更少(图7(e)). 比较图7(c)和(f)则说明, 野生型中构成叶绿体基粒的基粒类囊体堆叠整齐, 界限清晰, 可见其内膜系统完好, 而在突变体的叶绿体基粒中的基粒类囊体堆叠之间界限模糊, 内膜系统降解、破坏.

2.3 早衰性状的遗传分析及基因定位

本研究所用的早衰突变体 $w14$ 经过连续多代在不同的生态条件(福建沙县和海南三亚)种植, 均表现出稳定一致的早衰症状. 为了进一步明确水稻早衰突变体 $w14$ 的遗传机制, 我们将 $w14$ 分别与表型正常的普通粳稻品种日本晴和籼稻品种明恢63、93-11和美国光身稻品种Lemont等构建了8个正反交群体, 并对后代进行表

型的调查. 结果表明(表2), 无论 $w14$ 作为母本还是父本进行杂交, 8个正反交组合的 F_1 单株个体在全生育期均表现出野生型表型. 该结果说明, 早衰突变体 $w14$ 的早衰性状受隐性核基因所控制(表2).

在杂种 F_1 开花前, 进行单株套袋自交, 并单株收获 F_1 . 通过进一步种植和调查各组合 F_2 分离群体中单株的表型, 分别对具有野生型和早衰突变表型的单株在各自的 F_2 分离群体中的数目进行调查和统计, 利用浙江大学DPS7.05统计分析软件对调查数据进行卡方测验. 结果表明, 所有 P 值都大于0.05. 野生型和突变型单株的分离比符合3:1的孟德尔遗传. 这表明, 早衰突变体 $w14$ 的叶片早衰表型受单一隐性核基因控制(表2).

以 $w14$ /日本晴的 F_2 群体作为初步定位群体, 按BSA法分别构建野生型和突变体基因池(各10个表型确定的单株DNA等量混合), 选取水稻12条染色体上均匀分布的520对SSR及InDel标记进行亲本间多态性的筛选, 发现92对标记在亲本间具有多态性. 进一步在基因池间验证亲本间具有多态性的标记, 发现第3号染色体上的InDel标记D73在两池间表现明显的关联, 早衰基因池的带型与突变体来源亲本YY的带型相同. 用该标记

图6 (网络版彩色)野生型YY和突变体 $w14$ 成株期叶片组织切片表型观察. (a), (c) 野生型YY和早衰突变体 $w14$ 叶脉横切面, 标尺为5 μm ; (b), (d) 野生型YY和早衰突变体 $w14$ 叶片横切面, 标尺为5 mm

Figure 6 (Color online) Phenotypic observation on leaf tissue sections of wild type YY and mutant $w14$ at adult stage. (a), (c) Cross sections of leaf veins of wild-type YY and mutant $w14$, bars=5 μm ; (b), (d) cross sections of leaf of wild-type YY and mutant $w14$, bars=5 mm

分析定位群体的所有隐性单株, 发现所有隐性单株的带型都与YY的带型相同, 表明控制该早衰突变表型的基因位于水稻第3号染色体上.

为了进一步对目标基因进行精细定位, 在标记D73的两侧查找和开发了34个SSR和InDel标记, 将这些标记对亲本进行多态性分析, 共23个标记能扩增出特异条带, 其中T85、GH7、GH17、GH27和D75这5个标记在亲本间表现出多态性(表1). 继而利用这5个标记对 $w14$ 与日本晴正、反交 F_2 群体的390株早衰突变株进行连锁分析. 结果表明, 标记D75共检测到31个交换单株, 标记GH27检测到19个交换株, 标记GH7交换单株减少到16个, GH17减少到9个, 另一侧SSR标记T85检测到22个交换单株. 因此, 将目标基因定位在InDel标记D73和SSR标记T85之间(图8(a)). 为了进一步对目标基因 $w14$ 进行精细定位, 自行开发了10个InDel标记, 扩大 F_2 分离群体, 调查获得696个突变表型的单株, 设计的InDel标记3-4检测到14个交换单株, 3-11为4个交换单株, 3-7为2个交换单株, 3-9为1个交换单株, 且标记3-7与3-

9检测到的交换单株互不相同, 而标记3-10在所有突变型的分离群中均未检测到交换单株. 鉴于此, 将目的基因 $w14$ 定位在标记3-7和3-9之间大约76 kb的物理区间内(图8(b)). 参考水稻基因组注释计划数据库(<http://rapdb.dna.affrc.go.jp>), 该区间内共包含8个候选基因(图8(c)). 对候选基因的确定还有待于进一步的序列分析和验证.

3 讨论

本研究中的突变体 $w14$ 于孕穗期从基部倒二、倒三叶开始黄化、衰老, 抽穗期出现明显的叶衰老现象, 成熟期整株衰老枯死. 从表型上看, $w14$ 的表型与已报道的早衰突变体 $pse(t)$ 、 $es-t$ 、 lad 、 $psl1$ 、 $psl2$ 、 $psl3$ 、 $esl2$ 和 $esl3$ 均有明显的表型差别. 遗传分析和基因精细定位发现, 本研究的突变体 $w14$ 受单个隐性核基因控制, 该基因位于第3号染色体InDel标记3-7和3-9之间约76 kb的物理区间内, 与第3号染色体上已定位的 $D343$ ^[39]、 lst ^[40]和 $esl5$ ^[41]等基因均不等位, $w14$ 为一个新

图 7 (网络版彩色)野生型YY(a~c)和突变体w14(d~f)成株期叶片组织透射电子显微镜观察。Cp, 叶绿体; TK, 类囊体

Figure 7 (Color online) TEM observation on leaf tissue of wild type YY (a~c) and mutant *w14* (d~f) at adult stage. Cp, chloroplast; TK, thylakoid

表 2 以突变体w14构建的F₂分离群体的遗传分析

Table 2 Genetic analysis of F₂ populations constructed by mutant *w14*

组合	F ₁		F ₂		$\chi^2(3:1)$	P值
	野生型	早衰型w14	野生型	早衰型w14		
w14/日本晴	9	0	659	193	1.811	0.2736
日本晴/w14	17	0	678	209	0.3729	0.5757
w14/93-11	16	0	683	217	0.4009	0.6077
93-11/w14	8	0	301	95	0.3532	0.5698
w14/明恢63	17	0	735	214	1.3312	0.2783
明恢63/w14	15	0	652	190	0.7712	0.2928
w14/Lemont	22	0	388	117	1.0923	0.4327
Lemont/w14	13	0	511	150	1.3372	0.3425

的早衰相关基因。数据库比对分析发现, 精细定位的区间包含了8个ORFs: ORF1编码转座子蛋白; ORF2编码未知表达蛋白; ORF3编码ZOS3-16-C2H2锌指蛋白; ORF4编码Yippee锌结合蛋白; ORF5编码锌指家族蛋白; ORF6编码与动物BRCA1同源的BRCA1碳端结构域(BRCA1 C-terminus domain, BRCT); ORF7编码腺苷酸琥珀酸合成酶, 也是植物叶绿体的前体; ORF8编码含有OsFBO16-F-box的结构域。其中, BRCT结构域主要与动物的DNA损伤修复和癌症病变相关。而腺苷酸琥珀酸合成酶作为叶绿体合成的前体, 对于植物叶片

叶绿体的合成和发育有重要作用。根据基因功能注释, 暂将ORF6或ORF7暂定为可能的候选基因, 下一步将优先对其进行序列分析和功能研究。

植物叶片的衰老所涉及的基因调控网络较为复杂, 包括植株本身抗氧化能力的下降、叶绿素、蛋白质的降解以及根系流量的减少等^[40]。植物叶片衰老的外在直接表现是叶片变黄、变枯直至死亡, 而内在表现则是其可溶性蛋白含量、叶绿素含量的下降及其抗氧化系统的破坏导致的植物细胞死亡和微观结构的变化。本研究获得的早衰突变体w14从分蘖盛期开始出现

图 8 *w14*在水稻第3号染色体上的精细定位. (a) *w14*初定位在第3号染色体T85和D75之间; (b) *w14*精细定位在3-7和3-9之间76 kb范围内; (c) 精细定位区间内包含的开放阅读框(open reading frame, ORFs)

Figure 8 Fine mapping of *w14* on the 3rd chromosome of rice. (a) Primary mapping of *w14* between markers T85 and D75 on the 3rd chromosome; (b) *w14* was fine mapped to the interval between markers 3-7 and 3-9, a 76 kb region; (c) open reading frames (ORFs) within the fine-mapped region

明显的基部叶片衰老症状, 且因其叶绿素含量下降导致的光合效率降低, 致使突变体在株高、穗粒数、结实率、千粒重等主要农艺性状出现明显的差异, 至成熟期突变体整株枯死. 对野生型和突变体的抗氧化生理指标的检测也证实了突变体经历了典型衰老过程. 因CAT是清除生物体内 H_2O_2 的重要保护酶^[42], 本研究中突变体*w14*中CAT活性的显著下降直接导致植物细胞中 H_2O_2 的积累, 从而形成破坏性的氧化作用. 前人的研究结果也表明, ROS含量过高将进一步导致细胞膜的破坏、蛋白质和脂类物质的降解, 加速细胞和植株的衰老^[43]. 对衰老叶片进行组织化学染色和石蜡切片观察也证实了这一结果. 此外, 植物的可溶性蛋白是植物体内亲水性较强的有机物质, 具有明显地增加细胞持水力而实现自我保护的能力^[7]. 然而, 与*OsCDC48/48E*等基因介导水稻早衰致死的调控机理不同^[44], 本研究所获得突变体能够正常生长发育完成生育期并获得可以正常发芽的种子. 在本研究中, 突变体*w14*在苗期未出现衰老症状时叶片可溶性蛋白含量与野生型无显著差别, 但在衰老阶段其可溶性蛋白含量显著低于野生型. 分析其原因可能是水稻叶片衰老初期, 可溶性蛋

白含量减少缓慢^[36], 而衰老阶段可能是因为基因的突变, 导致基因调控网络的紊乱所造成^[45].

植物的衰老过程伴随着各种物质的代谢和产物成分的变化. 衰老时植物体内的营养物质将再次分配到代谢旺盛的生殖器官等部位, 将营养物质再次利用, 有利于植物的生长和繁殖, 是植物长期进化过程中形成的一种自我保护. 因此, 自然的衰老是植物生长发育的正常过程, 但早衰老则会导致作物产量和品质的下降. 因此, 分离水稻早衰相关基因并解析其生物学功能, 进而完善水稻叶片衰老调控分子机制网络构建, 对于提高和稳定水稻产量, 保障稻米品质具有重要意义. 本研究已完成对早衰相关基因*w14*的精细定位, 为克隆该基因以及深入研究该基因的功能奠定了基础.

4 结论

早衰突变体*w14*表现出叶片早衰, 株高、结实率、单株有效分蘖、千粒重等主要农艺性状发生显著变化. *w14*受一个隐性核基因所控制, 本研究将该基因定位在第3号染色体, 位于InDel标记3-7和3-9之间约76 kb的物理区间内. 推测*w14*是一个新的水稻衰老调控基因.

参考文献

- 1 Duan J, Liang C Y, Huang Y W. Studies on leaf senescence of hybrid rice at flowering and grain formation stage (in Chinese). Acta Phytophysiol Sin, 1997, 23: 139-144 [段俊, 梁承邴, 黄毓文. 杂交水稻开花结实期间叶片衰老. 植物生理学报, 1997, 23: 139-144]
- 2 Zhang C J, Chu H J, Chen G X, et al. Photosynthetic and biochemical activities in flag leaves of a newly developed superhigh-yield hybrid rice

- (*Oryza sativa*) and its parents during the reproductive stage. *J Plant Res*, 2007, 120: 209–217
- 3 Zhou K, Mei P, Wang L, et al. Identification and gene mapping of early senescence leaf mutant *w7* in rice (in Chinese). Sciencepaper Online, 2017-5-31 [周恺, 梅品, 王玲, 等. 水稻早衰突变体 *w7* 定位与功能分析. 中国科技论文在线, 2017-5-31]
- 4 Lim P O, Kim H J, Gil Nam H. Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, 58: 115–136
- 5 Liu D H. Senescence of plant leaves (in Chinese). *Plant Physiol Commun*, 1983, (2): 14–19 [刘道宏. 植物叶片的衰老. 植物生理学通讯, 1983, (2): 14–19]
- 6 Thomas H, Smart C M. Crops that stay green. *Ann Appl Biol*, 1993, 123: 193–219
- 7 Zhao C C, Huang F D, Gong P, et al. Physiological characteristics and gene mapping of a leaf early-senescence mutant *osled* in rice (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2014, 40: 1946–1955 [赵晨晨, 黄福灯, 龚盼, 等. 水稻叶片早衰突变体 *osled* 的生理特征与基因定位. 作物学报, 2014, 40: 1946–1955]
- 8 Wei D Z, Dai X B, Xu X M, et al. Several hypotheses on the mechanism of the plant leaf senescence (in Chinese). *Guihaia*, 1998, 18: 90–97 [魏道智, 戴新宾, 许晓明, 等. 植物叶片衰老机理的几种假说. 广西植物, 1998, 18: 90–97]
- 9 Wang J H, Xie Z P, Chen W. Research progress of aging mechanism and anti aging (in Chinese). *J Hexi Univ*, 2003, 2: 94–98 [王桔红, 谢宗平, 陈文. 衰老机理及抗衰老研究进展. 河西学院学报, 2003, 2: 94–98]
- 10 Luan W J, Shen A, Jin Z P, et al. Knockdown of *OsHox33*, a member of the class III homeodomain-leucine zipper gene family, accelerates leaf senescence in rice. *Sci China Life Sci*, 2013, 56: 1113–1123
- 11 Kong Z, Li M, Yang W, et al. A novel nuclear-localized CCCH-type zinc finger protein, *OsDOS*, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiol*, 2006, 141: 1376–1388
- 12 Zhou Y, Huang W, Liu L, et al. Identification and functional characterization of a rice NAC gene involved in the regulation of leaf senescence. *BMC Plant Biol*, 2013, 13: 132
- 13 Jan A, Maruyama K, Todaka D, et al. OsTZF1, a CCCH-tandem zinc finger protein, confers delayed senescence and stress tolerance in rice by regulating stress-related genes. *Plant Physiol*, 2013, 161: 1202–1216
- 14 Hudson D, Guevara D R, Hand A J, et al. Rice cytokinin GATA transcription factor1 regulates chloroplast development and plant architecture. *Plant Physiol*, 2013, 162: 132–144
- 15 Fukao T, Yeung E, Bailey-Serres J. The submergence tolerance gene *SUB1A* delays leaf senescence under prolonged darkness through hormonal regulation in rice. *Plant Physiol*, 2012, 160: 1795–1807
- 16 Lee R H, Hsu J H, Huang H J, et al. Alkaline α -galactosidase degrades thylakoid membranes in the chloroplast during leaf senescence in rice. *New Phytol*, 2009, 184: 596–606
- 17 Ansair M I, Lee R H, Chen S G. A novel senescence-associated gene encoding γ -aminobutyric acid (GABA): Pyruvate transaminase is upregulated during rice leaf senescence. *Physiol Plant*, 2004, 123: 1–8
- 18 Tang Y, Li M, Chen Y, et al. Knockdown of *OsPAO* and *OsRCCR1* cause different plant death phenotypes in rice. *J Plant Physiol*, 2011, 168: 1952–1959
- 19 Morita R, Sato Y, Masuda Y, et al. Defect in non-yellow coloring 3, an α/β hydrolase-fold family protein, causes a stay-green phenotype during leaf senescence in rice. *Plant J*, 2009, 59: 940–952
- 20 Kusaba M, Ito H, Morita R, et al. Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell*, 2007, 19: 1362–1375
- 21 Yamatani H, Sato Y, Masuda Y, et al. *NYC4*, the rice ortholog of *Arabidopsis THF1*, is involved in the degradation of chlorophyll-protein complexes during leaf senescence. *Plant J*, 2013, 74: 652–662
- 22 Jiang H, Li M, Liang N, et al. Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice. *Plant J*, 2007, 52: 197–209
- 23 Park S Y, Yu J W, Park J S, et al. The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell*, 2007, 19: 1649–1664
- 24 Rong H, Tang Y, Zhang H, et al. The stay-green rice like (SGRL) gene regulates chlorophyll degradation in rice. *J Plant Physiol*, 2013, 170: 1367–1373
- 25 Zhou Q, Yu Q, Wang Z, et al. Knockdown of *GDCH* gene reveals reactive oxygen species-induced leaf senescence in rice. *Plant Cell Environ*, 2013, 36: 1476–1489
- 26 Jiao B B, Wang J J, Zhu X D, et al. A novel protein RLS1 with NB-ARM domains is involved in chloroplast degradation during leaf senescence in rice. *Mol Plant*, 2012, 5: 205–217
- 27 Sato Y, Morita R, Katsuma S, et al. Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll *b* and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. *Plant J*, 2009, 57: 120–131
- 28 Sun B, Zhou Y, Lin Y J. Preliminary functional analysis of a rice leaf senescence up-regulated gene (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2012, 38: 1988–1996 [孙波, 周勇, 林拥军. 一个水稻叶片衰老上调表达基因的初步生物学功能分析. 作物学报, 2012, 38: 1988–1996]
- 29 Singh S, Giri M K, Singh P K, et al. Down-regulation of *OsSAG12-1* results in enhanced senescence and pathogen-induced cell death in transgenic

- rice plants. *J Biosci*, 2013, 38: 583–592
- 30 Chen L J, Wuriyanghan H, Zhang Y Q, et al. An s-domain receptor-like kinase, OsSIK2, confers abiotic stress tolerance and delays dark-induced leaf senescence in rice. *Plant Physiol*, 2013, 163: 1752–1765
- 31 Lee R H, Lin M C, Chen S C G. A novel alkaline α -galactosidase gene is involved in rice leaf senescence. *Plant Mol Biol*, 2004, 55: 281–295
- 32 Gao Q, Yang Z, Zhou Y, et al. Characterization of an Abc1 kinase family gene *OsABC1-2* conferring enhanced tolerance to dark-induced stress in rice. *Gene*, 2012, 498: 155–163
- 33 Undan J R, Tamiru M, Abe A, et al. 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*, 2012, 87: 169–179
- 34 Pitakrattananukool S, Kawakatsu T, Anuntalabhochai S, et al. Overexpression of *OsRab7B3*, a small GTP-binding protein gene, enhances leaf senescence in transgenic rice. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76: 1296–1302
- 35 Li Y Q, Gao J X, Xiao Y H, et al. Genetic analysis and gene fine mapping of yellow-green leaf mutant *yg180* in rice (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2014, 40: 644–649 [李燕群, 高家旭, 肖云华, 等. 水稻 $yg180$ 黄绿叶突变体的遗传分析与目标基因精细定位. 作物学报, 2014, 40: 644–649]
- 36 Qiao Y, Jiang W, Lee J H, et al. *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*, 2010, 185: 258–274
- 37 Kaur N, Sharma I, Kirat K, et al. Detection of reactive oxygen species in *Oryza sativa* L. (Rice). *Bio-protocol*, 2016, 6: e2061
- 38 Liu J, Cheng Y, Yan K, et al. The relationship between reproductive growth and blank fruit formation in *Corylus heterophylla* Fisch. *Sci Hortic*, 2012, 136: 128–134
- 39 Xiao R. Genetic analysis and gene mapping of two early senescence mutant in rice (in Chinese). Master Thesis. Chengdu: Sichuan Agriculture University, 2012 [肖锐. 两个水稻早衰突变体的遗传分析与基因定位. 硕士学位论文. 成都: 四川农业大学, 2012]
- 40 Sun H M, Pang G, Pang X H, et al. physiological analysis and gene mapping of the premature senescence *lst* mutant in rice (in Chinese). *J Nucl Agric Sci*, 2014, 28: 404–411 [孙惠敏, 潘刚, 潘晓华, 等. 水稻早衰突变体 lst 的生理分析与基因定位. 核农学报, 2014, 28: 404–411]
- 41 Sang X C, Xu F F, Zhu X Y, et al. Identification and gene fine mapping of early senescent leaf mutant *es15* in *Oryza sativa* (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2014, 40: 1182–1189 [桑贤春, 徐芳芳, 朱小燕, 等. 水稻早衰突变体 $es15$ 的鉴定及其基因精细定位. 作物学报, 2014, 40: 1182–1189]
- 42 Wang B F, Chen Y Y, Zhang Y X, et al. Identification and fine mapping of early senescent leaf mutant *es5* in *Oryza sativa* (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 2018, 51: 613–625 [王备芳, 陈玉宇, 张迎信, 等. 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: 613–625]
- 43 Manjunatha G, Lokesh V, Neelwarne B. Nitric oxide in fruit ripening: Trends and opportunities. *Biotechnol Adv*, 2010, 28: 489–499
- 44 Shi L. Molecular mechanism of *OsCDC48/48E* mediated premature senescence death in rice (in Chinese). Doctor Thesis. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2019 [石磊. *OsCDC48/48E*介导水稻早衰致死的分子机理. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学, 2019]
- 45 Wang Y, Lin A, Loake G J, et al. H_2O_2 -induced leaf cell death and the crosstalk of reactive nitric/oxygen species. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55: 202–208

Summary for “水稻早衰突变体*w14*的生理学特性分析及其基因的精细定位”

Analysis of physiological characteristics of early leaf senescence mutant *w14* and its gene mapping for rice

Yongsheng Zhu^{1,2,3}, Jiahuan Jiang^{2,3}, Qiuhua Cai^{2,3}, Yanmei Zheng^{2,3}, Wei He^{2,3}, Liping Chen^{2,3}, Yidong Wei^{2,3}, Airong Wang^{1*} & Jianfu Zhang^{1,2,3*}

¹ College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

² Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350019, China;

³ Key Laboratory of Germplasm Innovation and Molecular Breeding of Hybrid Rice for South China, Ministry of Agriculture and Rural/Fuzhou Branch, National Rice Improvement Center of China/Fujian Engineering Laboratory of Crop Molecular Breeding/Fujian Key Laboratory of Rice Molecular Breeding/Incubator of National Key Laboratory of Fujian Germplasm Innovation and Molecular Breeding Between Fujian and Ministry of Sciences & Technology/Base of South-China, National Key Laboratory of Hybrid Rice/National Rice Engineering Laboratory of China, Fuzhou 350003, China

* Corresponding authors, E-mail: arxg3000@163.com; jianfzhang@163.com

Leaf senescence has important effects on yield and quality of rice. In this study, a mutant *w14* of early leaf senescence was derived from *japonica* variety, Yunyin (YY) by ethylmethylsulfone (EMS) mutagenesis. The physiological and histological changes of the mutant *w14* were studied during the whole growth and development period. The results indicated that the growing vigor of the mutant *w14* was not only weak and slow from the full tillering stage, but also the early leaf senescence appeared obviously at the heading stage. At last the whole plant for the mutant *w14* appeared senescence and wilt. The submicroscopic structure observation indicated that the vesicular cells of leaves surface were not only damaged, but the cell structure was loose and their integrity decreased. The number of nuclei from the mutant cells was decreased significantly and intracellular nuclear degraded.

The contents of leaves chlorophyll between WT and the mutant *w14* were analyzed at the seedling stage and adult stage respectively, indicating that the difference was not significant among chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoid between WT and the mutant *w14* at the seedling stage. But the contents for chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoid of the mutant *w14* were significantly less than those of wild type (WT) at the adult stage, decreased by 15.5%, 37.6%, and 10.3%, respectively, and total chlorophyll content decreased by 20.6%. Moreover, the characteristics for antioxidant were analyzed for wild type and the mutant *w14*, including the activity of POD, SOD, CAT, MDA, LPO and so on, indicating that the POD activity of the mutant *w14* was much less than that of WT, decreased by 7.42% at the seedling stage, but decreased 9.52% compared with WT at the adult stage. Data of SOD activity indicated that the SOD activity of the mutant *w14* was much more than that of WT, increased by 15.5% at the seedling stage. But the difference was not significant for SOD activity between WT and the mutant *w14* at the adult stage. The catalase activity showed that the CAT activity of the mutant *w14* was not significantly different from WT at the seedling stage. The CAT activity of *w14* was much less than WT at the adult stage. The MDA content showed that the MDA content in the leaves of *w14* was not much different from WT, while the MDA content of *w14* increased 37.4% at the adult stage. The LPO content of *w14* was much more than that of WT at seedling stage and adult stage, increased by 19.2% and 20.6%, respectively.

At last, the target gene *w14* was fine mapped in a physical interval of about 76 kb between InDel markers 3-7 and 3-9 on chromosome 3 in rice. There were 8 candidate genes in this interval region, laid a basis for cloning and functional analysis of the gene *w14* in the future.

rice, early leaf senescence, physiological characteristics, microstructure, gene mapping

doi: [10.1360/TB-2021-0012](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0012)