DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.00862

水稻早衰突变体 *esl3* 的鉴定与基因定位

苗润隆 蒋钰东 廖红香 徐芳芳 何光华 杨正林 赵芳明 桑贤春*

西南大学水稻研究所 / 转基因植物与安全控制重庆市市级重点实验室 / 南方山地农业教育部工程研究中心, 重庆 400716

摘要: 叶片早衰直接降低作物的光合作用、产量和品质。因此, 鉴定早衰突变体和研究其基因功能对于作物的遗传改良具有重要的作用。*esl3* 来源于水稻粳型恢复系缙恢 10 号的 EMS 诱变库, 苗期叶片中上部呈现褐化枯萎, 该特征一直持续到植株成熟。与野生型相比, 突变体衰老部位叶绿素和光合速率极显著下降, 绿色部位光合色素和光合速率则略有升高。农艺性状分析发现, 结实率无显著变化, 有效穗、穗长、穗粒数、千粒重、株高和干物质重则显著或极显著下降。遗传分析表明, *esl3* 叶片早衰枯死性状受 1 对隐性核基因控制。利用 391 株日本晴/*esl3* 的 F₂ 突变型单株, 最终把 *ESL3* 基因定位在第 5 染色体 SSR 标记 RM19085 和 InDel 标记 Ind05-2 之间, 物理距离 91 kb, 包含 14 个注释基因, 为下一步调控基因的克隆和功能研究奠定了基础。

关键词: 水稻(*Oryza sativa*); 早衰; 基因定位; 光合速率

Identification and Gene Mapping of Rice Early Senescent Leaf (*esl3*) Mutant

MIAO Run-Long, JIANG Yu-Dong, LIAO Hong-Xiang, XU Fang-Fang, HE Guang-Hua, YANG Zheng-Lin, ZHAO Fang-Ming, and SANG Xian-Chun*

Rice Research Institute of Southwest University / Chongqing Key Laboratory of Application and Safety Control of Genetically Modified Crops / Engineering Research Center of South Upland Agriculture, Ministry of Education, Chongqing 400716, China

Abstract: Leaf early senescence can directly decrease crop photosynthesis, yield and quality. Therefore, the identifications of mutants with early senescence and its gene function play key roles in crop genetic improvement. A mutant with early senescent leaf blades, named as *esl3*, was identified from an EMS-induced progeny in the restorer line Jinhui 10. The middle-upper leaf in mutation displayed a brown and withered phenotype from seedling stage to maturity. Correspondingly, the chlorophyll content and net photosynthetic rate declined in the abnormal leaves while enhanced in the normal green part of leaves compared with the wild type. Agronomic traits, such as panicle number, panicle length, grains per panicle, 1000-grain weight, plant height and weight of dry matter, were reduced significantly or very significantly except for seed setting rate as compared with those of wild type. Genetic analysis showed the senescence was controlled by a recessive nuclear gene. Using 391 mutation individuals in a F₂ generation of Nipponbare/*esl3*, *ESL3* was mapped between SSR marker RM19085 and InDel marker Ind05-2 on the chromosome 5 with physical distance 91 kb including 14 annotated genes. These results provide a foundation for the further gene cloning and functional analysis of *ESL3* gene.

Keywords: Rice (*Oryza sativa*); Early senescence; Gene mapping; Photosynthetic rate

叶片是光合作用的主要器官, 其衰老是植物叶片发育的最后阶段, 自然状态下, 受遗传和外界因子(如光照、干旱、病害和高温等)的共同调控^[1]。叶片自然衰老是一个细胞程序性死亡的过程, 是植物进化过程中形成的适应性, 是植物生长发育过程中必然要经历的生命现象^[2]。在作物中, 叶片一旦早衰

将直接影响产量和品质, 因此, 是否早衰是作物育种中一个重要的选择指标^[3]。尽管目前已经进行了大量的衰老生理研究, 但其分子遗传机制还不清晰。

植物叶片衰老是一个复杂的生物学过程, 涉及叶绿体发育、叶绿素合成与代谢、细胞程序性死亡、

本研究由国家自然科学基金项目(31071072)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 桑贤春, E-mail: sangxianchun@163.com

第一作者联系方式: E-mail: mrlswx126@126.com

Received(收稿日期): 2012-10-12; Accepted(接受日期): 2012-12-15; Published online(网络出版日期): 2013-02-19.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130219.1021.016.html>

激素等多种调控途径, 其中, 叶绿素降解途径与叶片衰老之间的研究较为清晰^[4]。叶片衰老涉及基因类型多、参与细胞代谢途径也多, 而且, 在不同诱导因素下, 调控基因及数量也会改变, 遗传机制极为复杂^[5]。Guo 等^[6]在拟南芥叶片自然衰老过程中, 检测到 2491 个基因在转录水平发生了改变。Graaff 等^[7]研究发现, 自然衰老与暗处理和离体叶片衰老相比, 尽管大部分调控基因相同, 但是自然衰老基因是暗处理和离体叶片衰老调控基因的 2 倍。在双子叶模式植物拟南芥中, 目前已经克隆了多个衰老调控基因, 如加速衰老基因 *HYSI*^[8]、*ATPG*^[9]、*ATAPG9*^[10]和 *OLDI*^[11]等, 延迟叶片衰老基因 *ORE9*^[12]、*ORE1*^[13]、*OIN3*^[14]和 *ORE4*^[15]等, 根据基因功能可将其分为生物大分子、转录因子(TFs)、激素和 RNAi 等。

水稻是我国乃至世界上最重要的粮食作物之一, 约一半以上的人口以其为主食, 同时也是单子叶模式植物。研究水稻叶片早衰的分子机制, 不仅对水稻的遗传改良具有重要的意义, 对其他禾本科作物的生产也具有一定的指导意义。Liu 等^[16]在水稻剑叶自然早衰过程中检测到 815 个上调 ESTs, 其中 533 个被基因芯片和测序的进一步证实, 表明水稻叶片衰老也涉及多种代谢途径。*NOEI* 编码一个水稻过氧化氢酶 *OsCATC*, 突变致使叶片中过氧化氢含量增高, 激活了硝酸还原酶并促发 NO 的产生, 从而诱导水稻叶片早衰^[17]。突变体是基因定位和功能研究的最直接有效的材料, 除已克隆的 *NOEI*^[17]基因外, 目前还鉴定了 *psl1*、*psl2*、*psl3*、*pse(t)*、*esl2* 和 *lad* 等早衰突变体, 其调控基因分别定位在第 2、第 8、第 3、第 7、第 4 和第 11 染色体上^[18-23]。

我们从籼型水稻恢复系缙恢 10 号的 EMS 诱变库中, 鉴定了一个新型叶片早衰突变体 *esl3*。苗期开始, 全展叶的叶片中上部即开始表现褐化死亡, 但叶基部保持绿色, 该现象一直持续到成熟。调控基因被定位在第 5 染色体 91 kb 的物理范围内, 与目前已报道的衰老基因均不等位, 这为下一步基因的克隆和功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

利用 EMS 诱变籼型水稻恢复系缙恢 10 号, 从其后代中鉴定出一个叶片早衰突变体 *esl3*。三叶期之前, 表现不明显, 三叶期之后, 叶上部呈现褐化

衰老。连续种植 5 代, 表型均稳定遗传。配制日本晴和 *esl3* 杂交组合, 利用 F₁ 和 F₂ 群体进行遗传分析和基因定位。F₂ 群体的株行距为 20 cm×30 cm, 从苗期开始定株调查叶色性状, 调查时期分别为分蘖期、抽穗期和灌浆期, 取灌浆期叶片进行基因分子定位。

1.2 叶绿素含量测定

孕穗期, 在早晨 8:30—9:00, 取突变体衰老部位和绿色部位, 同时取野生型的相应部位作对照。采用 95%乙醇提取叶绿素, 分光光度计测其 470、646 和 663 nm 的光吸收值。参照 Wellburn^[24]的方法换算出叶绿体各色素含量。

1.3 光合速率测定

孕穗期, 晴天上午 9:30—10:30, 取长势相对一致的单株各 10 株, 利用 LI-6400 型便携式光合作用测定仪分别测定 *esl3* 衰老和绿色部位的光合速率, 同时测量相应部位的野生型。测量时使用红、蓝光源, 光强恒定为 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 温度为 30℃, CO₂ 浓度为空气中的浓度, 湿度为大气中的湿度^[25]。

1.4 农艺性状调查

成熟后, 分别取 10 株突变株和野生株, 测定株高、有效穗、穗长、穗粒数、结实率、千粒重、干物质重等农艺性状; 同时测量倒一、倒二、倒三、倒四等节间的长度。

1.5 DNA 的提取

采用 BSA 法筛选连锁标记, 从日本晴和 *esl3* 的 F₂ 群体中分别取 10 株正常和突变单株, 剪取等量叶片构建正常池和突变池。亲本和基因池的 DNA 采用 CTAB 法提取^[26], 采用碱煮法提取连锁分析 F₂ 突变型单株的 DNA^[27]。

1.6 SSR 分子标记分析

RM 系列 SSR 引物序列参照 <http://www.gramene.org/microsat>, 利用 victor9.0 比对 9311 和日本晴序列, 根据碱基差异设计 InDel 标记。PCR 体系 12.6 μL , 包括 1.25 μL 的 10×PCR buffer, 0.75 μL 的 25 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0.5 μL 的 2.5 mmol L⁻¹ dNTPs, 8.0 μL 的 ddH₂O, 1.0 μL 的 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 引物, 1.0 μL 的模板 DNA 和 0.1 μL 的 5 U μL^{-1} Taq DNA 聚合酶。PCR 程序为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 1 min; 35 个循环后, 再 72℃ 充分延伸 10 min。PCR 产物经 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 快速银染法并观察^[28]。

1.7 遗传图谱的构建

作图群体中, 将具有日本晴带型的单株记为 A, 具有 *esl3* 带型的记为 B, 具有 F₁ 带型的记为 H, 用 Mapmaker3.0 进行数据分析和作图^[29], 用 Kosambi 函数^[30]将重组率转化为遗传距离。

2 结果与分析

2.1 *esl3* 的形态鉴定

esl3 突变体来源于粳型水稻恢复系缙恢 10 号的 EMS 诱变。田间种植情况下, 一叶期至三叶期, 与野生型相比, 表型不很明显, 四叶期开始, *esl3* 突变体的叶片发育完全后(倒一全展叶), 叶尖即表现褐化死亡, 发育至倒二全展叶时, 叶中上部出现不同程度的枯萎死亡, 尤其是叶尖和叶边缘, 而叶基部保持绿色, 该性状一直持续到成熟。分蘖后期突变体和野生型植株和叶片的衰老枯死如图 1 所示。

esl3 的结实率无明显变化, 有效穗和穗长显著降低, 穗粒数、千粒重、株高和干物质重则极显著

下降, 分别为野生型的 57.5%、90.1%和 76.1% (表 1)。与野生型相比, 突变体的穗长和穗颈节间下降幅度达显著水平, 其余节间的下降幅度达极显著水平(表 2), 但叶片长度无明显变化。

图 1 野生型(WT)和突变体 *esl3* 分蘖期的植株形态
Fig. 1 Plant phenotype of the wild type (WT) and *esl3* mutant at the tillering stage
A: 野生型(WT)和突变体 *esl3* 的植株; B 和 C: 野生型(WT)和突变体 *esl3* 倒一全展叶的中上部和基部。
A: Plants of the wild type (WT) and *esl3* mutant; B and C: The middle-upper and basal parts of first fully expanded leaf blade in the wild type and *esl3* mutant.

表 1 野生型(WT)和 <i>esl3</i> 的农艺性状分析							
Table 1 Agronomic traits of the wild type (WT) and <i>esl3</i> mutant							
材料 Material	株高 Plant height (cm)	有效穗 Panicles per plant	穗长 Panicle length (cm)	穗粒数 Grain number per panicle	结实率 Seed setting rate (%)	千粒重 1000-grain weight	干物质重 Weight of dry matter (g)
WT	109.7±2.17	8.2±0.45	26.2±1.10	172.5±4.23	89.1±1.35	26.3±0.48	63.96±1.68
<i>esl3</i>	83.5±2.70**	6.4±1.34*	23.2±1.89*	99.2±5.89**	85.9±3.41	23.7±0.54**	25.34±2.81**

图 2 突变体 *esl3* 和野生型(WT)缙恢 10 号各节间长
Fig. 2 Internode length of *esl3* and wild type Jinhui 10
PL: 穗长; NL: 穗颈长; FL: 第 1 节间长; SL: 第 2 节间长; TL: 第 3 节间长; *在 0.05 水平上差异显著; **在 0.01 水平上显著差异。
PL: panicle length; NL: neck length of spike; FL: first internode length; SL: second internode length; TL: third internode length. * Significantly different at $P<0.05$; ** Significantly different at $P<0.01$.

2.2 *esl3* 的叶绿素和光合速率变化

与始亲本缙恢 10 号相比, *esl3* 衰老部位的叶绿素 a、叶绿素 b 和类胡萝卜素的含量分别下降了 81.5%、90.7%和 76.0%; 绿色部位分别升高了 15.3%、6.2%和 10.3% (图 3)。突变体衰老部位的光合速率极显著低于野生型, 绿色部位则极显著高于野生型(图 4)。

2.3 *esl3* 的遗传分析

田间种植情况下, 日本晴/*esl3* 的 F₁ 单株叶片均正常, F₂ 群体出现正常和叶片早衰枯死两种类型。分蘖期、抽穗期和灌浆期植株叶片一直呈现早衰特征的判定为突变型, 叶色无变化的判定为正常型。在 1672 株 F₂ 群体中, 正常株 1281 株, 突变株 391 株, 二者比例符合 3 : 1 的孟德尔独立分配定律($\chi^2=2.32$, $\chi^2_{0.05,1} = 3.84$, 表明 *esl3* 叶片早衰受 1 对隐性核基因调控。

2.4 *ESL3* 基因的分子定位

选用 480 对均匀分布在水稻 12 条染色体上的

图 3 孕穗期野生型(WT)和突变体 *esl3* 衰老部位的光合色素含量比较

Fig. 3 Photosynthetic pigment contents of the wild type and *esl3* mutant at booting stage

Chla: 叶绿素 a; Chlb: 叶绿素 b; Total Chl: 总叶绿素; Car: 类胡萝卜素; WT: 野生型; *esl3-d*: 突变体叶片基部绿色部分; *esl3-u*: 突变体叶片上部衰老部分; 误差线: 色素含量的标准差。

Chla: chlorophyll a; Chlb: chlorophyll b; Total Chl: total chlorophyll; Car: carotenoids; WT: wild type Jinhui10; *esl3-d*: green part of basal leaf blade in *esl3*; *esl3-u*: senescent part of upper leaf blade in *esl3*; Error bars: standard deviation of the pigment contents.

图 4 孕穗期野生型(WT)和突变体 *esl3* 的光合速率

Fig. 4 Photosynthetic rate of the wild type and *esl3* mutant at booting stages

WT: 野生型; *esl3-d*: 突变体叶片基部绿色部分; *esl3-u*: 突变体叶片上部衰老部分; 误差线: 光合速率的标准差。

WT: wild type Jinhui10; *esl3-d*: green part of basal leaf blade in *esl3*; *esl3-u*: senescent part of upper leaf blade in *esl3*; Error bars: standard deviation of photosynthetic rate.

SSR 标记对日本晴和 *esl3* 进行多态性分析, 然后再利用 120 对多态性引物分析正常基因池和突变基因池。结果发现位于第 5 染色体上的 SSR 标记 RM3321 和 RM1054 在亲本之间和基因池之间均存在差异。

利用这 391 株 F_2 突变型单株进行验证。初步将 *ESL3* 定位在 RM3321 和 RM1054 标记之间, 遗传距离分别为 7.80 cM 和 6.25 cM。进一步在 RM3321 和 RM1054 之间设计 SSR 和 InDel 标记, 其中 3 对引物在亲本之间呈现多态性。RM480 和 Ind05-2 (F: 5'-TCTCTAGCTTCAAAGTTCTATCC-3'; R: 3'-GTCAGATTTTAAATTAGGATT-5') 分别有 12 个和 7 个交换株, 而 RM19085 有 2 个交换株, 两侧交换株不同。因此, 最终把 *ESL3* 基因定位在第 5 染色体 Indel 标记 Ind05-2 和 SSR 标记 RM19085 之间, 物理距离 91 kb (图 5)。根据日本晴序列, 在该区间内有 14 个注释基因, 3 个编码转座子蛋白, 3 个编码未知表达蛋白, 其他分别编码磷脂酰丝氨酸合成酶、L7/L12 核糖体蛋白、MATE efflux 蛋白、反抑制蛋白、SNARE domain 蛋白、MYB 转录因子、ATP 合酶和微管蛋白。

图 5 *ESL3* 基因在第 5 染色体上的分子定位

Fig. 5 Molecular mapping of *ESL3* on chromosome 5

3 讨论

衰老是植物生长发育过程中的必然阶段, 一般发生在植物生长发育的最后时期, 受外界环境因素和基因调控的影响。对植物衰老相关基因的研究表明衰老过程具有复杂的调控网络^[31], 其中一个非常重要的途径是糖、蛋白质、叶绿素等大分子物质的代谢调控。如在拟南芥中, *SGR* 编码一个含有叶绿体转运肽的蛋白, 通过调节叶绿素蛋白复合体的形成和降解参与叶片衰老过程^[32]; *NYC1* 和 *NOL* 编码叶绿素 b 还原酶的 2 个亚基, 直接参与叶绿素 b 还原酶复合体的形成^[33-34], *PPH* 调节脱镁叶绿素(甲酯-)酸的合成, 该基因的缺陷导致叶绿素降解困难, 从而抑制叶片衰老^[35]。

本研究发现的 *esl3* 突变体从苗期开始, 新叶完全展开后, 叶尖就开始表现衰老, 至倒二全展叶状态, 叶尖和叶缘部位已枯萎死亡, 该现象一直持续

到成熟。其表型与已报道的早衰突变体 *psl1*、*psl2*、*psl3*、*pse(t)*、*esl2* 和 *lad* 均有明显的差别。*psl1* 形态特点是自苗期开始抽出心叶后, 抽出的叶片就开始变黄衰老; *psl2* 在抽穗前倒四叶开始衰老, 抽穗时倒三叶开始衰老, 穗完全抽出后, 倒二叶开始变黄衰老, 到灌浆期结束时剑叶完全衰老死亡; *psl3* 是从第 6 叶开始表现衰老, 叶片由基部到上部衰老程度逐渐加重; *pse(t)* 的特点是在抽穗期首先在老叶上出现褐色斑点, 接着整片叶黄化衰老, 到灌浆期叶鞘与上层叶片也迅速黄化衰老; *esl2* 表现为苗期正常, 孕穗期开始才从叶尖和叶缘部逐渐黄化衰老, 而中下部保持绿色不衰老^[18-22]。*lad* 是我们先前从缙恢 10 号鉴定的一个早衰突变体, 除新抽叶保持正常绿色外, 其余叶片的叶尖都逐渐变黄, 随后扩展到叶片的 2/3, 最后叶片尖端约 1/4 枯死^[23]。

遗传分析和基因定位发现, *esl3* 受单隐性核基因控制, 位于第 5 染色体 InDel 标记 Ind05-2 和 RM19085 之间, 物理距离约 91 kb, 包含 14 个注释基因。3 个编码转座子蛋白, 3 个编码未知表达蛋白, 其他分别编码磷脂酰丝氨酸合成酶、L7/L12 核糖体蛋白、MATE efflux 蛋白、反抑制蛋白、SNARE domain 蛋白、MYB 转录因子、ATP 合酶和微管蛋白。其中, 对磷脂酰丝氨酸合成酶编码基因 *LOC_Os05g48060.1/SUI2* 进行了初步的功能鉴定, *Tos17* 插入突变体表现为节间缩短、植株矮化, 基因过量表达则促进节间伸长^[36]。对另外 13 个基因没有进一步研究, 这表明 *esl3* 受一个功能未知的基因调控, 这为下一步基因的克隆和功能研究奠定了基础。

4 结论

突变体 *esl3* 是一个新型早衰突变体, 衰老部位的叶绿素含量和光合速率极显著下降, 绿色部位的叶绿素含量和光合速率相对野生型有所升高。其基因被定位于第 5 染色体, 物理距离约 91 kb, 共包含 14 个注释基因。这为基因的进一步精细定位、基因克隆和水稻早衰机制的研究奠定了基础。

References

- [1] Yoshida S. Molecular regulation of leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 79–84
- [2] Nam H G. The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr Opin Biotech*, 1997, 8: 200–207
- [3] Wang F-B(王复标), Huang F-D(黄福灯), Cheng F-M(程方民), Li Z-W(李兆伟), Hu D-W(胡东维), Pan G(潘刚), Mao Y-C(毛愉婵). Photosynthesis and chloroplast ultra-structure characteristics of flag leaves for a premature senescence rice mutant. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2012, 38(5): 871–879 (in Chinese with English abstract)
- [4] Eckardt N A. A New Chlorophyll Degradation Pathway. *Plant Cell*, 2009, 21: 700–700
- [5] He Y, Tang W, Swain J D, Green A L, Jack T P, Gan S. Networking senescence-regulating pathways by using Arabidopsis enhancer trap lines. *Plant Physiol*, 2001, 126: 707–716
- [6] Guo Y, Cai Z, Gan S. Transcriptome of Arabidopsis leaf senescence. *Plant Cell Environ*, 2004, 27: 521–549
- [7] Graaff E V D, Schwacke R, Schneider A, Desimone M, Flügge U, Kunze R. Transcription analysis of arabidopsis membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol*, 2006, 141: 776–792
- [8] Yoshida S, Ito M, Nishida I, Watanabe A. Identification of a novel gene *HYS1/CPR5* that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2002, 29: 427–437
- [9] Doelling J H, Walker J M, Friedman E M, Thompson A R, Vierstra R D. The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2002, 277: 33105–33114
- [10] Hanaoka H, Noda T, Shirano Y, Kato T, Hayashi H, Shibata D, Tabata S, Ohsumi Y. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an Arabidopsis autophagy gene. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1181–1193
- [11] Jing H C, Sturre M J, Hille J, Dijkwel P P. Arabidopsis onset of leaf death mutants identify a regulatory pathway controlling leaf senescence. *Plant J*, 2002, 32: 51–63
- [12] Woo H R, Chung K M, Park J H, Oh S A, Ahn T, Hong S H, Jang S K, Nam H G. ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2001, 13: 1779–1790
- [13] Oh S A, Park J H, Lee G I, Paek K H, Park S K, Nam H G. Identification of three genetic loci controlling leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1997, 12: 527–535
- [14] Gribic V, Bleecker A B. Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J*, 1995, 8: 595–602
- [15] Woo H R, Goh C H, Park J H, de la Serve B T, Kim J H, Park Y I, Nam H G. Extended leaf longevity in the *ore4-1* mutant of *Arabidopsis* with a reduced expression of a plastid ribosomal protein gene. *Plant J*, 2002, 31: 331–340
- [16] Liu L, Zhou Y, Zhou G, Ye R J, Zhao L N, Li X H, Lin Y J. Identification of early senescence-associated genes in rice flag leaves. *Plant Mol Biol*, 2008, 67: 37–55

- [17] Lin A H, Wang Y Q, Tang J Y, Xue P, Li C L, Liu L C, Hu B, Yang F Q, Loake G J, Chu C C. Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide induced leaf cell death in rice. *Plant Physiol*, 2012, 158: 1451–1464
- [18] 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 presenesing leaf gene *psll* in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin Sci Bull*, 2006, 51: 2986–2992
- [19] Zhu L, Liu W Z, Wu C, Luan W J, Fu Y P, Hu G C, Si H M, Sun Z X. Identification and fine mapping of a gene related to pale green leaf phenotype near centromere region in rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Sci*, 2007, 14: 172–180
- [20] Fang L K, Li Y F, Gong X P, Sang X C, Ling Y H, Wang X W, Cong Y F, He G H. Genetic analysis and gene mapping of dominant presenesing leaf gene *PSL3* in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin Sci Bull*, 2010, 55: 2517–2521
- [21] Li F Z, Hu G C, Fu Y P, Si H M, Bai X, Sun Z X. Genetic analysis and high-resolution mapping of a premature senescence gene *Pse(t)* in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 2006, 48: 738–746
- [22] Xu F-F(徐芳芳), Sang X-C(桑贤春), Ren D-Y(任德勇), Tang Y-Q(唐彦强), Hu H-W(胡宏伟), Yang Z-L(杨正林), Zhao F-M(赵芳明), He G-H(何光华). Genetic analysis and gene mapping of early senescence leaf mutant *esl2* in rice. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2012, 38(8): 1347–1353 (in Chinese with English abstract)
- [23] Du Q(杜青), Fang L-K(方立魁), Sang X-C(桑贤春), Ling Y-H(凌英华), Li Y-F(李云峰), Yang Z-L(杨正林), He G-H(何光华), Zhao F-M(赵芳明). Analysis of phenotype and physiology of leaf apex dead mutant (*lad*) in rice and mapping of mutant gene. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2012, 38(1): 168–173 (in Chinese with English abstract)
- [24] Wellburn A R. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J Plant Physiol*, 1994, 144: 307–313
- [25] Lü D-H(吕典华), Zong X-F(宗学凤), Wang S-G(王三根), Ling Y-H(凌英华), Sang X-C(桑贤春), He G-H(何光华). Characteristics of photosynthesis in two leaf color mutants of rice. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(12): 2304–2308 (in Chinese with English abstract)
- [26] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 69–76
- [27] Sang X-C(桑贤春), He G-H(何光华), Zhang Y(张毅), Yang Z-L(杨正林), Pei Y(裴炎). The simple gain of templates of rice genomes DNA for PCR. *Hereditas* (遗传), 2003, 25(6): 705–707 (in Chinese with English abstract)
- [28] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLPs) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, 252: 597–607
- [29] Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E, Newburg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1: 174–181
- [30] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugenics*, 1943, 12: 172–175
- [31] Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E, Breeze E, Lim P O, Nam H G, Lin J F, Wu S H, Swidzinski J, Ishizaki K, Leaver C J. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signaling pathways between developmental and dark/starvation induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2005, 42: 567–585
- [32] 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. *Plant J*, 2007, 52: 197–209
- [33] Kusaba M, Ito H, Morita R, Iida S, Sato Y, Fujimoto M, Kawasaki S, Tanaka R, Hirochika H, Nishimura M, Tanaka A. Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence. *Plant Cell*, 2007, 19: 1362–1375
- [34] Sato Y, Morita R, Katsuma S, Nishimura M, Tanaka A, Kusaba M. Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice. *Plant J*, 2009, 57: 120–131
- [35] Schelbert S, Aubry S, Burla B, Agne B, Kessler F, Krupinska K, Hörtensteiner S. Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2009, 21: 767–785
- [36] Yin H F, Gao P, Liu C W, Yang J, Liu Z C, Luo D. SUI-family genes encode phosphatidylserine synthases and regulate stem development in rice. *Planta*, 2003, 237: 15–27