

水稻剑叶衰老过程中内源 IAA 的轭合态变化及其氮素调控效应

赵华^{1,2} 王复标² 韩展誉² SHAMSU-ADO zakari² 李兆伟² 潘刚² 程方民^{2,*}

(¹ 金华职业技术学院, 浙江 金华 321017; ² 浙江大学 农业与生物技术学院, 杭州 310058; *通讯联系人, E-mail: chengfm@zju.edu.cn)

Senescence-specific Changes in Endogenous IAA Content and Its Conjugated Status in Rice Flag Leaf as Affected by Nitrogen Level

ZHAO Hua^{1,2}, WANG Fubiao², HAN Zhanyu², SHAMSU-ADO zakari², LI Zhaowei², PAN Gang²,
CHENG Fangmin^{2,*}

(¹ Jinhua Polytechnic, Jinhua 321017, China; ² College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; *Corresponding author, E-mail: chengfm@zju.edu.cn)

Abstract: 【Objective】 The objective is to clarify the genotype-dependent alteration in rice leaf senescence process and its relationship with the endogenous IAA content and its conjugated status in flag leaves during filling stage, and also to investigate the effect of N supply levels on leaf senescence and its relation to the endogenous IAA content and its conjugated status in leaves for different rice genotypes. 【Method】 Two rice genotypes, namely, the premature senescence mutant in flag leaf (*psf*) and its wild type (Zhehui 7954), were used to compare their difference in the temporal patterns of IAA content and its conjugated status as well as transcriptional expression of *YUCCAs* family genes in flag leaf during filling stage. Three N levels, including low nitrogen level (LN, 1.45 mmol/L), normal nitrogen level (MN, 2.9 mmol/L), and high nitrogen level (HN, 5.8 mmol/L), were designed to examine the response of IAA content and its conjugated status in senescent leaves to different N supply levels. 【Result】 The free IAA content in the flag leaf of *psf* mutant was significantly lower than that of its wild type during leaf senescence, while the opposite was true for the genotype-dependent alteration in the conjugated status IAA (IAA-ASP) content in senescent leaves, with a markedly higher level and more rapidly increase of IAA-ASP content in the flag leaf of *psf* mutant relative to its wild type along with leaf senescence. Among 7 *YUCCAs* isoform genes related to IAA biosynthesis, the transcriptional expressions of *YUCCA2*, *YUCCA3*, *YUCCA4* and *YUCCA6* were relatively lower in the flag leaf of *psf* mutant compared with its wild type, with the down-regulated temporal pattern during leaf senescence, regardless of rice genotypes. However, the transcript amount of *YUCCA7* in senescent leaves increased markedly from 0 to 21 days post anthesis, followed by a declining level of transcriptional expression at the late stage of leaf senescence process. This result implied that the rapid decrease in chlorophyll contents and also its accelerated leaf senescence symptoms for *psf* mutant were partly attributable to the weaker IAA biosynthesis in *psf* leaves during leaf senescence, in which the transcriptional level of *YUCCA7* expression might play an important role in the regulation of IAA biosynthesis in senescent leaves; the effect of N supply on the endogenous IAA content and its conjugated status in rice leaves was greatly variable, depending on the stage of leaf senescence. At the initial and early stages of leaf senescence, LN treatment decreased the free-IAA content in rice leaves and increased the IAA-ASP content in rice leaves, while HN resulted in a marked increase in free-IAA content in the senescent leaves, with a significant decrease in IAA-ASP content under HN. Comparatively, HN treatment displayed lower level in both free-IAA and IAA-ASP contents than NN and LN treatment at the late stage of leaf senescence (for *psf* mutant at about 28 day post anthesis) with severe leaf senescence symptom. 【Conclusion】 The onset and progression of leaf senescence were closely associated with IAA content and its conjugated status in rice leaves. The markedly increased IAA-ASP content in rice leaves may be considered as one of most important reasons for the accelerating progression of leaf senescence symptom, and HN-induced decrease in IAA-ASP content in rice leaves was, at least partly, responsible for the delay of leaf senescence progression.

Key words: *Oryza sativa*; leaf senescence; auxin (IAA); nitrogen supply; *psf* mutant

摘要:【目的】揭示水稻抽穗开花后剑叶衰老过程的内源自由态 IAA 和结合态 IAA 含量的动态变化及其基因型间的差异,明确氮素营养供应对叶片衰老过程的延缓效应及其与两种化学态 IAA 含量之间的关系。【方法】以剑叶早衰水稻突变体(*psf*)与其野生型(浙恢 7954)为材料,比较了其在田间条件下剑叶衰老过程中的内源 IAA 含量、IAA 类型和 *YUCCAs* 家族基因转录表达量差异,并利用水培种植试验设低氮(LN, 1.45 mmol/L)、正常氮(NN, 2.9 mmol/L)和高氮(HN, 5.8 mmol/L)3 个氮浓度水平处理,对不同氮素水平下水稻叶片衰老相关指标与两类 IAA 含量间的关系进行了分析。【结果】早衰突变体 *psf* 剑叶中的自由态 IAA 含量显著低于相同取样时期的野生对照,但前者剑叶中的结合态 IAA 含量显著高于后者,且随叶片衰老进程呈较明显的上升趋势;在 7 个 *YUCCAs* 同工型基因中, *YUCCA1*、*YUCCA2*、*YUCCA3*、*YUCCA4* 和 *YUCCA6* 的转录表达量随叶片衰老而下降,但 *YUCCA7* 则随叶片衰老呈现出先上升后下降的变化趋势。相同灌浆时期相比,绝大多数 *YUCCAs* 在早衰突变体 *psf* 剑叶中的转录表达量要低于其野生型对照,说明 IAA 合成代谢较弱是 *psf* 剑叶叶绿素含量迅速下降和早衰症状加剧的重要原因之一。其中, *YUCCA7* 转录表达量随叶片衰老而上升,可能对 *psf* 已衰老叶片中的 IAA 合成起重要调控作用;氮浓度对水稻叶片中的 IAA 含量及其自由态与结合态的影响表现为,在叶片开始衰老的初期和前中期,低氮处理(LN)引起剑叶中的自由态 IAA 含量下降和结合态 IAA 含量上升,而高氮处理(HN)可诱导叶片中的自由态 IAA 含量增加,并导致结合态 IAA 含量明显降低,但对已严重衰老的叶片而言(*psf* 在抽穗开花后 28 d 的剑叶),高氮处理下(HN)的自由态 IAA 和结合态 IAA 含量均低于正常氮处理(NN)和低氮处理(LN)。【结论】水稻叶片的衰老进程与其叶片器官中的 IAA 含量及其化学态之间存在较密切联系。其中,结合态 IAA 含量在叶片衰老过程的大幅度提升,是早衰突变体 *psf* 剑叶衰老进程加快的一个重要生理特征,而结合态 IAA 含量的下降,可能是高氮处理对水稻叶片衰老进程起到延缓作用的一个重要生理调节因素。

关键词: 水稻; 叶片衰老; 生长素; 氮素营养; 早衰突变体

中图分类号: Q945.6; S143.1; S511.01

文献标志码: A

文章编号: 1001-7216(2018)06-0591-10

水稻抽穗后籽粒灌浆所需营养物质的 60%~80% 来自叶片的光合同化产物^[1,2], 其生育后期功能叶片早衰,会引起叶片生理功能期和籽粒灌浆的持续时间缩短,导致叶片光合同化产物的产生能力及其向籽粒转运量减少,从而引起水稻灌浆期间的“库”/“源”关系失衡和合理灌浆动态遭受破坏,最终对水稻产量形成与稻米品质产生明显不利影响^[3-5]。在水稻籽粒灌浆后期,水稻功能叶片的寿命每延长 1 d,稻谷产量可增加 1%~2%^[5]。因此,探明水稻生育后期功能叶片衰老的遗传特点、生理生化及其栽培调控机理,对水稻育种和栽培管理具有重要理论指导意义。

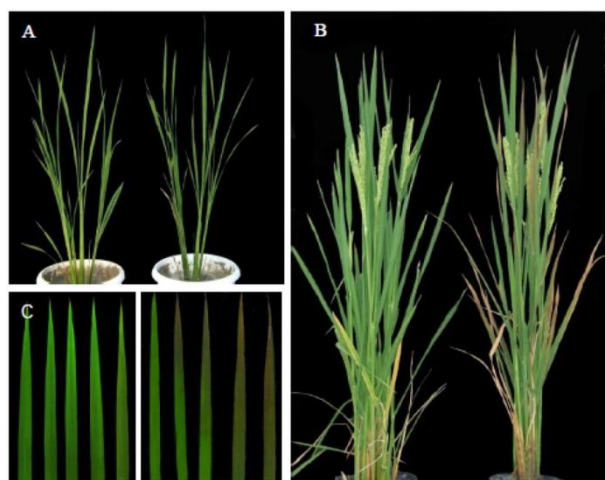
水稻生育后期的功能叶片衰老进程,既与品种遗传因素和类型特征有关,也与环境条件、栽培因素(如水肥管理、温光条件、种植方式等)之间存在密切联系^[2-5]。现已基本明确,氮素作为植物必需的营养元素,对水稻生育后期的功能叶片光合速率和叶片衰老进程影响很大^[2,6]。缺氮会引起水稻等作物功能叶片中的叶绿素含量下降、叶绿体蛋白降解、光合速率降低和 MDA 含量提高,进而导致叶片早衰和光合功能期缩短;而增施氮肥延缓叶片的衰老进程,促进叶片光合同化产物的产生^[7,8]。目前,植物内源激素参与叶片衰老的生理调控也已得到公认^[8-12]。其中,细胞分裂素(CTKs)可延缓植物叶片衰老,而脱落酸(ABA) 和乙烯(ethylene)则起相反作用^[8,10]。但对于生长素(IAA)与植物叶片衰老之间的关系,目前尚存在较大争议^[11,12]。此外,在植物叶

片中的 IAA 以自由态 IAA 和结合态 IAA 两种形式存在^[12],而对于 IAA 在叶片中的自由态和结合态变化及其与叶片衰老过程之间的关系还不清楚。为此,本研究利用通过辐射诱变获得的水稻早衰突变体材料(已命名为 *psf*, premature senescence at filling stage),对其抽穗后剑叶衰老过程中两种类型 IAA (自由态 IAA 和结合态 IAA)的动态变化及其与野生型间的差异进行了比较分析。在此基础上,通过水培条件下的氮浓度处理试验,研究了氮素营养供应对叶片衰老进程的调控及其与两类 IAA 化学态含量间的关系,并利用荧光定量 PCR 检测了相关代谢功能基因的转录表达模式,旨在明确水稻叶片衰老与 IAA 间关系及其调控机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料与田间动态取样

选用抽穗后剑叶早衰突变体(*psf*)及其野生型(浙恢 7954)作为试验材料。*psf* 是通过对浙恢 7954 的成熟种子进行 ⁶⁰Co-γ 射线辐照处理所获得的剑叶早衰突变体^[13]。*psf* 在水稻生长发育至孕穗期之前生长发育正常,株高、分蘖数、叶片的外观、形态和颜色均与对照基本接近,未表现出较明显的早衰症状,但在拔节孕穗期之后,由下部叶片开始,各功能叶(包括倒 3 叶和倒 2 叶)由下至上相继出现衰老迹象,至水稻抽穗时,倒 3 叶已基本接近枯死,倒 2 叶早衰症状也较严重,而此时的剑叶仍基本保



A—分蘖期(左为野生型植株, 右为早衰突变体 *psf* 植株); B—抽穗开花期(左为野生型植株, 右为早衰突变体 *psf* 植株); C—植株剑叶在抽穗开花后的衰老变化动态(从左到右分别为野生对照与早衰突变体 *psf* 剑叶在抽穗当日、抽穗后 7 d、14 d、21 d 和 28 d 的表型)。

A, Tillering stage (left, wild type; right, *psf* mutant); B, Heading and flowering stage (left, wild type; right, *psf* mutant); C, Phenotype of the flag leaf of *psf* and its wild type during filling stage (7, 14, 21 and 28 days after heading, from left to right, respectively).

图 1 早衰突变体 *psf* 和野生型浙恢 7954 的植株与叶片表型差异

Fig. 1. Difference in plant type and leaf appearance between *psf* mutant and its wild type (Zhehui 7954) at different growth stages.

持正常,但在数日后,其叶尖部出现锈状斑点,然后沿着叶脉扩展到叶基部,且锈状斑点颜色不断加深,至水稻抽穗开花后 20 d 左右时,剑叶的整个叶片已呈褐棕色,之后约 1 周左右,由叶尖开始整个叶片逐渐枯死,此时其野生型的叶片仍保持正常的绿色(图 1)。我们用早衰突变体 *psf* 为母本,与其野生型浙恢 7954 杂交, F_1 的叶片表型正常, F_2 在叶片表型出现分离,正常植株与早衰植株的分离比例大致为 3:1,说明该表型突变由隐性位点控制^[14]。进一步以 *psf* / 粳稻 02428 的 F_2 作为定位群体,将早衰突变体 *psf* 的突变基因定位于第 3 染色体的 RM15363 和 RM15361 标记之间,物理距离为 121 kb。通过对候选基因进行测序,发现在 LOC_03938990(编码 DNA/RNA 解旋酶基因)的 ORF 域发生了一个碱基突变,从而引起该酶基因的成熟 mRNA 剪切发生变化和氨基酸编码区发生移码^[14]。

田间试验于 2015 年在浙江大学紫金港校区实验农场进行。4 月 21 日播种,5 月 20 日移栽,单因素随机排列,每个品种(材料)种植 3 个小区,每小区面积 9 m²,栽插密度为 17 cm × 22 cm,单本手工栽插,大田常规水作管理,及时防治病虫和杂草。试验地

前茬为小麦,地力中等偏上。待水稻抽穗后,对当日抽穗的稻穗所对应的剑叶叶片进行挂牌标记。从抽穗当天(设定为 0 d)到抽穗后 28 d,每隔 7 d 取样 1 次,每次取 10 个剑叶,样品迅速用液氮冻后保存于 -80℃ 超低温冰箱中,待进一步测定分析有关指标。

1.2 水培氮营养处理

水培氮营养处理试验于 2016 年在浙江大学紫金港校区试验站大型智能温室中进行。供试材料是早衰突变体(*psf*)及其野生型(浙恢 7954)。将供试两个水稻材料的种子浸种消毒 3 d 后播种,田间湿润育秧,4 周后选取 3~4 叶期生长均匀的健壮秧苗,单株移植到装有 3 L 培养液的 4 L 水培盆中,每盆 3 株。水培营养液参照国际水稻研究所(IRRI)的水培完全营养液配方^[15],通过改变该配方营养液中的 NH₄NO₃ 浓度,设置低氮(LN, 1.45 mmol/L)、中氮(MN, 2.9 mmol/L)和高氮(HN, 5.8 mmol/L)3 个氮浓度水平。每个处理设 4 个重复(4 盆),每周更换 1 次营养液,直到取样结束。其中,中氮(MN)为 IRRI 营养液配方的标准氮素浓度(2.9 mmol/L),而低氮(LN)和高氮(HN)处理则分别为 IRRI 标准配方的 1/2 和 2 倍氮浓度。不同处理之间除氮营养浓度差异外,营养液中的其他组分及浓度完全相同。大型智能温室的室内保持自然光照,温度控制范围在 22℃~26℃(白天 26℃,夜晚 22℃),由校区试验站统一控制。从抽穗当天开始,每隔 14 d 取一次水稻植株的剑叶,标记好后用液氮迅速冷冻,并保存于 -80℃ 的超低温冰箱中备用。

1.3 叶片中自由态 IAA 和共轭态 IAA(IAA-ASP)含量的测定

叶片自由态 IAA 和 IAA-ASP 态含量的测定参照 Kojima 等^[16]的方法,采用 UPLC-ESI-qMS/MS 测定。IAA 的提取与收集方法如下:称取 1 g 新鲜的水稻叶片置于液氮中研磨至粉末,加入 5 mL 预冷提取缓冲液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{甲酸}}:V_{\text{水}}=15:1:4$),在 -30℃ 条件下冷冻提取 24 h,提取液 4℃ 10 000×g 下离心 15 min。沉淀中加入提取缓冲液重复提取一次,离心后合并两次上清液。样品提取液加入到 Oasis HLB96 孔收集板中,将收集板放置于自动固相萃取系统(SPE215; Gilson, Middleton, WI, USA)。提取液经过 1 mol/L 甲酸活化后过柱,收集洗脱液。然后采用逐级洗脱的方法分别洗脱 IAA 和 IAA-ASP。其中,IAA 经 0.5% 的甲酸洗脱获得,IAA-ASP 经 3% 的甲酸洗脱。洗脱液蒸发脱水干燥后经过进一步的纯化,然后用于 UPLC-ESI-qMS/MS 定量分析 IAA 和 IAA-ASP 含量。色谱参数和质谱条件设置依 Kojima 等^[16]的方法进行。

表 1 水稻 IAA 合成限速酶的编码基因 YUCCAs 各同工型的引物序列

Table 1. Sequence of primer pairs used for real-time quantitative PCR in this study.

基因名称 Gene name	登录号 Accession No.	引物 Primer pairs(5'-3')	产物大小 Product size/ bp
<i>Actin</i>	X16280	CAGCACATTCCAGCAGATGT TAGGCCGGTTGAAAACTTTG	198
<i>YUCCA1</i>	LOC_Os01g45760	TTGGATTTGTGCCGGCATGG TCGACGAGCTGAACCGGTAG	140
<i>YUCCA2</i>	LOC_Os05g45240	GCGCAGAATTTGACGAGCGA ACCAGCCACTGCGACACATA	100
<i>YUCCA3</i>	LOC_Os01g53200	GGCTCTACTCGGTCGGGTTC GCTTCCCTCTGGCCTTCCAT	105
<i>YUCCA4</i>	LOC_Os01g12490	AGGGCCAGATGATGCACTCC AGGTCGAGGGACACCTCCAT	109
<i>YUCCA5</i>	LOC_Os12g32750	TCTACGCCACCGGATTCACC GGCGAGGGACTTGGTCCAG	101
<i>YUCCA6</i>	LOC_Os07g25540	CGCCATGTCTGACCTGTTGC GGAACCGGAGGAGGAAGACG	107
<i>YUCCA7</i>	LOC_Os04g03980	CCCAACGGATGGAAGGGTGA GCCGTGCTCTTCTTGGTTGG	149

1.4 RNA 的提取、cDNA 的合成和荧光定量 PCR 检测

叶片总 RNA 采用 Trizol 提取法提取。称取 0.1 g 剪碎后的叶片样品，置于液氮预冷的研钵中迅速研磨至粉末状态，然后将粉碎样品转移至离心管，以 Trizol RNA 试剂盒(Invitrogen, 美国)提取和纯化水稻叶片总 RNA，并用 DNaseI 对总 RNA 进行消化。经变性甲醛琼脂糖凝胶电泳以及 NanoDrop 2000 微量分光光度计测定浓度后，参照 TOYOBO 公司的 cDNA 反转录试剂盒(ReverTra Ace@qPCR RT Kit)合成 cDNA 第 1 链。目标基因表达的荧光定量 PCR 检测采用 SYBR 实时荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Green Real-time PCR Master Mix reagent Kit, TOYOBO, OSAKA, 日本)进行。20 μL 的反应体系中包含 10 μL PCR 反应混合液，上、下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL，2 μL 反转录 cDNA 模板，6.4 μL 无菌离子水。在 Bio-Rad CFX96(Bio-Rad,美国)上进行实时荧光 PCR 反应及数据采集。目标基因的荧光定量 PCR 引物采用金斯瑞 RT-PCR 在线程序设计(<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>)，以 *Actin*(XM16280)作为内参基因，参照 Schmittgen 等^[17]的方法进行数据分析。

1.5 叶绿素含量和丙二醛(MDA)含量测定

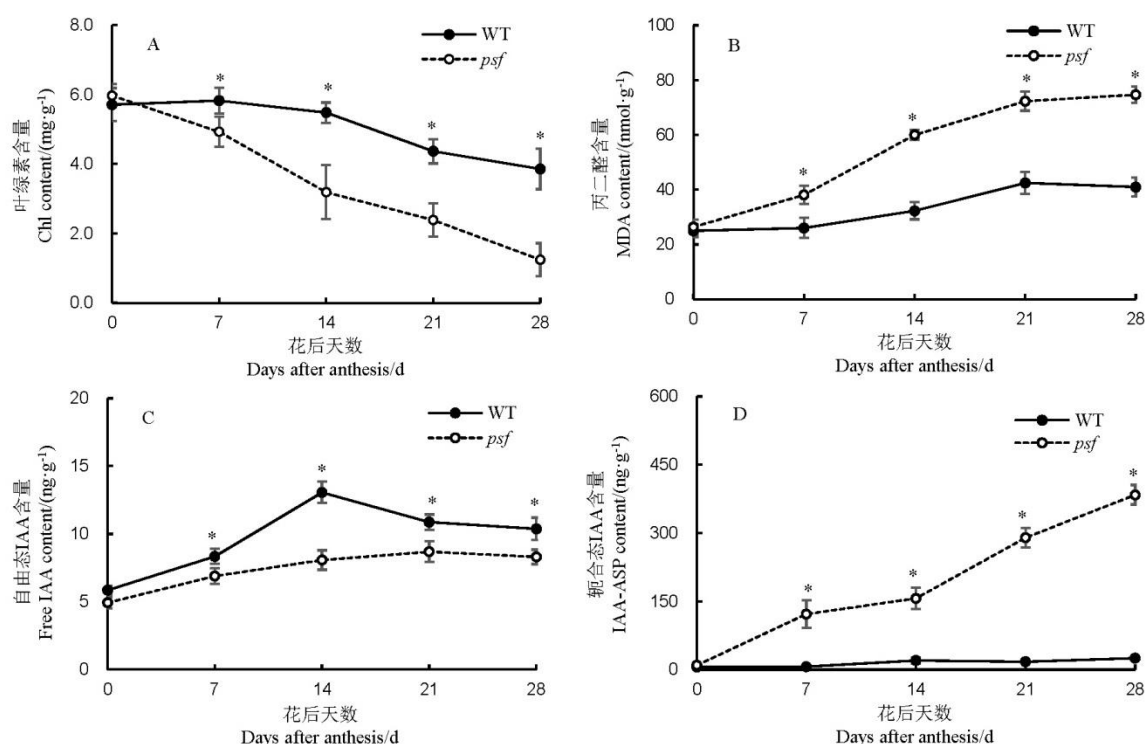
叶绿素含量和丙二醛含量的测定参照张志良等^[18]的方法进行。每样品各 3 次生物学重复。利用 EXCEL 进行平均值和标准差等统计运算。

2 结果与分析

2.1 早衰突变体(*psf*)剑叶衰老过程中的自由态 IAA 和结合态 IAA 含量变化及其与野生型对照品种(浙恢 7954)间差异

在抽穗开花期(0 d)，早衰突变体 *psf* 剑叶中的叶绿素含量和 MDA 含量与其野生型对照之间的差别并不明显，但在抽穗开花之后，早衰突变体 *psf* 剑叶的叶绿素含量迅速下降，而 MDA 含量显著上升(图 2-A 和图 2-B)。在抽穗后 14 d 时，早衰突变体 *psf* 剑叶中的叶绿素含量已降至抽穗开花期(0 d)的 50%左右，而 MDA 含量几乎是其抽穗开花期(0 d)的 3 倍(图 2-A)。与之相比，浙恢 7954 剑叶中的叶绿素含量和 MDA 含量基本保持稳定，在抽穗开花第 21 天后，浙恢 7954 剑叶中的叶绿素含量和 MDA 水平才出现一定程度下降或上升，但其下降与上升的幅度远小于早衰突变体 *psf*(图 2-B)。

由图 2-C 可见，早衰突变体 *psf* 剑叶中的自由态 IAA 含量虽然低于其相同取样时期的野生对照，但前者在叶片衰老过程中并没有呈现出较明显的下降趋势，甚至还略有上升(与 0 d 相比)。这说明在 *psf* 剑叶衰老过程中，其叶绿素含量下降和 MDA 上升等衰老指标变化并不是完全取决于其自由态 IAA 含量。与自由态 IAA 含量相比，供试两个基因型在结合态 IAA 含量(IAA-ASP)上的差异较大。其中，



A—叶绿素含量; B—丙二醛含量; C—自由态 IAA 含量; D—轭合态 IAA 含量。* 表示相同取样时期的两个基因型间差异达到统计显著水平($P < 0.05$)。A, Chlorophyll contents; B, MDA content; C, Free IAA content; D, IAA-ASP content. Vertical bars represent standard deviation ($n = 3$). * indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 2 早衰突变体 *psf* 和野生型间的叶绿素、丙二醛、自由态 IAA 和 IAA-ASP 态含量差异及其剑叶衰老过程的动态变化
Fig. 2. Temporal patterns of total chlorophyll, MDA, free-IAA and IAA-ASP contents in flag leaves from 0 to 28 days post anthesis between the wild type and the *psf* mutant.

除开花抽穗当日(0 d)之外, *psf* 剑叶中的 IAA-ASP 含量均显著高于野生型对照, 且随叶片衰老及其程度加剧, *psf* 剑叶中的 IAA-ASP 含量几乎呈直线上升趋势。与之相比, 野生型叶片中的 IAA-ASP 含量则极低, 在整个取样期间(0~28 d)仅略有上升或基本保持稳定(图 2-D)。上述现象说明, 轭合态 IAA(IAA-ASP)含量与水稻叶片的衰老过程密切相关, IAA-ASP 含量增加可能是导致早衰突变体 *psf* 叶片衰老进程加快、叶绿素含量迅速下降和 MDA 大幅度上升的一个重要生理调控因素。

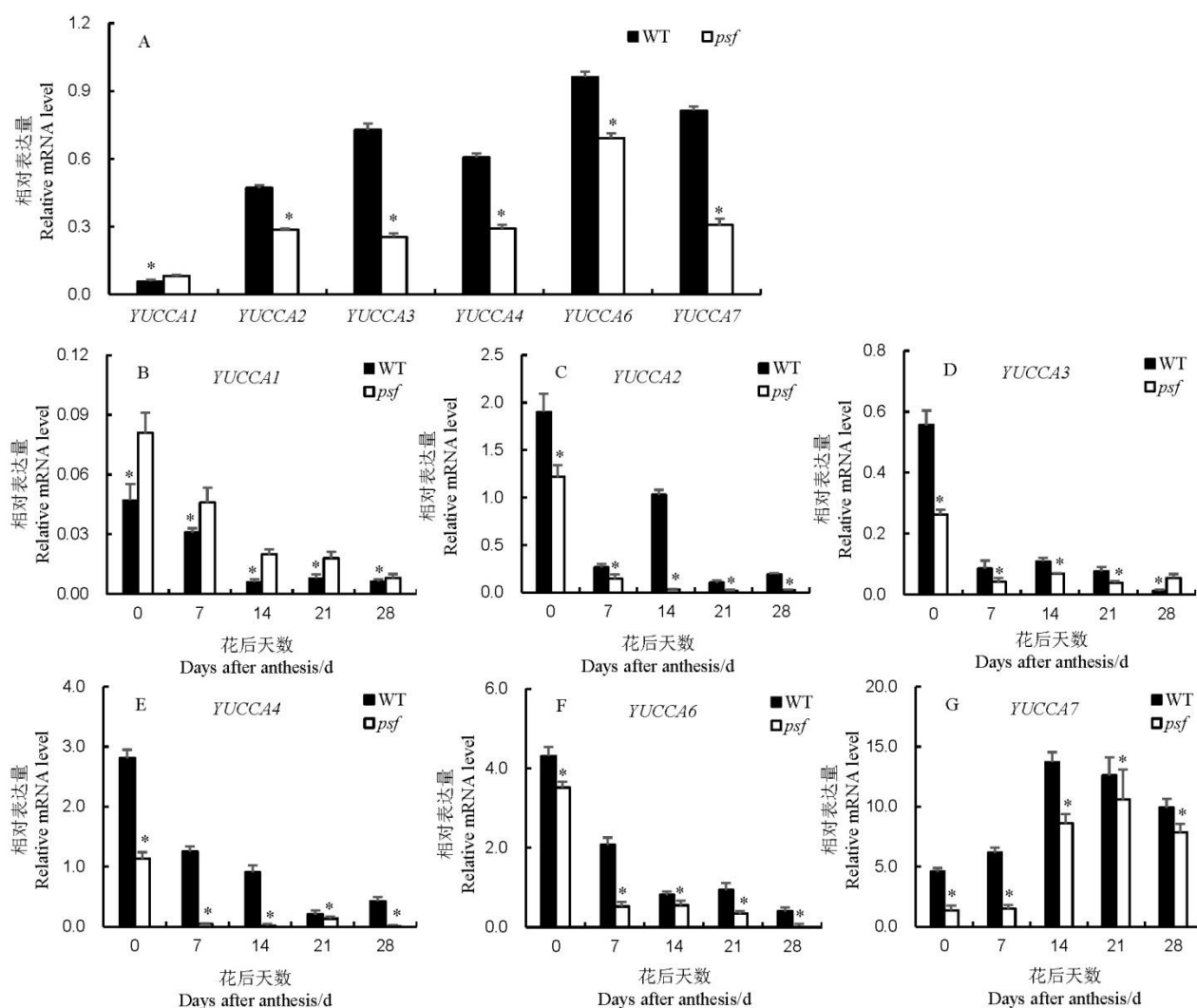
2.2 早衰突变体(*psf*)剑叶衰老过程中 IAA 合成关键基因 *YUCCAs* 的表达模式

YUCCAs 是调控植物器官中 IAA 合成关键限速酶的编码基因, 在水稻中共有 7 个同工型(*YUCCA1*、*YUCCA2*、*YUCCA3*、*YUCCA4*、*YUCCA5*、*YUCCA6* 和 *YUCCA7*)^[19]。对 *YUCCAs* 各同工型基因在早衰突变体 *psf* 和野生型对照叶片中的表达量检测结果表明, *YUCCA6* 和 *YUCCA7* 在水稻叶片中的表达量最高, 其次是 *YUCCA2*、*YUCCA3* 和 *YUCCA4*, 而 *YUCCA1* 在水稻叶片中的表达量很低, *YUCCA5* 在

水稻叶片中几乎不表达(图 3-A)。供试两个基因型相比, 早衰突变体 *psf* 剑叶中的绝大多数 *YUCCAs* 同工型基因表达水平(包括 *YUCCA2*、*YUCCA3*、*YUCCA4*、*YUCCA6* 和 *YUCCA7*)均显著低于相同时期的野生对照, 而 *YUCCA1* 在 *psf* 剑叶中呈上调表达(图 3-B~F)。从各个 *YUCCAs* 同工型基因在叶片衰老过程的变化动态来看, 大多数基因(包括 *YUCCA2*、*YUCCA3*、*YUCCA4* 和 *YUCCA6*)随着 *psf* 剑叶的叶片衰老症状加剧呈较明显的下降趋势, 但 *YUCCA7* 则有所上升, 供试两个基因型的表现基本一致, 但增幅有所差异。上述现象说明, 早衰突变体 *psf* 剑叶中的 IAA 合成代谢相对较弱, 这可能是其剑叶中的自由态 IAA 含量低于浙恢 7954 的主要原因之一, 而 *YUCCA7* 转录表达量随叶片衰老而上升则可能对已衰老叶片的 IAA 合成起着较特殊的调控作用。

2.3 氮素浓度处理对叶片衰老过程的延缓效应及其与叶片 IAA 含量间关系

氮素营养供应与水稻剑叶的衰老进程存在密切关系^[2,6]。由图4可见, 营养液的氮浓度水平对水



A—早衰突变体 *psf* 和野生型(WT)在抽穗后 0 d *YUCCAs* 各同工型基因的表达; B—*YUCCA1*; C—*YUCCA2*; D—*YUCCA3*; E—*YUCCA4*; F—*YUCCA6*; G—*YUCCA7*。*表示相同取样时期的两个基因型间差异达统计显著水平($P < 0.05$)。

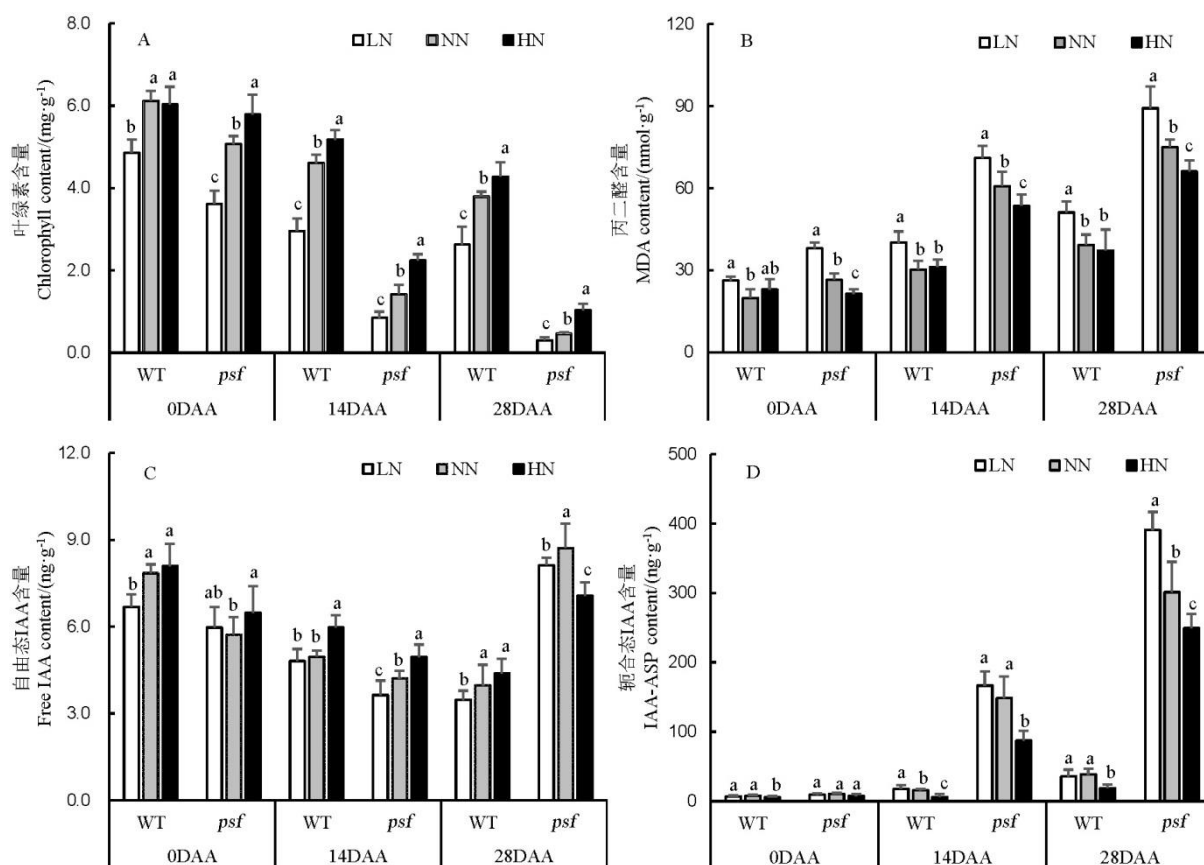
A, Comparison of seven *YUCCAs* isoform genes expressions at 0 day after anthesis; B, *YUCCA1*; C, *YUCCA2*; D, *YUCCA3*; E, *YUCCA4*; F, *YUCCA6*; G, *YUCCA7*. Vertical bars represent standard deviation ($n = 3$). * indicates significant difference ($P < 0.05$).

图3 早衰突变体 *psf* 和野生型在灌浆结实期剑叶衰老过程中调控 IAA 合成关键酶编码基因 *YUCCAs* 各同工型的动态表达
Fig. 3. Temporal patterns of the mRNA transcript levels of *YUCCAs* isogenes in flag leaves from 0 to 28 days post anthesis between the wild type and the *psf* mutant.

稻叶片器官中的叶绿素含量和MDA积累量有显著影响。随氮处理浓度提高,水稻剑叶中的叶绿素含量呈较明显的上升趋势,而MDA含量则相反,在高氮处理(HN)下的MDA含量显著低于其低氮处理(LN)(图4-A、B)。供试两个基因型(早衰突变体*psf*与野生对照)表现一致,氮素处理浓度增加有利于延缓水稻剑叶的衰老进程。

对不同氮营养处理下水稻剑叶自由态IAA和结合态IAA含量的测定结果,低氮处理(LN)可引起剑叶自由态IAA含量降低,而高氮处理(HN)可诱导其自由态IAA含量的显著提升(图4-C),这说明氮素营

养处理对叶片衰老进程的调控作用与水稻叶片中的自由态IAA含量变化有关,尤其是在叶片开始衰老的初期和前中期,高氮条件下自由态IAA含量的升高可能参与叶片衰老进程的延缓。但令人意外的是,对早衰突变体*psf*抽穗后28 d的剑叶而言,高氮处理(HN)下的自由态IAA含量却显著低于其正常氮(NN)和低氮(LN)处理,且差异达统计显著水平(图4-C)。这一现象说明,对于已呈现出较严重衰老症状的早衰突变体*psf*叶片(抽穗后28 d左右),此时的高氮浓度处理反而会抑制其叶片中的自由态IAA含量增加。此外,氮素营养浓度处理对结合态IAA



A—叶绿素含量; B—丙二醛含量; C—自由态 IAA 含量; D—轭合态 IAA 含量; LN—低氮(1.45 mmol/L); NN—正常氮(2.9 mmol/L); HN—高氮(5.8 mmol/L); 相同小写字母表示相同基因型在同一取样时期的不同氮素处理下的差异未达到统计显著水平($P < 0.05$)。DAA—花后天数。

A, Chlorophyll contents; B, MDA content; C, Free IAA content; D, IAA-ASP content; LN, Low N level (1.45 mmol/L); NN, Normal N level (2.9 mmol/L); HN, High N level (5.8 mmol/L). Values followed by the same letter for each rice genotype within the same sampling stage are not significantly different at the 0.05 level. DAA, Days after anthesis.

图 4 不同氮浓度处理下, 水稻剑叶中叶绿素总量、丙二醛、自由态 IAA 和轭合态 IAA 含量

Fig. 4. Total chlorophyll contents, MDA accumulaton, free IAA and IAA-ASP contents of the wild type and the *psf* mutant among three N regimes.

含量的影响表现为高氮处理(HN)会引起水稻剑叶中的IAA-ASP含量下降, 而低氮处理(LN)则会导致水稻剑叶中的轭合态IAA含量上升, 但降低或上升的幅度随水稻基因型及其叶片衰老的时期不同而异(图4-D)。其中, 早衰突变体*psf*在抽穗后28 d时的轭合态IAA含量相对最高, 不同氮浓度处理间的差异幅度也相对最大, 表现出较明显的与轭合态IAA含量相关的衰老生理变化, 即高氮处理(HN)下水稻叶片中的轭合态IAA含量降低可能是氮素营养供应引起水稻叶片衰老进程延缓的一个重要生理调节因素。

3 讨论

IAA是第一个被发现的植物激素, 在植物细胞、

组织和器官的分化、生长及植物与环境之间的信息交流中发挥着重要的调控作用^[12]。在过去一个多世纪的研究中, 人们对IAA在调节细胞伸长和分裂、器官分化、极性建成和环境响应等方面的生理功能及其调控机理已取得了较明确认识^[12,19]。此外, IAA的生理功能广泛, 能在各个层次和生长发育阶段, 参与植物从胚胎发育、侧根形成、叶片伸长、花序分枝和果实发育等多种生物学过程的代谢调控, 其生理功能几乎贯穿了整个生长发育过程^[8,10]。但相对于细胞分裂素(CTKs)、脱落酸(ABA)和乙烯及乙烯(Ethylene)等激素, 目前对IAA在调控植物叶片衰老中的作用及其代谢调节机理还存在较大争议^[8,10,20]。据Gan等^[8]报道, IAA在植物中可通过极性运输和非极性运输精确调控各组织器官中的内源IAA浓度, 外源施加人工合成或者天然生长素都可以显著延

缓多种植物离体叶片的失绿黄化、蛋白的降解以及衰老叶片中IAA含量的显著下降^[8,10]。此外,一些学者的盆栽与大田试验结果也证实,IAA在植物叶片衰老过程中起反向调控作用,相对较高的内源IAA浓度可延缓植物叶片衰老^[5,11];外源喷施IAA类物质可抑制衰老相关基因的表达,延缓水稻、小麦等多种作物的叶片衰老进程^[7,10]。但也有不少相反结论的研究报道。例如Quirino等^[21]发现,在拟南芥衰老叶片中的内源IAA含量比未衰老叶片高2~3倍;喷施2,4-D(外源IAA类化合物)能诱导玉米、小麦等作物的叶片衰老^[12]。赵春江^[22]对小麦生育后期功能叶片中的IAA含量测定结果也显示,成熟期小麦旗叶中的IAA含量显著高于抽穗开花期。Buchanan-Wollaston等^[23]以拟南芥等植物的叶片为材料,对其衰老叶片中的生长素响应因子(auxin response factor, ARF)和IAA含量进行测定,结果表明拟南芥叶片中的ARF相关基因在衰老过程中呈显著上调表达,IAA含量也随叶片衰老而增加。这说明生长素会促进叶片的衰老,或者是叶片衰老引起了IAA在叶片中的累积。在本研究结果中,早衰突变体 psf 剑叶中的自由态IAA含量虽然要低于其相同取样时期的野生对照,但早衰突变体 psf 剑叶中的自由态IAA含量水平并没有随着叶片衰老而下降,相反其含量随着叶片衰老而上升,这说明内源IAA与水稻叶片衰老之间的关系较复杂,IAA可能具有前期保持叶片生长发育和后期促进衰老的双重作用。与自由态IAA含量相比,早衰突变体 psf 与其野生型对照在结合态IAA含量上的差异较大,且随着叶片衰老进程的加速, psf 剑叶中的结合态IAA含量几乎呈直线上升趋势(图2-D)。这一现象揭示水稻叶片中的结合态IAA含量与水稻叶片的衰老过程存在密切联系。进一步对IAA合成关键限速酶的编码基因YUCCAs在叶片衰老过程的转录表达量检测结果表明,大多数YUCCAs(包括YUCCA2、YUCCA3、YUCCA4和YUCCA6)基因在 psf 剑叶中的转录表达量均低于其野生型对照,这说明早衰突变体 psf 剑叶中的IAA合成代谢相对较弱,这可能是 psf 剑叶中的自由态IAA含量低于浙恢7954的重要原因之一。然而,由于YUCCA7在 psf 剑叶衰老过程中呈上调表达,因而 psf 剑叶中的自由态IAA和结合态IAA含量随叶片衰老而上升(图2-C和图2-D)。其中,结合态IAA的大幅度上升,这是早衰突变体 psf 剑叶衰老过程所表现出的一个重要现象,其对水稻叶片衰老过程的调节机理尚有待进一步研究。值得一提的是,早衰突变体 psf 的突变基因是位于第3染色体的LOC-

_03938990(编码DNA/RNA解旋酶基因)在ORF域上发生了单碱基突变,并不是直接参与IAA的合成、分解及共轭态转化等代谢途径的功能基因产生了突变^[14]。然而,由于DNA/RNA解旋酶在调控有关基因错误编码的信使RNA降解(Nonsense-mediated mRNA decay, NMD)过程中扮演着必不可少的角色^[24],与植物激素IAA的生物合成及其在逆境胁迫下的ABA响应等代谢环节有均存在较密切联系^[25]。因此,除两种类型的IAA含量变化外,早衰突变体(psf)与野生对照之间在叶片衰老过程中的ABA含量差异^[26],以及相关激素相互作用所构成的较复杂的调控网络^[12],也可能在 psf 叶片衰老过程中起重要调节作用。叶绿素含量下降和MDA含量上升是评价植物叶片衰老及其程度的两个重要生理指标^[13]。魏海燕等^[2]的研究结果表明,不同氮肥利用效率水稻基因型的衰老特性差异明显,水稻的衰老特性与生育中后期氮素吸收与积累、氮肥吸收利用效率密切相关。缺氮会引起水稻功能叶片中的叶绿素含量下降、MDA含量上升及光合功能期缩短,而增施氮肥可延缓水稻生育后期的功能叶片早衰,提高叶片光合同化产物的供应量^[2]。郭文琦^[27]对不同氮处理下棉花叶片中抗氧化酶活性和内源激素含量的测定结果表明,缺氮会引起棉花叶片中的内源ABA含量增加、细胞分裂素类物质(ZRs)等含量的显著降低。另据何萍等报道^[28],氮钾配比适宜,可提高春玉米叶片生育后期穗叶的叶绿素含量,增加IAA、ZR和GA3含量及SOD活性,同时降低ABA含量和MDA含量,从而延缓玉米叶片生育后期的功能叶片衰老,而氮钾比例失调则会引起叶片中SOD和CAT等酶活性下降、自由基的清除能力降低,由此引起早衰。在本研究中,缺氮处理可引起水稻生育后期功能叶片中的叶绿素含量下降、MDA含量上升,而高氮处理对叶片衰老有明显的缓解作用(图4-A和4-B)。这与前人相关研究报道一致^[2,27,28]。但本研究结果表明,氮浓度处理对水稻生育后期剑叶中的IAA含量影响,不仅与IAA的化学态有关,而且与其叶片衰老时期及其衰老程度有着密切联系。在早衰突变体 psf 剑叶开始衰老的初期和前中期(第0天和第14天),其剑叶中的自由态IAA含量随氮处理浓度增加呈较明显的上升趋势,但在其剑叶衰老已较严重的中后期(花后28 d),自由态IAA含量随氮浓度水平增加而提升的趋势并不明显,甚至在高氮水平(HN)下有所下降(图4C)。与之相比,浙恢7954的剑叶衰老过程相对平缓,衰老程度也较轻(图1和图4-A),因此,即使是在抽穗开花后28 d,高氮处理

(HN)的自由态IAA含量仍高于其低氮处理(LN)和正常氮处理(NN)。其剑叶中的轭合态IAA含量也呈较明显的下降趋势(图4C)。值得关注的是, 缺氮处理在引起水稻叶片衰老进程加剧的同时, 供试两个水稻基因型剑叶中的轭合态IAA含量均呈现出较明显的上升趋势, 而高氮处理(HN)在延缓水稻生育后期叶片衰老进程的同时, 剑叶中的轭合态IAA含量均有显著下降, 尤其是对水稻灌浆中后期的剑叶叶片较明显(图4-D)。这一现象揭示, 缺氮(LN)或高氮(HN)所引起的水稻生育后期的功能叶片衰老进程变化与衰老叶片中IAA含量及其化学态变化有关。其中, 轭合态IAA含量的降低, 可能是氮营养供应增加可延缓水稻叶片衰老进程的一个重要因素。据研究报道, 植物叶片衰老过程通常是多种激素相互作用的结果, 并构成较复杂调控网络^[8,12]。IAA对叶片衰老的调控也可能是通过改变叶片组织中的ABA和乙烯含量或者叶片组织对乙烯的敏感性起作用的^[5,10-11]。据我们对早衰突变体(*psf*)与其野生型对照(浙恢7954)叶片器官以及根部伤流液中的玉米素类(ZR)和异戊二烯基腺嘌呤类(IPR)细胞分裂素含量及其差异变化的测定结果, *psf* 叶片和根系伤流液中的IPR含量均低于其野生对照, 但两者在ZR类细胞分裂素含量上的差异不明显(未发表数据)。因此, 本研究的后续研究工作有必要从多种内源激素含量及其各种激素之间的平衡关系等角度, 对氮素营养调节水稻生育后期叶片衰老过程的生理机制加以进一步明确解释。

谢辞: 本项目得到国家重点研发计划(2016YFD0300502)、浙江大学大北农学科发展与人才培养基金和江苏省现代作物协同创新中心的资助。

参考文献:

- [1] Yang J C, Zhang J H, Wang Z Q, Zhu Q S, Liu L J. Absciscic acid and cytokinins in the root exudates and leaves and their relationship to senescence and remobilization of carbon reserves in rice subjected to water stress during grain filling. *Planta*, 2002, 215(4): 645-652.
- [2] 魏海燕, 张洪程, 马群, 戴其根, 霍中洋, 许轲, 张庆, 黄丽芬. 不同氮肥吸收利用效率水稻基因型叶片衰老特性. *作物学报*, 2010, 36(4): 645-654.
Wei H Y, Zhang H C, Ma Q, Dai Q G, He Z Y, Zhang Q, Huang L F. Characteristics of leaf senescence in rice genotypes with different nitrogen use efficiency. *Acta Agron Sin*, 2010, 36(4): 645-654. (in Chinese with English abstract)
- [3] 李木英, 石庆华, 郑伟, 潘晓华, 谭雪明. 杂交稻生育后期叶片衰老频度及其关联因素研究. *江西农业大学学报*, 2010, 32(6): 1081-1088.
Li M Y, Shi Q H, Zheng W, Pan X H, Tan X M. A study on leaf senescence types and its impact factors in hybrid rice during grain filling stage. *J Jiangxi Agric Univ*, 2010, 32(6): 1081-1088. (in Chinese with English abstract)
- [4] 朱练峰, 刘学, 禹盛苗, 欧阳由男, 金千瑜. 增氧灌溉对水稻生理特性和后期衰老的影响. *中国水稻科学*, 2010, 24(3): 257-263.
Zhu L F, Liu X, Yu S M, Ouyang Y N, Jin Q Y. Effects of aerated irrigation on physiological characteristics and senescence at late growth stage of rice. *Chin J Rice Sci*, 2010, 24(3): 257-263. (in Chinese with English abstract)
- [5] 徐娜, 徐江民, 蒋玲欢, 饶玉春. 水稻叶片早衰成因及分子机理研究进展. *植物学报*, 2017, 52(1): 102-112.
Xu N, Xu J M, Jiang L H, Rao Y C. Advances in understanding leaf premature senescence and its molecular mechanism in rice. *Chin Bullet Bot*, 2017, 52(1): 102-112. (in Chinese with English abstract)
- [6] 谢金水, 邵彩虹, 唐秀英, 石庆华. 养分胁迫对籽粒灌浆期水稻叶片衰老影响的蛋白质组学分析. *中国水稻科学*, 2011, 25(2): 143-149.
Xue S J, Shao C H, Tang X Y, Shi Q H. Proteomics analysis of nutrition stress effect on rice leaf senescence at grain filling stage. *Chin J Rice Sci*, 2011, 25(2): 143-149. (in Chinese with English abstract)
- [7] Distelfeld A, Avni R, Fischer A M. Senescence, nutrient remobilization, and yield in wheat and barley. *J Exp Bot*, 2014, 65: 3783-3798.
- [8] Gan S, Amasino R M. Making sense of senescence. *Plant Physiol*, 1997, 113: 313-319.
- [9] 樊金娟, 李雪梅, 徐正进, 张立军. 杂交粳稻屈优418及其亲本灌浆期叶片内源激素含量变化与衰老之间的关系. *中国水稻科学*, 2004, 18(2): 47-50.
Fan J J, Li X M, Xu Z J, Zhang L J. Relationship between changes in leaf endogenous hormone contents and senescence of hybrid rice Tiyou 418 and its parents during filling stage. *Chin J Rice Sci*, 2004, 18(2): 47-50. (in Chinese with English abstract)
- [10] Yoshida S. Molecular regulation of leaf senescence. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 79-84.
- [11] 张艳军, 赵江哲, 张可伟. 植物激素在叶片衰老中的作用机制研究进展. *植物生理学报*, 2014(9): 1305-1309.
Zhang Y J, Zhao J Z, Zhang K W. Research progress on mechanisms of phytohormone regulating leaf senescence. *Acta Phytophysiol Sin*, 2014(9): 1305-1309. (in Chinese with English abstract)
- [12] 许智宏, 薛红卫. 植物激素作用的分子机理. 上海: 上

- 海科学技术出版社, 2012: 21-37.
- Xu Z H, Xue H W. Molecular mechanisms of plant hormone regulation. Shanghai: Shanghai Sci-tech Press, 2012: 21-37. (in Chinese)
- [13] 王复标, 黄福灯, 程方民, 李兆伟, 胡东维, 潘刚, 毛愉婵. 水稻生育后期叶片早衰突变体的光合特性与叶绿体超微结构观察. *作物学报*, 2012, 38(5): 871-879.
- Wang F B, Huang F D, Cheng F M, Li Z W, Hu D W, Pan G, Mao Y C. Photosynthesis and chloroplast ultra-structure characteristics of flag leaves for a premature senescence rice mutant. *Acta Agron Sin*, 2012, 38(5): 871-879. (in Chinese with English abstract)
- [14] 龚盼. 水稻叶片早衰基因*OsPLS2*的图位克隆及其功能分析. 杭州: 浙江大学, 2016.
- Gong P. Map-based cloning and function analysis of leaf early senescence gene *OsPLS2* in rice. Hangzhou: Zhejiang University, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [15] 毛达如. 植物营养研究法. 北京: 北京农业大学出版社, 1994: 14-16.
- Mao D R. Research method of plant nutrition. Beijing: Beijing Agriculture University Press, 1994: 14-16. (in Chinese)
- [16] Kojima M, Kamada-Nobusada T, Komatsu H. Highly sensitive and high-throughput analysis of plant hormones using MS-probe modification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: An application for hormone profiling in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol*, 2009, 50(7): 1201-1214.
- [17] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat prot*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [18] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导.(3 版) 北京: 高等教育出版社, 2005: 167-169.
- Zhang Z L, Qu W J. Physiology of plant experimental guidance. 3rd edn. Beijing: Higher Education Press, 2005: 167-169. (in Chinese)
- [19] Yamamoto Y, Sazuka T. Auxin biosynthesis by the *YUCCA* genes in rice. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1362-1371.
- [20] Zhao Y. The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development. *Curr Opin Plant Biol*, 2008, 11(1): 16-22.
- [21] Quirino B F, Normanly J, Amasino R M. Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol Biol*, 1999, 40: 267-278.
- [22] 赵春江, 康书江, 王纪华, 郭晓维, 李鸿祥. 植物内源激素对小麦叶片衰老的调控机理研究. *华北农学报*, 2000, 15(2): 53-56.
- Zhao C J, Kang S J, Wang J H, Guo X W, Li H X. Research on phyto-hormones regulating mechanism of the senescence of wheat leaves. *Acta Agric North China*, 2000, 15(2): 53-56. (in Chinese with English abstract)
- [23] Buchanan-Wollaston V, Page T, Harrison E. Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J*, 2005, 42(4): 567-585.
- [24] Hurt J A, Robertson A D, Burge C B. Global analyses of UPF1 binding and function reveal expanded scope of nonsense-mediated mRNA decay. *Genom Res*, 2013, 23: 1636-1650.
- [25] Merai Z, Benkovics A H, Nyiko T, Debreczeny M, Hiripi L, Kerenyi Z, Kondorosi E, Silhavy D. The late steps of plant nonsense-mediated mRNA decay. *Plant J*, 2013, 73: 50-62.
- [26] Wang F, Liu J C, Chen M X, Zhou L J, Li Z W, Zhao Q, Pan G, Cheng F M. Involvement of abscisic acid in PSII Photodamage and D1 protein turnover for light-induced premature senescence of rice flag leaves. *PLoS ONE*, 2016, 11(8): e0161203.
- [27] 郭文琦, 陈兵林, 刘瑞显, 周治国. 施氮量对花铃期短期渍水棉花叶片抗氧化酶活性和内源激素含量的影响. *应用生态学报*, 2010, 21(1): 53-60.
- Guo W Q, Chen B L, Liu R X, Zhou Z G. Effect of nitrogen application rate on cotton leaf antioxidant enzyme activities and endogenous hormone contents under short-term water logging at flowering and boll forming stage. *Chin J Appl Ecol*, 2010, 21(1): 53-60 (in Chinese with English abstract)
- [28] 何萍, 金继运. 氮钾营养对春玉米叶片衰老过程中激素变化与活性氧代谢影响. *植物营养与肥料学报*, 1999, 5(4): 289-296.
- He P, Jin J Y. Effect of N and K on change of endogenous hormone and metabolism of active oxygen during leaf senescence in spring wheat. *Plant Nut Fer Sci*, 1999, 5(4): 289-296. (in Chinese with English abstract)