

水稻卷叶突变体 *rl76* 的表型和组织分析及基因定位

何虎强, 邓秋雨, 罗丽华, 王 丹, 刘金灵, 肖应辉

(湖南农业大学农学院, 长沙 410128)

摘要: 叶片是水稻 (*Oryza sativa* L.) 进行光合作用的主要器官, 叶片形态是影响水稻群体光合效率的首要因素, 不断挖掘控制叶片卷曲的基因并揭示其遗传机理, 可为培育叶片适度卷曲的理想株型水稻品种提供基因资源。本研究以卷叶突变体 *rl76* 为材料, 开展了农艺性状调查、叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、类胡萝卜素、纤维素、半纤维素和木质素含量测定及组织学分析, 并用水稻 GSR40K 芯片技术对卷叶基因进行定位。表型鉴定发现, 从分蘖期开始, 突变体 *rl76* 与野生型相比, 叶片极度内卷成葱状且直立, 叶片卷曲指数极显著增加, 株高和有效分蘖数显著降低, 叶宽、剑叶长和穗长无明显差异。突变体 *rl76* 叶绿素含量显著高于野生型, 类胡萝卜素含量无明显差异, 纤维素含量和木质素含量均低于野生型。石蜡切片结构显示, *rl76* 突变体叶片气腔消失、远轴面厚壁细胞发育缺陷及泡状细胞面积和个数减少。遗传分析表明卷叶性状符合不完全显性单基因遗传规律; 采用水稻 GSR40K 芯片技术将 *rl76* 基因初步定位在第 9 染色体上 12.179~16.436 Mb 的区段; 进一步利用 F₂ 群体中的 949 株极端卷叶植株进行精细定位, 将卷叶基因定位在第 9 染色体上 SSR 标记 T5904-7 和 T5904-9 物理距离为 30.26 kb 的染色体区段, 在该染色体区间内含有 3 个注释基因, 其中 *LOC_Os09g23200* 是已报道控制水稻叶片卷曲的基因 *SLL1*, 因此推测 *rl76* 的卷叶表型可能是 *SLL1* 基因在发挥作用。综上所述, 突变体 *rl76* 的卷叶表型是由 9 号染色体上的一个不完全显性单基因通过调控泡状细胞及远轴面厚壁细胞的发育所致。

关键词: 水稻; 卷叶; 突变体; 遗传分析; 基因定位

Histomorphological Analysis and Gene Mapping of the Rolled Leaf Mutant *rl76* in Rice

HE Huqiang, DENG Qiuyu, LUO Lihua, WANG Dan, LIU Jinling, XIAO Yinghui

(Agronomy College of Hunan Agricultural University, Changsha 410128)

Abstract: Leaves are the main organs for photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.), and leaf morphology affects the photosynthetic efficiency of rice plants. Identification of genes that control leaf curling and revealing their genetic mechanisms, could provide genetic resources for optimizing the architecture of rice varieties with moderately curled leaves. In this study, the spontaneous rolled leaf mutant *rl76* was measured on their agronomic traits, content of leaf cellulose and chlorophyll, histomorphological observation was carried out as well. In addition, the rice GSR40K chip was applied to map the mutant gene *rl76*. At the seedling stage, there was no significant difference between the mutant *rl76* and the wild type on their leaf rolling severity, both of which showed slightly rolled leaves; through the tillering to the maturity stages, the leaves of *rl76* severely rolled into shallot-like shape and erect, while the leaves of wild type were flat and slightly drooping. Comparing with wild type, the leaf rolling index of *rl76* increased significantly, while the plant height and effective tiller number decreased significantly, there was no significant difference on leaf width, flag leaf length and panicle length. The chlorophyll content in leaves of *rl76* was significantly higher than that of the wild type, the carotenoid content did not significantly vary; nevertheless, the content of cellulose and lignin were lower in *rl76* than those

收稿日期: 2024-02-20 网络出版日期: 2024-09-10

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240220001>

第一作者研究方向为种子科学与技术, E-mail: 1409589858@qq.com

通信作者: 肖应辉, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: xiaoyh@hunau.edu.cn

基金项目: 湖南省重点领域研发计划项目 (2023NK2003)

Foundation project: Key Research and Development Program Projects in Hunan Province (2023NK2003)

in the wild type. The leaf histomorphology was observed by paraffin sectioning, in the leaves of *rl76* mutant, the two air cavities disappeared, the development of the sclerenchymatous cells on the abaxial surface was defective, and the area and number of the bulliform cells decreased. Genetic analysis showed that the rolled leaf was determined by a single gene inheritance pattern with incomplete dominant. By use of the rice GSR40K chip, the mutant gene *rl76* was preliminarily mapped within the region of 12.179-16.436 Mb on chromosome 9. With 949 plants showing severely rolled leaf in an F_2 population, the gene *rl76* was further fine mapped within the chromosomal segment delimiting by the SSR markers T5904-7 and T5904-9, corresponding to a physical distance of 30.26 Kb. It contains three annotation genes within this chromosomal segment, among which the gene *LOC_Os09g23200* encoding SHALLOT-LIKE 1 (*SLL1*) has been reported, it determines leaf curling by regulating the development of leaf distal surface cells. Therefore it is speculated that the rolled leaf in the mutant *rl76* may be regulated by the gene *SLL1*. In summary, the rolling leaf in the *rl76* mutant was resulted from abnormal development of the bulliform cells and abaxial sclerenchymatous cells that were regulated by a single incompletely dominant gene on chromosome 9.

Key words: rice; rolled leaves; mutant; genetic analysis; gene mapping

叶片是水稻进行光合作用的主要器官,改良水稻植株叶片形态、增强植株光捕获率从而增强光合作用对于提高水稻产量具有重要意义^[1]。叶片适度卷曲有利于塑造紧凑株型,改善群体结构,提高光合效率和产量。泡状细胞的大小、形态、分布和数量的改变是导致水稻叶片卷曲的首要因素。一般情况下,泡状细胞的数量或大小的增加会导致叶片外卷^[2-3],反之会导致叶片内卷^[4-5]。薄壁细胞、厚壁细胞和维管束中细胞的改变也可导致卷叶的形成。如水稻细卷叶突变体 *OSPM11* 卷叶的原因是薄壁细胞的严重变形及排列无规则^[6];窄卷叶突变体 *nrl3* 形成的原因是叶片远轴面厚壁细胞的发育缺陷^[7], Zhang 等^[8]认为叶片背面厚壁细胞发育缺陷,叶片支撑力丧失,导致叶片极度内卷。水稻 *twil* 突变体叶片扭曲是维管束细胞的特异性分化、表皮细胞、叶肉细胞以及角质层的异常发育所导致^[9]。Guo 等^[10]发现突变体 *cld1* 叶片卷曲是由于其表皮细胞受损导致叶片保水能力降低、叶片失水^[11]。葛倩雯等^[12]认为 *rld* 突变体叶片卷曲是维管束间的下表皮叶肉细胞面积增大及泡状化所导致。

目前共报道了 76 个水稻卷叶相关基因,在 12 条染色体上均有分布,其中经典遗传图谱上已标定 6 个控制卷叶的隐性基因 *rl1~rl6*^[13]。水稻卷叶性状一般由单基因控制,且大多数为单基因隐性遗传,少数为单基因显性遗传,或不完全显/隐性遗传。不完全显性遗传的如 *ERL1*^[14]和 *SRL2*^[15];不完全隐性遗传的如 *rl8*^[16]和 *rlt*^[17]。也有水稻卷叶性状由多基因控制,李仕贵等^[18]研究发现粳交 DH 群体中的卷叶性状是由 2 对互补基因控制。已克隆的水稻卷

叶基因 *SLL1* 位于 9 号染色体的 13.758~13.765 Mb 区域内。*SLL1* 编码一个 SHAQKYF 类 MYB 转录因子,属于 KANADI 家族基因,也被命名为 *AH2*、*OsKANAD11*。*SLL1* 通过调控水稻叶片远轴面厚壁组织细胞死亡来调控水稻叶片形状。*SLL1* 的突变引起叶绿素增加和光合作用增强^[19]。此外,*SLL1* 还参与调控水稻籽粒大小^[20]和外稃形态建成^[21]。

已有研究表明水稻卷叶性状的遗传机理十分复杂,因此挖掘调控水稻叶片卷曲的基因并揭示其遗传机理,有望通过遗传调控塑造适度卷曲的水稻叶片特征。本研究以水稻卷叶突变体 *rl76* 为材料,拟对其进行表型及组织学分析,并进行遗传分析和基因定位,为水稻卷叶基因的研究及育种应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

在粳型水稻温敏核不育系 9S 与常规水稻品种 LAC23 杂交的 BC_2F_6 群体中发现了一株自然突变的卷叶单株,命名为 *rolled leaf 76* (*rl76*)。该突变体自交后形成的 BC_2F_7 及其后代叶片均表现为卷叶表型。2021 年在位于长沙市江背镇的北大荒垦丰种业股份有限公司湖南育种站试验基地,种植卷叶突变体 *rl76* 为母本与粳稻品种日本晴杂交构建的 F_2 群体(共 4051 株),4 月 15 日播种,秧龄 25 d 左右移栽,每穴栽植 1 棵秧苗,株行距为 20 cm×20 cm,田间管理同当地常规栽培技术。

1.2 农艺性状调查

苗期观察突变体 *rl76* 与野生型 (WT, 粳 9S/

LAC23 BC₂F₆群体中的平展叶片植株)叶片的表型。成熟期调查 WT、*rl76*、日本晴和 F₁ 的株高、有效分蘖数(有效分蘖数为结实5粒以上的分蘖)、穗长(穗颈节至穗顶端的长度),每个株系随机选取5个单株调查,穗长测量时每个单株随机选取20穗进行调查。成熟期调查 WT、*rl76*、日本晴和 F₁ 的剑叶长、剑叶宽和叶片卷曲指数(LRI, leaf rolling index),叶片测量时选5株长势相似的植株测量,每株测量3片叶,取平均值为测量值。叶片卷曲指数的计算公式为 LRI (%) = (Lw - Ln) / Lw × 100%, 其中 Lw 是叶片展开后的宽度, Ln 是叶片卷曲时最宽处的宽度^[22]。群体表型鉴定采用目测法进行,以日本晴和卷叶突变体亲本叶片为对照,逐株调查 F₂ 群体各单株表型,记为野生型(平展叶)、突变体型(极端卷叶)和杂合型(半卷叶)。

1.3 生理学测定

选取成熟期长势一致的 *rl76* 与 WT 的剑叶为材料,各样品重复3次以丙酮浸提法^[23]测定叶绿素 a (Chla)、叶绿素 b (Chlb)、总叶绿素 (Cht) 和类胡萝卜素 (Car) 的含量;硝酸乙醇法^[24]测定纤维素 (E460)、半纤维素 (HC) 和木质素含量 (HL);由京卡文思检测技术有限公司检测。

1.4 组织学分析

石蜡切片:随机选取成熟期 *rl76* 与 WT 剑叶中段为材料,以 FAA 固定液(70%乙醇90 mL+冰醋酸5 mL+38%甲醛5 mL)固定后,经浓度分别为50%、70%、80%、90%、100%的乙醇脱水,依次经3:1 (V_{乙醇}:V_{二甲苯})、1:1、1:3和100%二甲苯透明处理,

再经浸蜡、包埋、切片、脱蜡后,取8~10 μm的切片以1.25%的甲苯胺蓝进行染色,封片后用光学显微镜(赛默飞,长沙)进行照相观察。

扫描电镜:选取长势良好的 *rl76* 与 WT 叶片,切成5 mm×5 mm的组织块,以2.5%的戊二醛溶液进行固定,固定后的叶片依次采用30%~100%(10%的浓度间隔)的乙醇脱水,再以1:1的乙醇乙醚混合液处理,100%乙醚进行置换。然后经断裂、干燥、喷金处理后用 Hitachi TM-1000 扫描电子显微镜(日立,长沙)观察不同部位并拍照。

1.5 遗传分析与基因定位

以卷叶突变体 *rl76* 与粳稻品种日本晴杂交的 F₁ 植株叶片表型初步确定卷叶表型遗传特征。采用 χ^2 检验分析 F₂ 群体中各表型的分离比是否符合孟德尔遗传定律。选取 *rl76* 突变体、日本晴、F₂ 群体中20株极端卷叶单株和20株极端平展叶单株的叶片,以 CTAB 法提取叶片总 DNA,将20株平展叶单株的 DNA 等量混合成野生池,20株卷叶单株的 DNA 等量混合成突变池。用武汉双绿源创芯科技研究院有限公司提供的“水稻40K基因芯片检测技术”(具体步骤详见武汉双绿源创芯科技研究院有限公司官网)完成突变基因的初定位。从 Gramene (<http://www.gramene.org/>) 获取粳稻品种日本晴和籼稻品种9311目标区间的基因组序列,并通过 NCBI 序列匹配数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对,使用 DANSTAR 和 SnapGene Viewer 设计开发新的 DNA 分子标记及引物进行精细定位,引物序列见表1。

表1 精细定位所用引物

Table1 Primers for fine mapping

引物名称 Primer name	正向引物序列(5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列(5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
ID09M07292	TGGTAAAACGTGTGACAAAA	ACTGATCATATGCCACCATT
ID09M07771	GTAGGCTTGTGTGATAGCAA	CTTTTACTGGATAACACCCGC
ID09M08238	CATACATGAAAGCAACATGG	CATACATGAAAGCAACATGG
ID09M08493	CAACAACAAGCACAACTACC	GTTCCGTTGATGTTGAAGTC
ID09M08762	GGGGAAGAAGTAGTCGGA	CATCAACTCCGACGAAAC
ID09M09856	GAGAGAGAGACAACCAGACG	TGAGGAGGCTACAGGTGA
T5904-1	TGGATGAACTCCCATATCTCA	AAGGGTGACAAAACAGACACA
T5904-7	GTTGTTACGACTCATCCATC	GAGACCAGTAAACCATCCAA
T5904-9	CGTCAGCCTACATCATCTC	CTTGAGATTGGTTTGCATCAT

PCR 扩增采用 10 μL 反应体系:DNA 模板 1 μL、正反向引物各 0.4 μL、2×Taq Plus Master Mix II (购自上海生工生物工程股份有限公司) 5 μL、ddH₂O 3.2 μL。反应程序:95 °C 预变性 5 min; 95 °C

变性 15 s, 58 °C 退火 20 s, 72 °C 扩增 30 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 16 °C 保温 10 min。PCR 产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 0.2% 的硝酸银染色后, 100 mL 1.5% 氢氧化钠+1 mL 甲醛显色观察

统计分析结果。

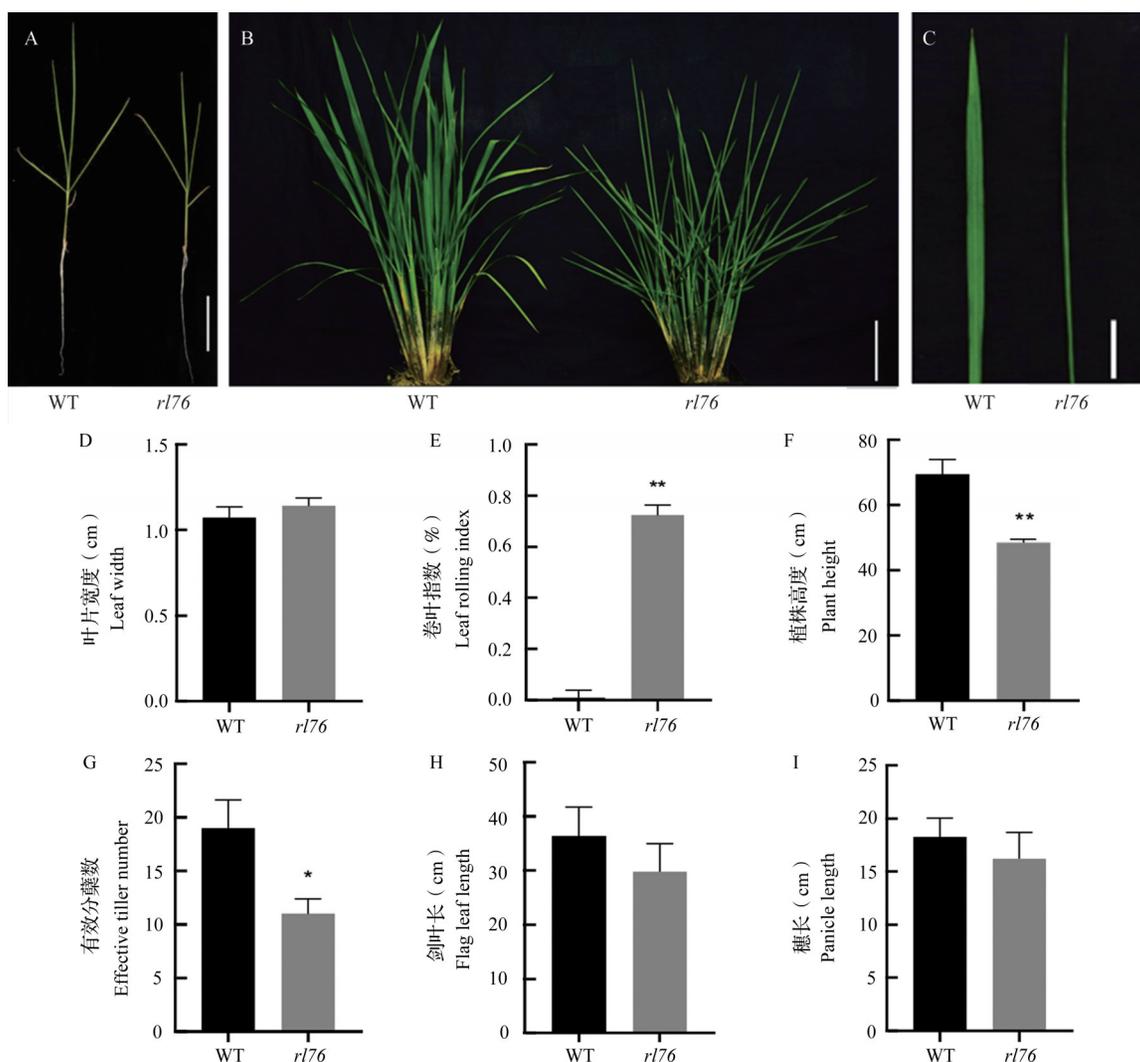
2 结果与分析

2.1 农艺性状表型鉴定

在苗期, 突变体 *rl76* 表型与野生型无明显差异, 均表现为轻度卷曲(图 1A)。从分蘖期开始, *rl76* 叶片极度内卷成葱状且直立, 而野生型叶片表现为平展、部分下垂(图 1B、C)。在成熟期, 调查了 *rl76* 突变体和野生型的农艺性状, 发现 *rl76* 突变体与野生型相比叶宽无明显差异(图 1D), 叶片卷曲指数极显著增加(图 1E); *rl76* 突变体的株高极显著降低(图 1F), 有效分蘖数显著减少(图 1G), 剑叶长和穗长与野生型间无明显差异(图 1H、I)。

2.2 生理指标分析

成熟期 *rl76* 突变体比野生型叶色更深, 且从分蘖期开始 *rl76* 叶片表现为明显直立状态, 因此检测了成熟期剑叶光合色素(叶绿素 a、叶绿素 b、类胡萝卜素)与木质纤维素(纤维素、半纤维素和木质素)含量。结果表明, 与野生型相比, 除类胡萝卜素含量无明显差异外, *rl76* 的叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量均显著高于野生型(图 2); 野生型纤维素、半纤维素和木质素含量分别为 166.81 mg/g、155.96 mg/g 和 6.99 mg/g, *rl76* 各组分含量分别为 147.59 mg/g、203.99 mg/g 和 5.72 mg/g(图 2), 纤维素和木质素含量均低于野生型, 而半纤维素含量却极显著高于野生型。



A: 苗期野生型与 *rl76* 植株的表型; B: 分蘖期野生型与 *rl76* 植株的表型; C: 分蘖期野生型与 *rl76* 叶片的表型; D-I: 成熟期野生型与 *rl76* 主要农艺性状。*表示在 $P < 0.05$ 水平上存在显著差异; **表示在 $P < 0.01$ 水平上存在极显著差异; 下同

A: Phenotype of wild type and *rl76* at seedling stage; B: Phenotypes of wild type and *rl76* at tillering stage; C: Phenotypes of leaves of wild type and *rl76* at tillering stage; D-I: Main agronomic traits of wild type and *rl76* at mature stage. * indicating that there was a significant difference at the $P < 0.05$ level; ** indicating that there was an extremely significant difference at the $P < 0.01$ level; The same as below

图 1 突变体的表型鉴定

Fig. 1 Phenotypic identification of mutant plant

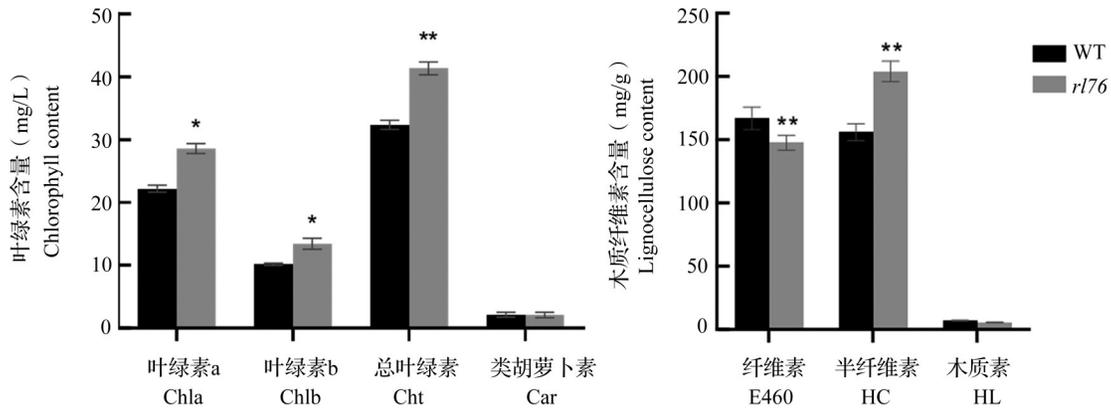


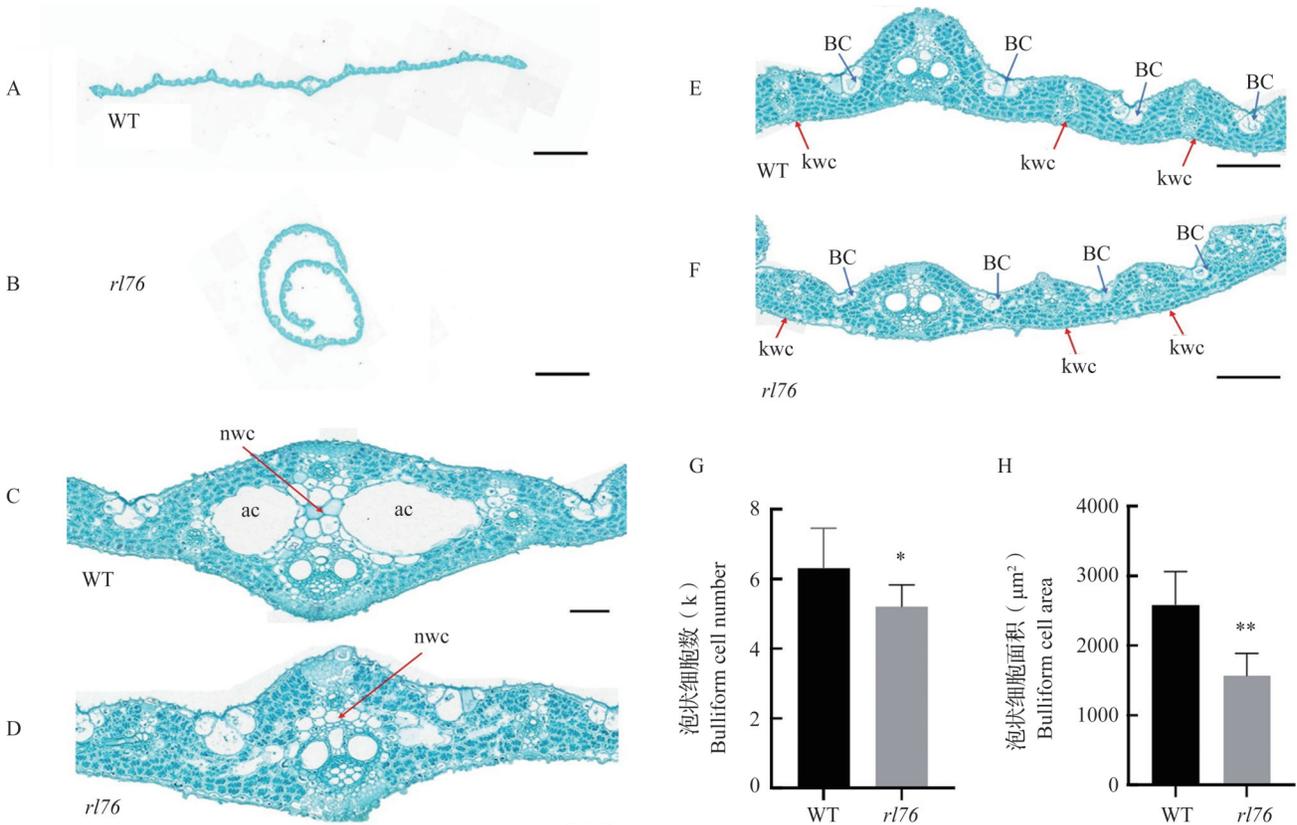
图2 WT和卷叶突变体*r176*叶片的木质纤维素和光合色素含量

Fig. 2 Lignocellulose and photosynthetic pigment content of WT and rolled leaf mutant *r176* leaves

2.3 组织学分析

2.3.1 石蜡切片 剑叶中段石蜡切片观察结果显示,野生型叶片横截面呈一字型,而*r176*叶片横截面呈盘状,表明*r176*叶片已卷曲至完全封闭(图3A、

B),中脉中没有气腔,被薄壁细胞填充(图3C、D),且远轴面厚壁细胞发育缺陷(图3E、F)。 *r176*泡状细胞面积和个数与野生型相比都显著减少(图3G、H)。以上结果说明*r176*叶片极度内卷是由于气腔



A:野生型叶片横截面;B:*r176*突变体叶片横截面;C:野生型叶片中脉;D:*r176*突变体叶片中脉;E:野生型叶片大维管束与小维管束;F:*r176*突变体叶片大维管束与小维管束;G:野生型与*r176*突变体泡状细胞数目;H:野生型与*r176*突变体泡状细胞面积。nwc:薄壁细胞;ac:气腔;BC:泡状细胞;kwc:厚壁细胞。比例尺=1000 μm(A,B), 50 μm(C,D), 100 μm(E,F)

A: Cross section of wild type leaves; B: Leaf cross section of *r176* mutant; C: Middle veins of wild type leaves; D: Leaf midrib of *r176* mutant; E: Large vascular bundles and small vascular bundles in wild-type leaves; F: Large vascular bundles and small vascular bundles in *r176* mutant leaves; G: Number of foam cells in wild type and *r176* mutant; H: Foam cell area of wild type and *r176* mutant. nwc: Parenchyma cells; ac: Cavity; BC: Bubble cells; kwc: Thick-walled cells. Bar=1000 μm (A,B), 50 μm (C,D), 100 μm (E,F)

图3 WT和卷叶突变体*r176*叶片石蜡切片

Fig. 3 Paraffin sections of WT and rolled leaf mutant *r176* leaves

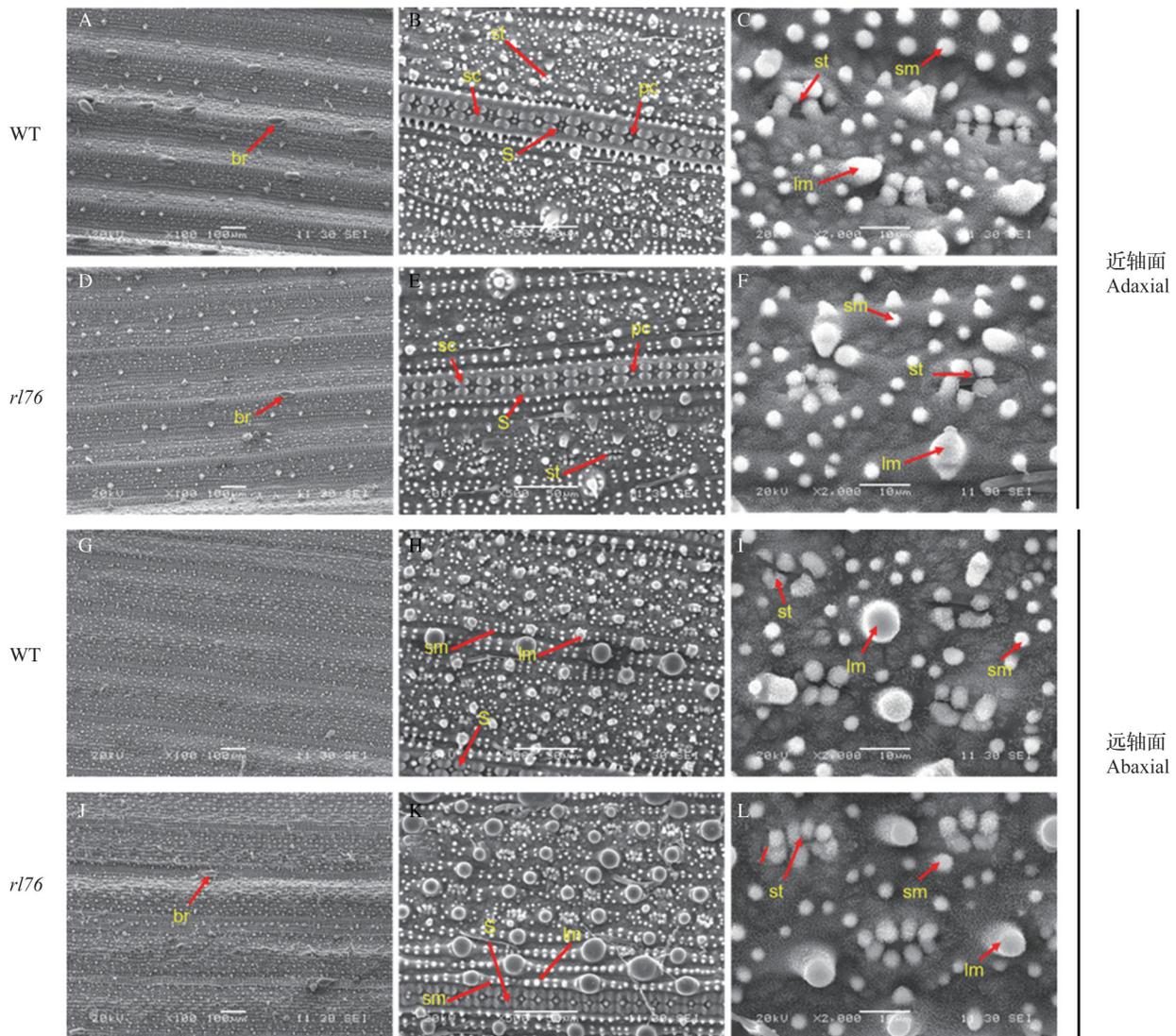
消失、远轴面厚壁细胞发育缺陷及泡状细胞面积和个数减少所致。

2.3.2 扫描电镜分析 叶片表面扫描电镜观察结果显示,野生型近轴面上的气孔分别位于硅质—木栓细胞带的两侧,一般有2列,且排列规则;突变体叶片近轴面的气孔也排列在硅质—木栓细胞带的两侧,但多于2列,排列无规则,气孔发生畸变。除此之外,突变体叶片上表皮刚毛数量减少(图4A~F)。突变体和野生型在叶片远轴面瘤状乳突带差异明显,野生型瘤状乳突带上的大乳突和小乳突均匀

排列,而 *rl76* 瘤状乳突带上大乳突明显增多,且大小不一,排列混乱(图4G~L)。

2.4 遗传分析与基因定位

2.4.1 遗传分析 *rl76* 突变体与粳稻品种日本晴杂交获得 F_1 , 其叶片表型介于两个亲本之间,呈现出半卷表型,故判定该卷叶表型为不完全显性遗传。进一步对 F_2 分离群体(共4051株)进行遗传分析,发现平展叶、半卷叶和卷叶植株数目符合1:2:1的分离比例(1039株平展叶植株、2063株半卷叶植株和949株卷叶植株; $\chi^2 = 5.39 < 5.99, P > 0.05$),符合不完全显



A~C: 成熟期 WT 叶片近轴面(上表面); D~F: 成熟期 *rl76* 近轴面(上表面); G~I: 成熟期 WT 叶片远轴面(下表面); J~L: 成熟期 *rl76* 远轴面(下表面)。br: 刚毛; lm: 大乳突; sm: 小乳突; st: 气孔; S: 硅质-木栓细胞带; sc: 硅细胞; pc: 栓细胞。每一列从左到右分别为放大100倍、500倍和2000倍图; 比例尺=100 μm (A, D, G, J), 50 μm (B, E, H, K), 10 μm (C, F, I, L)

A-C: Adaxial epidermis of matured leaves in wild type; D-F: Adaxial epidermis of *rl76* at mature stage; G-I: Abaxial epidermis of matured leaves in wild type; J-L: Abaxial epidermis of *rl76* at mature stage. br: Bristles; lm: Large mastoid; sm: Small mastoid; st: Stomata; S: Silicification-bolt cell column; sc: Silicon cells; pc: Plugged cell. Each column from left to right is enlarged by 100 times, 500 times and 2000 times, respectively; Bar=100 μm (A, D, G, J), 50 μm (B, E, H, K), 10 μm (C, F, I, L)

图4 WT和 *rl76* 叶片扫描电镜观察结果

Fig. 4 Electron microscopy scanning of WT and rolled leaf mutant *rl76* leaves

性单基因遗传规律。

2.4.2 基因初步定位 依据日本晴第六版基因组 (<https://www.ricedata.cn/gene/>) 构建各条染色体的框架(图5),对两个亲本和两个混池进行纯合度分析。结果显示 *rl76* 突变体纯合度较高,日本晴纯合度非常高,而两个极端混池则含有大量杂合区段

(图5)。基因型分析结果显示,在第9染色体长臂端,极端卷叶混池基因型与突变体基因型基本一致,而极端平展叶混池相应区段的基因型杂合度极高,结合具体的基因型数据,将控制卷叶相关的候选基因初步定位在第9染色体上12.179~16.436 Mb的区段。

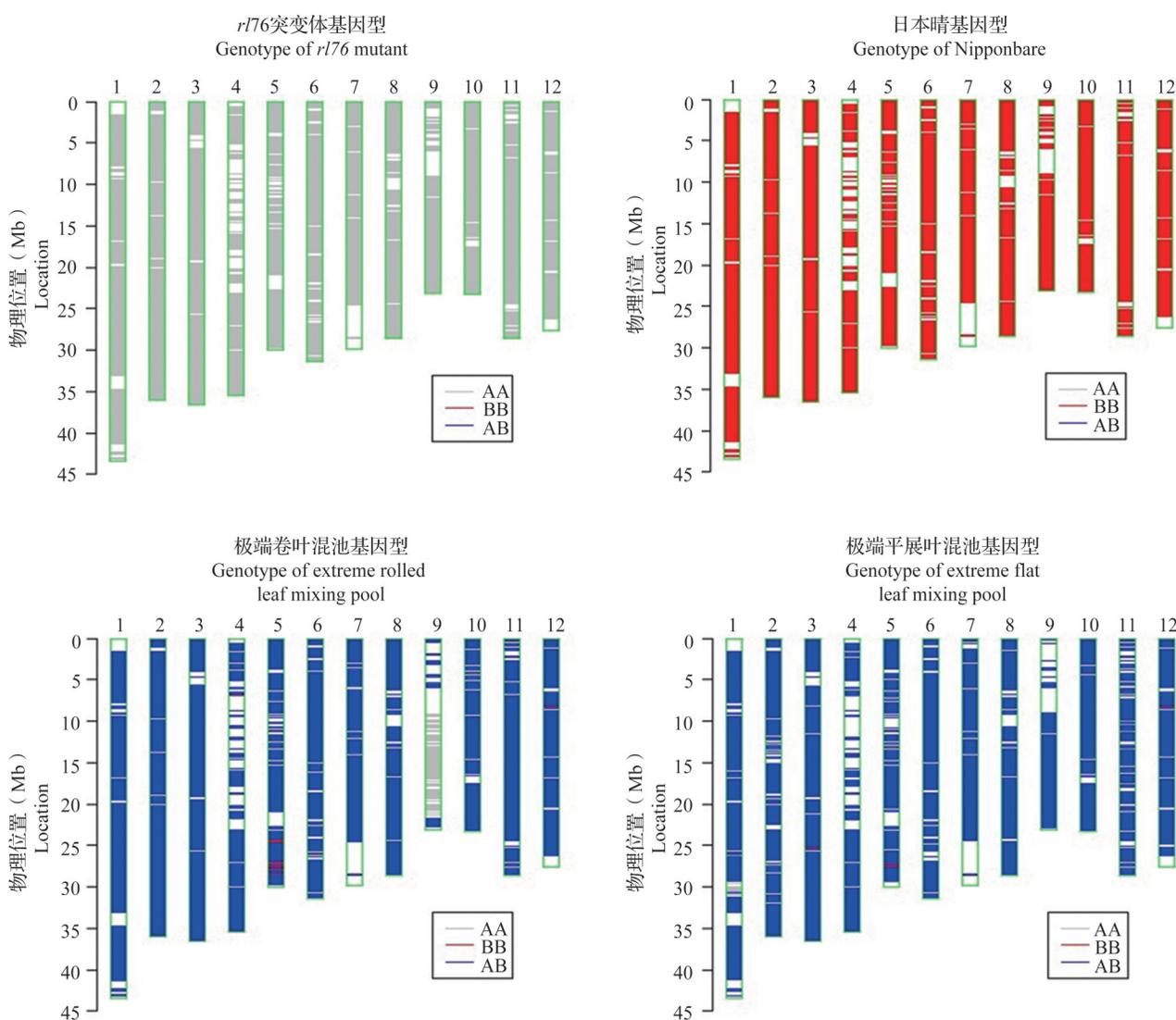
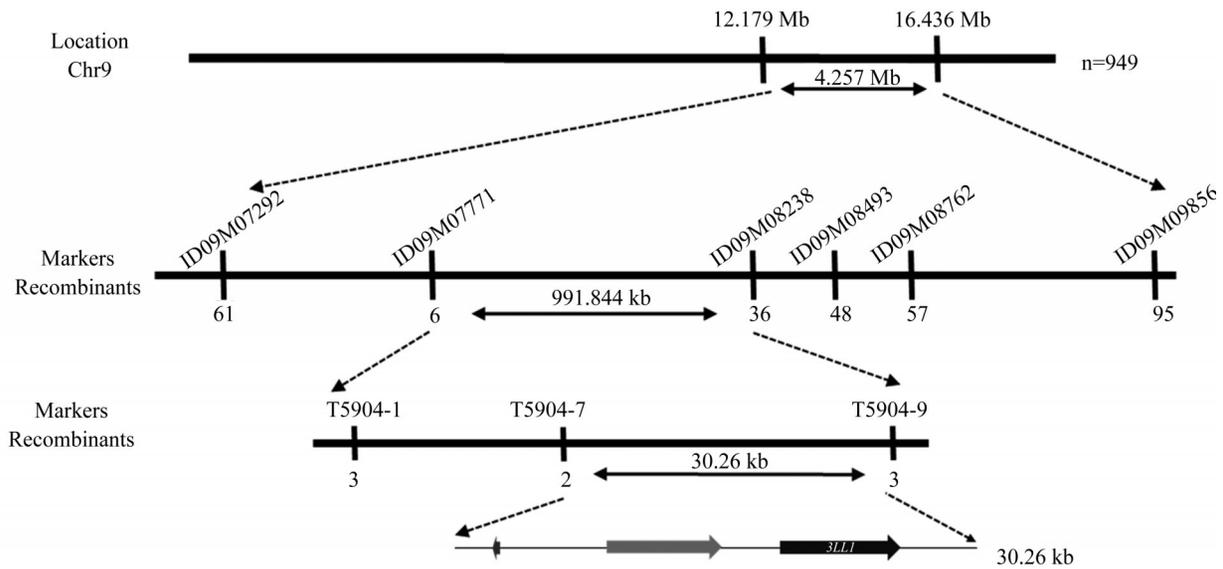


图5 亲本及两个极端混池的基因型分析

Fig. 5 Genotype analysis of parents and two extreme mixing pools

2.4.3 基因精细定位 采用在初定位区间内的两个多态性Indel标记ID09M07292和ID09M09856分别鉴定两个极端混池的各单株,验证初定位区间的真实性。利用 F_2 群体中的949株卷叶单株继续进行精细定位,最终将卷叶基因 *rl76* 定位在两个SSR标记T5904-7和T5904-9之间,物理距离为30.26 kb(图6)。通过 <http://rice.uga.edu/cgi-bin/gbrowse/rice>

网站查找在精细定位区间内含有3个注释基因,分别为 *LOC_Os09g23180*、*LOC_Os09g23190*、*LOC_Os09g23200*,其中 *LOC_Os09g23200* 是一个已知的通过调节叶片远轴面细胞发育来调控水稻叶片卷曲的基因 *SLL1*。故推测卷叶突变体 *rl76* 的卷叶表型是 *SLL1* 基因在发挥作用。



Arrows represent predicted genes, direction of the arrow represents the positive and negative direction of the genes

图6 卷叶基因 *rl76* 的精细定位

Fig. 6 Fine mapping of rolled leaf gene *rl76*

3 讨论

叶片是水稻最主要的同化器官,叶形是塑造理想株型、提高光能利用率以及产量形成的重要性状之一^[25]。卷叶是异型叶中的一种,最直接的作用是使植株保持叶片直立,增强植株间的透光及通风条件^[26]。然而,叶片过度卷曲会使光合作用长期处于光饱和点以下,降低光合利用率进而影响产量^[27]。多数卷叶突变体往往在农艺性状方面产生不良影响,使粒长粒宽变小,有效穗数、结实率和粒重下降,进而影响产量。如 *rl28* 突变体的结实率只有 40.2%^[25]; *Nrl3 (t)* 突变体与野生型 Zh8015 相比每穗粒数减少约 60%,千粒重降低 7 g,粒宽和粒长都显著变小^[7]; *soll* 有效穗数、千粒重、结实率均显著或极显著减少^[28]; *nsll* 突变体的株高、分蘖数、有效穗数、结实率均极显著低于野生型^[29]; *zll7* 突变体株高、单株有效穗数、主穗着粒数、主穗长和单株产量等均显著低于野生型^[30]。本研究中, *rl76* 突变体苗期与野生型无明显差异,从分蘖期开始, *rl76* 叶片极度内卷成葱状且直立; *rl76* 突变体的株高与有效分蘖数显著降低,剑叶长和穗长与野生型无明显差异。因此,只有在充分了解不同卷叶类型的生理和遗传调控机制的前提下,通过遗传操作塑造叶片适度卷曲的理想株型,才可以有效提高水稻品种的产量。

泡状细胞的大小、数量、形态以及分布是叶片卷曲的主导因素^[3]。 *rl28* 突变体卷叶的原因是中脉与第一个维管束、第一与第二个维管束之间的泡状细胞数量减少^[24], *soll* 突变体叶片外卷是其表皮泡状细胞异常所致^[27], *ocll* 突变体叶片外卷的原因是由于泡状细胞异常增大^[31]。 *sprll* 突变体的叶片卷曲是由于泡状细胞数量和面积减小所引起的^[32]。叶片卷曲后自身各生理进程会产生不同变化,与野生型相比,突变体 *nrl4* 的叶绿素含量增加^[33], *sll2* 突变体叶绿素含量、类胡萝卜素含量以及光合效率显著提高,蒸腾速率略有减少^[34]。 *rl76* 突变体的中脉中没有气腔,本该出现气腔的地方都被薄壁细胞所填充,且远轴面厚壁细胞发育缺陷,泡状细胞面积和个数相比显著减少;叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量显著提高;纤维素和木质素含量低于野生型,这与前人研究结论基本一致。

基因 *LOC_Os09g23180*, 全长 399 bp, 位于 9 号染色体的 13741473~13741075 bp 区域, 预测蛋白长度为 133 aa, 全基因只含一个外显子, 目前还未被注释。 *LOC_Os09g23190*, 全长 4059 bp, 位于 9 号染色体的 13747220~13753894 bp 区域, 预测蛋白长度 1353 aa, 全基因包含 12 个外显子和 11 个内含子, 预测为 CACTA, En/Spm 子类转录因子, 目前尚未被注释, 功能未知。 *LOC_Os09g23200* 基因全长为 1599 bp, 位于 9 号染色体的 13758215~13765052 bp

区域,蛋白长度为 533 aa,为已克隆的水稻卷叶基因 *SLL1*, *SLL1* 编码一个 SHAQKYF 类 MYB 转录因子,属于 KANADI 家族基因,通过调节叶片远轴面细胞发育来调控水稻叶片卷曲,也被命名为 *AH2*、*OsKANADII*。相比野生型,突变体 *ap2* 颖壳异常,内稃变得短小,部分颖壳缺失外部硅化细胞,并诱导外部粗糙表皮向内部光滑表皮转变。粒长粒宽下降,直链淀粉含量降低,胶稠度改变,蛋白质含量增加,结实率降低。MYB 转录因子 *AH2* 可能通过影响调控细胞增殖和伸长的基因表达,调控水稻籽粒大小^[20]。*AH2* 可与 *SLG7* 启动子结合并抑制其表达。利用基因编辑手段提高 *SLG7* 表达水平,能增加籽粒长宽比、降低稻米垩白^[35]。*OsADD1* 通过与启动子结合来调节纤维素合酶 D 亚族成员 *OsCSLD4* 表达,从而影响水稻花药开裂。突变体 *osadd1* 在花药开裂和颖壳开放方面表现出缺陷^[36]。

本研究发现卷叶突变体中脉气腔被薄壁细胞取代,泡状细胞个数及大小显著减少,气孔及瘤状乳突带上的大乳突发生畸变且排列混乱,表皮刚毛数量减少,纤维素和木质素含量显著降低,以上结果进一步丰富了卷叶形成的机制。

参考文献

- [1] 邓秋雨,肖应辉.水稻卷叶类型及调控机制研究进展.作物研究,2021,35(4):376-384
Deng Q Y, Xiao Y H. Research progress on types and regulation mechanism of rice rolled leaf. Crop Research, 2021, 35(4): 376-384
- [2] Hibara K, Obara M, Hayashida E, Abe M, Ishimaru T, Satoh H, Itoh J, Nagato Y. The *ADAXIALIZED LEAF1* gene functions in leaf and embryonic pattern formation in rice. Developmental Biology, 2009, 334(2): 345-354
- [3] 邢豹,陈振华,张治国.控制水稻叶形基因 *CLF1* 的图位克隆.生物技术通报,2017,33(9):110-115
Xing B, Chen Z H, Zhang Z G. Map-based cloning of a curly leaf gene *CLF1* in rice. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(9): 110-115
- [4] 周文期,强晓霞,李思雨,王森,卫万荣.水稻卷叶等位突变体 *e202* 的鉴定和基因精细定位.作物学报,2023,49(11):3029-3041
Zhou W Q, Qiang X X, Li S Y, Wang S, Wei W R. Identification of a rolling leaf allelic mutant *e202* and fine mapping of *E202* gene in rice. Acta Agronomica Sinica, 2023, 49(11): 3029-3041
- [5] Fang L K, Zhao F M, Cong Y F, Sang, X C, Du, Q Wang, D Z, Li, Y F, Ling, Y H, Yang, Z L, He, G H. *Rolling-leaf14* is a 2OG-Fe (II) oxygenase family protein that modulates rice leaf rolling by affecting secondary cell wall formation in leaves. Plant Biotechnology Journal, 2012, 10(5): 524-532
- [6] 姜建芳.基于两性生殖细胞MNU诱变系列水稻株型突变体的创制及其表征.太原:山西大学,2020
Jiang J F. Creation of plant mutants based on MNU mutagenesis of creation of germ cells of rice and their characterization. Taiyuan: Shanxi University, 2020
- [7] 张小惠,秦亚芝,张迎信,占小登,张振华,沈希宏,程式华,曹立勇,吴先军.水稻窄卷叶突变体 *Nrl3(t)* 的基因定位.中国水稻科学,2015,29(6):595-600
Zhang X H, Qin Y Z, Zhang Y X, Zhan X D, Zhang Z H, Shen X H, Cheng S H, Cao L Y, Wu X J. Gene mapping of a narrow and rolled leaf mutant *Nrl3(t)* in rice. Chinese Journal of Rice Science, 2015, 29(6): 595-600
- [8] Zhang G H, Xu Q, Zhu X D, Qian Q, Xue H W. *SHALLOT-LIKE1* is a *KANADI* transcription factor that modulates rice leaf rolling by regulating leaf abaxial cell development. Plant Cell, 2009, 21(3): 719-735
- [9] Cui X A, Zhang Z G, Wang Y W, Wu J X, Han X, Gu X F, Lu T G. *TWII* regulates cell-to-cell movement of *OSH15* to control leaf cell fate. The New Phytologist, 2019, 221(1): 326-340
- [10] Guo T T, Wang D F, Fang J J, Zhao J F, Yuan S J, Xiao L T, Li X Y. Mutations in the rice *OsCHR4* gene, encoding a CHD3 family chromatin remodeler, induce narrow and rolled leaves with increased cuticular wax. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(10): 2567-2567
- [11] Li W Q, Zhang M J, Gan P F, Gan P F, Qiao L, Yang S Q, Miao H, Wang G F, Zang M M, Liu W T, Li H F, Shi C H, Chen K M. *CLD1/SRL1* modulates leaf rolling by affecting cell wall formation, epidermis integrity and water homeostasis in rice. The Plant Journal, 2017, 92(5): 904-923
- [12] 葛倩雯,金宝花,傅小进,顾志敏,陈析丰,马伯军.水稻卷叶矮化突变体 *rdl* 的表型鉴定及基因精细定位.浙江师范大学学报:自然科学版,2019,42(4):434-440
Ge Q W, Jin B H, Fu X J, Gu Z M, Chen X F, Ma B J. Phenotypic identification and gene-fine mapping of a rolling leaf and dwarf mutant *rdl* in rice. Journal of Zhejiang Normal University: Natural Sciences Edition, 2019, 42(4): 434-440
- [13] Khush G S, Kinoshita T, Toenniessen G H. Rice karyotype, marker genes, and linkage groups. Rice Biotechnol, 1991, 3(3): 83-108
- [14] 徐静.水稻半显性卷叶突变体 *erll* 的遗传分析与基因定位.北京:中国农业科学院,2013
Xu J. Genetic analysis and gene mapping of a semi-dominant rolled leaf mutant *erll* in rice. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013
- [15] 米凯凯.一个水稻半显性卷叶突变体的遗传分析和精细定位.杭州:杭州师范大学,2012
Mi K K. Genetic analysis and fine mapping of a semi-dominant

- rolling leaf* mutant in rice. Hangzhou: Hangzhou Normal University, 2012
- [16] 邵元健, 陈宗祥, 张亚芳, 陈恩会, 祁顶成, 缪进, 潘学彪. 一个水稻卷叶主效 QTL 的定位及其物理图谱的构建. 遗传学报, 2005, 32(5): 501-506
Shao Y J, Chen Z X, Zhang Y F, Chen E H, Qi D C, Miao J, Pan X B. One major QTL mapping and physical map construction for rolled leaf in rice. Journal of Genetics and Genomics, 2005, 32(5): 501-506
- [17] 邵元健, 潘存红, 陈宗祥, 左示敏, 张亚芳, 潘学彪. 水稻不完全隐性卷叶主基因 *rl₍₁₎* 的精细定位. 科学通报, 2005, 16(19): 61-67
Shao Y J, Pan C H, Chen Z X, Zuo S M, Zhang Y F, Pan X B. Fine mapping of incomplete recessive leaf rolling major gene *rl₍₁₎* in rice. Chinese Science Bulletin, 2005, 16(19): 61-67
- [18] 李仕贵, 马玉清, 何平, 黎汉云, 陈英, 周开达, 朱立煌. 一个未知的卷叶基因的识别和定位. 四川农业大学学报, 1998, 16(4): 391-393
Li S G, Ma Y Q, He P, Li H Y, Chen Y, Zhou K D, Zhu L H. Genetic analysis and mapping the flag leaf roll in rice. Journal of Sichuan Agricultural University, 1998, 16(4): 391-393
- [19] Zhang G H, Xu Q, Zhu X D, Qian Q, Xue H W. SHALLOT-LIKE1 is a KANADI transcription factor that modulates rice leaf rolling by regulating leaf abaxial cell development. The Plant Cell, 2009, 21(3): 719-735
- [20] Ren D Y, Cui Y J, Hu H T, Xu Q K, Rao Y H, Yu X Q, Zhang Y, Wang Y X, Peng Y L, Zeng D, Hu J, Zhang G H, Gao Z Y, Zhu L, Chen G, Shen L, Zhang Q, Guo L B, Qian Q. AH2 encodes a MYB domain protein that determines hull fate and affects grain yield and quality in rice. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2019, 100(4): 813-824
- [21] Si F Y, Yang C, Yan B, Yan W, Tang S J, Yan Y, Cao X F, Song X W. Control of *OsARF3a* by *OsKANAD1* contributes to lemma development in rice. The Plant Journal: For cell and Molecular Biology, 2022, 110(6): 1717-1730
- [22] 高艳红, 吕川根, 王茂青, 王澎, 闫晓燕, 谢坤, 万建民. 水稻卷叶性状 QTL 的初步定位. 江苏农业学报, 2007(1): 5-10
Gao Y H, Lyu C G, Wang M Q, Wang P, Yan X Y, Xie K, Wan J M. QTL mapping for rolled leaf gene in rice. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2007(1): 5-10
- [23] 邱念伟, 王修顺, 杨发斌, 杨晓刚, 杨文, 刁润洁, 王秀, 崔静, 周峰. 叶绿素的快速提取与精密测定. 植物学报, 2016, 51(5): 667-678
Qiu N W, Wang X S, Yang F B, Yang X G, Yang W, Diao R J, Wang X, Cui J, Zhou F. Fast extraction and precise determination of chlorophyll. Chinese Bulletin of Botany, 2016, 51(5): 667-678
- [24] 王林凤, 程远超. 硝酸乙醇法测定纤维素含量. 化学研究, 2011, 22(4): 52-55
Wang L F, Cheng Y C. Determination of cellulose content by nitric acid ethanol method. Chemical Research, 2011, 22(4): 52-55
- [25] 冯萍, 邢亚迪, 刘松, 郭爽, 朱美丹, 娄启金, 桑贤春, 何光华, 王楠. 水稻卷叶突变体 *rl28* 的特性与基因定位. 作物学报, 2015, 41(8): 1164-1171
Feng P, Xing Y D, Liu S, Guo S, Zhu M D, Lou Q J, Sang X C, He G H, Wang N. Characterization and gene mapping of rolled leaf mutant 28 (*rl28*) in Rice. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(8): 1164-1171
- [26] 王伟, 王嘉宇, 杨生龙, 刘进, 董晓雁, 王国骄, 陈温福. 水稻窄卷叶突变体 *nr17* 的鉴定与基因定位. 植物学报, 2016, 51(3): 290-295
Wang W, Wang J Y, Yang S L, Liu J, Dong X Y, Wang G J, Chen W F. Identification and gene mapping of the *nr17* mutant in rice. Chinese Bulletin of Botany, 2016, 51(3): 290-295
- [27] Wang B, Smith S M, Li J. Genetic regulation of shoot architecture. Annual Review of Plant Biology, 2018, 69: 437-468
- [28] 谢园华, 李凤菲, 马晓慧, 谭佳, 夏赛赛, 桑贤春, 杨正林, 凌英华. 水稻半外卷叶突变体 *sol1* 的表型分析与基因定位. 作物学报, 2020, 46(2): 204-213
Xie Y H, Li F F, Ma X H, Tan J, Xia S S, Sang X C, Yang Z L, Ling Y H. Phenotype characterization and gene mapping of the semi-outcurved leaf mutant *sol1* in rice. Acta Agronomica Sinica, 2020, 46(2): 204-213
- [29] 崔永涛, 宋建, 范宏环, 王建军. 水稻窄叶突变体 *narrow and short leaf1 (ns1)* 的表型分析与基因定位. 分子植物育种, 2024, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S20220917.1714.016.html>
Cui Y T, Song J, Fan H H, Wang J J. Identification and fine mapping of *narrow and short leaf1 (ns1)* in rice. Molecular Plant Breeding, 2024, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S20220917.1714.016.html>
- [30] 廉院训, 韦子芸, 张强, 李清, 任德勇, 胡江, 朱丽, 高振宇, 张光恒, 郭龙彪, 曾大力, 钱前, 沈兰. 水稻斑马叶突变体 *z17* 的鉴定与基因的精细定位. 中国水稻科学, 2023, 37(2): 113-124
Lian Y X, Wei Z Y, Zhang Q, Li Q, Ren D Y, Hu J, Zhu L, Gao Z Y, Zhang G H, Guo L B, Zeng D L, Qian Q, Shen L. Identification and gene mapping of a zebra leaf mutant *z17* in rice. Chinese Journal of Rice Science, 2023, 37(2): 113-124
- [31] 任志奇, 薛可欣, 董铮, 李小湘, 黎用朝, 郭玉静, 刘文强, 郭梁, 盛新年, 刘之熙, 潘孝武. 水稻外卷叶突变体 *oc11* 的鉴定及基因定位. 中国水稻科学, 2023, 37(4): 337-346
Ren Z Q, Xue K X, Dong Z, Li X X, Li Y Z, Guo Y J, Liu W Q, Gou N, Sheng X N, Liu Z X, Pan X W. Identification and gene mapping of outcurved leaf mutant *oc11* in rice. Chinese Journal of Rice Science, 2023, 37(4): 337-346
- [32] Zhang J J, Wu S Y, Jiang L, Wang J L, Zhang X, Guo X P,

- Wu C Y, Wan J M. A detailed analysis of the leaf rolling mutant *sl2* reveals complex nature in regulation of bulliform cell development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Biology* (Stuttgart, Germany), 2015, 17(2): 437-448
- [33] 梁容, 秦冉, 曾冬冬, 郑希, 金晓丽, 石春海. 水稻窄卷叶突变体 *nr14* 的表型分析与基因定位. *中国农业科学*, 2016, 49(20): 3863-3873
- Liang R, Qin R, Zeng D D, Zheng X, Jin X L, Shi C H. Phenotype analysis and gene mapping of narrow and rolling leaf mutant *nr14* in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(20): 3863-3873
- [34] Liu X, Deng X J, Li C Y, Xiao Y K, Zhao K, Guo J, Yang X Y, Zhang H S, Chen C P, Luo Y T, Tang Y L, Yang B, Sun C H, Wang P R. Mutation of protoporphyrinogen IX oxidase gene causes spotted and rolled leaf and its overexpression generates herbicide resistance in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(10): 5781-5781
- [35] Tan W C, Miao J, Xu B, Zhou C T, Wang Y R, Gu X Q, Liang S N, Wang B X, Chen C, Zhu J Y, Zuo S M, Yang Z F, Gong Z Y, You A Q, Wu S J, Liang G H, Zhou Y. Rapid production of novel beneficial alleles for improving rice appearance quality by targeting a regulatory element of SLG7. *Plant Biotechnology Journal*, 2023, 21(7): 1305-1307
- [36] Xiao Y J, You S M, Kong W Y, Tang Q Y, Bai W T, Cai Y, Zheng H, Wang C L, Jiang J, Wang C M, Zhao Z G, Wan J M. A GARP transcription factor anther dehiscence defected 1 (*OsADD1*) regulates rice anther dehiscence. *Plant Molecular Biology*, 2019, 101(4-5): 403-414