



植物遗传资源学报
Journal of Plant Genetic Resources
ISSN 1672-1810, CN 11-4996/S

《植物遗传资源学报》网络首发论文

题目: 水稻卷叶突变体 *rl76* 的表型和组织分析及基因定位
作者: 何虎强, 邓秋雨, 罗丽华, 王丹, 刘金灵, 肖应辉
DOI: 10.13430/j.cnki.jpgr.20240220001
收稿日期: 2024-02-20
网络首发日期: 2024-09-10
引用格式: 何虎强, 邓秋雨, 罗丽华, 王丹, 刘金灵, 肖应辉. 水稻卷叶突变体 *rl76* 的表型和组织分析及基因定位[J/OL]. 植物遗传资源学报.
<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240220001>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

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、叶片纤维素、叶绿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。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

Phenotypic and Tissue Analysis and Gene Mapping of 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, China)

Abstract: Leaves are the main organs for photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.), and leaf morphology is the primary factor affecting the photosynthetic efficiency of rice plants. Continuously exploring genes that control leaf curling and revealing their genetic mechanisms, could provide optional genetic resources for cultivating ideal rice varieties with moderately curled leaves. In this study, the natural rolled leaf mutant *rl76* was used as the material to carry out agronomic trait investigation, leaf cellulose, chlorophyll content determination and tissue morphology observation, and the rice GSR40 K chip technology was used to locate the *rl76* rolled leaf gene. Phenotypic identification results indicated that there was no significant difference in the leaf rolling phenotype between the mutant *rl76* and the wild type at the seedling stage, both of which showed slightly rolled. From the tillering to maturity stage, the leaves of *rl76* were extremely rolled into shallot-like and erect, while the leaves of wild type were flat and slightly drooping. Compared to the wild type, the leaf rolled index of *rl76* increased significantly, plant height and effective tiller number decreased significantly, and there was no significant difference in leaf width, flag leaf length and panicle length. The chlorophyll content was significantly higher than that of the wild type, the carotenoid content was not significantly differently, nevertheless, the cellulose content and lignin content were lower than those of the wild type. The leaf structure by paraffin sectioning was observed that the *rl76* mutant leaf cavity disappeared, the development of the thick-walled cells on the abaxial surface was defective, and the area and number of vesicular cells decreased. Genetic analysis shows that the rolled leaf trait was consistent with the incomplete dominant

收稿日期: 2024-02-20

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

single gene inheritance pattern. By using rice GSR40K chip technology, the *rl76* gene was preliminarily localized in the region of 12.179-16.436 Mb on chromosome 9. With the extreme 949 leaf-rolled plant in the F₂ population, the rolled leaf gene was further fine mapped on the chromosome segment of SSR markers T5904-7 and T5904-9 with a physical distance of 30.26 kb on chromosome 9. This chromosome segment contains three annotation genes, among which LOC-Os09g23200 is a gene *SLL1* that has been reported to regulate rice leaf curling by regulating the development of leaf distal surface cells. Therefore it is speculated that the rolled leaf phenotype of the mutant *rl76* may be regulated by the *SLL1* gene. In summary, the rolling leaf phenotype of the *rl76* mutant was resulted from the abnormal development of bulliform cells and abaxial thick-walled cells regulated by an incompletely dominant single 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 *cll1* 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]*rlt* 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^[18]研究发现籼粳交 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*、*OsKANADII*。。*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

在籼型水稻温敏核不育系耘 9S 与常规水稻品种 LAC23 杂交的 BC₂F₆ 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 BC₂F₇ 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 F₂ 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（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）、株高及有效分蘖数，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 $LRI(\%) = (L_w - L_n) / L_w \times 100\%$ ，其中 L_w 是叶片展开后的宽度， L_n 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(Cha)、叶绿素 b(Chb)、总叶绿素(Chl)和类胡萝卜素(Car)的含量；硝酸乙醇法^[21]测定纤维素、半纤维素和木质素含量。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、1:1、1:3（V_{乙醇}:V_{二甲苯}）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。

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 预变性 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。

表 1 精细定位所用引物

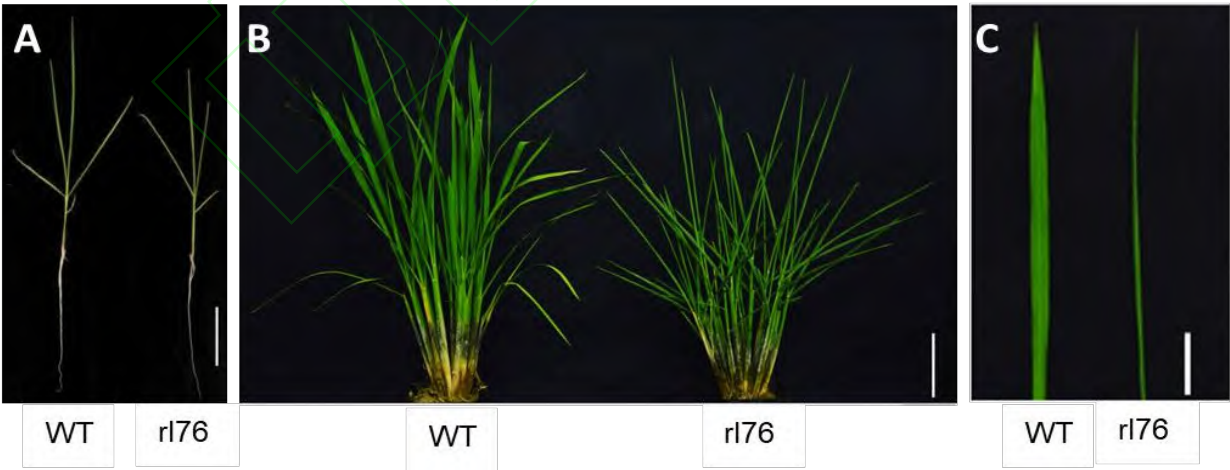
Table1 Primers for fine mapping

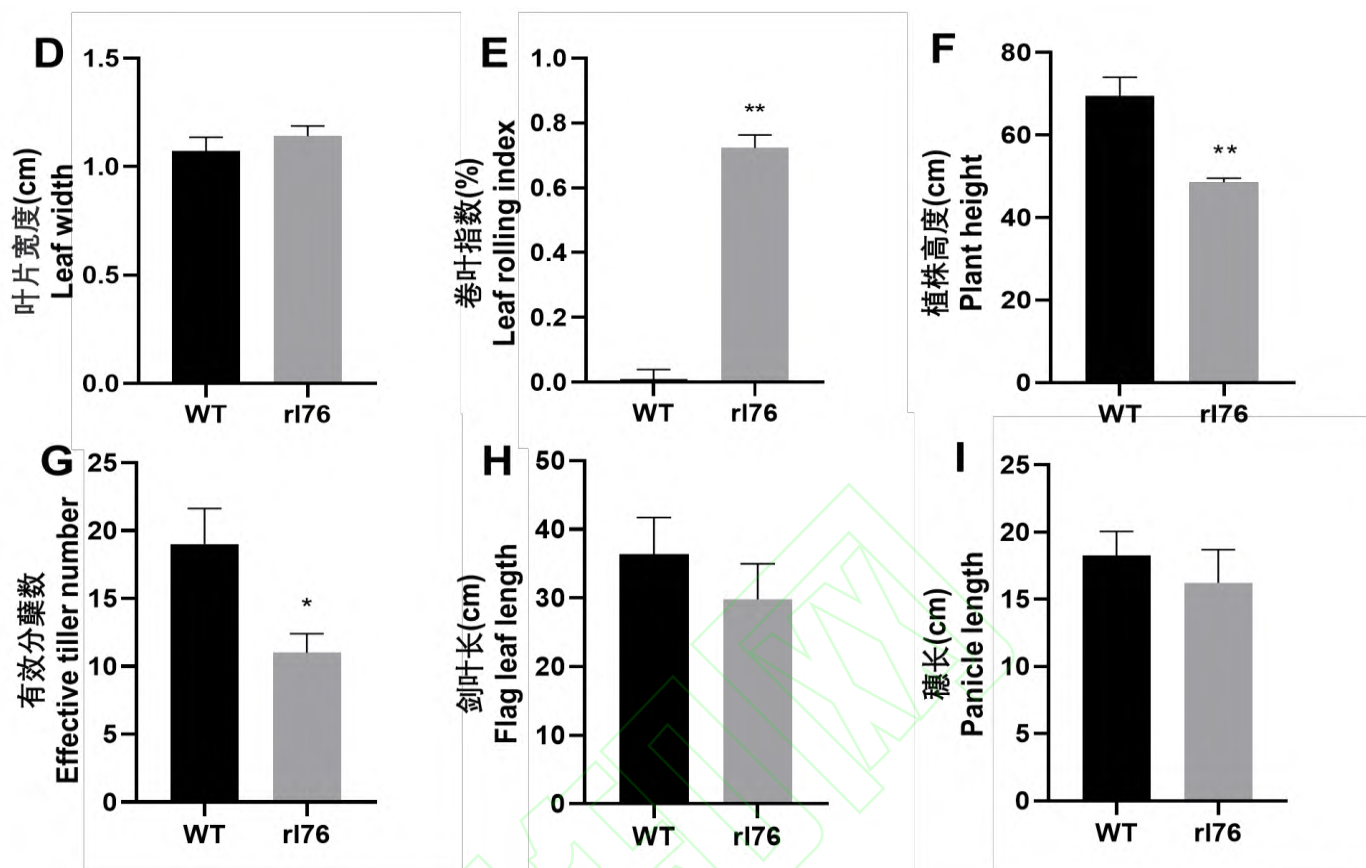
引物名称 Primer Name	正向引物序列 (5'-3') Forward primer sequence (5'-3')	反向引物序列 (5'-3') Reverse primer sequence (5'-3')
ID09M07292	TGGTAAAACGTGTGACAAAA	ACTGATCATATGCCACCATT
ID09M07771	GTAGGCTTGTGTGATAGCAA	CTTTTACTGGATAACACCGC
ID09M08238	CATACATGAAAGCAACATGG	CATACATGAAAGCAACATGG
ID09M08493	CAACAACAAGCACAACTACC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

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)。





A: 苗期野生型与 *r176* 植株的表型; B: 分蘖期野生型与 *r176* 植株的表型; C: 分蘖期野生型与 *r176* 叶片的表型; D-I: 成熟期野生型与 *r176* 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 *r176* at seedling stage; B: Phenotypes of wild type and *r176* at tillering stage; C: Phenotypes of leaves of wild type and *r176* at tillering stage; D-I: Main agronomic traits of wild type and *r176* at maturity. * indicating that there was a significant difference at the $P < 0.05$ level ;**indicating that there was a 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

2.2 生理指标分析

成熟期 *r176* 突变体比野生型叶色更深, 且从分蘖期开始 *r176* 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, 叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量 *r176* 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, *r176* 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, 而半纤维素含量却显著高于野生型。

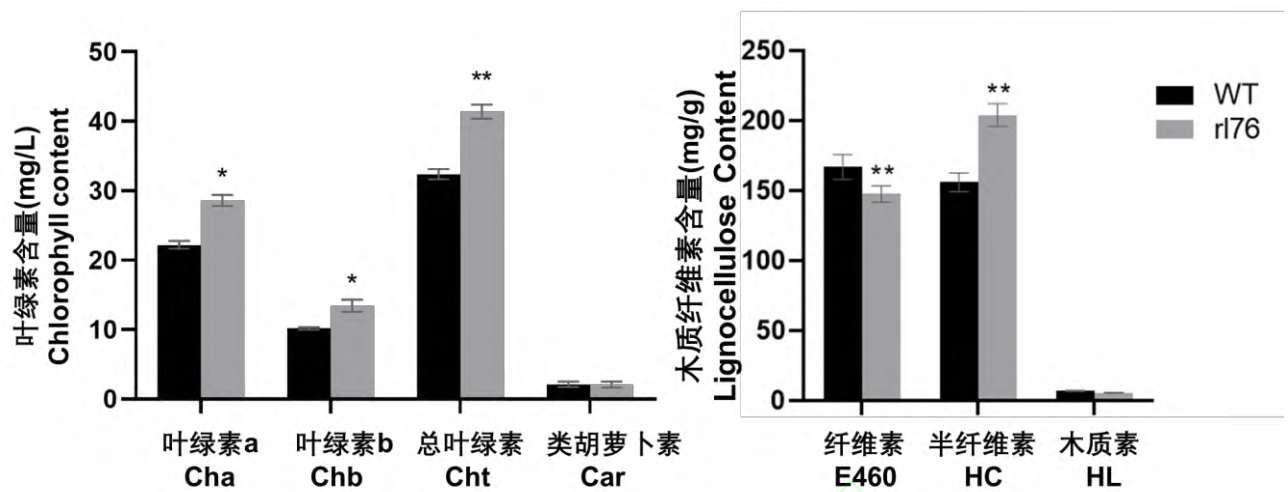


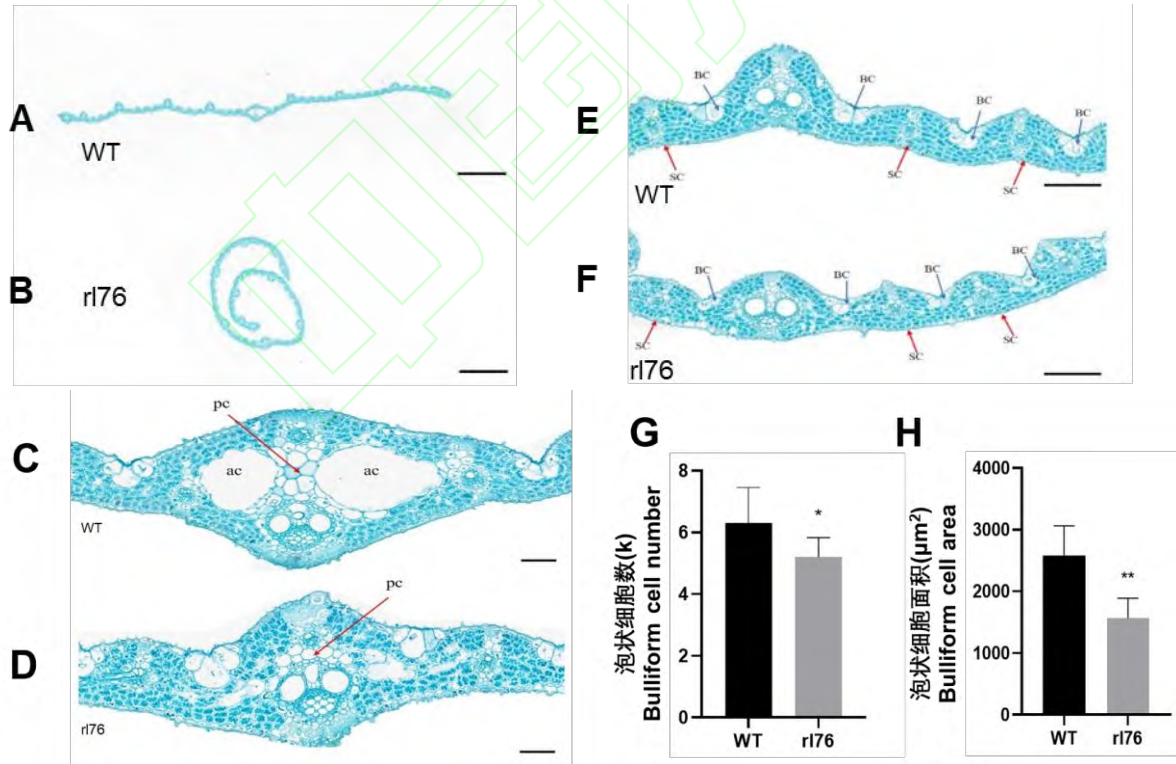
图 2 WT 和卷叶突变体 *r176* 叶片的木质纤维素和光合色素含量

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* 叶片横截面呈盘旋状，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。



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放大部分; F: *r176* 突变体叶片大维管束与小维管束放大部分; 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。pc:薄壁细胞; ac:气腔; BC:泡状细胞; SC:厚壁细胞。Bar=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 and small

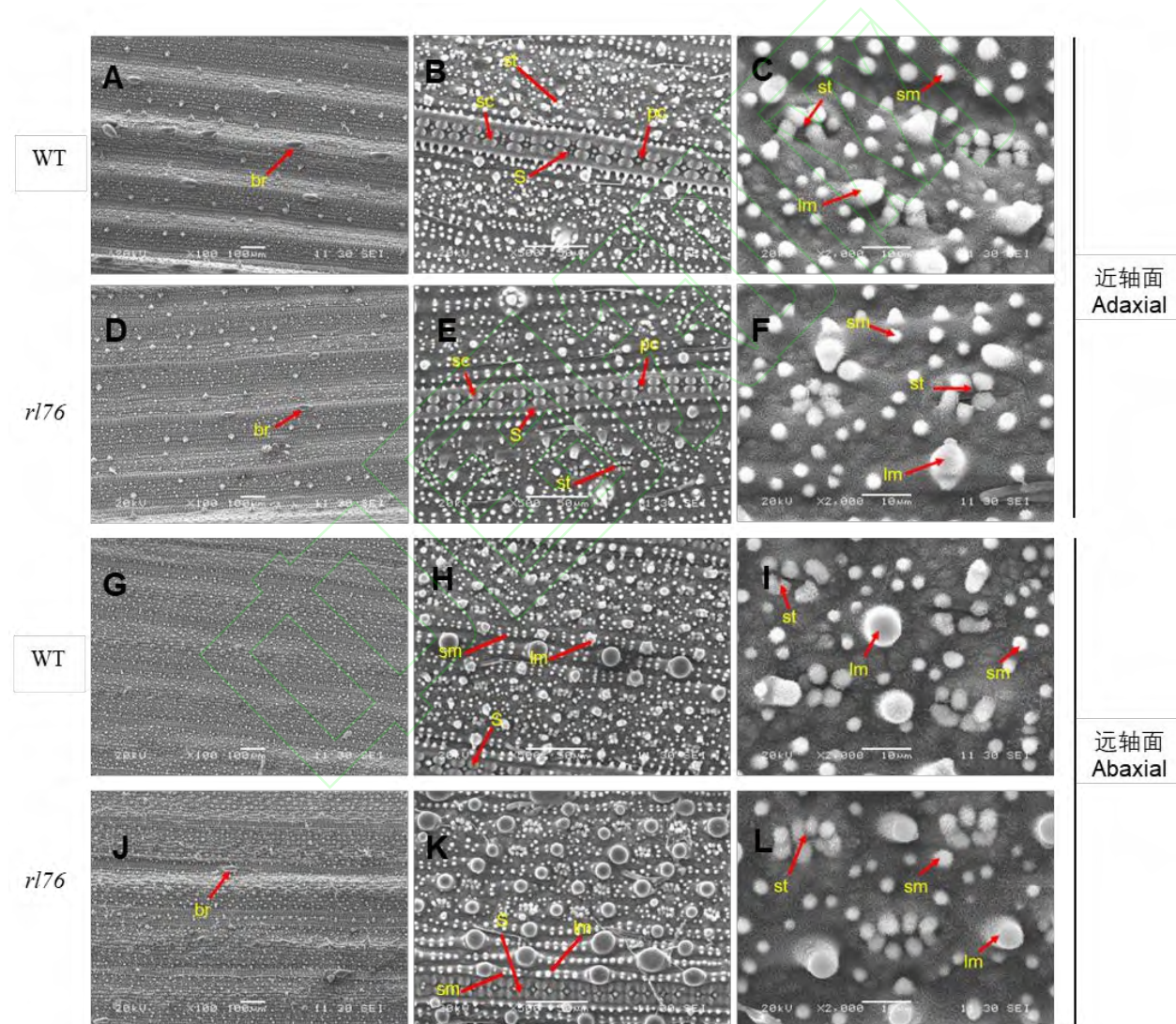
vascular bundles in wild-type leaves were mostly released; F: The large and small vascular bundles of *rl76* mutant leaves were mostly released; G: Number of foam cells in wild type and *rl76* mutant; H: Foam cell area of wild type and *rl76* mutant. pc: parenchyma cells; ac: cavity; BC: bubble cells; SC: thick-walled cells. Bar=1000 μ m (A,B), 50 μ m (C,D), 100 μ m (E,F)

图 3 WT 和卷叶突变体 *rl76* 叶片石蜡切片

Fig. 3 Paraffin sections of WT and rolled leaf mutant *rl76* leaves

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）。



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；Bar=100 μ m(A、D、G、J)、50 μ m(B、E、H、K)、10 μ m(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

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。

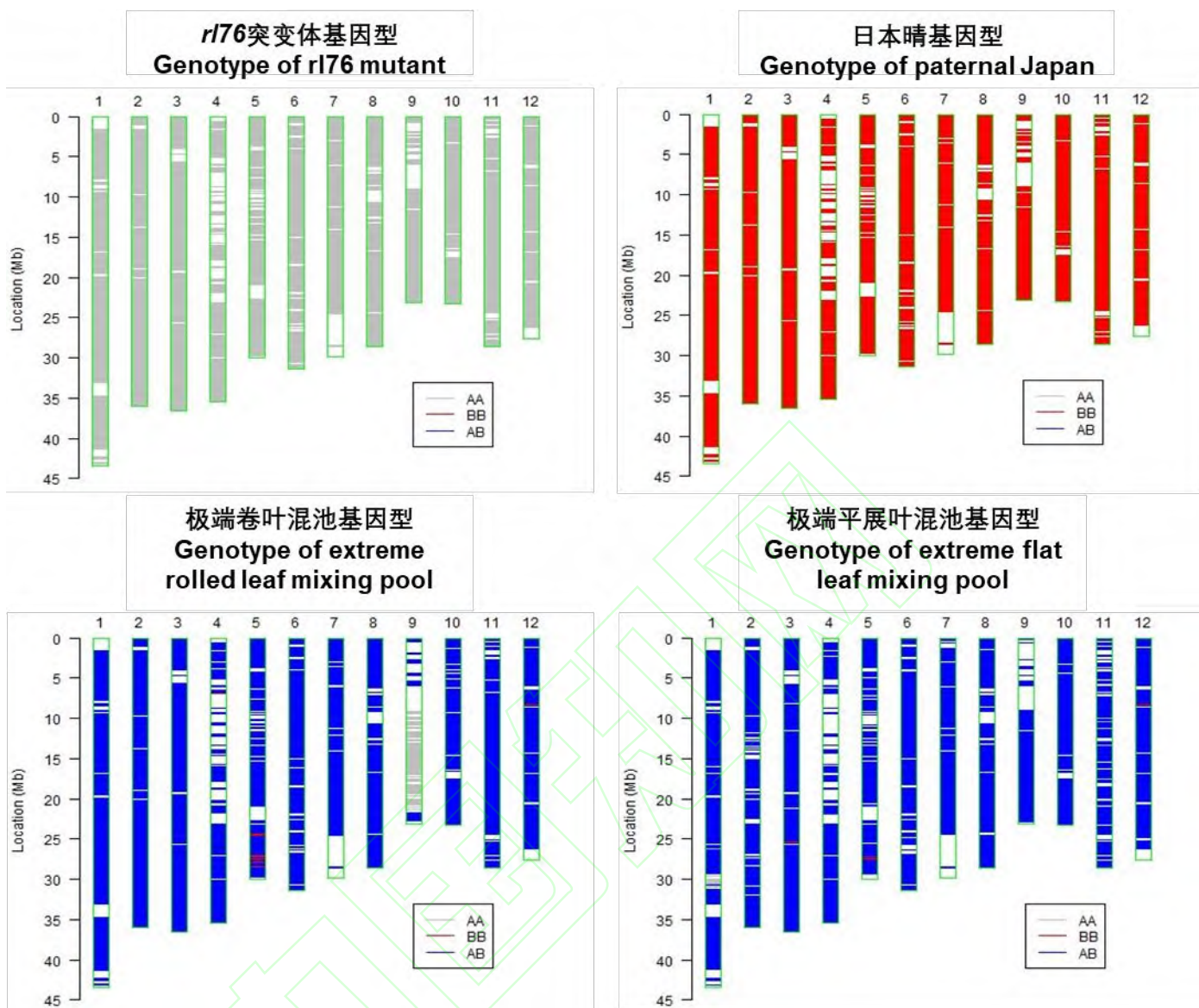
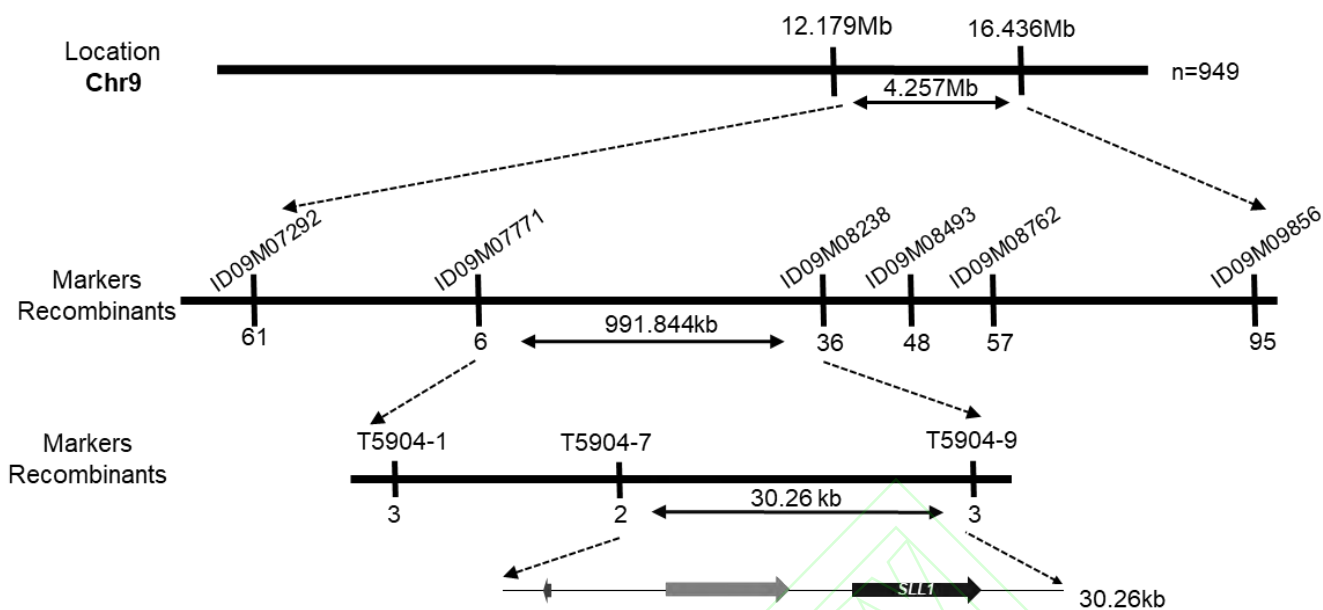


图 5 亲本及两个极端混池的基因型分析

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，验证了初定位区间的真实性。利用 F₂ 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 *r176* 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 *r176* 的卷叶表型是 *SLL1* 基因在发挥作用。



箭头表示预测基因，箭头方向代表基因的正反向

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

图 6 卷叶基因 *rl76* 的精确定位

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^[24]。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%^[24]；*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]；*sol1* 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]；*zl7* 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]，*sol1* 突变体叶片外卷是其表皮泡状细胞异常所致^[27]，*ocl1* 突变体叶片外卷的原因是由于泡状细胞异常增大^[31]。*sprl1* 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 1599bp, 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. 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. *TWIL* 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 rld 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 rld 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 J Y, 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 $OsKANADI1$ 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] 王林风, 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 $nrl7$ 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 $nrl7$ 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*. 1-8[2024-9-3]
- 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*, 1-8[2024-9-3]
- [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 $ocl1$ 的鉴定及基因定位. *中国水稻*

科学, 2023, 37(04): 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 *ocl1* in rice. Chinese Journal of Rice Science, 2023, 37(04): 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 *slr2* 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 $nrl4$ 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 *nrl4* 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 defect 1 (*OsADD1*) regulates rice anther dehiscence.[J].Plant molecular biology, 2019, 101(4-5): 403-414