

水稻生育后期卷叶突变体 *lrl1* 的鉴定及基因定位和候选基因预测

赵芳明*, 魏霞, 马玲, 桑贤春, 王楠, 张长伟, 凌英华, 何光华*

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, 重庆 400716

* 联系人, E-mail: zhaofangming2004@163.com; Hegh@swu.edu.cn

2015-06-29 收稿, 2015-08-20 接受, 2015-09-16 网络版发表

高等学校学科创新引智计划(B12006)、重庆市重点实验室能力提升项目(cstc2014pt-sy80001)和重庆市科技攻关计划重大项目(CSTC2012ggC80002)资助

摘要 叶片是水稻主要的光合器官, 适度卷曲有利于保持植株叶片直立而不披垂, 增加中、下层叶片透光率, 从而改善群体光照条件, 是理想株型的重要组成, 对水稻高产育种具有重要意义. 利用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变籼稻恢系绍恢10号获得了一个遗传稳定的水稻生育后期卷叶突变体 *lrl1*. *lrl1* 的叶片在前期生长正常, 从13叶龄开始, 上三叶沿中脉向内卷曲, 且随着生育期推进, 卷曲度增加, 在成熟期剑叶、倒二叶和倒三叶的卷曲度分别为73.66%, 66.91%和45.81%. 与野生型绍恢10号相比, 除 *lrl1* 的千粒重(21.43 g)显著降低外, 其他重要农艺性状均没有显著差异. *lrl1* 的叶片小维管束间的泡状细胞数量减少、形状怪异、排列极不规则, 导致小维管束之间的夹角变小, 从而引起了其叶片的卷曲. *lrl1* 的上三叶光合色素含量均显著高于野生型. 但其功能叶净光合速率等均与野生型没有显著差异. 经遗传分析和分子定位, 该叶片卷曲受一对隐性核基因控制, 位于第9染色体分子标记SWU-1和Ind6之间812 kb的区域. 通过基因预测, 在该区域共有129个候选基因, 对其中3个可能与卷叶相关的基因测序, 均未发现它们在 *lrl1* 与野生型间存在差异. 以泡状细胞变化相关的6个卷叶基因在突变体 *lrl1* 中的real-time PCR分析表明, 卷叶基因 *ROC5* 和 *RLI4* 的表达明显上调, 而 *ACLI*, *SRLI* 以及 *NAL7* 被下调, 暗示了这些基因可能在同一通路上调控叶片的发育. 该基因是一个新发现的基因, 而且遗传行为简单, 其相应突变体含有许多育种有利的性状, 因而研究结果为该基因的克隆和功能研究及高产育种奠定了良好基础.

关键词

水稻
卷叶
基因定位
real-time PCR

稻米是世界1/2以上人口的主食. 水稻(*Oryza sativa* L.)株型是影响稻米产量形成的重要因素. 20世纪90年代前后, 育种家提出叶片内卷直立是超级稻理想株型的特征之一^[1,2]. 三系法杂交稻组合“协优9308”以及两系法杂交稻组合“两优培九”和“两优E32”就是在此理论的指导下培育出的优良品种, 其上三叶叶片均表现为“长、直、窄凹”的特点^[3]. 研究表明, 适度卷曲有利于植株叶片保持直立不披垂, 增加中、下层叶片透光率, 从而改善群体光照条件, 为

提高产量奠定了良好株型基础^[4,5]. 但全生育期过度卷曲的卷叶资源, 往往伴随着植株矮小、结实率下降等不利性状的变异, 应用起来难度较大. 叶片后期中度卷曲是较理想的资源类型, 在水稻株型改良中具有重大的利用价值.

近年来, 通过理化诱变及T-DNA插入突变等手段, 已获得了丰富的卷叶资源. 借助这些材料, 水稻卷叶的分子遗传取得了较大进展. 目前, 定位在分子图谱上的基因有25个. 分别为位于第1染色体的单侧

引用格式: 赵芳明, 魏霞, 马玲, 等. 水稻生育后期卷叶突变体 *lrl1* 的鉴定及基因定位和候选基因预测. 科学通报, 2015, 60: 3133–3143

Zhao F M, Wei X, Ma L, et al. Identification, gene mapping and candidate gene prediction of a late-stage rolled leaf mutant *lrl1* in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 3133–3143, doi: 10.1360/N972015-00712

卷叶基因(*unilateral rolled leaf 1(t), URL1(t)*)^[6], 第2染色体的卷叶基因(*rolled leaf(t), RL(t)*)^[7], 近轴化卷叶基因(*adaxialized leaf 1, ADL1*)^[8], 剑叶卷曲基因(*curly flag leaf 1, CFL1*)^[9], 水稻最外层细胞特异化基因(*rice outermost cell-specific gene 5, ROC5*)^[10], 第3染色体的窄卷叶基因(*narrow and rolled leaf 2(t), NRL2(t)*)^[11], 窄叶基因(*narrow leaf 7, NAL7*)/枯萎基因(*constitutively wilted 1, COW1*)^[12,13], 引起水稻叶片向上卷曲的 *Argonaute* 家族基因 (*argonaute 7, OsAGO7*)^[14], 第4染色体的近轴叶片卷曲基因(*abaxially curled leaf 1, ACL1*)^[15], 第5染色体的卷叶基因(*rolled leaf 7, RL7*)^[16], 卷叶基因(*rolled leaf 8, RL8*)^[17], 第6染色体的半矮秆基因(*semi-dwarf-s1, SD-SL*)^[18], 卷叶基因(*rolled leaf 13, RL13*)^[19], 第7染色体的卷叶好条纹叶基因(*rolled fine striped leaf, RFS*)^[20], 卷叶基因(*rolled leaf 11(t), RL11(t)*)^[21], 半卷叶基因(*semi-rolled leaf 1, SRL1*)^[22], 类葱状卷叶基因(*shallot-like leaf 2, SLL2*)^[23], 第9染色体的卷叶基因(*rolled leaf 9(t), RL9(t)*)/类葱状卷叶基因(*shallot-like leaf 1, SLL1*)^[24,25], 动态卷叶基因(*rolled leaf 10(t), RL10(t)*)^[26], 第10染色体的卷叶基因(*rolled leaf 12(t), RL12(t)*)^[27], 中度卷叶基因(*rolled Leaf 14, RL14*)^[28], 卷叶基因(*rolled leaf 15, RL15*)^[29], 第11染色体上的窄卷叶基因(*narrow and rolled leaf(t), NRL(t)*)^[30]和第12染色体上的窄叶基因(*narrow leaf 3(t), NAL3(t)*)^[31], 窄卷叶基因(*narrow and rolled leaf 1, NRL1*)/水稻类纤维素合成酶D4基因(*rice cellulose synthase-like D4, OsCSLD4*)^[32,33]. 在这些基因中, 已经克隆了11个. 通过对这些基因的克隆, 初步揭示了水稻卷叶性状的一些形成机制, 主要包括三大类: (i) 近轴/远轴面的极性发育异常引起卷叶. 涉及该机制的卷叶基因如*RL9(t)/SLL1*^[24,25], *OsAGO7*^[14]和*ADL1*^[8]; (ii) 叶片角质层的发育异常引起卷叶, 如*CFL1*^[9]; (iii) 泡状细胞的发育异常引起叶片卷曲, 涉及该机制的基因如*SRL1*^[22], *ROC5*^[10], *RL14*^[28], *SLL2*^[23], *ACL1*^[15], *NRL1/OsCSLD4*^[32,33]和*NAL7/COW1*^[12,13]. 鉴定更多新的卷叶基因, 便于构建卷叶基因间的互作网络, 有利于使生物学家和遗传学家更深刻地认识生物表型多态性的遗传本质.

利用甲基磺酸乙酯(ethyl methane sulphonate, EMS)诱变籼稻恢复系缙恢10号获得了一个遗传稳定的水稻生育后期卷叶突变体*lr1l*, 本研究从形态学、

细胞学和生理学等全面鉴定*lr1l*突变体, 并进行遗传分析和基因定位、候选基因预测和测序及real-time PCR分析. 研究结果不仅有利于揭示水稻卷叶形成的分子机制, 而且为高产育种提供重要资源.

1 材料与方法

(i) 试验材料与种植. 以EMS化学诱变缙恢10号获得1个水稻生育后期卷叶突变体*lr1l*, 经过连续多代培育, 已经稳定遗传. 遗传分析和基因定位所用的另一亲本为全生育期叶片平展的不育系西农1A. 缙恢10号和西农1A均为西南大学水稻研究所选育的优良恢复系和不育系.

2012年在重庆配制西农1A×*lr1l*的杂交组合, 同年秋季在海南种植F₁, 收获F₂种子. 2013年在西南大学试验地种植全部F₂群体及*lr1l*和野生型缙恢10号各30株, 并在抽穗期调查F₂群体中各单株的叶片表型, 计算分离比, 分析卷叶基因的遗传行为, 并选取卷叶单株作为基因定位群体.

(ii) 叶片卷曲度和光合参数测定. 在孕穗期和成熟期, 分别测定10株野生型的上三叶叶宽, 以及10株*lr1l*的倒一叶(剑叶), 倒二叶和倒三叶的叶片最宽处卷曲后的叶缘间距(*Ln*), 展开后叶缘间距(*Lw*), 利用公式($(Lw-Ln)/Lw \times 100\%$)计算卷曲度.

在抽穗期利用Li-6400便携式光合仪(LI-COR, 美国)测定10株*lr1l*和野生型的剑叶、倒二叶和倒三叶的净光合速率(*Pn*)、气孔导度(*Gs*)、CO₂胞间浓度(*Ci*)和蒸腾速率(*Tr*).

(iii) 光合色素含量测定. 在抽穗期分别选*lr1l*和野生型缙恢10号各10株, 测定剑叶、倒二叶和倒三叶的光合色素含量, 用乙醇-丙酮法^[34]提取.

(vi) 石蜡切片制作和叶片细胞学分析. 在抽穗期取*lr1l*和缙恢10号的叶片相同部位, 参照李云峰^[35]描述的方法固定于福尔马林:乙酸:70%乙醇为2:1:7的溶液中, 乙醇脱水, 石蜡包埋, 切成10~15 μm厚度的薄片, 番红固绿对染, 然后用Nikon E600光学显微镜(日本)观察并照相, 分析叶片细胞结构.

(v) 农艺性状考查. 成熟期收取*lr1l*和野生型各10株考查株高、有效穗数、穗长、每穗总粒数、实粒数、结实率、千粒重等农艺性状, 然后用Excel进行统计分析.

(vi) 基因定位. 采用集群分离分析(bulked-segregation analysis, BSA)法, 根据F₂表型, 分别选取

10株正常株和10株卷叶突变株,剪取等量叶片分别构建正常基因池和突变基因池,用西农1A和缙恢10号间有多态性的分子标记分析可能的连锁标记.然后用F₂中10株正常株和10株突变株验证,最后用F₂隐性单株进行基因定位.

基因池叶片和亲本叶片DNA参照十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)法^[36]提取.基因定位群体的DNA采用简易碱煮法^[37]提取.

简单序列重复标记(single sequence repeat, SSR)引物序列和插入缺失标记(insertion-deletion, InDel)引物序列,全部都由上海生工生物技术有限公司(上海)合成. PCR反应总体积为25 μL,包括DNA模板2 μL,引物2 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, 10 mmol L⁻¹ dNTPs 0.5 μL, 5 U μL⁻¹ Taq DNA聚合酶0.25 μL, ddH₂O 17.75 μL. PCR程序为94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸45 s, 35个循环, 72℃延伸10 min. PCR产物在19:1的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,快速银染法染色^[38].将具有西农1A带型的单株记作A,具有*lr1l*带型的单株记作B,具有双亲带型的单株记作H,用Mapmaker/EXP3.0软件进行连锁分析,并用Kosambi函数将重组率转化为遗传距离(cM).

(vii) 候选基因预测和测序. 在水稻自动释义数据库(rice automatic interpretation database, RAD) (<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/rgadb/>)和水稻释义计划数据库(rice annotation project database, RAP-DB)中 (<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)查询精细定位区间内所有基因信息.与Gramene (http://www.gramene.org/rice_mutant/)中查询的基因信息进行比对,结合基因预测功能,筛选候选基因.

根据候选基因的DNA序列设计引物,测序区域包括基因的外显子和内含子.以缙恢10号和*lr1l*的DNA作为模板,用引物分段扩增目的基因,PCR产物

经琼脂糖凝胶电泳分离后,切胶回收并连接到pMD[®]19-T载体,连接产物转化大肠杆菌感受态DH5α,筛选鉴定的阳性克隆子送上海英潍捷基贸易有限公司(上海)测序,然后分析测序结果.

(viii) 实时定量PCR(real-time PCR)分析. 分析了6个引起泡状细胞变化的相关卷叶基因*ACL1*, *ROC5*, *RL14*, *SRL1*, *NRL1*, *NAL7*在突变体*lr1l*和野生型叶片中的表达差异.引物设计见表1.在孕穗期取*lr1l*和野生型缙恢10号的叶片,参照试剂盒说明书用TRIzol提取总RNA,按Superscript Preamplification System (Gibco/BRL, 美国)试剂盒说明书要求的标准条件合成cDNA第一链.以Actin为内参,50 μL PCR体系,设置3次重复,采用TaKaRa SYBR Green荧光染料(大连),反应在Bio-Rad CYF96型定量PCR仪(TaKaRa, 日本)上进行,用Mx3000P软件采集数据和分析^[28].

2 结果与分析

2.1 *lr1l*的形态和重要农艺性状分析

野生型缙恢10号叶片全生育期完全平展.*lr1l*的叶片在前期生长正常,从13叶龄开始,上三叶沿中脉向内卷曲;随着生育进程的推进,其卷曲度增加,抽穗期后卷曲度基本稳定(图1(a)~(h)).孕穗期最上叶、倒二叶和倒三叶卷曲度分别为60.83%, 58.63%和20.70%(图1(i)),成熟期剑叶、倒二叶和倒三叶的卷曲度分别为73.66%, 66.91%和45.81%(图1(j)).*lr1l*在孕穗期最上叶和成熟期剑叶均比野生型显著变窄,分别减少0.20和0.17 cm.而倒二叶和倒三叶的叶宽没有显著差异(表2).

在成熟期,*lr1l*与野生型缙恢10号的株高、穗长、有效穗数、每穗总粒数、每穗实粒数、结实率均没有显著差异,仅千粒重显著减少3.10 g(表3).可见,*lr1l*的千粒重虽然较野生型缙恢10号显著下降,但仍达

表1 Real-time PCR 相关引物
Table 1 Sequences of the primers used in real-time PCR

名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
<i>ACL1</i>	CTCCCCTTTCATCGTCTCC	CGTGTGTTGTTGCCGTTGTC
<i>ROC5</i>	CGCAAGAGGAAGAAGCGATAC	GCTCCAGTTGCGTCTTTCATC
<i>RL14</i>	CTCTTTCAGGCATTCCATTGATG	CAACACCTTGTCAGCTTTCAAGC
<i>NRL1</i>	TCAGTAGTGTAGTGGTGTGCG	GCACTCCTTCATGTGAGCTTCA
<i>SRL1</i>	TGCATCTTTTGACCCAGCTAC	ACAACAAGGGTGCCAGATAA
<i>NAL7</i>	TCAAGAACATCACCGGCCAA	CGATTTGATCAAGGACCATGCT
<i>OsACT</i>	AGGAAGGCTGGAAGAGGACC	CGGGAAATTGTGAGGGACAT

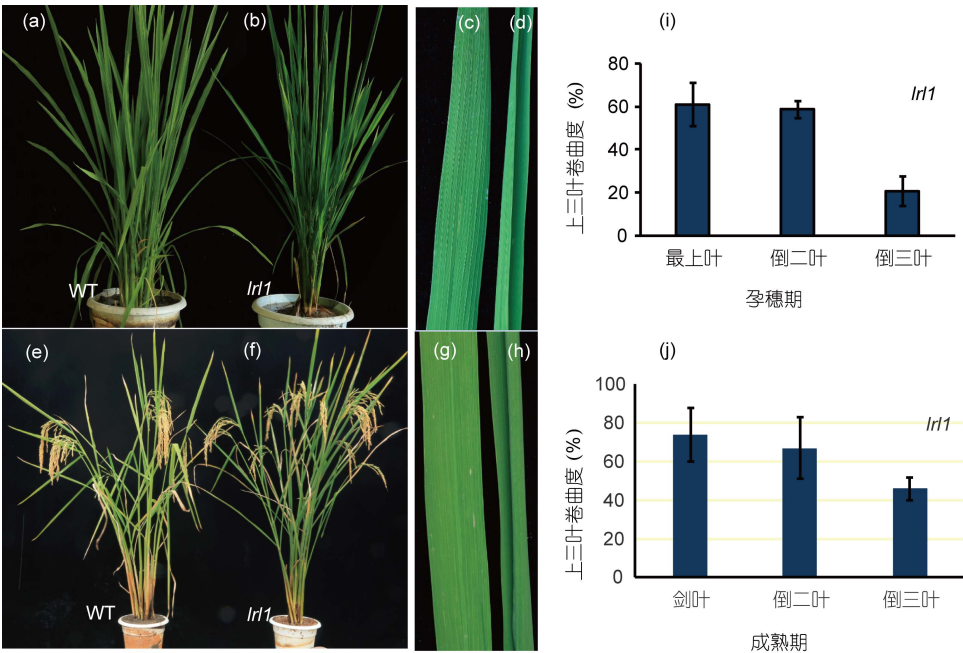


图 1 (网络版彩色)野生型(WT)和卷叶突变体(*lrl1*)的表型特征. (a) 孕穗期野生型(WT)植株; (b) 孕穗期 *lrl1* 植株; (c) 孕穗期野生型(WT)的最上叶; (d) 孕穗期 *lrl1* 的最上叶; (e) 成熟期野生型(WT)植株; (f) 成熟期 *lrl1* 的植株; (g) 成熟期野生型(WT)的旗叶; (h) 成熟期 *lrl1* 旗叶; (i) 孕穗期 *lrl1* 上三叶卷曲度; (j) 成熟期 *lrl1* 上三叶卷曲度

Figure 1 (Color online) The phenotype of wild type (WT) and the *lrl1* mutant. (a) The plant of wild type (WT) at booting stage; (b) the plant of *lrl1* at booting stage; (c) the uppermost leaf of the wild type (WT) at booting stage; (d) the uppermost leaf of *lrl1* at booting stage; (e) the plant of the wild type (WT) at maturation stage; (f) the plant of *lrl1* at maturation stage; (g) the flag leaf of the wild type (WT) at maturation stage; (h) the flag leaf of *lrl1* at maturation stage; (i) the rolling index of the upper three leaves of wild type (WT) at booting stage; (j) the rolling index of the upper three leaves of *lrl1* at maturation stage

表 2 孕穗期和成熟期野生型(WT)和 *lrl1* 的叶宽^{a)}

Table 2 Leaf width of wild type (WT) and the *lrl1* mutant at booting and maturation stages^{a)}

材料	孕穗期			成熟期		
	最上叶 (cm)	倒二叶 (cm)	倒三叶 (cm)	剑叶 (cm)	倒二叶 (cm)	倒三叶 (cm)
<i>lrl1</i>	1.52±0.83*	1.42±0.83	1.38±0.08	1.78±0.16*	1.67±0.90	1.53±0.08
WT	1.72±0.10	1.50±0.07	1.46±0.09	1.97±0.12	1.76±0.11	1.67±0.11

a) *: *lrl1* 和野生型的某性状在 0.05 水平下差异显著

表 3 野生型(WT)与 *lrl1* 的农艺性状^{a)}

Table 3 Agronomic traits of wild type (WT) and *lrl1* mutant at maturation stage^{a)}

材料	株高 (cm)	有效穗数	穗长 (cm)	每穗总粒数	每穗实粒数	结实率 (%)	千粒重 (g)
<i>lrl1</i>	108.26±4.56	10.80±2.97	28.38±1.10	180.92±10.97	134.59±5.83	74.47±1.68	21.43±0.72**
WT	112.0±4.28	11.80±3.26	28.55±0.42	197.57±21.81	156.58±18.25	79.27±3.89	24.53±0.73

a) **: 在 0.01 水平下差异显著; 无“*”表示材料间某性状无差异

21.43 g, 而且其他性状基本没有不利的变异, 因而在育种中具有重要的应用价值.

2.2 *lrl1*的叶片细胞学分析

为了从细胞学揭示*lrl1*叶片发生卷曲的原因, 在抽穗期取野生型和*lrl1*叶片的相同部位, 将其制作成

石蜡切片. 在显微镜下观察野生型和*lrl1*的叶片细胞. 结果发现, 野生型叶片小维管束间的泡状细胞数量多、形状规则、排列整齐有序(图2(a)和(b)). 而*lrl1*的叶片泡状细胞数量减少, 形状怪异, 排列极不规则, 使得小维管束之间的夹角变小(图2(c)和(d)), 这些泡状细胞的变化可能引起了*lrl1*叶片的卷曲.

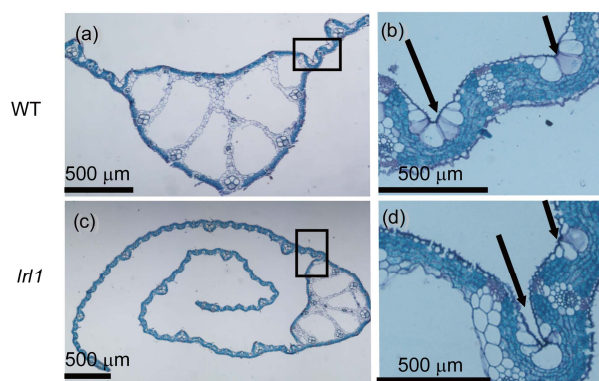


图2 (网络版彩色)野生型(WT)和突变体(*lrl1*)抽穗期叶片细胞学分析. (a) 野生型叶片中脉横切面; (b) 图(a)中黑框部分放大图; (c) *lrl1* 叶片横切面; (d) 图(c)中黑框部分放大图. 箭头所示泡状细胞

Figure 2 (Color online) Cytology analysis of wild type (WT) and the *lrl1* mutant at heading stage. (a) Cross-sections of leaf middle vein in wide type; (b) enlarged part of black box in (a); (c) cross-sections of leaf in *lrl1*; (d) enlarged part of black box in (c). Arrowhead point to bulliform cell

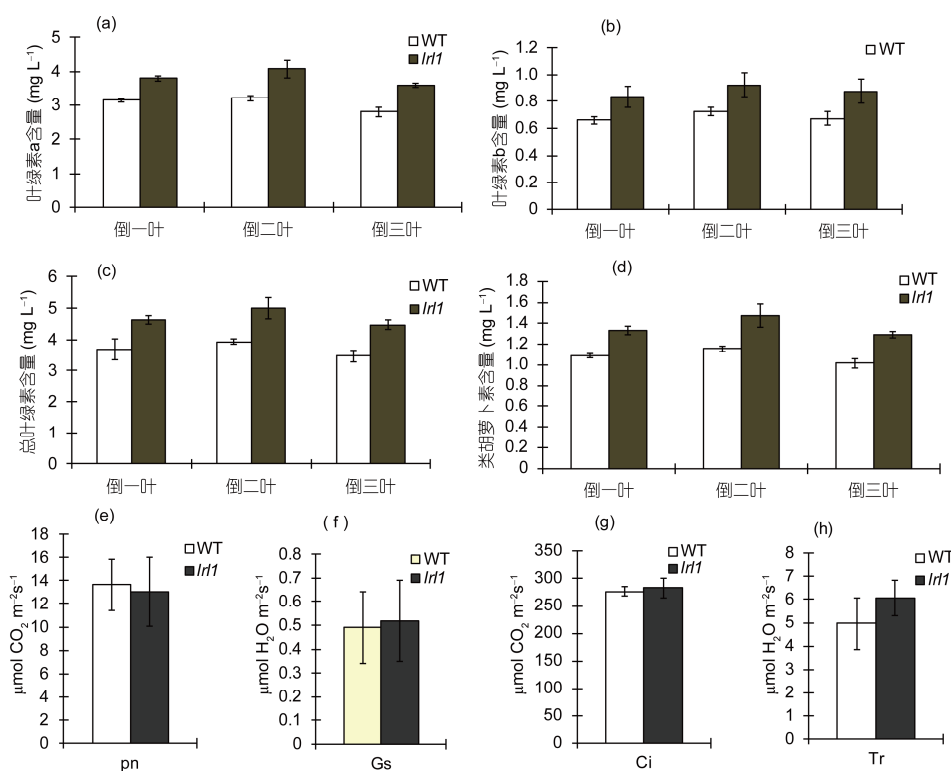


图3 (网络版彩色)抽穗期 *lrl1* 和野生型(WT)光合色素含量及光合参数分析. (a) 野生型(WT)和 *lrl1* 上三叶叶绿素 a 含量; (b) 野生型(WT)和 *lrl1* 上三叶叶绿素 b 含量; (c) 野生型(WT)和 *lrl1* 上三叶叶绿素含量; (d) 野生型(WT)和 *lrl1* 上三叶类胡萝卜素含量; (e) 野生型(WT)和 *lrl1* 叶片净光合速率; (f) 野生型(WT)和 *lrl1* 叶片气孔导度; (g) 野生型(WT)和 *lrl1* 叶片胞间 CO_2 浓度; (h) 野生型(WT)和 *lrl1* 叶片蒸腾速率. **: 在 0.01 水平差异显著

Figure 3 (Color online) Photosynthetic pigment contents and photosynthetic characters of wild type (WT) and the *lrl1* mutant at heading stage. (a) Chlorophyll a contents of *lrl1* and wild type in the upper three leaves; (b) chlorophyll b contents of *lrl1* and wild type in the upper three leaves; (c) total chlorophyll contents of *lrl1* and wild type in the upper three leaves; (d) carotenoids contents of *lrl1* and wild type in the upper three leaves; (e) net photosynthetic rate of *lrl1* and wild type leaves; (f) stomatal conductance of *lrl1* and wild type leaves; (g) intercellular CO_2 concentration of *lrl1* and wild type leaves; (h) transpiration rate of *lrl1* and wild type leaves. **: 0.01 significant level

2.3 *lrl1*的叶片的光合特性

在抽穗期分别对野生型缙恢10号和 *lrl1* 的剑叶、倒二叶和倒三叶进行光合色素含量分析. 结果表明, *lrl1* 功能叶的叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素含量以及类胡萝卜素含量均极显著高于野生型(图3(a)~(d)), 暗示了 *lrl1* 具有接受更多光能的高光效基础.

同时, 对野生型和 *lrl1* 的光合参数进行测定, 发现 *lrl1* 的叶片净光合速率(P_n)虽低于野生型约 $0.59 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 但没有显著差异. *lrl1* 的气孔导度、胞间 CO_2 浓度、蒸腾速率均分别高于野生型 $0.03 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $6.50 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ 和 $1.09 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 但也都未达 0.05 显著水平. 可能 *lrl1* 叶片光合色素的显著增加, 一定程度上弥补了因叶片卷曲导致个体光合面积减少而造成的损失, 最终其叶片净光合速率和其他生理没有显著影响(图3(e)~(h)). 同时,

这也可能是*lr1l*的株高、有效穗数、粒数和结实率等多数重要农艺性状没有显著减小的生理原因。

2.4 *lr1l*的遗传分析

利用平展叶的西农1A为母本与卷叶突变体*lr1l*杂交, F₁代植株叶片均表现正常. 暗示了该卷叶突变性状可能受隐性基因控制. F₂群体叶片呈现分离, 表现出双亲的性状, 其中卷叶单株960株, 平展叶单株3005株, 经 χ^2 测验, 平展叶:卷叶完全符合3:1的分离比($\chi^2=1.30<3.84(\chi^2(0.05,1))$), 进一步表明该卷叶突变受一对隐性单基因控制。

2.5 基因的分子定位

利用98对西农1A和缙恢10号间表现多态性的分子标记对卷叶和正常基因池进行基因连锁分析, 发现第9染色体上的标记RM201在两基因池间存在差异. 另取F₂中10株卷叶单株和10株正常单株进行连锁验证, 表明RM201与*lr1l*连锁. 然后利用F₂群体的960个突变单株将*lr1l*初步定位于Ind1和RM201之间, 遗传距离分别为2.4和4.0 cM(图4).

为了进一步精细定位, 在Ind1和RM201之间进一步设计了100个标记, 其中仅有6个有多态性(表4). 然后利用有多态性的6个标记对F₂隐性突变单株进行连锁分析, 最终将*LRL1*基因定位在SWU-1和Ind6之间, 遗传距离分别为1.2和2.0 cM, 根据籼稻品种9311参考序列, 其物理距离为812 kb(图4).

2.6 候选基因预测和测序

在水稻自动释义数据库(RAD)(<http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/rgadb/>)和水稻释义计划数据库(RAP-DB)(<http://rapdb.dna.affrc.go.jp/>)中查询该区间内所有基因信息. 与Gramene(http://www.gramene.org/rice_mutant/)中查询的基因信息进行比对, 结合基因预测功能, 发现在该区间内共有129个预测基因(表5).

筛选了3个可能与卷叶调控有关的基因, 分别为纤维素合成类似酶E1、纤维素合成类似酶E6和MYB家族转录因子. 根据这些基因的DNA序列设计引物, 分段扩增, 连接转化后送上海英潍捷基贸易有限公司(上海)测序. 经比对, 这些基因在*lr1l*和野生型间均无差异, 表明这3个基因均不是*LRL1*的候选基因。

表 4 *LRL1* 基因连锁的分子标记引物序列
Table 4 Primer sequences linked with *LRL1*

标记	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
Ind1	CGGCAGGTCCTGTAGTTTG	AGTAATTTGGTCTACAAGGAGTGG
Ind2	GATATGAGTTGCATGTGAGAGC	CTAGTGGGTCCCATGCAAA
Ind3	CCATCTTTCGTCGAGGAC	CAATGAATTAAGTGAACATTGATAT
SWU-1	GGTTTGCATGACCTTGATAGATT	AATACACATACCTTAGCTT
Ind6	TCCGAGTCGTACTCGTACCTC	TTTGGAGATGGGTGCGAT
Ind5	GAATGGGACGCATCCATA	TTCATTTACAAATACGCCGTT
Ind4	CCATTTGTAAGGTTCCAGAATT	GCTAGGAACCCTACTCACAGC
RM201	CTCGTTTATTACCTACAGTACC	CTACCTCCTTTCTAGACCGATA

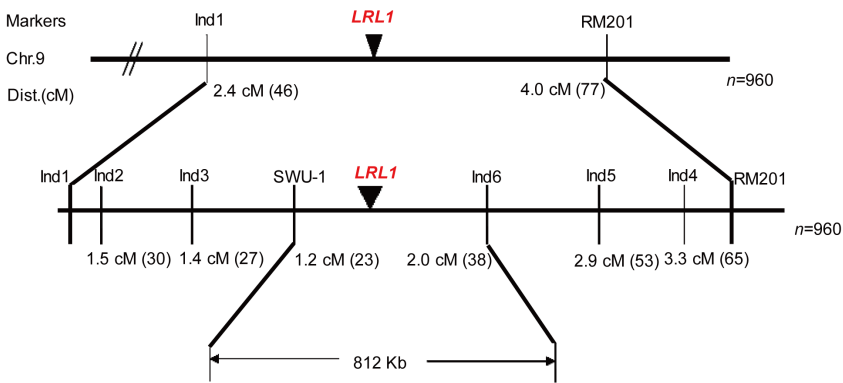


图 4 (网络版彩色)*LRL1* 基因的分子定位
Figure 4 (Color online) Molecular mapping of *LRL1*

表 5 区间内的预测基因

Table 5 The predicted genes in the location

预测基因	数量(个)
表达蛋白	24
假定蛋白	19
转移酶	7
热激蛋白	6
锌指蛋白	5
EF 手(EF-hand)家族蛋白	5
核酸结合蛋白	6
激酶	4
转座子蛋白	4
蛋白酶	3
转录因子	3
反转录转座子蛋白	2
纤维素合成类似酶	2
抗病蛋白	2
BURP 结构域家族蛋白	2
葡萄糖苷酶	2
光合作用相关蛋白	2
其他蛋白	16

暗示了 *LRL1* 可能是一个新基因。

2.7 卷叶相关基因的real-time PCR分析

为了为候选基因的进一步筛选提供线索,对6个已克隆的泡状细胞变化相关的卷叶基因进行 real-time PCR分析。结果发现,基因 *ROC5* 和 *RL14* 在 *lr1* 叶片中的表达量明显上调,而 *ACL1*, *SRL1* 和 *NAL7* 的表达被下调,暗示了这些基因可能在同一通路上调控水稻叶片的发育。而基因 *NRL1* 在野生型和突变体叶片中,表达量均极低,暗示了这个基因可能与 *LRL1* 无关(图5)。

3 讨论与结论

3.1 讨论

卷叶是水稻叶片的形态特征之一,其最直接的效应对叶片的直化作用,可有效解决叶长和叶挺之间的矛盾,是水稻理想株型的重要组成,对水稻产量形成具有重要的影响。在水稻卷叶资源中,据卷曲形态可分为正向卷曲和反向卷曲,以及两侧都卷和仅一侧卷曲;据卷曲程度有高度筒卷、中度卷曲和微卷;据卷曲部位有部分叶片卷曲,也有全部叶片卷曲的;根据卷曲发生的时期可分为全生育期卷曲、生育

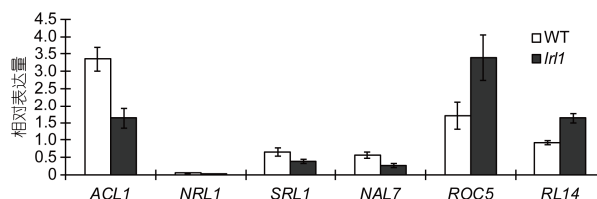


图 5 (网络版彩色)报道的泡状细胞变化的卷叶基因在 *lr1* 和野生型 (WT) 叶片中的 real-time PCR 分析

Figure 5 (Color online) Real-time PCR analysis of the reported genes for rolled leaf related to bulliform cells changes in leaves of *lr1* and wild type (WT)

前期卷曲而后期展开和前期不卷而后期卷曲。目前分子定位和克隆的20多个卷叶突变体中,多数表现为全生育期卷曲,仅有2个卷叶突变体表现非全生育期卷曲,卷叶突变体 *cfl1* 表现为分蘖后期卷曲^[9], *sll2* 在6叶龄的时候开始卷曲^[23]。在全生育期高度卷曲突变体中,由于生育前期叶片卷曲影响光合作用,导致植株发育不良,常伴随植株矮小、结实率下降、粒数减少、粒重减少等不利性状的变异,如 *nal3(t)*^[31], *nrl2(t)*^[11], *rl(t)*^[7], *sd-st*^[18]等。生育后期中度卷曲突变体,相对影响植株发育较小,伴随的不利性状变异也较少,在回交转育中相对容易,因而是最具有利用价值的卷叶资源。本研究发现的水稻生育后期卷叶突变体 *lr1*,从13叶龄开始,叶片呈现半卷曲,卷曲程度随生育进程的推进而增加,到抽穗期以后基本稳定,成熟期上三叶卷曲度分别为73.66%, 66.91%, 45.81%。*lr1* 突变体除千粒重显著减少(仍达21.43 g)外,其他性状与野生型均没有显著差异。因而, *lr1* 在表型上与所报道的卷叶突变体不同,生育后期卷曲,卷曲度适宜,具有许多育种有利的性状,是一种稀缺而有重要应用价值的卷叶资源,在基因聚合育种中有重要利用价值。

适度卷曲可使植株叶片保持直立不披垂,从而增加群体中、下层叶片透光率,有利于提高光能利用率^[4,17,26]。在 *lr1* 中,其功能叶的叶绿素a、叶绿素b、总叶绿素、类胡萝卜素含量均极显著高于野生型,但 *lr1* 个体的光合效率与野生型没有显著差异。可能对个体而言,叶片卷曲一定程度上影响光合效率,通过适当提高密度,可使其优势得到体现。研究证明,有些卷叶基因在高密度下有利于提高产量^[39]。郎有忠等人^[40,41]用珍汕97B和卷叶珍汕97B分别与明恢63配组的杂交组合为材料发现,卷叶的单叶正面光合效率低于平展叶,背面光合效率稍高于平展叶。在低密

度下,卷叶组合的群体光合效率、干物质生产及产量均低于平展叶组合,而中、高密度下高于平展叶组合。目前,已有卷叶品种创下最高产量和年最大种植面积的记录^[42]。水稻卷叶性状仍将是今后研究热点之一。

目前已经分子定位的水稻卷叶基因有25个,除了第8染色体外,其余11条染色体上均有分布,其中第1染色体1个,第2染色体4个,第3染色体3个,第4染色体1个,第5染色体2个,第6染色体2个,第7染色体4个,第9染色体2个,第10染色体3个,第11染色体1个,第12染色体2个^[6-33]。本研究发现,水稻生育后期卷叶基因*LRL1*位于第9染色体的分子标记SWU-1和Ind6之间812 kb的区域,与第9染色体上定位的卷叶基因*RL9(t)/SLL1*和*RL10(t)*位置不同,*RL9(t)/SLL1*位于第9染色体上的C23和C28之间^[24,25],以及*RL10(t)*位于RM105和RM3912之间^[26]。因而,从基因位置上,本研究发现的*LRL1*是一个尚未报道的新卷叶基因。然而,由于在该区间多态性标记较少,设计了100个标记仅发现6个存在多态性,*LRL1*定位的区间仍较大,定位区间内还有较多的候选基因(129个)。因而还需通过设计其他分子标记进一步缩小定位区间,以减少候选基因的数量,便于快速找到目的基因。

在以上所定位的卷叶基因中,已经克隆了11个。通过这些基因的克隆,水稻叶片卷曲的分子机制已有雏形。概括起来主要包括三大类。(1) 近轴/远轴面发育的不平衡引起卷叶。*RL9(t)/SLL1*基因编码一个属于KANADI家族的MYB转录因子,其突变使得叶片远轴面厚壁组织缺失以及远轴端叶肉细胞程序性死亡,从而导致叶片卷曲^[24,25]。*ADL1*编码一种植物所特有的类Calpain半胱氨酸蛋白酶,其突变导致远轴面上表皮细胞和叶肉组织的近轴化,最终改变了叶片的极性,从而造成叶片向远轴面卷曲^[8]。*OsAGO7*基因编码一个含有PAZ和PIWI结构域的蛋白,属Argonaute(AGO)家族蛋白,其功能也与叶片极性发育有关^[14]。(2) 叶片角质层的发育异常引起卷叶。显性基因*CFL1*编码一个具有WW结构域的蛋白,它的过量表达使叶片角质层受损,导致叶片卷曲。分析认为*CFL1*可能影响叶片特化表皮细胞的角质层发育,进而调控叶片卷曲^[9]。(3) 泡状细胞的发育异常引起叶片卷曲。水稻叶片外卷*oul1*突变体是由于*ROC5*基因敲除造成的。在*oul1*突变体和*ROC5*共抑制植株中叶片的泡状细胞数量和大小都有增加,而在过表达*ROC5*植株中两者均减少。表明*ROC5*对泡状细胞的

命运和发育起到负调作用^[10]。反卷叶基因*ACLI*编码一个带有未知保守功能域的蛋白,它的突变使泡状细胞的数目和大小增加,导致叶片近轴面和远轴面发育不协调,最终使叶片卷曲^[15]。*SRL1*基因编码一个预测的糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白,通过负向调节编码液泡H⁺-ATPase亚基和H⁺-焦磷酸酶基因的表达,抑制泡状细胞形成,进而调控叶片卷曲^[22]。*RL14*编码一个未知功能的2OG-Fe(II)氧化酶,通过影响次生细胞壁的组分而影响叶片中的水分运输,而这种水分运输变化导致叶片失水,造成泡状细胞形状发生异常,从而引起叶片卷曲^[28]。*NAL7/COW1*编码一个由421氨基酸组成的蛋白产物,产物包含FAD结合结构域和还原型辅酶II(β -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt, NADPH)结合结构域,在吲哚-3-乙酸(indole-3 acetic acid, IAA)生物合成中催化色胺的N-氧化反应,*OsCOW1*介导的IAA生物合成对于维持根与地上部分的比例发挥重要作用,进而影响水分的平衡^[12,13]。*NRL1/OsCSLD4*基因编码一个纤维素合成类似酶蛋白D4,在细胞壁的形成和植株生长过程中发挥着重要的作用,其突变导致*nrl1-1*突变体纵向叶脉变少,近轴泡状细胞变小^[32,33]。*SLL2*基因编码一个未知功能的蛋白,该基因的突变也引起泡状细胞发育异常^[23]。本研究发现的*lr1*突变体也是属于泡状细胞数量和形状的改变而引起的叶片卷曲,在预测的129个候选基因中,发现与上述卷叶机制中有3个功能相似的基因,分别为2个纤维素合成类似酶的基因(E1和E6),以及1个MYB转录因子。但通过测序,其编码框在*lr1*和野生型间均没有差异,表明这3个基因不是*LRL1*的候选基因。进一步通过6个与泡状细胞变化相关的卷叶基因在*lr1*叶片的real-time PCR分析发现,该基因可能与*ROC5*, *RL14*, *ACLI*, *SRL1*和*NAL7*是调控叶片发育的同一通路的基因。因而,推测*LRL1*是一个新基因,需进一步测序确定目的基因。随着更多卷叶基因的分离,水稻卷叶的分子机制和调控网络将更加清晰。这些研究将促进以分子育种手段通过调节叶片卷曲度及其发育,从而增强水稻光合作用能力,实现高光效育种的目的。

3.2 结论

通过EMS诱变获得一个新卷叶突变体,*lr1*从13叶龄开始叶片沿中脉向内半卷。其叶绿素含量极显

著增加,单株功能叶净光合速率等与野生型没有显著差异。*lrl1*突变体除千粒重显著降低外,其他重要农艺性状与野生型均无显著差异。对突变体*lrl1*叶片横切面的细胞结构进行分析,发现*lrl1*叶片的泡状细胞数量减少、形状怪异和排列不规则,导致维管束间夹角变小引起叶片卷曲。经遗传分析和分子定位,*LRL1*受一对单隐性核基因控制,位于水稻第9染色体长臂分子标记SWU-1和Ind6之间812 kb的区域。对3

个可能调控卷叶的基因(纤维素合成类似酶E1、纤维素合成类似酶E6、MYB家族转录因子)测序,但未发现它们在*lrl*与野生型间存在差异。Real-time PCR分析表明,*LRL1*可能与*ACL1*, *SRL1*, *NAL7*, *ROC5*, *RLI4*在同一通路调控叶片发育。该基因目前尚未被报道,且遗传行为简单,相应突变体具有多数育种有利的性状。因而在卷叶分子机理研究和高产分子育种中具有重要的应用价值。

参考文献

- 1 Zhou K D, Ma Y Q, Liu T Q, et al. The breeding of subspecific heavy ear hybrid rice—exploration about super-high yield breeding of hybrid rice (in Chinese). J Sichuan Agric Univ, 1995, 13: 403–407 [周开达, 马玉清, 刘太清, 等. 杂交水稻亚种间重穗型组合选育—杂交水稻超高产育种的理论与实践. 四川农业大学学报, 1995, 13: 403–407]
- 2 Yuan L P. Hybrid rice breeding for super high yield (in Chinese). Hybrid Rice, 1997, 12: 1–6 [袁隆平. 杂交水稻超高产育种. 杂交水稻, 1997, 12: 1–6]
- 3 Peng G F, Li Y Z, Yang G Q, et al. Studies on super-high-yield characteristics and culture of two-line hybrid rice Pei'ai 64S/E32 I. Determinants of super yield (in Chinese). Hybrid Rice, 2005, 15: 27–29 [彭桂峰, 李义珍, 杨高群. 两系杂交稻培矮64S/E-32的超高产特性与栽培研究I: 超高产的决定因素. 杂交水稻, 2005, 15: 27–29]
- 4 Chen Z X, Chen G, Pan X B, et al. Genetic expression and effects of rolled leaf gene *RI(t)* in hybrid rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). Acta Agron Sin, 2002, 28: 847–851 [陈宗详, 陈刚, 胡俊, 等. *RI(t)*卷叶基因在杂交稻中的遗传表达及效应研究. 作物学报, 2002, 28: 847–851]
- 5 Zhu D F, Lin X Q, Cao W X. Comparison of leaf photosynthetic characteristics among rice hybrids with different leaf rolling index (in Chinese). Acta Agron Sin, 2001, 27: 329–333 [朱德峰, 林贤青, 曹卫星. 不同叶片卷曲度杂交水稻的光合特性比较. 作物学报, 2001, 27: 329–333]
- 6 Yu D, Wu H B, Yang W T, et al. Genetic analysis and mapping of the unilateral rolled leaf trait of rice mutant B157 (in Chinese). Mol Plant Breed, 2008, 6: 220–226 [余东, 吴海滨, 杨文韬, 等. 水稻单侧卷叶突变体B157遗传分析及基因初步定位. 分子植物育种, 2008, 6: 220–226]
- 7 Pan C H, Li L, Chen Z X, et al. Fine mapping of a rolled leaf gene *rl(t)* in rice (in Chinese). Chin J Rice Sci, 2011, 25: 455–460 [潘存红, 李磊, 陈宗祥, 等. 一个水稻卷叶基因*rl(t)*的精细定位. 中国水稻科学, 2011, 25: 455–460]
- 8 Hibara K I, Obara M, Hayashida E, et al. The *ADAXIALIZED LEAF1* gene functions in leaf and embryonic pattern formation in rice. Dev Biol, 2009, 334: 345–354
- 9 Wu R H, Li B S, He S, et al. *CFL1*, a WW domain protein, regulates cuticle development by modulating the function of *HDG1*, a class IV homeodomain transcription factor, in rice and *Arabidopsis*. Plant Cell, 2011, 23: 3392–3411
- 10 Zou L P, Sun X H, Zhang Z G, et al. Leaf rolling controlled by the homeodomain leucine zipper class IV gene *Roc5* in rice. Plant Physiol, 2011, 156: 1589–1602
- 11 Wang D Z, Sang X C, You X Q, et al. Genetic analysis and gene mapping of a novel narrow and rolled leaf mutant *nrl2₀* in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). Acta Agron Sin, 2011, 37: 1159–1166 [王德仲, 桑贤春, 游小庆, 等. 水稻细卷叶突变体*nrl2₀*的遗传分析和基因定位. 作物学报, 2011, 37: 1159–1166]
- 12 Fujino K, Matsuda Y, Ozawa K, et al. *NARROW LEAF7* controls leaf shape mediated by auxin in rice. Mol Genet Genom, 2008, 279: 499–507
- 13 Woo Y M, Park H J, Su'udi M J, et al. *Constitutively wilted 1*, a member of the rice YUCCA gene family, is required for maintaining water homeostasis and an appropriate root to shoot ratio. Plant Mol Biol, 2007, 65: 125–136
- 14 Shi Z Y, Wang J, Wan X S, et al. Over-expression of rice *OsAGO7* gene induces upward curling of the leaf blade that enhanced erect-leaf habit. Planta, 2007, 226: 99–108
- 15 Li L, Shi Z Y, Li L, et al. Overexpression of *ACL1* (*abaxially curled leaf 1*) increased bulliform cells and induced abaxial curling of leaf blades in rice. Mol Plant, 2010, 3: 807–817

- 16 Li S G, He P, Wang Y P, et al. Genetic analysis and gene mapping of the leaf traits in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2000, 26: 261–265 [李仕贵, 何平, 王玉平, 等. 水稻剑叶性状的遗传分析和基因定位. *作物学报*, 2000, 26: 261–265]
- 17 Shao Y J, Chen Z X, Zhang Y F, et al. One major QTL mapping and physical map construction for rolled leaf in rice (in Chinese). *Acta Genet Sin*, 2005, 32: 501–506 [邵元健, 陈宗祥, 张亚芳, 等. 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: 501–506]
- 18 Xia L, Chen L, Guo C M, et al. Genetic analysis and mapping of rice (*Oryza sativa* L.) *sd-sl* mutant (in Chinese). *J Xiamen Univ (Nat Sci)*, 2007, 46: 847–851 [夏令, 陈亮, 郭迟鸣, 等. 一个新的水稻矮秆突变体 $sd-sl$ 的遗传与基因定位研究. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2007, 46: 847–851]
- 19 Tian X Q, Sang X C, Zhao F M, et al. Genetic analysis and molecular mapping of a rolled leaf gene *RL13* in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2012, 38: 423–428 [田晓庆, 桑贤春, 赵芳明, 等. 水稻卷叶基因 $RL13$ 的遗传分析和分子定位. *作物学报*, 2012, 38: 423–428]
- 20 Kishimoto N, Shimozaka E, Matsuura S, et al. A current RFLP linkage map of rice: Alignment of the molecular map with the classical map. *Rice Gen Newslett*, 1992, 9: 118–124
- 21 Shi Y F, Chen J, Liu W Q, et al. Genetic analysis and gene mapping of a novel rolled leaf mutant in rice (*Oryza sativa* L.) (in Chinese). *Sci China Ser C: Life Sci*, 2009, 39: 407–412 [施勇烽, 陈洁, 刘文强, 等. 一个新的水稻卷叶突变体的遗传分析与基因定位. *中国科学C辑: 生命科学*, 2009, 39: 407–412]
- 22 Xiang J J, Zhang G H, Qian Q, et al. *SEMI-ROLLED LEAF1* encodes a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein and modulates rice leaf rolling by regulating the formation of bulliform cells. *Plant Physiol*, 2012, 159: 1488–1500
- 23 Zhang J J, Wu S Y, Jiang L, et al. A detailed analysis of the leaf rolling mutant *sl2* reveals complex nature in regulation of bulliform cell development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Biol*, 2015, 437–448
- 24 Yan S, Yan C J, Zeng X H, et al. *Rolled leaf 9*, encoding a GARP protein, regulates the leaf abaxial cell fate in rice. *Plant Mol Biol*, 2008, 68: 239–250
- 25 Zhang G H, Xu Q, Zhu X D, et al. *SHALLOT-LIKE1* is a KANADI transcription that modulates rice leaf rolling by regulating leaf abaxial cell development. *Plant Cell*, 2009, 21: 719–735
- 26 Luo Z K, Yang Z, Zhong B Q, et al. Genetic analysis and fine mapping of a dynamic rolled leaf gene, *RL10(t)*, in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 2007, 50: 811–817
- 27 Luo Y Z, Zhao F M, Sang X C, et al. Genetic analysis and gene mapping of a novel rolled leaf mutant *rl12(t)* in rice (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2009, 35: 1967–1972 [罗远章, 赵芳明, 桑贤春, 等. 水稻新型卷叶突变体 $rl12(t)$ 的遗传分析和基因定位. *作物学报*, 2009, 35: 1967–1972]
- 28 Fang L K, Zhao F M, Cong Y F, et al. *Rolling-leaf 14* is a 2OG-Fe(II) oxygenase family protein that modulates rice leaf rolling by affecting secondary cell wall formation in leaves. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10: 524–532
- 29 Zhang L X, Liu H Q, Yu X, et al. Molecular mapping and physiological characterization of a novel mutant *rl15(t)* in rice (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 2014, 47: 2881–2888 [张礼霞, 刘合芹, 于新, 等. 水稻卷叶突变体 $rl15(t)$ 的生理学分析及基因定位. *中国农业科学*, 2014, 47: 2881–2888]
- 30 Chen T, Liu Y Q, Zhu Z, et al. Genetic analysis and gene mapping of a narrow and rolled mutant *nrl₁₀* in rice (in Chinese). *Acta Agric Boreal Sin*, 2014, 29: 37–43 [陈涛, 刘燕清, 朱镇, 等. 水稻窄卷叶突变体 nrl_{10} 的遗传分析与基因定位. *华北农学报*, 2014, 29: 37–43]
- 31 Wang D K, Liu H Q, Li K L, et al. Genetic analysis and gene mapping of a narrow leaf mutant rice (*Oryza sativa* L.). *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 752–758
- 32 Hu J, Zhu L, Zeng D L, et al. Identification and characterization of *NARROW AND ROLLED LEAF 1*, a novel gene regulating leaf morphology and plant architecture in rice. *Plant Mol Biol*, 2010, 73: 283–292
- 33 Li M, Xiong G, Li R, et al. Rice cellulose synthase-like D4 is essential for normal cell-wall biosynthesis and plant growth. *Plant J*, 2009, 60: 1055–1069
- 34 Zou Q. Experimental guide for plant physiology (in Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 2000. 27–29 [邹琦. 植物生理学实验指导. 北京: 中国农业出版社, 2000. 27–29]
- 35 Li Y F. Map-based cloning and functional analyses of *LEAFY HULL STERILE 1-3 (LHS1-3)* and *PISTILLOID-STAMEN (PS)* genes in rice (*Oryza Sativa* L. ssp. Indica) (in Chinese). Doctor Dissertation. Chongqing: Southwest University, 2008 [李云峰. 水稻小穗不确定性基因 $LHS1-3$ 和雄蕊雌蕊化基因 PS 的图位克隆与功能分析. 博士学位论文. 重庆: 西南大学, 2008]
- 36 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

- 37 Sang X C, He G H, Zhang Y, et al. The simple gain of templates of rice genomes DNA for PCR (in Chinese). *Hereditas*, 2003, 25: 705–707 [桑贤春, 何光华, 张毅, 等. 水稻PCR扩增模板的快速制备. *遗传*, 2003, 25: 705–707]
- 38 Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length poly-morphism (SSLPs) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Genet Genom*, 1996, 252: 597–607
- 39 Chen Z X, Hu J, Chen G, et al. Effects of rolled leaf gene *RI(t)* on economic traits of hybrid rice (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2004, 30: 465–469 [陈忠祥, 胡俊, 陈刚, 等. *RI(t)*卷叶基因对杂交稻经济性状的影响. *作物学报*, 2004, 30: 465–469]
- 40 Lang Y Z, Zhang Z J, Gu X Y, et al. Physiological and ecological effects of crimping leaf character in rice (*Oryza sativa* L.) I. Leaf orientation, canopy structure and light distribution (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2004, 30: 806–810 [郎有忠, 张祖建, 顾兴友, 等. 水稻卷叶性状的生理生态效应的研究 I. 叶片姿态、群体构成及光分布特征. *作物学报*, 2004, 30: 806–810]
- 41 Lang Y Z, Zhang Z J, Gu X Y, et al. Physiological and ecological effects of crimping leaf character in rice (*Oryza sativa* L.) II. Photosynthetic character, dry mass production and yield forming (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2004, 30: 883–887 [郎有忠, 张祖建, 顾兴友, 等. 水稻卷叶性状的生理生态效应的研究 II. 光合特性、物质生产与产量形成. *作物学报*, 2004, 30: 883–887]
- 42 Lü C G, Hu N, Xiang G L, et al. Panicle weight gain and its relation to climate condition for a two-line hybrid rice, Liangyoupeijiu (in Chinese). *Jiangsu J Agr Sci*, 2009, 25: 454–458 [吕川根, 胡凝, 相国根, 等. 两系杂交稻两优培九的穗增重特征及与气象条件的关系. *江苏农业学报*, 2009, 25: 454–458]

Identification, gene mapping and candidate gene prediction of a late-stage rolled leaf mutant *lrll* in rice (*Oryza sativa* L.)

ZHAO FangMing, WEI Xia, MA Ling, SANG XianChun, WANG Nan, ZHANG ChangWei, LING YingHua & HE GuangHua

Rice Research Institute, Southwest University; Chongqing Key Laboratory of Application and Safety Control of Genetically Modified Crops, Chongqing 400716, China

Leaf is the main photosynthetic organ of rice. Moderate rolling leaf could keep plants upright, increasing transmittance in the lower leaf, then improving the light condition of population, which is important for high-yield breeding. Here, we obtained a late-stage moderate-rolled leaf mutant *lrll* in rice deriving from the restorer line Jinhui10 (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*) treated by ethylmethane sulfonate (EMS). The leaves of *lrll* were normal in early development stages. Then, the upper 3 leaves began rolling inward along the vein after thirteen leaf age, and the rolling index increased with the plant development until the heading stage. The rolling index of flag leaf, 2nd and 3rd leaf from the top in *lrll* was 73.66%, 66.91% and 45.81% at maturity stage, respectively. Compared with the wild-type, most of the important agronomic traits in *lrll* existed no significant difference, only 1000-grains weight (21.43 g) were significantly less than that of the wild type. In mutant *lrll*, the decreased number, strange shape, and irregular arrangement of bulliform cells made the angles among small vascular bundles become smaller, which might cause the leaf rolling. Chlorophyll *a* and *b*, total chlorophyll and carotenoid content were all significantly higher than that of wild type. However, the net photosynthetic rate, stomatal conductance, transpiration rate in the *lrll* existed no difference with those in wild type. By genetic analysis and gene mapping, the rolled leaf mutant was found to be controlled by a single recessive nuclear gene. And the *LRLI* was mapped between SWU-1 and Ind6 on the chromosome 9, physical distance is 812 kb. By candidate gene prediction in the area, there are 129 genes altogether. Through sequencing, three genes possibly related to rolled leaf were found existing no difference between *lrll* and J10. Real-time PCR analysis of 6 cloned rolled leaf gene related to bulliform cells changes showed that the expression quantity of *ACL1*, *SRL1* and *NAL7* were down-regulated significantly, that of *ROC5* and *RL14* were up-regulated significantly, indicating that the *LRLI* might be the same passage for regulating leaf development with these genes. The *LRLI* is a new found gene. So these results will be important for further cloning and functional analysis of the gene, especially have important utilization value in rice high-yield breeding because of most advantageous traits to breeding in *lrll* and its simple genetic behavior.

rice (*Oryza sativa* L.), rolled leaf, gene mapping, real-time PCR

doi: 10.1360/N972015-00712