

水稻窄叶突变体 *nal12* 的鉴定与基因精细定位

文艺^{1,2,#} 方云霞^{3,#} 胡鹏² 王月影² 侯琳琳² 谭义青² 朱黎欣² 邓雪梅² 曾大力²
张光恒² 郭龙彪² 朱丽² 陈光² 任德勇² 饶玉春¹ 薛大伟³ 钱前^{1,2,*} 胡江^{2,*}

(¹浙江师范大学 化学与生命科学学院, 浙江 金华 321000; ²中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室, 杭州 310006; ³杭州师范大学 生命与环境科学学院, 杭州 310036; #共同第一作者; *通讯联系人, E-mail: qianqian188@hotmail.com; hujiang588@163.com)

Identification and Fine Mapping of a Narrow Leaf Mutant *nal12* in Rice

WEN Yi^{1,2,#}, FANG Yunxia^{3,#}, HU Peng², WANG Yueying², HOU Linlin², TAN Yiqing², ZHU Lixin²,
DENG Xuemei², ZENG Dali², ZHANG Guangheng², GUO Longbiao², ZHU Li², CHEN Guang², REN Deyong²,
RAO Yuchun¹, XUE Dawei³, QIAN Qian^{1,2,*}, HU Jiang^{2,*}

(¹College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321000, China; ²State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; ³College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China; #These authors contributed equally to this work; *Corresponding authors, E-mail: qianqian188@hotmail.com; hujiang588@163.com)

Abstract: 【Objective】 Leaf is a vital component of ideal plant type in rice. Screening and identification of new leaf mutants can lay the foundation for studying leaf development and constructing ideal leaf morphology. **【Method】** A novel rice mutant named *narrow leaf 12* (*nal12*) was identified from an EMS mutagenized population of Wuyunjing 31. The leaf length, leaf width, numbers of large and small veins from flag leaf to the 4th leaf from the top were measured, and the histological section and microscopic observation were conducted at the maturity stage. The F₂ segregating population was constructed from a cross between *nal12* and *indica* variety TN1, and 1709 narrow-leaf individuals were selected for fine mapping of *NAL12* with existing SSR, STS and developed molecular markers. **【Result】** The *nal12* showed narrow leaves at seedling stage, and exhibited dwarf, increased tillers and thinner stems at maturity stage. According to the anatomy observation of tissue sections, the narrow leaf phenotype of *nal12* was caused by the decrease in the number of large veins and small veins compared with the wild type. Genetic analysis indicated that the narrow leaf trait was regulated by a single recessive nuclear gene, and *NAL12* was finally mapped to a range of 64.7 kb between LC2-RF37 and LC4R-RF39 markers on chromosome 10. A total of 10 ORFs (open reading frames) were found and there were no narrow-leaf related genes reported in this region. qRT-PCR analysis revealed that the mutation of *NAL12* was involved in the expression level of auxin synthesis and transport-related genes. **【Conclusion】** *NAL12* is a new leaf-shape regulatory gene, which lay a foundation for further research on rice leaf development and enrich its molecular regulatory network.

Key words: rice; narrow leaf; *NAL12*; gene mapping

摘 要: 【目的】 水稻叶片是理想株型的主要组成部分。筛选和鉴定新的叶形突变材料, 可为研究叶发育调控机制和塑造叶片理想形态打下基础。**【方法】** 由粳稻品种武运粳 31 经 EMS(ethyl methane sulphonate)诱变获得窄叶突变体 *nal12*(*narrow leaf 12*); 通过表型测量分析剑叶至倒 4 叶的叶片长度、宽度、大脉数和小脉数, 并进行组织切片和显微观察; 将突变体 *nal12* 与籼稻品种中本地 1 号(TN1)杂交, 在 F₂ 分离群体中选取了 1709 个具窄叶突变表型的单株, 通过已有的 SSR、STS 和新开发的分子标记进行精细定位。**【结果】** *nal12* 在幼苗期就表现出了窄叶性状, 在成熟期植株较野生型矮小, 分蘖增多, 茎秆变细。经组织切片观察分析, *nal12* 叶片变窄是由于大脉和小脉数量减少造成。遗传分析表明该窄叶表型受单一隐性核基因调控; 最终将该基因定位在第 10 染色体上 LC2-RF37 与 LC4R-RF39 标记之间约 64.7 kb 的范围内。该区间内共有 10 个开放阅读框, 其中并无已报道的窄叶相关基因。qRT-PCR 结果表明, *NAL12* 基因的突变会影响生长素合成与运输相关基因的表达。**【结论】** *NAL12* 为一个新的叶形调控基因。这为进一步研究水稻叶片发育, 丰富其分子调控网络打下了基础。

关键词: 水稻; 窄叶; *NAL12*; 基因定位

中图分类号: Q343.5; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2019)03-0219-08

收稿日期: 2018-11-20; 修改稿收到日期: 2018-12-18。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31671666; 31871594; 91335105); 浙江省自然科学基金杰出青年项目(LR19C130001)。

叶片作为水稻光合作用和呼吸作用的主要器官,其形态结构直接影响水稻的生长发育和最终产量^[1]。因此,深入研究水稻叶发育的分子调控机制,建立相应的分子调控网络,塑造大田种植的最佳叶片形态,对提高水稻产量和改善稻米品质均有重要的理论意义和应用价值。作为水稻理想株型的重要组成部分,叶片大小和受光姿态一直是育种学家关注的重点。袁隆平针对长江中下游稻作区超级杂交水稻的理想株型,强调叶片要“长、直、窄、凹、厚”,充分发挥冠层在整个生育期的光合作用来提高产量^[1]。也即应根据不同地区和气候条件选择相应叶片形态,在同等光照下最大限度地保证每片叶的受光面积,提升光合效率,从而提高产量。

到目前为止,已有多多个水稻窄叶突变基因被发掘和克隆。通过经典遗传结合现代分子生物学技术,已经定位窄叶基因 *NAL1*~*NAL11*,其中 *NAL1*、*NAL2*、*NAL3*、*NAL7* 和 *NAL9* 已经被克隆^[2-5]。此外还有一些窄叶相关基因,如窄卷基因 *NRL1*^[6-8]和 *NRL2*^[9-11],白化窄叶基因 *NAAL1/CHR729/OsCHR4* 等^[12-13]。其中, *NAL1* 编码一个生物学功能未知蛋白,在维管束组织中大量表达,其突变后可引起叶片中小脉数显著减少从而导致叶宽变小^[12-13]。进一步研究发现 *NAL1* 是通过降低生长素的极性运输来调控叶发育,其在 9311 中的等位基因 *LSCHL4 (LEAF SHAPE AND CHLOROPHYLL4)* 可提高叶绿素含量,并增加产量^[14]。*NAL2* 和 *NAL3* 是拷贝基因,与拟南芥中的 *PRESSED FLOWER* 和玉米中的 *NS1*、*NS2* 同源,均编码与 *WUSCHEL* 相关的同源框蛋白 *OsWOX3A*,也是通过生长素极性运输来调控叶片的发育^[3]。*NAL7* 编码一个含核黄素的单加氧酶,是 *YUCCA* 家族中的一员,涉及到生长素的生物合成,该基因的突变可导致生长素含量的变化,最终影响叶宽^[4]。而 *NAL9* 与水稻黄叶基因 *VYL* 等位,同时调控着水稻叶绿体的发育和叶宽^[5]。窄卷叶基因 *NRL1 (NARROW AND ROLLED LEAF 1)* 编码一个纤维素合成类似酶 *OsCSLD4*,在根、叶鞘、穗部等生长旺盛的器官中大量表达,该基因能够通过影响维管束和泡状细胞的发育来调控叶片的宽度和卷曲度^[6-8]。*NAAL1/CHR729/OsCHR4* 编码 *CHR4/MI-2* 类似蛋白,是一类可调节 *H₃K₄* 和 *H₃K₂₇* 甲基化的基因,该基因也是通过调控生长素来影响水稻叶片维管束发育的^[12-13]。

本研究以新窄叶突变体 *nall12* 为材料,通过构建的 *F₂* 群体进行遗传分析,并利用已知的分子标记和新开发的分子标记开展了目的基因的精细定位,

将其锁定在第 10 染色体长臂末端约 64.7 kb 的区域内。同时还开展了组织切片观察,以及生长素相关基因的 qRT-PCR 表达分析。这些将为进一步的基因克隆和解析其调控叶发育的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究材料

粳稻品种武运粳 31 经 EMS 诱变,从其分离后代中获得一个窄叶突变体 *nall12*,经连续多代种植,突变性状能够稳定遗传。将 *nall12* 与籼稻品种台中本地 1 号(TN1)杂交得到 *F₁*,播种自交得到 *F₂* 分离群体,从中分离出现正常和窄叶两种表型,根据窄叶表型田间取样,共获得 1709 个窄叶材料用于基因定位。所有水稻材料均种植于杭州富阳中国水稻研究所试验田。

1.2 表型调查与显微观察

抽穗后分别调查野生型与 *nall12* 剑叶至倒 4 叶的叶长和叶宽、茎节长及分蘖数,在显微镜下统计叶脉数量。用 FAA 固定液(70%酒精、40%甲醛和冰乙酸的体积比为 18:1:1)固定剑叶,经酒精梯度脱水,二甲苯透明后用石蜡包埋,切片染色中性树脂封片后用显微镜观察维管束细胞,并拍照。

1.3 水稻 DNA 提取及 PCR

野生型和 *nall12* 两个亲本、*F₂* 群体及混池的 DNA 提取采用 CTAB 法。引物设计使用 Primer Premier 5.0 软件,由尚亚生物技术公司合成。PCR 采用 10 μL 扩增体系:2 μL 模板 DNA,1 μL dNTP(2 mmol/L),1 μL 缓冲液(10×),2 μL 正反向引物,0.1 μL *rTaq* DNA 聚合酶,3.95 μL ddH₂O。PCR 扩增程序如下:94℃下高温变性 4 min;94℃下 30 s,55℃下 30 s,72℃下 30 s,共计 40 个循环;72℃下充分延伸 10 min,15℃下保存。PCR 产物加入溴酚蓝核酸染料,琼脂糖凝胶电泳后置于凝胶成像仪上紫外扫描,保存胶图并统计分析。

1.4 *NAL12* 的精细定位

以 1709 株 *nall12*×台中本地 1 号的 *F₂* 隐性单株为定位群体,利用均匀分布于 12 条染色体上的 SSR 标记对群体 DNA 混池(*F₂* 群体中随机选取 30 单株)、*F₁* 以及双亲进行多态性筛选,找出与目的基因连锁的分子标记。然后扩大群体验证连锁标记,确定初定位区间。基于初定位结果,对比目标区间内籼粳基因组序列,以日本晴与珍汕 97 为参考,找出序列差异后用 Primer Premier 5.0 软件设计 InDel 标记引物。PCR 扩增双亲和琼脂糖凝胶电泳检测,筛选

出多态性引物对 F_2 群体进行检测。分析胶图, 将具有台中本地 1 号带型的单株记为 A, 具有 *nal12* 带型的单株记为 a, 具有 F_1 带型即交换单株记为 H, 统计交换单株的减少趋势及走向, 以明确目标基因的区间, 依据图位克隆原理完成精细定位。利用 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和水稻基因组注释数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)预测定位区间内的候选基因, 并下载其 DNA 序列。以候选基因序列为参考, 用 Primer Premier 5.0 软件设计测序引物, PCR 扩增野生型和突变体, 并送往尚亚生物技术公司进行测序。采用 Seqman 软件比对分析测序结果。

1.5 实时荧光定量 PCR

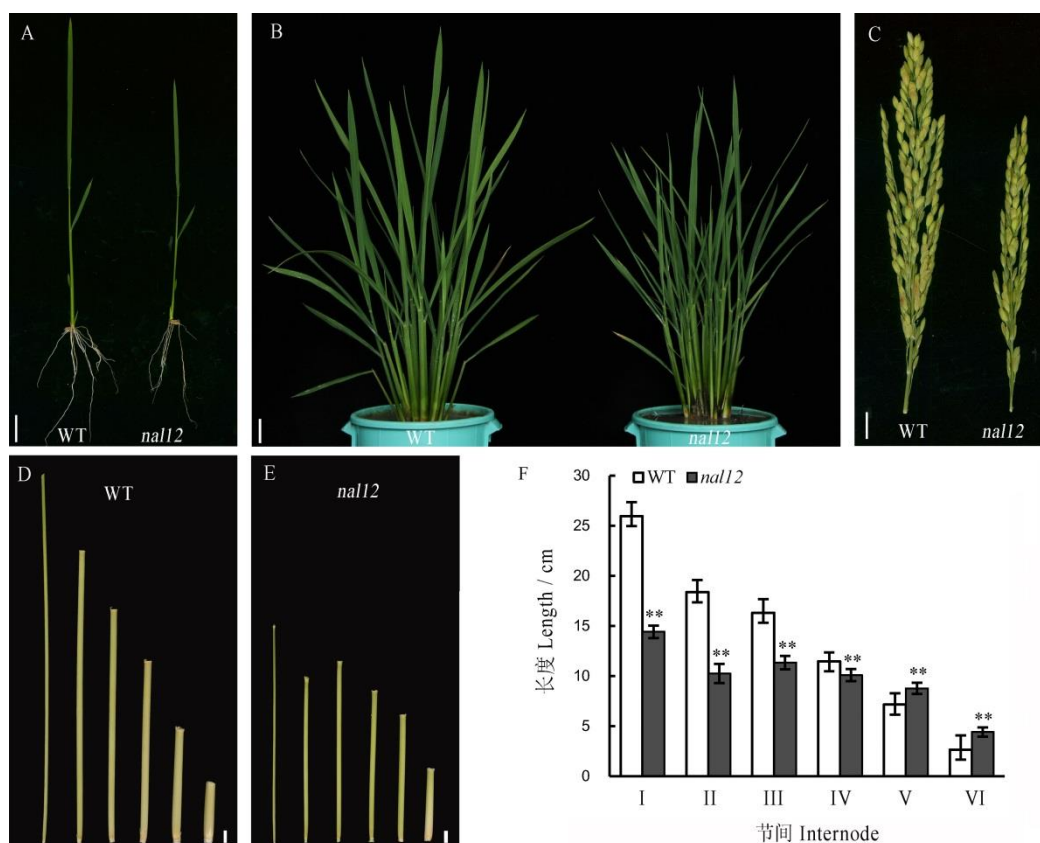
取野生型与突变体成熟植株的剑叶, 使用 Axygen 公司的 Miniprep 试剂盒提取基因组 RNA。随后用日本 TOYOBO 公司生产的反转录试剂盒 (ReverTra Ace quantitative PCR RT Master Mix) 反转合成第 1 链 cDNA, 实验操作均按照说明书进行。得到 cDNA 后, 稀释 5 倍用于实时荧光定量 PCR。

使用 Bio-Rad CFX96 PCR 仪器和 TOYOBO 生产的 2×SYBR Green PCR Master Mix 试剂, 扩增以水稻内参基因 *Actin* 作为对照, 样品 3 次重复, PCR 扩增程序如下: 95℃ 下预变性 60 s; 95℃ 下变性 15 s, 60℃ 下延伸 60 s, 共计 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 *nal12* 农艺性状分析

比较野生型武运粳 31 与窄叶突变体 *nal12* 植株形态, 两者在叶片、茎秆、株高、分蘖和穗等方面存在显著差异(图 1)。*nal12* 播种 10 d 左右, 即可观察到叶片显著变窄, 但根系发育正常(图 1-A)。抽穗后, *nal12* 株型紧凑, 相对野生型秆矮小, 分蘖数比野生型增多 33.33%, 叶片平均宽度和平均长度均低于野生型(图 1-B); 突变体茎秆变细, 倒 I 节至倒 IV 节长度分别为野生型的 55.6%, 55.8%, 69.5%, 88.1%(图 1-C、D、F), 穗形较小(图 1-E)。这表明该基因突变后不仅影响叶形态, 而且早期就开始调



A—10 d 秧龄的幼苗, 标尺=3 cm; B—分蘖期植株, 标尺=5 cm; C—穗, 标尺=1 cm; D 和 E—分别为茎秆倒 I 节到倒 VI 节, 标尺=1 cm; F 图中, 误差线表示标准差 ($n=20$), **表示差异达 0.01 显著水平。

A, Seedlings(10-day-old), scale bar=3 cm; B, Plant at the tillering stage, scale bar=5 cm; C, Panicle, scale bar=1 cm; D and E, Six sections of the culm, scale bar=1 cm. Bars represent standard deviations ($n=20$), ** significant difference between WT and *nal12* by *t*-test ($P<0.01$).

图 1 野生型武运粳 31 与突变体 *nal12* 的表型

Fig. 1. Phenotype of wild-type Wuyunjing 31 and mutant *nal12*.

控着整个植株的形态发育。

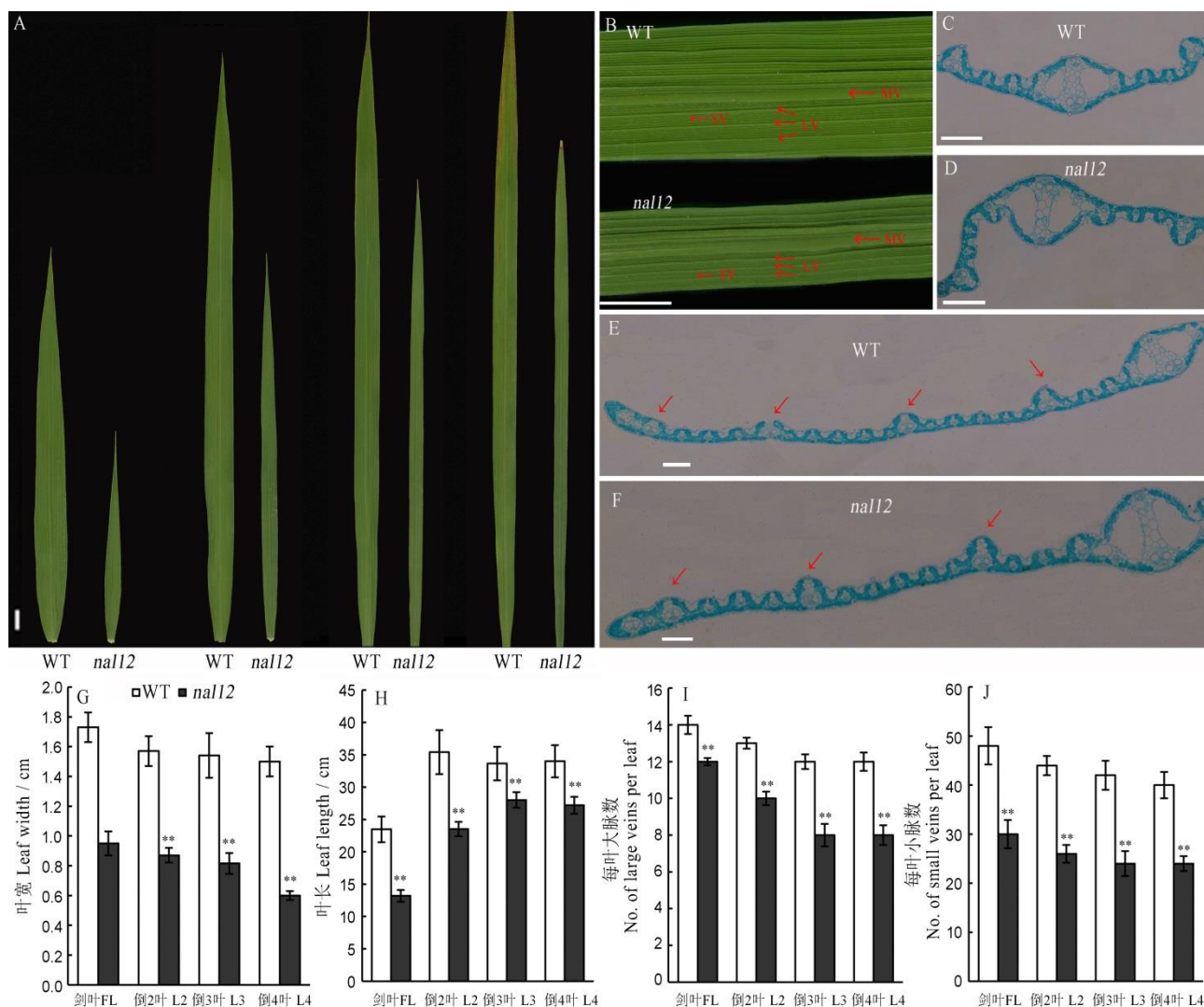
2.2 *nal12* 细胞学观察及组织解剖分析

调查统计发现, *nal12* 的叶宽与叶长均低于野生型, 其剑叶至倒4叶的叶宽分别占野生型叶宽的 58.8%、56.3%、53.3%和 40.0%; 而叶长则分别占野生型叶长的 56.2%、66.4%、83.1%和 80.0%(图 2-A、G、H)。由于已报道的窄叶相关基因大部分与叶片维管束的发育相关, 我们进行了显微镜及石蜡切片观察, 发现 *nal12* 叶片剑叶至倒4叶的大脉数分别占野生型大脉数的 83.3%、83.3%、66.7%和 66.7%;

而小脉数则分别占野生型小脉数的 69.8%、57.8%、58.5%和 62.5%, 野生型与突变体的差异均达显著水平(图 2-B~F、I、J)。因此, *nal12* 叶片的窄化应该是叶脉数量下降造成的。

2.3 遗传分析与基因定位

本研究将突变体 *nal12* 与籼稻台中本地 1 号(TN1)杂交, 得到的 F_1 代在田间种植为正常叶片表型, 表明该性状受隐性基因控制。收集 F_1 种子在田间播种, 可分离出窄叶表型植株和正常表型植株。统计正常植株与窄叶植株的数量比例为 5213:



A-野生型武运梗 31 和突变体 *nal12* 剑叶至倒 4 叶的形态, 标尺=1 cm; B-叶片的主脉、大脉和小脉。MV 为主脉, LV 为大脉, SV 为小脉, 标尺=1 cm; C 和 D-主脉的石蜡切片, 标尺=200 μ m; E 和 F-大脉和小脉的石蜡切片。标尺=200 μ m; G 和 H-野生型武运梗 31 和突变体 *nal12* 的叶宽和叶长; I 和 J-野生型武运梗 31 和突变体 *nal12* 的大脉数和小脉数。误差线表示标准差 ($n=20$), **0.01 极显著水平。

A, Morphology of top four leaves in the wild-type Wuyunjing 31 and mutant *nal12*, scale bar = 1 cm; B, The main vein (MV), large vein (LV) and small vein (SV) of leaves, scale bar = 1 cm; C and D, Paraffin section of main vein, scale bar = 200 μ m; E and F, Paraffin section of large veins and small veins, scale bar=200 μ m; G and H, Leaf width and length of top four leaves; I and J, Number of large veins and small veins of top four leaves; FL, Flag leaf; L2, The second leaf from the top; L3, The third leaf from the top; L4, The fourth leaf from the top. Bars represents standard deviations ($n=20$), **significant difference between WT and *nal12* by *t*-test ($P<0.01$).

图 2 野生型武运梗 31(WT)与突变体 *nal12* 叶片的显微结构

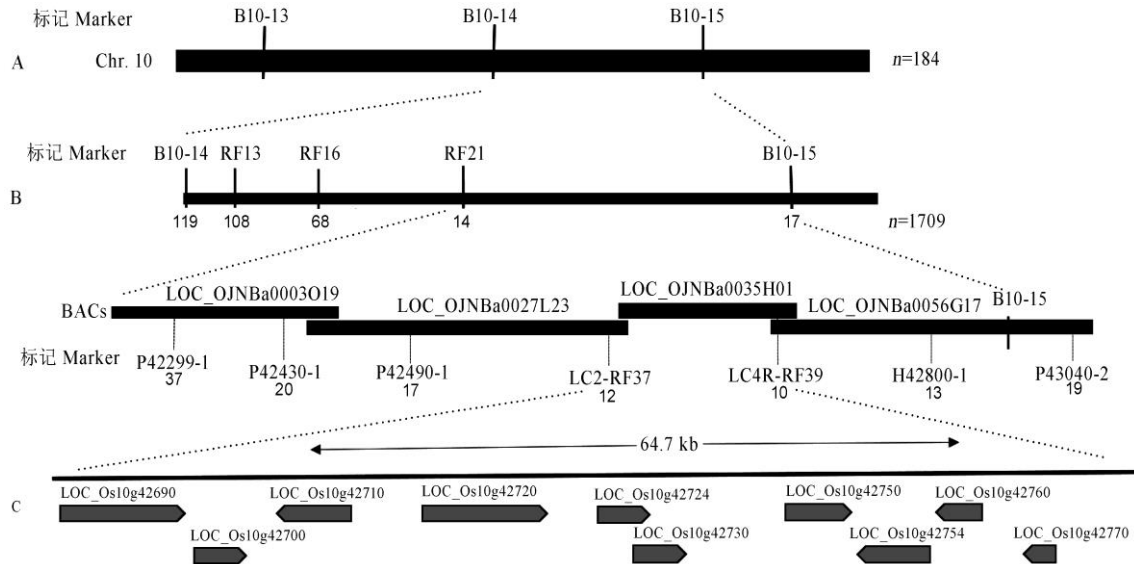
Fig. 2. Leaf microstructure of Wuyunjing 31(wild type, WT) and mutant *nal12*.

1709, 经卡方测验符合一对隐性核基因调控的 3:1 分离比($\chi^2=0.34<\chi^2_{0.05}=3.84$), 表明 *nal12* 表型受一单隐性核基因控制。以 184 个 F₂ 隐性个体为初定位群体, 利用 234 个均匀分布于 12 条染色体上的分子标记进行混池鉴定分析, 发现在第 10 染色体末端位置, 分子标记 B10-13、B10-14 和 B10-15 的扩增条带位置出现了偏扩增。随后用这 184 个单株进行验证, 结果表明 3 个分子标记均与目标性状连锁, 初步将目的基因锁定在第 10 染色体长臂末端(图 3-A)。然后扩大 F₂ 定位群体, 共计 1709 株突变体表型单株, 并在此区间进一步设计 SSR 和 InDel 标记, 筛选出亲本间具有多态性的分子标记进行精细定位, 最终将 *NAL12* 定位在标记 LC2-RF37 和

LC4R-RF39 之间, 物理距离为 64.7 kb(图 3-B, 表 1)。据前人相关报导并未在此区段发现类似的窄叶基因, 此为一个新的窄叶基因, 定名为 *NAL12*。

2.4 预测候选基因

根据水稻基因组注释数据库(Rice Genome Annotation Project, <http://rice.plantbiology.msu.edu/>)提供的信息, 在 *NAL12* 的定位区间内共包含 10 个预测基因, 分别为 LOC_Os10g42690, 编码一个结构域蛋白; LOC_Os10g42700, 编码假定的 CS 结构域蛋白质; LOC_Os10g42710, 编码 RCD1 酶; LOC_Os10g42720, 编码假定的酰基转移酶; LOC_Os10g42724, 编码 VHS 和 GAT 结构域蛋白; LOC_Os10g42730 和 LOC_Os10g42754, 均编码一



A-*NAL12* 初定位在第 10 染色体上; B-*NAL12* 精细定位在 64.7 kb 的区间内; C-定位区间的 10 个预测基因。
A, *NAL12* was primarily mapped on chromosome 10; B, *NAL12* was narrowed to a 64.7 kb genomic region; C, Total ten genes were predicted in the region.

图 3 窄叶突变基因 *NAL12* 的精细定位

Fig. 3. Fine mapping of *NAL12*.

表 1 用于基因定位和定量分析的分子标记

Table 1. Markers developed for mapping of *NAL12* and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis.

分子标记 Marker	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')
RF13	GTGTACATTTCGTGCGTACCA	TTGACTGATGAAGCAGAATGC
RF16	GCGTACGTTCAACAAGACCC	CAGTTCAACACAAGTAATGCAGAG
RF21	ATTATTCAACAACGAAGGAG	AAATTAAGAAAGATGGAGGG
P42299-1	AACGGAACAAGTCCACTAAACC	ATCCTCCTCTCTTGTACCTT
P42430-1	TTCAGGAATGCCAAGAAGACG	CGCTGTATCAGTATCAAAAACAAG
P42490-1	GATGCGGGCACTCCTTGAACA	ATGCCATTGCCAGCCGTTTCG
LC2-RF37	CATATTGCCTTTTGCTTTGT	AGCGAGCATGGTGTATCTT
LC4R-RF39	TTAAGCAGACAAGAGTCAACA	CCCCATCCAGATGTGAATCCGCCAT
H42800-1	AGGGTGCCGGATCAGAACAGC	CCATGGGGAATGGGGATTTAGTTT
P43040-2	CTCGCCGAGGTGAACCTATT	AGGAGGGTGGTGAAAGCAAA

表 2 目标区域预测基因
Table 2. Predicted genes in fine-mapping region.

基因 Locus name	功能注释 Function annotation
LOC_Os10g42690	jmjC 结构域蛋白 jmjC domain containing protein, expressed
LOC_Os10g42700	假定的 CS 结构域蛋白 CS domain containing protein, putative, expressed
LOC_Os10g42710	RCD1 酶 RCD1, putative, expressed
LOC_Os10g42720	假定的酰基转移酶 Acyltransferase, putative, expressed
LOC_Os10g42724	编码 VHS 和 GAT 结构域蛋白 VHS and GAT domain containing protein, expressed
LOC_Os10g42730	未知蛋白 Expressed protein
LOC_Os10g42750	CSLD1 纤维素合成酶 CSLD1-cellulose synthase-like family D, expressed
LOC_Os10g42754	未知蛋白 Expressed protein
LOC_Os10g42760	PPR 重复结构域蛋白 PPR repeat domain containing protein, putative, expressed
LOC_Os10g42770	编码假定的 a_IG002N01.7 蛋白 a_IG002N01.7, putative, expressed

个未知蛋白; LOC_Os10g42750, 编码 CSLD1 纤维素合成酶; LOC_Os10g42760, 编码一个 PPR 重复结构域蛋白; LOC_Os10g42770, 编码假定的 a_IG002N01.7 蛋白(图 3-C, 表 2)。

2.5 生长素相关基因的表达分析

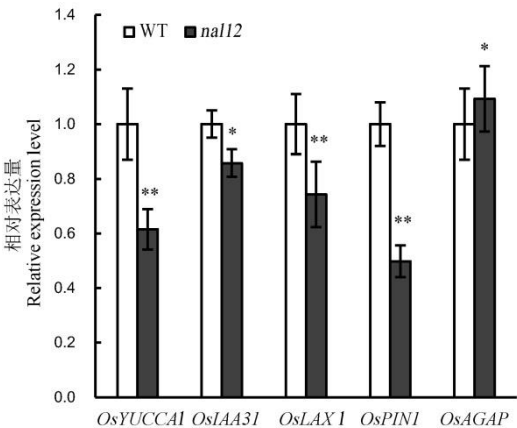
根据已克隆基因的 cDNA 序列设计引物用于 qRT-PCR(表 1)。我们检测了生长素相关基因在野生型武运粳 31 与窄叶突变体 *nal12* 中的表达情况(图 4)。实验结果表明,除生长素运输基因 *OsAGAP* 外,其他基因的转录水平在 *nal12* 中均有所下降。其中,生长素合成基因 *OsYUCCA1* 的表达量下调为野生型的 61.6%;信号传导有关基因 *OsIAA3* 的表达量下调为野生型的 85.8%;运输有关基因 *OsLAX1* 和 *OsPIN1* 分别下调为野生型的 74.3%和 49.8%。表明

NAL12 的基因突变可造成生长素的生物合成、运输和传导基因的改变,从而导致植株和叶发育的异常。

3 讨论

本研究从武运粳 31 的 EMS 诱变群体中获得的一个窄叶突变体 *nal12*, 其不仅表现为叶脉数量的显著下降,还伴随着植株矮化、分蘖增多、茎秆变细等表型,也即相关调控基因应该是在多组织中表达的。根据已报道窄叶材料的表型,大部分突变体除了叶片变窄外,多数还伴随着植株矮小、穗发育不良、叶片卷曲黄化等形态学特征。其中, *nal1*、*nal7*、*nal9* 和 *nrl1* 除了叶片变窄以外,还表现出植株矮化^[2, 4-8];而 *nal7*、*nrl1* 和 *nrl2* 则表现出不同程度叶片卷曲^[4, 6-12]。在叶色方面, *nal1* 的叶片为白条纹^[12-13], *nal9* 为黄化叶^[5],而显性窄叶突变体 *Dnal1* 的叶片则表现为深绿色^[15]。此外, *nal10* 窄叶突变体还会出现畸颖,并且不育^[16]。因此, *nal12* 与其他窄叶材料一样,均有多个性状发生变化,表明其突变基因可同时影响植株多个组织器官的发育。

通过图位克隆法,我们将 *NAL12* 精细定位在第 10 染色体末端约 64.7 kb 的区间,该区域内有 10 个预测基因。其中 *LOC_Os10g42750* 编码一个 *OsCSLD1* 蛋白,涉及到根毛的发育^[17]。在高等植物中,糖基转移酶家族的纤维素合酶类似蛋白 (cellulose synthase-like, CSL)对细胞壁的生物合成和植株生长至关重要。*CSLD* 家族参与纤维素与半纤维素的骨架合成,在水稻中有 5 个成员,即 *OsCSLD1~OsCSLD5*;在拟南芥中有 6 个成员,即 *AtCSLD1~AtCSLD6*^[6]。其中, *NRL1* 编码一个 *OsCSLD4* 蛋白,该基因的突变会导致植株矮化、窄



Bar 值代表标准误 (n=3), **表示 0.01 极显著水平, *表示 0.05 显著差异。
Bars represent standard error (n=3). ** and * indicate significant difference between WT and *nal12* by *t*-test ($P<0.01$, $P<0.05$) respectively.

图 4 野生型及突变体 *nal12* 生长素相关基因的表达分析
Fig. 4. Expression analysis of auxin-related genes in the wild-type Wuyunjing 31 and mutant *nal12*.

叶微卷及细长粒表型^[6-8]。而 *OsCSLD1/RTH2* 则是与水稻根毛的形态建成相关, 在根部和地上部分外皮层和皮层细胞的细胞壁表达, 该基因突变后可造成根毛缩短或无根毛表型, 但根系长度及地上部表型无显著性变化^[17-18]。尽管定位区间内包含 *OsCSLD1* 基因, 但 *nal12* 与 *oscsld1/rth2* 的突变表型显著不同, *oscsld1/rth2* 表型为无或短根毛, 植株和叶形正常, 而 *nal12* 则表现出了矮化、窄叶、分蘖增多、细秆, 且根毛正常表型, 表明 *Nal12* 应为一个调控叶片发育的新基因。

叶片从叶原基起始开始, 经近-远轴、基-顶轴和中-侧轴三个极性发育方向发育, 最终形成一片完整的叶, 而叶片宽窄改变应与中-侧轴的极性发育相关。通过解剖分析发现, 大多数窄叶都发生了叶脉数量的减少, 如 *nal1* 和 *nal7* 就会使大脉和小脉减少, 经组织切片后能观察到突变体的维管束发育不完全, 其数目和分布皆有所改变^[2, 4]。*NAL1* 与生长素极性运输相关^[2], 而 *NAL7* 则与生长素合成相关^[4], 事实上生长素对于细胞分裂、分化、纵向延伸以及叶原基的分化均有着重要作用^[19-20]。在 RT-PCR 分析中, *nal12* 中的生长素合成、信号转导及运输基因的表达基本都下降了, 表明 *nal12* 很可能也涉及到通过生长素调控叶发育。

目前, 由于突变发生的不确定性, 通过诱变育种来进行品种改良往往都伴随着一些不利性状, 如生育期延迟、植株矮化、叶片过于卷曲、结实率下降等, 导致多数突变材料, 特别是叶形类材料并不能直接用于育种改良。然而通过挖掘和鉴定新叶形突变材料, 克隆相关控制基因, 完善其分子调控网络, 再通过基因敲除或定点突变等新兴技术将为构造水稻理想株型的分子育种打下基础。

参考文献:

- [1] 袁隆平. 杂交水稻超高产育种. 杂交水稻, 1997, 12(6): 1-6.
Yuan L P. Breeding of super high yield hybrid rice. *Hybrid Rice*, 1997, 12(6): 1-6. (in Chinese with English abstract)
- [2] Qi J, Qian Q, Bu Q Y, Li S Y, Chen Q, Sun J Q, Liang W X, Zhou Y H, Chu C C, Li X G, Ren F G, Palme K, Zhao B G, Chen J F, Chen M S, Li C Y. Mutation of the rice *narrow leaf1* gene, which encodes a novel protein, affects vein patterning and polar auxin transport. *Plant Physiol*, 2008, 147(4): 1947-1959.
- [3] Cho S H, Yoo S C, Zhang H T, Pandeya D, Koh H J, Hwang J Y, Kim G T, Paek N C. The rice *narrow leaf2* and *narrow leaf3* loci encode WUSCHEL-related homeobox 3A (*OsWOX3A*) and function in leaf, spikelet, tiller and lateral root development. *New Phytol*, 2013, 198(4): 1071-1084.
- [4] Fujino K, Matsuda Y, Ozawa K, Nishimura T, Koshiba T, Fraaije M W, Sekiguchi H. *NARROW LEAF 7* controls leaf shape mediated by auxin in rice. *Mol Genet Genom*, 2008, 279(5): 499-507.
- [5] Li W, Wu C, Hu G C, Xing L, Qian W J, Si H M, Sun Z X, Wang X C, Fu Y P, Liu W Z. Characterization and fine mapping of a novel rice narrow leaf mutant *nal9*. *J Integr Plant Biol*, 2013, 55(11): 1016-1025.
- [6] Jiang H, Li Z, Zeng D L, Gao Z Y, Guo L B, Fang Y X, Zhang G H, Dong G J, Yan M X, Liu J, Qian Q. 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(3): 283-292.
- [7] Li M, Xiong G Y, Li R, Cui J J, Tang D, Zhang B C, Pauly M, Cheng Z K, Zhou Y H. Rice cellulose synthase-like D4 is essential for normal cell-wall biosynthesis and plant growth. *Plant J*, 2009, 60(6): 1055-1069.
- [8] Wu C, Fu Y P, Hu G C, Si H M, Cheng S H, Liu W Z. Isolation and characterization of a rice mutant with narrow and rolled leaves. *Planta*, 2010, 232(2): 313-324.
- [9] Zhao S S, Zhao L, Liu F X, Wu Y Z, Zhu Z F, Sun C Q, Tan L B. *NARROW AND ROLLED LEAF 2* regulates leaf shape, male fertility, and seed size in rice. *J Integr Plant Biol*, 2016, 58(12): 983-996.
- [10] Liu X F, Li M, Liu K, Tang D, Sun M F, Li Y F, Shen Y, Du G J, Cheng Z K. *Semi-Rolled Leaf2* modulates rice leaf rolling by regulating abaxial side cell differentiation. *J Exp Bot*, 2016, 67(8): 2139-2150.
- [11] Ma L, Sang X C, Zhang T, Yu Z Y, Li Y F, Zhao F M, Wang Z W, Wang Y T, Yu P, Wang N, Zhang C W, Ling Y H, Yang Z L, He G H. *ABNORMAL VASCULAR BUNDLES* regulates cell proliferation and procambium cell establishment during aerial organ development in rice. *New Phytol*, 2017, 213(1): 275-286.
- [12] Xu J, Wang L, Zhou M Y, Zeng D L, Hu J, Zhu L, Ren D Y, Dong G J, Gao Z Y, Guo L B, Qian Q, Zhang W Z, Zhang G H. *Narrow albino leaf 1* is allelic to *CHR729*, regulates leaf morphogenesis and development by affecting auxin metabolism in rice. *Plant Growth Regul*, 2017, 82(1): 175-186.
- [13] Ma X D, Ma J, Zhai H H, Xin P Y, Chu J F, Qiao Y L, Han L Z. *CHR729* is a chd3 protein that controls seedling development in rice. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138934.
- [14] Zhang G H, Li S Y, Wang L, Ye W J, Zeng D L, Rao Y C, Peng Y L, Hu J, Yang Y L, Xu J, Ren D Y, Gao Z Y, Zhu L, Dong G J, Hu X M, Yan M X, Guo L B, Li C Y, Qian

- Q. *LSCHLA*, from *japonica* cultivar, which is allelic to *nall*, increases yield of *indica* super rice 93-11. *Mol Plant*, 2014, 7(8): 1350-1364.
- [15] 桑贤春, 林婷婷, 何沛龙, 王晓雯, 廖红香, 张孝波, 马玲, 何光华. 水稻显性窄叶突变体 *Dnall* 的鉴定与基因定位. 中国农业科学, 2014, 47(9): 1819-1827.
Sang X C, Lin T T, He P L, Wang X W, Liao H S, Zhang X B, Ma L, He G H. Identification and gene mapping of a dominant narrow leaf mutant *Dnall* in rice (*Oryza sativa*). *Sci Agric Sin*, 2014, 47(9): 1819-1827. (in Chinses with English abstract)
- [16] 方云霞, 朱丽, 潘江杰, 余海平, 薛大伟, 饶玉春, 王小虎, 石珍源, 张栋, 祝阳舟, 董国军, 曾大力, 张光恒, 郭龙标, 胡江, 钱前. 水稻窄叶突变体 *nall10* 的鉴定与基因精细定位. 中国水稻科学, 2015, 29(6): 587-594.
Fang Y X, Zhu L, Pan J J, Yu H P, Xue D W, Rao Y C, Wang X H, Shi Z Y, Zhang D, Zhu Y Z, Dong G J, Zeng D L, Zhang G H, Guo L B, Hu J, Qian Q. Identification and fine mapping of a narrow leaf mutant *nall10* in rice. *Chin J Rice Sci*, 2015, 29(6): 587-594. (in Chinses with English abstract)
- [17] Kim C M, Park S H, Je B I, Park S H, Park S J, Piao H L, Eun M Y, Dolan L, Han C D. *OsCSLD1*, a cellulose synthase-like *DI* gene, is required for root hair morphogenesis in rice. *Plant Physiol*, 2007, 143(3): 1220-1230.
- [18] Takahisa Y, Kenji S, Naoki S, Akio M, Hirohiko H, Masahiko I, Taketa S. *Root hairless 2 (rth2)* mutant represents a loss-of-function allele of the cellulose synthase-like gene *OsCSLD1* in rice. *Breeding Sci*, 2011, 61(3): 225-233.
- [19] Vanneste S, Friml J. Auxin: A trigger for change in plant development. *Cell*, 2009, 136(6): 1005-1016.
- [20] Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*, 2010, 61: 49-64.