

引用格式:

姚栋萍, 盛文涛, 吴俊, 柏斌, 肖贵, 傅爱斌. 水稻窄叶突变体 *nrl2* 新等位基因的鉴定与功能分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(2): 133–139.

YAO D P, SHENG W T, WU J, BAI B, XIAO G, FU A B. Identification and functional analysis of a new narrow leaf *nrl2*-allele mutant in rice[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(2): 133–139.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



水稻窄叶突变体 *nrl2* 新等位基因的鉴定与功能分析

姚栋萍^{1,2}, 盛文涛³, 吴俊², 柏斌², 肖贵², 傅爱斌^{1*}

(1.湖南生物机电职业技术学院植物科技学院, 湖南 长沙 410127; 2.湖南杂交水稻研究中心杂交水稻国家重点实验室, 湖南 长沙 410125; 3.南昌师范学院生物技术研究院, 江西 南昌 330032)

摘要: 以籼型两系不育系 Y58S 的窄叶突变体 *nrl2(1)* 为试验材料, 对 *nrl2(1)* 突变体材料进行表型、组织学分析, 发现该突变体主要表现为叶片变窄且卷曲, 维管束发育异常, 大、小叶脉数显著减少; 遗传分析结果表明, 该窄叶表型受 1 对隐性核基因控制; 通过基因精细定位, 发现 *NRL2(1)* 定位在第 3 染色体 46 000 bp 区间内; 图位克隆及候选基因验证结果表明该基因是 *NRL2* 的等位基因; 测序比对结果显示, 突变体的第 17 个外显子由碱基 C 变为 T, 对应的氨基酸由谷氨酰胺变为终止密码子, 造成翻译提前终止。以 *nrl2(1)* 为亲本材料, 选育两系不育系, 预期可选育出叶片较窄、株型紧凑、分蘖多的新型两系不育系。

关键词: 水稻; 窄叶; 突变体; 基因克隆; 基因功能分析

中图分类号: S511.035.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)02-0133-07

Identification and functional analysis of a new narrow leaf *nrl2*-allele mutant in rice

YAO Dongping^{1,2}, SHENG Wentao³, WU Jun², BAI Bin², XIAO Gui², FU Aibin^{1*}

(1.College of Plant Science and Technology, Hunan Biological and Electromechanical Polytechnic, Changsha, Hunan 410127, China; 2.State Key Laboratory of Hybrid Rice, Hunan Hybrid Rice Research Center, Changsha, Hunan 410125, China; 3.Department of Biological Technology, Nanchang Normal University, Nanchang, Jiangxi 330032, China)

Abstract: In this study, the *nrl2(1)*, a narrow-leaf mutant of indica two-line sterile line Y58S was used to study the *nrl*-allele function. Compared with the wild type, the mutant showed mainly the characteristics of narrow and curly leaves, abnormal development of vascular bundles and the numbers of large and small veins were significantly reduced. Genetic analysis indicated that the narrow leaf phenotype was regulated by a pair of recessive nuclear genes, and the target gene was further located in the 46 000 bp region of chromosome 3. The results of map cloning and candidate gene verification indicated that the target gene was an allele of *NRL2*. Sequencing comparison results showed that the mutation site was the base C in 17th exon of wild-type changed to T, and the corresponding amino acid changed from glutamine into termination codon, resulting in premature termination of translation. Thus, the novel two-line sterile lines with narrow leaves, compact plant type and more tillers could be bred by using *nrl2(1)* as parent material.

Keywords: rice; narrow leaf; mutant; gene cloning; gene function analysis

叶片是植物进行光合作用最主要的器官。叶片的形态是水稻株型的重要组成部分, 是作物产量的

重要决定因子^[1]。当前主要采取株型改良与杂种优势利用相结合的策略来提高水稻产量。水稻叶片的形

收稿日期: 2022-09-21

修回日期: 2023-04-07

基金项目: 湖南省自然科学基金青年基金项目(2021JJ40393); 湖南省种业创新项目(2021NK1001)

作者简介: 姚栋萍(1984—), 女, 黑龙江大庆人, 博士, 讲师, 主要从事水稻遗传育种研究, yaodongping1218@126.com; *通信作者, 傅爱斌, 硕士, 教授, 主要从事水稻、油菜等植物保护技术研究, 543204285@qq.com

态与受光姿态一直是育种家研究的重要内容。袁隆平在以理想株型模式为基础的超级稻育种中,强调超级稻的倒三叶要“长、直、窄、凹、厚”,充分提高冠层的光能利用能力^[2-3];因此,开展对叶形发育和遗传机理调控的研究,加快水稻株型的改良,对提高水稻产量具有重要的理论意义和应用价值。

窄叶是植物叶片形态的重要性状之一。研究^[4-6]显示,水稻窄叶突变相关基因 *NAL1*、*NAL2*、…、*NAL10* 分别定位在第 4、11、12、4、4、3、3、7、3、1 染色体上(<http://www.ricedata.cn/gene/>),其中 *NAL1*、*NAL2*、*NAL3*、*NAL7* 和 *NAL9* 已经被克隆。

本研究以水稻窄叶突变体 *nrl2(1)* 为材料,对其进行表型、组织学、农艺性状及功能分析,以明确 *NRL2(1)* 基因的生物学功能,旨在为窄叶不育系的分子标记辅助选择和株型优良的两系不育系的选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻窄叶突变体 *nrl2(1)* 是 2013 年由湖南省核农学与航天育种研究所利用 EMS 诱变粳型两系不育系 Y58S 获得。突变体 *nrl2(1)* 与野生型材料 Y58S 杂交获得 F₁ 群体, F₁ 自交构建了 F₂ 群体,用于突变体的遗传分析。同时利用突变体 *nrl2(1)* 与粳稻材料日本晴杂交获得 F₂ 群体,用于基因的精细定位和图位克隆。Y58S、日本晴均由湖南杂交水稻研究中心提供。

1.2 田间表型及农艺性状调查

抽穗期调查 *nrl2(1)* 突变体与野生型 Y58S 的倒 1、倒 2、倒 3 叶的叶宽、叶长,统计倒 1 叶的大叶脉数、小叶脉数和叶片卷曲度。成熟期统计野生型与突变体的株高、单株有效穗数、每穗总粒数、谷粒长与谷粒宽等农艺性状。每个指标的测定设置 10 个生物学重复。

$$R = (L_w - L_n) / L_w \times 100\% \quad (1)$$

式中: *R* 为叶片卷曲度; *L_w* 为叶片最宽处展开后的叶缘间距; *L_n* 为叶片最宽处自然卷曲时的叶缘间距。

1.3 组织学分析

组织切片采用 ZHANG 等^[7]的方法并稍作修改:

分别取 Y58S 和 *nrl2(1)* 突变体剑叶中部 1 cm(包含叶脉)的叶片作为样品,将其置于含有 FAA 固定液(70% 乙醇、40% 甲醛与冰乙酸体积比为 18 : 1 : 1)的 10 mL 离心管中固定过夜,经蒸馏水冲洗、乙醇梯度脱水以及二甲苯透明石蜡浸蜡、包埋、切片染色,中性树脂封片风干后用显微镜观察并拍照。

透射电镜样品的制备和观察:开花期,取野生型 Y58S 和突变体 *nrl2(1)* 剑叶中部,经戊二醛和锇酸固定后将其切成 0.5 cm×1 cm 左右的小块(包含中脉),经丙酮酸脱水、环氧树脂包埋,制作超薄切片,在透射电镜下观察细胞的超微结构。

1.4 水稻 DNA 提取、引物设计及 PCR

采用 CTAB 法^[8]提取 3 个亲本材料野生型 Y58S、日本晴、突变体 *nrl2(1)* 和 F₂ 群体及混池的 DNA。试验所用 SSR 引物序列均通过网站 <http://www.gramene.org/> 查询,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。分析不育系 Y58S 基因组重测序的序列和公开发表的日本晴全基因组序列的数据,采用 Primer Premier 5.0 设计 Indel 和 SNP 引物,交由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。参照郑景生等^[9]的方法进行 PCR 扩增,扩增体系(10 μL): PCR MIX 4.5 μL, 引物 1 μL, DNA 模板 0.5 μL, ddH₂O 4 μL。反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 保温 10 min; 4 °C 保存。反应结束后,用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳检测 PCR 扩增产物。

1.5 目的基因定位与克隆

1.5.1 突变性状的遗传分析

将突变体 *nrl2(1)* 与 Y58S 杂交获得 F₁ 代,田间观察 F₁ 代植株叶片的表型。F₁ 代自交,得到 F₂ 代群体,观察 F₂ 代群体叶片性状的分离情况,并采用卡方检测检验正常表型与突变表型的分离比。

1.5.2 *NRL2(1)* 的精细定位

以 *nrl2(1)* 与日本晴杂交的 F₂ 群体作为定位群体,采用 BSA(bulked segregant analysis)法进行基因的初定位。从 F₂ 中选取 10 株极端窄叶单株,等量提取 DNA 后构建突变基因池;同时随机选取 10 株正常叶构建正常基因池。利用 400 对 SSR 标记(能

平均覆盖全基因组)对 2 个亲本进行多态性分析,再利用具有多态性的引物对基因池进行筛选,寻找与目的基因连锁的多态性标记,最后用这些多态性标记对 192 个 F₂ 隐性单株进行验证。根据筛选的连锁标记的条带类型初步分析目标基因在染色体上的位置,初步定位 *NRL2(1)*。通过 Y58S 基因组重测序的序列与参考基因组日本晴的序列比对,在初定位的区域内加密筛选 InDel 标记,利用 2739 株 F₂ 隐性单株进行目标基因的精细定位。

1.5.3 候选基因的确定

结合水稻基因组注释数据库 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)和 RAP-DB 水稻基因数据库分析精细定位区域的基因,并运用 FGESH、GENESCAN 等工具对该区域进行基因预测及同源性分析,分析所覆盖区域基因的功能,确定候选基因。无法确定目的基因时,则运用 Long-Rang PCR 技术对该区域进行分段扩增,直至完成目标区域全部序列的拼接,再比对突变型和野生型序列,分析序列间的差异,确定候选目的基因。

1.6 候选基因的验证

利用野生型 Y58S 的 *NRL2(1)* 基因及其 35S 启动子序列构建过表达载体并转入突变体材料,分析转基因株系的叶宽和其他形态生理指标。利用 CRISPR/Cas9 技术编辑野生型 Y58S 的 *NRL2(1)* 基因,使其表达沉默,分析突变体植株的叶宽和其他形态生理指标的变化情况。

1.7 窄叶突变体配组的农艺性状分析

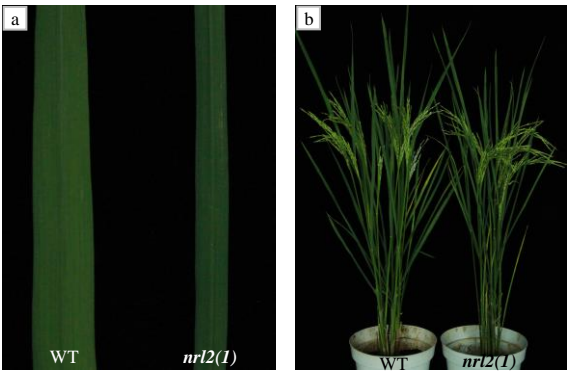
利用恢复系 9311、华扬和突变体 *nrl2(1)* 配组获得杂交组合,分别命名为巧两优 1 号和巧两优华扬。

同时利用 9311、华扬与野生型 Y58S 配组获得杂交组合 Y 两优 1 号和 Y 两优华扬(CK),调查杂交组合的综合产量以及株高、有效穗数、穗长、总粒数、实粒数、结实率等农艺性状。

2 结果与分析

2.1 窄叶突变体 *nrl2(1)* 的形态分析

田间种植条件下,窄叶突变体 *nrl2(1)* 全生育期的叶片宽度均显著小于野生型 Y58S 的,叶片长度无明显变化(图 1)。从表 1 可知,开花期突变体倒 1 叶、倒 2 叶、倒 3 叶的叶片宽度分别为 1.09、0.96、0.80 cm,仅为野生稻品种的 66.5%、77.4%、78.4%,表现为极显著下降。开花期突变体 *nrl2(1)* 倒 1 叶的大叶脉数、小叶脉数分别为 6.85、24.20,显著少于野生型的。开花期突变体 *nrl2(1)* 叶片的长度与野生型的无显著差异,但叶片表现为明显卷曲,卷曲度为 32%。推测 *nrl2(1)* 叶片变窄可能是由于叶脉数量减少引起的。



a 开花期剑叶; b 开花期植株; 左侧为野生型; 右侧为 *nrl2(1)*。

图1 突变体 *nrl2(1)* 和野生型 Y58S 植株的表型

Fig.1 Morphology identification of the mutant *nrl2(1)* and wild type Y58S

表 1 突变体 *nrl2(1)* 和野生型 Y58S 开花期植株的叶片性状

Table 1 Leaf characteristics of the mutant <i>nrl2(1)</i> and the wild type Y58S at the blooming stage									
材料	宽度/cm			长度/cm			倒 1 叶 卷曲度	倒 1 叶 大叶脉数	倒 1 叶 小叶脉数
	倒 1 叶	倒 2 叶	倒 3 叶	倒 1 叶	倒 2 叶	倒 3 叶			
WT	(1.64±0.23)*	(1.24±0.15)*	(1.02±0.08)*	44.45±2.28	42.40±3.21	35.60±1.76	0.00	(9.41±1.18)*	(42.37±2.21)**
<i>nrl2(1)</i>	1.09±0.11	0.96±0.08	0.80±0.11	43.72±3.12	43.63±2.68	39.25±1.45	(0.32±0.08)*	6.85±0.82	24.20±1.78

“*” “**” 分别示同列数据在 0.05、0.01 水平上的差异有统计学意义。

2.2 窄叶突变体 *nrl2(1)* 的农艺性状分析

从表 2 可以看出,在株行距 16.7 cm×20.0 cm 的种植密度下,突变型 *nrl2(1)* 与野生型 Y58S 的株

高、单株有效穗数、每穗总粒数、谷粒长和谷粒宽等农艺性状的差异不显著。

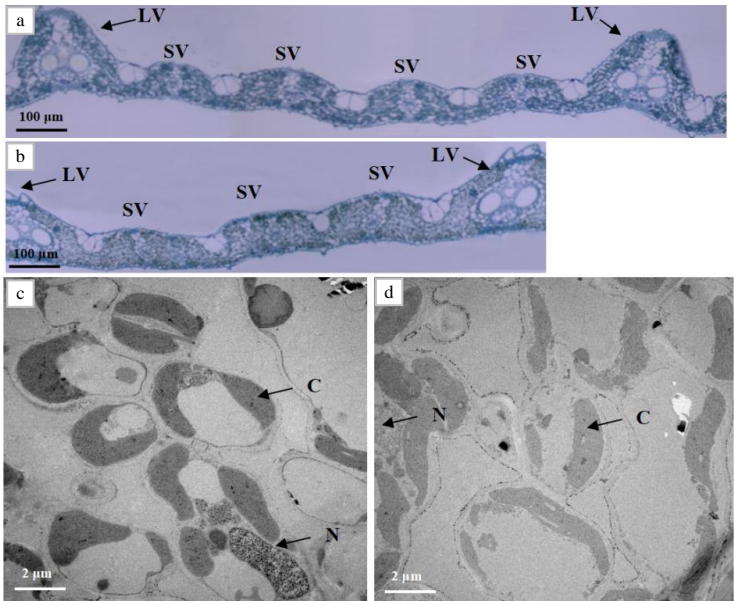
表 2 突变体 *nrl2(1)*与野生型 Y58S 的农艺性状

Table 2 The agronomic traits of the mutant <i>nrl2(1)</i> and the wild type Y58S					
材料	株高/cm	单株有效穗数	每穗总粒数	谷粒长/ mm	谷粒宽/ mm
WT	89.97±5.28	11.08±1.26	146.27±15.37	6.47±0.48	2.09±0.35
<i>nrl2(1)</i>	88.61±4.16	12.33±1.43	132.92±12.86	6.43±0.72	2.10±0.42

2.3 *nrl2-1* 突变体的组织切片分析

组织切片结果(图 2-a、图 2-b)表明, *nrl2(1)*的倒 1 叶至倒 3 叶大叶脉数和小叶脉数均少于野生型的, 并且叶脉的发育均正常。透射电镜(TEM)观察

分析叶肉细胞的生长发育情况, 结果(图 2-c、图 2-d)表明, 突变体 *nrl2(1)*的叶肉细胞发育正常, 细胞大小与野生型相比没有明显差异。



a Y58S的2个大叶脉间; b *nrl2(1)*的2个大叶脉间; c Y58S的叶肉细胞; d *nrl2(1)*的叶肉细胞; LV 大叶脉; SV 小叶脉; C 叶绿体; N 细胞核。

图2 突变体 *nrl2(1)*叶片的横切面以及透射电镜观察结果

Fig.2 Transverse section and TEM observation of leaf of the mutant *nrl2(1)*

2.4 突变体 *nrl2(1)*的遗传分析

突变体 *nrl2(1)*与野生型材料 Y58S 杂交获得了 F₁ 群体, 考察 F₁ 群体的叶片形态, 均表现为野生型的宽叶特征, 表明突变性状受隐性基因调控。F₂ 群体共计 210 株, 表现为宽叶和窄叶 2 种表型, 其中正常单株为 151 株, 窄叶单株为 59 株。经卡方检测, 符合 1 对隐性核基因控制的 3 : 1 分离比例 ($\chi^2=0.402$, 小于 $\chi^2_{0.05(1)}$), 表明该性状受 1 对隐性核基因控制。

2.5 *NRL2(1)*基因的精细定位

选取均匀分布于水稻 12 条染色体上的 400 对 SSR 引物, 筛选出在亲本 *nrl2(1)*与日本晴之间表现多态性的 107 对 SSR 引物。在 F₂ 群体中选取 10 个极端窄叶基因组 DNA, 构成窄叶 DNA 混池, 采用

107 对多态性的 SSR 引物标记进行连锁分析。结果发现, 位于 3 号染色体上的 4 个窄叶 SSR 标记 RM3134、RM14772、RM1284 和 RM282 与窄叶性状存在连锁关系。利用 192 个 F₂ 隐性单株进行验证, 初步将 *NRL2(1)*定位在 RM1284 和 RM282 之间, 遗传距离分别为 2.1 cM 和 8.7 cM。

在此基础上, 将 Y58S 基因组测序的序列与日本晴的序列进行比对, 在标记 RM1284 和 RM282 之间设计 InDel 标记(表 3), 同时利用 2739 个极端窄叶隐性单株进行精细定位, 将 *NRL2(1)*定位在 InDel 标记 NL16 和 NL25 之间, 两者之间的物理距离约 370 000 bp。通过在 NL16 和 NL25 之间设计新的标记, 最终将 *NRL2(1)*基因定位在 InDel 标记 NY28 和 NY31 之间的 46 000 bp 区间内。

表 3 用于 *NRL2(1)* 基因定位的部分分子标记

Table 3 Markers developed for mapping of <i>NRL2(1)</i>		
分析标记	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
RM1284	ACACTCCCCTTTTGTAAGC	CTAGAACTACGGCATTTCG
RM282	CTGTGTCGAAAGGCTGCAC	CAGTCCTGTGTTGCAGCAAG
NL5	CAAAATGCCTATGCACTGCC	GTCTCTGAAAACATCACATGC
NL13	GGAAGGAGGACGTCTGTGC	AATACGTGATAAGGTAAGGG
NL16	AGTGCCCGCTTATCCTATCC	TATACTACGAATCTGAACGG
NL25	TGAGGTGGACACTTGAAGC	GCTTTTATAATAGTTGAGGG
NL38	TGCAGACGCGTAGTAGTGGC	CTTTTCTGTTCTTTTACCG
NL49	CAGCTGGAGAGAGGACAGAG	TATTCCTTCTTTCTCCCGTC
NY3	GTACGACTTCAATGCCAGTACGCAGTT	CACTCTCTTGTGGAGCCTGTGATTTTG
NY6	ACATGAAAAAGATAGAAGTTGAAGAA	ACTGTGATGTCTAGATCAGTCGAGCCG
NY15	CCTTCGCTCGAAACGAGAAGCGGAGG	TTTAAGATAAATGGAATATGCAATGCA
NY17	GGGAGTTGTGGGCGAACTGATTTTCT	CACAGCCACCAGTCATGACCTCATCCT
NY26	TCGATCACGTTTCACAAACA	GGACGACATTTTCCTTTGCT
NY28	TTTCAGATTTGGGCCTTCAG	CCCATCGAGTTGGTCGTAAT
NY31	TCGAACACCTACAACCAGCTT	ACAAGGGTTCATCCAATCCA
NY32	ATGGCCCTAAATCAGAAAACC	CGTCAGCGAAACCGCCCTCC

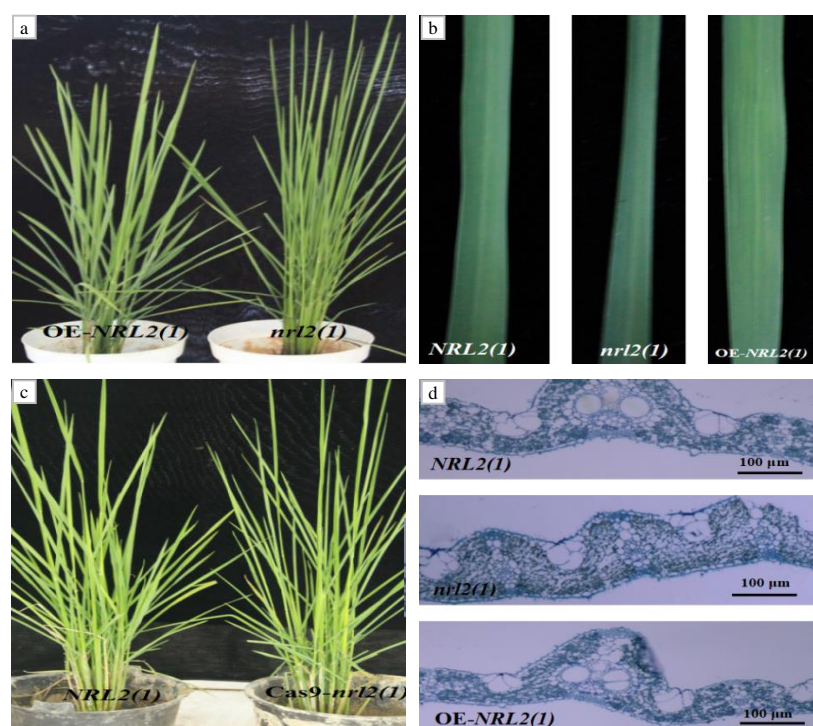
2.6 精细定位区间内候选基因的预测

突变体 *nrl2(1)* 窄叶调控相关基因 *NRL2(1)* 被定位在第 3 染色体短臂 46 000 bp 区域内，水稻基因组注释数据库(<http://rice.plantbiology.msu.edu/>)显示该区间共包含 8 个注释基因。LOC_Os03g19452 编码 SMP-30/葡萄糖酸内酯酶/LRE 结构域蛋白；LOC_Os03g19462 和 LOC_Os03g19490 编码表达蛋白；LOC_Os03g19470 编码未知功能结构域蛋白；LOC_Os03g19480 编码组蛋白 H3K27 甲基转移酶；LOC_Os03g19500、LOC_Os03g19510 分别编码泛素结合酶和叶绿体蛋白酶；LOC_Os03g19520 为半卷曲窄叶基因，包含 *SRL2*、*AVB*、*NRL2* 等 3 个等位基因，它们通过影响叶片远轴面厚壁细胞的发育、维管束发育和小孢子发育等而使水稻叶片变窄且卷曲，穗变小。本研究中的窄叶突变体仅表现为叶片变窄、卷曲，而其他农艺性状无显著改变。进一步对 LOC_Os03g19520 进行基因全长测序，比较野生型 Y58S 重测序序列与突变体 *nrl2(1)* 测序序列，发现在 LOC_Os03g19520 基因的蛋白编码区存在单碱基的改变。基因组 DNA 和 cDNA 之间的序列比较显示，该基因由 20 个外显子和 19 个内含子组成，编码由 988 个氨基酸组成的蛋白质，突变体

nrl2(1) 第 17 个外显子由野生型的碱基 C 变为 T，对应的谷氨酰胺 (Gln) 变为终止密码子，推测 LOC_Os03g19520 为候选基因。该基因是 *NRL2* 基因的 1 个等位基因，暂命名为 *NRL2(1)*。

2.7 候选基因的验证

为了证明 LOC_Os03g19520 基因是否是寻找的目的基因，将构建的包含 LOC_Os03g19520 基因的全长序列和 35S 启动子的过表达载体整合到 pCambia1301 植物表达载体上，农杆菌介导转入 *nrl2(1)* 突变体愈伤组织，组织培养分化后获得转基因植株。对 T₀ 转基因植株进行 GUS 染色，检测到 24 株转基因植株，13 株阳性植株 (OE-*NRL2(1)*)。将转基因阳性植株栽种到钵钵中，观察植株表型，发现突变体表型得到恢复(图 3)。由 T₀ 代自交获得的 T₁ 代性状出现分离，进一步证明了 T₀ 代表型恢复是由互补载体造成的。利用 CRISPR/Cas9 技术编辑了野生型 Y58S 的 LOC_Os03g19520 基因，结果显示：与野生型相比，12 株转基因植株 (Cas9-*NRL2(1)*) LOC_Os03g19520 转录本显著下调，表现出与 *nrl2(1)* 突变体相似的窄卷叶表型。2 个遗传转化试验均表明 LOC_Os03g19520 是 *NRL2(1)* 基因，即 *NRL2* 的 1 个新等位基因。



a *nrl2(1)*突变体和和在*nrl2(1)*背景下过表达LOC_Os03g19520的转基因株系OE-NRL2(1)的植株表型; b 野生型NRL2(1)(左)、*nrl2(1)*突变体(中间)和OE-NRL2(1)(右)的叶片形态; c 野生型植株(NRL2(1))和在野生型背景下LOC_Os03g19520表达下调的转基因株系(Cas9-*nrl2(1)*); d 野生型NRL2(1)(上)、突变体*nrl2(1)*(中)、OE-NRL2(1)(下)叶脉的横切面。

图 3 野生型 Y58S 与突变体 *nrl2(1)*候选基因的遗传转化结果

Fig.3 Genetic transformation result of the candidate genes of wild-type and mutant *nrl2(1)*

2.8 窄叶突变体配组品种的农艺性状表现

观察 4 个杂交组合(Y 两优 1 号、巧两优 1 号、Y 两优华扬、巧两优华扬)的农艺性状,发现所有杂交组合的叶片宽度与野生型 Y58S 的一致,且抗性较好,田间未出现稻瘟病、飞虱和白叶枯等病虫害。

从表 4 可知,与对照 Y 两优 1 号相比,巧两优 1 号的有效穗数增加,穗长、每穗总粒数、每穗实粒数下降,总体产量略有增加。与对照 Y 两优华扬相比,巧两优华扬的有效穗数、每穗总粒数、千粒质量等产量指标均无明显差异。

表 4 水稻窄叶突变体配组品种的农艺性状

Table 4 Agronomic traits of the varieties obtained by narrow-leaf mutants as maternal parent											
组合名称	基本苗/ (万 hm ⁻²)	总苗数/ (万 hm ⁻²)	有效穗数/ (万 hm ⁻²)	生育期/d	产量/ (t hm ⁻²)	株高/cm	穗长/cm	每穗总 粒数	每穗实 粒数	结实率/%	千粒 质量/g
Y 两优 1 号	67.5	450.0	207.0	135.0	8.6	129.5	28.9	194.7	167.2	85.9	27.3
巧两优 1 号	72.0	493.5	247.5	133.8	8.8	124.0	22.9	175.4	142.1	81.0	26.2
Y 两优华扬	66.0	516.0	334.5	125.3	7.8	100.5	24.1	128.9	109.5	84.9	24.3
巧两优华扬	67.5	534.0	327.0	122.7	7.3	96.2	22.0	135.9	99.2	73.0	24.1

3 结论与讨论

本研究中,笔者对窄叶突变体 *nrl2(1)*进行了表型分析,发现该突变体叶片变窄且卷曲,而株高、单株有效穗数、每穗总粒数等农艺性状与野生型 Y58S 的没有显著差异。遗传分析表明该窄叶性状受 1 对隐性基因控制。通过图位克隆方法,将 *NRL2(1)*精细定位在第 3 染色体 NY28 和 NY31 之间的 46 000 bp 区间内;该区间共有 8 个注释基因,

对候选基因进行测序、过表达和基因编辑等分析,发现目的基因是 *NRL2* 基因的等位基因。在突变体 *nrl2(1)*的第 17 个外显子中,野生型的碱基 C 变为 T,对应的谷氨酰胺 Gln 变为终止密码子。推测 *NRL2(1)*基因的突变造成叶片维管束发育异常,出现窄卷叶性状。

叶片的发育由叶原基开始,经近-远轴、基-顶轴与中-侧轴 3 个方向发育成完整的叶片,叶片的宽窄与中-侧轴的发育有关^[10-11]。本研究中,石蜡

切片和透射电镜观察结果显示, *nrl2(1)* 叶片变窄, 推测可能是叶片叶脉数减少、维管束发育不完全所致^[12-13]。本研究克隆的 *NRL2(1)* 基因是第 3 号染色体的 LOC_Os03g19520 基因, 该位点已报道的 3 个等位基因分别为 *NRL2*、*SRL2*、*AVB* 基因^[14-16]。*srl2* 中 LOC_Os03g19520 的第 15 个外显子有 1 个 T 碱基缺失, 导致翻译提前终止^[14]; *avb* 中 LOC_Os03g19520 的编码区发生了碱基的替换, C 碱基变为 T 碱基, 对应的密码子由精氨酸密码子改变为终止密码子, 导致翻译提前终止^[15]。*nrl2* 中 LOC_Os03g19520 基因的第 9 个外显子有 1 个 G 碱基缺失, 导致翻译提前终止^[16]。ZOU 等^[17]研究认为, 叶片的性状主要与球状细胞、厚壁细胞、叶肉细胞和维管束细胞的数量、大小和形态有关。*AVB* 基因在水稻 SAM 叶启动部位高表达, *avb* 突变体造成侧生器官原基细胞分裂受阻, 导致细胞数量减少、地上部器官变小, 同时原形成层细胞分化受到影响, 维管束细胞合成受阻, 导致维管束数量减少, 叶片变窄^[15]。*srl2* 突变体叶片变窄、变矮主要与节间细胞数量和维管束细胞数量减少有关^[14]。本研究中, *nrl2(1)* 突变体的表型不同于 *nrl2* 突变体, *nrl2(1)* 突变体只表现为叶片变窄且卷曲, 并未发现其他农艺性状的显著改变, 可作为育种的亲本或者中间材料予以利用。

鉴于当前两系不育系的选育相对滞后, 生产上常用的两系不育系多为 10 年前选育的材料; 因此, 新型两系不育系选育是当前两系育种的热点和突破点^[18]。本研究中, 利用突变体配组获得的巧两优 1 号的穗长、每穗总粒数、每穗实粒数虽然有所下降, 但有效穗数增加, 总体产量略有增加。巧两优华扬的有效穗数、每穗总粒数等产量指标均无明显变化; 因此, 可以 *nrl2(1)* 为亲本材料, 开发相应的功能分子标记, 利用 MAS 选育两系不育系, 优化不育系的株型结构, 可期选育出叶片较窄、株型紧凑、分蘖多的两系不育系。

参考文献:

- [1] VANHAEREN H, INZÉ D, GONZALEZ N. Plant growth beyond limits[J]. Trends in Plant Science, 2016, 21(2): 102–109.
- [2] 袁隆平. 超级杂交水稻育种研究的进展[J]. 中国稻米, 2008, 14(1): 1–3.
- [3] 胡娟, 林晗, 徐娜, 等. 水稻叶倾角分子机制及育种应用的研究进展[J]. 中国水稻科学, 2019, 33(5): 391–400.
- [4] CHO S H, YOO S C, ZHANG H T, et al. Rice *NARROW LEAF1* regulates leaf and adventitious root development[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2014, 32(1): 270–281.
- [5] CHEN M L, LUO J, SHAO G N, et al. Fine mapping of a major QTL for flag leaf width in rice, *qFLW4*, which might be caused by alternative splicing of *NALI*[J]. Plant Cell Reports, 2012, 31(5): 863–872.
- [6] FUJINO K, MATSUDA Y, OZAWA K, et al. *NARROW LEAF 7* controls leaf shape mediated by auxin in rice[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2008, 279(5): 499–507.
- [7] ZHANG G H, LI S Y, WANG L, et al. *LSCHL4* from japonica cultivar, which is allelic to *NALI*, increases yield of indica super rice 93-11[J]. Molecular Plant, 2014, 7(8): 1350–1364.
- [8] 赵红霞, 谢攀, 黄志坚, 等. 一种改良的水稻总 DNA 提取方法[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2006, 28(4): 389–392.
- [9] 郑景生, 吕蓓. PCR 技术及实用方法[J]. 分子植物育种, 2003, 1(3): 381–394.
- [10] 崔晓峰, 黄海. 叶发育的遗传调控机理研究进展[J]. 植物生理学报, 2011, 47(7): 631–640.
- [11] 汪虎. 黄瓜 *WUSCHEL*-related homeobox1 调控叶片形态的机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- [12] QI J, QIAN Q, BU Q Y, et al. Mutation of the rice *narrow leaf1* gene, which encodes a novel protein, affects vein patterning and polar auxin transport[J]. Plant Physiology, 2008, 147(4): 1947–1959.
- [13] CHO S H, YOO S C, ZHANG H T, et al. The rice *narrow leaf2* and *narrow leaf3* loci encode *WUSCHEL*-related homeobox 3A(*OsWOX3A*) and function in leaf, spikelet, tiller and lateral root development[J]. New Phytologist, 2013, 198(4): 1071–1084.
- [14] LIU X F, LI M, LIU K, et al. *Semi-Rolled Leaf2* modulates rice leaf rolling by regulating abaxial side cell differentiation[J]. Journal of Experimental Botany, 2016, 67(8): 2139–2150.
- [15] MA L, SANG X C, ZHANG T, et al. *ABNORMAL VASCULAR BUNDLES* regulates cell proliferation and procambium cell establishment during aerial organ development in rice[J]. New Phytologist, 2017, 213(1): 275–286.
- [16] ZHAO S S, ZHAO L, LIU F X, et al. *NARROW AND ROLLED LEAF2* regulates leaf shape, male fertility, and seed size in rice[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2016, 58(12): 983–996.
- [17] ZOU L P, ZHANG Z G, QI D F, et al. Cytological mechanisms of leaf rolling in rice[J]. Crop Science, 2014, 54(1): 198–209.
- [18] 段敏, 谢留杰, 黄善军, 等. 水稻籼型不育系选育研究进展[J]. 中国稻米, 2016, 22(3): 25–29.

责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳 正