

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00423

水稻卷叶基因 RL_{13} 的遗传分析和分子定位

田晓庆 桑贤春 赵芳明 李云峰 凌英华 杨正林 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重点实验室 / 南方山地农业教育部工程研究中心, 重庆 400715

摘 要: 叶片形态是理想株型的重要指标之一, 叶片适度卷曲有利于理想株型的建成, 是水稻超高产育种的重要材料。在 EMS 诱变籼稻缙恢 10 号群体中发现一个卷叶突变体, 表现叶片筒状卷曲, 经过多代连续自交, 性状稳定, 命名为 rl_{13} (rolled leaf 13)。 rl_{13} 的叶绿素 a、叶绿素 b 和总叶绿素含量均显著高于野生型对照缙恢 10 号, 类胡萝卜素含量在苗期、孕穗期与野生型相比有显著提高, 而抽穗期和成熟期则差异不显著。 rl_{13} 的三片功能叶的卷曲度与野生型相比均达到极显著差异, 但 rl_{13} 的三片功能叶之间差异不显著。通过石蜡切片分析, 突变体叶肉细胞层数变薄, 野生型含有的一个较大泡状细胞转变为卷叶突变体的 2 个大小相近的泡状细胞, 导致了叶片弯曲。以该突变体为父本, 西农 1A 为母本配制杂交组合构建 F_2 遗传群体, 结果表明, 该卷叶性状由一对隐性核基因控制。选用 F_2 代分离群体中的 1 215 个隐性单株作为定位群体, 将 RL_{13} 定位在第 6 染色体短臂上分子标记 RM276 和 SWU6-1 之间, 遗传距离分别为 1.1 cM 和 0.2 cM。

关键词: 水稻 (*Oryza sativa* L.); 卷叶突变体 rl_{13} ; 遗传分析; 分子定位

Genetic Analysis and Molecular Mapping of a Rolled Leaf Gene RL_{13} in Rice (*Oryza sativa* L.)

TIAN Xiao-Qing, SANG Xian-Chun, ZHAO Fang-Ming, LI Yun-Feng, LING Ying-Hua, YANG Zheng-Lin, and HE Guang-Hua*

Rice Research Institute of Southwest University / Chongqing Key Laboratory of Application and Safety Control of Genetically Modified Crops / Engineering Research Center of South Upland Agriculture, Ministry of Education, Chongqing 407145, China

Abstract: Rolled leaf mutants are good materials rice in breeding for leaf and plant type. A rolled leaf mutant rl_{13} was derived from an EMS-treated mutation in an *indica* line (Jinhui 10). The chlorophyll content of rl_{13} was significantly higher than that of wild type Jinhui 10. There was a highly significant difference in the curl of the three functional mutant leaves compared with those with wild-type. However, there were no significant differences between the three functional mutants. Through the analysis of paraffin, mesophyll cells per layer in rl_{13} thinned, wild-type cells contain a large bubble into two similar size vesicular cells of mutants, which resulted in the character of rolled leaf. We made the combination of Xinong 1A/ rl_{13} to establish genetic population for genetic analysis, the results confirmed that the mutant trait was controlled by a single recessive nuclear gene. In the F_2 , the gene of the rolled leaf trait was mapped between two SSR markers, RM276 and SWU6-1, with distances of 1.1 cM and 0.2 cM, respectively.

Keywords: Rice (*Oryza sativa* L.); Rolled leaf mutant; Genetic analysis; Molecular mapping

水稻株型改良是提高水稻产量的重要途径之一, 多数研究认为叶片的适度卷曲能使其保持直立而不过分披垂, 改善群体内部透光状况, 有利于群体与个体的协调发展而获得高产^[1]。而且卷叶群体的叶绿素含量显著高于正常群体, 叶片衰老缓慢, 在育

种上具有重要应用价值, 并取得了理想的效果^[2-4]。

水稻叶片发生卷曲, 一是由遗传基因直接控制, 性状能够遗传; 另一种是由环境胁迫所引起, 如生理性缺水, 属于不能遗传的卷叶性状。通常遗传性卷叶表型稳定, 植株一生中各叶片或上部几张叶片

本研究由重庆市重大攻关项目(CSTC, 2010AA1019)和国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-109B)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 何光华, E-mail: hegh@swu.edu.cn

Received(收稿日期): 2011-07-13; Accepted(接受日期): 2011-10-15; Published online(网络出版日期): 2012-01-04.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120104.1651.014.html>

均表现卷叶,只是不同发育时期的叶片卷曲程度不同而已,而逆境卷叶是在特定的外界条件诱导下产生的,是可逆的、不遗传的^[5]。目前在水稻经典遗传图谱上标定有6个控制卷叶的隐性基因 *rl1*、*rl2*、*rl3*、*rl4*、*rl5* 和 *rl6*,利用分子标记定位的水稻卷叶突变基因有9个,其中有2个卷叶基因已被克隆^[6-7]。

叶片的发育是一个复杂而多级的过程,叶片发生卷曲与叶片的近轴/远轴面的极性发育异常有关,编码 HD-ZIP III 蛋白家族的基因往往控制近轴/远轴面的发育^[8]。Luo 等^[9]推测 *RL9* 可能是 MYB 家族,该基因也与拟南芥中 *KANADI* 基因同源。Yan 等^[10]通过图位克隆方法分离了控制水稻叶片背腹极命运的 *RL9* 基因,该基因编码一个核定位的 GARP 蛋白,与拟南芥的 *KANADI* 基因有较高的同源性。Zhang 等^[7]预测 *SLL1* 编码了一个 *SHAQKYF* 类的 MYB-DNA 结合域的转录因子,通过调控远轴面厚壁组织的程序化死亡,来调控植株叶片的形状。Shi 等^[6]用 T-DNA 转化中花 11 水稻群体,获得一个显性卷叶突变体 R05,将控制该卷叶性状的基因 *OSAG07* 克隆,该基因编码一个包含 1 048 个氨基酸的蛋白质,其中包括 PAZ 和 PIWI 的保守区域,发现 *OSAG07* 是拟南芥 *AG07* 的同源基因,并且属于 AGO 家族,过表达 *OSAG07A* 能使叶片向上卷曲从而保持叶片直立。近年研究发现 miRNA 在植物叶片的发育过程中也到十分重要的作用,是调控叶片近轴/远轴发育的基因。邵元健等^[5]通过同源基因的预测和分析,在水稻 *rl(t)* 基因精细定位区间内发现了一个 AGO 蛋白家族成员的编码基因,推测其可能参与 miRNA 系统对叶片的发育调控。

我们在 EMS 诱变籼稻缙恢 10 号群体中发现了一个卷叶突变体 *rl₁₃* (*rolled leaf 13*),其整个生育期叶片呈筒状卷曲,对该突变体的形态特征、叶绿素和类胡萝卜素含量、叶片卷曲度及遗传特性进行了研究,并利用 SSR 标记技术对其进行了分子图谱定位,以期为该基因的图位克隆和功能分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

经 EMS 诱变籼稻缙恢 10 号种子获得突变体 *rl₁₃*,连续多代自交种植,突变性状稳定遗传。遗传分析和基因定位所用的西农 1A 由西南大学选育,全生育期叶片均表现平展。

1.2 遗传分析和定位群体构建

2007 年夏在西南大学水稻研究所配制西农 1A/*rl₁₃* 杂交组合,2007 年秋于海南种植 F_1 ,获得 F_2 代种子。2008 年夏在西南大学水稻研究所种植 F_2 代。抽穗时调查每个单株叶型,利用隐性卷叶单株作为基因定位群体。

1.3 叶绿素和类胡萝卜素含量测定

在苗期、孕穗期、抽穗期和成熟期按照 Reich^[11]的方法分别测定突变体和野生型对照缙恢 10 号叶片的叶绿素和类胡萝卜素含量。

1.4 叶片卷曲度测量

在抽穗期分别测量突变体和野生型对照的剑叶、倒二叶、倒三叶,随机选取 10 个单株,测量其卷曲度(RLI)^[12],取平均值。 $RLI = (L_w - L_n)/L_w \times 100\%$,其中, L_w 为叶片最宽处展开后叶缘间距, L_n 为叶片最宽处自然卷曲状态下叶缘间距。

1.5 细胞学分析

于分蘖期分别取突变体 *rl₁₃* 和野生型叶片的相同部位,固定于福尔马林溶液 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,在 NIKON E6000 显微镜下观察并拍照^[7]。

1.6 DNA 提取和 PCR 反应

于苗期选取幼嫩的叶片按 CTAB 法提取亲本和基因池 DNA^[13],按碱煮法提取单株 DNA^[14]。参照 Panaud 等^[15]的方法,稍做改动,PCR 体系为 25 μL ,含 10 \times PCR buffer 2.5 μL , 25 mmol L^{-1} MgCl_2 1.3 μL , 2.5 mmol L^{-1} dNTPs 1.0 μL , ddH₂O 16.0 μL , 10 μmol L^{-1} 引物 2.0 μL , 模板 DNA 2.0 μL , 5 U μL^{-1} *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL 。PCR 程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环;最后再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,快速银染后观察。

1.7 遗传作图

将具有突变体 *rl₁₃* 亲本带型的单株记为 B,具有西农 1A 亲本带型的单株记为 A,具有 F_1 带型的单株记为 H,用 Mapmaker3.0 进行数据分析和作图^[16]。

2 结果与分析

2.1 *rl₁₃* 的形态特征

rl₁₃ 卷叶突变体从苗期到成熟期叶片均呈现筒状卷曲,在整个生长期,突变体植株比野生型对照的植株直挺(图 1)。突变体剑叶、倒二叶、倒三叶的

卷曲度分别为 1.39、1.38、1.32, 与野生型的 3 片功能叶相比均达到极显著差异, 突变体的剑叶、倒二叶、倒三叶卷曲度之间则差异不显著, 说明该突变体表现为整株卷曲。石蜡切片结果表明, 卷叶突变

体 *rl13* 与野生型相比, 叶肉细胞层数少, 野生型含有的较大泡状细胞转变为卷叶突变体 *rl13* 的 2 个大小相近的泡状细胞(图 1-d, e 箭头所示), 导致叶片弯曲。

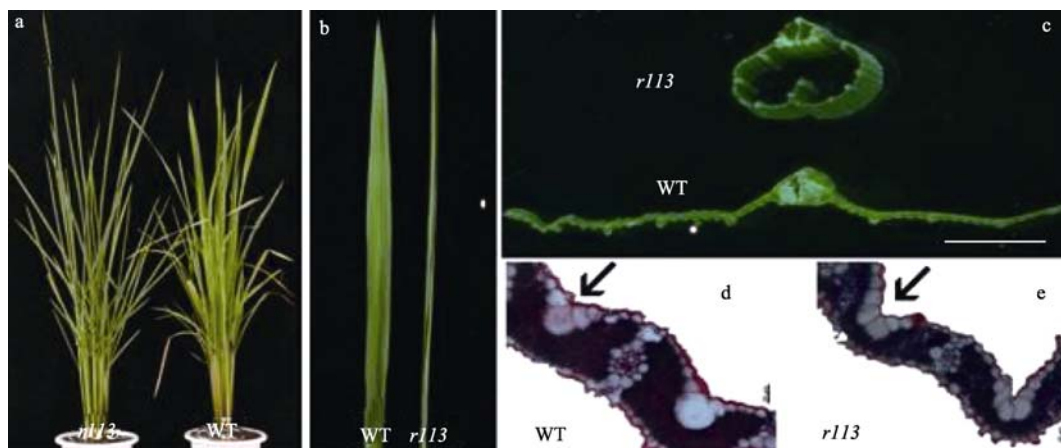


图 1 突变体和野生型叶片形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of mutant and WT

a: 植株; b: 叶片; c: 叶片横切面(bar=2 mm); d: 野生型分蘖期叶片横切面($\times 40$, bar=25 μm);

e: *rl13* 分蘖期叶片横切面($\times 40$, bar=25 μm)。

a: whole plant; b: leaf; c: cross-section of leaf (bar=2 mm); d: cross-section of leaf of WT during tillering stage ($\times 40$, bar=25 μm);

e: cross-section of leaf of *rl13* during tillering stage ($\times 40$, bar=25 μm)。

2.2 *rl13* 的叶绿素和类胡萝卜素含量

一般, 叶片卷曲后可提高叶绿素含量。苗期、孕穗期、抽穗期和成熟期卷叶突变体的叶绿素含量(叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量、叶绿素总含量)均显著高于野生型对照, 这有利于提高光合效率和合成更多的光合物质。类胡萝卜素含量在苗期、孕穗期与野生型相比有显著提高, 而抽穗期和成熟期则差异不显著(图 2)。

2.3 遗传分析

西农 1A/*rl13* 的 F_1 所有叶片在全生育期均表现平展而不卷曲, F_2 群体单株间出现分离, 表现卷叶和平展叶两种情况, 其中平展叶 3 705 株, 卷叶 1 215 株, 经 χ^2 测验符合 3 : 1 的分离比例($\chi^2 = 0.228 < \chi^2_{0.05} = 3.84$), 表明该卷叶性状受一对隐性核基因控制。

2.4 *rl13* 的分子图谱定位

用西农 1A/*rl13* 的 F_2 群体作为定位群体, 共获得 1 215 个突变单株。利用 400 对 SSR 引物对两亲本进行多态性筛选, 其中在两亲本间表现多态性的标记有 72 个。用这 72 对 SSR 引物对卷叶基因池和平展叶基因池进行分析, 发现第 6 染色体上的标记 RM587、RM5531 在基因池间表现多态性, 进一步利用 10 株卷叶株和 10 株平展叶株进行连锁分析, 结果表明两标记均与卷叶基因连锁。利用 RM587 和

RM5531 对 1 215 个隐性群体进行连锁分析, 遗传距离分别为 6.3 cM 和 13.4 cM。在两标记间设计了 50 对引物, 发现 RM19573、RM276 和 SWU6-1 (P1: 5'-CCCACAAGTCATTCTAAGGTCC-3', P2: 5'-CAACGTCTCGTGACCACATT-3')在亲本间存在多态性(图 3), 进一步分析卷叶群体, 分别获得 56、26 和 5 个交换株, RM276 的交换株都包含在 RM587 的交换株中, 且与 SWU6-1 的交换株没有重复, 最终将该卷叶基因定位于 RM276 与 SWU6-1 之间, 遗传距离分别为 1.1 cM 和 0.2 cM (图 4), 物理距离为 560 kb, 其中有 120 个注释基因。为卷叶基因 *rl13* 的分子标记辅助育种、精细定位和图位克隆奠定了基础。

3 讨论

叶片是水稻光合作用的重要场所, 是塑造理想株型的重要性状之一, 卷叶为异型叶中的一种, 其最直接的效应是增加叶片的承重力和直立程度, 减少叶片间的遮蔽, 有利于增加群体的光能利用率^[17]。生长中后期叶面积群体较大时, 卷叶品种的叶片衰老程度小于展叶品种, 在光能利用上有明显的优势, 后期干物质增长多, 有利于提高经济系数。在本研究中, 各个时期卷叶突变体的叶绿素含量均高于野生型对照, 而且均表现显著差异, 与前人的

研究结果一致^[9]。朱德峰等^[4]研究认为上部叶片特别是剑叶有一定的卷曲度,可以提高叶片的挺直度,同时减少对下部叶片的遮阴,郎有忠等^[18]研究结果表明,当卷曲度增至 1.5 后,其对披垂的减轻效应已

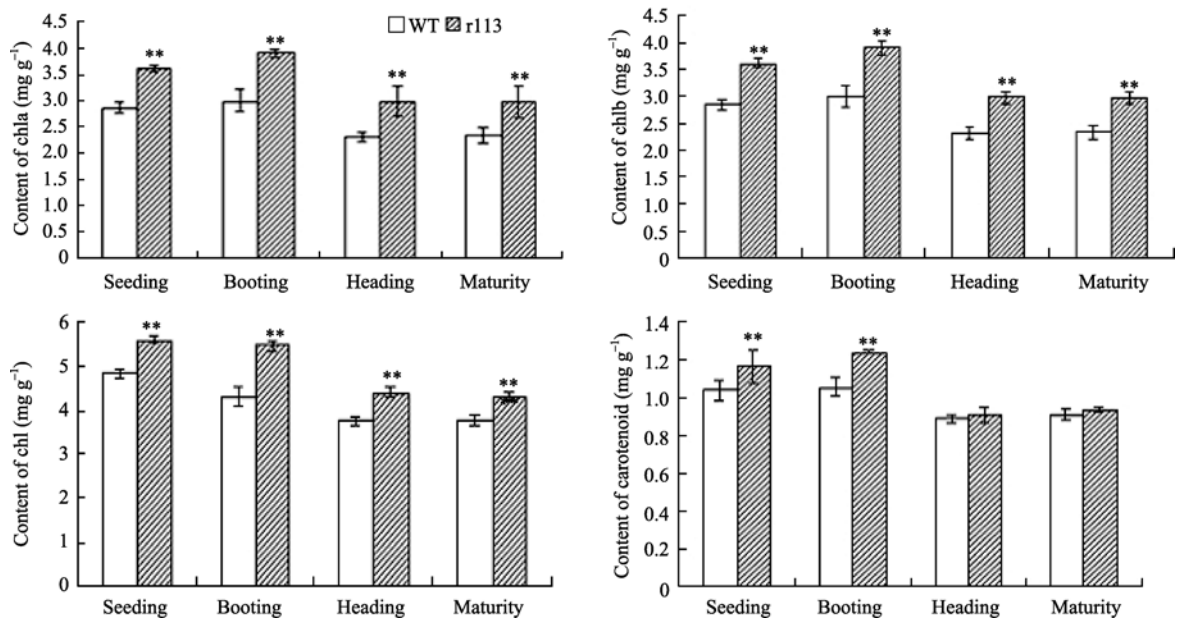


图 2 不同生长时期野生型(WT)和卷叶突变体(*rl₁₃*)的叶绿素和类胡萝卜素含量
Fig. 2 Chlorophyll and carotenoid contents between mutant and WT at different growth stage
**表示差异达到 1% 的显著水平。 ** Represent the 1% differential level.

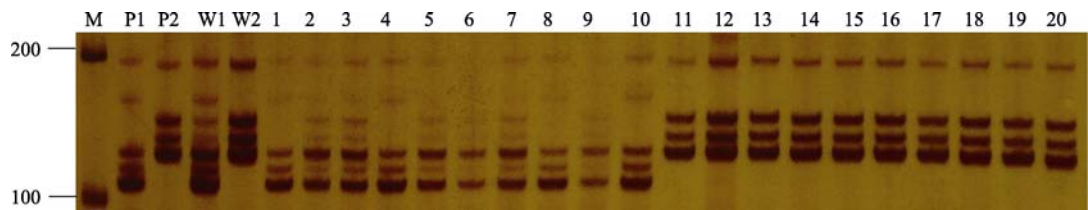


图 3 SSR 标记 SWU6-1 与突变位点连锁验证
Fig. 3 Linkage analysis between SSR marker SWU6-1 and *RL₁₃* locus

P1: 西农 1A; P2: *rl₁₃*; W1: 正常池; W2: 突变池; 1~10: *F₂* 群体中正常单株; 11~20: *F₂* 群体中突变单株。
M: marker; P1: Xinong 1A; P2: *rl₁₃*; W1: the normal gene pool; W2: the mutant gene pool; 1~10: the normal plants in *F₂* population; 11~20: the mutant plants in *F₂* population.

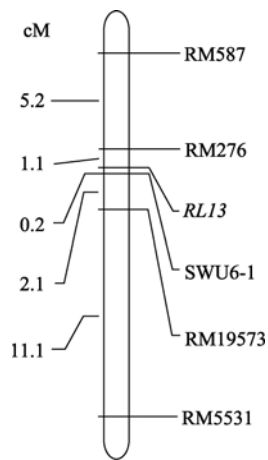


图 4 *RL₁₃* 在第 6 染色体上定位结果
Fig. 4 Mapping of *RL₁₃* gene on chromosome 6

达极致,进一步增大卷曲率,只会减少叶片受光面积,因此,在卷曲度利用上,应以 1.5 以下一个很小的范围为宜,其产量等表现优异,卷叶组合较展叶组合最高产量高约 3%。*rl₁₃* 突变体剑叶、倒二叶、倒三叶的卷曲度分别为 1.39、1.38、1.32,卷曲度符合此规律。

到目前为止,在水稻经典遗传图谱上标定了 *rl1*、*rl2*、*rl3*、*rl4*、*rl5* 和 *rl6* 等 6 个控制卷叶性状的隐性基因,它们分别位于第 1、第 4、第 12、第 1、第 3 和第 7 染色体上^[19,20],定位于分子遗传图谱上的卷叶基因有 11 个,其中 *url1(t)*^[21]、*rl7*^[22]、*rl8*^[5]、*rl9*^[23]、*rl10*^[9]、*nrl2(t)*^[24]、*RL12(t)*^[25] 分别位于第 1、第 5、第 5、第 9、第 9、第 10 和第 3 染色体上。表

现一因多效的基因有 *sd-sl* 和 *nal3(t)*。*sd-sl* 主要表型为植株较矮且叶片短而微卷, 被定位在第 6 染色体 InDel 标记 XL6-6 和 XL6-1 之间^[26]。*nal3(t)* 主要控制窄叶, 同时也控制内卷和矮化等性状, 定位在第 12 染色体 SSR 标记 RM7018 和 RM3331 之间^[27]。罗远章等^[25]利用 SSR 标记将 *RL12(t)* 基因定位于第 10 染色体 SWU-1 和 SWU-2 之间, 遗传距离分别是 1.5 cM 和 0.2 cM, *RL12(t)* 是唯一在第 10 染色体被分子定位的显性卷叶主基因。王德仲等^[24]从籼稻恢复系缙恢 10 号的 EMS 突变体库中发现 1 个水稻新型细卷叶突变体 *nrl2(t)*, 利用 SSR 标记将该基因定位于第 3 染色体 SSR 标记 s3RM1 和 s3RM3 之间, 物理距离约为 114 kb。另外, 采用 QTL 定位方式还检测出几个卷叶 QTL, 李仕贵等^[22]将籼粳交组合窄叶 8 号/京系 17 的 DH 中的卷叶基因 *rl7* 定位在第 5 染色体 RFLP 标记 RG13 和 RG573 之间。邵元建等^[5]在第 5 染色体长臂上 RM6954–RM6841 区间内定位到 1 个隐性卷叶的主效 QTL, 定名为 *rl8*。在本研究中, *rl₁₃* 与多数卷叶性状一样表现为隐性单基因遗传, 通过分子定位将其定位在第 6 染色体的短臂 SSR 标记 RM276 和 SWU6-1 之间, 物理距离为 560 kb, 其中有 120 个注释基因。目前在第 6 染色体上只发现 1 个卷叶基因 *sd-sl*, 但它的表现与 *rl₁₃* 明显不同, *sd-sl* 表现一因多效, 表现叶片短而微卷, 而 *rl₁₃* 只表现卷曲, 未发现一因多效现象, 二者染色体定位区段也不同, *sd-sl* 定位在第 6 染色体长臂 XL626 和 XL621 之间, 两标记分别位于 PAC 克隆 AP003490 和 AP005619 上^[26], 而 *RL₁₃* 定位在第 6 染色体的短臂 SSR 标记 RM276 和 SWU6-1 之间, 表明 *RL₁₃* 是一个尚未报道的新基因。

植物叶片发育是一个复杂的过程, 要得出水稻叶片内卷发育现象的正确解释, 还需进一步对突变体叶片发育的早期阶段进行扫描电镜观察、克隆基因, 并对基因的结构和功能进行研究。基因的精细定位是图位克隆最为重要的一步, 利用分子标记和遗传图谱是跟踪、定位和克隆相关基因的一种有效方法。本研究将该卷叶基因定位于 RM276 与 SWU6-1 之间, 遗传距离分别为 1.1 cM 和 0.2 cM, 物理距离为 560 kb, 在定位区间中没有发现 miRNA 基因, 也没有发现与叶片近轴化/远轴化发育相关的编码 HD-ZIP III 转录因子的基因以及 AGO 蛋白的同源基因, 这暗示着 *RL₁₃* 可能有不同的卷曲机理, 当然, 要揭示真相还需要进一步基因克隆及功能分析,

这一工作正在进行之中。

4 结论

通过 EMS 诱变籼稻缙恢 10 号得到一个卷叶突变体, 表现整株卷曲; 各个发育时期卷叶突变体的叶绿素含量均显著高于野生型对照; 卷叶性状受一对隐性核基因控制; 将 *RL₁₃* 定位在第 6 染色体短臂上分子标记 RM276 和 SWU6-1 之间, 遗传距离分别为 1.1 cM 和 0.2 cM, 物理距离为 560 kb。

References

- [1] Yuan L-P(袁隆平). Breeding for super for high-yielding in hybrid rice. *Hybrid Rice* (杂交水稻), 1997, 12(6): 1–3 (in Chinese with English abstract)
- [2] Chen W-F(陈温福), Xu Z-J(徐正进), Zhang W-Z(张文忠), Zhang L-B(张龙步), Yang S-R(杨守仁). Creation of new plant type and breeding rice for super high yield. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2001, 27(5): 665–667 (in Chinese with English abstract)
- [3] Chen Z-X(陈宗祥), Chen G(陈刚), Hu J(胡俊), Dai L-C(戴留春), Tao G-Y(陶国英), Pan X-B(潘学彪). Genetic expression and effects of rolled leaf gene *RL(t)* in hybrid rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2002, 28(6): 847–851 (in Chinese with English abstract)
- [4] Zhu D-F(朱德峰), Lin X-Q(林贤青). Comparison of leaf photosynthetic characteristics among rice hybrids with different leaf rolling index. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2001, 27(3): 329–333 (in Chinese with English abstract)
- [5] Shao Y-J(邵元健), Chen Z-X(陈宗祥), Zhang Y-F(张亚芳), Chen E-H(陈恩会), Qi X-C(祁顶成), Miao J(缪进), Pan X-B(潘学彪). One major QTL mapping and physical map construction for rolled leaf in rice. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2005, 32(5): 501–506 (in Chinese with English abstract)
- [6] Shi Z Y, Wang J, Wan X, Shen G, Wang X, Zhang J. Over-expression of rice *OsAGO7* gene induces upward curling of the leaf blade that enhanced erect-leaf habit. *Planta*, 2007, 226: 99–108
- [7] 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: 719–735
- [8] Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, Bartel D P. The action of *ARGONAUTE1* in the miRNA pathway and its regulation by the

- miRNA pathway are crucial for plant. *Genes Dev*, 2004, 43: 1187–1197
- [9] Luo Z K, Yang Z L, Zhong B Q, Li Y F, Xie R, Zhao F M, Ling Y H, He G H. Genetic analysis and fine mapping of a dynamic rolled leaf gene, *RL10(t)*, in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 2007, 50: 811–817
- [10] Yan C-J(严长杰), Yan S(严松), Zhang Z-Q(张正球), Liang G-H(梁国华), Lu J-F(陆驹飞), Gu M-H(顾铭洪). Genetic analysis and gene mapping of a new rolled leaf mutant *rl9(t)* in rice. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2006, 51(1): 2757–2762 (in Chinese)
- [11] Reich P B. Effects of low concentrations of O₃ on net photosynthesis, dark respiration, and chlorophyll contents in aging hybrid popular leaves. *Plant Physiol*, 1983, 73: 291–296
- [12] Gao Y-H(高艳红), Lü C-G(吕川根), Wang M-Q(王茂青), Wang P(王澎), Yan X-Y(闫晓燕), Xie K(谢坤), Wan J-M(万建民). QTL mapping for rolled leaf gene in rice. *Jiangsu J Agric Sci* (江苏农业学报), 2007, 23(1): 5–10 (in Chinese with English abstract)
- [13] Wang G-L(王关林), Fang H-Y(方宏筠). Plant Gene Engineering (植物基因工程), 2nd edn. Beijing: Science Press, 2002. pp 742–744 (in Chinese)
- [14] Sang X-C(桑贤春), He G-H(何光华), Zhang Y(张毅), Yang Z-L(杨正林), Pei Y(裴炎). The simple gain of templates of rice genomes DNA for PCR. *Hereditas* (遗传), 2003, 25(6): 705–707 (in Chinese with English abstract)
- [15] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, 259: 297–607
- [16] Xing G-N(邢光南), Zhao T-J(赵团结), Gai J-Y(盖钧镒). Application technique of marker grouping and ordering in genetic linkage map construction using Mapmaker/Exp. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2008, 34(2): 217–223 (in Chinese with English abstract)
- [17] Lü C-G(吕川根), Zou J-S(邹江石). Comparative analysis on plant type of two super hybrid rice and Shanyou 63. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2003, 36(6): 633–639 (in Chinese with English abstract)
- [18] Lang Y-Z(郎有忠), Zhang F-J(张祖建), Gu X-Y(顾兴友), Yang X-J(杨建昌), Zhu Q-S(朱庆森). Physiological and ecological effects of crimp leaf character in rice (*Oryza sativa* L.): II. Photosynthetic character, dry mass production and yield forming. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, 30(9): 883–887 (in Chinese with English abstract)
- [19] Kinoshita T. Gene Analysis and Linkage Map. Tokyo: Japan Science Society Press, 1984. pp 187–274
- [20] Khush G S, Kinoshita T. Rice karyotype, marker genes, and linkage groups. In: Khush G S, Toenniessen G H, eds. Rice Biology. Wallingford: CAB International and IRRI, 1991. pp 83–108
- [21] Yu D(余东), Wu H-B(吴海滨), Yang W-T(杨文韬), Gong P-T(巩鹏涛), Li Y-Z(李有志), Zhao D-G(赵德刚). Genetic analysis and mapping of the unilateral rolled leaf trait of rice mutant B157. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2008, 6(2): 220–226 (in Chinese with English abstract)
- [22] Li S-G(李仕贵), Ma Y-Q(马玉清), He P(何平), Li H-Y(黎汉云), Chen Y(陈英), Zhou K-D(周开达), Zhu L-H(朱立煌). Genetic analysis and mapping the flag leaf roll in rice (*Oryza sativa* L.). *J Sichuan Agric Univ* (四川农业大学学报), 1998, 16(4): 391–393 (in Chinese with English abstract)
- [23] Yan S, Yan C J, Zeng X H, Yang Y, Fang Y, Tian C, Sun Y, Cheng Z, Gu M. ROLLED LEAF 9, encoding a GARP protein, regulates the leaf abaxial cell fate in rice. *Plant Mol Biol*, 2008, 68: 239–250
- [24] Wang D-Z(王德仲), Sang X-C(桑贤春), You X-Q(游小庆), Wang Z(王增), Wang Q-S(王秋实), Zhao F-M(赵芳明), Ling Y-H(凌英华), Li Y-F(李云峰), He G-H(何光华). Genetic analysis and gene mapping of a novel narrow and rolled leaf mutant *nrl2(t)* in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2011, 37(7): 1159–1166 (in Chinese with English abstract)
- [25] Luo Y-Z(罗远章), Zhao F-M(赵芳明), Sang X-C(桑贤春), Lin Y-H(凌英华), Yang Z-L(杨正林), He G-H(何光华). Genetic analysis and gene mapping of a novel rolled leaf mutant *rl12(t)* in rice. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(11): 1967–1972 (in Chinese with English abstract)
- [26] Xia L(夏令), Chen L(陈亮), Guo C-M(郭迟鸣), Zhang H-X(张红心), Zhao Z(赵政), Shen M-S(沈明山). Genetic analysis and mapping of rice (*Oryza sativa* L.) *sd-sl* mutant. *J Xiamen Univ* (厦门大学学报), 2007, 46(6): 847–851 (in Chinese with English abstract)
- [27] Wang D K, Liu H Q, Li K L. Genetic analysis and gene mapping of a narrow leaf mutant in rice (*Oryza sativa* L.). *Chin Sci Bull*, 2009, 54: 752–758