

多年生长雄蕊野生稻剑叶长度的遗传分析

张美佳^{1,2}, 王昊云^{1,2}, 郑方静^{1,2}, 单媛媛^{1,2}, 杨江义^{1,2}, 范优荣^{1,2}⁽¹⁾广西大学生命科学与技术学院亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004; ⁽²⁾广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530004

摘要: 水稻剑叶性状与产量息息相关, 也是水稻遗传学和分子生物学研究的热点之一。剖析水稻剑叶长度的遗传机理, 为培育理想株型新品种提高水稻产量奠定基础。以长剑叶的非洲长雄蕊野生稻 (*Oryza longistaminata*) 为父本、短剑叶的梗稻 Balilla 为母本构建 F₂ 分离群体。统计近三年的 F₂ 群体的表型数据和基因型数据, 对剑叶长度性状进行了遗传效应分析和 QTL 定位。一共检测到 10 个控制剑叶长度的 QTL 位点, 分布在水稻的第 3、4、5、7、8、9、11 和 12 号染色体上。其中位于第 9 染色体上的 *qFLL9-1* 是群体中控制水稻剑叶长度的主效位点, 还鉴定到了两个新位点 *qFLL4-1* 和 *qFLL11-1*。针对主效位点 *qFLL9-1* 构建了高世代回交群体 BC₆F₂, 验证了 *qFLL9-1* 在群体中发挥重要的效应。鉴定了 *qFLL4-1* 和 *qFLL11-1* 两个调控剑叶长度的新 QTL 位点, 验证了一个调控水稻剑叶长度的主效 QTL *qFLL9-1*, 研究结果为水稻剑叶长度 QTL 的精细定位奠定了基础, 有利于长雄蕊野生稻种质资源的进一步开发与利用。

关键词: 长雄蕊野生稻; 剑叶长度; QTL 定位

Genetic Analysis on Flag Leaf Length of *Oryza Longistaminata*ZHANG Mei-jia^{1,2}, WANG Hao-yun^{1,2}, ZHENG Fang-jing^{1,2}, SHAN Yuan-yuan^{1,2}, YANG Jiang-yi^{1,2},
FAN You-rong^{1,2}⁽¹⁾State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Nanning 530004; ⁽²⁾College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004

Abstract: The flag leaf-related trait is important for the rice yield. The genetic mechanism of flag leaf length in rice was analyzed to lay a foundation in breeding of new varieties with ideal plant types and improve yield performance. In this study, the F₂ population was constructed, using and Balilla (*Oryza saliva* L. sub sp. *japonica*; short flag leaves; female) pollinated with the *O. longistaminata* (long flag leaves; male). Based on the data of phenotype and genotype of the F₂ populations in three years, the QTL of flag leaf length and their genetic effects were analyzed. Ten QTL modulating flag leaf length were detected on chromosome 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11 and 12 of rice. Among them, the QTL *qFLL9-1* was identified as the major locus, while the other two QTL *qFLL4-1* and *qFLL11-1* were newly identified. We further generated a high generation backcross population BC₆F₂ targeting *qFLL9-1*, and demonstrated this locus with an important role in the population. These results will benefit for future fine mapping of this QTL modulating flag leaf length, and the development and utilization of *Oryza longistaminata*.

Key words: *Oryza longistaminata*; flag leaf length; quantitative trait loci mapping

水稻(*Oryza sativa*)作为世界一半以上人口的主粮, 是重要的粮食作物。产量是水稻育种中的首要指标。在生产过程中, 人们发现水稻的产量与株型密切相关^[1]。影响水稻株型的各种因素中, 叶片性状与光合作用

收稿日期: 2022-08-05

修回日期: 2022-08-14

网络出版日期:

URL:

第一作者研究方向为植物遗传学, E-mail: 879464165@qq.com; 王昊云对该文工作做出同样贡献;

通信作者: 范优荣, 研究方向为水稻重要农艺性状基因的克隆及功能研究, E-mail: fanyourred@163.com

基金项目: 广西科技计划(桂科 AD19110145); 广西自然科学基金资助(2018GXNSFBA138022); 广西大学科研基金资助项目(XTZ131548; XMPZ160942); 广西高校中青年教师基础能力提升项目(2018KY0046)

Foundation project: Guangxi Science and Technology Development Program (AD19110145); Guangxi Natural Science Foundation of China (2018GXNSFBA138022); The Scientific Research Foundation of Guangxi University (XTZ131548, XMPZ160942); The Basic Ability Enhancement Program for Young and Middle-aged Teachers of Guangxi (2018KY0046)

直接相关,叶片的光合作用面积及光能利用率直接影响水稻产量^[2]。在水稻所有的叶片中,剑叶(最后一叶片,叶鞘呈环形,包裹着未伸出的稻穗)是叶片向稻穗运输光合产物的主要提供者^[3],占籽粒形成中光合产物的 40%^[4],对水稻产量的影响最为突出。

长而挺直的叶片其叶面积大且互不遮蔽,能有效增加光合作用面积。对剑叶形态进行统计分析,发现剑叶的面积与剑叶长、宽有极显著的正相关性,其中剑叶长度对叶面积的影响更大^[5]。但过长的叶片又极易形成披叶,不利于水稻群体的整体通风、透光性,同时还会增加染病几率。因此在水稻理想株型育种中,要选择合适长度的剑叶。

早在 1983 年科学家就提出了叶片性状对高光效植株的重要性^[6]。随着分子生物学的迅速发展和水稻全基因组测序工作的完成,以分子连锁图谱为基础的数量性状位点(quantitative trait loci, QTL)的研究取得了很大进展。剑叶长度的遗传是受微效多基因控制的数量性状^[7,8],存在与环境的互作^[9-12]。截至到目前为止,已报道了多个控制水稻剑叶长度的 QTL,在 12 条染色体上均有分布^[13-17],但其中精细定位的位点较少。Wang 等^[18]利用回交群体,将 QTL *qFL1* 定位在第 1 染色体 31 kb 大小的区域。除此之外,在第 6 染色体上精细定位了控制水稻剑叶长度的位点 *qFLL6*^[19]和 *qFLL6.2*^[20]。到目前为止,仅有一个控制水稻剑叶长度的基因 *qLL9* (LOC_Os09g26999) 被克隆^[21],研究发现 *qLL9* 可能是 *Dense And Erectpanicle 1(DEP1)/erect-panicle(EP)/qPE9-1* 的等位基因^[22-24]。*qLL9* 主要通过增加细胞数目来增加叶片长度,该基因被敲除后剑叶长度与剑叶面积明显降低。*qLL9* 长剑叶近等基因系单株产量提高,穗长、籽粒大小和千粒重均增加^[21]。并且该基因也位于 Jiang^[25]和苟晓霞等^[26]精细定位的区间内。

构建研究水稻剑叶长度性状的遗传材料时一般利用亚洲栽培稻,很少利用多年生非洲长雄蕊野生稻^[27,28]。长雄蕊野生稻和栽培稻同属于 AA 基因组,具有抗旱、耐盐碱胁迫、抗病、抗虫、宿根性等优良性状,是优良的水稻种质资源。本实验利用剑叶长度存在明显差异的长剑叶非洲长雄蕊野生稻与亚洲栽培稻梗稻 Balilla 构建 F₂ 分离群体,用于鉴定、分析控制水稻剑叶长度性状的 QTL 位点,为理想株型的构建提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

利用剑叶长度存在明显差异的多年生非洲长雄蕊野生稻(*Oryza longistaminata*,由广西大学农学院周瑞阳教授惠赠)和栽培稻 Balilla 进行杂交,通过幼胚拯救获得 F₁ 代,F₁ 自花授粉获得 F₂ 代。2015 年将 F₂ 群体种植于广西大学实验基地,2016 年和 2017 年分别对该 F₂ 群体通过营养繁殖进行移栽。

1.2 表型统计

于齐穗期测量水稻的剑叶长度,每株选 3 个分蘖,分别测出剑叶叶颈(叶环)到叶尖的距离,并取其平均值作为最终剑叶长度。2015 年 1 月共调查 186 个 F₂ 单株的剑叶长度数据,2016 年 3 月共收集到 211 个 F₂ 单株的剑叶长度数据,2017 年 7 月共收集到 196 个 F₂ 单株的剑叶长度数据。

1.3 分子标记筛选

利用两亲本及杂种 F₁ 间具有多态性的共显性 InDel 标记构建遗传连锁图。分子标记来源有三个方

一、由广西大学生命科学与技术学院罗继景课题组提供;二、直接从 Gramene 网站 (<http://www.gramene.org>) 查找;三、根据 NCBI 数据库参照日本晴序列进行开发设计。最终得到 162 个带型清晰且均匀分布于水稻

12 条染色体上的分子标记，所有分子标记引物均由上海生工生物公司合成。分子标记均以其物理位置命名，例如 C0916307，代表该分子标记位于第 9 号染色体（C09）16307 kb 的位置。

1.4 图谱构建

利用 162 对 InDel 分子标记检测 3 个 F_2 群体单株的基因型数据构建连锁遗传图谱。采用 QTL 作图分析软件 QTL IciMapping 4.0 的完备 CIM 法（ICIM），再结合单株剑叶长度的测量值，设定 LOD 阈值为 3.0，并计算出 QTL 对该表型遗传效应的贡献率值和加性效应值。2015 年 F_2 群体连锁图谱总图距约为 1129.07 cM，标记间平均图距为 6.97 cM。2016 年连锁图谱总图距约为 1118.71 cM，标记间平均图距为 6.90 cM。2017 年连锁图谱总图距约为 1097.83 cM，标记间平均图距为 6.77 cM。

2 结果与分析

2.1 亲本、 F_1 和 F_2 群体剑叶长度表型性状调查

对亲本及杂种 F_1 剑叶长度表型进行调查，发现父本非洲长雄蕊野生稻平均剑叶长度为 75.77 ± 7.49 cm，母本栽培稻 Balilla 平均剑叶长度为 25.40 ± 0.32 cm，两者杂交后代 F_1 单株剑叶长度连续分布，平均剑叶长度为 52.3 ± 0.74 cm，介于两亲本之间（图 1）。该数值表明亲本之间剑叶长度表型差异较大，有助于后期进行剑叶长度表型 QTL 定位。



注：A，非洲长雄蕊野生稻；B，杂种 F_1 ；C，Balilla；Bar=10 厘米。

Note: A, *Oryza longistaminata*; B, Hybrid F_1 ; C, Balilla; Bar=10 cm.

图 1 亲本及 F_1 的剑叶长度

Fig.1 The flag leaves of two parents and their F_1 .

从 F_1 收获种子种植 F_2 群体。Balilla 与长雄蕊野生稻的杂交 F_2 后代依然保留了宿根性状，因此将同一个 F_2 群体单株经根状茎营养繁殖，从 2015 年至 2017 年连续 3 年分别种植 186 株、211 株和 196 株，并考查群体剑叶长度。2015 年 F_2 群体的剑叶长度范围在 10.17~63.73 cm，均值为 32.02 ± 8.56 cm；2016 年 F_2 群体的剑叶长度范围在 10.30~55.40 cm，均值为 28.37 ± 8.11 cm；2017 年 F_2 群体的剑叶长度范围在 21.50~111.33 cm，均值为 50.36 ± 16.03 cm（表 1）。结合亲本分析发现，2015 年与 2016 年 F_2 的表型数据差异不大，剑叶长度的极大值与极小值均小于亲本；而 2017 年 F_2 的表型数据出现了超亲现象，剑叶长度的极大值大于亲本，而极小值小于亲本。

继续比较三年的 F_2 数据发现，2015 年与 2016 年的剑叶长度的平均值、极大值和极小值均显著小于 2017 年 F_2 群体，这可能与当年种植环境相关。2015 和 2016 年 F_2 群体剑叶完全展开时间在春季；而 2017 年群体

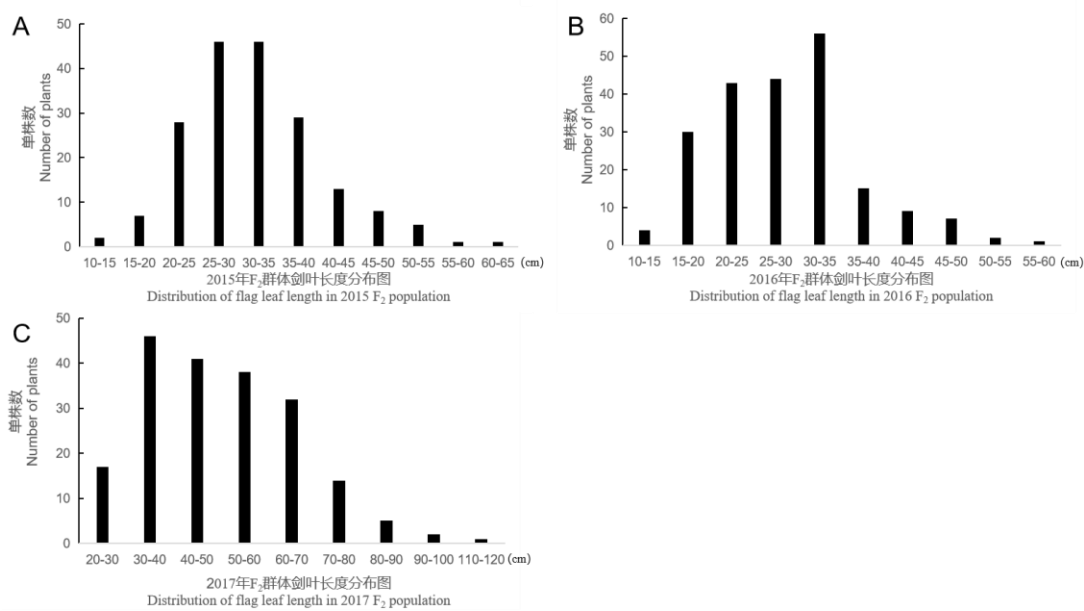
剑叶展开时间在 7 月份，此时气温高，营养生长期接受的日照时间更长，有利于水稻叶片生长，因此 2017 年种植的 F₂ 群体剑叶长度更长。

进一步对 3 个 F₂ 群体表型进行偏度和峰度分析。偏度主要反映频数分配的不对称程度，偏度越接近于零，说明表型分布越接近于正态分布。峰度是频数分配的集中程度，结果越趋近于 0，越符合正态分布。三年的数据显示 F₂ 群体的偏度和峰度均小于 1（表 1），且呈连续性分布（图 2），基本符合正态分布特点。说明在这些 F₂ 群体中，剑叶长度的表型分布均符合多基因控制的数量性状遗传。

表 1 三年 F₂ 群体剑叶长度

Table 1 The flag leaf length of F₂ population in three years.

年份 Year	单株数 Number of plants	平均值±标准差(cm) Mean± SD	变幅(cm) Range	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis
2015	186	32.02 ± 8.56	10.17-63.73	0.644	0.800
2016	211	28.37 ± 8.11	10.30-55.40	0.560	0.323
2017	196	50.36 ± 16.03	21.50-111.33	0.590	0.261



注：横轴表示剑叶长度数值分类区间，纵轴表示单株数；A，2015 年 F₂ 群体的剑叶长度频数分布图；B，2016 年 F₂ 群体的剑叶长度频数分布图；C，2017 年 F₂ 群体的剑叶长度频数分布图。

Note: The horizontal axis and vertical axis shows the numerical classification intervals and the number of plants, respectively. The flag leaf length data are from 2015 (A), 2016 (B), and 2017 (C).

图 2 三年 F₂ 群体剑叶长度表型分布

Fig.2 The frequency distribution of flag leaf length in F₂ populations for three years

2.2 剑叶长度 QTL 定位分析

本室前期已筛选得到非洲长雄蕊野生稻和 Balilla 之间存在多态性的 162 对分子标记引物，这些标记引物均匀覆盖了水稻 12 条染色体。采用遗传连锁图谱分析软件 QTL IciMapping 4.0 对 2015 年、2016 年和 2017 年的 F₂ 群体剑叶长度表型和基因型数据进行分析，共检测到 10 个与剑叶长度性状相关的 QTL，分布于水稻的第 3、4、5、7、8、9、11 和 12 染色体上（表 2、图 3）。2015 年检测到的 QTL 位点数目最多，共检测到 6 个与剑叶长度相关的 QTL: *qFLL3-2*、*qFLL4-1*、*qFLL5-1*、*qFLL7-1*、*qFLL7-2* 和 *qFLL9-1*；2016 年检测到 3 个 QTL: *qFLL7-2*、*qFLL9-1* 和 *qFLL11-1*；2017 年检测 5 个 QTL: *qFLL3-1*、*qFLL7-2*、*qFLL8-1*、

qFLL9-1 和 *qFLL12-1*。这些 QTL 的贡献率介于 3.99%~23.93%，其中 *qFLL12-1*、*qFLL8-1* 和 *qFLL9-1* 的贡献率大于 10%，有较强的效应。进一步分析其加性效应发现，*qFLL3-1*、*qFLL3-2*、*qFLL4-1*、*qFLL5-1*、*qFLL8-1* 和 *qFLL9-1* 的加性效应来自于父本长雄蕊野生稻，*qFLL7-1*、*qFLL7-2*、*qFLL11-1* 和 *qFLL12-1* 的加性效应来自于母本 Balilla。

因为 2016 年和 2017 年的 F₂ 群体都来自于 2015 年的 F₂ 群体单株，我们更关注在三年的 QTL 定位中均能被检测到的位点，这些位点对剑叶长度的贡献力可能受外界环境影响较小。在 3 年的剑叶长度 QTL 定位中，每年都能在第 7 和第 9 染色体上某一区间范围内检测到 QTL，虽然具体定位位置不是完全一致，但都位于相邻或同一区间内，将之认为是同一个 QTL 位点，分别命名为 *qFLL7-2* 和 *qFLL9-1* (表 2)。其中 *qFLL9-1* 的 LOD 值和贡献率在每年的检测到的 QTL 位点中都是最大的，分别为 9.59、13.36、14.41 和 21.28%、23.93%、17.30%。推测该位点可能是群体中控制水稻剑叶长度的主效位点，其加性效应来自长剑叶的非洲长雄蕊野生稻 (表 2)。*qFLL7-2* 虽然每年都能被检测到，但 LOD 值不高，其加性效应来自于短剑叶的母本 Balilla。其余 8 个位点 (*qFLL3-1*、*qFLL3-2*、*qFLL4-1*、*qFLL5-1*、*qFLL7-1*、*qFLL8-1*、*qFLL11-1*、*qFLL12-1*) 均只在某一年的数据中被检测到，这些位点的效应可能受环境影响较大，LOD 值和贡献率都较低，属于控制剑叶长度的微效位点。

表 2 F₂ 群体剑叶长度 QTL 的定位

Table 2 QTL mapping for flag leaf length in F₂ population

位点 Locus	年份 year	染色体 Chromosome	标记区间 Marker Interval		LOD 值 LOD score	贡献率(%) PVE	加性效应 Add
<i>qFLL3-1</i>	2017	3	C033245	C036812	5.32	6.24	5.88
<i>qFLL3-2</i>	2015	3	C037749	C0311540	6.11	10.32	2.99
<i>qFLL4-1</i>	2015	4	C044735	C049355	3.71	7.21	2.93
<i>qFLL5-1</i>	2015	5	C05176	C051419	3.00	4.92	2.62
<i>qFLL7-1</i>	2015	7	C077260	C0713423	3.92	7.32	-4.73
<i>qFLL7-2</i>	2017	7	C0713423	C0715287	3.68	3.99	-5.99
	2015	7	C0715287	C0716650	4.02	6.11	-4.29
	2016	7	C0715287	C0716650	6.81	9.99	-5.35
<i>qFLL8-1</i>	2017	8	C082927	C086172	10.53	11.96	6.24
<i>qFLL9-1</i>	2015	9	C0912291	C0914152	9.59	21.28	5.84
	2016	9	C0914152	C0916307	13.36	23.93	5.24
	2017	9	C0914152	C0916307	14.41	17.30	9.20
<i>qFLL11-1</i>	2016	11	C115478	C117873	3.76	7.08	-1.94
<i>qFLL12-1</i>	2017	12	C1219828	C1222595	5.53	5.91	-5.81

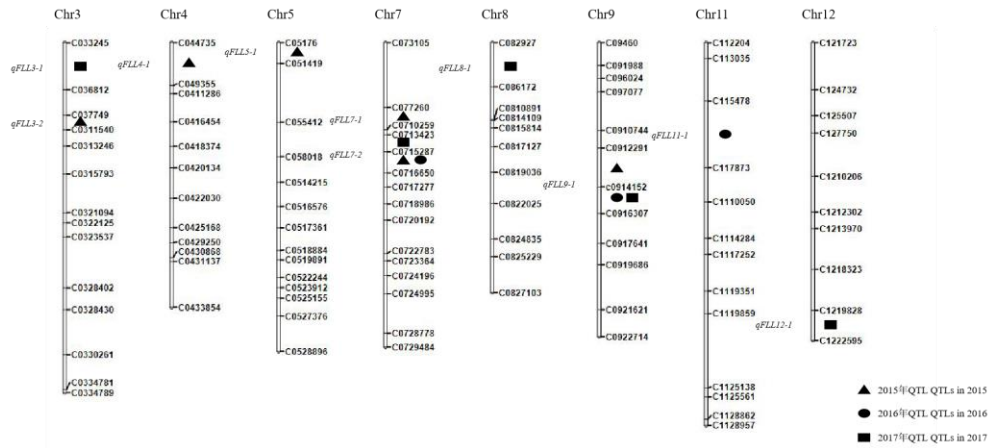


图 3 QTL 位点定位图

Fig.3 Mapping of QTL on chromosomes by molecular markers in three F_2 populations

与文献中已报道的剑叶长度 QTL 位点比较，发现在 2015 年和 2016 年分别检测到了 2 个新的控制水稻剑叶长度的 QTL 位点 $qFLL4-1$ 和 $qFLL11-1$ 。但这两个位点的 LOD 值都不高，低于 4.0，效应不大，可能在不同环境中对主效位点起辅助作用。

其他位点与文献报道已定位 QTL 位点均存在重叠（表 3）。我们分离到的主效位点 $qFLL9-1$ 与多个课题组定位的剑叶长度 QTL 区间重叠。李睿等^[2]定位的 $qFLL7-1$ 和 Wang 等^[29]定位的 $qFL7$ 均包含本研究定位的 $qFLL7-2$ ，且他们定位的左端标记（RM214、RM3583）还位于本研究定位的 $qFLL7-1$ 区间内；同时，邹德堂等^[30]定位的 $qFLL-7$ 也位于本实验室定位的 $qFLL7-1$ 区间。其他 QTL 定位的两端标记也全部或部分位于已报道的剑叶长度 QTL 定位区间内（表 3）。以上结果表明了本研究 QTL 定位的可靠性。

表 3 本研究定位的水稻剑叶长度相关 QTL 与已报道位点概况

Table 3 An overview of the QTL identified in our study and the previous research.

QTL	分子标记		参考文献
$qFLL3-1$	C033245	C036812	(Wu et al, 2017; Wang et al., 2012) ^[16, 29]
$qFLL3-2$	C037749	C0311540	(Wu et al, 2017; Wang et al., 2012) ^[16, 29]
$qFLL4-1$	C044735	C049355	
$qFLL5-1$	C05176	C051419	(Mei et al, 2005) ^[31]
$qFLL7-1$	C077260	C0713423	(李睿等, 2010; 邹德堂等, 2014; Wang et al., 2012) ^[2, 29, 30]
$qFLL7-2$	C0713423	C0716650	(李睿等, 2010; Wang et al., 2012;) ^[2, 29]
$qFLL8-1$	C082927	C086172	(Wang et al., 2012) ^[29]
$qFLL9-1$	C0912291	C0916307	(Yan, J et al, 1999; 朱双兵等, 2020; Wu et al., 2017; Jiang et al., 2010; 勾晓霞, 2013; 曹刚强, 2007) ^[12, 15, 16, 25, 26, 32]
$qFLL11-1$	C115478	C117873	
$qFLL12-1$	C1219828	C1222595	(朱双兵等, 2020; Wang et al, 2012) ^[15, 29]

2.3 主效位点 $qFLL9-1$ 高世代回交群体效应分析

为了更准确的验证调控剑叶长度主效位点 $qFLL9-1$ 的效应，我们以 Balilla 为轮回母本， F_2 群体中极端值单株为父本构建高世代回交群体（图 4）。随着回交世代的升高，背景基因逐渐被清除，在 BC_6F_2 群体中发现剑叶长度与 $qFLL9-1$ 位点基因型共分离。

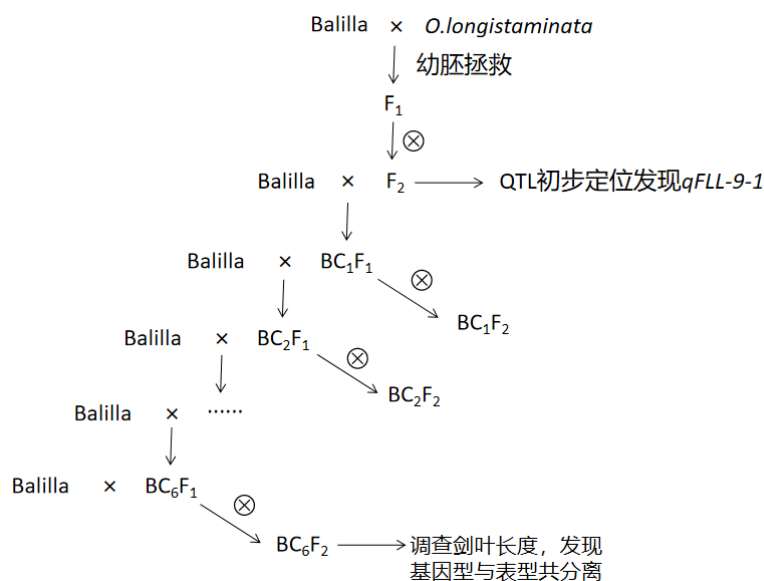


图 4 遗传分析群体的构建示意图

Fig.4 Diagram of advanced backcross population construction

2021 年 2 月在南宁种植了 BC_6F_2 群体 64 株，进行了基因型与表型鉴定。 $qFLL-9-1$ 位点基因型检测的左端和右端分子标记分别选用了易扩增和检测的 C0915017 和 C0916477。这 64 株在 $qFLL-9-1$ 左右两端分子标记处的基因型均相同，未发生重组。测量剑叶长度后分析 $qFLL-9-1$ 位点处三种基因型的表型差异及其显著性，结果表明，剑叶长度均值和 95% 置信区间均表现出长雄蕊野生稻纯合基因型(AA)> 杂合基因型(AB)> Balilla 纯合基因型(BB)（表 4）。

表 4 分离群体剑叶长度分布

Table 4 Flag leaf distribution of the population

基因型 Genotype	株数 Number of plants	平均值±标准差(cm) Mean±SD	95%置信区间 (cm) 95% confidence interval	标准误 SE
AA	13	34.74±2.748	33.09-36.41	0.762
AB	37	28.67±1.817	28.06-29.98	0.300
BB	14	26.18±2.278	24-27.05	0.609

注：AA，野生稻纯合基因型；AB，杂合基因型；BB，Balilla 纯合基因型；#平均值 ± 标准差。

Note: AA, homozygous genotype of *Oryza longistaminata*; AB, heterozygous genotype; BB, homozygous genotype of Balilla, # means ± SD.

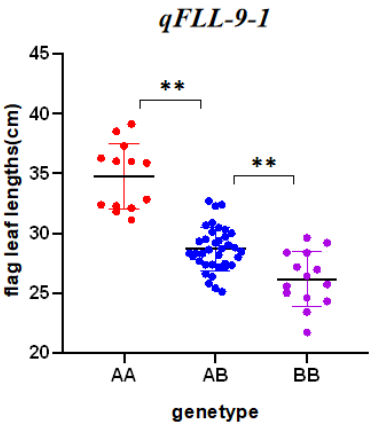
对 BC_6F_2 群体进行方差同质性检验。发现 $P=0.021$ ，小于 0.05，假设方差不齐性，利用 Tamhane's 计算显著性差异，三种基因型植株 AA 和 AB 之间，BB 和 AB 之间以及 AA 和 BB 之间 P 值均小于 0.01，存在极显著性差异（表 5）。在 BC_6F_2 群体中长雄蕊野生稻基因型(AA)植株剑叶长度极大值和极小值分别为 39.13 cm 和 31.13 cm，而短剑叶的栽培 Balilla 基因型(BB)植株剑叶长度极大值和极小值分别 29.60 cm 和 21.73 cm，AA 基因型植株的剑叶长度的极小值大于 BB 基因型植株的极大值，该群体中 $qFLL-9-1$ 的基因型与剑叶长度共分离（图 5），表明我们 QTL 初步定位结果中 $qFLL-9-1$ 为主效位点的可靠性。而杂合子植株(AB)的剑叶长度介于两者之间，但是更偏向于短剑叶（图 5）。

表 5 BC₆F₂ 各基因型间剑叶长度显著性分析

Table 5 Significance analysis of flag leaves between three genotypes of BC₆F₂

基因型 (I) Genotype(I)	基因型 (J) Genotype(J)	均差值 (I-J) Mean Difference(I-J)	标准误 SE	显著性 Sig
AA	AB	6.078**	0.819	0.000
	BB	8.567**	0.9759	0.000
AB	AA	-6.078**	0.819	0.000
	BB	2.489**	0.678	0.005
BB	AA	-8.567**	0.975	0.000
	AB	-2.489**	0.678	0.005

注：AA，野生稻纯合基因型；AB，杂合基因型；BB，Balilla 纯合基因型；*表示 $0.01 \leq P < 0.05$ ；**表示 $P < 0.01$ 。
Note: AA, homozygous genotype of *Oryza longistaminata*; AB, heterozygous genotype; BB, homozygous genotype of Balilla; significant differences are indicated by $*0.01 \leq P < 0.05$, $**P < 0.01$.



注：AA，野生稻纯合基因型；AB，杂合基因型；BB，Balilla 纯合基因型；**表示 $P < 0.01$ 。
Note: AA, homozygous genotype of *Oryza longistaminata*; AB, heterozygous genotype; BB, homozygous genotype of Balilla; significant differences are indicated by $**P < 0.01$, $*0.01 \leq P < 0.05$.

图 5 BC₆F₂ 群体单株 *qFLL-9-1* 位点基因型与剑叶长度

Fig.5 The genotype in *qFLL-9-1* and phenotype of BC₆F₂ individual plants

3 讨论

在过去的半个多世纪，利用半矮秆基因及杂种优势进行遗传改良，使水稻产量得到了两次巨大的飞跃^[33]。然而随着人口的增长，人类对粮食的需求越来越大。一些育种学家提出构想：利用遗传改良来塑造理想株型以提高水稻群体光合作用效率，进而增加单位面积产量^[34]。“理想株型”一词最早由澳大利亚 Donald 提出，是指“在一定环境中能够按照期望进行表达的生物模式”，即能够最大限度的提高光合速率，进而达到提高产量目的的株型^[35]。叶片作为植物光合作用的主要器官，其形态构型在塑造理想株型方面起着至关重要的作用。叶片的形态主要由叶形、叶尖、叶缘和叶脉等外部形态构成^[36]，其中叶形更是在光合作用中发挥着重大作用。袁隆平提出上三片叶，即剑叶、倒二叶和倒三叶要长、直、窄、V 形、厚，长且直立的叶片能够最大限度的提高光合效率^[37]。如果叶片过短，则会导致其光合作用产物不足支撑其生产较高的粮食产量；而叶片过长，则会导致叶片披散，互相覆盖，不利于通风透光，以至于影响光合速率。因此，我们研究剑叶长度相关基因对于培育合适长度的剑叶植株具有重要意义。

研究中我们发现，同一群体在不同季节的剑叶长度表型差异较大，如 2015 年和 2016 年种植单株叶片完全展开时是在春季，此时气温偏低，日照时间偏短，剑叶长度较短；而 2017 年叶片完全展开时是夏季，

气温高，日照时间相对较长，剑叶长度更长。由此可知，相比于气温低、日照时间短的春冬季节，剑叶在气温高、日照时间长的夏季生长更快，长度更长。此外，空气中 CO₂ 浓度、土壤的氮素含量和盐、碱含量均会影响剑叶长度^[9-12]。因此，在进行初步定位和精细定位的过程中，还需要考虑外界环境对剑叶长度表型的影响，才能得到更准确的结果。

本研究以长剑叶的长雄蕊野生稻为父本，短剑叶的 Balilla 为母本构建 F₂ 分离群体，考察三年的剑叶长度均符合正态分布。对剑叶长度进行 QTL 定位分析，三年的定位结果均检测到多个控制剑叶长度的 QTL。该结果符合沈福成^[6]研究的水稻剑叶长度性状呈连续性分布，受微效多基因控制的结论。我们三年的初步定位均检测到了 *qFLL7-2* 和 *qFLL9-1*，且 *qFLL9-1* 在三年中均为最高 LOD 值，为了进一步验证实验结果的可靠性，我们针对主效位点 *qFLL9-1*，以短剑叶的 Balilla 为轮回母本进行回交构建了高世代回交群体。在 BC₆F₂ 群体中发现剑叶长度与 *qFLL9-1* 共分离，该结果证明了我们初步定位的结果的可靠性，也为后续调控剑叶长度 QTL 位点的精细定位奠定了基础。

到目前为止，多个课题组虽然初步定位了很多控制剑叶长度的位点，但是其中被精细定位的基因较少，而克隆到的基因有且仅有 1 个^[21]，该基因距离我们所定位的 *qFLL9-1* 位点的右端分子标记 C0916307 仅 104 kb，该结果也从侧面证实了我们结果的可靠性。下一步是利用高世代回交群体对 *qFLL9-1* 位点进行精细定位和基因克隆。

目前使用长雄蕊野生稻作为亲本，进行剑叶长度 QTL 定位的很少被报道。我们利用长雄蕊野生稻定位到了新的 QTL 位点：*qFLL4-1* 和 *qFLL11-1*。这些新位点的遗传效应及利用有待进一步的研究。

综上所述，本研究检测到的剑叶长度相关位点及主效位点的效应验证为进一步的精细定位和基因克隆奠定了基础，也为利用长雄蕊野生稻进行理想株型培育和种质创新提供了思路。

作者贡献

张美佳和王昊云完成数据分析，近等基因系群体构建及论文写作；杨江义参与实验设计、实验结果分析；范优荣指导实验设计，数据分析，论文修改；郑方静和单媛媛参与了本研究的实验设计和部分实验数据采集。全体作者都阅读并同意最终的文本。

参考文献:

- [1] Donald C M, Hamblin J. The biological yield and harvest index of cereals as agronomic and plant breeding criteria. *Advances in Agronomy*. 1976, 28(1): 361-405.
- [2] 李睿,赵姝丽,毛艇,徐正进,陈温福. 水稻剑叶形态性状 QTL 分析[J]. 作物杂志. 2010, 003(03): 26-29.
Li R,Zhao S L,Mao T,Xu Z J,Chen W F. QTL analysis on flag leaf trait in rice[J]. *Crops*. 2010, 003(03): 26-29.
- [3] 李仕贵,何平,王玉平,黎汉云,陈英,周开达,朱立煌. 水稻剑叶性状的遗传分析和基因定位[J]. 作物学报. 2000, 03(26): 261-265.
Li S G,He P,Wang Y P,Li H Y,Chen Y,Zhou K D,Zhu L H. Genetic analysis and gene mapping of the leaf traits in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Acta Agronomica Sinica*. 2000, 03(26): 261-265.
- [4] Cai J, Zhang M, Guo L B, Li X M, Bao J S, Ma L Y. QTLs for rice flag leaf traits in doubled haploid populations in different environments. *Genetics And Moleculararch*. 2015, 14(2): 6786-6795.
- [5] 徐建军,赵强,赵元凤,朱磊,徐辰武,顾铭洪,韩斌,梁国华. 利用重测序的水稻染色体片段代换系群体定位剑叶形态 QTL[J]. 中国水稻科学. 2011, 25(05): 483-487.
Xu J J,Zhao Q,Zhao Y F,Zhu L,Xu C W,Gu M H,Han B,Liang G H. Mapping of QTLs for flag leaf shape using whole-genome re-sequenced chromosome

- segment substitution lines in rice[J]. Chinese Journal of Rice Science. 2011, 25(05): 483-487.
- [6] 沈福成. 水稻剑叶长、宽、角度及比叶重的遗传[J]. 贵州农业科学. 1983(06): 18-25.
- Shen F C. Inheritance of blade length, width, angle and specific leaf weight in rice[J]. Journal of Guizhou Agricultural Science. 1983(06): 18-25.
- [7] 马达鹏, 姜义龙, 陶大云. 贵州高原粳稻与矮秆粳稻杂交抽穗期及株高的遗传效应分析[J]. 贵州农业科学. 1989(04): 7-12.
- Ma D P, Lou Y L, Tao D Y. Genetic effect analysis on heading Stage and plant height of hybrid japonica rice with dwarf japonica rice in Guizhou Plateau[J]. Journal of Guizhou Agricultural Science. 1989(04): 7-12.
- [8] 夏仲炎. 粳稻叶型的遗传与选择的研究[J]. 作物学报. 1983(04): 275-282.
- Xia Z Y. Studies on inheritance and selection of leaf type in japonica rice[J]. Acta Agronomica Sinica. 1983(04): 275-282.
- [9] 姚晓云, 范淑秀, 邹国兴, 吴延寿, 陈春莲, 熊运华, 刘进, 王嘉宇, 徐正进. 不同施氮水平下水稻株高与剑叶性状 QTL 比较分析[J]. 华北农学报. 2019, 34(06): 54-62.
- Yao X Y, Fan S X, Zou G X, Wu Y S, Chen C L, Xiong Y H, Liu J, Wang J Y, Xu Z J. QTLs analysis for plant height and leaf traits of rice under two nitrogen levels[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica. 2019, 34(06): 54-62.
- [10] 邹德堂, 张恩源, 孙健, 王敬国, 刘化龙, 郑洪亮. 盐、碱条件下水稻剑叶形态相关性状 QTL 分析[J]. 东北农业大学学报. 2017, 48(11): 9-17.
- Zou D T, Zhang E Y, Sun J, Wang J G, Liu H L, Zheng H L. QTL analysis on characters related to flag leaf morphology of rice under salt and alkali conditions[J]. Journal of Northeast Agricultural University. 2017, 48(11): 9-17.
- [11] Fan G Z, Dong Y J, Wang C M, Wan J M, Xie H, Chang-Liang X U, Zhu J G, Cai Q S. Analysis of QTLs for flag leaf shape and its response to elevated CO₂ in rice (*Oryza sativa*). *Rice Science*. 2007, 14(001): 7-12.
- [12] Yan J Q, Zhu J, He C X, Benmoussa M, Wu P. Molecular marker-assisted dissection of genotype x environment interaction for plant type traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Crop Science*. 1999, 39(2): 538-544.
- [13] 沈波, 庄杰云, 张克勤, 夏奇清, 盛晨霞, 郑康乐. 水稻叶片性状和根系活力的 QTL 定位[J]. 遗传学报. 2003(12): 1133-1139.
- Shen B, Zhuang J Y, Zhang K Q, Xia Q Q, Sheng C X, Zheng K L. QTLs mapping of leaf traits and root vitality in a recombinant inbred line population of rice[J]. Acta Genetica Sinica. 2003(12): 1133-1139.
- [14] 蔡晶. 水稻剑叶性状的遗传分析和 QTL 定位[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- Cai J. Genetic analysis and QTL mapping of the flag leaf traits in rice (*Oryza sativa* L.)[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.
- [15] 朱双兵, 吕文恺, 何丽萍, 邢丹英, 杨隆维, 邱先进, 徐建龙. 全基因组关联分析解析水稻剑叶及单株产量的遗传基础[J]. 植物遗传资源学报. 2020, 21(03): 663-673.
- Zhu S B, Lu W K, He L P, Xing D Y, Yang L W, Qiu X J, Xu J L. Genetic dissection of flag leaf related traits and grain yield per plant using genome-wide association analysis[J]. Journal of Plant Genetic Resources. 2020, 21(03): 663-673.
- [16] Wu J T, Qi Y W, Hu G L, Li J J, Li Z C, Zhang H L. Genetic architecture of flag leaf length and width in rice (*Oryza sativa* L.) revealed by association mapping. *Genes & Genomics*. 2017, 39(3): 341-352.
- [17] 童汉华, 梅捍卫, 邢永忠, 曹一平, 余新桥, 章善庆, 罗利军. 水稻生育后期剑叶形态和生理特性的 QTL 定位[J]. 中国水稻科学. 2007(05): 493-499.
- Tong H H, Mei H W, Xing Y Z, Cao Y P, Yu X Q, Zhang S Q, Luo L J. QTL analysis for morphological and physiological characteristics of flag leaf at the late developmental stage in rice[J]. Chinese Journal of Rice Science. 2007(05): 493-499.
- [18] Wang P, Zhou G L, Yu H H, Yu S B. Fine mapping a major QTL for flag leaf size and yield-related traits in rice. *Theoretical And Applied Genetics*. 2011, 123(8): 1319-1330.
- [19] 王俊. 水稻剑叶长 QTL *qFLL6* 的遗传分析与基因定位研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- Wang J. Genetic analysis and mapping of a rice QTL *qFLL6* for flag leaf length[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2012.
- [20] Shen B, Yu W D, Zhu Y J, Fan Y Y, Zhuang J Y. Fine mapping of a major quantitative trait locus, *qFLL6.2*, controlling flag leaf length and yield traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*. 2012, 184(1): 57-64.
- [21] Fu X, Xu J, Zhou M, Chen M, Shen L, Li T, Zhu Y, Wang J, Hu J, Zhu L. Enhanced expression of QTL *qLL9/DEP1* facilitates the improvement of leaf morphology and grain yield in rice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(4): 866-887.
- [22] Huang X Z, Qian Q, Liu Z B, Sun H Y, He S Y, Luo D, Xia G M, Chu C C, Li J Y, Fu X D. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. *Nature Genetics*. 2009, 41(4): 494-497.
- [23] Wang J Y, Nakazaki T, Chen S Q, Chen W F, Saito H, Tsukiyama T, Okumoto Y, Xu Z J, Tanisaka T. Identification and characterization of the erect-pose panicle gene *EP* conferring high grain yield in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical And Applied Genetics*. 2009, 119(1): 85-91.
- [24] Zhou Y, Zhu J Y, Li Z Y, Yi C D, Liu J, Zhang H G, Tang S Z, Gu M H, Liang G H. Deletion in a quantitative trait gene *qPE9-1* associated with panicle erectness improves plant architecture during rice domestication. *Genetics*. 2009, 183(1): 315-324.
- [25] Jiang S K, Zhang X J, Wang J Y, Chen W F, Xu Z J. Fine mapping of the quantitative trait locus *qFLL9* controlling flag leaf length in rice. *Euphytica*. 2010, 176(3): 341-347.
- [26] 勾晓霞. 控制水稻剑叶长度性状位点 *qLFL1* 的精细定位及近等基因系的性状分析[D]. 金华: 浙江师范大学, 2013.
- Gou X X. Fine mapping of a quantitative trait locus *qLFL1* controlled flag leaf length and traits analysis of near isogenic lines in rice (*Oryza sativa* L.)[D]. JinHua: Zhejiang Normal University, 2013.

- [27] 胡大棒. 长雄蕊野生稻染色体片段代换系的构建及主要农艺性状 QTL 鉴定[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- Hu D B. Construction of chromosome segment substitution lines harboring *Oryza longistaminata* genome and QTL mapping for several agronomic traits in rice (*Oryza sativa*)[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2019.
- [28] 王德荣. 长雄蕊野生稻遗传图谱的构建及主要农艺性状 QTLs 定位[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- Wang D R. Construction of genetic linkage map and QTL mapping for important agronomic traits in *Oryza longistaminata*[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017.
- [29] Wang P, Zhou G, Cui K, Li Z, Yu S. Clustered QTL for source leaf size and yield traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*. 2012, 29(1): 99-113.
- [30] 邹德堂,王晋,王敬国,刘化龙,刘宇强,贾琰. 水稻剑叶形态与单株产量的基因定位分析[J]. 东北农业大学学报. 2014, 45(01): 23-28.
- Zou D T,Wang J,Wang J G,Liu H L,Liu Y Q,Jia Y. QTL analysis of flag leaf characteristics and ears weight in rice[J]. Journal of Northeast Agricultural University. 2014, 45(01): 23-28.
- [31] Mei H W, Li Z K, Shu Q Y, Guo L B, Wang Y P, Yu X Q, Ying C S, Luo L J. Gene actions of QTLs affecting several agronomic traits resolved in a recombinant inbred rice population and two backcross populations. *Theoretical And Applied Genetics*. 2005, 110(4): 649-659.
- [32] 曹刚强,高用明,朱军. 多环境下水稻 DH 群体剑叶长度的 QTL 分析[J]. 作物学报. 2007(02): 223-229.
- Cao G Q,Gao Y M,Zhu J. QTL analysis for flag leaf length in a rice DH population under multi environments[J]. Acta Agronomica Sinica. 2007(02): 223-229.
- [33] Zhang Q. Strategies for developing green super rice. *Molecular Plant Breeding*. 2005, 3(5): 601-602.
- [34] 薛大伟,钱前. 中国超级稻遗传基础与资源创新[J]. 沈阳农业大学学报. 2007, 05(38): 667-675.
- Xue D W,Qian Q. Genetic basis and resources innovation of super rice breeding in China[J]. Journal of Shenyang Agricultural University. 2007, 05(38): 667-675.
- [35] Donald C M. The breeding of crop ideotypes. *Euphytica*. 1968, 17(3): 385-403.
- [36] 严松,严长杰,顾铭洪. 植物叶发育的分子机理[J]. 遗传. 2008(09): 1127-1135.
- Yan S,Yan Z J,Gu M H. Molecular mechanism of leaf development[J]. Hereditas. 2008(09): 1127-1135.
- [37] 袁隆平. 超级杂交稻研究进展[J]. 农学学报. 2018, 8(01): 71-73.
- Yuan L P. Progress in breeding of super hybrid rice[J]. Journal of Agriculture. 2018, 8(01): 71-73.