

粳稻花时性状 QTL 定位与聚合效应分析

张城^{1,*} 邵国军¹ 张雪¹ 田书军¹ 孙驰¹ 郭艳颖¹ 周燃² 韩勇¹ 郑文静¹
孙廉平^{2,*}

(¹ 辽宁省水稻研究所, 沈阳 110101; ² 中国水稻研究所/国家水稻改良中心/水稻生物育种全国重点实验室, 杭州 311401; * 通信作者, email: zhch024@163.com; sunlianping@caas.cn)

QTL Mapping and Pyramiding Effect Analysis of Diurnal Floret Opening Time Traits in *japonica* Rice

ZHANG Cheng^{1,*}, SHAO Guojun¹, ZHANG Xue¹, TIAN Shujun¹, SUN Chi¹, GUO Yanying¹, ZHOU Ran², HAN Yong¹, ZHENG Wenjing¹, SUN Lianping^{2,*}

(¹ Liaoning Rice Research Institute, Shenyang, 110101, China; ² Chinese National Center for Rice Improvement/State Key Laboratory of Rice Biology and Breeding, China National Rice Research Institute, Hangzhou, 311401, China; *Corresponding author, email: zhch024@163.com; sunlianping@caas.cn)

Abstract: 【Objective】Diurnal flowering time (FT) of rice is an important trait that affects the outcrossing rate and seed production yield of *japonica* rice sterile lines. This study aims to locate QTLs related to diurnal-floret-opening-time (DFOT) in *japonica* rice and analyze the pyramiding effects to clarify the main effect loci for DFOT traits.

【Method】Recombinant inbred line populations consisting of 221 lines were constructed using *japonica* maintainer line J65B with early floret-opening-time and J139B with late floret-opening-time. The floret-opening-time was investigated in three years. QTL mapping analysis was conducted using genetic mapping and BSA-seq methods. 【Result】A total of 30 DFOT QTLs were detected using complete interval mapping (ICIM) method on chromosomes 2–12. *qFT5.2*, *qFT5.3*, *qFT5.5*, *qFT10.2*, and *qFT10.3* were major and stable QTLs which were detected simultaneously in more than eight environments, with an additive effect range of 13.04–50.93. Based on floret-opening time, extreme individuals were pooled for BSA-seq analysis. Association intervals related to floret-opening-time were detected in the regions of *qFT5.3*, *qFT5.5*, *qFT6.2*, and *qFT10.2*. According to the genotyping results, different progenies were divided into J139B type and J65B type in each QTL interval. QTL pyramiding effect analysis showed that QTLs derived from J65B would advance diurnal-floret-opening-time. The loci of *qFT5.3* and *qFT6.2* were essential for achieving early diurnal-floret-opening-time. The loci of *qFT5.5* and *qFT10.2* could further advance the diurnal-floret-opening-time.

【Conclusion】Genetic mapping and BSA-seq analysis successfully identified four major stable QTLs related to rice diurnal-floret-opening-time. The localization of *qFT5.3*, *qFT5.5*, *qFT6.2*, and *qFT10.2* establishes a foundation for further fine mapping and gene cloning and genetic improvement of diurnal-floret-opening-time in *japonica* rice.

Key words: *japonica* rice; diurnal-floret-opening-time; recombinant inbred line; BSA-seq; QTL mapping

摘要: 【目的】水稻日开花时间是影响粳稻不育系异交率及制繁种产量的重要性状。本研究旨在定位粳稻花时调控相关的 QTL 并对其聚合效应加以分析, 明确早花时 QTL 的主效位点。【方法】利用早花时粳稻保持系 65B(J65B)和晚花时粳稻保持系 139B(J139B)构建包含 221 个家系的重组自交系群体。连续 3 年调查群体花时性状, 采用遗传图谱和 BSA-seq 两种方法进行花时 QTL 定位分析。【结果】利用完备区间作图法共检测到 30 个花时性状 QTL, 分布于 2–12 号染色体上, 其中 *qFT5.2*、*qFT5.3*、*qFT5.5*、*qFT10.2*、*qFT10.3* 在 8 个以上环境中被同时检测到, 加性效应范围 13.04~50.93, 是稳定表达的主效位点; 选取花时极端早和极端晚家系构建混池, 利用 BSA-seq 方法在 *qFT5.3*、*qFT5.5*、*qFT6.2*、*qFT10.2* 位点检测到花时关联区域; 选取两种方法共同定位到的稳定表达位点进行 QTL 聚合分析, J65B 类型的 QTL 均会提早花时, *qFT5.3* 和 *qFT6.2* 是早花时改良的基础位点, *qFT5.5*、*qFT10.2* 是进一步提早花时的重要位点。【结论】采用两种方法定位到 4 个稳定表达主效花时 QTL *qFT5.3*、*qFT5.5*、*qFT6.2* 和 *qFT10.2*, 为早花时基因进一步精细定位、基因克隆和粳稻花时性状改良奠定了基础。

关键词: 粳稻; 花时; 重组自交系; BSA-seq; QTL 定位

收稿日期: 2025-01-14; 修改稿收到日期: 2025-03-22。

基金项目: 辽宁省自然科学基金面上项目“杂交粳稻保持系早花时 QTL 定位”(2022-MS-059); 辽宁省农业科学院学科建设计划项目(2024XKJS5222)。

水稻是世界上重要的粮食作物,我国在杂交水稻研究中取得的成就对于保障我国乃至世界的粮食安全具有重要意义。北方杂交粳稻发展较为缓慢,其中制种产量低、制种成本高是限制其推广应用的重要因素^[1]。究其原因,主要是因为粳稻花时普遍偏晚,并且不育系花时进一步延迟,造成不育系与恢复系花时不遇,严重影响了杂交粳稻制种产量^[2-5]。早花时性状受环境影响大,花时调查困难,导致杂交粳稻保持系花时性状遗传研究及育种改良进展缓慢。

有关花时性状 QTL 定位的报道较少。白刚^[6]利用川香 29B/Lemont 的重组自交系(RIL)群体,在 5 号和 10 号染色体定位到 3 个 QTL 位点;马作斌等^[7]利用七山占/秋光建立的 RIL 群体,在 1、2、7、8、10 和 12 号染色体上检测到 6 个花时性状位点;万国等^[8]利用两个粳稻品种的 F₂ 群体,在 1、10 和 12 号染色体上定位到 4 个花时的 QTL;张萌^[9]利用早花时突变体 EFT/日本晴的 RIL 群体,在 1、5、9 和 12 号染色体上检测到 7 个花时 QTL;Hideyuki 等^[10]利用近等基因系在 3 号染色体上定位到稳定花时性状位点 *qEMF3*。

近些年,随着动态转录组、群体遗传学等分子生物学技术的不断发展,对花时等复杂性状的研究也在不断深入,已有多个水稻开花时间相关基因被克隆^[11]。*EMF1/DFOT1*^[12,13]是第一个被克隆的早花时基因,华南农业大学团队和四川农业大学分别利用转录组和突变体方式克隆了该基因,并证实 DUF642 结构域蛋白 EMF1/DFOT1 可与 PME40、PME42 等果胶甲基酯酶家族(PME)多个成员互作,增加 PME 的活性,共同参与水稻浆片细胞壁发育,从而调控水稻开花时间。*DFOT1* 的 5' UTR 区域在粳籼亚种间存在一个明显的分化,粳型的 5' UTR 区片段缺失可促进其在早晨开花。茉莉酸(Jasmonic acid, JA)及其衍生物是水稻花时调控的关键激素,*OsAOS1*、*OsAOC*、*OsOPR7*、*OsHANI* 是内源 JA 合成及失活的重要基因,过表达 *OsOPR7*、敲除 *OsHANI* 会使粳稻提早开花;*OsJAZ7*、*OsJAZ9* 是 JA 信号负调控因子,敲除两个基因会促进粳稻提早开花;*OsMYC2* 是 JA 途径核心转录因子,粳稻中过表达 *OsMYC2* 一方面可以促进 JA 合成相关基因表达,另一方面还可以调控细胞壁松弛基因 *OsGH9B13* 和 *OsGns11* 的转录,促进粳稻花时提前;转录因子 *OsMYB8* 可以调控 *OsJAR1* 的表达,促进茉莉酸衍生物 JA-Ile 的合成,并调控水稻花时,启动子序列差异使粳稻 *OsMYB8* 表达量更高,花时更

早^[11,14-18]。另外,在一定的遗传背景下,粒形基因 *GS3* 对粳稻开花时间具有一定影响,基因编辑 *GS3* 基因可同时增长粒形并提早花时^[19]。

上述位点及基因多来源于籼稻背景,应用于北方粳稻亲本花时性状改良难度大。粳 65B 是辽宁省水稻研究所育成的早花时粳稻保持系,其开花盛期较一般粳稻品种早 1~3 h,制繁种产量显著提高,是北方粳稻早花时性状遗传研究及花时改良的重要资源。本研究利用粳 65B 与晚花时亲本粳 139B 杂交并构建 RIL 群体,利用 6K 水稻育种芯片检测 RIL 群体遗传信息并构建遗传连锁图谱,连续 3 年在沈阳种植 RIL 群体,在多个环境下对水稻花时性状进行 QTL 分析,为粳稻早花时性状基因挖掘及遗传改良提供遗传学基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

早花时亲本粳 65B(J65B)与晚花时亲本粳 139B(J139B)杂交, F₁ 自交获得 F₂, 采用单粒传方法连续回交加代, F₅ 选择单株, F₆ 建立株系, 筛选表型整齐一致的株系, 最终构建了包含 221 个株系的 RIL 群体。亲本和 RIL 群体分别于 2022、2023、2024 年种植于辽宁省水稻研究所沈阳市苏家屯试验基地, 每个株系种植 2 行区, 1.5 m 行长, 株行距为 18 cm×30 cm, 单苗插秧, 常规栽培管理。

1.2 表型调查和数据分析

在水稻开花期调查花时(floret-opening time, FT)。选择晴朗天气调查, 避开早晨降雨及降雨第二天。开花标准为在小区中, 有 3 朵以上颖花开放, 该时刻为开花时刻, 当日日出时刻至开花时刻的时长为花时。取开花 1/3 左右的主穗, 采用点花法测定亲本开花动态, 每间隔 30 min 调查一次, 剪除已开放颖花并计数。各不同调查环境及气象条件如表 1 所示。用 Microsoft Excel 2010 对数据进行记录、分析处理并绘制图表, 用 SPSS 对数据进行统计分析, 用 Map Chart 绘制遗传连锁图和 QTL 位点。

1.3 遗传图谱构建和 QTL 定位

2021 年秋季, 筛选整齐一致株系, 采集叶片后送于中玉金标记(北京)生物技术股份有限公司, 使用 Affymetrix 水稻 8K SNP 育种芯片进行检测分析。对亲本和 221 个子代的 7214 个 SNP 位点进行分析, 删除掉亲本间无多态性或缺失的标记, 剩余 519 个 SNP 标记。用 QTL Ici Mapping 构建遗传连锁图谱,

表 1 调查环境气象条件

Table 1. Meteorological conditions of the investigation environments

环境	天气	气温	注
Environment	Weather	Temperature(°C)	Note
2022-08-04	阴转多云 Overcast to cloudy	23~29	
2022-08-05	阴转阵雨 Overcast with showers later	21~26	部分晚花时株系受降雨影响未开花 Some late-FT lines failed to bloom due to rainfall
2022-08-07	阴转晴 Overcast to clear	19~30	
2022-08-08	晴 Clear	19~32	
2022-08-09	阴转阵雨 Overcast with showers later	20~30	部分晚花时株系受降雨影响未开花 Some late-FT lines failed to bloom due to rainfall
2022-08-10	阴转阵雨 Overcast with showers later	19~27	雨后花时异常 Abnormal FT after rain
2022-08-14	多云转晴 Cloudy to clear	17~27	群体开花末期 Flowering end period of the population
2023-08-10	多云 Cloudy	20~30	群体开花始期 Flowering initiation period of the population
2023-08-11	多云 Cloudy	20~29	
2023-08-12	阴转阵雨 Overcast with showers later	19~27	
2023-08-14	多云转阵雨 Cloudy with showers later	20~27	
2023-08-17	多云转晴 Cloudy to clear	19~31	
2024-08-02	多云 Cloudy	26~32	闷热, 开花早 Hot and stuffy, early FT
2024-08-03	多云转阵雨 Cloudy with showers later	27~32	闷热, 开花早, 部分晚花时株系受降雨影响未开花 Hot and stuffy, early FT. Some late-FT lines failed to bloom due to the rainfall

删除完全连锁的冗余标记, 最终获得包含 385 个 SNP 标记的遗传图谱, 总图距为 2672.60 cM, 相邻标记间平均遗传距离为 6.94 cM。利用 QTL Ici Mapping 中的完备区间作图法(inclusive composite interval mapping, ICIM)对花时性状进行 QTL 定位和遗传效应分析, LOD 阈值设为 2.5, 作图步长设为 1 cM。QTL 命名参照 McCouch 的方法^[20]。

1.4 花时性状混池构建及 BSA-seq

根据连续两年花时调查数据, 2023 年秋季分别选择早花时株系 21 个、晚花时株系 26 个构建早花时(FT-E)、晚花时(FT-L)混池。混池及两个亲本取叶片后送于青岛百迈克生物科技公司, 采用 CTAB 方法提取基因组 DNA, 构建 350 bp 测序文库, 在 Illumina/BGI 测序平台上对文库进行测序。2 个亲本、2 个混池过滤后的有效数据量达到 53.304 Gb, Q30 在 92%以上, GC 含量为 40.37%~41.46%, 与参考基因组的比对率在 98.9%以上, 5×测序深度下基因组覆盖率达到 95.9%以上, 10×测序深度下基因组覆盖率达到 91.70%以上, 4 个样品的测序数据充足且质量较高。

通过 fastp 对原始数据进行处理, 获得高质量有效数据。采用 bwa-mem2 软件将有效数据比对到参考基因组序列, 使用 GATK 软件进行变异检测,

过滤后得到高质量的 SNP 和 INDEL 数据。通过计算欧式距离(ED)、Δ(SNP-index)来挖掘混池之间的基因频率差距, 分别采用 DISTANCE/SNPNUM、局部加权回归的方法得到关联阈值, 高于阈值的区间作为候选区间。

1.5 主效位点聚合材料筛选与评价

对定位区间内所有分子标记进行分析, 将 221 个重组自交系在定位区间内的类型标记为 139 型和 65 型, 若定位区间内有不同类型的 SNP 标记, 表明区间发生交换, 不进行统计分析。选择稳定表达的主效位点, 在 RIL 群体中筛选出含有多个优异等位型的株系, 评价聚合株系的花时表现, 分析不同位点的聚合效应。

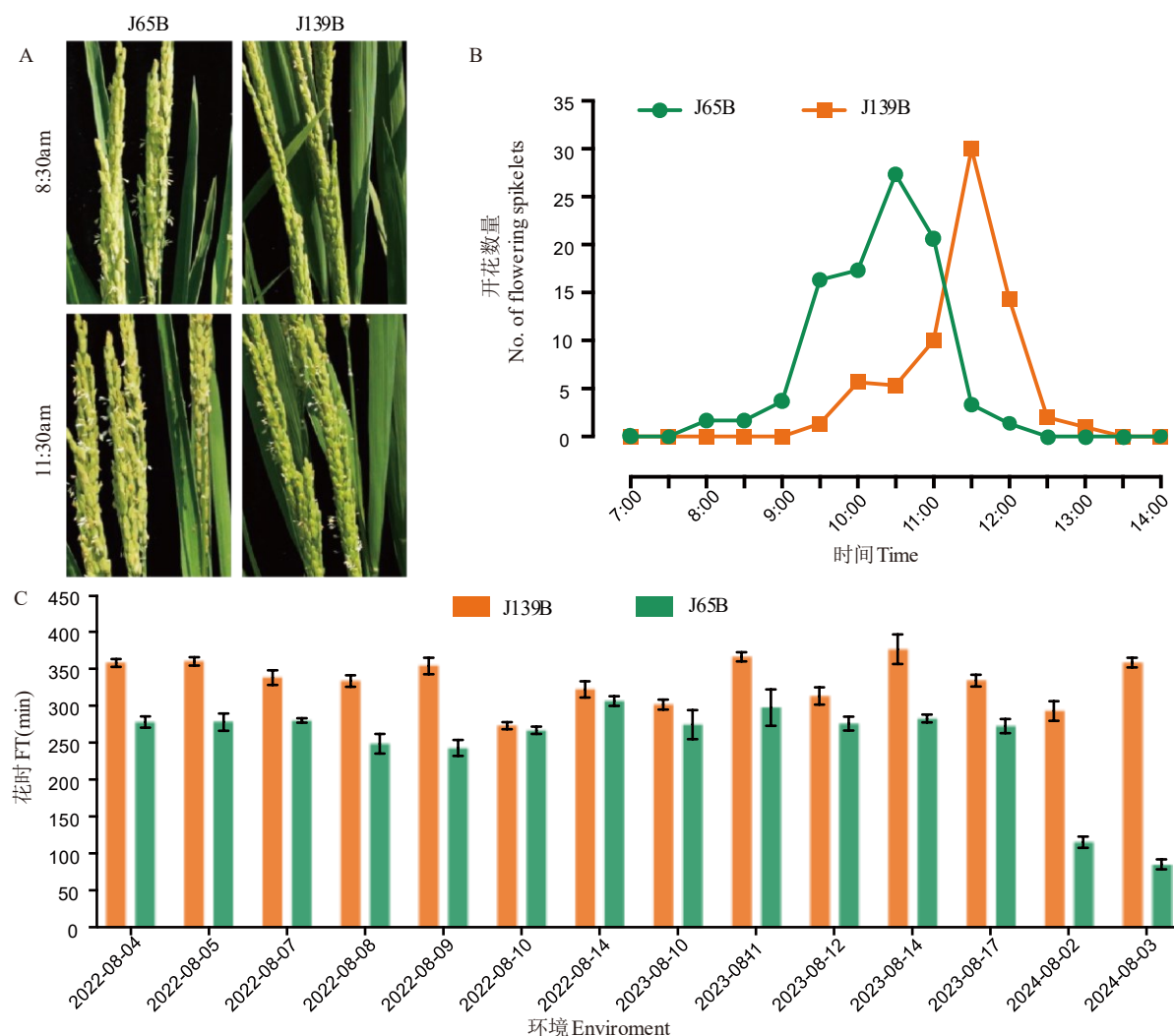
为了排除气象因素对花时的影响, 将不同日期的花时数据整合、分析, 本研究提出相对花时(relative flowering time, RFT)概念, 计算公式如下:

$$RFT_{RIL}=[FT_{RIL}-(FT_{J139B}+FT_{J65B})/2]/(FT_{J139B}-FT_{J65B})\times 100。$$

2 结果与分析

2.1 亲本及 RIL 群体的花时性状表型

2 个亲本及 221 份 J65B/J139B 遗传背景的 RIL



A: 亲本开花动态; B: 亲本在 14 个环境下的花时差异; C: 亲本颖花开放情况。

A, Diurnal-floret-opening-time dynamics of the parents; B, Diurnal-floret-opening-time difference between the two parents under 14 environments; C, Floret-opening-time of the two parents.

图 1 两个亲本花时表现

Fig. 1. Floret-opening time performance of the two parents

群体分别于 2022、2023、2024 年种植于沈阳, 在开花期调查 14 次花时表型。每次调查气象条件不同, 算作 14 个环境。亲本日花时动态显示, J65B 始花时间较 J139B 早约 120 min(图 1-A、B); J65B 盛花时间较 J139B 早 60 min 以上(图 1-B)。始花时间在亲本间差异更大, 且易于调查, 适合作为花时指标用于后续研究。亲本花时数据显示, 同一亲本在不同环境间花时差异达到极显著水平(图 1-C, 图 2, 表 2)。J139B 的花时变异系数为 9.1%, J65B 的花时变异系数为 26.3%, 早花时表型较晚花时表型更易受环境条件影响。在 11 个环境下, 亲本花时差异达到极显著水平(图 1-C, 图 2), 平均花时差为 103 ± 39.7 min, 表明亲本间的花时差是稳定存在的。

在亲本花时存在极显著差异的环境中, RIL 群

体平均花时的变化范围为 237.1~348.2 min, 群体花时差的变化范围是 102.9~281.2 min。单因素方差分析显示 RIL 群体花时在 11 个环境间存在极显著差异, 表明 RIL 群体的花时表型受环境影响较大(表 2)。从 RIL 群体的花时分布情况可知, 群体花时在变异范围内表现出连续的单峰分布; 多数环境中, 偏度都是负值, 为左偏, 说明水稻花时性状为数量性状, 受多基因控制。群体的相对花时分布显示, RIL 群体花时表现出连续的单峰分布, 为左偏的偏峰, 进一步说明水稻花时性状为数量性状, 受多基因控制。

2.2 水稻花时性状的 QTL 定位分析

基于 6K 水稻育种芯片检测结果和 11 个环境下群体花时表型数据, 利用 IciMapping 4.2 软件建立

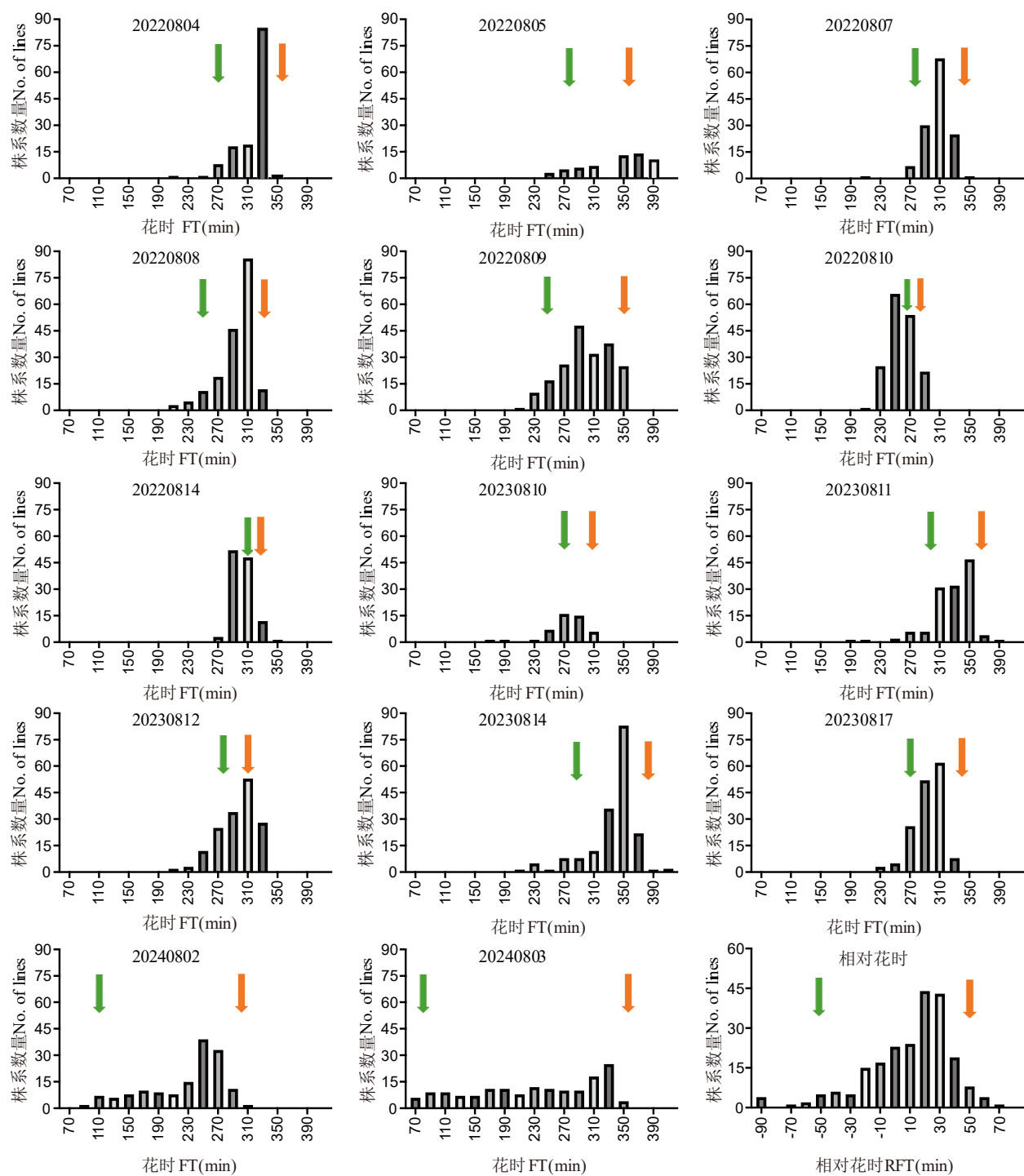


图2 RIL 群体在 14 个环境下花时分布情况
Fig. 2. Distribution of FT in the RIL populations under 14 environments

遗传连锁图谱, 并采用 ICIM-ADD 方法, 对水稻花时性状进行 QTL 分析。结果表明, 在 11 个环境中共检测到 30 个控制水稻花时性状的 QTL, 分布于 2~12 号染色体上, 其中 3、5 号染色体上各有 5 个位点; 2、10、11 号染色体上各有 3 个位点; 6、7、8、9、12 号染色体上各有 2 个位点; 4 号染色体上

有 1 个位点(表 3)。
在 30 个 QTL 中, *qFT5.3* 在 10 个环境中被检测到, *qFT5.5* 在 9 个环境中被检测到, *qFT5.2*、*qFT10.2*、*qFT10.3* 在 8 个环境中被检测到, 是稳定表达的 QTL; *qFT2.3*、*qFT3.4*、*qFT5.4*、*qFT6.2* 在 3 个以上环境中被检测到, 是较为稳定表达的 QTL;

表 2 亲本及 RIL 群体在 14 个环境下的花时性状表现

Table 2. Performance of FT in two parents and the RIL population under 14 environments

环境 Environment	J139B (min)	J65B (min)	群体均值 Mean(min)	幅度 FT difference(min)	标准误 Standard error	偏度 Skewness	峰度 Kurtosis	KS 检验 KS-test	P 值 P-value
2022-08-04	358 b B	277.9 bc C	328.0	130.0	21.9	-1.527	2.840	2.29	0.000
2022-08-05	360 b AB	278 bc C	348.2	141.0	43.2	-0.704	-0.884	1.61	0.011
2022-08-07	338 c CD	280.1 bc BC	318.0	126.0	17.1	-1.524	5.989	1.91	0.001
2022-08-08	333.6 cd D	248.4 d D	304.5	125.0	24.3	-1.453	2.103	2.26	0.000
2022-08-09	354 b BC	242.8 d D	307.8	140.0	33.4	-0.349	-0.699	1.07	0.203
2022-08-10	272.9 h H	266.8 c C	267.5	80.0	16.9	0.109	-0.552	0.83	0.489
2022-08-14	322.1 de DE	306.5 a A	312.9	91.0	13.8	0.434	1.271	1.03	0.236
2023-08-10	301.4 fg FG	274.4 bc C	283.2	135.0	27.3	-2.179	6.351	1.07	0.200
2023-08-11	366.4 ab AB	297.7 a AB	337.5	206.6	30.0	-1.560	4.279	1.55	0.017
2023-08-12	313.1 ef EF	275.9 bc C	305.2	130.9	28.0	-0.813	0.191	1.49	0.024
2023-08-14	376.6 a A	282.7 b BC	344.3	192.6	32.1	-1.524	2.691	2.66	0.000
2023-08-17	333.9 cd D	272.5 bc C	304.0	102.9	19.3	-0.840	1.138	1.09	0.189
2024-08-02	293.1 g G	115.5 e E	237.1	220.0	53.3	-0.952	-0.162	2.57	0.000
2024-08-03	358.3 b B	85.4 f F	238.5	281.2	84.4	-0.322	-1.188	1.60	0.012
均值 Mean	334.4	250.3							
标准差 SD	30.6	65.8							
变异系数 CV	9.1	26.3							

小写字母与大写字母分别表示 0.05 和 0.01 水平显著性差异。

The lowercase and uppercase letters indicate significant difference at 0.05 and 0.01 level, respectively.

表 3 在 11 个环境下花时 QTL 定位结果

Table 3. Information of FT-related QTLs in RILs under 11 environments

QTL	环境 Environment	染色体 Chr.	位置 Position	标记区间 Marker interval	LOD	表型贡献率 Phenotypic variance explained(%)	加性效应 Additive effect
<i>qFT2.1</i>	1	2	32	3548115-5120420	3.69	13.511	15.93
<i>qFT2.2</i>	1	2	160	5211026-10870893	2.50	0.721	14.08
<i>qFT2.3</i>	3	2	174-181	10870893-15640124	2.94-7.67	1.673-3.905	26.8-38.06
<i>qFT3.1</i>	2	3	2-3	1276817-6232373	4.28-5.10	0.993-3.874	3.76-6.51
<i>qFT3.2</i>	2	3	66-68	11778351-15589648	3.11-6.14	0.442-1.631	10.23-24.27
<i>qFT3.3</i>	1	3	133	15589648-15963860	3.65	3.867	35.89
<i>qFT3.4</i>	4	3	157-161	15963860-19173865	2.56-3.36	1.679-3.841	15.65-37.13
<i>qFT3.5</i>	2	3	180-180	21059861-22120274	3.06-3.56	0.512-0.672	10.78-15.3
<i>qFT4</i>	1	4	96	20657255-20765327	2.97	0.183	5.43
<i>qFT5.1</i>	1	5	23	1178896-2313820	3.48	0.895	6.13
<i>qFT5.2</i>	8	5	89-102	3512365-3770562	4.60-16.46	0.271-5.459	18.09-50.52
<i>qFT5.3</i>	10	5	107-119	3770562-5289420	3.11-18.94	0.271-8.945	13.04-50.47
<i>qFT5.4</i>	3	5	211-212	10410805-10847593	2.87-4.59	1.223-3.273	20.33-34.22
<i>qFT5.5</i>	9	5	217-232	11057325-20726014	3.87-13.67	0.271-5.636	16.81-48.85
<i>qFT6.1</i>	1	6	10	1632003-3338507	3.00	0.449	4.09
<i>qFT6.2</i>	3	6	129	26902414-29897327	3.28-7.15	0.555-1.644	6.71-24.23
<i>qFT7.1</i>	1	7	84	10497568-13804874	4.57	3.267	-22.95
<i>qFT7.2</i>	2	7	91-92	13804874-17673544	5.15-6.00	2.731-3.429	-22.09--17.81
<i>qFT8.1</i>	1	8	161	15987810-17697658	2.65	2.313	2.91
<i>qFT8.2</i>	1	8	227	21632760-24890652	3.03	1.061	7.32
<i>qFT9.1</i>	1	9	83	15336683-16946239	10.50	1.399	-10.86
<i>qFT9.2</i>	1	9	94	17736891-19018118	6.09	0.718	8.02
<i>qFT10.1</i>	1	10	22	2340168-2526630	2.95	0.566	6.72
<i>qFT10.2</i>	8	10	97-108	10550006-14355797	2.83-12.27	0.239-5.465	16.27-50.37
<i>qFT10.3</i>	8	10	117-127	14355797-17930367	2.64-11.99	0.236-5.428	16.41-50.93
<i>qFT11.1</i>	1	11	1	5768520-6510910	3.92	3.699	8.52
<i>qFT11.2</i>	1	11	37	8759552-8972803	4.16	0.594	4.73
<i>qFT11.3</i>	1	11	163	23361525-23613051	9.30	1.855	8.82
<i>qFT12.1</i>	1	11	81	19422618-22520720	2.65	0.805	5.81
<i>qFT12.2</i>	2	12	136-148	22520720-25953139	4.35-5.47	3.854-5.540	35.39-46.63

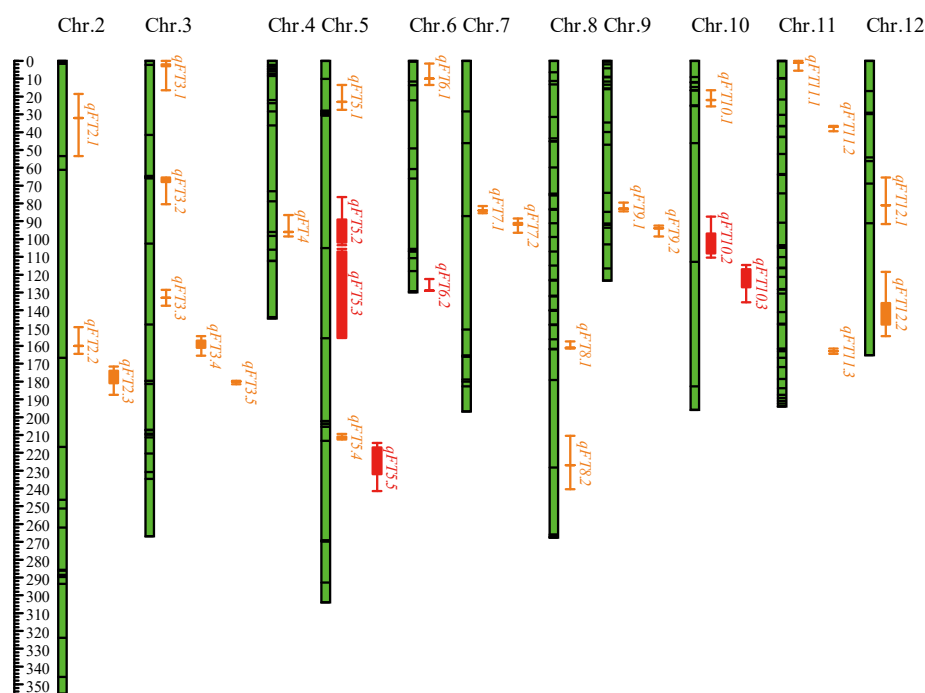


图3 SNP标记和花时QTLs在遗传图谱上的分布

Fig. 3. Distribution of SNP marker and FT-related QTLs on the genetic map

其余位点在1~2个环境中被检测到,是受环境影响较大的QTL(表3)。

稳定表达QTL的LOD值、表型贡献率和加性效应值都表较高。*qFT5.3*在20230814环境中LOD值达到18.94,在2022-08-07环境中表型贡献率达到8.945%,在2024-08-03环境中加性效应值达到50.47。*qFT5.5*、*qFT5.2*、*qFT10.2*、*qFT10.3*在2022-08-05环境中LOD值最高,分别是13.67、16.46、12.27、11.99;在2024-08-03环境中表型贡献率最高,分别达到5.636%、5.459%、5.465%、5.428%;在2024-08-03环境中加性效应值也是最高,分别达到48.85、50.52、50.37、50.93(表3,图3)。因此,这5个位点是稳定表达的主效QTL,对于水稻花时具有重要影响。

2.3 水稻花时性状的BSA定位分析

2.3.1 水稻花时性状的遗传位点发掘

测序数据与参考基因组比对,获得SNP和InDel数据,对数据进一步过滤,获得高质量、可信SNP位点229584个、InDel位点50984个,分别采用ED方法和inDex方法进行标记关联分析。采用ED方法分析SNP数据,计算得到的阈值为0.65,根据阈值判定,得到7个关联区域,总长度为6.38 Mb,7个关联区域有2个位于8号染色体,其余分别位于3、4、5、6、12号染色体;采用Index方法分析SNP数据,当置信度为99%时,共得到6

个关联区域,总长度为6.83 Mb,其中2个区域位于2号染色体,其余分别位于3、5、6、8号染色体。两种分析方法所得结果在3、5、6、8号染色体上的关联区段存在交集(图4-A、图5-A,表4)。

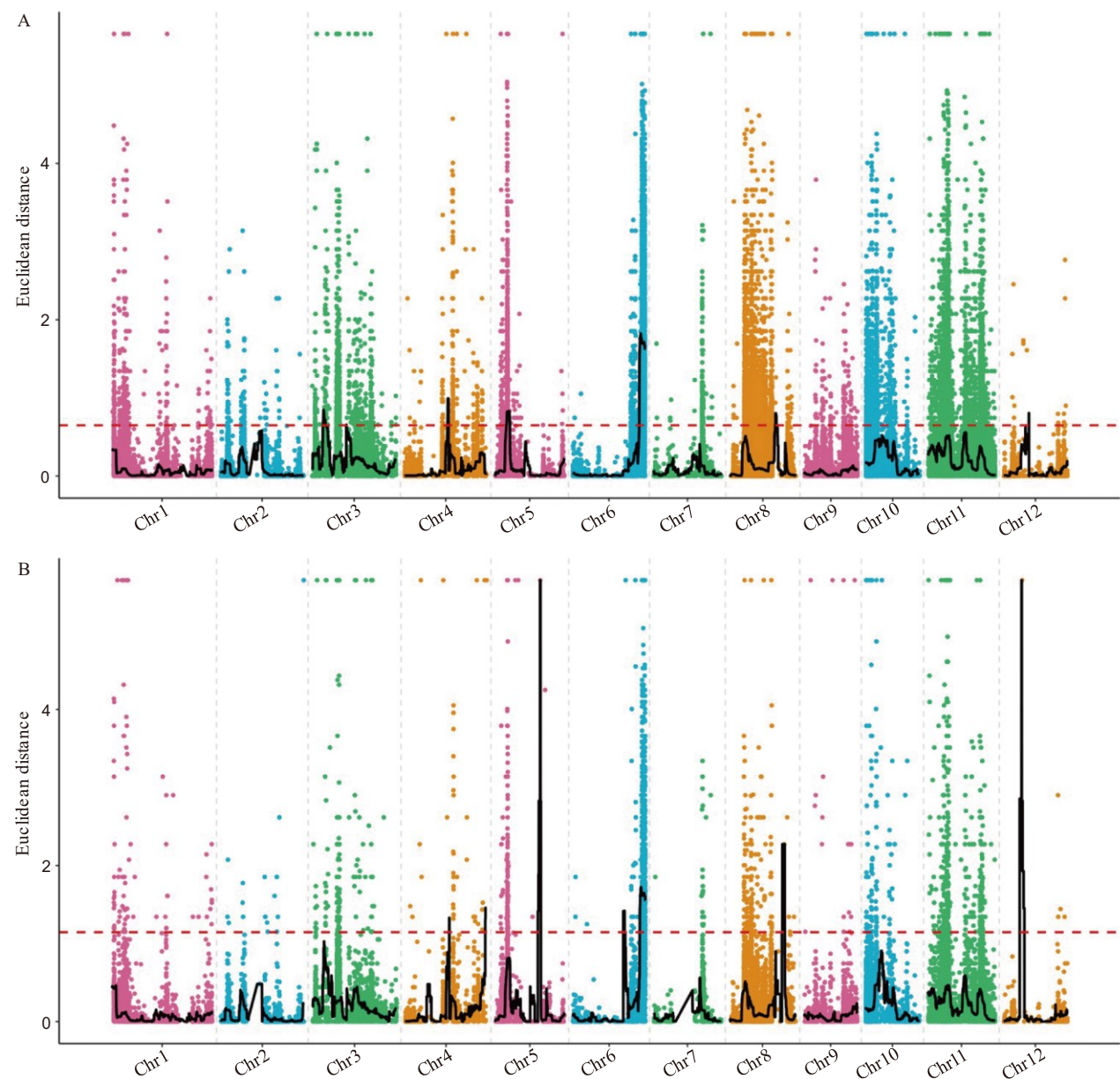
采用ED方法分析InDel数据,计算得到的阈值为1.15,根据阈值判定,得到8个关联区域,总长度为7.63 Mb,其中3个区域位于6号染色体,2个区域位于4号染色体,其余分别位于5、8、12号染色体;采用Index方法分析InDel数据,当置信度为99%时,共得到5个关联区域,总长度为4.01 Mb,其中2个区域位于5号染色体上,其余分别位于3、6、12号染色体。两种分析方法所得结果在5、6、12号染色体上存在交集(图4-B、图5-A,表4)。

综合SNP和InDel关联区域结果,仅在6号染色体上存在交集,表明该区段对于水稻花时表型具有重要影响。

2.4 花时QTL的聚合效应分析

将ICI Mapping定位结果与BSA定位结果进行比对,发现两种定位方法得到的花时性状QTL在4个位点有重叠,其中5号染色体有两个位点有重叠(*qFT5.3*、*qFT5.5*),3号和6号染色体各有1个位点有重叠(*qFT3.1*、*qFT6.2*)(图6)。两种定位方法相互印证,表明这些位点的定位结果真实可靠。

qFT5.3、*qFT5.5*是稳定表达的主效QTL,潜在育种应用价值较高;*qFT6.2*是较稳定表达的QTL,

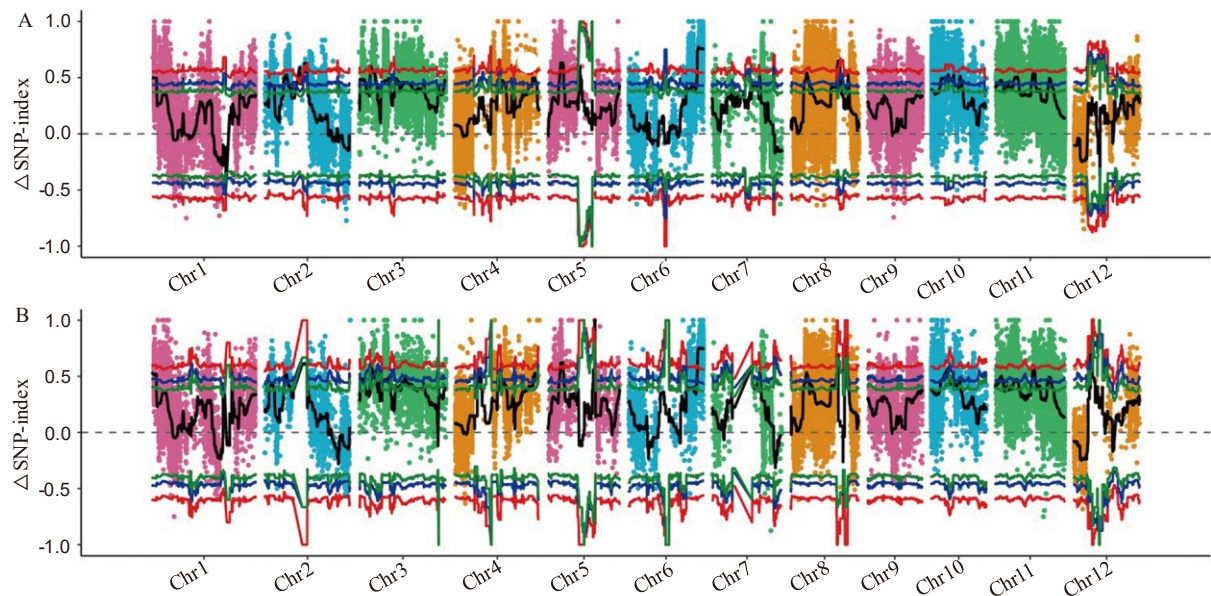


A: ED-SNP; B: ED-InDel. 横坐标为染色体名称, 彩色的点代表每个 SNP 位点的 ED 值, 黑色的线为拟合后的 ED 值, 红色的虚线代表显著性关联阈值。A 图阈值为 0.65, B 图阈值为 1.15, ED 值越高, 代表该点关联效果越好。
A, ED-SNP; B, ED-InDel. The abscissa is the chromosome name. Each coloured dot represents an ED-based linkage value of an SNP/InDel site. Black line represents ED value after fitting. Red dashed line represents linkage threshold. Figure A has a threshold of 0.65 and Figure B has a threshold of 1.15. A larger ED value indicates a stronger linkage of the SNP/InDel site to target trait.

图 4 ED 关联值在染色体上的分布
Fig. 4. Distribution of ED-based linkage value on chromosomes

加性效应在个别环境下可以达到 24.23, 对早花时性状具有重要影响; *qFT3.1* 仅在 1 个环境中被检测到, 加性效应值较低, 育种应用难度较大。*qFT10.2*、*qFT10.3* 是 2 个稳定表达的主效 QTL, 采用 BSA 方法, 利用 SNP 数据, 将置信度下调至 95%, 可以检测到 *qFT10.2* 是 1 个重叠位点, 表明该位点定位结果较为可靠, 且具有较大的育种应用价值(图 7)。
上述 4 个花时 QTL 育种价值较大, 按照亲本

来源可得到 16 种基因型组合。基因型间的相对花时显示, 来源于 J65B 的 QTL 会促进提早开花。4 个位点全部是 J65B 基因型的株系花时最早, 显著早于其他基因型; 其次为 Chr5.3^{J65B}/Chr5.5^{J65B}/Chr6.2^{J65B}/Chr10.2^{J139B} 基因型和 Chr5.3^{J65B}/Chr5.5^{J139B}/Chr6.2^{J65B}/Chr10.2^{J139B} 基因型的株系, 二者花时显著早于 4 个位点全部是 J139B 基因型的株系; 其余基因型株系花时偏晚且与全 J139B 基因型



A: SNP-index; B: InDel-index。横坐标为染色体名称, 彩色的点代表计算出来的 SNP-index/InDel-index 值, 黑色的线为拟合后的 SNP index/InDel-index 值。红色的线代表置信度为 99% 的阈值线, 蓝色的线代表置信度为 95% 的阈值线, 绿色的线代表置信度为 90% 的阈值线。

A, SNP-index; B, InDel-index. The abscissa is the chromosome name. The coloured dot represents the calculated SNP-index/InDel-index value of each SNP/InDel site. The black line is the fitted SNP index/InDel-index value. The red line is 0.99 threshold, the blue line is 0.95 threshold and the green line is 0.90 threshold.

图 5 SNP-index 和 InDel-index 在染色体上的分布

Fig. 5. Distribution of SNP-index and InDel-index on chromosomes

表 4 花时关联区域

Table 4. Association interval of flowering time

数据 Data	基因座 QTL	ED			Index			交集 Intersection		
		起始	终止	片段长度	起始	终止	片段长度	起始	终止	片段长度
		位置 Start	位置 End	Segment size(Mb)	位置 Start	位置 End	Segment size(Mb)	位置 Start	位置 End	Segment size(Mb)
SNP					14650000	14780000	0.13			
					16790000	17840000	1.05			
	<i>qFT3-SNP</i>	4690000	6010000	1.32	4720000	5710000	0.99	4720000	5710000	0.99
	<i>qFT5-SNP</i>	4880000	6390000	1.51	5050000	6420000	1.37	5050000	6390000	1.34
	<i>qFT6-SNP</i>	28740000	31230000	2.49	28750000	31230000	2.48	28750000	31230000	2.48
	<i>qFT8.1-SNP</i>	19550000	19880000	0.33	19250000	20060000	0.81	19550000	19880000	0.33
	<i>qFT8.2-SNP</i>	19910000	20060000	0.15	19250000	20060000	0.81	19910000	20060000	0.15
		18480000	19000000	0.52						
InDel		10920000	10980000	0.06						
					4880000	4910000	0.03			
					5140000	6390000	1.25			
	<i>qFT5-InDel</i>	18410000	19710000	1.30	19380000	19550000	0.17	19380000	19550000	0.17
	<i>qFT6-InDel</i>	28810000	31230000	2.42	28760000	31230000	2.47	28810000	31230000	2.42
	<i>qFT12-InDel</i>	7010000	9000000	1.99	7770000	7860000	0.09	7770000	7860000	0.09
		19010000	19010000	0.00						
		34530000	35140000	0.61						
		21690000	21860000	0.17						
		22180000	22250000	0.07						
		22740000	23810000	1.07						

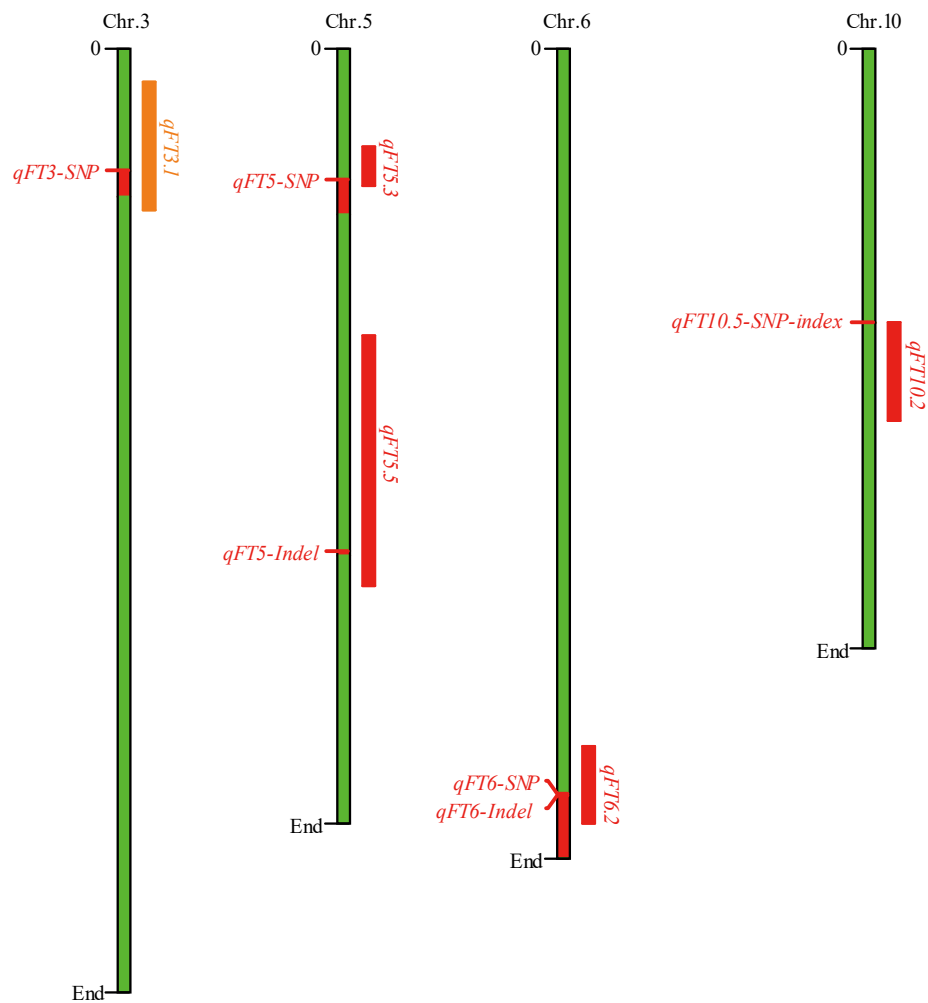


图 6 两种方法定位到的位置重叠 QTL
Fig. 6. QTLs with overlapping regions under two mapping methods

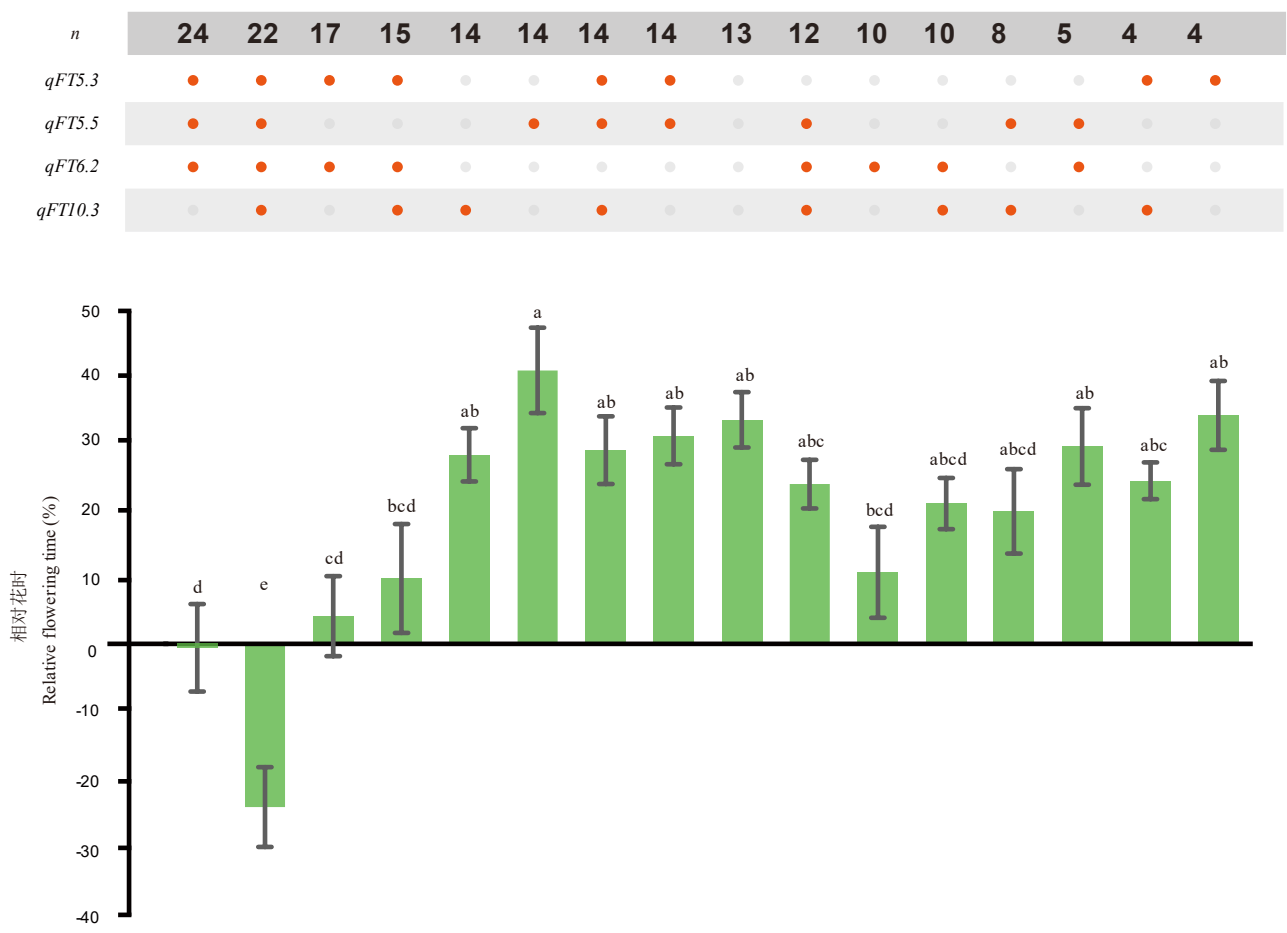
的株系间花时差异不显著。上述结果表明, *qFT5.3* 和 *qFT6.2* 可能是控制早花时性状的基础位点。在这个基础上, 继续导入 *qFT5.5*、*qFT10.2* 位点, 可以进一步提早粳稻保持系花时(图 7)。*qFT5.3*、*qFT6.2*、*qFT5.5*、*qFT10.2* 四个位点对于粳稻保持系花时性状改良具有较大的育种价值。

3 讨论

水稻日开花时间受环境影响较大, 准确评价水稻花时应考虑多种因素的影响。水稻开花初期和开花末期不适合调查花时。从本研究花时调查的不同环境看, 2023-08-10 群体处于始花期, 2022-08-14 群体处于开花末期, 当日开花数量少, 水稻开花无明显规律, 花时调查数据不能准确反映双亲的花时真实特性。降雨后 1 d 水稻花时异常提早, 不适合评价花时性状, 如 2022-08-09 午前开始下雨, 部分

晚花时株系未能开花, 2022-08-10 水稻花时明显偏早, 双亲花时差仅为 6 min, 且未达到显著差异, 表明降雨对第 2 天花时的影响已大于遗传因素影响, 该环境条件下调查的花时数据不适于开展花时性状的 QTL 定位。夜间闷热的晴朗天气适合调查花时, 2024-08-02、2024-08-03 两天为闷热天气, 日最低温度较高, 早花时亲本花时明显提前, 晚花时亲本花时相对稳定, 亲本间花时差较大, 适合对材料的花时性状进行准确评价。

前人利用多种群体, 在 1、2、3、5、7、9、10、12 号染色体上定位到多个花时相关 QTL。本研究中 *qFT5.2*、*qFT5.3*、*qFT5.5*、*qFT10.2*、*qFT10.3*、*qFT6.2* 是稳定表达的主效位点。其中 *qFT10.2*、*qFT10.3* 与白刚^[5]、万国^[7]定位到的 *qFT10.2*、*qFT10* 具有重叠区域, 有可能是同一位点; *qFT5.2*、*qFT5.5* 与白刚^[5]、张萌^[8]定位到的 *qFT5*、*qFT-5b* 位置相近, 是否是同一 QTL 尚需进一步确认; *qFT6.2* 虽加性



小写字母表示 0.05 水平显著性差异。
Lowercase letters indicate the difference at 0.05 level.
图 7 4 个稳定表达主效 QTL 的聚合效应分析
Fig. 7. Pyramiding effect analysis of the four stable main effect QTLs

效应稍低，也只在 3 个环境下被检测到，但 QTL 聚合效应显示其对早花时性状影响较大，该位点尚未见前人报道，是新的花时 QTL。

2017 年以来，水稻花时基因的克隆研究取得较快发展。华中农业大学团队^[14]首先发现了不育系珍汕 97A 的 *OsAOC* 表达量下降，使水稻内源茉莉酸合成受阻，导致不育系花时推迟且离散。围绕水稻茉莉酸代谢途径，华南农业大学和四川农业大学发现 *DFOT1/EMF1* 基因调控水稻浆片细胞壁成分，突变后浆片细胞壁疏松，吸水速率快，开花时间早^[11, 12]；该团队又陆续发现了 *OsMYC2*、*OsOPR7*、*OsJAZ7*、*OsJAZ9*、*OsHANI*、*OsAOS1*、*OsXTH9*、*OsSWEET4*、*OsPIP2;2*、*OsMYB8* 等基因可以参与调控水稻花时表型，其中 *DFOT1* 和 *OsMYC2* 在籼稻中存在早花时单倍型，在粳稻花时改良中具有应用价值^[13-18]。本研究利用两个粳稻品种构建遗传群体，定位到的稳定表达主效 QTL 分布在 5、6、10 号染色体上，定位区间内不包含上述已克隆的花时基因，表明

J65B 的早花时表型主要受其他未知基因调控，是具有进一步挖掘早花时主效位点价值的理想材料。本研究前期对两个粳稻亲本中 *DFOT1*、*OsMYB8* 等早花时基因的测序结果表明，粳 65B 和粳 139B 都是粳稻晚花时单倍型，表明在粳 65B 基础上，定向导入籼稻早花时基因如 *DFOT1*、*OsMYB8*，一方面可进一步改良粳稻保持系的开花习性，也可研究上述基因与粳 65B 中的早花时基因之间的遗传关系，有助于深入解析早花时性状的分子调控机制。

本研究采用两种定位方法共同定位到 4 个稳定表达 QTL，其加性效应较大，是后续深入研究和育种应用的重点。QTL 聚合效益分析显示，*qFT5.3* 和 *qFT6.2* 共同存在即可让后代花时显著早于 J139B，是粳稻保持系花时改良的基础位点。继续导入 *qFT5.5*、*qFT10.2* 两个位点可极显著提早后代花时，是进一步提早花时的重要位点。这 4 个花时 QTL 是控制 J65B 早花时性状的重要位点，潜在育种价值较高，是利用 J65B 改良粳稻保持系花时性

状的重点位点。

参考文献:

- [1] 隋国民. 杂交粳稻研究进展与发展策略[J]. 辽宁农业科学, 2018(1): 51-55+2.
Sui G M. Research progress and development strategy of japonica hybrid rice[J]. *Liaoning Agricultural Sciences*, 2018(1): 51-55+2. (in Chinese with English abstract)
- [2] 邓运, 康蓉蓉, 田小海, 林俊城, 陈淑莲. 12 个杂交水稻不育系异交性能的测定[J]. 作物杂志, 2008(2): 38-42.
Deng Y, Kang R R, Tian X H, Lin J C, Chen S L. Field performance of outcrossing characteristics for twelve male sterile-lines of hybrid rice[J]. *Crops*, 2008(2): 38-42. (in Chinese with English abstract)
- [3] 田大成, 黄三奎, 段永国, 王友红. 水稻不育系花时和受粉时间与异交结实率的关系[J]. 杂交水稻, 2004(3): 53-57.
Tian D C, Huang S K, Duan Y G, Wang Y H. The relationship between flowering and pollination time and outcrossing rate of male sterile lines in hybrid rice seed production[J]. *Hybrid Rice*, 2004(3): 53-57. (in Chinese with English abstract)
- [4] 张雪, 张城, 王彦荣, 陈亚军, 李春凯, 田书军. 6 个水稻三系不育系异交特性研究[J]. 辽宁农业科学, 2021(2): 34-36.
Zhang X, Zhang C, Wang Y R, Chen Y J, Li C K, Tian S J. Outcrossing characteristics of 6 rice CMS lines[J]. *Liaoning Agricultural Sciences*, 2021(2): 34-36. (in Chinese with English abstract)
- [5] Wang M M, Chen M H, Huang Z, Zhou H, Liu Z L. Advances on the study of diurnal flower-opening times of rice[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13): 10654.
- [6] 白刚. 水稻花时性状的 QTL 分析[D]. 成都: 四川师范大学, 2010.
Bai G. QTL analysis for flowering time in rice[D]. Chengdu: Sichuan Normal University, 2010. (in Chinese with English abstract)
- [7] 马作斌, 詹瞻, 徐海, 徐正进, 毛艇, 朱春杰, 郭艳华. 粳粳稻杂交后代花时性状的 QTL 分析[J]. 植物生理学报, 2011, 47(8): 799-802.
Ma Z B, Zhan Z, Xu H, Xu Z J, Mao T, Zhu C J, Guo Y H. QTL analysis on flowering time in filial generations of cross between indica and japonica rice[J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47(8): 799-802. (in Chinese with English abstract)
- [8] 万国, 冯跃, 张凤娇, 徐群, 王一平, 袁筱萍, 余汉勇, 彭锁堂. 水稻花时性状的 QTL 定位[J]. 核农学报, 2013, 27(5): 562-567.
Wan G, Feng Y, Zhang F J, Xu Q, Wang Y P, Yuan X P, Yu H Y, Peng S T. Mapping QTLs for flowering time in rice[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, 27(5): 562-567. (in Chinese with English abstract)
- [9] 张萌. 水稻花时的研究新方法探究及其 QTL 定位[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
Zhang M. New methods developed and QTL mapping for flowering time in rice[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016. (in Chinese with English abstract)
- [10] Hirabayashi H, Sasaki K, Kambe T, Gannaban R B, Miras M A, Mendioro M S, Simon E V, Lumanglas P D, Fujita D, Takemoto-Kuno Y, Takeuchi Y, Kaji R, Kondo M, Kobayashi N, Ogawa T, Ando I, Jagadish K S V, Ishimaru T. qEMF3, a novel QTL for the early-morning flowering trait from wild rice, *Oryza officinalis*, to mitigate heat stress damage at flowering in rice, *O. sativa*[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(5): 1227-1236.
- [11] Che J, Li X, Ouyang Y. To open early or late: Decoding the mystery of diurnal floret opening time in rice[J]. *Plant Communications*, 2024, 5(5): 100889.
- [12] Xu P Z, Wu T K, Ali A, Zhang H Y, Liao Y X, Chen X Q, Tian Y H, Wang W M, Fu X D, Li Y, Fan J, Wang H, Tian Y F, Liu Y T, Jiang Q S, Sun C H, Zhou H, Wu X J. *EARLY MORNING FLOWERING 1 (EMF1)* regulates the floret opening time by mediating lodicule cell wall formation in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2022, 20(8): 1441-1443.
- [13] Wang M M, Zhu X P, Peng G Q, Liu M L, Zhang S Q, Chen M H, Liao S T, Wei X Y, Xu P, Tan X Y, Li F P, Li Z C, Deng L, Luo Z L, Zhu L Y, Zhao S, Jiang D G, Li J, Liu Z L, Xie X R, Wang S K, Wu A M, Zhuang C X, Zhou H. Controlling diurnal flower-opening time by manipulating the jasmonate pathway accelerates development of *indica-japonica* hybrid rice breeding[J]. *Molecular Plant*, 2022, 15: 956-972.
- [14] Liu L, Zou Z S, Qian K, Xia C, He Y, Zeng H, Zhou X, Riemann M, Yin C X. Jasmonic acid deficiency leads to scattered floret opening time in cytoplasmic male sterile rice Zhenshan 97A[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(16): 4613-4625.
- [15] Wang M M, Zhu X P, Huang Z, Chen M H, Xu P, Liao S T, Zhao Y Z, Gao Y N, He J H, Luo Y T, Chen H X, Wei X Y, Nie S A, Dong J F, Zhu L Y, Zhuang C X, Zhao J L, Liu Z L, Zhou H. Controlling diurnal flower-opening time by manipulating the jasmonate pathway accelerates development of *indica-japonica* hybrid rice breeding [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(8): 2267-2281.
- [16] Zhu X P, Wang M M, Huang Z, Chen M H, Xu P, Liao S T, Gao Y N, Zhao Y Z, Chen H X, He J H, Luo Y T, Wei X Y, Zhu L Y, Liu C H, Huang J L, Zhao X H, Zhao J L, Zhang Z M, Zhuang C X, Liu Z L, Zhou H. The OsMYC2-JA feedback loop regulates diurnal flower-opening time via cell wall loosening in rice [J]. *Plant Journal*, 2024, 119(6): 2585-2598.
- [17] Ding W Y, Gou Y J, Li Y J, Li J J, Fang Y D, Liu X P, Zhu X Y, Ye R J, Heng Y Q, Wang H Y, Shen R X. A jasmonate-mediated regulatory network modulates diurnal floret opening time in rice [J]. *The New Phytologist*, 2024, 244(1): 176-191.
- [18] Ding W, Gou Y, Li Y, Li J, Fang Y, Liu X, Zhu X, Ye R, Heng Y, Wang H, Shen R. A jasmonate-mediated regulatory network modulates diurnal floret opening time in rice[J]. *The New Phytologist*, 2024, 244(1): 176-191.
- [19] Gou Y J, Heng Y Q, Ding W Y, Xu C H, Tan Q S, Li Y J, Fang Y D, Li X Q, Zhou D G, Zhu X Y, Zhang M Y, Ye R J, Wang H Y, Shen R X. Natural variation in *OsMYB8* confers diurnal floret opening time divergence between *indica* and *japonica* subspecies[J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 2262.
- [20] 孟帅, 徐鹏, 张迎信, 王宏, 曹立勇, 程式华, 沈希宏. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑粒长基因 *GS3* 改善粳稻花时[J]. 中国水稻科学, 2018, 32(2): 119-127.
Meng S, Xu P, Zhang Y X, Wang H, Cao L Y, Cheng S H, Shen X H. CRISPR/Cas9-mediated editing of *GS3* to improve flowering time in japonica rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2018, 32(2): 119-127. (in Chinese with English abstract)
- [21] McCouch S R. Gene nomenclature system for rice[J]. *Rice*, 2008, 1(1): 72-84.