

DOI:10.11686/cyxb2025117

http://cyxb.magtech.com.cn

张刚, 许兴, 朱林. 基于BSA技术的稗属牧草抽穗期QTL定位及候选基因分析. 草业学报, 2026, 35(3): 210—222.

ZHANG Gang, XU Xing, ZHU Lin. QTL mapping and analysis candidate genes for heading stage in *Echinochloa* based on bulked segregant analysis.

Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(3): 210—222.

基于BSA技术的稗属牧草抽穗期QTL定位及候选基因分析

张刚^{1,2}, 许兴³, 朱林^{1,2*}

(1. 宁夏大学生态环境学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学西北退化生态系统恢复与重建教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021; 3. 宁夏大学林业与草业学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 抽穗期是影响作物产量形成和环境适应性的关键阶段, 解析其分子调控机制对牧草种质资源创新和新品种培育具有重要意义。很多稗属植物是优良的耐盐碱牧草, 然而目前稗属牧草抽穗期的分子调控机制尚不明确, 制约了不同生态区适生品种的分子设计育种和盐碱地的可持续利用。为了系统解析稗草抽穗期的遗传调控网络, 本研究以稗的基因组作为参考基因组, 采用BSA-Seq(bulked segregant analysis sequencing)技术对湖南稗子和宁夏无芒稗及其杂交F_{2,3}群体(共62份样本)进行分析。基于R 4.2.2, 采用Index算法定位抽穗期相关QTL(quantitative trait locus), 通过String数据库构建蛋白质互作网络筛选候选基因, 并利用GO和KEGG数据库对候选基因进行功能注释。研究结果表明: 共鉴定出11347个SNP和1992个Indel有效变异位点; 定位到两个候选QTL: qHD-16-1(193.14 kb, 包含17个基因)和qHD-6-1(11.05 kb, 包含2个基因); 筛选出*EcRCS3*、*EcCYSK*(错义突变)、*EcP0710H01.9*、*EcAPG*、*EcCFAT*、*EcNBA1*共6个关键候选基因。功能注释表明, 这些基因主要通过调控硫代谢、半胱氨酸和蛋氨酸等代谢途径影响开花基因表达或直接影响花芽分化, 从而调控稗草的抽穗期。本研究为稗草分子标记辅助育种提供了重要的基因资源和潜在的分子靶点, 并为盐碱地适生牧草品种的精准选育奠定了理论基础, 具有重要的科学价值和应用前景。

关键词: 稗属牧草; 抽穗期; BSA-Seq; QTL定位; 候选基因分析

QTL mapping and analysis candidate genes for heading stage in *Echinochloa* based on bulked segregant analysis

ZHANG Gang^{1,2}, XU Xing³, ZHU Lin^{1,2*}

1. College of Ecology and Environment, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. Key Laboratory for Restoration and Restruction of Degraded Ecosystem in North-west China of Ministry of Education, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 3. School of Forestry and Grassland Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: Heading date is a crucial agronomic trait that significantly influences crop yield formation and environmental adaptability. Elucidating the molecular regulatory mechanisms of heading date is essential for forage germplasm innovation and for breeding new varieties. *Echinochloa* species (barnyard grass) are ideal forage resources for marginal land utilization because of their remarkable salt-alkali tolerance. However, the molecular mechanisms underlying the regulation of heading date in *Echinochloa* remain unclear. This knowledge gap

收稿日期: 2025-04-07; 改回日期: 2025-06-25

基金项目: 宁夏自然科学基金项目(2024AAC03133)资助。

作者简介: 张刚(1993—), 男, 贵州凯里人, 在读硕士。E-mail: 1792583447@qq.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhulinscience@126.com

substantially constrains molecular breeding of ecologically adapted varieties and the agricultural development of areas with saline-alkali soils. To decipher the genetic regulatory network controlling heading date in barnyard grass, we employed bulked segregant analysis sequencing (BSA-Seq) to analyze *Echinochloa crusgalli* var. *frumentacea*, *Echinochloa crusgalli* var. *mitis*, and their F_{2:3} hybrid population (62 samples in total), using the *Echinochloa* genome as a reference. Then, quantitative trait locus (QTL) mapping was performed using the Index algorithm in R 4.2.2, and a protein-protein interaction network was constructed using the String database to identify candidate genes. Functional annotation of these genes was conducted using the Gene Ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes databases. A total of 11347 single nucleotide polymorphisms and 1992 insertion/deletion mutations were identified as effective variants. Two candidate QTLs were mapped: qHD-16-1 (193.14 kb, containing 17 genes) and qHD-6-1 (11.05 kb, containing two genes). Six key candidate genes [*EcRCS3*, *EcCYSK* (missense mutation), *EcP0710H01.9*, *EcAPG*, *EcCFAT*, and *EcNBA1*] were identified. Functional annotation revealed that these genes regulate heading date primarily by modulating sulfur, cysteine, and methionine metabolic pathways, thereby influencing the expression of flowering-related genes and flower bud differentiation. This study provides valuable genetic resources and potential molecular targets for molecular marker-assisted breeding and offers critical insights into the molecular mechanisms underlying the regulation of heading date in barnyard grass (*Echinochloa* spp.). These findings establish a theoretical foundation for precision breeding of saline-alkali-adapted forage varieties, demonstrating significant scientific merit and promising application prospects for the utilization of saline-alkali land.

Key words: *Echinochloa*; heading stage; BSA-seq; QTL mapping; candidate genes analysis

土壤盐碱化是制约我国西北内陆干旱半干旱地区可持续发展的关键环境因素,科学改良和合理利用盐碱地资源,不仅关乎旱区农业生产的可持续性和农村经济的稳定发展,更是实现国土空间优化治理和生态系统功能提升的重要途径。稗属(*Echinochloa* spp.)牧草是一类繁殖力强、生态适应范围广的1年或多年生禾本科(Gramineae)自花授粉植物^[1]。稗属牧草具显著抗旱和耐盐碱生理特性,兼具有较高的饲用价值,其茎秆及籽粒含有丰富的营养,并且可多次刈割利用,是亚洲地区的主要粮饲作物^[2]。王玉兰等^[3]研究表明,种植在宁夏地区盐碱地的湖南稗子(*Echinochloa crusgalli* var. *frumentacea*)在大旱季节仍能保持较高的种子产量及草产量,是改良和利用盐碱地的优质草种。

抽穗期作为植物从营养生长向生殖生长转变的关键发育阶段,直接决定着作物的种子产量、生物量积累和生态适应性^[4]。抽穗期的精准调控是植物完成生活史和保证繁殖成功的重要生物学基础,更是作物遗传改良的核心研究内容。在模式植物和主要农作物中,抽穗期调控网络研究已取得重要突破。如在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中已鉴定出306个开花相关基因(flowering interactive, <http://www.flor-id.org>),其中,*LFY* (*Leafy*)、*CO* (*Constans*)、*FT* (*Flowering locus t*)、*SOC1* (*Suppressor of overexpression of constans 1*)是核心调控基因。水稻(*Oryza sativa*)的研究更为深入,共定位734个抽穗期相关基因和数量性状位点(quantitative trait locus, QTL) (<http://archive.gramene.org/qlt/>),并阐明以*Hd1* (*Heading date 1*)-*Ehd1* (*Early heading date 1*)-*Hd3a* (*Heading Date 3a*)和*Ghd7* (*Griains height date 7*)为核心的光周期响应通路。在小麦(*Triticum aestivum*)中则发现了春化途径的*Vrn* (*Vernalization*)基因家族(*Vrn-1*至*Vrn-4*)^[5]和光周期响应的*Ppd-1* (*Photoperiod-1*)基因系列(*Ppd-A1/B1/D1*)^[6-7]等。在青稞(*Hordeum vulgare*)中鉴定到早抽穗主效QTL *cqHD2H-2*及其候选基因*HORVU2Hr1G087460* (*HvNF-YB3*)^[8]。相比之下,稗属植物抽穗期分子调控机制研究明显滞后。解析其遗传调控网络,不仅可完善C₄植物发育生物学理论,更能为培育广适性稗草品种提供分子靶点,对推动盐碱地改良和饲草产业发展具有重要实践价值。

集群分离分析法(bulked segregant analysis, BSA)是由Michelmore等^[9]在1991年提出,其原理为选择目标性状差异显著的亲本杂交创建子代分离群体,从子代分离群体中选取极端表型个体(各30~50株),等量混合DNA

构建双亲本和双极端混池,采用 Illumina 平台进行全基因组测序,最后通过单核苷酸多态性指数法(single nucleotide polymorphism-index, SNP-index)、欧氏距离(euclidean distance, ED)和 G' -value 等算法识别关联区间^[10]。相比传统 QTL 定位,BSA-Seq 可在短的周期内,低成本和高精度地定位 QTL。因此,BSA-Seq 技术目前已被广泛应用于多种作物农艺性状相关 QTL 或基因的定位中,如 Takagi 等^[11]用 BSA-Seq 技术鉴定出水稻耐盐候选基因 *OsRR22*,并在 2 年内培育出了耐盐水稻新品种。Gao 等^[12]基于 BSA-Seq 定位到分布在谷子(*Setaria italica*)1 号和 4 号染色体上的 3 个株高相关 QTL(包含 9 个候选基因)。赵卫国等^[13]利用 BSA-Seq 在油菜(*Brassica napus*)A06 染色体上定位到 5 个矮秆性状相关基因 *BnaA06g27050D*、*BnaA06g34100D*、*BnaA06g34810D*、*BnaA06g35080D* 和 *BnaA06g36480D*。

稗属牧草作为典型的短日照植物,其生长发育表现出显著的光周期依赖性。当播种期不合适或引种地理跨度过大时,稗草植株会出现抽穗期紊乱现象,表现为过早、过晚抽穗甚至不抽穗。过早抽穗将导致株高降低、生物产量减少和饲用品质下降,而抽穗延迟则会引起结实率下降、籽粒不饱满及种子产量降低,严重时可导致生殖生长完全停滞。这一光周期敏感性严重限制了稗属牧草品种的跨地区推广应用,成为制约盐碱地生物改良和农牧产业可持续发展的关键瓶颈因素。尽管 Wu 等^[14]通过系统发育学和比较基因组学研究,已鉴定出稗属植物的 *FT*、*Hd1*、*Ehd1* 等 13 个开花相关基因,但对主效基因的深入挖掘及其上下游调控网络的系统解析仍然欠缺。现有关于稗草的研究主要集中于种质资源调查、系统进化分类及抗逆性评价等领域^[2],在优良基因资源开发利用方面研究较为薄弱,特别是关于抽穗期分子调控机制的研究尤为匮乏。

基于此,本研究采用 BSA-Seq 技术,选用抽穗期差异显著的湖南稷子(*E. crusgalli* var. *frumentacea*)和宁夏无芒稗(*Echinochloa crusgalli* var. *mitis*)作为亲本开展杂交育种,构建 $F_{2,3}$ 分离群体。从 $F_{2,3}$ 群体中挑选极端早抽穗和晚抽穗单株各 30 株,连同 2 个亲本进行 DNA 提取和建库,利用 Illumina NovaSeqTM 平台开展高通量测序。通过全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)技术开发全基因组范围内的 SNP 和 Indel 变异标记,采用 Δ SNP-index 和 Δ Indel-index 方法定位与抽穗期性状关联的基因组区域,筛选候选区域和候选基因并进行功能注释。本研究旨在阐明稗属牧草抽穗期的遗传调控基础,为培育具不同发育特性(早熟、中熟、晚熟)的稗草新品种提供科学依据和技术支撑,从而满足不同生态区的生产需求,推动盐碱地资源的可持续利用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究选用的母本‘海子 1 号’湖南稷子是由宁夏草原站万力生研究员于 1987 年培育成功的牧草品种,该品种已通过全国牧草及饲料作物品种审定委员会审定并获得农业部品种登记^[15]。‘海子 1 号’湖南稷子株高 190~220 cm,叶宽 3.00~3.50 cm,具有优良的抗倒伏特性,生育期 150 d 左右。父本材料宁夏无芒稗为禾本科稗属 1 年生植物,是吴素琴研究团队通过长期栽培驯化野生种质获得的地方品种^[16]。其株高 170~200 cm,叶宽 2.50~2.90 cm,生育期 120 d 左右。经细胞学鉴定,两个亲本均为自花授粉的六倍体植物($2n=6x=54$)。本课题组于 2020 年选用晚抽穗型湖南稷子(母本)与早抽穗型宁夏无芒稗(父本)进行杂交试验。为克服双亲花期不遇的问题,采用分期播种方案,母本采用常规单次播种,父本采用分期播种(每周播种一批次),最终获得 F_1 代种子 295 粒。2022 年在宁夏回族自治区平罗县高庄乡试验基地进行 F_1 代种子的大田扩繁,获得 F_2 群体。同年秋季,根据 F_2 群体在抽穗期和穗部性状表现出的明显分离现象,选取偏母、偏父及中间型植株穗子各 50 穗,共 150 穗,创建 $F_{2,3}$ 群体。

1.2 试验方法

1.2.1 大田试验 于 2023 年 4 月 15 日采用条播方式进行田间播种,按单穗单行方式构建穗行圃(单粒传法),设置行距 60 cm,行长 3 m,过道宽度 2 m,总种植面积 1400 m²。在拔节期及孕穗期分别追施尿素 1 次,每次施肥量为 199.50 kg·hm⁻²(折合纯氮 91.80 kg·hm⁻²)。在分蘖期、拔节期、孕穗期各进行 1 次灌溉,共计 3 次,灌水定额为 1200 m³·hm⁻²。其余田间管理均按照常规大田栽培规范执行。

1.2.2 性状调查与记录 当植株主穗穗尖突破剑叶叶鞘且外露长度 ≥ 1 cm时,判定为该单株进入抽穗期,并记录具体日期。田间首个抽穗植株出现后,每隔 2~4 d 调查 1 次。将各株系从播种到抽穗的时间作为该株系的抽穗期表型值,采用 Tukey 法识别并剔除异常值,以株系内有效观测单株的抽穗期算术均值作为该株系的抽穗期表型值^[17]。

1.2.3 材料处理与全基因组测序分析流程 基于 $F_{2,3}$ 群体抽穗期表型鉴定结果,分别选取极端早抽穗和晚抽穗单株各 30 株,连同双亲材料(湖南稷子和宁夏无芒稗),采集幼嫩叶片样本。样品经锡箔纸包裹后立即放入液氮中速冻,并送至上海美吉生物医药科技有限公司进行建库和测序分析。采用改良 CTAB 法^[18]提取叶片基因组 DNA,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性和污染情况,使用 NanoDrop (ND-2000) 技术检测 DNA 浓度及纯度,筛选合格样本 ($OD_{260/280}$ 为 1.8~2.0, $OD_{260/230} \geq 2.0$) 构建测序文库。样品检测合格后,将 30 株早抽穗的 DNA 等量混合成早抽穗混合池,30 株晚抽穗的等量混合成晚抽穗混合池。利用 DNA 超声波破碎仪 (Covaris M220, 美国) 将 2 个混合池和 2 个亲本的 DNA 片段化至 350 bp,经末端修复、加 A 尾和接头连接等步骤完成文库构建。采用 Illumina NovaSeq™ 平台进行测序,测序策略为 Illumina PE150,测序深度为:亲本 12.39 \times ,子代 34.12 \times 。对测序所得到的原始数据进行 Fastp^[19] 质控,去除接头和低质量序列,将过滤得到的 Clean reads 通过 BWA 软件的 MEM2 方法^[20] 比对至稗参考基因组上(基因组信息: *Echinochloa crusgalli*, 1278.6 Mb, 网址: https://plants.ensembl.org/Echinochloa_crusgalli/Info/Index)。比对结果经 Picard 软件的 MKDUP 功能去除重复,利用 GATK^[21] 的 Best practices 流程处理比对结果 (BAM 文件),利用 GATK 的 HaplotypeCaller 方法进行变异 SNP 和 Indel 的开发,过滤条件按照 GATK 推荐的参数进行 (<https://software.broadinstitute.org/gatk/documentation/article.php?id=3225>),使用 SnpEff 软件^[22] 结合参考基因组信息对所有的变异位点进行基因功能预测,并对变异位点功能进行注释。

1.2.4 候选基因筛选及功能注释 基于基因分型的结果,筛选亲本间纯合差异的多态性位点。以亲本互为参照,以公式(1)~(3)为基础用 R 4.2.2 计算 2 个子代混合池变异位点的 SNP-index 和 Indel-index,以所有 SNP-index 和 Indel-index 的平均值作为该窗口的 SNP-index 和 Indel-index。计算 2 个混池间 SNP-index 和 Indel-index 差,即为 Δ Indel-index 和 Δ SNP-index^[23-24]。为了降低单一变异位点带来的随机波动,采用滑窗(默认设置:1 Mb 窗口,10 kb 步长)和 loess 拟合 2 种方法对 Δ SNP-index 和 Δ Indel-index 值进行降噪处理。为了提高分析准确性,对滑窗结果均使用 bootstrap 法,针对不同位点深度和混池大小随机抽样 0.005 次,之后以阈值 $P \leq 0.995$ 作为阈值线。对于 loess 拟合则采用 1000000 分位数作为阈值线,选取阈值线之上变异位点作为候选区间。基于 String 数据库,对采用上述 2 种方法确定的 QTL 内基因进行蛋白质互作网络 (protein-protein interaction networks, PPI) 分析筛选候选基因,利用 R/clusterProfile 3.16 软件对候选基因进行 GO 和 KEGG 数据库注释,并对其进行功能预测。

$$Index_{wild} = \frac{Dep_w}{Dep_M + Dep_w} \quad (1)$$

$$Index_{Mut} = \frac{Dep_M}{Dep_M + Dep_w} \quad (2)$$

$$\Delta Index = Index_{Mut} - Index_{wild} \quad (3)$$

式中: Dep_M 和 Dep_w 分别为突变型和野生型的等位基因在突变池与野生池中的 Reads 数目。

2 结果与分析

2.1 稗属牧草抽穗期的表型特征

对亲本及 $F_{2,3}$ 群体的抽穗期性状进行统计分析(表 1 和图 1)可知,亲本抽穗期处于 $F_{2,3}$ 群体范围内,抽穗期在双亲之间差异显著 ($P < 0.05$)。 $F_{2,3}$ 群体的抽穗期具有超亲分离现象,平均为 94.00 d,变异范围为 66.00~130.00 d,变异系数 (coefficient of variation, CV) 为 20.39%。通过数据正态分布的适合性检验发现,抽穗期的偏度为 0,峰度绝对值小于 2,说明性状的表型符合正态分布,具有典型的数量性状遗传特征。

表1 亲本和F_{2,3}代群体抽穗期天数分布特征Table 1 Distribution characteristics of the heading stage days of the F_{2,3} generation population and parental

项目 Item	亲本均值 Parental mean (d)		F _{2,3} 群体 F _{2,3} population					
	湖南稷子 <i>E. crusgalli</i> var. <i>frumentacea</i>	宁夏无芒稗 <i>E. crusgalli</i> var. <i>mitis</i>	标准差 Standard deviation	平均值 Mean (d)	变异范围 Range of variation (d)	变异系数 Coefficient of variation (%)	峰度 Kurtosis	偏度 Skewness
	抽穗期 Heading stage	109±9.35a	96±10.80b	19.17	94.00	66.00~130.00	20.39	-1.20

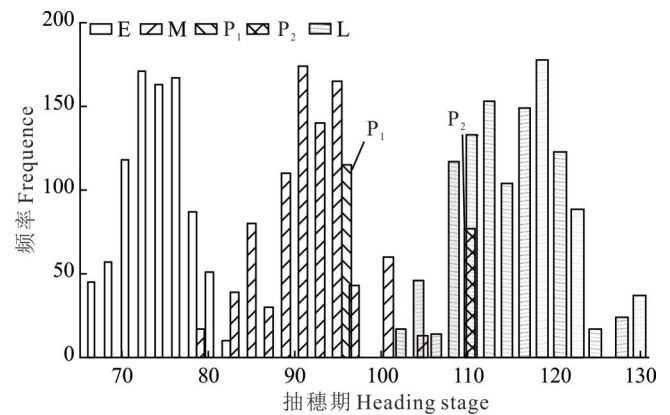
注: 同行不同小写字母表示两者间差异显著($P < 0.05$)。

Note: Values within a row followed by different lowercase letters are significantly different at $P < 0.05$.

2.2 测序质量评估

由表2可知,用高通量测序技术对检测合格的亲本及子代混合池共4个样本进行全基因组测序,平均测序深度父母本在(11.58×)~(13.20×)间,子代混合池则在(33.81×)~(34.42×)间,共获得120.46 G原始测序数据,经过数据过滤后,最终得到116.99 G高质量的Clean reads数据。GC含量为45.73%~48.35%,GC分布正常, $Q_{30} \geq 94.82\%$,测序数据质量较高。

使用BWA软件将Clean reads比对到稗的参考基因组。4个样本的比对率介于98.97%~99.75%,数据比对率高。在不同染色体区域的覆盖度和测序深度分布情况上,1×覆盖率百分比父母本超过91.57%,子代混合池超过93.69%,4×覆盖率百分比父母本超过81.55%,子代混合池超过91.35%。参考基因组被均匀覆盖,随机性良好。

图1 亲本和F_{2,3}群体抽穗期性状频率分布Fig. 1 Frequency distribution of heading stage in parents and F_{2,3} population

E: 早抽穗群体 Early heading population; M: 中间型群体 Intermediate population; L: 晚抽穗群体 Late heading population; P₂: 湖南稷子(母本) *E. crusgalli* var. *frumentacea* (Female); P₁: 宁夏无芒稗(父本) *E. crusgalli* var. *mitis* (Male).

表2 原始测序和质控后测序数据与参考基因组比对结果统计分析

Table 2 Quality statistics of raw data and matching of quality control data with reference genome

样本名 Sample ID	宁夏无芒稗 <i>E. crusgalli</i> var. <i>mitis</i>	湖南稷子 <i>E. crusgalli</i> var. <i>frumentacea</i>	早抽穗混合池 Early heading pool	晚抽穗混合池 Late heading pool
原始序列数 Raw reads	110698444	97387918	293041906	296602604
原始碱基数 Raw bases (bp)	16715465044	14705575618	44249327806	44786993204
过滤序列数 Clean reads	108936494	95849704	287622304	291064822
过滤碱基数 Clean bases (bp)	16249584281	14308880560	42973291907	43460506570
GC含量 GC content (%)	48.35	46.63	45.73	46.13
Q ₃₀ 含量 Q ₃₀ content (%)	94.82	94.96	94.97	95.06
比对率 Mapped ratio (%)	99.72	99.75	98.97	99.48
优质比对率 Proper ratio (%)	96.38	96.61	96.07	96.60
插入片段长度 Insert fragment length (bp)	338	345	323	310
平均测序深度 Average sequencing depth	13.20	11.58	33.81	34.42
覆盖度(≥1×) Coverage (≥1×) (%)	91.57	91.93	93.84	93.69
覆盖度(≥4×) Coverage (≥4×) (%)	81.55	84.93	91.36	91.35

注: 覆盖度(≥1×)和(≥4×)表示每个碱基在测序中平均被读取1和4次。

Note: Coverage (≥1×) and (≥4×) indicates the percentage of bases that are read at least once and four times during sequencing.

2.3 SNP和Indel的检测和注释

根据检测和注释结果进行SNP和Indel变异位点统计分析(表3)。4个样本中SNP和Indel变异位点数量均表现为宁夏无芒稗最少,分别为2610012和429336个,早抽穗混合池数量最多,分别为2829785和489104个。4个样本间,同一类型的SNP和Indel数量比例大致相当。SNP和Indel变异位置信息均主要包括7种类型。其中,大部分SNP和Indel位于基因区间,而非编码转录突变、外显子缺失突变和终止子编码突变类型的Indel和SNP较少。

2.4 候选区域的定位与分析

以亲本基因型为参照,对所获变异位点再一次进行过滤,过滤去除非二态性(有多种基因型)的变异位点,筛选2个亲本间纯合差异的遗传标记,过滤后获得SNP 11347个,Indel 1992个,基因4254个(图2)。

对经过亲本标记过滤的子代变异位点用Index方法计算2个子代混池的 Δ SNP-index和 Δ Indel-index,再用Index-slid和Index-loess两种算法进行关联分析。基于滑窗的SNP-index在16号染色体上定位了1个长度为0.19 Mb(2296912~2490050 bp)的区域。基于loess拟合的SNP-index在6号染色体上定位到1个长度为9.9 Mb(6914689~16813256 bp)的区域(图3)。

基于滑窗的Indel-index共获得11个与性状相关的候选区域,分布在1、2、4、13、14、16、17、26、6、7、8号染色体上。基于loess拟合的Indel-index共获得7个与性状相关的候选区域,分布在2、6、7、21、24、26、4号染色体上(图4和表4)。

结合两种方法,在6号染色体上,loess拟合的Indel-index与SNP-index共同定位到9.9 Mb(6914689~16813256 bp)包含944个基因的qHD-6-2,滑窗的Indel-index与SNP-index共同定位到11.05 kb(16802203~16813256 bp)包含2个基因的qHD-6-1。其中qHD-6-2包含qHD-6-1,因此推测qHD-6-1为候选QTL。在16号染色体上,loess拟合和滑窗的Indel-index与SNP-index共同定位到193.14 kb(2296912~2490050 bp)包含17个基因的qHD-16-1,确定其为候选QTL。

2.5 候选基因的筛选与功能注释

对qHD-6-1和qHD-16-1的共19个基因进行GO、KEGG富集分析,并按 P_{adjust} 排序对前20个GO和KEGG注释信息进行重点分析。其中GO数据库分别从细胞组分、分子功能、生物学过程3个方向对基因进行分类注释。19个基因中有14个富集在GO数据库的89个term中,包括

表 3 多态性位点注释统计

SNP 变异位点信息	宁夏无芒稗		湖南稷子		早抽穗混合池		晚抽穗混合池	
	<i>E. crusgalli</i> var. <i>mitis</i>	<i>E. crusgalli</i> var. <i>frumentacea</i>	<i>E. crusgalli</i> var. <i>frumentacea</i>	<i>E. crusgalli</i> var. <i>frumentacea</i>	Early heading pool	Late heading pool	Early heading pool	Late heading pool
起始密码子丢失 Start lost	538	521	538	521	550	557	198	188
终止密码子丢失 Stop lost	539	536	539	536	586	553	184	188
终止密码子获得 Stop gained	2874	2934	2874	2934	3252	3030	528	509
非同义突变 Nonsynonymous mutation	118535	120467	118535	120467	129985	124244	469267	448800
同义突变 Synonymous mutation	67254	68338	67254	68338	73371	70561	18908	18208
基因区间 Intragenic region	2420168	2436130	2420168	2436130	2621923	2544620	13	17
终止子编码突变 Stop retained mutation	104	111	104	111	118	113	6	3
SNP 和 Sum SNP	2610012	2629037	2610012	2629037	2829785	2743678	489104	467913
SNP 总数 Total SNP	2882936	2919872	2882936	2919872	3139343	3039142	582001	558165

75个生物学过程,6个细胞组分和8个分子功能。前20个功能组包括18个生物学过程、2个分子功能;在生物学过程中,这些基因主要参与代谢、生物合成等生物学过程;在分子功能中,这些基因主要参与结合、催化活性等功能。在KEGG数据库中,有4个基因富集在硫代谢,半胱氨酸和蛋氨酸代谢,乙醛酸和二羧酸代谢,色氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,柠檬酸循环(TCA循环),缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解,赖氨酸降解,丙酮酸代谢,同源重组,糖酵解/糖异生和丙酸代谢通路中(图5)。

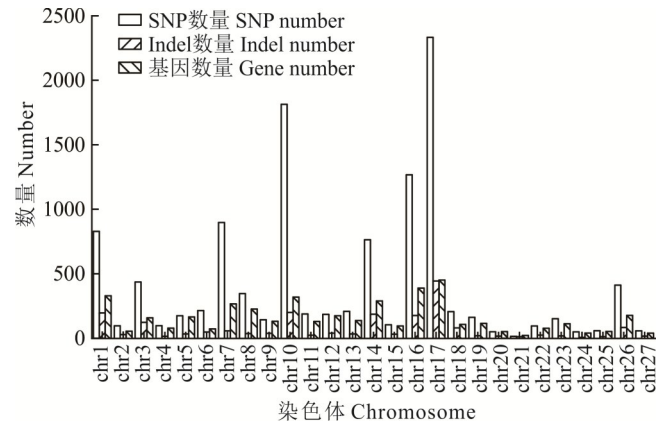


图2 二次过滤后获得的数据信息

Fig. 2 Data information obtained after secondary filtering

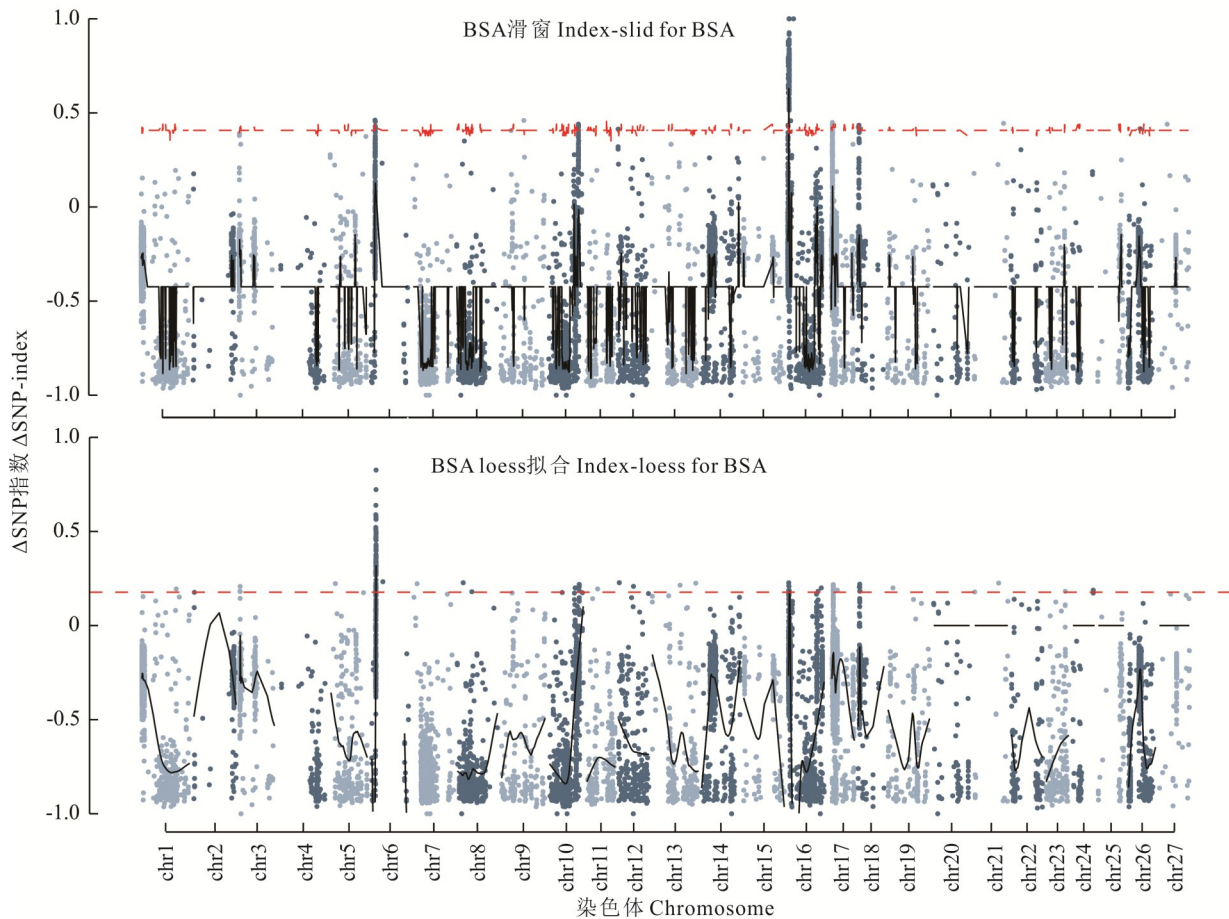


图3 Δ SNP-index 定位候选区间

Fig. 3 Locating candidate intervals with Δ SNP-index method

数量表型性状一般由多个基因联合调控,进一步对2个QTL中的19个基因进行PPI分析表明(图6),*EcRCS3*、*EcCYSK*、*EcP0710H01.9*和*EcCFAT*基因间存在蛋白互作,*EcAPG*和*EcNBA1*基因间存在蛋白互作。以此,将*EcRCS3*、*EcCYSK*、*EcP0710H01.9*、*EcAPG*、*EcCFAT*、*EcNBA1*共6个基因推测为控制稗属牧草抽穗期的候选基因,其中*EcCYSK*为非同义突变基因(表5)。进一步对这6个基因进行KEGG富集分析(图7),结果显示,*EcRCS3*、*EcCYSK*、*EcP0710H01.9*参与硫代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路,*EcNBA1*参与同源重组代谢通路。

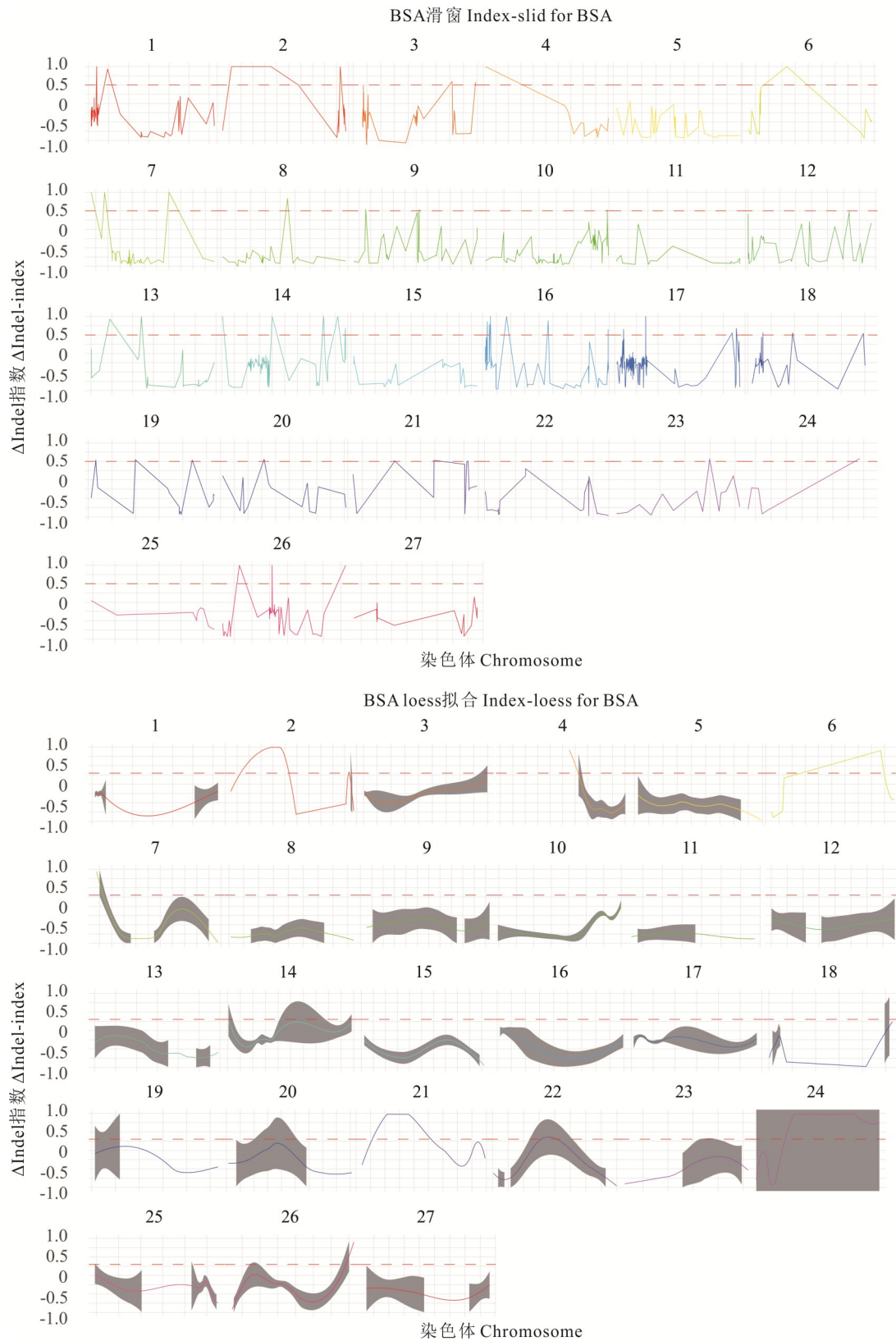


图 4 Δ Indel-index 定位候选区间

Fig. 4 Locating candidate intervals with Δ Indel-index method

3 讨论

传统作物育种方法存在周期长、效率低等局限性,随着高通量测序技术的快速发展,分子标记辅助育种 (molecular marker assisted breeding, MAS) 技术通过实现目标性状的精准选择,显著提高了育种效率^[10]。稗属牧

表 4 Indel-index 算法关联的区间

Table 4 Indel-index correlation interval

Loess 拟合 Loess fitting			滑窗策略 Sliding window strategy		
染色体 Chromosome	开始位置 Start position	结束位置 End position	染色体 Chromosome	开始位置 Start position	结束位置 End position
2	17062211	51531094	1	4108439	9491129
6	6601800	16813256	13	9003411	9044483
7	6840956	9180095	14	40414541	49041093
21	10182932	41322793	16	1612839	2819921
24	28707547	28722744	17	32032451	32989414
26	15686452	36334572	26	15686452	36334572
4	5777936	5787128	6	16802203	16813256
			7	3110078	8649515
			8	19854393	24310847
			2	17062211	51531094
			4	5777936	5787128

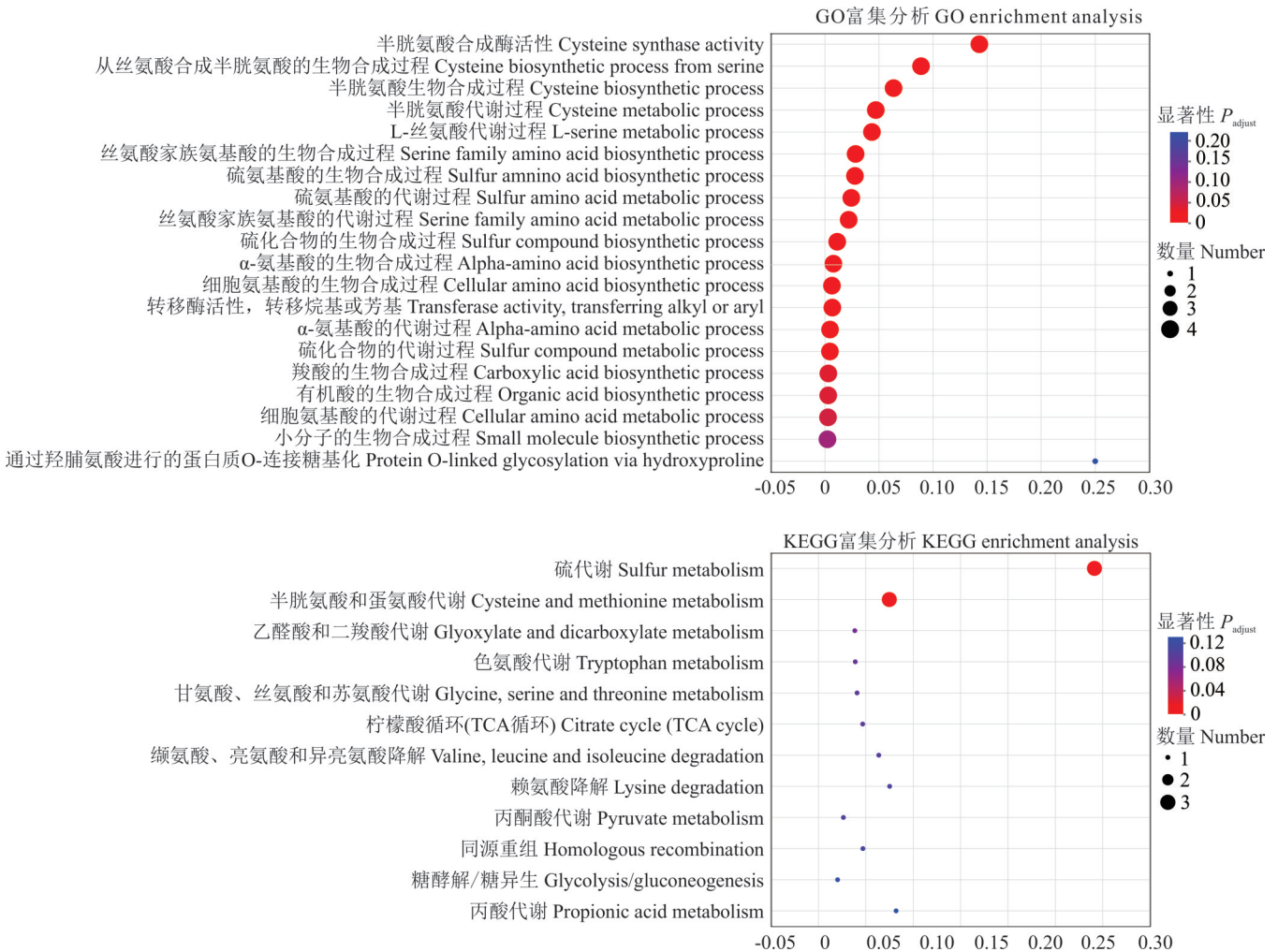


图 5 qHD-16-1 和 qHD-6-1 基因的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 5 Annotation analysis of qHD-16-1 and qHD-6-1 gene GO and KEGG databases

草作为干旱半干旱地区农牧业生产的重要饲草资源,其品种改良对保障区域粮饲安全具有战略意义^[3]。因此,解析稗属牧草抽穗期的分子遗传机制,对利用MAS技术培育具有优良农艺性状的新品种具有重要的理论价值和实

践意义^[25]。

本研究采用 BSA-Seq 技术,在 16 和 6 号染色体上成功定位到 3 个与稗草抽穗期相关 QTL,并将其中 193.14 kb (2296912~2490050 bp) 包含 17 个基因的 qHD-16-1 和 11.05 kb (16802203~16813256 bp) 包含 2 个基因的 qHD-6-1 推测为候选 QTL。数量表型性状一般是由多个基因协同调控,本研究对 2 个 QTL 中的 19 个候选基因进行了蛋白质互作网络分析(图 6),结果表明 *EcRCS3*、*EcCYSK*、*EcP0710H01.9* 和 *EcCFAT* 基因之间存在蛋白互作关系,*EcAPG* 和 *EcNBA1* 基因之间也存在明显互作。通过功能注释分析(表 5),最终筛选出 6 个调控稗属牧草抽穗期的关键候选基因:*EcRCS3*、*EcCYSK*、*EcP0710H01.9*、*EcAPG*、*EcCFAT*、*EcNBA1*。这 6 个基因的功能分别为半胱氨酸合酶(*EcRCS3*、*EcCYSK*、*EcP0710H01.9*)、GDSL 酯酶/脂肪酶(*EcAPG*)、松柏醇酰基转移酶(*EcCFAT*)、BRISC 复合物(*EcNBA1*) (表 5),其中 *EcRCS3*、*EcCYSK*、*EcP0710H01.9* 参与硫代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路,*EcNBA1* 参与同源重组代谢通路(图 7)。

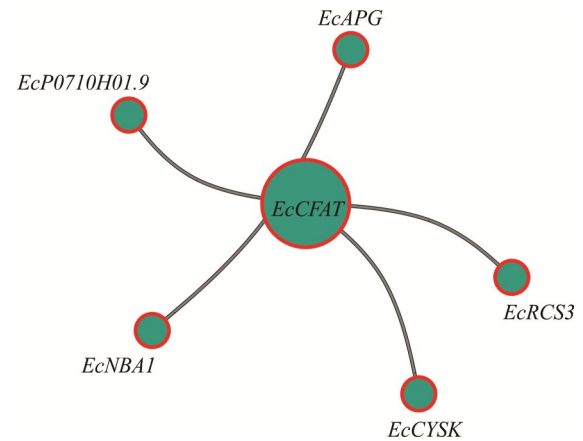


图 6 19 个基因 PPI 蛋白质互作网络分析

Fig. 6 PPI analysis of the protein-protein interaction network of 19 genes

表 5 候选基因功能分析

Table 5 Functional analysis of candidate genes

染色体 Chromosome	基因名 Gene name	基因位置起 Start site of the gene	基因位置结 End site of the gene	功能 Function	变异注释 Variant annotation
16	<i>EcRCS3</i>	2363209	2369975	半胱氨酸合酶 Cysteine synthase	内含子变异 Intron_variant
16	<i>EcCYSK</i>	2375433	2377934	半胱氨酸合酶 Cysteine synthase	非同义突变 Nonsynonymous mutation
16	<i>EcP0710H01.9</i>	2372051	2374659	半胱氨酸合酶 Cysteine synthase	下游基因变异 Downstream_gene_variant
16	<i>EcAPG</i>	2320024	2321505	GDSL 酯酶/脂肪酶 GDSL esterase/lipase	基因区间 Intergenic_region
16	<i>EcCFAT</i>	2455168	2456550	松柏醇酰基转移酶 Coniferyl alcohol acyltransferase	下游基因变异 Downstream_gene_variant
16	<i>EcNBA1</i>	2382266	2384322	BRISC 复合物 BRISC complex	下游基因变异/内含子变异 Downstream_gene_variant/Intron_variant

植物抽穗是一个复杂的生理生化过程,需要有足够的能量物质供应,同时受内源激素的精确调控。在氨基酸代谢通路中,半胱氨酸和蛋氨酸作为关键代谢物,通过参与植物的生理代谢和信号转导过程,不仅调控花芽分化和开花时间,还影响花粉发育和质量^[26]。Wang 等^[27]对不同生育期水稻的根、茎、叶、花蕾等器官的非编码转录组(lincRNAs)进行研究,编码半胱氨酸合成酶的 *RCS3* 基因在水稻的花蕾和花朵中特异性高表达,而编码半胱氨酸合成酶的另一基因 *P0710H01.9* 基因则在花期的花蕾、根和叶部位呈差异表达模式。Huang 等^[28]对活性氧(reactive oxygen species, ROS)激发蛋白质相分离控制干细胞命运的研究进一步揭示了半胱氨酸通过氧化形成二硫键,促进 TMF(terminating flower)蛋白质相分离,进而调控花原基分化基因 *AN(Anatha)* 的表达,从而精准调控番茄(*Solanum lycopersicum*)的茎尖分生组织的成熟和开花,这一机制为理解开花调控提供了新的视角。在含硫氨基酸代谢网络中,半胱氨酸和蛋氨酸可相互转化^[29-31]。蛋氨酸是多胺和乙烯生物合成的重要前体物质^[32]。多胺作为调节植物生长和发育的“第二信使”,能直接激活开花相关基因的表达,促进花芽形成、性别分化、雌雄蕊发育等生殖生长过程^[33]。乙烯作为植物重要的内源激素,通过乙烯受体 ETR(ethylene receptor)家族→CTR(constitutive triple response)家族→*EIN2(Ethylene insensitive 2)*→*EIN3(Ethylene insensitive 3)/EILs(Ethylene*

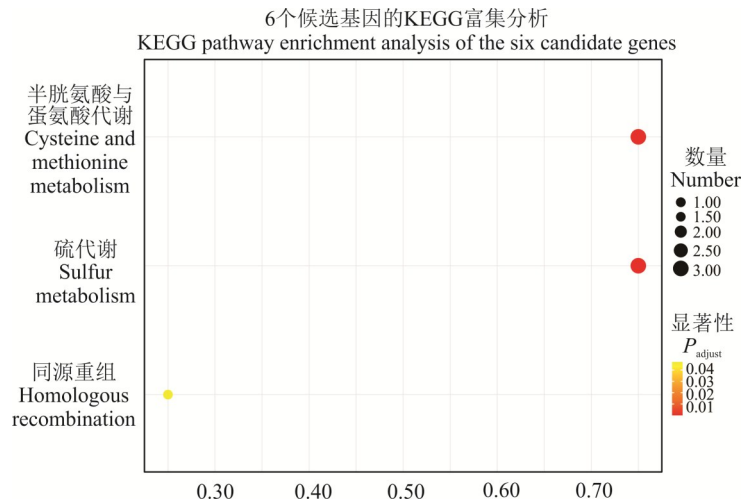


图7 候选基因 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment analysis of candidate genes

insensitive 3-like1) → ERF (ethylene response factor) → 乙烯反应相关基因表达^[34], 调控植物生长发育的多个环节^[35]。近年研究发现, 乙烯信号通路通过多层次的分子机制调控植物开花时间。Xu 等^[36]在拟南芥中的研究表明, 乙烯信号转导关键因子 *EIN3* 及其同源蛋白 *EIL1* 能够特异地与组蛋白去甲基化酶 *FLD* (flowering locus d) 相互作用, 通过表观遗传调控方式抑制 *FLC* (*Flowering locus c*) 基因的表达, 从而促进开花进程。这一发现揭示了乙烯信号与表观遗传调控的交叉作用机制。与此同时, Chen 等^[37]的研究则发现乙烯响应因子 *ERF1* (ethylene response factor 1) 可直接结合 *FT* (*Flowering locus t*) 基因启动子区域, 抑制其转录活性, 导致开花延迟。这两项研究共同阐明了乙烯信号通路在开花时间调控中的双重作用机制。在生殖发育的细胞学层面, 同源重组作为减数分裂的核心生物学过程, 通过确保染色体精确分离和遗传物质稳定传递, 对植物抽穗和结实等生殖生长过程具有决定性作用^[38-39]。最新研究表明, 这一过程与植物内源激素网络存在复杂的互作关系。例如, 赤霉素等植物激素能够特异性调节同源重组相关基因的表达, 进而影响植物的生长发育和抽穗过程^[40]。这种激素—减数分裂协同调控机制为深入理解植物抽穗的分子基础提供了新的研究方向。

本研究鉴定出的关键候选基因在稗属牧草抽穗期调控中展现出多种生物学功能。其中, *EcRCS3*、*EcCYSK* 和 *EcP0710H01.9* 基因主要参与氨基酸代谢途径, 在抽穗前期的特定发育阶段调控开花相关基因的表达网络, 影响关键调控蛋白的合成与修饰, 从而促进花芽分化的启动。而 *EcNBA1* 基因通过维持基因组稳定性 (DNA 损伤修复) 和整合植物激素信号转导途径, 在抽穗进程中发挥重要的调控作用。这些发现为阐明稗草抽穗期的分子调控网络提供了重要的理论依据和实践指导。

尽管已有研究证实 *EcRCS3* 和 *EcP0710H01.9* 在水稻中的同源基因参与抽穗期调控, 但其他候选基因在植物开花时间调控中的具体功能仍缺乏直接证据。基于此, 将来应开展以下研究: 首先, 通过全转录组测序 (RNA-Seq) 分析候选基因的时空表达特征; 其次, 采用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术构建功能缺失突变体进行表型验证; 再次, 利用酵母双杂交系统解析候选基因编码蛋白的相互作用网络; 最后, 通过荧光蛋白标记技术确定其亚细胞定位特征。这一系统的研究将有助于全面解析稗属植物抽穗期的分子调控机制, 不仅可为禾本科植物开花时间的进化研究提供新视角, 也将为稗属牧草的分子设计育种奠定重要的理论基础。

4 结论

1) 抽穗期性状分析表明, 双亲间存在显著差异 ($P < 0.05$), 亲本表型值位于 $F_{2:3}$ 群体分布区间内, 该杂交群体出现明显的超亲分离现象。

2) 通过 BSA-Seq 分析, 在稗草基因组中共定位到 3 个与抽穗期显著相关的 QTL 区间, 分别为 qHD-6-2, 位于 6 号染色体 6.91~16.81 Mb 区间, 跨度 9.9 Mb, 包含 944 个候选基因; qHD-6-1, 位于 6 号染色体 16.80~16.81

Mb 区间, 跨度 11.05 kb, 包含 2 个候选基因; qHD-16-1, 位于 16 号染色体 2.30~2.49 Mb 区间, 跨度 193.14 kb, 包含 17 个候选基因。

3) 候选 QTL 筛选结果为: 将 qHD-16-1 (16 号染色体, 2.30~2.49 Mb) 确定为候选区间, qHD-6-1 (6 号染色体, 16.80~16.81 Mb) 推测为候选区间。

4) 通过 PPI 分析, 从上述两个 QTL 区间的 19 个候选基因中筛选出 6 个关键候选基因 *EcRCS3*、*EcCYSK*、*EcP0710H01.9*、*EcAPG*、*EcCFAT* 和 *EcNBA1*, 其中 *EcCYSK* 存在错义突变。GO/KEGG 富集分析表明, 这些基因主要参与硫代谢、氨基酸代谢通路(半胱氨酸和蛋氨酸代谢), DNA 损伤修复途径(同源重组)。

参考文献 References:

- [1] Bhatt D, Rasane P, Singh J, *et al.* Nutritional advantages of barnyard millet and opportunities for its processing as value-added foods. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 2023, 60(11): 2748–2760.
- [2] Renganathan V G, Vanniarajan C, Karthikeyan A, *et al.* Barnyard millet for food and nutritional security: current status and future research direction. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 500.
- [3] Wang Y L, Lin S, Zhao L Z, *et al.* The trial cultivation of Hunan millet in saline-alkali wasteland showed good results. *Grass and Forage Journal*, 1992(1): 22.
王玉兰, 林森, 赵莱章, 等. 盐碱荒地试种湖南稷子情况良好. *草与畜杂志*, 1992(1): 22.
- [4] Wang F, Li S C, Kong F J, *et al.* Altered regulation of flowering expands growth ranges and maximizes yields in major crops. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1094411.
- [5] Kippes N, Debernardi J M, Vasquez-Gross H A, *et al.* Identification of the *VERNALIZATION 4* gene reveals the origin of spring growth habit in ancient wheats from South Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(39): 5401–5410.
- [6] Wilhelm E P, Turner A S, Laurie D A. Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 118(2): 285–294.
- [7] Beales J, Turner A, Griffiths S, *et al.* A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115(5): 721–733.
- [8] Yu X L, Li X, Yao X H, *et al.* Genetic mapping and candidate gene analysis of the major QTL *cqHD2H-2* for early heading in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 2022, 48(10): 2463–2474.
余鑫莲, 李新, 姚晓华, 等. 青稞早抽穗主效 QTL *cqHD2H-2* 的遗传定位及候选基因分析. *作物学报*, 2022, 48(10): 2463–2474.
- [9] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(21): 9828–9832.
- [10] Zhang G, Zhu L, Nie H J, *et al.* Application and prospect of BSA method based on bibliometrics in crop breeding. *Hereditas*, 2024, 46(5): 360–372.
张刚, 朱林, 聂豪杰, 等. 基于文献计量学 BSA 在作物育种领域的应用现状与展望. *遗传*, 2024, 46(5): 360–372.
- [11] Takagi H, Tamiru M, Abe A, *et al.* MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(5): 445–449.
- [12] Gao Y B, Yuan Y H, Zhang X Y, *et al.* Conuping BSA-Seq and RNA-Seq reveal the molecular pathway and genes associated with the plant height of foxtail millet (*Setaria italica*). *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19): 11824.
- [13] Zhao W G, Ta N, Wang H, *et al.* Analysis of significantly associated regions and candidate genes for dwarf stem trait in *Brassica napus* based on BSA-seq. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2024, 44(12): 1890–1899.
赵卫国, 塔娜, 王灏, 等. 基于 BSA-seq 技术对甘蓝型油菜矮秆性状的显著关联区域和候选基因分析. *西北植物学报*, 2024, 44(12): 1890–1899.
- [14] Wu D Y, Shen E H, Jiang B W, *et al.* Genomic insights into the evolution of *Echinochloa* species as weed and orphan crop. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 689.
- [15] Wan L S, Geng B R, Shao S R, *et al.* A promising forage and food crop—*Echinochloa frumentacea*. *Journal of Ningxia Agriculture and Forestry Science and Technology*, 1984(1): 37–38.
万力生, 耿本仁, 邵生荣, 等. 一种很有前途的草料兼用作物——湖南稷子. *宁夏农业科技*, 1984(1): 37–38.
- [16] Wu S Q, Yang P, Fan Z J, *et al.* Study on *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. var. *mitis* (Pursh) Peter. *Pratacultural*

- Science, 2002, 19(2): 33–36.
- 吴素琴, 杨平, 樊振军, 等. 宁夏无芒稗的研究. 草业科学, 2002, 19(2): 33–36.
- [17] Li D X, Yang J, Sun K, *et al.* Mapping new rice heading date QTLs based on high-density genetic map. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2020, 48(8): 43–49.
- 李冬秀, 杨靖, 孙凯, 等. 基于高密度遗传图谱定位新的水稻抽穗期 QTLs. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(8): 43–49.
- [18] Doyle J J T, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus (san Francisco, California.), 1990, 12(1): 13–15.
- [19] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, *et al.* Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Cold Spring Harbor Laboratory, 2018, 34(17): 884–890.
- [20] Jung Y, Han D S. BWA-MEME: BWA-MEM emulated with a machine learning approach. Bioinformatics, 2022, 38(9): 2404–2413.
- [21] McKenna A, Hanna M, Banks E, *et al.* The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Research, 2010, 20(9): 1297–1303.
- [22] Cingolani P, Platts A, Wang L L, *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. Fly (Austin), 2012, 6(2): 80–92.
- [23] Takagi H, Abe A, Yoshida K, *et al.* QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2013, 74(1): 174–183.
- [24] Li Z Q, Xu Y H. Bulk segregation analysis in the NGS era: a review of its teenage years. The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology, 2022, 109(6): 1355–1374.
- [25] Jaiswal V, Gupta S, Gahlaut V, *et al.* Genome-wide association study of major agronomic traits in foxtail millet (*Setaria italica* L.) using ddRAD sequencing. Scientific Reports, 2019, 9(1): 5020.
- [26] Sobieszczuk-Nowicka E, Arasimowicz-Jelonek M, Tanwar U K, *et al.* Plant homocysteine, a methionine precursor and plant's hallmark of metabolic disorders. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1044944.
- [27] Wang H, Niu Q W, Wu H W, *et al.* Analysis of non-coding transcriptome in rice and maize uncovers roles of conserved lncRNAs associated with agriculture traits. Plant Journal, 2015, 84(2): 404–416.
- [28] Huang X Z, Chen S D, Li W P, *et al.* ROS regulated reversible protein phase separation synchronizes plant flowering. Nature Chemical Biology, 2021, 17(5): 549–557.
- [29] Kopriva S, Mugford S G, Matthewman C, *et al.* Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. Plant Cell Reports, 2009, 28(12): 1769–1780.
- [30] Kopriva S. Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. Annals of Botany, 2006, 97(4): 479–495.
- [31] Hage H, Rosso M N, Tarrago L. Distribution of methionine sulfoxide reductases in fungi and conservation of the free-methionine-R-sulfoxide reductase in multicellular eukaryotes. Free Radical Biology and Medicine, 2021, 169: 187–215.
- [32] Ravel S, Gakière B, Job D, *et al.* The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(13): 7805–7812.
- [33] Chen D D, Shao Q S, Yin L H, *et al.* Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. Frontiers in Plant Science, 2019, 9: 1945.
- [34] Zhao H, Yin C C, Ma B, *et al.* Ethylene signaling in rice and *Arabidopsis*: new regulators and mechanisms. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(1): 102–125.
- [35] Iqbal N, Khan N A, Ferrante A, *et al.* Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 475.
- [36] Xu M T, Li X X, Xie W, *et al.* Correction to: ETHYLENE INSENSITIVE3/EIN3-LIKE1 modulate *FLOWERING LOCUS C* expression via histone demethylase interaction. Plant Physiology, 2024, 196(2): 1712.
- [37] Chen Y L, Zhang L P, Zhang H Y, *et al.* ERF1 delays flowering through direct inhibition of *FLOWERING LOCUS T* expression in *Arabidopsis*. Journal of Integrative Plant Biology, 2021, 63(10): 1712–1723.
- [38] Sun Y R, McCorvie T J, Yates L A, *et al.* Structural basis of homologous recombination. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020, 77(1): 3–18.
- [39] Liu S J, Hua Y, Wang J N, *et al.* RNA polymerase III is required for the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. Cell, 2021, 184(5): 1314.
- [40] Li F M, Xie J Y, Zhu X Y, *et al.* Genetic basis underlying correlations among growth duration and yield traits revealed by GWAS in rice (*Oryza sativa* L.). Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 650.