



殷娇娟, 任相锦, 李昕雨, 等. 水稻突变基因 *DHD9* 调控抽穗期的信号途径分析[J]. 江西农业大学学报, 2026, 48(3): 658–668.

Yin J J, Ren X J, Li X Y, et al. Analysis of the signaling pathway regulated by the rice mutant gene *DHD9* in controlling heading date [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2026, 48(3): 658–668.

水稻突变基因 *DHD9* 调控抽穗期的 信号途径分析

殷娇娟, 任相锦, 李昕雨, 王伶俐, 刘 琪, 邓梓阳, 吴自明, 汪欲鹏*

(江西农业大学 作物生理生态与遗传育种教育部重点实验室, 江西 南昌 330045)

摘要:【目的】抽穗期作为影响水稻产量和适应性的关键农艺性状,其调控网络非常复杂,鉴定水稻抽穗期基因,对解析水稻抽穗期的分子调控机制具有重要意义。【方法】以抽穗期延迟水稻突变体 *delayed heading date 9* (*dhd9*)及其野生型(WT)为试验材料,从表型、抽穗期关键基因的表达变化以及与生物钟系统之间的关系,初步探究 *DHD9* 调控抽穗期的生物学功能。【结果】与WT相比,突变体 *dhd9* 的抽穗期在自然长日照条件下延迟9 d左右,而人工短日照条件下延迟26 d左右。除有效穗数显著减少外,突变体 *dhd9* 株高、穗长、一级枝梗数、二级枝梗数、每穗粒数、结实率及单株产量较WT均显著增加。长、短日照条件下,成花素基因 *Hd3a*、*RFT1* 及其下游基因 *OsMADS14* 和上游调控因子 *Ehd1*,在 *dhd9* 中的表达水平相较于WT均显著下调,表明 *DHD9* 可能通过 *Ehd1*–*Hd3a*/*RFT1* 开花途径调控抽穗期;此外,参与水稻抽穗期调控的生物钟系统核心基因 *OsPRR37*、*OsPRR59*、*OsPRR73* 的表达量在 *dhd9* 中也发生了显著变化。【结论】*DHD9* 是调控水稻抽穗期和产量的重要因子,通过 *Ehd1*–*RFT1*/*Hd3a* 信号途径以及影响生物钟系统调控水稻抽穗期,研究结果为 *DHD9* 调控水稻抽穗期的分子机制提供支撑。

关键词: 水稻;光周期;抽穗期;产量;*Ehd1*;生物钟

中图分类号: S511.032 文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1000–2286(2026)03–0658–11

CSTR: 32399.14.aauj.2026054



Analysis of the signaling pathway regulated by the rice mutant gene *DHD9* in controlling heading date

Yin Jiaojuan, Ren Xiangjin, Li Xinyu, Wang Lingli, Liu Qi,
Deng Ziyang, Wu Ziming, Wang Yupeng*

(Key Laboratory of Crop Physiology, Ecology and Genetic Breeding, Ministry of Education/Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

收稿日期: 2025-10-27 修回日期: 2026-01-11 接受日期: 2026-01-16

基金项目: 江西省自然科学基金项目(20252BAC200389)

Project supported by Jiangxi Provincial Natural Science Foundation(20252BAC200389)

作者简介: 殷娇娟, 硕士生, orcid.org/0009–0006–9160–7597, 15736516765@163.com; *通信作者: 汪欲鹏, 讲师, 博士, 主要从事水稻重要农艺性状基因挖掘与利用研究, orcid.org/0009–0002–4216–695X, wangyupeng@jxau.edu.cn.

©《江西农业大学学报》编辑部, 开放获取 CC BY–NC–ND 协议

Abstract: [Objective] Heading date, a crucial agronomic trait that determines rice yield and adaptability, is governed by a complex regulatory network. The identification of genes governing heading date is therefore crucial for elucidating the molecular mechanisms underlying the regulation of heading date in rice. [Method] A delayed heading date mutant (*dhd9*) and its wild type (WT) was used as experimental material to investigate the biological function of the *DHD9* gene in the regulation of heading date by integrating analyses of phenotypic traits, expression patterns of key heading date regulatory genes, and the molecular association between *DHD9* and the circadian clock system. [Result] Under natural long-day conditions, heading date of *dhd9* was delayed by approximately 9 days compared to the WT, while under artificial short-day conditions, the delay extended to about 26 days. Plant height, panicle length, number of primary and secondary branches, grains per panicle, seed setting rate, and yield per plant were all significantly increased in *dhd9* compared to WT, except for a significant reduction in effective panicle number. Under both natural long-day and short-day conditions, expression levels of florigen genes *Hd3a* and *RFT1*, their downstream gene *OsMADS14*, and the upstream regulator *Ehd1* were significantly downregulated in *dhd9* relative to WT, indicating that *DHD9* may regulate heading date through the *Ehd1-Hd3a/RFT1* flowering pathway. Additionally, significant alterations in expression were observed in core circadian clock genes *OsPRR37*, *OsPRR59*, and *OsPRR73* in *dhd9*. [Conclusion] *DHD9* is a regulatory factor controlling heading date and yield in rice. It regulates heading date through the *Ehd1-RFT1/Hd3a* signaling pathway, as well as by influencing the circadian clock system. These findings lay a foundation for elucidating the molecular mechanism by which *DHD9* regulates heading date in rice.

Keywords: rice; photoperiod; heading date; yield; *Ehd1*; circadian clock

【研究意义】水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上最重要的粮食作物之一,提高水稻产量对于保障粮食安全具有重要意义。适宜的生育期对保持水稻高产稳产至关重要,生育期过短不利于前期的物质积累而导致减产,过长则可能使水稻后期遭遇低温等不良天气的影响而面临产量损失,且不利于种植后茬作物。抽穗期是水稻从营养生长到生殖生长完全转变的关键时期,很大程度上决定了生育期的长短^[1-2]。因此,鉴定调控水稻抽穗期的关键基因,可为生育期的调控提供理论指导和基因资源。【前人研究进展】水稻作为典型的一年生短日照作物,其抽穗期主要受到光周期途径的调控,并且可分为 *Hd1-Hd3a* 和 *Ehd1-RFT1/Hd3a* 2 条途径,其中 *Hd1* 和 *Ehd1* 被认为是抽穗期调控网络的信号集合因子,大部分相关基因通过影响它们的功能,调控成花素 *Hd3a* 和 *RFT1* 的表达,实现对抽穗期的调控^[3-4]。*Hd1* 是拟南芥 *CO* 的同源基因,长日照条件下 *Hd1* 负调控 *Hd3a* 表达,抑制水稻抽穗;而短日照条件下正调控 *Hd3a* 的表达,促进水稻抽穗^[5-8]。研究表明,*Hd1* 的功能受多个因子调控。例如,长日照条件下 *Hd1* 与 *DTH8* 互作,形成复合物结合 *Hd3a* 的启动子,调控 *Hd3a* 位点上的 H3K27 三甲基化水平,抑制 *Hd3a* 的表达,导致水稻抽穗延迟^[9]; *HAF1* 编码 E3 泛素连接酶,短日照条件下直接调控 *Hd1* 的泛素化并使其被蛋白酶体途径进行降解,从而延迟水稻抽穗期,但在长日照条件下,对 *Hd1* 的调控作用不明显^[10]。B 类型的应答调节因子 B-RRs 蛋白 *Ehd1* 是水稻特有的开花促进因子,在长、短日照条件下均正调控 *Hd3a* 和 *RFT1* 的表达,促进水稻抽穗^[11-12]。*Ehd1* 也受多个调控因子的直接或间接调控,其中 *OsGI* 在蓝光条件下激活 *Ghd7* 与 *Hd1*,从而抑制 *Ehd1* 的表达,同时还可以通过激活 *OsMADS51* 表达,间接提升 *Ehd1* 的表达水平^[13-14]; PHD 类蛋白 *Ehd3* 可分别通过 *Ghd7* 不依赖和依赖途径正调控 *Ehd1* 表达,从而促进水稻抽穗^[15]; *MADS50* 是拟南芥 *SOC1* 的同源基因,上调 *Ehd1* 的表达从而促进水稻开花^[16]; *Ghd7* 编码 CCT 结构域蛋白,在长日照条件下通过与 *Hd1* 互作,负调控 *Ehd1* 表达,最终导致水稻抽穗延迟;而在短日照条件下对抽穗期的调控呈现不显著作用^[17-18]。生物钟系统是生物体内为适应外界环境变化而进化出的一种呈约 24 h 周期性变化生理机制,调控众多生长发育过程^[19]。此前研究^[20]表明,生物钟系统由信号输入途径、核心振荡器和信号输出途径 3 个主要部分组成,这些组分可以通过影响光周期开花途径,调控植物的开花时间。目前,模式植物拟南芥的生物钟系统已研究较为深入,其生物钟系统核心振荡器主要由凌晨组分 *CCA1* 和 *LHY*,白天组

分 *PRR9*、*PRR7*、*PRR5*、*PRR3*、*PRR1*, 夜晚组分 *GI*、*ELF3*、*ELF4* 和 *LUX* 构成^[21-24]。拟南芥生物钟系统在不同植物中高度保守, 在不同物种中均具有同源基因。*OsCCA1* 是拟南芥 *CCA1* 在水稻中唯一的同源基因, 水稻中敲除 *OsCCA1* 后长短日照条件下抽穗期均会延迟, 表明该基因是一个抽穗期促进因子^[25]。*OsGI* 是水稻中与拟南芥 *GI* 的同源基因, 具有双重调控功能, 长日照条件下激活 *Hd1* 与 *Ghd7* 表达, 从而抑制 *Ehd1*; 在短日照条件下通过 *Hd1* 正向调控 *Ehd1* 及其下游基因表达^[8]。水稻中有 5 个 PRR 编码基因 *OsPRR37*、*OsPRR73*、*OsPRR59*、*OsPRR95* 和 *OsPRR1*^[26-27]。*OsPRR37* 对光周期敏感且是调控水稻抽穗期的关键基因, 属于水稻开花抑制因子, 能够上调 *Ghd7* 与 *Hd1* 的表达, 间接抑制 *Ehd1* 表达, 导致水稻抽穗期延迟^[28-29]。*OsPRR59* 在长日照条件下是一个开花抑制因子, 可以通过直接抑制 *Ehd3* 的表达延迟水稻抽穗期^[30]。以上研究表明, 生物钟系统在水稻抽穗期的调控过程中具有重要作用, 并且可通过影响光周期开花途径, 参与抽穗期的调控。

【本研究切入点】在温光资源充裕的条件下, 适当地延长水稻抽穗期, 可以使水稻充分地利用温光资源, 增加干物质的积累, 从而增加产量。此前, 虽然克隆了如 *DTH8*、*Ghd7*、*DTH7* 等基因能够延长抽穗期并增加产量, 但这些基因对抽穗期延长幅度过大, 难以直接大面积进行利用。因此, 有必要进一步挖掘能够适当延长抽穗期同时增加产量的基因。【拟解决的关键问题】本研究基于发掘的晚抽穗突变体 *delayed heading date 9 (dhd9)*, 自然长日照条件下其抽穗期相较于野生型晚 7~9 d, 人工短日照条件下抽穗期约晚 26 d, 且具有增加产量的潜力, 分别从表型鉴定、产量相关农艺性状调查、及其抽穗期关键基因表达变化等方面进行了研究, 初步鉴定突变基因 *DHD9* 的生物学功能, 为水稻抽穗期和产量的遗传改良提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

dhd9 突变体材料来源于常规粳稻品种日本晴(Nipponbare)组培突变, 通过连续三代种植确认该性状可以稳定遗传。

1.2 抽穗期表型调查

将 WT 和 *dhd9* 种植于江西省南昌市自然长日照环境(5—6月)与人工气候室短日照环境(30℃光照 10 h/26℃黑暗 14 h)。分别选取 20 株长势较一致的 WT 和突变体 *dhd9* 植株进行标记, 自播种后定期观察植株生长发育状况。抽穗期以稻穗伸出剑叶叶鞘 2 cm 为抽穗判定标准, 记录从播种至抽穗的时间作为抽穗期, 并计算平均值进行统计分析。

1.3 产量相关农艺性状考查

成熟期, 取 WT 和 *dhd9* 各 20 株长势一致的单株(除去边株), 测量其株高、有效穗数、穗长、一次枝梗数、二次枝梗数、结实率、单株产量。粒型性状和千粒质量均基于同一批成熟植株进行测定, 收获后从中随机选取 WT 和 *dhd9* 各 20 粒饱满谷粒, 使用游标卡尺(精确到 0.01 mm)测量其粒长、粒宽和粒厚; 另外, 从 WT 和 *dhd9* 中随机选取 200 粒饱满种子称量, 设置 3 次生物学重复, 并换算为千粒质量。

1.4 RT-qPCR 分析

分别取自然长日照条件下(南昌)播种后 45 d 以及人工气候室短日照条件下生长 25 d 的 WT 和 *dhd9* 倒二叶进行相关基因的表达分析, 具体方法为将叶片放在液氮中研磨成粉末, 利用 RNA 提取试剂盒(TaKaRa, 9767)和反转录试剂盒(TaKaRa, RR037Q), 根据试剂盒说明书提取总 RNA 和进行反转录试验, 获得 WT 和 *dhd9* 叶片的 cDNA, 以 cDNA 为模板, 采用荧光定量试剂盒(TaKaRa, 11184ES03)配置 qPCR 反应体系, 将相应反应液置于荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD CFX96 System)中进行基因的表达量分析。试验结果以水稻内参基因 *UBQ* 基因(LOC_Os01g22490)为内参, 计算目标基因在 WT 和 *dhd9* 中的表达量。各基因的荧光定量 PCR 反应所用引物序列如表 1 所示。

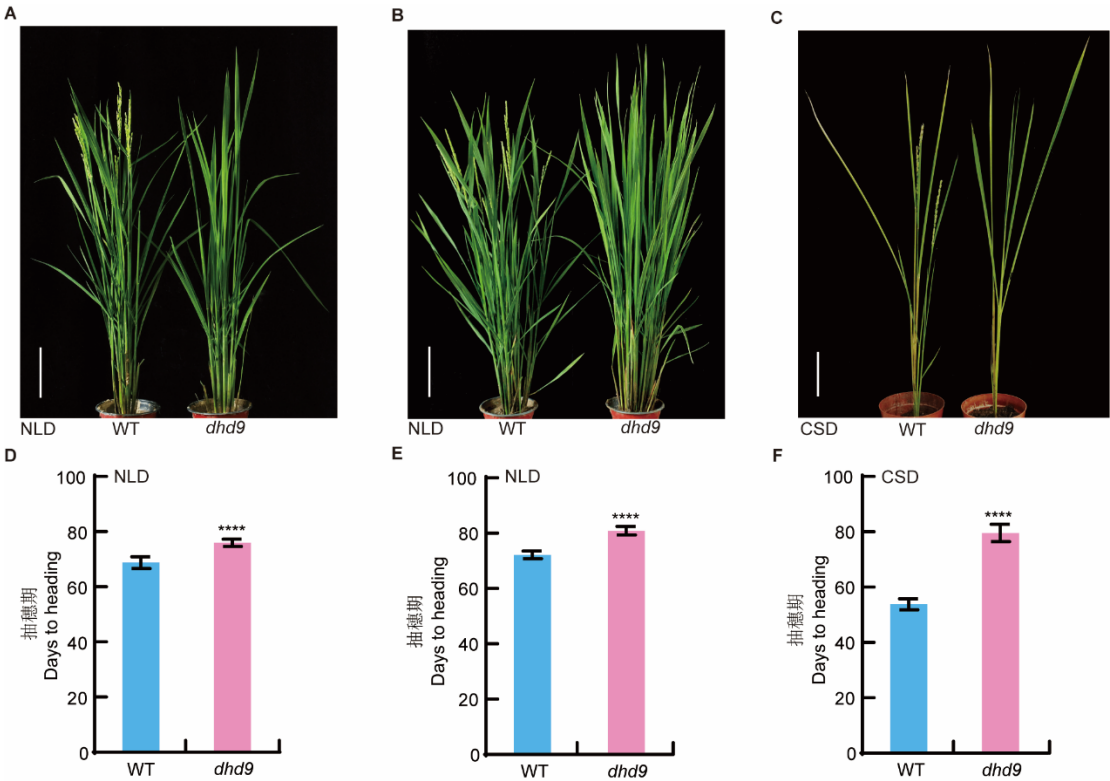
2 结果与分析

2.1 突变基因 *DHD9* 正调控水稻抽穗期

在自然长日照条件下(natural long-day conditions, NLD), 第 1 批种植的 WT 抽穗时间约为 69 d, *dhd9*

表 1 qPCR引物序列
Tab.1 Sequences of primers for qPCR

基因名称 Genes name	F引物序列(5'–3') Forward primer (5'–3')	R引物序列(5'–3') Reverse primer (5'–3')
<i>Hd3a</i>	ACCTCAAGGTCACCTATGGC	GGTGCATCTGGGTCTACCAT
<i>RFT1</i>	GTCGTGGTCGGTGGCAATGA	TTGCTTGGGCTCGGAGCATC
<i>OsMADS14</i>	GCAATGGGACCAGACACAAC	CTGCTACATCCTCTATCCTTTTCG
<i>OsMADS15</i>	CCCTACCCTACAGGCTACATA	TAGGAAGCACTAGGTACGTGCTGA
<i>Ehd1</i>	CGAGATCAACGGCCACCGAA	AACTGACGGTGCAACTGCGT
<i>Hd1</i>	CAGCAGCAACAACGGCATGT	CCACACACTCGCTCCCTTCC
<i>Ghd7</i>	CCAGCGCCACCATCATGTCA	GCCTCCCTCTCCACCATTGC
<i>OsMADS50</i>	GGTCGCGCTCATCGTCTTCT	GCCAAACCATCAGCGTCAGC
<i>Ehd3</i>	TTGCCACTCATGGCCAACGG	AAGCCGTGGAGAGTGTCCTT
<i>Trx1</i>	ATGCCATGTGGCCAGCTGTT	AAGGGCACCCTTGCTTCAA
<i>Ehd4</i>	GCCAGCGGAATCATCACCGT	GCACCCTTCCTGCAGTAGCC
<i>OsCCA1</i>	GGCTCTCTCCCAACATGGC	CCTTGTGTTGCCACCATGC
<i>OsELF3</i>	GCGCTAGCAGTCCTTTTGACA	TGAGGCTGTTGTTCTGAGCT
<i>OsGI</i>	TCAGCATGTCCGTCCTTCGC	CTCCACATCGGCTTGCCAGT
<i>OsPRR37</i>	GGATGGTGCAAACGCAATCCAAGA	TTCCCATGAATCCTGTCCCACCTT
<i>OsPRR59</i>	GGCATCGAGCTGCTCTCCAG	AATCCACCGCACCTTCTGC
<i>OsPRR73</i>	AGGTGCGCTATCAGAGCAGA	GGCCTGCCTGATCTTCCTGT



A~C: 自然长日照条件下第 1 批和第 2 批播种的 WT 和 *dhb9* 表型, 人工气候室短日照条件下播种的 WT 和 *dhb9* 表型, Bar=10 cm; D~F: 自然长日照条件下第 1 批和第 2 批播种的 WT 和 *dhb9* 抽穗时间统计, 人工气候室短日照条件下播种的 WT 和 *dhb9* 抽穗时间统计。数据表示平均值±标准差 ($n=20$), ****表示极显著水平 ($P<0.0001$; t 检验)。

A~C: Phenotypes of the first and second batches of sown WT and *dhb9* plants under natural long-day conditions, phenotypes of WT and *dhb9* plants grown under short-day conditions in a climate-controlled chamber, Scale bars, 10 cm; D~F: Heading date of the first and second batches of sown WT and *dhb9* plants under natural long-day conditions, heading date of WT and *dhb9* plants grown under short-day conditions in a climate-controlled chamber. Values are presented as means $\pm$ SD ($n=20$), statistically significant difference is marked with asterisks (**** $P<0.0001$; Student's t -test).

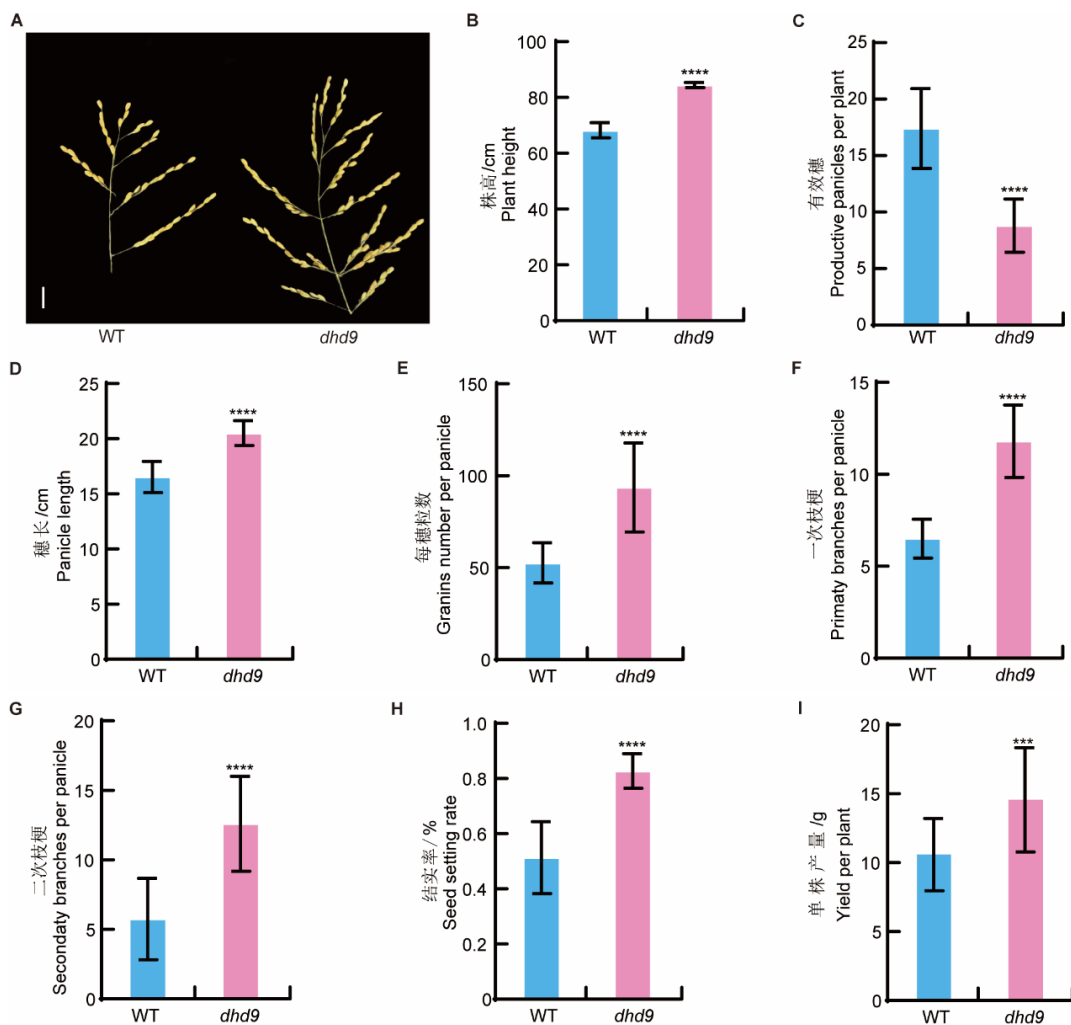
图 1 野生型(WT)和突变体 *dhb9* 的抽穗期表型

Fig.1 Flowering phenotype of WT and *dhb9* mutant

约为76 d,与WT相比,*dhd9*抽穗期推迟约7天(图1A、图1D);第2批种植的WT抽穗时间约为72 d,*dhd9*约为81 d,与WT相比,*dhd9*抽穗期推迟约9 d(图1B、图1E)。在人工气候室的短日照条件下(controlled short-day conditions, CSD),WT抽穗时间约为54 d,*dhd9*约为80 d,与WT相比,*dhd9*抽穗期推迟约26 d(图1C、图1F)。以上结果表明,突变基因*DHD9*是一个抽穗期正调控因子。

2.2 突变基因*DHD9*是一个产量调控因子

为研究*DHD9*对水稻产量的影响,在自然长日照条件下对WT和*dhd9*的产量相关农艺性状进行调查。结果表明,与WT相比,*dhd9*的株高、穗长、每穗粒数、一级枝梗数、二级枝梗数、结实率及单株产量均显著增加,分别增加了23.80%、24.05%、81.58%、81.54%、119.13%、61.24%、37.55%(图2A、图2B、图2D~图2I),而有效穗数则减少了37.16%(图2C)。以上结果表明,突变基因*DHD9*在延迟抽穗期的同时增加水稻产量。



A: WT与*dhd9*的穗部形态比较, Bar=2 cm; B~I: WT与*dhd9*的株高(B)、有效穗数(C)、穗长(D)、每穗粒数(E)、一级枝梗数(F)、二级枝梗数(G)、结实率(H)和单株产量(I)统计分析。数据表示平均值±标准差($n=20$), ****、***表示极显著水平($P<0.0001$, $P<0.001$; t 检验)。

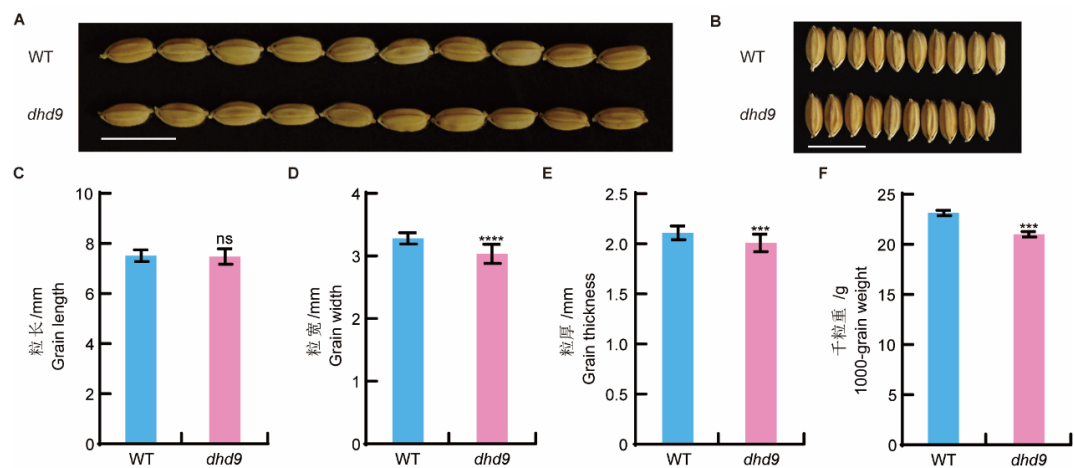
A: Comparison of panicle morphology between WT and *dhd9* plants, Scale bar, 2 cm; B~I: Statistical analysis of plant height (B), productive panicles per plant (C), panicle length (D), grain number per panicle (E), primary branch number (F), secondary branch number (G), seed setting rate (H), and yield per plant (I) between WT and *dhd9* plants. Values are presented as means±SD ($n=20$), statistically significant difference is marked with asterisks (**** $P<0.0001$, *** $P<0.001$; Student's t -test).

图2 野生型(WT)和突变体*dhd9*的农艺性状比较

Fig.2 Agronomic traits of WT and *dhd9* mutant

2.3 突变基因*DHD9*正调控水稻粒宽和粒厚

对WT和突变体*dhd9*的粒形相关性状进行调查,发现与WT相比,*dhd9*的粒长无显著变化(图3A、图3C),但粒宽、粒厚和千粒质量显著减小,分别减少了8.07%、5%和10.09%(图3B、图3D~图3F)。



A 和 B: WT 与 *dhd9* 的粒长和粒宽比较, Bar=1 cm; C~F: WT 与 *dhd9* 的粒长(C)、粒宽(D)、粒厚(E)和千粒质量(F)统计分析。数据表示平均值±标准差($n=20$), ***表示极显著水平($P<0.001$; *t* 检验)。

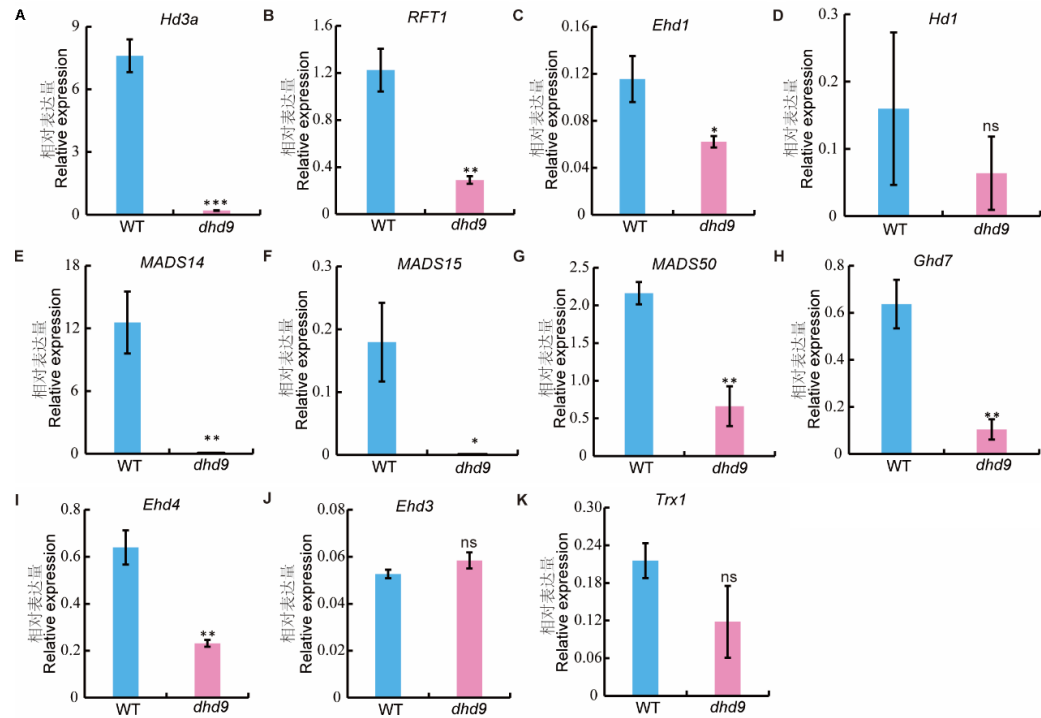
A and B: Comparison of grain length and width morphology between WT and *dhd9* plants, Scale bar, 1 cm; C~F: Comparative analysis of grain length (C), grain width (D), grain thickness (E), and 1 000-grain weight (F) between WT and *dhd9* plants. Values are presented as means±SD ($n=20$), statistically significant difference is marked with asterisks (*** $P<0.001$; Student's *t*-test).

图 3 野生型(WT)和突变体 *dhd9* 的粒性性状分析

Fig.3 Comparison of grain morphology between WT and *dhd9* mutant

2.4 突变基因 *DHD9* 可能通过 *Ehd1-Hd3a/RFT1* 途径调控水稻抽穗期

为明确突变基因 *DHD9* 调控水稻抽穗期的信号通路,在自然长日照条件下对成花素基因 *Hd3a*、*RFT1* 及下游花器官分化诱导基因 *MADS14*、*MADS15*、上游基因 *Ehd1*、*Hd1* 及其调控因子 *Ghd7*、*MADS50*



Hd3a、*RFT1*、*Ehd1*、*Hd1*、*MADS14*、*MADS15*、*MADS50*、*Ghd7*、*Ehd4*、*Ehd3*、*Trx1* 在长日照条件下 WT 和突变体 *dhd9* 中的相对表达情况。RNA 提取于植株倒二叶。Y 轴表示相对于水稻基因 *Ubiquitin* 的表达水平。数据表示平均值±标准差($n=3$), *、**、***表示极显著水平($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$; *t* 检验)。

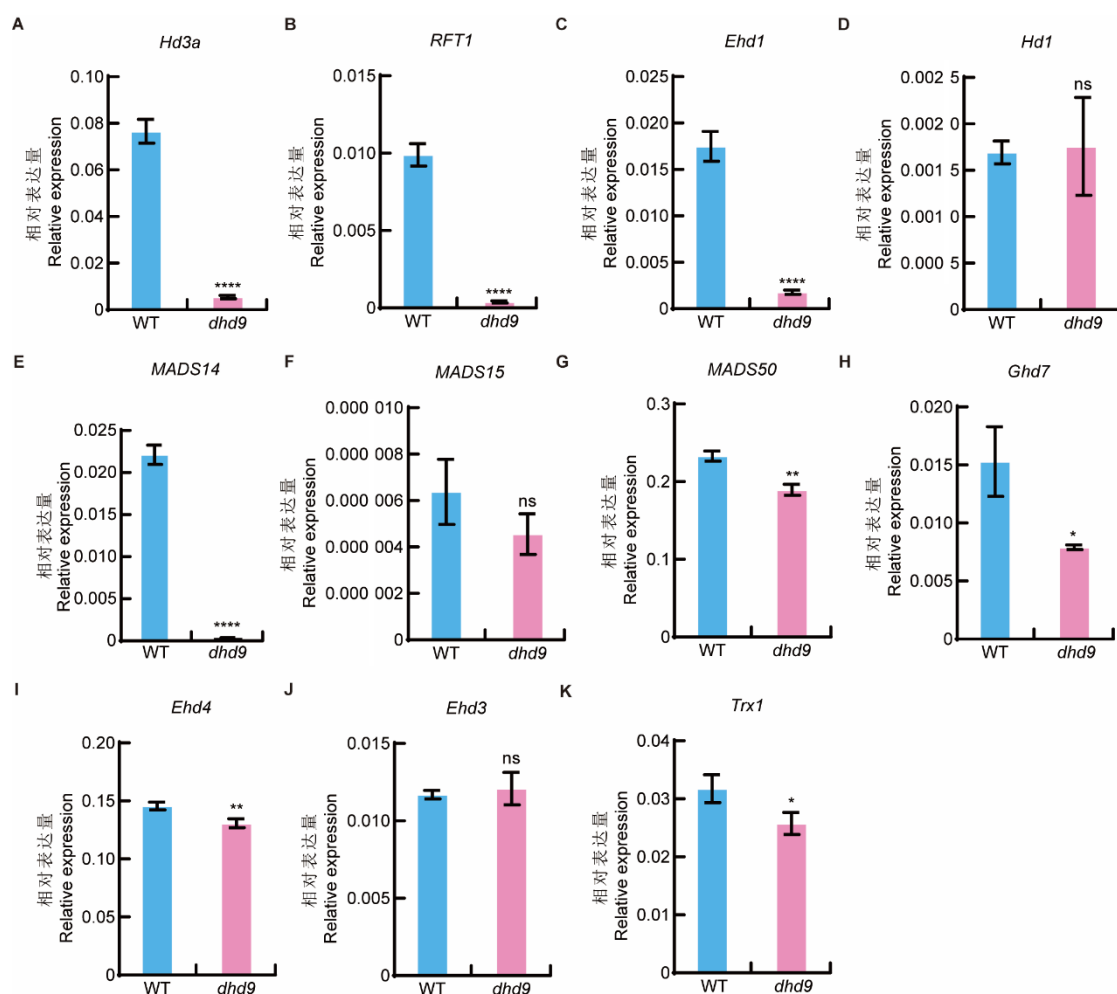
Relative expression of *Hd3a*, *RFT1*, *Ehd1*, *Hd1*, *MADS14*, *MADS15*, *MADS50*, *Ghd7*, *Ehd4*, *Ehd3*, *Trx1* in WT and *dhd9* plants under LD conditions. RNA isolated from the penultimate leaves of plants was used for qPCR. The Y-axes show transcript levels relative to rice *Ubiquitin*. Values are presented as means ± SD ($n=3$), statistically significant difference is marked with asterisks (*** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; Student's *t*-test).

图 4 长日照条件下抽穗期关键基因在野生型(WT)和突变体 *dhd9* 中的相对表达情况分析

Fig.4 Relative expression of key heading date gene in WT and *dhd9* plants under LD conditions

的表达量在WT和*dhd9*中进行了检测。结果表明,在自然长日照条件下,与WT相比,突变体中*Hd3a*、*RFT1*、*Ehd1*、*MADS14*、*MADS15*、*MADS50*、*Ghd7*表达量均显著下降(图4A~图4C、图4E~图4H),而*Hd1*表达量无明显变化(图4D)。进一步在短日照条件下也检测了相关基因的表达水平(图5A~图5H),发现除*MADS15*表达量无显著差异外,在WT和*dhd9*中其他基因的表达量变化与自然长日照条件下一致。以上结果表明,*DHD9*可能通过*Ehd1*-*Hd3a*/*RFT1*途径调控水稻抽穗期。

前人研究发现,*Ehd3*、*Ehd4*、*Trx1*这3个基因的突变也会使水稻产生较晚抽穗的表型^[15,31-32],为明确*DHD9*与它们之间的调控关系,在WT和*dhd9*中对它们的表达水平进行检测。结果发现,在2种环境下(NLD和CSD),突变体中*Ehd4*表达量较WT均显著下降(图4I,图5I),*Ehd3*、*Trx1*表达量则无明显变化(图4J、图4K,图5J、图5K),说明*DHD9*可能通过*Ehd4*介导的开花途径影响水稻的抽穗期。



Hd3a、*RFT1*、*Ehd1*、*Hd1*、*MADS14*、*MADS15*、*MADS50*、*Ghd7*、*Ehd4*、*Ehd3*、*Trx1*在短日照条件下WT和突变体*dhd9*中的相对表达情况。RNA提取于植株倒二叶。Y轴表示相对于水稻基因*Ubiquitin*的表达水平。数据表示平均值±标准差($n=3$), *、**、****表示极显著水平($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.0001$; t 检验)。

Relative expression of *Hd3a*, *RFT1*, *Ehd1*, *Hd1*, *MADS14*, *MADS15*, *MADS50*, *Ghd7*, *Ehd4*, *Ehd3*, *Trx1* in WT and *dhd9* plants under SD conditions. RNA isolated from the penultimate leaves of plants was used for qPCR. The Y-axes show transcript levels relative to rice *Ubiquitin*. Values are presented as means $\pm$ SD ($n=3$), statistically significant difference is marked with asterisks (**** $P<0.0001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; Student's t -test).

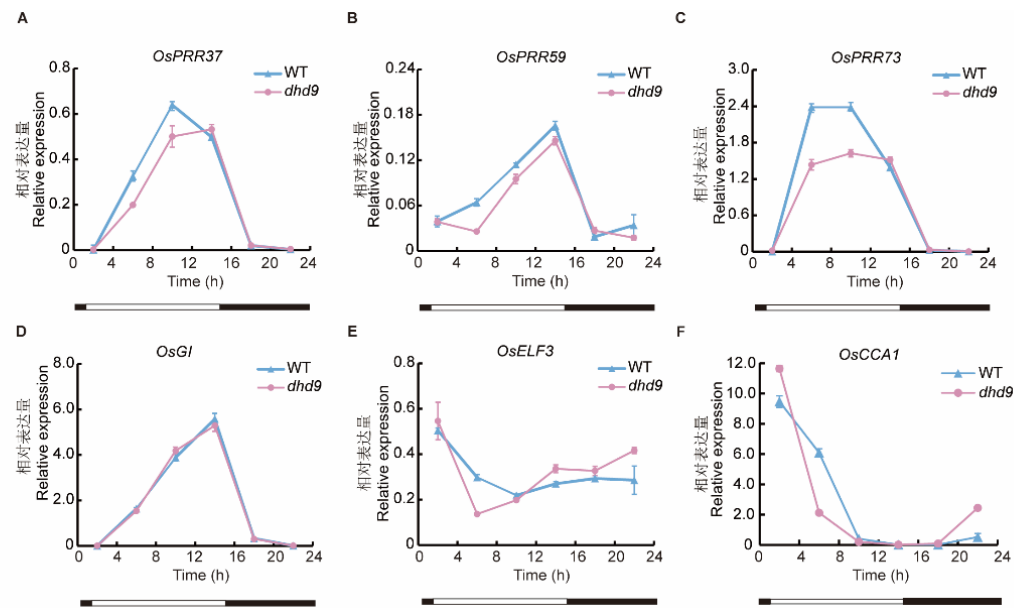
图5 短日照条件下抽穗期关键基因在野生型(WT)和突变体*dhd9*中的相对表达情况分析

Fig.5 Relative expression of key heading date gene in WT and *dhd9* plants under SD conditions

2.5 突变体*DHD9*可能参与了水稻生物钟系统的调控

为明确*DHD9*与生物钟系统之间的调控关系,从水稻生物钟系统核心组分中挑选了6个已报道的影响水稻抽穗期的关键基因,即*OsPRR37*、*OsPRR59*、*OsPRR73*、*OsGI*、*OsELF3*、*OsCCA1*,利用qPCR技术对这些生物钟系统核心基因在短日照条件下WT和*dhd9*中的表达量进行检测与分析。结果表明,与WT相

比,突变体 *dhd9* 中 *OsPRR37*、*OsPRR59*、*OsPRR73* 的表达量均有显著下降的趋势(图 6A~图 6C),而 *OsGI*、*OsELF3*、*OsCCA1* 表达量无明显变化(图 6D~图 6F)。以上结果表明,*DHD9* 的突变可能影响了水稻生物钟系统的稳定性。



OsPRR37、*OsPRR59*、*OsPRR73*、*OsGI*、*OsELF3*、*OsCCA1* 在 WT 和突变体 *dhd9* 中的相对表达情况。RNA 提取于植株倒二叶。Y 轴表示相对于水稻基因 *Ubiquitin* 的表达水平。白色和黑色矩形分别表示 24 h 内的光照和黑暗时段。

Relative expression of *OsPRR37*, *OsPRR59*, *OsPRR73*, *OsGI*, *OsELF3*, *OsCCA1* in WT and *dhd9* plants. RNA isolated from the penultimate leaves of plants was used for qPCR. The Y-axes show transcript levels relative to rice *Ubiquitin*. The open and filled bars at the bottom represent light and dark periods, respectively.

图 6 生物钟系统核心基因在野生型(WT)和突变体 *dhd9* 中的相对表达情况分析
Fig.6 Relative expression of core circadian clock genes in WT and *dhd9* plants

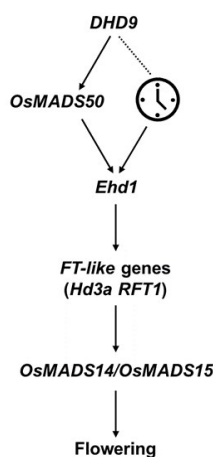
3 讨论与结论

水稻光周期开花调控途径可分为:*Hd1-Hd3a* 途径和 *Ehd1-RFT1/Hd3a* 途径^[4]。本研究发现,在 *dhd9* 突变体中下游成花素基因 *RFT1*、*Hd3a* 及其下游基因 *MADS14*、*MADS15* 的表达均显著下调,上游调控因子 *Ehd1* 的表达水平也显著下调,而 *Hd1* 无显著变化,说明 *DHD9* 可能是通过 *Ehd1-RFT1/Hd3a* 途径对成花素基因进行调控,且处于调控途径上游。*Ehd1* 作为调控途径中的核心基因,已鉴定到多个基因参与调控 *Ehd1* 的表达,例如 *OsMADS50*、*Ghd7*、*Ehd2*、*OsCOL4*、*OsCOL13*、*SIP1*、*DHD1* 等^[4]。其中,*MADS50* 是拟南芥 *SOC1* 的同源基因,通过上调 *Ehd1* 的表达从而促进水稻开花^[33]。在本研究中,*OsMADS50* 在 *dhd9* 突变体中表达显著下调,说明 *DHD9* 处于 *OsMADS50* 上游,并通过正调控其表达,激活 *Ehd1-RFT1/Hd3a* 信号途径,从而促进水稻抽穗。

生物钟参与调控植物体内几乎所有的生长发育和代谢过程,如光周期依赖的开花时间、发育、叶片衰老,以及植物对生物与非生物胁迫的响应等^[20-21]。一般认为,光周期开花途径位于生物钟系统的下游,生物钟基因通过调控光周期开花途径中的关键基因,从而对开花时间进行精确调控^[34]。前人研究表明,水稻生物钟夜晚组分 *OsLUX* 突变后,突变体表现为极晚抽穗,且生物钟相关基因的表达紊乱^[35];*OsPRR59* 作为水稻生物钟的核心组成部分,突变后不仅导致水稻在长日照条件下抽穗期提前,还影响了生物钟系统的稳定性^[30];*OsPRR73* 过表达导致水稻抽穗晚,改变了关键开花基因和生物钟基因的昼夜表达,可以通过与 *Ehd1* 启动子结合来连接光周期开花途径^[36]。本研究发现,几个影响水稻抽穗期的生物钟核心基因包括 *OsPRR37*、*OsPRR59*、*OsPRR73* 在突变体 *dhd9* 中表达量均显著降低,说明在 *dhd9* 中核心生物钟基因的反馈调控循环可能发生了紊乱,暗示突变基因 *DHD9* 可能通过影响生物钟系统的稳定提前水稻抽穗期。

目前,在水稻中已经克隆许多与抽穗期和产量相关的基因,但只有少数基因可以在调控抽穗期的同时增加产量。其中,*Ghd7*在长日照条件下表达增强,能够显著延迟水稻抽穗期约 21 d,并增加株高和每穗粒数,从而提高单株产量^[17]; *DTH8*在长日照条件下抽穗期也显著延迟 13 d 左右,同时株高、每穗粒数、产量均显著增加^[37]; *DHD1*属于 GRAS 蛋白家族,通过下调 *Ehd1* 的表达延迟水稻抽穗期,过表达 *DHD1* 会导致水稻抽穗期推迟约 1 个月,并提高产量^[38]; *DTH7*在长日照条件下通过抑制 *Ehd1* 的表达来抑制 *Hd3a*,最终导致水稻抽穗期延迟约 20 d,产量显著增加^[28]。在本研究中,*DHD9*突变后在自然长日照条件下会导致水稻抽穗期推迟 7~9 d,同时每穗粒数、结实率和单株产量增加,虽然有效穗数下降,但后期可以通过增加基本苗数,弥补单株有效穗数的减少,从而进一步增加产量,具有较大的应用潜力。然而,值得注意的是,日本晴在南昌种植时结实率普遍较差(本研究中仅 50% 左右),为全面评估突变基因 *DHD9* 对水稻产量的影响,今后需要在更多遗传背景、更多种植地点进行调查。

突变基因 *DHD9* 作为抽穗期正调控基因,处于 *OsMADS50* 上游,通过 *Ehd1-Hd3a/RFT1* 途径调控下游成花转变基因的表达影响水稻抽穗期。此外,*DHD9* 突变后会改变多个生物钟核心组分基因的表达水平,表明其可能通过影响生物钟系统稳定性调控水稻抽穗期(图 7)。



DHD9 可以通过 *OsMADS50* 和生物钟系统激活 *Ehd1-Hd3a/RFT1* 途径,上调成花转变基因 *OsMADS14/OsMADS15* 的表达,从而促进水稻抽穗。

DHD9 activates the *Ehd1-Hd3a/RFT1* pathway through *OsMADS50* and the circadian clock system, upregulating the expression of floral transition genes *OsMADS14* and *OsMADS15*, thereby promoting rice heading.

图 7 *DHD9* 调控水稻抽穗期的信号途径

Fig.7 The signaling pathway regulated by the rice mutant gene *DHD9* in controlling heading date

致谢:江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ2400315)和江西省研究生创新专项资金项目(YC2025-S418)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

参考文献 References:

- [1] Wang W, Hu B, Yuan D Y, et al. Expression of the nitrate transporter gene *OsNRT1.1A/OsNPF6.3* confers high yield and early maturation in rice[J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(3): 638-651.
- [2] Cui Y, Zhu M M, Xu Z J, et al. Assessment of the effect of ten heading time genes on reproductive transition and yield components in rice using a CRISPR/Cas9 system[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2019, 132(6): 1887-1896.
- [3] Komiya R, Ikegami A, Tamaki S, et al. *Hd3a* and *RFT1* are essential for flowering in rice[J]. *Development*, 2008, 135(4): 767-774.
- [4] Zhou S R, Zhu S S, Cui S, et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of heading date in rice[J]. *The New Phytologist*, 2021, 230(3): 943-956.
- [5] Tsuji H, Taoka K, Shimamoto K. Regulation of flowering in rice: two florigen genes, a complex gene network, and natural variation[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(1): 45-52.
- [6] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, et al. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related

- to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(12):2473-2483.
- [7] Izawa T, Oikawa T, Sugiyama N, et al. Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering of rice[J]. *Genes & Development*, 2002, 16(15):2006-2020.
- [8] Hayama R, Yokoi S, Tamaki S, et al. Adaptation of photoperiodic control pathways produces short-day flowering in rice[J]. *Nature*, 2003, 422(6933):719-722.
- [9] Du A, Tian W, Wei M, et al. The DTH8-Hd1 module mediates day-length-dependent regulation of rice flowering[J]. *Molecular Plant*, 2017, 10(7):948-961.
- [10] Yang Y, Fu D B, Zhu C M, et al. The RING-finger ubiquitin ligase HAF1 mediates heading date 1 degradation during photoperiodic flowering in rice[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(9):2455-2468.
- [11] Doi K, Izawa T, Fuse T, et al. *Ehd1*, a B-type response regulator in rice, confers short-day promotion of flowering and controls *FT*-like gene expression independently of *Hd1*[J]. *Genes & Development*, 2004, 18(8):926-936.
- [12] Komiya R, Yokoi S, Shimamoto K. A gene network for long-day flowering activates *RFT1* encoding a mobile flowering signal in rice[J]. *Development*, 2009, 136(20):3443-3450.
- [13] Itoh H, Nonoue Y, Yano M, et al. A pair of floral regulators sets critical day length for *Hd3a* florigen expression in rice[J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(7):635-638.
- [14] Kim S L, Lee S, Kim H J, et al. *OsMADS51* is a short-day flowering promoter that functions upstream of *Ehd1*, *OsMADS14*, and *Hd3a*[J]. *Plant Physiology*, 2007, 145(4):1484-1494.
- [15] Matsubara K, Yamanouchi U, Nonoue Y, et al. *Ehd3*, encoding a plant homeodomain finger-containing protein, is a critical promoter of rice flowering[J]. *The Plant Journal*, 2011, 66(4):603-612.
- [16] Lee S, Kim J, Han J J, et al. Functional analyses of the flowering time gene *OsMADS50*, the putative *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1/AGAMOUS-LIKE 20 (SOC1/AGL20)* ortholog in rice[J]. *The Plant Journal*, 2004, 38(5):754-764.
- [17] Xue W Y, Xing Y Z, Weng X Y, et al. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice[J]. *Nature Genetics*, 2008, 40(6):761-767.
- [18] Nemoto Y, Nonoue Y, Yano M, et al. *Hd1*, a *CONSTANS* ortholog in rice, functions as an *Ehd1* repressor through interaction with monocot-specific CCT-domain protein Ghd7[J]. *The Plant Journal*, 2016, 86(3):221-233.
- [19] 徐小冬, 谢启光. 植物生物钟研究的历史回顾与最新进展[J]. *自然杂志*, 2013, 35(2):118-126.
- Xu X D, Xie Q G. The circadian clock in plants[J]. *Chinese Journal of Nature*, 2013, 35(2):118-126.
- [20] 魏华, 王岩, 刘宝辉, 等. 植物生物钟及其调控生长发育的研究进展[J]. *植物学报*, 2018, 53(4):456-467.
- Wei H, Wang Y, Liu B H, et al. Deciphering the underlying mechanism of the plant circadian system and its regulation on plant growth and development[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2018, 53(4):456-467.
- [21] Schaffer R, Ramsay N, Samach A, et al. The *late elongated hypocotyl* mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering[J]. *Cell*, 1998, 93:1219-1229.
- [22] Wang Z Y, Tobin E M. Constitutive expression of the *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1 (CCA1)* gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression[J]. *Cell*, 1998, 93:1207-1217.
- [23] Nakamichi N, Kita M, Ito S, et al. The *Arabidopsis* pseudo-response regulators, PRR5 and PRR7, coordinately play essential roles for circadian clock function[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2005, 46(4):609-619.
- [24] Salome P A, McClung C R. *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 7* and *9* are partially redundant genes essential for the temperature responsiveness of the *Arabidopsis* Circadian Clock[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(3):791-803.
- [25] Lee S J, Kang K, Lim J H, et al. Natural alleles of *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED1* contribute to rice cultivation by fine-tuning flowering time[J]. *Plant Physiology*, 2022, 190(1):640-656.
- [26] Imamura A, Hanaki N, Nakamura A, et al. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction[J]. *Plant Cell and Physiology*, 1999, 40(7):733-742.
- [27] Murakami M, Ashikari M, Miura K, et al. The evolutionarily conserved *OsPRR* quintet: rice pseudo-response regulators implicated in circadian rhythm[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2003, 44(11):1229-1236.
- [28] Gao H, Jin M N, Zheng X M, et al. *Days to heading 7*, a major quantitative locus determining photoperiod sensitivity and regional adaptation in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(46):16337-16342.

- [29] Koo B H, Yoo S C, Park J W, et al. Natural variation in *OsPRR37* regulates heading date and contributes to rice cultivation at a wide range of latitudes[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(6): 1877-1888.
- [30] Wang Y P, Wu F Q, Zhou S R, et al. Clock component *OsPRR59* delays heading date by repressing transcription of *Ehd3* in rice[J]. *The Crop Journal*, 2022, 10(6): 1570-1579.
- [31] Gao H, Zheng X M, Fei G L, et al. *Ehd4* encodes a novel and *Oryza*-genus-specific regulator of photoperiodic flowering in rice[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(2): 1-12.
- [32] Choi S C, Lee S, Kim S R, et al. Trithorax group protein *Oryza sativa* Trithorax1 controls flowering time in rice via interaction with early heading date3[J]. *Plant Physiology*, 2014, 164(3): 1326-1337.
- [33] Ryu C H, Lee S, Cho L H, et al. *OsMADS50* and *OsMADS56* function antagonistically in regulating long day (LD)-dependent flowering in rice[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2009, 32(10): 1412-1427.
- [34] Song Y H, Shim J S, Kinmonth-Schultz H A, et al. Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2015, 66(1): 441-464.
- [35] Xu P, Zhang Y X, Wen X X, et al. The clock component OsLUX regulates rice heading through recruiting OsELF3-1 and Os-ELF4s to repress *Hd1* and *Ghd7*[J]. *Journal of Advanced Research*, 2023, 48: 17-31.
- [36] Liang L W, Zhang Z Y, Cheng N N, et al. The transcriptional repressor OsPRR73 links circadian clock and photoperiod pathway to control heading date in rice[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2021, 44(3): 842-855.
- [37] Wei X J, Xu J F, Guo H N, et al. *DTH8* suppresses flowering in rice, influencing plant height and yield potential simultaneously[J]. *Plant Physiology*, 2010, 153(4): 1747-1758.
- [38] Zhang H, Zhu S S, Liu T Z, et al. DELAYED HEADING DATE1 interacts with OsHAP5C/D, delays flowering time and enhances yield in rice[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(2): 531-539.

(责任编辑:张前锋)



第一作者简介:殷娇娟,硕士生。硕士期间学业优异,连续2年获得研究生学业奖学金。目前主要从事水稻基因功能研究,主持江西省研究生创新专项资金项目《转录因子Ehd7调控水稻抽穗期的分子机制》,开展水稻抽穗期基因的功能解析及分子机制研究。



通信作者简介:汪欲鹏,江西农业大学校聘副教授,硕士生导师,中国农业科学院博士后,江西省省级D类高层次人才,江西石城稻渔科技小院首席科学家,省科技特派员。主要从事水稻抽穗期、产量及抗逆相关基因挖掘与利用等方面的研究工作,主持中国博士后科学基金特别资助、江西省自然科学基金青年基金、江西省重点研发计划项目子课题等省部级课题4项,目前已挖掘水稻重要农艺性状基因十余个,并深入解析了部分基因的作用机理,相关研究成果以第一作者或通讯作者在 *Plant Physiology*、*The Crop Journal*、*Rice* 等国际权威期刊上发表论文6篇,中文核心期刊论文6篇,获得中国农业科学院作物科学研究所年度优秀博士后、江西省优秀博士论文等荣誉。