

# 小麦耐低磷相关性状的全基因组关联分析

周思远, 毕惠惠, 程西永, 张旭睿, 闰永行, 王航辉, 毛培钧, 李海霞, 许海霞

( 河南农业大学 / 省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室 / 河南省粮食作物协同创新中心, 郑州 450046 )

**摘要:** 通过对小麦耐低磷相关性状进行全基因组关联分析 ( GWAS, genome-wide association study ), 挖掘与小麦耐低磷性显著相关的单核苷酸多态性标记 ( SNP, single nucleotide polymorphism ) 位点及候选基因, 为小麦耐低磷性状的遗传基础和分子机制研究提供理论参考。本试验以 198 份黄淮麦区小麦品种 ( 系 ) 为试验材料, 设置低磷和正常磷营养液水培试验, 利用小麦 35K 芯片对分布于小麦全基因组的 11896 个 SNP, 采用 Q+K 关联模型对小麦耐低磷性相关性状进行关联分析。结果表明, 小麦耐低磷性状表现出广泛的表型变异, 变异系数为 15.65%~26.59%, 多态性信息含量 ( PIC, polymorphic information content ) 为 0.095~0.500。群体结构分析表明, 试验所用自然群体可分为 2 个亚群, GWAS 共检测到 67 个与小麦耐低磷相关性状显著关联的 SNP 位点 (  $P \leq 0.001$  ), 这些位点分布在除 3A、3B 和 3D 以外的 18 条染色体上, 单个 SNP 位点可解释 5.826%~9.552% 的表型变异。在这些显著位点中有 4 个 SNP 位点同时关联到了 2 个不同的耐低磷性状。对 67 个 SNP 位点进行发掘, 筛选到 7 个可能与小麦耐低磷性有关的候选基因。 *TraesCS6A02G001000* 和 *TraesCS6A02G001100* 在锌指合成中有重要作用; *TraesCS6A02G118100* 可能为低磷胁迫诱导基因; *TraesCS5D02G536400*、*TraesCS1B02G154200* 和 *TraesCS5D02G536500* 与低磷胁迫相关酶类基因家族有关; *TraesCS1D02G231200* 与植物 DUF 538 结构域蛋白有关, 是植物胁迫相关调控蛋白候选基因。

**关键词:** 小麦; 耐低磷相关性状; 全基因组关联分析; SNP; 候选基因

## Genome-Wide Association Study of Low-Phosphorus Tolerance Related Traits in Wheat

ZHOU Si-yuan, BI Hui-hui, CHENG Xi-yong, ZHANG Xu-rui, RUN Yong-hang,  
WANG Hang-hui, MAO Pei-jun, LI Hai-xia, XU Hai-xia

( Henan Agricultural University/National Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science/Collaborative  
Innovation Center of Henan Grain Crops, Zhengzhou 450046 )

**Abstract:** To screen the single nucleotide polymorphism ( SNP ) loci and candidate genes associated with low-phosphorus stress in wheat, genome-wide association study ( GWAS ) of low-phosphorus related traits in common wheat was performed for understanding the genetic mechanism of low-phosphorus tolerance. In the study, 198 wheat varieties ( lines ) originated from the Huang-Huai area were used as test materials to evaluate the related traits in low phosphorus and normal phosphorus solution cultures. The wheat 35K Chip with 11896 SNP markers which were distributed in the whole genome of wheat were used to analyze the related traits of low-phosphorus tolerance. The mixed model of Q+K was chosen to determine the statistical associations between phenotypes and genotypes to evaluate the effects of population structure and related traits. The result showed that the low-phosphorus tolerance character of wheat had a wide range of phenotypic variation with the coefficient variation between 15.65% and 26.59%. The polymorphism information content ( PIC ) was between 0.095 and

收稿日期: 2019-05-09 修回日期: 2019-06-06 网络出版日期: 2019-10-10

URL: <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190509001>

第一作者研究方向为 小麦分子生物学, E-mail: 18339927508@163.com

通信作者: 许海霞, 研究方向为小麦遗传育种, E-mail: hauxhx@163.com

李海霞, 研究方向为植物生理, E-mail: 527801231@qq.com

**基金项目:** 国家重点研发计划 ( 2017YFD0100706 ); 转基因生物新品种培育重大专项 ( 2016ZX08002003-004 )

**Foundation project:** National Key Research and Development Program of China ( 2017YFD0100706 ), National Major Project of Breeding for New Transgenic Crops ( 2016ZX08002003-004 )



0.500. Population structure analysis showed that the natural population in the experiment could be divided into two subgroups. GWAS analysis indicated that 67 SNP loci were significantly associated with low-phosphorus tolerance ( $p \leq 0.001$ ), which were located in 18 chromosomes except 3A, 3B and 3D chromosomes. Each SNP could explain 5.826%~9.552% of phenotypic variation. Four SNP sites were simultaneously associated with 2 different low-phosphorus tolerance traits in these significant sites. Seven candidate genes may be related to the low-phosphorus tolerance of wheat through analysis of the 67 SNP sites. *TraesCS6A02G001000* and *TraesCS6A02G001100* play important roles in the synthesis of zinc finger. *TraesCS6A02G118100* may be induced by low-phosphorus stress. *TraesCS5D02G536400*, *TraesCS1B02G154200* and *TraesCS5D02G536500* are related to the family of low-phosphorus stress-related enzymes. *TraesCS1D02G231200* is related to DUF538 and its product can be a putative candidate for common stress-related protein in plant.

**Key word:** wheat; low-phosphorus tolerance related traits; GWAS; SNP; candidate gene

土壤磷(P)缺乏是限制作物产量的主要因素之一。虽然土壤中的总磷含量很高,但通常与土壤中钙、铁、铝以及土壤粘粒相结合,形成难溶性的磷酸盐,根系很难吸收利用,使作物表现出缺磷症状<sup>[1]</sup>。小麦是中国主要的粮食作物之一,其磷肥利用率很低,生产中施加的磷肥只有小部分可以被小麦植株吸收利用<sup>[2]</sup>。利用小麦不同品系在磷素吸收和利用效率上的遗传多样性,充分挖掘小麦自身的磷素高效吸收利用能力,已成为小麦耐低磷育种的重要途径之一<sup>[3]</sup>。

近年来随着现代分子生物学技术的迅速发展,分子标记技术和响应低磷胁迫逆境的分子生物学研究在小麦育种领域也得到了深入发展<sup>[4]</sup>。小麦多数性状是由多基因控制的数量性状,受基因型和环境共同作用<sup>[5]</sup>。目前,研究作物数量性状的主要方法是QTL定位和关联分析。曹卫东等<sup>[6]</sup>对小麦地上部磷素利用效率和全株磷素利用效率进行QTL分析,在1B、2B、2D、3B、5A、6D和7A染色体上检测到了与磷素利用效率有关的QTL。Su等<sup>[7]</sup>对磷胁迫条件下小麦农艺性状与磷利用效率进行QTL定位,共鉴定出36个与磷利用效率有关的QTL,分布在14条染色体上,这些QTL与地上部干重、生物量、籽粒性状、磷吸收和磷利用效率等性状有关。Yang等<sup>[8]</sup>对小麦苗期缺磷根系性状进行研究,发现在低磷胁迫条件下,1D、2D、3D和7D染色体上检测到4个显著的QTL位点,这些QTL可使根系生物量增加并且对缺磷胁迫做出响应。关联分析也称连锁不平衡作图(linkage disequilibrium mapping),是以连锁不平衡为基础,在群体内进行分子标记与性状的相关性分析,来鉴定目标性状与染色体区段关系的分析方法<sup>[9]</sup>。关联分析与QTL的连锁分析相比具有耗时少、广度大和精度高等特点,

在解析数量性状遗传机制方面的应用越来越广泛。陈广凤等<sup>[10]</sup>对小麦株高进行全基因组关联分析,共发现38个与株高相关性状显著关联( $P \leq 0.0001$ )的SNP。时佳等<sup>[11]</sup>通过对普通小麦籽粒过氧化物酶活性全基因组关联分析,发现20个过氧化物酶活性位点,并在显著相关的位点区域内筛选到3个候选基因。郑洪华等<sup>[12]</sup>对小麦苗期磷效率性状进行全基因组关联分析,检测到1485个与耐低磷性有关的SNP标记位点,其中有288个SNP标记位点属于稳定关联位点。

有关小麦耐低磷性的研究表明,小麦生育前期的磷素营养状况对后期产量的形成起到了至关重要的作用<sup>[13-14]</sup>。由于受低磷胁迫的影响,小麦幼苗期的生物量、磷累积量和磷利用效率都会发生变化。前人对小麦耐低磷性的研究主要集中在小麦磷高效种质资源鉴定和磷效率分子遗传机制两方面<sup>[15]</sup>。在小麦磷高效基因型的鉴定及筛选、磷胁迫分子应答机制及磷效率相关性状的QTL定位等方面取得了一定进展,但有关利用SNP关联分析定位耐低磷相关位点的研究还比较少。本试验对黄淮麦区198份小麦品种(系)进行苗期耐低磷性鉴定,对小麦耐低磷性相关性状与SNP标记进行全基因组关联分析,以寻找与耐低磷性关联的SNP位点,并进一步筛选可能与小麦耐低磷性有关的候选基因,以期对小麦分子标记辅助选择及耐低磷性遗传机制研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试小麦材料共198份,其中河南的小麦材料160份,占材料总数的80%,陕西和山东的品种(系)各10个,江苏的小麦品种(系)7个。参



试材料主要是黄淮南片冬麦区主要推广品种、新育成品种和正在参加区域试验的优良品系及部分骨干亲本和历史品种(详见 <http://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20190509001>,附表1),在温室内进行表型鉴定。

### 1.2 试验处理及表型数据

采用改进的 Hoagland 培养液添加 500  $\mu\text{mol/L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (正常磷,CK)或者 5  $\mu\text{mol/L}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (低磷,LP)2 个处理<sup>[16-17]</sup>,试验设置 3 次重复,温度控制在 23~25  $^{\circ}\text{C}$ ,调控湿度在 50%~60%,光照时长设置为昼/夜=14 h/10 h。取均匀一致且饱满的小麦种子进行  $\text{H}_2\text{O}_2$ (10%)消毒 10 min,蒸馏水清洗 3 遍,放入标记好序号的培养皿中。2 d 黑暗遮光培养,3 d 光照培养。选择长势一致的幼苗,去除胚乳后,以 2 株小麦幼苗为 1 组,用海绵条固定,转移至打孔的泡沫板上,放入盛有营养液(pH=6.0)的 2L 聚乙烯塑料盆中进行培养。定时通气并每 3 d 更换营养液,培养 25 d 后进行相关性状的测定。

测定单株苗茎叶部干重、单株苗根部干重。利用  $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$  消煮和钼锑抗比色法<sup>[18]</sup>测定小麦样品茎叶部和根部磷浓度,计算单株茎叶部磷累积量、单株根部磷累积量、单株茎叶部磷利用效率和单株根部磷利用效率。磷累积量=磷浓度 $\times$ 植株干物质重;磷利用效率=植株干物质累积量/植株磷累积量。各性状的耐低磷系数( $\alpha$ )=处理组测定值/对照组测定值。

使用 Microsoft Excel 2016 和 IBM SPSS Statistic 20 对表型数据进行分析整理。

### 1.3 基因型测定与分析

每份试验材料发芽后取 5 株幼苗叶片混合,用植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP350, TIANGEN)提取总 DNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验合格的 DNA 进行基因型分析。委托北京博奥晶典生物技术有限公司,利用小麦 35K SNP 芯片进行 DNA 的基因分型,使用 Plink 软件转化基因分型数据,剔除最小等位基因频率(MAF)<0.05 和缺失率(Missing rate) $\geq 20\%$  的 SNP 标记,最终得到 11896 个 SNP 用于关联分析。

### 1.4 群体结构分析

应用 Tassel 5.0(<https://www.maizegenetics.net/>)软件计算多态性信息量(PIC, polymorphic information content),  $\text{PIC}=1-\sum P_{ij}^2$  ( $P_{ij}^2$  表示第  $i$  个位点的第  $j$  个等位变异出现的频率)<sup>[19]</sup>。利用 Structure 2.3.4 软件对该群体进行群体结构分析<sup>[20]</sup>,设置亚群数目  $K$  为 1~12,5 次模拟运算,模拟参数迭代(Length of

burn-in period)和蒙特卡罗迭代(MCMC, Markov Chain Monte Carlo)分别设置为  $1 \times 10^5$  和  $1 \times 10^6$  次循环,在混合模型和频率相关模型下运算。输出的后验概率值结果输入 Structure Harvester(<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>),计算 2 个连续的后验概率值的变化速率( $\Delta k$ )<sup>[21]</sup>和每个材料分别来自 1~12 亚群的  $Q$  值,以  $Q$  值 0.5 为分界线,最终确定群体的数目和结构。使用 Tassel 5.0 和 Gapit(<http://www.zzlab.net/GAPIT/>)软件绘制 PCA 群体结构分析图。

运用 Tassel 5.0 软件对自然群体进行亲缘关系评估,计算亲缘关系  $K$  矩阵。亲缘关系代表两个特定材料之间的遗传相似度与任意材料之间遗传相似度的相对值,当供试材料之间的亲缘关系值为负值时,直接将其定义为 0<sup>[22]</sup>。

### 1.5 全基因组关联分析

使用 Tassel 5.0 软件中的  $Q+K$  混合线性模型进行性状与标记之间的关联分析<sup>[23]</sup>,用代表群体结构的  $Q$  矩阵和亲缘关系矩阵(Kinship)作为协变量<sup>[24]</sup>,当标记与性状关联的  $P \leq 10^{-3}$  时认为显著关联。利用 Rstudio 软件绘制 Quantile-Quantile 散点图(Q-Q plot)和曼哈顿图(Manhattan)<sup>[25]</sup>,Manhattan 图显示关联分析后每个位点的显著性。

### 1.6 小麦耐低磷候选基因筛选

以获得的小麦耐低磷性状关联的 SNP 标记序列为探针,将相关 SNP 位点的核苷酸序列导入普通小麦中国春基因组数据库([http://plants.ensembl.org/Triticum\\_aestivum/Info/Index](http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index))获取基因序列,使用 NCBI([http://plants.ensembl.org/Triticum\\_aestivum/Info/Index](http://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Index))中 CDD 工具进行基因功能注释,筛选出与小麦耐低磷性状相关的基因。设置  $e$  值  $<10^{-5}$ ,序列一致性大于 75%。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦耐低磷相关性状的表型变异

对供试材料各性状耐低磷系数进行分析表明(图1),这些性状受多基因控制,属于数量性状遗传,适合进行 GWAS 分析。所研究的 6 个性状在低磷胁迫条件下的耐低磷系数均表现出广泛的表型变异(表1)。单株茎叶部磷累积量(SPC)耐低磷系数的变异幅度为 0.059~0.298,平均数为 0.151,变异系数为 26.12%。单株根部磷累积量(RPC)耐低磷系数的变异幅度为 0.102~0.598,平均值为 0.284,变异系数为 26.59%。单株茎叶部磷利用效



率 (SPUE) 耐低磷系数的变异幅度为 3.169~8.361, 平均值为 5.037, 变异系数为 20.46%。经低磷胁迫处理后, 供试小麦品种的单株苗根部干重 (RDW)、单株茎叶部磷利用效率 (SPUE)、单株根部磷利用效率 (RPUE) 的耐低磷系数均大于 1, 表明与对照

相比增加; 单株苗茎叶部干重 (SDW)、单株茎叶部磷累积量 (SPC) 和单株根部磷累积量 (RPC) 的耐低磷系数均小于 1, 表明与对照相比下降, 反映出小麦通过加强根部生长和提高体内磷的利用效率来应对低磷胁迫环境。

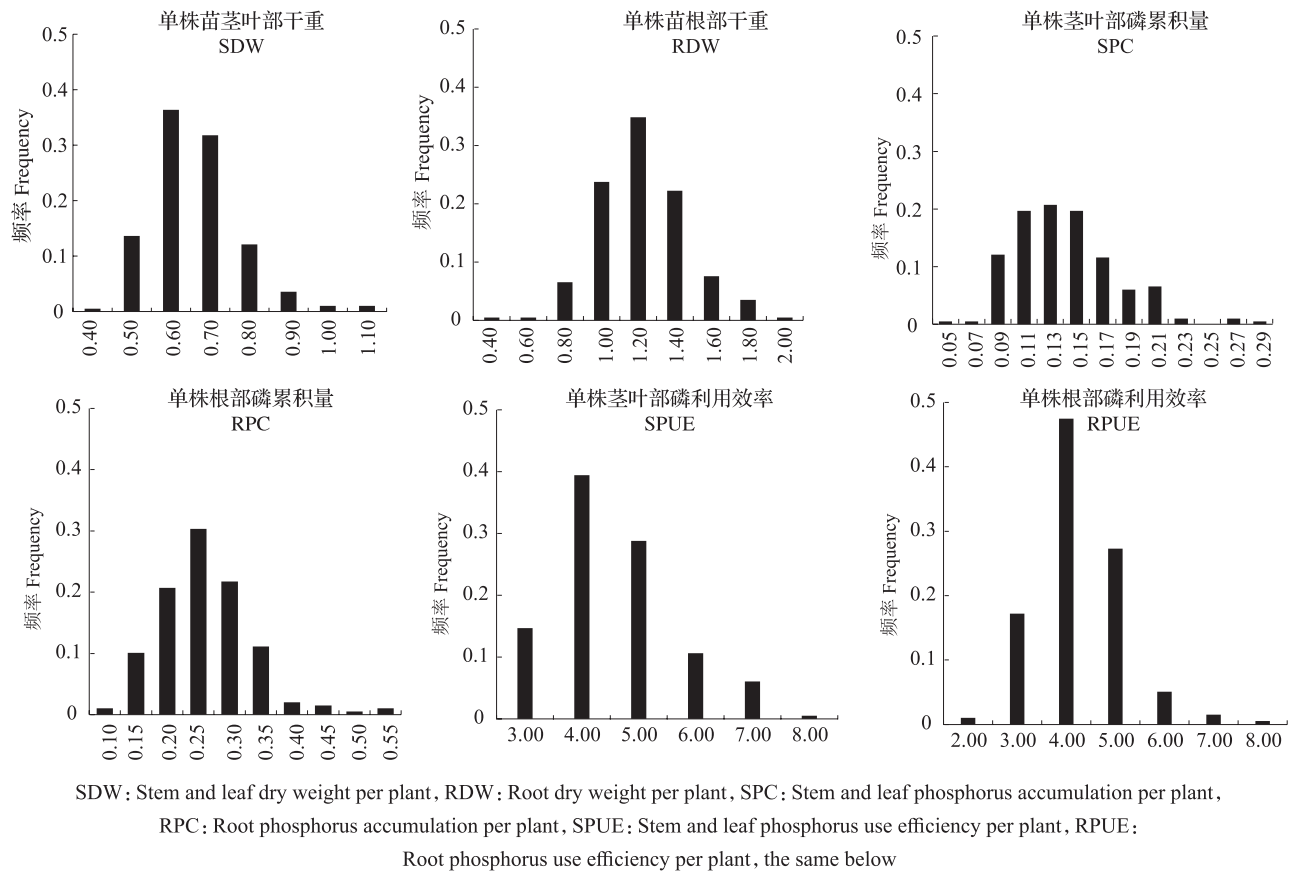


图 1 耐低磷系数频率分布图

Fig. 1 Frequency distribution map of low-phosphorus tolerance coefficient

表 1 相关性状耐低磷系数的表型变异

Table 1 Phenotypic variation of low phosphorus tolerance in related traits

性状 Traits	单株苗茎叶部 干重 SDW	单株苗根部 干重 RDW	单株茎叶部磷 累积量 SPC	单株根部磷 累积量 RPC	单株茎叶部磷 利用效率 SPUE	单株根部磷 利用效率 RPUE
最大值 Max.	1.176	2.116	0.298	0.598	8.361	8.156
最小值 Min.	0.497	0.467	0.059	0.102	3.169	2.978
平均数 Mean	0.710	1.320	0.151	0.284	5.037	4.729
标准差 SD	0.111	0.235	0.039	0.076	1.031	0.873
变异系数 CV(%)	15.65	17.78	26.12	26.59	20.46	18.47

2.2 SNP 多态性和群体结构

从小麦 35K 芯片中筛选出具有多态性且 MAF>0.05 的 SNP 标记 11896 个, 其中有具体物理位置信息的标记有 11399 个, 分布在 A 基因组、B 基因组和 D 基因组染色体上的 SNP 位点数目分别为 3448、4533 和 3418 (表 2)。3 个染色体组的

PIC 表现为 B (0.364)>A (0.349)>D (0.345)。全基因组的 PIC 变异范围在 0.095~0.500, 平均值为 0.353, 1B 染色体的 PIC 最大为 0.394, 6A 染色体最小为 0.322。说明选用的标记在各染色体组上分布较均匀, 且标记的等位变异间具有高度的多态性。



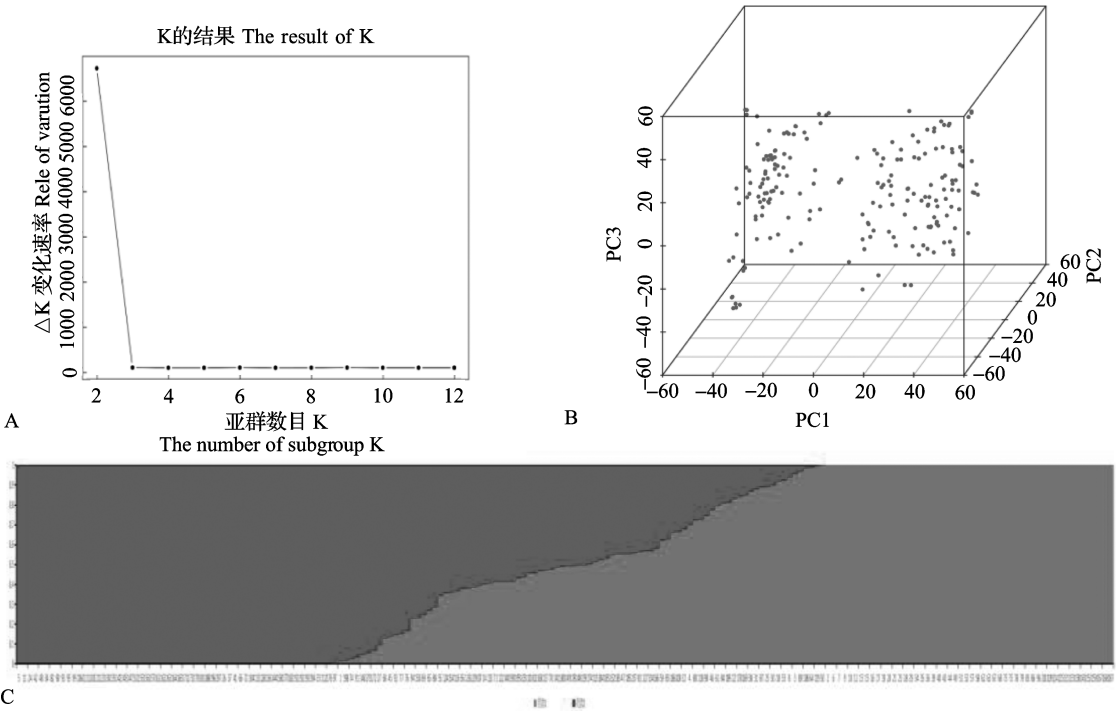
表 2 多态性信息表

Table 2 Polymorphism information

染色体 Chromosome	标记数目 No. of markers	多态性信息量 PIC		染色体 Chromosome	标记数目 No. of markers	多态性信息量 PIC	
		平均值 Mean	变异范围 Range			平均值 Mean	变异范围 Range
1A	600	0.355	0.096~0.500	5B	723	0.351	0.096~0.500
1B	880	0.394	0.096~0.500	5D	537	0.340	0.096~0.500
1D	776	0.374	0.096~0.500	6A	432	0.322	0.096~0.500
2A	580	0.358	0.096~0.500	6B	635	0.350	0.096~0.500
2B	756	0.358	0.096~0.500	6D	393	0.329	0.096~0.500
2D	673	0.346	0.096~0.500	7A	531	0.343	0.096~0.500
3A	418	0.354	0.096~0.500	7B	507	0.365	0.096~0.500
3B	664	0.388	0.096~0.500	7D	424	0.344	0.097~0.500
3D	446	0.354	0.095~0.500	Unmap	497	0.345	0.096~0.500
4A	324	0.353	0.097~0.500	A	3448	0.349	0.095~0.500
4B	368	0.344	0.096~0.500	B	4533	0.364	0.095~0.500
4D	169	0.331	0.102~0.500	D	3418	0.345	0.095~0.500
5A	563	0.358	0.096~0.500	总计 Total	11896	0.353	0.095~0.500

利用 Structure 软件对每个可能的 K 值模拟运算,用 K 值与  $\Delta K$  值做图(图 2A),在 K=2 处  $\Delta K$  值最大,并观察到坡度断裂,曲线变化程度最大。由图 2B 可以看出参试材料被分为 2 个亚群,亚群 1

包含 90 个(45.45%)试验材料,亚群 2 包含 108 个(54.55%)试验材料,这与主成分分析结果(图 2C)一致。因此将 K=2 时生成的 Q 矩阵,用于性状与标记的关联分析。



A:  $\Delta K$  折线图; B: 群体结构; C: PCA 分析  
A: line chart of  $\Delta K$ , B: structure plot, C: analysis of PCA

图 2 群体结构和主成分分析  
Fig. 2 Structure and PCA analysis



### 2.3 标记 - 性状 (MTA) 关联分析

将 198 份试验材料耐低磷相关性状的耐低磷系数与 11896 个 SNP 标记进行全基因组关联分析, 共检测到 67 个显著关联的标记 (表 3)。其中, 检测到 4 个与单株苗茎叶部干重关联的 SNP, 分布在 5D、6D 染色体上, 这些位点可解释的表型变异率分别为 5.921%、5.826%、8.862%、6.654%。检测到 11 个与单株苗根部干重显著关联的 SNP, 分布在 2D、6A、6B、6D 染色体上, SNP 可解释的表型变异率为 5.859%~7.087%。与单株茎叶部磷累积量显著关联的 SNP 标记共检测到 8 个, 分布在 2A、

6A、6B、6D、7B、7D 染色体上, 可解释的表型变异率为 6.575%~9.097%。检测到 38 个与单株根部磷累积量显著关联的 SNP 标记, 分布在 1A、1B、1D、2A、2D、4A、4B、4D、5A、7A、7D、UN 染色体上, 标记位点可解释的表型变异率为 5.892%~8.508%。检测到 6 个与单株根部磷利用效率关联的 SNP, 分布在 2B、5A、5B、6A、7B 染色体上, 表型变异率为 5.952%~9.552%。在这些显著关联的标记中, 单株根部磷累积量关联到的标记最多 (38 个), 且变异系数最大 (26.59%), 从一定程度上说明表型变异的大小会影响关联分析的关联效率。

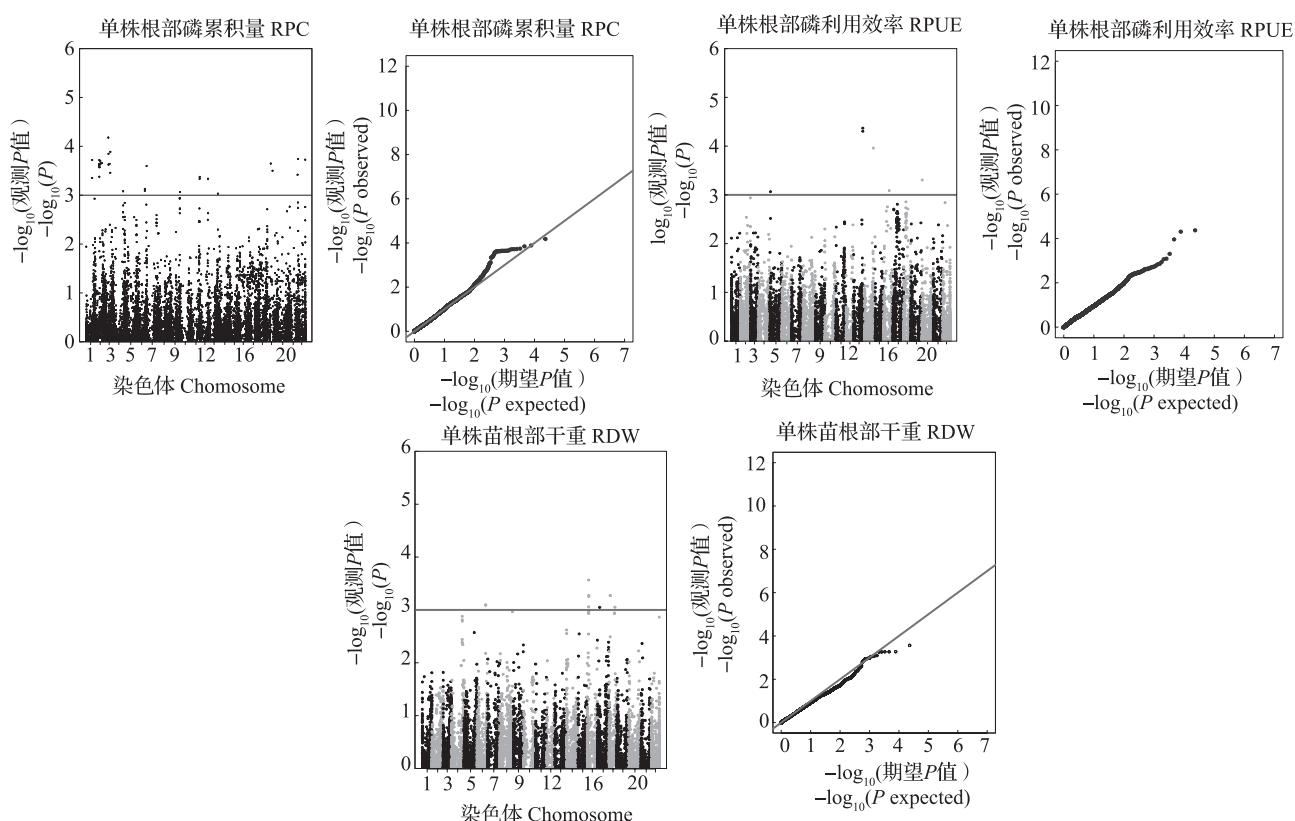


图 3 部分性状的曼哈顿图和 Q-Q 图

Fig. 3 Manhattan plot and Q-Q graphs of some traits

在这些关联的位点中, 位于 2D 染色体上的 AX-94463649 和 AX-95255212 同时与单株苗根部干重和单株根部磷累积量相关联, 位于 6D 染色体上的 AX-94995255 与单株苗茎叶部干重和单株茎叶部磷累积量相关联, 位于 5A 染色体上的 AX-95003472 同时与单株根部磷累积量和单株根部磷利用效率相关联 (表 3), 说明这 4 个位点为一因多效位点。

### 2.4 小麦耐低磷候选基因的预测

将 67 个与小麦耐低磷相关性状关联的 SNP 标

记序列在普通小麦中国春基因组数据库搜索, 获取基因序列, 使用 NCBI 中 CDD 工具进行基因功能注释, 共得到 7 个与耐低磷性相关的基因 (表 4)。在这些候选基因的注释中, *TraesCS5D02G536400* 编码核苷酸-糖基转移酶 (Nucleotid\_trans); *TraesCS5D02G536500* 对应的功能结构为 RNase\_E\_G 超级家族 (RNase\_E\_G super family), 属于核糖核酸酶; *TraesCS6A02G118100* 编码 STKc-TEY\_MAPK, 通过磷酸化促进植物防御信号转导; *TraesCS6A02G001000* 和 *TraesCS6A02G001100* 分



表 3 耐低磷相关性状显著关联的位点信息

Table 3 Loci information of significant correlation between low-phosphorus tolerance and related traits

指标 Trait	标记 SNP	染色体 Chromosome	物理位置 Position	P 值 P value	贡献率 (%) R <sup>2</sup>
单株苗茎叶部干重 SDW	AX-95148412	5D	549656712	8.01E-04	5.921
	AX-94764066	5D	549758159	9.24E-04	5.826
	AX-94995255	6D	5987057	4.17E-04	8.862
	AX-95204907	6D	332548111	7.69E-04	6.654
单株苗根部干重 RDW	AX-94463649	2D	531348258	8.02E-04	5.919
	AX-95255212	2D	531350330	8.14E-04	5.908
	AX-95006826	6A	88855086	5.50E-04	6.352
	AX-95098535	6A	90032600	5.36E-04	6.382
	AX-94712363	6A	90034206	8.73E-04	5.909
	AX-94506212	6A	91427030	2.72E-04	7.087
	AX-95629839	6A	93818299	5.47E-04	6.359
	AX-95168893	6B	149058576	8.95E-04	5.859
	AX-94921385	6D	73062256	5.36E-04	6.382
	AX-95188774	6D	75375480	5.33E-04	6.389
	AX-94635585	6D	363261091	8.86E-04	6.874
单株茎叶部磷累积量 SPC	AX-95151551	2A	79303847	6.31E-04	6.801
	AX-95630434	6A	639383	6.05E-04	7.746
	AX-94583199	6B	652376687	2.92E-04	8.379
	AX-94995255	6D	5987057	4.77E-04	9.097
	AX-94685291	7B	35308354	1.22E-04	8.589
	AX-94707406	7B	737099687	5.81E-04	7.528
	AX-95190395	7B	740038998	3.27E-04	7.469
	AX-95145900	7D	635582898	9.49E-04	6.575
单株根部磷累积量 RPC	AX-94479134	1A	402258367	4.45E-04	6.522
	AX-94558187	1A	403660035	1.91E-04	7.385
	AX-94826085	1B	256193565	2.28E-04	8.178
	AX-94851996	1B	277423361	2.33E-04	7.162
	AX-95158976	1B	277442508	2.37E-04	7.145
	AX-94555065	1B	280712168	4.19E-04	7.221
	AX-94427330	1B	281038551	2.33E-04	7.162
	AX-94526379	1B	282134721	2.37E-04	7.145
	AX-94545824	1B	282427873	1.91E-04	7.395
	AX-95260484	1B	282427911	2.37E-04	7.145
	AX-94910851	1B	285339009	2.67E-04	7.134
	AX-95116150	1B	285608131	2.68E-04	7.118
	AX-95194781	1B	286707988	2.34E-04	7.161
	AX-95211391	1B	342647869	2.29E-04	7.179
	AX-94451305	1B	344044080	2.00E-04	7.340
	AX-94749797	1B	347021392	2.29E-04	7.179



表 3( 续 )					
指标 Trait	标记 SNP	染色体 Chromosome	物理位置 Position	P 值 P value	贡献率 ( % ) R <sup>2</sup>
单株根部磷利用效率 RPUE	AX-95628967	1B	348419466	2.25E-04	7.193
	AX-94889904	1B	443996778	2.20E-04	7.310
	AX-94701961	1D	188345155	6.61E-05	8.508
	AX-94707483	1D	199595680	1.42E-04	7.988
	AX-95234839	1D	199672505	2.37E-04	7.152
	AX-94786026	1D	270018261	2.29E-04	7.179
	AX-95195442	1D	319615262	3.48E-04	6.835
	AX-94540527	1D	322165538	1.30E-04	7.886
	AX-94431639	2A	675306025	8.33E-04	5.892
	AX-94463649	2D	531348258	7.42E-04	5.996
	AX-95255212	2D	531350330	8.11E-04	5.929
	AX-94747841	2D	649305672	2.53E-04	7.272
	AX-94752113	4A	13757992	8.59E-04	6.216
	AX-94914669	4B	579392893	4.61E-04	6.477
	AX-94613319	4B	579406242	4.22E-04	6.59
	AX-94383186	4D	463403680	4.60E-04	6.477
	AX-95003472	5A	609195920	9.30E-04	6.174
	AX-94997235	7A	315516201	2.25E-04	7.193
	AX-94987601	7A	434777635	3.16E-04	6.848
	AX-94969629	7D	608447542	3.81E-04	7.369
	AX-94533843	Unknown	6017765	1.81E-04	7.419
	AX-94383420	Unknown	480753053	1.87E-04	7.411
	AX-94781649	2B	46891615	8.59E-04	5.952
	AX-95003472	5A	609195920	4.95E-05	9.552
	AX-94528104	5A	609243917	4.27E-05	8.941
	AX-95209080	5B	601328075	1.10E-04	8.57
	AX-94690130	6A	379659075	8.17E-04	6.732
	AX-95191125	7B	21668434	4.95E-04	6.368

表 4 筛选获得候选基因信息

Table 4 Candidate gene information obtained by screening

性状 Trait	位点 SNP	位点物理位置 Position	染色体 Chromosome	基因 Gene	基因注释或编码蛋白 Gene annotation or coding protein
单株苗茎叶部干重 SDW	AX-95148412	549656712	5D	<i>TraesCS5D02G536400</i>	Nucleotid_trans
	AX-94764066	549758159	5D	<i>TraesCS5D02G536500</i>	RNase_E_G super family
单株苗根部干重 RDW	AX-95006826	88855086	6A	<i>TraesCS6A02G118100</i>	STKc_Tey_MAPK
单株茎叶部磷累积 量 SPC	AX-95630434	639383	6A	<i>TraesCS6A02G001000</i> <i>TraesCS6A02G001100</i>	RING_Ubox super family RINGv
单株根部磷累积量 RPC	AX-94826085	256193565	1B	<i>TraesCS1B02G154200</i>	Haloacid Dehalogenase-like Hydrolases Cation_ATPase super family
	AX-95195442	319615262	1D	<i>TraesCS1D02G231200</i>	DUF538



别编码一个锌指结构域 RING\_Ubox super family 和 RINGv; *TraesCS-1B02G154200* 编码 卤代脱卤酶类水解酶 (HDAs, Haloacid Dehalogenase-like Hydrolases) 和阳离子转运蛋白 (Cation\_ATPase super family); *TraesCS1D02G231200* 编码 DUF 538 结构域, 该基因编码产物与植物中的胁迫调控蛋白有关。

### 3 讨论

#### 3.1 小麦耐低磷试验指标的选择

磷是小麦生长发育的必要元素之一。磷素的缺乏严重影响小麦产量<sup>[26]</sup>, 挖掘小麦耐低磷基因对于阐明小麦营养吸收机理尤为重要, 耐低磷相关性状指标的评价成为首要解决的问题。目前, 磷高效作物通常指在磷素供应不足时, 能比普通品种获得更高的经济产量或生物量的作物<sup>[27]</sup>, 一般可分为两种模式: 一是在磷素供应不足的土壤中能够活化尽量多的非有效磷供应根系吸收; 另一种是在植物体内磷素代谢效率较高, 能以少量磷素维持植物的正常生长发育。根据这两种模式, 本试验选取了单株茎叶部磷积累量、单株根部磷积累量、单株茎叶部磷利用效率和单株根部磷利用效率 4 个磷高效相关性状来评价小麦材料的耐低磷性。从选育耐低磷小麦获得较高产量的目的出发, 邢宏燕等<sup>[28]</sup>研究发现, 土培苗期生物产量相对值 (-P/+P) 能反映大田成株期的耐低磷特性, 可以作为小麦种质资源耐低磷特性筛选的早期选择指标。故本试验中选择了单株苗茎叶部干重和单株苗根部干重作为评价小麦耐低磷的重要指标。

#### 3.2 小麦耐低磷相关性状 GWAS 分析

根据性状与标记的关联分析结果, 有 5 个耐低磷相关性状都检测到了相关的位点, 这表明小麦的耐低磷性为微效多基因控制。本试验在 5A 染色体上检测到 2 个位点与单株根部磷利用效率性状相关联。Su 等<sup>[29]</sup>分别在 5A、5D 染色体上发现与小麦磷吸收和利用效率关联的位点。曹卫东等<sup>[6]</sup>的分析也表明 5A 染色体对磷利用效率具有重要意义, 在研究小麦根部磷利用效率的试验中可作为优先选择位点。李玉京等<sup>[30]</sup>发现耐低磷胁迫特性有关的基因可能位于 1A、4A、7A、3B、5B 和 7D 染色体, 其中 1A、4A 和 7A 染色体上的基因极显著。本试验在研究根部磷积累量性状关联位点中发现 1A 染色体关联 2 个位点、4A 染色体关联 1 个位点、7A 染色体关联 2 个位点, 这些位点可能对于

小麦根部磷积累量有一定效应。郑洪华<sup>[12]</sup>在研究茎叶干重的性状中, 共检测到 106 个显著位点, 其中 *BS00022688\_51*、*D\_GCE8AKX02IXEFJ\_281* 位点与本试验所得位点 *AX-94764066* 距离较近, 分别相距 0.879 cM 和 0.889 cM, *AX-94764066* 对应的位点注释为 RNase\_E\_G 超级家族, 是一类核糖核酸酶, 存在于植物的叶绿体中, 拟南芥 RNase\_E 酶的溶核活性取决于 5' 端磷酸盐的数量<sup>[31]</sup>。此外 *D\_GDS7LZN02I3554\_251* 和 *RFL\_Contig4176\_605* 位点与 *AX-95148412* 距离较近, 相距 0.715 cM 和 0.774 cM, *AX-95148412* 位点关联的基因是 *TraesCS5D02G536400*, 对应的基因注释为核苷酸-糖基转移酶 (Nucleotid\_trans), 是糖基转移酶 (GTs) 家族中的一员, 糖基转移酶通过参与多种物质的糖基化在植物抗逆方面起着重要作用<sup>[32]</sup>。这些与耐低磷性状显著关联的标记, 在进行小麦耐低磷遗传分子机制的研究中可优先选择。

#### 3.3 小麦耐低磷候选基因预测

利用中国春基因组数据库获取 67 个与耐低磷性状显著关联的 SNP 标记序列, 根据基因功能注释信息, 推测 7 个基因与小麦耐低磷性相关 (表 6)。其中, 位于 5D 染色体上单株苗根部干重的候选基因 *TraesCS5D02G536400* 编码 STKc\_Tey\_MAPK。MAPK 级联 (MAPK cascade) 由 3 个激酶组成, 并按 MAPKKK (MAP3K/MEKK) → MAPKK (MAP2K/MEK) → MAPK 的顺序依次被其上游组分磷酸化并激活, 位于最下游的被磷酸化的 MAPK 通过磷酸化下游效应分子将信号传递下去<sup>[33]</sup>。植物 MAPK 的部分成员参与逆境胁迫反应以及细胞分裂过程, 其中拟南芥 *AtMPK4* 基因可受多种生物或非生物胁迫因子诱导<sup>[34]</sup>, 推测本试验中 *TraesCS5D02G536400* 可能受到低磷胁迫的诱导, 触发 MAPK 信号转导过程从而参与到逆境胁迫反应中。位于 6A 染色体上的与单株茎叶磷积累量关联的候选基因 *TraesCS6A02G001000* 和 *TraesCS6A02G001100* 分别编码一个锌指结构 U 盒结构域 (RING\_Ubox) 和环变异结构域 (RINGv), 研究表明, 锌指蛋白类型转录因子在功能上广泛参与了活性氧逆境<sup>[35]</sup>、衰老<sup>[36]</sup>、光照<sup>[37]</sup> 和植株体内磷素内稳态<sup>[38]</sup> 等多种调控过程。位于 1B 染色体上单株根部磷积累量的候选基因 *TraesCS1B02G154200* 编码 卤代脱卤酶类水解酶 (HADs), 该类水解酶是一个庞大的基因家族, 成员中被证明具有磷酸酶、β-



磷酸葡萄糖苷酶和脱卤酶活性<sup>[39]</sup>。在大肠杆菌中 HADs 催化的磷供体可作为双组分信号转导系统接收自身磷酸化的底物,在低磷胁迫条件下小麦根部发育过程中,HADs 催化反应中磷酸酶活性和信号转导系统发生改变,进而影响根部磷的累积量。*TraesCS1B02G154200* 同时可编码阳离子 ATP 酶 (Type-P of cation\_ATPase super family) 结构域,其中 P-ATP 酶位于质膜上,是一类磷酸化后的阳离子泵,与植物离子运输、细胞信号转导、细胞膜形态建成和逆境抗性等相关<sup>[40]</sup>。位于 1D 染色体上与单株根部磷累积量关联的候选基因 *TraesCS1D02G231200*,具有 DUF 538 结构域的功能,该蛋白家族已被基因组注释,能在多种胁迫条件下诱导基因表达。Gholizadeha 等<sup>[41]</sup>预测 DUF 538 基因产物可能是植物中常见的胁迫相关调控蛋白。

对于候选基因 *TraesCS5D02G536400* 在拟南芥中的同家族成员的功能已有研究,但在小麦中还未进行探索。在大肠杆菌中的研究表明 *TraesCS1B02G154200* 可能是一个新的磷进化库,可为小麦磷高效研究提供参考,*TraesCS1D02G231200* 可能与多种胁迫环境相关,具有后续研究价值。

本试验采用 Q+K 混合线性模型,通过对 198 份黄淮麦区小麦品种耐低磷性相关性状进行全基因组关联分析,获得 67 个与耐低磷性相关性状显著关联的 SNP 位点。将试验所得位点信息导入中国春基因组数据库获取基因序列,使用 NCBI 中 CDD 工具进行基因功能注释,筛选出 7 个可能与小麦耐低磷性有关的候选基因。

#### 参考文献

- [1] 张福锁. 植物营养生态生理学和遗传学. 北京: 中国科学技术出版社, 1993: 53-62  
Zhang F S. Plant nutritional genetics. Beijing: China Agriculture Press, 1993: 53-62
- [2] 马保国, 杨太新, 郭凤台, 韩俊杰. 麦稻轮作体系中磷素平衡的研究. 农业环境科学学报, 2005, 24(2): 371-374  
Ma B G, Yang T X, Guo F T, Han J J. Balance of phosphorus in a rotation system with winter wheat and rice. Journal of Agro-Environment Science, 2005, 24(2): 371-374
- [3] 吴照辉, 贺立源, 张丽梅, 郭再华, 章爱群. 作物磷高效种质资源筛选研究进展. 山地农业生物学报, 2008, 27(1): 61-68  
Wu Z H, He L Y, Zhang L M, Guo Z H, Zhang A Q. Research progress in screening germplasm resources of crops with high phosphorus efficiency. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2008, 27(1): 61-68
- [4] 鲍金香. 利用 cDNA-AFLP 技术鉴定小麦磷胁迫诱导基因. 保定: 河北农业大学, 2009
- Bao J X. Identification of differential expressed genes induced by low-Pi stress based on cDNA-AFLP approach. Baoding: Hebei Agricultural University, 2009
- [5] 杨小红, 严建兵, 郑艳萍, 余建明, 李建生. 植物数量性状关联分析研究进展. 作物学报, 2007, 33(4): 523-530  
Yang X H, Yan J B, Zheng Y P, Yu J M, Li J S. Reviews of association analysis for quantitative traits in plants. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(4): 523-530
- [6] 曹卫东, 贾继增, 金继运. 小麦磷素利用效率的基因位点及其交互作用. 植物营养与肥料学报, 2001, 7(3): 285-292  
Cao W D, Jia J Z, Jin J Y. Identification and interaction analysis of QTL for phosphorus use efficiency in wheat. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2001, 7(3): 285-292
- [7] Su J Y, Zheng Q, Li H W, Li B, Jing R L, Tong Y P, Li Z S. Detection of QTLs for phosphorus use efficiency in relation to agronomic performance of wheat grown under phosphorus sufficient and limited conditions. Plant Science, 2009, 176: 824-836
- [8] Yang X L, Liu Y X, Wu F K, Jiang X J, Lin Y, Wang Z Q, Zhang Z L, Ma J, Chen G D, Wei Y M, Zheng Y L. Quantitative trait loci analysis of root traits under phosphorus deficiency at the seedling stage in wheat. Genome, 2018, 61: 209-215
- [9] Flint-Garcia S A, Thuillet A C, Yu J M, Pressoir G, Romero S M, Mitchell S E, Doebley J, Kresovich S, Goodman M M, Buckler E S. Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. The Plant Journal, 2005, 44(6): 1054-1064
- [10] 陈广凤, 陈建省, 田纪春. 小麦株高相关性状与 SNP 标记全基因组关联分析. 作物学报, 2015, 41(10): 1500-1509  
Chen G F, Chen J S, Tian J C. Genome-wide association analysis between SNP markers and plant height related traits in wheat. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(10): 1500-1509
- [11] 时佳, 翟胜男, 刘金栋, 魏景欣, 白璐, 高文伟, 闻伟铿, 何中虎, 夏先春, 耿洪伟. 普通小麦籽粒过氧化物酶活性全基因组关联分析. 中国农业科学, 2017, 50(21): 4212-4227  
Shi J, Zhai S N, Liu J D, Wei J X, Bai L, Gao Z W, Wen W E, He Z H, Xia X C, Geng H W. Genome-wide association study of grain peroxidase activity in common wheat. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(21): 4212-4227
- [12] 郑洪华. 基于 SNP 标记的小麦磷效率性状的关联分析. 泰安: 山东农业大学, 2015  
Zheng H H. Association analysis for wheat phosphor efficiency traits based on molecular marker of SNP. Taian: Shandong Agricultural University, 2015
- [13] Brenchley W E. The phosphate requirement of barley at different periods of growth. Annals of Botany, 1929, 1(43): 89-108
- [14] Gericke W F. Salt requirements of wheat at different growth phases. Botanical Gazette, 1925, 4(80): 410-425
- [15] 袁园园. 小麦苗期和成熟期磷效率及形态性状的 QTL 分析. 泰安: 山东农业大学, 2017  
Yuan Y Y. QTL mapping for phosphorus efficiency and morphological traits at seedling and maturity stages in wheat. Taian: Shandong Agricultural University, 2017
- [16] 杨秀君, 刘顺通, 王明凤, 乔帅, 许君, 郑文明. 不同基因型小麦在水培体系下的磷胁迫反应研究. 河南农业大学学报,



- 2009, 2 ( 43 ): 109-112
- Yang X J, Liu S T, Wang M F, Qiao S, Xu J, Zheng W M. Study on the phosphate stress responses of different genotype wheat in the hydroponic culture system. *Journal of Henan Agricultural University*, 2009, 2 ( 43 ): 109-112
- [ 17 ] 杨文博,程云,张艳,林德立,李雪,荆国珍,许君,郑文明. 不同基因型小麦耐低磷生理机制研究. *河南农业科学*, 2014, 43 ( 5 ): 24-29
- Yang W B, Cheng Y, Zhang Y, Lin D L, Li X, Xing G Z, Xu J, Zheng W M. Physiological features of different wheat genotypes exposed to low phosphate under hydroponic culture. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2014, 43 ( 5 ): 24-29
- [ 18 ] 鲍士旦. 土壤农化分析. 北京: 中国农业出版社, 2000: 71-79
- Bao S D. Soil agrochemical analysis. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 71-79
- [ 19 ] Wang S X, Zhu Y L, Zhang D X, Shao H, Liu P, Hu J B, Zhang H, Zhang H P, Chang C, Lu J, Xia X C, Sun G L, Ma C X. Genome-wide association study for grain yield and related traits in elite wheat varieties and advanced lines using SNP markers. *Plos One*, 2017, 12 ( 11 ): e0188662
- [ 20 ] Zhu C S, Gore M, Buckler E S, Yu J M. Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome*, 2008, 1 ( 1 ): 5-20
- [ 21 ] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 2005, 14: 2611-2620
- [ 22 ] Yu J M, Buckler E S. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17: 155-160
- [ 23 ] Yu J M, Pressoir G, Briggs W H, Bi I V, Yamasaki M, Doebley J F, McMullen M D, Gaut B S, Nielsen D M, Holland J B, Kresovich S, Buckler E S. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 2006, 38 ( 2 ): 203-208
- [ 24 ] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, 155 ( 2 ): 945-959
- [ 25 ] Khramtsova E A, Stranger B E. Assocplots: a Python package for static and interactive visualization of multiple-group GWAS results. *Bioinformatics*, 2017, 33 ( 3 ): 432-434
- [ 26 ] 王峻,宋科,薛永,潘剑君. 小麦氮、磷胁迫响应基因研究进展. *河北农业科学*, 2018, 47 ( 6 ): 1-6
- Wang J, Song K, Xue Y, Pan J J. Research progress on response genes of wheat to nitrogen, phosphorus stresses. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2018, 47 ( 6 ): 1-6
- [ 27 ] Fox R H. Selection for phosphorus efficiency in corn. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1978, 9 ( 1 ): 13-37
- [ 28 ] 邢宏燕,王二明,李滨,李继云,李振声. 有效利用土壤磷的小麦种质筛选方法研究. *作物学报*, 2000, 26 ( 6 ): 839-844
- Xing H Y, Wang E M, Li B, Li J Y, Li Z S. Studies on wheat germplasm screening method for efficient utilization of soil phosphorus. *Acta Agronomica Sinica*, 2000, 26 ( 6 ): 839-844
- [ 29 ] Su J Y, Xiao Y M, Li M, Liu Q Y, Li B, Tong Y P, Jia J Z, Li Z S. Mapping QTLs for phosphorus-deficiency tolerance at wheat seedling stage. *Plant Soil*, 2006, 281: 25-36
- [ 30 ] 李玉京,李滨,李继云,李振声. 植物有效利用土壤磷特性的遗传学研究进展. *遗传*, 1998, 20 ( 3 ): 38-41
- Li Y J, Li B, Li J Y, Li Z S. Advances in genetin study on character of plant efficiently utilizing soil phosphorus. *Hereditas ( Beijing )*, 1998, 20 ( 3 ): 38-41
- [ 31 ] Schein A, Sheffy-Levin S, Glaser F, Schuster G. The RNase E/G-type endoribonuclease of higher plants is located in the chloroplast and cleaves RNA similarly to the *E. coli* enzyme. *RNA*, 2008, 14 ( 6 ): 1057-1068
- [ 32 ] Vogt T, Jones P. Glycosyltransferases in plant natural product synthesis: characterization of a supergene family. *Trends in Plant Science*, 2000, 5 ( 9 ): 380-386
- [ 33 ] Menke F L H, van Pelt J A, Pieterse C M J, Klessig D F. Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2004, 16 ( 4 ): 897-907
- [ 34 ] 任琰,湛江华,黄俊浩,郑重,宋凤鸣. 水稻 MAPK 基因 *OsMPK4* 的克隆鉴定、蛋白表达和转基因载体构建. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2006, 32 ( 6 ): 613-620
- Ren Y, Chen J H, Huang J H, Zheng Z, Song F M. Molecular characterization of a rice mitogen-activated protein kinase gene *OsMPK4* and purification of recombinant protein and construction of binary vector. *Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Science*, 2006, 32 ( 6 ): 613-620
- [ 35 ] Davletova S, Schlauch K, Couto J, Mittler R. The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2005, 139 ( 2 ): 847-856
- [ 36 ] Kong Z S, Li M N, Yang W Q, Xu W Y, Xue Y B. A novel nuclear-localized CCCH-Type zinc finger protein, OsDOS, is involved in delaying leaf senescence in rice. *Plant Physiology*, 2006, 141 ( 4 ): 1376-1388
- [ 37 ] Tan Q K G, Irish V F. The Arabidopsis zinc finger-homeodomain genes encode proteins with unique biochemical properties that are coordinately expressed during floral development. *Plant Physiology*, 2006, 140: 1095-1108
- [ 38 ] Devaiah B N, Nagarajan V K, Raghothama K G. Phosphate homeostasis and root development in Arabidopsis are synchronized by the zinc finger transcription factor ZAT6. *Plant Physiology*, 2007, 145: 147-159
- [ 39 ] Kuznetsova E, Proudfoot M, Gonzalez C F, Brown G, Omelchenko M V, Borozan I, Carmel L, Wolf Y I, Mori H, Savchenko A V, Arrowsmith C H, Koonin E V, Edwards A M, Yakunin A F. Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *The Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281 ( 47 ): 36149-36161
- [ 40 ] 彭陈,何冰,郭士伟. 植物中的 P-ATP 酶. *植物生理学通讯*, 2010, 46 ( 7 ): 637-642
- Peng C, He B, Guo S W. P-ATPases in plants. *Plant Physiology Journal*, 2010, 46 ( 7 ): 637-642
- [ 41 ] Gholizadeh A, Baghban Kohnhrouz B. Identification of *DUF538* cDNA clone from *Celosia cristata* expressed sequences of nonstressed and stressed leaves. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2010, 57 ( 2 ): 247-252