

大豆耐低磷性全基因组关联分析

梁腾月¹, 谷勇哲², 马英杰³, 王辉¹, 杨光¹, 敖雪¹, 邱丽娟²

(¹沈阳农业大学农学院, 沈阳 110866; ²中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081;

³沈阳市辽中区农业技术推广与行政执法中心, 沈阳 110200)

摘要:大豆是喜磷作物, 缺磷会影响大豆正常生长发育, 使大豆产量下降。大豆的单株粒重为数量性状, 是鉴定大豆耐低磷性的重要指标, 目前多数研究还处于QTL定位阶段, 因而发掘出更多调控基因和优异等位变异, 对促进大豆耐低磷性调控机制的解析及育种利用尤为重要。本研究利用395份大豆种质资源, 以低磷处理下单株粒重和相对单株粒重作为耐低磷性状鉴定指标, 结合高密度SNP标记进行全基因组关联分析并初步预测候选基因。结果表明不同大豆种质的耐低磷性差异明显, 常磷处理下单株粒重分布范围为0.49~14.43 g、低磷处理下单株粒重分布范围为0.05~5.35 g、相对单株粒重分布范围为0.04~0.98, 三者变异系数均高于50%。通过聚类分析筛选出压破车(ZDD00219)、采种圃(ZDD00163)等4份地方种质和金元1(ZDD00383)、吉育48(ZDD23714)等16份选育种质为磷高效大豆种质。全基因组关联分析共鉴定出32个与大豆耐低磷性显著相关的SNP位点, 其中低磷处理下单株粒重相关的SNP位点23个, 相对单株粒重相关的SNP位点9个。经LD block分析得到候选基因2个, 分别是在根中特异性表达WRKY DNA结合域相关的基因和在根毛中特异性表达磷酸吡哆醛磷酸酶相关的基因。

关键词:大豆; 耐低磷性; 全基因组关联分析

Genome Wide Association Study of Low Phosphorus Tolerance in Soybean (*Glycine max* L.)

LIANG Teng-yue¹, GU Yong-zhe², MA Ying-jie³, WANG Hui¹, YANG Guang¹, AO Xue¹, QIU Li-juan²

(¹College of Agronomy, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866;

²Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

³Shenyang Liaozhong District Agricultural Technology Extension and Administrative Enforcement Center, Shenyang 110200)

Abstract: Soybean is a phosphorus-loving crop, whereas phosphorus deficiency can affect soybean growth and development finally resulting in yield loss. The grain weight per plant of soybean is a quantitative character, which is an important indicator for identifying soybean tolerance to low phosphorus. At present, most studies are still in the stage of QTL mapping, so it is particularly important to discover more regulatory genes and excellent allelic variations in order to promote the analysis of the regulatory mechanism of soybean tolerance to low phosphorus and its breeding utilization. In this study, 395 soybean germplasm resources were used to conduct genome-wide associated study (GWAS) and preliminarily predict candidate genes by using grain weight per plant under low phosphorus and relative conditions as identification indicators for low phosphorus tolerance traits, combined with high-density SNP markers. The results showed that the tolerance to low phosphorus was significantly different among different soybean germplasms. The grain weight distribution per plant of normal phosphorus was 0.49 ~ 14.43 g, the grain weight distribution per plant of low phosphorus was 0.05 ~ 5.35 g, and the relative grain weight distribution per plant was 0.04 ~ 0.98. The coefficients of variation of the three were all

收稿日期: 2022-07-21 修回日期: 2022-09-05 网络出版日期: 2022-10-27

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20220721003>

第一作者研究方向为大豆遗传改良与生理生态, E-mail: 1561347437@qq.com

通信作者: 敖雪, 研究方向为大豆遗传改良与生理生态, E-mail: a2009syau@syau.edu.cn

邱丽娟, 研究方向为大豆基因资源发掘与创新利用, E-mail: qiulijuan@caas.cn

基金项目: 中国和乌拉圭联合实验室合作项目(2018YFE0116900-09); 国家自然科学基金项目(31872854)

Foundation projects: Project of Sino-Uruguayan Joint Laboratory(2018YFE0116900-09); National Natural Science Foundation of China(31872854)

higher than 50%. Through cluster analysis, 4 landraces such as Yapoche(ZDD00219) and Caizhongpu(ZDD00163) and 16 cultivars such as Jinyuan 1 (ZDD00383) and Jiyu 48(ZDD23714) were screened as phosphorus efficient soybean germplasms. GWAS identified 32 SNP loci significantly associated with low phosphorus tolerance of soybean, including 23 SNP loci associated with single plant grain weight under low phosphorus and nine SNP loci associated with relative single plant grain weight. Two candidate genes were proposed by LD block analysis, including a WRKY DNA binding domain gene that was detected with specific expression in roots, and a pyridoxal phosphate phosphatase gene that was detected with specific expression in root hairs.

Key words: soybean; low phosphorus tolerance; GWAS

大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 是重要的粮油作物, 在世界经济发展中起着重要的作用^[1]。磷在植物生长发育和产量形成中是不可缺少的元素之一, 以多种方式参与植物体内各种生物化学反应, 对促进植物生长发育和保持植物正常新陈代谢起着重要的作用^[2]。磷还能增强植物抵抗不良自然条件的能力, 在一定程度上提高作物的耐旱、耐寒性和抗病能力^[3]。全世界 50% 的耕地缺磷, 我国耕地中约有 2/3 缺磷^[4] 且被大豆有效利用的磷含量较低, 尤其在一些酸性、钙质土中可被有效利用的磷更是少之又少^[5]。大豆是一种喜磷作物, 缺磷会导致大豆细胞分裂、光合作用和呼吸作用等代谢频率降低, 使大豆开花数和叶片减少, 最终影响大豆生长, 造成大豆产量降低^[6-7]。有研究表明, 不同基因型大豆对低磷胁迫的适应机制有显著的遗传差异^[8], 而在缺磷条件下的籽粒产量是衡量植株磷效率的重要性状^[2]。王辉^[9] 分析 90 个大豆品种单株粒重和相对单株粒重, 筛选出在低磷条件下减产较少的品种即磷高效大豆品种。目前对于解析低磷对大豆影响的遗传基础研究报道相对较少, 因此, 发掘调控大豆耐低磷的基因及优异等位基因, 对于进一步揭示大豆耐低磷的遗传与分子机制奠定坚实基础, 同时对实现绿色高效生产具有重要指导意义。

全基因组关联分析 (GWAS, genome-wide associated study) 是正向遗传学中鉴定基因最常用和最有效的方法之一^[10]。Zhang 等^[11] 利用 GWAS 分析定位一个主效耐低磷 QTL (qPE8), 分离并克隆了

控制该位点的候选基因 (*GmACPI*), 通过表达分析、遗传转化等实验证明该基因在低磷下表达显著增高。宁丽华^[12] 以 191 份栽培大豆为材料, 利用 GWAS 分析获得了 119 个与产量性状相关联的 SNPs, 并同源克隆了大豆中可能与磷效率相关的基因 *GmG3PT1* 基因, 并对该基因功能进行转基因验证, 结果表明在低磷胁迫条件下 *GmG3PT1* 基因参与植株体内有机磷向无机磷的转变, 对于维持植物体内磷酸盐的平衡中发挥重要作用。通过整合高密度连锁图谱和 GWAS 分析, Zhang 等^[13] 克隆一个控制乙烯生物合成的重要调节因子 *GmETO1*, 过表达 *GmETO1* 可抑制根系乙烯的合成, 促进根毛的增多和增长, 增加磷吸收和提高磷利用效率从而提高大豆对低磷胁迫的耐受性。

迄今, 有关大豆耐低磷的基因发掘研究报道较少, 尚不能满足育种需求, 本研究利用 395 份大豆种质资源, 筛选磷高效大豆种质。利用 GWAS 分析, 挖掘种质资源中控制大豆耐低磷性相关基因位点, 为大豆耐低磷性相关基因的克隆及遗传研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的 395 份大豆种质资源包含地方大豆种质 139 份和选育大豆种质 256 份 (表 1), 其中, 国内 21 个省份大豆种质 393 份、国外大豆种质 2 份 (18NQ1681、18NQ1745)。

表 1 供试种质清单

Table 1 List of soybean germplasm

序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight	序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight
1	ZDD23713	吉育 47	选育	0.59	0.25	199	18NQ1714	绥农 30	选育	1.67	0.35
2	ZDD00023	东农 4	选育	1.18	0.14	200	18NQ1715	合农 60	选育	1.81	0.37

表 1 (续)

序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight	序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight
3	ZDD00025	丰收1	选育	1.19	0.21	201	18NQ1716	抗线9	选育	0.05	0.05
4	ZDD00042	黑河3	选育	1.56	0.37	202	18NQ1717	吉原引3号	选育	0.65	0.15
5	ZDD00043	黑河51	选育	1.37	0.36	203	18NQ1718	绥农4号	选育	1.31	0.76
6	ZDD00059	牡丰1	选育	1.01	0.28	204	18NQ1719	绥08-5331	选育	1.24	0.42
7	ZDD00078	满仓金	地方	1.44	0.22	205	18NQ1720	绥08-5356	选育	0.91	0.22
8	ZDD00079	元宝金	地方	1.50	0.27	206	18NQ1721	合丰48	选育	0.21	0.10
9	ZDD00081	荆山扑	选育	1.45	0.62	207	18NQ1722	北疆193	选育	0.94	0.21
10	ZDD00127	毛豆	地方	1.12	0.38	208	18NQ1723	引北安	选育	1.11	0.32
11	ZDD00163	采种圃	地方	3.08	0.79	209	18NQ1724	北疆08-280	选育	1.41	0.43
12	ZDD00219	压破车	地方	2.86	0.84	210	18NQ1725	合05648	选育	0.96	0.30
13	ZDD00250	白毛霜	地方	1.10	0.52	211	18NQ1726	北疆05-38	选育	0.99	0.30
14	ZDD00252	六十天还家	地方	1.74	0.52	212	18NQ1728	华疆4403	选育	1.21	0.28
15	ZDD00261	海伦嘟噜豆	地方	0.99	0.26	213	18NQ1729	疆丰23-3412	选育	1.51	0.52
16	ZDD00267	小白豆	地方	1.51	0.35	214	18NQ1730	甘248	选育	0.60	0.21
17	ZDD00269	桦南小金豆	地方	0.65	0.15	215	18NQ1731	1358	选育	3.48	0.73
18	ZDD00303	绿瓢黑豆	地方	1.91	0.66	216	18NQ1732	2488	选育	0.91	0.50
19	ZDD00326	方正秣食豆	地方	0.98	0.38	217	18NQ1733	呼交282	选育	1.56	0.27
20	ZDD00338	吉林3	选育	1.22	0.22	218	18NQ1736	绥农31	选育	0.94	0.21
21	ZDD00375	小金黄1	选育	1.35	0.50	219	18NQ1742	丰收10号	选育	1.01	0.25
22	ZDD00377	丰地黄	地方	4.44	0.43	220	18NQ1743	北豆43	选育	1.29	0.54
23	ZDD00383	金元1	选育	3.25	0.81	221	18NQ1745	北见长叶	选育	0.93	0.16
24	ZDD00393	哈1	选育	0.54	0.14	222	18NQ1791	合丰38	选育	2.47	0.24
25	ZDD00485	嘟噜梅	地方	1.02	0.21	223	18NQ1792	合丰39	选育	1.25	0.19
26	ZDD00532	小白脐	地方	1.25	0.28	224	18NQ1793	合丰41	选育	1.36	0.25
27	ZDD00548	琿春豆	地方	0.66	0.29	225	18NQ1794	合丰42	选育	1.59	0.54
28	ZDD00554	蛟河紫花1	地方	0.36	0.12	226	18NQ1795	合丰43	选育	0.93	0.15
29	ZDD00569	蓝脐	地方	1.10	0.12	227	18NQ1796	合丰44	选育	0.88	0.15
30	ZDD00604	舒兰满仓金	地方	1.68	0.18	228	18NQ1797	合丰46	选育	0.99	0.37
31	ZDD00651	大红脐	地方	1.07	0.26	229	18NQ1798	合丰47	选育	1.35	0.25
32	ZDD00674	青杂豆	地方	1.18	0.13	230	18NQ1799	合丰48	选育	1.56	0.56
33	ZDD00686	黑豆	地方	1.47	0.66	231	18NQ1800	合丰49	选育	0.55	0.15
34	ZDD00691	黑大豆	地方	1.86	0.41	232	18NQ1801	合丰50	选育	1.74	0.41
35	ZDD00717	黑秣豆	地方	1.57	0.29	233	18NQ1802	合丰51	选育	1.11	0.28
36	ZDD06824	合丰26	选育	0.69	0.47	234	18NQ1803	合丰52	选育	1.03	0.19
37	ZDD06836	绥农6	选育	0.97	0.51	235	18NQ1804	合丰53	选育	1.38	0.26
38	ZDD06936	四粒黄	地方	1.50	0.39	236	18NQ1806	合丰55	选育	1.09	0.18
39	ZDD07010	涝洲白脐大豆	地方	1.07	0.20	237	18NQ1807	合丰56	选育	2.73	0.59
40	ZDD07024	永丰豆	地方	1.26	0.40	238	18NQ1808	合丰57	选育	1.20	0.22
41	ZDD07186	宾县黑豆	地方	0.86	0.64	239	18NQ1809	合农58	选育	0.59	0.25
42	ZDD07191	佳黑秣食豆	地方	1.39	0.37	240	18NQ1810	合农60	选育	1.23	0.23
43	ZDD07197	褐大豆	地方	1.07	0.22	241	18NQ1811	合农61	选育	1.57	0.29
44	ZDD07244	争光1	选育	1.44	0.43	242	18NQ1812	合农62	选育	1.24	0.73
45	ZDD07273	扶余嘟噜豆	地方	0.58	0.14	243	18NQ1814	合农64	选育	1.10	0.97
46	ZDD07307	九台薄地高	地方	1.47	0.40	244	18NQ1815	合农65	选育	1.31	0.40
47	ZDD07353	汪清神仙洞	地方	1.64	0.42	245	18NQ1816	合农66	选育	1.27	0.50
48	ZDD07391	盘石豆	地方	0.47	0.15	246	18NQ1817	合农67	选育	0.88	0.28
49	ZDD07502	乾安小黄豆	地方	0.90	0.16	247	18NQ1818	合农68	选育	0.95	0.18

表 1 (续)

序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight	序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight
50	ZDD07522	辉南青皮豆	地方	0.57	0.12	248	18NQ1819	合农 69	选育	1.12	0.21
51	ZDD07540	农安酱色豆	地方	0.70	0.10	249	18NQ1820	合农 70	选育	1.41	0.39
52	ZDD17668	黑河 5	选育	0.51	0.34	250	18NQ1821	合农 71	选育	0.99	0.15
53	ZDD17669	黑河 6	选育	0.73	0.17	251	18NQ1822	合农 75	选育	1.92	0.51
54	ZDD17686	合丰 29	选育	0.88	0.28	252	18NQ1823	合农 76	选育	0.82	0.26
55	ZDD17713	东农 47-1C	选育	0.79	0.47	253	18NQ1824	合农 92	选育	1.19	0.30
56	ZDD17728	黑河 101	选育	1.05	0.37	254	18NQ1825	合农 95	选育	1.22	0.30
57	ZDD17882	吉林小粒 1	选育	0.40	0.17	255	18NQ1826	合农 97	选育	1.27	0.34
58	ZDD22643	东农 42	选育	0.67	0.17	256	18NQ1827	绥农 4 号	选育	0.82	0.24
59	ZDD22657	合丰 35	选育	0.91	0.32	257	18NQ1828	绥恢 1 号	选育	0.45	0.08
60	ZDD22660	黑河 10	选育	1.78	0.65	258	18NQ1829	绥农 10 号	选育	0.94	0.20
61	ZDD22662	黑河 12	选育	1.08	0.27	259	18NQ1830	绥农 11	选育	4.02	0.80
62	ZDD22665	黑河 15	选育	1.49	0.48	260	18NQ1832	绥农 22	选育	1.64	0.72
63	ZDD23602	合丰 40	选育	1.05	0.22	261	18NQ1833	绥农 23	选育	1.68	0.33
64	ZDD23604	合丰 42	选育	1.20	0.33	262	18NQ1834	绥农 26	选育	0.56	0.09
65	ZDD23615	合丰 47	选育	0.78	0.56	263	18NQ1835	绥农 28	选育	0.69	0.13
66	ZDD23632	黑河 30	选育	1.51	0.46	264	18NQ1836	绥农 35	选育	1.53	0.18
67	ZDD23633	黑河 31	选育	0.96	0.42	265	18NQ1837	绥农 36	选育	1.05	0.08
68	ZDD23650	北疆 1	选育	0.90	0.22	266	18NQ1838	绥农 43	选育	0.88	0.20
69	ZDD23684	绥农 20	选育	1.98	0.83	267	18NQ1839	绥农 48	选育	0.82	0.53
70	ZDD23714	吉育 48	选育	3.79	0.46	268	18NQ1840	绥农 49	选育	0.89	0.38
71	ZDD23732	吉育 67	选育	1.39	0.33	269	18NQ1841	绥农 52	选育	0.75	0.22
72	ZDD24318	黑河 35	选育	1.19	0.38	270	18NQ1842	绥农 53	选育	0.48	0.09
73	ZDD24319	黑河 37	选育	0.51	0.22	271	18NQ1844	绥农 58	选育	1.68	0.35
74	ZDD24320	黑河 38	选育	0.96	0.43	272	18NQ1845	绥农 68	选育	1.33	0.35
75	ZDD24321	黑河 39	选育	1.73	0.53	273	18NQ1848	绥农 75	选育	1.28	0.21
76	ZDD24323	黑河 41	选育	1.24	0.96	274	18NQ1849	绥农 76	选育	0.83	0.17
77	ZDD24324	黑河 42	选育	1.47	0.33	275	18NQ1850	绥农 79	选育	0.91	0.29
78	ZDD24329	黑河 50	选育	0.90	0.22	276	18NQ1851	绥农 8	选育	0.73	0.13
79	ZDD24362	北豆 5	选育	0.89	0.14	277	18NQ1853	绥农 83	选育	0.42	0.13
80	ZDD24374	合丰 50	选育	1.27	0.20	278	18NQ1854	绥农 88	选育	0.53	0.31
81	ZDD24376	合丰 52	选育	2.83	0.72	279	18NQ1855	绥无腥豆 3 号	选育	1.07	0.41
82	ZDD24378	合丰 55	选育	1.27	0.24	280	18NQ1856	绥中作 40	选育	0.55	0.15
83	ZDD24399	绥农 26	选育	0.51	0.08	281	ZDD10270	小黑豆	地方	0.88	0.23
84	ZDD24401	绥农 28	选育	2.40	0.43	282	ZDD11092	油黄豆	地方	1.23	0.21
85	ZDD24424	东农 50	选育	0.56	0.10	283	ZDD02114	天鹅蛋	地方	1.24	0.35
86	ZDD24500	吉农 22	选育	1.25	0.19	284	ZDD19579	绿黄豆	地方	1.16	0.31
87	18NQ0433	东农 42A	选育	1.05	0.16	285	ZDD01629	白脐大豌豆	地方	0.76	0.16
88	18NQ0434	东农 42C	选育	0.74	0.08	286	ZDD02159	大黑豆	地方	0.53	0.46
89	18NQ0435	东农 42E	选育	1.24	0.25	287	ZDD02400	夏黑豆	地方	0.41	0.26
90	ZDD24328	黑河 49	选育	0.94	0.56	288	ZDD08190	样田小黄豆	地方	0.93	0.13
91	ZDD24316	黑河 33	选育	0.48	0.21	289	ZDD08238	赤城绿黄豆	地方	3.91	0.66
92	ZDD24325	黑河 43	选育	0.85	0.18	290	ZDD08251	大屯小黑豆	地方	0.82	0.36
93	ZDD23620	黑河 18	选育	0.97	0.85	291	ZDD08650	黄豆<2>	地方	2.07	0.37
94	ZDD31000	辽豆 24	选育	5.35	0.73	292	ZDD08928	六十日白豆	地方	0.76	0.31
95	18NQ0447	辽豆 32	选育	2.59	0.24	293	ZDD18524	下台子磨石豆	地方	0.87	0.19
96	18NQ0448	辽豆 37	选育	1.72	0.18	294	ZDD19027	绿皮黄豆	地方	1.28	0.20

表 1 (续)

序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight	序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight
97	18NQ0450	辽10Q015	选育	1.61	0.23	295	ZDD01983	白皮黄豆	地方	1.39	0.27
98	18NQ0451	辽0913	选育	1.08	0.38	296	ZDD08120	倪丁花眉豆	地方	1.47	0.20
99	18NQ0452	辽08012	选育	3.61	0.48	297	ZDD02096	天鹅蛋	地方	0.71	0.14
100	18NQ0453	辽08024	选育	1.84	0.21	298	ZDD08603	小黄豆	地方	1.04	0.81
101	18NQ0458	吉育105	选育	0.86	0.40	299	ZDD10186	早熟黄豆	地方	0.54	0.15
102	18NQ0459	吉育108	选育	0.36	0.09	300	ZDD10252	小黑豆	地方	1.39	0.98
103	18NQ0460	吉育109	选育	0.82	0.28	301	ZDD01612	兔儿眼	地方	1.32	0.23
104	ZDD24477	吉育101	选育	0.79	0.16	302	ZDD08228	南关小皮青	地方	0.52	0.11
105	18NQ0463	吉育86	选育	0.53	0.22	303	ZDD10359	老黑豆	地方	1.18	0.27
106	18NQ0464	吉育404	选育	2.47	0.57	304	ZDD00603	长春满仓金	地方	1.22	0.24
107	18NQ0465	吉育406	选育	2.44	0.50	305	ZDD01402	大粒黑豆	地方	0.90	0.28
108	18NQ0466	吉育302	选育	1.44	0.44	306	ZDD07623	吉林茶里花	地方	0.34	0.57
109	18NQ0467	吉育204	选育	1.49	0.23	307	ZDD00709	黑秣食豆	地方	0.86	0.27
110	18NQ0481	哈13-2089	选育	1.42	0.50	308	ZDD00854	锦州4-1	选育	1.20	0.28
111	18NQ0482	哈13-2413	选育	1.17	0.22	309	ZDD00076	绥农1号	选育	1.35	0.37
112	18NQ0483	哈13-2958	选育	1.69	0.37	310	ZDD01169	牛毛黄	地方	0.95	0.19
113	18NQ0484	哈14-2028	选育	1.44	0.38	311	ZDD01421	六十天还仓	地方	1.41	0.29
114	18NQ0485	哈12-3510	选育	1.49	0.27	312	ZDD06819	嫩丰11号	选育	1.20	0.34
115	18NQ0486	哈13-2185	选育	1.36	0.19	313	ZDD07409	和龙油太	地方	0.71	0.22
116	18NQ0487	哈13-2187	选育	2.51	0.53	314	ZDD07580	白城秣食豆	地方	0.79	0.56
117	18NQ0488	哈14-2146	选育	1.53	0.67	315	ZDD00294	青豆	地方	0.86	0.17
118	18NQ0489	哈12-4547	选育	1.94	0.24	316	ZDD07218	紫花2号	地方	0.90	0.19
119	18NQ0490	哈13-1613	选育	1.12	0.27	317	ZDD00921	天鹅蛋	地方	0.89	0.41
120	18NQ0491	哈11-4519	选育	1.41	0.49	318	ZDD03533	柘城小红豆	地方	0.63	0.26
121	18NQ0492	哈11-3646	选育	1.42	0.34	319	ZDD08472	黑豆	地方	1.38	0.45
122	18NQ0493	哈11-4142	选育	1.23	0.25	320	ZDD19381	高作选1号	选育	1.31	0.40
123	18NQ0494	哈11-2541	选育	1.10	0.30	321	ZDD03026	平顶黑	地方	0.81	0.69
124	18NQ0495	哈12-4891	选育	0.96	0.66	322	ZDD18632	冀豆7号	选育	1.47	0.44
125	ZDD23737	吉育72	选育	1.25	0.23	323	ZDD02864	平顶黄豆	地方	1.60	0.98
126	18NQ0514	合交02-69	选育	1.75	0.43	324	ZDD02921	青6号	选育	1.60	0.45
127	ZDD23625	黑河23	选育	1.33	0.21	325	ZDD03106	茶豆	地方	0.93	0.46
128	ZDD23629	黑河27	选育	0.90	0.22	326	ZDD03237	浙川鸡窝黄	地方	0.89	0.22
129	ZDD00610	牛毛黄	地方	1.87	0.35	327	ZDD03293	泌阳牛毛黄	地方	1.10	0.16
130	ZDD00021	黑农26	选育	0.91	0.27	328	ZDD03603	牛毛黄	地方	0.90	0.32
131	ZDD07395	东辽克霜	地方	0.89	0.35	329	ZDD08352	本地大黄豆	地方	0.81	0.20
132	ZDD00003	黑农2	选育	1.21	0.08	330	ZDD10615	老鼠皮	地方	0.90	0.18
133	ZDD06815	黑河4	选育	0.88	0.28	331	ZDD10812	酱黄豆	地方	0.85	0.18
134	ZDD06823	合丰25	选育	1.33	0.33	332	ZDD11159	花绿黄豆	地方	0.67	0.26
135	ZDD23626	黑河24	选育	1.32	0.75	333	ZDD11226	灌云海白花	地方	0.56	0.29
136	ZDD24315	黑河32	选育	1.49	0.98	334	ZDD18558	花黑虎	地方	0.81	0.16
137	ZDD17670	黑河7	选育	0.64	0.25	335	ZDD19699	泗豆2号	选育	0.78	0.96
138	ZDD22648	绥农14	选育	1.07	0.39	336	ZDD19409	郑84240-B1	选育	0.72	0.17
139	18NQ1513	吉育86	选育	2.00	0.64	337	ZDD02892	大天鹅蛋	地方	1.12	0.33
140	18NQ1516	黑河53	选育	0.67	0.26	338	ZDD03570	信阳羊眼豆	地方	0.78	0.74
141	18NQ1518	黑河48	选育	0.69	0.18	339	ZDD10100	郑8516	选育	0.87	0.43
142	18NQ1520	东农56	选育	1.45	0.20	340	ZDD02866	大白皮	地方	0.47	0.96
143	18NQ1522	东农59	选育	0.77	0.16	341	ZDD02626	胜利3号	选育	0.30	0.12
144	18NQ1524	东农绿芽1号	选育	0.51	0.14	342	ZDD02891	大黄豆	地方	1.12	0.15
145	18NQ1528	绥无腥豆2号	选育	0.78	0.09	343	ZDD02913	小米豆	地方	0.78	0.27

表1(续)

序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight	序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight
146	18NQ1529	绥农52	选育	1.18	0.27	344	ZDD02990	二粒黑豆	地方	1.87	0.53
147	18NQ1531	吉育112	选育	0.83	0.36	345	ZDD03969	邳县拉秧黄	地方	0.52	0.04
148	18NQ1536	吉育71	选育	0.91	0.17	346	ZDD03776	淮阴春豆	地方	0.22	0.23
149	18NQ1537	吉育401	选育	1.32	0.23	347	ZDD03739	邳县大紫花糙	地方	0.46	0.23
150	18NQ1538	辽黑豆2号	选育	0.88	0.24	348	ZDD03741	邳县四粒糙	地方	0.55	0.19
151	18NQ1539	辽黑豆4号	选育	0.47	0.23	349	ZDD12407	曾家绿黄豆	地方	0.35	0.34
152	18NQ1540	辽青豆1号	选育	1.14	0.13	350	ZDD05920	代米豆	地方	0.74	0.47
153	ZDD07345	汪清早大豆	地方	0.95	0.22	351	ZDD11581	中豆24	选育	0.70	0.20
154	18NQ1656	蒙豆36	选育	1.16	0.30	352	ZDD12908	邳崮西江黑豆	地方	1.35	0.87
155	18NQ1657	中作引1号	选育	1.72	0.74	353	ZDD13636	绿豆子	地方	0.70	0.83
156	18NQ1659	东农44	选育	1.11	0.53	354	ZDD17622	马兰早茶豆	地方	0.69	0.38
157	18NQ1660	FC001	选育	1.29	0.38	355	ZDD06067	粗豆	地方	0.22	0.27
158	18NQ1662	汇农10-06	选育	0.85	0.19	356	ZDD13666	绿蓝子	地方	0.84	0.39
159	18NQ1663	垦丰18	选育	0.75	0.17	357	ZDD04572	吴江五月牛毛黄	地方	0.34	0.28
160	18NQ1664	黑农44	选育	1.79	0.21	358	ZDD05572	荆黄35乙	选育	0.19	0.08
161	18NQ1665	合农69	选育	1.38	0.21	359	ZDD11586	82-16	选育	0.39	0.10
162	18NQ1666	蒙豆9号	选育	0.50	0.17	360	ZDD12322	化眉豆	地方	0.46	0.12
163	18NQ1667	蒙豆34	选育	1.38	0.52	361	ZDD04620	泰兴牛毛黄乙	地方	0.96	0.33
164	18NQ1668	黑河45	选育	0.45	0.14	362	ZDD11588	74-424	选育	0.71	0.15
165	18NQ1669	北疆九1号	选育	0.94	0.77	363	ZDD12836	什邡螺丝豆	地方	1.06	0.32
166	18NQ1670	吉育701	选育	1.28	0.14	364	ZDD14228	五月黄	地方	1.02	0.38
167	18NQ1671	龙垦316	选育	0.72	0.18	365	ZDD20652	2340322	选育	1.04	0.82
168	18NQ1672	龙垦330	选育	1.10	0.30	366	ZDD20387	84-70	地方	0.52	0.58
169	18NQ1673	北丰16	选育	0.59	0.14	367	ZDD12331	小白毛	地方	0.48	0.22
170	18NQ1674	龙垦332	选育	1.31	0.35	368	ZDD12453	渠县八月黄	地方	0.24	0.11
171	18NQ1675	北豆36	选育	0.75	0.24	369	ZDD11575	花色豆	地方	0.81	0.35
172	18NQ1678	东农48	选育	3.57	0.54	370	ZDD12680	犍为泉水豆	地方	0.81	0.75
173	18NQ1679	中黄901	选育	1.11	0.31	371	ZDD06494	沙心豆	地方	0.21	0.25
174	18NQ1681	加拿大蛋白豆	选育	0.74	0.32	372	ZDD21440	早熟毛蓬青	地方	0.79	0.19
175	18NQ1682	合丰30	选育	1.04	0.18	373	ZDD21907	新余大粒青	地方	0.50	0.28
176	18NQ1683	蒙豆33	选育	1.53	0.30	374	ZDD14409	大黄珠	地方	0.40	0.22
177	18NQ1685	华疆6155	选育	2.42	0.56	375	ZDD22191	恩平青豆	地方	0.55	0.24
178	18NQ1686	顺豆5	选育	2.13	0.68	376	ZDD06358	东山白马豆	地方	1.32	0.24
179	18NQ1687	蒙豆15	选育	1.01	0.21	377	ZDD06375	大青仁	选育	1.12	0.46
180	18NQ1688	垦11-7155	选育	1.94	0.30	378	ZDD14125	莆豆451	选育	1.05	0.96
181	18NQ1689	垦K11-7456	选育	0.81	0.16	379	ZDD06562	白毛豆	地方	0.90	0.58
182	18NQ1690	圣168	选育	0.98	0.46	380	ZDD16682	龙川黄牛毛	地方	0.78	0.66
183	18NQ1691	丰收12	选育	1.34	0.10	381	ZDD16743	廉江坡黄豆	地方	0.64	0.10
184	18NQ1692	东农4211	选育	1.32	0.48	382	ZDD14920	二季早豆-2	地方	0.42	0.34
185	18NQ1694	绥农34	选育	1.65	0.23	383	ZDD15357	大黄豆-1	地方	0.51	0.45
186	18NQ1695	黑农55	选育	1.67	0.17	384	ZDD16771	清远大青豆	地方	0.32	0.37
187	18NQ1696	蒙豆13	选育	0.78	0.12	385	ZDD22145	大黄豆-2	地方	0.23	0.19
188	18NQ1698	内豆4号	选育	1.19	0.97	386	ZDD14911	细黄豆-9	地方	0.44	0.17
189	18NQ1700	蒙豆16	选育	1.77	0.53	387	ZDD15624	皂角豆	地方	0.85	0.34
190	18NQ1701	嫩丰16	选育	1.21	0.14	388	ZDD14910	细黄豆-8	地方	0.90	0.15
191	18NQ1702	北豆37	选育	1.44	0.49	389	ZDD09279	小黑豆	地方	0.73	0.53
192	18NQ1703	黑河55	选育	1.31	0.26	390	ZDD01060	黄脐	地方	0.91	0.24
193	18NQ1704	蒙豆30	选育	1.05	0.12	391	ZDD03733	邳县红毛油	地方	1.55	0.58

表 1 (续)

序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight	序号 No.	种质编号 Number	种质名称 Name	类型 Type	低磷单株 粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight
194	18NQ1706	北豆 19	选育	1.22	0.38	392	ZDD12386	大华豆	地方	0.95	0.53
195	18NQ1707	蒙豆 28	选育	0.92	0.28	393	ZDD17375	黄豆	地方	0.67	0.17
196	18NQ1709	满归豆	地方	0.62	0.40	394	ZDD13560	白毛早豆子	地方	1.49	0.40
197	18NQ1710	黑农 62	选育	1.49	0.14	395	ZDD13590	透心绿	地方	0.41	0.06
198	18NQ1711	黑农 64	选育	0.86	0.12						

1.2 试验设计

2019-2020年种植在沈阳农业大学农学院教学科研实验基地盆栽场(41.81°N, 123.56°E),采用PVC管进行砂培,PVC管内径16 cm,高25 cm,盆底有3个直径0.3 cm小孔。设置两个处理,分别为常磷处理(NP, normal phosphorus),营养液磷浓度为0.5 mmol/L和低磷处理(LP, low phosphorus),营养液磷浓度为0.005 mmol/L。磷源采用磷酸二氢钾,缺乏的钾素用氯化钾补齐。完全随机区组排列,3次重复,每盆装5 kg石英砂,播种5粒种子,待大豆出苗后,选长势均匀一致的植株,每盆定苗3株。出苗后每天8:00浇500 mL 1/2营养液;16:00浇1 L蒸馏水,洗掉多余盐分,出苗7 d后改1/2营养液为全营养液。参照王辉^[9]的方法配置大豆营养液配方,营养液pH为6.0。

1.3 表型鉴定

395份大豆种质成熟后,对每盆3株大豆进行收获。待大豆籽粒自然晾干后,利用分析天平对大豆籽粒进行称量,每个样本3次重复,以低磷处理下单株粒重和低磷处理下与常磷处理下的单株粒重比值(相对单株粒重)作为耐低磷鉴定的指标^[9]。利用R软件进行大豆单株粒重聚类分析,以低磷处理下单株粒重和相对单株粒重作为鉴定大豆种质磷效分组的指标^[9]。

1.4 基因型测定与质控

本研究使用的基因型SNP(single nucleotide polymorphism)数据由中国农业科学院作物科学与北京康普森生物科技有限公司合作研发的“中豆芯一号”芯片^[14]测序而来。利用PLINK对最小等位基因频率小于0.05和基因型缺失率大于0.25的SNP进行基因型过滤^[15],剩余91,597个SNPs位点用于后续GWAS分析。

1.5 全基因组关联分析

使用GAPIT(<http://zzlab.net/GAPIT>)进行主成分分析、亲缘关系分析和GWAS分析。GWAS分析采用

固定和随机模型交替概率统一(farmCPU)来平衡假阳性和假阴性结果。显著性位点的阈值($-\log_{10}(P)$)设置调整为4,在结果中筛选出大于阈值的位点,用于后续筛选候选基因。

1.6 候选基因分析

利用soybase(<https://www.soybase.org/>)网站参考基因组图谱查找候选基因。基于大豆连锁不平衡衰减距离,在显著位点上下游各延伸100 kb,根据所有SNP位点物理位置对其进行基因扫描,寻找与耐低磷相关基因。利用Phytozome(<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)网站查找测序参考基因组Williams 82在各组织表达量^[2],利用TBtools软件(<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>)绘制候选基因组织表达热图。

2 结果与分析

2.1 表型分析

2.1.1 不同磷处理下大豆单株粒重分析 参试大豆种质资源单株粒重的变异幅度较大,常磷处理下分布范围为0.49~14.43 g,低磷处理下为0.05~5.35 g,相对单株粒重为0.04~0.98,且三者变异系数均高于50%,说明本研究所用试验材料在磷利用效率上具有丰富变异(表2)。在常磷、低磷处理下的单株粒重及相对单株粒重均呈正态分布(图1),符合典型的数量性状遗传特点。相对单株粒重在0.8以上的种质有17份,包括小黑豆(ZDD10252)、平顶黄豆(ZDD02864)等地方种质以及黑河32(ZDD24315)、黑河41(ZDD24323)等选育种质,表现为对低磷环境不敏感。相对单株粒重在0.1以下的种质有13份,包括邳县拉秧黄(ZDD03969)和透心绿(ZDD13590)地方种质以及绥农26(ZDD24399)、黑农2(ZDD00003)等选育种质,表现为对低磷环境极敏感(表1、图1)。这些结果说明本研究大豆种质的耐低磷抗性变异丰富,适宜进行关联分析。统计分析结果表明,地方种质在常磷和低磷处理下的变异幅

度均比选育种质小,但变异系数高于选育种质,耐低磷水平的下限比选育种质略高,二者在两种条件下

单株粒重均有极显著差异(图2),表明耐低磷性状可能在大豆改良过程中受到了选择。

表2 不同磷处理下大豆单株粒重的统计分析

Table 2 Statistical analysis of soybean grain weights per plant under different phosphorus treatments

性状 Trait	种质类型 Type	最小值 Min.	最大值 Max.	均值 Average	标准差 SD	变异系数(%) CV
常磷处理下单株粒重 (g) NP grain weight	地方种质	0.49	11.94	3.60	2.11	58.59
	选育种质	0.81	14.43	4.33	2.21	50.90
	总计	0.49	14.43	4.08	2.20	53.92
低磷处理下单株粒重 (g) LP grain weight	地方种质	0.21	4.44	1.00	0.61	60.87
	选育种质	0.05	5.35	1.22	0.65	52.97
	总计	0.05	5.35	1.15	0.64	56.12
相对单株粒重 Relative grain weight	地方种质	0.04	0.98	0.34	0.20	59.67
	选育种质	0.05	0.98	0.33	0.20	59.79
	总计	0.04	0.98	0.34	0.20	59.67

NP: 常磷处理; LP: 低磷处理; 下同

NP: Normal phosphorus; LP: Low phosphorus; The same as below

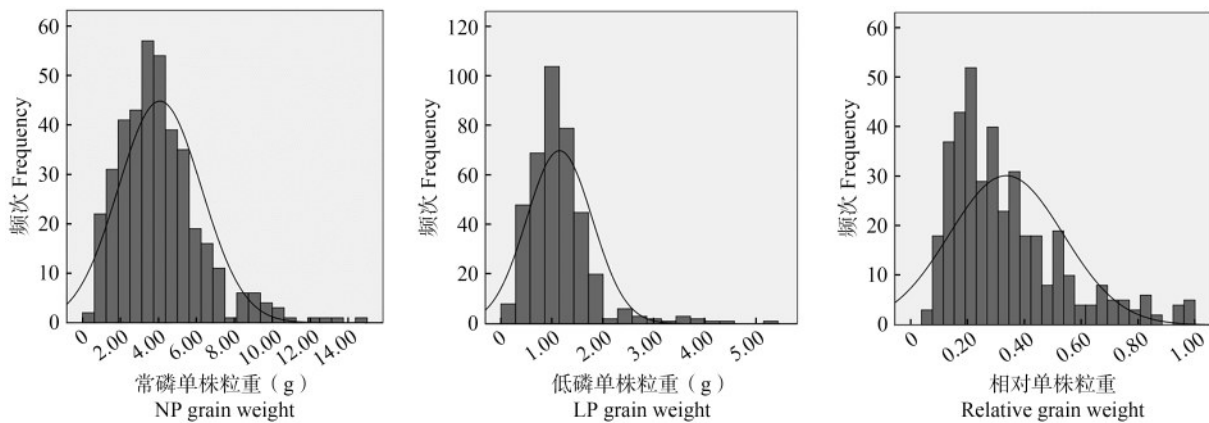
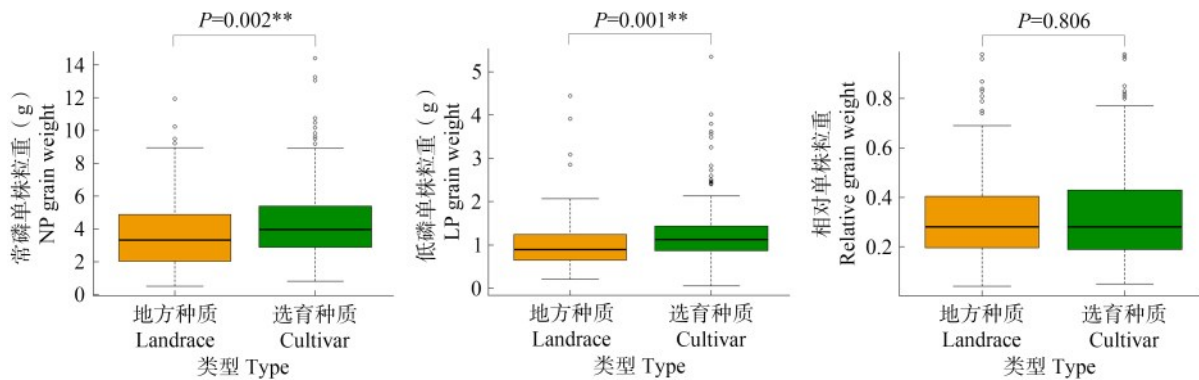


图1 大豆在常磷、低磷处理下单株粒重和相对单株粒重频次分布

Fig.1 Distribution of soybean in NP, LP grain weight and relative grain weight frequency



** : 在 $P < 0.01$ 水平差异显著

** : Correlation is significant at $P < 0.01$ level

图2 大豆地方种质与选育种质在常磷、低磷处理下单株粒重和相对单株粒重差异分析

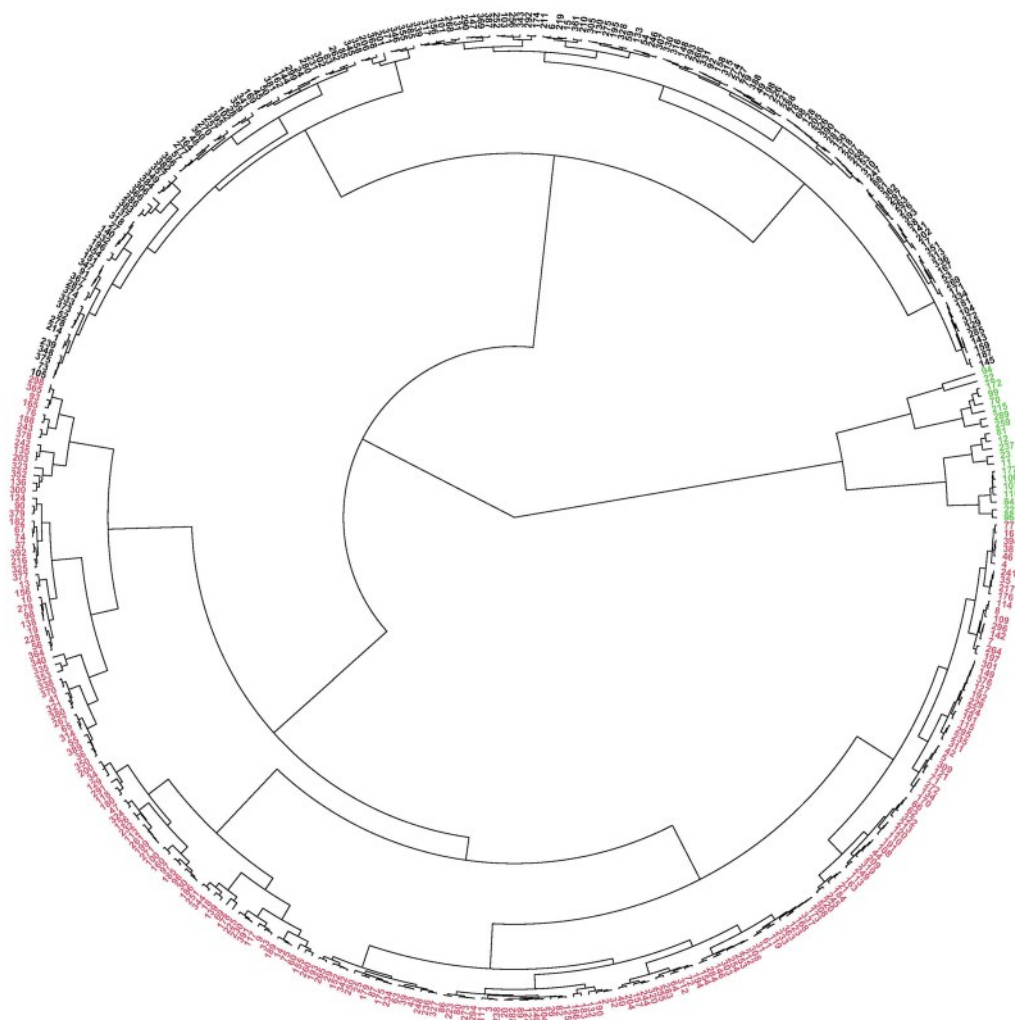
Fig.2 Analysis on the difference of soybean landrace and cultivar in NP, LP grain weight and relative grain weight

2.1.2 不同磷处理下大豆单株粒重聚类分析 对395份大豆种质低磷处理下单株粒重和相对单株粒重,以平方欧式遗传距离利用离差平方和法(Ward

法)进行系统聚类分析(图3),结果表明,以欧式遗传距离5为阈值,可将395个大豆种质划分为3大类(表3):第I类包含160份种质,占材料总数的

40.51%,分别为72份地方种质和88份选育种质,其低磷处理下单株粒重和相对单株粒重分布范围分别为0.05~1.01 g和0.04~0.58,表现为低磷处理下单株粒重和相对单株粒重均较低,被划分为磷低效大豆种质。第II类包含215份种质,占材料总数的54.43%,分别为63份地方种质和152份选育种质,低磷处理下单株粒重和相对单株粒重的变化范围分别在0.47~2.13 g和0.08~0.98,表现为低磷处理下单株粒重和相对单株粒重处于中间型,被划分为中间型大

豆种质。第III类包含20份种质,占材料总数的5.06%,分别为4份地方种质和16份选育种质,其低磷处理下单株粒重和相对单株粒重变化范围分别为2.40~5.35 g和0.24~0.84,表现为低磷处理下单株粒重和相对单株粒重均较高,被划分为磷高效大豆种质。这些磷高效大豆种质包括压破车(ZDD00219)、采种圃(ZDD00163)等地方种质,也包含金元1(ZDD00383)、吉育48(ZDD23714)等选育种质。



1~395:供试材料序号;黑色序号:第I组;红色序号:第II组;绿色序号:第III组

1-395: Number of test materials; Black number: Group I; Red number: Group II; Green number: Group III

图3 大豆种质在低磷处理下单株粒重和相对单株粒重聚类结果

Fig.3 Clustering results of grain weight under LP grain weight and relative grain weight of soybean germplasm

表3 大豆种质低磷处理下单株粒重和相对单株粒重聚类结果

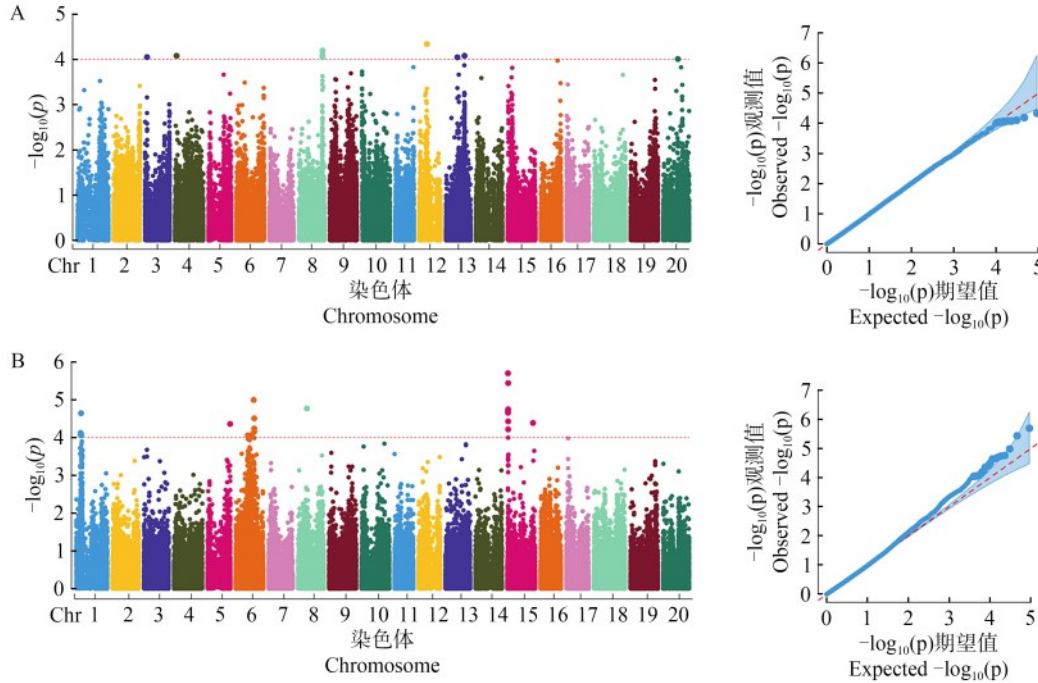
Table 3 Clustering results of soybean germplasm under LP grain weight and relative grain weight

分组 Groups	种质数量 Number of germplasm	低磷处理下单株粒重(g) LP grain weight	相对单株粒重 Relative grain weight	磷效率类型 Phosphorus efficiency types
I	160	0.05~1.01	0.04~0.58	磷低效
II	215	0.47~2.13	0.08~0.98	中间型
III	20	2.40~5.35	0.24~0.84	磷高效

2.2 大豆耐低磷相关性状 GWAS 分析

本研究利用 GAPIT 将基于自然群体的 395 份供试材料的低磷处理下单株粒重和相对单株粒重表型结合测序数据使用 farmCPU 模型进行全基因组关联分析(图 4)。低磷处理下单株粒重紧密关联的 SNPs ($-\log_{10}P > 4$) 有 9 个, 分布在 3 号、4 号、8 号、12 号、13 号和 20 号染色体上(表 4)。相对单株粒重紧密关

联的 SNPs ($-\log_{10}P > 4$) 有 23 个, 分布在 1 号、5 号、6 号、8 号和 15 号染色体上(表 4)。根据 SNPs 的物理位置, 将定位结果与前人研究进行比较后发现, 13 号染色体上定位到的 1 个 SNP 位于耿雷跃等^[16]定位的区间 satt335-satt522 内。除这个 SNP 位点以外, 其他定位到的 SNP 还未见报道, 表明这些 SNPs 是控制大豆耐低磷性的新位点。



A: 低磷处理下单株粒重在 farmCPU 模型下关联分析 Manhattan 图(左)和 Q-Q plot 图(右); B: 相对单株粒重在 farmCPU 模型下关联分析 Manhattan 图(左)和 Q-Q plot 图(右)

A: LP grain weight correlation analysis Manhattan plot and Q-Q plot under the farmCPU model; B: Relative grain weight correlation analysis Manhattan plot and Q-Q plot under the farmCPU model

图 4 大豆单株粒重 GWAS 分析

Fig.4 GWAS analysis of soybean grain weight

2.3 候选基因分析

为进一步确定与大豆耐低磷相关的候选基因, 对耐低磷相关的等位基因效应进行了分析, 一些 SNP 对大豆耐低磷性表现出显著的等位基因效应, 表明大豆耐低磷性的候选基因可能与这些 SNP 相关。通过分析 SNP 等位基因型对应的不同磷处理下的显著差异性, 以及 Manhattan 图和 QQ 图关联位点的显著性, 选择低磷处理下单株粒重关联到的 8 号染色体位点 Gm08_43852584 和相对单株粒重关联到的 15 号染色体位点 Gm15_1778761 进一步进行分析。其中 Gm08_43852584 位点等位基因型对应的耐低磷性状表现极显著差异 ($P=6.40 \times 10^{-5} < 0.01$), Gm15_1778761 位点等位基因型对应的耐低磷性状也表现极显著差异 ($P=1.81 \times 10^{-5} < 0.01$)。基

于该群体的 LD 衰减距离, 从与耐低磷性显著相关的 Gm08_43852584 和 Gm15_1778761 位点上下游 100 kb 范围内进行候选基因筛选。通过 LD block 绘图取位点前后 100 kb 表明, Gm08_43852584 位点、Gm15_1778761 位点前后 100 kb 内, SNP 位点均存在明显的 LD block(图 5)。

其中 Gm08_43852584 的 LD block 区间内共有 23 个基因(表 5), 其中 *GmLPW22* 基因注释为 WRKY DNA 结合域, 其拟南芥同源基因功能注释为 WRKY6, 转录因子 WRKY6 通过下调 PHO1 的表达调节磷稳态, 且在磷饥饿期间被降解, 泛素 E3 连接酶磷酸反应泛素 E3 LIGASE1 (PRU1) 可调节 WRKY6 蛋白水平以响应低磷压力^[17]。GmWRKY6 的转基因植株体内有效磷含量显著高于野生型^[18]。

除该基因外,其他基因均未有报道与耐低磷相关。*Gm15_1778761*的LD block区间内共有20个基因(表6),*GmRW14*、*GmRW15*基因注释为磷酸乙醇胺/磷酸胆碱磷酸酶/PHOSPHO1,其拟南芥同源基因功能注释为磷酸吡哆醛磷酸酶相关蛋白。磷酸乙醇胺/磷酸胆碱磷酸酶1(PECP1)和磷酸饥饿诱导基因2(PS2)属于磷酸饥饿诱导的一类新型磷酸酶,可在体内使磷酸胆碱和磷酸乙醇胺(PEtn)去磷酸化^[19]。*PHOSPHO1*亚家族*OsACPI*基因在水稻研究中突变体和过表达株系在Pi充足和缺乏条件下,其产物乙醇胺(EA)和相应胆碱(Cho)的浓度显著增加,二者含量浓度的高低会对植株磷含量高低进行响应^[20]。除该基因外,其他基因均未有报道与耐低磷相关。

表4 farmCPU模型下低磷处理下单株粒重和相对单株粒重关联显著SNP

Table 4 Significant SNP associated with LP grain weight and relative grain weight under farmCPU model

性状	染色体	位置	等位基因型	-logP 值极大值	
Trait	Chromosome	Position	Alleles	-log P max	
低磷处理下 单株粒重	3	3794570	T/C	4.05	
	4	2971132	C/T	4.08	
	8	43814202	C/T	4.05	
	8	43815543	T/C	4.10	
	8	43852584	T/A	4.19	
	12	14472037	G/A	4.34	
	13	21163574	A/G	4.04	
	13	34368248	G/A	4.08	
	20	27144081	G/A	4.00	
	相对单株 粒重	1	7755407	A/G	4.12
		1	7778930	C/A	4.07
		1	8467401	T/C	4.64
		1	8553492	T/G	4.06
1		8555369	T/C	4.08	
1		8651431	G/A	4.05	
5		41913145	C/T	4.36	
6		22891623	G/A	4.06	
6		29287355	C/T	4.06	
6		29949637	C/T	4.05	
6		33464838	T/C	4.99	
6		34251031	C/T	4.24	
6		34360346	C/T	4.51	
6	34434873	T/G	4.15		
8	16553159	C/A	4.76		
15	1512455	G/A	5.70		
15	1532279	A/G	4.69		
15	1553014	T/C	4.66		
15	1612581	T/C	5.44		
15	1623131	T/C	4.42		
15	1761674	T/C	4.21		
15	1778761	C/T	4.74		
15	47479136	A/T	4.38		

相关文献报道^[21]与大豆耐低磷性有关的组织部位主要是根系,为进一步分析LD block区域内的基因,利用Phytozome数据库,查找候选基因在不同组织的表达量。结果表明,*GmLPW22*基因在根中高表达;*GmRW14*基因在根毛中高表达;*GmRW15*基因在豆荚中高表达(图6)。因而,根据基因表达量和基因功能注释推测*GmLPW22*和*GmRW14*为大豆耐低磷性候选基因。

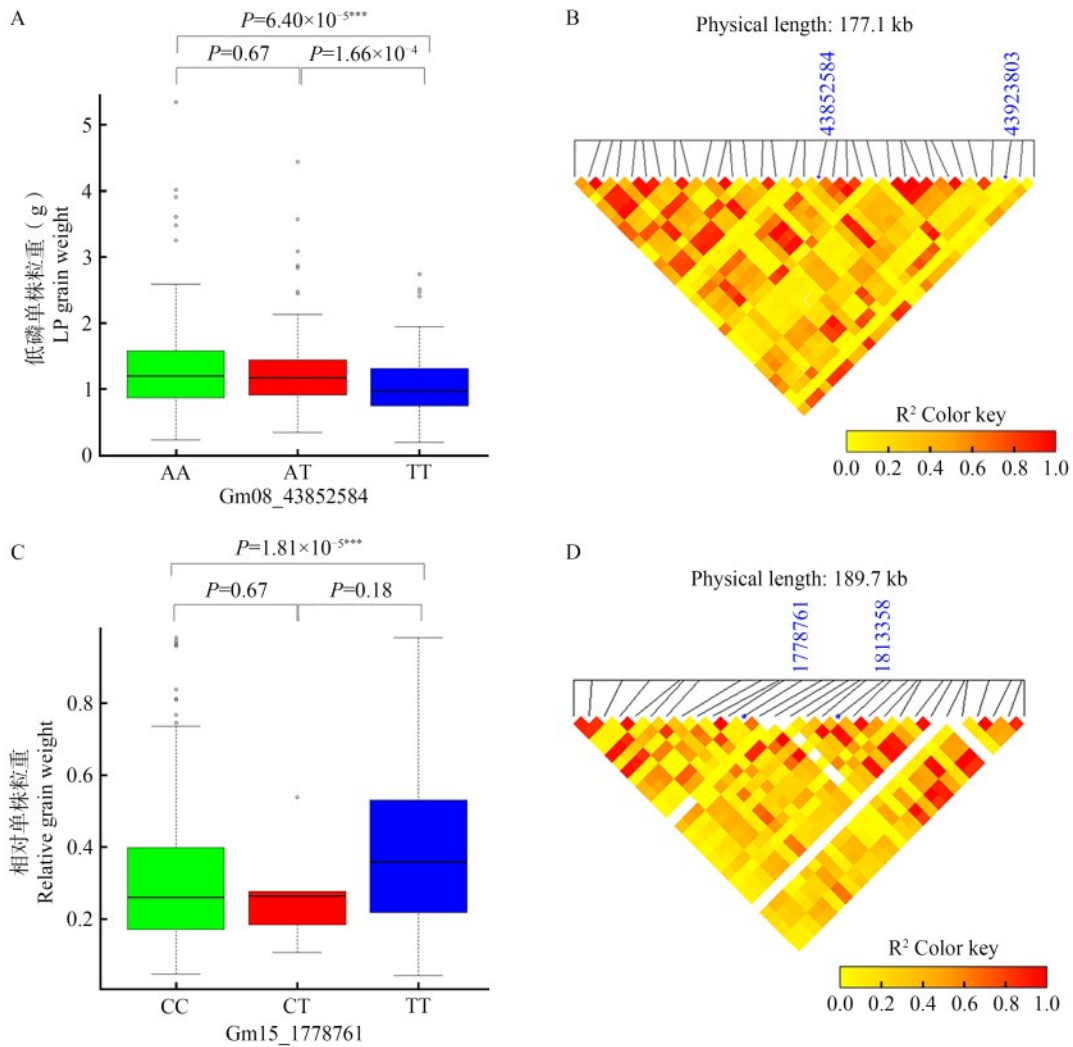
3 讨论

3.1 大豆单株粒重表型与耐低磷性关系

大豆粒重作为表型性状易于观察和测定,可作为育种选择的最直观的性状。本研究对395份大豆在常磷和低磷处理下的单株粒重及相对单株粒重平均值进行分析,结果表明单株粒重在不同磷浓度处理下差异明显。本研究发掘到20份磷高效大豆种质,共包含地方种质4份,这些种质经过长期驯化具有耐逆性强特点;选育种质16份,这些种质适宜种植在土壤磷含量较低的地区,在低磷条件下的产量损失减少。这些种质均可作为亲本用于耐低磷遗传改良育种,可为后续筛选大豆耐低磷性研究提供参考。

3.2 大豆耐低磷性GWAS相关位点分析

通过GWAS分析,鉴定出32个SNP位点与大豆耐低磷性相关,分布在10条染色体。其中13号染色体上定位到的位点在前人报道QTL区间^[16]内。*Zhang*等^[13]通过定位发现一些受到低磷胁迫强烈诱导的基因分别分布在1、6、7、15号染色体,与本研究在1、6、15号定位到的SNP相距较远。*武兆云*^[22]在20号染色体上克隆到的大豆耐低磷基因*GmPT2*(Chr20.42980124~42981928),与本研究在20号染色体上定位到的SNP位置相距较远。*徐影*^[18]在大豆16号和15号染色体上分别克隆了转录因子*GmWRKY75*和*GmWRKY6*,与本研究定位到的WRKY DNA结合域相关的基因位置相距较远,但属于同一个基因家族。因而本研究定位到的SNP可能是潜在的新耐低磷性的SNP位点。显著位点*Gm08_43852584*的LD block区域内关联到23个基因,其中*GmLPW22*基因注释是WRKY DNA结合域,拟南芥同源基因注释为WRKY6,转录因子WRKY6通过下调PHO1的表达来调节磷稳态。*Gm15_1778761*的LD block区域内关联到20个基因,其中*GmRW14*基因注释是磷酸乙醇胺/磷酸胆碱磷酸酶/PHOSPHO1,其含量高低会影响植株磷含量。



A: 极显著 SNP 位点 Gm08_43852584 等位基因差异显著性分析, 其中 AA 和 TT 表示该位点出现 AA 和 TT 纯合的频率, AT 表示该位点出现 AT 杂合的频率; B: 极显著 SNP 位点 Gm08_43852584 LD block 分析, 其中蓝色的点分别表示极显著 SNP 位点 Gm08_43852584 和 *GmLPW22* 基因在 8 号染色体上的 1 个 SNP 位点; C: 极显著 SNP 位点 Gm15_1778761 等位基因差异显著性分析, 其中 CC 和 TT 表示该位点出现 CC 和 TT 纯合的频率, CT 表示该位点出现 CT 杂合的频率; D: 极显著 SNP 位点 Gm15_1778761 LD block 分析, 其中蓝色的点分别表示极显著 SNP 位点

Gm15_1778761 和 *GmRW14* 基因在 15 号染色体上的 1 个 SNP 位点; ***: 在 $P < 0.001$ 水平差异显著

A: Peak SNP site Gm08_43852584 allele difference analysis, AA and TT represent the frequency of AA and TT homozygosity at this site, AT indicates the frequency of AT heterozygosity at this site; B: Peak SNP site Gm08_43852584 LD block analysis, where the blue dots respectively represent a peak SNP locus Gm08_43852584 and a SNP in the *GmLPW22* gene on chromosome 8; C: Peak SNP site Gm15_1778761 allele difference analysis, CC and TT represent the frequency of CC and TT homozygosity at this site, CT indicates the frequency of CT heterozygosity at this site; D: Peak SNP site Gm15_1778761 LD block analysis, where the blue dots respectively represent a peak SNP locus Gm15_1778761 and a SNP in the *GmRW14* gene on chromosome 15; ***: Correlation is significant at $P < 0.001$ level

图 5 2 个显著关联位点分析

Fig.5 Analysis of 2 significant association sites

通过表达谱分析表明 *GmLPW22* 和 *GmRW14* 基因在根和根毛中高表达, 推测这 2 个基因很可能与大豆耐低磷相关。而 *GmRW15* 基因注释虽然为磷酸乙醇胺/磷酸胆碱磷酸酶/PHOSPHO1, 但是不在根、根毛中高表达, 而是在豆荚中高表达, 因而推测其不与大豆耐低磷性相关。此外, *GmLPW10*、*GmLPW11*、*GmLPW18*、*GmLPW20*、*GmLPW21*、*GmRW2*、*GmRW3*、*GmRW4*、*GmRW5*、*GmRW10*、

GmRW13、*GmRW18*、*GmRW20* 这 13 个基因在根、根毛中表达量都相对较高, 但 3 个基因注释为未鉴定蛋白, 另外 10 个基因注释分别与 C2H2 样锌指蛋白、参与细胞分化/性发育的蛋白质、STIG1 类似蛋白质相关、蛋白质转运蛋白 SEC13 相关、富含亮氨酸重复蛋白激酶家族蛋白、转录因子 BHLH87、蛋白磷酸酶 PP2A 调节亚基相关, 暂未发现与大豆耐低磷性相关。

表5 Gm08_43852584的LD block 区间内候选基因注释

Table 5 Annotation of candidate genes in the LD blocks interval of Gm08_43852584

基因	注释
Gene	Annotation
GmLPW1	SWSN-9蛋白
GmLPW2	SWSN-9蛋白
GmLPW3	四酰二糖 4'-激酶
GmLPW4	含锌指 FYVE 结构域的蛋白质
GmLPW5	NA
GmLPW6	NA
GmLPW7	PPR 重复序列家族(PPR_2)/DYW 核酸脱氨酶家族 (DYW_deaminase)
GmLPW8	NA
GmLPW9	小热休克蛋白 HSP20 家族
GmLPW10	类 C2H2 锌指蛋白
GmLPW11	NA
GmLPW12	NA
GmLPW13	富含亮氨酸的重复蛋白
GmLPW14	咪唑甘油磷酸合成酶 HISHF
GmLPW15	预测水解酶(HIT 家族)
GmLPW16	NA
GmLPW17	NA
GmLPW18	参与细胞分化/性发育的蛋白质
GmLPW19	脯氨酸合成酶共转录细菌同源蛋白
GmLPW20	STIG1 样蛋白相关
GmLPW21	蛋白质转运蛋白 SEC13 相关
GmLPW22	WRKY DNA 结合结构域(WRKY)
GmLPW23	NA

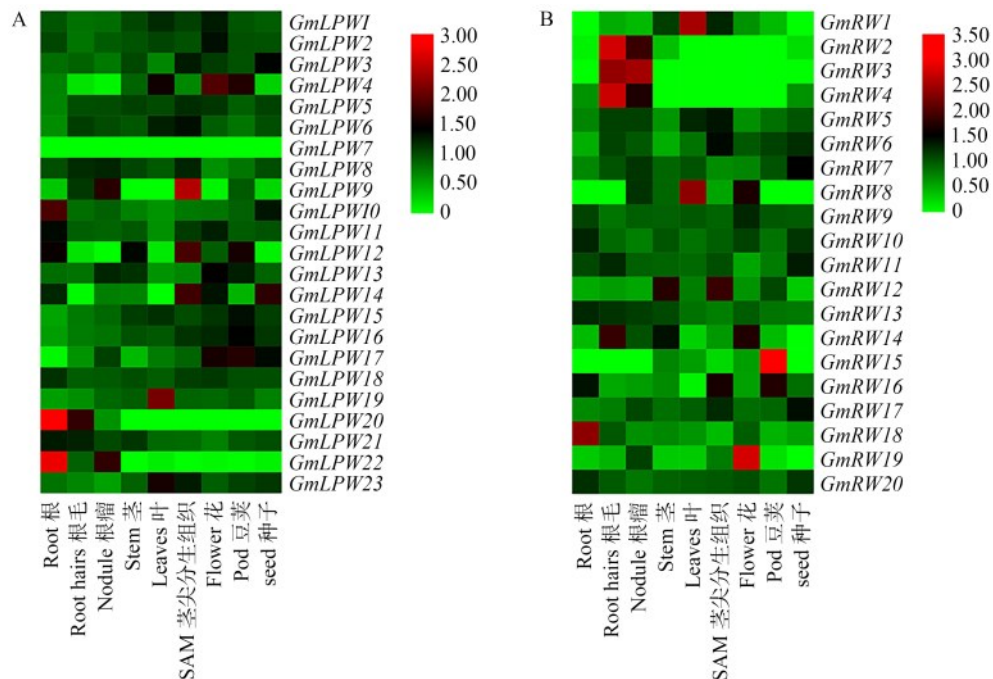
NA: 基因无功能注释;下同

NA: No functional annotation of genes; The same as below

表6 Gm15_1778761的LD block 区间内候选基因注释

Table 6 Annotation of candidate genes in the LD blocks interval of Gm15_1778761

基因	注释
Gene	Annotation
GmRW1	富含亮氨酸重复序列/蛋白酪氨酸激酶/ER的碳水化合物结合蛋白
GmRW2	富含亮氨酸重复序列/蛋白酪氨酸激酶/ER的碳水化合物结合蛋白
GmRW3	富含亮氨酸重复序列/蛋白酪氨酸激酶/ER的碳水化合物结合蛋白
GmRW4	转录因子 BHLH87
GmRW5	NA
GmRW6	23S rRNA(尿嘧啶(1939)-C(5))-甲基转移酶/RNA 尿苷甲基转移酶 A
GmRW7	IAA-氨基酸水解酶 ILR1 样 1 相关
GmRW8	NA
GmRW9	Jacalin 样凝集素结构域
GmRW10	带电多泡体蛋白
GmRW11	60S核糖体蛋白 L28
GmRW12	DOF 锌指蛋白 1
GmRW13	蛋白磷酸酶 PP2A 调节亚单位 B
GmRW14	磷酸乙醇胺/磷酸胆碱磷酸酶/PHOSPHO1
GmRW15	磷酸乙醇胺/磷酸胆碱磷酸酶/PHOSPHO1
GmRW16	具有腺嘌呤核苷酸 α 水解酶样结构域的蛋白激酶蛋白
GmRW17	核酸外切酶样蛋白
GmRW18	PRA1 家族蛋白 C 相关
GmRW19	磷脂酶 De
GmRW20	NA



A: Gm08_43852584 LD block 区间内候选基因表达谱; B: Gm15_1778761 LD block 区间内候选基因表达谱

A: Candidate gene expression profile in the Gm08_43852584 LD block interval; B: Candidate gene expression profile in the

Gm15_1778761 LD block interval

图6 候选基因组织表达热图

Fig.6 Heatmap profiles of the candidate genes in tissues

4 结论

本研究对395份大豆种质资源低磷处理下单株粒重和相对单株粒重表型和基因型进行性状鉴定和GWAS分析,共鉴定出磷高效大豆种质20份,大豆耐低磷性显著相关的SNP位点32个。其中与低磷处理下单株粒重相关的SNP 23个,相对单株粒重相关的SNP 9个,分别位于10条染色体上。其中,Gm08_43852584位点LD block区间内关联到1个与WRKY DNA结合域相关的基因*GmLPW22*,在根中特异性表达。Gm15_1778761位点LD block区域内关联到1个与磷酸吡哆醛磷酸酶相关的基因*GmRW14*,且在根毛中特异性表达。

参考文献

- [1] 陈玲玲,李战,刘亭萱,谷勇哲,宋健,王俊,邱丽娟.基于783份大豆种质资源的叶柄夹角全基因组关联分析.作物学报,2022,48(6):1333-1345
Chen L L, Li Z, Liu T X, Gu Y Z, Song J, Wang J, Qiu L J. Genome wide association analysis of petiole angle based on 783 soybean resources (*Glycine max* L.). Acta Agronomica Sinica, 2022, 48 (6): 1333-1345
- [2] 李志刚.不同磷效率基因型大豆的筛选及其对磷素水平的反应机理研究.沈阳:沈阳农业大学,2004
Li Z G. Screening of soybeans with high phosphorus absorption efficiency and their responses to different phosphorus levels. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2004
- [3] 沈启维,李艳春,张健.提高植物磷高效利用能力方法的研究进展.绿色科技,2021,23(11):157-160
Shen Q W, Li Y C, Zhang J. Research progress on methods to improve the efficient utilization of phosphorus in plants. Journal of Green Science and Technology, 2021, 23 (11): 157-160
- [4] 刘海旭,吴俊江,王金生,鹿文成,徐鹏飞,张淑珍.大豆耐低磷研究进展.大豆科学,2017,36(4):639-644
Liu H X, Wu J J, Wang J S, Lu W C, Xu P F, Zhang S Z. Progress of research on tolerance to low-phosphorus stress in soybean. Soybean Science, 2017, 36 (4): 639-644
- [5] Dan Z, Cheng H, Geng L, Kan G, Cui S, Meng Q, Gai J, Yu D. Detection of quantitative trait loci for phosphorus deficiency tolerance at soybean seedling stage. Euphytica, 2009, 167 (3): 313-322
- [6] Terry N, Ulrich A. Effects of potassium deficiency on the photosynthesis and respiration of leaves of sugar beet under conditions of low sodium supply. Plant Physiology, 1973, 51 (6): 1099-1101
- [7] 余松烈.作物栽培学.北方本.北京:农业出版社,1980:102-108
Yu S L. Crop cultivation. North. Beijing: Agriculture Press, 1980: 102-108
- [8] 丁洪,李生秀.大豆品种耐低磷和对磷肥效应的遗传差异.植物营养与肥料学报,1998(3):257-263
Ding H, Li S X. Genetic differences in low phosphorus tolerance and phosphorus fertilizer effects in soybean varieties. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 1998 (3): 257-263
- [9] 王辉.磷高效大豆品种的筛选及苗期鉴定方法.沈阳:沈阳农业大学,2020
Wang H. Screening and seedling stage identification of phosphorus high-efficient soybean varieties. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2020
- [10] Du W, Ning L, Liu Y, Zhang S, Yang Y, Wang Q, Chao S, Yang H, Huang F, Cheng H, Yu D. Identification of loci and candidate gene *GmSPX-RING1* responsible for phosphorus efficiency in soybean via genome-wide association analysis. BMC Genomics, 2020, 21 (1): 1-16
- [11] Zhang D, Song H, Cheng H, Hao D, Wang H, Kan G, Jin H, Yu D. The acid phosphatase-encoding gene *GmACPI* contributes to soybean tolerance to low-phosphorus stress. PLoS Genetics, 2014, 10 (1): e1004061
- [12] 宁丽华.大豆磷效率相关性状的关联分析及*GmG3PT1*基因功能的初步研究.南京:南京农业大学,2014
Ning L H. Association analysis for phosphorus efficiency-related traits in soybean (*Glycine max* L.) and function properties of *GmG3PT1*. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014
- [13] Zhang H, Yang Y, Sun C, Liu X, Lv L, Hu Z, Yu D, Zhang D. Up-regulating *GmETO1* improves phosphorus uptake and use efficiency by promoting root growth in soybean. Plant Cell Environment, 2020, 43 (9): 2080-2094
- [14] Sun R, Sun B, Tian Y, Su S, Zhang Y, Zhang W, Wang J, Yu P, Guo B, Li H, Li Y, Gao H, Gu Y, Yu L, Ma Y, Su E, Li Q, Hu X, Zhang Q, Guo Q, Chai S, Feng L, Wang J, Hong H, Xu J, Yao X, Wen J, Liu J, Li Y, Qiu L. Dissection of the practical soybean breeding pipeline by developing ZDX1, a high-throughput functional array. Theoretical and Applied Genetics, 2022, 135(4): 1413-1427
- [15] 赵兴震.大豆耐旱性评价及耐旱相关基因挖掘.北京:中国农业科学院,2020
Zhao X Z. Drought tolerance identification and gene discovery in soybean. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020
- [16] 耿雷跃,崔士友,张丹,邢邯,盖钧镒,喻德跃.大豆磷效率QTL定位及互作分析.大豆科学,2007,26(4):460-466
Geng L Y, Cui S Y, Zhang D, Xing H, Gai J Y, Yu D Y. QTL mapping and epistasis analysis for P-efficiency in soybean (*Glycine max* L.). Soybean Science, 2007, 26 (4): 460-466
- [17] Ye Q, Wang H, Su T, Wu W H, Chen Y F. The ubiquitin E3 ligase PRU1 regulates WRKY6 degradation to modulate phosphate homeostasis in response to low-Pi stress in arabidopsis. Plant Cell, 2018, 30 (5): 1062-1076
- [18] 徐影.大豆耐低磷相关转录因子和*GmWRKY75*和*GmWRKY6*的克隆及功能分析.南京:南京农业大学,2014
Xu Y. Cloning and functional analysis of two transcription factors

- GmWRKY75* and *GmWRKY6* related to soybean tolerance to low-phosphorus stress. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014
- [19] Angkawijaya A E, Ngo A H, Nguyen V C, Gunawan F, Nakamura Y. Expression profiles of 2 phosphate starvation-inducible phosphocholine/phosphoethanolamine phosphatases, PECP1 and PS2, in arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:662
- [20] Deng S, Li J, Du Z, Wu Z, Yang J, Cai H, Wu G, Xu F, Huang Y, Wang S, Wang C. Rice ACID PHOSPHATASE 1 regulates Pi stress adaptation by maintaining intracellular Pi homeostasis. *Plant Cell and Environment*, 2022, 45 (1): 191-205
- [21] 王树起, 韩晓增, 严君, 李晓慧, 乔云发. 缺磷胁迫对大豆根系形态和氮磷吸收积累的影响. *土壤通报*, 2010, 41 (3): 644-650
- Wang S Q, Han X Z, Yan J, Li X H, Qiao Y F. Effects of phosphorus deficiency stress on soybean root morphology and nitrogen and phosphorus uptake and accumulation. *Chinese Journal of Soil Science*, 2010, 41 (3): 644-650
- [22] 武兆云. 大豆苗期耐低磷性状评价和低磷胁迫的分子机理初步研究. 南京: 南京农业大学, 2011
- Wu Z Y. Evaluation of low phosphate tolerance at seedling stage and molecular essential study on phosphate stress in soybean. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011